

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-97946

(P2011-97946A)

(43) 公開日 平成23年5月19日(2011.5.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4

審査請求 有 請求項の数 79 O L 外国語出願 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-280298 (P2010-280298)	(71) 出願人	391008788
(22) 出願日	平成22年12月16日 (2010.12.16)		アボット・ラボラトリーズ
(62) 分割の表示	特願2006-539948 (P2006-539948) の分割		ABBOTT LABORATORIES
原出願日	平成16年11月12日 (2004.11.12)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット パーク アボット パーク ロード 10 0
(31) 優先権主張番号	10/706,689	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成15年11月12日 (2003.11.12)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140523
			弁理士 渡邊 千尋
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 8 結合タンパク質

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒトインターロイキン - 1 8 (h I L - 1 8) に結合する抗体、その製造方法、並びにその使用方法を提供する。

【解決手段】特定のアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン重鎖、軽鎖からなる、ヒト I L - 1 8 に特異的に結合する抗体であって、I L - 1 8 を中和する能力を有する中和結合タンパク質、並びに、前記抗体の製造方法。h I L - 1 8 の検出、また、h I L - 1 8 活性が有害である障害を患うヒト被験者における治療、のための使用。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原結合ドメインが、

C D R - H 1 : X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ (配列番号 4 2)

[上記配列において、

X₁ は S、N、H、R または Y であり ;

X₂ は Y、G、R、S または C であり ;

X₃ は W、G、Y、D、S、V または I であり ;

X₄ は I、H、W、Y、M、L または D であり ;

X₅ は G、Y、S、N または H であり ;

X₆ は W であるか非存在であり ;

X₇ は T、S、G であるか非存在である。] ;

C D R - H 2 : X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X

1 1 - X₁₂ - X₁₃ - X₁₄ - X₁₅ - X₁₆ - X₁₇ (配列番号 4 3)

[上記配列において、

X₁ は F、Y、H、S または V であり ;

X₂ は I または F であり ;

X₃ は Y、S または W であり ;

X₄ は P、Y または S であり ;

X₅ は G、S、R または D であり ;

X₆ は D または G であり ;

X₇ は S、T、G または R であり ;

X₈ は E、T、I または N であり ;

X₉ は T、Y、N、I、K または H であり ;

X₁₀ は R、Y または S であり ;

X₁₁ は Y、N または S であり ;

X₁₂ は S、P、A または V であり ;

X₁₃ は P、S または D であり ;

X₁₄ は T、L または S であり ;

X₁₅ は F、K または V であり ;

X₁₆ は Q、S または K であり ;

X₁₇ は G であるか非存在である。] ;

C D R - H 3 : X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X

1 1 - X₁₂ - X₁₃ - X₁₄ - X₁₅ - X₁₆ - X₁₇ - X₁₈ (配列番号 4 4)

[上記配列において、

X₁ は V、D、E、S または C であり ;

X₂ は G、R、D、S、K、L、Y または A であり ;

X₃ は S、G、Y または R であり ;

X₄ は G、S、Y、N、T または D であり ;

X₅ は W、S、A、G、Y または T であり ;

X₆ は Y、G、S、F、W または N であり ;

X₇ は P、S、F、Y、V、G、W または V であり ;

X₈ は Y、F、D、P、M、I または N であり ;

X₉ は T、W、D、L、Y、E、P、F または G であり ;

X₁₀ は F、D、Y、H、V、Y であるか非存在であり ;

X₁₁ は D、Y、F、L であるか非存在であり ;

X₁₂ は I、D、Y であるか非存在であり ;

X₁₃ は Y であるか非存在であり ;

X₁₄ は Y であるか非存在であり ;

X₁₅ は G であるか非存在であり ;

10

20

30

40

50

X_{16} は M であるか非存在であり ;
 X_{17} は D であるか非存在であり ;
 X_{18} は V であるか非存在である。] ;

C D R - L 1 : $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}$ (配列番号 4 5)

[上記配列において、

X_1 は R または K であり ;
 X_2 は A、G または S であり ;
 X_3 は S であり ;
 X_4 は E、R、Q または H であり ;
 X_5 は S、I、T または N であり ;
 X_6 は I、V、L または F であり ;
 X_7 は S、G、L、N または R であり ;
 X_8 は S、G、Y、R、N、H または D であり ;
 X_9 は N、G、Y、R または S であり ;

10

X_{10} は L、Y、S または D であり ;
 X_{11} は A、L、N、V、G または D であり ;
 X_{12} は A、N、E、K、G であるか非存在であり ;
 X_{13} は K、T、N であるか非存在であり ;
 X_{14} は N、Y、T であるか非存在であり ;
 X_{15} は Y、L であるか非存在であり ;
 X_{16} は L、C、Y であるか非存在であり ;
 X_{17} は A、D であるか非存在である。] ;

20

C D R - L 2 : $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号 4 6)

[上記配列において、

X_1 は T、G、S、W または E であり ;
 X_2 は A、V、T、I または L であり ;
 X_3 は S または F であり ;
 X_4 は T、I、N、S、R または Y であり ;
 X_5 は R または L であり ;
 X_6 は A、Q、E または F であり ;
 X_7 は T または S である。] ;

30

C D R - L 3 : $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10}$ (配列番号 4 7)

[上記式において

X_1 は Q または M であり ;
 X_2 は Q、H または Y であり ;
 X_3 は Y、N、G、S または R であり ;
 X_4 は N、H、Y、D、G、V、L または I であり ;
 X_5 は N、G、I、Y、S、Q、F または E であり ;
 X_6 は W、S、T、L、I または F であり ;
 X_7 は P、L、T、D または I であり ;
 X_8 は S、L、P、C、W、I または F であり ;
 X_9 は I、T、S であるか非存在であり ;
 X_{10} は T であるか非存在である。]

40

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 個の C D R を有する、ヒト I L - 1 8 への結合能を有する抗原結合ドメインを有する結合タンパク質。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 個の C D R が、

配列番号 6 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 6 の残基 5 0 ~ 6 6 ; 配列番号 6 の残基 9 9 ~

50

1 1 0 ;

配列番号 7 の残基 2 4 ~ 3 4 ; 配列番号 7 の残基 5 0 ~ 5 6 ; 配列番号 7 の残基 8 9 ~ 9 8 ;

配列番号 8 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 8 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 8 の残基 1 0 0 ~ 1 1 0 ;

配列番号 9 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 9 の残基 2 1 ~ 2 7 ; 配列番号 9 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 1 0 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 1 0 の残基 5 0 ~ 6 5 ; 配列番号 1 0 の残基 9 8 ~ 1 0 7 ;

配列番号 1 1 の残基 2 4 ~ 3 4 ; 配列番号 1 1 の残基 5 0 ~ 5 6 ; 配列番号 1 1 の残基 8 9 ~ 9 7 ; 10

配列番号 1 2 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 1 2 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 1 2 の残基 1 0 0 ~ 1 0 8 ;

配列番号 1 3 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 1 3 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 1 3 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 1 4 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 1 4 の残基 5 0 ~ 6 6 ; 配列番号 1 4 の残基 9 9 ~ 1 1 1 ;

配列番号 1 5 の残基 2 4 ~ 4 0 ; 配列番号 1 5 の残基 5 6 ~ 6 2 ; 配列番号 1 5 の残基 9 5 ~ 1 0 3 ;

配列番号 1 6 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 1 6 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 1 6 の残基 1 0 0 ~ 1 0 9 ; 20

配列番号 1 7 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 1 7 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 1 7 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 1 8 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 1 8 の残基 2 0 ~ 3 6 ; 配列番号 1 8 の残基 9 9 ~ 1 0 8 ;

配列番号 1 9 の残基 2 4 ~ 3 4 ; 配列番号 1 9 の残基 5 0 ~ 5 6 ; 配列番号 1 9 の残基 8 9 ~ 9 7 ;

配列番号 2 0 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 2 0 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 2 0 の残基 1 0 0 ~ 1 0 8 ;

配列番号 2 1 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 2 1 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 2 1 の残基 9 0 ~ 9 8 ; 30

配列番号 2 2 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 2 2 の残基 5 0 ~ 6 6 ; 配列番号 2 2 の残基 9 9 ~ 1 1 6 ;

配列番号 2 3 の残基 2 4 ~ 3 9 ; 配列番号 2 3 の残基 5 5 ~ 6 1 ; 配列番号 2 3 の残基 9 4 ~ 1 0 2 ;

配列番号 2 4 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 2 4 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 2 4 の残基 1 0 0 ~ 1 0 9 ;

配列番号 2 5 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 2 5 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 2 5 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 2 6 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 2 6 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 2 6 の残基 1 0 0 ~ 1 0 9 ; 40

配列番号 2 7 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 2 7 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 2 7 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 2 8 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 2 8 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 2 8 の残基 1 0 0 ~ 1 0 8 ;

配列番号 2 9 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 2 9 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 2 9 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 3 0 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 3 0 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 3 0 の残基 9 9 ~ 1 0 9 ;

配列番号 3 1 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 3 1 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 3 1 の残基 50

9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 3 2 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 3 2 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 3 2 の残基 1 0 0 ~ 1 0 9 ;

配列番号 3 3 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 3 3 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 3 3 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 3 4 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 3 4 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 3 4 の残基 1 0 0 ~ 1 0 8 ;

配列番号 3 5 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 3 5 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 3 5 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 3 6 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 3 6 の残基 5 0 ~ 6 6 ; 配列番号 3 6 の残基 9 9 ~ 1 1 6 ; 10

配列番号 3 7 の残基 2 4 ~ 3 9 ; 配列番号 3 7 の残基 5 5 ~ 6 1 ; 配列番号 3 7 の残基 9 4 ~ 1 0 2 ;

配列番号 3 8 の残基 3 1 ~ 3 5 ; 配列番号 3 8 の残基 5 0 ~ 6 6 ; 配列番号 3 8 の残基 9 9 ~ 1 0 8 ;

配列番号 3 9 の残基 2 4 ~ 3 5 ; 配列番号 3 9 の残基 5 1 ~ 5 7 ; 配列番号 3 9 の残基 9 0 ~ 9 8 ;

配列番号 4 0 の残基 3 1 ~ 3 7 ; 配列番号 4 0 の残基 5 2 ~ 6 7 ; 配列番号 4 0 の残基 9 7 ~ 1 0 9 ;

配列番号 4 1 の残基 2 4 ~ 4 0 ; 配列番号 4 1 の残基 5 6 ~ 6 2 ; 配列番号 4 1 の残基 9 5 ~ 1 0 3 20

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3】

前記結合タンパク質が少なくとも 3 個の C D R を有する請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 4】

前記抗原結合ドメインが V_H を有する請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

前記 V_H が、配列番号 6 ; 配列番号 8 ; 配列番号 1 0 ; 配列番号 1 2 ; 配列番号 1 4 ; 配列番号 1 6 ; 配列番号 1 8 ; 配列番号 2 0 ; 配列番号 2 2 ; 配列番号 2 4 ; 配列番号 2 6 ; 配列番号 2 8 ; 配列番号 3 0 ; 配列番号 3 2 ; 配列番号 3 4 ; 配列番号 3 6 ; 配列番号 3 8 ; および配列番号 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 4 に記載の結合タンパク質。 30

【請求項 6】

前記抗原結合ドメインが V_L を有する請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7】

前記 V_L が、配列番号 7 ; 配列番号 9 ; 配列番号 1 1 ; 配列番号 1 3 ; 配列番号 1 5 ; 配列番号 1 7 ; 配列番号 1 9 ; 配列番号 2 1 ; 配列番号 2 3 ; 配列番号 2 5 ; 配列番号 2 7 ; 配列番号 2 9 ; 配列番号 3 1 ; 配列番号 3 3 ; 配列番号 3 5 ; 配列番号 3 7 ; 配列番号 3 9 ; および配列番号 4 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 6 に記載の結合タンパク質。 40

【請求項 8】

前記抗原結合ドメインが V_H および V_L を有する請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 9】

V_H が配列番号 6 ; 配列番号 8 ; 配列番号 1 0 ; 配列番号 1 2 ; 配列番号 1 4 ; 配列番号 1 6 ; 配列番号 1 8 ; 配列番号 2 0 ; 配列番号 2 2 ; 配列番号 2 4 ; 配列番号 2 6 ; 配列番号 2 8 ; 配列番号 3 0 ; 配列番号 3 2 ; 配列番号 3 4 ; 配列番号 3 6 ; 配列番号 3 8 ; および配列番号 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、 V_H をさらに有する請求項 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 0】

前記 V_L が配列番号 7 のアミノ酸配列を有し、前記 V_H が配列番号 6 のアミノ酸配列を有する請求項 8 に記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

ヒト IgM 定常ドメイン；ヒト IgG1 定常ドメイン；ヒト IgG2 定常ドメイン；ヒト IgG3 定常ドメイン；ヒト IgG4 定常ドメイン；ヒト IgE 定常ドメインおよびヒト IgA 定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインをさらに有する請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 12】

前記重鎖免疫グロブリン定常領域ドメインがヒト IgG1 定常ドメインである請求項 1 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 13】

前記ヒト IgG1 定常ドメインが、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 12 に記載の結合タンパク質。

【請求項 14】

ヒト Ig カッパ定常ドメインおよびヒト Ig ラムダ定常ドメインからなる群から選択される軽鎖免疫グロブリン定常ドメインをさらに有する請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 15】

前記軽鎖免疫グロブリン定常領域ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するヒト Ig カッパ定常ドメインである請求項 14 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 16】

前記軽鎖免疫グロブリン定常領域ドメインが、配列番号 5 のアミノ酸配列を有するヒト Ig ラムダ定常ドメインである請求項 14 に記載の結合タンパク質。

【請求項 17】

前記結合タンパク質が、免疫グロブリン分子；scFv；モノクローナル抗体；ヒト抗体；キメラ抗体；ヒト化抗体；単ドメイン抗体；Fab 断片；Fab' 断片；F(ab')₂；Fv；およびジスルフィド連結 Fv からなる群から選択される請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 18】

前記結合タンパク質がヒト抗体である請求項 17 に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 19】

結合タンパク質が、
配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する Ig 定常重領域；
配列番号 4 および配列番号 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する IG 定常軽領域；
配列番号 6 のアミノ酸配列を有する Ig 可変重領域；および
配列番号 7 のアミノ酸配列を有する Ig 可変軽領域
を有する、ヒト IL-18 への結合能を有する結合タンパク質。

【請求項 20】

配列番号 3 のアミノ酸配列を有する Ig 定常重領域；
配列番号 4 のアミノ酸配列を有する IG 定常軽領域；
配列番号 6 のアミノ酸配列を有する Ig 可変重領域；および
配列番号 7 のアミノ酸配列を有する Ig 可変軽領域
を有する、ヒト IL-18 への結合能を有する結合タンパク質。

40

【請求項 21】

中和結合タンパク質が請求項 1 ないし 20 のいずれかに記載の結合タンパク質を有し、中和結合タンパク質が IL-18 を中和する能力を有する中和結合タンパク質。

【請求項 22】

前記 IL-18 が、プロ-ヒト IL-18；成熟-ヒト IL-18 および切断形ヒト IL-18 からなる群から選択される請求項 21 に記載の中和結合タンパク質。

50

【請求項 23】

前記中和結合タンパク質が、IL-18がその受容体に結合する能力を弱める請求項21に記載の中和結合タンパク質。

【請求項 24】

前記中和結合タンパク質が、プロ-ヒトIL-18、成熟-ヒトIL-18または切断形ヒトIL-18がその受容体に結合する能力を弱める請求項23に記載の中和結合タンパク質。

【請求項 25】

前記中和結合タンパク質が、Th1調節；Th2調節；Nk調節；好中球調節；単球-マクロファージ系統調節；好中球調節；好酸球調節；B-細胞調節；サイトカイン調節；ケモカイン調節；接着分子調節；および細胞動員調節からなる群から選択される1以上のIL-18生理活性を低下させる能力を有する請求項21に記載の中和結合タンパク質。

10

【請求項 26】

前記中和結合タンパク質が、最大で約 10^{-7} M；最大で約 10^{-8} M；最大で約 10^{-9} M；最大で約 10^{-10} M；最大で約 10^{-11} M；最大で約 10^{-12} M；および最大で 10^{-13} Mからなる群から選択される解離定数(K_D)を有する請求項21に記載の中和結合タンパク質。

【請求項 27】

前記中和結合タンパク質が、少なくとも約 10^2 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ；少なくとも約 10^3 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ；少なくとも約 10^4 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ；少なくとも約 10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ；および少なくとも約 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$ からなる群から選択されるオン速度を有する請求項21に記載の中和結合タンパク質。

20

【請求項 28】

前記中和結合タンパク質が、最大で約 10^{-3} s $^{-1}$ ；最大で約 10^{-4} s $^{-1}$ ；最大で約 10^{-5} s $^{-1}$ ；および最大で約 10^{-6} s $^{-1}$ からなる群から選択されるオフ速度を有する請求項21に記載の中和結合タンパク質。

【請求項 29】

結合タンパク質が検出可能な標識とコンジュゲート形成している、請求項1ないし20のいずれかに記載の結合タンパク質を含む標識結合タンパク質。

【請求項 30】

前記検出可能な標識が、放射能標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生体発光標識、磁気標識およびビオチンからなる群から選択される請求項29に記載の標識結合タンパク質。

30

【請求項 31】

前記標識が、 3 H、 14 C、 35 S、 90 Y、 99 Tc、 111 In、 125 I、 131 I、 177 Lu、 166 Hoまたは 153 Smからなる群から選択される放射能標識である請求項30に記載の標識結合タンパク質。

【請求項 32】

結合タンパク質が治療薬または細胞傷害薬とコンジュゲート形成している、請求項1ないし20のいずれかに記載の結合タンパク質を含む複合結合タンパク質。

【請求項 33】

前記治療薬または細胞傷害薬が、代謝拮抗薬、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、血管新生阻害剤、有糸分裂阻害剤、サントラサイクリン、毒物およびアポトーシス剤からなる群から選択される請求項32に記載の複合結合タンパク質。

40

【請求項 34】

請求項1ないし20のいずれかに記載の結合タンパク質アミノ酸配列をコードする単離核酸。

【請求項 35】

請求項34に記載の単離核酸を有するベクター。

【請求項 36】

前記ベクターがpcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJVおよび

50

p B J からなる群から選択される請求項 3 5 に記載のベクター。

【請求項 3 7】

請求項 3 5 または 3 6 に記載のベクターを有する宿主細胞。

【請求項 3 8】

前記宿主細胞が原核細胞である請求項 3 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 9】

前記宿主細胞が大腸菌 (*E . c o l i*) である請求項 3 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 0】

前記宿主細胞が真核細胞である請求項 3 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 1】

前記真核細胞が原生生物細胞、動物細胞、植物細胞および真菌細胞からなる群から選択される請求項 4 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 2】

前記真核細胞が、哺乳動物細胞、トリ細胞および昆虫細胞からなる群から選択される動物細胞である請求項 4 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 3】

前記動物細胞が C H O 細胞である請求項 4 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 4】

前記宿主細胞が C O S である請求項 4 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 5】

前記真核細胞がサッカロミセス・セレヴィシエ (*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*) である請求項 4 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 6】

前記動物細胞が昆虫 S f 9 細胞である請求項 4 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 7】

ヒト I L - 1 8 に結合する結合タンパク質を生産する上で十分な条件下で培地にて請求項 3 7 ないし 4 6 のいずれかに記載の宿主細胞を培養する段階を有する、ヒト I L - 1 8 に結合する結合タンパク質の生産方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の方法に従って生産される結合タンパク質。

【請求項 4 9】

前記結合タンパク質が結晶として存在する請求項 1 ないし 2 8 のいずれかに記載の結合タンパク質を有する結晶化結合タンパク質。

【請求項 5 0】

前記結晶が担体を含まない医薬徐放性結晶である請求項 4 9 に記載の結晶化結合タンパク質。

【請求項 5 1】

前記結合タンパク質が、前記結合タンパク質の可溶性対応物よりインビボで長い半減期を有する請求項 4 9 に記載の結晶化結合タンパク質。

【請求項 5 2】

前記結合タンパク質が生理活性を保持している請求項 4 9 に記載の結晶化結合タンパク質。

【請求項 5 3】

組成物が、

(a) 請求項 4 9 ないし 5 2 のいずれかに記載の結晶化結合タンパク質および成分を含む製剤ならびに

(b) 少なくとも 1 種類のポリマー担体を含む結合タンパク質の放出用の組成物。

【請求項 5 4】

前記ポリマー担体が、ポリ (アクリル酸) 、ポリ (シアノアクリレート) 、ポリ (アミ

10

20

30

40

50

ノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(デブシペプチド)、ポリ(エステル)、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)またはPLGA、ポリ(b-ヒドロキシブチレート)、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(ジオキサノン);ポリ(エチレングリコール)、ポリ(ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ[(有機)ホスファゼン]、ポリ(オルトエステル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテルコポリマー、プルロニックポリオール、アルブミン、アルギン酸化合物、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖類、グリカミノグリカン類、硫酸化多糖類、混合物およびこれらのコポリマーからなる群の1以上から選択されるポリマーである請求項53に記載の組成物。

10

【請求項55】

前記成分が、アルブミン、ショ糖、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールからなる群から選択される請求項53に記載の組成物。

【請求項56】

哺乳動物に対して、有効量の請求項53に記載の化合物を投与する段階を有する、哺乳動物の治療方法。

【請求項57】

(a) IL-18調節剤を提供する段階および

(b) 前記調節剤を細胞に接触させる段階

20

を有し;

前記対象遺伝子が、ジーンバンク識別番号: 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、X007730、M13955、M57710、S83362、NM__002314、NM__005569、U49957、U89922、X14008、U59914、D14497、X59727、NM__000429、U43944、X72755、NM__021230、NM__00

30

40

50

5 9 5 1、X 7 8 7 1 0、X 7 0 9 9 1、M 3 2 0 1 1、S 7 7 7 6 3、M 5 8 6 0 3、
S 7 6 6 3 8、M 6 9 0 4 3、U 9 1 6 1 6、D 8 6 4 2 5、L 1 3 7 4 0、U 4 4 8 4
8、U 7 9 2 5 1、M 2 7 2 8 8、A F 0 0 0 2 3 4、D 5 0 6 4 0、L 2 0 9 7 1、L
1 0 3 4 3、U 7 7 7 3 5、N M__0 0 3 5 7 9、U 1 7 0 3 4、A B 0 0 0 5 8 4、X
6 3 1 3 1、D 1 1 4 2 8、N M__0 3 2 9 4 0、N M__0 0 5 0 3 5、N M__0 0 3 5
7 9、M 1 8 2 5 5、L 0 1 0 8 7、D 3 8 1 2 8、Y 1 0 3 7 5、D 1 5 0 4 9、M 3
1 1 6 6、U 5 9 8 7 7、N M__0 0 3 5 7 9、U 6 4 6 7 5、S 5 7 1 5 3、N M__0
0 2 9 0 3、N G__0 0 0 0 1 3、X 7 5 0 4 2、M 8 3 2 2 1、N M__0 0 0 5 3 7、
U 2 2 3 1 4、S 5 9 0 4 9、U 7 0 4 2 6、U 2 2 3 7 7、U 3 8 4 8 0、L 1 0 3 3
8、M 2 3 1 7 8、M 6 9 2 0 3、N M__0 0 5 4 0 9、D 7 9 2 0 6、N M__0 0 5 0
6 5、N M__0 0 4 1 8 6、J 0 3 7 6 4、N M__0 0 6 8 0 2、D 8 9 0 7 7、N M__
0 0 3 0 3 7、M 9 1 4 6 3、D 8 2 3 2 6、L 0 5 5 6 8、U 9 6 0 9 4、X 8 3 3 0
1、D 2 1 2 6 7、L 3 1 5 2 9、M 6 2 8 0 0、N M__0 2 1 0 1 4、Z 3 5 0 9 3、
N M__0 0 5 8 1 6、L 2 5 4 4 4、M 9 5 7 8 7、N M__0 0 5 4 2 1、L 4 7 3 4 5
、M 5 7 7 3 2、N M__0 0 3 2 0 5、M 9 6 9 5 6、U 1 9 8 7 8、M 9 2 3 5 7、M
5 9 4 6 5、X 8 3 4 9 0、U 3 7 5 1 8、N M__0 0 3 2 9 4、U 1 9 2 6 1、U 7 8
7 9 8、S 6 9 7 9 0、U 5 3 4 7 6、L 1 5 3 0 9、U 7 8 7 2 2、X 5 7 8 0 9、U
7 9 2 4 9、A B 0 0 0 4 6 4、X 7 7 7 4 4、U 7 9 2 4 8、A I 4 2 0 1 2 9、H G
2 9 8 1 - H T 3 1 2 7、H G 3 5 4 8 - H T 3 7 4 9、H G 8 7 0 - H T 8 7 0、H G
4 3 3 3 - H T 4 6 0 3、H G 3 1 1 1 - H T 3 2 8 7、H G 4 5 9 3 - H T 4 9 9 8、
H G 9 6 1 - H T 9 6 1、H G 1 8 7 7 - H T 1 9 1 7、H G 3 1 1 5 - H T 3 2 9 1、
H G 4 1 1 5 - H T 4 3 8 5 および H G 3 9 2 5 - H T 4 1 9 5 からなる群から選択され
る、対象遺伝子の遺伝子発現を調節する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 8】

前記調節剤が拮抗薬である請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記調節剤が I L - 1 8 である請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記調節剤が、請求項 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質からなる群から選択される請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 1】

請求項 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 6 2】

I L - 1 8 活性が有害である障害の治療用の少なくとも 1 種類の別の治療薬をさらに含む請求項 6 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 3】

前記別の薬剤が、血管新生阻害薬；キナーゼ阻害薬；同時刺激分子遮断薬；接着分子遮断薬；抗サイトカイン抗体またはその機能性断片；メトトレキサート；コルチコステロイド類；シクロスポリン；ラパマイシン；F K 5 0 6；および非ステロイド系抗炎症剤からなる群から選択される請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 4】

ヒト I L - 1 8 を請求項 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と接触させることで、ヒト I L - 1 8 活性を低下させるようにする段階を有する、ヒト I L - 1 8 活性の低減方法。

【請求項 6 5】

ヒト被験者に対して、請求項 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を投与して、前記ヒト被験者でのヒト I L - 1 8 活性を低下させる段階を有する、h I L - 1 8 活性が有害である障害を患うヒト被験者でのヒト I L - 1 8 活性の低下方法。

【請求項 6 6】

被験者に対して請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を投与して治療を達成する、h I L - 18 活性が有害である疾患または障害の被験者の治療方法。

【請求項 67】

前記障害が、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎および敗血症性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、強皮性皮膚炎、対宿主性移植片病、臓器移植拒絶反応、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム硬化症、汎発性血管内凝固症候群、川崎病、グレーブズ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ヴェーゲナー肉芽腫症、ヘーノホ - シェーンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、トキシックショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンティングトン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性疾患、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性疾患、I 型多分泌腺機能低下および II 型多分泌腺機能低下、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促進症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性丘関節症、腸性滑膜炎、クラミジア、エルジニアおよびサルモネラに関連する関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患 / 動脈硬化症、アトピー、自己免疫性水泡性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 I g A 疾患、自己免疫性溶血性貧血、クーン陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋肉痛脳炎 / ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全疾患症候群、後天性免疫不全に関連する疾病、B 型肝炎、C 型肝炎、分類不能型免疫不全（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性の不妊症、卵巣不全、早発性卵巣不全、線維性肺疾患、原因不明の線維化肺肺炎、ポスト炎症性間隙性肺疾患、間隙性肺炎、結合組織病に伴う間隙性肺疾患、混合結合組織病に伴う肺疾患、全身性硬化症に伴う間隙性肺疾患、慢性関節リウマチに伴う間隙性肺疾患、全身性エリテマトーデスに伴う肺疾患、皮膚筋炎 / 多発性筋炎に伴う肺疾患、シェーグレン病に伴う肺疾患、強直性脊椎炎に伴う肺疾患、脈管性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症に伴う肺疾患、薬物誘発性の間隙性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間隙性肺疾患、通風性関節炎、自己免疫性肝炎、1 型自己免疫性肝炎（古典的な自己免疫性またはルポイド肝炎）、2 型自己免疫性肝炎（抗 L K M 抗体肝炎）、自己免疫媒介型低血糖症、黒色表皮症を伴う B 型インスリン抵抗性、上皮小体低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1 型乾癬、2 型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患 N O S、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的脈管炎、ライム病、ジスコイドエリテマトーデス、特発性または N O S の男性不妊症、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患の二次的な肺高血症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺発現、急性リウマチ熱、リウマチ様脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病 / 動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能亢進（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性脈管炎、白斑、急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発肝臓損傷、胆汁鬱滞、特異体質性肝臓疾患、薬物誘発肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アレルギーおよび喘息、B 群溶連菌（G B S）感染、精神障害（例：抑鬱および統合失調症）、T h 2 型および T h 1 型介在疾患、急性および慢性疼痛ならびに癌からなる群から選択される請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

第 2 の薬剤の投与の前、同時または後に請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を投与する段階を有し；前記第 2 の薬剤がヒト I L - 12 への結合能を有する抗体またはその断片、メトトレキサート；ヒト T N F への結合能を有する抗体またはその断片；コルチコステロイド類、シクロスポリン、ラバマイシン、F K 506 および非ステ

10

20

30

40

50

ロイド系抗炎症剤からなる群から選択される、IL - 18 が有害である障害を患う患者の治療方法。

【請求項 69】

中和結合タンパク質が成熟ヒト IL - 18 への結合能を有するが、プロ - ヒト IL - 18 には特異的に結合せず；中和結合タンパク質がヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および CDR 移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質。

【請求項 70】

前記結合タンパク質が成熟ヒト IL - 18 への結合能を有するが、プロ - ヒト IL - 18 には特異的に結合しない請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 71】

中和結合タンパク質がヒト IL - 18 との結合に関して 125 - 2 H 抗体と競合する能力を有し；中和結合タンパク質がヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および CDR 移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質。

【請求項 72】

前記結合タンパク質が、ヒト IL - 18 への結合に関して 125 - 2 H 抗体と競合する能力を有する請求項 1 に記載の結合タンパク質、

【請求項 73】

中和結合タンパク質がヒト IL - 18 への結合に関して 125 - 2 H 抗体と競合する能力を持たず；中和結合タンパク質がヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および CDR 移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質。

【請求項 74】

前記結合タンパク質がヒト IL - 18 への結合に関して 125 - 2 H 抗体と競合する能力を持たない請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 75】

中和結合タンパク質がヒト IL - 18 への結合に関して 2 . 5 (E) mg 1 抗体および IL - 18 BP からなる群から選択される結合タンパク質と競合する能力を持たず；中和結合タンパク質がヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および CDR 移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質。

【請求項 76】

前記結合タンパク質が、ヒト IL - 18 への結合に関して 2 . 5 (E) mg 1 抗体および IL - 18 BP からなる群から選択される結合タンパク質と競合する能力を持たない請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 77】

前記 V_L が配列番号 9 のアミノ酸配列を有し、前記 V_H が配列番号 8 のアミノ酸配列を有する請求項 8 に記載の結合タンパク質。

【請求項 78】

結合タンパク質が、
配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する Ig 定常重領域；

配列番号 4 および配列番号 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する Ig 定常軽領域；

配列番号 8 のアミノ酸配列を有する Ig 可変重領域、および

配列番号 9 のアミノ酸配列を有する Ig 可変軽領域

を有する、ヒト IL - 18 への結合能を有する結合タンパク質。

【請求項 79】

配列番号 3 のアミノ酸配列を有する Ig 定常重領域、

配列番号 4 のアミノ酸配列を有する Ig 定常軽領域、

配列番号 8 のアミノ酸配列を有する Ig 可変重領域、および

配列番号 9 のアミノ酸配列を有する Ig 可変軽領域

を有する、ヒト IL - 18 への結合能を有する結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターロイキン18 (IL-18) 結合タンパク質に関するものであり、具体的には急性および慢性炎症疾患の予防および/または治療におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

1989年当初において、インターロイキン 18 (IL-18) は、インターフェロン- γ 誘発因子 (IGIF) と言われていたが、現在では、インターフェロン- γ を誘発する能力以外にも各種機能を有するプロ炎症性サイトカインである。これらの生物学的特性には、NF- κ bの活性化、Fasリガンドの発現、CCおよびCXCケモカインの両方の誘発、コンピテントヒト免疫不全ウイルスの産生増加などがある。IL-18は、T細胞およびマクロファージ内でインターフェロン- γ 産生を誘発する能力を有することから、Th1型の免疫応答において重要な役割を果たし、先天性免疫および後天性免疫の両方に関与する。IL-18は、構造および機能の両方の点でIL-1ファミリーに属するものである。IL-18の構造、機能および生理活性については総覧が出されている (例えば、Dinarello, C. et al. (1998) J. Leukoc. Biol. 63: 658-654; Dinarello, C. A. (1999) Methods 19: 121-132; およびDinarello, C. A. (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103: 11-24; (McInnes, B. et al. (2000) Immunology Today 21: 312-315; Nakanishi, K. et al (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423-474 参照)。

【0003】

細胞内プロ-IL-18は、カスパーゼ1によってエンドトキシン刺激細胞で (Ghayur, T. et al., (1997) Nature 386: 619-623; Gu, et al., (1997) Science 275: 206-209)、およびカスパーゼ4、5および6によってFas-Lもしくは細菌DNA刺激細胞で (Tsutsui, H. et al., (1999) Immunity 11: 359-67; Ghayur, T., 未発表所見)、タンパク質分解的に処理されて18kDaの活性型となる。プロ-IL-18はまた、好中球プロテイナーゼ3 (Sugawara, S. et al., (2001) J. Immunol., 167, 6568-6575)、カスパーゼ3 (Akita, K. et al., (1997) J. Biol. Chem., 272, 26595-26603) およびセリンプロテアーゼであるエラスターゼおよびカテプシン (Gracie J. A., et al., (2003) Journal of Leukocyte Biology 73, 213-224) などの他のプロテアーゼによってもタンパク質分解的に処理される。ヒトおよびマウスの両方のIL-18とも従来のリーダー配列を持たず、細胞による成熟IL-18放出の機序については十分に解明されていない。

【0004】

IL-18の生理活性には、 α -サブユニット (IL-1R-関連タンパク質-1またはIL-1Rrp1とも称されるIL-1Rファミリーの1構成員) および β -サブユニット (IL-18R付属タンパク質、IL-18APまたはAcPLとも称される) という2つのサブユニットからなるヘテロ二量体IL-18受容体 (IL-18R) へのIL-18の結合が介在している。IL-18R α サブユニットはIL-18に直接結合するが、シグナル伝達することはできない。 β -サブユニットはそれ自体ではIL-18に結合しないが、 α -サブユニットと共同で、シグナル伝達に必要な高親和性受容体 (K_D = 約0.3 nM) を形成する (Sims, J. E., (2002) Current Opin Immunol. 14: 117-122)。IL-18R $\alpha\beta$ 複合体を介したI

IL-18シグナル伝達 は、IL-1Rおよびトール様受容体(TLR)系と類似している。IL-18R信号伝達は、MyD88、IRAK、TRAF6などのシグナル伝達分子を使用し、IL-1の場合と同様の応答を生じる(例:NIK、IκBキナーゼ、NF-κB、JNKおよびp38MAPキナーゼの活性化)。IL-18生理活性介在においてIL-18Rαおよびシグナル伝達分子が必要であることは、それぞれIL-18Rαサブユニット(Hoshino K., et al.(1999) J. Immunol. 162:5041-5044)、MyD88(Adachi O., et al.(1998) Immunity 9:143-150)またはIRAK(Kanakaraj P., (1999) J. Exp. Med. 189:1129-1138)ノックアウトを用いて確認されている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Dinarello, C. et al. (1998) J. Leukoc. Biol. 63:658-654

【非特許文献2】Dinarello, C. A. (1999) Methods 19:121-132

【非特許文献3】Dinarello, C. A. (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103:11-24

【非特許文献4】McInnes, B. et al. (2000) Immunology Today 21:312-315

【非特許文献5】Nakanishi, K. et al (2001) Ann. Rev. Immunol 19:423-474

【非特許文献6】Ghayur, T. et al., (1997) Nature 386:619-623

【非特許文献7】Gu, et al., (1997) Science 275:206-209

【非特許文献8】Tsutsui, H. et al., (1999) Immunity 11:359-67

【非特許文献9】Sugawara, S. et al., (2001) J. Immunol., 167, 6568-6575

【非特許文献10】Akita, K. et al., (1997) J. Biol. Chem., 272, 26595-26603

【非特許文献11】Gracie J. A., et al., (2003) Journal of Leukocyte Biology 73, 213-224

【非特許文献12】Sims, J. E., (2002) Current Opin Immunol. 14:117-122

【非特許文献13】Hoshino K., et al (1999) J. Immunol. 162:5041-5044

【非特許文献14】Adachi O., et al. (1998) Immunity 9:143-150

【非特許文献15】Kanakaraj P., (1999) J. Exp. Med. 189:1129-1138

20

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

IL-18に結合する抗体は当業界で知られている。IL-18を中和することができるマウス抗体が、EP0974600に開示されている。IL-18に対するヒト抗体が、PCT公開WO 0158956に開示されており、これらは参照によって本明細書に組み込まれる。本発明は、IL-18に結合する能力を有し、高親和性で結合し、IL-

50

18に結合してそれを中和することができる、結合タンパク質の新規ファミリー、ヒト抗体およびその断片を提供する。

【0007】

本発明は、IL-18結合タンパク質、特にヒトIL-18に対する抗体、ならびにそのような結合タンパク質の作製および使用方法に関する。本発明の1態様は、IL-18の調節剤を用いる遺伝子発現の調節方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の1態様は、ヒトIL-18への結合能を有する抗原結合ドメインを有する結合タンパク質に関する。1実施形態において、前記抗原結合ドメインは、

CDR-H1: $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号42)

[上記配列において、

X_1 はS、N、H、RまたはYであり；

X_2 はY、G、R、SまたはCであり；

X_3 はW、G、Y、D、S、VまたはIであり；

X_4 はI、H、W、Y、M、LまたはDであり；

X_5 はG、Y、S、NまたはHであり；

X_6 はWであるか非存在であり；

X_7 はT、S、Gであるか非存在である。]；

CDR-H2: $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}$ (配列番号43)

[上記配列において、

X_1 はF、Y、H、SまたはVであり；

X_2 はIまたはFであり；

X_3 はY、SまたはWであり；

X_4 はP、YまたはSであり；

X_5 はG、S、RまたはDであり；

X_6 はDまたはGであり；

X_7 はS、T、GまたはRであり；

X_8 はE、T、IまたはNであり；

X_9 はT、Y、N、I、KまたはHであり；

X_{10} はR、YまたはSであり；

X_{11} はY、NまたはSであり；

X_{12} はS、P、AまたはVであり；

X_{13} はP、SまたはDであり；

X_{14} はT、LまたはSであり；

X_{15} はF、KまたはVであり；

X_{16} はQ、SまたはKであり；

X_{17} はGであるか非存在である。]；

CDR-H3: $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18}$ (配列番号44)

[上記配列において、

X_1 はV、D、E、SまたはCであり；

X_2 はG、R、D、S、K、L、YまたはAであり；

X_3 はS、G、YまたはRであり；

X_4 はG、S、Y、N、TまたはDであり；

X_5 はW、S、A、G、YまたはTであり；

X_6 はY、G、S、F、WまたはNであり；

X_7 はP、S、F、Y、V、G、WまたはVであり；

X_8 はY、F、D、P、M、IまたはNであり；

10

20

30

40

50

X_9 は T、W、D、L、Y、E、P、F または G であり ;
 X_{10} は F、D、Y、H、V、Y であるか非存在であり ;
 X_{11} は D、Y、F、L であるか非存在であり ;
 X_{12} は I、D、Y であるか非存在であり ;
 X_{13} は Y であるか非存在であり ;
 X_{14} は Y であるか非存在であり ;
 X_{15} は G であるか非存在であり ;
 X_{16} は M であるか非存在であり ;
 X_{17} は D であるか非存在であり ;
 X_{18} は V であるか非存在である。] ;

10

C D R - L 1 : $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}$ (配列番号 4 5)

[上記配列において、

X_1 は R または K であり ;
 X_2 は A、G または S であり ;
 X_3 は S であり ;
 X_4 は E、R、Q または H であり ;
 X_5 は S、I、T または N であり ;
 X_6 は I、V、L または F であり ;
 X_7 は S、G、L、N または R であり ;
 X_8 は S、G、Y、R、N、H または D であり ;
 X_9 は N、G、Y、R または S であり ;
 X_{10} は L、Y、S または D であり ;
 X_{11} は A、L、N、V、G または D であり ;
 X_{12} は A、N、E、K、G であるか非存在であり ;
 X_{13} は K、T、N であるか非存在であり ;
 X_{14} は N、Y、T であるか非存在であり ;
 X_{15} は Y、L であるか非存在であり ;
 X_{16} は L、C、Y であるか非存在であり ;
 X_{17} は A、D であるか非存在である。] ;

20

30

C D R - L 2 : $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号 4 6)

[上記配列において、

X_1 は T、G、S、W または E であり ;
 X_2 は A、V、T、I または L であり ;
 X_3 は S または F であり ;
 X_4 は T、I、N、S、R または Y であり ;
 X_5 は R または L であり ;
 X_6 は A、Q、E または F であり ;
 X_7 は T または S である。] ;

C D R - L 3 : $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10}$ (配列番号 4 7)

40

[上記式において

X_1 は Q または M であり ;
 X_2 は Q、H または Y であり ;
 X_3 は Y、N、G、S または R であり ;
 X_4 は N、H、Y、D、G、V、L または I であり ;
 X_5 は N、G、I、Y、S、Q、F または E であり ;
 X_6 は W、S、T、L、I または F であり ;
 X_7 は P、L、T、D または I であり ;
 X_8 は S、L、P、C、W、I または F であり ;

50

X_9 は I、T、S であるか非存在であり；

X_{10} は T であるか非存在である。]

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 個の CDR を有する。

【0009】

好ましくは前記抗原結合ドメインは、配列番号 6 の残基 31～35；配列番号 6 の残基 50～66；配列番号 6 の残基 99～110；配列番号 7 の残基 24～34；配列番号 7 の残基 50～56；配列番号 7 の残基 89～98；配列番号 8 の残基 31～37；配列番号 8 の残基 52～67；配列番号 8 の残基 100～110；配列番号 9 の残基 24～35；配列番号 9 の残基 21～27；配列番号 9 の残基 90～98；配列番号 10 の残基 31～35；配列番号 10 の残基 50～65；配列番号 10 の残基 98～107；配列番号 11 の残基 24～34；配列番号 11 の残基 50～56；配列番号 11 の残基 89～97；配列番号 12 の残基 31～37；配列番号 12 の残基 52～67；配列番号 12 の残基 100～108；配列番号 13 の残基 24～35；配列番号 13 の残基 51～57；配列番号 13 の残基 90～98；配列番号 14 の残基 31～35；配列番号 14 の残基 50～66；配列番号 14 の残基 99～111；配列番号 15 の残基 24～40；配列番号 15 の残基 56～62；配列番号 15 の残基 95～103；配列番号 16 の残基 31～37；配列番号 16 の残基 52～67；配列番号 16 の残基 100～109；配列番号 17 の残基 24～35；配列番号 17 の残基 51～57；配列番号 17 の残基 90～98；配列番号 18 の残基 31～35；配列番号 18 の残基 20～36；配列番号 18 の残基 99～108；配列番号 19 の残基 24～34；配列番号 19 の残基 50～56；配列番号 19 の残基 89～97；配列番号 20 の残基 31～35；配列番号 20 の残基 52～67；配列番号 20 の残基 100～108；配列番号 21 の残基 24～35；配列番号 21 の残基 51～57；配列番号 21 の残基 90～98；配列番号 22 の残基 31～35；配列番号 22 の残基 50～66；配列番号 22 の残基 99～116；配列番号 23 の残基 24～39；配列番号 23 の残基 55～61；配列番号 23 の残基 94～102；配列番号 24 の残基 31～37；配列番号 24 の残基 52～67；配列番号 24 の残基 100～109；配列番号 25 の残基 24～35；配列番号 25 の残基 51～57；配列番号 25 の残基 90～98；配列番号 26 の残基 31～37；配列番号 26 の残基 52～67；配列番号 26 の残基 100～109；配列番号 27 の残基 24～35；配列番号 27 の残基 51～57；配列番号 27 の残基 90～98；配列番号 28 の残基 31～37；配列番号 28 の残基 52～67；配列番号 28 の残基 100～108；配列番号 29 の残基 24～35；配列番号 29 の残基 51～57；配列番号 29 の残基 90～98；配列番号 30 の残基 31～37；配列番号 30 の残基 52～67；配列番号 30 の残基 99～109；配列番号 31 の残基 24～35；配列番号 31 の残基 51～57；配列番号 31 の残基 90～98；配列番号 32 の残基 31～37；配列番号 32 の残基 52～67；配列番号 32 の残基 100～109；配列番号 33 の残基 24～35；配列番号 33 の残基 51～57；配列番号 33 の残基 90～98；配列番号 34 の残基 31～37；配列番号 34 の残基 52～67；配列番号 34 の残基 100～108；配列番号 35 の残基 24～35；配列番号 35 の残基 51～57；配列番号 35 の残基 90～98；配列番号 36 の残基 31～35；配列番号 36 の残基 50～66；配列番号 36 の残基 99～116；配列番号 37 の残基 24～39；配列番号 37 の残基 55～61；配列番号 37 の残基 94～102；配列番号 38 の残基 31～35；配列番号 38 の残基 50～66；配列番号 38 の残基 99～108；配列番号 39 の残基 24～35；配列番号 39 の残基 51～57；配列番号 39 の残基 90～98；配列番号 40 の残基 31～37；配列番号 40 の残基 52～67；配列番号 40 の残基 97～109；配列番号 41 の残基 24～40；配列番号 41 の残基 56～62；配列番号 41 の残基 95～103 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 個の CDR を有する。好ましくは前記結合タンパク質は少なくとも 3 個の CDR を有する。

【0010】

別の好ましい実施形態において前記結合タンパク質は、 V_H ドメインを有する。好まし

10

20

30

40

50

くは前記 V_H ドメインは、配列番号 6 ; 配列番号 8 ; 配列番号 10 ; 配列番号 12 ; 配列番号 14 ; 配列番号 16 ; 配列番号 18 ; 配列番号 20 ; 配列番号 22 ; 配列番号 24 ; 配列番号 26 ; 配列番号 28 ; 配列番号 30 ; 配列番号 32 ; 配列番号 34 ; 配列番号 36 ; 配列番号 38 ; および配列番号 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態において前記結合タンパク質は、 V_L ドメインを有する。好ましくは前記 V_L ドメインは、配列番号 7 ; 配列番号 9 ; 配列番号 11 ; 配列番号 13 ; 配列番号 15 ; 配列番号 17 ; 配列番号 19 ; 配列番号 21 ; 配列番号 23 ; 配列番号 25 ; 配列番号 27 ; 配列番号 29 ; 配列番号 31 ; 配列番号 33 ; 配列番号 35 ; 配列番号 37 ; 配列番号 39 ; および配列番号 41 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0011】

ある好ましい実施形態では前記結合タンパク質は、 V_H および V_L ドメインを有する。より好ましくは前記結合タンパク質は、配列番号 6 ; 配列番号 8 ; 配列番号 10 ; 配列番号 12 ; 配列番号 14 ; 配列番号 16 ; 配列番号 18 ; 配列番号 20 ; 配列番号 22 ; 配列番号 24 ; 配列番号 26 ; 配列番号 28 ; 配列番号 30 ; 配列番号 32 ; 配列番号 34 ; 配列番号 36 ; 配列番号 38 および配列番号 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_H ドメインならびに配列番号 7 ; 配列番号 9 ; 配列番号 11 ; 配列番号 13 ; 配列番号 15 ; 配列番号 17 ; 配列番号 19 ; 配列番号 21 ; 配列番号 23 ; 配列番号 25 ; 配列番号 27 ; 配列番号 29 ; 配列番号 31 ; 配列番号 33 ; 配列番号 35 ; 配列番号 37 ; 配列番号 39 および配列番号 41 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V_L ドメインを有する。最も好ましくは前記結合タンパク質は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V_L ドメインおよび配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V_H ドメインを有する。

【0012】

別の実施形態において前記結合タンパク質は、ヒト IgM 定常ドメイン ; ヒト IgG1 定常ドメイン ; ヒト IgG2 定常ドメイン ; ヒト IgG3 定常ドメイン ; ヒト IgG4 定常ドメイン ; ヒト IgE 定常ドメイン および ヒト IgA 定常ドメイン からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインをさらに有する。好ましくは前記重鎖免疫グロブリン定常領域ドメインは、ヒト IgG1 定常ドメインである。好ましくは、前記重鎖定常領域ドメインで、少なくとも 1 個のアミノ酸残基が置き換わっていることで、前記抗体のエフェクター機能が変化している。より好ましくは前記ヒト IgG1 定常ドメインは、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0013】

別の実施形態では前記結合タンパク質は、ヒト Ig カッパ定常ドメイン および ヒト Ig ラムダ定常ドメイン からなる群から選択される軽鎖免疫グロブリン定常ドメインをさらに有する。好ましくは前記ヒト Ig カッパ定常ドメインは配列番号 4 のアミノ酸配列を有し、前記ヒト Ig ラムダ定常ドメインは配列番号 5 のアミノ酸配列を有する。

【0014】

別の実施形態において前記結合タンパク質は、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する Ig 定常重領域 ; 配列番号 4 および配列番号 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する Ig 定常軽領域 ; 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する Ig 可変重領域 ; および配列番号 7 のアミノ酸配列を有する Ig 可変軽領域を有する。

【0015】

別の実施形態において前記結合タンパク質は、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する Ig 定常重領域 ; 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する Ig 定常軽領域 ; 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する Ig 可変重領域 ; および配列番号 7 のアミノ酸配列を有する Ig 可変軽領域を有する。

【0016】

別の実施形態において前記結合は、免疫グロブリン分子または当業界で公知のその機能的変異体からなる群から選択され、この変異体は前記結合タンパク質の特徴的な結合特性

10

20

30

40

50

を保持している。特異的免疫グロブリンの実施形態の例には、s c F v ; モノクローナル抗体 ; ヒト抗体 ; キメラ抗体 ; ヒト化抗体 ; 単ドメイン抗体 ; F a b 断片 ; F a b ' 断片 ; F (a b ') 2 ; F v ; ジスルフィド連結 F v および二重特異性または二重特異的抗体などがあるが、これらに限定されるものではない。最も好ましくは、前記結合タンパク質はヒト抗体である。

【0017】

本発明の別の態様は、上記で開示の結合タンパク質のいずれかを有する中和結合タンパク質であって、前記中和結合タンパク質が I L - 18 を中和する能力を有する中和結合タンパク質を提供する。好ましくは前記中和結合タンパク質は、プロ - ヒト I L - 18 ; 成熟 - ヒト I L - 18 または切断 - ヒト I L - 18 のうちのいずれかを中和する能力を有する。別の実施形態において前記中和結合タンパク質は、I L - 18 がその受容体に結合する能力を低下させる。好ましくは前記中和結合タンパク質は、プロ - ヒト I L - 18 ; 成熟 - ヒト I L - 18 または切断 - ヒト I L - 18 がその受容体に結合する能力を低下させる。

10

【0018】

別の実施形態において前記中和結合タンパク質は、T h 1 調節 ; T h 2 調節 (N a k a n i s h i K . , e t a l (2 0 0 1) C y t o k i n e a n d G r o w t h F a c t o r R e v . 1 2 : 5 3 - 7 2) ; N k 調節 ; 好中球調節 ; 単球 - マクロファージ系統調節 ; 好中球調節 ; 好酸球調節 ; B - 細胞調節 ; サイトカイン調節 ; ケモカイン調節 ; 接着分子調節 ; および細胞動員調節からなる群から選択される 1 以上の I L - 18 生理活性を阻害する能力を有する。

20

【0019】

好ましい実施形態において前記中和結合タンパク質は、最大で約 10^{-7} M ; 最大で約 10^{-8} M ; 最大で約 10^{-9} M ; 最大で約 10^{-10} M ; 最大で約 10^{-11} M ; 最大で約 10^{-12} M ; および最大で 10^{-13} M からなる群から選択される解離定数 (K_D) を有する。

【0020】

別の実施形態において前記中和結合タンパク質は、少なくとも約 10^2 M $^{-1}$ s $^{-1}$; 少なくとも約 10^3 M $^{-1}$ s $^{-1}$; 少なくとも約 10^4 M $^{-1}$ s $^{-1}$; 少なくとも約 10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$; および少なくとも約 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$ からなる群から選択されるオン速度を有する。

30

【0021】

さらに別の実施形態において前記中和結合タンパク質は、最大で約 10^{-3} s $^{-1}$; 最大で約 10^{-4} s $^{-1}$; 最大で約 10^{-5} s $^{-1}$; および最大で約 10^{-6} s $^{-1}$ からなる群から選択されるオフ速度を有する。

【0022】

本発明の別の態様は、上記で開示の前記結合タンパク質のいずれかを含み標識結合タンパク質であって、前記結合タンパク質が検出可能な標識とコンジュゲート形成している標識結合タンパク質を提供する。好ましくは前記検出可能な標識は、放射能標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生体発光標識、磁気標識およびビオチンからなる群から選択される。より好ましくは前記放射能標識は、 3 H、 14 C、 35 S、 90 Y、 99 T c、 111 I n、 125 I、 131 I、 177 L u、 166 H o または 153 S m である。

40

【0023】

本発明の別の態様は、上記で開示の結合タンパク質のいずれかを有する複合タンパク質であって、前記結合タンパク質が治療薬または細胞傷害薬とコンジュゲート形成している複合タンパク質を提供する。好ましくは前記治療薬または細胞傷害薬は、代謝拮抗薬 ; アルキル化剤 ; 抗生物質 ; 成長因子 ; サイトカイン ; 血管新生阻害剤 ; 有糸分裂阻害剤 ; サントラサイクリン ; 毒物 ; およびアポトーシス剤からなる群から選択される。

【0024】

1 実施形態は、上記で開示の結合タンパク質のうちのいずれかをコードする単離核酸に

50

関するものである。さらに別の実施形態は、上記で開示の単離核酸を有するベクターであって、前記ベクターが p c D N A ; p T T (D u r o c h e r e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 2 0 0 2 , V o l 3 0 , N o . 2) ; p T T 3 (別の多重クロニング部位を有する p T T) ; p E F B O S (M i z u s h i m a , S . a n d N a g a t a , S . , (1 9 9 0) N u c l e i c a c i d s R e s e a r c h V o l 1 8 , N o . 1 7) ; p B V ; p J V ; および p B J からなる群から選択されるベクターを提供する。

【0025】

別の実施形態では、宿主細胞を前記ベクターで形質転換する。好ましくは前記宿主細胞は原核細胞である。より好ましくは前記宿主細胞は、大腸菌 (E . c o l i) である。関係する実施形態では前記宿主細胞は、真核細胞である。好ましくは前記真核細胞は、原生動物細胞、動物細胞、植物細胞および真菌細胞からなる群から選択される。より好ましくは前記宿主細胞は、C H O および C O S など (これらに限定されるものではない) の哺乳動物細胞 ; またはサッカロミセス・セレヴィシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) などの真菌細胞 ; または S f 9 などの昆虫細胞である。

10

【0026】

本発明の別の態様は、ヒト I L - 1 8 に結合する結合タンパク質の生産方法であって、ヒト I L - 1 8 に結合する結合タンパク質を生産する上で十分な条件下で培地にて上記で開示の宿主細胞のいずれかを培養する段階を有する方法を提供する。別の実施形態は、上記で開示の方法に従って生産される結合タンパク質を提供する。

20

【0027】

本発明の別の態様は、上記で開示の結合タンパク質のいずれかを有する結晶化結合タンパク質であって、前記結合タンパク質が結晶として存在する結晶化結合タンパク質を提供する。好ましくは前記結晶は、担体を含まない医薬徐放性結晶である。1 実施形態では、結晶として存在する前記結合タンパク質は、前記結合タンパク質の可溶性の相手よりインビボで長い半減期を有する。別の実施形態では、前記結合タンパク質は、結晶化後にその生理活性を保持する。

【0028】

1 実施形態は、結合タンパク質の放出用の組成物であって、前記組成物が、上記で開示の結晶化結合タンパク質および成分を含む製剤ならびに少なくとも 1 種類のポリマー担体を有する組成物を提供する。好ましくは前記ポリマー担体は、ポリ (アクリル酸) 、ポリ (シアノアクリレート) 、ポリ (アミノ酸) 、ポリ (無水物) 、ポリ (デブシペプチド) 、ポリ (エステル) 、ポリ (乳酸) 、ポリ (乳酸 - コ - グリコール酸) または P L G A 、ポリ (b - ヒドロキシブチレート) 、ポリ (カプロラクトン) 、ポリ (ジオキサノン) ; ポリ (エチレングリコール) 、ポリ ((ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド、ポリ [(有機) ホスファゼン] 、ポリ (オルトエステル) 、ポリ (ビニルアルコール) 、ポリ (ビニルピロリドン) 、無水マレイン酸 - アルキルビニルエーテルコポリマー、プルロニックポリオール、アルブミン、アルギン酸化合物、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖類、グリカミノグリカン類、硫酸化多糖類、混合物およびこれらのコポリマーからなる群の 1 以上から選択されるポリマーである。好ましくは前記成分は、アルブミン、ショ糖、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル - β - シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールからなる群から選択される。別の実施形態は、哺乳動物の治療方法であって、この哺乳動物に対して、有効量の上記で開示の化合物を投与する段階を有する方法を提供する。

30

40

【0029】

本発明の別の態様は、対象遺伝子の遺伝子発現を調節する方法であって、I L - 1 8 ポリペプチドまたは I L - 1 8 調節剤を提供する段階および前記ポリペプチドまたは調節剤を細胞に接触させる段階を有し ; 前記対象遺伝子が、ジーンバンク (G e n e b a n k) 識別番号 :

50

【 0 0 3 0 】

【 化 1 】

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, 10
 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, 20
 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, 30
 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, and HG3925-HT4195.

によって識別される遺伝子からなる群から選択される方法を提供する。

【 0 0 3 1 】

好ましくは前記調節剤は、拮抗薬である。より好ましくは前記調節剤は、結合タンパク質または中和結合タンパク質である。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、上記で開示の結合タンパク質または中和結合タンパク質ならびに製薬上
 許容される担体を含む医薬組成物を提供する。別の実施形態において前記医薬組成物は、
 I L - 1 8 活性が有害である疾患を治療するための少なくとも 1 種類の別の治療薬を含む
 。好ましくは前記別の薬剤は、血管新生阻害薬（抗 V E G F 抗体または V E G F - トラッ
 プなど（これらに限定されるものではない。））；キナーゼ阻害薬（K D R および T I E
 - 2 阻害薬など（これらに限定されるものではない。））；同時刺激分子遮断薬（抗 B 7
 . 1、抗 B 7 . 2、C T L A 4 - I g、抗 C D 2 0 など（これらに限定されるものではない。
 い。））；接着分子遮断薬（抗 L F A - 1 A b s、抗 E / L セレクチン A b s、小分子阻
 害薬など（これらに限定されるものではない。））；抗サイトカイン抗体またはこの機能
 性断片（抗 I L - 1 2、抗 T N F、抗受容体抗体など（これらに限定されるものではない
 。））；メトトレキセート；コルチコステロイド類；シクロスポリン；ラバマイシン；F 40
 50

K 5 0 6 ; および非ステロイド系抗炎症剤からなる群から選択される。

【 0 0 3 3 】

別の態様において本発明は、ヒト I L - 1 8 活性の阻害方法であって、ヒト I L - 1 8 を上記で開示の結合タンパク質と接触させることで、ヒト I L - 1 8 活性を阻害するようにする段階を有する方法を提供する。関係する態様では本発明は、I L - 1 8 活性が有害である障害を患うヒト被験者でのヒト I L - 1 8 活性の阻害方法であって、このヒト被験者に対して、上記で開示の結合タンパク質を投与することで、ヒト被験者でのヒト I L - 1 8 活性を阻害し、治療を達成する段階を有する方法を提供する。好ましくは前記障害は、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎および敗血症性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、強皮性皮膚炎、対宿主性移植片病、臓器移植拒絶反応（骨髄および固形臓器拒絶などがあるが、これらに限定されるものではない。）、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム硬化症、汎発性血管内凝固症候群、川崎病、グレーブズ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ヴェーゲナー肉芽腫症、ヘーノホ - シェーンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、トキシックショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンティングトン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性疾患、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性疾患、I 型多分泌腺機能低下および I I 型多分泌腺機能低下、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促進症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性丘関節症、腸性滑膜炎、クラミジア、エルジニアおよびサルモネラに関連する関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患 / 動脈硬化症、アトピー、自己免疫性水泡性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 I g A 疾患、自己免疫性溶血性貧血、クーン陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋肉痛脳炎 / ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全疾患症候群、後天性免疫不全に関連する疾病、B 型肝炎、C 型肝炎、分類不能型免疫不全（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性の不妊症、卵巣不全、早発性卵巣不全、線維性肺疾患、原因不明の線維化肺炎、ポスト炎症性間隙性肺疾患、間隙性肺炎、結合組織病に伴う間隙性肺疾患、混合結合組織病に伴う肺疾患、全身性硬化症に伴う間隙性肺疾患、慢性関節リウマチに伴う間隙性肺疾患、全身性エリテマトーデスに伴う肺疾患、皮膚筋炎 / 多発性筋炎に伴う肺疾患、シェーグレン病に伴う肺疾患、強直性脊椎炎に伴う肺疾患、脈管性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症に伴う肺疾患、薬物誘発性の間隙性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間隙性肺疾患、通風性関節炎、自己免疫性肝炎、1 型自己免疫性肝炎（古典的な自己免疫性またはルポイド肝炎）、2 型自己免疫性肝炎（抗 L K M 抗体肝炎）、自己免疫媒介型低血糖症、黒色表皮症に伴う B 型インスリン抵抗性、上皮小体低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1 型乾癬、2 型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患 N O S、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的脈管炎、ライム病、ジスコイドエリテマトーデス、特発性または N O S の男性不妊症、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患の二次的な肺高血症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺発現、急性リウマチ熱、リウマチ様脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病 / 動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能亢進（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性脈管炎、白斑、急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発肝臓損傷、胆汁鬱滞、特異体質性肝臓疾患、薬物誘発肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アレルギーおよび喘息、B 群溶連菌（G B S）感染、精神障害（例：抑鬱および統合失調症）、T h 2 型および T h 1 型介在疾患ならびに肺癌、乳房癌

10

20

30

40

50

、胃癌、膀胱癌、結腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および直腸癌などの癌および造血器悪性腫瘍（白血病およびリンパ腫）を含む群から選択される。

【0034】

別の態様において本発明は、IL-18が有害である障害を患う患者の治療方法であって、上記で開示の結合タンパク質のいずれかを、上記で記載の第2の薬剤の前、同時または後に投与する段階を有する方法を提供する。

【0035】

本発明の別の態様は、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびCDR移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質であって、前記中和結合タンパク質が成熟-ヒトIL-18に結合する能力を有するが、プロ-ヒトIL-18に特異的に結合しない中和結合タンパク質を提供する。

10

【0036】

本発明の別の態様は、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびCDR移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質であって、前記中和結合タンパク質がヒトIL-18への結合に関して125-2H抗体と競合する能力を有する中和結合タンパク質を提供する。

【0037】

本発明の別の態様は、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびCDR移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質であって、前記中和結合タンパク質がヒトIL-18との結合に関して125-2H抗体と競合する能力を持たない中和結合タンパク質を提供する。

20

【0038】

本発明の別の態様は、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびCDR移植抗体からなる群から選択される中和結合タンパク質であって、前記中和結合タンパク質がヒトIL-18との結合に関して2.5(E)mg1抗体およびIL-18BPからなる群から選択される結合タンパク質と競合する能力を持たない中和結合タンパク質を提供する。

【0039】

好ましい実施形態において前記結合タンパク質は、成熟-ヒトIL-18に結合する能力を有するが、プロ-ヒトIL-18に特異的に結合しない。さらに別の実施形態では前記結合タンパク質は、ヒトIL-18との結合に関して125-2H抗体と競合する能力を有する。別の実施形態では前記結合タンパク質は、ヒトIL-18との結合に関して125-2H抗体と競合する能力を持たない。さらに別の実施形態では前記結合タンパク質は、ヒトIL-18との結合に関して2.5(E)mg1抗体およびIL-18BPからなる群から選択される結合タンパク質と競合する能力を持たない。

30

【0040】

好ましい実施形態では前記結合タンパク質は、配列番号9のアミノ酸配列を有するV_Lドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列を有するV_Hドメインを有する。

【0041】

別の実施形態において前記結合タンパク質は、配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するIg定常重領域；配列番号4および配列番号5からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するIg定常軽領域；配列番号8のアミノ酸配列を有するIg可変重領域；および配列番号9のアミノ酸配列を有するIg可変軽領域を有する。

40

【0042】

別の実施形態において前記結合タンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列を有するIg定常重領域；配列番号4のアミノ酸配列を有するIg定常軽領域；配列番号8のアミノ酸配列を有するIg可変重領域；および配列番号9のアミノ酸配列を有するIg可変軽領域を有する。

【発明を実施するための形態】

【0043】

50

本発明は、IL-18結合タンパク質、特に抗-IL-18抗体またはそれに結合するその抗原結合部分に関するものである。本発明の各種態様は、抗体および抗体断片およびそれらの医薬組成物、ならびにこのような抗体および断片を製造するための核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞に関するものである。ヒトIL-18の検出、インビトロまたはインビボでのヒトIL-18活性の阻害および遺伝子発現の調節を行うための本発明の抗体の使用方法も本発明に包含される。本発明はまた、切断IL-18に関するものでもある。関係する態様において本発明は、切断IL-18を製造するための核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞に関するものでもある。

【0044】

本明細書において別段の定義がない限り、本発明との関連で使用される科学用語および技術用語は、当業者が共通に理解する意味を有するものとする。さらに、文脈によって別段の必要がない限り、単数の用語は複数を含むものとし、複数の用語は単数を含むものとする。本願においては、別段の断りがない限り、「または」の使用は「および/または」を意味する。さらに、「包含する」という用語ならびに「含む」および「含まれる」などの他の形態の使用は限定的ではない。さらに、「要素」または「構成要素」などの用語は、別段の具体的な断りがない限り、1単位を有する要素および構成要素ならびに複数のサブユニットを有する要素および構成要素の両方を包含するものである。

【0045】

本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学およびタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションの方法および技術に関連して使用される命名法は、当業界において公知で、一般に使用されるものである。本発明の方法および技術は、別段の断りがない限り、当業界において公知であり、本明細書を通じて引用および議論される各種の一般的文献およびより具体的な文献に記載の従来法に従って行われる。酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従って、当業界で一般に行われる方法に従って、あるいは本明細書に記載の方法に従って行われる。本明細書に記載の分析化学、合成有機化学ならびに医化学および製薬化学に関連して使用される命名法ならびにそれらの実験質的な手順および技術は、当業界で公知であり、一般に使用される。化学合成、化学分析、医薬製造、製剤および投与ならびに患者治療については、標準的な技術を用いる。

【0046】

本発明についての理解を深めるため、特定の用語について下記のように定義する。

【0047】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸のポリマー鎖を指す。「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、ポリペプチドという用語と互換的に使用され、やはりアミノ酸のポリマー鎖を指す。「ポリペプチド」という用語は、天然または人工のタンパク質、タンパク質断片およびタンパク質配列のポリペプチド類縁体を包含する。ポリペプチドはモノマー性またはポリマー性であることができる。

【0048】

「単離タンパク質」または「分離ポリペプチド」という用語は、その起源または誘導源のために、天然の状態ではそれに伴っている天然関連成分と関連しておらず；同じ生物種からの他のタンパク質を実質的に含まず；異なる生物種からの細胞によって発現され；あるいは天然には生じないタンパク質またはポリペプチドである。従って、化学的に合成された、あるいは天然起源の細胞とは異なる細胞系で合成されたポリペプチドは、その天然関連成分から「単離」されている。タンパク質は、当業界で公知のタンパク質精製技術を用いた単離によって、天然関連成分を実質的に含まないものとすることもできる。

【0049】

本明細書で使用される「回収」という用語は、ポリペプチドなどの化学種を、例えば当業界では公知のタンパク質精製技術を用いる単離によって、天然関連成分を実質的に含まないようにするプロセスを指す。

【0050】

本明細書で使用される「IL-18」という用語は、インターフェロン γ の誘発能力以外に各種機能を示す炎症誘発性サイトカインであるインターフェロン- γ 誘発因子(IGIF)とも称されるサイトカインを指す。「hIL-18」という用語と互換的に使用される「ヒトIL-18」という用語は、配列番号1のポリペプチドおよびその断片を包含し、これにはプロ-ヒトIL-18、成熟ヒトIL-18および本明細書に記載のIL-18の生理活性を保持する切断形ヒトIL-18などがあるが、これらに限定されるものではない。本明細書で使用される「プロ-ヒトIL-18」という用語は、配列番号1のポリペプチドを指す。本明細書で使用される「成熟ヒトIL-18」という用語は配列番号1の残基37~193を指し、本明細書で使用される「切断形ヒトIL-18」という用語は、配列番号1の残基59~193を指す。好ましくは前記IL-18およびその断片は生理活性である。本明細書で使用される「組換えヒトIL-18」または「hIL-18」という用語は、組換えDNA技術を用いてインビトロで形成されるヒトIL-18を指す。

10

20

30

40

50

【0051】

本明細書で使用される「IL-18の生理活性」は、サイトカインIL-18の全ての固有の生理的特性を指す。IL-18の生理的特性には、IL-18受容体への結合；Th1およびTc1細胞の成熟および活性化の促進；いくつかの細胞種によるTNF、IFN γ およびIL-1 β などのサイトカイン類産生の促進；マクロファージによるTNFおよびIFN γ などのサイトカイン類放出、NO産生の促進；FasL発現、細胞傷害性およびNK細胞からのサイトカイン放出(IFN γ)の促進；好中球でのサイトカイン/ケモカイン放出、呼吸バースト、顆粒放出、接着分子発現の促進；内皮細胞の移動の促進と、それによる血管新生の促進；軟骨細胞でのGAG放出、MMPおよびNO産生の促進；一部細胞でのCOX2発現の促進；および一部細胞での細胞増殖低減などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0052】

抗体、タンパク質またはペプチドの第2の化学種との相互作用に関して本明細書で使用される「特異的結合」または「特異的に結合」という用語は、その相互作用が、その化学種上の特定の構造(例：抗原決定基またはエピトープ)の存在に依存することを意味する。例えば抗体は、タンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識「A」および抗体を含む反応においてエピトープAを含む分子(または遊離の未標識A)が存在すると、抗体に結合する標識Aの量が減る。

【0053】

本明細書で使用される「抗体」という用語は広義には、4つのポリペプチド鎖、すなわち2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖またはIg分子の本質的なエピトープ結合特徴を保持したその機能性断片、突然変異体、変異体または誘導体からなる免疫グロブリン(Ig)分子を指す。このような突然変異体、変異体または誘導抗体フォーマットは、当業界では公知である。その実施形態については下記で議論するが、これらに限定されるものではない。

【0054】

全長抗体において各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではHCVRまたはV_Hと略記される。)および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は3つのドメイン(CH1、CH2およびCH3)から構成される。各軽鎖は軽鎖可変領域(本明細書ではLCVRまたはV_Lと略記される。)および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は1つのドメイン(CL)から構成される。V_H領域およびV_L領域はさらに、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域に分割することができ、超可変領域には、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域が点在している。それぞれのV_HおよびV_Lは3つのCDRおよび4つのFRから構成され、これらはアミノ末端からカルボキシ末端にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で配置されている。

【0055】

本明細書で使用される抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）という用語は、抗原（例：hIL-18）と特異的に結合する能力を保持している抗体の1以上の断片を示す。抗体の抗原結合機能が全長抗体の断片によって発揮され得ることが示されている。そのような抗体の実施形態は、2特異的、二重特異的または複数特異的フォーマットであることもでき、具体的には2以上の異なる抗原に結合する。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片、すなわち、VLドメイン、VHドメイン、CLドメインおよびCH1ドメインからなる一価の断片；(ii) F(ab')₂断片、すなわち、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片；(iii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVLドメインおよびVHドメインからなるFv断片；(v) 単一可変領域を有するdAb断片(Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546)；および(vi) 分離相補性決定領域(CDR)などがある。さらに、Fv断片の2つのドメイン(VLおよびVH)は、別個の遺伝子によってコードされるが、組換え法を使用して、これらが単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって連結させることができ、この場合、単一のタンパク質鎖において、VL領域およびVH領域は対形成して、(単鎖Fv(scFv)として知られる。)一価の分子を形成する(例えば、Bird et al. Science 242: 423-426；およびHouston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883参照)。このような単鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものである。ジアボディーなどの他の形態の単鎖抗体もまた包含される。ジアボディーは、VHドメインおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖で発現される二価の二重特異的抗体であるが、同じ鎖における2つのドメインの間での対形成ができない短いリンカーが使用され、これにより、このドメインが他の鎖の相補的なドメインと対形成させられ、そして2つの抗原結合部位が生じている、二価の二重特異的抗体である(例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448；Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123参照)。このような抗体結合タンパク質は、当業界で公知である(Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)参照)。

【0056】

なおさらに、抗体またはその抗原結合部分は、抗体または抗体部分が1以上の他のタンパク質またはペプチドと共有結合的または非共有結合的に結合することによって形成されるより大きい免疫接着分子の一部であり得る。このような免疫接着分子の例には、四量体のscFv分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101)、ならびに二価のビオチン化scFv分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジン標識の使用(Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058)などがある。Fab断片およびF(ab')₂断片などの抗体部分はそれぞれ、完全な抗体のパパイン消化またはペプシン消化などの従来技術を使用して完全な抗体から得ることができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、本明細書に記載の標準的な組換えDNA技術を使用して得ることができる。

【0057】

本明細書で使用される「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を示すものである(例えば、hIL-18に特異的に結合する単離抗体は、hIL-18以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、hIL-18に特異的に結合する単離抗体は、他の生物種からのIL-18分子などの他

の抗体に対して交差反応性を有し得る。さらに、単離抗体は他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まない場合がある。

【0058】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変および定常領域を有する抗体を含むものである。本発明のヒト抗体は、例えばCDR類、特にCDR3でのヒト生殖系列免疫グロブリン配列（例：インビボでのランダムまたは部位特異的な変異誘発またはインビボでの体細胞変異誘発によって導入される変異）によってコードされていないアミノ酸残基を含み得る。しかしながら、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を包含するものではない。

10

【0059】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、宿主細胞にトランスフェクションされた組換え発現ベクターを用いて発現される抗体（さらに下記のセクションIICにも記載）、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離される抗体（Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371-378）、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例：マウス）から単離される抗体（例えば、Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann S. A., and Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21: 364-370 参照）などの組換え手段によって取得、発現、形成または単離される全てのヒト抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングが関与する他の手段によって取得、発現、形成または単離される抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある実施形態では、このような組換えヒト抗体がインビトロでの変異誘発（あるいは、ヒトIg配列に対してトランスジェニックである動物を用いる場合は、インビボでの体細胞変異誘発）に付され、かくして組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列由来であり、これら配列に関係するが、天然にはインビボでのヒト抗体生殖系列レパートリー内には存在し得ない配列である。

20

30

【0060】

「キメラ抗体」という用語は、ある動物種由来の重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列と、別の動物種由来の定常領域配列とを含む抗体を示し、例えば、マウスの重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列がヒトの定常領域に連結されている抗体をいう。

【0061】

「CDRグラフト化抗体」という用語は、ある動物種由来の重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を含むが、V_Hおよび／またはV_LのCDR領域の1以上の配列が別の動物種のCDR配列で置換されている抗体を示し、例えば、マウスの重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を有し、1以上のマウスCDR（例えば、CDR3）がヒトCDR配列で置換されている抗体をいう。

40

【0062】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の動物種（例えば、マウス）に由来の重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を含むが、V_H配列および／またはV_L配列の少なくとも一部が、より「ヒト様」であるように、すなわち、ヒトの生殖系列の可変配列により類似するように変化している抗体をいう。ある種類のヒト化抗体には、ヒトCDR配列が、

50

対応する非ヒトCDR配列を置換するために非ヒトのVH配列およびVL配列に導入されているCDRグラフト化抗体がある。

【0063】

本明細書で使用される場合、「hIL-18中和結合タンパク質」という用語は、hIL-18に特異的に結合して、hIL-18の生理活性を中和するタンパク質を指す。好ましくは中和結合タンパク質は、hIL-18への結合がhIL-18の生理活性の阻害を生じる中和抗体である。好ましくは、中和結合タンパク質はhIL-18に結合し、IL-18の生理活性を少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%またはそれ以上低下させる。中和結合タンパク質によるhIL-18生理活性の阻害は、hIL-18生理活性の一つ以上の指標を測定することで評価することができる。hIL-18生理活性のこれらの指標は、当業界で公知のいくつかの標準的なインビトロまたはインビボアッセイの一つ以上によって評価することができる。

10

【0064】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT-細胞受容体に対する特異的結合を行うことができるポリペプチド決定基を含む。ある種の実施形態では、エピトープ決定基には、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面基などがあり、ある種の実施形態では、特定の三次元構造特性および/または特定の帯電特性を有し得る。エピトープは、抗体によって結合した抗原の1領域である。ある種の実施形態では抗体は、それがタンパク質および/または巨大分子の複合体混合物においてその標的抗原を優先的に識別する場合に、特異的に結合すると言われる。

20

【0065】

本明細書で使用される「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、BIAcoreシステム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)を使用して、バイオセンサマトリックス内でのタンパク質濃度の変化を検出することによってリアルタイムでの生物特異的な相互作用の分析を可能にする光学的現象をいう。詳細については、文献を参照する(Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; および Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277)。

30

【0066】

本明細書で使用される「 K_{on} 」という用語は、当業界で公知である抗原への抗体の会合による抗体/抗原複合体形成に関するオン速度定数を指すものである。

【0067】

本明細書で使用される「 K_{off} 」という用語は、当業界で公知である抗体/抗原複合体からの抗体の解離に関するオフ速度定数を指すものである。

【0068】

本明細書で使用される「 K_d 」という用語は、当業界で公知である特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を指すものである。

40

【0069】

本明細書で使用される「標識結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の確認を提供する組み込み標識を有するタンパク質を指す。好ましくは、その標識は検出可能なマーカであり、例えば放射能標識アミノ酸の組み込み、あるいは標識アビジン(例: 光学的または比色的方法によって検出可能な蛍光マーカまたは酵素活性を含むストレプトアビジン)によって検出可能なビオチン部分のポリペプチドへの付着などがある。ポリペプチド用の標識の例としては、放射性同位体または放射性核種(例: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm)；蛍光標識(例: FITC、ローダミン、ランタニド系蛍光体)、酵素標識(例: 西洋わさびペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)；化学

50

発光マーカー；ビオチニル基；二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例：ロイシンジッパー対配列、二次抗体用の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；ならびにガドリニウムキレートなどの磁気剤などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0070】

「コンジュゲート形成結合タンパク質」という用語は、治療薬または細胞傷害薬などの第2の化学部分に化学的に連結された結合タンパク質を指す。本明細書において「薬剤」という用語は、化合物、化合物の混合物、生体巨大分子または生体材料からの抽出物を指すのに用いられる。好ましくは治療薬または細胞傷害薬には、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびビューロマイシンならびにこれらの類縁体または同族体などがあるが、これらに限定されるものではない。

10

【0071】

本明細書で使用される「結晶化結合タンパク質」という用語は、結晶の形態で存在するポリペプチドを指す。結晶は、非晶質固体状態や液晶状態などの他の形態とは異なる物質の固体状態の1形態である。結晶は、原子、イオン、分子（例：抗体などのタンパク質）または分子集合体（例：抗原/抗体複合体）の規則的で反復性の三次元配列からなる。これらの三次元配列は、当業界では良く知られている特定の数学的関係に従って並んでいる。結晶において繰り返される基本的な単位または構成ブロックは、非対称単位と称される。所定の明確な結晶学的対称性に一致する配置での非対称単位の繰り返しは、結晶の「単位セル」を提供する。3つの次元全てでの規則的な転位による単位セルの繰り返しが結晶を与える（Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999) 参照）。

20

【0072】

本明細書で言及される「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれかであるポリマー形態の2種類以上のヌクレオチドあるいはいずれかの種類のヌクレオチドの修飾型を意味する。この用語には、一本鎖型および二本鎖型のDNAが含まれるが、好ましくは二本鎖DNAである。

30

【0073】

本明細書で使用される「単離ポリヌクレオチド」という用語は、その起源のために「単離ポリヌクレオチド」がこの「単離ポリヌクレオチド」が天然において認められるポリヌクレオチドの全体または一部を伴っておらず、天然において連結されていないポリヌクレオチドに機能可能に連結されており；または天然ではより大きな配列の一部として生じない、ポリヌクレオチド（例えば、ゲノム、cDNAまたは合成起源のもの、またはこれらの何らかの組み合わせ）を意味するものとする。

40

【0074】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、連結されている別の核酸を輸送する能力を有する核酸分子を指す。ある種のベクターは「プラスミド」であり、これは別のDNA断片が連結されていても良い環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはウィルスベクターであり、ここでは別のDNA断片がウィルスゲノムに連結されていても良い。ある種のベクターは、これらが導入される宿主細胞で自己複製を行うことができる（例：細菌起源の複製を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例：非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み入れられることができ、それによって宿主ゲノムに従って複製される。さらに

50

、ある種のベクターは、機能可能に連結されている遺伝子の発現を有効にすることができる。このようなベクターは本明細書において、「組換え発現ベクター」（または簡単に「発現ベクター」と称する。通常、組換えDNA技術で利用される発現ベクターは、プラスミドの形態である場合が多い。本明細書においては、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であることから、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に使用しても良い。しかしながら本発明は、同等の機能を果たすウィルスベクター（例：複製欠損アデノウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの他の形態の発現ベクターをも包含するものである。

【0075】

「機能可能に連結」という用語は、記載の構成要素がその意図する形態で機能できる関係にある並置状態を指す。コード配列に「機能可能に連結」された制御配列は、制御配列に適合する条件下でコード配列の発現が行われるように連結されている。「機能可能に連結された」配列には、対象の遺伝子と近接している発現制御配列およびトランスで作用してまたは離れて作用して対象遺伝子を制御する発現制御配列の両方が含まれる。

10

【0076】

本明細書で使用される「発現制御配列」という用語は、連結しているコード配列の発現およびプロセッシングを行う上で必要なポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列には、適切な転写開始、終止、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を高める配列（すなわち、コザク（Kozak）コンセンサス配列）；タンパク質安定性を高める配列；および所望の場合にはタンパク質分泌を高める配列などがある。このような制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なる。原核生物では、このような制御配列にはプロモーター、リボソーム結合部位および転写終止配列などがあり、真核生物では、このような制御配列には、プロモーターおよび転写終止配列などがある。「制御配列」は、存在が発現およびプロセッシングに必須である成分を含むものであり、存在が有利である別の成分をも含み、これには例えばリーダー配列および融合パートナー配列がある。

20

【0077】

本明細書で定義される「形質転換」は、外来DNAが宿主細胞に進入するいずれかのプロセスを指す。形質転換は、当業界では公知の各種方法を用いて、自然または人工的な条件下で起こすことができる。形質転換は、外来核酸配列の原核または真核宿主細胞への挿入のための公知の方法のいずれかに依存し得る。この方法は、形質転換を受ける宿主細胞に基づいて選択され、ウィルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクションおよび粒子衝突などがあり得るが、これらに限定されるものではない。このような「形質転換（された）」細胞には、挿入DNAが自律的に複製するプラスミドとしてまたは宿主染色体の一部として複製する能力を有する安定に形質転換された細胞などがある。これらには、限られた期間にわたり、挿入DNAまたはRNAを一時的に発現する細胞も含まれる。

30

【0078】

本明細書で使用される「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」という用語は、外来DNAが導入された細胞を指す。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫も指すと理解されるべきである。突然変異または環境的影響のために、後継世代で一定の修飾が起こりえることから、このような子孫は実際には、親細胞と同一ではない可能性があるが、それでもなお、本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲に含まれる。好ましくは宿主細胞には、いずれかの生物界から選択される原核および真核細胞が含まれる。好ましい真核細胞には、原生生物、真菌、植物細胞および動物細胞などがある。最も好ましくは宿主細胞には、原核細胞系である大腸菌；哺乳動物細胞系であるCHOおよびCOS；昆虫細胞系であるSf9；および真菌細胞であるサッカロマイセス・セレビシエなどがあるが、これらに限定されるものではない。

40

【0079】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成および組織培養および形質転換には、標準的な

50

技術を用いることができる（例：電気穿孔法、リポフェクション）。酵素反応および精製技術は、製造者の説明書に従って、または当業界で一般に行われている方法に従って、または本明細書に記載の方法に従って行うことができる。前記の技術および手順は、当業界で公知の従来法に従って、ならびに本明細書を通じて引用および議論されている各種の一般的参考文献およびより具体的な参考文献に記載の方法に従って行うことができる（Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))；あらゆる目的において、参照によって本明細書に組み込まれる）。

【0080】

当業界で知られ、本明細書で使用される「トランスジェニック生物」は、導入遺伝子を含む細胞を有する生物であって、その生物（またはその成分の先祖）に導入された導入遺伝子が、その生物で天然に発現されないポリペプチドを発現する生物を指す。「導入遺伝子」とは、トランスジェニック生物が発育する細胞のゲノムに安定かつ機能可能に組み込まれて、トランスジェニック生物の1以上の細胞種または組織におけるコード遺伝子産物の発現を有効化するDNA構築物である。

【0081】

「調節」および「調整」という用語は、互換的に用いられ、本明細書で使用される場合、対象分子の活性（例：hIL-18の生理活性）における変化および変動を指す。調節は、対象分子のある種の活性または機能の強さにおける上昇または低下となり得る。分子の活性および機能の例には、結合特性、酵素活性、細胞受容体活性化およびシグナル伝達などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0082】

したがって、本明細書で使用される「調節剤」という用語は、対象分子の活性または機能（例：hIL-18の生理活性）を変化または変動させることができる化合物である。例えば調節剤は、調節剤がない場合に認められる活性または機能の大きさと比較して、分子のある種の活性または機能の大きさを上昇または低下させることができる。ある種の実施形態では調節剤は、分子の少なくとも1種類の活性または機能の大きさを低下させる阻害剤である。阻害剤の例には、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチボディ（peptibodies）、炭水化物または小有機分子などがあるが、これらに限定されるものではない。ペプチボディについては、例えばWO 01/83525に記載されている。

【0083】

本明細書で使用される「作働薬」という用語は、作働薬不在下で認められる活性または機能の強さと比較して、分子のある種の活性または機能の強さを上昇させる調節剤を指す。対象となる特定の作働薬には、IL-18ポリペプチドまたはポリペプチド、核酸、炭水化物またはhIL-18に結合する他の分子などがあり得るが、これらに限定されるものではない。

【0084】

本明細書で使用される「拮抗薬」または「阻害薬」という用語は、拮抗薬不在下で認められる活性または機能の強さと比較して、分子のある種の活性または機能の強さを低下させる調節剤を指す。対象となる特定の拮抗薬には、hIL-18の生理活性または免疫活性を遮断または調節するものなどがある。hIL-18の拮抗薬および阻害薬には、タンパク質、核酸、炭水化物またはhIL-18に結合する他の分子などがあり得るが、これらに限定されるものではない。

【0085】

本明細書で使用される「検体」という用語は、最も広い意味で用いられる。本明細書で使用される「生物検体」には、生物または以前に生物であったものからのいずれかの量の物質などがあるが、これに限定されるものではない。そのような生物には、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギおよび他の動物などがあるが、これらに限定されるものではない。そのような物質には、血液、血清、尿、滑液、細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ

10

20

30

40

50

節および脾臓などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0086】

本明細書で使用され、当業者によって一般に公知で使用される「競合する」という用語は、一つの結合タンパク質が、第2の結合タンパク質の両結合タンパク質に共通するリガンド（例：IL-18）への結合を妨害または障害する能力を指す。結合タンパク質の競合特性を測定する上で有用なアッセイは、当業界で公知である。好ましい競合アッセイについて、本明細書で説明する。

【0087】

I. ヒトIL-18に結合するヒト抗体

本発明の1態様は、高親和性、低オフ速度および高中和能でIL-18に結合する単離ヒト抗体またはこの抗原結合部分を提供する。好ましくはこの抗体またはこの部分は、単離抗体である。好ましくは、本発明のヒト抗体は、中和ヒト抗-IL-18抗体である。

10

【0088】

A. 抗IL-18抗体の形成方法

本発明の抗体は、当業界で公知の多くの技術のいずれかによって形成することができる。本発明の抗-IL-18抗体の特に好ましい形成方法には、ゼノマウストラנסジェニックマウスの使用および抗体製造において当業界で公知のハイブリドーマおよびSLAM細胞操作技術の使用（Abgenix, Inc., Fremont, CA）、ならびに実施例3.2に記載のIL-18ペプチド、すなわち、配列番号1のアミノ酸配列およびこの断片を有するヒトIL-18を含む抗原の使用などがある。

20

【0089】

本発明の1実施形態においてヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン座の一部または全てを有する非ヒト動物をIL-18抗原で免疫化することで形成される。好ましい実施形態では、前記非ヒト動物は、ゼノマウストラנסジェニックマウス、すなわちヒト免疫グロブリン座の大きい断片を有してマウス抗体産生欠乏の改変マウス系統である（例えば、Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994) および米国特許第5916771号、5939598号、5985615号、5998209号、6075181号、6091001号、6114598号および6130364号参照。さらに、1991年7月25日公開のWO91/10741、1994年2月3日公開のWO94/02602、いずれも1996年10月31日公開のWO96/34096およびWO96/33735、1998年4月23日公開のWO98/16654、1998年6月11日公開のWO98/24893、1998年11月12日公開のWO98/50433、1999年9月10日公開のWO99/45031、1999年10月21日公開のWO99/53049、2000年2月24日公開のWO0009560、および2000年6月29日公開のWO00/037504も参照）。ゼノマウストラנסジェニックマウスは、完全にヒトの抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトMabを形成する。ゼノマウストラנסジェニックマウスは、ヒト重鎖座およびx軽鎖座のメガ塩基対の大きさの生殖系列配置YAC断片の導入により、ヒト抗体レパートリーの約80%を含む（Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits J. Exp. Med., 188:483-495 (1998) 参照；これらの開示内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。）。

30

40

【0090】

本発明はまた、ヒト免疫グロブリン座を有する非ヒトトランスジェニック動物を免疫化することで、非ヒト非マウス動物から抗-IL-18抗体を形成する方法も提供する。直前に記載の方法を用いて、そのような動物を作ることができる。これらの特許に開示の方法には、米国特許第5994619号に記載の方法に従って変更を加えることができる。好ましい実施形態では、前記非ヒト動物は、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマであることができる。

【0091】

50

別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有する非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリンの「ミニ座 (mini locus)」を有する動物である。ミニ座アプローチでは、Ig 座からの個々の遺伝子を含めることによって、外来 Ig 座を模倣する。従って、1 以上の V_H 遺伝子、1 以上の D_H 遺伝子、1 以上の J_H 遺伝子、ミュー定常領域および第 2 の定常領域 (好ましくは γ 定常領域) が、動物への挿入のための構築物へと形成される。この手法については、特に米国特許第 5 5 4 5 8 0 7 号、5 5 4 5 8 0 6 号、5 6 2 5 8 2 5 号、5 6 2 5 1 2 6 号、5 6 3 3 4 2 5 号、5 6 6 1 0 1 6 号、5 7 7 0 4 2 9 号、5 7 8 9 6 5 0 号、5 8 1 4 3 1 8 号、5 5 9 1 6 6 9 号、5 6 1 2 2 0 5 号、5 7 2 1 3 6 7 号、5 7 8 9 2 1 5 号および 5 6 4 3 7 6 3 号 (参照によって本明細書に組み込まれる。) に記載されている。

10

【0092】

ミニ座手法の利点は、Ig 座の部分を含む構築物を迅速に形成し、動物に導入できるという点である。しかしながら、ミニ座手法の欠点となり得るものとしては、完全な B 細胞発達を支援するだけの免疫グロブリンの多様性がないために、抗体産生が相対的に低くなり得るというものである。

【0093】

ヒト抗-IL-18 抗体を産生するため、ヒト免疫グロブリン座の一部または全てを有する非ヒト動物を IL-18 抗原で免疫化し、抗体または抗体産生性細胞を動物から単離する。IL-18 抗原は、単離および/または精製 IL-18 であることができ、好ましくはヒト IL-18 である。別の実施形態では IL-18 抗原は、IL-18 の断片、好ましくは成熟 IL-18 の断片である。別の実施形態では IL-18 抗原は、IL-18 の少なくとも 1 個のエピトープを有する断片である。

20

【0094】

動物の免疫化は、当業界で公知の方法によって行うことができる (例えば Harlow and Lane, Antibody: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990 参照)。マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシおよびウマなどの非ヒト動物の免疫化方法は、当業界で公知である (例えば、Harlow and Lane および米国特許第 5 9 9 4 6 1 9 号参照)。好ましい実施形態では IL-18 抗原は、免疫応答を刺激するためのアジュバントとともに投与される。このようなアジュバントには、完全または不完全フロイントアジュバント、RIBI (ムラミルジペプチド類) または ISCOM (免疫刺激複合体) などがある。このようなアジュバントは、局所への沈着で隔離することによりポリペプチドを急速な分散から保護することができ、または宿主を刺激して、マクロファージおよび免疫系の他の構成要素に関して走化性である因子を分泌させる物質を含むことができる。好ましくは、ポリペプチドを投与するのであれば、免疫化スケジュールでは、数週間の期間で分けて、ポリペプチドを 2 回以上投与することになる。

30

【0095】

実施例 2.2.A では、リン酸緩衝生理食塩水中でのヒト IL-18 によるゼノマウストランスジェニックマウスの免疫化プロトコールを提供する。

【0096】

40

B. 抗体の産生および抗体産生細胞系

IL-18 抗原で動物を免疫化した後、抗体および/または抗体産生細胞をその動物から得ることができる。動物の放血または屠殺によって、抗-IL-18 抗体含有血清を動物から得る。動物から血清を得たままその血清を用いることができ、免疫グロブリン画分を血清から得ることができるか、または抗-IL-18 抗体を血清から精製することができる。このようにして得られる血清または免疫グロブリンはポリクローナルであることから、異種性の一連の特性を有する。

【0097】

別の実施形態では、抗体産生性不死化ハイブリドーマを免疫動物から得ることができる。免疫化後、動物を屠殺し、当業界で公知の方法に従って、脾臓 B 細胞を不死化骨髓腫細胞系

50

胞に融合させる（例えば、上記の Harlow and Lane 参照）。好ましい実施形態では、骨髓腫細胞は免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない（非分泌細胞系）。融合および抗生物質選択後、IL-18もしくはその一部またはIL-18を発現する細胞を用いてハイブリドーマをスクリーニングする。好ましい実施形態では、酵素免疫測定法（ELISA）または放射免疫アッセイ（RIA）を用いて、好ましくはELISAを用いて、初期スクリーニングを行う。ELISAスクリーニングの例については、WO 00/37504（参照によって本明細書に組み込まれる。）に記載がある。

【0098】

下記でさらに説明する方法に従って、抗IL-18抗体産生ハイブリドーマを選択し、クローニングし、旺盛なハイブリドーマの成長、高抗体産生および所望の抗体特性などの望ましい特性に関してさらにスクリーニングする。ハイブリドーマは、同系動物でインビボで、免疫系がない動物（例：ヌードマウス）で、またはインビトロでの細胞培養で培養しおよび増殖させることができる。ハイブリドーマの選択、クローニングおよび増殖の方法については、当業者には公知である。

10

【0099】

好ましくは免疫化動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する非ヒト動物であり、脾臓B細胞を、その非ヒト動物と同じ動物種由来の骨髓腫に融合させる。より好ましくは、免疫化動物はゼノマウストラנסジェニックマウスであり、骨髓腫細胞系は非分泌性マウス骨髓腫であり、例えばその骨髓腫細胞系はP3X63Ag8.653である（例えば、実施例2.2.B参照）。

20

【0100】

1態様において本発明は、ヒト抗IL-18抗体を産生するハイブリドーマを提供する。好ましい実施形態ではこのハイブリドーマは、前述のマウスハイブリドーマである。別の好ましい実施形態ではこのハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマなどの非ヒト非マウス動物で産生される。別の実施形態においてこのハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髓腫を抗IL-18抗体を発現するヒト細胞と融合させたヒトハイブリドーマである。

【0101】

本発明の別の態様では組換え抗体は、米国特許第5627052号、PCT公開WO 92/02551およびバブコックらの報告（Babcock, J. S. et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848）に記載の特定リンパ球抗体法（SLAM）と当業界で称される手順を用いて、単一種の単離リンパ球から形成される。この方法においては、対象抗体を分泌する単一種細胞（例えばセクションI（A）に記載の免疫動物のいずれか由来のリンパ球）を、抗原特異的溶血ブランクアッセイを用いてスクリーニングする。このアッセイでは抗原IL-18またはその断片を、ビオチンなどのリンカーを用いてヒツジ赤血球に結合させ、これを用いてIL-18に対する特異性を有する抗体を分泌する単一種細胞を特定する。対象の抗体分泌細胞を特定した後、重鎖および軽鎖可変領域cDNAを逆転写酵素-PCRによって細胞からレスキューし、次にCOSまたはCHO細胞などの哺乳動物宿主細胞での適切な免疫グロブリン定常領域（例：ヒト定常領域）の背景で、これらの可変領域を発現させることができる。次に、インビボの特定リンパ球由来の増幅免疫グロブリン配列でトランスフェクションした宿主細胞について、例えばトランスフェクション細胞をパニングしてIL-18に対する抗体を発現する細胞を単離することで、さらなる分析およびインビトロでの選択を行うことができる。増幅免疫グロブリン配列についてはさらに、例えばPCT公開WO 97/29131およびPCT公開WO 00/56772に記載の方法などのインビトロ親和性成熟法によって、インビトロでの処理を行うことができる。

30

40

【0102】

さらに、抗体ライブラリをスクリーニングして、所望の結合特異性を有する抗体を特定するインビトロ法を用いて、本発明の抗体を形成することができる。組換え抗体ライブラリのそのようなスクリーニング方法は当業界で公知であり、例えばラドナーら（Ladn

50

er) の米国特許第 5 2 2 3 4 0 9 号 ; カン (K a n g) らの P C T 公開 W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; ダウアー (D o w e r) らの P C T 公開 W O 9 1 / 1 7 2 7 1 ; ウィンター (W i n t e r) らの P C T 公開 W O 9 2 / 2 0 7 9 1 ; マークランド (M a r k l a n d) らの P C T 公開 W O 9 2 / 1 5 6 7 9 ; ブライントリング (B r e i t l i n g) らの P C T 公開 W O 9 3 / 0 1 2 8 8 ; マカファーティ (M c C a f f e r t y) らの P C T 公開 W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; ギャラード (G a r r a r d) らの P C T 公開 W O 9 2 / 0 9 6 9 0 ; フックス (F u c h s) らの報告 (F u c k s e t a l . (1 9 9 1) B i o l T e c h n o l o g y 9 : 1 3 7 0 - 1 3 7 2) ; ヘイらの報告 (H a y e t a l . (1 9 9 2) H u m A n t i b o d H y b r i d o m a s 3 : 8 1 - 8 5) ; ヒューズらの報告 (H u s e e t a l . (1 9 8 9) S c i e n c e 2 4 6 : 1 2 7 5 - 1 2 8 1) ; マカファーティらの報告 (M c C a f f e r t y e t a l . , N a t u r e (1 9 9 0) 3 4 8 ; 5 5 2 - 5 5 4) ; グリフィスらの報告 (G r i f f i t h s e t a l . , (1 9 9 3) E M B O J . 1 2 : 7 2 5 - 7 3 4) ; ホーキンスらの報告 (H a w k i n s e t a l . , (1 9 9 2) J M o l B i o l 2 2 6 : 8 8 9 - 8 9 6) ; クラクソンらの報告 (C l a c k s o n e t a l . (1 9 9 1) N a t u r e 3 5 2 : 6 2 4 - 6 2 8) ; グラムらの報告 (G r a m e t a l . (1 9 9 2) P N A S 8 9 : 3 5 7 6 - 3 5 8 0) ; ギャラードらの報告 (G a r r a d e t a l . (1 9 9 1) B i o / T e c h n o l o g y 9 : 1 3 7 3 - 1 3 7 7) ; ホーゲンブームらの報告 (H o o g e n b o o m e t a l . (1 9 9 1) N u c A c i d R e s 1 9 : 4 1 3 3 - 4 1 3 7) ; およびバルバスらの報告 (B a r b a s e t a l . (1 9 9 1) P N A S 8 8 : 7 9 7 8 - 7 9 8 2) 、米国特許出願公開 2 0 0 3 0 1 8 6 3 7 4 および P C T 公開 W O 9 7 / 2 9 1 3 1 (これらの各引例の内容は、参照によって本明細書に組み込まれる) に記載の方法などがある。

【 0 1 0 3 】

組換え抗体ライブラリは、I L - 1 8 または I L - 1 8 の一部で免疫化した被験者からのものであることができる。または組換え抗体ライブラリは、無傷被験者、すなわちヒト I L - 1 8 で免疫化されたことがないヒト被験者からのヒト抗体ライブラリなどの I L - 1 8 で免疫化されたことがない被験者からのものであることができる。本発明の抗体は、ヒト I L - 1 8 を含むペプチド (例 : h I L - 1 8 の一部に相当するペプチド) で組換え抗体ライブラリをスクリーニングすることで I L - 1 8 を識別する抗体を選択することによって選択される。このようなスクリーニングおよび選択を行う方法は、前記の段落での引例に記載のものなど、当業界では公知である。特定の k_{off} 速度定数でヒト I L - 1 8 から解離するものなどの h I L - 1 8 に対して特定の結合アフィニティを有する本発明の抗体を選択するためには、当業界で公知の表面プラズモン共鳴方法を用いて、所望の k_{off} 速度定数を有する抗体を選択することができる。特定の IC_{50} を有するものなどの h I L - 1 8 についての特定の中和活性を有する本発明の抗体を選択するには、h I L - 1 8 活性阻害を評価する当業界で公知の標準的な方法を用いることができる。

【 0 1 0 4 】

1 態様において本発明は、ヒト I L - 1 8 に結合する単離抗体またはその抗原結合部分に関するものである。好ましくはこの抗体は、中和抗体である。好ましくはこの抗体は、ヒト抗体である。各種実施形態において、前記抗体は組換え抗体またはモノクローナル抗体である。最も好ましい本発明の中和抗体は、本明細書において 2 . 5 (E) と称し、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V_L および配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V_H を有する。最も好ましくは、前記 2 . 5 (E) 抗体は、 5×10^{-10} M 未満の K_d でヒト I L - 1 8 に結合する (実施例 2 . 2 . F 参照) 。

【 0 1 0 5 】

好ましくは、前記 2 . 5 (E) 抗体および関連する抗体などの本発明の抗 - I L - 1 8 抗体は、例えば当業界で公知のいくつかのインビトロおよびインビボアッセイのいずれかによって評価される I L - 1 8 活性を低下または中和する能力を示す (例えば、実施例 3

・ 2・ F 参照)。例えばこれらの抗体は、少なくとも約 10^{-8} M、約 10^{-9} M または約 10^{-10} M の範囲の IC_{50} 値で、KG-1 細胞でのヒトインターフェロン γ の IL-18 誘発産生を中和する。さらにこれらの抗体は、また少なくとも約 10^{-8} M、約 10^{-9} M または約 10^{-10} M の範囲の IC_{50} 値で、全血球でのヒトインターフェロン γ の IL-18 誘発産生を中和する。

【0106】

特に好ましい実施形態では、前記抗-IL-18 抗体 2・5 (E) は、プロ-IL-18、成熟 IL-18 および切断形 IL-18 などの各種形態でヒト IL-18 に結合する。抗体 2・5 (E) は、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 (リンホトキシン)、LT α 1 β 2 および LT α 2 β 1 などの他のサイトカインには特異的に結合しない。しかしながら抗体 2・5 (E) は、他の動物からの IL-18 に対して交差反応性を示す。例えばこの抗体は、カニクイザルからの IL-18 の活性を中和する (カニクイザル IL-18 についての $IC_{50} = 9.1 E \times 10^{-11}$; 実施例 2・2・J1 参照)。

【0107】

1 態様において本発明は、低い解離速度および高い中和能を有する IL-18 に対する高親和性結合などの、2・5 (E) と同等の特性を有する 2・5 (E) 抗体および機能性抗体部分、2・5 (E) 関連抗体および機能性抗体部分ならびに他のヒト抗体および機能性抗体部分に関する。好ましい実施形態では、単離抗体またはその抗原結合部分がヒト IL-18 に結合し、この場合に抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴による測定で約 $0.1 s^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数でヒト IL-18 から解離し、または約 1×10^{-6} M 以下の IC_{50} でヒト IL-18 活性を阻害する。あるいは、前記抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴による測定で約 $110^{-2} s^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数でヒト IL-18 から解離することができ、または約 1×10^{-7} M 以下の IC_{50} でヒト IL-18 活性を阻害することができる。あるいは、前記抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴による測定で約 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数でヒト IL-18 から解離することができ、または約 1×10^{-7} M 以下の IC_{50} でヒト IL-18 活性を阻害することができる。あるいは、前記抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴による測定で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数でヒト IL-18 から解離することができ、または約 1×10^{-9} M 以下の IC_{50} でヒト IL-18 活性を阻害することができる。あるいは、前記抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴による測定で約 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数でヒト IL-18 から解離することができ、または約 1×10^{-10} M 以下の IC_{50} でヒト IL-18 活性を阻害することができる。あるいは、前記抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴による測定で約 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数でヒト IL-18 から解離することができ、または約 1×10^{-11} M 以下の IC_{50} でヒト IL-18 活性を阻害することができる。

【0108】

さらに別の実施形態において本発明は、配列番号 7 ; 配列番号 9 ; 配列番号 11 ; 配列番号 13 ; 配列番号 15 ; 配列番号 17 ; 配列番号 19 ; 配列番号 21 ; 配列番号 23 ; 配列番号 25 ; 配列番号 27 ; 配列番号 29 ; 配列番号 31 ; 配列番号 33 ; 配列番号 35 ; 配列番号 37 ; 配列番号 39 ; または配列番号 41 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V_L) および配列番号 6 ; 配列番号 8 ; 配列番号 10 ; 配列番号 12 ; 配列番号 14 ; 配列番号 16 ; 配列番号 18 ; 配列番号 20 ; 配列番号 22 ; 配列番号 24 ; 配列番号 26 ; 配列番号 28 ; 配列番号 30 ; 配列番号 32 ; 配列番号 34 ; 配列番号 36 ; 配列番号 38 ; または配列番号 40 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V_H) を持つ単離ヒト抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0109】

ある種の実施形態では前記抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA

、I g E、I g MまたはI g D定常領域などの重鎖定常領域を有する。好ましくは前記重鎖定常領域は、I g G 1重鎖定常領域またはI g G 4重鎖定常領域である。さらに前記抗体は、カッパ軽鎖定常領域またはラムダ軽鎖定常領域のいずれかである軽鎖定常領域を有することができる。好ましくは前記抗体は、カッパ軽鎖定常領域を有する。あるいは前記抗体部分は、例えばF a b断片または一本鎖F v断片であることができる。

【0110】

F c部分におけるアミノ酸残基を置き換えて抗体エフェクター機能を変える技術は、当業界で公知である（ウィンター（W i n t e r）らの米国特許第5648260号；5624821号）。抗体のF c部分は、サイトカイン誘発、A D C C、食作用、補体依存性細胞傷害（C D C）ならびに抗体および抗原 - 抗体複合体の半減期 / クリアランス速度などのいくつかの重要なエフェクター機能に介在する。場合によっては、これらのエフェクター機能は治療抗体には望ましいものであるが、治療目的によって、他の場合には不必要であったり、有害である場合もあろう。ある種のヒトI g Gアイソタイプ、特にI g G 1およびI g G 3は、それぞれF c y R類および補体C 1 qへの結合を介してA D C CおよびC D Cに介在する。新生児F c受容体（F c R n）は、抗体の循環半減期を決定する必須の成分である。さらに別の実施形態では、少なくとも一つのアミノ酸残基が、抗体の定常領域、例えば抗体のF c領域で置き換わっていることで、抗体のエフェクター機能が変化する。

【0111】

1実施形態は、本発明の抗体または抗体部分が誘導体化されているまたは別の機能性分子（例：別のペプチドまたはタンパク質）に連結されている標識結合タンパク質を提供する。例えば、本発明の標識結合タンパク質は、別の抗体（例：二重特異性抗体またはジアポディー）、検出可能な薬剤、細胞傷害薬、医薬および / または抗体または抗体部分の別の分子（ストレプトアビジン核領域またはポリヒスチジンタグなど）との会合に介在し得るタンパク質またはペプチドなどの1以上の他の分子種に本発明の抗体または抗体部分を機能的に連結させることで（化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合的会合その他によって）、誘導することができる。

【0112】

本発明の抗体または抗体部分を誘導体化することができる有用な検出可能な薬剤には、蛍光化合物などがある。蛍光性の検出可能な薬剤の例には、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、5 - ジメチルアミン - 1 - ナフタレンスルホニルクロライド、フィコエリトリンなどがある。抗体は、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な構成で誘導体化することもできる。抗体を検出可能な酵素で誘導体化する場合、この抗体は、その酵素が検出可能な反応産物を生成するのに使用する別の試薬を加えて、検出する。例えば、検出可能な薬剤である西洋わさびペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンを加えることで、検出可能な着色反応生成物が生じる。抗体はまた、ビオチンで誘導体化し、アビジンまたはストレプトアビジン結合を間接的に測定することで検出することもできる。

【0113】

本発明の別の実施形態は、結晶化結合タンパク質を提供する。好ましくは本発明は、本明細書に開示の全抗 - I L - 18抗体およびその断片の結晶ならびにこのような結晶を含む製剤および組成物に関する。1実施形態において前記結晶化結合タンパク質は、結合タンパク質の可溶性のものよりインビボでの半減期が長い。別の実施形態では、前記結合タンパク質は結晶化後に生理活性を保持する。

【0114】

本発明の結晶化結合タンパク質は、当業界で公知であって、W O 0 2 0 7 2 6 3 6（参照によって本明細書に組み込まれる）に開示の方法に従って製造することができる（実施例2.2.Mも参照）。

【0115】

本発明の別の実施形態は、前記抗体またはその抗原結合部分が１以上の炭水化物残基を有するグリコシル化結合タンパク質を提供する。新生インビボタンパク質産生は、翻訳後修飾と称されるさらなる処理が行われ得る。特に、糖（グリコール）残基を、グリコシル化と称されるプロセスで酵素的に付加させることができる。得られた共有結合連結されたオリゴ糖側鎖を有するタンパク質は、グリコシル化タンパク質または糖タンパク質と称される。タンパク質グリコシル化は、対象タンパク質のアミノ酸配列、ならびにそのタンパク質が発現される宿主細胞によって決まる。異なる生物は、異なるグリコシル化酵素（例：糖転移酵素類およびグリコシダーゼ類）を産生し、利用可能な基質（ヌクレオチド糖類）が異なる場合がある。このような要素のため、タンパク質グリコシル化パターンおよびグリコシル残基の組成は、特定のタンパク質が発現される宿主系に応じて異なり得る。本発明で有用なグリコシル残基には、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、*n*-アセチルグルコサミンおよびシアル酸などがあり得るが、これらに限定されるものではない。好ましくはグリコシル化結合タンパク質は、グリコシル残基を有することで、グリコシル化パターンがヒトのものである。

【０１１６】

タンパク質グリコシル化が変わると、タンパク質特性が変わり得ることは、当業者には公知である。例えば、酵母などの微生物宿主で産生され、酵母内在経路を利用してグリコシル化される治療タンパク質の効力を、CHO細胞系などの哺乳動物細胞で発現される同じタンパク質の場合と比較して低下させることができる。そのような糖タンパク質も、ヒトにおいて免疫原性であり、投与後にインビボで短い半減期を示し得る。ヒトおよび他の動物での特異的受容体は、特異的なグリコシル残基を識別し、血流からのそのタンパク質の迅速なクリアランスを促進することができる。他の有害効果には、タンパク質折り畳み、溶解性、プロテアーゼに対する感受性、輸送、運搬、区画化、分泌、他のタンパク質または因子による認識、抗原性またはアレルゲン性における変化などがあり得る。従って担当者は、グリコシル化の特異的組成およびパターン、例えばヒト細胞または所期の被験者動物の種特異的細胞で産生されるものと同じまたは少なくとも類似したグリコシル化組成およびパターンを有する治療タンパク質を好み得る。

【０１１７】

宿主細胞のものと異なるグリコシル化タンパク質の発現は、宿主細胞を遺伝子組換えすることで異種グリコシル化酵素を発現させることによって行うことができる。担当者は、当業界で公知の技術を用いて、ヒトタンパク質グリコシル化を示す抗体またはその抗原結合部分を形成することができる。例えば、酵母株を遺伝子組換えして非天然グリコシル化酵素を発現させることで、これらの酵母株で産生されるグリコシル化タンパク質（糖タンパク質）は、動物細胞、特にヒト細胞の場合と同等のタンパク質グリコシル化を示している（米国特許出願 20040018590 および 20020137134）。

【０１１８】

さらに、各種グリコシル化酵素を発現するよう遺伝子操作された宿主細胞のライブラリを用いて対象のタンパク質を発現させて、このライブラリの構成員の宿主細胞が変異体グリコシル化パターンを有する対象タンパク質を産生ようにすることが可能であることが、当業者には明らかであろう。次に担当者は、特定の新規なグリコシル化パターンを有する対象タンパク質を選択および単離することができる。好ましくは、特に選択された新規なグリコシル化パターンを有するタンパク質は、改善または変化した生理的特性を示す。

【０１１９】

C. 組換え IL-18 抗体の製造

本発明の抗体は、当業界で公知の多くの技術によって製造することができる。例えば、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを標準的な技術によって宿主細胞にトランスフェクションする、宿主細胞からの発現などがある。「トランスフェクション」という用語の各種形態は、例えば電気穿孔法、カルシウム-リン酸沈澱、DEAE-デキストラントランスフェクションなどの原核または真核宿主細胞への外来DNAの導入に一般に用いら

10

20

30

40

50

れる非常に多様な技術を含むものである。原核または真核宿主細胞で本発明の抗体を発現させることが可能であるが、真核細胞での抗体の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞での発現が最も好ましい。何故ならば、そのような真核細胞（特に哺乳動物細胞）は、原核細胞よりも、適切に折り畳まれた免疫的に活性な抗体を構築および分泌しやすいためである。

【0120】

本発明の組換え抗体の発現に好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（例えばカウフマンらの報告（R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601 - 621）に記載のDHFR selectable markerとともに用いられるウルラウブらの報告（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 - 4220）に記載のdhfr-CHO細胞など）、NSO骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞などがある。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、その抗体は、宿主細胞での抗体の発現、あるいはより好ましくは宿主細胞が増殖する培地への抗体の分泌を可能とするだけの期間にわたって宿主細胞を培養することで産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収することができる。

10

【0121】

宿主細胞を用いて、Fab断片またはscFv分子などの機能性抗体断片を産生することもできる。上記手順の変法が本発明の範囲に含まれることは明らかであろう。例えば、本発明の抗体の軽鎖および/または重鎖の機能性断片をコードするDNAで宿主細胞をトランスフェクションすることが望ましい場合がある。組換えDNA技術を用いて、対象の抗原に結合する上で必要ない軽鎖および重鎖のいずれかまたはその両方をコードするDNAの一部または全てを除去することもできる。このような切断形DNA分子から発現される分子も、本発明の抗体に包含される。さらに、標準的な化学的架橋方法によって第2の抗体に本発明の抗体を架橋させることで、一方の重鎖および一方の軽鎖が本発明の抗体であり、他方の重鎖および軽鎖が対象の抗原以外の抗原に対して特異的である二機能性抗体を製造することが可能である。

20

【0122】

本発明の抗体またはその抗原結合部分の組換え発現に好ましい系においては、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、リン酸カルシウム介在トランスフェクションによってdhfr-CHO細胞に導入する。この組換え発現ベクター内では、抗体重鎖および軽鎖遺伝子がそれぞれ、CMVエンハンサー/AdMLPプロモーター調節要素に機能可能に連結されていることで、これら遺伝子の高レベルの転写を推進する。この組換え発現ベクターは、メトトレキセート選択/増幅を用いてベクターでトランスフェクションされたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子も有する。選択された形質転換体宿主細胞を培養して、抗体の重鎖および軽鎖の発現を可能とし、無傷の抗体を培地から回収する。標準的な分子生物学技術を用いて、組換え発現ベクターを得て、宿主細胞をトランスフェクションし、形質転換体についての選択を行い、宿主細胞を培養し、培地から抗体を回収する。さらに本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで好適な培地で本発明の宿主細胞を培養することで、本発明の組換え抗体を合成する方法を提供する。この方法はさらに、培地から組換え抗体を単離する段階を有することができる。

30

40

【0123】

表1は、本発明の好ましい抗hIL-18抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列のリストである。V_H領域では、アミノ末端（N末端）の1位における天然アミノ酸が、グルタミン酸（E）またはグルタミン（Q）のいずれかである。しかしながら、V_H領域を有するタンパク質の大量製造時に均一なN末端を有する組換えタンパク質を形成するには、N末端の1位にはグルタミン酸（E）が好ましい。

【0124】

【表 1】

表1 VHおよびVL領域のアミノ酸配列のリスト

タンパク質 タンパク質領域	配列識別名	配列 12345678901234567890
VH 2.5(E)	配列番号 :6	<u>E</u> VQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFIYPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYYCARVG SGWYPYTFDIWGQGTMTVVS S
VH 2.5 CDR-H1	配列番号6の残基31～35	SYWIG
VH 2.5 CDR-H2	配列番号6の残基50～66	FIYPGDSETRYSPTFQG
VH 2.5 CDR-H3	配列番号6の残基99～110	VGSGWYPYTFDI
VL 2.5(E)	配列番号 :7	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFITYASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKR

10

20

タンパク質 タンパク質領域	配列識別名	配列 12345678901234567890
VL 2.5 CDR-L1	配列番号7の残基24～34	RASESISSNLA
VL 2.5 CDR-L2	配列番号7の残基50～56	TASTRAT
VL 2.5 CDR-L3	配列番号7の残基89～98	QQYNNWPSIT
VH 2.13	配列番号 :8	QVQLQESGPGLVTPSQTLSL TCTVSGGSISSGGHYWTWIR QHPGKGLEWIGYIYYSGSTY YNPSLKSRLTISVDTSKNQF SLKLSSVAAADTAVYYCARD RGGSGSYWDYWGQGLTVTS S
VH 2.13 CDR-H1	配列番号8の残基31～37	SGGHYWT
VH 2.13 CDR-H2	配列番号8の残基52～67	YIYYSGSTYYNPSLKS
VH 2.13 CDR-H3	配列番号8の残基100～110	DRGGSGSYWDY
VL 2.13	配列番号 :9	EIVLTQSPGTLSPGERAT LSCRGSRSVSSGYLAWYQQK PGQAPRLLIYGV SIRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYHGSPLTFG GGTKVEIKR
VL 2.13 CDR-L1	配列番号9の残基24～35	RGSRSVSSGYLA
VL 2.13 CDR-L2	配列番号9の残基21～27	GV SIRAT
VL 2.13 CDR-L3	配列番号9の残基90～98	QQYHGSPLT
VH 2.3	配列番号 :10	QVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGGSIRNYWWSWIRQP PGKGLEWVGYYSSGSTNYN PSLKS RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARDRG GASFFDYWGQGLTVTVSS
VH 2.3 CDR-H1	配列番号10の残基31～35	NY YWS
VH 2.3 CDR-H2	配列番号10の残基50～65	YIYSSGSTNYNPSLKS
VH 2.3 CDR-H3	配列番号10の残基98～107	DRGGASFFDY
VL 2.3	配列番号 :11	DIQMTQSPSSLSASIGDRV ITCRASQIIGGYLNWYQQR GKAPKFLIYSTSILQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQF EDFATYYCQQT YITPPTFGP GTKVDIKR
VL 2.3 CDR-L1	配列番号11の残基24～34	RASQIIGGYLN
VL 2.3 CDR-L2	配列番号11の残基50～56	STSILQS
VL 2.3 CDR-L3	配列番号11の残基89～97	QQT YITPPT
VH 215	配列番号 :12	QVQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGGSINSGDYWSWIR QHPGKGLEWIGHISYRGTTY YNPSLKS RVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYCCARD RGGGFFDLWGRGTLTVTVSS
VH 215 CDR-H1	配列番号12の残基31～37	SGDY YWS
VH 215 CDR-H2	配列番号12の残基52～67	HISYRGTTYYNPSLKS
VH 215 CDR-H3	配列番号12の残基100～108	DRGGGFFDL

10

20

30

40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別名	12345678901234567890
VL 215	配列番号 :13	EIVLTQSPGTL SL SPGERAT LSCRASRSLSSGYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASIRATGIP DRFSGSGSATDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYNYSPLTFG GGTRVEINR
VL 215 CDR-L1	配列番号13の残基24～35	RASRSLSSGYLA
VL 215 CDR-L2	配列番号13の残基51～57	GASIRAT
VL 215 CDR-L3	配列番号13の残基90～98	QQYNYSPLT
VH 231	配列番号 :14	EV QLVESGGG SV QPRGSLRL SCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVS YF SSSGGIYY ADSVKGRFTISRDN AK NSLY LQMNSLRDEDTAVYYCARD SSGYYPYFFDYWGQGT LV TV SS
VH 231 CDR-H1	配列番号14の残基31～35	SYSMN
VH 231 CDR-H2	配列番号14の残基50～66	YFSSSGGIYYADSVKG
VH 231 CDR-H3	配列番号14の残基99～111	DDSSGYYPYFFDY
VL 231	配列番号 :15	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQTVLYRSNNKNYLA WYQQKSGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQYYST PLTFGGGTKVEIKR
VL 231 CDR-L1	配列番号15の残基24～40	KSSQTVLYRSNNKNYLA
VL 231 CDR-L2	配列番号15の残基56～62	WASTRES
VL 231 CDR-L3	配列番号15の残基95～103	QYYSTPLT
VH 251	配列番号 :16	QL LQESGPGLVK P SETLSL TCTVSGGSISSRVYYWG W IR QPPGKGLEWIGSIYYSGSTY YNPSL K SRVTISVDASKNQF SLKLSSVTAADTAIYYCARE DSSAWVFEHWGQGT LV TVSS
VH 251 CDR-H1	配列番号16の残基31～37	SRVYYWG
VH 251 CDR-H2	配列番号16の残基52～67	SIYYSGSTYYNPSLKS
VH 251 CDR-H3	配列番号16の残基100～109	EDSSAWVFEH
VL 251	配列番号 :17	EIVLTQSPDTLSLSPGERAT LSCRASHILSRNYLAWYQQK PGQAPRLLMYGISIRATGIP DRFSGSGSGADFTLTINRLE PEDFAVYYCQHYDNSLCSFG QG T KLEV K R
VL 251 CDR-L1	配列番号17の残基24～35	RASHILSRNYLA
VL 251 CDR-L2	配列番号17の残基51～57	GISIRAT
VL 251 CDR-L3	配列番号17の残基90～98	QHYDNSLCS

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別名	配列 12345678901234567890
VH 268	配列番号 :18	<u>Q</u> VQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFRNYGLHWVRQA PGKGLEWVAVIWDGSKNYYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARES YYYYGMDVWGQGTTVTVSS
VH 268 CDR-H1	配列番号18の残基31～35	NYGLH
VH 268 CDR-H2	配列番号18の残基20～36	VIWYDGSNKYYADSVKG
VH 268 CDR-H3	配列番号18の残基99～108	ESYYYYGMDV
VL 268	配列番号 :19	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASQSFNSNLVWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNTWTFGQ GTKVEIKR
VL 268 CDR-L1	配列番号19の残基24～34	RASQSFNSNLV
VL 268 CDR-L2	配列番号19の残基50～56	GASTRAT
VL 268 CDR-L3	配列番号19の残基89～97	QQYNNTWT
VH 336	配列番号 :20	<u>Q</u> VQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGGSINSGDYYSWIR QHPGKGLEWIGHISYRGTTY YNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYCCARD RGGGFFDLWGRGTLVTVSS
VH 336 CDR-H1	配列番号20の残基31～35	SGDYYS
VH 336 CDR-H2	配列番号20の残基52～67	HISYRGTTYYNPSLKS
VH 336 CDR-H3	配列番号20の残基100～108	DRGGGFFDL
VL 336	配列番号 :21	EIVLTQSPGTLSLSPGERAT LSCRASQSVSSGYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASIRATGIP DRFSGSGSATDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYSPLTFG GGTRVEINR
VL 336 CDR-L1	配列番号21の残基24～35	RASQSVSSGYLA
VL 336 CDR-L2	配列番号21の残基51～57	GASIRAT
VL 336 CDR-L3	配列番号21の残基90～98	QQYGYSPLT
VH 351	配列番号 :22	<u>Q</u> VQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSHYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDGRNKYY VDSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVFYCAREK GGSGWPPFYYYYGMDVWGQG TTVTVSS
VH 351 CDR-H1	配列番号22の残基31～35	HYGMH
VH 351 CDR-H2	配列番号22の残基50～66	VISYDGRNKYYVDSVKG
VH 351 CDR-H3	配列番号22の残基99～116	EKGSGWPPFYYYYGMDV

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別名	配列 12345678901234567890
VL 351	配列番号 :23	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQNLLYSDGETYLCW YLQKPGQPPQLLIYEVSNR SGVPERFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIIYCMQNVQLP LTFGGGTRVEIKR
VL 351 CDR-L1	配列番号23の残基24～39	KSSQNLLYSDGETYLC
VL 351 CDR-L2	配列番号23の残基55～61	EVSNRFS
VL 351 CDR-L3	配列番号23の残基94～102	MQNVQLPLT
VH 413	配列番号 :24	QTQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSRVYWGWR QPPGKGLEWIGSIYYSGSTY YSPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAIYYCARE DSSAWVFEHWGQGTTLTVSS
VH 413 CDR-H1	配列番号24の残基31～37	SRVYYWG
VH 413 CDR-H2	配列番号24の残基52～67	SIYYSGSTYYSPSLKS
VH 413 CDR-H3	配列番号24の残基100～109	EDSSAWVFEH
VL 413	配列番号 :25	EIVLTQSPDTLSLSPGERAT LSCRASQILSRNYLAWYQQK PGQAPRLLIYGISIRATGIP DRFSGSGSGADFTLTINRLE PEDFAVYYCQHYDNSLCSFG QGTKLEVKR
VL 413 CDR-L1	配列番号25の残基24～35	RASQILSRNYLA
VL 413 CDR-L2	配列番号25の残基51～57	GISIRAT
VL 413 CDR-L3	配列番号25の残基90～98	QHYDNSLCS
VH 435	配列番号 :26	QLQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSIDSRIYYWGWR QPPGKGLEWIGSIYYRGSTY YNPSLKSRVTISVDTPKNQF SLKLNSVTAADTAVYYCARE DSSAWVFDYWGQGTTLATVSS
VH 435 CDR-H1	配列番号26の残基31～37	SRIYYWG
VH 435 CDR-H2	配列番号26の残基52～67	SIYYRGSTYYNPSLKS
VH 435 CDR-H3	配列番号26の残基100～109	EDSSAWVFDY
VL 435	配列番号 :27	EIVLTQSPGFTLSLSPGERAT LSCRASQSVRNYYLNWYQQK PGQAPRLLIYGAFSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFVYYCQYGNIDSIFG QGTKLEINR
VL 435 CDR-L1	配列番号27の残基24～35	RASQSVRNYYLN
VL 435 CDR-L2	配列番号27の残基51～57	GAFSRAT
VL 435 CDR-L3	配列番号27の残基90～98	QYGNIDS

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別名	配列 12345678901234567890
VH 444	配列番号 :28	<u>Q</u> VQLQESGPGGLVKPSQTL S L TCTVSGGSINSGDYYSYIR QHPGKGLEWIGHISYRGTTY YNPSLKS R VTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYCCARD RGGGFFDLWGRGTLVTVSS
VH 444 CDR-H1	配列番号28の残基31～37	SGDYYS
VH 444 CDR-H2	配列番号28の残基52～67	HISYRGTTYYNPSLKS
VH 444 CDR-H3	配列番号28の残基100～108	DRGGGFFDL
VL 444	配列番号 :29	EIVLTQSPGTL S LSPGERAT LSCRASQSVSSGYLAWYQRK PGQAPRLLIYGT S IRATGIP DRFSGSGSATDFTLSISRLG PEDFAVYYCQQYGYSP L TFG GGTRVEINR
VL 444 CDR-L1	配列番号29の残基24～35	RASQSVSSGYLA
VL 444 CDR-L2	配列番号29の残基51～57	GTSIRAT
VL 444 CDR-L3	配列番号29の残基90～98	QQYGYSP L T
VH 478	配列番号 :30	<u>Q</u> VQLQESGPGGLVKPSQTL S L TCTVSGGSISSGGHYWSWIR QHPGKGLEWIGIYYSGSTH YNPSLKS R VTISVDTSKNQF SLKLRSVSAADTAGYYCASL YNGNGYFDLWGRGTLVTVSS
VH 478 CDR-H1	配列番号30の残基31～37	SGGHYWS
VH 478 CDR-H2	配列番号30の残基52～67	YIYYSGSTHYNPSLKS
VH 478 CDR-H3	配列番号30の残基99～109	SLYNGNGYFDL
VL 478	配列番号 :31	EIVLTQSPGTL S LSPGERAT LSCRASQSISSGYLAWYQQK PGQAPRLIIYGVSR R ATGIP DRFSGSGSGADFTLTISRLD PEDFVVYYCQQYGFSP L TFG GGTKVEIKR
VL 478 CDR-L1	配列番号31の残基24～35	RASQSISSGYLA
VL 478 CDR-L2	配列番号31の残基51～57	GVSRRAT
VL 478 CDR-L3	配列番号31の残基90～98	QQYGFSP L T
VH 521	配列番号 :32	<u>Q</u> LQLQESGPGGLVKPSETL S L TCTVSGGSISR S YDYGWIR QPPGKGLEWIGSIYYRGSTY YNPSLKS R VTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARE YSTTWSIDYWGQGT L VTVSS
VH 521 CDR-H1	配列番号32の残基31～37	RSYDYG
VH 521 CDR-H2	配列番号32の残基52～67	SIYYRGSTYYNPSLKS
VH 521 CDR-H3	配列番号32の残基100～109	EYSTTWSIDY

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別名	配列 12345678901234567890
VL 521	配列番号 :33	ENVLTQSPGTL S SLSPGERAT LSCRASQSIRNNYLAWYQQK PGQAPRLLIHGASSRATGIP DRFGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYGNSIITFG PGTKVDVNR
VL 521 CDR-L1	配列番号33の残基24~35	RASQSIRNNYLA
VL 521 CDR-L2	配列番号33の残基51~57	GASSRAT
VL 521 CDR-L3	配列番号33の残基90~98	QQYGNSIIT
VH 550	配列番号 :34	<u>Q</u> VQLQESGPGLVKPSQTL S TCTVSGGSINSGGYWSWIR QHPGKGLEWIGHISYRGTTY SNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARD RGGGFFDLWGRGTLTVSS
VH 550 CDR-H1	配列番号34の残基31~37	SGGYWS
VH 550 CDR-H2	配列番号34の残基52~67	HISYRGTTYSNP S LKS
VH 550 CDR-H3	配列番号34の残基100~108	DRGGGFFDL
VL 550	配列番号 :35	EIVLTQSPGTL S SLSPGERAT LSCRASQSVNSGYLAWYQQK PGQAPRLLIYGV S IRATDIP DRFSGSGSATDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGF S PLTFG GGTRVEINR
VL 550 CDR-L1	配列番号35の残基24~35	RASQSVNSGYLA
VL 550 CDR-L2	配列番号35の残基51~57	GV S IRAT
VL 550 CDR-L3	配列番号35の残基90~98	QQYGF S PLT
VH 581	配列番号 :36	<u>Q</u> VQLVESGGGVVQPG R SLRL SCAASGFTFSHCGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN S KNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDH GGSGSPPFYYYYGMDVWGQG T T TVTVSS
VH 581 CDR-H1	配列番号36の残基31~35	HCGMH
VH 581 CDR-H2	配列番号36の残基50~66	VISYDGSNKYYADSVKG
VH 581 CDR-H3	配列番号36の残基99~116	DHGGSGSPPFYYYYGMDV
VL 581	配列番号 :37	DILMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQSLHGDGKTYLYW YLQKPGQPPQFLIQELSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRXEAEDVG V YYCMQSLQLP LTFGGGTKVQIKR
VL 581 CDR-L1	配列番号37の残基24~39	KSSQSLHGDGKTYLY
VL 581 CDR-L2	配列番号37の残基55~61	ELSNRFS
VL 581 CDR-L3	配列番号37の残基94~102	MQSLQLPLT

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別名	配列 12345678901234567890
VH 7.5	配列番号 :38	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSYYGMHWVRQA PGKGLEWVAWIYDGRNKYY ADSVKGRVTISRDNKKTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAREG GYYYGMDVWGQGTFTVTVSS
VH 7.5 CDR-H1	配列番号38の残基31～35	YYGMH
VH 7.5 CDR-H2	配列番号38の残基50～66	VIWYDGRNKYYADSVKG
VH 7.5 CDR-H3	配列番号38の残基99～108	EGGYYYGMDV
VL 7.5	配列番号 :39	EILLTQSPGTLSSLSPGERAT LSCRASQNVSSSYLAWYQQN PGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFEVYYCQQSGSSLFTFG PGTKVDIKR
VL 7.5 CDR-L1	配列番号39の残基24～35	RASQNVSSSYLA
VL 7.5 CDR-L2	配列番号39の残基51～57	GASSRAT
VL 7.5 CDR-L3	配列番号39の残基90～98	QQSGSSLFT
VH 2.11	配列番号 :40	QVQLQESGPGLVKPSQTLSL TCTVSGGSIRSGDHYWTWIR QHPGKGLEWIGHIYYSGSTY YNPSLKSRLTISIDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARD YGGNGYFDYWGQGTLLTVSS
VH 2.11 CDR-H1	配列番号40の残基31～37	SGDHYWT
VH 2.11 CDR-H2	配列番号40の残基52～67	HIYYSGSTYYNPSLKS
VH 2.11 CDR-H3	配列番号40の残基97～109	CARDYGGNGYFDY
VL 2.11	配列番号 :41	DIVMTQTPLSLPVTPGEPAS ISCRSSQSLDSDDGNTYLD WYLQKPGQSPQLLIYTLSTYR ASGVPRDRFSGSGSGTDFTLN ISRVEAEDVGVYYCMQRIEF PITFGQGTTRLEIKR
VL 2.11 CDR-L1	配列番号41の残基24～40	RSSQSLDSDDGNTYLD
VL 2.11 CDR-L2	配列番号41の残基56～62	TLSTYRAS
VL 2.11 CDR-L3	配列番号41の残基95～103	MQRIEFPIT

10

20

30

【 0 1 2 5 】

前記の単離抗 I L - 1 8 抗体 C D R 配列は、本発明に従って単離され、下記の表 2 に挙げた C D R 配列を含むポリペプチドを有する I L - 1 8 結合タンパク質の新規なファミリーを確立するものである。好ましい I L - 1 8 結合および / または中和活性を有する本発明の C D R を形成および選択するため、本明細書に具体的に記載のものなど（これらに限定されるものではない）の本発明の結合タンパク質の形成およびこれら結合タンパク質の I L - 1 8 結合および / または中和特性の評価に関して当業界で公知の標準的な方法を用いることができる。

40

【 0 1 2 6 】

【表 2】

表2:コンセンサIL-18CDR7フィニティリガント(代替の残基を、各アミノ酸位置で下記に挙げてある。-は、残基が非存在であっても良いことを示す)

CDR領域	配列識別名	コンセンサ配列
CDR-H1	配列番号42	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ S Y W I G - - N G G H Y W T H R Y W S S R S D Y N G Y C S M H V L I D
CDR-H2	配列番号43	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 F I Y P G D S E T R Y S P T F Q - Y F S Y S G T T Y Y N P S L K S G H W S R G I N S S A D S V K S D R N I V V K H
CDR-H3	配列番号44	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 V G S G W Y P Y T - - - - - D R G S S G S F W F D I Y Y G M D V E D Y Y A S F D D D Y D S S R N G F Y P L Y F Y C K T Y W V M Y H L L D T N G I E V Y W N P Y A V F G
CDR-L1	配列番号45	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 R A S E S I S S N L A - - - - K G R I V G G G Y L A K N Y L A S Q T L L Y Y S N N T Y L C D H N F N R R D V E N T Y R N S G K H D G D
CDR-L2	配列番号46	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ T A S T R A T G V F I L Q S S T N E W I S F E L R Y
CDR-L3	配列番号47	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ Q Q Y N N W P S - - M H N H G S L L I T Y G Y I T T P T S D Y L D C S R G S I I W V Q F I L F F I E

10

20

30

40

【0127】

D. 抗IL-18抗体の使用

ヒトIL-18に結合する能力を考慮すると、本発明の抗ヒトIL-18抗体またはその部分を用い、酵素免疫測定法(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)または組織

50

免疫組織化学分析などの従来の免役アッセイによってヒトIL-18（例えば、血清また血漿などの生体検体中）を検出することができる。本発明は、生体検体中のヒトIL-18を検出する方法であって、生体検体を本発明の抗体または抗体部分に接触させること、およびヒトIL-18に結合された抗体（または抗体部分）または結合されていない抗体（または抗体部分）を検出することを含む方法を提供し、これによって、生体検体中のヒトIL-18が検出される。抗体は、結合されまたは結合されていない抗体の検出を容易にするために、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な、検出可能な物質には、各種酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光材料および放射性物質などがある。適切な酵素の例には、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼなどがあり；適切な補欠分子団複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどがあり；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドまたはフェイコエリトリンなどがあり；発光材料の例にはルミノールなどがあり；適切な放射性物質の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm などがある。

10

20

30

40

50

【0128】

抗体を標識する代わりに、検出可能な物質で標識rhIL-18標準および未標識抗ヒトIL-18抗体を利用する競合免疫アッセイによって、生体液中でヒトIL-18のアッセイを行うことができる。このアッセイでは、生体検体、標識rhIL-18標準および抗ヒトIL-18抗体を組み合わせ、未標識抗体に結合された標識rhIL-18標準の量を求める。生体検体中のヒトIL-18の量は、抗IL-18抗体に結合された標識rhIL-18の量に反比例する。

【0129】

本発明の抗体および抗体部分は、インビトロとインビボの両方で、ヒトIL-18活性を中和することができることが好ましい。従って、本発明の抗体および抗体部分を使用してhIL-18活性を阻害することができ、これは例えば、hIL-18を含有する細胞培養物において、また、ヒト被験者あるいはその他哺乳動物被験者であってIL-18を有するものにおいて行われ、そこで本発明の抗体との交差反応が行われる。1実施形態では、本発明は、IL-18活性を阻害する方法であって、IL-18活性が阻害されるように本発明の抗体または抗体部分とIL-18とを接触させる段階を有する方法を提供する。IL-18はヒトIL-18であることが好ましい。例えば、hIL-18を含有または含有すると考えられる細胞培養物においては、本発明の抗体または抗体部分を培地に添加して培養物のhIL-18活性を阻害することができる。

【0130】

別の実施形態において本発明は、IL-18活性が有害である疾患または障害を患う被験者においてIL-18活性を低下させる方法を提供する。本発明は、疾患または障害を患う被験者でのIL-18活性の低下方法であって、被験者のIL-18活性が低下されるように本発明の抗体または抗体部分をその被験者に投与する段階を有する方法を提供する。IL-18はヒトIL-18であり、被験者はヒト被験者であることが好ましい。あるいは、被験者は、本発明の抗体が結合できるIL-18を発現する哺乳類であることができる。さらに、被験者は、hIL-18が導入された（例えば、hIL-18の投与によって、またはhIL-18導入遺伝子の発現によって）哺乳類であることができる。本発明の抗体は、治療を目的としてヒト被験者に投与することができる。さらに、獣医学的な目的で、あるいはヒト疾患の動物モデルとして、抗体が結合できるIL-18を発現する非ヒト哺乳動物に本発明の抗体を投与することができる。後者に関して、そのような動物モデルは、本発明の抗体の治療効力を評価する上で有用であろう（例えば、用量試験および投与の時間経過）。

【0131】

本明細書で使用される「IL-18活性が有害である疾患」という用語は、その疾患を

患う被験者がIL-18を有していることがその疾患の病態生理の原因であるか、あるいはその疾患を悪化させる一因である、ということが示されまたはそうであると考えられる疾患および他の障害を含む。従って、IL-18活性が有害である疾患は、IL-18活性の低下が、その疾患の症状および/または進行を緩和すると予想される疾患である。このような障害は、例えば上述の抗IL-18抗体を使用して検出することが可能な、その障害を患う被験者の生体液中のIL-18の濃度を高める（例えば、被験者の血清や血漿、滑液中のIL-18の濃度を高める）ことによって確認することができる。本発明の抗体で治療可能な障害の例には、本発明の抗体の医薬組成物に関して下記で論じる障害などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0132】

10

D. 医薬組成物

本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合部分および製薬上許容される担体を含む医薬組成物も提供する。1実施形態において、医薬組成物はさらに、IL-18活性が有害である障害を治療するための少なくとも1種の他の治療薬を含む。

【0133】

本発明の抗体および抗体部分は、被験者への投与に適する医薬組成物に組み込むことができる。代表的には、医薬組成物は、本発明の抗体または抗体部分と製薬上許容される担体を含む。本明細書で使用される「製薬上許容される担体」には、生理的に適合性である全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤または抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。製薬上許容される担体の例には、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノールなどのうちの1種類以上ならびにこれらの組合せなどがある。多くの場合、等張剤、例えば糖や、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。製薬上許容される担体には、さらに、湿潤剤や乳化剤、防腐剤、緩衝剤など、抗体または抗体部分の貯蔵寿命または有効性を高める少量の補助物質を含めることができる。

20

【0134】

本発明の抗体および抗体部分は、非経口投与に適する医薬組成物に組み込むことができる。抗体または抗体部分は、0.1~250mg/mLの抗体を含有する注射液剤として調製することが好ましい。注射液剤は、液体製剤または凍結乾燥製剤を、フリントまたはアンバーバイアル、アンプルまたは予備充填注射器に入れたもので構成することができる。緩衝剤は、pH5.0~7.0（最適な場合、pH6.0）のL-ヒスチジン（1~50mM）、最適には5~10mMのL-ヒスチジンとすることができる。その他の適切な緩衝剤には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、またはリン酸カリウムなどがあるが、これらに限定されるものではない。濃度0~300mMの溶液（液体製剤に関しては、最適には150mM）の毒性を変えるために、塩化ナトリウムを使用することができる。凍結乾燥製剤には、凍結保護剤、主として0~10%（最適な場合、0.5~1.0%）のショ糖を含めることができる。その他の適切な凍結保護剤にはトレハロースおよびラクトースなどがある。凍結乾燥製剤には、増量剤、主として1~10%のマンニトール（最適な場合、2~4%）を含有させることができる。液体製剤および凍結乾燥製剤のいずれも、安定剤、主として1~50mM（最適には5~10mM）のL-メチオニンを使用することができる。その他の適切な増量剤にはグリシン、アルギニンなどがあり、0~0.05%（最適には0.005~0.01%）のポリソルベート80として含有させることができる。他の界面活性剤には、ポリソルベート20およびBRI界面活性剤などがあるが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0135】

本発明の組成物は、各種形態のものであることができる。そのような組成物には、例えば、液剤（例えば注射液剤または注入液剤）や分散液、懸濁液、錠剤、丸薬、粉剤、リボソーム、坐剤などの液体、半固体、固体の製剤などがある。好ましい形態は、所期の投与形態および治療用途によって決まる。一般に好ましい組成物は、他の抗体でヒトを受動免疫化するのに使用されるものと同様の組成物など、注射液剤または注入液剤の形態のもの

50

である。好ましい投与形態は、非経口投与（例えば、静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉投与）である。好ましい実施形態では抗体は、静脈注入または静脈注射によって投与される。別の好ましい実施形態では抗体は、筋肉注射または皮下注射によって投与される。

【0136】

治療組成物は代表的には、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。この組成物は、液剤、微細乳濁液、分散液、リボソームまたは高薬剤濃度に適した他の秩序的構造として製剤することができる。無菌注射液剤は、必要量の活性化合物（すなわち抗体または抗体部分）を、必要な場合には上記成分のうちの１種類または組合せと共に適切な溶媒中で混合し、次に濾過滅菌を行うことによって調製することができる。一般に、活性化合物を、基本的な分散媒および上記で挙げたものから必要とされる他の成分を含有する無菌媒体に混ぜることによって分散液を調製する。無菌注射液剤を調製するための無菌凍結乾燥粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および噴霧乾燥であり、それによって活性成分粉末と前記滅菌濾過溶液からの他の所望成分が得られる。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤を使用することによって、分散液の場合には必要とされる粒径を維持することによって、および、界面活性剤を使用することによって維持することができる。注射組成物の長期吸収は、その組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩やゼラチンを含有させることによって行うことができる。

10

【0137】

本発明の抗体および抗体部分は、当技術分野で知られている各種方法によって投与することができるが、多くの治療用途での好ましい投与経路／形態は皮下注射、静脈注射または注入である。当業者には明らかなように、投与経路／形態は、所望の結果に応じて変わる。ある種の実施形態では、活性化合物は、インプラント、経皮貼付剤およびマイクロカプセル投与系などの徐放製剤など、その化合物が急速に放出されないようにする担体を用いて調製することができる。酢酸エチレンビニルやポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸など、生分解性で生体適合性のポリマーを使用することができる。このような製剤を調製するための多くの方法には特許が付与され、または当業者に一般に知られている（例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 参照）。

20

30

【0138】

ある種の実施形態では、本発明の抗体または抗体部分を、例えば不活性希釈剤または吸収性の食用担体と共に経口投与することができる。化合物（および望ましい場合は他の成分）は、硬質または軟質シェルのゼラチンカプセルに封入し、圧縮して錠剤とし、あるいは被験者の食物に直接混ぜることもできる。経口治療投与の場合、化合物を賦形剤に混ぜることができ、経口摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウェハなどの形で使用することができる。非経口投与以外で本発明の化合物を投与するには、その化合物の失活を防止する材料でその化合物を被覆し、またはその化合物の失活を防止する材料と同時にその化合物を投与する必要があると考えられる。

40

【0139】

組成物には、補助的な活性化合物も組み入れることができる。ある種の実施形態では、本発明の抗体または抗体部分は、IL-18 が原因となる障害を治療するのに有用な１種類以上の他の治療薬とともに製剤し、ないしはそのような他治療薬と同時に投与する。例えば、本発明の抗IL-18 抗体または抗体部分は、他の標的に結合する１種類以上の他の抗体（例えば、他のサイトカインに結合する抗体、または細胞表面分子に結合する抗体）とともに処方し、ないしはそのような他の抗体と同時に投与することができる。さらに、本発明の１種類以上の抗体を、前述の治療薬のうち２種類以上のものと併用することができる。そのような併用療法は、比較的低用量の投与治療薬を有利に用いることができ

50

ることから、各種単独療法に関連して起こり得る毒性または合併症が回避される。

【 0 1 4 0 】

ある種の実施形態において、IL - 18に対する抗体またはその断片を、当業界で公知の半減期延長媒体に連結させる。そのような媒体には、Fcドメイン、ポリエチレングリコールおよびデキストランなどがある。このような媒体については、例えば米国特許出願09/428082および公開PCT出願W099/25044（これらは、あらゆる目的において参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【 0 1 4 1 】

インターロイキン18は、免疫および炎症性の要素に関わる各種疾患に関連する病理で非常に重要な役割を果たす。これらの疾患には、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、強皮性皮膚炎、対宿主性移植片病、臓器移植拒絶反応、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム硬化症、汎発性血管内凝固症候群、川崎病、グレーブズ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ヴェーゲナー肉芽腫症、ヘーノホ - シェーンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、トキシックショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンティングトン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性疾患、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性疾患、I型多分泌腺機能低下およびII型多分泌腺機能低下、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促進症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸炎、腸性滑膜炎、クラミジア、エルジニアおよびサルモネラに関連する関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患 / 動脈硬化症、アトピー、自己免疫性水泡性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA疾患、自己免疫性溶血性貧血、クーン陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋肉痛脳炎 / ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全疾患症候群、後天性免疫不全に関連する疾病、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性の不孕症、卵巣不全、早発性卵巣不全、線維性肺疾患、原因不明の線維化肺炎、炎症後間隙性肺疾患、間隙性肺炎、結合組織病関連の間隙性肺疾患、混合結合組織病関連の肺疾患、全身性硬化症関連の間隙性肺疾患、慢性関節リウマチ関連の間隙性肺疾患、全身性エリテマトーデス関連の肺疾患、皮膚筋炎 / 多発性筋炎関連の肺疾患、シェーグレン病関連の肺疾患、強直性脊椎炎関連の肺疾患、脈管性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症関連の肺疾患、薬物誘発性の間隙性肺疾患、線維症、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間隙性肺疾患、通風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的な自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介型低血糖症、黒色表皮症を伴うB型インスリン抵抗性、上皮小体低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1型乾癬、2型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的脈管炎、ライム病、ジスコイドエリテマトーデス、特発性またはNOSの男性不孕症、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患の二次的な肺高血症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺発現、急性リウマチ熱、リウマチ様脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病 / 動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能亢進（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液性水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性脈管炎、白斑、急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発肝臓損傷、胆汁鬱滞、特異体質性肝臓疾患、薬物誘発肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、アレルギーおよび喘息、B群溶連菌（GBS）感染、精神障害（例：抑鬱および統合失調症）、T

10

20

30

40

50

h 2 型および T h 1 型介在疾患、急性および慢性疼痛（各種形態の疼痛）ならびに肺癌、乳房癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および直腸癌などの癌および造血器悪性腫瘍（白血病およびリンパ腫）などがあるが、これらに限定されるものではない。ヒト抗体、および本発明の抗体部分は、自己免疫疾患、特にリウマチ様脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎などの炎症関連のものに用いることができる。

【 0 1 4 2 】

好ましくは本発明の抗体またはその抗原結合部分は、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、真性糖尿病および乾癬の治療に使用する。

【 0 1 4 3 】

本発明の抗体または抗体部分は、自己免疫および炎症疾患の治療に有用な 1 種類以上の他の治療薬と併用投与することもできる。

【 0 1 4 4 】

本発明の抗体またはその抗原結合部分は、疾患を治療するため単独で、または併用で使うことができる。理解しておくべき点として、本発明の抗体またはその抗原結合部分は、単独で、または他の薬剤、例えば治療薬との併用で使うことができ、前記他薬剤はその所期の目的のため当業者によって選択されるものである。例えば、他薬剤は、本発明の抗体により治療される疾患または状態を治療するのに有用であることが当技術分野で理解されている治療薬であることができる。他薬剤は、治療組成物に有益な性質を与える薬剤、例えば組成物に粘性をもたらす薬剤であってもよい。

【 0 1 4 5 】

さらに理解すべき点として、本発明に含まれることになる組合せは、その所期の目的に有用な組合せのものである。以下に述べる薬剤は例示を目的とするものであり、これらに限定するものではない。本発明の一部であるその組合せは、本発明の抗体と、下記のリストから選択された少なくとも 1 種類の薬剤とすることができる。組合せは、複数の他薬剤を含むこともでき、例えば、形成される組成物がその所期の機能を発揮できるような組合せである場合には 2 種または 3 種の他薬剤を含むことができる。

【 0 1 4 6 】

好ましい組合せは、イブプロフェンのような薬剤を含む N S A I D S とも呼ばれる非ステロイド系抗炎症薬である。その他の好ましい組合せは、プレドニソロンを含むコルチコステロイドであり、本発明の抗 I L - 1 8 抗体と組み合わせて患者を治療する場合、必要とされるステロイドの用量を徐々に減少させることによって、ステロイド使用による既知の副作用を低減することができ、または無くすることさえできる。関節リウマチ用治療薬であって、本発明の抗体または抗体部分と組み合わせることができる治療薬の例には、以下のものなどがあるが、これに限定されるものではない。すなわち、サイトカイン抑制性抗炎症薬（C S A I D）と、他のヒトサイトカインまたは成長因子に対する抗体または拮抗薬であって、例えば T N F、L T、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 6、I L - 2 1、I L - 2 3、インターフェロン類、E M A P - I I、G M - C S F、F G F および P D G F である。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D 2 5、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 4 5、C D 6 9、C D 8 0（B 7 . 1）、C D 8 6（B 7 . 2）、C D 9 0、C T L A または C D 1 5 4 を含むこれらのリガンド（g p 3 9 または C D 4 0 L）などの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。

【 0 1 4 7 】

治療薬の好ましい組合せは、自己免疫および後続の炎症カスケードにおける異なる点で干渉し得る。好ましい例には、キメラ様の T N F 拮抗薬、ヒト化またはヒト T N F 抗体、D 2 F 7（P C T 公開番号 W O 9 7 / 2 9 1 3 1）、C A 2（R e m i c a d e（商標名））、C D P 5 7 1、および可溶性 p 5 5 または p 7 5 T N F 受容体、その誘導体（p 7 5 T N F R 1 g G（E n b r e 1（商標名））または p 5 5 T N F R 1 g G（L e n e r c e p t）、および T N F α 変換酵素（T A C E）が含まれ、同様に、I L - 1 阻害剤

10

20

30

40

50

(インターロイキン1変換酵素阻害剤、IL-1RAなど)を同様の理由で効果的に用いることができる。その他の好ましい組合せには、インターロイキン11が含まれる。さらに別の好ましい組合せは、IL-18の機能に並行して、依存して、または協働して作用することが可能な自己免疫応答のその他の主要な役割を果たすものであり、特に好ましいものは、IL-12抗体または可溶性IL-12受容体を含むIL-12拮抗薬、またはIL-12結合タンパク質である。IL-12およびIL-18が一部重複するが明確に異なる機能を有し、これら両者に対する拮抗薬の組合せが最も有効となり得ることが明らかになっている。さらに別の好ましい組合せは、非枯渴性抗CD4阻害剤である。さらに好ましい組合せには、抗体、可溶性受容体または拮抗性リガンドを含む同時刺激経路CD80(B7.1)またはCD86(B7.2)の拮抗薬などがある。

10

【0148】

本発明の抗体またはその抗原結合部分は、メトトレキサート、6-MP、アザチオプリン、スルファサラジン、メサラジン、オルサラジクロロキニン/ヒドロキシクロロキン、ペンシルアミン、金チオマレート(筋肉内および経口)、アザチオプリン、コチシン、コルチコステロイド(経口、吸入、および局所注射)、 β 2アドレナリン作用性受容体作動薬(サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル)、キサンチン(テオフィリン、アミノフィリン)、クロモグリケート、ネドクロミル、ケトチフェン、イブラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、例えばイブプロフェンなどのNSAID、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシン作動薬、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作用性の薬剤、TNF α やIL-1など、炎症誘発性サイトカインからのシグナルを妨げる薬剤(例えばIRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤)、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素(TACE)阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体(例えば可溶性p55またはp75 TNF受容体および誘導体p75 TNFR IgG(Enbrel(商標名)およびp55 TNFR IgG(Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、および抗炎症性サイトカイン(例えばIL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β)、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾロン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾロン、チオリンゴ酸金ナトリウム、アスピリン、トリアムシノロンアセトニド、プロボキシフェンナブシレート/apap、葉酸塩、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、オキシコドン塩酸塩、酒石酸水素ヒドロコドン/apap、ジクロフェナクナトリウム/ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組換え体、トラマドール塩酸塩、サルサラート、スリンダク、シアノコバラミン/fap/ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロン酸ナトリウム、プレドニゾロン、硫酸モルヒネ、塩酸リドカイン、インドメタシン、硫酸グルコサミン/コンドロイチン、アミトリプチリン塩酸塩、スルファジアジン、オキシコドン塩酸塩/アセトアミノフェン、オロパタジン塩酸塩、ミソプロストール、ナプロキセンナトリウム、オメプラゾール、シクロホスファミド、リツキシマブ、IL-1TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18BP、抗-IL-12、抗-IL15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX-740、ロフルミラスト、IC-485、CDC-801およびメソプラムなどの薬剤と組み合わせることもできる。好ましい組合せには、メトトレキサートまたはレフルノミドなどがあり、中等度または重度の関節リウマチの場合にはシクロスポリンなどがある。

20

30

40

【0149】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる炎症性腸疾患用治療薬の例には、ブデソニド；表皮成長因子；コルチコステロイド；シクロスポリン、スルファサラジン

50

；アミノサリチレート；6-メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リボキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジン；抗酸化薬；トロンボキサン阻害剤；IL-1受容体拮抗薬；抗IL-βモノクローナル抗体；抗IL-6モノクローナル抗体；成長因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル-イミダゾール化合物；その他のヒトサイトカインまたは成長因子に対する抗体または拮抗薬、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGFなどがあるが、それらに限定されるものではない。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはそれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、マイコフェノラートモフェチル、レフルノミド、NSAID（例えばイブプロフェン）、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシン作動薬、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作用性の薬剤、TNFαやIL-1など、炎症誘発性サイトカインからのシグナルを妨げる薬剤（例えばIRAK、NIK、IKK、p38、またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1β変換酵素阻害剤、TNFα変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば可溶性p55またはp75 TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）、および抗炎症性サイトカイン（例えばIL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGFβ）などの薬剤と組み合わせることもできる。

【0150】

抗体または抗原結合部分を組み合わせることができるクローン病用治療薬好ましい例には、以下のものなどがある。すなわち、TNF拮抗薬、例えば、抗TNF抗体、D2F7（PCT公開番号WO97/29131；フミラ（HUMIRA））、CA2（レミケード）、CDP571、TNFR-Ig構造体、（p75TNFRIGG（エンブレル）またはp55TNFRIGG（レネルセプト））阻害剤およびPDE4阻害剤である。本発明の抗体または抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えばブデソニドやデキサメタゾンと組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジンなどの薬剤、IL-1などのプロ炎症性サイトカイン、例えばIL-1β変換酵素阻害剤、およびIL-1raの合成または作用を妨げる薬剤と組み合わせることもできる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、T細胞シグナル阻害剤、例えばチロシンキナーゼ阻害剤6-メルカプトプリンと共に使用することもできる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、IL-11と組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、メサラミン、プレドニゾン、アザチオプリン、メルカプトプリン、インフリキシマブ、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、ジフェノキシレート/アトロブ硫酸塩、ロペラミド塩酸塩、メトトレキサート、オメプラゾール、葉酸塩、シプロフロキサシン/デキストロース-水、酒石酸水素ヒドロコドン/apap、テトラサイクリン塩酸塩、フルオシノニド、メトロニダゾール、チメロアル/ホウ酸、コレスチラミン/ショ糖、シプロフロキサシン塩酸塩、ヒヨスチアミン硫酸塩、メペリジン塩酸塩、ミダゾラム塩酸塩、オキシコドン塩酸塩/アセトアミノフェン、プロメタジン塩酸塩、リン酸ナトリウム、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、セレコキシブ、ポリカルボフィル、ナブシル酸プロボキシフェン、ヒドロコルチゾン、総合ビタミン剤、バルサラジド・2ナトリウム、リン酸コデイン/apap、コレセベラム塩酸塩、シアノコバラミン、葉酸、レボフロキサシン、メチルプレドニゾロン、ナタリズマブおよびインターフェロン-γと組み合わせることができる。

【0151】

本発明の抗体または抗体部分と組み合わせることができる多発性硬化症用治療薬の例には、コルチコステロイド；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シク

10

20

30

40

50

ロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；4 - アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン β 1 a（アボネックス；Biogen）；インターフェロン β 1 b（ベタセロン；Chiron/Berlex）；インターフェロン β 1 A - IF（Serono/Inhaled Therapeutics）、Pegインターフェロン α 2 b（Enzon/Schering-Plough）、コポリマー 1（Cop-1；コバキソン；Teva Pharmaceutical Industries, Inc.）；高压酸素；静脈免疫グロブリン；クラブリピン；その他のヒトサイトカインまたは成長因子およびこれらの受容体に対する抗体または拮抗薬、例えば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およびPDGFなどがあるが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、CD 2、CD 3、CD 4、CD 8、CD 19、CD 20、CD 25、CD 28、CD 30、CD 40、CD 45、CD 69、CD 80、CD 86、CD 90またはこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK 506、ラバマイシン、マイコフェノラートモフェチル、レフルノミド、NSAID（例えばイブプロフェン）、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシン作動薬、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作用性の薬剤、TNF α やIL - 1など、炎症誘発性サイトカインからのシグナルを妨げる薬剤（例えばIRAK、NIK、IKK、p 38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL - 1 β 変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6 -メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば可溶性p 55またはp 75 TNF受容体、sIL - 1RI、sIL - 1RII、sIL - 6R）および抗炎症性サイトカイン（例えばIL - 4、IL - 10、IL - 13およびTGF β ）などの薬剤と組み合わせることもできる。

10

20

30

40

50

【0152】

抗体またはその抗原結合部分を組み合わせることができる多発性硬化症用治療薬の好ましい例には、インターフェロン β 、例えばIFN β 1 aおよびIFN β 1 b；コバクソン、コルチコステロイド、カスパーゼ阻害薬（例えば、カスパーゼ - 1阻害薬）、IL - 1阻害剤、TNF阻害剤およびCD 40リガンドおよびCD 80に対する抗体などがある。

【0153】

本発明の抗体またはその抗原結合部分は、アテムツツマブ、ドロナビノール、ユニメド（Unimed）、ダクリツマブ、ミトキサントロン、キサリプロデン塩酸塩、ファムブリジン、酢酸グラチラマー、ナタリツマブ、シンナビドール（sinnabidol）、a - イムノカイン（a - immunokine）NNS 03、ABR - 215062、アレ르기（Anergi）X . MS、ケモカイン受容体拮抗薬、BBR - 2778、カラグアリン（calagualine）、CPI - 1189、LEM（リボソーム封入ミトキサントロン）、THC、CBD（カンナビノイド作動薬）MBP - 8298、メソプラム（PDE 4阻害薬）、MNA - 715、抗 - IL - 6受容体抗体、ニューロバクス（neurovax）、パーフェミドン・アロトラップ（allotrap）1258（RDP - 1258）、sTNF - R1、タラミパネル（talampanel）、テリフルノミド（teriflunomide）、TGF - β 2、チプリモチド（tipolimotide）、VLA - 4拮抗薬（例えば、TR - 14035、VLA 4ウルトラヘイラー（Ultrahaler）、アンテگران（Antegran） - ELAN/バイオゲン（Biogen）、インターフェロン γ 拮抗薬、IL - 4作動薬などの薬剤と組み合わせることもできる。

【0154】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる狭心症の治療薬の例としては、アスピリン、ニトログリセリン、1硝酸イソソルビド、コハク酸メトプロロール、アテノロール、酒石酸メトプロロール、ベシル酸アムロジピン、ジルチアゼム塩酸塩、2硝酸

イソソルビド、重硫酸クロピドグレル、ニフェジピン、アトルバスタチンカルシウム、塩化カリウム、フロセミド、シンバスタチン、ベラパミル塩酸塩、ジゴキシン、プロプラノロール塩酸塩、カルベジロール、リシノプリル、スピロノラクトン、ヒドロクロロチアジド、マレイン酸エナラプリル、ナドロール、ラミプリル、エノキサパリンナトリウム、ヘパリンナトリウム、バルサルタン、塩酸ソタロール、フェノフィブラート、エゼチミベ、ブメタニド、ロサルタンカリウム、リシノプリル/ヒドロクロロチアジド、フェロジピン、カプトプリル、フマル酸ビソプロロールなどがあるが、これらに限定されるものではない。

【0155】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる強直性脊椎炎の治療薬の例としては、イブプロフェン、ジクロフェナクおよびミソプロストール、ナプロキセン、メロキシカム、インドメタシン、ジクロフェナク、セレコキシブ、ロフェコキシブ、スルファサラジン、メトトレキセート、アザチオプリン、ミノサイクリン、プレドニゾン、エタネルセプト、インフリキシマブなどがあるが、これらに限定されるものではない。

10

【0156】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる喘息の治療薬の例としては、アルブテロール、サルメテロール/フルチカゾン、モンテルカストナトリウム、プロピオン酸フルチカゾン、ブデゾニド、プレドニゾン、キシナホ酸サルメテロール、レボ-アルブテロール塩酸塩、硫酸アルブテロール/イブラトロピウム、リン酸プレドニゾロンナトリウム、トリアムシノロンアセトニド、2プロピオン酸ベクロメタゾン、イブラトロピウムプロマイド、アジスロマイシン、酢酸ビルブテロール、プレドニゾン、無水テオフィリン、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、クラリスロマイシン、ザフィルルカスト、フマル酸フォルモテロール、インフルエンザウイルスワクチン、メチルプレドニゾン、アモキシシリン・3水和物、フルニソリド、アレルギー注射、クロモリンナトリウム、塩酸フェキソフェナジン、フルニソリド/メントール、アモキシシリン/クラブラン酸塩、レボフロキサシン、吸入支援機器、グアイフェネシン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、モキシフロキサシン塩酸塩、ドキシサイクリンヒクラート、グアイフェネシン/d-メトルフアン、p-エフェドリン/cod/クロルフェニル、ガチフロキサシン、塩酸セチリジン、フロ酸モメタゾン、キシナホ酸サルメテロール、ベンゾナテート、セファレキシム、pe/ヒドロコドン/クロルフェニル、セチリジン塩酸塩/プソイドエフェド(pseudoephed)、フェニレフリン/cod/プロメタジン、コデイン/プロメタジン、セフprozil、デクサメタゾン、グアイフェネシン/プソイドエフェドリン、クロルフェニラミン/ヒドロコドン、ネドクロミルナトリウム、硫酸テルブタリン、エピネフリン、メチルプレドニゾン、硫酸メタプロテレノールなどがあるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0157】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができるCOPDの治療薬の例としては、硫酸アルブテロール/イブラトロピウム、イブラトロピウムプロマイド、サルメテロール/フルチカゾン、アルブテロール、キシナホ酸サルメテロール、プロピオン酸フルチカゾン、プレドニゾン、無水テオフィリン、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、モンテルカストナトリウム、ブデゾニド、フマル酸フォルモテロール、トリアムシノロンアセトニド、レボフロキサシン、グアイフェネシン、アジスロマイシン、2プロピオン酸ベクロメタゾン、レボアルブテロール塩酸塩、フルニソリド、セフトリアキソンナトリウム、アモキシシリン・3水和物、ガチフロキサシン、ザフィルルカスト、アモキシシリン/クラブラン酸塩、フルニソリド/メントール、クロルフェニラミン/ヒドロコドン、硫酸メタプロテレノール、メチルプレドニゾン、フロ酸モメタゾン、p-エフェドリン/cod/クロルフェニル、酢酸ビルブテロール、p-エフェドリン/ロラタジン、硫酸テルブタリン、チオトロピウムプロマイド、(R,R)-フォルモテロール、TgAAT、シロミラスト、ロフルミラストなどがあるが、これらに限定されるものではない。

40

【0158】

50

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができるHCVの治療薬の例としては、インターフェロン- α -2a、インターフェロン- α -2b、インターフェロン- α con1、インターフェロン- α -n1、PEG化インターフェロン- α -2a、PEG化インターフェロン- α -2b、リバビリン、PEGインターフェロン α -2b+リバビリン、ウルソデオキシコール酸、グリチルリジン酸、チマルファシン、マキサミン(Maxamine)、VX-497およびHCVポリメラーゼ、HCVプロテアーゼ、HCVヘリカーゼ、HCVIRES(内部リボソーム侵入部位)という標的に介入することでHCVを治療するのに用いられる化合物などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0159】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる特発性肺線維症の治療薬の例としては、プレドニゾン、アザチオプリン、アルブテロール、コルヒチン、硫酸アルブテロール、ジゴキシン、 γ -インターフェロン、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、ロラゼパム、フロセミド、リシノプリル、ニトログリセリン、スピロノラクトン、シクロホスファミド、イプラトロピウムブロマイド、アクチノマイシンド、アルテブラーゼ、プロピオン酸フルチカゾン、レボフロキサシン、硫酸メタプロテレノール、硫酸モルヒネ、オキシコドン塩酸塩、塩化カリウム、トリウムシノロンアセトニド、無水タクロリムス、カルシウム、インターフェロン- α 、メトトレキセート、ミコフェノール酸モフェチル、インターフェロン- γ -1 β などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0160】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる心筋梗塞の治療薬の例としては、アスピリン、ニトログリセリン、酒石酸メトプロロール、エノキサバリンナトリウム、ヘパリンナトリウム、重硫酸クロピドグレル、カルベジロール、アテノロール、硫酸モルヒネ、コハク酸メトプロロール、ワーファリンナトリウム、リシノプリル、1硝酸イソソルビド、ジゴキシン、フロセミド、シンバスタチン、ラミプリル、テネクテブラーゼ、マレイン酸エナラプリル、トルセミド、レタバーゼ(retavase)、ロサルタンカリウム、キナプリル塩酸塩/マグカルブ(magcarb)、ブメタニド、アルテブラーゼ、エナラプリラート、アミオダロン塩酸塩、チロフィバン塩酸塩m-水和物、ジルチアゼム塩酸塩、カプトプリル、イルベサルタン、バルサルタン、プロプラノロール塩酸塩、フォシノプリルナトリウム、リドカイン塩酸塩、エブチフィバチド、セファゾリンナトリウム、硫酸アトロピン、アミノカプロン酸、スピロノラクトン、インターフェロン、ソタロール塩酸塩、塩化カリウム、ドキュセートナトリウム、ドブタミン塩酸塩、アルブラゾラム、プラバスタチンナトリウム、アトルバスタチンカルシウム、ミダゾラム塩酸塩、メベリジン塩酸塩、2硝酸イソソルビド、エピネフリン、ドーバミン塩酸塩、ピバリルジン、ロスバスタチン、エゼチミベ/シンバスタチン、アバシミベ(avasimibe)、カリポリドなどがあるが、これらに限定されるものではない。

【0161】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる乾癬の治療薬の例としては、カルシポトリエン、プロピオン酸クロベタゾール、トリウムシノロンアセトニド、プロピオン酸ハロベタゾール、タザロテン、メトトレキセート、フルオシノニド、ベタメタゾン・2プロピオン酸塩増量(augmented)、フルオシノロンアセトニド、アシトレチン、タールシャンプー、吉草酸ベタメタゾン、フロ酸モメタゾン、ケトコナゾール、ブラモキシノフルオシノロン、吉草酸ヒドロコルチゾン、フルランドレノリド、尿素、ベタメタゾン、プロピオン酸クロベタゾール/エモル(emol)、プロピオン酸フルチカゾン、アジスロマイシン、ヒドロコルチゾン、保湿剤、葉酸、デソニド(desonide)、ピメクロリムス、コールタール、2酢酸ジフロラゾン、葉酸エタネルセプト、乳酸、メトキサレン、hc/次没食子酸ビスマス/znox/resor、酢酸メチルプレドニゾン、プレドニゾン、日焼け止め、ハルシノニド、サリチル酸、アントラリン、ピバリン酸クロコルトロン、石炭抽出物、コールタール/サリチル酸、コールタール/サリチル酸/硫黄、デソキシメタゾン、ジアゼパム、緩和薬、フルオシノニド/緩和薬、鉱油/ヒマシ油/乳酸ナトリウム(nalact)、鉱油/落花生油、石油/ミリスチン酸

10

20

30

40

50

イソプロピル、ソラレン、サリチル酸、石鹼ノトリブロンサラン、チメロサル／ホウ酸、セレコキシブ、インフリキシマブ、シクロスポリン、アレファセプト、エファリズマブ、タクロリムス、ピメクロリムス、P U V A、W B、スルファサラジンなどがあるが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 6 2 】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる乾癬性関節炎の治療薬の例としては、メトトレキセート、エタネルセプト、ロフェコキシブ、セレコキシブ、葉酸、スルファサラジン、ナプロキセン、レフルノミド、酢酸メチルプレドニゾロン、インドメタシン、硫酸ヒドロキシクロロキン、プレドニゾン、スリンダク、ベタメタゾン・2プロピオン酸塩増量 (a u g m e n t e d)、インフリキシマブ、メトトレキセート、葉酸塩、10 トリアムシノロンアセトニド、ジクロフェナク、ジメチルスルホキシド、ピロキシカム、ジクロフェナクナトリウム、ケトプロフェン、メロキシカム、メチルプレドニゾロン、ナブメトン、トルメチンナトリウム、カルシボトリエン、シクロスポリン、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、フルオシノニド、硫酸グルコサミン、チオリンゴ酸金ナトリウム、酒石酸水素ヒドロコドン／ a p a p、イブプロフェン、リセドロン酸ナトリウム、スルファジアジン、チオグアニン、バルデコキシブ、アレファセプト、エファリズマブなどがあるが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 6 3 】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる再狭窄の治療薬の例としては、シロリムス、パクリタキセル、エベロリムス、タクロリムス、A B T - 5 7 8、アセト20 アミノフェンなどがあるが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 6 4 】

本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができる坐骨神経痛の治療薬の例としては、酒石酸水素ヒドロコドン／ a p a p、ロフェコキシブ、シクロベンザプリン塩酸塩、メチルプレドニゾロン、ナプロキセン、イブプロフェン、オキシコドン塩酸塩／アセトアミノフェン、セレコキシブ、バルデコキシブ、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、リン酸コデイン／ a p a p、トラマドール塩酸塩／アセトアミノフェン、メタキサロン、メロキシカム、メトカルバモール、リドカイン塩酸塩、ジクロフェナクナトリウム、ガバペンチン、デクサメタゾン、カリソプロドール、ケトロラクトロメタミン、インドメタシン、アセトアミノフェン、ジアゼパム、ナブメトン、オキシコドン塩酸塩、チザニジン塩酸塩、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、ナブシル酸プロボキシフェン／ a p a p、a s a / オキシコドン／オキシコドン t e r、イブプロフェン／ヒドロコドン b i t、トラマドール塩酸塩、エトドラク、プロボキシフェン塩酸塩、アミトリプチリン塩酸塩、カリソプロドール／リン酸コデイン／ a s a、硫酸モルヒネ、総合ビタミン剤、ナプロキセンナトリウムまたはクエン酸フェナドリン、テマゼパムなどがあるが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 6 5 】

抗体または抗原結合部分を組み合わせることができる S L E (狼瘡) の治療薬の好ましい例としては、ジクロフェナク、ナプロキセン、イブプロフェン、ピロキシカム、インドメタシンなどの N S A I D 類；セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブなどの C O X 2 阻害薬；ヒドロキシクロロキンなどの抗マラリア剤；プレドニゾン、プレドニゾロン、ブデソニド (b u d e n o s i d e)、デクサメタゾンなどのステロイド類；アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノール酸モフェチル、メトトレキセートなどの細胞傷害剤；セルセプトなどの P D E 4 の阻害薬またはプリン合成阻害薬などがある。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、スルファサラジン、5 - アミノサリチル酸、オルサラジン、イムランおよび I L - 1 などの炎症誘発性サイトカインの合成、産生または作用を妨害する薬剤 (例えば、I L - 1 β 変換酵素阻害薬および I L - 1 r a などのカスパーゼ阻害薬) のような薬剤と組み合わせることもできる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、例えばチロシンキナーゼ阻害薬などの T 細胞信号伝達阻害薬；あるいは例えば C T L A - 4 - I g G または抗 B 7 ファミリー抗体、抗 P D - 1 ファミリー抗体などの T 40 50

細胞活性化分子を標的とする分子とともに用いることもできる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、h I L - 1 1 または例えばフォトリズマブ (f o n o t o l i z u m a b) (抗 I F N γ 抗体) などの抗サイトカイン抗体、または例えば抗 I L - 6 受容体抗体および B 細胞表面分子に対する抗体などの抗 - 受容体受容体抗体と組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、L J P 3 9 4 (アベチムス (a b e t i m u s))、例えばリツキシマブ (抗 C D 2 0 抗体)、リンフォスタット (l y m p h o s t a t) - B (抗 B l y S 抗体) などの B 細胞を枯渇または失活させる薬剤、例えば抗 T N F 抗体、D 2 F 7 (P C T 公開番号 W O 9 7 / 2 9 1 3 1 ; フミラ (H U M I R A))、C A 2 (レミケード)、C D P 5 7 1、T N F R - I g 構造体、(p 7 5 T N F R I g G (エンブレル) または p 5 5 T N F R I g G (レネルセプト)) などの T N F 拮抗薬とともに用いることもできる。

10

【 0 1 6 6 】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体または抗体部分を、「治療上有効量」または「予防上有効量」含むことができる。「治療上有効量」は、必要とされる用量および期間で、所望の治療結果を実現するのに有効な量を指す。抗体または抗体の治療上有効量は当業者が決定することができ、個体の疾患状態や年齢、性別、体重などの要素と、抗体または抗体部分はその個体において所望の反応を引き起こす能力に応じて変動し得る。また治療上有効量とは、抗体または抗体部分の毒作用または有害効果より治療上有益な作用のほうが大きいものである。「予防上有効量」は、必要とされる用量および期間で、所望の予防結果を実現するのに有効な量を指す。一般に、疾患の早期段階の前または早期段階で予防用量を被験者に対して使用するので、予防上有効量は、治療上有効量よりも少なくなる。

20

【 0 1 6 7 】

投薬計画は、最適な所望の応答 (例えば治療応答または予防応答) が得られるように調整することができる。例えば、単一の薬剤塊を投与することができ、用量を数回に分けて時間をかけて投与することができ、またはその用量を、治療状況に必要な条件に示されるように比例的に減少または増加させることができる。投与を容易にし用量を均一にするため、非経口組成物を単位製剤に処方することが、特に有利である。本明細書で使用される単位製剤は、治療を受ける哺乳動物被験者に単一用量を与えるのに適した、物理的に分離された単位を指し、各単位は、必要とされる医薬担体と共同して所望の治療効果を発揮するよう計算された所定量の活性化化合物を含有する。本発明の単位製剤に関する仕様は、(a) 活性化化合物の固有の特徴および達成すべき特定の治療または予防効果と、(b) 個体における感受性治療を目的としたそのような活性化化合物の配合の技術分野に固有の制限によって決定され、およびこれらに直接依存する。

30

【 0 1 6 8 】

本発明の抗体または抗体部分の治療上または予防上有効量の範囲の例としては、0 . 1 ~ 2 0 m g / k g であり、より好ましくは 1 ~ 1 0 m g / k g であるが、これに限定されるものではない。留意すべき点として、用量値は、改善すべき状態の種類および重度に応じて変動し得る。さらに理解すべき点として、特定の被験者に関しては、個体のニーズ、そして組成物の投与を管理または監督する担当者の専門的判断に従って、具体的な投薬計画を経時的に調整すべきであり、そして本明細書に記載の用量範囲は例示にすぎず、特許請求の範囲に記載される組成物の範囲または実務を制限するものではない。

40

【 0 1 6 9 】

I I . I L - 1 8 応答遺伝子

I L - 1 8 は、マクロファージ、樹状細胞、星細胞、小膠細胞、上皮細胞、角化細胞、腸上皮細胞、軟骨細胞、滑膜線維芽細胞および骨芽細胞で発現され、さらには副腎皮質および下垂体内で発現される。ヒト単球および樹状細胞などの一部の細胞では発現は構成的であるが、他の細胞ではそれはデノボで誘発しなければならない。インターフェロン γ 発現は別として、I L - 1 8 単独または他のサイトカインと共同で誘発される他の遺伝子についてはほとんど解明されていない。

【 0 1 7 0 】

50

本発明の 1 実施形態は、対象遺伝子の遺伝子発現の調節方法であって、IL-18 または IL-18 調節剤を提供する段階；および IL-18 または前記調節剤を細胞に接触させる段階を有し、前記対象遺伝子が下記の表に示した遺伝子からなる群から選択される方法を提供する。

【0171】

【表 3】

表 3：IL-18 応答遺伝子

Genbank ID	遺伝子名	Unigene コメント
NM_000389	p21	サイクリン依存性キナーゼ阻害薬 1A(p21, Cip1)
NM_002198	IRF1	インターフェロン調節因子 1
NM_002163	ICSBP1	インターフェロンコンセンサス配列結合タンパク質 1
NM_006144	GZMA	グランザイム A
NM_006515	SETMAR	SET ドメインおよびマリナートランスポザーゼ融合遺伝子
NM_007185	TNRC4	トリヌクレオチド反復含有 4
NM_002288	LAIR2	白血球関連 Ig 様受容体 2
NM_003661	APOL1	アポリポタンパク質 L, 1
NM_021958	HLX1	H2.0 様ホメオボックス 1(ショウジョウバエ)
NM_001335	CTSW	カテプシン W(リンフォパイン (lymphopain))
Hs.382006	FCGR1B	FcR1b 型(AA1-344)
NM_020125	BLAME	ロイシンアミノペプチダーゼ 3
NM_007210	GALNT6	UDP-N-アセチル- α -D-ガラクトサミン
NM_021798	IL21R	インターロイキン 21 受容体
NM_013324	CISH	サイトカイン誘導性 SH2-含有タンパク質
M11313	A2M	α -2-マクログロブリン
D88152	ACATN	アセチル-補酵素 A トランスポーター
NM_001103	ACTN2	アクチニン, α 2
U37519	ALDH8	アルデヒドデヒドロゲナーゼ 8
NM_000697	ALOX12	アラキドン酸 12-リボキシゲナーゼ
J03600	ALOX5	アラキドン酸 5-リボキシゲナーゼ
NM_014578	ARHD	ras 相同体遺伝子ファミリー, 構成員
S66793	ARR3	アレスチン 3, 網膜(X-アレスチン)
U47054	ART3	ADP-リボシルトランスフェラーゼ 3
L19871	ATF3	活性化転写因子 3
M81181	ATP1B2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ 輸送
NM_001188	BAK1	BCL2 拮抗薬/キラー1
U15460	BATF	塩基性ロイシンジッパー転写因子, ATF 様
NM_014417	BBC3	Bcl-2 結合成分 3
Z23115	BCL2L1	BCL2 様 1
NM_001713	BHMT	ベタイン-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ
U45878	BIRC3	バキュロウイルス IAP 反復-含有 3
U37546	BIRC3	バキュロウイルス IAP 反復-含有 3
U72649	BTG2	BTG ファミリー, 構成員 2
U49187	C6ORF32	染色体 6 読み取り枠 32
J03507	C7	補体成分 7
U50360	CAMK2G	CaM キナーゼ II γ
XM071866	CAT56	CAT56 タンパク質
NM_005623	CCL8	
Z32765	CD36	CD36 抗原(コラーゲン I 型/TSP 受容体)

10

20

30

40

HG2981-HT 3127	CD44	CD44 抗原
Z11697	CD83	CD83 抗原
XM_071866	CDR2	小脳変性症関連タンパク質(62kD)
U51096	CDX2	尾型ホメオボックス転写因子 2
M83667	CEBPD	CCAAT/エンハンサー結合タンパク質(C/EBP), δ
D87469	CELSR2	カドヘリン, EGF LAG7 回貫通 G 型受容体 2
L07765	CES1	カルボキシルエステラーゼ 1
U66468	CGR11	EF ハンドドメインによる細胞増殖調節
X14830	CHRNA1	コリン受容体, ニコチン, β -ポリペプチド 1
L29217	CLK3	CDC 様キナーゼ 3
X15880	COL6A1	コラーゲン, VI 型, $\alpha 1$
NM_001851	COL9A1	コラーゲン, IX 型, $\alpha 1$
M27691	CREB1	cAMP 応答要素結合タンパク質 1
M37435	CSF1	コロニー刺激因子 1(マクロファージ)
HG3548-HT 3749	CUTL1	cut(CCAAT 置換タンパク質)
X13589	CYP19	チトクロム P450, サブファミリーXIX
X16866	CYP2D7AP	チトクロム P450, サブファミリーIID
X59131	D13S106E	高電荷タンパク質
NM_004393	DAG1	ジストログリカン 1
U73328	DLX4	ディスタルレスホメオボックス 4
L19267	DMWD	筋緊張性異栄養症, WD 反復モチーフ
U53445	DOC1	卵巣癌での低下 1
X68277	DUSP1	二重特異性ホスファターゼ 1
U48807	DUSP4	二重特異性ホスファターゼ 4
NM_001950	E2F4	E2F 転写因子 4, 107/130-結合
U87269	E4F1	E4F 転写因子 1
M57730	EFNA1	エフリン-A1
X52541	EGR1	初期成長応答 1
J04076	EGR2	初期成長応答 2 (Krox-20 相同体)
X63741	EGR3	初期成長応答 3
L07077	EHHADH	エノイル-補酵素 A
M62831	ETR101	最初期タンパク質
M60830	EVI2B	エコトロピックウィルス組込部位 2B
U53786	EVPL	エンボブラキン
NM_001988	EVPL	エンボブラキン
NM_000141	FCGBP	IgG 結合タンパク質の Fc 断片
M23668	FDX1	フェレドキシン 1
U60062	FEZ1	線維束形成および伸長タンパク質 ζ 1(ジギン (zygin)1)
NM_000141	FGFR2	線維芽細胞増殖因子受容体 2
U49973	FLJ10803	仮定的タンパク質 FLJ10803
U89995	FOXE1	フォークヘッドボックス E1 (甲状腺転写因子 2)
U27326	FUT3	フコシルトランスフェラーゼ 3
A28102	GABRA3	γ -アミノ酪酸(GABA)受容体

10

20

30

40

M25667	GAP43	増殖関連タンパク質 43
L34357	GATA4	GATA-結合タンパク質 4
U19523	GCH1	GTP シクロヒドロラーゼ 1
L01406	GHRHR	成長ホルモン放出ホルモン受容体
U03486	GJA5	ギャップ結合タンパク質, $\alpha 5$, 40kD (コネキシン 40)
X68285	GK	グリセリンキナーゼ
Z18859	GNAT2	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(G タンパク質)
HG870-IIT870	GOLGA3	ゴルジ自己抗原, ゴルジンサブファミリー-a, 3
D49958	GPM6A	糖タンパク質 M6A
D43772	GRB7	成長因子受容体結合タンパク質 7
AC000099	GRM8	グルタミン酸受容体, 代謝型 8
M57731	GRO2	GRO2 発癌遺伝子
X53800	GRO3	GRO3 発癌遺伝子
M91036	HBG2	ヘモグロビン, γ G
D16583	HDC	ヒスチジン脱炭酸酵素
X64877	HFL3	H 因子(補体) 様 3
X58431	HOXB6	ホメオボックス B6
M16937	HOXB7	ホメオボックス B7
NM_014468	HPX42B	造血系幹細胞ホメオボックス
X92814	IIREV107	ラット IIREV107 に類似
L19314	HRY	有毛(ショウジョウバエ)-相同体
M26665	IITN3	ヒスタチン 3
D10995	HTR1B	5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)受容体 1B
L41147	HTR6	5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)受容体 6
M24283	ICAM1	細胞間接着分子 1(CD54)
S81914	IER3	最初期応答 3
J03171	IFNAR1	インターフェロン(α , β および ω)受容体 1
J00219	IFNG	インターフェロン, γ
NM_000619	IFNG	インターフェロン, γ
NM_000585	IL15	インターロイキン 15
U31628	IL15RA	インターロイキン 15 受容体, α
X04500	IL1B	インターロイキン 1, β
M27492	IL1R1	インターロイキン 1 受容体, I 型
X01057	IL2RA	インターロイキン 2 受容体, α
M26062	IL2RB	インターロイキン 2 受容体, β
Y00081	IL6	インターロイキン 6(インターフェロン, $\beta 2$)
Y00787	IL8	インターロイキン 8
Z31695	INPP5A	イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ, 40kD
X06256	ITGA5	インテグリン, $\alpha 5$
X57206	ITPKB	イノシトール 1,4,5-3 リン酸 3-キナーゼ B
U20734	JLTNB	junB 癌原遺伝子
NM_014879	KIAA0001	UDP-グルコースの推定 G タンパク質結合受容体
D31762	KIAA0057	TRAM 様タンパク質
D42038	KIAA0087	KIAA0087 遺伝子産物
NM_005551	KIAA0133	KIAA0133 遺伝子産物

10

20

30

40

NM_014846	KIAA0196	KIAA0196 遺伝子産物
X06182	KIT	v-kit 発癌遺伝子相同体
NM_005551	KLK2	カリクレイン 2, 前立腺
X07730	KLK3	カリクレイン 3, (前立腺特異抗原)
M13955	KRT7	ケラチン 7
M57710	LGALS3	レクチン, ガラクトシド結合, 可溶性, 3 (ガレクチン 3)
S83362	LIFR	白血病阻害因子受容体
NM_002314	LIMK1	LIM ドメインキナーゼ 1
NM_005569	LIMK2	LIM ドメインキナーゼ 2
U49957	LPP	LIM ドメイン含有
U89922	LTB	リンホトキシン β (TNF スーパーファミリー, 構成員 3)
X14008	LYZ	リゾチーム(腎アミロイドーシス)
U59914	MADH6	MAD)相同体 6
D14497	MAP3K8	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ 8
X59727	MAPK4	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 4
NM_000429	MAT1A	メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ I, α
HG1877-IIT-1917	MBP	ミエリン塩基性タンパク質
HG3115-IIT-3291	MBP	ミエリン塩基性タンパク質
U43944	ME1	リンゴ酸酵素 1, NADP(+)依存性, 細胞質
X72755	MIG	γ インターフェロン誘発モノカイン
NM_021230	MLL3	骨髄/リンパ球様または混合系統白血病 3
NM_005951	MT1H	メタロチオネイン 1H
X78710	MTF1	金属調節転写因子 1
X70991	NAB2	NGF1-A 結合タンパク質 2(ERG1bp2)
M32011	NCF2	好中球細胞質因子 2
S77763	NFE2	核因子(赤血球由来 2), 45kD
M58603	NFKB1	核因子 κ B(p105)
S76638	NFKB2	核因子 κ B
M69043	NFKBIA	核因子 κ B
U91616	NFKBIE	核因子 κ B
D86425	NID2	ニドゲン 2
L13740	NR4A1	核受容体サブファミリー4, グループ A, 構成員 1
U44848	NRF1	核呼吸因子 1
U79251	OPCML	オピオイド結合タンパク質細胞接着分子様
HG4115-IIT-4385	OR1E3P	嗅覚受容体
M27288	OSM	オンコスタチン M
AF000234	P2RX4	プリン受容体 P2X
D50640	PDE3B	ホスホジエステラーゼ 3B, cGMP-阻害
L20971	PDE4B	ホスホジエステラーゼ 4B, cAMP-特異的
L10343	PI3	プロテアーゼ阻害薬 3, 皮膚由来(SKALP)
U77735	PIM2	pim-2 発癌遺伝子
NM_003579	PIP5K2A	ホスファチジルイノシトール-4-ホスフェート 5-キナーゼ

10

20

30

40

U17034	PLA2R1	ホスホリパーゼ A2 受容体 1, 180kD
AB000584	PLAB	前立腺分化因子
X63131	PML	前骨髄球性白血病
D11428	PMP22	末梢性ミエリンタンパク質 22
NM_032940	POLR2C	ポリメラーゼ(RNA)II ポリヘプチド
NM_005035	POLRMT	ポリメラーゼ(RNA)ミトコンドリア(DNA 依存性)
NM_003579	POU2F2	POU ドメイン, クラス 2, 転写因子 2
M18255	PRKCB1	タンパク質キナーゼ C, $\beta 1$
L01087	PRKCQ	タンパク質キナーゼ C, θ
D38128	PTGIR	プロスタグランジン 12(プロスタサイクリン)受容体 (IP)
Y10375	PTPNS1	チロシンホスファターゼ, 非受容体基質 1
D15049	PTPRH	タンパク質チロシンホスファターゼ, 受容体型, H
M31166	PTX3	ペンタキシン (pentaxin) 関連遺伝子
U59877	RAB31	RAB31, 構成員 RAS 発癌遺伝子ファミリー
NM_003579	RAD54L	RAD54(出芽酵母)様
U64675	RANBP2L1	RAN 結合タンパク質 2 様 1
S57153	RBBP1	網膜芽細胞腫結合タンパク質 1
NM_002903	RCV1	リカバリン
NG_000013	RDBP	RD RNA 結合タンパク質
X75042	REL	v-rel
M83221	RELB	v-rel
NM_000537	REN	レニン
U22314	REST	RE1-サイレンシング転写因子
S59049	RGS1	G-タンパク質シグナリングの制御因子 1
U70426	RGS16	G-タンパク質シグナリングの制御因子 16
U22377	RLF	再配列 L-myc 融合配列
U38480	RXRG	レチノイド X 受容体, γ
L10338	SCN1B	ナトリウムチャンネルポリヘプチド
M23178	SCYA3	小型誘導性サイトカイン A3
M69203	SCYA4	小型誘導性サイトカイン A4
NM_005409	SCYB11	小型誘導性サイトカインサブファミリー-B: CXC11
D79206	SDC4	シンデカン 4(アンフィグリカン, リュウードカン)
NM_005065	SEL1L	sel-1(lin-12 の抑制因子, シノラブディス・エレガンス) 様
NM_004186	SEMA3F	セマフォリン 3F
J03764	SERPINE1	ネキシン, プラスミノゲン活性化因子阻害薬 1 型
NM_006802	SF3A3	スプライシング因子 3a, サブユニット 3, 60kD
HG3925-HT 4195	SFTPA2	界面活性剤, 肺関連タンパク質 A2
D89077	SLA	Src 様-アダプター
NM_003037	SLAM	シグナリングリンパ球性活性化分子
M91463	SLC2A4	溶質キャリアファミリー2 グルコーストランスポーター
D82326	SLC3A1	溶質キャリアファミリー3
L05568	SLC6A4	溶質キャリアファミリー6(セロトニン)

10

20

30

40

U96094	SLN	サルコリピン
X83301	SMA3	SMA3
D21267	SNAP25	シナプトソーム関連タンパク質, 25kD
L31529	SNTB1	シントロフィン, ジストロフィン関連タンパク質 A1
HG961-HT9 61	SOS1	セブンレスの息子(ショウジョウバエ)相同体 1
M62800	SSA1	(52kD, リボ核タンパク質自己抗原 SS-A/Ro)
NM_021014	SSX3	滑膜肉腫, X ブレークポイント 3
Z35093	SURF1	サルファイト(surfeit)1
NM_005816	TACTILE	T 細胞活性化, 後期発現増加
L25444	TAF2E	TATA ボックス結合タンパク質(TBP)関連因子
M95787	TAGLN	トランスゲリン(transgelin)
NM_005421	TAL2	T 細胞急性リンパ性白血病 2
L47345	TCEB3	転写伸長因子 B(110kD, エロンギン (elongin) A)
M57732	TCF1	肝臓核因子(HNF1)
NM_003205	TCF12	ヘリックス・ループ・ヘリックス転写因子 4
M96956	TDGF1	奇形腫由来増殖因子 1
U19878	TMEFF1	EGF で膜貫通およびホリスタチン様
M92357	TNFAIP2	腫瘍壊死因子, α 誘発タンパク質 2
M59465	TNFAIP3	腫瘍壊死因子, α 誘発タンパク質 3
X83490	TNFRSF6	腫瘍壊死因子受容体構成員 6
U37518	TNFSF10	腫瘍壊死因子構成員 10
NM_003294	TPSB1	トリプターゼ β 1
U19261	TRAF1	TNF 受容体関連因子 1
U78798	TRAF6	TNF 受容体関連因子 6
S69790	WASF3	WAS タンパク質ファミリー, 構成員 3
U53476	WNT7A	無羽型 MMTV 組み込み部位ファミリー
L15309	ZNF141	亜鉛フィンガータンパク質 141(クローン pHZ-44)
U78722	ZNF165	亜鉛フィンガータンパク質 165
HG4333-HT 4603	ZNF79	亜鉛フィンガータンパク質 79(pT7)
X57809		入・軽鎖可変領域
HG3111-HT 3287		ヒトクローン HHI409 不明
U79249		ヒトクローン 23839 配列
AB000464		クローン:RES4-24A
HG4593-HT 4998		電圧依存型ナトリウムチャンネル(SCN1A)
X77744		FLJ00032 タンパク質用ヒト, 部分
U79248		ヒトクローン 23826 配列
AI420129		EST 類

10

20

30

40

【 0 1 7 2 】

IL - 18 によって調節される遺伝子の確認方法を実施例 3 に開示している。これらの試験から、IL - 18 が真の炎症誘発性サイトカインであり、他の炎症誘発性介在物質をコードするいくつかの遺伝子の発現を直接調節し得ることが明らかになった。ヒト血液検体を用いた試験では、IL - 18 に対する多くの応答が広くヒト群で起こることが明らかになり、IL - 18 の生化学的マーカーとしての有用性と結果的に抗 - IL 18 機能が示される。

【 0 1 7 3 】

IL - 18 の調節剤は、作働薬および拮抗薬であることができる。好ましくはその調節剤は、結合タンパク質または中和結合タンパク質である。

50

【0174】

IL-18阻害薬の例には、IL-18に結合する抗体およびその断片；IL-18Rに結合する抗体；IL-18RAcPに結合する抗体；IL-18bp；IL-18R断片（例：IL-18受容体の可溶性細胞外ドメイン）；IL-18に結合し、IL-18Rとのその相互作用を低減または防止するペプチド；IL-18Rに結合し、IL-18またはIL-18RAcPとのその相互作用を低減または防止するペプチド；IL-18RAcPに結合し、IL-18Rとのその相互作用を低減または防止するペプチド；およびIL-18産生またはIL-18、IL-18RおよびIL-18RAcPのいずれかの間の相互作用を低減または防止する小分子などがあるが、これらに限定されるものではない。

10

【0175】

ある種のIL-18阻害薬が、例えば1994年7月14日発行の米国特許第5912324号；1999年12月8日公開のEP0962531；1994年11月15日公開のEP712931；1994年7月14日発行の米国特許第5914253号；1997年7月10日公開のWO97/24441；2000年5月9日発行の米国特許第6060283号；1996年12月26日公開のEP850952；1998年9月16日公開のEP864585；1998年9月24日公開のWO98/41232；2000年4月25日発行の米国特許第6054487号；1997年8月14日公開のWO99/09063；1997年11月3日公開のWO99/22760；1998年1月23日公開のWO99/37772；1998年3月20日公開のWO99/37773；2000年1月26日公開のEP0974600；2000年3月9日公開のWO00112555；1997年10月31日公開の日本特許出願JP111399194；1998年2月8日公開のイスラエル特許出願IL121554A0（これらはいかなる目的においても参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されている。

20

【0176】

本明細書に記載の本発明の方法の他の好適な変更および調整は自明であり、本発明の範囲または本明細書に開示の実施形態を逸脱しない限りにおいて、好適な均等物を用いてそれらを行うことが可能であることは、当業者には容易に理解できよう。以上、本発明について詳細に説明したが、下記の実施例を参照することで本発明についての理解がさらに深まるであろう。そしてこれら実施例は、例示のみを目的として含めたものであり、本発明を限定するものではない。

30

【実施例】

【0177】

実施例1：組換えIL-18の産生および特性決定

実施例1.1：IL-18の生理活性を求めるアッセイ

実施例1および実施例2を通じて、別段の断りがない限り、下記のアッセイを用いて、IL-18の生理活性を測定した。

【0178】

実施例1.1.A：KG-1バイオアッセイ

KG-1(ATCC#CCL-246)は、低レベルの機能性IL-18受容体を構成的に発現するヒト骨髓単核細胞系である。TNFで処理することで、これらの細胞上の機能性IL-18受容体のIL-18R α および β サブユニットの両方が上昇する。TNF処理KG-1細胞を組換えヒトIL-18(rhu-IL-18)とともにインキュベートし、ELISAによってIL-18誘発ヒトIFN γ 産生のレベルを測定することで、KG-1バイオアッセイを行った(Konishi, K., et al (1997) J. Immunol. Methods 209:187-191)。KG-1バイオアッセイを用いて、IL-18拮抗薬の中和能力を測定した。例えば、抗IL-18抗体を各種濃度のrhu-IL-18とともにインキュベートし、次に96ウェルプレートで37にて16~18時間にわたってTNF処理KG-1細胞とともにインキュベートした。上清を回収し、ELISAによってヒトIFN γ レベルについてのアッセイを行った。こ

40

50

のアッセイは、IL-18拮抗薬のIC₅₀値を $4 \times 10^{-11} \sim 6 \times 10^{-11}$ Mまで測定することができる。

【0179】

実施例1.1.B: ヒト全血アッセイ

簡潔に言えば、ヒト全血アッセイ(WBA)によって、生理的状況での天然IL-18に対するIL-18拮抗薬の中和力を測定する。このアッセイでは、読み取りは内因性IL-18依存性ヒトIFN γ 産生の阻害とした。IL-18拮抗薬の存在下または非存在下に37℃で、LPS(1 μ g/mL)+IL-12(50pg/mL)で全血を刺激した。LPS+IL-12刺激後18~24時間にわたり、ヒトIFN γ 濃度をELISAによって測定した。

10

【0180】

実施例1.1.C: 受容体結合アッセイ

簡潔に言えば、受容体結合アッセイ(RBA)では、¹²⁵I標識rhIL-18を用いて、IL-18のIL-18受容体への結合を測定した。¹²⁵I-rhIL-18は、TNF処理KG-1細胞上のIL-18R $\alpha\beta$ に特異的に結合する(約7000部位/細胞)。¹²⁵I-rhIL-18は、未標識IL-18と同じ特異的活性を有し、未標識IL-18と競合し得る。

【0181】

2つの阻害モードAおよびBを定義した。中和モードAでは、IL-18の高親和性IL-18受容体(IL-18R $\alpha\beta$)への結合は行わず、IL-18介在シグナル伝達(すなわち、IFN γ 産生)を遮断した。中和モードBでは、IL-18のIL-18R $\alpha\beta$ への結合を遮断することで、その後の受容体介在信号伝達は起こらなかった。

20

【0182】

実施例1.2: 組換えIL-18の産生

実施例1.2.A: ヒトプロIL-18のプラスミド構築、発現および精製

SF-9昆虫細胞においてIL-18の前駆体を発現することで、組換えヒトIL-18を形成した。当業界で公知の標準的な分子生物学的方法により、発表されている配列(Ushio, S., et al. (1996) J. Immunol. 156: 4274-4279)に基づく特異的PCRプライマーを用いて全長ヒトプロ-IL-18 cDNAを形成し、次にバキュロウイルス(BV)転移ベクターpVL1393にクローニングした(BD Biosciences, San Jose, CA; Cat # 51-21201P)。全長ヒトプロ-IL-18 cDNAを形成するのに用いた5' PCRプライマーは、6-ヒスチジン領域をコードする配列を有することで、プロIL-18のN末端が6-HIS-タグを有するようになった。SF9昆虫細胞を、IL-18 cDNAを含むpVL1393ベクターを持ったバキュロウイルスで感染させた。感染SF9細胞を溶解させ、溶解物をニッケルカラムに流して、組換えHIS標識プロIL-18(rhプロIL-18)を精製した(BD Biosciences, San Jose, CA; Cat # 554802)。組換えHIS標識プロIL-18を、ヒトカスパーゼ-1で消化することでさらに処理して、生理活性IL-18(成熟IL-18)を形成した(Ghayur T., (1997) Nature 386: 619-623)。

30

40

【0183】

実施例1.2.B: IL-18のNEM処理

林原生物化学研究所(日本)から得た組換えヒトIL-18は、特異的活性およびIL-18結合親和性におけるバッチ間の変動を示した。IL-18は、成熟IL-18における4つのシステインの各種ペア間にジスルフィド結合を有していた。これらが、バッチ間での構造的および機能的不均一性および変動の原因となっていた。IL-1b配位を用いるヒトIL-18の相同性モデリングで、成熟ヒトIL-18の38位および68位でのシステイン残基が露出しているために反応性であることが明らかになった。

【0184】

実施例1.2.Aからの組換えヒトIL-18を、N-エチルマレイミド(NEM)で

50

処理して、システインを酸化から保護した。NEM-IL-18はモノマーであり、凝集体を形成せず、安定で、時間が経っても高い特異的活性を保持した。抗-huIL-18中和抗体がNEM-IL-18に結合し、これを中和したことから、NEM-IL-18は中和エпитープを保持していた。IL-18をNEMで処理したにも拘わらず、抗-IL-18抗体は、ヒトWBAにおいてNEM-IL-18および天然ヒトIL-18の両方の生理活性を中和する能力による測定により、NEM-IL-18上の中和エпитープを保存していた。NEM-IL-18を用いて、アッセイの至適化および選択ならびに完全ヒト抗-ヒト-IL-18 mAbsの初期特性決定を行った。

【0185】

実施例 1.2.C: IL-18 の 4C/A 変異体の形成および特性決定

成熟 IL-18 中の前記 4 つのシステイン残基をアラニンに変異させることで、IL-18 の 4C/A 変異体を形成した(「4C/A-huIL-18」)。下記の表 4 にまとめたように、IL-18 の 4C/A 変異体を NEM-huIL-18 と比較したところ、生理特性および生化学的特性において 2 つのタンパク質が識別できないことがわかった。IL-18 の 4C/A 変異体および NEM-huIL-18 の両方とも、動的光散乱(DLS)および粒径排除クロマトグラフィー(SEC)分析によってモノマーであり、円偏光二色性分析によって配座および物理的安定性は類似していた。IL-18 の 4C/A 変異体および NEM-huIL-18 の生理活性は、KG-1 アッセイにおいて類似していて、いずれの形態の IL-18 も類似の親和性で IL-18 BP および抗 IL-18 抗体に結合した。4C/A-huIL-18 は酸化的不安定性がなく、大腸菌において高レベルで容易に発現された。

【0186】

【表 4】

表 4: NEM-IL-18 および 4C/A-huIL-18 の比較から、配座的およびオリゴマー的純度、物理的安定性および抗体または細胞結合受容体への結合の測定においてそれらが等価であることが明らかである。

特性	測定	NEM-huIL-18	(4C/A)-huIL-18
オリゴマー状態	SEC	モノマー	モノマー
	DLS	モノマー	モノマー
配座	CD(波長スキャン)	210nm で CD 最小値	210nm で CD 最小値
安定性	CD(温度スキャン)	40°C まで安定	40°C まで安定
生理活性	2ng/mL の IL-18 によって IFN γ 産生	8ng/mL の IFN γ	8ng/mL の IFN γ
エпитープ	基準結合剤による IFN γ 産生の中和	IL-18BP-Fc、125-2H および IL-18R α により中和	IL-18BP-Fc、125-2H および IL-18R α により中和
	ピアコア(K _D)	IL-18BP-Fc: 0.098nM 125-2H: 0.2nM 2.5(E) mg1: 0.3nM	IL-18BP-Fc: 0.135nM 125-2H: 0.2nM 2.5(E) mg1: 0.2nM

【0187】

実施例 1.2.D: ビオチン化 rhuIL-18 (ピオト-IL-18) の形成および特性決定

当業界で公知の標準的な技術を用いて、リジン残基上で実施例 1.2.B からの NEM-IL-18 のビオチン化を行い(スルホ-NHS-LC-ビオチン(Pierce, Rockford, IL); カタログ番号 21335)、得られたビオチン化 rhu-IL-18 (ピオト-IL-18) は、huIL-18 当たり 1、2、3 または 4 個のビオチンを有するものを含む不均一混合物であった。さらに、huIL-18 当たり 2 または 3 個のビオチンを有するものが、ピオト-IL-18 において主要物であった。ピオト-I

IL-18は生理的に活性であり、ELISAによる測定で抗-IL-18抗体に結合しており、調べた全ての中和抗-huIL-18抗体によって中和された。ピオト-IL-18は、高親和性で表面にIL-18R $\alpha\beta$ を発現するKG-1細胞に結合し、KG-1細胞の表面上のピオト-IL-18を、抗ピオチン抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; カタログ番号B3640)を用いるFACS分析によって検出した。このように、ピオチン化は受容体結合を妨害せず、rhIL-18の中和エピトープを遮蔽しない。

【0188】

実施例1.2.E: 125 I 標識 rhIL-18 の形成および特性決定

実施例1.2.BからのNEM-IL-18上のリジン残基を、アマシャム指定の条件を用いて 125 Iで標識した(Amersham; Piscataway, NJ; カタログ番号IM5861)。 125 I-標識IL-18はその特異的活性を保持しており、未修飾IL-18と競合し、KG-1細胞上のIL-18Rに特異的に結合した。 125 I-標識IL-18のIL-18受容体への結合を、中和抗huIL-18モノクローナル抗体によって遮断した。このように、ヨウ素化はIL-18の受容体結合に影響せず、IL-18上の中和エピトープを遮蔽しなかった。 125 I-標識IL-18を用いて、中和モードおよび受容体結合アッセイでの抗IL-18抗体の効力を求めた。

10

【0189】

実施例2: 抗IL-18抗体の形成および単離

実施例2.1: 抗IL-18抗体を単離するためのアッセイ

実施例3を通じて、別段の断りがない限り、下記のアッセイを用いて抗IL-18抗体の同定および特性決定を行った。

20

【0190】

実施例2.1.A: ELISA

あるELISAが、ヒトIL-18に結合する抗体をスクリーニングするために開発された。このELISAにおいては、ヤギ抗ピオチン化IgGによって、またはストレプトアビジンでコーティングしたプレート上に、ピオチン化NEM-huIL-18(実施例1.2.B参照)を捕捉した。ハイブリドーマまたはB細胞上清を加え、当業界で公知の標準的なELISAプロトコルに従い、HRP接合抗-ヒトIgGを用いて、IL-18に結合した抗体を検出した。

30

【0191】

実施例2.1.B: ビアコア技術を用いる親和性測定

ビアコアアッセイ(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)は、オン速度定数、オフ速度定数の動力学的測定によって抗体の親和性を測定するものである。共有結合的に連結された二次抗体(例: ヤギ抗ヒトIgGまたは抗マウスIgG)によってバイオセンサーチップ上に抗体を捕捉し、各種濃度の組換えIL-18を加える。結合を時間の関数として記録し、動力学的速度定数を計算する。このアッセイでは、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ という高いオン速度および 10^{-6} s^{-1} という低いオフ速度を測定することができる。

40

【0192】

実施例2.1.C: エピトープマッピング

ビアコア技術を用いて、抗IL-18抗体などのIL-18拮抗薬によって認識されるエピトープをマッピングした。すなわち、一つのIL-18拮抗薬をビアコアチップ上に捕捉し、rhIL-18を固定化試薬に結合させた。次に、別の抗IL-18拮抗薬のこの複合体への結合を調べた。2つが試薬の同時に結合することにより、これらの2つの試薬は異なるエピトープを認識することを示す。

【0193】

実施例2.2: ゼノマウスを用いる抗IL-18 HuMAbの形成

ゼノマウストランスジェニックマウス技術(Abgenix, Inc., Fremont, CA)を用いて、完全ヒト抗ヒトIL-18モノクローナル抗体(HuMAb)を得

50

た。この技術は、VH、DHおよびJHを有するヒト可変重鎖座、C μ 、C δ および単一ヒトIgG定常重鎖座ならびに軽鎖遺伝子座を有するトランスジェニックマウスからなる。対象抗原で免疫化すると、これらのマウスは抗原に対する完全ヒト抗体を形成する。

【0194】

実施例2.2.A: IL-18抗原によるゼノマウスの免疫化

ゼノマウス動物を、全ての注射について足蹠経路で免疫化した。各注射の総容量は、マウス当たり50 μ L、足蹠当たり25 μ Lとした。最初の免疫化注射には、マウス1匹当たり、タイターマックス・ゴールド(Titer Max Gold)と1:1(体積比)混合した発熱物質を含まないDPBS中にヒトIL-18(NEM-rhuIL-18) 40 μ gを含有させた。以後の追加免疫は、6回にわたってマウス1匹当たりアジュホス(Adju-Phos)(リン酸アルミニウムゲル)25 μ gと混合した発熱物質を含まないDPBS中でのヒトIL-18 40 μ Lによって行い、最終追加免疫はマウス1匹当たりアジュバントを含まず発熱物質を含まないDPBS中のヒトIL-18 40 μ gで行った。このプロトコールでは、動物を第0、4、8、11、17、21、25および35日に免疫化した。第39日に融合を行った。上記の免疫化後、マウスを屠殺し、鼠径リンパ節および腰リンパ節を回収した。

【0195】

実施例2.2.B: ハイブリドーマの形成

組織破砕機を用い、実施例2.2.Aに従って得た鼠径リンパ節および腰リンパ節の機械的攪乱によってリンパ球を放出させ、CD90陰性選択によってT細胞枯渇とした。洗浄した豊富化B細胞およびATCCから購入した非分泌性骨髓腫P3X63Ag8.653細胞(カタログ番号CRL1580; Kearney et al., J. Immunol., 123, 1979, 1548-1550)を1:1の比率で混合することで、ハイブリドーマ融合を行った。細胞混合物について、800gでの遠心によって温和なペレット化を行った。上清を完全に除去した後、細胞を、2分以内にプロナーゼ溶液(Call Biochem, San Diego, CA; カタログ番号53702; 0.5mg/mLのPBS溶液)2~4mLで処理した。次に、FBS 3~5mLを加えて酵素活性を停止し、電気細胞融合溶液ECFS(0.3Mショ糖、Sigma-Aldrich, St Louis, MO、カタログ番号S7903、0.1mM酢酸マグネシウム、Sigma、カタログ番号M2545、0.1mM酢酸カルシウム、Sigma-Aldrich, St Louis, MO、カタログ番号C4705)を用いて、得られた懸濁液を総容量40mLに調節した。遠心後に上清を除去し、細胞をECFS 40mLに再懸濁させた。この洗浄段階を繰り返し、細胞を再度、細胞 2×10^6 個/mLの濃度までECFSに再懸濁させた。融合発生装置ECM2001型(Genetronic, Inc., San Diego, CA)を用いて、電気細胞融合を行った。使用した融合チャンバの大きさは2.0mLであり、用いた装置設定は、アラインメント条件: 電圧: 50V、時間: 50秒; 膜破壊: 電圧: 3000V、時間: 30秒; 融合後保持時間: 3秒であった。

【0196】

融合後、細胞を、ハイブリドーマ融合培地: 0.5XHA(Sigma-Aldrich, St Louis, MO; カタログ番号A9666)を含み、L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、OPI(オキサロ酢酸、ビルビン酸、ウシインシュリン)(いずれもSigma)およびIL-6(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)を補充したDMEM(JRH Biosciences)、15%FBS(Hyclone)に再懸濁させて、37および10%CO₂/空気で培養した。細胞を、細胞 4×10^4 個/ウェルで平底96ウェル組織培養プレートにて平板培養した。培養をハイブリドーマ融合培地に2週間維持してから、ハイブリドーマ培地: DMEM(JRH Biosciences, Lenexa, KS)、15%FBS(Hyclone, Logan, Utah)に移し、L-グルタミン、ペニシリン/スト

レプトマイシン、OPI（オキサロ酢酸、ピルビン酸、ウシインシュリン）（いずれもSigma）およびIL-6（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）を補充した。0.5XHAハイブリドーマ融合培地での生存によってハイブリドーマを選択し、ハイブリドーマを含むウェルからの上清について、ELISAによって抗原反応性のスクリーニングを行った。このELISA様式では、抗原コーティングプレート（ヒトIL-18コーティングプレート）上での上清のインキュベーションおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識マウス抗-ヒトIgGを用いたヒト抗ヒトIL-18結合抗体の検出を行い、次に抗原コーティングプレート（ヒトIL-18コーティングプレート）上での上清のインキュベーションおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識マウス抗-ヒトγおよびκ鎖を用いたヒト抗ヒトIL-18結合抗体の検出を行う並行した2組のELISAによって全ての陽性サンプルを確認した。

10

【0197】

クローニングは、限定希釈平板培養を用いて、選択された抗原陽性ウェルで行った。単一コロニー成長の存在に関してプレートを肉眼で調べ、次に上記の抗原特異的ELISAによって単一コロニーウェルからの上清のスクリーニングを行った。ルミネックス（Luminex）装置を用いる多重ELISAによって、高反応性クローンのアッセイを行って、ヒトγおよびκ鎖の純度を検証した。

【0198】

実施例2.2.C：ゼノマックス技術

別法として、実施例2.2.Bで得られたリンパ球について、ゼノマックス抗体選択技術を規定する選択的リンパ球抗体形成法（SLAM）を行った（Abgenix, Inc., Fremont, CA）。単一B細胞を、96ウェルプレートで平板培養し、所望の抗原（ヒトIL-18）に対するヒトモノクローナル抗体を産生するB細胞を、ブランク形成細胞アッセイ（Babcock, J.S., Leslie, K.B., Olsen, O.A., Salmon, R.A., and Schrader, J.W. Isolation of functional antibody genes from single lymphocytes of defined antigen-specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843-7848, 1996）によって確認し、VHおよびVkリーダー配列の5'プライマーおよびヒトCyおよびCκに特異的な3'プライマーを用いる単離B細胞の単一細胞RT-PCRによってIgG遺伝子をクローニングした。得られた組換えIgG遺伝子を、実施例2.2.Eおよび2.2.Gに記載の方法に従って、哺乳動物細胞で発現させた。

20

30

【0199】

実施例2.2.D：抗IL-18抗体の確認

実施例2.2.Bおよび2.2.Cに従って形成したIL-18に結合した抗体を産生するハイブリドーマおよびB細胞を、ビオチン化IL-18ELISAを用いて特定した（実施例2.1.A参照）。次いで、IL-18に結合した抗体を含むハイブリドーマおよびB細胞上清について、実施例1.1.Aに従って行うKG-1パイオアッセイで、IL-18中和能力について調べた。中和抗IL-18抗体（ハイブリドーマおよびSLAM手法から）を哺乳動物発現ベクターにサブクローニングし、COS細胞で発現させ、精製し、KG-1パイオアッセイで再度調べた（表5参照）。

40

【0200】

【表 5】

表5:KG-1ハ'イアツセイでの抗IL-18HuMAbの中和能力

HuMAb#	KG-17ツセイ(IC ₅₀ M)
	NEM-rhIL-18
ハイブ'リト'-マ	
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	

10

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

20

30

表 5 中の抗体の可変領域は表 1 に記載してある。

【0201】

実施例 2 . 2 . E : 中和抗 I L - 1 8 H u M A b 類の哺乳動物発現ベクターへのサブクローニング

製造者の指示に従って、CMVプロモーターの制御下に、抗体の重鎖および軽鎖の遺伝子を pCDNA (Invitrogen, Carlsbad, Ca) ベクターにクローニングした。ヒトゲノム γ - 2 配列および κ 配列を有するこれらのプラスミドを用いて、当業界で公知の標準的な条件を用いて各クローンに相当する重鎖および軽鎖での電気穿孔法によって、COS細胞を同時トランスフェクションした。

40

【0202】

グルタミンを補充した血清を含まない DMEM 中で 72 時間にわたり、細胞を回収、増殖および抗体分泌させた。培養上清を回収し、遠心および濾過によって清澄化し、タンパク質 A 樹脂上に乗せた。カラムを PBS で洗浄し、抗体を低 pH 緩衝液で溶出し、1 M Tris 溶液で直ちに中和した。抗体調製物をアミコン (Amicon) - 30 スピンフィルター上で PBS で緩衝液交換した。抗体の濃度および純度を、OD 280 でのスペクトル測定および SDS - PAGE によって分析してから、IL - 18 中和能力について調べた。

【0203】

50

COS細胞中でヒト抗体の発現レベルを高めるため、一部の抗体の重鎖および軽鎖を伸長因子プロモーターの制御下にベクターpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic acids Research Vol 18, 17) にサブクロニングした。

【0204】

簡単に述べると、重鎖可変領域のPCRプライマーを、これらがIgGシグナルペプチドおよびヒトIgG1定常領域の配列[野生型(配列番号2)または不活性突然変異体(配列番号3)]を含むカセットpEF-BOSプラスミドに挿入できるような形で設計した。正V_HPCRプライマーは、シグナルペプチドのヌクレオチド配列の場合と同様に、制限部位NruIを含んでいた。逆V_HPCRプライマーは、やはり操作されてγ-1Fc配列の5'末端となったSalI制限部位を含んでいた。V_HPCR断片をNruI/SalIで消化させ、pEF-BOSヒトIgG1野生型またはpEF-BOSヒトIgG1突然変異体構築物にクロニングした。全軽鎖遺伝子を、HindIII制限消化、突出部分のT4ポリメラーゼ充填、それに続くNotI消化によってpCDNAベクターから既存のκフォーマット中のpEF-BOSベクターに移動させた。これらの平滑/NotI軽鎖断片を、SrfI/NotI消化pEF-BOSベクターにクロニングした。

10

【0205】

抗体のV_HおよびV_L領域を、最初のハイブリドーマ系からクロニングした。RNAを抗体産生細胞から得て、上記の方法で設計したプライマー、すなわちV_HのNruI/SalIプライマーおよびV_LのNruI/BsiWIプライマーを用いてRT-PCRを行った。全長IgG1およびκ鎖を集合させてカセットベクターとした。

20

【0206】

選択された抗体をさらに修飾した。天然抗体は、重鎖および/または軽鎖NH₂末端としてグルタミン(Q)またはグルタミン酸(E)のいずれかを有する。NH₂末端としてQを有する抗体の産生によって、グルタミン残基のグルタミン酸への環化によるNH₂末端不均一化が生じる。従って、一部の抗体におけるNH₂末端でのグルタミン残基が突然変異を起こしてグルタミン酸となった。Fc部分のヒンジ領域における2つの残基、すなわちロイシン234およびロイシン235も突然変異を起こして、抗体のエフェクター機能を防止した。すなわち、ロイシン234およびロイシン235をそれぞれ、標準的な分子生物学的技術を用いてアラニン残基に置き換えた(Lund, J. et al., J. Immunology (1991) 147: 2657-2662; ウィンター(Winter)らの米国特許第5648260号; 5624821号; 5624821号)。これらのFc変異抗体は(mg1)と称した。これらの突然変異体については、下記の実施例2.2.J6でさらに特性決定する。

30

【0207】

実施例2.2.F: 特定の中和抗IL-18抗体の特性決定

異なる生殖系列配列を有するいくつかの組換え抗ヒトIL-18抗体を哺乳動物細胞で産生させ、精製し、各種アッセイで機能的に特性決定した(表6参照)。

【0208】

40

【表 6】

表6: いくつかの抗IL-18抗体のインビトロ抗原結合、細胞アッセイおよび骨格配列の特徴

抗体	方法 ^a	ヒト $\gamma\gamma^b$ (K _D , nM)	RBA (IC ₅₀ , nM)	KG-1 ^b (IC ₅₀ , nM)	WBA (IC ₅₀ , nM)	遺伝子ファミリー ^c 配列多様性	
2.5(E)mg1	ハイブリドーマ	0.31	2.38	0.20	3	VL-L2	VH5-51
2.5(E)wtg1	ハイブリドーマ	0.40	2.38	0.30	3	VL-L2	VH5-51
215(E)mg1 ^d	ヒトマウス	0.23	1.17	0.17	3	VL-A27	VH4-31
444(Q)mg1 ^d	ヒトマウス	1.61	2.49	0.13	1	VL-A27(7)	VH4-31(1)
581(E)mg1 ^d	ヒトマウス	2.00	1.28	1.3	3	VL-A2	VH3-30
2.3.1(E)wtg1	ハイブリドーマ	0.23	0.20	0.63	2	VL-02	VH4-59
2.13.1(E)wtg1	ハイブリドーマ	0.20	0.20	0.12	2	VL-A27(8)	VH4-31(18)

【0209】

NEM-cys 保護 rhIL-18 を用いた。

【0210】

括弧内の数字は、生殖系列配列に最も近い (close) クローンからのアミノ酸における差を示す。

【0211】

実施例 2.2.G: 2.5(E)mg1 を産生する CHO 細胞系の形成

2.5(E)mg1 抗体を発現する安定な CHO 細胞系を、下記に記載の手順に従って形成した。

【0212】

実施例 2.2.G1: 発現ベクターの構築プラスミド pA510 を、哺乳動物細胞系での抗体の高レベル発現用に構築した。この pUC19 由来プラスミドは、複製の大腸菌 ColE1 起源およびアンピシリン抵抗性の β -ラクタマーゼ遺伝子を含んでいた。

【0213】

すなわち、2.5(E)mg1 抗体の V_H および V_L 領域に相当する cDNA を、標準的な分子生物学的技術を用いてクローニングし、それぞれ突然変異ヒト γ -1 およびカップ定常領域遺伝子に融合させて、天然全ヒト IgG1 / カップ抗体をコードする DNA が産生されるようにした。これらの DNA を発現構築物 pA510 に導入した。得られたプラスミドは、5' - CMV エンハンサー、アデノウイルス主要後期プロモーター、ヒト免疫グロブリンシグナルペプチド、2.5(E)mg1 重鎖免疫グロブリン可変領域、ヒト γ -1 免疫グロブリン定常領域、SV40 ポリアデニル化配列、ヒトガストリン転写終止配列、複製の SV40 起源 (SV40 プロモーター / エンハンサー)、マウスジヒドロ葉酸レダクターゼ配列、単純疱疹ウイルスからのチミジンキナーゼポリアデニル化配列、CMV エンハンサー、アデノウイルス主要後期プロモーター、ヒト免疫グロブリンシグナルペプチド、2.5(E)mg1 軽鎖免疫グロブリン可変領域、ヒト免疫グロブリンカップ定常領域および SV40 ポリアデニル化配列 - 3' という遺伝子またはその順序での調節要素の配列 (pUC19 を除く) を含んでいた。このコード領域を、抗体遺伝子転写を促進する強力なウイルスプロモーターから下流に挿入した。このベクターは、マウス DHF

R 遺伝子の発現もコードしており、これはヌクレオシド非存在下での培養で成長する能力を有することで、形質転換細胞の選択が可能となった。

【0214】

実施例 2.2.G2: 発現ベクターの親細胞系へのトランスフェクション

ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子の発現が欠損している細胞系 CHO DUX B11. (Urlaub, G. and Chasin L. A., Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220 (1980)) を用いて、実施例 2.2.G1 に記載の発現ベクターのトランスフェクションを行った。CHO DUX B11 細胞を、下記の変更を加えた当業者に公知のリン酸カルシウム沈澱法を用いてベクターでトランスフェクションした (Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel, F. V., Brent, R., Moore, D. M., Kingston, R. E., Seidman, J. G., Smith, J. A., and K. Struhl eds; Wiley Interscience, N. Y., N. Y. (1990))。プレートを吸引し、F12 培地 9 mL を各プレートに加えた。プレートを 37 で 2 時間インキュベートした。50 mL 円錐管中、DNA 150 μ g を、水 2.7 mL に溶かした。2.5 M CaCl_2 300 μ L を加え、その DNA 混合物を 1 回 1 滴で、50 mL 円錐管に入った 2 $\times$ He p e s 緩衝生理食塩水 (HeBS) 3 mL に加えた。

10

【0215】

得られた混合物を 5 秒間渦攪拌し、室温で 20 分間インキュベートした。各プレートに 1 mL を均等に分配し (やはり F12 中)、プレートを 37 で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを吸引し、10% DMSO の F12 溶液 2 mL を各プレートに加えた。DMSO ショックを 1 分間続けてから、各プレートにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 5 mL を加えることで DMSO を希釈した。プレートを吸引し、PBS でさらに 2 回洗浄した。ヌクレオシドを含むギブコ (Gibco) アルファ MEM 10 mL を加え、プレートを 37 で終夜インキュベートした。翌日、培地を 5% 透析ウシ胎仔血清 (FBS) を含むぬ呉市度を含まないギブコアルファ MEM に変え、6 時間後に細胞を下記のように 96 ウェルプレートに接種した。10 cm プレートからの細胞をトリプシン消化を用いて回収し、5% 血清を含みヌクレオシドを含まないギブコアルファ MEM 総量 300 mL に再懸濁させた。20 個の 96 ウェルプレートを、10 mL / プレート、100 L / ウェルで接種した。同じ培地 100 mL を残った細胞 100 mL に加え、さらに 20 個の 96 ウェルプレートを上記の方法で接種した (これは 2 回目の希釈であった)。96 ウェルプレートで 1 週間後に培地を変え、それから 1 週間後にも再度変えた。ヌクレオシドを含まないアルファ MEM 培地を用いて、DHFR を発現する細胞、従って発現ベクターを選択した。

20

30

【0216】

実施例 2.2.G3: 2.5 (E) mg 1 産生細胞の選択

トランスフェクション CHO 細胞からの培養上清について、ヒト IgG に特異的な ELISA を用いて分泌抗体 2.5 (E) mg 1 の存在を調べた。1 組の CHO トランスフェクタントについてヒト抗体の発現をスクリーニングし終わったら、追加の選択を用いて、CHO ゲノムに組み込まれた発現ベクターのコピー数が増幅された細胞を単離した。増幅系の選択には、薬剤メトトレキセート (MTX) を用いた。MTX 存在下に増殖させた培養物について、免疫グロブリンの産生能を調べた。MTX 感受性の祖先より多くの抗体を発現した MTX 抵抗性系を、より高濃度の MTX での別の選択サイクルで取り、免疫グロブリン産生を調べた。CHO 細胞を発現する 2.5 (E) mg 1 を 1 リットルまたは 1.5 リットルのバイオリアクタで培養し、抗体の収量を 2 週間の試験で約 1.0 g / リットルと測定した。

40

【0217】

実施例 2.2.H: CHO 細胞由来 2.5 (E) mg 1 の物理化学的特性決定

CHO 由来 2.5 (E) mg 1 の予備的な物理的・化学的特性決定を行った。The 2

50

・ 5 (E) m g 1 の実験的に測定した分子量は、約 1 4 9 k D a であり、理論上の分子量と良好な一致があった。ペプチドマッピング技術 (K B i e m a n n A n n u . R e v . B i o c h e m . 1 9 9 2 6 1 9 7 7 - 1 0 1 0 ; D A . L e w i s A c c e l e r a t e d A r t i c l e s , A n a l . C h e m . 1 9 9 4 , 6 6 , 5 8 5 - 5 9 5) を用いて、 2 . 5 (E) m g 1 が軽鎖および重鎖の両方に正しい N 末端を有していることを確認した。 2 . 5 (E) m g 1 分子の 9 9 % が重鎖カルボキシ末端でリジンを持たないことから、重鎖 C 末端の変動性は非常に小さかった。各 2 . 5 (E) m g 1 重鎖は、オリゴマンノースおよび複合体を有する単一の N 連結グリコキシル化部位、 0 、 1 または 2 個の末端ガラクトース残基を有するフコシル化ビナテナリ (b i n a t e n n a r y) 構造を有していた。

10

【 0 2 1 8 】

実施例 2 . 2 . I : C H O 細胞由来 2 . 5 (E) m g 1 の溶解性および安定性

精製 2 . 5 (E) m g 1 は、最低 4 週間にわたり、p H 5 、 6 および 7 緩衝液中にて少なくとも 6 2 m g / m L まで可溶であった。これらの緩衝液中 3 7 ° C での 2 . 5 (E) m g 1 を用いた加速安定性試験を行って、安定性を示すアッセイおよび至適な長期保管 p H を確認した。粒径排除 H P L C および S D S - P A G E による分析用にサンプルを週 1 回の間隔で取って、凝集および断片化、 S - S 結合検出用の L C - M S / M S ペプチドマッピング、抗原 - E L I S A および / または活性測定のための細胞に基づくバイオアッセイおよびカチオン交換 H P L C および電荷不均一性測定のための イソ - A s p 定量の試験を行った。 S E C (粒径排除クロマトグラフィー) 、 S D S - P A G E およびカチオン交換クロマトグラフィーによるサンプルの予備分析で、これら 3 つのアッセイのいずれも安定性を示すことが明らかになったことから、 2 . 5 (E) m g 1 は約 p H 6 で比較的安定である。

20

【 0 2 1 9 】

実施例 2 . 2 . J : C H O 細胞由来抗 I L - 1 8 H u M A b 、 2 . 5 (E) m g 1 の特性決定

実施例 2 . 2 . J 1 : I L - 1 8 動物特異性

2 . 5 (E) m g 1 がヒト、カニクイザル、マウス、ラットおよびイヌからの I L - 1 8 に結合および / または中和する能力を評価した。製造者の指示に従ったピアコアアッセイ (実施例 2 . 1 . B 参照) を用いて、 2 . 5 (E) m g 1 が成熟ヒト I L - 1 8 に結合するが、マウス I L - 1 8 には結合しないことが明らかになった。さらに、免疫沈澱データから、 2 . 5 (E) m g 1 がカニクイザル I L - 1 8 に結合するが (c y n o I L - 1 8 の $I C_{50} = 9 . 1 E \times 10^{-11}$) 、イヌおよびラットの I L - 1 8 には結合しないことが明らかになった。 2 . 5 (E) m g 1 は、ヒトおよびカニクイザル I L - 1 8 生理活性を同様に機能的に中和したが、イヌ、ラットおよびマウス I L - 1 8 の阻害は全く認められなかった。

30

【 0 2 2 0 】

実施例 2 . 2 . J 2 : ヒトサイトカイン特異性

2 . 5 (E) m g 1 の I L - 1 8 に対する特異性を、製造者の指示に従ったピアコアアッセイを用いて評価した (実施例 2 . 1 . B 参照) 。 2 . 5 (E) m g 1 抗体をバイオセンサーチップで捕捉し、これが、溶液における一連の公知ヒトサイトカインに結合する能力を測定した。表 7 に示したように、 2 . 5 (E) m g 1 は組換えヒト成熟 I L - 1 8 およびプロ - I L - 1 8 に結合した。これとは対照的に、 2 . 5 (E) m g 1 は、 I L - 1 ファミリーの構成員である I L - 1 α および I L - 1 β などの他の調べた 2 3 種類のヒトサイトカインのいずれにも結合しなかった。

40

【 0 2 2 1 】

【表 7】

表7: 2.5(E)mg1によるサイトカイン結合のビアコア分析

可溶性組換えヒトサイトカイン(1 μ M)	捕捉2.5(E)mg1 (25 mg/mL)
	2.5(E)mg1結合
IFN γ	-
IL-1 α	-
IL-1 β	-
他のサイトカイン ^a	-
IL-18 ^b	+
マウス-IL-18	+

10

【0222】

^a 結合について調べた別のサイトカインは、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 α 1 β 2およびLT α 2 β 1などであった。

20

【0223】

2.5(E)mg1は、これらのサイトカインのいずれにも結合しなかった。

【0224】

システイン>アラニン突然変異体BV由来組換えヒトIL-18

実施例2.2.J3: 親和性測定

表8に、製造者の指示によるピアコアアッセイを用いて測定した2.5(E)mg1の*in vitro* IL-18結合特性を示してある。2.5(E)mg1抗体は高いオン速度、低いオフ速度を有し、全体の親和性は0.196nMであった。2つの基準IL-18拮抗薬(125-2HおよびIL-18結合タンパク質)の動力学的速度パラメータを比較のために示している。

30

【0225】

【表 8】

Table 8 2.5(E)mg1および基準試薬のIL-18結合特性

試薬	ビアコアパラメータ		
	オン速度 ($\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	オフ速度 ($\times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)	K _D (nM)
2.5(E)mg1 ^a	268	52.4	0.196
マウス抗ヒトIL-18(125-2H) ^b	190	110	0.550
IL-18BP-Fc ^c	140	26	0.190

40

(4C/A)-HuIL-18はビアコアで調べた。

^b -125-2H、中和マウス抗ヒトIL-18IgG1mAb

^c -IL-18BP-Fc、天然IL-18拮抗薬のFc融合

【0226】

実施例2.2.J4: *in vitro* IL-18中和能力

50

KG-1 バイオアッセイ、受容体結合アッセイ (RBA) およびヒトWBAで、2.5 (E) mg 1 のインビトロ中和能力を求めた (実施例 1.1.A ~ 1.1.C 参照)。表 8 に示したように、2.5 (E) mg 1 抗体は、組換え (KG-1 および RBA) および天然 IL-18 (WBA) の両方を中和し (IC₅₀ は KG-1 で < 0.5 nM、RBA で < 2 nM および WBA で < 5 nM)、IL-18 結合親和性と一致している。

【0227】

【表 9】

表8:2.5(E)mg1および基準試薬の中和能力

試薬	インビトロでの中和能力(IC50, nM)		
	KG-1 ^a	RBA ^b	WBA ^c
2.5(E)mg1	0.2	2.4	3.0
マウス抗ヒトIL-18mAb (125-2H)	0.2	>300 ^d	3.0
IL-18BP-Fc	0.03	1.0	5.7
抗-IL-18R mAb (M-840)	1.5	1.7	2.7

^b KG-1 バイオアッセイ、平均値

^c このアッセイでは(4C/A)-huIL-18を用いた。

^d 受容体結合アッセイ

【0228】

4 ~ 6 名の個人供血者でのヒト全血アッセイ。平均値を示している。

【0229】

125-2H は、受容体結合を阻害しないにも拘わらず、IL-18 生理活性を中和する。

【0230】

実施例 2.2.J5:2.5 (E) mg 1 のインビトロ中和能力

2.5 (E) mg 1 がインビボでの炎症環境で天然ヒトIL-18 誘発 IFN γ を中和する能力を評価するため、ヒトPBMCをマウスに注射し、細胞をインビボで刺激してヒトIL-18を産生させた重度複合免疫不全(SCID)マウスモデルを用いた(HuPBMC-SCIDモデル)。結果(表9)から、2.5 (E) mg 1 が、いずれの投与経路によっても、明瞭な用量-応答で、インビボにてヒトIL-18 依存性ヒトIFN γ 産生を阻害することがわかった。2.5 (E) mg 1 のED₅₀ は、腹腔内投与または静脈投与により、それぞれ約1 μ g または0.1 μ g / マウス (= 0.05 mg / kg または0.005 mg / kg) であった。

【0231】

10

20

30

40

【表 1 0】

表9A:HuPBMc-SCIDマウスモデルでの腹腔内投与2.5(E)mg1のインビキンの効力

群	huIFNg (pg/ml)	阻害%
2.5(E)mg1 0.025 µg/マウス	70 ± 17	61
2.5(E)mg1 0.25 µg/マウス	112 ± 29	36
2.5(E)mg1 2.5 µg/マウス	36 ± 10	80
2.5(E)mg1 25 µg/マウス	10 ± 8	94
2.5(E)mg1 250 µg/マウス	3 ± 2	98
未処置	193 ± 59	
HuIgG 対照 250 µg/マウス	177 ± 33	

10

【0 2 3 2】

【表 1 1】

表9B:HuPBMc-SCIDマウスモデルでの静脈投与2.5(E)mg1のインビキンの効力

群	huIFNg (pg/ml)	阻害%
2.5(E)mg1 0.025 µg/マウス	156 ± 45	36
2.5(E)mg1 0.25 µg/マウス	27 ± 9	89
2.5(E)mg1 2.5 µg/マウス	36 ± 8	85
2.5(E)mg1 25 µg/マウス	11 ± 6	96
2.5(E)mg1 250 µg/マウス	4 ± 2	98
未処置	279 ± 26	
HuIgG 対照 250 µg/マウス	245 ± 22	

20

30

【0 2 3 3】

実施例 2 . 2 . J 6 : エフェクター機能

抗体のFc部分は、サイトカイン誘発、抗体依存性細胞介在細胞傷害性(ADCC)、食作用、補体依存性細胞傷害(CDC)ならびに抗体および抗原-抗体複合体の半減期/クリアランス速度などのいくつかの重要なエフェクター機能に介在する。場合によっては、これらのエフェクター機能は治療抗体には望ましいものであるが、治療目的によっては他の場合には不必要であったり、有害である場合もあると考えられる。ある種のヒトIgGアイソタイプ、特にIgG1およびIgG3は、それぞれFcγR類および補体C1qへの結合を介してADCCおよびCDCに介在する。新生児Fc受容体(FcRn)が、抗体の循環半減期を決定する必須の成分である。

40

【0 2 3 4】

2.5(E)mg1でのL234AおよびL235A突然変異は、2.5(E)wtg1と比較して2.5(E)mg1HuMAbの全体的な親和性や中和能力には影響しなかった(表10)。しかしながら予想通り、これらの突然変異は、FcγRおよびC1qへの結合を消滅させた。

【0 2 3 5】

【表 1 2】

表10:残基L234およびL235のアニンへの突然変異は、2.5(E)mg1の親和性および中和能力に影響しない。

Ab	反応速度パラメータ			KG-1 ^h イファセリ
	初速度 ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	初速度 ($\times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)	K_D (nM)	IC_{50} (nM)
2.5(E)wtg1	281	47.8	0.170	0.4
2.5(E)mg1	268	52.4	0.196	0.2

10

【0 2 3 6】

実施例 2 . 2 . J 6 . 1 : F c γ R I 結合

ヒト F c γ R I (C D 6 4) は、I g G 1 免疫複合体 (K D 1 E - 8 - 1 E - 9 M) に対して比較的高い親和性を有する。これは、単球およびマクロファージならびに U 9 3 7 などの多くの骨髄細胞系上で発現される。2 . 5 (E) w t g 1 および 2 . 5 (E) m g 1 の U 9 3 7 細胞への結合を、蛍光活性化細胞分類 (F A C S) によって測定した (C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y , V o l (1) 5 . 3 . 1 , E d i t e d b y J . E . C o l i g a n e t . a l . , P u b l i s h e d b y J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , 2 0 0 2) 。得られたデータ (表 1 1 参照) は、2 . 5 (E) w t g 1 が U 9 3 7 細胞に結合するが、予想通り、2 . 5 (E) m g 1 は結合しないことを示していた。この結合に F c γ R I が介在していることを確認するため、マウス抗 h F c γ R I 阻止抗体 (1 0 . 1) を用いて、競争実験を行った。得られた結果は、抗体 1 0 . 1 が下記の試験濃度で用量依存的に 2 . 5 (E) w t g 1 の U 9 3 7 細胞への結合を遮断することから、2 . 5 (E) w t g 1 が U 9 3 7 細胞上の F c γ R I に結合することを示していた。

20

【0 2 3 7】

【表 1 3】

表11:2.5(E)wtg1と比較して、2.5(E)mg1がU937細胞上のFc γ RIに結合しないことを示している(データはMFI±標準偏差として示した)。

30

抗体濃度 (μM)	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

【0 2 3 8】

実施例 2 . 2 . J 6 . 2 : F c γ R I I 結合

ヒト F c γ R I I (C D 3 2) は、I g G 1 免疫複合体 (K D 1 E - 5 - 1 E - 7 M) に対して比較的低い結合親和性を有する。生理的条件下では、これは活性化に多重免疫複合体の形成を必要とする。F c γ R I 、 I I もしくは I I I に特異的なフルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 標識抗体およびフローサイトメトリーによる検出を用いて、本発明者らは、K 5 6 2 細胞上の F c γ R I I の発現を検証し、この細胞系を F c γ R I I 結合アッセイに用いた。モノマー 2 . 5 (E) w t g 1 の K 5 6 2 細胞への結合は非常に弱いものであった。従って、抗カップリング抗体を用いて I g G 1 分子を予備架橋することで多重免疫複合体を模倣させ、K 5 6 2 細胞上の F c γ R I I に対するこれらの結合を調べた。架橋後、2 . 5 (E) w t g 1 は K 5 6 2 細胞に結合したが、架橋後であっても 2 . 5 (E) m g 1 が示す結合は、存在してもごくわずかであった (表 1 2) 。抗 F c γ R I I 抗体、クローン I V 3 は、2 . 5 (E) w t g 1 の結合を遮断したことから、2 . 5 (E) w t g 1 の K 5 6 2 への結合には F c γ R I I が介在していた。

40

50

【 0 2 3 9 】

【 表 1 4 】

表12: 架橋後のK562細胞上のFcγRIIへの2.5(E)wtg1および2.5(E)mg1の結合
(データはMFI±標準偏差として示した)

抗体濃度 (μM)	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

10

【 0 2 4 0 】

実施例 2 . 2 . J 6 . 3 : C 1 q 結 合

従来の経路による補体活性化および細胞溶解は、IgG分子のFc部分へのC1qの結合を介して活性化される。C1qの2.5(E)wtg1および2.5(E)mg1への結合を、当業界で公知の標準的なELISA技術を用いて測定した(Hezareh, M., et al., (2001) J. Virology, 75 (24): 12161 - 12168)。2.5(E)wtg1および2.5(E)mg1HuMAbを、プラスチックプレート上にコーティングし、次にヒトC1qとともにインキュベートした。結合したC1q分子を、ヤギ抗ヒトC1qおよびウサギ抗ヤギIgGアルカリ性リン酸塩接合体の混合物によって検出した。結果から、2.5(E)wtg1がC1qに結合するが、2.5(E)mg1は結合しないことが明らかになった(表13)。

20

【 0 2 4 1 】

【 表 1 5 】

表13: ELISAにより、2.5(E)wtg1と比較して、2.5(E)mg1がC1qに結合しないことを示している(データはOD₄₀₅±標準偏差として示した)。

C1q 濃度 (μg/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

30

【 0 2 4 2 】

実施例 2 . 2 . J 6 . 4 : 新生児 Fc 受容体 (FcRn) 結 合

内皮細胞でのIgGと新生児Fc受容体(ブランブル受容体とも称される)との相互作用が、IgG性質制御系およびIgG類の長い半減期の非常に重要な決定基であることが提案されている[Ghetie, V., et al (1997) Nat. Biotechnol. 15: 637 - 640]。飲細胞作用および細胞内空胞中のFcRnへの良好な結合によって取られたIgG分子は循環に戻る。FcRnに結合しないIgG分子は分解される。

40

【 0 2 4 3 】

FcRn結合におけるヒトIgGの必須の残基は、CH2-CH3ドメインの接合部にマッピングされている(Kim J. K., et al (1999) Eur. J. Immunol. 29: 2819 - 2825)。重要な点として、これらのFcRn結合残基は、ヒトとマウスの免疫グロブリン間で保存され、ヒト免疫グロブリンがマウスFcRnに結合して、マウスでの構造活性相関試験が可能となる。

【 0 2 4 4 】

L234AおよびL235A突然変異のFcRn結合に対する効果を調べるため、インビトロでの野生型2.5(E)wtg1および突然変異体2.5(E)mg1のFcRnへの結合を、FcRn発現CHO細胞系を用いて測定した。2.5(E)wtg1および2.5(E)mg1を、pH6.5でFcRn発現CHO細胞とともにインキュベートし

50

、次にF I T C接合抗ヒトI g G (2 ° A b) とともにインキュベートした。細胞を洗浄し、F A C Sによって分析した。

【 0 2 4 5 】

5 0 0 n M濃度の2 . 5 (E) m g 1および2 . 5 (E) w t g 1は、0 . 5 n M濃度と比較して、F c R nに対する有意な結合を示し、細胞単独でのバックグラウンドと類似していた。

【 0 2 4 6 】

実施例 2 . 2 . K : マウスでの薬物動態

2 . 5 (E) m g 1の薬物動態 (P K) をスクリーニングマウス試験で評価して、2 . 5 (E) m g 1のF c γ RおよびC 1 qへの結合を防止するために導入されたF c突然変異 (L 2 3 4 A、L 2 3 5 A) が血清P Kプロファイルに悪影響を与えたか否かを決定した。マウスF c R nはマウスおよびヒトI g Gと同等に結合したことから、このマウスを、マウスでの構造活性相関試験における妥当な動物として使えた (O b e r , R . J . , e t a l (2 0 0 1) I n t . I m m u n o l . 1 3 : 1 5 5 1 - 1 5 5 9) 。マウスでは、2 . 5 (E) m g 1の末端半減期は1 2日間と推算された。同様の試験で、他のヒトモノクローナル抗体の半減期は1 0 ~ 1 4日間であった。

10

【 0 2 4 7 】

0 . 2 m g (1 0 m g / k gの平均と同等) の単回静脈投与後の雌マウス (J a c k s o n L a b s、C 5 7 B L / 6 n) で、2 . 5 (E) m g 1の薬物動態を評価した。合計2 4匹のマウスに投与を行い、3検体を各マウスから採取した。このサンプリング法を7日間に拡大した。2 . 5 (E) m g 1は、分布相とそれに続く排出相を示した。分布および排出半減期推定値は、2つのコンパートメントオープンモデルに基づいて約1 . 6時間および1 2日間であった (表 1 4) 。

20

【 0 2 4 8 】

【 表 1 6 】

表14: マウスでの単回静脈投与から得られる2.5(E)mg1の主要な薬物動態パラメータのまとめ

t _{1/2α} (hr)	t _{1/2β} (日)	C _{max} (g/mL)	CL (mL/hr)	V _{ss} (mL)	V ₁ (mL)	V ₂ (mL)	MRT (days)	AUC (hr*μg/mL)
1.58	12.2	63.2	0.0162	6.82	3.15	3.67	17.5	12250

30

【 0 2 4 9 】

疾患モデル

実施例 2 . 2 . L : 疾患モデルでの抗 I L - 1 8 抗体の効果

実施例 2 . 2 . L . 1 : 抗 m u I L - 1 8 m A b による L P S 誘発 I F N γ 産生の阻害

L P S 誘発 I F N γ 産生は、I L - 1 8 発現に依存している (G h a y u r , T . , e t a l , 1 9 9 7 . N a t u r e 3 8 6 : 6 1 9 - 6 2 3) 。L P S 誘発 I F N γ 産生アッセイを用いて、9 3 - 1 0 C が i n v i v o で I L - 1 8 依存性 L P S 誘発 I F N γ 産生を阻害する効力を測定した。マウスに対して、単回静脈投与の9 3 - 1 0 C (5 0 μ g) を投与した。3 0 分後、マウスに L P S を負荷し (2 0 m g / k g) 、4 時間後に放血した。血清 I F N γ 力価を E L I S A によって測定した。表 1 5 に示したように、9 3 - 1 0 C は L P S 誘発 I F N γ 産生を約 7 0 % 阻害した。

40

【 0 2 5 0 】

【表 17】

表15:93-10Cによる、インビボでのLPS誘発IFN γ 産生の阻害

群	muIFN γ (pg/ml)	%阻害
Rat IgG 250 μ g/マウス	7239 $\pm$ 365	N/A
MBT 93-10C 250 μ g/マウス	2395 $\pm$ 711	67

【0251】

実施例 2.2.L.2:カラギーナン誘発足浮腫の阻害

IL-18は、炎症部位への好中球招集に関与している。カラギーナン誘発足蹠浮腫は、単球および好中球依存性の炎症モデルである。このモデルでの浮腫は、IL-18の生理活性を中和することで大きく阻害することができる (Leung, B. P., et al (2001) J. Immunol. 167: 2879-2886)。マウスに1C5 (400 μ g) (林原研究所、日本) または93-10C (100 μ g) (Medical and Biological Laboratories (MBL) Co., Watertown, MA) または対照抗体を投与し (腹腔内投与)、次に後足の足蹠にカラギーナン (皮下注射) を注射した。カラギーナン誘発浮腫を、1日1回で24~96時間にわたって測定した。1C5および93-10Cは、負荷後24時間~96時間でカラギーナン誘発浮腫を有意に抑制した (約50%阻害) (表16)。好中球浸潤の遮断に加えて、93-10Cは、このモデルでの炎症部位でTNF発現も遮断する (Leung, B. P., et al (2001) J. Immunol. 167: 2879-2886)。

【0252】

【表 18】

表16:カラギーナン誘発足浮腫のインビボでの抑制

カラギーナン 時間(時)	足腫脹における変化(mm)			
	24	48	72	96
125-2H @ 400	0.357	0.557	0.543	0.414
1C5 @ 400 μ g	0.214	0.300	0.286	0.200
Rat IgG @ 100 μ g	0.300	0.500	0.550	0.450
93-10C @ 100 μ g	0.157	0.271	0.243	0.157
P<0.05と対照IgG				

【0253】

実施例 2.2.L.3:コラーゲン誘発関節炎

関節リウマチ (RA) は、関節の慢性炎症ならびに骨および関節軟骨の損失を特徴とする。RAは自己免疫疾患と考えられているが、関与する自己抗原は特定されておらず、疾患の正確な病因は不明である。コラーゲン誘発関節炎 (CIA) は、広く使用されるRAモデルであり、ヒト疾患と同様の組織病理学的特徴を有する (Bendele, A., et al (1999) Toxicol Pathol. 27: 134-142; Trentham, D. E. et al (1977) J. Exp. Med. 146: 857-868)。このモデルでは、遺伝的に感受性のマウスまたはラットを、完全フロイントアジュバント中、II型コラーゲン (CII) で免疫化する。得られた多発性関節炎は、軟骨の破壊、骨吸収、滑膜炎および関節周囲炎を特徴とする (Bendele, A., et al (1999) Toxicol Pathol. 27: 134-142)。DBA/1バックグラウンド上のIL-18KOマウスは、野生型マウスと比較して、CIAの発生率および重度の低下を示した (Wei, X. Q., et al (2000) J. Immunol. 166: 517-521)。

【0254】

10

20

30

40

50

C I A の病原における内因性 I L - 1 8 の役割を調べるため、マウス I L - 1 8 を中和するウサギポリクローナル I g G (B A 7 7) でマウスを処理した。初回刺激時から 1 4 日間投与した場合、B A 7 7 は疾患の発症を遅延させ、疾患の重度に有意な低下を生じた。B A 7 7 はまた、I g G 2 a 抗コラーゲン抗体の産生を有意に阻害した。これらの結果は I L - 1 8 K O マウスについて報告のものと類似しており、初期 C I A での重要な炎症誘発性サイトカインとしての I L - 1 8 の役割を確認するものである。

【 0 2 5 5 】

I L - 1 8 K O マウスおよび抗 I L - 1 8 I g G 処理野生型マウスからのデータは、I L - 1 8 が C I I 誘発一次 T 細胞活性化時に重要な炎症誘発の役割を果たすことを示している。C I A 発症時の I L - 1 8 の役割についての理解を深めるため、マウスを C I I で免疫化し、ラット I g G または 9 3 - 1 0 C による処理を、約 1 4 日目にかかる疾患発症の直前に開始した。9 3 - 1 0 C による処理で、対照ラット I g G と比較して、疾患の発症および重度に有意な遅延 / 低下が生じた (表 1 7)。これらのデータは、I L - 1 8 が T 細胞初回刺激だけでなく、C I I 特異的 T 細胞活性化後の関節炎発症応答の促進においても重要な因子であることを示している。

【 0 2 5 6 】

【 表 1 9 】

表17: 抗IL-18mAb93-10Cは、CIAの発症を遅延させ、その重度を低下させた。

治療	平均関節炎評点							
日数	11	12	13	14	15	16	17	18
ラットIgG @200 µg	0.00	0.13	0.13	0.13	0.27	0.53	1.20	1.20
93-10C @ 200 µg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.20	0.47
デキサメタゾン-21-P @1mpk	0.00	0.00	0.27	0.27	0.13	0.13	0.13	0.13
治療期間								
P<0.05 とラットIgG								

治療	平均関節炎評点							
日数	19	20	21	22	23	25	26	27
ラットIgG @200 µg	1.53	1.73	1.93	2.27	2.53	4.20	4.27	4.53
93-10C @ 200 µg	0.47	0.80	1.00	1.00	1.13	2.20	2.27	2.87
デキサメタゾン-21-P @1mpk	0.07	0.07	0.07	0.00	0.00	0.00	0.07	0.20
治療期間								
P<0.05 vs. Rat IgG								

【 0 2 5 7 】

実施例 2 . 2 . L . 4 : 敗血症性関節炎

I L - 1 8 は、敗血症性関節炎のマウスモデルの病因における重要な因子である。これは、R A のモデルとは考えられておらず、R A に関係する一部の炎症要素および病因を共有するものと考えられている。このモデルでは、生存グループ B 連鎖球菌 (G B S) を膝関節に注射することで疾患を誘発する。それに続く関節炎の重度は、I L - 1 0 および I L - 6 の全身レベルおよび局所レベルの両方に相関するが、T N F には相関しない (T i s s i L , , e t a l (1 9 9 9) I n f e c t . I m m u n o l . 6 7 : 4 5 4 5 - 5 0)。血清型 I V (G B S) 注射から 1 2 時間後という早期に関節で有意な I L - 1 8 レベルが検出され、その後 5 日後にピーク I L - 1 8 産生となった (1 C 5 処理で約 5 5 0 p g / m L、これに対して I g G 対照で約 3 0 p g / m L)。注射後第 5 日までに、血清で高 I L - 1 8 レベルが検出された (1 C 5 処理で約 1 8 0 p g / m L、これに対して I g G 対照で約 2 0 p g / m L)。

【 0 2 5 8 】

1 C 5 を G B S 投与の 1 時間前に注射した場合、第 2 日から第 1 0 日にかけて関節病変

の頻度に顕著な阻害があった（関節炎指数：1 C 5 処理で 1 . 0、それに対して I g G で 2 . 5）。さらに、1 C 5 処理によって、I L - 6 および I L - 1 β などの関節でのサイトカインレベルに有意な低下も生じた（データは示していない。）。

【0259】

実施例 2 . 2 . L . 5 : S L E

狼瘡の最も研究されているモデルでは、重度の糸球体腎炎、自己抗体産生（抗 D N A、抗 R N P など）、脾腫、リンパ節腫脹およびある程度の関節炎および血管炎を伴う狼瘡様症候群を自然に発症するマウスの系統（M R L / l p r および N Z B / N Z W F 1）を用いる。腎臓の関与が通常は 3 ~ 5 月齢で認められ、急速に進行し、6 ~ 10 ヶ月までに致死となる。両方のマウス系統について広範囲に調べられて、臨床的疾患についての知見が得られている。

10

【0260】

N Z B / N Z W F 1 (B / W) マウスモデル (T h e J a c k s o n L a b o r a t o r y , M a i n e , U S A) を、狼瘡様疾患進行に対する外来 I L - 18 の効果を評価する上での最も妥当なモデルとして選択した。B / W マウスでの疾患進行の開始は、通常は 7 ~ 9 月齢で認められ、腎不全の結果、12 ~ 14 ヶ月までに致死となる。狼瘡の病因における I L - 18 の役割を調べるため、7 月齢から開始して、B / W マウスを r - m u I L - 18 または媒体対照で 1 日 1 回処理した。タンパク尿の程度を測定することで、腎機能を評価した。B / W マウスを 50 μ g / k g の I L - 18 で 1 日 1 回処理することで、P B S 媒体処理群と比較して、重度タンパク尿の発症が加速された。I L - 18 処理 B / W マウスは、死亡の加速も示した。これらの所見は、M R L / l p r マウスについての前述の所見と一致しており、自己免疫疾患での I L - 18 についての炎症誘発の役割を強調するものである。

20

【0261】

S L E のマウスモデルでの I L - 18 遮断の治療効果を調べるため、狼瘡性腎炎の臨床療法を再現する B / W マウスでの誘発 - 維持処置プロトコルを確立した。この試験では、重度腎炎の B / W マウスに、サイトキサンの週 1 回で 5 回の投与（誘発相）を行い、次に慢性 1 C 5 またはマウス I g G 1 対照（125 - 2 H）処理（維持相）を行った。

【0262】

結果は、その後の維持処置 130 日間において、対照の I g G 1 125 - 2 H と比較して 1 C 5 が B W マウスの生存を有意に延長したことを示している。125 - 2 H は、m u I L - 18 を認識しないマウス I g G 1 m A b である（ $P < 0 . 05$ ）。生存延長に加えて、1 C 5 処理 B W マウスにおいて重度タンパク尿の発症が遅延され、I g G 2 a および I g G 1 抗 d s D N A の低下があった。1 C 5 処理による抗 d s D N A の低下は一時的であり、統計的に有意ではない。1 C 5 に対する抗体（マウス抗マウス抗体 [M A M A]）が検出され、その後第 130 日後に、生存の急峻な低下によって示される効力喪失ならびに抗 d s D N A 力価低下およびタンパク尿における効果喪失があった。結論として、1 C 5 に対する抗体応答が存在するにも拘わらず、1 C 5 による I L - 18 遮断が、B / W マウスにおいて生存を延長し、重度タンパク尿の発症を遅延させ、抗 d s D N A 力価を低下させた。これらのデータは、炎症応答促進による腎機能喪失および最終的に致死における I L - 18 の役割を示すものである。

30

40

【0263】

実施例 2 . 2 . L . 6 : 多発性硬化症

実験的アレルギー性脳脊髄炎（E A E ; M S のマウスモデル）の病因に対する I L - 18 の寄与を調べた。再発性 - 緩解性 E A E は、同様の疾患経過、臨床徴候および C N S 病理によるヒト疾患の妥当なモデルであると考えられている。これらの試験では、その疾患を I L - 18 K O マウスおよび W T C 57 / B 16 マウスで誘発した。I L - 18 K O マウスは、W T マウスと比較して疾患症状の発症にわずかな遅延を示し、後の時点において重度が有意に低い疾患を発症した（表 18）。免疫化後第 0 日から第 14 にかけて、W T マウスを B A 77（抗マウス I L - 18 I g G（250 m g、2 回 / 週）で処理すること

50

で、疾患症状の発症が遅延され、後の時点において疾患重度が有意に制限された（表 18）。抗 IL-18 IgG の保護効果は、処置中止後であっても後の時点で認めることができた。

【0264】

【表 20】

表18: 抗IL-18Ab治療マウスおよびIL-18ノックアウトマウスでは、EAE疾患の重度が相対的に低い。

		平均臨床評点 免疫化後第14日
SJL/Jマウスでの PLP誘発EAE	IgG (BA77) 抗IL-18ab	4 2.7
		平均臨床評点 第18日
IL-18KOおよびWTマウス でのMOB誘発EAE	WT KO	3.6 2.1

10

【0265】

実施例 2.2.L.7: 肝臓損傷

コンカナバリン A (ConA) 誘発肝臓炎症 / 損傷は、T 細胞介在肝臓疾患の動物モデルである。ConA による肝臓内 T 細胞の活性化によって、炎症介在物質（例：IFN γ および Fas リガンド）の局所産生が生じる。Fas - Fas リガンド相互作用によって、IL-18 の産生が生じ、これがさらに IFN γ 、Fas リガンドおよび TNF の産生を誘発する。このように、正フィードバックループが確立され、これによって肝臓の損傷が生じ、死んでいく細胞からの ALT および AST などの肝臓酵素の過剰産生が生じる。1C5 または 93-10CmAb を注射（腹腔内注射）し、1 時間後に ConA 150 μ g を静脈投与した。ConA 注射から 24 時間後にマウスを放血し、肝臓酵素（ALT および AST）の血清力価を測定した。1C5 および 93-10C のいずれも、肝臓酵素の LPS 誘発上昇を遮断したが、93-10C の方が相対的に低用量で有効であった（表 19）。

20

30

【0266】

【表 21】

表19: 93-10CによるConA誘発肝臓炎症のインビボでの阻害

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

40

【0267】

実施例 2.2.L.8: 敗血症

エンドトキシンショックの重要な介在物質として、IL-18 が登場してきた。IL-18 は、エンドトキシン誘発の肺、肝臓および多臓器の不全の非常に重要な介在物質である可能性がある（Neeta, M. G., et al (2000) J. Immunol. 164: 2644 - 2649）。IL-18 のこの効果は、IL-18 の細胞傷害性介在物質の産生を調節する能力、ならびに生来の免疫応答を活性化し好中球を局所炎症部位に招集する能力によって決まり得る。さらに、LPS 負荷によって、IFN γ 、TNF および IL-1 の血清レベル上昇が誘発され、これらのサイトカインは LPS 誘発の致死に寄与する可能性がある。LPS を負荷させた IL-18 ノックアウトマウスは LPS 誘

50

発 $IFN\gamma$ 欠乏であり、WTマウスと比較してTNFおよびIL-1の産生が有意に低い (Takeda, K., et al. (1998) Immunity 8:383-390)。

【0268】

LPS誘発致死実験を、下記の方法に従って実施した。動物を第0日に秤量し、投与すべき適切な用量を決定した。T = -1時間で、動物に0.9%生理食塩水(500 μ L)溶液で抗-IL-18抗体または対照抗体を腹腔内投与(IP)で注射した。T = 0で、動物に0.9%生理食塩水100 μ L中20 mg/kgのリボ多糖(LPS)(大腸菌血清型0111:B4、シグマ(Sigma)カタログ番号:L-4130、ロット番号:71K4110)を静脈投与(IV)で注射した。4時間後、心臓穿刺によって動物から採血を行った。血清muIFN γ 力価を、muIFN γ ELISAによって測定した(R & D Systems)。

【0269】

抗muIL-18 mAb、1C5または93-10Cで処理したWTマウスは、LPS誘発致死から保護された(表20)(125-2Hは1C5と同じ不活性アイソタイプを有するが、対照として用いられるmuIL-18には結合しない)。さらに、抗IL-18 IgG処理マウスは、LPS負荷後の肺および肝臓損傷を低下させることが報告されており、これは好中球蓄積の低下と相関していた(Neeta, M. G., et al. (2000) J. Immunol. 164:2644-2649)。

【0270】

【表22】

表20:1C5および93-10CmAbは、高用量LPS死亡率を防止する。

時間(時)	生存パーセント								
	0	8	24	32	48	56	72	120	144
生理食塩水	100	100	100	50	10	10	10	10	10
125-2H @ 400	100	100	80	70	10	10	10	10	10
1C5 @ 400 μ g	100	100	100	90	80	80	80	80	80

時間(時)	生存パーセント								
	0	8	24	32	48	56	72	120	144
生理食塩水	100	100	90	40	10	10	10	10	10
ラットIgG @ 100 μ g	100	100	100	100	70	40	40	40	40
93-10C @ 100 μ g	100	100	100	100	100	100	100	100	100

【0271】

実施例2.2.M:2.5(E)Fab断片の結晶化

本発明の抗体が結晶化し得ることで、結晶化抗体を含む製剤および組成物を得ることが可能であることを示すため、下記の実験を行った。

【0272】

実施例2.2.M.1:2.5(E)抗体Fab断片の取得および精製

2.5(E)ヒトIgGを、SR-286培地にてCHO細胞で発現させた。溶解後の上清を0.5ミクロンフィルターで濾過し、タンパク質A緩衝液A(1 $\times$ PBS)で平衡としておいたタンパク質Aカラムに乗せた。次に、IgGをタンパク質A緩衝液B(0.1M 酢酸Na(pH3.5)、150mM NaCl)で溶離した。蓄積したIgGを20 mg/mLまで濃縮し、50%パラインゲルスラリーと混和し、高攪拌下に37で24時間インキュベートした。得られた抗体/スラリー混合物を、4で終夜にわたり、50mM Tris緩衝液(pH7.0)に対して透析して、緩衝液からシステインを除去した。25mLタンパク質Aセファロース4ファストフロー(Sephacrose 4 Fast Flow)アフィニティカラム(Amersham Pharmacia)を、緩衝液A(50mM Tris (pH7.0))100mLで洗浄することで準備

した。透析上清を、そのアフィニティカラムに流した（流量 2 mL / 分）。2.5 (E) Fab 分画（280 nmでのUV吸光度によってモニタリング）をフロースルー（flow-through）で回収した。2.5 (E) Fab 濃度が 0.3 mg / mL より高い（280 nmでのUV吸光度によって測定）分画を集め、ウルトラフリー-15 バイオマックス（Ultrafree-15 Biomax）10 kDa 分子量カットオフ（MWCO）遠心フィルター装置（Millipore）を用いて濃縮して約 20 mg / mL とし、-80 で凍結した。その濃縮サンプルを、下記の結晶学実験で用いた。サンプル純度を SDS-PAGE で評価した。

【0273】

実施例 2.2.M.2: 2.5 (E) Fab 断片の結晶化

凍結 2.5 (E) Fab 原液（約 20 mg / mL）を氷上で解凍した。Fab（2 μ L）を 25 ~ 30 % ポリエチレングリコール（PEG）400、100 mM CAPS（pH 10.5）からなる貯留液 2 μ L と混合し、約 4 でシリコン処理カバーガラス片の下側にある貯留部に懸濁させた。棒状結晶が 1 日以内に現れた。その棒状結晶は、2.5 (E) Fab 断片結晶であることを確認した（データは示していない）。

【0274】

実施例 3: IL-18 応答遺伝子

実施例 3.1: 材料および方法

実施例 4 を通じて、別段の断りがない限り、下記の材料および方法を用いる。

【0275】

実施例 3.1.A: 細胞処理および RNA 取得

実施例 3.1.A.1: KG-1 細胞

約 3.0×10^7 の KG-1 細胞（ATCC 番号 CCL-246）を、4 つの処理群での各実験条件に用いた。第 1 の群では、10 mg / mL のシクロヘキシミドとともに 30 分間の前インキュベーションを行った場合と行わない場合で、50 ng / mL の組み換え IL-18 で細胞を処理した。30 分後または 2 時間後に、細胞について RNA の回収を行った。第 2 の群では、10 mg / mL のシクロヘキシミドとともに 30 分間の前インキュベーションを行った場合と行わない場合で、0、0.5、2.0、10 または 50 ng / mL の組換え IL-18 で細胞を処理した。2 時間後に、細胞について RNA の回収を行った。第 3 の群では、0 または 10 ng / mL の TNF で細胞を処理した。終夜インキュベーション後、10 mg / mL のシクロヘキシミドとともに 30 分間の前インキュベーションを行った場合と行わない場合で、0、0.5、2.0、10 または 50 ng / mL の組換え IL-18 で細胞を処理した。2 時間後に、細胞について RNA の回収を行った。最後の処理群では、10 mg / mL のシクロヘキシミドとともに 30 分間の前インキュベーションを行った場合と行わない場合で、0 または 10 ng / mL の TNF および 0 もしくは 2.0 ng / mL の組換え IL-18 で細胞を同時に処理した。2 時間後に、細胞について RNA の回収を行った。

【0276】

総 RNA を、TRIzol 試薬（Life Technologies, Rockville, MD）を用いて得た。製造者のプロトコールに従って初期相分離を行い、次に半容量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1、Life Technologies, Rockville, MD）を用いてさらに抽出した。RNA 沈澱および洗浄を、製造者の TRIzol プロトコール説明書に従って行った。RNA 約 3 μ g を、1.0 % アガロース / ホルムアルデヒド変性ゲル上で電気泳動して、品質を評価した。

【0277】

TNF 前インキュベーションを必要とする実験の場合、KG-1 細胞を 2 ng / mL の TNF とともに 12 時間インキュベーションしてから、2、10 または 40 ng / mL の IL-18 による刺激を行った。RNA は上記の方法に従って得た。

【0278】

10

20

30

40

50

実施例 3 . 1 . A . 2 : ヒト全血アッセイ

ヒト全血 2 . 5 mL を 15 mL 円錐管に小分けして入れ、IL18、IL12、IL18 + IL12、IL18 + IL12 + 抗 IL18 または IL18 + IL12、IL18 + IL12 + 対照抗体で処理した。最終濃度は、IL12 (500 pg/mL)、IL18 (YK27-1) (50 ng/mL)、mIgG (5 µg/mL)、抗 IL181252 H (5 µg/mL) および抗 IL182 . 5 (4 µg/mL) であった。間歇的な反転を温和に行いながら、混合物を 37 °C で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、1 × 溶解緩衝液 (Depc で 1 : 10 希釈したファーム・ライス (Pharm Lys e) 塩化アンモニウム溶解試薬) 5 mL を加えることで、塩化アンモニウムを用いて赤血球を除去した。氷上で 5 分後、混合物を 1200 rpm で 5 分間遠心した。その手順を 1 回繰り返して、血液白血球の白色ペレットを得た。次に、上記のトリゾール (Trizol) 手順を用いて、RNA を単離した。微量アッセイ分析のため、全てのサンプル容量を 4 倍に増やした。

10

【0279】

実施例 3 . 1 . B : プローブの準備および標的ハイブリダイゼーション

総 RNA 10 µg および cDNA 合成用スーパースクリプト (Super Script) 選択システム (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) を用いて、二本鎖 cDNA を合成した。この合成はアフィメトリクス (Affymetrix, Santa Clara, CA) のプロトコールに従って行い、このプロトコールではキットを設けたオリゴ (dT) またはランダムプライマーに代えて T7 - (dT) 24 オリゴマープライマー (GENSET) と、温度調節および最初の鎖合成段階時に 42 °C のインキュベーションが必要である。得られた cDNA を、フェーズロックゲルライト (Phase Lock Gel Light) 2 mL 管 (Eppendorf AG, Hamburg, DE) で清浄化し、ペレットを DEPC - H₂O 12 µL に懸濁させた。この cDNA 5 µL を、バイオアレー (Bio Array) 高収量 RNA 転写標識キット (Enzo, Farmingdale, NY) とともに用いて、T7 RNA ポリメラーゼプロモーターからの in vitro 転写 (IVT) によってビオチン標識 cRNA 標的を得た。遊離ヌクレオチドを、RNeasy ミニカラム (RNeasy Mini Column; Qiagen, Hilden, DE) を用いて UV 反応液から除去した。ビオチン標識 cRNA 15 µg を、アフィメトリクスプロトコールに従って断片化した。全断片化サンプルを、対照オリゴヌクレオチド B2 (アフィメトリクス) 5 µL、20 × 真核ハイブリダイゼーション対照 (アフィメトリクス) 15 µL、超音波処理サケ精子 DNA (10 mg/mL、Stratagene, La Jolla, CA) 3 µL、アセチル化 BSA (50 mg/mL、Gibco BRL) 3 µL、2 × MES ハイブリダイゼーション緩衝液 150 µL および最終容量 300 µL までの水と合わせた。アフィメトリクスプロトコールに従って、ジーンチップ (Gene chip) Hu Gene FL アレイ (アフィメトリクス) を 1 × MES で予め湿らせた。次に、ハイブリダイゼーションカクテルを加熱および遠心し、200 µL をチップ上に乗せた。そのチップを 45 °C のローテイツェリー (rotisserie) オープン中で 16 時間遠心した。

20

30

【0280】

実施例 3 . 1 . C : プローブアレイの洗浄、染色および走査

ハイブリダイゼーションカクテルをチップから除去し、非ストリンジェント洗浄緩衝液と置き換えた。製造者の説明 (アフィメトリクス) に従ったジーンチップ・フリュイディクス・ステーション (Gene Chip Fluidics Station) 400 に関する EuKGE - WS2 プロトコール; ストレプトアビジン・フィコエリトリン (SAPE) 染色溶液および抗体溶液の両方でチップの染色を行うプロトコールを用いて、チップを洗浄および染色した。全ての必要な洗浄緩衝液および染色液は、アフィメトリクスのプロトコールに従って調製した。ジーンアレイ走査装置 (Gene Array Scanner) (Agilent, Palo Alto, CA) を、ジーンチップ (Gene Chip) ソフトウェア (アフィメトリクス) とともに用いて、染色アレイの走査を行った

40

50

。

【0281】

実施例3.1.D: データ解析

ジーンチップデータを、アフィメトリクスMAS4からマイクロソフトエクセルに送り、スポットファイア・デシジョンサイト (Spotfire Decisionsite) 7.0にアップロードした。

【0282】

実施例3.2: IL-18によって調節される遺伝子発現実施例3.2.1: IL18単独でのKG1細胞における遺伝子コホートの直接調節

IL18によって直接調節される転写物を確認するため、タンパク質合成阻害薬であるシクロヘキシミドの存在下および非存在下にKG1細胞を用いて、サイトカイン力価測定実験を行った。表1には、シクロヘキシミドの存在下および非存在下における少なくとも一つの条件下に0.05未満のp値で(スチューデントのt検定を用いて)2倍以上調節されていることが認められた67の異なるプローブ集合(チップ上の重複性による)によって代表される62種類の転写物のリストを示してある。これらの遺伝子は、転写因子、キナーゼおよび分泌タンパク質などの各種機能カテゴリーを有していた。これらの遺伝子はデノボタンパク質合成なしに調節されることから、それら遺伝子はIL18誘発信号伝達に直接応答する。12の遺伝子が分泌タンパク質をコードし、13が表面分子をコードしている(それらを使用可能な抗体標的とする)。残りの遺伝子は、核および細胞質タンパク質をコードする(表2.1参照)。

10

20

【0283】

【表 2 3】

表 2 1 : I L 1 8 によって誘発される遺伝子

Genbank ID	位置/機能	遺伝子名	Unigene コメント	0.5ng/ml	2ng/ml	10ng/ml	50ng/ml
L29217	キナーゼ	CLK3	CDC 様キナーゼ 3	9.1	7.4	8.1	15.0
D14497	キナーゼ	MAP3K8	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ 8	6.6	2.9	5.8	3.9
L19871	なし	ATF3	活性化転写因子 3	1.0	1.1	3.3	2.6
U15460	なし	BATF	塩基性ロイシンジッパー転写因子, ATF 様	1.5	1.7	2.4	2.8
U45878	なし	BIRC3	パキキュロウィルス IAP 反復含有 3	7.0	6.2	10.2	10.0
U37546	なし	BIRC3	パキキュロウィルス IAP 反復含有 3	29.4	26.9	76.6	63.6
U72649	なし	BTG2	BTG ファミリー, 構成員 2	3.1	4.7	6.6	5.9
L07765	なし	CES1	カルボキシルエステラーゼ 1	1.0	1.3	2.1	2.1
M27691	なし	CREB1	CAMP 応答要素結合タンパク質 1	0.9	2.4	4.9	3.1
HG3548- HT3749	なし	CUTL1	cut(CCAAT 置換タンパク質)	2.5	2.1	1.3	0.7
X59131	なし	D13S106 E	高電荷タンパク質	2.1	0.5	1.5	2.3
U53445	なし	DOC1	卵巣癌で低下 1	2.0	3.3	3.0	3.8
X68277	なし	DUSP1	二重特異性ホスファターゼ 1	2.5	3.1	4.1	3.3
U48807	なし	DUSP4	二重特異性ホスファターゼ 4	2.0	2.3	2.9	2.0
X52541	なし	EGR1	早期成長応答 1	15.5	12.7	32.4	20.3
X63741	なし	EGR3	早期成長応答 3	5.9	7.3	15.1	9.0
L07077	なし	EHHAD H	エノイル・補酵素 A	3.4	2.3	1.8	2.5
M62831	なし	ETR101	最初期タンパク質	3.4	5.8	6.3	6.8
L19314	なし	HRV	有毛(ショウジョウバエ)・相同体	2.3	2.5	2.3	2.0
S81914	なし	IER3	最初期応答 3	17.0	18.6	32.9	29.6
X51345	なし	JUNB	junB 癌原遺伝子	7.2	6.1	10.7	9.6
U20734	なし	JUNB	junB 癌原遺伝子	10.2	21.8	25.0	25.4
U49957	なし	LPP	LIM ドメイン含有	2.2	1.1	2.0	1.9
M58603	なし	NFKB1	核因子カッパ B(p105)	1.6	2.0	2.9	2.3
S76638	なし	NFKB2	核因子カッパ B	1.7	2.2	3.5	4.3
M69043	なし	NFKBIA	核因子カッパ B	9.6	10.4	15.5	15.8
U91616	なし	NFKBIE	核因子カッパ B	11.6	14.8	20.7	21.0
L13740	なし	NR4A1	核受容体サブファミリー-4, 群 A, 構成員 1	2.0	2.7	2.4	2.5
HG4115- HT4385	なし	OR1E3P	嗅覚受容体	4.5	12.0	4.2	4.1
L20971	なし	PDE4B	ホスホジエステラーゼ 4B, cAMP 特異的	2.4	2.8	4.2	3.5
U64675	なし	RANBP2 L1	RAN 結合タンパク質 2 様 1	1.1	1.8	2.2	2.2
S57153	なし	RBBP1	網膜芽細胞腫結合タンパク質 1	2.5	3.4	5.0	4.1
X75042	なし	REL	v-rel	1.6	2.5	3.9	3.7
M83221	なし	RELB	v-rel	2.3	2.8	2.8	2.6
S59049	なし	RGS1	G-タンパク質シグナル伝達の調節因子 1	10.9	12.7	22.4	17.8
U70426	なし	ROS16	G-タンパク質シグナル伝達の調節因子 16	3.9	4.7	7.5	6.7
U22377	なし	RLF	転位 1-myc 融合配列	2.5	2.0	2.5	2.6
M95787	なし	TAGLN	トランスゲリン	6.6	4.7	1.0	1.6
L47345	なし	TCEB3	転写伸長因子 B(110kD, エロンジン A)	3.6	5.3	2.3	4.2
M59465	なし	TNFAIP3	腫瘍壊死因子, α 誘発タンパク質 3	9.9	12.4	25.4	20.6
U19261	なし	TRAF1	TNF 受容体関連因子 1	2.8	2.8	4.9	4.1
U78798	なし	TRAF6	TNF 受容体関連因子 6	1.2	2.0	2.1	2.2
M37435	分泌	CSF1	コロニー刺激因子 1(マクロファージ)	2.9	2.9	2.1	2.6

10

20

30

40

M57731	分泌	GRO2	GRO2 発癌遺伝子	15.2	20.9	26.3	27.0
X53800	分泌	GRO3	GRO3 発癌遺伝子	4.1	5.5	14.8	9.9
X04500	分泌	IL1B	インターロイキン 1, β	2.2	3.4	5.7	4.7
M28130	分泌	IL8	インターロイキン 8	6.2	10.0	13.4	14.5
Y00787	分泌	IL8	インターロイキン 8	5.8	7.4	8.3	8.5
U89922	分泌	LTB	リンホトキシン β (TNF スーパーファミリー, 構成員 3)	5.0	5.7	11.0	12.8
M31166	分泌	PTX3	ペントキシン関連遺伝子, IL-1 β によって急速に誘発	3.1	5.2	10.3	6.4
M23178	分泌	SCYA3	小型誘導性サイトカイン A3	1.8	2.0	5.0	3.8
M69203	分泌	SCYA4	小型誘導性サイトカイン A4	0.9	1.9	7.0	5.6
J04130	分泌	SCYA4	小型誘導性サイトカイン A4	1.0	2.6	5.9	4.5
M92357	分泌	TNFAIP2	腫瘍壊死因子, α 誘発タンパク質 2	4.2	6.4	20.3	19.3
Z32765	表面	CD36	CD36 抗原(コラーゲン I 型/TSP 受容体)	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	エフリン-A1	9.8	6.0	9.5	15.2
A28102	表面	GABRA3	γ -アミノ酪酸(GABA)受容体	3.0	2.5	1.6	2.7
M24283	表面	ICAM1	細胞間接着分子 1(CD54)	7.5	11.5	14.5	13.9
M55024	表面	ICAM1	細胞間接着分子 1(CD54)	2.5	3.4	3.2	3.7
J03171	表面	IFNAR1	インターフェロン(α , β および ω) 受容体 1	3.2	2.5	2.8	2.6
X01057	表面	IL2RA	インターロイキン 2 受容体, α	0.7	0.4	3.9	3.6
L10338	表面	SCN1B	ナトリウムチャンネルポリペプチド	1.8	2.3	1.5	1.5
D79206	表面	SDC4	シンデカン 4(アンフィグリカン, リュードカン)	4.0	4.2	7.2	6.1
HG961・HT961	表面	SOS1	セブレンスの息子(ショウジョウバエ) 相同体 1	6.3	6.2	9.1	9.9
X83490	表面	TNFRSF6	腫瘍壊死因子受容体構成員 6	1.1	1.3	3.8	3.3
U19523	なし	GCH1	GTP シクロヒドロラーゼ 1		2.1		
U37518	表面	TNFSF10	腫瘍壊死因子構成員 10	1.4	1.4	2.3	1.6

10

20

【 0 2 8 4 】

実施例 3 . 2 . 2 : サイトカイン曝露履歴の I L - 1 8 に対する K G - 1 細胞応答への影響

サイトカイン類は代表的には免疫応答時に順次現れることから、h I L 1 8 での処理に先だって T N F とともに K G - 1 細胞を前インキュベートする効果を調べた。この実験では、細胞のサイトカイン曝露履歴が、その後のサイトカイン曝露に対するその応答に影響し得るという仮説も調べた。細胞を T N F 1 2 2 n g で処理してから、1 2 時間後に I L 1 8 を加え、4 時間後に回収した。

30

【 0 2 8 5 】

I L 1 8 は、これらの条件下で約 1 2 5 種類の遺伝子の発現を調節した(表 2)。この遺伝子集合を得るのに用いたふるい分け基準は、1 0 n g / m L および 4 0 n g / m L での T N F による 5 0 % 未満の変化ならびに I L 1 8 による 2 倍以上の変化とした。これらの遺伝子は、転写因子、キナーゼ類および分泌タンパク質などの多様な機能カテゴリーを有していた(表 2 2)。ここで調べた他の条件とは対照的に、本発明者らは、T N F への曝露後に I L 1 8 によってインターフェロン γ m R N A およびタンパク質が誘発されることを認めている。

40

【 0 2 8 6 】

【表 2 4】

表 2 2 : TNF 処理後に IL 1 8 によって調節される遺伝子

Genbank ID	遺伝子名	Unigene コメント	濃度 10ng	濃度 40ng
J00219	IFNG	インターフェロン, γ	26.3	31.8
U17034	PLA2R1	ホスホリパーゼ A2 受容体 1, 180kD	29.6	28.7
M57710	LGALS3	レクチン, ガラクトシド結合, 可溶性, 3 (ガレクチン 3)	27.5	25.4
X97748	PTX3	ペンタキシン関連遺伝子, IL-1 誘発	15.2	13.6
M27288	OSM	オンコスタチン M	23.1	12.0
X57809		λ 軽鎖可変領域	10.9	10.0
Y00081	IL6	インターロイキン 6 (インターフェロン, $\beta 2$)	9.2	9.4
D16583	HDC	ヒスチジンデカルボキシラーゼ	8.0	9.4
X07730	KLK3	カリクレイン 3, (プロテアーゼ特異的抗原)	5.6	8.8
HG3111-H T3287		ヒトクローン HH409 未知	9.5	7.5
M57732	TCF1	肝臓核因子(HNF1)	2.0	7.2
U77735	PIM2	pim-2 発癌遺伝子	7.1	7.1
U96094	SLN	サルコリビン	12.2	6.1
D50640	PDE3B	ホスホジエステラーゼ 3B, cGMP 阻害	4.0	5.4
X14008	LYZ	リゾチーム(腎アミロイドーシス)	3.0	5.4
M91036	HBG2	ヘモグロビン, γ G	3.4	5.4
X72755	MIG	γ インターフェロン誘発モノカイン	5.2	5.2
AC000099	GRM8	グルタミン酸受容体, 代謝型 8	2.3	4.3
D11428	PMP22	末梢ミエリンタンパク質 22	5.0	4.0
M83667	CEBPD	CCAAT/エンハンサー結合タンパク質(C/EBP), δ	4.3	4.0
L19267	DMWD	筋緊張性異常栄養症, WD 反復モチーフ	3.0	3.8
M81181	ATP1B2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ 輸送	3.5	3.8
U79249		ヒトクローン 23839 配列	3.1	3.7
U49973	FLJ10803	仮定的タンパク質 FLJ10803	3.2	3.6
HG870-HT 870	GOLGA3	ゴルジ自己抗原, ゴルジサブファミリー-a, 3	3.5	3.6
X13589	CYP19	チトクロム P450, サブファミリー-XIX	3.0	3.5
AB000464		クローン:RES4-24A	2.9	3.5
M96956	TDGF1	奇形癌腫由来増殖因子 1	2.6	3.5
U31628	IL15RA	インターロイキン 15 受容体, α	6.4	3.3
D38128	PTGIR	プロスタグランジン 12 (プロスタサイクリン)受容体 (IP)	8.8	3.3
J03507	C7	補体成分 7	2.3	3.1
M32011	NCF2	好中球細胞質因子 2	3.5	3.0
X63131	PML	前骨髄球性白血病	4.7	3.0
D82326	SLC3A1	溶質キャリアファミリー 3	4.0	3.0
L10343	PI3	プロテアーゼ阻害薬 3, 皮膚由来(SKALD)	2.1	3.0
U89995	FOXE1	フォークヘッドボックス E1 (甲状腺転写因子 2)	2.6	2.9
M62800	SSA1	(52kD, リボ核タンパク質自己抗原 SSA/Ro)	3.1	2.9
AB000584	PLAB	前立腺分化因子	2.4	2.8
U37519	ALDH8	アルデヒドデヒドロゲナーゼ 8	2.2	2.7
D21267	SNAP25	シナプトソーム関連タンパク質, 25kD	2.2	2.7
M25667	GAP43	成長関連タンパク質 43	2.5	2.7
L34357	GATA4	GATA 結合タンパク質 4	2.3	2.7
U43944	ME1	リンゴ酸酵素 1, NADP(+)依存性, 細胞質	3.0	2.7
M16937	HOXB7	ホメオボックス B7	2.9	2.6
U27326	FUT3	フコシル基転移酵素 3	2.6	2.6
Z23115	BCL2L1	BCL2 様 1	2.2	2.6
HG1877-H T1917	MBP	ミエリン塩基性タンパク質	2.4	2.6
D10995	HTR1B	5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)受容体 1B	2.5	2.6

10

20

30

40

M91463	SLC2A4	溶質キャリアファミリー-2 グルコース輸送体	3.1	2.5
U19878	TMEFF1	EGF およびホリスタチン様による膜貫通	2.9	2.4
U66468	CGR11	EF ハンドドメインによる細胞増殖調節	2.2	2.4
U44848	NRF1	核呼吸因子 1	3.5	2.4
U73328	DLX4	ディスタルレスホメオボックス 4	3.2	2.4
HG4593-II T4998		電圧依存性ナトリウムチャンネル(SCN1A)	2.3	2.4
X78710	MTF1	金属調節転写因子 1	2.7	2.4
X59727	MAPK4	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 4	2.3	2.4
J03600	ALOX5	アラキドン酸 5-リボキシゲナーゼ	2.2	2.3
U87269	E4F1	B4F 転写因子 1	3.4	2.3
Y10375	PTPNS1	チロシンホスファターゼ, 非受容体基質 1	4.5	2.2
D49958	GPM6A	糖タンパク質 M6A	3.3	2.2
U60062	FEZ1	線維束形成および伸長タンパク質 1 (ジギン D)	3.3	2.2
X14830	CHRN1	コリン受容体, ニコチン, β ポリペプチド 1	2.4	2.1
J04076	EGR2	早期成長応答 2 (Krox-20 相同体)	3.0	2.1
HG2981-II T3127	CD44	CD44 抗原	2.2	2.1
U49187	C6ORF32	染色体 6 読み取り枠 32	3.8	2.1
X77744		FL100032 タンパク質についてのヒト, 部分	2.3	2.1
X68285	GK	グリセリンキナーゼ	2.4	2.0
HG3925-H T4195	SFTPA2	界面活性剤, 肺関連タンパク質 A2	3.9	2.0
M26062	IL2RB	インターロイキン 2 受容体, β	0.2	0.5
X06182	KIT	v-kit 発癌遺伝子相同体	0.4	0.5
U79251	OPCML	オピオイド結合タンパク質/細胞接着分子様	0.5	0.5
J03764	SERPINE1	ネキシン, プラスミノゲン活性化因子阻害薬 1 型	0.5	0.5
X92814	HREV107	ラット HREV107 と類似	0.3	0.5
L01087	PRKCQ	タンパク質キナーゼ C, θ	0.2	0.5
D43772	GRB7	増殖因子受容体結合タンパク質 7	0.2	0.5
X15880	COL6A1	コラーゲン, VI 型, $\alpha 1$	0.5	0.5
H03115-HT 3291	MBP	ミエリン塩基性タンパク質	0.4	0.5
X83301	SMA3	SMA3	0.5	0.5
D97469	CELSR2	カドヘリン, EGFLAG 7 回貫通 G 型受容体 2	0.4	0.5
M11313	A2M	α -2-マクログロブリン	0.4	0.4
X64877	HFL3	H 因子(補体)様 3	0.4	0.4
Z18859	GNAT2	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(G タンパク質)	0.4	0.4
D89077	SLA	Src 様アダプター	0.4	0.4
L25444	TAF2E	TATA ボックス結合タンパク質(TBP)関連因子	0.2	0.4
M26665	HTN3	ヒスタチン 3	0.4	0.4
S69790	WASF3	WAS タンパク質ファミリー, 構成員 3	0.4	0.4
U79248		ヒトクロン 23826 配列	0.4	0.4
L15309	ZNF141	亜鉛フィンガータンパク質 141(クロン p112-44)	0.3	0.4
L41147	HTR6	5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)受容体 6	0.4	0.4
X58431	HOXB6	ホメオボックス B6	0.4	0.4
U50360	CAMK2G	CaM キナーゼ II γ	0.2	0.4
D88152	ACATN	アセチル補酵素 A 輸送体	0.4	0.4
U39480	RXRG	レチノイド X 受容体, γ	0.3	0.4
X16866	CYP2D7AP	チトクロム P450, サブファミリー IID	0.4	0.4
X70991	NAB2	NGF1-A 結合タンパク質 2(ERG1bp2)	0.2	0.4
M60830	EVI2B	エコトロピックウイルス組み込み部位 2B	0.4	0.4
M27492	IL1R1	インターロイキン 1 受容体, 1 型	0.4	0.4
Z35093	SURF1	サルファイト 1	0.4	0.4
D86425	NID2	ニドゲン 2	0.3	0.3
U59914	MADH6	MAD 相同体 6	0.4	0.3
M18255	PRKCB1	タンパク質キナーゼ C, $\beta 1$	0.4	0.3
AF000234	P2RX4	プリン受容体 P2X	0.3	0.3
S77763	NFE2	核因子(赤血球由来 2), 45kD	0.4	0.3
U78722	ZNF165	亜鉛フィンガータンパク質 165	0.3	0.3

10

20

30

40

L05568	SLC6A4	可溶性キャリアファミリー 6(セロトニン)	0.3	0.3
L31529	SNTB1	シントロフィン, ジストロフィン関連タンパク質 A1	0.3	0.3
U47054	ART3	ADP-リボシルトランスフェラーゼ 3	0.4	0.3
M13955	KRT7	ケラチン 7	0.4	0.3
D15049	PTPRH	タンパク質チロシンホスファターゼ, 受容体型, H	0.4	0.3
U03486	GJA5	ギャップ接合タンパク質, $\alpha 5$, 40kD (コネキシン 40)	0.5	0.3
X06256	ITGA5	インテグリン, $\alpha 5$	0.4	0.3
U22314	REST	RE1-サイレンシング転写因子	0.3	0.3
U51096	CDX2	尾型ホメオボックス転写因子 2	0.2	0.2
D31762	KIAA0057	TRAM 様タンパク質	0.4	0.2
M23668	FDX1	フェレドキシン 1	0.2	0.2
U53476	WNT7A	無羽型 MMTV 組み込み部位ファミリー	0.2	0.2
X57206	ITPKB	イノシトール 1,4,5-三リン酸 3-キナーゼ B	0.2	0.2
Z31695	INPP5A	イノシトールポリリン酸 5-ホスファターゼ, 40kD	0.4	0.2
S66793	ARR3	アレステチン 3, 網膜(X-アレステチン)	0.2	0.2
U59877	RAB31	RAB31, 構成員 RAS 発癌遺伝子ファミリー	0.2	0.2
U53786	EVPL	エンボプラキン	0.2	0.2
S83362	LIFR	白血病阻害因子受容体	0.3	0.2
D42038	KIAA0087	KIAA0087 遺伝子産物	0.3	0.2
HG4333-H T4603	ZNF79	亜鉛フィンガータンパク質 79 (pT7)	0.1	0.1
L01406	GHRHR	成長ホルモン放出ホルモン受容体	0.4	0.1

10

【 0 2 8 7 】

20

実施例 3 . 2 . 3 : I L 1 8 に対するヒト白血球応答

I L 1 8 単独または I L 1 2 との組み合わせに対して応答するヒト白血球 (単離白血球泳動) の応答を調べた。抗 I L 1 8 モノクローナル抗体が転写応答を阻害する能力も調べた。細胞を実施例 4 . 1 に記載の方法に従って処理した。RNA を単離し、それを用いて、アフィメトリクス・ジーンチップ (H u g e n e , F L) のプロービングを行った。結果を表 2 3 に示してあり、その表には I L 1 8 + I L 1 2 によって誘発され、抗 I L 1 8 抗体によって逆転される 4 9 種類の転写物を挙げてある。いくつかの遺伝子が、免疫系に関連している。これら遺伝子の多くが、K G - 1 細胞において I L 1 8 によっても誘発された。

【 0 2 8 8 】

30

【表 2 5】

表 2 3 : アフィメトリクスジーンチップを用いた測定でヒト白血球サンプルで I L 1 8 + I L 1 2 によって 4 倍以上上昇し、1 2 5 2 H によって逆転される転写物から選択される他の可能な I L 1 8 / I L 1 2 マーカー

遺伝子名	Unigene コメント	Unigene
KIAA0001	UDP グルコースの推定 G タンパク質結合受容体	Hs.2465
LIMK2	LIM ドメインキナーゼ 2	Hs.278027
KIAA0196	KIAA0196 遺伝子産物	Hs.8294
IFNG	インターフェロン, γ	Hs.856
POLR2C	ポリメラーゼ(RNA)II ポリペプチド	Hs.79402
DAG1	ジストログリカン 1	Hs.76111
TPSB1	トリプターゼ β 1	Hs.250700
CDR2	小脳変性症関連タンパク質(62kD)	Hs.75124
TCF12	ヘリックス・ループ・ヘリックス転写因子 4	Hs.21704
TACTILB	T 細胞活性化, 後期発現上昇	Hs.142023
PIP5K2A	ホスファチジルイノシトール-4-ホスフェート 5-キナーゼ	Hs.108966
SF3A3	スプライシング因子 3a, サブユニット 3, 60kD	Hs.77897
SEL1L	sel-1(lin-12 の抑制因子, シノラブディス・エレガンス)様	Hs.181300
IL15	インターロイキン 15	Hs.168132
BAK1	BCL2 拮抗薬/キラー-1	Hs.93213
SLAM	シグナル伝達リンパ球活性化分子	Hs.32970
SCYB11	小型誘導サイトカインサブファミリー-B (Cys-X-Cys), 構成員 11	Hs.103982
LIMK1	LIM ドメインキナーゼ 1	Hs.36566
CAT56	CAT56 タンパク質	Hs.118354
POLRMT	ポリメラーゼ(RNA)ミトコンドリア(DNA 依存性)	Hs.153880
SCYA4	小型誘導サイトカイン A4/Mip-1b	Hs.75703
MIG	γ インターフェロン誘発モノカイン	Hs.77367
SSX3	滑膜肉腫, X ブレークポイント 3	Hs.178749
TNFRSF6	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, 構成員 6	Hs.82359
MAT1A	メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ 1, α	Hs.323715
KIAA0133	KIAA0133 遺伝子産物	Hs.57730
FCGBP	IgG 結合タンパク質の Fc 断片	Hs.111732
ARHD	ras 相同体遺伝子ファミリー, 構成員	Hs.15114
FGFR2	線維芽細胞増殖因子受容体 2	Hs.278581
COL9A1	コラーゲン, IX 型, α 1	Hs.154850
HPX42B	造血系幹細胞ホメオボックス	Hs.125231
TAL2	T 細胞急性リンパ性白血病 2	Hs.247978
	ESTS	Hs.196244
REN	レニン	Hs.3210
POU2F2	POU ドメイン, クラス 2, 転写因子 2	Hs.1101
ALOX12	アラキドン酸 12-リポキシゲナーゼ	Hs.1200
ACTN2	アクチニン, α 2	Hs.83672
KLK2	カリクレイン 2, 前立腺	Hs.181350
RCV1	リカバリン	Hs.80539
E2F4	E2F 転写因子 4, p107/p130 結合	Hs.108371
SEMA3F	免疫グロブリンドメイン(Ig), 短塩基性ドメイン, 分泌, (セマホリン)3F	Hs.32981
BHMT	ベタイン-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ	Hs.80756
EVPL	エンボブラキン	Hs.25482
BBC3	Bcl-2 結合成分 3	Hs.87246
SLN	サルコリピン	Hs.15219
RDBP	RDRNA 結合タンパク質	Hs.106061
MT1H	メタロチオネイン 1H	Hs.2667
RAD54L	RAD54(サッカロマイセス・セレヴィシエ)様	Hs.66718
MLL3	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病 3	Hs.288971

【 0 2 8 9 】

実施例 3 . 2 . 4 : I L 1 8 に対するヒト全血応答

ヒト全血が I L 1 8 単独または I L 1 2 との組み合わせに対して応答する応答を調べた。抗 I L 1 8 モノクローナル抗体が転写応答を阻害する能力も調べた。正常供血者血液検体を、実施例 4 . 1 に記載の方法に従って処理した。RNA を単離し、それを用いてアフィメトリクス・ジーンチップ (H u g e n e F L) のプロービングを行った。結果を表 2 4 にしめしてあり、その表には、2 名の健常供血者から単離した全血献体で、I L 1 8

10

20

30

40

50

+ I L 1 2 によって有意に調節され、抗 I L 1 8 抗体によって逆転された 1 6 種類の転写物を挙げてある。いくつかの遺伝子が免疫系に関連していた。本発明者らは続いて、定量的 P C R を用いて、1 0 名の正常供血者群でのこれら遺伝子のうちの 3 種類の応答も調べた。このヒト変動性試験の結果を、インターフェロン γ について表 2 5 に、C X C L 9 について表 2 6 に、C C L 8 について表 2 7 に示してある。この変動性試験の結果は、ヒト血液での I L 1 8 によるこれら転写物の調節が、ヒトの間で一般的なものである可能性が高いことを示していた。

【 0 2 9 0 】

【表 2 6】

表 2 4 : 2 名の供血者から単離し、次に I L 1 8 + I L 1 2 で処理した全血で上昇した転写物から選択される他の可能な I L 1 8 / I L 1 2 マーカー

プローブ集合 ID	名称	Unigene
202284_s_at	サイクリン依存性キナーゼ阻害薬 1A(21, Cip1)	Hs.179665
202531_at	インターフェロン調節因子 1	Hs.80645
204057_at	インターフェロンコンセンサス配列結合タンパク質 1	Hs.14453
205488_at	グランザイム A(グランザイム 1, 細胞傷害性 T リンパ球関連セリンエステラーゼ 3)	Hs.90708
206554_x_at	SET ドメインおよびマリナー-トランスボザ-ゼ融合遺伝子	Hs.265855
206817_x_at	トリヌクレオチド反復含有 4	Hs.26047
207509_s_at	白血球関連 Ig 様受容体 2	Hs.43803
209546_s_at	アポリポタンパク質 L 1	Hs.114309
214438_at	H2.0 様ホモオボックス 1(ショウジョウバエ)	Hs.74870
214450_at	カテプシン W(リンフォバイン)	Hs.87450
216950_s_at	FcR1b 型(AA1-344)[ヒト], mRNA 配列	Hs.382006
217933_s_at	ロイシニアミノペプチダーゼ 3	Hs.182579
219386_s_at	B リンパ球活性化因子マクロファージ発現	Hs.20450
219956_at	UDP-N-アセチル- α -D-ガラクトサミン:ポリペプチド N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ 6	Hs.151678
219971_at	インターロイキン 21 受容体	Hs.210546
221223_x_at	サイトカイン誘導 SH2 含有タンパク質	Hs.8257

【 0 2 9 1 】

【表 2 7】

表 25: 10 個のヒト血液検体でのインターフェロン γ の成績。いずれの抗体による阻害についても $p < 0.05$ 。

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

【 0 2 9 2 】

【表 2 8】

表26:10個のヒト血液検体でのMIG/CXCL9の成績。いずれかの抗体による阻害についても $p < 0.05$ 。

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

10

【0 2 9 3】

【表 2 9】

表27:10個のヒト血液検体でのMCP2/CCL8の成績。いずれかの抗体による阻害についても $p < 0.05$ 。

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

20

30

【0 2 9 4】

実施例 4 : 抗 I L - 1 8 H u M A b、2 . 1 3 (E) m g 1 の特性決定

実施例 4 . 1 : ヒトサイトカイン特異性

ヒト I L - 1 8 に対する 2 . 1 3 (E) m g 1 の特異性を、製造者の説明に従ってピア
 コアアッセイを用いて評価した (実施例 2 . 1 . B 参照) 。 2 . 1 3 (E) m g 1 をパイ
 オセンサーチップ上に捕捉し、それが溶液での既知のヒトサイトカイン群に結合する能力
 を測定した。表 2 8 に示したように、2 . 1 3 (E) m g 1 は組換え成熟ヒト I L - 1 8
 に結合した。しかしながら、2 . 1 3 (E) m g 1 はヒトプロ I L - 1 8 には結合せず、
 さらには I L - 1 ファミリー構成員である I L - 1 α および I L - 1 β などの調べた他の
 2 3 種類のヒトサイトカインのいずれにも結合しなかった。

40

【0 2 9 5】

【表 3 0】

表28: 2.13(E)mg1および2.5(E)mg1によるサイトカイン結合のビ'ア7分析

可溶性組換え ヒトサイトカイン(1μM)	捕捉 2.13(E)mg1 (25 mg/mL)	捕捉 2.5(E)mg1 (25 mg/mL)
	2.13(E)mg1 Binding	2.5(E)MG1Binding
IFN γ	-	-
IL-1 α	-	-
IL-1 β	-	-
他のサイトカイン ^a	-	-
IL-18 ^b	+	+
Pro-IL-18	-	+

^a 結合について調べた別のサイトカインは、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 α 1 β 2およびLT α 2 β 1などであった。2.13(E)mg1は、これらのサイトカインのいずれにも結合しなかった。

^b スティン>アラニン突然変異体BV由来組換えヒトIL-18

【0296】

実施例 4 . 2 : ヒト IL - 18 に結合する他の抗体との競合

いくつかの抗 IL - 18 抗体がヒト IL - 18 への結合について 2 . 13 (E) m g 1 と競合する能力を、製造者の説明に従ってピアコアアッセイを用いて評価した (実施例 2 . 1 . B 参照) 。すなわち、ポリクローナル抗ヒトまたは抗マウス抗体をバイオセンサーチップ上に捕捉した。その後、抗 IL - 18 抗体を導入し、上記のバイオセンサーチップ上に固定化したポリクローナル抗ヒトまたは抗マウス (125 - 2 H の場合のみ) 抗体 (一次固定化抗体) によって捕捉した。次に、組換えヒト IL - 18 を導入し、この一次固定化抗体によって捕捉した。最後に、二次可溶性抗 IL - 18 抗体を導入した。このアッセイによって、二次可溶性抗 IL - 18 が組換え IL - 18 に結合し、一次抗体と競合する能力を測定した。2 . 13 (E) m g 1 は 2 . 5 (E) m g 1 および IL - 18 B P のいずれとも競合しなかった。マウス抗 h u IL - 18 モノクローナル抗体 125 - 2 H は、ヒト IL - 18 に対する結合について 2 . 13 (E) m g 1 と競合した。

【0297】

【表 3 1】

表29: ヒトIL-18への結合についての抗体競合のビ'ア7分析

2 ⁰ 可溶性 Ab	1 ⁰ 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	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+は、一次および二次抗体が同時に結合することを示す。

-は、二次抗体が捕捉IL-18に結合できないことを示す。

10

20

30

40

50

【0298】

本発明は参照により、分子生物学の分野で公知の技術全体を組み込むものである。これらの技術には、下記の刊行物に記載の技術などがあるが、これらに限定されるものではない。

Ausubel, F. M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X)。

Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X)。

Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)。

Old, R. W. & S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V. 2: 409 pp. (ISBN 0-632-01318-4)。

Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 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 (translated by Horst Ibelgauf ts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4)。

【0299】

10

20

【表 3 2】

参考文献

US 特許

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	

US patent application publication 20030186374

U.S. Application Serial No. 09/428,082

10

外国特許文献

EP 712 931	EP 850 952	EP 864 585	EP 0 962 531	EP 0 974 600	JP 111,399194
IL 121554 A0	WO 91/10741	WO 91/17271	WO 92/01047	WO 92/02551	WO 92/09690
WO 92/15679	WO 92/18619	WO 92/20791	WO 93/01288	WO 94/02602	WO 96/33735
WO 96/34096	WO 97/24441	WO 97/29131	WO 98/16654	WO 98/24893	WO 98/41232
WO 98/50433	WO 99/09063	WO 99/22760	WO 99/25044	WO 99/37772	WO 99/37773
WO 99/45031	WO 99/53049	WO 00/37504	WO 00/09560	WO 00/12555	WO 00/37504
WO 00/56772	WO 01/58956	WO 01/83525	WO 02/72636		

20

他の参考文献Adachi O., et al. (1998) *Immunity* 9:143-150Akita, K. et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26595-26603Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445Babcock, J.S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982Bendele, A., et al (1999) *Toxicol Pathol.* 27:134-142Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426

30

Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628Dinarello, C. et al. (1998) *J. Leukoc. Biol.* 63:658-654Dinarello, C.A. (1999) *Methods* 19:121-132Dinarello, C.A. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:11-24;Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377

40

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

Giege, R. and 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. et al., (1997) *Nature* 386:619-623Ghetie, V., et al (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:637-640

- Gracie J. A., et al., (2003) *Journal of Leukocyte Biology* 73, 213-224
- Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580
- Green *et al.* *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)
- Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998)
- Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734
- Gu, Y. *et al.*, (1997) *Science* 275:206-209)
- Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85 10
- Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990.
- Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896
- Hezareh, M., *et al.*, (2001) *J. Virology*, 75 (24):12161-12168
- Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448
- Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137
- Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70
- Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378 20
- Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883
- Hoshino K., *et al* (1999) *J. Immunol.* 162:5041-5044
- Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281
- Johnnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.
- Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131
- Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627
- Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 30
- Kanakaraj P., (1999) *J. Exp. Med.* 189:1129-1138
- Kaufman, R.J. and Sharp, P.A., (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621
- Kearney *et al*, *J. Immunol.* 123, 1979, 1548-1550
- Kellermann S. A. and Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597
- Kim J.K., *et al* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2819-2825
- Konishi, K., *et al* (1997) *J. Immunol. Methods* 209:187-191
- Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058
- Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 40
- Leung, B.P., *et al* (2001) *J. Immunol.* 167:2879-2886
- Little M. *et al* (2000) *Immunology Today* 21:364-370
- BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
- Lund, J. *et al.*, *J. Immunology* (1991) 147: 2657-2662

- McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554
- McInnes, I.B. *et al.* (2000) *Immunology Today* 21:312-315;
- Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997)
- Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17
- Nakanishi, K. *et al* (2001) *Ann. Rev. Immunol* 19:423-474.
- Nakanishi K., *et al* (2001) *Cytokine and Growth Factor Rev.* 12:53-72
- Neeta, M.G., *et al* (2000) *J. Immunol.* 164:2644-2649
- Ober, R.J., *et al* (2001) *Int. Immunol.* 13:1551-1559
- Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123
- Seidman, J.G., Smith, J.A., and K. Struhl eds; Wiley Interscience, N.Y., N.Y. (1990)
- Sims, J.E., (2002) *Current Opin Immunol.* 14:117-122
- Sugawara, S. *et al.*, (2001) *J. Immunol.*, 167, 6568-6575
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.
- Takeda, K., *et al.* (1998) *Immunity* 8:383-390
- Taylor, L. D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295
- Tissi L., *et al* (1999) *Infect. Immunol.* 67:4545-50
- Trentham, D.E. *et al* (1977) *J. Exp. Med.* 146:857-868
- Tsutsui, H. *et al.*, (1999) *Immunity* 11:359-67
- Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220
- Ushio, S., *et al.* (1996) *J. Immunol.* 156:4274-4279
- Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546
- Wei, X.Q., *et al* (2000) *J. Immunol.* 166:517-521
- Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

10

20

30

40

【 0 3 0 0 】

以上、多くの実施形態および特徴について説明したが、本開示内容および添付の特許請求の範囲で定義される本発明から逸脱しない限りにおいて、上記で説明した実施形態および特徴の修正および変更を行うことが可能であることは、当業者には明らかであろう。本明細書で言及した各刊行物は、参照によって本明細書に組み込まれるものとする。

【 配列表 】

2011097946000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/06 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4375 (2006.01)
 A 6 1 K 31/573 (2006.01)
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/436 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 19/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 5/14 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 3/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 33/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/18 (2006.01)
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 7/06 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/14 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 17/04 (2006.01)
 A 6 1 P 31/16 (2006.01)
 A 6 1 P 31/20 (2006.01)
 A 6 1 P 15/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 7/00 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 P 25/18 (2006.01)
 A 6 1 P 25/04 (2006.01)
 A 6 1 P 25/24 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/00 1 0 1
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 45/06
 A 6 1 K 31/4375
 A 6 1 K 31/573
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 K 31/436
 A 6 1 K 39/395 C
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 19/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 5/14
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 17/14
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 17/04
 A 6 1 P 31/16
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 25/18

4 C 0 8 5
 4 C 0 8 6
 4 H 0 4 5

A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 K 47/38	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/38	
A 6 1 K 47/40	(2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 K 47/26	
G 0 1 N 33/532	(2006.01)	A 6 1 K 47/40	
		A 6 1 K 47/10	
		A 6 1 P 37/00	
		G 0 1 N 33/532	A

- (72)発明者 タリク・ガユール
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01746、ホーリイストン、ワシントン・ストリート・1014
- (72)発明者 ボリス・ラブコブスキー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01752、マールボロ、ブロードメドウ・ロード・107・エイ・5
- (72)発明者 ジェフリー・ダブリュ・ボス
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01520、ホールデン、シュローズベリー・ストリート・257
- (72)発明者 ラリー・グリーン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94114、サン・フランシスコ、ヒル・ストリート・464
- (72)発明者 ジョン・バブクック
カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・6・アール・2・アール・2、バンクーバー、ウエスト・トウエルブルス・アベニュー、4480
- (72)発明者 シヤオ・チー・チャ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・90034、ロス・アンジェルス、サウス・ビバリー・ドライブ・2262
- (72)発明者 ジェイムズ・ウィーラー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01915、ビバリー、プロートン・ドライブ・508
- (72)発明者 ジヤスパル・シン・カン
カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・4・エヌ・5・エイチ・6、サーレー、アベニュー・109・16727
- (72)発明者 ブラッド・ヘッドバーク
カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・6・ピー・6・エヌ・6、バンクーバー、キーファー・プレイス、ナンバー・1607-63

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA56 CA02 DA02 EA04 GA11
4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AB01 AC14 AC15 BA02 CA25 CA44
4C076 CC01 CC07 CC10 CC11 CC14 CC15 CC16 CC17 CC18 CC21
CC27 DD38 DD67 EE06 EE09 EE15 EE16 EE23 EE24 EE26
EE30 EE31 EE36 EE37 EE39 EE41 EE42 EE43 FF02
4C084 AA01 AA02 AA24 BA24 BA44 NA14 ZA02 ZA08 ZA12 ZA16
ZA18 ZA33 ZA36 ZA51 ZA55 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89
ZA92 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08 ZB13 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35
ZB37 ZC02 ZC21 ZC35
4C085 AA13 AA14 AA21 CC22 DD62 DD63 EE01 GG01

4C086	AA01	AA02	CB09	CB22	DA08	NA14	ZA02	ZA08	ZA12	ZA16
	ZA18	ZA33	ZA36	ZA51	ZA55	ZA59	ZA66	ZA75	ZA81	ZA89
	ZA92	ZA94	ZA96	ZB07	ZB08	ZB13	ZB26	ZB27	ZB33	ZB35
	ZB37	ZC02	ZC21	ZC35						
4H045	AA11	BA09	CA42	DA76	EA20	FA74				

【外国語明細書】
2011097946000001.pdf

专利名称(译)	IL-18結合蛋白		
公开(公告)号	JP2011097946A	公开(公告)日	2011-05-19
申请号	JP2010280298	申请日	2010-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	タリクガユール ボリスラブコブスキー ジエフリーダブリュボス ラリーグリーン ジョンバブクツク シャオチーチャ ジエイムズウィーラー ジャスパルシンカン ブラッドヘッドバーグ		
发明人	タリク・ガユール ボリス・ラブコブスキー ジエフリー・ダブリュ・ボス ラリー・グリーン ジョン・バブクツク シャオ・チー・チャ ジエイムズ・ウィーラー ジャスパル・シン・カン ブラッド・ヘッドバーグ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K45/00 A61K45/06 A61K31/4375 A61K31/573 A61K38/00 A61K31/436 A61P19/02 A61P19/00 A61P17/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P37/06 A61P3/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P33/00 A61P31/18 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/00 A61P1/16 A61P7/06 A61P35/00 A61P11/00 A61P17/14 A61P9/10 A61P17/04 A61P31/16 A61P31/20 A61P15/00 A61P9/00 A61P21/00 A61P7/00 A61P13/12 A61P27/02 A61P25/18 A61P25/04 A61P25/24 A61P35/02 A61K47 /32 A61K47/34 A61K47/38 A61K47/36 A61K47/42 A61K47/26 A61K47/40 A61K47/10 A61P37/00 G01N33/532 G01N33/68		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/02 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17 /06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31 /04 A61P31/10 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/244 C07K2317/33 C07K2317/52 C07K2317/55 C07K2317/71 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/6869 Y02A50/407		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395. D A61K39/395.N A61K45/00 A61K45/06 A61K31/4375 A61K31/573 A61K37/02 A61K31/436 A61K39 /395.C A61K39/395.L A61P19/02 A61P19/00 A61P17/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P37/06 A61P3/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P33/00 A61P31/18 A61P25 /14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/00 A61P1/16 A61P7/06 A61P35/00 A61P11/00 A61P17/14 A61P9 /10 A61P17/04 A61P31/16 A61P31/20 A61P15/00 A61P9/00 A61P21/00 A61P7/00 A61P13/12 A61P27 /02 A61P25/18 A61P25/04 A61P25/24 A61P35/02 A61K47/32 A61K47/34 A61K47/38 A61K47/36 A61K47/42 A61K47/26 A61K47/40 A61K47/10 A61P37/00 G01N33/532.A A61K38/00 A61K38/12 A61K38/15 A61K47/68 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/10		

F-TERM分类号

4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/CC01 4C076/CC07 4C076/CC10 4C076/CC11 4C076/CC14 4C076/CC15 4C076/CC16 4C076/CC17 4C076/CC18 4C076/CC21 4C076/CC27 4C076/DD38 4C076/DD67 4C076/EE06 4C076/EE09 4C076/EE15 4C076/EE16 4C076/EE23 4C076/EE24 4C076/EE26 4C076/EE30 4C076/EE31 4C076/EE36 4C076/EE37 4C076/EE39 4C076/EE41 4C076/EE42 4C076/EE43 4C076/FF02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA24 4C084/BA24 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA08 4C084/ZA12 4C084/ZA16 4C084/ZA18 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA51 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA75 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA92 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB13 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZB37 4C084/ZC02 4C084/ZC21 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB09 4C086/CB22 4C086/DA08 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA08 4C086/ZA12 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA51 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA92 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB13 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB37 4C086/ZC02 4C086/ZC21 4C086/ZC35 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74

代理人(译)	Masarushin大崎
优先权	10/706689 2003-11-12 US
其他公开文献	JP2011097946A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

提供了与人白介素-18 (hIL-18) 结合的抗体，其制备方法和使用方法。具有由免疫球蛋白重链和轻链组成的特定氨基酸序列的抗体，该抗体与人IL-18特异性结合，是具有中和IL-18能力的中和结合蛋白。 以及生产抗体的方法。 用于检测hIL-18，以及在患有hIL-18活性有害的疾病的人类受试者中进行治疗。 [选择图]无

表1 VHおよびVL領域の7ミ/酸配列のリスト

変異領域	変異領域	変異領域
変異領域	変異領域	変異領域
VH 2.5(E)	変異領域	変異領域
VH 2.5 CDR-H1	変異領域	変異領域
VH 2.5 CDR-H2	変異領域	変異領域
VH 2.5 CDR-H3	変異領域	変異領域
VL 2.5(E)	変異領域	変異領域