(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2002－542769
(P2002－542769A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/02	ZNA	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｕ	４Ｂ０２４
Ａ６１Ｋ 39/395		Ａ６１Ｐ 1/04		４Ｂ０６４
Ａ６１Ｐ 1/04		3/10		４Ｂ０６５
3/10		17/06		４Ｃ０８５
17/06		19/02		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求（全 70数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000－606631(P2000－606631)

(86)(22)出願日　平成12年3月17日(2000.3.17)
(85)翻訳文提出日　平成13年9月19日(2001.9.19)
(86)国際出願番号　PCT/US00/07349
(87)国際公開番号　WO00/56771
(87)国際公開日　平成12年9月28日(2000.9.28)
(31)優先権主張番号　60/125,299
(32)優先日　平成11年3月19日(1999.3.19)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　スミスクライン・ビーチャム・コーポレイション
ＳＭＩＴＨＫＬＩＮＥ　ＢＥＥＣＨＡＭ　ＣＯＲＰＯＲＡＴＩＯＮ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406－0939、キング・オブ・プルシア、スウェードランド・ロード709番
(72)発明者　イェン・セン・ホ
アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州バーウィン、オールド・ステイト・ロード362番
(74)代理人　弁理士　青山　葆　（外１名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＩＬ－１８により媒介される疾病の治療において有用な組み換えＩＬ－１８アンタゴニスト

(57)【要約】
高アフィニティー中和ｍＡｂ由来のキメラ、ヒト化および他のＩＬ－１８　ｍＡｂ、それを含有する医薬組成物、治療および診断方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　ヒトインターロイキン－１８に特異的で、３．９ｘ１０$^{-1}$[1]Ｍと同等またはそれ未満の解離定数により特徴づけられる結合アフィニティーを有するげっ歯類中和モノクローナル抗体。

【請求項２】　ラットモノクローナル抗体である請求項１記載のモノクローナル抗体。

【請求項３】　マウスモノクローナル抗体である請求項１記載のモノクローナル抗体。

【請求項４】　配列番号：１の軽鎖アミノ酸配列および配列番号：９の重鎖アミノ酸配列を含む請求項２記載のモノクローナル抗体。

【請求項５】　配列番号：１７の軽鎖アミノ酸配列および配列番号：２５の重鎖アミノ酸配列を含む請求項３記載のモノクローナル抗体。

【請求項６】　配列番号：３３の軽鎖アミノ酸配列および配列番号：４１の重鎖アミノ酸配列を含む請求項２記載のモノクローナル抗体。

【請求項７】　２Ｃ１０、１４Ｂ７または１３Ｇ９の同定特性を有する請求項１記載のモノクローナル抗体。

【請求項８】　請求項４のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項９】　請求項５のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項１０】　請求項６のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項１１】　細胞系１９５２２Ｃ１０（２）Ｆ２（１）Ａ１、１９５２１４Ｂ７（１）Ｈ１０および１８７４１３Ｇ９（３）Ｆ１２の同定特性を有するハイブリドーマ。

【請求項１２】　請求項１のモノクローナル抗体のＦｃ領域を欠失させることにより得られる中和ＦａｂフラグメントまたはそのＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント。

【請求項１３】　重鎖および軽鎖を含む改変抗体であって、該重鎖および軽鎖のフレームワーク領域が少なくとも１の選択された抗体に由来し、該各鎖の相補性決定領域のアミノ酸配列が請求項１のモノクローナル抗体に由来するもので

ある改変抗体。

【請求項１４】　アミノ酸配列が下記のもの：

(a)配列番号：３

(b)配列番号：５

(c)配列番号：７

(d)配列番号：１９

(e)配列番号：２１

(f)配列番号：２３

(g)配列番号：３５

(h)配列番号：３７

(i)配列番号：３９

からなる群より選択されるものである免疫グロブリン軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）。

【請求項１５】　アミノ酸配列が下記のもの：

(a)配列番号：１１

(b)配列番号：１３

(c)配列番号：１５

(d)配列番号：２７

(e)配列番号：２９

(f)配列番号：３１

(g)配列番号：４３

(h)配列番号：４５

(i)配列番号：４７

からなる群より選択されるものである免疫グロブリン重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）。

【請求項１６】　請求項１４の免疫グロブリン相補性決定領域（ＣＤＲ）をコードする核酸分子。

【請求項１７】　請求項１５の免疫グロブリン相補性決定領域（ＣＤＲ）をコードする核酸分子。

【請求項１８】　請求項１３の改変抗体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項１９】　治療を要するヒトに有効量の請求項１３の改変抗体を投与する工程を含む、自己免疫疾患に関連した症状の治療方法。

【請求項２０】　該疾病が多発性硬化症である請求項１９の方法。

【請求項２１】　該疾病がリューマチ性関節炎またはタイプＩもしくはインスリン依存性糖尿病である請求項１９の方法。

【請求項２２】　該疾病が炎症性腸疾患である請求項１９の方法。

【請求項２３】　該疾病が乾癬である請求項１９の方法。

【請求項２４】　（ａ）請求項１３の改変抗体をコードする核酸配列
（ｂ）（ａ）に対して相補的な核酸配列；および
（ｃ）ヒトインターロイキン－１８に対する特異性を有することにより特徴づけられる蛋白をコードしている（ａ）または（ｂ）のフラグメントまたはアナログからなる群より選択され、制限部位を含んでいてもよい単離核酸配列。

【請求項２５】　患者から生物学的液体の試料を得て、ＩＬ－１８／モノクローナル抗体複合体が生成しうる条件下において請求項１のモノクローナル抗体をかかる試料と接触させ、次いで、該ＩＬ－１８／モノクローナル抗体複合体の存在または不存在を検知することを特徴とする、ヒトにおけるヒトＩＬ－１８の存在または不存在を評価する方法。

【請求項２６】　請求項２５の方法により患者の試料中のＩＬ－１８量を決定し、それを正常集団のヒトＩＬ－１８平均量と比較し、そのことにより患者におけるヒトＩＬ－１８の有意に上昇した量の存在が自己免疫疾患を示すものであることを特徴とする自己免疫疾患の診断の助けとなる方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

発明の分野

一般的には、本発明は、ＩＬ－１８により媒介される症状の治療および診断において有用な抗体および改変抗体、より詳細には、ｍＡｂ、Ｆａｂ、キメラおよびヒト化抗体の分野に関する。

【０００２】

発明の背景

ヒトインターロイキン－１８は最近同定されたサイトカインであり、生物学的に不活性な１９３個のアミノ酸の前駆体蛋白として合成される（Ushio et al., J. Immunol. 156:4274, 1996）。例えば、カスパーゼ－１またはカスパーゼ－４による前駆体蛋白の開裂により１５６個のアミノ酸の成熟蛋白が遊離され（Gu et al., Science 275:206, 1997; Ghayur et al., Nature 386:619, 1997）、それはＴ細胞増殖の共刺激、ＮＫ細胞の細胞毒性促進、Ｔ細胞およびＮＫ細胞によるＩＦＮ－γ産生の誘導、ならびにＴヘルパータイプ１（Ｔｈ１）分化能促進を包含する生物学的活性を示す（Okamura et al., Nature 378:88, 1995; Ushio et al., J. Immunol. 156:4274, 1996; Micallef et al., Eur. J. Immunol. 26: 1647, 1996; Kohno et al., J. Immunol. 158:1541, 1997; Zhang et al., Infect. Immunol. 65:3594, 1997; Robinson et al., Immunity 7:571, 1997）。さらに、ＩＬ－１８は、ＩＬ－８、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）およびプロスタグランジン$Ｅ_2$（$ＰＧＥ_2$）を包含するヒト単球前炎症メディエイタの有効なインデューサーである（Ushio, S. et al., J. Immunol. 156:4274-4279, 1996; Puren, A.J. et al., J. Clin. Invest. 10:711-721, 1997; Podolin et al., J. Immunol. 1999年投稿）。

【０００３】

以前クローン化されたＩＬ－１受容体－関連蛋白（ＩＬ－１Ｒｐ）（Parnet et al., J. Biol. Chem. 271:3967, 1996）は、最近になってＩＬ－１８受容体の１のサブユニットとして同定された（Ｋｄ＝１８ｎＭ）（Torigoe et al., J. Biol. Chem. 272:25737, 1997）。ＩＬ－１８受容体の第２のサブユニットはＩ

Ｌ－１受容体アクセサリー蛋白に対して相同性を有し、ＡｃＰＬと呼ばれている（アクセサリー蛋白様）。ＩＬ－１ＲｒｐおよびＡｃＰＬの両方の発現は、ＩＬ－１８により誘導されるＮＫ－κＢおよびＪＮＫの活性化に必要である（Born et al., J. Biol. Chem. 273:29445, 1998）。ＮＫ－κＢおよびＪＮＫのほかに、ＩＬ－１８は、ＩＬ－1受容体結合キナーゼ（ＩＲＡＫ）、ｐ５６ｌｃｋ（ＬＣＫ）およびマイトジェン活性化蛋白キナーゼ（ＭＡＰＫ）を介してもシグナルを伝達する（Micallef et al., Eur. J. Immunol. 26:1647, 1996; Matsumoto et al., Biophys Biochem. Res. Comm. 234:454, 1997; Tsuji-Takayama et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 237:126, 1997）。

【０００４】

ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２およびＴＮＦ－βのごとき炎症サイトカインを産生するＴｈ１細胞（Mosmann et al., J. Immunol. 136:2348, 1986）は、多発性硬化症（ＭＳ）、リューマチ性関節炎（ＲＡ）、Ｉ型またはインスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）および乾癬を包含する多くの自己免疫疾患の媒介に関与している（Mosmann and Sad, Immunol. Today 17:138, 1996）。よって、ＩＬ－１８のごときＴｈ－１促進サイトカインに対する拮抗は、疾病の発症を抑制すると期待される。ＩＬ－１８特異的ｍＡｂはアンタゴニストとして使用できるであろう。

【０００５】

自己免疫疾患の発症におけるＩＬ－１８の役割が示されている。したがって、発症直前の非肥満性糖尿病（ＮＯＤ）マウスの膵臓および脾臓においてＩＬ－１８の発現が有意に増強される（Rothe et al., J. Clin. Invest. 99:469, 1997）。同様に、リューマチ性関節炎患者の滑液中のＩＬ－１８レベルが著しく増加することが示された（Kawashima et al., Arthritis and Rheumatism 39:598, 1996）。さらにそのうえ、ＩＬ－１８投与は、多発性硬化症のモデルであるＴｈ－１により媒介される自己免疫疾患であるマウスの実験的なアレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）の臨床的重篤性を増大させることが示されている。さらに、中和抗－ラットＩＬ－１８抗血清は、メスのLewisラットにおいてＥＡＥの発症を防止することが示されている（Wildbaum et al., J. Immunol. 161:6368, 1998）。

したがって、ＩＬ－１８は自己免疫性に対する新規治療薬の開発のための望ましい標的である。

【０００６】

Taniguchi et al., J. Immunol. Methods 206:107には、７種のマウスおよび６種のラットの抗－ヒトＩＬ－１８ｍＡｂが記載されており、それらは４つの異なった抗原部位に結合する。マウスｍＡｂの１つ（＃１２５－２Ｈ）および６種のラットｍＡｂは、ＩＬ－１８により誘導されるＫＧ－１細胞によるＩＦＮ－γ産生を阻害し、ラットｍＡｂは＃１２５－２Ｈよりも１０倍低い中和活性を示す。ウェスタンブロット分析により示されるように、３種のマウスｍＡｂは膜結合ヒトＩＬ－１８と強くは能するが、ラットｍＡｂは反応しない。さらに、＃１２５－２ＨおよびラットｍＡｂを用いる、ＩＬ－１８を検出するための酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）が記載されている。このＥＬＩＳＡの検出限界は１０ｐｇ／ｍｌである。

【０００７】

欧州特許出願ＥＰ０７１２９３１には、２種の抗－ヒトＩＬ－１８ｍＡｂ、Ｈ１（ＩｇＧ１）およびＨ２（ＩｇＭ）が開示されている。ウェスタンブロット分析により示されるように、両方のｍＡｂは膜結合ヒトＩＬ－１８と反応するが、膜結合ヒトＩＬ－１２とは反応しない。Ｈ１はヒトＩＬ－１８を精製するための免疫アフィニティークロマトグラフィープロトコルおよびヒトＩＬ－１８を測定するためのＥＬＩＳＡに使用される。Ｈ２はヒトＩＬ－１８を測定するためのラジオイムノアッセイに使用される。

【０００８】

中和ＩＬ－１８抗体はヒトにおける自己免疫疾患および関連徴候の緩和において潜在的に有用である可能性がある。それゆえ、Ｔｈ１分化および増殖を抑制し、かくして自己免疫疾患および関連徴候を抑制する、ヒトインターロイキン－１８に対する中和モノクローナル抗体のごとき高アフィニティーＩＬ－１８アンタゴニストに対する必要性が当該分野において存在する。

【０００９】

発明の概要

第１の態様において、本発明は、ヒトインターロイキン－１８に特異的で、詳細な説明に記載されたように約３．９ｘ１０$^{-11}$Mと同等またはそれ未満の解離定数により特徴づけられる結合アフィニティーを有するげっ歯類（例えば、ラットおよびマウス）中和モノクローナル抗体を提供する。かかるモノクローナル抗体の典型例はラットモノクローナル抗体２Ｃ１０ならびに１４Ｂ７および１３Ｇ９のごときマウスモノクローナル抗体である。本発明のもう１つの態様は１９５２２Ｃ１０（２）Ｆ２（１）Ａ１、１９５２１４Ｂ７（１）Ｈ１０および１８７４１３Ｇ９（３）Ｆ１２のごときハイブリドーマである。

【００１０】

関連した態様において、本発明は、本発明のげっ歯類中和モノクローナル抗体のＦｃ領域を欠失させることにより得られる、ヒトインターロイキン－１８に特異的な中和ＦａｂフラグメントまたはそのＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを提供する。

【００１１】

さらにもう１つの関連態様において、本発明は、非ヒト中和モノクローナル抗体（ｍＡｂ）由来の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む、ヒトインターロイキン－１８に特異的な改変抗体であって、ヒトインターロイキン－１８に対する約３．９ｘ１０$^{-11}$Mと同等またはそれ未満の解離定数およびそれをコードする核酸分子により特徴づけられる改変抗体を提供する。改変抗体がヒト化抗体である場合、非ヒト免疫グロブリン由来の相補性決定領域（ＣＤＲ）をコードする配列が第１の免疫グロブリンパートナー中に挿入され、第１の免疫グロブリンパートナーにおいて、その少なくとも１つ、好ましくはすべての相補性決定領域（ＣＤＲ）が非ヒトモノクローナル抗体由来のＣＤＲにより置換されている。好ましくは、第１の免疫グロブリンパートナーは第２の免疫グロブリンパートナーに作動可能に連結され、第２の免疫グロブリンパートナーも同様に免疫グロブリン不変鎖のすべてまたは一部を含んでいる。

【００１２】

関連態様において、本発明は、ヒトインターロイキン－１８に対する約３．９ｘ１０$^{-11}$Mと同等またはそれ未満の解離定数およびかかるＣＤＲをコードす

る核酸分子により特徴づけられる、非ヒト中和モノクローナル抗体（ｍＡｂ）由来のＣＤＲを提供する。

【００１３】

さらにもう１つの態様において、ヒト重鎖および軽鎖不変領域ならびに非ヒト中和モノクローナル抗体由来の重鎖および軽鎖可変領域を含むキメラ抗体であって、ヒトインターロイキン－１８に対する約３．９ｘ１０$^{-11}$Ｍと同等またはそれ未満の解離定数により特徴づけられるキメラ抗体が提供される。

【００１４】

さらにもう１つの態様において、本発明は、１（またはそれ以上）の上記改変抗体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【００１５】

さらなる態様において、本発明は、ヒトに有効量の本発明の医薬組成物を提供することによる、ヒトにおける過剰なＴｈ１産生に関連した症状、例えば自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

【００１６】

さらにもう１つの態様において、本発明は、非ヒト中和モノクローナル抗体（ｍＡｂ）に由来し、ヒトインターロイキン－１８に対する約３．９ｘ１０$^{-11}$Ｍと同等またはそれ未満の解離定数により特徴づけられる改変抗体（例えば、加工抗体、ＣＤＲ、ＦａｂまたはＦ（ａｂ）$_2$フラグメント、またはそれらのアナログ）の組み換え製造方法、ならびにその製造において有用な成分を提供する。これらの成分としては、上記のものをコードする単離核酸配列、組み換えプラスミドでトランスフェクションされた宿主細胞（好ましくは、哺乳動物細胞）中でその発現を指令しうる選択された調節配列の制御下にある核酸配列を含む組み換えプラスミド等がある。該製造方法は、改変抗体、好ましくはヒト化抗体が該細胞中で発現されるような条件下で本発明のトランスフェクションされた宿主細胞系を培養し、次いで、発現生成物をそれより単離することを含む。

【００１７】

本発明はさらにもう１つの態様において、患者から生物学的液体試料を得て、ＩＬ－１８／抗体（モノクローナルまたは改変）複合体が形成される条件下で本

発明の抗体および改変抗体をかかる試料と接触させ、該ＩＬ－１８／抗体複合体の存在または不存在を検知することを特徴とする、過剰なＴｈ１産生に関連した症状の診断方法に関する。

本発明の他の態様および利点はさらに詳細な説明およびその好ましい具体例において記載される。

【００１８】

発明の詳細な説明

本発明は、ラットモノクローナル抗体２Ｃ１０、マウスモノクローナル抗体１３Ｇ９およびラットモノクローナル抗体１４Ｂ７において示されるような、ヒトＩＬ－１８結合特異性、中和活性、およびＩＬ－１８に対する高アフィニティーにより特徴づけられる種々の抗体、改変抗体およびそれらのフラグメントを提供する。本発明の抗体は、新規中和抗体を得るための慣用的なハイブリドーマ法により調製された。これらの生成物は、ＩＬ－１８により媒介される疾病、例えば、多発性硬化症（ＭＳ）リューマチ性関節炎（ＲＡ）、１型またはインスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、および乾癬を包含する自己免疫疾患を治療するための治療組成物および医薬組成物において有用である（Mosmann and Sad, Immunol. Today 17:138, 1996）。これらの生成物は、ヒトにおける内在性ＩＬ－１８レベルまたは活性化細胞からex vivoにおいて放出されたＩＬ－１８を測定（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ））することによる、ＩＬ－１８により媒介される症状の診断においても有用である。

【００１９】

Ｉ．定義

「改変抗体（altered antibody）」は、改変された免疫グロブリンコーディング領域によりコードされる蛋白をいい、選択された宿主細胞における発現により得られるものであってもよい。かかる改変抗体は加工抗体（例えば、キメラまたはヒト化抗体）または免疫グロブリン不変領域の全部または一部を欠くフラグメント、例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、またはＦ（ａｂ）$_2$等である。

「改変免疫グロブリンコーディング領域」は、本発明の改変抗体をコードする核酸配列をいう。改変抗体がＣＤＲを移植した抗体またはヒト化抗抗体である場

合、非ヒト免疫グロブリン由来の相補性決定猟奇（ＣＤＲ）をコードする配列が、ヒト可変フレームワーク配列を含む第１の免疫グロブリンパートナー中に挿入される。第１の免疫グロブリンパートナーは第２の免疫グロブリンパートナーに作動可能に連結されてもよい。

「第１の免疫グロブリンパートナー」は、元の（あるいは天然に存在する）ＣＤＲコーディング領域がドナー抗体のＣＤＲコーディング領域により置換されているヒトフレームワークまたはヒト免疫グロブリン可変領域をコードする核酸配列をいう。ヒト可変領域は免疫グロブリン重鎖、軽鎖（または両方の鎖）、それらのアナログまたは機能的フラグメントであってもよい。抗体（免疫グロブリン）の可変領域中に存在するかかるＣＤＲ領域を、当該分野で知られた方法により決定することができる。例えば、Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987))にはＣＤＲ配置の規則が開示されている。さらに、ＣＤＲ領域／構造を同定するための有用なコンピュータープログラムが知られている。

「中和抗体」は、特異的受容体へのヒトＩＬ－１８の結合を妨げることにより、あるいはその受容体を介するＩＬ－１８のシグナリングを阻害することによりＩＬ－１８活性を阻害する抗体をいう。ＩＬ－１８中和アッセイにて測定されるＩＬ－１８活性阻害において９０％有効、好ましくは９５％有効、最も好ましくは１００％有効である場合にｍＡｂは中和的である。例えば、実施例１および表１参照。

用語「高アフィニティー」は、光学的バイオセンサー分析により測定した場合に、３．９ｘ１０$^{-11}$Mに等しいかまたはそれ未満のヒトＩＬ－１８に対するK_dにより特徴づけられる結合アフィニティーを有する抗体をいう。

「ヒトＩＬ－１８に対する結合特異性」は、マウスまたは他のＩＬ－１８よりもヒトＩＬ－１８に対する高いアフィニティーを意味する。

「第２の免疫グロブリンパートナー」は、第１の免疫グロブリンパートナーがインフレームであるいは所望の慣用的なリンカー配列を用いることにより融合されている（すなわち、作動するように連結されている）蛋白またはペプチドをコ

ードするもう１つのヌクレオチド配列をいう。好ましくは、それは免疫グロブリン遺伝子である。第２の免疫グロブリンパートナーは、興味ある同じ（すなわち、相同的－第１および第２の改変抗体が同じ源に由来する）または付加的な（すなわち、異種）抗体の不変領域全体をコードする核酸配列を含んでいてもよい。それは免疫グロブリン重鎖または軽鎖（または単一ポリペプチドの部分としての両方の鎖）であってもよい。第２の免疫グロブリンパートナーは特定の免疫グロブリンクラスまたはイソタイプには限定されない。さらに、第２の免疫グロブリンパートナーは、ＦａｂまたはＦ（ａｂ）$_2$中に見られるような免疫グロブリン不変領域の部分（すなわち、適当なヒト不変領域またはフレームワーク領域の別個の部分）を含んでいてもよい。かかる第２の免疫グロブリンパートナーは、例えば、ファージディスプレイライブラリーの一部として宿主細胞外表面上に露出した膜内在性蛋白をコードする配列、または分析もしくは診断的検出のための蛋白、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ等をコードする配列を含んでいてもよい。

用語Ｆｖ、Ｆｃ、Ｆｄ、ＦａｂまたはＦ（ａｂ）$_2$はそれらの標準的な意味で使用される（例えば、Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)参照）。

【００２０】

「加工抗体（engineered antibody）」は、選択されたアクセプター抗体の軽鎖および／または重鎖可変ドメインの一部分が、選択されたエピトープに対して特異性を有する１またはそれ以上のドナー抗体由来の類似部分により置換されている１のタイプの改変抗体、すなわち、全長合成抗体をいう（例えば、抗体フラグメントに対立するものとしてのキメラまたはヒト化抗体）。例えば、かかる分子は、未修飾軽鎖（またはキメラ軽鎖）に結合したヒト化重鎖（あるいはその逆）により特徴づけられる抗体を包含する。加工抗体は、ドナー抗体の結合特異性を保持するようなアクセプター抗体軽鎖および／または重鎖可変領域ドメインフレームワーク領域をコードする核酸配列の改変によっても特徴づけることができる。これらの抗体は、アクセプター抗体由来の１またはそれ以上（好ましくは、すべて）のＣＤＲの、本明細書記載のドナー抗体由来のＣＤＲでの置換を含んで

いてもよい。

「キメラ抗体」は、アクセプター抗体由来の軽鎖および重鎖不変領域に結合したドナー抗体由来の天然に存在する可変領域（軽鎖および重鎖）を含む加工抗体の１タイプをいう。

「ヒト化抗体」は、非ヒトドナー免疫グロブリン由来のＣＤＲを有する１のタイプの加工抗体をいい、分子の残りの免疫グロブリン由来の部分は１（またはそれ以上）のヒト免疫グロブリンである。さらに、フレームワーク支持残基が結合アフィニティーを保持するように改変されていてもよい（see, e.g., Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)）。

用語「ドナー抗体」は、その可変領域、ＣＤＲ、または他の機能的フラグメントもしくはそれらのアナログの核酸配列を第１の免疫グロブリンパートナーに与える抗体（モノクローナルまたは組み換え型）をいい、その結果、改変された免疫グロブリンコーディング領域が提供され、発現された改変抗体はドナー抗体に特徴的な抗原特異性および中和活性を有する。本発明における使用に適した１のドナー抗体は、２Ｃ１０と命名された非ヒト中和モノクローナル抗体（すなわちラット）である。抗体２Ｃ１０は、高アフィニティー、ヒトＩＬ－１８特異的（すなわち、マウスＩＬ－１８を認識しない）であり、適当なマウスＩｇＧ不変領域上の配列番号：１および２の可変軽鎖ＤＮＡおよびアミノ酸配列、配列番号：９および１０の可変重鎖ＤＮＡおよびアミノ酸配列をそれぞれ有するイソタイプＩｇG_{1K}の中和抗体として定義される。

用語「アクセプター抗体」は、その重鎖および／または軽鎖フレームワーク領域ならびに／あるいはその重鎖および／または軽鎖不変領域をコードする核酸配列のすべて（またはいずれかの部分、しかしすべての部分が好ましい）を第１の免疫グロブリンパートナーに与える、ドナー抗体とは異種の抗体（モノクローナルまたは組み換え型）をいう。好ましくは、ヒト抗体がアクセプター抗体である。

「ＣＤＲ」は免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である抗体の相補性決定領域アミノ酸配列と定義される。例えば、Kabat et al., Sequences of Pro

teins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)参照。免疫グロブリンの可変部分には３本の重鎖および３本の軽鎖ＣＤＲ（またはＣＤＲ領域）がある。よって、「ＣＤＲ」は３本の重鎖ＣＤＲすべて、または３本の軽鎖ＣＤＲすべて（あるいは適当な場合にはすべての重鎖およびすべての軽鎖ＣＤＲ）をいう。

ＣＤＲは抗原またはエピトープへの抗体の結合のための接触残基の大部分を提供する。本発明において興味あるＣＤＲはドナー抗体可変重鎖および軽鎖配列に由来するものであり、天然に存在するＣＤＲのアナログを包含し、また該アナログは、それが由来したドナー抗体と同じ抗原結合特異性および／または中和能を共有または保持している。

「抗原特異性または中和能を共有」とは、例えば、ｍＡｂ　２Ｃ１０は一定レベルの抗原アフィニティーにより特徴付けられるが、適当な構造環境中において２Ｃ１０の核酸配列によりコードされるＣＤＲがより低いまたはより高いアフィニティーを有していてもよいことを意味する。それにもかかわらず、かかる環境において２Ｃ１０のＣＤＲが２Ｃ１０が認識するのと同じエピトープを認識すると考えられる。２Ｃ１０の典型的な軽鎖ＣＤＲは

配列番号：３

配列番号：５

配列番号：７

を包含し、

２Ｃ１０の典型的な重鎖は

配列番号：１１

配列番号：１３

および配列番号：１５

を包含する。

【００２１】

「機能的フラグメント」は、そのフラグメントが由来した抗体と同じ抗原結合特異性および／または中和能を保持する部分的な重鎖または軽鎖可変配列（例えば、免疫グロブリン可変領域のアミノまたはカルボキシ末端における小さい欠失

物）である。

「アナログ」は、少なくとも１個のアミノ酸により修飾されたアミノ酸配列であり、該修飾は化学的なもの、あるいは数個（すなわち、１０個未満）のアミノ酸の置換もしくは転位であってもよく、修飾は、未修飾配列の生物学的特性、例えば、抗原特異性および高アフィニティーをアミノ酸配列に保持させるものである。例えば、特定のエンドヌクレアーゼ制限部位をＣＤＲコーディング領域中またはその付近に作成する場合に、置換により（サイレント）変異を構築することができる。

アナログは対立遺伝子変異として生じるものであってもよい。「対立遺伝子変異または修飾」は、本発明のアミノ酸またはペプチド配列をコードする核酸配列中の変化である。かかる変異または修飾は遺伝学的コードの縮重によるものであってもよく、あるいは所望特性を発揮するように慎重に加工されたものであってもよい。これらの変異または修飾はコードされるアミノ酸配列の変化を生じさせるものであってもよく、そうでなくてもよい。

用語「エフェクター剤」は、改変抗体、および／またはドナー抗体の天然もしくは合成の軽鎖または重鎖あるいはドナー抗体の他のフラグメントが慣用的な手段により結合される非蛋白担体分子をいう。かかる非蛋白担体は、診断分野で使用される慣用的担体、例えば、ポリスチレンまたは他のプラスチックビーズ、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ［Pharmacia］システムに使用されるような多糖類を包含し、あるいは医学分野で使用され、ヒトおよび動物に投与しても安全な他の非蛋白物質を包含する。他のエフェクター剤は、重金属原子をキレートする大員環、またはラジオアイソトープを包含する。かかるエフェクター剤、例えば、ポリエチレングリコールは、改変抗体の半減期を伸ばすことにおいても有用でありうる。

【００２２】

ＩＩ．高アフィニティーＩＬ－１８モノクローナル抗体

本発明の抗体、改変抗体およびフラグメントの構築において使用するために、非ヒト種（例えば、ウシ、ヒツジ、サル、ニワトリ、げっ歯類（例えば、マウスおよびラット））を用いて、ネイティブなヒトＩＬ－１８またはそれに由来する

ペプチドエピトープに対する所望免疫グロブリンを得る。慣用的なハイブリドーマ法を用いて、ＩＬ－１８に対する非ヒトｍＡｂを分泌するハイブリドーマ細胞系を得る。次いで、実施例セクションに記載されたようにして９６ウェルプレートに被覆したＩＬ－１８を用いて、あるいはストレプトアビジン被覆プレートに結合したビオチン化ＩＬ－１８を用いて、かかるハイブリドーマを結合に関してスクリーニングする。

本発明の１の典型的な高アフィニティー中和ｍＡｂは、下記実施例においてさらに詳細に説明する、キメラまたはヒト化抗体の生成に使用できるラット抗体ｍＡｂ　２Ｃ１０である。２Ｃ１０　ｍＡｂは、約３．９ｘ１０$^{-11}$ＭのＫ$_{d}$であるヒトＩＬ－１８に対する抗原結合特異性により特徴づけられる。

【００２３】

もう１つの望ましいドナー抗体はマウスｍＡｂ　１３Ｇ９である。このｍＡｂはイソタイプＩｇＧ$_{1K}$であることにより特徴づけられる。当該ｍＡｂのＩＬ－１８に対する解離定数は約１２ｘ１０$^{-9}$Ｍである。

さらにもう１つの望ましいドナー抗体はラットｍＡｂ　１４Ｂ７である。このｍＡｂのＩＬ－１８に対する解離定数は約１．５ｘ１０$^{-10}$Ｍである。１４Ｂ７はイソタイプＩｇＧ$_{1K}$であることによっても特徴づけられる。

【００２４】

本発明は、１３Ｇ９、２Ｃ１０、１４Ｂ７、またはそれらの超可変（すなわち、ＣＤＲ）配列の使用には限定されない。ヒトＩＬ－１８に対する約３．９ｘ１０$^{-11}$Ｍに等しいかまたはそれ未満の解離定数により特徴づけられる他のいずれの高アフィニティーＩＬ－１８抗体ならびに対応抗－ＩＬ－１８　ＣＤＲをそれらに代えて使用してもよい。以下の説明において、ドナー抗体が１３Ｇ９、２Ｃ１０、１４Ｂ７であると同定される場合、この称呼は例示のためのものであり、説明を簡単にするためだけのものである。

【００２５】

ＩＩＩ．抗体フラグメント

本発明は、ヒトＩＬ－１８に対して指向されたｍＡｂ由来のＦａｂフラグメントまたはＦ（ａｂ’）$_{2}$フラグメントも包含する。これらのフラグメントはイン

ビボにおけるＩＬ－１８およびＴｈ－１により媒介される症状に対する防御剤として、あるいはインビトロにおいてＩＬ－１８診断薬の一部として有用である。ＦａｂフラグメントはＨ軽鎖全体および重鎖のアミノ末端部分を含み、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントはジスルフィド結合により結合した２つのＦａｂフラグメントにより形成されるフラグメントである。ｍＡｂ　１３Ｇ９、２Ｃ１０、１４Ｂ７、および他の類似の高アフィニティーＩＬ－１８結合抗体は、ＦａｂフラグメントおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントの源を提供し、それらは慣用的手段、例えば、適当な蛋白分解酵素パパインおよび／またはペプシンを用いたｍＡｂの開裂により、あるいは組み換え法により得ることができる。これらのＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$はそれ自体、治療薬、予防薬または診断薬として、ならびに本明細書記載の組み換えまたはヒト化抗体の生成において有用な可変領域およびＣＤＲ配列を包含する配列のドナーとして有用である。

【００２６】

ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを、コンビナトリアルファージライブラリー（例えば、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)参照）または免疫グロブリンチェインシャフリング（例えば、Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)参照、出典明示により両方の文献を本明細書に一体化させる）により構築することができ、それらの方法において、選択された抗体（例えば、１３Ｇ９）由来のＦ$_d$またはV_H免疫グロブリンが軽鎖免疫グロブリンのレパートリー、V_L（またはV_K）に結合されて、新規Ｆａｂが得られる。逆に、選択された抗体由来の軽鎖免疫グロブリンを重鎖免疫グロブリンのレパートリー、V_H（またはＦ$_d$）に結合させて、新規Ｆａｂを得てもよい。

【００２７】

ＩＶ．興味ある抗－ＩＬ－１８アミノ酸および核酸配列

上記ｍＡｂ　２Ｃ１０または他の抗体は、可変重鎖および／または軽鎖ペプチド配列、フレームワーク配列、ＣＤＲ配列、それらの機能的フラグメントおよびアナログ、ならびにそれらをコードする核酸配列のごとき配列を与え、ドナー抗体の抗原結合特異性により特徴づけられる種々の改変抗体の設計および取得において有用である。

一例として、本発明は、ＩＬ－１８ ｍＡｂ ２Ｃ１０由来の可変軽鎖および可変重鎖配列ならびにそれらに由来する配列を提供する。

【００２８】

可変軽鎖および重鎖ペプチド配列をコードする、本発明の核酸配列、またはそのフラグメントもまた、ＣＤＲ、フレームワーク領域をコードする核酸配列中の特異的変化の突然変異による誘導に、そして得られた修飾または融合核酸配列を発現用プラスミド中に導入することに有用である。

【００２９】

遺伝学的コードの縮重を考慮して、ドナー抗体の抗原特異性を共有している本発明の可変重鎖および軽鎖アミノ酸配列およびＣＤＲ配列ならびにそれらの機能的フラグメントおよびアナログをコードする種々のコーディング配列を構築することができる。第２の免疫グロブリンパートナーに作動するように結合される場合、可変鎖ペプチド配列またはＣＤＲをコードする本発明の単離核酸配列、またはそのフラグメントを用いて、本発明の改変抗体、例えば、キメラまたはヒト化抗体、あるいは他の加工抗体を製造することができる。

【００３０】

本明細書記載の改変抗体および抗体の部分をコードする単離核酸配列のほかに、他のかかる核酸配列が本発明に包含され、例えば、ネイティブなＣＤＲコーディング配列に相補的な配列またはＣＤＲコーディング領域付近の修飾ヒトフレームワーク領域に相補的な配列がある。有用なＤＮＡ配列としては、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下［T. Maniatis et al, Molecular Cloning (A Laboratory Manual参照］でＤＮＡ配列にハイブリダイゼーションする配列等がある。１のかかるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、４ＸＳＳＣ、６５℃でのハイブリダイゼーション、次いで、０．１ＸＳＳＣ、６５℃で１時間洗浄である。別の典型的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、５０％ホルムアミド、４ＸＳＳＣ、４２℃におけるものである。好ましくは、これらのハイブリダイゼーションするＤＮＡ配列は少なくとも約１８ヌクレオチドの長さであり、すなわち、ほぼＣＤＲのサイズである。

【００３１】

Ｖ．改変免疫グロブリン分子および改変抗体

改変免疫グロブリン分子は、キメラ抗体およびヒト化抗体のごとき加工抗体を包含する改変抗体をコードしうる。所望の改変免疫グロブリンコーディング領域は、ＩＬ－１８抗体、好ましくは本発明により提供されるような高アフィニティー抗体の抗原特異性を有するペプチドをコードするＣＤＲコーディング領域であって、第１の免疫グロブリンパートナー（ヒトフレームワークまたはヒト免疫グロブリン可変領域）中に挿入されたＣＤＲコーディング領域を含む。

好ましくは、第１の免疫グロブリンパートナーは第２の免疫グロブリンパートナーに作動するように連結される。第２の免疫グロブリンパートナーは上で定義されたものであり、興味ある第２の抗体領域、例えば、Ｆｃ領域をコードする配列を含んでもよい。第２の免疫グロブリンパートナーは、軽鎖および重鎖不変領域がインフレームであるいはリンカー配列を用いることにより融合されている別の免疫グロブリンをコードする配列を含んでもよい。ＩＬ－１８の機能的フラグメントまたはアナログに指向された加工抗体を、同じ抗体との結合促進を誘導するように設計してもよい。

第２の免疫グロブリンパートナーを、非蛋白担体分子を包含する上記のエフェクター剤と結合させてもよく、慣用的手段により、エフェクター剤に第２の免疫グロブリンパートナーを作動するように連結することができる。

第２の免疫グロブリンパートナー、例えば抗体配列と、エフェクター剤との間の融合または連結は、いずれかの適当な手段、例えば慣用的な共有結合またはイオン結合、あるいはヘテロ二官能基架橋、例えばカルボジイミド、グルタルアルデヒド等によるものであってもよい。かかる方法は当該分野において知られており、慣用的な化学および生化学の教科書に記載されている。

さらに、第２の免疫グロブリンパートナーとエフェクター剤との間に所望のスペースを提供するだけの慣用的なリンカー配列を、改変免疫グロブリンコーディング領域中に構築してもよい。かかるリンカーの設計は当業者によく知られている。

さらに、本発明の分子のためのシグナル配列を修飾して発現を促進してもよい。

【００３２】

典型的な改変抗体は、ｍＡｂ　２Ｃ１０の抗原特異性を有する可変重鎖および／または軽鎖ペプチドまたは蛋白配列、例えば、V_HおよびV_L鎖を含む。さらにもう１つの本発明の望ましい改変抗体は、ラット抗体分子２Ｃ１０の重鎖および／または軽鎖の可変領域の少なくとも１つの、好ましくはすべてのＣＤＲを含むアミノ酸配列により特徴づけられ、残りの配列はヒト起源のものであるか、またはその機能的フラグメントもしくはアナログである。

【００３３】

さらなる具体例において、本発明の加工抗体は、それにさらなる剤が結合されていてもよい。例えば、組み換えＤＮＡ法の手順を用いて、完全抗体分子のＦｃフラグメントまたはＣＨ２　ＣＨ３ドメインが酵素または他の検出可能な分子（すなわち、ポリペプチドエフェクターまたはレポーター分子）により置換されている本発明の加工抗体を得てもよい。

【００３４】

例えばラット２Ｃ１０の抗原特異性を有する、ＣＤＲ含有配列とは異種の非免疫グロブリンペプチド、蛋白またはそれらのフラグメントに、第２の免疫グロブリンパートナーを作動するように連結してもよい。発現されて得られる蛋白は、抗－ＩＬ－１８抗原特異性および非免疫グロブリンの特性を示す可能性がある。その融合パートナー特性は、例えば、別の結合ドメインまたは受容体ドメインのごとき機能的特性、あるいは融合パートナーがそれ自体治療蛋白である場合には治療特性、あるいは付加的な抗原特性であってもよい。

【００３５】

本発明のもう１つの望ましい蛋白は、全長の重鎖および軽鎖を有する完全抗体分子、あるいはＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントのごときそれらの別個のフラグメント、重鎖ダイマー、あるいはF_vのごときそれらの最小組み換えフラグメント、あるいは１本鎖抗体（ＳＣＡ）、あるいは選択ドナーｍＡｂ、例えばｍＡｂ　２Ｃ１０と同じ特異性を有する他のいずれかの分子を含みうる。かかる蛋白は改変抗体の形態で使用でき、あるいはその未融合形態で使用できる。

【００３６】

第２の免疫グロブリンパートナーがドナー抗体とは異なる抗体、例えばいずれかのイソタイプまたはクラスの免疫グロブリンフレームワークまたは不変領域に由来する場合はいつでも、加工抗体が得られる。加工抗体は、１の起源、例えばアクセプター抗体起源の免疫グロブリン（Ｉｇ）不変領域および可変フレームワーク領域、およびドナー抗体、例えば本明細書記載の抗－ＩＬ－１８抗体に由来する１またはそれ以上（好ましくはすべて）のＣＤＲを含みうる。さらに、改変、例えばアクセプターｍＡｂ軽鎖および／または重鎖可変ドメインフレームワーク領域の核酸またはアミノ酸レベルでの欠失、置換、または付加を行って、ドナー抗体の抗原結合特異性を保持させてもよい。

【００３７】

ＩＬ－１８　ｍＡｂの可変重鎖および／または軽鎖の一方（または両方）（所望により説明したように修飾してもよい）あるいは１またはそれ以上の下記重鎖または軽鎖ＣＤＲを用いるようにかかる加工抗体を設計する。加工抗体は中和的であると考えられ、すなわち、望ましくはそれらはＩＬ－１８の受容体への結合をブロックし、さらにＩＬ－１８依存性細胞の増殖をブロックまたは防止すると考えられる。

かかる加工抗体は、選択されたヒト免疫グロブリンまたはサブタイプのフレームワーク領域を含むヒト化抗体、あるいはＩＬ－１８抗体の機能的フラグメントに融合したヒト重鎖および軽鎖不変領域を含むキメラ抗体を包含しうる。適当なヒト（または他の動物）のアクセプター抗体は、ドナー抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列に対する相同性により、慣用的なデータベース、例えばＫＡＢＡＴ（登録商標）データベース、Los Alamosデータベース、およびSwiss Proteinデータベースから選択されるものであってもよい。ドナー抗体のフレームワーク領域に対する相同性（アミノ酸による）により特徴づけられるヒト抗体は、ドナーＣＤＲの挿入のための重鎖不変領域および／または重鎖可変フレームワーク領域を提供することに適する。軽鎖不変または可変フレームワーク領域を与えうる適当なアクセプター抗体を同様の方法で選択してもよい。アクセプター抗体の重鎖および軽鎖は同じアクセプター抗体に由来することは必要ないことに注意すべきである。

【００３８】

望ましくは、異種フレームワークおよび不変領域をヒト免疫グロブリンクラスおよびイソタイプから、例えばＩｇＧ（サブタイプ１から４まで）、ＩｇM、ＩｇＡ、およびＩｇＥから選択する。しかしながら、アクセプター抗体はヒト免疫グロブリン蛋白配列だけを含む必要はない。例えば、ヒト免疫グロブリン鎖の一部をコードするＤＮＡ配列がポリペプチドエフェクターまたはレポーター分子のごとき非免疫グロブリンアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列に融合されている遺伝子を構築してもよい。

特に望ましいヒト化抗体の一例は、選択されたヒト抗体配列のフレームワーク領域上に挿入された２Ｃ１０のＣＤＲを含むであろう。中和ヒト化抗体に関しては、ＩＬ－１８抗体の重鎖および／または軽鎖可変領域由来の１、２または好ましくは３個のＣＤＲが選択ヒト抗体配列のフレームワーク領域中に挿入され、選択ヒト抗体のネイティブなＣＤＲに置き換わる。

【００３９】

好ましくは、ヒト化抗体において、ヒト重鎖および軽鎖両方における可変ドメインが、１またはそれ以上のＣＤＲ置換により加工されている。６個すべてのＣＤＲ、または６個未満のＣＤＲの種々の組み合わせを使用することが可能である。好ましくは、６個すべてのＣＤＲが置換される。ヒトアクセプター抗体由来の未修飾軽鎖を軽鎖として使用して、ヒト重鎖中のＣＤＲのみを置換することが可能である。さらに別法として、慣用的な抗体データベースを用いることにより適合する軽鎖を別のヒト抗体から選択してもよい。加工抗体の残りの部分はいずれの適当なアクセプターヒト免疫グロブリンに由来するものであってもよい。

【００４０】

よって、好ましくは加工ヒト化抗体は本来のヒト抗体またはそのフラグメントの構造を有し、有効な治療用途、例えば、ヒトにおけるＩＬ－１８により媒介される炎症性疾患の治療、あるいは診断用途に必要な特性の組み合わせを有する。

【００４１】

もう１つの例として、加工抗体は２Ｃ１０の可変軽鎖領域のＣＤＲおよび１３Ｇ９の可変重鎖領域のＣＤＲを含んでいてもよい。得られる抗体はｍＡｂ２Ｃ１

０と同じ抗原結合特異性および高アフィニティーにより特徴づけられるはずである。

【００４２】

ドナー抗体の特異性および高アフィニティーに影響することなく可変ドメインのアミノ酸を変化させることにより加工抗体をさらに修飾できることが当業者により理解されるであろう（すなわち、アナログ）。重鎖および軽鎖アミノ酸を、可変ドメインフレームワークまたはＣＤＲあるいはそれらの両方において他のアミノ酸により置換できると考えられる。

【００４３】

さらに、不変領域を改変して本発明の分子の選択特性を向上または低下させてもよい。例えば、ダイマー化、Ｆｃ受容体への結合、あるいは補体結合または活性化能（例えば、Angal et al., Mol. Immunol, 30:105-108 (1993), Xu et al., J. Biol. Chem, 269:3469-3474 (1994), Winter et al., EP 307,434-B参照）。

【００４４】

キメラ抗体である改変抗体は、両鎖に関してヒト免疫グロブリン不変領域に結合した、フレームワーク領域を包含する非ヒトドナー抗体重鎖および軽鎖可変領域の全体を提供することにより、上記ヒト化抗体とは異なる。本発明のヒト化抗体とは異なる付加的な非ヒト配列を保持するキメラ抗体はヒトにおいて有意な免疫応答を誘発する可能性がある。

かかる抗体は、後で説明するようにＩＬ－１８により媒介される疾病の予防および治療において有用である可能性がある。

【００４５】

ＶＩ．改変抗体および加工抗体の製造

好ましくは、以下のプロセスに従って、ｍＡｂ　２Ｃ１０または他の適当なドナーｍＡｂの可変軽鎖および／または重鎖配列およびＣＤＲ、ならびにそれらをコードする核酸配列を、本発明の改変抗体、好ましくはヒト化抗体の構築に使用する。同じまたは類似の方法を用いて本発明の他の具体例を得てもよい。

選択されたドナーｍＡｂ、例えばラット抗体２Ｃ１０を産生するハイブリドー

マを慣用的にクローニングし、当業者に知られた方法、例えばSambrook et al., (Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載された方法により、その重鎖および軽鎖可変領域のＤＮＡを得る。ドナーｍＡｂの結合特異性を保持させるのに必要な、少なくともＣＤＲコーディング領域を含む２Ｃ１０の可変重鎖および軽鎖領域、ならびにアクセプターｍＡｂの軽鎖および／または重鎖可変ドメインフレームワークのそれらの部分、ならびにヒト免疫グロブリン由来の抗体鎖の残りの免疫グロブリン由来部分を、ポリヌクレオチドプライマーおよび逆転写酵素を用いて得ることができる。既知データベースを用い、他の抗体と比較することによりＣＤＲコーディング領域を同定する。

次いで、ラット／ヒトキメラ抗体を調製し、結合能に関してアッセイしてもよい。かかるキメラ抗体は、両鎖に関してヒトＩｇ不変領域に結合した非ヒトドナー抗体V_HおよびV_L領域全体を含む。

【００４６】

ヒト化抗体はキメラ抗体由来のものであってもよく、あるいは好ましくは、重鎖および軽鎖由来のドナーｍＡｂＣＤＲコーディング領域を選択重鎖および軽鎖フレームワーク中に適当に挿入することにより合成される。別法として、標準的な突然変異法を用いて本発明のヒト化抗体を調製してもよい。かくして得られたヒト化抗体は、ヒトフレームワーク領域およびドナーｍＡｂのＣＤＲコーディング領域を含む。次いで、フレームワーク残基を処理してもよい。得られたヒト化抗体を組み換え宿主細胞、例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯまたはミエローマ細胞において発現させることができる。この方法を他の適当なＩＬ－１８特異的中和高アフィニティー非ヒト抗体に使用して、他のヒト化抗体を調製してもよい。

【００４７】

これらのコーディング配列を、宿主細胞における複製および発現ならびに／あるいは宿主細胞からの分泌を制御しうる慣用的な調節制御配列に作動するように連結された改変抗体のものと置きかえることにより、慣用的な発現ベクターまたは組み換えプラスミドを製造することができる。調節配列は、プロモーター配列、例えば、ＣＭＶプロモーター、および他の既知抗体由来であってもよいシグナ

ル配列を包含する。同様に、相補的な抗体軽鎖または重鎖をコードするＤＮＡ配列を有する第２の発現ベクターを製造することができる。好ましくは、各ポリペプチド鎖が機能的に発現されることが可能であるかぎり、この第２の発現ベクターは、コーディング配列および選択可能マーカーに関する以外は第１の発現ベクターと同じである。別法として、改変抗体の重鎖および軽鎖コーディング配列が単一ベクター上にあってもよい。

【００４８】

選択宿主細胞を、慣用的方法により、第１および第２のベクターで同時トランスフェクションして、組み換えまたは合成軽鎖および重鎖の両方を含む本発明のトランスフェクションされた宿主細胞を得る。次いで、慣用的方法によりトランスフェクションされた細胞を培養して、本発明の加工抗体を得る。両方の組み換え重鎖および／または軽鎖の結合を含むヒト化抗体を、ＥＬＩＳＡまたはＲＩＡのごとき適当なアッセイにより培養物からスクリーニングする。同様の慣用的方法を用いて本発明の他の改変抗体および分子を構築してもよい。

【００４９】

本発明の方法および構築物の構築に使用されるクローニングおよびサブクローニング工程に適したベクターは当業者により選択されうる。例えば、慣用的なｐＵＣシリーズのクローニングベクターを用いてもよい。使用される１のベクターはｐＵＣ１９であり、Amersham（Buckinghamshire）またはPharmacia（Uppsala, Sweden）のごときサプライハウス（supply houses）から市販されている。さらに、容易に複製可能なベクターは豊富なクローニング部位および選択可能遺伝子（例えば、抗生物質耐性）を有し、容易に取り扱いでき、クローニングに使用できる。よって、クローニングベクターの選択は本発明の制限因子ではない。

同様に、本発明の加工抗体の発現に使用するベクターはいずれかの慣用的ベクターから当業者により選択されうる。またベクターは、選択された宿主細胞中での異種ＤＮＡの複製および発現を指令する選択された調節配列（ＣＭＶプロモーターのごとき）を含む。これらのベクターは、加工抗体または改変免疫グロブリンコーディング領域をコードする上記ＤＮＡ配列を含む。さらに、ベクターは、操作容易のために所望制限部位を挿入することにより修飾された選択免疫グロブ

リン配列を含んでいてもよい。

【００５０】

異種ＤＮＡ配列、例えば、哺乳動物ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子の発現を増幅するのに適した遺伝子により、発現ベクターを特徴づけてもよい。他の好ましいベクター配列は、ウシ成長ホルモン（ＧＢＨ）およびベータグロブリンプロモーター配列（betaglopro）に由来するようなポリＡシグナル配列を包含する。本発明において有用な発現ベクターを、当業者によく知られた方法により合成してもよい。

かかるベクターの成分、例えば、レプリコン、選択遺伝子、エンハンサー、プロモーター、シグナル配列等を、市販または天然ソースから得てもよく、あるいは選択宿主における組み換えＤＮＡ産物の発現および／または分泌を起こさせる際に使用する既知方法により合成してもよい。哺乳動物、細菌、昆虫、酵母および真菌用の当該分野にて知られている他の適当な発現ベクターを、この目的のために選択してもよい。

【００５１】

また本発明は、加工抗体のコーディング配列または改変免疫グロブリン分子のコーディング配列を含む組み換えプラスミドでトランスフェクションされた細胞系を包含する。宿主細胞これらのクローニングベクターのクローニングおよび他の操作に有用な宿主細胞も慣用的なものである。しかしながら、最も望ましくは、Ｅ．ｃｏｌｉの種々の株に由来する細胞を、本発明の改変抗体の構築におけるクローニングベクターの複製および他の工程に使用する。

本発明の加工抗体または改変抗体の発現に適した宿主細胞は、好ましくは、ＣＨＯ、ＣＯＳ、線維芽細胞（例えば、３Ｔ３）、および骨髄細胞系のごとき哺乳動物細胞であり、より好ましくはＣＨＯまたは骨髄細胞系である。ヒト細胞を用いてもよく、かくして、ヒトの糖鎖付加パターンで分子を修飾することができる。別法として、他の真核細胞系を用いてもよい。適当な哺乳動物細胞および形質転換、培養、増幅、スクリーニングおよび生成物の製造および精製のための方法の選択は当該分野において知られている。例えば、上で引用したSambrookらの文献参照。

細菌細胞が本発明の組み換えＦａｂの発現に適した宿主細胞であるとわかるかもしれない（例えば、Pluckthun, A., Immunol. Rev., 130:151-188 (1992)参照）。しかしながら、細菌細胞にて発現された蛋白が変性し、あるいは非適切に折り畳まれており、あるいは糖鎖付加されていない形態である傾向があるので、細菌細胞において生成した組み換えＦａｂを抗原結合能の保持に関してスクリーニングされなければならないであろう。細菌細胞により発現された分子が正しく折り畳まれた形態であるならば、その細菌細胞は望ましい宿主であろう。例えば、発現に使用される種々のＥ．ｃｏｌｉ株がバイオテクノロジーの分野において宿主細胞としてよく知られている。種々のＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ、他の枯草菌等の株もこの方法に使用してもよい。

所望ならば、当業者に知られた酵母細胞株宿主細胞として使用可能であり、さらにならびに昆虫細胞、例えば、ＤｒｏｓｏｐｈｉｌａおよびＬｅｐｉｄｏｐｔｅｒａならびにウイルス発現系も使用可能である。例えば、Miller et al., Genetic Engineering, 8:277-298, Plenum Press (1986)およびその中で引用された文献参照。

本発明のベクターを構築することのできる一般的方法、本発明の宿主細胞を得るために必要なトランスフェクション方法、およびかかる宿主細胞から本発明の改変抗体を得るのに必要な方法はすべて慣用的な方法である。同様に、製造された場合、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を包含する当該分野の標準的方法によって本発明の改変抗体を細胞培養内容物から精製してもよい。かかる方法は当該分野の技術に包含され、本発明を制限するものではない。

【００５２】

ヒト化抗体の発現のためのもう１つの方法は、米国特許第４８７３３１６号に記載されたようなトランスジェニック動物における発現を用いるものであってもよい。この方法は、遺伝子導入により哺乳動物中に導入された場合にメスの動物に所望組み換え蛋白を乳中に産生させる、動物のカゼインプロモーターを用いる発現系に関連している。

所望方法により発現されたならば、適当なアッセイを用いて加工抗体をインビ

トロにおいて活性について試験する。現在慣用的となっているＥＬＩＳＡアッセイフォーマットを用いてＩＬ－１８への加工抗体の定性的および定量的結合を評価する。さらに他のインビトロでのアッセイを用いて、ヒトでの臨床研究を行う前に中和能を確かめて、通常のクリアランス機構にかかわらず体内で加工抗体が維持されることを評価してもよい。

【００５３】

ヒト化抗体の製造に関して説明した一般的方法の後に、当業者は、本明細書記載の他のドナーＩＬ－１８抗体、可変領域配列およびＣＤＲペプチドからヒト化抗体を構築してもよい。加工抗体のレシピエントにより「自己」であると潜在的に認識される可変領域フレームワークを用いて加工抗体を得ることができる。可変領域フレームワークに対する小さな修飾を行って、レシピエントに対する免疫原性を有意に増大させずに抗原結合を大幅に増強させることができる。かかる加工抗体はＩＬ－１８により媒介される症状を効果的に治療しうる。かかる抗体はかかる症状の診断にも有用でありうる。

【００５４】

ＶＩＩ．治療的／予防的使用

本発明は、本明細書記載の１またはそれ以上の加工抗体または改変抗体を包含する有効量の抗体またはそれらのフラグメントを投与することを特徴とする、ＭＳのごとき自己免疫関連徴候を有するヒトを治療する方法にも関する。

本発明の分子の使用により誘導される治療的応答は、ヒトＩＬ－１８への結合、その結果としてのＴｈ１刺激のブロックにより生じる。よって、本発明の分子は、治療用途に適した調合物および処方中にある場合、ＭＳ、ＲＡ、ＩＤＤＭ、ＩＢＤおよび乾癬（これらに限らない）のごとき自己免疫疾患を有するヒトにとり非常に望ましい。

【００５５】

本発明の治療薬は、２日ないし６ヶ月、あるいは適当期間の自己免疫症状の治療にとり望ましいものであると考えられる。例えば、ＭＳ等の治療の場合には長期の治療が望ましい。治療薬の用量および投与期間はヒト循環系における本発明の分子の相対的持続時間に関連し、治療すべき症状および患者の一般的健康状態

に応じて当業者により調節されうる。

本発明の治療薬の投与モードは、薬剤を宿主にデリバリーするいずれの適当な経路であってもよい。本発明の改変抗体、抗体、加工抗体、およびそれらのフラグメント、ならびに医薬組成物は、特に非経口投与、すなわち、皮下、筋肉内、静脈内、または鼻腔内投与に有用である。

【００５６】

医薬上許容される担体中の有効成分としての有効量の本発明の加工（例えば、ヒト化）抗体を含む医薬組成物として本発明の治療薬を調合してもよい。本発明の予防薬において、好ましくは生理学的ｐＨに緩衝化された加工抗体を含む水性懸濁液または溶液であって、容易に注射可能なものが好ましい。通常には、非経口投与用組成物は、医薬上許容される担体、好ましくは水性担体に溶解された本発明の加工抗体の溶液またはそのカクテルを含む。種々の水性担体を用いることができ、例えば、０．４％セイライン、０．３％グリシン等がある。これらの溶液は滅菌されており、通常には、粒子状物質を含まない。慣用的な、よく知られた滅菌方法（例えば、濾過）によりこれらの溶液を滅菌してもよい。組成物はｐＨ調節剤および緩衝剤等のごとき生理学的条件に近づけるのに必要な医薬上許容される補助的物質を含んでいてもよい。かかる医薬処方中の本発明の抗体の濃度は様々であり、すなわち、約０．５％未満から、通常には約１％または少なくとも約１％ないし１５または２０％（重量％）であり、選択された個々の投与モードに応じて、主に液体の体積、粘度等に基づいて選択されよう。

【００５７】

よって、筋肉内注射用の本発明の医薬組成物を、１ｍＬの滅菌緩衝化水、および約１ｎｇないし約１００ｍｇ、例えば、約５０ｎｇないし約３０ｍｇあるいはより好ましくは5ｍｇないし約２５ｍｇの本発明の加工抗体を含むように調製することができる。同様に、静脈輸液用の本発明の医薬組成物を、約２５０ｍｌのリンゲル溶液、および約１ないし約３０ｍｇ、好ましくは5ｍｇないし約２５０ｍｇの本発明の加工抗体を含むように調製することができる。非経口的に投与可能な組成物を調製するための実際の方法は当業者によく知られているかあるいは明らかであろうし、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed.,

Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvaniaにおいてより詳細に記載されている。

【００５８】

本発明の治療薬は、医薬調合物中にある場合には１回分の剤形として提供されるのが好ましい。適当な治療上有効量は当業者により容易に決定されうる。ヒトまたは他の動物における炎症性疾患を有効に治療するためには、体重７０ｋｇあたり約０．１ｍｇないし約２０ｍｇの本発明の蛋白または抗体である１回分の用量を非経口的に、好ましくはｉ．ｖ．（静脈内）またはｉ．ｍ．（筋肉内）投与すべきである。必要ならば、疾病期間中に医師により適宜選択される適当な時間間隔をおいてかかる用量を繰り返し投与してもよい。

【００５９】

本発明の改変抗体および加工抗体を、例えば、ＩＬ－１８により媒介される疾病の決定あるいはかかる疾病の治療進行を追跡するための診断法において使用してもよい。血清、血漿または他の適当な組織中のＩＬ－１８レベルまたは培養中のヒト細胞による放出を測定するためのＥＬＩＳＡおよび慣用的アッセイフォーマット用に、診断試薬としてこれらの改変抗体を慣用的に標識してもよい。改変抗体が使用されるアッセイの性質は慣用的なものであり、本発明を制限するものではない。

【００６０】

よって、本発明の１の具体例は、患者における過剰なＴｈ１　Ｔ細胞の産生に関連した自己免疫疾患および他の症状の診断の助けとなる方法に関するものであり、該方法は、該患者から得た試料（血漿または組織）中のヒトＩＬ－１８量を決定し、次いで、該決定された量を正常集団におけるヒトＩＬ－１８平均量と比較し、そのことにより、患者の試料中の有意に上昇したＩＬ－１８量の存在が過剰なＴｈ１　Ｔ細胞集団に関連した自己免疫疾患および他の症状を示すことを特徴とする。

【００６１】

本明細書記載の抗体、改変抗体またはそれらのフラグメントを保存のために凍結乾燥させ、使用前に適当な担体で復元することができる。この方法は、慣用的

な免疫グロブリンに関して有効であることが示されており、当該分野で知られた凍結乾燥および復元方法を用いることができる。

【００６２】

下記実施例は、典型的な加工抗体の構築および適当なベクターおよび宿主細胞におけるその発現を包含する本発明の種々の態様を説明するものであり、本発明の範囲を限定するものと解してはならない。すべてのアミノ酸は慣用的な３文字または１文字コードにより示される。すべての必用な制限酵素、プラスミド、および他の試薬ならびに材料は、特記しないかぎり、市販ソースから得た。すべての一般的クローニングおよび他の組み換えＤＮＡ法は上で引用したT. Maniatisらの文献あるいはその第２版（eds. Sambrook et al., (1989)、同じ出版社による（「Sambrook」らという））において行われたものと同じであった。

【００６３】

実施例１－ＩＬ－１８に対するｍＡｂの製造

Ａ．モノクローナル抗体の生成

マウス（Ｂａｌｂ／ｃおよびＣ５７ＢＬ／６のＦ１雑種）またはラット（Sprague Dawley）を、アジュバント中の３０μｇの組み換えＩＬ－１８で免疫し、４週間後にアジュバント中の３０μｇのＩＬ－１８で免疫した。Ｌ－１８に対する良好な血清抗体力価に基づいて、さらに１０－３０μｇのＩＬ－１８で動物を免疫した（セイライン中、腹腔内注射）。最後の免疫から３日後に脾臓切除を行った。マウスまたはラットの脾臓細胞を用いて、標準的方法（Zola, H.Ed., Monoclonal Antibodies, CRC Press Inc. 1987）によりハイブリドーマを調製した。限界希釈法により陽性ハイブリドーマをクローン化した。

Ｂ．ｍＡｂの生成

それぞれ製造者の指示を用いてProsepA（Bio Processing, Consett, UK）クロマトグラフィーによりｍＡｂを精製した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによれば、ｍＡｂは９５％よりも高い純度であった。

Ｃ．Ｍａｂのイソタイピング

市販キット（Zymed, Amersham）を用いてすべてのラットおよびマウスのｍＡｂのイソタイプを調べたところ、ＩｇＧ１カッパであることがわかった。

【００６４】

実施例２－アッセイ

Ａ．ＩＬ－１８のビオチン化

Molecular Probes Inc.から購入したキットを用いてビオチン化試薬の割合を１０：１としてＩＬ－１８をビオチン化した。ビオチン化はＩＬ－１８の生物学的活性に影響しなかった。

Ｂ．ハイブリドーマスクリーニングアッセイ

４℃において９６ウェルプレートをストレプトアビジン（ＰＢＳ中２μｇ／ｍｌ，１００μｌ／ウェル）で一晩被覆した。次いで、溶液を吸引し、室温においてＴＢＳバッファー（50mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Kathon, pH 7.4）中の２５０μｌ／ウェルの１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）で非特異的結合部位を５－６０分ブロックした。この工程およびその後の工程を行った後、洗浄バッファー（10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.02% Kathon, pH 7.4）でプレートを４回洗浄した。アッセイバッファー（ＴＢＳバッファー中 0.5% BSA, 0.05% ウシガンマグロブリン, 0.01% Tween 40, 20μMジエチレントリアミン五酢酸 in TBS buffer）中のビオチンＩＬ－１８（１００ｎｇ／ｍｌ）１００μｌを各ウェルに添加し、振盪インキュベーター中でプレートを室温にて３０分インキュベーションした。５０μｌのハイブリドーマ培地を各ウェルに添加し、次いで、５０μｌのアッセイバッファーを添加し、振盪インキュベーター中、室温で６０分インキュベーションした。その後、アッセイバッファー中の０．５μｇ／ｍｌ Eu^{3+}標識抗－マウスまたは抗－ラット抗体１００μｌを各ウェルに添加した。最後に、２００μｌ／ウェルのエンハンサー（Wallac）を添加し、室温で５分間インキュベーションし、時間とともに変化する蛍光を測定した。１００Ｋよりも大きいカウントを有するハイブリドーマを２４ウェルプレートにて増殖させた。

Ｃ．イムノアッセイ

得られた抗－ＩＬ－１８ Ｍａｂの特異性を調べるために、上記のごとく９６ウェルプレートを被覆し、ブロックし、ビオチンＩＬ－１８とともにインキュベーションした。その後のすべてのインキュベーションを室温において振盪インキ

ュベーターで行った。ウェルを洗浄後、５０μｌのＩＬ－１８（３μｇ／ｍｌ）またはアッセイバッファーおよび５０μｌのＭａｂを添加し、６０分インキュベーションした。ウェルを洗浄後、アッセイバッファー中０．５μｇ／ｍｌ Eu^{3+}標識抗－マウスまたは抗－ラット抗体１００μｌを６０分間添加し、ウェルを洗浄し、次いで、１００μｌ／ウェルののエンハンサー（Wallac）を添加し、室温で５分間インキュベーションし、時間とともに変化する蛍光を測定した。すべての陽性ハイブリドーマはＩＬ－１８での結合置換を示した。

Ｄ．中和アッセイ

Ficol-Paque（Pharmacia）グラジエントを用いて健康なドナーからＰＢＭＣを単離し、９６ウェル中、ＩＬ－１８（５ｎｇ／ｍｌ）および／またはＭａｂの存在下において、１μｇ／ｍｌのＣｏｎＡ（Sigma）を含有する１０％ DMEM／Ｆ１２培地中にて培養した。３７℃、空気中５％ CO_2、湿度９０％にて１８時間培養後、２５μｌの培地を除去し、インターフェロンガンマ（ＩＦＮｇ）濃度をイムノアッセイにより測定した。３つの実験の平均値から得た結果を表Ｉにまとめる。

Ｅ．モノクローナル抗体のアフィニティー測定

３０μｌ／分の流速を用いてＢＩＡｃｏｒｅ光学的バイオセンサー（Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sweden）にて精製ｍＡｂのアフィニティーを測定した。すでに説明されている関係（Karlsson et al, J. Immunol. Meth., 145:229-240 (1991)）（出典明示により本明細書に一体化させる）を用いて反応論的データを評価した。ｍＡｂ（HBS バッファー, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.01% Tween-20, pH 7.4で希釈）をウサギ抗－マウスＩｇＧ Ｆｃまたはヤギ抗－ラットＩｇＧ Ｆｃ表面に注入し、次いで、バッファーを流し、ＲＵを記録した。次いで、ＩＬ－１８（ＨＢＳバッファーで希釈）を１８０秒間注入し、その後バッファーを５００秒間流し、ＲＵを記録した。０．１Ｍリン酸を注入することによりセンサーチップ表面を再生した。ＢＩＡｃｏｒｅソフトウェアを用いて結合速度（Ｋａｓｓ）および解離速度（Ｋｄｉｓｓ）を計算し、これらをまとめて、ｍＡｂ １３Ｇ９について１２ｘ１０$^{-9}$Ｍ、ｍＡｂ ２Ｃ１０について３．９ｘ１０$^{-11}$Ｍ、そしてｍＡｂ １４Ｂ７について１．５ｘ１０$^{-10}$Ｍの平衡定数（Ｋ

$_D$）を計算した。表Ｉ参照。

Ｆ．モノクローナル抗体のエピトープ分析

精製Ｍａｂのエピトープ分析をＢＩＡｃｏｒｅにて測定した。１０μｌ／分の流速を用いて、第１の抗体（ＨＢＳで希釈）をウサギ抗－マウスＩｇＧ Ｆｃまたはヤギ抗－ラットＩｇＧ Ｆｃ表面に注入し、次いで、ＩＬ－１８を２４０秒間注入、ブロッキングＭａｂを４８秒間注入、そして第２のＭａｂを２４０秒間注入した。０．１Ｍリン酸を注入することにより表面を再生し、各注入後にＲＵを記録した。Ｍａｂ １３Ｇ９、２Ｃ１０および１４Ｂ７は類似または重複したエピトープを有することがわかった。

表Ｉ

ヒトＩＬ－１８と反応するｍＡｂのアフィニティーおよび中和活性

mAb	Kd (pM)a	中和 IC50 (nM)b
2C10 (ラット)	39	0.1
14B7 (ラット)	150	0.2
13G9 (マウス)	12000	3.0

a　光学的バイオセンサー(BIAcore)分析により決定(25℃)

b　5ng/mlヒトIL-18に応答したPBMCのIFNガンマ産生に対する阻害(nMで示す)

【００６５】

実施例３－ＣＤＲ配列

遺伝子クローニングおよび配列分析

以下に簡単に説明する標準的な分子生物学的方法を用いて可変重鎖および軽鎖遺伝子をハイブリドーマ細胞からクローン化した。製造者の指示に従ってＴＲＩｚｏｌ試薬（Life Technologies Cat. # 15596-026）を用いてハイブリドーマ細胞から全ＲＮＡを単離した。製造者（Boehringer Mannheim Cat. No. 1483-188）の指示に従ってポリ－ｄＴオリゴヌクレオチドをプライミングに使用してＲＴ－ＰＣＲを行ってＲＮＡを逆転写した。第１鎖ｃＤＮＡ合成後、３’不変領域特異的プライマーおよび縮重５’プライマーを用いて重鎖および軽鎖Ｖ領域をＰＣＲ増幅した。すでに決定されている種々の重鎖または軽鎖領域のＮ末端アミノ酸

配列をコードするように縮重５’プライマー配列を設計した。各ＰＣＲ増幅により複数クローンから全長配列を得て、並置比較してコンセンサスを得た。したがって、重鎖および軽鎖両方のＤＮＡ配列の最初の１７塩基は得られたＰＣＲプライマーであるが、翻訳蛋白配列はネイティブ（native）なものであった。

ハイブリドーマ抗体２Ｃ１０、１３Ｇ９、および１４Ｂ７のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図１－６に示す。各場合において、ＣＤＲおよびそれらをコードするヌクレオチド配列をボックスで囲んだ。縮重プライマー配列は太字である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Holmes, Stephen D.
Ho, Yen Sen
Taylor, Alexander
Abdel-Meguid, Sherin S.

<120> Recombinant IL-18 Antagonists Useful in
Treatment of IL-18 Mediated Disorders

<130> P50897

<140> 60/125,299
<141> 1999-03-19

<160> 48

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 324
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(324)
<223> Light chain V region

<400> 1

```
gac att caa atg acc cag tct cca gct tcc ctg tct gca tct ctg gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1               5                  10                  15

gaa act gtc tcc atc gaa tgt ctg gca agt gag gac ata tac act tat       96
Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Thr Tyr
             20                  25                  30
```

```
tta aca tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct caa ctc ctg atc      144
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
         35                  40                  45

tat ggt gca aat aag ttg caa gat ggg gtc cca tca cgg ttc agt ggc      192
Tyr Gly Ala Asn Lys Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60

agt gga tct ggc aca cag tat tct ctc aag atc agc ggc ata caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Ile Gln Pro
 65                  70                  75                  80

gaa gat gaa ggg gat tat ttc tgt cta cag ggt tcc aag ttt ccg ctc      288
Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu
                 85                  90                  95

acg ttc ggt tct ggg acc aag ctg gag atc aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 2

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1               5                  10                  15
Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Thr Tyr
            20                  25                  30
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Gly Ala Asn Lys Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Ile Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu
                85                  90                  95
```

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

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(33)
<223> VK2C10 Light Chain CDR I

<400> 3
ctg gca agt gag gac ata tac act tat tta aca 33
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Thr Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 4
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Thr Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
<223> VK2C10 Light Chain CDR II

<400> 5
ggt gca aat aag ttg caa gat 21
Gly Ala Asn Lys Leu Gln Asp
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 6
Gly Ala Asn Lys Leu Gln Asp
1 5

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(27)
<223> VK2C10 Light Chain CDR III

<400> 7
cta cag ggt tcc aag ttt ccg ctc acg 27
Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 8
Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 9
<211> 378
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS

<222> (1)...(378)
<223> Heavy chain V region

<400> 9

```
gag gtc cag cta cag cag tct ggg gct gag ctt gtg aga cct ggg acc       48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1               5                  10                  15

tct gtg aag tta tct tgc aaa gtt tct ggc gaa ata agt aca gga tac       96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Glu Ile Ser Thr Gly Tyr
             20                  25                  30

tat ttc cac ttt gtg agg cga agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg ata      144
Tyr Phe His Phe Val Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
         35                  40                  45

gga agg att gat cct gag gat gat agt act aaa tat gct gag agg ttc      192
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Arg Phe
     50                  55                  60

aaa gac agg gcg acg ctc act gca caa aca tcc tcc aac aca gcc tac      240
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Gln Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65                  70                  75                  80

ctg aac ctc agc agc ctg acc tct gag gac act gca act tat ttt tgt      288
Leu Asn Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                 85                  90                  95

acc aca tgg cgg ata tac cga gat agt tct ggc cgc ccc ttc tat gtt      336
Thr Thr Trp Arg Ile Tyr Arg Asp Ser Ser Gly Arg Pro Phe Tyr Val
            100                 105                 110

atg gat gcc tgg ggt caa gga gct tca gtc act gtc tcc tca              378
Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 10
<211> 126

<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 10

```
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Glu Ile Ser Thr Gly Tyr
            20                  25                  30
Tyr Phe His Phe Val Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Arg Phe
    50                  55                  60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Gln Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Asn Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Thr Thr Trp Arg Ile Tyr Arg Asp Ser Ser Gly Arg Pro Phe Tyr Val
            100                 105                 110
Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(15)
<223> VH2C10 Heavy chain CDR I

<400> 11

```
gga tac tat ttc cac                                                 15
Gly Tyr Tyr Phe His
 1               5
```

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 12

Gly Tyr Tyr Phe His
1 5

<210> 13
<211> 51
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(51)
<223> VH2C10 Heavy chain CDR II

<400> 13
agg att gat cct gag gat gat agt act aaa tat gct gag agg ttc aaa 48
Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

gac 51

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 14
Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

<210> 15
<211> 51
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(51)
<223> VH2C10 Heavy chain CDR III

<400> 15

```
tgg cgg ata tac cga gat agt tct ggc cgc ccc ttc tat gtt atg gat       48
Trp Arg Ile Tyr Arg Asp Ser Ser Gly Arg Pro Phe Tyr Val Met Asp
 1               5                  10                  15

gcc                                                                   51
```

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 16

```
Trp Arg Ile Tyr Arg Asp Ser Ser Gly Arg Pro Phe Tyr Val Met Asp
 1               5                  10                  15
```

<210> 17
<211> 342
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(342)
<223> Light chain V region

<400> 17

```
gac gtt gtt atg act caa act cct ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga       48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1               5                  10                  15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt       96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
             20                  25                  30

aat gga aac acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct      144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
         35                  40                  45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca      192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
     50                  55                  60
```

```
gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggt aca gat ttc aca ctc aag atc      240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65                  70                  75                  80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
                 85                  90                  95

aca cat gtt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata      336
Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

aaa cgg                                                             342
Lys Arg
```

<210> 18
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1               5                  10                  15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
                85                  90                  95
Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110
Lys Arg
```

<210> 19
<211> 48

<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(48)
<223> VK13G9 Light Chain CDR I

<400> 19
aga tct agt cag agc ctt gta cac agt aat gga aac acc tat tta cat 48
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
<223> VK13G9 Light chain CDR II

<400> 21
aaa gtt tcc aac cga ttt tct 21
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 22
<211> 7
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(30)
<223> CK13G9 Light chain CDR III

<400> 23
tct caa agt aca cat gtt cct ccg tac acg 30
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 25
<211> 369
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(369)
<223> Heavy chain V region

<400> 25

```
caa gtt act ctt aag gag tct ggc cct ggg ata ttg aag ccc tca cag       48
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1               5                  10                  15

acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tct ctg agc act tct       96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
             20                  25                  30

ggt atg ggt att gcc tgg gtt cgt cag cct tca ggg aag ggt ctg gag      144
Gly Met Gly Ile Ala Trp Val Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
         35                  40                  45

tgg ctg gca gac att tgg tgg gat gat aat aag tat tat aat cca tcc      192
Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
     50                  55                  60

ctg gag agc cag ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga aac cag gta      240
Leu Glu Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65                  70                  75                  80

ttc ctc acg atc acc agt gtg gac act gca gat tct gcc act tat tac      288
Phe Leu Thr Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
                 85                  90                  95

tgt gct cgt cat cat tac gac ggt agt agc ctc ctg cct atg gac tac      336
Cys Ala Arg His His Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Pro Met Asp Tyr
            100                 105                 110

tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca                          369
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 26
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26

```
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1               5                  10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
```

```
            20                  25                  30
Gly Met Gly Ile Ala Trp Val Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45
Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60
Leu Glu Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65                  70                  75                  80
Phe Leu Thr Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95
Cys Ala Arg His His Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Pro Met Asp Tyr
            100                 105                 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
<223> VH13G9 Heavy chain CDR I

<400> 27

```
act tct ggt atg ggt att gcc                                          21
Thr Ser Gly Met Gly Ile Ala
 1               5
```

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

```
Thr Ser Gly Met Gly Ile Ala
 1               5
```

<210> 29
<211> 48
<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)…(48)
<223> VH13G9 Heavy chain CDR II

<400> 29
gac att tgg tgg gat gat aat aag tat tat aat cca tcc ctg gag agc 48
Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30
Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 31
<211> 39
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)…(39)
<223> VH13G9 Heavy chain CDR III

<400> 31
cat cat tac gac ggt agt agc ctc ctg cct atg gac tac 39
His His Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32
His His Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 324
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)…(324)
<223> Light chain V region

<400> 33
gat att caa atg acg cag tct cca gct tcc ctg tct gca tct ctg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

gaa act gtc tcc atc gaa tgt cta gca agt gag gac ata tac agt tat 96
Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

tta gca tgg tat caa cag aag cca ggg aaa tct cct cag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

tat gcc aca aaa agg ttg caa gat ggg gtc cca tca cgg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggc aca cag tat tct ctc aaa ata agc gac atg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Asp Met Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat gaa ggg gat tat ttc tgt cta cag aat tcc aag ttt ccg gtc 288
Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val
85 90 95

acg ttc ggt tct ggg acc aag ctg gag atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Asp Met Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)…(33)
<223> VK14B7 Light chain CDR I

<400> 35
cta gca agt gag gac ata tac agt tat tta gca 33
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 36
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
<223> CK14B7 Light chain CDR II

<400> 37
gcc aca aaa agg ttg caa gat 21
Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 38
Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp
1 5

<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(27)
<223> VK14B7 Light chain CDR III

<400> 39
cta cag aat tcc aag ttt ccg gtc acg 27

```
Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr
 1               5


      <210> 40
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Rattus norvegicus

      <400> 40
Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr
 1               5

      <210> 41
      <211> 368
      <212> DNA
      <213> Rattus norvegicus

      <220>
      <221> CDS
      <222> (1)...(368)
      <223> Heavy chain V region

      <400> 41
gag gtt cag ctt cag cag tct ggg gct gag ctt gtg aga cct ggg acc       48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1               5                  10                  15

tct gtg aag ttt tct tgc aaa gtt tct ggc gat acc cct aca aca tac       96
Ser Val Lys Phe Ser Cys Lys Val Ser Gly Asp Thr Pro Thr Thr Tyr
             20                  25                  30

tac gtg cac ttt gtg aga caa agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg ata      144
Tyr Val His Phe Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
         35                  40                  45

gga agg att gat cct gag gat act agt act aaa tat gct gag aag ttc      192
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Thr Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe
     50                  55                  60

aga aat aag gcg aca ttc act gca gat cca tcc tcc aac aca gcc tac      240
```

```
Arg Asn Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65                  70                  75                  80

cta aac ctc agc agc ctg acc cct gag gac act gca acc tat ttt tgt      288
Leu Asn Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                 85                  90                  95

acc ata atg cgg tac cat agt acc tat agg gtc tat gtt atg gat ttc      336
Thr Ile Met Arg Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Val Met Asp Phe
            100                 105                 110

tgg ggt caa gga act gca gtc act gtc tcc tc                          368
Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser
        115                 120


      <210> 42
      <211> 122
      <212> PRT
      <213> Rattus norvegicus

      <400> 42
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Phe Ser Cys Lys Val Ser Gly Asp Thr Pro Thr Thr Tyr
            20                  25                  30
Tyr Val His Phe Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Thr Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe
    50                  55                  60
Arg Asn Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Asn Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Thr Ile Met Arg Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Val Met Asp Phe
            100                 105                 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser
        115                 120

      <210> 43
      <211> 15
      <212> DNA
```

<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(15)
<223> VH14B7 Heavy chain CDR I

<400> 43
aca tac tac gtg cac 15
Thr Tyr Tyr Val His
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 44
Thr Tyr Tyr Val His
1 5

<210> 45
<211> 51
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(51)
<223> VH14B7 Heavy chain CDR II

<400> 45
agg att gat cct gag gat act agt act aaa tat gct gag aag ttc aga 48
Arg Ile Asp Pro Glu Asp Thr Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe Arg
1 5 10 15

aat 51

<210> 46
<211> 16
<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 46
Arg Ile Asp Pro Glu Asp Thr Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe Arg
 1   5   10   15

<210> 47
<211> 42
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(42)
<223> VH14B7 Heavy chain CDR III

<400> 47
atg cgg tac cat agt acc tat agg gtc tat gtt atg gat ttc   42
Met Arg Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Val Met Asp Phe
 1   5   10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 48
Met Arg Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Val Met Asp Phe
 1   5   10

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１（配列番号：１および２）は、ラット抗体２Ｃ１０の軽鎖可変領域を示す。図１は両方の鎖に関する配列データを含む。箱に入れた領域はＣＤＲ（配列番号：３－８）を示す。太字の領域は縮重プライマー配列を示す。

【図２】　図２（配列番号：９および１０）は、ラット抗体２Ｃ１０の重鎖可変領域を示す。図２は両方の鎖に関する配列データを含む。箱に入れた領域はＣＤＲ（配列番号：１１－１６）を示す。太字の領域は縮重プライマー配列を示す。

【図３】　図３（配列番号：１７および１８）は、マウス抗体１３Ｇ９の軽鎖可変領域を示す。図３は両方の鎖に関する配列データを含む。箱に入れた領域はＣＤＲ（配列番号：１９－２４）を示す。太字の領域は縮重プライマー配列を

示す。

【図４】　図４（配列番号：２５および２６）は、マウス抗体１３Ｇ９の重鎖可変領域を示す。図４は両方の鎖に関する配列データを含む。箱に入れた領域はＣＤＲ（配列番号：２７－３２）を示す。太字の領域は縮重プライマー配列を示す。

【図５】　図５（配列番号：３３および３４）は、ラット抗体１４Ｂ７の軽鎖可変領域を示す。図５は両方の鎖に関する配列データを含む。箱に入れた領域はＣＤＲ（配列番号：３５－４０）を示す。太字の領域は縮重プライマー配列を示す。

【図６】　図６（配列番号：４１および４２）は、ラット抗体１４Ｂ７の重鎖可変領域を示す。図６は両方の鎖に関する配列データを含む。箱に入れた領域はＣＤＲ（配列番号：４３－４８）を示す。太字の領域は縮重プライマー配列を示す。

【図１】

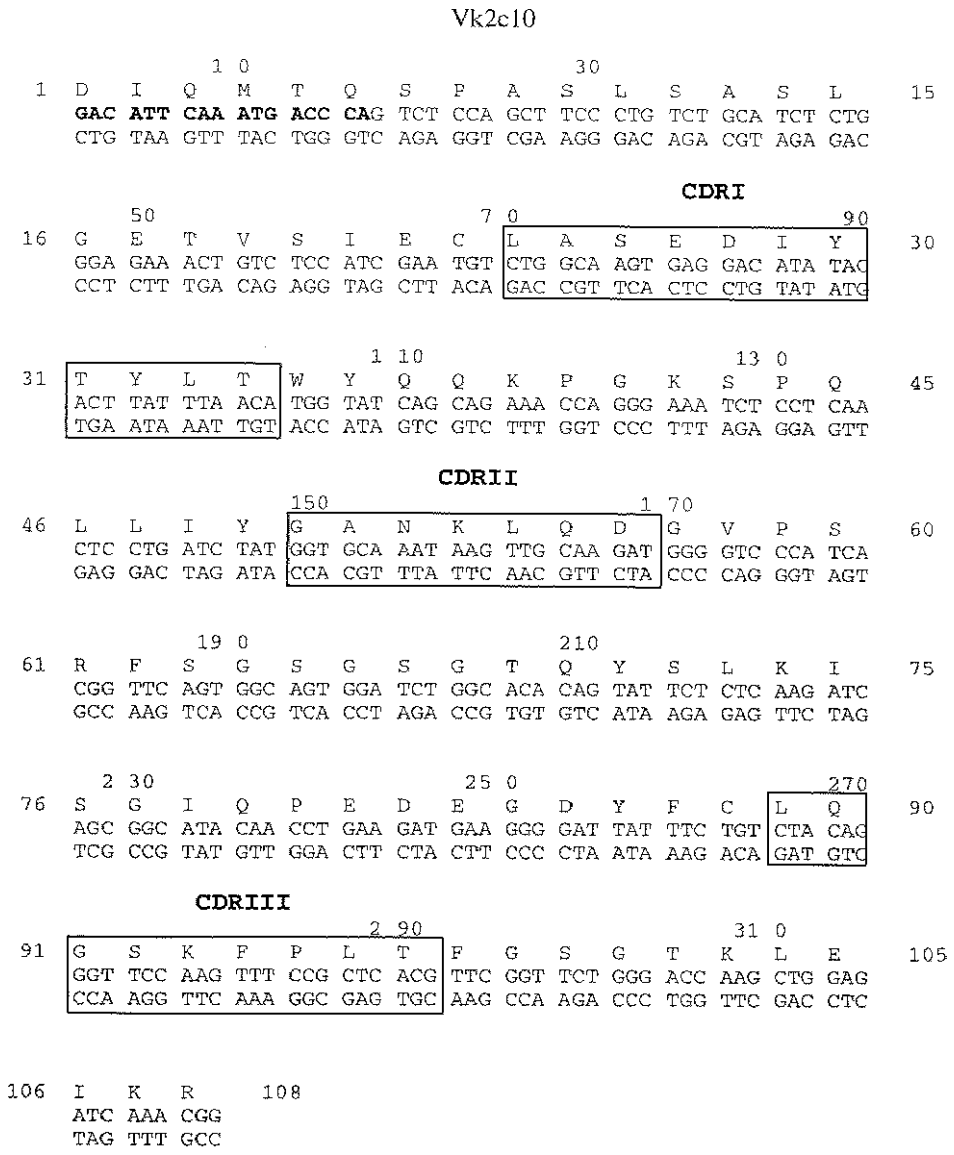

FIGURE 1

【図２】

VH2C10

```
                1 0                  30
1   E   V   Q   L   Q   Q   S   G   A   E   L   V   R   P   G     15
    GAG GTC CAG CTA CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTT GTG AGA CCT GGG
    CTC CAG GTC GAT GTC GTC AGA CCC CGA CTC GAA CAC TCT GGA CCC

        50                   7 0                  90
16  T   S   V   K   L   S   C   K   V   S   G   E   I   S   T     30
    ACC TCT GTG AAG TTA TCT TGC AAA GTT TCT GGC GAA ATA AGT ACA
    TGG AGA CAC TTC AAT AGA ACG TTT CAA AGA CCG CTT TAT TCA TGT

        CDRI
                    1 10                 13 0
31  G   Y   Y   F   H   F   V   R   R   R   P   G   Q   G   L     45
    GGA TAC TAT TTC CAC TTT GTG AGG CGA AGG CCT GGA CAG GGT CTG
    CCT ATG ATA AAG GTG AAA CAC TCC GCT TCC GGA CCT GTC CCA GAC

                        CDRII
                150                 1 70
46  E   W   I   G   R   I   D   P   E   D   D   S   T   K   Y     60
    GAA TGG ATA GGA AGG ATT GAT CCT GAG GAT GAT AGT ACT AAA TAT
    CTT ACC TAT CCT TCC TAA CTA GGA CTC CTA CTA TCA TGA TTT ATA

                19 0                 210
61  A   E   R   F   K   D   R   A   T   L   T   A   Q   T   S     75
    GCT GAG AGG TTC AAA GAC AGG GCG ACG CTC ACT GCA CAA ACA TCC
    CGA CTC TCC AAG TTT CTG TCC CGC TGC GAG TGA CGT GTT TGT AGG

    2 30                 25 0                 270
76  S   N   T   A   Y   L   N   L   S   S   L   T   S   E   D     90
    TCC AAC ACA GCC TAC CTG AAC CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC
    AGG TTG TGT CGG ATG GAC TTG GAG TCG TCG GAC TGG AGA CTC CTG

                    2 90                 31 0
91  T   A   T   Y   F   C   T   T   W   R   I   Y   R   D   S     105
    ACT GCA ACT TAT TTT TGT ACC ACA TGG CGG ATA TAC CGA GAT AGT
    TGA CGT TGA ATA AAA ACA TGG TGT ACC GCC TAT ATG GCT CTA TCA

            CDRIII
                330                 3 50
106 S   G   R   P   F   Y   V   M   D   A   W   G   Q   G   A     120
    TCT GGC CGC CCC TTC TAT GTT ATG GAT GCC TGG GGT CAA GGA GCT
    AGA CCG GCG GGG AAG ATA CAA TAC CTA CGG ACC CCA GTT CCT CGA

                37 0
121 S   V   T   V   S   S     126
    TCA GTC ACT GTC TCC TCA
    AGT CAG TGA CAG AGG AGT
```

FIGURE 2

【図３】

Vk13g9

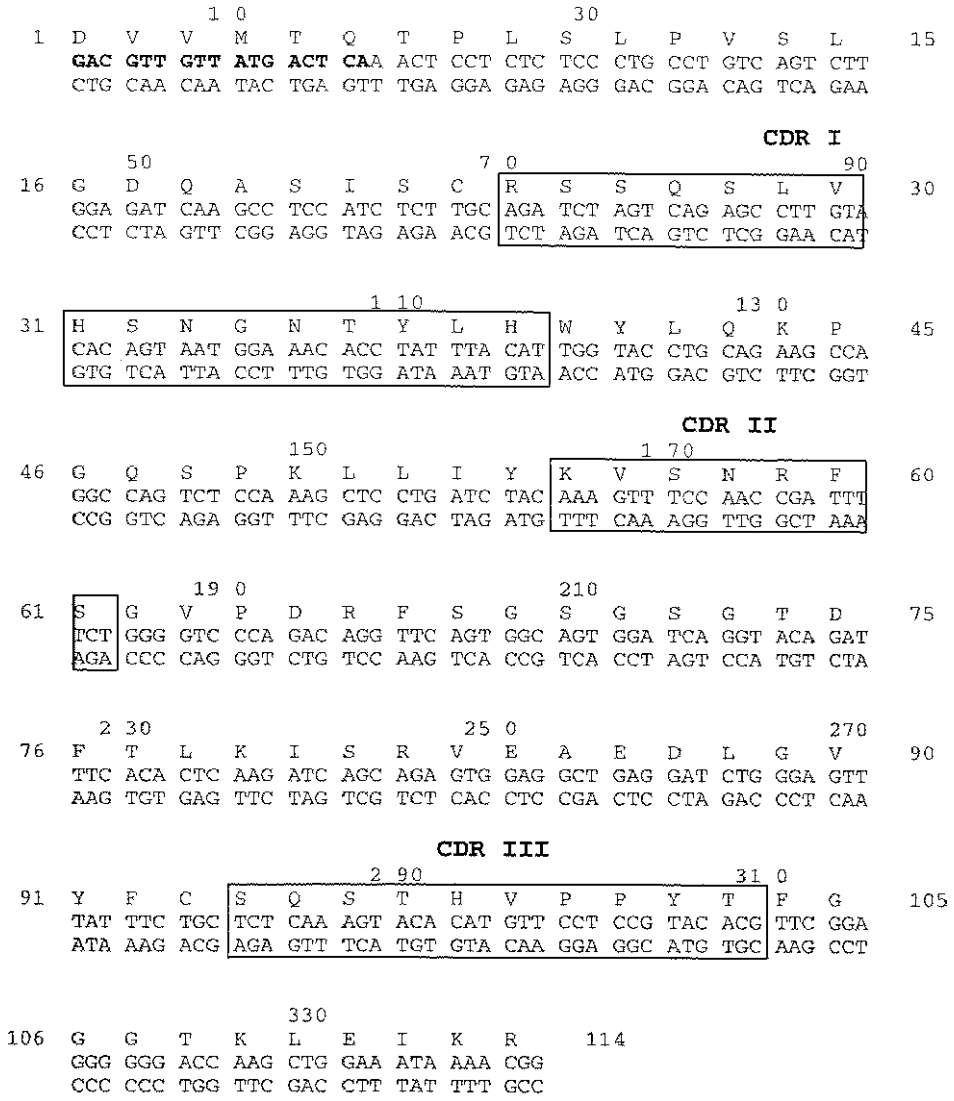

FIGURE 3

【図４】

VH13G9

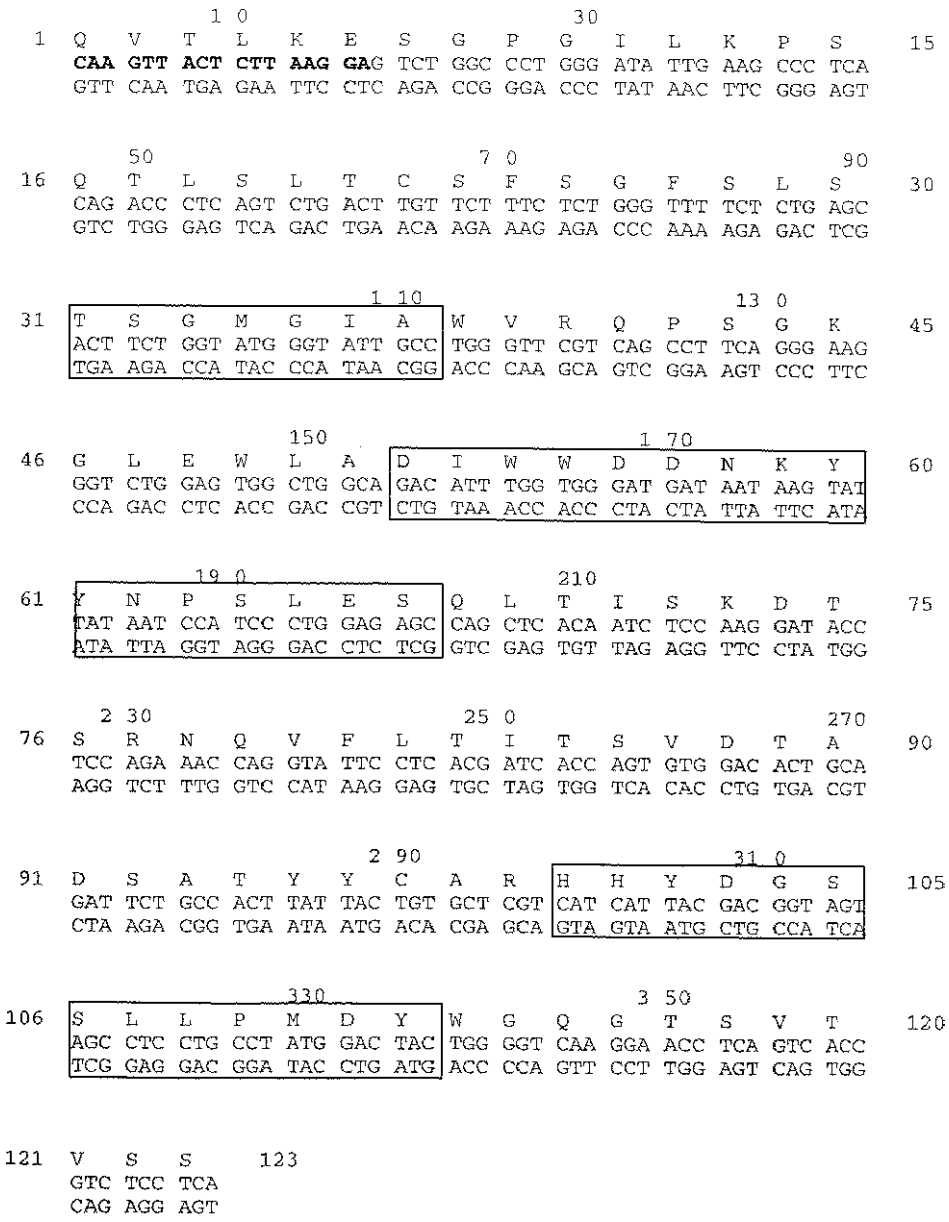

FIGURE 4

【図５】

Vk14B7

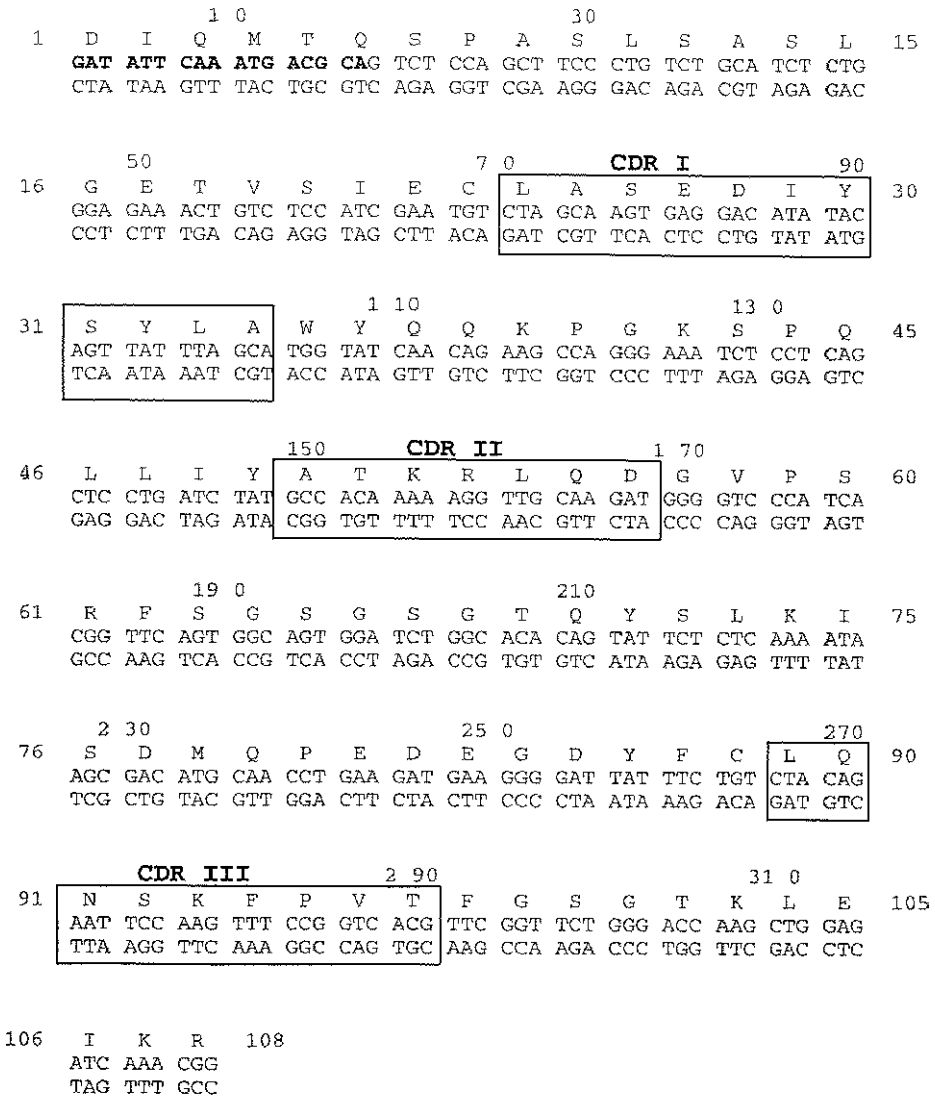

FIGURE 5

【図６】

VH14B7

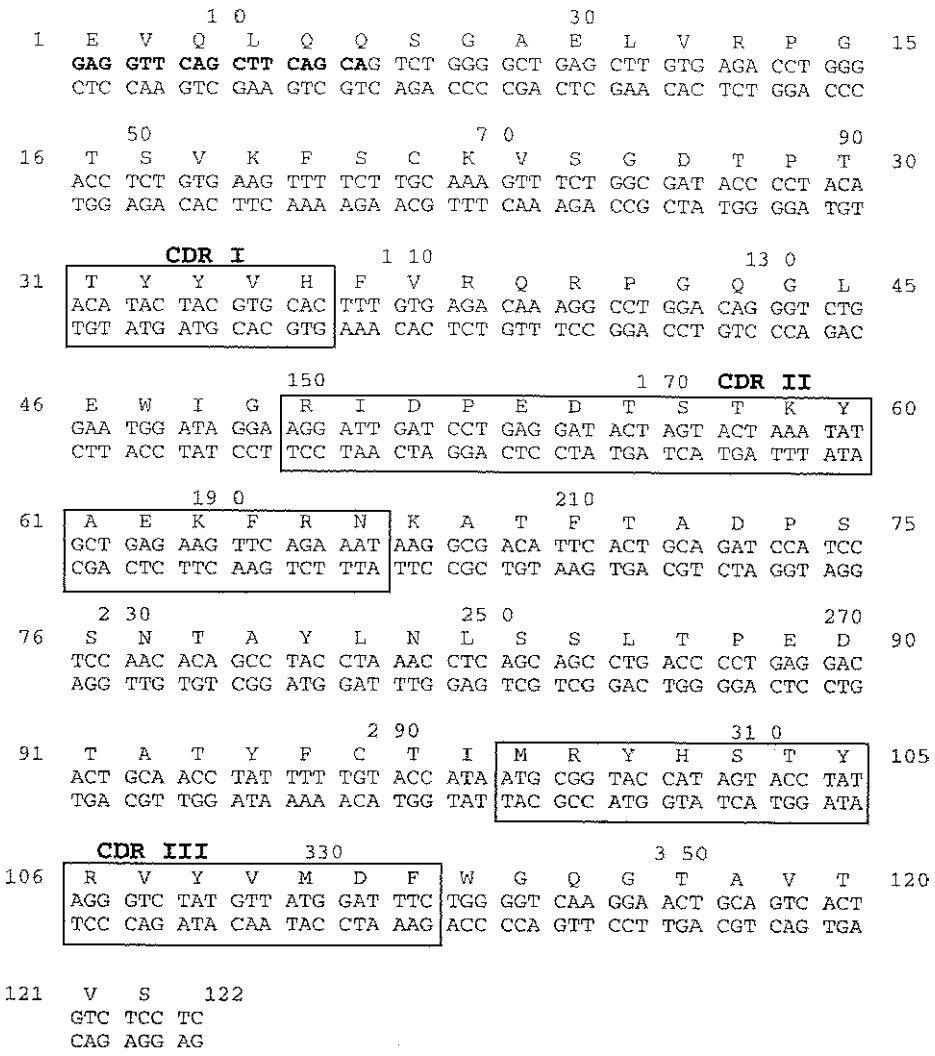

FIGURE 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/07349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :C07 K 16/18; A61 K 39/395; C12 N 5/12, 15/12
US CL :Please See Extra Sheet.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/388.1, 388.23; 435/326; 536/23.5; 424/130.1, 139.1, 141.1, 142.1, 145.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
West, US Patent full, STN via medline, caplus, embase, biosis. Search terms, interleukin-18 or IL-18, antibodies, monoclonal, humanized, 2C10, 14B7, 13G9

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REKVIG et al. Molecular analyses of anti-DNA antibodies induced by polymavirus BK in Balb/c mice. Scandinvian Journal of Immunology. 1995, Vol.41, No.6, pages 593-602. See sequence comparison "A".	14
X	BONILLA et al. V kappa gene usage, idiotype expression and antigen binding among clones expressing the VHX24 gene family derived from naive and anti-idiotype immune Balb/c mice. Journal of Immunolgy. 15 July 1990, Vol.145, No.2, pages 616-622, see sequence comparison "B"	14

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 29 JUNE 2000	Date of mailing of the international search report 04 AUG 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer FOZIA HAMUD Telephone No. (703) 308-0196

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/07349

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JONES et al. Expression of TIMP3 mRNA is elevated in retinas affected by simplex retinitis pigmentosa. FEBS Letters. October 1994, VOl.352, No.2, pages 171-174, see sequence comparison "C"	15
X	EP 0528767 A1 (SANDOZ, LTD.) 24 February 1993 (24.02.93), see page 35, also see sequence comparison "D"	14
A, P	EP 0974600 A2 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KASAKU KENKYUJO) 26 January 2000 (26.01.2000), see entire document.	1-26
A	WO 99/09063 A1 (VEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 25 February 1999 (25.02.99), see entire document.	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/07349

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international 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:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed 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:

Please See Extra Sheet.

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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/07349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

530/388.1, 388.23; 435/326; 536/23.5; 424/130.1, 139.1, 141.1, 142.1, 145.1

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING
This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-4, 7-8, 11-26, drawn to a rat monoclonal antibody (Rat 2C10) specific for human IL-18, a hybridoma cell line producing said antibody a nucleic acid encoding said antibody, a pharmaceutical composition comprising said antibody, a method of treatment using said antibody and a method of diagnosis using said antibody.

Group II, claims 1-3, 5, 7, 9, 11-26, drawn to a rat monoclonal antibody (Murine 13G9) specific for human IL-18, a hybridoma cell line producing said antibody a nucleic acid encoding said antibody, a pharmaceutical composition comprising said antibody, a method of treatment using said antibody and a method of diagnosis using said antibody.

Group III, claims 1-3, 6-7, 10-26, drawn to a rat monoclonal antibody (Rat 14B7) specific for human IL-18, a hybridoma cell line producing said antibody a nucleic acid encoding said antibody, a pharmaceutical composition comprising said antibody, a method of treatment using said antibody and a method of diagnosis using said antibody.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single
inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Pursuant to 37 C.F.R § 1.475 (d), the ISA/US considers that where
multiple products and processes are claimed, the main invention
shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each
of the other categories related thereto. Accordingly, the main
invention (Group I)comprises the first-recited product, the Rat 2C10 antibody and the nucleic acid molecule encoding it, a method of using it. Further pursuant to 37 C.F.R § 1.475 (d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/07349

methods accordingly defines a separate invention.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	FI		ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ａ６１Ｐ	19/02	Ａ６１Ｐ	25/00	
	25/00		37/00	
	37/00	Ｃ０７Ｋ	16/24	
Ｃ０７Ｋ	16/24	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｐ
Ｃ１２Ｎ	5/10		33/577	Ｂ
Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｃ１２Ｐ	21/08	
	33/577	Ｃ１２Ｒ	1:91	
// Ｃ１２Ｐ	21/08	Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＣ
(Ｃ１２Ｎ	5/10		5/00	Ｂ
Ｃ１２Ｒ	1:91)			

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

(71)出願人　スミスクライン　ビーチャム　パブリック　リミテッド　カンパニー
ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　Ｂｅｅｃｈａｍ　ｐ．ｌ．ｃ．
イギリス国　ティダブリュ８　９ジーエス，ミドルセックス，ブレントフォード，グレート　ウェスト　ロード　980
(72)発明者　イェン・セン・ホ
アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州バーウィン、オールド・ステイト・ロード362番
(72)発明者　スティーブン・ディ・ホームズ
イギリス、シーエム19・５エイディ、エセックス、ハーロウ、ザ・ピナクルズ、コールドハーバー・ロード
(72)発明者　アレキサンダー・エイチ・テイラー
アメリカ合衆国19341ペンシルベニア州エクストン、ウエストフィールド・ドライブ522番
(72)発明者　シェリン・エス・アブデルーメガイド
アメリカ合衆国19341ペンシルベニア州エクストン、オータム・ドライブ236番

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA05
HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA91X AB04 AB05 CA25
CA44 CA46
4C085 AA14 BB17 BB31 CC23 DD62
EE01 GG02 GG03 GG04
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA22
EA50 FA72

专利名称(译)	可用于治疗IL-18介导的疾病的重组IL-18拮抗剂		
公开(公告)号	JP2002542769A	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000606631	申请日	2000-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史克必成公司 史克必成公共有限公司		
[标]发明人	イエンセンホ スティーブンディホームズ アレキサンダーエイチテイラー シェリンエスアブデルメガイド		
发明人	イエン·セン·ホ スティーブン·ディ·ホームズ アレキサンダー·エイチ·テイラー シェリン·エス·アブデル-メガイド		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P1/04 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/00 C07K16/24 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/12 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/00 A61P37/02 C07K16/244		
FI分类号	A61K39/395.U A61P1/04 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/00 C07K16/24 G01N33/53.P G01N33/577.B C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB04 4B065/AB05 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB31 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	60/125299 1999-03-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了来自高亲和力中和mAb的嵌合体，人源化和其他IL-18 mAb，包含它们的药物组合物，治疗和诊断方法。