

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-501917

(P2005-501917A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 93 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-526424 (P2003-526424)	(71) 出願人	504087503
(86) (22) 出願日	平成14年9月9日 (2002.9.9)		ザ トラスティーズ オブ ボストン ユ
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月5日 (2004.3.5)		ニバーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/028708		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(87) 国際公開番号	W02003/022296		215, ボストン, ペイ ステート
(87) 国際公開日	平成15年3月20日 (2003.3.20)		ロード 108
(31) 優先権主張番号	60/318,096	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成13年9月7日 (2001.9.7)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/367,578		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成14年3月26日 (2002.3.26)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫複合体関連疾患を処置するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、免疫複合体関連疾患 (ICAD) を有するかまたは発症させる危険性のある患者を処置するための方法および組成物を提供する。本発明は、クロマチン含有免疫複合体が、二重のレセプター結合プロセスにより自己反応性B細胞および樹状細胞を活性化し、このプロセスは、両方の細胞型において、Toll様レセプター (TLR) に関連するという知見に基づく。ICADを処置する方法は、1) TLRの形成および/もしくはTLRへの結合のいずれかを防ぐことにより免疫複合体の形成を阻害するか、または2) TLRへの自己抗原含有免疫複合体の結合に干渉するか、または3) 免疫複合体もしくは非複合体化自己抗原を介する、BCRおよびTLR (B細胞において) もしくはFcRおよびTLR (樹状細胞において) の二重の結合により開始されるシグナル伝達経路を阻害するかのいずれかの化合物を、それを必要とする個体に投与する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫複合体関連疾患（ICAD）もしくは全身性自己免疫疾患を有するか、またはICADもしくは全身性自己免疫疾患の危険性がある患者を処置する方法であって、該方法は、該免疫複合体または自己抗原の、Toll様レセプターへの結合または該Toll様レセプターの活性化を阻害する有効量の化合物を、該患者に投与する工程を包含し、ここで、該免疫複合体は、自己抗体および細胞レセプターに結合される自己抗原を含む、方法。

【請求項 2】

前記ICADが、全身性エリテマトーデスである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記ICADが、慢性関節リウマチである、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記ICADが、C型肝炎関連免疫複合体疾患である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記Toll様レセプターが、Toll様レセプター9である、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記Toll様レセプターが、Toll様レセプター3である、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

請求項1に記載の方法であって、ここで、前記化合物が、以下からなる群より選択される、方法：

20

（a）前記免疫複合体の成分に結合し、そしてその形成または前記Toll様レセプターへの結合を防ぐ化合物；

（b）Toll様レセプターデコイ；

（c）MyD88またはTLRにより開始されるシグナル伝達カスケードの他の成分の活性を阻害する化合物；

（d）免疫複合体成分の産生を阻害する化合物；および

（e）Toll様レセプターアンタゴニスト。

【請求項 8】

前記化合物が、Toll様レセプターに結合する抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体が、単鎖抗体である、請求項8に記載の方法。

30

【請求項 10】

Toll様レセプター2、Toll様レセプター3、およびToll様レセプター9のうち少なくとも2つの組み合わせに対する結合を阻害する化合物のカクテルが用いられる、請求項7に記載の方法。

【請求項 11】

前記Toll様レセプターアンタゴニストが、阻害性オリゴヌクレオチドである、請求項7に記載の方法。

【請求項 12】

前記Toll様レセプターアンタゴニストが、ドミナントネガティブToll様レセプターである、請求項7に記載の方法。

40

【請求項 13】

免疫複合体の形成またはToll様レセプターへの結合を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、該方法は、免疫複合体成分を、該スクリーニングされる化合物と接触させる工程、ならびにB細胞の活性化および／もしくは増殖ならびに／またはToll様レセプターへの免疫複合体の抗原性フラグメントの結合を測定する工程を包含し、ここで、該免疫複合体は、自己抗体および自己抗原を含む、方法。

【請求項 14】

免疫複合体の形成またはToll様レセプターへの結合を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、該方法は、免疫複合体成分を、該スクリーニングされる化合物と接

50

触させる工程、ならびに樹状細胞の活性化および／またはT o l l様レセプターへの免疫複合体の抗原性フラグメントの結合および／または細胞形態を測定する工程を包含し、ここで、該免疫複合体は、自己抗体ならびに自己抗原を含む、方法。

【請求項15】

免疫複合体関連疾患（I D A C）もしくは全身性自己免疫疾患を有するか、またはI C D Aもしくは全身性自己免疫疾患の危険性のある患者を処置するために、前記免疫複合体または自己抗原の、T o l l様レセプターへの結合またはT o l l様レセプターの活性化を阻害する化合物の使用であって、ここで、該免疫複合体は、自己抗体および細胞レセプターに結合される自己抗原を含む、使用。

【請求項16】

請求項15に記載の化合物であって、ここで、前記化合物が、以下からなる群より選択される、化合物：

- （a）前記免疫複合体の成分を結合し、そしてその形成または前記T o l l様レセプターへの結合を防ぐ化合物；
- （b）T o l l様レセプターデコイ；
- （c）M y D 8 8またはT L Rにより開始されるシグナル伝達カスケードのほかの成分の活性を阻害する化合物；
- （d）免疫複合体成分の産生を阻害する化合物；および
- （e）T o l l様レセプターアンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、国立衛生研究所により授与された契約番号R 0 1 A R - 3 5 2 3 0およびK 0 8 D K - 0 2 5 9 7の下で政府支援を用いてなされた。政府は、本発明における特定の権利を有する。

【0002】

（発明の背景）

（発明の分野）

本発明は、免疫複合体関連疾患（好ましくは、全身性エリテマトーデス（S L E））および異常なT o l l様レセプター（T L R）／B細胞レセプター（B C R）二重結合（B細胞において）またはT L R／F c γレセプター二重結合（樹状細胞および／またはマクロファージにおいて）を有する被験体に関連する他の全身性自己免疫疾患を処置する方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

（背景）

自己免疫疾患は、非常に一般的であるが、理解が乏しい疾患群であり、この疾患群において、個体の免疫系は、1）自己抗原を外来として認識し始め、そしてそのような抗原を発現する組織を破壊し始め、それにより疾患を引き起こすか、または2）これらの抗原と免疫複合体を形成し、次いでそれが組織に沈着し、そして炎症性病理を引き起こすかのいずれかである。このような自己免疫疾患としては、例えば、糖尿病（ここで、免疫系は、インスリン産生膵島細胞に対し、そしてこれを破壊する）；多発性硬化症（ここで、標的抗原は、運動ニューロンの機能の破壊を導くミエリン鞘保護ニューロンである）；乾癬（ここで、免疫系の標的は、皮膚である）；慢性関節リウマチ（ここで、標的組織は、軟骨である）；および全身性エリテマトーデス（S L E）（これは、その標的抗原自体は、完全に一致しかつ特徴的であるが、見かけ上特異性も選択性も示すことなく種々の組織を標的化するものとして生じる）が挙げられる。自己免疫疾患の発症を導く機構が、一般的に、ほとんど未知であるので、これらの処置は、しばしば、一般的に免疫系を抑制することに向けられる。このような一般的な免疫抑制治療は、しばしば、種々の所望されない副作用（癌、不妊症、ならびにウイルス、真菌、酵母、および細菌による感染に対する増加した感

10

20

30

40

50

受性が挙げられる)を引き起こす。従って、自己免疫疾患の処置のためのより特定の治療の開発を可能にするために、免疫系を自己抗原に対して指向させる機構を理解することが所望される。

【0004】

理解が乏しい自己免疫疾患の一例は、一般に、狼瘡として知られている全身性エリテマトーデス(SLE)である。SLEは、抗核抗体の産生、循環性免疫複合体の産生、および補体系の活性化を生じる免疫系の調節不全により特徴付けられる。免疫複合体は、組織および関節中で蓄積して、組織および関節の両方に対する炎症および分解を引き起こす。用語「全身性」は、正しくは、この疾患が身体全体およびほとんどの器官の系統に影響することを示すが、この疾患は、大抵、炎症、および結果として生じる関節、皮膚、腎臓、脳、体腔における膜、肺、心臓、および胃腸管に対する損傷を伴う。SLEを有する個体は、しばしば、予想外の急性発症または「アウトブレイク」および等しく予想外の寛解を経験する。この疾患の病理の顕著な特徴は、皮膚表面の発疹または変化に似た、再発する、広範で、かつ多様な血管病変である。

10

【0005】

合衆国におけるSLEの有病率は、いくつかの議論の争点である。有病率の見積もりは、250,000~2,000,000人の範囲である。非常に高年および非常に若年の両方において報告されているが、この疾患は、主に、妊娠可能年齢の女性に発症する。子供において、SLEは、女性において、男性より3倍一般的である。思春期から30~40歳の間にこの疾患の発症を経験したSLE患者の60%において、女性：男性比は、9：1である。その後、この女性優性は、再び、思春期前の子供において観察される女性優性(すなわち、3：1)になる。さらに、この疾患は、アフリカ人起源およびアジア人起源の人において、白色人種起源の人においてよりも3倍一般的である。

20

【0006】

SLEの病因は、未知のままである。遺伝的素因、性ホルモンの全身性増殖、および種々の環境要因(例えば、ウイルス感染)が、この疾患を典型的に表す異常な免疫応答の誘発において役割を果たすことが示唆されている。遺伝の役割が、SLEの患者における2つの組織適合性抗原(HLA-DR2およびHLA-DR3)の増加した%によって示唆されている。さらに、罹患した個体において拡張されたハプロタイプHLA-A1、HLA-B8およびHLA-DR3の頻度が増加する。遺伝の役割は、一卵性双生児の中でのこの疾患についての一致によってさらに支持される。しかし、この遺伝的素因の遺伝的特性および環境因子の寄与は、まさに中程度であり、一致率により示唆され、25%~60%の間であると報告されている。

30

【0007】

SLEの正確な発症要因は未知である。しかし、この疾患の臨床的症候発現のほとんどが、自己抗体産生および引き続く病原性免疫複合体の形成により直接的または間接的のいずれかで引き起こされることが一般に受け入れられている。調節不全Bリンパ球により産生された、これらの自己抗体は、別個の核自己抗原(なかでも、DNA、ヌクレオソーム、およびサブヌクレオソーム)を認識する明確な特異性を有する。特定のRNA/タンパク質複合体(Sm抗原および核内低分子リボ核タンパク質(snRNP)が挙げられる)は、さらなる特徴的な自己抗原性特異性を有する。病原性免疫複合体は、自己抗体の、それぞれのそれらの核自己抗原への結合により形成される。

40

【0008】

SLEにおける自己抗体は、しばしば、それらのそれぞれの自己抗原に結合された免疫複合体(IC)として循環する。クロマチンまたはクロマチンフラグメント(例えば、DNA、ヌクレオソームまたはサブヌクレオソーム粒子)は、マウスおよびヒトの両方において特に一般的な自己抗原特異性を有する(Tan, E. Adv. Immunol. 44:44, 93-151(1989); MonestierおよびNovick, Mol. Immunol. 33:89-99, 1996)。

【0009】

50

従って、S L E の処置における主要な目的は、機能不全 B リンパ球を抑制し、それにより自己抗体の産生を減少させる試み、または一旦、免疫複合体が形成された後、それらの病原性を排除する試みのいずれかである。現在、これらの目的は、コルチゾン、アザチオプリン、ヒドロキシクロロキンおよびシクロホスファミドのような薬物を用いる集中的な免疫抑制剤治療の使用によってのみ、しばしば不完全に、達成され得る。これらの治療は、多くの重篤かつ所望されない副作用（感染、不妊症、網膜症、および癌が挙げられる）に関連する。従って、S L E、および他の自己免疫疾患についての新規の処置が所望される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0010】

（発明の要旨）

従って、本発明の目的は、自己免疫複合体関連疾患（I C A D）（例えば、S L E、慢性関節リウマチ、および C 型肝炎関連免疫複合体疾患（例えば、クリオグロブリン血症））を有するか、または I C A D を発症する危険性のある被験体における、I C A D を処置する方法および組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、クロマチン含有免疫複合体が、二重レセプター結合プロセスにより自己反応性 B 細胞および樹状細胞を、活性化することを発見した。両方の細胞型において、T o l l 様レセプター（T L R）が、関連する。T L R 9（細胞質コンパートメント内に位置する）は、細胞活性化のために必要とされる必須の第二のレセプターである。B 細胞の場合、その細胞表面上に位置する B 細胞抗原レセプターは、細胞活性化のために必要とされる必須の第一のレセプターである。樹状細胞の場合、細胞表面上に位置する刺激性 F c γ レセプターは、細胞活性化のために必要とされる必須の第二のレセプターである。本発明者らは、1）形成を防ぎそして / もしくは T o l l 様レセプター（T L R）への結合することのいずれかによって免疫複合体（すなわち、自己抗体および核自己抗体）の形成を阻害するか、2）自己抗原含有免疫複合体（もしくはその抗原性成分）の T L R への結合に干渉するか、または 3）免疫複合体化自己抗原または非複合体化自己抗原を介して B C R および T L R（B 細胞において）もしくは F c R および T L R（樹状細胞において）の二重結合により開始されるシグナル伝達経路を阻害するかのいずれかの化合物を、それを必要とする個体に投与することにより I C A D を処置する方法を見出した。この化合物は、薬学的に需要可能なキャリア中で投与される。

20

30

【0012】

好ましくは、I C A D は S L E、慢性関節リウマチまたは C 型肝炎関連免疫複合体疾患（例えば、クリオグロブリン血症）である。他の実施形態において、I C A D は、臓器移植後の宿主における免疫反応に関連する。

【0013】

理論に束縛されるように作用しないが、本発明者らは、自己抗原（例えば、クロマチン）を含む免疫複合体（I C）（しかし、外部抗原を含む I C ではない）が、自己反応性 B 細胞を活性化し得、そしてこの活性化は、自己抗原含有 I C が、B 細胞における B 細胞レセプター（B C R）または樹状細胞における F c γ R のいずれかと、第二のレセプター（T o l l 様レセプター）とを連続的に結合する能力に完全に依存すると考える。この知見は、先天免疫系および適応性免疫系間の新規の連結を確立し、そしてそれによりタンパク質 / 核酸自己抗原に特異的な自己反応性 B 細胞または樹状細胞が活性化される一般的な機構を示唆する。

40

【0014】

本発明の 1 つの局面に従い、I C A D を有する個体を同定する工程、そして自己抗原または自己抗原 / 免疫複合体が活性化 B 細胞または樹状細胞を形成および / または活性化することを阻害し得る有効量の化合物を投与する工程による、I C A D を有するか、または I

50

CADについての危険性のある患者を処置するための方法が提供される。

【0015】

ICADまたは全身性自己免疫疾患の危険性のある人とは、ICADまたは全身性自己免疫疾患を有する少なくとも親、祖父母、または兄弟を有する個体である。

【0016】

この化合物は、免疫複合体の成分を結合し、そしてその形成を防ぐかまたは自己抗原がToll様レセプター(TLR)を活性化するのを防ぐかのいずれかの化合物からなる群より選択される。このような化合物としては、Toll様レセプターデコイ、MyD88の活性を阻害する化合物、免疫複合体成分の産生を阻害する化合物(例えば、アンチセンスヌクレオチド)、ドミナントネガティブTLR、Toll様レセプターアンタゴニスト、およびTLRへの免疫複合体または自己抗原の相互作用または結合により活性化されるシグナル伝達経路を阻害する化合物が挙げられる。好ましくは、この化合物は、Toll様レセプターTLR2、TLR3、およびTLR9またはその機能的ドメインを結合し、そして/またはこれらの機能を阻害する。より好ましくは、このTLRは、TLR3もしくはTLR9またはそれらの機能的フラグメントである。

10

【0017】

免疫複合体の成分を結合し、そしてその形成を阻害するかまたはToll様レセプターへの複合体の結合を防ぐ化合物、およびMyD88シグナル伝達を阻害する化合物としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、野生型TLR活性をブロックし得るかまたはTLR媒介シグナル伝達カスケードの成分をブロックし得るドミナントネガティブタンパク質、阻害性オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)(例えば、S-ODN 2088)(Lenartら、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 4、247-256(2001))、アンチセンスヌクレオチド(RNAおよび改変ヌクレオチドを含む)、または他の経路特異的キナーゼインヒビターが挙げられる。この化合物は、クロロキン以外の化合物である。

20

【0018】

1つの実施形態において、本発明は、免疫複合体の形成またはToll様レセプターへの結合を阻害し、そして/またはB細胞/樹状細胞活性化を阻害する化合物または薬剤をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、免疫複合体成分と、試験薬剤と接触させる工程、およびB細胞または樹状細胞の活性化および/もしくは増殖ならびに/またはToll様レセプターへのこの複合体の結合を測定する工程を包含する。

30

【0019】

他の実施形態において、ICADを診断する方法が提供される。この方法は、ICADを有する疑いのある個体のIgGを含む生物学的サンプルを取り出す工程、この生物学的サンプルを、RF+B細胞または樹状細胞と共にインキュベートする工程、およびRF+B細胞または樹状細胞の活性化を測定する工程を包含し、ここで、ICADを有する疑いのある個体由来の生物学的サンプルに曝されたRF+B細胞または樹状細胞培養物における活性の、コントロールの個体由来のIgGを含む生物学的サンプルに曝されたRF+B細胞または樹状細胞と比較した変化は、ICADの指標である。好ましくは、この変化は、活性の増加である。B細胞の活性化が、例えば、同時刺激分子(例えば、CD80およびCD86)の増殖またはアップレギュレーション、ならびにMHCクラスII分子のアップレギュレーションを測定することにより測定され得る。樹状細胞の活性化は、同時刺激分子の発現、サイトカイン(例えば、TNF- α)の産生、または樹状細胞表現型の変化を測定することにより評価され得る。

40

【0020】

なお別の実施形態において、本発明は、化合物または薬剤のICADの処置におけるその有効性について評価するためのインビボモデル系を提供する。このモデル系は、ICADモデル動物(マウスモデルおよびラットモデルを含む)に試験薬剤を投与する工程、およびこのような動物におけるB細胞または樹状細胞の活性化および/もしくは増殖ならびに/またはToll様レセプターへのこの複合体の結合を測定する工程を包含し、ここで、

50

減少した活性化は、I C A Dを処置し得る薬剤の指標である。あるいは、実施者は、T o l l様レセプターを発現する細胞株を用い得、そしてそのようなレセプターを調節、好ましくは阻害またはブロックする化合物をスクリーニングし得る。

【0021】

本発明の他の局面を、以下に開示する。

【0022】

(発明の詳細な説明)

本発明は、免疫複合体関連疾患(I C A D)を有するかまたはI C A Dの危険性のある被験体において、I C A Dを処置および/または予防するための方法および組成物を提供する。

10

【0023】

本発明の目的のために、用語「免疫複合体関連疾患」すなわち「I C A D」としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない疾患をいう：全身性エリテマトーデス(S L E)および関連する結合組織疾患、慢性関節リウマチ、C型肝炎およびB型肝炎関連免疫複合体疾患(例えば、クリオグロブリン血症)、ベーチェット病(B e h c e t s d i s e a s e)、自己免疫系球体腎炎(a u t o i m m u n e g l o m e r u l o n e p h r i t i d e s)、ならびにL D L/抗L D L免疫複合体の存在と関連する血管症。

【0024】

本発明者らは、自己抗原(例えば、クロマチン)を含有する免疫複合体(I C)は、自己反応性B細胞を活性化し得るが、外来性抗原を含有するI Cは、自己反応性細胞を活性化し得ないこと、ならびにこの活性化は、自己抗原含有I Cが、B細胞レセプターおよび第2のレセプターであるT o l l様レセプターの両方に連続的に結合する能力に依存することを発見した。この知見は、先天性の免疫系および順応性の免疫系と、その結果としての一般機構との間の新規の関係を確立し、この一般機構によってタンパク質/核酸自己抗原に特異的な自己反応性B細胞が活性化される。

20

【0025】

T o l l様レセプター(T L R)は、膜結合レセプタータンパク質のファミリーであり、先天性の免疫応答に強く関与し、そして微生物に独特のものであると思われる病原体関連の分子パターンまたは決定因子を認識し、これらの微生物粒子の供給源に対する免疫細胞の活性化に関与する。

30

【0026】

レセプターのT o l l様ファミリーは、その細胞外ドメイン中にロイシンリッチリピートを有し、かつその細胞質ドメイン中にT o l l/I L - 1レセプターホモロジードメインを有する。このT o l lファミリーは、進化において著しく保存される。発見された第1のメンバーは、t o l l遺伝子の産物であり、この産物は、ショウジョウバエD r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e rの初期発生における背側-腹側極性の特異化を担う、シグナル伝達経路の一部である。

【0027】

現在10個の哺乳動物ホモログが同定されており、T L R 1 ~ T L R 10と呼ばれている。I L - 1レセプターとT L Rとの両方は、類似の下流効果(例えば、免疫応答遺伝子の活性化)を共有し、そしてこれらのレセプター全てが、アダプタータンパク質M y D 8 8を含むシグナル伝達カスケードを介して働く(M u s s i oら、S c i e n c e 278:1612; W e s c h eら、I m m u n i t y 7:837)。このM y D 8 8は、骨髄性分化タンパク質として以前に記載されている(L o r dら、O n c o g e n e 5:1095)。一般的には、異なるT L Rは、異なる型の微生物粒子によって活性化されると考えられる(H e m m iら、N a t u r e 408:740-745(2000); U n d e r h i l lら、N a t u r e 402:39-43(1999); A l i p r a n t i sら、E M B O J., 19:3325-3336(2000))。しかし、微生物粒子に加えて、哺乳動物T L Rはまた、特定の自己(哺乳動物)抗原(特に、細胞死の結果として細胞から放出される特定の細胞質成分)を認識するという証拠も蓄積されている

40

50

(Akiraら、Nat Immunol.、2:675-680(2000))。

【0028】

用語「Toll様レセプター」は、本明細書中において、インタクトなToll様レセプター(例えば、Online Mendelian Inheritance in Manに以下のアクセスナンバーで記載されているレセプター：*601194 TOLL-LIKE RECEPTOR 1、TLR1；*603028 TOLL-LIKE RECEPTOR 2、TLR2；*603029 TOLL-LIKE RECEPTOR 3、TLR3；*603030 TOLL-LIKE RECEPTOR 4、TLR4；*603031 TOLL-LIKE RECEPTOR 5、TLR5；*605403 TOLL-LIKE RECEPTOR 6、TLR6；*300365 TOLL-LIKE RECEPTOR 7、TLR7；*300366 TOLL-LIKE RECEPTOR 8、TLR8；*605474 TOLL-LIKE RECEPTOR 9、TLR9；および*606270 TOLL-LIKE RECEPTOR 10、TLR10；またはこれらの機能的フラグメント(例えば、Toll様レセプターの可溶形態(すなわち、膜結合ドメインが欠失しているかまたは変化されており、いくつかの実施形態において、細胞質ドメインもまた存在しない)あるいはMyD88に結合し得るかもしくはMyD88と相互作用し得る、Toll様レセプターまたはToll様レセプターのホモログのMyD88結合フラグメントまたはMyD88相互作用フラグメント)を含むことを意味する。より好ましくは、TLRは、TLR9である。

10

【0029】

この点に対する本発明者らの実験は、TLR9とクロマチン含有免疫複合体のクロマチン成分との間の相互作用の重要性を同定した。しかし、SLEおよび関連する疾患において、免疫複合体は、通常、自己抗体ならびにSm抗原および核内低分子リボ核タンパク質(snRNP)を含む別個のRNA/タンパク質抗原複合体によって生じる(Tan、E. Adv. Immunol. 44, 93-151(1989))。さらに、免疫複合体関連疾患(例えば、C型肝炎)において、病原性免疫複合体は、抗体とRNA含有ウイルスとの間に生じる。TLR3は、二本鎖RNAに特異的なレセプターとして同定されている(Alexopoulos、Nature. 413, 732-738(2001))。したがって、TLR3結合が、これらのRNA含有免疫応答複合体によって惹起される活性化プロセスにおいて重要であることを予測するのは当然である。

20

30

【0030】

好ましくは、TLRは、TLR3もしくはTLR9、あるいはこれらの機能的フラグメントまたはTLR3もしくはTLR9と相同であり、かつMyD88に結合し得るかもしくは相互作用し得るフラグメントである。

【0031】

本発明に従って有用なToll様レセプターはまた、融合レセプターであり得、ここで、このToll様レセプターは、Myタグのような別のタンパク質と融合される。好ましいToll様レセプターとしては、Toll様レセプター-2またはToll/インターロイキン-1レセプター様4(Chaudharyら、Blood 91:4020-4027, 1998)、Toll様レセプター-3(Rockら、Proc. Nat. Acad. Sci. 95:588-593, 1998)、およびToll様レセプター-9(ChuangおよびUlevitch、Europ. Cytokine Netw. 11:372-378, 2000；Duら、Europ. Cytokine Netw. 11:362-371, 2000)またはこれらの機能的フラグメントもしくは(例えば、MyD88に結合するような)類似の機能を有するホモログが挙げられる。

40

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「処置(treatment)」または「処置(treating)」は、以下を含む：(1)これらの疾患に罹りやすいが、これらの疾患を有しているとまだ診断されていない被験体が、このような疾患を発症するのを予防すること；(2)これらの疾患を抑制すること(すなわち、これらの発症をおさえること)；ま

50

たは(3)これらの疾患の症状を回復または軽減させること(すなわち、疾患状態の後退を引き起こすこと)。

【0033】

これらの化合物は、好ましくは、以下で議論されるインビトロアッセイまたはインビボアッセイにおいて、B細胞(BC)または樹状細胞(DC)の活性化を少なくとも約50%阻害する。より好ましくは、これらの化合物は、Toll様レセプターを介して、75%、最も好ましくは95%、BCまたはDCの自己抗原性活性化を阻害する。さらなる化合物が同定され、以下により詳細に議論されるスクリーニングアッセイにおいて試験される。

【0034】

本発明に従う有用な化合物は、免疫複合体の成分またはToll様レセプターに結合する化合物からなる群から選択される。これらの化合物は、免疫複合体の形成を防ぐか、あるいは、免疫複合体の自己抗原もしくは自己抗原性フラグメントがToll様レセプター(TLR)を活性化するのを防ぐか、または下流分子がToll様レセプターからの(MyD88を通して媒介されるような)シグナルを伝達するのを防ぐかのいずれかである。このような化合物としては、Toll様レセプターデコイ、MyD88の活性を阻害する化合物、免疫複合体成分(例えば、アンチセンスセンスヌクレオチド)の生成を阻害する化合物、ドミナントネガティブTLR、Toll様レセプターアンタゴニストもしくはToll様レセプターブロッカー(例えば、ODN2088またはTLRに対する抗体)、およびTLRに対する免疫複合体の抗原性フラグメントの相互作用もしくは結合によって活性化されるシグナル伝達経路を阻害する化合物が挙げられる。好ましくは、この化合物は、Toll様レセプターであるTLR2、TLR3、およびTLR9またはこれらの機能的ドメインに結合するかならびに/あるいはToll様レセプターであるTLR2、TLR3、およびTLR9またはこれらの機能的ドメインの機能を阻害する。より好ましくは、TLRは、TLR3もしくはTLR9またはこれらの機能的フラグメントである。

【0035】

本発明は、免疫複合体(またはこれらの抗原性成分)のTLR(好ましくは、TLR2、TLR3、TLR9またはこれらの任意の組み合わせであり、最も好ましくは、TLR3またはTLR9)への結合を阻害する薬剤について薬物またはリード化合物を同定するための効率的なスクリーニング法をさらに提供する。これらの方法は、自動化され、費用効率的なハイスループット薬物スクリーニングになじみ、かつ広範な薬物開発プログラムにおける直接の用途を有する。

【0036】

一般的には、これらのスクリーニング方法は、例えば、TLR(好ましくは、TLR2、TLR3、TLR9またはこれらの任意の組み合わせであり、最も好ましくは、TLR3またはTLR9)との自己抗原相互作用を調節する化合物についてのアッセイを含む。さらに、より好ましくは、これらの化合物は、TLR9との相互作用を調節する。結合剤についての広範な種々のアッセイが提供され、これらには、インビトロ標識化タンパク質-タンパク質結合アッセイ、免疫アッセイ、細胞ベースのアッセイなどが含まれる。

【0037】

インビトロ結合アッセイは、TLRポリペプチド(好ましくは、TLR2、TLR3、TLR9またはこれらの任意の組み合わせであり、最も好ましくは、TLR3またはTLR9、さらにより好ましくは、別のペプチドまたはポリペプチド(例えば、検出または固着のためのタグなど)との融合産物の一部であり得るTLR9)を含む成分の混合物を使用する。このアッセイ混合物はまた、天然の細胞内TLR結合標的(例えば、MyD88)を含み得る。ネイティブな全長結合標的が使用され得るが、アッセイにおいて都合よく測定可能な対象のMyD88ポリペプチドに対する結合親和性および結合活性を提供する部分ほどの長さの部分(例えば、ペプチド)を使用することが頻繁に好まれる。このアッセイ混合物はまた、候補薬物を含む。候補薬剤は、多くの化学物質のクラスを包含するが、典型的には、有機化合物であり;好ましくは、小さい有機化合物であって、合成化合物も

10

20

30

40

50

しくは天然の化合物のライブラリーを含む広範な種々の供給源から得られる。種々の他の試薬もまた、混合物中に含まれ得る。塩、緩衝剤、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、界面活性剤、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤などを含む試薬が、使用され得る。

【0038】

得られた混合物は、候補薬理学的因子の存在について、TLRポリペプチドが、参照結合親和性で、細胞結合標的、部分またはアナログに特異的に結合するような条件下で、インキュベートされる。この混合物の成分は、必要な結合を提供する任意の順序で添加され得、そしてインキュベーションは、最適な結合を促進する任意の温度で実施され得る。インキュベーション時間は、同様に、結合を最適化するために選択されるが、また迅速な高スループットを促進するために最小化される。

【0039】

インキュベーション後、TLRポリペプチドと1以上の結合標的との間の、この因子により偏向された結合は、任意の従来方法によって検出される。この因子の存在下での結合親和性と比較した、この因子の非存在下での、TLRポリペプチドの標的に対する結合親和性の差異は、この因子が、TLR結合標的に対するTLRポリペプチドの結合を調節することを示す。同様に、以下にまた記載される細胞ベースのアッセイにおいて、因子の存在下および非存在下でのTLR依存的転写活性化は、この因子が、TLR機能（例えば、MyD88に対する結合）を調節することを示す。本明細書中で使用される場合、差異とは、統計的に有意であり、かつ好ましくは、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、なおより好ましくは少なくとも90%の差異を示す。

【0040】

B細胞または樹状細胞の活性化を妨害する能力について、薬学的因子を試験するために好ましいアッセイは、適切な細胞培養培地中で、試験因子およびTLR刺激因子（例えば、PR1-3、PR2-3またはCpG S-ODN 1826（例えば、Leadbetterら、Nature、416:603-607、2002を参照のこと））と共にインキュベートされるRF+B細胞または樹状細胞を含む。試験因子とのインキュベーションは、刺激因子の添加の前または添加と同時に実施され得る。

【0041】

B細胞の活性化は、当業者に周知の多数の技術を使用して、観察され得る。例えば、³[H]チミジン取り込みアッセイは、B細胞の増殖を測定するために実施され得る。あるいは、B細胞の活性化は、例えば、CD80、CD86またはMHCクラスII分子の細胞表面発現を測定するために、蛍光活性化細胞分類（FACS）を使用して分析され得る。樹状細胞の活性化は、サイトカイン（例えば、TNF- α 、インターフェロン- α 、IL-12およびBAFF）または同時刺激分子（例えば、CD80、CD86またはMHCクラスII分子）の産生を測定することによって、観察され得る（Banchereauら、Annu. Rev. Immunol. 18:767-811、2000；MackayおよびBrowning、Nat. Rev. Immunol. 2:465-475）。

【0042】

あるいは、樹状細胞活性化は、DCにおける形態学的変化を測定することによって観察され得る（Banchereauら、Annu. Rev. Immunol. 18:767-811、2000）。

【0043】

試験因子の添加後に、例えば同時刺激分子の発現の刺激が減少する場合、この試験因子は、ICADを処置するための強力な因子とみなされる。発現は、試験因子が添加されていない細胞サンプルと比較して、少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60~75%、最も好ましくは少なくとも約90%減少した場合に、減少したとみなされる。より詳細な例は、この節の最後の実施例において与えられる。

【0044】

本発明の好ましいアッセイ混合物は、実施例において示される。本発明のアッセイ混合物

はまた、候補薬理学的因子を含む。一般に、複数のアッセイ混合物が、種々の濃度に対する差示的応答を得るために、異なる候補因子濃度で並行して実施される。代表的には、これらのアッセイ混合物の1つは、ネガティブコントロール（すなわち、ゼロ濃度またはアッセイ検出の限界未満）として働く。候補因子は、多数の化学物質のクラスを包含するが、これらは、代表的には、有機化合物であり、そして好ましくは小さい有機化合物である。小さい有機化合物は、適切には、例えば、約50より大きいが約2,500未満の分子量を有し得る。候補因子は、タンパク質および/またはDNAと相互作用する機能的化学基を含み得る。

【0045】

候補因子は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む、広範な種々の供給源から得られる。例えば、多数の手段が、広範な種々の有機化合物および生体分子（ランダム化オリゴヌクレオチドおよびペプチドの発現を含む）のランダム且つ直接的な合成のために利用可能である。あるいは、細菌、真菌、植物および動物の抽出物の形態での天然化合物のライブラリーが利用可能であるか、または容易に生成される。ライブラリーは、小さいポリペプチドから構成され得る（例えば、Lamら、Nature、354:82、1991およびWO 92/00091；Geysenら、J Immunol Meth、102:259、1987；Houghtenら、Nature、354:84、1991およびWO 92/09300、ならびにLeblら、Int J Pept Prot Res、41、201、1993を参照のこと）。あるいは、小さい非ペプチド分子のライブラリーは、一般的なテンプレートまたはコア構造に基づき得る（例えば、ベンゾジアゼピンテンプレートについては、EllmanおよびBunin、J Amer Chem Soc、114:10997、1992を；オキサゾールおよびアミジンテンプレートについては、WO 95/32184を；ジヒドロベンゾピランテンプレートについてはWO 95/30642を；そしてピロリジンテンプレートについては、WO 95/35278を参照のこと）。 10 20

【0046】

さらに、天然および合成的に生成されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的手段、物理的手段および生化学的手段によって、容易に改変される。さらに、既知の薬理学的因子は、指向的化学改変またはランダム化学改変（例えば、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化など）に供され得る。 30

【0047】

免疫複合体の成分を結合し、そして形成またはTLR結合を防止する、抗体およびその結合フラグメントまたはアプタマー（例えば、SomaLogic Inc.、Boulder、COから入手可能）もまた、有用である。本発明に従って有用な抗体の例としては、TLRに対するモノクローナル抗体（例えば、抗TLR3モノクローナル抗体（Matsumotoら、Biochem Biophys Res Commun、293:1364-1369、2002）、抗TLR-9（Toll様レセプター9、Imgenex、San Diego、CA）、またはこれらのヒト化バージョンが挙げられる。

【0048】

用語、ドミナントネガティブなToll様レセプターは、本明細書中で使用する場合、欠損（例えば、下流のシグナル伝達に必要なドメインの欠失）を有するが、免疫複合体の抗原性部分を結合し得るように操作された、Toll様レセプターをいう。 40

【0049】

抗体およびその結合フラグメントは、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかであり得るが、好ましくはモノクローナルである。ポリクローナルの場合、これらの抗体は、抗血清または単一特異的抗体の形態（例えば、精製タンパク質によって動物を免疫することによって生成された、精製抗血清）であり得る。しかし、好ましくは、これらの抗体は、個体への外来性タンパク質の投与を最小化するために、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、周知のプロトコルに従って調製され得る。例えば、Skareら、J Biol Chem、268:16302-16308（1993）；ならびに米 50

国特許第4,918,163号および同第5,057,598号(これらは、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。抗体は、全体、Fab、単鎖、単ドメイン重鎖などであり得る。単鎖抗体が好ましい。単鎖結合ポリペプチドの産生のための方法は、例えば、米国特許第4,946,778号(これは、本明細書中で参考として援用される)において詳細に記載される。

【0050】

抗体または他のタンパク質もしくはペプチドが使用される場合、このペプチドは、好ましくは、キャリア(例えば、ピオチンまたはポリ(アルカリンオキシド)(poly(alkaline oxide))(例えば、ポリエチレングリコール(PEG))に結合体化される。ポリマー性物質(例えば、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリサッカリド、デンプン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミドまたは他の類似のポリマー)が使用され得る。ポリ(アルカリンオキシド)(poly(alkaline oxide))としては、モノメトキシポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールのブロックコポリマーなどが挙げられ得る。ポリ(アルカリンオキシド)としては、ポリエチレングリコールが好ましい。これらのポリマーはまた、モノメトキシ基の代わりに、C₁~₄アルキルで、遠位でキャップされ得る。

10

【0051】

例えば、インビボ処置のための組成物の成分としての、ヒトへの投与のために、これらのモノクローナル抗体は、好ましくは、免疫原性を最小化するために実質的にヒト抗体であるかまたはヒト化抗体であり、そして実質的に純粋な形態である。「実質的にヒト」は、この組成物の免疫グロブリン部分が、一般に、少なくとも約70%のヒト抗体配列、好ましくは少なくとも約80%ヒト抗体配列、そして最も好ましくは少なくとも約90~95%またはそれ以上のヒト抗体配列を含む。

20

【0052】

治療適用について、これらの化合物は、単独でかまたは薬学的組成物の一部として、被験体(例えば、哺乳動物(特にヒト))に適切に投与され得、この組成物は、この化合物を、1種以上の薬学的に受容可能なキャリアと共に、そして必要に応じて他の治療成分と共に含む。キャリアは、処方物中の他の成分と適合性であり、そしてそのレシピエントに対して有害ではないという意味で、「受容可能」でなければならない。

【0053】

本発明の薬学的組成物としては、経口投与、直腸投与、鼻腔投与、局所投与(頬および舌下を含む)、膣投与、非経口投与(皮下、筋内、静脈内および皮内を含む)、点眼薬を使用する眼投与、エアロゾル化(aerosolubilize)または噴霧された薬物を使用する経肺投与に適切な組成物が挙げられる。この処方物は、簡便には、単位投薬形態(例えば、錠剤および徐放性カプセル)で、およびリポソーム中に提示され得、そして薬学分野で周知の任意の方法によって調製され得る(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy by Alfonso R. Gennaro(編)第20版、2000年12月15日、Lippincott, Williams & Wilkins; ISBN: 0683306472を参照のこと)。

30

【0054】

このような調製方法は、投与されるべき分子を、1つ以上の補助成分を構成する成分(例えば、キャリア)と会合させる工程を包含する。一般に、これらの組成物は、活性成分を、液体キャリア、リポソームまたは微細に分割された固体キャリア、あるいはこれら両方と、均一かつ完全に会合させ、次いで必要に応じて、製品を成形することによって、調製される。

40

【0055】

経口投与に適切な本発明の組成物は、別個の単位(例えば、カプセル、カシェ剤もしくは錠剤(各々、所定量の活性成分を含む))として;粉末もしくは顆粒として;水性液体もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として;または水中油液体エマルジョンもしくは

50

は油中水液体エマルジョンとして；あるいはリポソーム中にパッケージングされて、そしてポーラスなどとして、提示され得る。

【 0 0 5 6 】

錠剤は、必要に応じて1種以上の補助成分と共に、圧縮または成形によって、作製され得る。圧縮錠剤は、必要に応じて結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、防腐剤、界面活性剤または分散剤と混合された、自由流動形態（例えば、粉末または顆粒）の活性成分を、適切な機器において圧縮することによって調製され得る。成形された錠剤は、不活性液体希釈剤で加湿された粉末化合物の混合物を、適切な機器において成形することによって、作製され得る。これらの錠剤は、必要に応じて、コーティングされ得るかまたは刻み目を入れられ得、そしてこの錠剤中の活性成分の緩徐放出または制御放出を提供するように、処方され得る。

10

【 0 0 5 7 】

局所投与に適切な組成物としては、風味付けされた基剤（通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカント）中に活性成分を含むロゼンジ；および不活性基剤（例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシア）中に活性成分を含む香錠が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

非経口投与に適切な組成物としては、この処方物を、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および意図されたレシipientの血液と等張にする溶質を含み得る、水性および非水性の滅菌注射溶液；ならびに懸濁剤および増粘剤を含み得る、水性および非水性の滅菌注射溶液、が挙げられる。この処方物は、一回用量容器または複数回用量容器（例えば、密封アンプルおよび密封バイアル）で提示され得、そして滅菌液体キャリア（例えば、注射用の水）を使用直前に添加することのみを必要とする凍結乾燥（freeze dry (lyophilize)）条件にて、保存され得る。即席注射溶液および懸濁液は、滅菌の粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。

20

【 0 0 5 9 】

所定の治療において使用される所定の化合物の実際の好ましい量は、利用される特定の化合物、処方された特定の組成物、適用様式、特定の投与部位、患者の体重、一般的健康、性別など、処置される特定の適応症など、および所属の医師または獣医師を含む当業者によって認識される他のこのような因子に従って変動する。所定の投与プロトコルについての最適な投与速度は、従来の投薬量決定試験を使用して、当業者によって容易に決定され得る。

30

【 0 0 6 0 】

本発明はまた、個体においてICADを診断するための方法を提供する。この方法は、自己抗原および自己抗体からなる免疫複合体を含む生物学的サンプルによって誘導される、B細胞または樹状細胞のToll様レセプター媒介性活性化を測定する工程を包含する。B細胞におけるToll様レセプターの活性化は、例えば、B細胞の増殖、種々の同時刺激分子（例えば、CD80、CD86）の発現、またはMHCクラスII分子のアップレギュレーションを測定することによって、間接的に測定され得る。樹状細胞におけるToll様レセプターの活性化は、mRNAまたはタンパク質のレベルをアッセイすることを含む、多数の異なる技術を使用して、特異的染色を有するかもしれないか、または有さないかのいずれかである樹状細胞の形態学的変化を観察することによってか、または同時刺激分子（例えば、CD80、CD86）の発現を測定することによってか、または活性化マーカー（例えば、CD69）のアップレギュレーションを測定することによってか、またはケモカインレセプター（例えば、CCR7）のアップレギュレーションを測定することによってか、またはサイトカイン（例えば、TNF- α ）の産生を測定することによって、測定され得る。

40

【 0 0 6 1 】

例えば、TNF- α の発現の変化は、樹状細胞から単離されたRNAを使用して測定され得る。RNA定量法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）ベースの方法（例えば、

50

TaqMan (登録商標) システム (Applied Biosystems)、Brilliant Quantitative PCR (Stratagene)、Platinum (登録商標) 定量的 PCR (Resgen, Inc.) が挙げられる。RNA は、ICAD を有する疑いのある個体から採取された生物学的サンプル (例えば、血液サンプル) から単離される。Toll 様レセプター mRNA の量は、例えば、上記の技術を使用して定量され、そしてコントロール個体由来のサンプルと比較される。

【0062】

好ましくは、アッセイ (例えば、FACS 分析) は、同時刺激分子のタンパク質発現を測定するために使用される。これらの同時刺激分子の発現が増加する場合、このことは、その個体が ICAD に罹患していることを示す。コントロールサンプルと比較して、このアッセイが同時刺激分子の量の少なくとも約 5 % の増大を示す場合に、この活性は増大したとみなされる。

10

【0063】

あるいは、ICAD を有する疑いのある試験個体由来の血清は、機能的な Toll 様レセプター経路を発現する細胞培養物に注入され得る。Toll 様レセプターの活性は、結果として、コントロール被験体血清および試験被験体血清で並行して処理された細胞培養物から測定される。Toll 様レセプターの活性が、試験個体の血清で処理された細胞において、コントロール血清で処理された細胞と比較して増大する場合、このことは、その個体が、ICAD に罹患していることを示す。発現は、コントロールサンプルと比較して、少なくとも約 5 % 高い場合に、増大したとみなされる。

20

【0064】

本発明を、その好ましい特定の実施形態と組み合わせて記載してきたが、前述の説明および以下の実施例は、例示を意図し、そして本発明の範囲を限定しないことが、理解されるべきである。本発明の範囲内の他の局面、利点および改変は、本発明に関する分野の当業者に明らかである。

【実施例】

【0065】

(実施例 1)

自己反応性 B 細胞は、健常な個体のリンパ組織中に存在するが、代表的には、静止状態である。この恒常性が乱される場合、自己反応性抗体の形成は、重篤な病理学的結果を有し得る。自己 IgG に特異的な抗原レセプターを発現する B 細胞は、リウマチ因子 (RF) として公知の自己抗体のクラスを生成する。ここで、本発明者らは、RF + B 細胞の効果的な活性化が、IgG2a / クロマチン免疫複合体によって媒介され、そして抗原レセプターおよび MyD88 依存性 Toll 様レセプターファミリーメンバーの連続的結合を必要とすることを示す。これらのデータは、全身性自己免疫疾患の発症における生得的免疫系と順応性免疫系との間の重要な関連性を確立し、そして核酸 / タンパク質粒子と反応性の自己抗体の優勢を説明する。この二重結合経路の独自の特徴は、自己反応性 B 細胞を特異的に標的化する治療剤の開発を容易にするはずである。

30

【0066】

本発明者らは、ここで、自己免疫疾患における自己反応性 B 細胞および樹状細胞の活性化に關与する因子を分析するための、モデルインビトロ系を開発した。狼瘡傾向の lpr マウスにおける優勢な自己抗体特異性の 1 つは、リウマチ因子 (RF) である。RF は、自己 IgG と反応性の抗体である。RF + B 細胞は、自己免疫のマウス株において活性化され、数が増え、そして抗体分泌細胞へと分化するが、非自己免疫バックグラウンドでは、これらは起こらない。この病理学的活性化に關与する機構を調査するために、本発明者らは、特定の RF に、ほとんどの B 細胞に対する特異性を付与する一対の導入遺伝子を発現するように遺伝子操作されたマウスの脾臓由来の初代 RF + B 細胞を研究した。これらの B 細胞は、SLE 患者において見出される自己反応性 B 細胞の原型である。

40

【0067】

最初に、本発明者らは、これらの RF + B 細胞が、自己免疫マウス由来の血清サンプルに

50

よって活性化されたが、非自己免疫マウス由来の血清によっては、活性化されなかったことを実証した (R i f k i n ら、2000)。本発明者らは、血清中の刺激因子が、実際に I g G 2 a であることをさらに証明した。しかし、非自己免疫血清から単離されたかなりの量の I g G 2 a は、刺激性ではなく、このことは、I g G 2 a の全てが R F + B 細胞を刺激するのに、充分なわけではなかったことを示す。従って、本発明者らは、自己免疫血清中の I g G 2 a が、独自の特性を有すると結論付けた。優勢な I g G 2 a 成分をさらに同定するために、本発明者らは、I g G 2 a モノクローナル抗体 (m A b) を使用して、自己抗原 (例えば、D N A - ヒストン複合体) に特異的な m A b は刺激性であったが、一方で、外来または非自己の抗原に特異的な抗体は、刺激性でなかったことを示した。

【0068】

本発明者らは、次に、自己抗体 / 自己抗原免疫複合体が、優勢な成分であるという可能性を考慮した。血清および m A b を用いたアッセイを D N A s e の存在下で実施した場合、R F + B 細胞の刺激は、劇的に減少した (図 1)。これらのデータは、D N A 骨格の切断が、自己抗体 / 自己抗原 (D N A) 免疫複合体の解離を生じることを示唆した。このことは、自己抗体 / 自己抗原免疫複合体が、自己反応性 B 細胞を優先的に活性化する独自の特性を有することを強力に示す。非自己抗原を含む免疫複合体が、自己反応性 B 細胞を活性化できないことは、図 2 に示される。

【0069】

本発明者らは、自己抗体 / 自己抗原免疫複合体が、第二のレセプター (これは次いで、R F B 細胞の活性化を促進する) と結合し得るという可能性を調査した。最近の研究により、T o l l 様レセプター (T L R) として公知のタンパク質ファミリーが、細菌 D N A に結合し得、そしてマクロファージ、樹状細胞および B 細胞の活性化を導き得ることが示されたので、本発明者らは、T L R が、これらの自己反応性 R F B 細胞の活性化において役割を果たし得るという可能性を考慮した。T L R は、最近非常にポピュラーな研究領域であり、そして多くの病原体関連分子パターン (P A M P S) の結合および認識を担うことが示されており、従って、生得的免疫応答とのこの関連は、自己免疫についての非常に独自の関連である。全ての既知の哺乳動物 T L R は、アプタマータンパク質を介して、M y D 8 8 へとシグナル伝達する。M y D 8 8 遺伝子が遺伝子操作によって排除されたマウスにおける T L R 媒介性の活性化は、非常に損なわれ、そして T L R 9 を介したシグナルは、完全に破壊される。本発明者らは、本発明者らの R F + マウスを、M y D 8 8 - / - バックグラウンドで繁殖させた。得られたマウスは、R F 導入遺伝子について陽性であり (図 4 A)、そして M y D 8 8 シグナル伝達分子を欠いた (図 4 B)。

【0070】

本発明者らは、R F M y D 8 8 - / - マウスが、そうでなければ R F M y D 8 8 + / + の B 細胞の増殖を刺激する自己抗体のいずれに対しても応答できなかったことを見出した (図 4 C)。本発明者らは、複数の形態の自己抗体 (血清、抗ヌクレオソーム抗体および抗 S m 抗体) を試験した。これは、自己抗体 / 自己抗原免疫複合体が、反復パターンの成分 (例えば、B 細胞の内側 (D N A / T L R 9) または B 細胞の表面上 (R N A / T L R 3) のいずれかで T o l l レセプターと結合する、D N A または R N A) を含むという仮定と一致する。自己反応性 R F + B 細胞の場合、この自己抗体 / 自己抗原免疫複合体は、おそらく、B C R および T L R と連続的に結合して、活性化および増殖の増加を導く。これは、B C R および T L R の同時結合が、自己反応性 B 細胞の活性化を生じ得ることの最初の実証である。この関連は、自己免疫と身体の生得的免疫応答との間の非常に独自の関連を提供し、そして自己免疫疾患 (例えば、S L E および慢性関節リウマチ) における病原性応答の多くについての出発機構を提供し得る。

【0071】

引き続く研究は、T L R 9 を介する刺激性 C p G O D N による B 細胞活性化をブロックすることが知られている薬物 (例えば、クロロキンおよびコンカナマイシン (c o n c a n a m y c i n) A) が、I C を含有するクロマチンが R F + B 細胞を刺激する能力を完全にブロックすることを示した。その応答もまた、T L R 9 によって活性化を特異的に阻

10

20

30

40

50

害する阻害性 CpG ODNによってブロックされ得る。これらのデータは、TLR9が、自己反応性B細胞の活性化における重要なレセプターであることを示している。このデータは、免疫複合体のIgG成分が、BCR（これは、免疫複合体の内在化および内部小胞コンパートメントへの送達を引き起こす）に結合することを示している。この内部コンパートメント内のICのクロマチン成分による、引く続くTLR9の結合（engagement）は、B細胞の活性化を引き起こす。増強した有効性、従って、クロマチンそれ自体の取り込みに寄与する因子（SLEに対する感受性因子）もまた、類似の機構を介して、B細胞活性化を引き起こし得る。抗クロマチン抗体は、SLE患者および自発的SLEの動物モデルの血清中に存在する第一の検出可能な抗体であることが、記される。

【0072】

10

（実施例2）

SLEおよび他の全身性自己免疫疾患に罹患した患者は、広範な自己抗体特性を生じる。これらの自己抗体は、かなり頻繁に、クロマチンまたは他の亜細胞核酸/タンパク質粒子に結合する（Tan, E. Adv. Immunol. 44, 93-151 (1989)）。MRL/lprマウス（全身性エリテマトーデスおよび慢性関節リウマチについて十分に研究されたマウスモデル）もまた、高い力価のIgG抗IgGリウマチ因子（RF）を過度に生じる（Theofilopoulosら、J. Exp. Med. 162, 1-18 (1985)；Wolflowiczら、Clin. Immunol. Immunopath. 46, 382-395 (1988)）。そのRF応答は、自己抗体調節の研究に非常に適切なトランスジェニックモデルを提供する。AM14トランスジェニックマウス株由来のB細胞は、IgG2a^{a/j}に特異的な抗原レセプターを発現し、これは本来、病変したMRL/lprマウスの脾臓由来のハイブリドーマ産物として捕捉される（Shlomchikら、Int. Immunol. 5, 1329-1341 (1993)）。単量体IgG2aに対するAM14アロタイプの特異性および相対的に低い親和性は、RFレパトリーに関連した疾患の典型である（Jacobsonら、J. Immunol. 152, 4489-99 (1994)）。野生型マウスにおいて、AM14 RF+B細胞は、正常に発達し、そして機能的に未処置のままである（Hannumら、J. Exp. Med. 184, 1269-1278 (1996)）。しかし、同族アロタイプの自己免疫傾向性lprバックグラウンドにおいて、これらは活性になり、増殖し、そして自己抗体を分泌する（WangおよびShlomchik, J. Exp. Med. 190, 639-649 (1999)）。多数の因子が、lprマウスのAM14 B細胞の活性化に寄与するようであるが、これらの因子のほとんどが、自己抗原（IgG2a）の状態ではない。

20

30

【0073】

（RF+B細胞は、自己抗体/自己抗原免疫複合体によって活性化される）

本発明者らは、AM14 RF+B細胞が、自己免疫マウスの血清から単離されるIgG2a^{a/j}によってインビトロで活性化され得るが、野生型マウスから得られる血清中に存在する匹敵したレベルのIgG2aによって活性化されないことを以前に示した（Rifkinら、J. Immunol. 165, 1626-1633 (2000)）。RF+B細胞はまた、ヌクレオソームに特異的なアフィニティー精製されたIgG2a^j mAb（自己抗原）に応答して激しく増殖するが、ヘプタンまたは他の外来性抗原に特異的なIgG2a^{a/j} mAbは、たとえあったとしてもほとんど応答しないことが見出された（Rifkinら、J. Immunol. 165, 1626-1633 (2000)）。これらの研究は、IgG2aヌクレオソーム特異的mAbと共培養細胞から放出されるクロマチンフラグメントとの間に形成される免疫複合体（IC）（Emlenら、J. Immunol. 148, 3042-3048 (1992)）は、有効な活性化RF+B細胞であり得るが、単量体抗ハプテンIgG2a抗体は、有効な活性化RF+B細胞であり得ないことを示唆した。この前提をさらに試験するために、DNaseを、推定ICを分裂させる手段によって、アッセイ媒体に加えた。精製された抗ヌクレオソームmAb PL2-3によってか（MonestierおよびNovick Mol. Immunol

40

50

．33，89 - 99（1996））または自己免疫血清によって通常誘発される強い増殖性応答は、劇的に減少した（図1）。DNaseの非特異的毒性は、F(ab')₂抗IgMに対する応答のような因子ではなく、LPSは影響を受けなかった（図1）。これらのデータは、RF + B細胞が、DNAを含むIgG2a ICに応答し、単量体IgG2a抗体単独には応答しないことを確認する。

【0074】

単にIgG2a ICによるRF + B細胞の活性化が、単量体IgG2aを用いて可能であるよりも、より効果的な抗原レセプターの架橋を生じる場合、従来の抗ハプテン/ハプテン-タンパク質複合体はまた、RF + B細胞を強く刺激するはずである。この論点に取り組むために、TNF - BSAの濃度を変化させながら、IgG2aモノクローナル抗TNF抗体をプレインキュベートすることによって、ICを調製した；複合体形成を、C1q結合活性の増加を実証することによって、確認した（図2a）。予測されるように、C4010のIC（IgG2a^b抗TNF mAb）は、全ての抗TNF/TNF - BSA比で、RF + B細胞を刺激しなかった。驚くべきことに、Hy1.2のIC（IgG2a^a抗TNF mAb）のみが、抗ヌクレオソームmAb含有ICによって誘発される増殖性応答に対して、かなり適度な増殖性応答を誘発した。この矛盾は、ICによって誘発されるRF + B細胞増殖の程度が、（自己）抗原の抗体および性質の両方に依存することを示した。

【0075】

（ICによる活性化は、相補性レセプターの共結合（co-engagement）に依存しない）

抗ヌクレオソームおよび抗TNF ICの刺激能力の劇的な差異について考えられる説明は、前者のみがB細胞レセプター（BCR）とそのB細胞表面上の第二のレセプターとの両方に相乗的に結合することができるというものであった。相補性成分は、自己抗原ICに結合することが示されており、かつ理論上、CD19/CD21およびBCRと効果的に共結合するように働き得る場合、1つの潜在的な候補レセプターは、相補性レセプターCD21であった（Carterら、J. Immunol. 141, 457 - 463（1988））。しかし、AM14の重鎖トランスジェニックおよび軽鎖トランスジェニックを、CR1/2 Cr2欠乏性マウスから繁殖させた場合（Ahearneら、Immun. 4, 251 - 262（1996））、CR1/2の欠乏した同腹仔およびCR1/2の十分な同腹仔由来のRF + B細胞は、IgG2a抗ヌクレオソームmAbおよび自己免疫血清に対して同等に応答した（図3）。コントロールのRF同腹仔由来のB細胞は、いかなる形態のIgG2aに対しても応答せず、これにより、この研究において使用したリガンドの特定の性質が確認された。マイトジェン低メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチドを、コントロール刺激として含めた。これらのデータは、相補性レセプターが自己抗体/自己抗原ICに対するRF + B細胞応答に必要とされないことを示す。

【0076】

（MyD88依存性レセプターの役割）

潜在的な候補レセプターは、Toll様レセプター（TLR）ファミリーのメンバーを含んだ。これらのパターン認識レセプターは、Drosophilaにおいて最初に記載され、ここで、これらは、抗真菌ペプチドの放出を誘発することが示されている（Lemaîtreら、Cell 86, 973 - 983（1996））。その後同定された哺乳動物ホモログは、保存的微生物産物（すなわち、LPS、微生物リボタンパク質、および低メチル化CpG DNA）（病原体関連分子パターン（PAMPs）と呼ばれる（Medzhitovら、Nature 388, 323 - 324（1997）；Akiraら、Nat. Immunol. 2, 675 - 680（2001）））の種を認識することが見出された。初期の研究は、先天性免疫系の細胞に対する微生物産物の効果に焦点を当てており、ここで、これらは、広範な炎症性メディエーターの放出を刺激することが見出された（Akiraら、Nat. Immunol. 2, 675 - 680（2001））。しかし、外因性の微生物リガンドに加えて、TLRもまた、損傷性またはストレス性（str

10

20

30

40

50

ess ed) の哺乳動物細胞から放出される外因性リガンドを認識し得ることが、後に示された (Li ら、J. Immunol. 166, 7128 - 7135 (2001))。全ての公知の哺乳動物 TLR シグナル伝達経路は、アダプタータンパク質 MyD88 を使用するが (Akira ら、Nat. Immunol. 2, 675 - 680 (2001))、TLR4 の場合において、さらなる MyD88 依存性経路が、記載されている (Hornig ら、Nat. Immunol. 2, 835 - 841 (2001))。

【0077】

自己抗体 / 自己抗原 IC に対する RF + B 細胞応答を媒介する際の TLR の潜在的な役割を研究するために、本発明者らは、AM14 導入遺伝子を、MyD88 - / - バックグラウンド上に交雑させた (Adachi ら、Immunity 9, 143 - 150 (1998))。RF - MyD88 + / + 子孫 (野生型)、RF + MyD88 + / + 子孫、および RF + MyD88 - / - 子孫由来の B 細胞 (PCR 分析と FACS 分析との組み合わせによって同定される (図 4A ~ 4B)) を、それらが抗 IgM、CpG ODN、および LPS に応答する能力、ならびに抗ヌクレオソーム mAbs および自己免疫血清のパネルに 10 応答する能力について評価した。MyD88 欠乏性マウス由来の B 細胞は、抗 IgM に正常に応答したが、刺激性 CpG DNA には応答することができなかった (Hacke ら、J. Exp. Med. 192, 595 - 600 (2000))。これらの LPS に対する応答は、野生型マウスにおけるよりもかなり低かったが、MyD88 による部分的な活性化と一致して、依然として検出可能であり、そして LPS に対してのみ弱く応答した (これは、MyD88 依存性機構を介して部分的に刺激することが知られている (Hornig ら、Nat. Immunol. 2, 835 - 841 (2001))) (図 4C)。20 最も劇的には、RF + MyD88 - 欠乏性マウス由来の B 細胞は、完全に、抗ヌクレオソーム mAbs PR1 - 3 または PL2 - 3 に対して無応答性であるか、または RF + MyD88 + / + B 細胞を効果的に刺激するいかなる自己免疫血清に対して無応答性であった (図 4C)。これらの結果は、自己抗体 / 自己抗原 IC が、RF + B 細胞に対して部分的に刺激性であることを明確に示している。なぜなら、これらは、BCR と MyD88 依存性レセプターとの両方に相乗的に結合するからである。

【0078】

低メチル化 CpG モチーフは、細菌 DNA の共通の特徴であるが、これらはまた、哺乳動物 DNA プロモーターエレメントにも存在する (Singal および Ginder Blood 93, 4059 - 4070 (1999))。CpG オリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN) に対する B 細胞応答は、TLR9 によって媒介されるので (Hemmi ら、Nature 408, 740 - 745 (2000))、本発明者らは、クロマチン含有 IC が、TLR9 に共結合することによって RF B 細胞を刺激し得ると仮定した。CpG S - ODN に対する TLR9 媒介性応答は、クロロキンおよび塩化アンモニウムに対する感受性によって決定されるように、エンドソームの酸化および / または成熟のための推定される必要条件によって、他の公知の TLR シグナル伝達経路と区別される (Yi ら、J. Immunol. 160, 4755 - 4761 (1998)) ; Hacke ら、EMBO J. 17, 6230 - 6240 (1998))。コンカナマイシン B およびパ20 フィロマイシン A は、エンドソームの酸化を担う V 型 ATPase の特定のインヒビターである (Benaroch ら、EMBO J. 14, 37 - 49 (1995))。RF + B 細胞の酸化における TLR9 の役割を評価するために、mAb PL2 - 3 および公知の TLR2 (リボペプチド、ポリン (porin) B) (Massari ら、J. Immunol. 168: 1533 - 1537, 2002)、TLR4 (LPS)、および TLR9 (CpG S - ODN 1826) リガンドの刺激能力に対するクロロキン、コンカナマイシン B、パフィロマイシン A、および塩化アンモニウムの効果を決定した。予測されるように、クロロキンは、CpG S - ODN 応答を阻害し、そしてこれらのインヒビターは、TLR2 リガンドおよび TLR4 リガンドに対してほとんど効果がなかった。特に、クロロキンをブロックする 4 つ全ての因子はまた、mAb PL2 - 3 に対する RF + B 細胞応答を阻害した (図 5A および 5B)。クロロキンは、慢性関節リウマチおよ30

びSLEを含む自己免疫疾患に対する有効な処置であるので、クロロキンへの関連は興味深い(Canadian Hydroxychloroquine Study Group, N. Engl. J. Med. 324, 150-154 (1991); Furstら、Arth. Rheu. 42, 357-365 (1999))。従って、本発明者らのデータは、クロロキンの治療効果が、TLR媒介性シグナル(これは、自己抗体産生または炎症誘発性メジエーターの産生に寄与する)と干渉するその能力に、少なくとも部分的に起因することを示唆している。

【0079】

刺激性CpG S-ODN 1826に対するB細胞応答はまた、密接に関連したインヒビターCpG S-ODN(例えば、S-ODN 2088)の群によってブロックされ得る(Lenartら、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 4, 247-256 (2001))。本発明者らは、S-ODN 2088が、S-ODN 1826に対する増殖性応答を大いに阻害するが、抗IgMまたは本発明のTLR2リガンドおよびTLR4リガンドに対する応答に効果がないことを見出した(図5Cおよび5B)。最も有意には、S-ODN 2088はまた、mAb PL2-3に対するRF+B細胞応答を劇的にブロックした。全体的に、これらのデータは、RF+B細胞活性化における、エンドソームプロセッシングおよび/またはエンドソーム関連TLR(最も好ましくは、TLR9)の結合に強く関連する。

【0080】

外来性抗原に対する従来型のB細胞応答のT依存性特性と同様に、自己反応性B細胞クローンがアイソタイプスイッチングおよび体細胞性変異を受け得ることが明確に示された(Shlomchikら、Nature 328, 805-811 (1987))。しかし、より最近の報告によって、自己反応性B細胞は、末梢リンパ組織における従来型のB細胞と分離し得ることが示唆され;自己反応性B細胞は脾性白脾髄^{2 6} 髄質(splenic white pulp^{2 6} pulp)の周辺帯に局在する傾向がある(Zengら、J. Immunol. 164, 5000-5004 (2000))が、その一方で、従来型のB細胞は、濾胞性領域を目指すことが示唆されている。さらに、いくつかの例において、自己反応性B細胞の増殖および体細胞性変異は、その胚中心(germinal center)の外側で起こり得る。これらの分散性局在パターンは、刺激性の自己抗体/自己抗原ICのこれらの部位における優勢な集積を反映し得る。あるいは、この相対的に特有のホーミングパターン(homing pattern)は、BCR/TLR結合の総合効果に応答して誘発される特徴的なケモカインレセプタープロファイルから生じ得る。将来の研究では、BCR/TLR二重結合を通して活性化されたB細胞からBCRクロスリンキングのみを通して活性化されたB細胞の機能特性を比較する必要がある。

【0081】

DNA/ヌクレオソームを認識する自己抗体は、SLE患者およびSLEのマウスルーブスモデルにおいて限定的かつ最も優勢な特異性であるが、RFは、SLE患者、自己免疫易発性lprマウス、およびRA患者のサブセットの特徴である。注目すべきことに、これらの同じ自己抗原は、リンパ球の恒常性または自己抗原代謝を破壊する変異によって生じる多くの新規マウス自己免疫モデルにおける標的である(Bottorら、Nature Genetics 19, 56-59 (1998); Bickersstaffら、Nature Medicine 5, 694-697 (1999); Napireiら、Nat. Gen. 25, 177-180 (2000); Scottら、Nature 411, 207-211 (2001))。これらの特徴的な特異性の優勢の理由は、長い間探し求められてきた。本発明者らのデータは、説明、すなわち、クロマチン含有免疫複合体によって媒介されるBCR/TLRシグナル伝達事象の強力な相乗的効果を提供する。本発明者らの実験系(この系は、エンドソーム/リソソーム局在TLR9に依存している(Hackerら、EMBO J. 17, 6230-6240 (1998)))において、このBCRの自己抗体/自己抗原IC結合が、IC関連抗原のエンドサイトーシスを誘発して、これによって、エンドソーム結合TLR9に対するクロマチンフラグメントの高効

10

20

30

40

50

率送達が生じると結論付けることが妥当である。公開された研究 (Bellら, J. Clin. Invest. 85, 1487~1496 (1990); Bellら, Clin. Immunol. Immunopath. 60, 1326 (1991)) とは対照的に、本発明者らが培養上清またはクロマチンフラグメントのいずれかのみを用いてB細胞を活性化させることは不可能であった。マウスの他の系統が本発明者らのフラグメントに対してより応答性であるか否かということは未だ決定されていない。

【0082】

現存の実験モデルを超越して、BCR/TLR二重結合の原理は、一般にいう自己免疫についての広範な意味を有する。ハプテン化LPSおよびハプテン化LPS LPS結合SRBCのようなモデルリガンドはまた、BCRおよびTLRを同時刺激し得、そして、それらの関連レセプターを有するB細胞に対して、驚くほどに、強力かつ特異的である (Pike, Methods Enzymol. 1987; 150: 265~75, 1987)。従って、この様式での活性化は、広範で多様な設定における末梢B細胞寛容性の消失における基礎的な事象である可能性があり；他の自己抗原は、TLR9よりもTLRを通じてシグナル伝達し得る。全体として、これらのデータは、自己免疫における適応免疫系の異常な活性化での内因性TLRリガンドの重要な役割を確立し、そして、如何にして、この自己抗体レパートリーが、しばしば、細胞下の核酸/タンパク質粒子を認識する傾向にあるかを説明する (Tan, E. Adv. Immunol. 44, 93~151 (1989))。

【0083】

(方法)

(マウス) 以前に記載される (Hannumら, J. Exp. Med. 184, 1269~1278 (1996); Rifkinら, J. Immunol. 165, 1626~1633 (2000)) MRL+/+AM14 BCR Tgマウスを、Cr2欠失マウス (Dr. Michael Carroll (Harvard Medical School, Boston) の好意により提供された) とかけ合わせ、そして、そのF1子孫を交雑してAM14 Cr2欠失マウスおよびCr2の十分なコントロールマウスを作製した。MyD88-/-マウス (もともとは、Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan) により作製され (Adachiら, Immunity 9, 143-150 (1998))、そして、Dr. Douglas Golenbock (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA) の好意により提供された) をAM14 MRL+/+マウスとかけ合わせ、AM14 MyD88-/-およびコントロール同腹仔である子孫を作製した。RF+子孫を、まずPCRによって同定し、そして、これらの同一性を、記載された (Shlomchikら, Int. Immunol. 5, 1329-1341 (1993)) 4-G7モノクローナル抗イディオタイプを使用して、末梢血リンパ球および脾臓細胞のフローサイトメトリー分析によって確認した。補完的レセプターの遺伝子型を、FITC結合7G6抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) を使用するフローサイトメトリーによって決定した。MyD88遺伝子型を以下のプライマーを使用してPCRによって決定し、それぞれ約550bpおよび約750bpの野生型産物およびノックアウト産物を得た：MyD88F (5'-TGG CAT GCC TCC ATC ATA GTT AAC C-3') [配列番号1]、MyD88R (5'-GTC AGA AAC AAC CAC CAC CAT GC-3') [配列番号2]、およびneoR (5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC G-3') [配列番号3] (MWG Biotech, High Point, NC)。

【0084】

(細胞培養および試薬) 脾臓細胞調製物を、T減損 (T-deplete) させ、そして、40時間~48時間に亘って適切なリガンドを使用して培養した。いくつかの実験において、B細胞を、前述 (Rifkinら, J. Immunol. 165, 1626~1

10

20

30

40

50

633(2000))のように、CD40Lを用いてブレインキューベートした。最終的な16時間の培養の間の³[H]-チミジン取り込みによって、増殖をアッセイした。三連の培養からの抗IgM応答の平均パーセンテージとして、データを表す。この抗IgM応答のパーセンテージは、以下の式に従って計算した：

$$[(\text{cpm実験条件} - \text{cpm CD40L単独}) / (\text{cpm 抗IgM} - \text{cpm CD40L単独}) \times 100]。$$

【0085】

(含まれたリガンド)： ヤギ抗マウスIgM F(ab')₂ (15 μg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)；ヌクレオソーム特異的mAbである、PR1-3 (IgG2a^j)、PL2-3 (IgG2a^j)、およびPL2-8 (IgG2b) (これらの全ては、50 μg/mlであった) (これらは、Dr. Marc Monestier (Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA)のご好意によって提供された (Monestier and Novick Mol. Immunol. 33, 89-99 (1996))；10 μg/ml LP S (Sigma, St. Louis, MO)；0.3~2 μg/ml刺激性CpG S-ODN 1826 (Yiら, J. Immunol. 160, 4755-4761 (1998)) (Oligo's Etc, Wilsonville, OH)、10 μg/ml Neisseria MeningitidisポリリンB (Dr. Lee Wetzler (Boston University School of Medicine, Boston, MA)のご好意によって提供された)；10 μg/ml合成リポペプチドPam₃Cys-Sk₄ (これは、Dr. G. Jung, Univ. of Tuebingen, Germanyにより、Dr. Doug Golenbockのご好意によって提供された)；ならびに種々の濃度のTNP-BSAに複合体化された抗TNP mAb Hy1.2 (IgG2a^a)およびC1040 (IgG2a^b) (Hannumら, J. Exp. Med. 184, 1269~1278 (1996)) (双方とも50 μg/mlであった)。いくつかの実験において、DNase I (IV型) (Sigma, St. Louis, MO)、クロロキン (Sigma)、コンカナマイシンB (concanamycin B)、バフィロマイシンA (bafilomycin A) (Sigma)、または12 μg/mlの阻害性CpG S-ODN 2008 (Lenartら, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 4, 247-256 (2001)) (Oligo's Etc.)を、リガンドの添加の、15分間~30分間から2時間前に培養物に添加した。全てのmAbおよびODNの調製物を、Limulus Amebocyte Lysate ELISA (Bio-Whittaker, Walkersville, MD)によって、遊離した内毒素であったことを示した。

【0086】

(実施例3)

本発明者らは、樹状細胞が、FcレセプターおよびTLR9のその後の結合を介するクロマチン含有免疫複合体により活性化されることをさらに示した。これは、B細胞について記載した機構に類似の機構であるが、但し、B細胞の場合に、関連する細胞表面レセプターは、B細胞抗原レセプターであるが、樹状細胞において、この関連する細胞表面レセプターは、Fcγレセプター (FcγR) である。両方の細胞表面レセプターとも、エンドソーム/リソソーム画分中のTLR9に、クロマチンを送達する役割を担う。

【0087】

図8A~図8Cにおいて、樹状細胞はTLR9を介して特異的に活性化され得て、そしてこの活性化はODN2088でのTLR9阻害によってブロックされ得るということを発明者らは示す。特異的なTLR9活性化リガンドODN1826が、TNF-αおよびIL-12の産生を樹状細胞 (8A, 8B) により誘導し、そしてさらに同時刺激分子 (8C) のアップレギュレートを誘導するという点において、本発明者らがその後の実験 (以下の表1および表2において示される) において使用した樹状細胞は機能的TLR9を発

現するということが、上記の実験によって実証された。ODN 2088 が ODN 1826 媒介性活性をブロックするが LPS 媒介性活性化に対してはなんら影響を持たないので、ODN 2088 は、TLR 9 媒介性活性化の特異的なインヒビターである (8A、8B、8C に示される)。

【0088】

6 日間に亘る GM-CSF および IL-4 のインビトロ培養によって、樹状細胞を C57BL/6 マウスの骨髄から作製した。第 6 日目において、CD11c 陽性の樹状細胞を、磁性ビーズ (Miltenyi Biotec) を使用して単離し、そして、ODN 2088 (TLR 9 を介するシグナルで伝達を特異的にブロックする阻害性オリゴデオキシヌクレオチド) とともに、30 分間のプレインキュベートしたかまたは、プレインキュベートをしなかった。次いで、刺激性 ODN 1826 (CpG, 3 µg/ml) (TLR 9 を介して特異的に活性化する) または リボポリサッカリド (LPS, 10 µg/ml) (これは、TLR 4 を介して活性化する) あるいは培養培地単独 (培地) を、これらの培養物に添加した。48 時間後、培養物の上清中の TNF-α (8A) および IL-12 (8B) のレベルを、ELISA によって測定した (結果を、405 nm の吸収によって決定される OD 単位として示す)。この上清の除去の後に、細胞を回収して、そして同時刺激分子 CD86 (8c) の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。培地単独の存在下の CD86 の発現レベルは、刺激されなかったとしてみなされるが、刺激 (ODN 1826 または LPS) の存在下の CD86 の発現レベルは刺激されたとしてみなされる。

10

20

【0089】

以下の表 1 は、クロマチン含有免疫複合体 (クロマチン自己抗原と複合体化している自己抗体を含む) は、樹状細胞を活性化して、TNF-α を産生するが、その一方で、外来性の抗原 (TNP-BSA) を含む免疫複合体は、樹状細胞の活性化を誘導しないことを示す。さらに、クロマチン含有免疫複合体によって誘導される活性化は、TLR 9 特異的インヒビター ODN 2088 によって完全にブロックされ、このことは、(おそらくは、このクロマチン含有免疫複合体中のクロマチンによる) TLR 9 の結合が、活性化プロセスの本質的な構成要素であることを示している。

【0090】

(表 1)

30

【0091】

【表 1】

表 1

刺激	なし	2088
培地(刺激なし)	<50	<50
ODN 1826	2347	<50
LPS	2514	2393
PL2-3	1653	<50
TNP/αTNP-BSA IC 1:1	<50	<50
TNP/αTNP-BSA IC 4:1	<50	<50
TNP/αTNP-BSA IC 16:1	<50	<50

40

表 1 は、クロマチン含有免疫複合体によって誘導される樹状細胞 TNF-α 産生は、TLR 9 特異的インヒビター ODN 2088 によってブロックされることを示している。6 日間に亘る GM-CSF および IL-4 とのインビトロ培養によって、樹状細胞は、C57

50

B L / 6 マウスの骨髄から作製した。第 6 日目において、C D 1 1 c 陽性の樹状細胞を、磁性ビーズ (M i l t e n y i B i o t e c) を使用して単離した。次いで、これらの樹状細胞を、 $12 \mu\text{g} / \text{ml}$ の O D N 2 0 8 8 とともに、30 分間に亘って、プレインキュベートしたかまたは、プレインキュベートをしなかった。次いで、刺激性 O D N 1 8 2 6 ($3 \mu\text{g} / \text{ml}$) (T L R 9 を介して特異的に活性化する)、リポポリサッカリド (L P S , $10 \mu\text{g} / \text{ml}$) (これは、T L R 4 を介して活性化する)、抗クロマチン抗体 P L 2 - 3 ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$)、3 つの異なる抗体 / タンパク質比の α - T N P / T N P - B S A 免疫複合体 ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$)、あるいは培養培地単独 (培地) を、これらの培養物に添加した。48 時間後、培養物の上清中の T N F - α のレベルを、E L I S A によって測定した (結果を、 pg / ml として示す; アッセイの感度の低レベルは $50 \text{pg} / \text{ml}$ であった)。3 つの類似の実験のうちの代表的実験を示す。 10

【 0 0 9 2 】

表 2 は、クロマチン含有免疫複合体が、野生型マウス由来の樹状細胞により T N F - α 産生を誘導する (これはまた、O D N 2 0 8 8 の非存在下で、表 1 中に示された研究においても示される) が、F c レセプター γ 鎖欠失マウスに由来する樹状細胞による T N F - α の産生は全く誘導されないことを示す。このことは、活性化 F c レセプターが、クロマチン含有免疫複合体による樹状細胞活性化にとって絶対に必要とされることを実証している。

【 0 0 9 3 】

(表 2)

20

【 0 0 9 4 】

【 表 2 】

刺激	野生型	Fcレセプター γ 鎖欠損
培地 (刺激なし)	< 50	< 50
ODN 1826	7899	2373
LPS	7056	3411
PL2-3	4554	< 50
PL2-8	3964	< 50
TNP/ α TNP-BSA IC 1:1	< 50	< 50
TNP/ α TNP-BSA IC 4:1	< 50	< 50

30

表 2 は、クロマチン含有免疫複合体が、野生型マウス由来の樹状細胞による T N F - α 産生を誘導するが、F c レセプター γ 鎖欠損マウス由来の樹状細胞による T N F - α 産生を誘導しないことを立証する。C 5 7 B L / 6 野生型マウスの骨髄および F c レセプター γ 鎖を欠く C 5 7 B L / 6 マウスから、骨髄細胞を G M - C S F および I L - 4 とともに 6 日間インビトロ培養することにより、樹状細胞を産生した。6 日目に、C D 1 1 c ポジティブ樹状細胞を、磁性ビーズを使用して単離した。次いで、刺激性 O D N 1 8 2 6 ($3 \mu\text{g} / \text{ml}$) (これは、T L R 9 を介して特異的に活性化する)、リポポリサッカリド (L P S , $10 \mu\text{g} / \text{ml}$)、抗クロマチン抗体 P L 2 - 3 ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$; I g G 2 a) および P L 2 - 8 ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$; I g G 2 b)、2 つの異なる抗体 / タンパク質比の α - T N P / T N P - B S A 免疫複合体 ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$)、または培養培地のみ (培地) を、樹状細胞培養物に添加した。48 時間後、培養上清中の T N F - α のレベルを、E L I S A により測定した (結果を pg / ml として示す; アッセイの感度の低いレベルは、 $50 \text{pg} / \text{ml}$ である)。2 つの類似の実験の代表的な実験を示す。 40

50

【0095】

まとめると、上記の表1および表2に示すデータは、クロマチン含有免疫複合体によって誘導される樹状細胞の活性化が、活性化Fcγレセプターを介するシグナルおよびTLR9を介して媒介されるシグナルを必要とすることを立証する。

【0096】

このFcγR/TLR二重関与経路の機構および結果を評価するためのさらなる実験を、以下に概説する。

【0097】

(IFN-α産生樹状細胞サブセットの特徴づけ)

(マウス系統)自己免疫性狼瘡様マウス系統と非自己免疫性マウス系統との間の、樹状細胞およびマクロファージの機能における差が、記載されている。これらとしては、免疫複合体操作(Jonesら、Clin. Immunol. Immunopathol. 36:30-39, 1985; Magilavyら、J. Immunol. 131:2784-2788, 1983)、食作用(Russell, およびSteinberg Clin. Immunol. Immunopathol. 27:387-402, 1983)、Fcレセプターの発現および機能(Pritchardら、Current Biology. 10:227-230, 2000; Jiangら、Immunogenetics. 51:429-435, 2000)ならびにサイトカイン産生(Allegraら、J. Immunol. 159:5610-5619, 1997; Kohら、J. Immunol. 165:4190-4201, 2000)における差が挙げられる。従って、自己免疫性系統および非自己免疫性系統の両方由来の樹状細胞を直接比較することが重要である。MRL+/+および(NZB×NZW)F1は、2種の自己免疫性狼瘡様系統であり、そしてC57BL/6およびBALB/cは、使用した2種の非自己免疫性系統である。

【0098】

(樹状細胞サブセットの精製)SLEの病因において特に重要な2つの樹状細胞のサブセットがある:CD11c+ CD8α+およびCD11c+ B220+ Gr-1+。これらの細胞は、脾臓から直接得られるか(Hochreinら、J. Immunol. 166:5448-5455, 2000; Nakanoら、J. Exp. Med. 194:1171-1178, 2001)、またはFlt3リガンドの存在下で骨髓細胞のインビトロ培養によって産生されるかのいずれかである(Braselら、Blood. 96:3029-3039, 2000; Gillietら、J. Exp. Med. 195:953-958, 2002)。脾臓の樹状細胞を、記載されるとおり(Vremecら、J. Immunol. 164:2978-2986, 2000)に単離し、そして適切な蛍光抗体染色の後、特定の樹状細胞サブセットを、MoFloセルソーター(Cytomation, Fort Collins, CO)を用いて、分画および収集する。CD11c+ CD8α-樹状細胞サブセット(これもまた脾臓中に見られる)を、標的のCD11c+ CD8α+樹状細胞サブセットと同時に単離し、そして実験コントロールとして使用する。

【0099】

骨髓由来樹状細胞を産生するために、骨髓細胞を収集し、そして確立されたプロトコル(Gillietら、J. Exp. Med. 195:953-958, 2002; Laborら、J. Immunol. 162:168-175, 1999)を用いて、組換えマウスFlt3リガンドの存在下でインビトロで6~10日間培養する。Flt3リガンド中で増殖した骨髓細胞は、標的の集団(すなわち、CD11c+ CD8α+樹状細胞およびCD11c+ B220+ Gr-1+樹状細胞)が濃縮されている。これらの集団を、脾臓由来の樹状細胞について、上記のとおりセルソーティングにより分画する。

【0100】

(特定の樹状細胞サブセットにおけるTLR9の発現の決定)TLR9メッセンジャーRNAを、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により測定する。さらに、

T L R 9 特異的刺激性リガンド (S - O D N 1 8 2 6 (B a l l a s ら、 J . I m m u n o l . 1 6 7 : 4 8 7 8 - 4 8 8 6 , 2 0 0 1)) に対する樹状細胞サブセットの応答を、同時刺激性 (c o - s t i m u l a t o r y) 分子の発現およびサイトカイン産生を測定することにより比較する。マウス T L R 9 に対する特異的抗体を、当業者に公知の技術を用いて産生し得る。

【 0 1 0 1 】

(I C の調製ならびに樹状細胞による I C の結合および取り込みの評価)
(免疫複合体の調製) 抗ヌクレオソーム / クロマチン I C を、抗ヌクレオソームモノクローナル抗体 P L 2 - 3 (I g G 2 a)、P L 2 - 8 (I g G 2 b) および P L 9 - 7 (I g G 3) を、脾臓細胞の 2 4 時間インビトロ培養物から得た上清と共にインキュベートすることにより調製する。クロマチンは、培養脾臓細胞から自発的に放出され (B e l l ら、 J . C l i n . I n v e s t . 8 5 : 1 4 8 7 - 1 4 9 6 , 1 9 9 0)、そしてこのクロマチンに対する抗ヌクレオソーム抗体の結合は、C 1 q 免疫アッセイ (R i f k i n ら、 J o u r n a l o f I m m u n o l o g y . 1 6 5 : 1 6 2 6 - 1 6 3 3 , 2 0 0 0) を使用して測定され得る I C の形成を生じる。本発明者らは、培養液と予めインキュベートしたビオチン化 P L 2 - 3 が、フローサイトメトリーによって検出されるように、リウマチ因子 B 細胞に特異的に結合し ; 単量体のビオチン化 P L 2 - 3 は、結合しないことをさらに示している。非自己抗原コントロール I C は、抗 T N P モノクローナル抗体 H y 1 . 2 (I g G 2 a) または C 4 0 1 0 (I g G 2 b) を使用し、そしてそれらを T N P - B S A と共にインキュベートして作製し、I C 形成もまた、示されたように (L e a d b e t t e r ら、 N a t u r e . 4 1 6 : 6 0 3 - 6 0 7 , 2 0 0 2)、C 1 q 結合によって確認する。さらなる非自己抗原コントロール I C を、本研究所で調製した抗オボアルブミンモノクローナル抗体 O v 1 (I g G 2 a) および O v 2 (I g G 2 b) を使用し、そしてそれらをオボアルブミンとインキュベートすることにより作製する。C 1 q 結合アッセイにおいて I C 形成を立証すると同時に、さらなる確証的なアッセイとして、F P L C をまた使用する。

【 0 1 0 2 】

(樹状細胞による免疫複合体の結合および取り込み) I C および樹状細胞を含む実際の実験的培養物をセットアップする前に、異なる系統由来の精製した樹状細胞サブセットが I C を結合および取り込み得る程度を決定することが必要である。このことは、I C 操作 (J o n e s ら、 C l i n . I m m u n o l . I m m u n o p a t h o l . 3 6 : 3 0 - 3 9 , 1 9 8 5 ; M a g i l a v y ら、 J . I m m u n o l . 1 3 1 : 2 7 8 4 - 2 7 8 8 , 1 9 8 3)、および F c レセプターの発現 (P r i t c h a r d ら、 C u r r e n t B i o l o g y . 1 0 : 2 2 7 - 2 3 0 , 2 0 0 0 ; J i a n g ら、 I m m u n o g e n e t i c s . 5 1 : 4 2 9 - 4 3 5 . , 2 0 0 0) に関して、自己免疫性マウス系統と非自己免疫性マウス系統との間の報告された差を考慮すると、特に重要である。実験的アプローチは、フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡の組合せを使用して、免疫複合体の抗体構成要素を追跡することである。抗ヌクレオソーム抗体 P L 2 - 3 (I g G 2 a)、P L 2 - 8 (I g G 2 b) および P L 9 - 7 (I g G 3) を、標準的な手順を用いてビオチン結合体化し、そしてビオチン - 抗ヌクレオソーム / クロマチン I C を、上記のとおり
に調製する。ビオチン - 抗ヌクレオソーム / クロマチン I C が、機能性を保持していることを立証するために、ビオチン - P L 2 - 3 / クロマチン I C が、非ビオチン - P L 2 - 3 / クロマチン I C と同じ程度にリウマチ因子 B 細胞の増殖を誘導し得るかどうか評価する (R i f k i n ら、 J o u r n a l o f I m m u n o l o g y . 1 6 5 : 1 6 2 6 - 1 6 3 3 , 2 0 0 0)。I g G 2 b および I g G 3 がリウマチ因子 B 細胞によって認識されないの、このようにしてビオチン - P L 2 - 8 / クロマチン I C およびビオチン - P L 9 - 7 / クロマチン I C を、試験し得ないが、ビオチン結合体化の機能的影響は、アイソタイプに関わらず同様であると推定される。アイソタイプが一致するビオチン - 抗 T N P / T N P - B S A I C およびビオチン - 抗オボアルブミン / オボアルブミン I C を、同様に調製する。複合体中に組み入れられていないビオチン結合体化抗体単独を、コン

トロールとして使用する。ビオチン結合体化 IC およびビオチン結合体化抗体単独を、異なる樹状細胞サブセットに添加し、そしてフローサイトメトリーを使用して、細胞表面の結合を検出する。ビオチン標識化合物を、特定の蛍光色素に結合体化された抗ビオチンモノクローナル抗体 (Molecular Probes: 抗ビオチンマウスモノクローナル抗体 2F5 Alexa Fluor 488 結合体) を用いて可視化する。続いて、抗ヌクレオソーム抗体 (ビオチン - 抗ヌクレオソーム / クロマチン IC)、抗 TNF 抗体 (ビオチン - 抗 TNF / TNF - BSA IC) または抗オボアルブミン抗体 (ビオチン - 抗オボアルブミン / オボアルブミン IC) の樹状細胞内部移行を、1 ~ 12 時間のインキュベーション期間および 3 % パラホルムアルデヒドでの固定後に、共焦点顕微鏡を使用して評価する。

10

【0103】

さらに、エンドソーム / リソソームコンパートメントに特異的な蛍光標識化モノクローナル抗体での同時染色によってか、または酸性オルガネラに区分化する蛍光 pH 指示薬 (Molecular Probes) の使用によって、共局在研究を実施する。

【0104】

(クロマチン含有 IC ならびに Toll 様レセプターおよび Fcγレセプターの役割の確立による樹状細胞活性化の測定)

(IC による樹状細胞活性化の測定) 上記で概説した抗ヌクレオソーム / クロマチン IC、抗 TNF / TNF - BSA IC および抗オボアルブミン / オボアルブミン IC を、樹状細胞サブセットと共にインキュベートし、同時刺激性分子産生およびサイトカイン産生の上方制御を測定することにより樹状細胞活性化を決定する。コントロールとしては、単量体の非複合体化抗体単独、抗原単独、TLR9 シグナル伝達に対するポジティブコントロールとして刺激性 CpG S - ODN 1826、TLR4 シグナル伝達に対するポジティブコントロールとして LPS および TLR2 シグナル伝達に対するポジティブコントロールとして porin B が挙げられる。サイトカインを、ELISA によって測定する。サイトカインとしては、IL - 12、TNF - α、IL - 10 および IFN - α が挙げられる。IL - 12 および TNF - α は、樹状細胞活性化のマーカーとして最も一般的に使用される 2 つのサイトカインであり (Banchereau ら、Annu. Rev. Immunol. 18: 767 - 811, 2000)、そして IFN - α は、CD11c + CD8α + 樹状細胞サブセットおよび CD11c + B220 + Gr - 1 + 樹状細胞サブセットの活性化に最も強く関連したサイトカインである。マクロファージにおける Fcレセプター結合が、それに続く刺激により誘導される IL - 10 産生を導き得、この刺激は、Fcレセプター結合の非存在下では、IL - 12 産生を導き、そして IL - 10 産生を導かないことが示されているので (Gerber および Mosser J. Immunol. 166: 6861 - 6868, 2001)、IL - 10 を測定することが必要である。MHC クラス II ならびに同時刺激性分子 CD80、CD86 および CD40 の増加した発現を、フローサイトメトリーによって決定する。

20

30

【0105】

(IC 媒介樹状細胞活性化における Toll 様レセプターおよび Fcγレセプターの役割) S - ODN 2088 は、TLR9 を介するシグナル伝達を特異的にブロックする阻害性 CpG S - ODN である (Leneret ら、Antisense and Nucleic Acid Drug Development. 11: 247 - 256, 2001)。本発明者らは、S - ODN 2088 が、リウマチ因子 B 細胞レセプタートランスジェニックマウス由来の B 細胞のクロマチン含有 IC に誘導される増殖を強く阻害することを示している (Leadbetter ら、Nature. 416: 603 - 607, 2002 (Leadbetter ら、Nature. 416: 603 - 607, 2002)。また、本発明者らは、S - ODN 2088 が、TLR9 を介して作用する刺激性 CpG S - ODN (例えば、S - ODN 1826) による樹状細胞活性化を完全に抑制することを示している。上記で概説した実験を、S - ODN 2088 の存在下または非存在下で実施して、IC 媒介樹状細胞活性化における TLR9 の役割を評価する。それらを

40

50

また、TLR9を介するシグナル伝達を抑制するエンドゾームの酸性化のインヒビター（クロロキン、コンカナマイシンBおよびバフィロマイシンAが挙げられる）の存在下および非存在下で実施する。さらに、C57BL/6 MyD88+/+マウス由来の樹状細胞を、C57BL/6 MyD88-/-マウス由来の樹状細胞と比較して、TLRシグナル伝達についての要件を確立する。

【0106】

Fcγレセプター（FcγR）シグナル伝達についての要件を評価するために、2.4.G2（マウスFcγRIIおよびFcγRIIIを特異的にブロックするモノクローナル抗体）（Araujo-Jorgeら、Infect Immun. 61:4925-4928, 1993）の存在下および非存在下で、実験をまた実施する。しかし、第3の型のマウスFcγレセプター、FcγIは、2.4.G2によってブロックされず、そしてIC誘導炎症応答を媒介し得る（Ioan-Facsinaayら、Immunity. 16:391-402, 2002, Barnesら、Immunity. 16:379-389, 2002）。樹状細胞は、3つのクラスのFcγR（FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIII）全てを発現する（RavetchおよびBolland, Ann. Rev. Immunol. 19:275-290, 2001）。従って、FcγRノックアウトマウスを使用して、さらなる研究を実施し得る。マウスは、Jackson Laboratoriesから入手可能であり、そしてこれらとしては、i)これらの2つのレセプターにより共有される、共通の刺激性シグナル伝達γ鎖のノックアウトによってFcγRIおよびFcγRIIを遺伝的に欠損させられたマウス（Takaiら、Cell. 76:519-529, 1994）、ii)FcγRIIIノックアウトマウス（Takaiら、Nature. 379:346-349, 1996）ならびにiii)FcγRIIIノックアウトマウス（Hazebosら、Immunity. 5:181-188, 1996）が挙げられる。

【0107】

（樹状細胞による抗原プロセッシングおよび抗原提示におけるICおよびTLR9の役割）CD4+自己反応性T細胞は、ヒトおよびこの疾患のマウスモデルの両方においてSLEの食作用の要である（Craftら、Immunol. Res. 19:, 1999; Hoffmann, Front. Biosci. 6:D1369-78, 2001; Shlomchikら、Nature Rev. Immunol. 1:147-153, 2001）。樹状細胞は、T細胞応答の開始に関与する重要な抗原提示細胞であり（Banchereauら、Annu. Rev. Immunol. 18:767-811, 2000）、そしてTLR9結合が、Th1型免疫応答の進行を強く促進することが示されている（Jakobら、J. Immunol. 161:3042-3049, 1998; Lipfordら、J. Immunol. 165:1228-1235, 2000）。TLR9結合が、免疫複合体内に含まれる抗原に対するT細胞応答を変えるかどうかを示すために、オボアルブミンを、記載されるように（Shirotaら、J. Immunol. 164:5575-5582, 2000）、刺激性CpG S-ODN 1826に結合体化する。抗オボアルブミンモノクローナル抗体Ov1（IgG2a）またはOv2（IgG2b）と共に、非結合体化オボアルブミンまたはオボアルブミン-CpG結合体をインキュベートすることにより、結果的にICを作製する。BALB/cマウス（H-2^d）由来の樹状細胞サブセットを、これらのICでパルスする。CD4+T細胞（これは、H-2A^dの状況でオボアルブミンを認識する）を、オボアルブミン特異的T細胞レセプタートランスジェニックマウス（DO11.10マウス）のリンパ節から精製する（Murphyら、Science. 250:1720-1723, 1990）。これらのCD4+T細胞を、ICパルスした樹状細胞と共に培養し、そして1次T細胞応答および2次T細胞応答の間のT細胞の増殖およびサイトカイン産生（IFN-γ、IL-4およびIL-2）を測定する。S-ODN 2088およびエンドゾーム酸性化のインヒビターを使用して、TLR9の役割を評価する。

【0108】

10

20

30

40

50

(参考文献)

1. Tan, E. Adv. Immunol. 44, 93 - 151 (1989).
2. Theofilopoulos, J. Exp. Med. 162, 1 - 18 (1985).
3. Wolfowicz, Clin. Immunol. Immunopath. 46, 382 - 395 (1988).
4. Shlomchik, Int. Immunol. 5, 1329 - 1341 (1993).
5. Jacobson, J. Immunol. 152, 4489 - 99 (1994).
6. Hannum, J. Exp. Med. 184, 1269 - 1278 (1996).
7. Wang, および Shlomchik, J. Exp. Med. 190, 639 - 649 (1999).
8. Rifkin, J. Immunol. 165, 1626 - 1633 (2000).
9. Emlen, J. Immunol. 148, 3042 - 3048 (1992).
10. Monestier および Novick Mol. Immunol. 33, 89 - 99 (1996).
11. Carter, J. Immunol. 141, 457 - 463 (1988).
12. Ahearn, Immunity 4, 251 - 262 (1996).
13. Lemaître, Cell 86, 973 - 983 (1996).
14. Medzhitov, Nature 388, 323 - 324 (1997).
15. Akira, Nat. Immunol. 2, 675 - 680 (2001).
16. Li, J. Immunol. 166, 7128 - 7135 (2001).
17. Horng, Nat. Immunol. 2, 835 - 841 (2001).
18. Adachi, Immunity 9, 143 - 150 (1998).
19. Hacker, J. Exp. Med. 192, 595 - 600 (2000).
20. Singal および Ginder Blood 93, 4059 - 4070 (1999).
21. Hemmi, Nature 408, 740 - 745 (2000).
22. Yi, J. Immunol. 160, 4755 - 4761 (1998).
23. Hacker, EMBO J. 17, 6230 - 6240 (1998).
24. Benaroch, EMBO J. 14, 37 - 49 (1995).
25. Massari, J. Immunol. (印刷中).
26. Group, T. C. H. S. N. Engl. J. Med. 324, 150 - 154 (1991).
27. Furst, Arth. Rheu. 42, 357 - 365 (1999).
28. Lenart, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 4, 247 - 256 (2001).
29. Shlomchik, Nature 328, 805 - 811 (1987).
30. Zeng, J. Immunol. 164, 5000 - 5004 (2000).
31. Botto, Nature Genetics 19, 56 - 59 (1998).
32. Bickersstaff, Nature Medicine 5, 694 - 697 (1999).
33. Naporei, Nat. Gen. 25, 177 - 180 (2000).
34. Scott, Nature 411, 207 - 211 (2001).
35. Bell, J. Clin. Invest. 85, 1487 - 1496 (1990).

10

20

30

40

50

36. Bellら、Clin. Immunol. Immunopath. 60, 1326 (1991).
37. Mollerら、Cell. Immunol. 4, 416 - 424 (1972).
38. Blancoら、Science. 294:1540 - 1543., 2001.
39. Vallinら、Clin. Exp. Immunol. 115:196 - 202, 1999.
40. Vallinら、J. Immunol. 163:6306 - 6313, 1999.
41. Cellaraら、Nat. Med. 5:919 - 923., 1999. 10
42. Siegalら、Science. 284:1835 - 1837., 1999.
43. Hooksら、N. Engl. J. Med. 301:5 - 8., 1979.
44. Ytterbergら、Arthritis Rheum. 25:401 - 406., 1982.
45. Bengtssonら、Lupus. 9:664 - 671., 2000.

ここで引用される参考文献および本明細書全体を通して引用される参考文献は、その全体が本明細書中で参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【0109】

本明細書中に組みこまれ、そして本明細書の一部を構成する添付の図面は、本発明の実施形態を図示し、詳細な説明と共に、本発明の目的、利益、および原理を説明し、例示するために用いられる。 20

【図1】図1は、AM14 RF + B細胞の抗ヌクレオソーム抗体 (PL2 - 3) 刺激が、DNase感受性であることを示す。IgG2a抗ヌクレオソーム抗体は、培地中のB細胞から放出されたクロマチンに結合し、そのIgG2a特異的抗原レセプターを介してB細胞に認識される、免疫複合体を形成する。AM14 RF + 脾臓細胞を、ヤギ抗マウスIgM F(ab')₂、PL2 - 3 (IgG2a^j抗ヌクレオソームmAb)、またはLPSの添加前に、15分間、種々の濃度のDNase I (0 μg/ml、5 μg/ml、15 μg/ml、または50 μg/ml) と共にプレインキュベートした。結果を、DNaseの非存在下における、各リガンドに対する最大応答のパーセントとして示す 30

【図2a】図2は、抗TNF/TNF - BSA ICが、AM14 RF + B細胞の増殖を効果的に刺激できなかったことを示す。抗TNF mAbs Hy1.2 (IgG2a^a) およびC4010 (IgG2a^b) を、種々の濃度のTNF - BSA [50 μg/ml (丸)、12.5 μg/ml (四角)、3.1 μg/ml (上向き三角)] と混合し、それぞれ、1:1、4:1、および16:1の抗体/タンパク質比を有するICを形成した。図2aにおいて、IC形成を、複合体化されていない抗体 (下向き三角) に対するC1q結合活性のシフトによって確認した。

【図2b】図2は、抗TNF/TNF - BSA ICが、AM14 RF + B細胞の増殖を効果的に刺激できなかったことを示す。抗TNF mAbs Hy1.2 (IgG2a^a) およびC4010 (IgG2a^b) を、種々の濃度のTNF - BSA [50 μg/ml (丸)、12.5 μg/ml (四角)、3.1 μg/ml (上向き三角)] と混合し、それぞれ、1:1、4:1、および16:1の抗体/タンパク質比を有するICを形成した。図2bにおいて、RF + B細胞増殖を刺激するための、上記の抗TNF/TNF - BSA ICの能力を、抗ヌクレオソームmAb PR1 - 3、非複合体化Hy1.2、C4010、または50 μg/ml TNF - BSAによって誘導される刺激と比較した。 40

【図3】図3は、RF + B細胞の自己抗体/自己抗原 - IC刺激が、補体レセプター依存性ではないことを示す。各2匹のWTコントロールマウス (灰色)、RF + CR + / + マウス (白色)、およびRF + CR - / - マウス (網掛け) 由来の脾臓細胞を、ヤギ抗マウスIgM F(ab')₂、CpG S-ODN 1826、抗ヌクレオソームmAbで 50

あるPR1-3 (IgG2a^j)、PL2-3 (IgG2a^j)、PL2-8 (IgG2b)、またはそれぞれの自己免疫マウス (lpr / gldおよびgld) 由来の3%血清で刺激した。

【図4a】図4a~4cは、RF+B細胞の自己Ab / 自己Ag - IC刺激が、MyD88依存性であることを示す。図4aにおいて、野生型 (WT) およびRF+MyD88-/-マウス由来のT-枯渴脾臓細胞を、B220およびイディオタイプ特異的抗体である4G7で染色した。

【図4b】図4a~4cは、RF+B細胞の自己Ab / 自己Ag - IC刺激が、MyD88依存性であることを示す。図4bにおいて、MyD88 WTまたはノックアウトマウスをPCRによって同定した。

【図4c】図4a~4cは、RF+B細胞の自己Ab / 自己Ag - IC刺激が、MyD88依存性であることを示す。図4cにおいて、各2匹のWT (灰色)、RF+MyD88+/+ (白色)、RF+MyD88-/- (網掛け) マウス由来の脾臓細胞を、抗IgM F(ab')₂、CpG S-ODN 1826、LPS、抗ヌクレオソームmAbであるPR1-3、PL2-3、PL2-8、または3% lpr / gld血清で刺激した。抗IgM刺激培養物についての総cpmは、83,414 / 39,049 (WT); 93,126 / 61,315 (RF+MyD88+/+); および39,826 / 57,484 (RF+MyD88-/-) であった。結果を、抗IgM応答のパーセントとして示し、これらの結果は、4つの別々の実験を示す。

【図5】図5a~5cは、RF+B細胞の自己Ab / 自己Ag - IC刺激が、TLR9シグナル伝達経路のインヒビターによってブロックされ得ることを示す。図5aにおいて、RF+B細胞を、1μg/mlまたは2μg/mlのクロロキンで15分間プレインキュベートするか (a)、コンカナマイシンBで2時間プレインキュベートするか (b)、または阻害性CpG S-ODN 2088と共に (30分間) プレインキュベートし (c)、その後刺激性リガンドである抗IgM F(ab')₂、5~50μg/ml PL2-3、0.3~2.0μg/ml CpG S-ODN 1826、LPS、リポペプチド、もしくはポリリン (porin) Bを添加した。図5Bにおいて、RF+B細胞を、刺激性リガンドの添加前に、12μg/mlのCpG S-ODN 2088と共に30分間プレインキュベートした。結果を、インヒビターの非存在下における抗IgM応答のパーセントとして示す。(図5a) および (図5c) 中のデータは、2~4回の実験を示し、一方 (図5b) のデータは、2回の実験の平均値である。

【図6】図6A~Bは、MyD88欠損 (MyD88-/-) Fas充足マウスを、MyD88-充足 (MyD88+/+) Fas-欠損 (lpr lpr) 自己免疫マウスと交配して、MyD88-/- lpr / lpr マウスおよび適切なコントロール群を作成した実験の結果を示す。同一年齢のMyD88+/+ lpr lpr (図6A) およびMyD88-/- lpr / lpr (図6B) の同腹子 (12~13週齢) の血清中の抗核抗体 (ANA) を、以前に記載されたように (Rifkinら、Journal of Immunology、161:5164-5170、1998)、基質としてHEp-2細胞を使用して間接的な免疫蛍光によって検出した。罹患した自己免疫MRL-lpr / lpr マウス由来の血清をポジティブコントロールとして利用し、そして非自己免疫BALB/cマウス由来の血清をネガティブコントロールとして利用した。このインビボ実験は、標準マウス株および広範に使用された狼瘡マウス株において、抗体産生が、MyD88を介するシグナル伝達を必要とすることを示す。このことは、TLR活性化が、このモデルにおいて狼瘡の発症のために必要であることを強く示唆する。

【図7】図7A~7Bは、B細胞が、TLR9を介して活性化され得ること、およびこの活性化がODN2088でのTLR9阻害によってブロックされ得ることを示す。B細胞は、MRL+/+マウスの脾臓から精製され、そして種々の用量のODN2088 (TLR9を介するシグナル伝達を特異的にブロックする阻害オリゴデオキシヌクレオチド) と共に30分間プレインキュベートされるかまたはプレインキュベートされないかのいずれかであった。次いで、抗IgM F(ab')₂ (抗-IgM) (B細胞レセプターを介

10

20

30

40

50

して活性化する(7A))または刺激性ODN1826(TLR9を介して特異的に活性化する(7B))を、培養物に添加した。20~24時間後、³[H]チミジンを培養物に加え、さらに14~18時間後、増殖を、LKB Wallac 1212 Rack beta 計数器を使用してチミジン取りこみを測定することによって決定した。TLR9を介する刺激のみがODN2088によってブロックされ、このことは阻害効果(B細胞レセプター架橋によって誘導された刺激が阻害されないこと)の特異性を示している。

【図8A】図8A~8Cは、TLR9を介して特異的に活性化され得る樹状細胞およびこの活性化が、ODN2088でのTLR9阻害によってブロックされ得ることを示す。

【図8B】図8A~8Cは、TLR9を介して特異的に活性化され得る樹状細胞およびこの活性化が、ODN2088でのTLR9阻害によってブロックされ得ることを示す。

【図8C】図8A~8Cは、TLR9を介して特異的に活性化され得る樹状細胞およびこの活性化が、ODN2088でのTLR9阻害によってブロックされ得ることを示す。

【図9】図9は、クロマチン含有免疫複合体媒介性B細胞増殖に対するODN2088の阻害効果が持続性であることを示す。B細胞は、MRL+/+マウスの脾臓から精製され、12μg/mlのODN2088と共に16~20時間、プレインキュベートされるかまたはプレインキュベートされないかのいずれかであった。このプレインキュベーション後、この細胞を洗浄し、培養物からODN2088を除去し、次いで、このB細胞を培地のみでかまたは12μg/mlの新たなODN2088と共にかのいずれかで培養した。30分後、抗クロマチンモノクローナル抗体PL2-3(50μg/ml)またはLPS(10μg/ml)を培養物に加えた。20~24時間後、³[H]チミジンを培養物に加え、さらに14~18時間後、増殖を、LKB Wallac 1212 Rack beta 計数器を使用してチミジン取りこみを測定することによって決定した。

10

20

【図1】

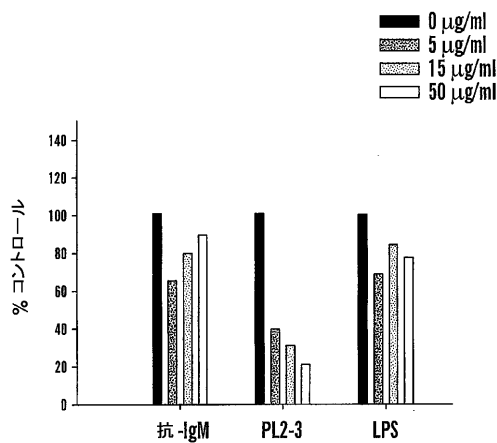


FIG. 1

【図2a】

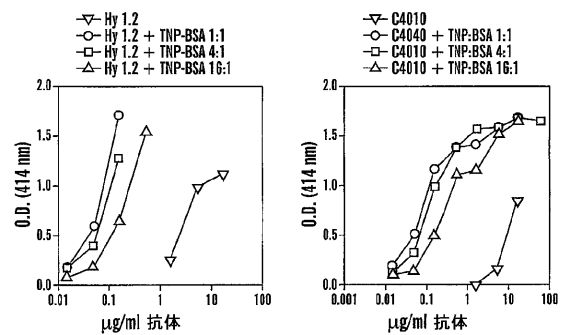


FIG. 2a

【 図 2 b 】

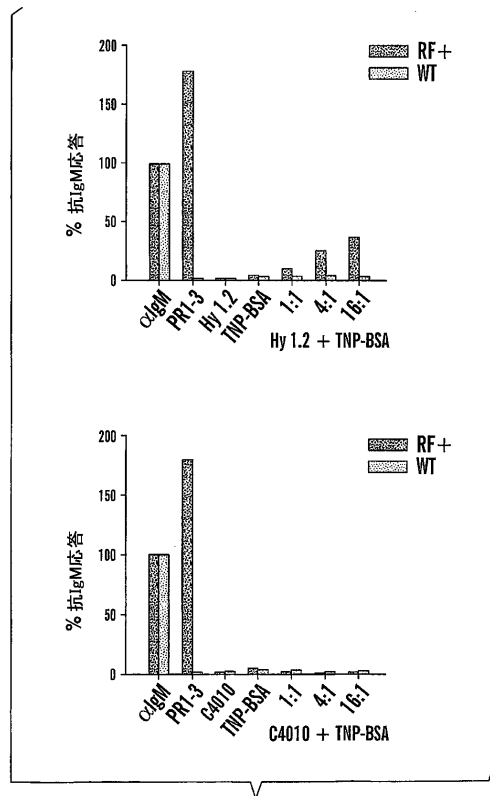


FIG. 2b

【 図 3 】

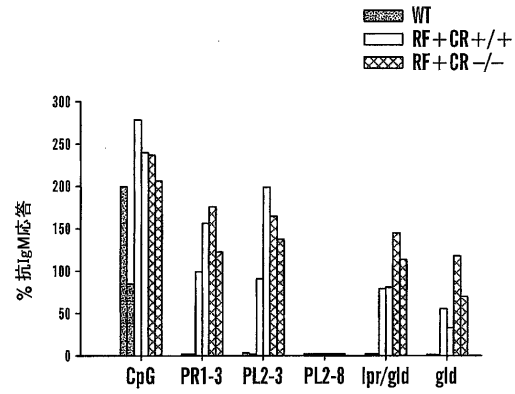


FIG. 3

【 図 4 c 】

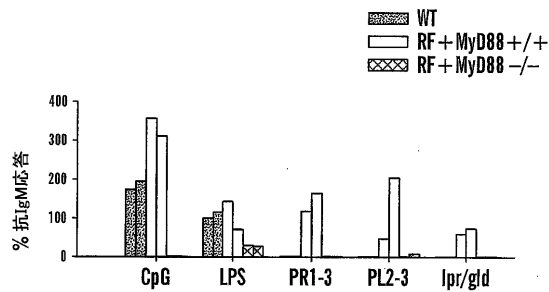


FIG. 4c

【 図 5 】

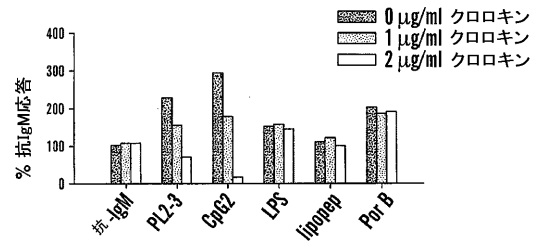


FIG. 5a

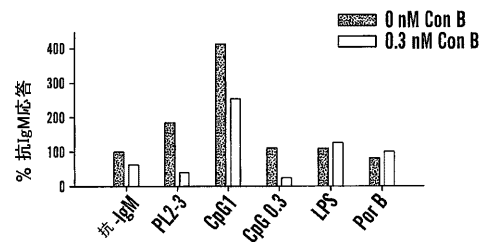


FIG. 5b

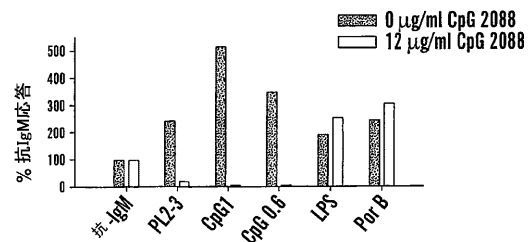


FIG. 5c

【 図 7 】

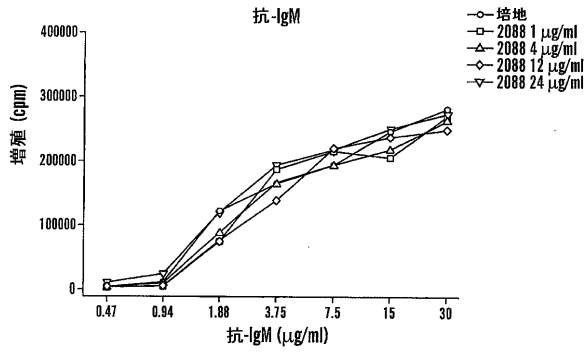


FIG. 7A

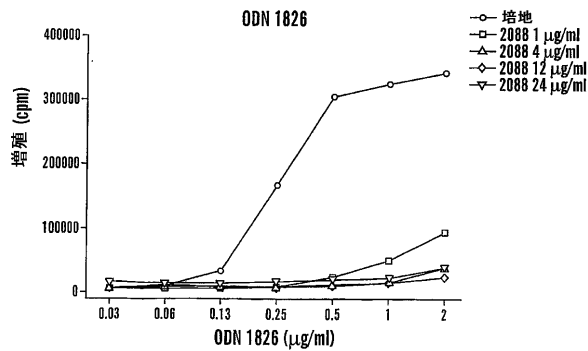


FIG. 7B

【 図 8 C 】

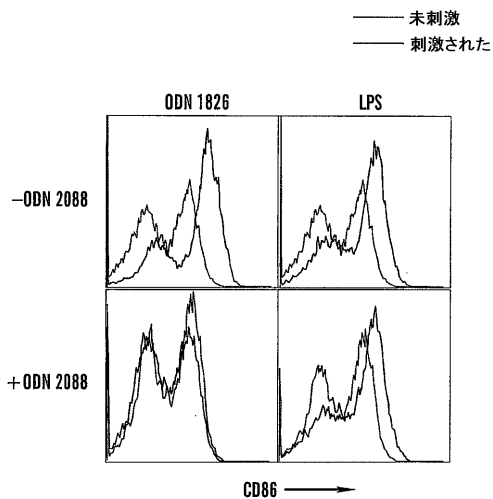


FIG. 8C

【 図 8 A 】

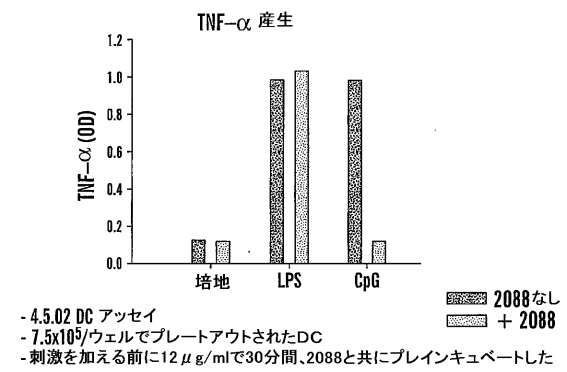


FIG. 8A

【 図 8 B 】

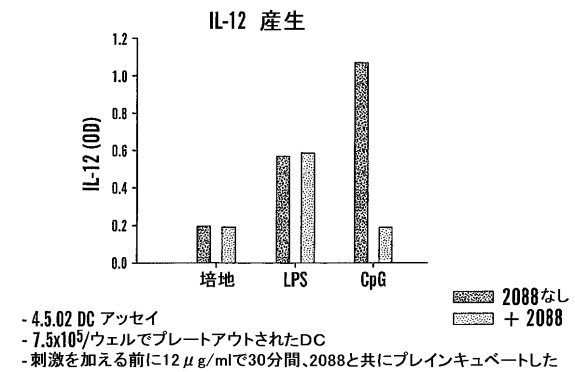


FIG. 8B

【 図 9 】

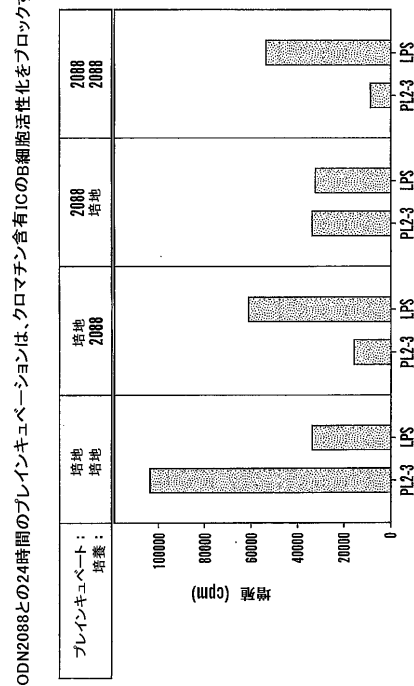


FIG. 9

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/022296 A1

(51) International Patent Classification: A61K 38/00, 39/095, G01N 33/567 (74) Agent: EISENSTEIN, Ronald, L.; Nixon Peabody LLP, 101 Federal Street, Boston, MA 02110 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/28708

(22) International Filing Date: 9 September 2002 (09.09.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/318,096 7 September 2001 (07.09.2001) US
60/367,578 26 March 2002 (26.03.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY [US/US]; 108 Bay State Road, Boston, MA 02215 (US).

(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MARSHAK-ROTHSTEIN, Ann [US/US]; 40 Royce Road, Needham, MA 02459 (US); LEADBETTER, Elizabeth [US/US]; Apt. 2, 246 Cornell Street, Roslindale, MA 02131 (US); RIFKIN, Ian [US/US]; 147 West Concord St., #3, Boston, MA 02459 (US).Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/022296 A1

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR TREATING IMMUNE COMPLEX ASSOCIATED DISORDERS

(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for treating immune complex associated diseases (ICAD), such as SLE, rheumatoid arthritis, and hepatitis C related immune complex disease (e.g., cryoglobulinemia) in a subject having an ICAD or at risk for developing ICAD. The invention is based upon the surprising finding that chromatin-containing immune complexes activate autoreactive B cells and dendritic cells by a dual receptor engagement process which, in both cell types, involves a Toll-like receptor (TLR). The methods of treating ICAD comprise administering a compound to an individual in need thereof that either 1) inhibits formation of the immune complex either by preventing formation and/or binding to the TLR, or 2) interferes with binding of an autoantigen-containing immune complex (or the antigenic component thereof) to the TLR, or 3) inhibits signaling pathways initiated by dual engagement of BCR and TLR (in B cells) or TLR and TLR (in dendritic cells) via immune complexed or uncomplexed autoantigens.

**METHOD AND COMPOSITION FOR TREATING
IMMUNE COMPLEX ASSOCIATED DISORDERS**

[001] This invention was made with Government Support under Contract Nos. R01 AR-35230 and K08 DK-02597 awarded by the National Institutes of Health. The Government has certain rights in the invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[002] The present invention relates to methods and compositions for treating immune complex associated diseases, preferably systemic lupus erythematosus (SLE), and other systemic autoimmune diseases associated with the subject having aberrant Toll-like receptor (TLR)/B cell receptor (BCR) dual engagement (in B cells) or TLR/Fc gamma receptor dual engagement (in dendritic cells and/or macrophages).

Background

[003] Autoimmune diseases are a fairly common but poorly understood group of diseases in which an individual's immune system either 1) begins recognizing self antigens as foreign and starts destroying tissues expressing such antigens thereby causing a disease, or 2) forms immune complexes with these antigens which then deposit in tissues and cause inflammatory pathology. Such autoimmune diseases include, for example, diabetes wherein the immune system turns against and destroys insulin producing pancreatic islet cells; multiple sclerosis, wherein the target antigen is the myelin sheath protecting neurons leading to destruction of function of motoneurons; psoriasis, where the target of the immune system is skin; rheumatoid arthritis, where the target organ is cartilage; and systemic lupus erythematosus (SLE), which presents itself as targeting a variety of tissues with no apparent specificity or selectivity although the target antigens themselves are extremely consistent and characteristic. Because the mechanisms leading to the development of autoimmune diseases in general are mostly unknown, their treatment is often directed to generally suppressing the immune system. Such general immunosuppressive therapies often

cause a variety of undesirable side effects including cancer, infertility, and increased susceptibility to infections by viruses, fungi, yeast, and bacteria. Therefore, it would be desirable to understand the mechanisms that cause the immune system to turn against self antigens to enable development of more specific therapies for the treatment of the autoimmune diseases.

[004] An example of a poorly understood autoimmune disease is systemic lupus erythematosus (SLE), commonly known as Lupus. SLE is characterized by dysregulation of the immune system resulting in the production of antinuclear antibodies, the generation of circulating immune complexes, and the activation of the complement system. The immune complexes build up in the tissues and joints causing inflammation, and degradation to both joints and tissues. While the word "systemic" correctly suggests that the disease affects the entire body and most organ systems, the disease most often involves inflammation and consequent injury to the joints, skin, kidney, brain, the membranes in body cavities, lung, heart, and gastrointestinal tract. An individual with SLE often experiences unpredictable acute episodes or "outbreaks" and equally unexpected remissions. The pathologic hallmark of the disease is recurrent, widespread, and diverse vascular lesions resembling a rash or changes on the surface of the skin.

[005] The prevalence of SLE in the United States is an issue of some debate. Estimates of prevalence range from 250,000 to 2,000,000 persons. Although reported in both the extremely old and the extremely young, the disease mainly affects women of childbearing age. Among children SLE is three times more common in females than in males. In the 60% of SLE patients who experience the onset of this disease between puberty and the fourth decade of life, the female to male ratio is 9:1. Thereafter, the female preponderance again falls to that observed in prepubescent children (i.e. 3:1). In addition, the disorder appears to be three times more common in persons of African and Asian descent than in persons of Caucasian descent.

[006] The etiology of SLE remains unknown. A genetic predisposition, the systemic proliferation of sex hormones, and various environmental triggers, such as viral infections have been suggested to play a role in triggering the aberrant immune responses that typify the disease. A role for genetics is suggested by the increased

percentage of two histocompatibility antigens, HLA-DR2 and HLA-DR3, in patients with SLE. In addition, there is an increased frequency of the extended haplotypes HLA-A1, B8, and DR3 in affected individuals. The role of heredity is further supported by the concordance for this illness among monozygotic twins. The polygenic nature, however, of this genetic predisposition as well as the contribution of environmental factors is suggested by the concordance rate, which is only moderate and reported to be between 25% and 60%.

[007] The precise initiating etiology of SLE is unknown. However, it is generally accepted that most of the clinical manifestations of the disease are caused either directly or indirectly by autoantibody production and the subsequent formation of pathogenic immune complexes. These autoantibodies, which are produced by dysregulated B lymphocytes, have distinct specificities recognizing discrete nuclear autoantigens including, among others, DNA, nucleosomes and subnucleosomes. Certain RNA/protein complexes including the Sm antigen and small nuclear ribonucleoproteins (snRNP) are additional characteristic autoantigenic specificities. The pathogenic immune complexes are formed by binding of the autoantibodies to their respective nuclear autoantigens.

[008] Autoantibodies in SLE often circulate as immune complexes (IC) bound with their respective autoantigens. Chromatin or chromatin fragments such as DNA, nucleosomes or subnucleosome particles are especially common autoantigenic specificities in both mice and humans (Tan, E. *Adv. Immunol.* **44**, 93-151 (1989); Monestier and Novick, *Mol. Immunol.* **33**: 89-99., 1996)

[009] The central goals in the treatment of SLE, therefore, are either to attempt to suppress the dysfunctional B lymphocytes thereby decreasing the production of autoantibody or, to attempt to diminish the pathogenicity of the immune complexes once they have formed. At present these goals can only be achieved, and often incompletely so, by the use of intensive systemic immunosuppressive drug therapy using drugs such as cortisone, azathioprine, hydroxychloroquine and cyclophosphamide. These therapies are associated with many serious and undesirable side-effects including infections, infertility, retinopathy and cancer. Therefore, new treatments for SLE, and other autoimmune diseases, would be desirable.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] It is therefore the purpose of the present invention to provide methods and compositions for treating immune complex associated diseases (ICAD), such as SLE, rheumatoid arthritis, and hepatitis-C related immune complex disease (e.g., cryoglobulinemia) in a subject having an ICAD or at risk for developing ICAD.

[0011] We have discovered that chromatin-containing immune complexes activate autoreactive B cells and dendritic cells by a dual receptor engagement process. In both cell types a Toll-like receptor (TLR) is involved. TLR9, located in a cytoplasmic compartment, is the essential second receptor required for cell activation. In the case of the B cell, the B cell antigen receptor located on the cell surface is the essential first receptor required for cell activation. In the case of the dendritic cell, a stimulatory Fc gamma receptor located on the cell surface is the essential first receptor required for cell activation. We have found a method of treating ICAD by administering a compound to an individual in need thereof that either 1) inhibits formation of the immune complex (i.e., autoantibody and nuclear autoantigen) either by preventing formation and/or binding to the Toll-like receptor (TLR), or 2) interferes with binding of an autoantigen-containing immune complex (or the antigenic component thereof) to the TLR, or 3) inhibits signaling pathways initiated by dual engagement of BCR and TLR (in B cells) or FcR and TLR (in dendritic cells) via immune complexed or uncomplexed autoantigens. The compound is administered in a pharmaceutically acceptable carrier.

[0012] Preferably, the ICAD is SLE, rheumatoid arthritis or hepatitis-C related immune complex disease (e.g., cryoglobulinemia). In another embodiment, the ICAD is related to an immune reaction in a host after organ transplantation.

[0013] Although not working to be bound by theory, we believe that immune complexes (IC) containing an autoantigen, such as chromatin, but not IC containing a foreign antigen, are able to activate autoreactive B cells and that this activation is absolutely dependent on the ability of the autoantigen-containing IC to sequentially engage either the B cell receptor (BCR) in B cells or FcγR in dendritic cells, and a second receptor, a Toll-like receptor. This finding establishes a novel link between

WO 03/022296

5

PCT/US02/28708

the innate and adaptive immune systems and suggests a general mechanism whereby autoreactive B cells or dendritic cells specific for protein/nucleic acid autoantigens are activated.

[0014] According to one aspect of the invention a method is provided for treating a patient having an ICAD or at risk for an ICAD by identifying an individual with ICAD and administering an effective amount of a compound capable of inhibiting the autoantigen or autoantigen/immune complex from forming and/or from activating B cells or dendritic cells.

[0015] A person at risk for ICAD or systemic autoimmune disease includes individuals having at least a parent, grandparent or sibling who has an ICAD or systemic autoimmune disease.

[0016] The compound is selected from a group consisting of compounds that bind components of the immune complex and either prevent its formation or prevent the autoantigen from activating a Toll-like receptor (TLR). Such compounds include Toll-like receptor decoys, compounds that inhibit the activity of MyD88, compounds that inhibit production of immune complex components (e.g., antisense nucleotides), dominant-negative TLR, a Toll-like receptor antagonist, and compounds that inhibit signaling pathways activated by the interaction or binding of the immune complex or autoantigen to the TLR. Preferably, the compound binds and/or inhibits function of Toll-like receptors TLR2, TLR3, and TLR9 or functional domains thereof. More preferably, the TLR is TLR3 or TLR9 or a functional fragment thereof.

[0017] Compounds that bind components of the immune complex and prevent its formation or prevent binding of the complex to the Toll-like receptor and compounds that inhibit MyD88 signaling include polyclonal and monoclonal antibodies, dominant negative proteins that can block wildtype TLR activity or block components of the TLR-mediated signaling cascade, inhibitory oligodeoxynucleotides (ODN), such as S-ODN 2088 (Lenart, *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 4, 247-256 (2001)), antisense nucleotides including RNA and modified nucleotides, or other pathway specific kinase inhibitors. The compound is a compound other than chloroquine.

[0018] In one embodiment the invention provides methods for screening compounds or agents that inhibit immune complex formation or binding to the Toll-

WO 03/022296

6

PCT/US02/28708

like receptor and/or inhibit B cell/dendritic cell activation. The methods comprise contacting immune complex components with a test agent and measuring B cell or dendritic cell activation and/or proliferation and/or binding of the complex to the Toll-like receptor.

[0019] In an other embodiment, a method of diagnosing an ICAD is provided. The method comprises taking a biological sample comprising IgG of an individual suspected of having ICAD, incubating the biological sample together with RF+ B cells or dendritic cells, and measuring the activation of the RF+ B cells or dendritic cells, wherein a change in activity in the RF+ B cell or dendritic cell cultures exposed to the biological sample from the individual suspected of having ICAD relative to the RF+ B cells or dendritic cells exposed to a biological sample comprising IgG from a control individual is indicative of ICAD. Preferably, the change is an increase in activity. Activation of the B cells can be measured, for example by measuring proliferation or upregulation of co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86 as well as upregulation of MHC class II molecules. Activation of dendritic cells can be assessed by measuring the expression of co-stimulatory molecules, production of cytokines, e.g., TNF- α , or changes in the dendritic cell phenotype.

[0020] In yet another embodiment, the invention provides an *in vivo* model system for evaluating a compound or an agent for its efficacy in treating ICAD. The model system comprises administering a test agent to an ICAD model animal including mouse and rat models, and measuring B cell or dendritic cell activation and/or proliferation and/or binding of the complex to the Toll-like receptor in such animal, wherein decreased activation is indicative of an agent which is capable of treating ICAD. Alternatively, one can use cell lines expressing Toll-like receptors and screen for compounds that modulate, preferably inhibit or block, such receptors.

[0021] Other aspects of the invention are disclosed *infra*.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0022] The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute a part of this specification, illustrate embodiments of the invention and, together with the description, serve to explain and illustrate the objects, advantages, and principles of the invention. In the drawings,

WO 03/022296

7

PCT/US02/28708

[0023] **Figure 1** shows that anti-nucleosome antibody (PL2-3) stimulation of AM14 RF+ B cells is DNase sensitive. The IgG2a anti-nucleosome antibody binds to chromatin released from the B cells in culture to form an immune complex which is recognized by the B cell via its IgG2a-specific antigen receptor. AM14 RF+ spleen cells were pre-incubated with various concentrations of DNase I (0, 5, 15, or 50 $\mu\text{g/ml}$) for 15 minutes prior to the addition of goat anti-mouse IgM F(ab')₂, PL2-3 (IgG2a^a anti-nucleosome mAb), or LPS. Results are expressed as the percentage of the maximum response to each ligand in the absence of DNase.

[0024] **Figures 2A-2B** show that anti-TNP/TNP-BSA IC fail to efficiently stimulate AM14 RF+ B cell proliferation. The anti-TNP mAbs Hy1.2 (IgG2a^b) and C4010 (IgG2a^b) were mixed with varying concentrations of TNP-BSA [50 $\mu\text{g/ml}$ (circle), 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (square), 3.1 $\mu\text{g/ml}$ (up-triangle)] to form IC with antibody/protein ratios of 1:1, 4:1, and 16:1 respectively. In Figure 2A, IC formation was confirmed by a shift in C1q binding activity relative to uncomplexed antibodies (down-triangle). In Figure 2B the ability of the anti-TNP/TNP-BSA IC described above to stimulate RF+ B cell proliferation was compared to the stimulation induced by the anti-nucleosome mAb PR1-3, uncomplexed Hy1.2, C4010, or 50 $\mu\text{g/ml}$ TNP-BSA.

[0025] **Figure 3** shows that autoantibody/autoantigen-IC stimulation of RF+ B cells is not complement receptor dependent. Spleen cells from each of two WT control mice (gray), RF+ CR^{+/+} mice (white), and RF+ CR^{-/-} mice (hatched) were stimulated with goat anti-mouse IgM F(ab')₂, CpG S-ODN 1826, the anti-nucleosome mAbs PR1-3 (IgG2a^a), PL2-3 (IgG2a^a), PL2-8 (IgG2b), or 3% serum from representative autoimmune mice (lpr/gld and gld).

[0026] **Figures 4A-4C** show that autoAb/autoAg-IC stimulation of RF+ B cells is MyD88-dependent. In Fig. 4A, T-depleted spleen cells from wildtype (WT) and RF+ MyD88^{-/-} mice were stained with B220 and an idiotype specific antibody, 4G7. In Fig. 4B, MyD88 WT or knock-out mice were identified by PCR. In Fig. 4C spleen cells from each of two WT (gray), RF+ MyD88^{+/+} (white), RF+ MyD88^{-/-} (hatched) mice were stimulated with anti-IgM F(ab')₂, CpG S-ODN 1826, LPS, anti-nucleosome

WO 03/022296

8

PCT/US02/28708

mAbs PR1-3, PL2-3, PL2-8, or 3% lpr/gld serum. Total cpm for the anti-IgM stimulated cultures were 83,414/39,049 (WT); 93,126/61,315 (RF+ MyD88^{+/+}); and 39,826/57,484 (RF+ MyD88^{-/-}). Results are expressed as the percentage of the anti-IgM response and are representative of four separate experiments.

[0027] **Figures 5A-5C** demonstrate that autoAb/autoAg-IC stimulation of RF+ B cells can be blocked by inhibitors of the TLR9 signaling pathway. In Fig. 5A, RF+ B cells were preincubated for 15 minutes with 1 or 2 µg/ml chloroquine (a), preincubated for 2 hrs with concanamycin B (b), or preincubated for 30 minutes with inhibitory CpG S-ODN 2088 (c), prior to the addition of the stimulatory ligands anti-IgM F(ab')₂, 5-50 µg/ml PL2-3, 0.3-2.0 µg/ml CpG S-ODN 1826, LPS, lipopeptide, or porin B. In Fig. 5B, RF+ B cells were preincubated for 30 min with 12 µg/ml CpG S-ODN 2088 prior to the addition of stimulatory ligands. Results are expressed as a percentage of the anti-IgM response in the absence of inhibitor. The data in (Fig. 5A) and (Fig. 5C) is representative of 2-4 experiments, while (Fig. 5B) is the mean of two experiments.

[0028] **Figures 6A-B** show the results of an experiment where MyD88-deficient (MyD88^{-/-}) Fas-sufficient mice were bred with MyD88-sufficient (MyD88^{+/+}) Fas-deficient (*lpr/lpr*) autoimmune mice to generate MyD88^{-/-} *lpr /lpr* mice, and appropriate control groups. Anti-nuclear-antibodies (ANA) in the sera of age-matched MyD88^{+/+} *lpr/lpr* (Figure 6A) and MyD88^{-/-} *lpr /lpr* (Figure 6B) littermates (12-13 weeks of age) were detected by indirect immunofluorescence using HEp-2 cells as substrate as previously described (Rifkin et al., *Journal of Immunology*, 161: 5164-5170, 1998). Serum from a diseased autoimmune MRL-*lpr/lpr* mouse served as the positive control and serum from a non-autoimmune BALB/c mouse as the negative control. This in vivo experiment demonstrates that, in a standard and widely used lupus mouse strain, autoantibody production requires signaling through MyD88. This strongly suggests that TLR activation is required for the development of lupus in this model.

[0029] **Figures 7A-7B** show that B cells can be activated through TLR9 and that this activation can be blocked by TLR9 inhibition with ODN 2088. B cells were purified from the spleen of MRL^{+/+} mice and either pre-incubated, or not pre-

WO 03/022296

9

PCT/US02/28708

incubated, for 30 minutes with varying doses of ODN 2088, an inhibitory oligodeoxynucleotide that specifically blocks signaling through TLR9. Anti-IgM F(ab')₂ (Anti-IgM), that activates through the B cell receptor (7A), or the stimulatory ODN 1826, that specifically activates through TLR9 (7B), was then added to the cultures. After 20-24 hours, ³[H] thymidine was added to the cultures and ,after an additional 14-18 hours, proliferation was determined by measuring thymidine incorporation using an LKB Wallac 1212 Rackbeta counter. Only stimulation through TLR9 is blocked by ODN 2088 demonstrating the specificity of the inhibitory effect: stimulation induced by B cell receptor cross-linking is not inhibited.

[0030] **Figures 8A-8C** show that dendritic cells can be specifically activated through TLR9 and this activation can be blocked by TLR9 inhibition with ODN 2088.

[0031] **Figure 9** shows the inhibitory effects of ODN 2088 on chromatin-containing immune complex mediated B cell proliferation are long-lasting. B cells were purified from the spleen of MRL^{+/+} mice and either pre-incubated, or not pre-incubated, for 16-20 hours with 12 μ g/ml ODN 2088. After this pre-incubation, the cells were washed to remove ODN 2088 from the cultures and then the B cells were cultured with either medium alone or with fresh ODN 2088 at 12 μ g/ml. Thirty minutes later the anti-chromatin monoclonal antibody PL2-3 (50 μ g/ml) or LPS (10 μ g/ml) were added to the cultures. After 20-24 hours, ³[H] thymidine was added to the cultures and ,after an additional 14-18 hours, proliferation was determined by measuring thymidine incorporation using an LKB Wallac 1212 Rackbeta counter.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0032] The present invention provides methods and compositions for treating and/or preventing immune complex associated diseases (ICAD), in a subject having an ICAD or at risk for the ICAD.

[0033] For the purposes of this invention the term "immune complex associated diseases" or "ICAD" refers to diseases including, but not limited to systemic lupus erythematosus (SLE) and related connective tissue diseases, rheumatoid arthritis, hepatitis-C and hepatitis B related immune complex disease (e.g., cryoglobulinemia),

Behcets disease, autoimmune glomerulonephritides, and vasculopathy associated with the presence of LDL/anti-LDL immune complexes.

[0034] We have discovered that immune complexes (IC) containing an autoantigen, such as chromatin, but not IC containing a foreign antigen, are able to activate autoreactive B cells and that this activation is dependent on the ability of the autoantigen -containing IC to sequentially engage both the B cell receptor and a second receptor, a Toll-like receptor.. This finding establishes a novel link between the innate and adaptive immune systems and consequently a general mechanism whereby autoreactive B cells specific for protein/nucleic acid autoantigens are activated.

[0035] The Toll-like receptors (TLRs) are a family of membrane bound receptor proteins that are critically involved in innate immune responses and recognize pathogen associated molecular patterns or determinants that appear unique to microorganisms and are involved in activating immune cells against the source of these microbial particles.

[0036] The Toll-like family of receptors have leucine-rich repeats in their extracellular domains and the Toll/IL-1 receptor homology domain in their cytoplasmic domains. The Toll family is remarkably conserved in evolution. The first member discovered was the product of the *toll* gene which is part of the signaling pathway responsible for the specification of dorsal-ventral polarity in the early development of the fruit fly *Drosophila melanogaster*.

[0037] Currently ten mammalian homologues have been identified, called TLR1 through TLR10. Both the IL-1 receptor and the TLRs share similar downstream effects, such as the activation of immune response genes, and all these receptors work through signaling cascades that include the adaptor protein MyD88 (Mussio et al., Science 278:1612; Wesche et al., Immunity 7:837) which has been previously described as a myeloid differentiation protein (Lord et al., Oncogene 5:1095). In general, the different TLRs are thought to be activated by different types of microbial particles (Hemmi et al., Nature 408:740-745 (2000); Underhill et al., Nature 402:39-43 (1999); Aliprantis et al., EMBO J., 19:3325-3336 (2000)). However, there is also accumulating evidence that in addition to microbial particles, mammalian TLRs can

WO 03/022296

11

PCT/US02/28708

also recognize certain self (mammalian) antigens, in particular cytoplasmic components that are released from cells as a result of cell death (Akira et al., *Nat Immunol.*, 2: 675-680 (2000).

[0038] The term "Toll-like receptor" is herein meant to include an intact Toll-like receptor, for example a receptor that has been described in the Online Mendelian Inheritance in Man under access numbers *601194 TOLL-LIKE RECEPTOR 1, TLR1; *603028 TOLL-LIKE RECEPTOR 2, TLR2; *603029 TOLL-LIKE RECEPTOR 3, TLR3; *603030 TOLL-LIKE RECEPTOR 4, TLR4; *603031 TOLL-LIKE RECEPTOR 5, TLR5; *605403 TOLL-LIKE RECEPTOR 6, TLR6; *300365 TOLL-LIKE RECEPTOR 7, TLR7; *300366 TOLL-LIKE RECEPTOR 8, TLR8; *605474 TOLL-LIKE RECEPTOR 9, TLR9; and *606270 TOLL-LIKE RECEPTOR 10; TLR10 or a functional fragment thereof such as, for example, a soluble form of the Toll-like receptor, i.e. where the membrane binding domain has been deleted or altered, in some embodiments the cytoplasmic domain is also not present, or a MyD88 binding or interacting fragment of the Toll-like receptor or a homolog of the Toll-like receptor capable of binding to or interacting with MyD88. More preferably the TLR is TLR 9.

[0039] Our experiments to this point have identified the importance of the interaction between TLR9 and the chromatin component of the chromatin-containing immune complexes. However, in SLE and related diseases immune complexes commonly form with autoantibodies and distinct RNA/protein antigenic complexes including the Sm antigen and small nuclear ribonucleoproteins (snRNP) (Tan, E. *Adv. Immunol.* 44, 93-151 (1989)). In addition, in immune complex associated diseases such as hepatitis C, pathogenic immune complexes form between antibodies and the RNA containing viruses. TLR3 has been identified as a specific receptor for double-stranded RNA (Alexopoulou, *Nature*. 413, 732-738 (2001). Thus, it is reasonable to anticipate that TLR3 engagement will be important in the activation process elicited by these RNA-containing immune complexes.

[0040] Preferably the TLR is TLR3 or TLR 9, or a functional fragment thereof or a fragment that is homologous to TLR 3 or TLR 9 and capable of binding or interacting with MyD88.

[0041] The Toll-like receptor useful according to the present invention can also be a fusion receptor wherein the Toll-like receptor is fused with another protein such as a Myc-tag. The preferred Toll-like receptors include Toll-like receptor-2 or Toll/Interleukin-1 receptor-like 4 (Chaudhary, et al., *Blood* 91: 4020-4027, 1998), Toll-like receptor-3 (Rock, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 588-593, 1998), and Toll-like receptor-9 (Chuang and Ulevitch, *Europ. Cytokine Netw.* 11: 372-378, 2000; Du, et al., *Europ. Cytokine Netw.* 11: 362-371, 2000) or functional fragments thereof or homologs that have a similar function, such as for example, binding MyD88.

[0042] As used herein, the terms "treatment" or "treating" include: (1) preventing such disease from occurring in a subject who may be predisposed to these diseases but who has not yet been diagnosed as having them; (2) inhibiting these diseases, i.e., arresting their development; or (3) ameliorating or relieving the symptoms of these diseases, i.e., causing regression of the disease states.

[0043] The compounds preferably inhibit activation of B cells (BC) or dendritic cells (DC) by at least about 50% in an *in vitro* or *in vivo* assays discussed below. More preferably the compounds inhibit autoantigenic activation of BCs or DCs via the Toll-like receptor by 75%, most preferably 95%. Additional compounds are identified and tested in the screening assays discussed in more detail below.

[0044] The compound useful according to the present invention is selected from a group consisting of compounds that bind components of the immune complex or Toll-like receptors. These compounds either prevent formation of the immune complex; prevent the autoantigen or the autoantigenic fragment of the immune complex from activating a Toll-like receptor (TLR) or prevent the downstream molecular signaling, such as that mediated through MyD88, from the Toll-like receptor. Such compounds include Toll-like receptor decoys, compounds that inhibit the activity of MyD88, compounds that inhibit production of immune complex components (e.g., antisense nucleotides), dominant-negative TLR, a Toll-like receptor antagonist or blocker (such as ODN 2088 or antibodies against the TLRs), and compounds that inhibit signaling pathways activated by the interaction or binding of the autoantigenic fragment of the immune complex to the TLR. Preferably, the compound binds and/or inhibits function of Toll-like receptors TLR2, TLR3, and

TLR9 or functional domains thereof. More preferably, the TLR is TLR3 or TLR9 or a functional fragment thereof.

[0045] The invention further provides efficient screening methods to identify pharmacological agents or lead compounds for agents which inhibit binding of the immune complex (or the autoantigenic component thereof) to the TLR, preferably TLR 2, TLR 3, TLR 9, or any combination thereof, most preferably TLR3 or TLR 9. The methods are amenable to automated, cost-effective high throughput drug screening and have immediate application in a broad range of pharmaceutical drug development programs.

[0046] Generally, these screening methods involve assaying for compounds that modulate, for example, the autoantigen interaction with a TLR, preferably TLR2, TLR3, TLR9, or any combination thereof, most preferably TLR3 or TLR 9. Still, more preferably the compound modulates interaction with TLR 9. A wide variety of assays for binding agents are provided including labeled in vitro protein-protein binding assays, immunoassays, cell based assays, etc.

[0047] In vitro binding assays employ a mixture of components including a TLR polypeptide, preferably TLR2, TLR3, TLR9, or any combination thereof, most preferably TLR3 or TLR9, still more preferably TLR9 which may be part of a fusion product with another peptide or polypeptide, e.g. a tag for detection or anchoring, etc. The assay mixtures may also comprise a natural intracellular TLR binding target, such as MyD88. While native full-length binding targets may be used, it is frequently preferred to use portions (e.g. peptides) thereof so long as the portion provides binding affinity and avidity to the subject MyD88 polypeptide conveniently measurable in the assay. The assay mixture also comprises a candidate pharmacological agent. Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic compounds; preferably small organic compounds and are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. A variety of other reagents may also be included in the mixture. These include reagents like salts, buffers, neutral proteins, e.g. albumin, detergents, protease inhibitors, nuclease inhibitors, antimicrobial agents, etc. may be used.

[0048] The resultant mixture is incubated under conditions whereby, but for the presence of the candidate pharmacological agent, the TLR polypeptide specifically binds the cellular binding target, portion or analog with a reference binding affinity. The mixture components can be added in any order that provides for the requisite bindings and incubations may be performed at any temperature that facilitates optimal binding. Incubation periods are likewise selected for optimal binding but also minimized to facilitate rapid, high-throughput screening.

[0049] After incubation, the agent-biased binding between the TLR polypeptide and one or more binding targets is detected by any convenient way. A difference in the binding affinity of the TLR polypeptide to the target in the absence of the agent as compared with the binding affinity in the presence of the agent indicates that the agent modulates the binding of the TLR polypeptide to the TLR binding target. Analogously, in the cell-based assay also described below, a difference in TLR-dependent transcriptional activation in the presence and absence of an agent indicates the agent modulates TLR function, for example, binding to MyD88. A difference, as used herein, is statistically significant and preferably represents at least a 50%, more preferably at least a 75%, still more preferably at least a 90% difference.

[0050] The preferred assay to test a pharmaceutical agent for potency of interrupting the activation of B cells or dendritic cells comprises RF⁺ B cells or dendritic cells which are incubated with a test agent and a TLR stimulatory agent, such as PRI-3, PL2-3, or a CpG S-ODN 1826 (see, e.g. Leadbetter et al., Nature, 416:603-607, 2002) in a suitable cell culture medium. Incubation with the test agent can be performed prior to or simultaneously with the addition of the stimulatory agent.

[0051] The activation of the B cells can be observed using a number of techniques well known to one skilled in the art. For example, the ³[H] thymidine incorporation assay can be performed to measure proliferation of B cells. Alternatively, activation of B cells can be analyzed using fluorescence activated cell sorting (FACS) to measure cell surface expression of, for example, CD80, CD86 or MHC class II molecules. Activation of dendritic cells can be observed by measuring production of cytokines, such as TNF- α , interferon- α , IL-12 and BAFF, or co-

stimulatory molecules such as CD80, CD86 or MHC class II molecules (Banchereau, et al., *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811, 2000; Mackay and Browning, *Nat. Rev. Immunol.* 2: 465-475).

[0052] Alternatively, dendritic cell activation can be observed by measuring morphologic changes in the DC (Banchereau, et al., *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811, 2000).

[0053] If the stimulation of the expression of, for example a co-stimulatory molecule is decreased as a result of adding the test agent, the test agent is considered to be a potential agent to treat ICAD. The expression is considered decreased if it is at least about 50%, more preferably at least about 60-75%, most preferably at least about 90% decreased as compared to a cell sample where no test agent has been added. More detailed examples are given in the Examples in the end of this section.

[0054] A preferred assay mixture of the invention is set forth in the Examples. An assay mixture of the invention also comprises a candidate pharmacological agent. Generally, a plurality of assay mixtures are run in parallel with different candidate agent concentrations to obtain a differential response to the various concentrations. Typically, one of these assay mixtures serves as a negative control, i.e. at zero concentration or below the limits of assay detection. Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic compounds and preferably small organic compounds. Small organic compounds suitably may have e.g. a molecular weight of more than about 50 yet less than about 2,500. Candidate agents may comprise functional chemical groups that interact with proteins and/or DNA.

[0055] Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides and peptides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. Libraries can be composed of small polypeptides (see, for instance, Lam et al., *Nature*, 354: 82, 1991 and WO 92/00091; Geysen et al., *J Immunol Meth*, 102: 259, 1987; Houghten et al., *Nature*,

WO 03/022296

16

PCT/US02/28708

354: 84, 1991 and WO 92/09300 and Lebl et al., Int J Pept Prot Res, 41, 201, 1993). Alternatively, libraries of small non-peptide molecules can be based upon a common template or core structure (see, for instance, Ellman and Bunin, J Amer Chem Soc, 114:10997, 1992 for benzodiazepine template; WO 95/32184 for oxazolone and amidine template; WO 95/30642 for dihydrobenzopyran template and WO 95/35278 for pyrrolidine template.

[0056] Additionally, natural and synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical, and biochemical means. In addition, known pharmacological agents may be subject to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification, etc.

[0057] Antibodies and binding fragments thereof or aptamers (available from, for example SomaLogic Inc., Boulder, CO) that bind immune complex components and prevent formation or TLR binding are also useful. Examples of antibodies useful according to the invention include monoclonal antibodies against TLRs such as anti-TLR3 monoclonal antibody (Matsumoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 293:1364-1369, 2002) anti-TLR-9 (Toll-like receptor 9, Imgenex, San Diego, CA) or humanized versions thereof.

[0058] The term dominant negative Toll-like receptor as used herein refers to Toll-like receptors, that have been engineered to have a defect, such as deletion of the domain required for downstream signaling but which can bind the antigenic portion of the immune complex.

[0059] The antibodies and binding fragments thereof can be either polyclonal or monoclonal, but preferably are monoclonal. If polyclonal, the antibodies can be in the form of antiserum or monospecific antibodies, such as purified antiserum which has been produced by immunizing animals with purified protein. Preferably, however, the antibodies are monoclonal antibodies so as to minimize the administration of extraneous proteins to an individual. Monoclonal antibodies can be prepared according to well known protocols. See, e.g., Skare et al., *J. Biol. Chem.* 268: 16302-16308 (1993); and U.S. Pat. Nos. 4,918,163 and 5,057,598, which are incorporated herein by reference. The antibodies can be whole, Fab's, single chain, single domain

heavy chain, etc. Single chain antibodies are preferable. Methods for the production of single chain binding polypeptides are described in detail in, e.g., U.S. Pat. No. 4,946,778, which is incorporated herein by reference.

[0060] When an antibody or other protein or peptide is used the peptide is preferably conjugated to a carrier such as biotin or a poly(alkaline oxide), for example polyethylene glycol (PEG). Polymeric substances such as dextran, polyvinyl pyrrolidones, polysaccharides, starches, polyvinyl alcohols, polyacryl amides or other similar polymers can be used. The poly(alkaline oxide) can include monomethoxy polyethylene glycol, polypropylene glycol, block copolymers of polyethylene glycol and the like. Polyethylene glycol as poly(alkylene oxide) is preferred. The polymers can also be distally capped with C₁₋₄ alkyls instead of monomethoxy groups.

[0061] For administration to humans, e.g., as a component of a composition for *in vivo* treatment, the monoclonal antibodies are preferably substantially human or humanized to minimize immunogenicity, and are in substantially pure form. By "substantially human" is meant that the immunoglobulin portion of the composition generally contains at least about 70% human antibody sequence, preferably at least about 80% human, and most preferably at least about 90-95% or more of a human antibody sequence.

[0062] For therapeutic applications, the compounds may be suitably administered to a subject such as a mammal, particularly a human, alone or as part of a pharmaceutical composition, comprising the compounds together with one or more acceptable carriers thereof and optionally other therapeutic ingredients. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the recipient thereof.

[0063] The pharmaceutical compositions of the invention include those suitable for oral, rectal, nasal, topical (including buccal and sublingual), vaginal, parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal), ocular using eye drops, transpulmonary using aerosolized or nebulized drug administration. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form, e.g., tablets and sustained release capsules, and in liposomes, and may be prepared by any methods well known in the art of pharmacy. (See, for example, Remington: The Science and

Practice of Pharmacy by Alfonso R. Gennaro (Ed.) 20th edition, December 15, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins; ISBN: 0683306472.)

[0064] Such preparative methods include the step of bringing into association with the molecule to be administered ingredients such as the carrier which constitutes one or more accessory ingredients. In general, the compositions are prepared by uniformly and intimately bringing into association the active ingredients with liquid carriers, liposomes or finely divided solid carriers or both, and then if necessary shaping the product.

[0065] Compositions of the present invention suitable for oral administration may be presented as discrete units such as capsules, cachets or tablets each containing a predetermined amount of the active ingredient; as a powder or granules; as a solution or a suspension in an aqueous liquid or a non-aqueous liquid; or as an oil-in-water liquid emulsion or a water-in-oil liquid emulsion, or packed in liposomes and as a bolus, etc.

[0066] A tablet may be made by compression or molding, optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared by compressing in a suitable machine the active ingredient in a free-flowing form such as a powder or granules, optionally mixed with a binder, lubricant, inert diluent, preservative, surface-active or dispersing agent. Molded tablets may be made by molding in a suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent. The tablets optionally may be coated or scored and may be formulated so as to provide slow or controlled release of the active ingredient therein.

[0067] Compositions suitable for topical administration include lozenges comprising the ingredients in a flavored basis, usually sucrose and acacia or tragacanth; and pastilles comprising the active ingredient in an inert basis such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia.

[0068] Compositions suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents and thickening agents. The formulations may be presented

in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampules and vials, and may be stored in a freeze dried (lyophilized) condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier, for example water for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets.

[0069] It will be appreciated that actual preferred amounts of a given compound used in a given therapy will vary according to the particular compound being utilized, the particular compositions formulated, the mode of application, the particular site of administration, the patient's weight, general health, sex, etc., the particular indication being treated, etc. and other such factors that are recognized by those skilled in the art including the attendant physician or veterinarian. Optimal administration rates for a given protocol of administration can be readily determined by those skilled in the art using conventional dosage determination tests.

[0070] The present invention also provides methods for diagnosing ICAD in an individual. The method comprises of measuring the Toll-like receptor mediated activation of a B cell or dendritic cell induced by a biological sample containing an immune complex(es) consisting of autoantigen(s) and autoantibody(ies). Activation of a Toll-like receptor in B cells can be measured indirectly, for example by measuring proliferation of the B cells, expression of various co-stimulatory molecules such as CD80, CD86 or upregulation of MHC class II molecules. Activation of Toll-like receptor in dendritic cells can be measured by observing morphologic changes of the dendritic cells either with or without specific staining, or by measuring expression of co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86, or by measuring upregulation of activation markers such as CD69, or by measuring upregulation of chemokine receptors such as CCR7, or by measuring the production of cytokines such as TNF- α using a number of different techniques including assaying mRNA or protein levels.

[0071] For example, change in the expression of TNF- α can be measured using RNA isolated from dendritic cells. RNA quantitation methods include polymerase chain reaction (PCR) based methods such as, for example, a TaqMan® system (Applied Biosystems), Brilliant Quantitative PCR (Stratagene), Platinum® quantitative PCR (Resgen, Inc.). RNA is isolated from a biological sample, for

example blood sample, which is taken from an individual suspected of having ICAD. The amount of Toll-like receptor mRNA is quantified using, for example, techniques listed above and compared to a sample from a control individual.

[0072] Preferably, assays such as FACS analysis are used to measure protein expression of the co-stimulatory molecules. If the expression of these co-stimulatory molecules is increased, it indicates that the individual is affected with an ICAD. The activity is considered increased if the assay shows at least about 5% increase in the amount of the co-stimulatory molecule compared to the control sample.

[0073] Alternatively, serum from a test individual suspected of having ICAD can be injected to a cell culture expressing a functional Toll-like receptor pathway. The activity of the Toll-like receptor is consequently measured from the cell culture treated, in parallel, with control and test subject serum. If the activity of the Toll-like receptor is increased in the cells treated with the test individual's serum compared to the cells treated with the control serum, it indicates that the individual is affected with an ICAD. The expression is considered increased if it is at least about 5% higher than in the control sample.

[0074] It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the preferred specific embodiments thereof that the foregoing description as well as the examples that follow are intended to illustrate and not limit the scope of the invention. Other aspects, advantages and modification within the scope of the invention will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains.

EXAMPLE 1

[0075] Autoreactive B cells are present in the lymphoid tissues of healthy individuals, but typically remain quiescent. When this homeostasis is perturbed, the formation of self-reactive antibodies can have serious pathological consequences. B cells expressing an antigen-receptor specific for self-IgG make a class of autoantibodies known as rheumatoid factor (RF). Here we show that effective activation of RF+ B cells is mediated by IgG2a/chromatin immune complexes and requires the sequential engagement of the antigen-receptor and a MyD88-dependent Toll-like receptor family member. These data establish a critical link between the

innate and adaptive immune systems in the development of systemic autoimmune disease and explain the preponderance of autoantibodies reactive with nucleic acid/protein particles. The unique features of this dual-engagement pathway should facilitate the development of therapies that specifically target autoreactive B cells.

[0076] We have now developed a model *in vitro* system for analyzing the factors involved in the activation of autoreactive B cells and dendritic cells in autoimmune disease. One of the prevalent autoantibody specificities in lupus-prone lpr mice is rheumatoid factor (RF). RFs are antibodies that are reactive with self IgG. RF B cells become activated, expand in number, and differentiate into antibody secreting cells in autoimmune strains of mice, but not in mice of a non-autoimmune background. In order to investigate the mechanisms involved in this pathologic activation, we studied primary RF+ B cells from the spleens of mice genetically engineered to express a pair of transgenes which would confer a particular RF specific to most B cells. These B cells are prototypes of the autoreactive B cells found in SLE patients.

[0077] Initially, we demonstrated that these RF+ B cells were activated by serum samples from autoimmune mice, but not by serum from non-autoimmune mice (Rifkin et al, 2000). We further proved that the stimulatory factor in the serum was, in fact, IgG2a. However, comparable amounts of IgG2a isolated from non-autoimmune sera were not stimulatory, indicating that not all IgG2a was sufficient to stimulate RF+ B cells. Therefore we concluded that IgG2a in the autoimmune sera had unique properties. To further identify the relevant IgG2a component, we used IgG2a monoclonal antibodies (mAbs) and showed that mAbs specific for self-antigens, such as DNA-histone complexes, were stimulatory while antibodies specific for foreign or non-self antigens were not stimulatory.

[0078] We next considered the possibility that autoantibody/autoantigen immune complexes were the relevant component. When the assays with sera and mAbs were run in the presence of DNase, stimulation of the RF+ B cells was dramatically reduced (Figure 1). These data suggested that cleavage of the DNA backbone results in the dissociation of the autoantibody/ autoantigen (DNA) immune complex. This strongly indicates that immune complexes of autoantigens/autoantibodies have unique properties which preferentially activate autoreactive B cells. The inability of immune

complexes containing non-self antigen to activate autoreactive B cells is shown in Figure 2.

[0079] We investigated the possibility that autoantibody/ autoantigen immune complexes are capable of engaging a second receptor, which then facilitates the activation of the RF B cells. Since recent studies have shown that a family of proteins known as Toll-like receptors (TLR) can bind to bacterial DNA and lead to macrophage, dendritic cell and B cell activation, we considered the possibility that TLR could play a role in the activation of these autoreactive RF B cells. TLR are currently a very popular area of study, and have been shown to be responsible to binding and recognition of many pathogen-associated molecular patterns (PAMPS), so this link to innate immune responses would be a very unique connection for autoimmunity. All known mammalian TLR signal through the adaptor protein, MyD88. TLR-mediated activation in mice in which the MyD88 gene has been eliminated by genetic engineering is severely compromised and signals mediated through TLR9 are completely abolished. We bred our transgenic RF+ mice onto a MyD88^{-/-} background. The resulting mice were positive for the RF transgenes (Figure 4A) and lacked MyD88 signaling molecules (Figure 4B).

[0080] We found that RF MyD88^{-/-} mice fail to respond to any of the autoantibodies which otherwise stimulate proliferation of RF MyD88^{+/+} B cells (see Figure 4C). We tested multiple forms of autoantibodies: serum, antinucleosome antibodies and anti-Sm antibodies. This is consistent with the hypothesis that autoantibody/autoantigen immune complexes contain repeating pattern components such as DNA or RNA which engage Toll receptors either inside the B cell (DNA/TLR9) or on the surface of the B cell (RNA/TLR3). In the case of autoreactive RF+ B cells, the autoantigen/ autoantibody immune complexes likely sequentially engage the BCR and the TLR, leading to increased activation and proliferation. This is the first demonstration that co-engagement of the BCR and TLR can result in the activation of autoreactive B cells. This connection provides a very unique link between autoimmunity and the body's innate immune response and may provide an initiating mechanism for many of the pathogenic responses in autoimmune diseases such as SLE and rheumatoid arthritis.

[0081] Subsequent studies demonstrated that drugs known to block B cell activation by stimulatory CpG ODN via TLR9, such as chloroquine and concanamycin A, completely blocked the ability of the chromatin containing IC to stimulate RF+ B cells. The response could also be blocked by inhibitory CpG ODN which specifically inhibits activation through TLR9. These data demonstrate that TLR9 is a key receptor in the activation of autoreactive B cells. The data demonstrate that the IgG component of the immune complex binds to the BCR leading to the internalization of the immune complex and delivery to an internal vesicular compartment. The subsequent engagement of TLR9 by the chromatin component of the IC within this internal compartment leads to B cell activation. Factors that contribute to the enhanced availability and thus uptake of chromatin per se (susceptibility factors for SLE) could also lead to B cell activation through a similar mechanism. It is of note that anti-chromatin antibodies are the first detectable autoantibody present in the sera of SLE patients and animals models of spontaneous SLE.

EXAMPLE 2

[0082] Patients afflicted with SLE and other systemic autoimmune diseases produce a wide range of autoantibody specificities. Very frequently these autoantibodies bind to chromatin or other subcellular nucleic acid/protein particles (Tan, E. *Adv. Immunol.* **44**, 93-151 (1989)). MRL/lpr mice, a well-studied murine model of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, also produce exceedingly high titers of IgG anti-IgG rheumatoid factor (RF) (Theofilopoulos, *et al.*, *J. Exp. Med.* **162**, 1-18 (1985); Wolfowicz, *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopath.* **46**, 382-395 (1988)). This RF response has provided a highly relevant transgenic model for the study of autoantibody regulation. B cells from the AM14 transgenic mouse line express an antigen receptor specific for IgG2a^{ab}, originally captured as a hybridoma product from the spleen of a diseased MRL/lpr mouse (Shlomchik, *et al.*, *Int. Immunol.* **5**, 1329-1341 (1993)). The AM14 allotype specificity and relatively low affinity for monomeric IgG2a are typical of the disease associated RF repertoire (Jacobson, *et al.*, *J. Immunol.* **152**, 4489-99 (1994)). In wildtype mice, AM14 RF+ B cells develop normally and remain functionally naïve (Hannum, *et al.*, *J. Exp. Med.* **184**, 1269-1278 (1996)). However, on an autoimmune-prone lpr background of the

WO 03/022296

24

PCT/US02/28708

cognate allotype, they become activated, proliferate and secrete autoantibody (Wang, and Shlomchik, *J. Exp. Med.* **190**, 639-649 (1999)). A number of factors are likely to contribute to the activation of AM14 B cells in lpr mice, not the least of which is the status of the autoantigen, IgG2a.

RF+ B Cells Are Activated By Autoantibody/Autoantigen Immune Complexes

[0083] We have previously shown that AM14 RF+ B cells can be activated *in vitro* by IgG2a^{ab} isolated from the sera of autoimmune mice, but not by comparable levels of IgG2a present in sera obtained from wildtype mice (Rifkin, *et al.*, *J. Immunol.* **165**, 1626-1633 (2000)). RF+ B cells were also found to proliferate strongly in response to affinity purified IgG2a^a mAbs specific for nucleosomes, a self-antigen, whereas IgG2a^{ab} mAbs specific for haptens or other foreign antigens produced little, if any, response (Rifkin, *et al.*, *J. Immunol.* **165**, 1626-1633 (2000)). These studies suggested that immune complexes (IC) formed between IgG2a nucleosome-specific mAbs and chromatin fragments released from co-cultured cells (Emlen, *et al.*, *J. Immunol.* **148**, 3042-3048 (1992)) could effectively activate RF+ B cells, while monomeric anti-hapten IgG2a antibodies could not. To further test this premise, DNase was added to the assay medium as a means of disrupting the putative IC. The vigorous proliferative response normally elicited by the purified anti-nucleosome mAb PL2-3 (Monestier and Novick *Mol. Immunol.* **33**, 89-99 (1996)) or by autoimmune serum was dramatically reduced (Fig. 1). Nonspecific toxicity of the DNase was not a factor as the responses to F(ab')₂ anti-IgM and LPS were unaffected (Fig. 1). These data confirm that RF+ B cells respond to IgG2a IC that contain DNA, not to monomeric IgG2a antibodies alone.

[0084] If RF+ B cell activation by IgG2a IC simply resulted from more effective crosslinking of the antigen receptor than would be possible with monomeric IgG2a, then conventional anti-hapten/hapten-protein complexes should also strongly stimulate RF+ B cells. To address this issue, ICs were prepared by pre-incubating IgG2a monoclonal anti-TNP antibodies with varying concentrations of TNP-BSA; complex formation was confirmed by demonstrating an increase in C1q binding activity (Fig. 2a). As expected, IC of C4010, an IgG2a^b anti-TNP mAb, failed to stimulate RF+ B cells at all anti-TNP/TNP-BSA ratios. Surprisingly, IC of Hy1.2, an

IgG2a⁺ anti-TNP mAb, only elicited a very modest proliferative response relative to that elicited by anti-nucleosome mAb-containing IC. This discrepancy indicated that the extent of RF+ B cell proliferation elicited by an IC depends on both the antibody and the nature of the (auto)antigen.

Activation By IC Is Not Dependent On Complement Receptor Co-Engagement

[0085] A possible explanation for the dramatic difference in stimulatory capacity of the anti-nucleosome and anti-TNP IC was that only the former could synergistically engage both the B cell receptor (BCR) and a second receptor on the B cell surface. One potential candidate receptor was the complement receptor CD21, as complement components have been shown to bind autoantigen IC and could, in theory, serve to effectively co-engage CD19/CD21 and the BCR (Carter *et al.*, *J. Immunol.* **141**, 457-463 (1988)). However, when the AM14 heavy and light chain transgenics were bred onto mice deficient for CR1/2Cr2 (Ahearn, *et al. Immunity* **4**, 251-262 (1996)), RF+ B cells from the CR1/2-deficient and CR1/2-sufficient littermates responded comparably to IgG2a anti-nucleosome mAbs and autoimmune sera (Fig. 3). B cells from control RF- littermates failed to respond to any form of IgG2a, confirming the specific nature of the ligands used in this study. A mitogenic hypomethylated CpG oligodeoxynucleotide was included as a control stimulus. These data demonstrate that complement receptors are not required for the RF+ B cell response to autoantibody/autoantigen IC.

Role Of A MyD88-Dependent Receptor

[0086] Potential candidate receptors included members of the Toll-like receptor (TLR) family. These pattern recognition receptors were first described in *Drosophila* where they were shown to trigger the release of anti-fungal peptides (Lemaitre *et al.*, *Cell* **86**, 973-983 (1996)). Subsequently identified mammalian homologues were found to recognize a series of conserved microbial products (i.e. LPS, microbial lipoproteins, and hypomethylated CpG DNA) referred to as pathogen associated molecular patterns (PAMPS) (Medzhitov, *et al.*, *Nature* **388**, 323-324 (1997); Akira, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2**, 675-680 (2001)). Initial studies focused on the effects of microbial products on cells of the innate immune system where they were found to stimulate the release of a wide range of inflammatory mediators (Akira, *et al.*, *Nat.*

Immunol. **2**, 675-680 (2001)). However, it was later shown that in addition to exogenous microbial ligands, TLRs could also recognize endogenous ligands released from damaged or stressed mammalian cells (Li, *et al.*, *J. Immunol.* **166**, 7128-7135 (2001)). All known mammalian TLRs signaling pathways use the adapter protein MyD88 (Akira, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2**, 675-680 (2001)), although in the case of TLR4, an additional MyD88-independent pathway has been described (Hornig, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2**, 835-841 (2001)).

[0087] To investigate the potential role of TLRs in mediating RF+ B cell responses to autoantibody/autoantigen IC, we crossed the AM14 transgenes onto a MyD88^{-/-} background (Adachi, *et al.*, *Immunity* **9**, 143-150 (1998)). B cells from RF- MyD88^{+/+} (wildtype), RF+ MyD88^{+/+}, and RF+ MyD88^{-/-} offspring, identified by a combination of PCR and FACS analysis (Figs. 4A-4B), were assessed for their ability to respond to anti-IgM, CpG ODN, and LPS, as well as to a panel of anti-nucleosome mAbs and autoimmune sera. B cells from the MyD88-deficient mice responded normally to anti-IgM, but were unable to respond to stimulatory CpG DNA (Hacker, *et al.*, *J. Exp. Med.* **192**, 595-600 (2000)). Their response to LPS was much lower than in wildtype mice, but still detectable, consistent with partial activation through MyD88, and responded only weakly to LPS, which is known to stimulate partially through a MyD88-independent mechanism (Hornig, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2**, 835-841 (2001)) (Fig. 4C). Most dramatically, B cells from the RF+ MyD88-deficient mice were completely unresponsive to the anti-nucleosome mAbs PR1-3 or PL2-3 or to any of the autoimmune sera that effectively stimulated RF+ MyD88^{+/+} B cells (Fig. 4C). These results clearly demonstrate that autoantibody/autoantigen IC are particularly stimulatory for RF+ B cells because they synergistically engage both the BCR and a MyD88-dependent receptor.

[0088] Hypomethylated CpG motifs are a common feature of bacterial DNA, but they are also present in mammalian DNA promoter elements (Singal and Ginder *Blood* **93**, 4059-4070 (1999)). Since the B cell response to CpG oligodeoxyribonucleotides (ODN) is mediated through TLR9 (Hemmi, *et al.*, *Nature* **408**, 740-745 (2000)), we hypothesized that chromatin-containing IC could stimulate RF B cells by co-engaging TLR9. The TLR9-mediated response to CpG S-ODN is distinguished from other known TLR signaling pathways by its presumed requirement

for endosome acidification and/or maturation as determined by sensitivity to chloroquine and ammonium chloride (Yi, *et al.*, *J. Immunol.* **160**, 4755-4761 (1998); Hacker, *et al.*, *EMBO J.* **17**, 6230-6240 (1998)). Concanamycin B and bafilomycin A are specific inhibitors of the V-type ATPase responsible for acidification of endosomes (Benaroch, *et al.*, *EMBO J.* **14**, 37-49 (1995)). To evaluate the role of TLR9 in the activation of RF+ B cells, the effect of chloroquine, concanamycin B, bafilomycin A, and ammonium chloride on the stimulatory capacity of mAb PL2-3 and known TLR2 (lipopeptide, porin B) (Massari, *et al.*, *J. Immunol.* 168:1533-1537, 2002), TLR4 (LPS), and TLR9 (CpG S-ODN 1826) ligands was determined. As expected, chloroquine inhibited the CpG S-ODN response and these inhibitors had little effect on the response to the TLR2 and TLR4 ligands. Notably, all four agents that blocked chloroquine also inhibited the RF+ B cell response to mAb PL2-3 (Figs. 5A and 5B). The link to chloroquine is intriguing, as chloroquine is an effective treatment for autoimmune diseases including rheumatoid arthritis and SLE (Canadian Hydroxychloroquine Study Group, *N. Engl. J. Med.* **324**, 150-154 (1991); Furst, *et al.*, *Arth. Rheu.* **42**, 357-365 (1999)). Our data therefore suggest that the therapeutic effects of chloroquine are due, at least in part, to its ability to interfere with TLR-mediated signals that contribute to autoantibody production or the production of proinflammatory mediators.

[0089] The B cell response to the stimulatory CpG S-ODN 1826 can also be blocked by a group of closely related inhibitory CpG S-ODN such as S-ODN 2088 (Lenart, *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **4**, 247-256 (2001)). We found that S-ODN 2088 profoundly inhibited the proliferative response to S-ODN 1826 but had no effect on the response to anti-IgM or our TLR2 and TLR4 ligands (Figure 5C and 5B). Most significantly, S-ODN 2088 also dramatically blocked the RF+ B cell response to mAb PL2-3. Overall, these data strongly implicate endosomal processing and/or engagement of an endosome-associated TLR, most probably TLR9, in RF+ B cell activation.

[0090] It has been clearly shown that autoreactive B cell clones can undergo isotype switching and somatic mutation, similar to the T-dependent features of conventional B cell responses to foreign antigens (Shlomchik, *et al.*, *Nature* **328**, 805-811 (1987)). However, more recent reports have suggested that autoreactive B

cells may segregate from conventional B cells in the peripheral lymphoid tissues; autoreactive B cells tend to localize in the marginal zone of the splenic white pulp³⁶pulp (Zeng, *et al.*, *J. Immunol.* **164**, 5000-5004 (2000)), while conventional B cells home to the follicular regions. In addition, in some instances, expansion and somatic mutation of autoreactive B cells can take place outside of the germinal center. These discrete localization patterns may reflect the preferential accumulation of stimulatory autoantibody/autoantigen IC at these sites. Alternatively, the relatively unique homing pattern may result from distinct chemokine receptor profiles elicited in response to the combined effects of BCR/TLR engagement. Future studies will need to compare the functional properties of B cells activated through BCR crosslinking alone from B cells activated through BCR/TLR dual engagement.

[0091] Autoantibodies that recognize DNA/nucleosomes are the defining and most prevalent specificity in SLE patients and murine lupus models of SLE, while RFs are characteristic of a subset of SLE patients, autoimmune-prone lpr mice, and RA patients. Remarkably, these same autoantigens are the targets in a number of new murine autoimmunity models generated by mutations that disrupt lymphocyte homeostasis or autoantigen metabolism (Botto, *et al.*, *Nature Genetics* **19**, 56-59 (1998); Bickerstaff, *et al.*, *Nature Medicine* **5**, 694-697 (1999); Napirei, *et al.*, *Nat. Gen.* **25**, 177-180 (2000); Scott, *et al.*, *Nature* **411**, 207-211 (2001)). The reason for the predominance of these particular specificities has been long-sought. Our data provide an explanation, namely the potent synergistic interaction of BCR/TLR signaling events mediated by chromatin containing immune complexes. In our experimental system, dependent on endosome/lysosome-localized TLR9 (Hacker, *et al.*, *EMBO J.* **17**, 6230-6240 (1998)), it is reasonable to conclude that autoantibody/autoantigen IC engagement of the BCR triggers the endocytosis of IC-associated antigen that then results in the highly efficient delivery of chromatin fragments to endosome-associated TLR9. In contrast to published studies (Bell, *et al.*, *J. Clin. Invest.* **85**, 1487-1496 (1990); Bell, *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopath.* **60**, 1326 (1991)), we have been unable to activate B cells with either culture supernatants or chromatin fragments alone. Whether other strains of mice will prove more responsive to our fragments remains to be determined.

[0093] Beyond the current experimental model, the principle of BCR/TLR dual-engagement has wide ranging implications for autoimmunity in general. Model ligands such as haptenated-LPS and haptenated LPSLPS-coupled SRBC can also co-signal BCRs and TLRs and are remarkably potent and specific for the B cells that have the relevant receptors (Pike, *Methods Enzymol.* 1987;150:265-75, 1987). Activation in this mode is therefore likely to be a fundamental event in the loss of peripheral B cell tolerance in a wide variety of settings; other autoantigens may signal through TLRs other than TLR9. Overall, the data establish a critical role for endogenous TLR ligands in the aberrant activation of the adaptive immune system in autoimmunity and explain why the autoantibody repertoire is often skewed toward the recognition of subcellular nucleic acid/protein particles (Tan, E. *Adv. Immunol.* 44, 93-151 (1989)).

Methods

[0093] Mice. The MRL^{+/+} AM14 BCR Tg mice described previously (Hannum, *et al.*, *J. Exp. Med.* 184, 1269-1278 (1996); Rifkin, *et al.*, *J. Immunol.* 165, 1626-1633 (2000)) were crossed to Cr2-deficient mice, kindly provided by Dr. Michael Carroll (Harvard Medical School, Boston), and the F1 offspring were intercrossed to generate AM14 Cr2 deficient and Cr2 sufficient control mice. MyD88^{-/-} mice, originally produced by Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan) (Adachi, *et al.*, *Immunity* 9, 143-150 (1998)) and kindly provided through Dr. Douglas Golenbock (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA) were crossed to AM14 MRL^{+/+} mice to generate AM14 MyD88^{-/-} and control littermate offspring. The RF⁺ offspring were initially identified by PCR, and their identity was confirmed by flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes or spleen cells, using the 4-G7 monoclonal anti-idiotypic as described (Shlomchik, *et al.*, *Int. Immunol.* 5, 1329-1341 (1993)). Complement receptor genotype was determined by flow cytometry using the FITC-conjugated 7G6 antibody (Pharmingen, San Diego, CA). MyD88 genotype was determined by PCR using the primers: MyD88F (5'-TGG CAT GCC TCC ATC ATA GTT AAC C -3') [SEQ ID NO: 1], MyD88R (5'-GTC AGA AAC AAC CAC CAC CAT GC -3') [SEQ ID NO: 2], and neoR (5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC G -3') [SEQ ID NO: 3] (MWG Biotech, High

WO 03/022296

30

PCT/US02/28708

Point, NC) to yield wild type and knockout products of approximately 550bp and 750bp respectively.

[0094] Cell culture and reagents. Spleen cell preparations were T-depleted and cultured with the appropriate ligands for 40-48 hrs. In some experiments, B cells were preincubated with CD40L as described (Rifkin, *et al.*, *J. Immunol.* **165**, 1626-1633 (2000)). Proliferation was assessed by ³[H]-thymidine incorporation during the final 16 hours of culture. Data are presented as the mean percentage of the anti-IgM response from triplicate cultures. The percentage of the anti-IgM response was calculated according to the formula: [(cpm experimental condition - cpm CD40L alone)/(cpm anti-IgM - cpm CD40L alone) x 100].

[0095] Ligands included: goat anti-mouse IgM F(ab')₂ (15 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA); the nucleosome specific mAbs PR1-3 (IgG2a^a), PL2-3 (IgG2a^a), and PL2-8 (IgG2b) (all at 50 µg/ml), kindly provided by Dr. Marc Monestier (Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA) (Monestier and Novick *Mol. Immunol.* **33**, 89-99 (1996)); 10 µg/ml LPS (Sigma, St. Louis, MO); 0.3-2 µg/ml stimulatory CpG S-ODN 1826 (Yi, *et al.*, *J. Immunol.* **160**, 4755-4761 (1998)) (Oligo's Etc, Wilsonville, OH), 10 µg/ml *Neisseria Meningitidis* porin B (kindly provided by Dr. Lee Wetzler, Boston University School of Medicine, Boston, MA); 10 µg/ml synthetic lipopeptide Pam₃Cys-Sk₄ (Dr. G. Jung, Univ. of Tuebingen, Germany, kindly provided by Dr. Doug Golenbock); and the anti-TNP mAbs Hy1.2 (IgG2a^a) and C1040 (IgG2a^b) (Hannum, *et al.*, *J. Exp. Med.* **184**, 1269-1278 (1996)) (both at 50 µg/ml) complexed to varying concentrations of TNP-BSA. In some experiments, DNase I (type IV) (Sigma, St. Louis, MO), chloroquine (Sigma), concanamycin B, bafilomycin A (Sigma), or 12 µg/ml of the inhibitory CpG S-ODN 2008 (Lenart, *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **4**, 247-256 (2001)) (Oligo's Etc.) were added to the cultures 15 -30 min-2 hr before the addition of the ligands. All mAb and ODN preparations were shown to be endotoxin free by Limulus Amebocyte Lysate ELISA (Bio-Whittaker, Walkersville, MD).

EXAMPLE 3

[0096] We have further shown that dendritic cells are activated by chromatin-containing immune complexes through sequential engagement of the Fc-receptor and TLR 9. This is a similar mechanism to that we have described for B cells except that in the case of the B cell, the relevant cell surface receptor is the B cell antigen receptor, whereas in dendritic cells the relevant cell surface receptor is an Fc gamma receptor (FcγR). Both cell surface receptors serve to deliver chromatin to TLR9 located within the endosome/lysosome compartment.

[0097] In Figures 8A-8C we show that dendritic cells can be specifically activated through TLR9 and this activation can be blocked by TLR9 inhibition with ODN 2088. These experiments demonstrate that the dendritic cells that we use in the subsequent experiments (shown in Tables 1 and 2 below) express functional TLR9, in that the specific TLR9 activating ligand ODN 1826 induces TNF-α and IL-12 production by the dendritic cells (8A, 8B) and furthermore induces upregulation of co-stimulatory molecules (8C). ODN 2088 is a specific inhibitor of the TLR9 mediated activation because (as shown in 8A, 8B, 8C), ODN 2088 blocks ODN 1826 mediated activation but has no effect on LPS mediated activation.

[0098] Dendritic cells were generated from the bone marrow of C57BL/6 mice by in vitro culture with GM-CSF and IL-4 for 6 days. On day 6, the CD11c positive dendritic cells were isolated using magnetic beads (Miltenyi Biotec) and either pre-incubated, or not pre-incubated, for 30 minutes with ODN 2088, an inhibitory oligodeoxynucleotide that specifically blocks signaling through TLR9. The stimulatory ODN 1826 (CpG, 3μg/ml), that specifically activates through TLR9, or lipopolysaccharide (LPS, 10μg/ml), that activates through TLR4, or culture medium only (media), was then added to the cultures. After 48 hours, levels of TNF-α (8A) and IL-12 (8B) in the culture supernatants were measured by ELISA (results shown as OD units determined by absorption at 405nm). After removal of the supernatants, cells were collected and analyzed by flow cytometry for expression of the co-stimulatory molecule CD86 (8C). Unstimulated refers to the level of expression of CD86 in the presence of media alone, whereas stimulated refers to the level of expression of CD86 in the presence of the stimulus (ODN 1826 or LPS).

WO 03/022296

32

PCT/US02/28708

[0099] Table 1 below shows that chromatin-containing immune complexes (containing autoantibody in a complex with the chromatin autoantigen) activate dendritic cells to produce TNF- α whereas immune complexes containing a foreign antigen (TNP-BSA) do not induce this dendritic cell activation. Additionally, the activation induced by the chromatin-containing immune complexes is completely blocked by the TLR9 specific inhibitor ODN 2088, indicating that engagement of TLR9 (presumably by the chromatin within the chromatin-containing immune complex) is an essential component of the activation process.

Table 1

Stimulus	None	2088
Media (no stimulus)	< 50	< 50
ODN 1826	2347	< 50
LPS	2514	2393
PL2-3	1653	< 50
TNP/ α TNP-BSA IC 1:1	< 50	< 50
TNP/ α TNP-BSA IC 4:1	< 50	< 50
TNP/ α TNP-BSA IC 16:1	< 50	< 50

[00100] Table 1 shows that dendritic cell TNF- α production induced by chromatin-containing immune complexes is blocked by the TLR9 specific inhibitor ODN 2088. Dendritic cells were generated from the bone marrow of C57BL/6 mice by in vitro culture with GM-CSF and IL-4 for 6 days. On day 6, the CD11c positive dendritic cells were isolated using magnetic beads (Miltenyi Biotec). The dendritic cells were then either pre-incubated, or not pre-incubated, for 30 minutes with ODN 2088 at 12 μ g/ml. The stimulatory ODN 1826 (3 μ g/ml), that specifically activates through TLR9, lipopolysaccharide (LPS, 10 μ g/ml), that activates through TLR4, the anti-chromatin antibody PL2-3 (50 μ g/ml), three different antibody/protein ratios of α -TNP/TNP-BSA immune complexes (50 μ g/ml), or the culture medium only (media), was then added to the cultures. After 48 hours, levels of TNF- α in the culture supernatants was measured by ELISA (results shown as pg/ml; lower level of

WO 03/022296

33

PCT/US02/28708

sensitivity of assay is 50 pg/ml). A representative experiment of 3 similar experiments is shown.

[00101] Table 2 shows that chromatin-containing immune complexes induce TNF- α production by dendritic cells from wildtype mice (as was also seen in the studies shown in table1 in the absence of ODN 2088) but completely fail to induce TNF- α production by dendritic cells from Fc receptor γ chain deficient mice. This demonstrates that an activating Fc receptor is absolutely required for dendritic cell activation by chromatin-containing immune complexes.

Table 2

Stimulus	wildtype	Fc receptor γ chain deficient
Media (no stimulus)	< 50	< 50
ODN 1826	7899	2373
LPS	7056	3411
PL2-3	4554	< 50
PL2-8	3964	< 50
TNP/ α TNP-BSA IC 1:1	< 50	< 50
TNP/ α TNP-BSA IC 4:1	< 50	< 50

[00102] Table 2 demonstrates that chromatin-containing immune complexes induce TNF- α production by dendritic cells from wildtype mice but do not induce TNF- α production by dendritic cells from Fc receptor γ chain deficient mice. Dendritic cells were generated from the bone marrow of C57BL/6 wildtype mice and from C57BL/6 mice lacking the Fc receptor γ chain in by in vitro culture of the bone marrow cells with GM-CSF and IL-4 for 6 days. On day 6, the CD11c positive dendritic cells were isolated using magnetic beads. The stimulatory ODN 1826 (3 μ g/ml), that specifically activates through TLR9, lipopolysaccharide (LPS, 10 μ g/ml), the anti-chromatin antibodies PL2-3 (50 μ g/ml; IgG2a) and PL2-8 (50 μ g/ml; IgG2b), two different antibody/protein ratios of α -TNP/TNP-BSA immune complexes (50 μ g/ml), or the culture medium only (media), was then added to the dendritic cell cultures. After 48 hours, levels of TNF- α in the culture supernatants

WO 03/022296

34

PCT/US02/28708

was measured by ELISA (results shown as pg/ml; lower level of sensitivity of assay is 50 pg/ml). A representative experiment of 2 similar experiments is shown.

[00103] Taken together, the data shown in Table 1 and Table 2 above demonstrate that dendritic cell activation induced by chromatin-containing immune complexes requires a signal through an activating Fc γ receptor as well as a signal mediated through TLR9.

[00104] Additional experiments to evaluate mechanisms and consequences of this Fc γ R/TLR dual engagement pathway are outlined below.

Characterization of the IFN- α producing dendritic cell subsets.

[00105] *Mouse strains.* Differences in dendritic cell and macrophage function between autoimmune lupus-like and non-autoimmune mouse strains have been described. These include differences in immune complex handling (Jones et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 36: 30-39, 1985; Magilavy et al., J. Immunol. 131: 2784-2788, 1983), phagocytosis (Russell, and Steinberg Clin. Immunol. Immunopathol. 27: 387-402, 1983), Fc receptor expression and function (Pritchard et al., Current Biology. 10: 227-230, 2000; Jiang et al., Immunogenetics. 51: 429-435, 2000) and cytokine production (Alleva et al., J. Immunol. 159: 5610-5619, 1997; Kohet et al., J. Immunol. 165: 4190-4201, 2000). It is therefore important to directly compare dendritic cells derived from both autoimmune and non-autoimmune strains. MRL+/+ and (NZBxNZW) F1 are the two autoimmune lupus-like strains and C57BL/6 and BALB/c are the two non-autoimmune strains that are used.

[00106] *Purification of dendritic cell subsets.* There are 2 dendritic cell subsets which are particularly important in the pathogenesis of SLE: CD11c+ CD8 α + and CD11c+ B220+ Gr-1+. These cells are either obtained directly from the spleen (Hochrein et al., J. Immunol. 166: 5448-5455, 2000; Nakano et al., J. Exp. Med. 194: 1171-1178, 2001) or generated by *in vitro* culture of bone marrow cells in the presence of Flt3 ligand (Brasel et al., Blood. 96: 3029-3039, 2000; Gilliet et al., J. Exp. Med. 195: 953-958, 2002). Splenic dendritic cells are isolated as described (Vremec et al., J. Immunol. 164: 2978-2986, 2000) and, after appropriate fluorescent antibody staining, the specific dendritic cell subsets are fractionated and collected

WO 03/022296

35

PCT/US02/28708

using a MoFlo cell sorter (Cytomation, Fort Collins, CO). The CD11c⁺ CD8 α -dendritic cell subset, which is also found in the spleen, are isolated at the same time as the target CD11c⁺ CD8 α ⁺ dendritic cell subset and used as an experimental control.

[00107] To generate bone marrow derived dendritic cells, bone marrow cells are harvested and cultured *in vitro* for 6-10 days in the presence of recombinant murine Flt3 ligand using established protocols (Gillet et al., J. Exp. Med. 195: 953-958, 2002; Labeur et al., J. Immunol. 162: 168-175, 1999). Bone marrow cells grown in Flt3 ligand are enriched in the target populations, namely CD11c⁺ CD8⁺ and CD11c⁺ B220⁺ Gr-1⁺ dendritic cells. These populations are fractionated by cell sorting as described above for the spleen-derived dendritic cells.

[00108] *Determining the expression of TLR9 in the specific dendritic cell subsets.* TLR9 messenger RNA is measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, the response of the dendritic cell subsets to a TLR9-specific stimulatory ligand, S-ODN 1826 (Ballas et al., J. Immunol. 167: 4878-4886, 2001), are compared by measuring expression of co-stimulatory molecules and cytokine production. Specific antibodies against murine TLR9 can be produced using techniques known to one skilled in the art.

Preparation of IC and assessment of IC binding and uptake by dendritic cells.

[00109] *Immune complex preparation.* Anti-nucleosome/chromatin IC is prepared by incubating the anti-nucleosome monoclonal antibodies PL2-3 (IgG2a), PL2-8 (IgG2b) and PL9-7 (IgG3) with supernatant obtained from 24 hour *in vitro* cultures of spleen cells. Chromatin is spontaneously released from spleen cells in culture (Bell et al., J. Clin. Invest. 85: 1487-1496, 1990) and binding of the anti-nucleosome antibodies to this chromatin results in the formation of IC which can be measured using a C1q immunoassay (Rifkin et al., Journal of Immunology. 165: 1626-1633, 2000). We have further shown that biotinylated PL2-3 preincubated with culture fluid binds specifically to rheumatoid factor B cells as detected by flow cytometry; monomeric biotinylated PL2-3 does not bind. Non-self antigen control IC is made using the anti-TNP monoclonal antibodies Hy1.2 (IgG2a) or C4010 (IgG2b) and incubating them with TNP-BSA, with confirmation of IC formation also by C1q binding as demonstrated (Leadbetter et al., Nature. 416: 603-607, 2002). Additional

non-self antigen control IC is made using the anti-ovalbumin monoclonal antibodies Ov1 (IgG2a) and Ov2 (IgG2b) prepared in this laboratory and incubating them with ovalbumin. As well as demonstrating IC formation in a C1q binding assay, FPLC is also used as an additional confirmatory assay.

[00110] *Immune complex binding and uptake by dendritic cells.* Before setting up the actual experimental cultures containing the IC and dendritic cells, it is necessary to determine the extent to which the purified dendritic cell subsets from the different strains are able to bind and take up IC. This is particularly important given the reported differences between autoimmune and non-autoimmune mouse strains as regards IC handling (Jones et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 36: 30-39, 1985; Magilavy et al., J. Immunol. 131: 2784-2788, 1983) and Fc receptor expression (Pritchard et al., Current Biology. 10: 227-230, 2000; Jiang et al., Immunogenetics. 51: 429-435, 2000). The experimental approach is to track the antibody component of the immune complex using a combination of flow cytometry and confocal microscopy. The anti-nucleosome antibodies PL2-3 (IgG2a), PL2-8 (IgG2b) and PL9-7 (IgG3) are biotin-conjugated, using standard procedures, and biotin-anti-nucleosome/chromatin IC are prepared as above. To confirm that the biotin-anti-nucleosome/chromatin IC retains functionality it is assessed whether the biotin-PL2-3/chromatin IC is able to induce proliferation in rheumatoid factor B cells to the same extent as the non-biotin-PL2-3/chromatin IC (Rifkin et al., Journal of Immunology. 165: 1626-1633, 2000). The biotin-PL2-8/chromatin IC and the biotin-PL9-7/chromatin IC cannot be tested in this way because IgG2b and IgG3 are not recognized by the rheumatoid factor B cell receptor, but it is assumed that the functional effect of biotin-conjugation will be similar irrespective of isotype. Isotype-matched biotin-anti-TNP/TNP-BSA IC and biotin-anti-ovalbumin/ovalbumin IC are prepared similarly. Biotin-conjugated antibodies alone not made into complexes are used as controls. The biotin-conjugated IC and biotin-conjugated antibodies alone are added to the different dendritic cell subsets, and flow cytometry is used to detect cell surface binding. The biotin-labeled compounds are visualized with an anti-biotin monoclonal antibody conjugated to a specific fluorochrome (Molecular Probes: anti-biotin mouse monoclonal 2F5 Alexa Fluor 488 conjugate). Subsequently, confocal microscopy is used to assess dendritic cell internalization of the anti-nucleosome

WO 03/022296

37

PCT/US02/28708

antibody (biotin-anti-nucleosome/chromatin IC), the anti-TNP antibody (biotin-anti-TNP/TNP-BSA IC) or the anti-ovalbumin antibody (biotin-anti-ovalbumin/ovalbumin IC) following incubation periods of 1-12 hours and fixation with 3% paraformaldehyde.

[00111] In addition, co-localization studies are performed by co-staining with fluorescent-labeled monoclonal antibodies specific for endosomal/lysosomal compartments, or by the use of fluorescent pH indicators that partition into acidic organelles (Molecular Probes).

Measurement of dendritic cell activation by chromatin-containing IC and establishment of the role of Toll-like receptors and Fc gamma receptors.

[00112] *Measuring dendritic cell activation by IC.* The anti-nucleosome/chromatin IC, anti-TNP/TNP-BSA IC and anti-ovalbumin/ovalbumin IC outlined above are incubated with the dendritic cell subsets and dendritic cell activation determined by measuring upregulation of co-stimulatory molecules and cytokine production. Controls include the monomeric non-complexed antibodies alone, antigens alone, stimulatory CpG S-ODN 1826 as a positive control for TLR9 signaling, LPS as a positive control for TLR4 signaling and porin B as a positive control for TLR2 signaling. Cytokines are measured by ELISA and include IL-12, TNF- α , IL-10 and IFN- α . IL-12 and TNF- α are the two cytokines most commonly used as markers of dendritic cell activation (Banchereau et al., Annu. Rev. Immunol. 18: 767-811, 2000) and IFN- α is the cytokine most strongly associated with the activation of the CD11c⁺ CD8 α ⁺ and the CD11c⁺ B220⁺ Gr-1⁺ dendritic cell subsets. It is necessary to measure IL-10 as it has been shown that Fc receptor engagement in macrophages can lead to IL-10 production induced by a subsequent stimulus which, in the absence of Fc receptor engagement, leads to IL-12 and not IL-10 production (Gerber and Mosser J.Immunol. 166: 6861-6868., 2001). The increased expression of MHC class II and the co-stimulatory molecules CD80, CD86, and CD40 is determined by flow cytometry .

[00113] *Role of Toll-like receptors and Fc gamma receptors in IC-mediated dendritic cell activation.* S-ODN 2088 is an inhibitory CpG S-ODN which specifically blocks signaling through TLR9 (Lenert et al., Antisense and Nucleic Acid

Drug Development. *11*: 247-256, 2001). We have shown that S-ODN 2088 strongly inhibits the chromatin-containing IC-induced proliferation of B cells from rheumatoid factor B cell receptor transgenic mice (Leadbetter et al., *Nature*. *416*: 603-607, 2002 (Leadbetter et al., *Nature*. *416*: 603-607, 2002). Also, we have shown that S-ODN 2088 completely prevents dendritic cell activation by stimulatory CpG S-ODN (such as S-ODN 1826) acting through TLR9. The experiments outlined above are done in the presence or absence of S-ODN 2088 to assess the role of TLR9 in IC-mediated dendritic cell activation. They are also done in the presence and absence of inhibitors of endosomal acidification, including chloroquine, concanamycin B and bafilomycin A, which prevent signaling through TLR9. In addition, dendritic cells from C57BL/6 MyD88^{+/+} mice are compared to dendritic cells from C57BL/6 MyD88^{-/-} mice to establish the requirement for TLR signaling.

[00114] In order to assess the requirement for Fc gamma receptor (FcγR) signaling, experiments are also done in the presence and absence of 2.4G2, a monoclonal antibody that specifically blocks murine FcγRII and FcγRIII (Araujo-Jorge et al., *Infect Immun*. *61*: 4925-4928., 1993). However, the third type of murine Fc gamma receptor, FcγRI, is not blocked by 2.4G2 and can mediate IC-induced inflammatory responses (Ioan-Facsinay et al., *Immunity*. *16*: 391-402., 2002; Barnes et al., *Immunity*. *16*: 379-389, 2002). Dendritic cells express all three classes of FcγR (FcγRI, FcγRII and FcγRIII) (Ravetch and Bolland, *Ann. Rev. Immunol*. *19*: 275-290, 2001). Therefore, additional studies can be performed using FcγR knockout mice. The mice are available from Jackson Laboratories, and include i) mice rendered genetically deficient in FcγRI and FcγRIII by knockout of the common stimulatory signal-transducing gamma chain shared by these two receptors (Takai et al., *Cell*. *76*: 519-529., 1994) ii) FcγRII knockout mice (Takai et al., *Nature*. *379*: 346-349., 1996) and iii) FcγRIII knockout mice (Hazenbos et al., *Immunity*. *5*: 181-188., 1996).

[00115] *Role of IC and TLR9 in antigen processing and presentation by dendritic cells.* CD4⁺ autoreactive T cells are central to the pathogenesis of SLE, both in humans and in murine models of the disease (Craft et al., *Immunol. Res*. *19*., 1999; Hoffman, *Front. Biosci*. *6*: D1369-78, 2001; Shlomchik et al., *Nature Rev. Immunol*. *1*: 147-153., 2001). Dendritic cells are the key antigen presenting cells involved in

initiating T cell responses (Banchereau et al., *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 767-811, 2000) and TLR9 engagement has been shown to strongly promote development of Th1-type immune responses (Jakob et al., *J. Immunol.* **161**: 3042-3049, 1998; Lipford et al., *J. Immunol.* **165**: 1228-1235, 2000). To show whether TLR9 engagement alters the T cell response to antigen contained within immune complexes, ovalbumin is conjugated to the stimulatory CpG S-ODN 1826 as described (Shirota et al., *J. Immunol.* **164**: 5575-5582, 2000). IC is consequently made by incubating unconjugated ovalbumin or the ovalbumin-CpG conjugate with the anti-ovalbumin monoclonal antibodies Ov1 (IgG2a) or Ov2 (IgG2b). Dendritic cell subsets from BALB/c mice (H-2^b) are pulsed with these IC. CD4⁺ T cells, which recognize ovalbumin in the context of H-2A^b, are purified from the lymph nodes of ovalbumin-specific T cell receptor transgenic mice (DO11.10 mice) (Murphy et al., *Science* **250**: 1720-1723, 1990). These CD4⁺ T cells are cultured with the IC-pulsed dendritic cells and T cell proliferation and cytokine production (IFN-gamma, IL-4 and IL-2) is measured during primary and secondary T cell responses. S-ODN 2088 and endosomal acidification inhibitors is used to assess the role of TLR9.

REFERENCES

1. Tan, E. *Adv. Immunol.* **44**, 93-151 (1989).
2. Theofilopoulos, et al., *J. Exp. Med.* **162**, 1-18 (1985).
3. Wolfowicz, et al., *Clin. Immunol. Immunopath.* **46**, 382-395 (1988).
4. Shlomchik, et al., *Int. Immunol.* **5**, 1329-1341 (1993).
5. Jacobson, et al., *J. Immunol.* **152**, 4489-99 (1994).
6. Hannum, et al., *J. Exp. Med.* **184**, 1269-1278 (1996).
7. Wang, and Shlomchik, *J. Exp. Med.* **190**, 639-649 (1999).
8. Rifkin, et al., *J. Immunol.* **165**, 1626-1633 (2000).
9. Emlen, et al., *J. Immunol.* **148**, 3042-3048 (1992).
10. Monestier and Novick *Mol. Immunol.* **33**, 89-99 (1996).
11. Carter et al., *J. Immunol.* **141**, 457-463 (1988).
12. Ahearn, et al. *Immunity* **4**, 251-262 (1996).

WO 03/022296

40

PCT/US02/28708

13. Lemaitre *et al.*, *Cell* **86**, 973-983 (1996).
14. Medzhitov, *et al.*, *Nature* **388**, 323-324 (1997).
15. Akira, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2**, 675-680 (2001).
16. Li, *et al.*, *J. Immunol.* **166**, 7128-7135 (2001).
17. Horng, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2**, 835-841 (2001).
18. Adachi, *et al.*, *Immunity* **9**, 143-150 (1998).
19. Hacker, *et al.*, *J. Exp. Med.* **192**, 595-600 (2000).
20. Singal and Ginder *Blood* **93**, 4059-4070 (1999).
21. Hemmi, *et al.*, *Nature* **408**, 740-745 (2000).
22. Yi, *et al.*, *J. Immunol.* **160**, 4755-4761 (1998).
23. Hacker, *et al.*, *EMBO J.* **17**, 6230-6240 (1998).
24. Benaroch, *et al.*, *EMBO J.* **14**, 37-49 (1995).
25. Massari, *et al.*, *J. Immunol.* (in press).
26. Group, T. C. H. S. *N. Engl. J. Med.* **324**, 150-154 (1991).
27. Furst, *et al.*, *Arth. Rheu.* **42**, 357-365 (1999).
28. Lenart, *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **4**, 247-256 (2001).
29. Shlomchik, *et al.*, *Nature* **328**, 805-811 (1987).
30. Zeng, *et al.*, *J. Immunol.* **164**, 5000-5004 (2000).
31. Botto, *et al.*, *Nature Genetics* **19**, 56-59 (1998).
32. Bickerstaff, *et al.*, *Nature Medicine* **5**, 694-697 (1999).
33. Napirei, *et al.*, *Nat. Gen.* **25**, 177-180 (2000).
34. Scott, *et al.*, *Nature* **411**, 207-211 (2001).
35. Bell, *et al.*, *J. Clin. Invest.* **85**, 1487-1496 (1990).
36. Bell, *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopath.* **60**, 1326 (1991).
37. Moller, *et al.*, *Cell. Immunol.* **4**, 416-424 (1972).

WO 03/022296

41

PCT/US02/28708

38. Blanco, *et al.*, Science. 294: 1540-1543., 2001.
39. Vallin, *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 115: 196-202, 1999.
40. Vallin, *et al.*, J. Immunol. 163: 6306-6313, 1999.
41. Cella, *et al.*, Nat. Med. 5: 919-923., 1999.
42. Siegal, *et al.*, Science. 284: 1835-1837., 1999.
43. Hooks, *et al.*, N. Engl. J. Med. 301: 5-8., 1979.
44. Ytterberg, *et al.*, Arthritis Rheum. 25: 401-406., 1982.
45. Bengtsson, *et al.*, Lupus. 9: 664-671., 2000.

The references cited herein and throughout the specification are herein incorporated by reference in their entirety.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of treating a patient having an Immune Complex Associated Disease (ICAD) or a systemic autoimmune disease or at risk for an ICAD or a systemic autoimmune disease comprising administering to the patient an effective amount of a compound that inhibits the immune complexes or autoantigens from binding to or activating a Toll-like receptor, wherein said immune complex comprises an autoantibody and an autoantigen bound to a cell receptor.
2. The method of claim 1, wherein the ICAD is systemic lupus erythematosus.
3. The method of claim 1, wherein the ICAD is rheumatoid arthritis.
4. The method of claim 1, wherein the ICAD is hepatitis-C related immune complex disease.
5. The method of claim 1 wherein the Toll-like receptor is Toll-like receptor-9.
6. The method of claim 1 wherein the Toll-like receptor is Toll-like receptor-3.
7. The method of claim 1, wherein the compound is selected from the group consisting of
 - (a) compounds that bind components of the immune complex and prevent its formation or binding to the Toll-like receptor;
 - (b) Toll-like receptor decoys;
 - (c) compounds that inhibit the activity of MyD88 or other components of a TLR-initiated signaling cascade;
 - (d) compounds that inhibit production of immune complex components; and
 - (e) a Toll-like receptor antagonist.
8. The method of claim 1, wherein the compound is an antibody that binds a Toll-like receptor.
9. The method of claim 8, wherein the antibody is a single chain antibody.

WO 03/022296

43

PCT/US02/28708

10. The method of claim 7, wherein a cocktail of compounds that inhibit binding to a combination of at least two of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-3, and Toll-like receptor-9 is used.
11. The method of claim 7, wherein the Toll-like receptor antagonist is an inhibitory oligonucleotide.
12. The method of claim 7, wherein the Toll-like receptor antagonist is a dominant negative Toll-like receptor.
13. A method for screening compounds that inhibit immune complex formation or binding to a Toll-like receptor comprising contacting immune complex components with the compound being screened and measuring B cell activation and/or proliferation and/or binding of the antigenic fragment of an immune complex to the Toll-like receptor, wherein said immune complex comprises an autoantibody and an autoantigen.
14. A method for screening compounds that inhibit immune complex formation or binding to a Toll-like receptor comprising contacting immune complex components with the compound being screened and measuring dendritic cell activation and/or binding of the antigenic fragment of an immune complex to the Toll-like receptor and/or cell morphology, wherein said immune complex comprises an autoantibody and an autoantigen.
15. Use of a compound that inhibits the immune complexes or autoantigens from binding to or activating a Toll-like receptor, wherein said immune complex comprises an autoantibody and an autoantigen bound to a cell receptor, to treat a patient having an immune complex associated disease (IDAC) or a systemic autoimmune disease or at risk for an ICAD or a systemic autoimmune disease.
16. The compound of claim 15, wherein the compound is selected from the group consisting of
 - (a) compounds that bind components of the immune complex and prevent its formation or binding to the Toll-like receptor;
 - (b) Toll-like receptor decoys;

WO 03/022296

44

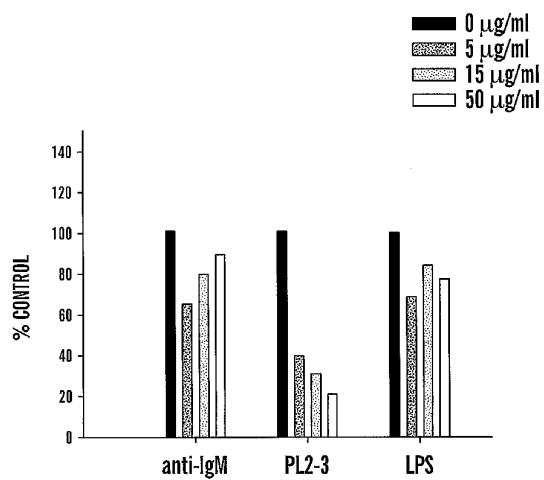
PCT/US02/28708

- (c) compounds that inhibit the activity of MyD88 or other components of a TLR-initiated signaling cascade;
- (d) compounds that inhibit production of immune complex components; and
- (e) a Toll-like receptor antagonist.

WO 03/022296

PCT/US02/28708

1/12

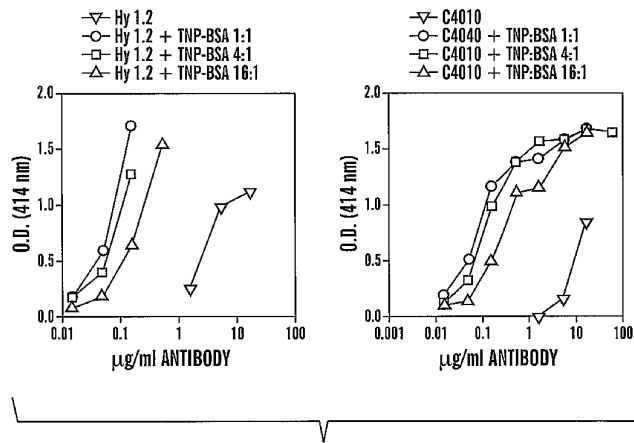
**FIG. 1**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

2/12

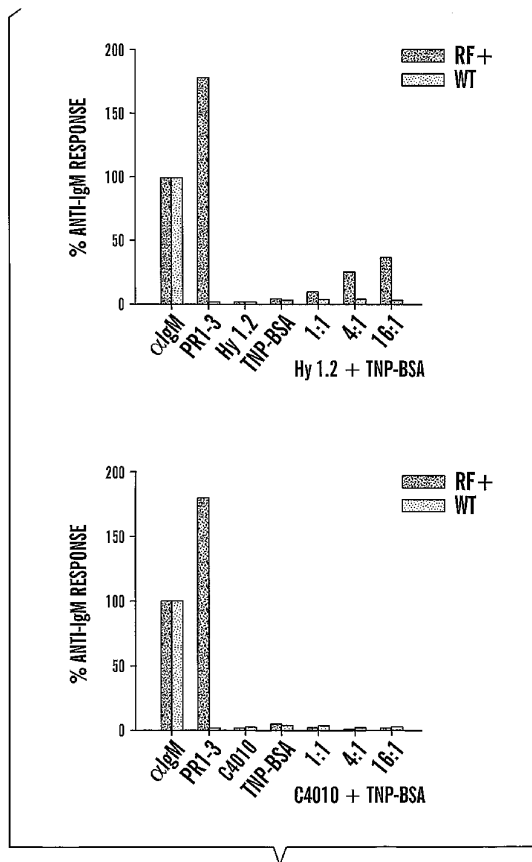
**FIG. 2a**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

3/12

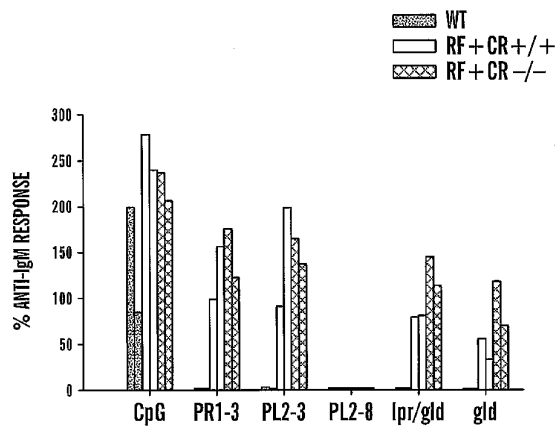
**FIG. 2b**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

4/12

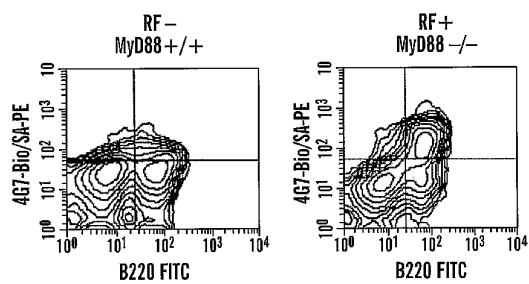
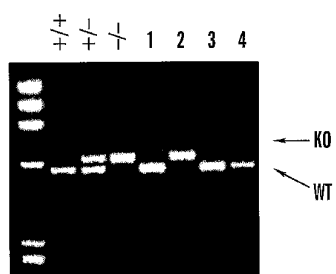
**FIG. 3**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

5/12

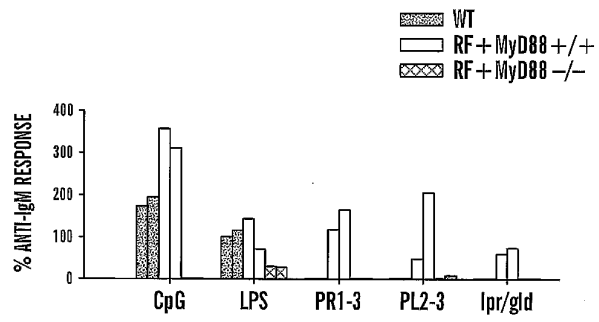
**FIG. 4a****FIG. 4b**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

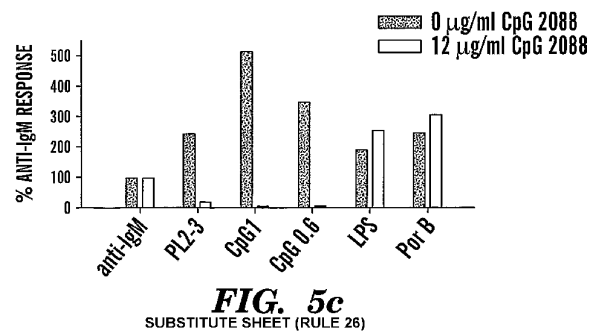
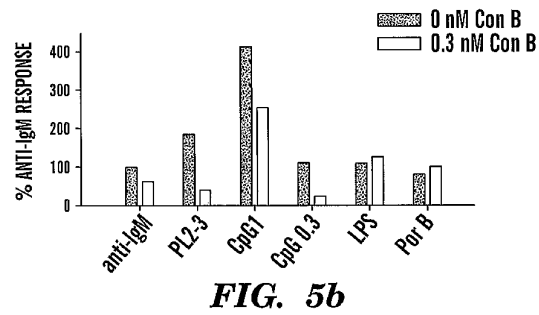
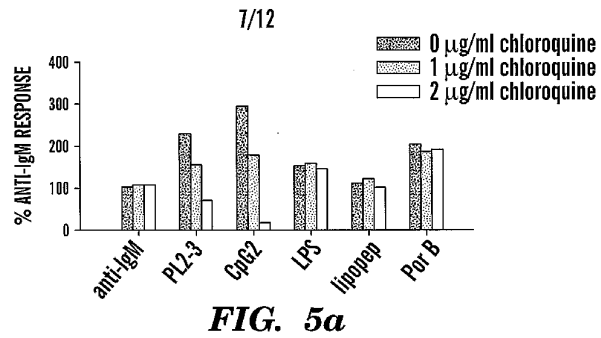
6/12

**FIG. 4c**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

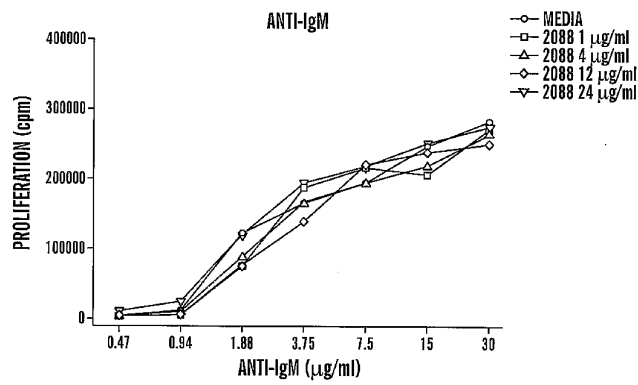
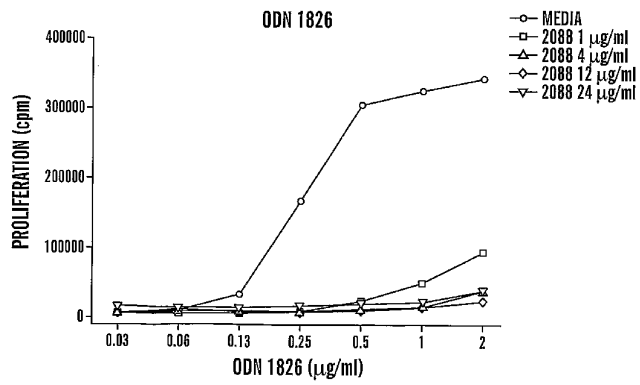
8/12

**FIG. 6A****FIG. 6B**

WO 03/022296

PCT/US02/28708

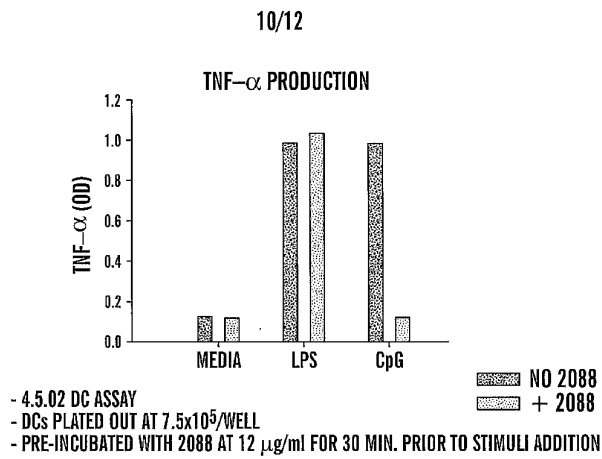
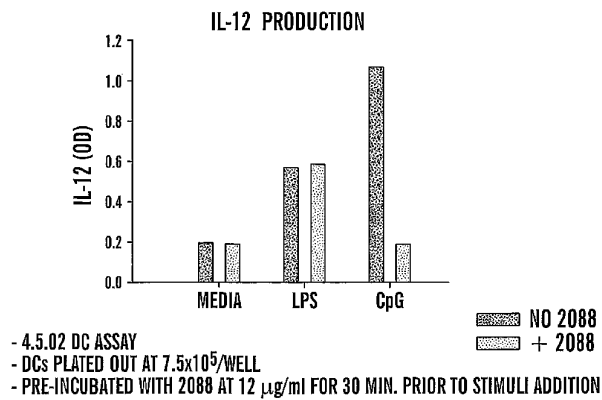
9/12

**FIG. 7A****FIG. 7B**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

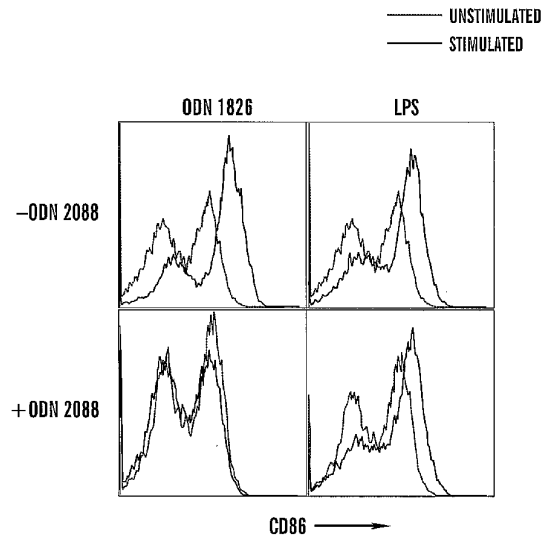
**FIG. 8A****FIG. 8B**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/022296

PCT/US02/28708

11/12

**FIG. 8C**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

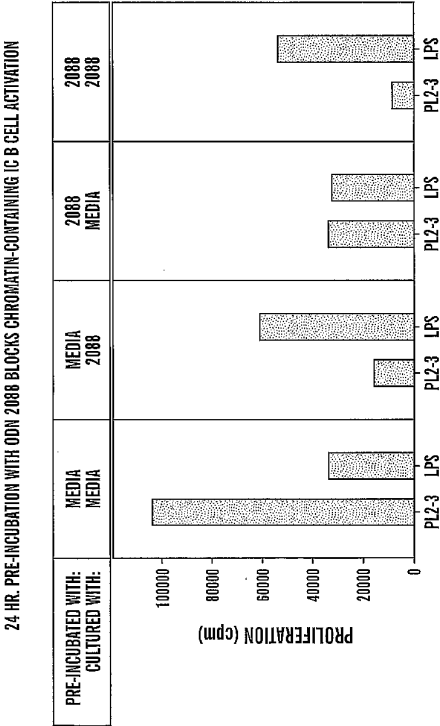


FIG. 9

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/28708
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/00, 39/395; G01N 33/567; US CL : 514/2, 424/139.1, 435/7.21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 424/139.1, 435/7.21 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	US 2002/0077304 A1 (PERSING et al.) 20 June 2002 (20.06.2002), page 1, paragraph 3, page 3, paragraph 31, page 4, paragraph 32.	1-4, 7, 10, 13-16
A, P	VINUSA, C.G, et al. DNA Drives Autoimmunity. Nature. 11 April 2002, Vol. 416, No. 6881, pages 595, 597, and 598.	1-16
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
18 November 2002 (18.11.2002)	03 DEC 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Teresa D. Roberts for Name: Andres Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/28708

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN, EAST
search terms: TLR, toll, autoimmune, B cell

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マーシャック - ロスステイン, アン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9, ニードハム, ロイス ロード 4 0

(72) 発明者 リードベター, エリザベス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 1, ロズリンデール, コーネル ストリート
2 4 6, アpartment 2

(72) 発明者 リフキン, イアン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9, ボストン, ウェスト コンコード ストリート
1 4 7 ナンバー 3

F ターム(参考) 4B063 QA06 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33 QX02
4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 ZA752 ZA962 ZB072 ZB152 ZB212
4C085 AA13 AA14 BB11 DD63 DD88
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 ZA75 ZA96 ZB07 ZB21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005501917A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003526424	申请日	2002-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	波士顿大学的受托人		
申请(专利权)人(译)	波士顿大学的受托人		
[标]发明人	マーシャックロスステインアン リードベターエリザベス リフキンイアン		
发明人	マーシャック-ロスステイン, アン リードベター, エリザベス リフキン, イアン		
IPC分类号	A61K45/00 A61K31/7088 A61K39/395 A61P1/16 A61P19/02 A61P37/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 A61K38/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/16 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/44 C07K2317/21 G01N33/5047 G01N33/564 G01N2500/00 G01N2500 /02 G01N2800/102		
FI分类号	A61K45/00 A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/16 A61P19/02 A61P37/02 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N A61K37/02		
F-TERM分类号	4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063 /QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/ZA752 4C084/ZA962 4C084 /ZB072 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD63 4C085 /DD88 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZA75 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB21		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/318096 2001-09-07 US 60/367578 2002-03-26 US		
其他公开文献	JP2005501917A		

摘要(译)

本发明提供了用于治疗患有或有风险发展免疫复合物相关疾病 (ICAD) 的患者的方法和组合物。本发明基于观察到含染色质的免疫复合物通过双受体结合过程激活自体反应性B细胞和树突细胞, 并且该过程与两种细胞类型中的Toll样受体 (TLR) 相关根据调查结果。治疗ICAD的方法包括1) 通过阻止TLR的形成和/或与TLR的结合来抑制免疫复合物的形成, 或2) 含有自身抗原的免疫复合物与TLR的结合, 或3) 通过BCR和TL, 通过免疫缀合物或未缀合的自身抗原向有此需要的个体施用抑制由R (在B细胞中) 或FcR和TLR (在树突细胞中) 的双重结合引发的信号转导途径的化合物它包括。