

(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2004-512026

(P2004-512026A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(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	A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 25/28	4 B 0 6 4
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 68 頁) 最終頁に続く

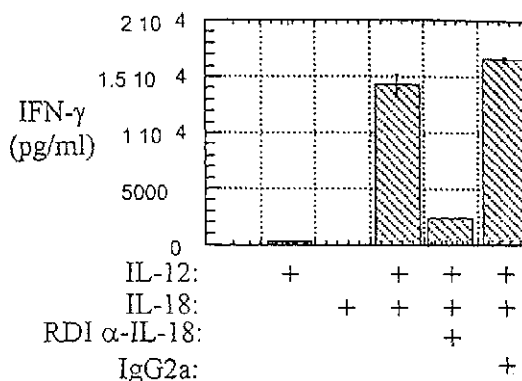
(21) 出願番号	特願2002-514176 (P2002-514176)	(71) 出願人	300049958 シエーリング アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国 デー-13353 ベ ルリン ミューラーシュトラッセ 178
(86) (22) 出願日	平成13年7月20日 (2001.7.20)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月20日 (2003.1.20)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/022863	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02002/008272	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 国際公開日	平成14年1月31日 (2002.1.31)	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治
(31) 優先権主張番号	60/219,447		
(32) 優先日	平成12年7月20日 (2000.7.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/908,494		
(32) 優先日	平成13年7月19日 (2001.7.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高親和性可溶性インターロイキン-18受容体

(57) 【要約】

そのサブユニットの1個は、IL-18Rの細胞外ドメインまたはその断片を含み、他方は、AcPLの細胞外ドメインまたはその断片を含む、2個のサブユニットを含む、可溶性、ヘテロ2量体インターロイキン18 (IL-18) 受容体分子が記述されている。好ましくは、可溶性の、ヘテロ2量体受容体は、IL-18RまたはAcPLの何れか単独よりも高い親和性を持って、IL-18に結合する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 個のサブユニットを含む可溶性のヘテロ 2 量体インターロイキン 18 (I L - 18) 受容体分子であって、該サブユニットの 1 個は I L - 18 R の細胞外ドメインまたはその断片を含み、他方は A c P L の細胞外ドメインまたはその断片を含むことを特徴とする受容体分子。

【請求項 2】

I L - 18 R または A c P L のいずれよりも高い親和性をもって I L - 18 に結合する、請求項 1 の可溶性のヘテロ 2 量体受容体。

【請求項 3】

2 個のサブユニットを含む可溶性のヘテロ 2 量体インターロイキン 18 (I L - 18) 受容体分子であって、該サブユニットの夫々はペプチドに付加した I L - 18 R または A c P L の可溶性部分を含み、ここで、2 個の該サブユニットは前記付加ペプチドを介して会合することを特徴とする受容体分子。

【請求項 4】

各ペプチドが免疫グロブリン鎖またはその断片である、請求項 3 の可溶性の受容体。

【請求項 5】

各ペプチドが免疫グロブリン重鎖またはその断片である、請求項 3 の可溶性の受容体。

【請求項 6】

各ペプチドがロイシンジッパーの一部である、請求項 3 の可溶性の受容体。

【請求項 7】

該サブユニットが化学的架橋により会合している、請求項 1 の可溶性の受容体。

【請求項 8】

該サブユニットが単一のポリペプチド鎖を形成する、請求項 1 の可溶性の受容体。

【請求項 9】

前記 I L - 18 R および A c P L がヒト由来である、請求項 1 の可溶性の受容体。

【請求項 10】

請求項 1 の可溶性のヘテロ 2 量体 I L - 18 および製薬的に受容できる担体を含む製薬組成。

【請求項 11】

請求項 1 の可溶性のヘテロ 2 量体受容体を製造する方法であって、2 個の該サブユニットを、化学的に架橋することにより、ペプチドリンカーで連結することにより、または組換え法により直線的ポリペプチド鎖を形成することにより、会合することを特徴とする方法。

【請求項 12】

可溶性の 2 量体受容体を製造するための組成物であって、ペプチドに付加された I L - 18 R の可溶性部分を含む融合タンパク質のためのコード配列を含むキメラポリヌクレオチド、およびペプチドに付加された A c P L の可溶性部分を含む融合タンパク質のためのコード配列を含むキメラポリヌクレオチドを含むことを特徴とする組成。

【請求項 13】

請求項 12 のキメラポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 14】

請求項 13 の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

可溶性のヘテロ 2 量体受容体を製造する方法であって、前記融合タンパク質の両方が発現される条件下で請求項 14 の細胞を培養すること、および前記タンパク質を収得することを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 8 の可溶性受容体をコード化するポリヌクレオチド。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

請求項 16 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 18】

請求項 17 の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 19】

単鎖の可溶性ヘテロ 2 量体受容体を製造する方法であって、単鎖ヘテロ 2 量体受容体が発現される条件下で請求項 18 の細胞を培養し、そして前記タンパク質を収得することを含んで成る方法。

【請求項 20】

IL - 18 の効果を阻害する方法であって、請求項 1 の可溶性、ヘテロ 2 量体 IL - 18 受容体を哺乳動物に投与することを含んで成る方法。

10

【請求項 21】

IL - 18 の発現または IL - 18 受容体を有する細胞の過剰なもしくは不適切な活性と関連した病理学的状態を治療する方法であって、その様な治療を必要とする患者に、有効量の、請求項 1 の可溶性、ヘテロ 2 量体 IL - 18 受容体分子を投与することを特徴とする方法。

【請求項 22】

前記患者がヒトである、請求項 21 の方法。

【請求項 23】

前記病理学的状態が自己免疫不全または炎症状態である、請求項 21 の方法。

【請求項 24】

該病理学的状態がリュウマチ性関節炎または多発性硬化症である、請求項 21 の方法。

20

【請求項 25】

哺乳動物における IL - 18 仲介炎症または IL - 18 仲介免疫応答を抑制する方法であって、その様な治療を必要とする患者に、有効量の、請求項 1 の可溶性、ヘテロ 2 量体 IL - 18 受容体分子を投与することを含んで成る方法。

【請求項 26】

該哺乳動物がヒトである、請求項 25 の方法。

【請求項 27】

IL - 18 分子を検出する方法であって、IL - 18 分子を含むであろう試料を、標識付けされている、請求項 1 の可溶性、ヘテロ 2 量体 IL - 18 受容体分子と接触させること

30

を含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヘテロ 2 量体を含む、たとえば可溶性の多量体インターロイキン 18 (IL - 18) 受容体分子に関する。

【0002】

発明の背景

以前 IFN - (インターフェロンガンマ) 誘導因子と呼ばれたインターロイキン 18 (IL - 18) は、多くの生物活性を示すサイトカインである。これらの生物活性は、細胞、たとえば活性化された T - または NK - 細胞上の細胞表面、すなわち細胞質膜、に IL - 18 分子が結合することにより仲介される。IL - 18 受容体は、少なくとも 2 個のサブユニットを含む。すなわち IL - 18 R (IL - 1 R 関連タンパク質、IL - 1 R r p、IL - 18 R、2 F I または「結合鎖」としても知られる) および A c P L (副タンパク質様 IL - 18 - A c P L、IL - 18 R または「信号鎖」としても知られる) である。高い親和性をもって IL - 18 に結合する作用物質に対する需要がある。このような作用物質は、たとえば試料中の IL - 18 を検出するために、または、たとえば細胞表面に存在する IL - 18 受容体への IL - 18 の結合に干渉することにより、IL - 18 により仲介される病理学的状態を治療するために使用できる。

40

【0003】

50

発明の記述

本発明は、たとえば可溶性の、多量体 I L - 1 8 受容体分子 (s I L - 1 8 R) に関するものであって、少なくとも 2 個のサブユニットを含み、その内の 1 つは、受容体 I L - 1 8 R の細胞外ドメインまたはその断片もしくは変形を含み、他方は受容体 A c P L の細胞外ドメインまたはその断片もしくは変形を含むものであって、ここで、前記可溶性受容体分子は I L - 1 8 R または A c P L ポリペプチドのいずれか単独よりも、高い親和性をもって I L - 1 8 に結合している。好ましくは、s I L - 1 8 R は、I L - 1 8 に結合する高い親和性を示す。好ましい具体例において、可溶性 I L - 1 8 受容体は、上述した如く 2 個の異なるサブユニットを含むヘテロ 2 量体受容体である。

【 0 0 0 4 】

「可溶性」の多量体受容体は、本明細書において、その受容体のサブユニットの夫々が、受容体の細胞外ドメインの一部または全てを含むが、細胞膜内に完全長受容体を通常維持する膜貫通ドメインの一部または全てを欠いている、多量体受容体を意味する。かくて、たとえば、その様な可溶性受容体またはそのサブユニットの 1 個が哺乳動物細胞内で組替式的に産生される場合、それは、細胞表面に残るよりは、むしろ細胞質膜を通して組換え型宿主細胞から分泌され得る。一般的には、本発明の可溶性受容体は、水溶液に溶解できる。然しながら、ある条件下では、受容体は、標準的手段で容易に溶解する封入体の形であり得る。「多量体」または「ヘテロ多量体」により、2 個またはそれ以上の異なるサブユニットを含むことを意味する。「ヘテロ 2 量体」受容体は、2 個の異なるサブユニットを含む。

10

20

【 0 0 0 5 】

本発明の好ましい具体例において、ヘテロ 2 量体 I L - 1 8 受容体の 1 個のサブユニットは、I L - 1 8 R の 1 以上の生体機能 (生物活性) を示し、そして他のサブユニットは、A c P L の 1 以上の生体機能 (生物活性) を示す。ここで使われている、I L - 1 8 R の「生物活性」という術語は、少なくともある程度、I L - 1 8 に結合する、および / または A c P L の I L - 1 8 への、または他分子への結合を調節する (たとえば、促進する、変化する) 能力を意味する。I L - 1 8 に結合する、および / またはその様な結合を調節する他のポリペプチド、またはその断片もしくは変形もまた本発明に含まれる。

【 0 0 0 6 】

「高親和性結合」は、ここに約 1 0 0 p M から 約 1 n M を意味する。「低親和性結合」は、ここに約 1 0 n M から 約 1 0 0 n M を意味する。I L - 1 8 結合を測定する幾つかの分析法に関する記述については、例 4 を参照のこと。

30

本発明の 1 具体例において、I L - 1 8 R - および A c P L - 含有サブユニットは、化学的架橋により会合する。

他の具体例において、I L - 1 8 R および A c P L サブユニットは、I L - 1 8 R および A c P L の可溶部分に付加している、抗体分子のペプチドたとえばロイシンジッパー部分のような部分または同様なものを介して会合している。

他の具体例において、I L - 1 8 R および A c P L サブユニットは、単鎖ポリペプチドを形成する (に存在する) 。

40

【 0 0 0 7 】

本発明は、I L - 1 8 を含むであろう試料中の I L - 1 8 を検出する方法にも関するものであって、該試料を、標識付けされている上述の如き可溶性のヘテロ 2 量体 I L - 1 8 受容体と接触させることおよび該標識を検出することを含む。

本発明はまた、過剰な、または不適切な量を含む I L - 1 8 の発現、および / または I L - 1 8 受容体を操作する細胞の過剰または不適切な活性と関連した状態 (たとえば病理学的状態) を治療したりまたは予防したりする方法にも関するものであって、その様な治療を必要とする患者に、有効量の、上述の如き可溶性のヘテロ 2 量体の I L - 1 8 受容体を投与することを含む。

【 0 0 0 8 】

本発明の可溶性の、多量体 I L - 1 8 受容体は、いかなる適切な方法でも、たとえば、サ

50

ブユニットを個別に調製し次いでそれらを会合させるか、または既にサブユニットを含む巨大分子を調製することにより、調製できる。IL-18に結合するおよび/またはIL-18にポリペプチドの結合を調整するいかなる受容体ポリペプチドも本発明に含まれることを理解すべきであるが、明瞭にするために、本出願の開示は、主としてIL-18RおよびAcPLに焦点を置いている。

【0009】

IL-18およびAcPLは、マウスおよびヒトの両方を起源として特徴付けられ、クローン化され、配列付けをされ、およびそれらの多くから精製されている。またそれらは、少なくとも他の哺乳動物種、たとえば牛、ブタ、種々のヒト以外の霊長類起源のものから特徴付けられている。IL-18RおよびAcPLの精製、操作、および/またはクローン化、および/またはそれらの配列の開示については、たとえば、Dinarelli (1999), *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 11-24; Torigoe et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25, 737-742; Parnet et al. (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 3967-70; EP864 585 およびEP850 952; WO97/31010; 米国特許No. 5,776,731; またはGreenfeder et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13, 757-765;あるいはBorn et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273, 29, 445-450を参照せよ。

10

【0010】

IL-18RおよびAcPLの機能ドメインは、同定されている。たとえば、ヒトIL-18Rの少なくとも1個の分離株は、細胞外ドメイン(アミノ酸1-310)、膜貫通領域(アミノ酸311-332)および細胞質ドメイン(アミノ酸332-522)を従えたシグナルペプチド(アミノ酸-19から-1まで)を含む(WO97/31010)。ヒトAcPLの少なくとも1個の分離株は、細胞外ドメイン(アミノ酸1-342)、膜貫通領域(アミノ酸343-367)および細胞質ドメイン(アミノ酸368-585)を従えたシグナルペプチド(アミノ酸-14から-1まで)を含む(Born et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 29, 445-50)。

20

【0011】

本発明の可溶性の、ヘテロ2量体受容体サブユニットは、もし上に定義したように、生物活性が保たれかつ分子が可溶性のままであるならば、IL-18RまたはAcPLの細胞外ドメインまたはその断片に加えて、シグナル塩基配列の配列、膜貫通領域、および/または受容体の細胞質ドメイン、あるいはこれらの領域の断片を含むことができる。これらの部分は、野生型分子と同じような直線配列または相対的配置である必要はなく、また内部的削除を含むことができる。

30

【0012】

本発明の受容体サブユニットは、シグナルペプチド配列の全てもしくは一部を含むことができ、または全く含まないこともできる。IL-18RまたはAcPLの細胞外ドメイン、および上に定義した如く夫々の受容体ポリペプチド鎖からの、任意に、1またはそれ以上の他の部分を含む分子は、ここに「受容体の可溶性部分」として指定される。この時、分子は可溶性でかつ上に定義した如き活性を示す。

40

【0013】

受容体ポリペプチドの可溶性部分の単離は、上記参照に開示されているような、通常の、当業者に認識されている手順を用いて、本質的に完全長の受容体の単離から始めることができる。本質的に完全長の受容体IL-18RまたはAcPLは、種々の*in vivo*の供給源から(たとえば、肺、脾臓、上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、軟骨細胞、単球、顆粒細胞、リンパ細胞、神経細胞、など)、タンパク質(たとえば、リンパ細胞、末梢血T細胞およびNK細胞を含む造血細胞)の1または両方を発現する確立した細胞株から、受容体の1または両方を分泌するリンパ腫細胞またはその断片から、またはポリペプチド

50

を発現しおよび任意に分泌する組換え型細胞から単離できる。

【0014】

「本質的に完全長」は、上述した全てのまたはほとんど全ての受容体ドメインを含むことを意味する。結果として、本質的に完全長のタンパク質の可溶性部分を単離できる。たとえば、可溶性部分は、それが細胞に結合しようとなかろうと、1以上のタンパク質分解酵素（たとえば、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、プロメライン、パパイン、牛腸活素、コラゲナーゼ、因子IX、ポリユビキチン加工酵素、など）で、または化学的開裂（たとえば、臭化シアンなどで）により、完全長受容体ポリペプチドから開裂できる。受容体の天然発生の可溶性型（たとえば、「デコイ」受容体）もまた、ヘテロ2量体の可溶性受容体を生成するために使用できる。勿論、1以上の受容体ドメインは、前述の如く、個別に調製でき、かつ当業者に認識されている手順を用いて、「受容体の可溶性部分」を形成するために他のドメインに結合される。

10

【0015】

あるいは、いずれかの受容体の可溶性部分は、通常の方法を用いて、組換え的に調製できる。最初の工程として、その様な可溶性部分をコード化するポリヌクレオチド断片（たとえば、DNA断片）は、多種の操作の何れかにより生成される。たとえば、それは、より大きなポリヌクレオチド（たとえば、ゲノム配列、cDNA、など）から適切な制限酵素を用いて開裂できる。これは、ヒトおよびマウスのIL-18R（たとえば、Parnet et al., supra および米国特許No. 5,776,731参照）またはヒトおよびマウスのAcPL（たとえば、Born et al., supra参照）の公

20

【0016】

他の具体例においては、そのような可溶性部分をコードするポリヌクレオチド断片は、より長い鋳型からのPCR増幅により、上述の様な公表された配列に基づく適切な先駆体を選択することにより生成できる。先駆体の選択、増幅に対する条件、および増幅された断片のクローン化を含む、PCR増幅の方法は、通常のものである。たとえば、Innis, M. A. et al., 編、PCR Protocols: a guide to methods and applications, 1990, Academic Press, San Diego, CAおよびWu et al., 編、Recombinant DNA Methodology, 1989, Academic Press, San Diego, CAを参照せよ。他の具体例において、そのような可溶性部分をコード化するポリヌクレオチド断片は、化学合成によって生成できる。

30

【0017】

上述の組換え型の組合せ、または非-組換え型法、あるいは他の通常の方法もまた採用できる。勿論、1またはそれ以上の受容体ドメインに相当するポリヌクレオチド断片は、上述の如く個別に調製でき、かつ当業者に認識されている手順を用いて、「受容体の可溶性部分」に相当するポリヌクレオチドを形成するために、他のドメインをコード化する断片に結合される。

【0018】

IL-18RまたはAcPLの可溶性部分をコード化するポリヌクレオチドは一旦単離されると、種々の調整要素の制御下、種々の発現ベクターの何れかにクローン化される、そうして原核生物、酵母、および哺乳動物、昆虫または植物の細胞を含む宿主とした種々の型の細胞に、または遺伝子組換えをした、ヒトで無い動物中に発現される。好ましい具体例で、発現した可溶性部分は細胞により分泌される；天然または異種の先導配列（シグナルペプチド）を、分泌を促進するために採用できる。

40

【0019】

核酸をクローンする方法は、当業界では日常的で通常のものである。本出願に記述されている分子生物学の方法、たとえば、単離、クローン化、修飾、標識付け、操作、配列化、その他核酸および/またはタンパク質を処理または分析すること、を記述している一般的な参照のためには、たとえば、Sambrook, J. et al. (1989).

50

Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (1995). Current Protocols in Molecular Biology, N.Y., John Wiley & Sons; Davis et al. (1986), Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York; Hames et al. (1985), Nucleic Acid Hybridization, IL Press; Dracopoli, N.C. et al. Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, Inc.; および Coligan, J.E., et al. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc. を見よ。さらに、クローン化および受容体タンパク質の特徴付けに特に重点をおいて開示している他の参照には、たとえば、米国特許 No. 5,919,903、No. 5,536,657 および No. 5,776,731、EP 864 585 および WO 97/31010 が含まれる。

【0020】

可溶性受容体またはそのサブユニットをコード化する核酸は、また遺伝子組換え種を生成するために、植物または動物（たとえば、マウス種、ウサギ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒトでない霊長類、など）にもクローンできる；そうして遺伝子組換え物から発現された産物は、単離できる。この目的のための遺伝子組換え形生物を生成しおよび利用する方法は、日常的であり、以下に記述されている。たとえば、Hogan et al., (1986) Manipulating The Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Press; Krimpenfort et al., (1991) Bio/Technology 9, 86; Palmitier et al., (1985) Cell 41, 343; Kraemer et al., (1985) Genetic Manipulation of The Early Mammalian Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Hammer et al., (1985) Nature 315, 680; Purcell et al., (1986) Science 244, 1281; Wagner et al., 米国特許 No. 5,175,385；および Krimpenfort et al., 米国特許 No. 5,175,384 を参照せよ。

【0021】

本発明の「IL-18R」および「AcPL」受容体およびその可溶性部分は、天然由来または、本発明で定義されている如く、その変化がポリペプチドの通常の機能を本質的に変更しない、意図的に形成された、野生型のヒトまたはマウスの受容体の種々の変形（誘導体）またはその断片を含む。

【0022】

その様な変形ポリペプチドは、野生型マウスまたはヒトの受容体の匹敵する部分に本質的同一性を示す。本発明で使用されている如く「本質的同一性」または「本質的類似性」という用語は、ポリペプチド（または核酸）が、少なくとも約10から約100またはそれ以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドの比較窓のいたるところで、参照配列に対して少なくとも約90%の配列同一性、または好ましくは少なくとも約95%の、あるいはより好ましくは参照配列に対して少なくとも約98%の配列同一性を有する配列を含むことを示す。2つのポリペプチド配列が本質的に同一であるという証拠は、1つのタンパク質が、第2のタンパク質に対して生じた抗体と免疫学的に反応性があることである。2個の核酸配列が本質的に同一である証拠は、第1の核酸がコード化するポリペプチドは、第2の核酸によりコード化されるポリペプチドと免疫学的に交差反応性があることである。

【0023】

本発明の変形ポリペプチドは、1個以上の天然由来の（たとえば天然の突然変異を通じて

）または非天然由来の（たとえば、位置指定の変異誘発によるような意図的な修飾による）修飾、たとえば、保守的なまたは非保守的な何れかの、挿入、削除および/または置換、を有するポリペプチドを含む。「保守的な置換」によりは、Gly、Ala；Val、Ile、Leu；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；およびPhe、Tyrのような組合せによることを意味する。変形は、たとえば同族体、突然変異タンパク質、および模倣体を含むことができる。変換後の修飾を含む多種のタンパク質修飾が含まれる。

【0024】

変換後修飾は、天然由来または合成的に産生された、他の化学的部分、たとえばグリコシル基、リピド、リン酸塩、アセチル基、などとの共有または凝集的抱合体を、およびまたたとえば、末端アミノ酸の開裂も同様に含む。たとえば、米国特許No. 5, 935, 835に開示された修飾を参照せよ。本発明は、生物活性に対して本質的でないシステイン残基は、削除されるかまたは他のアミノ酸で置換されているポリペプチドのような変形をも含む。それにより正しくない分子内ジスルフィド架橋の形成；代替りのmRNAスプライシングで生じる天然由来の変形；および遺伝子多形（たとえば対立変動）を反映する変更型、を防止する。受容体ポリペプチドの「断片」は、切り取られた分子が好ましい生物活性を保持する限り、如何なる長さの、およびポリペプチドの如何なる部分からのものでもあり得る。

10

【0025】

本発明の可溶性のヘテロ2量体受容体またはそのサブユニットは、治療目的のためまたは検出のために有益である、ポリペプチドの少なくとも1つに結合するまたは組み込まれる部分を含むことができる。検出可能な部分は、たとえば放射性同位元素、放射性核種、燐光および蛍光体、生物発光標識、などであり得る。

20

【0026】

本発明は、また本発明の可溶性ヘテロ2量体受容体のサブユニットに相当する核酸（たとえば融合タンパク質）、または単鎖の可溶性ヘテロ2量体受容体に関する。その様な核酸は、その発現を支配するコード配列および調節配列の両方を含む。そのようなヘテロ2量体受容体（たとえば、マウスもしくはヒトのIL-18RまたはAcPL受容体、あるいはペプチドリンカーの可溶性部分）の部分に相当する核酸配列は、相当する野生型分子をコード化する核酸に対して本質的同一性を示す。2個の核酸に「本質的同一性」を与える性質は、上記に定義されている。2個の核酸が本質的な同一性を示すさらなる証拠は、2個の分子が選択された高度にストリンジェントな条件下で互いに混成することである。

30

【0027】

高度にストリンジェントな条件は、配列に依存し、環境パラメーターが異なれば異なる。一般的には、高度にストリンジェントな条件は、定められたイオン強度およびpHで、特定の配列に対する熱融解点（ T_m ）より約5 から20 低く選択する。 T_m は、標的配列の50%が完全に合致したプローブに混成する温度（定められたイオン強度およびpH下）である。典型的には、高度にストリンジェントな条件は、塩濃度がpH 7で少なくとも約0.2モル濃度、および温度が少なくとも約60 の条件であろう。

【0028】

本発明の核酸は、1以上の天然または非天然由来の修飾、突然変異、多形、などを含むことができる；そして該核酸は、遺伝子コードの変質を反映して、基本組成に関して野生型の対照物とは異なることができる。

40

種々の通常の、当業者に認識された方法は、可溶性のヘテロ2量体（または多量体）のIL-18受容体分子を形成するために2個（またはそれ以上）の異なるサブユニットを会合させる（たとえば、共有または非共有で結合する；結びつける；付着する；架橋する；連結する；つなぐ）ために使用できる。可溶性のヘテロ2量体または多量体受容体を生成、精製、および特徴付ける典型的な方法を、下記に開示する。

【0029】

たとえば、WO 97/31010；WO 99/37772；米国特許No. 5, 91

50

9, 903; 米国特許No. 5, 470, 952; Croze et al. (1996) Eur. Cytokine Network, First Joint Meeting of the ICS and ISICR; およびArudini et al. (1999) Protein Science 8, 1867-77を見よ。本発明の可溶性ヘテロ2量体を形成するためにサブユニットを会合するために使用できる一般的種類の方法は、たとえば、1) 化学的架橋によりサブユニットを結びつける; 2) 融合または混成タンパク質生成のためにIL-18RおよびAcPLの可溶性部分に、ペプチドのような部分を追加する、そうして追加された部分を介して融合または混成タンパク質を連結する; 3) ポリペプチド鎖を形成するためにIL-18RおよびAcPLの可溶性部分を連結する、ことを含む。

10

【0030】

最初の範疇で、種々の通常の方法のどれでも、2個のポリペプチド鎖を化学的に結びつける(架橋する)ために使用できる。共有結合は、現存する側鎖の直接縮合(たとえば、システイン残基間のジスルフィド結合の形成)または外部架橋分子の組み入れのいずれかにより、達成できる。多くの2価のまたは多価の試薬がポリペプチドを結びつけるのに有益である。

【0031】

一般に、使用される架橋剤は、たとえば - アミノ基またはチオール基と反応する2官能基試薬である。これら架橋剤は、2つの範疇に分類できる。すなわち、同質 - および異質 - 2官能基試薬である。同質2官能基試薬は、たとえば遊離のチオール(たとえば、ジスルフィド結合の還元で生成された)と反応でき、そうしてたとえば、5, 5' - ジチオビス(2 - ニトロ安息香酸)(DNFB)およびo - フェニレンジマレイミド(O-PDM)を含むことができる。これらは、そのような遊離のチオールを有する2個のポリペプチド間にチオエーテル結合を形成できる。異質2官能基試薬は、それが第2のポリペプチドと反応できるようにするポリペプチドに、反応基を導入できる。

20

【0032】

たとえば、N - サクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)は、遊離チオール基を導入するために1級アミノ基と反応できる。他の化学的架橋剤は、たとえばカルボジイミド、ジソシアネート、ジアゾベンゼン、ヘキサメチレンジアミン、ジマレイミド、グルタルアルデヒド、4 - サクシンイミジル - オキシカルボニル - メチル(2 - ピリジルチオ)トルエン(SMPT)およびN - サクシンイミジル - Sアセチルチオ酢酸(SATA)を含む。ポリペプチドをその様な試薬と架橋する操作は、当業者に良く知られている。たとえば、Pierce Immuno Technology Catalog & Handbook (1991) E8 - E39; Karpovskiy et al. (1984) J. Exp. Med. 160, 1686; Liu et al. (1985) Proc. Natl Acad. Sci. 82, 8648; Segal et al. 米国特許No. 4, 676, 980(1987年6月30日)およびBrennen (1986) Biotech. 4, 424を参照せよ。

30

【0033】

架橋剤の2個の反応基の間のスペーサーアームは、種々の長さで化学的組成を有するだろう。スペーサーアームが長いほど、共役ポリペプチドの柔軟性はよくなる。一方、架橋のある特定の成分(たとえばベンゼン基)は、反応基により大きい安定性を与える、または種々の観点の作用に対して化学結合の耐性を増す(たとえば、還元剤に対するジスルフィド結合の抵抗力)。下記のようなペプチドリンカーまたはリンカーペプチドのようなペプチドスペーサーの使用もまた企てられている。

40

【0034】

会合方法の第2の範疇は、注目の受容体の可溶性部分に種々の部分(たとえば、ペプチド、本発明で時々「ペプチドリンカー」または「融合ドメイン」とよばれる)のいずれかを付加するために使用でき、これにより交配種または融合タンパク質を生成する、そうして交配種または融合タンパク質は、付加部分を介して会合される。付加ペプチドを介する可

50

能な会合の多くの型の内の幾つかを、図1Bに図示する。

1具体例において、ビオチンおよびアビジン(ストレプトアビジン)のような部分は、通常の方法を用いて、受容体の可溶性部分に複合する、そうしてこれらの部分は2個のサブユニットを会合するために相互に作用する。

【0035】

好ましい具体例において、付加された部分は、ペプチド(「ペプチドリinker」)である。使用される広汎なペプチドリinkerの中に、GST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)融合タンパク質、またはその2量化モチーフ; PDZ2量化ドメイン; FK-506BP(結合タンパク質)またはその2量化モチーフ; p53の天然または人工の螺旋-回転-螺旋2量化ドメイン、およびタンパク質Aまたはその2量化ドメイン、ドメインB、がある。

10

最も好ましい具体例において、付加ペプチドは、ロイシンジッパーの成分である。ロイシンジッパー部分は、しばしばヒトの転写因子c-junおよびc-fosから取られる。例5は、ヘテロ2量体sIL-18Rを生成するためのロイシンジッパーの使用を示している。

【0036】

他の最も好ましい具体例において、付加ペプチドは、免疫グロブリン、たとえば、IgA、IgM、IgD、IgE、または好ましくはIgG、の部分である。たとえば、1個の可溶性受容体部分に、重鎖の定常部領域を含むペプチド、またはその断片を付加し、そうして他の受容体部分に、軽鎖の相当する定常部領域、またはその断片を付加する。好ましくはこの時に、ヒンジ領域からのチオール含有アミノ酸が存在する。このように、2個の付加部分は、抗体鎖の夫々に付加した可溶性受容体部分を持つFab断片に似た分子を生成するために、たとえばジスルフィド結合を介してお互いに結合できる。

20

【0037】

他の具体例において、付加部分は、免疫グロブリン重鎖の部分(たとえば定常部領域のCH₂部分および/またはCH₃部分を含む)である。この重鎖は、2量化重鎖に通常責任のあるジスルフィド結合を介して会合でき、それにより各抗体鎖に付加した可溶性受容体部分と共にFc断片に類似した分子を形成する。例6は、ヘテロ2量体のsIL-18Rを生成するために付加されたIgG断片を含む受容体サブユニットの使用を説明している。

30

【0038】

勿論、2個のサブユニットは、如何なる相対的順番または配位で配置した、上述の部分の如何なる組合せ、たとえば、ロイシンジッパー部分および免疫グロブリンドメインの連結配置、を介しても会合できる。

本発明の「ペプチドリinker」は、「IL-18R」および「AcPL」受容体に関して、上述の如何なる型の断片または「変形」をも含む。

【0039】

ペプチドリinkerは、2個のサブユニットがお互いの活動を、たとえば立体障害により干渉することを防止し、また適度なタンパク質折り畳みをするために適度の柔軟性を与えるべきである;しかしながら、2個のサブユニットが、好ましくは高い親和性でIL-18に結合するための適切な空間配置を取るために、必要に応じてお互いに干渉できるようにすべきである。それ故、たとえばさらに別の「第2のリンカー部分」または「ヒンジ部分」に付加することにより、その長さ、アミノ酸組成、および/または構造を変えることによりペプチドリinkerを修飾することが望ましいだろう。

40

【0040】

多種の第2のリンカー部分の中には、たとえば、小さな、好ましくは中性および極性または非極性の、種々の長さおよび組合せで、たとえばグリシン、セリン、スレオニンまたはアラニンのようなアミノ酸の索;ポリリジン;などがある。代わりに、複数のリンカーおよび/または第2のリンカー部分が使用できる。柔軟なヒンジ領域、たとえば、例として、ヒトのIgGのヒンジ領域、またはある間隔でセリンもしくはスレオニンにより遮られ

50

たポリグリシン反復を使用することが時には望ましい。

【0041】

ペプチドリンカーの長さや組成は、可溶性受容体の望ましい性質、たとえばIL-18に結合するその能力、を最適化するために、当業界の熟練者により容易に選択できる。IL-18への結合の通常の測定法を、下記に述べる。たとえば、例4およびThomas et al. (1998). *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 1077-1088 (BIAコアチップについてヘテロ2量体に結合したIL-18); Torigoe et al. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 25737-25742 (細胞に結合したI^{1 2 5}-IL-18); Born et al. (2000). *J. Immunol.* 164, 3246-3254 (I^{1 2 5}-IL-18のヘテロ2量体への結合と引き続くプロテインAへの固定化); Born et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 29445-29450 (IL-18誘発NF- κ Bレポーター遺伝子活性化の阻害); Novick et al. (1999) *Immunity* 10, 127-136 (IL-18誘発IFN- γ 産生の阻害(これはまた動物で測定できる)); およびWO97/31010 (in vitroまたは動物のいずれかで、プロスタグランジンE₂合成の阻害を測定する間接的測定法)である。

【0042】

ペプチドリンカーは、当業界で通常の技術の一つ、たとえば、上述の化学的共役(必要ならば、適切なアミノ酸基の誘導体化後); ビオチン/アビジン相互作用を介する付加; 当業界で認識されている方法によりペプチドの共有結合(たとえば適切な酵素を使用); 組換え方法; またはそれらの組合せ、に明らかである種々の方法により、交配種または融合分子を形成するために受容体の可溶性部分に付加できる。本発明の「交配」タンパク質は、受容体の可溶性部分を含む部分およびリンカーペプチドを含む部分が、ペプチド連結以外の連結を介して(たとえば、化学共役によりまたはビオチン/アビジン相互作用を介して)連結しているタンパク質である。本発明の「融合」タンパク質は、その様な部分が、好ましくは組換え操作により達成されるペプチド結合により連結されているタンパク質である。

【0043】

組換え型融合タンパク質を作る方法は、通常のものであり、以下に記述されている。たとえば、Ashkenazi et al. (1991) *PNAS* 88, 10535; Byrn et al. (1990) *Nature* 344, 677; Hollenbaugh et al. (1992) "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins," in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pp. 10.19.1 to 10.19.11; WO93/10151; および米国特許No. 5,457,035である。典型的な方法を、例5および6に示す。各融合タンパク質は、1個の発現ベクターに独立に発現されるか、または2またはそれ以上の融合タンパク質が同じ発現ベクターに発現される。一般的に、融合タンパク質には、形質移入体(形質転換体)の選択を容易にするために、選択可能な標識で印しを付ける。

【0044】

可溶性受容体部分は、2個のサブユニットが会合する際に、1個または両方のサブユニットが望ましい生物活性を示す能力に該連結が干渉しないなら、可溶性受容体部分はそのN-末端またはC-末端のいずれかを介して連結するように、各サブユニットに配置できる。好ましい具体例において、2個の可溶性受容体部分は、N-末端領域内に在る分子の「作動部分」への物理的制約を最小にするために、そのC-末端を介して連結する。配位の幾つかの可能な型を、図1Bに示す。

【0045】

上述の如く形成された交配または融合分子の対は、非共有または共有結合により付加した部分を介してお互いに会合できる。非共有結合は、たとえば、ロイシンジッパー、ビオチン

ンノアビジン相互作用、水素結合、van der Waals力、疎水性相互作用、などを含む。可能な共有結合には、たとえば、天然に生成するジスルフィド結合（たとえば、修飾されたFabまたはF(ab')₂断片の形成）、または上述の如く化学的架橋反応により形成される結合がある。付加は、in vitro（たとえば、試験管内で）または細胞内で起こりえる。

【0046】

好ましい具体例において、付加は細胞内で起こる。夫々が2個の異なる融合タンパク質のうち1個をコード化している。2個の離れたキメラポリヌクレオチドは、同じ宿主細胞内に形質移入され、そうして共発現される。その様に産生された融合ポリペプチドは、細胞内または分泌中にお互いに連結すると信じられている。それらは、細胞溶解物から精製され、または好ましくは、細胞から分泌され、そうして培養培地から精製される。たとえば、例5および6を参照せよ。2個の融合タンパク質は、同一の発現ベクターまたは2個の異なる発現ベクターのいずれかから発現できる。

10

【0047】

もし望ましければ、細胞内で産生される2個の組替え型融合タンパク質の相対的な量は、たとえば、異なる強度の促進因子からそれらを発現することにより規制できる。たとえば、もしサブユニットAの付加ペプチドが高周波数でホモ2量体を生じ、一方サブユニットBの付加ペプチドが低周波数でホモ2量体を生じるならば、サブユニットBをサブユニットAよりも遥かに高い水準で発現させることにより、望ましいヘテロ2量体の形成を促すことができる。最適な相対的な量は、日常的な実験で経験的に決定できる。

20

【0048】

本発明はまた、上述の如く融合タンパク質をコード化するキメラポリヌクレオチド、その様な融合タンパク質を発現する宿主細胞、および該融合タンパク質が発現したタンパク質を収穫（回収）するような条件下でその様な細胞を培養することを含むその様な融合タンパク質を作る方法にも関する。本発明の融合タンパク質は、上述の様にキメラポリヌクレオチドのin vitro変換によっても作れる。本発明はまた、本発明の新規交配または融合タンパク質と免疫反応する抗体（たとえば、モノクローナル抗体）にも関する。

【0049】

会合方法の第3の範疇では、組替え型技術は、単鎖のポリペプチド分子を形成するために、枠組みの中で、2個の受容体の夫々の可溶性部分を連結するために用いられる。図1Cは、幾つかの可能な組合せを図示している。好ましくは、受容体部分は、ある長さまたはアミノ酸組成、最も好ましくは柔軟なループ構造のリンカーペプチドによりお互いから離れており、これにより2個の受容体部分は、最適な相互作用のためにお互いから適切な距離および適当な配置にある。

30

【0050】

典型的なリンカーペプチドは、小さな、好ましくは中性の、および極性または非極性何れかの、種々の長さおよび組合せで、たとえば、グリシン、セリン、スレオニンまたはアラニンのようなアミノ酸の索；ポリリジン；などである。リンカーペプチドは少なくとも1個のアミノ酸をもつことができるし、500またはそれより多いアミノ酸を有するだろう。好ましくは、リンカーは約100個より少ないアミノ酸、最も好ましくは約10個から30個のアミノ酸である。ヒトのIgGのヒンジ領域またはある間隔でセリンもしくはスレオニンにより遮られたポリグリジン反復のような柔軟なリンカードメインは、単独でまたは他の部分との組合せで使用できる。

40

【0051】

その様な直線的な単鎖のヘテロ2量体受容体を生成するために使用できる組替え体方法は、通常のものである。さらに、2個の可溶性受容体部分が、可溶性のヘテロ2量体受容体の最適機能を発揮させる距離および配置で並ぶように、定例的な操作でリンカーペプチドを選択しパラメーターを最適化できる。米国特許No. 4, 935, 233およびNo. 4, 751, 180を参照せよ。

【0052】

50

本発明はまた、上述の如き単鎖のヘテロ2量体の可溶性受容体分子をコード化するキメラポリヌクレオチド；その様なタンパク質を発現する宿主細胞；タンパク質が発現する条件下でそのような細胞を培養し収穫（回収）することを含むその様なタンパク質をつくること；およびその様な新規の単鎖ポリペプチドと免疫反応的な抗体（たとえば、モノクローナル抗体）にも関する。本発明の単鎖ヘテロ2量体可溶性受容体はまた、*in vitro*でのその様なキメラポリヌクレオチドの変換により作られる。

【0053】

上述の如きヘテロ2量体受容体に加えて、可溶性IL-18受容体は、如何なる組合せ（たとえば、IL-18Rの2個の複製およびAcPLの1個の複製；IL-18RおよびAcPL夫々2個の複製；IL-18RおよびAcPL夫々の3または4個の複製、など）においても、3個以上の受容体サブユニットを連結するために、上記方法の何れか1つを外挿するかまたはそれらの組合せによって、作る事ができる。幾つかの可能な変形を、図1Dに要約してある。

10

好ましくは、可溶性2量体受容体は、「単離される」、たとえば、天然に起こる以外の形で、たとえば、緩衝液で、キットまたは医薬品成分の一部として、再調製を待つ乾燥形で、などである。

【0054】

種々の通常の方法は、本発明の可溶性受容体を単離および/または精製するために使用できる。望ましい精製度は、タンパク質の意図した用途に依存するだろう。たとえば、*in vitro*のIL-18結合研究は、時によると1個以上の受容体サブユニットをコード化するベクターで形質移入された細胞からの上澄み液を使って実施される。典型的に、受容体は、本質的に精製される。ここで使用される術語「本質的に精製される」は、本質的に汚染内生物質、たとえば、例として他のタンパク質、リピド、炭水化物、核酸およびそれが天然に会合している他の生物物質、を含まない受容体に関する。たとえば、本質的に純粋な分子は、少なくとも、関心事の分子の、重量で、約60%、好ましくは約70%、80%、90%、95%、または99%である。

20

【0055】

本発明の可溶性受容体および/またはそのサブユニットは、可溶性タンパク質（好ましくは培養液中に分泌されたあとで）として、またはそれらは、たとえば、8Mのグアニジニウム塩酸塩および透析によりそれらから定量的に抽出される、封入体としてのいずれかで、細胞から回収できる。使用できる通常の方法は、たとえば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および/またはゲル濾過を含む。好ましい具体例において、親和性クロマトグラフィーは、たとえば、IL-18または他の適切な配位子；適切なレクチン、たとえば、例として小麦胚芽凝集素；ある種の可溶性受容体に存在するFc部分に結合できるプロテインAまたはプロテインG；またはIL-18Rおよび/またはAcPLに対し特異的な抗体を含むカラムで使用される。

30

【0056】

ことに好ましい具体例において、各受容体は、適切な親和性カラムに結合できる部分、好ましくは開裂可能なもので「標識付け」される。たとえば、1個または両方のサブユニットは、金属キレートクロマトグラフィーによる迅速な精製が出来るように、ポリHis（たとえば、His₆）；ストレプトアビジンに結合しイミノピオチンで溶出できるStreep-標識；アミロースに結合し、マルトースで溶出できるマルトース結合タンパク質（MBP）；または親和性クロマトグラフィーにより分離できる他のその様な部分で、標識付けられる。代わりに、1または両方のサブユニットを抗体があるエピトープ、たとえば、FLAG（商標）ペプチド、Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys（Eastman Kodak Co., Scientific Division, New Haven, CTより入手可能）で標識付けできる。

40

【0057】

他のその様な抗原識別子は米国特許No. 5,011,912およびHopp et al

50

． (1 9 8 8) *Bio / Technology* 6, 1 2 0 4 に述べられている (その様なエピトープの付加により、たとえば、選択的免疫沈降反応、ウエスタンブロットでの検出、またはバイオアッセイにおける活性減耗 / 阻害ができる) 。親和性標識を使用する典型的な方法については、たとえば、*Recombinant Protein Protocols: Detection and Isolation*, Rocky S. Tuan 編、*Methods in Molecular Biology*, Vol. 63, Humana Press, 1997 ならびに例 5 および 6 を見よ。上述の標識付け法の何れの組合せも勿論使用できる。

【 0 0 5 8 】

もし 2 量体受容体の調製方法が、ヘテロ 2 量体のみならずホモ 2 量体の形成をもたらすなら、好ましいヘテロ 2 量体は、2 つの型の間での差別化を許す種々の操作の何れか、たとえば、クロマトグラフィー技術、または調製用、非変性アクリルアミドゲルからの受動的溶出、によりホモ 2 量体から分離できる。最も好ましい具体例において、夫々のサブユニットは異なる標識をつけられ、二重に標識を付けられた 2 量体の可溶性受容体は、標識を 1 個だけ付けたホモ 2 量体から、親和クロマトグラフィーにより分離される。例 5 および 6 を参照せよ。

受容体の純度は、たとえば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、およびアミノ末端アミノ酸配列解析を含む標準的方法を用いて測定できる。

【 0 0 5 9 】

本発明はまた、その過剰なまたは不適切な量を含み、および / または IL - 1 8 受容体を処理する細胞の過剰なまたは不適切な活性を持つ、IL - 1 8 の発現に関連した状態 (たとえば、病理学的条件) を治療または防止する方法にも関するものであって、その様な治療を必要とする患者への上述の如く有効量の可溶性、ヘテロ 2 量体 IL - 1 8 受容体の投与を含むものである。如何なる機構にも束縛されることを望むものではないが、本発明の可溶性、ヘテロ 2 量体 IL - 1 8 受容体は、IL - 1 8 に結合することにより、かくしてそれを機能的に不活性化し、および / または天然の受容体への内生 IL - 1 8 の結合を競うことにより、IL - 1 8 拮抗薬として働くだろうことが示唆される。

【 0 0 6 0 】

あるいは、また如何なる機構にも束縛されることを望むものではないが、本発明の可溶性、ヘテロ 2 量体 IL - 1 8 受容体は、たとえば、身体の特定の場所に IL - 1 8 を隔離するための「流し」として働くことにより、それによりそれらの場所での IL - 1 8 の有効濃度を増加することにより、IL - 1 8 作動薬として働くだろう。

【 0 0 6 1 】

IL - 1 8 の活性は、たとえば、天然キラー (NK) 細胞の細胞毒性の誘発 ; 細胞溶解性 T 細胞反応の促進 ; 活性化 T および NK 細胞の増殖の刺激 ; 休息および活性化 T および NK 細胞による IFN - γ の誘発を含む、多数のサイトカインの規制 (刺激または抑制) ; $T_H - 1$ - 型ヘルパー細胞応答の促進 ; および破骨細胞増殖の阻害を含む。本発明の可溶性 IL - 1 8 受容体と接触することにより IL - 1 8 を妨害したり修飾したりすることは、これらの、または他の、IL - 1 8 により仲介される活性のいずれをも調整することができ、そうして直接的または間接的に、IL - 1 8 により仲介される状態または疾患を改善するために使用できる。IL - 1 8 が疾患を (直接的にまたは間接的に) 引き起こしたり、または憎悪したりする時に、疾患は IL - 1 8 により仲介されるといえる。

【 0 0 6 2 】

本発明の可溶性 2 量体受容体を、それを必要とする患者に投与することにより治療または予防できる多くの IL - 1 8 関連の状態には、種々の炎症状態 (例えば、慢性炎症) 、免疫疾患 (たとえば、自己免疫性またはアロ抗原誘発の) およびアレルギー疾患がある。治療または予防できる状態には、たとえば、エンドトキシン血症に関わる肝毒症、敗血症性ショック、ならびに多発性硬化症、リウマチ性関節炎、Crohn 病、狼そう腎炎、乾癬、喘息、悪性貧血、萎縮性胃炎、Wegener 肉芽腫症、円盤状紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸疾患、甲状腺機能高進症、自己免疫溶血性貧血、重症筋無力症、全身

10

20

30

40

50

性紅斑性狼瘡、Addison病、Hodgkin病、種々の白血病（たとえば、ALL、CLL、AML、およびCMLを含む）、HIV感染症、過剰のIFN- γ の産生または投与から生じる敗血症性ショック、インスリン耐性および若年型糖尿病、アトピー性皮膚炎、および急性または慢性移植拒絶（たとえば、移植臓器対個体反応疾患）を含む自己免疫性脱髄疾患がある。

【0063】

当業界の技術の1つで、本発明の可溶性2量体受容体の活性を、種々の適切な*in vitro*もしくは細胞培養分析法のいずれかで、または動物モデルで、測定可能である。たとえば、その様な受容体が拮抗薬または作動薬として働いているかを決定でき、および活性の量を定量できる。幾つかのその様な分析法がここに議論されている。他の*in vitro*法は、たとえば、移植臓器対個体反応疾患を評価する系（たとえば、例としてFanslow et al. (1990) Science 248, 739-741を見よ）およびたとえば多発性硬化症のような自己免疫脱髄疾患に対する動物モデル（たとえば、EAEモデル）を含む。

10

【0064】

MSの動物モデルの記述のためには、たとえば、Gold et al. (2000). Mol. Med. Today 6, 88-91 およびSwanborg (1995). Clin. Immunol. Immunopathol. 77, 4-13を見よ。可溶性受容体を試験するためにEAE動物モデルを用いる幾つかの方法の記述のためには、たとえば、Jacobs et al. (1991). J. Immunol. 146, 2983-2989 およびSelmaj et al. (1995). J. Neuroimmunol. 56, 135-141を見よ。またDinarelli (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103, 11-24も見よ。

20

【0065】

本発明の可溶性受容体は、他の匹敵する治療薬に対して記述されているような、通常の用量および投与方法を用いて投与できる。

投与用量は、当業界の熟練者に知られている通常の手順で測定できる。たとえば、The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, 編, Macmillan Publishing Co., New Yorkを見よ。一般に、有効用量は、望ましい効果、たとえば、天然の受容体への内生のIL-18の結合を阻害するに十分な量である。

30

【0066】

用量は、副作用、たとえば、望ましからぬ交差反応、アナフィラキシー反応、など、を生じる程多すぎてはいけない。考慮すべき因子は、含まれる特定の薬剤の活性、薬剤の代謝安定性および作用時間、投与の方法および時間、薬剤の組合せ、排泄速度、治療されている種、年齢、体重、一般的健康、性別、食事、および治療下の宿主の特定の疾患状態の重度を含む。たとえば、本発明の受容体に対する適切な治療の処方計画は、約1 ng/kg/日と約10 mg/kg/日の間の用量を患者に投与することを含む。

【0067】

適切な投与方法は、非経口および非経口以外の投与を含む。非経口経路は、たとえば、静脈内、動脈内、門脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、髄空内、くも膜下、脳室内、頭蓋内、胸膜内または他の注射経路を含む。非経口以外の投与経路は、たとえば、経口、経鼻、経皮、経肺、直腸内、舌下、経膈、眼を含む。投与はまた、連続的輸液、局部投与、埋め込み（ゲル、膜、など）からの徐放、および/または静脈注射によるだろう。

40

【0068】

種々の方法の投与に有益な医薬品組成のための、賦形剤、希釈剤および/または担体を含む処方成分は、当業界で通常のものであり、たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18版, Mack Publishing Company, 1990に記述されている。受容体を、たとえば、薬理的に受容できる

50

液体、固体、または半固体担体で、担体または標的分子（たとえば、抗体、ホルモン、成長因子、など）に連結して、処方することができ、および/または *in vivo* での投与前に、リポソーム、マイクロカプセルまたは徐放調製品（ヘテロ2量体受容体を発現する細胞を含む）内に取り込むことができる。

【0069】

本発明はまた、IL-18分子を検出する方法（たとえば、実験的または診断的方法）に関するものであって、IL-18分子を含む試料を、標識付けられている請求項1の可溶性、ヘテロ2量体IL-18受容体分子と接触させることを含むものである。通常の部分の受容体を、たとえば放射性または蛍光性物質で標識付けし、そうして標識を検知するために使用できる。その様な分析法は、勿論定量的にできる。1具体例において、その様な分析法は、関心事の薬剤が、受容体（たとえば、ヒトまたはマウスの細胞；試験管内で、培養液内で、または動物内で）に結合するために入手できるIL-18の量を細胞内で、増加したり減少したりすることを、および/または、それがIL-18の生物活性（たとえば、可溶性受容体に結合する）を調節する（阻害または促進する）ことを、測定するために使用される。幾つかの具体例においては、交差種試薬、たとえば、ヒトのIL-18に結合するマウス受容体、が使用できる。

10

【0070】

本発明の分析法は、たとえば、試薬の実験的性格付けのため、有望な治療薬の選別のため、体液中のIL-18の水準により示せる疾患の診断のため、または治療の効果を監視するため、に使用できる。

20

本発明の種々の他の特色および付随する長所は、本発明を付図に関連して考慮するとより良く理解できるので、より完全に認められるであろう：

【0071】

さらなる詳細説明なしに、当業者は、前記の記述を用いて、本発明を極限まで利用できる。前記の好ましい特定の具体例は、従って、単に例示的であって、如何なる風にも開示の残余を限定するものではないと解釈すべきである。

前記のおよび下記の例において、全ての温度は摂氏度（ $^{\circ}\text{C}$ ）で補正をせずに示され；そうでないと示さない限り、全ての割合と百分率は重量による。

上記または下記で引用した、および図面中の全ての特許出願、特許および出版物の全開示は、ここに参照により組み入れられている。

30

【0072】

例

1. ヒトおよびマウスのIL-18受容体のクローニング

ヒトおよびマウスのIL-18受容体は、逆転写-合成酵素連鎖反応（RT-PCR）によりクローンされ得る。たとえば、マウス受容体サブユニットIL-18R（受け入れ番号U43673）およびAcPL（受け入れ番号AF077347）は、以下の様にクローンされる。すなわち、全RNAは、AKR/Jマウスから誘導される、マウスT細胞クローンDorrisから調製される。RTは、オリゴ-dT先駆体を用いるClontech社製“Advantage RT-for-PCR kit”を使用し、実施される。そうして引き続くPCRは、2個のサブユニットのコード配列の5'および3'末端に相当する先駆体を用いて実施される。完全長cDNAは、5'および3'先駆体中に改変された制限酵素部位を介して、真核細胞発現ベクターpcDNA3.1(-)MYCHISBまたはpcDNA3.1(-)PUR (Invitrogen)中にクローンされる。マウスのIL-18RおよびAcPLのcDNAの配列は確認される。

40

【0073】

2. mIL-18Rを発現する安定な細胞株の形成

ヒト胚性腎臓線維芽細胞株293は、マウスのIL-18に応答しない。図1Aは、293細胞中のマウスIL-18（Peprotech）への応答能が、マウスのIL-18RおよびAcPLの発現ベクター両方の過渡的形質移入後に、最適であることを示す。293細胞は、示した如く、Effectene (Qiagen)を用いて、IL-18R

50

および A c P L 発現ベクターと共に、NF - B 依存ルシフェラーゼレポーター遺伝子プラスミド (C l o n t e c h) で共 - 形質移入される。形質移入の 24 時間後、細胞は、さらに 4 時間 I L - 18 に暴露される。I L - 18 誘発 NF - B は、細胞溶解質中でルシフェラーゼ活性により測定される。

【 0 0 7 4 】

安定な、ネオマイシン耐性 293 クローンは、 - M y c 抗体を用いるウエスタンブロット法により測定される如く、組換え型タンパク質で C - 末端 M y c 標識を認識する、完全長マウス I L - 18 R を発現することを立証される。図 1 B は、このクローンでの I L - 18 応答能がマウス A c P L の過渡的形質移入を必要とすることを示す。マウス I L - 18 R および A c P L 両方を発現する、安定なネオマイシン - およびプロマイシン - 耐性 293 クローンが、生成される。

【 0 0 7 5 】

3 . I L - 18 結合研究

I L - 18 R および A c P L 両方を発現する 293 細胞の安定なクローンを、融合まで 6 孔プレートで培養する。細胞を P B S で 1 回洗浄する。細胞を、0.5 mL P B S 中、室温で 15 分間、100,000 c p m (~ 10 n M) の I ¹²⁵ - I L - 18 (B o l t o n - H u n t e r R e a g e n t) とインキュベートする。そうして、全結合を測定する。非特定結合を、インキュベーション中に 1 μ M の冷 I L - 18 を含むことにより測定する。細胞抽出物を 10 % の S D S 中で溶解により調製する。遊離 I L - 18 は、結合 I L - 18 を鉱油を通して旋回させて分離する。結合 I L - 18 の量は、シンチレーションカウンターで直接計数して測定する。

高い親和性 I L - 18 受容体が I L - 18 R および A c P L サブユニットを含むことを示す、重要な特定結合が観測できる。

【 0 0 7 6 】

【表 1】

表 1

結合 (CPM + SD)	実験 #1	実験 #2
全体	15349 ± 142	13888 ± 582
非特異的	8546 ± 162	4063 ± 380
特異的	6803 ± 304	9825 ± 962

【 0 0 7 7 】

4 . I L - 18 結合および / または活性を測定する i n v i t r o 分析法

(A) N F - B 形成

マウスの胸腺腫株 E L 4 で、I L - 18 は同種の受容体に結合し、転写因子 NF - B の迅速形成をもたらす。NF - B は、電子移動度位相分析法 (E M S A) により核抽出物中に検出できる。I L - 18 結合の障害は、細胞刺激前に - I L - 18 抗体または可溶性 I L - 18 受容体と共にタンパク質のインキュベーションをすることにより測定できる。

【 0 0 7 8 】

たとえば、マウス I L - 18 は、P B S、T o r r e y P i n e 社製ウサギ - マウス I L - 18 ポリクロナール抗体、対照ウサギ血清 I g G ; R e s e a r c h D i a g n o s t i c 社製ラット - マウス I L - 18 モノクロナール抗体、対照ラット I g G 2 a、またはホモ 2 量体 I L - 18 R - F c 融合タンパク質の何れかと前混合する。37 で 2 時間のインキュベーション後、混合物は E L - 4 細胞を刺激するために使用される。

IL - 18の最終濃度は50 ng/mLである。30分後、細胞は収穫され、核抽出物が調製される。EMSAは、NF- κ Bコンセンサスプローブ(Santa Cruz)を用いて実施される。

【0079】

(B) NF- κ B依存ルシフェラーゼ活性

図2Aおよび2Bは、IL-18がマウスIL-18およびAcPL両方を過渡的または安定的に発現する293細胞にルシフェラーゼ活性を誘発することを示す。293細胞は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を促すコンセンサスNF- κ B結合部位の3個の複製を含むベクターで形質移入される。マウスIL-18は、NF- κ Bの形成を誘発する。これは次にルシフェラーゼ遺伝子を促すプロモーターを活性化する。ルシフェラーゼ活性の阻害は、可溶性IL-18受容体の機能的証明である。 10

【0080】

(C) IFN- γ 解放分析法

マウスのTh1クローンAe7は、図3に示した如く、標準ELISA(Biosource)により測定可能な、IFN- γ の意味のある量を分泌するためにマウスのIL-12およびIL-18に相乗的に応答する。IL-18の等モルのIL-18との前インキュベーションは、IgGを制御するものではないが、IFN- γ 分泌を阻害する。分析法は、可溶性IL-18受容体がIFN- γ 産生を阻害する能力を試験するために使用できる。

【0081】

図3に示す例において、Ae7細胞を、抗原で刺激してから7日間静置し、次いで96孔のプレートに 5×10^5 細胞/mLで置く。IL-12(5 pM)またはIL-18(100 pM)を加える。ラット-マウスIL-18モノクローナル抗体または複基準標本に合わせたラットIgG2aを、培地に加える前に、37°Cで2時間、IL-18(等モル)と前インキュベートする。48時間後、培養培地中のIFN- γ の量を、Biosource IFN- γ Cytoscreen ELISA kitを用いて測定する。

【0082】

(D) 免疫沈降法

IL-18または可溶性IL-18受容体のIL-18への直接結合は、共-免疫沈降実験により測定できる。たとえば、Fc抗体を用いて、IL-18をIL-18または可溶性IL-18受容体のFc-融合版の何れかと共沈できる。IL-18をウエスタンブロット法で検出できる。この方法で、IL-18と可溶性IL-18受容体の間の相互作用を定量的に測定する。 30

【0083】

たとえば、RDIラット-マウスIL-18モノクローナル抗体またはラットIgG2a複基準制御参照抗体を、4°Cで1時間、30 μ Lの(50% v/v)タンパク質A/Gアガロースビーズ(Sigma)と混合する。ビーズを冷PBSで3回洗浄し、1M NaClを含む0.5 mL PBSに再懸濁する。マウスIL-18(10 ng)を加え、混合物を4°Cで1時間インキュベートする。ビーズを洗浄し、免疫沈降したタンパク質をSDS-PAGEにより溶解する。ウエスタンブロット法を、Torrey Pine ウサギ-マウスIL-18ポリクローナル抗体を用いて実施する。 40

【0084】

(E) BIAコア

Thomassen et al. (1998) J. Inf. Cys. Res. 18 : 1077-1088に叙述された如く、BIAコア分析法により、IL-18および可溶性IL-18受容体の間の相互作用の定量的測定をする。

【0085】

5. 可溶性IL-18受容体-ロイシンジッパーヘテロ2量体

「PCR縫製」を、キメラマウスのIL-18受容体タンパク質をコード化するDNA配 50

列を生成するために使用する。たとえば、マウスの I L - 1 8 R (A A 1 - 3 1 4) の細胞外領域を、ヒト c - F O S タンパク質のロイシンジッパー (L Z) 領域 (A A 1 6 1 - 1 9 9) に融合する。マウスの A c P L (A A 2 0 - 3 4 4) の細胞外領域を、ヒト c - J U N タンパク質の L Z 領域 (A A 2 7 7 - 3 1 5) に融合し、p - F L A G - C M V - 1 (S i g m a 社) に挿入する。したがって、この融合タンパク質は、N - 末端 F L A G 標識を含む。I L - 1 8 R - L Z f および A c P L - L Z j キメラタンパク質をコード化する発現ベクターを、2 9 3 細胞に過渡的に形質移入する。細胞抽出物は、4 8 時間後に調製し F O S - J U N ヘテロ 2 量体は、- F L A G 抗体カラムを使って精製する。L Z ヘテロ 2 量体中のマウス I L - 1 8 R および A c P L 両方の存在を、ウエスタンブロット法により確認する。

10

【0086】

ヒトの 2 9 3 細胞を、F L A G - A c P L - L Z j u n、I L - 1 8 R - L z f o s、または E f f e c t e n e (Q i a g e n) を用いて両方で、過渡的に形質移入する。細胞抽出物を調整し、タンパク質試料 (5 μ L) を S D S - P A G E により溶解する。F O S - J U N ヘテロ 2 量体は、- F L A G 抗体 (S i g m a) により 2 重形質移入抽出物から免疫沈澱し、F L A G ペプチド (S i g m a) により溶出する。精製ヘテロ 2 量体の試料 (5 μ L) もまた同じゲル中に溶解する。ウエスタン移動後、ブロットを、- F L A G (S i g m a) または - F O S (S a n t a C r u z) 抗体のいずれかで精査する。

20

【0087】

6. 可溶性 I L - 1 8 受容体 - F c ヘテロ 2 量体

例 5 に述べた如く、マウスの I L - 1 8 R および A c P L の細胞外領域を、マウス免疫グロブリン (亜種) F c (C H 1 と C H 2 の間のヒンジ域、A A 2 2 1 から出発する) に融合し、かん状ウイルスの発現ベクターに挿入する。組換え型かん状ウイルスを生成し、融合タンパク質を S f 9 昆虫細胞に共発現する。2 量体 I L - 1 8 受容体を - F c および - F L A G 抗体カラムを用いて精製する。精製タンパク質調製品は、A c P L ホモ 2 量体および I L - 1 8 R / A c P L ヘテロ 2 量体の集団からなる。細胞を、A c P L 発現ウイルスに比べて 3 倍多い I L - 1 8 R 発現ウイルスで感染することにより、ヘテロ 2 量体の収率を促進できる。可溶性 I L - 1 8 受容体 F c ヘテロ 2 量体の存在を、ウエスタンブロット法により確認する。

30

【0088】

S f 2 1 細胞を、I L - 1 8 R - F c、F L A G - A c P L - F c、またはモル比 ~ 3 : 1 の両方で、感染する。2 重感染物からの上澄み液を 4 8 時間後に収穫し、- F L A G 抗体カラム (S i g m a) を通して処理する。上澄み液試料、カラム通過液、カラム洗浄液、および溶出液を、S D S - P A G E により溶解する。ウエスタンブロット法を、- マウス F c 抗体 (S i g m a) を用いて実施する。未変性の溶出液試料もまた S D S - P A G E により溶解する。

【0089】

7. I L - 1 8 受容体ヘテロ 2 量体を試験するための i n v i t r o 分析法および i n v i v o モデル

(A) I n v i t r o。I n v i t r o で I L - 1 8 を阻害する可溶性 I L - 1 8 受容体ヘテロ 2 量体の能力を試験するための分析法は、上記の例 2、3、および 4 に記述されたものを含む。

(B) I n v i v o。I n v i v o で I L - 1 8 を阻害する可溶性 I L - 1 8 受容体ヘテロ 2 量体の能力を試験するためのモデルは、下記のものを含む：P. a c n e s / L P S 処理ヌードマウスでの肝臓障害 (O k a m u r a e t a l . (1 9 9 5) N a t u r e 378: 88 - 90) ; S J L マウスでの P L P 誘発、養子移入実験的自己免疫脳脊髄炎 (L e o n a r d e t a l . (1 9 9 5) J . E x p . M e d . 181: 381 - 386) ; および D B A / 1 マウスでの I I 型コラーゲン誘発関節炎 (G r a c i e e t a l . (1 9 9 9) J . C l i n I n v e s t . 104: 1393 -

40

50

1401)。

【0090】

前記の例は、そこで用いられた本発明の一般的にまたは特定に記述された反応物および/または操作条件を置き換えることにより、同様の成功をもって繰り返せる。

前記の記述から、当業界の熟練者は、本発明の本質的な特徴を容易に保証でき、本発明の精神および範囲から離れること無く、種々の用途や状態に適応させるために、本発明の種々の変化や修正をすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヘテロ2量体および多量体の幾つかの例を示す。パネルAは、化学的架橋を図示する；パネルBは、付加した部分を介しての連結を図示する（一般的な付加ペプチド；抗体断片の重鎖/軽鎖相互作用；抗体断片の重鎖/重鎖相互作用）；パネルCは、単鎖ポリペプチドを図示する；およびパネルDは、4量体を図示する。

10

【図2A】

図2Aは、IL-18Rおよび/またはAcPL発現ベクターで形質移入された293細胞でのIL-18応答能を示す。

【図2B】

図2Bは、IL-18Rを発現するおよびAcPL発現ベクターで形質移入される細胞でのIL-18応答能を示す。

【図3】

図3は、IL-12およびIL-18はAe7細胞内でIFN- γ 分泌を相乗的に誘発することを示す。

20

【図1-1】

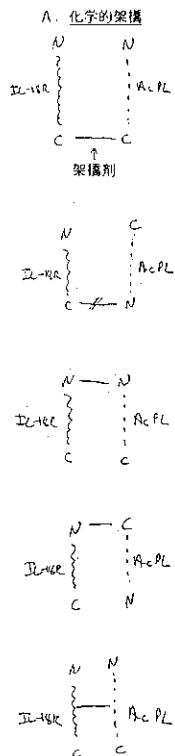
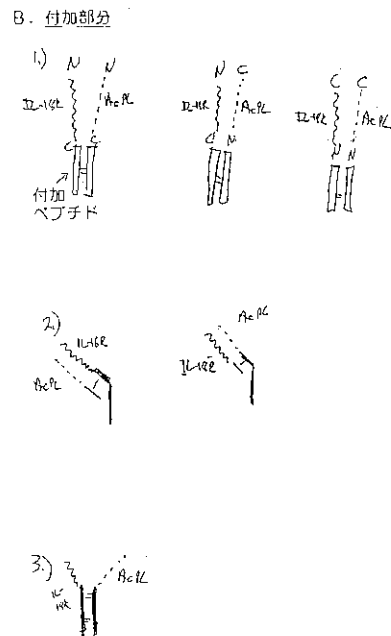
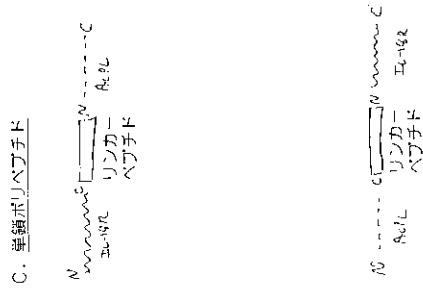
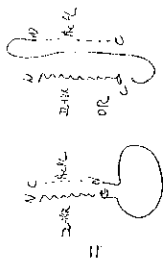


FIGURE 1

【図1-2】

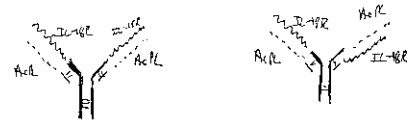


【 図 1 - 3 】



【 図 1 - 4 】

D. 4 鎖体



【 図 2 A 】

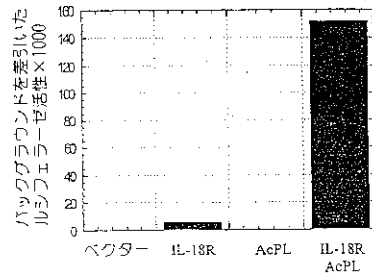


FIGURE 2A

【 図 2 B 】

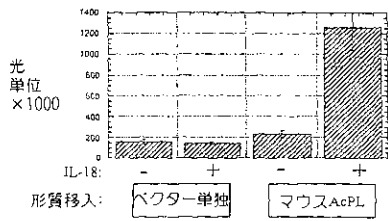


FIGURE 2B

【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
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08272 A2

- (51) International Patent Classification: **C07K 14/435**
- (71) Applicant for all designated States except US: **SCHERING AKTIEGESELLSCHAFT** [DE/DE], 13133/2 Berlin (DE).
- (21) International Application Number: **PCT/US01/22863**
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants for US only: **LEUNG**, Stewart [US/US], Apt. 802, 1260 Brighton Avenue, Albany, CA 94706 (US); **PEREZ, H.**, Daniel [US/US], 214 McAllister, Kentfield, CA 94904 (US); **MIYAMOTO**, Neil [US/US], 214 Sausalito Street, Corte Madera, CA 94925 (US).
- (22) International Filing Date: **29 July 2001 (20.07.2001)**
- (74) Agents: **ZELANO**, Anthony, J. et al.; Milten, White, Zelano & Branigan, P.C., Arlington Courthouse Plaza 1, Suite 1400, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (U.S.).
- (25) Filing Language: **English**
- (26) Publication Language: **English**
- (30) Priority Data:

60/219,447	29 July 2000 (20.07.2000)	US
09/508,394	19 July 2001 (19.07.2001)	US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:

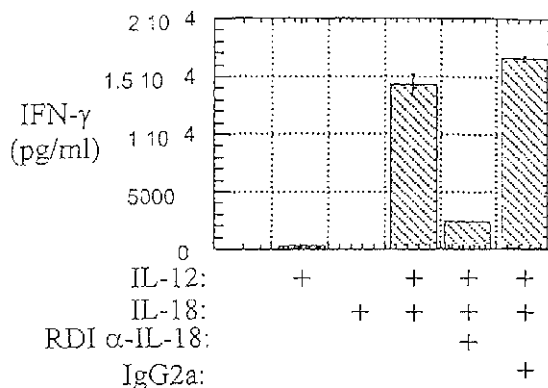
US	60/219,447 (CIP)
Filed on	29 July 2000 (20.07.2000)
US	Not furnished (CIP)
Filed on	19 July 2001 (19.07.2001)
- (81) Designated States (optional): **AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GG, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,**

[Continued on next page]



WO 02/08272 A2

(54) Title: HIGH AFFINITY SOLUBLE INTERLEUKIN 18 RECEPTOR



(57) Abstract: A soluble, heterodimeric interleukin 18 (IL-18) receptor molecule is described which comprises two subunits, one of which comprises an extracellular domain, or a fragment thereof, of IL-18R, and the other of which comprises an extracellular domain, or a fragment thereof, of AcPL. Preferably, the soluble, heterodimeric receptor binds to IL-18 with higher affinity than does either IL-18R or AcPL alone.

WO 02/08272 A2 

MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, 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, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-1-

HIGH AFFINITY SOLUBLE INTERLEUKIN-18 RECEPTOR

This application claims the benefit of the filing date of U.S. Provisional application Ser. No. 60/219,447, filed July 20, 2000.

Field of the Invention

This invention relates, *e.g.*, to soluble multimeric, including heterodimeric, interleukin 18 (IL-18) receptor molecules.

Background of the Invention

Interleukin-18 (IL-18), formerly called IFN- γ (interferon gamma)-inducing factor, is a cytokine which exhibits many biological activities. These biological activities are mediated by the binding of IL-18 molecules to cell surface, or plasma membrane, receptors on cells, *e.g.*, activated T- or NK-cells. IL-18 receptors comprise at least two subunits: IL-18R (also known as IL-1R-related protein, IL-1Rrp, IL-18R α , 2F1 or the "binding chain") and AcPL (also known as accessory protein-like, IL-18-AcPL, IL-18R β or the "signalling chain"). There is a need for agents which bind to IL-18 with high affinity. Such agents can be used, *e.g.*, to detect IL-18 in a sample or to treat pathological conditions mediated by IL-18, *e.g.* by interfering with the binding of IL-18 to IL-18 receptors located on the surface of cells.

Description of the Invention

This invention relates, *e.g.*, to soluble, multimeric IL-18 receptor molecules (sIL-18R), comprising at least two subunits, one of which comprises an extracellular domain, or a fragment or variant thereof, of the receptor IL-18R, and another of which comprises an extracellular domain, or a fragment or variant thereof, of the receptor AcPL, wherein said soluble receptor molecules bind to IL-18 with a higher affinity than does either the IL-18R or the AcPL polypeptide, alone. Preferably, the

-2-

sIL-18R exhibit high affinity binding to IL-18. In a preferred embodiment, the soluble IL-18 receptor is heterodimeric, containing two different subunits as described above.

By "soluble" multimeric receptor is meant herein a multimeric receptor, each of whose subunits comprises part or all of an extracellular domain of a receptor, but lacks part or all of the transmembrane domain which normally retains the full length receptor in the cell membrane. Thus, for example, when such a soluble receptor or one of its subunits is produced recombinantly in a mammalian cell, it can be secreted from the recombinant host cell through the plasma membrane, rather than remaining at the surface of the cell. In general, a soluble receptor of the invention is soluble in an aqueous solution. However, under certain conditions, the receptor can be in the form of an inclusion body, which is readily solubilized by standard procedures. By "multimeric" or "heteromultimeric" is meant comprising two or more different subunits. A "heterodimeric" receptor contains two different subunits.

In a preferred embodiment of the invention, one subunit of a heterodimeric IL-18 receptor exhibits one or more of the biological functions (activities) of IL-18R, and the other exhibits one or more of the biological functions (activities) of AcPL. The term, a "biological activity" of IL-18R, as used herein, means the ability to bind to IL-18, at least to some extent, and/or to modulate (*e.g.*, enhance, change) the binding of AcPL, or another molecule, to IL-18. The term, a "biological activity" of AcPL, as used herein, means the ability to bind, at least to some extent, to IL-18, and/or to modulate (*e.g.*, enhance, change) the binding of IL-18R, or another molecule, to IL-18. Other polypeptides, or fragments or variants thereof, which bind to IL-18, and/or which modulate such binding, are also encompassed by the invention.

By "high affinity binding" is meant herein about 100 pM to about 1 nM. By "low affinity binding" is meant herein about 10 to about 100 nM. See Example 4 for a description of some assays for measuring IL-18 binding.

In one embodiment of the invention, IL-18R- and AcPL-containing subunits are associated by chemical cross-linking.

In another embodiment, IL-18R and AcPL subunits are associated via moieties, such as peptides, for example leucine zippers, portions of antibody molecules, or the like, which are appended to soluble portions of IL-18R and AcPL.

In another embodiment, IL-18R and the AcPL subunits form (are present in) a single polypeptide claim.

This invention also relates to a method for detecting IL-18 in a sample which may contain IL-18, comprising contacting the sample with a soluble, heterodimeric IL-18 receptor as above which is labeled, and detecting the label.

This invention also relates to a method of treating or preventing a condition (*e.g.*, a pathological condition) associated with expression of IL-18, including excessive or inappropriate amounts thereof, and/or with excessive or inappropriate activity of cells possessing IL-18 receptors, comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a soluble, heterodimeric IL-18 receptor as above.

The soluble, multimeric IL-18 receptors of the invention can be prepared in any suitable manner, *e.g.*, by preparing the subunits individually and then associating them, or by preparing a macromolecule which already comprises the subunits. Although it is to be understood that any receptor polypeptide which binds to IL-18 and/or which modulates the binding of a polypeptide to IL-18 is encompassed by the invention, for clarity this application disclosure is focused primarily on the receptors IL-18R and AcPL.

IL-18R and AcPL have been characterized, cloned and sequenced from both murine and human sources, and have been purified from many of them; and they have been at least characterized from other mammalian species such as, *e.g.*, bovine, porcine and various non-human primate sources. For procedures to purify, manipulate and/or clone IL-18R and AcPL, and/or for a disclosure of their

sequences, see, e.g., Dinarello (1999). *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 11-24; Torigoe *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25,737-742; Parnet *et al.* (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 3967-70; EPs 864 585 and 850 952; WO97/31010; U.S. Patent 5,776,731; or Greenfeder *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13,757-765; or Born *et al.* (1998). *J. Biol. Chem.* 273, 29,445-450.

Functional domains of IL-18R and AcPL have been identified. For example, at least one isolate of human IL-18R comprises a signal peptide (amino acid -19 to -1), followed by an extracellular domain (amino acid 1-310), a transmembrane region (amino acid 311-332) and a cytoplasmic domain (amino acid 333-522) (WO 97/31010). At least one isolate of human AcPL comprises a signal peptide (amino acid -14 to -1), followed by an extracellular domain (amino acid 1-342), a transmembrane region (amino acid 343-367) and a cytoplasmic domain (amino acid 368-585) (Born *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 29,445-50). A subunit of a soluble, heterodimeric receptor of the invention can comprise, in addition to an extracellular domain or a fragment thereof of IL-18R or AcPL, sequences from the signal sequence, the transmembrane region, and/or the cytoplasmic domain of the receptor, or fragments of these regions, provided that biological activity as defined above is retained and the molecule remains soluble. These moieties need not be in the same linear arrangement or relative orientation as in the wild type molecule, and they can comprise internal deletions. A receptor subunit of the invention can contain all or part of a signal peptide sequence, or none at all. A molecule containing an extracellular domain of IL-18R or AcPL and, optionally, one or more other moieties from the respective receptor polypeptide chains as defined above, wherein the molecule is soluble and exhibits activity as defined above, is designated herein as a "soluble portion of a receptor."

To isolate soluble portions of receptor polypeptides, one can, using conventional, art-recognized procedures such as those disclosed in the above references, begin by isolating substantially full-length receptors. Substantially full-length IL-18R or AcPL can be isolated from a variety of *in vivo* sources (e.g., from

-5-

lung, spleen, epithelial cells, endothelial cells, interstitial cells, chondrocytes, monocytes, granulocytes, lymphocytes, neurocytes, etc.), from established cell lines which express one or both of the proteins (*e.g.*, hematopoietic cells, including lymphocytes, peripheral blood T cells and NK cells), from lymphoma cells which secrete one or both of the receptors or fragments thereof, or from recombinant cells which express and, optionally, secrete the polypeptides. By "substantially full-length" is meant containing all or nearly all of the receptor domains described above. Subsequently, one can isolate soluble portions of the substantially full-length proteins. For example, a soluble portion can be cleaved from a full length receptor polypeptide, whether or not it is bound to a cell, with one or more proteolytic enzymes (*e.g.*, peptidases or proteases, such as trypsin, chymotrypsin, pepsin, bromelain, papain, bovine enterokinase, collagenase, factor IX, polyubiquitin processing enzyme, or the like) or by chemical cleavage (*e.g.*, with cyanogen bromide, etc.). Naturally occurring soluble forms of the receptors (*e.g.*, "decoy" receptors) can also be used to generate heterodimeric soluble receptors. Of course, one or more of the receptor domains can be prepared individually, as described above, and then joined to other domains, using art-recognized procedures, to form a "soluble portion of a receptor."

Alternatively, soluble portions of either of the receptors can be prepared recombinantly, using conventional methods. As an initial step, polynucleotide fragments (*e.g.*, DNA fragments) encoding such soluble portions are generated by any of a variety of procedures. For example, they can be cleaved from larger polynucleotides (*e.g.*, genomic sequences, cDNA, or the like) with appropriate restriction enzymes, which can be selected on the basis of published sequences of human and murine IL-18R (see, *e.g.*, Parnet *et al.*, *supra* and U.S. Pat. 5,776,731) or human and murine ACPL (see, *e.g.*, Born *et al.*, *supra*). In another embodiment, polynucleotide fragments encoding such soluble portions can be generated by PCR amplification from longer templates, by selecting appropriate primers based on published sequences such as those above. Methods of PCR amplification, including

-6-

the selection of primers, conditions for amplification, and cloning of the amplified fragments, are conventional. See, e.g., Innis, M.A. et al., eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 1990, Academic Press, San Diego, CA and Wu et al., eds., *Recombinant DNA Methodology*, 1989, Academic Press, San Diego, CA. In another embodiment, polynucleotide fragments encoding such soluble portions can be generated by chemical synthesis. Combinations of the above recombinant or non-recombinant methods, or other conventional methods, can also be employed. Of course, polynucleotide fragments corresponding to one or more of the receptor domains can be prepared individually as described above and then joined to fragments encoding other domains, using art-recognized procedures, to form a polynucleotide which corresponds to a "soluble portion of a receptor."

Once a polynucleotide encoding a soluble portion of IL-18R or AcPL has been isolated, it can be cloned into any of a variety of expression vectors, under the control of a variety of regulatory elements, and expressed in a variety of cell types as hosts, including prokaryotes, yeast, and mammalian, insect or plant cells, or in a transgenic, non-human animal. In a preferred embodiment, the expressed soluble portions are secreted by the cell; either the natural or a heterologous leader sequence (signal peptide) can be employed to facilitate secretion.

Methods of cloning nucleic acids are routine and conventional in the art. For general references describing methods of molecular biology which are mentioned in this application, e.g., isolating, cloning, modifying, labeling, manipulating, sequencing and otherwise treating or analyzing nucleic acids and/or proteins, see, e.g., Sambrook, J. et al. (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*, N.Y., John Wiley & Sons; Davis et al. (1986), *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York; Hames et al. (1985), *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press; Dracopoli, N.C. et al. *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Inc.; and Coligan, J.E., et al. *Current Protocols in Protein Science*, John

Wiley & Sons, Inc. Other references which, in addition, disclose methods specifically drawn to cloning and characterizing receptor proteins include, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,919,903, 5,536,657 and 5,776,731, EP 864 585, and WO 9731010.

Nucleic acid encoding soluble receptors or subunits thereof can also be cloned into plants or animals (*e.g.*, murine species, rabbits, cows, pigs, goats, non-human primates or the like) to generate transgenic species; and the products expressed from the transgenes can be isolated. Methods to make and use transgenic organisms for this purpose are routine and are described, *e.g.*, in Hogan *et al.*, (1986) *Manipulating The Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Press; Krimpenfort *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9, 86; Palmiter *et al.*, (1985) *Cell* 41, 343; Kraemer *et al.*, (1985) *Genetic Manipulation of The Early Mammalian Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Hammer *et al.*, (1985) *Nature* 315, 680; Parcell *et al.*, (1986) *Science* 244, 1281; Wagner *et al.*, U.S. Patent No. 5,175,385; and Krimpenfort *et al.*, U.S. Patent No. 5,175,384.

"IL-18R" and "AcPL" receptors and soluble portions thereof of the invention encompass a variety of variants (derivatives) or fragments of wild type human or murine receptors, either naturally occurring or deliberately generated, wherein the changes do not substantially alter the normal function of the polypeptides, as defined elsewhere herein.

Such variant polypeptides exhibit substantial identity to comparable portions of wild type murine or human receptors. The term "substantial identity" or "substantial similarity" as used herein indicates that a polypeptide (or a nucleic acid) comprises a sequence that has at least about 90% sequence identity to a reference sequence, or preferably at least about 95%, or more preferably at least about 98% sequence identity to the reference sequence, over a comparison window of at least about 10 to about 100 or more amino acids residues or nucleotides. An indication that two polypeptide sequences are substantially identical is that one protein is immunologically reactive with antibodies raised against the second protein. An

indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the polypeptide which the first nucleic acid encodes is immunologically cross reactive with the polypeptide encoded by the second nucleic acid.

Variant polypeptides of the invention include polypeptides having one or more naturally-occurring (*e.g.*, through natural mutation) or non-naturally-occurring (*e.g.*, by deliberate modification, such as by site-directed mutagenesis) modifications, *e.g.*, insertions, deletions and/or substitutions, either conservative or non-conservative. By "conservative substitutions" is meant by combinations such as Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; and Phe, Tyr. Variants can include, *e.g.*, homologs, mutants and mimetics. Many types of protein modifications, including post-translational modifications, are included. Posttranslational modifications include naturally occurring or synthetically produced, covalent or aggregative conjugates with other chemical moieties, *e.g.*, glycosyl groups, lipids, phosphates, acetyl groups, etc., as well as cleavage, such as of terminal amino acid(s). See, *e.g.*, modifications disclosed in U.S. Pat. No. 5,935,835. The invention also encompasses variants such as polypeptides in which cysteine residues which are nonessential for biological activity are deleted or replaced with other amino acids, thereby preventing the formation of incorrect intramolecular disulfide bridges; naturally occurring variants arising from alternative mRNA splicing events; and altered forms reflecting genetic polymorphism (*e.g.*, allelic variation). "Fragments" of the receptor polypeptides can be of any length, and from any portion of the polypeptide, provided that the truncated molecules retain the desired biological activity.

Soluble heterodimeric receptors of the invention, or subunits thereof, can comprise moieties coupled to or incorporated into at least one of the polypeptides, which can be useful for therapeutic purposes or for detection. Detectable moieties can be, *e.g.*, radioisotopes, radionuclides, phosphorescent and fluorescent entities, bioluminescent markers, or the like.

The invention also relates to a nucleic acid corresponding to a subunit of a soluble, heterodimeric receptor of the invention (*e.g.*, a fusion protein) or to a

single chain soluble heterodimeric receptor. Such a nucleic acid can comprise both coding sequences and regulatory sequences which govern their expression. The nucleic acid sequence corresponding to a moiety of such a heterodimeric receptor (e.g., a soluble portion of a murine or human IL-18R or AcPL receptor, or a peptide linker) exhibits substantial identity to the nucleic acid encoding the corresponding wild type molecule. Properties which confer "substantial identity" upon two nucleic acids are defined above. A further indication that two nucleic acids exhibit substantial identity is that the two molecules hybridize to each other under selected high stringent conditions. High stringent conditions are sequence-dependent and will be different with different environmental parameters. Generally, high stringent conditions are selected to be about 5°C. to 20°C. lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. Typically, high stringent conditions will be those in which the salt concentration is at least about 0.2 molar at pH 7 and the temperature is at least about 60°C.

A nucleic acid of the invention can include one or more naturally- or non-naturally-occurring modifications, mutations, polymorphisms, etc.; and the nucleic acid can differ from its wild type counterpart with regard to base composition, reflecting the degeneracy of the genetic code.

A variety of conventional, art-recognized methods can be used to associate (e.g., bind, covalently or non-covalently; couple; attach; cross-link; join; connect) two (or more) different subunits to form a soluble heterodimeric (or multimeric) IL-18 receptor molecule. Typical methods of generating, purifying and characterizing soluble heterodimeric or multimeric receptors are disclosed, e.g., in WO97/31010; WO99/37772; U.S. Pat Nos 5,919,903; 5,470,952; Croze *et al.* (1996) *Eur. Cytokine Network*. First Joint Meeting of the ICS and ISICR; and Arduini *et al.* (1999) *Protein Science* 8, 1867-77. The general categories of methods which can be

-10-

used to associate subunits to form the soluble heterodimers of the invention include, *e.g.*, 1) coupling the subunits by chemical cross-linking; 2) appending a moiety, such as a peptide, to the soluble portions of IL-18R and AcPL to form fusion or hybrid proteins, and then joining the fusion or hybrid proteins via the appended moieties; and 3) linking soluble portions of IL-18R and AcPL to form a single polypeptide chain.

In the first category, any of a variety of conventional methods can be used to chemically couple (cross-link) the two polypeptide chains. Covalent binding can be achieved either by direct condensation of existing side chains (*e.g.*, the formation of disulfide bonds between cysteine residues) or by the incorporation of external bridging molecules. Many bivalent or polyvalent agents are useful in coupling polypeptides.

In general, the cross-linking agents used are bifunctional agents reactive, *e.g.*, with ϵ -amino group or thiol groups. These cross-linkers can be classified into two categories: homo- and hetero-bifunctional reagents. Homobifunctional reagents can react, *e.g.*, with free thiols (*e.g.*, generated upon reduction of disulfide bonds), and include, *e.g.*, 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DNTB), and *o*-phenylenedimaleimide (O-PDM), which can form a thioether bond between two polypeptides having such free thiols. Heterobifunctional reagents can introduce a reactive group onto a polypeptide that will enable it to react with a second polypeptide. For example, *N*-succinimidyl-3-(2-pyridyl)dithio propionate (SPDP) can react with a primary amino group to introduce a free thiol group. Other chemical cross-linking agents include, *e.g.*, carbodiimides, diisocyanates, diazobenzenes, hexamethylene diamines, dimaleimide, glutaraldehyde, 4-succinimidyl-oxycarbonyl- α -methyl α (2-pyridylthio)toluene (SMPT) and *N*-succinimidyl-S acetyl-thioacetate (SATA). Procedures for cross-linking polypeptides with such agents are well-known in the art. See, *e.g.*, Pierce ImmunoTechnology Catalog & Handbook (1991) E8-E39; Karpovsky *et al.* (1984)

J. Exp. Med. 160, 1686; Liu *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 8648; Segal *et al.* U.S. Pat. 4,676,980 (Jun 30, 1987) and Brennan (1986) *Biotech.* 4, 424.

Spacer arms between the two reactive groups of cross-linkers may have various lengths and chemical compositions. A longer spacer arm allows a better flexibility of the conjugated polypeptides, while some particular components in the bridge (*e.g.*, a benzene group) may lead extra stability to the reactive groups or an increased resistance of the chemical link to the action of various aspects (*e.g.*, disulfide bond resistance to reducing reagents). The use of peptide spacers such as the peptide linkers or linker peptides described below is also contemplated.

In the second category of association methods, conventional methods can be used to append any of a variety of moieties (*e.g.*, peptides, sometimes called herein "peptide linkers" or "fusion domains") to soluble portions of the receptors of interest, thereby generating hybrid or fusion proteins, and the hybrid or fusion proteins can then be associated via the appended moieties. Some of the many types of possible associations via appended peptides are illustrated in Figure 1B.

In one embodiment, moieties such as biotin and avidin (streptavidin) are complexed to soluble portions of the receptors, using conventional methods, and these moieties interact to associate the two subunits.

In a preferred embodiment, the appended moieties are peptides ("peptide linkers"). Among the wide variety of peptide linkers which can be used are the GST (glutathione S-transferase) fusion protein, or a dimerization motif thereof; a PDZ dimerization domain, FK-506 BP (binding protein) or a dimerization motif thereof; a natural or artificial helix-turn-helix dimerization domain of p53; and Protein A or its dimerization domain, domain B.

In a most preferred embodiment, the appended peptides are components of a leucine zipper. The leucine zipper moieties are often taken from the human transcription factors c-jun and c-fos. Example 5 demonstrates the use of a leucine zipper to generate a heterodimeric sIL-18R.

In another most preferred embodiment, the appended peptides are portions of immunoglobulins, *e.g.*, IgA, IgM, IgD, IgE, or, preferably, IgG. For example, to one soluble receptor portion is appended a peptide containing a constant region, or fragment thereof, of a heavy chain, and to another is appended a corresponding constant region, or fragment thereof, of a light chain, preferably wherein thiol-containing amino acids from the hinge region are present. In this way, the two appended moieties can bind to one another, *e.g.*, via disulfide bonds, to generate a molecule resembling an Fab fragment with soluble receptor moieties attached to each of the antibody chains. In another embodiment, the appended moieties are portions of immunoglobulin heavy chains (*e.g.*, comprising the CH₂ moiety and/or the CH₃ moiety of the constant region), which can associate via the disulfide bonds that are normally responsible for dimerizing heavy chains, thereby forming a molecule resembling an Fc fragment with a soluble receptor portion attached to each of the antibody chains. Example 6 demonstrates the use of receptor subunits comprising appended IgG fragments to generate a heterodimeric sIL18R.

Of course, two subunits can be associated via any combination of the above moieties, *e.g.*, a tandem arrangement of a leucine zipper moiety and an immunoglobulin domain, arranged in any relative order or orientation.

"Peptide linkers" of the invention encompass any of the types of fragments or "variants" described above with regard to "IL-18R" and "AcPL" receptors.

A peptide linker should provide an adequate degree of flexibility to prevent the two subunits from interfering with each others' activity, for example by steric hindrance, and to allow for proper protein folding; yet it should allow the two subunits to interact with one another as necessary in order to enable the proper spatial orientation for binding to IL-18, preferably at a high affinity. Therefore, it may be desirable to modify a peptide linker by altering its length, amino acid composition, and/or conformation, *e.g.*, by appending to it still other "secondary linker moieties" or "hinge moieties." Among the many types of secondary linker moieties are, *e.g.*, tracts of small, preferably neutral and either polar or nonpolar,

amino acids such as, *e.g.*, glycine, serine, threonine or alanine, at various lengths and combinations; polylysine; or the like. Alternatively, multiples of linkers and/or secondary linker moieties can be used. It is sometimes desirable to use a flexible hinge region, such as, *e.g.*, the hinge region of human IgG, or polyglycine repeats interrupted by serine or threonine at certain intervals.

The length and composition of a peptide linker can readily be selected by one of skill in the art in order to optimize the desired properties of the soluble receptor, *e.g.*, its ability to bind to IL-18. Conventional assays for binding to IL-18 are described, *e.g.*, in Example 4 and in Thomassen *et al.* (1998). *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 1077-1088 (IL-18 binding to heterodimer linked to BIAcore chip); Torigoe *et al.* (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 25737-25742 (¹²⁵I-IL-18 binding to cells); Barn *et al.* (2000). *J. Immunol.* **164**, 3246-3254 (¹²⁵I-IL-18 binding to heterodimer followed by immobilization on protein A); Born *et al.* (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 29445-29450 (inhibition of IL-18 induced NF- κ B reporter gene activation); Novick *et al.* (1999). *Immunity* **10**, 127-136 (inhibition of IL-18 induced IFN- γ production (which can also be measured in animals)); and WO97/31010 (an indirect assay, measuring the inhibition of prostaglandin E2 synthesis, either *in vitro* or in animals).

Peptide linkers can be appended to soluble portions of receptors to form hybrid or fusion molecules by a variety of methods which will be evident to one of ordinary skill in the art, *e.g.*, chemical coupling as described above (if necessary, following derivatization of appropriate amino acid groups); attachment via biotin/avidin interactions; covalent joining of the peptides by art-recognized methods (*e.g.*, using appropriate enzymes); recombinant methods; or combinations thereof. "Hybrid" proteins of the invention are proteins in which a moiety comprising a soluble portion of a receptor and moiety comprising a linker peptide are joined via linkages other than peptide linkages (*e.g.*, by chemical coupling or via biotin/avidin interactions). "Fusion" proteins of the invention are proteins in

which such moieties are linked by peptide bonds, preferably accomplished by recombinant processes.

Methods of making recombinant fusion proteins are conventional and are described, e.g., in Ashkenazi *et al.* (1991) *PNAS* 88, 10535; Byrn *et al.* (1990) *Nature* 344, 677; Hollenbaugh *et al.* (1992) "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins," in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pp. 10.19.1 to 10.19.11; WO93/10151; and U.S. Pat. No. 5,457,035. Typical methods are shown in Examples 5 and 6. Each of the fusion proteins can be expressed independently in a single expression vector, or two or more fusion proteins can be expressed in the same expression vector. Typically, sequences encoding the two polypeptide moieties of a fusion protein are fused in frame. Generally, fusion proteins are marked with selectable markers, in order to facilitate the selection of transfectants (transformants).

The soluble receptor portions can be oriented in each subunit so that, when the two subunits are associated, the soluble receptor portions are joined via either their N-termini or their C-termini, provided that the linkage does not interfere with the ability of one or both of the subunits to exhibit a desired biological activity. In a preferred embodiment, the two soluble receptor portions are joined via their C-termini, in order to minimize physical constraints on the "working portions" of the molecules, which lie within their N-terminal regions. See Figure 1B for illustrations of some of the possible types of orientations.

Pairs of hybrid or fusion molecules formed as described above can be associated with each other via the appended moieties by non-covalent or covalent bonds. The non-covalent bonds include, e.g., leucine zippers, biotin/avidin interactions, hydrogen bonding, van der Waals forces, hydrophobic interactions, etc. Among possible covalent bonds are, e.g., naturally forming disulfide bonds (e.g., formation of modified Fab or F(ab')₂ fragments), or bonds formed by

chemical cross-linking reactions as described above. The attachment can occur *in vitro* (e.g., in a test tube) or within a cell.

In a preferred embodiment, the attachment occurs intracellularly. Two separate chimeric polynucleotides, each encoding one of two different fusion proteins, are transfected into and co-expressed in the same host cell. Fusion polypeptides so produced are believed to join to one another within the cell or during secretion. They are then purified from a cell lysate or, preferably, are secreted from the cell and are purified from the culture medium. See, e.g., Examples 5 and 6. The two fusion proteins can be expressed either from the same expression vector or from two different expression vectors.

If desired, the relative amounts of two recombinant fusion proteins produced in a cell can be regulated, e.g., by expressing them from promoters of different strengths. For example, if the appended peptide of subunit A forms homodimers at a high frequency, whereas the appended peptide of subunit B forms homodimers at a low frequency, one can drive the formation of the desired heterodimers by expressing much higher levels of subunit B than of A. The optimal relative amounts can be determined empirically by routine experimentation.

The invention also relates to a chimeric polynucleotide encoding a fusion protein as described above, a host cell expressing such a fusion protein, and a method of making such a fusion protein comprising culturing such a cell under conditions in which the fusion protein is expressed and harvesting (recovering) the protein. A fusion protein of the invention can also be made by *in vitro* translation of a chimeric polynucleotide as above. The invention also relates to antibodies (e.g., monoclonal antibodies) immunoreactive with novel hybrid or fusion proteins of the invention.

In the third category of association methods, recombinant techniques are used to join soluble portions of each of two receptors, in frame, to form a single chain polypeptide molecule. Figure 1C illustrates some of the possible

-16-

combinations. Preferably, the receptor portions are separated from one another by a linker peptide, of any length or amino acid composition, most preferably a flexible loop structure, which allows the two receptor moieties to lie at an appropriate distance from each other and in a proper alignment for optimal interaction. Typical linker peptides contain tracts of small, preferably neutral and either polar or nonpolar amino acids such as, *e.g.*, glycine, serine, threonine or alanine, at various lengths and combinations; polylysine; or the like. The linker peptide can have at least one amino acid and may have 500 or more amino acids. Preferably, the linker is less than about 100 amino acids, most preferably about 10 to 30 amino acids. Flexible linker domains, such as the hinge region of human IgG, or polyglycine repeats interrupted by serine or threonine at certain intervals, can be used, alone or in combination with other moieties.

Recombinant methods which can be used to generate such linear, single chain heterodimeric receptors are conventional. Furthermore, routine procedures can be used to select linker peptides and to optimize parameters so that the two soluble receptor portions are aligned at a distance and in an orientation which allow optimal function of the soluble, heterodimeric receptor. See, *e.g.*, U.S. Pats 4,935,293 and 4,751,180.

The invention also relates to a chimeric polynucleotide which encodes a single chain heterodimeric soluble receptor molecule as described above; a host cell expressing such a protein; a method of making such a protein, comprising culturing such a cell under conditions in which the protein is expressed and harvesting (recovering) the protein; and an antibody (*e.g.*, a monoclonal antibody) immunoreactive with such a novel single chain polypeptide. A single chain heterodimeric soluble receptor of the invention can also be made by *in vitro* translation of such a chimeric polynucleotide.

In addition to the heterodimeric receptors described above, soluble multimeric IL-18 receptors can be made by extrapolating any of the above methods, or combinations thereof, to join three or more receptor subunits, in any combination

WO 02/06272

PCT/US01/22863

-17-

(e.g., 2 copies of IL-18R and one copy of AcPL; two copies each of IL-18R and AcPL; 3 or 4 copies of each of IL-18R and AcPL, etc.). Some of the possible variations are summarized in Figure 1D.

Preferably, a soluble dimeric receptor of the invention is "isolated," e.g., is in a form other than it occurs in nature, for example in a buffer, in a dry form awaiting reconstitution, as part of a kit or a pharmaceutical composition, etc.

A variety of conventional methods can be used to isolate and/or purify a soluble receptor of the invention. The desired degree of purity may depend on the intended use of the protein. For example, *in vitro* IL-18 binding studies are sometimes performed with the supernatants from cells transfected with a vector encoding one or more of the receptor subunits. Typically, the receptor is substantially purified. The term "substantially purified," as used herein, refers to a receptor which is substantially free of contaminating endogenous materials, such as, e.g., other proteins, lipids, carbohydrates, nucleic acids and other biological materials with which it is naturally associated. For example, a substantially pure molecule can be at least about 60%, by dry weight, preferably about 70%, 80%, 90%, 95% or 99% the molecule of interest.

Soluble receptors of the invention and/or their subunits can be recovered from cells either as soluble proteins (preferably after having been secreted into the culture fluid) or as inclusion bodies, from which they may be extracted quantitatively, e.g., by 8M guanidium hydrochloride and dialysis. Conventional purification methods which can be used include, e.g., ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, reverse phase chromatography, and/or gel filtration. In a preferred embodiment, affinity chromatography is used, e.g., with a column containing IL-18 or another appropriate ligand; an appropriate lectin, such as, e.g., wheat germ agglutinin; protein A or protein G, which can bind to the Fc moieties present in certain soluble receptors; or antibodies specific for IL-18R and/or AcPL. In a particularly

-18-

preferred embodiment, each receptor is "tagged" with a moiety, preferably a cleavable one, that can bind to an appropriate affinity column. For example, one or both subunits can be tagged with poly His (*e.g.*, His₆) to allow rapid purification by metal-chelate chromatography; with a Strep-tag which binds to streptavidin and can be eluted with iminobiotin; with maltose binding protein (MBP), which binds to amylose and can be eluted with maltose; or with any other such moiety which can be separated by affinity chromatography. Alternatively, one can tag one or both of the subunits with epitopes to which antibodies are available, such as the FLAG[®] peptide, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (available from Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, CT). Other such antigenic identifiers are described in U.S. Pat. 5,611,912 and in Hopp *et al.* (1988) *BioTechnology* 6, 1204. (The attachment of such epitopes can also allow for, *e.g.*, selective immunoprecipitation, detection on western blots, or activity depletion/blocking in bioassays.) For typical methods of using affinity tags, see, *e.g.*, *Recombinant Protein Protocols: Detection and Isolation*, Edited by Rocky S. Tuan, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 63, Humana Press, 1997 and Examples 5 and 6. Combinations of any of the above types of tags can be used, of course.

If the method of preparation of a dimeric receptor results in the formation of homodimers as well as heterodimers, the desired heterodimers can be separated from the homodimers by any of a variety of procedures which allow differentiation between the two forms, *e.g.*, chromatographic techniques or passive elution from preparative, non-denaturing acrylamide gels. In a most preferred embodiment, each of the subunits is tagged with a different tag, and doubly tagged dimeric soluble receptors are separated from singly tagged homodimers by affinity chromatography. See, *e.g.*, Examples 5 and 6.

The purity of the receptors can be determined using standard methods including, *e.g.*, polyacrylamide gel electrophoresis, column chromatography, and amino-terminal amino acid sequence analysis.

This invention also relates to a method of treating or preventing a condition (*e.g.*, a pathological condition) associated with expression of IL-18, including excessive or inappropriate amounts thereof, and/or with excessive or inappropriate activity of cells possessing IL-18 receptors, comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a soluble, heterodimeric IL-18 receptor as above. Although not wishing to be bound to any mechanism, it is suggested that the soluble, heterodimeric IL-18 receptors of the invention may act as IL-18 antagonists, by binding IL-18, thus functionally inactivating it, and/or by competing for the binding of endogenous IL-18 to its natural receptor. Alternatively, again not wishing to be bound to any mechanism, it is suggested that the soluble, heterodimeric IL-18 receptors of the invention may act as IL-18 agonists, *e.g.*, by acting as a "sink" to sequester IL-18 at particular sites in the body, thereby increasing the effective concentration of IL-18 at those sites.

Activities of IL-18 include, *e.g.*, induction of natural killer (NK) cell cytotoxicity; enhancement of cytolytic T-cell responses; stimulation of the proliferation of activated T and NK cells; regulation (stimulation or repression of) a number of cytokines, including induction of IFN- γ by resting and activated T- and NK-cells; promotion of T_H-1-type helper cell responses; and inhibition of osteoclast proliferation. Blocking or modifying IL-18 by contacting it with a soluble IL-18 receptor of the invention can modulate any of these, or other, activities mediated by IL-18, and thus can be used to ameliorate conditions or disorders mediated, directly or indirectly, by IL-18. A disorder is said to be mediated by IL-18 when IL-18 causes (directly or indirectly) or exacerbates the disorder.

Among the many IL-18 related conditions which can be treated or prevented by administering to a patient in need thereof a soluble dimeric receptor of the invention are a variety of inflammatory conditions (*e.g.*, chronic inflammation), immune disorders (*e.g.*, autoimmune or alloantigen-induced) and allergic diseases. Among the conditions which can be treated or prevented are, *e.g.*, hepatotoxicity associated with endotoxemia, septic shock, autoimmune demyelinating diseases,

-20-

including multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, Crohn's disease, lupus nephritis, psoriasis, asthma, pernicious anemia, atrophic gastritis, Wegener granulomatosis, discoid lupus erythematosus, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, hyperthyroidism, autoimmune hemolytic anemia, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, Addison's disease, Hodgkin's disease, various leukemias (including, *e.g.*, ALL, CLL, AML and CML), HIV infections, septic shock which results from production or administration of excessive IFN- γ , insulin-resistant and juvenile onset diabetes, atopic dermatitis, and acute or chronic transplant rejection (*e.g.*, Graft-versus-Host disease).

One of skill in the art can measure activity of the soluble dimeric receptors of the invention in any of a variety of suitable *in vitro* or cell culture assays, or in animal models. For example, one can determine whether such a receptor acts as an antagonist or an agonist, and can quantitate the amount of activity. Several such assays are discussed herein. Other *in vivo* methods include, *e.g.*, systems for evaluating graft vs. host reactions (see, *e.g.*, Fanslow *et al.* (1990) *Science* **248**, 739-741 and animal models (*e.g.*, the EAE model) for autoimmune demyelinating diseases such as, *e.g.*, multiple sclerosis. For a description of animal models of MS, see, *e.g.*, Gold *et al.* (2000). *Mol. Med. Today* **6**, 88-91 and Swanborg (1995). *Clin. Immunol. Immunopathol.* **77**, 4-13. For a description of some methods of using the EAE animal model to test soluble receptors, see, *e.g.*, Jacobs *et al.* (1991). *J. Immunol.* **146**, 2983-2989 and Selmaj *et al.* (1995). *J. Neuroimmunol.* **56**, 135-141.) See also Dinarello (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 11-24.

Soluble dimeric IL-18 receptors of the invention can be administered using conventional doses and delivery methods, such as those described for other, comparable therapeutic agents.

Dosages to be administered can be determined by conventional procedures known to those of skill in the art. See, *e.g.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman and Gilman, eds., Macmillan Publishing Co., New York. In general, effective dosages are those which are large enough to produce the desired

effect, e.g., blocking the binding of endogenous IL-18 to the natural receptor. The dosage should not be so large as to cause adverse side effects, such as unwanted cross-reactions, anaphylactic reactions, and the like. Factors to be considered include the activity of the specific agent involved, the metabolic stability and length of action of the agent, mode and time of administration, drug combination, rate of excretion, the species being treated, and the age, body weight, general health, sex, diet, and severity of the particular disease-states of the host undergoing therapy. For example, appropriate therapeutic regimens for a receptor of the invention involve administration to a patient of a dose of between about 1 ng/kg/day and about 10 mg/kg/day.

Appropriate methods of administration include parenteral and non-parenteral routes of administration. Parenteral routes include, e.g., intravenous, intraarterial, intraportal, intramuscular, subcutaneous, intraperitoneal; intraspinal, intrathecal, intracerebroventricular, intracranial, intrapleural or other routes of injection. Non-parenteral routes include, e.g., oral, nasal, transdermal, pulmonary, rectal, buccal, vaginal, ocular. Administration may also be by continuous infusion, local administration, sustained release from implants (gels, membranes or the like), and/or intravenous injection.

Ingredients, including excipients, diluents and/or carriers, for pharmaceutical compositions useful for the various modes of administration are conventional in the art, and are described, e.g., in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, 1990. The receptors can be formulated, e.g., in a pharmacologically acceptable liquid, solid or semi-solid carrier, linked to a carrier or targeting molecule (e.g., antibody, hormone, growth factor, etc.) and/or incorporated into liposomes, microcapsules or controlled release preparations (including cells which express the heterodimeric receptors) prior to administration *in vivo*.

-22-

The invention also relates to methods of detecting IL-18 molecules (*e.g.*, experimental or diagnostic methods), comprising contacting a sample which may contain IL-18 molecules with a soluble, heterodimeric IL-18 receptor molecule of claim 1, which is labeled. Conventional moieties can be used to label the receptors, *e.g.*, radioactive or fluorescent entities and to detect the labels. Such assays can be quantitative, of course. In one embodiment, such assays are used to determine whether an agent of interest causes an increase or decrease in a cell of the amount of IL-18 which is available for binding to a receptor (*e.g.*, human or murine cells; in a test tube, in culture, or in an animal), and/or whether it modulates (inhibits or enhances) the biological activity of IL-18 (*e.g.*, its binding to a soluble receptor). In some embodiments, cross-species reagents can be used, *e.g.*, mouse receptors which bind to human IL-18.

Assays of the invention can be used, *e.g.*, for experimental characterization of an agent; for screening for potentially therapeutic agents; for the diagnosis of diseases which can be indicated by the levels of IL-18 in bodily fluids; or to monitor the effects of treatment.

Brief Description of the Drawings

Various other features and attendant advantages of the present invention will be more fully appreciated as the same becomes better understood when considered in conjunction with the accompanying drawings:

Fig. 1 shows some examples of heterodimers and multimers. Panel A illustrates chemical cross-linking; Panel B illustrates linkage via appended moieties (generic appended peptides; heavy/light chain interactions of antibody fragments; heavy/heavy chain interactions of antibody fragments); Panel C illustrates single chain polypeptides; and Panel D illustrates tetramers.

Fig. 2A shows IL-18 responsiveness in 293 cells transfected with IL-18R and/or AcPL expression vectors.

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-23-

Fig. 2B shows IL-18 responsiveness of cells which express IL-18R and which are transfected with an AcPL expression vector.

Fig. 3 shows that IL-12 and IL-18 synergistically induce IFN- γ secretion in Ae7 cells.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The preceding preferred specific embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever.

In the foregoing and in the following examples, all temperatures are set forth uncorrected in degrees Celsius; and, unless otherwise indicated, all parts and percentages are by weight.

The entire disclosure of all applications, patents and publications, cited above or below and in the figures are hereby incorporated by reference.

Examples

1. Cloning of the human and mouse IL-18 receptors

The human and mouse IL-18 receptors can be cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). For example, the mouse receptor subunits IL-18R (Accession #U43673) and AcPL (Accession #AF077347) are cloned as follows: total RNA is prepared from the mouse T cell clone Dorris, which is derived from AKR/J mice. RT is performed using the Clontech "Advantage RT-for-PCR kit" using an oligo-dT primer, and subsequent PCR is performed using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the coding sequences of the two subunits. The full-length cDNAs are cloned, via restriction enzymes sites engineered into the 5' and 3' primers, into the eukaryotic expression vectors pcDNA3.1(-)MYCHISB or pcDNA3.1(-)PUR (Invitrogen). The sequences of the mouse IL-18R and AcPL cDNAs are confirmed.

2. Generation of stable cell lines expressing mL-18R

The human embryonic kidney fibroblast line 293 does not respond to mouse IL-18. Figure 1A shows that responsiveness to mouse IL-18 (Peprotech) in 293 cells is optimal following the transient transfection of both mouse IL-18R and AcPL expression vectors. 293 cells are co-transfected with an NF- κ B dependent luciferase reporter gene plasmid (Clontech) together with IL-18R and AcPL expression vectors, as indicated, using Effectene (Qiagen). Twenty-four hours after transfection, cells are exposed to IL-18 for a further 4 hours. IL-18-induced NF- κ B is measured by luciferase activity in cell lysates.

A stable, neomycin-resistant 293 clone is established that expresses full-length mouse IL-18R, as determined by Western blotting using an α -Myc antibody, which recognizes the C-terminal Myc tag on the recombinant protein. Figure 1B shows that IL-18 responsiveness in this clone requires the transient transfection of mouse AcPL. Stable neomycin- and puromycin-resistant 293 clones that express both mouse IL-18R and AcPL are generated.

3. IL-18 binding studies

Stable clones of 293 cells expressing both IL-18R and AcPL are cultured in 6-well plates until confluent. Cells are washed 1X with PBS. Cells are incubated with 100,000 cpm (~10 nM) of 125 I-IL-18 (Bolton-Hunter Reagent) for 15 min at RT in 0.5 ml PBS, and total binding is determined. Non-specific binding is determined by including 1 μ M of cold IL-18 in the incubation. Cell extracts are prepared by lysis in 10% SDS. Free IL-18 is separated from bound IL-18 by spinning through mineral oil. The amount of bound IL-18 is determined by direct counting in a scintillation counter.

Significant specific binding can be observed, indicating that the high affinity IL-18 receptor comprises IL-18R and AcPL subunits.

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-25-

Binding (CPM \pm SD)	Experiment #1	Experiment #2
Total	15349 \pm 142	13888 \pm 582
Non-specific	8546 \pm 162	4063 \pm 380
Specific	6803 \pm 304	9825 \pm 962

4. *In vitro* assays to measure IL-18 binding and/or activity

(A) NF- κ B formation. In the mouse thymoma line EL4, IL-18 binds to its cognate receptor resulting in rapid formation of the transcription factor NF- κ B. NF- κ B can be detected in nuclear extracts by an electromobility shift assay (EMSA). The inhibition of IL-18 binding can be measured by incubation of the protein with an α -IL-18 antibody or soluble IL-18 receptors prior to cell stimulation.

For example, mouse IL-18 is pre-mixed with either PBS, rabbit α -mouse IL-18 polyclonal antibody from Torrey Pine Inc., control rabbit serum IgG; rat α -mouse IL-18 monoclonal antibody from Research Diagnostic Inc., control rat IgG2a, or homodimeric IL-18R-Fc fusion protein. After incubation at 37°C for 2 hours, the mixes are used to stimulate EL-4 cells, the final concentration of IL-18 is 50 ng/ml. After 30 minutes, cells are harvested, and nuclear extracts are prepared. EMSA is performed using an NF- κ B consensus probe (Santa Cruz).

(B) NF- κ B-dependent luciferase activity. Figures 2A and 2B show that IL-18 induces luciferase activity in 293 cells either transiently or stably expressing both mouse IL-18R and AcPL. 293 cells are transfected with a vector containing 3 copies of a consensus NF- κ B binding site driving expression of the luciferase reporter gene. Mouse IL-18 induces formation of NF- κ B, which in turn activates the promoter driving the luciferase gene. The inhibition of luciferase activity is a functional demonstration of a soluble IL-18 receptor.

(C) IFN- γ release assay. The murine Th1 clone Ae7 synergistically responds to mouse IL-12 and IL-18 to secrete significant amounts of IFN- γ , measurable by standard ELISA (Biosource), as shown in Figure 3. Pre-incubation of IL-18 with an equimolar amount of α -IL-18, but not control IgG, inhibits IFN- γ secretion. The

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-26-

assay can be used to test the ability of soluble IL-18 receptors to inhibit IFN- γ production.

In the Example shown in Figure 3, Ae7 cells are primed with antigen and rested for 7 days, and then placed at 5×10^5 cells/ml in 96-well plates. IL-12 (5 pM) or IL-18 (100 pM) are added. Rat α -mouse IL-18 monoclonal antibody or an isotype-matched rat IgG2a are preincubated with IL-18 (equimolar amount(s) for 2 hours at 37°C prior to adding to the cultures. After 48 hours, the amount of IFN- γ in the culture medium is measured using a Biosource IFN- γ Cytoscreen ELISA kit.

(D) Immunoprecipitation. The direct binding of α -IL-18 or soluble IL-18 receptors to IL-18 can be determined by co-immunoprecipitation experiments. For example, using a α -Fc antibody, IL-18 can be co-precipitated with either α -IL-18 or the Fc-fusion versions of soluble IL-18 receptors. IL-18 is detected by Western blotting. This method provides a qualitative measure of the interaction between IL-18 and soluble IL-18 receptors.

For example, an RDI rat α -mouse IL-18 monoclonal antibody or a rat IgG2a isotype control antibody are mixed with 30 μ l of (50% v/v) protein A/G agarose beads (Sigma) for 1 hour at 4°C. Beads are washed 3X with cold PBS and resuspended in 0.5 ml PBS with 1M NaCl. Mouse IL-18 (10 ng) is added and the mixtures are incubated for 1 hour at 4°C. Beads are washed and the immunoprecipitated proteins are resolved by SDS-PAGE. Western blotting is performed using a Torrey Pine rabbit α -mouse IL-18 polyclonal antibody.

(E) BIAcore. The BIAcore assay, as described in Thomassen et al. (1998) *J. Inn. Cyt. Res.* 18:1077-1088), provides a quantitative measure of the interaction between IL-18 and soluble IL-18 receptors.

5. Soluble IL-18 receptor-leucine zipper heterodimers

"PCR sewing" is used to generate DNA sequences encoding chimeric mouse IL-18 receptor proteins. For example, the extracellular region of mouse IL-18R (AA1-314) is fused to the leucine zipper (LZ) region (AA161-199) of the human α -FOS protein. The extracellular region of mouse AcPL (AA20-344) is fused to the LZ

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-27-

region (AA277-315) of the human c-JUN protein, and inserted into pFLAG-CMV-1 (Sigma, Inc.), so that this fusion protein contains an N-terminal FLAG tag. Expression vectors encoding the IL-18R-LZf and AcPL-LZj chimeric proteins are transiently transfected into 293 cells. Cell extracts are prepared after 48 hours, and the FOS-JUN heterodimer is purified using a α -FLAG antibody column. The presence of both mouse IL-18R and AcPL in the LZ heterodimer are confirmed by Western blotting.

Human 293 cells are transiently transfected with FLAG-AcPL-LZjun, IL-18R-LZfos, or both using Effectene (Qiagen). Cell extracts are prepared and protein samples (5 μ l) are resolved by SDS-PAGE. FOS-JUN heterodimers are immunoprecipitated from the double transfection extract by an α -FLAG antibody (Sigma) and eluted by a FLAG peptide (Sigma). Samples (5 μ l) of the purified heterodimer are also resolved in the same gel. After Western transfer, the blots are probed with either α -FLAG (Sigma) or α -FOS (Santa Cruz) antibodies.

6. Soluble IL-18 receptor-Fc heterodimers

The extracellular regions of mouse IL-18R and AcPL, as described in example 5, are fused to the mouse immunoglobulin (subtype) Fc (starts from AA 221, hinge area between CH1 and CH2) and inserted into baculovirus expression vectors. Recombinant baculoviruses are generated and the fusion proteins are co-expressed in Sf9 insect cells. Dimeric IL-18 receptors are purified using α -Fc and α -FLAG antibody columns. The purified protein preparation consists of a population of AcPL homodimers and IL-18R/AcPL heterodimers. By infecting cells with 3X more IL-18R-expressing virus as compared to AcPL-expressing virus, the yield of heterodimers can be enhanced. The presence of soluble IL-18 receptor-Fc heterodimers is confirmed by Western blotting.

Sf21 cells are infected with IL-18R-Fc, FLAG-AcPL-Fc, or both in a molar ratio of ~3:1. Supernatants from double infections are harvested 48 h later and are applied through a α -FLAG antibody column (Sigma). Supernatant samples, column flow-through, column wash, and eluate are resolved by SDS-PAGE. Western blotting

-28-

is performed using a α -mouse Fc antibody (Sigma). A non-denatured eluate sample is also resolved by SDS-PAGE.

7. *In vitro* assays and *in vivo* models to test IL-18 receptor heterodimers

(A) *In vitro*. Assays to test the ability of soluble IL-18 receptor heterodimers to inhibit IL-18 *in vitro* include those described in examples 2, 3 and 4 above.

(B) *In vivo*. Models to test the ability of soluble IL-18 receptor heterodimers to inhibit IL-18 *in vivo* include: liver damage in *P. acnes*/LPS-treated nude mice (Okamura et al. (1995) *Nature* 378:88-90); PLP-induced, adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice (Leonard et al. (1995) *J. Exp. Med.* 181:381-386); and type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice (Gracie et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 104:1393-1401).

The preceding examples can be repeated with similar success by substituting the generically or specifically described reactants and/or operating conditions of this invention for those used in the preceding examples.

From the foregoing description, one skilled in the art can easily ascertain the essential characteristics of this invention and, without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modification of the invention to adapt it to various usages and conditions.

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-29-

We claim:

1. A soluble, heterodimeric interleukin 18 (IL-18) receptor molecule comprising two subunits, one of which comprises an extracellular domain, or a fragment thereof, of IL-18R, and the other of which comprises an extracellular domain, or a fragment thereof, of AcPL.
2. The soluble, heterodimeric receptor of claim 1, which binds to IL-18 with higher affinity than does either IL-18R or AcPL.
3. A soluble, heterodimeric interleukin 18 (IL-18) receptor molecule comprising two subunits, each of which comprises a soluble portion of either IL-18R or AcPL appended to a peptide, wherein the two subunits are associated via said appended peptides.
4. The soluble receptor of claim 3, wherein each peptide is an immunoglobulin chain, or a fragment thereof.
5. The soluble receptor of claim 3, wherein each peptide is an immunoglobulin heavy chain, or a fragment thereof.
6. The soluble receptor of claim 3, wherein each peptide is part of a leucine zipper.
7. The soluble receptor of claim 1, wherein the subunits are associated by chemical cross-linking.
8. The soluble receptor of claim 1, wherein the subunits form a single polypeptide chain.

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-30-

9. The soluble receptor of claim 1, wherein the IL-18R and AcPL are human.
10. A pharmaceutical composition comprising a soluble heterodimeric IL-18 of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.
11. A method of making a soluble heterodimeric receptor of claim 1, comprising associating the two subunits by cross-linking them chemically, by joining them with a peptide linker, or by forming a single linear polypeptide chain by recombinant methods.
12. A composition for making a soluble dimeric receptor, comprising a chimeric polynucleotide which comprises a coding sequence for a fusion protein comprising a soluble portion of IL-18R appended to a peptide, and a chimeric polynucleotide which comprises a coding sequence for a fusion protein comprising a soluble portion of AcPL appended to a peptide.
13. An expression vector comprising the chimeric polynucleotides of claim 12.
14. A host cell comprising an expression vector of claim 13.
15. A method of making a soluble heterodimeric receptor, comprising culturing a cell of claim 14 under conditions in which both of said fusion proteins are expressed, and harvesting said proteins.
16. A polynucleotide which encodes a soluble receptor of claim 8.
17. An expression vector comprising a polynucleotide of claim 16.

WO 02/08272

PCT/US01/22863

-31-

18. A host cell comprising an expression vector of claim 17.
19. A method of making a single chain soluble heterodimeric receptor, comprising culturing a cell of claim 18 under conditions such that single chain heterodimeric receptor is expressed, and harvesting said protein.
20. A method for inhibiting the effects of IL-18, comprising administering a soluble, heterodimeric IL-18 receptor of claim 1 to a mammal.
21. A method of treating a pathological condition associated with IL-18 expression or with excessive or inappropriate activity of cells possessing IL-18 receptors, comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a soluble, heterodimeric IL-18 receptor molecule of claim 1.
22. The method of claim 21, wherein the patient is human.
23. The method of claim 21, wherein the pathological condition is an autoimmune dysfunction or an inflammatory condition.
24. The method of claim 21, wherein the pathological condition is rheumatoid arthritis or multiple sclerosis.
25. A method for suppressing IL-18 mediated inflammation or an IL-18 mediated immune response in a mammal, comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a soluble, heterodimeric IL-18 receptor molecule of claim 1.
26. The method of claim 25, wherein the mammal is human.

WO 02/06272

PCT/US01/22863

-32-

27. A method of detecting an IL-18 molecule, comprising contacting a sample which may contain IL-18 molecules with a soluble, heterodimeric IL-18 receptor molecule of claim 1, which is labeled.

A. Chemical Crosslinking

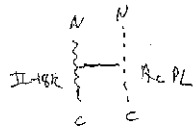
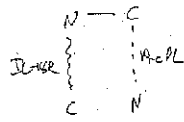
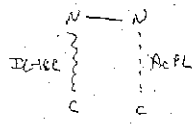
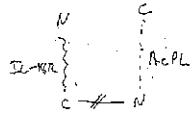
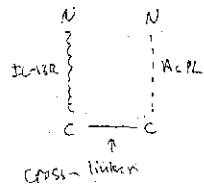
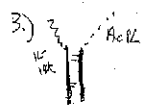
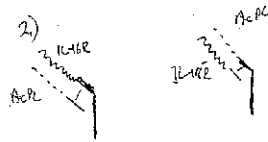
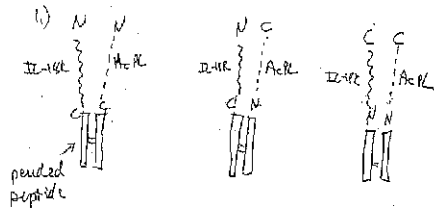


FIGURE 1.

B. Appended Moieties

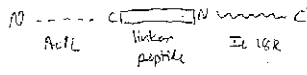
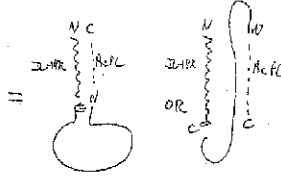
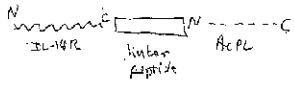


WO 02/08272

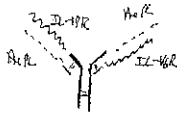
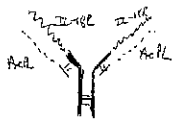
3/7

PCT/US01/22863

c. Single chain polypeptides



D Tetramers



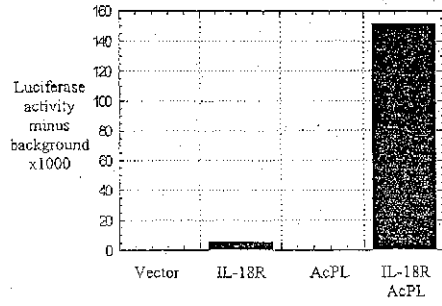


FIGURE 2A

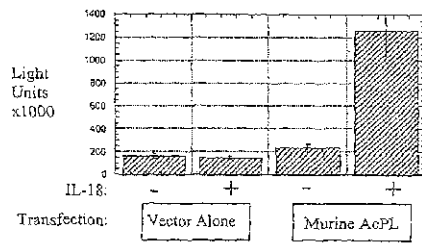


FIGURE 2B

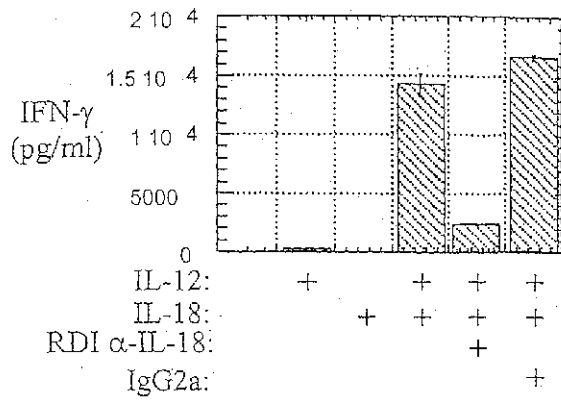


FIGURE 3

【 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
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08272 A3

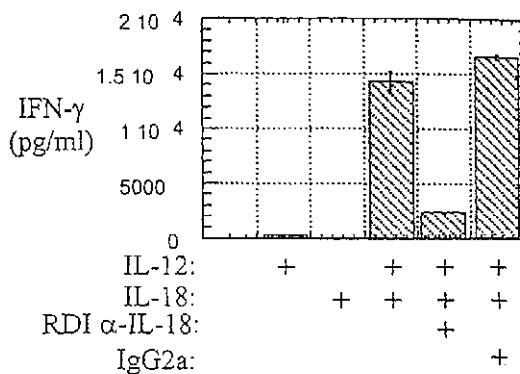
- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, 15/62, C07K 147/13, A61K 38/17, C12N S10 # A61P 19/02, 21/03, 37/03
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); D-13342 Berlin (DE).
- (21) International Application Number: PCT/US01/22863
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LEUNG, Stewart [US/US]; Apt. 302, 1260 Brighton Avenue, Albany, CA 94706 (US); PEREZ, H., Daniel [US/US]; 214 McAdams, Kentfield, CA 94904 (US); MIYAMOTO, Neil [US/US]; 214 Sausalito Street, Corte Madera, CA 94925 (US).
- (22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20 July 2000 (20.07.2000) US 60/219,447; 19 July 2001 (19.07.2001) US 09/908,494
- (74) Agents: ZELANO, Anthony, J. et al.; Millen, White, Zelano & Branigan, P.C., Arlington Courthouse Plaza I, Suite 1400, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications: US 60/219,447 (CIP); Filed on 20 July 2000 (20.07.2000); US Not furnished (CIP); Filed on 19 July 2001 (19.07.2001)
- (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, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: HIGH AFFINITY SOLUBLE INTERLEUKIN-18 RECEPTOR



WO 02/08272 A3



(57) Abstract: A soluble, heterodimeric interleukin 18 (IL-18) receptor molecule is described which comprises two subunits, one of which comprises an extracellular domain, or a fragment thereof, of IL-18R, and the other of which comprises an extracellular domain, or a fragment thereof, of AcPL. Preferably, the soluble, heterodimeric receptor binds to IL-18 with higher affinity than does either IL-18R or AcPL alone.

WO 02/08272 A3



MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TI, TM, TR, TT, UZ, UA, UK, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(88) Date of publication of the international search report:
18 April 2002

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

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/22863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C07K14/715 A61K38/17 C12N5/10 //A61P19/02, A61P21/00, A61P37/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 37772 A (BORN TERESA L ; SIMS JOHN E (US); IMMUNEX CORP (US)) 29 July 1999 (1999-07-29) cited in the application the whole document	1-27
A	EP 0 864 585 A ((HAYB) HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU) 16 September 1998 (1998-09-16) the whole document	
<input checked="" type="checkbox"/> If other documents are listed in the continuation of box C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Spread categories of cited documents:		
*W document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *L earlier document but published on or after the international filing date *I document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish 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 later than the priority date claimed *I' 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 *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 *A document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of making of the international search report	
6 February 2002	26/02/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 2018 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 240-2040, Tx 31 651 epo nl Fax (+31-70) 240-3016	Authorized officer Aslund, J	

6

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/22863

C/Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BORN TEREAS L ET AL: "Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 45, 6 November 1998 (1998-11-06), pages 29445-29450, XP002189279 ISSN: 0021-9258</p> <p>----</p>	
A	<p>MANTOVANI A ET AL: "Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 6, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 328-336, XP004249049 ISSN: 1471-4906</p> <p>-----</p>	

6

Form PCT/ISA/210 (Continuation of second sheet), July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/22863

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9937772	A	29-07-1999	AU 2337399 A	09-08-1999
			AU 737592 B2	23-08-2001
			AU 2466899 A	09-08-1999
			EP 1049777 A1	08-11-2000
			EP 1047781 A1	02-11-2000
			WO 9937772 A1	29-07-1999
			WO 9937773 A1	29-07-1999
EP 0864585	A	16-09-1998	AU 733126 B2	10-05-2001
			AU 4922397 A	17-09-1998
			CA 2219964 A1	12-09-1998
			EP 0864585 A1	16-09-1998
			JP 11240898 A	07-09-1999
			US 6087116 A	11-07-2000

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1999)

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 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/715	C 0 7 K 14/715	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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

(72) 発明者 ローレン, スチュワート

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 7 0 6, アルバニー, ブライトン アベニュー 1 2 6 0, アpartment 3 0 2

(72) 発明者 ベレッツ, エイチ・ダニエル

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 9 0 4, ケントフィールド, マクアリスター 2 1 4

(72) 発明者 ミヤモト, ネイル

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 9 2 5, コート マデラ, ソーサリト ストリート 2 1 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA07 DA02 DA03 EA04 HA01 HA11
 4B064 AG01 AG20 CA10 CA19 CC01 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02
 CA24 CA43 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 BA08 DA12 DC50 MA52 MA55 MA56 MA57
 MA59 MA60 MA63 MA66 MA67 NA14 ZA022 ZB082 ZB112 ZB152
 ZC412
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA51 EA20 EA50 FA20 FA74

专利名称(译)	高亲和力可溶性白细胞介素-18受体		
公开(公告)号	JP2004512026A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002514176	申请日	2001-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	先灵公司		
申请(专利权)人(译)	先灵股份公司		
[标]发明人	ローン スチュワート ペレツ エイチ ダニエル ミヤモト ネイル		
发明人	ローン, スチュワート ペレツ, エイチ. ダニエル ミヤモト, ネイル		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/715 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/28 A61P29/00 C07K14/7155 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.A A61P25/28 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K14/715 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG01 4B064/AG20 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA08 4C084/DA12 4C084/DC50 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	60/219447 2000-07-20 US 09/908494 2001-07-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了一种可溶性异二聚体白介素18 (IL-18) 受体分子, 其包含两个亚基, 其中一个包含IL-18R的胞外域或其片段, 另一个包含一个胞外域或IL-18R。 AcPL的片段。 优选地, 可溶性异二聚体受体以比单独的IL-18R或AcPL更高的亲和力与IL-18结合。

