

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536605

(P2004-536605A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 4
A 6 1 P 19/02	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 5
C O 7 K 16/24	A 6 1 P 19/02	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10	C O 7 K 16/24	Z N A 4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 134 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-515633 (P2003-515633)	(71) 出願人	590005922
(86) (22) 出願日	平成14年7月18日 (2002.7.18)		イーライ・リリー・アンド・カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月26日 (2004.1.26)		E L I L L Y A N D C O M P A N Y
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/021281		
(87) 国際公開番号	W02003/010282		アメリカ合衆国46285インディアナ州
(87) 国際公開日	平成15年2月6日 (2003.2.6)		インディアナポリス市、リリー・コーポ
(31) 優先権主張番号	60/307, 973		レイト・センター
(32) 優先日	平成13年7月26日 (2001.7.26)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 恭生
(31) 優先権主張番号	60/312, 278	(74) 代理人	100103230
(32) 優先日	平成13年8月14日 (2001.8.14)		弁理士 高山 裕貢
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087114
			弁理士 齋藤 みの里
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インターロイキン1β抗体

(57) 【要約】

本発明は、インビボでIL-1β活性を中和する高親和性抗体に関する。これらの抗体は、慢性関節リウマチおよび骨関節症のような種々の疾患を治療するために用いられ得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体が、マウスモノクローナル抗体Mu007またはヒト型抗体Hu007と同じ成熟ヒトIL-1 β 上のエпитープに結合する、成熟ヒトIL-1 β に特異的に結合する抗体。

【請求項 2】

ヒトIL-1 β に対するマウスモノクローナル抗体Mu007の親和定数の10倍以内である親和定数で成熟ヒトIL-1 β に特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 および配列番号 10 からなる群から選択される配列を有する相補性決定基を少なくとも 1 つ含有する、請求項 1 または 2 に記載の抗体。 10

【請求項 4】

抗体が配列番号 27 の配列を有する軽鎖可変部を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

抗体が配列番号 28 の配列を有する重鎖可変部を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 6】

配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 に対応する配列を含む 3 つの軽鎖相補性決定基(CDR)からなるヒト型軽鎖、ならびに配列番号 8、配列番号 9 および配列番号 10 に対応する配列を有する 3 つの重鎖CDRからなるヒト型重鎖を含む、成熟ヒトIL-1 β に特異的に結合するヒト型抗体。 20

【請求項 7】

配列番号 27 の配列を有する軽鎖可変部を含む、請求項 6 に記載のヒト型抗体。

【請求項 8】

配列番号 28 の配列を有する重鎖可変部を含む、請求項 6 に記載のヒト型抗体。

【請求項 9】

配列番号 11 の配列を有する軽鎖可変部および配列番号 15 の配列を有する重鎖可変部を含む、請求項 6 に記載のヒト型抗体。

【請求項 10】

配列番号 13 の配列を有する軽鎖可変部および配列番号 17 の配列を有する重鎖可変部を含む、請求項 9 に記載のヒト型抗体。 30

【請求項 11】

抗体の可変ドメインが、1 種以上のヒトイムノグロブリン重鎖または軽鎖可変ドメイン生殖細胞系配列に対応するフレームワーク領域、および配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 および配列番号 10 に対応する配列を有する相補性決定基(CDR)を有している、ヒトIL-1 β に特異的に結合する抗体。

【請求項 12】

相補性決定基(CDR)が、抗体Mu007のCDRに対応する修飾形態のCDRであり、この修飾によりHu007抗体の結合親和性または生物学的活性と比較して結合親和性または生物学的活性を改善するCDRからなる、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体の酵素切断により得られる、抗体フラグメント。 40

【請求項 14】

FabまたはF(ab')₂フラグメントである、請求項 13 に記載の抗体フラグメント。

【請求項 15】

1 本鎖抗体である請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 16】

抗体がIgGイソタイプを有する、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 17】

イソタイプがIgG1 およびIgG4 からなる群から選択される、請求項 16 に記載の抗体。 50

【請求項 18】

イソタイプがIgG1である、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

抗体が、成熟ヒトIL-1 β に対するMu007の結合親和性の5倍以内である成熟ヒトIL-1 β に対する結合親和性を有する、請求項 1～18 のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 20】

Mu007の結合親和性が3倍以内である、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

重鎖または軽鎖可変フレームワーク領域が抗体Mu007の対応するフレームワーク領域と少なくとも65%の同一性を有する、請求項 1～20 のいずれか1項に記載の抗体。

10

【請求項 22】

配列同一性が少なくとも70%である、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 23】

配列同一性が少なくとも80%である、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 24】

抗体が、成熟ヒトIL-1 β に対するMu007のIC50の10倍以内である成熟ヒトIL-1 β に対するIC50を有する、請求項 1～23 のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 25】

抗体がMu007の5倍以内であるIC50を有する、請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 26】

抗体がMu007の3倍以内であるIC50を有する、請求項 25 に記載の抗体。

20

【請求項 27】

請求項 1～26 のいずれか1項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む、単離核酸。

【請求項 28】

配列番号1、配列番号3、配列番号11、配列番号13、配列番号15および配列番号17からなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドを1種以上含む、請求項 27 に記載の核酸。

【請求項 29】

配列番号13および配列番号17に対応する配列を有するポリヌクレオチドを含む、請求項 28 に記載の核酸。

30

【請求項 30】

請求項 27～29 のいずれか1項に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 31】

宿主細胞が請求項 1～26 のいずれか1項に記載の抗体を発現する、請求項 30 に記載の発現ベクターで安定にトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項 32】

宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巢細胞、SP2/0骨髓腫細胞、NS0骨髓腫細胞、ゴールデンハムスター卵巢細胞および胚腎臓細胞からなる群から選択される、請求項 31 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 33】

チャイニーズハムスター卵巢細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 34】

抗体の発現に安定な条件下で請求項 32 の宿主細胞を培養すること、および該抗体を細胞培養物から回収することを含む、抗体の製造方法。

【請求項 35】

請求項 1～26 のいずれか1項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 36】

請求項 1～26 のいずれか1項に記載の抗体を有効量で被検体に投与することを含む、慢性関節リウマチまたは骨関節症の治療方法。

50

【請求項 37】

請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効量で、軟骨の破壊の阻害を必要とする被検体に投与することを含む、軟骨の破壊を阻害する方法。

【請求項 38】

慢性関節リウマチまたは骨関節症を有する被検体の治療用医薬の製造のための、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【請求項 39】

軟骨の破壊を阻害する必要がある被検体で軟骨の破壊を阻害するための医薬の製造用の、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本出願は米国仮出願出願番号 60/307973(2001年 7 月 26 日出願、現在放棄)および米国仮出願出願番号 60/312,278(2001年 8 月 14 日出願、現在放棄)の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

インターロイキン-1 β (IL-1 β) は前炎症性サイトカインである。IL-1 β 過剰産生は種々の疾患(慢性関節リウマチおよび骨関節症など)の病因に関与している。IL-1 β は、接着分子のアップレギュレーション、プロスタグランジンおよびメタロプロテイナーゼの産生刺激、コラーゲンおよびプロテオグリカン合成の阻害、および破骨細胞骨吸収の刺激による関節の炎症滑膜への細胞遊走の上昇を示している。これらの特性により、IL-1 は関節炎における骨および軟骨の破壊の主なメディエーターの 1 つである。それゆえ、IL-1 β の活性を低下させる薬剤は、関節炎のような疾患に対する治療の可能性を示す。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

3 種の IL-1 遺伝子ファミリー、IL-1 α 、IL-1 β および IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) がある。IL-1 α および IL-1 β は IL-1 レセプターのアゴニストであり、他方、IL-1ra は特異的レセプターアンタゴニストであり、それゆえ、IL-1 の内因性の競合インヒビターである。臨床試験において、組換え IL-1ra の投与は、重篤な慢性関節リウマチを有する患者においてプラセボと比較して顕著な臨床上的改善を提供した。さらに、IL-1ra の投与は進行性関節損傷の速度を低下させた。しかしながら、薬物動態特性が良くなく、投与される必要のある大用量が、組換え IL-1ra を理想の治療用薬剤よりも劣ったものになっている。

30

【0004】

IL-1 β に対する高親和性の中和抗体は、優れた治療薬剤を作製する。高親和性結合で結合した、通常の排泄半減期の長い抗体は、組換え IL-1ra よりもかなり低い濃度でかなり少ない頻度で投薬し得る治療薬剤を生じる。多数の IL-1 β 抗体が記載されているが、高親和性、高い特異性および強力な中和活性を有するモノクローナル抗体を同定することは非常に困難であった。

【課題を解決するための手段】

40

【0005】

本発明は、ヒト IL-1 β に対する独特の(unique)マウス抗体由来のヒト型 IL-1 β 抗体に関する。これらの抗体は、強力な IL-1 β 中和活性および IL-1 β に対する高い特異性を有する高親和性抗体である。

【発明の効果】

【0006】

本発明は、成熟ヒト IL-1 β に特異的に結合する抗体に関する。本明細書中に記載の、および特許請求の範囲の抗体は、成熟ヒト IL-1 β 上の同一のエピトープに、マウスモノクローナル抗体 Mu007 またはヒト型抗体 Hu007 が結合するヒト IL-1 β 上のエピトープと同一のエピトープに結合する。本発明は、成熟ヒト IL-1 β に、マウスモノクローナル抗体 Mu007 のヒ

50

トIL-1 β に対する親和性定数の10倍以内の親和性定数で特異的に結合する抗体を含む。また、本発明は、以下からなる群から選択される配列を有する、少なくとも1つの相補性決定部位を含む抗体、好ましくはヒト型抗体を含む；配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9および配列番号10。ヒト起源の軽鎖可変フレームワークおよび配列番号5、6および7に対応する配列を有する3個のCDR、およびヒト起源の重鎖可変フレームワークおよび配列番号8、9および10に対応する配列を有する3個のCDRを備えたヒト型抗体が最も好ましい。本発明の抗体は、マウスモノクローナル抗体Mu007中の対応するフレームワーク領域と少なくとも65%の同一性を有するフレームワーク領域を含む抗体を含む。

【0007】

10

また、本発明の抗体はマウスモノクローナル抗体Mu007またはヒト型抗体Hu007の10倍以内の結合親和性を有し、マウスモノクローナル抗体Mu007またはヒト型抗体Hu007の10倍以内のIC50値の強力な中和活性を有することが好ましい。

【0008】

本発明は、本明細書中に記載の、および特許請求の範囲に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸に関する。本発明はまた、本明細書中に記載の、および特許請求の範囲に記載の抗体を発現する、これらのポリヌクレオチドでトランスフェクトした宿主細胞に関する。

【0009】

本発明は、本明細書中に記載の、および特許請求の範囲に記載の抗体を有効量で被検体に投与することを含む慢性関節リウマチおよび骨関節症の治療方法、ならびに関節炎になり易い、または関節炎を有する被検体で生じる軟骨の破壊の阻害方法に関する。

20

【0010】

本発明は、マウスモノクローナル抗体Mu007が結合するヒトIL-1 β 上のエピトープと同一のエピトープに結合する、抗体、好ましくはヒト型抗体に関する。好ましくは、これらの抗体はMu007抗体の相補性決定部位(CDR)からなる。これらの抗体のフレームワークおよび他の部分は、ヒト生殖細胞系を起源とし得る。Mu007抗体のヒト型バージョンは、Mu007マウス抗体で観察される高い親和性、高い特異性および強力な中和活性を保持する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

30

本明細書中で用いる用語「治療(処置)」は、処置される病態がすでに存在することが知られている場合の治療的処置、および予防、すなわち、病態の将来の発生の可能性の予防または改善を含む。

【0012】

「被検体」は、治療の必要性を有する哺乳動物、好ましくはヒトを意味する。治療の必要性を有する被検体としては、関節炎になり易い哺乳動物、任意の軟骨破壊を示す哺乳動物、および慢性関節リウマチまたは骨関節症に関連した兆候および症状を有する哺乳動物が挙げられる。

【0013】

「単離核酸」は、天然の核酸供給源と通常は関係のある少なくとも1種の英雑物核酸分子から単離され、分離されている核酸分子である。このような単離核酸分子は、天然で見出される形態または配置以外のものである。従って、単離核酸分子は天然の細胞中に存在する場合の核酸分子と区別される。しかし、単離ポリペプチド(抗体)コード核酸分子としては、核酸分子が天然の細胞とは異なる染色体位置にある、通常ポリペプチドを発現する細胞に含まれるポリペプチド(抗体)コード核酸分子が挙げられる。

40

【0014】

「抗体」は、マウスモノクローナル抗体Mu007またはヒト型抗体Hu007が結合するエピトープと同一のエピトープに結合する、全長重鎖および軽鎖を有する完全な抗体分子、そのフラグメント(例えば、F_{ab}、F_{ab}、またはF_{(ab)2})またはFvフラグメント、1本鎖抗体フラグメント(例えば、1本鎖Fv)、軽鎖または重鎖の一量体または二量体、連結構造によ

50

り互いに結合した、2、3、4以上の抗体またはそのフラグメントを含む多価モノ特異的抗原結合タンパク質、または上記の任意のもののアナログ。本明細書中の文脈において、フラグメントは具体的に強調して記載されているが、それ以外の場合にはフラグメントが特記されているかどうかにかかわらず、用語「抗体」がそのようなフラグメントならびに1本鎖形態を含むことが理解される。タンパク質がヒトIL-1 β 上のMu007またはHu007が結合するエピトープと同じエピトープに結合する能力を保持している限り、用語「抗体」の定義内に含まれる。好ましくは、しかし必ずしも必須ではないが、本発明に有用な抗体は組換え技術により産生される。抗体はグリコシル化されていても、グリコシル化されていなくとも良いが、グリコシル型抗体が好ましい。

【0015】

10

成熟ヒトIL-1 β に「特異的に結合する」抗体としては、当該分野において公知の成熟型ヒトIL-1 β に結合する上記の抗体、図3に示す抗体、および成熟ヒトIL-1 α に結合しない抗体が挙げられる。成熟ヒトIL-1 β に特異的に結合する抗体は、他の種起源の成熟IL-1 β にいくらか交差反応性を示し得る。

【0016】

基本的な抗体構造単位は、四量体であることが知られている。各四量体は2つの同一のポリペプチド鎖対からなり、各対は1本の「軽」鎖(約25kDa)および1本の「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主な抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は主にエフェクター機能を担う定常域を規定する。

20

【0017】

軽鎖は κ および λ に分類される。重鎖は γ 、 μ 、 α 、 δ または ϵ に分類され、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体イソタイプを規定する。軽鎖および重鎖内で、可変域および定常域は約12以上のアミノ酸の「J」領域により連結され、また、重鎖は約3以上のアミノ酸の「D」領域を含んでいる。

【0018】

IgG抗体は血清中で最も豊富なイムノグロブリンである。また、IgGは血清中の任意のイムノグロブリンの中で最も長い半減期を有する。他のイムノグロブリンとは異なり、IgGはFcRnに結合した後効率的に再循環する。4種のIgGサブクラス、G1、G2、G3およびG4が存在し、これらは各々異なるエフェクター機能を有する。G1、G2およびG3はC1qに結合し、補体を固定することができるが、他方、G4はできない。G3はG1よりも効率的にC1qと結合することができるが、G1の方が補体依存性細胞溶解の媒介に有効である。G2は非常に非効率的に補体を固定する。IgG中のC1q結合部位はCH2ドメインのカルボキシ末端領域に位置する。

30

【0019】

IgGサブクラスは全て、Fcレセプター(CD16、CD32、CD64)と結合することができ、G1およびG3は、G2およびG4よりも効率的である。IgGのFcレセプター結合領域は、CH2ドメインのヒンジおよびカルボキシ末端領域の両方に位置する残基により形成される。

【0020】

IgAは、一量体およびJ鎖により共に保持されている二量体形態の両方で存在し得る。IgAは血清中で2番目に豊富なIgであるが、半減期はわずか6日間である。IgAは3つのエフェクター機能を有する。マクロファージおよび好酸球上のIgA特異的レセプターに結合し、それぞれ食作用および脱顆粒を引き起こす。また、未知の別の経路を介して補体を固定するかもしれない。IgMは五量体または六量体のいずれかで発現され、これらは両方ともJ鎖とともに保持されている。IgMは血清中での半減期が5日間である。そのCH3ドメインに位置する結合部位を介してC1qに弱く結合する。IgDは血清中での半減期が3日間である。どのようなエフェクター機能がこのIgにあるのかは不明である。IgEは一量体Igであり、血清中での半減期が2.5日間である。IgEは2つのFcレセプターに結合し、これは脱顆粒を引き起こし、前炎症因子の放出を生じる。

40

【0021】

50

所望のインビボ効果および所望の半減期に応じて、本発明の抗体は上記の任意のイソタイプを含み得るか、または補体および／Fcレセプター結合機能が変化している変異領域を含み得る。

【0022】

各軽鎖／重鎖対の可変域は抗体結合部位を形成する。従って、インタクトな抗体は2つの結合部位を有する。鎖は全て、3つの超可変部(相補性決定基またはCDRとも呼ぶ)により連結した比較的保存されているフレームワーク領域(FR)の同じ全体構造を示す。各対の2つの鎖に由来するCDRをフレームワーク領域により整列させると特異的エピトープに結びつけることができる。N-末端からC-末端で、軽鎖および重鎖は両方とも、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の配置は、周知の慣例に従って行う[Kabat「Sequences of Proteins of Immunological Interest」National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987および1991; Chothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら、Nature 342:878-883 (1989)]。

10

【0023】

「ヒト型抗体」は、ヒト抗体生殖細胞系または転移配列に由来するアミノ酸配列から部分的に、または完全に構成されており、非ヒト相補性決定基(CDR)を有する抗体の配列を変更することにより作製される抗体を意味する。フレームワーク領域の可変域を、対応するヒトフレームワーク領域で置換し、非ヒトCDRは実質的にインタクトなままに残す。フレームワーク領域は完全にヒトであってもよく、標的抗原に対する抗体の結合に影響を与える領域内の置換を含んでいてもよい。これらの領域は、対応する非ヒトアミノ酸で置換されていてもよい。本明細書中に記載のように、ヒト型抗体の文脈中での抗体とは、全長抗体に限定されず、フラグメントおよび1本鎖形態を含み得る。

20

【0024】

ヒト型抗体は、ヒト治療での使用に関して、非ヒトおよびキメラ抗体を超える種々の利点を有する可能性がある。例えば、ヒト免疫系はヒト型抗体のフレームワークまたは定常部を異種として認識せず、それゆえ、このような注射抗体に対する抗体反応は完全に異種の非ヒト抗体または部分的に異種のキメラ抗体よりも少ない。さらに、注射したヒト型抗体は、通常、循環中において注射した非ヒト抗体よりも長い半減期を有する。さらに、エフェクター機能が望ましい場合、エフェクター部分はヒトであるので、ヒト免疫系の他の部分とよりよく相互作用する可能性がある。

30

【0025】

好ましくは、本発明の抗体はマウス抗体Mu007由来のCDRを含む。マウスMu007抗体の軽鎖可変域に対するcDNAおよびアミノ酸配列は以下のとおりである。

【数1】

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGA

D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R

GTCACATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTGATAGGTATTTAAGTTGGTTCCAGCAG

V T I T C K A S Q D I D R Y L S W F Q Q

AAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGTAAGAGATTGGTAGATGGGGTC

K P G K S P K T L I Y R V K R L V D G V

10

CCATCAAGGTTCACTGGCAGCGCATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTG

P S R F S G S A S G Q D Y S L T I S S L

CAGTATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTACACGTTT

Q Y E D M G I Y Y C L Q Y D E F P Y T F

20

GGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

G G G T K L E I K [配列番号1]

Kabatの定義に基づくCDRには下線を付す。成熟軽鎖はアスパラギン酸残基で始まる。配列番号1の直前にあるかもしれない一本鎖配列は以下のとおりである。

【数2】

30

ATGGACATGAGGACCCCTGCTCAGTTTCTTGGAATCTTTTCTTCTGGTTTCCAGGTATC

M D M R T P A Q F L G I F F F W F P G I

AGATGT

R C [配列番号19]

【0026】

マウスMu007抗体の重鎖可変部に対するcDNAおよびアミノ酸配列は以下のとおりである。

40

【数3】

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S

GTGAAGGTGTCCTGCAAGGTGTCTGGCTACACATTCAGTAGGTATTGGATAGAGTGGGTT

V K V S C K V S G Y T F S R Y W I E W V

AGACAGGCACCTGGAAAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAATGGAAAT

R Q A P G K G L E W I G E I L P G N G N

10

ATTAACTACAATGAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACAATCACAGCAGATACATCCACAGAT

I N Y N E K F K G K A T I T A D T S T D

ACAGCCTACATGGAACCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACAGCCGTCTATTATTGTTCA

T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C S

ACAATCTACTATGATTACGACCAGGGGTTTACTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACT

T I Y Y D Y D Q G F T Y W G Q G T L V T

20

GTTTCTGCA

V S A

[配列番号3]

Kabatの定義に基づくCDRには下線を付す。成熟軽鎖はグルタミン残基で始まる。配列番号2の直前にあるかもしれない一本鎖配列は以下のとおりである。

【数4】

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCC

M E W T W V F L F L L S V T A G V H S

30

[配列番号21]

【0027】

本発明の好ましい抗体は、結合特異性、結合親和性、およびMu007で観察される効力と類似の効力を有する。本発明の抗体を規定する特性は、主に抗体の可変部にある。従って、定常部の任意の文脈においてMu007抗体の完全な軽鎖および重鎖の可変部を用いることができ、結合親和性および特異性、ならびに成熟ヒトIL-1 β を中和する能力は通常、影響を受けない。本明細書中で用いる「Mu007」は、任意のマウス定常部、好ましくは κ 軽鎖および γ -1重鎖の文脈において配列番号1および配列番号3で示される可変鎖配列を意味する。

40

【0028】

本発明の好ましい抗体は、1種以上のCDRと以下のアミノ酸配列からなるヒト型抗体である。

【数5】

軽鎖 CDR1:

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr Leu Ser [配列番号5]

軽鎖 CDR2:

Arg Val Lys Arg Leu Val Asp [配列番号6]

軽鎖 CDR3:

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Tyr Thr [配列番号7]

10

重鎖 CDR1:

Arg Tyr Trp Ile Glu [配列番号8]

重鎖 CDR2:

Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
Lys Gly [配列番号9]

20

重鎖 CDR3:

Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr [配列番号10]

【0029】

基本的に、任意のヒト抗体由来のフレームワーク配列は、CDR継ぎ合せのための鋳型として機能し得る。しかしながら、このようなフレームワークへの直鎖置換は、抗原への結合親和性をいくらか損失することが多い。ヒト抗体が本来のマウス抗体に対して相同であればあるほど、マウスCDRとヒトフレームワークとの組み合わせが、CDR中へのひずみ(これが親和性を低下させ得る)を導入する可能性がおそらく低くなる。従って、CDRは除いて、マウス可変フレームワークを置き換えるために選択したヒト可変フレームワークは、マウス抗体可変部フレームワークと少なくとも65%の配列同一性を有することが好ましい。CDRは除いて、ヒトおよびマウス可変部が、少なくとも70%の配列同一性を有することがより好ましい。CDRは除いて、ヒトおよびマウス可変部が、少なくとも75%の配列同一性を有することがさらに好ましい。CDRは除いて、ヒトおよびマウス可変部が、少なくとも80%の配列同一性を有することが最も好ましい。例えば、図1に示す、本発明の抗体の可変軽鎖に対する好ましいヒトフレームワーク領域は、対応するマウス配列(CDR以外)と約80%の配列同一性を有する。図2に示す本発明の抗体の可変重鎖に対して好ましいヒトフレームワーク領域は、対応するマウス配列(CDR以外)と約70%の配列同一性を有する。

30

【0030】

重鎖および軽鎖可変部フレームワーク残基は、同一または異なるヒト抗体配列に由来し得る。ヒト抗体配列は天然に存在するヒト抗体の配列であってもよく、またはいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であってもよい。本発明のヒト型抗体の重鎖可変部に対する好ましいヒトフレームワーク配列には、VHセグメントDP-5 (Tomlinsonら、(1992) J. Mol. Biol. 227:776-798)およびJセグメントJH4 (Ravetchら、(1981) Cell 27:583-591)が挙げられる。VkセグメントL1 (Coxら(1994) Eur. J. Immunol. 24:827-836) およびJセグメントJk2(Hieterら(1982) J. Biol. Chem. 10:1516-1522)は、ヒト型軽鎖可変部に対するフレームワークを提供するために好ましい配列である。

40

【0031】

ヒト可変部フレームワーク残基由来の特定のアミノ酸を対応するマウスアミノ酸で置換し

50

てCDR構造および／またはIL-1 β 抗原に対する結合への影響を最小にした。

【0032】

通常、アミノ酸が以下のカテゴリーに入る場合、用いるヒトイムノグロブリン(アクセプターイムノグロブリン)のフレームワークアミノ酸はCDR提供(CDR-providing)非ヒトイムノグロブリン(ドナーイムノグロブリン)由来のフレームワークアミノ酸で置き換えられる。

(a)アクセプターイムノグロブリンのヒトフレームワーク領域内のアミノ酸は、その位置のヒトイムノグロブリンにとっては異常であるが、ドナーイムノグロブリン内の対応するアミノ酸はその位置ではヒトイムノグロブリンにとっては典型的なものである。

(b)アミノ酸の位置はCDRの1つにすぐ隣接している。

(c)3次元イムノグロブリンモデルにおいて、フレームワークアミノ酸の任意の側鎖原子は、CDRアミノ酸の任意の原子の約5～6オングストローム(中心～中心)内にある [Queenら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)およびCoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991)]。アクセプターイムノグロブリンのヒトフレームワーク域内のアミノ酸、およびドナーイムノグロブリン内の対応するアミノ酸はそれぞれ、その位置ではヒトイムノグロブリンにとっては異常であり、このようなアミノ酸はその位置ではヒトイムノグロブリンにとっては典型的であるアミノ酸により置き換えられる。

【0033】

本発明のヒト型抗体に好ましいフレームワーク領域の分析は、CDRと有意に接触しているかもしれないいくつかのアミノ酸を示唆した。マウスモノクローナル抗体Mu007由来のこれらのアミノ酸は、本来のヒトフレームワークアミノ酸を置換する。

【0034】

図1および2は、マウス配列、好ましいヒト型配列および好ましいヒト生殖系配列由来の可変軽鎖および重鎖部のアラインメントを提供する。ヒト型配列中に1本の下線を付したアミノ酸は、対応するマウス残基で置換した。これは、例えば、重鎖の29、30、48、67、68、70、72および97位の残基で行った。軽鎖に関しては、置換は66位および71位の残基で行った。

【0035】

本発明の抗体の好ましい軽鎖可変部は、配列番号27である式Iを含む。

【数6】

10

20

30

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Asp Ile Xaa Met Thr Gln Xaa Pro Ser Ser Xaa Xaa Ala Ser Xaa

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 Gly Xaa Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

10

46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 Xaa Leu Ile Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser

61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75

Arg Phe Ser Gly Ser Xaa Ser Gly Xaa Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

20

76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln

91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

106 107

Ile Lys

30

3位のXaaはGlnまたはLysである。

7位のXaaはSerまたはThrである。

11位のXaaはLeuまたはMetである。

12位のXaaはSer、TyrまたはThrである。

15位のXaaはValまたはLeuである。

17位のXaaはAspまたはGluである。

46位のXaaはSerまたはThrである。

66位のXaaはAlaまたはGlyである。

69位のXaaはThrまたはGlnである。

40

式I [配列番号27]

【0036】

本発明の抗体にさらに好ましい軽鎖可変部は、配列番号11を含む。

【数7】

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTA

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp
GGA GAC AGA GTC ACT ATC ACT TGC AAG GCG AGT CAG GAC ATT GAT

Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
AGG TAT TTA AGT TGG TTC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG

10

Ser Leu Ile Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser
TCC CTG ATC TAT CGT GTA AAG AGA TTG GTA GAT GGG GTC CCA TCA

Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
AGG TTC AGT GGC AGC GCA TCT GGG ACA GAT TAT ACT CTC ACC ATC

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTC GCA ACC TAT TAT TGT CTA CAG

20

Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
TAT GAT GAG TTT CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG CTG GAA

Ile Lys
ATA AAA

[配列番号11]

30

【0037】

本発明の抗体にさらに好ましい全長軽鎖は、配列番号13である式IIを含む。

【数8-1】

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTA

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp
GGA GAC AGA GTC ACT ATC ACT TGC AAG GCG AGT CAG GAC ATT GAT

Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
AGG TAT TTA AGT TGG TTC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG

10

Ser Leu Ile Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser
TCC CTG ATC TAT CGT GTA AAG AGA TTG GTA GAT GGG GTC CCA TCA

Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
AGG TTC AGT GGC AGC GCA TCT GGG ACA GAT TAT ACT CTC ACC ATC

【数 8 - 2】

20

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
 AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTC GCA ACC TAT TAT TGT CTA CAG

Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 TAT GAT GAG TTT CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG CTG GAA

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 ATA AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA

10

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp, Lys Val
 CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG

20

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA

30

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC

Arg Gly Glu Cys

AGG GGA GAG TGT [配列番号13]

配列番号11、13または27の直前の好ましいシグナル配列は以下のとおりである。

40

【数9】

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Phe Phe Phe
 ATG GAC ATG AGG ACC CCT GCT CAG TTT CTT GGA ATC TTT TTC TTC

Trp Phe Pro Gly Ile Arg Cys

TGG TTT CCA GGT ATC AGA TGT [配列番号23]

【0038】

50

本発明の抗体に好ましい重鎖可変部は配列番号28である式IIを含む。

【数10】

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Xaa	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Xaa	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Xaa
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
<u>Arg</u>	<u>Tyr</u>	<u>Trp</u>	<u>Ile</u>	<u>Glu</u>	Trp	Xaa	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Xaa	Gly	Leu
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Glu	Trp	Xaa	Gly	<u>Glu</u>	<u>Ile</u>	<u>Leu</u>	<u>Pro</u>	<u>Gly</u>	<u>Asn</u>	<u>Gly</u>	<u>Asn</u>	<u>Ile</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
<u>Asn</u>	<u>Glu</u>	<u>Lys</u>	<u>Phe</u>	<u>Lys</u>	<u>Gly</u>	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Thr	Ala	Asp	Xaa	Ser
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Xaa	Xaa	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Xaa	Ser	Glu	Asp
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Thr	<u>Ile</u>	<u>Tyr</u>	<u>Tyr</u>	<u>Asp</u>	<u>Tyr</u>	<u>Asp</u>	<u>Gln</u>
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
<u>Gly</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser

10

20

30

40

1位のXaaはGlnまたはGluである。

24位のXaaはVal、AlaまたはSerである。

30位のXaaはSerまたはThrである。

37位のXaaはValまたはIleである。

43位のXaaはLys、GlnまたはHisである。

48位のXaaはIleまたはMetである。

67位のXaaはLysまたはArgである。

68位のXaaはAlaまたはValである。

70位のXaaはIle、MetまたはValである。

74位のXaaはThrまたはSerである。

76位のXaaはThrまたはSerである。

77位のXaaはAsp、GluまたはSerである。

87位のXaaはArgまたはSerである。

式II [配列番号28]

【0039】

本発明の抗体にさらに好ましい重鎖可変部は配列番号15を含む。

【数11】

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
GCC TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GTG TCT GGC TAC ACA TTC AGT

Arg Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
AGG TAT TGG ATA GAG TGG GTT AGA CAG GCA CCT GGA AAA GGC CTT

10

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr
GAG TGG ATT GGA GAG ATT TTA CCT GGA AAT GGA AAT ATT AAC TAC

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
AAT GAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATC ACA GCA GAT ACA TCC

Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
ACA GAT ACA GCC TAC ATG GAA CTC AGC AGC CTG AGG TCT GAG GAC

20

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln
ACA GCC GTC TAT TAT TGT TCA ACA ATC TAC TAT GAT TAC GAC CAG

Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
GGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTT TCT TCT

30

[配列番号15]

【0040】

本発明の抗体にさらに好ましい全長重鎖部は配列番号17を含む。

【数12-1】

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
GCC TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GTG TCT GGC TAC ACA TTC AGT

Arg Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
AGG TAT TGG ATA GAG TGG GTT AGA CAG GCA CCT GGA AAA GGC CTT

10

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr
GAG TGG ATT GGA GAG ATT TTA CCT GGA AAT GGA AAT ATT AAC TAC

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
AAT GAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATC ACA GCA GAT ACA TCC

Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
ACA GAT ACA GCC TAC ATG GAA CTC AGC AGC CTG AGG TCT GAG GAC

20

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln
ACA GCC GTC TAT TAT TGT TCA ACA ATC TAC TAT GAT TAC GAC CAG

Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
GGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTT TCT TCT

30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC

40

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC

10

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG

20

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG

30

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
AGC ACG TAC CGT₉ GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC

40

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA

SEQ ID NO:17

配列番号15、17または28の直前にある好ましいシグナルは以下のとおりである。

【数13】

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val
 ATG GAA TGG ACC TGG GTC TTT CTC TTC CTC CTG TCA GTA

Thr Ala Gly Val His Ser

ACT GCA GGT GTC CAC TCC [配列番号25]

本明細書中の抗体「Hu007」は、配列番号13に対応する軽鎖配列および配列番号17に対応する重鎖配列を有するマウスモノクローナル抗体Mu007のヒト型バージョンである。

【0041】

別の種由来の抗体をヒト化する主な理由(impetus)は、治療としてヒト患者に注射した場合に抗体が免疫反応を引き起こす可能性を減少させることである。ヒト型抗体で用いられるヒト配列が多ければ多いほど、免疫原性の危険性が低くなる。抗体の生物学的特性に重大な影響を与えることなく、好ましい重鎖および軽鎖部として本明細書中に記載される配列に変更を行うことができる。これは、特に、CDRのIL-1 β に結合する能力に影響を与えない抗体定常部および可変部の一部に当てはまる。

【0042】

さらに、本明細書中に記載するように、他のヒトフレームワーク可変部およびその変異体を本発明において使用することができる。しかしながら、選択したフレームワークにかかわらず、免疫原性の危険性の減少が目的である場合、選択したヒトフレームワークに対する変更の数は最小にされるべきである。

【0043】

本発明は、抗体Mu007のCDRを1種以上使用する抗体または他のタンパク質に関する。本発明のCDRはMu007抗体の超過変部であり、特異的IL-1 β エピトープに対する抗体の結合に関する定常部の大部分を提供する。従って、本明細書中に記載のCDRは、CDRに連結した場合に活性構造配置にCDRを維持し、CDRを用いるタンパク質の成熟IL-1 β に対する結合親和性をMu007の結合親和性と比較して上昇させる、Mu007の結合親和性と同じである、またはMu007抗体の結合親和性と比較して10分の1以下には減少しない、言い換えるとMu007抗体の結合親和性と比較して10分の1より少なくない、全長抗体および機能的フラグメントおよびアナログまたは他のタンパク質を製造するために使用することができる。好ましくは、結合親和性はMu007抗体の結合親和性と比較して5分の1未満には減少しない。最も好ましくは、結合親和性はMu007抗体の結合親和性の3倍以内である。

【0044】

Mu007抗体の結合親和性は、表面プラズモン共鳴 (BIAcoreTM)を用いて決定した。これらの実験においては、抗体をBIAcoreTMチップ上で低密度で固定化し、リガンドを流す(flow past)。チップの表面での塊の蓄積を測定した。この分析方法により、結合についてのオンおよびオフの速度を両方リアルタイムで測定することができる。Mu007抗体は、約6.0ピコモルの親和性を有する(実施例9を参照)。本発明の好ましいヒト型抗体、Hu007は、約10~20ピコモルの親和性を有する(実施例9を参照)。Hu007は、それぞれ配列番号17および配列番号13に対応する重鎖および軽鎖を有する。

【0045】

また、Mu007抗体のCDRを利用する、本発明の抗体または他のタンパク質は、IL-1 β に特異的に結合するが、他のIL-1ファミリーメンバーまたは同じ種内の構造的に関連するタンパク質とは結合しないことが好ましい。例えば、Mu007またはHu007はいずれもヒトIL-1 α には結合しない(実施例9を参照)。

【0046】

また、Mu007抗体のCDRを利用する、本発明の抗体または他のタンパク質は、IL-1 β の生物学的活性を中和することが好ましい。2個の異なるアッセイを用いて、Mu007およびHu007のIL-1 β 活性を中和する能力を試験した。増殖に低レベルのIL-1 β を必要とするマウス細胞株を第1のアッセイで用いた。ヒトIL-1 β は倍地中に一定濃度で存在し、各抗体の希釈系列を加えた。増殖の阻害により、抗体のIL-1レセプターのIL-1 β 活性化をブロックする能力の効力の測定値を得た。異なる濃度の抗体の増殖測定により、IC50の平均値を生じた(Mu007に関して220ピコモル、およびHu007に関して480ピコモル)(実施例10を参照のこと)。本発明の抗体または他のタンパク質は、Mu007よりも良い、同じ、または10倍以内、あるいはMu007の10分の1より大きいIC50効力を有することが好ましい。好ましくは、IC50効力はMu007の5倍以内である。最も好ましくは、IC50効力はMu007の3倍以内である。本明細書中における「IC50」は、抗体のヒトIL-1 β 活性を阻害する効力の測定値である。IC50は、単用量実験において50% IL-1 β 阻害を生じる抗体濃度である。IC50は、ヒトIL-1 β 活性の阻害を検出する任意のアッセイにより測定することができる。しかしながら、得られるIC50値は、用いるアッセイに応じて変化する。同じアッセイを用いる実験間でさえ、いくらかのばらつきがあるかもしれない。例えば、上記のIL-1 β 依存性細胞の状態は、得られるIC50の値に影響を有する。従って、本発明の目的に関して重要な値は、単独の実験でMu007またはHu007を用いて得られた値に対して比較した値である。

【0047】

Mu007またはHu007はいずれも、マウスIL-1 β と交差反応性を示さず、このことによりマウスモデルを用いてインビボでの中和活性を試験することが困難となっている。しかしなが

ら、IL-1 β の前炎症活性の影響のひとつはIL-6(IL-1 β の非局所的な効果をいくらか媒介する別の前炎症性サイトカイン)の誘導である。ヒトIL-1 β はマウスIL-1 β レセプターに結合し、刺激してマウスIL-6の上昇を導くことができる。従って、中和活性を有する抗体は、一定用量のヒトIL-1 β を与えたマウスにおいてIL-6の誘導をブロックする。Mu007およびHu007は両方とも、炎症刺激のマウスモデルにおいて、ヒトIL-1 β の強力な中和を示した。ヒト型抗体は、Mu007抗体の約1/3の有効性であった(実施例11を参照)。

【0048】

また、本発明は、Mu007 CDRをヒトフレームワーク領域またはヒトフレームワーク変異体(例えば、Hu007)に移植し、結合親和性または他の生物学的特性(例えば、IC50値として表され得る、特定の濃度での抗体がIL-1 β 活性を中和する能力)を上昇させるように修飾または変異させている抗体に関する。

10

【0049】

本発明の抗体は、Mu007およびHu007抗体の場合と同じヒトIL-1 β 上のエピトープに結合することが好ましい。さらに、本発明は、これらの抗体がヒトIL-1 β をインビボで中和する能力を有するならば、Mu007およびHu007抗体が結合するエピトープと重ねてか、またはそれらを含むエピトープに結合する抗体に関する。

【0050】

本発明は、ヒトIL-1 β の153アミノ酸成熟形態の特定の領域の発見に関し、そのような領域への抗体の結合は、タンパク質の活性を完全に中和する。さらに、成熟IL-1 β の特定の領域に対する抗体は、それらが他のIL-1ファミリーメンバーまたは関連タンパク質とは交差反応しないという点で特異的である。本発明はこのエピトープに結合し、IL-1 β 活性を中和する抗体全てに関するが、抗体はMu007に存在するCDRのうちの少なくとも1つを用いることが好ましい。IL-1 β 活性を中和する抗体は、成熟IL-1 β タンパク質がレセプターに結合すること、および/またはシグナル伝達経路を開始させることを阻害する。

20

【0051】

Mu007および/またはHu007が結合するIL-1 β エピトープは、成熟IL-1 β タンパク質とは異なるアミノ酸セグメントを含有するファミリーのフラグメントを提供することにより決定することができる。各フラグメントは、通常、少なくとも4、6、8、10、20、50または100の連続アミノ酸を含む。ポリペプチドフラグメントのファミリーは、成熟IL-1 β のアミノ酸配列の多くまたは全てを包含する。ファミリーのメンバーを、それぞれ、Mu007またはHu007抗体への結合に関して試験する。試験する抗体に特異的に結合し得る最も小さいフラグメントは、抗体により認識されるエピトープのアミノ酸配列を含有する。エピトープをマッピングするさらなる方法は、抗体がランダム変異を導入したIL-1 β に結合する能力を試験することに関する。この方法は、エピトープの3次元構造が結合に重要である場合に好ましくあり得る。Mu007またはHu007はいずれもマウスまたはラットのIL-1 β に結合しないので、Mu007またはHu007により認識されるエピトープは、マウス、ラットおよびヒト配列の間で完全には保存されていないIL-1 β タンパク質の領域にマッピングされる。さらに、Mu007およびHu007は、カニクイザルおよびウサギのIL-1 β に結合し、中和する。従って、Mu007およびHu007により認識されるエピトープは、ヒト、カニクイザルおよびウサギのIL-1 β にわたって非常によく保存されていなければならない。図3は、マウス、ラット、ウサギ、カニクイザルおよびヒトの成熟IL-1 β タンパク質配列のアラインメントを示す。従って、Mu007およびHu007により認識されるエピトープをマッピングするために、ヒト、カニクイザルおよびウサギのIL-1 β にわたり配列の保存を示すが、マウスおよびラットのIL-1 β とは異なる部位に変異を標的化し得る。これらの条件を満たす位置としては、3位のバリン、5位のセリン、22位のグリシン、51位のグルタミン酸、76位のアスパラギン酸、77位のリジン、106位のイソロイシン、110位のロイシン、130位のメチオニン、140位のグリシンおよび150位のグルタミン酸が挙げられる(図3、ヒトまたはカニクイザル配列に従って番号付け)。76位のアスパラギン酸をグリシンに、77位のリジンをスレオニンに変異することは、カニクイザルIL-1 β への結合になんら影響を有さない。したがって、この領域はMu007およびHu007のIL-1 β への結合に重要ではない。

30

40

50

【0052】

また、IL-1 β を固定化抗体により補足し、この複合体をトリプシンのようなプロテアーゼで処理して抗体により保護されていない分子の部分を切断することができる。消化の後、未結合のペプチドを洗い流す。残った結合型ペプチドを抗体から溶離し、質量分光分析にかけて同一性(identity)を決定する。あるいは、IL-1 β をプロテアーゼで消化してもよく、そしてペプチドを抗体により補足してもよい。未結合のペプチドを洗い流す。残った結合型ペプチドを抗体から溶離し、質量分光分析にかけて同一性を決定する。

【0053】

さらなるエピトープマッピング実験は、NMR分光法の使用に関する。IL-1 β タンパク質を、窒素¹⁵、炭素¹³および重水素の濃度を高くした倍地中で生育させた宿主細胞(例えば、大腸菌)中で発現させる。標識IL-1 β を精製し、NMRで分析する。NMRピークを異なるアミノ酸に当てはめる。次いで、IL-1 β 抗体由来のFabの存在下で分析を繰り返す。特定のNMRピークの変化は、ピークの原因であるアミノ酸の環境の差異の指標である。これは、特定のアミノ酸への抗体の結合、抗体のアミノ酸への物理的な近さ、または抗体結合により誘発される立体配座のシフト(これは特定のアミノ酸に対する環境の変化を導く)に起因しうる。多くの場合、特に立体配座エピトープをマッピングする場合、1種より多くの方法を適用して推定抗体結合部位を確認する。

10

【0054】

Mu007およびHu007に結合するエピトープ(epitopic)フラグメントを免疫原として用いて、治療薬剤として用いるために直接、またはヒト型で用い得る、高い親和性結合および強力な中和活性を有するさらなる交差反応性抗体を得る。

20

【0055】

本発明はまた、発現させた場合にMu007およびHu007が結合するエピトープと同一のエピトープに特異的に結合し、強力なインビボ中和活性を有する抗体をコードする組換えDNAに関する。好ましくは、DNAは、発現させた場合に1種以上の重鎖および軽鎖Mu007 CDRを含む抗体をコードする[配列番号5、6、7、8、9および10]。発現させると、Mu007およびHu007抗体の重鎖および軽鎖のCDRを含むポリペプチド鎖をコードする代表的なDNA配列は、配列番号1、3、11、13、15および17と表される。遺伝コードの縮重を基にして、他のDNA配列は簡単に例示配列のかわりに置き換えられることができる。

【0056】

本発明の抗体をコードするDNAは、通常、抗体コード配列(天然で関与する、または異種性のプロモーター領域を含む)に動作可能に連結されている発現制御ポリヌクレオチド配列をさらに含む。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトし得るベクター中の真核細胞プロモーター系であるが、原核生物宿主に対する制御配列もまた使用することができる。一旦、適切な宿主細胞株にベクターを組み込むと、宿主細胞をヌクレオチド配列の発現、望ましい場合には軽鎖、重鎖、軽鎖/重鎖二量体またはインタクトな抗体、結合フラグメント、またはイムノグロブリン形態の回収および精製に適切な条件下で増殖させる。

30

【0057】

最終的に所望の抗体を発現し得る本発明の核酸配列は、種々の異なるポリヌクレオチド(ゲノムまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチドなど)および構成成分(例えば、V、J、DおよびC領域)から任意の種々の周知の技術を用いて形成することができる。適切なゲノム配列および合成配列の連結が一般的な産生方法であるが、cDNA配列もまた、利用することができる。

40

【0058】

ヒト定常部DNA配列は、種々のヒト細胞から周知の方法を用いて単離することができるが、好ましくは不死化B細胞由来である。ポリヌクレオチド配列に適した供給源細胞、およびイムノグロブリン発現および分泌用の宿主細胞は、当該分野において周知の多数の供給源から入手することができる。

【0059】

50

本明細書中に具体的に記載する抗体に加えて、本明細書中に記載の他の「実質的に相同な」修飾抗体は、当業者に周知の種々の組換えDNA技術を用いて簡単に設計および製造することができる。例えば、フレームワーク領域は、種々のアミノ酸置換、末端および中間の付加および欠失などにより、一次構造レベルでネイティブな配列から変更することができる。さらに、種々の異なるヒトフレームワーク領域が、単独で、または本発明のヒト型イムノグロブリンに対する基礎として組み合わせて使用されうる。通常、遺伝子の修飾は、種々の周知の技術(部位特異的変異誘発法など)により簡単に達成されうる。

【0060】

あるいは、一次抗体構造の一部のみを含むポリペプチドフラグメントを製造することができる。このフラグメントは1種以上のイムノグロブリン活性(例えば、補体結合活性)を有する。これらのポリペプチドフラグメントは、当該分野において周知の方法により、または部位特異性変異誘発法を用いて停止コドンベクター中の所望の位置に挿入することにより、インタクトな抗体のたんぱく質分解性切断により製造することができる(例えば、CH1の後にFabフラグメントを製造するため、またはヒンジ領域の後にF(ab')₂フラグメントを製造するためなど)。1本鎖抗体は、VLおよびVHをDNAリンカーと連結することにより製造することができる。

10

【0061】

先に記載したように、ポリヌクレオチドは、配列を発現制御配列に動作可能に連結した(すなわち、確実に機能し得るように配置した)後に、宿主細胞中で発現される。これらの発現ベクターは、通常、エピソードまたは宿主染色体DNAの必須部分のいずれかとして、宿主細胞中で複製可能である。通常、発現ベクターは、所望のDNA配列でトランスフェクトした細胞の検出を可能にするために選択マーカー(テトラサイクリン、ネオマイシンおよびジヒドロ葉酸レダクターゼ等)を含む。

20

【0062】

大腸菌は本発明のポリヌクレオチドのクローニングに特に有用な原核生物宿主である。使用に適した他の微生物宿主としては、バシラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)のようなバシラス属(*bacilli*)およびサルモネラ(*Salmonella*)、セラティア(*Serratia*)のような腸内細菌および種々のシュードモナス(*Pseudomonas*)種が挙げられる。これらの原核生物宿主において、通常は宿主細胞と適合した発現制御配列(例えば、複製起点)を含む、発現ベクターもまた、作製することができる。さらに、多数の周知のプロモーターのうちの任意のものが存在してもよい(例えば、ラクトースプロモーター系、トリプトファン(*trp*)プロモーター系、 β -ラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダ由来のプロモーター系)。通常、プロモーターは発現を制御するが、場合により、転写および翻訳の開始および完了のために、オペレーター配列を伴い、リボソーム結合部位配列などを有する。

30

【0063】

他の微生物(酵母等)もまた、発現のために使用することができる。サッカロミセス(*Saccharomyces*)は好ましい宿主であり、3-ホスホグリセラートキナーゼまたは他の糖分解酵素を含む発現制御配列(プロモーター等)、および複製起点、所望であれば終止配列などを含む適切なベクターを有している。

40

【0064】

微生物に加えて、植物細胞もまた、発現のために使用することができる。植物形質転換に最適の方法は、植物のタイプに依存して変化する。例えば、W000/53794(本明細書中に参照して組み込む)を参照のこと。

【0065】

哺乳動物組織細胞培養物もまた、本発明のポリペプチドを発現させ、生産するために使用することができる。インタクトなイムノグロブリンを分泌し得る多数の適切な宿主細胞株が当該分野において開発されているので、真核生物細胞は実際に好ましく、これには、CHO細胞株、種々のCOS細胞株、ゴールデンハムスター卵巣細胞株、HeLa細胞、骨髓腫細胞株、形質転換したB細胞、ヒト胚腎臓細胞株またはハイブリドーマが挙げられる。好ましい

50

細胞株はCHOおよび骨髓腫細胞株(SP2/0およびNS0等)である。

【0066】

これらの細胞のための発現ベクターは、発現制御配列(例えば、複製起点)、プロモーター、エンハンサー、および必須のプロセッシング情報部位(例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位および転写終止部位)を含み得る。好ましい発現制御配列は、イムノグロブリン遺伝子、SV40、アデノウィルス、ウシ乳頭腫ウィルス、サイトメガロウィルス等に由来するプロモーターである。好ましいポリアデニル化部位としては、SV40およびウシ成長ホルモン由来の配列があげられる。

【0067】

目的のポリヌクレオチド配列(例えば、重鎖および軽鎖をコードする配列および発現制御配列)を含むベクターを、周知の方法(細胞宿主のタイプに応じて変わる)により宿主細胞にトランスフェクトすることができる。例えば、真核生物細胞に関しては、塩化カルシウムトランスフェクションが通常用いられるが、他の細胞宿主に関しては、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが用いられ得る。

【0068】

一旦発現させたら、標準的な方法(硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換、アフィニティー(例えば、プロテインA)、逆相、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動など)にしたがって、抗体を精製することができる。医薬用途には、少なくとも約90~95%の純度を有する実質的に純粋なイムノグロブリンが好ましく、98~99%以上の純度が最も好ましい。部分的または所望される均質性まで精製した後、本明細書中に記載するようにポリペプチドを治療的または予防的に使用することができる。

【0069】

本発明はまた、IL-1 β 媒介性炎症性障害を経験しているヒトの治療方法に関し、この方法は、有効用量のIL-1 β 抗体を治療を必要とする患者に投与することを含む。本発明の抗体はIL-1 β に結合し、IL-1 β がIL-1 β レセプターに結合してシグナル伝達(signal)を開始することを阻害する。種々のIL-1 β 媒介性障害としては、慢性関節リウマチ(RA)、骨関節症(OA)、アレルギー、敗血症性または内毒素性ショック、敗血症、脳卒中(stroke)、喘息、移植片対宿主病、クローン病および他の炎症性腸疾患が挙げられる。好ましくは、本発明に関するIL-1 β 抗体はRAおよび/またはOAを治療するために使用される。

【0070】

RAを有する患者は関節の慢性の腫脹および関節の炎症、および進行中の軟骨および骨の破壊をわずらっている。IL-1 β およびTNF- α はRAの病因において最も重要なサイトカインである。しかし、IL-1 β およびTNF- α は両方とも炎症を媒介するが、IL-1 β は骨および軟骨破壊の主なメディエーターである。滑膜組織中の活性型の単球および線維芽細胞はIL-1 β を産生し、これは次に、さらなる前炎症性サイトカイン、プロスタグランジンおよびマトリックスメタロプロテアーゼの産生を刺激する。滑膜内膜は肥大し、骨および軟骨内に進入し、侵食する。

【0071】

予防維持性抗リウマチ薬(DMARDs)、たとえば、ヒドロキシクロロキン、経口用または注射金剤、メトトレキサート、アザチオプリン、ペニシラミンおよびスルファサラジンは、RAの処置に用いられてきたが、これらは効き目が穏やかである。それらのRAの経過を改変する活性は、IL-1 β のような炎症性メディエーターの抑制および変更に起因すると考えられている。たとえば、メトトレキサートは、一週間あたり7.5~10 mgの用量で、RA患者のIL-1 β の血漿濃度の減少を引き起こす。類似の結果が、コルチコステロイドで観察されている。したがって、本発明のIL-1 β 抗体は、単独または血漿中のIL-1 β たんぱく質レベルを低下させるように作用し得るDMARDsと組み合わせて用いられ得る。

【0072】

本発明のIL-1 β 抗体の有効量は、容認し難い副作用または毒性を伴わずに臨床上的有効性を提供する量である。RA患者に対する臨床上的有効性は、アメリカリウマチ学会、改善の定義(the American College of Rheumatology Definition of Improvement)(ACR20)を用

いて評価することができる。患者が、関節の滑らかさの評点、関節の腫脹の評点、および5つの他の構成要素(患者の疼痛の評価、患者の全体的な評価、医師の全体的な評価、健康評価質問表(Health Assessment Questionnaire)、および血清C反応性タンパク質(seum C-reactive protein)を含む)のうち3つにおいて20%の改善を示した場合に患者を応答者とみなす。構造的損傷の予防は、放射線写真のシャープ評点システム(Sharp Scoring system)のファンデルハイジ(van der Heijde)の改変法の評価することができる(腐食カウント、関節腔の狭さ)。

【0073】

また、本発明のIL-1 β 抗体は骨関節症(OA)を罹患した患者を処置するために使用することができる。OAはヒト関節の最も一般的な疾患であり、関節軟骨の損失および骨棘形成により特徴づけられる。临床上の特徴としては、関節痛、硬直、肥大、不安定(instability)、動きの制限、および機能的な障害が挙げられる。OAは、特発性(原発性)および二次型に分類することができる。膝および股関節部のOAの分類に関する判断基準は、临床上のパラメーター、放射線写真のパラメーターおよび研究室内でのパラメーターに基づいてアメリカリウマチ学会により開発された。

【0074】

本発明のIL-1 β 抗体の有効量は、疼痛および機能ならびに構造的損傷の予防における改善により測定した場合に、OA患者において临床上の有効性を示す量である。疼痛および機能における改善とは、疼痛および肉体機能のサブスケールのWOMAC OAインデックスを用いて評価することができる。このインデックスにより、疼痛の領域、硬直、および肉体機能の、临床上重要な患者に関連する症状を調べる。構造的損傷の予防は、膝または股関節の放射線写真における関節腔の幅を測定することにより評価することができる。

【0075】

本発明の抗体は、標準的な投与方法、好ましくは静脈内、腹膜内、皮下、経肺、経皮、筋肉内、経鼻、経頬粘膜、舌下または坐薬での投与により抹消から(すなわち、中枢神経系への投与によるものではない)、投与される。

【0076】

投与用医薬組成物は、選択した投与の態様に適切であるように設計されており、適切な場合には、緩衝剤、界面活性剤(surfactant)、保存剤、溶解補助剤、等張化剤、安定剤などの製薬上許容される賦形剤を用いる。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, 最新版(本明細書中に参照して組み込む)は、通常、当業者に公知の製薬技術の要約を提供する。

【0077】

製剤中のIL-1 β 抗体の濃度は、約0.1重量%の低い程度から、15または20重量%の高い程度であってよく、主に、流体の体積、粘性、安定性等に基づき、選択した特定の投与態様にしたがって選択する。IL-1 β 抗体の好ましい濃度は、通常、1～約100 mg/mLの範囲にある。好ましくは、10～約50 mg/mLである。

【0078】

製剤は緩衝剤を含んでもよい。好ましくは、緩衝剤はクエン酸緩衝剤またはリン酸緩衝剤、またはそれらの組み合わせである。通常、製剤のpHは約4～約8の間である。好ましくは、pHは約5～約7.5の間である。製剤のpHは、抗体の安定性(化学的および物理的)および投与時の患者への快適さのバランスをとって選択される。また、製剤はNaClのような塩を含有しうる。さらに、製剤は凝集を予防し、安定性の維持を助けるために界面活性剤(detergent)を含んでいてもよい。例えば、Tween-80およびTween-20は、Hu007抗体と適合性であることが示されている。

【0079】

製剤を作製後に滅菌ろ過しても良いし、または微生物学的に許容可能にしても良い。保存剤(m-クレゾールまたはフェノール、あるいはそれらの混合物)を添加して微生物の増殖および汚染を予防してもよい。

【0080】

静脈内注入用の通常の組成物は、液体(例えば、滅菌リンガー液)250mLもの容量および1～100mg/mL以上の抗体濃度を有してもよい。本発明の治療用薬剤は保存用に凍結または凍結乾燥させて、使用前に適切な滅菌キャリア中で再構築してもよい。凍結乾燥および再構築は、種々の程度の抗体活性の損失を生じるかもしれない(例えば、通常のイムノグロブリンであるIgM抗体は、IgG抗体よりも抗体活性損失の程度が高い傾向にある)。補うために用量を調整する必要があるかもしれない。

【0081】

前記の方法が、適切な適用により、ヒト型抗体のようなタンパク質の投与に最も都合が良く、最も適切であるが、適切な製剤が設計されている場合には他の投与方法(例えば、経皮投与および経口投与)が使用されうる。さらに、生分解性フィルムおよびマトリックス、または浸透性ミニポンプ、またはデキストランビーズ、アルギナートまたはコラーゲンに基づくデリバリーシステム、を用いる制御放出製剤を用いることが望ましいかもしれない。要約すると、製剤は本発明の抗体の投与のために利用可能であり、種々の選択肢から選択することができる。

10

【0082】

通常の用量レベルは、標準的な臨床上の技術を用いて最適化することができ、投与の態様および患者の状態に依存する。通常、用量は10 μ g/kg/月～10 mg/kg/月の範囲である。

【実施例】

【0083】

本発明を以下の実施例により例示するが、これはいかなる様式においても限定は意図しない。

20

【0084】

実施例 1

Mu007可変部

Mu007軽鎖および重鎖可変部のcDNAをハイブリドーマ細胞株からクローニングした。数個の軽鎖および重鎖のクローンを、2回の独立したPCR反応から配列決定した。機能的な軽鎖可変域配列は機能的なマウス κ 鎖可変部の典型的なものであり、Kabatの定義(Johnson, G.およびWu, T. T. (2000) Nucleic Acids Res. 28: 214-218)に基づきサブグループVに属することを見出した。重鎖に関しては、代表的なマウス重鎖可変部に相同な独特の配列を同定した。Mu007可変重鎖を、Kabatの定義(JohnsonおよびWu, 2000)に基づきサブグループII(A)に分類した。軽鎖および重鎖可変部をコードするcDNA配列は、それぞれ、配列番号1および3とあらかず。

30

【0085】

実施例 2

Hu007可変部

Mu007 CDRに対するアクセプターとして用いるヒト可変部フレームワークを構築し、約65～80塩基の長さにあたる8個の重複合成オリゴヌクレオチド(Heら、(1998) J. Immunol. 160: 1029-1035)を用いて増幅した。オリゴヌクレオチドを対でアニーリングさせ、DNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントを用いて伸長し、4本の二重鎖フラグメントを得た。得られたフラグメントを変性させ、対でアニーリングさせ、クレノーを用いて伸長させて2本のフラグメントを得た。これらのフラグメントを変性し、対でアニーリングさせ、もう一度伸長し、全長遺伝子を得た。PCR増幅したフラグメントをゲル精製し、pCR4Bluntベクターにクローニングした。配列を確認した後、可変軽鎖および可変重鎖の遺伝子をMluIおよびXbaIで消化し、ゲル精製し、それぞれ軽鎖および重鎖の発現用のベクターにサブクローニングしてpVk-Hu007およびpVg1-Hu007を作製した。

40

【0086】

実施例 3

Hu007の発現

マウス骨髄腫細胞株Sp2/0-Ag14(以下、Sp2/0)をATCCから入手し、37℃のインキュベーター中で10%FBS(カタログ番号SH30071.03, Hyclone, Logan, UT)を含むDME培地に維持し

50

た。

【0087】

マウス骨髄腫細胞株Sp2/0への安定なトランスフェクションを、取扱説明書に従ってGene Pulser装置(BioRad, Hercules, CA)を360 Vおよび25 μ Fで用いるエレクトロポレーションにより達成した。トランスフェクションの前に、pVk-Hu007およびpVg1-Hu007プラスミドDNAを、FspIを用いて線状化した。約 10^7 のSp2/0細胞をpVk-Hu007(30 μ g)およびpVg1-Hu007(60 μ g)でトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を10% FRSを含有するDME培地に懸濁し、数枚の96ウェルプレートにプレーティングした。48時間後、細胞を選択培地(10% FBS、HT培地補充物、キサンチン0.3 mg/mlおよびミコフェノール酸1 μ g/mlを含有するDME培地)を用いてgpt発現に関して選択した。選択の開始の約10日後、培養物上清を、ELISAにより抗体産生についてアッセイした(実施例7を参照のこと)。高収率のクローンを、10% FBSを含有するDME培地に広げ、抗体発現についてさらに分析した。次いで、選択したクローンを無血清培地(Hybridoma SFM, カタログ番号12045-076, Life Technologies, Rockville, MD)中での増殖に適合させた。これは、血清レベルが0.1%未満になるまで、細胞を徐々にHybridoma SFMに分割することにより(通常は、各分割毎に25~50%)達成する。その後、トランスフェクト物をHybridoma SFM中で維持した。細胞密度を 2×10^5 /ml~ 10^6 /mlの間で維持した。

10

【0088】

CHO-DG44細胞をpVk-Hu007(50 μ g)およびpVg1-Hu007(50 μ g)でトランスフェクト(ゲノムトランスフェクション)するか、またはHu007軽鎖に対応するcDNAを含む発現ベクター(50 μ g)およびHu007重鎖に対応するcDNAを含むベクター(50 μ g)でトランスフェクトした。約 10^7 の細胞を、ゲノムトランスフェクションのためには350ボルト/50 μ Fおよび380/50 μ F、およびcDNAトランスフェクションのためには350ボルト/71 μ Fおよび380ボルト/71 μ Fでエレクトロポレーションを行った。細胞を室温でインキュベートし、次いで増殖培地(Growth Medium)(20 ml)(ExCell 302 培地+ L-グルタミン(4mM) + 1 $\times$ ヒポキサンチン/チミジン試薬+ 硫酸デキストラン(100 μ g/mL))中で希釈し、37°C/5% CO₂インキュベーター中で72時間回復させた。ゲノムトランスフェクション用にはメトトレキサート(50nM)、およびcDNAトランスフェクション用にはメトトレキサート(20nM)およびG418(200 μ g/mL)を含有する培地を用いて細胞を選択した。

20

【0089】

実施例 4

Hu007の精製

Sp2/0高発現クローンをローラー瓶中Hybridoma SFM中で1500mlまで拡大した(1ローラー瓶あたり500ml)。Hu007 IgG1 モノクローナル抗体を消費培養物上清から、プロテイン-A Sepharoseカラムを用いて精製した。細胞生存率が10%以下に達した時点で消費培養物上清を回収し、プロテイン-A Sepharoseカラムにかけた。0.1 M グリシン-HCl (pH 2.8)、0.1 M NaClを用いて抗体を溶離する前に、カラムをPBSで洗浄した。1 M Tris HCl (pH 8)で中和した後、溶離したタンパク質をPBS(2 L、3回交換)で透析し、0.2 μ mフィルターでろ過した後4°Cで保存した。280 nmでの吸光度を測定することにより抗体濃度を決定した(1 mg/ml=1.4 A₂₈₀)。

30

40

【0090】

実施例 5

Mu007の発現および精製

Mu007を産生するハイブリドーマ細胞を、最初は10% FBS(HyClone)、10 mM HEPES、2 mM グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mMピルビン酸ナトリウム、25 μ g/ml ゲンタミシンを含有するRPMI-1640培地中で増殖させ、次いで、2% 低Ig FBS(カタログ番号3015 1.03, HyClone)を含有する無血清培地(Hybridoma SFM、カタログ番号12045-076, Life Technologies, Rockville, MD)中でローラー瓶中1 Lまで拡大させる。Mu007を、プロテイン-G Sepharoseカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより培養物上清から精製した。EZ-連結スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン(カタログ番号21338ZZ, Pierce, Rockford

50

， IL)を用いて、ビオチニル化Mu007を製造した。

【0091】

実施例 6

単離したMu007およびHu007のSDS-PAGE分析

標準的な方法に従い、4～20%勾配ゲル(カタログ番号EC6025, Novex, San Diego, CA)でTris-グリシン緩衝液中でSDS-PAGEを行った。非還元条件下でのMu007およびHu007のSDS-PAGE分析は、両方の抗体が約150～160kDの分子量を有することを示した。還元条件下での分析は、両方の抗体が約50kDの分子量を有する重鎖および25kDの分子量を有する軽鎖からなることを示した。Hu007の純度は95%よりも高い。

【0092】

実施例 7

ELISAによる抗体発現の定量

96-ウェル ELISAプレートのウェル(Nunc-Immunoプレート、カタログ番号 439454, NalgeNunc, Naperville, IL)を、0.2 M 炭酸ナトリウム-重炭酸緩衝液(pH 9.4) 中1 μ g/ml ヤギ抗ヒトIgG Fcフラグメント特異的ポリクローナル抗体(カタログ番号109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)(100 μ l)で、一晩、4 $^{\circ}$ Cでコーティングした。洗浄緩衝液 (0.1% Tween 20を含有するPBS)で洗浄した後、ウェルをSuperblock Blocking Buffer (カタログ番号37535, Pierce)(400 μ l)で30分間ブロックし、次いで、洗浄緩衝液で洗浄した。Hu007を含むサンプルを、ELISA緩衝液 (1% BSAおよび0.1% Tween 20を含有するPBS) で適切に希釈し、ELISAプレート (100 μ l/ウェル)に適用した。基準として、ヒト型抗-CD33 IgG1モノクローナル抗体HuM195 (Coら、(1992) J. Immunol. 148: 1149-1154)を用いた。ELISAプレートを、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートし、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した。次いで、ELISA緩衝液中で1/1,000に希釈したHRP結合型ヤギ抗ヒト κ ポリクローナル抗体(100 μ l) (カタログ番号1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL)を各ウェルに適用した。37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、ABTS基質 (カタログ番号507602および506502, KirkegaardおよびPerry Laboratories, Gaithersburg, MD)(100 μ l)を各ウェルに加えた。2%シュウ酸100 μ l/ウェルを加えることにより発色を停止させた。OPTImaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Menlo Park, CA)を用いて415nmで吸光度を読み取った。

【0093】

実施例 8

ELISA競合

96-ウェルELISAプレート(Nunc-Immunoプレート、カタログ番号439454, NalgeNunc)のウェルを0.5 μ g/ml of 0.2M 炭酸ナトリウム-重炭酸緩衝液 (pH 9.4)中のヒトIL-1 β (0.5 μ g/ml)100 μ lで4 $^{\circ}$ Cで1晩、コーティングし、洗浄緩衝液で洗浄し、Superblockブロック緩衝液で37 $^{\circ}$ Cで30分間ブロックし、洗浄緩衝液で再度洗浄した。ビオチニル化Mu007 (最終濃度0.16 μ g/ml)および競合抗体 (Mu007 またはHu007; 最終濃度100 μ g/mlで始める、3倍の系列希釈)のELISA緩衝液中の混合物を、ウェルあたり100 μ lの最終体積で3連で加えた。非競合コントロールとしては、ビオチニル化Mu007(0.16 μ g/ml)100 μ lを用いた。バックグラウンドコントロールとしては、ELISA緩衝液100 μ lを用いた。ELISAプレートを37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した後、HRP結合型ストレプトアビジン(1 μ g/ml) (Jackson ImmunoResearch)100 μ lを各ウェルに加えた。ELISAプレートを室温で30分間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した。発色用に、ABTS基質(100 μ l/ウェル)を加えた。2%シュウ酸100 μ l/ウェルを加えることにより発色を停止させた。吸光度を415nmで読み取った。

【0094】

Mu007およびHu007は両方とも濃度依存的な様式でビオチニル化Mu007と競合した。濃度依存的な競合物は、競合抗体が成熟IL-1 β 上の同じエピトープに結合することを示した。3回の独立した試験におけるMu007およびHu007のIC₅₀値(コンピューターソフトウェアPrism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)を用いて得た)を表1に示す。Hu007の相対的

10

20

30

40

50

な結合は、Mu007の相対的な結合の1.3倍(平均)であった。

表 1 : ELISA競合試験のまとめ

【表 1】

競合物	実験 A	実験 B	実験 C	平均	標準 偏差
Mu007	0.40	0.40	0.39	0.40	0.006 9
Hu007	0.39	0.35	0.32	0.35	0.035
差異	0.98	0.88	0.82	0.89	

10

【 0 0 9 5 】

実施例 9

結合親和性および特異性

Hu007およびMu007の両方の親和性および特異性を、BIAcore測定機を用いて決定した。BIAcoreTMは分子相互作用を測定する自動バイオセンサーシステムである (Karlssonら (1991) J. Immunol. Methods 145: 229-240)。これらの実験において、抗体をBIAcoreTMチップ上に低密度で固定化した。エチル-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (EDC) を用いて反応性アミノ基を精製ヤギ抗ヒトIgGに、またはヤギ抗ウサギIgGをカルボキシメチル(CM5) BIAcoreTMセンサーチップのフローセルにカップリングした。ヤギIgGを、酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)中で希釈し、EDCを用いてCM5チップのフローセルに固定化して1000反応ユニットを得た。未反応の部位をエタノールアミン(ethanolamine)でブロックした。60 μ l/分の流速を用いた。複数回の結合/溶出サイクルを、15 μ g/mL Mu007またはHu007の溶液(100 μ l)の注入、続いてヒトIL-1 β 、マウスIL-1 β 、ラットIL-1 β 、カニクイザルIL-1 β 、ブタIL-1 β 、ヒトIL-1レセプターアンタゴニストおよびヒトIL-1 α を各サイクルについて濃度を減少 (たとえば、1500、750、375、188、94、47、23.5、12および0ピコモル) させて注入することにより行った。グリシン-HCl(pH 1.5)を用いて溶離を行った。BIAevaluationTMを用いて反応速度データを分析した。表 2 は、ヒトおよびカニクイザルIL-1 β に対するHu007およびMu007の親和性を示す。マウスIL-1 β 、ラットIL-1 β 、IL-1レセプターアンタゴニスト、およびヒトIL-1 α はHu007に結合しなかった。カニクイザルおよびブタのIL-1 β は、ヒトIL-1 β と比較してHu007に100%結合した。

20

30

表 2 : Hu007およびMu007のIL-1 β に対する親和性

【表 2】

抗体	標的分子	KD (ピコモル)
Mu007	ヒト IL-1 β	6.2
Hu007	ヒト IL-1 β	10.2
Mu007	カニクイザル IL-1 β	7.3
Hu007	カニクイザル IL-1 β	10.4

40

【 0 0 9 6 】

実施例 10

抗体有効性

低レベルのIL-1 β を増殖に必要とするマウス細胞を用いて、Hu007およびMu007のヒトIL-1 β を中和する能力を測定した。すでにlog増殖期にはないT1165.17細胞を、10%ウシ胎仔血清(GibcoBRLカタログ番号10082-147)、1 mMピルビン酸ナトリウム、50 μ M β -メルカプ

50

トエタノールおよび抗生物質/抗微生物薬(GibcoBRLカタログ番号15240-062)を補充したRPMI 1640 (GibcoBRLカタログ番号22400-089)で3回洗浄した。細胞を96ウェルプレートに1ウェルあたり5,000細胞でプレーティングした。ヒトIL-1 β は0.3pMの一定レベルで入っており、抗体の希釈系列を加えた。希釈サンプルを加え、細胞を37°C/5% CO₂インキュベーター中で20時間インキュベートし、ウェルあたり1 μ Ci ³H-チミジンを添加した時点で、プレートをさらに4時間、インキュベーター中でインキュベートした。細胞を回収し、組み込まれた放射活性をシンチレーションカウンタで測定した。図5はMu007およびHu007によるIL-1 β 刺激増殖の障害を示す。3回の個別の実験から計算したMu007およびHu007に対する平均のIC50値はそれぞれ220 pMおよび480 pMであった。

【0097】

10

実施例11

インビボでのヒトIL-1 β の中和：

ヒトIL-1 β はマウスIL-1 β レセプターに結合し、刺激することができ、これによりマウスIL-6の上昇が生じる。実験にわたる時間および用量は、ヒトIL-1 β の最適の用量、およびマウスIL-6の誘導に最適な時間を同定するために行った。これらの実験は、ヒトIL-1 β の用量3 μ g/kgおよびIL-1 β 投与後2時間がマウス血清中最大レベルのIL-6を与えることを示した。Mu007およびHu007をマウスに投与(IV)し、1時間後にヒトIL-1 β を27、81、270および2700 μ g/mlでIP注射した。IL-1 β 投与の2時間後、マウスを屠殺し、ELISAによりIL-6レベルを決定した。イソタイプが適合した抗体をネガティブコントロールとして用いた。Mu007およびHu007は、マウスIL-6のヒトIL-1 β 誘導を、用量依存様式(81および270 μ g/kgで始まり、2700 μ g/kgでIL-6の誘導をすべて阻害)で阻害する。

20

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】 Mu007、Hu007および生殖細胞L1およびJ κ 2セグメント由来の可変軽鎖アミノ酸配列のアラインメント。Kabatの定義に基づくCDR配列は、Mu007可変軽鎖配列中、下線を引いている。アクセプターヒト可変軽鎖セグメント中のCDR配列は削除する。

【図2】 Mu007、Hu007および生殖細胞DP5およびJH4セグメント由来の可変重鎖アミノ酸配列のアラインメント。Kabatの定義に基づくCDR配列は、Mu007可変重鎖配列中、下線を引いている。アクセプターヒト可変重鎖セグメント中のCDR配列は削除する。

【図3】 ヒト、カニクイザル、ウサギ、ラットおよびマウス由来の成熟IL-1 β タンパク質配列のアラインメント。

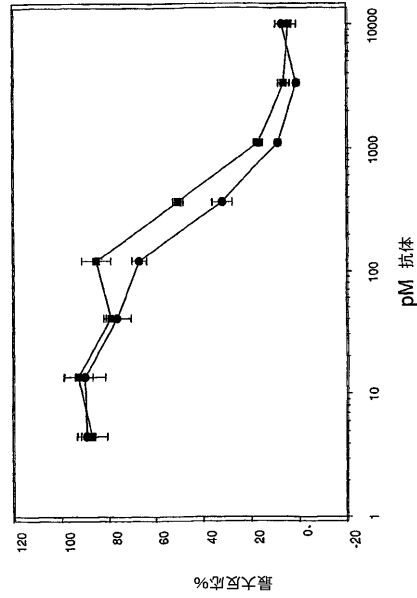
30

【図4】 Mu007およびHu007のIL-1 β -依存性細胞株の増殖を阻害する能力を示すグラフ(黒丸-Mu007; 黒四角-Hu007)。

【図 3】

ヒト	APVRLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGDMEQQVVFMSFVQGE
カニクイザル	APVRLHCTLRDAQLKSLVMSGPYELKALHLQGDLEQQVVFMSFVQGE
ウサギ	AVRSLHCRLLQDAQQKSLVSGTYELKALHLNAENLNQQVVFMSFVQGE
マウス	VPIRQLHYRLRDEQQKSLVSDPYELKALHLNGQINQVVFMSFVQGE
ラット	VPIRQLHCRRLRDEQQKSLVSDPYELKALHLNGQINISQQVVFMSFVQGE
ヒト	ESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTTLOLESVDPKNYPKKKMEKRFV
カニクイザル	ESNDKIPVALGLKAKNLYLSCVLKDDKPTTLOLESVDPKNYPKKKMEKRFV
ウサギ	ESNDKIPVALGLRGKNLYLSCVMKDDKPTTLOLESVDPNRYPKKKMEKRFV
マウス	PSNDKIPVALGLGKNLYLSCVMKDGPTTLOLESVDPKQYPKKKKMEKRFV
ラット	TSNDKIPVALGLGKNLYLSCVMKDGPTTLOLESVDPKQYPKKKKMEKRFV
ヒト	FNKIEINNKLFEFSAQFPFNWYISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS
カニクイザル	FNKIEINNKLFEFSAQFPFNWYISTSQAENMPVFLGGTRGGQDITDFTMQFVS
ウサギ	FNKIEIKDKLEFESAQFPFNWYISTSQEYMPVFLGNNSGGQDLIDFSMEFVSS
マウス	FNKIEVKSKEFEFSAQFPFNWYISTSQAEHKPVFLGNNSG-QDIIIDFTMESVSS
ラット	FNKIEVKTKEFEFSAQFPFNWYISTSQAEHRPVFLGNNSG-RDIVDFTMEPVSS

【図 4】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 February 2003 (06.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/010282 A2

(51) International Patent Classification: C12N

(21) International Application Number: PCT/US02/21281

(22) International Filing Date: 18 July 2002 (18.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/307,373 26 July 2001 (26.07.2001) US
60/312,278 14 August 2001 (14.08.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BRIGHT, Stuart, Willis** [US/US]; 13408 Brookshire Parkway, Carmel, IN 46033 (US); **JIA, Audrey, Yunhua** [CN/US]; 34772 Chesapeake Drive, Union City, CA 94587 (US); **KUH-STOSS, Stuart, Allen** [US/US]; 8206 Narragansett Court, Indianapolis, IN 46256 (US); **MANETTA, Joseph, Vincent** [US/US]; 8134 North Richard Avenue, Indianapolis, IN 46256 (US); **TSURUSHITA, Naoya** [JP/US]; 3719 Redwood Circle, Palo Alto, CA 94306 (US); **VASQUEZ, Maximiliano, J.** [CR/US]; 3813 Louis Road, Palo Alto, CA 94303 (US).(74) Agents: **APELGREN, Lynn, D.** et al.; ELI LILLY AND COMPANY, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(81) Designated States (national): AL, AG, AL, AM, AI (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW; ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CI, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW; ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CI, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

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

(54) Title: INTERLEUKIN-1 BETA ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention encompasses high affinity antibodies that neutralize IL-1 β activity in vivo. These antibodies can be used to treat various diseases such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

WO 03/010282 A2

WO 03/010282

PCT/US02/21281

INTERLEUKIN-1 BETA ANTIBODIES

This application claims the benefit of U.S. Provisional
5 Application Serial No. 60/307973 filed July 26, 2001, now
abandoned and U.S. Provisional Application Serial No.
60/312,278 filed August 14, 2001, now abandoned.

Interleukin-1 β (IL-1 β) is a proinflammatory cytokine.
IL-1 β over-production has been implicated in the pathogenesis
10 of a variety of diseases such as rheumatoid arthritis and
osteoarthritis. IL-1 β has been shown to increase cell
migration into the inflamed synovium of joints by the up-
regulation of adhesion molecules, the stimulation of the
production of prostaglandins and metalloproteinase, the
15 inhibition of collagen and proteoglycan synthesis, and the
stimulation of osteoclastic bone resorption. Because of
these properties, IL-1 is one of the primary mediators of
bone and cartilage destruction in arthritis. Thus, agents
that reduce the activity of IL-1 β represent possible
20 treatments for diseases such as arthritis.

There are three members of the IL-1 gene family: IL-
1 α , IL-1 β , and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra). IL-1 α and
IL-1 β are agonists of the IL-1 receptor whereas the IL-1ra
is a specific receptor antagonist and thus, an endogenous
25 competitive inhibitor of IL-1. Administration of
recombinant IL-1ra in clinical trials provided significant
clinical improvements in patients with severe rheumatoid
arthritis compared to placebo. Furthermore, administration
of IL-1ra reduced the rate of progressive joint damage.
30 However, the poor pharmacokinetic properties and the large
dose that must be administered make recombinant IL-1ra a
less than ideal therapeutic agent.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-2-

A high affinity neutralizing antibody to IL-1 β would make a superior therapeutic agent. The typically long elimination half-lives of antibodies coupled with high affinity binding result in a therapeutic agent wherein much lower concentrations can be dosed much less frequently than recombinant IL-1ra. Although numerous IL-1 β antibodies have been described, it has been exceedingly difficult to identify monoclonal antibodies having high affinity, high specificity, and potent neutralizing activity.

The present invention encompasses humanized IL-1 β antibodies derived from a unique murine antibody to human IL-1 β . These antibodies are high affinity antibodies that have potent IL-1 β neutralizing activity and are highly specific for IL-1 β .

This invention encompasses antibodies that specifically bind mature human IL-1 β . The antibodies described and claimed herein bind the same epitope on mature human IL-1 β as mouse monoclonal antibody Mu007 or humanized antibody Hu007. The invention includes antibodies that specifically bind mature human IL-1 β with an affinity constant that is within ten-fold the affinity constant of mouse monoclonal antibody Mu007 for human IL-1 β . The invention also includes antibodies, preferably humanized antibodies comprising at least one complementarity determining region having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:10. Most preferred are humanized antibodies comprising a light chain variable framework of human origin and three CDRs having sequences that correspond to SEQ ID NO:5, 6, and 7 and a heavy chain variable framework of human origin and three CDRs having sequences that correspond to SEQ ID NO:8, 9, and 10. The antibodies of the present

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-3-

invention include antibodies having framework regions that have at least 65% identity with the corresponding framework regions in mouse monoclonal antibody Mu007.

It is also preferred that the antibodies of the present invention have binding affinities within 10-fold that of mouse monoclonal antibody Mu007 or humanized antibody Hu007 and have potent neutralizing activity with IC50 values within 10-fold that of mouse monoclonal antibody Mu007 or humanized antibody Hu007.

The invention includes isolated nucleic acids comprising polynucleotides that encode the antibodies described and claimed herein. The invention also encompasses host cells transfected with these polynucleotides that express the antibodies described and claimed herein.

The invention encompasses methods of treating rheumatoid arthritis and osteoarthritis which comprise administering to a subject an effective amount of an antibody described and claimed herein as well as a method of inhibiting the destruction of cartilage that occurs in subjects that are prone to or have arthritis.

Fig. 1. Alignment of variable light chain amino acid sequences from Mu007, Hu007, and the germline L1 and JK2 segments. The CDR sequences based on the definition of Kabat are underlined in the Mu007 variable light chain sequence. The CDR sequences in the acceptor human variable light segment are omitted.

Fig. 2. Alignment of variable heavy chain amino acid sequences from Mu007, Hu007, and the germline DP5 and JH4 segments. The CDR sequences based on the definition of Kabat are underlined in the Mu007 variable heavy chain sequence. The CDR sequences in the acceptor human variable heavy segment are omitted.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-4-

Fig. 3. Alignment of the mature IL-1 β protein sequences from human, cynomolgous monkey, rabbit, rat, and mouse.

Fig. 4. Graph depicting the ability of Mu007 and Hu007 to inhibit the proliferation of an IL-1 β -dependent cell line(●-Mu007; ■-Hu007)

The present invention encompasses antibodies, preferably humanized antibodies, which bind the same epitope on human IL-1 β as mouse monoclonal antibody Mu007.

10 Preferably, these antibodies are comprised of the complementarity determining regions (CDRs) of the Mu007 antibody. The framework and other portions of these antibodies may originate from a human germ line. The humanized versions of the Mu007 antibody retain the high
15 affinity, high specificity, and potent neutralizing activity observed for the Mu007 murine antibody.

As used herein, the word "treat" includes therapeutic treatment, where a condition to be treated is already known to be present and prophylaxis - *i.e.*, prevention of, or
20 amelioration of, the possible future onset of a condition.

A "subject" means a mammal, preferably a human having need of treatment. Subjects having need of treatment include mammals that are prone to arthritis, mammals that exhibit any cartilage destruction, and mammals that have
25 signs and symptoms associated with rheumatoid arthritis or osteoarthritis.

An "isolated nucleic acid" is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is
30 ordinarily associated in the natural source of the nucleic acid. Such an isolated nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the nucleic acid molecule as it exists in natural

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-5-

cells. However, an isolated polypeptide(antibody)-encoding nucleic acid molecule includes polypeptide(antibody)-encoding nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express polypeptides where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

"Antibody" means a complete antibody molecule, having full length heavy and light chains; a fragment thereof, such as a F_{ab} , $F_{ab'}$, or $F_{(ab')_2}$ or Fv fragment; a single chain antibody fragment, e.g. a single chain Fv, a light chain or heavy chain monomer or dimer; multivalent monospecific antigen binding proteins comprising two, three, four, or more antibodies or fragments thereof bound to each other by a connecting structure; or an analogue of any of the above which binds the same epitope as mouse monoclonal antibody Mu007 or humanized antibody Hu007. In some contexts, herein, fragments will be mentioned specifically for emphasis; nevertheless, it will be understood that regardless of whether fragments are specified, the term "antibody" includes such fragments as well as single-chain forms. As long as the protein retains the ability to bind the same epitope on human IL-1 β as Mu007 or Hu007, it is included within the term "antibody." Preferably, but not necessarily, the antibodies useful in the invention are produced recombinantly. Antibodies may or may not be glycosylated, though glycosylated antibodies are preferred.

Antibodies that "specifically bind" mature human IL-1 β include antibodies as defined above that bind the mature form of human IL-1 β known in the art and represented in figure 3 and do not bind mature human IL-1 α . An antibody that specifically binds mature human IL-1 β may show some cross-reactivity with mature IL-1 β from other species.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-6-

The basic antibody structural unit is known to comprise a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kDa) and one "heavy" chain (about 50-70 kDa). The amino-terminal portion of each chain includes a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The carboxy-terminal portion of each chain defines a constant region primarily responsible for effector function.

Light chains are classified as kappa and lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 3 or more amino acids.

IgG antibodies are the most abundant immunoglobulin in serum. IgG also has the longest half-life in serum of any immunoglobulin. Unlike other immunoglobulins, IgG is efficiently recirculated following binding to FcRn. There are four IgG subclasses G1, G2, G3, and G4, each of which have different effector functions. G1, G2, and G3 can bind C1q and fix complement while G4 cannot. Even though G3 is able to bind C1q more efficiently than G1, G1 is more effective at mediating complement-directed cell lysis. G2 fixes complement very inefficiently. The C1q binding site in IgG is located at the carboxy terminal region of the CH2 domain.

All IgG subclasses are capable of binding to Fc receptors (CD16, CD32, CD64) with G1 and G3 being more effective than G2 and G4. The Fc receptor binding region of IgG is formed by residues located in both the hinge and the carboxy terminal regions of the CH2 domain.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-7-

IgA can exist both in a monomeric and dimeric form held together by a J-chain. IgA is the second most abundant Ig in serum, but it has a half-life of only 6 days. IgA has three effector functions. It binds to an IgA specific receptor on macrophages and eosinophils, which drives phagocytosis and degranulation, respectively. It can also fix complement via an unknown alternative pathway. IgM is expressed as either a pentamer or a hexamer, both of which are held together by a J-chain. IgM has a serum half-life of 5 days. It binds weakly to C1q via a binding site located in its CH3 domain. IgD has a half-life of 3 days in serum. It is unclear what effector functions are attributable to this Ig. IgE is a monomeric Ig and has a serum half-life of 2.5 days. IgE binds to two Fc receptors which drives degranulation and results in the release of proinflammatory agents.

Depending on the desired *in vivo* effect and the desired half-life, the antibodies of the present invention may contain any of the isotypes described above or may contain mutated regions wherein the complement and/or Fc receptor binding functions have been altered.

The variable regions of each light/heavy chain pair form the antibody binding site. Thus, an intact antibody has two binding sites. The chains all exhibit the same general structure of relatively conserved framework regions (FR) joined by three hypervariable regions, also called complementarity determining regions or CDRs. The CDRs from the two chains of each pair are aligned by the framework regions, enabling binding to a specific epitope. From N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain is in accordance with well known conventions [Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health,

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-8-

Bethesda, Md., 1987 and 1991; Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia, *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989)].

"Humanized antibody" means an antibody that is composed partially or fully of amino acid sequences derived from a human antibody germline or a rearranged sequence and made by altering the sequence of an antibody having non-human complementarity determining regions (CDR). The framework regions of the variable regions are substituted by corresponding human framework regions leaving the non-human CDR substantially intact. The framework region may be entirely human or may contain substitutions in regions that influence binding of the antibody to the target antigen. These regions may be substituted with the corresponding non-human amino acids. As discussed herein, antibody in the context of humanized antibody is not limited to a full-length antibody and can include fragments and single chain forms.

Humanized antibodies have several potential advantages over non-human and chimeric antibodies for use in human therapy. For example, the human immune system should not recognize the framework or constant region of the humanized antibody as foreign, and therefore the antibody response against such an injected antibody should be less than against a totally foreign non-human antibody or a partially foreign chimeric antibody. In addition, injected humanized antibodies generally have a longer half-life in the circulation than injected non-human antibodies. Furthermore, if effector function is desired, because the effector portion is human, it may interact better with the other parts of the human immune system.

Preferably, the antibodies of the present invention contain the CDRs from mouse antibody Mu007. The cDNA and

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-9-

amino acid sequence for the light chain variable region of
the mouse MU007 antibody is as follows:

5 GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGA
 D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R

10 GTCACATACACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTGATAGGTATTTAAGTTGGTTCCAGCAG
 V T I T C K A S Q D I D R Y L S W F Q Q

15 AAACCAGGGAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGTAAAGAGATTGCTAGATGGGGTC
 K P G K S P K T L I Y R V K R L V D G V

20 CCATCAAGGTTCACTGGCAGCGCATCTGGGCAAGATTATCTCTCACCATCAGCAGCCTG
 P S R F S G S A S G Q D Y S L T I S S L

25 CAGTATGAAGATATGGGAATTTATTTATGTCACAGTATGATGAGTTCCGTACACGTTC
 Q Y E D M G I Y Y C L Q Y D E F P Y T F

30 GGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
 G G G T K L E I K [SEQ ID NO:1]

The CDRs based on the definition of Kabat are underlined.
The mature light chain begins with an aspartic acid residue.
A signal sequence which can immediately precede SEQ ID NO:1
is as follows:

35 ATGGACATGAGGACCCCTGCTCAGTTTCTTGAATCTTTTCTTCTGTTTCCAGGTATC
 M D M R T P A Q F L G I F F F W F P G I

 AGATGT
 R C [SEQ ID NO:19]

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-10-

The cDNA and amino acid sequence for the heavy chain variable region of the mouse Mu007 antibody is as follows:

5
CAGGTTGAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S

GTGAAGGTGTCTCTGCAAGGTGCTGGCTACACATTCAGTAGGTATTGGATAGAGTGGGTT
10 V K V S C K V S G Y T F S R Y W I E W V

AGACAGGCACCTGGAAAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTACCTGGAAATGGAAAT
R Q A P G K G L E W I G E I L P G N G N

15 ATTAATACAATGAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACAATCACAGCAGATACATCCACAGAT
I N Y N E K F K G K A T I T A D T S T D

ACAGCCTACATGGAACTCAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACAGCCGTCTATTATTGTTCA
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C S
20
ACAATCTACTATGATTACGACCAGGGGTCTACTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACT
T I Y Y D Y D Q G F T Y W G Q G T L V T

GTTTCTGCA
25 V S A [SEQ ID NO:3]

The CDRs based on the definition of Kabat are underlined.
The mature heavy chain begins with a glutamine residue. A
signal sequence which can immediately precede SEQ ID NO:2 is
30 as follows:

ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAATGCAGGTGCCACTCC
M E W T W V F L F L L S V T A G V H S
[SEQ ID NO:21]
35

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-11-

The preferred antibodies of the present invention have binding specificity, binding affinity, and potency similar to that observed for Mu007. The properties that define the antibodies of the present invention reside primarily in the variable regions of the antibody. Thus, the complete light chain and heavy chain variable regions of the Mu007 antibody can be used in the context of any constant region and the binding affinity and specificity as well as ability to neutralize mature human IL-1 β will be generally unaffected. "Mu007" as used herein refers to the variable chain sequences represented as SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3 in the context of any mouse constant region, preferably a kappa light chain and a gamma-1 heavy chain.

A preferred antibody of the present invention is a humanized antibody comprised of one or more CDRs with the following amino acid sequences:

Light Chain CDR1:

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr Leu Ser [SEQ ID NO:5]

Light Chain CDR2:

Arg Val Lys Arg Leu Val Asp [SEQ ID NO:6]

Light Chain CDR3:

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Tyr Thr [SEQ ID NO:7]

Heavy Chain CDR1:

Arg Tyr Trp Ile Glu [SEQ ID NO:8]

Heavy Chain CDR2:

Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly [SEQ ID NO:9]

Heavy Chain CDR3:

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-12-

Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr [SEQ ID NO:10]

In principle, a framework sequence from any human antibody may serve as the template for CDR grafting.

5 However, straight chain replacement onto such a framework often leads to some loss of binding affinity to the antigen. The more homologous a human antibody is to the original murine antibody, the less likely the possibility that combining the murine CDRs with the human framework will

10 introduce distortions in the CDRs that could reduce affinity. Therefore, it is preferable that the human variable framework that is chosen to replace the murine variable framework apart from the CDRs have at least a 65% sequence identity with the murine antibody variable region

15 framework. It is more preferable that the human and murine variable regions apart from the CDRs have at least 70% sequence identity. It is even more preferable that the human and murine variable regions apart from the CDRs have at least 75% sequence identity. It is most preferable that

20 the human and murine variable regions apart from the CDRs have at least 80% sequence identity. For example, a preferred human framework region for the variable light chain of the antibodies of the present invention as shown in figure 1 has approximately 80% sequence identity with the

25 corresponding mouse sequence outside the CDRs. A preferred human framework region for the variable heavy chain of the antibodies of the present invention as shown in figure 2 has approximately 70% sequence identity with the corresponding mouse sequence outside the CDRs.

30 The heavy and light chain variable region framework residues can be derived from the same or different human antibody sequences. The human antibody sequences can be the sequences of naturally occurring human antibodies or can be consensus sequences of several human antibodies. Preferred

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-13-

human framework sequences for the heavy chain variable region of the humanized antibodies of the present invention include the VH segment DP-5 (Tomlinson, *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798) and the J segment JH4 (Ravetch, *et al.* (1981) *Cell* 27:583-591). The Vk segment L1 (Cox, *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:827-836) and the J segment Jk2 (Hieter, *et al.* (1982) *J. Biol. Chem.* 10:1516-1522) are preferred sequences to provide the framework for the humanized light chain variable region.

10 Certain amino acids from the human variable region framework residues were substituted with the corresponding murine amino acid to minimize effects on CDR conformation and/or binding to the IL-1 β antigen.

Generally, when an amino acid falls under the following
15 category, the framework amino acid of a human immunoglobulin to be used (acceptor immunoglobulin) is replaced by a framework amino acid from a CDR-providing non-human immunoglobulin (donor immunoglobulin):

(a) the amino acid in the human framework region of the
20 acceptor immunoglobulin is unusual for human immunoglobulin at that position, whereas the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is typical for human immunoglobulin at that position;

(b) the position of the amino acid is immediately
25 adjacent to one of the CDRs; or

(c) any side chain atom of a framework amino acid is within about 5-6 angstroms (center-to-center) of any atom of a CDR amino acid in a three dimensional immunoglobulin model [Queen, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989), and Co, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2869 (1991)]. When each of the amino acids in the human
30 framework region of the acceptor immunoglobulin and a corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is unusual for human immunoglobulin at that position, such an

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-14-

amino acid is replaced by an amino acid typical for human immunoglobulin at that position.

Analysis of the preferred framework regions for the humanized antibodies of the present invention suggested several amino acids that may have significant contact with the CDRs. These amino acids from mouse monoclonal antibody Mu007 were substituted for the original human framework amino acids.

Figures 1 and 2 provide an alignment of the variable light and heavy regions from the mouse sequence, a preferred humanized sequence, and a preferred human germline sequence. The single underlined amino acids in the humanized sequence were substituted with the corresponding mouse residues. For example, this was done at residues 29, 30, 48, 67, 68, 70, 72 and 97 of the heavy chain. For the light chain, the replacements were made at residues 66 and 71.

A preferred light chain variable region for the antibodies of the present invention comprises Formula I which is SEQ ID NO:27.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Asp	Ile	Xaa	Met	Thr	Gln	Xaa	Pro	Ser	Ser	Xaa	Xaa	Ala	Ser	Xaa
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Gly	Xaa	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	<u>Lys</u>	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>Asp</u>	<u>Ile</u>	<u>Asp</u>
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
<u>Arg</u>	<u>Tyr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Xaa	Leu	Ile	Tyr	<u>Arg</u>	<u>Val</u>	<u>Lys</u>	<u>Arg</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Asp</u>	Gly	Val	Pro	Ser
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-15-

Arg Phe Ser Gly Ser Xaa Ser Gly Xaa Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln

5

91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105

Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu

106 107

10 Ile Lys

Xaa at position 3 is Gln or Lys;

Xaa at position 7 is Ser or Thr;

Xaa at position 11 is Leu or Met;

15 Xaa at position 12 is Ser, Tyr, or Thr;

Xaa at position 15 is Val or Leu;

Xaa at position 17 is Asp or Glu;

Xaa at position 46 is Ser or Thr;

Xaa at position 66 is Ala or Gly; and

20 Xaa at position 69 is Thr or Gln;

Formula I [SEQ ID NO:27]

A more preferred light chain variable region for the antibodies of the present invention comprises SEQ ID NO:11.

25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTA

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp

30 GGA GAC AGA GTC ACT ATC ACT TGC AAG GCG AGT CAG GAC ATT GAT

Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

AGG TAT TTA AGT TGG TTC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-16-

Ser Leu Ile Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser
TCC CTG ATC TAT CGT GTA AAG AGA TTG GTA GAT GGG GTC CCA TCA

Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
5 AGG TTC AGT GGC AGC GCA TCT GGG ACA GAT TAT ACT CTC ACC ATC

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTC GCA ACC TAT TAT TGT CTA CAG

10 Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
TAT GAT GAG TTT CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG CTG GAA

Ile Lys
ATA AAA

15 [SEQ ID NO:11]

A more preferred full-length light chain for the
antibodies of the present invention comprises Formula II
which is SEQ ID NO: 13.

20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTA

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp
25 GGA GAC AGA GTC ACT ATC ACT TGC AAG GCG AGT CAG GAC ATT GAT

Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
AGG TAT TTA AGT TGG TTC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG

30 Ser Leu Ile Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser
TCC CTG ATC TAT CGT GTA AAG AGA TTG GTA GAT GGG GTC CCA TCA

Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
AGG TTC AGT GGC AGC GCA TCT GGG ACA GAT TAT ACT CTC ACC ATC

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-17-

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTC GCA ACC TAT TAT TGT CTA CAG

5 Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
TAT GAT GAG TTT CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG CTG GAA

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
ATA AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA

10 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp, Lys Val
15 CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG

20 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA

25 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC

Arg Gly Glu Cys
30 AGG GGA GAG TGT [SEQ ID NO:13]

A preferred signal sequence immediately preceding SEQ ID
NO:11, 13, or 27 is as follows:

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-18-

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Phe Phe Phe
 ATG GAC ATG AGG ACC CCT GCT CAG TTT CTT GGA ATC TTT TTC TTC

5 Trp Phe Pro Gly Ile Arg Cys
 TGG TTT CCA GGT ATC AGA TGT [SEQ ID NO:23]

A preferred heavy chain variable region for the
 10 antibodies of the present invention comprises Formula II
 which is SEQ ID NO: 28.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Xaa Ser Gly Tyr Thr Phe Xaa
 20 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
Arg Tyr Trp Ile Glu Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu
 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 Glu Trp Xaa Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr
 25 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Xaa Xaa Thr Xaa Thr Ala Asp Xaa Ser
 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
 Xaa Xaa Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Xaa Ser Glu Asp
 30 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln
 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-19-

Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

- Xaa at position 1 is Gln or Glu;
 Xaa at position 24 is Val, Ala, or Ser;
 5 Xaa at position 30 is Ser or Thr;
 Xaa at position 37 is Val or Ile;
 Xaa at position 43 is Lys, Gln, or His;
 Xaa at position 48 is Ile or Met;
 Xaa at position 67 is Lys or Arg;
 10 Xaa at position 68 is Ala or Val;
 Xaa at position 70 is Ile, Met, or Val;
 Xaa at position 74 is Thr or Ser;
 Xaa at position 76 is Thr or Ser;
 Xaa at position 77 is Asp, Glu, or Ser; and
 15 Xaa at position 87 is Arg or Ser
 Formula II [SEQ ID NO:28]

A more preferred heavy chain variable region for the
 antibodies of the present invention comprises SEQ ID NO:15.

- 20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 25 GCC TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GTG TCT GGC TAC ACA TTC AGT
Arg Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 AGG TAT TGG ATA GAG TGG GTT AGA CAG GCA CCT GGA AAA GGC CTT
 30 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr
 GAG TGG ATT GGA GAG ATT TTA CCT GGA AAT GGA AAT ATT AAC TAC
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
 AAT GAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATC ACA GCA GAT ACA TCC

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-20-

Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
ACA GAT ACA GCC TAC ATG GAA CTC AGC AGC CTG AGG TCT GAG GAC

5 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln
ACA GCC GTC TAT TAT TGT TCA ACA ATC TAC TAT GAT TAC GAC CAG

Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
GGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTT TCT TCT

10 [SEQ ID NO:15]

A more preferred full-length heavy chain region for the
antibodies of the present invention comprises SEQ ID NO: 17.

15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
20 GCC TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GTG TCT GGC TAC ACA TTC AGT

Arg Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
AGG TAT TGG ATA GAG TGG GTT AGA CAG GCA CCT GGA AAA GGC CTT

25 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr
GAG TGG ATT GGA GAG ATT TTA CCT GGA AAT GGA AAT ATT AAC TAC

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
AAT GAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATC ACA GCA GAT ACA TCC

30 Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
ACA GAT ACA GCC TAC ATG GAA CTC AGC AGC CTG AGG TCT GAG GAC

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-21-

ACA GCC GTC TAT TAT TGT TCA ACA ATC TAC TAT GAT TAC GAC CAG

Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 GGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTT TCT TCT

5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

10 AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC

15 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC

20

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

25 AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA

30 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-22-

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG

5 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
AGC ACG TAC CGT₀ GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC

10 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
15 CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG

20 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG

25 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
30 TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-23-

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA
SEQ ID NO:17

- 5 A preferred signal sequence immediately preceding SEQ
ID NO:15, 17, or 28 is the following:

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val
ATG GAA TGG ACC TGG GTC TTT CTC TTC CTC CTG TCA GTA

10

Thr Ala Gly Val His Ser
ACT GCA GGT GTC CAC TCC [SEQ ID NO:25]

- 15 Antibody "Hu007" as referred to herein is a humanized
version of mouse monoclonal antibody Mu007 having a
light chain sequence corresponding to SEQ ID NO:13 and
a heavy chain sequence corresponding to SEQ ID NO:17.

- The primary impetus for humanizing antibodies
from another species is to reduce the possibility that
the antibody causes an immune response when injected
into a human patient as a therapeutic. The more human
sequences that are employed in a humanized antibody,
the lower the risk of immunogenicity. Changes can be
made to the sequences described herein as preferable
heavy and light chain regions without significantly
affecting the biological properties of the antibody.
This is especially true for the antibody constant
regions and parts of the variable region which do not
influence the ability of the CDRs to bind to IL-1 β .

- 30 Furthermore, as discussed herein other human
framework variable regions and variants thereof may be
used in the present invention. However, regardless of
the framework chosen, if reducing the risk of
immunogenicity is a focus, the number of changes

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-24-

relative to the human framework chosen should be minimized.

The present invention encompasses antibodies or other proteins that make use of one or more of the CDRs of antibody Mu007. The CDRs encompassed by the present invention are the hypervariable regions of the Mu007 antibody which provide the majority of contact residues for the binding of the antibody to a specific IL-1 β epitope. Thus, the CDRs described herein can be used to make full-length antibodies as well as functional fragments and analogs or other proteins which when attached to the CDRs maintain the CDRs in an active structural conformation such that the binding affinity of the protein employing the CDRs for mature IL-1 β increases compared to the binding affinity of Mu007, is the same as the binding affinity of Mu007, or does not decrease by more than 10-fold compared to the binding affinity of the Mu007 antibody or alternatively, is not less than 10-fold less compared to the binding affinity of the Mu007 antibody. Preferably the binding affinity does not decrease by more than 5-fold compared to the binding affinity of the Mu007 antibody. Most preferably the binding affinity is within 3-fold the binding affinity of the Mu007 antibody.

The binding affinity of the Mu007 antibody was determined using surface plasmon resonance (BIAcoreTM). In these experiments antibody was immobilized at low density on a BIAcoreTM chip and ligand was flowed past. Build up of mass at the surface of the chip was measured. This analytical method allows the determination in real time of both on and off rates for binding. The Mu007 antibody has an affinity of approximately 6.0 picomolar (See Example 9). A

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-25-

preferred humanized antibody of the present invention, Hu007 had an affinity of approximately 10 to 20 picomolar. (See example 9). Hu007 comprises heavy and light chains that correspond to SEQ ID NO:17 and
5 SEQ ID NO:13, respectively.

It is also preferred that the antibodies or other proteins of the present invention which employ the CDRs of the Mu007 antibody bind specifically to IL-1 β and not other IL-1 family members or structurally
10 related proteins within the same species. For example, neither the Mu007 nor Hu007 bind to human IL-1 α . (See example 9).

It is also preferred that the antibodies or other proteins of the present invention which employ the
15 CDRs of the Mu007 antibody neutralize the biological activity of IL-1 β . Two different assays were employed to test the ability of Mu007 and Hu007 to neutralize IL-1 β activity. A murine cell line which requires low levels of IL-1 β for proliferation was used in the
20 first assay. Human IL-1 β was present at a constant level in the medium and a dilution series of each antibody was added. Inhibition of proliferation provided a measurement of the efficacy of the antibody's ability to block IL-1 β activation of the
25 IL-1 receptor. Proliferation measurements for different concentrations of antibody resulted in an average IC50 value of 220 picomolar for Mu007 and 480 picomolar for Hu007 (See example 10). It is preferred that the antibodies or other proteins of the present
30 invention have an IC50 potency which is better than, the same as, or within 10-fold that of Mu007 or alternatively, not less than 10-fold lower than that of MU007. Preferably the IC50 potency is within 5-

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-26-

fold that of Mu007. Most preferably the IC50 potency is within 3-fold that of Mu007. "IC50" as referred to herein is the measure of potency of an antibody to inhibit the activity of human IL-1 β . IC50 is the
5 concentration of antibody that results in 50% IL-1 β inhibition in a single dose experiment. The IC50 can be measured by any assay that detects inhibition of human IL-1 β activity. However, the IC50 values obtained may vary depending on the assay used. There
10 may even be some variability between experiments using the same assay. For example, the condition of the IL-1 β dependent cells discussed herein, has an effect on the IC50 values obtained. Thus, the critical value for the purposes of the present invention is a value
15 relative to that obtained using Mu007 or Hu007 in a single experiment.

Neither Mu007 nor Hu007 cross-react with mouse IL-1 β making it difficult to use a mouse model to test neutralizing activity in vivo. However, one
20 consequence of the proinflammatory activity of IL-1 β is the induction of IL-6, another proinflammatory cytokine that mediates some of the non-local effects of IL-1 β . Human IL-1 β is able to bind and stimulate the mouse IL-1 β receptor, leading to an elevation of
25 mouse IL-6. Thus, an antibody with neutralizing activity would block the induction of IL-6 in a mouse given a dose of human IL-1 β . Both Mu007 and Hu007 demonstrated potent neutralization of human IL-1 β in the murine model of inflammatory stimulation. The
30 humanized antibody was approximately 1/3 as efficacious as the Mu007 antibody (See example 11).

The invention also encompasses antibodies wherein

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-27-

the Mu007 CDRs have been grafted into a human framework region or a human framework variant such as in Hu007 and then modified or mutated to enhance binding affinity or other biological properties such as the ability of the antibody to neutralize IL-1 β activity at specific concentrations which can be expressed as an IC50 value.

It is preferred that the antibodies of the present invention bind the same epitope on human IL-1 β as the Mu007 and Hu007 antibodies. In addition, the invention encompasses antibodies that bind epitopes that overlap with or include the epitope bound by the Mu007 and Hu007 antibodies provided those antibodies have the ability to neutralize human IL-1 β *in vivo*.

The present invention encompasses the discovery of a specific region of the 153 amino acid mature form of human IL-1 β wherein the binding of an antibody to that region completely neutralizes activity of the protein. Furthermore, antibodies directed to this specific region of mature IL-1 β are specific in that they do not cross react with other IL-1 family members or related proteins. While the invention encompasses all antibodies that bind this epitope and neutralize IL-1 β activity, it is preferred that the antibodies employ at least one of the CDRs present in Mu007. Antibodies that neutralize IL-1 β activity prevent the mature IL-1 β protein from binding to its receptor and/or initiating a signal transduction pathway.

The IL-1 β epitope bound by Mu007 and/or Hu007 can be determined by providing a family of fragments containing different amino acid segments from the mature IL-1 β protein. Each fragment typically

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-28-

comprises at least 4, 6, 8, 10, 20, 50, or 100 contiguous amino acids. The family of polypeptide fragments cover much or all of the amino acid sequence of mature IL-1 β . Members of the family are tested individually for binding to the Mu007 or Hu007 antibodies. The smallest fragment that can specifically bind to the antibody being tested contains the amino acid sequence of the epitope recognized by the antibody. An additional method to map epitopes involves testing the ability of an antibody to bind IL-1 β in which random mutations have been introduced. This method may be preferred if the epitope's three-dimensional structure is critical for binding. Because neither Mu007 nor Hu007 bind mouse or rat IL-1 β , the epitope recognized by Mu007 or Hu007 maps to an area or areas of the IL-1 β protein which is not completely conserved between the mouse, rat, and human sequences. Further, Mu007 and Hu007 bind and neutralize Cynomolgus and rabbit IL-1 β . Therefore, the epitope recognized by Mu007 and Hu007 must be largely conserved among human, Cynomolgus, and rabbit IL-1 β . Figure 3 depicts an alignment of the mouse, rat, rabbit, Cynomolgus, and human mature IL-1 β protein sequences. Thus, to map the epitope recognized by Mu007 and Hu007, mutations can be targeted to sites that show sequence conservation among human, Cynomolgus, and rabbit IL-1 β but which differ in mouse and rat IL-1 β . Positions which fulfill these conditions include valine 3, serine 5, glycine 22, glutamate 51, aspartate 76, lysine 77, isoleucine 106, leucine 110, methionine 130, glycine 140, and glutamate 150 (Figure 3, numbering according to the human or Cynomolgus sequence. Mutating

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-29-

aspartate 76 to glycine and lysine 77 to threonine has no effect on binding to Cynomolgus IL-1 β . Therefore this region is not important for binding of Mu007 and Hu007 to IL-1 β .

5 IL-1 β can also be captured by immobilized antibody and the complex treated with proteases such as trypsin to cleave portions of the molecule that are not protected by the antibody. After digestion, unbound peptides are washed away. The remaining bound
10 peptides are eluted from the antibody and subjected to mass spectrometric analysis to determine their identity. Alternatively, IL-1 β can be digested with proteases, and peptides can be captured by antibody. Unbound peptides are washed away. The remaining bound
15 peptide is eluted from the antibody and subjected to mass spectrometric analysis to determine its identity.

An additional epitope mapping experiment involves the use of NMR spectroscopy. IL-1 β protein is expressed in a host cell such as E. coli grown in
20 medium enriched for Nitrogen¹⁵, carbon¹³, and deuterium. Labeled IL-1 β is purified and analyzed by NMR. NMR peaks are assigned to different amino acids. The analysis is then repeated in the presence of Fabs derived from IL-1 β antibody. A change in specific NMR
25 peaks is indicative of a different environment of the amino acids contributing to the peaks. This could be due to binding of antibody to the specific amino acids, to physical proximity of the antibody to the amino acids, or to a conformational shift induced by
30 antibody binding which leads to an altered environment for the specific amino acids. Often it is the case, especially when a conformational epitope is mapped, that more than one method is applied to confirm a

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-30-

predicted antibody binding site.

The epitopic fragment which binds Mu007 and Hu007 can be used as an immunogen to obtain additional crossreacting antibodies with high affinity binding and potent neutralizing activity which can be used directly or humanized for use as a therapeutic agent.

The present invention also is directed to recombinant DNA encoding antibodies which, when expressed, specifically bind to the same epitope that Mu007 and Hu007 bind to and have potent *in vivo* neutralizing activity. Preferably, the DNA encodes antibodies that, when expressed, comprise one or more of the heavy and light chain Mu007 CDRs [SEQ ID NO:5,6,7,8,9, and 10]. Exemplary DNA sequences which, on expression, code for the polypeptide chains comprising the heavy and light chain CDRs of the Mu007 and Hu007 antibodies are represented as SEQ ID NO:1,3,11,13,15, and 17. Due to the degeneracy of the genetic code, other DNA sequences can be readily substituted for the exemplified sequences.

DNA encoding the antibodies of the present invention will typically further include an expression control polynucleotide sequence operably linked to the antibody coding sequences, including naturally-associated or heterologous promoter regions. Preferably, the expression control sequences will be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells, but control sequences for prokaryotic hosts may also be used. Once the vector has been incorporated into the appropriate host cell line, the host cell is propagated under conditions suitable for expressing the nucleotide sequences, and, as desired, the collection and purification of the light chains, heavy

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-31-

chains, light/heavy chain dimers or intact antibodies, binding fragments or other immunoglobulin forms.

The nucleic acid sequences of the present invention capable of ultimately expressing the desired antibodies can be formed from a variety of different polynucleotides (genomic or cDNA, RNA, synthetic oligonucleotides, etc.) and components (e.g., V, J, D, and C regions), using any of a variety of well known techniques. Joining appropriate genomic and synthetic sequences is a common method of production, but cDNA sequences may also be utilized.

Human constant region DNA sequences can be isolated in accordance with well known procedures from a variety of human cells, but preferably from immortalized B-cells. Suitable source cells for the polynucleotide sequences and host cells for immunoglobulin expression and secretion can be obtained from a number of sources well-known in the art.

As described herein, in addition to the antibodies specifically described herein, other "substantially homologous" modified antibodies can be readily designed and manufactured utilizing various recombinant DNA techniques well known to those skilled in the art. For example, the framework regions can vary from the native sequences at the primary structure level by several amino acid substitutions, terminal and intermediate additions and deletions, and the like. Moreover, a variety of different human framework regions may be used singly or in combination as a basis for the humanized immunoglobulins of the present invention. In general, modifications of the genes may be readily accomplished by a variety of well-known techniques, such as site-directed mutagenesis.

Alternatively, polypeptide fragments comprising only a portion of the primary antibody structure may be produced, which fragments possess one or more immunoglobulin activities (e.g., complement fixation activity). These

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-32-

polypeptide fragments may be produced by proteolytic cleavage of intact antibodies by methods well known in the art, or by inserting stop codons at the desired locations in vectors using site-directed mutagenesis, such as after CH1 to produce Fab fragments or after the hinge region to produce F(ab')₂ fragments. Single chain antibodies may be produced by joining VL and VH with a DNA linker.

As stated previously, the polynucleotides will be expressed in hosts after the sequences have been operably linked to (i.e., positioned to ensure the functioning of) an expression control sequence. These expression vectors are typically replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the host chromosomal DNA. Commonly, expression vectors will contain selection markers, e.g., tetracycline, neomycin, and dihydrofolate reductase, to permit detection of those cells transformed with the desired DNA sequences.

E. coli is a prokaryotic host useful particularly for cloning the polynucleotides of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include bacilli, such as *Bacillus subtilis*, and other enterobacteriaceae, such as *Salmonella*, *Serratia*, and various *Pseudomonas* species. In these prokaryotic hosts, one can also make expression vectors, which will typically contain expression control sequences compatible with the host cell (e.g., an origin of replication). In addition, any of a number of well-known promoters may be present, such as the lactose promoter system, a tryptophan (*trp*) promoter system, a beta-lactamase promoter system, or a promoter system from phage lambda. The promoters will typically control expression, optionally with an operator sequence, and have ribosome binding site sequences and the like, for initiating and completing transcription and translation.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-33-

Other microbes, such as yeast, may also be used for expression. *Saccharomyces* is a preferred host, with suitable vectors having expression control sequences, such as promoters, including 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, and an origin of replication, termination sequences and the like as desired.

In addition to microorganisms, Plant cells may also be used for expression. Optimal methods of plant transformation vary depending on the type of plant. For example, see WO00/53794 which is herein incorporated by reference.

Mammalian tissue cell culture may also be used to express and produce the polypeptides of the present invention. Eukaryotic cells are actually preferred, because a number of suitable host cell lines capable of secreting intact immunoglobulins have been developed in the art, and include the CHO cell lines, various COS cell lines, Syrian Hamster Ovary cell lines, HeLa cells, myeloma cell lines, transformed B-cells, human embryonic kidney cell lines, or hybridomas. Preferred cell lines are CHO and myeloma cell lines such as SP2/0 and NS0.

Expression vectors for these cells can include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, an enhancer, and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. Preferred expression control sequences are promoters derived from immunoglobulin genes, SV40, Adenovirus, Bovine Papilloma Virus, cytomegalovirus and the like. Preferred polyadenylation sites include sequences derived from Sv40 and bovine growth hormone.

The vectors containing the polynucleotide sequences of interest (e.g., the heavy and light chain encoding sequences

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-34-

and expression control sequences) can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts.

Once expressed, the antibodies can be purified according to standard procedures, including ammonium sulfate precipitation, ion exchange, affinity (e.g. Protein A), reverse phase, hydrophobic interaction column chromatography, gel electrophoresis, and the like. Substantially pure immunoglobulins having at least about 90 to 95% purity are preferred, and 98 to 99% or more purity most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used therapeutically or prophylactically, as directed herein.

This invention also relates to a method of treating humans experiencing an IL-1 β mediated inflammatory disorder which comprises administering an effective dose of an IL-1 β antibody to a patient in need thereof. The antibodies of the present invention bind to and prevent IL-1 β from binding an IL-1 β receptor and initiating a signal. Various IL-1 β -mediated disorders include rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA), allergy, septic or endotoxic shock, septicemia, stroke, asthma, graft versus host disease, Crohn's disease, and other inflammatory bowel diseases. Preferably, the IL-1 β antibodies encompassed by the present invention are used to treat RA and/or OA.

Patients with RA suffer from chronic swelling and inflammation of the joints and ongoing destruction of cartilage and bone. IL-1 β and TNF- α are the most critical cytokines in the pathogenesis of RA. However, while both

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-35-

IL-1 β and TNF- α mediate inflammation, IL-1 β is the primary mediator of bone and cartilage destruction. Activated monocytes and fibroblasts in the synovial tissue produce IL-1 β which in turn stimulates the production of additional pro-inflammatory cytokines, prostaglandins, and matrix metalloproteases. The synovial lining becomes hypertrophied, invading and eroding bone and cartilage.

Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as hydroxychloroquine, oral or injectable gold, methotrexate, azathioprine, penicillamine, and sulfasalazine have been used with modest success in the treatment of RA. Their activity in modifying the course of RA is believed to be due to suppression or modification of inflammatory mediators such as IL-1 β . Methotrexate, for example, at doses of 7.5 to 10 mg per week caused a reduction in IL-1 β plasma concentrations in RA patients. Similar results have been seen with corticosteroids. Thus, the IL-1 β antibodies of the present invention may be used alone or in combinations with DMARDs which may act to reduce IL-1 β protein levels in plasma.

An effective amount of the IL-1 β antibodies of the present invention is that amount which provides clinical efficacy without intolerable side effects or toxicity. Clinical efficacy for RA patients can be assessed using the American College of Rheumatology Definition of Improvement (ACR20). A patient is considered a responder if the patient shows a 20% improvement in the tender joint count, swollen joint count, and 3 of 5 other components which include patient pain assessment, patient global assessment, physician global assessment, Health Assessment Questionnaire, and serum C-reactive protein. Prevention of structural damage can be assessed by the van der Heijde

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-36-

modification of the Sharp Scoring system for radiographs (erosion count, joint space narrowing).

The IL-1 β antibodies of the present invention can also be used to treat patients suffering from osteoarthritis (OA). OA is the most common disease of human joints and is characterized by articular cartilage loss and osteophyte formation. Clinical features include joint pain, stiffness, enlargement, instability, limitation of motion, and functional impairment. OA has been classified as idiopathic (primary) and secondary forms. Criteria for classification of OA of the knee and hip have been developed by the American College of Rheumatology on the basis of clinical, radiographic, and laboratory parameters.

An effective amount of the IL-1 β antibodies of the present invention is the amount which shows clinical efficacy in OA patients as measured by the improvement in pain and function as well as the prevention of structural damage. Improvements in pain and function can be assessed using the pain and physical function subscales of the WOMAC OA Index. The index probes clinically important patient-relevant symptoms in the areas of pain, stiffness, and physical function. Prevention of structural damage can be assessed by measuring joint space width on radiographs of the knee or hip.

The antibodies of the present invention are administered using standard administration techniques, preferably peripherally (i.e. not by administration into the central nervous system) by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, pulmonary, transdermal, intramuscular, intranasal, buccal, sublingual, or suppository administration.

The pharmaceutical compositions for administration are designed to be appropriate for the selected mode of administration, and pharmaceutically acceptable excipients

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-37-

such as, buffers, surfactants, preservatives, solubilizing agents, isotonicity agents, stabilizing agents and the like are used as appropriate. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, latest edition, incorporated herein by reference, provides a compendium of formulation techniques as are generally known to practitioners.

The concentration of the IL-1 β antibody in formulations may be from as low as about 0.1% to as much as 15 or 20% by weight and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, stability, and so forth, in accordance with the particular mode of administration selected. Preferred concentrations of the IL-1 β antibody will generally be in the range of 1 to about 100 mg/mL. Preferably, 10 to about 50 mg/mL.

The formulation may include a buffer. Preferably the buffer is a citrate buffer or a phosphate buffer or a combination thereof. Generally, the pH of the formulation is between about 4 and about 8. Preferably, the pH is between about 5 and about 7.5. The pH of the formulation can be selected to balance antibody stability (chemical and physical) and comfort to the patient when administered. The formulation may also include a salt such as NaCl. In addition, the formulation may include a detergent to prevent aggregation and aid in maintaining stability. For example, Tween-80 and Tween-20 were shown to be compatible with the Hu007 antibody.

The formulation may be sterile filtered after making the formulation, or otherwise made microbiologically acceptable. A preservative such as m-cresol or phenol, or a mixture thereof may be added to prevent microbial growth and contamination.

A typical composition for intravenous infusion could have a volume as much as 250 mL of fluid, such as sterile

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-38-

Ringer's solution, and 1-100 mg per mL, or more in antibody concentration. Therapeutic agents of the invention can be frozen or lyophilized for storage and reconstituted in a suitable sterile carrier prior to use. Lyophilization and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss (e.g. with conventional immunoglobulins, IgM antibodies tend to have greater activity loss than IgG antibodies). Dosages may have to be adjusted to compensate.

Although the foregoing methods appear the most convenient and most appropriate for administration of proteins such as humanized antibodies, by suitable adaptation, other techniques for administration, such as transdermal administration and oral administration may be employed provided proper formulation is designed. In addition, it may be desirable to employ controlled release formulations using biodegradable films and matrices, or osmotic mini-pumps, or delivery systems based on dextran beads, alginate, or collagen. In summary, formulations are available for administering the antibodies of the invention and may be chosen from a variety of options.

Typical dosage levels can be optimized using standard clinical techniques and will be dependent on the mode of administration and the condition of the patient. Generally, doses will be in the range of 10 µg/kg/month to 10 mg/kg/month.

The invention is illustrated by the following examples which are not intended to be limiting in any way.

Example 1

Mu007 variable regions:

The Mu007 light and heavy chain variable region cDNAs were cloned from a hybridoma cell line. Several light and heavy chain clones were sequenced from two independent PCR

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-39-

reactions. The functional light chain variable sequence was typical of a functional mouse kappa chain variable region and was found to belong to subgroup V based on the definition of Kabat (Johnson, G. and Wu, T. T. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 214-218). For the heavy chain, a unique sequence homologous to a typical mouse heavy chain variable region was identified. Mu007 variable heavy chain was classified to subgroup II(A) based on the definition of Kabat (Johnson and Wu, 2000). The cDNA sequences coding light and heavy chain variable regions are represented as SEQ ID NO: 1 and 3, respectively.

Example 2

Hu007 variable regions:

The human variable region framework used as an acceptor for Mu007 CDRs was constructed and amplified using eight overlapping synthetic oligonucleotides ranging in length from approximately 65 to 80 bases (He, et al. (1998) *J. Immunol.* 160: 1029-1035). The oligonucleotides were annealed pairwise and extended with the Klenow fragment of DNA polymerase I, yielding four double-stranded fragments. The resulting fragments were denatured, annealed pairwise, and extended with Klenow, yielding two fragments. These fragments were denatured, annealed pairwise, and extended once again, yielding a full-length gene. The PCR-amplified fragments were gel-purified and cloned into pCR4Blunt vector. After sequence confirmation, the variable light and variable heavy genes were digested with MluI and XbaI, gel-purified, and subcloned respectively into vectors for expression of light and heavy chains to make pVκ-Hu007 and pVγ1-Hu007.

Example 3

Expression of Hu007

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-40-

Mouse myeloma cell line Sp2/0-Ag14 (hereinafter, Sp2/0) was obtained from the ATCC and maintained in DME medium containing 10% FBS (Cat # SH30071.03, Hyclone, Logan, UT) in a 37°C incubator.

5 Stable transfection into mouse myeloma cell line Sp2/0 was accomplished by electroporation using a Gene Pulser apparatus (BioRad, Hercules, CA) at 360 V and 25 μ F according to the manufacturer's instructions. Before
10 transfection, pV_k-Hu007 and pV_{g1}-Hu007 plasmid DNAs were linearized using FspI. Approximately 10^7 Sp2/0 cells were transfected with 30 μ g of pV_k-Hu007 and 60 μ g of pV_{g1}-Hu007. The transfected cells were suspended in DME medium containing 10% FBS and plated into several 96-well plates. After 48 hr, cells were selected for *gpt* expression using
15 selection media (DME medium containing 10% FBS, HT media supplement, 0.3 mg/ml xanthine and 1 μ g/ml mycophenolic acid). Approximately 10 days after the initiation of selection, culture supernatants were assayed for antibody production by ELISA (See Example 7). High-yielding clones
20 were expanded in DME medium containing 10% FBS and further analyzed for antibody expression. Selected clones were then adapted to growth in serum free medium (Hybridoma SFM, Cat. # 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD). This was accomplished by splitting the cells gradually in Hybridoma
25 SFM, usually by a 25 to 50% split each time, until the serum level was below 0.1%. Thereafter, the transfectant was maintained in Hybridoma SFM. The cell density was maintained between 2×10^5 /ml and 10^6 /ml.

CHO-DG44 cells were transfected with 50 μ g of pV_k-Hu007
30 and 50 μ g of pV_{g1}-Hu007 (genomic transfection) or 50 μ g of an expression vector containing cDNA corresponding to the Hu007 light chain and 50 μ g of a vector containing cDNA corresponding to the Hu007 heavy chain. Approximately 10^7

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-41-

cells were electroporated at 350 volts/50 μ F and 380 volts/50 μ F for the genomic transfection and 350 volts/71 μ F and 380 volts/71 μ F for the cDNA transfection. Cells were incubated at room temperature and then diluted with 20 ml Growth Medium (ExCell 302 medium + 4 mM L-Glutamine + 1X hypoxanthine/thymidine reagent + 100 μ g/mL dextran sulfate) and allowed to recover for 72 hours in a 37°C/5% CO₂ incubator. Cells were selected with medium containing 50 nM methotrexate for the genomic transfectants and 20 nM methotrexate and 200 μ g/mL G418 for the cDNA transfectants.

Example 4

Purification of Hu007:

A high expressing Sp2/0 clone was expanded to 1,500 ml in Hybridoma SFM in roller bottles (500 ml per roller bottle). Hu007 IgG1 monoclonal antibody was purified from spent culture supernatant with a protein-A Sepharose column. Spent culture supernatant was harvested when cell viability reached 10% or below and loaded onto a protein-A Sepharose column. The column was washed with PBS before the antibody was eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.8), 0.1 M NaCl. After neutralization with 1 M Tris HCl (pH 8), the eluted protein was dialyzed against 3 changes of 2 liters PBS and filtered through a 0.2 μ m filter prior to storage at 4°C. Antibody concentration was determined by measuring absorbance at 280 nm (1 mg/ml = 1.4 A₂₈₀).

Example 5

Expression and Purification of Mu007:

Hybridoma cells producing Mu007 were first grown in RPMI-1640 medium containing 10% FBS (HyClone), 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 25 μ g/ml gentamicin, and then expanded in

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-42-

serum-free media (Hybridoma SFM, Cat # 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD) containing 2% low Ig FBS (Cat # 30151.03, HyClone) to a 1 liter volume in roller bottles. Mu007 was purified from the culture supernatant by affinity chromatography using a protein-G Sepharose column. Biotinylated Mu007 was prepared using EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Cat # 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL).

Example 6

- 10 SDS-PAGE analysis of isolated Mu007 and Hu007:
SDS-PAGE in Tris-glycine buffer was performed according to standard procedures on a 4-20% gradient gel (Cat # EC6025, Novex, San Diego, CA).
SDS-PAGE analysis of Mu007 and Hu007 under non-reducing
15 conditions indicated that both antibodies have a molecular weight of about 150-160 kD. Analysis under reducing conditions indicated that both antibodies were comprised of a heavy chain with a molecular weight of about 50 kD and a light chain with a molecular weight of about 25 kD. The
20 purity of Hu007 appeared to be more than 95%.

Example 7

Quantification of antibody expression by ELISA:

- Wells of 96-well ELISA plates (Nunc-Immuno plate, Cat #
25 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) were coated with 100 μ l of 1 μ g/ml goat anti-human IgG, Fc γ fragment specific, polyclonal antibodies (Cat # 109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) in 0.2 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.4) overnight at 4°C. After washing
30 with Washing Buffer (PBS containing 0.1% Tween 20), wells were blocked with 400 μ l of Superblock Blocking Buffer (Cat # 37535, Pierce) for 30 min and then washed with Washing Buffer. Samples containing Hu007 were appropriately diluted in ELISA Buffer (PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween 20)

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-43-

and applied to ELISA plates (100 μ l per well). As a standard, humanized anti-CD33 IgG1 monoclonal antibody HuM195 (Co et al. (1992) J. Immunol. 148: 1149-1154) was used. ELISA plates were incubated for 2 hr at 37°C and the wells were washed with Wash Buffer. Then, 100 μ l of 1/1,000-diluted HRP-conjugated goat anti-human kappa polyclonal antibodies (Cat # 1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) in ELISA Buffer was applied to each well. After incubating for 1 hr at 37°C and washing with Wash Buffer, 100 μ l of ABTS substrate (Cat #s 507602 and 506502, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) was added to each well. Color development was stopped by adding 100 μ l of 2% oxalic acid per well. Absorbance was read at 415 nm using an OPTImax microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Example 8

ELISA competition:

Wells of 96-well ELISA plates (Nunc-Immuno plate, Cat # 439454, NalgeNunc) were coated with 100 μ l of 0.5 μ g/ml of human IL-1 β in 0.2M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.4) overnight at 4°C, washed with Wash Buffer, blocked with Superblock blocking buffer for 30 min at 37°C, and washed again with Wash Buffer. A mixture of biotinylated Mu007 (0.16 μ g/ml final concentration) and competitor antibody (Mu007 or Hu007; starting at 100 μ g/ml final concentration and serial 3-fold dilutions) in ELISA Buffer were added in triplicate in a final volume of 100 μ l per well. As a no-competitor control, 100 μ l of 0.16 μ g/ml biotinylated Mu007 was used. As a background control, 100 μ l of ELISA Buffer was used. ELISA plates were incubated at 37°C for 2 hr. After washing the wells with Washing Buffer, 100 μ l of 1 μ g/ml HRP-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch) was added to each well. ELISA plates were incubated at room

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-44-

temperature for 30 min and washed with Washing Buffer. For color development, 100 μ l/well of ABTS substrate was added. Color development was stopped by adding 100 μ l/well of 2% oxalic acid. Absorbance was read at 415 nm.

- 5 Both Mu007 and Hu007 competed with biotinylated Mu007 in a concentration-dependent manner. A concentration-dependent competition indicates that the competing antibodies bind the same epitope on mature IL-1 β . The IC₅₀ values of Mu007 and Hu007 in three independent experiments, obtained using the computer software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) are shown in Table 1. The relative binding of Hu007 was on average 1.3 fold less than that of Mu007.

- 15 Table 1: Summary of ELISA competition experiments

IC₅₀ (μ g/ml)

Competitor	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Average	Std. Dev.
Mu007	0.40	0.40	0.39	0.40	0.0069
Hu007	0.39	0.35	0.32	0.35	0.035
Difference	0.98	0.88	0.82	0.89	

Example 9

- 20 Binding affinity and specificity:

Affinities and specificities of both Hu007 and Mu007 were determined using BIAcore measurements. BIAcore™ is an automated biosensor system that measures molecular interactions. (Karlsson, et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 145: 229-240). In these experiments antibody was immobilized at low density on a BIAcore™ chip. Ethyl-dimethylaminopropyl-carbodiimide (EDC) was used to couple reactive amino groups to purified goat anti-human IgG or

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-45-

goat anti-rabbit IgG to a flow cell of a carboxy-methyl (CM5) BIAcore™ sensor chip. Goat IgG was diluted in sodium acetate buffer, pH 4.0, and immobilized on a flow cell of a CM5 chip using EDC to yield 1000 response units. Unreacted sites were blocked with ethanolamine. A flow rate of 60 μ l/min was used. Multiple binding/elution cycles were performed by injection a 100 μ l solution of 15 μ g/mL Mu007 or Hu007 followed by human IL-1 β , mouse IL-1 β , rat IL-1 β , cynomolgus monkey IL-1 β , porcine IL-1 β , human IL-1 receptor antagonist, and human IL-1 α at decreasing concentrations for each cycle (e.g. 1500, 750, 375, 188, 94, 47, 23.5, 12, and 0 picomolar). Elution was performed with glycine-HCl, pH 1.5. BIAevaluation™ was used to analyze the kinetic data. Table 2 depicts the affinities of Hu007 and Mu007 for human and cynomolgus IL-1 β . Mouse IL-1 β , rat IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, and human IL-1 α did not bind to Hu007. Cynomolgus and porcine IL-1 β had 100% binding to Hu007 relative to human IL-1 β .

Table 2: Affinities of Hu007 and Mu007 for IL-1 β

Antibody	Target Molecule	KD (Picomolar)
Mu007	Human IL-1 β	6.2
Hu007	Human IL-1 β	10.2
Mu007	Cynomolgus IL-1 β	7.3
Hu007	Cynomolgus IL-1 β	10.4

Example 10

Antibody potency:

A murine cell requiring low levels of IL-1 β for proliferation was used to determine the ability of Hu007 and

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-46-

Mu007 to neutralize human IL-1 β . T1165.17 cells which are no longer in log phase growth were washed 3 times with RPMI 1640 (GibcoBRL Cat. # 22400-089) supplemented with 10% fetal calf serum (GibcoBRL Cat. # 10082-147), 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M beta mercaptoethanol, and an antibiotic/antimycotic (GibcoBRL Cat. # 15240-062). Cells were plated at 5,000 cells per well of a 96 well plate. Human IL-1 β was present at a constant level of 0.3 pM and a dilution series of antibody was added. Diluted samples were added and cells were incubated for 20 hours in a 37°C/5 % CO₂ incubator at which point 1 μ Ci ³H-thymidine was added per well and plates incubated an additional 4 hours in the incubator. Cells were harvested and incorporated radioactivity determined by a scintillation counter. Figure 5 illustrates inhibition of IL-1 β stimulated proliferation by Mu007 and Hu007. Average IC50 values calculated from three separate experiments for Mu007 and Hu007 were 220 pM and 480 pM respectively.

20 Example 11

Neutralization of human IL-1 β in vivo:

Human IL-1 β is able to bind and stimulate the mouse IL-1 β receptor, leading to an elevation of mouse IL-6. Time and dose ranging experiments were undertaken to identify the optimal dose of human IL-1 β and the optimal time for induction of mouse IL-6. These experiments indicated that a 3 μ g/kg dose of human IL-1 β and a time of 2 hours post IL-1 β administration gave maximal levels of IL-6 in mouse serum. Mu007 and Hu007 were administered IV to mice one hour prior to an IP injection of human IL-1 β at 27, 81 270, and 2700 μ g/kg. At two hours post IL-1 β administration, mice were sacrificed, and IL-6 levels were determined by ELISA.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-47-

Isotype matched antibodies were used as negative controls.
Mu007 and Hu007 inhibit human IL-1 β induction of mouse IL-6
in a dose dependent manner beginning at 81 and 270 μ g/kg
with total inhibition of IL-6 induction at 2700 μ g/kg.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-48-

We Claim:

1. An antibody that specifically binds mature human IL-1 β
wherein the antibody binds the same epitope on mature
5 human IL-1 β as mouse monoclonal antibody Mu007 or
humanized antibody Hu007.
2. The antibody of Claim 1 that specifically binds mature
human IL-1 β with an affinity constant that is within
10 ten-fold the affinity constant of mouse monoclonal
antibody Mu007 for human IL-1 β .
3. The antibody of Claims 1 or 2 wherein the antibody
comprises at least one complementarity determining
15 region having a sequence selected from the group
consisting of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ
ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:10.
4. The antibody of Claim 3 wherein the antibody comprises a
20 light chain variable region having the sequence of SEQ
ID NO:27.
5. The antibody of Claim 3 wherein the antibody comprises a
heavy chain variable region having the sequence of SEQ
25 ID NO:28.
6. A humanized antibody which specifically binds mature
human IL-1 β comprising a humanized light chain which is
comprised of three light chain complementarity
30 determining regions (CDRs) having sequences that
correspond to SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, and SEQ ID NO:7
and a humanized heavy chain which is comprised of three

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-49-

heavy chain CDRs having sequences that correspond to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:10.

- 5 7. The humanized antibody of Claim 6 comprising a light chain variable region having the sequence of SEQ ID NO:27.
8. The humanized antibody of Claim 6 comprising a heavy chain variable region having the sequence of SEQ ID NO:28.
- 10 9. The humanized antibody of Claim 6 comprising a light chain variable region having the sequence of SEQ ID NO:11 and a heavy chain variable region having the sequence of SEQ ID NO:15.
- 15 10. The humanized antibody of Claim 9 comprising a light chain having the sequence of SEQ ID NO:13 and a heavy chain having the sequence of SEQ ID NO:17.
- 20 11. An antibody that specifically binds human IL-1 β wherein the variable domains of the antibody have framework regions which correspond to one or more human immunoglobulin heavy or light chain variable domain germline sequences and complementarity determining regions (CDRs) having sequences that correspond to: SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:10.
- 25 12. An antibody of Claim 1 or 2 comprised of complementarity determining regions (CDRs) wherein said CDRs are a modified form of the CDRs that correspond to the CDRs of antibody Mu007 wherein said modification improves binding affinity or biological activity compared to the
- 30

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-50-

binding affinity or biological activity of the Mu007 antibody.

- 5 13. An antibody fragment obtainable by enzymatic cleavage of the antibody as claimed in any one of Claims 1 through 12.
- 10 14. The antibody fragment of claim 13 which is a Fab or F(ab')₂ fragment.
- 15 15. The antibody of any one of Claims 1 through 14 which is a single chain antibody.
- 16 16. The antibody of any one of Claims 1 through 15 wherein the antibody has an IgG isotype.
- 17 17. The antibody of Claim 16 wherein the isotype is selected from the group consisting of IgG1 and IgG4.
- 20 18. The antibody of Claim 17 wherein the isotype is IgG1.
19. The antibody of any one of Claims 1 through 18 wherein the antibody has a binding affinity for mature human IL-1 β which is within 5-fold of the binding affinity of Mu007 for mature human IL-1 β .
- 25 20. The antibody of Claim 19 which is within 3-fold the binding affinity of Mu007.
- 30 21. The antibody of any one of Claims 1 through 20 wherein the heavy chain or light chain variable framework region has at least 65% sequence identity with the corresponding framework region of the antibody Mu007.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-51-

22. The antibody of Claim 21 wherein the sequence identity is at least 70%.
23. The antibody of Claim 22 wherein the sequence identity is at least 80%.
5
24. The antibody of any one Claims 1 through 23 wherein the antibody has an IC50 for mature human IL-1 β within 10-fold the IC50 of Mu007 for mature human IL-1 β .
10
25. The antibody of Claim 24 wherein the antibody has an IC50 within 5-fold that of Mu007.
26. The antibody of Claim 25 wherein the antibody has an IC50 within 3-fold that of Mu007.
15
27. An isolated nucleic acid, comprising a polynucleotide encoding an antibody of any one of Claims 1 through 26.
28. The nucleic acid of Claim 27 comprising one or more polynucleotides having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, and SEQ ID NO:17.
20
29. The nucleic acid of Claim 28 comprising a polynucleotide having a sequence which corresponds to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:17.
25
30. An expression vector comprising a nucleic acid according to any one of Claims 27 through 29.
30
31. A host cell stably transfected with the expression vector of Claim 30 wherein the host cell expresses a antibody of any one of Claims 1 through 26.

WO 03/010282

PCT/US02/21281

-52-

32. The host cell of Claim 31 wherein the host cell is
selected from the group consisting of a Chinese Hamster
Ovary cell, SP2/0 myeloma cell, NS0 Myeloma cell, a
5 syrian hamster ovary cell, and an embryonic kidney cell.
33. The host cell of Claim 32, which is a Chinese Hamster
Ovary cell.
- 10 34. A process for producing an antibody comprising culturing
the host cell of Claim 32 under conditions suitable for
expression of said antibody and recovering said antibody
from the cell culture.
- 15 35. A pharmaceutical composition comprising the antibody of
any one of Claims 1 through 26.
36. A method of treating rheumatoid arthritis or osteo-
arthritis, comprising administering to a subject an
20 effective amount of the antibody of any one of Claims 1
through 26.
37. A method of inhibiting the destruction of cartilage,
comprising administering to a subject in need thereof
25 an effective amount of the antibody of any one of
Claims 1 through 26.
38. The use of the antibody of any one of Claims 1 through
26 for the manufacture of a medicament to treat a
30 subject with rheumatoid arthritis or osteo-arthritis.
39. The use of the antibody of any one of Claims 1 through
26 for the manufacture of a medicament to inhibit
cartilage destruction in a subject in need thereof.
35

X-14900

FIG. 1

Mu007	D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R V T I T C K A	50
Hu007	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C K A	
L1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C - -	
Mu007	S Q D I D R Y L S W F Q Q K P G K S P K T L I Y R	50
Hu007	S Q D I D R Y L S W F Q Q K P G K A P K S L I Y R	
L1	- - - - - W F Q Q K P G K A P K S L I Y -	
Mu007	V K R L V D G V P S R F S G S A S G Q D Y S L T I	75
Hu007	V K R L V D G V P S R F S G S A S G T D Y T L T I	
L1	- - - - - G V P S R F S G S G T D Y T L T I	
Mu007	S S L Q Y E D M G I Y Y C L Q Y D E F P Y T F G G	100
Hu007	S S L Q P E D F A T Y Y C L Q Y D E F P Y T F G Q	
L1/Jk2	S S L Q P E D F A T Y Y C - - - - - F G Q	
Mu007	G T K L E I K	107
Hu007	G T K L E I K	
Jk2	G T K L E I K	

X-14900

FIG. 2

Mu007	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	T
Hu007	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	V	S
DP-5	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	V	S
Mu007	G	Y	T	F	S	R	Y	W	I	E	W	I	K	Q	R	P	G	H	G	L	E	W	I	G	E
Hu007	G	Y	T	F	S	R	Y	W	I	E	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E
DP-5	G	Y	T	L	T	-	-	-	-	-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	M	G	-
Mu007	I	L	P	G	N	G	N	I	N	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	I	S	A	D	S	S
Hu007	I	L	P	G	N	G	N	I	N	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	I	T	A	D	T	S
DP-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	V	T	M	T	E	D	T	S
Mu007	S	E	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	S	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	S	T	I	Y
Hu007	T	D	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	T	I	Y
DP-5	T	D	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	-	-
Mu007	Y	D	Y	D	Q	G	F	T	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	A				
Hu007	Y	D	Y	D	Q	G	F	T	Y	W	G	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S				
JH4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S				

X-14900

FIG. 3

3/4

Human	APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGDMEQQVVFMSFVQGE
Cynomolgus	APVRSLHCTLRDAQLKSLVMSGPYELKALHLQGDLEQQVVFMSFVQGE
Rabbit	AVRSLHCRLDQAQQKSLVLSGTYELKALHLNAENLNQQVVFMSFVQGE
Mouse	VPIRQLHYRLRDEQQKSLVLSDPYELKALHLNGQINQQVVFMSFVQGE
Rat	VPIRQLHCRRLRDEQQKCLVLSDFCELKALHLNGNISQQVVFMSFVQGE
Human	ESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFV
Cynomolgus	ESNDKIPVALGLKAKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFV
Rabbit	ESNDKIPVALGLRGKNLYLSCVMKDDKPTLQLESVDENRYPKKKMEKRFV
Mouse	PSNDKIPVALGLKGNLYLSCVMKDGTPTLQLESVDPKQYPKKKMEKRFV
Rat	TSNDKIPVALGLKGLNLYLSCVMKDGTPTLQLESVDPKQYPKKKMEKRFV
Human	FNKIEINNKLFEFESAQFPNWIISTSAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS
Cynomolgus	FNKIEINNKLFEFESAQFPNWIISTSAENMPVFLGGTRGGQDITDFTMQFVS
Rabbit	FNKIEIKDKLEFESAQFPNWIISTQTEYMPVFLGNNSGGQDLTDFSMERFVSS
Mouse	FNKIEVKSVEFESAEPNWIISTSAEHRPVFLGNNSG-QDIDFTMEFVSS
Rat	FNKIEVKTVEFESAQFPNWIISTSAEHRPVFLGNNSG-RDIVDFTMEFVSS

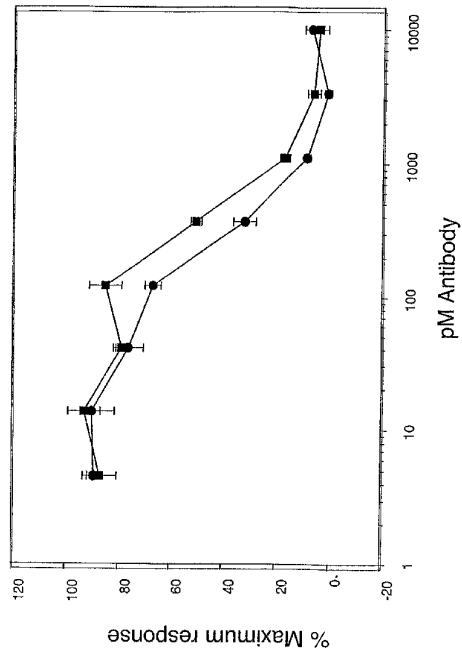
WO 03/010282

PCT/US02/21281

4/4

X-14900

FIG. 4



WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> Interleukin-1 Beta Antibodies

<130> X-14900

<150> US 60/307,973

<151> 2001-07-26

<150> US 60/312,278

<151> 2001-08-14

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (321)

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(34)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(56)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(97)

<223> Kabat region

<400> 1

gac atc aag atg acc cag tct cca tct tcc atg tat gca tct cta gga

48

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac att gat agg tat

96

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr

20

25

30

tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct aag acc ctg atc

Page 2

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

144
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

tat cgt gta aag aga ttg gta gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc
192
Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc gca tct ggg caa gat tat tct ctc acc atc agc agc ctg cag tat
240
Ser Ala Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Tyr
65 70 75 80

gaa gat atg gga att tat tat tgt cta cag tat gat gag ttt ccg tac
288
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa
321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(34)

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(56)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(97)

<223> Kabat region

<400> 2

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Ala Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 3

<211> 360

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(35)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(66)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (99)..(109)

<223> Kabat region

<400> 3

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc

48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

```

1           5           10           15
tca gtg aag gtg tcc tgc aag gtg tct ggc tac aca ttc agt agg tat
96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
20           25           30
tgg ata gag tgg gtt aga cag gca cct gga aaa ggc ctt gag tgg att
144
Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35           40           45
gga gag att tta cct gga aat gga aat att aac tac aat gag aag ttc
192
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50           55           60
aag ggc aag gcc aca atc aca gca gat aca tcc aca gat aca gcc tac
240
Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65           70           75           80
atg gaa ctc agc agc ctg agg tct gag gac aca gcc gtc tat tat tgt
288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95
tca aca atc tac tat gat tac gac cag ggg ttt act tac tgg ggc caa
336
Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100           105           110
ggg act ctg gtc act gtt tct gca
360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115           120

```

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(35)
<223> Kabat region

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(66)
<223> Kabat region

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)..(109)
<223> Kabat region

<400> 4
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody light chain CDR1

<400> 5

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<223> Humanized antibody light chain CDR2

<400> 6

Arg Val Lys Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody light chain CDR3

<400> 7

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Tyr Thr
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody heavy chain CDR1

<400> 8

Arg Tyr Trp Ile Glu
1 5

<210> 9

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody heavy chain CDR2

<400> 9

Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody heavy chain CDR3

<400> 10

Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr
1 5 10

<210> 11

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<220>

<223> Humanized antibody light chain variable region

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(34)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(56)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(97)

<223> Kabat region

<400> 11

gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg tct gca tct gta gga

48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Page 11

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

gac aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac att gat agg tat
96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr

20

25

30

tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag tcc ctg atc
144
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

tat cgt gta aag aga ttg gta gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc
192
Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agc gca tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc agc ctg cag cct
240
Ser Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttc gca acc tat tat tgt cta cag tat gat gag ttt cgg tac
288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85

90

95

acg ttc gga cag ggg acc aag ctg gaa ata aaa
321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody light chain variable region

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(34)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(56)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(97)

<223> Kabat region

<400> 12

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asp	Arg	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Arg	Val	Lys	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50			55					60					

Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Page 14

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(97)

<223> Kabat region

<400> 13

gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg tct gca tct gta gga

48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

gac aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac att gat agg tat

96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr

20

25

30

tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag tcc ctg atc

144

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

tat cgt gta aag aga ttg gta gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc

192

Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agc gca tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc agc ctg cag cct

240

Ser Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttc gca acc tat tat tgt cta cag tat gat gag ttt ccg tac

Page 15

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85

90

95

acg ttc gga cag ggg acc aag ctg gaa ata aaa cga act gtg gct gca

336

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100

105

110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga

384

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc

432

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag

480

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145

150

155

160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc

528

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165

170

175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac

576

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180

185

190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc

624

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

Page 16

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

195

200

205

ttc aac agg gga gag tgt
642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody light chain variable region

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(34)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(56)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(97)

<223> Kabat region

<400> 14

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr
20     25     30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35     40     45
Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50     55     60
Ser Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65     70     75     80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85     90     95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100    105    110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115    120    125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130    135    140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145    150    155    160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165    170    175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180    185    190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195    200    205

```

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 15

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody heavy chain variable region

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(35)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(66)

<223> Kabat region

<220>

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<221> misc_feature

<222> (99)..(109)

<223> Kabat region

<400> 15

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc

48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

tca gtg aag gtg tcc tgc aag gtg tct ggc tac aca ttc agt agg tat

96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr

20

25

30

tgg ata gag tgg gtt aga cag gca cct gga aaa ggc ctt gag tgg att

144

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

gga gag att tta cct gga aat gga aat att aac tac aat gag aag ttc

192

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

aag ggc aag gcc aca atc aca gca gat aca tcc aca gat aca gcc tac

240

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

atg gaa ctc agc agc ctg agg tct gag gac aca gcc gtc tat tat tgt

288

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

tca aca atc tac tat gat tac gac cag ggg ttt act tac tgg ggc caa
336
Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

ggg act ctg gtc act gtt tct tct
360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody heavy chain variable region

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(35)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(66)

<223> Kabat region

<220>

<221> misc_feature

<222> (99)..(109)

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<223> Kabat region

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody full-length heavy chain region

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1350)

<223>

<400> 17

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc

48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

tca gtg aag gtg tcc tgc aag gtg tct ggc tac aca ttc agt agg tat

96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr

20

25

30

tgg ata gag tgg gtt aga cag gca cct gga aaa ggc ctt gag tgg att

144

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

gga gag att tta cct gga aat gga aat att aac tac aat gag aag ttc

192

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

.

aag ggc aag gcc aca atc aca gca gat aca tcc aca gat aca gcc tac

240

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

atg gaa ctc agc agc ctg agg tct gag gac aca gcc gtc tat tat tgt

288

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Page 23

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

tca aca atc tac tat gat tac gac cag ggg ttt act tac tgg ggc caa
 336
 Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggg act ctg gtc act gtt tct tct gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc
 384
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc
 432
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg
 480
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc
 528
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc
 576
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag
 624
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

```

ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac
672
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
      210              215              220

aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga
720
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225              230              235              240

ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc
768
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
      245              250              255

tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa
816
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
      260              265              270

gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat
864
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      275              280              285

aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt
912
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
      290              295              300

gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag
960
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305              310              315              320

gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag
1008

```

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325

330

335

aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac
1056

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340

345

350

acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg
1104

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355

360

365

acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg
1152

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370

375

380

gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg
1200

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385

390

395

400

ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac
1248

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405

410

415

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat
1296

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420

425

430

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg
1344

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

WO 03/010282

PCT/US02/21281

435 X-14900.ST25.txt 445
 440
 450
 ggt aaa
 1350
 Gly Lys
 450

 <210> 18
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Humanized antibody full-length heavy chain region
 <400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 19

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<220>

<223> Humanized antibody light chain signal peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(66)

<223>

<400> 19

atg gac atg agg acc cct gct cag ttt ctt gga atc ttt ttc ttc tgg

48

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Phe Phe Phe Trp

1

5

10

15

ttt cca ggt atc aga tgt

66

Phe Pro Gly Ile Arg Cys

20

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody light chain signal peptide

<400> 20

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Phe Phe Phe Trp

1

5

10

15

Phe Pro Gly Ile Arg Cys

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

20

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody heavy chain signal peptide to precede SEQ
ID N

O: 3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<223>

<400> 21

atg gaa tgg acc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gta act gca ggt

48

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1

5

10

15

gtc cac tcc

57

Val His Ser

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody heavy chain signal peptide to precede SEQ

ID N

O: 3

<400> 22

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 23

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody full-length chain signal peptide to precede SE

Q ID NO: 11, 13 or 27

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(66)

<223>

<400> 23

atg gac atg agg acc cct gct cag ttt ctt gga atc ttt ttc ttc tgg
 48

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Phe Phe Phe Trp

Page 33

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt
ede SEQ ID NO: 15, 17 or 28

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<223>

<400> 25

atg gaa tgg acc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gta act gca ggt
48

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc

57
Val His Ser

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody full-length heavy chain signal peptide to
prec

ede SEQ ID NO: 15, 17 or 28

<400> 26

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> light chain variable region, Formula I
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa at position 3 is Gln or Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 is Ser or Thr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa at position 11 is Leu or Met;

<220>
<221> MISC_FEATURE

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa at position 12 is Ser, Tyr, or Thr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa at position 15 is Val or Leu;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa at position 17 is Asp or Glu;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46) .. (46)

<223> Xaa at position 46 is Ser or Thr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (66) .. (66)

<223> Xaa at position 66 is Ala or Gly; and

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (69) .. (69)

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<223> Xaa at position 69 is Thr or Gln;

<400> 27

Ala Ile Xaa Met Thr Gln Xaa Pro Ser Ser Xaa Xaa Ala Ser Xaa Gly
1 5 10 15

Xaa Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Xaa Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Xaa Ser Gly Xaa Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> heavy chain variable region, Formula II

<220>

WO 03/010282

PCT/US02/21281__

X-14900.ST25.txt

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is Gln or Glu;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa at position 24 is Val, Ala, or Ser;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa at position 30 is Ser or Thr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> Xaa at position 37 is Val or Ile;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa at position 43 is Lys, Gln, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<222> (48)..(48)

<223> Xaa at position 48 is Ile or Met;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa at position 67 is Lys or Arg;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223> Xaa at position 68 is Ala or Val;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (70)..(70)

<223> Xaa at position 70 is Ile, Met or Val;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (74)..(74)

<223> Xaa at position 74 is Thr or Ser;

<220>

<221> MISC_FEATURE

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

<222> (76) .. (76)

<223> Xaa at position 76 is Thr or Ser;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (77) .. (77)

<223> Xaa at position 77 is Asp, Glu, or Ser; and

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (87) .. (87)

<223> Xaa at position 87 is Arg or Ser

<400> 28

Xaa	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Xaa	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Xaa	Arg	Tyr
		20						25					30		

Trp	Ile	Glu	Trp	Xaa	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Xaa	Gly	Leu	Glu	Trp	Xaa
		35					40					45			

Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Asn	Gly	Asn	Ile	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Gly	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Thr	Ala	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Thr	Ala	Tyr
65				70						75				80	

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Xaa	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	

WO 03/010282

PCT/US02/21281

X-14900.ST25.txt

Ser Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 February 2003 (06.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/010282 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/24,
A61K 39/395, C12N 15/00, 5/10, C12P 21/00

(21) International Application Number:
PCT/US2002/021281

(22) International Filing Date: 18 July 2002 (18.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/307,973 26 July 2001 (26.07.2001) US
60/312,278 14 August 2001 (14.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ELI
LILLY AND COMPANY [US/US]; Lilly Corporate
Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BRIGHT, Stuart,
Wills [US/US]; 12408 Brookshire Parkway, Carmel,
IN 46033 (US). JLA, Audrey, Yambua [CN/US]; 34772
Chesapeake Drive, Union City, CA 94587 (US). KUH-
STOSS, Stuart, Allen [US/US]; 8206 Narragansett Court,
Indianapolis, IN 46256 (US). MANETTA, Joseph, Vin-
cent [US/US]; 8134 North Richard Avenue, Indianapolis,
IN 46256 (US). TSURUSHITA, Naoya [JP/US]; 3719
Redwood Circle, Palo Alto, CA 94306 (US). VASQUEZ,
Maximiliano, J. [CR/US]; 3813 Louis Road, Palo Alto,
CA 94303 (US).

(74) Agents: APELGREN, Lynn, D. et al.; ELI LILLY AND
COMPANY, P. O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288
(US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (uti-
lity model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE, DK, EE
(utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following desig-
nations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent
(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR),
OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
12 February 2004

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

(54) Title: INTERLEUKIN-1 BETA ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention encompasses high affinity antibodies that neutralize IL-1 β activity in vivo. These antibodies
can be used to treat various diseases such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

WO 2003/010282 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/21281
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 16/24; A61K 39/395; C12N 15/00, 5/10; C12P 21/00 US CL : 530/387.3, 388.23, 391.3; 536/23.5; 424/134.1, 145.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/387.3, 388.23, 391.3; 536/24.1; 424/134.1, 145.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95/01997 A1 (SMITHKLINE BEECHAM) 19 JANUARY 1995 (19.01.95), see entire document.	1-39
A	VASWANI et al. Humanized Antibodies as Potential Therapeutic Drugs. Annual Allergy Asthma Immunology. August 1998, Vol.81, pages 105-118, see entire document.	1-39
A	SIMON et al. Mapping of Neutralizing Epitopes and the Receptor Binding Site of Human Interleukin 1 beta. The Journal of Biological Chemistry. May 1993, vol.268, No.13, pages 9771-9779, see entire document.	1-39
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 November 2003 (10.11.2003)		Date of mailing of the international search report 24 NOV 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1-450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Collette Bell-Harris Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/21281

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

West US patent full, STN. via caplus, medline, biosis, embase, SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 27 and 29 searched against commercial data bases. Search terms: antibodies, interleukin-1 beta, humanized, mu007 and hu007

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 5/00	B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 スチュアート・ウィリス・ブライト
アメリカ合衆国46033インディアナ州カーメル、ブルックシャー・パークウェイ12408番

(72)発明者 ジャ・オードリー・ユンファ
アメリカ合衆国94587カリフォルニア州ユニオン・シティ、チェサピーク・ドライブ3477
2番

(72)発明者 スチュアート・アレン・クストス
アメリカ合衆国46256インディアナ州インディアナポリス、ナラーガンセット・コート820
6番

(72)発明者 ジョゼフ・ビンセント・マネッタ
アメリカ合衆国46256インディアナ州インディアナポリス、ノース・リチャート・アベニュー
8134番

(72)発明者 ツルシタ ナオヤ
アメリカ合衆国94306カリフォルニア州パロ・アルト、レッドウッド・サークル3719番

(72)発明者 マクシミリアノ・ホタ・バスケス
アメリカ合衆国94303カリフォルニア州パロ・アルト、ルイス・ロード3813番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA56 CA01 DA02
4B064 AG27 CA19 CC24 DA03
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB17 DD62
4H045 AA11 DA76 EA22 FA74