

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502428

(P2004-502428A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	U 4 B O 2 4
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00	Z 4 B O 6 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 5
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 111 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-508013 (P2002-508013)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日 (2002.12.26)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/020755		アメリカ合衆国、イリノイ・60064-
(87) 国際公開番号	W02002/002773		6050、アボット・パーク、アボット・
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		パーク・ロード・100、チャド・037
(31) 優先権主張番号	60/215,379		7/エイ・ピー・6・デー2
(32) 優先日	平成12年6月29日 (2000.6.29)	(74) 代理人	100062007
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100105131
			弁理士 井上 満
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 二重特異性抗体ならびに作製方法および使用方法

(57) 【要約】

構造的に関連する2つの異なる抗原に対して二重の特異性を有する抗体が提供される。そのような抗体は、例えば、完全なヒト抗体、組換え抗体またはモノクローナル抗体であり得る。好ましい抗体はIL-1 α およびIL-1 β に対して二重の特異性を有しており、IL-1 α およびIL-1 β の活性をインビトロおよびインビボで中和する。本発明の抗体は全長の抗体またはその抗原結合部分であり得る。本発明の抗体の作製方法および使用方法もまた提供される。本発明の抗体または抗体の部分は、構造的に関連する2つの異なる抗原（例えば、IL-1 α およびIL-1 β ）を検出するために、そして（例えば、IL-1 α および／またはIL-1 β の活性が有害である障害に罹患しているヒト患者において）これらの抗原の活性を阻害するために有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インターロイキン-1 α およびインターロイキン-1 β と特異的に結合する二重特異性抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2】

表面プラズモン共鳴によって測定されたとき、 0.1 s^{-1} 以下の k_{off} 速度定数でインターロイキン-1 α と結合し、または $1\times 10^{-5}\text{ M}$ 以下の IC_{50} でインターロイキン-1 α の活性を阻害する、請求項 1 に記載の二重特異性抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3】

表面プラズモン共鳴によって測定されたとき、 0.1 s^{-1} 以下の k_{off} 速度定数でインターロイキン-1 β と結合し、または $1\times 10^{-5}\text{ M}$ 以下の IC_{50} でインターロイキン-1 β の活性を阻害する、請求項 1 に記載の二重特異性抗体またはその抗原結合部分。 10

【請求項 4】

インターロイキン-1 α およびインターロイキン-1 β と特異的に結合する二重特異性抗体を得る方法であって、

IL-1 α およびIL-1 β の共通する構造的な特徴を含む抗原を提供すること、

抗体レパートリーを抗原にさらすこと、

IL-1 α およびIL-1 β と特異的に結合する抗体をレパートリーから選択し、それにより二重特異性抗体を得ること

を含む方法。 20

【請求項 5】

抗原が、IL-1 α とIL-1 β との間で同一的な連続したトポロジー領域に基づいて設計される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

抗原がNEAQNTDF（配列番号 1）またはdNdEdAdQNTDFのアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

抗原が、IL-1 α およびIL-1 β の共通する折りたたみ部のループを構造的に模倣することに基づいて設計される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

抗原が、Cyelo-MAFLRANQNNGKISVAL（PG）（配列番号 2）のアミノ酸配列を含む環状ペプチドである、請求項 7 に記載の方法。 30

【請求項 9】

抗原が、ハイブリッド分子を作製するために、IL-1 α およびIL-1 β の重複する部分を一緒にスプライシングすることに基づいて設計される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

抗原がTKGGQDITDFQILENQ（配列番号 3）のアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

抗原が、下記のアミノ酸配列： 40

APVRS LNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQV
VFSMGAYKSSSKDDAKITVILGLKEKNLYLSCVVKDDKPTL
QLESVDPKNYPKKMEKRFFVFNKIEINNKLFESESAQFPNW
YISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS（配列番号 4）
を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 12】

抗体レパートリーが、動物を抗原で免疫化することによってインビボにおいて抗原にさらされる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 13】

動物のリンパ球に由来するハイブリドーマのパネルを調製し、そしてIL-1 α およびI 50

L-1 β と特異的に結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

動物が、マウス、ラット、ウサギおよびヤギからなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

動物が、IL-1 α 、またはIL-1 β 、またはIL-1 α およびIL-1 β の両方について欠損したノックアウトマウスである、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

動物が、抗原刺激したときにヒト抗体を作製するようにヒト免疫グロブリン遺伝子について遺伝子導入されているマウスである、請求項12に記載の方法。 10

【請求項17】

動物が、ヒト末梢血の単核細胞またはリンパ系細胞またはその前駆体で再構成されている重症複合免疫不全症（SCID）マウスである、請求項12に記載の方法。

【請求項18】

動物が、致死的な全身照射、その後、重症複合免疫不全症（SCID）マウスの骨髄細胞を用いた放射線防護、その後、機能的なヒトリンパ球またはその前駆体を用いた移植で処置されているマウスである、請求項12に記載の方法。

【請求項19】

抗体レパートリーが、組換え抗体ライブラリーを抗原でスクリーニングすることによってインビトロにおいて抗原にさらされる、請求項4に記載の方法。 20

【請求項20】

組換え抗体ライブラリーがバクテリオファージの表面において発現している、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

組換え抗体ライブラリーが酵母の表面において発現している、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

組換え抗体ライブラリーが細菌の表面において発現している、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

組換え抗体ライブラリーがRNA-タンパク質融合体として発現される、請求項19に記載の方法。 30

【請求項24】

組換え抗体ライブラリーがscFvライブラリーまたはFabライブラリーである、請求項19に記載の方法。

【請求項25】

抗体レパートリーが、動物を抗原でインビボにおいて免疫化し、その後、動物のリンパ系細胞から調製された組換え抗体ライブラリーを抗原でインビトロにおいてスクリーニングすることによって抗原にさらされる、請求項4に記載の方法。

【請求項26】

抗体レパートリーが、動物を抗原でインビボにおいて免疫化し、その後、動物のリンパ系細胞から調製された組換え抗体ライブラリーをインビトロにおいて親和性成熟させることによって抗原にさらされる、請求項4に記載の方法。 40

【請求項27】

抗体レパートリーが、動物を抗原でインビボにおいて免疫化し、その後、抗原と結合する抗体を分泌する単一細胞を選択し、そして重鎖可変領域および軽鎖可変領域のcDNAをこの単一細胞から回収することによって抗原にさらされる、請求項4に記載の方法。

【請求項28】

二重特異性抗体が完全なヒト抗体である、請求項4に記載の方法。

【請求項29】

二重特異性抗体がキメラ抗体である、請求項4に記載の方法。 50

【請求項 30】

二重特異性抗体が C D R グラフト化抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 4 に記載の方法によって得られる、インターロイキン-1 α およびインターロイキン-1 β と特異的に結合する二重特異性抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 32】

構造的に関連する 2 つの異なる分子と特異的に結合する二重特異性抗体を得る方法であって、

構造的に関連する 2 つの異なる分子の共通する構造的な特徴を含む抗原を提供すること、
抗体レパートリーを抗原にさらすこと、

構造的に関連する 2 つの異なる分子と特異的に結合する抗体をレパートリーから選択し、
それにより二重特異性抗体を得ること

を含む方法。

10

【請求項 33】

抗原が、構造的に関連する 2 つの異なる分子の間で同一的な連続したトポロジー領域に基づいて設計される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

構造的に関連する 2 つの異なる分子がタンパク質であり、抗原が、この 2 つのタンパク質の間で同一的な連続したトポロジー領域のアミノ酸配列を含む、請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 35】

抗原が、構造的に関連する 2 つの異なる分子の共通する折りたたみ部のループを構造的に模倣することに基づいて設計される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

構造的に関連する 2 つの異なる分子がタンパク質であり、抗原が、この 2 つのタンパク質の共通する折りたたみ部のループを構造的に模倣する環状ペプチドである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

抗原が、ハイブリッド分子を作製するために、構造的に関連する 2 つの異なる分子の重複する部分を共にスプライシングすることに基づいて設計される、請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 38】

構造的に関連する 2 つの異なる分子がタンパク質であり、抗原が、この 2 つのタンパク質の重複するアミノ酸配列を一緒にスプライシングすることによって作製されるハイブリッドペプチドである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

抗原が構造的に関連する 2 つの異なる分子の一方である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 40】

抗体レパートリーが、動物を抗原で免疫化することによってインビボにおいて抗原にさらされる、請求項 32 に記載の方法。

40

【請求項 41】

動物のリンパ球に由来するハイブリドーマのパネルを調製し、そして構造的に関連する 2 つの異なる分子と特異的に結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することをさらに含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

動物が、マウス、ラット、ウサギおよびヤギからなる群から選択される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

動物が、抗原の内因性型について欠損したノックアウトマウスである、請求項 40 に記載の方法。

50

【請求項 4 4】

動物が、抗原刺激したときにヒト抗体を作製するようにヒト免疫グロブリン遺伝子について遺伝子導入されているマウスである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 5】

動物が、ヒト末梢血の単核細胞またはリンパ系細胞またはその前駆体を用いて再構成されている重症複合免疫不全症（S C I D）マウスである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 6】

動物が、致死的な全身照射、その後、重症複合免疫不全症（S C I D）マウスの骨髓細胞を用いた放射線防護、その後、機能的なヒトリンパ球を用いた移植で処置されているマウスである、請求項 4 0 に記載の方法。

10

【請求項 4 7】

抗体レパートリーが、組換え抗体ライブラリーを抗原でスクリーニングすることによってインビトロにおいて抗原にさらされる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】

組換え抗体ライブラリーがバクテリオファージの表面において発現している、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

組換え抗体ライブラリーが酵母の表面において発現している、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

組換え抗体ライブラリーが細菌の表面において発現している、請求項 4 7 に記載の方法。

20

【請求項 5 1】

組換え抗体ライブラリーが R N A タンパク質融合体として発現させられる、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 2】

組換え抗体ライブラリーが s c F v ライブラリーまたは F a b ライブラリーである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 3】

抗体レパートリーが、動物を抗原でインビボにおいて免疫化し、その後、動物のリンパ系細胞から調製された組換え抗体ライブラリーを抗原でインビトロにおいてスクリーニングすることによって抗原にさらされる、請求項 3 2 に記載の方法。

30

【請求項 5 4】

抗体レパートリーが、動物を抗原でインビボにおいて免疫化し、その後、動物のリンパ系細胞から調製された組換え抗体ライブラリーをインビトロにおいて親和性成熟させることによって抗原にさらされる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

抗体レパートリーが、動物を抗原でインビボにおいて免疫化し、その後、抗原と結合する抗体を分泌する単一細胞を選択し、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の c D N A をこの単一細胞から回収することによって抗原にさらされる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

二重特異性抗体が完全なヒト抗体である、請求項 3 2 に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

二重特異性抗体がキメラ抗体である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 8】

二重特異性抗体が C D R グラフト化抗体である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 9】

請求項 3 2 に記載される方法によって得られる二重特異性抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 6 0】

生物学的サンプルまたは組織における I L - 1 α または I L - 1 β を検出する方法であって、I L - 1 α または I L - 1 β を含有することが疑われる生物学的サンプルまたは組織を請求項 1 に記載される二重特異性抗体またはその抗原結合部分と接触させて、生物学的

50

サンプルまたは組織における I L - 1 α または I L - 1 β を検出するための含む方法。

【請求項 6 1】

I L - 1 α または I L - 1 β が診断目的のために検出される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

生物学的サンプルがインビトロでのサンプルである、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

組織が被験体においてインビボで存在し、かつ方法が組織のインビボ画像化を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 4】

I L - 1 α または I L - 1 β の活性を阻害する方法であって、I L - 1 α または I L - 1 β の活性が阻害されるように、I L - 1 α または I L - 1 β を請求項 1 に記載される二重特異性抗体またはその抗原結合部分と接触させることを含む方法。 10

【請求項 6 5】

I L - 1 α または I L - 1 β の活性がインビトロで阻害される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

インターロイキン-1 関連障害を処置する方法であって、インターロイキン-1 関連障害に罹患している患者に、請求項 1 に記載される二重特異性抗体またはその抗原結合部分を、インターロイキン-1 関連障害について患者が処置されるように投与することを含む方法。 20

【請求項 6 7】

I L - 1 関連障害が炎症性障害である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

I L - 1 関連障害が自己免疫障害である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

I L - 1 関連障害が、慢性関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病および乾癬からなる群から選択される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 0】

抗体またはその抗原結合部分のライブラリーを作製する方法であって、

a) 第 1 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー A を得る工程、 30
b) 第 1 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー B を得る工程、
c) 第 2 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー C を得る工程、
d) 第 2 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー D を得る工程、
e) 組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー A を組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー D と組み合わせて、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー X を得る工程、および／または組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー C を組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー B と組み合わせて、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Y を得る工程、 40
を含む方法。

【請求項 7 1】

抗体またはその抗原結合部分のライブラリー X を抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Y と組み合わせて、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Z を得る工程をさらに含む、請求項 7 0 に記載の抗体またはその抗原結合部分のライブラリーを作製する方法。 40

【請求項 7 2】

請求項 7 0 に記載される方法に従って作製される、抗体またはその抗原結合部分のライブ 50

ラリー X。

【請求項 7 3】

請求項 7 0 に記載される方法に従って作製される、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Y。

【請求項 7 4】

請求項 7 1 に記載される方法に従って作製される、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Z。

【請求項 7 5】

二重特異性抗体またはその抗原結合部分を作製する方法であって、

- a) 第 1 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー A を得る工程、
- b) 第 1 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー B を得る工程、
- c) 第 2 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー C を得る工程、
- d) 第 2 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー D を得る工程、
- e) 組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー A を組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー D と組み合わせて、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー X を得る工程、および／あるいは組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー C を組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー B と組み合わせて、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Y を得る工程、そして
- f) 第 1 の抗原および第 2 の抗原の両方と結合する抗体またはその抗原結合部分を抗体またはその抗原結合部分のライブラリー X および／あるいは抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Y から選択する工程を含む方法。

【請求項 7 6】

請求項 7 5 に記載される方法によって作製される二重特異性抗体。

【請求項 7 7】

二重特異性抗体またはその抗原結合部分を作製する方法であって、

- a) 第 1 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー A を得る工程、
- b) 第 1 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー B を得る工程、
- c) 第 2 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー C を得る工程、
- d) 第 2 の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー D を得る工程、
- e) 組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー A を組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー D と組み合わせて、抗体ライブラリー X を得る工程、および／または組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリー C を組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリー B と組み合わせて、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Y を得る工程、
- f) 抗体またはその抗原結合部分のライブラリー X を抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Y と組み合わせて、抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Z を得る工程、
- g) 第 1 の抗原および第 2 の両方と結合する抗体またはその抗原結合部分を抗体またはその抗原結合部分のライブラリー Z から選択する工程を含む方法。

【請求項 7 8】

請求項 7 7 に記載される方法によって作製される二重特異性抗体またはその抗原結合部分

。

【請求項 79】

第1の抗原および第2の抗原がそれぞれ独立して、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドからなる群から選択され、第1の抗原および第2の抗原が同じではない、請求項70、75または77に記載の方法。

【請求項 80】

タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドが分泌型タンパク質または表面の受容体である、請求項79に記載の方法。

【請求項 81】

分泌型タンパク質が、IFN、TNF、インターロイキン、IP-10、PF4、GRO 10
、9E3、EMAP-11、CSF、FGFおよびPDGFからなる群から選択される、請求項80に記載の方法。

【請求項 82】

第1の抗原がIL-1 α であり、第2の抗原がIL-1 β である、請求項81に記載の方法。

【請求項 83】

請求項72、73または74に記載される抗体またはその抗原結合部分のライブラリー（1つまたは複数）の各メンバーをコードするヌクレオチド配列。

【請求項 84】

請求項76または78に記載される二重特異性抗体またはその抗原結合部分をコードする 20
ヌクレオチド配列。

【請求項 85】

請求項72、73または74に記載される抗体またはその抗原結合部分のライブラリーのメンバー（1つまたは複数）をコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 86】

請求項76または78に記載される二重特異性抗体またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 87】

請求項85に記載されるベクターでトランスフェクションされた宿主細胞。

【請求項 88】

請求項86に記載されるベクターでトランスフェクションされた宿主細胞。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

（発明の背景）

哺乳動物の免疫系には、数兆の異なる抗体特異性から構成される抗体レパートリーを全体として発現するBリンパ球が含まれる。特定の抗原に対する正常な免疫応答は、抗原と特異的に結合する1つ以上の抗体をこのレパートリーから選択し、免疫応答の成功は、少なくとも部分的にはこれらの抗体が、刺激抗原を特異的に認識し（そのような抗原を究極的には排除し）、かつそのような抗体の環境において他の分子を「無視」することができる機能により免疫応答が達成される。 40

【0002】

1つの特定の標的抗原を特異的に認識する抗体の有用性は、モノクローナル抗体技術の開発をもたらした。標準的なハイブリドーマ技術により、今日では、目的とする抗原に対して単一の特異性を有する抗体の調製が可能になっている。近年には、インビトロ抗体ライブラリーのスクリーニングなどの様々な組換え抗体技術が開発されている。これらの技術もまた、目的とする抗原に対して単一の特異性を有する抗体の製造を可能にしている。

【0003】

1つの標的抗原に対する特異性を有する抗体は、少なくともある種の状況下では、他の抗原に対する望ましくない交差反応性またはバックグラウンド結合を示すことがある。しかしながら、通常、この交差反応性またはバックグラウンド結合は予測することができない 50

(すなわち、抗体がどの抗原と交差反応するかを予測することができない)。さらに、通常、この交差反応性またはバックグラウンド結合は特異的な抗原結合と区別することができない。これは、交差反応性またはバックグラウンド結合は、典型的には、抗体の結合能の非常に小さい割合(例えば、抗体結合全体の1%以下)を表すだけであり、そして典型的には、高い抗体濃度(例えば、特異的な抗原結合を観測するために必要とされるよりも1000倍以上の高い濃度)で観測されるだけであるからである。構造的に関連するタンパク質ファミリーに属し得る抗原がいくつか存在するが、特定のファミリーメンバーに対する抗体応答は非常に特異的である。さらに、同じ受容体または受容体成分または複数の構造的に関連する受容体に結合するタンパク質ファミリーメンバーの例がいくつか存在する(例えば、IL-1ファミリーおよびTNFファミリーのメンバー)が、ファミリーの1つのメンバーに対して惹起されたモノクローナル抗体は、ファミリーの他のメンバーに対しては大きい交差反応性を示さない。ファミリーの様々なメンバーに対するMAbの交差反応性がないことには2つの理由が考えられる。第1に、標準的なハイブリドーマ製造では、標的抗原に対する特異性/親和性が大きい少数の抗体のみが探索され、その後、その少数の選択された抗体の交差反応性またはバックグラウンド結合が調べられる。第2に、ファミリー内のタンパク質は構造的に関連しているが、他にはない、重複しない免疫優性エピトープを有し得る。従って、全長のタンパク質を使用することによって惹起されたMAbは、他の構造的に関連するタンパク質と交差反応しないと考えられる。

10

【0004】

1つの種の抗原に対して惹起されたモノクローナル抗体が別種の同じ機能的な抗原に対して特異的に結合する例もまたある。例えば、抗マウスX抗体は、ヒトに由来する抗原Xと容易に結合することができる。これは、それらが同一ではないが、それらが重要な配列および構造的類似性をともに有しているからである。しかし、そのような種交差反応性抗体は、異なる種に由来する同じ抗原に対する特異性を有するので、「二重特異性」抗体を構成しない。

20

【0005】

従って、予測可能な二重特異性または多重特異性を有するモノクローナル抗体、すなわち、2つ以上の異なる抗原に対して真の特異性を有する抗体が依然として求められている。

【0006】

(発明の概要)

30

本発明は、少なくとも2つの異なる構造的に関連する抗原に対して二重の特異性を有する抗体を作製するための方法を提供すること；抗体レパートリーを抗原にさらすこと；および構造的に関連する2つの異なる分子と特異的に結合する抗体をレパートリーから選択し、それにより二重特異性抗体を得ることを伴う。臨床的状況において、同じタンパク質ファミリーのいくつかのメンバーが疾患プロセスの様々な症状に寄与することがある。従って、同じタンパク質ファミリーのいくつかのメンバーに結合して、そのタンパク質ファミリーの2つ以上のメンバーの機能を阻止する本発明の二重特異性抗体の使用は、疾患の症状を緩和するために、または疾患プロセス自体を妨げるために有益であり得る。さらに、本発明のそのような二重特異性抗体は、構造的に関連する抗原を検出するために有用であり、構造的に関連する抗原を精製するために有用であり、および構造的に関連する抗原を伴う診断アッセイにおいて有用である。

40

【0007】

好ましい実施形態において、抗原は、構造的に関連する2つの異なる分子の間で同一的な連続したトポロジー領域に基づいて設計される。例えば、構造的に関連する2つの異なる分子はタンパク質であり得るし、抗原は、この2つのタンパク質の間で同一的な連続したトポロジー領域のアミノ酸配列を含むペプチドであり得る。

【0008】

別の実施形態において、抗原は、構造的に関連する2つの異なる分子の共通する折りたたみ部のループを構造的に模倣することに基づいて設計される。例えば、抗原は、構造的に

50

関連する2つの異なるタンパク質の共通する折りたたみ部のループを構造的に模倣する環状ペプチドであり得る。

【0009】

さらに別の実施形態において、抗原は、ハイブリッド分子を作製するために、構造的に関連する2つの異なる分子の交互に連続する部分および／または重複する部分を一緒にスプライシングすることに基づいて設計される。例えば、抗原は、構造的に関連する2つの異なる分子の交互に連続する部分および／または重複する部分を一緒にスプライシングすることによって作製されるハイブリッドペプチドであり得る。

【0010】

なおさらに別の実施形態において、抗原は、構造的に関連する2つの異なる分子の一方を含むことができ、そして方法は、両方の関連する分子を特異的に認識する抗体を選択することを伴う。 10

【0011】

本発明の方法において、抗体レパートリーは、目的とする抗原に対してインビボまたはインビトロのいずれにおいてもさらすことができる。例えば、1つの実施形態において、抗原に対するレパートリーの暴露は、動物を抗原でインビボにおいて免疫化することを伴う。このインビボ法は、動物のリンパ球からハイブリドーマのパネルを調製し、そして構造的に関連する2つの異なる分子と特異的に結合する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することを伴う。免疫化される動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギまたはヤギ、あるいは前記動物のいずれかの遺伝子導入体（例えば、抗原刺激したときにヒト抗体を作製するようにヒト免疫グロブリン遺伝子について遺伝子導入されているマウスなど）であり得る。免疫化され得る動物の他のタイプには、ヒト末梢血の単核細胞またはリンパ系細胞またはその前駆体を用いて再構成されている重症複合免疫不全症（SCID）のマウス（hu-PBMC-SCIDキメラマウス）、および致死的な全身照射、その後、重症複合免疫不全症（SCID）マウスの骨髄細胞を用いた放射線防護、その後、機能的なヒトリンパ球を用いた移植で処置されているマウス（トリメラ（Trimerica）系）が含まれる。免疫化され得る動物のさらに他のタイプには、目的とする抗原（1つまたは複数）をコードする内因性遺伝子（1つまたは複数）について（例えば、相同的組換えによって）そのゲノムが「ノックアウト」されている動物（例えば、マウス）がある。この場合、そのようなKO動物は、目的とする抗原（1つまたは複数）で免疫化されたとき、その抗原を異物として認識する。 20 30

【0012】

別の実施形態において、抗体レパートリーは、組換え抗体ライブラリーを抗原でスクリーニングすることによってインビトロにおいて抗原にさらされる。組換え抗体ライブラリーは、例えば、バクテリオファージの表面において、または酵母の表面において、または細菌の表面において発現している。様々な実施形態において、組換え抗体ライブラリーは、例えば、scFvライブラリーまたはFabライブラリーである。さらに別の実施形態において、抗体ライブラリーはRNA-タンパク質融合体として発現させられる。

【0013】

二重特異性抗体を調製する別の方法は、動物を抗原でインビボにおいて免疫化することによって抗体レパートリーを抗原にさらし、その後、動物のリンパ系細胞から調製された組換え抗体ライブラリーを抗原でインビトロにおいてスクリーニングすることなどのインビボ法とインビトロ法との組合せを伴う。なおさらに別の方法は、動物を抗原でインビボにおいて免疫化することによって抗体レパートリーを抗原にさらし、その後、動物のリンパ系細胞から調製された組換え抗体ライブラリーをインビトロにおいて親和性成熟させることを伴う。さらに別の方法は、動物を抗原でインビボにおいて免疫化することによって抗体レパートリーを抗原にさらし、その後、目的とする抗体を分泌する単一の抗体産生細胞を選択し、そして重鎖可変領域および軽鎖可変領域のcDNAをこれらの選択された細胞から（例えば、PCRによって）回収し、そして重鎖可変領域および軽鎖可変領域を哺乳動物宿主細胞においてインビトロで発現させることを伴い（これは選択的リンパ球抗体法 40 50

またはS L A Mと呼ばれる)、それにより選択遺伝子配列のさらなる選択および操作が可能になる。なおさらに、モノクローナル抗体は、重鎖および軽鎖の抗体遺伝子を哺乳動物細胞において発現させ、そして必要な結合特異性を有する抗体を分泌する哺乳動物細胞を選択することによる発現クローニングによって選択することができる。

【0014】

本発明の方法は、完全なヒト抗体、キメラ抗体およびC D Rグラフト化抗体を含む様々な異なるタイプの二重特異性抗体ならびにその抗原結合部分の調製を可能にする。本発明の方法に従って調製される二重特異性抗体もまた提供される。本発明の好ましい二重特異性抗体は、インターロイキン-1 α およびインターロイキン-1 β と特異的に結合する二重特異性抗体である。そのような二重特異性抗体は、I L-1 α またはI L-1 β を検出する方法において使用することができる。この方法は、I L-1 α またはI L-1 β が検出されるように、I L-1 α またはI L-1 β をそのような二重特異性抗体またはその抗原結合部分と接触させることを含む。中和する二重特異性抗体もまた、I L-1 α またはI L-1 β の活性を阻害する方法において使用することができる。この方法は、I L-1 α またはI L-1 β の活性が阻害されるように、I L-1 α またはI L-1 β をそのような二重特異性抗体またはその抗原結合部分と接触させることを含む。そのような二重特異性抗体はまた、インターロイキン-1関連障害を処置する方法において使用することができる。この方法は、インターロイキン-1関連障害に罹患している患者にそのような二重特異性抗体またはその抗原結合部分を投与することを含む。

10

【0015】

別の実施形態において、本発明は、下記の工程を行うことによって抗体またはその抗原結合部分のライブラリーを作製する方法を提供する：a) 第1の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリーAを得る工程；b) 第1の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリーBを得る工程；c) 第2の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリーCを得る工程；d) 第2の抗原にさらすことから生じる抗体レパートリーから組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリーDを得る工程；そしてe) 組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリーAを組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリーDと組み合わせ、抗体またはその抗原結合部分のライブラリーXを得る工程、および／または組換え重鎖またはその抗原結合部分のライブラリーCを組換え軽鎖またはその抗原結合部分のライブラリーBと組み合わせ、抗体またはその抗原結合部分のライブラリーYを得る工程。

20

30

【0016】

本発明の別の実施形態において、本発明の直前に記載された方法は、抗体またはその抗原結合部分のライブラリーXを抗体またはその抗原結合部分のライブラリーYと組み合わせ、抗体またはその抗原結合部分のライブラリーZを得る工程をさらに含むことができる。

【0017】

さらなる実施形態において、本発明は、抗体またはその抗原結合部分のライブラリーX、YおよびZに関する。

40

【0018】

別の実施形態において、本発明の方法は、第1の抗原および第2の抗原の両方と結合する抗体またはその抗原結合部分をライブラリーX、Yおよび／またはZから選択することによって二重特異性抗体またはその抗原結合部分の同定を可能にする。

【0019】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明の方法のいずれかによって作製および／または選択される二重特異性抗体に関する。

【0020】

別の実施形態において、本発明はまた、ライブラリーX、YおよびZの抗体またはその抗原結合部分のそれぞれのメンバーをコードするヌクレオチド配列；そして二重特異性抗体

50

またはその抗原結合部分、上記に記載されるヌクレオチド配列を含むベクター、および上記に記載されるベクターでトランスフェクションされた宿主細胞に関する。

【0021】

好ましい実施形態において、第1の抗原および第2の抗原はそれぞれ独立して、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドからなる群から選択されるが、第1の抗原および第2の抗原は同じではない。さらなる実施形態において、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドは分泌型タンパク質または表面の受容体であり、分泌型タンパク質は、IFN、TNF、インターロイキン、IP-10、PF4、GRO、9E3、EMAP-II、CSF、FGFおよびPDGFからなる群から選択される。別の好ましい実施形態において、第1の抗原はIL-1 α であり、第2の抗原はIL-1 β である。

10

【0022】

(発明の詳細な説明)

本発明は、二重特異性抗体（すなわち、構造的に関連する少なくとも2つの異なる分子に対して親和性を有する抗体）を作製するための抗原の設計および使用、ならびにそのような二重特異性抗体の選択、調製および使用に関する。本発明の抗原の構造的関連性は抗原（例えば、タンパク質）の全域にわたってであり得るか、または特定の構造的に関連する領域だけにおいてであり得る。本発明は、構造的に関連する2つの異なる分子と特異的に結合する二重特異性抗体を得るための方法を提供する。この方法は、構造的に関連する2つの異なる分子の共通する構造的な特徴を含む抗原を提供すること；抗体レパートリーを抗原にさらすこと；構造的に関連する2つの異なる分子と特異的に結合する抗体をレパートリーから選択し、それにより二重特異性抗体を得ることを含む。

20

【0023】

本発明は、本明細書中では、関連する2つの異なる抗原の認識に関して記載されるが、用語「二重特異性抗体」は、関連する2つ以上の異なる抗原さえも特異的に認識する抗体、例えば、3つ、4つ、5つまたはそれ以上の構造的に関連する別個の抗原を認識する抗体などを包含することを意味することを理解しなければならないことに留意しなければならない。さらに、用語「構造的に関連する異なる抗原」は、その全体的な構造が関連している抗原（例えば、タンパク質）、ならびに1つ以上の構造的に関連する領域をともに有するが、それ以外では関連性がない抗原（例えば、タンパク質）を包含することを意味する。従って、「構造的に関連する異なる」抗原には、例えば、共通する全体的な構造を有する同じタンパク質ファミリーのメンバーである2つのタンパク質を挙げることができ、または例えば、全体的な構造は似ていない（関連性がない）が、構造的に関連するドメインをそれぞれが含む2つのタンパク質を挙げることができる。

30

【0024】

様々なタイプの抗原を使用して、本発明の抗体を誘発させることができ、そして様々な抗体作製方法を適用して、本発明の二重特異性抗体を得ることができる。これらは、下記において、下記の節でさらに詳しく議論される。

【0025】

40

I. 二重特異性抗原

本発明の二重特異性抗体を調製するために、抗体が、二重特異性抗体を誘発させることができる抗原に対して惹起される。そのような抗原は、一般に、本明細書中では二重特異性抗原として示される。様々な異なるタイプの二重特異性抗原を本発明において使用することができ、そして様々なタイプの二重特異性抗原の設計が下記の節においてさらに記載される。

【0026】

A. 連続したトポロジー領域

1つの実施形態において、本発明の二重特異性抗原は、二重特異性抗体が惹起させられる構造的に関連する2つの異なる分子の間で同一的および／または類似的な連続したトポロ

50

ジ領域を含む。好ましくは、抗原は、構造的に関連する2つの異なる分子の間で同一的および／または類似的な最大（例えば、最長）の連続したトポロジー領域を含む。好ましくは、構造的に関連する2つの異なる分子はタンパク質であり、二重特異性抗原は、2つのタンパク質の間で同一的および／または類似的な最大（例えば、最長）の連続したトポロジー領域に対応する直鎖状ペプチドを含む。選ばれる同一的／類似的な適切な領域は、好ましくは、受容体またはリガンドが結合する領域であるが、同一的／類似的な他の領域もまた使用することができる。

【0027】

2つの分子（例えば、タンパク質）の間で同一的な連続したトポロジー領域を決定するために、2つの分子（例えば、タンパク質）が比較され（例えば、相同性モデリング、構造情報またはアラインメントされ）、同一の領域または類似した領域が明らかにされる。タンパク質の場合、アラインメントアルゴリズムを使用して、最適なアラインメントを作り出し、そして2つのタンパク質の間で同一的／類似的な最大（例えば、最長）の連続したトポロジー領域を同定することができる。2つの配列を比較するために利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例としては、KarlinおよびAltschul（1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87：2264～68）のアルゴリズムがあり、これは、KarlinおよびAltschul（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90：5873～77）に記載されるように改変されている。そのようなアルゴリズムは、Altschul他（1990、J. Mol. Biol. 215：403～10）のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。比較のためにギャップを有するアラインメントを得るために、Altschul他（1997）Nucleic Acids Research、25（17）：3389～3402に記載されるようなギャップ化BLASTを利用することができる。BLASTプログラムおよびギャップ化BLASTプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）の設定省略時のパラメーターを使用することができる。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照のこと。使用され得る別の数学的アルゴリズムには、MyersおよびMiller（1988）Comput. Appl. Biosci. 4：11～17に記載されるALLIGNプログラムにおいて使用されるアルゴリズムがある。

【0028】

同一的／類似的な適切な領域が選ばれると、その領域に対応する二重特異性抗原を化学合成することができる。例えば、ペプチド抗原の場合、ペプチドを標準的なペプチド合成法によって合成することができる。1つの実施形態において、ペプチド抗原はL-アミノ酸を含む。他の実施形態では、ペプチド抗原は、一部または全体がD-アミノ酸から構成され得る。構造的に類似する2つの異なるタンパク質の間で同一的および／または類似的な連続したトポロジー領域に基づく二重特異性抗原の設計例が実施例1に詳しく記載される。

【0029】

B. 構造的ループを模倣する環状ペプチド

別の実施形態において、本発明の二重特異性抗原は、二重特異性抗体が惹起させられる構造的に関連する2つの異なる分子（例えば、タンパク質）の共通する折りたたみ部の重要なループを構造的に模倣する環状分子（好ましくは環状ペプチド）を含む。このタイプの抗原を調製するために、2つの関連する分子の構造が比較され、2つの分子において見出される共通する折りたたみ部のループが明らかにされる。標準的な分子モデリングおよび結晶学的解析を、そのようなループおよび共通する折りたたみ部の同定を助けるために使用することができる。同一の領域および類似した領域（例えば、2つのタンパク質の間でのアミノ酸配列）が同定され、コンセンサス配列を、同一ではないが、類似している領域について設計することができる。鎖状の分子（例えば、直鎖状ペプチド）がこれらの類似した領域および同一の領域に基づいて設計され、その後、この鎖状分子は、重要なループを模倣する抗原を作製するために、知られている化学的手段によって環化することができ

る。例えば、ペプチドを環化させるために、プロリンおよびグリシンを直鎖状ペプチドの末端に付加することができる。構造的に関連する2つの異なるタンパク質がともに有する構造的ループを模倣する環状ペプチドに基づく二重特異性抗原の設計例が実施例2に詳しく記載される。

【0030】

C. ハイブリッド分子

別の実施形態において、本発明の二重特異性抗原は、二重特異性抗体が惹起させられる構造的に關する2つの異なる分子（例えば、タンパク質）の交互に連続する領域および／または重複する領域を含むハイブリッド分子（好ましくはハイブリッドペプチド）を含む。このタイプの抗原を調製するために、2つの分子の構造が比較され、重複する領域（すなわち、同一の領域）が、同一でない領域と同様に、2つの分子の間に明らかにされる。2つの分子のそれぞれに由来する交互に連続する領域（例えば、アミノ酸配列）を両方の分子に共通する重複した領域と同様に含むことが好ましいハイブリッド分子（例えば、2つの関連する分子がタンパク質であるときにはハイブリッドペプチド）が調製される。概略的には、そのようなハイブリッド分子はX-Y-Zとして表すことができる（式中、Yは、2つの関連する分子の間に同一的または強い類似的な領域（すなわち、重複する領域）を表し、Xは、関連する分子の一方に由来する領域を表し、Zは、関連する分子のもう一方に由来する領域を表す）。構造的に関連する2つの異なるタンパク質の配列から構成されるハイブリッドペプチドに基づく二重特異性抗原の設計例が実施例3に詳しく記載される。

10

20

【0031】

別のタイプのハイブリッド分子として、（「標的」タンパク質と呼ばれる）全長のタンパク質にペプチドが導入されている分子がある。構造的に関連する2つの異なるタンパク質の機能的な領域（例えば、受容体と相互作用する領域）を表すペプチドが選択される。そのようなペプチドは、本明細書中では機能的ペプチドとして示される。関連するタンパク質の一方に由来する機能的ペプチドは、その後、もう一方の関連するタンパク質の全長タンパク質に導入されるか、あるいは関連性がないタンパク質に導入される。例えば、IL-1 α の受容体相互作用領域に対応するIL-1 α のペプチドが同定され、そしてIL-1 α のこの機能的ペプチドが全長のIL-1 β タンパク質に導入され、IL-1 α /IL-1 β のハイブリッド分子が作製される。同様に、IL-1 β の受容体相互作用領域に対応するIL-1 β のペプチドが同定され、そしてIL-1 β のこの機能的ペプチドが全長のIL-1 α タンパク質に導入され、IL-1 α /IL-1 β のハイブリッド分子が作製される。関連する全長タンパク質への機能的ペプチドのこの導入により、機能的ペプチドが両端に存在することになり、そして機能的ペプチドの折りたたみ構造が保たれる。

30

【0032】

IL-1 α /IL-1 β ハイブリッドの場合、機能的ペプチドは好ましくは、IL-1 α およびIL-1 β の共通する折りたたみ構造を表す標的領域に挿入される（天然アミノ酸と置き換えられる）。そのような領域はタンパク質の全長にわたって（例えば、N末端領域、タンパク質の中央部、C末端領域において）見出すことができる。さらに、共通するIL-1 α /IL-1 β 折りたたみ構造を表す機能的ペプチドもまた、アルブミンまたは任意の他の天然に存在するタンパク質などの関連性がないタンパク質に挿入することができる。この場合、ペプチドに対する好ましい挿入部位は、ペプチドが所望する折りたたみ構造を維持することができる領域である。従って、挿入部位は、タンパク質のN末端、中央部またはC末端のいずれかであり得る。任意の天然に存在する標的タンパク質におけるペプチドの配置は、ペプチドが由来する天然タンパク質によってペプチドに負わせられる構造的制約を模倣するように選択される。機能的ペプチドのアミノ酸が標的タンパク質に付加されるように機能的ペプチドを単に標的タンパク質に挿入することができる一方で、好ましくは、機能的ペプチドのアミノ酸は、挿入される標的タンパク質の一部を置換する。

40

【0033】

50

非限定的な例として、ハイブリッド分子が、IL-1 α およびIL-1 β に対する二重特異性抗体を惹起させるための二重特異性抗原として使用するために構築される。この場合、IL-1 α またはIL-1 β のいずれかの特異的な構造的エレメントに対応する機能的ペプチドが等価な構造的位において全長のIL-1 β またはIL-1 α に導入される。選ばれたハイブリッド分子により、IL-1 β の残基160～176がIL-1 α の残基168～184で置換される。得られる分子は下記のアミノ酸配列を有する（置換されたIL-1 α 配列（残基168～184）には下線が付されている）：

APVRS LNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQV
VFSMGAYKSSSKDDAKITVILGLKEKNLYLSCVVKDDKPTL
QLESVDPKNYPKKMEKRFFVFNKIEINNKL E F E S A Q F P N W 10
YISTTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS（配列番号4）

この分子は、公開されているIL-1 α およびIL-1 β のcDNA配列を使用する標準的な分子生物学的技術（例えば、クローニング、ポリメラーゼ連鎖反応）および組換えタンパク質発現技術を使用して調製することができる。ハイブリッドDNAを調製して、適切な発現ベクターに導入することができ、そしてポリペプチドを、発現ベクターを適切な宿主細胞に導入することによって発現させることができる。

【0034】

D. 疎水性プロットに基づくペプチド

別の実施形態において、本発明の二重特異性抗原は、非常に抗原性であることが予測されるペプチドを選択するために疎水性プロットに基づいて選択される。例えば、ペプチドの抗原性指数を、JamesonおよびWolf（CABIOS、4（1）、181～186（1988））によって記載されるようなコンピューターソフトウェアを使用して計算することができる。抗体が結合するための目的とする領域を、抗原性の可能性を最大にするために選ぶことができる。 20

【0035】

E. 抗原でトランスフェクションされた細胞による免疫化

別の実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、抗原でトランスフェクションされた細胞による免疫化によって調製される（すなわち、本発明の二重特異性抗原は、抗原でトランスフェクションされた細胞であり得る）。構造的に関連する2つの異なる抗原またはそれらのハイブリッド分子を安定的に発現する細胞株を作製することができる。例えば、IL-1 α またはIL-1 β またはIL-1 α /IL-1 β ハイブリッド分子（例えば、配列番号4）を安定的に発現する細胞株を作製することができる。目的とする分子を、（可溶性タンパク質の場合には）細胞から分泌させることができ、または（受容体、酵素の場合には）細胞表面において発現させることができる。宿主細胞による抗原の発現を可能にする宿主細胞への遺伝子移入は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞融合、リポフェクション、粒子衝撃導入、マイクロインジェクションまたはウイルス感染（これらに限定されない）を含む多数の従来の手段によって達成することができる。目的とする抗原を発現する細胞株は、その後、抗体を産生させるための目的とする動物の体内に1つ以上の様々な経路（腹腔内、皮下、筋肉内など）を介して移植することができる。その後、細胞は、目的とする抗原の徐放性供給源として役立つ。好ましくは、細胞は全長のタンパク質を発現する。しかしながら、抗原性のフラグメントもまた発現させることができる。可溶性タンパク質の場合、タンパク質は好ましくは、細胞によって分泌される。2つの非常に関連する受容体の細胞外ドメインに対する二重特異性抗体を作製するために、受容体は好ましくは、細胞表面において発現させられる。 30 40

【0036】

F. 構造的に関連する分子の1つによる免疫化

別の実施形態において、二重特異性抗原は、二重特異性抗体が惹起させられる構造的に関連する2つの異なる分子の単に一方である。2つの関連する分子の一方が免疫化剤として使用され、その後、得られる抗体レパートリーが、構造的に関連する2つの異なる分子の両方と結合する抗体について、より好ましくは、構造的に関連する2つの異なる分子の両 50

方を中和する抗体についてスクリーニングされる。例えば、 $IL-1\alpha$ または $IL-1\beta$ のいずれかで免疫化し、その後、 α/β の結合体について、より好ましくは、 α/β の中和体についてスクリーニングすることができる。この実施形態において使用されるように、用語「免疫化する」は、大ざっぱには、抗体レパートリーを $IL-1\alpha$ または $IL-1\beta$ などの抗原にインビボまたはインビトロのいずれかにおいてさらすことを包含することが意図される。従って、この実施形態には、動物を $IL-1\alpha$ または $IL-1\beta$ のいずれかで免疫化し、得られる惹起された抗体をスクリーニングして、 $IL-1\alpha$ および $IL-1\beta$ の両方と結合するそのような抗体を選択すること、ならびに組換え抗体ライブラリーをインビトロにおいて $IL-1\alpha$ または $IL-1\beta$ のいずれかでスクリーニングし、その後、 $IL-1\alpha$ および $IL-1\beta$ の両方と結合する組換え抗体を選択することが包含される。 10

【0037】

I I. 二重特異性抗体の作製方法

本発明の二重特異性抗体を調製するために、抗体レパートリー（インビボまたはインビトロのいずれか）が、前節に記載されるように調製された二重特異性抗原にさらされ、そして適切な二重特異性抗体がレパートリーから選択される。抗原の抗体認識の2つの要素は、特異的な分子相互作用に基づく構造的認識および親和性成熟である。自然の免疫応答のとき、構造的モチーフを認識する低親和性抗体（例えば、ある種のパターン認識受容体による抗原の認識）が容易に発達し、そして自然の免疫応答における初期には、少数のクローンの親和性を増大させる体細胞成熟がこれに続く。インビボおよびインビトロでの様々なプロセスが、この自然の現象を模倣するために開発されている。低親和性の二重特異性抗体を、本明細書中に記載されるインビトロ法およびインビボ法のいずれによっても作製することができ、そしてより大きい親和性の二重特異性Mabを、本明細書中に記載される体細胞変異法によって調製することができる。さらに、高親和性の二重特異性Mabを最適化するために、所望する抗原との低親和性Mabの同時結晶構造体を作製することができる。得られる構造情報は、本明細書中に記載されるように、特異的な分子相互作用を増強するためにMabの特異的な接触残基を変化（変異）させることによってさらなる親和性増強の指針となり得る。 20

【0038】

インビボ法またはインビトロ法または両者の組合せを使用する二重特異性抗体の作製方法が下記の節においてさらに詳しく記載される。 30

【0039】

A. インビボ法

抗体を調製するための標準的なインビボ法は、適切な動物被験体を抗原で免疫化し、それによりインビボ抗体レパートリーを抗原にさらし、その後、目的とする抗体（1つまたは複数）を動物から回収することによる。そのような方法は、二重特異性抗原の使用および目的とする2つの構造的に関連する分子を特異的に認識する抗体に対する選択によって二重特異性抗体の調製に適合させることができる。二重特異性抗体は、好適な被験体（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物、これにはそのような哺乳動物の遺伝子導入体およびノックアウト体が含まれる）を二重特異性抗原の免疫原調製物で免疫化することによって調製することができる。適切な免疫原調製物は、例えば、化学合成または組換え発現された二重特異性抗原を含むことができる。免疫原調製物は、フロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバントなどのアジュバント、または類似する免疫刺激化合物をさらに含むことができる。さらに、特にインビボ免疫化によって抗体を惹起させるために使用されるとき、本発明の二重特異性抗原は単独で使用することができ、またはより好ましくは、キャリアタンパク質との結合体として使用される。抗体応答を増強するためのそのような方法はこの分野では十分に知られている。二重特異性抗原を結合させることができる好適なキャリアタンパク質の例には、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびアルブミンが挙げられる。 40

【0040】

抗体産生細胞は被験体から得ることができ、そしてKohlerおよびMilstein (1975、Nature、256:495~497)によって最初に記載されたハイブリドーマ技術など標準的な技術によってモノクローナル抗体を調製するために使用することができる(Brown他(1981) J. Immunol. 127:539~46; Brown他(1980) J. Biol. Chem. 255:4980~83; Yeh他(1976) PNAS、76:2927~31; Yeh他(1982) Int. J. Cancer、29:269~75もまた参照のこと)。モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製するための技術は十分に知られている(一般的には、R. H. Kenneth、Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses、Plenum Publishing Corp.、New York、New York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med.、54:387~407; M. L. Gelfer 他(1977) Somatic Cell Genet.、3:231~36を参照のこと)。簡単に記載すると、不死細胞株(典型的にはミエローマ)が、上記に記載されるように二重特異性免疫原で免疫化された哺乳動物に由来するリンパ球(典型的には、脾臓細胞またはリンパ節細胞または末梢血リンパ球)に対して融合させられ、そして得られるハイブリドーマ細胞の培養上清が、目的とする構造的に関連する2つの異なる分子に対して二重の特異性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定するためにスクリーニングされる。リンパ球および不死化細胞株を融合するために使用される多くのよく知られているプロトコルはどれも、二重特異性モノクローナル抗体を作製するために適用することができる(例えば、G. Galfre 他(1977) Nature、266:550~52; Gelfer 他、Somatic Cell Genet. (前掲); Lerner 他、Yale J. Biol. Med. (前掲); Kenneth、Monoclonal Antibodies (前掲)を参照のこと)。さらに、当業者は、そのような方法には多くの変法があり、これらもまた有用であることを理解する。典型的には、不死細胞株(例えば、ミエローマ細胞株)は、リンパ球と同じ哺乳動物種に由来する。例えば、ネズミのハイブリドーマを、本発明の免疫原調製物で免疫化されたマウスに由来するリンパ球を不死化マウス細胞株と融合することによって作製することができる。好ましい不死細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養培地(「HAT培地」)に対して感受性を有するマウスミエローマ細胞株である。多数のミエローマ細胞物はどれも、標準的な技術に従って、融合相手として使用することができる(例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/O-Ag14のミエローマ株)。これらのミエローマ株はAmerican Type Culture Collection (ATCC、Rockville、Md)から入手することができる。典型的には、HAT感受性のマウスミエローマ細胞が、ポリエチレングリコール(「PEG」)を使用してマウスの脾臓細胞に対して融合させられる。融合から得られるハイブリドーマ細胞は、その後、融合していないミエローマ細胞および非産生的に融合したミエローマ細胞が生存できないHAT培地を使用して選択される(融合していない脾臓細胞は、形質転換されていないので数日後に死亡する)。目的とする2つの構造的に関連する分子を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞が、2つの関連する分子と特異的に結合するそのような抗体を選択するために、例えば、標準的なELISAアッセイを使用して、ハイブリドーマの培養上清をそのような抗体についてスクリーニングすることによって同定される。

【0041】

所望する抗体のタイプに依存して、様々な動物宿主をインビボ免疫化のために使用することができる。目的とする抗原(1つまたは複数)の内因性型を自身が発現する宿主を使用することができ、あるいは目的とする抗原(1つまたは複数)の内因性型を欠損させた宿主を使用することができる。例えば、対応する内因性遺伝子に対する相同的組換えによって特定の内因性タンパク質を欠損させたマウス(すなわち、「ノックアウト」マウス)は、そのタンパク質で免疫化されたときにタンパク質に対する液性応答を誘発し、従って、

そのタンパク質に対する高親和性のモノクローナル抗体を産生させるために使用できることが示されている（例えば、Rose, J. 他（1995）J. Immunol. Methods、183：231～237；Lunn, M. P. 他（2000）J. Neurochem. 75：404～412を参照のこと）。

【0042】

非ヒト抗体を（例えば、ヒトの二重特異性抗原に対して）産生させる場合、様々な非ヒト哺乳動物が抗体産生用の宿主として好適であり、これには、マウス、ラット、ウサギおよびヤギ（ならびにそれらのノックアウト体）（これらに限定されない）が含まれるが、マウスがハイブリドーマ製造には好ましい。さらに、完全なヒト抗体をヒトの二重特異性抗原に対して産生させる場合、ヒト抗体レパートリーを発現する非ヒト宿主動物を使用することができ、そのような非ヒト動物には、ヒト免疫グロブリンのトランスジーンを有する遺伝子導入動物（例えば、マウス）であるhu-PBMC-SCIDキメラマウス、およびヒト／マウスの放射線照射キメラが含まれる。これらはそれぞれが下記においてさらに議論される。

10

【0043】

例えば、1つの実施形態において、二重特異性抗原で免疫化される動物は、抗原刺激したときに非ヒト哺乳動物（例えば、マウス）がヒト抗体を作製するようにヒト免疫グロブリン遺伝子について遺伝子導入されている非ヒト哺乳動物（好ましくはマウス）である。そのような動物において、典型的には、ヒト生殖系列形態の重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンのトランスジーンが、その内因性の重鎖座および軽鎖座が不活性であるように操作されている動物に導入される。そのような動物を（例えば、ヒト抗原で）抗原刺激したとき、ヒト免疫グロブリンの配列に由来する抗体（すなわち、ヒト抗体）が産生され、そしてヒトモノクローナル抗体を標準的なハイブリドーマ技術によってそのような動物のリンパ球から作製することができる。ヒト抗体の産生におけるヒト免疫グロブリン遺伝子導入マウスおよびその使用のさらなる記載については、例えば、米国特許第5,939,598号、PCT国際特許出願公開WO96/33735、PCT国際特許出願公開WO96/34096、PCT国際特許出願公開WO98/24893およびPCT国際特許出願公開WO99/53049（Abgenix Inc.）、ならびに米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、同第5,770,429号、同第5,814,318号、同第5,877,397号およびPCT国際特許出願公開WO99/45962（Genpharm Inc.）を参照のこと。また、MacQuitty, J. J. およびKay, R. M.（1992）Science、257：1188；Taylor, L. D. 他（1992）Nucleic Acids Res. 20：6287～6295；Lonberg, N. 他（1994）Nature、368：856～859；Lonberg, N. およびHuszar, D.（1995）Int. Rev. Immunol. 13：65～93；Harding, F. A. およびLonberg, N.（1995）Ann. N. Y. Acad. Sci. 764：536～546；Fishwild, D. M. 他（1996）Nature Biotechnology、14：845～851；Mendez, M. J. 他（1997）Nature Genetics、15：146～156；Green, L. L. およびJakobovits, A.（1998）J. Exp. Med. 188：483～495；Green, L. L.（1999）J. Immunol. Methods、231：11～23；Yang, X. D. 他（1999）J. Leukoc. Biol. 66：401～410；Gallico, M. L. 他（2000）Eur. J. Immunol. 30：534～540を参照のこと。

20

30

40

【0044】

別の実施形態において、二重特異性抗原で免疫化される動物は、ヒト末梢血の単核細胞またはリンパ系細胞またはその前駆体を用いて再構成されている重症複合免疫不全症（SCID）のマウスである。hu-PBMC-SCIDキメラマウスとして示されるそのようなマウスは、抗原刺激したときにヒト免疫グロブリン応答を産生することが明らかにされ

50

ている。抗体作製におけるこれらのマウスおよびその使用のさらなる記載については、例えば、Leader, K. A. 他 (1992) *Immunology*, 76: 229~234; Bombil, F. 他 (1996) *Immunobiol.* 195: 360~375; Murphy, W. J. 他 (1996) *Semin. Immunol.* 8: 233~241; Herz, U. 他 (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113: 150~152; Albert, S. E. 他 (1997) *J. Immunol.* 159: 1393~1403; Nguyen, H. 他 (1997) *Microbiol. Immunol.* 41: 901~907; Arai, K. 他 (1998) *J. Immunol. Methods*, 217: 79~85; Yoshinari, K. および Arai, K. (1998) *Hybridoma*, 17: 41~45; Hutchins, W. A. 他 (1999) *Hybridoma*, 18: 121~129; Murphy, W. J. 他 (1999) *Clin. Immunol.* 90: 22~27; Smithson, S. L. 他 (1999) *Mol. Immunol.* 36: 113~124; Chamat, S. 他 (1999) *J. Infect. Diseases*, 180: 268~277; Heard, C. 他 (1999) *Molec. Med.* 5: 35~45を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0045】

別の実施形態において、二重特異性抗原で免疫化される動物は、致死的な全身照射、その後、重症複合免疫不全症 (SCID) マウスの骨髓細胞を用いた放射線防護、その後、機能的なヒトリンパ球を用いた移植で処置されているマウスである。このタイプのキメラはトリメラ (Trimer) システムと呼ばれており、マウスを目的の抗原で免疫化し、その後、標準的なハイブリドーマ技術を使用してモノクローナル抗体を調製することによってヒトモノクローナル抗体を産生させるために使用されている。抗体作製におけるこれらのマウスおよびその使用のさらなる記載については、例えば、Eren, R. 他 (1998) *Immunology*, 93: 154~161; Reisner, Y および Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16: 242~246; Ilan, E. 他 (1999) *Hepatology*, 29: 553~562; Bocher, W. O. 他 (1999) *Immunology*, 96: 634~641を参照のこと。

【0046】

B. インビトロ法

インビボ免疫化および選択により二重特異性抗体を調製することの代わりに、本発明の二重特異性抗体は、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー (例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー) を二重特異性抗原でスクリーニングし、それにより、目的とする2つの構造的に関連する異なる分子に対して特異的に結合する免疫グロブリンライブラリーのメンバーを単離することによって同定および単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを作製し、スクリーニングするためのキットが市販されている (例えば、Pharmaciaの組換えファージ抗体システム、カタログ番号27-9400-01; およびStratageneのSurfZAP (商標) ファージディスプレイキット、カタログ番号240612)。様々な実施形態において、ファージディスプレイライブラリーはscFvライブラリーまたはFabライブラリーである。組換え抗体ライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ技術はこの分野では幅広く記載されている。抗体ディスプレイライブラリーの作製およびスクリーニングにおける使用に特に適し得る方法および化合物の例を下記において見出すことができる: 例えば、McCafferty 他、国際特許出願公開WO92/01047、米国特許第5,969,108号および欧州特許EP589,877 (これらは特にscFvのディスプレイを記載する)、Ladner 他、米国特許第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,571,698号、同第5,837,500号および欧州特許EP436,597 (これらは、例えば、pIII融合を記載する); Dower 他、国際特許出願公開WO91/17271、米国特許第5,427,908号、同第5,580,7

17号および欧州特許EP527, 839（これらは特にFabのディスプレイを記載する）；Winter他、国際特許出願公開WO92/20791および欧州特許EP368, 684（これらは特に免疫グロブリン可変ドメインの配列のクローニングを記載する）；Griffiths他、米国特許第5, 885, 793号および欧州特許EP589, 877（これらは、特に、組換えライブラリーを使用してヒト抗原に対するヒト抗体を単離することを記載する）；Garrard他、国際特許出願公開WO92/09690（これは特にファージ発現技術を記載する）；Knappik他、国際特許出願公開WO97/08320（これはヒト組換え抗体ライブラリーHuCalを記載する）；Salfeld他、国際特許出願公開WO97/29131（これは、ヒト抗原（ヒト腫瘍壊死因子α）に対する組換えヒト抗体の調製、ならびに組換え抗体のインビトロ親和性成熟を記載する）、およびSalfeld他、米国仮特許出願第60/126, 603号（これもまた、ヒト抗原（ヒトインターロイキン12）に対する組換えヒト抗体の調製、ならびに組換え抗体のインビトロ親和性成熟を記載する）。

10

【0047】

組換え抗体ライブラリースクリーニングの他の記載を、Fuchs他（1991）Bio/Techonology、9：1370～1372；Hay他（1992）Hum Antibod Hybridomas、3：81～85；Huse他（1989）Science、246：1275～1281；Griffiths他（1993）EMBO J、12：725～734；Hawkins他（1992）J Mol Biol、226：889～896；Clarkson他（1991）Nature、352：624～628；Gram他（1992）PNAS、89：3576～3580；Garrard他（1991）Bio/Techonology、9：1373～1377；Hoogenboom他（1991）Nuc Acid Res、19：4133～4137；Barbas他（1991）PNAS、88：7978～7982；McCafferty他、Nature（1990）348：552～554；Knappik他（2000）J. Mol. Biol. 296：57～86などの科学的刊行物に見出すことができる。

20

【0048】

バクテリオファージディスプレイシステムを使用することの代わりに、組換え抗体ライブラリーを酵母または細菌の表面に発現させることができる。酵母の表面において発現するライブラリーを調製し、スクリーニングする方法がさらに、PCT国際特許出願公開WO99/36569に記載される。細菌の表面において発現するライブラリーを調製し、スクリーニングする方法がさらに、PCT国際特許出願公開WO98/49286に記載される。

30

【0049】

目的とする抗体がコンビナトリアルライブラリーから同定されると、抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNAが、ライブラリーのスクリーニングプロセスのときに単離されたディスプレイパッケージ（例えば、ファージ）からDNAをPCR増幅することなどによる標準的な分子生物学的技術によって単離される。PCRプライマーが調製され得る抗体の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子のヌクレオチド配列はこの分野では知られている。例えば、多くのそのような配列が、Kabata, E. A. 他（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest（第5版、米国厚生省、NIH刊行物番号91-3242）に、そして「Vbase」ヒト生殖系列配列データベースに開示されている。

40

【0050】

本発明の抗体または抗体の一部は、免疫グロブリンの軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子を宿主細胞において組換え発現することによって調製することができる。抗体を組換え発現するために、宿主細胞は、軽鎖および重鎖が宿主細胞において発現するように、好ましくは、宿主細胞が培養される培地に分泌され、そしてそのような培地から抗体が回収され得るように、抗体の免疫グロブリンの軽鎖および重鎖をコードするDNAフラグメントを有する1つまたは複数の組換え発現ベクターでトランスフェクションされる。標準的な組換えD

50

NA方法論が、抗体の重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を得るために、そしてこれらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み込むために、そしてベクターを宿主細胞に導入するために使用される。そのような方法論は、例えば、Sambrook、FritschおよびManiatis（編）、Molecular Cloning; A Laboratory Manual（第2版、Cold Spring Harbor、N. Y.、1989）、Ausubel、F. M. 他（編）、Current Protocols in Molecular Biology（Greene Publishing Associates、1989）および米国特許第4,816,397号（Boss他）などに記載されている。

【0051】

10

目的とする抗体のVHセグメントおよびVLセグメントをコードするDNAフラグメントが得られると、これらのDNAフラグメントは、例えば、可変領域の遺伝子を全長の抗体鎖遺伝子に、またはFabフラグメントの遺伝子に、またはscFv遺伝子に変換するために、標準的な組換えDNA技術によってさらに操作することができる。これらの操作において、VLまたはVHをコードするDNAフラグメントは、抗体の定常領域または柔軟なリンカーなどの別のタンパク質をコードする別のDNAフラグメントに対して機能的に連結される。これに関連して使用される用語「機能的に連結される」は、2つのDNAフラグメントによってコードされるアミノ酸配列の読み枠が変わらないように2つのDNAフラグメントが連結させられることを意味することが意図される。

【0052】

20

VH領域をコードする単離されたDNAは、VHをコードするDNAを、重鎖定常領域（CH1、CH2およびCH3）をコードする別のDNA分子に機能的に連結することによって全長の重鎖遺伝子に変換することができる。ヒトの重鎖定常領域遺伝子の配列はこの分野では知られており（例えば、Kabat、E. A. 他（1991）Sequence of Proteins of Immunological Interest（第5版、米国厚生省、NIH刊行物番号91-3242）を参照のこと）、これらの領域を含むDNAフラグメントを標準的なPCR増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgDの定常領域であり得るが、最も好ましくはIgG1またはIgG4の定常領域である。Fabフラグメントの重鎖遺伝子の場合、VHをコードするDNAを、重鎖のCH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に機能的に連結することができる。

30

【0053】

VL領域をコードする単離されたDNAは、VLをコードするDNAを、軽鎖定常領域CLをコードする別のDNA分子に機能的に連結することによって全長の軽鎖遺伝子（ならびにFab軽鎖遺伝子）に変換することができる。ヒトの軽鎖定常領域遺伝子の配列はこの分野では知られており（例えば、Kabat、E. A. 他（1991）Sequence of Proteins of Immunological Interest（第5版、米国厚生省、NIH刊行物番号91-3242）を参照のこと）、これらの領域を含むDNAフラグメントを標準的なPCR増幅により得ることができる。軽鎖定常領域はカッパまたはラムダの定常領域であり得るが、最も好ましくはカッパの定常領域である。

40

【0054】

scFv遺伝子を作製するために、VHおよびVLをコードするDNAフラグメントは、VL領域およびVH領域が柔軟なリンカーによって連結されている連続した単鎖タンパク質としてVH配列およびVL配列が発現し得るように、柔軟なリンカーをコードする別のフラグメントに、例えば、アミノ酸配列（Gly₄-Ser）₃をコードする別のフラグメントに機能的に連結される（例えば、Bird他（1988）Science、242：423～426；Huston他（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85：5879～5883；McCafferty他、Nature（1990）、348：552～554を参照のこと）。

50

【0055】

本発明の組換え抗体または抗体の一部を発現させるために、部分的または全長の軽鎖および重鎖をコードするDNA（これは上記に記載されるようにして得られる）を、これらの遺伝子が転写制御配列および翻訳制御配列に機能的に連結されるように発現ベクターに挿入することができる。これに関連して、用語「機能的に連結される」は、ベクター内の転写制御配列および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するその意図された機能を果たすように、抗体遺伝子がベクター内に連結されることを意味することが意図される。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合し得るように選ばれる。抗体の軽鎖遺伝子および抗体の重鎖遺伝子は別個のベクターに挿入することができ、またはより典型的には、両方の遺伝子は同じ発現ベクター内に挿入される。これらの抗体遺伝子は標準的な方法（例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクターにおける相補的な制限部位の連結、または制限部位が存在しない場合の平滑末端連結）によって発現ベクターに挿入される。軽鎖配列または重鎖配列の挿入に先立って、発現ベクターは抗体の定常領域配列を既に有することができる。例えば、VH配列およびVL配列を全長の抗体遺伝子に変換する1つの方法は、VHセグメントがベクター内のCHセグメント（1つまたは複数）に機能的に連結され、かつVLセグメントがベクター内のCLセグメントに機能的に連結されるように、重鎖定常領域および軽鎖定常領域をそれぞれ既にコードしている発現ベクターにそれらを挿入することである。さらに、または代わりに、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を容易にするシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端に読み枠を合わせて連結されるようにベクター内にクローン化することができる。シグナルペプチドは免疫グロブリンのシグナルペプチドまたは異種のシグナルペプチド（すなわち、免疫グロブリン以外のタンパク質に由来するシグナルペプチド）であり得る。

【0056】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。用語「調節配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御配列（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望するタンパク質の発現レベルなどのような要因に依存し得ることが当業者によって理解される。哺乳動物宿主細胞での発現について好ましい調節配列には、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を行わせるウイルスエレメントが含まれ、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー（CMVプロモーターおよび／またはエンハンサーなど）、シミアンウイルス40由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー（SV40プロモーターおよび／またはエンハンサーなど）、アデノウイルス由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））、およびポリオマ由来のプロモーターおよび／またはエンハンサーなどがある。ウイルス調節エレメントのさらなる記載およびその配列については、例えば、米国特許第5,168,062号（Stinski）、米国特許第4,510,245号（Bell他）および米国特許第4,968,615号（Schaffner他）を参照のこと。

【0057】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー遺伝子などのさらなる配列を有することができる。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号および同第5,179,017号（すべてAxel他）を参照のこと）。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、G418、ヒグロマイシンまたはメトトレキ

サートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入されている宿主細胞に付与する。好ましい選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子 (メトトレキサート選択／増幅とともに dhfr^r 宿主細胞において使用される) および neo 遺伝子 (G418 選択用) が挙げられる。

【0058】

軽鎖および重鎖を発現させるために、軽鎖および重鎖をコードする発現ベクター (1つまたは複数) は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される。用語「トランスフェクション」の様々な形態は、外因性の DNA を原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞に導入するために一般的に使用されている広範囲の技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE デキストラン トランスフェクションなどを包含することが意図される。本発明の抗体を原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞のいずれかにおいて発現させることは理論的には可能であるが、真核生物細胞 (最も好ましくは哺乳動物宿主細胞) において抗体を発現させることが最も好ましい。そのような真核生物細胞 (特に哺乳動物細胞) は、正しく折り畳まれた免疫学的に活性な抗体を組み立てて、分泌する可能性が原核生物細胞よりも高いからである。抗体遺伝子の原核生物での発現は、大量の活性な抗体を製造するためには効果的ではないことが報告されている (Boss, M. A. および Wood, C. R. (1985) *Immunology Today*, 6: 12~13)。

10

【0059】

本発明の組換え抗体を発現させるための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 (dhfr⁻ CHO 細胞を含む; これは Urlaub および Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216~4220 に記載され、例えば、R. J. Kaufman および P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601~621 に記載されるように、DHFR 選択マーカーとともに使用される)、NS0 ミエローマ細胞、COS 細胞および SP2 細胞が含まれる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入されたとき、抗体は、宿主細胞における抗体の産生を可能にする十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって、またはより好ましくは、宿主細胞が増殖する培養培地中への抗体の分泌を可能にする十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を使用して培養培地から回収することができる。

20

30

【0060】

宿主細胞はまた、Fab フラグメントまたは scFv 分子などの無傷の抗体の一部分を製造するために使用することができる。上記手法に対する様々な変法は本発明の範囲内に含まれることが理解される。例えば、宿主細胞を、本発明の抗体の軽鎖または重鎖の (両方ではなく) いずれかをコードする DNA で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 技術はまた、目的とする抗原に対する結合のためには必要ない、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 の一部またはすべてを除くために使用することができる。そのような短縮型 DNA 分子から発現する分子もまた本発明の抗体によって包含される。さらに、本発明の抗体を別の抗体に標準的な化学的架橋方法によって架橋することによって、1つの重鎖および1つの軽鎖が本発明の抗体であり、それ以外の重鎖および軽鎖が目的とする抗原とは異なる抗原に対して特異的である二官能性抗体を製造することができる。

40

【0061】

本発明の抗体またはその抗原結合部分を組換え発現させる好ましいシステムにおいて、抗体の重鎖と抗体の軽鎖との両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによって dhfr⁻ CHO 細胞に導入される。組換え発現ベクター内において、抗体の重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子はそれぞれ、遺伝子の高レベルの転写を行わせる CMV エンハンサー / AdMLP プロモーターの調節エレメントに機能的に連結されている。組換え発現ベクターはまた、ベクターでトランスフェクションされた CH

50

O細胞の選択を、メトトレキサートによる選択／増幅を使用して可能にするDHF R遺伝子を有する。選択された形質転換宿主細胞は、抗体の重鎖および軽鎖の発現を行わせるために培養され、そして完全な抗体が培養培地から回収される。標準的な分子生物学的技術が、組換え発現ベクターを調製するために、宿主細胞をトランスフェクションするために、形質転換体を選択するために、宿主細胞を培養するために、そして抗体を培養培地から回収するために使用される。なおさらに、本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで本発明の宿主細胞を好適な培養培地において培養することによって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、組換え抗体を培養培地から単離することをさらに含むことができる。

【0062】

ファージディスプレイによる組換え抗体ライブラリーをスクリーニングすることの代わりに、大きいコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするためにこの分野で知られている他の方法論を適用して、本発明の二重特異性抗体を同定することができる。代替りの発現システムの1つのタイプは、PCT国際特許出願公開WO98/31700 (SzostakおよびRoberts) に、そしてRoberts, R. W. およびSzostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94: 12297~12302に記載されるような、組換え抗体ライブラリーをRNA-ペプチド融合体として発現させるシステムである。このシステムでは、共有結合した融合体が、ピュロマイシン (ペプチジルのアクセプター抗生物質) をその3'末端に有する合成mRNAをインビトロ翻訳することによって、mRNAと、mRNAがコードするペプチドまたはタンパク質との間で生じる。従って、特定のmRNAを、コードされるペプチドまたはタンパク質 (例えば、抗体またはその一部分) の性質に基づいて、例えば、抗体またはその一部分の結合が二重特異性抗原に結合することなどの性質に基づいてmRNAの複雑な混合物 (例えば、コンビナトリアルライブラリー) から濃縮することができる。そのようなライブラリーのスクリーニングから回収された抗体またはその一部分をコードする核酸配列を、(例えば、哺乳動物宿主細胞において) 上記に記載されるような組換え手段によって発現させることができ、そしてさらには、上記に記載されるように、最初に選択された配列 (1つまたは複数) に変異が導入されているmRNA-ペプチド融合体のスクリーニングをさらに行うか、または組換え抗体のインビトロでの親和性成熟に関する他の方法のいずれかによってさらなる親和性成熟に供することができる。

【0063】

C. 組合せ法

本発明の二重特異性抗体はまた、二重特異性抗原と結合する抗体の産生を刺激するために、二重特異性抗原が最初に宿主動物においてインビボで抗体レパートリーにさらされるが、1つ以上のインビトロ技術を使用して、抗体のさらなる選択および／または成熟 (すなわち、改善) が達成される方法などの、インビボ法とインビトロ法との組合せを使用して調製することができる。

【0064】

1つの実施形態において、そのような組合せ法は、最初に非ヒト動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、またはそれらの遺伝子導入体、またはキメラマウス) を二重特異性抗原で免疫化して、抗原に対する抗体応答を刺激し、その後、二重特異性抗原にさらされることによってインビボで刺激されたリンパ球に由来する免疫グロブリンの配列を使用してファージディスプレイ抗体ライブラリーを調製し、スクリーニングすることを含む。この組合せ手法の最初の段階は、上記のIIA節に記載されるように行うことができ、この手法の第2段階は、上記にIIB節に記載されるように行うことができる。非ヒト動物を過免疫化し、その後、刺激されたリンパ球から調製されたファージディスプレイライブラリーをインビトロでスクリーニングする好ましい方法論には、BioSite Inc. により記載される方法論が含まれる。例えば、PCT国際特許出願公開WO98/47343、PCT国際特許出願公開WO91/17271、米国特許第5,427,908号および米国特許第5,580,717号を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0065】

別の実施形態において、組合せ法は、最初に非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、あるいはそれらのノックアウト体および／または遺伝子導入体、またはキメラマウス）を二重特異性抗原で免疫化して、抗原に対する抗体応答を刺激し、そして（例えば、免疫化された動物から調製されるハイブリドーマをスクリーニングすることによって）所望する二重特異性を有する抗体を産生しているリンパ球を選択することを含む。選択されたクローンに由来する再配置された抗体遺伝子が、その後、（逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応などの標準的なクローニング方法によって）単離され、そしてインビトロ親和性成熟に供され、それにより、選択された抗体（1つまたは複数）の結合特性が強化される。この手法の最初の段階は、上記の I I A 節に記載されるように行うことができ、この手法の第2段階は、特に、P C T 国際特許出願公開 W O 9 7 / 2 9 1 3 1 および P C T 国際特許出願公開 W O 0 0 / 5 6 7 7 2 に記載される方法などのインビトロ親和性成熟法を使用して、上記の I I B 節に記載されるように行うことができる。

10

【0066】

さらに別の組合せ法では、組換え抗体が、米国特許第 5, 6 2 7, 0 5 2 号、P C T 国際特許出願公開 W O 9 2 / 0 2 5 5 1、および B a b c o c k, J. S. 他 (1996) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、9 3 : 7 8 4 3 ~ 7 8 4 8 に記載されるように、選択的リンパ球抗体法 (S L A M) としてこの分野では呼ばれている手法を使用して、単一の単離されたリンパ球から作製される。この方法では、本発明の二重特異性抗体に適用されるように、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、またはそれらの遺伝子導入体、またはキメラマウス）が最初に二重特異性抗原でインビボにおいて免疫化され、抗原に対する抗体応答が刺激され、その後、目的とする抗体、例えば、二重特異性抗原に対して特異的である抗体を分泌する単一細胞が、抗原に特異的な溶血性プラークアッセイを使用して選択される（例えば、二重特異性抗原自体、または目的とする構造的に関連する分子は、ビオチンなどのリンカーを使用してヒツジの赤血球にカップリングされ、それにより、適切な特異性を有する抗体を分泌する単一細胞の同定が、溶血性プラークアッセイを使用して可能になる）。目的とする抗体分泌細胞を同定した後、重鎖および軽鎖の可変領域の c D N A が逆転写酵素－P C R によって細胞から取り出され、その後、これらの可変領域を、適切な免疫グロブリンの定常領域（例えば、ヒトの定常領域）との組合せで、C O S 細胞または C H O 細胞などの哺乳動物宿主細胞において発現させることができる。インビボで選択されたリンパ球に由来する増幅された免疫グロブリン配列でトランスフェクションされた宿主細胞は、その後、例えば、所望する二重特異性を有する抗体を発現する細胞を単離するためにトランスフェクション細胞をパンニングすることによって、インビトロでのさらなる分析および選択を受けることができる。増幅された免疫グロブリン配列は、上記に記載されるように、インビトロ親和性成熟などによってインビトロでさらに操作することができる。

20

30

【0067】

別の実施形態において、二重特異性抗体を製造するための組合せ法は下記の工程を伴う。第1の非ヒト動物が第1の抗原で免疫化され、そして、第1の抗原と構造的に類似していることが好ましい第2の異なる抗原で第2の非ヒト動物が免疫化され、抗体応答がインビボで刺激される。組換え重鎖ライブラリーおよび組換え軽鎖ライブラリーが、第1の非ヒト動物および第2の非ヒト動物に由来する抗体遺伝子から、I I B 節に記載されるようにそれぞれ構築される。第1の抗原で免疫化された動物に由来する重鎖ライブラリーを第2の抗原で免疫化された動物に由来する軽鎖ライブラリーと組み合わせて、抗体ライブラリー X が作製される。同様に、第2の抗原で免疫化された動物に由来する重鎖ライブラリーを第1の抗原で免疫化された動物に由来する軽鎖ライブラリーと組み合わせて、抗体ライブラリー Y が作製される。さらに、ライブラリー X およびライブラリー Y を組み合わせて、ライブラリー X Y を作製することができる。第1の抗原および第2の抗原の両方と結合する二重特異性抗体を、X ライブラリー、Y ライブラリーおよび／または X Y ライブラリーから同定および単離することができる。

40

50

【0068】

I I I . 二重特異性抗体の特徴

本発明は、本発明の方法に従って調製され得る二重特異性抗体ならびにその抗体部分を提供する。好ましくは、抗体またはその一部分は単離抗体である。好ましくは、抗体またはその一部分は中和抗体である。本発明の抗体には、モノクローナル抗体および組換え抗体およびそれらの一部分が含まれる。様々な実施形態において、抗体またはその一部分は、完全なヒト抗体または完全なマウス抗体またはそれらの一部分などの、1つの種に全体が由来するアミノ酸配列を含むことができる。他の実施形態において、抗体またはその一部分はキメラ抗体またはCDRグラフト抗体または他の形態のヒト化抗体であり得る。

【0069】

本明細書中で使用される用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互に連結された2つの重(H)鎖と2つの軽(L)鎖との4つのポリペプチド鎖から構成される免疫グロブリン分子を示すことが意図される。それぞれの重鎖は重鎖可変領域(本明細書中ではHCVRまたはVH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。それぞれの軽鎖は軽鎖可変領域(本明細書中ではLCVRまたはVL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。VH領域およびVL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VHおよびVL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下記の順で配置されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0070】

抗体の「抗原結合部分」(または単に「抗体部分」)の用語は、本明細書中で使用される場合、構造的に関連する2つの異なる抗原と特異的に結合する能力を保持している二重特異性抗体の1つ以上のフラグメントを示す。抗体の抗原結合機能が全長抗体のフラグメントによって発揮され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」の用語に包含される結合フラグメントの例には、(i) Fabフラグメント、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フラグメント; (ii) F(ab')₂フラグメント、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フラグメントを含む二価のフラグメント; (iii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント; (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フラグメント; (v) VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward他(1989) Nature、341:544~546);そして(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fvフラグメントの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、そ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他(1988) Science、242:423~426; Huston他(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:5879~5883を参照のこと)。そのような単鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」の用語に包含されることが意図される。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、それにより、そのドメインが別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. 他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444~6448; Poljak, R. J. 他(1994) Structure、2:1121~1123を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0071】

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つ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。そのような免疫接着分子の例には、四量体のs c F V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 (K i p r i y a n o v, S. M. 他 (1995) Human Antibodies and Hybridomas, 6:93~101)、そして二価のビオチン化s c F v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 (K i p r i y a n o v, S. M. 他 (1994) Mol. Immunol. 31:1047~1058)が含まれる。F a bフラグメントおよびF (a b')₂フラグメント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調製することができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、標準的な組換えDNA技術を使用して得ることができる。

10

【0072】

本明細書中で使用される「単離された二重特異性抗体」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二重特異性抗体を示すことが意図される (例えば、構造的に関連する2つの異なる抗原と特異的に結合するか、またはそうでない場合には関連性がない抗原の構造的に関連する領域と特異的に結合する単離された抗体であるが、関連性がない他の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない単離された抗体)。さらに、単離された二重特異性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。

20

【0073】

本明細書中で使用される「中和抗体」は、特定の抗原に対するその結合が抗原の生物学的活性の阻害を生じさせる抗体を示すことが意図される。抗原の生物学的活性のこの阻害は、適切なインビトロアッセイまたはインビボアッセイを使用して抗原の生物学的活性の1つ以上の指標を測定することによって評価することができる。

【0074】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマに由来する抗体 (例えば、K o h l e r および M i l s t e i n の標準的なハイブリドーマ方法論などのハイブリドーマ技術により調製されたハイブリドーマによって分泌される抗体)を示すことが意図される。従って、ハイブリドーマに由来する本発明の二重特異性抗体は、2つ以上の抗原に対する抗原特異性を有するが、それでもモノクローナル抗体として示される。

30

【0075】

用語「組換え抗体」は、組換え手段によって調製、発現、作製または単離される抗体を示し、例えば、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使用して発現させられた抗体、組換えのコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子が遺伝子導入されている動物 (例えば、マウス) から単離された抗体 (例えば、T a y l o r, L. D. 他 (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287~6295を参照のこと)、または特定の免疫グロブリン遺伝子の配列 (ヒト免疫グロブリン遺伝子の配列など) をスプライシングして他のDNA配列にすることを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製もしくは単離された抗体などをいう。組換え抗体の例には、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体およびヒト化抗体が含まれる。

40

【0076】

用語「ヒト抗体」は、例えば、K a b a t 他によって記載されるように、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列に対応または由来する可変領域および定常領域を有する抗体をいう (K a b a t 他 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (第5版、米国厚生省、NIH刊行物番号91-3242)を参照のこと)。しかし、本発明のヒト抗体は、例えば、CDRにおいて、特にCDR3において、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列によってコードされていないアミノ酸残基 (例えば、インビトロでのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘

50

発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異)を含むことができる。

【0077】

本発明の組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する可変領域を有し、そしてヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する定常領域もまた含むことができる (Kabat, S. A. 他 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (第5版、米国厚生省、N I H刊行物番号91-3242)を参照のこと)。しかし、いくつかの実施形態において、そのような組換えヒト抗体はインビトロ変異誘発に供され (またはヒトIg配列に対する遺伝子導入された動物が使用されるときには、インビボ体細胞変異誘発に供され)、従 10
って、組換え抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のVH配列およびVL配列に由来し、かつ関連する一方で、インビボでのヒト抗体生殖系列レパートリーにおいて天然に存在しないことがある配列である。しかし、いくつかの実施形態において、そのような組換えヒト抗体は選択変異誘発または逆変異またはその両方の結果である。

【0078】

用語「逆変異」は、ヒト抗体の体細胞変異したアミノ酸の一部またはすべてが、相同的な生殖系列の抗体配列に由来する対応した生殖系列残基によって置換されるプロセスをいう。本発明のヒト抗体の重鎖配列および軽鎖配列は、最も大きい相同性を有する配列を同定するために、V B A S Eデータベース内の生殖系列配列と別々にアラインメントされる。 20
本発明のヒト抗体において異なるところが、そのような異なるアミノ酸をコードする明らかにされたヌクレオチド位置を変異させることによって生殖系列の配列に戻される。逆変異の候補としてこのようにして同定された各アミノ酸の役割が、抗原結合における直接的または間接的な役割について調べられるはずであり、そしてヒト抗体の何らかの望ましい特徴に影響を及ぼすことが変異後に見出される何らかのアミノ酸は最終的なヒト抗体には 30
含まれないはずである。逆変異を受けるアミノ酸の数を最小限に抑えるために、最も近縁の生殖系列の配列とは異なるが、別の生殖系列の配列において対応するアミノ酸と同一であることが見出されたそのようなアミノ酸位置は、別の生殖系列の配列が少なくとも10アミノ酸 (好ましくは12アミノ酸) について本発明のヒト抗体の配列と同一であり、かつ共直線的であるならば、問題としているアミノ酸の両側に残留させることができる。 30
逆変異は、抗体を最適化する任意の段階で行うことができる。

【0079】

用語「キメラ抗体」は、1つの種に由来する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列と、別の種に由来する定常領域配列とを含む抗体を示し、例えば、ネズミ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などをいう。

【0080】

用語「CDRグラフト化抗体」は、1つの種に由来する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つ以上の配列が別の種のCDR配列で置換されている抗体を示し、例えば、ネズミの重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を有し、1つ以上のネズミCDR (例えば、CDR3) がヒトのCDR配列で 40
置換されている抗体をいう。

【0081】

用語「ヒト化抗体」は、非ヒト種 (例えば、マウス) に由来する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を含むが、VH配列および／またはVL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。1つのタイプのヒト化抗体には、ヒトCDR配列が、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。

【0082】

抗体の結合速度論を測定する1つの方法は表面プラズモン表面による。本明細書中で使用 50

される用語「表面プラズモン表面」は、例えば、B I A c o r e システム (P h a r m a c i a B i o s e n s o r A B、U p p s a l a (スウェーデン) および P i s c a t a w a y、N J) を使用して、バイオセンサー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现象をいう。さらなる記載については、J o n s s o n, U. 他 (1993) A n n. B i o l. C l i n. 51:19~26; J o n s s o n, U. 他 (1991) B i o t e c h n i q u e s, 11:620~627; J o h n s s o n, B. (1995) J. M o l. R e c o g n i t. 8:125~131; J o h n s s o n, B. (1991) A n a l. B i o c h e m. 198:268~277を参照のこと。

【0083】

10

本明細書中で使用される用語「 K_{off} 」は、抗体／抗原複合体から抗体が解離することに関する解離速度定数を示すことが意図される。

【0084】

本明細書中で使用される用語「 K_d 」は、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を示すことが意図される。

【0085】

本発明の二重特異性抗体は、上記の I I 節に記載される抗体を調製するための様々な方法のいずれかを使用して調製される。本発明の二重特異性抗体は、本質的には任意の構造的に関連する抗原に対し得るが、本発明の好ましい二重特異性抗体は、I L - 1 α および I L - 1 β と特異的に結合する二重特異性抗体であり、そのような抗体は、実施例 1 から 4 に記載される二重特異性抗原などの二重特異性抗原を使用して調製することができる。本発明に適用され得る他の構造的に関連する抗原には、カスパーゼファミリーのメンバー、サイトカインファミリー、例えば、I L - 1 ファミリーのメンバー (例えば、I L - 1 / I L - 18)、T N F ファミリーメンバー (例えば、T N F α / T N F β)、I L - 6 ファミリーのメンバー、インターフェロン、T G F β ファミリーのメンバー、E G F ファミリーのメンバー、F G F ファミリーのメンバー、P D G F ファミリーのメンバー、V E G F ファミリーのメンバー、アングリオポエチンファミリーのメンバー、骨形態形成タンパク質、分泌型プロテイナーゼ (メタロプロテイナーゼ) など、ならびにサイトカイン受容体のファミリー、例えば、I L - 1 受容体ファミリーのメンバー、T N F 受容体ファミリーのメンバー、T G F β 受容体ファミリーのメンバー、E G F 受容体ファミリーのメンバー、F G F 受容体ファミリーのメンバー、P D G F 受容体ファミリーのメンバー、V E G F 受容体ファミリーのメンバー、およびアングリオポエチン受容体ファミリーのメンバーなどが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0086】

本発明の二重特異性抗体は、二重特異性抗体が結合する構造的に関連する 2 つの異なる抗原に対して等しい結合活性を示すことができ、あるいは 2 つの抗原の一方に対してより優先的に結合することができるが、関連性がない抗原と比較して、その 2 つの抗原に対する特異性を依然として有する。構造的に関連する抗原に対する二重特異性抗体の結合活性、ならびに関連性がない抗原に対する二重特異性抗体の結合活性は、E L I S A 分析または B I A c o r e 分析などの標準的なインビトロ免疫アッセイを使用して評価することができる。好ましくは、構造的に関連しない抗原に対する抗体の K_d と、構造的に関連する抗原に対する抗体の K_d との比は、少なくとも 3 であることが望ましく、さらにより好ましくは、その比は少なくとも 5 であることが望ましく、さらにより好ましくは、その比は少なくとも 10 であることが望ましく、さらにより好ましくは、その比は少なくとも 50、100、200、300、400、500、600、700、800、900 または 1000 であることが望ましい。

40

【0087】

定量的には、バックグラウンド結合と二重特異性との差はレベルまたは程度の差である。例えば、バックグラウンド結合は低いレベルであり、例えば、5%未満であり、より好ましくは 3%未満であり、最も好ましくは約 0.1% から 1% であり、これに対して、特異

50

的な交差反応性または二重特異性の結合はより大きいレベルであり、例えば、1%よりも大きく、より好ましくは3%よりも大きく、さらにより好ましくは5%よりも大きく、さらにより好ましくは10%よりも大きい。さらに、好ましくは、標的抗原に対する二重特異性抗体の IC_{50} は所与のバイオアッセイにおける抗原の ED_{50} に近い。

【0088】

本発明の二重特異性抗体またはその抗原結合部分は、二重特異性抗体またはその抗原結合部分が特異的に結合する抗原の一方について、より好ましくはそのような抗原の両方について望ましい結合速度論（例えば、大きい親和性、低い解離、遅い解離速度、強い中和活性）を有するように選択されることが好ましい。例えば、二重特異性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って測定されたときに、 0.1 s^{-1} 以下の k_{of} 10
 k_{ff} 速度定数で、より好ましくは $1 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ 以下の k_{of} k_{ff} 速度定数で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ 以下の k_{of} k_{ff} 速度定数で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ 以下の k_{of} k_{ff} 速度定数で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ 以下の k_{of} k_{ff} 速度定数で、構造的に関連する抗原の一方と結合することができ、より好ましくはその両方と結合することができる。あるいは、またはさらに、二重特異性抗体またはその一部分は、 $1 \times 10^{-6}\text{ M}$ 以下の IC_{50} で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-7}\text{ M}$ 以下の IC_{50} で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-8}\text{ M}$ 以下の IC_{50} で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-9}\text{ M}$ 以下の IC_{50} で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-10}\text{ M}$ 以下の IC_{50} で、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-11}\text{ M}$ 以下の IC_{50} で、構造的に 20
関連する抗原の一方の活性を阻害することができ、より好ましくはその両方の活性を阻害することができる。好ましくは、 IC_{50} は高感度なバイオアッセイを使用して測定されることが望ましく、そのようなバイオアッセイでは、 IC_{50} 値は、そのアッセイにおける抗原の ED_{50} に近いはずである。

【0089】

本発明はまた、本発明の二重特異性抗体またはその抗原結合部分と、医薬適合性のキャリアとを含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物はさらに、少なくとも1つのさらなる治療剤を含むことができ、例えば、二重特異性抗体の使用が障害の緩和に対して有益である障害を処置するための1つ以上のさらなる治療剤を含むことができる。例えば、二重特異性抗体がIL-1 α およびIL-1 β と特異的に結合する場合、医薬組成物は、IL-1活性が有害である障害を処置するための1つ以上のさらなる治療剤をさらに含むこと 30
ができる。

【0090】

本発明の抗体および抗体部分は、患者への投与に好適な医薬組成物に配合することができる。典型的には、医薬組成物は、本発明の抗体または抗体部分と、医薬適合性のキャリアとを含む。本明細書中で使用される「医薬適合性のキャリア」には、生理学的に適合し得る任意およびすべての溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。医薬適合性のキャリアの例には、水、生理的食塩水、リン酸塩緩衝化生理的食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1つまたは複数、ならびにそれらの組合せが挙げられる。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（マンニトール、ソルビトールなど）または塩化ナトリウム）を組成物に含 40
むことは好ましい。医薬適合性のキャリアはさらに、抗体または抗体部分の貯蔵安定性または有効性を高める微量の補助的な物質、例えば、湿潤化剤または乳化剤、保存剤または緩衝剤を含むことができる。

【0091】

本発明の抗体および抗体部分は、非経口投与に好適な医薬組成物に配合することができる。好ましくは、抗体または抗体部分は、 0.1 mg/ml から 250 mg/ml の抗体を含有する注射可能な溶液として調製される。注射可能な溶液は、フリントガラスもしくは褐色のバイアル、アンプル、または充填済みのシリンジにおいて、液体の投薬形態物または凍結乾燥された投薬形態物のいずれかから構成され得る。緩衝剤は、pHが5.0から7.0（最適にはpH6.0）であるL-ヒスチジン（ 1 mM から 50 mM ）（最適には 50

5 m Mから1 0 m M)であり得る。他の好適な緩衝剤には、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が挙げられるが、これらに限定されない。塩化ナトリウムを、0 m Mから3 0 0 m M (最適には、液体の投薬形態物については1 5 0 m M)の濃度で溶液の張性を変化させるために使用することができる。凍結保護剤を凍結乾燥された投薬形態物の場合には含めることができ、凍結保護剤は主として0 %から1 0 %のスクロース (最適には0 . 5 %から1 . 0 %)である。他の好適な凍結保護剤には、トレハロースおよびラクトースが挙げられる。増量剤を凍結乾燥された投薬形態物の場合には含めることができ、増量剤は主として1 %から1 0 %のマンニトール (最適には2 %から4 %)である。安定化剤を液体の投薬形態物および凍結乾燥された投薬形態物の両方において使用することができる、安定化剤は主として1 m Mから5 0 m Mのメチ

10

【0 0 9 2】

本発明の組成物は様々な形態にすることができる。これらには、例えば、液体および半固体および固体の投薬形態物が含まれ、例えば、液体溶液 (例えば、注射可能な溶液および注入可能な溶液)、分散物または懸濁物、錠剤、ピル、粉末、リポソームおよび坐薬などが含まれる。好ましい形態は、意図された投与様式および治療的適用に依存する。典型的な好ましい組成物は、他の抗体を用いたヒトの受動免疫化のために使用される組成物に類似する組成物などの注射可能な溶液または注入可能な溶液の形態である。好ましい投与様式は非経口的 (例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内)である。好ましい実施形態において、抗体は静脈内への注入または注射によって投与される。別の好ましい実施形態において、抗体は筋肉内注射または皮下注射によって投与される。

20

【0 0 9 3】

治療組成物は、典型的には、製造および保存の条件のもとで無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散物、リポソーム、または大きい薬物濃度に好適な他の規定された構造物として配合することができる。無菌の注射溶液は、必要に応じて上記に列記された成分の1つまたはその組合せとともに、必要とされる量の活性な化合物 (すなわち、抗体または抗体部分)を適切な溶媒に混合し、その後、ろ過滅菌することによって調製することができる。一般には、分散物が、基礎となる分散媒体と、上記に列記された成分に由来する必要とされる他の成分とを含有する無菌のビヒクルに活性な化合物を混合することによって調製される。無菌の注射溶液を調製するための無菌の凍結乾燥粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分およびさらなる所望する成分の粉末がその前記の無菌ろ過された溶液から得られる真空乾燥およびスプレー乾燥である。溶液の適正な流動性を、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散物の場合には必要とされる粒子サイズを維持することによって、そして界面活性剤の使用によって維持することができる。注射可能な組成物の長期にわたる吸収が、吸収を遅らせる薬剤 (例えば、モノステアラート塩およびゼラチン)を組成物に含めることによってもたら

30

40

【0 0 9 4】

本発明の抗体および抗体部分は、この分野で知られている様々な方法で投与することができるが、多くの治療的適用の場合、好ましい投与経路/様式は皮下注射または静脈内への注射もしくは注入である。当業者によって理解されるように、投与経路/様式は、所望する結果に依存して変化する。いくつかの実施形態において、活性な化合物は、インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出配合物などの、迅速な放出から化合物を保護するキャリアとともに調製され得る。生分解性の生体適合性ポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などを使用することができる。そのような配合物を調製

50

する多くの方法が特許化され、または当業者に広く知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc.、New York、1978)を参照のこと。

【0095】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体または抗体部分は、例えば、不活性な希釈剤または吸収され得る食用キャリアとともに経口投与することができる。化合物（および所望する場合には他の成分）はまた、硬殻ゼラチンカプセルまたは軟殻ゼラチンカプセルで包むことができ、または錠剤に圧縮成形することができ、または患者の食事に直接混合することができる。経口による治療的投与の場合、化合物は賦形剤と混合され、摂取可能な錠剤、口内錠剤、トローチ剤、カプセル、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシュ剤などの形態で使用する。本発明の化合物を非経口投与以外で投与するためには、化合物を、その不活性化を防止する物質でコーティングするか、または化合物を、その不活性化を防止する物質と同時に投与することが必要になる場合がある。

10

【0096】

補助的である活性な化合物もまた組成物に配合することができる。いくつかの実施形態において、本発明の抗体または抗体部分は、IL-1活性が有害である障害を処置するために有用な1つ以上のさらなる治療剤と同時に配合され、かつ／または同時に投与される。例えば、本発明の抗IL-1 α /IL-1 β 二重特異性抗体または抗体部分は、他の標的と結合する1つ以上のさらなる抗体（例えば、他のサイトカインと結合する抗体または細胞表面分子と結合する抗体）と同時に配合することができ、かつ／または同時に投与することができる。さらに、本発明の1つまたは複数の抗体は、2つ以上の前記治療剤と組み合わせ使用することができる。そのような組合せ療法は、好都合には、投与される治療剤のより少ない投薬量を利用することができ、従って、様々な単一療法に付随する考えられる毒性または合併症を避けることができる。

20

【0097】

IV. 二重特異性抗体の使用

構造的に関連する2つの異なる抗原と結合するその能力を考えた場合、本発明の二重特異性抗体またはその一部分は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)または組織免疫組織化学などの従来の免疫アッセイを使用して、（例えば、血清または血漿などの生物学的サンプルにおける）これらの抗原のいずれかまたはその両方を検出するために使用することができる。本発明は、生物学的サンプルにおける抗原を検出するための方法を提供する。この方法は、生物学的サンプルを、抗原を特異的に認識する本発明の二重特異性抗体または抗体部分と接触させること、そして抗原に結合した抗体（もしくは抗体部分）または結合していない抗体（もしくは抗体部分）のいずれかを検出し、それにより生物学的サンプル中の抗原を検出することを含む。抗体は、結合した抗体または結合し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的または間接的に標識される。好適な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が含まれる。好適な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、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が挙げられる。好適な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる。好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、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、ダンシル塩化物またはフィコエリトリンが挙げられる。発光物質の例には、ルミノールが挙げられる。好適な放射性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

30

40

【0098】

抗体を標識することの代わりに、抗原（1つまたは複数）は、検出可能な物質で標識された抗原標準物およびその抗原に対して特異的な標識されていない二重特異性抗体を用いる競合的な放射免疫アッセイによって生物学的体液においてアッセイすることができる。こ

50

のアッセイにおいて、生物学的サンプル、標識された抗原標準物、および二重特異性抗体は一緒にされ、標識されていない抗体に結合した標識された抗原標準物の量が測定される。生物学的サンプルにおける抗原の量は、標識されていない抗体に結合した標識された抗原標準物の量に反比例する。

【0099】

好ましい実施形態において、二重特異性抗体はIL-1 α およびIL-1 β を特異的に認識し、従って前記の検出方法は、IL-1 α および／またはIL-1 β を検出するために使用される。従って、本発明はさらに、生物学的サンプルまたは組織におけるIL-1 α またはIL-1 β を検出する方法を提供する。この方法は、IL-1 α またはIL-1 β を含有することが疑われる生物学的サンプルまたは組織を本発明の二重特異性抗体またはその抗原結合部分と接触させること、そして生物学的サンプルまたは組織におけるIL-1 α またはIL-1 β を検出することを含む。生物学的サンプルは、例えば、細胞、組織または体液（例えば、血液、血漿、尿、唾液など）のサンプルなどのインビトロサンプルであり得る。さらに、検出される組織は、患者の体内に存在する組織であり、例えば、（例えば、標識された抗体を使用して）組織をインビボ画像化することによって可視化された組織であり得る。

【0100】

本発明の二重特異性抗体はまた診断目的のために使用することができる。1つの実施形態において、本発明の抗体はインビトロでの診断アッセイにおいて使用され、例えば、目的とする抗原（1つまたは複数）を検出するための試験室試験において、または目的とする抗原（1つまたは複数）を検出するための管理試験のときに使用される。抗体を利用する十分に確立されたインビトロアッセイの例には、各種のELISA、RIA、ウエスタンブロットなどが含まれる。別の実施形態において、本発明の抗体は、インビボ画像化試験などのインビボでの診断アッセイにおいて使用される。例えば、抗体は、インビボで検出され得る検出可能な物質で標識することができ、標識された抗体を患者に投与することができ、そして標識された抗体をインビボで検出することができ、それによりインビボ画像化が可能になる。

【0101】

IL-1 α およびIL-1 β を特異的に認識する本発明の二重特異性抗体は、例えば、様々な炎症性の疾患および障害ならびに胎児の自然吸収における診断目的のためにIL-1 α および／またはIL-1 β を検出する診断アッセイにおいて使用することができる。特定タイプの疾患および障害に関して、本発明の二重特異性の抗IL-1 α ／IL-1 β 抗体は、そのような抗体の治療的使用に関して本明細書中に記載される疾患／障害のいずれか、例えば、下記にさらに議論される、IL-1活性が有害である障害などにおける診断目的のために使用することができる（下記を参照のこと）。

【0102】

本発明の二重特異性抗体および抗体部分は、好ましくは、二重特異性抗体および抗体部分が結合する抗原の活性をインビトロおよびインビボの両方で中和することができる。従って、本発明のそのような抗体および抗体部分は、例えば、抗原を含有する細胞培養物において、または本発明の二重特異性抗体が反応する抗原を有するヒト患者もしくは他の哺乳動物患者において抗原の活性を阻害するために使用することができる。1つの実施形態において、本発明は、抗原の活性を阻害するための方法を提供する。この方法は、抗原の活性が阻害されるように抗原を本発明の二重特異性抗体または抗体部分と接触させることを含む。好ましい実施形態において、二重特異性抗体はIL-1 α およびIL-1 β と結合し、従って、この方法は、IL-1 α および／またはIL-1 β を二重特異性抗体またはその一部分と接触させることによってIL-1 α および／またはIL-1 β の活性を阻害するための方法である。IL-1 α および／またはIL-1 β の活性は、例えば、インビトロで阻害することができる。例えば、IL-1 α および／またはIL-1 β を含有するか、またはIL-1 α および／またはIL-1 β を含有することが疑われる細胞培養物において、本発明の抗体または抗体部分は、培養物におけるIL-1 α および／またはIL

ー 1 β の活性を阻害するために培養培地に加えることができる。あるいは、I L - 1 α および／または I L - 1 β の活性は患者におけるインビボで阻害することができる。

【0103】

別の実施形態において、本発明は、抗原の活性が有害である障害に罹患している患者における抗原の活性を阻害するための方法を提供する。本発明は、そのような障害に罹患している患者における抗原の活性を阻害するための方法を提供する。この方法は、患者における抗原の活性が阻害されるように本発明の二重特異性抗体または抗体部分を患者に投与することを含む。好ましくは、抗原はヒト抗原であり、患者はヒト患者である。本発明の抗体は、治療目的のためにヒト患者に投与することができる。さらに、本発明の抗体は、獣医学的目的のために、またはヒト疾患の動物モデルとして、抗体が結合する抗原を発現する非ヒト哺乳動物に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ために有用であり得る（例えば、投薬量および投与時間経過を試験することに関して有用であり得る）。 10

【0104】

好ましくは、二重特異性抗体は I L - 1 α および I L - 1 β と結合し、従って患者における抗原の活性を阻害するためのこの方法は、患者（例えば、I L - 1 の活性が有害である障害に罹患している患者）において I L - 1 の活性を阻害するための方法である。本明細書中で使用される「I L - 1 の活性が有害である障害」は、そのような障害に罹患している患者における I L - 1（これは I L - 1 α および I L - 1 β の両方を包含する）の存在が、障害の病理生理学または障害の悪化に寄与する因子のいずれかに関わっていることが示されているか、または障害の病理生理学または障害の悪化に寄与する因子のいずれかに関わっていることが疑われる疾患および他の障害を包含することが意図される。従って、I L - 1 の活性が有害である障害は、I L - 1 活性（すなわち、I L - 1 α および I L - 1 β のいずれかまたはその両方）の阻害により、障害の症状および／または進行の緩和が期待される障害である。そのような障害は、例えば、障害に罹患している患者の生物学的体液における I L - 1 濃度の増大（例えば、患者の血清、血漿、滑液などにおける I L - 1 濃度の増大）によって明らかにされ得る。この場合、I L - 1 は、例えば、抗 I L - 1 抗体を上記に記載されるように使用して検出することができる。 20

【0105】

インターロイキン 1 は、様々な免疫エレメントおよび炎症エレメントを伴う様々な疾患に関連する病理学において重要な役割を果たしている。このような疾患には、下記が含まれるが、それらに限定されない：慢性滑節リウマチ、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、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、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に伴う急性免疫疾患または慢性免疫疾患、類肉腫症、アテローム性動脈硬化症、汎発性血管内凝固、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、ヘノッホーシェンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的脈管炎、慢性の活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生虫疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断脊髄炎、ハンチントン病、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、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性の I 型多線性不全症および II 型多線性不全症、シュミット症候群、成人（急性）呼吸窮迫症候群、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、潰瘍性大腸炎性関節症、腸症性滑膜炎、クラミジアおよびエルシニアおよびサルモネラに関連する関節症、脊椎関節症、アテローム性の疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱疾患、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、クーム陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／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、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症疾患症候群、後天性免疫不全症関連疾患、C 型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型低 γ グロブリン血症） 30 40 50

、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、成熟前の卵巣機能不全、線維症性肺疾患、突発性線維化肺胞炎、炎症後の間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合型結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、慢性関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性エリテマトーデス関連間質性肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症関連肺疾患、薬物誘導による間質性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後の間質性肺疾患、痛風関節炎、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肝炎またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介による低血糖症、黒色表皮肥厚症を伴うB型インスリン耐性、上皮小体機能低下症、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、腎臓疾患（NOS型）、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的脈管炎、ライム病、円板状エリテマトーデス、男性不妊症（特発性またはNOS型）、精子自己免疫性、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患の二次的な肺性高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性動脈周囲炎の肺発現、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／関節炎、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、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫性自己免疫性甲状腺機能低下症（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、水晶体原性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑、中枢神経系の疾患（例えば、うつ病、精神分裂病、アルツハイマー病、パーキンソン病など）、急性痛および慢性痛、ならびに脂質不均衡。本発明のヒト抗体および抗体部分は、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を含む、炎症を伴う自己免疫疾患）に罹患しているヒトを処置するために使用することができる。

10

20

30

40

50

【0106】

好ましくは、本発明のIL-1 α /IL-1 β 二重特異性抗体またはその抗原結合部分は、慢性関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病および乾癬を処置するために使用される。

【0107】

本発明のIL-1 α /IL-1 β 二重特異性抗体または抗体部分はまた、自己免疫性疾患および炎症性疾患の処置において有用な1つ以上のさらなる治療剤とともに投与することができる。

【0108】

本発明の抗体またはその抗原結合部分は、そのような疾患を処置するために単独または組合せで使用することができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は単独で使用することができ、またはその意図された目的のために当業者によって選択されるさらなる薬剤（例えば、治療剤）と組み合わせて使用できることを理解しなければならない。例えば、そのようなさらなる薬剤は、本発明の抗体によって処置されている疾患または状態を処置するために有用であることがこの分野で認識されている治療剤であり得る。そのようなさらなる薬剤はまた、治療組成物に有益な特性を付与する薬剤、例えば、組成物の粘性をもたらす薬剤であり得る。

【0109】

本発明の範囲に包含され得る組合せ物は、その意図された目的のために有用であるそのような組合せ物であることをさらに理解しなければならない。下記に示される薬剤は例示目的であり、限定することを目的としていない。本発明の一部である組合せ物は、本発明の抗体、および下記のリストから選択される少なくとも1つの薬剤であり得る。組合せはまた、形成された組成物がその意図された機能を発揮し得るように組合せがなされるならば、2つ以上のさらなる薬剤（例えば、2つまたは3つのさらなる薬剤）を含むことができる。

【0110】

好ましい組合せ物は、NSAIDsとも呼ばれる非ステロイド性抗炎症薬であり、これはイブプロフェンおよびCOX-2阻害剤のような薬物を含む。他の好ましい組合せ物は、プレドニゾロンを含むコルチコステロイドである；ステロイド使用のよく知られている副作用を、患者を処置するときに必要とされるステロイド量を本発明の抗IL-1抗体と組合せて徐々に減少させることによって低下させることができ、または除くことさえできる。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慢性関節リウマチ用治療剤の非限定的な例には、下記が挙げられる：サイトカイン抑制性抗炎症薬（CSAID）；他のヒトサイトカインもしくは増殖因子（例えば、TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGF）に対する抗体またはそれらのアンタゴニスト。10
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、CD80（B7.1）、CD86（B7.2）、CD90またはそれらのリガンド（CD154（gp39またはCD40L）を含む）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。

【0111】

治療剤の好ましい組合せ物は、自己免疫およびその後の炎症カスケードにおける種々の点を妨害することができる；好ましい例には、キメラTNF抗体またはヒト化TNF抗体またはヒトTNF抗体であるD2E7（PCT国際特許出願公開WO97/29131）、CA2（Remicade（商標））、CDP571、CDP870、サリドマイドのようなTNFアンタゴニスト、および可溶性のp55TNF受容体またはp75TNF受容体、その誘導体（p75TNFR1gG（Enbrel（商標））またはp55TNFR1gG（Lanercapt））、そしてまたTNF α 変換酵素（TACE）阻害剤が含まれる；同様に、同じ理由から、IL-1阻害剤（インターロイキン-1変換酵素阻害剤、IL-1RAなど）は効果的であり得る。他の好ましい組合せ物はインターロイキン11を含む。さらに別の好ましい組合せ物は、IL-1の機能と同時に、またはIL-1の機能に依存して、またはIL-1の機能と協調して作用し得る自己免疫応答の他の重要な因子である；IL-12抗体および／もしくはIL-18抗体、または可溶性のIL-12受容体および／もしくはIL-18受容体、またはIL-12結合タンパク質および／もしくはIL-18結合タンパク質を含むIL-12アンタゴニストおよび／もしくはIL-18アンタゴニストが特に好ましい。IL-12およびIL-18は、重複するが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組合せは最も効果的であり得ることが示されている。さらに別の好ましい組合せ物は、枯渴しない抗CD4阻害剤である。さらに別の好ましい組合せ物には、抗体、可溶性の受容体またはアンタゴニスト性リガンドを含む同時刺激経路のアンタゴニストであるCD80（B7.1）またはCD86（B7.2）が含まれる。30

【0112】

本発明の抗体またはその抗原結合部分はまた、様々な薬剤と組み合わせることができ、例えば、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、ペンシラミン、金チオリンゴ酸塩（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アドレナリン受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル）、キサンチン類（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプ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）、コルチコステロイド（プレドニゾロンなど）、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動剤、TNF α またはIL-1などの前炎症性サイトカインによるシグナル変換を妨害する薬剤（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38キナーゼ阻害剤または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細胞シグナル変換阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラ40

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、可溶性のp55TNF受容体またはp75TNF受容体およびその誘導体（p75TNFRIGG（Enbrel（商標））およびp55TNFGIGG（Lenercept））、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）、ならびに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）などと組み合わせることができる。好ましい組合せ物はメトトレキサートまたはレフルノミドを含み、そして中程度または重度の慢性関節リウマチの場合にはシクロスポリンを含む。

【0113】

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剤の非限定的な例には、下記が挙げられる：ブデノシド；上皮増殖因子；コルチコステロイド；シクロスポリン、スルファサラジン；アミノサリチラート；6-メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジド；抗酸化剤；トロンボキサン阻害剤；IL-1受容体アンタゴニスト；抗IL-1βモノクローナル抗体；抗IL-6モノクローナル抗体；増殖因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニルイミダゾール化合物；他のヒトサイトカインまたは増殖因子（例えば、TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGF）に対する抗体またはそれらのアンタゴニスト。本発明の抗体は、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また、様々な薬剤と組み合わせることができ、例えば、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミ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）、コルチコステロイド（プレドニゾロンなど）、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動剤、TNFαまたはIL-1などの前炎症性サイトカインによるシグナル変換を妨害する薬剤（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38キナーゼ阻害剤または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細胞シグナル変換阻害剤、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-メルカプトプリン類、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、可溶性のp55TNF受容体またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）、ならびに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）などと組み合わせることができる。

【0114】

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剤の好ましい例には、下記が挙げられる：TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体のD2E7（PCT国際特許出願公開WO97/29131）、CA2（Remicade（商標））、CDP571、TNFR-IG構築物（p75TNFRIGG（Enbrel（商標））およびp55TNFGIGG（Lenercept））阻害剤、ならびにPDE4阻害剤。本発明の抗体またはその抗原結合部分またはその抗原結合部分はコルチコステロイド（例えば、ブデノシドおよびデキサメタゾン）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また、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸およびオルサラジンなどの薬剤と組み合わせることができ、そしてIL-1などの前炎症性サイトカインの合成または作用を妨害する薬剤（例えば、IL-1β変換酵素阻害剤およびIL-1ra）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また、T細胞シグナル変換阻害剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤の6-メルカプトプリン類）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IL-11とと組み合わせることができる。

【0115】

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多発性硬化症用治療剤の非限定的な例には、下記が挙げられる：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 1a (Avonex; Biogen)；インターフェロン- β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex)；コポリマー1 (Cop-1; Copaxone; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)；高圧酸素；静脈注射免疫グロブリン；クラブリン；他のヒトサイトカインまたは増殖因子（例えば、TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGF）に対する抗体またはそれらのアンタゴニスト。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、CD80、CD86、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また、様々な薬剤と組み合わせることができ、例えば、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミ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、COX-2阻害剤）、コルチコステロイド（プレドニゾロンなど）、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動剤、TNF α またはIL-1などの前炎症性サイトカインによるシグナル変換を妨害する薬剤（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38キナーゼ阻害剤または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細胞シグナル変換阻害剤、メタプロ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-メルカプトプリン類、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、可溶性のp55TNF受容体またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）、ならびに抗炎症性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-13およびTGF β ）などと組み合わせることができる。

10

20

30

40

50

【0116】

本発明の抗体またはその抗体部分を組み合わせることができる多発性硬化症用治療剤の好ましい例には、インターフェロン- β （例えば、IFN β 1aおよびIFN β 1b）；コパキソン、コルチコステロイド、IL-1阻害剤、TNF阻害剤、ならびにCD40リガンドおよびCD80に対する抗体が挙げられる。

【0117】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体または抗体部分の「治療効果的な量」または「予防効果的な量」を含むことができる。「治療効果的な量」は、所望する治療的結果を達成するための必要な投薬量および時間での効果的な量をいう。抗体または抗体部分の治療効果的な量は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに個体において所望する応答を生じさせる抗体または抗体部分の能力などの要因に依存して変化し得る。治療効果的な量はまた、抗体または抗体分子の何らかの毒性作用または有害作用よりも、治療的に有益な作用が勝っている量である。「予防効果的な量」は、所望する予防的結果を達成するための必要な投薬量および時間での効果的な量をいう。典型的には、予防的用量が、より初期の疾患段階に先立って、またはより初期の疾患段階で対象体において使用されるので、予防効果的な量は、治療効果的な量よりも少ない。

【0118】

投薬法は、最適な所望する応答（例えば、治療的または予防的な応答）が得られるように調節することができる。例えば、単回のボラス剤を投与することができ、または数個の分割用量を所定時間にわたって投与することができ、または用量を、治療状況の要件によって示されるように対応して減少もしくは増大させることができる。投与を容易にし、かつ投薬を均一にするために投薬ユニット形態で非経口組成物を配合することは特に好都合である。本明細書中で使用される投薬ユニット形態は、処置される哺乳動物患者に対する単位投薬量として適する物理的に分離したユニットをいう。この場合、ユニットは、所望

する治療効果をもたらすために計算された所定量の活性な化合物を、必要とされる薬学的キャリアと一緒に含有する。本発明の投薬ユニット形態物の仕様は、(a) 活性な化合物の特徴的な特性および達成される特定の治療効果または予防効果、そして(b) 個体における感受性を処置するためにそのような活性な化合物を配合することのこの分野における固有的な制限によって決定され、かつそれらに直接依存している。

【0119】

本発明の抗体または抗体部分の治療効果的または予防効果的な量の例示的で非限定的な範囲は0.1mg/kgから20mg/kgであり、より好ましくは1mg/kgから10mg/kgである。投薬量の値は、緩和される状態のタイプおよび重篤度によって変化し得ることに留意しなければならない。任意の特定の患者に対して、特定の投薬法は、個体の必要性および組成物を投与する医師または組成物の投与を監督する医師の専門的判断に従って時間とともに調節されなければならないこと、そして本明細書中に示される投薬量の範囲は例示にすぎず、請求項に記載される組成物の範囲または実施を制限することを意図していないことをさらに理解しなければならない。

10

【0120】

本発明は下記の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例は決して限定として解釈してはならない。本明細書中を通して引用されているすべての引用参考文献(文献、発行された特許および公開された特許明細書を含む)の内容はこれらにより参考として特に組み込まれる。

【0121】

実施例1：同一の連続したトポロジー領域に基づく二重特異性抗原の設計

本実施例では、構造的に関連する2つの異なるタンパク質のIL-1 α およびIL-1 β の間で最も長い同一の連続したトポロジー領域が、IL-1 α およびIL-1 β に対する二重特異性抗体を惹起させるための二重特異性抗原を示すための基礎として決定された。BLASTアルゴリズムが、この2つのタンパク質を比較するために使用された。これにより、類似する構造的領域または機能的領域において別の残基に置換するための残基の傾向を見積もることができる。この分析により、IL-1 α およびIL-1 β の間で最も長い同一の連続したトポロジー領域の同定が可能になり、そして二重特異性抗原として役立つ直鎖状ペプチドを作製するために類似する妥当な領域を伴ってこの領域を拡大することができた。これらの基準を最も良く満たすペプチドは下記のアミノ酸配列を有する：

20

30

NEAQNITDF (配列番号1)

* * * * *

アスタリクス(*)は両方のタンパク質において同一の残基を示し、それ以外の残基は、BLASTアルゴリズムにより強い類似性を有する。例えば、リシンは、相同的なタンパク質において、フェニルアラニンではなく、アルギニンの代わりに使用されることが多い。配列番号1のこのペプチドは、反対方向で伸びている構造の2つの異なる部分から得られるハイブリッドであり、従って、このエピトープの別の妥当な表示を下記に示す：

dNdEdAdQNITDF

(式中、「d」の添え字は、そのアミノ酸残基がD-アミノ酸残基であることを示す)。ペプチドのL-アミノ酸型およびD-アミノ酸残基で部分的に置換された型はともに標準的な化学的方法によって合成される。その後、ペプチドはキャリアタンパク質(例えば、KLHまたはアルブミン)に結合させられ、そして結合させられたペプチドは、インビトロ法またはインビボ法によって抗体を選択するために使用される。

40

【0122】

実施例2：共通する折りたたみ部のループを模倣する環状ペプチドに基づく二重特異性抗原の設計

本実施例では、構造的に関連する2つの異なるタンパク質のIL-1 α およびIL-1 β の間において共通する折りたたみ部の重要なループを構造的に模倣する環状ペプチドが、IL-1 α およびIL-1 β に対する二重特異性抗体を惹起させるための二重特異性抗原として使用するために構築された。選ばれたループはIL-1 α の残基168~184お

50

よび I L-1 β の残基 160～176 を表す。そのコンセンサス配列を下記に示す：

C y c l o-M A F L R A N Q N N G K I S V A L (P G) (配列番号 2)

* c b c c c c c c c c * * c * b *

アスタリクス (*) は I L-1 α および I L-1 β の間で同一の残基を示し、c はコンセンサス残基 (すなわち、I L-1 α および I L-1 β に類似しているが、実際にはいずれかのタンパク質においてこの位置には存在していない残基) を示し、そして b は、明瞭なコンセンサス残基が存在せず、従って I L-1 β 配列そのものが保持されていたことを示す。この直鎖状ペプチドは標準的な化学的合成法によって合成される。このペプチドを環化するために、プロリン残基およびグリシン残基が付加される。この環状ペプチドは、N, N-ジメチルホルムアミドにおける高希釈度 (1 mg / ml) での標準的なカップリング条件を使用して合成することができる。典型的な反応が、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウム・ヘキサフルオロホスファート (PyBOP; 2 当量) および重炭酸ナトリウム (10 当量) などの過剰なカップリング試薬を使用して室温で行われる。その後、ペプチドはキャリアタンパク質 (例えば、KLH またはアルブミン) に結合させられ、そして結合させられたペプチドは、インビトロ法またはインビボ法によって抗体を選択するために使用される。

【0123】

実施例 3：ハイブリッドペプチドに基づく二重特異性抗原の設計

本実施例では、構造的に関連する 2 つの異なるタンパク質の I L-1 α および I L-1 β の交互に連続する配列または重複する配列を含むハイブリッドペプチドが、I L-1 α および I L-1 β に対する二重特異性抗体を惹起させるための二重特異性抗原として使用するために構築された。ハイブリッドペプチドを作製するために、I L-1 α および I L-1 β の交互に連続するアミノ酸配列または重複するアミノ酸配列が、下記のペプチドを作製するために同定され、一緒にスプライシングされた：

T K G G Q D I T D F Q I L E N Q (配列番号 3)

b b b b b b b b b b

a a a a a a a a a a

a および b は、残基がどのタンパク質から由来するかを示している (a = I L-1 α ; b = I L-1 β)。両方のタンパク質に共通する I T D F (配列番号 4) モチーフがハイブリッドペプチドに含まれた。さらに、このハイブリッドペプチドは、両方のタンパク質のカルボキシ末端に由来する配列に集中しており、そして両方のタンパク質における中和抗体に対して抗原性であることもまた知られている。このハイブリッドペプチドは標準的な化学的合成法によって合成される。その後、ペプチドはキャリアタンパク質 (例えば、KLH またはアルブミン) に結合させられ、そして結合させられたペプチドは、インビトロ法またはインビボ法によって抗体を選択するために使用される。

【0124】

実施例 4：I L-1 α および I L-1 β に対する二重特異性抗体の作製

N E A Q N I T D F (配列番号 1)

C y c l o-M A F L R A N Q N N G K I S V A L (P G) (配列番号 2)

T K G G Q D I T D F Q I L E N Q (配列番号 3)

配列番号 1、2 および 3 のペプチドを KLH と結合して、個々のウサギを免疫化した。3 つのペプチドのそれぞれで免疫化されたウサギから得られた抗血清は、抗原として使用されたペプチドに対して良好な抗体応答を示した。しかし、配列番号 3 のペプチドで免疫化されたウサギから得られた抗血清だけは、I L-1 α タンパク質および I L-1 β タンパク質の両方と結合することができた。

【0125】

5 匹のマウス (B A 1 1 9 ~ B A 1 2 3) を、KLH と結合させた配列番号 3 のペプチドおよびフロインド不完全アジュバント (F I A) を用いて、3 週間毎に 1 回、合計で 3 回、皮下注射によって免疫化し、その後、KLH と結合させた配列番号 3 のペプチドを用いた 2 回の静脈内注射による追加免疫を行った。各マウスはそれぞれの免疫化の 10 日後に

10

20

30

40

50

採血され、抗体価が E L I S A によって測定された。B A 1 1 9 および B A 1 2 3 のマウスから得られた脾臓細胞をそれぞれ、I I A 節に記載されるように、ミエローマ細胞株 P 3 X 3 6 A g 8 . 6 3 5 と融合し、得られた融合細胞を、限界希釈を使用して数枚の 9 6 ウエルプレートにウエルあたり 1 個の細胞で播種した。増殖したハイブリドーマクローンを、抗体産生クローンを同定するために、標準的な E L I S A によって I g G および I g M の産生について最初にアッセイした。マウス # B A 1 2 3 の融合から合計で 9 4 5 個のクローンが単離された。E L I S A で試験された 3 5 5 個のクローンから得られた上清が、I L - 1 α 、または I L - 1 β 、または I L - 1 α および I L - 1 β の両方に対する抗原結合活性を示した。

【0126】

【表1】

クローンの数	抗原特異性(全長の I L - 1 α および/または I L - 1 β に対して)	イソタイプ
249	I L - 1 α のみ	I g G
19	I L - 1 α のみ	I g M
15	I L - 1 β のみ	I g G
2	I L - 1 β のみ	I g M
57	I L - 1 α および β	I g G
13	I L - 1 α および β	I g M

【0127】

均等物

当業者は、日常的にすぎない実験を使用して、本明細書中に記載されている本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、またはそのような均等物を確認することができる。そのような均等物は、添付されている請求項によって包含されるものとする。

【0128】

【表2】

10

20

30

配 列 表

NEAQNITDF (配列番号 1)

Cyclo-MAFLRANQNNGKISVAL(PG) (配列番号 2)

10

TKGGQDITDFQILENQ (配列番号 3)

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFSMGAYKSSKD
DAKITVILGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
NKLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS

(配列番号 4)

20

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02773 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/13,
C07K 16/24, G01N 33/68, 33/577, A61K 51/10, 39/395,
A61P 37/06, C12N 15/63 // C07K 14/545, A01K 67/027(74) Agents: CONWAY, John et al., Abbott Laboratories, 100
Research Drive, Worcester, MA 01605-4314 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/20755

(22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/215,379 29 June 2000 (29.06.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ABBOTT
LABORATORIES [US/AT]; 100 Abbott Park Road, Ab-
bott Park, IL 60064 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK,
SL, TL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, UG, UZ, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): COLLINSON,
Albert [US/US]; 21 Overlook Drive, Marlborough, MA
01752 (US); GHAYUR, Tariq [PK/US]; 1614 Washington
Street, Holliston, MA 01746 (US); AVGERINOS, George
[US/US]; 15 Hammond Circle, Sudbury, MA 01776
(US); DIXON, Richard [US/US]; 6 Samuel Drive, North
Grafton, MA 01536 (US); KAYMAKCALAN, Zehra
[US/US]; 4 Piccadilly Way, Westborough, MA 01581
(US).

Published:

- without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

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

WO 02/02773 A2

(54) Title: DUAL SPECIFICITY ANTIBODIES AND METHODS OF MAKING AND USING

(57) Abstract: Antibodies having dual specificity for two different but structurally related antigens are provided. The antibodies can be, for example, entirely human antibodies, recombinant antibodies, or monoclonal antibodies. Preferred antibodies have dual specificity for IL-1 α and IL-1 β and neutralize IL-1 α and IL-1 β activity *in vitro* and *in vivo*. An antibody of the invention can be a full-length antibody or an antigen-binding portion thereof. Methods of making and methods of using the antibodies of the invention are also provided. The antibodies, or antibody portions, of the invention are useful for detecting two different but structurally related antigens (e.g., IL-1 α and IL-1 β) and for inhibiting the activity of the antigens, (e.g., in a human subject suffering from a disorder in which IL-1 α and/or IL-1 β activity is detrimental).

WO 02/02773

PCT/US01/20755

**DUAL SPECIFICITY ANTIBODIES AND
METHODS OF MAKING AND USING**

5

Background of the Invention

The mammalian immune system includes B lymphocytes that, in totality, express an antibody repertoire composed of hundreds of billions of different antibody specificities. A normal immune response to a particular antigen involves the selection
10 from this repertoire of one or more antibodies that specifically bind the antigen, and the success of an immune response is based, at least in part, on the ability of these antibodies to specifically recognize (and ultimately eliminate) the stimulating antigen and "ignore" other molecules in the environment of the antibodies.

The usefulness of antibodies that specifically recognize one particular target
15 antigen led to the development of monoclonal antibody technology. Standard hybridoma technology now allows for the preparation of antibodies having a single specificity for an antigen of interest. More recently, recombinant antibody techniques, such as screening of *in vitro* antibody libraries, have been developed. These techniques also allow for production of antibodies with a single specificity for an antigen of interest.

20 Antibodies having specificity for a single target antigen may, at least under certain circumstances, display undesired cross-reactivity or background binding to other antigens. This cross-reactivity or background binding, however, is usually unpredictable (*i.e.*, it is not possible to predict which antigen the antibody will cross-react with). Moreover, it is usually distinguishable from specific antigen binding, since it typically
25 represents only a very minor portion of the binding ability of the antibody (*e.g.*, 1% or less of total antibody binding) and typically is only observed at high antibody concentrations (*e.g.*, 1000 fold, or higher, concentrations than needed to observe specific antigen binding). Although there are several antigens that may belong to a structurally related family of proteins, the antibody response to a particular family member is highly
30 specific. In addition, there are several examples of protein family members (*e.g.*, members of the IL-1 and TNF families) that bind to the same receptor, receptor component or structurally related receptors, yet monoclonal antibodies raised against one

WO 02/02773

PCT/US01/20755

member of the family do not show high cross reactivity towards other family members. There could be two reasons for this lack of cross-reactivity of MAbs towards various family members. First, in standard hybridoma production, one searches for only a few antibodies of high specificity/affinity for the target antigen and then checks for cross
5 reactivity or background binding of the few selected antibodies. Second, although proteins within a family are structurally related, they may have exclusive, non-overlapping immunodominant epitopes. Therefore, MAbs raised by using full length protein may not cross react with other structurally related proteins.

There are also examples of monoclonal antibodies raised against an antigen of
10 one species that will bind specifically to the same functional antigen in another species. For example, an anti-mouse X antibody may readily bind antigen X from human. This is because they share significant sequence and structural similarities though they are not identical. However, such species-cross-reactive antibodies do not constitute "dual specificity" antibodies, since they have specificity for the same antigen from different
15 species.

Thus, monoclonal antibodies having predictable dual or multiple specificity, that is, antibodies having true specificity for two or more different antigens, are still needed.

Summary of the Invention

This invention provides methods for making antibodies having dual specificity
20 for at least two structurally-related, yet different, antigens. The method generally involves providing an antigen that comprises a common structural feature of the two different but structurally related molecules; exposing an antibody repertoire to the antigen; and selecting from the repertoire an antibody that specifically binds the two different but structurally related molecules to thereby obtain the dual specificity
25 antibody. In clinical settings, several members of the same family of proteins may contribute to the various symptoms of a disease process. Therefore, use of a dual specificity antibody of the invention, which binds members of the same family of proteins, to block the functions of more than one member of the protein family can be beneficial for alleviating disease symptoms or for interrupting the disease process itself.
30 Moreover, such dual specificity antibodies of the invention are useful to detect structurally related antigens, to purify structurally related antigens and in diagnostic assays involving structurally related antigens.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

In a preferred embodiment, the antigen is designed based on a contiguous topological area of identity between the two different but structurally related molecules. For example, the two different but structurally related molecules can be proteins and the antigen can be a peptide comprising an amino acid sequence of a contiguous topological area of identity between the two proteins.

In another embodiment, the antigen is designed based on structurally mimicking a loop of a common fold of the two different but structurally related molecules. For example, the antigen can be a cyclic peptide that structurally mimics a loop of a common fold of two different but structurally related proteins.

In yet another embodiment, the antigen is designed based on splicing together alternating and/or overlapping portions of the two different but structurally related molecules to create a hybrid molecule. For example, the antigen can be a hybrid peptide made by splicing together alternating and/or overlapping amino acid sequences of two different but structurally related proteins.

In still another embodiment, the antigen can comprise one of the two different but structurally related molecules and the method involves selecting antibodies that specifically recognize both related molecules.

In the method of the invention, the antibody repertoire can be exposed to the antigen of interest either *in vivo* or *in vitro*. For example, in one embodiment, exposure of the repertoire to the antigen involves immunizing an animal *in vivo* with the antigen. This *in vivo* approach can further involve preparing a panel of hybridomas from lymphocytes of the animal and selecting a hybridoma that secretes an antibody that specifically binds the two different but structurally related molecules. The animal that is immunized can be, for example, a mouse, a rat, a rabbit, or a goat, or a transgenic version of any of the foregoing animals, such as a mouse that is transgenic for human immunoglobulin genes such that the mouse makes human antibodies upon antigenic stimulation. Other types of animals that can be immunized include mice with severe combined immunodeficiency (SCID) that have been reconstituted with human peripheral blood mononuclear cells (hu-PBMC-SCID chimeric mice) or lymphoid cells or precursors thereof and mice that have been treated with lethal total body irradiation, followed by radioprotection with bone marrow cells of a severe combined immunodeficiency (SCID) mouse, followed by engraftment with functional human

WO 02/02773

PCT/US01/20755

lymphocytes (the Trimera system). Still another type of animal that can be immunized is an animal (e.g., mouse) whose genome has been "knocked out" (e.g., by homologous recombination) for an endogenous gene(s) encoding the antigen(s) of interest, wherein upon immunization with the antigen(s) of interest the KO animal recognizes the

5 antigen(s) as foreign.

In another embodiment, the antibody repertoire is exposed to the antigen *in vitro* by screening a recombinant antibody library with the antigen. The recombinant antibody library can be, for example, expressed on the surface of bacteriophage or on the surface of yeast cells or on the surface of bacterial cells. In various embodiments, the

10 recombinant antibody library is, for example, a scFv library or a Fab library. In yet another embodiment, antibody libraries are expressed as RNA-protein fusions.

Another approach to preparing the dual specificity antibodies involves a combination of *in vivo* and *in vitro* approaches, such as exposing the antibody repertoire to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by *in*

15 *vitro* screening of a recombinant antibody library prepared from lymphoid cells of the animal with the antigen. Still another approach involves exposing the antibody repertoire to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by *in vitro* affinity maturation of a recombinant antibody library prepared from lymphoid cells of the animal. Yet another approach involves exposing the antibody repertoire to

20 the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by selection of single antibody producing cells secreting an antibody of interest, recovery of heavy- and light chain variable region cDNAs from these selected cells (e.g., by PCR) and expression of the heavy- and light chain variable regions in mammalian host cells *in vitro* (referred to as the selected lymphocyte antibody method, or SLAM), thereby

25 allowing for further selection and manipulation of the selection antibody gene sequences. Still further, monoclonal antibodies can be selected by expression cloning by expressing heavy and light chain antibody genes in mammalian cells and selecting for mammalian cells secreting an antibody having the requisite binding specificity.

The methods of the invention allow for the preparation of various different types of dual specificity antibodies, including fully human antibodies, chimeric antibodies and 30 CDR-grafted antibodies, and antigen-binding portions thereof. Dual specificity antibodies prepared according to the methods of the invention are also provided. A

WO 02/02773

PCT/US01/20755

preferred dual specificity antibody of the invention is one that specifically binds interleukin-1 α and interleukin-1 β . Such a dual specificity antibody can be used in methods of detecting IL-1 α or IL-1 β comprising contacting IL-1 α or IL-1 β with the dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, such that IL-1 α or IL-1 β is
5 detected. A neutralizing dual specificity antibody also can be used in methods of inhibiting IL-1 α or IL-1 β activity comprising contacting IL-1 α or IL-1 β with the dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, such that the activity of IL-1 α or IL-1 β is inhibited. Such dual specificity antibodies also can be used in methods of
10 treating an interleukin-1-related disorder comprising administering to a subject suffering from an interleukin-1-related disorder the dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof.

In another embodiment, the invention provides a method of making an antibody or an antigen binding portion thereof library by performing the following steps:
a) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A
15 from an antibody repertoire resulting from exposure to a first antigen; b) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B from an antibody repertoire resulting from exposure to the first antigen; c) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library C from an antibody repertoire
20 resulting from exposure to a second antigen; d) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library D from an antibody repertoire resulting from exposure to the second antigen; and e) combining the recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A with the recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library D to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library X and/or combining the recombinant heavy chain or an antigen binding
25 portion thereof library C with the recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library Y.

In another embodiment of the present invention, the immediately foregoing method of the invention can further comprise the step of combining the antibody or an antigen binding portion thereof library X with the antibody or an antigen binding portion
30 thereof library Y to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library Z.

In a further embodiment, the present invention is directed to the antibody or an antigen binding portion thereof libraries X, Y and Z.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

In another embodiment, the method of the present invention allows for the identification of dual specific antibody or an antigen binding portion thereof by selecting from the libraries X, Y and/or Z an antibody or an antigen binding portion thereof that binds both the first and the second antigen.

5 In a further embodiment, the present invention is directed to the dual specific antibody made and/or selected by any of the methods of the present invention.

In another embodiment, the present invention is also directed to the nucleotide sequence encoding each member of the antibody or an antigen binding portion thereof of libraries X, Y, and Z; and the dual specific antibody or an antigen binding portion thereof, a vector comprising the afore mentioned nucleotide sequences and host cell transfected with the afore mentioned vector.

In a preferred embodiment, the first and second antigen is each independently selected from the group consisting of proteins, polypeptides and peptides provided that the first and second antigens are not the same. In a further embodiment, the proteins, polypeptides and peptides are secreted proteins or surface receptors and the secreted protein is selected from the group consisting of an IFN, a TNF, an Interleukin, IP-10, PF4, a GRO, 9E3, EMAP-II, a CSF, an FGF, and a PDGF. In another preferred embodiment the first antigen is IL-1 α and the second antigen is IL-1 β .

Detailed Description of the Invention

20 This invention pertains to the design and use of antigens for generating dual specificity antibodies, *ie.*, antibodies having specificity for at least two different but structurally related molecules, as well as the selection, preparation and use of such dual specificity antibodies. The structural relatedness of the antigens of the invention can be over the entire antigen (e.g., protein) or only in certain structurally-related regions. The invention provides a method for obtaining a dual-specificity antibody that specifically binds two different but structurally related molecules, wherein the method involves:

providing an antigen that comprises a common structural feature of the two different but structurally related molecules;

exposing an antibody repertoire to the antigen; and

30 selecting from the repertoire an antibody that specifically binds the two different but structurally related molecules to thereby obtain the dual specificity antibody.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

It should be noted that while the invention is described herein in terms of recognition of two different but related antigens, it should be understood that the term "dual specificity antibody" is intended to include antibodies that specifically recognize even more than two different but related antigens, such as antibodies that recognize
 5 three, four, five or more structurally related but distinct antigens. Furthermore, the term "different but structurally related antigens" is intended to include antigens (*e.g.*, proteins) whose overall structures are related as well as antigens (*e.g.*, proteins) which share one or more structurally-related regions but that are otherwise unrelated. Thus, "different but structurally related" antigens could be, for example, two proteins that are
 10 members of the same protein family having a common overall structure or could be, for example, two proteins whose overall structure is dissimilar (unrelated) but that each contain a structurally-related domain.

Various types of antigens may be used to elicit the antibodies of the invention and various methods of making antibodies can be applied to obtain a dual specificity
 15 antibody of the invention, as discussed in further detail below in the following subsections.

I. Dual Specificity Antigens

To prepare a dual specificity antibody of the invention, antibodies are raised against an antigen capable of eliciting dual specificity antibodies. Such antigens
 20 generally are referred to herein as dual specificity antigens. Various different types of dual specificity antigens can be used in the invention and the design of various types of dual specificity antigens is described further in the following subsections.

A. Contiguous Topological Areas

In one embodiment, a dual specificity antigen of the invention comprises a
 25 contiguous topological area of identity and/or similarity between the two different but structurally related molecules to which a dual specificity antibody is to be raised. Preferably, the antigen comprises the largest (*e.g.*, longest) contiguous topological area of identity and/or similarity between the two different but structurally related molecules. Preferably, the two different but structurally related molecules are proteins and the dual
 30 specificity antigen comprises a linear peptide corresponding to the largest (*e.g.*, longest) contiguous topological area of identity and/or similarity between the two proteins. The appropriate region of identity/similarity that is chosen is preferably a receptor or ligand

WO 02/02773

PCT/US01/20755

binding region, although other regions of identity/similarity can also be used.

To determine contiguous topological areas of identity between two molecules (*e.g.*, proteins), the two molecules (*e.g.*, proteins) are compared (*e.g.*, homology modeling, structural information or aligned) and identical or similar regions are identified. For proteins, an alignment algorithm can be used to create optimal alignment and identify the largest (*e.g.*, longest) contiguous topological area of identity and/or similarity between the two proteins. A preferred, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of two sequences is the algorithm of Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, modified as in Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used. See <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. An alternative mathematical algorithm that can be used is that used in the ALIGN program described in Myers and Miller (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17.

When an appropriate region of identity/similarity is chosen, the dual specificity antigen corresponding to the region can be chemically synthesized. For example, for peptide antigens, the peptide can be synthesized by standard peptide synthesis methods. In one embodiment, the peptide antigen comprises L amino acids. In other embodiments, the peptide antigen may be partially or entirely composed of D amino acids. An example of the design of a dual specificity antigen based on a contiguous topological area of identity and/or similarity between two different but structurally related proteins is described in detail in Example 1.

B. Cyclic Peptides Mimicking a Structural Loop

In another embodiment, a dual specificity antigen of the invention comprises a cyclic molecule, preferably a cyclic peptide, that structurally mimics a key loop of a common fold of the two different but structurally related molecules (*e.g.*, proteins) to which dual specificity antibodies are to be raised. To prepare this type of antigen, the structures of the two related molecules are compared and a loop of a common fold found

WO 02/02773

PCT/US01/20755

in the two molecules is identified. Standard molecular modeling and crystallographic analysis can be used to aid in the identification of such loops and common folds. Identical and similar regions (*e.g.*, amino acid sequences between two proteins) are identified and a consensus sequence can be designed for similar but not identical regions. A linear molecule, *e.g.*, a linear peptide, is designed based on these similar and identical regions and this linear molecule can then be cyclized, by known chemical means, to create an antigen that mimics the key loop. For example, a proline and a glycine can be added to the end of a linear peptide to allow for cyclization of the peptide. An example of the design of a dual specificity antigen based on a cyclic peptide mimicking a structural loop shared by two different but structurally related proteins is described in detail in Example 2.

C. Hybrid Molecules

In another embodiment, a dual specificity antigen of the invention comprises a hybrid molecule, preferably a hybrid peptide, that includes alternating and/or overlapping regions of the two different but structurally related molecules (*e.g.*, proteins) to which dual specificity antibodies are to be raised. To prepare this type of antigen, the structures of the two molecules are compared, and overlapping regions are identified (*i.e.*, regions of identity), as well as nonidentical regions between the two molecules. A hybrid molecule (*e.g.*, a hybrid peptide, when the two related molecules are proteins) is prepared that preferably comprises alternating regions (*e.g.*, amino acid sequences) from each of the two molecules, as well as an overlapping region that is common to both molecules. Schematically, such a hybrid molecule can be described as: X-Y-Z, wherein Y represents a region of identity or strong similarity between the two related molecules (*i.e.*, an overlapping region), X represents a region from one of the related molecules and Z represents a region from the other of the related molecules. An example of the design of a dual specificity antigen based on a hybrid peptide composed of sequences of two different but structurally related proteins is described in detail in Example 3.

Another type of hybrid molecule is one in which a peptide has been introduced into a full-length protein (referred to as a "target" protein). Peptides are selected that represent functional regions of two different but structurally related proteins, for example, receptor interacting regions. Such peptides are referred to herein as functional peptides. A functional peptide from one of the related proteins is then introduced into

WO 02/02773

PCT/US01/20755

the full-length protein of the other related protein or, alternatively, an unrelated protein. For example, a peptide of IL-1 α corresponding to a receptor interacting region of IL-1 α is identified and this functional peptide of IL-1 α is introduced into the full-length IL-1 β protein to create a hybrid IL-1 α /IL-1 β molecule. Similarly, a peptide of IL-1 β

5 corresponding to a receptor interacting region of IL-1 β is identified and this functional peptide of IL-1 β is introduced into the full-length IL-1 α protein to create a hybrid IL-1 α /IL-1 β molecule. This introduction of the functional peptide into the related full-length protein constrains the functional peptide at both ends and maintains the fold-structure of the functional peptide.

10 In case of an IL-1 α /IL-1 β hybrid, the functional peptide preferably is inserted (replaces the natural amino acids) in a target area representing the common fold structures of IL-1 α and IL-1 β . Such areas may be found over the entire length of the protein (e.g., in the N-terminal region, in the middle of the protein, in the C-terminal region). Furthermore, functional peptides representing the common IL-1 α /IL-1 β fold
15 structures can also be inserted into an irrelevant protein, such as albumin or some other naturally occurring protein. In this instance, the preferred insertion site for the peptide is a region that allows the peptide to maintain the desired fold structure. Therefore, the insertion sites can be either at the N-terminus, the middle, or the C-terminus of the protein. The positioning of the peptide in any naturally occurring target protein is
20 selected to mimic the structural constraints placed upon it by the native protein from which it is derived. While the functional peptide may simply be inserted into the target protein such that the amino acids of the functional peptide are added to the target protein, preferably the amino acids of the functional peptide replace a portion of the target protein into which it is inserted.

25 As a non-limiting example, a hybrid molecule is constructed for use as a dual specificity antigen for raising dual specificity antibodies to IL-1 α and IL-1 β wherein a functional peptide corresponding to a specific structural element of either IL-1 α or IL-1 β is introduced into the full length IL-1 β or IL-1 α in the equivalent structural position. The chosen hybrid molecule replaces residues 160-176 of IL-1 β with residues 168-184
30 of IL-1 α . The resulting molecule possesses the following amino acid sequence, in which the substituted IL-1 α sequences (residues 168-184) are underlined:

WO 02/02773

PCT/US01/20755

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFS**MGAYKSSKD**
DAKTIIVLGLKEKNLYLSCVLDKDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEI
 NNKLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS
 (SEQ ID NO: 4)

5

This molecule can be prepared using standard molecular biology techniques (*e.g.*, cloning, polymerase chain reaction) using the publicly available IL-1 α and IL-1 β cDNA sequences and recombinant protein expression techniques. A hybrid cDNA can be prepared, introduced into an appropriate expression vector and the polypeptide can be expressed by introducing the expression vector into an appropriate host cell.

10

D. Peptides Based on Hydrophobicity Plots

In another embodiment, a dual specificity antigen of the invention is selected based on hydrophobicity plots to select peptides predicted to be highly antigenic. For example, antigenic indexes of peptides can be calculated using computer software as described by Jameson and Wolf (CABIOS, 4(1), 181-186 (1988)). Regions of interest for antibody binding can be chosen to maximize the probability of antigenicity.

15

E. Immunization with Antigen-Transfected Cells

In another embodiment, a dual specificity antibody of the invention is prepared by immunization with antigen-transfected cells (*i.e.*, dual specificity antigens of the invention can be antigen-transfected cells). Cell lines can be generated that stably express the two different but structurally related antigens, or a hybrid molecule thereof. For example, cell lines can be generated that stably express IL-1 α or IL-1 β or an IL-1 α /IL-1 β hybrid molecule (*e.g.*, SEQ ID NO: 4). The molecules of interest can be secreted from the cells (in case of soluble proteins) or can be expressed on the cell surface (in case of receptors, enzymes). Gene delivery into the host cells to allow for expression of the antigens by the host cells can be accomplished by a number of conventional means, including but not limited to transfection, electroporation, cell fusion, lipofection, particle bombardment, microinjection, or viral infection. The cell lines expressing the antigens of interest can then be transplanted via one or more various routes (intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, and the like) into an animal of interest for antibody production. The cells then serve as a slow release source of the antigen of interest. Preferably the cells express the full length proteins. However,

20

25

30

WO 02/02773

PCT/US01/20755

antigenic fragments can also be expressed. For soluble proteins, the proteins preferably are secreted by the cells. To generate a dual specificity antibody to the extracellular domain of two closely related receptors, the receptors preferably are expressed on the cell surface.

5 *F. Immunization with One of the Structurally Related Molecules*

In another embodiment, the dual specificity antigen is simply one of the two different but structurally related molecules to which dual specificity antibodies are to be raised. One of the two related molecules is used as the immunization agent and then the resultant antibody repertoire is screened for antibodies that bind, and more preferably neutralize, both of the two different but structurally related molecules. For example, one can immunize with either IL-1 α or IL-1 β and then screen for α/β binders, and more preferably neutralizers. As used in this embodiment, the term "immunize" is intended to broadly encompass the exposure of an antibody repertoire to the antigen, such as IL-1 α or IL-1 β , either *in vivo* or *in vitro*. Thus, this embodiment encompasses immunizing an animal with either IL-1 α or IL-1 β , and screening the resultant antibodies raised to select for those antibodies that bind both IL-1 α and IL-1 β , as well as screening a recombinant antibody library *in vitro* with either IL-1 α or IL-1 β and then selecting for recombinant antibodies that bind both IL-1 α and IL-1 β .

II. Methods of Making Dual Specificity Antibodies

20 To prepare a dual specificity antibody of the invention, an antibody repertoire (either *in vivo* or *in vitro*) is exposed to a dual specificity antigen, prepared as described in the previous section, and an appropriate dual specificity antibody is selected from the repertoire. The two elements of antibody recognition of an antigen are structural recognition and affinity maturation based on specific molecular interactions. During a natural immune response, low affinity antibodies that recognize structural motifs (for example the recognition of an antigen by certain pattern recognition receptors) are developed easily, and early on in the natural immune response this is followed by somatic mutations to increase the affinity of a few clones. Various *in vivo* and *in vitro* processes have been developed to mimic this natural phenomenon. Low affinity dual specificity antibodies can be generated by any of the *in vitro* and *in vivo* methods described herein and higher affinity dual specificity Mabs can be prepared by somatic mutagenesis methods described herein. Moreover, to optimize high affinity dual

WO 02/02773

PCT/US01/20755

specificity MAbs, co-crystal structures of the low affinity MAbs with the desired antigens can be made. The structural information obtained can guide further affinity enhancements by altering (mutating) specific contact residues of the MAbs to enhance specific molecular interactions, as described herein.

5 Methods for making dual specificity antibodies using *in vivo* approaches, *in vitro* approaches, or a combination of both, are described in further detail in the following subsections.

A. *In vivo* Approaches

A standard *in vivo* approach to preparing antibodies is by immunizing an appropriate animal subject with an antigen to thereby expose the *in vivo* antibody repertoire to the antigen, followed by recovery of an antibody or antibodies of interest from the animal. Such an approach can be adapted to the preparation of dual specificity antibodies by use of a dual specificity antigen and selection for antibodies that specifically recognize the two structurally related molecules of interest. Dual specificity antibodies can be prepared by immunizing a suitable subject, (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal, including transgenic and knockout versions of such mammals) with an immunogenic preparation of a dual specificity antigen. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, a chemically synthesized or recombinantly expressed dual specificity antigen. The preparation can further include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory compound. Moreover, when used to raise antibodies, in particular by *in vivo* immunization, a dual specificity antigen of the invention can be used alone, or more preferably is used as a conjugate with a carrier protein. Such an approach for enhancing antibody responses is well known in the art. Examples of suitable carrier proteins to which a dual specificity antigen can be conjugated include keyhole limpet haemocyanin (KLH) and albumin.

Antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) (see also, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *PNAS* 76:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). The technology for producing monoclonal antibody hybridomas is well known (see generally R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In*

WO 02/02773

PCT/US01/20755

Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes or lymph node cells or peripheral blood lymphocytes) from a mammal immunized with a dual specificity immunogen as described above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody with dual specificity for the two different but structurally related molecules of interest. Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating dual specificity monoclonal antibodies (see, e.g., G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:550-52; Gefter *et al. Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited *supra*). Moreover, the ordinary skilled artisan will appreciate that there are many variations of such methods, which also would be useful. Typically, the immortal cell line (e.g., a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("ILAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines may be used as a fusion partner according to standard techniques, e.g., the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing monoclonal antibodies that specifically recognize the two structurally related molecules of interest are identified by screening the hybridoma culture supernatants for such antibodies, e.g., using a standard ELISA assay, to select those antibodies that specifically can bind the two related molecules.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

Depending on the type of antibody desired, various animal hosts may be used for *in vivo* immunization. A host that itself expresses an endogenous version of the antigen(s) of interest can be used or, alternatively, a host can be used that has been rendered deficient in an endogenous version of the antigen(s) of interest. For example, it
5 has been shown that mice rendered deficient for a particular endogenous protein via homologous recombination at the corresponding endogenous gene (*i.e.*, "knockout" mice) elicit a humoral response to the protein when immunized with it and thus can be used for the production of high affinity monoclonal antibodies to the protein (see *e.g.*, Roes, J. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 183:231-237; Lunn, M.P. et al. (2000) *J.*
10 *Neurochem.* 75:404-412).

For production of non-human antibodies (*e.g.*, against a human dual specificity antigen), various non-human mammals are suitable as hosts for antibody production, including but not limited to mice, rats, rabbits and goats (and knockout versions thereof), although mice are preferred for hybridoma production. Furthermore, for production of
15 fully-human antibodies against a human dual specificity antigen, a host non-human animal can be used that expresses a human antibody repertoire. Such non-human animals include transgenic animals (*e.g.*, mice) carrying human immunoglobulin transgenes, hu-PBMC-SCID chimeric mice, and human/mouse radiation chimeras, each of which is discussed further below.

Thus, in one embodiment, the animal that is immunized with a dual specificity antigen is a non-human mammal, preferably a mouse, that is transgenic for human immunoglobulin genes such that the non-human mammal (*e.g.*, mouse) makes human antibodies upon antigenic stimulation. In such animals, typically, human germline configuration heavy and light chain immunoglobulin transgenes are introduced into
25 animals that have been engineered so that their endogenous heavy and light chain loci are inactive. Upon antigenic stimulation of such animals (*e.g.*, with a human antigen), antibodies derived from the human immunoglobulin sequences (*i.e.*, human antibodies) are produced, and human monoclonal antibodies can be made from lymphocytes of such animals by standard hybridoma technology. For further description of human
30 immunoglobulin transgenic mice and their use in the production of human antibodies see for example, U.S. Patent No. 5,939,598, PCT Publication No. WO 96/33735, PCT Publication No. WO 96/34096, PCT Publication WO 98/24893 and PCT Publication

WO 02/02773

PCT/US01/20755

- WO 99/53049 to Abgenix Inc., and U.S. Patent No. 5,545,806, No. 5,569,825, No. 5,625, 126, No. 5, 633, 425, No. 5,661,016, No. 5,770,429, No. 5,814,318, No. 5,877,397 and PCT Publication WO 99/45962 to Genpharm Inc. See also MacQuitty, J.J. and Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L.D. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding, F.A. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. M. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Mendez, M. J. *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L.L. and Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495; Green, L.L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X.D. *et al.* (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M.L. *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

- In another embodiment, the animal that is immunized with a dual specificity antigen is a mouse with severe combined immunodeficiency (SCID) that has been reconstituted with human peripheral blood mononuclear cells or lymphoid cells or precursors thereof. Such mice, referred to as hu-PBMC-SCID chimeric mice, have been demonstrated to produce human immunoglobulin responses upon antigenic stimulation. For further description of these mice and their use in antibody generation, see for example Leader, K.A. *et al.* (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. *et al.* (1996) *Immunobiol.* 195:360-375; Murphy, W.J. *et al.* (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. *et al.* (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:150-152; Albert, S.E. *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Nguyen, H. *et al.* (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Arai, K. *et al.* (1998) *J. Immunol. Methods* 217:79-85; Yoshinari, K. and Arai, K. (1998) *Hybridoma* 17:41-45; Hutchins, W.A. *et al.* (1999) *Hybridoma* 18:121-129; Murphy, W.J. *et al.* (1999) *Clin. Immunol.* 90:22-27; Smithson, S.L. *et al.* (1999) *Mol. Immunol.* 36:113-124; Chamat, S. *et al.* (1999) *J. Infect. Diseases* 180:268-277; and Heard, C. *et al.* (1999) *Molec. Med.* 5:35-45.

- In another embodiment, the animal that is immunized with a dual specificity antigen is a mouse that has been treated with lethal total body irradiation, followed by radioprotection with bone marrow cells of a severe combined immunodeficiency (SCID) mouse, followed by engraftment with functional human lymphocytes. This type of chimera, referred to as the Trimer system, has been used to produce human monoclonal antibodies by immunization of the mice with an antigen of interest followed by

WO 02/02773

PCT/US01/20755

preparation of monoclonal antibodies using standard hybridoma technology. For further description of these mice and their use in antibody generation, see for example Eren, R. *et al.* (1998) *Immunology* 93:154-161; Reisner, Y and Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:242-246; Ilan, E. *et al.* (1999) *Hepatology* 29:553-562; and Bocher, W.O. 5 *et al.* (1999) *Immunology* 96:634-641.

B. In vitro Approaches

Alternative to preparing dual specificity antibodies by *in vivo* immunization and selection, a dual specificity antibody of the invention can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., an antibody phage 10 display library) with a dual specificity antigen, to thereby isolate immunoglobulin library members that bind specifically to the two structurally related, but different, molecules of interest. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). In 15 various embodiments, the phage display library is a scFv library or a Fab library. The phage display technique for screening recombinant antibody libraries has been described extensively in the art. Examples of methods and compounds particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, McCafferty *et al.* International Publication No. WO 92/01047, U.S. Patent No. 20 5,969,108 and EP 589,877 (describing in particular display of scFv); Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409, No. 5,403,484, No. 5,571,698, No. 5,837,500 and EP 436,597 (describing, for example, pIII fusion); Dower *et al.* International Publication No. WO 91/17271, U.S. Patent No. 5,427,908, U.S. Patent No. 5,580,717 and EP 527,839 (describing in particular display of Fab); Winter *et al.* International Publication WO 25 92/20791 and EP 368,684 (describing in particular cloning of immunoglobulin variable domain sequences); Griffiths *et al.* U.S. Patent No. 5,885,793 and EP 589,877 (describing in particular isolation of human antibodies to human antigens using recombinant libraries); Garrard *et al.* International Publication No. WO 92/09690 (describing in particular phage expression techniques); Knappik *et al.* International 30 Publication No. WO 97/08320 (describing the human recombinant antibody library HuCal); Salfeld *et al.* International Publication No. WO 97/29131, describing the preparation of a recombinant human antibody to a human antigen (human tumor necrosis

WO 02/02773

PCT/US01/20755

factor alpha), as well as *in vitro* affinity maturation of the recombinant antibody) and Salfeld *et al.* U.S. Provisional Application No. 60/126,603, also describing the preparation of a recombinant human antibody to a human antigen (human interleukin-12), as well as *in vitro* affinity maturation of the recombinant antibody)

- 5 Other descriptions of recombinant antibody library screenings can be found in scientific publications such as Fuchs *et al.* (1991) *BioTechnology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Husc *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 10 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *BioTechnology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982; McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554; and Knappik *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86.

- Alternative to the use of bacteriophage display systems, recombinant antibody 15 libraries can be expressed on the surface of yeast cells or bacterial cells. Methods for preparing and screening libraries expressed on the surface of yeast cells are described further in PCT Publication WO 99/36569. Methods for preparing and screening libraries expressed on the surface of bacterial cells are described further in PCT Publication WO 98/49286.

- 20 Once an antibody of interest has been identified from a combinatorial library, DNAs encoding the light and heavy chains of the antibody are isolated by standard molecular biology techniques, such as by PCR amplification of DNA from the display package (*e.g.*, phage) isolated during the library screening process. Nucleotide sequences of antibody light and heavy chain genes from which PCR primers can be 25 prepared are known in the art. For example, many such sequences are disclosed in Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 and in the "Vbase" human germline sequence database.

- An antibody, or antibody portion, of the invention can be prepared by 30 recombinant expression of immunoglobulin light and heavy chain genes in a host cell. To express an antibody recombinantly, a host cell is transfected with one or more recombinant expression vectors carrying DNA fragments encoding the immunoglobulin

WO 02/02773

PCT/US01/20755

light and heavy chains of the antibody such that the light and heavy chains are expressed in the host cell and, preferably, secreted into the medium in which the host cells are cultured, from which medium the antibodies can be recovered. Standard recombinant DNA methodologies are used obtain antibody heavy and light chain genes, incorporate

5 these genes into recombinant expression vectors and introduce the vectors into host cells, such as those described in Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) and in U.S. Patent No. 4,816,397 by Boss *et al.*

10 Once DNA fragments encoding the VH and VL segments of the antibody of interest are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes or to a scFv gene. In these manipulations, a VL- or VH-encoding DNA fragment is operatively linked to another

15 DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

The isolated DNA encoding the VH region can be converted to a full-length

20 heavy chain gene by operatively linking the VH-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA

25 fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG4 constant region. For a Fab fragment heavy chain gene, the VH-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

30 The isolated DNA encoding the VL region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the VL-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The

WO 02/02773

PCT/US01/20755

sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR
 5 amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region, but most preferably is a kappa constant region.

To create a scFv gene, the VH- and VL-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, *e.g.*, encoding the amino acid sequence (Gly₄-Ser)₃, such that the VH and VL sequences can be expressed as a
 10 contiguous single-chain protein, with the VL and VH regions joined by the flexible linker (see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554).

To express the recombinant antibodies, or antibody portions of the invention, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, obtained as described
 15 above, can be inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene.
 20 The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (*e.g.*, ligation of complementary restriction sites on the
 25 antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). Prior to insertion of the light or heavy chain sequences, the expression vector may already carry antibody constant region sequences. For example, one approach to converting the VH and VL sequences to full-length antibody genes is to insert them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant
 30 regions, respectively, such that the VH segment is operatively linked to the CH segment(s) within the vector and the VL segment is operatively linked to the CL segment within the vector. Additionally or alternatively, the recombinant expression

WO 02/02773

PCT/US01/20755

vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a
5 signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the invention carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation
10 signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences may depend on such factors as the choice
15 of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, *etc.* Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV) (such as the CMV promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer),
20 adenovirus, (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP)) and polyoma. For further description of viral regulatory elements, and sequences thereof, see *e.g.*, U.S. Patent No. 5,168,062 by Stinski, U.S. Patent No. 4,510,245 by Bell *et al.* and U.S. Patent No. 4,968,615 by Schaffner *et al.*

In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the
25 recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (*e.g.*, origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see *e.g.*, U.S. Patents Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*). For example, typically the selectable
30 marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes

WO 02/02773

PCT/US01/20755

include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr⁻ host cells with methotrexate selection/amplification) and the *neo* gene (for G418 selection).

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is theoretically possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells, and most preferably mammalian host cells, is the most preferred because such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody. Prokaryotic expression of antibody genes has been reported to be ineffective for production of high yields of active antibody (Boss, M.A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Preferred mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr⁻ CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), NS0 myeloma cells, COS cells and SP2 cells. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

Host cells can also be used to produce portions of intact antibodies, such as Fab fragments or scFv molecules. It will be understood that variations on the above procedure are within the scope of the present invention. For example, it may be desirable to transfect a host cell with DNA encoding either the light chain or the heavy chain (but not both) of an antibody of this invention. Recombinant DNA technology may also be used to remove some or all of the DNA encoding either or both of the light

WO 02/02773

PCT/US01/20755

and heavy chains that is not necessary for binding to the antigens of interest. The molecules expressed from such truncated DNA molecules are also encompassed by the antibodies of the invention. In addition, bifunctional antibodies may be produced in which one heavy and one light chain are an antibody of the invention and the other heavy and light chain are specific for an antigen other than the antigens of interest by crosslinking an antibody of the invention to a second antibody by standard chemical crosslinking methods.

In a preferred system for recombinant expression of an antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention, a recombinant expression vector encoding both the antibody heavy chain and the antibody light chain is introduced into dhfr- CHO cells by calcium phosphate-mediated transfection. Within the recombinant expression vector, the antibody heavy and light chain genes are each operatively linked to CMV enhancer/AdMLP promoter regulatory elements to drive high levels of transcription of the genes. The recombinant expression vector also carries a DHFR gene, which allows for selection of CHO cells that have been transfected with the vector using methotrexate selection/amplification. The selected transformant host cells are culture to allow for expression of the antibody heavy and light chains and intact antibody is recovered from the culture medium. Standard molecular biology techniques are used to prepare the recombinant expression vector, transfect the host cells, select for transformants, culture the host cells and recover the antibody from the culture medium. Still further the invention provides a method of synthesizing a recombinant antibody of the invention by culturing a host cell of the invention in a suitable culture medium until a recombinant antibody of the invention is synthesized. The method can further comprise isolating the recombinant antibody from the culture medium.

Alternative to screening of recombinant antibody libraries by phage display, other methodologies known in the art for screening large combinatorial libraries can be applied to the identification of dual specificity antibodies of the invention. One type of alternative expression system is one in which the recombinant antibody library is expressed as RNA-protein fusions, as described in PCT Publication No. WO 98/31700 by Szostak and Roberts, and in Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. In this system, a covalent fusion is created between an mRNA and the peptide or protein that it encodes by *in vitro* translation of synthetic

WO 02/02773

PCT/US01/20755

mRNAs that carry puromycin, a peptidyl acceptor antibiotic, at their 3' end. Thus, a specific mRNA can be enriched from a complex mixture of mRNAs (e.g., a combinatorial library) based on the properties of the encoded peptide or protein, e.g., antibody, or portion thereof, such as binding of the antibody, or portion thereof, to the dual specificity antigen. Nucleic acid sequences encoding antibodies, or portions thereof, recovered from screening of such libraries can be expressed by recombinant means as described above (e.g., in mammalian host cells) and, moreover, can be subjected to further affinity maturation by either additional rounds of screening of mRNA-peptide fusions in which mutations have been introduced into the originally selected sequence(s), or by other methods for affinity maturation *in vitro* of recombinant antibodies, as described above.

C. Combination Approaches

Dual specificity antibodies of the invention also can be prepared using a combination of *in vivo* and *in vitro* approaches, such as methods in which the dual specificity antigen is originally exposed to an antibody repertoire *in vivo* in a host animal to stimulate production of antibodies that bind the dual specificity antigen but wherein further antibody selection and/or maturation (i.e., improvement) is accomplished using one or more *in vitro* techniques.

In one embodiment, such a combination method involves first immunizing a non-human animal (e.g., a mouse, rat, rabbit, goat, or transgenic version thereof, or a chimeric mouse) with the dual specificity antigen to stimulate an antibody response against the antigen, following by preparation and screening of a phage display antibody library using immunoglobulin sequences from lymphocytes stimulated *in vivo* by exposure to the dual specificity antigen. The first step of this combination procedure can be conducted as described in subsection IIA above, while the second step of this procedure can be conducted as described in subsection IIB above. Preferred methodologies for hyperimmunization of non-human animals followed by *in vitro* screening of phage display libraries prepared from the stimulated lymphocytes include those described by BioSite Inc., see e.g., PCT Publication WO 98/47343, PCT Publication WO 91/17271, U.S. Patent No. 5,427,908 and U.S. Patent No. 5,580,717.

In another embodiment, a combination method involves first immunizing a non-human animal (e.g., a mouse, rat, rabbit, goat, or knockout and/or transgenic version

WO 02/02773

PCT/US01/20755

thereof, or a chimeric mouse) with the dual specificity antigen to stimulate an antibody response against the antigen and selection of lymphocytes that are producing antibodies having the desired dual specificity (e.g., by screening hybridomas prepared from the immunized animals). The rearranged antibody genes from the selected clones are then
5 isolated (by standard cloning methods, such as reverse transcriptase-polymerase chain reaction) and subjected to *in vitro* affinity maturation, to thereby enhance the binding properties of the selected antibody or antibodies. The first step of this procedure can be conducted as described in subsection IIA above, while the second step of this procedure can be conducted as described in subsection IIB above, in particular using *in vitro*
10 affinity maturation methods such as those described in PCT Publication WO 97/29131 and PCT Publication WO 00/56772.

In yet another combination method, recombinant antibodies are generated from single, isolated lymphocytes using a procedure referred to in the art as the selected lymphocyte antibody method (SLAM), as described in U.S. Patent No. 5,627,052, PCT
15 Publication WO 92/02551 and Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. In this method, as applied to the dual specificity antibodies of the invention, a non-human animal (e.g., a mouse, rat, rabbit, goat, or transgenic version thereof, or a chimeric mouse) first is immunized *in vivo* with the dual specificity antigen to stimulate an antibody response against the antigen and then single cells secreting
20 antibodies of interest, e.g., specific for the dual specificity antigen, are selected using an antigen-specific hemolytic plaque assay (e.g., the dual specificity antigen itself, or the structurally-related molecules of interest, are coupled to sheep red blood cells using a linker, such as biotin, thereby allowing for identification of single cells that secrete antibodies with the appropriate specificity using the hemolytic plaque assay). Following
25 identification of antibody-secreting cells of interest, heavy- and light-chain variable region cDNAs are rescued from the cells by reverse transcriptase-PCR and these variable regions can then be expressed, in the context of appropriate immunoglobulin constant regions (e.g., human constant regions), in mammalian host cells, such as COS or CHO cells. The host cells transfected with the amplified immunoglobulin sequences, derived
30 from *in vivo* selected lymphocytes, can then undergo further analysis and selection *in vitro*, for example by panning the transfected cells to isolate cells expressing antibodies

WO 02/02773

PCT/US01/20755

having the desired dual specificity. The amplified immunoglobulin sequences further can be manipulated *in vitro*, such as by *in vitro* affinity maturation, as described above.

- In another embodiment, the combination method to produce a dual specific antibody involves the following steps. A first non-human animal is immunized with a first antigen and a second non-human animal is immunized with a second different antigen, wherein preferably the second antigen is structurally similar to the first antigen, to stimulate an antibody response *in vivo*. A recombinant heavy chain library and a recombinant light chain library are constructed from antibody genes derived from the first non-human animal and the second non-human animal, respectively, as described in section IIB. The heavy chain library from the animal immunized with the first antigen is combined with the light chain library from the animal immunized with the second antigen to generate an antibody library X. Similarly, the heavy chain library from the animal immunized with the second antigen is combined with the light chain library from the animal immunized with the first antigen to generate an antibody library Y. Additionally, libraries X and Y can be combined to generate library XY. Dual specific antibodies that bind both first and second antigen can be identified and isolated from X, Y and/or XY libraries.

III. Characteristics of Dual Specificity Antibodies

- The invention provides dual specificity antibodies, as well as antibody portions thereof, that can be prepared in accordance with the methods of the invention. Preferably, the antibodies, or portions thereof, are isolated antibodies. Preferably, the antibodies, or portions thereof, are neutralizing antibodies. The antibodies of the invention include monoclonal and recombinant antibodies, and portions thereof. In various embodiments, the antibody, or portion thereof, may comprise amino acid sequences derived entirely from a single species, such as a fully human or fully mouse antibody, or portion thereof. In other embodiments, the antibody, or portion thereof, can be a chimeric antibody or a CDR-grafted antibody or other form of humanized antibody.

- The term "antibody", as used herein, is intended to refer to immunoglobulin molecules comprised of four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as HCVR or VH) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and

WO 02/02773

PCT/US01/20755

CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as LCVR or VL) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion"), as used herein, refers to one or more fragments of a dual specificity antibody that retain the ability to specifically bind two different but structurally related antigens. It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. Other forms of single chain antibodies, such as diabodies are also encompassed. Diabodies are bivalent, bispecific antibodies in which VH and VL domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and

WO 02/02773

PCT/US01/20755

creating two antigen binding sites (see e.g., Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Still further, an antibody or antigen-binding portion thereof may be part of a larger immunoadhesion molecules, formed by covalent or noncovalent association of the antibody or antibody portion with one or more other proteins or peptides. Examples of such immunoadhesion molecules include use of the streptavidin core region to make a tetrameric scFv molecule (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) and use of a cysteine residue, a marker peptide and a C-terminal polyhistidine tag to make bivalent and biotinylated scFv molecules (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Antibody portions, such as Fab and F(ab')₂ fragments, can be prepared from whole antibodies using conventional techniques, such as papain or pepsin digestion, respectively, of whole antibodies. Moreover, antibodies, antibody portions and immunoadhesion molecules can be obtained using standard recombinant DNA techniques.

An "isolated dual specificity antibody", as used herein, is intended to refer to an a dual specificity antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (e.g., an isolated antibody that specifically binds two different but structurally related antigens, or structurally-related regions of otherwise unrelated antigens, but that is substantially free of antibodies that specifically bind other unrelated antigens). Moreover, an isolated dual specificity antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

A "neutralizing antibody", as used is intended to refer to an antibody whose binding to a particular antigen results in inhibition of the biological activity of the antigen. This inhibition of the biological activity of the antigen can be assessed by measuring one or more indicators of biological activity of the antigen using an appropriate *in vitro* or *in vivo* assay.

A "monoclonal antibody" as used herein is intended to refer to a hybridoma-derived antibody (e.g., an antibody secreted by a hybridoma prepared by hybridoma technology, such as the standard Kohler and Milstein hybridoma methodology). Thus, a hybridoma-derived dual specificity antibody of the invention is still referred to as a monoclonal antibody although it has antigenic specificity for more than a single antigen.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

The phrase "recombinant antibody" refers to antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as antibodies expressed using a recombinant expression vector transfected into a host cell, antibodies isolated from a recombinant, combinatorial antibody library, antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic for human immunoglobulin genes (see e.g., Taylor, L.D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) or antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involves splicing of particular immunoglobulin gene sequences (such as human immunoglobulin gene sequences) to other DNA sequences. Examples of recombinant antibodies include chimeric, CDR-grafted and humanized antibodies.

The term "human antibody" refers to antibodies having variable and constant regions corresponding to, or derived from, human germline immunoglobulin sequences as described by, for example, Kabat *et al.* (See Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). The human antibodies of the invention, however, may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*), for example in the CDRs and in particular CDR3.

Recombinant human antibodies of the invention have variable regions, and may also include constant regions, derived from human germline immunoglobulin sequences (See Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies are subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the VH and VL regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline VH and VL sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*. In certain embodiments, however, such recombinant antibodies are the result of selective mutagenesis or backmutation or both.

The term "backmutation" refers to a process in which some or all of the somatically mutated amino acids of a human antibody are replaced with the

WO 02/02773

PCT/US01/20755

- corresponding germline residues from a homologous germline antibody sequence. The heavy and light chain sequences of a human antibody of the invention are aligned separately with the germline sequences in the VBASE database to identify the sequences with the highest homology. Differences in the human antibody of the invention are
- 5 returned to the germline sequence by mutating defined nucleotide positions encoding such different amino acid. The role of each amino acid thus identified as candidate for backmutation should be investigated for a direct or indirect role in antigen binding and any amino acid found after mutation to affect any desirable characteristic of the human antibody should not be included in the final human antibody. To minimize the number
- 10 of amino acids subject to backmutation those amino acid positions found to be different from the closest germline sequence but identical to the corresponding amino acid in a second germline sequence can remain, provided that the second germline sequence is identical and colinear to the sequence of the human antibody of the invention for at least 10, preferably 12 amino acids, on both sides of the amino acid in question.
- 15 Backmutation may occur at any stage of antibody optimization.

The term "chimeric antibody" refers to antibodies which comprise heavy and light chain variable region sequences from one species and constant region sequences from another species, such as antibodies having murine heavy and light chain variable regions linked to human constant regions.

- 20 The term "CDR-grafted antibody" refers to antibodies which comprise heavy and light chain variable region sequences from one species but in which the sequences of one or more of the CDR regions of V_H and/or V_L are replaced with CDR sequences of another species, such as antibodies having murine heavy and light chain variable regions in which one or more of the murine CDRs (*e.g.*, CDR3) has been replaced with human
- 25 CDR sequences.

- The term "humanized antibody" refers to antibodies which comprise heavy and light chain variable region sequences from a non-human species (*e.g.*, a mouse) but in which at least a portion of the V_H and/or V_L sequence has been altered to be more "human-like", *i.e.*, more similar to human germline variable sequences. One type of
- 30 humanized antibody is a CDR-grafted antibody, in which human CDR sequences are introduced into non-human V_H and V_L sequences to replace the corresponding nonhuman CDR sequences.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

One way of measuring the binding kinetics of an antibody is by surface plasmon resonance. The term "surface plasmon resonance", as used herein, refers to an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time biospecific interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example
 5 using the BLAcore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). For further descriptions, see Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* **51**:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* **11**:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* **8**:125-131; and Johnsson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* **198**:268-277.

The term " K_{off} ", as used herein, is intended to refer to the off rate constant for
 10 dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex.

The term " K_d ", as used herein, is intended to refer to the dissociation constant of a particular antibody-antigen interaction.

The dual specificity antibodies of the invention are prepared using any of the various methods for preparing antibodies described in subsection II above. The dual
 15 specificity antibodies of the invention may be directed against essentially any structurally related antigens, although preferred dual specificity antibodies of the invention are those that specifically bind IL-1 α and IL-1 β , which can be prepared using a dual specificity antigen such as those described in Examples 1-4. Other structurally related antigens that can be applied to the current invention include but are not limited to
 20 caspase family members, cytokine families, such as IL-1 family members (e.g., IL-1/IL-18), TNF family members (e.g., TNF α /TNF β), IL-6 family members, Interferons, TGF β family members, EGF family members, FGF family members, PDGF family members, VEGF family members, Angiopoietin family members, Bone morphogenic proteins, secreted proteinases (metallo-proteinases), and cytokine receptor families, such
 25 as IL-1-receptor family members, TNF-receptors family members TGF β receptor family members, EGF receptor family members, FGF receptor family members, PDGF receptor family members, VEGF receptor family members and Angiopoietin receptor family members.

The dual specificity antibodies of the invention may display equal binding
 30 activity toward the two different but structurally related antigens to which it binds or, alternatively, the dual specificity antibodies may bind more preferentially to one of the two antigens, yet still have specificity towards the two related antigens as compared to

WO 02/02773

PCT/US01/20755

unrelated antigens. The binding activity of the dual specificity antibodies toward the structurally related antigens, as well as toward unrelated antigens, can be assessed using standard *in vitro* immunoassays, such as ELISA or BIAcore analysis. Preferably, the ratio of K_D of antibody toward structurally unrelated antigens to the K_D of antibody toward structurally related antigens should be at least 3, even more preferably the ratio should be at least 5, even more preferably the ratio should be at least 10, or even more preferably the ratio should be at least 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 or 1000.

In quantitative terms, the difference between background binding and dual specificity is one of level or degree. For example, background binding is at a low level, *e.g.*, less than 5%, more preferably less than 3% and most preferably, about 0.1-1% whereas specific cross-reactivity or dual specificity binding is at a higher level, *e.g.*, greater than 1%, more preferably greater than 3%, even more preferably greater than 5% and even more preferably greater than 10%. Additionally, preferably the IC_{50} of the dual specificity antibody for the target antigens is close to the ED_{50} s of the antigens in a given bioassay.

A dual specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention is preferably selected to have desirable binding kinetics (*e.g.*, high affinity, low dissociation, slow off-rate, strong neutralizing activity) for one, and more preferably both, of the antigens to which it specifically binds. For example, the dual specificity antibody, or portion thereof, may bind one, and more preferably both, of the structurally related antigens with a k_{off} rate constant of $0.1s^{-1}$ or less, more preferably a k_{off} rate constant of $1 \times 10^{-2}s^{-1}$ or less, even more preferably a k_{off} rate constant of $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ or less, even more preferably a k_{off} rate constant of $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ or less, or even more preferably a k_{off} rate constant of $1 \times 10^{-5}s^{-1}$ or less, as determined by surface plasmon resonance. Alternatively or additionally, a dual specificity antibody, or portion thereof, may inhibit the activity of one, and more preferably both, of the structurally related antigens with an IC_{50} of $1 \times 10^{-6}M$ or less, even more preferably with an IC_{50} of $1 \times 10^{-7}M$ or less, even more preferably with an IC_{50} of $1 \times 10^{-8}M$ or less, even more preferably with an IC_{50} of $1 \times 10^{-9}M$ or less, even more preferably with an IC_{50} of $1 \times 10^{-10}M$ or less, or even more preferably with an IC_{50} of $1 \times 10^{-11}M$ or less. Preferably, IC_{50} should

WO 02/02773

PCT/US01/20755

be measured using a sensitive bioassay where IC_{50} values should be close to the ED_{50} value of the antigen in that assay.

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising a dual specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention and a
5 pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutical composition of the invention can further comprise at least one additional therapeutic agent, e.g., one or more additional therapeutic agents for treating a disorder in which use of the dual specificity antibody is beneficial to amelioration of the disorder. For example, when the dual specificity antibody specifically binds IL-1 α and IL-1 β , the pharmaceutical composition
10 can further include one or more additional therapeutic agents for treating disorders in which IL-1 activity is detrimental.

The antibodies and antibody-portions of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration to a subject. Typically, the pharmaceutical composition comprises an antibody or antibody portion of the invention
15 and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Examples of pharmaceutically acceptable carriers include one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and
20 the like, as well as combinations thereof. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the antibody or
25 antibody portion.

The antibodies and antibody-portions of the invention can be incorporated into a pharmaceutical composition suitable for parenteral administration. Preferably, the antibody or antibody-portions will be prepared as an injectable solution containing 0.1-
250 mg/ml antibody. The injectable solution can be composed of either a liquid or
30 lyophilized dosage form in a flint or amber vial, ampule or pre-filled syringe. The buffer can be L-histidine (1-50 mM), optimally 5-10mM, at pH 5.0 to 7.0 (optimally pH 6.0). Other suitable buffers include but are not limited to, sodium succinate, sodium citrate,

WO 02/02773

PCT/US01/20755

sodium phosphate or potassium phosphate. Sodium chloride can be used to modify the toxicity of the solution at a concentration of 0-300 mM (optimally 150 mM for a liquid dosage form). Cryoprotectants can be included for a lyophilized dosage form, principally 0-10% sucrose (optimally 0.5-1.0%). Other suitable cryoprotectants include 5 trehalose and lactose. Bulking agents can be included for a lyophilized dosage form, principally 1-10% mannitol (optimally 2-4%). Stabilizers can be used in both liquid and lyophilized dosage forms, principally L-Methionine (optimally 5-10 mM). Other suitable bulking agents include glycine, arginine, can be included as 0-0.05% polysorbate-80 (optimally 0.005-0.01%). Additional surfactants include but are not 10 limited to polysorbate 20 and BRJ surfactants.

The compositions of this invention may be in a variety of forms. These include, for example, liquid, semi-solid and solid dosage forms, such as liquid solutions (e.g., injectable and infusible solutions), dispersions or suspensions, tablets, pills, powders, liposomes and suppositories. The preferred form depends on the intended mode of 15 administration and therapeutic application. Typical preferred compositions are in the form of injectable or infusible solutions, such as compositions similar to those used for passive immunization of humans with other antibodies. The preferred mode of administration is parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular). In a preferred embodiment, the antibody is administered by intravenous 20 infusion or injection. In another preferred embodiment, the antibody is administered by intramuscular or subcutaneous injection.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, dispersion, liposome, or other ordered structure suitable to high 25 drug concentration. Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (i.e., antibody or antibody portion) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion 30 medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile, lyophilized powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and spray-drying that yields a

WO 02/02773

PCT/US01/20755

powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The proper fluidity of a solution can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prolonged
 5 absorption of injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

The antibodies and antibody-portions of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art, although for many therapeutic applications, the preferred route/mode of administration is subcutaneous injection,
 10 intravenous injection or infusion. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. In certain embodiments, the active compound may be prepared with a carrier that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable,
 15 biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. See, e.g., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

20 In certain embodiments, an antibody or antibody portion of the invention may be orally administered, for example, with an inert diluent or an assimilable edible carrier. The compound (and other ingredients, if desired) may also be enclosed in a hard or soft shell gelatin capsule, compressed into tablets, or incorporated directly into the subject's diet. For oral therapeutic administration, the compounds may be incorporated with
 25 excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. To administer a compound of the invention by other than parenteral administration, it may be necessary to coat the compound with, or co-administer the compound with, a material to prevent its inactivation.

30 Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions. In certain embodiments, an antibody or antibody portion of the invention is coformulated with and/or coadministered with one or more additional therapeutic

WO 02/02773

PCT/US01/20755

agents that are useful for treating disorders in which IL-1 activity is detrimental. For example, an anti-IL-1 α /IL-1 β dual specificity antibodies, or antibody portions, of the invention may be coformulated and/or coadministered with one or more additional antibodies that bind other targets (e.g., antibodies that bind other cytokines or that bind cell surface molecules). Furthermore, one or more antibodies of the invention may be used in combination with two or more of the foregoing therapeutic agents. Such combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies.

10 IV. Uses of Dual Specificity Antibodies

Given their ability to bind two different but structurally related antigens, the dual specificity antibodies, or portions thereof, of the invention can be used to detect either or both of these antigens (e.g., in a biological sample, such as serum or plasma), using a conventional immunoassay, such as an enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), an radioimmunoassay (RIA) or tissue immunohistochemistry. The invention provides a method for detecting an antigen in a biological sample comprising contacting a biological sample with a dual specificity antibody, or antibody portion, of the invention that specifically recognizes the antigen and detecting either the antibody (or antibody portion) bound to antigen or unbound antibody (or antibody portion), to thereby detect the antigen in the biological sample. The antibody is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound antibody. Suitable detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S or ^3H .

Alternative to labeling the antibody, the antigen(s) can be assayed in biological fluids by a competition radioimmunoassay utilizing antigen standards labeled with a detectable substance and an unlabeled dual specificity antibody specific for the

WO 02/02773

PCT/US01/20755

antigen(s). In this assay, the biological sample, the labeled antigen standards and the dual specificity antibody are combined and the amount of labeled antigen standard bound to the unlabeled antibody is determined. The amount of antigen in the biological sample is inversely proportional to the amount of labeled antigen standard bound to the

5 unlabeled antibody.

In a preferred embodiment, the dual specificity antibody specifically recognizes IL-1 α and IL-1 β and the foregoing detection methods are used to detect IL-1 α and/or IL-1 β . Accordingly, the invention further provides a method of detecting IL-1 α or IL-1 β in a biological sample or tissue comprising contacting the biological sample or tissue

10 suspected of containing IL-1 α or IL-1 β with a dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention and detecting IL-1 α or IL-1 β in the biological sample or tissue. The biological sample can be, for example, an *in vitro* sample, such as a sample of cells, tissue or bodily fluid (*e.g.*, blood, plasma, urine, saliva etc.). Moreover, the tissue detected can be tissue located *in vivo* in a subject, *e.g.*, tissue

15 visualized by *in vivo* imaging of the tissue (*e.g.*, using a labeled antibody)

The dual specificity antibodies of the invention also can be used for diagnostic purposes. In one embodiment, an antibody of the invention is used in a diagnostic assay *in vitro*, such as in a laboratory test to detect the antigen(s) of interest or in a point of care test to detect the antigen(s) of interest. Examples of well-established *in vitro* assays

20 utilizing antibodies include ELISAs, RIAs, Western blots and the like. In another embodiment, an antibody of the invention is used in a diagnostic assay *in vivo*, such as an *in vivo* imaging test. For example, the antibody can be labeled with a detectable substance capable of being detected *in vivo*, the labeled antibody can be administered to a subject, and the labeled antibody can be detected *in vivo*, thereby allowing for *in vivo*

25 imaging.

Dual specificity antibodies of the invention that specifically recognize IL-1 α and IL-1 β can be used in diagnostic assays to detect IL-1 α and/or IL-1 β for diagnostic purposes, for example in a variety of inflammatory diseases and disorders, as well as in spontaneous resorption of fetuses. With regard to specific types of diseases and

30 disorders, the dual specificity anti-IL-1 α /IL-1 β antibodies of the invention can be used for diagnostic purposes in any of the diseases/disorders described herein with regard to

WO 02/02773

PCT/US01/20755

the therapeutic uses of such antibodies (see below), such as disorders in which IL-1 activity is detrimental, discussed further below.

The dual specificity antibodies and antibody portions of the invention preferably are capable of neutralizing, both *in vitro* and *in vivo*, the activity of the antigens to which they bind. Accordingly, such antibodies and antibody portions of the invention can be used to inhibit the activity of the antigens, e.g., in a cell culture containing the antigens or in human subjects or in other mammalian subjects having the antigens with which the dual specificity antibody of the invention reacts. In one embodiment, the invention provides a method for inhibiting antigen activity comprising contacting the antigen with a dual specificity antibody or antibody portion of the invention such that antigen activity is inhibited. In a preferred embodiment, the dual specificity antibody binds IL-1 α and IL-1 β and the method is a method for inhibiting IL-1 α and/or IL-1 β activity by contacting IL-1 α and/or IL-1 β with the dual specificity antibody, or portion thereof. The IL-1 α and/or IL-1 β activity can be inhibited, for example, *in vitro*. For example, in a cell culture containing, or suspected of containing, IL-1 α and/or IL-1 β , an antibody or antibody portion of the invention can be added to the culture medium to inhibit IL-1 α and/or IL-1 β activity in the culture. Alternatively, IL-1 α and/or IL-1 β activity can be inhibited *in vivo* in a subject.

In another embodiment, the invention provides a method for inhibiting antigen activity in a subject suffering from a disorder in which that antigen activity is detrimental. The invention provides methods for inhibiting antigen activity in a subject suffering from such a disorder, which method comprises administering to the subject a dual specificity antibody or antibody portion of the invention such that antigen activity in the subject is inhibited. Preferably, the antigen is a human antigen and the subject is a human subject. An antibody of the invention can be administered to a human subject for therapeutic purposes. Moreover, an antibody of the invention can be administered to a non-human mammal expressing an antigen with which the antibody binds for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (e.g., testing of dosages and time courses of administration).

Preferably, the dual specificity antibody binds IL-1 α and IL-1 β and the method for inhibiting antigen activity in a subject is a method for inhibiting IL-1 activity in a

WO 02/02773

PCT/US01/20755

subject, for example a subject suffering from a disorder in which IL-1 activity is detrimental. As used herein, the term "a disorder in which IL-1 activity is detrimental" is intended to include diseases and other disorders in which the presence of IL-1 (which encompasses both IL-1 α and IL-1 β) in a subject suffering from the disorder has been

5 shown to be or is suspected of being either responsible for the pathophysiology of the disorder or a factor that contributes to a worsening of the disorder. Accordingly, a disorder in which IL-1 activity is detrimental is a disorder in which inhibition of IL-1 activity (*i.e.*, either or both of IL-1 α and IL-1 β) is expected to alleviate the symptoms and/or progression of the disorder. Such disorders may be evidenced, for example, by an

10 increase in the concentration of IL-1 in a biological fluid of a subject suffering from the disorder (*e.g.*, an increase in the concentration of IL-1 in serum, plasma, synovial fluid, *etc.* of the subject), which can be detected, for example, using an anti-IL-1 antibody as described above.

Interleukin 1 plays a critical role in the pathology associated with a variety of

15 diseases involving immune and inflammatory elements. These diseases include, but are not limited to, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, juvenile chronic arthritis, Lyme arthritis, psoriatic arthritis, reactive arthritis, spondyloarthropathy, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, insulin dependent diabetes mellitus, thyroiditis, asthma, allergic diseases, psoriasis, dermatitis

20 scleroderma, graft versus host disease, organ transplant rejection, acute or chronic immune disease associated with organ transplantation, sarcoidosis, atherosclerosis, disseminated intravascular coagulation, Kawasaki's disease, Grave's disease, nephrotic syndrome, chronic fatigue syndrome, Wegener's granulomatosis, Henoch-Schoenlein purpura, microscopic vasculitis of the kidneys, chronic active hepatitis, uveitis, septic

25 shock, toxic shock syndrome, sepsis syndrome, cachexia, infectious diseases, parasitic diseases, acquired immunodeficiency syndrome, acute transverse myelitis, Huntington's chorea, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, stroke, primary biliary cirrhosis, hemolytic anemia, malignancies, heart failure, myocardial infarction, Addison's disease, sporadic, polyglandular deficiency type I and polyglandular deficiency type II, Schmidt's

30 syndrome, adult (acute) respiratory distress syndrome, alopecia, alopecia areata, seronegative arthropathy, arthropathy, Reiter's disease, psoriatic arthropathy, ulcerative colitic arthropathy, enteropathic synovitis, chlamydia, yersinia and salmonella associated

WO 02/02773

PCT/US01/20755

- arthropathy, spondyloarthropathy, atheromatous disease/arteriosclerosis, atopic allergy, autoimmune bullous disease, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, pemphigoid, linear IgA disease, autoimmune haemolytic anaemia, Coombs positive haemolytic anaemia, acquired pernicious anaemia, juvenile pernicious anaemia, myalgic
- 5 encephalitis/Royal Free Disease, chronic mucocutaneous candidiasis, giant cell arteritis, primary sclerosing hepatitis, cryptogenic autoimmune hepatitis, Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome, Acquired Immunodeficiency Related Diseases, Hepatitis C, common varied immunodeficiency (common variable hypogammaglobulinaemia), dilated cardiomyopathy, female infertility, ovarian failure,
- 10 premature ovarian failure, fibrotic lung disease, cryptogenic fibrosing alveolitis, post-inflammatory interstitial lung disease, interstitial pneumonitis, connective tissue disease associated interstitial lung disease, mixed connective tissue disease associated lung disease, systemic sclerosis associated interstitial lung disease, rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease, systemic lupus erythematosus associated lung
- 15 disease, dermatomyositis/polymyositis associated lung disease, Sjögren's disease associated lung disease, ankylosing spondylitis associated lung disease, vasculitic diffuse lung disease, haemosiderosis associated lung disease, drug-induced interstitial lung disease, radiation fibrosis, bronchiolitis obliterans, chronic eosinophilic pneumonia, lymphocytic infiltrative lung disease, postinfectious interstitial lung disease, gouty
- 20 arthritis, autoimmune hepatitis, type-1 autoimmune hepatitis (classical autoimmune or lupoid hepatitis), type-2 autoimmune hepatitis (anti-LKM antibody hepatitis), autoimmune mediated hypoglycaemia, type B insulin resistance with acanthosis nigricans, hypoparathyroidism, acute immune disease associated with organ transplantation, chronic immune disease associated with organ transplantation,
- 25 osteoarthritis, primary sclerosing cholangitis, psoriasis type 1, psoriasis type 2, idiopathic leucopaenia, autoimmune neutropaenia, renal disease NOS, glomerulonephritides, microscopic vasculitis of the kidneys, lyme disease, discoid lupus erythematosus, male infertility idiopathic or NOS, sperm autoimmunity, multiple sclerosis (all subtypes), sympathetic ophthalmia, pulmonary hypertension secondary to
- 30 connective tissue disease, Goodpasture's syndrome, pulmonary manifestation of polyarteritis nodosa, acute rheumatic fever, rheumatoid spondylitis, Still's disease, systemic sclerosis, Sjögren's syndrome, Takayasu's disease/arteritis, autoimmune

WO 02/02773

PCT/US01/20755

thrombocytopaenia, idiopathic thrombocytopaenia, autoimmune thyroid disease, hyperthyroidism, goitrous autoimmune hypothyroidism (Hashimoto's disease), atrophic autoimmune hypothyroidism, primary myxoedema, phacogenic uveitis, primary vasculitis, vitiligo, diseases of the central nervous system (e.g., depression, schizophrenia, Alzheimers, Parkinsons, etc.), acute and chronic pain, and lipid imbalance. The human antibodies, and antibody portions of the invention can be used to treat humans suffering from autoimmune diseases, in particular those associated with inflammation, including, rheumatoid spondylitis, allergy, autoimmune diabetes, autoimmune uveitis.

10 Preferably, the IL-1 α /IL-1 β dual specificity antibodies of the invention or antigen-binding portions thereof, are used to treat rheumatoid arthritis, Crohn's disease, multiple sclerosis, insulin dependent diabetes, mellitus and psoriasis.

An IL-1 α /IL-1 β dual specificity antibody, or antibody portion, of the invention also can be administered with one or more additional therapeutic agents useful in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases.

Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof can be used alone or in combination to treat such diseases. It should be understood that the antibodies of the invention or antigen binding portion thereof can be used alone or in combination with an additional agent, e.g., a therapeutic agent, said additional agent being selected by the skilled artisan for its intended purpose. For example, the additional agent can be a therapeutic agent art-recognized as being useful to treat the disease or condition being treated by the antibody of the present invention. The additional agent also can be an agent which imparts a beneficial attribute to the therapeutic composition e.g., an agent which effects the viscosity of the composition.

25 It should further be understood that the combinations which are to be included within this invention are those combinations useful for their intended purpose. The agents set forth below are illustrative for purposes and not intended to be limited. The combinations which are part of this invention can be the antibodies of the present invention and at least one additional agent selected from the lists below. The combination can also include more than one additional agent, e.g., two or three additional agents if the combination is such that the formed composition can perform its intended function.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

Preferred combinations are non-steroidal anti-inflammatory drug(s) also referred to as NSAIDS which include drugs like ibuprofen and COX-2 inhibitors. Other preferred combinations are corticosteroids including prednisolone; the well known side-effects of steroid use can be reduced or even eliminated by tapering the steroid dose required when treating patients in combination with the anti-IL-1 antibodies of this invention. Non-limiting examples of therapeutic agents for rheumatoid arthritis with which an antibody, or antibody portion, of the invention can be combined include the following: cytokine suppressive anti-inflammatory drug(s) (CSAIDs); antibodies to or antagonists of other human cytokines or growth factors, for example, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, FMAP-II, GM-CSF, FGF, and PDGF. Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, or their ligands including CD134 (gp39 or CD40L).

Preferred combinations of therapeutic agents may interfere at different points in the autoimmune and subsequent inflammatory cascade; preferred examples include TNF antagonists like chimeric, humanized or human TNF antibodies, D2E7, (PCT Publication No. WO 97/29131), CA2 (RemicadeTM), CDP 571, CDP 570, Thalidamide and soluble p55 or p75 TNF receptors, derivatives, thereof, (p75TNFR1gG (EnbrelTM), or p55TNFR1gG (Lenercept), and also TNF α converting enzyme (TACE) inhibitors; similarly IL-1 inhibitors (Interleukin-1-converting enzyme inhibitors, IL-1RA etc.) may be effective for the same reason. Other preferred combinations include Interleukin 11. Yet another preferred combination are other key players of the autoimmune response which may act parallel to, dependent on or in concert with IL-1 function; especially preferred are IL-12 and/or IL-18 antagonists including IL-12 and/or IL-18 antibodies or soluble IL-12 and/or IL-18 receptors, or IL-12 and/or IL-18 binding proteins. It has been shown that IL-12 and IL-18 have overlapping but distinct functions and a combination of antagonists to both may be most effective. Yet another preferred combination are non-depleting anti-CD4 inhibitors. Yet other preferred combinations include antagonists of the co-stimulatory pathway CD80 (B7.1) or CD86 (B7.2) including antibodies, soluble receptors or antagonistic ligands.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents, such as methotrexate, 6-MP, azathioprine, sulfasalazine, mesalazine, olsalazine, chloroquine/hydroxychloroquine, penicillamine, aurothiomalate (intramuscular and oral), azathioprine, cochlincine, corticosteroids (oral, inhaled and local injection), beta-2 adrenoceptor agonists (salbutamol, terbutaline, salmeterol), xanthines (theophylline, aminophylline), cromoglycate, nedocromil, ketotifen, ipratropium and oxitropium, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signaling by proinflammatory cytokines such as TNF α or IL-1 (e.g. IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors), IL-1 β converting enzyme inhibitors, TNF α converting enzyme (TACE) inhibitors, T-cell signalling inhibitors such as kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof (e.g. soluble p55 or p75 TNF receptors and the derivatives p75TNFR Δ 1IgG (EnbrelTM) and p55TNFR Δ 1IgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) and antiinflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 and TGF β). Preferred combinations include methotrexate or leflunomide and in moderate or severe rheumatoid arthritis cases, cyclosporine.

Non-limiting examples of therapeutic agents for inflammatory bowel disease with which an antibody, or antibody portion, of the invention can be combined include the following: budenoside; epidermal growth factor; corticosteroids; cyclosporin, sulfasalazine; aminosalicylates; 6-mercaptopurine; azathioprine; metronidazole; lipoxygenase inhibitors; mesalamine; olsalazine; balsalazide; antioxidants; thromboxane inhibitors; IL-1 receptor antagonists; anti-IL-1 β monoclonal antibodies; anti-IL-6 monoclonal antibodies; growth factors; elastase inhibitors; pyridinyl-imidazole compounds; antibodies to or antagonists of other human cytokines or growth factors, for example, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, and PDGF. Antibodies of the invention can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 or their ligands. The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents, such as methotrexate, cyclosporin,

WO 02/02773

PCT/US01/20755

- FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signalling by proinflammatory cytokines such as TNF α or IL-1 (e.g.
- 5 IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors), IL-1 β converting enzyme inhibitors, TNF α converting enzyme inhibitors, T-cell signalling inhibitors such as kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof (e.g. soluble p55 or p75 TNF receptors, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) and
- 10 antiinflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 and TGF β).
- Preferred examples of therapeutic agents for Crohn's disease in which an antibody or an antigen binding portion can be combined include the following: TNF antagonists, for example, anti-TNF antibodies, D2E7 (PCT Publication No. WO 97/29131), CA2 (RemicadeTM), CDP 571, TNFR-Ig constructs, (p75TNFRIgG
- 15 (EnbrelTM) and p55TNFRIgG (Lenercept)) inhibitors and PDE4 inhibitors. Antibodies, or antigen binding portions thereof, of the invention or antigen binding portions thereof, can be combined with corticosteroids, for example, budesonide and dexamethasone. Antibodies of the invention or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents such as sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid and olsalazine, and agents which
- 20 interfere with synthesis or action of proinflammatory cytokines such as IL-1, for example, IL-1 β converting enzyme inhibitors and IL-1ra. Antibodies of the invention or antigen binding portion thereof may also be used with T cell signaling inhibitors, for example, tyrosine kinase inhibitors 6-mercaptopurines. Antibodies of the invention or antigen binding portions thereof, can be combined with IL-11.
- 25 Non-limiting examples of therapeutic agents for multiple sclerosis with which an antibody, or antibody portion, of the invention can be combined include the following: corticosteroids; prednisolone; methylprednisolone; azathioprine; cyclophosphamide; cyclosporine; methotrexate; 4-aminopyridine; tizanidine; interferon- β 1a (Avonex; Biogen); interferon- β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex); Copolymer 1 (Cop-1; Copaxone;
- 30 Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbaric oxygen; intravenous immunoglobulin; clabribine; antibodies to or antagonists of other human cytokines or growth factors, for example, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, BMAP-II, GM-

WO 02/02773

PCT/US01/20755

CSF, FGF, and PDGF. Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 or their ligands.

The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be

- 5 combined with agents, such as methotrexate, cyclosporine, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, COX-2 inhibitors, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signalling by proinflammatory cytokines such as TNF α or IL-1 (e.g. IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors), IL-1 β converting enzyme inhibitors, 10 TACE inhibitors, T-cell signalling inhibitors such as kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof (e.g. soluble p55 or p75 TNF receptors, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) and antiinflammatory cytokines (e.g. IL-15 4, IL-10, IL-13 and TGF β).

Preferred examples of therapeutic agents for multiple sclerosis in which the antibody or antigen binding portion thereof can be combined to include interferon- β , for example, IFN β 1a and IFN β 1b; copaxone, corticosteroids, IL-1 inhibitors, TNF inhibitors, and antibodies to CD40 ligand and CD80.

- 20 The pharmaceutical compositions of the invention may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody or antibody portion of the invention. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody or antibody portion may vary 25 according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antibody portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an 30 amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at

WO 02/02773

PCT/US01/20755

an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic or prophylactic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

An exemplary, non-limiting range for a therapeutically or prophylactically effective amount of an antibody or antibody portion of the invention is 0.1-20 mg/kg, more preferably 1-10 mg/kg. It is to be noted that dosage values may vary with the type and severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that dosage ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed composition.

The present invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as limiting in any way. The contents of all cited references, including literature references, issued patents, and published patent applications, as cited throughout this application are hereby expressly incorporated by reference.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

**EXAMPLE 1: Design of a Dual Specificity Antigen Based on a
Contiguous Topological Area of Identity**

In this example, the largest contiguous topological area of identity between two different but structurally related proteins, IL-1 α and IL-1 β , was determined as a basis for designing a dual specificity antigen for raising dual specificity antibodies to IL-1 α and IL-1 β . The BLAST algorithm was used to compare the two proteins and allows one to measure the tendency of one residue to replace another in similar structural or functional regions. This analysis allowed for the identification of the largest contiguous topological area of identity between IL-1 α and IL-1 β and to extend this area with any reasonable stretches of similarity to create a linear peptide that serves as a dual specificity antigen. The peptide that best fits these criteria has an amino acid sequence as follows:

NEAQNIITDF (SEQ ID NO: 1)
* * * * *

The asterisk (*) indicates identical residues in both proteins and the other residues are strongly similar according to the BLAST algorithm. For example, lysine will often substitute for arginine in homologous proteins, but not for phenylalanine. This peptide of SEQ ID NO: 1 is a hybrid taken from two different sections of the structure which are running in opposite directions, so another reasonable representation of this epitope is:

dNdEdAdQNIITDF

(wherein the "d" prefix indicates that the amino acid residue is a D amino acid residue).

Both the L amino acid version of the peptide and the version partially substituted with D amino acid residues are synthesized by standard chemical methods. The peptide is then conjugated to a carrier protein (e.g., KLH or albumin) and the conjugated peptide is used to select antibodies by *in vitro* or *in vivo* methods.

**EXAMPLE 2: Design of a Dual Specificity Antigen Based on a Cyclic
Peptide that Mimics a Loop of a Common Fold**

In this example, a cyclic peptide that structurally mimics a key loop of a common fold between two different but structurally related proteins, IL-1 α and IL-1 β , was constructed for use as a dual specificity antigen for raising dual specificity antibodies to

WO 02/02773

PCT/US01/20755

IL-1 α and IL-1 β . The chosen loop represents residues 168-184 of IL-1 α and residues 160-176 of IL-1 β . The consensus sequence is:

Cyclo-MAPLRANQNNGKTSVAL (SEQ ID NO: 2)

5 *cbccccccc*c*b*

The asterisk (*) indicates identical residues between IL-1 α and IL-1 β , c indicates consensus residues, i.e., residues similar to IL-1 α and IL-1 β but not actually present at this location in either protein, and b indicates there was no clear consensus residue so IL-

10 1 β sequence identity was retained. The linear peptide is synthesized by standard chemical synthesis methods. To cyclize this peptide, a proline and a glycine residue are added. The cyclic peptide may be synthesized using standard coupling conditions at high dilution in N,N-dimethylformamide (1mg/ml). Prototypical reactions are run at room temperature using excess coupling reagent, such as benzotriazole-1-yl-oxy-tris-
15 pyrrolidino-phosphonium hexafluoro phosphate (PyBOP; 2 eq) and sodium bicarbonate (10 eq). The peptide is then conjugated to a carrier protein (e.g., KLH or albumin) and the conjugated peptide is used to select antibodies by *in vitro* or *in vivo* methods.

EXAMPLE 3: Design of a Dual Specificity Antigen Based on a Hybrid Peptide

In this example, a hybrid peptide that includes alternating or overlapping
20 sequences of two different but structurally related proteins, IL-1 α and IL-1 β , was constructed for use as a dual specificity antigen for raising dual specificity antibodies to IL-1 α and IL-1 β . To create the hybrid peptide, alternating and overlapping amino acid sequences of IL-1 α and IL-1 β were identified and spliced together to generate the following peptide:

25
TEGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO: 3)
bbbbbbbbbb
aaaaaaaaaa

30 The a and b indicate which protein is the source of the residues (a=IL-1 α , b=IL-1 β). The ITDF (SEQ ID NO: 4) motif common to both proteins was included in the hybrid peptide. Moreover, this hybrid peptide focuses on sequences from the carboxy termini

WO 02/02773

PCT/US01/20755

of both proteins, which is known to be antigenic for neutralizing antibodies in both proteins as well. The hybrid peptide is synthesized by standard chemical synthesis methods. The peptide is then conjugated to a carrier protein (e.g., KLH or albumin) and the conjugated peptide is used to select antibodies by *in vitro* or *in vivo* methods.

5

EXAMPLE 4: Generation of Dual Specific antibodies to IL-1 α and IL-1 β

NEAQNITDF (SEQ ID NO: 1)

10 Cyclo-MAFLRANQNNGKISVAL(PG) (SEQ ID NO: 2)

TKGGQDIIDFQILENQ (SEQ ID NO: 3)

Peptides of SEQ ID NO: 1, 2 and 3 were conjugated with KLH and individual rabbits were immunized. Antiserum from rabbits immunized with each of the three peptides showed good antibody response against the peptide used as antigen. However, only antiserum from rabbit immunized with Peptide of SEQ ID NO: 3 was able to bind both IL-1 α protein and IL-1 β protein.

Five mice (BA119 - BA123) were immunized subcutaneously with peptide of SEQ ID NO: 3 conjugated with KLH plus Freund's incomplete adjuvant (FIA) once every three weeks for a total of three times, followed by two intravenous boosts with peptide of SEQ ID NO: 3 conjugated with KLH. Each mouse was bled 10 days after each immunization and antibody titer was determined by ELISA. Spleen cells from mouse BA119 and BA123 respectively were fused with myeloma cell line P3X36Ag8.653 as described in section II A, and the resulting fused cells were seeded one cell per well in several 96-well plates using limiting dilution. The hybridoma clones that grew were first assayed for IgG and IgM production by standard ELISA to identify antibody-producing clones. A total of 945 clones from mouse #BA123 fusion were isolated. Supernatants from 355 clones tested in an ELISA showed antigen binding activity to IL-1 α , IL-1 β or both IL-1 α and IL-1 β .

30

WO 02/02773

PCT/US01/20755

# of clones	Antigen Specificity (against full length IL-1 α and/or IL-1 β)	Isotype
249	IL-1 α only	IgG
19	IL-1 α only	IgM
15	IL-1 β only	IgG
2	IL-1 β only	IgM
57	IL-1 α and β	IgG
13	IL-1 α and β	IgM

EQUIVALENTS

- 5 Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

We claim:

1. A dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, that specifically binds interleukin-1 α and interleukin-1 β .
- 5 2. The dual-specificity antibody of claim 1, or antigen-binding portion thereof, which binds interleukin-1 α with a k_{off} rate constant of 0.1s⁻¹ or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits the activity of interleukin-1 α with an IC₅₀ of 1 x 10⁻⁸ M or less.
3. The dual-specificity antibody of claim 1, or antigen-binding portion
10 thereof, which binds interleukin-1 β with a k_{off} rate constant of 0.1s⁻¹ or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits the activity of interleukin-1 β with an IC₅₀ of 1 x 10⁻⁸ M or less.
4. A method of obtaining a dual-specificity antibody that specifically binds interleukin-1 α and interleukin-1 β , the method comprising:
15 providing an antigen that comprises a common structural feature of IL-1 α and IL-1 β ;
exposing an antibody repertoire to the antigen; and
selecting from the repertoire an antibody that specifically binds IL-1 α and IL-1 β to thereby obtain the dual specificity antibody.
- 20 5. The method of claim 4, wherein the antigen is designed based on a contiguous topological area of identity between IL-1 α and IL-1 β .
6. The method of claim 5, wherein the antigen comprises the amino acid sequence NEAQNTIDF (SEQ ID NO: 1) or dNdEdAdQNTIDF.
7. The method of claim 4, wherein the antigen is designed based on
25 structurally mimicking a loop of a common fold of IL-1 α and IL-1 β .
8. The method of claim 7, wherein the antigen is a cyclic peptide comprising the amino acid sequence Cyclo-MAFLRANQNGKISVAL(PG) (SEQ ID NO: 2).
9. The method of claim 4, wherein the antigen is designed based on splicing
30 together overlapping portions of IL-1 α and IL-1 β to create a hybrid molecule.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

10. The method of claim 9, wherein the antigen comprises the amino acid sequence TKGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO: 3).
11. The method of claim 4, wherein the antigen comprises the amino acid sequence
- 5 APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHJLQGQDMEQQVVFS**MGAYKSSKD**
DAKUYILGLKEKNLYLSCLVKDDKPTLQESVDPKNYPKKMEKRFVFNKIEI
 NNKLEFESAQFPNWIYSTQAENMPVFLGGTKGGQDITDFIMQFVSS
 (SEQ ID NO: 4).
12. The method of claim 4, wherein the antibody repertoire is exposed to the
- 10 antigen *in vivo* by immunizing an animal with the antigen.
13. The method of claim 12, which further comprises preparing a panel of hybridomas from lymphocytes of the animal and selecting a hybridoma that secretes an antibody that specifically binds IL-1 α and IL-1 β .
14. The method of claim 12, wherein the animal is selected from the group
- 15 consisting of mice, rats, rabbits and goats.
15. The method of claim 12, wherein the animal is a knockout mouse deficient for IL-1 α , IL-1 β or both IL-1 α and IL-1 β .
16. The method of claim 12, wherein the animal is a mouse that is transgenic for human immunoglobulin genes such that the mouse makes human antibodies upon
- 20 antigenic stimulation.
17. The method of claim 12, wherein the animal is a mouse with severe combined immunodeficiency (SCID) that has been reconstituted with human peripheral blood mononuclear cells or lymphoid cells or precursors thereof.
18. The method of claim 12, wherein the animal is a mouse that has been
- 25 treated with lethal total body irradiation, followed by radioprotection with bone marrow cells of a severe combined immunodeficiency (SCID) mouse, followed by engraftment with functional human lymphocytes or precursors thereof.
19. The method of claim 4, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen *in vitro* by screening a recombinant antibody library with the antigen.
- 30 20. The method of claim 19, wherein the recombinant antibody library is expressed on the surface of bacteriophage.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

21. The method of claim 19, wherein the recombinant antibody library is expressed on the surface of yeast cells.
22. The method of claim 19, wherein the recombinant antibody library is expressed on the surface of bacterial cells.
- 5 23. The method of claim 19, wherein the recombinant antibody library is expressed as RNA-protein fusions.
24. The method of claim 19, wherein the recombinant antibody library is a scFv library or a Fab library.
25. The method of claim 4, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by *in vitro* screening of a recombinant antibody library prepared from lymphoid cells of the animal with the antigen.
- 10 26. The method of claim 4, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by *in vitro* affinity maturation of a recombinant antibody library prepared from lymphoid cells of the animal.
- 15 27. The method of claim 4, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by selection of single cells secreting antibodies that bind the antigen and recovery of heavy- and light-chain variable region cDNAs from the single cells.
- 20 28. The method of claim 4, wherein the dual-specificity antibody is a fully human antibody.
29. The method of claim 4, wherein the dual-specificity antibody is a chimeric antibody.
- 25 30. The method of claim 4, wherein the dual-specificity antibody is a CDR-grafted antibody.
31. A dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, that specifically binds interleukin-1 α and interleukin-1 β obtainable by the method of claim 4.
- 30 32. A method of obtaining a dual-specificity antibody that specifically binds two different but structurally related molecules, the method comprising:

WO 02/02773

PCT/US01/20755

- providing an antigen that comprises a common structural feature of the two different but structurally related molecules;
- exposing an antibody repertoire to the antigen; and
- selecting from the repertoire an antibody that specifically binds the two
- 5 different but structurally related molecules to thereby obtain the dual specificity antibody.
33. The method of claim 32, wherein the antigen is designed based on a contiguous topological area of identity between the two different but structurally related molecules.
- 10 34. The method of claim 33, wherein the two different but structurally related molecules are proteins and the antigen is a peptide comprising an amino acid sequence of the contiguous topological area of identity between the two proteins.
35. The method of claim 32, wherein the antigen is designed based on structurally mimicking a loop of a common fold of the two different but structurally
- 15 related molecules.
36. The method of claim 35, wherein the two different but structurally related molecules are proteins and the antigen is a cyclic peptide that structurally mimics a loop of a common fold of the two proteins.
37. The method of claim 32, wherein the antigen is designed based on
- 20 splicing together overlapping portions of the two different but structurally related molecules to create a hybrid molecule.
38. The method of claim 37, wherein the two different but structurally related molecules are proteins and the antigen is a hybrid peptide made by splicing together overlapping amino acid sequences of the two proteins.
- 25 39. The method of claim 32, wherein the antigen is one of the two different but structurally related molecules.
40. The method of claim 32, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen *in vivo* by immunizing an animal with the antigen.
41. The method of claim 40, which further comprises preparing a panel of
- 30 hybridomas from lymphocytes of the animal and selecting a hybridoma that secretes an antibody that specifically binds the two different but structurally related molecules.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

42. The method of claim 40, wherein the animal is selected from the group consisting of mice, rats, rabbits and goats.
43. The method of claim 40, wherein the animal is a knockout mouse deficient for an endogenous version of the antigen.
- 5 44. The method of claim 40, wherein the animal is a mouse that is transgenic for human immunoglobulin genes such that the mouse makes human antibodies upon antigenic stimulation.
45. The method of claim 40, wherein the animal is a mouse with severe combined immunodeficiency (SCID) that has been reconstituted with human peripheral
10 blood mononuclear cells or lymphoid cells or precursors thereof.
46. The method of claim 40, wherein the animal is a mouse that has been treated with lethal total body irradiation, followed by radioprotection with bone marrow cells of a severe combined immunodeficiency (SCID) mouse, followed by engraftment with functional human lymphocytes.
- 15 47. The method of claim 32, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen *in vitro* by screening a recombinant antibody library with the antigen.
48. The method of claim 47, wherein the recombinant antibody library is expressed on the surface of bacteriophage.
49. The method of claim 47, wherein the recombinant antibody library is
20 expressed on the surface of yeast cells.
50. The method of claim 47, wherein the recombinant antibody library is expressed on the surface of bacterial cells.
51. The method of claim 47, wherein the recombinant antibody library is expressed as RNA-protein fusions.
- 25 52. The method of claim 47, wherein the recombinant antibody library is a scFv library or a Fab library.
53. The method of claim 32, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by *in vitro* screening of a recombinant antibody library prepared from lymphoid cells of the animal
30 with the antigen.
54. The method of claim 32, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by *in vitro*

WO 02/02773

PCT/US01/20755

affinity maturation of a recombinant antibody library prepared from lymphoid cells of the animal.

55. The method of claim 32, wherein the antibody repertoire is exposed to the antigen by *in vivo* immunization of an animal with the antigen, followed by selection of single cells secreting antibodies that bind the antigen and recovery of heavy- and light-chain variable region cDNAs from the single cells.

56. The method of claim 32, wherein the dual-specificity antibody is a fully human antibody.

57. The method of claim 32, wherein the dual-specificity antibody is a chimeric antibody.

58. The method of claim 32, wherein the dual-specificity antibody is a CDR-grafted antibody.

59. A dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, obtainable by the method of claim 32.

60. A method of detecting IL-1 α or IL-1 β in a biological sample or tissue comprising contacting the biological sample or tissue suspected of containing IL-1 α or IL-1 β with the dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 1 and detecting IL-1 α or IL-1 β in the biological sample or tissue.

61. The method of claim 60, wherein IL-1 α or IL-1 β is detected for diagnostic purposes.

62. The method of claim 60, wherein the biological sample is an *in vitro* sample.

63. The method of claim 60, wherein the tissue is located *in vivo* in a subject and the method comprises *in vivo* imaging of the tissue.

64. A method of inhibiting IL-1 α or IL-1 β activity comprising contacting IL-1 α or IL-1 β with the dual-specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 1 such that the activity of IL-1 α or IL-1 β is inhibited.

65. The method of claim 64, wherein IL-1 α or IL-1 β activity is inhibited *in vitro*.

66. A method of treating an interleukin-1-related disorder comprising administering to a subject suffering from an interleukin-1-related disorder the dual-

WO 02/02773

PCT/US01/20755

specificity antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 1, such that the subject is treated for the interleukin-1-related disorder.

67. The method of claim 66, wherein the IL-1-related disorder is an inflammatory disorder.

5 68. The method of claim 66, wherein the IL-1-related disorder is an autoimmune disorder.

69. The method of claim 66, wherein the IL-1-related disorder is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, Crohn's disease, multiple sclerosis, insulin dependent diabetes, mellitus and psoriasis.

- 10 70. A method of making an antibody or an antigen binding portion thereof comprising the steps of:
- a) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A from an antibody repertoire resulting from exposure to a first antigen;
 - 15 b) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B from an antibody repertoire resulting from exposure to the first antigen;
 - c) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library C from an antibody repertoire resulting from exposure to a second antigen;
 - 20 d) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library D from an antibody repertoire resulting from exposure to the second antigen; and
 - e) combining the recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A with the recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library D to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library X and/or combining the recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library C with the recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library Y.
 - 25
 - 30 71. A method of making an antibody or an antigen binding portion thereof library according to claim 70 further comprising the step of combining

WO 02/02773

PCT/US01/20755

the antibody or an antigen binding portion thereof library X with the antibody or an antigen binding portion thereof library Y to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library Z.

72. The antibody or an antigen binding portion thereof library X made according to the method of claim 70.
73. The antibody or an antigen binding portion thereof library Y made according to the method of claim 70.
74. The antibody or an antigen binding portion thereof library Z made according to the method of claim 71.
75. A method of making a dual specific antibody or an antigen binding portion thereof comprising the steps of:
 - a) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A from an antibody repertoire resulting from exposure to a first antigen;
 - b) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B from an antibody repertoire resulting from exposure to the first antigen;
 - c) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library C from an antibody repertoire resulting from exposure to a second antigen;
 - d) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library D from an antibody repertoire resulting from exposure to the second antigen;
 - e) combining the recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A with the recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library D to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library X and/or combining the recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library C with the recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library Y; and
 - f) selecting from the antibody or an antigen binding portion thereof library X and/or antibody or an antigen binding portion thereof library Y

WO 02/02773

PCT/US01/20755

an antibody or an antigen binding portion thereof that binds both the first and the second antigen.

76. The dual specific antibody made by the method of claim 75.

77. A method of making a dual specific antibody or an antigen binding

5 portion thereof comprising the steps of:

a) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A from an antibody repertoire resulting from exposure to a first antigen;

10 b) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B from an antibody repertoire resulting from exposure to the first antigen;

c) obtaining a recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library C from an antibody repertoire resulting from exposure to a second antigen;

15 d) obtaining a recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library D from an antibody repertoire resulting from exposure to the second antigen;

e) combining the recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library A with the recombinant light chain or an antigen binding

20 portion thereof library D to obtain an antibody library X and/or combining the recombinant heavy chain or an antigen binding portion thereof library C with the recombinant light chain or an antigen binding portion thereof library B to obtain an antibody or an antigen binding

25 portion thereof library Y; f) combining the antibody or an antigen binding portion thereof library X with the antibody library or an antigen binding portion thereof Y to obtain an antibody or an antigen binding portion thereof library Z; and

g) selecting from the antibody or an antigen binding portion thereof library Z an antibody or an antigen binding portion thereof that binds both

30 the first and the second antigen.
78. The dual specific antibody or an antigen binding portion thereof made by the method according to claim 77.

WO 02/02773

PCT/US01/20755

79. The method according to claims 70, 75 or 77 wherein the first and second antigen is each independently selected from the group consisting of proteins, polypeptides and peptides provided that the first and second antigens are not the same.
- 5 80. The method of claim 79, wherein the proteins, polypeptides and peptides are secreted proteins or surface receptors.
81. The method of claim 80, wherein the secreted protein is selected from the group consisting of an IFN, a TNF, an Interleukin, IP-10, PF4, a GRO, 9E3, EMAP-II, a CSF, an FGF, and a PDGF.
- 10 82. The method according to claim 81, wherein the first antigen is IL-1 α and the second antigen is IL-1 β .
83. The nucleotide sequence encoding each member of the antibody or an antigen binding portion thereof library or libraries according to claims 72,73 or 74.
- 15 84. The nucleotide sequence encoding the dual specific antibody or an antigen binding portion thereof according to claims 76 or 78.
85. A vector comprising the nucleotide sequence encoding a member of the antibody or an antigen binding portion thereof library or libraries of claims 72,73 or 74.
- 20 86. A vector comprising the nucleotide sequence encoding the dual specific antibody or an antigen binding portion thereof according to claims 76 or 78.
87. A host cell transfected with the vector of claim 85.
- 25 88. A host cell transfected with the vector of claim 86.
- 30

WO 02/02773

PCT/US01/20755

I

SEQUENCE LISTING

5 NEAQNITDF (SEQ ID NO: 1)

Cyclo-M~~A~~FLRANQNNNGKISVAL(PG) (SEQ ID NO: 2)

TEGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO: 3)

10

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMBQQVVFMSGAYKSSKD
DAKTIIVILGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
NKLEFESAQHPNWIYSTQAENMPVFLGGTKGGQDIIDFIMQIVSS
(SEQ ID NO: 4)

15

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/002773 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/13,
C07K 16/24, G01N 33/68, 33/577, A61K 5/00, 39/395,
A61P 37/05, C12N 15/63 // C07K 14/545, A01K 67/027

(21) International Application Number: PCT/US01/20755

(22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/255,579 29 June 2000 (29.06.2000) US

(71) Applicant for all designated States except US: ABBOTT
LABORATORIES [US/US]; 100 Abbott Park Road, Ab-
bott Park, IL 60054 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants for US only: COLLINSON,
Albert [US/US]; 21 Overlook Drive, Marlborough, MA
01752 (US); GHAYUR, Tariq [PK/US]; 1014 Washington
Street, Holliston, MA 01746 (US); AVGERINOS, George
[US/US]; 15 Hammond Circle, Sudbury, MA 01776
(US); DIXON, Richard [US/US]; 6 Samuel Drive, North
Grafton, MA 01536 (US); KAYMAKCIAN, Zehra
[US/US]; 1 Piccadilly Way, Westborough, MA 01581
(US).(74) Agents: DECONTE, Giulio, A., et al., Fichini & Cackfield,
LLP, 28 State Street, Boston, MA 02109-1784 (US).(81) Designated States (nominally): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and no be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
27 August 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/002773 A3

(54) Title: DUAL SPECIFICITY ANTIBODIES AND METHODS OF MAKING AND USING

(57) Abstract: Antibodies having dual specificity for two different but structurally related antigens are provided. The antibodies can be, for example, entirely human antibodies, recombinant antibodies, or monoclonal antibodies. Preferred antibodies have dual specificity for IL-1 α and IL-1 β and neutralize IL-1 α and IL-1 β activity *in vivo*. An antibody of the invention can be a full-length antibody or an antigen-binding portion thereof. Methods of making and methods of using the antibodies of the invention are also provided. The antibodies, or antibody portions, of the invention are useful for detecting two different but structurally related antigens (e.g., IL-1 α and IL-1 β) and for inhibiting the activity of the antigens, (e.g., in a human subject suffering from a disorder in which IL-1 α and/or IL-1 β activity is detrimental.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20755
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/13 C07K16/24 G01N33/68 G01N33/577 A61K51/10 A61K39/395 A61P37/06 C12N15/63 //C07K14/545,A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Min. num. documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base etc., where practicable, search term(s) used) SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUGER T A ET AL: "MONOCLONAL ANTI-INTERLEUKIN 1 IS DIRECTED AGAINST A COMMON SITE OF HUMAN INTERLEUKIN 1-ALPHA AND INTERLEUKIN 1-BETA" IMMUNOBIOLOGY, vol. 172, no. 3-5, 1986, pages 346-356, XP008004584 ISSN: 0171-2985 abstract page 351, line 7-10 page 354, line 2-10 --- -/--	1, 4, 5, 12-14, 31-34, 39-42, 59-69
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to substantiate the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but after the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but disclosing an advancement of the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 June 2002		28/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-5010		Authorized officer COVONE-VAN HEES, M

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20755
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 756 095 A (JUTILA MARK A) 26 May 1998 (1998-05-26) abstract column 6, line 44-48 column 9, line 24-53 column 11, line 35-45 claim 1	32-42, 47-59
A	WO 98 20159 A (GERSHONI JONATHAN M ; ENSHEL DAVID (IL); UNIV RAMOT (IL)) 14 May 1998 (1998-05-14) page 9, paragraph 2 claim 1	70-88

Form PCT/ISRP/10 (see instruction to second sheet) (July 1994)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/20755
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the preconditions requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01/20755

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 64(part), 66-69(complete) are directed to a method of treatment of the human/animal body, and claim 60, 61(part), 63(complete) is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/US 01/20755

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5756095 A	26-05-1998	AU 682824 B2	23-10-1997
		AU 4523293 A	30-12-1993
		CA 2134966 A1	09-12-1993
		EP 0642577 A1	15-03-1995
		JP 8502242 T	12-03-1996
		WO 9324614 A1	09-12-1993
WO 9820159 A	14-05-1998	IL 119587 A	06-12-2000
		AU 4792997 A	29-05-1998
		EP 0944737 A1	29-09-1999
		WO 9820159 A1	14-05-1998
		US 6165722 A	26-12-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 0 7 K 16/24	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/24	Z T D
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	P
	C 1 2 N 5/00	A

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

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(72)発明者 コリンソン, アルバート

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 7 5 2、マールボロ、オーバールツク・ドライブ・2 1

(72)発明者 ガユール, タリク

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 7 4 6、ホーリイストン、ワシントン・ストリート・1 0 1 4

(72)発明者 アビゲリノス, ジョージ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・1 0 7 7 6、スンドベリ、ハムモンド・サークル・1 5

(72)発明者 デイクソン, リチャード

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 3 6、ノース・グラフトン、サムエル・ドライブ・6

(72)発明者 カイマークカラン, ゼーラ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 8 1、ウエストバラ、ピカデリー・ウェイ・4

F ターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA44 BA56 CA04 CA07 GA03 GA11 HA01 HA12
HA15

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90X AA91X AA93Y AA94X AB01 AB05 AC14 BA24 CA25 CA44
CA46

4C085 AA14 BB17 CC23 HH03 KA04 LL20

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	双特异性抗体及其制备和使用方法		
公开(公告)号	JP2004502428A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002508013	申请日	2001-06-28
[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	コリンソンアルバート ガユールタリク アビゲリノスジョージ デイクソンリチャード カイマークカランゼーラ		
发明人	コリンソン,アルバート ガユール,タリク アビゲリノス,ジョージ デイクソン,リチャード カイマークカラン,ゼーラ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61K47/48 A61K49/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/06 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K47/6845 A61K2039/505 A61P1/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/545 C07K16/245 C07K16/46 C07K16/468 C07K2317/31 C07K2317/33 C07K2317/34 G01N33/6869 C07K2317/10 C07K2317/56 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.U A61K49/00.Z A61P1/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/06 C07K16/24.ZTD C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.P C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA56 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/CC23 4C085/HH03 4C085/KA04 4C085/LL20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/215379 2000-06-29 US		
其他公开文献	JP4955185B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了对两种不同但结构相关的抗原具有双重特异性的抗体。抗体可以是，例如，完全人抗体，重组抗体或单克隆抗体。优选的抗体对IL-1 α 和IL-1 β 具有双重特异性，并在体外和体内中和IL-1 α 和IL-1 β 活性。抗体可以是全长抗体或其抗原结合部分。还提供了制备方法和使用抗体的方法。抗体或抗体部分可用于检测两种不同但结构相关的抗原（例如，IL-1 α 和IL-1 β ）并用于抑制抗原的活性（例如，在患有疾病的人类受试者中）。哪种IL-1 α 和/或IL-1 β 活性是有害的。

(51) Int. Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00		Z N A A 2 G O 4 5	
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395		U 4 B O 2 4	
A 6 1 K 49/00		A 6 1 K 49/00		Z 4 B O 6 4	
A 6 1 P 1/04		A 6 1 P 1/04		4 B O 6 5	
A 6 1 P 17/06		A 6 1 P 17/06		4 C O 8 5	
		審査請求 未請求		予備審査請求 有 (全 111 頁)	
				最終頁に	
(21) 出願番号 特願2002-508013 (P2002-508013)		(71) 出願人 391008788			
(86) (22) 出願日 平成13年8月28日 (2001. 6. 28)				アボット・ラボラトリーズ	
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月26日 (2002. 12. 26)				A B B O T T L A B O R A T O R I E	
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/020755				アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 4	
(87) 国際公開番号 W02002/002773				6 0 5 0、アボット・パーク、アボット	
(87) 国際公開日 平成14年1月10日 (2002. 1. 10)				パーク・ロード・1 0 0、チャド・O 3	
(31) 優先権主張番号 60/215, 379				7/エイ・ビー・6・デイズ	
(32) 優先日 平成12年6月29日 (2000. 6. 29)		(74) 代理人 100062007			
(33) 優先権主張国 米国 (US)				弁理士 川口 義雄	
		(74) 代理人 100105131			
				弁理士 井上 満	
		(74) 代理人 100113332			
				弁理士 一入 豊夫	
		(74) 代理人 100114188			
				弁理士 小野 誠	
				最終頁に続く	