

(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2004-500086

(P2004-500086A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/02</b>	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 1/04</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 3/10</b>	A 6 1 P 1/04	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 142 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-558102 (P2001-558102)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成13年2月9日 (2001.2.9)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成14年8月9日 (2002.8.9)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/004170		アメリカ合衆国、イリノイ・60064-
(87) 国際公開番号	W02001/058956		6050、アボット・パーク、アボット・
(87) 国際公開日	平成13年8月16日 (2001.8.16)		パーク・ロード・100、チャド・037
(31) 優先権主張番号	60/181, 608		7/エイ・ピー・6・デー2
(32) 優先日	平成12年2月10日 (2000.2.10)	(74) 代理人	100062007
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100105131
			弁理士 井上 満
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトインターロイキン18に結合する抗体とその調整方法および使用方法

## (57) 【要約】

ヒトインターロイキン - 18 (h I L - 18) に結合する抗体が提供され、特に、ヒト I L - 18 のエピトープに結合する抗体が提供される。抗体は、例えば全体がヒト抗体、組換え抗体、またはモノクローナル抗体でよい。好ましい抗体は、h I L - 18 に対する親和性が高く、生体外および生体内で h I L - 18 活性を中和する。本発明の抗体は、完全長抗体またはその抗原結合部分でよい。本発明の抗体を作製する方法および使用方法も提供される。本発明の抗体または抗体部分は、h I L - 18 の検出に有用であり、例えば、h I L - 18 活性が害となる疾患に罹患したヒト対象の h I L - 18 活性を阻害するのに有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト IL - 18 アミノ酸配列またはその一部に結合することができる化合物であって、前記アミノ酸が、配列番号 67 および配列番号 68 からなる群から選択された配列を含む化合物。

## 【請求項 2】

前記化合物が、小分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体、および抗体フラグメントからなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

前記抗体または抗体フラグメントが完全にヒトのものである請求項 2 に記載の化合物。 10

## 【請求項 4】

ヒト IL - 18 に結合することができるヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項 5】

抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $0.1 \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL - 18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$  以下でヒト IL - 18 活性を阻害する、請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL - 18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$  以下でヒト IL - 18 活性を阻害する、請求項 4 に記載の抗体。 20

## 【請求項 7】

抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL - 18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$  以下でヒト IL - 18 活性を阻害する、請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 8】

抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL - 18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-9} \text{ M}$  以下でヒト IL - 18 活性を阻害する、請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 9】

抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL - 18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-10} \text{ M}$  以下でヒト IL - 18 活性を阻害する、請求項 4 に記載の抗体。 30

## 【請求項 10】

抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL - 18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-11} \text{ M}$  以下でヒト IL - 18 活性を阻害する、請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 11】

配列番号 3 および配列番号 33 を含む群から選択されたアミノ酸配列を含む、ヒト IL - 18 のエピトープまたはその一部に結合する、単離された抗体またはその抗原結合部分。 40

## 【請求項 12】

抗体が中和抗体である、請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項 13】

ヒト抗体である請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項 14】

組換え抗体である請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項 15】

モノクローナル抗体である請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項 16】

ヒト IL - 18 のエピトープに結合する、単離された抗体またはその抗原結合部分であつ 50

て、抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $0.1 \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL-18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$  以下でヒト IL-18 活性を阻害する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 17】

表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL-18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$  以下でヒト IL-18 活性を阻害する、請求項 16 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 18】

表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL-18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$  以下でヒト IL-18 活性を阻害する、請求項 16 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。 10

【請求項 19】

表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL-18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-9} \text{ M}$  以下でヒト IL-18 活性を阻害する、請求項 16 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 20】

表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL-18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-10} \text{ M}$  以下でヒト IL-18 活性を阻害する、請求項 16 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 21】

表面プラズモン共鳴により決定されるように  $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  以下でヒト IL-18 から解離し、または  $IC_{50} = 1 \times 10^{-11} \text{ M}$  以下でヒト IL-18 活性を阻害する、請求項 16 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。 20

【請求項 22】

ヒト IL-18 のエピトープに結合することができる少なくとも 1 つの可変部領域 CDR を含む、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 23】

前記抗体またはその抗原結合部分が、修飾されていない抗体またはその抗原結合部分に比べて IL-18 結合を改善する少なくとも 1 つのアミノ酸置換または挿入を含む、請求項 22 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。 30

【請求項 24】

前記抗体またはその抗原結合部分が、修飾されていない抗体またはその抗原結合部分に比べて IL-18 の中和を改善する少なくとも 1 つのアミノ酸置換または挿入を含む、請求項 22 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 25】

前記可変部領域が、  
配列番号 9 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 9 から変更された配列を有する H 鎖 CDR 1 ドメインと、  
配列番号 10 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 10 から変更された配列を有する H 鎖 CDR 2 ドメインと、  
配列番号 11 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 11 から変更された配列を有する H 鎖 CDR 3 ドメインと  
からなる群から選択された CDR ドメインを含む、請求項 22 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。 40

【請求項 26】

前記可変部領域が、  
位置 H 30、H 31、H 32、H 33、または H 35 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 9 から変更された H 鎖 CDR 1 ドメインと、  
位置 H 52、H 52a、H 53、H 54、H 56、または H 58 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 10 から変更された H 鎖 CDR 2 ドメインと、 50

位置 H 9 5、H 9 6、H 9 7、または H 9 8 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 1 1 から変更された H 鎖 C D R 3 ドメインと  
からなる群から選択された C D R ドメインを含む、請求項 2 5 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2 7】

前記可変部領域が、

配列番号 1 2 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 1 2 から変更された配列を有する L 鎖 C D R 1 ドメインと、

配列番号 1 3 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 1 3 から変更された配列を有する L 鎖 C D R 2 ドメインと、

配列番号 1 4 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 1 4 から変更された配列を有する L 鎖 C D R 3 ドメインと

からなる群から選択された C D R ドメインを含む、請求項 2 2 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2 8】

前記可変部領域が、

位置 L 3 0、L 3 1、L 3 2、または L 3 4 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 1 2 から変更された L 鎖 C D R 1 ドメインと、

位置 L 5 0、L 5 2、L 5 3、または L 5 5 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 1 3 から変更された L 鎖 C D R 2 ドメインと、

位置 L 8 9、L 9 0、L 9 1、L 9 2、L 9 3、L 9 4、L 9 5、L 9 5 a、L 9 5 b、L 9 6、または L 9 7 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 1 4 から変更された L 鎖 C D R 3 ドメインと

からなる群から選択された C D R ドメインを含む、請求項 2 7 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2 9】

配列番号 1 5、1 6、および 1 7 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む可変部領域を有する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 0】

配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む L 鎖可変部領域 ( L C V R ) と、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H 鎖可変部領域 ( H C V R ) を有する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 1】

配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する L 鎖可変部領域 ( L C V R ) と、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する H 鎖可変部領域 ( H C V R ) を有する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 2】

前記可変部領域が、

配列番号 2 0 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 0 から変更された配列を有する H 鎖 C D R 1 ドメインと、

配列番号 2 1 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 1 から変更された配列を有する H 鎖 C D R 2 ドメインと、

配列番号 2 2 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 2 から変更された配列を有する H 鎖 C D R 3 ドメインと

からなる群から選択された C D R ドメインを含む、請求項 2 2 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 3】

前記可変部領域が、

位置 H 3 0、H 3 1、H 3 2、H 3 3、または H 3 5 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 0 から変更された H 鎖 C D R 1 ドメインと、

10

20

30

40

50

位置 H 5 0、H 5 1、H 5 2、H 5 2 a、H 5 3、H 5 4、H 5 6、または H 5 8 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 1 から変更された H 鎖 C D R 2 ドメインと

、  
位置 H 9 6、H 9 6、H 9 7、H 9 8、H 9 9、H 1 0 0、H 1 0 0 a、H 1 0 1、または H 1 0 2 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 2 から変更された H 鎖 C D R 3 ドメインと

からなる群から選択された C D R ドメインを含む、請求項 3 2 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 4】

前記可変部領域が、

配列番号 2 3 のアミノ酸配列、または位置で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 3 から変更された配列を有する L 鎖 C D R 1 ドメインと、

配列番号 2 4 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 4 から変更された配列を有する L 鎖 C D R 2 ドメインと、

配列番号 2 5 のアミノ酸配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 5 から変更された配列を有する L 鎖 C D R 3 ドメインと

からなる群から選択された C D R ドメインを含む、請求項 3 2 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 5】

前記可変部領域が、

位置 L 3 0、L 3 1、L 3 2、または L 3 4 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 3 から変更された L 鎖 C D R 1 ドメインと、

位置 L 5 0、L 5 2、L 5 3、または L 5 5 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 4 から変更された L 鎖 C D R 2 ドメインと、

位置 L 8 9、L 9 0、L 9 1、L 9 2、L 9 3、L 9 4、L 9 5、L 9 5 a、L 9 5 b、L 9 6、または L 9 7 で少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって配列番号 2 5 から変更された L 鎖 C D R 3 ドメインと

からなる群から選択された C D R ドメインを含む、請求項 3 4 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 6】

配列番号 2 6、2 7、および 2 9 からなる群から選択されたアミノ酸を含む可変部領域を有する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 7】

配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む L 鎖可変部領域 ( L C V R ) と、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H 鎖可変部領域 ( H C V R ) を有する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 8】

配列番号 2 9 のアミノ酸配列を有する L 鎖可変部領域 ( L C V R ) と、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する H 鎖可変部領域 ( H C V R ) を有する、単離された抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 9】

請求項 4 から 3 8 のいずれか一項に記載の抗体 C D R アミノ酸配列をコードする、単離された核酸。

【請求項 4 0】

組換え発現ベクターにある請求項 3 9 に記載の単離された核酸。

【請求項 4 1】

内部に請求項 4 0 に記載の組換え発現ベクターが導入された、宿主細胞。

【請求項 4 2】

ヒト I L - 1 8 に結合する抗体を合成する方法であって、ヒト I L - 1 8 に結合する抗体が細胞によって合成されるまで請求項 4 1 に記載の宿主細胞を培地で培養することを含む

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 4 3】

前記抗体がヒトのものである請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

請求項 4 から 3 8 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合部分を含む医薬品組成物、および医薬品として許容される担体。

【請求項 4 5】

IL - 1 8 活性が有害である障害を治療するための少なくとも 1 種の他の治療薬をさらに含む、請求項 4 4 に記載の医薬品組成物。

【請求項 4 6】

前記他の薬剤が、ヒト IL - 1 2 に結合することができる抗体またはそのフラグメント、メトトレキサート抗 TNF、コルチコステロイド、シクロスポリン、ラパマイシン、FK 5 0 6、および非ステロイド系抗炎症薬からなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の医薬品組成物。

【請求項 4 7】

ヒトインターロイキン 1 8 ( IL - 1 8 ) に結合する抗体を作製する方法であって、ヒト IL - 1 8 のエピトープまたはその一部を含む抗原に、抗体群を曝露すること、およびヒト IL - 1 8 のエピトープまたはその一部に結合する抗体を抗体群から選択することを含む方法。

【請求項 4 8】

抗体群が動物の *in vivo* レパートリーであり、方法が、ヒト IL - 1 8 のエピトープまたはその一部を含む抗原で動物を免疫化することを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記エピトープが、配列番号 3 および 3 3 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む、請求項 4 6 または 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 *in vivo* レパートリーが、動物のゲノムに組み込まれた完全ヒト免疫グロブリンレパートリーである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

抗体群が組換え抗体ライブラリーであり、方法が、ヒト IL - 1 8 のエピトープまたはその一部を含む抗原でライブラリーをスクリーニングすることを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 2】

ライブラリーがヒト抗体ライブラリーである請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 3】

ヒト IL - 1 8 活性が阻害されるように、ヒト IL - 1 8 と請求項 1 に記載の化合物を接触させることを含む、ヒト IL - 1 8 活性を阻害するための方法。

【請求項 5 4】

ヒト IL - 1 8 活性が阻害されるように、ヒト IL - 1 8 と、請求項 4 から 3 8 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合部分を接触させることを含む、ヒト IL - 1 8 活性を阻害するための方法。

【請求項 5 5】

IL - 1 8 活性が害となる疾患に罹患したヒト対象のヒト IL - 1 8 活性を阻害するための方法であって、ヒト対象のヒト IL - 1 8 活性が阻害されるように、請求項 1 に記載の化合物をヒト対象に投与することを含む方法。

【請求項 5 6】

IL - 1 8 活性が害となる疾患に罹患したヒト対象のヒト IL - 1 8 活性を阻害するための方法であって、ヒト対象のヒト IL - 1 8 活性が阻害されるように、請求項 4 から 3 8 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合部分をヒト対象に投与することを含む方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 57】

治療が達成されるように、請求項 1 に記載の化合物を投与することによって、IL-18 活性が害となる疾患に罹患したヒト対象を治療するための方法。

## 【請求項 58】

治療が達成されるように、請求項 4 から 38 のいずれか一項に記載の抗体を投与することによって、IL-18 活性が害となる疾患に罹患したヒト対象を治療するための方法。

## 【請求項 59】

前記障害が、慢性関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、再活性化関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、強皮性皮膚炎、対宿主性移植片病、臓器移植拒絶反応、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム硬化症、汎発性血管内凝固症候群、川崎病、グレーブズ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ヴェーゲナー肉芽腫症、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、トキシックショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンティングトン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性疾患、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性疾患、I 型多分泌腺機能低下および II 型多分泌腺機能低下、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促進症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性丘関節症、腸性滑膜炎、クラミジア、エルジニアおよびサルモネラに関連する関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患/動脈硬化症、アトピー、自己免疫性水泡性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 IgA 疾患、自己免疫性溶血性貧血、クーン陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋肉痛脳炎/ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全疾患症候群、後天性免疫不全に関連する疾病、C 型肝炎、分類不能型免疫不全（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣不全、早発性卵巣不全、線維性肺疾患、原因不明の線維化肺胞炎、ポスト炎症性間隙性肺疾患、間隙性肺炎、結合組織病に伴う間隙性肺疾患、混合結合組織病に伴う肺疾患、全身性硬化症に伴う間隙性肺疾患、慢性関節リウマチに伴う間隙性肺疾患、全身性エリテマトーデスに伴う肺疾患、皮膚筋炎/多発性筋炎に伴う肺疾患、シェーグレン病に伴う肺疾患、強直性脊椎炎に伴う肺疾患、脈管性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症に伴う肺疾患、薬物誘発性の間隙性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間隙性肺疾患、通風性関節炎、自己免疫性肝炎、1 型自己免疫性肝炎（古典的な自己免疫性またはルポイド肝炎）、2 型自己免疫性肝炎（抗 LKM 抗体肝炎）、自己免疫媒介型低血糖症、黒色表皮症を伴う B 型インスリン抵抗性、上皮小体低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1 型乾癬、2 型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患 NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的脈管炎、ライム病、ジスコイドエリテマトーデス、特発性または NOS の男性不妊症、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患の二次的な肺高血症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺発現、急性リウマチ熱、リウマチ様脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能亢進（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性脈管炎および白斑、急性肝臓疾患、慢性肝臓疾患、アレルギーおよび喘息、精神障害（例えばうつ病や精神分裂病）、Th2 型および Th1 型媒介疾患を含む群から選択される、請求項 57 または 58 に記載の方法。

## 【請求項 60】

IL-18 が害となる疾患に罹患した患者を治療する方法であって、抗 IL-18 抗体を、第 2 の薬剤の前に、第 2 の薬剤と同時に、または第 2 の薬剤の後に投与するステップを

10

20

30

40

50

含み、第2の薬剤が、抗IL-12抗体またはその抗原結合フラグメント、メトトレキサート、抗TNF抗体またはその抗原結合フラグメント、コルチコステロイド、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、および非ステロイド系抗炎症薬からなる群から選択されるものである方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

##### 関連出願

本出願は、「Antibodies that Bind Human Interleukin-18 and Methods of Making and Using」という名称の2000年2月10日に提出された米国仮出願第60/181,608号の優先権を主張する、仮出願ではない通常の出願であり、その内容を参照により本明細書に組み込む。さらに、本出願全体を通して引用された、参考文献、発行された特許、および公表された特許出願を含めた全ての引用文献の内容を、参照により本明細書に特に組み込む。

10

#### 【0002】

##### 発明の背景

1989年、インターロイキン18(IL-18)は、当初、インターフェロン-誘導因子(IGIF)と言われていたが、現在では、インターフェロン-を誘導する能力の他にも様々な機能を有するプロ炎症性サイトカインである。これらの生物学的性質には、NF- $\kappa$ Bの活性化、Fasリガンドの発現、CCおよびCXCケモカインの誘導、コン

20

#### 【0003】

IL-18は、T細胞およびマクロファージ内でインターフェロン-産生を誘導することができるので、Th1タイプの免疫応答において重要な役割を果たし、先天性免疫および後天性免疫の両方に関与する。IL-18は、構造および機能の両方の点でIL-1ファミリーに関連する。IL-18の構造、機能、および生物学的活性の概要については、例えば、Dinarello, C. 他(1998) J. Leukoc. Biol. 63: 658~654; Dinarello, C. A. (1999) Methods 19: 121~132; および Dinarello, C. A. (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103: 11~24を参照されたい。

30

#### 【0004】

様々なヒト免疫応答においてIL-18を調節して使用することが望ましい。詳細には、IL-18に結合しIL-18を中和する抗体が特に望ましい。さらに、ネズミIL-18抗体は、例えば血清半減期が短く、ある特定のヒトエフェクター機能を発揮させることができず、人体内においてマウス抗体に対し望ましくない免疫応答(「ヒト抗マウス抗体」(HAMA)反応)を引き起こすなど、マウス抗体のヒトへの投与に関連した問題が生じるので、その生体内での使用が限られている。

#### 【0005】

一般に、完全なネズミ抗体の人体内での使用に関連した問題を克服する試みでは、抗体を遺伝子操作して、より「ヒトのように」することが行われてきた。例えば抗体鎖の可変部領域がネズミで誘導され、抗体鎖の不変部領域がヒトで誘導されたキメラ抗体が調製された(Jung Hans 他(1990) Cancer Res. 50: 1495~1502; Brown 他(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 2663~2667; Kettleborough 他(1991) Protein Engineering. 4: 773~783)。しかし、これらのキメラおよびヒト化抗体は、一部が依然としてネズミ配列のままであるので、特に長期間にわたって投与する場合に望ましくない免疫反応、すなわちヒト抗キメラ抗体(HAMA)反応を、依然として引き起こす可能性がある。

40

#### 【0006】

ネズミ抗体またはその誘導體(例えばキメラまたはヒト化抗体)に好ましいIL-18阻

50



害剤は、完全なヒト抗IL-18抗体と考えられるが、それは、そのような薬剤が長期間にわたって使用される場合であってもHAMA反応を引き起こすべきではないからである。しかし、そのような抗体について当技術分野では述べられておらず、したがって、そのような抗体が依然として必要とされている。

#### 【0007】

##### 発明の概要

本発明は、ヒトIL-18に結合する抗体などの化合物、ならびにそのような化合物または抗体を形成し使用する方法に関する。

#### 【0008】

一態様では、本発明は、ヒトIL-18アミノ酸配列またはその一部に結合することができる化合物に関し、ただしそのアミノ酸は、配列番号70または配列番号71で与えられるようなヒトIL-18のN末端部分またはC末端部分を含むものである。一実施形態で、化合物は、完全なヒト抗体やフラグメントなどの、小さい分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体、または抗体フラグメントである。

10

#### 【0009】

別の態様では、本発明は、ヒトIL-18に結合することができるヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。他の実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、プラズモン共鳴によって決定されるように、 $k_{off}$ 速度定数 $0.1\text{ s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-6}\text{ s}^{-1}$ 以下でヒトIL-18から解離し、あるいはIC<sub>50</sub>が $1 \times 10^{-6}$ 以下、 $1 \times 10^{-7}$ 以下、 $1 \times 10^{-8}$ 以下、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ 以下、または $1 \times 10^{-10}$ 以下でヒトIL-18活性を阻害する。

20

#### 【0010】

別の態様では、本発明は、アミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）、VIRNLDQVLFIHQ（配列番号33）、またはその一部を含んだヒトIL-18のエピトープに結合する、単離された抗体またはその抗原結合部分に関する。抗体は、中和抗体であることが好ましい。抗体は、ヒト抗体であることが好ましい。様々な実施形態では、抗体は組換え抗体（例えば一本鎖抗体（scFv））またはモノクローナル抗体である。

#### 【0011】

他の実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合部分は、ヒトIL-18のエピトープまたはどちらか一方の一部に結合し、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定されるように、 $k_{off}$ 速度定数 $0.1\text{ s}^{-1}$ 以下でヒトIL-18から解離し、またはIC<sub>50</sub>  $1 \times 10^{-6}\text{ M}$ 以下でヒトIL-18活性を阻害する。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定されるように、 $k_{off}$ 速度定数 $1 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ 以下でヒトIL-18から解離することができ、またはIC<sub>50</sub>  $1 \times 10^{-7}\text{ M}$ 以下でヒトIL-18活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定されるように、 $k_{off}$ 速度定数 $1 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ 以下でヒトIL-18から解離することができ、またはIC<sub>50</sub>  $1 \times 10^{-8}\text{ M}$ 以下でヒトIL-18活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定されるように、 $k_{off}$ 速度定数 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ 以下でヒトIL-18から解離することができ、またはIC<sub>50</sub>  $1 \times 10^{-9}\text{ M}$ 以下でヒトIL-18活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定されるように、 $k_{off}$ 速度定数 $1 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ 以下でヒトIL-18から解離することができ、またはIC<sub>50</sub>  $1 \times 10^{-10}\text{ M}$ 以下でヒトIL-18活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定されるように、 $k_{off}$ 速度定数 $1 \times 10^{-6}\text{ s}^{-1}$ 以下でヒトIL-18から解離することができ、またはIC<sub>50</sub>  $1 \times 10^{-11}\text{ M}$ 以下でヒトIL-18活性を阻害することができる。

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

本発明の別の態様は、ヒト I L - 1 8 のエピトープに結合することができる少なくとも 1 つの変部領域 C D R ドメインを含んだ、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分に関する。関連する実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合部分は、例えば表 7 ~ 8 および 1 0 ~ 1 1 に示される K a b a t 位のいずれかに、またはそこに隣接して 1 つまたは複数のアミノ酸置換またはアミノ酸挿入を行うことが可能な、表 6 または 9 に示される H および / または L 鎖 C D R 1 ドメイン、C D R 2 ドメイン、または C D R 3 ドメインを含んだ変部領域を有する。好ましい実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む L 鎖可変部領域 ( L C V R ) および配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H 鎖可変部領域 ( H C V R ) を含んでいる。別の好ましい実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合部分は、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を有する L 鎖可変部領域 ( L C V R ) および配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する H 鎖可変部領域 ( H C V R ) を含む。

10

## 【 0 0 1 3 】

本発明の別の態様は、本発明の抗体またはその抗原結合部分を含む医薬品組成物と、医薬品として許容される担体に関する。一実施形態では、医薬品組成物は、I L - 1 8 活性が有害である障害を治療するための少なくとも 1 種の他の治療薬をさらに含む。

## 【 0 0 1 4 】

本発明の別の態様は、ヒトインターロイキン 1 8 ( I L - 1 8 ) に結合する抗体を形成する方法に関する。本発明は、アミノ酸 P L F E D M T D S D C R D N A ( 配列番号 1 )、V I R N L N D Q V L F I D Q ( 配列番号 3 3 )、またはどちらか一方の一部を含むヒト I L - 1 8 のエピトープを含む抗原に抗体群を曝露すること、および抗体群から、アミノ酸 P L F E D M T D S D C R D N A ( 配列番号 1 )、V I R N L N D Q V L F I D Q ( 配列番号 3 3 )、またはどちらか一方の一部を含むヒト I L - 1 8 のエピトープに結合する抗体を選択することを含む方法を提供する。

20

## 【 0 0 1 5 】

一実施形態では、抗体群は動物における *i n v i v o* レパートリーであり、その方法は、アミノ酸 P L F E D M T D S D C R D N A ( 配列番号 1 )、V I R N L N D Q V L F I D Q ( 配列番号 3 3 )、ヒト I L - 1 8 の N 末端または C 末端部分 ( 配列番号 7 0 ~ 7 1 )、またはこれらのエピトープのいずれかの一部を含むヒト I L - 1 8 のエピトープを含んだ抗原で、動物を免疫化することを含む。別の実施形態では、抗体群は組換え抗体ライブラリーであり、その方法は、アミノ酸 P L F E D M T D S D C R D N A ( 配列番号 1 )、V I R N L N D Q V L F I D Q ( 配列番号 3 3 )、配列番号 3 1 ~ 3 2 および 3 4 ~ 6 0 によって表されるペプチド、または前述のいずれかの一部を有するヒト I L - 1 8 のエピトープを含有する抗原で、そのライブラリーをスクリーニングすることを含む。ライブラリーは、ヒト抗体ライブラリーであることが好ましい。

30

## 【 0 0 1 6 】

別の態様では、本発明は、上記態様のいずれかの抗体、例えば H および / または L 鎖可変部領域の抗体またはその一部をコードする、単離された核酸を提供する。関連する実施形態では、抗 I L - 1 8 抗体またはその一部をコードする単離された核酸は、例えば宿主細胞内で発現させるための組換え発現ベクターに在る。

40

## 【 0 0 1 7 】

このため別の態様では、本発明は、ヒト I L - 1 8 に結合する抗体を合成するために、ヒト I L - 1 8 に結合する抗体が宿主細胞によって合成されるまで宿主細胞を培地で培養することによって組換え発現ベクターが内部に導入された、前述の宿主細胞を使用する方法に関する。

## 【 0 0 1 8 】

本発明の別の態様は、ヒト I L - 1 8 活性が阻害されるように、本発明の抗体またはその抗原結合部分にヒト I L - 1 8 を接触させることを含む、ヒト I L - 1 8 活性を阻害するための方法に関する。

50

## 【 0 0 1 9 】

本発明のさらに別の態様は、IL - 18 活性が害となる疾患に罹患したヒト被験者のヒト IL - 18 活性を阻害するための方法であって、ヒト対象のヒト IL - 18 活性が阻害されるように、本発明の抗体およびその抗原結合部分をヒト対象に投与することを含む方法に関する。一実施形態では、抗 IL - 18 抗体は、例えば抗 IL - 12 抗体やその抗原結合フラグメント、メトトレキサート、抗 TNF 抗体やその抗原結合フラグメント、コルチコステロイド、サイクロスポリン、ラパマイシン、FK506、非ステロイド系抗炎症薬などの、他の薬剤の前に、その薬剤と同時に、またはその薬剤の後に、投与することができる。

## 【 0 0 2 0 】

10

図面の簡単な説明

図 1 は、IL - 1 ( 左 ) および IL 1 R A ( 右 ) と比較した IL - 18 ( 中央 ) の構造モデルを示す。

## 【 0 0 2 1 】

図 2 は、IL - 18 受容体と複合体を形成する IL - 18 の構造モデルを示し、IL - 18 のアミノ酸 PLFEDMTDSDCRDNA ( 配列番号 1 ) を含むペプチドエピトープが濃い灰色で示されている。このペプチドエピトープは抗 IL 18 抗体 2 E 1 に結合している。

## 【 0 0 2 2 】

図 3 は、IL - 18 受容体と複合体を形成する IL - 18 の構造モデルを示し、IL - 18 のアミノ酸 YFGKLESKLSVIRN ( 配列番号 33 ) を含むペプチドが濃い灰色で示されている。このペプチドエピトープは抗 IL 18 抗体 LT 28 に結合している。

20

## 【 0 0 2 3 】

図 4 は、IL - 18 受容体と複合体を形成する完全長 IL - 18 の構造モデルを示す。球状の薄い灰色および濃い灰色のエピトープは、IL - 18 の N および C 末端接触エピトープを表す ( それぞれ配列番号 70 および 71 ) 。

## 【 0 0 2 4 】

図 5 は、IL - 18 の生物学的作用を中和する際の 3 種の異なる抗 IL - 18 抗体の効力を、KG1 細胞内での IFN -  $\gamma$  誘導の阻害の関数として示す。抗体 125H ( 四角形 ) および IgG 抗体 ( 円形 ) としてまたは一本鎖抗体 ( 三角形 ) としての 2 E 1 抗体に関する IC50 値は、それぞれ、 $2.1 \times 10^{-10}$ 、 $9.0 \times 10^{-10}$ 、および  $3.3 \times 10^{-9}$  である。

30

## 【 0 0 2 5 】

発明の詳細な説明

本発明は、IL - 18 で媒介されるシグナル形質導入に対する中和抗体を生成することが可能なペプチドエピトープの選択、これらのエピトープに対する抗体の調製、およびそのような抗体の使用法であって IL - 18 に関係する障害を治療する用法も含めた使用法に関する。エピトープを選択する戦略として、IL - 18 およびそれに対応する受容体のホモロジーモデルを構築することが必要である。次いで目視検査とコンピュータによる評価の組合せを使用して、合成および抗体生成のための代表的なペプチドセグメントを選択する。本明細書で示されるアミノ酸配列は、標準的な 1 文字省略コードを使用する。

40

## 【 0 0 2 6 】

IL - 18 エピトープの選択

プログラム Modeler ( Sali , A 他、Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. Proteins: Struct. , Funct. , Genet. ( 1995 )、23 ( 3 )、318 ~ 26 頁、CODEN: PSFGEY; ISSN: 0887 - 3585 ) を使用して、IL - 18 と IL - 18 受容体の両方のホモロジーモデルを生成した。IL - 1 の X 線結晶構造 ( Priestle , J. 他、The three - dimensional structure of human interleukin - 1 . beta . r

50

efined to 2.0. ANG. resolution. Prog. Clin. Biol. Res. (1990)、349 (Cytokines Lipocortins Inflammation Differ.)、297~307頁)およびIL-1RAの結晶構造 (Schreuder, H. 他、Refined crystal structure of the interleukin-1 receptor antagonist: presence of a disulfide link and a cis-proline. Eur. j. Biochem. (1995)、227 (3)、838~47頁)を利用することができ、これらの結晶構造を、IL-18のモデル構造の基準座標として使用した。IL-18受容体をモデル化するためにIL-1受容体構造 (Vigers, G. 他、Crystal structure of the type-1 interleukin-1-receptor complexed with interleukin-1. beta. Nature (London) (1997)、386 (6621)、190~194頁)を使用した。

10

#### 【0027】

次に、IL-18およびIL-18受容体のための構造モデル構築について、以下に述べる。

#### 【0028】

##### IL-18モデル構築

これら2種のタンパク質 (すなわちIL-1 およびIL-18) の全体的な配列ホモロジーは低い、IL-18がIL-1ファミリーのメンバであり (Dinarello, C. A. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. J. Allergy Clin. Immunol. (1999)、103 (1, Pt. 1)、11~24頁参照)、全体的なタンパク質の折りたたみが非常に類似しているという有力な証拠がある。IL-1と同様に、IL-18は、初めに前駆体の状態で分泌される。プロIL-1とプロIL-18は、共にIL-1変換酵素 (ICE) によって活性化される (Fantuzzi, G. およびDinarello, C. A. Interleukin-18 and interleukin-1: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). J. Clin. Immunol. (1999)、19 (1)、1~11頁)。IL-1受容体とIL-18受容体は、類似していることも知られている (Dinarello, C. A. 他、Overview of Interleukin-18: more than an interferon-inducing factor. J. Leukocyte Biol. (1998)、63 (6)、658~664)。IL-1はIL-18受容体に結合することができる。最後の論点として、IL-1 およびIL-1RAは、これら2種のタンパク質の全体的な配列ホモロジーがIL-18との配列ホモロジーと同等であるが、同一の折りたたみを示す。3種のタンパク質 (すなわちIL-18、IL-1、およびIL-1RA) 間の配列アライメントを、プログラムInsight IIを用いて手作業で構成した。このアライメントを表1に見ることができる。

30

#### 【0029】

40

#### 【表1】

表1: IL-1 $\beta$ およびIL-1RAに対するIL-18の配列アライメント

24		
IL-18:	YFGK-LESKLS-VIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE--DMT-DSDCRD--NAP	
IL-1 $\beta$ :	AP-VRS-LNCTLRDSQQKSLVMS-G--P-YELKALHLQGQ--D--MEQ	
IL-1RA:	SSKMQA-FR--IWDVNQKTFYLR-N--N--QLVAGYLQGP--NVNLEE	
80		
IL-18:	RTIFIISMY-KDSQPRG-MAVTISVKCEKISTLSC----ENK-IISFKEM	
IL-1 $\beta$ :	QVVFMS-FVQGEESNDKIPVALGLK-EKNLYLSCVLK-DDKPTLQLESV	
IL-1RA:	KI--DV---VP-IEPH---ALFLGIH-GGKMCLSCV-KSGDETRLQLEAV	
123		
IL-18:	NPPDNI-KDTKSDIIF-FQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACE-KERDL	
IL-1 $\beta$ :	DPKNYP-KK-KMEKRFVFNK-I-EINNLEFESAQFPNWIYSTS-QAENM	
IL-1RA:	NITDLSNR-KQDKRFAPIR-S-DSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQ-	
170		
IL-18:	FKLILKKED-ELGDRSIM-FTVQNE	( 配列番号 : 4 )
IL-1 $\beta$ :	-PVFL--GG-TKGGQDITDFTMQFVSS	( 配列番号 : 5 )
IL-1RA:	-PVSL--TNMPDEGVMVTKFYFQED	( 配列番号 : 6 )

10

20

## 【0030】

これらの配列間の配列ホモロジーを表2に列挙する。上方の三角形は、厳密な配列同一性のパーセントであり、下方の三角形は、保存配列ホモロジーのパーセントである。表1に報告された全配列の一部のみを表2に示したと考えられる。上述のように、全体的なホモロジーは低い、そのファミリー全体にわたって一貫性がある。

## 【0031】

30

## 【表2】

表2: IL-1ファミリーメンバー間の配列ホモロジー

分子	IL-18	IL-1 $\beta$	IL-1RA	IL-1受容体	IL-18受容体
IL-18	-	20.0	21.8	-	-
IL-1 $\beta$	53.5	-	27.5	-	-
IL-1RA	50.6	54.4	-	-	-
IL-1受容体	-	-	-	-	26.1
IL-18受容体	-	-	-	50.5	-

40

## 【0032】

得られたIL-18構造を、IL-1およびIL-1RAと共に図1に示す。プログラムWhat-Check(Hoof, R.W.他、Errors in Protein Structures. Nature(1996)381、272頁)により評価された全体的な質は妥当なものであるが、少しだけ低い(下記の表3参照)。

## 【0033】

## 【表3】

50

表3：What\_Checkからの構造に関するZ得点（正の値は平均よりも良い）

	IL-1 $\beta$	IL-1RA	IL-1Rec	IL-18 (モデル)	IL-18受容体 (モデル)
パッキングの質	-1.6	-2.3	-3.6	-5.5	-5.7
ラマチャンドラン プロット	-2.0	-1.3	-2.9	-3.3	-2.3
回転異性体正規性	-1.6	-0.8	-1.5	-0.6	-0.6
骨格配座	-1.7	+0.5	-1.6	-5.6	-2.7

10

## 【0034】

しかし、What\_Checkによる基準構造の評価も低く、このタンパク質の折りたたみは基準構造のデータベースに十分に表されていないことが示唆される。しかし明らかに、本発明者等の全体的なタンパク質の折りたたみに対する確信にも関わらず、配列ホモロジーが低いことが、完全とはいえない最終構造の原因となっていた。しかし、抗体生成のためエピトープを選択するには、この構造で十分と考えられる。

## 【0035】

IL-18受容体モデル構築

IL-18受容体の構造も、プログラムModelerを使用して生成した。基準座標はIL-1受容体からのものであった。これらの受容体に関連するサイトカインの場合と同様に、全体的な配列同一性は低い、アライメントを生成するには十分である。配列ホモロジーの数値を上記表2に示す。アライメントはプログラムInsight IIを使用して手作業で生成したが、それを表4に示す。

20

## 【0036】

## 【表4】

表4 IL-1受容体に対するIL-18受容体の配列アライメント

IL-18 Rec:	CTSRPHITVVEGEFFYLKHCSCSLAHEIETTTKSWYKSSGSQEHVELNPR
IL-1 Rec :	CKEREKIIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGTTITWYKDD-SKTPVSTEQA
IL-18 Rec:	SSSRIALHDCVLEFWFVELNDTGSYFFQMKNYTQKWKLNVIIRNKHS---
IL-1 Rec :	S--RIHQHKEKLWFVPKVEDSGHYVCVVRNSSYCLRIKISAKFVNEPN
IL-18 Rec:	-CFTREQVTSKIVEVKKFFQITCENSYYQTLVNST----SLYKNCKKLLL
IL-1 Rec :	LCYNAQAIKQKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCCKPLLL
IL-18 Rec:	EN-----NKNPTIKKNAEFEDQGYSCVHFLHHNGKLFNITKTFNITIVE
IL-1 Rec :	DNIHFGVKDRILIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLGKQYPITRVIEFITLE
IL-18 Rec:	DRSNIVPVLGPKLNHVAVELGKNVRLNCSALLNEEDVIYWMF-GEE-NG
IL-1 Rec :	ENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQIQLICNVGTGQLSDIAYWKWNGSVIDE
IL-18 Rec:	SDPNIHKEE-KEMRIMTPEGKWHASKVLRLENIGESNLNVLYNCTVASTGG
IL-1 Rec :	DDPVLGEDYYSVENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFKANTHG
IL-18 Rec:	TDTKSFILVRKAD ( 配列番号 : 7)
IL-1 Rec :	IDAAYIQLIYPVT ( 配列番号 : 8)

30

40

## 【0037】

Modelerプログラムを使用して決定されたIL-18受容体の構造の全体的な品質は妥当なものであるが、やはりWhat\_Checkによればやや低い得点となっている（上記表3参照）。全体的な折りたたみに信頼を置くことができるのは、主に、IL-1がIL-1およびIL-18受容体の両方に結合するからである。配列ホモロジーが低いことは確かに最終構造の質の一因であるが、上記関連サイトカインの場合と同様に、こ

50

の現行の構造で十分と考えられる。他の作業として、IL-18受容体と複合体を形成する場合の、LT28に結合したIL-18ペプチドエピトープ（配列番号33）をモデル化した（図3）。最終の作業として、IL-18/IL-18受容の複合体モデルを、IL-1/IL-1受容体構造に基づいて生成した（図4）。この構造は、サイトカイン構造と受容体構造を重ね合わせることによって生成した。最終構造を最小限にする試みはなされなかった。

#### 【0038】

##### ペプチドエピトープの選択

構造モデルを生成する主な目的は、主として目に見える得点に基づいて適切なペプチドを選択できるようにすることであった。いずれも親水性で受容体/サイトカイン複合体に埋め込まれている、溶媒に曝されたタンパク質のセクションおよびタンパク質の一部が考えられた。考えられる最後の要素は選択性の基準に基づいていた。選択されたペプチドエピトープは、配列が、そのファミリーの他のメンバの同様の部分とは異なるべきである。この基準に基づいて、IL-18からのペプチドを選択した。さらに、完全長ヒトIL-18（配列番号61）を代表するペプチド（配列番号31～60）の広範な重複パネルも作成したが、これらのIL-18関連ペプチドの全ての配列を、以下の表5に示す。

#### 【0039】

##### 【表5】

表5 IL-18を代表する選択されたペプチド

ペプチド配列	配列番号
PLFEDMTSDCDRNA	( 配列番号 : 1)
CPLFEDMTSDCDRNA	( 配列番号 : 2)
PLFEDMTSDCDR	( 配列番号 : 3)
YFGKLESKLSVIRN	( 配列番号 : 31)
ESKLSVIRNLNDQV	( 配列番号 : 32)
VIRNLNDQVLFIDQ (LT28結合エピトープ)	( 配列番号 : 33)
NDQVLFIDQGNRPL	( 配列番号 : 34)
FIDQGNRPLFEDMT	( 配列番号 : 35)
NRPLFEDMTSDCDR (2E1結合エピトープ)	( 配列番号 : 36)
EDMTSDCDRNAPR	( 配列番号 : 37)
SDCDRNAPRTIFII	( 配列番号 : 38)
NAPRTIFIISMYKD	( 配列番号 : 39)
IFIISMYKDSQPRG	( 配列番号 : 40)
MYKDSQPRGMAVTI	( 配列番号 : 41)
QPRGMAVTISVKCE	( 配列番号 : 42)
AVTISVKCEKISTL	( 配列番号 : 43)
VKCEKISTLSCENK	( 配列番号 : 44)
ISTLSCENKIISFK	( 配列番号 : 45)
CENKIISFKEMNPP	( 配列番号 : 46)

ISFKEMNPPDNIKD	( 配列番号 : 47)
MNPPDNIKDTKSDI	( 配列番号 : 48)
NIKDTKSDIIFQQR	( 配列番号 : 49)
KSDIIFQQRVPGH	( 配列番号 : 50)
FFQQRVPGHDNKMQ	( 配列番号 : 51)
VPGHDKMQFESSS	( 配列番号 : 52)
NKMQFESSSYEGYF	( 配列番号 : 53)
ESSSYEGYFLACEK	( 配列番号 : 54)
EGYFLACEKERDLF	( 配列番号 : 55)
ACEKERDLFKLILK	( 配列番号 : 56)
RDLFKLILKKEDEL	( 配列番号 : 57)
LILKKEDELGDRSI	( 配列番号 : 58)
EDELGDRSIMFTVQ	( 配列番号 : 59)
DRSIMFTVQNED	( 配列番号 : 60)
YFGKLESKLSVIRNLDQVLFIDQGNRPLFEDMTD SDCRDNAPRTIFITISMYKDSQPRGMAVTISVKCEK ISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQQR VPGHDKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKK EDELGDRSIMFTVQNED	( 配列番号 : 61) L T 2 8 および 2 E 1 エピトープは 太字で表示

10

20

## 【 0 0 4 0 】

配列番号 2 により表される I L - 1 8 ペプチドの N 末端システインは、天然の I L - 1 8 配列の一部ではないが、接合部位として加えた。したがって、天然 I L - 1 8 アミノ酸配列内では、選択されたエピトープに対応する領域が、アミノ酸配列 P L F E D M T D S D C R D N A ( 配列番号 1 ) を有するアミノ酸残基を含む。

## 【 0 0 4 1 】

I L - 1 8 受容体と複合体を形成する I L - 1 8 ペプチド ( 配列番号 1 ) の概略的なモデルを図 2 に示し、このペプチドエピトープを濃い灰色で示す。

## 【 0 0 4 2 】

後続の抗原性に関する計算を、I L - 1 8 ペプチド配列について行い、その結果、このペプチドは特に高い得点を示した。このペプチドを合成しエピトープとして使用して、ウサギ宿主内に抗体を生成した。図 2 および 3 に示されるような、同族受容体、すなわち I L - 1 8 受容体と比べると、I L - 1 8 ペプチド P L F E D M T D S D C R D N A ( 配列番号 1 ) または Y F G K L E S K L S V I R N ( 配列番号 3 1 ) を使用して得られた分子モデル化データにより、中和抗体または化合物がどの残基と相互に作用し合うかが示される。

30

## 【 0 0 4 3 】

ペプチドエピトープを選択するための代替の方法は、免疫選択を使用して代表的なペプチドのパネルをスクリーニングすることにより、どのような分子モデル化も行うことなく、実現することができる。ある手法では、タンパク質配列全体を代表する重複ペプチドを使用することができる。より限定された手法では、ある特定のエピトープだけをペプチドのパネルに表す。組み合わせられた手法では、重要である可能性が高いエピトープを識別するために、分子モデル化を使用することができる。次いで、識別されたエピトープ配列を使用して、識別されたエピトープを代表するペプチドのパネルを構築することができる ( 例えば重複ペプチド ) 。所望のペプチド配列を製造するための方法は、当技術分野で知られている標準的な技法を使用して実行することができる。

40

## 【 0 0 4 4 】

結合ペプチド ( 例えば重複ペプチドのパネル ) が選択されたら、同族受容体に関して免疫スクリーンを行うことができる。あるいは、ある特定の結合親和性を有するペプチドを識

50



別することができるように、免疫スクリーンを、選択された同族受容体で行うことができる。さらに研究を行うための候補結合分子として所望の受容体または所望のペプチドのいずれかを識別できるように、免疫スクリーンを任意の回数で行うことができる。このような、タンパク質とタンパク質の相互作用を分析し、候補結合分子を識別し、かつ/または結合親和性に得点を付けるための「おとり (bait)」および「餌食 (prey)」技法については当技術分野で述べられている。好ましい一技法は、本明細書で述べるファージディスプレイを利用する。

#### 【0045】

抗IL-18抗体

本発明は、IL-18に結合する抗体ならびにその抗体部分を提供する。抗体またはその部分は、単離された抗体であることが好ましい。抗体またはその部分は、中和抗体であることが好ましい。

#### 【0046】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、4本のポリペプチド鎖、2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖であってジスルフィド結合によって相互接続されたものからなる免疫グロブリン分子を指すものとする。各H鎖は、H鎖可変部領域(本明細書ではHCVRまたはVHと略す)とH鎖不変部領域からなる。H鎖不変部領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3からなる。各L鎖は、L鎖可変部領域(本明細書ではLCVRまたはVLと略す)とL鎖不変部領域からなる。L鎖不変部領域は、1つのドメイン、CLからなる。VHおよびVL領域は、より一定に保たれたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域が散在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に、さらに細分することができる。VHおよびVLのそれぞれは、3つのCDRおよび4つのFRからなり、これらは以下の順序、すなわちFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列される。

#### 【0047】

本明細書で使用される抗体の「抗原結合部分」(または簡単に「抗体部分」という用語は、抗原(例えばhIL-18)に特異的に結合する能力を持つ1つまたは複数の抗体のフラグメントを指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体のフラグメントによって発揮できることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合フラグメントの例には、(i)Fabフラグメント、すなわちVL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる1価のフラグメント；(ii)F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、すなわちヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された2つのFabフラグメントを含む2価のフラグメント；(iii)VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iv)抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(v)VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward他、(1989)Nature 341: 544~546)；および(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン、VLおよびVHは別個の遺伝子でコードされるが、これらは、VL領域およびVH領域が対になって1価の分子を形成する1本のタンパク質鎖(1本鎖Fv(scFv))として知られている；例えば、Bird他(1988)Science 242: 423~426；およびHouston他(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879~5883参照)として形成することができる。そのような1本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。二抗体など、1本鎖抗体のその他の形も包含される。二抗体は、2価の二重特異性抗体であり、VHおよびVLドメインが1本のポリペプチド鎖上に発現するが、同じ鎖上の2つのドメイン同士を対にできるようにするには短すぎるリンカーを使用すると、それらのドメインは、必ず別の鎖の相補性ドメインと対になり、2つの結合部位が作り出される(Holliger, P. 他(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444~6448；Poljak, R. J. 他(1994)Structure 2: 1121~1123参照)。

## 【0048】

さらに、抗体またはその抗原結合部分は、抗体または抗体部分と、1つまたは複数のその他のタンパク質またはペプチドとの共有または非共有会合によって形成された、より大きい免疫接着分子の一部にすることができる。そのような免疫接着分子の例には、四量体 *s c F v* 分子を形成するためにストレプトアビジンコア領域を使用すること (K i p r i y a n o v , S . M . 他 ( 1 9 9 5 ) *Human Antibodies and Hybridomas* 6 : 9 3 ~ 1 0 1 )、および2価のビオチニル化した *s c F v* 分子を形成するためにシステイン残基、標識ペプチド、およびC末端ポリヒスチジンタグを使用すること (K i p r i y a n o v , S . M . 他 ( 1 9 9 4 ) *Mol. Immunol.* 3 1 : 1 0 4 7 ~ 1 0 5 8 ) が含まれる。F a b フラグメントや F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントなどの抗体部分は、それぞれ抗体全体のパepsin消化またはペプシン消化などの従来の技法を使用して、抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分、および免疫接着分子は、本明細書に記載する標準的な組換えDNA技法を使用して得ることができる。

10

## 【0049】

本明細書で使用される「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を持たないその他の抗体を、実質上含まない抗体を指すものとする (例えば、h I L - 1 8 に特異的に結合する単離された抗体は、h I L - 1 8 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質上含まない)。しかし、h I L - 1 8 に特異的に結合する単離された抗体は、他の種からの I L - 1 8 分子などその他の抗原に対して交差反応性を有する場合がある。さらに、単離された抗体は、その他の細胞材料および/または化学物質を実質上含まなくてもよい。さらに、単離された抗体、例えば単離されたヒト抗体は、キメラ抗体にすることができ、例えば、別の人間を元に得られた可変部領域、C D R ドメイン、またはアイソタイプが、親であるヒト抗体に組み込まれる。

20

## 【0050】

本明細書で使用される「化合物」は、抗体などの結合分子、例えばポリクローナル抗体やモノクローナル抗体、それらの結合フラグメント (例えば F a b フラグメント)、1本鎖抗体 (例えば *s c F v*)、ペプチドまたはペプチドミメティクス、ならびにリガンド結合活性を有する小分子などペプチドをベースとしない分子を指す。

## 【0051】

本明細書で使用される「中和抗体」(または「h I L - 1 8 活性を中和した抗体」)は、h I L - 1 8 に結合することによってh I L - 1 8 の生物学的活性を阻害する抗体を指すものとする。このh I L - 1 8 の生物学的活性の阻害は、h I L - 1 8 の生物学的活性の1つまたは複数の指標を測定することによって評価することができる。h I L - 1 8 生物学的活性のこれらの指標は、当技術分野で知られているいくつかの標準的な *i n v i t r o* または *i n v i v o* アッセイの1つまたは複数によって、評価することができる。

30

## 【0052】

本明細書で使用される「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えばB I A コアシステムを使用して (P h a r m a c i a B i o s e n s o r A B、U p p s a l a、スウェーデンおよびP i s c a t a w a y、N J) バイオセンサーマトリックス内でのタンパク質濃度の変化を検出することにより、実時間での生物特異的な相互作用の分析を可能にする、光学的現象を指す。さらなる記述に関しては、J o n s s o n , U . 他 ( 1 9 9 3 ) *Ann. Biol. Clin.* 5 1 : 1 9 ~ 2 6 ; J o n s s o n , U . 他 ( 1 9 9 1 ) *Biotechniques* 1 1 : 6 2 0 ~ 6 2 7 ; J h o n s s o n , B . 他 ( 1 9 9 5 ) *J. Mol. Recognit.* 8 : 1 2 5 ~ 1 3 1 ; および J h o n n s o n , B . 他 ( 1 9 9 1 ) *Anal. Biochem.* 1 9 8 : 2 6 8 ~ 2 7 7 を参照されたい。

40

## 【0053】

本明細書で使用される「K<sub>off</sub>」という用語は、抗体/抗原複合体から抗体が解離する *off* 速度定数を指すものとする。

50

## 【0054】

本明細書で使用される「 $K_d$ 」という用語は、特定の抗体・抗原相互作用の解離定数を指すものとする。

## 【0055】

一態様では、本発明は、アミノ酸 P L F E D M T D S D C R D N A (配列番号1)または V I R N L N D Q V L F I D Q (配列番号33)を含むヒト I L - 18 のエピトープまたはこれらのエピトープのいずれかの一部に結合する、単離された抗体またはその抗原結合部分に関する。抗体は中和抗体であることが好ましい。抗体はヒト抗体であることが好ましい。様々な実施形態で、抗体は組換え抗体またはモノクローナル抗体である。

## 【0056】

その他の実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合部分は、アミノ酸 P L F E D M T D S D C R D N A (配列番号1)を含むヒト I L - 18 のエピトープに結合し、この抗体またはその抗原結合部分が、表面プラズモン共鳴により決定されるように、 $k_{off}$  速度定数  $0.1 s^{-1}$  以下でヒト I L - 18 から解離し、または  $IC_{50}$  が  $1 \times 10^{-6} M$  以下でヒト I L - 18 活性を阻害する。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴により決定されるように、 $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-2} s^{-1}$  以下でヒト I L - 18 から解離することができ、または  $IC_{50}$  が  $1 \times 10^{-7} M$  以下でヒト I L - 18 活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴により決定されるように、 $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-3} s^{-1}$  以下でヒト I L - 18 から解離することができ、または  $IC_{50}$  が  $1 \times 10^{-8} M$  以下でヒト I L - 18 活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴により決定されるように、 $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-4} s^{-1}$  以下でヒト I L - 18 から解離することができ、または  $IC_{50}$  が  $1 \times 10^{-9} M$  以下でヒト I L - 18 活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴により決定されるように、 $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  以下でヒト I L - 18 から解離することができ、または  $IC_{50}$  が  $1 \times 10^{-10} M$  以下でヒト I L - 18 活性を阻害することができる。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴により決定されるように、 $k_{off}$  速度定数  $1 \times 10^{-6} s^{-1}$  以下でヒト I L - 18 から解離することができ、または  $IC_{50}$  が  $1 \times 10^{-11} M$  以下でヒト I L - 18 活性を阻害することができる。

## 【0057】

識別された抗 I L - 18 抗体の親和性成熟

本発明は、I L - 18 エピトープに結合することが確認された抗体の、別の修飾も提供する。識別された抗 I L - 18 抗体の修飾は、結合および/または中和活性を改善することである。

## 【0058】

治療組成物および投与方法

本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合部分を含む医薬品組成物と、医薬品として許容される担体も提供する。一実施形態では、医薬品組成物はさらに、I L - 18 活性が有害である障害を治療するための少なくとも1種の他の治療薬を含む。

## 【0059】

本発明の抗体および抗体部分は、被験対象への投与に適する医薬品組成物に組み込むことができる。典型的な場合、医薬品組成物は、本発明の抗体または抗体部分と、医薬品として許容される担体を含む。本明細書で使用される「医薬品として許容される担体」には、生理学的に適合可能な、任意の、または全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤または抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などが含まれる。医薬品として許容される担体の例には、水、塩類溶液、リン酸緩衝化生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1種または複数、ならびにこれらの組合せが含まれる。多くの場合、等張剤、例えば糖や、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。医薬品として許容される担体には、さらに、湿潤剤や乳

10

20

30

40

50

化剤、防腐剤、緩衝剤など、抗体または抗体部分の保存性または有効性を増大させる少量の補助物質を含めることができる。

#### 【0060】

本発明の抗体および抗体部分は、非経口投与に適する医薬品組成物に組み込むことができる。抗体または抗体部分は、 $0.1 \sim 250 \text{ mg/ml}$ の抗体を含有する注射可能な溶液として調製することが好ましい。注射可能な溶液は、液体または凍結乾燥させた剤型を、フリントまたはアンバーバイアル、アンプル、または予備充填シリンジに入れたもので構成することができる。緩衝剤は、 $\text{pH} 5.0 \sim 7.0$ （最適な場合、 $\text{pH} 6.0$ ）のL-ヒスチジン（ $1 \sim 50 \text{ mM}$ ）、最適な場合は $5 \sim 10 \text{ mM}$ のL-ヒスチジンにすることができる。その他の適切な緩衝剤には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、またはリン酸カリウムが含まれるが、これらに限定されない。濃度 $0 \sim 300 \text{ mM}$ の溶液（液体剤型に関しては、最適な場合、 $150 \text{ mM}$ ）の毒性を変えるために、塩化ナトリウムを使用することができる。凍結乾燥させた剤型には、凍結保護物質、主に $0 \sim 10\%$ （最適な場合、 $0.5 \sim 1.0\%$ ）のスクロースを含めることができる。その他の適切な凍結保護物質にはトレハロースおよびラクトースが含まれる。凍結乾燥させた剤型には、増量剤、主に $1 \sim 10\%$ のマニトール（最適な場合、 $2 \sim 4\%$ ）を含めることができる。液体および凍結乾燥させた剤型の両方には、安定剤、主に $1 \sim 50 \text{ mM}$ （最適な場合、 $5 \sim 10 \text{ mM}$ ）のL-メチオニンを使用することができる。その他の適切な増量剤にはグリシン、アルギニンが含まれ、 $0 \sim 0.05\%$ （最適な場合、 $0.005 \sim 0.01\%$ ）のポリソルベート80として含めることができる。他の界面活性剤には、ポリソルベート20およびBRIJ界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

#### 【0061】

本発明の組成物は、様々な剤型にすることができる。そのような組成物には、例えば、溶液（例えば注射可能であり輸液可能な溶液）や分散液、懸濁液、錠剤、ピル、粉末、リポソーム、坐剤など、液体、半固体、固体の剤型が含まれる。好ましい形は、意図される投与形態および治療の適用例により異なる。一般に好ましい組成物は、他の抗体でヒトを受動免疫化するために使用されるものと同様の組成物など、注射可能または輸液可能な溶液の形にあるものである。好ましい投与形態は、非経口的なもの（例えば静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内から）である。好ましい実施形態では、抗体は、静脈輸液または静脈注射によって投与される。別の好ましい実施形態では、抗体は筋肉内注射または皮下注射によって投与される。

30

#### 【0062】

治療組成物は、一般に、製造および貯蔵の条件下で無菌または安定でなければならない。この組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高い薬物濃度に適するその他のオーダーされた構造として、処方することができる。無菌の注射可能な溶液は、必要とされる量の活性化化合物（すなわち抗体または抗体部分）を、必要な場合には上述の成分の1つまたは組合せと共に適切な溶媒に混ぜ、その後、濾過滅菌を行うことによって調製することができる。一般に、活性化化合物を、基本的な分散媒および上記列挙したものから必要とされるその他の成分を含有する無菌ビヒクルに混ぜることによって、分散液を調製する。無菌の注射可能な溶液を調製するための無菌凍結乾燥粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および噴霧乾燥であり、それによって、活性成分の粉末に加え、前に述べたその滅菌濾過溶液からの任意の他の所望の成分が得られる。溶液の適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、また、分散液の場合には必要とされる粒度を維持することによって、また、界面活性剤を使用することによって、維持することができる。注射可能な組成物の長期にわたる吸収は、その組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩やゼラチンを含めることによって行うことができる。

40

#### 【0063】

本発明の抗体および抗体部分は、当技術分野で知られている様々な方法によって投与することができるが、多くの治療の適用例での好ましい投与経路/形態は皮下注射、静脈注射

50

、または輸液である。当業者に理解されるように、投与経路／形態は、所望の結果に応じて異なる。ある実施形態では、活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達システムを含む、制御放出製剤など、この化合物が急速に放出されないようにする担体と共に調製することができる。エチレン酢酸ビニルやポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸など、生分解性で生体適合性のポリマーを使用することができる。このような製剤を調製するための多くの方法には特許が付与され、または当業者に一般に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson 編、Marcel Dekker, Inc.、New York、1978を参照されたい。

10

#### 【0064】

ある実施形態では、本発明の抗体または抗体部分を、例えば不活性な希釈剤または同化可能な食用担体と共に経口投与することができる。化合物（および望むならその他の成分）は、硬質または軟質シエルのゼラチンカプセルに封入し、錠剤に圧縮し、または被験対象の食物に直接混ぜることもできる。経口治療投与の場合、化合物を賦形剤に混ぜることができ、経口摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、オブラートなどの形で使用することができる。非経口投与以外で本発明の化合物を投与するには、その化合物の不活性化を防止する材料でその化合物を被覆し、またはその化合物の不活性化を防止する材料と同時にその化合物を投与する必要があると考えられる。

#### 【0065】

20

組成物には、補助的な活性化合物も組み入れることができる。ある実施形態では、本発明の抗体または抗体部分は、IL-18が原因となる疾患を治療するのに有用な1種または複数の他の治療薬と一緒に処方し、またはそのような他治療薬と同時に投与する。例えば、本発明の抗IL-18抗体または抗体部分は、他の標的に結合する1つまたは複数の他の抗体（例えば、他のサイトカインに結合する抗体、または細胞表面分子に結合する抗体）と一緒に処方し、またはそのような他の抗体と同時に投与することができる。さらに、本発明の1つまたは複数の抗体は、前述の治療薬のうち2種またはそれ以上の種類を組み合わせて使用することができる。そのような組合せによる療法は、投与された治療薬のより低い用量を有利に利用することができ、したがって、様々な単一療法に伴う可能性ある毒性または合併症が回避される。

30

#### 【0066】

##### 治療上の用法

インターロイキン18は、免疫および炎症性の因子に関わる様々な疾病に関連する病理学で、非常に重要な役割を果たす。これらの疾病には、慢性関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、再活性化関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、強皮性皮膚炎、対宿主性移植片病、臓器移植拒絶反応、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム硬化症、汎発性血管内凝固症候群、川崎病、グレーブズ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ヴェーゲナー肉芽腫症、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、トキシックショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンティングトン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性疾患、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性疾患、I型多分泌腺機能低下およびII型多分泌腺機能低下、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促進症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性丘関節症、腸性滑膜炎、クラミジア、エルギニアおよびサルモネラに関連する関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー、自己免疫性水泡性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA疾患、自己免疫性溶血性貧血、クーン陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋肉痛脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジ

40

50

ダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全疾患症候群、後天性免疫不全に関連する疾病、C型肝炎、分類不能型免疫不全（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性の不妊症、卵巣不全、早発性卵巣不全、線維性肺疾患、原因不明の線維化肺炎、ポスト炎症性間隙性肺疾患、間隙性肺炎、結合組織病に伴う間隙性肺疾患、混合結合組織病に伴う肺疾患、全身性硬化症に伴う間隙性肺疾患、慢性関節リウマチに伴う間隙性肺疾患、全身性エリテマトーデスに伴う肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎に伴う肺疾患、シェーグレン病に伴う肺疾患、強直性脊椎炎に伴う肺疾患、脈管性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症に伴う肺疾患、薬物誘発性の間隙性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間隙性肺疾患、通風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的な自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介型低血糖症、黒色表皮症に伴うB型インスリン抵抗性、上皮小体低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1型乾癬、2型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的脈管炎、ライム病、ジスコイドエリテマトーデス、特発性またはNOSの男性不妊症、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患の二次的な肺高血症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺発現、急性リウマチ熱、リウマチ様脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能亢進（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性脈管炎および白斑が含まれるが、これらに限定されない。ヒト抗体、および本発明の抗体部分は、自己免疫性疾患、特に炎症に伴う自己免疫性疾患であって、リウマチ様脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎、急性肝臓疾患、慢性肝臓疾患、アレルギーおよび喘息、精神障害（例えばうつ病や精神分裂病）、Th2型およびTh1型媒介疾患を含めた疾患に苦しむ人を治療するのに使用することができる。

10

20

#### 【0067】

本発明の抗体またはその抗原結合部分は、慢性関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、真性糖尿病、および乾癬の治療に使用することが好ましい。

#### 【0068】

本発明の抗体または抗体部分は、自己免疫および炎症性疾患の治療に有用な1種または複数の他の治療薬と共に投与することもできる。

30

#### 【0069】

本発明の抗体またはその抗原結合部分は、そのような疾病を治療するため単独で、または組み合わせて使用することができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、単独で、または他の薬剤、例えば治療薬と共に使用することができ、前記他の薬剤はその意図される目的のため当業者によって選択されるものであることを理解されたい。例えば、他の薬剤は、本発明の抗体により治療される病気または容態を治療するのに有用であることが当技術分野で理解されている治療薬でよい。他の薬剤は、治療組成物に有益な性質を与える薬剤、例えば組成物に粘性をもたらす薬剤でもよい。

40

#### 【0070】

本発明に含まれることになる組合せは、その意図される目的に有用な組合せのものであることを、さらに理解されたい。以下に述べる薬剤は例示を目的とするものであり、これらに限定するものではない。本発明の一部であるその組合せは、本発明の抗体と、下記のリストから選択された少なくとも1種の薬剤にすることができる。組合せは、複数の他の薬剤を含むこともでき、例えば、形成された組成物がその意図される機能を発揮できるような組合せである場合には2種または3種の他の薬剤を含むことができる。

#### 【0071】

好ましい組合せは、イブプロフェンのような薬剤を含む、NSAIDsとも呼ばれる非ステロイド系抗炎症薬である。その他の好ましい組合せは、プレドニソロンを含むコルチコ

50

ステロイドであり、本発明の抗IL-18抗体と組み合わせて患者を治療する場合、必要とされるステロイドの用量を徐々に減少させることによって、ステロイド使用によるよく知られている副作用を低減することができ、または無くすることさえできる。慢性関節リウマチ用治療薬であって、本発明の抗体または抗体部分と組み合わせることができるその治療薬の非限定的な例には、以下のものが含まれる。すなわち、サイトカイン抑制性抗炎症薬(CSAID)と、他のヒトサイトカインまたは成長因子に対する抗体または拮抗薬であって、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、EMAP-II、GM-CSF、FGF、およびPDGFである。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90、または、CD154を含むこれらのリガンド(gp39またはCD40L)などの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0072】

治療薬の好ましい組合せは、自己免疫および後続の炎症カスケードの異なる点で干渉する可能性があり、好ましい例には、キメラ様のTNF拮抗薬、ヒト化したまたはヒトTNF抗体、D2F7(PCR公開番号WO97/29131)、CA2(Remicade(商標))、CDP571、および可溶性p55またはp75 TNF受容体、その誘導体、(p75TNFR1gG(Enbrel(商標))またはp55TNFR1gG(Lenercept))、およびTNF変換酵素(TACE)も含まれ、同様に、IL-1阻害剤(インターロイキン1変換酵素阻害剤、IL-1RAなど)を同様の理由で効果的に用いることができる。その他の好ましい組合せには、インターロイキン11が含まれる。さらに別の好ましい組合せは、IL-18の機能に並行して、依存して、または協働して作用することが可能な自己免疫応答のその他の主要な役割を果たすものであり、特に好ましいものは、IL-12抗体または可溶性IL-12受容体を含むIL-12拮抗薬、またはIL-12結合タンパク質である。IL-12およびIL-18は一部重複するところがあるが、明確に異なる機能および双方に対する拮抗薬の組合せを、最も効果的にすることができると示されてきた。さらに別の好ましい組合せは、非枯渴性抗CD4阻害剤である。さらに好ましい組合せには、抗体、可溶性受容体、または拮抗性リガンドを含む同時刺激性経路CD80(B7.1)またはCD86(B7.2)の拮抗薬が含まれる。

#### 【0073】

本発明の抗体またはその抗原結合部分は、メトトレキサート、6-MP、アザチオプリン、スルファサラジン、メサラジン、オルサラジנקロロキニン/ヒドロキシクロロキン、ペンシルアミン、金チオマレート(筋肉内および経口)、アザチオプリン、コチシン、コルチコステロイド(経口、吸入、および局所注射)、2アドレナリン作用性受容体作動薬(サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル)、キサンチン(テオフィリン、アミノフィリン)、クロモグリケート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えばイブプロフェン、cox-2阻害剤、cox-2選択的阻害剤(例えばロフェコキシブ(VIOXX(商標); Merck & Co., Inc.))、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシン作動薬、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作用性の薬剤、TNFやIL-1など、プロ炎症性サイトカインからのシグナルを妨げる薬剤(例えばIRAK、NIK、IKK、p38、またはMAPキナーゼ阻害剤)、IL-1変換酵素阻害剤、TNF変換酵素(TACE)阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体(例えば可溶性p55またはp75 TNF受容体および誘導体p75TNFR1gG(Enbrel(商標))およびp55TNFR1gG(Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、および抗炎症性サイトカイン(例えばIL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF)などの薬剤と組み合わせることもできる。

好ましい組合せには、メトトレキサートまたはレフルノミドが含まれ、中程度または重度の慢性関節リウマチの場合にはシクロスポリンが含まれる。

#### 【0074】

炎症性腸疾患用治療薬であって、本発明の抗体または抗体部分を組み合わせることができるその治療薬の非限定的な例には、以下のものがふくまれる。すなわち、ブデソニド；表皮成長因子；コルチコステロイド；シクロスポリン、スルファサラジン；アミノサリチレート；6-メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リボキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジン；抗酸化薬；トロポキサン阻害剤；IL-1受容体拮抗薬；抗IL-モノクローナル抗体；抗IL-6モノクローナル抗体；成長因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル-イミダゾール化合物；その他のヒトサイトカインまたは成長因子に対する抗体または拮抗薬、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、EMAP-II、GM-CSF、FGF、およびPDGFである。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはそれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、マイコフェノラートモフェチル、レフルノミド、NSAID、例えばイブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシン作動薬、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作用性の薬剤、TNFやIL-1など、プロ炎症性サイトカインからのシグナルを妨げる薬剤（例えばIRAK、NIK、IKK、p38、またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1変換酵素阻害剤、TNF変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル阻害剤、メタロプロテインナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）、および抗炎症性サイトカイン（例えばIL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF $\beta$ ）などの薬剤と組み合わせることもできる。

#### 【0075】

クローン病用治療薬であって、抗体または抗原結合部分を組み合わせることができるその治療薬の好ましい例には、以下のものが含まれる。すなわち、TNF拮抗薬、例えば、抗TNF抗体、D2F7（PCT公開番号WO97/29131）、CA2（Remicade（商標））、CDP571、TNFR-Ig構造体、（p75TNFR-IgG（Enbrel（商標））またはp55TNFR-IgG（Lenercept））阻害剤、およびPDE4阻害剤である。本発明の抗体または抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えばブデソニドやデキサメタゾンと組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジンなどの薬剤、IL-1などのプロ炎症性サイトカイン、例えばIL-1変換酵素阻害剤、およびIL-1raの合成または作用を妨げる薬剤と組み合わせることもできる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、T細胞シグナル阻害剤、例えばチロシンキナーゼ阻害剤6-メルカプトプリンと共に使用することもできる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、IL-1と組み合わせることができる。

#### 【0076】

多発性硬化症用治療薬であって、本発明の抗体または抗体部分と組み合わせることができるその治療薬の非限定的な例には、以下のものが含まれる。すなわち、コルチコステロイド；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；4-アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン1a（Avonex；Biogen）；インターフェロン1b（Betaseron；Chiron/Berlex）；コポリマー1（Cop-1；Copaxone；Teva Pharmaceutical Industries, Inc.）；高圧酸素；静脈内免疫グロブリン；クラブリピン；その他のヒトサイトカインまたは成長因子に対する



抗体または拮抗薬、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、EMAP-II、GM-CSF、FGF、およびPDGFである。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、またはこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、マイコフェノラートモフェチル、レフルノミド、NSAID、例えばイブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシン作動薬、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作用性の薬剤、TNFやIL-1など、プロ炎症性サイトカインからのシグナルを妨げる薬剤（例えばIRAK、NIK、IKK、p38、またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば可溶性p55またはp75 TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）、および抗炎症性サイトカイン（例えばIL-4、IL-10、IL-13およびTGF $\beta$ ）などの薬剤と組み合わせることもできる。

10

#### 【0077】

多発性硬化症用治療薬であって、抗体またはその抗原結合部分を組み合わせることができるその治療薬の好ましい例には、インターフェロン、例えばIFN- $\gamma$ およびIFN- $\beta$ ；コパクソン、コルチコステロイド、IL-1阻害剤、TNF阻害剤、およびCD40リガンドおよびCD80に対する抗体が含まれる。

20

#### 【0078】

本発明の医薬品組成物は、本発明の抗体または抗体部分を、「治療上有効な量」または「予防に有効な量」だけ含むことができる。「治療上有効な量」は、必要とされる投与量および時間で、所望の治療結果を実現するのに有効な量を指す。抗体または抗体の治療上有効な量は、個人の疾病の状態や年齢、性別、体重などのファクタと、抗体または抗体部分が個人の所望の反応を引き起こす能力によって、様々に変えることができる。また治療上有効な量とは、抗体または抗体部分の任意の毒作用または有害な影響よりも治療上有益な作用のほうが大きいものである。「予防に有効な量」は、必要とされる投与量および時間で、所望の予防結果を実現するのに有効な量を指す。一般に、疾病の早期段階の前または早期段階で予防的用量を被験対象に対し使用するので、予防に有効な量は、治療上有効な量よりも少なくなる。

30

#### 【0079】

投薬計画は、最適な所望の応答（例えば治療上または予防的な応答）が得られるように調整することができる。例えば、ひと塊の薬を投与することができ、用量を数回に分けて時間をかけて投与することができ、またはその用量を、治療状況に必要な条件に示されるように、比例的に減少させまたは増加させることができる。投与を容易にし投薬量を均一にするため、非経口組成物を単位剤型に処方することが、特に有利である。本明細書で使用される単位剤型は、治療が施される哺乳類の被験体に単一の投薬量を与えるのに適する、物理的に隔散した単位を指し、各単位は、必要とされる医薬品担体と共同して所望の治療効果を発揮するよう計算された、所定量の活性化合物を含有する。本発明の単位剤型に関する仕様は、(a)活性化合物の独自の特徴、および実現される特定の治療または予防効果と、(b)個々の感受性を治療するためそのような活性化合物を配合する技術分野に固有の制限によって決定され、かつこれらに直接依存する。

40

#### 【0080】

本発明の抗体または抗体部分の治療上または予防に有効な量の、例示的な非限定的範囲は、0.1~20mg/kgであり、より好ましくは1~10mg/kgである。投薬量の値は、緩和されるべき状態のタイプおよび重さに応じて変えることができることに留意されたい。任意の特定の被験対象に関しては、特定の個人のニーズ、および組成物の投与を

50

管理し監督する担当者の専門的判断に従って、投薬計画を経時的に調整すべきであり、かつ、本明細書で述べる投薬量の範囲は単なる例示にすぎず、特許請求の範囲に記載される組成物の範囲または実施を制限するものではないことを、さらに理解されたい。

#### 【0081】

抗IL-18抗体を形成する方法

本発明の抗IL-18抗体は、抗体を調製する技術分野で知られている様々な技法のいずれか1つを使用して、また、サブセクションに記載されているIL-18ペプチドエピトープ、すなわちアミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含むヒトIL-18のエピトープを含む抗原を使用して、形成される。

#### 【0082】

一般に、ヒトインターロイキン18（IL-18）に結合する抗体を形成するための本発明の方法は、

抗体群を、アミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）またはその一部（例えば配列番号3または33）を含むヒトIL-18のエピトープを含む抗原に曝すこと、および

抗体群から、アミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）またはその一部（例えば配列番号3または33）を含むヒトIL-18のエピトープに結合する抗体を選択することを含む。

#### 【0083】

一実施形態では、抗体群は、動物におけるin vivoレパートリーであり、方法は、アミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含むヒトIL-18のエピトープを含む抗原で動物を免疫化することを含む。別の実施形態では、抗体群は、組換え抗体ライブラリーであり、方法は、アミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含むヒトIL-18のエピトープを含む抗原で、ライブラリーをスクリーニングすることを含む。このライブラリーは、ヒト抗体ライブラリーであることが好ましい。

#### 【0084】

当技術分野では、抗原で動物を免疫化し、それによって抗原に対する特異抗体を作らせる方法がよく知られている。アミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含むヒトIL-18のエピトープを含むIL-18抗原を動物に投与して、ポリクローナル抗体を導き出すことができ、エピトープに結合する特異抗体は、エピトープに結合するそのような抗体をポリクローナル抗体から選択することによって（例えば、hIL-18のアミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含むペプチドを含んだカラムにポリクローナル抗血清を通すことによって）、単離することができる。ポリクローナル抗体を導き出すのに使用される抗原は、無傷（すなわち完全長）のhIL-18でよく、または、問題のエピトープを含むhIL-18の一部、例えば、hIL-18のアミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含む合成ペプチドの一部でよい。さらに、エピトープに対するモノクローナル抗体は、標準的なハイブリドーマ技術を使用し、問題のエピトープに特異的に結合する抗体を分泌するそのようなハイブリドーマを選択することによって、前述の動物から形成することができ、例えば、hIL-18のアミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含むペプチドでハイブリドーマをスクリーニングし、ペプチドに特異的に結合する抗体を選択することによって、形成することができる。

#### 【0085】

本発明の抗体を形成するためにin vitro法を使用することもでき、この場合、抗体ライブラリーをスクリーニングして、所望の結合特異性を有する抗体を識別する。そのような組換え抗体ライブラリーのスクリーニング方法は当技術分野でよく知られており、例えば、Ladner他の米国特許第5,223,409号；Kang他のPCT公開番号WO92/18619；Dower他のPCT公開番号WO91/17271；Winter他のPCT公開番号WO92/20791；Markland他のPCT公開番号WO92/15679；Breitling他のPCT公開番号WO93/01288；

10

20

30

40

50

McCafferty 他 (PCT 公開番号 WO 92/01047; Garrard 他 (PCT 公開番号 WO 92/09690; Fuchs 他 (1991) Bio/Technology 9:1370~1372; Hay 他 (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81~85; Huse 他 (1989) Science 246:1275~1281; McCafferty 他、Nature (1990) 348:552~554; Griffiths 他 (1993) EMBO J 12:725~734; Hawkins 他 (1992) J Mol Biol 226:889~896; Clackson 他 (1991) Nature 352:624~628; Gram 他 (1992) PNAS 89:3576~3580; Garrard 他 (1991) Bio/Technology 9:1373~1377; Hoogenboom 他 (1991) Nuc Acid Res 19:4133~4137; および Barbass 他 (1991) PNAS 88:7978~7982、および PCT 公開番号 WO 97/29131 に記載されている方法が含まれ、そのそれぞれの内容を参照により本明細書に組み込む。

10

20

30

40

50

#### 【0086】

組換え抗体ライブラリーは、IL-18 または IL-18 の一部であってアミノ酸 PLFEDMTDSDCRDNA (配列番号 1) のエピトープを含むもので免疫化された被験対象からのものでよい。あるいは、組換え抗体ライブラリーは、まだ処置を施していない被験対象、すなわち IL-18 で免疫化されていない被験対象からのものでよく、ヒト IL-18 で免疫化されていないヒト対象からのヒト抗体ライブラリーなどがある。本発明の抗体は、ヒト IL-18 のアミノ酸 PLFEDMTDSDCRDNA (配列番号 1) のエピトープで組換え抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより選択され、その結果、このエピトープを認識する抗体が選択される。このようなスクリーニングおよび選択を実行するための方法は、上記段落の引例に記載されているものなど当技術分野ではよく知られている。

#### 【0087】

hIL-18 に対する特定の結合親和性を有する本発明の抗体を選択するには、当技術分野で知られている表面プラズモン共鳴方法を使用することができる。hIL-18 に対する特定の中和活性を有する抗体を選択するには、hIL-18 活性の阻害を評価するための当技術分野で知られている標準的な方法を使用することができる。さらに、マウスを免疫化するための方法であって、遺伝子導入によりこのマウスを変化させてヒト免疫グロブリンレパートリーをコードし、それによって生体が免疫原に応答して完全なヒト抗体を発現することができるようにされた、マウスを免疫化するための方法が、当技術分野で知られている (例えば、米国特許第 5,877,397 号および第 6,150,584 号参照)。

#### 【0088】

##### 抗 IL-18 抗体の使用法

hIL-18 に結合することができるので、酵素様免疫吸着法 (ELISA) や放射免疫アッセイ (RIA)、組織に関する免疫組織学などの従来の免疫アッセイを使用することにより、本発明の抗 hIL-18 抗体またはその一部を使用して hIL-18 (例えば、血清や血漿などの生体試料中) を検出することができる。本発明は、生体試料中の hIL-18 を検出するための方法であって、生体試料を本発明の抗体または抗体部分に接触させること、および hIL-18 に結合された抗体 (または抗体部分) または結合されていない抗体 (または抗体部分) を検出することを含む方法を提供し、それによって、生体サンプル中の hIL-18 が検出される。抗体は、結合されまたは結合されていない抗体の検出を容易にするために、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な、検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子団、蛍光物質、ルミネッセント材料、および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ; 適切な補欠分子団複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ; 適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イ

ソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフェイコエリトリンが含まれ；ルミネッセント材料の例にはルミノールが含まれ；適切な放射性物質の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、または $^3\text{H}$ が含まれる。

#### 【0089】

抗体を標識する代わりに、検出可能な物質で標識された r h I L - 1 8 標準および標識されていない抗 h I L - 1 8 抗体を利用する競合免疫アッセイによって、生物学的流体中で h I L - 1 8 をアッセイにかけることができる。このアッセイでは、生体試料、標識された r h I L - 1 8 標準、および抗 h I L - 1 8 抗体を組み合わせ、標識されていない抗体に結合された標識済みの r h I L - 1 8 標準の量を決定する。生体試料中の h I L - 1 8 の量は、抗 h I L - 1 8 抗体に結合された標識済みの r h I L - 1 8 の量に反比例する。

10

#### 【0090】

本発明の抗体および抗体部分は、生体外と生体内の両方で、h I L - 1 8 活性を中和することができることが好ましい。したがって、本発明の抗体および抗体部分を使用して h I L - 1 8 活性を阻害することができ、これは例えば、h I L - 1 8 を含有する細胞培養物において、また、ヒト対象あるいはその他の哺乳類被験対象であって I L - 1 8 を有するものにおいて行われ、そこで本発明の抗体との交差反応が行われる。一実施形態では、本発明は、I L - 1 8 活性を阻害するための方法であって、I L - 1 8 活性が阻害されるように本発明の抗体または抗体部分と I L - 1 8 とを接触させることを含む方法を提供する。

20

#### 【0091】

別の実施形態では、本発明は、I L - 1 8 活性が害となる疾患に罹患した被験対象の I L - 1 8 活性を阻害するための方法を提供する。本発明は、そのような障害に苦しむ被験対象の I L - 1 8 活性を阻害するための方法であって、被験対象の I L - 1 8 活性が阻害されるように本発明の抗体または抗体部分をその被験対象に投与することを含む方法を提供する。I L - 1 8 はヒト I L - 1 8 であり、被験対象はヒト対象であることが好ましい。あるいは、被験対象は、本発明の抗体と交差反応する I L - 1 8 を発現する哺乳類でよい。

30

#### 【0092】

特に、動物での I L - 1 8 活性を調節するための 1 つの動物モデルでは、ヒト末梢血単核細胞が移植された N O D - S C I D マウスが使用される。次いで、移植後 2 ~ 4 週間経過後（血清中のヒト I g G 力価により測定される）、マウスに L P S（リポ多糖類）を注射する。4 ~ 6 時間後、L P S が導入されたヒトインターフェロン 血清力価を測定する。抗 I L - 1 8 抗体（例えば I L - 1 8 中和抗体）の効力（力価）は、L P S 試験の 1 日前に抗体を注射（i p）し、その後、試験動物を監視して、そのインターフェロン 血清力価の減少（I L - 1 8 i n v i v o 活性の関数）を対照と比較することによって決定される（例えば、H o l m e s 他、H y b r i d o m a、19:363367（2000）参照）。

40

#### 【0093】

本明細書で使用される「I L - 1 8 活性が害となる疾患」という用語は、その疾患にかかっている被験対象が I L - 1 8 を持っていることがその疾患の病態生理の原因でありまた

50

はその疾患を悪化させる一因である、ということが示されまたはそうであると考えられる疾病およびその他の疾患を含むものとする。したがって、IL-18活性が害となる疾患は、IL-18活性の阻害によってその疾患の症状および/または進行が緩和されることが予測される疾患である。このような疾患は、例えば上述の抗IL-18抗体を使用して検出することが可能な、その疾患にかかっている被験対象の生物学的流体中のIL-18の濃度を高める（例えば、被験対象の血清や血漿、滑液中のIL-18の濃度を高める）ことによって証明することができる。

【0094】

本発明の抗体で治療することができる疾患の非限定的な例には、本発明の抗体の医薬品組成物に関する上記で論じた疾患が含まれる。

10

【0095】

本発明のその他の特徴は、それに限定されると解釈すべきではない以下の実施例から明らかにされよう。

【0096】

実例

一般に、本発明の実施に際して、他に特に示さない限り、化学、分子生物学、組換えDNA技術、PCR技術、免疫学（特に、例えば抗体技術）、および任意の必要な細胞培養または畜産学的技法といった従来の技法であって当業者の範囲内にあり文献に十分に説明されている技法が使用される。例えば、Sambrook、FritschおよびManiatis、Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); DNA Cloning, Vol. 1および2、(D.N. Glover 編 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 編 1984); PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry、Beaucage 編 John Wiley & Sons (1999) (編集者); Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure、Neidle 編、Oxford Univ Press (1999); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Innis 他、Academic press (1990); PCR Essential Techniques: Essential Techniques、Burke 編、John Wiley & Son Ltd (1996); The PCR Technique: RT-PCR、Siebert 編、Eaton Pub. Co. (1998); Quantitative PCR Protocols、Kochanowski 他 編、Humana Press (1999); Clinical Applications of PCR、Lo 編、Humana Press (1998); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)、510、Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series、169)、McCafferty 編、Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual、Harlow 他、C.S.H.L. Press 出版 (1999); Current Protocols in Molecular Biology、編集 Ausubel 他、John Wiley & Sons (1992); Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology、Lubiniecki, A. 編、Marcel Dekker 出版 (1990); および Manipulating the Mouse Embryo、Hogan 他、C.S.H.L. Press 出版 (1994) を参照されたい。

20

30

40

【0097】

実施例の全体を通して、他に特に示さない限り、上記材料および方法を使用した。

【0098】

50

## 実施例 1

## 抗 I L - 1 8 抗体の単離

ヒト B 細胞（例えば扁桃腺や脾臓）由来の m R N A からヒト V L および V H c D N A を使用して調製された、別個の s c F v ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって、h I L - 1 8 に対する抗体を単離した。このライブラリーの構造および選択方法は、V a u g h a n 他（1996）N a t u r e B i o t e c h . 1 4 : 3 0 9 ~ 3 1 4 に記載されている。

## 【0099】

このライブラリーを、完全長ヒト I L - 1 8（配列番号 61）、I L - 1 8 のペプチドエピトープ（配列番号 1 ~ 3）、または I L - 1 8 を表す重複 15 アミノ酸ペプチドのパネル（そのエピトープ配列を表 5 の配列番号 31 ~ 60 に示す）を使用して、ライブラリーをスクリーニングした。標準の手順を使用してイムノチューブに抗原をコーティングすることにより、I L - 1 8 特異抗体を選択した（M a r k s 他（1991）J . M o l . B i o l . 222 : 581 ~ 597）。かなりの数の I L - 1 8 特異バインダーを発生させるため、I L - 1 8、I L - 1 8 のペプチドエピトープ、または I L - 1 8 ペプチドパネルを使用して、s c F v ライブラリーをスクリーニングした。いくつかの異なるクロノタイプを選択し、制限酵素消化パターンによって決定し、D N A 配列決定によって確認した。

## 【0100】

完全長 I L - 1 8 またはその代表的なペプチドに優先的に結合する I L - 1 8 抗体を識別するために、E L I S A において、ビオチンに取り込まれた I L - 1 8 に、s c F v を含有する上清を滴下して滴定を行い、結合特性を決定した。

## 【0101】

2 つの抗 I L - 1 8 一本鎖抗体が得られ、その 1 つは 2 E 1 と呼ばれてペプチドエピトープおよびペプチドパネルを使用して独立に単離され、2 つめの抗 I L - 1 8 抗体は L T 2 8 と呼ばれて完全長 I L - 1 8 を使用して単離された。これらの親抗 I L - 1 8 抗体を選択して、さらに研究を行い変更を加えた。

## 【0102】

## 実施例 2

## 抗 - 1 8 抗体の親和性成熟

確認された I L - 1 8 結合活性と表 6 に示される H 鎖および L 鎖配列を有する一本鎖 F v タイプの抗体 2 E 1 をさらに修飾して、I L - 1 8 活性の中和を改善した。

## 【0103】

## 【表 6】

表 6 一本鎖抗 I L - 1 8 抗体 2 E 1 の配列

2 E 1 H 鎖 (配列番号 : 18)	
CDR1 (配列番号 : 9)	
QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSCKTSQYTF <u>TCGYI</u> HWVRQAHCQGFEWI	
CDR2 (配列番号 : 10)	CDR3 (配列番号 : 11)
<u>GR</u> LNPTTGDANFAEK <u>FQ</u> GRVALTRDTSISTAYLQLDLKSDDTAVYYCAG <u>KEGA</u> WGQG	
TLVTVSS	

10

20

30

40

表6 一本鎖抗IL-18抗体2E1の配列(続き)

2E1 L鎖 (配列番号 : 19)	
CDR1 (配列番号 : 12)	CDR2 (配列番号 : 13)
SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRFYFN</u> WYQQKPGQAPVLVIY <u>GKNNRPS</u>	
CDR3 (配列番号 : 14)	
GIPDRFSGSGSGNTGSLTITGAQAEDEADYYC <u>GSRDSSGIHV</u> VFGGGTKVTVLG	

10

## 【0104】

IL-18ペプチドと、IL-18を表す順次重複ペプチドパネル(表6参照)を使用して、抗IL-18抗体2E1を独立に選択した。

## 【0105】

突然変異誘発のために選択されたH鎖可変部領域の特定のアミノ酸残基を表7にまとめる。特に、H鎖領域に関しては、それぞれのアミノ酸置換について、CDR1の位置H30、H31、H32、H33、およびH35で、CDR2の位置H52、H52a、H53、H54、H56、およびH58で、CDR3のH95、H96、H97、およびH98で試験をした。

20

## 【0106】

突然変異のために選択されたL鎖アミノ酸残基に関しては、それぞれのアミノ酸置換について、CDR1の位置L30、L31、L32、およびL34で、CDR2の位置L50、L52、L53、およびL55で、CDR3の位置L89、L90、L91、L92、L93、L94、L95、L95a、L95b、L96、およびL97で試験をした。

## 【0107】

## 【表7】

表 7 2 E 1 に導入された H 鎖アミノ酸置換

H 鎖突然変異	
CDR / Kabat 位	置換された残基
<b>CDR1</b>	
H30	A, R, N, D, C, G, H, I, F, P, S, V または
H31	A, C, H, S, T, Y または
H32	R, N, C, H, P, S, T または
H33	N, D, C, Q, H, L, M, F, S, V または
H35	N, D, L, F または
<b>CDR2</b>	
H52	T
H52a	R, Q, L, S, T, W または
H53	A, R, N, L, P, S, Y または
H54	A, R, N, D, Q, L, K, M, P, S, Y または
H56	A, R, N, C, G, H, I, L, F または
H58	A, R, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y, P, S, T, W, Y, V または
<b>CDR3</b>	
H95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H96	A, R, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H98	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または

10

20

【 0 1 0 8 】

【 表 8 】

表 8 2 E 1 に導入された L 鎖アミノ酸置換

30

L 鎖突然変異	
CDR / Kabat 位	置換された残基
<b>CDR1</b>	



L30	N, D, C, G, I, L, S, W, Y または
L31	R, N, D, C, G, H, I, L, P, S, T, Y または
L32	R, N, D, E, G, I, L, P, S, T, V または
L34	A, R, N, D, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V または
<b>CDR2</b>	
L50	A, N, I, L, F, P, S, W, Y, V または
L52	A, R, D, E, H, I, L, M, F, P, S, T, V または
L53	A, R, C, I, L, K, M, P, S, T または
L55	A, R, N, D, C, G, H, I, L, S, T, Y または
<b>CDR3</b>	
L89	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
L90	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, C または
L91	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
L92	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
L93	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, C または
L94	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, C または
L95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
L95a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
L95b	A, R, E, Q, S, Y, V, P, W, C または
L96	A, R, E, Q, S, Y, H, P, W, C または
L97	A, R, E, Q, S, Y, H, P, W, C または

10

20

## 【0109】

置換は、標準の技法を使用して導入した（例えば、Taylor他、Nucleic Acids Res. 13: 8764~8758 (1985); Nakamaye他、Nucleic Acids Res. 14: 9679~9698 (1986); および Olsen他、Methods in Enzymology、217: 189 (1993) に記載されている）。簡単に言えば、突然変異が誘起される位置のそれぞれについて、所与のコドンに関して縮重しているオリゴヌクレオチドを合成した。一本鎖Fvタイプの抗体2E1遺伝子を含む、もとのプラスミドから、一本鎖DNA鋳型を調製した。親2E1抗体HおよびL鎖の核酸配列は、配列番号62および63で与えられる。次いで、突然変異オリゴヌクレオチドを使用して、相補的DNA鎖、最終的には二本鎖プラスミドを生成し、したがって、抗体の所与のコドンに、縮重または種々の突然変異が取り込まれた。特に、製造業者の指示に従いQuickChange Kit (Stratagene) を使用して、2E1のHおよびL鎖のCDR3領域に変更を加えた。

30

## 【0110】

次いで、各突然変異誘発反応から代表的な数のクローンの配列決定をし（すなわち7~36クローン）、親2E1一本鎖抗体配列からの変化を示すものを細菌中に発現させ、さらに以下に述べるin vitroおよびin vivo試験を行うために精製した。

40

## 【0111】

完全長IL-18リガンドを使用する別のスクリーンでは、第2の抗IL-18抗体を識別し、選択して、親和性成熟を使用してさらに改善した。特に、上述の技法を使用して、表9に示されるH鎖およびL鎖配列（および配列番号66および68で与えられる核酸配列）を有するLT28抗体をさらに修飾した。

## 【0112】

## 【表9】

表9 一本鎖抗IL-18抗体LT28の配列

LT28L鎖 (配列番号 : 28)
<p>CDR1 (配列番号 : 20) CDR2 (配列番号 : 21)</p> <p>LVQPGGSLRLSCAASGFTFS<u>SYAMS</u>WVRQAPGKGLEWVS<u>AI</u>SGSGGSTYYADSVKG</p> <p>CDR3 (配列番号 : 22)</p> <p>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>DDDDYDFDY</u>WGRGTMVTVSS</p>

10

表9 一本鎖抗IL-18抗体LT28の配列(続き)

LT28L鎖 (配列番号 : 29)
<p>CDR1 (配列番号 : 23) CDR2 (配列番号 : 24)</p> <p>QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC<u>SGSSSNIGINAVN</u>WYQQLPGTAPKLLIY<u>GNDQRPS</u></p> <p>CDR3 (配列番号 : 25)</p> <p>GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC<u>AAWDDSLSGPV</u>FGGCTKLTVLG</p>

20

## 【0113】

H鎖領域に関しては、アミノ酸置換を、CDR1の位置H31、H32、H33、およびH35に、CDR2の位置H50、H51、H52、H52a、H53、H54、H56、およびH58に、CDR3の位置H95、H96、H97、H98、H99、H100、H100a、H101、およびH102に導入した。

30

## 【0114】

突然変異のために選択されたL鎖残基に関しては、アミノ酸置換を、CDR1の位置L30、L31、L32、L34に、CDR2の位置L50、L52、L53、L55に、また位置L89、L90、L91、L92、L93、L94、L95、L95a、L95b、L96、L97に導入した。

## 【0115】

## 【表10】

表 10 LT28に導入されたH鎖アミノ酸置換

H鎖突然変異	
CDR / Kabat 位	置換された残基
<b>CDR1</b>	
H31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H32	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H33	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H35	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
<b>CDR2</b>	
H50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H51	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H52	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H52a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H53	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H54	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H56	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H58	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
<b>CDR3</b>	
H95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または

10

20

H96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H98	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H99	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H100	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H100a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H101	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または
H102	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C または

30

【 0 1 1 6 】

【 表 1 1 】

表 1 1 L T 2 8 に導入された L 鎖アミノ酸置換

L 鎖突然変異	
CDR / 突然変異	置換された残基
<b>CDR1</b>	
L30	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L32	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C, G
L34	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
<b>CDR2</b>	
L50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, C
L52	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C
L53	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C, N
L55	A, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
<b>CDR3</b>	
L89	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L90	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L91	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L92	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L93	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L94	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95b	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C

10

20

30

## 【 0 1 1 7 】

置換は上述のように導入した。次いで、各突然変異誘発反応から代表的な数のクローンの配列決定を行い、親 L T 2 8 一本鎖抗体配列からの変化を示すものを細菌中で発現させ、以下に述べる試験をさらに行うために精製した。

## 【 0 1 1 8 】

## 実施例 3

I L - 1 8 に対するヒト抗体の結合活性

B I A c o r e システム ( P h a r m a c i a B i o s e n s e r 、 P i s c a t a w a y 、 N J ) を使用した表面プラズモン共鳴 ( S P R ) によって、リガンド ( バイオセンサーマトリックスに固定化されたピオチニル化組換えヒト I L - 1 8 ( r h I L - 1 8 ) ) と分析物 ( 溶液中の抗体 ) との実時間結合相互作用を測定した。このシステムは、デキストランバイオセンサーマトリックス内でのタンパク質濃度の変化を検出するために S P R の光学的性質を利用する。タンパク質は、知られている濃度でデキストランマトリックスに共有結合している。このデキストランマトリックスを通して抗体を注入し、注入された抗体と固定化されたリガンドとの特異結合によって、マトリックスタンパク質濃度が増し、その結果、S P R シグナルに変化が生じる。これらの S P R シグナルの変化を共鳴ユニット ( R U ) として記録し、センサーグラムの y 軸に沿って、時間に対して表示する。

40

## 【 0 1 1 9 】

バイオセンサーマトリックスへのピオチニル化 r h I L - 1 8 の固定化を容易にするために、遊離アミン基を介してストレプトアビジンとデキストランマトリックスとを共有結合

50

させるが、これは、まず、マトリックス上のカルボキシル基を100 mMのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)と400 mMのN-エチル-N'-(3-ジエチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)を用いて活性化することにより行う。次に、この活性化したマトリックスを通してストレプトアビジンを注入する。pH 4.5の酢酸ナトリウムに入れて希釈した35マイクロリットルのストレプトアビジン(25 µg/ml)を、活性化したバイオセンサーを通して注入し、タンパク質上の遊離アミンをこの活性化したカルボキシル基に直接結合させる。1 Mのエタノールアミンを注入することによって、未反応のマトリックスEDC-エステルを非活性化する。ストレプトアビジン結合バイオセンサーチップは市販もされている(Pharmacia BR-1000-16、Pharmacia Biosensor、Piscataway、NJ)。

10

#### 【0120】

ビオチニル化rhIL-18を調製したが、それには、まず、ビオチン(D-ビオチニル-アミノカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル; Boehringer Mannheim カタログNo. 1008960) 5.0 mgをジメチルスルホキシド500 µlに溶解して10 mg/ml溶液を作製した。rhIL-18 1 ml当たり、ビオチン10マイクロリットルを添加し(2.65 mg/mlで)、ビオチンとrhIL-18のモル比を2:1にした。反応物を穏やかに混合し、暗闇の中で、室温で2時間インキュベートした。PD-10カラム、Sephadex G-25M(Parmacia カタログNo. 17-0851-01)を、低温のPBS 25 mlで平衡状態にし、カラム1本当たり、rhIL-18-ビオチン2 mlを充填した。このカラムについて、1 mlの低温のPBSで10回、溶離を行った。画分を収集し、OD 280で読み取った(1.0 OD = 1.25 mg/ml)。適切な画分をプールし、使用まで-80で保存した。

20

#### 【0121】

ストレプトアビジンを介してマトリックス上に固定化させるビオチニル化rhIL-18を、0.05%(BIAcore)界面活性剤P20(Pharmacia BR-1000-54、Pharmacia Biosensor、Piscataway、NJ)が補われたPBS流動緩衝液(Gibco カタログNo. 14190-144、Gibco BRL、Grand Island、NY)に入れて希釈した。固定化されたrhIL-18にrhIL-18特異抗体が結合する能力を決定するため、結合アッセイを以下のように行った。ビオチニル化rhIL-18のアリコート(25 nM; 10 µlアリコート)を、ストレプトアビジン結合デキストランマトリックスを通して5 µl/分の流量で注入した。タンパク質の注入前、およびその直後に、各フローセルを通してPBS緩衝液のみを流した。基準線と、ビオチニル化したrhIL-18の注入が終了して30秒経過したときのシグナルの正味の差を、結合値を表すものとして解釈した。固定化されたビオチニル化rhIL-18へのrhIL-18特異抗体の直接的な結合を測定した。抗体(20 µg/ml)をPBS流動緩衝液に入れて希釈し、25 µlのアリコートを、固定化されたタンパク質マトリックスを通して5 µl/分の流量で注入した。抗体の注入前、およびその直後に、各フローセルを通してPBS緩衝液のみを流した。基準線のシグナルと、抗体注入が終了した後のシグナルとの正味の差を、特定のサンプルの結合値を表すものとして解釈した。次のサンプルを注入する前に、100 mMのHClを使用して、バイオセンサーマトリックスを再度生成した。off速度( $K_{off}$ )、on速度( $K_{on}$ )、会合速度( $K_a$ )、および解離速度( $K_d$ )定数を決定するために、BIAcore反応速度評価ソフトウェア(バージョン2.1)を使用した。

30

40

#### 【0122】

ビオチニル化したrhIL-18に結合する、改善された候補抗IL-18抗体の代表的な結果を、親抗体2E1およびLT28(およびネズミ対照)と比較して、以下の表12に示す。比較のために、細胞ベースの中和アッセイからのIC50値も含め、それらを実施例4に示す。全てのクローンは、Biacore分析および以下に述べる細胞ベースのアッセイを使用する試験用の一本鎖Fv抗体として調製した。列挙されたクローンが、突

50

然変異していない親HおよびL鎖を含んでいるのに対し、一本鎖突然変異体は、1本の親鎖および1本の突然変異した鎖を含んでおり、この突然変異した鎖は重(H)鎖または軽(L)鎖であり、その後にK a b a t位が続いて、アミノ酸置換の性質を持つ。

【 0 1 2 3 】

【 表 1 2 】

表 1 2 2 E 1 および L T 2 8 から誘導された抗 I L - 1 8 抗体の結合

抗体 クローン	On速度 ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Off速度 ( $s^{-1}$ )	Kd (M)	IC50 値*
2 E 1 親および突然変異体				
2E1 ( 親 ) ScFv	2.6E+3	6.42E-03	1.5E-07	3.3E-8M
2E1 ( 親 ) IgG				9.0E-10M
L34S		1.69E-04		1.5E-8M
H53R		2.34E-03		2.5E-8M
H53Y		-		1.5E-8M
H58Q		-		1.6E-8M
L34S + H53R (2E1RS)	2.7E+03	6.82E-05	2.3E-08	3.0E-09M
L34S + H58Q		-		1.5E-8M
L34S + H53Y		5.28E-05		6.7E-9M
H53R + H58Q		-		1.2E-8M
H53Y + H58Q		-		1.2E-8M
L34S + H53R + H58Q		6.18E-05		2.8E-9M
L34S + H53Y + H58Q		-		8.0E-9M
L90C				4x
L93C				2-4x

L94P, Q, or R				2-4x
L95R, Y				3-8x
L95bE, W				2-4x
L T 2 8 親および突然変異体				
LT28 (parent)	1.3E+04	4.8E-04	3.9E-08	9.0E-8M
H54Q				2-3x
H58W				2-3x
1				
125-2H	1.7E+05	1.1E-04	6.2E-10	2.E-10M
318-M	1.2E+04	1.1E-04	9.6E-09	4.0E-9M

\*いくつかの値は、親に比べてフォールドが改善されたことを示す。

【 0 1 2 4 】

実施例 4

抗 I L - 1 8 抗体の中和活性

本発明の抗ヒトIL-18抗体の中和活性を試験するために、IL-18活性をモニタするための当技術分野で認められているアッセイを使用した。

#### 【0125】

簡単に言うと、そのアッセイは、標準的な技法（例えば、RPMI 1640培地 Gibco #21870-076；（10%ウシ胎児血清（Bio Whittaker #14-501F）が補われた）；2mM L-グルタミン（Gibco #25030-081）；50単位/mlペニシリン、50ug/mlストレプトアビジン（Gibco #15070-063）；および0.075%重炭酸ナトリウムを使用する）により培養されたKG1細胞（ATCC #CCL-246、骨髄性白血病の骨髄細胞）を使用する。

10

#### 【0126】

IL-18中和の試験を行うため、20ng/mlのhTNF- $\alpha$ （Lot #19130132）で刺激を与えた $3 \times 10^5$ 個のKG-1細胞を、50ulの抗IL-18抗体（4倍濃度）と50ulのIL-18（4倍濃度=8ng/ml）を用いてインキュベートし、37℃で1時間または16~20時間インキュベートした。誘導されたhIFN- $\gamma$ の関数として生じたIL-18中和の量を決定するために、製造業者の指示に従って、市販のELISAキット（R&D #DIF00/Endogen #EH-IFNG）を使用してELISAを行い、hIFN- $\gamma$ 産生を標準曲線から計算した（pg/ml）。

#### 【0127】

全部で4つの突然変異体、すなわち2E1から誘導されたL34S、H53R、H53Y、およびH58Qは、そのIL-18中和能力が、親2E1抗体よりも大きいことが示された（表12参照）。KG-1アッセイを使用したIC50値の改善は、2~5倍の範囲内であり、同様に改善された結合結果は、BIAcore分析を使用して決定された。

20

#### 【0128】

様々な突然変異の組合せクローンも調製して試験を行ったが、そのデータを表12にまとめる。最良の組合せのクローンL34S-H53Rは、KG-1細胞ベースのアッセイとBIAcore分析を使用した場合の両方で、親抗体2E1よりも10倍改善されたことを示した。得られた抗体は、2E1RSという名称で示した。

#### 【0129】

2E1のいくつかのその他の突然変異クローンは、KG-1アッセイを使用して決定されたように、その効力、すなわちIL-18中和が改善されたことを示した。突然変異体L95Yは、そのIC50値が、親2E1抗体よりも5~8倍良いことを示した。いくつかのその他の突然変異体は2~3倍改善されたことを示し、それらは、2E1突然変異体H96A、H96Q、H96S、H98S、L90C、L90W、L93C、L94P、L94P、L94Q、L94R、L94W、L95R、L95aA、L95aH、L95aP、L95aR、L95aW、L95bE、L95bW、L95bY、L97C、およびL97Eであった。

30

#### 【0130】

ScFv抗体またはIgG抗体の形をした2E1の結合も比較した（表5参照）。

40

#### 【0131】

さらに、LT28親から誘導された2つの突然変異体は、そのIL-18中和活性が、親抗体に比べて改善されていた。

#### 【0132】

これらの結果は、本発明の方法および組成物を使用して、完全なヒトIL-18中和抗体を得ることができることを実証している。

#### 【0133】

均等物

当業者なら、本明細書に記載された本発明の特定の実施形態の多くの均等物を理解し、または通常の実験しか使用しないで確認することができるであろう。そのような均等物は、

50

上述の特許請求の範囲に包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0134】

【図1】

IL-1（左）およびIL1RA（右）と比較したIL-18（中央）の構造モデルを示す図である。

【0135】

【図2】

IL-18受容体と複合体を形成するIL-18の構造モデルを示し、IL-18のアミノ酸PLFEDMTDSDCRDNA（配列番号1）を含むペプチドが濃い灰色で示されている図である。 10

【0136】

【図3】

IL-18受容体と複合体を形成するIL-18の構造モデルを示し、IL-18のアミノ酸YFGKLESKLSVIRN（配列番号33）を含むペプチドが濃い灰色で示されている図である。

【0137】

【図4】

IL-18受容体と複合体を形成する完全長IL-18の構造モデルを示す図である。

【0138】

【図5】

IL-18の生物学的作用を中和する際の3種の異なる抗IL-18抗体の効力を、KG1細胞内でのIFN-誘導の阻害の関数として示す図である。 20

【図1】

【図2】

Fig. 1

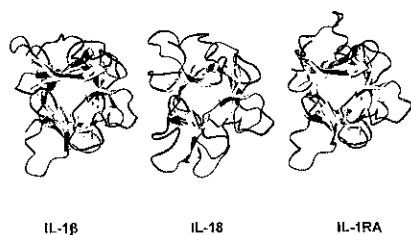


Fig. 2





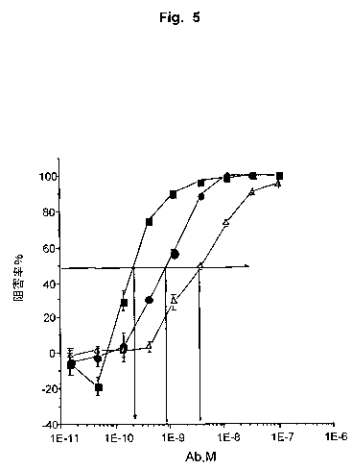
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【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  
16 August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/58956 A2

(51) International Patent Classification: C07K 16/00

(21) International Application Number: PCT/US91/04170

(22) International Filing Date: 9 February 2001 (09.02.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(36) Priority Data:  
60/181,608 10 February 2000 (10.02.2000) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:  
US 60/181,698 (CON)  
Filed on 10 February 2000 (10.02.2000)

(71) Applicant (for all designated States except US): BASF AKTIEGESELLSCHAFT [DE/DE], Ludwigshafen, Rheinland Pfalz (DE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GHAYUR, Tariq [PK/US], 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (US); DIXON, Richard W. [US/US], 6 Samuel Drive, North Grafton, MA 01546 (US); ROGUSKA, Mike [US/US], 16 Hillside Road, Ashland, MA 01721 (US); WHITE, Michael [US/US], 30 Angelica Drive, Framingham, MA 01701 (US); LABKOVSKY, Boris [US/US], 107A-5 Broadmeadow Road, Marlborough, MA 01752 (US); SAJFELD, Jochea [DE/US], 177 Old Westboro Road, North Grafton, MA 01536 (US); DUNCAN, Alexander, Robert [GB/GB], 8 Garden Fields,

Little Shelford, Cambridge CB2 5HH (GB); BROCK-LEHURST, Simon, Mark [GB/GB], 38 Hantsmill, Fobboon, Cambridge CB1 3RH (GB); MANKOVICH, John [US/US], 416 Lowell Street, Andover, MA 01810 (US); SHORROCK, Celia, Patricia [GB/US], 17 Stanley Road, Cambridge CB5 8LE (GB); THOMPSON, Julia, Elizabeth [GB/GB], Seely's Cottage, 6 High Street, Whittlesford, Cambridge CB2 4LT (GB); LENNARD, Simon, Nicholas [GB/GB], 1 Bakers Lane, Linton, Cambridgeshire CB1 6NF (GB).

(74) Agents: DECONTE, Giulio, A., JR., et al.: Lashive &amp; Cuckfield LLP, 28 State Street, Boston, MA 02109 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, ES, FI, GB, GR, GE, GM, GU, HK, 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, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

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

Published:

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

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

WO 01/58956 A2

(54) Title: ANTIBODIES THAT BIND HUMAN INTERLEUKIN-18 AND METHODS OF MAKING AND USING

(57) Abstract: Antibodies that bind human interleukin 18 (hIL-18) are provided, in particular antibodies that bind epitope(s) of human IL-18. The antibodies can be, for example, entirely human antibodies, recombinant antibodies, or monoclonal antibodies. Preferred antibodies have high affinity for hIL-18 and neutralize hIL-18 activity *in vitro* and *in vivo*. An antibody of the invention can be a full-length antibody or an antigen-binding portion thereof. Method of making and method of using the antibodies of the invention are also provided. The antibodies, or antibody portions, of the invention are useful for detecting hIL-18 and for inhibiting hIL-18 activity, e.g., in a human subject suffering from a disorder in which hIL-18 activity is detrimental.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

**ANTIBODIES THAT BIND HUMAN INTERLEUKIN-18  
AND METHODS OF MAKING AND USING**

**Related Applications**

5        This application is a non-provisional application claiming priority to U.S.  
provisional application Serial No. 60/181,608, filed February 10, 2000, entitled,  
“Antibodies that Bind Human Interleukin-18 and Methods of Making and Using” the  
contents of which are hereby incorporated by reference. In addition, the contents of all  
cited references, including literature references, issued patents, and published patent  
10 applications, as cited throughout this application are hereby expressly incorporated by  
reference.

**Background of the Invention**

Interleukin-18 (IL-18) was originally described in 1989 as interferon-gamma  
15 inducing factor (IGIF) and is a pro-inflammatory cytokine with various functions in  
addition to an ability to induce interferon gamma. These biological properties include  
activation of NF- $\kappa$ B, Fas ligand expression, the induction of both CC and CXC  
chemokines, and increased production of competent human immunodeficiency virus.

Due to the ability of IL-18 to induce interferon gamma production in T cells and  
20 macrophages, it plays an important role in Th1-type immune responses and participates  
in both innate and acquired immunity. IL-18 is related to the IL-1 family in terms of  
both structure and function. For reviews of IL-18 structure, function and biological  
activity, see for example Dinarello, C. et al. (1998) *J. Leukoc. Biol.* 63:658-654;  
Dinarello, C.A. (1999) *Methods* 19:121-132; and Dinarello, C.A. (1999) *J. Allergy Clin.*  
25 *Immunol.* 103:11-24.

It would be desirable to use to modulate IL-18 in a variety of human immune  
responses. In particular, antibodies that bind to and neutralize IL-18 are particularly  
desirable. Moreover, murine IL-18 antibodies are limited for their use *in vivo* due to  
problems associated with administration of mouse antibodies to humans, such as short  
30 serum half life, an inability to trigger certain human effector functions and elicitation of

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 2 -

an unwanted immune response against the mouse antibody in a human (the "human anti-mouse antibody" (HAMA) reaction).

In general, attempts to overcome the problems associated with use of fully-murine antibodies in humans, have involved genetically engineering the antibodies to be more "human-like." For example, chimeric antibodies, in which the variable regions of the antibody chains are murine-derived and the constant regions of the antibody chains are human-derived, have been prepared (Junghans, *et al.* (1990) *Cancer Res.* 50:1495-1502; Brown *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2663-2667; Kettlborough *et al.* (1991) *Protein Engineering.* 4:773-783). However, because these chimeric and humanized antibodies still retain some murine sequences, they still may elicit an unwanted immune reaction, the human anti-chimeric antibody (HAMA) reaction, especially when administered for prolonged periods.

A preferred IL-18 inhibitory agent to murine antibodies or derivatives thereof (e.g., chimeric or humanized antibodies) would be an entirely human anti-IL-18 antibody, since such an agent should not elicit the HAMA reaction, even if used for prolonged periods. However, such antibodies have not been described in the art and, therefore are still needed.

#### Summary of the Invention

This invention pertains to compounds, such as antibodies, that bind human IL-18, as well as methods of making and using such compounds or antibodies.

In one aspect, the invention pertains to a compound capable of binding a human IL-18 amino acid sequence, or portion thereof, where the amino acid comprises an N- or C-terminal portion of human IL-18 such as provided in SEQ ID NO: 70 or SEQ ID NO:

71. In one embodiment, the compound is a small molecule, peptide, polypeptide, antibody, or antibody fragment, such as a fully human antibody or fragment.

In another aspect, the invention pertains to a human monoclonal antibody, or antigen-binding portion thereof, capable of binding to human IL-18. In other embodiments, the antibody or fragment thereof, dissociates from human IL-18, as determined by plasmon resonance, with a koff rate constant of 0.1s-1 or less, 1 x 10E-2 s-1 or less, 1 x 10E-3 s-1 or less, 1 x 10E-4 s-1 or less, 1 x 10E-5 s-1 or less, 1 x 10E-6

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 3 -

s-1 or less, or inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-6}$  or less,  $1 \times 10^{-7}$  or less,  $1 \times 10^{-8}$  or less,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$  or less, or  $1 \times 10^{-11}$  or less.

In another aspect, the invention pertains to an isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, that binds an epitope of human IL-18 comprising amino acids  
 5 PI.FEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), or a portion of either. Preferably, the antibody is a neutralizing antibody. Preferably, the antibody is a human antibody. In various embodiments, the antibody is a recombinant antibody (e.g., a single-chain antibody (scFv)), or a monoclonal antibody.

In other embodiments, the isolated antibody, or antigen-binding portion thereof,  
 10 binds to an epitope of human IL-18, or a portion of either, where the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $0.1s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-6}M$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate  
 15 constant of  $1 \times 10^{-2}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-7}M$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-3}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-8}M$  or less. Alternatively, the  
 20 antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-4}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-9}M$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-5}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or  
 25 may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-10}M$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-6}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-11}M$  or less.

Another aspect of the invention pertains to an isolated human antibody, or an  
 30 antigen-binding portion thereof, containing at least one variable region CDR domain capable of binding an epitope of human IL-18. In related embodiments, the isolated

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 4 -

antibody, or an antigen-binding portion thereof, has a variable region containing a heavy and/or light chain CDR1 domain, CDR2 domain, or CDR3 domain as set forth in Table 6 or 9 which can have, *e.g.*, one or more amino acid substitutions or insertions at or adjacent to any of the Kabat positions indicated in Tables 7-8 and 10-11. In a preferred embodiment, the isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, contains a light chain variable region (LCVR) containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 and a heavy chain variable region (HCVR) containing the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26. In another preferred embodiment, the isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, contains a light chain variable region (LCVR) having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 and a heavy chain variable region (HCVR) having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 27.

Another aspect of the invention pertains to pharmaceutical compositions comprising an antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment, the pharmaceutical composition further comprises at least one additional therapeutic agent for treating a disorder in which IL-18 activity is detrimental.

Another aspect of the invention pertains to methods of making an antibody that binds human interleukin-18 (IL-18). The invention provides a method comprising exposing an antibody repertoire to an antigen comprising an epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), or a portion of either; and selecting from the antibody repertoire an antibody that binds the epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), or a portion of either.

In one embodiment, the antibody repertoire is an *in vivo* repertoire in an animal and the method comprises immunizing the animal with the antigen comprising the epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), the N- or C-terminal portion of human IL-18 (SEQ ID NOS: 70-71), or a portion of any of these epitopes. In another embodiment, the antibody repertoire is a recombinant antibody library and the method comprises screening the library with an antigen containing the epitope of human IL-18 having the

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 5 -

amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNI,NDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), peptides represented by SEQ ID NOS: 31-32 and 34-60, or a portion of any of the foregoing. Preferably, the library is a human antibody library.

In another aspect, the invention provides an isolated nucleic acid encoding an antibody of any of the above aspects, *e.g.*, a heavy and/or light chain variable region, or portion thereof. In related embodiments, the isolated nucleic acid encoding the anti-IL-18 antibody, or portion thereof, is in a recombinant expression vector, *e.g.*, for expression in a host cell.

Thus, in another aspect, the invention pertains to a method of using the foregoing host cell into which the recombinant expression vector has been introduced, for synthesizing an antibody that binds human IL-18, by culturing the host cell in a culture medium until an antibody that binds human IL-18 is synthesized by the cell.

Another aspect of the invention pertains to a method for inhibiting human IL-18 activity comprising contacting human IL-18 with the antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention such that human IL-18 activity is inhibited.

Yet another aspect of the invention pertains to a method for inhibiting human IL-18 activity in a human subject suffering from a disorder in which IL-18 activity is detrimental, comprising administering to the human subject the antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention such that human IL-18 activity in the human subject is inhibited. In one embodiment, the anti-IL-18 antibody may be administered, *e.g.*, before, concurrent, or after, an additional agent such as an anti-IL-12 antibody or antigen binding fragment thereof, methotrexate, anti-TNF antibody or antigen binding fragment thereof, corticosteroids, cyclosporin, rapamycin, FK506, or a non-steroidal anti-inflammatory agent.

#### Brief Description of the Drawings

*Figure 1* shows the structural model of IL-18 (center) as compared to IL-1 $\beta$  (left) and IL1RA (right).

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 6 -

*Figure 2* shows a structural model of IL-18 complexed with the IL-18 receptor, wherein the peptide epitope comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) of IL-18 is indicated in dark gray. This peptide epitope is bound by the anti-IL-18 antibody 2E1.

5

*Figure 3* shows a structural model of IL-18 complexed with the IL-18 receptor, wherein the peptide epitope comprising amino acids YFGKLESKLSVIRN (SEQ ID NO: 33) of IL-18 is indicated in dark gray. This peptide epitope is bound by the anti-IL-18 antibody LT28.

10

*Figure 4* shows a structural model of full length IL-18 complexed with the IL-18 receptor. The spherical light and dark gray epitopes represent the N and C terminal contact epitopes of IL-18 (respectively, SEQ ID NOS: 70 and 71).

15

*Figure 5* shows the potency of three different anti-IL-18 antibodies in neutralizing the biologic effects of IL-18 as a function of inhibition of IFN- $\gamma$  induction in KG1 cells. The IC<sub>50</sub> values for the antibodies 125H (boxes) and the 2E1 antibody as an IgG antibody (circles) or as a single chain antibody (triangles) are, respectively, 2.1E-10, 9.0E-10, and 3.3E-9.

20

#### Detailed Description of the Invention

This invention pertains to the selection of peptide epitopes that are capable of generating neutralizing antibodies to IL-18 mediated signal transduction, the preparation of antibodies to these epitopes and the use of such antibodies, including use to treat disorders involving IL-18. The strategy of selecting epitopes entails construction of an homology model of the IL-18 protein and its corresponding receptor. A combination of visual inspection and computational evaluation is then used to select representative peptide segments for synthesis and antibody generation. Amino acid sequences shown herein use the standard one-letter abbreviation code.

30



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 7 -

Selection of IL-18 Epitopes

- The program Modeler (Sali, A. et al., *Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER*, Proteins: Struct., Funct., Genet. (1995), 23(3), pp. 318-26. CODEN: PSFGY; ISSN: 0887-3585) was used to generate homology models for both
- 5 IL-18 and the IL-18 receptor. The X-ray crystal structures of IL-1 $\beta$  (Prestige, J., et al. *The three-dimensional structure of human interleukin-1 $\beta$ . refined to 2.0 Å resolution*. Prog. Clin. Biol. Res. (1990), 349 (Cytokines Lipocortins Inflammation Differ.), pp. 297-307) and IL-1RA (Schreuder, H. et al., *Refined crystal structure of the interleukin-1 receptor antagonist: presence of a disulfide link and a cis-proline*. Eur. J. Biochem. (1995), 227(3), pp. 838-47) are available and were used as reference
- 10 coordinates for the model construction of IL-18. The IL-1 receptor structure (Vigers, G., et al. *Crystal structure of the type-I interleukin-1-receptor complexed with interleukin-1 $\beta$* . Nature (London) (1997), 386(6621), pp. 190-194) was used to model the IL-18 receptor.
- 15 The structural model building for IL-18 and the IL-18 receptor is described further below.

IL-18 Model Building

- The overall sequence homology with these two proteins (i.e., IL-1 $\beta$  and IL-18) is
- 20 low, however, there is compelling evidence that IL-18 is a member of the IL-1 family (see Dinarello, C.A. *IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family*. J. Allergy Clin. Immunol. (1999), 103(1, Pt. 1), pp. 11-24) and that the overall protein fold is very similar. Like IL-1 $\beta$ , IL-18 is initially secreted in a pro form. Both pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 are activated by IL-1 $\beta$ -converting enzyme
- 25 (ICE) (Fantuzzi, G. and Dinarello, C.A. *Interleukin-18 and interleukin-1 $\beta$ : two cytokine substrates for ICE (caspase-1)*. J. Clin. Immunol. (1999), 19(1), pp. 1-11). It is also known that the IL-1 receptor and the IL-18 receptor are similar (Dinarello, C.A. et al. *Overview of interleukin-18: more than an interferon- $\gamma$  inducing factor*. J. Leukocyte Biol. (1998), 63(6), 658-664). IL-1 $\beta$  is capable of binding to the IL-18 receptor. As a
- 30 final argument, IL-1 $\beta$  and IL-1RA display an identical fold, even though the overall

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 8 -

sequence homology between these two proteins is on a par with the sequence homology with IL-18. The sequence alignment between the three proteins (*i.e.*, IL-18, IL-1 $\beta$  and IL1-RA) was constructed manually with the program InsightII. This alignment can be seen in Table 1:

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 9 -

**Table 1: Sequence alignment for IL-18 relative to IL-1 $\beta$  and IL-1RA**

		24	
5	IL-18:	YFGK-LESKLS-VIRNLNDQVI-FIDQGNRPLEE--DMT-DSDCRD--NAP	
	IL-1 $\beta$ :	AP-VRS-LNCTLRDSQQKSLVMS-G--P-YRLKALHLQGQ--D--MEQ	
	IL-1RA:	SSKMQA-FR--IWDVNQKTFYLR-N--N--QLVAGYLQGP--NVNLEB	
		80	
10	IL-18:	RTIFLIISMY-KDSQPRG-MAVTISVKCEKISTLSC----ENK-IISFKEM	
	IL-1 $\beta$ :	QVVFMS- FVQGEESNOKIPVALGIK-EKNLYLSCVTK-DDKPTLQLESV	
	IL-1RA:	KI--DV---VP-IEPH---ALFLGIH-CCKMCLSCV-KSGDETRLQLEAV	
		123	
15	IL-18:	NPPDNI-KDTKSDIIF-FQSVFPGHDNMQFESSSYEGYFLACE-KERDL	
	IL-1 $\beta$ :	DPKNYP-KK-KMEKRFEVFNK-I-EINNKLEFESAQFFNWIYSTS-QAENM	
	IL-1RA:	NITOLSENR-KQDKRFAPIR-S-DSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQ-	
		170	
20	IL-18:	FKILKKED-ELGDRSIM-FTVQNEQ	(SEQ ID NO: 4)
	IL-1 $\beta$ :	-PVFL--GG-TKGGQDITDFTMQFVSS	(SEQ ID NO: 5)
	IL-1RA:	-PVSL--TNMPDEGVMWTKFYFQED	(SEQ ID NO: 6)

25 The sequence homology between these sequences is listed in Table 2. The upper triangle is percent strict sequence identity and the lower triangle is percent conservative sequence homology. Only the portions of the total sequences reported in Table 1 are considered in Table 2. As was mentioned above, the overall homology is low but consistent across the family.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 10 -

**Table 2: Sequence homology between IL-1 family members**

Molecule	IL-18	IL-1 $\beta$	IL-1RA	IL-1 Rec	IL-18 Rec
IL-18	-	20.0	21.8	-	-
IL-1b	53.5	-	27.5	-	-
IL-1RA	50.6	54.4	-	-	-
IL-1 Rec	-	-	-	-	26.1
IL-18 Rec	-	-	-	50.5	-

The resulting IL-18 structure is pictured in Figure 1 along with IL-1 $\beta$  and IL-1RA. The overall quality as assessed by the program What\_Check (Hoofst, R.W. et al., *Errors in Protein Structures*. Nature (1996) 381, pp. 272) is reasonable, but a bit low (see Table 3 below).

**Table 3: Structural Z-scores from What\_Check (Positive is better than average)**

	IL-1 $\beta$	IL-1RA	IL-1 Rec	IL-18 (model)	IL-18 Rec (model)
<b>Packing Quality</b>	-1.6	-2.3	-3.6	-5.5	-5.7
<b>Ramachandran Plot</b>	-2.0	-1.3	-2.9	-3.3	-2.3
<b>Rotamer Normality</b>	-1.6	-0.8	-1.5	-0.6	-0.6
<b>Backbone Conformation</b>	-1.7	+0.5	-1.6	-5.6	-2.7

5

However, the assessment of the reference structures by What\_Check is also low, suggesting that this protein fold is poorly represented in the database of reference structures. Undoubtedly though, the low sequence homology contributed to a less than perfect final structure in spite of our confidence in the overall protein fold. However, for the purpose of choosing epitopes for antibody generation, this structure is considered to be sufficient.

10

#### IL-18 Receptor Model Building

The structure of the IL-18 receptor was also generated using the program

15

Modeler. The reference coordinates were from the IL-1 receptor. As in the case of the cytokines associated with these receptors, the overall sequence identity is low, but sufficient to generate an alignment. The sequence homology figures are included in Table 2 above. The alignment was generated manually using the program InsightII and is presented in Table 4.

20

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 12 -

**Table 4. Sequence alignment for the IL-18 receptor relative to the IL-1 Receptor**

5	IL-10 Rec :	22	CTSRPHITVVEGEFFYLKHCSCLAHIEITTTKSWYKSSGSQFRVELNPR
		IL-1 Rec :	CKEREKILIVSSANLIDVRPCPINPNKRGTTTWYKDD-SKTPVSTQA
10	IL-18 Rec :	72	SSSRIALEGCVTEFWPVFIINDTGSYPOMKNYTKKRLKVTIRKHS---
		IL-1 Rec :	S--RIHQKREKQWVPAKVEDSGHYCVVRNSSYCLRIRKISAKSVENEPN
	IL-10 Rec :	119	-CFTEQVTSKLVKRFQITCENSYYQPLVNST----SLYKCKKLL
		IL-1 Rec :	LCINAQAIKQKLPVAGDQGLVCPHSEFFRMENNELPKLQWYKCKELL
	IL-18 Rec :	163	EN----NKNPTIRKNAEFQGGYYSVHFLAHNGKLFLEKTFTNIEVE
		IL-1 Rec :	DNHFSGVKQRLVWNVAKKRCNYTCHASYTLGKQYPTTAVIRFCTLE
15	IL-18 Rec :	209	DSNTVFVLLGPKLNHVAVELGKNVRLNCSALLNEEDVIYWMF-GE-NG
		IL-1 Rec :	ENKETRPVIVSPANETMEVDLGGQIQLICNVVGGQLSDIAYWKNQSVIDE
	IL-18 Rec :	257	SDPNINSE-KEMRIMTPEGRWHASKVLRISNIGESNLNVLNCLVASTCG
		IL-1 Rec :	DDVLGECYYSVENPANKRSTLTVLNLSBLSRIYKHFTCFARN7RG
	IL-18 Rec :	306	TJTKSEILVAKAD (SEQ ID NO: 7)
		IL-1 Rec :	LDAAVILLYPVT (SEQ ID NO: 8)

The overall quality of the structure of the IL-18 receptor as determined using the Modeler program is reasonable but again scores somewhat low according to What\_Check (see Table 3 above). The confidence that can be placed on the overall fold comes primarily from the fact that IL-1 $\beta$  binds to both the IL-1 and IL-18 receptor. The low sequence homology certainly contributes to the quality of the final structure, however, as in the case of the associated cytokines above, this current structure is considered to be sufficient. As an additional exercise, the IL-18 peptide epitope bound by LT28 (SEQ ID NO: 33) was modeled when complexed with the IL-18 receptor (Figure 3). As a final exercise, a model of the IL-18/IL-18 receptor complex was generated based on the IL-1 $\beta$ /IL-1 receptor structure (Figure 4). This structure was generated by superimposing the cytokine structures and the receptor structures. No attempt was made to energy minimize the final structure.

#### Peptide Epitope Selection

The primary purpose of generating structural models was to be able to select suitable peptides based primarily on a visual score. Solvent exposed sections of the

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 13 -

proteins and portions of the proteins which were both hydrophilic and buried in the receptor/cytokine complex were considered. A final element considered was based on a selectivity criterion. The selected peptide epitope should be different in sequence from similar portions of other members of the family. Based on this criteria, a peptide from IL-18 was selected. In addition, a comprehensive overlapping panel of peptides (SEQ ID NOS: 31-60) representative of full length human IL-18 (SEQ ID NO: 61) was also made and the sequence of all of these IL-18 related peptides is shown in Table 5, below.

Table 5. Selected Peptides Representative of IL-18

10

Peptide Sequence	SEQ ID NO:
PLFEDMTSDCRDNA	(SEQ ID NO: 1)
CPLFEDMTSDCRDNA	(SEQ ID NO: 2)
PLFEDMTSDCR	(SEQ ID NO: 3)
YFGKLESKLSVIRK	(SEQ ID NO: 31)
ESKLSVIRNLNDQV	(SEQ ID NO: 32)
VIRNLNDQVLFIDQ (LT28 binding epitope)	(SEQ ID NO: 33)
NDQVLFIDQGNREL	(SEQ ID NO: 34)
FIDQGNRELPEDMT	(SEQ ID NO: 35)
NRPLFEDMTSDCR (2E1 binding epitope)	(SEQ ID NO: 36)
EDMTSDCRDNAPR	(SEQ ID NO: 37)
SDCRDNAPRTIFII	(SEQ ID NO: 38)
NAPRTIFIIISMYKD	(SEQ ID NO: 39)
IFIIISMYKDSQPRG	(SEQ ID NO: 40)
MYKDSQPRGMAVTI	(SEQ ID NO: 41)
QPRGMAVTISVKCE	(SEQ ID NO: 42)
AVTISVKCEKISTL	(SEQ ID NO: 43)
VKCEKISTLSCENK	(SEQ ID NO: 44)
ISTLSCENKIISFK	(SEQ ID NO: 45)
CENKIISFKEMNFP	(SEQ ID NO: 46)

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 14 -

ISFKEMNPPDNIKD	(SEQ ID NO: 47)
MNPPDNIKDKSDI	(SEQ ID NO: 48)
NIKDKSDIIFFOR	(SEQ ID NO: 49)
KSDIIFFORSVPGH	(SEQ ID NO: 50)
FFORSVPGHGNKMQ	(SEQ ID NO: 51)
VPGHGNKMQFESS	(SEQ ID NO: 52)
NKMQFESSSYEGYF	(SEQ ID NO: 53)
ESSSYEGYFLACEK	(SEQ ID NO: 54)
EGYFLACEKERDLF	(SEQ ID NO: 55)
ACEKERDLFKILK	(SEQ ID NO: 56)
RDLFKILKKEDEL	(SEQ ID NO: 57)
LILKKEDELGDRSI	(SEQ ID NO: 58)
EDELGDRSIMFTVQ	(SEQ ID NO: 59)
DRSIMFTVQNED	(SEQ ID NO: 60)
YFGKLESKLSVIRNLDQVLFIDQGNRPLFEDMTD	(SEQ ID NO: 61)
SDCRDNAPRTIFIIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEK	LT28 and 2E1
ISGTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDKSDIIFFOR	epitopes
VPGHGNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKILK	indicated in bold
EDELGDRSIMFTVQNED	

The N-terminal cysteine of the IL-18 peptide represented by SEQ ID NO: 2 is not part of the native IL-18 sequence, but was added as a conjugation site. Accordingly, within the native IL-18 amino acid sequence, the region corresponding to the selected epitope comprises amino acid residues having the amino acid sequence

PI.FEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1).

A schematic model of the IL-18 peptide (SEQ ID NO: 1) complexed with the IL-18 receptor is shown in Figure 2, with this peptide epitope indicated in dark gray.

Subsequent antigenicity calculations were performed on IL-18 peptide sequences, with the result that this peptide scored particularly highly. This peptide was synthesized and used as an epitope to generate antibodies in a rabbit host. Molecular modeling data obtained using the IL-18 peptide PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) or YFGKLESKLSVIRN (SEQ ID NO: 31) as compared to a cognate receptor, *i.e.*,



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 15 -

the IL-18 receptor, as depicted in Figures 2 and 3, provides an indication as to what residues a neutralizing antibody or compound may interact with.

An alternative method for peptide epitope selection can be accomplished in the absence of any molecular modeling by screening a panel of representative peptides using immunoselection. In one approach, overlapping peptides representative of the entire protein sequence can be used. In a more limited approach, only certain epitopes are represented in the panel of peptides. In a combined approach, molecular modeling can be used to identify epitopes likely to be important. The identified epitope(s) sequence can then be used to construct a panel of peptides (*e.g.*, overlapping peptides) that are representative of the identified epitope(s). Methods for manufacturing desired peptide sequences can be carried out using standard techniques known in the art.

Once the binding peptide or peptides (*e.g.*, panel of overlapping peptides) has been selected, an immunoscreen for a cognate receptor can be performed. Alternatively, an immunoscreen can be performed with a selected cognate receptor such that a peptide having a certain binding affinity can be identified. Any number of immunoscreens can be employed such that, either a desired receptor or desired peptide can be identified as a candidate binding molecule for further study. Such "bait" and "prey" techniques for analyzing protein-protein interactions, for identifying candidate binding molecules, and/or for scoring binding affinities are described in the art. One preferred technique utilizes phage display as described herein.

#### Anti-IL-18 Antibodies

The invention provides antibodies, as well as antibody portions thereof, that bind IL-18. Preferably, the antibodies, or portions thereof, are isolated antibodies. Preferably, the antibodies, or portions thereof, are neutralizing antibodies.

The term "antibody", as used herein, is intended to refer to immunoglobulin molecules comprised of four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as HCVR or VH) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 16 -

as LCVR or VL) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR).

- 5 Each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

- The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, hIL-18). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')<sub>2</sub> fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. Other forms of single chain antibodies, such as diabodies are also encompassed. Diabodies are bivalent, bispecific antibodies in which VH and VL domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and creating two antigen

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 17 -

binding sites (see e.g., Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Still further, an antibody or antigen-binding portion thereof may be part of a larger immunoadhesion molecules, formed by covalent or noncovalent association of the antibody or antibody portion with one or more other proteins or peptides. Examples of such immunoadhesion molecules include use of the streptavidin core region to make a tetrameric scFv molecule (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) and use of a cysteine residue, a marker peptide and a C-terminal polyhistidine tag to make bivalent and biotinylated scFv molecules (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Antibody portions, such as Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments, can be prepared from whole antibodies using conventional techniques, such as papain or pepsin digestion, respectively, of whole antibodies. Moreover, antibodies, antibody portions and immunoadhesion molecules can be obtained using standard recombinant DNA techniques, as described herein.

An "isolated antibody", as used herein, is intended to refer to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (e.g., an isolated antibody that specifically binds hIL-18 is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than hIL-18). An isolated antibody that specifically binds hIL-18 may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as IL-18 molecules from other species. Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals. Further, an isolated antibody, e.g., an isolated human antibody, can be a chimeric antibody wherein, e.g., variable regions, CDR domains, or isotypes derived from a different human source are grafted to the parent human antibody.

A "compound" as used herein, refers to binding molecules such as antibodies, e.g., polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, binding fragments thereof (e.g., Fab fragments), single chain antibodies (e.g., scFv), peptides or peptide mimetics, as well as non-peptide based molecules, such as small molecules having ligand binding activity.

A "neutralizing antibody", as used herein (or an "antibody that neutralized hIL-18 activity"), is intended to refer to an antibody whose binding to hIL-18 results in inhibition of the biological activity of hIL-18. This inhibition of the biological activity

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 18 -

of hIL-18 can be assessed by measuring one or more indicators of hIL-18 biological activity. These indicators of hIL-18 biological activity can be assessed by one or more of several standard *in vitro* or *in vivo* assays known in the art.

The term "surface plasmon resonance", as used herein, refers to an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time biospecific interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example using the BIAcore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). For further descriptions, see Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Jönsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; and Johnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

The term " $K_{off}$ ", as used herein, is intended to refer to the off rate constant for dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex.

The term " $K_d$ ", as used herein, is intended to refer to the dissociation constant of a particular antibody-antigen interaction.

In one aspect, the invention pertains to an isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, that binds an epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) or VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), or a portion of any of these epitopes. Preferably, the antibody is a neutralizing antibody. Preferably, the antibody is a human antibody. In various embodiments, the antibody is a recombinant antibody or a monoclonal antibody.

In other embodiments, the isolated antibody, or antigen-binding portion thereof, binds to an epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $0.1 s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-6} M$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-2} s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-7} M$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-3} s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-8} M$  or

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 19 -

less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  or less. Alternatively, the antibody, or an antigen-binding portion thereof, may dissociate from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or may inhibit human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-11} \text{ M}$  or less.

#### Affinity Maturation of Identified Anti-IL-18 Antibodies

The invention also provides for the further modification of an antibody identified as binding to an IL-18 epitope. The modification of the identified anti-IL-18 antibody is to improve binding and/or neutralization activity.

#### Therapeutic Compositions and Methods for Administering

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising an antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment, the pharmaceutical composition further comprises at least one additional therapeutic agent for treating a disorder in which IL-18 activity is detrimental.

The antibodies and antibody-portions of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration to a subject. Typically, the pharmaceutical composition comprises an antibody or antibody portion of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Examples of pharmaceutically acceptable carriers include one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. In many cases, it will be preferable to include

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 20 -

isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the antibody or antibody portion.

The antibodies and antibody-portions of the invention can be incorporated into a pharmaceutical composition suitable for parenteral administration. Preferably, the antibody or antibody-portions will be prepared as an injectable solution containing 0.1-250 mg/ml antibody. The injectable solution can be composed of either a liquid or lyophilized dosage form in a flint or amber vial, ampule or pre-filled syringe. The buffer can be L-histidine (1-50 mM), optimally 5-10 mM, at pH 5.0 to 7.0 (optimally pH 6.0). Other suitable buffers include but are not limited to, sodium succinate, sodium citrate, sodium phosphate or potassium phosphate. Sodium chloride can be used to modify the toxicity of the solution at a concentration of 0-300 mM (optimally 150 mM for a liquid dosage form). Cryoprotectants can be included for a lyophilized dosage form, principally 0-10% sucrose (optimally 0.5-1.0%). Other suitable cryoprotectants include trehalose and lactose. Bulking agents can be included for a lyophilized dosage form, principally 1-10% mannitol (optimally 2-4%). Stabilizers can be used in both liquid and lyophilized dosage forms, principally 1-50 mM L-Methionine (optimally 5-10 mM). Other suitable bulking agents include glycine, arginine, can be included as 0-0.05% polysorbate-80 (optimally 0.005-0.01%). Additional surfactants include but are not limited to polysorbate 20 and BRIJ surfactants.

The compositions of this invention may be in a variety of forms. These include, for example, liquid, semi-solid and solid dosage forms, such as liquid solutions (e.g., injectable and infusible solutions), dispersions or suspensions, tablets, pills, powders, liposomes and suppositories. The preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. Typical preferred compositions are in the form of injectable or infusible solutions, such as compositions similar to those used for passive immunization of humans with other antibodies. The preferred mode of administration is parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular). In a preferred embodiment, the antibody is administered by intravenous

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 21 -

infusion or injection. In another preferred embodiment, the antibody is administered by intramuscular or subcutaneous injection.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution,

- 5 microemulsion, dispersion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (*i.e.*, antibody or antibody portion) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active
- 10 compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile, lyophilized powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and spray-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The
- 15 proper fluidity of a solution can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prolonged absorption of injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

- 20 The antibodies and antibody-portions of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art, although for many therapeutic applications, the preferred route/mode of administration is subcutaneous injection, intravenous injection or infusion. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. In certain embodiments, the
- 25 active compound may be prepared with a carrier that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such
- 30 formulations are patented or generally known to those skilled in the art. See, *e.g.*,

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 22 -

*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

In certain embodiments, an antibody or antibody portion of the invention may be orally administered, for example, with an inert diluent or an assimilable edible carrier.

- 5 The compound (and other ingredients, if desired) may also be enclosed in a hard or soft shell gelatin capsule, compressed into tablets, or incorporated directly into the subject's diet. For oral therapeutic administration, the compounds may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. To administer a compound of the
- 10 invention by other than parenteral administration, it may be necessary to coat the compound with, or co-administer the compound with, a material to prevent its inactivation.

- Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions. In certain embodiments, an antibody or antibody portion of the invention
- 15 is coformulated with and/or coadministered with one or more additional therapeutic agents that are useful for treating disorders in which IL-18 activity is detrimental. For example, an anti-hIL-18 antibody or antibody portion of the invention may be coformulated and/or coadministered with one or more additional antibodies that bind other targets (e.g., antibodies that bind other cytokines or that bind cell surface
- 20 molecules). Furthermore, one or more antibodies of the invention may be used in combination with two or more of the foregoing therapeutic agents. Such combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies.

25

#### Therapeutic Uses

- Interleukin 18 plays a critical role in the pathology associated with a variety of diseases involving immune and inflammatory elements. These diseases include, but are not limited to, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, juvenile chronic arthritis, Lyme
- 30 arthritis, psoriatic arthritis, reactive arthritis, spondyloarthropathy, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, insulin



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 23 -

- dependent diabetes mellitus, thyroiditis, asthma, allergic diseases, psoriasis, dermatitis scleroderma, graft versus host disease, organ transplant rejection, acute or chronic immune disease associated with organ transplantation, sarcoidosis, atherosclerosis, disseminated intravascular coagulation, Kawasaki's disease, Grave's disease, nephrotic
- 5 syndrome, chronic fatigue syndrome, Wegener's granulomatosis, Henoch-Schoenlein purpura, microscopic vasculitis of the kidneys, chronic active hepatitis, uveitis, septic shock, toxic shock syndrome, sepsis syndrome, cachexia, infectious diseases, parasitic diseases, acquired immunodeficiency syndrome, acute transverse myelitis, Huntington's chorea, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, stroke, primary biliary cirrhosis,
- 10 hemolytic anemia, malignancies, heart failure, myocardial infarction, Addison's disease, sporadic, polyglandular deficiency type I and polyglandular deficiency type II, Schmidt's syndrome, adult (acute) respiratory distress syndrome, alopecia, alopecia areata, seronegative arthropathy, arthropathy, Reiter's disease, psoriatic arthropathy, ulcerative colitic arthropathy, enteropathic synovitis, chlamydia, yersinia and salmonella
- 15 associated arthropathy, spondyloarthropathy, atheromatous disease/arteriosclerosis, atopic allergy, autoimmune bullous disease, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, pemphigoid, linear IgA disease, autoimmune haemolytic anaemia, Coombs positive haemolytic anaemia, acquired pernicious anaemia, juvenile pernicious anaemia, myalgic encephalitis/Royal Free Disease, chronic mucocutaneous candidiasis, giant cell arteritis,
- 20 primary sclerosing hepatitis, cryptogenic autoimmune hepatitis, Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome, Acquired Immunodeficiency Related Diseases, Hepatitis C, common varied immunodeficiency (common variable hypogammaglobulinaemia), dilated cardiomyopathy, female infertility, ovarian failure, premature ovarian failure, fibrotic lung disease, cryptogenic fibrosing alveolitis, post-
- 25 inflammatory interstitial lung disease, interstitial pneumonitis, connective tissue disease associated interstitial lung disease, mixed connective tissue disease associated lung disease, systemic sclerosis associated interstitial lung disease, rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease, systemic lupus erythematosus associated lung disease, dermatomyositis/polymyositis associated lung disease, Sjögren's disease
- 30 associated lung disease, ankylosing spondylitis associated lung disease, vasculitic diffuse lung disease, haemosiderosis associated lung disease, drug-induced interstitial

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 24 -

- lung disease, radiation fibrosis, bronchiolitis obliterans, chronic eosinophilic pneumonia, lymphocytic infiltrative lung disease, postinfectious interstitial lung disease, gouty arthritis, autoimmune hepatitis, type-1 autoimmune hepatitis (classical autoimmune or lupoid hepatitis), type-2 autoimmune hepatitis (anti-LKM antibody hepatitis),
- 5 autoimmune mediated hypoglycaemia, type B insulin resistance with acanthosis nigricans, hypoparathyroidism, acute immune disease associated with organ transplantation, chronic immune disease associated with organ transplantation, osteoarthritis, primary sclerosing cholangitis, psoriasis type 1, psoriasis type 2, idiopathic leucopaenia, autoimmune neutropenia, renal disease NOS,
- 10 glomerulonephritides, microscopic vasculitis of the kidneys, Lyme disease, discoid lupus erythematosus, male infertility idiopathic or NOS, sperm autoimmunity, multiple sclerosis (all subtypes), sympathetic ophthalmia, pulmonary hypertension secondary to connective tissue disease, Goodpasture's syndrome, pulmonary manifestation of polyarteritis nodosa, acute rheumatic fever, rheumatoid spondylitis, Still's disease,
- 15 systemic sclerosis, Sjögren's syndrome, Takayasu's disease/arteritis, autoimmune thrombocytopaenia, idiopathic thrombocytopenia, autoimmune thyroid disease, hyperthyroidism, goitrous autoimmune hypothyroidism (Hashimoto's disease), atrophic autoimmune hypothyroidism, primary myxoedema, phacogenic uveitis, primary vasculitis and vitiligo. The human antibodies, and antibody portions of the invention can
- 20 be used to treat humans suffering from autoimmune diseases, in particular those associated with inflammation, including, rheumatoid spondylitis, allergy, autoimmune diabetes, autoimmune uveitis, acute liver disease, chronic liver diseases, allergy and asthma, mental disorders (e.g., depression and schizophrenia), and Th2 Type and Th1 Type mediated diseases.
- 25 Preferably, the antibodies of the invention or antigen-binding portions thereof, are used to treat rheumatoid arthritis, Crohn's disease, multiple sclerosis, insulin dependent diabetes, mellitus, and psoriasis.
- An antibody, or antibody portion, of the invention also can be administered with one or more additional therapeutic agents useful in the treatment of autoimmune and
- 30 inflammatory diseases.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 25 -

Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof can be used alone or in combination to treat such diseases. It should be understood that the antibodies of the invention or antigen binding portion thereof can be used alone or in combination with an additional agent, *e.g.*, a therapeutic agent, said additional agent being selected by the skilled artisan for its intended purpose. For example, the additional agent can be a therapeutic agent art-recognized as being useful to treat the disease or condition being treated by the antibody of the present invention. The additional agent also can be an agent which imparts a beneficial attribute to the therapeutic composition *e.g.*, an agent which effects the viscosity of the composition.

It should further be understood that the combinations which are to be included within this invention are those combinations useful for their intended purpose. The agents set forth below are illustrative for purposes and not intended to be limited. The combinations which are part of this invention can be the antibodies of the present invention and at least one additional agent selected from the lists below. The combination can also include more than one additional agent, *e.g.*, two or three additional agents if the combination is such that the formed composition can perform its intended function.

Preferred combinations are non-steroidal anti-inflammatory drug(s) also referred to as NSAIDS which include drugs like ibuprofen. Other preferred combinations are corticosteroids including prednisolone; the well known side-effects of steroid use can be reduced or even eliminated by tapering the steroid dose required when treating patients in combination with the anti-IL-18 antibodies of this invention. Non-limiting examples of therapeutic agents for rheumatoid arthritis with which an antibody, or antibody portion, of the invention can be combined include the following: cytokine suppressive anti-inflammatory drug(s) (CSAIDs); antibodies to or antagonists of other human cytokines or growth factors, for example, TNF, I.T, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF, and PDGF. Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, or their ligands including CD154 (gp39 or CD40L).

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 26 -

Preferred combinations of therapeutic agents may interfere at different points in the autoimmune and subsequent inflammatory cascade; preferred examples include TNF antagonists like chimeric, humanized or human TNF antibodies, D2E7, (PCT Publication No. WO 97/29131), CA2 (Remicade<sup>TM</sup>), CDP 571, and soluble p55 or p75

5 TNF receptors, derivatives, thereof, (p75TNFR1gG (Enbrel<sup>TM</sup>) or p55TNFR1gG (Lenercept), and also TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) inhibitors; similarly IL-1 inhibitors (Interleukin-1-converting enzyme inhibitors, IL-1RA etc.) may be effective for the same reason. Other preferred combinations include Interleukin 11. Yet another preferred combination are other key players of the autoimmune response which may act

10 parallel to, dependent on or in concert with IL-18 function; especially preferred are IL-12 antagonists including IL-12 antibodies or soluble IL-12 receptors, or IL-12 binding proteins. It has been shown that IL-12 and IL-18 have overlapping but distinct functions and a combination of antagonists to both may be most effective. Yet another preferred combination are non-depleting anti-CD4 inhibitors. Yet other preferred combinations

15 include antagonists of the co-stimulatory pathway CD80 (B7.1) or CD86 (B7.2) including antibodies, soluble receptors or antagonistic ligands.

The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents, such as methotrexate, 6-MP, azathioprine sulphasalazine, mesalazine, olsalazine chloroquine/hydroxychloroquine, penicillamine, aurothiomalate

20 (intramuscular and oral), azathioprine, cochlincine, corticosteroids (oral, inhaled and local injection), beta-2 adrenoreceptor agonists (salbutamol, terbutaline, salmeterol), xanthines (theophylline, aminophylline), cromoglycate, nedocromil, ketotifen, ipratropium and oxitropium, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, cox-2 inhibitors, cox-2 selective inhibitors (e.g.,

25 rofecoxib (VIOXX<sup>TM</sup>, Merck & Co., Inc.)) corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signalling by proinflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  or IL-1 (e.g. IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors),

30 IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitors, TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) inhibitors, T-cell signalling inhibitors such as kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors,

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 27 -

sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof (e.g. soluble p55 or p75 TNF receptors and the derivatives p75TNFRlgG (Enbrel<sup>TM</sup> and p55TNFRlgG (Tenoret)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) and antiinflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 and TGF $\beta$ ). Preferred combinations include methotrexate or leflunomide and in moderate or severe rheumatoid arthritis cases, cyclosporine.

Non-limiting examples of therapeutic agents for inflammatory bowel disease with which an antibody, or antibody portion, of the invention can be combined include the following: budenoside; epidermal growth factor; corticosteroids; cyclosporin, sulfasalazine; aminosalicylates; 6-mercaptopurine; azathioprine; metronidazole; lipoxigenase inhibitors; mesalamine; olsalazine; balsalazide; antioxidants; thromboxane inhibitors; IL-1 receptor antagonists; anti-IL-1 $\beta$  monoclonal antibodies; anti-IL-6 monoclonal antibodies; growth factors; elastase inhibitors; pyridinyl-imidazole compounds; antibodies to or antagonists of other human cytokines or growth factors, for example, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF, and PDGF. Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 or their ligands. The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents, such as methotrexate, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signalling by proinflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  or IL-1 (e.g. IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors), IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitors, TNF $\alpha$  converting enzyme inhibitors, T-cell signalling inhibitors such as kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof (e.g. soluble p55 or p75 TNF receptors, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) and antiinflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 and TGF $\beta$ ).

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 28 -

- Preferred examples of therapeutic agents for Crohn's disease in which an antibody or an antigen binding portion can be combined include the following: TNF antagonists, for example, anti-TNF antibodies, D2E7 (PCT Publication No. WO 97/29131), CA2 (Remicade<sup>TM</sup>), CDP 571, TNFR-Ig constructs, (p75TNFRIgG (Enbrel<sup>TM</sup>) and p55TNFRIgG (Lenercept)) inhibitors and PDE4 inhibitors. Antibodies of the invention or antigen binding portions thereof, can be combined with corticosteroids, for example, budesonide and dexamethasone. Antibodies of the invention or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents such as sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid and olsalazine, and agents which interfere with synthesis or action of proinflammatory cytokines such as IL-1, for example, IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitors and IL-1ra. Antibodies of the invention or antigen binding portion thereof may also be used with T cell signaling inhibitors, for example, tyrosine kinase inhibitors 6-mercaptopurines. Antibodies of the invention or antigen binding portions thereof, can be combined with IL-11.
- Non-limiting examples of therapeutic agents for multiple sclerosis with which an antibody, or antibody portion, of the invention can be combined include the following: corticosteroids; prednisolone; methylprednisolone; azathioprine; cyclophosphamide; cyclosporine; methotrexate; 4-aminopyridine; tizanidine; interferon- $\beta$ 1a (Avonex; Biogen); interferon- $\beta$ 1b (Betaseron; Chiron/Berlex); Copolymer 1 (Cop-1; Copaxone; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbaric oxygen; intravenous immunoglobulin; clabribine; antibodies to or antagonists of other human cytokines or growth factors, for example, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, LMAP-11, GM-CSF, EGF, and PDGF. Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 or their ligands. The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents, such as methotrexate, cyclosporine, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signalling

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 29 -

by proinflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  or IL-1 (*e.g.* IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors), IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitors, TACE inhibitors, T-cell signalling inhibitors such as kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof (*e.g.* soluble p55 or p75 TNF receptors, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) and antiinflammatory cytokines (*e.g.* IL-4, IL-10, IL-13 and TGF $\beta$ ).

Preferred examples of therapeutic agents for multiple sclerosis in which the antibody or antigen binding portion thereof can be combined to include interferon- $\beta$ , for example, IFN $\beta$ 1a and IFN $\beta$ 1b; copaxone, corticosteroids, IL-1 inhibitors, TNF inhibitors, and antibodies to CD40 ligand and CD80.

The pharmaceutical compositions of the invention may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody or antibody portion of the invention. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody or antibody portion may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antibody portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 30 -

unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic or prophylactic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

10 An exemplary, non-limiting range for a therapeutically or prophylactically effective amount of an antibody or antibody portion of the invention is 0.1-20 mg/kg, more preferably 1-10 mg/kg. It is to be noted that dosage values may vary with the type and severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to

15 the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that dosage ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed composition.

20 Methods of Making Anti-IL-18 Antibodies

The anti-IL-18 antibodies of the invention are made using any one of a variety of techniques known in the art for preparing antibodies and using antigens comprising the IL-18 peptide epitope described in subsection I, *i.e.*, an epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1).

25 In general, the methods of the invention for making an antibody that binds human interleukin-18 (IL-18) involve:

exposing an antibody repertoire to an antigen comprising an epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), or portion thereof (*e.g.*, SEQ ID NO: 3 or 33); and



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 31 -

selecting from the antibody repertoire an antibody that binds the epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), or portion thereof (*e.g.*, SEQ ID NO: 3 or 33).

- In one embodiment, the antibody repertoire is an *in vivo* repertoire in an animal and the method comprises immunizing the animal with the antigen comprising the epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1). In another embodiment, the antibody repertoire is a recombinant antibody library and the method comprising screening the library with the antigen comprising the epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1).
- 10 Preferably, the library is a human antibody library.

- Methods for immunizing an animal with an antigen to thereby raise specific antibodies to the antigen are well known in the art. An IL-18 antigen comprising an epitope of human IL-18 comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) can be administered to an animal to elicit polyclonal antibodies and specific antibodies that bind the epitope can be isolated by selecting from the polyclonal antibodies those antibodies that bind to the epitope (*e.g.*, by passing the polyclonal antisera over a column that comprises a peptide comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) of hIL-18). The antigen used to elicit the polyclonal antibodies can be intact (*i.e.*, full-length) hIL-18 or can be a portion of hIL-18 that includes the epitope of interest, *e.g.*, a synthetic peptide comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) of hIL-18. Furthermore, monoclonal antibodies to the epitope can be made from the aforementioned animals using standard hybridoma technology and selection for those hybridomas secreting an antibody that specifically binds the epitope of interest, *e.g.*, by screening the hybridomas with a peptide comprising amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) of hIL-18 and selecting for antibodies that bind specifically to the peptide.
- 20
- 25

- In vitro* methods also can be used to make the antibodies of the invention, wherein an antibody library is screened to identify an antibody having the desired binding specificity. Methods for such screening of recombinant antibody libraries are well known in the art and include methods described in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT
- 30

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 32 -

Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.* PCT Publication No. WO 92/20791; Markland *et al.* PCT Publication No. WO 92/15679; Breilling *et al.* PCT Publication No. WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT Publication No. WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *BioTechnology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *BioTechnology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; and Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982, and PCT Publication No. WO 97/29131, the contents of each of which are incorporated herein by reference.

The recombinant antibody library may be from a subject immunized with IL-18, or a portion of IL-18 comprising the epitope of amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1). Alternatively, the recombinant antibody library may be from a naïve subject, *i.e.*, one who has not been immunized with IL-18, such as a human antibody library from a human subject who has not been immunized with human IL-18. Antibodies of the invention are selected by screening the recombinant antibody library with the epitope of amino acids PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) of human IL-18 to thereby select those antibodies that recognize this epitope. Methods for conducting such screening and selection are well known in the art, such as described in the references in the preceding paragraph.

To select antibodies of the invention having a particular binding affinity for hIL-18, the art-known method of surface plasmon resonance can be used. To select antibodies having a particular neutralizing activity for hIL-18, standard methods known in the art for assessing the inhibition of hIL-18 activity may be used. In addition, methods for immunizing mice that have been transgenically altered to encode a human immunoglobulin repertoire thereby enabling the organism to express fully human antibodies in response to an immunogen, are known in the art (see, *e.g.*, U.S.P.N.s 5,877,397 and 6,150,584).

30

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 33 -

Uses of Anti-IL-18 Antibodies

Given their ability to bind to hIL-18, the anti-hIL-18 antibodies, or portions thereof, of the invention can be used to detect hIL-18 (e.g., in a biological sample, such as serum or plasma), using a conventional immunoassay, such as an enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), an radioimmunoassay (RIA) or tissue immunohistochemistry. The invention provides a method for detecting hIL-18 in a biological sample comprising contacting a biological sample with an antibody, or antibody portion, of the invention and detecting either the antibody (or antibody portion) bound to hIL-18 or unbound antibody (or antibody portion), to thereby detect hIL-18 in the biological sample. The antibody is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound antibody. Suitable detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; and examples of suitable radioactive material include  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ , or  $^3\text{H}$ .

Alternative to labeling the antibody, hIL-18 can be assayed in biological fluids by a competition immunoassay utilizing rhIL-18 standards labeled with a detectable substance and an unlabeled anti-hIL-18 antibody. In this assay, the biological sample, the labeled rhIL-18 standards and the anti-hIL-18 antibody are combined and the amount of labeled rhIL-18 standard bound to the unlabeled antibody is determined. The amount of hIL-18 in the biological sample is inversely proportional to the amount of labeled rhIL-18 standard bound to the anti-hIL-18 antibody.

The antibodies and antibody portions of the invention preferably are capable of neutralizing hIL-18 activity both *in vitro* and *in vivo*. Accordingly, such antibodies and antibody portions of the invention can be used to inhibit hIL-18 activity, e.g., in a cell culture containing hIL-18, in human subjects or in other mammalian subjects having IL-

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 34 -

18 with which an antibody of the invention cross-reacts. In one embodiment, the invention provides a method for inhibiting IL-18 activity comprising contacting IL-18 with an antibody or antibody portion of the invention such that IL-18 activity is inhibited. Preferably, the IL-18 is human IL-18. For example, in a cell culture

5 containing, or suspected of containing hIL-18, an antibody or antibody portion of the invention can be added to the culture medium to inhibit hIL-18 activity in the culture.

In another embodiment, the invention provides a method for inhibiting IL-18 activity in a subject suffering from a disorder in which IL-18 activity is detrimental. The invention provides methods for inhibiting IL-18 activity in a subject suffering from such a disorder, which method comprises administering to the subject an antibody or antibody portion of the invention such that IL-18 activity in the subject is inhibited. Preferably, the IL-18 is human IL-18 and the subject is a human subject. Alternatively, the subject can be a mammal expressing an IL-18 with which an antibody of the invention cross-reacts. Still further the subject can be a mammal into which has been introduced hIL-18 (e.g., by administration of hIL-18 or by expression of an hIL-18 transgene). An antibody of the invention can be administered to a human subject for therapeutic purposes. Moreover, an antibody of the invention can be administered to a non-human mammal expressing an IL-18 with which the antibody cross-reacts for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (e.g., testing of dosages and time courses of administration).

In particular, one animal model for modulating IL-18 activity in an animal uses NOD-SCID mice which are transplanted with human peripheral blood mononuclear cells. Then, two to four weeks after engraftment (as measured by human IgG titers in serum) the mice are injected with LPS (lipopolysaccharide). Four to six hours later LPS-induced human interferon-gamma serum titers are determined. The efficacy (potency) of anti-IL-18 antibodies (e.g., IL-18 neutralizing antibodies) is determined by injecting the antibodies (ip) one day prior to LPS challenge followed by monitoring the test animals for a reduction in interferon-gamma serum titers (a function of IL-18 *in vivo* activity) as compared to controls (see, e.g., Holmes et al., Hybridoma, 19:363367 (2000)).

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 35 -

As used herein, the term "a disorder in which IL-18 activity is detrimental" is intended to include diseases and other disorders in which the presence of IL-18 in a subject suffering from the disorder has been shown to be, or is suspected of being, either responsible for the pathophysiology of the disorder or a factor that contributes to a worsening of the disorder. Accordingly, a disorder in which IL-18 activity is detrimental is a disorder in which inhibition of IL-18 activity is expected to alleviate the symptoms and/or progression of the disorder. Such disorders may be evidenced, for example, by an increase in the concentration of IL-18 in a biological fluid of a subject suffering from the disorder (e.g., an increase in the concentration of IL-18 in serum, plasma, synovial fluid, etc. of the subject), which can be detected, for example, using an anti-IL-18 antibody as described above.

Non-limiting examples of disorders that can be treated with the antibodies of the invention include those disorders discussed in the section above pertaining to pharmaceutical compositions of the antibodies of the invention.

Other features of the invention will be apparent from the following examples which should not be construed as limiting.

#### EXEMPLIFICATION

In general, the practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of chemistry, molecular biology, recombinant DNA technology, PCR technology, immunology (especially, e.g., antibody technology), and any necessary cell culture or animal husbandry techniques, which are within the skill of the art and are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *DNA Cloning*, Vols. 1 and 2, (D.N. Glover, Ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, Ed. 1984); *PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, Ed. John Wiley & Sons (1999) (Editor); *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, Neidle, Ed., Oxford Univ Press (1999); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.*, Academic Press (1990); *PCR Essential Techniques: Essential Techniques*, Burke, Ed., John Wiley & Son Ltd (1996); *The PCR Technique: RT-PCR*, Siebert, Ed., Eaton Pub. Co. (1998); *Quantitative PCR Protocols*, Kochanowski *et al.*,

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 36 -

Eds., Humana Press (1999); *Clinical Applications of PCR*, Lo, Ed., Humana Press (1998); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Ir Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992); *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*, Lubiniecki, A., Ed., Marcel Dekker, Pub., (1990); and *Manipulating the Mouse Embryo*, Hogan et al., C.S.H.L. Press, Pub (1994).

Throughout the examples, unless otherwise indicated, the above materials and methods were used.

#### EXAMPLE 1

##### ISOLATION OF ANTI-IL-18 ANTIBODIES

Antibodies to hIL-18 were isolated by screening separate scFv phage display libraries prepared using human VL and VH cDNAs from mRNA derived from human B cells (e.g., tonsils and spleen). Construction of the library and methods for selection are described in Vaughan et al. (1996) *Nature Biotech.* 14: 309-314.

The libraries were screened using either full length human IL-18 (SEQ ID NO: 61), a peptide epitope of IL-18 (SEQ ID NOS: 1-3), or a panel of overlapping 15 amino acid peptides representing IL-18 (the epitope sequence of which is presented in Table 5; SEQ ID NOS: 31-60). IL-18 specific antibodies were selected by coating the antigen onto immunotubes using standard procedures (Marks et al., (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597). The scFv libraries were screened using either IL-18, a peptide epitope of IL-18, or an IL-18 peptide panel to generate a significant number of IL-18 specific binders. Several different clonotypes were selected, determined by restriction enzyme digestion patterns, and confirmed by DNA sequencing.

In order to identify IL-18 antibodies which preferentially bind either full length IL-18 or a representative peptide thereof, the supernatant containing scFv was titrated on biotin-captured IL-18 in an ELISA and binding characteristics were determined.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 37 -

Two anti-IL-18 single chain antibodies were obtained, one termed 2E1, independently isolated using a peptide epitope and the peptide panel, and a second anti-IL-18 antibody termed LT28, isolated using full length IL-18. These parent anti-IL-18 antibodies were selected for further study and modification.

5

**EXAMPLE 2****AFFINITY MATURATION OF AN ANTI-18 ANTIBODIES**

A single chain Fv version of antibody 2E1 having an identified IL-18 binding activity and the heavy chain and light chain sequence shown in Table 6 was further  
10 modified for improved neutralization of IL-18 activity.

**Table 6. Sequence of Single-Chain Anti-IL-18 Antibody 2E1**

<b>2E1 Heavy Chain</b> (SEQ ID NO: 18)	
<b>CDR1</b> (SEQ ID NO: 9) QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSCKTSGYTF <b>TCGYTH</b> WVRQAHGQGFEWI	
<b>CDR2</b> (SEQ ID NO: 10) <b>GRINPTTGDANFAEKFK</b> GRVALTRDTSISTAYLQDLSKSDDTAVYYCAG <b>KEGAWGQG</b> TLVTVSS	<b>CDR3</b> (SEQ ID NO: 11) <b>KEGAWGQG</b>

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 38 -

**Table 6. Sequence of Single-Chain Anti-IL-18 Antibody 2E1 (Continued)**

2E1 Light Chain (SEQ ID NO: 19)	
CDR1 (SEQ ID NO: 12)	CDR2 (SEQ ID NO: 13)
SSELTQDPAVSVALGQTVRITP <u>QGDSLRLHFYPN</u> WYQQKPGQAPFLVIY <u>GKNNRFS</u>	
CDR3 (SEQ ID NO: 14)	
GIPDRFSGSGSGNTGSLTITGAQAEDEADYYC <u>GRDSSGIHVVF</u> GGGTKVTVLG	

The anti-IL-18 antibody 2E1 was independently selected using an IL-18 peptide  
 5 and sequential, overlapping, peptide panel representative of IL-18 (see Table 6).

The specific amino acid residues of the heavy chain variable region selected for  
 mutagenesis are summarized in Table 7. In particular, with respect to the heavy chain  
 region, individual amino acid substitutions were tested at positions H30, H31, H32, H33,  
 and H35 of CDR1, positions H52, H52a, H53, H54, H56, and H58 of CDR2, and H95,  
 10 H96, H97, and H98 of CDR3.

With regards to light chain amino acid residues selected for mutagenesis,  
 individual amino acid substitutions were tested at positions L30, L31, L32, and L34 of  
 CDR1, positions L50, L52, L53, and L55 of CDR2 and positions L89, L90, L91, L92,  
 L93, L94, L95, L95a, L95b, L96, and L97 of CDR 3.



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 39 -

Table 7. Heavy Chain Amino Acid Substitutions Introduced Into 2E1

Heavy Chain Mutations	
CDR / Kabat Position	substituted residue
<b>CDR1</b>	
H30	A, R, N, D, C, G, H, I, F, P, S, or V
H31	A, C, H, S, T, or Y
H32	R, N, C, H, P, S, or T
H33	N, D, C, Q, H, L, M, F, S, or V
H35	N, D, L, or F
<b>CDR2</b>	
H52	I
H52a	R, Q, L, S, T, or W
H53	A, R, N, L, P, S, or Y
H54	A, R, N, D, Q, L, K, M, P, S, or Y
H56	A, R, N, C, G, H, I, L, or F
H58	A, R, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y, P, S, T, W, Y, or V
<b>CDR3</b>	
H95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H96	A, R, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H98	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C

Table 8. Light Chain Amino Acid Substitutions Introduced Into 2E1

5

Light Chain Mutations	
CDR / Kabat Position	substituted residue
<b>CDR1</b>	

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 40 -

L30	N, D, C, G, I, L, S, W, or Y
L31	R, N, D, C, G, H, I, L, P, S, T, or Y
L32	R, N, D, E, G, I, L, P, S, T, or V
L34	A, R, N, D, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, or V
<b>CDR2</b>	
L50	A, N, I, L, F, P, S, W, Y, or V
L52	A, R, D, E, H, I, L, M, F, P, S, T, or V
L53	A, R, C, I, L, K, M, P, S, or T
L55	A, R, N, D, C, G, H, I, L, S, T, or Y
<b>CDR3</b>	
L89	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L90	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, or C
L91	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L92	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L93	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, or C
L94	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, or C
L95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L95a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L95b	A, R, E, Q, S, Y, V, P, W, or C
L96	A, R, E, Q, S, Y, H, P, W, or C
L97	A, R, E, Q, S, Y, H, P, W, or C

Substitutions were introduced using standard techniques (*e.g.*, as described in Taylor et al., *Nucleic Acids Res.* 13: 8764-8758 (1985); Nakamaye et al., *Nucleic Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); and Olsen et al., *Methods in Enzymology*, 217: 189 (1993)).

- 5 In brief, oligonucleotides degenerate for a given codon were synthesized for each of the positions to be mutagenized. A single-stranded DNA template was prepared from the original plasmid containing a single-chain Fv version of the antibody 2E1 gene. The nucleic acid sequence of the parent 2E1 antibody heavy and light chain is provided in SEQ ID NOS: 62 and 64. The mutant oligonucleotides were then used to create a

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 41 -

complementary DNA strand and eventually a double-stranded plasmid, thus incorporating the degeneracy or the different mutations in a given codon of the antibody. In particular, the CDR3 region of the heavy and light chain of 2E1 was altered using the QuikChange Kit (Stratagene) according to the manufactures instruction.

- 5 A representative number of clones were then sequenced from each mutagenesis reaction (*i.e.*, 7 to 36 clones) and those representing a change from the parent 2E1 single chain antibody sequence were expressed in bacteria and purified for further *in vitro* and *in vivo* testing as described infra.

- 10 In another screen using a full length IL-18 ligand, a second anti-IL-18 antibody was identified and selected for further improvement using affinity maturation. In particular, using the techniques described above, the LT28 antibody having the heavy chain and light chain sequence shown in Table 9 (and nucleic sequence provided in SEQ ID NOS: 66 and 68) was further modified.

15 **Table 9. Sequence of Single-Chain Anti-IL-18 Antibody LT28**

LT28 Heavy Chain	
(SEQ ID NO: 28)	
CDR1 (SEQ ID NO: 20) CDR2 (SEQ ID NO: 21)	
LVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYAMSN</u> VRQAPGKGLEWVSA <u>ISGSGGSTIYADSVKG</u>	
CDR3 (SEQ ID NO: 22)	
RFTISRDNKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DDDDYDFDY</u> WGRTMTVTSS	

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 42 -

**Table 9. Sequence of Single-Chain Anti-IL-18 Antibody LT28 (Continued)**

<b>LT28 Light Chain</b>	
(SEQ ID NO: 29)	
<b>CDR1</b> (SEQ ID NO: 23)	<b>CDR2</b> (SEQ ID NO: 24)
QSVLTQPPFSASGTFGQRVTISC <u>SGSSSNIGINAVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>GNDQRP</u> S	
<b>CDR3</b> (SEQ ID NO: 25)	
GVPDFRFGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCA <u>AWDDSLSGPV</u> FGGGTKLTVLG	

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 43 -

With respect to the heavy chain region, amino acid substitutions were introduced at positions H31, H32, H33, and H35 of CDR1, positions H50, H51, H52, H52a, H53, H54, H56, and H58 of CDR2, and H95, H96, H97, H98, H99, H100, H100a, H101, and H102 of CDR3.

- 5 With regards to light chain residues selected for mutation, amino acid substitutions were introduced at positions L30, L31, L32, L34 of CDR1, positions L50, L52, L53, L55 of CDR2 and positions L89, L90, L91, L92, L93, L94, L95, L95a, L95b, L96, L97.

10 **Table 10. Heavy Chain Amino Acid Substitutions Introduced into LT28**

Heavy Chain Mutations	
CDR / Kabat Position	substituted residue
<b>CDR1</b>	
H31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H32	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H33	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H35	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
<b>CDR2</b>	
H50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H51	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H52	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H52a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H53	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H54	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H56	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H58	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
<b>CDR3</b>	
H95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 44 -

H96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H98	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H99	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H100	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H100a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H101	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H102	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 45 -

Table 11. Light Chain Amino Acid Substitutions Introduced into LT28

Light Chain Mutations	
CDR / Position	substituted residue
<b>CDR1</b>	
L30	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L32	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C, G
L34	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
<b>CDR2</b>	
L50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, C
L52	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C
L53	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C, N
L55	A, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
<b>CDR3</b>	
L89	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L90	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L91	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L92	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L93	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L94	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95b	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C

Substitutions were introduced as described above. A representative number of  
5 clones were then sequenced from each mutagenesis reaction and those representing a

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 46 -

change from the parent LT28 single chain antibody sequence were expressed in bacteria and purified for further testing as described below.

### EXAMPLE 3

#### 5 BINDING ACTIVITY OF HUMAN ANTIBODIES TO IL-18

Real-time binding interactions between ligand (biotinylated recombinant human IL-18 (rhIL-18) immobilized on a biosensor matrix) and analyte (antibodies in solution) were measured by surface plasmon resonance (SPR) using the BIAcore system (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). The system utilizes the optical properties of SPR to detect alterations in protein concentrations within a dextran biosensor matrix. Proteins are covalently bound to the dextran matrix at known concentrations. Antibodies are injected through the dextran matrix and specific binding between injected antibodies and immobilized ligand results in an increased matrix protein concentration and resultant change in the SPR signal. These changes in SPR signal are recorded as resonance units (RU) and are displayed with respect to time along the y-axis of a sensorgram.

To facilitate immobilization of biotinylated rhIL-18 on the biosensor matrix, streptavidin is covalently linked via free amine groups to the dextran matrix by first activating carboxyl groups on the matrix with 100 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) and 400 mM N-ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). Next, streptavidin is injected across the activated matrix. Thirty-five microliters of streptavidin (25 µg/ml), diluted in sodium acetate, pH 4.5, is injected across the activated biosensor and free amines on the protein are bound directly to the activated carboxyl groups. Unreacted matrix EDC-esters are deactivated by an injection of 1 M ethanolamine. Streptavidin-coupled biosensor chips also are commercially available (Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ).

Biotinylated rhIL-18 was prepared by first dissolving 5.0 mg of biotin (D-biotinyl-L-aminocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester; Boehringer Mannheim Cat. No. 1008 960) in 500 µl dimethylsulfoxide to make a 10 mg/ml solution. Ten microliters of biotin was added per ml of rhIL-18 (at 2.65 mg/ml) for a 2:1 molar ratio of



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 47 -

biotin to rhIL-18. The reaction was mixed gently and incubated for two hours at room temperature in the dark. A PD-10 column, Sephadex G-25M (Pharmacia Catalog No. 17-0851-01) was equilibrated with 25 ml of cold PBS and loaded with 2 ml of rhIL-18-biotin per column. The column was eluted with 10 x 1 ml cold PBS. Fractions were  
 5 collected and read at OD280 (1.0 OD = 1.25 mg/ml). The appropriate fractions were pooled and stored at -80° C until use.

Biotinylated rhIL-18 to be immobilized on the matrix via streptavidin was diluted in PBS running buffer (Gibco Cat. No. 14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 0.05% (BIAcore) surfactant P20 (Pharmacia BR-1000-54,  
 10 Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). To determine the capacity of rhIL-18-specific antibodies to bind immobilized rhIL-18, a binding assay was conducted as follows. Aliquots of biotinylated rhIL-18 (25 nM; 10 µl aliquots) were injected through the streptavidin-coupled dextran matrix at a flow rate of 5 µl/min. Before injection of the protein and immediately afterward, PBS buffer alone flowed through each flow cell.  
 15 The net difference in signal between baseline and approximately 30 sec. after completion of biotinylated rhIL-18 injection was taken to represent the binding value. Direct rhIL-18-specific antibody binding to immobilized biotinylated rhIL-18 was measured. Antibodies (20 µg/ml) were diluted in PBS running buffer and 25 µl aliquots were injected through the immobilized protein matrices at a flow rate of 5 µl/min. Prior  
 20 to injection of antibody, and immediately afterwards, PBS buffer alone flowed through each flow cell. The net difference in baseline signal and signal after completion of antibody injection was taken to represent the binding value of the particular sample. Biosensor matrices were regenerated using 100 mM HCl before injection of the next sample. To determine the off rate ( $K_{off}$ ), on rate ( $K_{on}$ ), association rate ( $K_a$ ) and  
 25 dissociation rate ( $K_d$ ) constants, BIAcore kinetic evaluation software (version 2.1) was used.

Representative results of improved candidate anti-IL-18 antibodies binding to biotinylated rhIL-18, as compared to the parent antibodies 2E1 and LT28 (and murine controls), are shown below in Table 12. For comparison, IC50 values from the cell-  
 30 based neutralization assay are also included and these are described in Example 4. All

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 48 -

clones were prepared as single-chain Fv antibodies for testing using Biacore analysis and the cell-based assay described below. Parental clones listed comprise an unmutated parental heavy and light chain, whereas single chain mutants contain one parental chain and one mutated chain where the mutated chain is indicated as being either heavy (H) or light (L) followed by the Kabat position and nature of the amino acid substitution.

Table 12. Binding of Anti-IL-18 Antibodies Derived From 2E1 and LT28

Antibody Clone	On-rates (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Off-rates (s <sup>-1</sup> )	Kd (M)	IC50 Value*
<b>2E1 parent and mutants</b>				
2E1 (parent) ScFv	2.6E+3	6.42E-03	1.5E-07	3.3E-8M
2E1 (parent) IgG				9.0E-10M
L34S		1.69E-04		1.5E-8M
H53R		2.34E-03		2.5E-8M
H53Y		-		1.5E-8M
H58Q		-		1.6E-8M
L34S + H53R (2E1RS)	2.7E+03	6.82E-05	2.3E-08	3.0E-09M
L34S + H58Q		-		1.5E-8M
L34S + H53Y		5.28E-05		6.7E-9M
H53R + H58Q		-		1.2E-8M
H53Y + H58Q		-		1.2E-8M
L34S + H53R + H58Q		6.18E-05		2.8E-9M
L34S + H53Y + H58Q		-		8.0E-9M
L90C				4x
L93C				2-4x

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 49 -

L94P, Q, or R				2-4x
L95R, Y				3-8x
L95bE, W				2-4x
LT28 parent and mutants				
LT28 (parent)	1.3E+04	4.8E-04	3.9E-08	9.0E-8M
H54Q				2-3x
H58W				2-3x
1				
125-2H	1.7E+05	1.1E-04	6.2E-10	2.E-10M
318-M	1.2E+04	1.1E-04	9.6E-09	4.0E-9M

\* Some values presented as fold improvement compared to the parent.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 50 -

**EXAMPLE 4****NEUTRALIZING ACTIVITY OF ANTI-IL-18 ANTIBODIES**

To examine the neutralizing activity of the anti-human IL-18 antibodies of the invention, an art recognized assay for monitoring IL-18 activity was used.

5 Briefly, the assay employs KG1 cells (ATCC #CCL-246, myelogenous leukemia bone marrow cells) which were cultured according to standard techniques (*e.g.*, using RPMI 1640 Culture Medium Gibco #21870-076; (supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (BioWhittaker #14-501F); 2mM L-glutamine (Gibco #25030-081); 50units/ml Penicillin, 50ug/ml Streptomycin (Gibco #15070-063); and .075% Sodium Bicarbonate).

10 To test for IL-18 neutralization, 3 x 10<sup>5</sup> KG-1 cells stimulated with 20ng/ml hTNF-alpha (Lot# 19130132) was incubated with 50ul of anti-IL-18 antibody (4 x Conc.) and 50ul of IL-18 (4xConc.=8ng/ml) and incubated for 37°C for 1hr or 16-20 hrs. To determine the amount of IL-18 neutralization that occurred as a function of induced hIFN-gamma production, an ELISA was performed using commercially available Elisa  
15 Kits (R & D #DIF00/Endogen #EH-IFNG), according to the manufacturers instructions, and hIFN-gamma production was calculated (pg/ml) off a standard curve.

In all, four mutant antibodies, *i.e.*, the 2E1 derived L34S, H53R, H53Y, and H58Q, were shown to have greater IL-18 neutralization potency than the parent 2E1 antibody (see Table 12). The improvements in IC50 values using the KG-1 assay were  
20 in the range of 2 to 5 fold, and similar improved binding results were determined using BIAcore analysis.

Various mutation combination clones were also prepared and tested, and this data is summarized in the Table 12. The best combination clone L34S-H53R showed a greater than ten fold improvement over the parent antibody 2E1 in both the KG-1 cell-  
25 based assay and using the BIAcore analysis. The resulting antibody was designated the name of 2E1RS.

Several other mutant clones of 2E1 showed an improvement in potency, *i.e.*, IL-18 neutralization, as determined using the KG-1 assay. The mutant L95Y offered 5 to 8 fold better IC50 values than the parent 2E1 antibody. Several other mutants offered a 2  
30 to 3 fold improvement and they are 2E1 mutants H96A, H96Q, H96S, H98S, L90C,

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 51 -

L90W, L93C, L94P, L94Q, L94R, L94W, L95R, L95aA, L95aH, L95aP, L95aR, L95aW, L95bE, L95bW, L95bY, L97C, and L97E.

The binding of 2E1 in the form of an ScFv antibody or IgG antibody was also compared (see Fig. 5).

5        Still further, two mutants derived from the LT28 parent should improved IL-18 neutralization activity compared to the parent antibody.

These results demonstrate that fully human IL-18 neutralizing antibodies can be obtained using the methods and compositions of the invention.

10

#### EQUIVALENTS

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 52 -

What is claimed:

1. A compound capable of binding a human IL-18 amino acid sequence, or portion thereof, wherein said amino acid comprises a sequence selected from the group  
5 consisting of SEQ ID NO: 67 and SEQ ID NO: 68.
2. The compound of claim 1, wherein said compound is selected from the group consisting of a small molecule, peptide, polypeptide, antibody, and antibody fragment.  
10
3. The compound of claim 2, wherein said antibody, or antibody fragment, is fully human.
4. A human monoclonal antibody, or antigen-binding portion thereof,  
15 capable of binding to human IL-18.
5. The antibody of claim 4, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $0.1s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with  
20 an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-6}M$  or less.
6. The antibody of claim 4, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-2}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with  
25 an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-7}M$  or less.
7. The antibody of claim 4, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-3}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with  
30 an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-8}M$  or less.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 53 -

8. The antibody of claim 4, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-4} s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-9} M$  or less.
- 5
9. The antibody of claim 4, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-10} M$  or less.
- 10
10. The antibody of claim 4, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-6} s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-11} M$  or less.
- 15
11. An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, that binds an epitope of human IL-18, or portion thereof, comprising an amino acid sequence selected from the group comprising SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 33.
- 20
12. The antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 11, wherein the antibody is a neutralizing antibody.
13. The antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 11, which is a human antibody.
- 25
14. The antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 11, which is a recombinant antibody.
15. The antibody, or antigen-binding portion thereof, of claim 11, which is a
- 30 monoclonal antibody.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 54 -

16. An isolated antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds to an epitope of human IL-18, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $0.1s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-6}M$  or less.

17. The isolated antibody of claim 16, or an antigen-binding portion thereof, which dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-2}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-7}M$  or less.

18. The isolated antibody of claim 16, or an antigen-binding portion thereof, which dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-3}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-8}M$  or less.

19. The isolated antibody of claim 16, or an antigen-binding portion thereof, which dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-4}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-9}M$  or less.

20. The isolated antibody of claim 16, or an antigen-binding portion thereof, which dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-5}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-10}M$  or less.

21. The isolated antibody of claim 16, or an antigen-binding portion thereof, which dissociates from human IL-18 with a  $k_{off}$  rate constant of  $1 \times 10^{-6}s^{-1}$  or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an  $IC_{50}$  of  $1 \times 10^{-11}M$  or less.



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 55 -

22. An isolated human antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising at least one variable region CDR domain capable of binding an epitope of human IL-18.
- 5 23. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 22, wherein said antibody, or an antigen-binding portion thereof, contains at least one amino acid substitution or insertion that improves IL-18 binding as compared to the unmodified antibody or antigen-binding portion thereof.
- 10 24. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 22, wherein said antibody, or an antigen-binding portion thereof, contains at least one amino acid substitution or insertion that improves neutralization of IL-18 as compared to the unmodified antibody or antigen-binding portion thereof.
- 15 25. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 22, wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:
- a heavy chain CDR1 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 9, or sequence modified from SEQ ID NO: 9 by at least one amino acid substitution;
  - 20 a heavy chain CDR2 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, or sequence modified from SEQ ID NO: 10 by at least one amino acid substitution; and
  - a heavy chain CDR3 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 11, or sequence modified from SEQ ID NO: 11 by at least one amino acid substitution.
- 25 26. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 25, wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:
- a heavy chain CDR1 domain modified from SEQ ID NO: 9 by at least one amino acid substitution at position H30, H31, H32, H33, or H35;
  - 30 a heavy chain CDR2 domain modified from SEQ ID NO: 10 by at least one amino acid substitution at position H52, H52a, H53, H54, H56, or H58; and

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 56 -

a heavy chain CDR3 domain modified from SEQ ID NO: 11 by at least one amino acid substitution at position H95, H96, H97, or H98.

27. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 22,  
5 wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:

a light chain CDR1 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 ,  
or sequence modified from SEQ ID NO: 12 by at least one amino acid substitution;

a light chain CDR2 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 ,  
10 or sequence modified from SEQ ID NO: 13 by at least one amino acid substitution; and

a light chain CDR3 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 ,  
or sequence modified from SEQ ID NO: 14 by at least one amino acid substitution.

28. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 27,  
15 wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:

a light chain CDR1 domain modified from SEQ ID NO: 12 by at least one amino  
acid substitution at position L30, L31, L32, or L34;

a light chain CDR2 domain modified from SEQ ID NO: 13 by at least one amino  
20 acid substitution at position L50, L52, L53, or L55; and

a light chain CDR3 domain modified from SEQ ID NO: 14 by at least one amino  
acid substitution at position L89, L90, L91, L92, L93, L94, L95, L95a, L95b, L96, or  
L97.

25 29. An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a variable  
region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID  
NO: 15, 16, and 17.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 57 -

30. An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a light chain variable region (LCVR) comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 and a heavy chain variable region (HCVR) comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.

5

31. An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a light chain variable region (LCVR) having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 and a heavy chain variable region (HCVR) having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17.

10

32. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 22, wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:

a heavy chain CDR1 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 20, or sequence modified from SEQ ID NO: 20 by at least one amino acid substitution; a heavy chain CDR2 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 21, or sequence modified from SEQ ID NO: 21 by at least one amino acid substitution; and a heavy chain CDR3 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 22, or sequence modified from SEQ ID NO: 22 by at least one amino acid substitution.

20

33. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 32, wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:

a heavy chain CDR1 domain modified from SEQ ID NO: 20 by at least one amino acid substitution at position H30, H31, H32, H33, or H35; a heavy chain CDR2 domain modified from SEQ ID NO: 21 by at least one amino acid substitution at position H50, H51, H52, H52a, H53, H54, H56, or H58; and a heavy chain CDR3 domain modified from SEQ ID NO: 22 by at least one amino acid substitution at position H96, H96, H97, H98, H99, H100, H100a, H101, or H102.

30

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 58 -

34. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 32, wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:

- a light chain CDR1 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 23 ,  
5 or sequence modified from SEQ ID NO: 23 by at least one amino acid substitution at position ;
- a light chain CDR2 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 24 ,  
or sequence modified from SEQ ID NO: 24 by at least one amino acid substitution; and
- a light chain CDR3 domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 25,  
10 or sequence modified from SEQ ID NO: 25 by at least one amino acid substitution.

35. The isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, of claim 34, wherein said variable region comprises a CDR domain selected from the group consisting of:

- 15 a light chain CDR1 domain modified from SEQ ID NO: 23 by at least one amino acid substitution at position L30, L31, L32, or L34;
- a light chain CDR2 domain modified from SEQ ID NO: 24 by at least one amino acid substitution at position L50, L52, L53, or L55; and
- a light chain CDR3 domain modified from SEQ ID NO: 25 by at least one amino acid  
20 substitution at position L89, L90, L91, L92, L93, L94, L95, L95a, L95b, L96, or L97.

36. An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a variable region comprising an amino acid selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, 27, and 29.

25

37. An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a light chain variable region (LCVR) comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 and a heavy chain variable region (HCVR) comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26.

30

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 59 -

38. An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a light chain variable region (LCVR) having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 and a heavy chain variable region (HCVR) having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 27.

5

39. An isolated nucleic acid encoding an antibody CDR amino acid sequence of any one of claims 4-38.

40. The isolated nucleic acid of claim 39, which is in a recombinant expression vector.

10

41. A host cell into which the recombinant expression vector of claim 40 has been introduced.

42. A method of synthesizing an antibody that binds human IL-18, comprising culturing the host cell of claim 41 in a culture medium until an antibody that binds human IL-18 is synthesized by the cell.

15

43. The method of claim 42, wherein said antibody is human.

20

44. A pharmaceutical composition comprising the antibody, or antigen-binding portion thereof, of any of claims 4-38, and a pharmaceutically acceptable carrier.

45. The pharmaceutical composition of claim 44 which further comprises at least one additional therapeutic agent for treating a disorder in which IL-18 activity is detrimental.

25

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 60 -

46. The pharmaceutical composition of claim 45, wherein said additional agent is selected from the group consisting of an antibody, or fragment thereof, capable of binding human IL-12, methotrexate anti-TNF, corticosteroids, cyclosporin, rapamycin, FK506, and non-steroidal anti-inflammatory agents.

5

47. A method of making an antibody that binds human interleukin-18 (IL-18), comprising:

exposing an antibody repertoire to an antigen comprising an epitope of human IL-18 or portion thereof; and

10 selecting from the antibody repertoire an antibody that binds the epitope of human IL-18, or portion thereof.

48. The method of claim 47, wherein the antibody repertoire is an *in vivo* repertoire in an animal and the method comprises immunizing the animal with the  
15 antigen comprising an epitope of human IL-18 or portion thereof.

49. The method of claim 46 or 47, wherein said epitope comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 3 and 33.

20 50. The method of claim 47, wherein said *in vivo* repertoire is a fully human immunoglobulin repertoire integrated into the genome of the animal.

51. The method of claim 47, wherein the antibody repertoire is a recombinant antibody library and the method comprises screening the library with an antigen  
25 comprising the epitope of human IL-18 or portion thereof.

52. The method of claim 47, wherein the library is a human antibody library.

53. A method for inhibiting human IL-18 activity comprising contacting  
30 human IL-18 with the compound of claim 1 such that human IL-18 activity is inhibited.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 61 -

54. A method for inhibiting human IL-18 activity comprising contacting human IL-18 with the antibody, or antigen-binding portion thereof, of any of claims 4-38 such that human IL-18 activity is inhibited.
- 5 55. A method for inhibiting human IL-18 activity in a human subject suffering from a disorder in which IL-18 activity is detrimental, comprising administering to the human subject the compound of claim 1 such that human IL-18 activity in the human subject is inhibited.
- 10 56. A method for inhibiting human IL-18 activity in a human subject suffering from a disorder in which IL-18 activity is detrimental, comprising administering to the human subject the antibody, or antigen-binding portion thereof, of any of claims 4-38 such that human IL-18 activity in the human subject is inhibited.
- 15 57. A method for treating a human subject suffering from a disorder in which IL-18 activity is detrimental by administering a compound according to claim 1 such that treatment is achieved.
58. A method for treating a human subject suffering from a disorder in which
- 20 IL-18 activity is detrimental by administering an antibody according to any one of claims 4-38 such that treatment is achieved.
59. The method of claim 57 or 58, wherein said disorder is selected from the group comprising rheumatoid arthritis, osteoarthritis, juvenile chronic arthritis, Lyme
- 25 arthritis, psoriatic arthritis, reactive arthritis, spondyloarthropathy, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, insulin dependent diabetes mellitus, thyroiditis, asthma, allergic diseases, psoriasis, dermatitis scleroderma, graft versus host disease, organ transplant rejection, acute or chronic immune disease associated with organ transplantation, sarcoidosis, atherosclerosis,
- 30 disseminated intravascular coagulation, Kawasaki's disease, Grave's disease, nephrotic syndrome, chronic fatigue syndrome, Wegener's granulomatosis, Henoch-Schoenlein

WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 62 -

- purpura, microscopic vasculitis of the kidneys, chronic active hepatitis, uveitis, septic shock, toxic shock syndrome, sepsis syndrome, cachexia, infectious diseases, parasitic diseases, acquired immunodeficiency syndrome, acute transverse myelitis, Huntington's chorea, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, stroke, primary biliary cirrhosis,
- 5 hemolytic anemia, malignancies, heart failure, myocardial infarction, Addison's disease, sporadic, polyglandular deficiency type I and polyglandular deficiency type II, Schmidt's syndrome, adult (acute) respiratory distress syndrome, alopecia, alopecia areata, seronegative arthropathy, arthropathy, Reiter's disease, psoriatic arthropathy, ulcerative colitic arthropathy, enteropathic synovitis, chlamydia, yersinia and salmonella
- 10 associated arthropathy, spondyloarthropathy, atheromatous disease/arteriosclerosis, atopic allergy, autoimmune bullous disease, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, pemphigoid, linear IgA disease, autoimmune haemolytic anaemia, Coombs positive haemolytic anaemia, acquired pernicious anaemia, juvenile pernicious anaemia, myalgic encephalitis/Royal Free Disease, chronic mucocutaneous candidiasis, giant cell arteritis,
- 15 primary sclerosing hepatitis, cryptogenic autoimmune hepatitis, Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome, Acquired Immunodeficiency Related Diseases, Hepatitis C, common varied immunodeficiency (common variable hypogammaglobulinemia), dilated cardiomyopathy, female infertility, ovarian failure, premature ovarian failure, fibrotic lung disease, cryptogenic fibrosing alveolitis, post-
- 20 inflammatory interstitial lung disease, interstitial pneumonitis, connective tissue disease associated interstitial lung disease, mixed connective tissue disease associated lung disease, systemic sclerosis associated interstitial lung disease, rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease, systemic lupus erythematosus associated lung disease, dermatomyositis/polymyositis associated lung disease, Sjögren's disease
- 25 associated lung disease, ankylosing spondylitis associated lung disease, vasculitic diffuse lung disease, haemosiderosis associated lung disease, drug-induced interstitial lung disease, radiation fibrosis, bronchiolitis obliterans, chronic eosinophilic pneumonia, lymphocytic infiltrative lung disease, postinfectious interstitial lung disease, gouty arthritis, autoimmune hepatitis, type-1 autoimmune hepatitis (classical autoimmune or
- 30 lupoid hepatitis), type-2 autoimmune hepatitis (anti-LKM antibody hepatitis), autoimmune mediated hypoglycaemia, type B insulin resistance with acanthosis



WO 01/58956

PCT/US01/04170

- 63 -

- nigricans, hypoparathyroidism, acute immune disease associated with organ transplantation, chronic immune disease associated with organ transplantation, osteoarthritis, primary sclerosing cholangitis, psoriasis type 1, psoriasis type 2, idiopathic leucopaenia, autoimmune neutropaenia, renal disease NOS,
- 5 glomerulonephritides, microscopic vasculitis of the kidneys, Lyme disease, discoid lupus erythematosus, male infertility idiopathic or NOS, sperm autoimmunity, multiple sclerosis (all subtypes), sympathetic ophthalmia, pulmonary hypertension secondary to connective tissue disease, Goodpasture's syndrome, pulmonary manifestation of polyarteritis nodosa, acute rheumatic fever, rheumatoid spondylitis, Still's disease,
- 10 systemic sclerosis, Sjögren's syndrome, Takayasu's disease/arteritis, autoimmune thrombocytopaenia, idiopathic thrombocytopaenia, autoimmune thyroid disease, hyperthyroidism, goitrous autoimmune hypothyroidism (Hashimoto's disease), atrophic autoimmune hypothyroidism, primary myxoedema, phacogenic uveitis, primary vasculitis, vitiligo, acute liver disease, chronic liver diseases, allergy and asthma, mental
- 15 disorders (e.g., depression and schizophrenia) and Th2 Type and Th1 Type mediated diseases.

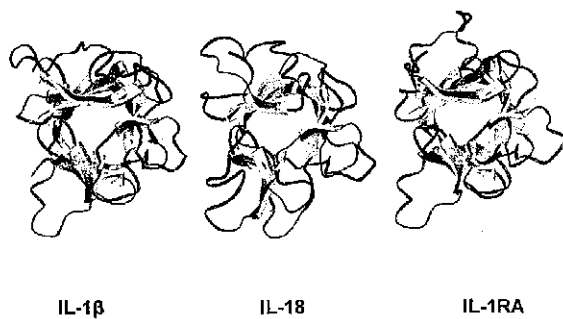
60. A method of treating a patient suffering from a disorder in which IL-18 is detrimental comprising the step of administering an anti-IL-18 antibody, before,
- 20 concurrent, or after the administration of a second agent, wherein the second agent is selected from the group consisting of an anti-IL-12 antibody or antigen binding fragment thereof, methotrexate, anti-TNF antibody or antigen binding fragment thereof, corticosteroids, cyclosporin, rapamycin, FK506, and non-steroidal anti-inflammatory agents.

WO 01/58956

PCT/US01/04170

1/5

Fig. 1

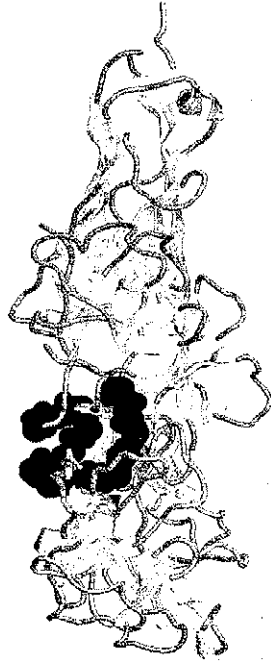


WO 01/58956

PCT/US01/04170

2/5

Fig. 2

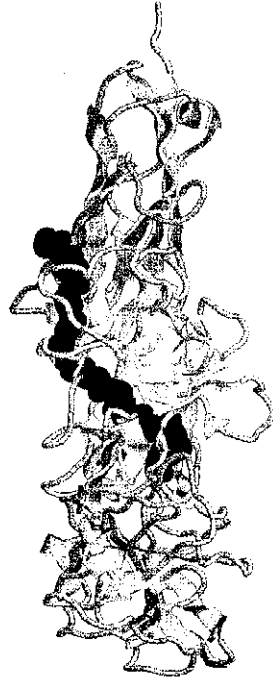


WO 01/58956

PCT/US01/04170

3/5

Fig. 3

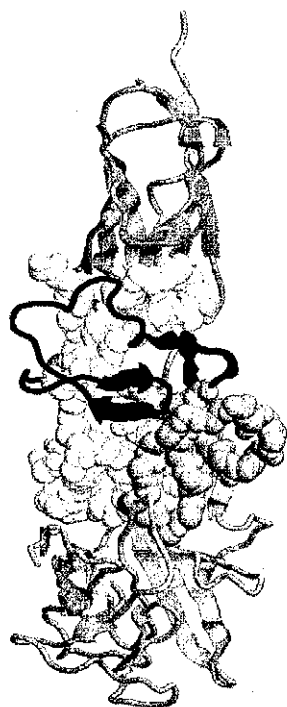


WO 01/58956

PCT/US01/04170

4/5

Fig. 4

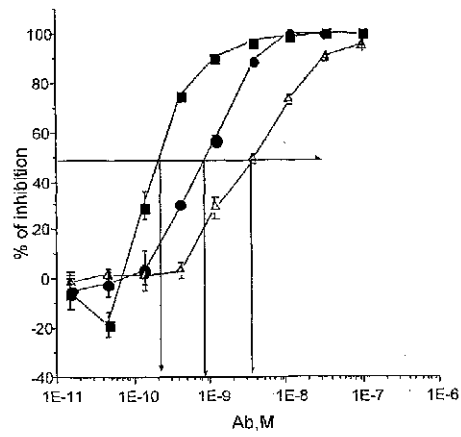


WO 01/58956

PCT/US01/04170

5/5

Fig. 5



WO 01/58956

PCT/US01/04170

I

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Ghayur, Farig et al.

&lt;120&gt; ANTIBODIES THAT BIND HUMAN INTERLEUKIN-16 AND METHODS OF MAKING AND USING

&lt;130&gt; BBI-139

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 60/181,608

&lt;151&gt; 2000-02-10

&lt;160&gt; 71

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Cys Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 157

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn  
1 5 10 15Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp  
20 25 30

WO 01/58956

2

PCT/US01/04170

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile  
 35 40 45  
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Thr Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys  
 85 90 95  
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys  
 100 105 110  
 Met Gln Phe Gln Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu  
 115 120 125  
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu  
 130 135 140  
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp  
 145 150 155

<210> 5  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln  
 20 25 30  
 Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln  
 35 40 45  
 Gly Gln Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu  
 50 55 60  
 Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu  
 85 90 95  
 Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe  
 100 105 110  
 Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Tyr Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu  
 115 120 125  
 Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr  
 130 135 140  
 Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 145 150



WO 01/58956

3

PCT/US01/04170

<210> 6  
 <211> 145  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro  
 20 25 30  
 Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His  
 35 40 45  
 Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val  
 50 55 60  
 Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg  
 85 90 95  
 Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly  
 100 105 110  
 Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Glu Pro Val Ser Leu Thr  
 115 120 125  
 Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu  
 130 135 140  
 Asp  
 145

<210> 7  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu Gly Glu Pro Phe Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu Ile Glu Thr Thr Thr  
 20 25 30  
 Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu His Val Glu Leu Asn  
 35 40 45  
 Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp Cys Val Leu Glu Phe  
 50 55 60  
 Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Phe Phe Gln Met Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile Arg Arg Asn Lys His

WO 01/58956 4 PCT/US01/04170  
85 90 95

Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys Ile Val Glu Val Lys  
100 105 110

Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr Tyr Gln Thr Leu Val  
115 120 125

Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys Leu Leu Leu Glu Asn  
130 135 140

Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu Phe Glu Asp Gln Gly  
145 150 155 160

Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn Gly Lys Leu Phe Asn  
165 170 175

Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu Asp Arg Ser Asn Ile  
180 185 190

Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His Val Ala Val Glu Leu  
195 200 205

Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu Asn Glu Glu Asp  
210 215 220

Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly Ser Asp Pro Asn Ile  
225 230 235 240

His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro Glu Gly Lys Trp His  
245 250 255

Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly Glu Ser Asn Leu Asn  
260 265 270

Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly Gly Thr Asp Thr Lys  
275 280 285

Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp  
290 295

<210> 8  
<211> 310  
<212> PR1  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser Ala Asn Glu  
1 5 10 15

Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His Lys Gly Thr  
20 25 30

Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu Gln  
35 40 45

Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe Val Pro Ala  
50 55 60

Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg Asn Ser Ser

WO 01/58956 PCT/US01/04170

65 70 5 75 80

Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu Asn Glu Pro  
85 90 95

Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu Pro Val  
100 105 110

Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe Phe Lys Asn  
115 120 125

Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp Cys Lys Pro  
130 135 140

Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp Arg Leu Ile  
145 150 155 160

Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr Cys His Ala  
165 170 175

Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg Val Ile Glu  
180 185 190

Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val Ile Val Ser  
195 200 205

Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln Ile Gln Leu  
210 215 220

Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr Trp Lys Trp  
225 230 235 240

Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly Glu Asp Tyr  
245 250 255

Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr Leu Ile Thr  
260 265 270

Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys His Pro Phe  
275 280 285

Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala Tyr Ile Gln  
290 295 300

Leu Ile Tyr Pro Val Thr  
305 310

<210> 9  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
Thr Gly Tyr Tyr Ile His  
1 5

<210> 10  
<211> 11  
<212> PRT

WO 01/58956 6 PCT/US01/04170

<213> Homo sapiens

<400> 10  
 Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe  
 1 5 10 15

Gln

<210> 11  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 Lys Glu Gly Ala  
 1

<210> 12  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro Asn  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14  
 Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His Val Val  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 15  
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Ser Asn  
 1 5 10

<210> 16

WO 01/58956

7

PCT/US01/04170

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 .  
 <400> 16  
 Gly Arg Leu Asn Pro Arg Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe  
 1 5 10 15  
 Gln

<210> 17  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 .  
 <400> 17  
 Gly Arg Leu Asn Pro Arg Thr Gly Asp Ala Gln Phe Ala Glu Lys Phe  
 1 5 10 15  
 Gln

<210> 18  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 .  
 <400> 18  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala His Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Ala Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asp Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Gly Lys Glu Gly Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110  
 Ser

<210> 19  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

WO 01/58956 8 PCT/US01/04170

<400> 19  
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro  
 20 25 30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His  
 85 90 95  
 Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 20  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20  
 Ser Tyr Ala Met  
 1

<210> 21  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

WO 01/58956

9

PCT/US01/04170

<400> 23  
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Ala Val Asn  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Gly Asn Asp Gln Arg Pro  
 1 5

<210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25  
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26  
 Ala Ile Ser Gly Ser Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 27  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 27  
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 28  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28  
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

WO 01/58956 PCT/US01/04170

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
50 55 60

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
65 70 75 80

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp  
85 90 95

Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
100 105

<210> 29  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn  
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 30  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
Deu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
1 5 10 15

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr  
35 40 45



WO 01/58956 11 PCT/US01/04170

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
50 55 60

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
65 70 75 80

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp  
85 90 95

Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu  
115 120 125

Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile  
130 135 140

Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Ala Val Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn  
165 170 175

Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser  
180 185 190

Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu  
195 200 205

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val  
210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
225 230 235

<210> 31  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn  
1 5 10

<210> 32  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val  
1 5 10

<210> 33  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

WO 01/58956

12

PCT/US01/04170

<400> 33  
Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln  
1 5 10

<210> 34  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu  
1 5 10

<210> 35  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr  
1 5 10

<210> 36  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg  
1 5 10

<210> 37  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 37  
Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg  
1 5 10

<210> 38  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 38  
Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile  
1 5 10

<210> 39  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

WO 01/58956

13

PCT/US01/04170

<400> 39  
Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp  
1 5 10

<210> 40  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 40  
Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly  
1 5 10

<210> 41  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 41  
Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile  
1 5 10

<210> 42  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 42  
Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu  
1 5 10

<210> 43  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 43  
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu  
1 5 10

<210> 44  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44  
Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys  
1 5 10

<210> 45  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45

WO 01/58956 14  
 Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 46  
 Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 47  
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp  
 1 5 10

<210> 48  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48  
 Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile  
 1 5 10

<210> 49  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 49  
 Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 50  
 Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His  
 1 5 10

<210> 51  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 51  
 Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln  
 1 5 10

PCT/US01/04170

WO 01/58956

15

PCT/US01/04170

<210> 52  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 52  
Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser  
1 5 10

<210> 53  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54  
Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe  
1 5 10

<210> 54  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54  
Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys  
1 5 10

<210> 55  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 55  
Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe  
1 5 10

<210> 56  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 56  
Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys  
1 5 10

<210> 57  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 57  
Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu  
1 5 10

WO 01/58956

16

PCT/US01/04170

<210> 58  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 58  
 Leu ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Ieu Gly Asp Arg Ser ile  
 1 5 10

<210> 59  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 59  
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser ile Met Phe Thr Val Gln  
 1 5 10

<210> 60  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 60  
 Asp Arg Ser ile Met Phe Thr Val Glu Asn Glu Asp  
 1 5 10

<210> 61  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 61  
 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val ile Arg Asn Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Val Leu Phe ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp  
 20 25 30  
 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr ile Phe ile  
 35 40 45  
 ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr ile  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Cys Glu Lys ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys ile  
 65 70 75 80  
 ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn ile Lys Asp Thr Lys  
 85 90 95  
 Ser Asp ile ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys  
 100 105 110  
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu  
 115 120 125

WO 01/58956 17 PCT/US01/04170

Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu  
 130 135 140

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp  
 145 150 155

<210> 62  
 <211> 341  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(359)

<400> 62  
 cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg 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

tgc atg asa gtc tcc tgt aag act tct gga tac acc ttc acc ggc tat 96  
 Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

tat atc cac tgg gtg cga cag gcc cct gga cag gga ttc gag tgg ata 144  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile  
 35 40 45

gga cgg ctc aac ccc acc act ggt gac gca aat ttt gca gaa aag ttt 192  
 Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe  
 50 55 60

cag ggc agg gtc gcc ctg acc aga gac acg tcc atc agc aca gcc tat 240  
 Gln Gly Arg Val Ala Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

tta caa cta gac agc ctc aaa tct gac gac acg gcc gta tat tat tgt 288  
 Leu Gln Leu Asp Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

ggg gga aaa gag ggt gcc tgg ggc cgg ggc acc ctg gtc acc gtc tcy 336  
 Ala Gly Lys Glu Gly Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110

agt gg 341  
 Ser

<210> 63  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 63  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

WO 01/58956 18 PCT/US01/04170

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe  
50 55 60

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

Leu Gln Leu Asp Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Lys Gln Gly Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

<210> 64  
<211> 327  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(327)

<400> 64  
tot tot gag ctg aot cag gac oot got gtg tot gtg gcc ttg gga aag 48  
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

aca gtc agg atc aca tgc cag gga gac agc ctc aga cac ttt tat cca 96  
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro  
20 25 30

aac tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc oot gta ctt gtc atc tat 144  
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

ggt aaa aac aat agg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tot ggc tcc 192  
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

ggc tca gga aac aca ggt tcc ttg acc atc act ggg gcc cag gcg gaa 240  
Gly Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
65 70 75 80

gat gag gct gac tat tac tgt ggc tcc cgg gac agc agt ggt atc cat 288  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His  
85 90 95

gtg gta ttc gcc gga ggg acc aag gtc acc gtc cta ggt 327  
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 65  
<211> 109  
<212> PRT



WO 01/58956 19 PCT/US01/04170

<213> Homo sapiens

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

<210> 66  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(354)

<400> 66  
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 46  
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac ccg gcc gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gcg aga gat gac gat gac tac gac ttt gac tac tgg gcc cgg ggg aca 336  
 Ala Arg Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr

WO 01/58956 PCT/US01/04170

100 20 105 110 354

atg gtc acc gtc tgc agt  
Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 67  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 67  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr  
100 105 110  
Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 68  
<211> 334  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(333)

<400> 68  
cag tct gtg ttg acc cag cag ccc tca ggg tct ggg gcc ccc ggt cag 48  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
aga gtc acc atc tct lgt tct gga agc agc tcc aac atc gga att aat 96  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn  
20 25 30  
gct gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144  
Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
atc tat ggt aat gat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct 192  
Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

WO 01/58956 PCT/US01/04170

50 55 21 60

ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc stc agt ggg ctg cag 240  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 65 70 75 80

tct gag gat gag gct gat tat aac tgt gca gca lgg gat gac agc ctg 288  
 Ser Glu Asp Gln Ala Asp Tyr Asn Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
 85 90 95

agt gat ccg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt g 334  
 Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 69  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 69  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn  
 20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Gln Ala Asp Tyr Asn Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
 85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 70  
 <211> 66  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 70  
 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn  
 1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp  
 20 25 30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile  
 35 40 45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile  
 50 55 60

WO 01/58956  
Ser Val  
65

22

PCT/US01/04170

<210> 71  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71  
Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys  
1 5 10 15  
Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn  
20 25 30  
Glu Asp

## 【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  
16 August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/58956 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/24.  
A61K 39/395, C12N 5/10, 15/13, A61K 39/17, 38/13,  
31/505, 31/445, C12N 15/85, A61P 1/00, 3/00, 5/00, 7/00,  
9/00, 11/00, 13/00, 15/00, 17/00, 19/00, 21/00, 25/00,  
29/00, 31/00, 33/00, 35/00, 37/00, A61K 31/56, 31/56,  
31/56 # (A61K 39/395, 31/505) (A61K 39/395, 38/13)  
(A61K 39/395, 31/445) (A61K 39/395, 31/56) (A61K  
39/395, 38/13)

(21) International Application Number: PCT/US01/04170

(22) International Filing Date: 9 February 2001 (09.02.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/181,608 10 February 2000 (10.02.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part  
(CIP) to earlier application:  
US 60/181,608 (CON)  
Filed on 10 February 2000 (10.02.2000)

(71) Applicant (for all designated States except US): BANK  
AKTIENGESSELLSCHAFT (DE/DE); Ludwigshafen,  
Rheinland-Phalz (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GHAYUR, Tariq  
(PK/US); 1014 Washington Street, Holliston, MA  
01746 (US); DIXON, Richard, W. (US/US); 6 Samuel  
Drive, North Grafton, MA 01546 (US); ROGUSKA,  
Mike (US/US); 16 Hildale Road, Ashland, MA 01721  
(US); WHITE, Michael (US/US); 30 Angelica Drive,  
Framingham, MA 01701 (US); LABKOVSKY, Boris  
(US/US); 107A-5 Broadmeadow Road, Marlborough,  
MA 01752 (US); SALFELD, Jochen (DE/US); 177 Old

Westboro Road, North Grafton, MA 01536 (US); DUN-  
CAN, Alexander, Robert (GB/GB); 8 Garden Fields,  
Little Shelford, Cambridge CB2 5HH (GB); BROCK-  
LEITHURST, Simon, Mark (GB/GB); 38 Hunsell,  
Fulbourn, Cambridge CB1 5RH (GB); MANKOVICH,  
John (US/US); 416 Lowell Street, Andover, MA 01810  
(US); SBOERROCK, Celia, Patricia (GB/US); 17 Stanley  
Road, Cambridge CB5 8LF (GB); THOMPSON, Julia,  
Elizabeth (GB/GB); Seeby's Cottage, 6 High Street,  
Whitlifford, Cambridge CB2 4LT (GB); FENNARD,  
Simon, Nicholas (GB/GB); 1 Bakers Lane, Linton, Cam-  
bridgeshire CB1 6NF (GB).

(74) Agents: DECONTI, Giulio, A., JR. et al.; Lohve &  
Cockfield, LLP, 28 State Street, Boston, MA 02109 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, EG, FI, GB, GE, GR, GU, GM, HR,  
HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

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

Published:

— with international search report

(85) Date of publication of the international search report:  
7 March 2002

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.

WO 01/58956 A3

(84) Title: ANTIBODIES THAT BIND HUMAN INTERLEUKIN-18 AND METHODS OF MAKING AND USING

(57) Abstract: Antibodies that bind human interleukin-18 (hIL-18) are provided, in particular antibodies that bind epitope(s) of human IL-18. The antibodies can be, for example, entirely human antibodies, recombinant antibodies, or monoclonal antibodies. Preferred antibodies have high affinity for hIL-18 and neutralize hIL-18 activity *in vitro* and *in vivo*. An antibody of the invention can be a full-length antibody or an antigen-binding portion thereof. Method of making and method of using the antibodies of the invention are also provided. The antibodies, or antibody portions, of the invention are useful for detecting hIL-18 and for inhibiting hIL-18 activity, e.g., in a human subject suffering from a disorder in which hIL-18 activity is detrimental.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International Application No. PCT/US 01/04170
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C07K16/24	A61K39/395	C12N5/10	C12N15/13	A61K38/17	
	A61K38/13	A61K31/505	A61K31/445	C12N15/85	A61P1/00	
	A61P3/00	A61P5/00	A61P7/00	A61P9/00	A61P11/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
B. FIELDS SEARCHED						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)						
IPC 7	C07K	A61K	C12N	A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.	
X	EP 0 974 600 A (HAYASHIBARA BIOCHEM LAB) 26 January 2000 (2000-01-26) paragraph [0021] paragraph [0038] - paragraph [0040] paragraph [0045] - paragraph [0071] claims 1-27				1-3, 53, 55, 57, 59	
X	KOHKA HIDEO ET AL: "Involvement of interleukin-18 (IL-18) in mixed lymphocyte reactions (MLR)." JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, vol. 19, no. 9, 1999, pages 1053-1057, XP001007317 ISSN: 1079-9907 the whole document				1, 2, 53, 55, 57, 59, 60	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier document but published on or after the international filing date. "L" document which may throw doubts on priority claimed 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 principles at issue 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 docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family.						
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report		
24 July 2001				17.09.01		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5010 Patenkamp 2 D-5280 XIV Ruyven Tel. (+31 70) 340-2040, Tr. 31 651 epo nl Fax (+31 70) 340-0816				Authorized official Renggli, J		

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 01/04170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	A61P13/00	A61P15/00	A61P17/00	A61P19/00	A61P21/00
	A61P25/00	A61P29/00	A61P31/00	A61P33/00	A61P35/00
	A61P37/00	A61K31/56	A61K31/56	A61K31/56	
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)					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category: 1 - Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.	
P, X	WO 00 56771 A (HOLMES STEPHEN D ; SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB); ABDEL MEGUID SHERIN) 28 September 2000 (2000-09-28) page 2 -page 3; claims 1-23 -----				1,2,53, 55,57,59
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claimed or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents 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 compared with one or more other such documents, such comparison being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search				Date of mailing of the international search report	
24 July 2001					
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplatz 2 NL - 2200 MB Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 600 m. Fax: (+31-70) 340-3016				Authorized officer Renggli, J	

Form PCT/ISA/210 (second annex) July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/04170
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 // (A61K39/395,31:565), (A61K39/395,38:13), (A61K39/395,31:445), (A61K39/395,31:56), (A61K39/395,38:17)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "D" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention "G" 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 "H" 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 "I" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report
24 July 2001		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 551A Patentplan 2 DE - 69001 Heidelberg Tel: (+31-70) 340-3040, Tx: 31 551 500 R, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Renggli, J

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



<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/US 01/04170
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 53, 55, 57, 59 and 60 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 53, 55, 57, 59 (part) and 60	
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01/04170

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-3, 53, 55, 57, 59 (part) and 60

A compound capable of binding a human IL-18 amino acid sequence or portion thereof, wherein said amino acid comprises a sequence selected for the group consisting of SEQ ID NO:67 and SEQ ID NO:68 and methods of inhibiting or treating involving the use of said compound.

2. Claims: 4-10, 39-46 (part), 54 (part), 56 (part), 58 (part) and 59 (part)

A human monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, capable of binding to human IL-18 and isolated nucleic acid encoding an CDR of said antibody, host cells containing the said nucleic acid, method of synthesizing said antibody, pharmaceutical compositions comprising said antibody, methods for inhibiting or treating involving the use of said antibody.

3. Claims: 11-15, 39-46 (part), 54 (part), 56 (part), 58 (part) and 59 (part)

An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, that binds an epitope of human IL-18, or portion thereof, comprising an amino acid sequence selected from the group comprising seq ID:3 and 33 and isolated nucleic acid encoding an CDR of said antibody, host cells containing the said nucleic acid, method of synthesizing said antibody, pharmaceutical compositions comprising said antibody, methods for inhibiting or treating involving the use of said antibody.

4. Claims: 16-21, 39-46 (part), 54 (part), 56 (part), 58 (part) and 59 (part)

An isolated antibody, or antigen-binding portion thereof, that binds to an epitope of human IL-18, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, dissociates from human IL-18 with a koff rate constant of 0.1 s<sup>-1</sup> or less, as determined by surface plasmon resonance, or which inhibits human IL-18 activity with an IC50 of 1 x 10<sup>-6</sup> M or less and isolated nucleic acid encoding an CDR of said antibody, host cells containing the said nucleic acid, method of synthesizing said antibody, pharmaceutical compositions comprising said antibody, methods for inhibiting or treating involving the use of said antibody.

International Application No. PCT/US 01/04170

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. Claims: 22-28, 32-35, 39-46 (part), 54 (part), 56 (part),  
58 (part) and 59 (part)

An isolated human antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising at least one variable region CDR domain capable of binding an epitope of human IL-18 and isolated nucleic acid encoding an CDR of said antibody, host cells containing the said nucleic acid, method of synthesizing said antibody, pharmaceutical compositions comprising said antibody, methods for inhibiting or treating involving the use of said antibody.

6. Claims: 29-31, 39-46 (part), 54 (part), 56 (part),  
58 (part) and 59 (part)

An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of seq IDs: 15, 16 and 17 and isolated nucleic acid encoding an CDR of said antibody, host cells containing the said nucleic acid, method of synthesizing said antibody, pharmaceutical compositions comprising said antibody, methods for inhibiting or treating involving the use of said antibody.

7. Claims: 36-38, 39-46 (part), 54 (part), 56 (part),  
58 (part) and 59 (part)

An isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, with a variable region comprising an amino acid selected from the group consisting of seq IDs: 26, 27 and 29 and isolated nucleic acid encoding an CDR of said antibody, host cells containing the said nucleic acid, method of synthesizing said antibody, pharmaceutical compositions comprising said antibody, methods for inhibiting or treating involving the use of said antibody.

8. Claims: 47-52

A method of making an antibody that binds human interleukin-18 comprising exposing an antibody repertoire to an antigen comprising an epitope of human IL-18 or portion thereof and selecting from the antibody repertoire an antibody that binds the epitope of human IL-18, or portion thereof.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/04170

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0974600	A	26-01-2000	JP 2000236884 A	05-09-2000
WO 0056771	A	28-09-2000	NONE	

Form PCT/ISA(210) (patent family annex) July 1993

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/14	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 39/00	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 39/02	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/24	A 6 1 P 39/00	
C 1 2 N 1/15	A 6 1 P 39/02	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 16/24	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 1/21	
	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 5/00	A

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

- (74)代理人 100117053  
弁理士 相馬 貴昌
- (72)発明者 ガユール, タリク  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01746、ホリストン、ワシントン・ストリート・1014
- (72)発明者 デイクソン, リチャード・ダブリュ  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01546、ノース・グラフトン、サムユエル・ドライブ・6
- (72)発明者 ログスカ, マイク  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01721、アツシユランド、ヒルデール・ロード・16
- (72)発明者 ホワイト, マイケル  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01701、フラミングハム、アンジェリカ・ドライブ・30
- (72)発明者 ラブコフスキー, ボリス  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01752、マールボロウ、ブロードメドウ・ロード・107・エイ - 5
- (72)発明者 ザルフエルト, ヨツヘン  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01536、ノース・グラフトン、オールド・ウエストボロ・ロード・177
- (72)発明者 ダンカン, アレクサンダー・ロバート  
イギリス国、ケンブリッジ・シー・ビー・2・5・エイチ・エイチ、リトル・シエルフオード、ガーデン・フィールズ・8
- (72)発明者 プロツクルハースト, サイモン・マーク  
イギリス国、ケンブリッジ・シー・ビー・1・5・アール・エイチ、フルボーン、ハンツミル・38
- (72)発明者 マンコビッチ, ジョン  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01810、アンドーバー、ロウエル・ストリート・416
- (72)発明者 シャーロック, セリア・パトリシア  
イギリス国、ケンブリッジ・シー・ビー・5・8・エル・エフ、スタンレー・ロード・17
- (72)発明者 トンプソン, ジュリア・エリザベス  
イギリス国、ケンブリッジ・シー・ビー・2・4・エル・テイ、ハウイツトルズフオード、ハイ・ストリート・6、シービーズ・コテージ
- (72)発明者 レナード, サイモン・ニコラス  
イギリス国、ケンブリッジシャー・シー・ビー・1・6・エヌ・エフ、リントン、ベイカーズ・レーン・1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA02

EA04 GA11 HA12

4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46

4C084 AA19 MA02 NA14 ZA121 ZA122 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA181

ZA182 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA421 ZA422 ZA451 ZA452 ZA511

ZA512 ZA541 ZA542 ZA551 ZA552 ZA591 ZA592 ZA681 ZA682 ZA751

ZA752 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA921 ZA922 ZA961 ZA962 ZA971

ZA972 ZB011 ZB012 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131

ZB132 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB311 ZB312 ZB331

ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZC351 ZC352 ZC371 ZC372

4C085 AA14 BB17 CC03 EE03 EE05

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74