

(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2004-506901
(P2004-506901A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

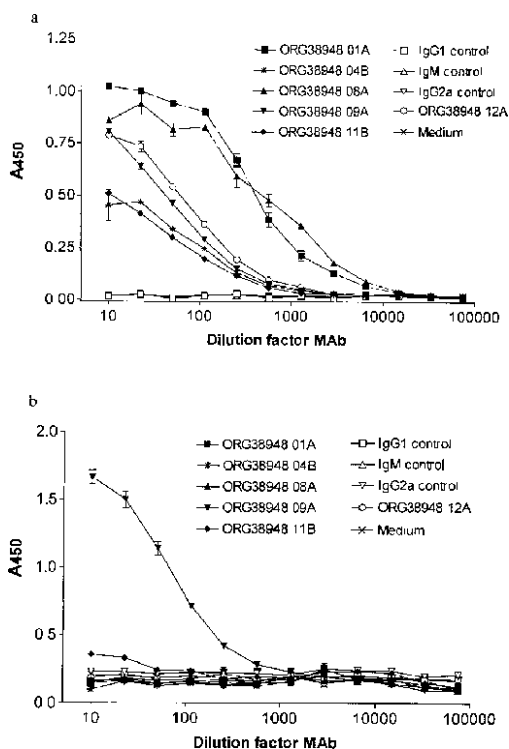
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 C O 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	N 4 H O 4 5
A 6 1 P 19/02	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 19/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-519948 (P2002-519948)	(71) 出願人 394010986
(86) (22) 出願日 平成13年8月8日 (2001.8.8)	アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
(85) 翻訳文提出日 平成15年2月13日 (2003.2.13)	オランダ国、6824・ベー・エム・アー
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/009136	ネム、フェルペルウエヒ・76
(87) 国際公開番号 W02002/014870	(74) 代理人 100062007
(87) 国際公開日 平成14年2月21日 (2002.2.21)	弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号 00202844.7	(74) 代理人 100105131
(32) 優先日 平成12年8月14日 (2000.8.14)	弁理士 井上 満
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人 100113332
	弁理士 一入 章夫
	(74) 代理人 100114188
	弁理士 小野 誠
	(74) 代理人 100103920
	弁理士 大崎 勝真
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的なMHC - ペプチド複合体に対する抗体の使用

(57) 【要約】

本発明は、自己免疫疾患に罹患している患者における自己免疫性特異的MHC - ペプチド複合体の存在を検出することによって、自己免疫疾患の活性を診断するための方法を記載する。このMHC - ペプチド複合体は関節リウマチに関連する。この方法のために使用されるモノクローナル抗体もまた記載される。抗体はまた治療目的のために使用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己免疫疾患を診断するための方法であって、MHC-HC-gp39由来ペプチド複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合ドメインを用いて、自己免疫疾患に罹患している患者における自己免疫特異的MHC-ペプチド複合体の存在を検出することを含む方法。

【請求項 2】

複合体のMHC部が、DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0407およびDRB1*0101の各HLAタイプである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

MHCタイプがHLA DRB1*0401である、請求項2に記載の方法。

10

【請求項 4】

HCgp-39由来ペプチドがHC-gp39²⁶³⁻²⁷³またはHC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵を含む、請求項1から3に記載の方法。

【請求項 5】

HCgp-39由来ペプチドがHC-gp39²⁶³⁻²⁷³またはHC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

抗体が、ORG38948 08A、ORG38948 12AまたはORG38948 04Bである、請求項5に記載の方法。

20

【請求項 7】

請求項1から6のいずれか1項に記載される方法において使用される抗体。

【請求項 8】

請求項7に記載される抗体の1つ以上と、検出剤とを含む診断組成物。

【請求項 9】

治療において使用される請求項7に記載の抗体。

【請求項 10】

自己免疫障害を治療するための医薬調製物を製造するための、請求項7に記載される抗体の使用。

【請求項 11】

自己免疫性特異的MHC-ペプチド複合体を精製するための、請求項7に記載される抗体の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、自己免疫疾患を診断するための方法、この方法において使用されるモノクローナル抗体、このような抗体を含む診断組成物、ならびに自己免疫異常を処置するための方法に関する。

【0002】

自己免疫疾患はヒトの医療における主要な問題である。一部の自己免疫疾患は、1つの抗原または抗原性複合体に対する免疫学的プロセスの結果であり得るが、これに対して、複数の器官に存在し得る多くのタイプの抗原が自己免疫反応に関与し得る自己免疫疾患もある。

40

【0003】

免疫系の主要な機能的役割は、異物（すなわち、非自己）の抗原を有する病原体の侵入から個体を守ることである。この機能を安全かつ効果的な方法で遂行するためには、異物抗原と、個体自身の身体に由来する自己抗原とを識別するための機構が必要である。一般に、ほとんどの個体は、自分自身の身体に存在する物質に対しては寛容である。

【0004】

他方で、一部の個体は、その抗原を自己として認識することができず、内因性の物質、組織または構成成分に対して免疫応答を生じさせる。そのような免疫応答は、このような内

50

因性物質を含有する器官に大きい損傷を引き起こす。関連した自己免疫疾患の発症は一般には非常に遅く（数年程度）、このため、時宜を得た臨床的診断および処置が大きく妨げられている。一般に、診断は、認識され得る損傷が既に身体に生じた後に行うことができるにすぎない。

【0005】

関節リウマチ（RA）などの自己免疫疾患の診断は、初期の疾患、または比較的少数の関節が関わっているときには非常に困難であり、残念ながら、通常では症状の発現後、数ヶ月遅れて診断される。この時点において、例えば関節リウマチを慢性的な炎症性関節炎または一時的な滑膜炎候群から区別することは困難である。持続性の未分化型多発性関節炎候群の患者が頻繁に認められており、関節リウマチとの区別は初期には困難である場合がある。多くの患者は炎症性関節炎の徴候および症状を伴っているが、関節リウマチには罹っていない。

10

【0006】

個体が自己免疫疾患を発症し得る可能性は、その遺伝的背景に密接に関連している。主要組織適合複合体（MHC）-ペプチド複合体を認識する応答性のT細胞に、（自己）抗原を提示するMHCクラスII分子をコードする遺伝子は、疾患の感受性に対する強い遺伝的連鎖を示している。初期の疾患では、病理発生はT細胞媒介であると考えられている。T細胞は、抗原性ペプチドと一緒に特異的な主要組織適合複合体分子をT細胞受容体（TCR）によって認識する。MHC/ペプチド/TCR複合体により生じたシグナルによって、T細胞の活性化がもたらされる。この三分子複合体は、全身的な免疫応答および自己免疫性における重要な要素である。現在では、MHCに結合しているプロセッシングされた自己抗原をCD4⁺T細胞のTCRに提示することが多くの自己免疫疾患の病理発生に関与していると考えられている。

20

【0007】

関節リウマチにおいて特定された自己抗原候補の1つがヒト軟骨糖タンパク質-39（HCgp-39）である（Verheijdenら、1997、Arthritis and Rheum.、40：1115～1125）。このタンパク質によるBALB/cマウスの免疫化は慢性的な再発性関節炎の発症をもたらした。この免疫化の前にこのタンパク質を鼻内投与することにより、i) DTH応答の完全な阻害、およびii) 疾患からの保護または発症の遅延がもたらされた。さらに、HCgp-39による、半治療的治療を行い、DBA/1マウスにおけるII型コラーゲン誘導の関節炎の、発生率および重篤度を低下させることができた（Joostenら、2000、Arthritis Rheum. 43：645～655）。

30

【0008】

HCgp-39の数個のペプチドが潜在的な自己反応性であるとして同定された。これらのペプチドの少なくとも4つ（103～116、259～271、263～275および326～338）がRA患者のT細胞によって認識される。興味深いことに、HCgp-39^{263～275}が、RA患者で、健康なコントロール者よりも顕著に認められた。このことは、このT細胞エピトープが、関節リウマチの開始および維持における役割を果たしていることを示唆する。従って、このペプチドはRAにおける治療目的および診断目的のために注目される。治療目的のために、このペプチドまたは修飾体を経鼻寛容化のために使用することができる。さらに、DRB1*0401とペプチドの複合体は静脈内寛容化のために使用することができる。

40

【0009】

MHC分子に対して複合体化されたペプチドは、診断目的のために利用することができる。特異的なMHC-ペプチド複合体を検出する従来の方法は、関連するTCRを有するT細胞の活性化に頼っている。しかし、そのような機能的アッセイは、組織切片におけるTCRリガンド保有APCを同定するためには使用することができない。

【0010】

本発明により、自己免疫疾患（好ましくは関節リウマチ）に関連するMHC-ペプチド複

50

合体に対する特異性を有する抗体が作製された。H C g p - 39 に由来する複合体におけるペプチドが最も好ましい。

【0011】

M H C - ペプチド複合体は症候群特異的である。すなわち疾患は、M H C と自己抗原との特異的複合体の出現により特徴づけられる。

【0012】

今回、臨床的確定診断前に、これらの特異的複合体が、多くの場合、患者の組織において検出できることが見出された。従って、この免疫複合体により、どのような疾患が発症しつつあるかが予測される。

【0013】

これらの免疫複合体が患者の組織、または血液において早期に検出されることはより重要である。なぜなら、その場合、患者の処置をより早く開始することができ、それにより、疾患の後期における、多くの場合に重篤である損傷を遅らせることができ、または損傷防止することさえできるからである。

【0014】

従って、本発明の1つの態様により、自己免疫疾患を診断するための方法が提供される。この方法は、自己免疫疾患に罹患している患者における自己免疫特異的なM H C - ペプチド複合体の存在の検出を含む。検出には、M H C - ペプチド複合体に特異的に結合する抗体を利用する。

【0015】

本明細書中で使用される抗体という用語は、関係する抗原に結合特性を有する単一抗体種または多重抗体種として定義される。抗体は、M H C - ペプチド複合体を認識するのみであり、ペプチドまたはM H C を単独では認識しない。従って、抗体は、M H C 分子の結合溝内に位置する特異的な自己免疫関連ペプチドを、認識することができなければならない。抗体は、そのような抗体を含有する血清から精製することができるが、好ましくは、抗体はモノクローナル抗体であり、より好ましくは、マウスまたはヒトのモノクローナル抗体である。よって抗体は、自己免疫疾患に罹患している患者における、自己免疫特異的M H C - ペプチド複合体に結合する。この特異的複合体は、M H C - ペプチド複合体としてさらに示される。

【0016】

特異的M H C - ペプチド複合体に結合することが、依然として可能な抗体のフラグメントもまた、本発明の一部をなすことは当業者には明かである。それ故、フラグメントという用語は、F a b、F (a b ')₂ またはF v などの可変ドメイン領域を含む抗体のそのような部分を意味する。また、M H C - ペプチド複合体に結合することができる、単鎖抗体またはキメラ（例えば、二重特異性）抗体を含む抗体は、遺伝子操作によって作製できる。さらに抗体は、例えば、キメラ抗体またはヒト化抗体などのように、異なる種に由来する領域から構成され得る。

【0017】

本発明に従って検出されるM H C - ペプチド複合体は自己免疫疾患に関連し、好ましくは関節リウマチに関連する。好ましくは、M H C 複合体は、D R B 1 * 0 4 0 1、D R B 1 * 0 4 0 4、D R B 1 * 0 4 0 7 および D R B 1 * 0 1 0 1 の各H L A タイプであり、H L A D R B 1 * 0 4 0 1 が最も好ましく、これに対して、複合体におけるペプチドは、好ましくはR A 関連抗原である。好ましくは、抗体は、H C g p - 39 に由来するペプチドとの複合体を使用して調製される。好ましくは、ペプチドはH C g p - 39 のアミノ酸263 ~ 273 または263 ~ 275 (H C g p - 39^{263 ~ 273} またはH C g p - 39^{263 ~ 275}) を含むが、アミノ酸配列におけるわずかな変化は可能である。そのような抗体により、H C g p - 39 と関連するM H C - ペプチド複合体が検出され、おそらくは、ペプチドがH C g p - 39 に由来するM H C - ペプチド複合体が検出される。

【0018】

これらのペプチドはペプチドのいずれかの端または両端で伸長することができ、そして同

10

20

30

40

50

じ免疫学的機能を依然として発揮し得ること(すなわち、MHC関連複合体内において、抗体によって認識され得ること)は当業者には明かである。延長部は、タンパク質の天然の配列に類似するアミノ酸配列であってもよい。しかし、ペプチドはまた、非天然の配列によって延ばすこともできる。また、ペプチド自体の配列は、抗体によって依然として認識され得ながら、わずかに変化させることができる。

【0019】

特により小さいペプチドの配列においては、配列全体におけるアミノ酸の違い(1つまたは複数)によって、または前記配列におけるアミノ酸(1つまたは複数)の欠失、置換、挿入、反転もしくは付加によって明らかにされ得る。生物学的活性および免疫学的活性を本質的に変化させないことが予想される様々なアミノ酸置換が記載されている。関連したアミノ酸同士のアミノ酸置換、または進化において頻繁に生じている置換には、中でも、Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Valがある(Dayhof, M. D., タンパク質配列および構造の地図(Nat. Biomed. Res. Found., Washington D. C., 1978, 第5巻, 増刊3)を参照のこと)。この情報に基づいて、LipmanおよびPearsonは、相同的ポリペプチド間の機能的類似性を明らかにするための迅速かつ高精度なタンパク質比較方法(Science, 227: 1435~1441, 1985)を開発した。

10

【0020】

(より小さい)ペプチドは、例えば、J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149 (1963)およびInt. J. Peptide Protein Res. 35: 161~214 (1990)に記載される固相ペプチド合成などの、周知の有機化学的ペプチド合成方法によって調製することができる。

20

【0021】

ペプチドは、エキソペプチダーゼにより触媒される加水分解を低下させる、C末端および/またはN末端修飾によって安定化される。そのような修飾には、C末端のアシル化(例えば、アセチル化=Ac-ペプチド)、N末端へのアミド導入(例えば、ペプチド-NH₂)、アシル化およびアミド導入の組合せ(例えば、Ac-ペプチド-NH₂)、ならびにL-アミノ酸に代わるD-アミノ酸の導入を挙げることができる(Powellら、J. Pharm. Sci., 81: 731~735, 1992)。

30

【0022】

他の修飾は、エンドペプチダーゼによる加水分解の防止に集中している。このような修飾の例には、L-アミノ酸に代わるD-アミノ酸の導入、修飾アミノ酸、ペプチド内での環化、修飾型ペプチド結合(例えば、還元型ペプチド結合 [CH₂NH])の導入、および例えばペプトイド(N-アルキル化グリシン誘導体)が挙げられる(Adangら、Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 113: 63~78, 1994; Simonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367~9371, 1992)。

【0023】

モノクローナル抗体は標準的な手法に従って調製することができる。MHC-ペプチド複合体含有調製物による動物の免疫化は、適切なアジュバントの存在下または非存在下のいずれかで行われる。その後、適切な融合技術、好ましくはPEG融合(KohlerおよびMilstein、Nature, 256, 495~497, 1975)または電気融合(Van Duijinら、Exp. Cell Research, 183, 463~472, 1989)を使用して、これらの免疫化動物に由来するB細胞をミエローマ細胞と融合することによって、ハイブリドーマを作製する。免疫化、融合、ハイブリドーマの選別、ハイブリドーマのクローニングおよびスケールアップ、ならびにモノクローナル抗体の精製に関する標準的な手法は、モノクローナル抗体の作製に関するハンドブックに十分に記載されている(例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、またはColiganら、Current Proto

40

50

cols in Immunology (John Wiley and Sons Inc. 1992)。

【0024】

抗原特異的なB細胞を、B細胞培養系(好ましくはEL-4B細胞培養系)における限界希釈条件のもとで選別し、増殖させることができる。その後、個々のB細胞クローンは、例えば、欧州特許EP448470および米国特許第6,020,170号(これらは参考として本明細書中に含まれる)に記載されるように、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得るために融合させることができる。

【0025】

ヒトモノクローナル抗体または抗体フラグメントもまた、この分野で周知の技術に従って作製することができる。好適なマウスモノクローナル抗体のキメラ化またはヒト化により、ヒト抗体または抗体フラグメントを作製することができる。ヒト抗体または抗体フラグメントを作製するための別の周知の技術として、ファージディスプレイ技術が挙げられる。ヒトモノクローナル抗体はまた、インビボにて初回抗原刺激されたB細胞のEBV形質転換によって、またはインビトロにて免疫化されたB細胞の不死化によって、またはヒト免疫グロブリンレパートリーを発現する免疫化されたトランスジェニックマウスに由来するB細胞の不死化によって作製することができる。

【0026】

適切な複合体による免疫化を、実施例1に記載されるように単離されるMHC-ペプチド複合体を用いて行うことができる。しかし、複合体の供給源として、適切なMHC複合体を有し、かつ例えば、APCにHCgp-39を与えることによって特異的な自己抗原によって負荷された、単球、樹状細胞およびB細胞などの抗原提示細胞(APC)もまた使用しうる。APCに目的とする複合体タンパク質を与えることの代わりとして、その部分配列を与えることもできる。そのような部分配列の長さは、関係するMHC分子により認識されるエピトープを含むならば重要ではない。好ましくは、このようなペプチドは9個~55個のアミノ酸残基のアミノ酸配列を有する。より好ましくは、ペプチドは9個~35個(特に9個~25個)のアミノ酸残基のアミノ酸配列を有する。9個~15個のアミノ酸残基のアミノ酸配列を有するペプチドがさらにより好ましい。最も好ましいペプチドはHCgp-39²⁶³⁻²⁷³またはHCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵である。

【0027】

従って、自己免疫疾患(好ましくは、関節リウマチ)に関連するMHC-ペプチド複合体に対して特異的である抗体を提供することも、また本発明の目的である。好ましくは、MHC複合体は、DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0407およびDRB1*0101の各HLAタイプであり、HLA DRB1*0401が最も好ましく、これに対して、複合体におけるペプチドは、好ましくはRA関連抗原である。最も好ましいペプチドはHCgp-39に由来する。好ましくは、ペプチドはHCgp-39のアミノ酸263~273または263~275(HCgp-39²⁶³⁻²⁷³またはHCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵)を含むが、アミノ酸配列におけるわずかな変化は可能である。最も好ましい抗体は、ORG38948 08A、ORG38948 12AまたはORG38948 04Bである。

【0028】

本発明の目的はまた、特異的なMHC-ペプチド複合体と反応する抗体を提供することであり、この場合、ペプチドは、より小さいRA関連ペプチドの多量体(例えば、二量体または三量体など)からなる。多量体は、多数の同じペプチドからなるホモマーか、または異なるペプチドからなるヘテロマーであり得る。

【0029】

また、本発明の別の目的は、結合溝がペプチドにより占められるような、そのペプチドがMHC分子に結合している自己免疫性特異的複合体に対して反応し得る抗体を提供することである。柔軟なリンカー分子、好ましくはやはりアミノ酸配列からなり、ペプチドを連結することができる。また、MHCサブユニットは、直接的に、または柔軟なスペーサー

10

20

30

40

50

分子を介して共有結合的に連結することができる。MHCサブユニットは、例えば、「骨格」としての単量体または二量体のIg分子において組み立てることができる。MHC分子はその定常ドメインを有する必要はなく、相互の直接的な共有結合により連結させて、または柔軟なリンカーを介して連結させて、その可変ドメインのみから構成されうる。そのような抗体またはそのフラグメントは従来の組換えDNA技術によって調製することができる。骨格としてIgGを有する、二量体のMHC/ペプチド複合体が、例えば、Lebowitzら(1999)、Cellular Immunology、192:175~184などによって記載される。

【0030】

四量体のMHC/ペプチドが、MHC IについてはDavisら(1996)、Science、274:94~99によって記載され、そしてMHC IIについては、Gutgemannら(1998)、Immunity、8:667~673、およびKotzinら(2000)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97:291~296によって記載される。

【0031】

本発明の抗体は、例えば、組織切片でのAPCにおけるHCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵の自己免疫性特異的複合体を同定するために、および例えば個々のAPCにあるDRB1^{*}0401/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体のような、MHC-ペプチド複合体を定量するために使用することができる。特異的な抗体を用いてMHC-ペプチド複合体を定量することにより、疾患活性をモニターする機会が得られる。抗体はさらに、病理学的組織内のAPC所在を突き止めるために使用することができる。

【0032】

抗体(すなわち、MHC-ペプチド複合体の特異性)に依存して、インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、重症筋無力症、乾癬または関節リウマチなどのいくつかの自己免疫疾患を診断することができる。さらに、RA関連MHC-ペプチド複合体に対する特異性を有する抗体を使用して、関節リウマチを、多発性関節炎、乾癬性関節炎、脊椎関節症または変形性関節症などの慢性的な炎症性疾患の他の原因から区別することができる。

【0033】

特異的なMHC-ペプチド複合体を検出するために抗体または抗体フラグメントを使用する技術がいくつかある。これらの技術には、免疫組織化学、FACS、免疫沈降およびウエスタンブロットが含まれるが、これらに限定されない。抗体または抗体フラグメントは、非標識で、または酵素、放射性イソタイプ、蛍光色素、常磁性粒子もしくはビオチン分子に結合させて使用することができる。

【0034】

本発明のさらに別の目的は、例えば、アフィニティークロマトグラフィーによる精製のような、MHC-ペプチド自己免疫複合体の精製において使用される抗体を提供することである。この目的のために、抗体は、この分野で周知の技術を使用して固体マトリックス(例えば、セファロースビーズ、シリカビーズまたは常磁性ビーズ)に結合される。この目的のために使用される抗体は、本発明による診断方法のために記載される抗体である。

【0035】

さらに、そのような抗体は、インビトロまたはインビボで自己抗原性ペプチドに対するT細胞の応答を阻害するために使用することができる。

【0036】

治療において使用される抗体を提供することは本発明の別の目的である。従って、本発明はまた、自己免疫性の複合体に対する抗体、より具体的にはMHC-ペプチド複合体に対する抗体、好ましくはMHC-HCgp-39部分配列の複合体、より好ましくは、DRB1^{*}0401、DRB1^{*}0404、DRB1^{*}0101またはDRB1^{*}0407/HCgp-39²⁶³⁻²⁷³またはHCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵の複合体に対する抗体を投与することによって、インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、乾癬、重症筋無力症および関節リウマチなどの自己免疫疾患(関節リウマチが最も好ましい)を治療する方

法を提供する。ORG38948 08A、ORG38948 12AまたはORG38948 04Bの抗体が最も好ましい抗体である。前記に記載されるような抗体の、様々な変異体もまた治療目的には有用である。従って、本発明によるモノクローナル抗体は、自己免疫障害（より好ましくは関節リウマチ）を治療するための医薬品を製造に使用することができる。本発明による抗体の投与により、T細胞の活性化を阻止することによって、炎症を低下させることができる。

【0037】

抗体に対する抗原性応答を避けるために、ヒト抗体を使用することが好ましい。抗体がヒト由来ではない場合、ヒト化抗体が好ましい。CDRグラフトイング (grafting) などの、抗体をヒト化するための方法が知られている (Jonesら、Nature、321、522～525、1986)。

【0038】

ORG38948 08A、ORG38948 12AまたはORG38948 04Bの各抗体は、EACC (Salisbury、Wiltshire SP4 0JG、英国) に、それぞれ、99061728、99061729および99061730の各アクセシオン番号で寄託されている。これらの寄託はブダペスト条約の条項に従って行われた。

【0039】

【表1】

APPENDIX 3

Page 14

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO

INTERNATIONAL FORM

AKZO NOBEL b.v.
VELPERWEG 76
6824 BM ARNHEM
THE NETHERLANDS

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

10

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: ORG 38948 OBA	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: 99061728
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/> A scientific description	
<input type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 th JUNE 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Dr P J Packer Address: ECACC CMR Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): Date: 2/9/99 <i>P.J. Packer</i>

20

30

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

40

[0 0 4 0]

[表 2]

APPENDIX 3

Page 14

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO

INTERNATIONAL FORM

AKZO NOBEL B.V.
VELPERWEG 76
6824 BN ARNHEM
THE NETHERLANDS

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

10

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: ORG38948 12A	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 99061729
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/> A scientific description	
<input type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 th June 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: Dr P J Packer Address: ECACC CAMR Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): Date: 1/31/00 PJP

20

30

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

40

[0 0 4 1]

[表 3]

APPENDIX 3

Page 14

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO

INTERNATIONAL FORM

AKZO NOBEL b.v.
VELPERWEG 76
6024 BM ARNHEM
THE NETHERLANDSNAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

10

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: ORG 38948 04B	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 99061730
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/> A scientific description	
<input type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 th JUNE 1999 (date of the original deposit); ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: Dr P J Packer	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):
Address: ECACC CAMR Porton Down Salisbury SP4 0JG	Date: 2/9/99 <i>P.J.Packer</i>

20

30

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

40

【 0 0 4 2 】

下記の実施例は本発明の例示であり、本発明の範囲を限定するものとして決して解釈すべきではない。

【 0 0 4 3 】

(図面の簡単な説明)

図 1 は、Org 38948 に対するモノクローナル抗体が DRB 1 * 0401 分子と反応しないことを示す。

精製された Org 38948 (a) または DRB 1 * 0401 (b) でコーティングされ

50

たマイクロエライザプレートで、モノクローナル抗体の力価が測定された。次に、プレートをヤギ抗マウスHRPでインキュベーションし、発色反応は、標準的なELISAの手順を使用して行われた。

【0044】

図2は、免疫沈降により明らかにされるように、抗Org38948MAbがMHCクラスIIを認識する。

上段：プロット1；SDS-PAGEを非還元条件下で行い、プロットをL243で発色させた。下段：プロット2；SDS-PAGEを還元条件下で行い、プロットをL227で発色させた。

レーン1：分子量マーカー、レーン2：ORG38948 01A (IgG1、)、レーン3：ORG38948 04B (IgA、)、レーン4：ORG38948 08A (IgG1、)、レーン5：ORG38948 09A (IgA、)、レーン6：ORG38948 11B (IgG1、)、レーン7：ORG38948 12A (IgG1、)、レーン8：ZP(19~38)1A (IgG1コントロール)、レーン9：L243 (抗HLA-DR)、レーン10：ZP 1A (IgAコントロール)。注：ORG38948 09Aは、ORG38948およびDRB1*0401の両方と反応する抗体である。

【0045】

図3aは、HCgp-39²⁶³~27⁵で負荷されたDRB1*0401陽性BSMにおけるHCgp-39²⁶³~27⁵複合体を抗Org38948MAbが認識することを示す。

BSM細胞はHCgp-39²⁶³~27⁵で負荷され(実線)、抗Org38948抗体による染色が、FACS分析によって非負荷細胞の染色(破線)と比較された。抗HLA/DRのL243が、DR分子の存在に対する陽性コントロールとして使用された。イソタイプコントロール抗体は、陰性コントロール(点線)として使用された。

【0046】

図3bは、HCgp-39²⁶³~27⁵で負荷されたDRB1*0401陽性PriessにおけるHCgp-39²⁶³~27⁵複合体を抗Org38948MAbが認識することを示す。

Priess細胞はHCgp-39²⁶³~27⁵で負荷され(実線)、抗Org38948抗体による染色が、FACS分析によって非負荷細胞の染色(破線)と比較された。抗HLA/DRのL243が、DR分子の存在に対する陽性コントロールとして使用された。イソタイプコントロール抗体が陰性コントロール(点線)として使用された。

【0047】

図4は、Org38948に対する抗体が、Org38948によるT細胞ハイブリドーマの活性化を阻害することを示す。

Org38948複合体をコーティングして、漸増濃度のMAbおよび当該T細胞ハイブリドーマをインキュベーションした。37で2日間インキュベーションした後、IL-2の産生を測定した。それぞれの値は、3組みの培養物の平均カウントを表す。a)ハイブリドーマ5G11、b)ハイブリドーマ4G11およびc)ハイブリドーマ8B12。

【0048】

図5は、Org38948に対する抗体が、HCgp-39²⁶³~27⁵でパルス処理されたBSM細胞によるT細胞ハイブリドーマの活性化を阻害することを示す。

HCgp-39²⁶³~27⁵でパルス処理されたBSM細胞を、10μg/mlのMAbおよびT細胞ハイブリドーマ5G11(左パネル)または14G11(右パネル)のいずれかと一緒にインキュベーションした。37で2日間インキュベーションした後、IL-2の産生を測定した。それぞれの値は、3組みの培養物の平均カウント+標準偏差を表す。

【0049】

(実施例)

実施例 1

Org 38948の製造

Org 38948は、HCgp-39のアミノ酸263~275を含むペプチドとDRB1*0401(DRA、DRB1*0401)二量体からなる複合体であり、これは0.05%ドデシルマルトシド界面活性剤溶液で可溶化される。

【0050】

DRB1*0401分子は、いくつかの軽微な改良を行った、Nagら(J. Immunol. (1993) 150:1558~1564)により記載された方法で精製した。簡潔には、EBVにより形質転換されたリンパ芽球細胞株BSM(NIGMS; GM06821)を、10%FCS、2g/lのグルコース、4mMのL-グルタミンを含有するRPMI1640培地で培養した。細胞を回収後、DRB1*0401分子を0.5%トリトンX100/PBSで抽出した。その後、溶解液をろ過によって清澄化し、10kDa限外ろ過膜でさらに濃縮した。濃縮されたトリトンX100溶解液をL243結合セファロース-4Bカラムにかけ、結合したDRB1*0401をPBS/0.05%ドデシルマルトシド(pH11.3)で溶出した。分画物を20%リン酸ナトリウム-塩基性緩衝液で直ちに中和し、そしてDRB1*0401分子をPBS/0.05%ドデシルマルトシド(pH7.3)中のDEAEイオン交換カラムに通して集めた。

10

【0051】

HCgp-39のアミノ酸残基263~275に対応するペプチドは、fmoc化学を使用してDiosynthにおいてGMP条件のもとで合成された。

20

【0052】

MHC-ペプチド複合体は、50xモル過剰量のHCgp-39^{263~275}を精製されたDRB1*0401分子と37°CでPBS/0.05%ドデシルマルトシド(pH7.0)中にて、72時間~80時間インキュベーションすることによって調製した。最後に、遊離ペプチドをS-300/S-200のタンデムサイズエクスクルーージョンカラムクロマトグラフィーによって取除き、精製された複合体はPBS/0.05%ドデシルマルトシド(pH7.2)中で保存された。

【0053】

実施例 2

Org 38948に対するモノクローナル抗体の作製

6週齢のメスBALB/cマウスを表Iに示されるスケジュールに従って免疫化した。免疫化スケジュールの48日目に、血液サンプルを眼窩穿刺によって採取した。このときに、Org 38948およびDRB1*0401に対する抗体は、高力価(22,000~46,000の範囲)であることがわかった。使用された免疫化スケジュール間で、著しい差は見出されなかった。最後の注射を行った5日後に、マウスを屠殺して、赤血球非含有脾臓細胞集団を(Steenbakkers, 1992, J. Immunol. Methods, 152:69; Steenbakkers, 1994, Molecular Biology Reports, 19:125)に、以前記載されたように調製した。これらの脾臓細胞集団は-140°Cで凍結されたか、MAbを作製するためにすぐに使用された。

30

40

【0054】

MAbを作製するために、マウス1、マウス2およびマウス3に由来する 2×10^7 個の赤血球非含有脾臓細胞をためておき、大部分の単球を除くために、プラスチック製の培養フラスコで、DMEM/HAM F12(Gibco BRL, Paisly, 英国; カタログ番号041-91825)、10%ウシ血清(Hyclone, Logan, UT, 米国)において37°Cで1時間インキュベーションした。続いて、非接着性の細胞を、(Steenbakkersら(1994, Molecular Biology Reports, 19:125)によって記載されるように、DRB1*0401でコーティングされた培養ディッシュで、3回連続したパニングを行った。そのような段階で、HLA-DRB1*0401に対するB細胞が細胞懸濁物から除かれる。続いて、DRB1*

50

0401/Hcgp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体に対するB細胞は、得られた細胞懸濁物をOrg38948コーティング培養ディッシュにおいて、37で90分間インキュベーションすることにより選択された。結合していない細胞を慎重な洗浄によって除き、最後に、結合した細胞をトリプシン処理によって回収した。

【0055】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、(Steenbakkersら、1994、Molecular Biology Reports、19:125)に以前記載されたように、クローン増殖およびミニ電気融合によって、これらの選択されたB細胞から作製した。簡潔には、選択されたB細胞を、96ウエル平底組織培養プレートにおいて、200 μ l(最終容量)のDMEM/HAM F12、10%ウシ血清でT細胞上清および50,000個の放射線照射(2500rad)EL-4 B5細胞と混合した。上清を、DRB1*0401またはOrg38948コーティングプレートのいずれかを使用するELISAで、8日目に試験した。DRB1*0401とではなく、Org38948と反応し得るMAbを産生するB細胞培養物を、ミニ電気融合法に付した。これらの培養物に由来する特異的B細胞を、10⁶個のNS-1ミエローマ細胞と混合し、そしてDMEM/HAM F12で洗浄することによって血清を除いた。次に、細胞をプロナーゼ溶液で3分間処理し、続いて融合培地で洗浄した。電気融合は、50 μ lの融合チャンパーにおいて、30s、2MHz、400V/cmの交流電場、続く10 μ s 3kV/cmの矩形高電場パルスおよび再度の30s、2MHz、400V/cmの交流電場によって行われた。最後に、融合チャンパーの内容物を選択培地(DMEM/HAM F12、10%FCS、10⁻⁴Mヒポキサンチン(Sigma(登録商標))、1.6 \times 10⁻⁵Mチミジン(Sigma(登録商標))、0.4 μ Mアミノプテリン(Life Technologies(登録商標))、1%ヒト膀胱カルシノーマT24条件培地(ATCC HTB4)に移し、限界希釈条件で96ウエルマイクロタイタープレートに置床した。融合後の13日目に、培養物をハイブリドーマの増殖について調べ、DRB1*0401またはOrg38948コーティングプレートのいずれかを使用するELISAで、再びスクリーニングした。

【0056】

B細胞の培養およびミニ電気融合の後、DRB1*0401とではなく、Org38948との反応性をELISAにおいて示す5つの抗体(ORG38948 01A、ORG38948 04B、ORG38948 08A、ORG38948 11BおよびORG38948 12A)が見出された(図1aおよび1b)。これらのMAbもまた、ポリスチレン製プレートにコーティングされたHcgp-39²⁶³⁻²⁷⁵とは反応せず、Org38948に対する反応性が遊離Hcgp-39²⁶³⁻²⁷⁵により阻害され得ないため、これらのMAbは、DRB1*0401とHcgp-39²⁶³⁻²⁷⁵との混合エピトープに指向する。ペプチドHcgp-39²⁶³⁻²⁷⁵に対する結合がないことはBIAcore実験で確認された。

【0057】

MAbの特異性をさらに裏付けるために、本発明者らは、Org38948を用いた免疫沈降を行った。簡潔には、10 μ gのOrg38948を、1mlのハイブリドーマ上清が事前に加えられた、6 \times 10⁶個のヒツジ抗マウスIg結合常磁性ビーズ(Dynal(登録商標)110.02、Oslo、ノルウェー)と、300 μ lのPBS/0.1%BSAにおいて4で2時間インキュベーションした。その後、免疫沈降物をPBSで3回洗浄して、サンプル緩衝液で煮沸し、非還元条件下および還元条件下での10%ゲルでのSDS-PAGEに付した。PVDF膜へのタンパク質の電気泳動転写は、標準的な手法で行った。プロットにおける未結合部位をPBS/0.5%ツイーン20(登録商標)/5%スキムミルクでブロッキングした後、プロットをPBS/0.5%ツイーン20(登録商標)/1%BSA/1%正常ヤギ血清における抗DR MAb(20ml L243(2 μ g/ml)または12.5ml L227(1.1 μ g/ml)のいずれかと室温で1時間インキュベーションした。その後、プロットを同じ緩衝液におけるアルカリホス

ファクターゼ結合ヤギ抗マウスIgと1時間インキュベーションした。最後に、プロットを、BCIP(登録商標)および発色色素基質としてのNBTを使用して発色させた。これらの実験により、MAbは、還元条件下でSDS/PAGEで泳動されたときに、33kDaおよび28kDaの2つの分子に解離する60kDaの分子を、免疫沈殿させ得ることが明らかにされた(図2)。これらの分子量は、2つの非共有結合的に結合しているポリペプチド鎖(32kDaの鎖および28kDaの鎖)からなるMHCクラスII分子に対するMAbの反応性を裏付けている。

【0058】

実施例3

Org 38948に対するMAbは、HCGp-39²⁶³⁻²⁷⁵が負荷されたDRB1^{*}0401陽性BLCLにおけるDRB1^{*}0401/HCGp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体を認識する。

【0059】

FACS分析を使用して、様々なペプチドでパルス処理された、MHCを発現する種々のEBV形質転換B細胞株(BLCL)に対するMAbの結合が明らかにされた。ペプチドは、自動化されたMilligen9050合成機を使用する固相ペプチド合成によって合成され、逆相HPLCによって精製された。

【0060】

簡潔には、10⁶個のBLCLを、500μlのDMEM/HAM F12またはブランク培地において、40μgのペプチドと、37で4時間、インキュベーションした。このインキュベーションの後、細胞をPBS/2%FCS/0.02%アジ化ナトリウムで洗浄した。約2×10⁵個の細胞を、4で1時間、130μlのMAb含有ハイブリドーマ上清および20μlのPBS/20%FCS/0.02%アジ化ナトリウムとインキュベーションした。細胞をPBS/2%FCS/0.02%アジ化ナトリウムで2回洗浄した後、細胞を、4で1時間、50μlのPBS/20%FCS/0.02%アジ化ナトリウムおよび10μlのヤギ抗マウスIg/FITC(Beckton&Dickinson)とインキュベーションした。続いて、細胞をPBS/20%FCS/0.02%アジ化ナトリウムで3回洗浄し、最後に400μl PBS/2%p-ホルムアルデヒドに再懸濁した。ペプチド結合に対するコントロールとして、細胞をビオチン化HCGp-39²⁶³⁻²⁷⁵とインキュベーションして、ストレプトアビジン/PE(Beckton&Dickinson)で染色した。HLA-DR発現に対するコントロールとして、染色を、抗HLA/DRのL243(ハイブリドーマATCC HB55から精製されたIg)を用いて行った。染色された細胞は、FACSscan(登録商標)(Beckton&Dickinson)を用いて分析された。すべての場合において、死細胞および細胞破片をさらなる分析から除くために、前方および側方の散乱分析が適用された。

【0061】

DRB1^{*}0401についてホモ接合性の2つのBLCL(BSMおよびPriess)をHCGp-39²⁶³⁻²⁷⁵で負荷し、このペプチドで負荷されなかった細胞と、これらの細胞に対する抗体の反応性を比較した。図3aおよび図3bは、ORG38948 11Bを除くすべてのORG38948特異的抗体が、反応性においてペプチド負荷BLCLと非負荷BLCLとを、識別することを示している。DRB1^{*}0401/HCGp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体の最も良い染色がORG38948 01AおよびORG38948 08AおよびORG38948 12Aで得られた。しかし、これらの抗体のうち2つ(01Aおよび08A)はBLCLの1つ(BSM)でバックグラウンドの染色を少し示した。このため、これらは有用性が低いと考えられる。

【0062】

実施例4

Org 38948に対するMAbのエピトープマッピング
本発明者らはDRB1^{*}0401と関連するHCGp-39²⁶³⁻²⁷⁵の、様々な修飾ペプチドおよび切断されたペプチドに対する結合を調べることによって、抗体により認

10

20

30

40

50

識されるエピトープをマッピングした。抗体の反応性を、マウスT細胞ハイブリドーマ8B12 (HLA-DRB1*0401と関連するHCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵を認識するマウスT細胞ハイブリドーマ)のTCRによる認識と比較した。このハイブリドーマは、Copeら(1999、Arthritis and Rheumatism、42:1597~1507)によって記載されるように、HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵で免疫化された、HLA-DRB1*0401^{+/+}、ヒトCD4^{+/+}、I-A^{-/-}トランスジェニックマウスから作製された。

【0063】

ペプチド骨格および側鎖における様々な修飾が、ORG38948 12Aまたは8B12による認識に影響を及ぼすことなく可能である(表II)。抗体ORG38948 01Aおよび抗体ORG38948 08Aによる認識は、認識されるエピトープに関してより重大であるようである。これは、修飾体があまり認識されない(ORG38948 08A)か、または全く認識されない(ORG38948 01A)からである。ORG38948 12Aは、N末端において2アミノ酸が伸長しているペプチド(DRB1*0401/HCgp-39²⁶¹⁻²⁷⁵)とは反応しない。

【0064】

別の実験では、HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵の多様な切断されたペプチド体が、ORG38948 12Aによって認識されるDRB1*0401における最小エピトープを明らかにするために試験された。C末端では、2つのアミノ酸が、結合性を失わせることなく除くことができるが、これに対して、N末端では切断することは許されない(表III)。従って、ORG38948 12Aによって認識される最小のエピトープはDRB1*0401/HCgp-39²⁶³⁻²⁷³である。ORG38948 12Aによって認識されるエピトープは、ハイブリドーマ8B12によって認識されるエピトープとは異なる。C末端での2アミノ酸の切断に加えて、ハイブリドーマ8B12は、N末端での2アミノ酸の除去が可能である。

【0065】

実施例5

Org38948に対するMAbの微細な特異性

実施例3に記載されるのと同じ手順を使用して、1)抗Org38948MAbが、1組の異なるペプチドを伴うDRB1*0401と交差反応するかどうか、そして2)ORG38948 12Aの結合が、DRB1*0401と関連するHCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵に限定されるかどうか、または他のHLA-DR/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体もまた認識されるかどうかを調べた。

【0066】

1)に関して、Priess細胞は、DRB1*0401に対して十分に結合するペプチドでパルス処理された。表IVにまとめられているデータは、DRB1*0401結合モチーフを達成する、他のHCgp-39由来ペプチドを伴うDRB1*0401では、交差反応が認められなかったことを示している。また、インフルエンザ赤血球凝集素およびらい菌(Mycobacterium Leprae)に由来する無関係なペプチドを伴うDRB1*0401では交差反応は見出せなかった。

【0067】

ORG38948 12Aはビオチン化HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵をも認識するが、これに対して、ORG38948 01A、ORG38948 04BおよびORG38948 08Aの各抗体はこれを認識しない。ビオチンはペプチドのN末端に結合されているので、このことは、後者のMAbは複体内のペプチドのN末端に近いエピトープを認識することを示唆している。

【0068】

2)に関して、DRB1*0401/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵以外のHLA-DR/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体とのORG38948 12Aの交差反応性を調べるために、下記の十分に特徴付けられたホモ接合性EBV形質転換Bリンパ芽球細胞株

(B L C L) が使用された :

P r i e s s : D R A 、 D R B 1 * 0 4 0 1 。

【 0 0 6 9 】

B S M : D R A * 0 1 0 1 、 D R B 1 * 0 4 0 1 、 D R B 4 * 0 1 0 1 、 D Q A 1 * 0 3 0 1 、 D Q B 1 * 0 3 0 2 、 D P A 1 * 0 1 、 D P B 1 * 0 1 0 1 2 。

【 0 0 7 0 】

Y A R : D R A * 0 1 0 1 、 D R B 1 * 0 4 0 2 、 D R B 4 * 0 1 0 1 、 D Q A 1 * 0 3 0 1 、 D Q B 1 * 0 3 0 2 、 D P A 1 * 0 1 、 D P B 1 * 0 4 0 1 。

【 0 0 7 1 】

S A 9 0 0 1 : D R A 、 D R B 1 * 0 1 0 1 、 D Q 1 、 D P 4 。

10

【 0 0 7 2 】

B M 9 2 : D R A * 0 1 0 1 、 D R B 1 * 0 4 0 4 、 D R B 4 * 0 1 0 1 、 D Q A 1 * 0 3 0 1 、 D Q B 1 * 0 3 0 2 、 D P A 1 * 0 1 、 D P B 1 * 0 4 0 2 。

【 0 0 7 3 】

M G A R : D R A * 0 1 0 2 、 D R B 1 * 1 5 0 1 、 D R B 5 * 0 1 0 1 、 D Q A 1 * 0 1 0 2 、 D Q B 1 * 0 6 0 2 、 D P A 1 * 0 1 、 D P B 1 * 0 4 0 1 。

【 0 0 7 4 】

J H A F : D R B 1 * 0 4 0 7 、 D R B 4 * 0 1 0 1 、 D Q A 1 * 0 3 0 1 、 D Q B 1 * 0 3 0 1 、 D P A 1 * 0 1 、 D P B 1 * 0 3 0 1 。

【 0 0 7 5 】

20

A M A L A : D R A * 0 1 0 2 、 D R B 1 * 1 4 0 2 、 D R B 3 * 0 1 0 1 、 D Q A 1 * 0 5 0 1 、 D Q B 1 * 0 3 0 1 、 D P A 1 * 0 1 、 D P B 1 * 0 4 0 2 。

【 0 0 7 6 】

E K : D R A * 0 1 0 2 、 D R B 1 * 1 4 0 1 、 D R B 3 * 0 2 0 2 、 D Q A 1 * 0 1 0 1 、 D Q B 1 * 0 5 0 3 、 D P A 1 * 0 1 、 D P B 1 * 0 4 0 2 。

【 0 0 7 7 】

これらのホモ接合性 B L C L は H C g p - 3 9 ^{2 6 3} ~ 2 7 ⁵ で負荷され、続いて O R G 3 8 9 4 8 1 2 A で染色された。一連の実験において、O R G 3 8 9 4 8 1 2 A により、H C g p - 3 9 ^{2 6 3} ~ 2 7 ⁵ が D R B 1 * 0 4 0 1 および D R B 1 * 0 4 0 7 の両方の存在下で染色される (表 V)。抗体の濃度が正常なとき、ペプチドの染色は、D R B 1 * 0 1 0 1、D R B 1 * 0 4 0 4、D R B 1 * 1 4 0 2 (R A 感受性ハプロタイプ)、D R B 1 * 0 4 0 2、D R B 1 * 1 3 0 1、D R B 1 * 1 4 0 1 (近縁の非 R A 感受性ハプロタイプ)、および D R B 1 * 1 5 0 1 (より遠く離れている非 R A 感受性ハプロタイプ) の存在下では認められなかった。抗体の濃度が極めて高いとき、より弱い反応性が、D R B 1 * 0 1 0 1、D R B 1 * 0 4 0 4、D R B 1 * 1 3 0 1 および D R B 1 * 1 4 0 1 の存在下において H C g p - 3 9 ^{2 6 3} ~ 2 7 ⁵ でもまた検出された。これらの実験のコントロールでは、i) O R G 3 8 9 4 8 1 2 A は非負荷 B L C L には結合しないこと、ii) H C g p - 3 9 ^{2 6 3} ~ 2 7 ⁵ は B L C L に結合すること、そして iii) すべての B L C L は高レベルの D R 発現 (データ示さず) を示すことが明らかにされた。

30

【 0 0 7 8 】

40

実施例 6

O r g 3 8 9 4 8 に対する M A b は、O r g 3 8 9 4 8 および H C g p - 3 9 ^{2 6 3} ~ 2 7 ⁵ でパルス処理された D R B 1 * 0 4 0 1 陽性 B L C L による、T 細胞ハイブリドーマの活性化を阻害する。

【 0 0 7 9 】

抗 O r g 3 8 9 4 8 M A b による T 細胞ハイブリドーマの抗原誘導活性化の阻害を、2 つの異なるアッセイで測定した。一方のアッセイでは、T 細胞ハイブリドーマが M H C / ペプチド複合体で刺激された。もう一方のアッセイでは、H C g p - 3 9 ^{2 6 3} ~ 2 7 ⁵ で負荷された E B V 形質転換 B 細胞は、T 細胞ハイブリドーマ 5 G 1 1、8 B 1 2 および 1 4 G 1 1 (H L A - D R B 1 * 0 4 0 1 H C g p - 3 9 ^{2 6 3} ~ 2 7 ⁵) を認識するマウス

50

T細胞ハイブリドーマ；これらのハイブリドーマは、Copeら(1999、Arthritis and Rheumatism、42:1597~1507)によって記載されるように、HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵で免疫化された、HLA-DRB1*0401^{+/+}、ヒトCD4^{+/+}、I-A^{-/-}のトランスジェニックマウスから作製された)を刺激するために使用された。

【0080】

MHC/ペプチド複合体による刺激のために、平底マイクロウエルを、PBS中において、濃度が200ng/mlである100μlのOrg38948を用いて、4でコーティングした。過剰な複合体を、PBSで2回洗浄することによって除いた。その後ウエルを、100μlのDMEM/HAM F12、10%FCSにおいて様々な濃度のMAbと、37で1時間インキュベーションした。MAbとプレインキュベーションした後、DMEM/HAM F12、10%FCS中の、100μlのT細胞ハイブリドーマ懸濁物(2×10⁴細胞/ウエルの5G11および14G11；10⁴細胞/ウエルの8B12)を加えた。培養物を37で2日間インキュベーションして、最後に上清を集め、マウスIL-2を測定した。図4aでは、すべてのMAbが用量に関連してハイブリドーマ5G11の活性化を阻害したことが示される。ORG38948 01Aを使用した場合、コントロールのIgG MAbと比較して部分的な阻害が得られた。他方で、ORG38948 08AおよびORG38948 12Aとのインキュベーションは、25μg/mlの濃度で完全な阻害をもたらした。これらの複合体特異的抗体は、抗HLA/DR MAb L243よりも強力でないT細胞ハイブリドーマ活性化阻害剤であった。これは、抗体の親和性が異なるためであると考えられる。同様の結果が、ハイブリドーマ14G11を使用して得られた(図4b)。ハイブリドーマ8B12はあまり阻害されなかった(図4c)。これは、完全に刺激されるためにはこのハイブリドーマは複合体をほとんど必要としないという、本発明者らの以前の観測結果と一致している。

【0081】

もう一方のアッセイでは、1.2×10⁶細胞を1mlのDMEM/HAM F12中、ペプチド10μgとともに、37で5時間インキュベーションすることによってBSM細胞に、HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵が負荷された。その後、過剰なペプチドを洗浄して除き、細胞には、15,000radの線量が照射された。続いて、2×10⁴個のペプチド負荷BSM細胞を、37で1時間、丸底マイクロウエルにおいて、100μlのDMEM/HAM F12中、10μg/ml(最終容量)のMAbとプレインキュベーションした。その後、2×10⁴個のT細胞ハイブリドーマを、100μl DMEM/HAM F12、20%FCSとして加えた。37で2日間インキュベーションした後、上清が集められ、マウスIL-2について試験された。図5から推定され得るように、すべての抗体は、ハイブリドーマ5G11および14G11のペプチド誘導による活性化を、10μg/ml(濃度)で阻害することが見出された。ここでも、より強い阻害が抗HLA/DR MAb L243で得られた。

【0082】

注：マウスIL-2は、捕捉用の抗マウスIL-2(Pharmingen 18161D)および第2抗体としての抗マウスIL-2/ビオチン(Pharmingen 18172D)を使用するダブルサンドイッチELISAで測定された。ユーロピウムに結合させたストレプトアビジン(Wallac(登録商標)1244-360)は、時間分解蛍光光度計でIL-2結合を検出するために使用された。

【0083】

実施例7

DRB1*0401/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体はRA患者の滑液内のAPCにおいて提示される

Baetenら(2000、Arthritis and Rheumatism、43:1233~1243)記載の方法で、滑膜切片に対する免疫組織化学を実施した。簡潔には、滑膜生検物を液体窒素で急速凍結し、5μmのクリオスタット切片を作製した。ア

セトン中で10分間固定し、1%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした後、切片を、3つの異なる抗HCgp-39MAb(06A、08Bおよび10B)、またはORG38948 12Aと、30分間インキュベーションした。対応する切片は、陰性コントロールとして、イソタイプが一致する関連性のないMAbとインキュベーションされた。切片は、続いて、ビオチン化抗マウス二次抗体とインキュベーションし、その後、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体(Dako、Glostруп、デンマーク)とインキュベーションした。3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)発色性基質を使用して、発色反応させた。最後に、切片をヘマトキシリンで対比染色した。染色された滑膜切片は盲検下で、2名の観測者によって独立的にスコア化された。

【0084】

19名のRA患者、10名のSpA患者、3名のPsA患者、2名のOA患者、1名の軟骨石灰化症患者、および未だ確定診断されていない3名の患者の滑膜切片をHCgp-39発現について試験し、3つの抗HCgp-39MAbの1組およびORG38948 12Aをそれぞれ使用する免疫組織化学によってORG38948 12Aで染色した。DR4/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体またはDRB1*0101/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵複合体が15名の共有エピトープ陽性RA患者のうち10名で検出された(表VIa)。DRB1*0404/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵およびDRB1*0101/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵との反応性は、ORG38948 12AもまたDRB1*0404およびDRB1*0101との関連においてHCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵を認識するという観測結果と一致している(表V)。ORG38948 12Aによる染色は、リンパ様浸潤物内またはその近くに存在する個々の樹状様細胞に限定されていた(データ示さず)。この位置は、HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵発現細胞の位置とは明らかに異なる。このことは、MHC/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵発現細胞がHCgp-39産生細胞ではないことを示唆している。ORG38948 12AのMAbによる染色は、様々な疾患を有する19名のコントロール患者では見出されなかった(表VIb)。これらの患者のうち5名は、共有エピトープ(DR4またはDR1)が発現することによる関連性のあるコントロールであり、6名は共有エピトープが陰性であり、そして残りのHLA-DRタイプは依然として不明である。イソタイプのコントロール抗体による染色は常に陰性であった。

【0085】

【表4】

表I:Org38948による免疫化

マウス番号	0日目	20日目	41日目	48日目	59日目	63日目
1	100μg i.p.	100μg i.p.	100μg i.p.	血液サンプル	100μg i.p.	血液サンプル; 脾臓細胞
2	25μg i.p.	25μg i.p.	25μg i.p.	血液サンプル	25μg i.p.	血液サンプル; 脾臓細胞
3	100μg cFA;s.c.	100μg iFA;s.c.	100μg iFA;s.c.	血液サンプル	100μg i.p.	血液サンプル; 脾臓細胞
4	25μg cFA;s.c.	25μg iFA;s.c.	25μg iFA;s.c.	血液サンプル	25μg i.p.	血液サンプル; 脾臓細胞

cFA=完全70kD抗原; iFA=不完全70kD抗原

i.p.=腹腔内;s.c.=皮下

【0086】

【表5】

10

20

30

40

表 II: Org38948 に対するモノクローナル抗体の比トポロジーが

HCgp-39 ^h 対	認識			
	MAb01A	MAb08A	MAb12A	8B12
RSFTLASSETGVG	+	+	+	+
Ac-RSFTLASSETGVG	·	·	+	+
HOCH ₂ -(CHOH) ₄ -CH ₂ -RSFTLASSETGVG	+/-	+/-	+	+
Ac-RSFTLASSETGV-ψ-[CH ₂ NH]-G-NH ₂	·	+/-	+	+
Ac-R-NhSer-FTLASSETGVG-NH ₂	·	+/-	+	+
Ac-R-NhSer-FTLASSETGV-ψ-[CH ₂ NH]-G-NH ₂	·	+/-	+	+
FGRSFTLASSETGVG	·	+/-	·	?
Ac-RSFTLASSETGVG-NH ₂	·	+/-	+	+

【 0 0 8 7 】
【 表 6 】

10

20

30

40

表 III: モノクローナル抗体 ORG38948 12A の比ト-7°で比°ソグ

	結合性		認識	
	DRB1*0401 における HCgp-39 ハブド		MAb12A	8B12
RSFTLASSETGVG	263-275	+++	+	+
RSFTLASSETGV	263-274	+++	+	+
RSFTLASSETG	263-273	+++	+	+/-
RSFTLASSET	263-272	++	-	-
FTLASSETGVG	265-275	+++	-	+/-
TLASSETGVG	266-275	-	-	-
SFTLASSETGV	264-274	+++	-	+
FTLASSETG	265-273	+	-	-

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

【 表 7 】

表IV:種々のハプロタイプで負荷された Pries 細胞における DRA/DRB1*0401 に対する Org38948Mab の特異性

ハプロタイプ	IC50	01A	04B	08A	11B	12A
なし	.	.	.	+/	+/	.
HCgp-39 ²⁶³⁻²⁷⁵	0.08	+	+/	+	+/	+
HCgp-39 ²⁶³⁻²⁷⁵ -bio	n.d.	.	.	+/	+/	+
HCgp-39 ¹⁰³⁻¹¹⁶	0.08	.	.	+/	+/	.
HCgp-39 ²⁵⁹⁻²⁷¹	0.04	.	.	+/	+/	.
IHA ³⁰⁷⁻³¹⁹ F	0.56	.	.	+/	+/	.
IHA ³⁰⁷⁻³¹⁹ F-bio	n.d.	.	.	+/	+/	.
MLep18K ³⁸⁻⁵¹	0.3	.	.	+/	+/	.

IC50:DRB1*0401 に対する相対的結合親和性;IHA:インフルエンザ赤血球凝集素;MLep:らい菌(Mycobacterium Leprae)

+:抗体の結合なし(蛍光強度:0~4)

+/:抗体の中等度の結合(蛍光強度:4~40)

+:抗体の強い結合(蛍光強度:40~400)

【 0 0 8 9 】

【 表 8 】

10

20

30

40

表 V:モノクローナル抗体 ORG38948 12A による、HCgp・39²⁶³⁻²⁷⁵ を伴う HLA-DR 分子の認識

BCLCL	HLA-DR 17° 047°		RA に対する感受性		ORG38948 12A による認識	
	DRB1*0401	DR4 Dw4	感受性	3 μg/ml	200~500 μg/ml	
BSM	DRB1*0401	DR4 Dw4	感受性	++	++	
Priess	DRB1*0401	DR4 Dw4	感受性	++	++	
SA9001	DRB1*0101	DR1 Dw1	感受性	.	+/-	
BM92	DRB1*0404	DR4 Dw14	感受性	.	+	
AMALA	DRB1*1402	DR6 Dw16	感受性	.	.	
YAR	DRB1*0402	DR4 Dw10	密接に関連感受性なし	.	.	
CB6B	DRB1*1301	DR6a	密接に関連感受性なし	.	+/-	
EK/OH	DRB1*1401	DR6b	密接に関連感受性なし	.	+/-	
MGAR	DRB1*1501	DR2 Dw2	密接に関連感受性なし	.	.	
JHAF	DRB1*0407	DR4 Dw13	感受性なし	++	++	
			不明			

様々な BCLCL は、HCgp・39²⁶³⁻²⁷⁵ で負荷され、続いて ORG38948 12A によって染色された。ii) DR1 において、i) ORG38948 12A は非負荷 BCLCL には結合しないこと、ii) HCgp・39²⁶³⁻²⁷⁵ は BCLCL に結合すること、そして iii) すべての BCLCL は高バールの DR 発現を示すことが明らかになった。

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

【 表 9 】

表 VIa: RA 患者の滑膜における MHC/HCgp-39^{263~275} 複合体の発現

患者	年齢	診断	罹患期間	HLA-DR	MHC-ハプロト
1	57	RA	1年	B1*0404	+
2	74	RA	2年	B1*0401	-
3	53	RA	6年	B1*0401	+
4	60	RA	7年	B1*0401	+
5	67	RA	19年	B1*0101	-
6	78	RA	20年	B1*0401	-
7	70	RA	22年	B1*0401	+
8	64	RA	25年	B1*0101	-
9	50	RA	2ヶ月	B1*04	+
10	39	RA	3ヶ月	?	-
11	50	RA	4ヶ月	B1*04	-
12	52	RA	9ヶ月	B1*04	+
13	24	RA	1年	B1*0101	+
14	33	RA	3年	B1*04	+
15	82	RA	4年	?	-
16	48	RA	6年	B1*0401, B1*0404	+
17	36	RA	8年	-/-	-
18	64	RA	15年	?	-
19	58	RA	20年	B1*04	+

10

20

RA: 関節リウマチ

【 0 0 9 1 】

【 表 1 0 】

表 VIb: 非 RA コントロールの滑膜における MHC/HCgp-39^{263~275} 複合体の発現

患者	年齢	診断	罹患期間	HLA-DR	MHC-ハプロト
1	30	SpA	2ヶ月	?	-
2	36	SpA	3ヶ月	-/-	-
3	37	SpA	6ヶ月	?	-
4	56	SpA	6ヶ月	B1*0401	-
5	28	SpA	6ヶ月	-/-	-
6	52	SpA	8ヶ月	-/-	-
7	19	SpA	9ヶ月	-/-	-
8	22	SpA	2年	B1*0401	-
9	35	SpA	3年	?	-
10	41	SpA	12年	B1*0401	-
1	48	PsA	1ヶ月	?	-
2	60	PsA	1ヶ月	-/-	-
3	52	PsA	2年	?	-
1	73	CC	2年	-/-	-
2	76	OA			-
3	66	OA			-
4	67	?	9ヶ月	B1*04	-
5	80	?	1ヶ月	?	-
6	38	?	30年	B1*0101	-

30

40

CC: 軟骨石灰化症; SpA: 脊椎関節症; PsA: 乾癬性関節炎; OA: 変形性関節症

50

【図面の簡単な説明】

【図1】Org 38948 に対するモノクローナル抗体がDRB1*0401分子と反応しないことを示す。

【図2】免疫沈降により明らかにされるように、抗Org 38948 MA bがMHCクラスIIを認識する。

【図3 a - 1】HC gp - 39²63~27⁵ で負荷されたDRB1*0401陽性BSMにおけるHC gp - 39²63~27⁵ 複合体を抗Org 38948 MA bが認識することを示す。

【図3 a - 2】HC gp - 39²63~27⁵ で負荷されたDRB1*0401陽性BSMにおけるHC gp - 39²63~27⁵ 複合体を抗Org 38948 MA bが認識することを示す。

【図3 b - 1】HC gp - 39²63~27⁵ で負荷されたDRB1*0401陽性Pr i e s sにおけるHC gp - 39²63~27⁵ 複合体を抗Org 38948 MA bが認識することを示す。

【図3 b - 2】HC gp - 39²63~27⁵ で負荷されたDRB1*0401陽性Pr i e s sにおけるHC gp - 39²63~27⁵ 複合体を抗Org 38948 MA bが認識することを示す。

【図4】Org 38948 に対する抗体が、Org 38948 によるT細胞ハイブリドーマの活性化を阻害することを示す。

【図5】Org 38948 に対する抗体が、HC gp - 39²63~27⁵ でパルス処理されたBSM細胞によるT細胞ハイブリドーマの活性化を阻害することを示す。

【図1】

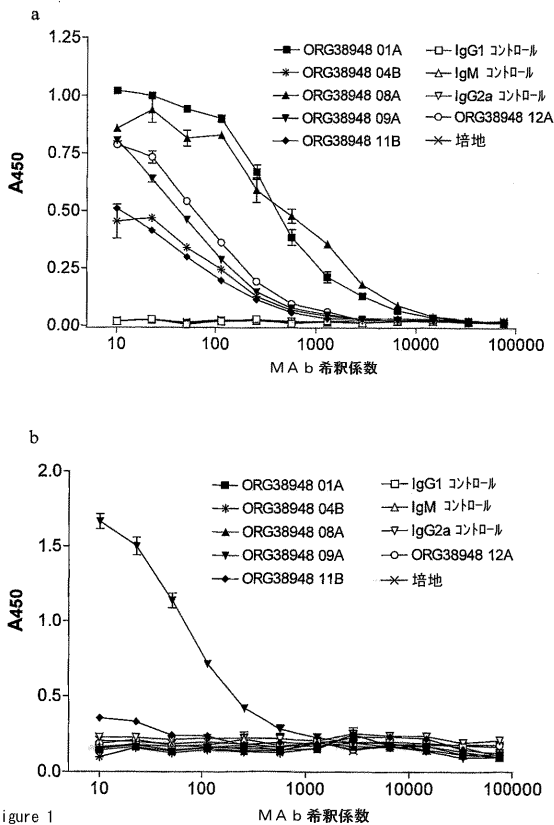


Figure 1

【図2】

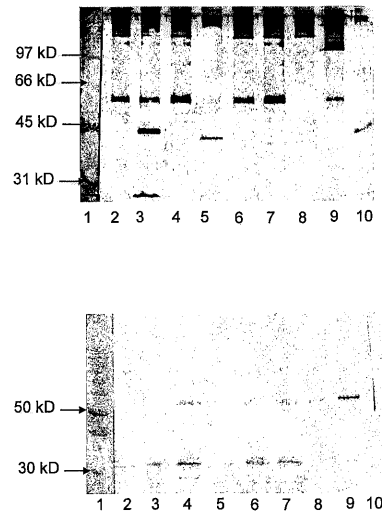


Figure 2

10

20

【 図 3 a - 1 】

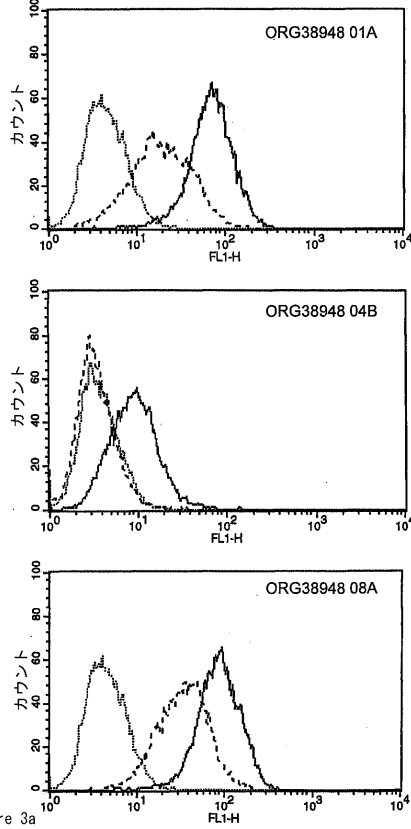


Figure 3a

【 図 3 a - 2 】

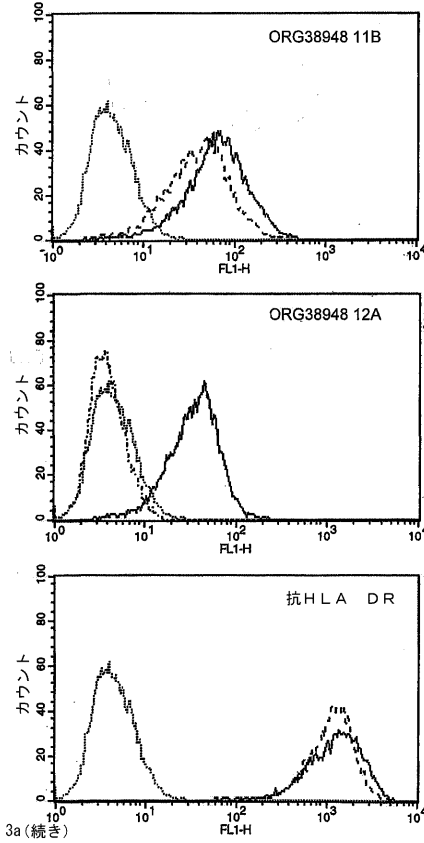


Figure 3a (続き)

【 図 3 b - 1 】

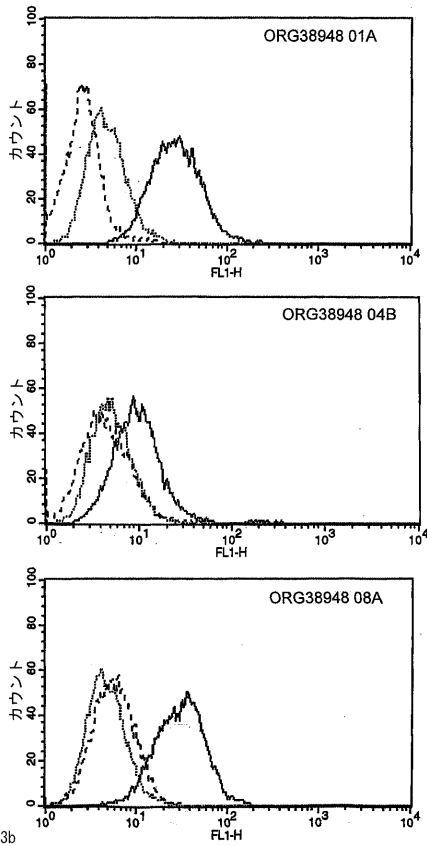


Figure 3b

【 図 3 b - 2 】

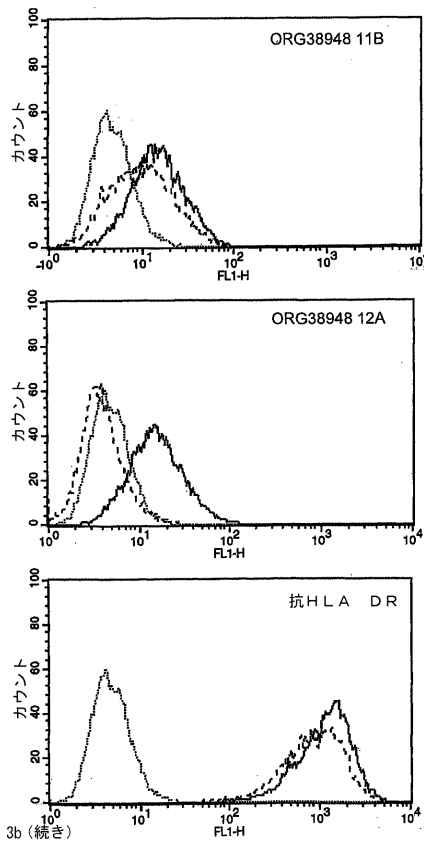


Figure 3b (続き)

【 図 4 】

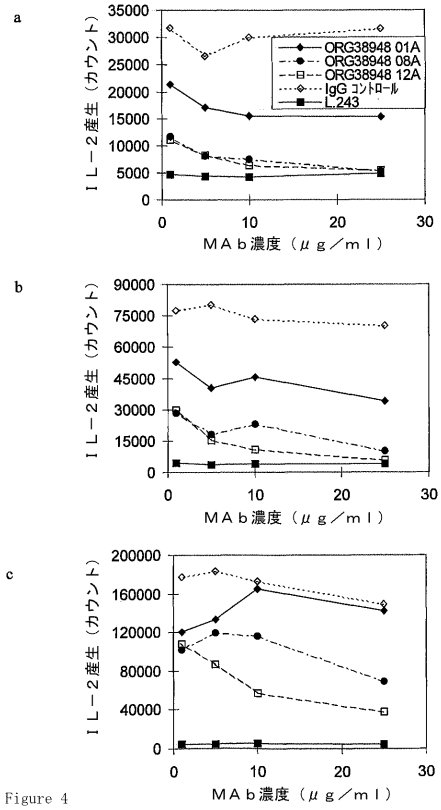


Figure 4

【 図 5 】

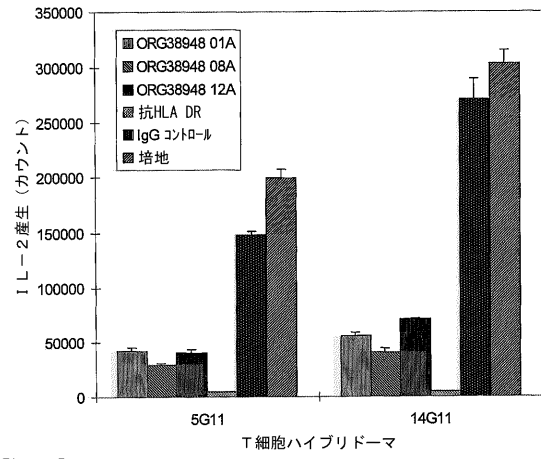


Figure 5

【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
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/14870 A2

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/564** (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.
- (21) International Application Number: PCT/EP01/09136 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 8 August 2001 (08.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00202844.7 14 August 2000 (14.08.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): **AKZO NOBEL N.V.** [NL/NL]; Velperweg 76, NL-6824 BM Arnhem (NL).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): **STEENBAKKERS, Petrus, Gerardus, Antonius** [NL/NL]; Weibouder Donkersaat 3, NL-5469 VL Erp (NL).
- (74) Agent: **VAN WEZENBEEK, P.**; P.O. Box 20, NL-5340 BH Oss (NL).

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 02/14870 A2

(54) Title: USE OF ANTIBODIES AGAINST SPECIFIC MHC-PEPTIDE COMPLEXES

(57) Abstract: The invention describes a method to diagnose the autoimmune disease activity by detecting the presence of an autoimmune specific MHC-peptide complex in a patient suffering from an autoimmune disease. The MHC-peptide complex is associated with rheumatoid arthritis. Monoclonal antibodies to be used for this method are also described. The antibodies can also be used for therapeutic purposes.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

Use of antibodies against specific MHC-peptide complexes

The current invention relates to a method to diagnose autoimmune diseases, monoclonal antibodies used in this method, a diagnostic composition comprising these
5 antibodies as well as a method to treat autoimmune disorders.

Autoimmune diseases are a major problem in human health care. Some autoimmune diseases may be the result of an immunological process directed at one antigen or antigenic complex whereas in others the autoimmune reaction may involve many types of antigens that may be present in multiple organs.

10 The primary functional role of the immune system is to protect the individual against invading pathogens bearing foreign, that is non-self, antigens. In order to fulfil this function in a safe and effective manner, a mechanism is required to discriminate between foreign antigens and autoantigens derived from the individuals own body. Most individuals are in general tolerant to substances which occur in their own body.

15 Some individuals on the other hand fail to recognize their antigens as self and generate an immune response against endogenous substances, tissues, or components. Such an immune response causes great damage to the organs which contain these endogenous substances. The development of the associated autoimmune disease is in general very slow (a matter of years) and this hampers timely clinical diagnosis and treatment to a
20 high degree. Diagnosis can generally only be made after appreciable damage has already been caused to the body.

The diagnosis of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA) is most difficult in early disease or when relatively few joints are involved and unfortunately diagnosis is usually delayed several months after the onset of symptoms.
25 Distinguishing e.g. rheumatoid arthritis from other causes of chronic inflammatory arthritis or transient synovitis syndromes at this point is difficult. Patients with a persistent undifferentiated polyarthritis syndrome are frequently seen and differentiation from rheumatoid arthritis may initially be difficult. Many patients will present with signs and symptoms of inflammatory arthritis but do not have rheumatoid
30 arthritis.

The chances of individuals to develop an autoimmune disease are closely linked to their genetic backgrounds: genes encoding major histocompatibility complex (MHC) class II molecules that present (auto)antigens to responding T cells which recognize

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

- 2 -

MHC-peptide complexes show a strong genetic linkage to disease susceptibility. In early disease the pathogenesis is thought to be T cell mediated. T cells recognize specific major histocompatibility complex molecules combined with antigenic peptide by virtue of the T-cell receptor (TCR). The signal generated by the MHC/peptide/TCR complex leads to T cell activation. This trimolecular complex is a key element in the general immune response and in autoimmunity. It is currently believed that the presentation of MHC-bound processed autoantigens to the TCR of CD4⁺ T cells is involved in the pathogenesis of many autoimmune diseases.

One of the candidate autoantigens identified in rheumatoid arthritis is human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39) (Verheijden *et al.*, 1997, *Arthritis and Rheum.*, 40:1115-1125). Immunisation of BALB/c mice with this protein resulted in the development of a chronic, relapsing arthritis. Intranasal administration of the protein prior to this immunization resulted in: i) complete abrogation of DTH responses, and ii) protection from or delayed onset of the disease. Furthermore, HC gp-39 could reduce the incidence and severity of collagen type II induced arthritis in DBA/1 mice using a semi-therapeutic regime (Joosten *et al.*, 2000, *Arthritis Rheum.* 43:645-655).

Several peptides of HC gp-39 were identified as potentially self-reactive. At least four of these peptides (103-116, 259-271, 263-275 and 326-338) are recognized by T cells of RA patients. Interestingly, HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ was more prominently recognized in RA patients than in healthy controls, suggesting a role for this T-cell epitope in initiation or maintenance of rheumatoid arthritis. This peptide is therefore of interest for therapeutic and diagnostic purposes in RA. For therapeutic purposes, the peptide or a modification can be used for nasal tolerization. Furthermore, the peptide complexed with DRB1*0401 can be used for intravenous tolerization.

The peptide complexed to a MHC molecule can be exploited for diagnostic purposes. The conventional way to detect specific MHC-peptide complexes relies on the activation of T cells bearing relevant TCR. However, such functional assays cannot be used to identify TCR-ligand-bearing APC in tissue sections.

According to the present invention antibodies have been generated having specificity for a MHC-peptide complex associated with an autoimmune disease, preferably rheumatoid arthritis. Most preferred is a peptide in the complex derived from HC gp-39.

MHC-peptide complexes are syndrome-specific, i.e. the disease is characterized by the occurrence of such specific complexes of MHC and autoantigen.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

- 3 -

It has now been found that these specific complexes can often be detected in the tissue of a patient before the clinical diagnosis can be made with certainty. The immune complexes therefore predict which disease is developing.

5 The timely detection of these immune complexes in the patient's tissue or blood is the more important because the patient's treatment can then be initiated earlier, thereby delaying, or even preventing, the often serious damage during the later phase of the disease.

10 Thus, according to one aspect of the invention a method is provided for diagnosing an autoimmune disease. The method comprises the detection of the presence of an autoimmune specific MHC-peptide complex in a patient suffering from an autoimmune disease. The detection makes use of antibodies which specifically bind to the MHC-peptide complex.

15 The term antibody as used herein is defined as a single antibody species or multiple antibody species with binding characteristics for the relevant antigen. The antibody only recognizes the MHC-peptide complex and does not recognize the peptide or the MHC alone. Thus, the antibody must be capable of recognizing a specific autoimmune associated peptide located within the binding groove of a MHC molecule. The antibody can be purified from serum containing such antibodies but preferably the antibody is a monoclonal antibody, more preferably a mouse or human monoclonal antibody. The
20 antibody thus binds to an autoimmune specific MHC-peptide complex in a patient suffering from an autoimmune disease. This specific complex is further referred to as MHC-peptide complex.

25 It will be clear to those skilled in the art that also fragments of the antibody still capable of binding to the specific MHC-peptide complex form part of the invention. By the term fragment therefore is meant those parts of the antibodies comprising variable domain regions such as Fab, F(ab')₂ or Fv. The antibody might also be genetically engineered including single-chain antibodies or chimeric (e.g. bi-specific) antibodies that can bind to the MHC-peptide complex. Furthermore, the antibody might consist of regions originating from different species, such as e.g. chimeric or humanized
30 antibodies.

The MHC-peptide complex to be detected according to the present invention is associated with autoimmune diseases, preferably with rheumatoid arthritis. Preferably, the MHC complex is of the type HLA DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0407 and DRB1*0101, HLA DRB1*0401 being the most preferred whereas the peptide in the

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

- 4 -

complex is preferably a RA associated antigen. Preferably the antibodies are prepared using complexes with peptide derived from HC gp-39. Preferably the peptide comprises the amino acids 263-273 or 263-275 of HC gp-39 (HC gp-39²⁶³⁻²⁷³ or HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵), but small variations in the amino acid sequences are possible. Such antibodies will detect HC gp-39 associated MHC-peptide complexes, most likely the antibodies will detect MHC-peptide complexes the peptide of which is HC gp-39 derived.

It will be clear to those skilled in the art that the peptides may be extended at either side of the peptide or at both sides and still exert the same immunological function i.e. in a MHC associated complex it is capable to be recognized by the antibody. The extended part may be an amino acid sequence similar to the natural sequence of the protein. However, the peptide might also be extended by non-natural sequences. Also the sequence of the peptide itself might be slightly different while still capable of being recognized by the antibody.

Variations that can occur in a sequence, especially of smaller peptides, may be demonstrated by (an) amino acid difference(s) in the overall sequence or by deletions, substitutions, insertions, inversions or additions of (an) amino acid(s) in said sequence. Amino acid substitutions that are expected not to essentially alter biological and immunological activities have been described. Amino acid replacements between related amino acids or replacements which have occurred frequently in evolution are, inter alia Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (see Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3). Based on this information Lipman and Pearson developed a method for rapid and sensitive protein comparison (Science, 227:1435-1441, 1985) and determining the functional similarity between homologous polypeptides.

The (smaller) peptides can be prepared by well known organic chemical methods for peptide synthesis such as, for example, solid-phase peptide synthesis described for instance in J. Amer. Chem. Soc. 85:2149 (1963) and Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214 (1990).

The peptides may be stabilised by C- and/or N- terminal modifications, which will decrease exopeptidase catalysed hydrolysis. The modifications may include: C-terminal acylation, (e.g. acetylation = Ac-peptide), N-terminal amide introduction, (e.g. peptide-NH₂) combinations of acylation and amide introduction (e.g. Ac-peptide-NH₂) and introduction of D-amino acids instead of L-amino acids (Powell *et al.*, J. Pharm. Sci., 81:731-735, 1992).

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

- 5 -

Other modifications are focussed on the prevention of hydrolysis by endopeptidases. Examples of these modifications are: introduction of D-amino acids instead of L-amino acids, modified amino acids, cyclisation within the peptide, introduction of modified peptide bonds, e.g. reduced peptide bonds $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ and e.g. peptoids (N-alkylated glycine derivatives) (Adang *et al.*, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 113:63-78, 1994 and Simon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371, 1992).

Monoclonal antibodies can be prepared according to standard procedures. Immunizations of animals with MHC-peptide complex-containing preparations are performed either in the presence or absence of an appropriate adjuvant. Then, hybridomas are generated by fusion of B cells from these immunized animals with myeloma cells using an appropriate fusion technique, preferably PEG-fusion (Kohler and Milstein, Nature 256; 495-497, 1975) or electrofusion (Van Duijn *et al.*, Exp. Cell Research, 183, 463-472, 1989). Standard procedures for immunization, fusion, selection of hybridomas, cloning and scaling up of hybridomas, and purification of monoclonal antibodies are well described in handbooks for the generation of monoclonal antibodies e.g. Harlow and Lane, Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1988 or Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons Inc. 1992.

Antigen-specific B cells can be selected and grown up under limiting dilution conditions in a culture system for B cells, preferably the EL-4 B-cell culture system. Then individual B-cell clones can be submitted to fusion in order to obtain monoclonal antibody producing hybridomas as described a.o. in EP448470 and US6,020,170 herein included by reference.

Human monoclonal antibodies or antibody fragments can also be generated according to techniques well known in the art. Chimerization or humanization of suitable mouse monoclonal antibodies can generate human antibodies or antibody fragments. Another well-known technique for generating human antibodies or antibody fragments is the phage display technology. Human monoclonal antibodies can also be generated by EBV-transformation of *in vivo* primed B cells, by immortalization of *in vitro* immunized B cells or by immortalization of B cells from immunized transgenic mice expressing a human immunoglobulin repertoire.

Immunization with the appropriate complex can be performed with MHC-peptide complex which is isolated as described in example 1. As a source of the complex, however, also antigen presenting cells (APC's) such as monocytes, dendritic cells and

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

- 6 -

- B-cells having the appropriate MHC complex and loaded with the specific autoantigen e.g. by providing APC's with HC gp-39, may be used. As an alternative to providing APC's with the complete protein of interest also subsequences thereof may be provided. The length of the subsequences is not important provided that it comprises the epitope to be recognized by the relevant MHC molecule. Preferably these peptides have an amino acid sequence of 9-55 amino acid residues. More preferably the peptides have an amino acid sequence of 9-35, in particular 9-25 amino acid residues. Much more preferred are peptides having an amino acid sequence of 9-15 amino acid residues. The most preferred peptide is HC-gp39²⁶³⁻²⁷³ or HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵.
- 10 Thus, it is also an object of the present invention to provide antibodies which are specific for MHC-peptide complexes associated with autoimmune diseases, preferably rheumatoid arthritis. Preferably, the MHC complex is of the type HLA DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0407 and DRB1*0101, HLA DRB1*0401 being the most preferred whereas the peptide in the complex is preferably a RA associated antigen.
- 15 The most preferred peptide is derived from HC gp-39. Preferably the peptide comprises the amino acids 263-273 or 263-275 of HC gp-39 (HC-gp39²⁶³⁻²⁷³ or HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵), but small variations in the amino acid sequences are possible. The most preferred antibodies are ORG38948 08A, ORG38948 12A or ORG38948 04B.
- It is also an object of the present invention to provide antibodies reacting with specific MHC-peptide complexes wherein the peptide consists of multimers of a smaller RA associated peptide such as for example a dimer or trimer. A multimer can either be a homomer, consisting of a multitude of the same peptide, or a heteromer consisting of different peptides.
- 20 Again another object of the present invention is to provide antibodies reactive to autoimmune specific complexes, the peptide of which is connected to MHC molecules, such that the binding groove is occupied by the peptide. A flexible linker molecule, preferably also consisting of amino acid sequences might connect the peptide. Also the MHC subunits might be covalently linked either directly or through a flexible spacer molecule. They might be built on e.g. monomeric or dimeric Ig molecules as "scaffold". The MHC molecules do not need to possess their constant domains and might consist of their variable domains only, either directly covalently linked to each other or linked through a flexible linker. Such antibodies or fragments thereof can be prepared by conventional recombinant DNA technology. Dimeric MHC/peptide complexes with IgG as scaffold are a.o. described by Lebowitz et al. (1999) Cellular
- 35 Immunology 192:175-184.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

- 7 -

Tetrameric MHC/peptide complexes for MHC I have been described by Davis et al. (1996) Science 274:94-99 and for MHC II by Gütgemann et al. (1998) Immunity 8:667-673 and Kotzin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:291-296.

5 The antibodies of the present invention can be used for the identification of autoimmune specific complexes e.g. of HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ on APC in tissue sections and quantification of MHC-peptide complexes e.g. DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ complexes on individual APC's. Quantification of the MHC-peptide complex with specific antibodies provides an opportunity to monitor the disease activity. The antibodies can
10 further be used to localize the APC's within pathological tissues.

Depending on the antibody i.e. the specificity of the MHC-peptide complex several autoimmune diseases such as insulin-dependent diabetes mellitus, multiple sclerosis, Myasthenia gravis, psoriasis or rheumatoid arthritis can be diagnosed. Furthermore, using antibodies with specificity for RA associated MHC-peptide complexes,
15 rheumatoid arthritis can be distinguished from other causes of chronic inflammatory diseases such as polyarthritis, psoriatic arthritis, spondyloarthropathy or osteoarthritis.

There are several techniques for using the antibody or antibody fragments to detect specific MHC-peptide complexes. These techniques include but are not limited to: immunohistochemistry, FACS, immunoprecipitation and Western blot. The antibodies
20 or antibody fragments can be used either unlabeled or conjugated to an enzyme, a radioactive isotope, a fluorochrome, a paramagnetic particle or a biotin molecule.

It is yet another object of the present invention to provide the antibodies for use in the purification of the MHC-peptide autoimmune complexes by e.g. affinity chromatography. For this purpose the antibodies are coupled to a solid matrix e.g.
25 Sepharose beads, Silica beads or paramagnetic beads using techniques that are well-known in the art. The antibodies to be used for this purpose are those described for the diagnostic method according to the invention.

Moreover, such antibodies may be used to inhibit T-cell responses to autoantigenic peptides *in vitro* and *in vivo*.

30 It is another object of the present invention to provide antibodies to be used in therapy. The invention thus also provides a method to treat autoimmune diseases such as insulin-dependent diabetes mellitus, multiple sclerosis, psoriasis, Myasthenia gravis and rheumatoid arthritis, rheumatoid arthritis being the most preferred disease, by administration of the antibodies directed against the autoimmune complex, more
35 specifically the MHC-peptide complex, preferably a MHC-HC gp-39 subsequence

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

- 8 -

complex, more preferably a DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101 or DRB1*0407 / HC gp-39²⁶³⁻²⁷³ or HC gp-39²⁶³⁻²⁷³ complex. The antibodies ORG38948 08A, ORG38948 12A or ORG38948 04B are the most preferred antibodies. Variations of the antibodies as described before are also useful for therapeutic purposes. Thus, the monoclonal antibodies according to the invention can be used for the manufacture of a pharmaceutical for the treatment of autoimmune disorders, more preferably rheumatoid arthritis. Inflammation can be reduced by the administration of the antibodies according to the invention by blocking T-cell activation.

In order to avoid an antigenic response to the antibodies it is preferred to use human antibodies. If the antibodies are from non-human origin, humanized antibodies are preferred. Methods for humanizing antibodies, such as CDR-grafting, are known (Jones et al., Nature 321, 522-525, 1986).

The antibodies ORG38948 08A, ORG38948 12A or ORG38948 04B have been deposited at ECACC, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK under the accession numbers 99061728; 99061729 and 99061730, respectively. These deposits have been made under the terms of the Budapest Treaty.

The following examples are illustrative for the invention and should in no way be interpreted as limiting the scope of the invention.

20

Legends to the figures

Figure 1 Monoclonal antibodies to Org38948 do not react with DRB1*0401 molecules.

Monoclonal antibodies were titrated on microelisa plates coated with purified Org38948 (a) or DRB1*0401 (b). Then the plates were incubated with goat anti-mouse-HRP and the color reaction was developed using standard ELISA procedures.

Figure 2 Anti-ORG38948 MAb recognize MHC class II molecules as determined by immunoprecipitation.

Top: blot 1; SDS/PAGE was performed under non-reducing conditions and blots were developed with L243. Bottom: Blot 2; SDS/PAGE was performed under reducing conditions and blots were developed with L227.

Lane 1: molecular weight marker, lane 2: ORG38948 01A (IgG1, κ), lane 3: ORG38948 04B (IgA, κ), lane 4: ORG38948 08A (IgG1, κ), lane 5: ORG38948 09A

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

APPENDIX 3
Page 14

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO
AZZO NOBEL b.v.
VELDENBERG 76
6624 XN ARNHEM
THE NETHERLANDS

INTERNATIONAL FORM

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: ORG 38948 O8A	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 99061728
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/> A scientific description	
<input type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 th JUNE 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: Dr P J Packer Address: ECACC CNR8 Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): Date: 2/9/99 <i>PJP</i>

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

APPENDIX 3

Page 14

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

TO

ARCO HUBER, B.V.
VELPERSWEG 76
6824 BM ARNHEM
THE NETHERLANDS

NAME AND ADDRESS OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: GMS38948 12A	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: 99061729
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/> A scientific description	<input type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 th June 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Dr P J Facker Address: ECACC Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): Date: 1/3/00 <i>PSD</i>

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

APPENDIX 3

Page 14

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURES

TO
AKZO NOBEL B.V.
VELPERWEG 76
6524 EN ARNHEM
THE NETHERLANDS

INTERNATIONAL FORM

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: ORG 38948 048	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 99061730
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/> A scientific description	
<input type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 th JUNE 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: Dr P J Becker Address: ECNCC CMR Parson Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized officials(s): Date: 2/9/99 P. J. Becker

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

12

(IgA, κ), lane 6: ORG38948 11B (IgG1, κ), lane 7: ORG38948 12A (IgG1, κ), lane 8: ZP(19-38) 1A (IgG1 control), lane 9: L243 (anti-HLA-DR), lane 10: ZP 1A (IgA control). Note: ORG38948 09A is an antibody that reacts with both Org38948 and DRB1*0401.

5 **Figure 3a Anti-ORG38948 MAb recognize HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes on DRB1*0401-positive BSM loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵.**
 BSM cells were loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ (—————) and staining by anti-
 Org38948 antibodies was compared to staining of non-loaded cells (- - - - -) by
 FACS analysis. Anti-HLA/DR, L243, was used as a positive control for the presence of
 10 DR-molecules. Isotype control antibodies were used as a negative control
 (.....).

Figure 3b: Anti-ORG38948 MAb recognize HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes on DRB1*0401-positive Priess loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵.
 Priess cells were loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ (—————) and staining by anti-
 15 Org38948 antibodies was compared to staining of non-loaded cells
 (- - - - -) by FACS analysis. Anti-HLA/DR, L243, was used as a positive control
 for the presence of DR-molecules. Isotype control antibodies were used as a negative
 control (.....).

Figure 4: Antibodies to Org38948 inhibit activation of T-cell hybridomas by Org38948.
 20 Org38948 complexes were coated and incubated with increasing concentrations of
 MAb and the T-cell hybridoma of interest. After two days incubation at 37 °C, IL-2
 production was determined. Each value represents the mean counts of triplicate
 cultures. a) hybridoma 5G11, b) hybridoma 4G11 and c) hybridoma 8B12.

25 **Figure 5: Antibodies to Org38948 inhibit activation of T-cell hybridomas by BSM cells pulsed with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵.**
 BSM cells pulsed with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ were incubated with 10 µg/ml MAb and either
 T-cell hybridoma 5G11(left panel) or 14G11(right panel). After two days of incubation
 at 37 °C, IL-2 production was determined. Each value represents the mean counts of
 30 triplicate cultures + standard deviation.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

13

Examples

Example 1

Production of Org38948

Org38948 is a complex of the DRB1*0401 (DRA, DRB1*0401) dimer with a peptide encompassing amino acids 263-275 of HC gp-39, solubilized in 0.05 % dodecylmaltoside detergent solution.

DRB1*0401 molecules were purified as described by Nag et al. (J. Immunol. (1993) 150: 1558-1564) with some minor modifications. Briefly, the EBV transformed lymphoblastoid cell line BSM (NIGMS; GM06821) was cultured in RPMI 1640 medium containing 10 % FCS, 2 g/l glucose, 4 mM L-glutamine. After harvesting the cells, DRB1*0401 molecules were extracted with 0.5 % Triton X100 in PBS. Then, the lysate was clarified by filtration and further concentrated on a 10 kD ultrafiltration membrane. The concentrated Triton X100 lysate was applied onto L243 coupled Sepharose-4B column, and the bound DRB1*0401 was eluted in PBS, 0.05 % dodecylmaltoside pH 11.3. Fractions were immediately neutralized with 20 % sodium phosphate monobasic buffer, and the DRB1*0401 molecules were collected through a DEAE ion-exchange column in PBS, 0.05 % dodecylmaltoside pH 7.3.

The peptide that corresponds to amino acid residues 263-275 of HC gp-39 was synthesized under GMP conditions at Diosynth using fmoc chemistry.

MHC-peptide complexes were prepared by incubating a 50x molar excess of HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ with purified DRB1*0401 molecules for 72-80 h at 37 °C in PBS, 0.05 % dodecylmaltoside pH 7.0. Finally, free peptide was removed by S-300/S-200 tandem size exclusion column chromatography and purified complexes were stored in PBS, 0.05 % dodecylmaltoside pH 7.2.

Example 2

Generation of monoclonal antibodies to Org38948

Six-week old female BALB/c mice were immunized according to the schedule presented in Table I. At day 48 of the immunization schedule, a blood sample was taken by orbita puncture. At this time, high titers of antibodies to Org38948 and DRB1*0401 (ranging from 22,000 to 46,000) were found. No significant differences were found between the immunization schedules used. Five days after the final injection, mice were sacrificed and erythrocyte-depleted spleen cell populations were prepared as described previously (Steenbakkers, 1992 J. Immunol.Methods 152:69; Steenbakkers, 1994, Molecular Biology Reports 19:125). These spleen cell populations were either frozen at -140 °C or used for the generation of MAb directly.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

14

For the generation of MAb, 2×10^7 erythrocyte-depleted spleen cells from mouse 1, mouse 2 and mouse 3 were pooled and incubated in DMEM/HAM's F12 (Gibco BRL, Paisly, UK, cat. no. 041-91825), 10 % Calf Serum (Hyclone, Logan, UT, USA) for 1 h at 37 °C on a plastic culture flask in order to remove the majority of monocytes. Subsequently, the non-adherent cells were submitted to three subsequent cycles of panning on DRB1*0401-coated culture dishes as described by Steenbakkers et al. (1994, Molecular Biology Reports 19:125). In those steps, B cells directed to HLA-DRB1*0401 are removed from the cell suspension. Subsequently, B cells directed to DRB1*0401/HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes were selected by incubating the resulting cell suspension on Org38948-coated culture dishes for 90 min at 37 °C. Unbound cells were removed by careful washing and finally bound cells were harvested by trypsin treatment.

Monoclonal antibody producing hybridomas were generated from these selected B cells by clonal expansion and mini-electrofusion as described previously (Steenbakkers et al., 1994 Molecular Biology Reports 19:125). Briefly, selected B cells were mixed with T-cell supernatant and 50,000 irradiated (2500 rad) EL-4 B5 cells at a final volume of 200 μ l DMEM/HAM's F12, 10% Calf Serum in 96-well flat bottomed tissue culture plates. On day 8, supernatants were tested in an ELISA using either DRB1*0401- or Org38948-coated plates. B-cell cultures producing MAb reactive with Org38948 and not with DRB1*0401 were submitted to a mini-electrofusion procedure. The specific B-cells from these cultures were mixed with 10^5 NS-1 myeloma cells and serum was removed by washing with DMEM/HAM's F12. Next, the cells were treated with pronase solution for 3 min and subsequently washed with fusion medium. Electrofusion was performed in a 50 μ l fusion chamber by an alternating electric field of 30 s, 2 MHz, 400 V/cm followed by a square, high field pulse of 10 μ s, 3 kV/cm and again an alternating electric field of 30 s, 2 MHz, 400 V/cm. Finally, the contents of the fusion chamber were transferred to selection medium (DMEM/HAM's F12, 10 % FCS, 10^{-4} M hypoxanthine (Sigma[®]), 1.6×10^{-5} M thymidine (Sigma[®]), 0.4 μ M aminopterin (Life Technologies[®]), 1 % conditioned medium of human bladder carcinoma T24 (ATCC HTB 4)) and plated into a 96-well microtiter plate under limiting dilution conditions. At day 13 after fusion, the cultures were examined for hybridoma growth and screened again in an ELISA using either DRB1*0401- or Org38948-coated plates.

After B-cell culture and mini-electrofusion, 5 antibodies (ORG38948 01A, ORG38948 04B, ORG38948 08A, ORG38948 11B and ORG38948 12A) were found that showed reactivity with Org38948, but not with DRB1*0401 in an ELISA (Figure 1a and 1b). As these MAb also do not react with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ coated on polystyrene plates, and because reactivity to Org38948 could not be inhibited by free HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵, these MAb are directed to a combination epitope of DRB1*0401 and HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵. Absence of binding to peptide HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ was confirmed in a BIAcore experiment.

To further support specificity of the MAb, we performed immunoprecipitations with Org38948. Briefly, 10 μg Org38948 were incubated with 6×10^6 Sheep anti-mouse Ig coupled paramagnetic beads (Dyna[®] 110.02, Oslo, Norway) preloaded with 1 ml hybridoma supernatant for 2 h at 4 °C in 300 μl PBS, 0.1 % BSA. Then, immunoprecipitates were washed three times with PBS, boiled in sample buffer and submitted to SDS-PAGE on a 10 % gel under non-reducing and reducing conditions. Electrophoretic transfer of the proteins to PVDF membranes was performed using standard procedures. After blocking free binding sites on the blots with PBS, 0.5 % Tween20[®], 5 % skim milk, the blots were incubated with anti-DR MAb (either 20 ml L243 at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 12.5 ml L227 at 1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in PBS, 0.5 % Tween20[®], 1 % BSA, 1 % normal goat serum for 1 h at room temperature. Then, the blots were incubated for 1 h with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse Ig in the same buffer. Finally, the blots were developed using BCIP[®] and NBT as a chromogenic substrate. These experiments showed that the MAb are able to immunoprecipitate a molecule of 60 kD which dissociates into two molecules of 33 kD and 28 kD when run on a SDS/PAGE under reducing conditions (Figure 2). These molecular weights confirm reactivity of the MAb to MHC class II molecules which consist of two non-covalently linked polypeptide chains (α -chain 32 kD and β -chain 28 kD).

Example 3

20 MAb to Org38948 recognize DRB1*0401/HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵ complexes on DRB1*0401-positive BLCL loaded with HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵.

Using FACS analysis, binding of the MAb to different MHC-expressing EBV-transformed B-cell lines (BLCL) pulsed with various peptides was established. Peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis using an automated Milligen 9050 synthesizer and purified by reverse phase HPLC.

Briefly, 10^6 BLCL were incubated with 40 μg peptide in 500 μl DMEM/HAM's F12 or blank medium for 4 h at 37°C. After this incubation, the cells were washed with PBS, 2 % FCS, 0.02 % sodiumazide. Approximately 2×10^5 cells were incubated for 1 h, 4 °C with 130 μl MAb-containing hybridoma supernatant plus 20 μl PBS, 20 % FCS, 0.02 % sodiumazide. After washing the cells twice with PBS, 2 % FCS, 0.02 % sodiumazide, they were incubated for 1h, 4°C with 50 μl PBS, 20 % FCS, 0.02 % sodiumazide plus 10 μl Goat anti-mouseIg/FITC (Beckton & Dickinson). Subsequently, the cells were washed three times with PBS, 2 % FCS, 0.02 % sodiumazide and finally resuspended in 400 μl PBS, 2 % p-formaldehyde. As a control for peptide binding, cells were incubated with biotinylated HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ and stained with streptavidin/PE (Beckton & Dickinson). As a control for HLA-DR expression, staining was performed with anti-HLA/DR, L243 (purified Ig from hybridoma ATCC HB 55). Stained cells were analyzed with the FACScan[™] (Beckton & Dickinson). In

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

16

all cases, forward and side scatter analysis was applied to eliminate dead cells and debris from further analysis.

Two BLCL homozygous for DRB1*0401 (BSM and Priess) were loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵, and reactivity of the antibodies to these cells was compared to cells that were not loaded with this peptide. Figures 3a and b shows that all Org38948-specific antibodies, except ORG38948 11B, discriminate in reactivity between peptide-loaded and non-loaded BLCL. The best staining of DRB1*0401/HCgp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes was obtained with ORG38948 01A, ORG38948 08A and ORG38948 12A. However, two of these antibodies (01A and 08A) showed some background staining on one of the BLCL (BSM), which probably makes them less useful.

Example 4

Epitope mapping of MAb to Org38948

By studying binding to various modified and truncated peptides of HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ in the context of DRB1*0401, we mapped the epitopes recognized by the antibodies. Reactivity of the antibodies was compared with recognition by the TCR of mouse T-cell hybridoma 8B12 (mouse T-cell hybridoma recognizing HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ in the context of HLA-DRB1*0401. This hybridoma was generated from HLA-DRB1*0401^{+/+}, human CD4^{+/+}, I-AB^{-/-} transgenic mice immunized with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ as described by Cope et al., 1999 Arthritis and Rheumatism 42:1597-1507)

Various modifications in the peptide backbone and side-chains are allowed without influencing recognition by ORG38948 12A or 8B12 (Table II). Recognition by antibodies ORG38948 01A and ORG38948 08A appears more critical with respect to the epitopes recognized as the modifications are recognized less well (ORG38948 08A) or not at all (ORG38948 01A). ORG38948 12A does not react with a peptide that is elongated by two amino acids at the N-terminus (DRB1*0401/HC gp-39²⁶¹⁻²⁷⁵).

In another experiment, various truncations of HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ were tested in order to establish the minimal epitope in DRB1*0401 recognized by ORG38948 12A. At the C-terminus two amino acids can be removed without loss of binding, whereas at the N-terminus no truncations are allowed (Table III). So, the minimal epitope recognized by ORG38948 12A is DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷³. The epitope recognized by ORG38948 12A is different from the epitope recognized by hybridoma 8B12. Besides truncation of two amino acids at the C-terminus, hybridoma 8B12 allows removal of two amino acids at the N-terminus.

Example 5

Fine specificity of MAb to Org38948

Using the same procedure as described in example 3, it was investigated whether 1) the anti-ORG38948 MAb cross-react with DRB1*0401 loaded with a set of different

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

17.

peptides and 2) binding of ORG38948 12A is restricted to HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ in the context of DRB1*0401 or that other HLA-DR/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes are also recognized.

Ad 1) Priess cells were pulsed with peptides that bind well to DRB1*0401. The data summarized in Table IV show that no cross-reaction was observed with DRB1*0401 loaded with other HC gp-39-derived peptides that accomplish a DRB1*0401-binding motif. Also no cross-reaction was found with DRB1*0401 loaded with unrelated peptides from *Influenza Haemagglutinin* and *Mycobacterium Leprae*.

ORG38948 12A also recognizes biotinylated HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ whereas antibodies ORG38948 01A, ORG38948 04B and ORG38948 08A do not. As the biotin is coupled to the N-terminus of the peptide, this suggests that the latter MAb recognize an epitope closely to the N-terminus of the peptide in the complex.

Ad 2) To study the cross-reactivity of ORG38948 12A with other HLA-DR/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes than DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵, the following well-characterized, homozygous EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines (BLCL) were used:

Priess: DRA, **DRB1*0401**
 BSM: DRA*0101, **DRB1*0401**, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0302, DPA1*01, DPB1*01012.
 20 YAR: DRA*0101, **DRB1*0402**, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0302, DPA1*01, DPB1*0401
 SA9001: DRA, **DRB1*0101**, DQ1, DP4.
 BM92: DRA*0101, **DRB1*0404**, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0302, DPA1*01, DPB1*0402.
 25 MGAR: DRA*0102, **DRB1*1501**, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602, DPA1*01, DPB1*0401.
 JHAF: **DRB1*0407**, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0301, DPA1*01, DPB1*0301.
 AMALA: DRA*0102, **DRB1*1402**, DRB3*0101, DQA1*0501, DQB1*0301, DPA1*01, DPB1*0402.
 30 EK: DRA*0102, **DRB1*1401**, DRB3*0202, DQA1*0101, DQB1*0503, DPA1*01, DPB1*0402.

These homozygous BLCL were loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ and subsequently stained with ORG38948 12A. In a series of experiments, ORG38948 12A stains HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ in the context of both DRB1*0401 and DRB1*0407 (Table V). At normal concentrations of antibody, no staining was observed of the peptide in the context of

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

18

DRB1*0101, DRB1*0404, DRB1*1402 (RA susceptible haplotypes), DRB1*0402, DRB1*1301, DRB1*1401 (closely related, not RA susceptible haplotypes) and DRB1*1501 (more distantly related, not RA susceptible haplotype). At extremely high concentrations of antibody, also weaker reactivity was found with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ in the context of DRB1*0101, DRB1*0404, DRB1*1301 and DRB1*1401. In the controls of these experiments, it was established that i) ORG38948 12A does not bind to non-loaded BLCL, ii) HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ binds to the BLCL and iii) all BLCL show a high level of DR-expression (data not shown).

Example 6

10 MAb to Org38948 inhibit activation of T-cell hybridomas by Org38948 and DRB1*0401-positive BLCL pulsed with HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵.

Inhibition of antigen-induced activation of T-cell hybridomas by anti-Org38948 MAb was measured in two different assays. In one assay, the T-cell hybridomas were stimulated with MHC/peptide-complexes. In the other assay EBV-transformed B cells loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ were used for stimulation of T-cell hybridomas 5G11, 8B12 and 14G11(mouse T-cell hybridomas recognizing HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ in the context of HLA-DRB1*0401; these hybridomas were generated from HLA-DRB1*0401^{+/+}, human CD4^{+/+}, I-A^β^{-/-} transgenic mice immunized with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ as described by Cope et al., 1999, Arthritis and Rheumatism 42:1597-1507)

20 For stimulation with MHC/peptide complexes, flat-bottomed microwells were coated overnight at 4 °C with 100 µl Org38948 at a concentration of 200 ng/ml in PBS. Excess complex was removed by washing twice with PBS. Then, the wells were incubated for 1 h at 37 °C with various concentrations of MAb in 100 µl DMEM/HAM's F12, 10 % FCS. After preincubation with MAb, 100 µl T-cell hybridoma suspension in DMEM/HAM's F12, 10 % FCS (5G11 and 14G11 at 2×10^4 c/well; 8B12 at 10^4 c/well) was added. Cultures were incubated for two days at 37°C and finally supernatant was harvested for measurement of mouse IL-2. Figure 4a shows that all MAb inhibited activation of hybridoma 5G11 in a dose-related fashion. Using ORG38948 01A, a partial inhibition was obtained as compared to a control IgG MAb. On the other hand, incubation with ORG38948 08A and ORG38948 12A resulted in complete inhibition at a concentration of 25 µg/ml. The complex-specific antibodies were less potent inhibitors of T-cell hybridoma activation than anti-HLA/DR MAb, L243, which may be due to differences in affinity of the antibodies. Similar results were obtained using hybridoma 14G11 (Figure 4b). Hybridoma 8B12 was inhibited less well (Figure 4c) which is in agreement with the our previous observations that this hybridoma requires less complexes to become fully stimulated.

35 In the other assay, BSM cells were loaded with HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ by incubation of 1.2×10^6 cells with 10 µg peptide in 1 ml DMEM/HAM's F12 for 5 h at 37°C. Then, excess peptide was washed out and the cells were irradiated with a dose of 15,000 rad.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

19

Subsequently, 2×10^4 peptide-loaded BSM cells were preincubated for 1 h at 37°C in round-bottomed microwells with 10 µg/ml of MAb in a final volume of 100 µl DMEM/HAM's F12. Then, 2×10^4 T-cell hybridomas were added in 100 µl DMEM/HAM's F12, 20 % FCS. After two days incubation at 37°C, supernatant was harvested and tested on mouse IL-2. As can be deduced from Figure 5, all antibodies were found to inhibit peptide-induced activation of hybridomas 5G11 and 14G11 at a concentration of 10 µg/ml. Again, stronger inhibition was obtained with anti-HLA/DR MAb, L243.

Note: Mouse IL-2 was determined in a double sandwich ELISA using anti-mouse IL-2 (Pharmingen 18161D) for capture and anti-mouse IL-2/biotin (Pharmingen 18172D) as a second antibody. Streptavidin conjugated to Europium (Wallac™ 1244-360) was used for detection of IL-2 binding in a time-resolved fluorometer.

Example 7

15 DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes are presented on APC in the synovia of RA patients

Immunohistochemistry on synovial sections were performed as described by Baeten et al. (2000, Arthritis and Rheumatism 43:1233-1243). Briefly, synovial biopsies were snap frozen in liquid nitrogen and 5 µm cryostat sections were made. After fixation in acetone for 10 min and blocking of endogenous peroxidase with 1 % hydrogen peroxide, the sections were incubated for 30 min with a pool of 3 different anti-HC gp-39 MAb (06A, 08B and 10B), or ORG38948 12A. Parallel sections were incubated with irrelevant isotype-matched MAb as a negative control. The sections were subsequently incubated with biotinylated anti-mouse secondary antibody, followed by a streptavidin-peroxidase complex (Dako, Glostrup, Denmark). The colour reaction was developed using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) chromogen substrate. Finally, the sections were counter stained with haematoxylin. The stained synovial sections were blinded and scored independently by two observers.

Synovial tissue sections of 19 RA patients, 10 SpA patients, 3 PsA patients, 2 OA patients, 1 patient with chondrocalcinosis and 3 patients with an as yet unidentified diagnosis were tested on HC gp-39 expression and stained with ORG38948 12A by immunohistochemistry using a set of three anti-HC gp-39 MAb and ORG38948 12A respectively. DR4/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ or DRB1*0101/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes were detected in 10 out of 15 shared epitope-positive RA patients (Table VIa). Reactivity with DRB1*0404/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ and DRB1*0101/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ is in agreement with the observation that ORG38948 12A also recognizes HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵ in the context of DRB1*0404 and DRB1*0101 (Table V). Staining with ORG38948 12A was restricted to individual dendritic-like cells located in or nearby lymphoid infiltrates (data not shown). This location is clearly distinct from the location of the HC gp-39

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

20

expressing cells which suggests that MHC/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ expressing cells are not the HC gp-39 producing cells. No staining with ORG38948 12A MAb was found in 19 control patients with various diseases (Table VIb). Five of these patients are relevant controls due to the expression of the shared epitope (DR4 or DR1), six are shared
5 epitope-negative and the HLA-DR type of the others is still unknown. Staining with an isotype control antibody was always negative.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

21..

Table I: Immunizations with Org38948

mouse no.	day 0	day 20	day 41	Day 48	day 59	day 63
1	100 µg i.p.	100 µg i.p.	100 µg i.p.	Blood Sample	100 µg i.p.	blood sample; spleen cells
2	25 µg i.p.	25 µg i.p.	25 µg i.p.	Blood sample	25 µg i.p.	blood sample; spleen cells
3	100µg cFA; s.c.	100 µg iFA; s.c.	100 µg iFA; s.c.	blood sample	100 µg i.p.	blood sample; spleen cells
4	25 µg cFA; s.c.	25 µg iFA; s.c.	25 µg iFA; s.c.	blood sample	25 µg i.p.	blood sample; spleen cells

cFA=complete Freund's adjuvant; iFA=incomplete Freund's adjuvant

i.p.=intraperitoneally; s.c.=subcutaneously

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

Table II: Epitope mapping of monoclonal antibodies to Org38948

HC gp-39 peptide	Recognition by			
	MAb 01A	MAb 08A	MAb 12A	8B12
RSFTLASSETGVG	+	+	+	+
Ac-RSFTLASSETGVG	-	-	+	+
HOCH ₂ -(CHOH) ₄ -CH ₂ -RSFTLASSETGVG	+/-	+/-	+	+
Ac-RSFTLASSETGV-ψ-[CH ₂ NH]-G-NH ₂	-	+/-	+	+
Ac-R-NhSer-FTLASSETGVG-NH ₂	-	+/-	+	+
Ac-R-NhSer-FTLASSETGV-ψ-[CH ₂ NH]-G-NH ₂	-	+/-	+	+
FGRSFTLASSETGVG	-	+/-	-	?
Ac-RSFTLASSETGVG-NH ₂	-	+/-	+	+

22

Table III: Epitope mapping of monoclonal antibody ORG38948 12A

HC gp-35 peptide in DRB1*0401	binding	Recognition by	
		Mab 12A	8B12
RSFTLASSETGVG	263-275	+++	+
RSFTLASSETGV	263-274	+++	+
RSFTLASSETG	263-273	+++	+/-
RSFTLASSET	263-272	++	-
FTLASSETGVG	265-275	+++	+/-
TLASSETGVG	266-275	-	-
SFTLASSETGV	264-274	+++	+
FTLASSETG	265-273	+	-

Table IV: Specificity of Org38948 MAbs for DRB1*0401 on Prieess cells loaded with different peptides.

Peptide	IC50	01A	04B	08A	11B	12A
None	-	-	-	+/-	+/-	-
HC gp-39 ²⁶³⁻²⁷⁵	0.08	+	+/-	+	+/-	+
HC gp-39 ²⁶³⁻²⁷⁵ -bio	n.d.	-	-	+/-	+/-	+
HC gp-39 ¹⁰³⁻¹¹⁶	0.08	-	-	+/-	+/-	-
HC gp-39 ²⁵⁹⁻²⁷¹	0.04	-	-	+/-	+/-	-
IHA ³⁰⁷⁻³¹⁹ F	0.56	-	-	+/-	+/-	-
IHA ³⁰⁷⁻³¹⁹ F-bio	n.d.	-	-	+/-	+/-	-
MLep 18K ³⁸⁻⁵¹	0.3	-	-	+/-	+/-	-

IC50: relative binding affinity for DRB1*0401; IHA: Influenza Haemagglutinin, MLep, Mycobacterium Leptrae

- : no binding of antibody (fluorescence intensity: 0-4)

+/-: intermediate binding of antibody (fluorescence intensity: 4-40)

+: strong binding of antibody (fluorescence intensity: 40-400)

Table V: Recognition of HLA-DR molecules loaded with HC gp-39⁶³⁻²⁷⁵ by monoclonal antibody ORG38948 12A

BLCL	HLA-DR haplotype		Recognition by ORG38948 12A	
	susceptibility for RA		3 µg/ml	200-500 µg/ml
BSM	DRB1*0401	DR4 Dw4	susceptible	++
Priess	DRB1*0401	DR4 Dw4	susceptible	++
SA 9001	DRB1*0101	DR1 Dw1	susceptible	+/-
BM92	DRB1*0404	DR4 Dw14	susceptible	+
AMALA	DRB1*1402	DR6 Dw16	susceptible	-
YAR	DRB1*0402	DR4 Dw10	closely related; not susceptible	-
CB6B	DRB1*1301	DR6a	closely related; not susceptible	+/-
EK/OH	DRB1*1401	DR6b	closely related; not susceptible	+/-
MGAR	DRB1*1501	DR2 Dw2	not susceptible	-
IHAF	DRB1*0407	DR4 Dw13	unknown	++

Various BLCL were loaded with HC gp-39⁶³⁻²⁷⁵ and subsequently stained with ORG38948 12A. In the controls, it was established that i) ORG38948 12A does not bind to non-loaded BLCL, ii) HC gp-39⁶³⁻²⁷⁵ binds to the BLCL and iii) all BLCL show a high level of DR-expression.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

26

Table VIa: Expression MHC/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes in synovium of RA patients.

patient	age	diagnosis	disease duration	HLA-DR	MHC-peptide
1	57	RA	1 year	B1*0404	+
2	74	RA	2 years	B1*0401	-
3	53	RA	6 years	B1*0401	+
4	60	RA	7 years	B1*0401	+
5	67	RA	19 years	B1*0101	-
6	78	RA	20 years	B1*0401	-
7	70	RA	22 years	B1*0401	+
8	64	RA	25 years	B1*0101	-
9	50	RA	2 months	B1*04	+
10	39	RA	3 months	?	-
11	50	RA	4 months	B1*04	-
12	52	RA	9 months	B1*04	+
13	24	RA	1 year	B1*0101	+
14	33	RA	3 years	B1*04	+
15	82	RA	4 years	?	-
16	48	RA	6 years	B1*0401,B1*0404	+
17	36	RA	8 years	-/-	-
18	64	RA	15 years	?	-
19	58	RA	20 years	B1*04	+

RA: Rheumatoid Arthritis

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

27

Table VIb: Expression MHC/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵-complexes in synovium of non-RA controls.

patient	age	Diagnosis	disease duration	HLA-DR	MHC-peptide
1	30	SpA	2 months	?	-
2	36	SpA	3 months	-/-	-
3	37	SpA	6 months	?	-
4	56	SpA	6 months	B1*0401	-
5	28	SpA	6 months	-/-	-
6	52	SpA	8 months	-/-	-
7	19	SpA	9 months	-/-	-
8	22	SpA	2 years	B1*0401	-
9	35	SpA	3 years	?	-
10	41	SpA	12 years	B1*0401	-
1	48	PsA	1 month	?	-
2	60	PsA	1 month	-/-	-
3	52	PsA	2 years	?	-
1	73	CC	2 years	-/-	-
2	76	OA			-
3	66	OA			-
4	67	?	9 months	B1*04	-
5	80	?	1 month	?	-
6	38	?	30 years	B1*0101	-

CC: chondrocalcinosis; SpA: spondyloarthropathy; PsA: psoriatic arthritis;

OA: osteoarthritis

Claims

1. A method for diagnosing an autoimmune disease comprising detecting the presence of an autoimmune specific MHC - peptide complex in a patient suffering from an autoimmune disease with antibodies or antigen binding domains thereof specifically binding to a MHC - HC-gp39-derived peptide complex.
2. The method of claim 1 wherein the MHC part of the complex is of the type HLA DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0407 and DRB1*0101.
3. The method of claim 2 wherein the MHC type is HLA DRB1*0401.
4. The method of claims 1-3 wherein the HC gp-39 derived peptide comprises HC-gp39²⁶³⁻²⁷³ or HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵.
5. The method of claim 4 wherein the HC gp-39 derived peptide is HC-gp39²⁶³⁻²⁷³ or HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵.
6. The method of claim 5 wherein the antibody is ORG38948 08A, ORG38948 12A or ORG38948 04B.
7. Antibody used in the method of any one of claims 1-6.
8. Diagnostic composition comprising one or more of the antibodies according to claim 7 and a detection agent.
9. Antibody according to claim 7 for use in therapy.
10. Use of the antibody according to claim 7 for the manufacture of a pharmaceutical preparation for the treatment of autoimmune disorders.
11. Use of the antibody according to claim 7 for purification of autoimmune specific MHC-peptide complexes.

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

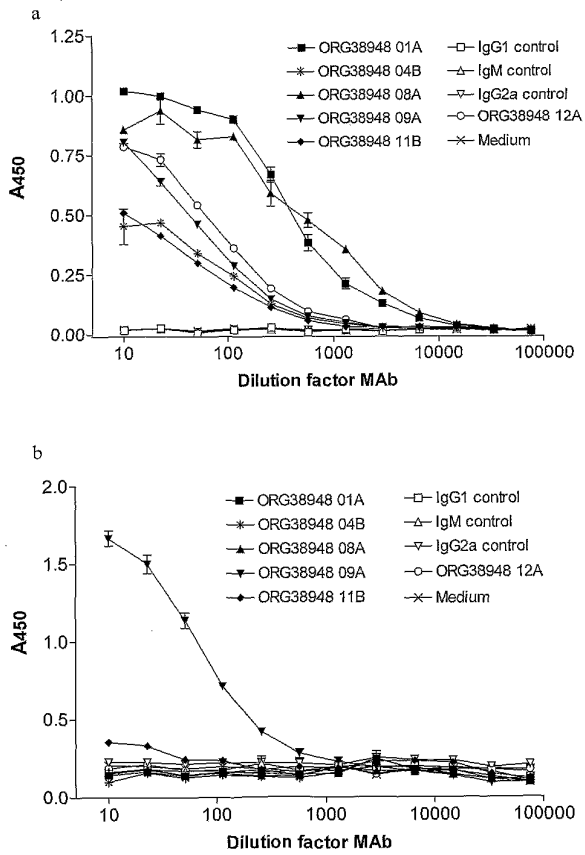


Figure 1

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

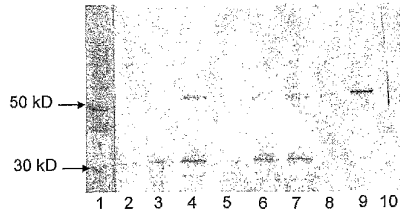
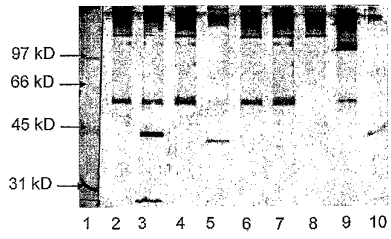


Figure 2

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

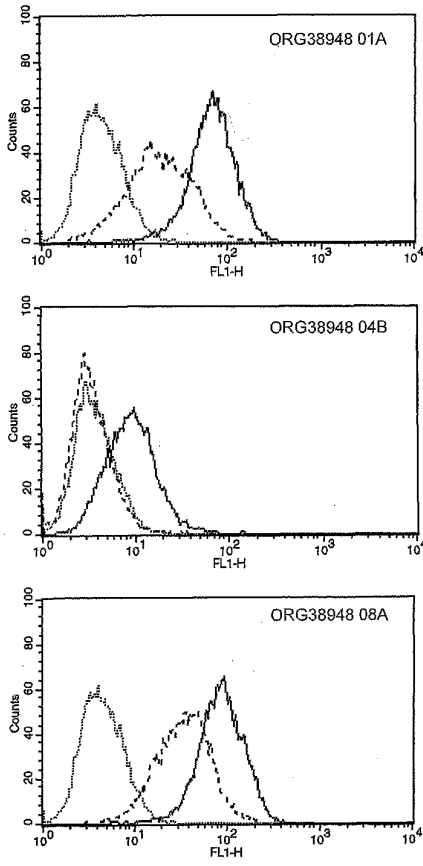


Figure 3a

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

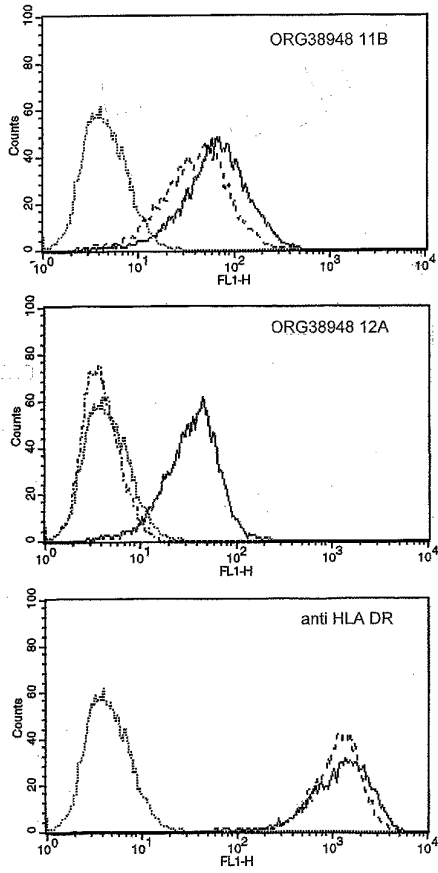


Figure 3a (continued)

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

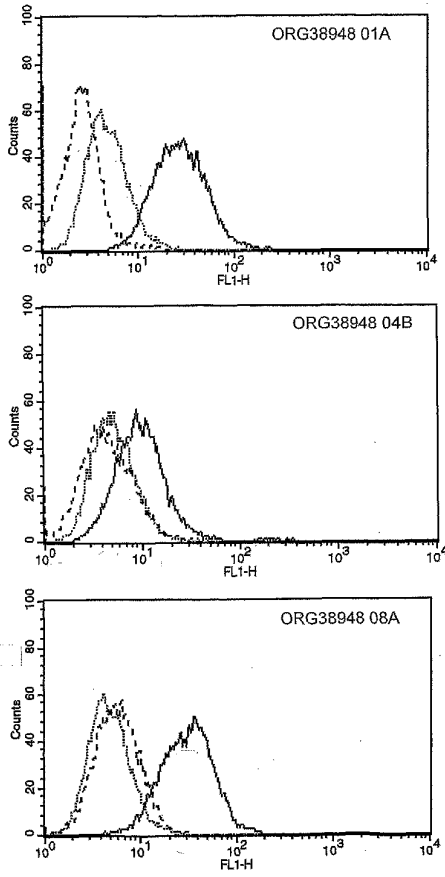


Figure 3b

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

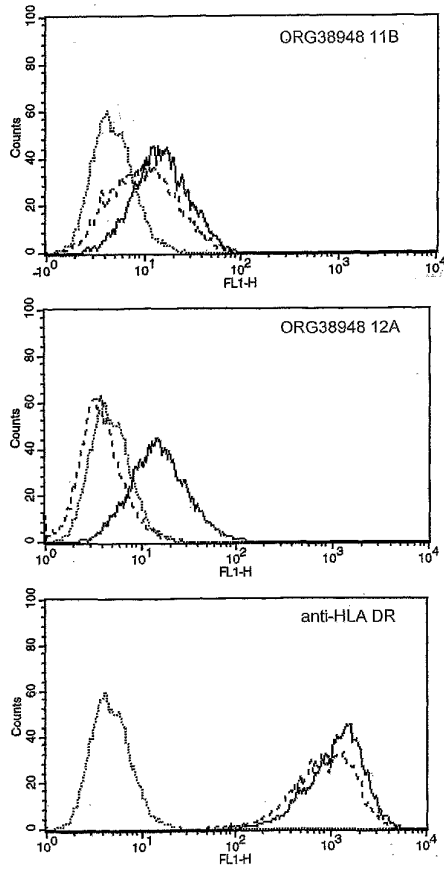


Figure 3b (continued)

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

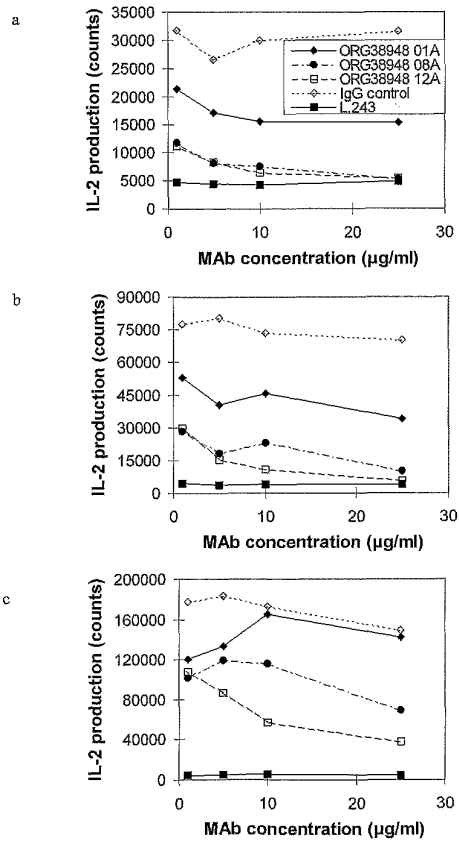


Figure 4

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

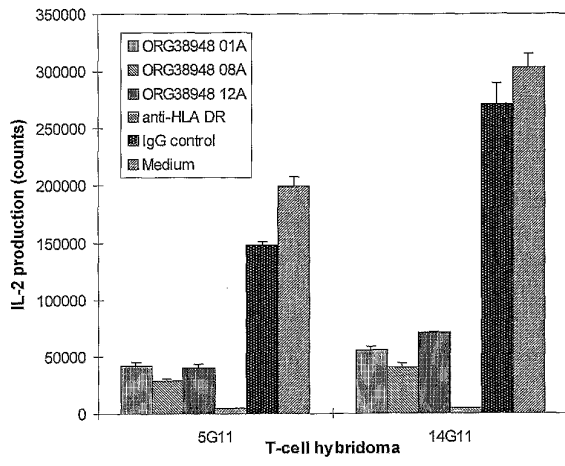


Figure 5

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

1

SEQUENCE LISTING

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> Use of antibodies against specific MHC-peptide complexes

<130>

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HC gp-39 AA 263-273

<400> 1

Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly
1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HC gp-39 AA 263-275

<400> 2

Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HC gp-39 AA 263-274

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

2

<400> 3
Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HC gp-39 AA 263-272

<400> 4
Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HC gp-39 AA 265-275

<400> 5
Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HC gp-39 AA 266-275

<400> 6
Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

3

<220>

<223> HC gp-39 AA 264-274

<400> 7

Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val
1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HC gp-39 AA 265-273

<400> 8

Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly
1 5

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: At the
N-terminus connected to acetyl

<400> 9

Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: At the
N-terminus connected to HOCH₂-(CHOH)₄-CH₂

<400> 10

Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

4

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: At the
N-terminus acetyl is connected; at the C-terminus
NH₂ is connected; Xaa at position 12 is
NH-CH(CH(CH₃)₂)-CH₂

<400> 11
Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Xaa Gly
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: At the
N-terminus acetyl is connected; at the C-terminus
NH₂ is connected; Xaa at position 2 is
N[(CH₂)₂-OH]-CH₂-C(O)

<400> 12
Arg Xaa Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: At the
N-terminus acetyl is connected; at the C-terminus
NH₂ is connected; Xaa at position 2 is
N[(CH₂)₂-OH]-CH₂-C(O); Xaa at position 12 is
NH-CH(CH(CH₃)₂)-CH₂

<400> 13
Arg Xaa Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Xaa Gly
1 5 10

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

5

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HC gp-39 AA 261-275

<400> 14
Phe Gly Arg Ser Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: At the
N-terminus acetyl is connected; at the C-terminus
NH2 is connected

<400> 15
Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Influenza virus

<220>
<223> Haemagglutinin AA 307-319

<400> 16
Pro Lys Phe Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Mycobacterium leprae

<220>
<223> 18K protein AA 38-51

WO 02/14870

PCT/EP01/09136

6

<400> 17
Glu Glu Phe Val Val Glu Phe Asp Leu Pro Gly Ile Lys Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HC gp-39 AA 103-116

<400> 18
Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn Thr Gln Ser Arg
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HC gp-39 AA 259-271

<400> 19
Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu
1 5 10

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HC gp-39 AA 326-338

<400> 20
Val Gly Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser Lys Val
1 5 10

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/014870 A3

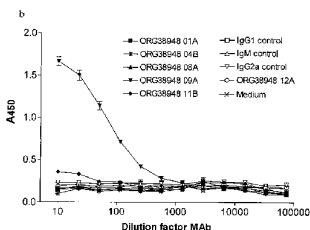
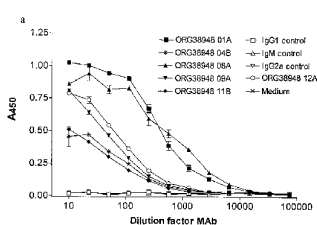
- (51) International Patent Classification: G01N 33/564, 33/569, C07K 16/28, G01N 33/68
- (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): STEENBAKKERS, Petrus, Gerardus, Antonius [NL/NL]; Wethouder Donkerstraat 3, NL-5469 VL Eup (NL).
- (21) International Application Number: PCT/EU01/09136
- (74) Agent: VAN WEZENBEEK, P.; P.O. Box 20, NL-5340 BH Oss (NL).
- (22) International Filing Date: 8 August 2001 (08.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GH, GI, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LX, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.
- (26) Publication Language: English
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CI, DJ, EG, GA, GN, GU, GW, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LY, MA, MG, MK, MN, MU, MW, MY, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SG, SI, SK, SL, SM, SN, ST, SV, SZ, TD, TG, TH, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW).
- (30) Priority Data: 00202844.7 14 August 2000 (14.08.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): AKZO NOBEL N.V. [NL/NL]; Velperweg 76, NL-6824 BM Arnhem (NL).

[Continued on next page]

(54) Title: USE OF ANTIBODIES AGAINST SPECIFIC MHC-PEPTIDE COMPLEXES



WO 02/014870 A3



(57) Abstract: The invention describes a method to diagnose the autoimmune disease activity by detecting the presence of an autoimmune specific MHC-peptide complex in a patient suffering from an autoimmune disease. The MHC-peptide complex is associated with rheumatoid arthritis. Monoclonal antibodies to be used for this method are also described. The antibodies can also be used for therapeutic purposes.

WO 02/014870 A3 

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, (88) **Date of publication of the international search report:**
TG) 15 August 2002

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.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09136
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/564 G01N33/569 C07K16/28 G01N33/68		
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) IPC 7 G01N C07K		
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 practical, search terms used) BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBL, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 01995 A (UNIV CALIFORNIA ;PRICE PAUL A (US); JOHANSEN JULIA S (DK)) 19 January 1995 (1995-01-19) abstract ---	1-14
A	WO 95 02188 A (UNIV CALIFORNIA) 19 January 1995 (1995-01-19) abstract ---	1-14
A	HARVEY S ET AL: "CHONDREX: NEW MARKER OF JOINT DISEASE" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, US, vol. 44, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 509-516, XP008000660 ISSN: 0009-9147 page 510, right-hand column, paragraph 3 --- -/--	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but 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		*Z* 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 21 March 2002		Date of mailing of the international search report 28/03/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/09136

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VERHEIJDEN G F M ET AL: "HUMAN CARTILAGE GLYCOPROTEIN-39 AS A CANDIDATE AUTOANTIGEN IN RHEUMATOID ARTHRITIS" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 40, no. 6, 1 June 1997 (1997-06-01), pages 1115-1125, XP002039029 ISSN: 0004-3591 table 2 page 1117, left-hand column, line 12,13,16 ---</p>	1-14
A	<p>PORGADOR A ET AL: "LOCALIZATION, QUANTIFICATION, AND IN SITU DETECTION OF SPECIFIC PEPTIDE-MHC CLASS I COMPLEXES USING A MONOCLONAL ANTIBODY" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 6, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 715-726, XP000991374 ISSN: 1074-7613 the whole document -----</p>	1-14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1995)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/09136

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9501995	A	19-01-1995	EP 0710251 A1	08-05-1996
			JP 2878455 B2	05-04-1999
			JP 9500209 T	07-01-1997
			WO 9501995 A1	19-01-1995
			US 5935798 A	10-08-1999
WO 9502188	A	19-01-1995	WO 9502188 A1	19-01-1995

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 37/06	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47	
G 0 1 N 33/564	C 0 7 K 16/18	
	G 0 1 N 33/564	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA

(72) 発明者 ステンバツケルス, ペトルス・ヘラルドウス・アントニウス
オランダ国、エヌ・エル - 5 4 6 9 ・フエー・エル・エルプ、ウエタウデル・ドンケルストラート
・ 3

F ターム(参考) 4C084 AA17 ZA96 ZB15
4C085 AA13 AA14 BB31 CC21 DD88 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA40 CA40 DA75 EA50 FA71 FA82
GA22 GA26

专利名称(译)	抗特定MHC-肽复合物的抗体的用途		
公开(公告)号	JP2004506901A	公开(公告)日	2004-03-04
申请号	JP2002519948	申请日	2001-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克苏诺贝尔的基础		
[标]发明人	ステーンバツケルスペトルスヘラルドウスアントニウス		
发明人	ステーンバツケルス,ペトルス・ヘラルドウス・アントニウス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/28 G01N33/564 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 G01N33/564 G01N2800/24 Y10S530/866 Y10S530/868		
FI分类号	G01N33/53.D A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/564.Z		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/ZA96 4C084/ZB15 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA82 4H045/GA22 4H045/GA26		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	2000202844 2000-08-14 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明描述了通过检测患有自身免疫疾病的患者中自身免疫特异性MHC-肽复合物的存在来诊断自身免疫疾病活性的方法。MHC-肽复合物与类风湿性关节炎相关。还描述了用于该方法的单克隆抗体。抗体也可用于治疗目的。

