

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039948.2

[51] Int. Cl.

*C07K 16/00 (2006.01)*

*C12N 15/00 (2006.01)*

*C07H 21/04 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

[43] 公开日 2007 年 1 月 24 日

[11] 公开号 CN 1902229A

[22] 申请日 2004.11.12

[21] 申请号 200480039948.2

[30] 优先权

[32] 2003.11.12 [33] US [31] 10/706,689

[86] 国际申请 PCT/US2004/037971 2004.11.12

[87] 国际公布 WO2005/047307 英 2005.5.26

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.5

[71] 申请人 艾博特公司

地址 美国伊利诺伊州

[72] 发明人 T·加于尔 B·拉布科夫斯基

J·W·沃斯 L·格林

J·巴布库克 X·-C·贾

J·韦勒 J·S·康

B·赫德伯格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 李连涛

权利要求书 15 页 说明书 109 页 序列表 51 页

[54] 发明名称

IL-18 结合蛋白

[57] 摘要

本发明涉及 IL-18 结合蛋白，特别是结合人白介素-18(hIL-18)的抗体。具体地说，本发明涉及全人抗体的抗体。优选地，抗体具有体外和体内对于 hIL-18 的高亲和性和/或中和 hIL-18 的性质。本发明的抗体可以是全长抗体或者其抗原结合部分。还提供了本发明抗体的制备方法和使用方法。本发明的抗体或抗体部分用于对例如患有其中 hIL-18 活性是有害的疾病的人受治疗者检测 hIL-18 和用于抑制 hIL-18 活性。

1. 一种包括能结合人 IL-18 的抗原结合结构域的结合蛋白，所述抗原结合结构域包括至少一个包括选自下面的氨基酸序列的 CDR：

CDR-H1.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$  (SEQ ID NO : 42)，其中：

$X_1$  是 S, N, H, R, 或 Y；

$X_2$  是 Y, G, R, S, 或 C；

$X_3$  是 W, G, Y, D, S, V, 或 I；

$X_4$  是 I, H, W, Y, M, L, 或 D；

$X_5$  是 G, Y, S, N, 或 H；

$X_6$  是 W, 或者不存在；和

$X_7$  是 T, S, G, 或者不存在；

CDR-H2.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$  (SEQ ID NO : 43)，其中；

$X_1$  是 F, Y, H, S, 或 V；

$X_2$  是 I, 或 F；

$X_3$  是 Y, S, 或 W；

$X_4$  是 P, Y, 或 S；

$X_5$  是 G, S, R, 或 D；

$X_6$  是 D, 或 G；

$X_7$  是 S, T, G, 或 R；

$X_8$  是 E, T, I, 或 N；

$X_9$  是 T, Y, N, I, K, 或 H；

$X_{10}$  是 R, Y, 或 S；

$X_{11}$  是 Y, N, 或 S；

$X_{12}$  是 S, P, A, 或 V；

$X_{13}$  是 P, S, 或 D；

$X_{14}$  是 T, L, 或 S；

$X_{15}$  是 F, K, 或 V；

$X_{16}$  是 Q, S, 或 K；和

$X_{17}$  是 G, 或者不存在；

CDR-H3.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$  (SEQ ID NO: 44)，其中；

$X_1$  是 V, D, E, S, 或 C ;  
 $X_2$  是 G, R, D, S, K, L, Y, 或 A ;  
 $X_3$  是 S, G, Y, 或 R ;  
 $X_4$  是 G, S, Y, N, T, 或 D ;  
 $X_5$  是 W, S, A, G, Y, 或 T ;  
 $X_6$  是 Y, G, S, F, W, 或 N ;  
 $X_7$  是 P, S, F, Y, V, G, W, 或 V ;  
 $X_8$  是 Y, F, D, P, M, I, 或 N ;  
 $X_9$  是 T, W, D, L, Y, E, P, F, 或 G ;  
 $X_{10}$  是 F, D, Y, H, V, Y, 或者不存在;  
 $X_{11}$  是 D, Y, F, L, 或者不存在;  
 $X_{12}$  是 I, D, Y, 或者不存在;  
 $X_{13}$  是 Y, 或者不存在;  
 $X_{14}$  是 Y, 或者不存在;  
 $X_{15}$  是 G, 或者不存在;  
 $X_{16}$  是 M, 或者不存在;  
 $X_{17}$  是 D, 或者不存在; 和  
 $X_{18}$  是 V, 或者不存;

CDR-L1.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-$

$X_{16}-X_{17}$  (SEQID NO : 45), 其中;

$X_1$  是 R, 或 K;  
 $X_2$  是 A, G, 或 S;  
 $X_3$  是 S;  
 $X_4$  是 E, R, Q, 或 H;  
 $X_5$  是 S, I, T, 或 N;  
 $X_6$  是 I, V, L, 或 F ;  
 $X_7$  是 S, G, L, N, 或 R;  
 $X_8$  和 S, G, Y, R, N, H, 或 D ;  
 $X_9$  是 N, G, Y, R, 或 S ;  
 $X_{10}$  是 L, Y, S, 或 D;  
 $X_{11}$  是 A, L, N, V, G, 或 D ;  
 $X_{12}$  是 A, N, E, K, G, 或者不存在;

X<sub>13</sub> 是 K, T, N, 或者不存在;

X<sub>14</sub> 是 N, Y, T, 或者不存在;

X<sub>15</sub> 是 Y, L, 或者不存在;

X<sub>16</sub> 是 L, C, Y, 或者不存在; 和

X<sub>17</sub> 是 A, D, 或者不存在;

CDR-L2. X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 46), 其中:

X<sub>1</sub> 是 T, G, S, W, 或 E ;

X<sub>2</sub> 是 A, V, T, I, 或 L ;

X<sub>3</sub> 是 S, 或 F;

X<sub>4</sub> 是 T, I, N, S, R, 或 Y ;

X<sub>5</sub> 是 R, 或 L ;

X<sub>6</sub> 是 A, Q, E, 或 F ; 和

X<sub>7</sub> 是 T, 或 S;

和

CDR-L3. X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub> (SEQ ID NO: 47), 其中:

X<sub>1</sub> 是 Q, 或 M;

X<sub>2</sub> 是 Q, H, 或 Y ;

X<sub>3</sub> 是 Y, N, G, S, 或 R ;

X<sub>4</sub> 是 N, H, Y, D, G, V, L, 或 I ;

X<sub>5</sub> 是 N, G, I, Y, S, Q, F, 或 E ;

X<sub>6</sub> 是 W, S, T, L, I, 或 F ;

X<sub>7</sub> 是 P, L, T, D, 或 I ;

X<sub>8</sub> 是 S, L, P, C, W, I, 或 F ;

X<sub>9</sub> 是 I, T, S, 或者不存在; 和

X<sub>10</sub> 是 T, 或者不存在。

2. 根据权利要求 1 的结合蛋白, 其中所述至少一个 CDR 包括选自下面的氨基酸序列:

SEQ ID NO. : 6 的残基 31-35 ; SEQ ID NO. : 6 的残基 50-66;  
SEQ ID NO. : 6 的残基 99-110;

SEQ ID NO. : 7 的残基 24-34; SEQ ID NO. : 7 的残基 50-56;  
SEQ ID NO. : 7 的残基 89-98;

SEQ ID NO. : 8 的残基 31- 37; SEQ ID NO. : 8 的残基 52-67;  
SEQ ID NO. : 8 的残基 100-110;  
SEQ ID NO. : 9 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 9 的残基 21-27;  
SEQ ID NO. : 9 的残基 90-98;  
SEQ ID NO. : 10 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 10 的残基 50-  
65; SEQ ID NO. : 10 的残基 98-107;  
SEQ ID NO.: 11 的残基 24-34 ; SEQ ID NO. : 11 的残基 50-  
56 ; SEQ ED NO. : 11 的残基 89-97 ;  
SEQ ED NO. : 12 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 12 的残基 52- 67;  
SEQ ID NO. : 12 的残基 100-108;  
SEQ ID NO. : 13 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 13 的残基 51-  
57; SEQ ED NO. : 13 的残基 90-98;  
SEQ ID NO. : 14 的残基 31- 35; SEQ ID NO.: 14 的残基 50-  
66; SEQ ID NO.: 14 的残基 99-111;  
SEQ ID NO.: 15 的残基 24-40; SEQ ID NO.: 15 的残基 56-62;  
SEQ ID NO. : 15 的残基 95- 103;  
SEQ ID NO. : 16 的残基 31-37; SEQ ID NO.: 16 的残基 52-67;  
SEQ ID NO. : 16 的残基 100-109;  
SEQ ID NO. : 17 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 17 的残基 51-  
57; SEQ ID NO. : 17 的残基 90-98;  
SEQ ID NO. : 18 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 18 的残基 20-  
36; SEQ ID NO. : 18 的残基 99-108 ;  
SEQ ID NO. : 19 的残基 24- 34 ; SEQ ID NO.: 19 的残基 50-56 ;  
SEQ ID NO.: 19 的残基 89-97 ;  
SEQ ID NO. : 20 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 20 的残基 52-  
67; SEQ ID NO. : 20 的残基 100-108;  
SEQ ID NO. : 21 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 21 的残基 51-  
57; SEQ ID NO. : 21 的残基 90-98;  
SEQ ID NO. : 22 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 22 的残基 50-  
66; SEQ ID NO. : 22 的残基 99-116;  
SEQ ID NO. : 23 的残基 24-39; SEQ ID NO. : 23 的残基 55-  
61; SEQ ID NO. : 23 的残基 94-102;

SEQ ID NO. : 24 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 24 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 24 的残基 100-109;

SEQ ID NO. : 25 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 25 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 25 的残基 90-98;

SEQ ID NO. : 26 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 26 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 26 的残基 100-109;

SEQ ID NO. : 27 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 27 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 27 的残基 90-98;

SEQ ID NO. : 28 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 28 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 28 的残基 100-108;

SEQ ID NO. : 29 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 29 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 29 的残基 90-98;

SEQ ID NO. : 30 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 30 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 30 的残基 99-109;

SEQ ID NO. : 31 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 31 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 31 的残基 90-98;

SEQ ID NO. : 32 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 32 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 32 的残基 100-109;

SEQ ID NO. : 33 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 33 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 33 的残基 90-98;

SEQ ID NO. : 34 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 34 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 34 的残基 100-108;

SEQ ID NO. : 35 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 35 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 35 的残基 90-98;

SEQ ID NO. : 36 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 36 的残基 50-66; SEQ ID NO. : 36 的残基 99-116;

SEQ ID NO. : 37 的残基 24-39; SEQ ID NO. : 37 的残基 55-61; SEQ ID NO. : 37 的残基 94-102;

SEQ ID NO. : 38 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 38 的残基 50-66; SEQ ID NO. : 38 的残基 99-108;

SEQ ID NO. : 39 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 39 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 39 的残基 90-98;

SEQ ID NO. : 40 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 40 的残基 52-67;  
SEQ ID NO. : 40 的残基 97-109;

SEQ ID NO. : 41 的残基 24-40; SEQ ID NO. : 41 的残基 56-62; SEQ ID NO. : 41 的残基 95-103。

3. 根据权利要求 2 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白包括至少 3 个 CDRs。

4. 根据权利要求 2 的结合蛋白, 其中所述抗原结合结构域包括一个  $V_H$ 。

5. 根据权利要求 4 的结合蛋白, 其中所述  $V_H$  包括选自下面的氨基酸序列:

SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; 和 SEQ ID NO: 40。

6. 根据权利要求 2 的结合蛋白, 其中所述抗原结合结构域包括一个  $V_L$ 。

7. 根据权利要求 6 的结合蛋白, 其中所述  $V_L$  包括选自下面的氨基酸序列:

SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SET M NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; 和 SEQ ID NO: 41。

8. 根据权利要求 2 的结合蛋白, 其中所述抗原结合结构域包括一个  $V_H$  和一个  $V_L$ 。

9. 根据权利要求 7 的结合蛋白, 进一步包括一个  $V_H$ , 其中所述  $V_H$  包括选自下面的氨基酸序列: SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; 和 SEQ ID NO: 40。

10. 根据权利要求8的结合蛋白, 其中所述 $V_L$ 包括SEQ ID NO: 7的氨基酸序列, 所述 $V_H$ 包括SEQ ID NO: 6的氨基酸序列。

11. 根据权利要求2的结合蛋白, 进一步包括选自人IgM恒定区; 人IgG1恒定区; 人IgG2恒定区; 人IgG3恒定区; 人IgG4恒定区; 人IgE恒定区和人IgA恒定区的重链免疫球蛋白恒定区。

12. 根据权利要求11的结合蛋白, 其中所述重链免疫球蛋白恒定区是人IgG1恒定区。

13. 根据权利要求12的结合蛋白, 其中所述人IgG1恒定区包括选自SEQ IDNO. : 2, 和SEQ IDNO. : 3的氨基酸序列。

14. 根据权利要求2的结合蛋白, 进一步包括选自人Ig $\kappa$ 恒定区, 和人Ig $\lambda$ 恒定区的轻链免疫球蛋白恒定区。

15. 根据权利要求14的结合蛋白, 其中所述轻链免疫球蛋白恒定区是人Ig $\kappa$ 恒定区, 包括氨基酸序列SEQ IDNO. : 4的氨基酸序列。

16. 根据权利要求14的结合蛋白, 其中所述轻链免疫球蛋白恒定区是包括SEQ IDNO. : 5的氨基酸序列的人Ig $\lambda$ 恒定区。

17. 根据权利要求2的结合蛋白, 其中所述结合蛋白选自免疫球蛋白分子, scFv; 单克隆抗体; 人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体; 单结构域抗体; Fab片段; Fab'片段; F(ab')<sub>2</sub>; Fv; 二硫键连接的Fv。

18. 根据权利要求17的结合蛋白, 其中所述结合蛋白是人抗体。

19. 一种能结合人IL-18的结合蛋白, 所述结合蛋白包括:

具有选自SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的Ig重链恒定区;

具有选自SEQ ID NO: 4, 和SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的IG轻链恒定区;

具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的Ig重链可变区; 和

具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的Ig轻链可变区。

20. 一种能结合人IL-18的结合蛋白, 所述结合蛋白包括:

具有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的Ig重链恒定区;

具有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的IG轻链恒定区;

具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的Ig重链可变区; 和

具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的Ig轻链可变区。

21. 一种中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白包括权利要求1-

20 任一项的结合蛋白，其中所述中和结合蛋白能中和 IL-18。

22. 根据权利要求 21 的中和结合蛋白，其中所述 IL-18 选自人 IL-18 原；成熟-人 IL-18 或截短的-人 IL-18。

23. 根据权利要求 21 的中和结合蛋白，其中所述中和结合蛋白减小了 IL-18 结合其受体的能力。

24. 根据权利要求 23 的中和结合蛋白，其中所述中和结合蛋白减小了人 IL-18 原；成熟-人 IL-18 或截短的-人 IL-18 结合其受体的能力。

25. 根据权利要求 21 的中和结合蛋白，其中所述中和结合蛋白能减小选自下面的 IL-18 生物活性中的一种或几种：Th1 调节；Th2 调节；Nk 调节；嗜中性白细胞调节；单核细胞-巨噬细胞系调节；嗜中性白细胞调节；嗜酸性细胞调节；B-细胞调节；细胞因子调节；趋化因子调节；粘着分子调节；和细胞募集调节。

26. 根据权利要求 21 的中和结合蛋白，其中所述中和结合蛋白具有选自下面的解离常数( $K_D$ ): 最大大约  $10^{-7}$  M；最大大约  $10^{-8}$  M；最大大约  $10^{-9}$  M；最大大约  $10^{-10}$  M；最大大约  $10^{-11}$  M；最大大约  $10^{-12}$  M；和最大大约  $10^{-13}$  M。

27. 根据权利要求 21 的中和结合蛋白，其中所述中和结合蛋白具有选自下面的生成速率：至少大约  $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；至少大约  $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；至少大约  $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；至少大约  $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；和至少大约  $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

28. 根据权利要求 21 的中和结合蛋白，其中所述中和结合蛋白具有选自下面的离解速率：最大大约  $10^{-3} \text{s}^{-1}$ ；最大大约  $10^{-4} \text{s}^{-1}$ ；最大大约  $10^{-5} \text{s}^{-1}$ ；和最大大约  $10^{-6} \text{s}^{-1}$ 。

29. 包括权利要求 1-20 任一项的结合蛋白的标记结合蛋白，其中所述结合蛋白与可检测标记物偶联。

30. 权利要求 29 的标记结合蛋白，其中所述可检测标记物选自放射性标记物，酶，荧光标记物，发光标记物，生物发光标记物，磁性标记物和生物素。

31. 权利要求 30 的标记结合蛋白，其中所述标记物是选自  $^3\text{H}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{90}\text{Y}$ ， $^{99}\text{Tc}$ ， $^{111}\text{In}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^{131}\text{I}$ ， $^{177}\text{Lu}$ ， $^{166}\text{Ho}$ ，和  $^{153}\text{Sm}$  的放射性标记物。

32. 包括权利要求 1-20 任一项的结合蛋白的偶联结合蛋白，其中所述结合蛋白与治疗性或细胞毒性物质偶联。

33. 权利要求 32 的偶联结合蛋白, 其中所述治疗性或细胞毒性物质选自抗-代谢物; 烷基化试剂; 抗生素; 生长因子; 细胞因子; 抗-血管生成药物; 抗-有丝分裂物质; 蒽环霉素 A; 毒素; 和编程性细胞死亡剂。

34. 编码权利要求 1-20 任一项的结合蛋白氨基酸序列的分离的核酸。

35. 包含权利要求 34 的分离的核酸的载体。

36. 权利要求 35 的载体, 其中所述载体选自: pcDNA ; pTT; pTT3; pEFBOS; pBV; pJV; 和 pBJ。

37. 包含权利要求 35 或 36 任一项的载体的宿主细胞。

38. 根据权利要求 37 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是原核细胞。

39. 根据权利要求 38 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是大肠杆菌。

40. 根据权利要求 37 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是真核细胞。

41. 根据权利要求 40 的宿主细胞, 其中所述真核细胞选自原生生物细胞, 动物细胞, 植物细胞和真菌细胞。

42. 根据权利要求 41 的宿主细胞, 其中所述真核细胞是选自哺乳动物细胞, 鸟类细胞, 和昆虫细胞的动物细胞。

43. 根据权利要求 42 的宿主细胞, 其中所述动物细胞是 CHO 细胞。

44. 根据权利要求 42 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是 COS。

45. 根据权利要求 41 的宿主细胞, 其中所述真核细胞是啤酒糖酵母。

46. 根据权利要求 42 的宿主细胞, 其中所述动物细胞是昆虫 Sf9 细胞。

47. 结合人 IL-18 的结合蛋白的制备方法, 包括在足以产生结合人 IL-18 的结合蛋白的条件下在培养基中培养权利要求 37-46 任一项的宿主细胞。

48. 根据权利要求 47 的方法制备的结合蛋白。

49. 包括根据权利要求 1-28 任一项的结合蛋白的结晶结合蛋白, 其中所述结合蛋白以晶体存在。

50. 权利要求 49 的结晶结合蛋白, 其中所述晶体是没有载体的药理学控制释放晶体。

51. 权利要求 49 的结晶结合蛋白, 其中所述结合蛋白具有比所述

结合蛋白可溶性配对物更大的体内半存留期。

52. 权利要求 49 的结晶结合蛋白，其中所述结合蛋白保留其生物活性。

53. 一种用于释放结合蛋白的组合物，所述组合物含有：

(a) 一种组合物，其中所述组合物含有根据权利要求 49 - 52 任一项的结晶结合蛋白，和一种成分；和

(b) 至少一种聚合物载体。

54. 根据权利要求 53 的组合物，其中所述聚合物载体选自下面的一种或几种：聚(丙烯酸)，聚(氰基丙烯酸酯)，聚(氨基酸)，聚(酸酐)，聚(缩肽)，聚(酯)，聚(乳酸)，聚(乳酸-共-羟基乙酸)或 PLGA，聚(b-羟基丁酸)，聚( $\gamma$ -己内酯)，聚(二氧六环酮)；聚(乙二醇)，聚((羟丙基)甲基丙烯酰胺，聚[(有机)磷腈]，聚(原酯)，聚(乙烯醇)，聚(乙烯吡咯烷酮)，马来酸酐-烷基乙烯基醚共聚物，多聚醇，白蛋白，藻酸盐，纤维素和纤维素衍生物，胶原，纤维蛋白，明胶，透明质酸，低聚糖，glycaminoglycans，硫酸多糖，它们的混合物和它们的共聚物。

55. 根据权利要求 53 的组合物，其中所述成分选自白蛋白，蔗糖，海藻糖，乳糖醇，明胶，羟丙基- $\beta$ -环糊精，甲氧基聚乙二醇和聚乙二醇。

56. 对哺乳动物治疗的方法，包括对哺乳动物施用有效量的根据权利要求 53 的组合物步骤。

57. 一种感兴趣的基因的基因表达的调控方法，包括下面的步骤：

(a) 提供 IL-18 调节剂；和

(b) 所述调节剂接触细胞，

其中所述感兴趣的基因选自下面 Genbank 鉴定号确定的基因：

NM\_000389, NM\_002198, NM\_002163, NM\_006144, NM\_006515, NM\_007185,  
NM\_002288, NM\_003661, NM\_021958, NM\_001335, Hs.382006, NM\_020125,  
NM\_007210, NM\_021798, NM\_013324, M11313, D88152, NM\_001103,  
U37519, NM\_000697, J03600, NM\_014578, S66793, U47054,  
L19871, M81181, NM\_001188, U15460, NM\_014417, Z23115,  
NM\_001713, U45878, U37546, U72649, U49187, J03507,  
U50360, XM\_071866, NM\_005623, Z32765, Z11697, XM\_071866,  
U51096, M83667, D87469, L07765, U66468, X14830,  
L29217, X15880, NM\_001851, M27691, M37435, X13589,  
X16866, X59131, NM\_004393, U73328, L19267, U53445,  
X68277, U48807, NM\_001950, U87269, M57730, X52541,  
J04076, X63741, L07077, M62831, M60830, U53786,  
NM\_001988, NM\_000141, M23668, U60062, NM\_000141, U49973,  
U89995, U27326, A28102, M25667, L34357, U19523,  
L01406, U03486, X68285, Z18859, D49958, D43772,  
AC000099, M57731, X53800, M91036, D16583, X64877,  
X58431, M16937, NM\_014468, X92814, L19314, M26665,  
D10995, L41147, M24283, S81914, J03171, J00219,  
NM\_000619, NM\_000585, U31628, X04500, M27492, X01057,  
M26062, Y00081, Y00787, Z31695, X06256, X57206,  
U20734, NM\_014879, D31762, D42038, NM\_005551, NM\_014846,  
X06182, NM\_005551, X07730, M13955, M57710, S83362,

NM\_002314, NM\_005569, U49957, U89922, X14008, U59914,  
D14497, X59727, NM\_000429, U43944, X72755, NM\_021230,  
NM\_005951, X78710, X70991, M32011, S77763, M58603,  
S76638, M69043, U91616, D86425, L13740, U44848,  
U79251, M27288, AF000234, D50640, L20971, L10343,  
U77735, NM\_003579, U17034, AB000584, X63131, D11428,  
NM\_032940, NM\_005035, NM\_003579, M18255, L01087, D38128,  
Y10375, D15049, M31166, U59877, NM\_003579, U64675,  
S57153, NM\_002903, NG\_000013, X75042, M83221, NM\_000537,  
U22314, S59049, U70426, U22377, U38480, L10338,  
M23178, M69203, NM\_005409, D79206, NM\_005065, NM\_004186,  
J03764, NM\_006802, D89077, NM\_003037, M91463, D82326,  
L05568, U96094, X83301, D21267, L31529, M62800,  
NM\_021014, Z35093, NM\_005816, L25444, M95787, NM\_005421,  
L47345, M57732, NM\_003205, M96956, U19878, M92357,  
M59465, X83490, U37518, NM\_003294, U19261, U78798,  
S69790, U53476, L15309, U78722, X57809, U79249,  
AB000464, X77744, U79248, AI420129,  
HG2981-HT3127, HG3548-HT3749, HG870-HT870, HG4333-HT4603,  
HG3111-HT3287, HG4593-HT4998, HG961-HT961, HG1877-HT1917,  
HG3115-HT3291, HG4115-HT4385, 和 HG3925-HT4195.

58. 根据权利要求 57 的方法, 其中所述调节剂是拮抗剂。

59. 根据权利要求 57 的方法, 其中所述调节剂是 IL-18。

60. 根据权利要求 57 的方法, 其中所述调节剂选自根据权利要求 1-28 任一项的结合蛋白。

61. 含有权利要求 1-28 任一项的结合蛋白和药学可接受载体的药物组合物。

62. 权利要求 61 的药物组合物, 其进一步含有至少一种用于治疗其中 IL-18 活性是有害的疾病的另外的治疗药物。

63. 权利要求 62 的药物组合物, 其中所述另外的药物选自: 血管生成抑制剂; 激酶抑制剂; 共同-刺激分子阻断剂; 粘着分子阻断剂; 抗-细胞因子抗体或者其功能片段; 甲氨喋呤; 皮质类固醇; 环孢菌素; 雷帕霉素; FK506; 和非甾类抗炎药物。

64. 一种减小人 IL-18 活性的方法, 包括使人 IL-18 接触权利要求 1-28 任一项的结合蛋白, 使得人 IL-18 活性被减小。

65. 一种对患有其中 IL-18 活性是有害的疾病的人患者减小人

IL-18 活性的方法，包括对人受治疗者施用权利要求 1-28 任一项的结合蛋白，使得人受治疗者中的人 IL-18 活性被减小。

66. 一种对患有其中 IL-18 活性是有害的疾病或病症的受治疗者进行治疗的方法，包括对受治疗者施用权利要求 1-28 任一项的结合蛋白，完成治疗。

67. 权利要求 66 的方法，其中所述疾病选自：类风湿性关节炎，骨关节炎，幼年型慢性关节炎，莱姆关节炎，银屑病关节炎，反应性关节炎，和脓毒性关节炎，脊椎关节病，全身红斑狼疮，局限性回肠炎，溃疡性结肠炎，肠炎，胰岛素依赖性糖尿病，甲状腺炎，哮喘，变态反应疾病，牛皮癣，皮炎硬皮病，移植物抗宿主病，器官移植排斥，急性或慢性的与器官移植相关的免疫疾病，肉状瘤病，动脉粥样硬化，传播性血管凝固，Kaw 阿司匹林 ki's 病，Grave's 病，肾病综合征，慢性疲劳综合征，Wegener's 肉芽肿病，Henoch-Schoenlein 紫癜，肾微结节性脉管炎，慢性活性肝炎，眼色素层炎，脓毒性休克，中毒休克综合征，脓毒症综合征，恶病质，传染病，由寄生虫引起的疾病，后天免疫缺陷综合征，急性横向骨髓炎，Huntington's 舞蹈病，帕金森病，老年性痴呆，中风，原发肝功能障碍引起的肝硬化，溶血性贫血，恶性肿瘤，心脏衰竭，心肌梗塞，Addison's 病，散发性，I 型多腺缺乏和 II 型多腺缺乏，Schmidt's 综合征，成人(急性)呼吸抑制综合征，脱发，脱发斑，血清反应阴性关节病，关节病，Reiter's 病，牛皮癣关节病，溃疡性结肠关节病，肠滑膜炎，衣菌，鼠疫和沙门氏菌相关关节病，脊椎关节病，动脉粥样化疾病/动脉硬化，特应性变态反应，自身免疫大疱病，寻常性天疱疮，落叶性天疱疮，类天疱疮，线性 IgA 病，自身免疫溶血性贫血，Coombs 阳性溶血性贫血，后天性恶性贫血，少年恶性贫血，肌痛性大脑炎/Royal Free 病，慢性粘膜皮肤念珠菌病，巨细胞关节炎，原发硬化肝炎，起因不明自身免疫肝炎，后天性免疫缺陷病综合征，后天性免疫缺陷相关疾病，乙肝，丙肝，普通各式各样的免疫缺陷(普通各式各样的血丙种球蛋白减少)，膨胀心肌病，女性不孕症，卵巢衰竭，早产卵巢衰竭，纤维变性肺病，起因不明的纤维组织形成牙槽炎，炎后间质肺病，间质局限性肺炎，与间质肺病相关的缔结组织疾病，与肺病相关的混合缔结组织疾病，与间质肺病相关的全身硬化，与间质肺病相关的类风湿性关节炎，与肺病相

关的全身红斑狼疮, 与肺病相关的皮肤肌炎/多肌炎, 与肺病相关的 Sjogren's 病, 与肺病相关的僵硬脊椎炎, 结节性脉管炎弥散肺病, 与肺病相关的含铁血黄素沉着病, 药物引起的间质肺病, 辐射纤维化, 闭塞性毛细支气管炎, 慢性嗜酸性肺炎, 淋巴细胞浸润性肺病, 传染病后间质肺病, 痛风关节炎, 自身免疫肝炎, 1-型自身免疫肝炎(典型自身免疫或狼疮样肝炎), 2-型自身免疫肝炎(抗-LKM 抗体肝炎), 自身免疫介导的低血糖, B 型胰岛素抗性微黑棘皮症, 甲状旁腺机能减退, 与器官移植相关的急性免疫疾病, 与器官移植相关的慢性免疫疾病, 骨关节炎, 原发硬化胆管炎, 1 型牛皮癣, 2 型牛皮癣, 自发性白细胞减少, 自身免疫中性白细胞减少, 肾病 NOS, 肾小球肾炎, 肾 microscopic vasculitis, 莱姆病, 盘形红斑狼疮, 特发性男性不孕症或 NOS, 精液自身免疫性, 多发性硬化(所有亚型), 交感神经眼炎, 缔结组织疾病继发性高血压, Goodpasture's 综合征, 结节性多动脉炎肺动, 急性风湿性发烧, 类风湿性脊椎炎, Still's 病, 全身硬化, Sjogren's 综合征, Takayasu's 病/动脉炎, 自身免疫血小板减少, 特发性血小板减少, 自身免疫甲状腺病, 甲状腺机能亢进, 甲状腺肿自身免疫甲状腺机能亢进(Hashimoto's 病), 萎缩性自身免疫甲状腺机能亢进, 原发性粘液水肿, 晶体抗原性葡萄膜炎, 原发性结节性脉管炎, 白癜风, 急性肝病, 慢性肝病, 酒精性肝硬化, 酒精引起的肝损伤, choleosatatis, 特应性肝病, 药物引起的肝炎, 非酒精性脂肪性肝炎, 变应性变态反应和哮喘, B 族链球菌(GBS)感染, 精神病(例如, 抑郁症和精神分裂症), Th2 型和 Th1 型介导的疾病, 急性和慢性疼痛, 和癌症。

68. 一种对患有其中 IL-18 活性是有害的疾病的患者进行治疗的方法, 包括在施用第二种药物之前, 同时, 或之后对患者施用权利要求 1-28 任一项的结合蛋白的步骤, 其中所述第二种药物选自: 能结合人 IL-12 的抗体, 或其片段; 甲氨喋呤; 能结合人 TNF 的抗体, 或其片段; 皮质类固醇; 环孢菌素; 雷帕霉素; FK506; 和非甾类抗炎药物。

69. 一种中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白能结合成熟-人 IL-18, 但是不特异性结合人 IL-18 原, 并且其中所述中和结合蛋白选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体。

70. 根据权利要求 1 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白能结合成熟-

人 IL-18, 但是不特异性结合人 IL-18 原。

71. 一种中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白能与 125-2H 抗体竞争结合人 IL-18, 并且其中所述中和结合蛋白选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体。

72. 根据权利要求 1 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白能与 125-2H 抗体竞争结合人 IL-18。

73. 一种中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白不能与 125-2H 抗体竞争结合人 IL-18, 并且其中所述中和结合蛋白选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体。

74. 根据权利要求 1 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白不能与 125-2H 抗体竞争结合人 IL-18。

75. 一种中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白不能与选自 2.5 (E) mg1 抗体和 IL-18BP 的结合蛋白竞争结合人 IL-18, 并且其中所述中和结合蛋白选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体。

76. 根据权利要求 1 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白不能与选自 2.5 (E) mg1 抗体和 IL-18BP 的结合蛋白竞争结合人 IL-18。

77. 根据权利要求 8 的结合蛋白, 其中所述  $V_L$  包括 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列, 和所述  $V_H$  包括 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列。

78. 一种能结合人 IL-18 的结合蛋白, 所述结合蛋白包括:

具有选自 SEQ ID NO : 2, 和 SEQ ID NO : 3 的氨基酸序列的 Ig 重链恒定区;

具有选自 SEQ ID NO : 4, 和 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的 IG 轻链恒定区;

具有 SEQ ID NO : 8 的氨基酸序列的 Ig 重链可变区; 和

具有 SEQ ID NO : 9 的氨基酸序列的 Ig 轻链可变区。

79. 一种能结合人 IL-18 的结合蛋白, 所述结合蛋白包括:

具有 SEQ ID NO : 3 的氨基酸序列的 Ig 重链恒定区;

具有 SEQ ID NO : 4 的氨基酸序列的 IG 轻链恒定区;

具有 SEQ ID NO : 8 的氨基酸序列的 Ig 重链可变区; 和

具有 SEQ ID NO : 9 的氨基酸序列的 Ig 轻链可变区。

## IL-18 结合蛋白

### 相关申请的交叉文献

本申请要求 2003 年 11 月 12 日申请的美国申请 No. 10/706,689 的优先权利益。

### 技术领域

本发明涉及白细胞介素 18 (IL-18) 结合蛋白, 特别涉及它们在急性和慢性炎症疾病的预防和/或治疗中的用途。

### 背景技术

最早在 1989 年白细胞介素-18 (IL-18) 被描述为  $\gamma$ -干扰素诱导因子 (IGIF), 并且是促炎症细胞因子, 除了具有诱导  $\gamma$ -干扰素的能力外, 还具有多方面功能。这些生物学性能包括 NF- $\kappa$ B 的激活, Fas 配体表达, CC 和 CXC 趋化因子的诱导, 感受态人免疫缺陷病毒的增加的产生。由于 IL-18 有诱导 T 细胞和巨噬细胞中  $\gamma$ -干扰素产生的功能, 它在 Th1-型免疫应答中和参与先天和后天免疫性中起着重要作用。IL-18 就其结构和功能来说涉及 IL-1 家族。有关 IL-18 结构, 功能和生物学活性, 参见, 例如 Dinarello, C. 等 (1998) J. Leukoc. Biol. 63: 658-654; Dinarello, C. A. (1999) Methods 19: 121-132; 和 Dinarello, C. A. (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103: 11-24; (McInnes, I. B. 等 (2000) Immunology Today 21: 312-315; Nakanishi, K. 等 (2001) Ann. Rev. Immunol 19: 423-474。

细胞内 IL-18-原在内毒素-刺激的细胞中经胱天蛋白酶 1 (Ghayur, T. 等, (1997) Nature 386: 619-623; Gu, Y. 等, (1997) Science 275: 206-209), 在 Fas-L 或细菌 DNA 刺激细胞中经胱天蛋白酶 4, 5 和 6 蛋白酶解加工成 18 kDa 活性形式 (Tsutsui, H. 等, (1999) Immunity 11: 359-67; Ghayur, T., 没有出版的 Observations)。IL-18-原还被其他蛋白酶解加工, 例如嗜中性白细胞蛋白酶 3 (Sugawara, S. 等, (2001) J. Immunol., 167, 6568-6575), 胱天蛋白酶 3 (Akita, K. 等, (1997) J. Biol. Chem.

272,26595-26603), 和丝氨酸蛋白酶弹性蛋白酶和组织蛋白酶 (Gracie J. A. , 等, (2003) *Journal of Leukocyte Biology* 73, 213-224)。人和鼠 IL-18 没有常规的前导序列, 并且细胞成熟 IL-18 释放的原理还不十分清楚。

IL-18 的生物活性通过 IL-18 与由两个亚基构成的异二聚体 IL-18 受体 (IL-18R) 结合而介导:  $\alpha$ -亚基 (IL-1R 家族中的一员, 也称作 IL-1R-相关蛋白-1 或 IL-1Rrp1) 和  $\beta$ -亚基 (也称作 IL-18R 辅助蛋白, IL-18AP 或 AcPL)。IL-18R  $\alpha$  亚基直接结合 IL-18, 但是不能信号传导。 $\beta$ -亚基本身不结合 IL-18, 但是与  $\alpha$ -亚基联合形成信号转导必需的高亲和性受体 ( $K_D = \sim 0.3\text{nM}$ ) (Sims, J. E. , (2002) *Current Opin Immunol.* 14: 117-122)。通过 IL-18  $\alpha\beta$  复合体的 IL-18 信号传导类似于 IL-1R 和 Toll 样受体 (TLR) 系统。IL-18R 信号传导利用信号传导分子, 例如 MyD88, IRAK, TRAF6, 并且产生和 IL-1 产生的相似的响应 (例如, NIK, I $\kappa$ B 激酶, NF- $\kappa$ B, JNK 和 p38 MAP 激酶的激活)。介导 IL-18 生物活性对 IL-18R  $\alpha$  和信号传导分子的需要已经分别使用 IL-18R  $\alpha$ -亚基 (Hoshino K. , 等 (1999) *J. Immunol.* 162: 5041-5044;), MyD88 (Adachi O. , 等 (1998) *Immunity* 9: 143-150) 或 IRAK (Kanakaraj P. , (1999) *J. Exp. Med.* 189: 1129-1138) 敲除证实了。

结合 IL-18 的抗体是本领域公知的。EP 0 974 600 公开了能中和 IL-18 的小鼠抗体。抗 IL-18 人抗体在 PCT 公开 WO 0158956 中公开, 这里引作参考。本发明提供了能以高亲合力结合 IL-18, 结合并中和 IL-18 的结合蛋白质的新的家族, 人抗体, 及其片段。

## 发明概述

本发明提供 IL-18 结合蛋白, 特别是人 IL-18 的抗体, 以及制备和使用这样的蛋白质的方法。本发明的一个方面是提供使用 IL-18 调节子调节基因表达的方法。

本发明的一个方面是提供包括能结合人 IL-18 的抗原结合结构域的结合蛋白质。在一个实施方案中, 抗原结合结构域包括至少一个包括选自下面的氨基酸序列的 CDR:

CDR-H1.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$  (SEQ ID NO: 42), 其中:

$X_1$  是 S, N, H, R, 或 Y ;

$X_2$  是 Y, G, R, S, 或 C ;

$X_3$  是 W, G, Y, D, S, V, 或 I ;

$X_4$  是 I, H, W, Y, M, L, 或 D ;

$X_5$  是 G, Y, S, N, 或 H ;

$X_6$  是 W, 或者不存在;

和  $X_7$  是 T, S, G, 或者不存在;

CDR-H2.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$

(SEQ ID NO : 43), 其中;

$X_1$  是 F, Y, H, S, 或 V ;

$X_2$  是 I, 或 F;

$X_3$  是 Y, S, 或 W ;

$X_4$  是 P, Y, 或 S ;

$X_5$  是 G, S, R, 或 D ;

$X_6$  是 D, 或 G;

$X_7$  是 S, T, G, 或 R ;

$X_8$  是 E, T, I, 或 N ;

$X_9$  是 T, Y, N, I, K, 或 H ;

$X_{10}$  是 R, Y, 或 S ;

$X_{11}$  是 Y, N, 或 S ;

$X_{12}$  是 S, P, A, 或 V ;

$X_{13}$  是 P, S, 或 D ;

$X_{14}$  是 T, L, 或 S;

$X_{15}$  是 F, K, 或 V ;

$X_{16}$  是 Q, S, 或 K ; 和

$X_{17}$  是 G, 或者不存在;

CDR-H3.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-$

$X_{17}-X_{18}$  (SEQ ID NO: 44), 其中;

$X_1$  是 V, D, E, S, 或 C ;

$X_2$  是 G, R, D, S, K, L, Y, 或 A ;

$X_3$  是 S, G, Y, 或 R ;

$X_4$  是 G, S, Y, N, T, 或 D ;

$X_5$  是 W, S, A, G, Y, 或 T ;

$X_6$  是 Y, G, S, F, W, 或 N ;

$X_7$  是 P, S, F, Y, V, G, W, 或 V ;

$X_8$  是 Y, F, D, P, M, I, 或 N ;

$X_9$  是 T, W, D, L, Y, E, P, F, 或 G ;

$X_{10}$  是 F, D, Y, H, V, Y, 或者不存在;

$X_{11}$  是 D, Y, F, L, 或者不存在;

$X_{12}$  是 I, D, Y, 或者不存在;

$X_{13}$  是 Y, 或者不存在;

$X_{14}$  是 Y, 或者不存在;

$X_{15}$  是 G, 或者不存在;

$X_{16}$  是 M, 或者不存在;

$X_{17}$  是 D, 或者不存在; 和

$X_{18}$  是 V, 或者不存;

CDR-L1.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$

(SEQID NO : 45), 其中;

$X_1$  是 R, 或 K;

$X_2$  是 A, G, 或 S;

$X_3$  是 S;

$X_4$  是 E, R, Q, 或 H;

$X_5$  是 S, I, T, 或 N;

$X_6$  是 I, V, L, 或 F ;

$X_7$  是 S, G, L, N, 或 R;

$X_8$  和 S, G, Y, R, N, H, 或 D ;

$X_9$  是 N, G, Y, R, 或 S ;

$X_{10}$  是 L, Y, S, 或 D;

$X_{11}$  是 A, L, N, V, G, 或 D ;

$X_{12}$  是 A, N, E, K, G, 或者不存在;

$X_{13}$  是 K, T, N, 或者不存在;

$X_{14}$  是 N, Y, T, 或者不存在;

$X_{15}$  是 Y, L, 或者不存在;

$X_{16}$  是 L, C, Y, 或者不存在; 和

$X_{17}$  是 A, D, 或者不存在;

CDR-L2.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$  (SEQ ID NO: 46), 其中:

$X_1$  是 T, G, S, W, 或 E ;

$X_2$  是 A, V, T, I, 或 L ;

$X_3$  是 S, 或 F;

$X_4$  是 T, I, N, S, R, 或 Y ;

$X_5$  是 R, 或 L ;

$X_6$  是 A, Q, E, 或 F ; 和

$X_7$  是 T, 或 S;

和

CDR-L3.  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$  (SEQ ID NO: 47), 其中:

$X_1$  是 Q, 或 M;

$X_2$  是 Q, H, 或 Y ;

$X_3$  是 Y, N, G, S, 或 R ;

$X_4$  是 N, H, Y, D, G, V, L, 或 I ;

$X_5$  是 N, G, I, Y, S, Q, F, 或 E ;

$X_6$  是 W, S, T, L, I, 或 F ;

$X_7$  是 P, L, T, D, 或 I ;

$X_8$  是 S, L, P, C, W, I, 或 F ;

$X_9$  是 I, T, S, 或者不存在;和

$X_{10}$  是 T, 或者不存在。

优选地, 抗原结合结构域包括至少一个包括选自由下面的残基构成的组的氨基酸序列的 CDR: SEQ ID NO. : 6 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 6 的残基 50-66; SEQ ID NO. : 6 的残基 99-110; SEQ ID NO. : 7 的残基 24-34; SEQ ID NO. : 7 的残基 50-56; SEQ ID NO. : 7 的残基 89-98; SEQ ID NO. : 8 的残基 31- 37; SEQ ID NO. : 8 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 8 的残基 100-110; SEQ ID NO. : 9 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 9 的残基 21-27; SEQ ID NO. : 9 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 10 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 10 的残基 50-65; SEQ ID NO. : 10 的残基 98-107; SEQ ID NO.: 11 的残基 24-34 ; SEQ ID NO. : 11 的残基 50-56 ; SEQ ED NO. : 11 的残基 89-97 ; SEQ ED NO. : 12 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 12 的残基

52- 67; SEQ ID NO. : 12 的残基 100-108; SEQ ID NO. : 13 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 13 的残基 51-57; SEQ ED NO. : 13 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 14 的残基 31- 35; SEQ ID NO.: 14 的残基 50-66; SEQ ID NO.: 14 的残基 99-111; SEQ ID NO.: 15 的残基 24-40; SEQ ID NO.: 15 的残基 56-62; SEQ ID NO. : 15 的残基 95-103; SEQ ID NO. : 16 的残基 31-37; SEQ ID NO.: 16 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 16 的残基 100-109; SEQ ID NO. : 17 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 17 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 17 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 18 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 18 的残基 20-36; SEQ ID NO. : 18 的残基 99-108 ; SEQ ID NO. : 19 的残基 24- 34 ; SEQ ID NO.: 19 的残基 50-56 ; SEQ ID NO.: 19 的残基 89-97 ; SEQ ID NO. : 20 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 20 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 20 的残基 100-108; SEQ ID NO. : 21 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 21 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 21 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 22 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 22 的残基 50-66; SEQ ID NO. : 22 的残基 99-116; SEQ ID NO. : 23 的残基 24-39; SEQ ID NO. : 23 的残基 55-61; SEQ ID NO. : 23 的残基 94-102; SEQ ID NO. : 24 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 24 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 24 的残基 100-109; SEQ ID NO. : 25 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 25 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 25 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 26 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 26 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 26 的残基 100-109; SEQ ID NO. : 27 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 27 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 27 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 28 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 28 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 28 的残基 100-108; SEQ ID NO. : 29 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 29 的残基 51-57; SEQ BD NO. : 29 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 30 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 30 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 30 的残基 99-109; SEQ ID NO. : 31 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 31 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 31 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 32 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 32 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 32 的残基 100-109; SEQ ID NO. : 33 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 33 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 33 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 34

的残基 31-37; SEQ ID NO. : 34 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 34 的残基 100-108; SEQ ID NO. : 35 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 35 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 35 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 36 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 36 的残基 50-66; SEQ ID NO. : 36 的残基 99-116; SEQ ID NO. : 37 的残基 24-39; SEQ ID NO. : 37 的残基 55-61; SEQ ID NO. : 37 的残基 94-102; SEQ ID NO. : 38 的残基 31-35; SEQ ID NO. : 38 的残基 50-66; SEQ ID NO. : 38 的残基 99-108; SEQ ID NO. : 39 的残基 24-35; SEQ ID NO. : 39 的残基 51-57; SEQ ID NO. : 39 的残基 90-98; SEQ ID NO. : 40 的残基 31-37; SEQ ID NO. : 40 的残基 52-67; SEQ ID NO. : 40 的残基 97-109; SEQ ID NO. : 41 的残基 24-40; SEQ ID NO. : 41 的残基 56-62; SEQ ID NO. : 41 的残基 95-103。优选地, 结合蛋白包括至少 3 个 CDRs。

在另一个优选实施方案中, 结合蛋白包括一个  $V_H$  结构域。优选地,  $V_H$  结构域包括选自下面的氨基酸序列: SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; 和 SEQ ID NO: 40。在另一个实施方案中, 结合蛋白包括一个  $V_L$  结构域。优选地,  $V_L$  结构域包括选自下面的氨基酸序列: SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SET M NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; 和 SEQ ID NO: 41。

在一个优选的实施方案中, 结合蛋白包括一个  $V_H$  和一个  $V_L$  结构域。更优选地, 结合蛋白包括包括选自下面的氨基酸序列的  $V_H$  结构域: SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; 和 SEQ ID NO: 40 和包括选自下面的氨基酸序列的  $V_L$  结构

域: SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; 和 SEQ ID NO: 41。最优选地, 结合蛋白包括包括 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的  $V_L$  结构域和包括 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的  $V_H$  结构域。

在另一个实施方案中, 结合蛋白进一步包括选自人 IgM 恒定区; 人 IgG1 恒定区; 人 IgG2 恒定区; 人 IgG3 恒定区; 人 IgG4 恒定区; 人 IgE 恒定区和人 IgA 恒定区的重链免疫球蛋白恒定区。优选地, 重链免疫球蛋白恒定区是人 IgG1 恒定区。优选地, 重链恒定区中至少一个氨基酸残基被置换, 使得抗体的效应子功能被改变。更优选地, 人 IgG1 恒定区包括选自 SEQ ID NO: 2, 和 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

在另一个实施方案中, 结合蛋白进一步包括选自人 Ig  $\kappa$  恒定区, 和人 Ig  $\lambda$  恒定区的轻链免疫球蛋白恒定区。优选地, 人 Ig  $\kappa$  恒定区包括氨基酸序列 SEQ ID NO: 4, 人 Ig  $\lambda$  恒定区包括氨基酸序列 SEQ ID NO: 5。

在另一个实施方案中, 结合蛋白包括具有选自 SEQ ID NO: 2, 和 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 Ig 重链恒定区; 具有选自 SEQ ID NO: 4, 和 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的 Ig 轻链恒定区; 具有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 Ig 重链可变区; 和具有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 Ig 轻链可变区。

在另一个实施方案中, 结合蛋白包括具有 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 Ig 重链恒定区; 具有 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的 Ig 轻链恒定区; 具有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 Ig 重链可变区; 和具有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 Ig 轻链可变区。

在另一个实施方案中, 结合选自免疫球蛋白分子或者本领域公知的其功能变体, 所述变体保持结合蛋白的特征结合性质。具体免疫球蛋白实施方案的例子包括但不限于 scFv; 单克隆抗体; 人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体; 单结构域抗体; Fab 片段; Fab' 片段; F(ab')<sub>2</sub>; Fv; 二硫键连接的 Fv, 和双特异性或双重特异性抗体。最优选地, 结合蛋白是人抗体。

本发明的另一方面提供了中和结合蛋白，其包括上文公开的结合蛋白的任一种，其中中和结合蛋白能中和 IL-18。优选地，中和结合蛋白能结合中和人 IL-18 原；成熟-人 IL-18 或截短的-人 IL-18 中的任何一种。在另一个实施方案中，中和结合蛋白减小了 IL-18 结合其受体的能力。优选地，中和结合蛋白减小了人 IL-18 原；成熟-人 IL-18 或截短的-人 IL-18 结合其受体的能力。

在另一个实施方案中，中和结合蛋白能抑制选自下面的 IL-18 生物活性中的一种或几种：Th1 调节；Th2 调节 (Nakanishi K., 等 (2001) Cytokine and Growth Factor Rev. 12: 53-72)；Nk 调节；嗜中性白细胞调节；单核细胞-巨噬细胞系调节；嗜中性白细胞调节；嗜酸性细胞调节；B-细胞调节；细胞因子调节；趋化因子调节；粘着分子调节；和细胞募集调节。

在优选的实施方案中，中和结合蛋白具有选自下面的解离常数 ( $K_D$ )：最大大约  $10^{-7}$  M；最大大约  $10^{-8}$  M；最大大约  $10^{-9}$  M；最大大约  $10^{-10}$  M；最大大约  $10^{-11}$  M；最大大约  $10^{-12}$  M；最大大约  $10^{-13}$  M。

在另一个实施方案中，中和结合蛋白具有选自下面的生成速率：至少大约  $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；至少大约  $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；至少大约  $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；至少大约  $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ；至少大约  $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

在另一个实施方案中，中和结合蛋白具有选自下面的离解速率：最大大约  $10^{-3} \text{s}^{-1}$ ；最大大约  $10^{-4} \text{s}^{-1}$ ；最大大约  $10^{-5} \text{s}^{-1}$ ；最大大约  $10^{-6} \text{s}^{-1}$ 。

本发明的另一方面提供包括上面公开的结合蛋白中任何一种的标记结合蛋白，其中所述结合蛋白与可检测标记物结合。优选地，可检测标记物选自放射性标记物，酶，荧光标记物，发光标记物，生物发光标记物，磁性标记物和生物素。更优选地，放射性标记物是  $^3\text{H}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{90}\text{Y}$ ， $^{99}\text{Tc}$ ， $^{111}\text{In}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^{131}\text{I}$ ， $^{177}\text{Lu}$ ， $^{166}\text{Ho}$ ，或  $^{153}\text{Sm}$ 。

本发明的另一方面提供一种包括上面公开的结合蛋白中任何一种的结合蛋白，其中所述结合蛋白与治疗性或细胞毒性物质结合。优选地，所述治疗性或细胞毒性物质选自抗-代谢物；烷基化试剂；抗生素；生长因子；细胞因子；抗-血管生成药物；抗-有丝分裂物质；蒽环霉素 A；毒素；编程性细胞死亡剂。

一个实施方案允许分离编码上述公开的结合蛋白中的任何一种的

核酸。另一个实施方案提供包括分离的上面公开的核酸的载体，其中所述载体选自 pcDNA；pTT (Durocher 等, *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No. 2); pTT3 (有另外多个克隆位点的 pTT; pEFBOS (Mizushima, S. 和 Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17); pBV; pJV; 和 pBJ。

在另一个实施方案中，用载体转染宿主细胞。优选地，宿主细胞是原核细胞。更优选地，宿主细胞是大肠杆菌。在相关实施方案中，宿主细胞是真核细胞。优选地，所述真核细胞选自原生生物细胞，动物细胞，植物细胞和真菌细胞。更优选地，宿主细胞是哺乳动物细胞，包括但不限于，CHO 和 COS；或者真菌细胞，例如啤酒糖酵母；或昆虫细胞，例如 Sf9。

本发明的另一方面提供结合人 IL-18 的结合蛋白的制备方法，包括在足以产生结合人 IL-18 的结合蛋白的条件下在培养基中培养上面公开的宿主细胞中的任何一种。另一个实施方案提供根据上面公开的方法制备的结合蛋白。

本发明的另一方面提供包括上面公开的结合蛋白中的任何一种的结晶结合蛋白，其中所述结合蛋白以晶体存在。优选地，所述晶体是没有载体的药学控制释放晶体。在一个实施方案中，作为晶体存在的结合蛋白具有比结合蛋白可溶性配对物更大的体内半存留期。在另一个实施方案中，结合蛋白在结晶之后保留其生物活性。

一个实施方案提供用于释放结合蛋白的成分，其中所述成分包括含有上面公开的结晶结合蛋白和成分；和至少一种聚合物载体的组合物。优选地，所述聚合物载体选自下面的一种或几种：聚(丙烯酸)，聚(氰基丙烯酸酯)，聚(氨基酸)，聚(酸酐)，聚(缩肽)，聚(酯)，聚(乳酸)，聚(乳酸-共-羟基乙酸)或 PLGA，聚(b-羟基丁酸)，聚( $\gamma$ -己内酯)，聚(二氧六环酮)；聚(乙二醇)，聚((羟丙基)甲基丙烯酰胺，聚[(有机)磷腈]，聚(原酯)，聚(乙烯醇)，聚(乙烯吡咯烷酮)，马来酸酐-烷基乙烯基醚共聚物，多聚醇，白蛋白，藻酸盐，纤维素和纤维素衍生物，胶原，纤维蛋白，明胶，透明质酸，低聚糖，glycaminoglycans，硫酸多糖，它们的混合物和共聚物。优选地，所述成分选自白蛋白，蔗糖，海藻糖，乳糖醇，明胶，羟丙基- $\beta$ -环糊精，甲氧基聚乙二醇和聚乙二醇。另一个实施方案提供对哺乳动物治疗的方法，包括对哺乳动

物施用有效量的上述组合物的步骤。

本发明的另一方面提供一种感兴趣的基因的基因表达的调节方法,包括下面的步骤:提供 IL-18 多肽或 IL-18 调节剂;和多肽或调节剂接触细胞,其中感兴趣的基因选自下面 Genbank 鉴定号确定的基因:NM\_000389, NM\_002198, NM\_002163, NM\_006144, NM\_006515, NM\_007185, NM\_002288, NM\_003661, NM\_021958, NM\_001335, Hs. 382006, NM\_020125, NM\_007210, NM\_021798, NM\_013324, M11313, D88152, NM\_001103, U37519, NM000697, J03600, NM\_014578, S66793, U47054, L19871, M81181, NM~001188, U15460, NM014417, Z23115, NM\_001713, U45878, U37546, U72649, U49187, J03507, U50360, XM\_071866, NM\_005623, Z32765, Z11697, XM071866, U51096, M83667, D87469, L07765, U66468, X14830, L29217, X15880, NM\_001851, M27691, M37435, X13589, X16866, X59131, Nu004393, U73328, L19267, U53445, X68277, U48807, NM001950, U87269, M57730, X52541, J04076, X63741, L07077, M62831, M60830, U53786, NM\_001988, NM\_000141, M23668, U60062, NM\_000141, U49973, U89995, U27326, A28102, M25667, L34357, U19523, L01406, U03486, X68285, Z18859, D49958, D43772, AC000099, M57731, X53800, M91036, D16583, X64877, X58431, M16937, NM014468, X92814, L19314, M26665, D10995, L41147, M24283, S81914, J03171, J00219, NM\_000619, NM\_000585, U31628, X04500, M27492, X01057, M26062, Y00081, Y00787, Z31695, X06256, X57206, U20734, NM014879, D31762, D42038, NM\_005551, NM\_014846, X06182, Nu005551, X07730, M13955, M57710, S83362, NM\_002314, NM\_005569, U49957, U89922, X14008, U59914, D14497, X59727, NM000429, U43944, X72755, NM021230, NM005951, X78710, X70991, M32011, S77763, M58603, S76638, M69043, U91616, D86425, L13740, U44848, U79251, M27288, AF000234, D50640, L20971, L10343, U77735, NM003579, U17034, AB000584, X63131, D11428, NM\_032940, NM\_005035, NM\_003579, M18255, L01087, D38128, Y10375, D15049, M31166, U59877, NM\_003579, U64675, S57153, NM\_002903, NG\_000013, X75042, M83221, NM\_000537,

U22314, S59049, U70426, U22377, U38480, L10338, M23178, M69203, NM-005409, D79206, NM-005065, NM-004186, J03764, NM-006802, D89077, NM-003037, M91463, D82326, L05568, U96094, X83301, D21267, L31529, M62800, NM-021014, Z35093, NM-005816, L25444, M95787, NM005421, L47345, M57732, NM-003205, M96956, U19878, M92357, M59465, X83490, U37518, NM-003294, U19261, U78798, S69790, U53476, L15309, U78722, X57809, U79249, AB000464, X77744, U79248, AI420129, HG2981-HT3127, HG3548-HT3749, HG870-HT870, HG4333-HT4603, HG3111-HT3287, HG4593-HT4998, HG961-HT961, HG1877-HT1917, HG3115-HT3291, HG4115-HT4385, 和 HG3925-HT4195。

优选地, 调节剂是拮抗剂。更优选地, 调节剂是结合蛋白或中和结合蛋白。

本发明还提供含有上述结合蛋白或中和结合蛋白和药学可接受载体的药物组合物。在另一个实施方案中, 药物组合物含有至少一种用于治疗其中 IL-18 活性是有害的疾病的另外的治疗药物。优选地, 所述另外的药物选自: 血管生成抑制剂 (包括但不限于抗-VEGF 抗体或 VEGF-诱捕剂); 激酶抑制剂 (包括但不限于 KDR 和 TIE-2 抑制剂); 共同-刺激分子阻断剂 (包括但不限于抗-B7.1, 抗-B7.2, CTLA4-Ig, 抗-CD20); 粘着分子阻断剂 (包括但不限于抗-LFA-1 Abs, 抗-E/L 选择蛋白 Abs, 小分子抑制剂); 抗-细胞因子抗体或者其功能片段 (包括但不限于抗-IL-12, 抗-TNF, 抗-IL-6 / 细胞因子受体抗体); 甲氨喋呤; 皮质类固醇; 环孢菌素; 雷帕霉素; FK506; 和非甾类抗炎药物。

另一方面, 本发明提供一种抑制人 IL-18 活性的方法, 包括使人 IL-18 接触上述结合蛋白, 使得人 IL-18 活性被抑制。在相关方面, 本发明提供对患有其中 IL-18 活性是有害的疾病的人患者抑制人 IL-18 活性的方法, 包括对人患者施用上述结合蛋白使得人患者中的人 IL-18 活性被抑制, 从而实现治疗。优选地, 所述疾病选自: 类风湿性关节炎, 骨关节炎, 幼年型慢性关节炎, 莱姆关节炎, 银屑病关节炎, 反应性关节炎, 和脓毒性关节炎, 脊椎关节病, 全身红斑狼疮, 局限性回肠炎, 溃疡性结肠炎, 肠炎, 胰岛素依赖性糖尿病, 甲状腺炎, 哮喘, 变态反应疾病, 牛皮癣, 皮炎硬皮病, 移植物抗宿主病, 器官

移植排异（包括但不限于骨髓和实体器官排异），急性或慢性的与器官移植相关的免疫疾病，肉状瘤病，动脉粥样硬化，传播性血管凝固，Kaw 阿司匹林 ki's 病，Grave's 病，肾病综合征，慢性疲劳综合征，Wegener's 肉芽肿病，Henoch-Schoenlein 紫癜，肾微结节性脉管炎，慢性活性肝炎，眼色素层炎，脓毒性休克，中毒休克综合征，脓毒症综合征，恶病质，传染病，由寄生虫引起的疾病，后天免疫缺陷综合征，急性横向骨髓炎，Huntington's 舞蹈病，帕金森病，早老性痴呆，中风，原发性功能障碍引起的肝硬化，溶血性贫血，恶性肿瘤，心脏衰竭，心肌梗塞，Addison's 病，散发性，I 型多腺缺乏和 II 型多腺缺乏，Schmidt's 综合征，成人（急性）呼吸抑制综合征，脱发，脱发斑，血清反应阴性关节病，关节病，Reiter's 病，牛皮癣关节病，溃疡性结肠关节病，肠滑膜炎，衣菌，鼠疫和沙门氏菌相关关节病，脊柱关节病，动脉粥样化疾病/动脉硬化，特应性变态反应，自身免疫大疱病，寻常性天疱疮，落叶性天疱疮，类天疱疮，线性 IgA 病，自身免疫溶血性贫血，Coombs 阳性溶血性贫血，后天性恶性贫血，少年恶性贫血，肌痛性大脑炎/Royal Free 病，慢性粘膜皮肤念珠菌病，巨细胞关节炎，原发性硬化性肝炎，起因不明自身免疫肝炎，后天性免疫缺陷病综合征，后天性免疫缺陷相关疾病，乙肝，丙肝，普通各式各样的免疫缺陷（普通各式各样的血丙种球蛋白减少），膨胀心肌病，女性不孕症，卵巢衰竭，早产卵巢衰竭，纤维变性肺病，起因不明的纤维组织形成牙槽炎，炎后间质肺病，间质局限性肺炎，与间质肺病相关的缔结组织疾病，与肺病相关的混合缔结组织疾病，与间质肺病相关的全身硬化，与间质肺病相关的类风湿性关节炎，与肺病相关的全身红斑狼疮，与肺病相关的皮肤肌炎/多肌炎，与肺病相关的 Sjogren's 病，与肺病相关的僵硬脊椎炎，结节性脉管炎弥散肺病，与肺病相关的含铁血黄素沉着病，药物引起的间质肺病，辐射纤维化，闭塞性毛细支气管炎，慢性嗜酸性肺炎，淋巴细胞浸润性肺病，传染病后间质肺病，痛风性关节炎，自身免疫肝炎，1-型自身免疫肝炎（典型自身免疫或狼疮样肝炎），2-型自身免疫肝炎（抗-LKM 抗体肝炎），自身免疫介导的低血糖，B 型胰岛素抗性微黑棘皮症，甲状旁腺机能减退，与器官移植相关的急性免疫疾病，与器官移植相关的慢性免疫疾病，骨关节炎，原发性硬化性胆管炎，1 型牛皮癣，2 型牛皮癣，自发性白细胞减少，自身免疫中性白细胞减少，肾病 NOS，

肾小球肾炎, 肾 microscopic vasculitis, 莱姆病, 盘形红斑狼疮, 特发性男性不孕症或 NOS, 精液自身免疫性, 多发性硬化(所有亚型), 交感神经眼炎, 缔结组织疾病继发性高血压, Goodpasture's 综合征, 结节性多动脉炎肺动, 急性风湿性发烧, 类风湿性脊椎炎, Still's 病, 全身硬化, Sjogren's 综合征, Takayasu's 病/动脉炎, 自身免疫血小板减少, 特发性血小板减少, 自身免疫甲状腺病, 甲状腺机能亢进, 甲状腺肿自身免疫甲状腺机能亢进(Hashimoto's 病), 萎缩性自身免疫甲状腺机能亢进, 原发性粘液水肿, 晶体抗原性葡萄膜炎, 原发性结节性脉管炎, 白癜风, 急性肝病, 慢性肝病, 酒精性肝硬化, 酒精引起的肝损伤, choleosatatis, 特应性肝病, 药物引起的肝炎, 非酒精性脂肪性肝炎, 变应性变态反应和哮喘, B 族链球菌(GBS)感染, 精神病(例如, 抑郁症和精神分裂症), Th2 型和 Th1 型介导的疾病, 和癌症, 例如肺癌, 乳房癌, 胃癌, 膀胱癌, 结肠癌, 胰腺癌, 卵巢癌, 前列腺癌和直肠癌, 和造血恶性肿瘤(白血病和淋巴瘤)。

另一方面, 本发明提供对患有其中 IL-18 活性是有害的疾病的患者治疗的方法, 包括在施用上述第二种药物之前, 同时, 或之后对患者施用上述结合蛋白中的任何一种的步骤。

本发明另一方面提供选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体的中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白能结合成熟-人 IL-18, 但是不特异性结合人 IL-18 原。

本发明另一方面提供选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体的中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白能与 125-2H 抗体竞争结合人 IL-18。

本发明另一方面提供选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体的中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白不能与 125-2H 抗体竞争结合人 IL-18。

本发明另一方面提供选自人抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体和 CDR 接枝抗体的中和结合蛋白, 其中所述中和结合蛋白不能与选自 2.5 (E) mg1 抗体和 IL-18BP 的结合蛋白竞争结合人 IL-18。

在优选的实施方案中, 结合蛋白能结合成熟-人 IL-18, 但是不特异性结合人 IL-18 原。在另一个实施方案中, 结合蛋白能与 125-2H 抗体竞争结合人 IL-18。在另一个实施方案中, 结合蛋白不能与 125-2H

抗体竞争结合人 IL-18。

在另一个实施方案中，结合蛋白不能与选自 2.5 (E) mg1 抗体和 IL-18BP 的结合蛋白竞争结合人 IL-18。

在优选的实施方案中，结合蛋白包括包括 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的  $V_L$ ，和包括 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的  $V_H$ 。

在另一个实施方案中，结合蛋白包括具有选自 SEQ ID NO: 2, 和 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 Ig 重链恒定区；具有选自 SEQ ID NO: 4, 和 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的 IG 轻链恒定区；具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 Ig 重链可变区；和具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的 Ig 轻链可变区。

在另一个实施方案中，结合蛋白包括具有选自 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 Ig 重链恒定区；具有选自 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的 IG 轻链恒定区；具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 Ig 重链可变区；和具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的 Ig 轻链可变区。

### 本发明的详细描述

本发明提供 IL-18 结合蛋白，特别是抗-IL-18 抗体，或者与其结合的其抗原-结合部分。本发明的各方面涉及抗体和抗体片段，及其药物组合物，以及制备这样的抗体和片段的核酸，重组表达载体和宿主细胞。

本发明还包括使用本发明的抗体体外或体内检测人 IL-18，抑制人 IL-18 活性，和调节基因表达的方法。本发明还提供截短的 IL-18。在相关方面，本发明还提供用于制备截短的 IL-18 的核酸，重组表达载体和宿主细胞。

除非在这里另有定义，与本发明相关使用的科学和技术定义应该具有本领域技术人员通常理解的定义。此外，除非上下文必需说明，单数应该包括复数，而复数应当包括单数。在本说明书中，除非另有说明"或"的意思是"和/或"。此外，术语"包括"，以及其他形式，例如，第三人称的和过去式的"包括"的使用，是非限制性的。还有，除非另有说明，术语，例如"元素"或"成分"包括包括一个成分的元素和成分以及包括一个以上子单位的元素和成分。

一般情况下，与这里描述的细胞和组织培养，分子生物学，免疫

学,微生物学,遗传学和蛋白质和核酸化学和杂交技术相关使用的术语是本领域公知的和通常使用的。本发明的方法和技术一般根据本领域公知的常规方法和本说明书引述的和讨论的各种概述性的和更专业的参考文献来进行,除非另有说明。根据厂商说明书进行酶促反应和纯化技术,如本领域常规实现的或者如这里描述的。与这里描述的实验步骤,分析化学,合成有机化学和药物化学技术相关的术语是本领域公知的和通常使用的。化学合成,化学分析,药物制备,制剂和送药和对患者的治疗是标准技术。

下面定义选择的术语,可以更容易理解本发明。

这里使用的术语"多肽"指任何氨基酸的聚合链。术语"肽"和"蛋白质"与术语多肽互换使用,也指氨基酸的聚合链。术语"多肽"包括天然或人造蛋白质,蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物。多肽可以是单体的或聚合的。

术语"分离的蛋白质"或"分离的多肽"是由于其来源或产生来源不与其天然态下伴随它的天然相关成分相关;基本上没有来自相同物种的其他蛋白质;由不同物种的细胞表达;或者在自然中不存在的蛋白质或多肽。因此,化学合成或在不同于其天然起源细胞不同的细胞系中合成的多肽是与其天然相关成分"分离的"。利用本领域公知的蛋白质纯化技术,通过分离,可以使得蛋白质基本上没有天然相关成分。

这里使用的术语"回收"指,例如,利用本领域公知的蛋白质纯化技术,通过分离,使得化学物质例如多肽基本上没有天然相关成分的方法。

这里使用的术语"IL-18",指也已知为干扰素- $\gamma$ 的细胞因子,包括因子(IGIF),那是一种促炎性细胞因子,除了诱导干扰素- $\gamma$ 的能力外还具有各种功能。与术语"hIL-18"互换使用的术语"人IL-18"包括SEQ ID NO:1的多肽及其片段,包括但不限于,人IL-18原,成熟人IL-18原,和保留这里描述的IL-18的生物活性的任何截短的人IL-18。这里使用的术语"人IL-18原"指SEQ ID NO:1的多肽。这里使用的术语"成熟人IL-18",指SEQ ID NO:1的残基37-193,这里使用的术语"截短的人",指SEQ ID NO:1的残基59-193。优选地,IL-18,及其片段是生物活性的。这里使用的术语"重组人IL-18"或"rhIL-18"指利用重组DNA技术体外制备的人IL-18。

这里使用的"IL-18 的生物活性"指细胞因子 IL-18 的所有固有的生物学性质。IL-18 的生物学性质包括但不限于结合 IL-18 受体;促进 Th1 和 Tc1 细胞的成熟和激活;通过几种细胞型促进细胞因子例如 TNF, IFN  $\gamma$  和 IL-1  $\beta$  的产生;促进巨噬细胞释放细胞因子例如 TNF 和 IFN  $\gamma$ , 产生 NO; 促进 FasL 表达, 细胞毒性和细胞因子从 NK 细胞释放 (IFN  $\gamma$ ); 促进细胞因子 / 趋化因子释放, 突发性呼吸, 颗粒释放, 嗜中性白细胞中粘着分子表达;促进内皮细胞迁移从而促血管生成;促进 GAG 释放, 软骨细胞中 MMP 和 NO 产生;促进某些细胞中 COX2 表达;和在某些细胞中减少细胞增殖。

关于抗体, 蛋白质, 或肽与第二化学物质相互作用的这里使用的术语"特异性结合"或"特异地结合", 意思是相互作用取决于化学物质上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如, 抗体识别和结合特定蛋白质结构而不是一般的蛋白质。如果抗体对于表位"A"是特异性的, 含有标记的"A"和抗体的反应中, 含有表位 A (或者游离的, 没有标记的 A), 的分子的存在, 会减少与抗体结合的标记的 A 的量。

这里使用的术语"抗体", 广义上指由四个多肽链构成的任何免疫球蛋白(Ig)分子: 两个重链(H)和两个轻链(L), 或者保留 Ig 分子的基本表位结合特征的其任何功能片段, 突变体, 变体, 或衍生物。这样的突变体, 变体, 或衍生物抗体形式是本领域公知的。下面讨论非限制性实施方案。

在全长抗体中, 每条重链由一个重链可变区(这里缩写为 HCVR 或 VH)和一个重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域, CH1, CH2 和 CH3 构成。每条轻链由一个轻链可变区(这里缩写为 LCVR 或 VL)和一条轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域, CL 构成。VH 和 VL 区能进一步分为高变区, 称作互补性决定区(CDR), 期间散布着更保守的称作构架区(FR)的区。每条 VH 和 VL 由三个 CDRs 和四个 FRs 构成, 从氨基末端至羧基末端以下面的顺序排列: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

这里使用的术语, 抗体的"抗原-结合部分"(或者简单地"抗体部分"), 指保留特异性结合抗原(例如, hIL-18)能力的抗体的一个或几个片段。已经证明通过全长抗体的片段能完成抗体的抗原-结合功能。这样的抗体实施方案还可以是双特异性的, 双重特异性的, 或多特异

性的形式;特异性结合两个或多个不同的抗原。术语抗体的"抗原-结合部分"所包括的结合片段的实施例包括:(i) Fab 片段,由 VL, VH, CL 和 CH1 结构域构成的一价片段;(ii)  $F(ab')_2$  片段,包括在铰链区通过二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段;(iii) 由 VH 和 CH1 结构域构成的 Fd 片段;(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域构成的 Fv 片段,(v) dAb 片段(Ward 等, (1989) *Nature* 341: 544-546),其包括一个可变区;和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然 Fv 片段的两个结构域, VL 和 VH, 由不同的基因编码,利用重组方法,通过使它们制备成其中 VL 和 VH 区对形成一价分子(已知是单链 Fv(scFv); 参见,例如, Bird 等 (1988) *Science* 242: 423-426; 和 Huston 等 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883) 的蛋白质单链的合成接头,能将它们连接。这样的单链抗体也包括在术语,抗体的"抗原-结合部分"中。也包括其他形式的单链抗体,例如双抗体。双抗体是二价,双特异性抗体,其中 VH 和 VL 结构域在单链多肽上表达,但是使用太短不能在相同链上两个结构域之间配对的接头,从而使结构域与另一个链的互补结构域配对,产生两个抗原结合位点(参见,例如, Holliger, P., 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R. J., 等 (1994) *Structure* 2: 1121-1123)。这样的抗体结合部分是本领域公知的 (Kontermann 和 Dubel 编著, *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5))。

此外,抗体或其抗原-结合部分可以是更大的免疫粘着分子,是通过抗体或抗体部分与一个或几个其他蛋白质或肽的共价或非共价结合形成的。这样的免疫粘着分子的;例子包括使用链霉抗生物素蛋白核心区形成四聚体 scFv 分子(Kipriyanov, S. M., 等 (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101),标记肽和 C-末端多组氨酸标签形成二价的和生物素化 scFv 分子 (Kipriyanov, S. M., 等 (1994) *Mol. Immunol.* 31: 1047-1058)。抗体部分,例如 Fab 和  $F(ab')_2$  片段,能应用常规技术,例如分别对全抗体进行木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化而从全抗体制备。此外,应用这里描述的标准重组 DNAa 技术能获得抗体,抗体部分和免疫粘着分子。

这里使用的术语"分离的抗体",意指基本上没有具有不同抗原特

异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合 hIL-18 的分离的抗体基本上没有特异性结合 hIL-18 以外抗原的抗体)。然而,特异性结合 hIL-18 的分离的抗体具有与其他抗原例如来自其他物种的 IL-18 分子的交叉反应性。此外,分离的抗体基本上没有其他细胞材料和/或化学品。

这里使用的术语"人抗体"意指包括具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如 体外随机或定点诱变或通过体内体突变诱导的突变),例如在 CDRs 中,特别是在 CDR3 中。然而,这里使用的术语"人抗体"不包括其中 CDR 序列来自另一个哺乳动物种系例如小鼠的种系的抗体接枝到人构架序列上。

这里使用的术语"重组人抗体"意在包括通过重组方法制备,表达,产生或分离的所有的人抗体,例如利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(在下面 I1 C 章节进一步描述),从重组组合人抗体库分离的抗体(Hoogenboom H. R. , (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy H. , 和 Highsmith W. E. , (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo J. V. , 和 Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H. , 和 Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371- 378), 从人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见,例如, Taylor, L. D. , 等 (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295 ; Kellermann S-A. , 和 Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. 等 (2000) Immunology Today 21: 364-370) 或者通过涉及人免疫球蛋白基因序列与其他 DNA 序列剪接的任何其他方法制备,表达,产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。但是在一些实施方案中,对这样的重组人抗体体外诱变(或者,当体内体诱变使用人 Ig 序列的转基因动物时),从而重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是来自体内人抗体种系全部中天然并不存在的人种系 VH 和 VL 序列或者与人种系 VH 和 VL 序列相关的序列。

术语"嵌合抗体"指包括来自一个物种的重链和轻链可变区序列和来自另一个物种的恒定区序列的抗体,例如具有与人恒定区连接的鼠重链和轻链可变区的抗体。

术语"CDR-接枝抗体"指包括来自一个物种的重链和轻链可变区,

但是其中序列中 VH 和/或 VL 中一个或几个 CDR 区被另一个物种的 CDR 序列置换,例如具有其中一个或几个鼠 CDRs (例如, CDR3)被人 CDR 序列置换的鼠重链和轻链可变区的抗体。

术语"人源化抗体"指包含来自非人物种(例如小鼠)但是其中 VH 和/或 VL 序列中至少一部分被变为更"人-样",即人种系可变序列更相似的重链和轻链可变区序列的抗体。人源化抗体的一种类型是 CDR-接枝抗体,其中人 CDR 序列导入非人 VH 和 VL 序列置换相应的非人 CDR 序列。

如这里使用的,术语"hIL-18 中和结合蛋白"指特异性结合 hIL-18 并且中和 hIL-18 的生物活性的蛋白质。优选地,中和结合蛋白是其与 hIL-18 的结合导致 hIL-18 的生物活性被抑制的中和抗体。优选地,中和结合蛋白结合 hIL-18 并且将 hIL-18 的生物活性减小至少大约 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 或更多。中和结合蛋白对 hIL-18 的生物活性的这种抑制作用能通过测定 hIL-18 生物活性的一个或几个指标来评定。hIL-18 生物活性的这些指标能通过本领域公知的体外或体内分析的几种标准方法中的一种或几种来评定。

术语"表位"包括能特异性结合免疫球蛋白或 T-细胞受体的任何多肽决定簇。在一些实施方案中,表位决定簇包括象氨基酸,糖侧链,磷酸基,或磺酰基这样的分子的化学活性表面基团,并且在一些实施方案中,可以具有特定的三维结构特征和/或特定电荷特征。表位是抗体结合的抗原的区。在一些实施方案中,当抗体优先识别蛋白质和/或大分子复合混合物中其靶物抗原时,抗体特异性结合抗原。

如这里使用的术语"表面等离子共振"指一种光学现象,它使得通过检测生物传感器基体中蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用,例如利用 BIAcore 系统(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)。为了进一步描述,参见 Jonsson, U., 等 (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jonsson, U., 等 (1991) *Biotechniques* 11: 620-627; Johnsson, B., 等 (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; 和 Johnson, B., 等 (1991) *Anal. Biochem.* 198 : 268-277。

如这里使用的术语" $K_{on}$ ", 意指本领域公知的抗体与抗原缔合生成抗体/抗原复合体的生成速率常数。

如这里使用的术语" $K_{off}$ ", 意指本领域公知的抗体从抗体/抗原复合体离解的离解速率常数。

如这里使用的术语" $K_d$ ", 意指本领域公知的特定抗体-抗原相互作用的离解常数。

如这里使用的术语"标记的结合蛋白", 指带有插入的标记物提供结合蛋白鉴定的蛋白质。优选地, 标记物是可检测标记, 例如插入放射性标记的氨基酸或连接标记的抗生物素蛋白能检测的生物素基部分的多肽(例如, 包含荧光标记物或者光学或比色方法能检测的酶活性的链霉抗生物素蛋白)。多肽的标记物的例子包括但不限于下面的: 放射性同位素或放射性核素(例如,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , 或  $^{153}\text{Sm}$ ); 荧光标记物(例如, FITC, 罗丹明, 镧系磷光剂), 酶学标记(例如, 辣根过氧化物酶, 荧光素酶, 碱性磷酸酶); 化学发光标记物; 生物素基团; 预先确定的第二报告基团识别的多肽表位(例如, 亮氨酸拉链对序列, 二次抗体的结合位点, 金属结合结构域, 表位标签); 和有吸引力的试剂, 例如钐螯合剂。

术语"缀合结合蛋白"指与第二化学部分, 例如治疗性药物或细胞毒性试剂, 化学连接的结合蛋白。术语"试剂"在这里用来指化合物, 化合物的混合物, 生物大分子, 或者从生物材料制备的提取物。优选地, 治疗性药物或细胞毒性试剂包括但不限于, 百日咳毒素, 紫杉酚, 细胞松弛素 B, 短杆菌肽 D, 溴化乙锭, 吐根碱, 丝裂霉素, 依托泊苷, tenoposide, 长春新碱, 长春碱, 秋水仙碱, 阿霉素, 柔红霉素, 二羟基炭疽菌素二酮, 二羟基蒽二酮, 光辉霉素, 放线菌素 D, 1-脱氢睾酮, 糖皮质激素, 普鲁卡因, 丁卡因, 利多卡因, 普萘洛尔, 和嘌呤霉素, 和它们的类似物或同系物。

这里使用的术语"结晶结合蛋白"指以晶体形式存在的多肽。晶体是一种固态形式, 它与其他形式例如无定形固态或液晶态截然不同。晶体由原子, 离子, 分子(例如蛋白质, 象抗体), 或分子集合体(例如抗原/抗体复合体)有序的重复的三维排列组成。这些三维排列根据本领域公知的特殊数学关系排列。晶体中重复的基础单元, 或者构件, 称作不对称单元。证实给出确定的结晶学对称性的排列中重复的不对称单元提供晶体的"晶胞"。所有三个方向规则转换的晶胞的重复得到

晶体。参见 Giege, R. 和 Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999) "。

这里称作"多核苷酸"的术语在这里指两个或多个核苷酸,核糖核酸或脱氧核糖核酸或任何类型核苷酸的修饰形式的聚合形式。该术语包括单链和双链形式的 DNA,但是优选双链 DNA。

这里使用的术语"分离的多核苷酸"意思是多核苷酸(例如基因组的, cDNA, 或者合成来源, 或者它们的组合), 其由于其来源, "分离的多核苷酸": 与自然界发现"分离的多核苷酸"的多核苷酸的全部或部分不相缔合; 与自然界不连接的多核苷酸操作连接; 或者在自然界不作为更大序列的部分而存在。

这里使用的术语"载体"意指能将它所连接的另一个核酸转运的核酸分子。载体的一种类型是"质粒", 它指其中可以连接另外的 DNA 片段的环状双链 DNA 环。载体的另一种类型是病毒载体, 其中另外的 DNA 片段连接到病毒基因组中。一些载体能在导入它们的宿主细胞中自主复制(例如, 有细菌复制起点的细菌载体和游离基因哺乳动物载体)。其他载体(例如, 非游离型哺乳动物载体)在导入宿主细胞中时能被整合到宿主细胞的基因组中, 从而与宿主基因组一起复制。此外, 一些载体能指导它们操作连接的基因的表达。这样的载体在这里称作"重组表达载体"(或者简单地, "表达载体")。一般情况下, 重组 DNA 技术中使用的表达载体经常是质粒形式。本说明书中, "质粒"和"载体"可以互换使用, 因为质粒是最常使用的载体形式。然而, 本发明意在包括这样的表达载体的其他形式, 例如病毒载体(例如, 复制缺陷逆转录病毒, 腺病毒和腺-相关病毒, 它们起着同等的功能。

术语"操作连接"指其中将描述的成分相关联使得它们以期望的方式发挥功能的连接。与编码序列"操作连接"的调控序列以这样的方式连接使得在与调控序列相匹配的条件下实现编码序列的表达。"操作连接"序列包括与感兴趣的基因邻接的表达调控序列和以反式起作用或者与感兴趣的调控基因有距离的表达调控序列。

这里使用的"表达调控序列"指进行表达和加工它们连接的编码序列所必需的多核苷酸序列。表达调控序列包括合适的转录起始序列,

中止序列，启动子和增强子序列；有效 RNA 加工信号，例如剪接和多腺苷酸化信号；稳定胞质 mRNA 的序列；提高翻译效率的序列（剂，Kozak 共有序列）；提高蛋白质稳定性的序列；如果期望，增强蛋白质分泌的序列。这样的调控序列的性质根据宿主生物而不同；在原核生物中，这样的调控序列一般包括启动子，核糖体结合位点，和转录终止序列；在真核生物中，一般情况下，这样的调控序列包括启动子和转录终止序列。术语“调控序列”意在包括其存在对于表达和加工是必须的成分，并且还包括其存在是有利的附加成分，例如前导序列和融合配对物序列。

这里定义的“转化”指外源 DNA 进入宿主细胞的任何过程。利用本领域公知的各种各样的方法在天然或人为条件下可以发生转化。转化可以依赖公知的方法将外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞。根据转化的宿主细胞选择方法并且包括但不限于，病毒感染，电穿孔，脂质转染，和粒子轰击。这样的“转化”细胞包括稳定转化的细胞，其中插入的 DNA 能作为自身复制质粒或者作为宿主染色体的部分复制。它们还可以包括瞬时表达插入的 DNA 或 RNA 有限时间的细胞。

这里使用的“重组宿主细胞”（或者简单地“宿主细胞”）意指其中已经导入外源 DNA 的细胞。应该理解这样的术语意在不仅指特定受体细胞，而且还有这样的细胞的后代。因为由于突变或环境影响，在后代中可能发生一些改变，这样的后代事实上可能与母本细胞不同，但是它仍然包括在这里使用的术语“宿主细胞”的范围内。优选地，宿主细胞包括选自生命界任何原核和真核细胞。优选的真核细胞包括原生生物，真菌，植物和动物细胞。最优选地，宿主细胞包括但不限于原核细胞系大肠杆菌；哺乳动物细胞系 CHO 和 COS；昆虫细胞系 Sf9；和真菌细胞啤酒糖酵母。

标准技术可以用于重组 DNA，寡核苷酸合成，和组织培养和转化（例如，电穿孔，脂质转染）。酶促反应和纯化技术可以根据厂商说明书进行或者以本领域常规做法或者根据这里的描述进行。上述技术和方法一般根据本领域公知的常规方法和各种概述和更具体说明的参考文献的描述进行，这些参考文献在本说明书中引述并讨论。参见，例如，Sambrook 等 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*（第二版，冷泉港出版社，冷泉港，纽约（1989）），这里为了所有的目的引作参

考。

正如本领域公知的和这里使用的, "转基因生物", 指有包含转基因的细胞的生物, 其中导入生物体中的转基因(生物体的祖先)表达在生物体中天然并不表达的多肽。"转基因"是 DNA 构建体, 其稳定操作整合产生转基因生物体的细胞的基因组中, 在转基因生物的一种或几种细胞类型或组织中指导编码基因产物的表达。

术语"调控"和"调节"互换使用, 如这里使用的, 指感兴趣的分子活性(例如, hIL-18 的生物活性)的变化或改变。调控可以是感兴趣的分子的某些活性或功能大小的增加或减小。举例的分子的活性和功能包括但不限于, 结合特征, 酶活性, 细胞受体激活, 和信号转导。

相应地, 这里使用的术语"调节剂"是能改变或变化感兴趣的分子的活性或功能(例如, hIL-18 的生物活性)的化合物。例如, 调节剂可以引起分子的某些活性或功能的大小与不存在调节剂所发现的活性或功能的大小相比有所增大或降低。在一些实施方案中, 调节剂是抑制剂, 其降低分子的至少一种活性或功能大小。举例的抑制剂包括但不限于蛋白质, 肽, 抗体, , peptibodies, 碳水化合物或小有有机分子。Peptibodies 描述于, 例如, W001/83525。

这里使用的术语"激动剂"指一种调节剂, 其当与感兴趣的分子接触时, 引起分子的某些活性或功能的大小与不存在激动剂所发现的活性或功能的大小相比有所增大。特别感兴趣的激动剂包括但不限于, IL-18 多肽, 核酸, 碳水化合物, 或结合 hIL-18 的任何其他分子。

这里使用的术语"拮抗剂"或"抑制剂"指一种调节剂, 其当与感兴趣的分子接触时, 引起分子的某些活性或功能的大小与不存在拮抗剂所发现的活性或功能的大小相比有所增大。特别感兴趣的拮抗剂包括阻断或调节 hIL-18 的生物学或免疫学活性的那些。hIL-18 的拮抗剂和抑制剂包括但不限于, 蛋白质, 核酸, 碳水化合物, 或结合 hIL-18 的任何其他分子。

这里使用的术语"样品"以其广义使用。这里使用的"生物样品"包括但不限于, 来自活体或活体前的一定量物质。这样的活体包括但不限于, 人, 小鼠, 大鼠, 猴, 狗, 兔和其他动物。这样的物质包括但不限于, 血液, 血清, 尿液, 滑液, 细胞, 器官, 组织, 骨髓, 淋巴结和脾。

这里使用的, 一般公知的, 本领域技术人员使用的, 术语"竞争",

指一种蛋白质与第二种结合蛋白结合这两种结合蛋白共同的配体(例如, IL-18)的相互干扰或者阻碍的能力。用于测定结合蛋白的竞争特征的试验是本领域公知的。这里描述优选的竞争试验。

#### I. 结合人 IL-18 的人抗体

本发明的一个方面提供以高亲合力, 低解离速率和高中和能力, 结合 IL-18 分离的人抗体, 其抗原结合部分。优选地, 抗体, 或者其部分是分离的抗体。优选地, 本发明的人抗体是中和人抗-IL-18 抗体。

##### A. 抗 IL-18 抗体的制备方法

通过本领域公知的多种技术可以制备本发明的抗体。制备本发明的抗-IL-18 抗体的特别优选的方法包括使用 XENOMOUSE 转基因小鼠, 并且使用本领域公知的用于制备抗体的杂交瘤和 SLAM 细胞操作技术 (Abgenix, Inc., Fremont, CA), 并且使用包括实施例 3.2 描述的 IL-18 肽的抗原, 即, 包括 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列和其片段的人 IL-18。

在本发明的一个实施方案中, 通过用 IL-18 抗原免疫包括人免疫球蛋白基因座全部或部分的非人动物制备人抗体。在优选的实施方案中, 非人动物是 XENOMOUSE 转基因小鼠, 包括人免疫球蛋白基因座的大片段并且在小鼠抗体产生中缺乏的基因工程小鼠品系。参见, 例如, Green 等 Nature Genetics 7: 13-21 (1994) 和美国专利 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 和 6,130,364。还参见 1991 年 7 月 25 日公开的 W0 91/10741, 1994 年 2 月 3 日公开的 W0 94/02602, 1996 年 10 月 31 日公开的 W0 96/34096 和 W0 96/33735, 1998 年 4 月 23 日公开的 W098/16654, 1998 年 6 月 11 日公开的 W0 98/24893, 1998 年 11 月 12 日公开的 W0 98/50433, 1999 年 9 月 10 日公开的 W099/45031, 1999 年 10 月 21 日公开的 W0 99/53049, 2000 年 2 月 24 日公开的 W0 00 09560, 和 2000 年 6 月 29 日公开的 W0 00/037504。XENOMOUSE 转基因小鼠产生全人抗体的成人-样人抗体库, 并且产生抗原-特异性人 Mabs。XENOMOUSE 转基因小鼠通过导入兆碱基大小的, 人重链基因座和 x 轻链基因座的种系构型 YA 片段而包含大约 80% 人抗体库。参见 Mendez 等, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green 和

Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998), 其公开内容引作参考。

本发明还提供了通过免疫包括人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物从非人非小鼠动物制备抗-IL-18 抗体的方法。人们可以利用上面刚描述的方法制备这样的动物。这些专利文献中公开的方法可以根据美国专利 5,994,619 的描述改进。在优选实施方案中,非人动物可以是大鼠,绵羊,猪,山羊,牛或马。

在另一个实施方案中,包括人免疫球蛋白基因座的非人动物是人免疫球蛋白“小基因座”的动物。在小基因座研究中,通过从 Ig 基因座包含各个基因来模拟外源 Ig 基因座。这样,一个或几个  $V_H$  基因,一个或几个  $D_H$  基因,一个或几个  $J_H$  基因,一个  $\mu$  恒定区,和一个第二恒定区(优选  $\gamma$  恒定区)形成用于插入动物中的构建体。这项研究具体描述于美国专利 No. 5,545,807, 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,591,669, 5,612,205, 5,721,367, 5,789,215, 和 5,643,763, 这里引作参考。

小基因座研究的好处是快捷,能产生包括 Ig 基因座的部分的构建体并且导入动物中。然而,小基因座研究的潜在的缺点是可能没有足够的免疫球蛋白多样性来支持全 B-细胞发育,使得抗体产生较少。

为了制备人抗-IL-18 抗体,用 IL-18 抗原免疫包括人免疫球蛋白基因座的一些或全部的非人动物,并且从动物分离抗体或产生抗体的细胞。IL-18 抗原可以是分离的和/或纯化的 IL-18, 并且优选是人 IL-18。在另一个实施方案中,IL-18 抗原是 IL-18 的片段,优选成熟 IL-18。在另一个实施方案中,IL-18 抗原是包括至少一个 IL-18 的表位的片段。

对动物的免疫可以通过本领域公知的任何方法来进行。参见,例如, Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 纽约:冷泉港出版社, 1990。对非人动物例如小鼠,大鼠,绵羊,山羊,猪,牛和马进行免疫的方法是本领域公知的。参见,例如, Harlow 和 Lane, 美国专利 5,994,619。在优选的实施方案中,IL-18 抗原与辅助剂一起施用刺激免疫应答。这样的辅助剂包括完全或不完全福氏佐剂, RIBI (胞壁酰二肽)或 ISCOM (免疫刺激复合体)。这样的辅助剂通过局

部沉积分离它而可以保护多肽不快速散播,或者它们可以含有刺激宿主分泌对巨噬细胞和免疫系统的其他成分有趋化性的物质。优选地,如果施用多肽,免疫程序包括施用两次或多次多肽,延续几周。

实施例 2.2. A 提供用磷酸盐缓冲盐水中人 IL-18 免疫 XENOMOUSE 转基因小鼠的方案。

#### B. 抗体和产生抗体的细胞系的产生

用 IL-18 抗原免疫动物之后,可以从动物获得抗体和/或产生抗体的细胞。通过从动物取血或杀死动物而从动物获得含有抗-IL-18 抗体的血清。可以使用从动物获得的血清,从血清获得的免疫球蛋白级分,或者从血清纯化的抗-IL-18 抗体。以这种方式获得的血清或免疫球蛋白是多克隆的,因此带有一系列异源性物质。

在另一个实施方案中,可以从受免疫动物制备产生抗体的无限繁殖杂交瘤。免疫之后杀死动物,并且根据本领域公知的,将 B 脾细胞与无限繁殖骨髓瘤细胞融合。参见,例如,Harlow 和 Lane,上文。在优选实施方案中,骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌细胞系)。融合 抗生素选择之后,使用 IL-18,或者其部分,或表达 IL-18 的细胞筛选杂交瘤。在优选实施方案中,利用酶联免疫分析(ELISA)或者放射免疫分析(RIA)进行最初的筛选,优选 ELISA。WO 00/37504 中提供了 ELISA 筛选的实施例,这里引作参考。

选择产生抗-IL-18 抗体的杂交瘤,克隆,并且进一步筛选期望的特征,包括强健杂交瘤生长,高抗体产生和期望的抗体特征,下面进一步讨论。培养杂交瘤并且在同源动物体内,在没有免疫系统的动物,例如,裸鼠,中展开,或者在培养基中体外培养。筛选,克隆和扩展杂交瘤的方法是本领域技术人员公知的。

优选地,免疫动物是表达人免疫球蛋白基因并且 B 脾细胞与来自和非人动物相同物种的骨髓瘤融合的非人动物。更优选地,免疫动物是 XENOMOUSE 转基因小鼠,骨髓瘤细胞系是非-分泌小鼠骨髓瘤,例如骨髓瘤细胞系是 P3X63Ag8.653 (参见,例如,实施例 2.2. B)。

一方面,本发明提供产生人抗-IL-18 抗体的杂交瘤。在优选的实施方案中,杂交瘤是小鼠杂交瘤,如上所述。在另一个优选的实施方案中,杂交瘤是在非人非小鼠物种中产生的,例如大鼠,绵羊,猪,山羊,牛或马。在另一个实施方案中,杂交瘤是人杂交瘤,其中人非分泌骨髓

瘤与表达抗-IL-18 抗体的人细胞融合。

在本发明的另一个方面,利用本领域称作筛选淋巴细胞抗体方法 (SLAM) 的方法从单一的分选的淋巴细胞制备重组抗体,如美国专利 No. 5,627,052, PCT 公开 WO 92/02551, 和 Babcock, J. S. 等 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848 所述。在该方法中,应用抗原特异性溶血血小板测试来筛选 I (A) 章节中描述的任何一种免疫动物得到的分泌感兴趣的抗体的单一细胞,例如淋巴细胞,在抗原特异性溶血血小板测试中,抗原 IL-18, 或者其片段,利用接头,例如生物素,与绵羊红细胞偶联,并且用来鉴定分泌对 IL-18 有特异性的抗体的单一细胞。鉴定感兴趣的分泌抗体的细胞之后,通过逆转录酶-PCR 从细胞获得重链和轻链可变区 cDNAs,然后在哺乳动物细胞例如 COS 或 CHO 细胞中,在合适的免疫球蛋白恒定区(例如,人恒定区)的上下游表达这些可变区。用来自体内筛选的淋巴细胞的扩增的免疫球蛋白序列转染宿主细胞,然后进一步分析并体外筛选,例如通过使转染细胞分离表达抗 IL-18 抗体的细胞。进一步体外操作扩增的免疫球蛋白序列,例如通过体外亲和性成熟方法,例如 PCT 公开 WO 97/29131 和 PCT 公开 WO 00/56772 中描述的那些。

也可以利用体外方法来制备本发明的抗体,其中筛选抗体库来鉴定具有期望的结合特异性的抗体。这样筛选重组抗体库的方法是本领域公知的并且包括例如下面文献中描述的方法: Ladner 等, 美国专利 No. 5,223,409; Kang 等, PCT 公开 No. WO92/18619; Dower 等, PCT 公开 No. WO 91/17271; Winter 等, PCT 公开 No. WO 92/20791; Markland 等, PCT 公开 No. WO 92/15679; Breitling 等, PCT 公开 No. WO 93/01288; McCafferty 等, PCT 公开 No. WO 92/01047; Garrard 等, PCT 公开 No. WO 92/09690; Fuchs 等 (1991) Biol Technology 9: 1370-1372; Hay 等 (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Huse 等 (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty 等, Nature (1990) 348: 552-554; Griffiths 等, (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins 等 (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson 等 (1991) Nature 352: 624-628; Gram 等 (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrard 等 (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom 等 (1991) Nucl Acid Res 19: 4133-4137; 和 Barbas

等 (1991) PNAS 88: 7978-7982, 美国专利申请公开 20030186374, 和 PCT 公开 No. WO 97/29131, 这些文献的内容在此引作参考。

重组抗体库可以来自用 IL-18, 或 IL-18 的部分免疫的受试者。或者, 重组抗体库可以来自裸受试者, 即, 没有用 IL-18 免疫的受试者, 例如从没有用 人 IL-18 免疫的人受试者获得的人抗体库。通过用包括人 IL-18 的肽(例如, 相应于 hIL-18 的部分的肽) 筛选重组抗体库来筛选本发明的抗体, 从而筛选识别 IL-18 的那些抗体。实施这样的筛选和选择的方法是本领域公知的, 例如上一段中的参考文献中描述的。为了筛选对 hIL-18 具有特定的结合亲和性的本发明的抗体, 例如以特定解离速率常数从人 IL-18 离解的那些, 能利用本领域公知的表面等离子共振的方法来筛选具有期望的解离速率常数的抗体。为了筛选对 hIL-18 具有特定中和活性的本发明的抗体, 例如具有特殊  $IC_{50}$  的那些, 可以利用本领域公知的评价 hIL-18 活性的抑制作用的本领域公知的标准方法。

一方面, 本发明提供分离的抗体, 或者结合人 IL-18 的其抗原结合部分。优选地, 抗体是中和抗体。优选地, 抗体是人抗体。在很多实施方案中, 抗体是重组抗体或单克隆抗体。本发明最优选的中和抗体在这里称作 2.5 (E), 并且具有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 VL 和 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 VH。最优选地, 2.5 (E) 抗体结合人 IL-18,  $K_d$  小于  $5 \times 10^{-10} M$  (参见实施例 2.2. F)。

优选地, 本发明的抗-IL-18 抗体, 例如 2.5 (E) 抗体和相关抗体, 具有减小或中和 IL-18 活性的能力, 例如, 根据本领域公知的几种体外和体内测试所测定的(例如, 参见实施例 3.2. F)。例如, 这些抗体中和 KG-1 细胞中人  $\gamma$  干扰素的 IL-18-诱导的产生,  $IC_{50}$  值的范围至少大约  $10^{-8} M$ , 大约  $10^{-9} M$ , 或者大约  $10^{-10} M$ 。此外, 这些抗体还中和全血细胞中人  $\gamma$  干扰素的 IL-18-诱导的产生,  $IC_{50}$  值的范围至少大约  $10^{-8} M$ , 大约  $10^{-9} M$ , 或者大约  $10^{-10} M$ 。

在特别优选的实施方案中, 抗-IL-18 抗体 2.5 (E) 结合各种形式的人 IL-18, 包括 IL-18 原, 成熟 IL-18 和截短的 IL-18。抗体 2.5 (E) 不特异性结合其他细胞因子, 例如 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21, TNF, LT (淋巴毒素),  $LT\alpha 1\beta 2$ , 和  $LT\alpha 2\beta 1$ 。但是,

抗体 2.5 (E) 与来自其他物种的 IL-18 没有交叉反应性。例如, 抗体中和来自 cynomolgus 猴的 IL-18 的活性 ( $IC_{50}$  for cyno IL-18 =  $9. E \times 10^{-11}$ ; 参见实施例 2.2. J1)。

一方面, 本发明提供 2.5 (E) 抗体和功能抗体部分, 2.5 (E)-相关抗体和功能抗体部分, 与 2.5 (E) 等同性质的其他人抗体和功能抗体部分, 例如以低离解动力学和高中和能力结合 IL-18 的高亲和性。在优选的实施方案中, 分离的抗体, 或者其抗原-结合部分, 结合人 IL-18, 根据表面等离子共振所测定的, 其中抗体, 或者其抗原-结合部分, 其中抗体, 或者其抗原-结合部分, 以大约  $0.1 s^{-1}$  或更小的  $K_{off}$  速率常数从人 IL-18 离解, 或者其以大约  $1 \times 10^{-6} M$  或更小的  $IC_{50}$  抑制人 IL-18 活性。或者, 根据表面等离子共振所测定的, 抗体, 或者其抗原-结合部分, 可以以大约  $1 \times 10^{-2} s^{-1}$  或更小的  $K_{off}$  速率常数从人 IL-18 离解, 或者其以大约  $1 \times 10^{-7} M$  或更小的  $IC_{50}$  抑制人 IL-18 活性。或者, 根据表面等离子共振所测定的, 抗体, 或者其抗原-结合部分, 可以以大约  $1 \times 10^{-3} s^{-1}$  或更小的  $K_{off}$  速率常数从人 IL-18 离解, 或者其以大约  $1 \times 10^{-8} M$  或更小的  $IC_{50}$  抑制人 IL-18 活性。或者, 根据表面等离子共振所测定的, 抗体, 或者其抗原-结合部分, 可以以大约  $1 \times 10^{-4} s^{-1}$  或更小的  $K_{off}$  速率常数从人 IL-18 离解, 或者其以大约  $1 \times 10^{-9} M$  或更小的  $IC_{50}$  抑制人 IL-18 活性。或者, 根据表面等离子共振所测定的, 抗体, 或者其抗原-结合部分, 可以以大约  $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  或更小的  $K_{off}$  速率常数从人 IL-18 离解, 或者其以大约  $1 \times 10^{-10} M$  或更小的  $IC_{50}$  抑制人 IL-18 活性。或者, 根据表面等离子共振所测定的, 抗体, 或者其抗原-结合部分, 可以以大约  $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  或更小的  $K_{off}$  速率常数从人 IL-18 离解, 或者其以大约  $1 \times 10^{-11} M$  或更小的  $IC_{50}$  抑制人 IL-18 活性。

在另一个实施方案中, 本发明提供分离的人抗体, 或其抗原结合部分, 具有包括 SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; 或 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列的轻链可变区 (VL), 和包括 SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20;

SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; 或 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 。

在一些实施方案中, 抗体包括重链恒定区, 例如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 或 IgD 恒定区。优选地, 重链恒定区是 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。此外, 抗体包括轻链恒定区,  $\kappa$  轻链恒定区或  $\lambda$  轻链恒定区。优选地, 抗体包括  $\kappa$  轻链恒定区。或者, 抗体部分可以是, 例如, Fab 片段或单链 Fv 片段。

Fc 部分中氨基酸残基的置换改变抗体效应子功能是本领域公知的 (Winter, 等, 美国专利 No. 5,648,260 ; 5624821)。抗体的 Fc 部分介导几种重要效应子功能, 例如细胞因子诱导, ADCC, 吞噬作用, 补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体和抗原-抗体复合体的半衰期/清除率。在一些情况下, 对于治疗性抗体, 这些效应子功能是所期望的, 但是在另一些情况下可能是不需要的甚至是有害的, 取决于治疗目标。一些人 IgG 同位型, 特别是 IgG1 和 IgG3, 分别通过与 Fc $\gamma$ Rs 和补体 C1q 结合而介导 ADCC 和 CDC。新生 Fc 受体 (FcRn) 是决定抗体的循环半衰期的关键成分。在另一个实施方案中, 抗体的恒定区例如抗体的 Fc 区中至少一个氨基酸残基被置换, 使得抗体的效应子功能被改变。

一个实施方案提供了标记的结合蛋白, 其中本发明的抗体或抗体部分被衍生化或者连接另一个功能分子 (例如, 另一个肽或蛋白质)。例如, 通过将本发明的抗体或抗体部分 (通过化学偶联, 基因融合, 非共价结合或者其他) 与一个或几个其他分子部分功能连接, 能衍生本发明的标记的结合蛋白, 所述其他分子部分例如另一种抗体 (例如, 双特异性抗体或二联抗体), 可检测试剂, 细胞毒性试剂, 药物物质, 和/或能介导抗体或抗体部分与另一种分子 (例如链霉抗生物素蛋白核心区或多组氨酸标签) 结合的蛋白质或肽。

本发明的抗体或抗体部分可以被衍生化的有用可检测试剂包括荧光化合物。举例的荧光可检测试剂包括荧光素, 荧光素异硫氰酸酯, 罗丹明, 5-二甲基胺-1-萘磺酰基氯, 藻红蛋白等等。还可以用可检测酶将抗体衍生化, 例如用碱性磷酸酶, 辣根过氧化物酶, 葡萄糖氧化酶等等能够。当用可检测酶将抗体衍生化时, 通过加入另外的试剂检测它,

酶用来产生可检测反应产物。例如,当存在可检测试剂辣根过氧化物酶时,加入过氧化氢和二氨基联苯胺产生有色反应产物,其是可检测的。也可以用生物素将抗体衍生物化,并且通过间接测定抗生物素蛋白或链酶抗生物素蛋白结合来测定。

本发明的另一个实施方案提供结晶结合蛋白。优选地,本发明涉及这里公开的全抗-IL-18 抗体及其片段的结晶,含有这样的结晶的制剂和组合物。在一个实施方案中,结晶的结合蛋白具有比结合蛋白的可溶配对物更长的体内半存留期。在另一个实施方案中,结合蛋白在结晶之后保留了生物活性。

根据本领域公知的方法和根据中公开的,可以制备本发明的结晶结合蛋白,WO 02072636 在此引作参考(也参见例如 2.2. M)。

本发明另一个实施方案提供糖基化结合蛋白,其中抗体或抗原-结合部分包括一个或几个糖残基。最初的体内蛋白质的产生可以进一步加工,这是翻译后修饰。特别地,糖(乙二醇)残基可以酶促加上,这个过程是糖基化作用。得到的带有共价连接的寡糖侧链的蛋白质已知是糖基化蛋白质或糖蛋白。蛋白质糖基化作用取决于感兴趣的蛋白质的氨基酸序列,以及其中表达蛋白质的宿主细胞。不同的生物体可以产生不同的糖基化作用酶(例如,糖基转移酶和糖苷酶),并且具有不同的底物(核苷酸糖类)。由于这样的因素,蛋白质糖基化模式,糖基残基的成分可以根据其中表达特定蛋白质的宿主系统而不同。本发明中使用的糖基残基可以包括但不限于,葡萄糖,半乳糖,甘露糖,岩藻糖,n-乙酰氨基葡萄糖和唾液酸。优选地,糖基化结合蛋白包括糖基化残基,使得糖基化模式是人的。

本领域技术人员公知不同的蛋白质糖基化作用可以产生不同的蛋白质特征。例如,与哺乳动物例如 CHO 细胞系中表达的相同蛋白质相比,微生物宿主例如使用酵母内源途径的酵母中产生的糖基化的治疗性蛋白质的功效可能被减小。这样的糖蛋白在人体中也可以是免疫原性的并且具有给药后减小的体内半存留期。人和其他动物中的特异受体可以识别特异糖基残基并且促进蛋白质在血液中的快速清除。其他副作用包括蛋白质折叠,可溶性,对蛋白酶的灵敏性,运输,转运,区室化,分泌,被其他蛋白质或因子识别,抗原性,或变应原性的改变。因此,医师可能优选具有特定糖基化作用成分和模式的治疗性蛋白质,

例如与人细胞中或关注的受试者动物的物种-特异性细胞中产生的相同或至少相似的糖基化成分和模式。

通过基因修饰宿主细胞来表达异源糖基化酶,可以实现与宿主细胞不同的糖基化蛋白质的表达。应用本领域公知的技术,医师可以获得具有人蛋白质糖基化作用的抗体或其抗原-结合部分。例如,对酵母菌株进行基因修饰来表达非天然存在的糖基化酶,使得这些酵母菌株中产生的糖基化蛋白质(糖蛋白)具有与动物细胞特别是人细胞产生的相同的蛋白质糖基化作用(美国专利申请 20040018590 和 20020137134)。

此外,本领域技术人员明白,使用经基因工程处理的表达各种糖基化酶的宿主细胞库,可以表达感兴趣的蛋白质,使得库中成员宿主细胞产生具有不同糖基化作用模式的感兴趣的蛋白质。医师可以选择并分离具有特定糖基化作用模式的感兴趣的蛋白质。优选地,具有特定的选择的新的糖基化作用模式的蛋白质具有改善的或改变的生物性质。

### C. 重组 IL-18 抗体的产生

通过本领域公知的各种技术可以制备本发明的抗体。例如,从宿主细胞表达,其中编码重链和轻链的表达载体通过标准技术被转染导宿主细胞中。各种形式的术语"转染"意在包括通常用于将外源 DNA 导入原核或真核细胞中的各种技术,例如,电穿孔,磷酸钙沉淀,DEAE-葡聚糖转染等。虽然有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体,但是在真核细胞中表达是优选的,最优选在哺乳动物宿主细胞中表达抗体,因为这样的真核细胞(特别是哺乳动物细胞)比原核细胞更有可能装配和分泌适当地折叠并具有免疫活性的抗体。

用于表达本发明的重组抗体的优选的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)(包括 dhfr-CHO 细胞,描述于 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 与 DHFR 选择标记物一起使用,例如,如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621)所述, NS0 骨髓瘤细胞, COS 细胞和 SP2 细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养足以使抗体在宿主细胞中表达的时间来制备抗体,或者,更优选地,抗体分泌到宿主细胞在其中生长的培养基中。

利用标准蛋白质纯化技术从培养基中回收抗体。宿主细胞还可以用来制备功能抗体片段,例如 Fab 片段或 scFv 分子。理解上述方法中的变化在本发明的范围内。例如,可以预期用编码本发明的抗体的轻链和/或重链的功能片段的来转染宿主细胞。还可以利用重组 DNA 技术来去除对于与感兴趣的抗原结合不是必需的编码轻链和重链之一的 DNA 的一些或部分。这样截短的 DNA 分子表达的分子也包括在本发明的抗体内。另外,可以制备双功能抗体,其中一个重链和一个轻链是本发明的抗体,而另一个重链和轻链对于感兴趣的抗原之外的抗原是特异性的,通过标准化学交联方法使本发明的抗体与第二抗体交联。

在本发明抗体或抗原-结合部分的重组表达的优选系统中,通过磷酸钙介导的转染,将编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体导入 dhfr-CHO 细胞。在重组表达载体中,抗体重链和轻链基因各自操作连接于 CMV 增强子/AdMLP 启动子调控元件,驱动高水平基因转录。重组表达载体还带有 DHFR 基因,其用于使用甲氨喋呤筛选/扩增用载体转染的 CHO 细胞的筛选。培养选择的转化子宿主细胞让它表达抗体重链和轻链,并且从培养基回收完整抗体。利用标准分子生物技术来制备重组表达载体,转染宿主细胞,选择转化子,培养宿主细胞,并且从培养基回收抗体。本发明还提供通过在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞直到合成本发明的重组抗体来合成本发明的重组抗体的方法。该方法进一步包括从培养基分离重组抗体。

表 1 是本发明优选的抗-hIL-18 抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列的表。在 VH 区中,氨基末端(N-末端)的位置 1 中天然存在的氨基酸是谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)。但是,为了在包括 VH 区的蛋白质的大规模生产中产生带有同源 N-末端的重组蛋白质,N-末端的位置 1 优选谷氨酸(E)。

表1 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

| 蛋白质<br>蛋白质区   | 序列标识                  | 序列<br>12345678901234567890                                                                                                                        |
|---------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VH 2.5(E)     | SEQ ID NO.:6          | EVQLVQSGTEVKKPGESLKI<br>SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM<br>PGKGLEWMGFIYPGDSETRY<br>SPTFQGQVTISADKSFNTAF<br>LQWSSLKASDTAMYICARVG<br>SGWYPYTFDIWGQGTMTVTS<br>S |
| VH 2.5 CDR-H1 | SEQ ID NO.:6的残基31-35  | SYWIG                                                                                                                                             |
| VH 2.5 CDR-H2 | SEQ ID NO.:6的残基50-66  | FIYPGDSETRYSPTFQG                                                                                                                                 |
| VH 2.5 CDR-H3 | SEQ ID NO.:6的残基99-110 | VGSGWYPYTFDI                                                                                                                                      |
| VL 2.5(E)     | SEQ ID NO.:7          | EIVMTQSPATLSVSPGERAT<br>LSCRASESISNLAWEYQQK<br>GQAPRLFITYASTRAVDIPA<br>RFGSGSGTEFTLTISLQS<br>EDFAVYYCQQYNWPSITFG<br>QGTRLEIKR                     |

| 蛋白质            | 序列标识                     | 序列                                                                                                                                                                  |
|----------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 蛋白质区           |                          | 12345678901234567890                                                                                                                                                |
| VL 2.5 CDR-L1  | SEQ ID NO.: 7的残基24-34    | RASESISSNLA                                                                                                                                                         |
| VL 2.5 CDR-L2  | SEQ ID NO.: 7的残基50-56    | TASTRAT                                                                                                                                                             |
| VL 2.5 CDR-L3  | SEQ ID NO.: 7的残基89-98    | QQYNNWPSIT                                                                                                                                                          |
| VH 2.13        | SEQ ID NO.:8             | QVQLQESGPGGLVTPSQTL <del>SL</del><br>TCTVSGGSISSGGHYWTWIR<br>QHPGKGLEWIGYIYYSGSTY<br>YNPSLKSRLTISVDTSKNQF<br>SLKLSSVAAADTAVYYCARD<br>RGGSGSYWDYWGQGLTVTS<br>S       |
| VH 2.13 CDR-H1 | SEQ ID NO.: 8的残基31-37    | SGGHYWT                                                                                                                                                             |
| VH 2.13 CDR-H2 | SEQ ID NO.: 8的残基52-67    | YIYYSGSTYYNPSLKS                                                                                                                                                    |
| VH 2.13 CDR-H3 | SEQ ID NO.: 8的残基100-110  | DRGGSGSYWDY                                                                                                                                                         |
| VL 2.13        | SEQ ID NO.:9             | EIVLTQSPGTL <del>SL</del> SPGERAT<br>LSCRGSRSVSSGYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYGV <del>SIRAT</del> GIP<br>DRFSGSGSGTDFTLTISRLE<br>PEDFAVYYCQQYHGSPLTFG<br>GGTKVEIKR         |
| VL 2.13 CDR-L1 | SEQ ID NO.: 9的残基24-35    | RGSRSVSSGYLA                                                                                                                                                        |
| VL 2.13 CDR-L2 | SEQ ID NO.: 9的残基21-27    | GV <del>SIRAT</del>                                                                                                                                                 |
| VL 2.13 CDR-L3 | SEQ ID NO.: 9的残基90-98    | QQYHGSPLT                                                                                                                                                           |
| VH 2.3         | SEQ ID NO.:10            | QVQLQESGPGGLVKPSETLSL<br>TCTVSGGSIRNYYWSWIRQP<br>PGKGLEWVGYYSSGSTNYN<br>PSLKS <del>RV</del> TISVDTSKNQFSL<br>KLSSVTAADTAVYYCARDRG<br>GASFFDYWGQGLTVTVSS             |
| VH 2.3 CDR-H1  | SEQ ID NO.: 10的残基31-35   | NY <del>YWS</del>                                                                                                                                                   |
| VH 2.3 CDR-H2  | SEQ ID NO.: 10的残基50-65   | YIYSSGSTNYNPSLKS                                                                                                                                                    |
| VH 2.3 CDR-H3  | SEQ ID NO.: 10的残基98-107  | DRGGASFFDY                                                                                                                                                          |
| VL 2.3         | SEQ ID NO.:11            | DIQMTQSPSSLSASIGDRVT<br>ITCRASQIIGGYLNWYQQRP<br>GKAPKFLIYSTSILQSGVPS<br>RFSGSGSGTDFTLT <del>ISS</del> LQP<br>EDFATYYCQQT <del>YIT</del> PPTFGP<br>GTKVDIKR          |
| VL 2.3 CDR-L1  | SEQ ID NO.: 11的残基24-34   | RASQIIGGYLN                                                                                                                                                         |
| VL 2.3 CDR-L2  | SEQ ID NO.: 11的残基50-56   | STSILQS                                                                                                                                                             |
| VL 2.3 CDR-L3  | SEQ ID NO.: 11的残基89-97   | QQT <del>YIT</del> PPT                                                                                                                                              |
| VH 215         | SEQ ID NO.:12            | QVQLQESGPGGLVKPSQTL <del>SL</del><br>TCTVSGGSINSGDYWSWIR<br>QHPGKGLEWIGHISYRGTTY<br>YNPSLKS <del>RV</del> TISVDTSKNQF<br>SLKLSSVTAADTAVYCCARD<br>RGGGFFDLWGRGTLTVSS |
| VH 215 CDR-H1  | SEQ ID NO.: 12的残基31-37   | SGDYWS                                                                                                                                                              |
| VH 215 CDR-H2  | SEQ ID NO.: 12的残基52-67   | HSYRGTTYNPSLKS                                                                                                                                                      |
| VH 215 CDR-H3  | SEQ ID NO.: 12的残基100-108 | DRGGGFFDL                                                                                                                                                           |

| 蛋白质<br>蛋白质区   | 序列标识                    | 序列<br>12345678901234567890                                                                                                                       |
|---------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VL 215        | SEQ ID NO.:13           | EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT<br>LSCRASRSLSSGYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYGASIRATGIP<br>DRFSGSGSATDFTLTISRLE<br>PEDFAVYYCQQYNYSPLTFG<br>GGTRVEINR               |
| VL 215 CDR-L1 | SEQ ID NO.:13的残基24-35   | RASRSLSSGYLA                                                                                                                                     |
| VL 215 CDR-L2 | SEQ ID NO.:13的残基51-57   | GASIRAT                                                                                                                                          |
| VL 215 CDR-L3 | SEQ ID NO.:13的残基90-98   | QQYNYSPLT                                                                                                                                        |
| VH 231        | SEQ ID NO.:14           | EVQLVESGGGSGVQPRGSLRL<br>SCAASGFTFSSYSMNWVRQA<br>PGKGLEWVSFYSSSGGIYY<br>ADSVKGRFTISRDNKNSLY<br>LQMNSLRDEDTAVYYCARD<br>SSGYYPYFFDYWGQGTLLTV<br>SS |
| VH 231 CDR-H1 | SEQ ID NO.:14的残基31-35   | SYSMN                                                                                                                                            |
| VH 231 CDR-H2 | SEQ ID NO.:14的残基50-66   | YFSSSGGIYYADSVKG                                                                                                                                 |
| VH 231 CDR-H3 | SEQ ID NO.:14的残基99-111  | DDSSGYYPYFFDY                                                                                                                                    |
| VL 231        | SEQ ID NO.:15           | DIVMTQSPDSLAVSLGERAT<br>INCKSSQTVLYRSNNKNYLA<br>WYQQKSGQPPKLLIYWASTR<br>ESGVPDRFSGSGSGTDTLT<br>ISSLQAEDVAVYYCQQYYST<br>PLTFGGGGTKVEIKR           |
| VL 231 CDR-L1 | SEQ ID NO.:15的残基24-40   | KSSQTVLYRSNNKNYLA                                                                                                                                |
| VL 231 CDR-L2 | SEQ ID NO.:15的残基56-62   | WASTRES                                                                                                                                          |
| VL 231 CDR-L3 | SEQ ID NO.:15的残基95-103  | QQYYSTPLT                                                                                                                                        |
| VH 251        | SEQ ID NO.:16           | QLQLQESGPGLVKPSSETLSL<br>TCTVSGGSISRVYYWGWR<br>QPPGKLEWIGSIYYSGSTY<br>YNPSLKSRTISVDASKNQF<br>SLKLSSVTAADTAIYYCARE<br>DSSAWVFEHWGQGTLLTVSS        |
| VH 251 CDR-H1 | SEQ ID NO.:16的残基31-37   | SRVYYWG                                                                                                                                          |
| VH 251 CDR-H2 | SEQ ID NO.:16的残基52-67   | SIYYSGSTYYNPSLKS                                                                                                                                 |
| VH 251 CDR-H3 | SEQ ID NO.:16的残基100-109 | EDSSAWVFEH                                                                                                                                       |
| VL 251        | SEQ ID NO.:17           | EIVLTQSPDTLSLSPGERAT<br>LSCRASHILSRNYLAWYQQK<br>PGQAPRLLMYGISIRATGIP<br>DRFSGSGSGADFTLTINRLE<br>PEDFAVYYCQHYDNSLCSFG<br>QGKLEVKR                 |
| VL 251 CDR-L1 | SEQ ID NO.:17的残基24-35   | RASHILSRNYLA                                                                                                                                     |
| VL 251 CDR-L2 | SEQ ID NO.:17的残基51-57   | GISIRAT                                                                                                                                          |
| VL 251 CDR-L3 | SEQ ID NO.:17的残基90-98   | QHYDNSLCS                                                                                                                                        |

| 蛋白质<br>蛋白质区   | 序列标识                    | 序列                                                                                                                                                     |
|---------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                         | 12345678901234567890                                                                                                                                   |
| VH 268        | SEQ ID NO.:18           | QVQLVESGGGVVQPGRSLRL<br>SCAASGFTFRNYGLHWVRQA<br>PGKGLEWVAVIWDGSKNYYY<br>ADSVKGRFTISRDNKNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCARES<br>YYYYGMDVWGQGTTVTVSS             |
| VH 268 CDR-H1 | SEQ ID NO.:18的残基31-35   | NYGLH                                                                                                                                                  |
| VH 268 CDR-H2 | SEQ ID NO.:18的残基20-26   | VIWYDGSNKYYADSVKG                                                                                                                                      |
| VH 268 CDR-H3 | SEQ ID NO.:18的残基99-108  | ESYYYYGMDV                                                                                                                                             |
| VL 268        | SEQ ID NO.:19           | EIVMTQSPATLSVSPGERAT<br>LSCRASQSFNSNLVWYQQKP<br>GQAPRLLIYGASTRATGIPA<br>RFSGSGSGTEFTLTISLSQS<br>EDFAVYYCQYNNWTWTFGQ<br>GTKVEIKR                        |
| VL 268 CDR-L1 | SEQ ID NO.:19的残基24-34   | RASQSFNSNLV                                                                                                                                            |
| VL 268 CDR-L2 | SEQ ID NO.:19的残基50-56   | GASTRAT                                                                                                                                                |
| VL 268 CDR-L3 | SEQ ID NO.:19的残基89-97   | QYNNWTWT                                                                                                                                               |
| VH 336        | SEQ ID NO.:20           | QVQLQESGPGLVKPSQTLST<br>TCTVSGGSINSGDYYWSWIR<br>QHPGKLEWIGHISYRGTTY<br>YNPSLKSRTISVDTSKNQF<br>SLKLSSVTAADTAVYCCARD<br>RGGGFFDLWGRGTLTVTVSS             |
| VH 336 CDR-H1 | SEQ ID NO.:20的残基31-35   | SGDYYWS                                                                                                                                                |
| VH 336 CDR-H2 | SEQ ID NO.:20的残基52-67   | HISYRGTTYNNPSLKS                                                                                                                                       |
| VH 336 CDR-H3 | SEQ ID NO.:20的残基100-108 | DRGGGFFDL                                                                                                                                              |
| VL 336        | SEQ ID NO.:21           | EIVLTQSPGTLSLSPGERAT<br>LSCRASQSVSSGYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYGASIRATGIP<br>DRFSGSGSATDFTLTISRLE<br>PEDFAVYYCQYGYSPLTFG<br>GGTRVEINR                       |
| VL 336 CDR-L1 | SEQ ID NO.:21的残基24-35   | RASQSVSSGYLA                                                                                                                                           |
| VL 336 CDR-L2 | SEQ ID NO.:21的残基51-57   | GASIRAT                                                                                                                                                |
| VL 336 CDR-L3 | SEQ ID NO.:21的残基90-98   | QYGYSPLT                                                                                                                                               |
| VH 351        | SEQ ID NO.:22           | QVQLVESGGGVVQPGRSLRL<br>SCAASGFTFSHYGMHWVRQA<br>PGKGLEWVAVISYDGRNKYY<br>VDSVKGRFTISRDNKNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVFYCAREK<br>GGSGWPPFYYYYGMDVWGQG<br>TTVTVSS |
| VH 351 CDR-H1 | SEQ ID NO.:22的残基31-35   | HYGMH                                                                                                                                                  |
| VH 351 CDR-H2 | SEQ ID NO.:22的残基50-66   | VISYDGRNKYYVDSVKG                                                                                                                                      |
| VH 351 CDR-H3 | SEQ ID NO.:22的残基99-116  | EKGSGWPPFYYYYGMDV                                                                                                                                      |

| 蛋白质<br>蛋白质区   | 序列标识                    | 序列<br>12345678901234567890                                                                                                                        |
|---------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VL 351        | SEQ ID NO.:23           | DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS<br>ISCKSSQNLLYS DGETYLCW<br>YLQKPGQPPQLLIYEVS NRF<br>SGVPERFSGSGSGTDFTLKI<br>SRVEAEDVGIIYCMQNVQLP<br>LTFGGGTRVEIKR           |
| VL 351 CDR-L1 | SEQ ID NO.:23的残基24-39   | KSSQNLLYS DGETYLC                                                                                                                                 |
| VL 351 CDR-L2 | SEQ ID NO.:23的残基55-61   | EVS NRF S                                                                                                                                         |
| VL 351 CDR-L3 | SEQ ID NO.:23的残基94-102  | MQNVQLPLT                                                                                                                                         |
| VH 413        | SEQ ID NO.:24           | QTQLQESGPGLVKPS ETL SL<br>TCTVSGGSIS SRVYYWGWIR<br>QPPGKGLEWIGSIYYSGSTY<br>YSPSLKSRVTISVDTSKNQF<br>SLKLSSVTAADTAIYYCARE<br>DSSAWVFEHWGQGT LVT VSS |
| VH 413 CDR-H1 | SEQ ID NO.:24的残基31-37   | SRVYYWG                                                                                                                                           |
| VH 413 CDR-H2 | SEQ ID NO.:24的残基52-67   | SIYYSGSTIYSPSLKS                                                                                                                                  |
| VH 413 CDR-H3 | SEQ ID NO.:24的残基100-109 | EDSSAWVFEH                                                                                                                                        |
| VL 413        | SEQ ID NO.:25           | EIVLTQSPDTLSLSPGERAT<br>LSCRASQILSRNYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYGISIRATGIP<br>DRFSGSGSGADFTLTINRLE<br>PEDFAVYYCQHYDNSLCSFG<br>QG TKLEVKR                |
| VL 413 CDR-L1 | SEQ ID NO.:25的残基24-35   | RASQILSRNYLA                                                                                                                                      |
| VL 413 CDR-L2 | SEQ ID NO.:25的残基51-57   | GISIRAT                                                                                                                                           |
| VL 413 CDR-L3 | SEQ ID NO.:25的残基90-98   | QHYDNSLCS                                                                                                                                         |
| VH 435        | SEQ ID NO.:26           | QLQLQESGPGLVKPS ETL SL<br>TCTVSGGSIDSRIYYWGWIR<br>QPPGKGLEWIGSIYYRGSTY<br>YNPSLKSRVTISVDTPKNQF<br>SLKLNSVTAADTAVYYCARE<br>DSSAWVFDYWGQGT LAT VSS  |
| VH 435 CDR-H1 | SEQ ID NO.:26的残基31-37   | SRIYYWG                                                                                                                                           |
| VH 435 CDR-H2 | SEQ ID NO.:26的残基51-67   | SIYYRGSTIYNPSLKS                                                                                                                                  |
| VH 435 CDR-H3 | SEQ ID NO.:26的残基100-109 | EDSSAWVFDY                                                                                                                                        |
| VL 435        | SEQ ID NO.:27           | EIVLTQSPGTL SLSPGERAT<br>LSCRASQSVRN NYLNWYQQK<br>PGQAPRLLIYGAFSRATGIP<br>DRFSGSGSGTDFTLTISSLE<br>PEDFVYYCQYGN SIDSFG<br>QG TKLEINR               |
| VL 435 CDR-L1 | SEQ ID NO.:27的残基24-35   | RASQSVRN NYLN                                                                                                                                     |
| VL 435 CDR-L2 | SEQ ID NO.:27的残基51-57   | GAFSRAT                                                                                                                                           |
| VL 435 CDR-L3 | SEQ ID NO.:27的残基90-98   | QYGN SIDS                                                                                                                                         |

| 蛋白质<br>蛋白质区   | 序列标识                    | 序列                                                                                                                                                                                              |
|---------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                         | 12345678901234567890                                                                                                                                                                            |
| <b>VH 444</b> | <b>SEQ ID NO.:28</b>    | <b>QVQLQESGPGLVKPSQTL</b><br><b>SL</b><br><b>TCTVSGGSINSGDYWSYIR</b><br><b>QHPGKGLEWIGHISYRGTTY</b><br><b>YNPSLKSRVTISVDTSKNQF</b><br><b>SLKLSSVTAADTAVYCCARD</b><br><b>RGGGFFDLWGRGTLTVSS</b>  |
| VH 444 CDR-H1 | SEQ ID NO.:28的残基31-37   | SGDYWS                                                                                                                                                                                          |
| VH 444 CDR-H2 | SEQ ID NO.:28的残基52-67   | HISYRGTTYYNPSLKS                                                                                                                                                                                |
| VH 444 CDR-H3 | SEQ ID NO.:28的残基100-108 | DRGGGFFDL                                                                                                                                                                                       |
| <b>VL 444</b> | <b>SEQ ID NO.:29</b>    | <b>EIVLTQSPGTLSPGERAT</b><br><b>LSCRASQSVSSGYLAWYQRK</b><br><b>PGQAPRLLIYGTISRATGIP</b><br><b>DRFSGSGSATDFTLSISRLG</b><br><b>PEDFAVYYCQYGYSPFTFG</b><br><b>GGTRVEINR</b>                        |
| VL 444 CDR-L1 | SEQ ID NO.:29的残基24-35   | RASQSVSSGYLA                                                                                                                                                                                    |
| VL 444 CDR-L2 | SEQ ID NO.:29的残基51-57   | GTSIRAT                                                                                                                                                                                         |
| VL 444 CDR-L3 | SEQ ID NO.:29的残基90-98   | QYGYSPFT                                                                                                                                                                                        |
| <b>VH 478</b> | <b>SEQ ID NO.:30</b>    | <b>QVQLQESGPGLVKPSQTL</b><br><b>SL</b><br><b>TCTVSGGSISSGGHYWSWIR</b><br><b>QHPGKGLEWIGYIYSGSTH</b><br><b>YNPSLKSRVTISVDTSKNQF</b><br><b>SLKLRSVSAADTAGYYCASL</b><br><b>YNGNGYFDLWGRGTLTVSS</b> |
| VH 478 CDR-H1 | SEQ ID NO.:30的残基31-37   | SGGHYWS                                                                                                                                                                                         |
| VH 478 CDR-H2 | SEQ ID NO.:30的残基52-67   | YIYSGSTHYNPSLKS                                                                                                                                                                                 |
| VH 478 CDR-H3 | SEQ ID NO.:30的残基99-109  | SLYNGNGYFDL                                                                                                                                                                                     |
| <b>VL 478</b> | <b>SEQ ID NO.:31</b>    | <b>EIVLTQSPGTLSPGERAT</b><br><b>LSCRASQSISSGYLAWYQQK</b><br><b>PGQAPRLIIYGVSRRTATGIP</b><br><b>DRFSGSGSGADFTLTISRDL</b><br><b>PEDFVYYCQYGFSPFTFG</b><br><b>GGTKVEIKR</b>                        |
| VL 478 CDR-L1 | SEQ ID NO.:31的残基24-35   | RASQSISSGYLA                                                                                                                                                                                    |
| VL 478 CDR-L2 | SEQ ID NO.:31的残基51-57   | GVSRRAT                                                                                                                                                                                         |
| VL 478 CDR-L3 | SEQ ID NO.:31的残基90-98   | QYGFSPFT                                                                                                                                                                                        |
| <b>VH 521</b> | <b>SEQ ID NO.:32</b>    | <b>QLQLQESGPGLVKPSETLSL</b><br><b>TCTVSGGSISRSYDWGWIR</b><br><b>QPPGKGLEWIGSIYYRGSTY</b><br><b>YNPSLKSRVTISVDTSKNQF</b><br><b>SLKLSSVTAADTAVYYCARE</b><br><b>YSTTWSIDYWGQGTTLTVSS</b>           |
| VH 521 CDR-H1 | SEQ ID NO.:32的残基31-37   | RSYDWG                                                                                                                                                                                          |
| VH 521 CDR-H2 | SEQ ID NO.:32的残基52-67   | SIYYRGSTYYNPSLKS                                                                                                                                                                                |
| VH 521 CDR-H3 | SEQ ID NO.:32的残基100-109 | EYSTTWSIDY                                                                                                                                                                                      |

| 蛋白质<br>蛋白质区   | 序列标识                     | 序列<br>12345678901234567890                                                                                                                               |
|---------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VL 521        | SEQ ID NO.:33            | ENVLTQSPGTLSSLSPGERAT<br>LSCRASQSIRNNYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIHGASSRATGIP<br>DRFGSGSGTDFTLTISRLE<br>PEDFAVYFCQQYGNSIITFG<br>PGTKVDVNR                        |
| VL 521 CDR-L1 | SEQ ID NO.: 33的残基24-35   | RASQSIRNNYLA                                                                                                                                             |
| VL 521 CDR-L2 | SEQ ID NO.: 33的残基51-57   | GASSRAT                                                                                                                                                  |
| VL 521 CDR-L3 | SEQ ID NO.: 33的残基90-98   | QQYGNSIIT                                                                                                                                                |
| VH 550        | SEQ ID NO.:34            | QVQLQESGPGLVKPSQTLSSL<br>TCTVSGGSINSGGYWSWIR<br>QHPGKGLEWIGHISYRGTTY<br>SNPSLKSRVTISVDTSKNQF<br>SLKLSSVTAADTAVYYCARD<br>RGGGFFDLWGRGTLTVSS               |
| VH 550 CDR-H1 | SEQ ID NO.: 34的残基31-37   | SGGYWS                                                                                                                                                   |
| VH 550 CDR-H2 | SEQ ID NO.: 34的残基52-67   | HISYRGTTYSNPSLKS                                                                                                                                         |
| VH 550 CDR-H3 | SEQ ID NO.: 34的残基100-108 | DRGGGFFDL                                                                                                                                                |
| VL 550        | SEQ ID NO.:35            | EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT<br>LSCRASQSVNSGYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYGVSIRATDIP<br>DRFSGSGSATDFTLTISRLE<br>PEDFAVYYCQQYGFSPITFG<br>GGTRVEINR                       |
| VL 550 CDR-L1 | SEQ ID NO.: 35的残基24-35   | RASQSVNSGYLA                                                                                                                                             |
| VL 550 CDR-L2 | SEQ ID NO.: 35的残基51-57   | GVSIRAT                                                                                                                                                  |
| VL 550 CDR-L3 | SEQ ID NO.: 35的残基90-98   | QQYGFSPIT                                                                                                                                                |
| VH 581        | SEQ ID NO.:36            | QVQLVESGGGVVQPGSRSLRL<br>SCAASGFTFSHCGMHWVRQA<br>PGKGLEWVAVISYDGSNKYY<br>ADSVKGRFTISRDNKNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCAKDH<br>GGSGSPFFYYYYGMDVWGQG<br>TFTVTVSS |
| VH 581 CDR-H1 | SEQ ID NO.: 36的残基31-35   | HCGMH                                                                                                                                                    |
| VH 581 CDR-H2 | SEQ ID NO.: 36的残基50-66   | VISYDGSNKYYADSVKG                                                                                                                                        |
| VH 581 CDR-H3 | SEQ ID NO.: 36的残基99-116  | DHGGSGSPFFYYYYGMDV                                                                                                                                       |
| VL 581        | SEQ ID NO.:37            | DILMTQTPLSLSVTPGQPAS<br>ISCKSSQSLHGDGKTYLYW<br>YLQKPGQPPQFLIQELSNRF<br>SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI<br>SRXEAEDVGVYYCMQSLQLP<br>LTFGGGTKVQIKR                     |
| VL 581 CDR-L1 | SEQ ID NO.: 37的残基24-39   | KSSQSLHGDGKTYLY                                                                                                                                          |
| VL 581 CDR-L2 | SEQ ID NO.: 37的残基55-61   | ELSNRFS                                                                                                                                                  |
| VL 581 CDR-L3 | SEQ ID NO.: 37的残基94-102  | MQSLQLPLT                                                                                                                                                |

| 蛋白质<br>蛋白质区    | 序列标识                    | 序列                                                                                                                                              |
|----------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                |                         | 12345678901234567890                                                                                                                            |
| VH 7.5         | SEQ ID NO.:38           | QVQLVESGGGVVQPGRSLRL<br>SCAASGFTFSYYGMHWVRQA<br>PGKGLEWVAVIWDGRNKYY<br>ADSVKGRVTISRDN SKKTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCAREG<br>GYYYGMDVWGQGT TTVTVSS   |
| VH 7.5 CDR-H1  | SEQ ID NO.: 38的残基31-35  | YYGMH                                                                                                                                           |
| VH 7.5 CDR-H2  | SEQ ID NO.: 38的残基50-66  | VIWYDGRNKYYADSVKG                                                                                                                               |
| VH 7.5 CDR-H3  | SEQ ID NO.: 38的残基99-108 | EGGYYYGMDV                                                                                                                                      |
| VL 7.5         | SEQ ID NO.:39           | EILLTQSPGTL SLSPGERAT<br>LSCRASQNVSSSYLA WYQQN<br>PGQAPRL LIYGASSRATGIP<br>DRFSGSGSGTDFTLTISRLE<br>PEDFEVYYCQQSGSSLFTFG<br>PGTKVDIKR            |
| VL 7.5 CDR-L1  | SEQ ID NO.: 39的残基24-35  | RASQNVSSSYLA                                                                                                                                    |
| VL 7.5 CDR-L2  | SEQ ID NO.: 39的残基51-57  | GASSRAT                                                                                                                                         |
| VL 7.5 CDR-L3  | SEQ ID NO.: 39的残基90-98  | QQSGSSLFT                                                                                                                                       |
| VH 2.11        | SEQ ID NO.:40           | QVQLQESGPGLVKPSQTL SL<br>TCTVSGGSIRSGDHYWTWIR<br>QHHPGKLEWIGHIYYSGSTY<br>YNPSLKSRLTISIDTSKNQF<br>SLKLSSVTAADTAVYYCARD<br>YGGNGYFDYWGQGT LTVTVSS |
| VH 2.11 CDR-H1 | SEQ ID NO.: 40的残基31-37  | SGDHYWT                                                                                                                                         |
| VH 2.11 CDR-H2 | SEQ ID NO.: 40的残基52-67  | HIYYSGSTYYNPSLKS                                                                                                                                |
| VH 2.11 CDR-H3 | SEQ ID NO.: 40的残基97-109 | CARDYGGNGYFDY                                                                                                                                   |
| VL 2.11        | SEQ ID NO.:41           | DIVMTQTPLSLPVTPGEPAS<br>ISCRSSQSLLDSDDGNTYLD<br>WYLQKPGQSPQLLIYTL SYR<br>ASGVDPDRFSGSGSGTDFTLN<br>ISRVEAEDVGVYYCMQRIEF<br>PITFGQGT RLEIKR       |
| VL 2.11 CDR-L1 | SEQ ID NO.: 41的残基24-40  | RSSQSLLDSDDGNTYLD                                                                                                                               |
| VL 2.11 CDR-L2 | SEQ ID NO.: 41的残基56-62  | TL SYRAS                                                                                                                                        |
| VL 2.11 CDR-L3 | SEQ ID NO.: 41的残基95-103 | MQRIEFPIT                                                                                                                                       |

上面分离的抗-IL-18 抗体 CDR 序列确立了根据本发明分离的并且包括下面表 2 列出的 CDR 序列的多肽的 IL-18 结合蛋白的新家族。为了制备和选择具有优选 IL-18 结合和 / 或中和活性的本发明的 CDR, 可以使用本领域公知的标准方法来制备本发明的结合蛋白并且评价那些结合蛋白的 IL-18 结合和 / 或中和特征, 包括但不限于这里具体描述的那些。

表 2: 共有 IL-18 CDR 亲和配体 (下面列出每个氨基酸位置可供选择的残基; -表示残基可以不存在)。

| CDR 区  | 序列标识          | 共有序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CDR-H1 | SEQ ID NO.:42 | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub><br>S Y W I G - -<br>N G G H Y W T<br>H R Y W S S<br>R S D Y N G<br>Y C S M H<br>V L<br>I D                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| CDR-H2 | SEQ ID NO.:43 | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> X <sub>17</sub><br>F I Y P G D S E T R Y S P T F Q -<br>Y F S Y S G T T Y Y N P S L K S G<br>H W S R G I N S S A D S V K<br>S D R N I V<br>V K<br>H                                                                              |
| CDR-H3 | SEQ ID NO.:44 | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> X <sub>17</sub> X <sub>18</sub><br>V G S G W Y P Y T - - - - -<br>D R G S S G S F W F D I Y Y G M D V<br>E D Y Y A S F D D D Y D<br>S S R N G F Y P L Y F Y<br>C K T Y W V M Y H L<br>L D T N G I E V<br>Y W N P Y<br>A V F<br>G |
| CDR-L1 | SEQ ID NO.:45 | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> X <sub>17</sub><br>R A S E S I S S N L A - - - - -<br>K G R I V G G G Y L A K N Y L A<br>S Q T L L Y S N N T Y L C D<br>H N F N R R D V E N T Y<br>R N S G K<br>H D G<br>D                                                       |
| CDR-L2 | SEQ ID NO.:46 | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub><br>T A S T R A T<br>G V F I L Q S<br>S T N E<br>W I S F<br>E L R<br>Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| CDR-L3 | SEQ ID NO.:47 | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub><br>Q Q Y N N W P S - -<br>M H N H G S L L I T<br>Y G Y I T T P T<br>S D Y L D C S<br>R G S I I W<br>V Q F I<br>L F F<br>I E                                                                                                                                                                                                      |

#### D. 抗-IL-18 抗体的应用

由于它们与人 IL-18 结合的能力, 本发明的抗-人 IL-18 抗体, 或者

其部分能用来检测人 IL-18 (例如, 生物样品中的, 例如血清或血浆), 利用常规的免疫分析, 例如常用的酶联免疫吸着测定法 (ELISA), 放射免疫测定法 (RIA) 或组织免疫组织化学法。本发明提供检测生物样品中人 IL-18 的方法, 包括使生物样品接触本发明的抗体或抗体部分, 并且检测与 IL-18 结合的抗体 (或抗体部分) 或没有结合的抗体 (或抗体部分), 从而检测生物样品中的人 IL-18。用可检测物质直接或间接标记抗体有利于结合或没有结合的抗体的检测。合适的可检测物质包括各种酶, 非肽基基团, 荧光材料, 发光材料和放射性材料。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶,  $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 合适的非肽基基团复合体的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素; 合适的荧光材料的例子包括 7-羟基香豆素, 荧光素, 荧光素异硫代氰酸酯, 罗丹明, 二氯三嗪基胺荧光素, 丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光材料的例子包括鲁米诺; 合适的放射性材料的例子包括  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , 或  $^{153}\text{Sm}$ 。

供标记抗体可选择的, 通过使用用可检测物质标记的 hIL-18 标准物和没有标记的抗-人 IL-18 抗体的竞争免疫测定能测定生物液体中的人 IL-18。在该项分析中, 生物样品, 标记的 rhIL-18 标准物和抗-人 IL-18 抗体合并, 并且测定与没有标记的抗体结合的标记的 rhIL-18 标准物的量。样品中, 人 IL-18 的量与和抗-人 IL-18 抗体结合的标记的 rhIL-18 标准物的量成反比。

本发明的抗体和抗体部分优选能体外和体内中和人 IL-18 活性。因此, 例如, 在含有 hIL-18 的细胞培养物中, 在 IL-18 与本发明的抗体有交叉反应的人受治疗者中或者其他哺乳动物受治疗者中, 这样的本发明的抗体和抗体部分能用来抑制 hIL-18 活性。在一个实施方案中, 本发明提供抑制 IL-18 活性的方法, 包括使 IL-18 接触本发明的抗体或抗体部分, 使得 IL-18 活性被抑制。优选地, IL-18 是人 IL-18。例如, 在含有或怀疑含有 hIL-18 的细胞培养物中, 向培养基加入本发明的抗体或抗体部分, 抑制培养物中的 hIL-18 活性。

在另一个实施方案中, 本发明提供减小受治疗者 IL-18 活性的方法, 有利地对患有其中 IL-18 活性是有害的疾病或病症的患者减小 IL-18 活性。本发明提供对患有这样的疾病或病症的患者减小 IL-18 活性的方法, 该方法包括对受治疗者施用本发明的抗体或抗体部分, 使得患者

体内 IL-18 活性被减小。

优选地, IL-18 是人 IL-18 并且受治疗者是人受治疗者。或者, 受试者可以是表达能结合本发明的抗体的 IL-18 的哺乳动物。还有, 受治疗者还可以是导入了 hIL-18 的哺乳动物(例如, 通过施用 hIL-18 或者通过 hIL-18 转基因的表达)。为了治疗目的, 可以对人受治疗者施用本发明的抗体。此外, 为了兽医的目的或者作为人疾病的动物模型, 能对表达 IL-18 的非人哺乳动物施用本发明的抗体, 其中抗体能结合。关于后一种情况, 这样的动物模型对于评价本发明的抗体的治疗功效是有用的(例如, 剂量试验和给药持续时间)。

如这里使用的, 术语"其中 IL-18 活性是有害的疾病"意在包括其中已经确诊患有疾病的患者体内存在 IL-18 是或者怀疑是疾病病理原因或者使疾病恶化原因的疾病的因素的疾病或其他病症。因此, 其中 IL-18 活性是有害的疾病是其中预期 IL-18 活性的减小减轻疾病的症状和/或进展的疾病。患有疾病的患者的生物液体中 IL-18 浓度的增加可以证实这种疾病(例如, 患者的血清, 血浆, 滑液等中 IL-18 浓度的增加), 利用例如上述抗-IL-18 抗体能检测。能使用本发明的抗体治疗的疾病的非限制性例子包括下面涉及本发明的抗体的药物组合物的章节中讨论的那些疾病。

#### D. 药物组合物

本发明还提供含有本发明的抗体或其抗原-结合部分和药学可接受载体的药物组合物。在一个实施方案中, 药物组合物进一步含有至少一种用于治疗其中 IL-18 活性是有害的疾病另外的治疗药物。

本发明的抗体和抗体部分能被掺入适合对患者给药的药物组合物中。典型地, 药物组合物含有本发明的抗体或抗体部分和药学可接受载体。这里使用的, "药学可接受载体"包括生理相容的任何和所有溶剂, 分散介质, 抗菌剂和抗真菌剂, 等张剂和吸收延迟剂等。药学可接受载体的例子包括下面的一种或几种: 水, 盐水, 磷酸盐缓冲盐水, 葡萄糖, 甘油, 乙醇等, 以及它们的组合。很多情况下, 组合物中优选含有等张剂, 例如糖, 多元醇, 例如甘露糖醇, 山梨醇或氯化钠。药学可接受载体还包括少量辅助物质, 例如湿润剂或乳化剂, 防腐剂或缓冲液, 它们提高抗体或抗体部分的贮存期或效率。

本发明的抗体和抗体部分能被掺入适合肠胃外给药的药物组合物

中。优选地, 抗体或抗体-部分制备成含有 0.1-250 毫克/毫升 抗体的注射液。注射液包括硬质或琥珀小瓶, 安瓿或预先装填的注射器中的液体或冻干剂型。缓冲剂可以是 L-组氨酸 (1-50mM), 最佳 5-10mM, pH 5.0 至 7.0 (最佳 pH 6.0)。合适的缓冲剂包括但不限于, 琥珀酸钠, 柠檬酸钠, 磷酸钠或磷酸钾。可以用氯化钠来改变 0-300 mM (对于液体剂型最佳 150 mM) 浓度的溶液的毒性。冻干剂型可以含有抗冻剂, 主要是 0-10%蔗糖 (最佳 0.5-1.0%)。其他合适的抗冻剂包括海藻糖和乳糖。冻干剂型可以含有膨胀剂, 主要是 1-10% 甘露糖醇 (最佳 2-4%)。液体和冻干剂型可以含有稳定剂, 主要是 1-50 mM L-甲硫氨酸 (最佳 5-10 mM)。其他合适的膨胀剂包括甘氨酸, 精氨酸, 可以含有 0-0.05% 吐温-80 (最佳 0.005-0.01%)。另外的表面活性剂包括但不限于吐温 20 和 BRIJ 表面活性剂。

本发明的组合物可以是各种各样的剂型。这些包括, 例如, 液体, 半固体和固体剂型, 例如溶液 (例如, 注射液和灌注液), 分散剂或悬浮剂, 片剂, 丸剂, 粉末剂, 脂质体和栓剂。优选剂型取决于想要的给药方式 and 治疗应用。典型优选组合物是注射液或灌注液, 例如与用其他抗体对人被动免疫使用的那些相似的组合物。优选的给药方式是肠胃外 (例如, 静脉内, 皮下, 腹膜内, 肌内)。在优选的实施方案中, 通过静脉内灌注或注射施用抗体。在另一个优选的实施方案中, 通过肌内或皮下施用抗体。

治疗性组合物一般必须是灭菌的并且在制备和贮存条件下是稳定的。组合物可以配制成溶液, 微乳剂, 分散剂, 脂质体, 或者适合高药物浓度的其他有序结构。通过将活性化合物 (即抗体或抗体部分) 与上面例举的成分的一种或组合一起掺入需要量的合适的溶剂, 如果需要, 接着无菌过滤, 能制备灭菌注射液。一般情况下, 通过将活性成分掺入到含有基本分散基质和上面例举的那些的其他成分的无菌赋形剂中来制备分散剂。在无菌情况下, 无菌注射液制剂的冻干粉末剂, 制剂的优选方法是真空干燥和喷雾干燥, 得到活性成分加预先灭菌过滤的溶液的任何附加期望的成分的粉末剂。例如, 通过使用包衣例如卵磷脂, 通过在分散剂情况下保持要求的粒度和通过使用表面活性剂, 能保持溶液的合适的流动性。通过组合物中含有延迟吸收的物质, 例如一硬脂酸盐和明胶, 能使可注射组合物延续吸收。

通过本领域公知的各种方法能施用本发明的抗体和抗体-部分,但是对于很多治疗性应用,优选的给药途径/方式是皮下注射,静脉内注射或输液。如本领域技术人员明白的,给药途径/方式根据预期结果而不同。在一些实施方案中,使用保护化合物抗快速释放的载体可以制备活性化合物制剂,例如控制释放制剂,包括植入物,透皮贴,和微胶囊送药系统。可以使用可生物降解生物匹配聚合物,例如 乙烯醋酸乙烯酯,聚酞类,聚乙二醇酸,胶原,聚原酯,和聚乳酸。这样的制剂的很多制备方法申请了专利或者一般为本领域技术人员公知的。参见,例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, 编著, Marcel Dekker, Inc. , New York, 1978。

在一些实施方案中,本发明的抗体或抗体部分可以例如和惰性稀释剂或可同化可食用载体一起口服给药。化合物(如果期望,和其他成分)还可以在硬或软外壳明胶胶囊中封闭,压制成片,或者直接掺到患者的食物中。对于口服治疗给药,化合物可以与赋形剂混合并且以摄食片剂,口腔片剂,锭剂,胶囊,酞剂,悬浮剂,糖浆,糯米纸囊剂等剂型使用。对于通过肠胃外给药之外的本发明化合物的施用,必需用防止它失活的材料将化合物包衣,或者与化合物共同给药。

还可以向组合物中掺入补充活性化合物。在一些实施方案中,本发明的抗体或抗体部分与用于治疗其中 IL-18 活性是有害的疾病的一种或几种另外的治疗药物共同配制和/或共同给药。例如,本发明的抗-hIL-18 抗体或抗体部分可以与结合其他靶物的一种或几种另外的抗体(例如,结合其他细胞因子或结合细胞表面分子的抗体)共同配制和/或共同给药。此外,本发明的一种或几种抗体可以与上述治疗药物的一种或几种联合使用。这样的联合治疗可以有利地使用较低剂量的施用的治疗药物,从而避免与各种单一治疗相关的可能的毒性或并发症。

在一些实施方案中,抗 IL-18 抗体或者其片段与本领域公知的半保留期伸长赋形剂连接。这样的赋形剂包括但不限于, Fc 结构域, 聚乙二醇, 和葡萄糖。这样的赋形剂描述于, 例如, 美国申请顺序号 No. 09/428, 082 和公开的 PCT 申请 No. WO 99/25044, 它们为了任何目的在此引作参考。

在与各种涉及免疫和炎症元素的疾病相关的病理中, 白介素 18 起着关键作用。这些疾病包括但不限于: 类风湿性关节炎, 骨关节炎,

幼年型慢性关节炎, 脓毒性关节炎, 莱姆关节炎, 银屑病关节炎, 反应性关节炎, 和脓毒性关节炎, 脊椎关节病, 全身红斑狼疮, 局限性回肠炎, 溃疡性结肠炎, 肠炎, 胰岛素依赖性糖尿病, 甲状腺炎, 哮喘, 变态反应疾病, 牛皮癣, 皮炎硬皮病, 移植物抗宿主病, 器官移植排异, 急性或慢性的与器官移植相关的免疫疾病, 肉状瘤病, 动脉粥样硬化, 传播性血管凝固, Kawapapki's 病, Grave's 病, 肾病综合征, 慢性疲劳综合征, Wegener's 肉芽肿病, Henoch-Schoenlein 紫癜, 肾微结节性脉管炎, 慢性活性肝炎, 眼色素层炎, 脓毒性休克, 中毒休克综合征, 脓毒症综合征, 恶病质, 传染病, 由寄生虫引起的疾病, 后天免疫缺陷综合征, 急性横向骨髓炎, Huntington's 舞蹈病, 帕金森病, 老年性痴呆, 中风, 原发肝功能障碍引起的肝硬化, 溶血性贫血, 恶性肿瘤, 心脏衰竭, 心肌梗塞, Addison's 病, 散发性, I 型多腺缺乏和 II 型多腺缺乏, Schmidt's 综合征, 成人(急性)呼吸抑制综合征, 脱发, 脱发斑, 血清反应阴性关节病, 关节病, Reiter's 病, 牛皮癣关节病, 溃疡性结肠关节病, 肠滑膜炎, 衣菌, 鼠疫和沙门氏菌相关关节病, 脊椎关节病, 动脉粥样化疾病/动脉硬化, 特应性变态反应, 自身免疫大疱病, 寻常性天疱疮, 落叶性天疱疮, 类天疱疮, 线性 IgA 病, 自身免疫溶血性贫血, Coombs 阳性溶血性贫血, 后天性恶性贫血, 少年恶性贫血, 肌痛性大脑炎/Royal Free 病, 慢性粘膜皮肤念珠菌病, 巨细胞关节炎, 原发硬化肝炎, 起因不明自身免疫肝炎, 后天性免疫缺陷病综合征, 后天性免疫缺陷相关疾病, 乙肝, 丙肝, 普通各式各样的免疫缺陷(普通各式各样的血丙种球蛋白减少), 膨胀心肌病, 女性不孕症, 卵巢衰竭, 早产卵巢衰竭, 纤维变性肺病, 起因不明的纤维组织形成牙槽炎, 炎后间质肺病, 间质局限性肺炎, 与间质肺病相关的缔结组织疾病, 与肺病相关的混合缔结组织疾病, 与间质肺病相关的全身硬化, 与间质肺病相关的类风湿性关节炎, 与肺病相关的全身红斑狼疮, 与肺病相关的皮肤肌炎/多肌炎, 与肺病相关的 Sjogren's 病, 与肺病相关的僵硬脊椎炎, 结节性脉管炎弥散肺病, 与肺病相关的含铁血黄素沉着病, 药物引起的间质肺病, 纤维化, 辐射纤维化, 闭塞性毛细支气管炎, 慢性嗜酸性肺炎, 淋巴细胞浸润性肺病, 传染病后间质肺病, 痛风关节炎, 自身免疫肝炎, 1-型自身免疫肝炎(典型自身免疫或狼疮样肝炎), 2-型自身免疫肝炎(抗-LKM 抗体肝

炎), 自身免疫介导的低血糖, B型胰岛素抗性微黑棘皮症, 甲状旁腺机能减退, 与器官移植相关的急性免疫疾病, 与器官移植相关的慢性免疫疾病, 骨关节炎, 原发硬化胆管炎, 1型牛皮癣, 2型牛皮癣, 自发性白细胞减少, 自身免疫中性白细胞减少, 肾病 NOS, 肾小球肾炎, 肾 microscopic vasculitis, 莱姆病, 盘形红斑狼疮, 特发性男性不孕症或 NOS, 精液自身免疫性, 多发性硬化(所有亚型), 交感神经眼炎, 缔结组织疾病继发性高血压, Goodpasture's 综合征, 结节性多动脉炎肺动, 急性风湿性发烧, 类风湿性脊椎炎, Still's 病, 全身硬化, Sjogren's 综合征, Takayasu's 病/动脉炎, 自身免疫血小板减少, 特发性血小板减少, 自身免疫甲状腺病, 甲状腺机能亢进, 甲状腺肿自身免疫甲状腺机能亢进(Hashimoto's 病), 萎缩性自身免疫甲状腺机能亢进, 原发性粘液水肿, 晶体抗原性葡萄膜炎, 原发性结节性脉管炎, 白癜风, 急性肝病, 慢性肝病, 酒精性肝硬化, 酒精引起的肝损伤, choleosatatis, 特应性肝病, 药物引起的肝炎, 非酒精性脂肪性肝炎, 变应性变态反应和哮喘, B 族链球菌(GBS)感染, 精神病(例如, 抑郁症和精神分裂症), Th2 型和 Th1 型介导的疾病, 急性和慢性疼痛(不同疼痛类型), 和癌症, 例如肺癌, 乳房癌, 胃癌, 膀胱癌, 结肠癌, 胰腺癌, 卵巢癌, 前列腺癌和直肠癌, 和造血恶性肿瘤(白血病和淋巴瘤)。本发明的人抗体和抗体部分能用来治疗患有自身免疫疾病的患者, 特别是与炎症相关的那些, 包括类风湿性脊椎炎, 变态反应, 自身免疫糖尿病, 自身免疫葡萄膜炎。

优选地, 本发明的抗体或者其抗原-结合部分被用来治疗类风湿性关节炎, Crohn's 病, 多发性硬化, 胰岛素依赖型糖尿病, 糖尿病和牛皮癣。

本发明的抗体, 或抗体部分还可以与用于治疗自身免疫和炎症疾病的一种或几种治疗性药物一起给药。

本发明的抗体或者其抗原-结合部分可以单独使用或联合治疗这样的疾病。应该明白本发明的抗体或者其抗原-结合部分可以单独使用或与附加的药物例如治疗性药物联合, 所述附加的药物由技术人员为了想要的目的来选择。例如, 附加的药物可以是本领域认为用于本发明的抗体治疗的疾病或症状的治疗药物。附加药物也可以是对治疗组合物有益贡献的药物, 例如, 影响组合物粘度的药物。

还应该明白本发明所包括的联合是用于它们想要的目的的那些联合。下面列出的药物是为了详细说明的目的而不是为了限制。作为本发明一部分的联合治疗是本发明的抗体和至少一种选自下面列出的附加药物。联合给药还可以包括一种以上的附加药物，例如两种或三种附加药物，如果如此联合，则形成的组合物能实现它想要的功能。

优选的联合给药是非甾类抗炎药，也称作 NSAIDS，包括象布洛芬的药物。其他优选的联合给药是皮质类固醇，包括氢化泼尼松；当与本发明的抗-IL-18 抗体联合治疗患者时，通过减小甾类剂量能减小甚至消除使用甾类的公知的副作用。本发明的抗体，或抗体部分可以与之联合的用于类风湿性关节炎的治疗药物的非限制性例子包括下面的：细胞因子抑制抗炎药物（CSAIDs）；其他细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂，例如，TNF，LT，IL-1，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-7，IL-8，IL-12，IL-15，IL-16，IL-21，IL-23，干扰素，EMAP-II，GM-CSF，FGF，和 PDGF。本发明的抗体，或其抗原结合部分能与细胞表面分子的抗体联合，细胞表面分子例如 CD2，CD3，CD4，CD8，CD25，CD28，CD30，CD40，CD45，CD69，CD80（B7.1），CD86（B7.2），CD90，CTLA 或它们的配体，包括 CD154（gp39 或 CD40L）。

在自身免疫和接着的炎症级联中不同点，治疗药物优选的联合可能干涉；优选的例子包括 TNF 拮抗剂，象嵌合，人源化或人 TNF 抗体，D2E7，（PCT 公开 No. W097/29131），CA2（Remicade™），CDP 571，和可溶性 p55 或 p75 TNF 受体，其衍生物，（p75TNFRlgG（Enbrel™）或 p55TNFRlgG（Lenercept），还有 TNF  $\alpha$  转化酶（TACE）抑制剂；类似地，IL-1 抑制剂（白介素-1-转化酶抑制剂，IL-1RA 等）对于相同原因是有效的。其他优选联合包括白介素。还有另一个优选联合是自身免疫应答的其他关键起作用者，其作用平行于，依赖于或与 IL-18 功能一致；特别优选的是 IL-12 拮抗剂包括 IL-12 抗体或可溶性 IL-12 受体，或 IL-12 结合蛋白。已经证明 IL-12 和 IL-18 重叠但是功能不同，两者的拮抗剂的联合可能最有效。还有另一个优选的联合是非耗尽抗-CD4 抑制剂。还有其他优选的联合包括共同刺激途径 CD80（B7.1）或 CD86（B7.2）的拮抗剂，包括 抗体，可溶性受体或拮抗剂配体。

本发明的抗体，或其抗原结合部分还可以与下面的药物联合，例如甲氧嘌呤，6-MP，硫唑嘌呤，柳氮磺胺吡啶，美沙拉秦，奥沙拉秦，

氯化喹啉/羟氯喹, pencillamine, 金硫丁二钠(肌内和口服), 硫唑嘌呤, cochlaine, 皮质类固醇(口服, 吸入和局部注射),  $\beta$ -2 腺受体激动剂(沙丁胺醇, 特布他林, 沙美特洛), 黄嘌呤(茶叶碱, 氨茶碱), 色甘酸盐, 萘多罗米, 酮替芬, 阿托品和溴乙东碱, 环孢菌素, FK506, 瑞帕霉素, 霉酚酸酯, 来氟洛米, NSAIDs, 例如, 布洛芬皮质类固醇, 例如, 氢化泼尼松, 磷酸二酯酶抑制剂, 腺苷激动剂, 抗血栓形成剂, 补体抑制剂, 肾上腺素能剂, 干扰通过促炎症细胞因子例如  $\text{TNF}\alpha$  或  $\text{IL-1}$  传导信号的药物(例如 IRAK, NIK, IKK, p38 或 MAP 激酶抑制剂),  $\text{IL-1}\beta$  转化酶抑制剂,  $\text{TNF}\alpha$  转化酶(TACE)抑制剂, T-细胞信号传导抑制剂, 例如激酶抑制剂, 金属蛋白酶抑制剂, 柳氮磺胺吡啶, 硫唑嘌呤, 6-巯基嘌呤, 血管紧张肽转化酶抑制剂, 可溶性细胞因子受体和其衍生物(例如可溶性 p55 或 p75  $\text{TNF}$  受体和衍生物 p75 $\text{TNFRIG}$  (Enbrel<sup>TM</sup> H p55 $\text{TNFRIG}$  (Lenercept) ), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 抗炎细胞因子(例如, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 和  $\text{TGF}\beta$ ), 塞来昔布, 叶酸, 羟氯喹硫酸盐, 罗非克西, etanercept, 英夫单抗, 萘普生, valdecoxib, 柳氮磺胺吡啶, 甲泼尼龙, 美洛昔康, 甲泼尼龙乙酸盐, 金硫丁二钠, 阿司匹林, 去炎松, 待所利德, 丙氧芬, 二巯硫胺/扑热息痛, 叶酸盐, 萘普酮, 二氯酚酸钠, 吡罗昔康, 依托度酸, 双氯芬酸钠, 丙嗪, 氧可酮盐酸盐, 氢可酮二酒石酸盐/扑热息痛, 双氯芬酸钠/米索普特, 芬太尼, anakinra, 人重组体, 曲马朵盐酸盐, 双水杨酯, 舒林酸, 维生素 B12/脂肪酸/维生素 B6, 扑热息痛, 阿仑特罗钠, 氢化泼尼松, 硫酸吗啡, 利多卡因盐酸盐, 消炎痛, 硫酸葡萄糖胺/软骨素, 盐酸阿米替林, 磺胺嘧啶, 盐酸氧可酮/扑热息痛, 盐酸奥洛他定, 米索普特, 萘普生钠, 奥美拉唑, 环磷酰胺, 利妥希玛, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, 抗-IL-12, 抗-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, 和甲基氢化泼尼松。优选的联合包括甲氧嘌呤或来氟洛米, 在中等或严重类风湿性关节炎情况下, 环孢菌素。

本发明的抗体, 或抗体部分能与之联合一起治疗肠炎的治疗药物的非限制性例子包括下面的: budenoside; 表皮生长因子; 环孢菌素, 柳氮磺胺吡啶; 氨基水杨酸盐; 6-巯基嘌呤; 硫唑嘌呤; 甲硝哒唑; 脂

氧合酶抑制剂;美沙拉嗪;奥沙拉嗪;巴柳氮;抗氧化剂;血栓烷抑制剂;IL-1 受体拮抗剂;抗-IL-1 $\beta$  单克隆抗体;抗-IL-6 单克隆抗体;生长因子;弹性蛋白酶抑制剂;吡啶-咪唑化合物;其他人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂,例如, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 和 PDGF。本发明的抗体或者其抗原结合部分能与细胞表面分子的抗体联合,例如 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 或者它们的配基。本发明的抗体或者其抗原结合部分还可以与药物联合,例如与甲氨喋呤, 环孢菌素, FK506, 瑞帕霉素, 霉酚酸酯, 来氟洛米, NSAIDs, 例如, 布洛芬, 皮质类固醇, 例如氢化泼尼松, 磷酸二酯酶抑制剂, 腺苷激动剂, 抗血栓剂, 补体抑制剂, 肾上腺素能剂, 干扰促炎症细胞因子例如 TNF $\alpha$  或 IL-1 传导信号的药物(例如 IRAK, NIK, IKK, p38 或 MAP 激酶抑制剂), IL-1 $\beta$  转化酶抑制剂, TNF $\alpha$  转化酶抑制剂, T-细胞信号传导抑制剂, 例如激酶抑制剂, 金属蛋白酶抑制剂, 柳氮磺胺吡啶, 硫唑嘌呤, 6-巯基嘌呤, 血管紧张肽转化酶抑制剂, 可溶性细胞因子受体和其衍生物(例如可溶性 p55 或 p75 TNF 受体, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 抗炎细胞因子(例如, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 和 TGF $\beta$ )。

本发明的抗体, 或抗原结合部分能与之联合一起治疗 Crohn's 病的治疗药物的优选例子包括下面的: TNF 拮抗剂, 例如, 抗-TNF 抗体, D2E7 (PCT 公开 No. WO97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, TNFR-Ig 构建体, (p75TNFR IgG (ENBREL) 和 p55TNFR IgG (LENERCEPT)) 抑制剂和 PDE4 抑制剂。本发明的抗体, 或其抗原结合部分能与皮质类固醇联合, 例如 budenoside 和地塞米松。本发明的抗体, 或其抗原结合部分还可以与药物例如柳氮磺胺吡啶, 5-氨基水杨酸和奥沙拉嗪, 和干扰炎症细胞因子例如 IL-1 的合成或作用的药物, 例如 IL-1 $\beta$  转化酶抑制剂和 IL-1ra 联合。本发明的抗体, 或其抗原结合部分还可以与 T 细胞信号传导抑制剂使用, 例如, 酪氨酸激酶抑制剂 6-巯基嘌呤。本发明的抗体, 或其抗原结合部分能与 IL-11 联合。本发明的抗体, 或其抗原结合部分能与下面的药物联合: 美沙拉嗪, 泼尼松, 硫唑嘌呤, 巯基嘌呤, 英夫单抗, 甲泼尼龙, 琥珀酸钠, 地芬诺酯/硫酸阿托品, 盐酸洛派丁胺, 甲氨喋呤, 奥美拉唑, 叶酸盐, 环丙

沙星/葡萄糖-水, 重酒石酸二氢可待因酮/扑热息痛, 盐酸四环素, 氟轻松醋酸酯, 甲硝哒唑, 硫贡撒/硼酸, 消胆胺/蔗糖, 盐酸环丙沙星, 硫酸天仙子胺, 盐酸杜冷丁, 盐酸咪达唑仑, 盐酸氧可酮/扑热息痛, 盐酸异丙嗪, 磷酸钠, 新诺明/甲氧苄定, 塞来昔布, 聚丙烯酸树脂, 萘磺酸丙氧芬, 氢化可的松, 多种维他命, 巴柳氮二钠, 磷酸可卡因/扑热息痛, colessevelam 盐酸盐, 维生素 B12, 叶酸, 左氟沙星, 甲泼尼龙, natalizumab 和干扰素- $\gamma$ 。

本发明的抗体, 或抗体部分能与之联合治疗多发性硬化的治疗药物的非限制性例子包括下面的: 皮质类固醇; 氢化泼尼松; 甲泼尼龙; 硫唑嘌呤; 环磷酰胺; 环孢菌素; 甲氨喋呤; 4-氨基吡啶; 替扎尼定; 干扰素- $\beta$  1a (AVONEX; Biogen); 干扰素- $\beta$  1b (BETASERON ; Chiron/Berlex); 干扰素 $\alpha$ -n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), 干扰素- $\alpha$  (Alfa Wassermann/J & J), 干扰素- $\beta$  1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferon  $\alpha$  2b (Enzon/Schering-Plough), 共聚物 1 (Cop-1 ; 格拉太咪尔; Teva Pharmaceutical Industries, Inc. ) ; 高压纯氧; 静脉内免疫球蛋白; 克拉利平; 其他人细胞因子或生长因子和它们的受体的抗体或拮抗剂, 例如, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-23, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 和 PDGF。本发明的抗体或者其抗原结合部分能与细胞表面分子的抗体联合, 例如 CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 或者它们的配基。本发明的抗体或者其抗原结合部分还可以与药物联合, 例如与甲氨喋呤, 环孢菌素, FK506, 瑞帕霉素, 霉酚酸酯, 来氟洛米, NSAIDs, 例如, 布洛芬, 皮质类固醇, 例如氢化泼尼松, 磷酸二酯酶抑制剂, 腺苷激动剂, 抗血栓剂, 补体抑制剂, 肾上腺素能剂, 干扰促炎症细胞因子例如 TNF $\alpha$  或 IL-1 传导信号的药物 (例如 IRAK, NIK, IKK, p38 或 MAP 激酶抑制剂), IL-1 $\beta$  转化酶抑制剂, TACE 抑制剂, T-细胞信号传导抑制剂, 例如激酶抑制剂, 金属蛋白酶抑制剂, 柳氮磺胺吡啶, 硫唑嘌呤, 6-巯基嘌呤, 血管紧张肽转化酶抑制剂, 可溶性细胞因子受体和其衍生物 (例如可溶性 p55 或 p75 TNF 受体, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 抗炎细胞因子 (例如, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 和 TGF $\beta$  )。

本发明的抗体或者其抗原结合部分能与之联合治疗多发性硬化的治疗药物优选例子包括干扰素- $\beta$ ，例如，IFN  $\beta$  1a 和 IFN  $\beta$  1b；格拉太咪尔，皮质类固醇，胱天蛋白酶抑制剂，例如胱天蛋白酶-1 的抑制剂，IL-1 抑制剂，TNF 抑制剂，和 CD40 配体和 CD80 的抗体。

本发明的抗体或者其抗原结合部分还可以与药物联合，例如 alemtuzumab，四氢大麻酚，Unimed，daclizumab，米托蒎醌，xaliproden hydrochloride，4-氨基吡啶，乙酸格拉太咪尔，natalizumab，sinnabidol， $\alpha$ -immunokine NNS03，ABR-215062，AnergiX.MS，趋化因子受体拮抗剂，BBR-2778，calagualine，CPI-1189，LEM（脂质体胶囊米托蒎醌），THC.CBD（类大麻素激动剂）MBP-8298，甲基氢化泼尼松（PDE4 抑制剂），MNA-715，抗-IL-6 受体抗体，neurovax，派非尼酮，allotrap 1258（RDP-1258），sTNF-R1，talampanel，teriflunomide，TGF- $\beta$  2，tiplimotide，VLA-4 拮抗剂（例如，TR-14035，VLA4 Ultrahaler，Antegran-ELAN/Biogen）， $\gamma$  干扰素拮抗剂，IL-4 激动剂。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗咽痛的治疗药物的非限制性例子包括下面的：阿司匹林，硝酸甘油，单硝酸异山梨酯，琥珀酸美托洛尔，阿替洛尔，酒石酸美托洛尔，阿罗地平 磺酸盐，硫氮翁酮 盐酸盐，硝酸异山梨酯，氯吡格雷硫酸氢盐，心痛定，阿托伐他汀 钙，氯化钾，呋塞米，辛伐他汀，盐酸维拉帕米，地高辛，盐酸心得安，卡维地洛，萘诺普利，螺内酯，二氢氯噻，依那普利 马来酸盐，纳多洛尔，雷米普利，依诺肝素 钠，肝素钠，缬沙坦，盐酸甲磺胺心定，降脂异丙酯，ezetimibe，布美他尼，氯沙坦 钾，萘诺普利/二氢氯噻，非洛地平，卡托普利，比索洛尔 富马酸盐。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗关节强硬脊椎炎的治疗药物的非限制性例子包括下面的：布洛芬，二氯酚酸钠和米索普特，萘普生，美洛昔康，消炎痛，二氯酚酸钠，塞来昔布，罗非克西，柳氮磺胺吡啶，甲氧喋呤，硫唑嘌呤，米诺环素，泼尼松，etanercept，英夫单抗。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗哮喘的治疗药物的非限制性例子包括下面的：沙丁胺醇，沙美特罗/氟地松，孟鲁司特 钠，氟地松 丙酸盐，步地奈德，泼尼松，沙美特罗 xinafoate，

levalbuterol 盐酸盐, 硫酸沙丁胺醇/异丙托品, 泼尼松龙磷酸钠, 曲安奈德, 倍氯米松二丙酸盐, 溴化异丙托品, 阿奇霉素, 乙酸吡布特罗, 氢化泼尼松, 无水茶叶碱, 甲泼尼龙钠琥珀酸盐, 克拉霉素, 扎鲁司特, 福莫特罗富马酸盐, 流感病毒疫苗, 甲泼尼龙, 阿莫西林三水合物, 氟尼缩松, 变应性变态反应注射液, 色氨酸钠, 盐酸甲美芳铵, 氟尼缩松/薄荷醇, 阿莫西林/克拉维酸钾, 左氟沙星, 吸入器辅助装置, 愈创甘油醚, 地塞米松钠磷酸盐, 莫西沙星盐酸盐, 盐酸多西环素, 愈创甘油醚/d-消旋啡烷, p-麻黄素/cod/扑尔敏, 加替沙星, 西替利嗪盐酸盐, 糠酸毛他松, 沙美特罗 xinafoate, 退嗽, 头孢氨苄, pe/氢可酮/扑尔敏, 西替利嗪盐酸盐/伪麻黄碱, 苯福林/cod/异丙嗪, 可卡因/异丙嗪, 头孢罗齐, 地塞米松, 愈创甘油醚/假麻黄碱, 扑尔敏/氢可酮, 奈多罗米 钠, 硫酸特布他林, 肾上腺素, 甲泼尼龙, 硫酸奥西那林。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗 COPD 的治疗药物的非限制性例子包括下面的: 硫酸沙丁胺醇/异丙托品, 溴化异丙托品, 沙美特罗/氟地松, 沙丁胺醇, 沙美特罗 xinafoate, 倍氯米松二丙酸盐, 泼尼松, 无水茶叶碱, 甲泼尼龙钠琥珀酸盐, 孟鲁司特 钠, 布地奈德, 福莫特罗 富马酸盐, 曲安奈德, 左氟沙星, 愈创甘油醚, 阿奇霉素, 倍氯米松 二丙酸盐, levalbuterol 盐酸盐, 氟尼缩松, 头孢曲松钠, 阿莫西林三水合物, 加替沙星, 扎鲁司特, 阿莫西林/克拉维酸钾, 氟尼缩松/薄荷醇, 扑尔敏/氢可酮, 硫酸奥西那林, 甲泼尼龙, 糠酸毛他松, p-黄麻碱/cod/扑尔敏, 乙酸吡布特罗, p-黄麻碱/氯雷他定, 硫酸特布他林, tiotropium bromide, (R,R)-福莫特罗, TgAAT, Cilomilast, Roflumilast。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗 HCV 的治疗药物的非限制性例子包括下面的: 干扰素- $\alpha$ -2a, 干扰素- $\alpha$ -2b, 干扰素- $\alpha$ -con1, 干扰素- $\alpha$ -n1, PEG 化干扰素- $\alpha$ -2a, PEG 化干扰素- $\alpha$ -2b, 利巴韦林, PEG 化干扰素- $\alpha$ -2b + 利巴韦林, 熊去氧胆酸, 甘草酸, 胸腺法新, Maxamine, VX-497 和用下面的靶物干扰用来治疗 HCV 的任何化合物: HCV 聚合酶, HCV 蛋白酶, HCV helicase, HCV IRES (内部核糖体进入位点)。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗特发性肺纤维化的治疗

药物的非限制性例子包括下面的: 泼尼松, 硫唑嘌呤, 沙丁胺醇, 秋水仙碱, 硫酸沙丁胺醇, 地高辛,  $\gamma$  干扰素, 甲泼尼龙琥珀酸盐, 劳拉西泮, 呋塞米, 赖诺普利, 硝酸甘油, 螺内酯, 环磷酰胺, 异丙托品, 放线菌素 d, 阿替普酶, 丙酸氟地松, 左氟沙星, 硫酸奥西那林, 硫酸吗啡, 盐酸羟可待酮, 氯化钾, 曲安奈德, 无水他克莫司, 钙, 干扰素- $\alpha$ , 甲氨喋呤, 霉酚酸酯, 干扰素- $\gamma$ -1 $\beta$ 。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗心肌梗塞的治疗药物的非限制性例子包括下面的: 阿司匹林, 硝酸甘油, 酒石酸美托洛尔, 依诺肝素钠, 肝素钠, 氯吡格雷二硫酸盐, 卡维地洛, 阿替洛尔, 硫酸吗啡, 琥珀酸美托洛尔, 法华林钠, 赖诺普利, 单硝酸异山梨酯, 地高辛, 呋塞米, 辛伐他汀, 雷米普利, 替尼普酶, 马来酸依那普利, torsemide, 瑞替普酶, 氯沙坦钾, 盐酸喹那普利, 碳酸镁, 布美他尼, 阿替普酶, 依那普利拉, 胺碘酮盐酸盐, 盐酸替罗非班 m-水合物, 盐酸地尔硫卓, 卡托普利, 依贝沙坦, 缬沙坦, 盐酸普萘洛尔, 福辛普利钠, 盐酸利多卡因, 表非替得, 头孢唑啉钠, 硫酸阿托品, 亮氨酸, 螺内酯, 干扰素, 盐酸索他洛尔, 氯化钾, 琥珀辛酯钠, 盐酸多巴酚丁胺, 阿普唑仑, 普伐他汀 钠, 阿托伐他汀 钙, 盐酸咪达唑仑, 盐酸度冷丁, 硝酸异山梨酯, 肾上腺素, 盐酸多巴胺, 比伐卢定, rosuvastatin, ezetimibe/辛伐他汀, avasimibe, cariporide。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗牛皮癣的治疗药物的非限制性例子包括下面的: 钙泊三烯, 丙酸氯倍他索, 曲安奈德, halobetasol 丙酸盐, 他佐罗汀, 甲氨喋呤, 氟轻松醋酸酯, 增长的倍他米松, 氟轻松, 阿维 A, 焦油香波, 缬草酸倍他米松, 糠酸毛他松, 酮康唑, 普拉莫星/氟轻松, 缬草酸氢化可的松, 氟氢缩松, 豚, 倍他米松, 丙酸氯倍他索/伊莫, 氟地松 丙酸盐, 阿奇霉素, 氢化可的松, 加湿配方, 叶酸, 地奈德, pimecrolimus, 煤焦油, 二乙酸二氟拉松, etanercept folate, 乳酸, 甲氧沙林, hc/bismuthsubgal/znox/resor, 乙酸甲泼尼龙, 强的松, 防晒剂, 哈西奈德, 水杨酸, 蒎林, 新戊酸氟可托龙, 煤提取物, 煤焦油/水杨酸, 煤焦油/水杨酸/硫, 去羟米松, 安定, 润滑药, 氟轻松醋酸酯/润滑药, 矿物油/蓖麻油/na lact, 矿物油/花生油, 石油/十四酸异丙酯, 补骨脂素, 水杨酸, 皂/三溴沙仑, 硫贡撒/硼酸, 塞来昔布, 英夫单抗, 环孢菌素, alefacept,

efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, WB, 柳氮磺胺吡啶。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗牛皮癣关节炎的治疗药物的非限制性例子包括下面的：甲氨喋呤，etanercept，罗非克西，塞来昔布，叶酸，柳氮磺胺吡啶，萘普生，来氟洛米，乙酸甲泼尼龙，消炎痛，硫酸羟氯喹，强的松，舒林酸，渐增的二丙酸倍他米松，英夫单抗，甲氨喋呤，叶酸盐，曲安奈德，二氯酚酸钠，二甲基亚砷，吡罗昔康，双氯芬酸钠，酮洛芬，美洛昔康，甲泼尼龙，萘普酮，托美丁钠，钙泊三烯，环孢菌素，双氯芬酸钠/米索普特，氟轻松醋酸酯，硫酸葡萄糖胺，硫羟苹果酸金钠，氢可酮酒石酸氢酯/扑热息痛，布洛芬，利塞膦酸钠，磺胺嘧啶，硫鸟嘌呤，valdecoxib，alefacept，efalizumab。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗再狭窄的治疗药物的非限制性例子包括下面的：西罗莫司，紫杉醇，everolimus，tacrolimus，ABT-578，扑热息痛。

本发明的抗体或抗体部分能与之联合治疗坐骨神经痛的治疗药物的非限制性例子包括下面的：氢可酮酒石酸氢酯/扑热息痛，罗非克西，盐酸环苯扎林，甲泼尼龙，萘普生，布洛芬，盐酸氧可酮/扑热息痛，塞来昔布，valdecoxib，乙酸甲泼尼龙，强的松，磷酸可卡因/扑热息痛，盐酸曲马朵/扑热息痛，美他沙酮，美洛昔康，美索巴莫，盐酸利多卡因，双氯芬酸钠，加巴喷丁，地塞米松，卡立普多，酮洛酸，氨丁三醇，消炎痛，扑热息痛，安定，萘普酮，盐酸氧可酮，替扎尼定盐酸盐，双氯芬酸钠/米索普特，丙氧芬二硫化胺/扑热息痛，阿司匹林/oxyd/羟可待酮 ter，布洛芬/少量氢可酮，盐酸曲马朵，乙哌乙酸，盐酸丙氧芬，盐酸阿米替林，肌安宁/磷酸可卡因/阿司匹林，硫酸吗啡，多种维他命，萘普生钠，邻甲苯海拉明 柠檬酸盐，替马西洋。

本发明的抗体或抗原结合部分能与之联合治疗 SLE（狼疮）的治疗药物的优选例子包括下面的：NSAIDS，例如，双氯芬酸，萘普生，布洛芬，吡罗昔康，消炎痛；COX2 抑制剂，例如，塞来昔布，罗非克西，valdecoxib；抗疟药，例如，羟氯喹；类固醇，例如，强的松，氢化泼尼松，budenoside，地塞米松；细胞毒素，例如，硫唑嘌呤，环磷酰胺，霉酚酸酯，甲氨喋呤；PDE4 的抑制剂或嘌呤合成抑制剂，例

如 麦考酚酸吗啉乙酯。本发明的抗体或抗原结合部分还可以与下面的药物联合，例如柳氮磺胺吡啶，5-氨基水杨酸，奥沙拉嗪，硫唑嘌呤，和干扰促炎性细胞因子例如 IL-1 的合成，制备或作用的药物，例如胱天蛋白酶 抑制剂，象 IL-1 $\beta$  转化酶抑制剂和 IL-1ra 联合。本发明的抗体，或其抗原结合部分还可以与 T 细胞信号传导抑制剂使用，例如，酪氨酸激酶抑制剂；或瞄准 T 细胞激活分子的分子，例如，CTLA-4-IgG 或抗-B7 家族抗体，抗-PD-1 家族抗体。本发明的抗体或抗原结合部分还可以与 IL-11 或抗-细胞因子抗体联合，例如，fonotolizumab (抗-IFN $\gamma$  抗体)，或抗-受体抗体，例如，抗-IL-6 受体抗体和抗 B-细胞表面分子抗体。本发明的抗体或抗原结合部分还可以与下面的药物联合使用：LJP 394 (abetimus)，减少或灭活 B-细胞的药物，例如，利妥昔玛 (抗-CD20 抗体)，lymphotoxin-B (抗-BlyS 抗体)，TNF 拮抗剂，例如，抗-TNF 抗体，D2E7 (PCT 公开 No. W097/29131；HUMIRA)，CA2 (REMICADE)，CDP 571，TNFR-Ig 构建体，(p75TNFR IgG (ENBREL) 和 p55TNFR IgG (LENERCEPT))。

本发明的药物组合物可以含有"治疗有效量"或"预防有效量"本发明的抗体或抗体部分。"治疗有效量"指实现期望的治疗结果的必需的剂量和给药时间的有效量。本发明的抗体或抗体部分的治疗有效量可以由本领域技术人员确定并且根据个体因素例如疾病状态，年龄，性别和体重，以及抗体或抗体部分激发个体期望的响应的能力而不同。治疗有效量也是其中治疗有益作用比抗体或抗体部分的毒性或有害作用更重要的量。"预防有效量"指实现期望的预防结果的必需的剂量和给药时间的有效量。典型地，在疾病之前或早期使用预防剂量，预防有效量比治疗有效量小。

调节给药方案提供最佳期望响应(例如，治疗或预防响应)。例如，可以施用一次大剂量，也可以在一定时间施用几次分开的剂量，或者根据治疗状况紧急情形显示的，可以相应减小或增加剂量。以易于给药和剂量均匀性的单位剂型配制肠胃外用组合物是特别有利的。这里使用的单位剂型指适合作为要治疗的哺乳动物受治疗者的单一剂量的物理分散的单位；各个单位含有经计算产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物和必需的药物载体。根据 (a) 活性化合物的独特特征和要实现的特定的治疗或预防效果，和 (b) 化合物领域固有的限制如活性化

合物对于个体治疗灵敏性，指示本发明的单位剂型的说明，并且该说明直接根据(a)和(b)。

作为例子，本发明的抗体或抗体部分治疗或预防有效量的非限制范围是0.1-20毫克/千克，更优选1-10毫克/千克。注意，剂量值可以随着要减轻的症状的类型和严重程度而变化。要进一步明白，对于任何特定受治疗者，应该根据个体需要和实施或监督组合物的给与的人的专业判断，随时间调节具体给药方案，这里给出的剂量范围只是例举而不是为了限制要求的组合物的范围或实施。

## II. IL-18 易感基因

IL-18 在巨噬细胞，树突状细胞，星形细胞，小神经胶质细胞，上皮细胞，角质形成细胞，肠上皮细胞，软骨细胞，滑液成纤维细胞和成骨细胞，以及在肾上腺皮质和脑垂体腺中表达。在一些细胞中，例如人单核细胞和树状细胞中，表达是组成型的，而在其他细胞中，一定是重新诱导。

除了 $\gamma$ 干扰素表达之外，对于IL-18单独诱导的或者与其他细胞因子协调的其他基因知之甚少。

本发明的一个实施方案提供了调控感兴趣的基因的基因表达的方法，包括下面的步骤：提供IL-18或IL-18调节剂；使IL-18或调节剂接触细胞，细胞中感兴趣的基因选自下面的表中给出的基因。

表 3 IL-18 易感基因

| Genbank ID | 基因名称   | Unigene备注                                |
|------------|--------|------------------------------------------|
| NM_000389  | p21    | 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A (p21, Cip1)             |
| NM_002198  | IRF1   | 干扰素调控因子1                                 |
| NM_002163  | ICSBP1 | 干扰素共有序列结合蛋白1                             |
| NM_006144  | GZMA   | 粒酶A                                      |
| NM_006515  | SETMAR | SET结构域和mariner转座酶融合基因                    |
| NM_007185  | TNRC4  | 包含三核苷酸重复4                                |
| NM_002288  | LAIR2  | 白细胞-相关Ig-样受体2                            |
| NM_003661  | APOL1  | 载脂蛋白L, 1                                 |
| NM_021958  | HLX1   | H2.0样同源异形框1 (果蝇)                         |
| NM_001335  | CTSW   | 组织蛋白酶W (lymphopain)                      |
| Hs.382006  | FCGR1B | FcRI b形式 (AA 1-344)                      |
| NM_020125  | BLAME  | 亮氨酸氨基肽酶3                                 |
| NM_007210  | GALNT6 | UDP-N-乙酰基- $\alpha$ -D-半乳糖胺              |
| NM_021798  | IL21R  | 白介素21受体                                  |
| NM_013324  | CISH   | 包含细胞因子可诱导SH2-蛋白质                         |
| M11313     | A2M    | $\alpha$ -2-巨球蛋白                         |
| D88152     | ACATN  | 乙酰基辅酶A转运蛋白                               |
| NM_001103  | ACTN2  | 辅肌动蛋白, $\alpha$ 2                        |
| U37519     | ALDH8  | 醛脱氢酶8                                    |
| NM_000697  | ALOX12 | 花生四烯酸12-脂氧合酶                             |
| J03600     | ALOX5  | 花生四烯酸5-脂氧合酶                              |
| NM_014578  | ARHD   | Ras同系物基因家族, 成员                           |
| S66793     | ARR3   | 抑制蛋白3, 视网膜的 (X-抑制蛋白)                     |
| U47054     | ART3   | ADP-核糖基转移酶3                              |
| L19871     | ATF3   | 激活转录因子3                                  |
| M81181     | ATP1B2 | ATP酶, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> 转运 |
| NM_001188  | BAK1   | BCL2-拮抗剂/杀伤者1                            |
| U15460     | BATF   | 碱性亮氨酸拉链转录因子, ATF-样                       |
| NM_014417  | BBC3   | Bcl-2结合成分3                               |
| Z23115     | BCL2L1 | BCL2-样1                                  |
| NM_001713  | BHMT   | 甜菜碱-高半胱氨酸甲基转移酶                           |

|                   |          |                                 |
|-------------------|----------|---------------------------------|
| U45878            | BIRC3    | 包含IAP重复的杆状病毒3                   |
| U37546            | BIRC3    | 包含IAP重复的杆状病毒3                   |
| U72649            | BTG2     | BTG家族, 成员2                      |
| U49187            | C6ORF32  | 染色体6开放读框32                      |
| J03507            | C7       | 补体成分7                           |
| U50360            | CAMK2G   | CaM激酶II $\gamma$                |
| XM_071866         | CAT56    | CAT56蛋白质                        |
| NM_005623         | CCL8     |                                 |
| Z32765            | CD36     | CD36抗原 (胶原I型 / TSP受体)           |
| HG2981-<br>HT3127 | CD44     | CD44抗原                          |
| Z11697            | CD83     | CD83抗原                          |
| XM_071866         | CDR2     | 小脑变性-相关蛋白 (62kD)                |
| U51096            | CDX2     | 尾侧同源异形框转录因子2                    |
| M83667            | CEBPD    | CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP), $\delta$ |
| D87469            | CELSR2   | 钙黏着蛋白, EGF LAG七跨膜区G-型受体2        |
| L07765            | CES1     | 羧酯酶1                            |
| U66468            | CGR11    | 带有EF-HAND的细胞生长调控结构域             |
| X14830            | CHRNB1   | 胆碱能受体, 烟酸, $\beta$ 多肽1          |
| L29217            | CLK3     | CDC-样激酶3                        |
| X15880            | COL6A1   | 胶原, IV型, $\alpha 1$             |
| NM_001851         | COL9A1   | 胶原, IX型, $\alpha 1$             |
| M27691            | CREB1    | CAMP响应元件结合蛋白1                   |
| M37435            | CSF1     | 集落刺激因子1 (巨噬细胞)                  |
| HG3548-<br>HT3749 | CUTL1    | 切 (CCAAT置换蛋白)                   |
| X13589            | CYP19    | 细胞色素P450, 亚家族XIX                |
| X16866            | CYP2D7AP | 细胞色素P450, 亚家族IID                |
| X59131            | D13S106E | 带高电荷蛋白                          |
| NM_004393         | DAG1     | 肌营养不良蛋白聚糖1                      |
| U73328            | DLX4     | distal-less同源异形框4               |
| L19267            | DMWD     | 肌强直性营养不良, WD重复基序                |
| U53445            | DOC1     | 卵巢癌中的负调节1                       |
| X68277            | DUSP1    | 双重特异性磷酸酶1                       |
| U48807            | DUSP4    | 双重特异性磷酸酶4                       |
| NM_001950         | E2F4     | E2F转录因子4, p107/p130-结合          |
| U87269            | E4F1     | E4F转录因子1                        |
| M57730            | EFNA1    | 肝配蛋白-A1                         |
| X52541            | EGR1     | 早期生长响应1                         |
| J04076            | EGR2     | 早期生长响应2 (Krox-20同系物)            |
| X63741            | EGR3     | 早期生长响应3                         |
| L07077            | EHHADH   | 烯酰辅酶A                           |
| M62831            | ETR101   | 即时早期蛋白                          |
| M60830            | EV12B    | 亲嗜性病毒整合位点2B                     |
| U53786            | EVPL     | 外被斑蛋白                           |
| NM_001988         | EVPL     | 外被斑蛋白                           |
| NM_000141         | FCGBP    | IgG结合蛋白的Fc片段                    |
| M23668            | FDX1     | 铁氧化还原蛋白1                        |
| U60062            | FEZ1     | 束状&伸长蛋白质 $\zeta 1$ (zygin 1)    |

|             |          |                                           |
|-------------|----------|-------------------------------------------|
| NM_000141   | FGFR2    | 成纤维细胞生长因子受体2                              |
| U49973      | FLJ10803 | 推定的蛋白质FLJ10803                            |
| U89995      | FOXE1    | Forkhead基因盒(甲状腺转录因子2)                     |
| U27326      | FUT3     | 岩藻糖转移酶3                                   |
| A28102      | GABRA3   | $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)受体                    |
| M25667      | GAP43    | 生长相关蛋白43                                  |
| L34357      | GATA4    | GATA-结合蛋白4                                |
| U19523      | GCH1     | GTP环化水解酶1                                 |
| L01406      | GHRHR    | 生长激素释放激素受体                                |
| U03486      | GJA5     | 间隙连接蛋白, $\alpha$ 5, 40kD(肌联蛋白40)          |
| X68285      | GK       | 甘油激酶                                      |
| Z18859      | GNAT2    | 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白)                           |
| HG870-HT870 | GOLGA3   | 高尔基体自身抗原, 高尔基体亚家族a, 3                     |
| D49958      | GPM6A    | 糖蛋白M6A                                    |
| D43772      | GRB7     | 生长因子受体-结合蛋白7                              |
| AC000099    | GRM8     | 谷氨酸受体, 代谢型8                               |
| M57731      | GRO2     | GRO2致癌基因                                  |
| X53800      | GRO3     | GRO3致癌基因                                  |
| M91036      | HBG2     | 血红蛋白, $\gamma$ G                          |
| D16583      | HDC      | 组氨酸脱羧酶                                    |
| X64877      | HFL3     | H因子(补体)-样3                                |
| X58431      | HOXB6    | 同源异形框B6                                   |
| M16937      | HOXB7    | 同源异形框B7                                   |
| NM_014468   | HPX42B   | 造血祖先同源异形框                                 |
| X92814      | HREV107  | 类似于大鼠HREV107                              |
| L19314      | HRV      | 毛状(果蝇)-同系物                                |
| M26665      | HTN3     | Histatin3                                 |
| D10995      | HTR1B    | 5-羟色胺(血清素)受体1B                            |
| L41147      | HTR6     | 5-羟色胺(血清素)受体6                             |
| M24283      | ICAM1    | 细胞间黏着分子1(CD54)                            |
| S81914      | IER3     | 即时早期响应3                                   |
| J03171      | IFNAR1   | 干扰素( $\alpha$ , $\beta$ 和 $\epsilon$ )受体1 |
| J00219      | IFNG     | 干扰素 $\gamma$                              |
| NM_000619   | IFNG     | 干扰素 $\gamma$                              |
| NM_000585   | IL15     | 白介素15                                     |
| U31628      | IL15RA   | 白介素15受体, $\alpha$                         |
| X04500      | IL1B     | 白介素1, $\beta$                             |
| M27492      | IL1R1    | 白介素1受体, I型                                |
| X01057      | IL2RA    | 白介素2受体, $\alpha$                          |
| M26062      | IL2RB    | 白介素2受体, $\beta$                           |
| Y00081      | IL6      | 白介素6(干扰素, $\beta$ 2)                      |
| Y00787      | IL8      | 白介素8                                      |
| Z31695      | INPP5A   | 肌醇聚磷酸盐-5-磷酸酶, 40kD                        |
| X06256      | ITGA5    | 整联蛋白, $\alpha$ 5                          |
| X57206      | ITPKB    | 肌醇1, 4, 5-三磷酸3-激酶B                        |
| U20734      | JUNB     | 连接B原型致癌基因                                 |
| NM_014879   | KIAA0001 | UDP-葡萄糖的推导的G蛋白偶联受体                        |
| D31762      | KIAA0057 | TRAM-样蛋白质                                 |
| D42038      | KIAA0087 | KIAA0087基因产物                              |

|                   |          |                               |
|-------------------|----------|-------------------------------|
| NM_005551         | KIAA0133 | KIAA0133基因产物                  |
| NM_014846         | KIAA0196 | KIAA0196基因产物                  |
| X06182            | KIT      | V-试剂盒致癌基因同系物                  |
| NM_005551         | KLK2     | 血管舒缓素2, 前列腺的                  |
| X07730            | KLK3     | 血管舒缓素3, (前列腺特异性抗原)            |
| M13955            | KRT7     | 胶原蛋白7                         |
| M57710            | LGALS3   | 凝集素, 半乳糖苷-结合, 可溶性, 3 (半乳凝集素3) |
| S83362            | LIFR     | 白血病抑制因子受体                     |
| NM_002314         | LIMK1    | LIM结构域激酶1                     |
| NM_005569         | LIMK2    | LIM结构域激酶2                     |
| U49957            | LPP      | 包含LIM结构域                      |
| U89922            | LTB      | 淋巴毒素 $\beta$ (TNF超家族, 成员3)    |
| X14008            | LYZ      | 溶菌酶 (肾淀粉样变性)                  |
| U59914            | MADH6    | MAD) 同系物                      |
| D14497            | MAP3K8   | 促细胞分裂剂-激活的蛋白质激酶激酶激酶8          |
| X59727            | MAPK4    | 促细胞分裂剂-激活的蛋白质激酶4              |
| NM_000429         | MAT1A    | 甲硫氨酸腺苷转移酶I, $\alpha$          |
| HG1877-<br>HT1917 | MBP      | 髓磷脂碱性蛋白                       |
| HG3115-<br>HT3291 | MBP      | 髓磷脂碱性蛋白                       |
| U43944            | ME1      | 苹果酶1, NADP(+)-依赖性, 胞质         |
| X72755            | MIG      | $\gamma$ 干扰素诱导的单核因子           |
| NM_021230         | MLL3     | 骨髓/淋巴样或混合血统白血病3               |
| NM_005951         | MT1H     | 金属硫蛋白                         |
| X78710            | MTF1     | 金属-调控转录因子1                    |
| X70991            | NAB2     | NGFI-A结合蛋白2 (ERG1 bp 2)       |
| M32011            | NCF2     | 嗜中性白细胞胞质因子2                   |
| S77763            | NFE2     | 核因子 (类红细胞-产生的), 45kD          |
| M58603            | NFKB1    | 核因子 $\kappa$ B (p105)         |
| S76638            | NFKB2    | 核因子 $\kappa$ B                |
| M69043            | NFKBIA   | 核因子 $\kappa$ B                |
| U91616            | NFKBIE   | 核因子 $\kappa$ B                |
| D86425            | NID2     | 巢蛋白2                          |
| L13740            | NR4A1    | 核受体亚家族4, A族, 成员1              |
| U44848            | NRF1     | 核呼吸因子1                        |
| U79251            | OPCML    | 阿片样物质-结合蛋白/细胞黏合分子-样           |
| HG4115-<br>HT4385 | OR1E3P   | 嗅神经受体                         |
| M27288            | OSM      | 制瘤素M                          |
| AF000234          | P2RX4    | 嘌呤能受体P2X                      |
| D50640            | PDE3B    | 磷酸二酯酶3B, cGMP-抑制的             |
| L20971            | PDE4B    | 磷酸二酯酶4B, cAMP-特异性             |
| L10343            | PI3      | 蛋白酶抑制剂3, 皮肤-产生的 (SKALP)       |
| U77735            | PIM2     | pim-2致癌基因                     |
| NM_003579         | PIP5K2A  | 磷脂酰肌醇-4-磷酸5-激酶                |
| U17034            | PLA2R1   | 磷脂酶A2受体1, 180kD               |
| AB000584          | PLAB     | 前列腺分化因子                       |
| X63131            | PML      | 前髓细胞白血病                       |

|               |          |                                 |
|---------------|----------|---------------------------------|
| D11428        | PMP22    | 外周髓磷脂蛋白质22                      |
| NM_032940     | POLR2C   | 聚合酶(RNA)II多肽                    |
| NM_005035     | POLRMT   | 聚合酶(RNA)线粒体(DNA 方向)             |
| NM_003579     | POU2F2   | POU结构域, 2类, 转录因子2               |
| M18255        | PRKCB1   | 蛋白质激酶C, $\beta$ 1               |
| L01087        | PRKCQ    | 蛋白质激酶C, $\theta$                |
| D38128        | PTGIR    | 前列腺素I2(前列腺环素)受体(IP)             |
| Y10375        | PTPNS1   | 酪氨酸磷酸酶, 非受体酶作用物1                |
| D15049        | PTPRH    | 蛋白质酪氨酸磷酸酶, 受体型, H               |
| M31166        | PTX3     | pentaxin-相关基因                   |
| U59877        | RAB31    | RAB31, 成员 RAS致癌基因家族             |
| NM_003579     | RAD54L   | RAD54(啤酒糖酵母)-样                  |
| U64675        | RANBP2L1 | RAN结合蛋白2-样1                     |
| S57153        | RBBP1    | 成视网膜细胞瘤-结合蛋白1                   |
| NM_002903     | RCV1     | 恢复蛋白                            |
| NG_000013     | RDBP     | RD RNA-结合蛋白                     |
| X75042        | REL      | v-rel                           |
| M83221        | RELB     | v-rel                           |
| NM_000537     | REN      | 肾素                              |
| U22314        | REST     | RE1-缄默转录因子                      |
| S59049        | RGS1     | G-蛋白信号的调节剂1                     |
| U70426        | RGS16    | G-蛋白信号的调节剂16                    |
| U22377        | RLF      | 重排L-myc融合序列                     |
| U38480        | RXRG     | 视网膜样X受体, $\gamma$               |
| L10338        | SCN1B    | 钠通道多肽                           |
| M23178        | SCYA3    | 小的可诱导细胞因子A3                     |
| M69203        | SCYA4    | 小的可诱导细胞因子A4                     |
| NM_005409     | SCYB11   | 小的可诱导细胞因子亚家族B: CXC11            |
| D79206        | SDC4     | 黏结蛋白聚糖4(双栖蛋白聚糖, 抗凝蛋白聚糖)         |
| NM_005065     | SEL1L    | sel-1(lin-12的抑制剂, C. elegans)-样 |
| NM_004186     | SEMA3F   | 脑信号蛋白3F                         |
| J03764        | SERPINE1 | 连接蛋白, 纤溶酶原激活剂抑制剂1型              |
| NM_006802     | SF3A3    | 剪接因子3a, 亚基3, 60kD               |
| HG3925-HT4195 | SFTPA2   | 表面活性剂, 肺-相关蛋白质A2                |
| D89077        | SLA      | Src-样-接头                        |
| NM_003037     | SLAM     | 信号淋巴因子激活分子                      |
| M91463        | SLC2A4   | 可溶性载体家族2葡萄糖转运蛋白                 |
| D82326        | SLC3A1   | 可溶性载体家族3                        |
| L05568        | SLC6A4   | 可溶性载体家族6(血清素)                   |
| U96094        | SLN      | sarcolipin                      |
| X83301        | SMA3     | SMA3                            |
| D21267        | SNAP25   | 突触小体相关蛋白, 25kD                  |
| L31529        | SNTB1    | 肌养蛋白结合蛋白, 肌养蛋白-相关蛋白A1           |
| HG961-HT961   | SOS1     | 无七区(果蝇)同系物1的产物                  |
| M62800        | SSA1     | (52kD, 核糖核蛋白自身抗原SS-A/Ro)        |
| NM_021014     | SSX3     | 滑膜肉瘤, X断点3                      |
| Z35093        | SURF1    | 马荨麻疹1                           |
| NM_005816     | TACTILE  | T细胞激活, 增加的晚期表达                  |

|                   |         |                                 |
|-------------------|---------|---------------------------------|
| L25444            | TAF2E   | TATA盒结合蛋白(TBP)-相关因子             |
| M95787            | TAGLN   | 转凝蛋白                            |
| NM_005421         | TAL2    | T-细胞急性淋巴细胞白血病2                  |
| L47345            | TCEB3   | 转录延长因子B(110kD, 延伸蛋白 A)          |
| M57732            | TCF1    | 肝核因子(HNF1)                      |
| NM_003205         | TCF12   | 螺旋-环-螺旋转录因子4                    |
| M96956            | TDGF1   | 畸形瘤-产生的生长因子1 <sub>ictor 1</sub> |
| U19878            | TMEFF1  | 带有EGF和促滤泡素抑制素样跨膜蛋白              |
| M92357            | TNFAIP2 | 肿瘤坏死因子, $\alpha$ -诱导蛋白2         |
| M59465            | TNFAIP3 | 肿瘤坏死因子, $\alpha$ -诱导蛋白3         |
| X83490            | TNFRSF6 | 肿瘤坏死因子受体成员6                     |
| U37518            | TNFSF10 | 肿瘤坏死因子成员10                      |
| NM_003294         | TPSB1   | 类胰蛋白酶 $\beta$ 1                 |
| U19261            | TRAF1   | TNF受体-相关因子1                     |
| U78798            | TRAF6   | TNF受体-相关因子6                     |
| S69790            | WASF3   | WAS蛋白质家族, 成员3                   |
| U53476            | WNT7A   | wingless-型 MMTV整合位点家族           |
| L15309            | ZNF141  | 锌指蛋白141(克隆pHZ-44)               |
| U78722            | ZNF165  | 锌指蛋白165                         |
| HG4333-<br>HT4603 | ZNF79   | 锌指蛋白79(pT7)                     |
| X57809            |         | $\lambda$ 轻链可变区                 |
| HG3111-<br>HT3287 |         | 未知的人克隆HH409                     |
| U79249            |         | 人克隆23839序列                      |
| AB000464          |         | 克隆: RES4-24A                    |
| HG4593-<br>HT4998 |         | 电压控制钠通道(SCN1A)                  |
| X77744            |         | 人FLJ00032蛋白质, 部分                |
| U79248            |         | 人克隆23826序列                      |
| AI420129          |         | ESTs                            |

实施例3公开了IL-18调控的基因的鉴定方法。这些研究表明IL-18是真实促炎性细胞因子,并且能直接调控编码其他炎性原介质的几种基因的表达。使用人血样的研究表明对于IL-18的很多响应在人群中广泛发生,并且证实了它们作为生物化学标记的用途,以及接着的抗-IL18功能。

IL-18的调节剂可以是激动剂和拮抗剂。优选地,调节剂是结合蛋白或中和结合蛋白。

举例的IL-18抑制剂包括但不限于,结合IL-18的抗体及其片段;结合IL-18R的抗体;结合IL-18RAcP的抗体;IL-18bp;IL-18R片段(例如,IL-18受体的溶解的胞外结构域);结合IL-18并且减小或防止它与IL-18R相互作用的肽;结合IL-18R并且减小或防止它与

IL-18 或 IL-18RAcP 相互作用的肽；结合 IL-18 RAcP 并且减小或防止它与 IL-18R 相互作用的肽；减小或防止 IL-18 产生或者 IL-18, IL-18R, 和 IL-18RAcP 任何一个之间的相互作用的小分子。

下面文献描述了一些 IL-18 抑制剂，例如，1994 年 7 月 14 日公开的美国专利 No. 5,912,324；1999 年 12 月 8 日公开的 EP 0 962531；1994 年 11 月 15 日公开的 EP 712931；1994 年 7 月 14 日公开的美国专利 No. 5,914,253；1997 年 7 月 10 日公开的 WO 97/24441；2000 年 5 月 9 日公开的美国专利 No. 6,060,283；1996 年 12 月 26 日公开的 EP850 952；1998 年 9 月 16 日公开的 EP 864 585；1998 年 9 月 24 日公开的 WO 98/41232；2000 年 4 月 25 日公开的美国专利 No. 6,054,487；1997 年 8 月 14 日公开的 WO 99/09063；1997 年 11 月 3 日公开的 WO 99/22760；1998 年 1 月 23 日公开的 WO 99/37772；1998 年 3 月 20 日公开的 WO 99/37773；2000 年 1 月 26 日公开的 EP 0 974 600；2000 年 3 月 9 日公开的 WO 00112555；1997 年 10 月 31 日公开的日本专利申请 JP 111,399194；1998 年 2 月 8 日公开的以色列专利申请 IL 121554A0；这些文献为了任何目的在此引作参考。

对于本领域技术人员显而易见的是这里描述的本发明的其他合适的修饰和改变是显而易见的，并且不脱离本发明的范围或这里公开的实施方案使用合适的等同物可以进行。在详细描述本发明的基础上，参照下面的实施例，更清楚地理解，实施例只是为了详细说明的目的而不是要限制本发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1: 重组 IL-18 的制备和表征

#### 实施例 1.1 : IL-18 生物活性测定试验

实施例 1 和实施例 2 中，除非另有说明，利用下面的试验测定 IL-18 的生物活性。

#### 实施例 1.1. A: KG-1 生物测定

KG-1 (ATCC # CCL-246) 是组成型表达低水平功能 IL-18 受体的人骨髓单核细胞系。使用 TNF 治疗增量调节这些细胞上功能 IL-18 受体的 IL-18R  $\alpha$  和  $\beta$  亚基。通过 ELISA，将 TNF-处理的 KG-1 细胞与重组

人 IL-18 (rhu-IL-18) 温育进行 KG-1 生物测定, 测定 IL-18-诱导的人 IFN  $\gamma$  产生的水平 (Konishi, K. , 等 (1997) J. Immunol. Methods 209: 187-191)。利用 KG-1 生物测定来测定 IL-18 拮抗剂的中和能力。例如, 抗-IL-18 抗体与不同浓度的 rhu-IL-18 温育, 然后在 37  $^{\circ}\text{C}$  下在 96-孔板中与 TNF-处理的 KG-1 细胞温育 16-18 小时。收集上清液并且通过 ELISA 测定人 IFN  $\gamma$  水平。该项试验测得 IL-18 拮抗剂低至  $4 \times 10^{-11}$  至  $6 \times 10^{-11}$  M 的  $\text{IC}_{50}$  值

#### 实施例 1.1. B: 人全血分析

简要地说, 人全血分析 (WBA) 测定生理学背景下 IL-18 拮抗剂抗天然 IL-18 的中和效力。在各项试验中, 读出的是内源 IL-18-依赖性人 IFN  $\gamma$  产生的抑制。在 37  $^{\circ}\text{C}$  下存在或不存在 IL-18 拮抗剂下, 用 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加 IL-12 (50  $\text{pg}/\text{mL}$ ) 刺激全血。LPS 加 IL-12 刺激之后 18-24 小时通过 ELISA 测定人 IFN  $\gamma$  浓度。

#### 实施例 1.1. C: 受体结合试验

简要地说, 在受体结合试验 (RBA) 中,  $^{125}\text{I}$  标记的 rhu-IL-18 被用来测定 IL-18 与 IL-18 受体的结合。 $^{125}\text{I}$ -rhu-IL-18 特异性结合 TNF 处理的 KG-1 细胞上 IL-18R  $\alpha\beta$  ( $\sim 7,000$  位点/细胞)。. $^{125}\text{I}$ -rhu-IL-18 具有和没有标记的 IL-18 一样的特异活性并且能被没有标记的 IL-18 竞争掉。

定义两种抑制方式, A 和 B。在中和模式 A 中, IL-18 与高亲和性 IL-18 受体 (IL-18R  $\alpha\beta$ ) 的结合没有效果, 但是 IL-18-介导的信号转导 (即 IFN  $\gamma$  产生) 被阻断。在中和模式 B 中, IL-18 与 IL-18R  $\alpha\beta$  的结合被阻断, 从而接着没有发生受体-介导的信号转导。

#### 实施例 1.2 : 重组 IL-18 的产生

##### 实施例 1.2. A: 质粒构建, 人 IL-18 原的表达和纯化

通过在 SF-9 昆虫细胞中表达 IL-18 母体形式产生重组人 IL-18。应用本领域公知的标准分子生物学方法, 一公开的序列 (Ushio, S. , 等 (1996) J. Immunol. 156: 4274-4279) 为基础利用特异 PCR 引物制备全长人 IL-18 原 cDNA, 并且接着克隆到 杆状病毒 (BV) 转移载体

pVL1393 (BD Biosciences, San Jose, CA; Cat # 51-21201P)。用来制备全长人 IL-18 原 cDNA 的 5' PCR 引物包含编码 6-组氨酸区的序列, 使得 IL-18 原的 N-末端包含 6-HIS-标签。

用带有包含 IL-18cDNA 的 pVL1393 载体的杆状病毒转染 SF9 I 昆虫细胞。将转染的 SF9 细胞溶解并且将溶胞产物流经镍柱以纯化重组 HIS-标记的 IL-18 原 (rhu proIL-18) (BD Biosciences, San Jose, CA; Cat # 554802)。通过用人胰天蛋白酶-1 消化进一步处理重组 HIS-标记的 IL-18 原, 产生生物活性 IL-18 (成熟 IL-18) (Ghayur T., (1997) Nature 386: 619-623)。

### 实施例 1.2. B: IL-18 的 NEM 处理

从日本 Hayashibara Biochemical Laboratories 获得的重组人 IL-18 表现特异活性和 IL-18 结合亲和性的分批差异。成熟 IL-18 中四个半胱氨酸不同对之间, IL-18 包含二硫键。这些引起分批的结构和功能异质性, 和差异。利用 IL-1b 配位的人 IL-18 的同源性模型表明, 成熟人 IL-18 的位置 38 和 68 的半胱氨酸残基是暴露的, 因此是有活性的。

用 N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 处理实施例 1.2. A 获得的重组人 IL-18, 保护半胱氨酸不被氧化。NEM-IL-18 是单体的, 不形成聚集体, 它是稳定的并且随着时间保持高特异活性。NEM-IL-18 保留中和表位, 因为抗-huIL-18 中和抗体结合并中和 NEM-IL-18。尽管 NEM 处理 IL-18, 根据抗-IL-18 抗体中和人 WBA 中 NEM-IL-18 和天然人 IL-18 的生物活性的能力所测定的, NEM-IL-18 上中和表位保留了。NEM-IL-18 用于测定全长人抗-人-IL-18 mAbs 的最优化和选择和初步特征。

### 实施例 1.2. C: IL-18 的 4C/A 突变体的产生和表征

通过将成熟 IL-18 中四个半胱氨酸突变成丙氨酸制备 IL-18 的 4C/A 突变体 ("4C/A-huIL-18")。根据下面表 4 中总结的, IL-18 的 4C/A 突变体与 NEM-huIL-18 比较, 表明两种蛋白质的生物学和生物化学性质完全不同。通过动态光散射 (DLS) 和大小排阻层析 (SEC) 分析, IL-18 和 NEM-huIL-18 的 4C/A 突变体是单体, 圆二色性分析表

明构象和物理稳定性相似。IL-18 和 NEM-huIL-18 的 4C/A 突变体的生物活性在 KG-1 试验中是相同的, IL-18 结合的 IL-18BP 和抗-IL-18 抗体的两种形式具有相似的亲和性。4C/A-huL-18 没有氧化不稳定性, 并且容易在大肠杆菌中高水平表达。

表 4 NEM-IL-18 和 4C/A-huIL-18 的比较表明它们的构象和寡聚物纯度, 物理稳定性, 和与抗体或细胞结合的受体结合的量度是相等的。

| 性质    | 量度                               | NEM-huIL-18                                                 | (4C/A)-huIL-18                                              |
|-------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 寡聚物状态 | SEC                              | 单体                                                          | 单体                                                          |
|       | DLS                              | 单体                                                          | 单体                                                          |
| 构象    | CD (波长扫描)                        | 210 nmCD 最小                                                 | 210 nmCD 最小                                                 |
| 稳定性   | CD (温度扫描)                        | 高至 40℃ 稳定                                                   | 高至 40℃ 稳定                                                   |
| 生物活性  | 2ng/mL IL-18 引起的 IFN $\gamma$ 产生 | 8ng/mL IFN $\gamma$                                         | 8ng/mL IFN $\gamma$                                         |
| 表位    | 参照结合蛋白对 IFN $\gamma$ 产生的中和       | IL-18BP-Fc, 125-2H 和 IL-18R $\alpha$ 的中和                    | IL-18BP-Fc, 125-2H 和 IL-18R $\alpha$ 的中和                    |
|       | Biacore (K <sub>D</sub> )        | IL-18BP-Fc, 0.098nM<br>125-2H: 0.2nM<br>2.5 (E) mg/l: 0.3nM | IL-18BP-Fc, 0.135nM<br>125-2H: 0.2nM<br>2.5 (E) mg/l: 0.2nM |

实施例 1. 2. D : 生物素化 rhuIL-18 (生物素化-IL-18) 的产生和表征

利用本领域公知的标准技术, 于阿赖氨酸残基上对来自实施例 1. 2. B 的 NEM-IL-18 进行生物素化 (Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, Rockford, IL ; Cat # 21335), 获得的生物素化 rhu-IL-18 (biot-IL-18) 是每 huIL-18 含有带有 1, 2, 3, 或 4 个生物素的物质的不均匀混合物。此外, 在 biot-IL-18 中每个 huIL-18 带有 2 或 3 个生物素的物质是主要物质。根据 ELISA 分析, Biot-IL-18 是生物活性的, 结合的抗-IL-18 抗体, 并且被试验的所有中和抗-huIL-18 抗体中和。Biot-IL-18 结合的 KG-1 细胞在细胞表面上表达高亲和性的 IL-18R  $\alpha \beta$ , 利用抗-生物素抗体 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; cat # B 3640) 通过 FACS 分析检测 KG-1 细胞表面上 biot-IL-18。因

此生物素化作用不干扰受体结合，不屏蔽 rhuIL-18 的中和表位。

#### 实施例 1.2. E: $^{125}\text{I}$ 标记的 rhuIL-18 的产生和表征

应用 Amersham 描述的条件 (Piscataway, NJ; Cat # IM5861), 用  $^{125}\text{I}$  标记实施例 1.2. B 获得的 NEM-IL-18 上赖氨酸残基。保留了其特异活性的  $^{125}\text{I}$  标记的 IL-18 与没有修饰的 IL-18 竞争, 并且特异性结合 KG-1 细胞上的 IL-18R。通过中和抗 -huIL-18 单克隆抗体阻断  $^{125}\text{I}$  标记的 IL-18 与 IL-18 受体的结合。因此, 碘化作用不影响 IL-18 的受体结合, 因此不屏蔽中和 IL-18 上的表位。在受体结合试验中, 使用  $^{125}\text{I}$  标记的 IL-18 测定抗-IL-18 抗体的中和模式和能力。

### 实施例 2 : 抗 IL-18 抗体的产生和分离

#### 实施例 2.1 : 鉴定抗-IL-18 抗体的试验

在实施例 3 中, 除非另有说明, 利用下面的试验鉴定和表征抗-IL-18 抗体。

#### 实施例 2.1. A: ELISA

进行 ELISA, 筛选结合人 IL-18 的抗体。在这项 ELISA 中, 生物素化 NEM-huIL-18 (参见实施例 1.2. B) 被山羊-生物素化 IgG 捕获或者被捕获到链霉抗生物素包被的平板上。使用杂交瘤或 B 细胞上清液, 并且利用 HRP-偶联的抗-人 IgGs, 根据本领域公知的标准 ELISA 方法, 检测 IL-18- 结合的抗体。

#### 实施例 2.1. B: 应用 BIACORE 技术的亲和性测定

BIACORE 试验 (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) 测定抗体的亲和性, 测定生成, 离解速率常数的动力学常数。利用共价连接的第二抗体 (例如山羊抗-人 IgG 或抗-小鼠 IgG), 将抗体捕获到生物传感器芯片上, 然后使用不同浓度的重组 IL-18。结合记录为时间的函数, 并且计算动力学速率常数。在该项试验中, 测得生成速率象  $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  这样快, 离解速率象  $10^{-6} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  这样慢。

#### 实施例 2.1. C: 表位图谱

应用 BIACORE 技术测绘 IL-18 拮抗剂例如抗-IL-18 抗体识别的

表位的图谱。简要地说,一种 IL-18 拮抗剂被捕获到 Biacore 芯片上, rhuIL-18 与固定化试剂结合。然后分析另一种抗-IL-18 拮抗剂与这种复合体的结合。两种试剂同时结合证明,这两者识别不同的表位。

#### 实施例 2.2 : 使用 XENOMOUSE 的抗-IL-18 HuMAbs 的产生

应用 XENOMOUSE 转基因小鼠技术 (Abgenix, Inc., Fremont, CA) 获得全人抗-人 IL-18 单克隆抗体 (HuMAbs)。这项技术包括转基因小鼠携带带有 VH, DH, 和 JH, C $\mu$ , C $\delta$  的人可变重链基因座, 和单链人 IgG 恒定重链基因座和轻链基因座。用感兴趣的抗原免疫之后, 这些小鼠产生抗该抗原的全人抗体。

##### 实施例 2.2. A: 用 IL-18 抗原对 XENOMOUSE 的免疫

对于所有注射, 通过足垫途径对 XENOMOUSE 动物接种。每次注射的总体积是每只小鼠 50 微升, 每只足垫 25 微升。对于每只小鼠, 初次免疫注射, 在与 TiterMax Gold 以 1: 1v/v 混合的无热源 DPBS 中含有 40 微克人 IL-18 (NEM-rhuIL-18)。接着对每只小鼠施用与 25 微克 Adju-Phos (磷酸铝凝胶) 混合的无热源 DPBS 中 40 微克人 IL-18 进行加强免疫 6 次, 然后对每只小鼠使用没有辅助剂的无热源 DPBS 中 40 微克人 IL-18 进行最后一次加强免疫。在此方案中, 在第 0, 4, 8, 11, 17, 21, 25 和 35 天对动物免疫接种。在第 39 天进行融合。上述免疫方案后, 将小鼠处以安乐死, 然后回收腹股沟和腰部淋巴结。

##### 实施例 2.2. B: 杂交瘤的制备

通过对腹股沟和腰部淋巴结机械破碎来释放根据实施例 2.2. A 获得的淋巴细胞, 使用组织研磨机, 通过 CD90 阴性选择排除 T 细胞。以 1:1 的比例混合洗涤过的富集 B 细胞和从 ATCC 购得的非分泌骨髓瘤 P3X63Ag8.653 细胞, cat # CRL 1580 (Kearney 等, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550), 进行杂交瘤融合。通过以 800 g 离心使细胞混合物温和沉淀。完全去除上清液之后, 细胞用 2-4 毫升链霉蛋白酶溶液 (CalBiochem, San Diego, CA; cat. # 53702; 0.5 毫克/毫升 PBS 溶液) 处理不超过 2 分钟。然后加入 3-5 毫升 FBS 以中止酶活性, 并且使用电细胞融合溶液, ECFS (0.3M 蔗糖, Sigma-Aldrich,

St Louis, MO; Cat # S7903, 0.1mM 乙酸镁, Sigma, Cat # M2545, 0.1mM 乙酸钙, Sigma-Aldrich, St Louis, MO; Cat # C4705) 将悬浮液调节至 40 毫升总体积。离心之后去除上清液, 并且将细胞再悬浮于 40 毫升 ECFS。反复这种洗涤步骤, 再次将细胞重新悬浮于 ECFS 至  $2 \times 10^6$  细胞/毫升浓度。

使用 ECM2001 型, Genetronic, Inc., San Diego, CA 融合发生器进行电-细胞融合。使用的融合室大小是 2.0 毫升, 使用下面的仪器设置: 校准条件: 电压: 50 v, 时间: 50 秒; 膜破碎条件: 电压: 3000 v, 时间: 30 秒; 融合后保留时间: 3 秒。

融合之后, 细胞重新悬浮于杂交瘤融合培养基中: DMEM (JRH Biosciences), 15% FBS (Hyclone), 含有 0.5XHA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; cat # A9666), 并且补加有 L-谷氨酰胺, pen/strep, OPI (草酰乙酸盐, 丙酮酸盐, 牛胰岛素) (都从 Sigma 获得) 和 IL-6 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 37℃ 和 10%CO<sub>2</sub> 的空气中培养。以每孔  $4 \times 10^4$  细胞在平底 96-孔组织培养板上将细胞平板培养。培养物在杂交瘤融合培养基中保持 2 周, 然后转移到杂交瘤培养基: DMEM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 15% FBS (Hyclone, Logan, Utah), 并且补充有 L-谷氨酰胺, pen/strep, OPI (草酰乙酸盐, 丙酮酸盐, 牛胰岛素) (都从 Sigma 获得) 和 IL-6 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)。以在 0.5XHA 杂交瘤融合培养基中存活来筛选杂交瘤, 并且通过 ELISA 对含有杂交瘤的那些孔筛选抗原反应性。ELISA 格式详细描述了在抗原包被的平板(人 IL-18 包被平板) 上温育上清液, 并且使用辣根过氧化物酶(HRP) 标记的小鼠抗-人 IgG 检测人抗-人 IL-18 结合抗体, 然后通过平行进行两组 ELISA 来证实所有的阳性样品, 详细描述了在抗原包被的平板(人 IL-18 包被平板) 上温育上清液, 并且使用辣根过氧化物酶(HRP) 标记的小鼠抗-人  $\gamma$  和  $\kappa$  链检测人抗-人 IL-18 结合抗体。

利用限制稀释平板培养在选择性的抗原-阳性孔上进行克隆。对平板目测检查单一菌落生长的存在, 然后通过上述抗原-特异性 ELISA 筛选单一菌落孔的上清液。通过多样 ELISA, 使用 Luminex 仪器, 分析高反应性克隆, 证实人  $\gamma$  和  $\kappa$  链的纯度。

### 实施例 2.2. C: XENOMAX 技术

或者,对实施例 2.2. B 中获得的淋巴细胞实施选择淋巴细胞抗体-产生方法 (SLAM), 该方法确定了 XENOMAX 抗体选择技术 (Abgenix, Inc., Fremont, CA)。在 96 孔板中平板培养单一 B 细胞, 通过空斑形成细胞试验鉴定在产生抗期望抗原 (人 IL-18) 的人单克隆抗体的 B 细胞 (Babcock, J. S. , Leslie, K. B., Olsen, O. A. , Salmon, R. A. , 和 Schrader, J. W. , Isolation of functional antibody genes from single lymphocytes of defined antigen-specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843-7848, 1996), 对于 VH 和 Vk 前导序列使用 5' 引物, 和对于人 C $\gamma$  和 C $\kappa$  特异的 3' 引物, 通过对分离的 B 细胞进行单细胞 RT-PCR, 克隆 IgG 基因。根据实施例 2.2. E 和 2.2. G 所述在哺乳动物细胞中表达获得的重组 IgG 基因。

### 实施例 2.2. D: 抗-IL-18 抗体的鉴定

应用生物素化 IL-18 ELISA (参见实施例 2.1. A), 鉴定根据实施例 2.2. B 和 2.2. C 制备的杂交瘤和产生结合 IL-18 的抗体的 B-细胞。然后在根据实施例 1.1. A 进行的 KG-1 生物试验中, 对含有结合 IL-18 的抗体的杂交瘤和 B 细胞上清液测定 IL-18 中和能力。将中和抗-IL-18 抗体 (来自杂交瘤和 SLAM approaches) 亚克隆到哺乳动物载体中, 在 COS 细胞中表达, 纯化, 并且在 KG-1 生物试验中再次试验 (参见表 5)。

表 5 KG-1 生物试验中抗-IL-18 HuMAbs 的中和能力

| HuMAb#  | KG-1 测定 ( $IC_{50}M$ ) |
|---------|------------------------|
|         | NEM-rhuIL-18           |
| 杂交瘤     |                        |
| 2.5.1   | 3E-10; 4E-10           |
| 2.13.1  | 2E-10; 1E-10; 7E-11    |
| 2.3.3   | 1E-9; 2E-10; 7E-10     |
|         |                        |
| XENOMAX |                        |
| 215     | 1E-10; 3E-10; 1E-10;   |
| 444     | 1E-10; 2E-10; 2E-10    |
| 478     | 7E-10; 2E-9; 3E-10     |
| 435     | 8E-10; 7E-10; 4E-10;   |
| 413     | 1E-9; 7E-10; 7E-10     |
| 581     | 7E-10; 3E-10; 3E-9     |
| 231     | 1E-10; 3E-11; 2E-9     |
| 521     | 6E-10; 3E-10; 2E-9     |
| 336     | 7E-10                  |
| 351     | 2E-10                  |
| 490     | 5E-10                  |
| 550     | TBD                    |
| 268     | 7E-9                   |

在表 1 中描述了表 5 中抗体的可变区。

实施例 2.2.E: 中和抗-IL-18 HuMAbs 亚克隆到哺乳动物表达载体中

根据生产商说明书, 在 CMV 启动子的调控下, 在 pCDNA (Invitrogen, Carlsbad, Ca) 载体中克隆抗体的重链和轻链基因。通过电穿孔, 使用本领域公知的标准条件, 用相应于各克隆的重链和轻链, 使用包含人基因组  $\gamma-2$  和  $\kappa$  序列的这些质粒共同转染 COS 细胞。

回收细胞, 在补充有谷酰胺的无血清 DMEM 中培养细胞, 并分泌抗体 72 小时。然后收集培养物上清液, 离心澄清并且过滤, 并且上 Protein-A 树脂。用 PBS 洗涤柱子, 用低 pH 缓冲剂洗脱抗体, 并且用 1M Tris 溶液快速中和。在 Amicon-30 旋转过滤器上用 PBS 对抗体制备物

进行缓冲剂交换。通过在 OD<sub>280</sub> 下的光谱测定法和 SDS-PAGE 分析抗体的浓度和纯度，然后对它们测定 IL-18 中和能力。

为了实现人抗体在 COS 细胞中更高水平表达，在延长因子启动子的调控下，一些抗体的重链和轻链亚克隆导载体 pEF-BOS (Mizushima, S. 和 Nagata, S. (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17)。

简言之，以这样的方式设计用于重链可变区的 PCR 引物，使得它们被插入包含 IgG 信号肽和人 IgG1 恒定区的序列 [野生型 (SEQ ID No. 2) 或失活突变体 (SEQ ID No. 3)] 的盒 pEF-BOS 质粒中。前向 V<sub>H</sub> PCR 引物包含限制位点 NruI，象信号肽的核苷酸序列一样。反向 V<sub>H</sub> PCR 引物包含 SalI 限制位点，它经基因工程导入 γ-1 Fc 序列的 5' 端。用 NruI/SalI 消化 V<sub>H</sub> PCR 片段，并且克隆到 pEF-BOS 人 IgG1 野生型或 pEF-BOS 人 IgG1 突变体构建体中。通过 HindE 限制消化，整个轻链以来自 pCDNA 载体的 κ 形式存在，转移到 pEF-BOS 载体中，用 T4 聚合酶填充突出端，接着用 NotI 消化。然后将这些钝的/NotI 轻链片段克隆到 SrfI/NotI 消化的 pEF-BOS 载体中。

从最初杂交瘤系克隆抗体的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 区。从产生抗体的细胞制备 RNA，使用如上所述设计的引物进行 RT-PCR，即对于 V<sub>H</sub> 用 NruI/SalI 引物，对 V<sub>L</sub> 用 NruI/BsiWI 引物。将全长 IgG1 和 κ 链组装成盒载体。

进一步修饰选择的抗体。天然存在的抗体有谷酰胺 (Q) 或谷氨酸 (E)，这好似重链和 / 或轻链 NH<sub>2</sub>-末端。Q 作为 NH<sub>2</sub>-末端的抗体的制备得到 NH<sub>2</sub>-末端异源性，由于谷酰胺环化为谷氨酸。因此，一些抗体的 NH<sub>2</sub>-末端处谷酰胺残基突变为谷氨酸。还有两个残基，Fc 部分的绞合区中亮氨酸 234 和亮氨酸 235 突变，妨碍了抗体的效应子功能。简要说，利用标准分子生物学技术，用丙氨酸置换亮氨酸 234 和亮氨酸 235 (Lund, J. 等, *J. Immunology* (1991) 147: 2657-2662; Winter, 等 美国专利 No. 5, 648, 260; 5,624,821 ; 5,624,821)。这些 Fc-突变抗体有专门术语 (mg1)。下面实施例 2.2. J 6 进一步表征了这些突变体。

#### 实施例 2.2. F: 选择的中和抗-IL-18 抗体的表征

在哺乳动物细胞中产生具有不同种系序列的几种重组抗-人 IL-18 抗体，纯化并且在各种试验中进行功能表征 (见表 6)。

表 6：一些抗-IL-18 抗体的体外抗原结合，细胞检测和骨架序列特征

| 抗体                     | 技术 <sup>a</sup> | Biacore <sup>b</sup><br>(K <sub>D</sub> , nM) | RBA<br>(IC <sub>50</sub> , nM) | KG-1 <sup>b</sup><br>(IC <sub>50</sub> , nM) | WBA<br>(IC <sub>50</sub> , nM) | 基因家族 <sup>c</sup><br>序列多样性 |            |
|------------------------|-----------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------|
| 2.5(E)mg1              | 杂交瘤             | 0.31                                          | 2.38                           | 0.20                                         | 3                              | VL-L2                      | VH5-51     |
| 2.5(E)wtg1             | 杂交瘤             | 0.40                                          | 2.38                           | 0.30                                         | 3                              | VL-L2                      | VH5-51     |
| 215(E)mg1 <sup>d</sup> | Xenomax         | 0.23                                          | 1.17                           | 0.17                                         | 3                              | VL-A27                     | VH4-31     |
| 444(Q)mg1 <sup>d</sup> | Xenomax         | 1.61                                          | 2.49                           | 0.13                                         | 1                              | VL-A27(7)                  | VH4-31(1)  |
| 581(E)mg1 <sup>d</sup> | Xenomax         | 2.00                                          | 1.28                           | 1.3                                          | 3                              | VL-A2                      | VH3-30     |
| 2.3.1(E)wtg1           | 杂交瘤             | 0.23                                          | 0.20                           | 0.63                                         | 2                              | VL-02                      | VH4-59     |
| 2.13.1(E)wtg1          | 杂交瘤             | 0.20                                          | 0.20                           | 0.12                                         | 2                              | VL-A27(8)                  | VH4-31(18) |

使用 NEM-cys 保护的 rhuIL-18。

括号中的数字指明克隆盒中氨基酸与种系序列的差异。

实施例 2.2. G：产生 2.5 (E) mg1 的 CHO 细胞系的产生  
根据下面描述的方法制备表达 2.5 (E) mg1 抗体的稳定的 CHO 细胞系。

#### 实施例 2.2. G 1：表达载体的构建

构建质粒 pA510 用于哺乳动物细胞系中抗体的高水平表达。这种 pUC19-衍生的质粒包含大肠杆菌 ColE1 复制起点和用于氨苄青霉素抗性的 β-内酰胺酶基因。

简要地说，应用标准分子生物学技术，克隆相应于 2.5 (E) mg1 抗体的 VH 和 VL 区的 cDNA，分别与突变的人 γ-1 和 κ 恒定区基因，制得编码天然全人 IgG1/κ 抗体的 DNA。将这些 DNAs 导入表达构建体 pA510。得到的质粒包含下面顺序的基因或调控元件的序列（不包括 pUC19）：5'-CMV 增强子，腺病毒主要晚期启动子，人免疫球蛋白信号

肽, 2.5 (E) mg1 重链免疫球蛋白可变区, 人  $\gamma$ -1 免疫球蛋白恒定区, SV40 聚腺苷酸化序列, 人促胃液素转录中止序列, SV40 复制起点 (SV40 启动子/增强子), 鼠二氢叶酸还原酶序列, 来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶聚腺苷酸化序列, CMV 增强子, 腺病毒主要晚期启动子, 人免疫球蛋白信号肽, 2.5 (E) mg1 轻链免疫球蛋白可变区, 人  $\kappa$  免疫球蛋白恒定区, SV40 聚腺苷酸化序列-3'。将该编码区插入趋动抗体基因转录的强病毒启动子的下游。载体还编码小鼠 DHFR 基因的表达, 根据不存在核苷的培养基中的生长能力筛选转化的细胞。

#### 实施例 2.2.G 2: 表达载体转染到双亲细胞系

使用细胞系, CHO DUX B 11. (Urlaub, G. 和 Chasin L. A. Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220(1980)), 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因表达缺陷, 转染实施例 2.2.G1 中描述的表达载体。应用本领域公知的磷酸钙沉淀法用载体转染 CHO DUX B 11 细胞 (Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel, F. V., Brent, R., Moore, D. M., Kingston, R. E., Seidman, J. G., Smith, J. A., 和 K. Struhl eds; Wiley Interscience, N. Y., N. Y. (1990)), 有下面的改进。对培养板抽吸并且向各板加入 9 毫升 F12 培养基。培养板在 37℃ 保温 2 小时。将 150 微克 DNA 溶解于 50 毫升圆锥形试管中 2.7 毫升水中。加入 300 微升 2.5 M  $\text{CaCl}_2$ , 一次一滴, 将该 DNA 混合物加给 50 毫升圆锥形试管中 3 毫升 2 x Hepes 缓冲盐水 (HeBS)。

将得到的混合物涡流 5 秒钟并且在室温下温育 20 分钟。各个板均匀分布 1 毫升 (仍然在 F12 中), 培养板在 37℃ 保温 4 小时。温育之后, 对培养板抽吸, 并且向各板加入 2 毫升 F12 中 10 % DMSO。DMSO 处理持续 1 分钟, 然后向各板加入 5 毫升磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 稀释 DMSO。

对培养板抽吸, 并且用 PBS 洗涤两次以上。加入 10 毫升有核苷的 Gibco  $\alpha$  MEM, 培养板在 37℃ 保温过夜。第二天, 培养基换成没有核苷的有 5% 透析的胎牛血清 (FBS) 的 Gibco  $\alpha$  MEM, 6 小时之后, 如下将细胞接种到 96-孔板中。利用胰蛋白酶消化收获 10 厘米板中的细胞, 并且重新悬浮于总共 300 毫升没有核苷有 5% 血清 (FBS) 的 Gibco  $\alpha$  MEM 中。以 10 毫升/板, 100 微升/孔, 接种 20 个 96-孔板。加入 100 毫升相同的培养基, 保持 100 毫升细胞, 并且如上所述接种 20 个另

外的 96-孔板（这是第二次稀释）。一周之后更换 96-孔板中的培养基，又一周后再次更换。使用没有核苷的  $\alpha$  MEM 培养基选择表达 DHFR 的细胞，从而选择表达载体。

### 实施例 2.2. G 3: 产生 2.5 (E) mg1 细胞的选择

应用对于人 IgG 特异性的 ELISA，对转染 CHO 细胞的培养物上清液检测分泌的抗体 2.5 (E) mg1 的存在。一旦筛选了一组 CHO 转染子用于表达人抗体，用另外的选择分离有扩增数目的整合到 CHO 基因组中的表达载体的那些细胞。使用药物甲氨喋呤 (MTX) 选择扩增系。对 MTX 存在下培养的培养物测定它们产生免疫球蛋白的能力。对比它们 MTX-敏感前期物质表达更多抗体的 MTX-抗性系进行另一轮更高浓度 MTX 的筛选，并且测定免疫球蛋白产生。在 1 或 15 升生物反应器中培养表达 2.5 (E) mg1 的 CHO 细胞，并且在进行两周时测定抗体产率是 ~ 1.0 克/升。

### 实施例 2.2. H: CHO 细胞-产生的 2.5 (E) mg1 的物理化学特征

进行 CHO 产生的 2.5 (E) mg1 的初步物理和化学表征。试验测定 2.5 (E) mg1 的分子量大约是 149 kDa，与理论分子量很好吻合。应用肽图谱技术 (K Biemann *Annu. Rev. Biochem.* 1992, 61 977-1010; D A. Lewis *Accelerated Articles, Anal. Chem.* 1994, 66, 585-595)，证明 2.5 (E) mg1 对于轻链和重链具有正确的 N-末端。有非常小的重链 C 末端可变性，因为 99% 的 2.5 (E) mg1 分子重链羧基末端没有赖氨酸。各个 2.5 (E) mg1 重链包含有寡甘露糖和复合体的单一 N-连接糖基化位点，有 0, 1 或 2 个半乳糖残基的岩藻糖基化两耳结构。

### 实施例 2.2.1 : CHO 细胞-产生的 2.5 (E) mg1 的溶解性和稳定性

纯的 2.5 (E) mg1 是可溶的，在 pH 5, 6 和 7 缓冲剂中至少 62 毫克/毫升最短 4 周。在 37°C 下在这些缓冲剂中进行使用 2.5 (E) mg1 的加速稳定性研究来鉴定稳定性 - 指征分析和最佳长期贮存 pH。通过大小排阻 HPLC 和 SDS-PAGE 以周间隔对样品进行分析，测定聚集作用和片段化作用，用于 S-S 键检测的 LC-MS/MS 肽图谱，用于活性测定

的抗原-ELISA 和/或以细胞为基础的生物试验,和阳离子交换 HPLC 和用于电荷不均匀性测定的 iso-Asp 定量测定。SEC (大小排阻色谱法), SDS-PAGE 和阳离子交换色谱法对样品的初步分析表明所有三项分析证明了稳定性,因此 2.5 (E) mg1 在 ~ pH6 下更稳定。

实施例 2.2.J : CHO-细胞-产生的抗-IL-18HuMAb, 2.5 (E) mg1 的表征

#### 实施例 2.2.J 1: IL-18 物种特异性

评价了 2.5 (E) mg1 结合和 / 或中和人, cynomolgus 猴, 小鼠, 大鼠和狗的 IL-18 的能力。利用 BIACORE 分析, 根据生产商说明书 (参见实施例 2.1.B), 证明 2.5 (E) mg1 结合成熟人 IL-18, 但是不结合小鼠 IL-18。另外, 免疫沉淀数据表明 2.5 (E) mg1 结合 cynomolgus 猴 IL-18 (对于狗 IL-18 的  $IC_{50} = 9.1E \times 10^{-11}$ ), 但是不结合狗或大鼠 IL-18。2.5 (E) mg1 以相似方式功能结合人和 cynomolgus IL-18 生物活性, 但是没有看到狗, 大鼠或小鼠 IL-18 的抑制作用。

#### 实施例 2.2.J 2: 人细胞因子特异性

根据生产商说明书 (参见实施例 2.1.B), 利用 BIACORE 分析, 评价了 2.5 (E) mg1 对于 IL-18 的特异性。2.5 (E) mg1 抗体被捕获到生物传感器芯片上, 并且测定其与溶液中一组已知人细胞因子结合的能力。如表 7 所示, 2.5 (E) mg1 结合重组人成熟 IL-18 和 IL-18-原。相反, 2.5 (E) mg1 不结合试验的其他 23 种人细胞因子的任何一种, 包括 IL-1 家族成员 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ 。

表 7 2.5 (E) mg1 与细胞因子结合的 Biacore 分析

| 可溶性重组细胞因子 (1 $\mu$ M) | 捕获的 2.5(E)mg1 (25 mg/mL) |
|-----------------------|--------------------------|
|                       | 2.5(E)mg1 结合             |
| IFN $\gamma$          | -                        |
| IL-1 $\alpha$         | -                        |
| IL-1 $\beta$          | -                        |
| 其它细胞因子 <sup>a</sup>   | -                        |
| IL-18 <sup>b</sup>    | +                        |
| IL-18原                | +                        |

<sup>a</sup>对另外的细胞因子检测结合,包括 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21, TNF, LT, LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2, 和 LT $\alpha$ 2 $\beta$ 1。

2.5 (E) mg1 与这些细胞因子的任一种都不结合。

半胱氨酸 > 丙氨酸突变体 BV 产生的重组人 IL-18

### 实施例 2.2.J 3: 亲和性测定

表 8 给出应用 BIACORE 试验根据生产商说明书测定的 2.5 (E) mg1 的体外 IL-18 结合性质。2.5 (E) mg1 抗体具有快的生成速率, 缓慢的解离速率, 总亲和性是 0.196nM。为了比较, 给出两种参照 IL-18 拮抗剂 (125-2H 和 IL-18 结合蛋白) 的动力学速率参数。

表 8 2.5 (E) mg1 和参照试剂的 IL-18 结合性质

| 试剂                              | Biacore 参数                                              |                                             |                        |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|
|                                 | 生成速率<br>( $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) | 解离速率<br>( $\times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ) | K <sub>D</sub><br>(nM) |
| 2.5(E)mg1 <sup>a</sup>          | 268                                                     | 52.4                                        | 0.196                  |
| 鼠抗人 IL-18 (125-2H) <sup>b</sup> | 190                                                     | 110                                         | 0.550                  |
| IL-18BP-Fc <sup>c</sup>         | 140                                                     | 26                                          | 0.190                  |

在 BIACORE 中分析 (4C/A)-HuIL-18。

<sup>b</sup>-125-2H, 中和小鼠抗-人 IL-18 IgG1 mAb

<sup>c</sup>-IL-18BP-Fc, 天然 IL-18 拮抗剂的 Fc 融合

### 实施例 2.2.J 4: 体外 IL-18 中和能力

在 KG-1 生物实验中, 受体结合试验 (RBA) 和人 WBA (参见实施例 1.1. A-1.1. C), 测定 2.5 (E) mg1 的体外中和能力。如表 8 所示, 2.5 (E) mg1 抗体中和重组 (KG-1 和 RBA) 和中和 IL-18 (WBA), (在 KG-1 中 IC<sub>50</sub> < 0.5 nM, 在 RBA 中 < 2 nM, 在 WBA 中 < 5 nM), 并且与其 IL-18 结合亲和性吻合。

表 8 2.5 (E) mg1 和参照试剂的中和能力

| 试剂                        | 体外中和能力 (IC50, nM) |                   |                  |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|                           | KG-1 <sup>a</sup> | RBA <sup>b</sup>  | WBA <sup>c</sup> |
| 2.5(E)mg1                 | 0.2               | 2.4               | 3.0              |
| 鼠抗人 IL-18<br>mAb (125-2H) | 0.2               | >300 <sup>d</sup> | 3.0              |
| IL-18BP-Fc                | 0.03              | 1.0               | 5.7              |
| 抗 -IL-18R mAb (M-840)     | 1.5               | 1.7               | 2.7              |

<sup>b</sup> KG-1 生物试验, 平均值

<sup>c</sup> 在该项试验中使用 (4C/A) -huIL-18

<sup>d</sup> 受体结合分析

使用 4-6 个供体的人全血分析。给出平均值。

125-2H 中和 IL-18 生物活性, 虽然不能抑制受体结合。

#### 实施例 2.2.J 5: 2.5 (E) mg1 的体内中和能力

为了评价 2.5 (E) mg1 体内在炎症环境中中和天然人 IL-18-诱导的 IFN  $\gamma$  的能力, 使用严重合并免疫缺陷 (SCID) 小鼠模型, 对小鼠注射人 PBMCs, 并且体内刺激细胞产生人 IL-18 (HuPBMC-SCID 模型)。结果 (表 9) 表明 2.5 (E) mg1 体内抑制人 IL-18-依赖性人 IFN  $\gamma$  产生, 两种给药途径都是清除的剂量-响应关系。分别通过腹膜内或静脉内给药, 2.5 (E) mg1 的 ED<sub>50</sub> 大约是 1 微克或 0.1 微克/小鼠 (=0.05 毫克/千克 或 0.005 毫克/千克)。

表 9A 对 HuPBMC-SCID 小鼠模型 i. p. 施用 2.5 (E) mg1 的体内功效

| 组                          | huIFNg (pg/ml) | %抑制率 |
|----------------------------|----------------|------|
| 2.5(E)mg1 0.025 $\mu$ g/小鼠 | 70 $\pm$ 17    | 61   |
| 2.5(E)mg1 0.25 $\mu$ g/小鼠  | 112 $\pm$ 29   | 36   |
| 2.5(E)mg1 2.5 $\mu$ g/小鼠   | 36 $\pm$ 10    | 80   |
| 2.5(E)mg1 25 $\mu$ g/小鼠    | 10 $\pm$ 8     | 94   |
| 2.5(E)mg1 250 $\mu$ g/小鼠   | 3 $\pm$ 2      | 98   |
| 没有处理                       | 193 $\pm$ 59   |      |
| HuIgG 对照 250 $\mu$ g/小鼠    | 177 $\pm$ 33   |      |

表 9B 对 HuPBMC-SCID 小鼠模型 i. v. 施用 2.5 (E) mg1 的体内功效

| 组                          | huIFNg (pg/ml) | %抑制率 |
|----------------------------|----------------|------|
| 2.5(E)mg1 0.025 $\mu$ g/小鼠 | 156 $\pm$ 45   | 36   |
| 2.5(E)mg1 0.25 $\mu$ g/小鼠  | 27 $\pm$ 9     | 89   |
| 2.5(E)mg1 2.5 $\mu$ g/小鼠   | 36 $\pm$ 8     | 85   |
| 2.5(E)mg1 25 $\mu$ g/小鼠    | 11 $\pm$ 6     | 96   |
| 2.5(E)mg1 250 $\mu$ g/小鼠   | 4 $\pm$ 2      | 98   |
| 没有处理                       | 279 $\pm$ 26   |      |
| HuIgG 对照 250 $\mu$ g/小鼠    | 245 $\pm$ 22   |      |

#### 实施例 2.2.J 6: 效应子功能

抗体的 Fc 部分介导几种重要的效应子功能, 例如细胞因子诱导, 抗体-依赖性细胞-介导的细胞毒性 (ADCC), 吞噬作用, 补体依赖性细胞毒性 (CDC), 和抗体和抗原-抗体复合体的半存留期/清除速率。在一些情况下, 这些效应子功能对于治疗性抗体是期望的, 但是在其他情况下, 可能不是必需的, 甚至可能是有害的, 取决于治疗主体。一些人 IgG 同位型, 特别是 IgG1 和 IgG3, 通过分别与 Fc  $\gamma$  Rs 和补体 C1q 结合而介导 ADCC 和 CDC。新生 Fc 受体 (FcRn) 是测定抗体的循环半存留期的重要成分。

与 2.5 (E) mg1 相比, 2.5 (E) mg1 中 L234A 和 L235A 突变不影响 2.5 (E) mg1 HuMAb 总的亲和力或中和能力 (表 10)。然而, 正如所

预期的,这些突变消除与 Fc  $\gamma$  R 和 C1q 的结合。

表 10: 残基 L234 和 L235 突变为丙氨酸不影响 2.5 (E) mg1 的亲合力或中和能力

| Ab         | 动力速率参数                                              |                                             |               | KG-1 生物测定         |
|------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------|-------------------|
|            | On-rate<br>( $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) | 解离速率<br>( $\times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ) | $K_D$<br>(nM) | $IC_{50}$<br>(nM) |
| 2.5(E)wtg1 | 281                                                 | 47.8                                        | 0.170         | 0.4               |
| 2.5(E)mg1  | 268                                                 | 52.4                                        | 0.196         | 0.2               |

#### 实施例 2.2.J 6.1 :Fc $\gamma$ RI 结合

人 Fc  $\gamma$  RI (CD64) 对于 IgG1 免疫复合体具有相对高的亲合力 ( $K_D 1E-8 \sim 1E-9M$ )。在单核细胞和巨噬细胞和多种骨髓细胞系上表达,包括 U937。通过荧光-激活细胞分类(FACS) (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Vol (1) 5.3. 1, J. E. Coligan 等编著, John Wiley & Sons, Inc. 出版, 2002)测定 2.5 (E) wtg1 和 2.5 (E) mg1 与 U937 细胞的结合。获得的数据 (参见表 11) 证明 2.5 (E) wtg1 结合 U937 细胞,但是正如所预料的, 2.5 (E) mg1 不结合。为了证实这种结合通过 Fc  $\gamma$  RI 介导,使用小鼠抗-hFc  $\gamma$  RI 阻断抗体 (10.1) 进行竞争试验。这些结果表明,在下面试验的浓度下,抗体 10.1 以剂量依赖性方式阻断 2.5 (E) wtg1 与 U937 细胞的结合,因此, 2.5 (E) wtg1 结合 U937 细胞上的 Fc  $\gamma$  RI。

表 11. 证明与 2.5 (E) wtg1 相反, 2.5 (E) mg1 不能结合 U937 细胞上的 Fc  $\gamma$  RI (数据以 MFI+/-SD 给出)

| 抗体浓度<br>( $\mu M$ ) | 1.00E-09  | 1.00E-08  | 1.00E-07  | 1.00E-06  | 1.00E-05  | 1.00E-04  | 1.00E-03  | 1.00E-02   | 1.00E-01   |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| 2.5(E)wtg1          | 0.50+0.00 | 0.50+0.00 | 0.63+0.12 | 0.57+0.05 | 0.60+0.00 | 1.10+0.00 | 5.80+0.05 | 29.60+0.05 | 38.76+5.19 |
| 2.5(E)mg1           | 0.67+0.09 | 0.67+0.09 | 0.60+0.00 | 0.80+0.14 | 0.63+0.05 | 0.67+0.05 | 0.53+0.05 | 0.60+0.05  | 0.63+0.08  |

#### 实施例 2.2.J 6.2 :Fc $\gamma$ R II 结合

人 Fc  $\gamma$  RII (CD32) 对于 IgG1 免疫复合体具有相对低的结合亲合

力( $K_{\text{D}} 1\text{E}-5 \sim 1\text{E}-7\text{M}$ )。在生理条件下,它要求生成多价免疫复合体用于激活。使用对于  $\text{Fc}\gamma\text{R I, II}$  源特异性的荧光素异硫代氰酸酯(FITC)标记的抗体,并且通过流式细胞计数进行测定,我们证实 K562 细胞上  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  的表达。单体 2.5(E) wtg1 与 K562 细胞的结合非常弱。因此,使用抗- $\kappa$ 链抗体使 IgG1 分子与模拟多价免疫复合体预先交联,并且测定它们与 K562 细胞上  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  的结合。交联之后,2.5(E) wtg1 与 K562 细胞结合,但即使交联之后,2.5(E) wtg1 即使表现出,也只是非常小的结合(表 12)。抗- $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  抗体,克隆 IV3,阻断 2.5(E) wtg1 的结合,因此 2.5(E) wtg1 与 K562 的结合是  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  介导的。

表 12. 交联之后 2.5(E) wtg1 和 2.5(E) wgl 与 K562 细胞上  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  的结合(数据以 MFI+/-SD 给出)

| 抗体浓度<br>( $\mu\text{M}$ ) | 1.00E-08  | 1.00E-07  | 1.00E-06  | 1.00E-05  | 1.00E-04  | 1.00E-03  | 1.00E-02  | 1.00E-01   | 1.00E+00     |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|--------------|
| 2.5(E)wtg1                | 0.37+0.05 | 0.37+0.05 | 0.40+0.00 | 0.43+0.05 | 0.80+0.08 | 3.43+0.21 | 19.7+0.70 | 93.33+4.90 | 134.37+12.93 |
| 2.5(E)mg1                 | 0.30+0.00 | 0.40+0.00 | 0.40+0.00 | 0.37+0.05 | 0.37+0.05 | 0.40+0.00 | 0.50+0.00 | 1.60+0.08  | 5.37+0.38    |

#### 实施例 2.2.J 6.3 : C1q 结合

通过 C1q 与 IgG 分子的 Fc 部分的结合,通过常规途径的细胞的补体激活和溶解被激活。应用本领域公知的标准 ELISA 技术 (Hezareh, M., 等, (2001) J. Virology, 75 (24): 12161-12168), 测定 C1q 与 2.5(E) wtg1 和 2.5(E) mg1 的结合。将 2.5(E) wtg1 和 2.5(E) mg1 HuMAbs 包被到塑料板上,接着与人 C1q 温育。然后用山羊-抗-人 C1q 和兔抗-山羊 IgG 碱性磷酸酶偶联物的混合物检测结合的 C1q 分子。结果表明 2.5(E) wtg1 结合 C1q, 但是 2.5(E) mg1 不结合(表 13)。

表 13. ELISA 证明与 2.5(E) wtg1 相反, 2.5 (E) wgl 不能结合 C1q (数据以 D405+/-SD 给出)

| C1q 浓度<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0         | 20        | 40        | 60        | 80        | 100       | 120       |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 2.5(E)wtg1                     | 0.09+0.00 | 0.78+0.00 | 0.98+0.00 | 1.06+0.07 | 1.14+0.06 | 1.32+0.13 | 1.24+0.06 |
| 2.5(E)mg1                      | 0.10+0.01 | 0.12+0.00 | 0.16+0.00 | 0.18+0.00 | 0.21+0.01 | 0.21+0.01 | 0.22+0.00 |

#### 实施例 2.2.J 6.4 : 新生儿 Fc 受体 (FcRn) 结合

提出 IgG 与内皮细胞中新生儿 Fc 受体 (也称作 Bramble 受体) 的相互作用是 IgG 质量控制系统和 IgG 长半寿期的关键决定因素 [Ghetie, V. , 等(1997) Nat. Biotechnol. 15: 637-640]。通过饮液吸收的 IgG 分子以及成功地与细胞液泡中 FcRn 结合返回循环。不能结合 FcRn 的 IgG 分子降解。

对人 IgG 与 FcRn 结合的关键残基作出图谱连接 CH2-CH3 结构域 (Kim J. K. , 等(1999) Eur. J. Immunol. 29: 2819-2825)。重要地, 这些 FcRn 结合残基在人和小鼠免疫球蛋白之间是保守的, 并且人免疫球蛋白结合小鼠 FcRn, 使得可以对小鼠进行结构活性相关性研究。

为了测定 L234A 和 L235A 突变对 FcRn 结合的影响, 利用 FcRn 表达 CHO 细胞系, 测定野生型 2.5 (E) wtg1 和突变体 2.5 (E) mg1 与 FcRn 体外结合。2.5 (E) wtg1 和 2.5 (E) mg1 与 FcRn 表达 CHO 细胞在 pH 6.5 下温育, 接着与 FITC-偶联抗-人 IgG (2 Ab) 温育。将细胞洗涤并且通过 FACS 分析。

与 0.5 nM 浓度相比, 500 nM 浓度的 2.5 (E) mg1 和 2.5 (E) wtg1 表现出与 FcRn 显著结合, 这与单独用细胞的背景类似。

#### 实施例 2.2. K: 小鼠药动学

在筛选小鼠研究中评价 2.5 (E) mg1 的药动学 (PK), 测定 Fc 突变的引入 (L234A, L235A) 是否防止 2.5 (E) mg1 结合 Fc  $\gamma$  R, 以及 C1q 是否副作用影响血清 PK 曲线。小鼠 FcRn 结合小鼠和人 IgG 同样好地使小鼠成为相关物种, 用于小鼠结构活性相关性研究 (Ober, R. J. , 等 (2001) Int. Immunol. 13: 1551-1559)。在小鼠中, 估计最终 2.5 (E) mg1 半寿期是 12 天。在类似研究中, 其他人单克隆抗体的半寿期是 10-14 天。

对雌性小鼠 (Jackson Labs, C57BL/6n) 评价 2.5 (E) mg1 的药动学, 一次静脉内施用剂量 0.2 毫克 (相当于 10 毫克 / 千克的平均值)。总共对 24 小鼠给药, 并且从每只小鼠取 3 个样品。取样方案持续 7 天。2.5 (E) mg1 显示一个分布期, 接着是一个排除期。分布和消除半寿期估计值大约是 1.6 小时和 12 天, 取决于两个隔室开放模型 (表

14)。

表 14 对小鼠一次静脉内给药产生的 2.5 (E) mg1 的关键药动学参数总结

| $t_{1/2\alpha}$<br>(hr) | $t_{1/2\beta}$<br>(天数) | $C_{\max}$<br>(g/mL) | CL<br>(mL/hr) | $V_{ss}$<br>(mL) | $V_1$<br>(mL) | $V_2$<br>(mL) | MRT<br>(天数) | AUC<br>(hr* $\mu$ g/mL) |
|-------------------------|------------------------|----------------------|---------------|------------------|---------------|---------------|-------------|-------------------------|
| 1.58                    | 12.2                   | 63.2                 | 0.0162        | 6.82             | 3.15          | 3.67          | 17.5        | 12250                   |

疾病模型

实施例 2.2. L: 疾病模型中抗-IL-18 抗体的作用

实施例 2.2. L.1 : 抗-muIL-18mAbs 对 LPS-诱导的 IFNg 产生的抑制作用

LPS-诱导的 IFN  $\gamma$  产生取决于 IL-18 表达 (Ghayur, T. , 等, 1997. Nature 386: 619-623. )。利用 LPS-诱导的 IFN  $\gamma$  产生试验来测定 93-10C 体内抑制 IL-18-依赖性 LPS-诱导的 IFN  $\gamma$  产生的效力。对小鼠 iv 施用单一剂量的 93-10C (50 微克)。30 分钟之后,用 LPS (20 毫克 / 千克)攻击小鼠, 4 小时之后取血。通过 ELISA 测定血清 IFN  $\gamma$  滴度。如表 15 所示, 93-10C 将 LPS-诱导的 IFN  $\gamma$  产生抑制 70%。

表 15 93-10C 体内抑制 LPS-诱导的 IFNg 产生

| 组                         | muIFNg (pg/ml) | %抑制率 |
|---------------------------|----------------|------|
| Rat IgG 250 $\mu$ g/小鼠    | 7239 $\pm$ 365 | N/A  |
| MBT 93-10C 250 $\mu$ g/小鼠 | 2395 $\pm$ 711 | 67   |

实施例 2.2. L. 2 : 角叉藻聚糖-诱导的爪水肿的抑制

嗜中性白细胞集中在炎症位点中涉及 IL-18 。 角叉藻聚糖-诱导的爪垫水肿是单核细胞和 嗜中性白细胞-依赖性炎症模型。通过中和 IL-18 的生物活性, 这个模型的水肿能显著被抑制 (Leung, B. P. , 等 (2001) J. Immunol. 167:2879-2886) 。 用 1C5 (400 微克) (Hyashibara Laboratories, 日本)或 93-10C(100 微克) (Medical and Biological Laboratories (MBL) Co. Watertown MA. )或对照抗体在后爪垫对小鼠给药(ip), 然后用角叉藻聚糖注射(sc)。从 24 小

时至 96 小时每天测量角叉藻聚糖-诱导的水肿。攻击之后,从 24 小时至 96 小时,1C5 和 93-10C 显著抑制角叉藻聚糖-诱导的水肿(~50% 抑制作用)(表 16)。除了阻断嗜中性白细胞渗滤,93-10C 还阻断这种模型中炎症位点的 TNF 表达 (Leung, B. P., 等(2001) J. Immunol. 167: 2879-2886)。

表 16 角叉藻聚糖-诱导的爪水肿的体内抑制

| 角叉藻聚糖<br>时间 (hrs) | 爪肿胀变化 (mm) |       |       |       |
|-------------------|------------|-------|-------|-------|
|                   | 24         | 48    | 72    | 96    |
| 125-2H @ 400      | 0.357      | 0.557 | 0.543 | 0.414 |
| 1C5 @ 400 ug      | 0.214      | 0.300 | 0.286 | 0.200 |
| 大鼠 IgG @ 100 ug   | 0.300      | 0.500 | 0.550 | 0.450 |
| 93-10C @ 100 ug   | 0.157      | 0.271 | 0.243 | 0.157 |
| P<0.05 对对照 IgG    |            |       |       |       |

### 实施例 2.2. L. 3 : 胶原-诱导的关节炎

类风湿性关节炎(RA)特征在于关节的慢性炎症,和骨和关节软骨的损失。虽然认为 RA 是自身免疫疾病,但是还没有鉴定涉及的自身抗原,并且疾病的精确病因学还不清楚。胶原-诱导的关节炎(CIA)是广泛使用的 RA 模型并且具有与人基本类似的病理组织学特征(Bendele, A., 等(1999) Toxicol Pathol. 27: 134-142; Trentham, D. E. 等(1977) J. Exp. Med. 146: 857-868)。在这个模型中,用弗氏完全佐剂中 II 型胶原(CII)免疫易受遗传影响的小鼠或大鼠。得到的多关节炎特征在于软骨破坏,骨吸收,滑膜炎,和关节周炎症(Bendele, A., 等(1999) Toxicol Pathol. 27: 134-142)。DBA/1 背景的 IL-18 KO 小鼠表现比野生型小鼠降低的发生率和 CIA 严重度(Wei, X. Q., 等(2000) J. Immunol. 166: 517-521)。

为了找到内源 IL-18 在 CIA 的发病机理中的作用,用中和小鼠 IL-18 的兔多克隆 IgG (BA77)处理小鼠。从致敏时起给药 14 天时,BA77 推迟疾病发作并且导致疾病严重程度的显著减轻。BA77 还显著抑制 IgG2a 抗-胶原抗体的产生。这些结果与对于 rIL-18 KO 小鼠报道的那些类似,并且证实和早期 CIA 中重要促炎症细胞因子一样的 rIL-18 的作用。

来自 IL-18 KO 小鼠和抗-IL-18 IgG 处理的野生型小鼠的数据表

明, 在 CII-I 诱导的最初的 T 细胞激活中, IL-18 起着重要的促炎症作用。为了更好地理解 IL-18 在 CIA 启动期间的作用, 用 CII 免疫小鼠, 并且在疾病发作之前开始用大鼠 IgG 或 93-10C 处理, 这大概要 14 天。与对照大鼠 IgG 相比, 用 93-10C 治疗导致疾病发作和严重度的显著延迟 (表 17)。这些数据表明 IL-18 是有效的因子, 不仅是在 T 细胞引发中, 而且还在 CII-特异性 T 细胞激活之后促进 arthritogenic 响应中。

表 17 抗-IL-18 mAb 93-10C 延迟发病并且减轻 CIA 严重性

| 处理                   | 平均关节炎评分 |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| 天                    | 11      | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   |
| 大鼠 IgG @200 $\mu$ g  | 0.00    | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.27 | 0.53 | 1.20 | 1.20 |
| 93-10C @ 200 $\mu$ g | 0.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.00 | 0.20 | 0.47 |
| 地塞米松 -21-P @1mpk     | 0.00    | 0.00 | 0.27 | 0.27 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| 处理时间                 |         |      |      |      |      |      |      |      |
| P<0.05 对大鼠 IgG       |         |      |      |      |      |      |      |      |

| 处理                   | 平均关节炎评分 |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| 天                    | 19      | 20   | 21   | 22   | 23   | 25   | 26   | 27   |
| 大鼠 IgG @200 $\mu$ g  | 1.53    | 1.73 | 1.93 | 2.27 | 2.53 | 4.20 | 4.27 | 4.53 |
| 93-10C @ 200 $\mu$ g | 0.47    | 0.80 | 1.00 | 1.00 | 1.13 | 2.20 | 2.27 | 2.87 |
| 地塞米松 -21-P @1mpk     | 0.07    | 0.07 | 0.07 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.20 |
| 处理时间                 |         |      |      |      |      |      |      |      |
| P<0.05 对大鼠 IgG       |         |      |      |      |      |      |      |      |

#### 实施例 2.2. L. 4 : 脓毒性关节炎

IL-18 在脓毒性关节炎的小鼠模型的发病机理中是重要因子。一般不认为这是 RA 的模型, 但是同样有一些炎性成分和与 RA 相关的病理。在这个模型中, 向膝关节注射活 B 组链球菌 (GBS) 诱发疾病。跟着发生的关节炎的严重度与 IL-10 和 IL-6 的全身和局部水平有关, 而与 TNF 无关 (Tissi L., 等 (1999) Infect. Immunol. 67: 4545-50)。用血清型 IV (GBS) 注射后 12 小时这样早就在关节中测定了显著 IL-18 水平, 接着在 5 天之后 IL-18 产生达到峰值 (处理的 1C5 中 ~ 550 pg/ml, 对 IgG 对照物中 ~ 30 pg/ml)。注射后 5 天在血清中测得提高的 IL-18 水平 (处理的 1C5 中 ~ 180 pg/ml, 对 IgG 对照物中 ~ 20 pg/ml)。

在施用 GBS 之前 1 小时注射 1C5 时,从第二天至第十天关节损伤频率有显著抑制作用(关节指数:处理的 1C5 中 1.0,对 IgG 对照物中 2.5)。另外,1C5 处理还导致关节中细胞因子包括 IL-6 和 IL-1 $\beta$  的水平显著减小(没有给出数据)。

#### 实施例 2.2. L. 5: SLE

大多研究的狼疮模型涉及小鼠品系 (MRL/lpr 和 NZB/NZW F1),该小鼠品系自发发生狼疮样症状,伴有严重肾小球肾炎,自身抗体产生(抗-DNA,抗 RNP 等),脾大,淋巴结病,和一定程度关节炎和结节性脉管炎。通常在 3-5 月龄时观察到肾涉及,发展快速,6-10 个月是致命的。充分研究两个小鼠品系,弄明白了临床疾病。

选择 NZB/NZW F1 (B/W)小鼠模型 (The Jackson Laboratory, Maine, USA)作为评价外源 IL-18 对狼疮样疾病进程的影响的最相关模型。通常在 7-9 月龄发现 B/W 小鼠开始疾病进程,12-14 个月作为肾衰竭结果是致命的。为了研究狼疮发病机理中 IL-18 的作用,在 7 月龄开始每天用 r-muIL-18 或赋形剂对照物治疗 B/W 小鼠。通过测定蛋白尿程度评价肾功能。与 PBS 赋形剂治疗组相比,每天用 50 微克/千克 IL-18 治疗 B/W 小鼠导致促进严重蛋白尿的开始。IL-18 治疗的 B/W 小鼠还显示加速死亡。这些观察与上面对于 MRL/lpr 小鼠描述的那些相吻合,并且划线于自身免疫基本中 IL-18 的促炎作用。

为了研究 SLE 小鼠模型中 IL-18 阻断的治疗效果,建立了 B/W 小鼠诱导-保持处理方案,它概括了用于狼疮肾炎的临床治疗法。在该项研究中,严重肾炎的 B/W 小鼠接受 5 周环磷酰胺给药(诱导期),接着是长期 1C5 或小鼠 IgG 对照(125-2H) 处理(保持期)。

结果证明,与对照物 IgG1 125-2H 相比,继续 130 天保持处理,1C5 显著延长了 BW 小鼠的存活期。125-2H 是小鼠 IgG1 mAb,它不识别 muIL-18 ( $P < 0.05$ )。除了延长存活期,延迟了严重蛋白尿的开始,降低了 1C5 处理的 BW 小鼠中的 IgG2a 和 IgG1 抗-dsDNA。1C5 处理对抗-dsDNA 的减少是瞬时的,不是统计学意义的。检测抗 1C5 抗体(小鼠抗-小鼠抗体 [MAMA]),根据存活率的迅速降低和在抗 dsDNA 滴度和蛋白尿减少中作用的丧失所证明的,130 天之后效能丧失。结论是,尽管抗体的存在响应 1C5,1C5 阻断 IL-18 延长存活期,延迟严重蛋白

尿的发生,并且减小 B/W 小鼠抗-dsDNA 滴度。这些数据证明 IL-18 在促进炎症响应中的作用导致肾功能缺损,最后死亡。

#### 实施例 2.2. L. 6: 多发性硬化

研究了 IL-18 对试验性变应性脑脊髓炎(EAE ; MS 鼠模型)的贡献。认为复发-缓解 EAE 是人类疾病的适当模型,因为有相似的疾病过程,临床征兆,和 CNS 病理学。在这些研究中,对 IL-18 KO 小鼠和 WTC57/B16 诱导疾病。

IL-18 KO 小鼠表现出与 WT 小鼠相比疾病症状发生稍微延迟,在后来的时间点,疾病发展严重程度显著减小 (表 18)。在免疫后 0-14 天,用 BA77 (抗-小鼠 IL-18 IgG (250 毫克, 2X/wk)处理 WT 小鼠,在后来的时间点延迟疾病病症的发生并且显著限制疾病的严重程度 (表 18)。在后来的时间点,即使在停止治疗之后,还能观察到抗-IL-18 IgG 的保护作用。

表 18 抗-IL-18 Ab 处理的小鼠和 IL-18 敲除小鼠发生严重度减小的 EAE 疾病

|                            |           | 免疫后第14天<br>平均临床评分 |
|----------------------------|-----------|-------------------|
| SJL/J小鼠中<br>PLP诱导的EAE      | IgG(BA77) | 4                 |
|                            | 抗-IL-18抗体 | 2.7               |
|                            |           | 第18天平均临床评分        |
| IL-18KO和WT大鼠中<br>MOG诱导的EAE | WT        | 3.6               |
|                            | KO        | 2.1               |

#### 实施例 2.2. L. 7: 肝损伤

刀豆球蛋白 A (Con A)-诱导的肝炎/肝损伤是 T-细胞-介导肝病的动物模型。Con A 对肝内 T-细胞的激活导致局部产生炎性传递质介体 (例如 IFN  $\gamma$  和 Fas 配基)。Fas-Fas 配基相互作用导致 IL-18 的产生,其进一步诱导 IFN  $\gamma$ , Fas 配基和 TNF 产生。因此,确立阳性反馈圈,其导致肝损伤和将死细胞过量产生肝酶例如 ALT 和 AST。在静脉内施用 150 微克 Con A 之前 1 小时,注射(ip) 1C5 或 93-10C mAbs。Con A 注射后 24 小时对小鼠取血,并且测定肝酶(ALT & AST)的血清滴度。

1C5 和 93-10C 都阻断 LPS-诱导的肝酶提高,但是在低剂量时 93-10C 也有效(表 19)。

表 19 93-10C 对 ConA-诱导的肝炎的体内抑制

| 处理                   | AST  | stdv | ALT  | stdv |
|----------------------|------|------|------|------|
| PBS                  | 57   | 16   | 30   | 2    |
| ConA 只有              | 1138 | 416  | 1294 | 481  |
| ConA+93-10C (50ug)   | 183  | 70   | 153  | 88   |
| ConA+93-10C (12.5ug) | 635  | 427  | 443  | 256  |
| ConA+大鼠 IgG1(50ug)   | 3924 | 1062 | 3455 | 753  |

#### 实施例 2.2. L. 8: 脓毒症

IL-18 已经显示是内毒素休克的重要的传递质。IL-18 可能是内毒素诱导的肺,肝和多器官衰竭的决定性介体(Neeta, M. G. , 等(2000) J. Immunol. 164: 2644-2649)。IL-18 的这种作用可能以其调节细胞毒性介体产生的能力以及其激活先天免疫应答的能力和对局部炎症部位补充嗜中性白细胞的能力为基础。另外, LPS 攻击诱导 IFN  $\gamma$ , TNF 和 IL-1 血清水平升高, 这些细胞因子对 LPS-诱导的死亡率有贡献。用 LPS 攻击的 IL-18 敲除小鼠 LPS-诱导 IFN  $\gamma$  不足, 并且比 WT 小鼠产生少得多的 TNF 和 IL-1 (Takeda, K. , 等 (1998) Immunity 8: 383-390)。

如下进行 LPS 诱导死亡率实验。第 0 天对动物称重并且确定合适的给药剂量。在 T = -1 小时, 用 500 微升 0.9% 盐水中抗-IL-18 抗体或对照抗体对动物腹膜内(IP)注射。在 T = 0, 用 100 微升 0.9% 盐水中 20 毫克/千克脂多糖(LPS) (大肠杆菌血清型 0111 : B4 Sigma Cat # L-4130 1o # 71K4110)对动物静脉内注射。4 小时后, 通过心脏穿刺对动物采血。通过 muIFN $\gamma$  ELISA (R & D Systems)测定血清 muIFN  $\gamma$  滴度。

保护用抗-muIL-18mAbs, 1C5 或 93-10C 处理的 WT 小鼠免受 LPS-诱导的致死率(表 20) (125-2H, 和 1C5 具有相同的失活同位型, 但是不结合作为对照物的 muIL-18)。另外, 据报道, 抗-IL-18 IgG 处理的小鼠在 LPS 攻击之后具有减小的肺和肝损伤, 这与减少的嗜中性白细胞聚集有关(Neeta, M. G. , 等(2000) J. Immunol. 164: 2644-

2649)。

表 20 1C5 和 93-10CmAbs 防止高剂量 LPS 致死性

| 致死性               | 存活百分率 |     |     |    |    |    |    |     |     |
|-------------------|-------|-----|-----|----|----|----|----|-----|-----|
| 时间(小时)            | 0     | 8   | 24  | 32 | 48 | 56 | 72 | 120 | 144 |
| 盐水                | 100   | 100 | 100 | 50 | 10 | 10 | 10 | 10  | 10  |
| 125-2H @ 400      | 100   | 100 | 80  | 70 | 10 | 10 | 10 | 10  | 10  |
| 1C5 @ 400 $\mu$ g | 100   | 100 | 100 | 90 | 80 | 80 | 80 | 80  | 80  |

| 致死性                  | 存活百分率 |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 时间(小时)               | 0     | 8   | 24  | 32  | 48  | 56  | 72  | 120 | 144 |
| 盐水                   | 100   | 100 | 90  | 40  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  |
| 大鼠 IgG @ 100 $\mu$ g | 100   | 100 | 100 | 100 | 70  | 40  | 40  | 40  | 40  |
| 93-10C @ 100 $\mu$ g | 100   | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

### 实施例 2.2.M: 2.5(E) Fab 片段的结晶

为了证明本发明的抗体能被结晶，从而能制备含有结晶抗体的制剂和组合物，进行下面的实验。

#### 实施例 2.2. M.1 : 2.5(E) 抗体 Fab 片段的制备和纯化

在 SR-286 培养基中在 CHO 细胞中表达 2.5(E) 人 IgG。溶胞之后上清液通过 0.5 微米过滤器过滤并且加载到在 Protein A 缓冲剂 A (1XPBS) 中预平衡的 Protein A 柱上。然后用 Protein A 缓冲剂 B (0.1M 乙酸钠 pH 3.5, 150 mM NaCl) 洗脱 IgG。将合并的 IgG 浓缩至 20 毫克/毫升，与 50% 木瓜蛋白酶凝胶浆状物混合，剧烈搅拌下在 37℃ 下温育 24 小时。然后 4℃ 下抗体/浆液混合物对 50 mM Tris 缓冲剂 pH 7.0 透析过夜，从缓冲剂去除半胱氨酸。通过用 100 毫升缓冲剂 A (50 mM Tris pH 7.0) 制备 25 毫升蛋白质 A 琼脂糖 4 Fast Flow 亲和柱 (Amersham Pharmacia)。透析的上清液应用到亲和柱上 (流速 2 毫升/分钟)。在流通池中收集 2.5(E) Fab 级分 (在 280 nm 下通过 UV 吸光度测定)。将含有浓度大于 0.3 毫克/毫升 (在 280 nm 下通过 UV 吸光度测定) 的 2.5(E) Fab 的级分合并，并且使用 Ultrafree-15 Biomax 10 kDa 截留分子量 (MWC0) 离心过滤装置 (Millipore) 浓缩至 ~20 毫克/毫升 并且在 -80℃ 下冷冻。在下面描述的结晶学实验中使用该浓缩样品。应用 SDS-PAGE 测定样品纯度。

### 实施例 2.2. M. 2: 2.5 (E) Fab 片段的结晶

冷冻 2.5 (E) Fab 贮存液 (~20 毫克/毫升) 在冰上解冻。Fab (2 微升) 与 2 微升的由 25-30% 聚乙二醇 (PEG) 400, 100 mM CAPS pH 10.5 组成的贮存液混合, 并且在大约 4℃ 下在硅化玻璃载玻片下面的贮存液上悬浮。一天之内出现杆状晶体。测得杆状晶体是 2.5 (E) Fab 片段晶体 (没有给出数据)。

### 实施例 3: IL-18 响应基因

#### 实施例 3.1 : 材料和方法

实施例 4 中, 除非另有说明, 使用下面的材料和方法。

#### 实施例 3.1. A: 细胞处理和 RNA 制备

##### 实施例 3.1. A.1 : KG-1 细胞

在四个处理组中, 对各试验条件使用大约  $3.0 \times 10^7$  个 KG1 细胞 (ATCC # CCL-246)。首先, 有或没有与 10 毫克/毫升 放线菌酮预先温育 30 分钟情况下, 用 50 ng/mL 重组 IL18 处理细胞。30 分钟之后或 2 小时之后, 对细胞收集 RNA。其次, 有或没有与 10 毫克/毫升 放线菌酮预先温育 30 分钟情况下, 用 0, 0.5, 2.0, 10 或 50 ng/mL 重组 IL18 处理细胞。2 小时之后, 对细胞收集 RNA。第三, 用 0 或 10 ng/mL TNF 处理细胞。过夜温育之后, 有或没有与 10 毫克/毫升 放线菌酮预先温育 30 分钟情况下, 用 0, 0.5, 2.0, 10 或 50 ng/mL 重组 IL18 处理细胞。2 小时之后, 对细胞收集 RNA。在最后的处理组中, 有或没有与 10 毫克/毫升 放线菌酮预先温育 30 分钟情况下, 用 0 或 10 ng/mL TNF 和 0 或 2.0 ng/mL 重组 IL18 同时处理细胞。2 小时之后, 对细胞收集 RNA。

使用 TRIZOL 试剂 (Life Technologies, Rockville, MD) 制备总 RNA。根据生产商说明进行初始阶段分离, 并且接着使用一半体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1, Life Technologies, Rockville, MD) 进行另外的萃取。根据生产商 TRIZOL 程序说明进行 RNA 沉淀和洗涤。在 1.0% 琼脂糖/甲醛变性凝胶上对大约 3 微克 RNA 进行电泳测定性质。

对于需要 TNF 预先温育的实验, KG-1 细胞与 2 ng/ml TNF 温育 12

小时,然后用 2,10 或 40ng/ml 的 IL-18 刺激。如上所述制备 RNA。

### 实施例 3.1. A. 2: 人全血分析

2.5mL 等份全血装入 15 毫升圆锥形试管并且用 IL18, IL12, IL18+IL12, IL18+IL12+抗-IL18 或 IL18+IL12, IL18+IL12+对照抗体处理。最终浓度如下: IL12-500pg/mL, IL18(YK27-1) ~ 50ng/mL, mIgG ~ 5ug/mL, 抗-IL18 125 2H ~ 5ug/mL, 和抗-IL18 2.5 ~ 4ug/mL。37℃下,温和地间歇式地反转下将混合物温育。温育之后,通过加入 5 毫升 1X 溶胞缓冲液(在 Depc 中以 1: 10 稀释的 Pharm 溶解氯化铵溶解试剂),利用氯化铵回收红细胞。在冰上 5 分钟之后,以 1200 rpm 将混合物离心 5 分钟。将该程序重复一次,得到白色血白细胞沉淀物。接着应用上述 Trizol 程序分离 RNA。对于微量阵列分析,所有的样品体积增加 4 倍。

### 实施例 3.1. B : 探针的制备和靶物杂交

使用 10 微克总 RNA 和用于 cDNA 合成的 SuperScript Choice System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 来合成双链 cDNA。根据 Affymetrix (Santa Clara, CA) 程序进行合成,需要 T7-(dT)<sub>24</sub> 寡聚物引物(GENSET)代替试剂盒提供的寡(dT)或随机引物,并且在温度调节和第一个链合成步骤期间在 42℃下温育。得到的 cDNA 用 Phase Lock Gel Light 2 毫升试管 (Eppendorf AG, Hamburg, DE) 清洗,沉淀物悬浮于 12 微升 DEPC-H<sub>2</sub>O。与 BioArray High Yield RNA 转录标记试剂盒(Enzo, Farmingdale, NY)联合使用 5 微升 cDNA, 通过从 T7 RNA 聚合酶启动子体外转录 (IVT), 制备生物素-标记 cRNA 靶物。使用 RNeasy Mini Columns (Qiagen, Hilden, DE) 从 IVT 反应去除游离的核苷酸。然后根据 Affymetrix 方法将 15 微克生物素-标记的 cRNA 片段化。将全部片段化样品与 5 微升对照物寡核苷酸 B2 (Affymetrix), 15 微升 20X Eukaryotic Hybridization Control (Affymetrix), 3 微升超声处理的鲑精 DNA (10 毫克/毫升, Stratagene, La Jolla, CA), 3 微升乙酰化 BSA (50 毫克/毫升, Gibco BRL), 150 微升 2X MES 杂交缓冲液, 和水, 达到 300 微升终体积。根据 Affymetrix 方法, 预先用 1X MES 湿润 Genechip HuGeneFL

Arrays (Affymetrix)。然后将杂交混合物加热并离心，并且将 200 微升加载到芯片上。芯片在 45℃烤箱中自旋 16 小时。

#### 实施例 3.1. C: 对探针阵列洗涤，染色和扫描

从芯片取出杂交混合物并且用非严谨洗涤缓冲液置换。利用 EukGE-WS2 方案，在 GeneChip Fluidics Station 400 上，根据生产商说明书 (Affymetrix)；用链霉抗生素蛋白藻红蛋白 (SAPE) 染色溶液和抗体溶液对芯片染色的方法，将芯片洗涤和染色。所有的需要的缓冲洗涤液和染色剂都根据 Affymetrix 方法制备。与 GeneChip software (Affymetrix) 联合使用 GeneArray Scanner (Agilent, Palo Alto, CA) 来扫描染色阵列。

#### 实施例 3.1. D: 数据分析

基因芯片数据从 Affymetrix MAS4 传给 Microsoft Excel，然后上载到 Spotfire Decisionsite 7.0。

#### 实施例 3.2 : IL-18 调控的基因表达

实施例 3.2. 1: 单独的 IL18 直接调控基因在 KG1 细胞中形成股

为了测定 IL18 直接调控的转录体，在存在和不存在蛋白质合成抑制剂放线菌酮下，使用 KG1 细胞进行细胞因子滴定试验。表 1 所示的是在存在和不存在放线菌酮的至少一种条件下已经被调控 2 倍或更多的 67 个不同探针组 (由于芯片上的冗余性) 代表的 62 个转录体的列表，p 值小于 0.05 (利用斯氏 t 分析)。这些基因包括各种功能分类，包括转录因子，激酶，和分泌的蛋白质。因为这些基因是受调控的，没有从头合成蛋白质，这些基因直接响应 IL18 诱导的信号。12 个基因编码分泌的蛋白质，并且 13 个编码表面分子 (制备这些可行抗体靶物)。其余编码细胞核和胞质蛋白质 (见表 21)。

表 21. IL18 诱导的基因

| Genbank ID        | 位置 / 功能 | 基因名称     | Unigene备注              | 0.5<br>ng/ml | 2<br>ng/ml | 10<br>ng/ml | 50<br>ng/ml |
|-------------------|---------|----------|------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| L29217            | 激酶      | CLK3     | CDC-样激酶3               | 9.1          | 7.4        | 8.1         | 15.0        |
| D14497            | 激酶      | MAP3K8   | 促细胞分裂剂-激活的蛋白质激酶激酶8     | 6.6          | 2.9        | 5.8         | 3.9         |
| L19871            | 两个都不    | ATF3     | 激活转录因子3                | 1.0          | 1.1        | 3.3         | 2.6         |
| U15460            | 两个都不    | BATF     | 碱性亮氨酸拉链转录因子, ATF-样     | 1.5          | 1.7        | 2.4         | 2.8         |
| U45878            | 两个都不    | BIRC3    | 包含杆状病毒IAP重复3           | 7.0          | 6.2        | 10.2        | 10.0        |
| U37546            | 两个都不    | BIRC3    | 包含杆状病毒IAP重复3           | 29.4         | 26.9       | 76.6        | 63.6        |
| U72649            | 两个都不    | BTG2     | BTG家族, 成员2             | 3.1          | 4.7        | 6.6         | 5.9         |
| L07765            | 两个都不    | CES1     | 羧酸酯酶1                  | 1.0          | 1.3        | 2.1         | 2.1         |
| M27691            | 两个都不    | CRBB1    | cDNA响应元件结合蛋白1          | 0.9          | 2.4        | 4.9         | 3.1         |
| HG3548-<br>HT3749 | 两个都不    | CUTL1    | 切补 (CCAAT替代蛋白质)        | 2.5          | 2.1        | 1.3         | 0.7         |
| X59131            | 两个都不    | D13S106E | 高电荷蛋白质                 | 2.1          | 0.5        | 1.5         | 2.3         |
| U53445            | 两个都不    | DOC1     | 卵巢癌1中负调节               | 2.0          | 3.3        | 3.0         | 3.8         |
| X68277            | 两个都不    | DUSP1    | 双重特异性磷酸酶1              | 2.5          | 3.1        | 4.1         | 3.3         |
| U48807            | 两个都不    | DUSP4    | 双重特异性磷酸酶4              | 2.0          | 2.3        | 2.9         | 2.0         |
| X52541            | 两个都不    | EGR1     | 早期生长响应1                | 15.5         | 12.7       | 32.4        | 20.3        |
| X63741            | 两个都不    | EGR3     | 早期生长响应3                | 5.9          | 7.3        | 15.1        | 9.0         |
| L07077            | 两个都不    | BHADH    | 烯脂酰辅酶A                 | 3.4          | 2.3        | 1.8         | 2.5         |
| M62831            | 两个都不    | ETR101   | 即时早期蛋白质                | 3.4          | 5.8        | 6.3         | 6.8         |
| L19314            | 两个都不    | HRY      | 毛发 (果蝇) 同系物            | 2.3          | 2.5        | 2.3         | 2.0         |
| S81914            | 两个都不    | IER3     | 即时早期响应3                | 17.0         | 18.6       | 32.9        | 29.6        |
| X51345            | 两个都不    | JUNB     | jun B原癌基因              | 7.2          | 6.1        | 10.7        | 9.6         |
| U20734            | 两个都不    | JUNB     | jun B原癌基因              | 10.2         | 21.8       | 25.0        | 25.4        |
| U49957            | 两个都不    | LPP      | 包含LIM结构域               | 2.2          | 1.1        | 2.0         | 1.9         |
| M58603            | 两个都不    | NFKB1    | 核因子κB (p105)           | 1.6          | 2.0        | 2.9         | 2.3         |
| S76638            | 两个都不    | NFKB2    | 核因子κB                  | 1.7          | 2.2        | 3.5         | 4.3         |
| M69043            | 两个都不    | NFKB1A   | 核因子κB                  | 9.6          | 10.4       | 15.5        | 15.8        |
| U91616            | 两个都不    | NFKBIE   | 核因子κB                  | 11.6         | 14.8       | 20.7        | 21.0        |
| L13740            | 两个都不    | NR4A1    | 核受体亚家族4, 族A, 成员1       | 2.0          | 2.7        | 2.4         | 2.5         |
| HG4115-<br>HT4385 | 两个都不    | OR1E3P   | 嗅感受蛋白                  | 4.5          | 12.0       | 4.2         | 4.1         |
| L20971            | 两个都不    | PDE4B    | 磷酸二酯酶4B, cAMP-特异性      | 2.4          | 2.8        | 4.2         | 3.5         |
| U64675            | 两个都不    | RANBP2L1 | RNA结合蛋白2-样1            | 1.1          | 1.8        | 2.2         | 2.2         |
| S57153            | 两个都不    | RBBP1    | 成视网膜细胞瘤-结合蛋白1          | 2.5          | 3.4        | 5.0         | 4.1         |
| X75042            | 两个都不    | REL      | v-rel                  | 1.6          | 2.5        | 3.9         | 3.7         |
| M83221            | 两个都不    | RELB     | v-rel                  | 2.3          | 2.8        | 2.8         | 2.6         |
| S59049            | 两个都不    | RGS1     | G-蛋白质信号调控剂1            | 10.9         | 12.7       | 22.4        | 17.8        |
| U70426            | 两个都不    | RGS16    | G-蛋白质信号调控剂16           | 3.9          | 4.7        | 7.5         | 6.7         |
| U22377            | 两个都不    | RLF      | 重排L-myc融合序列            | 2.5          | 2.0        | 2.5         | 2.6         |
| M95787            | 两个都不    | TAGLN    | 转凝蛋白                   | 6.6          | 4.7        | 1.0         | 1.6         |
| L47345            | 两个都不    | TCEB3    | 转录延伸因子B (110kD, 延伸蛋白A) | 3.6          | 5.3        | 2.3         | 4.2         |
| M59465            | 两个都不    | TNFAIP3  | 肿瘤坏死因子, α-诱导蛋白质3       | 9.9          | 12.4       | 25.4        | 20.6        |
| U19261            | 两个都不    | TRAF1    | TNF受体结合因子1             | 2.8          | 2.8        | 4.9         | 4.1         |
| U78798            | 两个都不    | TRAF6    | TNF受体结合因子6             | 1.2          | 2.0        | 2.1         | 2.2         |
| M37435            | 分泌的     | CSF1     | 集落刺激因子1 (巨噬细胞)         | 2.9          | 2.9        | 2.1         | 2.6         |
| M57731            | 分泌的     | GRO2     | GRO2致癌基因               | 15.2         | 20.9       | 26.3        | 27.0        |
| X53800            | 分泌的     | GRO3     | GRO3致癌基因               | 4.1          | 5.5        | 14.8        | 9.9         |
| X04500            | 分泌的     | IL1B     | 白介素1, β                | 2.2          | 3.4        | 5.7         | 4.7         |
| M28130            | 分泌的     | IL8      | 白介素8                   | 6.2          | 10.0       | 13.4        | 14.5        |
| Y00787            | 分泌的     | IL8      | 白介素8                   | 5.8          | 7.4        | 8.3         | 8.5         |
| U89922            | 分泌的     | LTB      | 淋巴毒素β (TNF超家族, 成员3)    | 5.0          | 5.7        | 11.0        | 12.8        |

| Genbank ID  | 位置/<br>功能 | 基因名称     | Unigene备注                                 | 0.5<br>ng/ml | 2<br>ng/ml | 10<br>ng/ml | 50<br>ng/ml |
|-------------|-----------|----------|-------------------------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| M31166      | 分泌的       | PTX3     | Pentaxin-相关基因, IL-1 $\beta$ 快速诱导          | 3.1          | 5.2        | 10.3        | 6.4         |
| M23178      | 分泌的       | SCYA3    | 小的可诱导细胞因子A3                               | 1.8          | 2.0        | 5.0         | 3.8         |
| M69203      | 分泌的       | SCYA4    | 小的可诱导细胞因子A4                               | 0.9          | 1.9        | 7.0         | 5.6         |
| J04130      | 分泌的       | SCYA4    | 小的可诱导细胞因子A4                               | 1.0          | 2.6        | 5.9         | 4.5         |
| M92357      | 分泌的       | TNFAIP2  | 肿瘤坏死因子, $\alpha$ -诱导蛋白质2                  | 4.2          | 6.4        | 20.3        | 19.3        |
| Z32765      | 表面        | CD36     | CD36抗原(胶原I型/TSP受体)                        | 1.6          | 2.0        | 1.4         | 1.2         |
| Z11697      | 表面        | CD83     | CD83抗原                                    | 4.7          | 8.2        | 19.6        | 16.7        |
| M57730      | 表面        | EFNA1    | 肝配蛋白-A1                                   | 9.8          | 6.0        | 9.5         | 15.2        |
| A28102      | 表面        | GABRA3   | $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)受体                    | 3.0          | 2.5        | 1.6         | 2.7         |
| M24283      | 表面        | ICAM1    | 细胞胞间粘着分子1(CD54)                           | 7.5          | 11.5       | 14.5        | 13.9        |
| M55024      | 表面        | ICAM1    | 细胞胞间粘着分子1(CD54)                           | 2.5          | 3.4        | 3.2         | 3.7         |
| J03171      | 表面        | IFNAR1   | 干扰素( $\alpha$ , $\beta$ 和 $\epsilon$ )受体1 | 3.2          | 2.5        | 2.8         | 2.6         |
| X01057      | 表面        | IL2RA    | 白介素2受体, $\alpha$                          | 0.7          | 0.4        | 3.9         | 3.6         |
| L10338      | 表面        | SCN1B    | 钠通道肽                                      | 1.8          | 2.3        | 1.5         | 1.5         |
| D79206      | 表面        | SDC4     | 黏结蛋白聚糖4(双糖蛋白聚糖, 抗凝蛋白聚糖)                   | 4.0          | 4.2        | 7.2         | 6.1         |
| HG961-HT961 | 表面        | SOS1     | Sos蛋白(果蝇)同系物1                             | 6.3          | 6.2        | 9.1         | 9.9         |
| X83490      | 表面        | TNFRSF6  | 肿瘤坏死因子受体成员6                               | 1.1          | 1.3        | 3.8         | 3.3         |
| U19523      | 两个都不      | GCH1     | GTP环化水解酶1                                 |              | 2.1        |             |             |
| U37518      | 表面        | TNFRSF10 | 肿瘤坏死因子受体成员10                              | 1.4          | 1.4        | 2.3         | 1.6         |

### 实施例 3.2. 2: 细胞因子暴露历史影响 KG-1 细胞对 IL-18 的响应

因为在免疫应答中细胞因子一般接着出现, 对 IL18 处理之前与 TNF 一起温育 KG-1 细胞的效果进行分析。该项试验还验证了细胞因子暴露历史可以影响它们对接着的细胞因子暴露的响应的假设。在加入 IL18 之前用 2ng TNF 将细胞处理 12 小时并且在 4 小时之后收获。

IL18 调控这些条件下大约 125 种基因的表达(表 2)。获得这组基因使用的过滤条件由于 TNF 而变化小于 50%, 由于 10 ng/mL 和 40ng/mL IL18 而变化两倍或更大。这些基因包括各种各样的功能分类, 包括转录因子, 激酶, 和分泌的蛋白质(表 22)。与这里试验的其他条件相反, 我们发现干扰素  $\gamma$  mRNA 和暴露 TNF 之后 IL18 诱导的蛋白质。

表 22. TNF 处理后 IL18 调控的基因

| Genbank ID    | 基因名称     | Unigene备注                                | 折叠10ng | 折叠40ng |
|---------------|----------|------------------------------------------|--------|--------|
| J00219        | IFNG     | 干扰素, $\gamma$                            | 26.3   | 31.8   |
| U17034        | PLA2R1   | 磷酸酯酶A2受体1, 180kD                         | 29.6   | 28.7   |
| M57710        | LGALS3   | 凝集素, 半乳糖苷-结合, 可溶性, 3 (半乳凝集素3)            | 27.5   | 25.4   |
| X97748        | PTX3     | pentaxin-相关基因, IL-1诱导的                   | 15.2   | 13.6   |
| M27288        | OSM      | 制瘤素M                                     | 23.1   | 12.0   |
| X57809        |          | $\lambda$ 轻链可变区                          | 10.9   | 10.0   |
| Y00081        | IL6      | 白介素6 (干扰素, $\beta$ 2)                    | 9.2    | 9.4    |
| D16583        | HDC      | 组氨酸脱羧酶                                   | 8.0    | 9.4    |
| X07730        | KLK3     | 血管舒缓素3 (前列腺特异性抗原)                        | 5.6    | 8.8    |
| HG3111-HT3287 |          | 未知的人克隆HH409                              | 9.5    | 7.5    |
| M57732        | TCF1     | 肝核因子 (HNF1)                              | 2.0    | 7.2    |
| U77735        | PIM2     | pim-2致癌基因                                | 7.1    | 7.1    |
| U96094        | SLN      | sarcolipin                               | 12.2   | 6.1    |
| D50640        | PDE3B    | 磷酸二酯酶3B, cGMP-抑制的                        | 4.0    | 5.4    |
| X14008        | LYZ      | 溶菌酶 (肾淀粉样变性)                             | 3.0    | 5.4    |
| M91036        | HBG2     | 血红素, $\gamma$ G                          | 3.4    | 5.4    |
| X72755        | MIG      | $\gamma$ 干扰素诱导的单核因子                      | 5.2    | 5.2    |
| AC000099      | GRM8     | 谷氨酸受体, 代谢型8                              | 2.3    | 4.3    |
| D11428        | PMP22    | 外周髓磷脂蛋白质22                               | 5.0    | 4.0    |
| M83667        | CEBPD    | CCAAT/增强子结合蛋白                            | 4.3    | 4.0    |
| L19267        | DMWD     | 肌强直性营养不良, WD重复基序                         | 3.0    | 3.8    |
| M81181        | ATP1B2   | ATP酶, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> 运输 | 3.5    | 3.8    |
| U79249        |          | 人克隆23839序列                               | 3.1    | 3.7    |
| U49973        | FLJ10803 | 假定蛋白FLJ10803                             | 3.2    | 3.6    |
| HG870-HT870   | GOLOA3   | 高尔基体自身抗原, 高尔基体亚家族a, 3                    | 3.5    | 3.6    |
| X13589        | CYP19    | 细胞色素P450, 亚家族XIX                         | 3.0    | 3.5    |
| AB000464      |          | 克隆: RES4-24A                             | 2.9    | 3.5    |
| M96956        | TDGF1    | 畸胎瘤-产生的生长因子1                             | 2.6    | 3.5    |
| U31628        | IL15RA   | 白介素15受体, $\alpha$                        | 6.4    | 3.3    |
| D38128        | PTGIR    | 前列腺素I2 (前列腺环素) 受体 (IP)                   | 8.8    | 3.3    |
| J03507        | C7       | 补体成分7                                    | 2.3    | 3.1    |
| M32011        | NCF2     | 嗜中性白细胞胞质因子2                              | 3.5    | 3.0    |
| X63131        | PML      | 前髓细胞白血病                                  | 4.7    | 3.0    |
| D82326        | SLC3A1   | 溶质载体家族3                                  | 4.0    | 3.0    |
| L10343        | PI3      | 蛋白酶抑制剂3, 皮肤-产生的 (SKALP)                  | 2.1    | 3.0    |
| U89995        | FOXE1    | 叉头盒E1 (甲状腺转录因子2)                         | 2.6    | 2.9    |
| M62800        | SSA1     | (52kD, 核糖核蛋白自身抗原SS-A/Ro)                 | 3.1    | 2.9    |
| AB000584      | PLAB     | 前列腺分化因子                                  | 2.4    | 2.8    |
| U37519        | ALDH8    | 醛脱氢酶8                                    | 2.2    | 2.7    |
| D21267        | SNAP25   | 突触体-结合蛋白, 25kD                           | 2.2    | 2.7    |
| M25667        | GAP43    | 生长相关蛋白43                                 | 2.5    | 2.7    |
| L34357        | GATA4    | GATA-结合蛋白4                               | 2.3    | 2.7    |
| U43944        | ME1      | 苹果酶1, NADP (+)-依赖性, 胞质                   | 3.0    | 2.7    |
| M16937        | HOXB7    | 同源异型框B7                                  | 2.9    | 2.6    |
| U27326        | FUT3     | 岩藻糖转移酶3                                  | 2.6    | 2.6    |

| Genbank ID    | 基因名称     | Unigene备注                 | 折叠10ng | 折叠40ng |
|---------------|----------|---------------------------|--------|--------|
| Z23115        | BCL2L1   | BCL2-样1                   | 2.2    | 2.6    |
| HG1877-HT1917 | MBP      | 髓磷脂碱性蛋白                   | 2.4    | 2.6    |
| D10995        | HTR1B    | 5-羟酪胺(血清素)受体1B            | 2.5    | 2.6    |
| M91463        | SLC2A4   | 溶质载体家族2葡萄糖转运蛋白            | 3.1    | 2.5    |
| U19878        | TMEFF1   | 跨膜蛋白, EGF和促滤泡素抑制素样        | 2.9    | 2.4    |
| U66468        | CGR11    | 带有EF-hand结构域的细胞生长调控       | 2.2    | 2.4    |
| U44848        | NRF1     | 核呼吸因子1                    | 3.5    | 2.4    |
| U73328        | DLX4     | distal-less同源异型框4         | 3.2    | 2.4    |
| HG4593-HT4998 |          | 电压控制钠通道(SCN1A)            | 2.3    | 2.4    |
| X78710        | MTF1     | 金属调节转录因子1                 | 2.7    | 2.4    |
| X59727        | MAPK4    | 促细胞分裂剂-激活蛋白质激酶4           | 2.3    | 2.4    |
| J03600        | ALOX5    | 花生四烯酸5-脂加氧酶               | 2.2    | 2.3    |
| U87269        | E4F1     | E4F转录因子1                  | 3.4    | 2.3    |
| Y10375        | PTPNS1   | 酪氨酸磷酸酶, 非受体作用物1           | 4.5    | 2.2    |
| D49958        | GPM6A    | 糖蛋白M6A                    | 3.3    | 2.2    |
| U60062        | FEZ1     | 成束和伸长蛋白质 $\zeta$ 1(zygin) | 3.3    | 2.2    |
| X14830        | CHRNA1   | 胆碱能受体, 烟碱, $\beta$ 多肽1    | 2.4    | 2.1    |
| J04076        | EGR2     | 早期生长响应2(Krox-20同系物)       | 3.0    | 2.1    |
| HG2981-HT3127 | CD44     | CD44抗原                    | 2.2    | 2.1    |
| U49187        | C6ORF32  | 染色体6开放读框32                | 3.8    | 2.1    |
| X77744        |          | 人FLJ00032蛋白质, 部分          | 2.3    | 2.1    |
| X68285        | GK       | 甘油激酶                      | 2.4    | 2.0    |
| HG3925-HT4195 | SFTPA2   | 表面活性剂, 肺-相关蛋白质A2          | 3.9    | 2.0    |
| M26062        | IL2RB    | 白介素2受体, $\beta$           | 0.2    | 0.5    |
| X06182        | KIT      | V-试剂盒致癌基因同系物              | 0.4    | 0.5    |
| U79251        | OPCML    | 阿片样物质-结合蛋白/细胞粘着分子-样       | 0.5    | 0.5    |
| J03764        | SERPINE1 | 连接蛋白, 纤溶酶原激活剂抑制剂1型        | 0.5    | 0.5    |
| X92814        | HREV107  | 与大鼠HREV107类似物             | 0.3    | 0.5    |
| L01087        | PRKCQ    | 蛋白激酶C, $\theta$           | 0.2    | 0.5    |
| D43772        | GRB7     | 生长因子受体-结合蛋白7              | 0.2    | 0.5    |
| X15880        | COL6A1   | 胶原VI型, $\alpha$ 1         | 0.5    | 0.5    |
| HG3115-HT3291 | MBP      | 髓磷脂碱性蛋白                   | 0.4    | 0.5    |
| X83301        | SMA3     | SMA3                      | 0.5    | 0.5    |
| D87469        | CELSR2   | 钙黏着蛋白, EGF LAG 七跨膜区G-型受体2 | 0.4    | 0.5    |
| M11313        | A2M      | $\alpha$ -2-巨球蛋白          | 0.4    | 0.4    |
| X64877        | HFL3     | H因子(补体)-样3                | 0.4    | 0.4    |
| Z18859        | GNAT2    | 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白)           | 0.4    | 0.4    |
| D89077        | SLA      | Src-样-接头                  | 0.4    | 0.4    |
| L25444        | TAF2E    | TATA盒结合蛋白(TBP)-相关因子       | 0.2    | 0.4    |
| M26665        | HTN3     | Histatin3                 | 0.4    | 0.4    |
| S69790        | WASF3    | WAS蛋白质家族, 成员3             | 0.4    | 0.4    |
| U79248        |          | 人克隆23826序列                | 0.4    | 0.4    |
| L15309        | ZNF141   | 锌指蛋白141(克隆pHZ-44)         | 0.3    | 0.4    |
| L41147        | HTR6     | 5-羟酪胺(血清素)受体6             | 0.4    | 0.4    |
| X58431        | HOXB6    | 同源异型框B6                   | 0.4    | 0.4    |
| U50360        | CAMK2G   | CaM激酶II $\gamma$          | 0.2    | 0.4    |
| D88152        | ACATN    | 乙酰辅酶A转运蛋白                 | 0.4    | 0.4    |
| U38480        | RXRG     | 视网膜样X受体, $\gamma$         | 0.3    | 0.4    |
| X16866        | CYP2D7AP | 细胞色素P450, 亚家族IID          | 0.4    | 0.4    |

| Genbank ID    | 基因名称     | Unigene备注                      | 折叠10ng | 折叠40ng |
|---------------|----------|--------------------------------|--------|--------|
| X70991        | NAB2     | NGFI-A结合蛋白2 (ERG1 bp2)         | 0.2    | 0.4    |
| M60830        | EVI2B    | 嗜亲性病毒整合位点2B                    | 0.4    | 0.4    |
| M27492        | IL1R1    | 白介素1受体, I型                     | 0.4    | 0.4    |
| Z35093        | SURF1    | 马苕麻疹1                          | 0.4    | 0.4    |
| D86425        | NID2     | 巢蛋白2                           | 0.3    | 0.3    |
| U59914        | MADH6    | MAD) 同系物6                      | 0.4    | 0.3    |
| M18255        | PRKCB1   | 蛋白质激酶C, $\beta$ 1              | 0.4    | 0.3    |
| AF000234      | P2RX4    | 嘌呤能受体P2X                       | 0.3    | 0.3    |
| S77763        | NFE2     | 核因子(红细胞-产生的2), 45kD            | 0.4    | 0.3    |
| U78722        | ZNF165   | 锌指蛋白165                        | 0.3    | 0.3    |
| L05568        | SLC6A4   | 溶质载体家族6(血清素)                   | 0.3    | 0.3    |
| L31529        | SNTB1    | 肌养蛋白-相关蛋白A1                    | 0.3    | 0.3    |
| U47054        | ART3     | ADP-核糖基转移酶3                    | 0.4    | 0.3    |
| M13955        | KRT7     | 角蛋白7                           | 0.4    | 0.3    |
| D15049        | PTPRH    | 蛋白质酪氨酸磷酸酶, 受体型, H              | 0.4    | 0.3    |
| U03486        | GIA5     | 间隙连接蛋白, $\alpha$ 5, 40kD(连接蛋白) | 0.5    | 0.3    |
| X06256        | ITGA5    | 整联蛋白, $\alpha$ 5               | 0.4    | 0.3    |
| U22314        | REST     | RE1-沉默转录因子                     | 0.3    | 0.3    |
| U51096        | CDX2     | 尾侧型同源异形框转录因子2                  | 0.2    | 0.2    |
| D31762        | KIAA0057 | TRAM-样蛋白                       | 0.4    | 0.2    |
| M23668        | FDX1     | 铁氧化还原蛋白1                       | 0.2    | 0.2    |
| U53476        | WNT7A    | 无翼型MMTV整合位点家族                  | 0.2    | 0.2    |
| X57206        | ITPKB    | 肌醇1, 4, 5-三磷酸酶3-激酶B            | 0.2    | 0.2    |
| Z31695        | INPP5A   | 肌醇聚磷酸酶-5-磷酸酶, 40kD             | 0.4    | 0.2    |
| S66793        | ARR3     | 视紫红质抑制蛋白3, 视网膜的(X-抑制蛋白)        | 0.2    | 0.2    |
| U59877        | RAB31    | RAB31, 成员RAS致癌基因家族             | 0.2    | 0.2    |
| U53786        | EVPL     | 外被斑蛋白                          | 0.2    | 0.2    |
| S83362        | LIFR     | 白血病抑制因子受体                      | 0.3    | 0.2    |
| D42038        | KIAA0087 | KIAA0087基因产物                   | 0.3    | 0.2    |
| HG4333-HT4603 | ZNF79    | 锌指蛋白79 (pT7)                   | 0.1    | 0.1    |
| L01406        | GHRHR    | 生长激素释放激素受体                     | 0.4    | 0.1    |

### 实施例 3.2. 3: 人白细胞对 IL18 的响应

试验了人白细胞(分离的白细胞生成)对单独的 IL18 或者与 IL12 联合的 IL18 的响应。也分析了抗-IL18 单克隆抗体抑制转录应答的能力。根据实施例 4.1 所述处理细胞。分离 RNA 并且用于探测 Affymetrix Genechips (Hugene, FL)。表 23 给出结果, 列出了 IL18+IL12 诱导的被抗-IL18 抗体反转的 49 个转录物。几种基因与免疫系统有关。这些基因中的很多也由 KG-1 细胞中的 IL18 诱导。

表 23. 根据使用 Affymetrix Genechips 所测定的, 从人白细胞样品中 IL18+IL12 正调节 4 倍或更多并且由 125 2H 反转的转录物中选择的其他有效 IL18/IL12 标记物

| 基因名称     | Unigene备注                               | Unigene   |
|----------|-----------------------------------------|-----------|
| KIAA0001 | 假定G蛋白偶联受体, 用于UDP-葡萄糖                    | Hs.2465   |
| LIMK2    | LIM结构域激酶2                               | Hs.278027 |
| KIAA0196 | KIAA0196基因产物                            | Hs.8294   |
| IFNG     | 干扰素, $\gamma$                           | Hs.856    |
| POLR2C   | 聚合酶(RNA) II多肽                           | Hs.79402  |
| DAG1     | 营养不良蛋白聚糖1                               | Hs.76111  |
| TPSB1    | 类胰蛋白酶 $\beta$ 1                         | Hs.250700 |
| CDR2     | 小脑变性-相关蛋白质(62kD)                        | Hs.75124  |
| TCF12    | 螺旋-环-螺旋转录因子4                            | Hs.21704  |
| TACTILE  | 晚期表达增加的T细胞激活                            | Hs.142023 |
| PIP5K2A  | 磷脂酰肌醇-4-磷酸5-激酶                          | Hs.108966 |
| SF3A3    | 剪接因子3a, 亚基3, 60kD                       | Hs.77897  |
| SEL1L    | sel-1(lin-12的抑制剂, <i>C. elegans</i> )-样 | Hs.181300 |
| IL15     | 白介素15                                   | Hs.168132 |
| BAK1     | BCL2-拮抗剂/杀伤者1                           | Hs.93213  |
| SLAM     | 信号淋巴细胞激活分子                              | Hs.32970  |
| SCYB11   | 小的可诱导细胞因子亚家族B (Cys-X-Cys), 成员11         | Hs.103982 |
| LIMK1    | LIM结构域激酶1                               | Hs.36566  |
| CAT56    | CAT56蛋白质                                | Hs.118354 |
| POLRMT   | 聚合酶(RNA)线粒体(DNA指示)                      | Hs.153880 |
| SCYA4    | 小的可诱导细胞因子A4/Mip-1b                      | Hs.75703  |
| MIG      | $\gamma$ 干扰素诱导的单核因子                     | Hs.77367  |
| SSX3     | 滑膜肉瘤, X断点3                              | Hs.178749 |
| TNFRSF6  | 肿瘤坏死因子受体亚家族, 成员6                        | Hs.82359  |
| MAT1A    | 蛋氨酸腺苷转移酶I, $\alpha$                     | Hs.323715 |
| KIAA0133 | KIAA0133基因产物                            | Hs.57730  |
| FCGBP    | IgG结合蛋白的Fc片段                            | Hs.111732 |
| ARHD     | Ras同系物基因家族, 成员                          | Hs.15114  |
| FGFR2    | 成纤维细胞生长因子受体2                            | Hs.278581 |
| COL9A1   | 胶原, IX型, $\alpha$ 1                     | Hs.154850 |
| HPX42B   | 造血先祖同源异形框                               | Hs.125231 |
| TAL2     | T-细胞急性淋巴细胞白血病2                          | Hs.247978 |
|          | ESTs                                    | Hs.196244 |
| REN      | 肾素                                      | Hs.3210   |
| POU2F2   | POU结构域, 2类, 转录因子2                       | Hs.1101   |
| ALOX12   | 花生四烯酸12-脂氧合酶                            | Hs.1200   |
| ACTN2    | 辅肌动蛋白, $\alpha$ 2                       | Hs.83672  |
| KLK2     | 血管舒缓素2, 前列腺的                            | Hs.181350 |

| 基因名称   | Unigene备注                              | Unigene   |
|--------|----------------------------------------|-----------|
| RCV1   | 恢复蛋白                                   | Hs.80539  |
| E2F4   | E2F转录因子4, p107/p130-结合                 | Hs.108371 |
| SEMA3F | 免疫球蛋白结构域(Ig), 短的碱性结构域, 分泌的, (脑信号蛋白) 3F | Hs.32981  |
| BHMT   | 甜菜碱-高半胱氨酸甲基转移酶                         | Hs.80756  |
| EVPL   | 外被斑蛋白                                  | Hs.25482  |
| BBC3   | Bcl-2结合成分3                             | Hs.87246  |
| SLN    | Sarcolipin                             | Hs.15219  |
| RDBP   | RD RNA-结合蛋白                            | Hs.106061 |
| MT1H   | 金属硫蛋白                                  | Hs.2667   |
| RAD54L | RAD54 (啤酒糖酵母)-样                        | Hs.66718  |
| MLL3   | 骨髓 / 淋巴样或混合-血统白血病3                     | Hs.288971 |

#### 实施例 3.2. 4: 人全血对 IL18 的响应

试验了全血细胞对单独的 IL18 或者与 IL12 联合的 IL18 的响应。也分析了抗-IL18 单克隆抗体抑制转录应答的能力。根据实施例 4.1 所述处理正常的供体血样。分离 RNA, 并且用来探测 Affymetrix Genechips (HugeneFL)。表 24 给出结果, 它列出 IL18+IL12 显著调控的并且抗-IL18 抗体反转的从两名健康供体分离的全血样中 16 个转录体。几个基因与免疫系统有关。我们应用定量 PCR 平行对 10 名正常供体的这些基因中的三个测定响应。表 25 对于干扰素  $\gamma$  给出这个人可变性研究的结果; 表 26 给出 CXCL9 的结果, 表 27 给出 CCL8 的结果。可变性研究的结果表明, 人血液中 IL18 对这些转录体的调控在人中可能是普遍的。

表 24. 从两名供体分离的然后用 IL18+IL12 处理的全血正调节转录体选择的其他 IL18 / IL12 有效标记物

| 探针组ID       | 标题                            | Unigene   |
|-------------|-------------------------------|-----------|
| 202284_s_at | 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A (p21, Cip1)  | Hs.179665 |
| 202531_at   | 干扰素调控因子1                      | Hs.80645  |
| 204057_at   | 干扰素共有序列结合蛋白1                  | Hs.14453  |
| 205488_at   | 粒酶A (粒酶1, 细胞毒素T-淋巴细胞相关丝氨酸酯酶3) | Hs.90708  |
| 206554_x_at | SET结构域和mariner转座酶融合基因         | Hs.265855 |
| 206817_x_at | 包含三核苷酸重复单元4                   | Hs.26047  |
| 207509_s_at | 白细胞-相关Ig-样受体2                 | Hs.43803  |
| 209546_s_at | 载脂蛋白L, 1                      | Hs.114309 |
| 214438_at   | H2.0-样同源异形框1 (果蝇)             | Hs.74870  |

|             |                                                    |           |
|-------------|----------------------------------------------------|-----------|
| 214450_at   | 组织蛋白酶W (lymphopain)                                | Hs.87450  |
| 216950_s_at | FcRI b形式(AA1-344) [人], mRNA序列                      | Hs.382006 |
| 217933_s_at | 亮氨酸氨基肽酶3                                           | Hs.182579 |
| 219386_s_at | B淋巴细胞激活剂, 巨噬细胞表达的                                  | Hs.20450  |
| 219956_at   | UDP-N-乙酰基- $\alpha$ -D-半乳糖胺: 多肽N-乙酰基<br>氨基半乳糖基转移酶6 | Hs.151678 |
| 219971_at   | 白介素21受体                                            | Hs.210546 |
| 221223_x_at | 细胞因子可诱导SH2-包含蛋白质                                   | Hs.8257   |

表 25. 10 个人血样中干扰素  $\gamma$  性能。全抗体的抑制作用  $p < 0.05$ 

| IFN    | 没有刺激的 | 刺激的   | 抗 -IL18 2.5 | 抗 -IL18 125-2H |
|--------|-------|-------|-------------|----------------|
| 供体 3n  | 0.001 | 0.187 | 0.014       | 0.026          |
| 供体 5n  | 0.003 | 0.012 | 0.006       | 0.006          |
| 供体 9n  | 0.001 | 1.250 | 0.037       | 0.000          |
| 供体 10n | 0.002 | 0.361 | 0.024       | 0.002          |
| 供体 1n  | 0.002 | 0.339 | 0.022       | 0.070          |
| 供体 2n  | 0.001 | 0.032 | 0.003       | 0.003          |
| 供体 4n  | 0.001 | 0.082 | 0.011       | 0.027          |
| 供体 6n  | 0.002 | 0.076 | 0.006       | 0.010          |
| 供体 7n  | 0.002 | 0.049 | 0.009       | 0.012          |
| 供体 8n  | 0.002 | 0.049 | 0.009       | 0.012          |

表 26. 10 个人血样中 MIG/CXCL9 性能。全抗体的抑制作用  $p < 0.05$ 

| CXCL9 | 没有刺激的 | 刺激的   | 抗 -IL18 2.5 | 抗 -IL18 125-2H |
|-------|-------|-------|-------------|----------------|
| 供体 1  | 0.000 | 0.170 | 0.082       | 0.010          |
| 供体 10 | 0.000 | 0.015 | 0.000       | 0.000          |
| 供体 2  | 0.001 | 0.006 | 0.001       | 0.001          |
| 供体 3  | 0.000 | 0.067 | 0.010       | 0.006          |
| 供体 4  | 0.000 | 0.023 | 0.012       | 0.003          |
| 供体 5  | 0.000 | 0.004 | 0.000       | 0.000          |
| 供体 6  | 0.000 | 0.070 | 0.001       | 0.001          |
| 供体 7  | 0.001 | 0.034 | 0.001       | 0.000          |
| 供体 8  | 0.001 | 0.034 | 0.001       | 0.000          |
| 供体 9  | 0.000 | 0.035 | 0.000       | 0.001          |

表 27. 10 个人血样中 MCP2/CCL8 性能。全抗体的抑制作用  $p < 0.05$

| CCL8  | 没有刺激的 | 刺激的   | 抗-IL18 2.5 | 抗-IL18 125-2H |
|-------|-------|-------|------------|---------------|
| 供体 1  | 0.036 | 8.941 | 4.054      | 1.051         |
| 供体 10 | 0.004 | 0.987 | 0.009      | 0.025         |
| 供体 2  | 0.036 | 1.225 | 0.105      | 0.057         |
| 供体 3  | 0.012 | 3.923 | 0.648      | 0.663         |
| 供体 4  | 0.021 | 2.227 | 0.994      | 0.630         |
| 供体 5  | 0.001 | 0.005 | 0.001      | 0.001         |
| 供体 6  | 0.000 | 0.023 | 0.002      | 0.001         |
| 供体 7  | 0.001 | 0.009 | 0.001      | 0.001         |
| 供体 8  | 0.001 | 0.009 | 0.001      | 0.001         |
| 供体 9  | 0.001 | 2.438 | 0.003      | 0.059         |

#### 实施例 4: 抗-IL-18 HuMAb, 2.13 (E) mg1 的表征

##### 实施例 4.1 : 人细胞因子特异性

应用 BIACORE 试验, 根据生产商说明书 (参见实施例 2.1.B), 评价 2.13 (E) mg1 对人 IL-18 的特异性。2.13 (E) mg1 捕获到生物芯片商, 并且测定其与溶液中一组已知人细胞因子结合的能力。如图 28 所示, 2.13 (E) mg1 结合重组成熟人 IL-18。然而, 2.13 (E) mg1 不与人 IL-18 原结合, 也不与试验的其他 23 种人细胞因子结合, 包括 IL-1 家族成员 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ 。

表 28 2.13 (E) mg1 和 2.5 (E) mg1 对细胞因子结合的 Biacore 分析

| 可溶性重组<br>人细胞因子, (1 $\mu$ M) | 捕获的 2.13(E)mg1<br>(25 mg/mL) | 捕获的 2.5(E)mg1<br>(25 mg/mL) |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                             | 2.13(E)mg1 结合                | 2.5(E)MG1 结合                |
| IFN $\gamma$                | -                            | -                           |
| IL-1 $\alpha$               | -                            | -                           |
| IL-1 $\beta$                | -                            | -                           |
| 其它细胞因子 <sup>a</sup>         | -                            | -                           |
| IL-18 <sup>b</sup>          | +                            | +                           |
| Pro-IL-18                   | -                            | +                           |

<sup>c</sup> 用于结合试验的另外的细胞因子包括 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21, TNF, LT, LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2, 和 LT $\alpha$ 2 $\beta$ 1。2.13 (E) mg1 与这些细胞因子的任何一个都不结合。

## 半胱氨酸 >丙氨酸突变体 BV 衍生的重组人 IL-18

### 实施例 4.2: 与其他抗体竞争结合人 IL-18

应用 BIACORE 试验, 根据生产商说明书(参见实施例 2.1.B), 评价几种抗-IL-18 抗体与 2.13(E)mg1 竞争结合人 IL-18 的能力。简要地说, 多克隆抗-人或抗-小鼠抗体捕获到生物芯片上。然后, 导入抗-IL-18 抗体, 并且用固定在上述生物芯片上的多克隆抗-人或抗-小鼠(仅对 125-2H)抗体(第一固定化抗体)捕获。然后导入重组人 IL-18 并且由第一固定化抗体捕获。最后, 导入第二可溶性抗-IL-18 抗体。该试验测定第二可溶性抗-IL-18 抗体结合重组 IL-18 并且与第一抗体竞争的能力。2.13(E) mg1 不与 2.5(E) mg1 或 IL-18BP 竞争。鼠抗-huIL-18 单克隆抗体 125-2H 与 2.13(E) mg1 竞争结合人 IL-18。

表 29 结合人 IL-18 的抗体竞争 BIACORE a 分析

| 2 <sup>0</sup> 可溶性<br>Ab | 1 <sup>0</sup> 固定化 Ab |           |     |     |     |     |            |     |         |
|--------------------------|-----------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|---------|
|                          | 125-2H                | 2.5(E)mg1 | 215 | 444 | 581 | 435 | 2.13(E)mg1 | 2.3 | IL-18BP |
| 125-2H                   | -                     | +         | -   | -   | +   | +   | -          | -   | +       |
| 2.5(E)mg1                | +                     | -         | +   | +   | -   | -   | +          | +   | +       |
| 215                      | -                     | +         | -   | -   | +   | +   | -          | -   | +       |
| 444                      | -                     | +         | -   | -   | +   | +   | -          | -   | +       |
| 581                      | +                     | -         | +   | +   | -   | -   | +          | +   | +       |
| 435                      | +                     | -         | +   | +   | -   | -   | +          | +   | +       |
| 2.13(E)mg1               | -                     | +         | -   | -   | +   | +   | -          | -   | +       |
| 2.3                      | -                     | +         | -   | -   | +   | +   | -          | -   | +       |
| IL-18BP                  | +                     | +         | +   | +   | +   | +   | +          | +   | -       |

+指第一和第二抗体同时结合

-指第二抗体不能结合捕获的 IL-18

本发明参考了分子生物学领域公知的全部技术。这些技术包括, 但不限于, 下面出版物中描述的技术:

Ausubel, F. M. 等 编著, Short Protocols In Molecular Biology (第四版 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X)。

Lu 和 Weiner 编著, Cloning and Expression Vectors for Gene

Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X)。

Kontermann 和 Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN3-540-41354-5)。

Old, R. W. & S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation : An Introduction To Genetic Engineering (第三版 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V. 2: 409 pp. (ISBN 0-632-01318-4)。

Sambrook, J. 等编著, Molecular Cloning : A Laboratory Manual (第二版 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6)。

Winnacker, E. L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (HorstIbelgaufits 翻译)。 634 pp. (ISBN0-89573-614-4)。

### 参考文献

#### 美国专利

|           |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 5,545,806 | 5,545,807 | 5,591,669 | 5,612,205 | 5,625,126 |
| 5,625,825 | 5,627,052 | 5,633,425 | 5,643,763 | 5,661,016 |
| 5,721,367 | 5,770,429 | 5,789,215 | 5,789,650 | 5,814,318 |
| 5,912,324 | 5,916,771 | 5,939,598 | 5,985,615 | 5,994,619 |
| 5,998,209 | 6,054,487 | 6,060,283 | 6,075,181 | 6,091,001 |
| 6,114,598 | 6,130,364 |           |           |           |

美国专利申请公开 20030186374

美国专利登记号 No. 09/428,082

#### 外国专利文献

EP 712 931 EP 850 952 EP 864 585 EP 0 962 531 EP0 974 600 JP 111,399194 IL 121554 AO WO 91/10741 WO 91/17271 WO 92/01047 WO 92/02551 WO 92/09690 W092/15679 WO 92/18619 W092/20791 WO 93/01288 WO 94/02602 WO 96/33735 WO 96/34096 W097/24441 WO 97/29131 W098/16654 W098/24893 W098/41232 W098/50433

W099/09063 W099/22760 WO 99/25044 WO 99/37772 WO 99/37773 WO  
99/45031 W099/53049 WO 00/37504 W000/09560 WO 00/12555 WO  
00/37504 WO 00/56772 W001/58956 W001/83525 WO 02/72636

### 其他参考文献

Adachi O., 等 (1998) *Immunity* 9: 143-150

Akita, K. 等, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26595-26603

Azzazy H., 和 Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445

Babcock, J.S. 等 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848

Barbas 等 (1991) *PNAS* 88:7978-7982

Bendele, A., 等 (1999) *Toxicol Pathol.* 27:134-142

Bird 等 (1988) *Science* 242:423-426

Clackson 等 (1991) *Nature* 352:624-628

Dinareello, C. 等 (1998) *J. Leukoc. Biol.* 63:658-654

Dinareello, C.A. (1999) *Methods* 19:121-132

Dinareello, C.A. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:11-24;

Durocher 等 *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2

Fuchs 等 (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372

Garrad 等 (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377

Gavilondo J.V., 和 Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145

Giege, R. 和 Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

Ghayur, T. 等, (1997) *Nature* 386:619-623

Ghetie, V., 等 (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:637-640

Gracie J. A. , 等, (2003) *Journal of Leukocyte Biology* 73, 213-224

Gram 等 (1992) *PNAS* 89 : 3576-3580

Green 等 *Nature Genetics* 7: 13-21 (1994)

Green 和 Jakobovits J. *Exp. Med.* 188: 483-495 (1998)

Griffiths 等 (1993) *EMBO J* 12:725-734

Gu, Y. 等, (1997) *Science* 275 : 206-209

Hay 等 (1992) *Hum Antibod Hybridonias* 3:81-85

Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York : Cold Spring Harbor Press, 1990

- Hawkins 等 (1992) *J Mol Biol* 226: 889-896
- Hezareh, M. ,等, (2001) *J. Virology*, 75 (24): 12161-12168
- Holliger, P. , 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448
- Hoogenboom 等 (1991) *Nuc Acid Res* 19: 4133-4137
- Hoogenboom H. R. , (1997) *TIB Tech.* 15: 62-70
- Hoogenboom H. , 和 Chames P. (2000) *Immunology Today* 21: 371-378
- Huston 等 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 5879-5883
- Hoshino K. ,等(1999) *J. Immunol.* 162: 5041-5044
- Huse 等 (1989) *Science* 246: 1275-1281
- Johnson, B. ,等 (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277
- Johnsson, B. , 等 (1995) *J. Mol. Recognit.* 8 : 125-131
- Jonsson, U. , 等 (1991) *Biotechniques* 11: 620-627
- Jonsson, U. , 等 (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26
- Kanakaraj P. , (1999) *J. Exp. Med.* 189: 1129-1138
- Kaufman, R. J. 和 Sharp, P. A. , (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621
- Kearney 等, *J. Immunol.* 123, 1979, 1548-1550
- Kellermann S. A. 和 Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 593-597
- Kim J. K. , 等(1999) *Eur. J. Immunol.* 29: 2819-2825
- Konishi, K. ,等(1997) *J. Immunol. Methods* 209: 187-191
- Kipriyanov, S. M. ,等 (1994) *Mol. Immunol.* 31: 1047-1058
- Kipriyanov, S. M. , 等 (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101
- Leung, B. P. , 等 (2001) *J. Immunol.* 167: 2879-2886
- Little M. 等(2000) *Immunology Today* 21: 364-370
- BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X)
- Lund, J. 等, *J. Immunology* (1991) 147: 2657-2662
- McCafferty 等, *Nature* (1990) 348: 552-554
- McInnes, I. B. 等 (2000) *Immunology Today* 21: 312-315
- Mendez 等, *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997)

- Mizushima, S. 和 Nagata, S. , (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17
- Nakanishi, K. 等 (2001) *Ann. Rev. Immunol* 19: 423-474
- Nakanishi K. , 等 (2001) *Cytokine and Growth Factor Rev.* 12: 53-72
- Neeta, M. G. , 等 (2000) *J. Immunol.* 164: 2644-2649
- Ober, R. J. , 等 (2001) *Int. Immunol.* 13: 1551-1559
- Poljak, R. J., 等 (1994) *Structure* 2: 1121-1123
- Seidman, J. G. , Smith, J. A. , 和 K. Struhl 编著; Wiley Interscience, N. Y. , N. Y. (1990)
- Sims, J. E. , (2002) *Current Opin Immunol.* 14: 117-122
- Sugawara, S. 等 , (2001) *J. Immunol.*, 167, 6568-6575
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, 编著, Marcel Dekker, Inc. , New York, 1978
- Takeda, K. , 等 (1998) *Immunity* 8: 383-390
- Taylor, L. D. , 等 (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295
- Tissi L. , 等 (1999) *Infect. Immunol.* 67: 4545-50
- Trentham, D. E. 等 (1977) *J. Exp. Med.* 146: 857-868
- Tsutsui, H. 等 , (1999) *Immunity* 11: 359-67
- Urlaub 和 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220
- Ushio, S. , 等 (1996) *J. Immunol.* 156: 4274-4279
- Ward 等, (1989) *Nature* 341: 544-546
- Wei, X. Q. , 等 (2000) *J. Immunol.* 166: 517-521
- Winnacker, E. L. *From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology* (1987) VCH Publishers, NY Horstlbelgaufits 翻译). 634 pp. (ISBN0-89573-614-4)。

虽然上面描述了很多实施方案和特征,本领域技术人员明白可以对所描述的实施方案和特征进行修饰和改变而不脱离本发明公开内容后面权利要求书定义的本发明。这里提到的各个公开物在此引作参考。

<110> Ghayur, Tariq  
Labkovsky, Boris  
Voss, Jeffrey  
Green, Larry  
Babcook, John  
Jia, Xiao-chi  
Wieler, James  
Kang, Paul  
Hegberg, Brad

<120> IL-18 结合蛋白

<130> BBC-085US

<140> not yet assigned

<141> filed concurrently herewith

<160> 47

<210> 1

<211> 193

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met  
1 5 10 15

Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn  
20 25 30

Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile  
35 40 45

Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro  
50 55 60

---

Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg  
65 70 75 80

Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met  
85 90 95

Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys  
100 105 110

Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile  
115 120 125

Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly  
130 135 140

His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe  
145 150 155 160

Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys  
165 170 175

Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu  
180 185 190

Asp

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

---

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu |     |     |     |

---

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                         |     |     |
| 325                                                             | 330 |     |

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 4

<211> 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 105

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Glx Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Val Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Ser Pro Thr Phe

---

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Phe Asn Thr Ala Phe |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Ala Arg Val Gly Ser Gly Trp Tyr Pro Tyr Thr Phe Asp Ile Trp Gly |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser                             |     |     |     |
| 115                                                             | 120 |     |     |
| <210> 7                                                         |     |     |     |
| <211> 109                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 人                                                         |     |     |     |
| <400> 7                                                         |     |     |     |
| Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Asn |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe Ile |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Tyr Thr Ala Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Ser  
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 8  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 8

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
20 25 30

Gly His Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Ala Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Trp Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Gly Ser Arg Ser Val Ser Ser Gly  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Val Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gly Ser Pro  
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

---

<400> 10

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Asp Arg Gly Gly Ala Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ile Ile Gly Gly Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Thr Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ile Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
100 105

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly  
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Cys  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Gly Phe Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Ser Ser Gly  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Ser Pro  
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Asn Arg  
100 105

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Glx Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Arg Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Gly Gly Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp

---

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser                         |     |     |     |
| 115                                                             | 120 |     |     |
| <210> 15                                                        |     |     |     |
| <211> 114                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 人                                                         |     |     |     |
| <400> 15                                                        |     |     |     |
| Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Arg |     |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |     |
| Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln |     |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| Lys Arg                                                         |     |     |     |

<210> 16  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 16

Glx Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg  
 20 25 30

Val Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Ser Ser Ala Trp Val Phe Glu His Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 17  
 <211> 109  
 <212> PRT

---

<213> 人

<400> 17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ile Leu Ser Arg Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Met Tyr Gly Ile Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Ser Leu  
85 90 95

Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg  
100 105

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Glx Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| $\langle 210 \rangle$ | 19  |
| $\langle 211 \rangle$ | 108 |
| $\langle 212 \rangle$ | PRT |
| $\langle 213 \rangle$ | 人   |
| $\langle 400 \rangle$ | 19  |

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Thr Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly  
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Cys  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Gly Phe Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 21  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 21

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Ser Pro  
85 90 95

---

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Asn Arg  
100 105

<210> 22  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 22

Glx Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Lys Gly Gly Ser Gly Trp Pro Pro Phe Tyr Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Ser  
                  20                    25                    30

Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
                  35                    40                    45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                  50                    55                    60

Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Asn  
                  85                    90                    95

Val Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys  
                  100                    105                    110

Arg

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

---

Glx Thr Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg  
20 25 30

Val Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Ser Ser Ala Trp Val Phe Glu His Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 25

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

---

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Leu Ser Arg Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ile Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Ser Leu  
85 90 95

Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg  
100 105

<210> 26  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 26

Glx Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asp Ser Arg  
20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

---

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Cys Ala Arg Glu Asp Ser Ser Ala Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Gly Thr Leu Ala Thr Val Ser Ser                                 |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 |     |
| <210> 27                                                        |     |     |     |
| <211> 109                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 人                                                         |     |     |     |
| <400> 27                                                        |     |     |     |
| Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Asn |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |

Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Ile  
85 90 95

Asp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg  
100 105

<210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<400> 28

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly  
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Tyr Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Cys  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Gly Phe Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 29  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg Leu Gly  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Ser Pro  
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Asn Arg  
100 105

<210> 30  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 人

---

<400> 30

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
20 25 30

Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr His Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Ser Ala Ala Asp Thr Ala Gly Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Ser Leu Tyr Asn Gly Asn Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 31

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Gly  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile  
35 40 45

Ile Tyr Gly Val Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Asp  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Phe Ser Pro  
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 32  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 32

Glx Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Ser  
20 25 30

Tyr Asp Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Tyr Ser Thr Thr Trp Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Asn  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile His Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Gly  
50 55 60



|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Thr Leu Val Thr Val Ser Ser                                     |     |     |     |
| 115                                                             |     |     |     |
| <210> 35                                                        |     |     |     |
| <211> 109                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 人                                                         |     |     |     |
| <400> 35                                                        |     |     |     |
| Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly |     |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |     |
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Gly |     |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |     |
| Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu |     |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |     |
| Ile Tyr Gly Val Ser Ile Arg Ala Thr Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser |     |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |     |
| Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu |     |     |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |     |     |
| Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Phe Ser Pro |     |     |     |
| 85 90 95                                                        |     |     |     |
| Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Asn Arg             |     |     |     |
| 100 105                                                         |     |     |     |

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 36

Glx Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Cys  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp His Gly Gly Ser Gly Ser Pro Pro Phe Tyr Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 37

---

Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1                      5                      10                      15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Gly  
                    20                      25                      30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
                    35                      40                      45

Pro Gln Phe Leu Ile Gln Glu Leu Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                    50                      55                      60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65                      70                      75                      80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
                    85                      90                      95

Leu Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys  
                    100                      105                      110

Arg

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<400> 38

Glx Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1                      5                      10                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr

---

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 65  | 70  | 75  |
|                                                                 |     |     | 80  |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser                                     |     |     |     |
|                                                                 | 115 |     |     |
| <210> 39                                                        |     |     |     |
| <211> 109                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 人                                                         |     |     |     |
| <400> 39                                                        |     |     |     |
| Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Ser Ser Ser |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Glu Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gly Ser Ser Leu  
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
100 105

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> 人

<400> 40

Glx Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly  
20 25 30

Asp His Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Asn Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 41

<211> 114

<212> PRT

<213> 人

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn  
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln  
85 90 95

---

Arg Ile Glu Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg

<210> 42  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 抗-IL-18 抗体 CDR 序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)  
<223> Xaa 是 Ser, Asn, His, Arg, 或 Tyr

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)  
<223> Xaa 是 Tyr, Gly, Arg, Ser, 或 Cys

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)  
<223> Xaa 是 Trp, Gly, Tyr, Asp, Ser, Val, 或 Ile

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)  
<223> Xaa 是 Ile, His, Trp, Tyr, Met, Leu, 或 Asp

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)

<223> Xaa 是 Gly, Tyr, Ser, Asn, 或 His

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)

<223> Xaa 是 Trp, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)

<223> Xaa 是 Thr, Ser, Gly, 或不存在

<400> 42

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-IL-18 抗体 CDR 序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)

<223> Xaa 是 Phe, Tyr, His, Ser, 或 Val

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)

<223> Xaa 是 Ile, 或 Phe

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)

<223> Xaa 是 Tyr, Ser, 或 Trp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)

<223> Xaa 是 Pro, Tyr, 或 Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)

<223> Xaa 是 Gly, Ser, Arg, 或 Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)

<223> Xaa 是 Asp, 或 Gly

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)

<223> Xaa 是 Ser, Thr, Gly, 或 Arg

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)

<223> Xaa 是 Glu, Thr, Ile, 或 Asn

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)

<223> Xaa 是 Thr, Tyr, Asn, Ile, Lys, 或 His

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)

<223> Xaa 是 Arg , Tyr , 或 Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)

<223> Xaa 是 Tyr, Asn, 或 Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)

<223> Xaa 是 Ser, Pro, Ala, 或 Val

<220>

<221> misc\_feature

<222> (13)

<223> Xaa 是 Pro, Ser, 或 Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14)

<223> Xaa 是 Thr, Leu, 或 Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)

<223> Xaa 是 Phe, Lys, 或 Val

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)

<223> Xaa 是 Gln, Ser, 或 Lys

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)

<223> Xaa 是 Gly, 或不存在

<400> 43

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-IL-18 抗体 CDR 序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)

<223> Xaa 是 Val, Asp, Glu, Ser, 或 Cys

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)

<223> Xaa 是 Gly, Arg, Asp, Ser, Lys, Leu, Tyr, 或 Ala

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)

<223> Xaa 是 Ser, Gly, Tyr, 或 Arg

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)

<223> Xaa 是 Gly, Ser, Tyr, Asn, Thr, 或 Asp

<220>

---

<221> misc\_feature

<222> (5)

<223> Xaa 是 Trp, Ser, Ala, Gly, Tyr, 或 Thr

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)

<223> Xaa 是 Tyr, Gly, Ser, Phe, Trp, 或 Asn

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)

<223> Xaa 是 Pro, Ser, Phe, Tyr, Val, Gly, Trp, 或 Val

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)

<223> Xaa 是 Tyr, Phe, Asp, Pro, Met, Ile, 或 Asn

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)

<223> Xaa 是 Thr, Trp, Asp, Leu, Tyr, Glu, Pro, Phe, 或 Gly

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)

<223> Xaa 是 Phe, Asp, Tyr, His, Val, Tyr, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)

<223> Xaa 是 Asp, Tyr, Phe, Leu, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)

<223> Xaa 是 Ile, Asp, Tyr, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (13)

<223> Xaa 是 Tyr, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14)

<223> Xaa 是 Tyr, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)

<223> Xaa 是 Gly, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)

<223> Xaa 是 Met, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)

<223> Xaa 是 Asp, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)

<223> Xaa 是 Val, 或不存在

<400> 44

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-IL-18 抗体 CDR 序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)

<223> Xaa 是 Arg, 或 Lys

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)

<223> Xaa 是 Ala, Gly, 或 Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)

<223> Xaa 是 Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)

<223> Xaa 是 Glu, Arg, Gln, 或 His

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)

<223> Xaa 是 Ser, Ile, Thr, 或 Asn

---

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)

<223> Xaa 是 Ile, Val, Leu, 或 Phe

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)

<223> Xaa 是 Ser, Gly, Leu, Asn, 或 Arg

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)

<223> Xaa 是 Ser, Gly, Tyr, Arg, Asn, His, 或 Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)

<223> Xaa 是 Asn, Gly, Tyr, Arg, 或 Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)

<223> Xaa 是 Leu, Tyr, Ser, 或 Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)

<223> Xaa 是 Ala, Leu, Asn, Val, Gly, 或 Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)

<223> Xaa 是 Ala, Asn, Glu, Lys, Gly, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (13)

<223> Xaa 是 Lys, Thr, Asn, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14)

<223> Xaa 是 Asn, Tyr, Thr, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)

<223> Xaa 是 Tyr, Leu, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)

<223> Xaa 是 Leu, Cys, Tyr, 或不存在

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)

<223> Xaa 是 Ala, Asp, 或不存在

<400> 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-IL-18 抗体 CDR 序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)

<223> Xaa 是 Thr, Gly, Ser, Trp, 或 Glu

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)

<223> Xaa 是 Ala, Val, Thr, Ile, 或 Leu

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)

<223> Xaa 是 Ser, 或 Phe

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)

<223> Xaa 是 Thr, Ile, Asn, Ser, Arg, 或 Tyr

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)

<223> Xaa 是 Arg, 或 Leu

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)

<223> Xaa 是 Ala, Gln, Glu, 或 Phe

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)

<223> Xaa 是 Thr, 或 Ser

<400> 46

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-IL-18 抗体 CDR 序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)

<223> Xaa 是 Gln, 或 Met

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)

<223> Xaa 是 Gln, His, 或 Tyr

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)

<223> Xaa 是 Tyr, Asn, Gly, Ser, 或 Arg

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)

<223> Xaa 是 Asn, His, Tyr, Asp, Gly, Val, Leu, 或 Ile

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)

<223> Xaa 是 Asn, Gly, Ile, Tyr, Ser, Gln, Phe, 或 Glu

---

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)  
<223> Xaa 是 Trp, Ser, Thr, Leu, Ile, 或 Phe

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)  
<223> Xaa 是 Pro, Leu, Thr, Asp, 或 Ile

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)  
<223> Xaa 是 Ser, Leu, Pro, Cys, Trp, Ile, 或 Phe

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)  
<223> Xaa 是 Ile, Thr, Ser, 或不存在

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)  
<223> Xaa 是 Thr, 或不存在

<400> 47

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | IL - 18结合蛋白                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1902229A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 公开(公告)日 | 2007-01-24 |
| 申请号            | CN200480039948.2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 申请日     | 2004-11-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 雅培公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 艾博特公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 艾博特公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
| [标]发明人         | T加于尔<br>B拉布科夫斯基<br>JW沃斯<br>L格林<br>J巴布库克<br>X C贾<br>J韦勒<br>JS康<br>B赫德伯格                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| 发明人            | T·加于尔<br>B·拉布科夫斯基<br>J·W·沃斯<br>L·格林<br>J·巴布库克<br>X·C·贾<br>J·韦勒<br>J·S·康<br>B·赫德伯格                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/00 C12N15/00 C07H21/04 G01N33/53 A61K39/395 C07K16/24 G01N33/68                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| CPC分类号         | C07K2317/33 C07K2317/52 C07K2317/92 C07K2317/71 G01N33/6869 C07K2317/94 C07K16/244<br>A61K2039/505 C07K2317/76 C07K2317/55 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/<br>/02 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/00 A61P5/14 A61P5/16 A61P5/50 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00<br>A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/00 A61P13/12 A61P15/00<br>A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/<br>/04 A61P19/06 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24<br>A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/<br>/18 A61P31/20 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06<br>A61P37/08 A61P43/00 Y02A50/407 |         |            |
| 代理人(译)         | 关立新<br>李连涛                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 优先权            | 10/706689 2003-11-12 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 其他公开文献         | CN1902229B                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及IL - 18结合蛋白，特别是结合人白介素 - 18(hIL - 18)的抗体。具体地说，本发明涉及全人抗体的抗体。优选地，抗体具有体外和体内对于hIL - 18的高亲和性和/或中和hIL - 18的性质。本发明的抗体可以是全长抗体或者其抗原结合部分。还提供了本发

明抗体的制备方法和使用方法。本发明的抗体或抗体部分用于对例如患有其中hIL - 18活性是有害的疾病的人受治疗者检测hIL - 18和用于抑制hIL - 18活性。

表 1 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表

| 蛋白质           | 序列标识                   | 序列                   |
|---------------|------------------------|----------------------|
| 蛋白质区          |                        | 12345678901234567890 |
| VH 2.5(E)     | SEQ ID NO.:6           | EVQLVQSGTEVKKPGESLKI |
|               |                        | SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM |
|               |                        | PGKGLEWMGFIYPGDSETRY |
|               |                        | SPTFQGQVTISADKSFNTAF |
|               |                        | LQWSSLKASDTAMYCARVG  |
|               |                        | SGWYPYTFDIWGQGTMTVTS |
|               |                        | S                    |
| VH 2.5 CDR-H1 | SEQ ID NO.: 6的残基31-35  | SYWIG                |
| VH 2.5 CDR-H2 | SEQ ID NO.: 6的残基50-66  | FIYPGDSETRYSPTFQG    |
| VH 2.5 CDR-H3 | SEQ ID NO.: 6的残基99-110 | VGSGWVPYTFDI         |
| VL 2.5(E)     | SEQ ID NO.:7           | EIVMTQSPATLSVSPGERAT |
|               |                        | LSCRASESISNLAWYQQKP  |
|               |                        | GQAPRLFIYTASTRATDIPA |
|               |                        | RFGSGSGSTEFTLTISLQS  |
|               |                        | EDFAVIYCQQYNWPSITFG  |
|               |                        | QGTRLEIKR            |