

(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2004-521654

(P2004-521654A)

(43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(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 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-514010 (P2003-514010)	(71) 出願人	300049958
(86) (22) 出願日	平成13年7月20日 (2001.7.20)		シエーリング アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月20日 (2003.1.20)		ドイツ連邦共和国 デー-13353 ベ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/022862		ルリン ミューラーシュトラッセ 178
(87) 国際公開番号	W02003/008452	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	60/219,448	(74) 代理人	100092624
(32) 優先日	平成12年7月20日 (2000.7.20)		弁理士 鶴田 準一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	09/907,960		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成13年7月19日 (2001.7.19)	(74) 代理人	100082898
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 2 及び I L - 1 8 に対する二特異的モノクローナル抗体

(57) 【要約】

2種の成分、すなわち I L - 1 2 受容体の I L - 1 2 R 1 又は I L - 1 2 R 2 サブユニットのいずれかに対して特異的である抗原 - 結合領域を含んで成る1つの成分、及び I L - 1 8 受容体の I L - 1 8 R 又は A c P L サブユニットのいずれかに対して特異的である抗原 - 結合領域を含んで成る他の成分を含んで成る二特異的モノクローナル抗体が、記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2種の成分、すなわちIL-12受容体のIL-12R₁又はIL-12R₂サブユニットのいずれかに対して特異的である抗原-結合領域を含んで成る1つの成分、及びIL-18受容体のIL-18R又はAcPLサブユニットのいずれかに対して特異的である抗原-結合領域を含んで成る他の成分を含んで成る二特異的モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記抗原-特異的領域の1つがIL-18R₁に対して特異的であり、そして他の1つがIL-12R₂に対して特異的である請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体。

【請求項 3】

前記抗原-特異的領域の1つがAcPLに対して特異的であり、そして他の1つがIL-12R₂に対して特異的である請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

前記抗原-結合領域の個々が異種ペプチドに付加され、それにより、ハイブリッド又は融合タンパク質が形成され、そして前記ハイブリット又は融合タンパク質が前記付加されたペプチドを通して会合される請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体。

【請求項 5】

個々の付加されるペプチドが、ロイシンジッパーの一部である請求項4記載の二特異的モノクローナル抗体。

【請求項 6】

前記2種の成分が、化学的架橋により会合される請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体。

20

【請求項 7】

前記2種の成分が、一本鎖ポリペプチドを形成する請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体。

【請求項 8】

前記化学的架橋が、2種のFc分子間に存在する請求項6記載の二特異的モノクローナル抗体。

【請求項 9】

前記IL-12及びIL-18受容体がヒトである請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体。

30

【請求項 10】

請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る医薬組成物。

【請求項 11】

請求項1記載の二特異的モノクローナル抗体の製造方法であって、前記2種の成分を、それらを化学的に架橋することにより、それらを付加される異種ペプチドリンカーにより連結することにより、組換え方法により一本鎖線状ポリペプチド鎖を形成することにより、又はその個々が前記成分の1つを発現する、2種のハイブリドーマ細胞を融合することにより会合することを含んで成る方法。

40

【請求項 12】

異種ペプチドに付加されるIL-12受容体サブユニットに対して特異的である抗原-結合領域を含んで成る融合タンパク質、及び/又は異種ペプチドに付加されるIL-18受容体サブユニットに対して特異的である抗原-結合領域を含んで成る融合タンパク質をコードするキメラポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項12記載のキメラポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクター。

【請求項 14】

請求項13記載の発現ベクターを含んで成る宿主細胞。

【請求項 15】

50

二特異的抗体の製造方法であって、請求項 1 4 記載の細胞を、前記両融合タンパク質が発現される条件下で培養し、そして前記タンパク質を収穫することを含んで成る方法。

【請求項 1 6】

請求項 7 記載の二特異的抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 記載のポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の発現ベクターを含んで成る宿主細胞。

【請求項 1 9】

一本鎖可溶性ヘテロダイマー受容体の製造方法であって、請求項 1 8 記載の細胞を、前記一本鎖ヘテロダイマー受容体が発現される条件下で培養し、そして前記タンパク質を収穫することを含んで成る方法。

10

【請求項 2 0】

請求項 1 記載の二特異的モノクローナル抗体の製造方法であって、その個々細胞が前記 2 種の成分の 1 つを発現する、2 種のハイブリドーマ細胞を融合することを含んで成る方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 記載の二特異的モノクローナル抗体の製造方法であって、IL - 1 2 受容体のサブユニットの細胞外ドメインを含んで成るポリペプチド、又は IL - 1 8 受容体のサブユニットの細胞外ドメインを含んで成るポリペプチドにより、ヒト抗体を生成することができるトランスジェニックマウスを免疫感作することを含んで成る方法。

20

【請求項 2 2】

請求項 1 記載の二特異的モノクローナル抗体を、哺乳類に投与することを含んで成る、IL - 1 2 及び / 又は IL - 1 8 の効果を阻害するための方法。

【請求項 2 3】

IL - 1 2 及び / 又は IL - 1 8 の発現、あるいは IL - 1 2 及び / 又は IL - 1 8 受容体を有する細胞の過度又は不適切な活性、に關係する病理学的状態の処理方法であって、有効量の請求項 1 記載の二特異的モノクローナル抗体を、そのような処理の必要な患者に投与することも含んで成る方法。

【請求項 2 4】

前記患者がヒトである請求項 2 3 記載の方法。

30

【請求項 2 5】

前記病理学的条件が、自己免疫機能不全又は炎症状態である請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記病理学的条件が、リウマチ様関節炎又は多発性硬化症である請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 7】

哺乳類における IL - 1 2 及び / 又は IL - 1 8 介在性炎症、あるいは IL - 1 2 及び / 又は IL - 1 8 介在性免疫応答を抑制するための方法であって、有効量の請求項 1 記載の二特異的モノクローナル抗体を、そのような処理の必要な患者に投与することを含んで成る方法。

40

【請求項 2 8】

前記哺乳類がヒトである請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

毒素又は治療剤をさらに含んで成る、有効量の請求項 1 記載の二特異的モノクローナル抗体を患者に投与することを含んで成る、そのような処理の必要な患者に、毒素又は治療剤を供給するための方法。

【請求項 3 0】

IL - 1 2 及び / 又は IL - 1 8 受容体サブユニットを発現する細胞を検出するための方法であって、そのような細胞を含むことができるサンプルと、ラベルされる請求項 1 記載の二特異的モノクローナル抗体とを接触せしめることを含んで成る方法。

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野：

本発明は、例えばインターロイキン - 12 及び / 又はインターロイキン - 18 受容体のサブユニットに対する特異性を有する二特異的抗体に関する。

【0002】

発明の背景：

細胞毒性リンパ球成熟因子又はNK細胞刺激因子とこれまで呼ばれているインターロイキン - 12 (IL - 12)、IFN - (インターフェロン) - 誘発因子とこれまで呼ばれているインターロイキン - 18 (IL - 18) は、多くの生物学的活性を示すサイトカインである。

10

【0003】

IL - 12 及び IL - 18 の生物学的活性は、細胞表面、例えばT細胞、B細胞、NK細胞、又はマクロファージ、特にTh前駆体上のそれらの同系受容体へのサイトカインの結合により介在される。IL - 12 受容体は、少なくとも2種のサブユニット、すなわちIL - 12 R₁ (また、1鎖としても知られている) 及びIL - 12 R₂ (また、2鎖としても知られている) を含んで成る。IL - 18 受容体は、次の少なくともサブユニットを含んで成る：IL - 18 R (また、IL - 1 R - 関連タンパク質、IL - 1 Rrp、IL - 18 Rd、2FI又は“結合鎖”としても知られている) 及びAcPL (また、アクセサリタンパク質 - 様、IL - 18 - AcPL、IL - 18 R₁ 又は“シグナル鎖”としても知られている)。

20

【0004】

発明の記載：

本発明は例えば、IL - 12 受容体の少なくとも1つのサブユニット及び / 又はIL - 18 受容体の少なくとも1つのサブユニットに対して向けられる多特異的抗体 (例えば、ポリクローナル又はモノクローナル抗体) に関する。本明細書における議論は主にIL - 12 受容体サブユニットIL - 12 R₁ 及びIL - 12 R₂、及びIL - 18 受容体サブユニットIL - 18 R₁ 及びScPLに向けられるが、IL - 12 又はIL - 18 が結合する他の受容体もまた包含されることが理解されるべきである。

【0005】

本発明は、上記受容体のいずれかの組合せ、例えば2種のIL - 12 受容体サブユニット、2種のIL - 18 受容体サブユニット、1つのIL - 12 受容体サブユニット及び1つのIL - 18 受容体サブユニット、3又は4種の上記受容体サブユニット、等に対して向けられるマルチマー抗体を包含する。好ましい態様においては、抗体はモノクローナルであり、二特異的であり、そしてIL - 12 受容体の1つのサブユニット及びIL - 18 受容体の1つのサブユニット (例えば、IL - 12 R₂ 及びIL - 18 R₁、IL - 12 R₂ 及びAcPL、等) に対して向けられる。

30

【0006】

“多特異的”抗体とは、少なくとも2種の異なった抗体特異性を有する抗体を本明細書において意味する。そのような抗体は、複数の特異性を有する単一の抗体 (又は抗体フラグメント)、又は1又は複数の抗体 (又は抗体フラグメント) の凝集体 (個々は、1又は複数の異なった特異性を有する) であり得る。本明細書において使用される場合、抗原に対する抗体の特異的結合を言及する場合、用語、“～に結合する”、“～に対する結合特異性を有する”、“～に対して特異的である”、及び“～に対して向けられる”とは、相互交換でき、そして抗体が抗原 (例えば、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント又はペプチド) における定義されるエピトープに選択的に又は優先的に結合することを意味する。

40

【0007】

“二特異的”抗体とは、2種の異なった結合特異性を有する、単一の抗体又は抗体フラグメントを、本明細書においては意味する。すなわち、二特異的抗体は、2種の成分を含ん

50

で成り、それらの個々は、異なった抗原性標的物に対して特異的である結合領域を含んで成る。“結合領域”は、抗原-結合部位(抗原のための結合部位)を含んで成る抗体の一部(ポリペプチド又はペプチド)である。

【0008】

本発明の“抗体”とは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ハイブリッド又はキメラ抗体、一本鎖抗体、フラグメント、例えばFab, F(ab'), F(ab)₂又は同様のものを包含する。“抗体”は、いずれかの哺乳類から単離され得、例えばそれらはネズミ、部分的に又は十分にヒト適合されるか、又はヒトであり得;そしてそれらはいずれかの免疫学的結合剤、例えばIgE、IgM、IgD又は好ましくはIgGを包含する。

10

【0009】

本発明の1つの観点は、2種の成分、すなわちIL-12受容体のサブユニットに対して特異的である抗原-結合領域を含んで成る1つの成分、及びIL-18受容体のサブユニットに対して特異的である抗原-結合領域を含んで成る他の成分を含んで成る二特異的モノクローナル抗体であり、ここで前記2種の成分は1又は複数の化学的架橋により会合される。そのような二特異的抗体の例は、抗原結合領域が受容体サブユニットの細胞外ドメインを認識し、そして受容体の刺激を伴わないで、サイトカイン結合を阻止する抗体である。

【0010】

本発明のもう1つの観点は、上記のような2種の成分を含んで成る二特異的モノクローナル抗体であり、ここで個々の成分の抗原結合領域は異種ペプチドに付加され、そして前記2種の成分は前記付加された異種ペプチドを通して会合される。

20

本発明のもう1つの観点は、IL-12受容体のサブユニットに対して特異的な抗原結合領域、及びIL-18受容体のサブユニットに対して特異的な抗原結合領域を含んで成る二特異的モノクローナル抗体であり、ここで前記2種の領域は一本鎖ポリペプチドを形成する(その一部である)。

【0011】

本発明はまた、抗体の使用法、例えばIL-12及び/又はIL-18受容体を発現する細胞を含むことができるサンプルにおいてそのような細胞を検出するための方法に関し、ここで前記方法は、ラベルされる上記のような二特異的モノクローナル抗体と前記サンプルとを接触し、そして前記ラベルを検出することを含んで成る。

30

【0012】

本発明はまた、過剰又は不適切な量のサイトカインを包含する、IL-12及び/又はIL-18の発現、及び/又はIL-12及び/又はIL-18受容体を有する細胞の過度又は不適切な活性に関する状態(例えば、病理学的状態)を処理するか又は予防するための方法に関し、ここで前記方法は、有効量の上記二特異的モノクローナル抗体を、そのような処理の必要な患者に投与することを含んで成る。

【0013】

本発明の多特異的(例えば、二特異的)抗体は、いずれかの適切な態様、例えば1)複数の受容体サブユニット又はそのフラグメントに対して特異的な抗体を個々に調製し、そして次に抗体又はその一部を、例えば化学的架橋により、種々の組み合わせで結合することによって; 2)上記のように個々の抗体を調製し、そして次に、それらを、付加される成分、例えば異種ペプチドにより結合することによって; 3)少なくとも2種の受容体サブユニット特異性を有する一本鎖抗体を調製するために組換え方法を用いることによって; 又は4)トリオーマ、クアトロオーマ又は他のポリドーマを形成するために、受容体サブユニットの1つ、又はそのフラグメントに対して向けられる抗体をそれぞれ生成する、複数の異なった細胞系(例えば、ハイブリドーマ)を融合し、そして次に、その融合された細胞から分泌される多特異的(例えば、二特異的)抗体を単離することによって調製され得る。

40

【0014】

50

所定の受容体サブユニット又はそのフラグメントに対して特異的な抗体は、いずれかの適切な方法に従って得られる。例えば、受容体又はフラグメントを単離し、必要なら、それを精製し、そしてそれにより動物を免疫化することができる。それらの方法のすべては、当業者にとっては従来通りである。

【0015】

IL-12受容体のIL-12R₁及びIL-12R₂受容体サブユニットは、マウス及びヒト源から精製され、特徴づけられ、クローン化され、そして配列決定されている。IL-12R₁又はIL-12R₂を精製し、操作し、そして/又はクローン化するための方法に関しては、及び/又はそれらの配列の開示のためには、例えばChuaなど、(1994) J. Immunol. 153, 128; アメリカ特許第5,919,903号; Chuaなど、(1994) J. Immunol. 153, 128-136; Chuaなど、(1995) J. Immunol. 155, 4286-4294; 及びPreskyなど、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14002-14007を参照のこと。

【0016】

IL-18受容体のIL-18R及びAcPL受容体サブユニットはまた、ネズミ及びヒト源から特徴づけられ、クローン化され、そして配列決定されており、そしてそれらの中から精製されており;そしてそれらは、他の哺乳類、例えばウシ、ブタ及び種々の非ヒト霊長類源から少なくとも特徴づけられている。IL-18R及びAcPLを精製し、操作し、そして/又はクローン化するための方法及び/又はそれらの配列の開示に関しては、例えば、Dinarello(1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103, 11-24; Torigoeなど、(1997) J. Biol. Chem. 272, 25, 737-742; Parnetなど、(1996) J. Biol. Chem. 271, 3967-70; EP864585号及び850952号、WO97/31010号、アメリカ特許第5,776,731号; Greenfederなど、(1995) J. Biol. Chem. 270, 13, 757-765; 又はBornなど、(1998) J. Biol. Chem. 273, 29, 445-450を参照のこと。

【0017】

免疫原として使用され得る受容体サブユニットのフラグメントは、抗体受容体を誘発するいずれのものでもあり得る。好ましい態様においては、受容体の細胞外ドメインに対応するフラグメント(損なわれていない細胞においては、リガンド又は抗体への結合のために利用できる受容体の一部)が使用される。IL-12及びIL-18受容体サブユニットの細胞外ドメインは、同定され、そして特徴づけられている。

【0018】

例えば、IL-12受容体については、ヨーロッパ特許757466A2号、及びIL-18受容体サブユニットについては、WO97/31010号及びBornなど、(1998) J. Biol. Chem. 273, 29, 445-50を参照のこと。細胞外ドメイン、そのフラグメント、及び前記ドメインを含んで成るポリペプチドは、従来の方法により(例えば、プロテアーゼにより、又は化学的分解により)、損なわれていない受容体サブユニットから生成され得るか、又は例えば下記及び例1に論じられるように、組換え的に調製され得る。天然に存在する細胞外形、例えば“誘発性(decoy)”受容体がまた使用され得る。

【0019】

受容体サブユニットポリペプチド又はそのフラグメントは、いずれかの種々の源、例えばインビボ源(例えば、肺、脾臓、上皮細胞、内皮細胞、介在性細胞、軟骨細胞、単球、顆粒球、リンパ球、神経細胞、等);1又は複数のポリペプチドを発現する確立された細胞系(例えば、造血細胞、例えばリンパ球、末梢血液T細胞及びNK細胞);1又は複数のポリペプチドを分泌する細胞(例えば、リンパ腫細胞);又はポリペプチドを発現し、そして任意には分泌する組換え細胞から単離され得る。

【0020】

受容体サブユニット又はそのフラグメントを発現する組換え細胞は、従来の方法により調製され得る。そのような組換えクローンの生成における第1の段階として、受容体サブユニット又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド（例えば、DNAフラグメント）は、種々の方法のいずれかにより生成され得る。例えば、それらは、ヒト及びネズミ IL-18R（例えば、Parnet など、前記及びアメリカ特許第5,776,731号を参照のこと）；ヒト及びネズミ AcPL（例えば、Born など、前記を参照のこと）；ヒト及びネズミ IL-12R 1（例えば、Chua など、1994, 1995, 前記を参照のこと）；又はヒト及びネズミ IL-12R 2（例えば、Presky など、1996前記を参照のこと）の公開された配列に基づいて選択され得る。 10

【0021】

適切な制限酵素による大きなポリヌクレオチド（例えば、ゲノム配列、cDNA又は同様のもの）から分解され得る。もう1つの態様においては、受容体サブユニット、又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドは、上記公開された配列に基づいて適切なプライマーを選択することによって、PCR増幅により生成され得る。プライマーの選択、増幅のための条件、及び増幅されたフラグメントのクローニングを包含する、PCR増幅の方法は従来通りである。

【0022】

例えば、Innis、M.A. など、eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications, 1990, Academic Press, San Diego, CA 及び Wu など、eds., Recombinant DNA Methodology, 1989, Academic Press, San Diego, CA を参照のこと。もう1つの態様においては、受容体サブユニット又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドフラグメントは、化学的合成により生成され得る。もちろん、上記組合せ又は非組み合わせ方法の組み合わせ、又は他の従来の方法がまた使用され得る。 20

【0023】

受容体サブユニット又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドが単離されると、それは、種々の調節要素の制御下で、種々の発現ベクター中にクローン化され、そして 30 宿主、例えば原核生物、酵母、及び哺乳類、昆虫又は植物細部のような種々の細胞型において、又はトランスジェニック非ヒト動物において発現され得る。好ましい態様においては、発現されたポリペプチドは、精製を促進するために細胞により分泌される。天然又は異種リーダー配列（シグナルペプチド）が、分泌を促進するために使用され得る。

【0024】

核酸のクローニング方法は、当業界においては通常且つ従来のことである。本出願に言及される分子生物学の方法、例えば核酸及び/又はタンパク質を単離し、クローニングし、修飾し、ラベルし、操作し、配列決定し、そして処理するか又は分析する方法を記載する一般的な文献については、例えば Sambrook, J. など、(1989) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. など、(1995) Current Protocols in Molecular Biology, N.Y., John Wiley & Sons; Davis など、(1986), Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York; Hames など、(1985), Nucleic Acid Hybridization IL Press; Dracopoli, N.C. など、Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, Inc.; 及び Coligan, J.E., など、Current Protocols in Protein S 40 50

science, John Wiley & Sons, Inc. を参照のこと。さらに、受容体タンパク質のクローニング及び特徴づけを特に記載する方法を開示する他の文献は、例えばアメリカ特許第5,919,903号、第5,536,657号及び第5,776,731号、ヨーロッパ特許864585号及びWO9731010号を包含する。

【0025】

受容体サブユニット又はそのフラグメントをコードする核酸はまた、トランスジェニック種を生成するために、植物又は動物（例えば、ネズミ種、ウサギ、ウシ、ブタ、ヤギ、非ヒト霊長類又は同様のもの）中にクローン化され得；そしてトランスジーンから発現される生成物が単離され得る。この目的のためのトランスジェニック生物を製造し、そして使用のための方法は、通常のことであり、そして例えば、次の文献に記載されている：

10

【0026】

Hoganなど., (1986) Manipulating The Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Press; Krimpenfortなど., (1991) Bio/Technology 9, 86; Palmiteirなど., (1985) Cell 41, 343; Kraemerなど., (1985) Genetic Manipulation of The Early Mammalian Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Hammerなど., (1985) Nature 315, 680; Purcelなど., (1986) Science 244, 1281; Wagnerなど., アメリカ特許第5,175,385号 and Krimpenortなど., アメリカ特許第5,175,384号。

20

【0027】

好ましくは、本発明の受容体サブユニット又はそのフラグメントは、例えばそれが天然において、例えば緩衝液において存在するよりも他の形で、再構成を待っている乾燥形で、キット又は医薬組成物の一部として、等で、“単離される”。

【0028】

種々の従来の方法が、本発明の受容体サブユニット又はそのフラグメントを単離し、そして/又は精製するために使用され得る。所望する純度の程度は、タンパク質の意図される使用に依存する。例えば、受容体によりトランスフェクトされた細胞の粗調製物は、適切なモノクローナル抗体を検出できるスクリーニング方法が利用できる場合、抗体を生成するために使用され得る。典型的には、タンパク質が実質的に精製される。用語、“実質的に精製される”とは、本明細書において使用される場合、汚染性内因性物質、例えば他のタンパク質、脂質、炭水化物、核酸、及び天然において関係する他の生物学的材料を実質的に有さないタンパク質を言及する。

30

【0029】

例えば、実質的に純粋な分子は、興味ある分子の少なくとも約60%（乾量）、好ましくは約70%、80%、90%、95%又は99%であり得る。受容体サブユニット又はそのフラグメントは、可溶性タンパク質として（好ましくは、培養溶液中に分泌された後）、又は封入体として細胞から回収され得、それから、受容体又はそのフラグメントは、例えば8Mのグアニジウム塩酸塩により安定的に抽出され得る。使用され得る従来精製方法は、例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、HPLC及び/又はゲル濾過を包含する。

40

【0030】

好ましい態様においては、IL-12又はIL-18、又は適切なもう1つのリガンド；適切なレクチン、例えば小麦胚凝集素；又はIL-12及び/又はIL-18受容体に対して特異的な抗体を含むカラムと共に、親和性クロマトグラフィーが使用される。特に好ましい態様においては、タンパク質が、適切な親和性カラムに結合できる1つの成分、好ましくは分解性成分により“標識”される。例えば、それは、金属キレートクロマトグラフィーによる急速な精製を可能にするために、ポリHis（例えば、His₆）により；ストレプトタビジンに結合し、そしてイミノビオチンにより溶離され得るStrept-標識

50

により；アミロースに結合し、そしてマルトースにより溶離され得るマルトース結合タンパク質（MBP）により；又は親和性クロマトグラフィーにより分離され得るそのようないずれか他の成分により標識され得る。

【0031】

他方では、抗体が利用できるエピトープ、例えばFLAG（商標）ペプチド、すなわち Asp - Tyr - Lys - Asp - Asp - Asp - Asp - Lys（Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, CTから入手できる）によりサブユニットの1つ又は両者を標識することができる。他のそのような抗原性識別体は、アメリカ特許第5,011,912号及びHoppなど、（1988）Bio/Technology 6, 1204に記載されている。親和性標識を用いる典型的な方法に関しては、例えばRecombinant Protein Protocols: Detection and Isolation, Edited by Rocky S. Tuan, Methods in Molecular Biology, Vol. 63, Humana Press, 1997を参照のこと。上記タイプの標識のいずれかの組合せが使用され得る。

10

【0032】

好ましい態様においては、個々の受容体サブユニットが組換え細胞において、別々に発現される。受容体サブユニットが1又は複数の他の受容体サブユニットとの混合物として存在する他の方法に関しては、動物中に導入する前、個々の受容体サブユニットをそれぞれ単離する必要がある。そのような分離は、種々の方法のいずれか、例えば分離用非変性アクリルアミドゲルからの受動的溶離、又はクロマトグラフィー技法、例えば上記のような“標識された”分子の親和性クロマトグラフィーにより行われ得る。

20

【0033】

タンパク質の純度は、標準の方法、例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、及びアミノ末端アミノ酸配列分析を用いて決定され得る。

【0034】

受容体サブユニット又はそのフラグメントが単離されると、それらは、動物（例えば、マウス、ウサギ、ハムスター、テンジクネズミ、ヤギ、等）を免疫化するために使用され得、それにより、それらのタンパク質に対して特異的なポリクローナル抗体を生成する。ポリクローナル抗体の製造方法は、当業者に良く知られている。例えば、Greenなど、（1992）Production of Polyclonal Antisera, in Immunochemical Protocols (Manson, ed.), page 1-5 (Humana Press), 及びColiganなど、（1992）Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters, in Current Protocols in Immunology, section 2.4.1を参照のこと。

30

【0035】

モノクローナル抗体を生成することが所望される場合、種々の従来の方法のいずれかが使用され得る。例えば、Kohlerなど、（1975）nature 256; 495; Coliganなど、（1988）Current Protocols in Immunology, section 2.5.1-2.6.7; 及びHarlowなど、（1988）Antibodies: A Laboratory Manual, page 726 (Cold Spring Harbor Pub.)を参照のこと。手短には、モノクローナル抗体は、抗原を含んで成る組成物をマウスに注射し、血清サンプルを除去することによって抗体生成の存在を確証し、Bリンパ球を得るために脾臓を除き、ハイブリドーマを生成するために前記Bリンパ球と骨髄腫細胞とを融合し、ハイブリドーマをクローニングし、抗原に対する抗体を生成する正のクローンを選択し、そしてハイブリドーマ培養物から抗体を単離することによって得られる。

40

【0036】

50

モノクローナル抗体は、種々の十分な確立されている技法により、ハイブリドーマ培養物から単離され、そして精製され得る。そのような単離技法は、プロテイン - A Sepharose を有する親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、抗原親和性精製及びイオン交換クロマトグラフィーを包含する。例えば、Coligan など、, Current Protocols in Immunology, sections 2.7.1 - 2.7.12 and sections 2.9.1 - 2.9.3; Barnes など、, (1992) Purification of Immunoglobulin G (IgG), in Methods in Molecular Biology, Vol. 10, pages 79 - 104 (Humana Press) を参照のこと。

10

【0037】

モノクローナル抗体はまた、従来の方法を用いて、組換え的に生成され得る。例えば本発明の抗体は、結合免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体に由来することができる。例えば、Barbas など、, (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology, Vol. 2, page 119; Winter など、, (1994) Ann. Rev. Immunol 12, 433, 及びアメリカ特許第6,004,555号を参照のこと。

【0038】

モノクローナル抗体のインビトロ及びインビボ操作方法は、当業者に良く知られている。インビトロ操作は、適切な培養培地、例えば任意には、哺乳類血清、例えばウシ胎児血清又は微量元素及び増殖維持サプリメント、例えば正常なマウス腹膜滲出物細胞、脾臓細胞、骨髓マクロファージにより補充された、ダルベッコ変性イーグル培地又はRPMI 1640培地において行われ得る。インビトロ生成は、比較的純粋な抗体調製物を提供し、そして多量の所望する抗体を生成するために拡大を可能にする。

20

【0039】

大規模ハイブリドーマ培養は、空中反応器において、連続攪拌反応器において、又は固定された又は閉じ込められた細胞培養において、均質懸濁培養により行われ得る。インビボ操作は、抗体生成腫瘍の増殖を引き起こすために、親細胞と組織適合できる哺乳類、例えば同系マウス中に細胞クローンを注入することによって行なわれ得る。任意には、動物は、注入の前、炭化水素、特に油、例えばプリスタンにより感作される。1~3週間後、所望するモノクローナル抗体が、動物の体液から回収される。

30

【0040】

ポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれかのフラグメントは、従来の方法を用いて、容易に生成され、そして単離され、そして/又は精製され得る。抗体フラグメントは、抗体のタンパク質加水分解により、又はフラグメントをコードするDNAの宿主(例えば、E.コリ)における発現により調製され得る。抗体フラグメントは、従来の方法により、完全な抗体の酵素(例えば、ペプシン又はパパイン)消化により得られる。例えば、抗体フラグメントは、F(ab')₂として示される5Sフラグメントを供給するために、ペプシンによる抗体の酵素分解により生成され得る。

【0041】

このフラグメントは、チオール還元剤、及び任意には、ジスルフィド結合の分解に起因するスルフィドリル基についてのブロック基を用いて分解され、3.5S Fab'-価フラグメント及びFcフラグメントが直接的に生成され得る。そのような方法は例えば、Goldenberg、アメリカ特許第4,036,945号及び第4,331,647号、及びそこに含まれる引例により記載される。また、Nisonhoff など、, (1960), Arch. Biochem. Biophys. 89, 230; Porter (1959), Biochem. J. 73, 119; Edelman など、, (1967) Methods in Enzymology, Vol. 1, page 422 (Academic Press); 及びColigan など、, Current Protocols in Immunology, section 2.8

40

50

． 1 - 2 . 8 . 1 0 及び 2 . 1 0 . 1 - 2 . 1 0 . 4 を参照のこと。

【 0 0 4 2 】

モノクローナル抗体は、従来の方法を用いて、部分的に又は完全にヒト適合され得る。例えば、ヒト適合された抗体は、ネズミ抗体（又はまさにその抗原 - 結合部位）の可変領域、及びヒト抗体に起因する不変領域、又はネズミモノクローナル抗体の抗原 - 結合部位及びヒト抗体に起因する可変フラグメント（抗原 - 結合部位を欠いている）を含んで成る。ヒト適合されたモノクローナル抗体に起因する抗体成分の使用は、ネズミ不変領域の免疫原性に関連する可能性ある問題を回避する。

【 0 0 4 3 】

ヒト適合されたモノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンのH及びL可変領域からのマウス相補的決定領域をヒト可変ドメイン中にトランスファーし、そして次に、ネズミの対応部分の骨格領域におけるヒト残基を置換することによって生成され得る。ネズミ免疫グロブリン可変ドメインをクローニングするための一般的な技法は、例えば次の文献に記載されている： Jones など . (1 9 8 6) , Nature 3 2 1 , 5 2 2 ; R i e c h m a n n など . (1 9 8 8) , Nature 3 3 2 ; L i u など . (1 9 8 7) , Proc . Natl . Acad . Sci . USA 8 4 , 3 4 3 9 ; L a r r i c k など . (1 9 8 9) , Bio / Technology 7 , 9 3 4 ; W i n t e r など . , (1 9 9 3) , T I P S 1 4 , 1 3 9 ; J o n e s など . (1 9 8 6) , nature 3 2 , 5 2 2 ; V e r h o y e n など . (1 9 8 8) , Science 2 3 , 1 5 3 4 ; C a r t e r など . (1 9 9 2) , Proc . Natl . Acad . Sci . USA 8 9 , 4 2 8 5 ; 及び Sandhu (1 9 9 2) , Crit . Rev . Biotech . 1 2 , 4 3 7 .

【 0 0 4 4 】

好ましい態様においては、ヒト抗体は、本発明の受容体又はそのフラグメントを、免疫グロブリン遺伝子がヒト I g 遺伝子の大きな部分により置換されているトランスジェニックマウス中に導入することによって生成される。生成される抗体は十分にヒトであり；そしてトランスジェニックマウスが、抗体 - 分泌性ハイブリドーマを生成するために使用され得る。そのようなトランスジェニックマウスを用いる方法は、例えば Green など . , (1 9 9 4) Nature Genet . 7 , 1 3 ; L o n b e r g など . , (1 9 9 4) Nature 3 6 8 , 8 5 6 ; 及び Taylor など . , (1 9 9 4) I n t . Immunol . 6 , 5 7 9 に記載されている。

【 0 0 4 5 】

IL - 1 2 又は IL - 1 8 受容体の個々のサブユニットに対して向けられた抗体又はそのフラグメントが単離されると、種々の従来、技術的に認識されているいずれかの方法が、本発明の二特異的（又は多特異的）抗体を形成するために、2種（又はそれ以上の）の異なった抗体成分を会合する（例えば、共有、又は非共有結合し；カップリングし；付着し；架橋し、連結し；接続し；接合する）ために使用され得る。ポリクローナル又は好ましくは、モノクローナル抗体、又はそのフラグメントが、出発材料として使用され得る。

【 0 0 4 6 】

非共有結合は、例えばロイシンジッパー、ビオチン / アビジン相互作用、水素結合、ファン・デル・ワールスカ、疎水性相互作用、等を包含する。中でも、可能な共有結合は、例えば天然において形成するジスルフィド結合（例えば、変性された F a b 又は F (a b ')₂ フラグメントの形成）、又は化学的架橋反応により形成される結合である。付着は、インビトロ（例えば、試験管において）、又は細胞内で生じる。二特異的抗体を生成し、精製し、そして特徴づけるための典型的な方法は、例えばアメリカ特許第 5 , 6 0 1 , 8 1 9 号；第 6 , 0 0 4 , 5 5 5 号及び第 5 , 7 6 2 , 9 3 0 号；及び Coa など . , (1 9 9 8) Bioc conjugate Chem . 9 . 6 3 5 - 6 4 4 に開示されている。

【 0 0 4 7 】

上記で示されたように、本発明の二特異的抗体を形成するために抗体成分を会合するため

に使用され得る一般的種類の方法は、1) 例えば、化学的架橋による成分のカップリング；2) 融合又はハイブリッドタンパク質を形成するために抗原結合領域の個々への異種ペプチドの付加、及びその付加されたペプチドを通しての融合又はハイブリッドタンパク質の連結；3) 2種の抗原特異性を含んで成る一本鎖抗体の生成；又は4) 例えば、ハイブリドーマの体細胞融合を包含する。

【0048】

二特異的抗体を生成するための第1の種類の方法においては、種々のタイプの成分が、二特異的抗体を形成するためにカップリングされ得る。例えば、2種の2価抗体（それぞれは、IL-12又はIL-18受容体サブユニットの異なったサブユニットに対して特異的である）が、分離され得、そして次に、半分の分子が、従来の方法を用いて、二特異的抗体を形成するために共有的に再連結され得る。そのような二特異的抗体は、個々の親分子からの通常のFc部分及び1つのFab部分を含んで成る。

10

【0049】

従って、1つのFab部分は、受容体サブユニットの1つに対して特異的であり、そして他は異なった受容体サブユニットに対して特異的である。もちろん、出発材料は、損なわれていない二価抗体である必要はない。例えば、それらは、フラグメント、例えばFabフラグメント、又は1又は複数のH鎖CH₂及び/又はCH₃ドメインをさらに含んで成るFabフラグメント（例えば、F(ab')₂フラグメント）であり得る。この方法により製造され得るいくつかのタイプの二特異的抗体の例示についての図1Aを参照のこと。出発材料は、天然に存在する抗体から生成され得、又はそれらは組換え的に生成され得る。

20

【0050】

種々の従来の方法のいずれかが、2種のポリペプチド鎖（例えば、抗体成分）を化学的にカップリングする（架橋する）ために使用され得る。共有結合は、存在する側鎖の直接的な縮重（例えば、システイン残基間でのジスルフィド結合の形成）により、又は外部の架橋分子の組みにより達成され得る。多くの二価又は多価剤が、ポリペプチドのカップリングにおいて有用である。抗体を化学的に架橋するために使用され得るいくつかの方法の記載については、例えば次の文献を参照のこと：

【0051】

Caοなど、(1988) *Bioconjugate Chemistry* 2, 635-644; Shalabyなど、(1992) *J. Exp. Med.* 175, 217-225; Glennieなど、(1987) *J. Immunol.* 139, 2367-2375; Jungなど、(1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 2431-2435; VanDijkなど、(1989) *Int. J. Cancer* 44, 738-743; Pierce *Immuno Technology Catalog & Handbook* (1991) E8-E39; Karpovskyなど、(1984) *J. Exp. Med.* 160, 1686; Liuなど、(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8648; Kranzなど、(1981), *PNAS* 78, 5807; Perezなど、(1986), *J. Exp. Med.* 163, 166-178; Brenna (1986) *Biotech.* 4, 424; 及びアメリカ特許第4,676,980号, 第6,010,902号及び第5,959,083号。

30

40

【0052】

一般的に、使用される架橋別は、-アミノ基又はチオール基と反応性の二官能価剤である。それらの架橋剤は、次の2種のカテゴリーに分類され得る：ホモ-及びヘテロ-二官能価剤。ホモ二官能価試薬は、例えば遊離チオール（例えば、内部H鎖又はFabジスルフィド結合の還元に基づいて生成される）と反応することができ、そして例えば、そのような遊離チオールを用いて2種のポリペプチド間にチオエーテル結合を形成することができる、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DNTB)、及びo-フェニレンジマレイミド(O-PDM)を包含する。

50

【0053】

ヘテロ二官能価試薬は、第2ポリペプチドとの反応を可能にするであろうポリペプチド上に反応基を導入することができる。例えば、N-スクシジンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)は、遊離チオール基を導入するために一次アミノ基と反応することができる。他の化学的架橋剤は、例えばカルボジイミド、ジイソシアネート、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-スクシンイミジル-オキシカルボニル- -メチル (2-ピリジルチオ)トルエン(SMPT)及びN-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)を包含する。

【0054】

架橋剤の2種の反応基間のスペーサーアームは、種々の長さの及び化学的組成を有することができる。より長いスペーサーアームは、接合されたポリペプチドの良好な柔軟性を可能にし、そしてその橋におけるいくつかの特定の成分(例えば、ベンゼン基)は反応基に特別な安定性付与し、又は種々の観点の作用に対しての化学結合の高められた耐性(例えば、還元試薬に対するジスルフィド結合耐性)を付与することができる。ペプチドスペーサー、例えばペプチドリinker又は下記に記載されるリンカーペプチドの使用がまた、企画される。

【0055】

二特異的抗体を生成する第2のカテゴリーの方法においては、2種の抗原結合領域の個々(それぞれは、異なった受容体サブユニットに対して特異的である)は、もう1つの成分、例えば種々の異種ペプチドのいずれか、すなわち免疫グロブリンに存在しないペプチド(時々、“ペプチドリinker”又は“融合ドメイン”としてとして本明細書においては、示される)に付加され、それによりハイブリッド又は融合タンパク質が生成される。次に、そのハイブリッド又は融合タンパク質は、前記付加された成分を通して会合される。付加された成分による多くのタイプの可能な会合のいくつかは、図1Bに示されている。

【0056】

1つの態様においては、成分、例えばビオチン及びアビジン(ストレプトアビジン)は抗原結合領域に複合体化され、それにより、ハイブリッド分子が形成され、そして従来の方法を用いて、ハイブリッド分子はビオチン及びアビジンを通して会合される。

【0057】

好ましい態様においては、付加された分子は、異種ペプチド(“ペプチドリinker”)である。中でも、使用され得る広範囲の種類のパペチドリinkerは、GST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)融合タンパク質、又はその二量体化モチーフ; PDZ二量化ドメイン; Fk-506BP(結合タンパク質)又はその二量体化モチーフ; p53の天然又は人工的ヘリックス-回転-ヘリックス二量体化ドメイン; 及びプロテインA又はその二量体化ドメイン(ドメインB)である。最も好ましい態様においては、付加されたペプチドは、ロイシンジッパーの成分である。ロイシンジッパー成分は、いずれか適切な源、例ヒト転写因子c-jun及びc-fosから取られる。もちろん、そのような異種ペプチドは、抗体分子の末端に付加される必要はない。例えば、異種ペプチドは、H鎖の2種の不変ドメイン間に挿入され得る。

【0058】

本発明の“ペプチドリinker”は、天然に存在する(野生型)ペプチドリinker(例えば、二量体化ドメイン)の変異体又はフラグメントを包含し、但し、ペプチドリinkerは適切な会合を形成する能力を保持すべきである。そのような変異体は、例えば1又は複数の天然に存在する(例えば、天然の突然変異を通して)、又は天然に存在しない(例えば、意図的な修飾により、例えば特定部位の突然変異誘発により)修飾、例えば挿入、欠失、及び/又は置換(保存性又は保存性)を有するペプチドを包含する。

【0059】

ペプチドリinkerは好ましくは、例えば立体的妨害により個々の他の活性を妨害することから2種の抗体成分を妨げるために適切な程度の柔軟性を提供し、正しいタンパク質折り

10

20

30

40

50

たたみを可能にし、そして必要なら、2種のたぶん広く間隔を開けられた同じ細胞上の受容体と抗体成分との相互作用を可能にするのに十分な長さであり；さらに、それは好ましくは、2種の抗体成分の細胞における安定した維持を可能にするのに十分な長さである。

【0060】

従って、その長さ、アミノ酸組成及び/又はコンホメーションを変えることによって、例えばそれに、さらに他の“第2リンカー成分”又は“ヒンジ成分”を付加することによって、ペプチドリナーを修飾することが所望され得る。中でも、多くのタイプの第2リンカー成分は、例えば小さな、好ましくは中性の及び極性又は非極性のアミノ酸、例えば種々の長さの及び組み合わせでのグリシン、セリン、トレオニン又はアラニン、ポリリシン；又は同様のものである。他方では、複数のリンカー及び/又は第2リンカー成分が使用され得る。柔軟ヒンジ領域、例えばヒトIgGのヒンジ領域、又は一定の間隔でセリン又はトレオニンにより中断されるポリグリシン反復体を使用することが時々、所望される。

10

【0061】

ペプチドリナーの長さ及び組織は、二特異的抗体の所望する性質、例えば同系受容体に結合するその能力を最適化するために、当業者によって容易に選択され得る。IL-12及び/又はIL-18受容体に結合するための従来のアッセイは、例えば次の文献に記載されている：Kunikataなど、(1998)、Cell Immunol. 189, 135-143 (IL-18R1)；Xuなど、(1998)、J. Exp. Med. 188, 1485-1492 (IL-18R1)；Roggeなど、(1999)、J. Immunol. 162, 3926-3932 (IL-12R2)；Gollobなど、(1997)、Eur. J. Immunol. 27, 647-652 (IL-12R1)；Wuなど、(2000)、Eur. J. Immunol. 30, 1364-1374 (IL-12R2)；及び例5-7。

20

【0062】

ペプチドリナーは、当業者に明らかである種々の手段、例えば上記に記載されるような化学的カップリング（必要なら、適切なアミノ酸基の誘導体化に続いて）；技術的に認識される方法によるペプチドの共有結合；ビオチン/アビジン相互作用を通しての結合；組換え方法；又はそれらの組合せにより、ハイブリッド又は融合タンパク質を形成するために抗原結合領域に付加され得る。本発明の“ハイブリッド”タンパク質は、抗原結合領域を含んで成る成分及びリンカーペプチドを含んで成る成分が、ペプチド結合よりも他の結合を通して（例えば、化学的カップリングにより、又はビオチン/アビジン相互作用を通して）連結されているタンパク質である。本発明の“融合”タンパク質は、そのような成分がペプチド結合により連結され、好ましくは組換え工程により達成されているタンパク質である。

30

【0063】

組換え融合タンパク質の製造方法は、従来通りであり、そして例えば、Ashkenaziなど、(1991) PNAS 88, 10535；Byrnなど、(1990) Nature 344, 677；Hollenbaughなど、(1992) “Construction of Immunoglobulin Fusion Protein”, in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pp. 10.19.1-10.19.11；WO93/10151号；及びアメリカ特許第5,457,035号に記載されている。融合タンパク質の個々は単一の発現ベクターにより独立的に発現され得るか、又は複数の融合タンパク質が同じ発現ベクターにより発現され得る。好ましくは、融合タンパク質の2種の成分をコードする配列は、整合して存在する。

40

【0064】

抗原結合領域は、付加された異種ペプチドに対して配向され、その結果、2種の抗体成分が会合される場合、抗原結合領域は、それらのN末端又はそれらのC末端を通して連結され、但し結合は、それらの同種受容体への1又は両抗原結合領域の結合能力を妨げるべきではない。好ましい態様においては、2種の抗原結合領域の結合能力を妨げるべきではな

50

い。好ましい態様においては、2種の抗原結合領域は、N末端近くに存在する、分子の“作用部分”（抗原結合部位）上の物理的制限を最少にするために、それらのC末端を通して連結される。可能なタイプの配向の例示のためには、図1Bを参照のこと。

【0065】

上記のようにして形成される1対のハイブリッド又は融合分子が、非共有又は共有結語により、付加される成分を通してお互い結合され得る。好ましい態様においては、結合は細胞内で生じる。2種の異なった融合分子の1つをそれぞれコードする、2種の別々のキメラポリヌクレオチドが同じ宿主細胞中にトランスフェクトされ、そしてそこにおいて同時発現される。そのようにして生成された融合ポリペプチドは、細胞内で又は分泌の間、お互い連結すると思われる。次に、それらは細胞溶解物から精製され、又は好ましくは、細胞から分泌され、そして培養培地から精製される。2種の融合タンパク質は、同じ発現ベクターから、又は2種の異なった発現ベクターから発現され得る。一般的に、融合タンパク質は、トランスフェクタント（形質転換体）の選択を促進するために、選択マーカーにより標識される。

10

【0066】

所望により、2種の組換え融合タンパク質の相対的量は、例えば異なった長さのプロモーターからそれらを発現することによって調節され得る。例えば、サブユニットAの付加されたペプチドが高頻度でホモダイマーを形成する場合、サブユニットBの付加されたペプチドは低頻度でホモダイマーを形成するが、AよりもサブユニットBをより高いレベルで発現することによって、所望するヘテロダイマーの形成を誘発することができる。最適な相対量は、通常の実験により、実験的に決定され得る。

20

【0067】

本発明はまた、上記のような融合タンパク質をコードするキメラポリヌクレオチド、そのような融合タンパク質を発現する宿主細胞、及び融合タンパク質が発現される条件下で細胞を培養し、そしてタンパク質を収穫する（回収する）ことを含んで成る、融合タンパク質の製造方法に関する。本発明の融合タンパク質はまた、上記のようなキメラポリヌクレオチドのインビトロ翻訳により製造され得る。本発明はまた、本発明の新規ハイブリッド又は融合タンパク質と免疫反応性の抗体（例えば、モノクローナル抗体）にも関する。

【0068】

本発明のキメラポリヌクレオチドは、それらの発現を支配する、コード配列及び調節配列の両者を含むことができる。そのような融合タンパク質（例えば、抗原結合領域又はペプチドリンカー）の成分に対応する核酸配列は、その対応する野生型分子をコードする核酸に対して実質的な同一性を示し、例えばそれは、対照配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、又は好ましくは、少なくとも10～約100又はそれ以上のヌクレオチドの比較窓に対して、少なくとも約95%、又はより好ましくは、少なくとも約98%の配列同一性を有する配列を含んで成る。2種の核酸が実質的な同一性を示すさらなる徴候は、2種の分子が選択される高い緊縮条件下でお互いハイブリダイズすることである。高い緊縮条件は、配列依存性であり、そして異なった環境パラメーターを伴って異なるであろう。

30

【0069】

一般的に、高い緊縮条件は、定義されるイオン強度及びpHで特定の配列に関する熱溶融点（ T_m ）よりも約5～20低く選択される。 T_m は、標的配列の50%が完全に適合されるプローブに対してハイブリダイズする温度（定義されるイオン強度及びpH下）である。典型的には、高い緊縮条件は、塩濃度がpH7で少なくとも約0.2モル濃度であり、そして温度が少なくとも約60であるそれらの条件であろう。本発明のポリヌクレオチドは、1又は複数の天然に存在するか又は天然に存在しない修飾、突然変異、多形現象、等を包含することができ；そして核酸は、遺伝子コードの縮重に影響を及ぼす塩基組成に関して、野生型の対応部分とは異なる。

40

【0070】

二特異的抗体を生成するための第3カテゴリーの方法においては、組換え技法は、一本鎖

50

二特異的抗体を生成するために使用される。一本鎖抗体結合タンパク質 (sFv) が、V_H 及び V_L 鎖、又はそのフラグメント又は変異体を、ペプチドリンカーにより連結することによって、興味ある2種の抗原結合領域の個々のために生成され；そして次に、2組の sFv が、二特異的一本鎖抗体 (bsFv) を形成するために、ペプチドリンカーにより連結される。いくつかの一本鎖二特異的抗体の例示のためには図1Cを参照のこと。sFv を生成するための典型的な方法は例えば、次の文献に記載されている：

【0071】

Whitlow など. (1991), *Methods; A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 97; Bird など. (1988). *Science* 242, 423-426; アメリカ特許第 4, 946, 778号、Pack など. (1993), *Bio/Technology* 11, 1271-77; and Sandhu (1992). *Crit. Rev. Biotech.* 12, 437. *Methods for generating bispecific single chain antibodies, in particular, are described, e.g. in* アメリカ特許第5, 892, 020号; Gruber など. (1994). *J. Immunol.* 152, 5368-74; Mallender など. (1994). *Biochemistry* 33, 10100-10108; Winter など. (1991). *Nature* 349, 293-299; Schmidt など. (1996). *International Journal of Cancer* 65, 538-546; 及び Thirion など. (1996). *Eur. J. of Cancer Prevention* 5, 507-511.

【0072】

一本鎖二特異的抗体、すなわちダイアボディー (diabodies) の変動がまた使用され得る。そのような分子の製造方法に関しては、例えば Holliger など. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 644-48 及び Coa など. (1998) *Bioconjugate Chem.* 9, 635-644 を参照のこと。

【0073】

二特異的一本鎖抗体における2種の sFv は、最適な相互作用のためにお互いから適切な距離で及び適切な配置での抗体成分の存在を可能にする、いずれかの長さ又はアミノ酸組成、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分離分離され得る。典型的なリンカーペプチドは、小さな好ましくは中性及び極性又は非極性のアミノ酸、例えばグリシン、セリン、トレオニン又はアラニン (種々の長さ及び組合せでの) ; ポリリシン; 又は同様のものを含む。

【0074】

リンカーペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸を有することができ、そして500又はそれ以上のアミノ酸を有することができる。好ましくは、リンカーは約100個以下のアミノ酸、最も好ましくは約10~30個のアミノ酸である。柔軟なリンカードメイン、例えばヒトIgGのヒンジ領域、又は一定の間隔でセリン又はトレオニンにより中断されるポリグリシン反復体が、単独で又は他の成分と組合して使用され得る。リンカーペプチドを選択し、そしてパラメーターを最適化するために、通常の方法が使用され得、その結果、2種の抗体成分が、最適な機能を可能にする、距離で及び配向で整列される。例えば、アメリカ特許第4, 935, 233号、第4, 751, 180号及び第5, 892, 020号を参照のこと。

【0075】

本発明はまた、上記のような一本鎖二特異的抗体分子をコードするキメラポリヌクレオチド; そのようなタンパク質を発現する宿主細胞: そのような細胞を、タンパク質が発現される条件下で培養し、そして前記タンパク質を収穫する (回収する) ことを含んで成る、そのようなタンパク質の製造方法; 及びそのような新規一本鎖ペプチドと免疫反応性の抗

体（例えば、モノクローナル抗体）に関する。本発明の一本鎖二特異的抗体はまた、そのようなキメラポリヌクレオチドのインビトロ翻訳により製造され得る。

そのようなキメラポリヌクレオチド及びその変異体の性質は、融合タンパク質に対応するポリヌクレオチドに関して上記で論じられている通りである。

【0076】

二特異的抗体を生成するための第4のカテゴリーの方法においては、2種の異なったクローン細胞系（例えば、ハイブリドーマ又はリンパ球）は、トリオーマ、クアドローマ又は他のポリドーマを形成するために融合され、そして分泌される二特異的抗体が単離される。そのような二特異的抗体は、個々の親細胞（例えば、ハイブリドーマ）からの通常のFc部分及び1つのFab部分を含んで成る。そのような細胞を融合するための方法は、従来通りであり、そしてアメリカ特許第5,959,084号、第4,474,893号、第5,643,759号及び第5,141,736号に記載されている。

10

【0077】

クアドローマを生成するために2種の確立されたハイブリドーマを融合するための典型的な方法は、次の文献に記載される：Milsteinなど、(1983) Nature 305, 537-540；Stearsなど、(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1453-1457；Sureshなど、(1986) Methods Enzymol. 121, 210-228；Sureshなど、(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7989；及びアメリカ特許第4,474,893号及び第5,643,759号。トリオーマを生成するために第2抗原により免疫化されたマウスからのリンパ球と1つの確立されたハイブリドーマを融合するための典型的な方法は、例えばNolanなど、(1990) Biochem. Biophys. Acta 1040, 1-11に記載されている。

20

【0078】

そのような方法により生成される抗体集団は、ホモ特異的及び二特異的分子を含む。二特異的モノクローナルの存在についてアッセイするための方法は、従来通りであり、そして例えば橋ELISAアッセイを包含する（例えば、Sureshなど、(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7989-93；Koolwijkなど、(1988) Hybridoma 7, 217-225；及びDe Lauなど、(1989) J. Immunol. 149, 1840-46を参照のこと）。二重抗原ELISAは、十分な量のそれぞれの抗原が入手できる場合に使用され得る。2種の異なったH鎖イソタイプがbsMAbに存在する場合、イソタイプ特異的試薬が、ハイブリッド分子の検出のために使用され得る。さらに、bsMAbを推定的に含むクローンの上清液が機能的に試験され得る。

30

【0079】

上記二特異的抗体の他に、多特異的抗体は、3又はそれよりも多くの抗体成分（例えば、IL-12受容体サブユニット及びAcPLの両者；IL-12受容体サブユニットの両者及びIL-18受容体の両者、等に対して特異的な抗体）を、いずれかの組み合わせで連結するために、上記方法のいずれか又はその組合せを選択することによって製造され得る。可能性ある変動のいくつかは、図2Aに要約されている。1つの態様においては、Fc領域が、第3の抗原結合領域を含むよう修飾され得る。

40

【0080】

例えば、Fc領域の一部又はすべてが、第3の抗原結合領域により置換され得る。そのような修飾は、従来の子工学技法により達成され得る。他の態様においては、二価の又は二特異的抗体が、お互い、並んで、頭-頭又は尾-尾の配向で架橋され得る。そのようなマルチマー抗体を製造し、そして使用するための典型的な方法に関しては、例えばTuttなど、(1991) Eur. J. Immunol. 21, 1351-58；Tuffなど、(1991) J. Immunol. 147, 60-69；及びCaoなど、(1988) Bioconjugate Chemistry 9,

50

635 - 644 を参照のこと。

【0081】

好ましくは、本発明の多特異的（例えば、二特異的）モノクローナル抗体は、上記で定義されたようにして“単離される”。本発明の二特異的モノクローナル抗体を単離し、そして/又は精製するための方法は、従来通りであり、そして一般的に、受容体サブユニット又はモノクローナル抗体の精製について上記に記載されるそれらの方法に類似する。中でも、使用され得る従来の精製方法は、例えば等電点電気泳動、親和性クロマトグラフィー、二重親和性クロマトグラフィー（例えば、連続的マウス抗-イディオタイプ抗-イソタイプモノクローナル抗体を用いる）、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、擬似親和性方法、グラジエントチオフィリッククロマトグラフィー又は高性能液体クロマトグラフィーである。純度の所望する程度は、タンパク質の意図される使用に依存する。

10

【0082】

細胞融合により調製される二特異的モノクローナル抗体は、ハイブリッドハイブリドーマ（又は他のポリドーマ）の上清液、又はハイブリッドハイブリドーマを注射されたマウスの腹水から得られる。

【0083】

二特異的抗体の調製方法が一特異的及び二特異的抗体の形成（例えば、化学的カップリングの方法に従って）をもたらす場合、所望する二特異的抗体は、2種の形の間の示差を可能にする種々の方法のいずれか、例えば分離用、非変性アクリルアミドゲルからの受動的溶出、又は種々の従来のクロマトグラフィー技法、例えばアニオン交換、HPLC又はチオフィリック吸着クロマトグラフィーにより、一特異的抗体から分離され得る（例えば、Kreutzなど、(1998) J. Chromatography 714, 161-170を参照のこと）。最も好ましい態様においては、個々の抗体成分は、異なった標識により標識され、そして二重標識され、二特異的抗体が単標識され一特異的抗体から、二重親和性クロマトグラフィーにより分離される。

20

【0084】

本発明はまた、例えば検出、処理、研究用具、等への本発明の多特異的抗体の使用方法に関する。

【0085】

本発明の抗体は、IL-12及び/又はIL-18のためのアンタゴニスト又はアゴニストとして作用することができる。それらの2種のサイトカインは、別々に又は一緒に、同種受容体又はそのサブユニットへの結合に基づいて、中でも次の活性を誘発することができる：T1型ヘルパー細胞応答の促進；活性化されたT及びNK細胞の細胞増殖の刺激；多くのサイトカイン、例えばIFN- γ の生成及び/又は発現の休止及び活性化されたT-及びNK-細胞による刺激；天然キラー（NK）細胞の細胞毒性の誘発；細胞溶解性T-細胞応答の増強；破骨細胞増殖の阻害；Jak2、Tyk2、Stat3、Stat4又は同様のもののチロシンリン酸化及び活性化；IL-18受容体又はIL-12受容体、Fasリガンド又はICAM-1のアップレギュレーション；又はMgD88、IRAK、TRAF-6、NIK、IKK又はIRAKの活性化を包含することができる、NF- κ Bの活性化。

30

40

【0086】

1又は複数の上記活性を増強する（例えば、少なくともある程度、高める）抗体は、“アンタゴニスト”として作用する。1又は複数のそれらの活性を阻害する（例えば、ある程度低める）抗体は、“アンタゴニスト”として作用する。もちろん、抗体は、同種受容体に結合し、受容体へのサイトカインの接近を妨げ、さらに、1又は複数の上記活性を実際的に増強し、；そのような場合、抗体は、アゴニストであると思われる。

【0087】

当業者は、抗体がアゴニストとして又はアンタゴニストとして作用するかどうかを、従来の方法を用いて、上記活性のいずれかについてアッセイすることにより容易に決定され得

50

る。例えば、次の文献を参照のこと：Tominga など．（2000）．*Intl. Immunol.* 12, 151 - 160；Yoshimoto など．，（1998）．*J. Immunol.* 161, 3400 - 3407；Xu など．（1998）．*J. Exp Med.* 188, 1485 - 1492；Kunikata など．（1998）．*Cell. Immunol.* 189, 135 - 143；Ahn など．（1997）．*J. Immunol.* 158, 1541 - 2131；Yoshimoto など．（1997）．*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3948 - 53；Munder など．（1998）．*J. Exp. Med.* 187, 2103 - 2108；Otani など．（1999）．*Cell. Immunol.* 198, 111 - 119；Hyodo など．（1999）．*J. Immunol.* 162, 1662 - 1668；

【0088】

Okamoto など．（1999）．*J. Immunol.* 3202 - 3211；Lauwerys など．（1999）．*Cytokine* 11, 822 - 830；Bacon など．（1995）．*J. Exp. Med.* 181, 399 - 404（*Jak2 and Tyk2*）；Jacobson など．（1995）．*J. Exp. Med.* 181, 1755 - 1762（*Stat3 and Stat4*）；Kojima など．（1999）．*J. Immunol.* 162, 5063 - 5069（*NF - B*）；Kojima など．（1998）．*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 183 - 186（*IRAK and Traf - 6*）；Ohtsuki など．（1997）．*Anticancer Res.* 17, 3253 - 3258（*Fas Ligand*）；及び Kohka など．（1998）．*J. Leukocyte Biol.* 64, 519 - 527（*ICAM - 1*）。

【0089】

本発明の操作のいずれか特定の理論に結びつけることを所望しないが、本発明の抗体は、例えば1又は複数の次の手段で、IL - 12及び/又はIL - 18受容体サブユニットを担持する細胞の生物学的機能を調節することができる。抗体は、1又は複数のIL - 12及び/又はIL - 18受容体サブユニットの細胞外ドメインに結合し、そしてそれにより、受容体への同様のリガンドの結合を阻害する。抗体は、1又は複数の上記機能のリガンドによる誘発を阻害する（抗体は、アンタゴニストとして作用し；抗体は、受容体機能を“中和し”、又は受容体機能を“阻止する”。

【0090】

抗体は、1又は複数の上記機能を刺激する（抗体はアゴニストとして作用する）。抗体は、1又は複数の受容体サブユニットの発現をアップ又はダウンレギュレートする。抗体は、1又は複数のサイトカインの活性をアップ又はダウンレギュレートする。抗体は、同種サイトカインの効果に対して、IL - 12及び/又はIL - 18受容体サブユニットを担持する細胞を敏感にする（アゴニストとして作用する）。

【0091】

抗体は、受容体サブユニットの1又は複数のシグナルトランスダクション機能を阻害し、そして/又は刺激する。抗体は、受容体サブユニットとの複合体化に基づいて、細胞外活性を刺激し、又は阻害し、例えば血清補体を活性化し、そして/又は抗体細胞毒性を仲介する。抗体は、それが毒性（免疫毒性）又は治療剤（例えば、薬剤）と会合される場合、毒性又は剤を細胞の表面に供給し、ここで次に、それは表面で作用し、または細胞により摂取される。

【0092】

本発明は、IL - 12及び/又はIL - 18の発現、又は受容体又はそのサブユニット、例えば過剰又は不適切な量のそれらのサイトカイン、及び/又はIL - 12及び/又はIL - 18受容体を有する細胞の過度の又は不適切な活性と関連する状態（例えば、病理学的状態）を処理し、又は妨げる方法に関し、ここで前記方法は、有効量の上記二特異的モ

ノクローナル抗体をそのような処理の必要な患者に投与することを含んで成る。特に好ましい態様においては、前記状態は、IL-12及びIL-18の両者の発現、及び/又はIL-12及びIL-18受容体を発現する(有する)細胞の過度の又は不適切な活性に関連する。

【0093】

IL-12及び/又はIL-18の活性は、独立して又は一緒に、上記に示される活性を包含する。本発明の二特異的モノクローナル抗体と受容体とを接触することによるIL-12及び/又はIL-18活性の阻止、増強又は修飾は、IL-12及び/又はIL-18により介在されるそれらの又は他の活性のいずれかを調節することができ、そして従って、それらのサイトカインにより、直接的に又は間接的に介在される状態又は障害を改善するために使用され得る。障害は、IL-12及び/又はIL-18が障害を引き起こすか(直接的に又は間接的に)又は悪化する場合、IL-12及び/又はIL-18により介在されると言われる。

10

【0094】

本発明の二特異的モノクローナル抗体は、IL-12のみにより、IL-18のみにより、又はIL-12及びIL-18の両者により介在される障害を処理するために使用され得る。いずれかの特定の機構によって結びつけられることを所望しないが、IL-12及びIL-18が相乗的に作用する場合(例えば、一定のNK細胞、CD4⁺T細胞、B細胞又はマクrophageにおいて)、細胞は、本発明の二特異的モノクローナル抗体による処理に対して特に敏感である(受け入れやすい)。

20

【0095】

さらに、再び、いずれの特定の理論によっても結びつけられることを所望しないが、本発明の二特異的モノクローナル抗体が、同じ細胞上に位置する(例えば、同時に、連続的に又は等位的に)IL-12及びIL-18受容体に結合する条件下で、二特異的抗体は、一特異的抗体よりもそれらの細胞に対する高い結合活性を示す。従って、それらの及び他の環境下で(例えば、他の因子の存在下で)、一特異的に抗体の量よりもより低い量の二特異的抗体が所定の応答を誘発するために必要とされる。

【0096】

中でも、本発明の二特異的モノクローナル抗体をその必要な患者に投与することによって処理されるか又は予防され得る多くのIL-12及び/又はIL-18関連の状態は、種々の炎症状態(例えば、慢性炎症)、免疫患者(例えば、自己免疫又はアロ抗原誘発された)、及びアレルギー性疾患である。中でも、処理されるか又は予防され得る状態は、内毒血症に関連する肝臓毒性、敗血性ショック、自己免疫脱髄性疾患、例えば多発性硬化症、リウマチ様関節炎、クローン病、ループス腎炎、乾癬、ぜん息、悪性貧血、萎縮性胃炎、Wegener肉芽腫症、円板状エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、炎症性腫症患、甲状腺機能亢進症、自己免疫溶貧血、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、アジソン症、ホジキン症、種々の白血病(例えば、ALL、SLL、AML及びCML)、HIV感染、過剰のIFN- γ の生成又は投与に起因する敗血性ショック、インスリン耐性及び幼年期開始糖尿病、アトピー性皮膚炎、及び急性又は慢性移植片拒絶(例えば、対宿主性移植片病)である。

30

40

【0097】

好ましい態様においては、本発明の二特異的抗体は、中和性抗体である。“中和性”とは、受容体サブユニットへの抗体の結合が同種サイトカインの結合を阻害するか又は妨げ、そしてそれにより、サイトカインの活性を阻害することを意味する。本発明の二特異的抗体は、それが単独で投与される場合、中和できないが、しかしそれが第2抗体(例えば二特異的抗体が特異的でない受容体サブユニットに対して特異的な抗体)と共に同時投与される場合、中和性になることができる。

【0098】

もう一つの態様においては、本発明の二特異的抗体が、その表面上でIL-12及び/又はIL-18受容体サブユニットを発現する細胞に毒素及び/又は治療物質(例えば、薬

50

剤)を供給するために使用される。毒素又は治療物質と称するそのような“剤”は、それがそれらの標的物に結合する2種の抗原-結合領域の能力を実質的に妨げないような手段で抗体に結合される(例えば、接合される)。例えば、剤は、Fc領域に結合される。他方では、剤がペプチドの形で存在する場合、それはFc領域のすべて又は一部を置換することができ、又はそれは第3抗体成分の抗原-結合領域の一部又はすべてを置換することができ、第3のFabフラグメントに類似する構造を形成する。そのような構造の例示については図2Bを参照のこと。

【0099】

本発明の剤は、その表面上でIL-12及び/又はIL-18受容体サブユニットを担持する細胞の発現を調節する(例えば、治療効果を提供し;細胞の生理学的活性を増強するか又は抑制し、又は細胞の増殖、殺害、破壊、排除、制御、修飾、等の阻害又は抑制を達成する)いずれかの物質であり得る。いずれかの効果的剤、例えば一般的に、上記に示される状態を処理するために使用される剤が使用され得る。

10

【0100】

中でも、使用され得る多くの毒性は、例えばリシン(例えば、そのA及び/又はB鎖、又は脱グルコシル化された形)、毒性レクチン、ジフテリア毒性、シュードモナス・アエルギノサからの外毒素、アブリン、モデクシン、ボッリナ毒素、 α -アマニタン、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質(PAP、例えばPAPI, PAPII及びPAP-S)、リボソーム阻害タンパク質、特に大麦、小麦、トウモロコシ、ライ麦又はゲロニン(geloinin)のリボソーム阻害タンパク質、又はリボソーム不活性糖タンパク質(GPIR)である。

20

【0101】

そのような毒性のフラグメント、サブユニット、ムテイン、擬似体、変異体及び/又は類似体はもちろん、当業者に知られており、そして本発明により包含される。それらの毒性性質を保持するすべてのそのような変異体は、本発明に従って使用されるであろうことが考慮される。多くの可能な治療薬剤、例えば種々の免疫抑制剤又は免疫調節剤、例えばデキサメタゾン、シクロスポリン又はFK506のいずれかが使用され得る。

【0102】

そのような剤は、本明細書に記載されるいずれかのタイプの方法、例えば化学的カップリング、ビオチン/アビジン相互作用又はペプチドリンカーを通しての結合、組換え方法、等により本発明の二特異的抗体に結合され得る。

30

もちろん、そのような毒素又は治療成分に接合される抗体は、中和する(受容体へのサイトカインの結合を阻止する)必要はない。むしろ、それらは標的細胞に剤を供給するよう作用することができ、その結果、その剤は、細胞の表面でその効果を発揮し、又は細胞中に組み込まれ得る。

本発明の抗体は、それらが毒素又は治療剤と会合されても、又はされなくても、単独で又は他の治療材と組合して投与され得る。

【0103】

当業者は、種々の適切なインビトロ又は細胞培養アッセイ、又は動物方法のいずれかにより、本発明の二特異的抗体の活性を測定することができる。いくつかのそのようなアッセイは本明細書に論じられる。さらなるインビボ方法は、例えば移植片-宿主反応を評価するためのシステム(例えば、Fanslowなど、(1990) Science 248, 739-741を参照のこと)、及び自己免疫脱髄性疾患、例えば多発性硬化症のための動物モデル(例えば、EAモデル)を包含する。

40

【0104】

MSの動物モデルの記載については、例えば、Goldなど、(2999), Mot. Med. Today 6, 88-91 and Swanborg (1995). Clin. Immunol. Immunopathol. 77, 4-13. For a description of some methods of using the EA animal model. See, e.g., Leonardなど、(199

50

5) . J . Exp . Med . 181 , 381 - 386 and Wildbaur n など . (1998) . J . Immunol . 161 , 6368 - 6374 .) を参照のこと。また、Dinare llo (1999) J . Allergy Clin . Immunol . 103 , 11 - 24 も参照のこと。

本発明の二特異的抗体は、従来の用量及び供給方法、例えば他の適合できる治療剤について記載されるそれらの方法を用いて投与され得る。

【0105】

投与されるべき用量は、当業者に知られている従来の方法により決定され得る。例えば、The Pharmacological Basis of Therapeutics , Goodman and Gilman , eds . , Macmillan Publishing Co . , New York を参照のこと。一般的に、効果的な用量は、所望する効果、例えば天然の受容体への内因性 IL - 12 及び / 又は IL - 18 の結合の阻止、又は薬剤への毒素の供給を生成するのに十分な量である。その用量は、副作用、例えば所望しない交差反応、過敏性反応及び同様のものを引き起こすほど多量であるべきではない。

【0106】

考慮されるべき要因は、包含される特定の抗体 / 剤の活性、作用のその代謝安定性及び長さ、投与のモード及び時間、薬剤の組合せ、排泄の速度、処理される種、及び治療を受ける宿主の年齢、体重、一般的な、性別、ダイエット及び特定の疾病状態の重症度を包含する。例えば、本発明の二特異的抗体についての適切な治療レジメは、約 0 . 1 mg / kg ~ 約 10 mg / kg の用量の患者への投与を包含する。

【0107】

適切な投与方法は、非経口及び経口投与路を包含する。非経口路は、例えば静脈内、門脈内、皮下、腹腔内、脊椎内、鞘内、脳血管内、頭側内、胸膜内又は他の注射路を包含する。経口路は、口、鼻、経皮、肺、直腸、頬、膺、眼を包含する。投与はまた、連続的注入、局部投与、移植体 (ゲル、膜又は同様のもの) からの持効性放出、及び / 又は静脈内注射によってであり得る。

【0108】

種々の投与態様のために有用な医薬組成物のための生成、例えば賦形剤、希釈剤及び / 又はキャリアーは、当業界において従来通りであり、そして、例えば Remington ' s Pharmaceutical Sciences , 18th ed . , Mack Publishing Company (1990) に記載されている。二特異的抗体は、例えば薬理的に許容できる液体、固体又は半固体において配合され、キャリアー又は標的分子 (例えば、抗体、ホルモン、成長因子、等) に連結され、そして / 又はインビボ投与の前、リポソーム、マイクロカプセル又は調節された放出調製物 (ヘテロダイマー受容体を発現する細胞を包含する) 中に組み込まれ得る。

【0109】

本発明はまた、IL - 12 及び / 又は IL - 18 受容体サブユニットを発現する細胞の検出方法、及び / 又は受容体サブユニットの検出方法に関し、ここで前記方法は、そのような細胞 (又は受容体サブユニット) を含むことができるサンプルと、ラベルされる (すなわち、検出できるか成分を含んで成る) 、本発明の二特異的モノクローナル抗体とを接触することを含んで成る。典型的には、受容体サブユニットを発現する細胞においては、受容体サブユニットの細胞外ドメインは細胞の表面で存在し、そして抗体への結合のために利用できる。

【0110】

従来の方法は、抗体をラベリングし、そして検出するために使用され得る。典型的なラベルは、例えば放射性同位体、放射性核種、リン光又は蛍光体、生物発光マーカー、染色又は同様のものを包含する。そのようなアッセイはもちろん、定量的であり得る。いずれかの理論によって結びつけられることを所望しないが、本発明の二特異的抗体が両標的受容体を担持する細胞について特に高い結合活性を示し、そして従って、受容体の 1 つのみを

発現する細胞よりもむしろそのような細胞を特異的にラベルすることが提案されている。

【0111】

本発明の1つの態様においては、アッセイは、興味ある剤が細胞（例えば、ヒト又はネズミ細胞；試験管において、培養において、又は動物において）の表面上のIL-12及び/又はIL-18受容体サブユニットの量の上昇又は低下を引き起こすかどうか、及び/又はそれが受容体サブユニットの生物学的活性（例えば、抗体に結合するその能力）を調節するかどうか（阻害するか又は増強するかどうか）を決定するために使用される。

【0112】

他方では、アッセイは、サイトカイン又は抗体への結合のためには利用できる遊離受容体の量をモニターすることによって（サイトカインにより飽和されなかった受容体のレベルを決定するために）、細胞におけるIL-2及び/又はIL-18の量を間接的にモニターすることができる。本発明のアッセイは、例えば剤の実験的特徴づけのために；体液におけるIL-18のレベルにより示され得る疾病の診断（例えば、放射線診断）のために；又は処理の効果をモニターするために使用され得る。

【0113】

さらなる労力を伴わないで、当業者は、前述の記載を用いて、本発明のその十分な程度に利用すると思われる。従って、前述の好ましい特異的の態様は、単なる例示的であって、開示の残りを制限するものではない。

前述及び次の例においては、すべての温度は 示され；そして特にことわらない限り、すべての部及び%は、重量によってである。

上記又は下記、及び図に示されるすべての出願、特許及び公報のすべての開示は、引用により本明細書に組み込まれる。

【0114】

実施例

1. 十分な長さのヒトIL-12及びIL-18受容体のサブユニットのクローニング

ヒトIL-12及びIL-18受容体サブユニット（例えば、十分な長さの分子）を、遺伝子特異的プライマー、及びconA-活性化され；IL-12及びIL-18刺激され、CD14-消費されたPBMCから単離された全RNAを用いて、逆転写ポリメラーゼ鎖反応（RT-PCR）により、標準の方法に従ってクローン化する。RTは、オリゴdTプライマーを用いて、Clontech “ Advantage RT-for-PCR kit ” により行われ、そして続いて、PCRは、コード配列の5'及び3'末端に対応するプライマーを用いて行われる。十分な長さのcDNAを、プライマー中に構築された制限酵素部位を通して、真核細胞発現ベクターpcDNA3.1(-)MYCHISB又はpcDNA3.1(-)PUR (Invirogen) 中にクローン化する。例えば、十分な長さのヒトIL-12R₂及びIL-18R cDNAをクローン化する。

【0115】

ヒトIL-12R₁：十分な長さのヒトIL-12R₁ cDNA（受託番号U03187号）の読み取り枠は、AA1~24のシグナルペプチドと共に662AAのタンパク質をコードする、位置65~2151である。

ヒトIL-12R₂：十分な長さのヒトIL-12R₂ cDNA（受託番号U64198号）の読み取り枠は、AA1~27のシグナルペプチドと共に862AAのタンパク質をコードする、位置641~3229である。

【0116】

ヒトIL-18R：十分な長さのヒトIL-18R cDNA（受託番号U43672号）の読み取り枠は、AA1~19のシグナルペプチドと共に541AAのタンパク質をコードする、位置25~1650である。

ヒトAcPL：十分な長さのヒトAcPL cDNA（受託番号AF077346号）の読み取り枠は、AA1~14のシグナルペプチドと共に599AAのタンパク質をコードする、位置484~2283である。

【0117】

2. ヒトIL-12及びIL-18受容体サブユニットの細胞外ドメインのクローニング
 ヒトIL-12及びIL-18受容体サブユニットの細胞外ドメインを例1に記載のよう
 にしてクローン化し、但し、3'プライマーは、それぞれのタンパク質の細胞外ドメイン
 のC-末端に対応する。例えば、ヒトIL-12R₂及びIL-18R_{cDNA}の細胞
 外ドメインをクローン化する。

ヒトIL-12R₁：ヒトIL-12R₁の細胞外ドメインは、AA1~540である。
 10

ヒトIL-12R₂：ヒトIL-12R₂の細胞外ドメインは、AA1~622である。

ヒトIL-18R：ヒトIL-18Rの細胞外ドメインは、AA1~329である。

ヒトAcPL：ヒトIL-AcPLの細胞外ドメインは、AA1~356である。

【0118】

3. ヒトIL-12又はIL-18受容体サブユニットに対するモノクローナル抗体の生成

細胞表面受容体分子に対する抗体（例えば、中和抗体）の生成方法は、免疫学の分野にお
 いて十分に記録されており、そして例えば、Methods in Molecular
 Biology, Vol. 45, Monoclonal Antibody Protocols, ed. by Davis, W.C., Human Press, Inc.,
 1995, 及びCurrent Protocols in Immunology, ed. by Coligan, J.E. など, J. Wiley & Sons,
 1992に記載されている。1つの免疫化方法は、細菌、昆虫細胞、酵母又は哺乳類
 細胞において発現される、受容体の精製された細胞外ドメインである抗原をマウスに注射
 することである。
 20

【0119】

好ましい免疫化方法は、マウスプレ-B細胞系において十分な長さの組換えヒト受容体を
 発現し、そして次に、前記細胞系が由来する同じマウス株（又は密接に関連する）中に、
 抗原としての安定してトランスフェクトされたマウス細胞を注入することである。この方
 法は、IL-12R₂について記載されている（Gollob, J.A. など, Eur. J. Immunol. 27: 647-652, 1997）。他の情況にお
 いては、他の種からの細胞は、PHA-活性化されたヒトPBMCを用いてIL-12受
 容体について記載のようにして、使用され得る（Gatelyなど, アメリカ特許第
 5,853,721号、Dec. 29, 1998）。免疫化されたマウスは、追加免疫
 化され、そして標準の方法に従って放血される。
 30

【0120】

マウスを、ヒトIL-12R₁及びIL-12R₂（IL-12受容体）又はヒトIL-
 18R及びAcPL（IL-18受容体）により安定してトランスフェクトされたマ
 ウスプレ-B細胞系により免疫化する。安定してトランスフェクトされた細胞上の機能的
 受容体の発現を、放射性ラベルされたりガンドによる結合研究により確かめる。免疫化さ
 れたマウスからの血清を、免疫化のために使用される同じ細胞系を用いて、標的受容体（
 IL-12又はIL-18）に対する抗体の存在についてスクリーンする。
 40

【0121】

トランスフェクトされていない細胞を、負の対照として使用する。受容体を発現する細胞
 へのリガンド結合の阻害による抗体の中和活性についてスクリーンすることができる。こ
 れは、免疫化のために使用される同じ細胞系、又は標的受容体を発現するもう一つの細胞
 系であり得る。IL-12及びIL-18受容体に関しては、それぞれ、ヒト天然キラー
 系NK-92及びヒト骨髄単球系KG-1を使用することができる（例7及び図8を参照
 のこと）。機能的受容体を発現する細胞においては、血清がまた、IFN- γ 生成を阻害
 するそれらの能力について試験され得る。

【0122】

10

20

30

40

50

標的受容体に対する抗体を生成するマウスからの脾臓細胞を、抗体 - 分泌性ハイブリドーマを生成するためにマウス骨髄腫細胞系により融合する。二特異的モノクローナル抗体の生成を促進するために（下記例 8 を参照のこと）、異なった薬剤耐性表現型を有する異なった骨髄腫系を、 $-IL-12$ 及び $-IL-18$ 受容体抗体生成細胞との融合のために使用することができる。ハイブリドーマからの培養培地を、上記のようにして、標的受容体に対する抗体についてスクリーンする。中和抗体を生成するハイブリドーマをクローン化し、そして抗体調製物を、大規模ハイブリドーマ培養培地、又はハイブリドーマを注射されたマウスからの腹水のいずれかから生成する。抗体を、カラム支持マトリックスに結合されるプロテイン A / G 又は特異的抗原のいずれかを用いて、親和性カラムクロマトグラフィーにより精製する。

10

【0123】

ヒトモノクローナル抗体を生成するために、ヒト免疫グロブリン H 鎖及び L 鎖遺伝子座の一部を担持し、そしてそれらの内因性対応物を欠いているトランスジェニックマウスを、初期免疫化のために使用する。Gen Pharm Int., Inc., により始めに開発された Medarex's HuMAb - マウス技法を、高い親和性ヒト抗体を生成するために使用した。

【0124】

4. EAE における、単独での $-IL-12$ 、単独での $-IL-18$ 、及び $-IL-12$ 及び $-IL-18$ の効果

多発性硬化症 (MS) の嚙歯動物モデルにおける $IL-12$ 及び $IL-18$ の効果を評価するために、S J L マウスにおける PLP - 誘導された、養子移入 EAE における $IL-12$ 及び $IL-18$ に対する抗体の効果を調べた。使用される $-IL-12$ 及び $-IL-18$ 抗体は市販されており、そしてそれぞれ、 $IL-12$ 及び $IL-18$ に応答してのネズミ Th1 クローン Ae7 における IFN - 生成を生成するそれらの能力のために、インビトロで中和することが示されている。 $-IL-18$ 抗体はまた、P. acnes / LPS - 処理されたマウスにおける肝臓損傷を低めるその能力のために、インビボで中和性であることが示された（例 10 及び図 9 を参照のこと）。

20

【0125】

単独での $-IL-12$: 図 3 は、 $-IL-12$ 処理が、PBS 又は対照 IgG に比較して、開始を遅延し、そして疾病評点を低めることを示す。また、異なった抗体を用いての、Leonard など, J. Exp. Med. 181: 381 - 396, 1995 により報告される実験を参照のこと。

30

市販のヤギ $-IL-12$ ポリクローナル抗体を、示される日、 $200 \mu g$ / マウスで i.p. 注射した。PBS を受けるか又は等量のヤギ IgG により処理されたマウスに比較して、 $-IL-12$ 処理されたマウスにおける、疾病の遅延された開始、及び低められたピークの臨床学的評点が存在した。 $-IL-12$ 処理されたマウスの臨床学的評点は、IgG 処理されたマウス ($n = 9 \sim 10$) とは有意に異なった ($p < 0.05$)。

【0126】

単独での $-IL-18$: 図 4 は、 $-IL-18$ 処理が疾病開始に対して効果を有さないが、しかし PBS 又は対照 IgG 2a に比較して、疾病評点を有意に悪化することを示す。

40

PLP - 誘発された養子移入 EAE 研究を、市販のラット $-IL-18$ ポリクローナル抗体を用いて、S J L マウスにおいて行った。示される日、 $250 \mu g$ / マウスを i.p. 注射した。PBS を受けるか又は等量の IgG により処理された対照マウスに比較して、 $-IL-18$ 処理されたマウスにおいて疾病の開始に差異は存在しなかった。しかしながら、 $-IL-18$ 処理されたマウスについての平均臨床学的評点は、PBS 又は IgG 対照マウスよりも有意に高かった。しかしながら、 $-IL-18$ 処理されたマウスについての平均臨床学的評点は、PBS 又は IgG 対照マウスよりも有意に高かった。

50

【0127】

- I L - 1 2 及び - I L - 1 8 : 図 5 は、組合された - I L - 1 2 及び - I L - 1 8 処理が、- I L - 1 2 のみによる処理と同じ保護効果を有することを示す。市販のヤギ - マウス I L - 1 2 ポリクローナル抗体を、示されるように、 $200 \mu\text{g} / \text{マウス}$ で *i . p .* 注射した。もう一つのグループのマウスは、- I L - 1 2 及び市販のラット - マウス I L - 1 8 モノクローナル抗体を受けた。示される日、 $250 \mu\text{g} / \text{マウス}$ を *i . p .* 注射した。等量のヤギ *I g G* により処理されたマウスと比較して、- I L - 1 2 及び - I L - 1 8 処理されたマウスにおいて疾病の遅延された開始及び低められたピークの臨床学的評点が存在した。- I L - 1 2、並びに - I L - 1 2 及び - I L - 1 8 により処理されたマウスは、*I g G* 処理されたマウス ($n = 9 \sim 10$) とは有意に異なったが ($p < 0 . 05$)、しかしお互いとは異ならなかった。

【0128】

5 . ヒト CD 1 4 - 消耗された P B M C における I L - 1 2 及び I L - 1 8 による I F N - 生成の相乗的誘発

サイトカイン I L - 1 2 及び I L - 1 8 は、プロ - 炎症 *T h 1* エフェクターサイトカイン、例えば *I F N -* の生成を補助することができる。図 6 は、*con A* - 感作され、I L - 1 2 / I L - 1 8 刺激された CD 1 4 - 消耗されたヒト P B M C における *I F N -* 生成の相乗的誘発を示すアッセイを示す。

【0129】

4 種の正常なドナーからの精製され、*con A* - 感作されたヒト CD 1 4 - 消耗された P B M C を、 $2 . 5 \times 10^5$ 個の細胞 / ml で、96 ウェルプレートにプレートした。示されるように、*DEX* (20 nM)、I L - 1 2 (10 pM) 又は I L - 1 8 (50 nM) を添加した。細胞を 16 ~ 24 時間インキュベートし、そして培養培地における *I F N -* の量を、*Biosource Cytoscreen I F N - ELISA* キットを用いて決定した。

【0130】

6 . ヒト CD 3⁺ 及び CD 4⁺ T 細胞における I L - 1 2 及び I L - 1 8 による I F N - 生成の相乗的誘発

CD 3⁺ 及び CD 4⁺ 細胞 を、*Con A* - 感作された、CD 1 4 - 消耗されたヒト P B M C から精製し、そして I L - 1 2 及び I L - 1 8 に対して応答するそれらの能力を調べた。図 7 に示されるように、CD 3⁺ 及び CD 4⁺ T 細胞 は I L - 1 2 及び I L - 1 8 に一緒に応答して *I F N -* を生成するが、しかし単独でのサイトカインに応答してはそれを生成しない。

【0131】

精製され、*con A* - 感作されたヒト CD 1 4 - 消耗された CD 3⁺ 又は CD 4⁺ T 細胞 (95% 以上の純度) を、 5×10^5 個の細胞 / ml で、96 ウェルプレートにプレートした。示されるように、 $50 \mu\text{g}$ の *DEX* (20 nM)、I L - 1 2 (10 pM) 又は I L - 1 8 (50 nM) を添加した。細胞を 16 ~ 24 時間インキュベートし、そして培養培地における *I F N -* の量を、*Biosource Cytoscreen I F N - ELISA* キットを用いて決定した。

【0132】

7 . NK - 9 2 細胞における I L - 1 2 及び KG - 1 細胞における I L - 1 8 による I F N - 生成の誘発

2 種のアッセイは、単独での I L - 1 2 及び I L - 1 2 の生活性を示す。NK - 9 2 は、悪性ホドキンリンパ腫を有する患者に起因する天然のキラー系である。KG - 1 は、急性骨髄性白血病を有する患者に起因する骨髄単球系である。NK - 9 2 及び KG - 1 細胞 は、それぞれ I L - 1 2 及び I L - 1 8 受容体を構成的に発現する。図 8 に示されるように、I L - 1 2 及び I L - 1 8 は、それぞれ NK - 9 2 及び KG - 1 細胞 において *I F N -* 生成を誘発する。

【0133】

10

20

30

40

50

KG-1細胞を、血清フリー培地において24時間、培養し、そして次に、 1×10^6 個の細胞/mlで96ウェルプレートにプレートした。示されるように、IL-18(50 nM)又はDEX(20 nM)を添加した。NK-92細胞を、100/mlのIL-2の存在下で培養し、そして 2.5×10^4 個の生存(トリパブルー陰性)細胞/mlで96ウェルプレートにプレートした。示されるように、IL-12(10 pM)又はDEX(20 nM)を添加した。KG-1及びNK-92細胞を16~24時間インキュベートし、そして培養培地におけるIFN- γ の量を、Biosource Cytoscreen IFN- γ ELISAキットを用いて決定した。

【0134】

8. 二特異的モノクローナル抗体の生成方法

二特異的モノクローナル抗体を、モノクローナル抗体を製造する当業者に良く知られている種々の方法により生成する(例えば、Caoなど、M. R. Bioconjugate Chem. 9: 635-644, 1998を参照のこと)。IL-12及びIL-18受容体を認識し、結合し、そして阻害する二特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する好ましい方法は、2腫のハイブリドーマを融合することにより形成されるクオドローマを生成することである(Cao, Y. など、J. Immunol. Methods 187: 1-7, 1995に記載される)。この二特異的抗体を、グラジエントチオトロフィック親和性クロマトグラフィーにより、クオドローマから精製できる(例えば、Kreuntz, F. T. など、J. Chromatog. 714: 161-170, 1998に記載のように)。

【0135】

9. 二特異的モノクローナル抗体の活性を示すためのインビトロアッセイ

IL-12/IL-18受容体に対するモノクローナル抗体又は二特異的ヒトモノクローナル抗体の中和活性を示すために使用され得るインビトロアッセイは、例えば例5, 6及び7, 及び図6, 7及び8に記載されている。

【0136】

10. 二特異的モノクローナル抗体の活性を示すためのインビボモデル

IL-12/IL-18受容体に対するモノクローナル抗体又は二特異的ヒトモノクローナル抗体の中和活性を示すために使用され得るインビボモデルは、例えばBalb/cマウスにおけるLPS誘発された内毒素ショック;ヌードマウスにおけるP. acnes/LPS誘発された肝臓損傷(図9を参照のこと);SILマウスにおけるPLP誘発された養子移入EAE(図3~5を参照のこと);及びDBA/1マウスにおけるII型コラーゲン誘発された関節炎を包含する。

【0137】

図9は、RDI-IL-18により処理されるマウスが、P. acnes/LPS肝臓損傷モデルにおいてより低い病理学を示すことを示す。雄nu/nu Balb/cマウスに、1mgの加熱殺害されたP. acnesを注射し(iv);RDI-IL-18又は正常なラットIgGを7日後に注射し;LPS(1 μ g)を、抗体の1時間後に注射し;マウスを24時間後に殺害し;そして肝臓を組織学的分析にゆだねた。RDI-IL-18抗体により処理された動物からの肝臓は、より低い病理学的評点を有した。それらの変化は、統計学的に有意であった(有意なレベル:5%、n=6/グループ/グループ、p値=0.0346)。

【0138】

前述の例は、本発明の遺伝学的に又は特異的に記載される反応体及び/又は操作条件と前述の例に使用されるそれらとを置換することによって、類似する好結果を伴って、反復され得る。

前述の記載から、当業者は、本発明の必須の特徴を容易に確かめることができ、そして本発明の範囲内で、本発明の種々の変更及び修飾を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

10

20

30

40

50

図 1 は、二特異的抗体のいくつかの例を示す。パネル A は、化学的架橋を示し；パネル B は付加される成分を通しての結合を示し；パネル C は単鎖ポリペプチドを示し；そしてパネル D は細胞融合により形成される分子を示す。

【図 2】

図 2 は、多特異的抗体のいくつかの例を示す。パネル A は、3 又はそれ以上の特異性を有する抗体を示し；パネル B は、毒性又は治療用ペプチドを含んで成る多特異的抗体を示す。

【図 3】

図 3 は、E A E における - I L - 1 2 処理の効果を示す。

【図 4】

図 4 は、E A E における - I L - 1 8 処理の効果を示す。

【図 5】

図 5 は、E A E における - I L - 1 2 及び - I L - 1 8 処理の効果を示す。

【図 6】

図 6 は、I L - 1 2 及び I L - 1 8 が C D 1 4 - 消耗されたヒト末梢血液単核細胞 (P M B C) における I F N - 生成を相乗的に誘発できることを示す。

【図 7】

図 7 は、I L - 1 2 及び I L - 1 8 が、C D 3 + 及び C D 4 + T 細胞において I F N - 生成を相乗的に誘発できることを示す。

【図 8】

図 8 は、I L - 1 8 刺激された K G - 1 細胞及び I L - 1 2 刺激された N K - 9 2 細胞における I F N - 生成を示す。

【図 9】

図 9 は、- I L - 1 8 モノクローナル抗体の活性を試験するためのインビボモデルを示す。

【図 1 A】

【図 1 B】

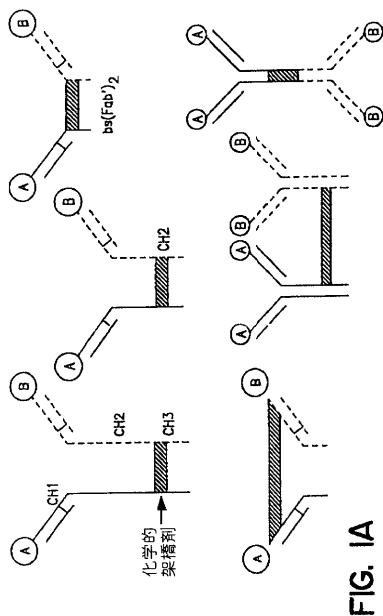


FIG. 1A

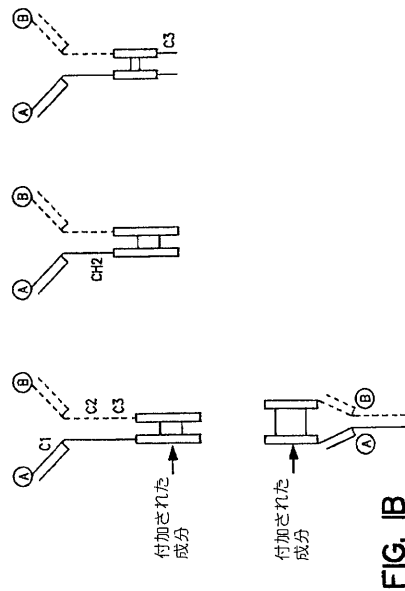


FIG. 1B

10

20

【 図 4 】

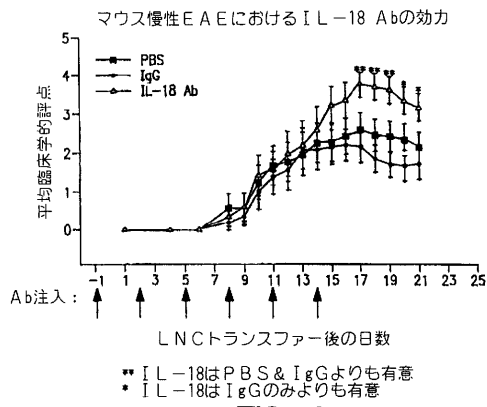


FIG. 4

【 図 5 】

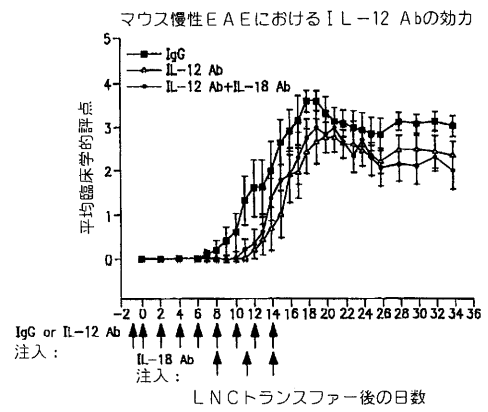


FIG. 5

【 図 6 】

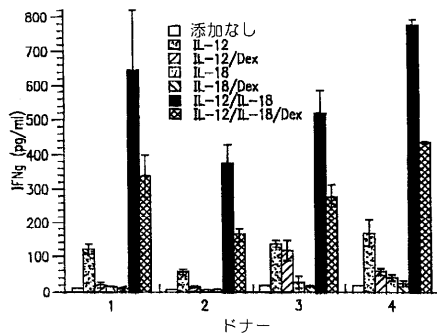


FIG. 6

【 図 7 】

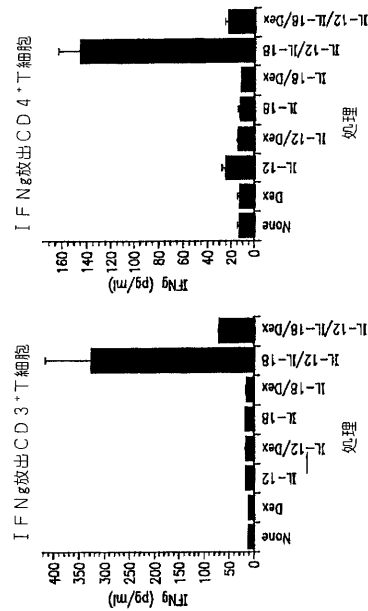


FIG. 7

【 図 8 】

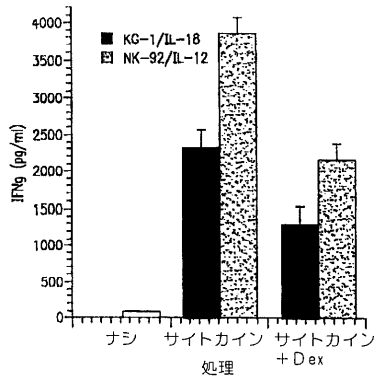


FIG. 8

【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
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

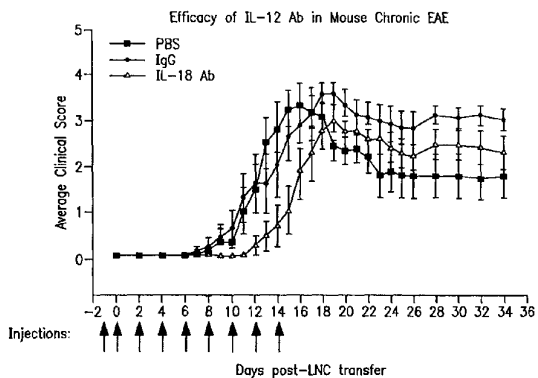
(10) International Publication Number
WO 03/008452 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 16/28, A61K 39/395, C07K 19/00, C12N 15/13, 5/10, A61P 37/00, G01N 33/577
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 13342 Berlin (DE).
- (21) International Application Number: PCT/US01/22862
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LEUNG, Stewart [US/US]; 2310 Cedar Street, El Cerrito, CA 94530 (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: 20 July 2001 (20.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (74) Agent: ZELANO, Anthony, J.; Millen, White, Zelano & Branigan, P.C., Arlington Courthouse Plaza I, Suite 1400, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).
- (30) Priority Data: 60/219,448 20 July 2000 (20.07.2000) US; 09/907,960 19 July 2001 (19.07.2001) US
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI, 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, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/219,448 (CIP) Filed on 19 July 2001 (19.07.2001)

[Continued on next page]

(54) Title: BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO IL-12 AND IL-18

WO 03/008452 A2



(57) Abstract: A bispecific monoclonal antibody is described which comprises two moieties, one of which comprises an antigen-binding region which is specific for either the IL-12β1 or the IL-12Rβ2 subunit of an IL-12 receptor, and the other of which comprises an antigen-binding region which is specific for either the IL-18R or the AcPI subunit of an IL-18 receptor.

WO 03/008452 A2 

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, 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.

BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO IL-12 AND IL-18

This application claims the benefit of the filing date of U.S. Provisional application Ser. No. 60/219,448, filed July 20, 2000.

Field of the Invention

5 This invention relates, *e.g.*, to bispecific antibodies having specificities for the subunits of interleukin-12 and/or interleukin-18 receptors.

Background of the Invention

10 Interleukin-12 (IL-12), formerly called cytotoxic lymphocyte maturation factor or NK cell stimulatory factor, and Interleukin-18 (IL-18), formerly called IFN- γ (interferon gamma)-inducing factor, are cytokines which exhibit many biological activities.

The biological activities of IL-12 and IL-18 are mediated by the binding of the cytokines to their cognate receptors on cell surfaces, *e.g.*, T cells, B cells, NK cells or macrophages, in particular on Th precursors. IL-12 receptors comprise at least two subunits, IL-12R β 1 (also known as the beta 1 chain) and IL-12R β 2 (also known as the beta 2 chain). IL-18 receptors comprise at least two subunits: IL-18R (also known as IL-1R-related protein, IL-1Rrp, IL-18R α , 2FI or the "binding chain") and AcPL (also known as accessory protein-like, IL-18-AcPL, IL-18R β or the "signaling chain").

20

Description of the Invention

This invention relates, *e.g.*, to a multispecific antibody (*e.g.*, a polyclonal or monoclonal antibody) which is directed against at least one subunit of an IL-12 receptor and/or at least one subunit of an IL-18 receptor. It is to be understood that, although the discussion herein focuses primarily on the IL-12 receptor subunits IL-12R β 1 and IL-12R β 2, and the IL-18 receptor subunits IL-18R1 and AcPL, other

25

receptors to which IL-12 or IL-18 bind are also included. The invention encompasses multimeric antibodies which are directed against any combination of the above-mentioned receptors, *e.g.*, against two IL-12 receptor subunits, against two IL-18 receptor subunits, against one IL-12 receptor subunit and one IL-18 receptor subunit, against three or four of the above-mentioned receptor subunits, etc. In a preferred embodiment, the antibody is monoclonal, is bispecific, and is directed against one subunit of an IL-12 receptor and one subunit of an IL-18 receptor (*e.g.*, IL-12R β 2 and IL-18R1, IL-12R β 2 and AcPL, etc.).

By "multispecific" antibody is meant herein an antibody having at least two distinct antibody specificities. Such an antibody can be a single antibody (or an antibody fragment) having multiple specificities, or an aggregate of two or more antibodies (or antibody fragments), each having one or more different specificities. As used herein, when referring to the specific binding of an antibody to an antigen, the terms "binds to," "has a binding affinity for," "is specific for," and "is directed against" are interchangeable and mean that the antibody binds selectively or preferentially to a defined epitope in the antigen (*e.g.*, a polypeptide, polypeptide fragment or peptide).

By "bispecific" antibody is meant herein a single antibody or antibody fragment having two distinct binding specificities. That is, a bispecific antibody comprises two moieties, each of which comprises a binding region that is specific for a different antigenic target. A "binding region" is a portion of an antibody (a polypeptide or a peptide) which comprises an antigen-binding site (a combining site for an antigen).

"Antibodies" of the invention include polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, hybrid or chimeric antibodies, single chain antibodies, fragments such as, *e.g.*, Fab, F(ab'), F(ab)₂, or the like. "Antibodies" can be isolated from any mammalian species, *e.g.*, they can be murine, partially or fully humanized, or human; and they include broadly any immunological binding agent such as, *e.g.*, IgE, IgM, IgA, IgD or, preferably, IgG.

One aspect of the invention is a bispecific monoclonal antibody comprising two moieties, one of which comprises an antigen-binding region that is specific for a subunit of an IL-12 receptor, and the other of which comprises an antigen-binding region that is specific for a subunit of an IL-18 receptor, wherein the two moieties are associated by one or more chemical cross-linkers. An example of such a bispecific antibody is one in which the antigen-binding regions recognize extracellular domains of the receptor subunits and which blocks cytokine binding without stimulating the receptors.

Another aspect of the invention is a bispecific monoclonal antibody comprising two moieties as above, wherein the antigen-binding region of each moiety is appended to a heterologous peptide, and the two moieties are associated via the appended heterologous peptides.

Another aspect of the invention is a bispecific monoclonal antibody comprising an antigen-binding region specific for a subunit of an IL-12 receptor and an antigen-binding region specific for a subunit of an IL-18 receptor, wherein the two regions form (are part of) a single polypeptide chain.

This invention also relates to methods of using the antibody, for instance a method for detecting cells expressing IL-12 and/or IL-18 receptors in a sample which may contain such cells, comprising contacting the sample with a bispecific monoclonal antibody 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-12 and/or IL-18, including excessive or inappropriate amounts of those cytokines, and/or with excessive or inappropriate activity of cells possessing IL-12 and/or IL-18 receptors, comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a bispecific monoclonal antibody as above.

The multispecific (*e.g.*, bispecific) antibodies of the invention can be prepared in any suitable manner, *e.g.*, 1) by individually preparing antibodies

specific for two or more of the receptor subunits, or fragments thereof, and then associating the antibodies, or portions thereof, in various combinations, for example by chemical cross-linking; 2) by preparing individual antibodies as above and then associating them via appended moieties, such as heterologous peptides; 3) by using
5 recombinant methods to prepare a single chain antibody having at least two receptor subunit specificities; or 4) by fusing two or more different cell lines (*e.g.*, hybridomas), each of which produces an antibody directed against one of the receptor subunits, or a fragment thereof, to form a trioma, quadroma or other polydroma, and then isolating multispecific (*e.g.*, bispecific) antibodies which are
10 secreted from the fused cells.

Antibodies specific for a given receptor subunit or a fragment thereof can be obtained according to any suitable method. For example, one can isolate the receptor or fragment, purify it as necessary, and immunize an animal with it. All of these procedures are conventional for a skilled worker.

15 The IL12R β 1 and IL12R β 2 receptor subunits of the IL-12 receptor have been purified, characterized, cloned and sequenced from both mouse and human sources. For procedures to purify, manipulate and/or clone IL12R β 1 or IL12R β 2, and/or for a disclosure of their sequences, see, *e.g.*, Chua *et al.*, (1994) *J. Immunol.* 153, 128; U.S. Pat. No. 5,919,903; Chua *et al.* (1994) *J. Immunol.* 153, 128-136;
20 Chua *et al.* (1995) *J. Immunol.* 155, 4286-4294; and Presky *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14002-14007. The IL-18R and AcPL receptor subunits of the IL-18 receptor have also 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.*,
25 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.

Fragments of receptor subunits which can be used as immunogens can be of any size which elicits an antibody response. In a preferred embodiment, fragments corresponding to extracellular domains of the receptors (portions of the receptors which, in an intact cell, are available for binding to a ligand or an antibody) are used. Extracellular domains of IL-12 and IL-18 receptor subunits have been identified and characterized. See, *e.g.*, EP 759466 A2 for the IL-12 receptor subunits, and WO 97/31010 and Born *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 29,445-50 for the IL-18 receptor subunits. Extracellular domains, fragments thereof, and polypeptides comprising the domains, can be generated from intact receptor subunits by conventional methods, (*e.g.*, with proteases or by chemical cleavage), or can be prepared recombinantly, *e.g.*, as discussed below and in Example 1. Naturally occurring extracellular forms, such as, *e.g.*, "decoy" receptors, can also be used.

The receptor subunit polypeptides or fragments thereof can be isolated from any of a variety of sources, *e.g.*, *in vivo* sources (for example, lung, spleen, epithelial cells, endothelial cells, interstitial cells, chondrocytes, monocytes, granulocytes, lymphocytes, neurocytes, etc.); established cell lines which express one or more of the polypeptides (*e.g.*, hematopoietic cells, including lymphocytes, peripheral blood T cells and NK cells); cells (*e.g.*, lymphoma cells) which secrete one or more of the polypeptides; or recombinant cells which express and, optionally, secrete the polypeptides.

Recombinant cells which express the receptor subunits or fragments thereof can be prepared by conventional methods. As a first step in the generation of such recombinant clones, polynucleotides (*e.g.*, DNA fragments) encoding receptor subunits or fragments thereof can be 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); human and murine AcPL (see, *e.g.*, Born *et al.*, supra); human and murine IL-12R β 1 (see, *e.g.*, Chua *et al.*, 1994, 1995 supra); or human and murine IL-12R β 2 (see, *e.g.*, Presky *et al.*, 1996, supra).

5 In another embodiment, polynucleotides encoding receptor subunits, or fragments thereof, can be generated by PCR amplification by selecting appropriate primers based on published sequences such as those above. Methods of PCR amplification, including 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*
10 *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 receptor subunits, or fragments thereof, can be generated by chemical synthesis. Of course, combinations of the above recombinant or non-recombinant methods, or other
15 conventional methods, can also be employed.

Once a polynucleotide encoding a receptor subunit or a fragment thereof 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
20 as hosts, including prokaryotes, yeast, and mammalian, insect or plant cells, or in a transgenic, non-human animal. In a preferred embodiment, the expressed polypeptides are secreted by the cell in order to facilitate purification. 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.
25 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.

WO 03/008452

PCT/US01/22862

7

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 acids encoding receptor subunits or fragments 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; Purcel *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.

Preferably, a receptor subunit or fragment thereof 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 receptor subunit, or fragment thereof, of the invention. The desired degree of purity may depend on the intended use of the protein. For example, crude preparations of cells transfected with a receptor can be used to generate an antibody, provided that a screening procedure is available which can detect the appropriate

monoclonal antibodies. Typically, the protein is substantially purified. The term "substantially purified," as used herein, refers to a protein 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. Receptor subunits or fragments thereof 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, HPLC, and/or gel filtration. In a preferred embodiment, affinity chromatography is used, *e.g.*, with a column containing IL-12 or IL-18, or another appropriate ligand; an appropriate lectin, such as, *e.g.*, wheat germ agglutinin; or antibodies specific for the IL-12 and/or IL-18 receptors. In a particularly preferred embodiment, a protein is "tagged" with a moiety, preferably a cleavable one, that can bind to an appropriate affinity column. For example, it 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-Asp-Lys (available from Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, CT). Other such antigenic identifiers are described in U.S. Pat. 5,011,912 and in Hopp *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6, 1204. 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. Combinations of any of the above types of tags can be used, of course.

In a preferred embodiment, individual receptor subunits are expressed separately in recombinant cells. With other methods, in which the receptor subunits
5 are present as mixtures with one or more other receptor subunits, it may be necessary to isolate each receptor subunit individually before introduction into an animal. Such separations can be performed by any of a variety of procedures, *e.g.*, passive elution from preparative, non-denaturing acrylamide gels, or chromatographic techniques, *e.g.*, affinity chromatography of "tagged" molecules
10 as described above.

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

Once receptor subunits or fragments thereof have been isolated, they can be
15 used to immunize animals (*e.g.*, mouse, rabbit, rat, hamster, guinea pig, goat, etc.), thereby generating polyclonal antibodies specific for those proteins. Methods of making polyclonal antibodies well-known to those of skill in the art. See, for example, Green *et al.* (1992) Production of Polyclonal Antisera, in *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), pages 1-5 (Humana Press); and Coligan *et al.* (1992)
20 Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters, in *Current Protocols in Immunology*, section 2.4.1.

If it is desired to generate monoclonal antibodies, any of a variety of conventional methods can be used. See, for example, Kohler *et al.* (1975), *Nature* 256, 495; Coligan *et al.* (1988), *Current Protocols in Immunology*, sections 2.5.1-
25 2.6.7; and Harlow *et al.* (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, page 726 (Cold Spring Harbor Pub.). Briefly, monoclonal antibodies can be obtained by injecting mice with a composition comprising an antigen, verifying the presence of antibody production by removing a serum sample, removing the spleen to obtain B

lymphocytes, fusing the B lymphocytes with myeloma cells to produce hybridomas, cloning the hybridomas, selecting positive clones that produce antibodies to the antigen, and isolating the antibodies from the hybridoma cultures. Monoclonal antibodies can be isolated and purified from hybridoma cultures by a variety of well-

5 established techniques. Such isolation techniques include affinity chromatography with Protein-A Sepharose, size-exclusion chromatography, antigen affinity purification and ion-exchange chromatography. See, e.g., Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, sections 2.7.1-2.7.12 and sections 2.9.1-2.9.3; Barnes *et al.*, (1992), Purification of Immunoglobulin G (IgG), in *Methods in Molecular Biology, Vol. 10*,

10 pages 79-104 (Humana Press).

Monoclonal antibodies can also be generated recombinantly, using conventional procedures. For example, antibodies of the invention may be derived from antibody fragments isolated from a combinatorial immunoglobulin library. See, for example, Barbas *et al.* (1991), *Methods: A Companion to Methods in Enzymology, Vol. 2*, page 119; Winter *et al.* (1994), *Ann. Rev. Immunol.* 12, 433, and U.S Patent

15 No. 6,004,555.

Methods of *in vitro* and *in vivo* multiplication of monoclonal antibodies are well-known to those skilled in the art. Multiplication *in vitro* may be carried out in suitable culture media such as Dulbecco's Modified Eagle Medium or RPMI 1640 medium, optionally replenished by a mammalian serum such as fetal calf serum or

20 trace elements and growth-sustaining supplements such as normal mouse peritoneal exudate cells, spleen cells, bone marrow macrophages. Production *in vitro* provides relatively pure antibody preparations and allows scale-up to yield large amounts of the desired antibodies. Large scale hybridoma cultivation can be carried out by

25 homogenous suspension culture in an airlift reactor, in a continuous stirrer reactor, or in immobilized or entrapped cell culture. Multiplication *in vivo* may be carried out by injecting cell clones into mammals histocompatible with the parent cells, e.g., syngeneic mice, to cause growth of antibody-producing tumors. Optionally, the animals are primed with a hydrocarbon, especially oils such as pristane

(tetramethylpentadecane) prior to injection. After one to three weeks, the desired monoclonal antibody is recovered from the body fluid of the animal.

Fragments of either polyclonal or monoclonal antibodies, can be readily generated and isolated and/or purified, using conventional procedures. Antibody fragments can be prepared by proteolytic hydrolysis of the antibody or by expression in a host (*e.g.*, *E. coli*) of DNA encoding the fragment. Antibody fragments can be obtained by enzyme (*e.g.*, pepsin or papain) digestion of whole antibodies by conventional methods. For example, antibody fragments can be produced by enzymatic cleavage of antibodies with pepsin to provide a 5S fragment denoted F(ab')₂. This fragment can be further cleaved using a thiol reducing agent, and optionally a blocking group for the sulfhydryl groups resulting from cleavage of disulfide linkages, to produce 3.5S Fab' monovalent fragments and an Fc fragment directly. Such methods are described, for example, by Goldenberg, U.S. Patent Nos. 4,036,945 and 4,331,647, and references contained therein. See also Nisonhoff *et al.* (1960), *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 230; Porter (1959), *Biochem. J.* 73, 119; Edelman *et al.* (1967), *Methods in Enzymology*, Vol. 1, page 422 (Academic Press); and Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, sections 2.8.1-2.8.10 and 2.10.1-2.10.4.

Monoclonal antibodies can be partially or completely humanized, using conventional procedures. For example, a humanized antibody can comprise a variable region of a murine antibody (or just the antigen-binding site thereof) and a constant region derived from a human antibody, or the antigen-binding site of a murine monoclonal antibody and a variable fragment (lacking the antigen-binding site) derived from a human antibody. The use of antibody components derived from humanized monoclonal antibodies obviates potential problems associated with the immunogenicity of murine constant regions.

Humanized monoclonal antibodies can be produced by transferring mouse complementary determining regions from heavy and light variable chains of the mouse immunoglobulin into a human variable domain, and then substituting human

residues in the framework regions of the murine counterparts. General techniques for cloning murine immunoglobulin variable domains are described, for example, by Orlandi *et al.* (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3833. Techniques for producing humanized monoclonal antibodies are described, for example, by Jones *et al.* (1986), *Nature* **321**, 522; Riechmann *et al.* (1988), *Nature* **332**, 323; Liu *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3439; Larrick *et al.* (1989), *BioTechnology* **7**, 934; Winter *et al.* (1993), *TIPS* **14**, 139; Jones *et al.* (1986), *Nature* **32**, 522; Verhoyen *et al.* (1988), *Science* **23**, 1534; Carter *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4285; and Sandhu (1992), *Crit. Rev. Biotech.* **12**, 437.

In a preferred embodiment, human antibodies are generated by introducing receptors or fragments thereof of the invention into a transgenic mouse in which the immunoglobulin genes have been replaced by large portions of human Ig genes. The antibodies produced are fully human; and the transgenic mice can be used to produce human antibody-secreting hybridomas. Methods of using such transgenic mice are described, *e.g.*, in Green *et al.* (1994), *Nature Genet.* **7**, 13 (1994); Lonberg *et al.* (1994), *Nature* **368**, 856; and Taylor *et al.* (1994), *Int. Immunol.* **6**, 579 (1994)

Once antibodies or fragments thereof directed against individual subunits of IL-12 or IL-18 receptors have been isolated, any of 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; conjugate) two (or more) different antibody moieties to form a bispecific (or multispecific) antibody of the invention. Polyclonal or, preferably, monoclonal antibodies, or fragments thereof, can be used as starting materials. 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. The attachment can occur *in vitro* (*e.g.*, in a test tube) or within a cell.

Typical methods of generating, purifying and characterizing bispecific antibodies are disclosed, *e.g.*, in U.S. Pat. Nos. 5,601,819; 6,004,555 and 5,762,930; and Coa *et al.* (1998), *Bioconjugate Chem.* 9, 635-644.

As noted above, the general categories of methods which can be used to associate antibody moieties to form the bispecific antibodies of the invention include 1) coupling the moieties by, *e.g.*, chemical crosslinking; 2) appending heterologous peptides to each of the antigen-binding regions to form fusion or hybrid proteins, and joining the fusion or hybrid proteins via the appended peptides; 3) generating single chain antibodies comprising the two antigenic specificities; or 4) somatic fusion of, *e.g.*, hybridomas.

In the first category of methods to generate bispecific antibodies, a variety of types of moieties can be coupled to form bispecific antibodies. For example, two bivalent antibodies, each specific for a different one of the IL-12 or IL-18 receptor subunits, can be separated and the half molecules then rejoined covalently to form a bispecific antibody, using conventional procedures. Such a bispecific antibody comprises a common Fc portion and one Fab portion from each of the parental molecules. Thus, one Fab portion is specific for one of the receptor subunits, and the other is specific for a different receptor subunit. Of course, the starting materials need not be intact, bivalent antibodies. For example, they can be fragments, *e.g.*, Fab fragments, or Fab fragments further comprising one or more heavy chain CH2 and/or CH3 domains (*e.g.*, F(ab')₂ fragments). See Figure 1A for an illustration of some of the types of bispecific antibodies which can be made by this method. The starting materials can be generated from naturally occurring antibodies or they can be produced recombinantly.

Any of a variety of conventional methods can be used to chemically couple (cross-link) two polypeptide chains (*e.g.*, antibody moieties). 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. For a description of some methods which can be used to chemically cross-link antibodies, see, *e.g.*, Cao *et al.* (1988) *Bioconjugate Chemistry* **9**, 635-644; Shalaby *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 217-225; Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**, 2367-2375; Jung *et al.* (1991) *Eur. J. Immunol.* **21**, 2431-2435; VanDijk *et al.* (1989) *Int. J. Cancer* **44**, 738-743; Pierce ImmunoTechnology Catalog & Handbook (1991) E8-E39; Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* **160**, 1686; Liu *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8648; Kranz *et al.* (1981), *PNAS* **78**, 5807; Perez *et al.* (1986), *J. Exp. Med.* **163**, 166-178; Brennan (1986) *Biotech.* **4**, 424; and U.S.Pat. Nos 4,676,980, 6,010,902 and 5,959,083.

In general, the cross-linking agents used are bifunctional agents reactive 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 inter heavy chain or Fab 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-pyridyldithio) 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).

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 lend 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 are also contemplated.

5 In the second category of methods to generate bispecific antibodies, each of two antigen-binding regions, each specific for a different receptor subunit, is appended to another moiety, *e.g.*, any of a variety of heterologous peptides, *i.e.*, peptides which do not occur in immunoglobins (sometimes designated herein as "peptide linkers" or "fusion domains"), thereby generating hybrid or fusion
10 proteins. The hybrid or fusion proteins are then associated via the appended moieties. Some of the many types of possible associations via appended moieties are illustrated in Figure 1B.

In one embodiment, moieties such as biotin and avidin (streptavidin) are complexed to antigen-binding regions, thereby forming hybrid molecules, and, using conventional methods, the hybrid molecules are associated via the biotin and
15 avidin.

In a preferred embodiment, the appended moieties are heterologous 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
20 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 taken from any appropriate source, *e.g.*, the human transcription factors c-jun and c-fos. Of course, such heterologous peptides need not be
25 appended to the ends of antibody molecules. For example, a heterologous peptide can be inserted between two constant domains of a heavy chain.

"Peptide linkers" of the invention encompass variants or fragments of naturally occurring (wild type) peptide linkers (*e.g.*, dimerization domains), provided that the peptide linkers retain the ability to form appropriate associations.

Such variants include, *e.g.*, peptides 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.

5 A peptide linker is preferably long enough to provide an adequate degree of flexibility to prevent the two antibody moieties from interfering with each others' activity, for example by steric hindrance, to allow for proper protein folding and, if necessary, to allow the antibody molecules to interact with two, possibly widely spaced, receptors on the same cell; yet it is preferably short enough to allow the two
10 antibody moieties to remain stable in the cell. 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,
15 *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.

20 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 bispecific antibody, *e.g.*, its ability to bind to a cognate receptor. Conventional assays for binding to IL-12 and/or IL-18 receptors are described, *e.g.*, in Kunikata *et al.* (1998). *Cell. Immunol.* 189, 135-143 (IL-18R1); Xu *et al.* (1998). *J. Exp. Med.* 188, 1485-1492 (IL-18R1); Rogge *et al.* (1999). *J. Immunol.* 162, 3926-3932 (IL-
25 12R β 2); Gollob *et al.* (1997). *Eur. J. Immunol.* 27, 647-652 (IL-12R β 1); Wu *et al.* (2000). *Eur. J. Immunol.* 30, 1364-1374 (IL-12R β 2); and in Examples 5-7.

Peptide linkers can be appended to antigen-binding regions to form hybrid or fusion proteins by a variety of means 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); covalent joining of the peptides by art-recognized methods (*e.g.*, using appropriate enzymes); attachment via biotin/avidin interactions; recombinant methods; or combinations thereof.

5 “Hybrid” proteins of the invention are proteins in which a moiety comprising an antigen-binding region and a 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.

10 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. 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. Preferably, sequences encoding the two moieties of a fusion protein are in frame.

20 The antigen-binding regions can be oriented with respect to the appended heterologous peptide so that, when the two antibody moieties are associated, the antigen-binding regions 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 antigen-binding regions to bind to their cognate receptors. In a preferred embodiment, the two antigen-binding regions are joined via their C termini, in order to minimize physical constraints on the “working portions” (the antigen-binding sites) of the molecules, which lie closer to the N-termini. 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 attached to each other via the appended moieties by non-covalent or covalent bonds. In a preferred embodiment, the attachment occurs intracellularly. Two separate chimeric polynucleotides, each encoding one of two different fusion molecules, 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. The two fusion proteins can be expressed either from the same expression vector or from two different expression vectors. Generally, fusion proteins are marked with selectable markers, in order to facilitate the selection of transfectants (transformants).

If desired, the relative amounts of two recombinant fusion proteins 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 the novel hybrid or fusion proteins of the invention.

A chimeric polynucleotide of the invention can comprise both coding sequences and regulatory sequences which govern their expression. The nucleic acid sequence corresponding to a moiety of such a fusion protein (*e.g.*, an antigen-

binding region or a peptide linker) exhibits substantial identity to the nucleic acid encoding the corresponding wild type molecule, *e.g.*, it comprises a sequence that has at least about 90% sequence identity to the reference sequence, or preferably at least about 95%, or more preferably at least about 98% sequence identity, over a comparison window of at least about 10 to about 100 or more nucleotides. 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. Polynucleotides 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.

In the third category of methods to generate bispecific antibodies, recombinant techniques are used to generate a single-chain bispecific antibody. Single-chain antibody binding proteins (sFv) are generated for each of two antigen-binding regions of interest by linking the V_H and V_L chains, or fragments or variants thereof, with a peptide linker; and the two sets of sFv are then joined, also by a peptide linker, to form a bispecific single chain antibody (bsFv). See Figure 1C for an illustration of some single chain bispecific antibodies. Recombinant methods in general are described elsewhere herein. Typical methods to generate sFv and are described, *e.g.*, in Whitlow *et al.* (1991), *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 97; Bird *et al.* (1988), *Science* 242, 423-426; U.S. Patent

No. 4,946,778; Pack *et al.* (1993), *Bio/Technology* **11**, 1271-77; and Sandhu (1992), *Crit. Rev. Biotech.* **12**, 437. Methods for generating bispecific single chain antibodies, in particular, are described, *e.g.*, in U.S. Pat. No. 5,892,020; Gruber *et al.* (1994). *J. Immunol.* **152**, 5368-74; Mallender *et al.* (1994). *Biochemistry* **33**, 10100-10108; Winter *et al.* (1991). *Nature* **349**, 293-299; Schmidt *et al.* (1996). *International Journal of Cancer* **65**, 538-546; and Thirion *et al.* (1996). *Eur. J. of Cancer Prevention* **5**, 507-511.

A variation of single chain bispecific antibodies, diabodies, can also be used. For methods of making such molecules, see, *e.g.*, Holliger *et al.* (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6444-48 and Cao *et al.* (1998), *Bioconjugate Chem.* **9**, 635-644.

The two sFv's in a bispecific single chain antibody can be separated (distanced) from one another by a linker peptide of any length or amino acid composition, most preferably a flexible loop structure, which allows the antibody 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. Routine procedures can be used to select linker peptides and to optimize parameters so that the two antibody moieties are aligned at a distance and in an orientation which allow for optimal functioning. See, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 4,935,233; 4,751,180 and 5,892,020.

The invention also relates to a chimeric polynucleotide which encodes a single chain bispecific antibody 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 bispecific antibody of the invention

5 can also be made by *in vitro* translation of such a chimeric polynucleotide.

Properties of such chimeric polynucleotides and variants thereof are as discussed above in relation to polynucleotides corresponding to fusion proteins.

In the fourth category of methods to generate bispecific antibodies, two different clonal cell lines (*e.g.*, hybridomas or lymphocytes) are fused to form a trioma, quadroma or other polydroma, and the bispecific antibodies which are

10 secreted are isolated. Such bispecific antibodies comprises a common Fc portion and one Fab portion from each of the parental cells (*e.g.*, hybridomas). Methods of fusing such cells are conventional and are described, *e.g.*, in U.S. Pat. Nos. 5,959,084, 4,474,893, 5,643,759 and 5,141,736. Typical methods for fusing two

15 established hybridomas to generate a quadroma are described, *e.g.*, in Milstein *et al.* (1983) *Nature* 305, 537-540; Stears *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1453-1457; Suresh *et al.* (1986) *Methods Enzymol.* 121, 210-228; Suresh *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7989; and U.S. Pat. Nos. 4,474,893 and 5,643,759. Typical methods to fuse one established hybridoma with a lymphocyte

20 from a mouse immunized with a second antigen to generate a trioma are described, *e.g.*, in Nolan *et al.* (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1040, 1-11.

Antibody populations produced by such methods contain both homospecific and bispecific molecules. Methods to assay for the presence of bispecific

monoclonals are conventional and include, *e.g.*, bridge ELISA assays (see, *e.g.*,

25 Suresh *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7989-93; Koolwijk *et al.* (1988) *Hybridoma* 7, 217-225; and De Lau *et al.* (1989) *J. Immunol.* 149, 1840-46). Double antigen ELISA may be employed if sufficient quantities of the respective antigens are available. When two different heavy chain isotypes are

present in the bsMAb, isotypic specific reagents can be used for detection of hybrid molecules. Furthermore, the supernatants of clones putatively containing bsMAbs can be tested functionally.

5 In addition to the bispecific antibodies described above, multispecific antibodies can be made by extrapolating any of the above methods, or combinations thereof, to join three or more antibody moieties, in any combination (*e.g.*, antibodies specific for both of the IL-12 receptor subunits plus AcPL; for both of the IL-12 receptor subunits and both of the IL-18 receptor subunits, etc.). Some of the possible variations are summarized in Figure 2A. In one embodiment, an Fc region may be modified to include a third antigen-binding region. For example, 10 part or all of an Fc region may be replaced with a third antigen-binding region. Such modifications can be accomplished with conventional genetic engineering techniques. In other embodiments, bivalent mono- or bi-specific antibodies can be cross-linked to one another in a side-by-side, head-to-head or tail-to-tail orientation. For typical methods to make and use such multimeric antibodies, see, *e.g.*, Tutt *et al.* (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 1351-58; Tutt *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147, 60-69; and Cao *et al.* (1988) *Bioconjugate Chemistry* 2, 635-644. 15

20 Preferably, a multispecific (*e.g.*, bispecific) monoclonal antibody of the invention is "isolated," as defined above. Methods to isolate and/or purify a bispecific monoclonal antibody of the invention are conventional and are similar to those described above for the purification of receptor subunits or of monoclonal antibodies in general. Among the conventional purification methods which can be used are, *e.g.*, isoelectric focusing, affinity chromatography, including double affinity chromatography (*e.g.*, using sequential mouse anti-idiotypic anti-isotype monoclonal antibodies), hydroxylapatite chromatography, ion-exchange 25 chromatography, mimetic affinity methods, gradient thiophilic chromatography, or

high performance liquid chromatography. The desired degree of purity may depend on the intended use of the protein.

Bispecific monoclonal antibodies prepared by cell fusion can be obtained from either the supernatant of a hybrid hybridoma (or other polydroma) or from the ascites fluid of a mouse injected with the hybrid hybridoma.

If the method of preparation of a bispecific antibody results in the formation of monospecific as well as bispecific antibodies (*e.g.*, following procedures of chemical coupling), the desired bispecific antibodies can be separated from the monospecific ones by any of a variety of procedures which allow differentiation between the two forms, *e.g.*, passive elution from preparative, non-denaturing acrylamide gels or various conventional chromatographic techniques, *e.g.*, anion-exchange, HPLC, or thiophilic adsorption chromatography (*see, e.g.*, Kreutz *et al.* (1998). *J. Chromatography* 714, 161-170). In a most preferred embodiment, each of the antibody moieties is tagged with a different tag, and doubly tagged, bispecific antibodies are separated from singly tagged monospecific antibodies by dual affinity chromatography.

The present invention also relates to methods of using multispecific antibodies of the present invention, *e.g.*, for detection, treatments, research tools, etc.

An antibody of the invention can act either as an antagonist or as an agonist for IL-12 and/or IL-18. These two cytokines, upon binding to a cognate receptor or a subunit thereof, either separately or together, can induce, among others, the following activities: promotion of T_H1-type helper cell responses; stimulation of cell proliferation, *e.g.*, of activated T and NK cells; stimulation of the production and/or expression of a number of cytokines, including IFN- γ , *e.g.*, by resting and activated T- and NK-cells; induction of natural killer (NK) cell cytotoxicity; enhancement of cytolytic T-cell responses; inhibition of osteoclast proliferation; tyrosine phosphorylation and activation of Jak2, Tyk2, Stat3, Stat4 or the like; up-regulation of the IL-18 receptor(s) or the IL-12 receptor(s), Fas ligand or ICAM-1; or

activation of NF- κ B, which can involve activation of, *e.g.*, MyD88, IRAK, TRAF-6, NIK, IKK or I κ B.

Antibodies which enhance (*e.g.*, increase, at least to some extent) one or more of the above activities act as "agonists" ("ligand-mimicking agents"). Antibodies which inhibit (*e.g.*, decrease, at least to some extent) one or more of these activities act as "antagonists." Of course, an antibody may bind to a cognate receptor, preventing access of a cytokine to the receptor, yet may actually enhance one or more of the above activities; in such a case, the antibody is considered to be an agonist.

One of skill in the art can readily determine whether an antibody acts as an agonist or as an antagonist by assaying for any of the above activities, using conventional procedures. See, *e.g.*, Tominga *et al.* (2000). *Intl. Immunol.* 12, 151-160; Yoshimoto *et al.* (1998). *J. Immunol.* 161, 3400-3407; Xu *et al.* (1998). *J. Exp. Med.* 188, 1485-1492; Kunikata *et al.* (1998). *Cell. Immunol.* 189, 135-143; Ahn *et al.* (1997). *J. Immunol.* 158, 1541-2131; Yoshimoto *et al.* (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3948-53; Munder *et al.* (1998). *J. Exp. Med.* 187, 2103-2108; Otani *et al.* (1999). *Cell. Immunol.* 198, 111-119; Hyodo *et al.* (1999). *J. Immunol.* 162, 1662-1668; Okamoto *et al.* (1999). *J. Immunol.* 3202-3211; Lauwerys *et al.* (1999). Cytokine 11, 822-830; Bacon *et al.* (1995). *J. Exp. Med.* 181, 399-404 (Jak2 and Tyk2); Jacobson *et al.* (1995). *J. Exp. Med.* 181, 1755-1762 (Stat3 and Stat4); Kojima *et al.* (1999). *J. Immunol.* 162, 5063-5069 (NF- κ B); Kojima *et al.* (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 183-186 (IRAK and Traf-6); Ohtsuki *et al.* (1997). *Anticancer Res.* 17, 3253-3258 (Fas ligand); and Kohka *et al.* (1998). *J. Leukocyte Biol.* 64, 519-527 (ICAM-1).

While not wishing to be bound to any particular theory of operation of the invention, it is believed that antibodies of the invention can modulate a biological function of a cell bearing IL-12 and/or IL-18 receptor subunit(s) in, for example, one or more of the following ways:

The antibody binds to an extracellular domain of one or more of the IL-12 and/or IL-18 receptor subunits and thereby inhibits the cognate ligand from binding to the receptor.

The antibody inhibits a ligand from inducing one or more of the above-described functions (the antibody acts as an antagonist; the antibody "neutralizes" receptor function, or "blocks" receptor function).

5 The antibody stimulates one or more of the above-described functions (the antibody acts as an agonist).

The antibody up- or down-regulates the expression of one or more of the receptor subunits.

10 The antibody up- or down-regulates the activities of one or more of the cytokines.

The antibody sensitizes cells bearing IL-12 and/or IL-18 receptor subunits to the effects of cognate cytokines (acts as an agonist).

The antibody inhibits and/or stimulates one or more of the signal transduction functions of a receptor subunit.

15 The antibody, upon complexing with a receptor subunit, stimulates or inhibits an extracellular activity, *e.g.*, activates serum complement and/or mediates antibody cellular toxicity.

The antibody, if it is associated with a toxin (immunotoxin) or a therapeutic agent (*e.g.*, a drug), delivers the toxin or agent to the surface of the cell, where it then acts at the surface or is taken up by the cell.

20 This invention relates to a method of treating or preventing a condition (*e.g.*, a pathological condition) associated with expression of IL-12 and/or IL-18, or a receptor or subunit thereof, including excessive or inappropriate amounts of those cytokines, and/or with excessive or inappropriate activity of cells possessing IL-12 and/or IL-18 receptors, comprising administering to a patient in need of such
25 treatment an effective amount of a bispecific monoclonal antibody as above. In a particularly preferred embodiment, the condition is associated with expression of both IL-12 and IL-18, and/or with excessive or inappropriate activity of cells expressing (possessing) both IL-12 and IL-18 receptors.

Activities of IL-12 and/or IL-18, independently or together, include, *e.g.*, the activities noted above. Blocking, enhancing or modifying IL-12 and/or IL-18 activities by contacting their receptors with a bispecific monoclonal antibody of the invention can modulate any of these, or other, activities mediated by IL-12 and/or IL-18, and thus can be used to ameliorate conditions or disorders mediated, directly or indirectly, by these cytokines. A disorder is said to be mediated by IL-12 and/or IL-18 when IL-12 and/or IL-18 cause (directly or indirectly) or exacerbate the disorder.

The bispecific monoclonal antibodies of the invention can be used to treat disorders mediated by IL-12 alone, by IL-18 alone, or by both IL-12 and IL-18. Without wishing to be bound by any particular mechanism, in cases in which IL-12 and IL-18 act synergistically (*e.g.*, in certain NK cells, CD4⁺ T cells, B cells or macrophages), the cells may be particularly sensitive (receptive) to treatment with the bispecific monoclonal antibodies of the invention. Furthermore, again not wishing to be bound to any particular theory, it is suggested that, under conditions in which a bispecific monoclonal antibody of the invention binds to IL-12 and IL-18 receptors which are located on the same cell (*e.g.*, simultaneously, sequentially or coordinately), the bispecific antibody exhibits a greater avidity for those cells than does a monospecific antibody. Therefore, under these and other circumstances (*e.g.*, in the presence of other factors), a lower amount of a bifunctional antibody can be required to elicit a given response than that of a monospecific antibody.

Among the many IL-12 and/or IL-18 related conditions which can be treated or prevented by administering to a patient in need thereof a bispecific monoclonal antibody 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, 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).

In a preferred embodiment, the bispecific antibodies of the invention are neutralizing antibodies. By "neutralizing" is meant herein that binding of an antibody to a receptor subunit inhibits or prevents the binding of a cognate cytokine, and thereby inhibits the activity of the cytokine. A bispecific antibody of the invention may not be neutralizing when it is administered alone, but may become neutralizing when it is co-administered with a second antibody (*e.g.*, an antibody specific for a receptor subunit for which the bispecific antibody is not specific).

In another embodiment, a bispecific antibody of the invention is used to deliver a toxin and/or therapeutic substance (*e.g.*, drug) to a cell which expresses IL-12 and/or IL-18 receptor subunits on its surface. Such an "agent," as a toxin or therapeutic substance can be called, is attached (*e.g.*, conjugated to) the antibody in such a way that it does not substantially disturb the ability of the two antigen-binding regions to bind to their targets. For example, the agent can be attached to an Fc region. Alternatively, when the agent is in the form of a peptide, it can replace all or part of an Fc region, or it can substitute for part or all of an antigen-binding region of a third antibody moiety, forming a structure similar to a third Fab fragment. See Figure 2B for an illustration of such structures.

An agent of the invention can be any substance which modulates the expression of a cell bearing IL-12 and/or IL-18 receptor subunits on its surface (*e.g.*, provides a therapeutic effect; enhances or suppresses a physiological activity of the cell; or achieves inhibition or suppression of growth, killing, destruction, elimination, control, modification, etc. of the cell). Any effective agent can be

used, including an agent which is generally used to treat the conditions noted above. Among the many toxins which can be used are, *e.g.*, ricin (*e.g.*, the A and/or B chain thereof, or the deglycosylated form), poisonous lectins, diphtheria toxin, exotoxin from *Pseudomonas aeruginosa*, abrin, modeccin, botulina toxin, alpha-amanitan, pokeweed antiviral protein (PAP, including PAPI, PAPII and PAP-S), ribosome inhibiting proteins, especially the ribosome inhibiting proteins of barley, wheat, corn, rye, or gelonin, or ribosome-inactivating glycoprotein (GPIR). Fragments, subunits, muteins, mimetics, variants and/or analogues of such toxins are, of course, known to those of skill in the art and are encompassed by the invention. It is contemplated that all such variants or mutants which retain their toxic properties will be of use in accordance with the present invention. Many possible therapeutic drugs can be used, for example any of a variety of immunosuppressants or immunomodulatory agents, *e.g.*, dexamethasone, cyclosporin or FK506.

Such an agent can be attached to a bispecific antibody of the invention by any of the types of methods described elsewhere herein, *e.g.*, chemical coupling, attachment via biotin/avidin interactions or a peptide linker, recombinant methods, etc.

Of course, antibodies conjugated to such toxic or therapeutic moieties need not be neutralizing (blocking the binding of a cytokine to a receptor). Rather, they can serve to deliver an agent to a target cell, so that the agent can, *e.g.*, exert its effect at the surface of the cell, or be incorporated into the cell.

Antibodies of the invention, whether or not they are associated with toxins or therapeutic agents can, of course, be administered alone or in conjunction with other therapeutic entities.

One of skill in the art can measure activity of the bispecific antibodies of the invention by any of a variety of suitable *in vitro* or cell culture assays, or in animal models. Several such assays are discussed herein. Further *in vivo* methods include, *e.g.*, systems for evaluating graft vs. host reactions (see, *e.g.*, Fanslow *et al.* (1990)

5 *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, see, *e.g.*, Leonard *et al.* (1995). *J. Exp. Med.* 181, 381-386 and Wildbaum *et al.* (1998). *J. Immunol.* 161, 6368-6374.) See also Dinarello (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 11-24.

10 Bispecific antibodies of the invention can be administered using conventional doses and delivery methods, such as those described for other, comparable therapeutic agents.

15 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-12 and/or IL-18 to the natural receptor, or delivery of a toxin or drug. 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 antibody/agent involved, its metabolic stability and length of action, 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 bispecific antibody of the invention involve administration to a patient of a dose of between about 0.1 mg/kg and about 10 mg/kg.

25 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.

5 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 bispecific antibodies 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*.

15 The invention also relates to methods of detecting a cell which expresses an IL-12 and/or IL-18 receptor subunit, and/or of detecting the receptor subunits, themselves, comprising contacting a sample which may contain such a cell (or receptor subunit) with a bispecific monoclonal antibody of the invention, which is labeled (*i.e.*, comprises a detectable moiety). Typically, in cells which express receptor subunits, extracellular domains of the receptor subunits are present at the surface of the cells and are available for binding to the antibody. Conventional methods can be used to label and detect the antibodies. Typical labels include, *e.g.*, radioisotopes, radionuclides, phosphorescent or fluorescent entities, bioluminescent markers, stains, or the like. Such assays can be quantitative, of course. Although not wishing to be bound by any theory, it is suggested that bispecific antibodies of 20 the invention exhibit a particularly high avidity for cells bearing both target receptors, and thus specifically label such cells in preference to cells expressing only one of the receptors.

In one embodiment of the invention, assays are used to determine whether an agent of interest causes an increase or decrease in the amount of IL-12 and/or IL-18 receptor subunits on the surface of a cell (*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 a receptor subunit (*e.g.*, its ability to bind to an antibody). Alternatively, an assay can indirectly monitor the amount of IL-2 and/or IL-18 in a cell, by monitoring the amount of free receptor which is available for binding to a cytokine or antibody (*i.e.*, to determine the level of receptors which have not been saturated by the cytokines). 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 (*e.g.*, radiodiagnosis); or to monitor the effects of treatment.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows some examples of bispecific antibodies. Panel A illustrates chemical cross-linking; Panel B illustrates linkage via appended moieties; Panel C illustrates single chain polypeptides; and Panel D illustrates molecules formed by cell fusion.

Fig. 2 shows some examples of multispecific antibodies. Panel A antibodies having three or more specificities; Panel B illustrates multispecific antibodies comprising toxic or therapeutic peptides.

Fig. 3 shows the effect of α -IL-12 treatment in EAE.

Fig. 4 shows the effect of α -IL-18 treatment in EAE.

Fig. 5 shows the effect of α -IL-12 plus α -IL-18 treatment in EAE.

Fig. 6 shows that IL-2 and IL-18 can synergistically induce IFN- γ production in CD14-depleted human peripheral blood mononuclear cells (PMBC).

Fig. 7 shows that IL-2 and IL-18 can synergistically induce IFN- γ production in CD3⁺ and CD4⁺ T cells.

Fig. 8 shows IFN- γ production in IL-18 stimulated KG-1 cells and IL-12 stimulated NK-92 cells.

Fig. 9 shows an *in vivo* model to test the activity of α -IL-18 monoclonal antibodies.

5 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.

10 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.

15 **Examples**

1. Cloning of full-length human IL-12 and IL-18 receptor subunits

Human IL-12 and IL-18 receptor subunits (*e.g.*, full length molecules) are cloned following standard procedures by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using gene-specific primers and total RNA isolated from conA-activated, IL-12 and IL-18 stimulated, CD14-depleted PBMC. 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. The full-length cDNA is cloned, *via* restriction enzymes sites engineered into the primers, into the eukaryotic expression vectors pcDNA3.1(-)MYCHISB or pcDNA3.1(-)PUR (Invitrogen). For example, full-length human IL-12R β 2 and IL-18R cDNAs are cloned.

20

25

Human IL-12R β 1: The open reading frame of the full-length human IL-12R β 1 cDNA (Accession # U03187) is from position 65 to 2053, encoding a protein of 662 AA, with a signal peptide from AA 1 to 24.

Human IL-12R β 2: The open reading frame of the full-length human IL-12R β 2 cDNA (Accession # U64198) is from position 641 to 3229, encoding a protein of 862 AA, with a signal peptide from AA 1 to 27.

Human IL-18R: The open reading frame of the full-length human IL-18R cDNA (Accession # U43672) is from position 25 to 1650, encoding a protein of 541 AA, with a signal peptide from AA 1 to 19.

Human AcPL: The open reading frame of the full-length human AcPL cDNA (Accession # AF077346) is from position 484 to 2283, encoding a protein of 599 AA with a signal peptide from AA 1 to 14.

2. Cloning of extracellular domains of human IL-12 and IL-18 receptor subunits

The extracellular domains of human IL-12 and IL-18 receptor subunits are cloned as described in Example 1, except that the 3' primer corresponds to the C-terminus of the extracellular domain of the respective proteins. For example, the extracellular domains of the human IL-12R β 2 and IL-18R cDNAs are cloned.

Human IL-12R β 1: The extracellular domain of human IL-12R β 1 is from AA 1 to 540.

Human IL-12R β 2: The extracellular domain of human IL-12R β 2 is from AA 1 to 622.

Human IL-18R: The extracellular domain of human IL-18R is from AA 1 to 329.

Human AcPL: The extracellular domain of human AcPL is from AA 1 to 356.

3. Generation of monoclonal antibodies to human IL-12 or IL-18 receptor subunits

Methods to generate antibodies (*e.g.*, neutralizing antibodies) to cell surface receptor molecules are well documented in the field of immunology, and are

described, e.g., in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 45, *Monoclonal Antibody Protocols*, ed. by Davis, W.C., Human Press, Inc., 1995, and *Current Protocols in Immunology*, ed. by Coligan, J.E. et al., J. Wiley & Sons, 1992). One method of immunization is to inject mice with an antigen that is a purified extracellular domain of a receptor, which is expressed in bacteria, insect cells, yeast, or mammalian cells. A preferred method of immunization is to express the recombinant full-length human receptor(s) in a mouse pre-B cell line and then inject the stably transfected mouse cells as antigen into the same (or a closely related) strain of mice from which the line was derived. This method has been described for IL-12R β 2 (Gollub, J.A. et al., *Eur. J. Immunol.* 27:647-652, 1997). In other situations, cells from other species may be used, e.g., as described for the IL-12 receptor using PHA-activated human PBMC (Gately et al., US Patent No. 5,853,721, Dec. 29, 1998). Immunized mice are boosted and bled according to standard protocols.

Mice are immunized with a mouse pre-B cell line stably transfected with both human IL-12R β 1 and IL-12R β 2 (IL-12 receptor) or both human IL-18R and AcPL (IL-18 receptor). The expression of functional receptors on the stably transfected cells is verified by binding studies with radio-labeled ligands. The sera from immunized mice are screened for the presence of antibodies to the target receptor (either IL-12 or IL-18) using the same cell line used for the immunization. The non-transfected cells are used as negative control. One can screen for neutralizing activity of the antibodies by inhibition of ligand binding to the cells expressing the receptor. This can be the same cell line used for the immunization, or another cell line expressing the target receptor. For the IL-12 and IL-18 receptors, one can use the human natural killer line NK-92 and the human myelomonocytic line KG-1, respectively (see Example 7 and Figure 8). In cells expressing a functional receptor, the sera can also be tested for their ability to inhibit IFN- γ production.

Spleen cells from mice producing antibodies to the target receptor are fused with a mouse myeloma cell line to generate antibody-secreting hybridomas. To facilitate the generation of bi-specific monoclonal antibodies (see Example 8 below), different myeloma lines with different drug resistant phenotypes can be used for

fusion with the α -IL-12 and α -IL-18 receptor antibody producing cells. The culture media from the hybridomas are screened for antibodies to the target receptor as described above. The hybridomas that produce neutralizing antibodies are cloned, and antibody preparations are generated from either large-scale hybridoma culture media or ascites fluid from mice injected with the hybridomas. Antibodies are purified by affinity column chromatography, using either Protein A/G or specific antigen bound to the column support matrix.

To generate human monoclonal antibodies, transgenic mice carrying portions of the human immunoglobulin heavy chain and kappa light chain loci and lacking their endogenous counterparts are used for the initial immunization. Medarex's HuMAb-Mouse technology, which was originally developed by GenPharm Int., Inc., has been successfully used to generate high affinity human antibodies.

4. Effect of α -IL-12 alone, α -IL-18 alone, and α -IL-12 plus α -IL-18 in EAE

To assess the effects of IL-12 and IL-18 in rodent models of multiple sclerosis (MS), we investigated the effects of antibodies to IL-12 and IL-18 in PLP-induced, adoptive transfer EAE in SJL mice. The α -IL-12 and α -IL-18 antibodies used were commercially available and demonstrated to be neutralizing *in vitro*, due of their ability to inhibit IFN- γ production in the murine Th1 clone Ae7 in response to IL-12 and IL-18, respectively. The α -IL-18 antibody was also shown to be neutralizing *in vivo*, due to its ability to reduce liver damage in *P. acnes*/LPS-treated mice (see Example 10 and Figure 9).

α -IL-12 alone: Figure 3 shows that α -IL-12 treatment delays the onset and reduces the disease scores as compared to PBS or control IgG. See also experiments reported by Leonard et al., *J. Exp. Med.* 181: 381-386, 1995, using a different antibody.

A commercially available, goat α -mouse IL-12 polyclonal antibody was injected i.p at 200 μ g/mouse on the days indicated. There was a delayed onset of disease and a reduced peak clinical score in the α -IL-12 treated mice as compared to mice receiving PBS or treated with an equal amount of goat IgG. The clinical score of

the α -IL-12 treated mice was significantly different ($p < 0.05$) from the IgG treated mice ($n = 9-10$).

α -IL-18 alone: Figure 4 shows that α -IL-18 treatment has no effect on disease onset, but significantly exacerbates disease scores as compared to PBS or control IgG2a.

A PLP-induced, adoptive transfer EAE study was performed in SJL mice with a commercially available, rat α -mouse IL-18 polyclonal antibody. On the indicated days, 250 μ g/mouse was injected i.p. There was no difference in the onset of disease in the α -IL-18 treated mice as compared to control mice receiving PBS or treated with an equal amount of IgG. However, the average clinical score for the α -IL-18 treated mice was significantly higher than either the PBS or IgG control mice.

α -IL-12 plus α -IL-18: Figure 5 shows that combined α -IL-12 and α -IL-18 treatment has the same protective effect as α -IL-12 treatment alone.

A commercially available, goat α -mouse IL-12 polyclonal antibody was injected i.p., at 200 μ g/mouse, as indicated. Another group of mice received α -IL-12 plus a commercially available, rat α -mouse IL-18 monoclonal antibody. On the indicated days, 250 μ g/mouse was injected i.p. There were delayed onsets of disease and reduced peak clinical scores in the α -IL-12 and α -IL-12 plus α -IL-18 treated mice as compared to mice treated with an equal amount of goat IgG. The α -IL-12 and α -IL-12 plus α -IL-18 treated mice were significantly different ($p < 0.05$) from the IgG treated mice ($n = 9-10$), but not from each other.

5. Synergistic induction of IFN- γ production by IL-12 and IL-18 in human CD14-depleted PBMC

The cytokines IL-12 and IL-18 can synergize for production of pro-inflammatory Th1 effector cytokines, such as IFN- γ . Figure 6 shows an assay that shows synergistic induction of IFN- γ production in conA-primed, IL-12/IL-18 stimulated CD14-depleted human PBMC.

Purified, conA-primed human CD14-depleted PBMC from four normal donors were plated at 2.5×10^5 cells/ml in 96-well plates. As indicated, DEX (20 nM), IL-12 (10 pM), or IL-18 (50 nM) were added. The cells were incubated for 16 to 24 hours, and the amount of IFN- γ in the culture medium was determined using the Biosource Cytoscreen IFN- γ ELISA kit.

6. Synergistic induction of IFN- γ production by IL-12 and IL-18 in human CD3+ and CD4+ T cells

CD3+ and CD4+ T cells were purified from conA-primed CD14-depleted human PBMC, and their ability to respond to IL-12 and IL-18 was investigated. As shown in Figure 7, both CD3+ and CD4+ T cells produce IFN- γ in response to IL-12 and IL-18 together, but not to either cytokine alone.

Purified, conA-primed human CD3+ or CD4+ T cells (>95% purity) were plated at 5×10^5 cells/ml in 96-well plates. As indicated, 50 μ l of DEX (20nM), IL-12 (10 pM), or IL-18 (50 nM) were added. The T cells were incubated for 16 to 24 hours, and the amount of IFN- γ in the culture medium was determined using the Biosource Cytoscreen IFN- γ ELISA kit.

7. Induction of IFN- γ production by IL-12 in NK-92 cells and by IL-18 in KG-1 cells

Two assays show the bioactivity of IL-12 and IL-18 alone. NK-92 is a natural killer line derived from a patient with malignant Hodgkin's lymphoma. KG-1 is a myelomonocytic line derived from a patient with acute myelogenous leukemia. NK-92 and KG-1 cells constitutively express the IL-12 and IL-18 receptors, respectively. As shown in Figure 8, IL-12 and IL-18 induce IFN- γ production in NK-92 cells and KG-1 cells, respectively.

KG-1 cells were cultured in serum-free medium for 24 hours, and then plated at 1×10^5 cells/ml in 96-well plates. As indicated, IL-18 (50 nM) or DEX (20 nM) were added. NK-92 cells were cultured in the presence of 10 U/ml IL-2, and plated at 2.5×10^4 viable (Trypan Blue negative) cells/ml in 96-well plates. As indicated, IL-

12 (10 pM) or DEX (20 nM) were added. The KG-1 and NK-92 cells were incubated for 16 to 24 hours, and the amount of IFN- γ in the culture medium was determined using the Biosource Cytoscreen IFN- γ ELISA kit.

5 **8. Method to generate bi-specific monoclonal antibodies**

 Bi-specific monoclonal antibodies are generated by a variety of methods known to those skilled in the art of making monoclonal antibodies (see, *e.g.*, Cao *et al.*, M.R. *Bioconjugate Chem.* 9: 635-644, 1998). A preferred method to generate a bi-specific human monoclonal antibody that recognizes, binds, and inhibits both the IL-12 and IL-18 receptor is to generate a quadroma, which is formed by fusing two hybridomas (described in Cao, Y. *et al. J. Immunol. Methods* 187:1-7, 1995). The bi-specific antibody can be purified from the quadroma by gradient thiophilic affinity chromatography (as described, *e.g.*, in Kreutz, F.T. *et al. J. Chromatog.* 714:161-170, 1998).

15 **9. In vitro assays to demonstrate activity of bi-specific monoclonal antibodies**

In vitro assays that can be used to demonstrate the neutralizing activity of either monoclonal antibodies or bi-specific human monoclonal antibodies to the IL-12/IL-18 receptors are described, *e.g.*, in Examples 5, 6, and 7 and Figures 6, 7 and 8.

20 **10. In vivo models to demonstrate activity of bi-specific monoclonal antibodies**

In vivo models that can be used to demonstrate the neutralizing activity of either monoclonal antibodies or bi-specific human monoclonal antibodies to the IL-12/IL-18 receptors include, *e.g.*, LPS-induced endotoxic shock in Balb/C mice; *P. acnes*/LPS-induced liver damage in nude mice (see Figure 9); PLP-induced adoptive transfer EAE in SJL mice (see Figures 3-5); and type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice.

 Figure 9 shows, for example, that mice treated with RDI α -IL-18 display lower pathology in the *P. acnes*/LPS liver damage model. Male nu/nu Balb/C mice were injected with 1 mg heat killed *P. acnes* (iv); RDI α -IL-18 or normal rat IgG was

injected 7 days later; LPS (1 μg) was injected 1 h after the antibodies; mice were sacrificed 24 h later; and livers were subjected to histological analysis. The livers from animals treated with RDI α -IL-18 antibody had lower pathological scores. These changes were statistically significant (Significance Level: 5%, n=6 per group, P-value=.0346).

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.

We claim:

1. A bispecific monoclonal antibody comprising two moieties, one of which comprises an antigen-binding region which is specific for either the IL-12R β 1 or the IL-12R β 2 subunit of an IL-12 receptor, and the other of which comprises an antigen-binding region which is specific for either the IL-18R or the AcPL subunit of an IL-18 receptor.

2. A bispecific monoclonal antibody of claim 1, wherein one of the antigen-binding regions is specific for IL-18R1 and the other is specific for IL-12R β 2.

3. A bispecific monoclonal antibody of claim 1, wherein one of the antigen-binding regions is specific for AcPL and the other is specific for IL-12R β 2.

4. A bispecific monoclonal antibody of claim 1, wherein each of the antigen-binding regions is appended to a heterologous peptide, thereby forming a hybrid or fusion protein, and wherein the hybrid or fusion proteins are associated via said appended peptides.

5. The bispecific monoclonal antibody of claim 4, wherein each appended peptide is part of a leucine zipper.

6. The bispecific monoclonal antibody of claim 1, wherein the two moieties are associated by chemical cross-linking.

7. The bispecific monoclonal antibody of claim 1, wherein the two moieties form a single polypeptide chain.

8. The bispecific monoclonal antibody of claim 6, wherein the chemical cross-linking is between two Fc molecules.

9. The bispecific monoclonal antibody of claim 1, wherein the IL-12 and IL-18 receptors are human.

10. A pharmaceutical composition comprising a bispecific monoclonal antibody of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

11. A method of making a bispecific monoclonal antibody of claim 1, comprising associating the two moieties by cross-linking them chemically, by joining them via an appended heterologous peptide linker, by forming a single linear polypeptide chain with recombinant methods, or by fusing two hybridoma cells, each of which expresses one of said moieties.

12. A chimeric polynucleotide which encodes a fusion protein comprising an antigen-binding region that is specific for an IL-12 receptor subunit appended to a heterologous peptide, and/or a fusion protein comprising an antigen-binding region that is specific for an IL-18 receptor subunit appended to a heterologous peptide.

13. An expression vector comprising a chimeric polynucleotide of claim 12.

14. A host cell comprising an expression vector of claim 13.

15. A method of making a bispecific antibody, 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 bispecific antibody of claim 7.
17. An expression vector comprising a polynucleotide of claim 16.
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 of making a bispecific monoclonal antibody of claim 1, comprising fusing two hybridoma cells, each of which expresses one of the two moieties.
21. A method of making a bispecific monoclonal antibody of claim 1, comprising immunizing a transgenic mouse that can produce human antibodies with a polypeptide which comprises an extracellular domain of a subunit of an IL-12 receptor or with a polypeptide which comprises an extracellular domain of a subunit of an IL-18 receptor.
22. A method for inhibiting the effects of IL-12 and/or IL-18, comprising administering a bispecific monoclonal antibody of claim 1 to a mammal.
23. A method of treating a pathological condition associated with expression of IL-12 and/or IL-18, or with excessive or inappropriate activity of cells possessing IL-12 and/or IL-18 receptors, comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a bispecific monoclonal antibody of claim 1.

24. The method of claim 23, wherein the patient is human.
25. The method of claim 23, wherein the pathological condition is an autoimmune dysfunction or an inflammatory condition
26. The method of claim 23, wherein the pathological condition is rheumatoid arthritis or multiple sclerosis.
27. A method for suppressing IL-12 and/or IL-18 mediated inflammation or an IL-12 and/or IL-18 mediated immune response in a mammal, comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a bispecific monoclonal antibody of claim 1.
28. The method of claim 27, wherein the mammal is human.
29. A method for delivering a toxin or therapeutic agent to a patient in need of such treatment, comprising administering to the patient an effective amount of a bispecific monoclonal antibody of claim 1 which further comprises a toxin or therapeutic agent.
30. A method of detecting a cell expressing an IL-12 and/or IL-18 receptor subunit, comprising contacting a sample which may contain such a cell with a bispecific monoclonal antibody of claim 1, which is labeled.

WO 03/008452

1/7

PCT/US01/22862

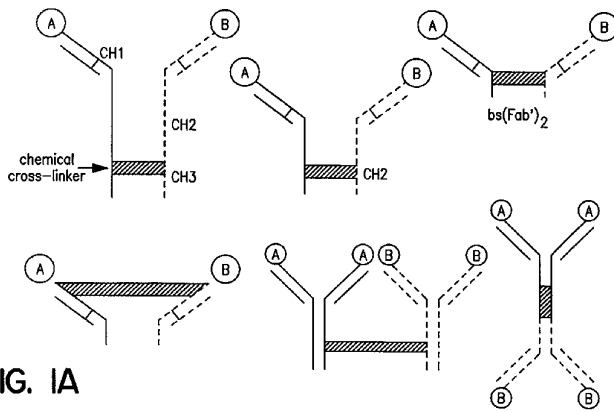


FIG. 1A

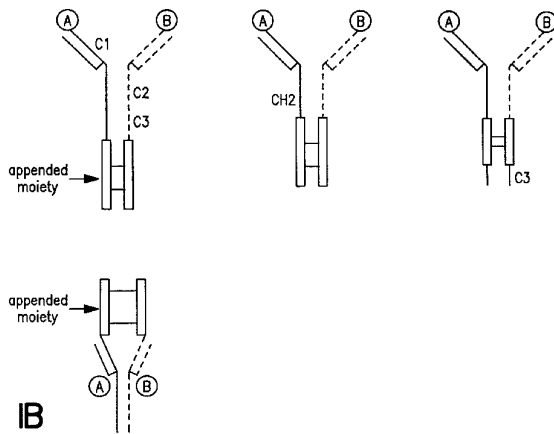


FIG. 1B

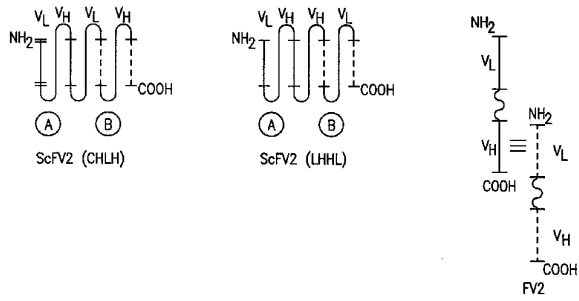


FIG. 1C

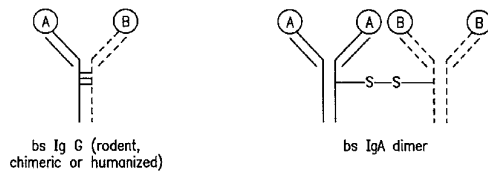


FIG. 1D

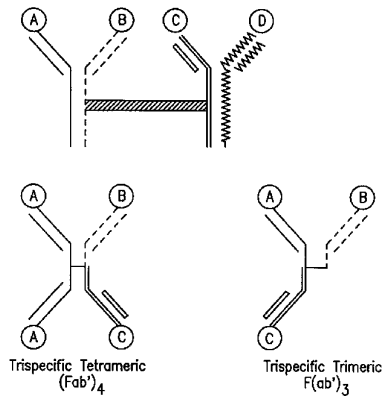


FIG. 2A

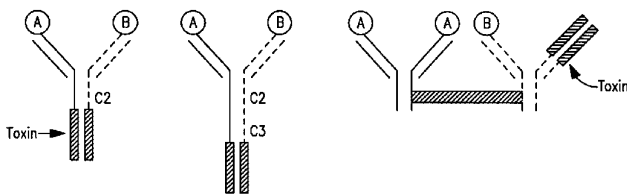


FIG. 2B

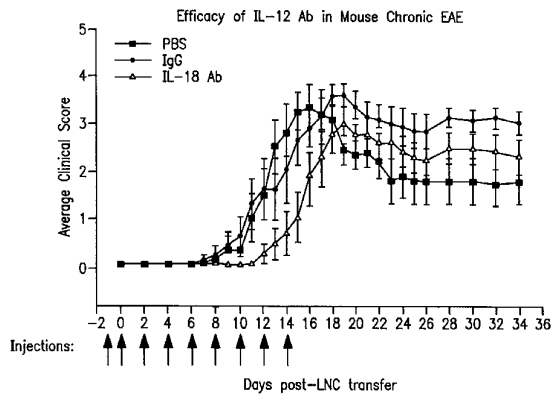


FIG. 3

WO 03/008452

5/7

PCT/US01/22862

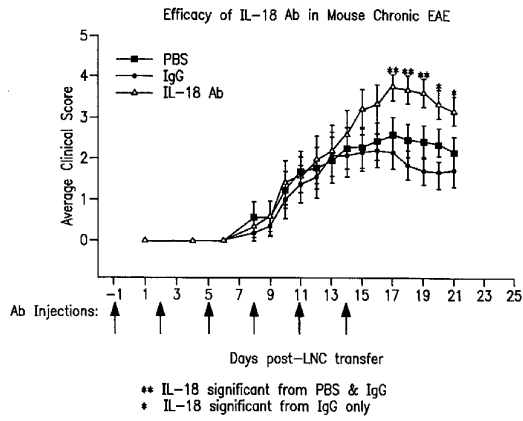


FIG. 4

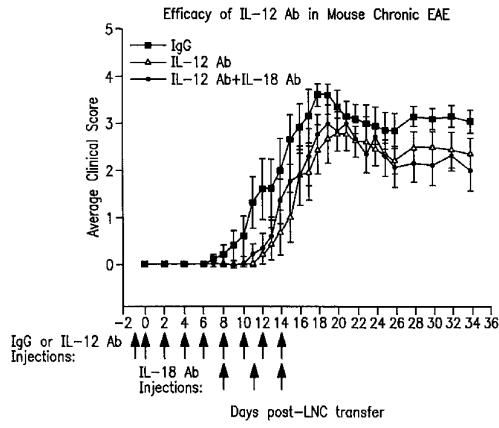


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008452

6/7

PCT/US01/22862

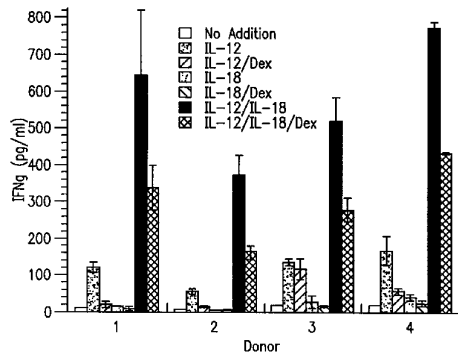


FIG. 6

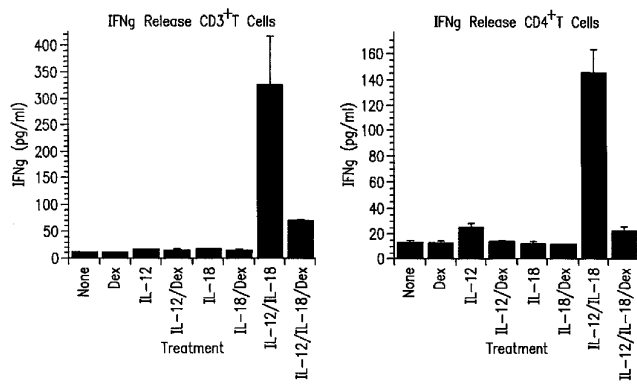


FIG. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

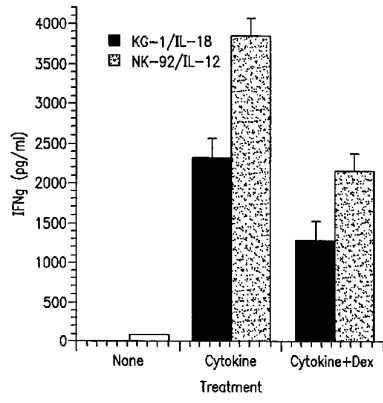


FIG. 8

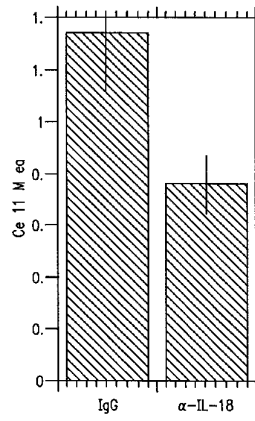


FIG. 9

【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
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008452 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 16/28, CA 94904 (US), MIYAMOTO, Neil [US/US]; 214 Sausalito Street, Corte Madera, CA 94925 (US).
A61K 39/395, C07K 19/00, C12N 15/13, 5/10, A61P 37/00, G01N 33/577
- (21) International Application Number: PCT/US01/22862
- (22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/219,448 20 July 2000 (20.07.2000) US
09/907,960 19 July 2001 (19.07.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/219,448 (CIP)
Filed on 19 July 2001 (19.07.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 13342 Berlin (DE).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): LEUNG, Stewart [US/US]; 2310 Cedar Street, El Cerrito, CA 94530 (US). PEREZ, H., Daniel [US/US]; 214 McAlister, Kentfield, CA 94904 (US), MIYAMOTO, Neil [US/US]; 214 Sausalito Street, Corte Madera, CA 94925 (US).
- (74) Agent: ZELANO, Anthony, J.; Mfilien, White, Zelano & Brannigan, P.C., Arlington Courthouse Plaza I, Suite 1400, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).
- (81) Designated States (national): AB, AG, AI, 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, 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 (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
10 July 2003
- 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 03/008452 A3

(54) Title: BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO IL-12 AND IL-18 RECEPTORS

(57) Abstract: A bispecific monoclonal antibody is described which comprises two moieties, one of which comprises an antigen-binding region which is specific for either the IL-12 β 1 or the IL-12R β 2 subunit of an IL-12 receptor, and the other of which comprises an antigen-binding region which is specific for either the IL-18R or the AcPL subunit of an IL-18 receptor.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/22862
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/28 A61K39/395 C07K19/00 C12N15/13 C12N5/10 A61P37/00 G01N33/577		
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 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHANG JOHN T ET AL: "The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 30, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 1113-1119, XP002236730 ISSN: 0014-2980 figures 1,2 abstract --- ---	1-18, 20-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating 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 *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention **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 mailing of the international search report	
1 April 2003	11/04/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstr 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer COVONE-VAN HEES, M	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US 01/22862

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRIELAND JOAN K ET AL: "Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled Aspergillus fumigatus." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 69, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 1554-1560, XP002236731 ISSN: 0019-9567 page 1557; table 1 abstract ---	1-18, 20-30
A	WONG C K ET AL: "Elevation of plasma interleukin-18 concentration is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus." RHEUMATOLOGY (OXFORD), vol. 39, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1078-1081, XP002236732 ISSN: 1462-0324 page 1080, paragraph 3 ---	22-30
A	BRENNAN M ET AL: "PREPARATION OF BISPECIFIC ANTIBODIES BY CHEMICAL RECOMBINATION OF MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN G1 FRAGMENTS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, , US, vol. 229, 5 July 1989 (1989-07-05), pages 81-83, XP002028196 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-18,20, 21
A	WO 98 41232 A (BASF AG ;CARTER ADAM (US); SEKUT LES (US); GHAYUR TARIQ (US); TRAC) 24 September 1998 (1998-09-24) page 2, line 33 -page 3, line 12 page 4, line 7-37 page 68, line 19-29 ---	22-29
E	WO 01 58956 A (BASF AG ;BROCKLEHURST SIMON MARK (GB); DUNCAN ALEXANDER ROBERT (GB) 16 August 2001 (2001-08-16) page 5, line 16-24 page 16, line 8 -page 17, line 2 -----	1-18,20, 21

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/22862**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 22-29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 19
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 22862

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 19

Present claim 19 relates to a method of making a single chain soluble heterodimeric receptor. The claim covers all methods having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for none of these methods. Moreover, present claim is in clear contradiction with claim 16, which refers to a polynucleotide coding for a bispecific antibody. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has not been carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/22862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9841232	A	24-09-1998	US 6054487 A 25-04-2000
			AU 734756 B2 21-06-2001
			AU 6760498 A 12-10-1998
			BG 103808 A 31-07-2000
			BR 9810409 A 22-08-2000
			CN 1269722 T 11-10-2000
			DE 998300 T1 01-03-2001
			EP 0998300 A1 10-05-2000
			ES 2146192 T1 01-08-2000
			HU 0104439 A2 29-04-2002
			JP 2002504091 T 05-02-2002
			NO 994506 A 17-11-1999
			NZ 337769 A 27-09-2002
			PL 336464 A1 19-06-2000
			SI 20110 A 30-06-2000
			SK 122199 A3 11-12-2000
			TR 9902615 T2 21-03-2000
			WO 9841232 A2 24-09-1998
WO 0158956	A	16-08-2001	AU 3680701 A 20-08-2001
			BR 0108188 A 25-02-2003
			EP 1257585 A2 20-11-2002
			NO 20023788 A 09-10-2002
			WO 0158956 A2 16-08-2001

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 37/06	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/24	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/24	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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 ルン, スチュワート

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 3 0, エル セリト, シダー ストリート 2 3 1 0

(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, マカリストアー 2 1 4

(72) 発明者 ミヤモト, ニール

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 9 2 5, コルテ マデラ, サウサリト ストリート 2 1 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 DA02 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
 4B065 AA91X AA93Y AB01 AB05 BA02 BA08 CA25 CA44
 4C084 AA02 AA19 MA02 NA05 ZA021 ZB081 ZB111 ZB151
 4C085 AA14 BB11 EE03
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26

专利名称(译)	针对IL-12和IL-18的双特异性单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2004521654A	公开(公告)日	2004-07-22
申请号	JP2003514010	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	ルスチュワート ペレツエイチダニエル ミヤモトニール		
发明人	ルン,スチュワート ペレツ,エイチ.ダニエル ミヤモト,ニール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/2866 C07K2317/31 G01N33/6869		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/395.N A61K45/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/06 A61P43/00.121 C07K16/24 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/53.Y G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZA021 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB151 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	60/219448 2000-07-20 US 09/907960 2001-07-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了一种双特异性单克隆抗体，其包含两个部分，其中一个包含对IL-12受体的IL-12Rbeta1或IL-12Rbeta2亚基具有特异性的抗原结合区，而另一个包含抗原-对IL-18受体的IL-18R或AcPL亚基特异的结合区。

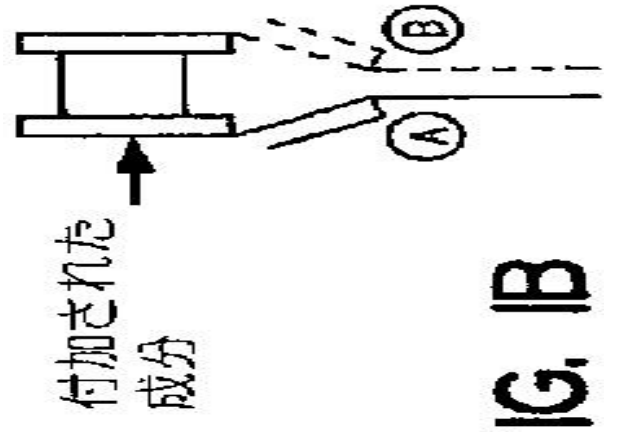


FIG. 1B