

(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2014-508511

(P2014-508511A)

(43) 公表日 平成26年4月10日(2014.4.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 C O 8 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-545325 (P2013-545325)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月20日 (2011.12.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月13日 (2013.8.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/073496
 (87) 国際公開番号 W02012/085015
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012.6.28)
 (31) 優先権主張番号 61/424,920
 (32) 優先日 平成22年12月20日 (2010.12.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508098350
 メドイミュン・リミテッド
 MedImmune Limited
 英国シービー21・6ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミルスタイン・ビルディング
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 I L - 1 8 抗体およびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、インターロイキン - 1 8 についての特異的結合親和性を有するヒト、ヒト化および/またはキメラ抗体ならびにそれらの断片、誘導体/コンジュゲートおよび組成物を提供する。本発明は、I L - 1 8 活性の増加に伴う疾患の診断および治療のためのそれらの抗体の使用を含み、治療においては医薬組成物の形態である。

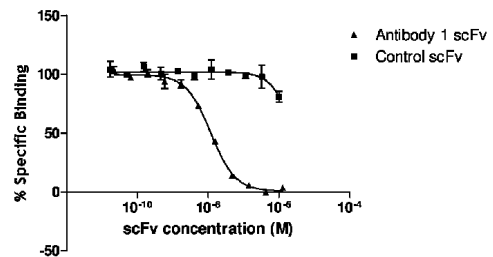


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト IL - 18 上の IL - 18 BP 結合部位と完全にまたは部分的に重複するヒト IL - 18 のエピトープに特異的に結合するヒト IL - 18 についての単離された抗体分子。

【請求項 2】

残基 Tyr 1、Gly 3、Leu 5、Glu 6、Lys 8、Met 51、Lys 53、Asp 54、Ser 55、Gln 56、Pro 57、Arg 58、Gly 59、Met 60、Arg 104、Ser 105 および Pro 107 の 1 つ以上を含むヒト IL - 18 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 3】

前記エピトープが、残基 Tyr 1、Gly 3、Leu 5、Glu 6、Lys 8、Met 51、Lys 53、Asp 54、Ser 55、Gln 56、Pro 57、Arg 58、Gly 59、Met 60、Arg 104、Ser 105 および Pro 107 を含む、請求項 2 に記載の抗体分子。

【請求項 4】

IL - 18 受容体 (IL - 18 R) および / または IL - 18 結合タンパク質 (IL - 18 BP) への IL - 18 結合を阻害する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 5】

IL - 18 への結合について IL - 18 BP と競合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 6】

IL - 18 への IL - 18 BP 結合の少なくとも 90% の阻害を示す、請求項 5 に記載の抗体分子。

【請求項 7】

ヒト IL - 18 に 1 nM 未満の IC₅₀ 値において結合する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 8】

$9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満のヒト IL - 18 についての解離定数 (k_d) を示す、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 9】

10 nM 未満、好ましくは 100 pM 未満のヒト IL - 18 についての親和性 (K_D) を示す、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 10】

規定される親 CDR : HCDR 1、HCDR 2、HCDR 3、LCDR 1、LCDR 2 および LCDR 3 のセットを含み、

HCDR 1 が、アミノ酸配列の配列番号 153 を有し；

HCDR 2 が、アミノ酸配列の配列番号 154 を有し；

HCDR 3 が、アミノ酸配列の配列番号 155 を有し；

LCDR 1 が、アミノ酸配列の配列番号 158 を有し；

LCDR 2 が、アミノ酸配列の配列番号 159 を有し；

LCDR 3 が、アミノ酸配列の配列番号 160 を有し；

または 1 つ以上のアミノ酸置換、欠失もしくは挿入を有する親の CDR のセットを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 11】

(a) 配列番号 153 と同一の、またはそれに対して 3 つ以下のアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する HCDR 1；

(b) 配列番号 154 と同一の、またはそれに対して 4 つ以下のアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する HCDR 2；

(c) 配列番号 155 と同一の、またはそれに対して 5 つ以下のアミノ酸残基置換を含む

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を有するHCDR3；

(d) 配列番号158と同一の、またはそれに対して4つ以下のアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有するLCDR1；

(e) 配列番号159と同一の、またはそれに対して4つ以下のアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有するLCDR2；および

(f) 配列番号160と同一の、またはそれに対して9つ以下のアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有するLCDR3

含む、請求項9に記載の抗体分子。

【請求項12】

HCDR3において、

Kabat残基97が、Alaであり；

Kabat残基98が、Tyrであり；

Kabat残基99が、AspまたはPheであり；

Kabat残基100が、Glyであり；

Kabat残基100Dが、AlaまたはThrであり；

Kabat残基100Eが、Aspである、

請求項10または11に記載の抗体分子。

【請求項13】

HCDR3において、

Kabat残基95が、Thrであり；

Kabat残基96が、Proであり

Kabat残基97が、Alaであり；

Kabat残基98が、Tyrであり；

Kabat残基99が、AspもしくはPheであり；

Kabat残基100が、Glyであり；

Kabat残基100Aが、AspもしくはGlnであり；

Kabat残基100Bが、AlaもしくはAspであり；

Kabat残基100Cが、Argであり

Kabat残基100Dが、AlaもしくはThrであり；

Kabat残基100Eが、Aspであり；

Kabat残基100Fが、Pheであり；

Kabat残基100Gが、Pheであり；

Kabat残基101が、Aspであり；および/または

Kabat残基102が、Valである、

請求項10～12のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項14】

HCDR3において、

HCDR3のKabat残基99が、Pheであり；

HCDR3のKabat残基100aが、Glnであり；

HCDR3のKabat残基100bが、Aspであり；および/または

HCDR3のKabat残基100dが、Thrである、

請求項10～13のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項15】

HCDR3が、配列番号5、15、25、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、135、145、または155のいずれか1つである、請求項10～14のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項16】

HCDR3が、アミノ酸配列の配列番号155である、請求項15に記載の抗体分子。

【請求項17】

HCDR2において、

10

20

30

40

50

K a b a t 残基 5 2 が、T y r であり ;
 K a b a t 残基 5 3 が、T y r であり ;
 K a b a t 残基 5 8 が、T y r である、
 請求項 1 0 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 1 8】

H C D R 1 において、
 K a b a t 残基 3 5 が、T y r である、
 請求項 1 0 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 1 9】

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 2 が、T y r、S e r、L e u、H i s、もしくは A l a であり ;

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 3 が、S e r、P h e、T y r、H i s、もしくは I l e であり ; および / または

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 4 が、T h r もしくは P r o である、

請求項 1 0 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 2 0】

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 1 が、S e r もしくは I l e であり ;

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 2 が、H i s であり ;

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 3 が、H i s であり ; および / または

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 4 が、P r o である、

請求項 1 0 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 2 1】

L C D R 3 の K a b a t 残基 8 9 が、G l n もしくは A l a であり ;

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 0 が、G l n、A s p、もしくは A s n であり ;

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 1 が、S e r もしくは I l e であり ;

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 5 が、P r o、A s n、もしくは G l n であり

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 6 が、T r p であり、および / または

L C D R 3 の K a b a t 残基 9 7 が、T h r もしくは A s p である、

請求項 1 0 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 2 2】

L C D R 3 が、配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、または 1 6 0 である、請求項 1 0 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 2 3】

L C D R 3 が、アミノ酸配列の配列番号 1 6 0 である、請求項 2 1 に記載の抗体分子。

【請求項 2 4】

H C D R 1 が、配列番号 3、1 0 3、1 1 3 または 1 5 3 であり ; H C D R 2 が、配列番号 4、1 2 4、1 3 4、1 4 4、または 1 5 4 である、請求項 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 2 5】

H C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 3 であり ; および / または H C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 4 である、請求項 2 2 に記載の抗体分子。

【請求項 2 6】

L C D R 1 において、

K a b a t 残基 3 0 が、S e r であり ;

K a b a t 残基 3 2 が、T r p である、

請求項 1 0 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 2 7】

L C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 8 であり ; および / または

L C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 9 である、

10

20

30

40

50

請求項 10 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 28】

抗体 1、抗体 1 G L、抗体 2、抗体 3、抗体 4、抗体 5、抗体 6、抗体 6 G L、抗体 7、抗体 7 G L、抗体 8 G L、抗体 9、抗体 10、抗体 11、抗体 11 __ G L、および抗体 12 G L の抗体のいずれかについての表 11 に示す C D R のセットを含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 29】

抗体 V H ドメインおよび抗体 V L ドメインを含み、前記 V H ドメインが、それぞれ配列番号 153、154 および 155 のアミノ酸配列を有する H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み；前記 V L ドメインが、それぞれ配列番号 158、159 および 160 のアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の抗体分子。

10

【請求項 30】

前記重鎖および/または軽鎖フレームワーク領域が、ヒト生殖細胞系列遺伝子セグメント配列に生殖細胞系列化されている、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 31】

V L F W 1 k a b a t 残基 1 が、A s p である、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 32】

配列番号 2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、および 152 から選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有する V H ドメインを含む、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の抗体分子。

20

【請求項 33】

前記 V H ドメインが、配列番号 2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、および 152 から選択される、請求項 32 に記載の抗体分子。

【請求項 34】

配列番号 7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、および 157 から選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を有する V L ドメインを含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の抗体分子。

30

【請求項 35】

前記 V L ドメインが、配列番号 7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、および 157 から選択される、請求項 34 に記載の抗体分子。

【請求項 36】

抗体 V H ドメインおよび抗体ドメイン V L を含み、前記抗体 V H ドメインおよび前記抗体 V L ドメインのアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 2 および 7、それぞれ配列番号 12 および 17；それぞれ配列番号 22 および 27；それぞれ配列番号 32 および 37；それぞれ配列番号 42 および 47；それぞれ配列番号 52 および 57；それぞれ配列番号 62 および 67；それぞれ配列番号 72 および 77；それぞれ配列番号 82 および 87；それぞれ配列番号 92 および 97；それぞれ配列番号 102 および 107；それぞれ配列番号 112 および 117；それぞれ配列番号 122 および 127；それぞれ配列番号 132 および 137；それぞれ配列番号 142 および 147；またはそれぞれ配列番号 152 および 157 と少なくとも 90% 同一である、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の抗体分子。

40

【請求項 37】

抗体 V H ドメインおよび抗体 V L ドメインを含み、前記抗体 V H ドメインおよび前記抗

50

体 V L ドメインのアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 2 および 7、それぞれ配列番号 1 2 および 1 7 ; それぞれ配列番号 2 2 および 2 7 ; それぞれ配列番号 3 2 および 3 7 ; それぞれ配列番号 4 2 および 4 7 ; それぞれ配列番号 5 2 および 5 7 ; それぞれ配列番号 6 2 および 6 7 ; それぞれ配列番号 7 2 および 7 7 ; それぞれ配列番号 8 2 および 8 7 ; それぞれ配列番号 9 2 および 9 7 ; それぞれ配列番号 1 0 2 および 1 0 7 ; それぞれ配列番号 1 1 2 および 1 1 7 ; それぞれ配列番号 1 2 2 および 1 2 7 ; それぞれ配列番号 1 3 2 および 1 3 7 ; それぞれ配列番号 1 4 2 および 1 4 7 ; またはそれぞれ配列番号 1 5 2 および 1 5 7 である、請求項 3 6 に記載の抗体分子。

【請求項 3 8】

前記抗体 V H ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 1 5 2 と少なくとも 9 0 % 同一であり、前記抗体 V L ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 1 5 7 と少なくとも 9 0 % 同一である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の抗体分子。

10

【請求項 3 9】

前記抗体 V H ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 1 5 2 であり、前記抗体 V L ドメインのアミノ酸配列が、配列番号 1 5 7 である、請求項 3 8 に記載の抗体分子。

【請求項 4 0】

配列番号 1 5 2 のアミノ酸配列を有する抗体 V H ドメインおよび抗体 V L ドメイン配列の配列番号 1 5 7 を含む抗体分子と、I L - 1 8 への結合について競合する抗体分子。

【請求項 4 1】

寄託アクセッション番号 N C I M B 4 1 7 8 6 の核酸配列によりコードされる V H および V L ドメインを含む抗体分子。

20

【請求項 4 2】

s c F v である、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 4 3】

抗体定常領域を含む、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 4 4】

モノクローナル抗体である、請求項 4 3 に記載の抗体分子。

【請求項 4 5】

キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全ヒト抗体である、請求項 4 4 に記載の抗体分子。

【請求項 4 6】

I g G である、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の抗体分子。

30

【請求項 4 7】

I g G 1 または I g G 4 である、請求項 4 6 に記載の抗体分子。

【請求項 4 8】

Y T E および T M 突然変異を F c 領域中に有する I g G 1 である、請求項 4 7 に記載の抗体分子。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子の単離された V H ドメイン。

【請求項 5 0】

請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子の単離された V L ドメイン。

40

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体分子および薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物。

【請求項 5 2】

ヒトまたは動物体の治療方法において使用される、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子を含む組成物。

【請求項 5 3】

個体における I L - 1 8 活性の減少において使用される、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

個体における I L - 1 8 発現または活性の増加に関連する疾患の治療において使用され

50

る、請求項 5 2 または 5 3 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記疾患が、炎症、心血管または自己免疫疾患である、請求項 5 4 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

前記疾患が、急性冠症候群 (A V S) ; アテローム性動脈硬化症 ; および慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) から選択される、請求項 5 5 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

個体における I L - 1 8 の活性を減少させるための医薬品の製造のための、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子の使用。

【請求項 5 8】

個体における I L - 1 8 発現または活性の増加に関連する疾患の治療のための医薬品の製造のための、請求項 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の抗体分子の使用。

【請求項 5 9】

前記疾患が、炎症、心血管または自己免疫疾患である、請求項 5 8 に記載の使用。

【請求項 6 0】

前記疾患が、急性冠症候群 (A V S) ; アテローム性動脈硬化症 ; および慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) から選択される、請求項 5 9 に記載の使用。

【請求項 6 1】

個体を治療する方法であって、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子を前記個体に投与することを含む方法。

【請求項 6 2】

前記抗体分子が、前記個体における I L - 1 8 の活性を減少させる、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

個体における I L - 1 8 発現または活性の増加に関連する疾患の治療のための、請求項 6 1 または 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記疾患が、炎症、心血管または自己免疫疾患である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記疾患が、急性冠症候群 (A C S) ; アテローム性動脈硬化症 ; および慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子、請求項 4 9 に記載の V H ドメインまたは請求項 5 0 に記載の V L ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 6 7】

請求項 6 6 に記載の核酸によりインビトロで形質転換された宿主細胞。

【請求項 6 8】

抗体 V H または V L ドメインを産生する方法であって、前記抗体分子 V H または V L ドメインの産生のための条件下で請求項 6 7 に記載の宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 6 9】

前記抗体分子 V H ドメインまたは V L ドメインを単離および / または精製することをさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記抗体分子 V H ドメインまたは V L ドメインを、少なくとも 1 つの追加の構成要素を含む組成物に製剤化することをさらに含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

ヒト I L - 1 8 についての抗体抗原結合ドメインを産生する方法であって、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む親 V H ドメイン (前記親 V H ドメイン H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 は、表 1 1 に示される H C D R のセットである)

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換または挿入を用いて、前記親VHドメインのアミノ酸配列変異体であるVHドメインを提供し、場合によりこうして提供した前記VHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせて1つ以上のVH/VL組合せを提供すること；ならびに

前記親VHドメインのアミノ酸配列変異体である前記VHドメインまたはVH/VL組合せを試験してIL-18についての抗体抗原結合ドメインを同定すること

を含む方法。

【請求項72】

前記親VHドメインが、配列番号152に記載のVHドメインである、請求項71に記載の方法。

10

【請求項73】

前記1つ以上のVLドメインを、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む親VLドメインのアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換または挿入の手法により提供し、前記親VLドメインLCDR1、LCDR2およびLCDR3は、表11に示されるCDRのVLセットであり、それぞれが前記親VLドメインのアミノ酸配列変異体である1つ以上のVLドメインを産生する、請求項71または72に記載の方法。

【請求項74】

前記親VLドメインが、配列番号157に記載のVLドメインである、請求項73に記載の方法。

20

【請求項75】

前記親VHドメインのアミノ酸配列変異体である前記VHドメインを、CDR突然変異導入により提供する、請求項71～74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項76】

IgG、scFvまたはFab抗体分子の構成要素としての前記抗体抗原結合ドメインを産生することをさらに含む、請求項71～75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項77】

ヒトIL-18に結合する結合メンバーを産生する方法であって、

VHドメインをコードする出発核酸またはVHドメインをそれぞれコードする核酸の出発レパートリーを提供すること（前記VHドメインが、置き換えるべきHCDR1、HCDR2および/またはHCDR3を含み、またはHCDR1、HCDR2および/またはHCDR3コード領域を欠く）；

30

前記出発核酸または出発レパートリーを、表11に示されるHCDR1、HCDR2、および/またはHCDR3のアミノ酸配列をコードするドナー核酸またはその突然変異により産生されたドナー核酸と組み合わせて前記ドナー核酸が前記出発核酸または出発レパートリー中のCDR1、CDR2および/またはCDR3領域中に挿入されるようにしてVHドメインをコードする核酸の産物レパートリーを提供すること；

前記産物レパートリーの核酸を発現させて産物VHドメインを産生すること；

場合により、前記産物VHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせること；

産物VHドメインおよび場合によりVLドメインを含む、IL-18についての結合メンバーを選択すること；ならびに

40

前記結合メンバーまたはそれをコードする核酸を回収すること

を含む方法。

【請求項78】

前記ドナー核酸を、前記HCDR1および/またはHCDR2の突然変異により産生する、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

前記ドナー核酸をHCDR3の突然変異により産生する、請求項77に記載の方法。

【請求項80】

前記ドナー核酸を、核酸のランダム突然変異により提供することを含む、請求項77に記載の方法。

50

【請求項 8 1】

回収した結合メンバー内に含まれる産物 V H ドメインを抗体定常領域に付着させることをさらに含む、請求項 7 7 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記産物 V H ドメインおよび V L ドメインを含む I g G、s c F v または F a b 抗体分子を提供することを含む、請求項 7 7 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

I L - 1 8 に結合する前記抗体抗原結合ドメインまたは結合メンバーを、I L - 1 8 R へのヒト I L - 1 8 の結合阻害能について試験することをさらに含む、請求項 7 7 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8 4】

ヒト I L - 1 8 に結合し、I L - 1 8 R へのヒト I L - 1 8 結合を阻害する抗体分子を含む結合メンバーを得る、請求項 7 7 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記抗体分子が、s c F v である、請求項 7 7 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記抗体分子が、I g G である、請求項 7 7 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

抗体分子組成物を産生する方法であって、請求項 8 4 ~ 8 6 のいずれか一項に記載の方法を使用して抗体分子を得ることと、前記抗体分子を、少なくとも 1 つの追加の構成要素を含む組成物に製剤化することを含む方法。

20

【請求項 8 8】

試料中の I L - 1 8 を計測する方法における、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子の使用。

【請求項 8 9】

I L - 1 8 が、遊離 I L - 1 8 である、請求項 8 8 に記載の使用。

【請求項 9 0】

I L - 1 8 を検出および / または計測する方法であって ;
 (i) 請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子を I L - 1 8 に曝露することならびに
 (i i) I L - 1 8 への前記結合メンバーの結合を検出および / または計測することを含む方法。

30

【請求項 9 1】

試料中の I L - 1 8 を計測する方法であって ;
 (i) 試料を請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子と接触させること ; および
 (i i) 前記試料への前記抗体分子の結合を測定することを含み、
 前記試料への前記抗体分子の結合が前記試料中の I L - 1 8 の量を示す、方法。

【請求項 9 2】

試料中の I L - 1 8 を計測する方法であって ;
 前記試料を、I L - 1 8 に結合する第 1 の抗体分子と接触させること、および ;
 I L - 1 8 に結合する第 2 の抗体分子を使用して、前記試料中での I L - 1 8 への前記第 1 の抗体分子の結合を測定することを含み、
 前記第 1 または第 2 の抗体分子の一方が、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子であり、前記第 1 または第 2 の結合メンバーの他方が、I L - 1 8 への結合について請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の抗体分子と競合しない抗 I L - 1 8 抗体分子である方法。

40

【請求項 9 3】

前記試料が、脳脊髄液 (C S F)、胆汁、尿、皮脂、唾液または血清試料である、請求

50

項 9 1 または 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記 I L - 1 8 が、遊離 I L - 1 8 である、請求項 9 0 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記 I L - 1 8 が、遊離 I L - 1 8 である、請求項 9 1 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターロイキン 1 8 (I L - 1 8) に結合し、その生物学的効果を阻害する抗体分子に関する。抗 I L - 1 8 抗体は、例えば、I L - 1 8 レベルの上昇に伴う障害、例として、炎症、心血管および自己免疫疾患の診断および治療において有用であり得る。

10

【背景技術】

【0002】

インターロイキン - 1 8 (I L - 1 8) は、自然免疫応答および獲得免疫応答の両方において役割を担う強力なサイトカインである。I L - 1 8 は、T ヘルパー (T h) 1 型免疫応答の一次エフェクター分子の 1 つである I F N - γ の産生のその誘導能について最初に同定された (O k a m u r a 他 (1 9 9 5) N a t u r e 3 7 8 : 8 8 - 9 1) 。 続

いて、ある設定において、I L - 1 8 は、追加の応答、例えば T h 2 の発達にも寄与し得ることが示された (N a k a n i s h i 他 (2 0 0 1) A n n u R e v I m m u n o l . 1 9 : 4 2 3 - 7 4) 。 分

化 (C D) 4 + および C D 8 + T 細胞のクラスターに対するその刺激効果に加えて、I L - 1 8 は、種々の細胞型、例として好中球、単球 / マクロファージ、ナチュラルキラー (N K) 細胞、上皮および内皮細胞に対する炎症関連効果の幅広のスペクトルを有することが示されている。

20

【0003】

I L - 1 8 は、インターロイキン - 1 (I L - 1) スーパーファミリーに属し、I L - 1 ベータ (I L - 1 β) と同様に、最初に不活性細胞内ポリペプチドのプロ I L - 1 8 (2 4 k D a) として合成される。プロペプチドの酵素的開裂は、I L - 1 8 の生物学的に

活性の成熟形態 (1 8 k D a) を放出する。I L - 1 8 は、免疫応答に関与するマクロファージおよび他の細胞により産生される。I L - 1 8 は、その生理学的役割とは別に、重

度の炎症反応にも寄与し、ある炎症障害、例えば自己免疫疾患におけるその役割の指標を提供する。I L - 1 8 は、部分的には、I L - 1 8 に結合し、I L - 1 8 受容体 (I L - 1 8 R) へのその結合を遮断し、それにより I L - 1 8 活性を抑制する内因性 I L - 1 8 結合タンパク質 (I L - 1 8 B P) により調節される。しかしながら、ある状況において、この負のフィードバックループは、I L - 1 8 の生物学的効果を適切に抑制するのに不

十分である一方、自然免疫応答を開始させるのに十分な I L - 1 8 生物学的活性を依然として提供する。

30

【0004】

I L - 1 8 の生物学的活性は、I L - 1 8 が細胞結合 I L - 1 8 R に結合したときに生成され、他のサイトカインの発現をもたらす細胞シグナリングを開始させる。I L - 1 8 R は、鎖が I L - 1 8 結合モチーフを含有し、鎖が細胞内シグナリングドメイン (T I R) を含有する機能的複合体を形成する 2 つの I g G 様ポリペプチド鎖を含むヘテロダイマーである (T o r i g o e 他 (1 9 9 7) J B i o l C h e m 2 7 2 : 2 5 7 3 7) 。 I L - 1 8 は、最初に I L - 1 8 R に結合すると考えられ、次いで鎖がリクルートされて機能的ヘテロダイマーが形成される。 / 複合体への I L - 1 8 の結合は、細胞内シグナリングカスケードの活性化をもたらす。したがって、I L - 1 8 R への I L - 1 8 の結合の遮断は、所望されない I L - 1 8 の抑制において有用であり得る。

40

【0005】

50

IL-18は、多数のヒト疾患、主として自己免疫または炎症疾患および癌に關与している。乾癬患者は、皮膚病巣および血液循環の両方においてIL-18の増加を有する (Flisiak他(2006)11:194)。血漿IL-18レベルの上昇が、多発性硬化症の患者の脳脊髄液および血漿中で觀察されている (Fassbender他(1999)Neurology 53:1104; Nicoletti他(2001)Neurology 57:342)。炎症性腸疾患 (例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎)の患者は、血液循環中のIL-18レベルの上昇を有する (Ludwiczek他(2005)Eur. Cytokine Netw. 16:27; Wiercinska-Drapalo他(2005)World J Gastroenterol. 11:605)。關節リウマチ (RA)の患者は、滑液中のIL-18レベルの上昇を有する (Gracie他(1999)J Clin Invest 104:1393)。IL-18は、全身症状を有する他の關節炎疾患、例えばスティル病 (Kawashima他(2001)Arthritis Rheum. 44(3):550-60)および全身性若年性特発性關節炎 (sJIA) (Maeno他(2002)Arthritis Rheum. 46(9):2539-41; Shimizu他(2010)Rheumatology 49(9):1645-53)を有する患者の血清中で増加することも示されており、疾患重症度のマーカーとして提案されている (Kawagushi他(2001)Arthritis Rheum. 44(7):1716-7; Lotito他(2007)J Rheumatol. 34(4):823-30)。これらの自己炎症障害において、血液循環IL-18は、疾患の活性期の間および合併症、例えばマクロファージ活性化症候群を發症する患者の下位群においてさらに増加することが示された (Shimizu他(2010)Rheumatology 49(9):1645-53)。IL-18レベルは、全身的、および慢性閉塞性肺疾患 (COPD)患者の肺組織の両方において増加することも示され、IL-18は肺胞マクロファージ、CD8+T細胞および気道上皮細胞に關連する (Imaoka他(2009)Eur Respir J. 31:287-97; Kang他(2007)J. Immunol. 178(3):1948-59; Petersen他(2007)Lung 185:161-71; Rovina他(2009)Respir Med. 103:1056-62)。IL-18は、COPD併存疾患にも寄与し得る (Petersen他(2007)Lung 185:161; Larsen他(2008)Cardiovasc Res 80:47)。

【0006】

心血管疾患において、血液循環IL-18の血漿または血清レベルの上昇が、急性冠症候群、心筋梗塞、冠動脈アテローム性動脈硬化症、および不安定狭心症において計測された (Mallat他(2002)Heart 88:467; Hulthe他(2006)Atherosclerosis 188:450; Mallat他(2001)Circulation 104:1598)。血清IL-18レベルは、頸動脈の内膜中膜厚にも關連する (Yamagami他(2004)Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:1458)。

【0007】

癌のいくつかの型も、IL-18發現レベルの上昇に關連する。しかしながら、IL-18の役割は、悪性疾患において二重であり得る (Dinarellio(2008)Cancer & Metastasis Rev 25:307)。一方で、IL-18は、血管新生促進性であり得、それにより腫瘍發達を促進し得、他方、細胞免疫応答、例えば、NK細胞媒介細胞傷害を刺激し得、それにより抗腫瘍形成作用物質として作用し得る (Kim他(2007)Oncogene 26:1468)。

【0008】

これらの臨床觀察の多くは、ヒト疾患の動物モデルにおいても裏付けられている。これらの試験は、IL-18依存性の疾患機構および介入のための潜在的標的としてのIL-18の両方に対処した。最も広く使用される多発性硬化症についての動物モデルである実験的自己免疫性脳炎 (EAE)におけるCNS病変の發達は、IL-18R エンゲージ

10

20

30

40

50

メントに依存性であることが示された (Gutcher 他 (2006) Nat Immunol 7:946)。動物への IL-18 の投与は、RA のコラーゲン誘導関節炎モデルにおいて疾患を悪化させることが示された (Gracie 他 (1999) J Clin Invest 104:1393) 一方、IL-18 の欠損または IL-18 中和療法は疾患の重症度を減衰させた (Banda 他 (2003) J Immunol 170:2100)。IL-18 ノックアウトマウスは、実験的誘導大腸炎に耐性である (Hovet 他 (2001) Gastroenterol 121:1372) 一方、IL-18 を過剰発現するトランスジェニック動物はより影響を受けやすい (Ishikura 他 (2003) J Gastroenterol Hepatol 18:960)。IL-18 中和治療は、腸炎症を減衰させる (Lochner and Foster (2002) Pathobiol 70:164)。

【0009】

COPD を発症させた動物モデルにおいて、タバコ煙は、IL-18 発現を肺組織中で局所的に増加させることが示された (Kang 他 (2008) J Clin Invest 118:2771, Kang 他 (2007) J Immunol 178:1948)。このモデルにおいて、IL-18 R 遺伝子の破壊を介する IL-18 シグナリングの損傷は、肺炎症、細胞アポトーシスおよび肺気腫の減少をもたらした (Kang 他 (2007) J Immunol 178:1948)。逆に、マウスの肺中の IL-18 の過剰発現は、CD8+T 細胞、マクロファージ、好中球および好酸球のリクルートメントを特徴とする肺炎症ならびに気腫表現型を有する肺に関連した (Hoshino 他 (2007) Am J Respir Crit Care Med 176:49)。慢性肺炎症に加えて、IL-18 は、ウイルスまたは細菌誘発性悪化に関連し得る。タバコ煙マウスモデルにおいて、IL-18 レベルは、ポリ (I:C) によるマウスの処理またはインフルエンザによる感染によりさらに増強することおよび炎症、肺胞リモデリングおよびアポトーシスに寄与することが示された (Kang 他 (2008) 前掲)。

【0010】

多数の実験的動物モデルは、心血管疾患、特にアテローム性動脈硬化症の発達における IL-18 の役割に対処した。ApoE-/-マウスへの組換え IL-18 の投与は、アテローム性動脈硬化症病巣サイズの増加および血漿 IFN レベルの上昇をもたらした (Tenger 他 (2005) Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:791)。ApoE-/-マウスにおける、天然に生じる IL-18 インヒビター、IL-18 BP の過剰発現は、アテローム性動脈硬化症の低減およびより「安定」な病巣を示すプラーク表現型の大きな変化をもたらした (Mallat 他 (2001) Circ Res 89:E41)。二重ノックアウト ApoE-/-xIL-18-/-マウスの表現型は、IL-18 BP 過剰発現 ApoE-/-マウスと、病巣がより小さく、それらの表現型がより「安定」である点で類似する (Elhage 他 (2003) Cardiovasc Res 59:234)。ラット血管損傷モデルにおける中和抗 IL-18 抗体の投与は、新生内膜形成を顕著に減少させ、その結果、内膜内細胞増殖の低減、ならびに IFN および IL-6 遺伝子発現に相当した (Maffia 他 (2006) Circulation 114:430)。さらに、IL-18-/-マウスは、過食症、肥満およびインスリン耐性を受けやすい (Netea 他 (2006) Nat. Med. 12:650)。

【0011】

上記のとおり、IL-18 は、疾患を媒介する炎症促進性サイトカイン、ならびに感染および癌に対する宿主防御に重要な免疫賦活性サイトカインとみなすことができる。

【0012】

高親和性で構成的に発現される血液循環 IL-18 結合タンパク質 (IL-18 BP) は、IL-18 についての細胞表面受容体と競合し、IL-18 活性を中和し、天然抗炎症および免疫抑制分子として作用し得る。ヒトにおいて、選択的スプライシングから生じる IL-18 BP の 4 つの異なるアイソフォーム (a、b、c および d) が同定されてい

る。IL-18BP aおよびIL-18BP cのみが、ヒトIL-18に結合し、その生物学的活性を中和することが示されており、アイソフォーム aはアイソフォーム cよりも10倍高い親和性を有する(Kim他(2000)PNAS 97 1190-1195)。ヒトIL-18のコンピュータモデリングは、IL-18BPの大きい疎水性ポケット中に埋め込まれた逆荷電アミノ酸残基と相互作用する2つの荷電残基Glu-42およびLys-89を同定した。細胞表面IL-18受容体アルファ鎖は、IL-18結合についてIL-18BPと競合するが、IL-18受容体アルファ鎖は、IL-18BPと顕著な相同性を共有しない。

【0013】

可溶性IL-18の構造は、NMR分光法により決定されており、 α -トレフォイルを形成する12個のストランドからなる(Kato他(2003)Nat. Struct. Biol. 10:966)。3つの特異的表面領域が同定されている。I部位は、コアパレルの片側上に局在する5つの残基(Arg13、Asp17、Met33、Asp35およびAsp132)により形成され、IL-18R α への結合を担う。II部位は、 α -パレルの頂部に局在する6つの残基(Lys4、Leu5、Lys8、Arg58、Met60およびArg104)により形成され、同様にIL-18R α 結合に重要である。 α -パレルの底部においてII部位の反対側に局在するIII部位(Lys79、Lys89、asp98)は、IL-18R α への結合である(Kato他(2003)前掲)。

10

【0014】

IL-18に結合する抗体は、当技術分野において公知である(例えば、米国特許第6706487号明細書、国際公開第2001/058956号パンフレット、欧州特許第1621616号明細書、米国特許出願公開第2005/0147610号明細書；欧州特許第0974600号明細書；および国際公開第0158956号パンフレットを参照)。しかしながら、治療用途においてIL-18の生物学的活性を低減させる抗IL-18抗体が依然として必要とされている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の態様は、IL-18R α およびIL-18BPの一方または両方へのIL-18の結合を阻害し、それによりIL-18活性を低減させるインターロイキン-18(IL-18)の単離された結合メンバーを提供する。

30

【0016】

本発明の結合メンバーは、IL-18分子上のIL-18BP結合部位に全体的または部分的に重複するエピトープに結合し得る。IL-18分子上のIL-18BP結合部位を図13に示す。

【0017】

例えば、本発明の結合メンバーは、残基Tyr1、Gly3、Leu5、Glu6、Lys8、Met51、Lys53、Asp54、Ser55、Gln56、Pro57、Arg58、Gly59、Met60、Arg104、Ser105、およびPro107の1つ以上を含むヒトIL-18のエピトープに結合し得る。

40

【0018】

本発明の結合メンバーは、IL-18活性の増加に関連する疾患、例えば急性冠症候群(ACS)；アテローム性動脈硬化症；および慢性閉塞性肺疾患(COPD)の診断および治療において有用であり得る。

【0019】

本発明の結合メンバーは、試料中の遊離IL-18の量の計測においても有用であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0020】

50

【図1】増加濃度の抗体1 s c F v (三角)によるヒトIL-18、IL-18受容体アルファおよびIL-18受容体ベータ複合体の形成の阻害を示す。Y軸は、IL-18受容体複合体へのIL-18の特異的結合を、いかなるs c F vも不存在下で観察された全結合の割合として表す。データは、SEMとともに二重点の平均値を表す。

【図2】グラフAにおいて、増加濃度の抗体1 I g G₂ (三角)によるヒトIL-18、IL-18受容体アルファおよびIL-18受容体ベータ複合体の形成の阻害を、グラフBにおいて、増加濃度の抗体1 I g G₂ (三角)によるアカゲザルIL-18、IL-18受容体アルファおよびIL-18受容体ベータ複合体の形成の阻害を示す。Y軸は、IL-18受容体複合体へのIL-18の特異的結合を、いかなるI g Gも不存在下で観察された全結合の割合として表す。データは、SEMとともに二重点の平均値を表す。

【図3】増加濃度の抗体1 I g G₂ (円)によるヒトIL-18-FHへのIL-18 B P a - F cの結合の阻害を示す。Y軸は、IL-18 B P a - F cへのIL-18の特異的結合を、いかなるI g Gも不存在下で観察された全結合の割合として表す。データは、SEMとともに二重点の平均値を表す。

【図4】増加濃度の抗体9 s c F v (円)および抗体10 s c F v (四角)によるヒトIL-18への抗体6 G L結合の阻害を示す。Y軸は、抗体6 G LへのIL-18の特異的結合を、いかなるs c F vも不存在下で観察された全結合の割合として表す。データは、SEMとともに二重点の平均値を表す。

【図5】増加濃度の抗体9 s c F v (四角)、抗体10 s c F v (円)および抗体7 s c F v (三角)の存在下で外因性ヒトIL-18およびTNFにより刺激したKG-1細胞によるIFN放出の阻害を示す。Y軸は、IFN放出を、中和抗体の不存在下で観察される最大応答の割合として表す。データは、SEMとともに二重ウェルの平均値を表す。

【図6】増加濃度の生殖細胞系列化抗IL-18 I g Gの存在下で外因性ヒトIL-18およびTNFにより刺激したKG-1細胞によるIFN放出の阻害を示す。抗体11 G L (円)、抗体12 G L (四角)、抗体8 G L (菱形)(I g G₂に全て変換)、および対照I g G (三角)の中和効果をグラフAに示す。I g G₁ T Mに変換した抗体12 G L (白四角)および対照I g G (白三角)の中和効果をグラフBに示す。Y軸は、IFN放出を、中和抗体の不存在下で得られる最大応答の割合として表す。データは、SEMとともに二重ウェルの平均値を表す。

【図7】増加濃度の生殖細胞系列化抗体12 I g G₁ T M (四角)および対照I g G (三角)の存在下でL P SおよびヒトIL-12により刺激したヒト(グラフA)およびカニクイザル(グラフB)起源のP B M CによるIFN放出の阻害を示す。Y軸は、IFN放出を、中和抗体の不存在下で得られる最大応答の割合として表す。データは、SEMとともに3つのドナーの平均値を表す。

【図8】増加濃度の生殖細胞系列化抗体12 I g G₁ T M (円)および対照I g G (三角)の存在下でヒトIL-18により刺激したヒト好中球上のC D 1 1 b上方調節の阻害を示す。Y軸は、未処理細胞中の発現レベルを差し引いた後のC D 1 1 b発現の幾何平均を表す。データは、SEMとともに二重ウェルの平均値を表す。

【図9】増加濃度の生殖細胞系列抗体12 I g G₁ T M (四角)および対照I g G (三角)の存在下でヒトIL-18およびf M L F Fにより刺激したヒト好中球による活性酸素種(R O S)産生の阻害を示す。Y軸は、未処理細胞において見られるレベルを差し引いた後のR O S産生(F L - 2チャンネル中)陽性の細胞の割合を表す。データは、SEMとともに二重ウェルの平均値を表す。

【図10】増加量の抗体12 G L I g G₁ T M (グラフA)の存在下でヒトIL-18により刺激したKG-1細胞によるIFN放出の用量依存性誘導および抗体のK Dを決定するために使用した対応するS c h i l dプロット(グラフB)を示す。

【図11】増加濃度の抗体12 G L I g G₂ (円)によるヒトIL-18-FHへのヒトIL-18 B P a - F c結合の阻害を示す。Y軸は、IL-18 B P a - F cへのIL-18の特異的結合を、いかなるI g Gも不存在下で観察された全結合の割合として表す。

10

20

30

40

50

データは、SEMとともに二重点の平均値を表す。

【図12】IL-18（灰色）のポリペプチド鎖が抗体12GL（黒色）と複合体化するIL-18：抗体12GLの複合体を示す。

【図13】抗体12GL（上部）およびIL-18BP（下部）と相互作用するIL-18配列内の残基（灰色、下線）（すなわち、エピトープ）を示す。

【図14】IL-18と相互作用する抗体12GL配列内の残基（灰色、下線）（すなわち、パラトープ）を示す。

【図15】pCLD-1128プラスミドのマップを示す。

【図16】組換えIL-18BPを用いる遊離IL-18についてのアッセイにおける組換えIL-18からのシグナルの濃度依存性阻害を示す。

【図17】遊離IL-18についてのアッセイにおける3つのヒト唾液試料中の内因性遊離IL-18からのシグナルの組換えIL-18BPおよび抗体12GLによる阻害を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、IL-18に結合する結合メンバー、例として、ヒト、ヒト化および/またはキメラ抗体、ならびにそれらの断片、誘導體/コンジュゲートおよび組成物を提供する。本明細書に記載の結合メンバーは、IL-18BPおよび/またはIL-18RへのIL-18の結合をモジュレートし得、IL-18の例えばインビボ、エクスピボまたはインビトロ生物学的活性の減少において有用であり得る。IL-18に結合する結合メンバーは、例えば、試料中のIL-18の存在の検出においても有用であり得る。

【0022】

本発明の一態様は、IL-18RおよびIL-18BPの一方または両方へのIL-18の結合を阻害し、それによりIL-18活性を低減させるIL-18についての単離された結合メンバーを提供する。

【0023】

単離された結合メンバーは、IL-18BP結合部位に完全にまたは部分的に重複するIL-18分子上のエピトープに結合し得る。

【0024】

IL-18BP結合部位を図13に示す。

【0025】

例えば、IL-18についての単離された結合メンバーは、ヒトIL-18の残基Tyr1、Gly3、Leu5、Glu6、Lys8、Met51、Lys53、Asp54、Ser55、Gln56、Pro57、Arg58、Gly59、Met60、Arg104、Ser105およびPro107または他の種、例えば霊長類、例えばアカゲザルのIL-18からの対応する残基の1つ以上を含むIL-18のエピトープに特異的に結合し得る。

【0026】

IL-18についての結合メンバーは、ヒトIL-18のTyr1、Gly3、Leu5、Glu6、Lys8、Met51、Lys53、Asp54、Ser55、Gln56、Pro57、Arg58、Gly59、Met60、Arg104、Ser105、およびPro107からなる群から選択される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16または全17個の残基を含むIL-18エピトープに結合し得る。

【0027】

例えば、IL-18エピトープは、残基Tyr1、Gly3、Leu5、Met51、Lys53、Asp54、Ser55、Gln56、Pro57、Arg58、Gly59、Met60、Arg104およびSer105を含み得る。場合により、エピトープは、残基Glu6、Lys8およびPro107をさらに含み得る。

【0028】

10

20

30

40

50

一部の好ましい実施形態において、IL-18についての結合メンバーは、Tyr1、Gly3、Leu5、Met51、Lys53、Asp54、Ser55、Gln56、Pro57、Arg58、Gly59、Met60、Arg104およびSer105からなるIL-18エピトープに結合し得る。

【0029】

IL-18の配列を、エピトープ残基を示して図13に記載する。

【0030】

IL-18エピトープの一部として同定されたIL-18残基は、本明細書において、結合したIL-18/抗体複合体中の抗体可変ドメインの1つ以上の残基の0.5nm(5)以内に位置することが示される。一部の実施形態において、結合したIL-18/抗体複合体中の抗体可変ドメインのより多くの残基に近接して(例えば、0.75nm以内または1nm以内)さらに局在する他のIL-18残基も、IL-18エピトープの一部とみなすことができる。

10

【0031】

IL-18は、特に記載のない限りヒトIL-18である。ヒトIL-18の多数の多形変異体が公知である。最も一般的な2つの多形変異体は、SNPデータベースにおいてアクセッション番号rs2854746(A32G)およびrs9282734(H158P)を有する。ヒトIL-18の配列は、公共データベース上で入手可能であり(Gene ID:3606;NCBI NP_001553.1GI:4504653;UniProt Q14116-1)、成熟ヒトIL-18配列は配列番号169に示す。非ヒトIL-18は、ヒト以外の種、例えば齧歯類または非ヒト霊長類において天然に生じるIL-18のオルソログを指す。他の種、例としてアカゲザルからのIL-18配列は当技術分野において公知であり、公共データベース、例えばGenbank上で入手可能である。ヒトIL-18中の指定の残基に対応する他の種からのIL-18配列中の残基は、配列アラインメントツールを使用して容易に同定することができる。

20

【0032】

組換え発現成熟ヒトおよびアカゲザルIL-18を使用して、本明細書に記載の抗体分子を選択およびスクリーニングした。非ヒトオルソログ、例えば齧歯類およびアカゲザルIL-18を、種交差反応分析についての本明細書に記載の実験において使用した。

【0033】

記載の結合メンバーはヒトIL-18に結合する。結合メンバーは、他の種からのIL-18中の標的エピトープにも結合し得る。例えば、本明細書に記載の結合メンバーは、非ヒト霊長類、例えばアカゲザルおよび/またはカニクイザルからのIL-18に結合し得る。一部の実施形態において、結合メンバーは、齧歯類IL-18、例えばマウスまたはラットIL-18への結合も示し得ず、実質的な結合も示し得ない。

30

【0034】

本明細書に記載の結合メンバーは、本明細書に記載の標的IL-18エピトープに特異的であり、この標的エピトープに非標的エピトープ、例えばIL-18以外のタンパク質からのエピトープに対して高い親和性で結合する。例えば、結合メンバーは、他のヒトサイトカイン、例えばIL-1およびIL-1F7よりも少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍または少なくとも2000倍大きいIL-18についての結合親和性を示し得る。

40

【0035】

結合メンバーは、 10^{-2} s^{-1} 未満、好ましくは、 10^{-3} s^{-1} 未満、より好ましくは、 10^{-4} s^{-1} 未満、例えば、 9×10^{-5} 以下、典型的には2から $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ のヒトIL-18および場合によりアカゲザルIL-18についての解離定数(k_d)を示し得る。(例えば、本明細書に記載のBiacoreにより計測された抗体12GLIGG1TMについて $2.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)。

【0036】

結合メンバーは、10nM未満(例えば、本明細書に記載のBiacoreアッセイに

50

において計測された抗体 1、 $KD = 9.96 \text{ nM}$); 好ましくは、 1 nM 未満、より好ましくは、 500 pM 未満、より好ましくは、 100 pM 未満、さらにより好ましくは好ましくは、 70 pM 未満(例えば、抗体 12GLIGG1TM、 $KD =$ 本明細書に記載の Biacore アッセイにおいて計測された 63 pM)のヒト IL-18 についての親和性 (kD)を示し得る。結合メンバーの結合キネティクスおよび親和性(平衡解離定数 K_D と表現)は、標準的技術を使用して、例えば表面プラズモン共鳴、例えば Biacore (商標)分析を使用して、または本明細書に記載のとおり細胞ベースアッセイ(Schild プロット/ pA_2 分析)を薬理的に使用して測定することができる。

【0037】

本明細書に記載の結合メンバーは、IL-18 受容体(IL-18R)および/または IL-18 結合タンパク質(IL-18BP)へのIL-18の結合を阻害し得る。例えば、結合メンバーは、IL-18R(IL-18R、Uniprot アクセション# Q13478; IL-18R、Uniprot アクセション# O95256)および/またはIL-18BP、例えばIL-18BPアイソフォームa(Uniprot アクセション# O95998)とIL-18への結合について競合し得る。

10

【0038】

競合は、標準的技術、例えば実施例に記載のIL-18/IL-18BPホモジニアス時間分解蛍光(HTRF(商標))競合アッセイを使用して計測することができる。例えば、結合メンバーは、好適なアッセイ、例えばHTRF(商標)IL-18/IL-18BP競合アッセイにおいて例えば 10 nM において計測されたIL-18へのIL-18BP結合の少なくとも 70% 、少なくとも 75% 、少なくとも 80% 、少なくとも 85% または少なくとも 90% の阻害を示し得る。

20

【0039】

本明細書に記載の結合メンバーは、IL-18の生物学的活性を阻害し得る。結合メンバーによるIL-18活性の阻害は、例えば、本明細書に記載のアッセイにおいて、結合メンバーがIL-18に結合し、それを阻害することを示す。IL-18活性の阻害は、IFN 産生の減少により簡便に計測することができる。阻害は、例えばELISAにより他の可溶性メディエーター、例えばIL-8、MCP-1、CXCL16、GM-CSF、sICAM-1、およびMMPの放出により計測することもできる。

【0040】

IFN および他の可溶性メディエーターの産生および放出を計測する技術は当技術分野において周知であり、その技術には、細胞ベースアッセイ、例えばKG-1アッセイおよびPBMCアッセイ;免疫学的技術、例えばELISA、ウエスタンブロッティングおよび免疫沈降;親和性クロマトグラフィーおよび他の生化学的アッセイが含まれる。

30

【0041】

IL-18活性の阻害は、細胞上の活性化マーカー、例えばCD11bの発現の減少または酸化ストレスのメディエーター、例えば活性酸素種(ROS)の産生の減少により計測することもできる。CD11bまたはROSのモジュレーションを計測する技術は当技術分野において周知であり、その技術には、細胞ベースアッセイ、例えば好中球刺激アッセイ;免疫学的技術、例えばフローサイトメトリーのための免疫染色および他の生化学的アッセイが含まれる。

40

【0042】

IL-18活性の阻害は、部分的または全体的(すなわち、中和)であり得る。例えば、結合メンバーは、IL-18活性を、結合メンバー不存在下の活性に対して 100% 、または少なくとも 95% 、少なくとも 90% 、少なくとも 85% 、少なくとも 80% 、少なくとも 75% 、少なくとも 70% 、少なくとも 60% 、または少なくとも 50% だけ阻害し得る。

【0043】

結合メンバーの中和効力を測定することができる。効力は、通常、 IC_{50} 値として、特に記載のない限り nM で表現される。機能アッセイにおいて、 IC_{50} は、生物学的応

50

答をその最大値の50%だけ低減させる抗体分子の濃度である。リガンド結合試験において、 IC_{50} は、受容体結合を最大特異的結合レベルの50%だけ低減させる濃度である。 IC_{50} は、結合メンバー濃度の対数の関数として最大生物学的応答の%をプロットし、ソフトウェアプログラム、例えばPrism(GraphPad)またはOrigin(Origin Labs)を使用してシグモイド関数をデータにフィットさせて IC_{50} 値を作成することにより算出することができる。効力を計測または測定する好適なアッセイは、当技術分野において周知である。

【0044】

本明細書に記載の結合メンバーは、例えば、IL-18誘発性のIFN放出により計測された260nM未満、100nM未満、10nM未満、5nM未満、1nM未満、または0.5nM未満のIL-18についての IC_{50} 値(効力の幾何平均として表現)を示し得る。IFN放出についての好適なアッセイには、本明細書に記載のKG-1およびPBMCアッセイが含まれる。

10

【0045】

第1の種(例えばヒト)からのIL-18を使用するアッセイにおいて算出された結合メンバーの中和効力を、第2の種(例えばアカゲザルIL-18)からのIL-18を使用する同一アッセイにおける結合メンバーの中和効力と比較して、2つの種のIL-18についての結合メンバーの交差反応性の程度を評価することができる。本明細書に記載の結合メンバーは、非ヒトIL-18アッセイにおけるものよりもヒトIL-18アッセイにおける中和効力が大きいことがある。例えば、ヒトIL-18についての結合メンバーの中和効力は、アカゲザルIL-18についてのものよりも大きいことがある。

20

【0046】

結合メンバーは、抗体フレームワーク内の1つ以上のCDR、例えばCDRのセット(すなわち、抗体抗原結合ドメイン)を有する抗体分子を含み得る。例えば、抗体分子は、抗体VHおよび/またはVLドメインを含み得る。抗体分子のVHおよびVLドメインも、本発明の一部として提供される。周知のとおり、VHおよびVLドメインは、相補性決定領域(「CDR」)、およびフレームワーク領域(「FW」)を含む。VHドメインはHCDRのセットを含み、VLドメインはLCDRのセットを含む。抗体分子は、VHCDR1、CDR2およびCDR3を含む抗体VHドメインならびに/またはVLCDR1、CDR2およびCDR3を含む抗体VLドメインを含み得る。VHまたはVLドメインは、フレームワークをさらに含み得る。VHまたはVLドメインフレームワークは、典型的には、4つのフレームワーク領域FW1、FW2、FW3およびFW4を含み、それらには以下の構造でCDRが組み入れられている: FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3-FW4。

30

【0047】

本発明の態様による抗体VHおよびVLドメイン、FWおよびCDRの例を、表10および11ならびに本開示の一部を形成する付属の配列表に列記する。本明細書に開示される全てのVHおよびVL配列、CDR配列、CDRのセット、HCDRのセットおよびLCDRのセットならびにそれらの要素の組合せは、本発明の態様を表す。本明細書に記載のとおり、「CDRのセット」は、CDR1、CDR2およびCDR3を含む。したがって、HCDRのセットはHCDR1、HCDR2およびHCDR3を指し、LCDRのセットはLCDR1、LCDR2およびLCDR3を指す。特に記載のないかぎり、「CDRのセット」には、HCDRおよびLCDRが含まれる。典型的には、本発明の抗体分子は、モノクローナル抗体である。

40

【0048】

他の実施形態において、結合メンバーは、以下にさらに考察するとおり、通常、1つ以上のCDR、例えば非抗体タンパク質足場中のCDRのセットにより提供される非抗体分子内の抗原結合部位を含み得る。

【0049】

表10、11および配列表に示すCDR配列およびフレームワーク配列のセットを有す

50

る抗体 1 と称する親抗体分子の単離を、本明細書に記載する。最適化のプロセスを介して、抗体クローンのパネルを称する抗体 1 から作製し、それらを抗体 1 G L、抗体 2、抗体 3、抗体 4、抗体 5、抗体 6、抗体 6 G L、抗体 7、抗体 7 G L、抗体 8 G L、抗体 9、抗体 10、抗体 11、抗体 11 G L、および抗体 12 G L と称する。これらの最適化クローンの C D R 配列および可変ドメイン配列は、表 10 および 11 に参照し、配列表に記載する。例えば、表 11 は、H C D R 1 が配列番号 3 (K a b a t 残基 31 ~ 35 b) であり、H C D R 2 が配列番号 4 (K a b a t 残基 50 ~ 65) であり、H C D R 3 が配列番号 5 (K a b a t 残基 95 ~ 102) であり、L C D R 1 が配列番号 8 (K a b a t 残基 24 ~ 34) であり、L C D R 2 が配列番号 9 (K a b a t 残基 50 ~ 56) であり、L C D R 3 が配列番号 10 (K a b a t 残基 89 ~ 97) である C D R のセットを抗体 1 が有することを示す。抗体 2 は、それぞれ、配列番号 23、24、25、28、29、および 30 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 配列を有する。他の最適化抗体クローンは、表 11 に同様に示し、それも本発明の態様として提供する。

10

【0050】

本発明による I L - 18 についての結合メンバーは、本明細書に記載の 1 つ以上の C D R、例えば C D R 3、ならびに場合により C D R のセットを形成するための C D R 1 および C D R 2 も含み得る。C D R または C D R のセットは、抗体 1 C D R もしくは抗体 1 C D R の組であり得、または C D R もしくは抗体 1 G L、抗体 2、抗体 3、抗体 4、抗体 5、抗体 6、抗体 6 G L、抗体 7、抗体 7 G L、抗体 8 G L、抗体 9、抗体 10、抗体 11、抗体 11 G L、および抗体 12 G L のいずれかの C D R のセットであり得、または本明細書に記載のそれらの変異体であり得る。

20

【0051】

一部の実施形態において；

H C D R 1 は、K a b a t 残基 31 ~ 35 b からなる 7 アミノ酸長であり得；

H C D R 2 は、K a b a t 残基 50 ~ 65 からなる 16 アミノ酸長であり得；

H C D R 3 は、K a b a t 残基 95 ~ 102 からなる 15 アミノ酸長であり得；

L C D R 1 は、K a b a t 残基 24 ~ 34 からなる 11 アミノ酸長であり得；

L C D R 2 は、K a b a t 残基 50 ~ 56 からなる 7 アミノ酸長であり得；および / または

30

L C D R 3 は、K a b a t 残基 89 ~ 97 からなる 9 アミノ酸長であり得る。

【0052】

結合メンバーは、表 11 に列記される抗体のいずれかの H C D R 1、H C D R 2 および / または H C D R 3 および / または L C D R 1、L C D R 2 および / または L C D R 3、例えば表 11 に列記される抗体のいずれかの C D R のセットを含み得る。結合メンバーは、それらの抗体のいずれか 1 つの V H C D R のセットを含み得る。場合により、それは、それらの抗体の 1 つの V L C D R のセットも含み得る。V L C D R は、V H C D R と同一または異なる抗体からのものであり得る。表 11 に列記される抗体のいずれかの H C D R のセットを含む V H ドメイン、および / または表 11 に列記される抗体のいずれかの L C D R のセットを含む V L ドメインも、本明細書に提供される。

40

【0053】

本明細書に記載のインターロイキン - 18 (I L - 18) に特異的に結合する結合メンバーは：

(a) 配列番号 153 と同一の、またはそれに対して 1、2、もしくは 3 つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する H C D R 1 ；

(b) 配列番号 154 と同一の、またはそれに対して 1、2、3 もしくは 4 つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する H C D R 2 ；

(c) 配列番号 155 と同一の、またはそれに対して 1、2、3、4 もしくは 5 つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する H C D R 3 ；

(d) 配列番号 158 と同一の、またはそれに対して 1、2、3 もしくは 4 つのアミノ酸

50

残基置換を含むアミノ酸配列を有する L C D R 1 ;

(e) 配列番号 1 5 9 と同一の、またはそれに対して 1、2、3 もしくは 4 つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する L C D R 2 ; および

(f) 配列番号 1 6 0 と同一の、またはそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、または 9 つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する L C D R 3 を含み得る。

【 0 0 5 4 】

結合メンバーは、親抗体の抗体 1 または 1 つ以上の置換、例えば最大 1 5、最大 1 6、もしくは最大 1 7 個の置換を H および / もしくは L C D R の開示のセット内に有する表 1 1 に列記される抗体のいずれかの H および / または L C D R のセットを含み得る。例えば、本発明の抗体分子は、1 7、1 6 または 1 5 以下の置換、例えば 1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 個の置換を有する抗体 1、抗体 1 G L、抗体 2、抗体 3、抗体 4、抗体 5、抗体 6、抗体 6 G L、抗体 7、抗体 7 G L、抗体 8 G L、抗体 9、抗体 1 0、抗体 1 1、抗体 1 1 G L、および抗体 1 2 G L のいずれか 1 つからの H および / または L C D R のセットを含み得る。置換は、潜在的に、C D R のセット内の任意の残基において作製することができる。

10

【 0 0 5 5 】

例えば、好適な抗体分子は、C D R のセット : H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み得、C D R のセットは、以下からの 1 7、1 6 または 1 5 以下のアミノ酸置換を有する :

20

(i)

H C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 3 であり ;
H C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 4 であり ;
H C D R 3 が、アミノ酸配列の配列番号 5 であり ;
L C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 8 であり ;
L C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 9 であり ;
L C D R 3 が、アミノ酸配列の配列番号 1 0 である、
抗体 1 C D R のセット :

(i i)

H C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 1 4 3 であり ;
H C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 1 4 4 であり ;
H C D R 3 が、アミノ酸配列の配列番号 1 4 5 であり ;
L C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 1 4 8 であり ;
L C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 1 4 9 であり ;
L C D R 3 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 0 である、
抗体 1 1 G L C D R のセット : または

30

(i i i)

H C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 3 であり ;
H C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 4 であり ;
H C D R 3 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 5 であり ;
L C D R 1 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 8 であり ;
L C D R 2 が、アミノ酸配列の配列番号 1 5 9 であり ;
L C D R 3 が、アミノ酸配列の配列番号 1 6 0 である、
抗体 1 2 G L C D R のセット。

40

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、置換は、I L - 1 8 / m A b 複合体中の I L - 1 8 残基から 0 . 5 n m (5) を超えて離れて局在する残基において作製することができる (図 1 4 参照)。例えば、H C D R 3 は、K a b a t 残基 9 5、9 6、1 0 0 A、1 0 0 B、1 0 0 C、1 0 0 f、1 0 0 g、1 0 1 および 1 0 2 から選択される 1、2、3、4 または 5 つの位置における置換を含み得る。H C D R 2 は、K a b a t 残基 5 0、5 1、5 4 ~ 5

50

7および59～65から選択される1、2、3または4つの位置における置換を含み得る。HCDR1は、Kabat残基31～34、35aおよび35bから選択される1、2または3つの位置における置換を含み得る。好適なLCDR3は、Kabat残基89、90、95および97から選択される1、2、3、または4つの位置における置換を含み得る。LCDR2は、Kabat残基50～56から選択される1、2、3または4つの位置における置換を含み得る。LCDR1は、Kabat残基24から29、31、33および34から選択される1、2、3、または4つの位置における置換を含み得る。

【0057】

一部の実施形態において、置換は、表11に示す抗体1GL、抗体2、抗体3、抗体4、抗体5、抗体6、抗体6GL、抗体7、抗体7GL、抗体8GL、抗体9、抗体10、抗体11、抗体11GL、および抗体12GLのいずれかにおいて置換される位置において作製することができる。したがって、1つ以上の置換は、以下の残基の1つ以上におけるものであり得る：

HCDR3のKabat残基99、100a、100bおよび100d；

LCDR3のKabat残基89、90、91、92、93、94、95、および97。

【0058】

結合メンバーは、

Kabat残基95が、Thrであり；

Kabat残基96が、Proであり

Kabat残基97が、Alaであり；

Kabat残基98が、Tyrであり；

Kabat残基99が、AspもしくはPheであり；

Kabat残基100が、Glyであり；

Kabat残基100Aが、AspもしくはGlnであり；

Kabat残基100Bが、AlaもしくはAspであり；

Kabat残基100Cが、Argであり

Kabat残基100Dが、AlaもしくはThrであり；

Kabat残基100Eが、Aspであり；

Kabat残基100Fが、Pheであり；

Kabat残基100Gが、Pheであり；

Kabat残基101が、Aspであり；および/または

Kabat残基102が、Valである

HCDR3を含み得る。

【0059】

例えば、HCDR3のKabat残基99はPheであり得；Kabat残基100aはGlnであり得；Kabat残基100bはAspであり得；および/またはKabat残基100dはThrであり得る。

【0060】

結合メンバーは、

Kabat残基92が、Tyr、Ser、Leu、His、またはAlaであり；

Kabat残基93が、Ser、Phe、Tyr、His、またはIleであり；および/または

Kabat残基94が、ThrまたはProである、

LCDR3を含み得る。

【0061】

例えば、結合メンバーは、

Kabat残基89が、GlnもしくはAlaであり；

Kabat残基90が、Gln、Asp、もしくはAsnであり；

Kabat残基91が、SerもしくはIleであり；

Kabat残基92が、Tyr、Ser、Leu、His、もしくはAlaであり；

K a b a t 残基 9 3 が、S e r、P h e、T y r、H i s、もしくはI l eであり；
K a b a t 残基 9 4 が、T h rまたはP r oであり；
K a b a t 残基 9 5 が、P r o、A s n、もしくはG l nであり、
K a b a t 残基 9 6 が、T r pであり、および/または
K a b a t 残基 9 7 が、T h rもしくはA s pである
L C D R 3 を含み得る。

【 0 0 6 2 】

一部の好ましい実施形態において、L C D R 3 の K a b a t 残基 9 2 が H i s であり得
； K a b a t 残基 9 3 は H i s であり得； および/または K a b a t 残基 9 4 は P r o で
あり得る。

10

【 0 0 6 3 】

結合メンバーの一部の例において、H C D R 1 は、配列番号 3、1 0 3、1 1 3 または
1 5 3 の 1 つであり得； H C D R 2 は、配列番号 4、1 0 4、1 2 4、または 1 3 4 の 1
つであり得る。例えば、H C D R 1 は、配列番号 1 5 3 であり得； H C D R 2 は、配列番
号 1 5 4 であり得る。

【 0 0 6 4 】

H C D R 3 は、配列番号 5、1 5、2 5、3 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、9 5
、1 0 5、1 1 5、1 2 5、1 3 5、1 4 5、または 1 5 5 の 1 つであり得る。例えば、
H C D R 3 は、配列番号 1 5 5 であり得る。

【 0 0 6 5 】

L C D R 1 は、配列番号 1 5 8 であり得； L C D R 2 は、アミノ酸配列は、アミノ酸配
列の配列番号 1 5 9 であり得る。

20

【 0 0 6 6 】

L C D R 3 は、配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1
0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、または 1 6 0 の 1 つであり得る。例え
ば、L C D R 3 は、配列番号 1 6 0 であり得る。

【 0 0 6 7 】

上記のとおり、結合メンバーは、1 つ以上の C D R、例えば C D R のセットを抗体フレ
ームワーク内に有する抗体分子を含み得る。例えば、抗体の 1 つ以上の C D R または C D
R のセットは、フレームワーク（例えば、ヒトフレームワーク）中にグラフトして抗体分
子を提供することができる。フレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系列遺伝子セグメント
配列のものであり得る。したがって、フレームワークは、生殖細胞系列化されていてよく
、それによりフレームワーク内の 1 つ以上の残基が、最も類似するヒト生殖細胞系列フレ
ームワーク中の等価位置における残基に適合するように変更されている。当業者は、生殖
細胞系列化前に抗体のフレームワーク配列に配列が最も近縁の生殖細胞系列セグメントを
選択し、抗体の親和性または活性を試験して生殖細胞系列化が本明細書に記載のアッセイ
において抗原結合または効力を顕著に低減させないことを確認することができる。ヒト生
殖細胞系列遺伝子セグメント配列は当業者に公知であり、例えば、V B A S E コンピレー
ション（V B A S E , M R C C e n t r e o f P r o t e i n E n g i n e e r
i n g , U K , 1 9 9 7 , [http // m r c - c p e . c a m . a c . u k](http://mrc-cpe.cam.ac.uk)）から評価
することができる。

30

40

【 0 0 6 8 】

本明細書に記載の結合メンバーは、ヒト生殖細胞系列フレームワーク中の H C D R のセ
ットを含む V H ドメイン、例えば V h 4 D P 6 6（4 ~ 6 1）を有する単離されたヒト抗
体分子であり得る。したがって、V H ドメインフレームワーク領域 F W 1、F W 2 および
/ または F W 3 は、ヒト生殖細胞系列遺伝子セグメントのフレームワーク領域 V h 4 D P
6 6（4 ~ 6 1）を含み得、および/またはフレームワーク残基を、このヒト生殖細胞系
列遺伝子セグメントのフレームワーク残基に適合するように突然変異させることにより生
殖細胞系列化することができる。F W 4 は、ヒト生殖細胞系列 j セグメント J H 2 のフレ
ームワーク領域を含み得る。V H F W 1 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 1 であり得る。

50

V H F W 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 2 であり得る。V H F W 3 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 3 であり得る。V H F W 4 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 4 であり得る。通常、結合メンバーは、例えば、ヒト生殖細胞系列フレームワーク、例えば V カッパ 1 L 1 2 中の L C D R のセットを含む V L ドメインも有する。したがって、V L ドメインフレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系列遺伝子セグメント V カッパ 1 L 1 2 のフレームワーク領域 F W 1、F W 2 および / または F W 3 を含み得、および / またはフレームワーク残基を、このヒト生殖細胞系列遺伝子セグメントのフレームワーク残基に適合するように突然変異させることにより生殖細胞系列化することができる。F W 4 は、ヒト生殖細胞系列 j セグメント J K 2 のフレームワーク領域を含み得る。V L F W 1 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 5 であり得る。V L F W 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 6 であり得る。V L F W 3 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 7 であり得る。V L F W 4 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 8 であり得る。生殖細胞系列化 V H または V L ドメインは、1 つ以上のパーニア残基において生殖細胞系列化していてもいなくてもよいが、通常されていない。

10

【 0 0 6 9 】

本発明の抗体分子は、
K a b a t 残基 6 が、G l n もしくは G l u であり得 ;
K a b a t 残基 1 0 が、A r g もしくは G l y であり得 ;
K a b a t 残基 1 3 が、L y s もしくは G l u であり得 ; および / または
K a b a t 残基 1 6 が、G l n もしくは G l u であり得る、
重鎖 F W 1 を含み得る。

20

【 0 0 7 0 】

本発明の抗体分子は、K a b a t 残基 4 1 が A l a もしくは P r o である重鎖 F W 2 および / または K a b a t 残基 7 4 が P r o もしくは S e r である重鎖 F W 3 を含み得る。

【 0 0 7 1 】

本発明の抗体分子は、K a b a t 残基 3 が V a l もしくは G l n である軽鎖 F W 1 ; K a b a t 残基 4 2 が A r g、L y s もしくは G l y である軽鎖 F W 2 ; K a b a t 残基 7 0 が A s p もしくは G l u であり、および / または K a b a t 残基 8 1 が G l u もしくは A s p である軽鎖 F W 3 ; ならびに / または K a b a t 残基 9 9 が G l y もしくは S e r である軽鎖 F W 4 を含み得る。

30

【 0 0 7 2 】

例えば、本明細書に記載の抗体分子または V H ドメインは、重鎖フレームワーク領域の以下のセット :

F W 1 配列番号 1 6 1 ;
F W 2 配列番号 1 6 2 ;
F W 3 配列番号 1 6 3 ;
F W 4 配列番号 1 6 4 ;

を含み得、

または 1、2、3、4、5、6 もしくは 7 つのアミノ酸変化、例えば置換を有する重鎖フレームワーク領域の前記セットを含み得る。

【 0 0 7 3 】

本明細書に記載の抗体分子または V L ドメインは、軽鎖フレームワーク領域の以下のセット :

F W 1 配列番号 1 6 5 ;
F W 2 配列番号 1 6 6 ;
F W 3 配列番号 1 6 7 ;
F W 4 配列番号 1 6 8 ;

含み得、

または 1、2、3、4、5、もしくは 6 つのアミノ酸変化、例えば置換を有する軽鎖フレームワーク領域の前記セットを含み得る。

40

【 0 0 7 4 】

50

アミノ酸変化は、置換、挿入または欠失であり得る。

【 0 0 7 5 】

例えば、抗体分子は、

重鎖 F W 1 が、配列番号 1 6 1 であり；
 重鎖 F W 2 が、配列番号 1 6 2 であり；
 重鎖 F W 3 が、配列番号 1 6 3 であり；
 重鎖 F W 4 が、配列番号 1 6 4 であり；
 軽鎖 F W 1 が、配列番号 1 6 5 であり；
 軽鎖 F W 2 が、配列番号 1 6 6 であり；
 軽鎖 F W 3 が、配列番号 1 6 7 であり；
 軽鎖 F W 4 が、配列番号 1 6 8 であり；

一組の重鎖および軽鎖フレームワーク領域のセットを含み得、

または 1 1 個以下、例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 1 0 個のアミノ酸変化、例えば置換を有する重鎖および軽鎖フレームワーク領域の前記セットを含み得る。例えば、重鎖および軽鎖フレームワーク領域の前記セット中に 1 または 2 つのアミノ酸置換が存在し得る。

【 0 0 7 6 】

非生殖細胞系列化抗体分子は、生殖細胞系列化抗体分子と比較して同一の C D R を有するが、異なるフレームワークを有する。付属の配列表中に本明細書に示す抗体配列のうち、抗体 1、抗体 6、抗体 7、抗体 8、抗体 1 1、および抗体 1 2 の配列は、生殖細胞系列化されている。抗体 2、抗体 3、抗体 4、抗体 5、および抗体 9 および抗体 1 0 の生殖細胞系列化抗体は、他の抗体について本明細書に示す V H および V L ドメイン配列のフレームワーク領域を生殖細胞系列化することにより産生することができる。

【 0 0 7 7 】

典型的には、V H ドメインは、V L ドメインと対合して抗体抗原結合部位を提供するが、上記考察のとおり、V H または V L ドメインを単独で使用して抗原に結合させることができる。例えば、抗体 1 2 G L V H ドメイン（配列番号 1 5 2）は、抗体 1 2 G L V H および V L ドメインの両方を含む抗体抗原結合部位が形成されるように、抗体 1 2 G L V L ドメイン（配列番号 1 5 7）と対合してよい。類似の実施形態は、本明細書に開示される他の抗体の V H および V L ドメインについて提供される。他の実施形態において、抗体 1 2 G L V H は、抗体抗体 1 2 G L V L 以外の V L ドメインと対合する。軽鎖の多角性は、当技術分野において十分に確立されている。ここでも、類似の実施形態が、本明細書に開示される他の V H および V L ドメインについて本発明により提供される。したがって、親抗体 1 のまたは最適化クローン抗体 1 G L、抗体 2、抗体 3、抗体 4、抗体 5、抗体 6、抗体 6 G L、抗体 7、抗体 7 G L、抗体 8 G L、抗体 9、抗体 1 0、抗体 1 1、抗体 1 1 G L、および抗体 1 2 G L のいずれかの V H は、異なる抗体からの V L ドメインと対をなしてよく、例えば、V H および V L ドメインは、抗体 1、抗体 1 G L、抗体 2、抗体 3、抗体 4、抗体 5、抗体 6、抗体 6 G L、抗体 7、抗体 7 G L、抗体 8 G L、抗体 9、抗体 1 0、抗体 1 1、抗体 1 1 G L、および抗体 1 2 G L から選択される異なる抗体からのものであり得る。

【 0 0 7 8 】

単離された結合メンバーは、

(i) V H ドメインアミノ酸配列が配列番号 1 4 2 に示され、V L ドメインアミノ酸配列が配列番号 1 4 7 に示され、

(i i) V H ドメインアミノ酸配列が配列番号 1 4 2 と比較して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4 または 1 5 個のアミノ酸置換を有し、V L ドメインアミノ酸配列が配列番号 1 4 7 と比較して 8、9、1 0、1 1、1 2 または 1 3 個のアミノ酸置換を有し；または

(i i i) V H ドメインアミノ酸配列が配列番号 1 4 2 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有し、V L ドメインア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列が配列番号147と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する、
VHドメインおよびVLドメインを含み得る。

【0079】

単離された結合メンバーは、

(i) VHドメインアミノ酸配列が配列番号152に示され、VLドメインアミノ酸配列が配列番号157に示され、

(ii) VHドメインアミノ酸配列が配列番号152と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸置換を有し、VLドメインアミノ酸配列が配列番号157と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個のアミノ酸置換を有し；または

(iii) VHドメインアミノ酸配列が配列番号152と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、VLドメインアミノ酸配列が配列番号157と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する、
VHドメインおよびVLドメインを含み得る。

【0080】

単離された結合メンバーは、

(i) VHドメインアミノ酸配列が配列番号102に示され、VLドメインアミノ酸配列が配列番号107に示され、

(ii) VHドメインアミノ酸配列が配列番号102と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸置換を有し、VLドメインアミノ酸配列が配列番号107と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個のアミノ酸置換を有し；または

(iii) VHドメインアミノ酸配列が配列番号102と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、VLドメインアミノ酸配列が配列番号107と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する、
VHドメインおよびVLドメインを含み得る。

【0081】

一部の実施形態において、抗体分子は、抗体定常領域、例えばscFvを欠損し得る。

【0082】

他の実施形態において、抗体分子は、抗体定常領域を含み得る。抗体分子は、全抗体、例えばIgG、すなわち、IgG1、IgG2、またはIgG4であり得、または下記の抗体断片もしくは誘導體であり得る。抗体分子は、他のフォーマット、例えばYTE (Dall'Acqua他(2002) J. Immunology, 169: 5171-5180; Dall'Acqua他(2006) J. Biol. Chem. 281(33): 23514-24) および/またはTM突然変異 (Oganessian他(2008) Acta Cryst D 64: 700-4) をFc領域中に有するIgG1も有し得る。

【0083】

抗体12__GLのVHおよびVLドメインをコードするベクターを含有する大腸菌(E. coli) TOP10細胞を、ブダペスト条約の下National Collection of Industrial, food and Marine Bacteria (NCIMB) (NCIMB Ltd, Aberdeen UK) に、2010年11月23日にアクセッション番号NCIMB41786で寄託した。寄託されたVHおよびVLドメインのヌクレオチド配列を配列番号152および157に示す。

【0084】

本明細書に記載の結合メンバーは、寄託アクセッション番号NCIMB41786の核酸配列および/またはベクターによりコードされるCDR、VHドメイン、VLドメイン、抗体-抗原結合部位または抗体分子を含み得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載の結合メンバーは、寄託アクセッション番号NCIMB41786の核酸、ベクターまたは細胞系から産生または産生可能であり得る。例えば、結合メンバーは、寄託アクセッション番号NCIMB41786の細胞系の核酸またはベクターの発現により産生することができる。核酸またはベクターは、任意の簡便な発現系により発現させることができる。あるいは、結合メンバーは、寄託アクセッション番号NCIMB41786の細胞系により発現させることができる。

【 0 0 8 6 】

本発明の態様は、アクセッション番号NCIMB41786の細胞系中に含有されるVHおよび/またはVLドメインをコードする核酸；アクセッション番号NCIMB41786の細胞系中に含有される前記核酸を含むベクター；ならびにアクセッション番号NCIMB41786の細胞または細胞系も提供する。

10

【 0 0 8 7 】

本発明の別の態様は、

(i) IL-18に結合し、
 (ii) 抗体分子、VHおよび/またはVLドメイン、CDR、例えばHCDR3、および/または表10および11に列記されるCDRのセットを含む、
 任意の抗体分子と、IL-18への結合について競合する抗体抗原結合部位または本明細書に記載の抗体分子を含む結合メンバーを提供する。

20

【 0 0 8 8 】

例えば、結合メンバー、例えば抗体分子は、

(i) 配列番号152の配列を有するVHドメインおよび配列番号157の配列を有するVLドメイン；
 (ii) 配列番号152と比較して15個以下、例えば、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個のアミノ酸置換を有する配列を有するVHドメイン；および配列番号157と比較して13個以下、例えば12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個のアミノ酸置換を有する配列を有するVLドメイン；または

(iii) 配列番号152および配列番号157とそれぞれ少なくとも90%の配列同一性を有する配列を有するVHドメインおよびVLドメインを含む抗体分子と競合し得る。

30

【 0 0 8 9 】

結合メンバー間の競合は、例えばELISAを使用して、および/または生化学的競合アッセイ、例えばタグ付けされていない1つ以上の他の結合メンバーの存在下で検出することができる指定のレポーター分子を結合メンバーにタグ付けすることにより、インビトロで容易にアッセイすることができ、同一エピトープまたは重複するエピトープに結合する結合メンバーの同定が可能となる。このような方法は当業者に容易に公知であり、本明細書においてより詳細に記載される。

【 0 0 9 0 】

さらなる態様において、本発明は、本発明による結合メンバー、VHドメインおよび/またはVLドメインをコードする配列を含む単離された核酸、ならびに本発明の結合メンバー、VHドメインおよび/またはVLドメインを調製する方法であって、前記核酸を前記結合メンバー、VHドメインおよび/またはVLドメインの産生を生じさせるための条件下で発現させること、およびそれを回収することを含む方法を提供する。

40

【 0 0 9 1 】

例えば、本発明の態様は、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151および170の単離されたVHドメイン核酸配列；配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156および171の単離されたVLドメイン核酸配列；ならびにVHおよびVL核酸配列の対合を含む単離された核酸、

50

構築物およびベクターを提供する。

【0092】

本発明の別の態様は、例えば、表10および11または配列表において本明細書に開示されるVHCDRまたはVLCDR配列をコードする単離された核酸を提供する。

【0093】

本発明の別の態様は、例えば、調節エレメントに機能的に連結している上記の単離された核酸を含むベクター、例えばプラスミドまたはファージベクターを提供する。

【0094】

さらなる態様は、本発明の核酸および/またはベクターを含有する、またはそれらにより形質転換された宿主細胞を提供する。

【0095】

本発明のさらなる態様は、IL-18、好ましくは遊離IL-18（すなわち、IL-18BPに結合していないIL-18）の計測における本発明の結合メンバーの使用、および例えば個体から得られた試料中の遊離IL-18を計測するアッセイ方法を提供する。

【0096】

本発明のさらなる態様は、本発明の結合メンバーを含有する組成物、ならびにIL-18を阻害および/または中和する方法、例としてヒトまたは動物体を治療により治療する方法におけるそれらの使用を提供する。

【0097】

本発明による結合メンバーは、治療または診断する方法、例えばヒトまたは動物体における（例えば、ヒト患者における）疾患または障害を治療（予防的治療を含み得る）する方法であって、前記患者に有効量の本発明の結合メンバーを投与することを含む方法において使用することができる。本発明により治療可能な病態には、本明細書の他箇所に詳細に考察されるIL-18が役割を担う任意のもの、例えばIL-18レベルの上昇に関連する病態が含まれる。

【0098】

本発明のこれらのおよび他の態様を以下により詳細に記載する。

【0099】

結合メンバー

結合メンバーという用語は、互いに結合する分子のペアの一方のメンバーを説明する。結合ペアのメンバーは、天然に由来し得、または全体的もしくは部分的に合成により産生することができる。分子のペアの一方のメンバーは、分子のペアの他のメンバーに結合し、したがってそのメンバーの特定の空間的および極性組織化に相補的であるその表面上の領域、または空洞を有する。結合ペアのタイプの例は、抗原-抗体、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモン受容体、受容体-リガンド、酵素-基質である。本発明は、抗原-抗体タイプの反応に関する。

【0100】

結合メンバーは、通常、抗原結合部位を有する分子を含む。例えば、結合メンバーは、抗体分子または抗原結合部位を含む非抗体タンパク質であり得る。

【0101】

抗原結合部位は、非抗体タンパク質足場、例えばフィブロネクチンまたはシトクロムBなど[Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6; Koide他(1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151; Nygren他(1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469]の上のCDRの配置により、またはタンパク質足場内のループのアミノ酸残基をランダム化もしくは突然変異させて所望の標的についての結合特異性を付与することにより提供することができる。タンパク質中の新規結合部位の遺伝子操作のための足場は、Nygren他[前掲]により詳細に記載されている。抗体模倣体のためのタンパク質足場は、

10

20

30

40

50

参照により全体として本明細書に組み込まれる国際公開第0034784号パンフレットに開示されており、発明者らは、少なくとも1つのランダム化ループを有するフィブロネクチンタイプIIIDメインを含むタンパク質(抗体模倣体)を記載している。1つ以上のCDR、例えば、HC DRのセットまたはHC DR3および/もしくはLC DR3をグラフトする好適な足場は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの任意のドメインメンバーにより提供することができる。足場は、ヒトまたは非ヒトタンパク質であり得る。非抗体タンパク質足場の利点は、それが少なくとも一部の抗体分子よりも小さいおよび/または製造容易な足場分子中の抗原結合部位を提供し得ることである。小サイズの結合メンバーは、有用な生理学的特性、例えば、細胞に流入する能力、組織中に深く浸透もしくは他の構造内の標的に到達する能力、または標的抗原のタンパク質空洞内に結合する能力を付与し得る。非抗体タンパク質足場中の抗原結合部位の使用は、Wess, 2004 [Wess, L.: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004]に記載されている。安定な骨格および1つ以上の可変ループを有するタンパク質が典型的であり、ループのアミノ酸配列は、特異的にまたはランダムに突然変異させて標的抗原に結合する抗原結合部位を作出する。このようなタンパク質には、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)からのプロテインA、トランスフェリン、テトラネクチン、フィブロネクチン(例えば第10フィブロネクチンタイプIIIDメイン)、リポカリンならびにガンマクリスタリンおよび他のAffilin(商標)足場(Scil Proteins)のIgG結合ドメインが含まれる。他のアプローチの例には、シクロチド(分子内ジスルフィド結合を有する小タンパク質)に基づく合成「マイクロボディ」、マイクロタンパク質(Versabodies(商標), Amunix)およびアンキリンリピートタンパク質(DARpins, Molecular Partners)が含まれる。

【0102】

抗体配列および/または抗原結合部位に加えて、結合メンバーは、例えばペプチドまたはポリペプチド、例えば折り畳みドメインを形成する、または分子に抗原結合能に加えた別の機能的特徴を付与するための他のアミノ酸を含み得る。結合メンバーは、検出可能な標識を担持し得、または毒素もしくは標的化部分もしくは酵素(例えば、ペプチジル結合またはリンカーを介して)にコンジュゲートしてよい。例えば、結合メンバーは、触媒部位(例えば、酵素ドメイン中)および抗原結合部位を含み得、抗原結合部位が抗原に結合し、したがって触媒部位を抗原に標的化する。触媒部位は、抗原の生物学的機能を例えば開裂により阻害し得る。

【0103】

留意されるとおり、CDRは非抗体足場により担持され得るが、本発明のCDR、例えばCDR3、またはCDRのセットを担持するための構造は、一般に、CDRまたはCDRのセットが、再編成される免疫グロブリン遺伝子によりコードされる天然に生じるVHおよびVL抗体可変ドメインのCDRまたはCDRのセットに対応する位置において局在化される抗体重鎖または軽鎖配列またはその実質的な部分である。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Kabata他, 1987 [Kabata, E. A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, アメリカ合衆国保健福祉省(US Department of Health and Human Services), 1987]およびその更新情報を参照して決定することができる。多数の学術的および市販のオンライン資源がこのデータベースのクエリーに利用可能である。例えば、Martin, A. C. R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25(1996), 130-133および関連するオンライン資源、現在<http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>のウェブアドレス参照。

【0104】

10

20

30

40

50

CDR領域またはCDRにより、Kabat他1991[Kabat, E. A他(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. アメリカ合衆国保健福祉省, 公共サービス(Public Service), アメリカ国立衛生研究所(NIH), ワシントン]、および後続の版により定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を示すものとする。抗体は、典型的には、3つの重鎖CDRおよび3つの軽鎖CDRを含有する。CDRという用語は、本明細書において、場合に応じて、それが認識する抗原またはエピトープについての抗体の親和性による結合を担う大部分のアミノ酸残基を含有するそれらの領域の1つまたはそれらの領域のいくつか、またはさらに全体を示すために使用される。

10

【0105】

6つの短いCDR配列のうち、重鎖の第3のCDR(HCDR3)は、より大きいサイズ可変性を有する(本質的には、それを生じさせる遺伝子の配置の機構に起因するより大きい多様性)。それは、2アミノ酸ほど短いこともあるが、公知の最長サイズは26である。CDR長はまた、特定の基礎フレームワークにより収容され得る長さにより変動し得る。機能的には、HCDR3は、部分的に、抗体の特異性の決定において役割を担う(Segal他, PNAS, 71:4298-4302, 1974; Amit他, Science, 233:747-753, 1986; Chothia他, J. Mol. Biol., 196:901-917, 1987; Chothia他, Nature, 342:877-883, 1989; Caton他, J. Immunol., 144:1965-1968, 1990; Sharon他, PNAS, 87:4814-4817, 1990; Sharon他, J. Immunol., 144:4863-4869, 1990; およびKabat他, J. Immunol., 147:1709-1719, 1991)。

20

【0106】

抗体分子

抗体は、天然であるかまたは部分的もしくは完全に合成により産生されるかにかかわらず、免疫グロブリンを説明する。この用語はまた、抗体抗原結合部位を含む任意のポリペプチドまたはタンパク質を包含する。ここで、本発明は天然形態の抗体に関するものではなく、すなわちそれらはその天然環境中に存在しないが、それらは天然源から単離することができたか、または精製により得ることができたか、またはそうでなければ遺伝子組換え、もしくは化学合成により得ることができたものであり、その場合、下記のとおりそれらは非天然アミノ酸を含有し得ることが理解されなければならない。抗体抗原結合部位を含む抗体断片には、限定されるものではないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、scFv、Fv、dAbおよびFdなどの分子が含まれる。1つ以上の抗体抗原結合部位を含む種々の他の抗体分子が遺伝子操作されており、それには、例えばFab₂、Fab₃、ダイアボディ(diabodies)、トリアボディ(triabodies)、テトラボディ(tetrabodies)およびミニボディ(minibodies)が含まれる。抗体分子およびそれらの構築および使用のための方法はHolliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 2005に記載されている。

30

40

【0107】

モノクローナルおよび他の抗体を採用し、組換えDNA技術の技術を使用して標的抗原に結合する他の抗体またはキメラ分子を産生することが可能である。そのような技術は、異なる免疫グロブリンの定常領域とフレームワーク領域に対する抗体の免疫グロブリン可変領域、またはCDRをコードするDNAを導入することを必要し得る。例えば欧州特許出願公開第A-184187号明細書、英国特許第2188638A号明細書または欧州特許出願公開第A-239400号明細書、および大多数の後続の文献を参照。ハイブリドーマまたは抗体を産生する他の細胞を遺伝子突然変異または他の変化に供することができ、それらは、産生される抗体の結合特異性を変化させてもさせなくてもよい。

【0108】

50

抗体は多数の手法で改変することができるため、用語「抗体分子」は、要求される特異性を有する抗体抗原結合部位を有し、および/または抗原と結合する、任意の結合メンバーまたは物質を包含すると解釈すべきである。したがって、この用語は抗体の断片および誘導体を包含し、それには、天然であるか完全にまたは部分的に合成されたものであるかにかかわらず、抗体抗原結合部位を含む任意のポリペプチドが含まれる。したがって、別のポリペプチド（例えば別の種由来または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属するポリペプチド）に融合された抗体抗原結合部位または等価物を含むキメラ分子が含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現は欧州特許出願公開第A-0120694号明細書および欧州特許出願公開第A-0125023号明細書、および大多数の後続文献に記載されている。

10

【0109】

抗体工学分野で利用可能なさらなる技術によりヒト抗体およびヒト化抗体を単離することが可能になる。例えば、ヒトハイブリドーマはKontermann & Dubel [Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545]により記載のとおり作製することができる。結合メンバーを生成する別の確立技術であるファージディスプレイは、多数の刊行物、例えばKontermann & Dubel [前掲]および国際公開第92/01047号パンフレット（さらに以下で考察される）、および米国特許5969108号明細書、米国特許第5565332号明細書、米国特許第5733743号明細書、米国特許第5858657号明細書、米国特許第5871907号明細書、米国特許第5872215号明細書、米国特許第5885793号明細書、米国特許第5962255号明細書、米国特許第6140471号明細書、米国特許第6172197号明細書、米国特許第6225447号明細書、米国特許第6291650号明細書、米国特許第6492160号明細書、米国特許第6521404号明細書に詳細に記載されている。

20

【0110】

マウス抗体遺伝子が不活性化され、ヒト抗体遺伝子により機能的に置き換えられている一方、マウス免疫系のインタクトな他の構成要素を残すトランスジェニックマウスを、ヒト抗体の単離に使用することができる [Mendez, M他(1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156]。ヒト化抗体は、当技術分野において公知の技術、例えば、国際公開第91/09967号パンフレット、米国特許第5,585,089号明細書、欧州特許第592106号明細書、米国特許第565,332号明細書および国際公開第93/17105号パンフレットに開示されているものを使用して産生することができる。さらに、国際公開第2004/006955号パンフレットは、非ヒト抗体の可変領域のCDR配列についてのカノニカルCDR構造タイプを、ヒト抗体配列、例えば生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントのライブラリーからの対応するCDRについてのカノニカルCDR構造タイプと比較することによる、ヒト抗体遺伝子からの可変領域フレームワーク配列の選択に基づいて、抗体をヒト化するための方法を記載している。非ヒトCDRと類似のカノニカルCDR構造タイプを有するヒト抗体可変領域は、ヒトフレームワーク配列を選択するメンバーヒト抗体配列のサブセットを形成する。サブセットメンバーをヒトCDR配列と非ヒトCDR配列との間のアミノ酸類似性に基づいてさらにランク付けすることができる。国際公開第2004/006955号パンフレットの方法において、選択したサブセットメンバーヒトフレームワークを使用して、ヒトCDR配列を非ヒトCDR対応物により機能的に置き換えるキメラ抗体を構築するためのフレームワーク配列を提供するために最高位にランキングされたヒト配列を選択し、それにより非ヒト抗体とヒト抗体との間のフレームワーク配列を比較する必要なく、高親和性および低免疫原性のヒト化抗体を提供する。この方法により作製されたキメラ抗体も開示される。

30

40

【0111】

合成抗体分子は、例えばKnappik他 [Knappik他 *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86] またはKrebs他 [Krebs他 *Journal*

50

of Immunological Methods 254 2001 67-84]により記載されるとおり、合成され、好適な発現ベクター内でアSEMBLされたオリゴヌクレオチドにより生成された遺伝子から発現させることにより作出することができる。

【0112】

全抗体の断片は抗原に結合する機能を達成し得ることが示されている。結合断片の例は (i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなるFab断片；(ii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iii) 単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFv断片；(iv) VHまたはVLドメインからなるdAb断片 [Ward, E. S 他, Nature 341, 544-546 (1989)；McCafferty 他 (1990) Nature, 348, 552-554；Holt 他 (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490]；(v) 単離されたCDR領域；(vi) F(ab')₂断片、2つの連結されたFab断片を含む二価断片 (vii) VHドメインおよびVLドメインが、2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することを可能にするペプチドリンカーによって連結されている一本鎖Fv分子 (scFv) [Bird 他, Science, 242, 423-426, 1988；Houston 他, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988]；(viii) 二重特異性一本鎖Fv二量体 (PCT/US92/09965) および (ix) 遺伝子融合により構築された「ダイアボディ」、多価または多重特異性断片 (国際公開第94/13804号パンフレット；[Holliger, P. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993]) である。VHおよびVLドメインを連結するジスルフィド架橋を取り込むことによりFv、scFvまたはダイアボディ分子を安定化することができる [Reiter, Y. et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996]。CH3ドメインに連結されたscFvを含むミニボディを作製することもできる [Hu, S. et al, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996]。結合断片の他の例は、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端に少数の残基、例として抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインの付加によりFab断片と異なるFab'、および定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を担持するFab'断片であるFab'-SHである。

【0113】

Qui 他 [Qui 他, Nat. Biotechnol. 25: 921-929 2007] は、フレームワーク領域によって連結されている2つのCDRしか含有しない抗体分子を記載した。VHまたはVLドメインからのCDR3は、他のドメインのCDR1またはCDR2ループに連結された。選択CDR1またはCDR2のC末端とCDR3のN末端がFR領域を介して連結された。Qui 他は最少の疎水性パッチを有するFR領域を選択した。試験抗体についての最良の組合せは、VHFR2によりVHCDR3に連結されたVLCDR1であることが見出された (VHCDR1-VHFR2-VLCDR3)。約3kDaの分子量においてこれらの抗体分子は、完全免疫グロブリン (約150kDa) またはscFv (約28kDa) と比較して改善された組織浸透性の点で利点を提供する。

【0114】

本発明の抗体断片は、酵素、例えばペプシンもしくはパインによる消化などの方法および/または化学的還元によるジスルフィド架橋の開裂により、本明細書に列記される抗体のいずれかから出発して得ることができる。別の様式において、本発明に含まれる抗体断片は、同様に当業者に周知の遺伝子組換え技術またはそうでなければ自動ペプチドシンセサイザー、例えばApplied Biosystems社などにより供給されるものを用いるペプチド合成、または核酸合成および発現により得ることができる。

【0115】

本発明の機能的抗体断片には、化学修飾、特にPEG化、またはリポソームへの取り込みにより半減期が増加した任意の機能的断片が含まれる。

【0116】

10

20

30

40

50

d A b (ドメイン抗体) は抗体の単量体の抗原結合性小断片であり、すなわち抗体重鎖または軽鎖の可変領域である。V H d A b はラクダ科動物 (例えばラクダ、ラマ) に天然に生じ、ラクダ科動物を標的抗原により免疫化し、抗原特異的 B 細胞を単離し、個々の B 細胞から d A b 遺伝子を直接クローニングすることにより産生することができる。d A b は細胞培養物中で産生可能でもある。それらの小さいサイズ、良好な溶解度および温度安定性により、それらは特に生理学的に有用であり、選択および親和性成熟に好適である。ラクダ科動物の V H d A b は「nanobodies (商標)」の名称で治療用途に開発中である。本発明の結合メンバーは、実質的に本明細書に記載される V H もしくは V L ドメイン、または実質的に本明細書に記載される C D R セットを含む V H もしくは V L ドメインを含む d A b であり得る。

10

【0117】

二重特異性または二機能性抗体は、2つの異なる可変領域が同一分子中で組み合わされている第二世代のモノクローナル抗体を形成する [Holliger and Bohlen 1999 Cancer and metastasis rev. 18: 411 - 419]。それらの使用は、新規エフェクター機能をリクリートするかまたは腫瘍細胞表面上のいくつかの分子を標的化するそれらの能力から、診断分野および治療分野の両方で実証されている。二重特異性抗体を使用すべき場合、これらは二重特異性抗体は種々の手法で製造することができる慣用の二重特異性抗体であり得 [Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol 4, 446 - 449 1993]、例えば化学的にまたはハイブリッドハイブリドーマから調製し、または上記の二重特異性抗体断片のいずれかであり得る。これらの抗体は、化学的方法 [Glennie M J 他, 1987 J. Immunol. 139, 2367 - 2375; Repp R 他, 1995 J. Hemat. 377 - 382] または体細胞法 [Staerz U. D. and Bevan M. J. 1986 PNAS 83; Suresh M. R 他, 1986 Method Enzymol. 121: 210 - 228] によって得ることができるが、同様に優先的に、ヘテロ二量体化を強制することが可能で、したがって目的の抗体の精製プロセスを促進する遺伝子工学技術により得ることができる [Merchand 他, 1998 Nature Biotech. 16: 677 - 681]。二重特異性抗体の例には、異なる特異性を有する2つの抗体の結合ドメインを使用し、短いフレキシブルペプチドを介して直接連結することができる BiTE (商標) 技術の二重特異性抗体が含まれる。これは短い単一ポリペプチド鎖上で2つの抗体を組み合わせる。ダイアボディおよび s c F v は、可変ドメインのみを使用して、F c 領域を用いずに構築することができ、潜在的に抗イディオタイプ反応の効果を低減する。

20

30

【0118】

二重特異性抗体は、完全 I g G として、二重特異性 F a b ' 2 として、F a b ' P E G として、ダイアボディとして、またはそうでなければ二重特異性 s c F v として構築することができる。さらに、当技術分野において公知の定型的方法を使用して2つの二重特異性抗体を連結し、四価抗体を形成することができる。

【0119】

二重特異性完全抗体とは対照的に二重特異性ダイアボディが特に有用であることがある。それというのも、それらは容易に構築することができ、大腸菌 (E. coli) 中で発現させることができるためである。適切な結合特異性のダイアボディ (および多数の他のポリペプチド、例えば抗体断片) は、ファージディスプレイ (国際公開第 94 / 13804 号パンフレット) を使用してライブラリーから容易に選択することができる。ダイアボディの一方のアームが一定に保持され、例えば I L - 18 に対して指向される特異性を有する場合、他方のアームが変動するライブラリーを作製することができ、適切な特異性の抗体を選択することができる。Ridgeway 他, 1996 [Ridgeway, J. B. B. et al, Protein Eng., 9, 616 - 621, 1996] に記載の代替の遺伝子操作方法により二重特異性完全抗体を作製することができる。

40

【0120】

50

当技術分野においてIL-18に対する抗体を得るための種々の方法が利用可能である。抗体は、当業者に周知の標準的方法にしたがって得ることができる、特にヒト、マウス、キメラまたはヒト化起源のモノクローナル抗体であり得る。

【0121】

一般に、特にマウス起源のモノクローナル抗体またはそれらの機能的断片の調製について、特に手引き「Antibodies」[Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988]に記載の技術またはKoehlerおよびMilstein [Koehler and Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975]により記載されたハイブリドーマからの調製の技術を参照することが可能である。

10

【0122】

モノクローナル抗体は、例えば、IL-18、または前記モノクローナル抗体により認識されるエピトープを含有するその断片の1つにより免疫化された動物細胞から得ることができる。それらを含む好適な断片およびペプチドまたはポリペプチドは本明細書に記載されており、それらを使用して動物を免疫化してIL-18に対する抗体を生成することができる。前記IL-18、またはその断片の1つは、特に、IL-18またはその断片をコードするcDNA配列に含有される核酸配列から出発する遺伝子組換えにより、IL-18および/またはその断片のペプチド配列に含まれるアミノ酸の配列から出発するペ

20

【0123】

モノクローナル抗体は、例えば、IL-18、または前記モノクローナル抗体により認識されるエピトープを含有するその断片の1つが事前に固定化された親和性カラム上で精製することができる。より具体的には、モノクローナル抗体は、プロテインAおよび/またはG上でのクロマトグラフィーにより精製し、次いで残留するタンパク質汚染物質ならびにDNAおよびLPS自体を排除する目的のイオン交換クロマトグラフィーを行うかまたは行わずに、次いで二量体または他の多量体の存在に起因する潜在的凝集物を排除するためのセファロースゲル上での排除クロマトグラフィーを行うかまたは行わずに達成することができる。一実施形態において、これらの技術の全部を同時にまたは連続的に使用

30

【0124】

抗原結合部位

抗原結合部位は、標的抗原の全体または部分と結合し、それと相補的な分子の部分の説明する。抗体分子において、それは抗体抗原結合部位と称され、標的抗原の全体または部分と結合し、それと相補的な抗体の部分を含む。抗原が大きい場合、抗体は抗原の特定部分にのみ結合し得、その部分はエピトープと称される。抗体抗原結合部位は1つ以上の抗体可変ドメインにより提供することができる。抗体抗原結合部位は、抗体軽鎖可変領域(VL)および抗体重鎖可変領域(VH)を含み得る。

【0125】

国際公開第2006/072620号パンフレットは、免疫グロブリンドメインのベータストランド間で拡張する構造(非CDR)ループ中の抗原結合部位の遺伝子操作を記載している。抗原結合部位は、CDRの天然位置と離隔した抗体分子の領域中で、例えばVHまたはVLドメインのフレームワーク領域中で、または抗体定常ドメイン、例えばCH1および/またはCH3中で、遺伝子操作することができる。構造領域中で遺伝子操作された抗原結合部位は、VHおよびVLドメインのCDRのセットにより形成された抗原結合部位に追加的な、またはそれに代わるものであり得る。複数の抗原結合部位が抗体分子中に存在する場合、それらは同一抗原(標的抗原)に結合し得、それにより結合メンバーの価数を増加させる。あるいは、複数の抗原結合部位は、異なる抗原(標的抗原および1つ以上の別の抗原)に結合し得、これを使用してエフェクター機能を追加することができ

40

50

、抗体分子の半減期を延長させるかまたはそのインビボ送達を改善させる。

【0126】

単離された

「単離された」は、本発明の結合メンバー、またはそのような結合メンバーをコードする核酸が、一般に本発明による状態を指す。したがって、本発明による結合メンバー、VHおよび/またはVDドメイン、ならびにコード核酸分子およびベクターは、実質的に純粋または均質な形態で、例えばそれらの天然環境から単離および/または精製されている状態、または核酸の場合、要求される機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の起源の核酸または遺伝子を含まないかまたは実質的に含まない状態で提供することができる。単離されたメンバーおよび単離された核酸は、それらが天然に付随する材料、例えばその天然環境、またはそれらが調製される環境（例えば細胞培養物）中で（そのような調製がインビトロもしくはインビボで実施される組換えDNA技術によるものである場合）、それらが見出される他のポリペプチドまたは核酸を含まないかまたは実質的に含まない。メンバーおよび核酸は希釈剤またはアジュバントとともに製剤化することができ、実際的な目的のために依然として単離されており、例えば、メンバーは、イムノアッセイで使用するためのマイクロタイタープレートにコーティングするために使用する場合、通常ゼラチンまたは他の担体と混合し、または診断もしくは治療において使用する場合、薬学的に許容可能な担体または希釈剤と混合する。結合メンバーは、天然にまたは異種真核細胞（例えばCHOまたはNS0（ECACC 85110503）細胞）の系によってグリコシル化されているか、または（例えば原核細胞中の発現により産生される場合）非グリコシル化状態であり得る。

10

20

【0127】

抗IL-18抗体分子を含む不均一調製物もまた、本発明の部分を構成する。例えば、そのような調製物は、完全長重鎖およびC末端リジンを欠く重鎖を有し、種々の程度のグリコシル化を有し、ならびに/または誘導体化アミノ酸、例えばピログルタミン酸残基を形成するN末端グルタミン酸の環化物を有する抗体の混合物であり得る。

【0128】

本明細書において使用される語句「実質的に記載される」とは、本明細書に記載の結合メンバーのVHまたはVDドメインの関連CDRの特徴が、本明細書に配列が記載される指定領域と同一であるかまたは高度に類似することを指す。本明細書に記載のとおり1つ以上の可変ドメインの指定領域に関する語句「高度に類似する」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸置換をCDRおよび/またはVHもしくはVDドメイン中で作製することができることが企図される。

30

【0129】

上記のとおり、本発明による結合メンバーは、IL-18の生物学的活性をモジュレートし、中和し得る。本明細書に記載のとおり、本発明のIL-18結合メンバーは、その中和効力について最適化することができる。一般に、効力の最適化は、選択された結合メンバーの配列（通常は抗体の可変ドメイン配列）を突然変異させて結合メンバーのライブラリーを生成することを含み、次いでそのライブラリーを効力に関してアッセイし、より強力な結合メンバーを選択する。こうして選択された「効力最適化」結合メンバーは、ライブラリーを生成した結合メンバーよりも高い効力を有する傾向がある。これにもかかわらず、最適化を行わずに高い効力の結合メンバーを得ることもでき、例えば、初期スクリーニング、例えば生化学的中和アッセイから高い効力の結合メンバーを直接得ることができる。「効力最適化」結合メンバーは、IL-18の特定の活性または下流機能の中和の効力が最適化されている結合メンバーを指す。アッセイおよび効力は本明細書の他の箇所により詳細に記載される。本発明は、効力最適化および/または非最適化結合メンバーの両方、ならびに選択された結合メンバーから効力を最適化する方法を提供する。したがって、本発明は、当業者が、高い効力を有する結合メンバーを生成することを可能にする。

40

【0130】

さらなる態様において、本発明は、抗原に結合し得る1つ以上の結合メンバーを得る方

50

法であって、本発明による結合メンバーのライブラリーおよび前記抗原を接触させること、ならびに前記抗原に結合し得るライブラリーの1つ以上の結合メンバーを選択することを含む方法を提供する。

【0131】

ライブラリーは、粒子または分子複合体、例えば複製可能な遺伝子パッケージ、例えば酵母粒子、細菌粒子またはバクテリオファージ（例えばT7）粒子、ウイルス、細胞または共有結合性、リボソーム性または他のインビトロディスプレイ系上でディスプレイすることができ、それぞれの粒子または分子複合体は、その上にディスプレイされる抗体VH可変ドメイン、および場合によりディスプレイされるVLドメイン（存在する場合）もコードする核酸を含有する。ファージディスプレイは、国際公開第92/01047号パンフレットおよび例えば米国特許第5969108号明細書、米国特許第5565332号明細書、米国特許第5733743号明細書、米国特許第5858657号明細書、米国特許第5871907号明細書、米国特許第5872215号明細書、米国特許第5885793号明細書、米国特許第5962255号明細書、米国特許第6140471号明細書、米国特許第6172197号明細書、米国特許第6225447号明細書、米国特許第6291650号明細書、米国特許第6492160号明細書および米国特許第6521404号明細書に記載されており、それらのそれぞれは参照により全体として本明細書に組み込まれる。リボソームディスプレイは、Hanes J and Plueckthun A. (1997) Proc Natl Acad Sci USA. 1997年5月 13; 94(10): 4937-42; 国際公開第01/75097号パンフレットおよび国際公開第2006/072773号パンフレットに記載されており、それらのそれぞれは参照により全体として本明細書に組み込まれる。

10

20

【0132】

抗原に結合し得、バクテリオファージまたは他のライブラリー粒子もしくは分子複合体上にディスプレイされる結合メンバーの選択後、前記選択された結合メンバーをディスプレイするバクテリオファージまたは他の粒子もしくは分子複合体から核酸を採取することができる。前記選択された結合メンバーをディスプレイするバクテリオファージまたは他の粒子もしくは分子複合体から採取された核酸の配列を有する核酸からの発現による結合メンバーまたは抗体VHもしくはVL可変ドメインの後続の産生にそのような核酸を使用することができる。

30

【0133】

前記選択された結合メンバーの抗体VH可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体VH可変ドメインは、そのようなVHドメインを含む結合メンバーと同様に、単離された形態で提供することができる。

【0134】

IL-18に結合する能力をさらに試験することができ、さらに、IL-18との結合について、例えば本明細書に列記される抗体のいずれか（例えばscFvフォーマットおよび/またはIgGフォーマット、例えばIgG2またはIgG1）と競合する能力も試験することができる。本明細書の他箇所さらに考察されるとおり、IL-18を中和する能力を試験することができる。

40

【0135】

結合メンバーは、表10および11に列記される抗体のいずれか、例えばscFv、IgG2、IgG1TMもしくはIgG1の親和性で、またはより良好な親和性で、IL-18に結合し得る。抗体結合親和性を表5に示す。

【0136】

結合メンバーは、本明細書に列記される抗体のいずれか、例えばscFv、IgG2、IgG1の効力で、または増加した効力で、IL-18の生物学的活性を中和し得る。

【0137】

異なる結合メンバーの結合親和性および中和効力を適切な条件下で比較することができる。

50

【0138】

本明細書に記載のVHおよびVLドメインならびにCDRの変異体、例としてアミノ酸配列が本明細書に記載されているもの、およびIL-18についての結合メンバー中であることができるものは、配列を変化または突然変異させ、所望の特性を有する抗原結合メンバーをスクリーニングする方法を用いて得ることができる。所望の特性の例には、限定されるものではないが、以下の特性が含まれる：

- ・抗原に特異的な既知の抗体に対して増加した、抗原についての結合親和性
- ・抗原活性が既知である場合、抗原に特異的な既知の抗体に対して増加した、抗原活性の中和性
- ・指定モル比における、抗原に対する既知の抗体またはリガンドとの、指定の競合能力
- ・複合体を免疫沈降させる能力
- ・指定エピトープに結合する能力
 - ・線形エピトープ、例えば、本明細書に記載のペプチド結合スキャン（例えば線形および/または拘束コンフォメーションでスクリーニングされたペプチドを使用する）を使用して同定されたペプチド配列
 - ・不連続残基により形成されたコンフォメーションルエピトープ
- ・IL-18、または下流の分子の新規生物学的活性をモジュレートする能力。

10

【0139】

そのような方法も本明細書に提供される。

【0140】

本明細書に開示される抗体分子の変異体を産生し、本発明において使用することができる。多変量データ分析技術を構造/特性-活性関係に対して適用する場合の計算化学の手引き[例えば、Wold他, Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski); D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6 参照]に従って、周知の数学的技術、例えば統計回帰、パターン認識および分類[例えば、Norman他, Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (1998年4月) ISBN: 0471170828; Kandel, Abraham他, Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (1995年5月11日), ISBN: 0133418847; Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (2000年12月), ISBN: 0198507089; Witten, Ian H. 他, Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (1999年10月11日), ISBN: 1558605525; Denison David G. T. (Editor) et al Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (2002年7月), ISBN: 0471490369; Ghose, Arup K 他, Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8 参照]を使用して抗体の定量的活性-特性関係を導き出すことができる。抗体の特性は、抗体配列、機能

20

30

40

50

的および3次元構造の経験的および理論的モデル（例えば、接触候補残基の分析または算出上の物理化学的特性）から導き出すことができ、これらの特性は個々におよび組み合わせて考慮することができる。

【0141】

VHドメインおよびVLドメインから構成される抗体抗原結合部位は、典型的には、ポリペプチドの6つのループにより形成され：3つは軽鎖可変ドメイン（VL）からのものであり、3つは重鎖可変ドメイン（VH）からのものである。既知の原子構造の抗体の分析により、抗体結合部位の配列と3次元構造との間の関係が解明されている [Chothia 他, Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817; Al-Lazikani, 他 Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948]。これらの関係は、VHドメイン中の第3領域（ループ）を除いて、結合部位ループが少数の主鎖コンフォメーション：カノニカル構造の1つを有することを意味する。特定ループ中で形成されるカノニカル構造は、そのサイズならびにループおよびフレームワーク領域の両方の重要部位におけるある残基の存在により決定されることが示されている。

10

【0142】

配列-構造関係のこの研究は、抗体のCDRループの3次元構造の維持に重要な、したがって結合特異性を維持する、配列が既知であるが3次元構造が未知の抗体中の残基を予測するために使用することができる。これらの予測は、予測を先の最適化実験からの出力と比較することにより確認することができる。構造的アプローチにおいて、任意の無料で利用可能なまたは市販のパッケージ、例えばWAM [Whitelegg, N. R. u. and Rees, A. R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824] を使用して抗体分子のモデルを作出することができる [Chothia 他, Science, 223, 755-758 (1986)]。次いで、タンパク質視覚化および分析ソフトウェアパッケージ、例えばInsight II (Accelrys, Inc.) またはDeep View [Guex, N. and Peitsch, M. C. Electrophoresis (1997) 18, 2714-2723] を使用してCDR中のそれぞれの位置における置換候補を評価することができる。次いで、この情報を使用して活性に対して最小または有益な効果を有する可能性が高い置換を作製することができる。

20

【0143】

CDR、抗体VHまたはVLドメインおよび結合メンバーのアミノ酸配列内で置換を作製するために必要とされる技術は、一般に当該技術分野において利用可能である。活性に対して最小または有益な影響を有すると予測されてもされなくてもよい置換を有する変異体配列を作製し、IL-18に結合し、および/またはそれらを中和する能力および/または任意の他の所望の特性について試験することができる。

30

【0144】

本明細書に配列が具体的に開示されている任意のVHおよびVLドメインのいずれかの可変ドメインアミノ酸配列変異体を、考察されるとおり本発明により用いることができる。

【0145】

上記のとおり、本発明の態様は、VHドメイン配列が以下の付属の配列表に示される本明細書に列記される抗体のいずれかのVHドメインと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するVHドメインを含み；および/またはVLドメイン配列が付属の配列表に示される表11に列記される抗体のいずれかのVLドメインと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するVLドメインを含む結合メンバー、例えば抗体分子を提供する。

40

50

【0146】

本発明の態様は、VHC DR配列が本明細書に示される本明細書に列記される抗体のいずれかのVHC DRのセットと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するVHC DRのセットを有するVHドメインを含み；および/またはVLC DR配列が本明細書に示される本明細書に列記される抗体のいずれかのVLC DRのセットと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するVLC DRのセットを有するVLドメインを含む結合メンバー、例えば抗体分子を提供する。

10

【0147】

2つのアミノ酸配列の同一性%を算出するために使用できるアルゴリズムには、例えばBLAST [Altschul他(1990) J. Mol. Biol. 215:405-410]、FASTA [Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85:2444-2448]、またはSmith-Watermanアルゴリズム [Smith and Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197] (例えばデフォルトパラメータを用いる)が含まれる。

【0148】

特定の可変ドメインは、1つ以上のアミノ酸配列変化(アミノ酸残基の置換、欠失および/または挿入)を含み得、約15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2個未満である。

20

【0149】

変更形態は、1つ以上のフレームワーク領域および/または1つ以上のCDR中で作製することができる。変更形態は、通常、機能の損失をもたらさず、したがって、こうして変更したアミノ酸配列を含む結合メンバーはIL-18に結合し、および/またはそれを中和する能力を保持し得る。それは、例えば本明細書に記載のアッセイにおいて計測された場合、変更形態が作製されていない結合メンバーと同一の定量的結合および/または中和能力を保持し得る。こうして変更したアミノ酸配列を含む結合メンバーは、IL-18に結合し、および/またはそれを中和する能力の改善を示し得る。

30

【0150】

変更形態は、1つ以上のアミノ酸残基を、天然に存在しないかもしくは非標準アミノ酸により置き換えること、1つ以上のアミノ酸残基を、天然に存在しないかもしくは非標準形態に改変すること、または1つ以上の天然に存在しないかもしくは非標準アミノ酸を配列内に挿入することを含み得る。本発明の配列中の変更の数および位置の例は、本明細書の他箇所に記載されている。天然に存在するアミノ酸には、20種の「標準」L-アミノ酸が含まれ、それらの標準一文字コードによりG、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、Eとして同定される。非標準アミノ酸には、ポリペプチド骨格中に取り込むことができるかまたは既存のアミノ酸残基の改変から生じ得る任意の他の残基が含まれる。非標準アミノ酸は天然に存在しても天然に存在しなくてもよい。いくつかの天然に存在する非標準アミノ酸が当技術分野において公知であり、例えば4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリジン、3-メチルヒスチジン、N-アセチルセリンなどである [Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995]。N-アルファ位置において誘導体化されているアミノ酸残基はアミノ酸配列のN末端に局在するにすぎない。本発明においては通常、アミノ酸はL-アミノ酸であるが、D-アミノ酸であってもよい。したがって、変更形態は、L-アミノ酸をD-アミノ酸に改変するかまたはL-アミノ酸をD-アミノ酸により置き換えることを含む。アミノ酸のメチル化、アセチル化および/またはリン酸化形態も既知であり、本発明におけるアミノ酸をそのような改変に供することができる。

40

【0151】

50

本発明の抗体ドメインおよび結合メンバー中のアミノ酸配列は上記の非天然または非標準アミノ酸を含み得る。非標準アミノ酸（例えばD-アミノ酸）は、合成中に、またはアミノ酸配列の合成後に「元の」標準アミノ酸の改変または置き換えによりアミノ酸配列中に取り込むことができる。

【0152】

非標準および/または天然に存在しないアミノ酸の使用により、構造的および機能的多様性を増加させ、したがって本発明の結合メンバーにおける所望のIL-18結合および中和特性を達成するための潜在性を増加させることができる。さらに、D-アミノ酸および類似体は、動物、例えばヒトへの投与後のL-アミノ酸を有するポリペプチドのインビボ分解により標準L-アミノ酸と比較して異なる薬物動態学的プロファイルを有することが示されている。このことは、一部のインビボ適用についてはD-アミノ酸が有利であることを意味する。

10

【0153】

本発明のCDR由来配列を担持する新規VHまたはVL領域は、全可変ドメイン内の突然変異を生成する1つ以上の選択VHおよび/またはVL遺伝子のランダム突然変異導入を使用して生成することができる。そのような技術はエラープロードPCRを使用したGram他[Gram他, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580]により記載されている。一部の実施形態において、全可変ドメインまたはCDRのセット内で1または2つのアミノ酸置換を作製する。

【0154】

使用することができる別の方法はVHまたはVL遺伝子のCDR領域に対する直接突然変異導入である。そのような技術は、Barbas他[Barbas他, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813]およびSchier他[Schier他, 1996, J. Mol. Biol. 263:551-567]により開示されている。

20

【0155】

全ての上記技術は、当技術分野においてそれ自体公知であり、当業者は、そのような技術を使用して当技術分野における定型的な方法論を使用して本発明の結合メンバーを提供することができる。

【0156】

本発明のさらなる態様は、IL-18についての抗体抗原結合部位を得る方法であって、本明細書に記載のVHドメインのアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、または挿入を用いて、VHドメインのアミノ酸配列変異体であるVHドメインを提供し、場合により、こうして提供されたVHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせること、およびVHドメインまたはVH/VL組合せを試験して、IL-18についての結合メンバーまたは抗体抗原結合部位（場合により1つ以上の所望の特性、例えばIL-18活性を中和する能力を有する）を同定することを含む方法を提供する。前記VLドメインは本明細書に実質的に記載されるアミノ酸配列を有し得る。本明細書に開示されるVLドメインの1つ以上の配列変異体を1つ以上のVHドメインと組み合わせる類似の方法を用いることができる。

30

40

【0157】

上記のとおり、本明細書に実質的に記載されるCDRアミノ酸配列は、ヒト抗体可変ドメインまたはその実質的部分中のCDRとして取り込むことができる。本明細書中に実質的に記載されるHCDR3配列は本発明の実施形態を表し、これらのそれぞれはヒト重鎖可変ドメインまたはその実質的部分中のHCDR3として取り込むことができる。

【0158】

本発明において用いられる可変ドメインは、任意の生殖細胞系列もしくは再編成ヒト可変ドメインから得ることができ、もしくはそれに由来し得、または既知のヒト可変ドメインのコンセンサスまたは実際の配列に基づく合成可変ドメインであり得る。可変ドメインは非ヒト抗体に由来するものであり得る。組換えDNA技術を使用してCDR（例えばC

50

DR3)を欠く可変ドメインのレパートリー中に本発明のCDR配列(例えばCDR3)を導入することができる。例えば、Marks他[Marks他 Bio/Technology, 1992, 10:779-783]は、抗体可変ドメインのレパートリーを産生する方法であって、可変ドメイン領域の5'末端に指向されるかまたはそれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒトVH遺伝子の第3フレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーとともに使用してCDR3を欠くVH可変ドメインのレパートリーを提供する方法を記載している。Marks他は、このレパートリーを特定の抗体のCDR3とどのように組み合わせることができるかをさらに記載している。類似の技術を使用して、本発明のCDR3由来配列を、CDR3を欠くVHまたはVLドメインのレパートリーとシャッフリングし、シャッフリングされた完全VHまたはVLドメインをコグネイトVLまたはVHドメインと組み合わせる本発明の結合メンバーを提供することができる。次いで、好適な結合メンバーを選択することができるように、レパートリーを好適な宿主系、例えば国際公開第92/01047号パンフレット(参照により全体として本明細書に組み込まれる)、または後続の多数の文献のいずれか、例としてKay, Winter & McCafferty [Kay, B. K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press]のファージディスプレイ系中でディスプレイすることができる。レパートリーは、 10^4 個の個々のメンバー以上、例えば少なくとも 10^5 個、少なくとも 10^6 個、少なくとも 10^7 個、少なくとも 10^8 個、少なくとも 10^9 個または少なくとも 10^{10} 個のメンバー以上のいずれかから構成され得る。他の好適な宿主系には、限定されるものではないが、酵母ディスプレイ、細菌ディスプレイ、T7ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、細胞ディスプレイ、リボソームディスプレイおよび共有結合ディスプレイが含まれる。

【0159】

IL-18についての結合メンバーを調製する方法であって：

- (a) 置き換えるべきCDR3を含むかまたはCDR3コード領域を欠くVHドメインをコードする核酸の出発レパートリーを提供すること；
- (b) 前記レパートリーを、VHCDR3、例えば表11に示されるVHCDR3について本明細書に実質的に記載されるアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせる前記ドナー核酸がレパートリー中のCDR3領域中に挿入されるようにしてVHドメインをコードする核酸の産物レパートリーを提供すること；
- (c) 前記産物レパートリーの核酸を発現させること；
- (d) IL-18についての結合メンバーを選択すること；および
- (e) 前記結合メンバーまたはそれをコードする核酸を回収することを含む方法を提供する。

【0160】

ここでも、置き換えるべきCDR3を含むかまたはCDR3コード領域を欠くVLドメインをコードする核酸のレパートリーと本発明のVLCDR3を組み合わせる類似の方法を用いることができる。

【0161】

同様に、1つ以上の、または全ての3つのCDRを、VHまたはVLドメインのレパートリー中にグラフトし、次いでIL-18についての結合メンバーについてスクリーニングすることができる。

【0162】

例えば、表11に列記される抗体の1つ以上からのHCDR1、HCDR2および/もしくはHCDR3、例えば、HCDRのセットを用いることができ、ならびに/または本明細書に列記される抗体の1つ以上からのLCDR1、LCDR2および/もしくはLCDR3、例えばLCDRのセットを用いることができる。

【0163】

10

20

30

40

50

同様に、本明細書に開示される他のVHおよびVLドメイン、CDRのセットならびにHC DRのおよび/またはLC DRのセットを用いることができる。

【0164】

免疫グロブリン可変ドメインの実質的部分は少なくとも3つのCDR領域をそれらの介在フレームワーク領域と一緒に含み得る。部分は第1および第4フレームワーク領域の一方または両方の少なくとも約50%を含んでもよく、50%は第1フレームワーク領域のC末端の50%であり、第4フレームワーク領域のN末端の50%である。可変ドメインの実質的部分のN末端またはC末端における追加の残基は、天然に存在する可変ドメイン領域に通常付随しない残基であり得る。例えば、本発明の結合メンバーの構築を組換えDNA技術により行ってクローニングまたは他の操作ステップを促進するために導入されるリンカーによりコードされるNまたはC末端残基の導入をもたらすことができる。他の操作ステップには、本発明の可変ドメインをさらなるタンパク質配列に連結させるためのリンカーの導入が含まれ、そのタンパク質配列には、本明細書の他箇所さらに詳細に考察される抗体定常領域、他の可変ドメイン(例えばダイアポディの産生における場合)または検出可能/機能的標識が含まれる。

10

【0165】

本発明の一部の態様において、結合メンバーはVHおよびVLドメインのペアを含むが、VHまたはVLドメイン配列のいずれかに基づく単一の結合ドメインは本発明のさらなる態様を形成する。単一の免疫グロブリンドメイン、特にVHドメインは特異的様式で標的抗原に結合し得ることが公知である。例えば、上記dAbについての考察を参照のこと。

20

【0166】

いずれの単一結合ドメインの場合でも、これらのドメインを使用して、IL-18に結合し得る2ドメイン結合メンバーを形成し得る相補的ドメインについてスクリーニングすることができる。これは、国際公開第92/01047号パンフレット(参照により全体として本明細書に組み込まれる)に開示されるいわゆる階層的二重コンビナトリアルアプローチ(hierarchical dual combinatorial approach)を使用するファージディスプレイスクリーニング法により達成することができ、その方法において、HまたはL鎖クローンのいずれかを含有する個々のコロニーを使用して、他方の鎖(LまたはH)をコードするクローンの完全ライブラリーを感染させ、得られた2鎖結合メンバーを例えば参考文献に記載のファージディスプレイ技術に従って選択する。この技術もMarks他, Bio/Technology, 1992, 10: 779-783に開示されている。

30

【0167】

本発明の結合メンバーは、抗体定常領域またはその部分、例えばヒト抗体定常領域またはその部分をさらに含み得る。例えば、VLドメインをそのC末端において、ヒトCまたはC鎖を含む抗体軽鎖定常ドメインに付着させることができる。同様に、VHドメインに基づく結合メンバーをそのC末端で、任意の抗体アイソタイプ、例えばIgG、IgA、IgEおよびIgMならびに任意のアイソタイプサブクラスのうちいずれか、特にIgG2、IgG1およびIgG4由来の免疫グロブリン重鎖の全体または部分(例えばCH1ドメイン)に付着させることができる。IgG2は、そのエフェクター機能の欠損により一部の実施形態において有利であり得る。他の実施形態において、IgG1は、そのエフェクター機能および製造容易性により有利であり得る。これらの特性を有し、可変領域を安定化する任意の合成または他の定常領域変異体も本発明において有用であり得る。

40

【0168】

結合メンバーは、検出可能または機能的標識により標識することができる。したがって、検出可能および/または定量可能なシグナルを得るために、結合メンバーまたは抗体分子をイムノコンジュゲートの形態で提供することができる。イムノコンジュゲートは検出可能または機能的標識とコンジュゲートされた本発明の抗体分子を含み得る。標識は、シグナルを産生するかまたはシグナルの産生を誘導し得る任意の分子であり得、それには、

50

限定されるものではないが、蛍光標識、放射性標識、酵素、化学発光標識または光増感剤が含まれる。したがって、蛍光または発光、放射能、酵素活性または吸光度を検出することによって結合を検出および/または計測することができる。

【0169】

好適な標識には、例として、限定されるものではないが、以下のものが含まれる

- 酵素、例えばアルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(「G6PDH」)、アルファ-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼおよびペルオキシダーゼ、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ；
- 色素；
- 蛍光標識または蛍光剤、例えばフルオレセインおよびその誘導体、蛍光色素、ローダミン化合物および誘導体、GFP(GFPは「緑色蛍光タンパク質」を表す)、ダンシル、ウンベリフェロン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド(o-phthaldehyde)、およびフルオレサミン；フルオロフォア、例えばランタニドクリプテートおよびキレート、例えばユーロピウムなど(Perkin ElmerおよびCis Biointernational)、
- 化学発光標識または化学発光剤、例えばイソルミノール、ルミノールおよびジオキセタン；
- 生物発光標識、例えばルシフェラーゼおよびルシフェリン；
- 増感剤；
- 補酵素；
- 酵素基質；
- 放射性標識、例として限定されるものではないが、臭素⁷⁷、炭素¹⁴、コバルト⁵⁷、フッ素⁸、ガリウム⁶⁷、ガリウム⁶⁸、水素³(トリチウム)、インジウム¹¹¹、インジウム^{113m}、ヨウ素^{123m}、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹²⁶、ヨウ素¹³¹、ヨウ素¹³³、水銀¹⁰⁷、水銀²⁰³、リン³²、レニウム^{99m}、レニウム¹⁰¹、レニウム¹⁰⁵、ルテニウム⁹⁵、ルテニウム⁹⁷、ルテニウム¹⁰³、ルテニウム¹⁰⁵、スカンジウム⁴⁷、セレン⁷⁵、硫黄³⁵、テクネチウム⁹⁹、テクネチウム^{99m}、テルル^{121m}、テルル^{122m}、テルル^{125m}、ツリウム¹⁶⁵、ツリウム¹⁶⁷、ツリウム¹⁶⁸、イットリウム¹⁹⁹および本明細書に記載の他の放射性標識；
- 粒子、例えばラテックスまたは炭素粒子；金属ゾル；微結晶；リポソーム；細胞など(色素、触媒または他の検出可能な基によりさらに標識することができる)；
- ビオチン、ジゴキシゲニンまたは5-プロモデオキシウリジンなどの分子；
- 毒素部分、例えばシュードモナス外毒素(PEまたはその細胞傷害性断片もしくは突然変異体)、ジフテリア毒素またはその細胞傷害性断片もしくは突然変異体、ボツリヌス毒素A、B、C、D、EもしくはF、リシンまたはその細胞傷害性断片、例えばリシンA、アプリンまたはその細胞傷害性断片、サボリンまたはその細胞傷害性断片、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルス毒素またはその細胞傷害性断片およびブリオジン1(bryodin 1)またはその細胞傷害性断片の群から選択される毒素部分など。

【0170】

好適な酵素および補酵素の例は、米国特許第4275149号明細書、および米国特許第4318980号明細書に開示されている。好適な蛍光剤および化学発光剤も、米国特許第4275149号明細書に開示されている。標識には、特異的なコグネイト検出可能部分、例えば標識アビジンまたはストレプトアビジンへの結合を介して検出することができる化学的部分、例えばビオチンがさらに含まれる。検出可能な標識は、当技術分野において公知の慣用化学反応を使用して本発明の抗体に付着させることができる。

【0171】

イムノコンジュゲートまたはそれらの機能的断片は、当業者に公知の方法により調製することができる。それらは、直接またはスパーサー基もしくは連結基、例えばポリアルデ

10

20

30

40

50

ヒド、例えばグルタルアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、ジエチレン - トリアミン五酢酸 (D P T A) の仲介により、またはカップリング剤、例えば治療コンジュゲートについて上記のものの存在下で、酵素または蛍光標識にカップリングすることができる。フルオレセインタイプの標識を含有するコンジュゲートはイソチオシアネートと反応させることにより調製することができる。

【 0 1 7 2 】

直接または上記キレート剤、例えば E D T A、D T P A を介して治療放射性同位体を抗体にカップリングする既存の当技術分野において公知の方法を、診断において使用することができる放射性元素に使用することもできる。同様に、クロラミン T 法 [Hunter W . M . and Greenwood F . C . (1 9 6 2) Nature 1 9 4 : 4 9 5] によるナトリウム ^{1 2 5} による標識化またはそうでなければ米国特許第 4 4 2 4 2 0 0 号明細書) の技術によるかもしくは米国特許第 4 4 7 9 9 3 0 号明細書により記載されるとおり D T P A を介して付着させるテクネチウム ^{9 9 m} による標識化を実施することが可能である。

10

【 0 1 7 3 】

標識が、外部手段、例えば視覚的試験、電磁放射線、熱、および化学試薬により検出可能なシグナルを産生し得る多数の方法が存在する。本発明の抗体に結合する別の結合メンバー、または担体に標識を結合させることもできる。

【 0 1 7 4 】

標識は、シグナルを直接産生し得、したがってシグナルの産生に追加の構成要素は要求されない。多数の有機分子、例えば蛍光剤は紫外光および可視光を吸収し得、光吸収はこれらの分子にエネルギーを移動させ、それらを励起エネルギー状態に上昇させる。次いで、この吸収エネルギーは第 2 の波長における発光により消散する。この第 2 の波長での発光も、標識アクセプター分子にエネルギーを移動させ得、得られるエネルギーは、発光、例えば蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) によりアクセプター分子から消散する。シグナルを直接産生する他の標識には、放射性同位体および色素が含まれる。

20

【 0 1 7 5 】

あるいは、標識は、シグナルを産生するために他の構成要素を必要とし得、そしてシグナル産生系は計測可能なシグナルを産生するために要求される全ての構成要素を含み、その場合それには、基質、補酵素、エンハンサー、追加の酵素、酵素産物と反応する物質、触媒、アクチベーター、補因子、インヒビター、スカベンジャー、金属イオン、およびシグナル生成物質の結合に要求される特異的結合物質が含まれ得る。好適なシグナル産生系についての詳細な考察は米国特許第 5 1 8 5 2 4 3 号明細書に見出すことができる。

30

【 0 1 7 6 】

本発明の態様は、I L - 1 8 への本明細書に提供される結合メンバーの結合を生じさせるかまたは可能にすることを含む方法を提供する。上記のとおり、そのような結合はインビボで例えば結合メンバー、または結合メンバーをコードする核酸の投与後に生じ得、またはそれはインビトロで例えば E L I S A、ウエスタンブロッティング、免疫細胞化学、免疫沈降、親和性クロマトグラフィー、および生化学的もしくは細胞ベースアッセイ、例えば K G - 1 もしくは P B M C 細胞アッセイにおいて生じ得る。

40

【 0 1 7 7 】

本発明はまた、本発明による結合メンバーを例えばバイオセンサ系で用いることにより抗原のレベルを直接計測することを提供する。例えば、I L - 1 8 への結合を検出および / または計測する方法は、(i) 前記結合メンバーを I L - 1 8 に曝露することおよび (i i) I L - 1 8 への前記結合メンバーの結合を検出することを含み得、結合は本明細書に記載の任意の方法または検出可能な標識を使用して検出する。この方法、および本明細書に記載の任意の他の結合検出方法は、方法実施者が、例えば検出可能な標識を視覚的に観察することにより直接解釈することができる。あるいは、この方法、または本明細書に記載の任意の他の結合検出方法は、オートラジオグラフ、写真、コンピュータ印刷物、フローサイトメトリーレポート、グラフ、チャート、結果物を含有する試験管もしくは容器

50

もしくはウェル、または本方法の結果の任意の他の視覚的もしくは物理的表現の形態でレポートを作成し得る。

【0178】

一部の実施形態において、結合メンバーにより結合されるIL-18は、遊離IL-18（すなわち、IL-18BPに結合していないIL-18）であり得る。遊離IL-18は、IL-18の生物学的に活性な形態である。

【0179】

IL-18への結合メンバーの結合の量を測定することができる。定量は、診断目的である得る試験試料中の抗原の量に関連し得る。IL-18結合についてのスクリーニングおよび/またはその定量は、例えば本明細書に言及される疾患または障害および/または異常なIL-18発現および/または活性を伴う任意の他の疾患または障害についての患者のスクリーニングにおいて有用であり得る。

10

【0180】

本発明の診断方法は、(i)対象から組織または体液試料を得ること、(ii)前記組織または体液試料を1つ以上の本発明の結合メンバーに曝露すること；および(iii)対照試料と比較して結合したIL-18を検出することを含み得、対照と比較したIL-18結合の量の増加が、異常なレベルのIL-18の発現または活性を示し得る。試験すべき組織または体液試料には、血液、血清、尿、生検材料、腫瘍、または異常なIL-18レベルを含有すると疑われる任意の組織が含まれる。異常なIL-18レベルまたは活性について陽性であると試験された対象はさらに、本明細書に以下に開示される治療方法によって恩恵を受け得る。

20

【0181】

当業者は、本明細書に開示される方法に照らして、その優先性および一般的知識に従って、抗原への結合メンバーの結合を測定する好適な様式を選択することができる。

【0182】

試料中の結合メンバーの反応性を任意の適切な手段によって測定することができる。ラジオイムノアッセイ(RIA)は一候補である。放射性標識抗原を非標識抗原(試験試料)と混合し、結合メンバーに結合させる。結合した抗原を未結合抗原から物理的に分離し、結合メンバーと結合している放射性抗原の量を測定する。試験試料中に存在する抗原が多ければ、結合メンバーに結合する放射性抗原が少ない。レポーター分子に連結された抗原または類似体を使用して、非放射性抗原とともに競合結合アッセイを使用することもできる。レポーター分子は、スペクトルにより単離される吸収または発光特性を有する蛍光色素、リン光体またはレーザー色素であってよい。好適な蛍光色素には、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッド、ならびにランタニドキレートまたはクリプテートが含まれる。好適な発色色素には、ジアミノベンジジンが含まれる。

30

【0183】

他のレポーターには、高分子コロイド粒子または粒子状材料、例えば有色性、磁性または常磁性のラテックスビーズ、および視覚的に観察されるか、電子的に検出されるか、または別の方法で記録される対象の検出可能なシグナルを直接または間接的に生じさせることができる生物学的もしくは化学的に活性な作用物質が含まれる。これらの分子は、例えば、発色させるかまたは変色させるかまたは電気的特性の変化を生じさせる反応を触媒する酵素であり得る。これらは、エネルギー状態間の電子遷移が特徴的スペクトル吸収または発光をもたらすように分子的に励起可能であり得る。これらには、バイオセンサーとともに使用される化学実体が含まれ得る。ピオチン/アビジンまたはピオチン/ストレプトアビジンおよびアルカリホスファターゼ検出系を用いることができる。

40

【0184】

個々の結合メンバー-レポーターコンジュゲートにより生成されるシグナルを使用して、試料(正常および試験試料)中の該当する結合メンバーの結合についての定量可能な絶対的または相対的データを導き出すことができる。

【0185】

50

本明細書に記載のインターロイキン - 18 (I L - 18) についての単離された結合メンバーは、 I L - 18 への結合について I L - 18 B P と競合し得、したがって、 I L - B P に結合している I L - 18 と遊離 I L - 18 (すなわち、 I L - 18 B P に結合していない I L - 18) との区別において有用であり得る。

【 0 1 8 6 】

本発明の単離された結合メンバーは、遊離 I L - 18 の検出および / または計測において有用であり得る。遊離 I L - 18 を検出および / または計測する方法は、 (i) 本発明による結合メンバーを遊離 I L - 18 に曝露することならびに (i i) 遊離 I L - 18 への前記結合メンバーの結合を検出および / または計測することを含み得る。遊離 I L - 18 への結合メンバーの結合は、任意の簡便な方法、例えば本明細書に記載の方法を使用して検出および / または計測することができる。

10

【 0 1 8 7 】

本発明の方法は、試料中の遊離 I L - 18 の量の測定において有用であり得る。

【 0 1 8 8 】

試料中の遊離 I L - 18 を計測する方法は：
試料を本発明の結合メンバーと接触させることおよび
試料への結合メンバーの結合を測定すること
を含み得る。

【 0 1 8 9 】

試料への結合メンバーの結合は、試料中の遊離 I L - 18 の存在の指標である。試料への結合メンバーの結合の量は、試料中の遊離 I L - 18 の量の指標であり得る。

20

【 0 1 9 0 】

アッセイは、 I L - 18 に結合する第 1 の結合メンバーおよび同様に I L - 18 に結合するが第 1 の結合メンバーとは異なる I L - 18 上のエピトープに結合する第 2 の結合メンバーの使用を含み得る。第 1 または第 2 の結合メンバーの一方は、本発明の結合メンバーであり、第 1 または第 2 の結合メンバーの他方は、公知の I L - 18 結合メンバー、例えば抗 I L - 18 抗体であり得る。好適な公知の I L - 18 結合メンバーは、当技術分野において利用可能である。

【 0 1 9 1 】

一部の簡便なアッセイフォーマットにおいて、前記第 1 または第 2 の結合メンバーの一方は、固体支持体上で固定化されていてよく、他方は固定化されていないとよい。

30

【 0 1 9 2 】

結合メンバーは、当技術分野において公知の多数の異なる手法において固体担体上に固定化することができる。例えば、結合メンバーは、例えば、プラスチック固体担体の場合、例えば、静電および / または疎水相互作用を介して固体担体に直接吸着させることができる。あるいは、結合メンバーは、固体担体に共有結合させることができる。この場合、固体担体は、化学的に修飾して機能的化学基、例えばヒドロキシルまたはアミン基を担体の表面上に導入または活性化し、架橋剤、例えばグルタルアルデヒドを使用して担体を架橋して固体担体への第 1 のメンバーの共有結合を促進することができる。さらなる代替例において、結合メンバーは、例えば、ビオチンとアビジンとの相互作用による特異的結合相互作用により、またはプロテイン A もしくはプロテイン G を固体担体に固定化し、次いで結合メンバー自体に特異的結合させることにより固体担体に間接的に付着させることができる。

40

【 0 1 9 3 】

遊離 I L - 18 の検出に好適な多くの異なるアッセイフォーマットが、当技術分野において公知であり、それには非競合および競合アッセイならびにイムノアッセイが含まれる。

【 0 1 9 4 】

非競合アッセイフォーマットは、例えば、固体担体において I L - 18 に結合する第 1 の結合メンバーを固定化することを含み得る。次いで、固定化された結合メンバーを目的

50

の試料と接触させることができる。試料が I L - 1 8 を含有する場合、それは固定化された結合メンバーと結合する。次いで、I L - 1 8 に結合する第 2 の結合メンバーを添加し、結合させる。一部の実施形態において、固定化された第 1 の結合メンバーは、本発明の結合メンバーであり得る。他の実施形態において、第 2 の結合メンバーは、本発明の結合メンバーであり得る。

【 0 1 9 5 】

検出を可能とするため、第 2 の結合メンバーを検出可能な標識により標識することができる。あるいは、第 2 の結合メンバーの結合は、第 2 の結合メンバーに特異的に結合し、検出可能な標識により標識された第 3 の結合メンバー、例えば抗体を使用して測定することができる。試料中の遊離 I L - 1 8 分子は、固定化された第 1 の結合メンバーにより捕捉し、それにより担体において固定化する。第 2 の結合メンバーは、捕捉された遊離 I L - 1 8 に結合し、担体において固定化する。第 2 の結合メンバーは捕捉された遊離 I L - 1 8 に結合し、担体にそれ自体固定化する。一部の実施形態において、標識された第 3 の結合メンバーは、第 2 の結合メンバーに結合し得、担体において固定化することもできる。

10

【 0 1 9 6 】

第 3 の結合メンバーは、例えば、第 2 の結合メンバー（例えば、抗 I g G 抗体）に直接結合し得、または第 2 の結合メンバーに連結または融合している親和性タグに結合し得る。

【 0 1 9 7 】

好適な親和性タグには、ビオチンまたはペプチジル配列、M R G S (H)₆、D Y K D D D D K (F L A G (商 標))、T 7 -、S - (K E T A A A K F E R Q H M D S)、ポリ - A r g (R 5 ~ 6)、ポリ - H i s (H 2 ~ 1 0)、ポリ - C y s (C 4)、ポリ - P h e (F 1 1)、ポリ - A s p (D 5 ~ 1 6)、S t r e p t - タグ I I (W S H P Q F E K)、c - m y c (E Q K L I S E E D L)、インフルエンザ - H A タグ (M u r r a y , P . J . e t a l (1 9 9 5) A n a l B i o c h e m 2 2 9 , 1 7 0 - 9)、G l u - G l u - P h e タグ (S t a m m e r s , D . K . e t a l (1 9 9 1) F E B S L e t t 2 8 3 , 2 9 8 - 3 0 2)、T a g . 1 0 0 (Q i a g e n ; 哺乳動物 M A P キナーゼ 2 に由来する 1 2 アミノ酸タグ)、C r u z t a g 0 9 (商 標) (M K A E F R R Q E S D R , S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y I n c .) および C r u z t a g 2 2 (商 標) (M R D A L D R L D R L A , S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y I n c .) が含まれる。

20

30

【 0 1 9 8 】

次いで、固体担体に直接または間接的に結合した標識された第 2 または第 3 の結合メンバーの量を計測し、それにより検出された標識された結合メンバーの量が、試料中に存在する遊離 I L - 1 8 の量に直接比例する。

【 0 1 9 9 】

例えば、試料中の遊離 I L - 1 8 を計測する方法は；
試料を I L - 1 8 に結合する第 1 の結合メンバーと接触させること、および；
試料中の I L - 1 8 への前記第 1 の結合メンバーの結合を、I L - 1 8 に結合する第 2 の結合メンバーを使用して測定すること
を含み得、
前記第 1 または第 2 の結合メンバーの一方が本発明の結合メンバーであり、前記第 1 または第 2 の結合メンバーの他方が、I L - 1 8 への結合について本発明の結合メンバーと競合しない抗 I L - 1 8 結合メンバーである。

40

【 0 2 0 0 】

上記のとおり、第 1 の結合メンバーは、本発明の結合メンバーであり得、第 2 の結合メンバーは、I L - 1 8 への結合について本発明の結合メンバーと競合しない抗 I L - 1 8 結合メンバーであり得；または第 2 の結合メンバーは本発明の結合メンバーであり得、第 1 の結合メンバーは、I L - 1 8 への結合について本発明の結合メンバーと競合しない抗

50

IL - 18 結合メンバーであり得る。

【0201】

目的の試料中の遊離 IL - 18 の存在を決定するための競合アッセイは、本発明の結合メンバーを固体担体において固定化することを含み得る。次いで、標識された IL - 18 を添加し、固定化された本発明の結合メンバーに結合させ、次いで試料を添加する。試料が遊離 IL - 18 を含有する場合、それは固定化された本発明の結合メンバーへの結合について、標識された IL - 18 と競合する。次いで、固体担体に結合した標識された IL - 18 の量を計測する。この場合、検出される標識された IL - 18 の量は、試料中に存在する遊離 IL - 18 の量に反比例する。

【0202】

好適な試料には、生物学的体液の試料、例えば脳脊髄液 (CSF)、胆汁、尿、皮脂、唾液または血清が含まれる。試料は、個体、例えば霊長類、例えばヒトまたはサルから、標準的技術を使用して得ることができる。

【0203】

本明細書において称される検出可能な標識は、シグナルを産生または誘導して産生することができる任意の標識、例として、限定されるものではないが、蛍光剤、化学発光剤 (例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ)、着色標識 (例えば、ラテックス[ブルー]またはコロイダルゴールド[レッド])、放射性標識、酵素、および磁気標識であり得る。したがって、表面、例えばキャピラリー孔の表面において結合した標識の量は、蛍光または発光、発色、放射能、酵素活性、または磁場の変化を検出することにより検出および/または計測することができる。検出可能な標識は、慣用の化学反応を使用して結合メンバーに付着させることができる。好ましくは、検出可能な標識は、例えばデジタルカメラまたはフラットベッドスキャナを有する光学インタロゲーションにより検出可能な標識である。光学インタロゲーションにより検出することができる標識には、蛍光剤、化学発光剤および着色標識が含まれる。光学的検出のためにシグナルを生成することができる機構には、(必ずしも限定されるものではないが)：光吸収、光散乱、光回折、光反射、蛍光または発光が含まれる。

【0204】

本明細書に記載の遊離 IL - 18 の計測は、生物学的に活性な IL - 18 のレベルを試料中で正確に測定することを可能とする。

【0205】

遊離 IL - 18 の計測は、疾患状態、例として炎症疾患、自己免疫疾患、例えば続発性血球貪食症候群、マクロファージ活性化症候群、関節リウマチ、および I 型糖尿病、ならびに心血管疾患、例えば冠動脈疾患、例えば慢性閉塞性肺疾患 (COPD) および急性冠症候群の診断および/または予後診断において有用であり得る。

【0206】

遊離 IL - 18 の計測は、治療に対する疾患状態の応答性の評価においても有用であり得る。

【0207】

治療に対する個体における疾患状態の応答性を評価する方法は：
上記のとおり、本発明の結合メンバーを使用する前記治療前および後に個体から得られた試料中の遊離 IL - 18 の量を計測すること
を含み得、
遊離 IL - 18 のレベルの減少は、個体が治療に対して応答性であることを示す。

【0208】

遊離 IL - 18 のレベルまたは量は、本明細書に記載のとおり本発明の結合メンバーを使用する前記投与前に個体から得られた第 1 の試料中および前記投与後に個体から得られた第 2 の試料中で計測することができ、第 1 の試料および第 2 の試料中の遊離 IL - 18 のレベルまたは量の差、例えば、減少が、疾患状態が前記治療に対して応答性であることを示す。

10

20

30

40

50

【0209】

個体における疾患状態の治療をモニタリングする方法は：

- (a) 個体を治療のレジメンに供すること；および
 - (b) 上記の方法を使用して個体から得られた試料中で遊離IL-18のレベルまたは量を前記治療の間モニタリングすること
- を含み得、

治療の間に得られた試料中の遊離IL-18のレベルまたは量の低減が、レジメンが個体における疾患状態の治療に有効であることを示す。

【0210】

治療の間に患者から得られた試料中の遊離IL-18のレベルまたは量の持続変化の不存在下、本方法は、さらに；

- (c) 治療のレジメンを変え、変えたレジメンに個体を供すること；
- (d) 本明細書に記載の方法を使用して個体から得られた試料中の遊離IL-18のレベルをモニタリングすること、ならびに
- (e) 工程c)およびd)を、遊離IL-18のレベルの持続変化が観察されるまで繰り返すこと

を含み得、

治療の間に持続される遊離IL-18のレベルまたは量の変化、例えば低減が、変えたレジメンが個体における疾患状態の治療に有効であることを示す。

【0211】

治療の間の遊離IL-18のレベルまたは量の持続変化の存在下、本方法は、さらに；

- (c) 治療のレジメンを変え、変えたレジメンに個体を供すること；
- (d) 本明細書に記載の方法を使用して個体から得られた試料中の遊離IL-18のレベルをモニタリングすること、ならびに
- (e) 工程c)およびd)を、遊離IL-18のレベルの最大変化が観察されるまで繰り返すこと

を含み得、

治療の間に持続される遊離IL-18のレベルまたは量の最大変化が、変えたレジメンが個体における疾患状態の治療に有効であることを示す。

【0212】

遊離IL-18の計測は、臨床試験のための患者のコホートの同定においても有用であり得る。

【0213】

患者のコホートを同定する方法は：

- (a) 疾患状態を有する患者の集団を同定すること
- (b) 上記のとおり本発明の結合メンバーを使用して集団の患者から得られた試料中の遊離IL-18の量を計測すること；
- (c) 閾値超または未満である遊離IL-18の量を含有する試料を同定すること、および；

(d) 同定された試料から患者のコホートを同定すること

を含み得る。

【0214】

同定された患者のコホートは、全て、高または低レベルの遊離IL-18（すなわち、閾値超または未満のレベル）を有し得る。

【0215】

疾患状態には、炎症および自己免疫疾患、例えば、続発性血球貪食症候群、マクロファージ活性化症候群、関節リウマチ、およびI型糖尿病、および冠動脈疾患、例えば、慢性閉塞性肺疾患（COPD）および急性冠症候群が含まれ得る。

【0216】

上記のとおり患者においてモニタリングおよび/または評価することができる好適な治

10

20

30

40

50

療は、当技術分野において周知である。

【0217】

本明細書に記載の結合メンバーを含むキットも、本発明の態様として提供される。キットにおいて、例えば以下でさらに記載されるとおり、結合メンバーを標識して、試料中のその反応性の測定を可能にすることができる。さらに、結合メンバーを固体担体に付着させても付着させなくてもよい。キットの構成要素は一般に滅菌されており、密封バイアルまたは他の容器中に存在する。結合メンバーが有用である診断分析または他の方法においてキットを用いることができる。キットは、上記方法において使用することができる。キットは、方法、例えば本発明による方法における構成要素の使用についての指示書を含み得る。そのような方法を支援するかまたはその実施を可能にするための付属材料を本発明のキット内に含めることができる。付属材料には、第1の結合メンバーに結合する第2の異なる結合メンバーが含まれ、検出可能な標識（例えば、蛍光標識、放射性同位体または酵素）にコンジュゲートされる。抗体ベースのキットは、免疫沈降を実施するためのビーズも含み得る。キットのそれぞれの構成要素は、一般にそれ自体の好適な容器中に存在する。したがって、これらのキットは一般にそれぞれの結合性メンバーに好適な個別の容器を含む。さらに、キットはアッセイならびにアッセイの実施から得られたデータを解釈および分析するための方法を実施するための指示書を含み得る。

10

【0218】

本発明はまた、競合アッセイにおいて抗原レベルを計測するための上記結合メンバーの使用、すなわち、本発明により提供される結合メンバーを競合アッセイにおいて用いることによって試料中の抗原のレベルを計測する方法を提供する。これは、結合抗原を未結合抗原から物理的に分離することが要求されない場合であり得る。レポーター分子を結合メンバーに連結し、結合時に物理的または光学的変化が生じるようにすることが1つの可能性である。レポーター分子は、検出可能なシグナルを直接または間接的に生成し得、そのシグナルは定量可能であり得る。レポーター分子の連結は、直接または間接的に共有結合により、例えばペプチド結合を介してまたは非共有結合によるものであり得る。ペプチド結合を介する連結は、抗体およびレポーター分子をコードする遺伝子融合物の組換え発現の結果であり得る。

20

【0219】

上記のとおり、本発明は、本明細書に定義の任意の結合メンバー、例えば表11に列記される抗体のいずれか、例えばIgG2、IgG1またはIgG1三重突然変異(TM; Oganesyan他(2008) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64(Pt6):700-4)フォーマットのものとのIL-18への結合について競合する結合メンバーに及ぶ。結合メンバー間の競合は、例えば、他方のタグ付けされていない結合メンバーの存在下で検出することができる特異的レポーター分子を一方の結合メンバーにタグ付けすることによりインビトロで容易にアッセイすることができ、同一エピトープまたは重複するエピトープに結合する結合メンバーの同定を可能とする。競合は、例えばELISAを使用して測定することができる。競合は、例えばELISAを使用して測定することができ、ELISAでは、IL-18をプレートに固定化し、タグ付けまたは標識された第1の結合性メンバーを、タグ付けも標識もされていない1つ以上の他の結合メンバーとともにプレートに添加する。タグが付いている結合メンバーと競合する、タグ付けされていない結合性メンバーの存在は、タグ付けされた結合メンバーにより放出されるシグナルの減少により観察される。

30

40

【0220】

例えば、本発明は、IL-18結合化合物を同定する方法であって、(i)IL-18を担体に固定化すること、(ii)前記固定化されたIL-18を、タグ付けまたは標識された少なくとも1つの本発明の結合メンバーおよびタグ付けも標識もされていない1つ以上の試験結合化合物と、同時にまたは段階的様式で接触させること、および(iii)タグ付けされた結合メンバーからの結合タグの量の減少を観察することにより、新規IL-18結合化合物を同定することを含む方法を含む。そのような方法は、マルチウェルま

50

たはアレイフォーマットを使用してハイスループット様式で実施することができる。そのようなアッセイは、溶液中で実施することもできる（例えば米国特許第5,814,468号明細書参照）。上記のとおり、結合の検出は、方法実施者が、例えば検出可能な標識またはその存在の減少を視覚的に観察することにより直接解釈することができる。あるいは、本発明の結合方法は、オートラジオグラフ、写真、コンピュータ印刷物、フローサイトメトリーレポート、グラフ、チャート、結果物を含む試験管もしくは容器もしくはウェル、または本方法の結果の任意の他の視覚的もしくは物理的表現の形態のレポートを作成し得る。

【0221】

エピトープマッピングにおいて競合アッセイを使用することもできる。ある例において、エピトープマッピングを使用して、場合により最適化された中和および/またはモジュレート特性を有し得るIL-18結合メンバーが結合するエピトープを同定することができる。そのようなエピトープはリニアまたはコンフォメーションナルエピトープであり得る。コンフォメーションナルエピトープは、IL-18の少なくとも2つの異なる断片を含み得、前記断片はIL-18がその3次元または4次元構造にフォールディングされる場合に互いに近接して位置してコンフォメーションナルエピトープを形成し、それがIL-18のインヒビター、例えばIL-18結合メンバーにより認識される。競合についての試験において、抗原のペプチド断片、特に、目的のエピトープを含むかまたは本質的にそれからなるペプチドを用いることができる。エピトープ配列に加えて両端に1つ以上のアミノ酸を有するペプチドを使用することができる。本発明による結合メンバーは、抗原についてその結合が、挙げられた配列を有するかまたは含むペプチドにより阻害されるようなものであり得る。

10

20

【0222】

本発明はさらに、本明細書に記載の結合メンバーをコードする、単離された核酸配列を提供する。核酸は、DNAおよび/またはRNAを含み得る。一方で、本発明は、上記定義の本発明のCDRまたはCDRのセットまたはVHドメインまたはVLドメインまたは抗体抗原結合部位または抗体分子、例えばscFvまたはIgG（例えば、IgG2、IgG1またはIgG1）をコードする核酸を提供する。

【0223】

本発明はまた、少なくとも1つの上記ポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写または発現カセットの形態の構築物を提供する。

30

【0224】

本発明はまた、1つ以上の上記構築物を含む組換え宿主細胞系を提供する。提供される任意のCDRまたはCDRのセットまたはVHドメインまたはVLドメインまたは抗体抗原結合部位または抗体分子、例えばscFvまたはIgG（例えば、IgG2、IgG1またはIgG1TM）をコードする核酸配列は、そのコードされる産物を産生する方法であって、そのコード核酸配列からの発現を含む方法とともに本発明の態様を形成する。核酸を含む組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することにより、発現を簡便に達成することができる。発現による産生後、VHもしくはVLドメイン、または結合メンバーを、任意の好適な技術を使用して単離および/または精製し、次いで適宜使用することができる。

40

【0225】

本発明による核酸配列は、DNAまたはRNAを含み得、完全にまたは部分的に合成であり得る。本明細書に記載のヌクレオチド配列への言及は、文脈上特に要求されない限り、指定配列を有するDNA分子を包含し、Tの代わりにUが用いられる指定配列を有するRNA分子を包含する。

【0226】

別の態様は、抗体VH可変ドメインの産生方法であって、コード核酸配列からの発現を生じさせることを含む方法を提供する。そのような方法は、前記抗体VH可変ドメインの産生のための条件下で宿主細胞を培養することを含み得る。

50

【0227】

V L可変ドメインならびにV Hおよび/またはV Lドメインを含む結合メンバーを産生する類似の方法が、本発明のさらなる態様として提供される。

【0228】

産生方法は、産物を単離および/または精製する工程を含み得る。産生方法は、産物を、少なくとも1つの追加の構成要素、例えば薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物に製剤化することを含み得る。

【0229】

種々の異なる宿主細胞におけるクローニング系およびポリペプチドの発現系が周知である。好適な宿主細胞には、細菌、哺乳動物細胞、植物細胞、糸状菌、酵母およびバキュロウイルス系ならびにトランスジェニック植物および動物が含まれる。原核細胞中での抗体および抗体断片の発現は、当技術分野において十分確立されている。概説に関しては、例えばPlucekthun [Plucekthun, A. Bio/Technology 9:545-551 (1991)]を参照のこと。一般的な細菌宿主は大腸菌(E. coli)である。

10

【0230】

培養物中の真核細胞中での発現も、結合メンバーを産生するための任意選択として当業者が利用可能である [Chadd HE and Chamow SM (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:188-194; Andersen DC and Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:117; Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418]。

20

【0231】

当技術分野において、異種ポリペプチドの発現に利用可能な哺乳動物細胞系には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎細胞、NS0マウス黒色腫細胞、YB2/0ラット骨髄腫細胞、ヒト胚性腎細胞、ヒト胚性網膜細胞および多数の他の細胞が含まれる。

【0232】

適切な調節配列、例としてプロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および他の配列を適宜含有する好適なベクターを選択または構築することができる。ベクターは、適宜、プラスミド、例えばファージミド、またはウイルス、例えば「ファージ」であり得る [Sambrook and Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press]。例えば核酸構築物の調製、突然変異導入、シーケンシング、細胞中へのDNAの導入および遺伝子発現における核酸の操作、ならびにタンパク質の分析のための多数の公知技術およびプロトコルは、Ausubel他 [Ausubel他 eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4th edition 1999]に詳細に記載されている。

30

40

【0233】

本発明のさらなる態様は、本明細書に開示されている核酸を含有する宿主細胞を提供する。そのような宿主細胞はインビトロであり得、培養物中で存在し得る。そのような宿主細胞は、インビボであり得る。宿主細胞がインビボで存在すれば、本発明の結合メンバーを「イントラボディ」または細胞内抗体として細胞内で発現させることが可能になり得る。イントラボディは遺伝子治療に使用することができる。

【0234】

50

別の態様は、本発明の核酸を宿主細胞中に導入することを含む方法を提供する。導入は、任意の利用可能な技術を用い得る。真核細胞について、好適な技術には、リン酸カルシウム形質移入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リボソーム媒介形質移入およびレトロウイルスまたは他のウイルス、例えばワクシニアまたは昆虫細胞についてバキュロウイルスを使用する形質導入が含まれ得る。宿主細胞、特に真核細胞での核酸の導入では、ウイルスまたはプラスミドベースの系を使用することができる。プラスミド系はエピソームとして維持するか、または宿主細胞中または人工染色体中に取り込むことができる。取り込みは、単一または複数の遺伝子座における1コピー以上のランダムまたはターゲティングされた統合であり得る。細菌細胞について、好適な技術には、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーションおよびバクテリオファージを使用する形質移入が含まれ得る。

10

【0235】

導入後に、例えば遺伝子の発現のための条件下で宿主細胞を培養することにより、核酸からの発現を生じさせるかまたは可能にすることができる。発現産物の精製は、当業者に公知の方法により達成することができる。

【0236】

本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば染色体）中に統合することができる。標準的技術に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列を含めることにより統合を促進することができる。

【0237】

本発明はまた、発現系中で上記構築物を使用して上記結合メンバーまたはポリペプチドを発現させることを含む方法を提供する。

20

【0238】

本明細書に記載の結合メンバーは、ヒトまたは動物対象、例えばヒトにおける診断または治療の方法において使用することができる。IL-18についての結合メンバーを使用してIL-18に関連する障害および/またはIL-18の活性の減少が有益である障害を治療することができる。

【0239】

IL-18についての結合メンバーを使用して個体におけるIL-18の活性を減少させることができる。したがって、本発明は、個体におけるIL-18の活性を減少させる方法であって、IL-18の活性の減少が必要とされる個体に、IL-18の活性を減少させるように、有効量の1つ以上の本発明の結合メンバーを単独で、または当技術分野において公知のまたは本明細書に記載の別の適切な医薬品との併用治療レジメンにおいて投与することを含む方法を提供する。

30

【0240】

本明細書に記載の結合メンバーは、以下に列記される病態の治療において使用することができる：

1. 骨および関節：例えば、先天的股異形成に対して原発性および続発性の骨関節炎/変形性関節症に関連するか、もしくはそれを含む関節炎；頸部および腰部脊椎症、ならびに腰部および頸部疼痛；関節リウマチ；ステイル病；血清反応陰性脊椎関節症、例として強直性脊椎関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎および未分化脊椎関節症；敗血症性関節炎および他の感染関連関節症ならびに骨障害、例えば結核、例としてポツツ病およびボンセ症候群；急性および慢性の結晶誘導性滑膜炎、例として尿酸性痛風、ピロリン酸カルシウム蓄積症、ならびにカルシウムアパタイトに関連する腱、滑液胞および滑液炎症；ベーチェット病；原発性および続発性シェーグレン症候群；全身性硬化症および限局性強皮症；全身性エリテマトーデス、混合結合組織疾患、および未分化結合組織疾患；炎症性筋疾患、例として皮膚筋炎および多発性筋炎；リウマチ性多発性筋痛；川崎病；若年性関節炎、例として全身性若年性特発性関節炎（SJIA）および全ての関節分布の特発性炎症性関節炎および関連症候群；マクロファージ活性化症候群；リウマチ熱およびその全身性合併症；血球貪食症候群；血球貪食リンパ組織球増加症；CAP症候群；血管炎、例として巨

40

50

細胞動脈炎、高安動脈炎、チャージ・ストラウス症候群、結節性多発性動脈炎、顕微鏡的多発性動脈炎、ならびにウイルス感染、過敏性反応、クリオグロブリン、およびパラプロテインと関連する血管炎；腰部疼痛；家族性地中海熱、マックル・ウェルズ症候群；ならびに家族性ヒベルニアン熱、菊池病；薬剤誘導性関節痛、腱炎、および筋疾患；

2．傷害に起因する筋骨格障害の疼痛および結合組織再形成〔例えば、スポーツによる傷害〕または疾患：関節炎（例えば、関節リウマチ、骨関節炎、痛風または結晶性関節炎）、他の関節疾患（例えば、椎間板変性または側頭下顎関節変性）、骨再形成疾患（例えば、骨粗鬆症、パジェット病または骨壊死）、多発性軟骨炎、強皮症、混合結合組織障害、脊椎関節症または歯周疾患（例えば、歯周炎）；

3．心血管：腎虚血；卒中；アテローム性動脈硬化症；動脈硬化症；腹部大動脈瘤；末梢動脈疾患；狭心症；急性冠症候群；心筋梗塞；鬱血性心不全；血管再開通術後の再狭窄；脳血管疾患、例として多発性脳梗塞性認知症；末梢血管疾患、例として勃起機能不全；冠状循環および末梢循環に影響する障害；心筋炎、炎症および自己免疫心筋症、例として心筋サルコイド；虚血性再かん流傷害；心内膜炎、弁膜炎、および大動脈炎、例として感染性（例えば、梅毒）；血管炎；近位静脈および末梢静脈の障害、例として静脈炎および血栓症、例として深静脈血栓症および静脈瘤の合併症；

4．内分泌疾患：真性糖尿病、例として2型糖尿病および糖尿病性合併症、例えば糖尿病性ネフロパシー、ニューロパシーおよびレチノパシー。

5．気道：気道の閉塞性疾患、例として喘息、例として断続的および持続的の両方ならびに全ての重症度の気管支性、アレルギー性、内在性、外来性、運動誘導性、薬剤誘導性（例としてアスピリンおよびNSAID誘導性）および粉塵誘導性喘息、ならびに他の原因の気道過敏性；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；気管支炎、例として感染性および好酸球性気管支炎；肺気腫；気管支拡張症；嚢胞性線維症；サルコイドーシス；農夫肺および関連疾患；過敏性肺炎；肺線維症、例として特発性繊維化性肺炎、特発性間質性肺炎、抗新生物治療および慢性感染に併発する線維症、例として結核およびアスペルギルス症ならびに他の真菌感染；肺移植の合併症；肺血管の血管性および血栓性障害、ならびに肺高血圧；鎮咳活性、例として気道の炎症および分泌病態に関連する慢性の咳、ならびに医原性の咳の治療；急性および慢性鼻炎、例として薬物性鼻炎、および血管運動神経性鼻炎；通年性および季節性アレルギー性鼻炎、例として神経性鼻炎（花粉症）；鼻ポリープ；急性ウイルス感染、例として風邪、ならびに呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ、コロナウイルス（例としてSARS）およびアデノウイルスに起因する感染；

6．皮膚：乾癬、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎もしくは他の湿疹様皮膚炎、および遅延型過敏反応；植物性皮膚炎および光線皮膚炎；脂漏性皮膚炎、疱疹状皮膚炎、扁平苔癬、硬化性萎縮性苔癬、壊疽性膿皮症、皮膚サルコイド、円板状エリテマトーデス、天疱瘡、類天疱瘡、表皮水疱症、蕁麻疹、血管性浮腫、血管炎、毒性紅斑、皮膚好酸球増加症、円形脱毛症、男性型禿頭症、スイート症候群、ウェーバー・クリスチャン症候群、多形性紅斑；感染性および非感染性の蜂巣炎；脂肪織炎；皮膚リンパ腫、非メラノーマ皮膚癌および他の異形成病変；薬剤誘導性障害、例として固定薬疹；

7．眼：眼瞼炎；結膜炎、例として通年性および春季アレルギー性結膜炎；虹彩炎；前部および後部ブドウ膜炎；脈絡膜炎；自己免疫；網膜に影響する変性障害もしくは炎症疾患；眼炎、例として交感性眼炎；サルコイドーシス；感染、例としてウイルス、真菌、および細菌感染；

8．胃腸管：舌炎、歯肉炎、歯周炎；食道炎、例として逆流性食道炎；好酸球性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病、大腸炎、例として潰瘍性大腸炎、直腸炎、肛門搔痒症；セリアック症、過敏性腸症候群、および腸から遠くでの効果を有し得る食品関連アレルギー（例えば、偏頭痛、鼻炎または湿疹）；

9．腹部：肝炎、例として自己免疫性、アルコール性およびウイルス性肝炎；肝臓の線維症および肝硬変；胆嚢炎；急性および慢性の膵炎；

10．尿生殖器：腎炎、例として間質性腎炎および糸球体腎炎；ネフロゼ症候群；膀胱炎、例として急性および慢性（間質性）膀胱炎ならびにハンナー潰瘍；急性および慢性尿

10

20

30

40

50

道炎、前立腺炎、精巣上体炎、卵巣炎ならびに卵管炎；外陰膣炎；ペイロニー病；勃起機能不全（男性および女性の両方）；

11．同種移植片拒絶反応：例えば、腎臓、心臓、肝臓、肺、骨髄、皮膚もしくは角膜の移植後もしくは輸血後の急性および慢性拒絶反応；または慢性移植片対宿主病；

12．CNS：アルツハイマー病ならびに他の認知障害、例としてCJDおよびnvCJD；アミロイドーシス；多発性硬化症および他の脱髄症候群；脳のアテローム性動脈硬化症および血管炎；側頭動脈炎；重症筋無力症；急性および慢性疼痛（中枢もしくは末梢起源の急性、断続的もしくは持続的なもの）、例として内臓痛、頭痛、片頭痛、三叉神経痛、非定型顔面痛、関節および骨の疼痛、癌および腫瘍侵襲から生じる疼痛、ニューロパシー性疼痛症候群、例として糖尿病性、ヘルペス後およびHIV関連性ニューロパシー；ニューロサルコイドーシス；悪性の感染または自己免疫プロセスの中核および末梢神経系合併症；

13．他の自己免疫およびアレルギー障害、例として橋本甲状腺炎、グレーブス病、アジソン病、糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病、好酸球性筋膜炎、超IgE症候群、抗リン脂質症候群；

14．炎症または免疫学的構成要素による他の障害、例として後天性免疫不全症候群（AIDS）、ハンセン病、セザリー症候群、および腫瘍随伴症候群；

15．癌、例として任意のタイプの転移性または非転移性固形腫瘍または悪性リンパ腫、例えば白血病、肉腫、皮膚癌、膀胱癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、肝臓癌、頭頸部癌、食道癌、膵臓癌、腎臓癌、胃癌および脳癌。

【0241】

本明細書に記載の結合メンバーを使用してそのような障害を治療することができ、それには予防的治療および障害の重症度もしくはその症状の1つ以上の軽減、または発症の遅延もしくはそのリスクの軽減が含まれる。

【0242】

したがって、本発明は、本明細書に挙げられる障害のいずれかの少なくとも1つの症状を治療またはその重症度を軽減する方法であって、その治療または軽減を必要とする患者に、上記障害のいずれかの少なくとも1つの症状の重症度が軽減されるように、有効量の1つ以上の本発明の結合メンバーを単独で、または当技術分野において公知もしくは本明細書に記載の別の適切な医薬品との併用治療レジメンにおいて投与することを含む方法を提供する。

【0243】

本発明の結合メンバーは、動物および疾患の動物モデル、例えば霊長類モデル、例えばアカゲザルまたはカニクイザルモデルにおいて使用することができる。好適な動物モデルには、ヒト細胞により再構成された免疫不全非ヒト哺乳動物、例えばマウスまたはラットも含まれ得る。

【0244】

したがって、本明細書に記載の結合メンバーは、IL-18、例えばIL-18発現および/または活性、特に異常な発現/活性が関与する疾患または障害の治療における治療剤として有用である。治療方法は、有効量の本明細書に記載の結合メンバーを、治療を必要とする患者に投与することを含み得、IL-18の異常な発現および/または活性を減少させる。治療方法は、(i)例えば上記診断方法を使用して、異常なIL-18レベルまたは活性を示す患者を同定すること、および(ii)有効量の本明細書に記載の結合メンバーを患者に投与することを含み得、IL-18の異常な発現および/または活性を減少させる。有効量は、治療される特定の疾患または障害の少なくとも1つの症状の重症度を減少または低下させるためにIL-18の異常な発現および/または活性を減少させる量であり、必ずしも疾患または障害を治癒させる量ではない。

【0245】

本発明はまた、IL-18の少なくとも1つの効果にアンタゴナイズする方法であって、前記IL-18の少なくとも1つの効果がアンタゴナイズされるように有効量の1つ以

10

20

30

40

50

上の本発明の結合メンバーと接触させるかまたはそれを投与することを含む方法を提供する。本発明の方法によりアンタゴナイズすることができるIL-18の効果には、その受容体および/またはIL-18BPへの結合、ならびにそれらの結合反応の結果として生じる任意の下流の効果が含まれる。

【0246】

したがって、本発明のさらなる態様は、提供される結合メンバーを投与することを含む治療方法、そのような結合メンバーを含む医薬組成物、および投与用医薬品の製造における、例えば結合メンバーを薬学的に許容可能な賦形剤とともに製剤化することを含む医薬品または医薬組成物の作製方法におけるそのような結合メンバーの使用を提供する。薬学的に許容可能な賦形剤は、医薬組成物に入るが二次反応を引き起こさず、例えば結合メンバーの投与を容易にし、体内でのその寿命および/またはその効力を増加させ、溶液中のその溶解度を増加させ、またはそうでなければその保存を改善する化合物または化合物の組合せであり得る。これらの薬学的に許容可能なビヒクルは周知であり、選択される活性化化合物の性質および投与様式に応じて、当業者により適合させる。

10

【0247】

本明細書に記載の結合メンバーは、通常、結合メンバーに加えて少なくとも1つの成分を含み得る医薬組成物の形態で投与される。したがって、本発明による医薬組成物、および本発明により使用される医薬組成物は、結合メンバーに加えて、当業者に周知の薬学的に許容可能な賦形剤、担体、緩衝液、安定剤または他の材料を含み得る。そのような材料は無毒で、活性成分の効力を干渉しないべきである。担体または他の材料の厳密な性質は投与経路に依存し、経路は、以下で考察されるとおり、経口、吸入、気管内、局所、関節内、嚢内であるかまたは注射による経路であり得る。

20

【0248】

経口投与用の医薬組成物、例えば単一ドメイン抗体分子（例えば「nanobodies（商標）」）なども、本発明において想定される。そのような経口製剤は、錠剤、カプセル剤、散剤、液体または半固体形態であり得る。錠剤は、固体担体、例えばゼラチンまたはアジュバントを含み得る。液体医薬組成物は、一般に、液体担体、例えば水、石油、動物油または植物油、鉱油または合成油を含む。生理食塩水溶液、デキストロスまたは他の糖類溶液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールを含めることができる。

30

【0249】

静脈内注射、または罹患部位における注射（例えば、関節内注射）について、活性成分は、パイロジェンフリーの、好適なpH、等張性および安定性を有する、非経口的に許容可能な水溶液の形態である。当業者は、例えば等張性ビヒクル、例えば塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、乳酸化リンガー注射液を使用して、好適な溶液を調製することが十分に可能である。保存剤、安定剤、緩衝液、酸化防止剤および/または他の添加物を必要に応じて用いることができ、それには、緩衝液、例えばリン酸、クエン酸および他の有機酸；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン；保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；塩化ヘキサメチウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3'-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；単糖、二糖および他の炭水化物、例としてグルコース、マンノースまたはデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成カウンターイオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および/または非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

40

50

【0250】

本明細書に記載の結合メンバーは、分子の物理化学的特性および送達経路に応じて、液体、半固体または固体形態で製剤化することができる。製剤は、賦形剤、または賦形剤の組合せ、例えば：糖、アミノ酸および界面活性剤を含み得る。液体製剤は、広範囲の抗体濃度およびpHを含み得る。固体製剤は、例えば、凍結乾燥、噴霧乾燥、または超臨界流体技術による乾燥により産生することができる。抗IL-18の製剤は、意図される送達経路に依存し：例えば、肺送達用製剤は、吸入時に肺に深く浸透することを保証する物性を有する粒子からなり得；局所製剤（例えば瘻痕、例えば真皮瘻痕治療用の局所製剤）は、薬物が作用部位に留まる時間を延長する粘性改変剤を含み得る。結合メンバーは、結合メンバーを急速な放出から保護する担体とともに調製することができ、例えば制御放出製剤であり、それには、移植片、経皮貼付剤、およびマイクロカプセル化送達系が含まれる。生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を使用することができる。そのような製剤を調製するための多数の方法が当業者に公知である [Robinson, J. R. ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク, 1978]。

10

【0251】

抗IL-18治療は、経口で（例えば単ドメイン抗体分子（例えば「nanobodies（商標）」）など）、注射により（例えば皮下、関節内、静脈内、腹膜内、動脈内または筋肉内注射により）、吸入により、気管内、嚢内経路（膀胱内への点滴注入）によって、または局所的（例えば眼内、鼻内、経直腸、創傷内、皮膚上）に施すことができる。治療は、パルス注入により、特に傾斜用量の結合メンバーを用いて施行することができる。投与経路は、治療の物理化学的特性により、疾患に関する特別な配慮により、または効力を最適化するかもしくは副作用を最小化する必要性により決定することができる。特定の一投与経路は静脈内経路である。本発明の医薬組成物を投与する別の経路は皮下経路である。抗IL-18治療は診療所における使用に制限されないことが想定される。したがって、無針デバイスを使用する皮下注射も有利である。

20

【0252】

組成物は、単独でまたは他の治療と組み合わせ、治療すべき病態に応じて同時にもしくは連続して投与することができる。

30

【0253】

IL-18についての結合メンバーは、追加の医薬構成要素と組み合わせた併用療法の部分として使用することができる。併用治療、特に抗IL-18結合メンバーおよび1つ以上の他の薬物の組合せを使用して顕著な相乗効果を提供することができる。IL-18についての結合メンバーは、本明細書に列記される病態の1つ以上の治療のために、別の1つまたは複数の治療剤と同時にまたは連続してまたは組合せ調製物として投与することができる。

【0254】

本発明による結合メンバーは、以下の薬剤の1つ以上と組み合わせまたはそれらに加えて提供することができる：

40

- サイトカインまたはサイトカイン機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト（例えばサイトカインシグナリング経路に作用する薬剤、例えばSOC S系のモジュレーター）、例えばアルファ-、ベータ-および/またはガンマ-インターフェロン；インシュリン様成長因子I型（IGF-1）、その受容体および関連結合タンパク質；インターロイキン（IL）、例えばIL-1からIL-37の1つ以上、および/またはインターロイキンアンタゴニストまたはインヒビター、例えばアナキナラ；インターロイキンファミリーメンバーの受容体のインヒビターまたはそのような受容体の特定サブユニットのインヒビター（例えば、トシリズマブ（Actemra（商標）；Roche）、ヒトIL-6受容体に対するヒト化IgG1モノクローナル抗体）、腫瘍壊死因子アルファ（TNF-）

50

インヒビター、例えば抗TNFモノクローナル抗体（例えばインフリキシマブ、アダリムマブおよび/またはCDP-870）および/またはTNF受容体アンタゴニスト、例えば免疫グロブリン分子（例えばエタネルセプト）および/または低分子量薬剤、例えばペントキシフィリン；

- B細胞のモジュレーター、例えばBリンパ球を標的化するモノクローナル抗体（例えばCD20（リツキシマブ）またはMRA-aIL16R）またはTリンパ球を標的化するにすもの（例えばCTLA4-Ig、HuMax IL-15またはアバタセプト）；

- 破骨細胞活性を阻害するモジュレーター、例えばRANKLに対する抗体；

- ケモカインまたはケモカイン受容体機能のモジュレーター、例えばCCR1、CCR2、CCR2A、CCR2B、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10およびCCR11（C-Cファミリーについて）；CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4およびCXCR5およびCXCR6（C-X-Cファミリーについて）ならびにCX₃CR1（C-X₃-Cファミリーについて）のアンタゴニスト；

- マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、すなわちストロメライシン、コラゲナーゼおよびゼラチナーゼならびにアグリカナーゼ、特にコラゲナーゼ-1（MMP-1）、コラゲナーゼ-2（MMP-8）、コラゲナーゼ-3（MMP-13）、ストロメライシン-1（MMP-3）、ストロメライシン-2（MMP-10）および/またはストロメライシン-3（MMP-11）および/またはMMP-9および/またはMMP-12の1つ以上のインヒビター、例えばドキシサイクリンなどの薬剤；

- ロイコトリエン生合成インヒビター、5-リポキシゲナーゼ（5-LO）インヒビターまたは5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質（FLAP）アンタゴニスト、例えばジレウトン；ABT-761；フェンレウトン；テボキサリン；Abbot-79175；Abbot-85761；N-（5-置換）-チオフェン-2-アルキルスルホンアミド；2,6-ジ-tert-ブチルフェノールヒドラゾン；メトキシテトラヒドロピラン、例えばZeneca ZD-2138；化合物SB-210661；ピリジニル置換2-シアノナフタレン化合物、例えばL-739,010；2-シアノキノリン化合物、例えばL-746,530；インドールおよび/またはキノリン化合物、例えばMK-591、MK-886および/またはBAYx1005；

- フェノチアジン-3-1、例えばL-651,392；アミジノ化合物、例えばCGS-25019c；ベンゾキサミン（benzoxalamines）、例えばオンタゾラスト；ベンゼンカルボキシミドアミド、例えばBIIL284/260；および化合物、例えばザフィルルカスト、アブルカスト、モンテルカスト、ブランルカスト、ベルルカスト（MK-679）、RG-12525、Ro-245913、イラルカスト（CGP45715A）およびBAYx7195からなる群から選択されるロイコトリエン（LT）B4、LTC4、LTD4、およびLTE4の受容体アンタゴニスト；

- ホスホジエステラーゼ（PDE）インヒビター、例えばメチルキサントニン（methylxanthanine）、例えばテオフィリンおよび/またはアミノフィリン；および/または選択的PDEアイソザイムインヒビター、例えばPDE4インヒビターおよび/またはアイソフォームPDE4Dのインヒビターおよび/またはPDE5のインヒビター；

- ヒスタミン1型受容体アンタゴニスト、例えばセチリジン、ロラタジン、デスロラタジン、フェキソフェナジン、アクリバスチン、テルフェナジン、アステミゾール、アゼラスチン、レボカバスチン、クロルフェニラミン、プロメタジン、シクリジン、および/またはミゾラスチン（一般に、経口、局所または非経口で適用される）；

- プロトンポンプインヒビター（例えばオメプラゾール）または胃保護性ヒスタミン2型受容体アンタゴニスト；

- ヒスタミン4型受容体のアンタゴニスト；

- アルファ-1/アルファ-2アドレナリン受容体アゴニスト血管収縮性交感神経様作

10

20

30

40

50

用剤、例えばプロピルヘキセドリン、フェニレフリン、フェニルプロパノールアミン、エフェドリン、シュードエフェドリン、塩酸ナファゾリン、塩酸オキシメタゾリン、塩酸テトラヒドロゾリン、塩酸キシロメタゾリン、塩酸トラマゾリンおよび塩酸エチルノルエビネフリン；

- 抗コリン作動剤、例えばムスカリン受容体（M1、M2、およびM3）アンタゴニスト、例えばアトロピン、ヒヨスチン、グリコピロレート、臭化イプラトロピウム、臭化チオトロピウム、臭化オキシトロピウム、ピレンゼピンおよびテレンゼピン；

- ベータ-アドレナリン受容体アゴニスト（例としてベータ受容体サブタイプ1~4）、例えばイソプレナリン、サルブタモール、ホルモテロール、サルメテロール、テルブタリン、オルシプレナリン、メシル酸ピトルテロールおよび/またはビルブテロール、例えばそのキラリエナンチオマー；

- クロモン、例えばクロモグリク酸ナトリウムおよび/またはネドクロミルナトリウム；

- PDE-4インヒビター、例えばロフルミラスト

- グルココルチコイド、例えばフルニソリド、トリアムシノロンアセトニド、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ブデソニド、プロピオン酸フルチカゾン、シクレソニド、および/またはフランカルボン酸モメタゾン；

- 核ホルモン受容体、例えばPPARをモジュレートする薬剤；

- 免疫グロブリン（Ig）もしくはIg調製物またはIg機能をモジュレートするアンタゴニストもしくは抗体、例えば抗IgE（例えばオマリズマブ）；

- 他の全身または局所適用の抗炎症剤、例えばサリドマイドもしくはその誘導体、レチノイド、ジトラノールおよび/またはカルシポトリオール；

- アミノサリチル酸およびスルファピリジンの組合せ、例えばスルファサラジン、メサラジン、バルサラジド、およびオルサラジン；ならびに免疫調節剤、例えばチオプリン；およびコルチコステロイド、例えばブデソニド；

- 抗菌剤、例えばペニシリン誘導体、テトラサイクリン、マクロライド、ベータ-ラクタム、フルオロキノロン、メトロニダゾールおよび/もしくは吸入アミノグリコシド；ならびに/または抗ウイルス剤、例えばアシクロビル、ファムシクロビル、バラシクロビル、ガンシクロビル、シドフォビル；アマンタジン、リマンタジン；リバビリン；ザナミビル（zanamavir）および/またはオセルタマビル（oseltamavir）；プロテアーゼインヒビター、例えばインジナビル、ネルフィナビル、リトナビルおよび/またはサキナビル；ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、例えばジダノシン、ラミブジン、スタブジン、ザルシタピン、ジドブジン；非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、例えばネビラピン、エファビレンツ；または抗体、例えばパリビズマブ（Synagis（商標））；

- 心血管作動剤、例えばチアジドまたはループ利尿薬；血管拡張剤、例えばニトログリセリン、カルシウムチャンネルブロッカー、アルファ-アドレナリン受容体ブロッカー、ベータ-アドレナリン受容体ブロッカーまたはアルファおよびベータ-アドレナリン受容体ブロッカーの組合せ、アンギオテンシン変換酵素（ACE）インヒビター、アンギオテンシン-2受容体アンタゴニスト；アルドステロンアンタゴニストまたはカリウム保持性利尿薬；脂質低下剤、例えばスタチン、コレステロール吸収インヒビターおよび/またはフィブレート；血液細胞形態のモジュレーター、例えばペントキシフィリン；血栓溶解剤および/または抗凝血剤、例えば血小板凝集インヒビター；

- CNS作動剤、例えば抗うつ剤（例えばセルトラリン）、抗パーキンソン薬（例えばデプレニル、L-ドーパ、ロピニロール、プラミベキソール；MAOBインヒビター、例えばセレギンおよびラサギリン；comPインヒビター、例えばtasmar；A-2インヒビター、ドーパミン再取り込みインヒビター、NMDAアンタゴニスト、ニコチンアゴニスト、ドーパミンアゴニストおよび/またはニューロン-酸化窒素シンターゼのインヒビター）および抗アルツハイマー薬、例えばドネペジル、リバスチグミン、タクリン、COX-2インヒビター、プロベントフィリンまたはメトリホネート；

10

20

30

40

50

- 急性および慢性疼痛を治療するための薬剤、例えば中枢または末梢作用鎮痛薬、例えばオピオイド類似体または誘導體、カルバマゼピン、フェニトイン、バルプロ酸ナトリウム、アミトリプチリンまたは他の抗うつ剤、パラセタモール、または非ステロイド性抗炎症剤；

- 非経口または局所適用（吸入を含む）局所麻酔剤、例えばリグノカインまたはその類似体；

- 抗骨粗鬆症剤、例えばホルモン剤、例えばラロキシフェン、またはビホスホネート、例えばアレンドロネート；

- (i) トリプターゼインヒビター；(ii) 血小板活性化因子(PAF)アンタゴニスト；(iii) インターロイキン変換酵素(ICE)インヒビター；(iv) IMPDHインヒビター；(v) 接着分子インヒビター、例としてVLA-4アンタゴニスト；(vi) カテプシン；(vii) キナーゼインヒビター、例えばチロシンキナーゼのインヒビター（例えばBtk、Itk、Jak3MAPインヒビターの例にはゲフィチニブ、メシル酸イマチニブが含まれる）、セリン/スレオニンキナーゼ（例えばMAPキナーゼ、例えばp38、JNK、プロテインキナーゼA、BおよびCならびにIKKのインヒビター）、または細胞周期調節に關与するキナーゼ（例えばサイクリン依存性キナーゼ）；

(viii) グルコース-6リン酸デヒドロゲナーゼインヒビター；(ix) キニン-B₁-および/またはB₂-受容体アンタゴニスト；(x) 抗痛風剤、例えばコルヒチン；(xi) キサンチンオキシダーゼインヒビター、例えばアロプリノール；(xii) 尿酸排泄剤、例えばプロベネシド、スルフィンピラゾン、および/またはベンズプロマロン；(xiii) 成長ホルモン分泌促進剤；(xiv) トランスフォーミング成長因子(TGF)；(xv) 血小板由来成長因子(PDGF)；(xvi) 線維芽細胞成長因子、例えば塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)；(xvii) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)；(xviii) カプサイシンクリーム；(xix) タキキニンNK₁および/またはNK₃受容体アンタゴニスト、例えばNK₁-608C、SB-233412（タルネタント）および/またはD-4418；(xx) エラスターゼインヒビター、例えばUT-77および/またはZD-0892；(xxi) TNF-アルファ変換酵素インヒビター(TACE)；(xxii) 誘導性一酸化窒素シンターゼ(iNOS)インヒビターまたは(xxxiii) TH2細胞上で発現される化学誘引物質受容体相同分子（例えばCRTH2アンタゴニスト）；(xxiv) P38のインヒビター(xxxv) Toll様受容体(TLR)の機能をモジュレートする薬剤および(xxxvi) プリン受容体の活性をモジュレートする薬剤、例えばP2X7；(xxvii) 転写因子活性化、例えばNFκB、API、および/またはSTATSのインヒビターまたは(xxxviii) カスパーゼインヒビター、例えばBoc-Asp-FMK、z-VAD-FMK、YVAD-FMK、Ac-WEHD-CHO、Ac-DEVD-CHO、Ac-YVADCHO、t-ブトキシカルボニル-IETD-CHO、およびt-ブトキシカルボニル-AEVD-CHO。

【0255】

インヒビターは特異的であるか、または混合インヒビター、例えば上記の分子（例えば受容体）または分子クラスの2つ以上を標的化するインヒビターであり得る。

【0256】

結合メンバーは、化学療法剤または別のチロシンキナーゼインヒビターと会合させて同時投与でまたはイムノコンジュゲートの形態で使用することもできる。前記抗体の断片は、組換え機構または生化学的カップリングおよび次いで上記抗体の特異性を、IL-18が關連する活性に關与する他の分子を認識し得る他の抗体の特異性と会合させることにより得られる二重特異性抗体において使用することもできる。

【0257】

炎症性疾患、例えば、上記炎症性病態、例えば関節リウマチ、骨関節炎、喘息、アレルギー、アレルギー性鼻炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、乾癬、全身性エリテマトーデス、全身性若年性特発性関節炎、自己免疫疾患、座瘡、血管炎、およびスティル病の治療

【0258】

【0259】

【0260】

【0261】

【0262】

【0263】

【0264】

【0265】

【0266】

【0267】

【0268】

【0269】

【0270】

【0271】

【0272】

10

20

30

40

50

について、本発明の結合メンバーを、1つ以上の薬剤、例えば局所適用であるか全身適用であるかにかかわらず非ステロイド性抗炎症剤（以後NSAID）、例として非選択的シクロオキシゲナーゼ（COX）-1/COX-2インヒビター、例えばピロキシカム、ジクロフェナク、プロピオン酸、例えばナプロキセン、フルルビプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェンおよびイブプロフェン、フェナメート、例えばメフェナム酸、インドメタシン、スリンダク、アザプロパゾン、ピラゾロン、例えばフェニルブタゾン、サリチレート、例えばアスピリン）；選択的COX-2インヒビター（例えばメロキシカム、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、ルマロコキシブ（lumarcoxi b）、パレコキシブおよびエトリコキシブ）；シクロオキシゲナーゼ阻害-酸化窒素ドナー（CINOD）；グルココルチコステロイド（局所、経口、筋肉内、静脈内または関節内経路による投与のいずれでもよい）；メトトレキセート、レフルノミド；ヒドロキシクロロキン、d-ペニシラミン、オーラノフィンまたは他の非経口もしくは経口金製剤；鎮痛薬；ジアセレイン；関節内治療薬、例えばヒアルロン酸誘導体；および栄養補助食品、例えばグルコサミンと組み合わせることができる。

【0258】

本明細書に記載の結合メンバーは癌を治療するための既存の治療剤と組み合わせて使用することもできる。組み合わせるために好適な薬剤には、以下のものが含まれる：

(i) 内科的腫瘍学において使用される抗増殖性/抗悪性腫瘍薬およびその組合せ、例えばGleevec（メシル酸イマチニブ）、アルキル化剤（例えばシスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロランブシル、ブスルファンおよびニトロソウレア）；代謝拮抗剤（例えば葉酸拮抗剤、例えばフルオロピリミジン、例えば5-フルオロウラシルおよびテガフル、ラルチトレキセド、メトトレキセート、シトシンアラビノシド、ヒドロキシウレア、ゲムシタピンおよびバクリタキセル）；抗腫瘍性抗生物質（例えばアントラサイクリン、例えばアドリアマイシン、ブレオマイシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、エビルピシン、イダルピシン、マイトマイシン-C、ダクチノマイシンおよびミトラマイシン）；有糸分裂阻害剤（例えばピンカアルカロイド、例えばピンクリスチン、ピンラスチン、ピンデシンおよびピノレルピンおよびタキソイド、例えばタキソールおよびタキソテル）；およびトポイソメラーゼインヒビター（例えばエピドフィロトキシン、例えばエトポシドおよびテニポシド、アムサクリン、トポテカンおよびカンプトセシン）；

(ii) 細胞増殖抑制剤、例えば抗エストロゲン剤（例えばタモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロキシフェンおよびヨードキシフェン（iodoxyfene））、エストロゲン受容体下方調節因子（例えばフルベストラント）、抗アンドロゲン剤（例えばピカルタミド、フルタミド、ニルタミドおよび酢酸シプロテロン）、LHRHアンタゴニストまたはLHRHアゴニスト（例えばゴセレリン、ロイプロレリンおよびブセレリン）、プロゲステゲン（例えば酢酸メゲストロール）、アロマターゼインヒビター（例えばアナストロゾール、レトロゾール、ボラゾール（vorazole）およびエキセメスタンとして）および5-レダクターゼのインヒビター、例えばフィナステリド；

(iii) 癌細胞侵襲を阻害する薬剤（例えばメタロプロテイナーゼインヒビター、例えばマリマスタットおよびウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター受容体機能のインヒビター）；

(iv) 成長因子機能のインヒビター、例えば、そのようなインヒビターには、成長因子抗体、成長因子受容体抗体（例えば抗erbB2抗体トラスツズマブおよび抗erbB1抗体セツキシマブ[C225]）、ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、チロシンキナーゼインヒビターおよびセリン/スレオニンキナーゼインヒビター、例えば上皮細胞成長因子ファミリーのインヒビター（例えばEGFRファミリーチロシンキナーゼインヒビター、例えばN-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン-4-アミン（ゲフィチニブ、AZD1839）、N-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-

10

20

30

40

50

4 - アミン (エルロチニブ、OSI - 774) および 6 - アクリルアミド - N - (3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) - 7 - (3 - モルホリノプロポキシ) キナゾリン - 4 - アミン (CI 1033)、例えば血小板由来成長因子ファミリーのインヒビターおよび例えば肝細胞成長因子ファミリーのインヒビターが含まれ；

(v) 血管新生阻害剤、例えば血管内皮成長因子の効果を阻害するもの (例えば抗血管内皮細胞成長因子抗体ベバシズマブ、国際公開第 97 / 22596 号パンフレット、国際公開第 97 / 30035 号パンフレット、国際公開第 97 / 32856 号パンフレットおよび国際公開第 98 / 13354 号パンフレットに開示されている化合物等の化合物および他の機構により作用する化合物 (例えばリノマイド、インテグリン v 3 機能のインヒビターおよびアンギオスタチン)；

(v i) 血管損傷剤、例えばコンプレタスタチン A 4 および国際公開第 99 / 02166 号パンフレット、国際公開第 00 / 40529 号パンフレット、国際公開第 00 / 41669 号パンフレット、国際公開第 01 / 92224 号パンフレット、国際公開第 02 / 04434 号パンフレットおよび国際公開第 02 / 08213 号パンフレット (そのそれぞれは、全体として本明細書に組み込まれる) に開示されている化合物；

(v i i) アンチセンス治療薬、例えば上記列挙される標的に指向されるもの、例えば ISIS 2503、抗 r a s アンチセンス；

(v i i i) 遺伝子治療アプローチ、例として例えば異常遺伝子、例えば異常 p 53 または異常 B R C A 1 もしくは B R C A 2 を置き換えるアプローチ、G D E P T (遺伝子指向性酵素プロドラッグ治療) アプローチ、例えばシトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼまたは細菌性ニトロレダクターゼ酵素を使用するアプローチおよび化学療法または放射線療法に対する患者の耐容性を増加させるアプローチ、例えば多剤耐性遺伝子治療；ならびに

(i x) 免疫療法アプローチ、例として例えば患者腫瘍細胞の免疫原性を高めるエクスピボおよびインビボアプローチ、例えばサイトカイン、例えばインターロイキン 2、インターロイキン 4 または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子による形質移入、T 細胞不応答を減少させるアプローチ、形質移入された免疫細胞、例えばサイトカインにより形質移入された樹状細胞を使用するアプローチ、サイトカインにより形質移入された腫瘍細胞系を使用するアプローチおよび抗イディオタイプ抗体を使用するアプローチ。

【0259】

IL - 18 についての結合メンバーおよび上記の追加医薬構成要素の 1 つ以上を医薬品の製造において使用することができる。医薬品は個体に対する別個または組合せ投与用であり得、したがって結合メンバーおよび追加の構成要素を組合せ調製物または別個の調製物として含み得る。別個の調製物を使用して、別個の連続する投与または同時投与を促進し、異なる経路、例えば経口および非経口投与による構成要素の投与を可能にする。

【0260】

提供される組成物は、哺乳動物に投与することができる。通常、投与は「治療有効量」で行われ、それは患者に利益を示すために十分な量である。そのような利益は少なくとも 1 つの症状の少なくとも改善であり得る。実際の投与量、ならびに投与の割合および時間経過は、治療されるものの性質および重症度、治療対象の具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床的状态、疾患の原因、組成物の送達部位、結合メンバーのタイプ、投与方法、投与計画および医師に公知の他の要因に依存する。治療の処方、例えば用量などの決定は一般開業医および他の医師の責任の範囲内であり、症状の重症度および / または治療される疾患の進行に依存し得る。抗体の適切な用量は当技術分野において周知である。投与される医薬品のタイプに応じて本明細書または Physician's Desk Reference (2005) に記載の具体的な用量を適宜使用することができる。本発明の結合メンバーの治療有効量または好適な用量は、そのインビボ活性および動物モデルにおけるインビボ活性を比較することにより決定することができる。試験動物における有効投与量をヒトに対して外挿する方法が公知である。厳密な用量は、多数の要因、例として抗体が診断用であるか、予防用であるかまたは治療用であるか、治療すべき領域のサイズおよび

10

20

30

40

50

位置、抗体の厳密な性質（例えば完全抗体、断片またはダイアボディ）および抗体に付着している任意の検出可能な標識または他の分子の性質に依存する。典型的な抗体用量は、全身適用について100 μgから1gの範囲であり、局所適用について1 μgから1mgの範囲である。最初に高負荷用量を投与し、次いで1回以上の低用量を投与することができる。典型的には、抗体は完全抗体であり、例えばIgG1アイソタイプである。これは成体患者の単回治療についての用量であり、小児および乳児に関して比例的に調節することができる、分子量に比例して他の抗体フォーマットについて調節することもできる。治療は、医師の裁量において毎日、週2回、毎週または毎月の間隔で繰り返すことができる。治療は、皮下投与について2から4週毎であり得、静脈内投与について4から8週毎であり得る。治療は定期的であり得、投与間の期間は約2週間以上、例えば約3週間以上、約4週間以上、または約月1回である。治療は、外科手術前および/もしくは後に施すことができ、ならびに/または外科治療の解剖部位に直接投与または適用することができる。

10

【0261】

本発明の種々のさらなる態様および実施形態は、本開示に照らして当業者に明らかである。

【0262】

本明細書に挙げられる全ての文献、例として、データベースリファレンスおよびアクセッション番号、特許、特許出願および刊行物は、全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0263】

本明細書において使用される「および/または」は、他方を有するかまたは有さない2つの指定の特徴または構成要素のそれぞれの指定の開示と解釈すべきである。例えば、「Aおよび/またはB」は、それぞれが個々に本明細書に記載されるかのとおり(i)A、(ii)Bならびに(iii)AおよびBのそれぞれの指定の開示と解釈すべきである。

20

【0264】

特に文脈に記載のない限り、上記特徴の記載および定義は、本発明のいかなる特定の態様にも実施形態にも限定されるものではなく、記載される全ての態様および実施形態に等しく当てはまる。

【0265】

本発明のある態様および実施形態を、目下、実施例として、および付属の図面および表を参照して説明する。

30

【実施例】

【0266】

実施例1

抗-18抗体生成およびリード選択

1.1 組換えヒトIL-18抗原の発現および精製

細菌発現のためのヒトIL-18(Uniprot登録番号Q14116-1;配列番号169)を、pET21aベクター(Novagen)中にクローニングし、大腸菌(E.coli)BL21DE3*中で発現させた。構築物は、N末端GSTタグ、ヒスチジンタグ(8xHis)をXa因子開裂部位と一緒に含むようにインハウスで生成した。可溶性発現後、タンパク質を標準的親和性クロマトグラフィーを使用する精製に付し、次いでXa因子開裂し、サイズ排除精製して生物学的に活性なヒトIL-18を生成した。

40

【0267】

ヒトIL-18のパキユロウイルス発現のため、構築物は、N末端Flagタグおよびヒスチジンタグを有するように設計した。構築物をpDONR221(Invitrogen, Paisley, UK)中にクローニングし、製造業者の指示書に従って昆虫細胞中の発現のための目的ベクターpDEST8(Invitrogen, Paisley, UK)に移した。タンパク質は、標準的親和性およびサイズ排除クロマトグラフィー技術により精製した。

【0268】

50

IL-18のビオチン化を、EZ-linkビオチン-BMCC試薬(Thermo Fisher Scientific, Rochester NY;カタログ番号21900)を使用して遊離システイン上でSH基を介して行った。

【0269】

1.2 選択

繊維状ファージM13に基づくファージミドベクター中にクローニングされたナイーブヒト一本鎖Fv(scFv)ファージディスプレイライブラリーを選択に使用した(Vaughan他(1996)Nature Biotechnology 14(3):309-14;Lloyd他(2009)Protein Eng Des Sel.(3):159-68;Hutchings他(2001)Generation of Naive Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, Ed. by R. Kontermann & S. Dubel, Springer Laboratory Manuals, Berlin, p93;Groves他(2006)J Immunol Methods. 313(1-2):129-39)。Vaughan他((1996)Nature Biotechnology 14(3):309-14)およびHawkins他((1992)Journal of Molecular Biology 226, 889-896)により本質的に既に記載されているとおり、組換えヒトIL-18(Medical and Biological Laboratories Co., 日本, 名古屋)に基づく一連の選択サイクルを使用してファージディスプレイライブラリーから抗IL-18特異的scFv抗体を単離した。簡潔に述べると、パニング選択の第1ラウンドについて、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS, pH7.4)中のヒトIL-18を、Nunc(商標)maxisorpマイクロタイタープレート(Thermo Fisher Scientific, Rochester NY;カタログ番号439454)のウェル上に4において一晚、事前に吸着させたラット抗IL-18モノクローナル抗体、クローン159-12B(Medical and Biological Laboratories, Japan;カタログ番号D045-3)により特異的に捕捉させた。ウェルをPBSにより洗浄し、次いでPBS-Marvel(3%w/v)により1時間ブロッキングした。4倍過剰の捕捉抗体、ラット抗IL-18モノクローナル抗体を含有するPBS-Marvel(3%w/v)中の精製ファージを除外プレート(maxisorpマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させたラット抗IL-18モノクローナル抗体)のウェルに1時間添加してからコーティングされた抗原(組換えヒトIL-18)と1時間結合させた。未結合ファージをPBS-Tween(0.1%v/v)およびPBSを使用する一連の洗浄サイクルにより除去した。結合したファージ粒子を溶出させ、大腸菌(E.coli)TG1細菌中に感染させ、次の選択ラウンドのためにレスキューした(Vaughan他(1996)Nature Biotechnology 14(3):309-314)。第2ラウンドの選択を、ファージ粒子を100nMのビオチン化IL-18とインキュベートすることにより溶液中で実施し、次いで上記のラット抗IL-18モノクローナル抗体捕捉選択の第3ラウンドを実施した。

【0270】

1.3 IL-18受容体アルファおよびベータ鎖へのIL-18結合の未精製scFvによる障害

ペリプラズム調製物からの未精製scFvを、EnVisionプレートリーダー(PerkinElmer, Boston MA)を使用するホモジニアス時間分解蛍光(HTRF(登録商標)、CIS Bio international)受容体リガンド結合アッセイにおいてスクリーニングした。ヒトIL-18Rアルファ鎖([IL-18R];R&D Systems, Minneapolis, MN;カタログ番号816-LR)のユウロピウムクリプテート標識を、トリスピリジン-Eu3+-クリプテート-NHS(CIS bio International, フランス, パニョル・シュル・セズ(Bagnols-sur-Ceze);カタログ番号65EUSABA)をpH

8のPBS中で製造業者の指示書に従って使用して達成した。ヒトIL-18Rベータ鎖([IL-18R]; R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号118-AP)は、EZlinkスルホ-NHS-LC-ビオチン(Thermo Fisher Scientific, Rochester NY; カタログ番号21335)をpH8のPBS中で使用して遊離アミンを介してビオチン化した。HTRF(商標)アッセイにおいて、未精製scFv試料は、ヒト組換えIL-18のその受容体、ユウロピウムクリプテート標識ヒトIL-18R およびビオチン化ヒトIL-18Rへの結合相互作用について競合した。選択産物は、50mMのMOPS緩衝液pH7.4、0.5mMのEDTAおよび0.5Mのソルビトール中で調製されたscFvを含有する未精製細菌ペリプラズム抽出物としてスクリーニングした。5マイクロリットルの未精製scFv試料をCostar(登録商標)384ウェルアッセイプレート(Corning; Lowell, MA; カタログ番号77776-818)に添加した。この後に、5μlの6nM組換えヒトIL-18(インハウス、大腸菌(E. coli)由来)を添加し、次いで10nMのビオチン化IL-18R、2.5nMのユウロピウムクリプテート標識IL-18R および30nMのストレプトアビジンXlent!(Cis Bio International, フランス, パニョル・シュル・セズ(Bagnols-sur-Ceze); カタログ番号611SAXLB)を含有する10μlの混合物を添加した。非特異的結合は、対照マウスモノクローナル抗ヒトIL-18抗体(Medical & Biological Laboratories Co., 日本, 名古屋; クローン125-2H)を5nM最終濃度においてペリプラズム抽出物に代えて使用して測定した。全ての希釈は、0.4MのKFおよび0.1%のBSAを含有するPBS(アッセイ緩衝液)中で実施した。アッセイプレートを、室温において4時間インキュベートしてから、EnVisionプレートリーダー(Perkin Elmer, Waltham, Ma)を使用してユウロピウム分子を320nmにおいて励起させ、ユウロピウム分子についての620nmにおける発光およびXL665分子についての665nm発光波長を計測することにより時間分解蛍光を読み取った。

10

20

【0271】

データを、それぞれの試料についてデルタF%値を算出することにより分析した。デルタFを式1に従って決定した。

30

【0272】

式1:

【数1】

$$\text{デルタF\%} = \frac{(\text{試料 665nm/620nm 比值}) - (\text{非特異的対照 665nm/620nm 比值})}{(\text{非特異的対照 665nm/620nm 比值})} \times 100$$

【0273】

続いて、デルタF%値を使用して特異的結合%を式2に記載のとおり算出した。

【0274】

式2:

【数2】

40

$$\text{特異的結合\%} = \frac{\text{試料のデルタF\%}}{\text{全結合対照のデルタF\%}} \times 100$$

【0275】

1.4 IL-18受容体アルファおよびベータ鎖へのIL-18結合の精製scFvによる阻害

未精製ペリプラズム抽出物としてIL-18受容体アルファおよび受容体ベータ結合相互作用に対して顕著な阻害効果を示したscFv抽出物を、DNAシーケンシングに供した(Vaughan他(1996) Nature Biotechnology 14:

50

309-314; Osbourn 他 (1996) Immunotechnology . 2 , 181-196)。特有の配列を有する scFv を大腸菌 (E. coli) 中で発現させ、親和性クロマトグラフィーにより精製した (Bannister 他 (2006) Biotechnology and bioengineering , 94.931-937 により記載のとおり)。未精製 scFv ペリプラズム抽出物を精製 scFv に置換して、セクション 1.3 に記載の HTRF (商標) アッセイにおける希釈系列の精製 scFv を試験することにより平均 scFv (av scFv) の効力を測定した。

【0276】

セクション 1.3 に記載のとおりデルタ F % 値および特異的結合 % を算出することによりデータを分析した。IC₅₀ 値は、GraphPad Prism ソフトウェアを使用して、4 パラメータロジスティック式を使用する曲線フィッティングにより算出した (式 3)。

【0277】

式 3 :

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\exp((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

X は、濃度の対数である。

Y は、特異的結合である

【0278】

図 1 に説明されるとおり、抗体 1 の精製 scFv 調製物は、IL-18 受容体複合体の形成を 12 nM (n = 1) の IC₅₀ 値で阻害した。

【0279】

1.5 抗体 1 scFv の IgG2 への再フォーマット化

完全ヒト抗体重鎖および軽鎖をそれぞれ発現するベクター中に可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL) ドメインをサブクロニングすることにより、抗体 1 scFv を IgG₂ に再フォーマット化した。哺乳動物細胞中で完全 IgG₂ 重鎖を発現させるためのヒト重鎖定常ドメインおよび調節エレメントを含有する哺乳動物発現ベクター (pEU9.2) 中に可変重鎖をクロニングした。同様に、哺乳動物細胞中で完全 IgG 軽鎖を発現させるためのヒト軽鎖定常ドメインおよび調節エレメントの発現のための哺乳動物発現ベクター (pEU3.4) 中に可変軽鎖ドメインをクロニングした。重鎖および軽鎖の発現のためのベクターは、Persic 他, (1997) Gene 187:9-18 に最初に記載された。抗体 1 を IgG₂ として得るため、重鎖および軽鎖 IgG 発現ベクターを HEK293-EBNA 哺乳動物細胞中に一過的に形質移入し、抗体を発現させ、培地中に分泌させた。回収した培地を精製前に遠心分離により澄清化した。IgG は、プロテイン A (GE Healthcare) を使用して精製した。培養上清を、50 mM の Tris、0.15 M の NaCl pH 8 緩衝液中で事前に平衡化した 1 ml カラム上にロードした。0.1 M のシトレート pH 3 を使用してカラムから 1 M の Tris pH 10 中に IgG を直接溶出させた。溶出物は、NAP-10 緩衝液交換カラム (GE Healthcare) を使用して 1 x DPBS への緩衝液交換に付した。精製 IgG は、0.2 マイクロメートル滅菌濾過し、内毒素について分析し、SDS PAGE により特性決定し、280 nm における吸光度により濃度測定した。

【0280】

1.6 抗体 1 IgG2 による IL-18 受容体アルファおよびベータへの IL-18 結合の阻害

上記のとおり、IL-18、IL-18R および IL-18R 複合体の形成を提示した精製抗体 1 scFv を、組換え IgG₂ に変換した。精製抗体 1 IgG₂ を系列希釈し、セクション 1.3 に記載の HTRF (商標) IL-18 リガンド受容体アッセイにおいて試験した。抗体 1 の IgG₂ 調製物は、ヒト IL-18 / ヒト IL-18 受容体複合体の形成を 2.9 nM (幾何平均、n = 2; 図 2 A) の IC₅₀ 値で阻害した。

【0281】

10

20

30

40

50

一部の実験において、組換えヒトIL-18を、組換えアカゲザルIL-18 (R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号2548-RM; アクセション番号AAK13416) により1.5 nMの最終濃度において置換した。アカゲザルIL-18のアミノ酸配列は、カニクイザルIL-18と100%の相同性を提示する。標識ヒトIL-18受容体、検出試薬およびアッセイパラメータは、セクション1.3に記載したものと同一であった。抗体1IgG₂の調製物は、組換えアカゲザルIL-18/ヒトIL-18受容体複合体の形成を5.4 nMのIC₅₀値で阻害した(幾何平均、N=2; 図2B)。

【0282】

1.7 IL-18により刺激したKG-1細胞のIFN産生の抗体1IgG₂による阻害

組換えヒトIL-18の生物学的活性を中和する抗体1IgG₂の効力を、KG-1細胞アッセイを使用して確認した。KG-1細胞(ヒト骨髄性白血病細胞系)は、外因性組換えヒトIL-18に応答してIL-18R およびIL-18R 鎖を発現し、インターフェロン-ガンマ(IFN γ)を産生することが示されている(Konishi他(1997) J. Immunol. Methods 209(2): 187-191)。KG-1細胞(ECACC, United Kingdom; カタログ番号86111306)を、Costar(登録商標)96ウェル平底組織培養処理プレート(Corning, Lowell, MA; カタログ番号3596)中に、培養培地(5% v/vの加熱不活化FBS、100 U/mlのペニシリンおよび100 μ g/mlのストレプトマイシン[Invitrogen Corp., Paisley, UK; カタログ番号15140-122]を含有するIMDM[Invitrogen Corp., Paisley, UK; カタログ番号21980-032])中で10⁵個の細胞/100 μ l/ウェルにおいてプレーティングした。IL-18と相乗作用してIFN γ 産生を誘導することが示された組換え腫瘍壊死因子アルファ(TNF α) (R&D Systems Minneapolis, MN; カタログ番号210-TA)を、1.1 nMの最終濃度において添加した。抗体1IgG₂の効力を測定するため、U底96ウェルポリプロピレンプレート(Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria; カタログ番号650201)中で培養培地中で抗体の系列希釈物(700 nMから0.1 nMの細胞アッセイにおける最終濃度)を作製することにより試験溶液を調製した。組換えヒトIL-18(インハウス、大腸菌(E. coli)由来)をそれぞれのウェルに添加して3 ng/mlから8 ng/mlの細胞アッセイにおける最終濃度を得た。濃度は、最終濃度および1.1 nMのTNF α の存在下で最大IFN γ 分泌の約50%増加を与える用量に基づき選択した。抗体1/IgG₂混合物を室温において30~45分間インキュベートしてから100 μ lの試料を上記のとおり調製したKG-1細胞に移した。細胞を加湿雰囲気中で37 $^{\circ}$ C/5% CO₂中で22~24時間インキュベートした後、150 μ lの上清をそれぞれのウェルから回収し、IFN γ の濃度を下記のとおり測定した。

【0283】

簡潔に述べると、Nunc(商標)黒色96ウェルMaxisorpプレート(Theermo Fisher Scientific, Rochester NY; カタログ番号437111)を、4 μ g/mlの捕捉抗IFN γ 抗体(BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, NJ; カタログ番号551221; クローンNIB42)により一晚コーティングした。次いで、プレートをPBSにより洗浄し、それぞれのウェル中で3%のミルク粉末(Marvel)を含有する200 μ lのPBSによりブロッキングすることにより非特異的結合を防止した。プレートを室温において1時間インキュベートし、PBSにより3回洗浄した。次いで、ウェルを、100 μ lの1/2に希釈した実験試料または標準曲線(濃度範囲40000~39 pg/ml)を確立するために使用する系列希釈した組換えヒトIFN γ (R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号285-IF)により充填した。これらの試料を室温において1時間インキュベートし、次いで0.01%のTween-

10

20

30

40

50

20を含有するPBS中でプレートを3回洗浄した。プレートへのIFN結合を検出するため、100 μ lのビオチン化抗IFN抗体(BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, NJ; カタログ番号554550; クローン4S.B3)を1 μ g/mlの最終濃度において添加し、室温において1時間インキュベートした。0.01%のTween-20を含有するPBS中でプレートを3回洗浄した後、DELFLIAアッセイ緩衝液(PerkinElmer, Boston MA; カタログ番号4002-0010)中で1/1000に希釈した100 μ lのDELFLIA(登録商標)Eu-標識ストレプトアビジン(PerkinElmer, Boston MA; カタログ番号1244-360)を添加した。プレートを室温において1時間さらにインキュベートし、次いでDELFLIA洗浄溶液(PerkinElmer, Boston MA; カタログ番号1244-114)を使用して7回洗浄した。100マイクロリットルのDELFLIA増強溶液(PerkinElmer, Boston MA; カタログ番号4001-0010)をそれぞれのウェルに添加し、プレートを室温において暗所で10分間インキュベートした。次いで、解離増強時間分解蛍光を計測するEnvisionプレートリーダー(Perkin-Elmer, Boston MA)を使用してそれぞれのウェル中の応答を測定した。

10

20

30

40

50

【0284】

実験データは、抗体の不存在下でIL-18により刺激したKG-1細胞について得られたユウロピウムカウント数を使用して正規化し、IFN放出の50%を阻害する抗体の濃度(IC₅₀)を測定した。IC₅₀値は、GraphPad Prismソフトウェアを使用して、4パラメータロジスティック式(セクション1.4の式3)を使用する曲線フィッティングにより算出した。

【0285】

精製IgG₂として試験した場合の抗体1のIC₅₀は、258nMであった(幾何平均、n=4, 95%CI: 121~550nM)。

【0286】

1.8 表面プラズモン共鳴を使用するIL-18への抗体1IgG₂の結合親和性の測定。

BIAcore2000(GE Healthcare)バイオセンサ装置を使用して抗体1と組換え発現ヒトIL-18との相互作用のキネティックパラメータを評価した。これらの実験は、本質的にはKarlsson他(1991)J. Immunol. Methods 145(1-2): 229-240により記載のとおり実施した。

【0287】

バイオセンサは、表面プラズモン共鳴(SPR)の光学効果を使用して、バイオセンサチップのデキストラン層に共有結合しているリガンド分子上を流動させる分析物分子の相互作用から生じる表面濃度の変化を試験する。典型的には、規定濃度の分析物種をカップリングさせたりリガンド上に通過させ、任意の結合を局所的なSPRシグナルの増加(会合相)として検出する。これに緩衝液流動の期間が続き、この間、表面固定化リガンドからの分析物種の解離をシグナルの減少(解離相)として観察することができる。次いで、残留分析物をチップ結合リガンドからストリッピングし、この手順をいくつかの異なる分析物濃度において繰り返すことができる。実験は、カップリングさせたりリガンドの絶対結合能もキネティックプロファイルも、実験全体の間に変化せず、実験を通して用いられる一連の対照を使用してモニタリングすることができるように設計する。EDTAを含有する特許HEPES緩衝生理食塩水(HBS-EP+; GE Healthcare)を分析物試料のための希釈緩衝液として、および解離相の間の流動緩衝液として典型的に使用する。実験データは、「共鳴単位」(RU)として記録し、それは、経時的なSPRシグナルに直接対応する任意の単位である。RUは、チップ表面上の屈折率の変化に直接比例し、同様にそれは結合した分析物の質量のおおよその尺度である。次いで、特許BIAevaluationソフトウェアパッケージを使用してデータを処理し、結合モデルをデータセットにフィットさせることができる。戻り会合(k_a ; M⁻¹s⁻¹)および

解離 ($k_d ; s^{-1}$) 速度定数は、解離 ($K_D ; M$) 親和性定数の算出を可能とする。

【0288】

抗体 1 IgG₂ と IL-18 分析物との結合の親和性を、約 600 RU の最終表面密度に特許 CM3 チップ表面へのアミン連結により抗体を共有結合させるアッセイを使用して推定した。チップ表面は、10 mM グリシン pH 2 の対にした 15 秒間のインジェクションによるサイクルの間に再生して抗体に結合した IL-18 を除去した。再生は、抗体結合活性の顕著な損失をもたらさなかった。

【0289】

組換えヒト IL-18 の一連の希釈物 (0.4 ~ 200 nM) を、正確に 1 : 1 結合モデルにフィットすることができるセンサグラムを観察するために十分な時間量について抗体 1 IgG₂ 上を連続的に通過させた。ブランク参照フローセルデータは、それぞれの IgG データセットから差し引き、ゼロ濃度緩衝液ブランクは、主データセットから差し引いた二重参照であっていかなる緩衝液アーティファクトまたは (最小) 非特異的結合効果も低減させた。次いで、BIAevaluation ソフトウェアを使用してそれぞれの分析物タイター測定からのデータに 1 : 1 ラングミュアモデルを同時にフィットさせた。

10

【0290】

データの妥当性は、算出されたカイ 2 乗および T 値 (パラメータ値 / オフセット) を使用して評価し、その最小許容値は < 2 および > 100 にそれぞれ拘束され、残留物を使用するフィットの全体的成功について評価した (< 2 RU)。

【0291】

組換えヒト IL-18 を分析物として使用すると、抗体 1 IgG₂ 会合定数 (K_a)、解離速度 (K_d) および親和性定数 (K_D) は、それぞれ $7.35 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.32 \times 10^{-3} s^{-1}$ および 9.96 nM であった。

20

【0292】

1.9 表面プラズモン共鳴バイオセンサを使用する抗体 1 IgG₂ の結合特異性の分析 BIAcore 2000 バイオセンサ装置 (GE Healthcare) を使用して、抗体 1 IgG₂ と一連の組換え発現 IL-18 タンパク質および IL-18 生物学に関連するタンパク質との相互作用の特異性を評価した。

【0293】

抗体 1 と分析物タンパク質との結合相互作用は、抗体 1 を約 600 RU の最終表面密度に CM3 チップ表面へのアミン連結により抗体を共有結合させるアッセイを使用して分析した。ランニング緩衝液中で希釈した 200 ナノモル濃度溶液の組換えヒト IL-18、アカゲザル IL-18 (R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号 2548-RM)、ラット IL-18 (R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号 521-RL-025)、ヒト IL-1 ベータ (R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号 201-LB) またはヒト IL-1F7/FIL1ゼータ (R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号 1975-IL-025) を、チップ表面上にインジェクトした。その後、チップ表面は、10 mM グリシン pH 2 の対にしたインジェクションによるサイクルの間に再生して抗体に結合した IL-18 を除去した。

30

40

【0294】

抗体 1 に提示されたタンパク質のうち、IgG がヒトおよびアカゲザル IL-18 にのみ選択的に結合することが観察された。組換えラット IL-18 もヒト IL-1 ベータもヒト IL-1F7/FIL1ゼータも顕著な結合は観察されなかった。

【0295】

1.10 IL-18 結合タンパク質エピトープ競合アッセイにおける抗体 1 の特性決定 抗体 1 がヒト IL-18 へのヒト IL-18 結合タンパク質 (IL-18BP) の結合を阻害し得るか否かを決定するため、エピトープ競合アッセイを開発した。精製 scFv または IgG₂ としての希釈系列の抗体 1 を、scFv について 4893 nM から 41.4 pM、IgG₂ について 987 nM から 16.8 pM の範囲で調製した。10 マイクロ

50

リットルのそれぞれの希釈物を、Costar（登録商標）384 ウェルアッセイプレート（Corning, Lowell, MA；カタログ番号3676）中に移した。別個に、1.73 nMのクリプテート標識抗FLAG抗体（Cis Bio International, Bagols-sur-Ceze, フランス；カタログ番号61FG2KL B）を、FLAGおよびHisタグを含有する3.2 nMのパキヨウイルス産生IL-18（インハウス）と合わせた。5マイクロリットルのこの混合物を、抗体1 scFvまたはIgG₂を有するアッセイプレートに添加した。ヒトIL-18 BPa-Fc（R&D Systems, Minneapolis, MN；カタログ番号119BP）を、EZ linkスルホ-NHS-LC-ピオチン（Thermo Fisher Scientific, Rochester NY；カタログ番号21335）をpH8のPBS中で使用して遊離アミンを介してピオチン化した。0.8 nMのピオチン化IL-18 BPa-Fcを、20 nMのストレプトアビジンXlent!（Cis Bio International. カタログ番号611SAXLB）と合わせ、5 μlのこの溶液をアッセイプレートに添加した。

【0296】

非特異的結合は、ヒトIL-18（インハウスで生成）を25 nMの最終濃度で使用して規定した。全ての希釈は、0.4 MのKFおよび0.1%のBSAを含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（アッセイ緩衝液）中で実施した。

【0297】

アッセイプレートを室温において4時間インキュベートし、次いで4 において一晚インキュベートしてから、EnVisionプレートリーダー（Perkin Elmer, Boston, MA）を使用して620 nmおよび665 nm発光波長における時間分解蛍光を読み取った。結果は、セクション1.3および1.4に記載の式を使用して算出した。

【0298】

精製scFv抗体1の調製物は、2446 nMにおいて86%の平均阻害率を生成した。抗体1のIgG₂調製物は、このアッセイにおいて493 nMにおいて68%の平均阻害率を生成した（図3）。

【0299】

実施例 2

抗体最適化

2.1 標的化突然変異導入による抗体1の最適化

標的化突然変異導入アプローチおよび親和性ベースファージディスプレイ選択を使用して、ヒトおよびアカゲザルIL-18の両方に対する親和性の改善のために抗体1を最適化した。抗体1に由来するラージscFv-ファージライブラリーを、Clackson and Lowman (2004) A Practical Approach, 2004. Oxford University Pressにより記載される標準的分子生物学的技術を使用して可変重鎖（V_H）および軽鎖（V_L）相補性決定領域3（CDR3）のオリゴヌクレオチド指向突然変異導入により作出した。

【0300】

ライブラリーを、親和性ベースファージディスプレイ選択に供して、IL-18の組換えヒトおよびアカゲザル形態についてより高い親和性を有する変異体を選択した。選択は、本質的には、既に記載されているとおり実施した（Thompson (1996) Journal of Molecular Biology 256:77-88）。簡潔に述べると、scFvファージ粒子を溶液中の組換えピオチン化組換えヒトIL-18（bio-huIL-18、インハウス、大腸菌（E. coli）由来）とインキュベートした。次いで、抗原に結合したscFv-ファージを、製造業者の推奨に従ってストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Invitrogen Corp., Paisley, UK; Dynabeads（登録商標）M280）上で捕捉した。次いで、選択されたscFv-ファージ粒子を既に記載されているとおりレスキューし（Osbourne他（1

10

20

30

40

50

996) *Immunotechnology*, 2(3); 181-96)、選択プロセスを減少濃度のピオチン化ヒトIL-18(3ラウンドにわたり25 nMから500 pM)の存在下で繰り返した。このプロセスは、生化学的エピトープ競合アッセイ(セクション2.3)およびKG-1細胞アッセイ(表1)において改善された効力を有する抗体2、抗体3、抗体4および抗体5の単離をもたらした。

【0301】

親和性ベース選択の3ラウンドの競合時、VHおよびVLランダム化ライブラリーを組換えて、クローンがランダムに対合した個々にランダム化されたVHおよびVL配列を含有する単一ライブラリーを形成した。次いで、選択を、減少濃度のピオチン化ヒトIL-18(さらなる3ラウンドにわたり500 pMから20 pM)の存在下で上記のとおり継続し、改善されたクローン抗体6および抗体7の単離をもたらした。

10

【0302】

2.2 ランダム突然変異導入によるリード抗体の最適化

組換えヒトおよびアカゲザルIL-18への結合を改善し得るscFv可変ドメイン内の重要な残基を同定するためのランダム突然変異導入アプローチを使用して、抗体6および抗体7をさらに最適化した。抗体6および7の可変領域全体にわたるランダム突然変異の導入によりラージscFv-リボソームディスプレイライブラリーを生成した。この生成は、A Diverisify(商標)PCRランダム突然変異導入キット(BD Biosciences, Franklin Lakes NJ; カタログ番号630703)を製造業者の指示書に従って使用する2ラウンドの突然変異導入により達成して、突然変異導入1ラウンド当たり核酸配列の1キロボース当たり平均8.1個の突然変異を取り込んだ。選択は、本質的には、既に記載されているとおり実施した(Hanes他(2000) *Methods in Enzymology* 328: 404-430)。簡潔に述べると、標的化CDR3ランダム化戦略から同定した2つのリードクローン(抗体6および抗体7)のランダム突然変異導入ライブラリーを、mRNAに転写し、続いてプールして1つのライブラリーを作出した。翻訳停止のプロセスを使用して、mRNA-リボソーム-scFv複合体を形成した(Hanes J and Plueckthun A. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997年5月 13; 94(10): 4937-42)。次いで、これらの複合体を、減少濃度のピオチン化ヒトIL-18またはピオチン化アカゲザルIL-18(3ラウンドにわたり1 nMから30 pM)の存在下でインキュベートする3ラウンドの選択に供して、IL-18のヒトおよびアカゲザル形態の両方についてより高い親和性を有する変異体について選択した。次いで、抗原と結合したそれらの複合体をストレプトアビジンコート常磁性ビーズ(Dynabeads(商標))上で捕捉した。非特異的リボソーム複合体を洗い流し、結合したリボソーム複合体からmRNAを単離し、cDNAに逆転写し、次いでPCRにより増幅した。このDNAを次のラウンドの選択に使用し、および/またはスクリーニングのためにクローンアウトした。リボソームディスプレイ構築物をNco1/Not1制限エンドヌクレアーゼにより消化し(New England Biolabs, Ipswich MA)、次いでNco1/Not1消化pCANTAB6中にT4 DNAリガーゼ(New England Biolabs, Ipswich MA)(McCafferty他(1994) *Appl. Biochem. Biotech.* 47: 157-171,)を使用してライゲートすることにより、リボソームディスプレイにより単離されたscFvをファージミドベクターpCANTAB6中にクローニングした。

20

30

40

【0303】

この最適化戦略は、改善されたクローン抗体9および抗体10の単離をもたらした。

【0304】

さらなる点突然変異を抗体7、抗体9および抗体10中に部位特異的突然変異導入により導入し、抗体8GL、抗体11、抗体11GLおよび抗体12GLをもたらした。これらの点突然変異は、HCDR1(Ser31Ala)およびHCDR2(Ile51Leu、Ser65Gly)中のものであった。

50

【0305】

2.3 エピトープ競合アッセイを使用する改善されたクローンの同定

セクション2.1に記載の標的化突然変異導入アプローチからの選択ラウンド2および3からランダムに選択された880個のs c F vを細菌中で発現させ、未精製s c F vをエピトープ競合H T R F (商標)アッセイフォーマット中でスクリーニングした。このアッセイにおいて、未精製s c F vは、ユウロピウムクリプテート標識ヒトIL-18 (インハウス)への結合について抗体1 I g G₂と競合した。組換えヒトIL-18のユウロピウムクリプテート標識は、トリスピリジン-Eu³⁺-クリプテート-4-カルボキシ-4'- (マレイミドプロピオンアミド-2-アミノエチル-アミノカルボニル) (C i s b i o I n t e r n a t i o n a l, フランス, バニョル・シュル・セズ (B a g n o l s - s u r - C e z e); カタログ番号65 E U M A B A) を中性pHのP B S中で使用して達成した。選択産物は、50mMのM O P S緩衝液pH7.4、0.5mMのE D T Aおよび0.5Mのスクロース中で調製された未精製s c F vを含有する未希釈または希釈ペリプラズム抽出物としてスクリーニングし、0.4MのK Fおよび0.1%のB S Aを含有するリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) (アッセイ緩衝液) 中で希釈した。24ナノモル濃度の抗体1 I g G₂および30nMの抗ヒトF c X L 6 6 5 (C i s B i o I n t e r n a t i o n a l, フランス, バニョル・シュル・セズ (B a g n o l s - s u r - C e z e); カタログ番号61 H F C X L A) を、アッセイ緩衝液中で一緒に希釈した。10マイクロリットルのこの溶液をC o s t a r (登録商標) 384ウェルアッセイプレート (C o r n i n g, L o w e l l, M A; カタログ番号3676) に移した。5マイクロリットルの未精製s c F vをアッセイプレートに添加し、次いで1.2nMに希釈したユウロピウムクリプテート標識組換えヒトIL-18を添加した。非特異的結合は、モノクローナルマウス抗ヒトIL-18クローン125-2H (R & D S y s t e m s, M i n n e a p o l i s, M N) を20nMの最終濃度において使用して測定した。アッセイプレートを室温において3時間インキュベートしてから、セクション1.3に記載のとおりE n V i s i o nプレートリーダー (P e r k i n E l m e r, B o s t o n M A) を使用して620nmおよび665nmの発光波長における時間分解蛍光を読み取った。データは、セクション1.3に記載の式を使用して特異的結合%として算出した。顕著な阻害特性を示し、抗体1 I g G₂がIL-18に結合するのを妨げるs c F vを、D N Aシーケンシングに供し、特有の配列を有するs c F vを精製調製物として調製した。

10

20

30

【0306】

精製s c F v抗体の効力は、上記の抗体1 I g G₂エピトープ競合アッセイにおいて同一条件を使用して希釈系列の精製s c F v調製物を試験することにより測定した。抗体2、抗体3、抗体4および抗体5の精製s c F v調製物は、抗体1 I g G₂とユウロピウムクリプテート標識ヒトIL-18との相互作用をそれぞれ0.5、0.6、0.6および0.17nM (n=1)のI C₅₀値で阻害した。

【0307】

組換え後標的化突然変異導入選択からのスクリーニングは、上記と同一のエピトープ競合アッセイを使用した。但しユウロピウムクリプテート標識IL-18濃度を0.2nMの最終アッセイ濃度に低減させた。このアッセイを使用して改善されたクローンを同定し、それらをセクション2.4に記載のK G - 1機能細胞アッセイにおける直接プロファイリングのために事前に取り出した。このアプローチから、抗体6および抗体7を改善されたs c F vとして同定した。これらのリード抗体をさらに最適化するため、ランダム突然変異導入アプローチをセクション2.2に記載のとおり続けた。

40

【0308】

ランダム突然変異導入選択からのs c F vを細菌中で発現させ、未精製s c F vをH T R F (商標)エピトープ競合アッセイフォーマット中でスクリーニングした。このアッセイは、生殖細胞系列化 (G L)抗体6 I g G₂ (セクション2.7に記載のI g Gの生殖細胞系列化)へのユウロピウムクリプテート標識IL-18の結合を阻害する未精製s c

50

Fvの能力を試験した。上記と同一のフォーマットを使用した。但し抗体1 IgG₂を12 nMの最終濃度の抗体6 GL IgG₂に置き換え、ユウロピウムクリプテート標識組換えヒトIL-18を0.2 nMの最終濃度において使用した。このアッセイにおいて非特異的結合を規定するため、抗体6 GL IgG₂を対照ウエルから排除した。

【0309】

ランダム突然変異導入選択のスクリーニングから同定されたヒットをランク付けし、最良のscFvをシーケンシングおよび精製した。scFvの効力を測定するため、希釈系列の精製scFvを上記のとおり抗体6 GL IgG₂エピトープ競合アッセイにおいて試験した。抗体9および抗体10の精製調製物は、抗体6 GL IgG₂とユウロピウムクリプテート標識組換えヒトIL-18との相互作用を、それぞれ5.2および5.7 nM (n = 1)のIC₅₀値で阻害した(図4)。

10

【0310】

2.4 IL-18により刺激したKG-1細胞によるIFN 産生の最適化クローン(scFv)による阻害

標的化突然変異導入およびランダム突然変異導入により生成した精製最適化scFv抗体の効力も、ヒトおよびアカゲザルIL-18をアゴニストとして使用するIFN 放出KG-1細胞アッセイにおいて測定した。アッセイは、セクション1.7に記載のとおり設定した。一部の試験において、ヒトIL-18を組換えアカゲザルIL-18(R&D systems, Minneapolis MN; カタログ番号2548-RM/CF)により置き換え、4 ng/mlの最終濃度において使用した。scFvを、100 nMから0.03 nMの最終濃度範囲において試験した。精製scFv抗体についての効力の例を表1に提供する。抗体7、抗体9および抗体10 scFvについての代表的データを図5に示す。

20

【0311】

2.5 scFvのIgG₂およびIgG₁TMへの再フォーマット化

完全ヒト抗体重鎖および軽鎖をそれぞれ発現するベクター中に可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)ドメインをサブクローニングすることにより、scFvをIgG₂に再フォーマット化した。哺乳動物細胞中で完全IgG₂重鎖を発現させるためのヒト重鎖定常ドメインおよび調節エレメントを含有する哺乳動物発現ベクター(pEU9.2)中に可変重鎖をクローニングした。同様に、哺乳動物細胞中で完全IgG軽鎖を発現させるためのヒトカッパ軽鎖定常ドメインおよび調節エレメントの発現のための哺乳動物発現ベクター(pEU3.4)中に可変軽鎖ドメインをクローニングした。抗体をIgG₂として得るため、重鎖および軽鎖IgG発現ベクターをHEK293-EBNA哺乳動物細胞中に一過的に形質移入し、抗体を発現させ、培地中に分泌させた。回収した培地を精製前に遠心分離により澄清化した。IgGは、プロテインA(GE Healthcare)を使用して精製した。培養上清を、50 mMのTris、0.15 MのNaCl pH 8 緩衝液中で事前に平衡化した1 mlカラム上にロードした。0.1 MのシトレートpH 3を使用してカラムから1 MのTris pH 10中にIgGを直接溶出させた。溶出物は、NAP-10緩衝液交換カラム(GE Healthcare)を使用して1 x DPBSへの緩衝液交換に付した。精製IgGは、0.2マイクロメートル滅菌濾過し、内毒素について分析し、SDS PAGEにより特性決定し、280 nmにおける吸光度により濃度測定した。

30

40

【0312】

抗体12 GLも、定常ドメイン内に3つの単一アミノ酸置換(TM)を含有するヒトIgG₁アイソタイプに変換した([IgG₁TM]; Oganesyan他(2008) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 64(Pt 6): 700-4)。簡潔に述べると、IgG軽鎖遺伝子は、抗体可変ドメイン配列に融合している分泌リーダー配列およびヒトカッパKm3定常ドメイン配列から構成した。IgG重鎖遺伝子は、TM改変を有するヒトガンマ1(f)定常ドメイン配列を有する抗体可変ドメインに融合している分泌リーダー配列から構成した。軽鎖および重鎖遺伝子を

50

コードするDNA配列を、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中での高レベル発現について最適化して(配列番号170および171参照)(Geneart AG, Regensburg, Germany)からそれぞれ発現カセットベクターpEE12.4およびpEE6.4(Lonza Biologics, Slough, UK)中にDNAクローニングした。次いで、フランキング転写調節配列を含む抗体重鎖遺伝子を抗体軽鎖プラスミド中に挿入して二重抗体遺伝子、タンデムベクター(pCLD-1128)(図15参照)を作出した。pCLD-1128プラスミドを線形化し、既知組成培地(CD-CHO; Invitrogen, Paisley, UK)中での懸濁液培養において成長するように事前に適合させたCHOK1SV(Lonza Biologics)をCHO宿主細胞系中に形質移入した。CHOゲノム中に統合させたpCLD-1128

10

【0313】

高収量の抗体を発現するプールを選択し、拡張させてフェドバッチ産生培養物を接種した。接種後約14日目、培養回収物を遠心分離および/または濾過により澄清化して細胞および細胞デブリスを除去した。次いで、得られた培養上清から、プロテインA親和性クロマトグラフィーにより抗体を回収し、次いで好適な緩衝液にPD10緩衝液交換した。

【0314】

2.6 IL-18により刺激したKG-1細胞によるIFN 産生の最適化クローン(IgG)による阻害

20

KG-1細胞アッセイにおける最も強力なscFvクローンを、上記のとおり(セクション2.5)IgGに変換し、この細胞アッセイにおいて20nMから0.002nMの最終濃度範囲において再試験した。精製IgG抗体についての効力の例を表2に提供する。

【0315】

2.7 生殖細胞系列化

抗体1および親和性最適化抗IL-18抗体のV_HおよびV_Lドメインのアミノ酸配列を、VBASEデータベース(Tomlinson(1997)Journal of Molecular biology 224:487-499)中の既知のヒト生殖細胞系列配列にアラインし、最も近縁な生殖細胞系列を配列類似性により同定した。最適化抗体系列のV_Hドメインについて、これはVh4__DP-66__(4-61)であった。V_Lドメインについて、これはV 1__L12であった。不変のままであったパーニア残基(Foote & Winter(1992)J Mol Biol. 224(2):487-99)を除き、生殖細胞系列化プロセスは、V_HおよびV_Lドメインのフレームワーク残基を最も近縁な生殖細胞系列配列に復帰させて同等にヒト抗体に適合させることであった。産生した全ての抗体のV_HおよびV_Lドメイン配列を表12および13に示す。これらのアミノ酸残基の生殖細胞系列化は、適切な突然変異導入プライマーを用いる標準的な部位特異的突然変異導入技術を使用して実施した。次いで、ランダム突然変異導入戦略からCDR中に導入された変化を完全に生殖細胞系列化された骨格中に導入した。次いで、IgG₂またはIgG₁TMフォーマットの生殖細胞系列化抗体を、KG-1細胞アッセイにおいて再評価して効力の顕著な低減が存在しなかったことを確認した。生殖細胞系列化(GL)抗体の効力の例を表3に提供する。抗体8GL、抗体11GLおよび抗体12GL IgGの代表的データを図6に示す。

30

40

【0316】

2.8 LPSおよびIL-12により刺激したヒトPBMCによるIFN 産生の生殖細胞系列化最適化クローン(IgG)による阻害

生殖細胞系列化IgGを、組換えヒトおよびアカゲザルIL-18を阻害するそれらの効力その他、内因的に産生されるIL-18を中和するそれらの能力について試験した。末梢血単核細胞(PBMC)を、ヒト軟膜血液またはカニクイザル血液から精製し、LPS(Sigma-Aldrich, St Louis MO; カタログ番号L-6143)

50

および組換えヒトIL-12 (R&D Systems, Minneapolis MN; カタログ番号219-IL)により刺激して、IL-18依存性機構を介してIFN放出を誘発した。内因性IL-18にアンタゴナイズし、結果的にIFN産生を遮断する最適化生殖細胞系列化IgGの能力を、このアッセイにおいて評価した。簡潔に述べると、PBMCを培養培地(10% v/vの熱不活化FBS [S.A.F.C. Biosciences; カタログ番号12076C]、100 U/mlのペニシリンおよび100 μg/mlのストレプトマイシン [Invitrogen Corp., Paisley, UK; カタログ番号15140-122]を含有するRPMI-1640 [Invitrogen Corp., Paisley, UK; カタログ番号61870-010])中で、300 gにおける遠心分離により10分間洗浄した。PBMCを培養培地中で再懸濁し、Costar (登録商標) 96ウェル平底組織培養処理プレート (Corning, Lowell, MA; カタログ番号3596)中に、 4×10^5 個の細胞/100 μl/ウェル(抗体8GLIgG₂、抗体11LIgG₂および抗体12GLIgG₂の評価について)または 2×10^5 個の細胞/100 μl/ウェル(抗体12GLIgG₁TMについて)においてプレティングした。最適化生殖細胞系列化IgGの効力を測定するため、U底96ウェルポリプロピレンプレート (Greiner Bio-One; Kremsmunster, Austria; カタログ番号650201)中の培養培地中でIgGの系列希釈物(2.5 pMから16.7 nMの細胞アッセイにおける最終濃度)を作製することにより試験溶液を調製した。50マイクロリットルのこれらの溶液を、PBMCを含有するプレートのウェルに移した。内因性IL-18の産生を誘発するため、次いでLPS (Sigma-Aldrich, St. Louis MO; カタログ番号L-6143)および組換えヒトIL-12 (R&D Systems, Minneapolis MN; カタログ番号219-IL)(両方1 ng/ml最終)の50 μlの混合物を添加することにより細胞を刺激した。細胞を加湿雰囲気中で37 / 5% CO₂において24時間インキュベートした後、150 μlの上清をそれぞれのウェルから回収し、IFNの濃度をセクション1.7に記載のとおり測定した。

10

20

30

40

50

【0317】

抗体の不存在下でLPSおよびIL-12により刺激したPBMCについて得られたユロピウムカウント数を使用して実験データを正規化し、IFN放出の50%を阻害する抗体の濃度(IC₅₀)を測定した。IC₅₀値は、GraphPad Prismソフトウェアを使用して4パラメータロジスティック式(セクション1.4の式3)を使用する曲線フィッティングにより算出した。

【0318】

このアッセイにおける生殖細胞系列化(GL)抗体についての効力の例を、表4に提供する。ヒトおよびカニクイザルPBMCに基づくアッセイにおける抗体12GLIgG₁TMについての代表的データを図7に示す。

【0319】

2.9 抗体12GLIgG₁TMによる一次好中球上のIL-18誘導性CD11b上方調節の阻害

CD11bは、活性化の間に好中球上で上方調節されることが示されている。これらの細胞は、多数の炎症性障害において重要な役割を担い、インビトロIL-18誘導性CD11b上方調節を阻害する抗体12GLIgG₁TMの能力をフローサイトメトリーにより測定した。

【0320】

新たな末梢血を健常ヒトボランティアから得、等容量の2.4%のデキストラン(GE Healthcare, カタログ番号17-0320-01)を血液に添加し、反転により十分に混合した。次いで、赤血球を1時間沈降させた。次いで、パーコールを10x PBS (Invitrogen Corp., Paisley UK; カタログ番号14200059)により9:1に希釈することにより不連続パーコール勾配(GE Healthcare, カタログ番号17-0891-01)を調製して100%の原液を作製

した。この原液をさらに1×PBS (Invitrogen Corp., Paisley UK; カタログ番号14190) により希釈して72%溶液および67%溶液を形成した。次いで、3ミリリットルの72%溶液を15mlのFalcon (登録商標) チューブ (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ; カタログ番号352096) に添加し、3mlの62%溶液を72%溶液上に層状化させた。赤血球枯渇後、赤血球枯渇細胞懸濁液を15mlチューブ中で62%溶液の頂部上に層状化させた。これらのチューブを、ブレーキをかけずに1138×gにおいて20分間遠心分離した。顆粒球層を、72%および62%のパーコールの界面からPBSを含有する新たな50mlのFalcon (登録商標) チューブ (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ; カタログ番号352070) 中に取り出し、次いで300×gにおいて10分間遠心分離した。上清を廃棄し、顆粒球を50mlのPBS中で再懸濁し、トリパンブルー排除色素を使用してカウントした。次いで、顆粒球を200×gにおいて5分間ペレット化し、刺激緩衝液 (RPMI-1640 [Invitrogen Corp., Paisley UK; カタログ番号61870] および2%のBSA [Sigma-Aldrich, St Louis MO; カタログ番号A9576]) 中で $1 \sim 2 \times 10^6$ / mlにおいて再懸濁した。100マイクロリットルの細胞懸濁液を丸底96ウェルポリスチレン組織培養処理プレート (Costar, Kremsmunster, Austria; カタログ番号650201) のウェル中に分注した。次いで、添加5分前に事前混合した抗体12GLIG₁TM (2.55pMから16.7nMの範囲) および2.78nMの組換えヒトIL-18 (インハウス、大腸菌 (E. coli) 由来) のタイター測定物を含有する100μlの溶液により細胞を処理した。プレートを加湿5%CO₂ 雰囲気中で37°Cにおいて2時間インキュベートした。

【0321】

次いで、細胞を300×gにおいて4°Cで3分間遠心分離することによりペレット化し、上清を排除した。細胞を150μlのPBS中で再懸濁し、再度遠心分離した。次いで、細胞を、0.1μgのFITC-コンジュゲート抗ヒトCD11b (eBioscience Inc., San Diego CA; カタログ番号11-0118、クローンICRF44) を含有する100μlのFACS緩衝液 (2%のFBSを有するPBS) 中で再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞を150μlの氷冷PBS中で、300×gにおいて4°Cの3分間の遠心分離により2回洗浄してから150μlのPBS中3.7%ホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich, St Louis MO; カタログ番号F1635-1GA) 中で固定した。FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ) を使用してCD11b発現のモジュレーションを測定した。好中球を、それらの特徴的な前方散乱 (FSC) および側方散乱 (SSC) 特性により同定した。対応する集団をゲーティングし、FL-1チャンネル (励起波長488nm、フィルター530/30) 中で蛍光を分析してCD11b発現レベルを評価した。

【0322】

抗体12GLIG₁TMは、ヒト好中球上のCD11bのIL-18誘導性上方調節を、2.032nM (95%CI: 1.021~4.046nM; n=7) の幾何平均IC₅₀で阻害し得た (図8)。

【0323】

2.10 一次好中球によるIL-18誘導性活性酸素種産生の抗体12GLIG₁TMによる阻害

適切な同時刺激物質、例えばホルミル化ペプチドの存在下、IL-18は好中球による多数の炎症性促進メディエーター、例として活性酸素種 (ROS) の産生を促進することが示された (Elbin他 (2005) Clin Diagn Lab Immunol. 12 (3): 436-46)。好中球によるホルミルペプチド誘導性ROS産生のIL-18誘導性増強をインビトロで阻害する抗体12GLIG₁TMの能力を、フローサイトメトリーにより評価した。

【0324】

セクション2.9に記載のとおりヒト血液から好中球を単離した後、細胞を 1×10^6 個/mlにおいて $1.5 \mu\text{g/ml}$ のROS感受性色素ヒドロエチジン(Invitrogen, Paisley UK; カタログ番号D11347)を含有するRPMI-1640中で再懸濁し、加湿5%CO₂雰囲気中で37°Cにおいて15分間インキュベートした。次いで、細胞を300xgにおいて5分間遠心分離によりペレット化し、上清を除去し、2%のBSAを有する50mlのRPMI-1640中で再懸濁した。1回のさらなる遠心分離後、細胞を2%のBSAを有するRPMI-1640中で $3 \sim 5 \times 10^6$ 個/mlの濃度において最後に再懸濁した。50マイクロリットルのこの細胞懸濁液を96ウェルポリスチレン組織培養処理プレート(Costar, Kremsmünster, Austria; カタログ番号650201)中にプレATINGした。次いで、添加5分前に事前混合した抗体12GLIGG₁TM($2.55 \mu\text{M}$ から 16.7nM の範囲)および 2.78nM の組換えヒトIL-18(インハウス、大腸菌(E. coli)由来)のタイター測定物を含有する $100 \mu\text{l}$ の溶液により細胞を処理した。プレートを加湿5%CO₂雰囲気中で37°Cにおいて2時間インキュベートした。次いで、細胞を 400nM のfMLFF(Bachem, Germany; カタログ番号H-4294)を含有する2%のBSAを有する $50 \mu\text{l}$ のRPMI 1640により刺激した。細胞を加湿5%CO₂雰囲気中で37°Cにおいてさらに10分間インキュベートした。次いで、細胞を $150 \mu\text{l}$ の氷冷PBS中で、300xgにおいて4°Cの3分間の遠心分離により2回洗浄してから $150 \mu\text{l}$ のPBS中3.7%ホルムアルデヒド(Sigma-Aldrich, St. Louis MO; カタログ番号F1635-1GA)中で固定した。FACSCanto IIフローサイトメーター(BD Biosciences, Franklin Lakes NJ)を使用してROSの産生を測定した。好中球を、それらの特徴的な前方散乱(FSC)および側方散乱(SSC)特性により同定した。対応する集団をゲATINGし、FL-2チャンネル(励起波長488nm、フィルター585/42)中で蛍光を分析してROSレベルを評価した。

10

20

【0325】

抗体12GLIGG₁TMは、ヒト好中球におけるfMLFF誘導性ROS産生のIL-18媒介性増強を、 0.200nM ($n=2$)の幾何平均IC₅₀で阻害し得た(図9)。

30

【0326】

2.11 表面プラズモン共鳴を使用するIL-18への抗体8GLおよび抗体12GLIGGの結合親和性の測定。

上記セクション(セクション1.8)に詳述したとおりBIACore2000またはT-100(GE Healthcare)バイオセンサ装置を使用して抗IL-18抗体、抗体8GLおよび抗体12GLと、組換え発現ヒトIL-18(インハウス、大腸菌(E. coli)由来)またはアカゲザルIL-18(R&D systems, Minneapolis MN; カタログ番号2548-RM)との相互作用のキネティックパラメータを評価した。

40

【0327】

本質的には、それぞれのIgGとIL-18分析物との結合の親和性を、アミン連結によりCM3またはCM5チップにIgGを共有結合し、組換えIL-18の希釈物($0.4 \sim 200 \text{nM}$)をチップ表面上で連続的に通過させることにより評価した(セクション1.8参照)。得られたデータを1:1ラングニユアモデル(同時 k_a k_d)にフィットさせ、平均値を表5に報告する。

【0328】

2.12 細胞ベースアッセイを使用する抗体12GLIGG₁TM親和性の薬理的測定: pA₂分析

競合アンタゴニストの親和性を定量するための主要な薬理的ツールは、Schild分析である。このアプローチを使用して、機能アッセイにおけるアンタゴニスト親和性を

50

推定する系非依存性手段を決定することができる。この方法は、アンタゴニスト濃度およびその親和性がアゴニスト応答のアンタゴニズムを決定するという概念に基づく。アンタゴニズムは定量することができ、アンタゴニストの濃度が既知であるため、アンタゴニストの親和性を測定することができる。このアンタゴニズムは、用量比 (DR) と称される、アンタゴニストの存在下および不存在下で計測されるアゴニストの等活性 (equiactive) 濃度の比を計測することにより定量する。

【0329】

用量比は、結合メンバーの不存在下のアゴニスト (典型的には IL-18) EC_{50} と、単一濃度の結合メンバーの存在下のアゴニストの EC_{50} との比を取ることにより算出することができる。次いで、 $\log(DR - 1)$ として表現する用量比を、 \log [結合メンバー] に対する線形回帰において使用して Schild 回帰をもたらすことができる。したがって、結合メンバーの濃度毎に、対応する DR 値が存在し; それらを、 \log [結合メンバー] に対する $\log(DR - 1)$ の回帰としてプロットする。アンタゴニズムが競合的である場合、式が

$$\log(DR - 1) = \log[B] - \log K_B$$

(式中、[B] は結合メンバーの分子濃度である)

である Schild 式に従って $\log(DR - 1)$ と \log [結合メンバー] の間に線形関係が存在する。

【0330】

これらの状況下では、縦座標の 0 の値は、 $\log[B] = \log K_B$ である x 軸の切片を与える。したがって、 $\log(DR - 1) = 0$ をもたらす結合メンバーの濃度は、 $\log K_B$ 、結合メンバー - 受容体複合体の平衡解離定数に等しい。これは、結合メンバー親和性を推定するための系非依存性定量である。伝統的には、このアプローチを、受容体アンタゴニストの親和性を測定するために使用するが、リガンド中和に関する類似する想定に基づいて、用量比の算出は、細胞上での IL-18 活性を中和する結合メンバー親和性の推定も可能にすべきである。 K_B 値は対数プロットから得られるため、それらは対数正規分布している。この特定の濃度の負の対数を、経験的に pA_2 と呼び、これはアゴニスト用量応答曲線の 2 倍のシフトをもたらすアンタゴニストの濃度である。アンタゴニストの効力は、式

$$pA_2 = \log(DR - 1) - \log[B]$$

から用量比についての単一値をもたらす単一濃度のアンタゴニストから pA_2 を算出することにより定量することができる。

[B] は、元の最大以下の応答を引き出すアゴニスト濃度を倍加するために必要であるアンタゴニストのモル濃度である。

DR = 用量比であり、アンタゴニストの存在下および不存在下で計測されたアゴニストの等量活性の濃度の比を計測することにより定量される。

pA_2 は、用量応答アッセイデータから算出することができる。

【0331】

pA_2 法を使用してヒト IL-18 についての抗体 12GLIgG₁TM 親和性を測定するため、KG-1 細胞をセクション 1.7 に記載のとおりプレATINGした。抗体 12GLIgG₁TM の系列希釈物 (20 nM、6.66 nM、2.22 nM、0.74 nM、0.2 nM および 0 の細胞アッセイにおける最終濃度) を培養培地中で調製し、細胞に添加した。組換えヒト IL-18 の系列希釈物 (42 nM から 0.25 pM の細胞アッセイにおける最終濃度) も培養培地中で調製し、それぞれの抗体 12GLIgG₁TM 濃度について IL-18 の用量範囲が試験されるように細胞に添加した。細胞を加湿雰囲気中 37 / 5% CO₂ において 22 ~ 24 時間インキュベートした後、150 μl の上清をそれぞれのウェルから回収し、IFN の濃度をセクション 1.7 に示すとおり測定した。一部の実験において、ヒト IL-18 をアカゲザル IL-18 により置き換え、種々の濃度の抗体 12GLIgG₁TM (60 nM、20 nM、6.66 nM、2.22 nM、0.74 nM、0.25 nM および 0 の最終濃度) の存在下で 125 nM から 0.25

10

20

30

40

50

n Mの最終濃度において使用した。

【0332】

実験データをプロットしてそれぞれの抗体濃度、KG-1細胞によるIFN 産生の50%増加を誘発するために要求されるIL-18の量(EC₅₀)を決定した。EC₅₀値は、GraphPad Prismソフトウェアを使用して、4パラメータロジスティック式を使用する曲線フィッティングにより算出した。次いで、EC₅₀値および抗体濃度を使用してGraphPad PrismにおいてSchildプロットを作成し、上記のとおりpA₂およびK_D値を決定した。図10は、抗体12GLIgG₁TMによるKG-1細胞に対するヒトIL-18効果の用量依存性阻害の例ならびにpA₂およびK_D値の決定を可能とする対応するSchildプロットを示す。

10

【0333】

KG-1細胞ベースアッセイを使用して抗体12GLIgG₁TMについて得られたpA₂およびK_D値を表6にまとめる。

【0334】

2.13 表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサを使用する抗体8GLおよび抗体12GLの結合特異性の分析

Biacore 2000またはT-100(GE Healthcare)バイオセンサ装置を使用して抗IL-18抗体、抗体8GLおよび抗体12GLと、一連の組換え発現IL-18および関連タンパク質との相互作用の特異性を評価した。

20

【0335】

上記に詳述したとおり(セクション1.9)、それぞれのIgGと種々の分析物との結合相互作用を、CM5チップへのアミン連結によりIgGを共有結合させ、組換えタンパク質をチップ表面上に通過させるアッセイを使用して推定した。抗体8GLおよび抗体12GLは、ヒトおよびアカゲザルIL-18に結合することが見出されたが、マウスIL-18への結合も、ラットIL-18への結合も、ヒトIL-1F7への結合も、ヒトIL-1への結合も示さなかった(表7)。

【0336】

2.14 IL-18BPエピトープ競合アッセイにおける抗体12GLの特性決定

精製抗体12GLIgG₂の希釈系列物を調製して、抗体がIL-18とIL-18BPとの結合相互作用を阻害し得るか否かを決定し、したがって抗体12GLが組換えヒトIL-18上のIL-18BPと同一のコンフォメーションエピトープに結合したことを示し得るか否かを判定した。このアッセイはセクション1.10に記載のとおり設定した。

30

【0337】

結果は、セクション1.3および1.4に記載のものと同じの式を使用して算出した。

【0338】

図11に説明するとおり、抗体12GLIgG₂は、0.2nM(95%CI:0.1~0.4nM、n=4)のIC₅₀を生成した。

【0339】

2.15 IL-18BPへのIL-18結合の抗体12GLIgG₁TMによる阻害

ヒトIL-18への結合についての抗体12GLIgG₁TMとIL-18BPとの競合の評価を、Biacore 2000またはT100と類似の様式で作動するProtein XPR装置(Bio-Rad, Hercules CA)を使用してさらに評価した。この実験において、12GLIgG₁TMまたはIL-18BPα-Fc(R&D Systems, Minneapolis MN;カタログ番号119-BP)の3つの異なる密度(230~6340RUの範囲)のアミン連結表面は、100nM溶液(10RUから330RUの最終密度)からヒトIL-18(インハウス、大腸菌(E.coli)由来)を捕捉させ、次いで安定化させた。その後、さらなる抗体12GLIgG₁TMおよびIL-18BPを100nMにおいて、捕捉されたIL-18上で通過させ、得られたセンサグラムを調査してそれらがIL-18への結合であるか否かを決定した。さ

40

50

らなる結合は、抗体 12GLIgG₁TM または IL-18BP a - Fc の組合せのいずれにおいても観察されなかった。このことは、抗体 12GLIgG₁TM および IL-18BP a が IL-18 上の重複するエピトープを有する指標を提供する。

【0340】

実施例 3

結晶学的試験

3.1 ヒト IL-18 および抗体 12GLFab 断片の精製

ヒト IL-18 構築物、セクション 1.1 に挙げた His-GST-IL-18 を、大腸菌 (E. coli) 中で可溶性発現に付した。タンパク質は、標準的な親和性クロマトグラフィーにより精製し、次いで Xa 因子開裂した。次いで、開裂したタンパク質をアニオン交換クロマトグラフィーおよび標準的な親和性クロマトグラフィーにより精製していかなる汚染開裂タグも除去し、次いで結晶解析のために遠心分離濃縮デバイスを使用してタンパク質を濃縮した。

10

【0341】

抗体 12GLIgG を馴化培地から MabSelect SuRe プロテイン A (GE Healthcare) への吸着およびそれからの溶出により精製した。5mg のパインと 100mg の IgG との比において 30mM のシステインを含有するリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2 中でパイン (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) 中で、精製抗体 12GL (+30mM のシステイン) をインキュベートして Fab 断片を産生した。96 分間インキュベートした後、消化をヨードアセトアミドの添加により終結させて 50mM の最終濃度とした。消化物を MabSelect SuRe プロテイン A (GE Healthcare) に pH 7.2 において適用することにより Fab 断片を精製し、次いで未結合 Fab 断片を回収した。濃縮後、脱塩 PD-10 カラム (GE Healthcare) を使用して Fab を 50mM の酢酸ナトリウム、30mM の塩化ナトリウム + 2% w/v のソルビトール、pH 5.50 に緩衝液交換した。

20

【0342】

3.2 IL-18 および抗体 12GLFab 複合体形成

抗体 12GLFab およびヒト IL-18 (インハウス、大腸菌 (E. coli) 由来) を、1:1 のモル比 (IL-18 がわずかに過剰) で混合し、+4 において一晚穏やかに攪拌した。形成された複合体を過剰の IL-18 から、20mM の HEPES、pH 7.5、150mM の NaCl 中で 2.5mL/分において平衡化した HiLoad Superdex 75 pg 26/60 カラム (GE Healthcare) 上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより分離した。複合体を単一ピークとして溶出させ、回収し、10kDa の MWC O を有する Amicon 遠心分離デバイスを使用して 10mg/mL に濃縮した。

30

【0343】

3.3 結晶化、データ回収および構造決定

広範な蒸気拡散結晶化試験を、タンパク質緩衝液 (20mM の HEPES pH 7.5、150mM の NaCl) 中 15mg/mL の濃度の IL-18:抗体 12GLFab 複合体について設定して結晶化条件を同定した。タンパク質を遠心分離してから 100nL タンパク質溶液および 100nL ウェル溶液を有する Intelli-plate Flat ledge (Art Robbins) 中でシッピングドロップを設定した。第 1 の結晶は、エタノール、3-メチル-1,5-ペンタジオール (MPD) またはその両方を含むドロップ中で数週間以内に現れた。結晶は、針または針の束として現れ、回折実験に有用でなかった。結晶は UV 顕微鏡観察によりタンパク質であることを確認した。

40

【0344】

結晶化条件の最適化全体にわたりシーディングを使用した。回折に試験する結晶を得るため、数ラウンドのマイクロおよびマクロシーディングを実施した。マイクロシーディングのためのシードストックは、30μL のウェル溶液中で結晶を破碎することにより得た

50

。シードストックを希釈し、種々の希釈物を結晶化ドロップに添加し、例えば、10 nLの希釈物シードストックを200 nLのドロップに添加した。マクロシーディングも使用し、針様結晶の束をより小さい細片に破壊し、それらを新たな結晶化ドロップに移した。

【0345】

データ回収に使用した結晶は、+20 °Cにおいて35~40%のエタノールを含有する500 µLウェル溶液を有するNextalプレート(Qiagen)中でハンギングドロップから得た。マクロシーディングを使用して、結晶の細片を、タンパク質およびウェル溶液を1:1の比で含有する新たな3 µLの結晶化ドロップに移した。最良の結晶は、マクロシーディングされたドロップ中で現れたが、おそらく、より大きい細片よりも小さい核の結果であった。得られた約200 µmの棒形状結晶を遠隔データ収集のためにフランス、グルノーブル(Grenoble)のEuropean Synchrotron Radiation Facility(ESRF)に送った。データは、ESRFにおいてID23-1ビームラインにおいてADSC Q315R検出器上で100 K.において単一結晶から2.5 Åまで収集した。

10

【0346】

データは、100 Kにて単一結晶から収集した。データセットは、MOSFLM(Leslie, A(1991) Crystallographic computing Vpp. 27-38)を使用して統合し、Scala(CCP4 suite)によりスケリングした。データ収集統計を表8に示す。結晶は、細胞寸法 $a = b = 95.1$ 、 $c = 316.9$ 、 $\beta = 90$ 、 $\gamma = 120$ を有する空間群P3121に属した。非対称単位は、3.1のMatthew係数および60%の溶媒含有率を生じさせるIL-18-Fab複合体の2つのコピーを含有する。

20

【0347】

IL-18:抗体12GLFab複合体の構造を、Protein Data Bank登録番号3F62(Krumm他(2008)PNAS 105(52):20711-20715)および1AQK(Faber他(1998)Immunotechnology 3:253-370)にそれぞれ由来するIL-18および抗体12GLFabについての検索モデルを有するプログラムPhaser(CCP4 Suite 1994)を使用する分子置換法により決定した。

【0348】

最初の検索モデル(1AQK__可変)は、後続のループ:LC93~99、HC27~32、51~58、73.76、および101-107が除去された1AQK(重鎖残基2~122、軽鎖2~111)からFab可変ドメインを含有した。Phaserは、空間群P3121で単一解を与えた。このモデルの1つのコピーが見出され、この解の固定を保持しながら、1つのループ(54~61)が除去された3F62(IL-18:IL-18BP複合体)から抽出したIL-18検索モデルを次に配置した。この解を固定し、連続的な検索を1AQK(LC残基112~216およびHC123~226)からの抗体12GLFab定常ドメインについて行った。IL-18:抗体12GLFab(1AQK__可変)複合体の第2のコピーを、非対称単位で配置した。1AQKHC(重鎖123~226)からの定常ドメインを検索し、見出した。しかしながら、Phaserは、FabLC定常の位置を同定し得なかった。モデルは、autobuster(Global phasing)リジッドボディリファインメントにおいてランさせた。得られたマップは良質なものであり、抗体12GLFab側鎖をプログラムCoot(Emsley P. et al(2010)Acta Cryst D66:486-501)においてリモデリングしてシーケンシングし、Cootプログラムを使用して手作業でミッシングループを再構築して抗体12GL配列に適合させた。ミッシングループは、Cootにおいて密度差マップに構築した。autobusterリファインメントの追加のサイクル後、第2の分子中の最後のLC定常ドメインをCootにおいて手作業で配置しなければならなかった。Fab鎖は、Kabatinナンピング(Kabat他(1991)Sequences of Proteins of Immunological I

30

40

50

nterest, 5th ed. Bethesda, Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine) に従ってナンバリングした。完全モデルをプログラム Refmac5 (CCP4 suite 1994) により最終 R 因子 24.5% および 28.6% のフリー R 因子にリファインした。

【0349】

3.4 IL-18: 抗体 12GLFab 複合体の結晶構造

ヒト IL-18: 抗体 12GL 複合体の結晶を、空間群 P3121 で得た。電子密度マップの全体の質は良好であり、残基の 97% の明確なモデリングを可能とした。特に、エピトープおよびパラトープ領域を十分に規定した。IL-18 の最終モデルは、残基 1~156 を含有する。2つのループ領域を電子密度で無秩序化し (残基 33~41 および 131~132)、それらの一部をモデルから除外した。同一のループを、エクトウイルス (ectovirus) (PDB アクセションコード 3F62; Krumm 他 2008 (前掲)) からの IL-18BP との複合体中の IL-18 の公開結晶構造のモデルから除外し、未結合 IL-18 の溶液構造で高度にフレキシブルであると報告する (PDB コード 1J0S; Kato 他 (2003) Nat Struct Biol 10 (11): 966-971)。抗体 12GLFab の最終モデルは、軽鎖 (LC) 残基 1~213 (非対称単位の第 2 の分子について 1~212) および重鎖 (HC) 1~226 からなる。最終モデルは、IL-18-抗体 12GLFab 複合体の 2つのコピーおよび 79 個の水分子を含有する。

10

20

【0350】

結晶構造は、それぞれの IL-18 分子が 1つの抗体 12GLFab 断片に結合していることを示す (図 12)。この結晶構造は、IL-18 と、原子詳細において試験すべき抗体 12GL とのエピトープ相互作用を可能とする。これらを表 9 に記録し、残基番号は鎖指標 (H: 抗体 12GL 重鎖、L: 抗体 12GL 軽鎖) を含有する。距離は、CCP4 プログラム CONTACT (CCP4, 1994) を使用して得た。2つの複合体の 1つを記載することが必要であるにすぎない。それというのも、それらは等価であるためである。相互作用は、抗体断片の重鎖および軽鎖の両方から相補性決定領域 (CDR) を含む。エピトープの一部を形成する IL-18 中のアミノ酸残基は、Tyr1、Gly3、Leu5、Glu6、Lys8、Met51、Lys53、Asp54、Ser55、Gln56、Pro57、Arg58、Gly59、Met60、Arg104、Ser105 および Pro107 である。抗体 12GL 軽鎖から寄与される残基は、Gly28、Ser30、Trp32、Ser91、His92、His93 および Pro94 である。これらは、軽鎖フレームワーク 1、残基 Asp1 からの単一アミノ酸寄与である。重鎖から寄与される残基は、Tyr35、Tyr52、Tyr53、Tyr58、Ala97、Tyr98、Phe99、Gly100、Thr100D および Asp100E である。

30

【0351】

IL-18 の全体構造は、0.87 Å の全 C 標準偏差を有する IL-18: IL-18BP 複合体 (3F62; Krumm 他 2008 (前掲)) からの IL-18 に高度に類似する。しかしながら、IL-18: IL-18BP 複合体と比較して 1つのループ (残基 55~59) の 3 位置シフトが存在する。このシフトにもかかわらず、パラトープとの多数の相互作用点を担持するループの全コンフォメーションは、依然として全く類似する。対照的に、ループ (55~59) のコンフォメーションは、未結合 IL-18 の報告された NMR 溶液構造 (Kato 他 2003 (前掲)) および IL-18: 125-2H 複合体 (Argiriadi, M. A. et al (2009) JBC 284: 24478-24489) の結晶構造から、それぞれ 5 および 7 の最大シフトで大きくずれる。抗体 12GL の結合様式は、近年公開された結晶構造 (Krumm 他 2008 (前掲)) に示されるとおりエクトウイルスからの IL-18BP とほぼ完全に重複する。IL-18: 抗体 12GLFab 複合体の結晶構造は、本質的に 125-2H (2VXT; Argiriadi 他 2009 (前掲)) と抗体 12GLEピトープとの重複が存

40

50

在しないことを表す。

【0352】

種交差反応性に関して、抗体12GLはマウスIL-18と交差反応性でないが、カニクイザルIL-18と交差反応性である。カニクイザルおよびヒトIL-18エピトープは、100%同一である。

【0353】

実施例4

遊離IL-18アッセイ

遊離IL-18の濃度を、エレクトロルミネセント(EL)イムノアッセイにより測定した。

【0354】

0.625 µg/mlの濃度の抗体12GLを、96ウェルプレート(Standard Plate, Mesoscale Discovery)の炭素電極上に一晚コーティングした。ウェルを洗浄し、続いてI-ブロック緩衝液(Tropix)と1から3時間インキュベートした。スタンダードおよびQC濃縮物を、I-ブロック緩衝液中で組換えヒトIL-18(R&D Systems)から調製した。ウェルを洗浄し、スタンダード、QCおよび未希釈試験試料を室温において30分間インキュベートした。ウェルを洗浄し、0.5 µg/mlのビオチン化検出抗体(MBL International)をウェルに添加した。1時間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、ストレプトアビジン-スルホタグ(Mesoscale Discovery)をそれぞれのウェルに添加した。30分間のインキュベーション時間の後、ウェルを洗浄し、読取り緩衝液(Mesoscale Discovery)をそれぞれのウェルに添加した。ELシグナルをSector Imager 2400(Mesoscale Discovery)上で読み取った。結果を図16および17に示す。

【0355】

【表1】

表1; IFN γ 放出 KG-1 細胞アッセイにおいて試験した場合の改善された scFv クローンの効力の例

クローン(scFv)	IC ₅₀ (nM)	
	ヒト IL-18	アカゲザル IL-18
抗体 2	106.8 (n=2)	
抗体 3	44.4 (n=2)	
抗体 4	50 (n=2)	
抗体 5	45.1 (27.4-74.2; n=3)	
抗体 6	11.6 (4.8-28.2; n=5)	65.7 (20.2-213; n=4)
抗体 7	6.1 (3.8-9.6; n=7)	24.9 (11.0-56.3; n=5)
抗体 9	0.714 (n=2)	2.174 (n=2)
抗体 10	0.977 (n=2)	2.924 (n=2)

データは幾何平均として表現する(95%信頼区間;n)

【0356】

【表 2】

表 2 ; IFN γ 放出 KG-1 細胞アッセイにおいて試験した場合の改善された IgG₂ の効力の例

クローン	IC ₅₀ (nM)	
	ヒト IL-18	アカゲザル IL-18
抗体 2 IgG ₂	5 (n=1)	33 (n=1)
抗体 3 IgG ₂	4.1 (n=1)	21 (n=1)
抗体 4 IgG ₂	6.6 (n=1)	35 (n=1)
抗体 5 IgG ₂	5.4 (n=1)	30 (n=1)
抗体 9 IgG ₂	0.166 (0.1-0.275; n=4)	0.212 (0.141-0.319; n=3)
抗体 10 IgG ₂	0.220 (0.112-0.433; n=4)	0.338 (0.161-0.713; n=3)
抗体 11 IgG ₂	0.260 (0.06-1.115; n=3)	0.444 (n=2)

データは幾何平均として表現する(95%信頼区間;n)

10

【 0 3 5 7 】

【表 3】

表 3 ; IFN γ 放出 KG-1 細胞アッセイにおいて評価した場合の生殖細胞系列化最適化クローンについての効力データの例

クローン (生殖細胞系列化 IgG)	IC ₅₀ (nM)	
	ヒト IL-18	アカゲザル IL-18
抗体 1 GL IgG ₂	159 (n=1)	
抗体 6 GL IgG ₂	0.535 (0.257-1.115; n=3)	9.9 (n=2)
抗体 7 GL IgG ₂	0.314 (0.268-0.369; n=4)	2.497 (1.169-5.332; n=4)
抗体 8 GL IgG ₂	0.444 (0.323-0.610; n=11)	1.517 (1.166-1.974; n=9)
抗体 11 GL IgG ₂	0.194 (0.137-0.274; n=6)	0.276 (0.185-0.409; n=5)
抗体 12 GL IgG ₂	0.202 (0.142-0.288; n=6)	0.285 (0.187-0.436; n=5)
抗体 12 GL IgG ₁ TM	0.080 (0.063-0.1, 8)	0.461 (0.317-0.670, 8)

データは幾何平均として表現する(95%信頼区間;n)

30

【 0 3 5 8 】

【表 4】

表 4 ; IFN γ 放出 PBMC 細胞アッセイにおいて評価した場合の生殖細胞系列化最適化クローンについての効力データの例

クローン (生殖細胞系列化 IgG)	IC ₅₀ (nM)	
	ヒト PBMC	カニクイザル PBMC
抗体 8 GL IgG ₂	0.51 (n=1)	試験せず
抗体 11 GL IgG ₂	0.25 (n=1)	試験せず
抗体 12 GL IgG ₂	0.32 (n=1)	試験せず
抗体 12 GL IgG ₁ TM	0.15 (0.06-0.39, n=3)	0.28 (0.10-0.79, n=3)

データは幾何平均として表現する(95%信頼区間;試験した PBMC ドナーの数)

10

【 0 3 5 9 】

【表 5】

表 5 ; 組換えヒトおよびアカゲザル IL-18 に対する抗体 8 GL および抗体 12 GL のキネティック分析

クローン	ヒト IL-18			アカゲザル IL-18		
	K-on (1/Ms)	K-off (1/s)	KD (pM)	K-on (1/Ms)	K-off (1/s)	KD (pM)
抗体 8 GL IgG ₂	5.0x10 ⁵	5.49x10 ⁻⁵	110	4.36x10 ⁶	7.08x10 ⁻⁵	163
抗体 12 GL IgG ₂	8.85x10 ⁵	8.16x10 ⁻⁵	92	1.05x10 ⁶	4.79x10 ⁻⁵	46
抗体 12 GL IgG ₁ TM	4.6x10 ⁵	2.9x10 ⁻⁵	62.9	6.3x10 ⁵	3.5x10 ⁻⁵	54.7

20

30

【 0 3 6 0 】

【表 6】

表 6 ; ヒト IL-18 またはアカゲザル IL-18 を使用する KG-1 細胞アッセイにおける抗体 12GLIgG₁TM の pA₂ および KD 値の例

リガンド	pA ₂	KD (pM)
ヒト IL-18	-10.15 (-10.25 から -10.5; n=7)	71 (56 から 90; n=7)
アカゲザル IL-18	-9.85 (-10.34 から -9.35; n=4)	142 (46 から 440; n=4)

データは幾何平均として表現する(95%信頼区間;実験の数)

40

【 0 3 6 1 】

【表 7】

表 7 ; SPR を使用する抗 IL-18IgG 抗体 8 GL および抗体 12GL 特異性分析。得られた観察応答を緩衝液単独の応答と比較し、結合 (+) または非結合 (-) を示すものとして評価した。

クローン	分析物	結合
抗体 8 GL IgG ₂	ヒト IL-18	+
	アカゲザル IL-18	+
	ラット IL-18	-
	マウス IL-18	測定せず ^a
	ヒト IL-1 β	-
	ヒト IL-1F7/FIL1 ゼータ	-
抗体 12 GL IgG ₂	ヒト IL-18	+
	アカゲザル IL-18	+
	ラット IL-18	-
	マウス IL-18	-
	ヒト IL-1F7/FIL1 ゼータ	-
	ヒト IL-1 β	-
抗体 12 GL IgG ₁ TM	ヒト IL-18	+
	アカゲザル IL-18	+
	ラット IL-18	-
	マウス IL-18	-
	ヒト IL-1F7/FIL1 ゼータ	測定せず ^a
	ヒト IL-1 β	測定せず ^a

10

20

【 0 3 6 2 】

30

【表 8】

表 8 ; IL-18:抗体 12 GL の結晶およびリファインメント詳細

結晶およびリファインメント詳細	
空間群	P3121
細胞パラメータ	a=95.10 b=95.10 c= 316.10, a=b=90.0 g=120.0
分子数/a.u.	2
反射数	
合計数	327931
独立数	46619
分解能(Å)	50-2.70 (2.77-2.70) ^a
多重度	7.1(7.3) ^a
MnI/σ	14.5 (3.5) ^a
完全性(%)	99.8 (99.6) ^a
精度(%)	9.8 (71.1) ^a
モザイク性	0.7
R 因子(%)	24.65
フリーR 因子(%)	28.66
水分子数	79
理想値からの r.m.s.d.	
結合長(Å)	0.008
結合角(°)	1.00
平均 B 因子(Å ²)	
IL18 主鎖原子	62.4
IL18 全原子	62.4
Fab HC ^b 主鎖原子	41.5
Fab HC ^b 全原子	41.5
Fab LC ^b 主鎖原子	48.0
Fab LC ^b 全原子	47.9
水分子	39.5
^a 丸括弧中の数字は、外殻の分解能に対する数字を指す ^b HC = 重鎖、LC=軽鎖	

10

20

30

40

【 0 3 6 3 】

【表 9 - 1】

表 9 ; IL-18:抗体 12 GL 結晶構造の詳細

IL18:抗体 12 GLFab 相互作用に関与する残基間の計測距離(4Å 未満)。2つの残基間の最短計測距離を挙げる。最大推定誤差(SFcheck) = 0.202。
*非対称単位の2つの分子間の変動は、0.25Å 超である

IL18 残基	Fab 残基	Fab 鎖	距離(Å)	注釈
水素結合距離(2.4~3.2Å)				
Lys A 53 NZ	Ser L 91 O	LC	2.6	
Lys A 53 NZ	His L 92 O	LC	2.6	
Lys A 53 NZ	Asp H 100E OD	HC	2.9	
Pro A 57 O	Tyr H 52 OH	HC	2.5	
Arg 58 O	Tyr 58 OH	HC	3.2	
Arg 104 NE	Tyr 58 OH	HC	3.0	
Ser A 105 OG	Asp L 1 N	LC	2.8	
相互作用 < 4Å				
Tyr 1	Tyr 98	HC	3.6	
Tyr 1	Phe 99	HC	3.5	
Tyr 1	Gly 100	HC	3.8	
Gly 3	Tyr 98	HC	3.7	
Leu 5	Trp 32	LC	3.7	
Glu 6	Ser 30	LC	3.8*	側鎖について不十分な電子密度
Met 51	His 92	LC	3.4	側鎖について不十分な電子密度
Asp 54	Tyr 98	HC	3.7	
Lys 53	Thr 100D	HC	4.1*	
Lys 53	Tyr 98	HC	3.4	
Lys 53	Trp 32	LC	3.6	
Ser 55	Tyr 98	HC	3.4	
Ser 55	Phe 99	HC	3.7	
Ser 55	Ala 97	HC	3.3	

10

20

30

40

【 0 3 6 4 】

【表 9 - 2】

Ser	55	Tyr	35	HC	4.1	
Gln	56	Tyr	53	HC	3.4	
Gln	56	Tyr	52	HC	3.3*	
Pro	57	Tyr	35	HC	3.7	
Pro	57	Tyr	58	HC	3.5	
Pro	57	Pro	94	LC	3.5	
Pro	57	Trp	96	LC	3.7	
Pro	57	Asp	100E	HC	4.0	
Gly	59	Tyr	58	HC	3.7	
Gly	59	His	93	LC	3.6	
Gly	59	Pro	94	LC	3.5	
Met	60	His	92	LC	3.7	
Met	60	His	93	LC	3.7	

10

【 0 3 6 5 】

20

【表 10 - 1】

表 10; 以下の配列表の配列と、本明細書に記載の抗体の VH ドメイン、VL ドメイン、CDR およびフレームワーク領域との対応性

配列番号 1	抗体 1	VH DNA	
配列番号 2	抗体 1	VH PRT	
配列番号 3	抗体 1	HCDR1 PRT	
配列番号 4	抗体 1	HCDR2 PRT	10
配列番号 5	抗体 1	HCDR3 PRT	
配列番号 6	抗体 1	VL DNA	
配列番号 7	抗体 1	VL PRT	
配列番号 8	抗体 1	LCDR1 PRT	
配列番号 9	抗体 1	LCDR2 PRT	
配列番号 10	抗体 1	LCDR3 PRT	
配列番号 11	抗体 1 GL	VH DNA	
配列番号 12	抗体 1 GL	VH PRT	20
配列番号 13	抗体 1 GL	HCDR1 PRT	
配列番号 14	抗体 1 GL	HCDR2 PRT	
配列番号 15	抗体 1 GL	HCDR3 PRT	
配列番号 16	抗体 1 GL	VL DNA	
配列番号 17	抗体 1 GL	VL PRT	
配列番号 18	抗体 1 GL	LCDR1 PRT	
配列番号 19	抗体 1 GL	LCDR2 PRT	30
配列番号 20	抗体 1 GL	LCDR3 PRT	
配列番号 21	抗体 2	VH DNA	
配列番号 22	抗体 2	VH PRT	
配列番号 23	抗体 2	HCDR1 PRT	
配列番号 24	抗体 2	HCDR2 PRT	
配列番号 25	抗体 2	HCDR3 PRT	
配列番号 26	抗体 2	VL DNA	
配列番号 27	抗体 2	VL PRT	40
配列番号 28	抗体 2	LCDR1 PRT	
配列番号 29	抗体 2	LCDR2 PRT	
配列番号 30	抗体 2	LCDR3 PRT	

【 0 3 6 6 】

【表 10 - 2】

配列番号 31	抗体 3	VH DNA
配列番号 32	抗体 3	VH PRT
配列番号 33	抗体 3	HCDR1 PRT
配列番号 34	抗体 3	HCDR2 PRT
配列番号 35	抗体 3	HCDR3 PRT
配列番号 36	抗体 3	VL DNA
配列番号 37	抗体 3	VL PRT
配列番号 38	抗体 3	LCDR1 PRT
配列番号 39	抗体 3	LCDR2 PRT
配列番号 40	抗体 3	LCDR3 PRT
配列番号 41	抗体 4	VH DNA
配列番号 42	抗体 4	VH PRT
配列番号 43	抗体 4	HCDR1 PRT
配列番号 44	抗体 4	HCDR2 PRT
配列番号 45	抗体 4	HCDR3 PRT
配列番号 46	抗体 4	VL DNA
配列番号 47	抗体 4	VL PRT
配列番号 48	抗体 4	LCDR1 PRT
配列番号 49	抗体 4	LCDR2 PRT
配列番号 50	抗体 4	LCDR3 PRT
配列番号 51	抗体 5	VH DNA
配列番号 52	抗体 5	VH PRT
配列番号 53	抗体 5	HCDR1 PRT
配列番号 54	抗体 5	HCDR2 PRT
配列番号 55	抗体 5	HCDR3 PRT
配列番号 56	抗体 5	VL DNA
配列番号 57	抗体 5	VL PRT
配列番号 58	抗体 5	LCDR1 PRT
配列番号 59	抗体 5	LCDR2 PRT
配列番号 60	抗体 5	LCDR3 PRT
配列番号 61	抗体 6	VH DNA
配列番号 62	抗体 6	VH PRT
配列番号 63	抗体 6	HCDR1 PRT
配列番号 64	抗体 6	HCDR2 PRT

10

20

30

40

【表 10 - 3】

配列番号 65	抗体 6	HCDR3 PRT
配列番号 66	抗体 6	VL DNA
配列番号 67	抗体 6	VL PRT
配列番号 68	抗体 6	LCDR1 PRT
配列番号 69	抗体 6	LCDR2 PRT
配列番号 70	抗体 6	LCDR3 PRT
配列番号 71	抗体 6 GL	VH DNA
配列番号 72	抗体 6 GL	VH PRT
配列番号 73	抗体 6 GL	HCDR1 PRT
配列番号 74	抗体 6 GL	HCDR2 PRT
配列番号 75	抗体 6 GL	HCDR3 PRT
配列番号 76	抗体 6 GL	VL DNA
配列番号 77	抗体 6 GL	VL PRT
配列番号 78	抗体 6 GL	LCDR1 PRT
配列番号 79	抗体 6 GL	LCDR2 PRT
配列番号 80	抗体 6 GL	LCDR3 PRT
配列番号 81	抗体 7	VH DNA
配列番号 82	抗体 7	VH PRT
配列番号 83	抗体 7	HCDR1 PRT
配列番号 84	抗体 7	HCDR2 PRT
配列番号 85	抗体 7	HCDR3 PRT
配列番号 86	抗体 7	VL DNA
配列番号 87	抗体 7	VL PRT
配列番号 88	抗体 7	LCDR1 PRT
配列番号 89	抗体 7	LCDR2 PRT
配列番号 90	抗体 7	LCDR3 PRT
配列番号 91	抗体 7 GL	VH DNA
配列番号 92	抗体 7 GL	VH PRT
配列番号 93	抗体 7 GL	HCDR1 PRT
配列番号 94	抗体 7 GL	HCDR2 PRT
配列番号 95	抗体 7 GL	HCDR3 PRT
配列番号 96	抗体 7 GL	VL DNA
配列番号 97	抗体 7 GL	VL PRT
配列番号 98	抗体 7 GL	LCDR1 PRT

10

20

30

40

【 0 3 6 8 】

【表 10 - 4】

配列番号 99	抗体 7 GL	LCDR2 PRT
配列番号 100	抗体 7 GL	LCDR3 PRT
配列番号 101	抗体 8 GL	VH DNA
配列番号 102	抗体 8 GL	VH PRT
配列番号 103	抗体 8 GL	HCDR1 PRT
配列番号 104	抗体 8 GL	HCDR2 PRT
配列番号 105	抗体 8 GL	HCDR3 PRT
配列番号 106	抗体 8 GL	VL DNA
配列番号 107	抗体 8 GL	VL PRT
配列番号 108	抗体 8 GL	LCDR1 PRT
配列番号 109	抗体 8 GL	LCDR2 PRT
配列番号 110	抗体 8 GL	LCDR3 PRT
配列番号 111	抗体 9	VH DNA
配列番号 112	抗体 9	VH PRT
配列番号 113	抗体 9	HCDR1 PRT
配列番号 114	抗体 9	HCDR2 PRT
配列番号 115	抗体 9	HCDR3 PRT
配列番号 116	抗体 9	VL DNA
配列番号 117	抗体 9	VL PRT
配列番号 118	抗体 9	LCDR1 PRT
配列番号 119	抗体 9	LCDR2 PRT
配列番号 120	抗体 9	LCDR3 PRT
配列番号 121	抗体 10	VH DNA
配列番号 122	抗体 10	VH PRT
配列番号 123	抗体 10	HCDR1 PRT
配列番号 124	抗体 10	HCDR2 PRT
配列番号 125	抗体 10	HCDR3 PRT
配列番号 126	抗体 10	VL DNA
配列番号 127	抗体 10	VL PRT
配列番号 128	抗体 10	LCDR1 PRT
配列番号 129	抗体 10	LCDR2 PRT
配列番号 130	抗体 10	LCDR3 PRT
配列番号 131	抗体 11	VH DNA
配列番号 132	抗体 11	VH PRT

10

20

30

40

【表 10 - 5】

配列番号 133	抗体 11	HCDR1 PRT
配列番号 134	抗体 11	HCDR2 PRT
配列番号 135	抗体 11	HCDR3 PRT
配列番号 136	抗体 11	VL DNA
配列番号 137	抗体 11	VL PRT
配列番号 138	抗体 11	LCDR1 PRT
配列番号 139	抗体 11	LCDR2 PRT
配列番号 140	抗体 11	LCDR3 PRT
配列番号 141	抗体 11 GL	VH DNA
配列番号 142	抗体 11 GL	VH PRT
配列番号 143	抗体 11 GL	HCDR1 PRT
配列番号 144	抗体 11 GL	HCDR2 PRT
配列番号 145	抗体 11 GL	HCDR3 PRT
配列番号 146	抗体 11 GL	VL DNA
配列番号 147	抗体 11 GL	VL PRT
配列番号 148	抗体 11 GL	LCDR1 PRT
配列番号 149	抗体 11 GL	LCDR2 PRT
配列番号 150	抗体 11 GL	LCDR3 PRT
配列番号 151	抗体 12 GL	VH DNA
配列番号 152	抗体 12 GL	VH PRT
配列番号 153	抗体 12 GL	HCDR1 PRT
配列番号 154	抗体 12 GL	HCDR2 PRT
配列番号 155	抗体 12 GL	HCDR3 PRT
配列番号 156	抗体 12 GL	VL DNA
配列番号 157	抗体 12 GL	VL PRT
配列番号 158	抗体 12 GL	LCDR1 PRT
配列番号 159	抗体 12 GL	LCDR2 PRT
配列番号 160	抗体 12 GL	LCDR3 PRT
配列番号 161	生殖細胞系列化 VH FW1	
配列番号 162	生殖細胞系列化 VH FW2	
配列番号 163	生殖細胞系列化 VH FW3	
配列番号 164	生殖細胞系列化 VH FW4	
配列番号 165	生殖細胞系列化 VL FW1	
配列番号 166	生殖細胞系列化 VL FW2	

10

20

30

40

【表 10 - 6】

配列番号 167	生殖細胞系列化 VL FW3	
配列番号 168	生殖細胞系列化 VL FW4	
配列番号 169	ヒト IL-18	
配列番号 170	抗体 12 GL	最適化 VH DNA
配列番号 171	抗体 12 GL	最適化 VL DNA

【 0 3 7 1 】

10

【表 1 1】

表 11 ; 本明細書に記載の mAb の VH および VL ドメインならびに CDR についての配列番号

抗体	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	2	3	4	5	7	8	9	10
1_GL	12	13	14	15	17	18	19	20
2	22	23	24	25	27	28	29	30
3	32	33	34	35	37	38	39	40
4	42	43	44	45	47	48	49	50
5	52	53	54	55	57	58	59	60
6	62	63	64	65	67	68	69	70
6_GL	72	73	74	75	77	78	79	80
7	82	83	84	85	87	88	89	90
7_GL	92	93	94	95	97	98	99	100
8_GL	102	103	104	105	107	108	109	110
9	112	113	114	115	117	118	119	120
10	122	123	124	125	127	128	129	130
11	132	133	134	135	137	138	139	140
11_GL	142	143	144	145	147	148	149	150
12_GL	152	153	154	155	157	158	159	160

20

30

【 0 3 7 2 】

【表 15】

表 15 本明細書に記載の mAb の VH または VLCDR にわたる配列同一性

抗体	抗体 1	抗体 2	抗体 3	抗体 4	抗体 5	抗体 6	抗体 7	抗体 8	抗体 9	抗体 10	抗体 11	抗体 12	抗体 13	抗体 14	抗体 15	抗体 16	抗体 17	抗体 18	抗体 19	抗体 20	抗体 21	抗体 22	抗体 23	抗体 24	抗体 25	
抗体 1	100%																									
抗体 2	100%	100%																								
抗体 3	100%	100%	100%																							
抗体 4	100%	100%	100%	100%																						
抗体 5	100%	100%	100%	100%	100%																					
抗体 6	100%	100%	100%	100%	100%	100%																				
抗体 7	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%																			
抗体 8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%																		
抗体 9	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%																	
抗体 10	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%																
抗体 11	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%															
抗体 12	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%														
抗体 13	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%													
抗体 14	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%												
抗体 15	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%											
抗体 16	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%										
抗体 17	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%									
抗体 18	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%								
抗体 19	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%							
抗体 20	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%						
抗体 21	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%					
抗体 22	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%				
抗体 23	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%			
抗体 24	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
抗体 25	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

【表 1 6】

印刷(電子フォームの原本)

0-1	フォームPCT/RO/134 (SAFE) 寄託された微生物または他の生物材料に 関する表示(PCT規則13の2)	
0-1-1	右記を使用して作成	PCT オンライン出願 バージョン 3.5.000.225 MT/FQP 20020701/0.20.5.20
0-2	国際出願番号	EP2011073496
0-3	出願人または代理人の出願参照番号	IL18-10WO1

10

1	下記の表示は、明細書 において言及 される寄託された微生物または他の生物材料 に関連する:	
1-1	頁	26
1-2	行	29
1-3	寄託の証明	
1-3-1	寄託機関の名称	NCIMB NCIMB Ltd.
1-3-2	寄託機関のあて名	英国AB21 9YA、アパディーン、バックスパーン、 クレイブストーン・エステート、フォーガストンビルディング
1-3-3	寄託日	2010年11月23日(23.11.2010)
1-3-4	受託番号	NCIMB 41786
1-5	表示が適用される指定国	全指定

20

受理官庁のみ使用

0-4	本フォームは、国際出願で受理された: (はい/いいえ)	
0-4-1	権限者	

国際事務局のみ使用

30

0-5	本フォームは、右記の日付で国際事務局により 受理された:	02.01.2012
0-5-1	権限者	Thomas Rochaix

【 图 1 】

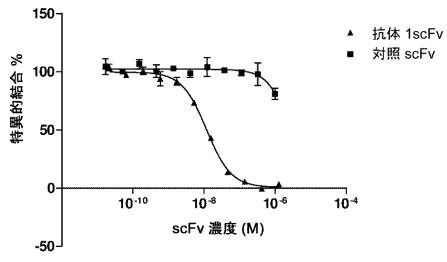
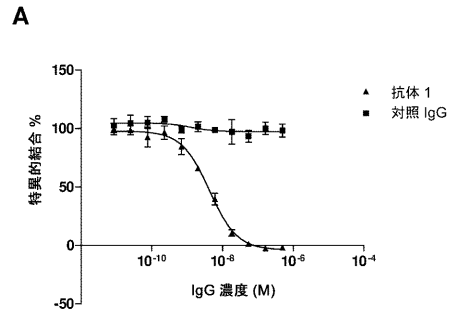


图 1

【 图 2 】



B

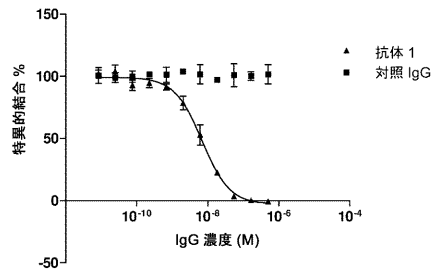


图 2

【 图 3 】

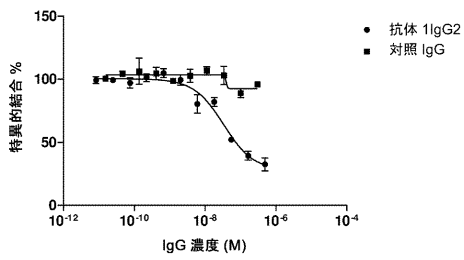


图 3

【 图 4 】

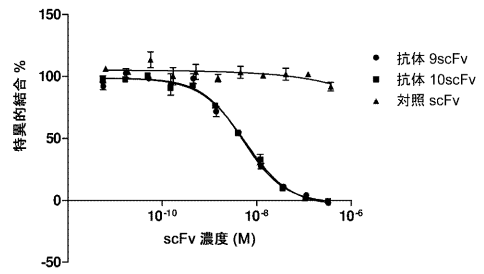


图 4

【 図 5 】

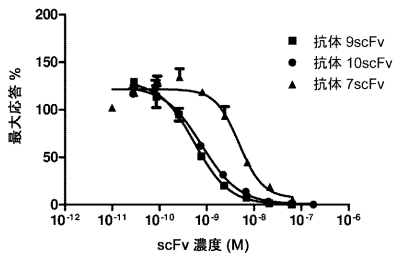
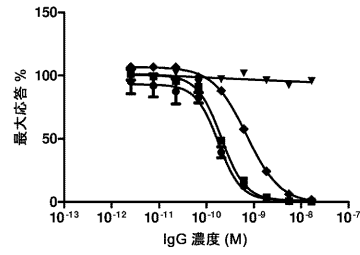


図 5

【 図 6 】

A



B

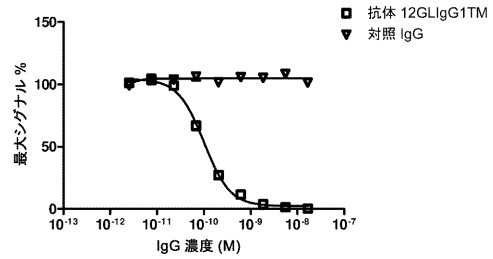
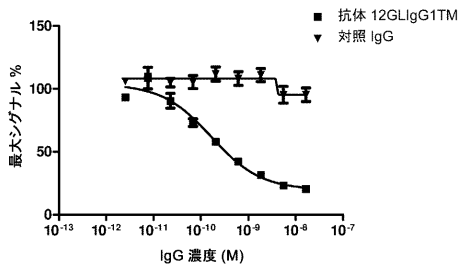


図 6

【 図 7 】

A



B

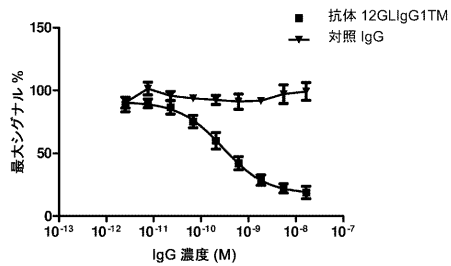


図 7

【 図 8 】

A

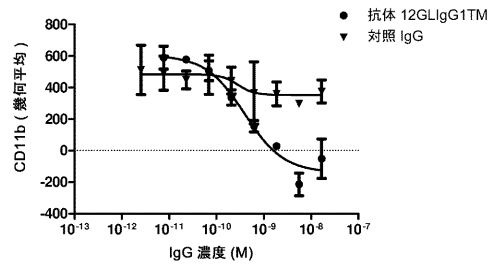


図 8

【 図 9 】

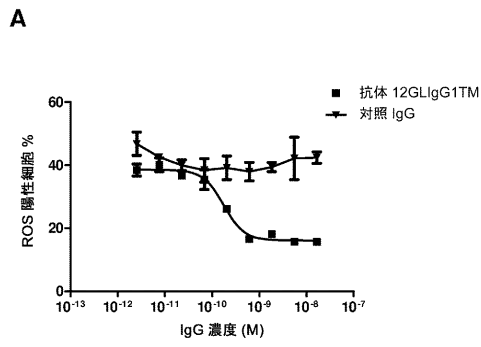
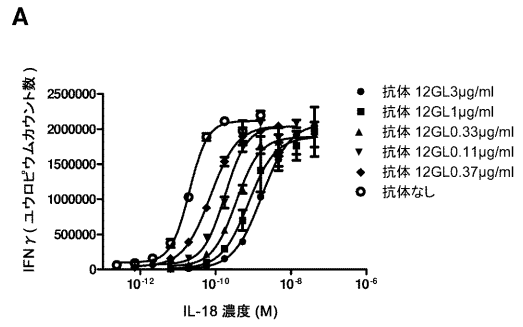


図 9

【 図 10 】



B

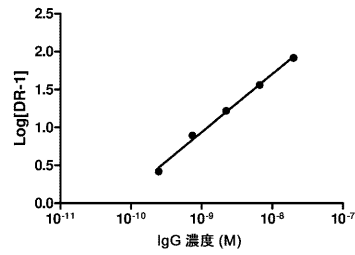


図 10

【 図 11 】

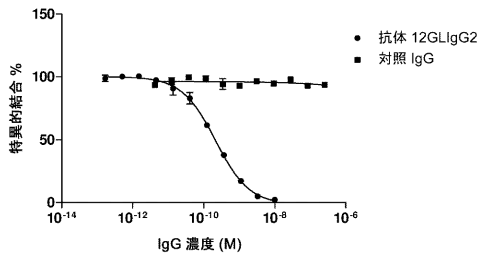


図 11

【 図 12 】

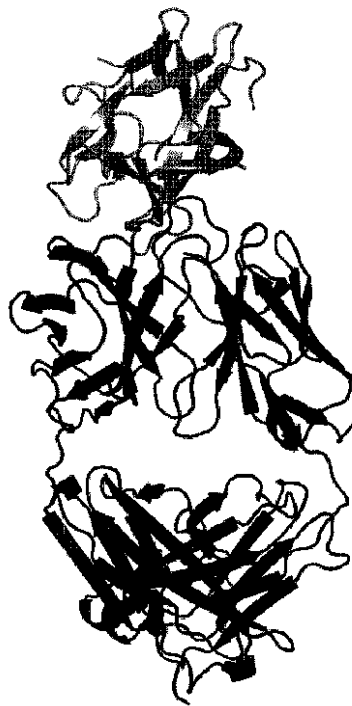


FIGURE 12

【 図 1 3 】

抗体 12GL YFGKLES₁LSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIS₁MY
 IL18-BP YFGKLES₁LSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIS₁MY

抗体 12GL KDSQPRGM₁AVTISVKCEKISTLSCENKISFKEMNPPDNKDKSDIFFQR₁SV
 IL18-BP KDSQPRGM₁AVTISVKCEKISTLSCENKISFKEMNPPDNKDKSDIFFQR₁SV

抗体 12GL PGHDNKM₁QFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE₁D
 IL18-BP PGHDNKM₁QFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE₁D

図 13

【 図 1 4 】

軽鎖、可変ドメイン :

FW1	CDR1	FW2	CDR2
DIQMTQSPSTLSASVIGDRVTITC	RASQGISWLA 30 32	WYQQKPGKAPK ₁ VLIY	KASTLES
FW3	CDR3	FW4	
GVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPD ₁ FATYYC	QQSH ₁ HP ₁ PWT 91 94 96	FGQG ₁ T ₁ KLEIK	

図 14A

重鎖、可変ドメイン :

FW1	CDR1	FW2	CDR2
QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSIS	ADGYY ₁ WS 35	WIRQPPGKLEWIG	SLYYSGST ₁ YNP ₁ SLKG 52 53 58
FW3	CDR3	FW4	
RVTISGDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	TPAY ₁ FG ₁ QDR ₁ TD ₁ FDV 57 109 100E	WGRG ₁ TL ₁ V ₁ SS	

図 14B

【 図 1 5 】

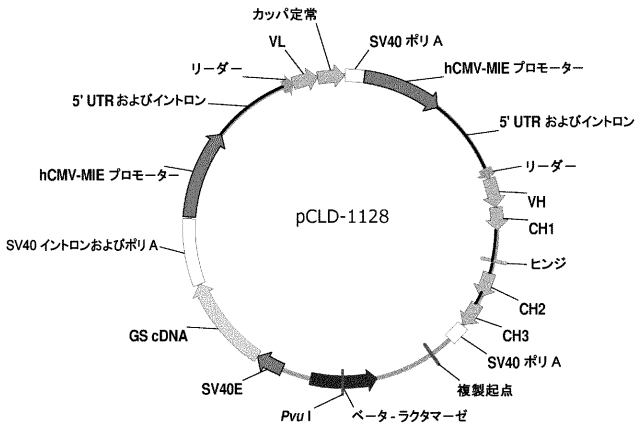


図 15

【 図 1 6 】

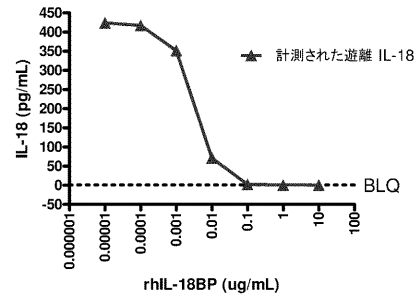


図 16

【 図 17 】

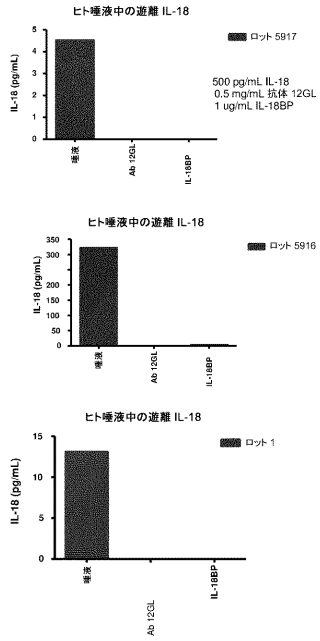


図 17

【 配列表 】

2014508511000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/073496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/24 ADD.		
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) 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) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search, COMPENDEX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/099545 A1 (ABBOTT LAB [US]; ARGIRIADI MARIA A [US]; BORHANI DAVID W [US]; XIANG T) 13 August 2009 (2009-08-13) page 5, line 10 - line 16 page 5, lines 21-25 -----	1-40
X	EP 1 621 616 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY [JP]; SUGIMURA KAZUHISA [JP]; CHEMO SERO T) 1 February 2006 (2006-02-01) examples -----	1-95
X	WO 01/58956 A2 (BASF AG [DE]; GHAYUR TARIQ [US]; DIXON RICHARD W [US]; ROGUSKA MIKE [U]) 16 August 2001 (2001-08-16) example 1 page 18, line 15 - line 18 page 13; table 5 page 5, line 13 - line 24 -----	1-95
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 6 February 2012		Date of mailing of the international search report 17/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Covone-van Hees, M

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/073496

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/047307 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; LABKOVSKY BORIS [US]; VOSS JEFFREY) 26 May 2005 (2005-05-26) page 1, paragraph 1 examples -----	1-95
A	WU CHENGBIN ET AL: "IL-18 receptor beta-induced changes in the presentation of IL-18 binding sites affect ligand binding and signal transduction.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 170, no. 11, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 5571-5577, XP002668730, ISSN: 0022-1767 the whole document -----	1-95
A	CAO Q ET AL: "Multimodality imaging of IL-18-binding protein-Fc therapy of experimental lung metastasis", CLINICAL CANCER RESEARCH 20081001 US LNKD-DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-0049, vol. 14, no. 19, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 6137-6145, XP002668731, ISSN: 1078-0432 the whole document -----	1-95
A	EP 1 705 191 A2 (HAYASHIBARA BIOCHEM LAB [JP]) 27 September 2006 (2006-09-27) the whole document -----	1-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/073496

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/073496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009099545 A1	13-08-2009	CA 2713342 A1	13-08-2009
		CN 102065892 A	18-05-2011
		EP 2247310 A1	10-11-2010
		JP 2011511777 A	14-04-2011
		US 2009202557 A1	13-08-2009
		WO 2009099545 A1	13-08-2009
		EP 1621616 A1	01-02-2006
CA 2523912 A1	11-11-2004		
CN 1780911 A	31-05-2006		
EP 1621616 A1	01-02-2006		
JP 4134166 B2	13-08-2008		
KR 20060015558 A	17-02-2006		
US 2006292145 A1	28-12-2006		
WO 2004097019 A1	11-11-2004		
WO 0158956 A2	16-08-2001	AR 027404 A1	26-03-2003
		AR 077568 A2	07-09-2011
		AU 3680701 A	20-08-2001
		AU 2006252098 A1	11-01-2007
		AU 2011201536 A1	28-04-2011
		BG 107045 A	30-05-2003
		BR 0108188 A	25-02-2003
		CA 2399148 A1	16-08-2001
		CN 1461310 A	10-12-2003
		CN 102206277 A	05-10-2011
		EP 1257585 A2	20-11-2002
		EP 2332579 A2	15-06-2011
		EP 2338515 A2	29-06-2011
		EP 2360184 A2	24-08-2011
		HU 0300423 A2	28-06-2003
		JP 2004500086 A	08-01-2004
		KR 20090078372 A	17-07-2009
		KR 20110032012 A	29-03-2011
		MX PA02007756 A	10-09-2004
		NO 20023788 A	09-10-2002
		NZ 520392 A	29-04-2005
		PL 356836 A1	12-07-2004
		SK 12942002 A3	02-05-2003
		TW 1335336 B	01-01-2011
		TW 201036638 A	16-10-2010
		US 2010104563 A1	29-04-2010
		US 2011008357 A1	13-01-2011
WO 0158956 A2	16-08-2001		
ZA 200206266 A	06-11-2003		
WO 2005047307 A2	26-05-2005	AU 2004290073 A1	26-05-2005
		BR PI0416255 A	09-01-2007
		CA 2543920 A1	26-05-2005
		CN 1902229 A	24-01-2007
		CN 101948539 A	19-01-2011
		CN 101979412 A	23-02-2011
		EP 1685152 A2	02-08-2006
		EP 2385070 A1	09-11-2011
		EP 2395020 A2	14-12-2011
		JP 2007510435 A	26-04-2007
		JP 2011097946 A	19-05-2011
		JP 2011097947 A	19-05-2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/073496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR 20060123148 A	01-12-2006
		NZ 582097 A	29-07-2011
		US 2005100965 A1	12-05-2005
		WO 2005047307 A2	26-05-2005
		ZA 200603733 A	31-10-2007

EP 1705191	A2	27-09-2006	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
	G 0 1 N 33/53	P

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

- (72) 発明者 クレア・ドブソン
英国シービー 2 1・6 ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グラント・パーク、ミル
スタイン・ビルディング、メドイミュン・リミテッド
- (72) 発明者 スティーブン・レイン
英国シービー 2 1・6 ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グラント・パーク、ミル
スタイン・ビルディング、メドイミュン・リミテッド
- (72) 発明者 フィリップ・ニュートン
英国シービー 2 1・6 ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グラント・パーク、ミル
スタイン・ビルディング、メドイミュン・リミテッド
- (72) 発明者 マルティン・シュヴィカート
アメリカ合衆国 9 4 6 1 8 カリフォルニア州オークランド、ベンベニュー・アベニュー 6 4 8 0 番
・ナンバー 2
- (72) 発明者 アン・カルロット・ステッフェン
英国シービー 2 1・6 ジーエイチ、ケンブリッジ、グラント・パーク、ミルスタイン・ビルディン
グ、メドイミュン・リミテッド内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA06 CA07 DA03 EA04 GA11 HA01 HA06
HA15
4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA93X AA93Y AA94Y AB01 AC14 BA01 BD14 BD15 BD18 CA24
CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 DD62 DD63 EE01 GG01 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74
GA10 GA15 GA26

专利名称(译)	抗IL-18抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2014508511A	公开(公告)日	2014-04-10
申请号	JP2013545325	申请日	2011-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	Medoju有限公司排放		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司有限公司		
[标]发明人	クレアドブソン スティーブンレイン フィリップニュートン マルティンシュヴィカート アンカルロットステッフエン		
发明人	クレアドブソン スティーブンレイン フィリップニュートン マルティンシュヴィカート アンカルロットステッフエン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C12P21/08 C12N15/02 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/715 C07K19/00 A61K39/395 A61P9/10 A61P11/00 A61P29/00 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P9/10 A61P11/00 A61P29/00 A61P37/02 C07K16/244 C07K2299/00 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/52 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12P21/08 C12N15/00.C C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K14/715 C07K19/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/10 A61P11/00 A61P29 /00 A61P37/02 G01N33/53.P		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA01 4B024/HA06 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BD14 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065 /CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045 /EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	田中, 三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/424920 2010-12-20 US		
其他公开文献	JP2014508511A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供对白细胞介素-18具有特异性结合亲和力的人，人源化和/或嵌合抗体及其片段，衍生物/缀合物及其组合物。本发明包括这些抗体在诊断和治疗与IL-18活性增加有关的疾病中的用途，并且是治疗中的药物组合物形式。

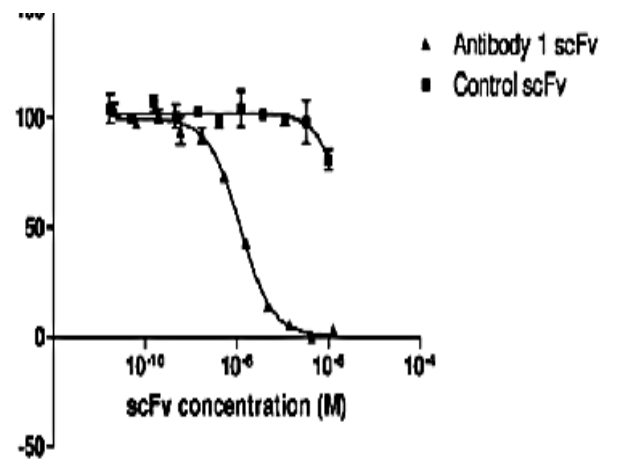


FIGURE 1