

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780018859.3

[51] Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年6月10日

[11] 公开号 CN 101454343A

[22] 申请日 2007.5.23

[21] 申请号 200780018859.3

[30] 优先权

[32] 2006.5.25 [33] GB [31] 0610438.4

[32] 2006.6.5 [33] GB [31] 0611046.4

[86] 国际申请 PCT/EP2007/055029 2007.5.23

[87] 国际公布 WO2007/137984 英 2007.12.6

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.24

[71] 申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国梅得塞克斯

[72] 发明人 J·H·艾利斯

V·格尔马谢夫斯基

P·A·汉布林 I·柯比

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 付磊

权利要求书7页 说明书42页 附图19页

[54] 发明名称

修饰的人源化的抗-干扰素-18 抗体

[57] 摘要

本发明公开了人源化的抗-IL-18 抗体、生产方法和用该抗体治疗的方法。还公开了使用例如样品表面等离子共振的筛选方法来鉴别具有治疗潜力的抗体。

1、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含具有下列互补决定区（CDR）的重链和轻链：

CDRH1 :SEQ.I.D.NO:1

CDRH2:SEQ.I.D.NO:2

CDRH3:SEQ.I.D.NO:3

CDRL1 :SEQ.I.D.NO:4

CDRL2:SEQ.I.D.NO:5

CDRL3:SEQ.I.D.NO:6。

2、人源化的抗白介素-18 抗体，包含具有下列 CDR 的重链和轻链：

CDRH1 :SEQ.I.D.NO:1

CDRH2:SEQ.I.D.NO:2

CDRH3:SEQ.I.D.NO:3

CDRL1 :SEQ.I.D.NO:4

CDRL2:SEQ.I.D.NO:5

CDRL3:SEQ.I.D.NO:6

其中用在衍生 CDR 的供体抗体中发现的相应残基取代了所述轻链的第 71 位残基。

3、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含移植到人受体框架区上的从供体抗体衍生的 CDR，所述抗-白介素 18 抗体包含具有在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，其中所述抗-白介素 18 抗体的轻链的第 71 位残基与在供体抗体框架中的相应位置中发现的残基相同。

4、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，所述抗体在所述轻链的第 71 位包含酪氨酸。

5、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含具有在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的 CDR 的重链和具有在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的 CDR 的轻链，其中所述轻链的 CDR 是从一种供体抗体衍生的，在该供体抗体的轻链的第 71 位具有酪氨酸。

6、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含来自供体抗体的 CDR 并且在所述人源化抗体的轻链的第 71 位处包含酪氨酸，其中所述供体抗体是 2C10 或其框架变体（即，人源化抗体包含与 2C10 相同的 CDR，但是不同的框架，参见 US 专利 6,706,487）。

7、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a)重链，其具有含有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列的 CDR，和

(b)轻链，其具有含有移植到人轻链受体框架上的在 SEQ ID NO:4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，其中所述人轻链受体框架包含 SEQ ID NO:38 并且其中 SEQ ID NO:38 的第 71 位是酪氨酸。

8、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a)重链，其包含具有在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列的 CDR，和

(b)轻链，其包含具有在移植到人轻链受体框架上的在 SEQ ID NO:4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，其中所述人源化的抗-白介素-18 抗体的所述轻链受体框架是在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列的变体，其中所述变体在第 71 位包含酪氨酸，并且其中所述变体与具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列的框架具有 75%或更高的同一性。

9、人源化的抗-白介素-18 抗体，所述抗体包含：

(a)从供体抗体衍生的在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，所述供体抗体在供体抗体第 71 位含有酪氨酸；

(b)人受体框架，所述受体框架在人轻链第 71 位包含苯丙氨酸；其中，抗-白介素 18 抗体在轻链第 71 位包含酪氨酸。

10、人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a)从供体抗体衍生的在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的 CDR，所述供体抗体在供体抗体轻链第 71 位包含芳香族氨基酸；

(b)人受体框架，所述受体框架在轻链受体框架第 71 位包含与(a)部分中的芳香族氨基酸不同类型的芳香族氨基酸；

其中所述的抗-白介素 18 抗体包含从(a)部分的抗体衍生的轻链，该轻链在第 71 位具有芳香族氨基酸。

11、人源化的抗-白介素-18 抗体，当在 37°C 用表面等离子体共振(例如，BiacoreTM T100)测量时，所述抗体针对人 IL-18 表现出 90pM 或更大的结合亲和力(KD)。

12、人源化的抗-白介素-18 抗体，所述抗体包含 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的 CDR，当在 37°C 用表面等离子体共振(例如，BiacoreTM T100)测量时，所述抗体针对人 IL-18 表现出 90pM 或更大的

结合亲和力 (KD)。

13、人源化的抗-白介素-18 抗体, 当在 37°C 用表面等离子体共振(例如, Biacore™ T100) 测量时, 针对与人 IL-18 的结合, 所述抗体表现出 0.0002 (1/s) 或更低的解离速率 (kd)。

14、人源化的抗-白介素-18 抗体, 该抗体包含:

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链, 所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列, 所述重链受体框架具有在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列, 其中所述重链的第 27、28、29、93、39、40、36、71、89、91 位的一个或多个残基与所述供体抗体重链中的相应残基相同;

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链, 所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列, 所述轻链受体框架具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列, 其中所述轻链的第 71 位以及任意的第 45、83、84、85 位的一个或多个 (例如, 全部) 残基与所述供体抗体轻链中的相应残基相同。

15、人源化的抗-白介素-18 抗体, 该抗体包含:

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链, 所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列, 所述重链受体框架具有在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列, 其中所述重链的第 27、28、29、93 位的一个或多个残基与所述供体抗体重链中的相应残基相同;

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链, 所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列, 所述轻链受体框架具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列, 其中, 所述抗-白介素-18 抗体的轻链的第 71 位的残基与所述供体抗体轻链中的相应残基相同。

16、人源化的抗-白介素-18 抗体, 该抗体包含:

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链, 所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列, 所述重链受体框架具有在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列, 其中所述重链的第 27、28、29、39、40、93 位的残基与所述供体抗体重链中的相应残基相同;

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链, 所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列, 所述轻链受体框架具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列, 其中所述轻链的第 71 位的

残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

17、人源化的抗-白介素-18 抗体，该抗体包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链，所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列，所述重链受体框架具有在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列，其中所述重链的第 27、28、29、36、39、40、71、89、91、93 位的残基与所述供体抗体重链中的相应残基相同；

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链，所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列，所述轻链受体框架具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列，其中所述轻链的第 71 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

18、人源化的抗-白介素-18 抗体，该抗体包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链，所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列，所述重链受体框架具有在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列，其中所述重链的第 27、28、29、93 位的一个或多个残基与所述供体抗体重链中的相应残基相同；

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链，所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列，所述轻链受体框架具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列，其中所述抗-白介素-18 抗体的轻链的第 71、45、83、84、85 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

19、人源化的抗-白介素-18 抗体，该抗体包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链，所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列，所述重链受体框架具有在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列，其中所述重链的第 27、28、29、93、39、40 位的残基与所述供体抗体重链中的相应残基相同；

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链，所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列，所述轻链受体框架具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列，其中所述抗-白介素-18 抗体的轻链的第 71、45、83、84、85 位的残基与所述供体抗体轻链中的相应残基相同。

20、人源化的抗-白介素-18 抗体，该抗体包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链, 所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列, 所述重链受体框架具有在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列, 其中所述重链的第 27、28、29、93、39、40、36、71、89、91 位的残基与供体抗体重链中的相应残基相同;

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链, 所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列, 所述轻链受体框架具有在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列, 其中所述抗-白介素-18 抗体的轻链第 71、45、83、84、85 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

21、人源化的抗-白介素-18 抗体, 包含选自 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21 的重链和选自 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:29 的轻链。

22、人源化的抗-白介素-18 抗体, 包含 SEQ ID NO:9 的重链和 SEQ ID NO:13 的轻链, 或者 SEQ ID NO:9 的重链和 SEQ ID NO:29 的轻链。

23、人源化抗-白介素-18 抗体, 包含 SEQ ID NO:17 的重链和 SEQ ID NO:13 的轻链, 或者 SEQ ID NO:17 的重链和 SEQ ID NO:29 的轻链。

24、人源化抗-白介素-18 抗体, 包含 SEQ ID NO:21 的重链和 SEQ ID NO:13 的轻链, 或者 SEQ ID NO:21 的重链和 SEQ ID NO:29 的轻链。

25、人源化的抗-白介素-18 抗体, 包含:

(a) 重链, 其具有允许与人 IL-18 特异性结合的 CDR, 和

(b) 轻链, 其包含具有含有在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR 的受体框架, 并且在第 71 位具有酪氨酸残基。

26、包含重链和轻链的人源化的抗-白介素-18 抗体, 其中, 在 25°C 时所述抗体和人 IL-18 的结合的解离速率 (kd) 与在 37°C 时所述抗体和人 IL-18 的结合的解离速率 (kd) 之间的比值是 1: 5 (或 1: 小于 5), 其中所述抗体包含从供体抗体衍生的 CDR 和人受体框架, 并且其中所述人受体框架轻链的第 71 位的残基被所述供体抗体的相应残基取代了。

27、根据权利要求 26 的人源化的抗体, 其中 CDR 具有在 SEQ.I.D.NO: 1、2、3、4、5 和 6 中陈列的序列。

28、根据权利要求 26 或 27 的人源化的抗体, 其中所述人受体框架的轻链的第 71 位的残基是芳香族氨基酸, 优选地是苯丙氨酸, 并且在

所述供体抗体中的相应残基是不同类型的芳香族氨基酸，优选酪氨酸。

29、药物组合物，包含根据权利要求 1 至 28 中任一项的抗-白介素-18 抗体和药学上可接受的载体。

30、根据权利要求 1 至 28 中任一项的抗-白介素-18 抗体在生产用于治疗自身免疫病例如多发性硬化、关节炎疾病如类风湿性关节炎、I 型糖尿病、炎性肠病 (IBD) 和牛皮癣的药物中的用途。

31、权利要求 31 在生产用于治疗类风湿性关节炎的药物中的用途。

32、权利要求 1 至 28 中任一项的抗体，用于治疗自身免疫病例如多发性硬化、关节炎疾病如类风湿性关节炎、I 型糖尿病、炎性肠病 (IBD) 和牛皮癣。

33、治疗患有自身免疫病例如多发性硬化、关节炎疾病如类风湿性关节炎、I 型糖尿病、炎性肠病 (IBD) 和牛皮癣的人类患者的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的根据权利要求 1 至 28 中任一项的抗体。

34、生产根据权利要求 1 至 28 中任一项的抗体的方法，所述方法包括在允许表达所述抗体的条件下，培养用包含编码所述抗体的多核苷酸的载体转化或转染的宿主细胞。

35、权利要求 34 的方法，其中所述条件包括在无血清培养基中培养所述宿主细胞。

36、权利要求 34 或 35 的方法，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

37、权利要求 36 的方法，其中所述宿主细胞是 CHO 或 NS0。

38、权利要求 37 的方法，其中在用所述多核苷酸转染或转化前，所述 CHO 细胞是 DHFR- CHO 细胞。

39、筛选用于治疗用途的抗体（特别是抑制配体和受体之间相互作用的抗体，例如抗-白介素-18 抗体）的方法，所述方法包括：

(a) 在 30 至 45°C (优选的 37°C) 的温度下测量抗体对抗体特异性结合的抗原的结合亲和力 (使用例如: Biacore™ 表面等离子体共振)；

(b) 在 20 至 25°C (优选的 25°C) 的温度下测量抗体对抗体特异性结合的抗原的结合亲和力 (使用例如: Biacore™ 表面等离子体共振)；

(c) 如果 (a) 的亲和力大于 (b) 的亲和力，优选地，如果 (a) 的亲和力比 (b) 的亲和力大 2 倍或更多，更优选地，4 倍或更多，则选择所述抗体用于治疗用途。

40、筛选用于治疗用途的抗体（特别是抑制配体和受体之间相互作用的抗体，例如抗-白介素-18抗体）的方法，所述方法包括：

（a）在 30 至 45℃（优选的 37℃）的温度下测量抗体与抗体特异性结合的抗原的解离速率（使用例如：BiacoreTM表面等离子体共振）；

（b）在 20 至 25℃（优选的 25℃）的温度下测量抗体与抗体特异性结合的抗原的解离速率（使用例如：BiacoreTM表面等离子体共振）；

（c）如果（a）的解离速率低于（b）的解离速率，则选择所述抗体用于治疗用途。

修饰的人源化的抗-干扰素-18 抗体

1. 发明领域

本发明一般涉及免疫球蛋白领域，例如抗体，特别是人源化的抗体，可用于治疗和诊断由人干扰素-18 介导的适应症。

2. 发明背景

人干扰素-18 (IL-18) 是作为无生物活性的 193 个氨基酸的前体蛋白质形式被合成的细胞因子 (Ushio 等人, *J. Immunol.* 156:4274, 1996)。通过例如半胱天冬酶-1 或半胱天冬酶-4 切割前体蛋白, 释放 156 个氨基酸的成熟蛋白质 (Gu 等人, *Science*, 275:206, 1997; Ghayur 等人, *Nature* 386:619, 1997), 表现出生物学活性, 包括辅助刺激 T 细胞增殖、增强 NK 细胞的细胞毒性、诱导 T 细胞和 NK 细胞生产 IFN- γ 以及加强 I 型 T 辅助细胞 (Th1) 分化 (Okamura 等人, *Nature* 378:88, 1995; Ushio 等人, *J. Immunol.* 156:4274, 1996; Micallef 等人, *Eur. J. Immunol.* 26:1647, 1996; Kohno 等人, *J. Immunol.* 158:1541, 1997; Zhang 等人, *Infect. Immunol.* 65:3594, 1997; Robinson 等人, *Immunity* 7:571, 1997)。此外, IL-18 还是人单核细胞促炎症介质的有效的诱导剂, 这些介质包括 IL-8、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和前列腺素 E2 (PGE 2) (Ushio, S. 等人, *J. Immunol.* 156:4274-4279, 1996; Puren, A. J. 等人, *J. Clin. Invest.* 10:711-721, 1997; Podolin 等人, *J. Immunol.* submitted, 1999)。

经鉴别, 以前克隆的 IL-1 受体相关蛋白 (IL-1Rrp) (Parnet 等人, *J. Biol. Chem.* 271:3967, 1996) 是 IL-18 受体的亚基 (Kd=18 nM) (Torigoe 等人, *J. Biol. Chem.* 272:25737, 1997)。IL-18 的第二个亚基表现出与 IL-1 受体附加蛋白的同源性, 已命名为 AcPL (得名于附加蛋白-样)。IL-1 Rrp 和 AcPL 都是 IL-18 诱导的 NF- κ B 和 JNK 活化所必需的 (Born 等人, *J. Biol. Chem.* 273:29445, 1998)。除 NF- κ B 和 JNK 以外, IL-18 信号还通过 IL-1 受体相关激酶 (IRAK)、p56lck (LCK) 和有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 起作用 (Micallef 等人, *Eur. J. Immunol.* 26:1647, 1996; Matsumoto 等人, *Biophys Biochem. Res. Comm.* 234:454, 1997; Tsuji-Takayama 等人, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 237:126, 1997)。

TH1 细胞生产促炎症细胞因子例如 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- β (Mosmann

等人, *J. Immunol.* 136:2348, 1986), 涉及介导多种自身免疫病, 包括多发性硬化 (MS)、类风湿性关节炎 (RA)、胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM)、炎性肠病 (IBD) 和牛皮癣 (Mosmann 和 Sad, *Immunol. Today* 17:138, 1996)。因此, 预期 TH1-促进性的细胞因子例如 IL-18 的拮抗剂将抑制疾病发展。IL-18 特异性单克隆抗体 (mAb) 可用做拮抗剂。

已经证实了 IL-18 在自身免疫疾病发展中的作用。相应地, 已经证实了在疾病发生之前, IL-18 的表达在非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠的胰脏和脾脏中显著增加 (Rothe 等人, *J. Clin. Invest.* 99:469, 1997)。相似地, 已经显示了在类风湿性关节炎患者的滑液中, IL-18 的水平显著升高了 (Kawashima 等人, *Arthritis and Rheumatism* 39:598, 1996)。此外, 已经证实了 IL-18 增加了小鼠实验性变应性脑脊髓炎 (EAE) 的临床严重程度。此外, 还已经证实了在雌性路易斯大鼠中, 中和抗-大鼠 IL-18 抗血清防止了 EAE 的发展 (Wildbaum 等人, *J. Immunol.* 161:6368, 1998)。因此, IL-18 是发展新的治疗自身免疫的理想靶。

Taniguchi 等人, *J. Immunol. Methods* 206:107 描述了七种小鼠和六种大鼠的抗人 IL-18 单克隆抗体 (mAb), 其结合四种不同的抗原位点。一种小鼠 mAb (#125-2H) 和六种大鼠 mAb 抑制 IL-18 诱导的 KG-1 细胞的 IFN- γ 生产, 大鼠 mAb 表现的中和活性比 #125-2H 的中和活性低 10 倍。蛋白质印迹检测证实, 三种小鼠 mAb, 但是大鼠 mAb 中没有一种, 与膜结合的人 IL-18 强烈反应。此外, 还描述了利用 #125-2H 和大鼠 mAb 来检测人 IL-18 的酶联免疫吸附检测 (ELISA)。该 ELISA 检测的极限是 10 pg/ml。

欧洲专利申请 EP 0 712 931 公开了两种小鼠抗人 IL-18 mAb、H1 (IgG1) 和 H2 (IgM)。蛋白质印迹检测证实, 两种 mAb 都与膜结合的人 IL-18 反应, 而不与膜结合的人 IL-12 反应。在免疫亲和色谱实验规程中使用了 H1 来纯化人 IL-18, 并且用在 ELISA 中来测量人 IL-18。H2 被用于放射性免疫检测中来测量人 IL-18。

中和 IL-18 抗体可潜在地用于缓解自身免疫病和人的相关症状。因此, 本领域需要高亲和力的 IL-18 拮抗剂, 例如抗人白介素 18 的中和单克隆抗体, 其可降低 Th1 细胞的分化和增殖, 因而降低自身免疫病和相关症状。

本说明书全文中提及的所有参考文献都通过引用明确和完整的整

合到本文中。

3. 发明概述

根据本发明，提供了人源化的抗白介素-18 抗体，包含具有下列互补决定区（CDR）的重链和轻链：

CDRH1 :SEQ.I.D.NO:1

CDRH2:SEQ.I.D.NO:2

CDRH3:SEQ.I.D.NO:3

CDRL1 :SEQ.I.D.NO:4

CDRL2:SEQ.I.D.NO:5

CDRL3:SEQ.I.D.NO:6

根据本发明，提供了人源化的抗白介素-18 抗体，包含具有下列互补决定区（CDR）的重链和轻链：

CDRH1 :SEQ.I.D.NO:1

CDRH2:SEQ.I.D.NO:2

CDRH3:SEQ.I.D.NO:3

CDRL1 :SEQ.I.D.NO:4

CDRL2:SEQ.I.D.NO:5

CDRL3:SEQ.I.D.NO:6

其中，所述轻链的第 71 位残基被衍生 CDR 的供体抗体中发现的相应残基取代了。

对本领域技术人员是显而易见的，术语“衍生”不仅意在定义所述材料的物理来源，而且还定义了材料与并非源自参考源的材料在结构上一致。因此，“从衍生 CDR 的供体抗体框架中发现的”相应的残基不是必须从供体抗体框架中纯化的。相似地，“从供体抗体衍生的”CDR 也不是必须从供体抗体纯化的。

除非另外提示，CDR 和框架区（FR）和氨基酸计数，都遵从在 Kabat 等人“Sequences of immunological interest”，NIH 中提出的 Kabat 定义。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，其包含移植到人受体框架区上的从供体抗体衍生的 CDR，所述抗-白介素 18 抗体包含具有在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，其中所述抗-白介素 18 抗体的轻链的第 71 位残基与供体抗体框架中的相应位置中发现的残基相同。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，其包含具有在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，所述抗体在轻链的第 71 位包含酪氨酸。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含具有在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的 CDR 的重链和具有在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的 CDR 的轻链，其中所述轻链的 CDR 是从供体抗体衍生的，所述供体抗体在供体抗体轻链的第 71 位具有酪氨酸。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含来自供体抗体的 CDR，并且在所述人源化抗体的轻链的第 71 位具有酪氨酸，其中所述供体抗体是 2C10 或其框架变体（即，所述人源化的抗体包含与 2C10 相同的 CDR，但是不同的框架，参见 US 专利 6,706,487）。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 重链，其具有含有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列的 CDR，和

(b) 轻链，其具有含有移植到人轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，其中所述人轻链受体框架包含从 SEQ ID NO:38 衍生的框架区，其中 SEQ ID NO:38 的第 71 位是酪氨酸。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 重链，其具有允许与人 IL-18 特异性结合的 CDR，和

(b) 轻链，其具有受体框架，并具有含有在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，并在第 71 位具有酪氨酸残基。

所述轻链的 CDR 优选地位于受体框架内的位置，这些位置对应于在 SEQ ID NO:35 中陈列的序列中的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列的位置。所述轻链和/或重链优选地在人类患者中是非免疫原性的。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 重链，其包含具有在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列的 CDR，和

(b) 轻链，其包含移植到人轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，其中所述人源化的抗-白介素-18 抗体的所述轻链受体框架区衍生自在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列的变体，其中所述变体在第 71 位包含酪氨酸，并且所述变体包含与在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列有 75%或更高同一性的序列。优选地，所述变体包含与在

SEQ ID NO:38 中陈列的序列有 80%或更高的例如 81%、82%、83%、84% 同一性，更优选地，85%或更高的，例如 86%、87%、88%、89%的同一性，甚至更优选地，90%或更高的，例如 91%、92%、93%、94%的同一性，更优选地，95%或更高的，例如 96%、97%、98%、99%的同一性。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，该抗体包含：

(a) 从供体抗体衍生的在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的序列的 CDR，所述供体抗体在供体抗体的第 71 位含有酪氨酸；

(b) 人受体框架，所述受体框架在人轻链的第 71 位含有苯丙氨酸；其中所述抗-白介素 18 抗体在轻链的第 71 位含有酪氨酸。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 从供体抗体衍生的在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的 CDR，所述供体抗体在供体抗体轻链的第 71 位含有芳香族氨基酸；

(b) 人受体框架，所述受体框架在轻链受体框架的第 71 位含有与 (a) 部分中的芳香族氨基酸不同类型的芳香族氨基酸；

其中所述抗-白介素 18 抗体包含从 (a) 部分的抗体衍生的轻链，其在第 71 位含有芳香族氨基酸。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，当在 37°C 用表面等离子体共振（例如，Biacore™，优选的使用 Biacore™ 3000 仪器和在下文 7.4.1 中给出的条件）测量时，所述抗体针对结合人 IL-18 具有 300pM 的平衡常数。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，所述抗体包含在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的 CDR，并且当在 37°C 用表面等离子体共振（例如，Biacore™，优选的使用 Biacore™ 3000 仪器和在下文 7.4.1 中给出的条件）测量时，所述抗体对于结合人 IL-18 具有 300pM 的平衡常数。

优选地，有关抗体结合人 IL-18 的平衡常数在 37°C 用表面等离子体共振（例如，Biacore™，优选的使用 Biacore™ 3000 仪器和在下文 7.4.1 中给出的条件）测量时少于 90pM。更优选地，平衡常数是 70pM 或更少，更优选地是 65pM、60pM、55pM 或 50pM 或更少。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，所述抗体在 37°C 用表面等离子体共振（例如，Biacore™，优选的使用 Biacore™

T100 仪器和在下文 7.4.2 中给出的条件) 测量时, 对于人 IL-18 表现出 0.0002 1/s 或更高的解离常数或解离速率 (kd)。

在本发明的另一方面, 提供了人源化的抗-白介素-18 抗体, 该抗体包含:

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链, 所述 CDR 具有移植到重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列, 所述重链受体框架包含从在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列衍生的框架区, 其中所述重链的第 27、28、29、93、39、40、36、71、89、91 位的一个或多个残基与供体抗体重链中的相应残基相同;

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链, 所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列, 所述轻链受体框架包含从 SEQ ID NO:38 中陈列的序列衍生的框架区, 其中所述轻链的第 71 位和任选的第 45、83、84、85 位的一个或多个残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

在本发明的另一方面, 提供了人源化的抗-白介素-18 抗体, 包含:

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链, 所述 CDR 具有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列, 所述重链受体框架包含从 SEQ ID NO:37 中陈列序列衍生的框架区, 其中所述重链的第 27、28、29、93 位的残基与供体抗体重链中的相应残基相同;

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链, 所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列, 所述轻链受体框架包含从在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列衍生的框架区, 其中所述抗-白介素-18 抗体的轻链的第 71 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

在本发明的另一方面, 提供了人源化的抗-白介素-18 抗体, 包含:

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链, 所述 CDR 具有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列, 所述重链受体框架包含从在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列衍生的框架区, 其中所述重链的第 27、28、29、39、40、93 位的残基与供体抗体重链中的相应残基相同;

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链, 所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列, 所述轻链受

体框架包含从在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述轻链的第 71 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链，所述 CDR 具有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列，所述重链受体框架包含从在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述重链的第 27、28、29、36、39、40、71、89、91、93 位的残基与供体抗体重链中的相应残基相同；

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链，所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列，所述轻链受体框架包含从在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述轻链的第 71 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链，所述 CDR 具有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列，所述重链受体框架包含从在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述重链的第 27、28、29、93 位的残基与供体抗体重链中的相应残基相同；

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链，所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列，所述轻链受体框架包含从在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述轻链的第 71、45、83、84、85 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链，所述 CDR 具有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列，所述重链受体框架包含从在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述重链的第 27、28、29、93、39、40 位的残基与供体抗体重链中的相应残基相同；

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链，所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列，所述轻链受体框架包含从在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述

轻链的第 71、45、83、84、85 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

在本发明的另一方面，提供了人源化的抗-白介素-18 抗体，包含：

(a) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的重链，所述 CDR 具有移植到人重链受体框架上的在 SEQ ID NO:1、2 和 3 中陈列的序列，所述重链受体框架包含从在 SEQ ID NO:37 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述重链的第 27、28、29、93、39、40、36、71、89、91 位的残基与供体抗体重链中的相应残基相同；

(b) 包含从供体抗体衍生的 CDR 的轻链，所述 CDR 具有移植到轻链受体框架上的在 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中陈列的序列，所述轻链受体框架包含从在 SEQ ID NO:38 中陈列的序列衍生的框架区，其中所述轻链的第 71、45、83、84、85 位的残基与供体抗体轻链中的相应残基相同。

在本发明的另一方面，提供了包含重链和轻链的人源化抗-白介素-18 抗体，其中所述抗体在 25°C 时和结合的人 IL-18 的解离速率 (kd) 与所述抗体在 37°C 时和结合的人 IL-18 的解离速率 (kd) 之间的比值是 1: 5 或更少，其中所述抗体包含从供体抗体衍生的 CDR 和人受体框架，其中所述人受体框架的轻链的第 71 位的残基被来自供体抗体的相应残基取代。优选地使用 Biacore™ T100 仪器和在下文 7.4.2 中给出的条件来测量解离速率。

在本发明的另一方面，提供了人源化抗-白介素-18 抗体，其包含选自 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21 的重链和选自 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:29 的轻链。

在本发明的另一方面，提供了人源化抗-白介素-18 抗体，其包含 SEQ ID NO:9 的重链和 SEQ ID NO:13 的轻链，或者 SEQ ID NO:9 的重链和 SEQ ID NO:29 的轻链。

在本发明的另一方面，提供了人源化抗-白介素-18 抗体，其包含 SEQ ID NO:17 的重链和 SEQ ID NO:13 的轻链，或者 SEQ ID NO:17 的重链和 SEQ ID NO:29 的轻链。

在本发明的另一方面，提供了人源化抗-白介素-18 抗体，其包含 SEQ ID NO:21 的重链和 SEQ ID NO:13 的轻链，或者 SEQ ID NO:21 的重链和 SEQ ID NO:29 的轻链。

在本发明的另一方面，提供了包含本文中描述的抗-白介素-18抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。

在本发明的另一方面，提供了筛选用于治疗用途的抗体（特别是抑制配体和受体之间相互作用的抗体，例如抗-白介素-18抗体）的方法，所述方法包括：

(a) 在 30 至 45°C（优选的 37°C）测量抗体对抗体特异性结合的抗原的结合亲和力（使用例如：Biacore™ 表面等离子体共振）；

(b) 在 20 至 25°C（优选的 25°C）测量抗体对抗体特异性结合的抗原的结合亲和力（使用例如：Biacore™ 表面等离子体共振）；

(c) 如果 (a) 的亲和力大于 (b) 的亲和力，优选地，如果 (a) 的亲和力比 (b) 的亲和力大 2 倍或更多，更优选地，4 倍或更多，选择所述抗体用于治疗用途。

在本发明的另一方面，提供了选择用于治疗用途的抗体（特别是抑制配体和受体之间相互作用的抗体，例如抗-白介素-18抗体）的方法，所述方法包括：

(a) 在 30 至 45°C（优选的 37°C）时测量抗体与抗体特异性结合的抗原之间的解离速率（使用例如：Biacore™ 表面等离子体共振）；

(b) 在 20 至 25°C（优选的 25°C）测量抗体与抗体特异性结合的抗原之间的解离速率（使用例如：Biacore™ 表面等离子体共振）；

(c) 如果 (a) 的解离速率低于 (b) 的解离速率，则选择所述抗体用于治疗用途。

术语“抗-白介素-18抗体”指代本发明的抗体时意指此类能够中和人白介素-18 的生物学活性的抗体。它不排除此类抗体也可以中和非人灵长类（例如恒河猴和/或短尾猴）白介素-18 的生物学活性的情况。

附图的简要说明

还将参照附图进一步描述发明，其中：

图 1 显示了温度对 H1L1 和 H1L2 的结合速率 (k_a) 的影响；

图 2 显示了温度对解离速率 (k_d) 的影响；

图 3 显示了温度对平衡常数 (KD) 的影响；

图 4A-4C 显示了来自产生表 7 所示的 EC_{50} 值的一个实验的代表性数据；

图 5 显示了四种选择的人源化变体结合人 IL-18 的 EC50 值；
图 6 显示了选择的人源化变体结合人 IL-18 的 EC50 值；
图 7 显示了在存在 50%滑液时 H1L2 与人 IL-18 的结合；
图 8 显示了在 KG1 检测中,对 IL-18 激发的 IFN- γ 生产的抑制作用；
图 9A 和 9B 显示了分别在 10%和 25%自体血清中,在人 PBMCS 供体中对 LPS 激发的 IFN- γ 生产的抑制作用；
图 10 显示了 2C10 结合被 hIL18BP 捕获的 hIL18；
图 11 显示了 9 种人源化的变体抑制 IL-18 激发的在 KG1 细胞中释放 IFN- γ 的能力；
图 12 显示了 H1 变体和 2C10 在 KG1 细胞中对 IL-18 激发的 IFN- γ 生产的抑制作用；
图 13 显示了取 95%置信区间时 H1 变体的 IC50 数据；
图 14 显示了在 KG1 细胞中对 IL-18 激发的 IFN- γ 生产的抑制作用；
图 15 显示了在 KG1 细胞中对恒河猴 IL-18 激发的 IFN- γ 生产的抑制作用；
图 16 显示了使用嵌合 2C10 的人 IL-18 结合 ELISA 的结果；
图 17 显示了使用嵌合 2C10 的恒河猴 IL-18 结合 ELISA 的结果；
图 18A 和 18B 显示了分别使用 H1L2 和 2C10,结合人 IL-18 结合的 IL-19BP 的结合 ELISA 的结果。

4. 人源化的抗体

利用完整的非人类抗体治疗人类疾病或障碍,其本身就具有目前已被普遍证实的潜在免疫原性问题,特别是基于抗体的重复给药。即,患者的免疫系统将非人类的完整抗体识别为异己并且发起中和反应。除了发展完全的人抗体(参见上文)以外,多年来已经发展了各种技术来克服这些问题,这些技术一般涉及到减少完整抗体中的非人类氨基酸序列成分,但保留从接种动物(例如小鼠、大鼠或兔)获得非人类抗体的相对简易性。概括地说,已有两种方法可以达到这个目的。第一种方法是嵌合抗体,一般包含与人恒定区融合的非人类(例如:啮齿类例如小鼠)的可变区。因为抗体的抗原结合位点位于可变区内,嵌合抗体仍然保留了它对抗原的结合亲和力,但获得了人恒定区的效应子功能,因此能够发挥上文描述过的效应子功能。一般利用重组 DNA 方法来制备嵌合抗

体。分离编码抗体的 DNA (例如: cDNA), 用常规方法测序 (例如使用能与编码本发明抗体的 H 和 L 链的基因(例如编码上述 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 的 DNA)特异性地结合的寡核苷酸探针)。将杂交瘤细胞用作此类 DNA 的常见来源。如果需要表达嵌合载体, 分离编码轻链和重链的完整的成熟可变区的 cDNA, 将其框内插入到合适的表达载体中, 此外, 所述载体还含有一般是人类来源的合适的免疫球蛋白恒定区以及信号序列、终止密码子、启动子、终止子和其它获得抗体表达所需的元件。然后, 将此类载体转染到如不经转染则不会产生免疫球蛋白的宿主细胞 (例如: E.Coli、COS 细胞、CHO 细胞或骨髓瘤细胞) 中来获得抗体的合成。可以通过用人 L 和 H 链的编码序列来取代相应的非人类 (例如小鼠) 的 H 和 L 恒定区来对 DNA 进行修饰, 参见 Morrison, PNAS 81, 6851 (1984)。

第二种方法涉及制备人源化抗体, 其中, 通过人源化可变区减少了抗体的非人类组分。有两种常用的人源化技术。第一种是通过 CDR 移植实现人源化。CDR 在接近抗体的 N 末端形成环, 在框架区提供的支架上形成表面。抗体的抗原结合特异性主要是由该 CDR 表面的拓扑学和化学特征决定的。这些特征反过来又是由各个 CDR 的构象、CDR 的相对分布以及包含 CDR 的残基侧链的性质和分布决定的。仅通过将非人类 (例如小鼠) 抗体 (供体抗体) 的 CDR 移植到人框架区 (受体框架) 和恒定区上, 就可以大大降低免疫原性(参见 Jones 等人, (1986) Nature 321:522-525 和 Verhoeyen M 等人, (1988) Science 239:1534-1536)。但是 CDR 移植本身可能不会获得完全保留的抗原结合特性, 人们经常发现: 如果要恢复主要的抗原结合亲和力, 就需要保留供体抗体中的一些框架残基(有时称为“回复突变”)(参见, Queen C 等人, (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M 等人, (1991) Nature 351, 501-502)。在此情况下, 为了提供人框架区(FR), 可以从数据库中选择与非人类供体抗体序列同源性最高 (一般 60%或更高) 的人 V 区。可以从人共有序列或者各人的抗体中挑选人 FR。必要时, 可以将供体抗体的关键残基置换到人受体框架区内, 从而保留 CDR 构象。抗体的计算机模型可用于协助鉴定这些结构上重要的残基, 参见 W099/48523。

可选地, 还可以通过“表面修饰(veneering)”的过程实现人源化。人和鼠独特的免疫球蛋白重链和轻链可变区的统计学分析揭示, 在人和鼠

的抗体中，暴露残基的精确模式是不同的，多数单个的表面位置对很少几个不同的残基有强烈的偏好(参见，Padlan E.A.等人，(1991) Mol.Immunol. 28, 489-498 和 Pedersen J.T.等人，(1994) J. Mol. Bio. 235; 959-973)。因此，通过取代框架区中与通常在人抗体中发现的残基不同的暴露残基，就可能降低非人 Fv 的免疫原性。因为蛋白质的抗原性可能与其表面的可接近性相关，替换表面残基可能足以使人免疫系统“无视”小鼠可变区(还参见 Mark G E.等人，(1994) Handbook of Experimental Pharmacology 第 113 期: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134 页)。该人源化过程被称为“表面修饰化”，因为只改变了抗体的表面而没有干扰支持残基。其它可选的方法包括 WO04/006955 中提出的方法和 HumaneeringTM (Kalobios) 的方法，其利用细菌的表达系统生产序列上接近人类种系的抗体 (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics, January 2007, San Diego, California)。此外，目前的人源化方法涉及在人 CDR 区与供体小鼠抗体 CDR 区的结构相似性的基础上，而非基于抗体其它区域例如框架区的同源性，来选择人受体框架。该方法也被称为 SuperhumanizationTM (Evogenix Inc.; Hwang 等人, (2005) Methods 36:35-42)。

因此，本发明涉及上文第 3 节提出的人源化抗体。此类抗体优选地含有 IgG 同种型 (例如 IgG1 或 IgG4)

在替代实施方案中，可以让上文第 3 节提出的人源化抗体与非人恒定区 (“反相嵌合”) 融合，例如非人灵长类、大鼠、小鼠或兔子。

当然对本领域技术人员是显而易见的是，在 SEQ ID NO:37 和 38 中陈列的受体框架构成了分别由 VH 和 V_K基因编码的免疫球蛋白氨基酸。如此，它们同时包含了框架区和受体抗体的 CDR。用在 SEQ ID NO:1、2、3、4、5 和 6 中陈列的供体 CDR 取代受体抗体 CDR 以及将获得的序列与合适的框架 4 序列 (例如 SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:40 陈列的序列) 结合，从而生产完整的免疫球蛋白可变区 (例如，SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:15 陈列的)，完全属于本领域技术人员的能力范畴。

4.1 其它修饰

认为抗体的 Fc 区和各 Fc 受体(Fc γ R)之间的相互作用介导抗体的效应子功能，包括抗体依赖性的细胞毒性(ADCC)、补体的固定、细胞吞

噬作用和抗体的半衰期/消除。可以根据理想的效应子特性对本发明抗体的 Fc 区进行各种修饰。例如 EP 0 629 240 B1 和 EP 0 307 434 B2 中详细描述，在 Fc 区进行特定突变，使本来裂解性的抗体成为非裂解性的；或者可以在抗体中掺入补救受体结合表位，提高其血清半衰期(见 US 5739277)。目前识别的 5 种人 Fc γ 受体是 Fc γ R(I)、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa 和新生的 FcRn。Shields 等人, (2001) *J. Biol. Chem* 276, 6591-6604)证实了一组公用 IgG1 残基参与和所有 Fc γ R 的结合，同时 Fc γ RII 和 Fc γ RIII 还利用这组公用残基之外的一些不同位点。将以下一组 IgG1 残基改变为丙氨酸时，降低与所有 Fc γ R 的结合：Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297 和 Pro-239。所述残基全部位于 IgG 的 CH2 区，簇集在连接 CH1 和 CH2 的铰链附近。Fc γ R1 只利用公用 IgG1 残基组进行结合，而 Fc γ RII 和 Fc γ RIII 除了公用残基组外还与一些独特残基相互作用。一些残基的改变只减弱与 Fc γ RII 的结合(例如 Arg-292)或与 Fc γ RIII 的结合(例如 Glu-293)。一些变体表现出与 Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的改善的结合，但不影响与其他受体的结合(例如，Ser-267Ala 改善与 Fc γ RII 的结合，但不影响与 Fc γ RIII 的结合)。其它变体则表现出与 Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的改良的结合，但与其他受体的结合下降(例如，Ser-298Ala 提高了与 Fc γ RIII 的结合，但与 Fc γ RII 的结合下降)。对于 Fc γ RIIIa，结合最好的 IgG1 变体综合了在 Ser-298、Glu-333 和 Lys-334 处的丙氨酸取代。认为新生儿 FcRn 受体参与了抗体清除和跨组织的胞吞转运作用(参见，Junghans R.P (1997) *Immunol. Res* 16, 29-57 和 Ghetie 等人, (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766)。决定与人 FcRn 直接相互作用的人 IgG1 残基包括：Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434 和 His435。因此，本发明涉及具有任一项上文详细描述残基改变的发明的抗体，所述改变可修饰半衰期/清除和/或改变效应子功能(例如 ADCC 和/或补体裂解)。

其他修饰包括本发明抗体的糖基化变体。已知在抗体恒定区的保守位点处抗体的糖基化对抗体功能，特别是对例如上文描述的效应子功能有深刻的影响，参见例如：Boyd 等人, (1996), *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318。还考虑本发明的治疗用抗体或其抗原结合片段的糖基化变体，其中增加、取代、删除或者修饰了一或多个碳水化合物部分。引入天冬酰胺-X-丝氨酸或天冬酰胺-x-苏氨酸基序，产生了用于碳水化合物

部分的酶促附连的潜在位点，因此可用于操纵抗体糖基化。在 Raju 等人, (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876 中，利用 β -1,4-半乳糖基转移酶和/或 α -2,3-唾液酸转移酶通过再半乳糖糖基化和/或再唾液酸化，提高了 TNFR-IgG 免疫粘附素的末端唾液酸化。认为增加末端唾液酸化能够延长免疫球蛋白的半衰期。与多数糖蛋白一样，抗体通常是以糖型混合物的形式产生的。在真核细胞，特别是在哺乳动物细胞中生产抗体时，这种混合物尤其明显。已经开发了多种方法来制备指定的糖型，参见 Zhang 等人, *Science* (2004), 303, 371, Sears 等人, *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker 等人, (2002) *Science*, 298 1790, Davis 等人, (2002) *Chem.Rev.* 102, 579, Hang 等人, (2001) *Acc.Chem.Res* 34, 727。因此，本发明考虑了涉及多种如本文所述的治疗性(单克隆)抗体(可以是 IgG 同种型，例如 IgG1)，所述抗体包含指定数量(例如 7 或以下，例如 5 或以下，例如 2 或 1 个)的所述抗体或抗原结合片段的糖型。

本发明其它的实施方案包括与非蛋白性多聚体(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化亚烷基(polyoxyalkylene))偶联的本发明的治疗用抗体或其抗原结合片段。使蛋白质与 PEG 偶联是已有技术，可用于提高蛋白质半衰期、降低蛋白质的抗原性和免疫原性。已经采用完整抗体以及 Fab' 片段研究了不同分子量和形式(线形或分支)的 PEG 修饰的用途，参见 Koumenis I. L. 等人, (2000) *Int.J.Pharmaceut.* 198:83-95。

5. 制备方法

可以在转基因生物中生产本发明的抗体，这些转基因生物例如是山羊(参见 Pollock 等人, (1999), *J. Immunol. Methods* 231 :147-157)、鸡(参见 Morrow KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20:1-55)、小鼠(见 Pollock 等人, 同上)或植物(见 Doran PM, (2000) *Curr.Opinion Biotechnol.* 11, 199-204, Ma JK-C (1998), *Nat.Med.* 4; 601-606, Baez J 等人, *BioPharm* (2000) 13: 50-54, Stoger E 等人; (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590)。也可以通过化学合成来生产抗体。但是本发明的抗体通常是利用本领域技术人员熟知的重组细胞培养技术制备的。分离编码抗体的多核苷酸，将其插入可复制载体(例如质粒)用于进一步克隆(扩增)或在宿主细胞中表达。一个有效的表达系统是谷氨酸合成酶系统(例如 Lonza Biologics 出售的)，尤其是当宿主细胞是 CHO 或 NSO 的时候(见下文)。利用传统程

序(例如寡核苷酸探针)可以方便地对编码抗体的多核苷酸进行分离和测序。可用的载体包括质粒、病毒、噬菌体、转座子、微染色体,其中质粒是代表性的实施方案。一般来说,此类载体还包括与轻链和/或重链多核苷酸可操纵地连接的信号序列、复制起点、一或多个标志基因、增强子元件、启动子和转录终止序列,从而有利于表达。可以将编码轻链和重链的多核苷酸插入分离的载体,并同时或先后引入(例如:通过转化、转染、电穿孔或转导)同一宿主细胞,或者如果需要,可以在上述转导前将重链和轻链插入相同的载体。

对本领域技术人员显而易见的是由于遗传密码的冗余性,文中公开的多核苷酸的替代多核苷酸序列也可以编码本发明的多肽。

5.1 信号序列

可以以带有异源信号序列的融合蛋白形式来生产本发明的抗体,所述信号序列在成熟蛋白质的N末端具有特异性切割位点。宿主细胞可以识别和加工信号序列。对于原核宿主细胞,信号序列可以是碱性磷酸酶、青霉素酶或者热稳定的肠毒素II前导序列。对于酵母菌分泌,信号序列可以是酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列或酸性磷酸酶前导序列(见如W090/13646)。在哺乳动物细胞系统中,可获得的是病毒分泌前导序列(例如单纯疱疹病毒gD信号)和天然免疫球蛋白信号序列(例如人的Ig重链)。通常,信号序列与编码本发明抗体的多核苷酸连接在同一读码框内。

5.2 复制起点

本领域熟知的复制起点含有适合多数革兰氏阴性细菌的pBR322、适合多数酵母菌的2 μ 质粒以及适合多数哺乳动物细胞的各种病毒复制起点,例如SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或者BPV。通常,整合的哺乳动物表达载体不需要复制起点成分,除非需要在E.Coli中载体增殖。但是SV40 ori含有早期启动子,所以可以被使用。

5.3 选择标记

典型的选择基因编码这样的蛋白质:(a)赋予对抗生素(例如氨基青霉素、新霉素、氨基蝶呤或四环素)或其他毒素的抗性,或者(b)互补营

养缺陷型或提供复合培养基中没有的营养物，或者(c)两者的结合。选择的原理可涉及使不含有载体的宿主细胞停止生长。那些成功地转化了编码本发明治疗用抗体的基因的细胞，由于共同递送的选择标记所赋予的例如药物抗性而存活。一个实例是 DHFR-选择系统，其中，转化子是从 DHFR 阴性的宿主菌株中产生的（例如参见，Page 和 Sydenham 1991 *Biotechnology* 9: 64- 68）。在该系统中，DHFR 基因与本发明的抗体多核苷酸序列被共同递送，然后通过撤除核苷酸来选择 DHFR 阳性细胞。如果需要，还可以使用 DHFR 的抑制剂氨甲喋呤来选择 DHFR 基因扩增的转化子。通过将 DHFR 基因可操作地连接到本发明的抗体编码序列或其功能性衍生物，DHFR 基因的扩增可获得所需要的目标抗体序列的共同扩增。CHO 细胞特别适合该 DHFR/氨甲喋呤选择，使用 DHFR 系统扩增和选择宿主细胞的方法也是本领域普遍已知的，参见 Kaufman R.J. 等人, *J. Mol. Biol.* (1982) 159, 601-621, 关于综述，参见 Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", *Arzneimittel-Forschung*. 48(8):870-80, 1998 Aug。其它的实例是谷氨酸合成酶表达系统（Lonza Biologics）。适于在酵母中使用的选择基因是 *trp1* 基因，参见 Stinchcomb 等人, *Nature* 282, 38, 1979。

5.4 启动子

用于表达本发明抗体的合适启动子与编码抗体的 DNA/多核苷酸可操作地连接在一起。用于原核宿主的启动子包括 *phoA* 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸和杂合启动子，例如 *Tac*。适于在酵母细胞中进行表达的启动子包括 3-磷酸甘油激酶或者其他糖酵解酶，例如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油变位酶和葡萄糖激酶。可诱导的酵母启动子包括醇脱氢酶 2、同型细胞色素 C、酸性磷酸酶、金属硫蛋白和负责氮代谢或者麦芽糖/半乳糖利用的酶。

用于在哺乳动物细胞系统中表达的启动子包括 RNA 聚合酶 II 启动子，包括病毒启动子，例如多瘤病毒、禽痘病毒和腺病毒（例如腺病毒 2）、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒（特别是立即早期基因启动子）、逆转录病毒、乙型肝炎病毒、肌动蛋白、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和早期或晚期猴病毒 40；以及非病毒启动子例如 *EF-1 α* （Mizushima

和 Nagata *Nucleic Acids Res* 1990 18(17):5322)。启动子的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的相容性。

5.5 增强子元件

合适时（例如用于在高等真核细胞中表达时），可以使用与启动子元件可操纵地相连在载体中的增强子元件。合适的哺乳动物增强子序列包括来自球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、胎蛋白和胰岛素的增强子元件。可选地，可以使用来自真核细胞病毒的增强子元件，例如 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子、杆状病毒增强子或者小鼠 IgG2a 座位（参见 W004/009823）。一般此类增强子在载体上位于启动子上游的位置，但也可以位于任何位置，例如：在非翻译区或多聚腺苷酸信号的下游。增强子的选择和放置可以基于与用于表达的宿主细胞的相容性。

5.6 多聚腺苷化/终止

在真核系统中，多聚腺苷化信号可操作地与编码本发明抗体的多聚核苷酸连接。此类信号一般位于开放阅读框的 3'端。在哺乳动物系统中，非限制性的信号实例包括从生长激素、延伸因子-1 α 和病毒（例如：SV40）基因或逆转录病毒长末端重复衍生的信号。在酵母系统中，多聚腺苷化/终止信号包括自磷酸甘油激酶（PGK）和乙醇脱氢酶 1（ADH）基因衍生的信号。在原核系统中一般不需要多聚腺苷化信号，取而代之一般使用更短和更清晰的终止子序列。多聚腺苷化/终止信号的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的相容性。

5.7 用于提高产量的其它方法/元件

除了上述内容，还可以使用其它特征来提高产量，包括染色体重建元件、内含子和宿主细胞特异性密码子修饰。可以适应宿主细胞的密码子偏爱来修饰本发明抗体的密码子用法，从而提高转录和/或产品产量（例如：Hoekema A 等人, *Mol Cell Biol* 1987 7(8):2914-24）。密码子的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的相容性。

5.8 宿主细胞

用于克隆或表达编码本发明抗体的载体的合适的宿主细胞是原核、酵母或高等真核细胞。合适的原核细胞包括真细菌，例如肠杆菌科，如埃希氏菌属（例如 *E.coli*（例如：ATCC 31446；31537；27325））、肠杆菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏菌属、变形菌属、沙门氏菌属如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)和志贺氏菌属，以及芽孢杆菌属如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)(参见，DD 266 710)、假单胞杆菌如铜绿假单胞杆菌(*P. aeruginosa*)和链霉菌。酵母宿主细胞有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)(例如：ATCC 16045、12424、24178、56500)、耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP402226)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183070；还参见 Peng 等人, *J. Biotechnol.* 108 (2004) 185-192)、念珠菌(*Candida*)、里氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244 234)、青霉菌(*Penicillin*)、弯颈霉(*Tolyposcladium*)和曲霉属(*Aspergillus*)，例如：构巢曲霉(*A. nidulans*)和黑曲霉(*A. niger*)。

虽然本发明特别考虑真核和酵母宿主细胞，但一般地，本发明的宿主细胞是脊椎动物细胞。合适的脊椎动物宿主细胞包括哺乳动物细胞，例如：COS-1 (ATCC No. CRL 1650)、COS-7(ATCC CRL 1651)、人胚胎肾细胞系 293、幼仓鼠肾细胞(BHK)(ATCC CRL. 1632)、BHK570(ATCC NO: CRL 10314)、293 (ATCC NO. CRL 1573)、中国仓鼠卵巢细胞 CHO(例如 CHO-K1, ATCC NO: CCL 61)、DHFR-CHO 细胞系(例如 DG44, 参见 Urlaub 等人, (1986) 同上)，特别是那些适合悬浮培养的 CHO 细胞系、小鼠支持细胞(*Sertoli cell*)、猴肾细胞、非洲绿猴肾细胞(ATCC CRL-1587)、HELA 细胞、犬肾细胞(ATCC CCL 34)、人肺细胞(ATCC CCL 75)、Hep G2 和骨髓瘤或淋巴瘤细胞，如 NSO(参见 US 5807715)、Sp2/0、Y0。

因此,本发明一个实施方案提供了稳定转化的宿主细胞,其包含编码本文所述治疗用抗体的重链和/或轻链的载体。一般此类宿主细胞包含编码轻链的第一载体和编码重链的第二载体。

还可以进一步改造或调试此类宿主细胞,从而修饰本发明抗体的质量、功能和/或产量。非限制性的实例包括表达特定修饰(例如糖基化)的酶和蛋白质折叠伴侣。

5.9 细胞培养方法

可以通过本领域技术人员已知的任何方法培养用编码本发明治疗用抗体的载体转化的宿主细胞。可以将宿主细胞培养在旋转角瓶、摇瓶、滚瓶或中空纤维系统中，但是对于大规模生产，优选搅拌罐反应器或袋式反应器（例如 Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA）进行悬浮培养。一般利用例如分散器、挡板或低剪切搅拌翼将搅拌罐改造成适应通气。对于鼓泡塔和气升式反应器，可以用空气或氧气泡直接通气。当宿主细胞培养在无血清培养基中时，优选在培养基中补充细胞保护剂（例如 Pluronic F-68），保护细胞免受通气过程造成的损伤。根据宿主细胞的特点，贴壁依赖性细胞系可使用微载体作为生长基质，或者使细胞适应悬浮培养（常见情况）。宿主细胞，特别是脊椎动物宿主细胞的培养，可以运用多种操作模式，例如补料分批、重复分批培养（参见 Drapeau 等人, (1994) *cytotechnology* 15: 103-109）、持续单批培养或者灌流培养。虽然可以在含有血清（如胎牛血清(FCS)）的培养基中培养重组转化的哺乳动物宿主细胞，但是，优选地在合成的无血清培养基（例如 Keen 等人, (1995) *Cytotechnology* 17:153-163 中公开的）或可商购的培养基（例如 ProCHO-CDM 或 UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA),）中培养此类宿主细胞，如果需要，还可以补充必要的能量源如葡萄糖和合成生长因子如重组胰岛素。宿主细胞的无血清培养要求这些细胞适应在无血清的条件下生长。一种适应方法是在含有血清的培养基中培养此类宿主细胞，然后重复地将 80% 的培养基换成无血清培养基，使宿主细胞学习适应无血清条件（参见例如 Scharfenberg K 等人, (1995) in *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E. C. 等人编著), 619-623 页, Kluwer Academic publishers)。

可以利用各种技术从培养基中回收和纯化分泌到培养基中的本发明抗体，从而提供适合所需用途的纯化程度。例如，本发明的治疗用抗体用于治疗人类患者的用途通常要求，与含有治疗性抗体的培养基相比，用还原性 SDS-PAGE 测定时具有至少 95% 的纯度，更常见的要求 98% 或 99% 的纯度。在第一个例子中，通常利用离心去除培养基中的细胞残片，随后利用例如微滤、超滤和/或深层过滤进行上清液的澄清化步骤。可选地，可以在不离心的条件下，利用微滤、超滤或深层过滤收获

抗体。还可使用多种其他技术，例如：透析、凝胶电泳和层析技术（例如羟基磷灰石层析(HA)、亲和层析(任选地涉及亲和标记体系如多聚组氨酸)和/或疏水相互作用层析(HIC，参见 US5429746)。在一个实施方案中，在多个澄清化步骤之后，利用蛋白 A 或 G 亲和层析捕获本发明抗体，随后是进一步的层析步骤如离子交换和/或 HA 层析、阴离子或阳离子交换、大小排阻层析以及硫酸铵沉淀。通常，还使用各种去除病毒的步骤（例如用 DV-20 滤膜进行纳米过滤等）。经过这些步骤，提供了纯化的（通常是单克隆的）制品，其包含至少 10 mg/ml 或更多（例如 100 mg/ml 或更多）的本发明抗体，从而构成了发明的一个实施方案。通过超速离心可以产生 100 mg/ml 或更高的浓度。适合的此类制品基本上不含有聚集形式的本发明抗体。

细菌体系特别适合表达抗体片段。这些片段位于胞内或周间质。根据本领域技术人员已知的方法，可以提取不溶性周间质蛋白，并重新折叠成活性蛋白质，参见 Sanchez 等人, (1999) *J.Biotechnol.* 72, 13-20 和 Cupit PM 等人, (1999) *Lett Appl Microbiol*, 29, 273-277。

6. 药物组合物

上文描述的本发明抗体的纯化制剂(特别是单克隆制剂)，可以被掺入到药物组合物中，用于治疗上文概述过的人类疾病和紊乱。通常此类组合物还包含药学上可接受的（即，惰性的）载体，所述载体是可接受的药学实践已知且要求的，参见例如：*Remingtons Pharmaceutical Science*，第 16 版，(1980) Mack 出版公司。此类载体的实例包括用适宜缓冲液缓冲到 pH5-8 的灭菌载体，例如：盐水、林格氏溶液或葡萄糖溶液。注射（例如：通过静脉内、腹腔内、皮内、皮下、肌肉内或门静脉内）或持续输注的药物组合物合适地不含可见颗粒物，并可包含 0.1 ng-100 mg 抗体，通常 5 mg-25 mg 抗体。制备这类药物组合物的方法是本领域熟知的。在一个实施方案中，药物组合物的每单位剂量形式含有 0.1 ng-100 mg 本发明的治疗用抗体，任选地还具有使用说明。可以冻干（冷冻干燥）本发明的药物组合物，用于在给药前根据本领域技术人员已知的或显而易见的方法进行重建。当发明实施方案包含本发明抗体的 IgG1 同种型时，可以向药物组合物中加入铜螯合剂，如柠檬酸盐（例如柠檬酸钠）或 EDTA 或组氨酸，从而降低铜介导的该同种型抗体的降解

程度，参见 EP0612251。

一般根据经验决定本发明抗体给药的有效剂量和治疗方案，依赖于患者的年龄、体重和健康状况以及治疗的疾病或障碍。这些影响因素在主治医生的考虑内。在例如 Smith 等人, (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York 中可发现对选择合适剂量的指导，但一般在 1 mg 至 1000 mg 之间。在一个实施方案中，治疗患有 RA 的人类患者的剂量方案是每周或每两周皮下给予 100 mg 左右(例如，在 50 mg 至 200 mg 之间)的本发明抗体(或其抗原结合片段)。本发明的组合物还可以用于预防性用途。

根据所治疗的疾病和障碍，可以将包含治疗有效量的本发明抗体的药物组合物与有效量的另一种药剂同时、分别或先后使用，所述药剂是例如：抗炎剂如 NSAID、氨甲蝶呤、布西拉明(bucillamine)、乙硫羟酸钠，或者一种或多种抗-TNF α 治疗，例如：Enbrel™(依那西普)、Remicade™(英夫利昔单抗)、Humira™(阿达木单抗)和/或 CDP870。本发明的抗体可以与有效量的抗-TNF α 受体抗体联合使用，参见 Davis MW 等人, (2000) *Ann Rheum Dis* 59(Suppl 1): 41-43。在另一个实施方案中，本发明的抗体可以与有效量的针对以下物质的试剂联合使用：IL-1/IL-1 R(例如 Kineret™)、CTLA4-Ig、IL-6(参见 Choy 等人, (2002) *Ann. Rheum. Dis* 61 (suppl 1): 54)、IL-8、IL-15、VEGF、IL-17、IL-18(参见 Taylor 等人, (2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13: 611-616)、抗-ICAM 和/或抗-CD4 抗体，针对 MMP 家族的成员(如 MMP-1、2、3 和/或 13)的试剂。发明的抗体还可以与摘除已知在炎症过程涉及的细胞的试剂联合使用，例如 CD20 阳性的 B 细胞，使用 Mabthera™(利妥昔单抗)。其它与本发明抗体结合的治疗还包括血管生成抑制疗法，例如：整合素 α V β 3 的拮抗剂、Kringle 1-5(参见 Sumariwalla P 等人, (2003), *Arthritis Res Ther* 5:R32-R39)、可溶性 Flt-1(参见 Miotla 等人, (2000) *Lab. Invest.* 80:1195-1205)、抗-COX-2 试剂或抗-OSM 试剂(如抗-OSM 抗体)，参见 WO2005/095457，其完整内容通过引用被整合到本文中，并可被读者查阅。按照惯例，本发明还应考虑这样的药物组合物，其包含本发明抗体或其抗原结合片段和其它药品，并且任选地与使用说明一起构成的试剂盒。这些组合在治疗关节疾病/病症例如类风湿性关节炎中或许是特别有用的。

7. 临床用途

本发明的抗体可用于治疗 IL-18 介导的疾病，例如自身免疫病。特别提及的是多发性硬化、关节炎疾病如类风湿性关节炎、I 型糖尿病、炎性肠病 (IBD) 和牛皮癣。因此，本发明还包括治疗患有应答 hIL-18 中和作用的疾病 (例如多发性硬化、类风湿性关节炎、I 型糖尿病、IBD、牛皮癣) 的人类患者的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的本发明抗体，特别是具有在 SEQ ID NO:9 中陈列的序列的重链和在 SEQ ID NO:13 中陈列的序列的轻链的抗体。

还提供了本发明抗体在生产用于治疗一种 (或多种) 上述疾病/障碍的药物中的用途。

表 A

蛋白质或多核苷酸(PN)的描述	序列识别符 (SEQ ID NO:)
CDRH1	1
CDRH2	2
CDRH3	3
CDRL1	4
CDRL2	5
CDRL3	6
人 IL-18	7
人 IL-18 PN	8
H1 重链(可变区+恒定区)	9
H1 重链(PN)	10
H1 可变区	11
H1 可变区(PN)	12
L2 轻链(可变区+恒定区)	13
L2 轻链(PN)	14
L2 可变区	15
L2 可变区(PN)	16
H2 重链(可变区+恒定区)	17

H2 重链(PN)	18
H2 可变区	19
H2 可变区(PN)	20
H3 重链(可变区+恒定区)	21
H3 重链(PN)	22
H3 可变区	23
H3 可变区(PN)	24
L1 轻链(可变区+恒定区)	25
L1 轻链(PN)	26
L1 可变区	27
L1 可变区(PN)	28
L3 轻链(可变区+恒定区)	29
L3 轻链(PN)	30
L3 可变区	31
L3 可变区(PN)	32
2c10 大鼠-人 IgG1 嵌合体	33
2c10 大鼠-人 IgG1 嵌合体(PN)	34
2c10 大鼠-人 C κ 嵌合体	35
2c10 大鼠-人 C κ 嵌合体(PN)	36
重链受体框架	37
轻链受体框架	38
添加到 SEQ ID NO:37 的 JH6 氨基酸序列	39
添加到 SEQ ID NO:38 的 J κ 氨基酸序列	40

7. 举例说明

下列实施例例举了本发明的各个方面。所有一般的克隆、连接和其它重组 DNA 技术都根据 Maniatis 等人, Molecular cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 或 Sambrook 等人, Molecular Cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory 中的一般教导实施。本文中使用的载体系统和其它分子生物学方法都被公开在 WO2005/095457 中, 其完整内容通过引用被整合到本文中, 并且读者可

专门查阅。

7.1 克隆杂交瘤可变区

亲代大鼠抗体 2C10 是在 US 专利 6706487 中陈列的。读者可以专门查阅该文件。在上述公开的大鼠 V 区的基础上，连接人 IgG1 或 κ C 区，设计嵌合抗体 2C10c。在重链和轻链构建体上引入通用的免疫球蛋白信号序列和翻译起始密码子 ATG。设计 Hind III 和 BsiWI 限制性内切酶位点来框出 VL 结构域，并且允许将其克隆到已经含有人 C κ 区 (SEQ ID NO:36) 的哺乳动物表达载体中。设计 Hind III 和 SpeI 限制性内切酶位点来框出 VH 结构域，并且允许将其克隆到已经含有人 γ 1 C 区 (SEQ ID NO:34) 的哺乳动物表达载体中。这导致在 2C10 Vh 区的框架 4 (Kabat 残基 107 和 108) 与已公开的序列有 2 个氨基酸的改变，如在 SEQ ID NO:33 中所示的。

通过 PCR 使用重叠的寡核苷酸来构建整个编码序列，并克隆到上文概述的表达载体中。经过序列验证后，在 CHO 细胞中表达嵌合抗体。通过在 rProtein A 琼脂糖上亲和层析来从细胞培养上清液中纯化所生产的抗体。在体外结合检测中评估 2C10 的嵌合抗体，证实其与亲代大鼠 2C10 具有可比较的效价。通过在 ELISA 中测定结合人或恒河猴 IL-18 的 EC50 值 (图 16 和 17)，或在 KG-1 生物检测中测定对 IFN- γ 释放的抑制作用 (参见图 15)，来实现上述评估。

7.2 人源化

7.2.1 轻链的人源化策略

对于 2C10 大鼠可变轻链序列，选择与大鼠 2C10 可变轻链序列具有 64% 同一性 (包括 CDR) 的人种系受体框架 (F_IGV1D-12-1, SEQ ID NO:38)。种系 V 区在电脑模拟中与合适的 FR4 结合，在此情况下，J 区 κ 2 小基因 (Kabat Vol.II) 基于序列相似性 (SEQ ID NO:40)。基于序列比较和对抗体功能的可能的影响，产生了三种人源化变体。构建体 L1 是大鼠 CDR (使用 Kabat 定义) 直接移植到上文选定的人受体框架上。构建体 L2 在 L1 的基础上具有第 71 位残基的一处额外回复突变。构建体 L3 在 L2 的基础上在第 45、83、84 和 85 位残基处具有 4 处额外

的回复突变。参见表 1。

表 1: 产生的人源化 VL 变体的概述

构建体	受体/模板框架	位于 aa#处的回复突变 (Kabat)	回复突变总数	人受体框架	原始大鼠序列
L1	F_IGV1D-12-1/J2 SEQ.I.D.NO:38	-----	无	----	-----
L2	L1	71	1	F	Y
L3	L2	45 83 84 85	5	K F A T	Q E G D

7.2.2 重链的人源化对策

对于 2C10 大鼠可变重链序列, 选择与大鼠 2C10 可变重链序列具有 59% 同一性 (包括 CDR) 的人种系受体框架 (Fp_IGHV1-f_2, SEQ ID NO:37)。种系 V 区在电脑模拟中与合适的 FR4 结合, 在此情况下, JH6 小基因 (Kabat Vol.II) 基于序列相似性 (SEQ ID NO:39)。基于该框架产生了三种人源化变体。H1 是大鼠 CDR (使用 Kabat 定义) 的移植物, 在第 27、28、29 和 93 位残基处具有 4 个额外的回复突变。这允许在紧挨亲代 (即, 供体) 抗体的 CDR1 上游罕见的氨基酸序列, 其可以构成部分 CDR (参见 Clouthia 的定义)。H2 在 H1 的基础上具有第 39 和 40 位残基的 2 处额外回复突变。H3 在 H2 的基础上在第 36、71、89 和 91 位残基处具有另外 4 处额外的回复突变。参见表 2。

表 2: 产生的人源化 Vh 变体的概述

构建体	受体/模板框架	位于 aa#处的回复突变 (Kabat)	回复突变总数	人受体框架	原始大鼠序列
H1	Fp_IGHV1-f_2 SEQ.ID.NO:37	27	4	Y	E
		28		T	I
		29		L	S
		93		A	T
H2	H1	39	6	Q	R
		40		A	R
H3	H2	36	10	W	F
		71		E	A
		89		V	T
		91		Y	F

7.3 2C10C 的人源化

通过 PCR 扩增和重叠的寡核苷酸重新构建人源化的 V 区。引物包含用于克隆到哺乳动物表达载体的限制性酶切位点和用于分泌的人免疫球蛋白信号序列。使用 Hind III 和 SpeI 将人源化的 V 区作为 H1、H2 和 H3 克隆到含有人 $\gamma 1$ 恒定区的哺乳动物表达载体中，使用 Hind III 和 BsiWI 作为 L1、L2 和 L3 克隆到含有人 κ 恒定区的哺乳动物表达载体中。其产生了人源化重链变体的人 IgG 同种型和人源化轻链变体的人 κ 同种型。

7.3.1 表达人源化的重链和轻链抗体组合

以一式四份瞬时地转染 CHOK1 细胞。检测上清液的抗体浓度，然后通过比较 2C10 大鼠-人嵌合体，用于体外结合检测。

按如下方式实施所有 9 种变体的大规模瞬时表达：每个培养瓶，在 8 ml 培养基 (OptiMEM/glutamax/5% FBS) 中混合 51.4 μg 轻链质粒和 8.6 μg 重链质粒以及 240 μg 转染液体 (在 WO2006/053783, 实施例 13 中描述了该液体，其通过引用全文整合到本文中)，并将该混合物施用于两瓶 T175 培养瓶的几乎汇合的 CHOK1 细胞上，在典型的组织培养条

件下维持 72 小时。还在多克隆 CHO 细胞系统中，以 mg 量级表达所述抗体，使用摇瓶并使用 FPLC 和蛋白 A 进行纯化。

7.4 体外结合检测

7.4.1 Biacore 分析

利用蛋白 A 捕获 HBS-EP 缓冲液(Biacore™)中的抗体，在 Biacore™ 3000 仪器上进行人源化 2C10 抗体的 Biacore™ 动力学分析。简而言之，通过伯胺偶联将蛋白 A 固定在 CM5 芯片上，利用生产商推荐的实验规程，达到密度约 2000-4000 共振单位 (RU's)。然后，让人源化抗体经过蛋白 A 表面，捕获水平为约 200-500 RU's，经过一段时间的稳定后，将 IL18 (人的或恒河猴的) 以确定的浓度通过捕获的抗体表面，获得结合的感应谱。利用酸性洗脱条件再生，从蛋白 A 表面完全去除捕获的抗体，而不会显著降低表面的结合容量。所有曲线都双倍参考了缓冲注射液以代替 IL18，利用在 BiaEval 4.1 中的全球普适的参数将数据拟合到 1:1 结合模型。解离速率评级实验也是利用相同的蛋白 A 捕获方法建立的，但是只使用了单个的 IL18 浓度 (10 nM)。同时也使用与动力学分析相同的结合模型拟合数据，由于报告解离速率使用一种分析物浓度，该值更适合用于排序而不是给出确切的动力学测量，作为将选择何种抗体将被进一步研究的方法。

在 25°C 时的初始结果指示，所有的构建体具有与大鼠 2C10 亲代抗体相似的人 IL18 结合亲和力。然而，当在 37°C 进行解离速率评定实验时，L1 构建体比 L2 和 L3 表现差，可见增加的解离速率 (表 3a 和 3b)。

表 3a: 人抗-IL18 抗体的 Biacore 分析的动力学参数，在 25°C 时检测。

抗体	ka	Kd	KD(pM)
2C10	2.55e6(7e4)	3.5e-5(4.2e-6)	13.9(2.2)
H1L1	1.4e6	4.7e-5	33.2
H1L2	1.3e6(1.4e5)	3.85e-5(1.5e-5)	30.3(8.7)
H1L3	1.25e6(2.1e4)	2.8e-5(5.7e-6)	22.5(7.2)
H2L1	1.03e6(1.0e5)	3.35e-5(1.1e-5)	33.5(13.4)
H2L2	1.4e6(1.4e5)	2.8e-5(0.0)	20.1(1.8)

H2L3	1.15e6(7e5)	2.8e-5(2.8e-6)	23.8(0.7)
H3L1	2.5e6(4.2e5)	4.7e-5(9.9e-6)	19.4(7.6)
H3L2	2.6e6(2.8e5)	4.3e-5(3.6e-6)	16.5(2.7)
H3L3	1.7e6(4.2e5)	4.0e-5(5.7e-6)	24.2(9.3)

数据：两次实验的结果（标准偏差）。

表 3b: Biacore 检测与蛋白 A 捕获的人源化抗-IL18 抗体结合的人 IL18 的解离速率评级，在 37°C 时检测。

抗体	Kd
2C10	7.01e-5
H1L1	1.62e-4
H1L2	4.81e-5
H1L3	5.54e-5
H2L1	9.93e-5
H2L2	4.15e-5
H2L3	4.62e-5
H3L1	1.3e-4
H3L2	8.22e-5
H3L3	7.01e-5

数据：一次实验的结果。

不仅在 37°C 时表现差，L1 构建体结合恒河猴 IL18 的亲合力在 25°C 时也同样不佳（表 4a）。基于这些观察结果，在 37°C 详细研究选定抗体与人和恒河猴 IL-18 的结合。表 4b 中显示的人 IL-18 的数据是六次独立测定的平均值（和标准偏差）。恒河猴 IL-18 的数据显示 H1L2 和 H1L3 的两次使用的平均值和标准偏差，而 H3L2 和 H3L3 的数据则来自单次实验。该数据相对较高的标准偏差可能是在 37°C 时进行该实验的结果。

L1 构建体表现相对较差的事实是令人惊讶的，考虑到 L1 和 L2 构建体之间的差异仅在于用苯丙氨酸取代轻链第 71 位酪氨酸的回复突变。酪氨酸和苯丙氨酸都是芳香族氨基酸，因此在 37°C（而非 25°C）时，

在 Biacore™ 系统中观察到框架结构中这一细微的改变产生明显的结果（对于结合亲和力）是预料之外的。

表 4a: Biacore 检测与人源化抗体构建体结合的恒河猴 IL-18 的动力学参数，在 25°C 时检测。

抗体	ka	Kd	KD(pM)
2C10	1.2E6	6.6E-5	54.7
H1L1	4.3E5	1.6E-4	380
H1L2	4.3E5	4.7E-5	108
H1L3	5.8E5	6.4E-5	109
H2L1	2.9E5	1.8E-4	627
H2L2	5.3E5	5.5E-5	104
H2L3	4.7E5	8.8E-5	189
H3L1	9.1E5	1.4E-4	149
H3L2	1.1E6	6.6E-5	59.6
H3L3	1.0E6	7.0E-5	69.1

数据：一次实验的结果。

表 4b: Biacore 检测与人源化抗体构建体结合的恒河猴 IL-18 的动力学参数，在 37°C 时检测。

抗体/IL18	ka	Kd	KD(pM)
H1L2			
人 IL18	7.75e5(2.9e4)	1.38e-4(1.7e-5)	197(66.3)
恒河猴 IL18	1.01e6(9.2e5)	1.40e-4(2.1e-5)	139(8.5)
H1L3			
人 IL18	7.12e5(2.5e4)	1.18e-4(1.9e-5)	188(81)
恒河猴 IL18	1.08e6(2.2e5)	1.86e-4(6.1e-5)	170(21.9)
H3L2			
人 IL18	1.52e6(4.9e5)	1.45e-4(2.2e-5)	105(39.6)
恒河猴 IL18	1.85e6	1.19e-4	64.3
H3L3			
人 IL18	1.49e6(4.5e5)	1.52e-4(1.7e-5)	110(36.1)
恒河猴 IL18	1.79e6	1.35e-4	75.6

选择变体 H1L1、H1L2 和 H1L3 用于下节 7.4.2 中的进一步分析。

7.4.2 Biacore 分析 T100 数据

使用 T100 Biacore™ 仪器进一步表征了一些变体抗体。由于使用了可以减小高温下缓冲液影响的内联脱气仪，该仪器在灵敏度、温度控制和基线在高温下的稳定性方面比 Biacore™ 3000 更有优势。它还提供了增强的软件，例如自动数据分析。

方法基本上与上述 7.4.1 节使用的方法相同；将蛋白 A 通过伯胺偶联以 2000-6000 RU's 的密度固定在 CM5 芯片上。在 HBS-EP (Biacore™) 中运行。捕获抗 IL-18 抗体的密度在 100-500 RUs 之间，让 IL-18 以 16-0.0625 nM 的浓度通过该捕获表面，而双基准则使用 0 nM 浓度（即，只注射捕获抗体的缓冲液）。每次注射 IL18 后，通过柔和的酸性洗脱液（10 mM 甘氨酸，pH1.5 注射两次）来再生。该再生步骤从蛋白 A 表面去除了捕获的抗体（以及因此去除了所有结合其上的 IL18）。再生不会显著改变蛋白 A 表面结合以后的抗体峰的能力，允许另一次捕获事件的发生。使用 T100 仪器内置的分析软件，利用 1: 1 结合模型分析获得的结合曲线。在所示温度下运行。

在 15°C、20°C、25°C、32°C 和 37°C 下分析与 H1L1 和 H1L2 的结合在不同的温度下利用上述方法进行实验。图 1 显示了温度对结合速率 (k_a) 的影响，同时图 2 显示了对解离速率 (k_d) 的影响，图 3 显示了对平衡常数 (K_D) 的影响。表 5 详细描述了用于绘制这些图使用的动力学值。

表 5: 从温度变化实验获得的动力学参数

温度 °C	抗体	K_a	K_d	K_D (pM)
15	H1L1	1.49e6	2.98e-5	20.1
	H1L2	2.07e6	2.07e-5	10.0
20	H1L1	2.02e6	4.77e-5	23.7
	H1L2	2.84e6	2.53e-5	8.9
25	H1L1	2.52 e6	7.82e-5	31.1

	H1L2	3.37e6	4.22e-5	12.5
32	H1L1	3.48e6	1.64e-4	47.2
	H1L2	4.51e6	8.57e-5	18.9
37	H1L1	6.30e6	3.36e-4	53.3
	H1L2	5.89e6	1.31e-4	22.3

数据来自单次实验。

数据显示了测试的两种抗体的结合速率在测试的温度范围内相似，H1L2 一般具有更快的结合速率，直到 37°C 的最终值之前，此时 H1L1 具有更快的结合速率。然而，解离速率显示出更大的差异，在 15°C、20°C、25°C 时两种抗体具有相似的解离速率，但是在 32°C 和 37°C 时开始背离，观察到 H1L1 更快的解离速率。总平衡常数（其是 k_d/k_a 的函数）反映了这些变化，并且提示 H1L1 和 H1L2 之间的差异主要在通过解离速率（ k_d ）定义的抗体/IL18 复合体的稳定性方面。

在 25°C 和 37°C 下分析与 H1L1、H1L2、H1L3 和嵌合 2C10 的结合按上述进行实验。表 6 详细描述了获得的动力学参数。数据显示，根据由平衡常数 K_D 定义的结合，在 25°C 和 37°C 时，H1L2 都是比 H1L1 更好的抗体，但是，动力学参数显示，在 25°C 时，H1L2 具有比 H1L1 更好的结合速率（ k_a ）。而在 37°C 时，位置被颠倒了，指示在 37°C 时观察到的 H1L2 更好的结合是由于解离速率（ k_d ）的原因，指示使 L2 区别于 L1 的突变赋予了在更高温度下的 IL18-抗体复合体增加的稳定性。

表 6: 在 25°C 和 37°C 下, 与 H1L1、H1L2、H1L3 和嵌合 2C10 与人 IL18 结合的动力学

在 25°C 时的人 IL18

在 37°C 时的人 IL18

抗体	Ka	Kd	KD(pM)	抗体	Ka	Kd	KD(pM)
H1L1 (n=4)	2.49e6 (4.41e5)	7.94e-5 (1.02e-5)	33.1 (9.3)	H1L1 (n=6)	5.64e6 (2.42e6)	4.58e-4 (1.02e-4)	94.3 (39.6)
H1L2 (n=4)	2.88e6 (7.39e5)	4.32e-5 (9.75e-6)	16.3 (7.0)	H1L2 (n=6)	4.86e6 (1.88e6)	1.98e-4 (5.20e-5)	46.0 (18.8)
H1L3 (n=3)	2.36e6 (9.89e5)	4.53e-5 (7.46e-6)	22.0 (9.9)	H1L3 (n=3)	6.43e6 (6.10e6)	2.11e-4 (4.84e-5)	64.8 (57.3)
嵌合 2C10 (n=3)	6.88e6 (3.22e6)	5.22e-5 (8.94e-5)	9.1 (4.7)	嵌合 2C10 (n=2)	2.55e7 (1.25e7)	5.62e-4 (1.97e-4)	22.9 (3.5)

数据是多个独立数据集合的平均值, 显示了平均值和标准偏差, 标准偏差位于括号内。该数据表中还包含了从五个不同温度下的分析中所获得的、在 25°C 和 37°C 运行的 H1L1 和 H1L2 的值。

7.4.3 在 IL18 结合 ELISA 中评估 2C10 人源化变体

利用不同批次的纯化抗体, 进行了至少 6 次所有 9 种人源化变体的 ELISA。图 4A-4C 显示了来自一次实验的典型数据, 所述实验是表 7 中所示的产生 EC50 值排名的实验。使用 2.5 µg/ml 的 16D10 (非中和性小鼠单克隆抗体) 将人 IL-18 固定在 Nunc Maxisorp 96 孔平板上, 来捕获 5 ng/ml 的重组人 IL-18。将不同抗-IL-18 人源化抗体添加到各种稀释液中。利用抗人 IgG Fc 特异性过氧化物酶缀合物 (Sigma A0170) 检测结合的人源化抗体。

表 7: 2C10 人源化变体的增加的 EC50 值 (以 [µg/ml] 表示)

	2C10c	H3L2	H3L3	H1L1	H1L2	H1L3	H2L2	H3L1	H2L3	H2L1
EC50*	0.007	0.008	0.009	0.010	0.011	0.011	0.012	0.013	0.016	0.021

所有的标准误差都在 0.001 和 0.002 之间。

所有变体的能力都表现得非常接近 2C10 嵌合体，提示人源化作用只产生了很少的能力丧失。虽然通过这些检测的若干次重复而产生的 EC50 值确实产生了变体的排序，但是，仅 ELISA 并不能产生这些变体之间的清楚的区别（参见表 7 和图 4A-4C）。利用 Biacore™（参见 7.4.1 和 7.4.2）获得了变体的一些区别，其导致在一些利用人和恒河猴 IL18 的独立重复的实验中 4 个被检查的变体更接近了（表 8，图 5[人]和 6[恒河猴]）。

表 8: 4 个选定的人源化变体与人 IL-18 结合的六次独立重复实验的 EC50 值

	实验 1/1	实验 1/2	实验 2/1	实验 2/2	实验 3/1	实验 3/2	均值	SE
2C10c	0.015	0.016	0.013	0.011	0.020	0.020	0.0158	0.004
H1L2	0.029	0.030	0.021	0.025	0.024	0.027	0.0260	0.003
H1L3	0.027	0.025	0.029	0.028	0.029	0.027	0.0275	0.002
H3L2	0.032	0.030	0.026	0.018	0.025	0.022	0.0255	0.005
H3L3	0.035	0.028	0.018	0.021	0.025	0.025	0.0253	0.006

7.4.4 在 IL-18 结合 ELISA 中评估 2C10 人源化 H1 变体

用三种人源化 H1 变体：H1L1、H1L2 和 H1L3 进行 ELISA，在室温和 37°C 时，评估其在人血清和封闭溶液（PBS 0.05% TWEEN 和 1% BSA(w/v)）中与人 IL-18 的结合。将人源化抗体变体以 2.5 µg/ml 固定在 Nunc Maxisorp 96 孔平板上。在室温和 37°C 时，在人血清和封闭溶液中，进行对 5 ng/ml 的重组人 IL-18 的捕获。添加抗 IL-18 小鼠单克隆抗体 16D10。利用抗小鼠 κ 过氧化物酶缀合物（Serotec MCA 1291P）检测结合的小鼠抗体。表 9 中显示了从研究数据产生的典型 EC50 值。

表 9: 在室温和 37°C 下, 2C10 人源化 H1 变体的 EC50 值

	EC50 (ng/ml)	标准误差
室温孵育		
存在血清时		
2C10 嵌合体	7.296	0.358
H1L1	10.189	0.512
H1L2	9.791	0.471
H1L3	8.989	0.411
在封闭缓冲液中		
2C10 嵌合体	3.814	0.068
H1L1	3.315	0.136
H1L2	3.552	0.079
H1L3	3.790	0.133
在 37°C 孵育		
存在血清时		
2C10 嵌合体	10.140	1.254
H1L1	12.069	0.740
H1L2	9.791	0.471
H1L3	11.438	1.861
在封闭缓冲液中		
2C10 嵌合体	3.794	0.114
H1L1	3.430	0.104
H1L2	3.404	0.145
H1L3	3.334	0.222

通过改变进行人 IL-18 结合步骤的温度, 在该检测中从室温到 37°C, 三种人源化 H1 变体的能力不受影响。当人血清中存在抗体时观察到较低的结合信号。

7.4.5 在 37°C 时评估人源化 H1 变体抗体的稳定性

测定三种人源化 H1 变体：H1L1、H1L2 和 H1L3，在 37°C 下的人血清和磷酸盐缓冲盐水中为期 14 天的储存稳定性。将抗体稀释至 50 µg/ml，在 37°C 孵育 0、1、4、6、8 和 14 天的时间后，通过 IL-18 结合 ELISA 检测稳定性。对于 IL-18 结合 ELISA，将 16D10（非中和性小鼠单克隆抗体）固定在 Nunc Maxisorp 96 孔平板上，来捕获 5 ng/ml 的重组人 IL-18。在 37°C 孵育时程的不同时间点上添加抗-IL-18 人源化抗体。利用抗-人 IgG Fc 特异性过氧化物酶缀合物检测结合的人源化抗体。

基于在该检测模式下所述抗体与人 IL-18 结合的能力，延长暴露在 37°C 温度下 0、1、4、6、8 和 14 天没有影响人源化 H1 抗体变体的结合能力。

7.5 存在滑液时 H1L2 与人 IL18 的结合

将 500 ng/ml 至 0 ng/ml 范围的重组人 IL18 掺入到 50% 人滑液中，实施 ELISA。然后将该溶液中含有的 IL-18 用于用 H1L2 抗体包被的 Maxisorp 96 孔平板（Nunc）的孔中。然后，通过生物素化的抗 IL-18 抗体（D045-6，MBL）和抗生物素蛋白链菌素-HRP 检测结合的 IL-18。滴定 50% 滑液（SF）中的重组人 IL18 产生了与滴定缓冲液中的重组人 IL18 几乎相同的曲线，仅在半最大值上存在轻微的偏移。参见图 7。这证实了即使存在 50% 人 SF，抗体也具有结合 hIL-18 的能力，所述条件更接近地模拟了抗体在治疗性场景中将要遇到的结合环境。

7.5.1 存在 IL18 结合蛋白（IL18bp）时与 IL18 的结合

使用 Biacore™ 技术（Biacore™ 3000）和 ELISA 确定当存在人 IL18bp 时，H1L2 是否仍然能够结合人 IL18。IL18bp 具有与 IL18 的高亲和力，作为 IL-18 功能的天然抑制剂而起作用（图 8、图 9 A 和 B、表 10 和表 11）。

Biacore 检测

简而言之，通过伯胺偶联将蛋白 A 以约 4000 共振单位（RU's）的密度固定在 CM5 芯片表面上。然后，将浓度为 3 µg/ml 的重组 Fc-IL18 结合蛋白（R&D Systems）以 10 µl/分钟的流速通过 1 分钟；导致捕获约 1400 RU's 的 IL-18 结合蛋白。然后，将浓度为 30 nM 的 IL18 以 10 µl/

分钟的流速通过捕获的 IL18 结合蛋白表面 5 分钟。此后,将浓度为 10 nM 的大鼠 2C10 亲代抗体以 30 μ l/分钟的流速通过 IL18 结合蛋白/IL18 表面 3 分钟。IL18 上被 2C10 抗体识别的表位将干扰与 IL18 结合蛋白相互作用的位点,则其后应该不可见任何结合信号。图 10 证实了 2C10 结合已经被 hIL-18BP 捕获的 hIL-18,指示 2C10 和 hIL-18BP 的结合位点是不重叠的。

表 10: IL-18BP 对 IFN γ 分泌类风湿性关节炎 (RA) 滑膜细胞的影响

样品, IL-18BP 状态	对照	IL-12	IL-18	IL-12 + IL-18
RA1				
-	ND	0.63	ND	1.63
+	ND	0.29	ND	0.13
RA2				
-	ND	0.85	ND	0.70
+	ND	0.10	ND	0.10
RA3				
-	ND	1.06	ND	1.62
+	ND	0.32	ND	0.40

ELISA 检测

在直接结合 ELISA 中测试了人源化 H1L2 或 2C10 大鼠 MAbs 与结合在捕获 IL18BP 上的人 IL18 的结合,所述 ELISA 中重组人 IL18bp-Fc 融合蛋白 (R&D Systems #119-BP) 以 0.5 μ g/ml 被包被在 Nunc Maxisorp 平板上。将重组人 IL18 (内部试剂) 以 100 ng/ml 添加到封闭缓冲液 (含有 1% w/v BSA) 中。添加浓度范围在 0.5 ng/ml 至 1 μ g/ml 的纯化抗体。用抗-人 κ 轻链的特异性 HRP 缀合物 (Sigma) 或抗-大鼠 IgG HRP 检测结合的抗体。图 18A 和 B 举例说明了获得的结果。

7.6 体外生物测定

7.6.1 人源化构建体在中和 KG-1 细胞系 IL18 应激 IFN- γ 释放中的活性

该检测测量了特异性地针对 IL-18 的抗体的中和活性，并且基于 IL-18-介导的 KG-1 细胞中的 IFN- γ 释放。KG-1 (ATCC #CCL-246) 是组成型表达功能性 IL-18 受体的人骨髓单核细胞系，因而应答外源性 IL-18 激发。

测定了全部九种人源化变体对 KG-1 细胞中人 IL18 激发的 IFN- γ 释放的抑制能力 (表 12 和附图 11)。

表 12: 利用所有九种人源化变体在 KG-1 生物检测中中和重组人 IL18 的 IC50 值

抗体	IC50
H1L1	0.071
H1L2	0.033
H1L3	0.027
H2L1	0.145
H2L2	0.054
H2L3	0.046
H3L1	0.027
H3L2	0.035
H3L3	0.034
2C10(1)	0.042
2C10(2)	0.039

对于 4 种优选的人源化变体还至少实施了 6 次重复实验，所述优选的变体在 Biacore™ 检测中表现出与重组的人和恒河猴 IL18 的最佳亲和力。图 8 举例说明了四种优选的人源化变体和 H1L1 的代表性结果，表 13 概括了这些检测的结果，上述检测均使用从 CHOe1a 细胞衍生的相同蛋白质批次的材料。

表 13: 在使用 4 或 5 种选定的人源化变体的 KG-1 生物检测中中和重组人 IL18 的 IC50 值

	平均值 2C10 IC50	(H1L1)	(H1L2)	(H1L3)	(H3L2)	(H3L3)	IL-18bp
实验 1	0.046	没有检测	0.062	0.064	0.064	0.057	没有检测
实验 2	没有拟合	没有检测	没有拟合	没有拟合	没有拟合	没有拟合	没有检测
实验 3 平板 1	0.074	没有检测	0.109	0.144	0.090	0.091	没有检测
实验 3 平板 2	0.075	没有检测	0.173	0.156	0.128	0.115	没有检测
实验 4	0.017	0.091	0.017	0.044	没有拟合	0.016	没有拟合
实验 5 (估计的 EC80)	0.075	0.757	0.122	0.085	0.072	0.056	0.054
实验 5 (估计的 EC50)	0.044	0.180	0.047	0.046	0.039	0.038	0.034
实验 6 (估计的 EC80)	没有拟合	0.078	0.023	0.021	没有拟合	0.013	0.007
实验 6 (估计的 EC50)	0.020	0.069	0.019	0.019	0.015	0.016	0.01

在比较 H1L1 和其它人源化变体的情况下, H1L1 表现出比测试的其它四种人源化构建体以及 2C10 亲代 MAbs 更低的效价。

用四种优选的单克隆抗体还实施了进一步的分析, 比较了对人 IL18 激发的 KG-1 细胞释放 IFN- γ 的抑制能力: 2C10 和从 2C10 衍生的人源化变体 (H1L1、H1L2 和 H1L3)。在 96 孔平板中实施 KG-1 生物测定, 通过在 37°C 和 5% CO₂ 中孵育 50 ng/ml 的重组人 IL-18 和不同浓度的特

异性 IL18 的抗体（从 2 $\mu\text{g/ml}$ 至 7.8 ng/ml ，二倍稀释）或阴性的同种型对照（Synagis，抗-RSV 抗体），然后每孔添加 $3 \cdot 10^5$ KG-1 细胞。最终将平板在 37°C、5% CO_2 中孵育 20-24 小时。收获上清液，利用商购的人 $\text{IFN}\gamma$ ELISA 试剂盒（Biosource AHC4432; AHC4539）测定 $\text{IFN}\gamma$ 产量。

已经实施了三种实验。根据阴性对照将对 IL-18 激发的 $\text{IFN}\gamma$ 生产的抑制结果归一化。统计分析的目标是获得在针对任何 Synagis 应答调整后，对每种实验的每种 mAb 的 IC_{50} 估计值。然后在统计学上分析 IC_{50} 估计值，产生具有 95% 置信区间（即，统计学似然范围）的每种 mAb 的 IC_{50} 综合估计值。最终使用邓奈特氏检验（Dunnett's test）将每种人源化变体与 2C10 进行回顾比较。

图 12 举例说明了代表性的实验。表 14 和图 13 显示了在 95% 置信区间下对每种单克隆抗体的 IC_{50} 的综合估计值，以及在 p 值和置信区间下与大鼠 2C10 的 % 变化。

表 14: 在 KG-1 生物测定中 IL18 激发的 $\text{IFN}\gamma$ 生产的中和作用的 IC_{50} 值

单克隆抗体	平均 IC_{50} $\mu\text{g/ml}$ (95% CI)	% 变化 vs 2C10 (95%CI)	Dunnett p 值
2C10	0.095 (0.071, 0.127)	-	-
H1L1	0.352 (0.264, 0.470)	269.4 (117.2, 528.2)	0.0001
H1L2	0.154 (0.112, 0.211)	61.5 (-7.6, 182.0)	0.0968
H1L3	0.164 (0.121, 0.221)	71.6 (-0.4, 195.8)	0.0519

H1L1 的效价在统计学上显著地低于 2C10 ($p < 0.001$)。其它人源化变体则未显著地区别于 2C10，虽然 H1L3 与 2C10 的比较位于界限上。

7.6.2 H1L2 在中和激发的人 PBMC 中 $\text{IFN}\gamma$ 释放的活性

用重组人 IL18 和抗-CD3 抗体激发来自三个供体的人 PBMC，并添加所研究的四种选定的人源化抗体变体的稀释梯度。每个供体都包括了亲代 2C10 抗体和 IL18bp 作为比较。对于三个供体中的两个，IL18 和抗-CD3 的激发是失败的，没有检测到任何 $\text{IFN}\gamma$ 。在余下的供体中，低浓

度时的结果差异很大，但是通过添加各种抗-IL18 抗体，包括人源化变体，都可以实现对 IL18 诱导的 IFN- γ 生产的完全抑制。参见图 14。

还用 LPS 激发的人 PBMC 进行实验，所述激发也导致 IL18 的产生和相关的 IFN γ 释放。LPS 以浓度依赖性的方式诱导 IFN γ 产生，以 1 $\mu\text{g/ml}$ 的固定浓度添加 2C10 亲代单克隆抗体完全抑制了该激发作用，指示所述效应是 IL18 介导的，并且可以中和内源性 IL18（未显示数据）。在全血中也可以证实该效果，但是 2C10 的抑制效应虽然还是剂量依赖性的，但是却较不明显（数据未显示）。图 9 举例说明了 3 个独立供体和用亲代大鼠单克隆 2C10、H1L2 和 IL18bp 抑制的实验结果。供体 1 和 3 产生了相似的结果，而供体 2 对 LPS 激发没有表现出 IFN γ 释放（未显示）。当存在添加了 $>1 \mu\text{g/ml}$ 抗体或 IL18bp 的 10% 或 25% 的人血清时，可以完全抑制 IL18 介导的 IFN γ 释放。在 10 ng/ml 及以上就已经可以观察到抑制作用，表 11 显示了存在 10% 或 25% 的人血清时该抑制作用的 IC₅₀ 值。

表 11: 在存在人血清时，利用 2C10、H1L2 和 IL18bp 抑制 LPS-激发的 IFN γ 释放的 IC₅₀ 值，所述释放是由内源性 IL18 中和作用导致的

	IL18bp	H1L2	2C10
供体 1 10%血清	0.024	0.102	0.023
供体 1 25%血清	0.064	0.113	0.069
供体 3 10%血清	0.032	0.042	0.033
供体 3 25%血清	0.046	0.108	0.086

7.6.3 与 IL18 直系同源物结合的概述

利用 ELISA 和 Biacore 以及 KG-1 细胞生物测定检验了抗体与来自其它物种的 IL18 的结合。这首先利用亲代 2C10 和嵌合 2C10c 对恒河猴/短尾猴进行，但是采用一些人源化变体重复。利用 Biacore 和 ELISA 测试了亲代 2C10 与猪、小鼠和大鼠 IL18 的结合，测试了 4 种最佳的人源化变体与恒河猴/短尾猴和狗 IL18 的结合。用恒河猴/短尾猴 IL18 和三种单克隆抗体、2C10 嵌合体和代表性的人源化变体 H3L3，实施 KG-1 生物测定。考虑到所有人源化变体的相似性，它也可能代表产生的其它变体，包括 H1L2（参见表 15，图 8）。

表 15: 2C10 亲代大鼠 MAb、大鼠-人嵌合 2C10c 和选定的 4 种人源化变体的混合物的直系同源物结合的概述

	恒河猴/短尾猴 IL18	狗 IL18	小鼠&大鼠 IL18	猪 IL18
2C10 大鼠 MAb	ELISA(+) KG-1(+)	ELISA(-)	ND	ND
2C10 嵌合体 (大鼠/人)	ELISA(+) KG-1(+) Biacore TM (+)	ELISA(-) Biacore TM (-)	ELISA(-) Biacore TM (-)	ELISA(-) Biacore TM (-)
人源化 (H1L2, H1L3, H3L1, H3L3)	ELISA(+) KG-1(+) 仅测试了 H3L3 Biacore TM (+)	ELISA(-)	ELISA(-)	ELISA(-)

ND: 未确定; +: 可检测的结合

7.7 IL18 抗体的圆二色性和热变性研究

利用圆二色性 (CD) 研究来研究 IL18 抗体的二级结构的改变作为温度的函数, 特别是从 25°C 至 37°C。进行这些相同抗体的热变性研究来确定它们的热稳定性和它们的解链温度 (T_m)。

CD 方法: 用 Applied Photophysics Chirascan 光谱仪以 0.5 nm 步距和 1 nm 带宽扫描 180 nm-280 nm, 获得 CD 光谱。每个点的采集时间是 5 秒。将样品在 PBS 中稀释至 ~0.2 mg/ml, 并放置在 1 mm 光路长度小室中。用设定在 4°C、25°C 和 37°C 的恒温槽采集每种蛋白质的光谱。通过放置在细胞内部液体中的探针来确定样品的实际温度, 并且所述实际温度在设定温度的 ~3°C 范围内。

T_m 方法: 在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 的 1:1000 Sypro 橙中将所有蛋白质稀释至 0.2 mg/ml。利用 Bioneer Exicycler 仪器在 620 nm (激发在 490 nm) 在每 0.5°C 间隔测量荧光发射, 将样品温度从 10°C 斜升高至 95°C, 每个温度点等待 10 秒。利用 Grafit 将变性曲线拟合到标准融解等温线。

如预期，比较来自所有四种抗体的 CD 光谱的形状，显示了它们的结构是高度 β 折叠的，并且具有基本相同的构造。CD 揭示了，在 4°C - 37°C 的温度范围内，三种抗体（H1L1、H1L2、H1L3）的二级结构没有表现出任何显著的改变。但是，在该温度范围内，2C10 抗体嵌合体在结构上确实表现出轻微的减少。这与下表 16 中给出的热稳定性趋势是一致的。

表 16: IL18 抗体的热变性

抗体	H1L1	H1L2	H1L3	嵌合体
T _m	73°C	70°C	67°C	65°C

T_m=变性/解链温度

H1L1、H1L2 和 H1L3 在远高于 37°C 的条件下也明显地是稳定的，在体温下没有任何变性的信号。因此，它们在热稳定性上的差异在正常体温和环境温度下不太可能赋予任何差异性优势。

在不同温度下H1L1和H1L2对比Hu IL18的Ka

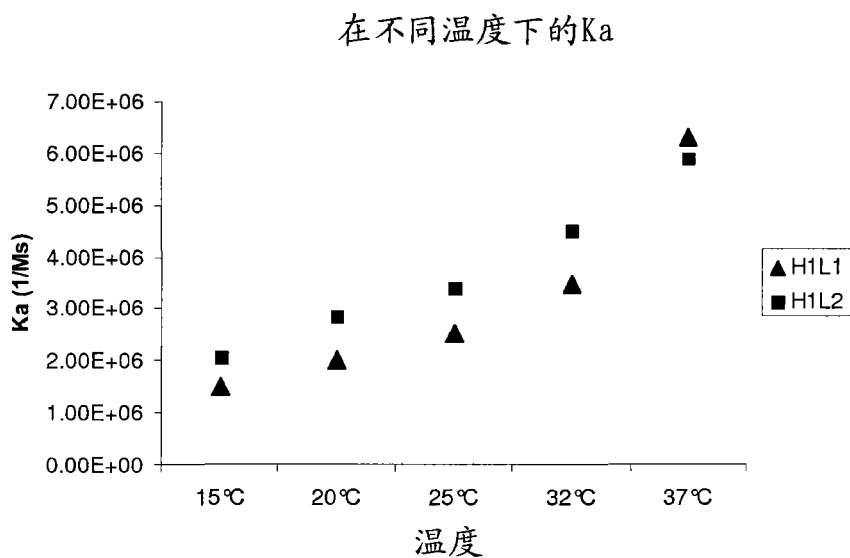


图 1

温度对H1L1和H1L2的结合速率 (ka) 的影响

在不同温度下H1L1和H1L2对比Hu IL18的Kd

在不同温度下的Kd

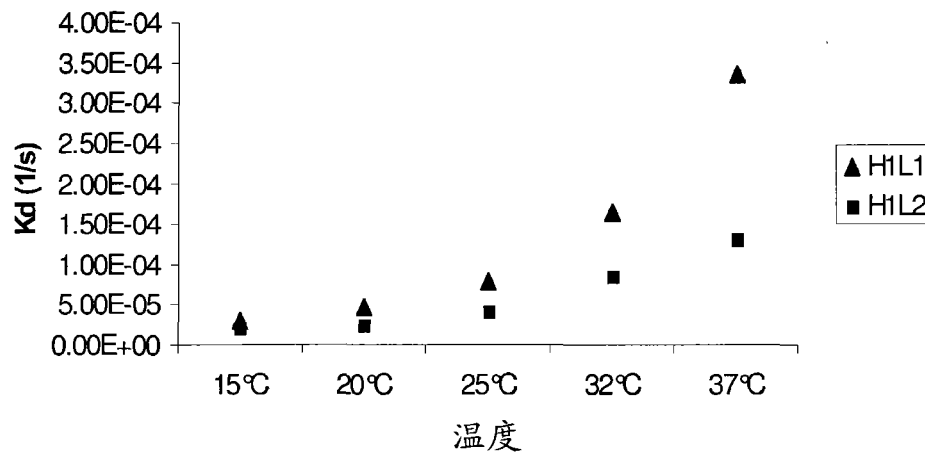


图 2

温度对解离速率(kd)的影响

在不同温度下H1L1和H1L2对比Hu IL18的KD

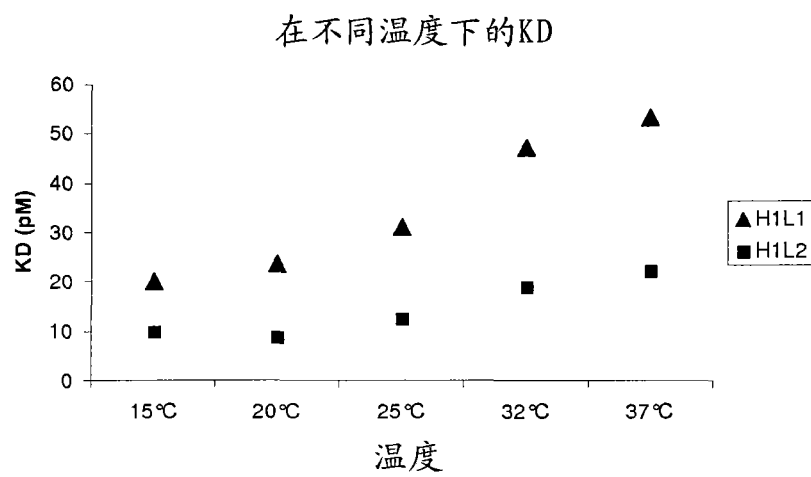
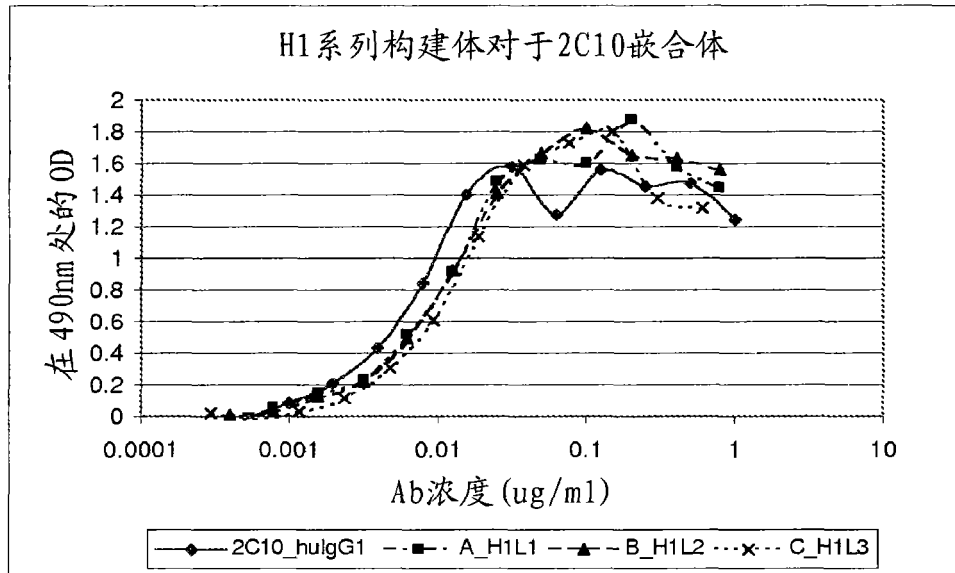


图 3
温度对平衡常数 (KD) 的影响

A



B

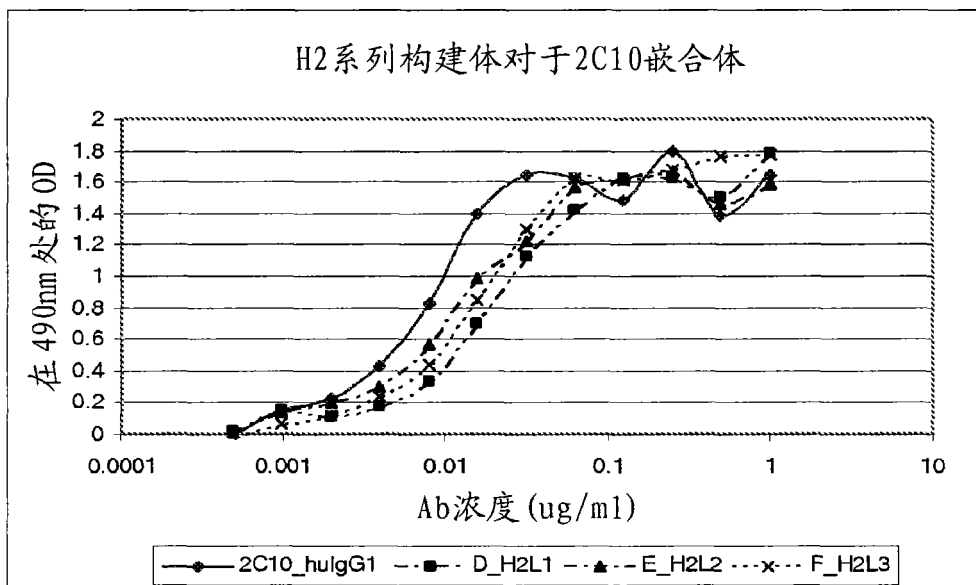


图 4

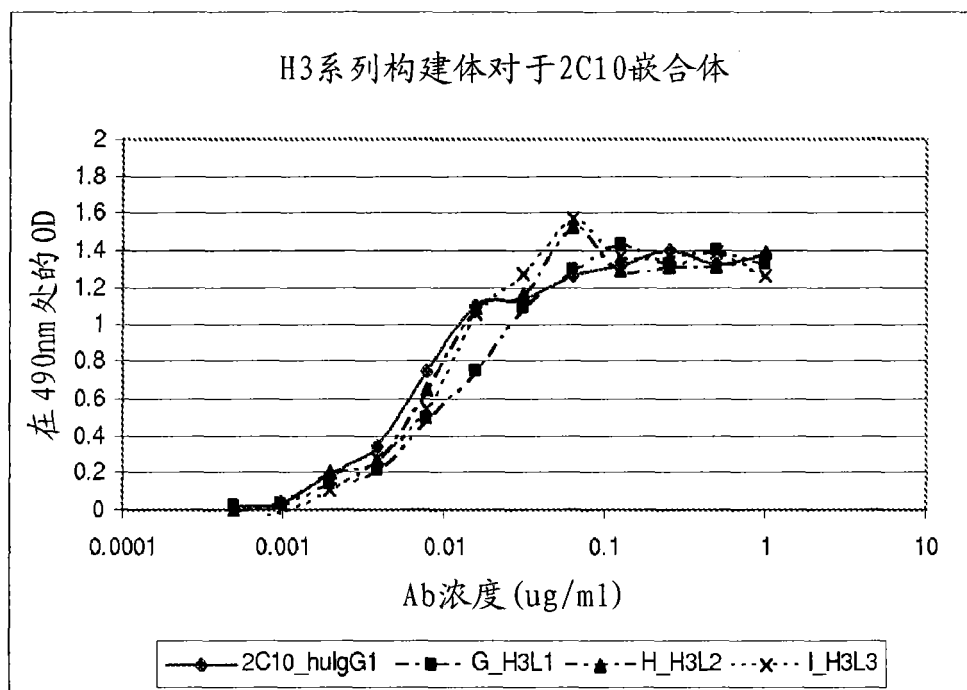


图 4C

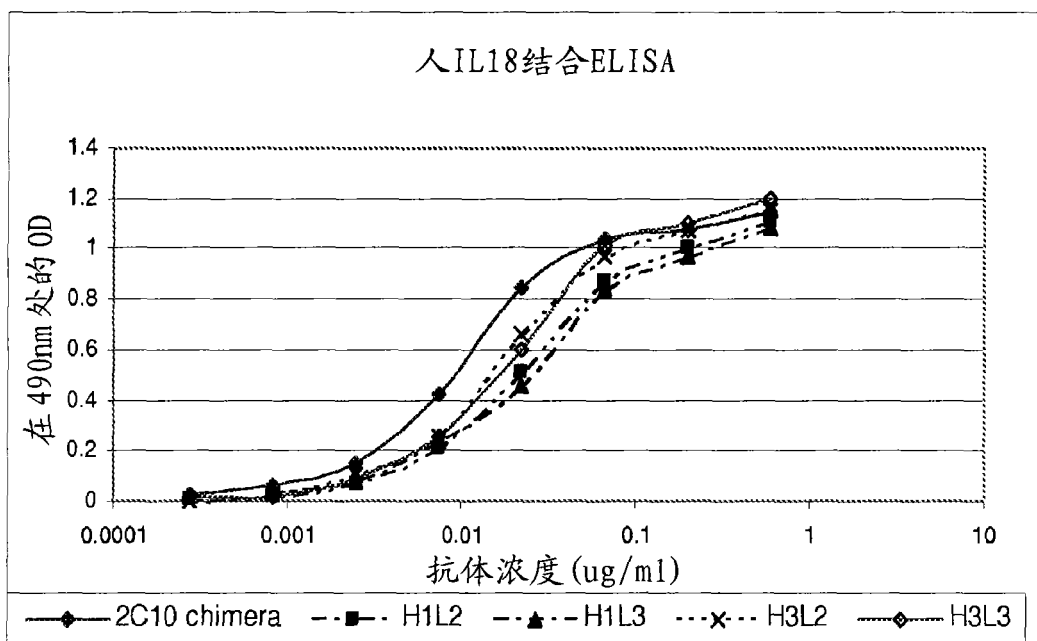


图 5

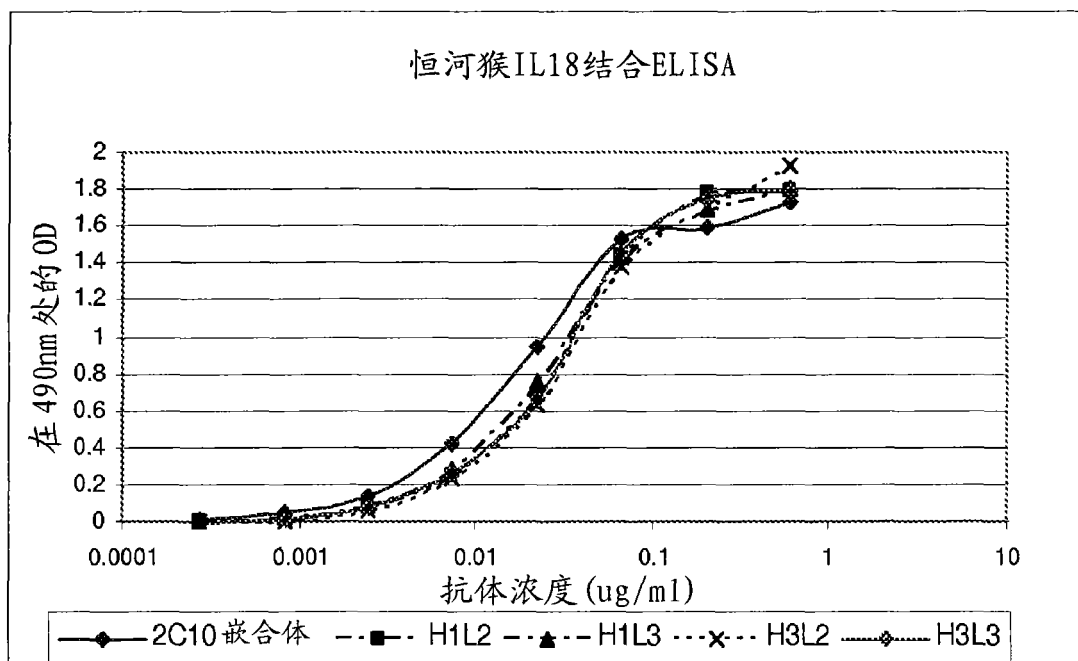


图 6

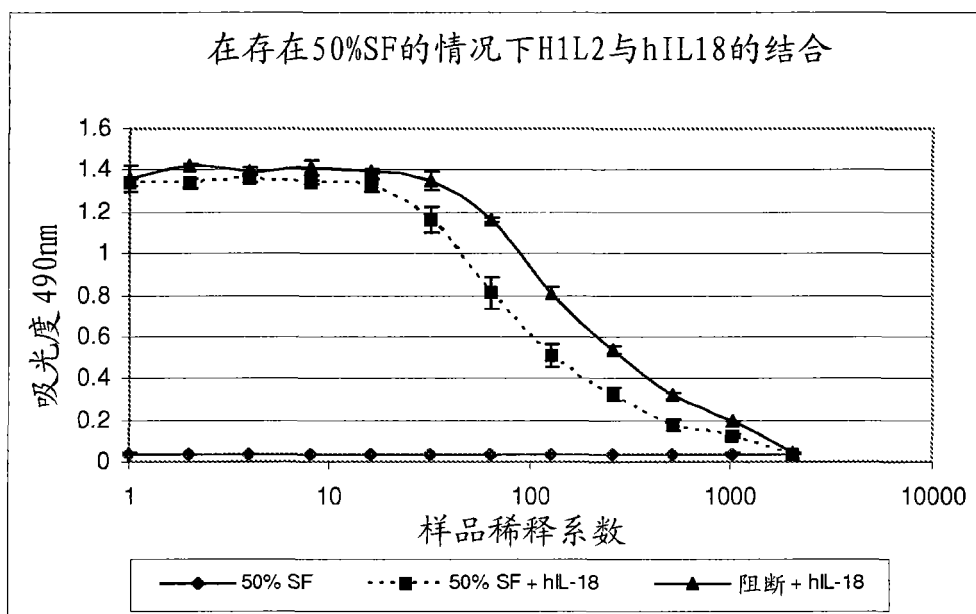


图 7

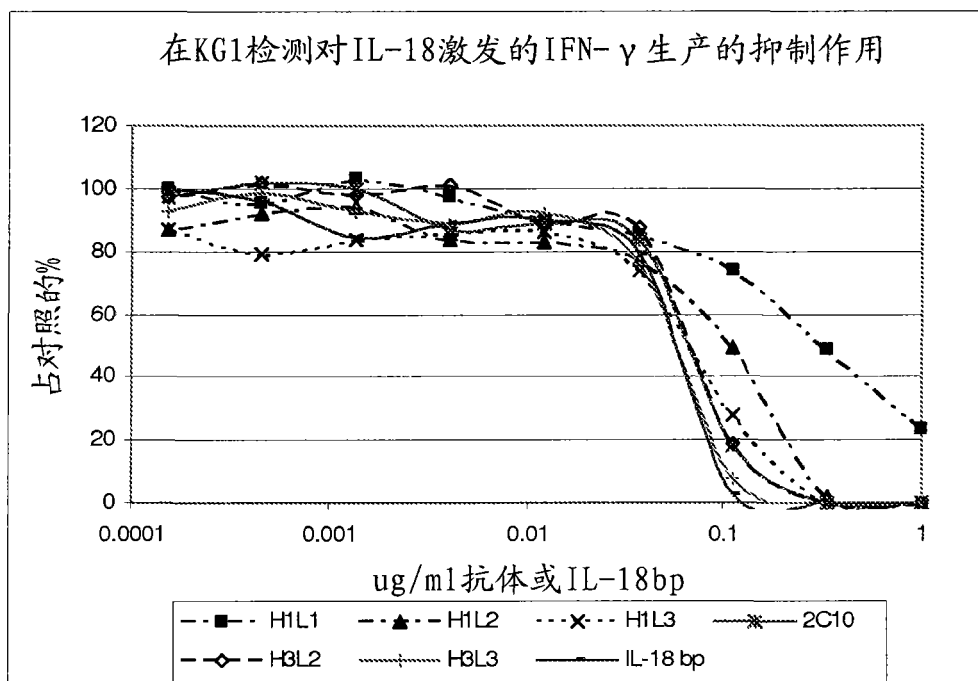
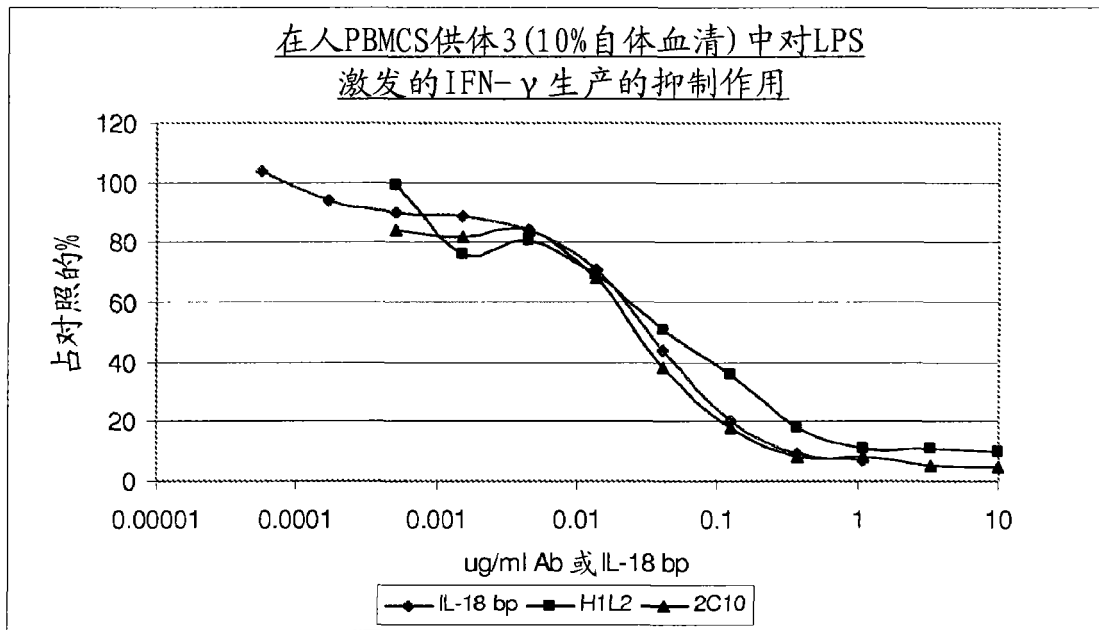


图 8

A



B

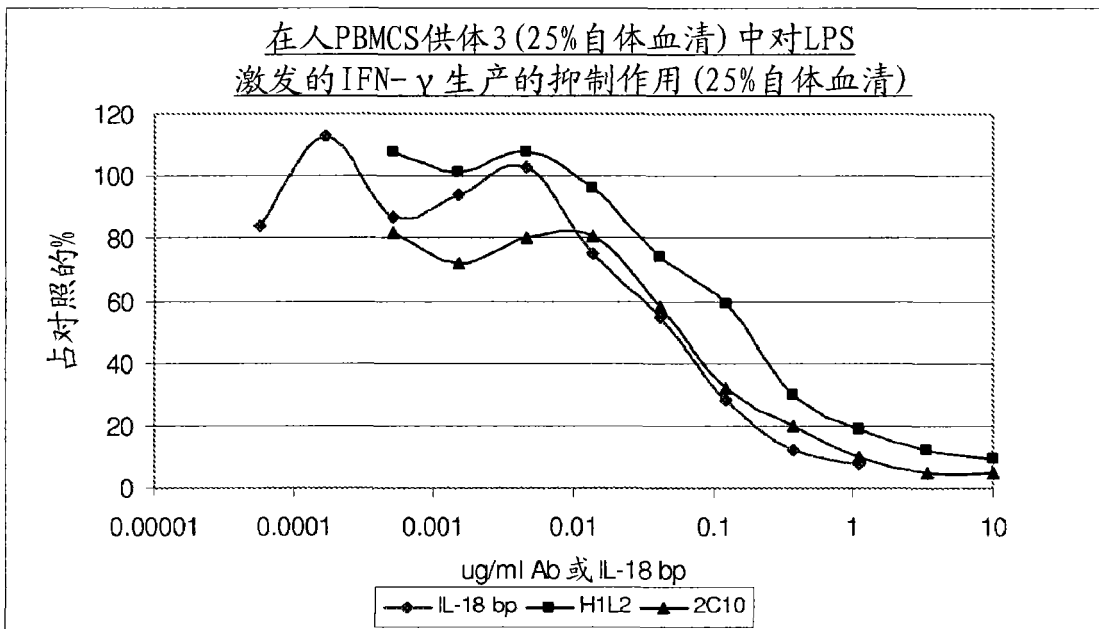


图 9

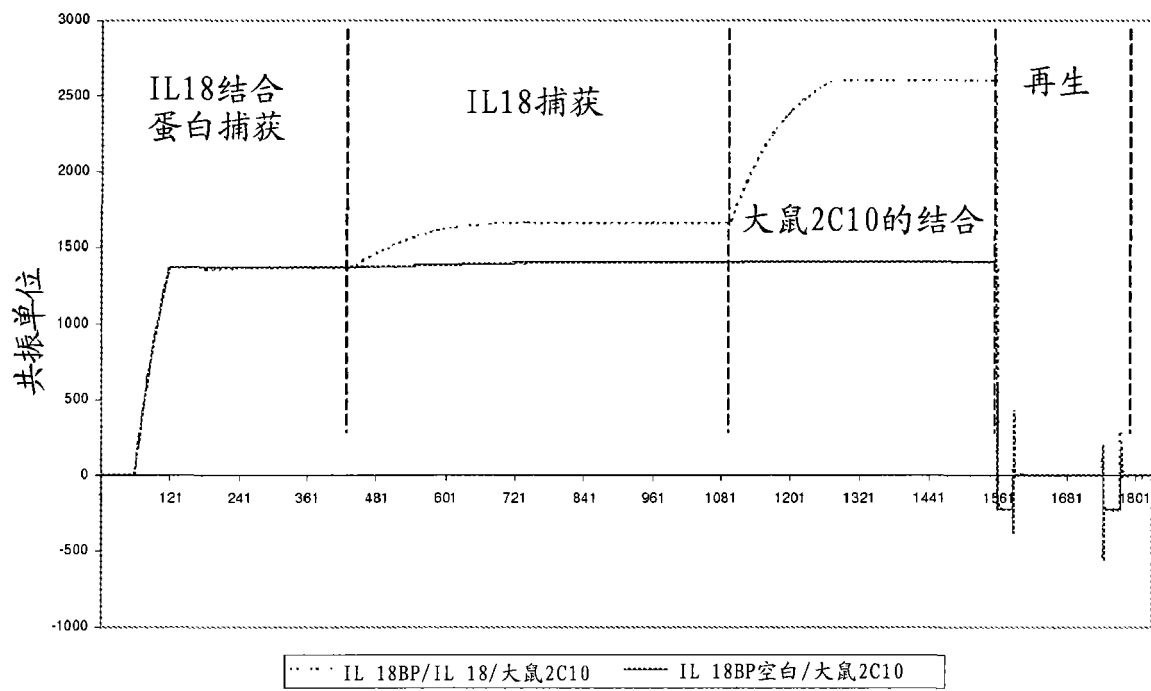


图 10

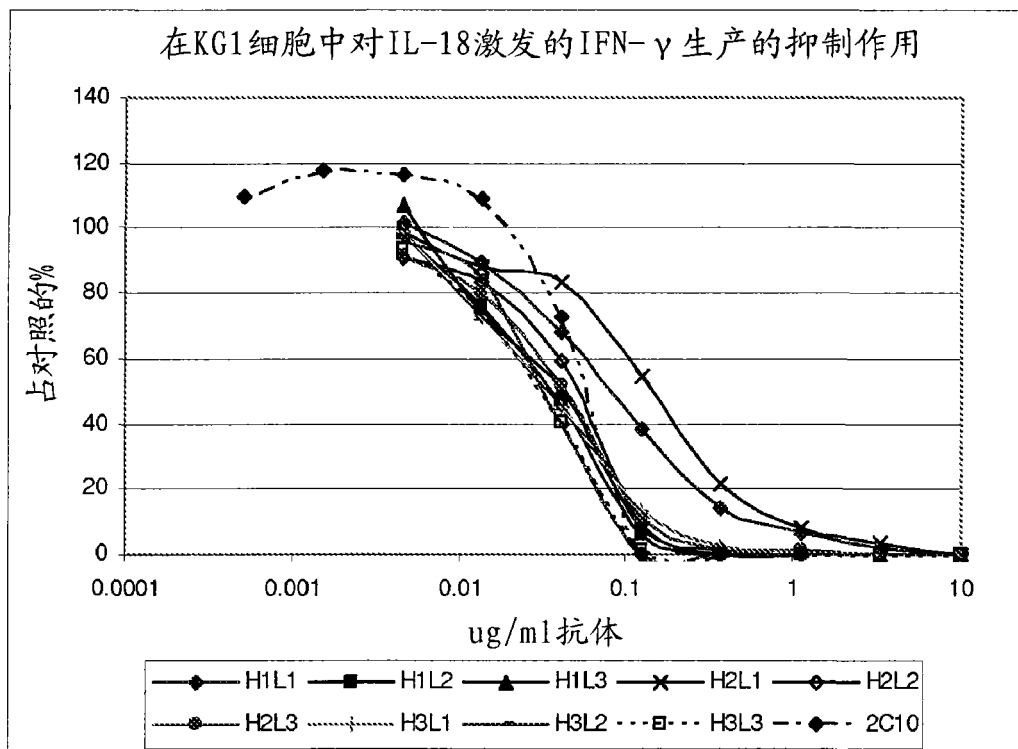


图 11

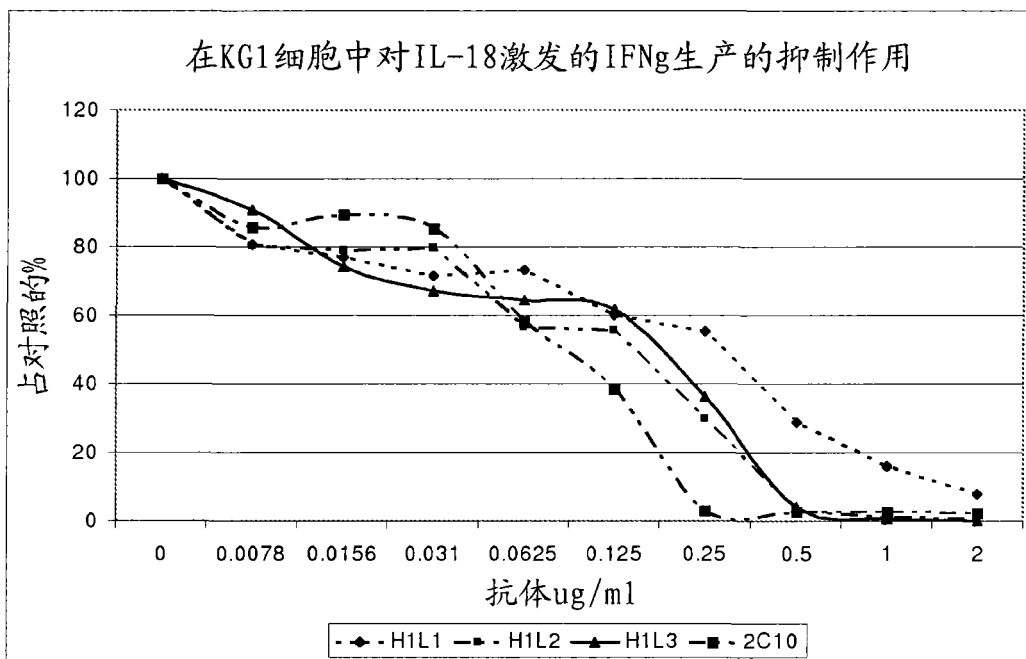


图 12

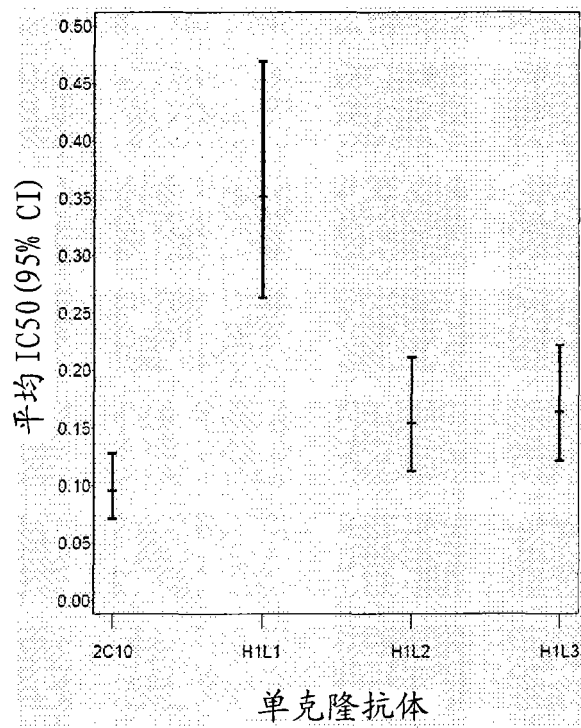


图 13
在95%置信区间下每种单克隆抗体的IC50值(μg/ml)

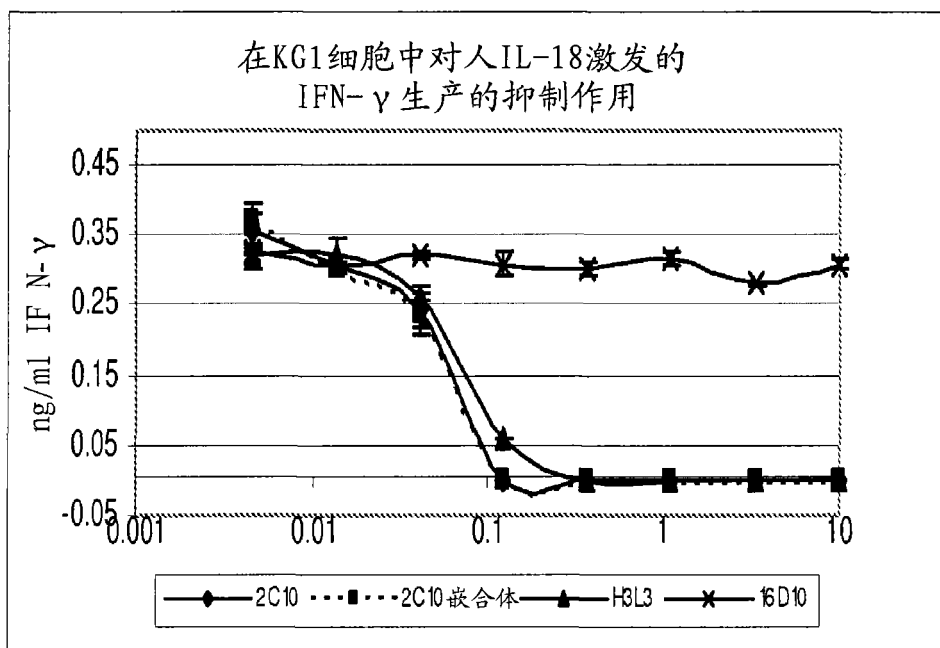


图 14

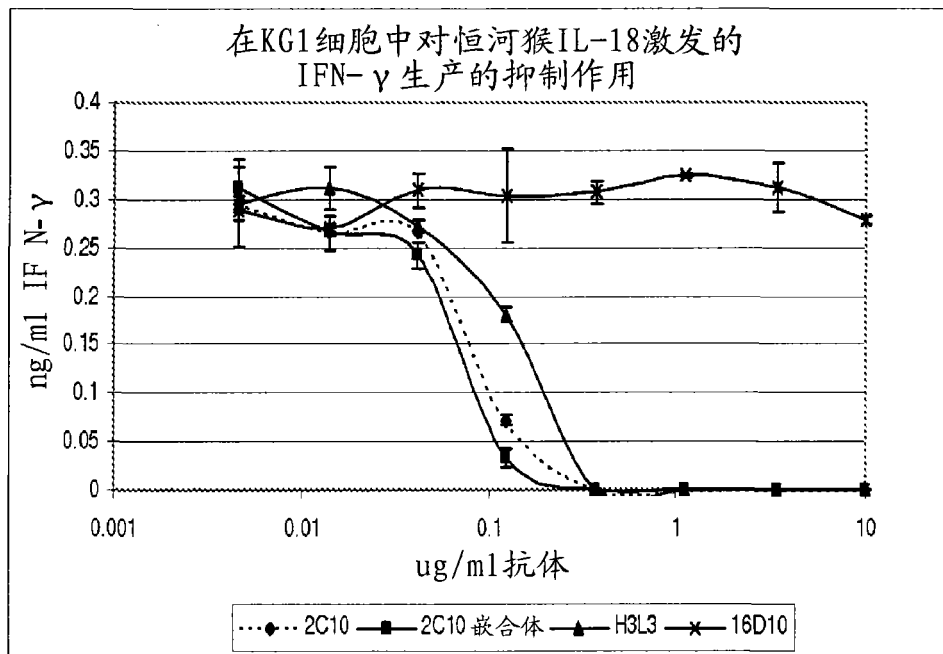


图 15

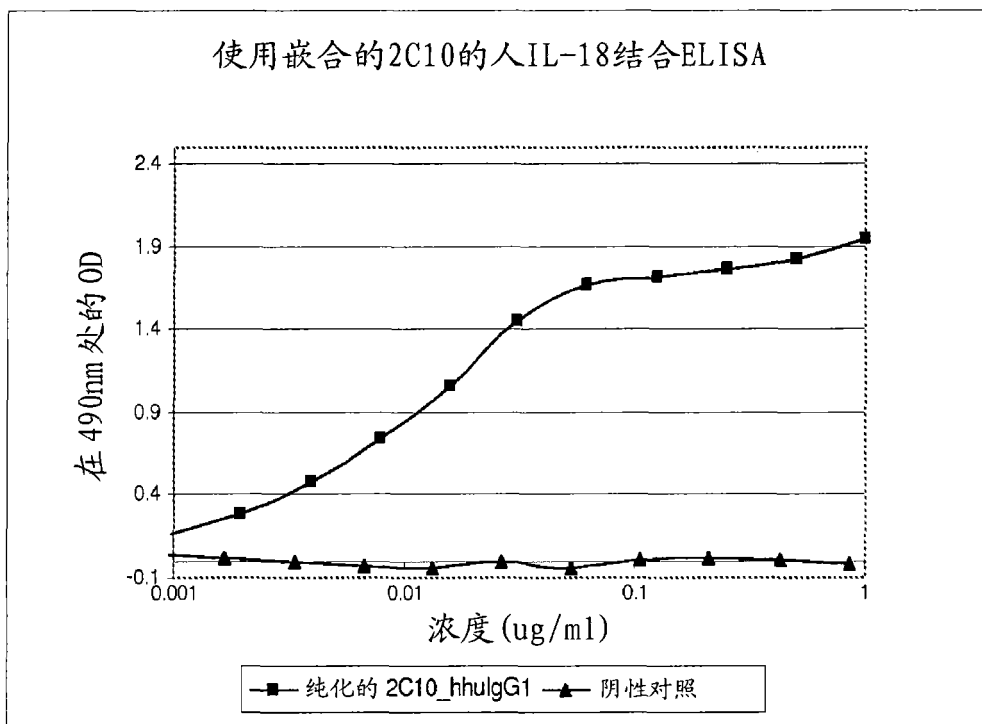


图 16

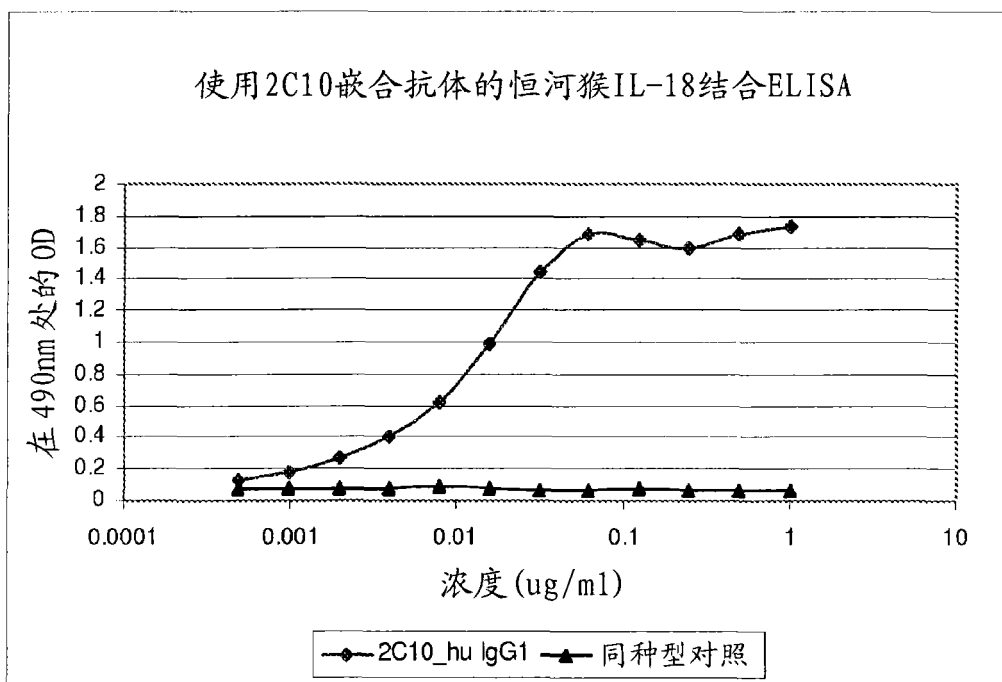
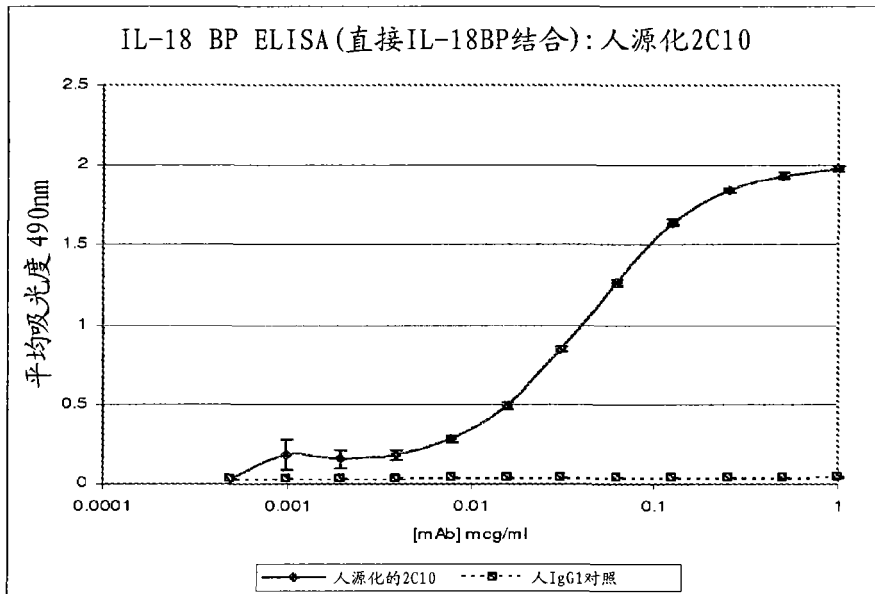


图 17

A)



B)

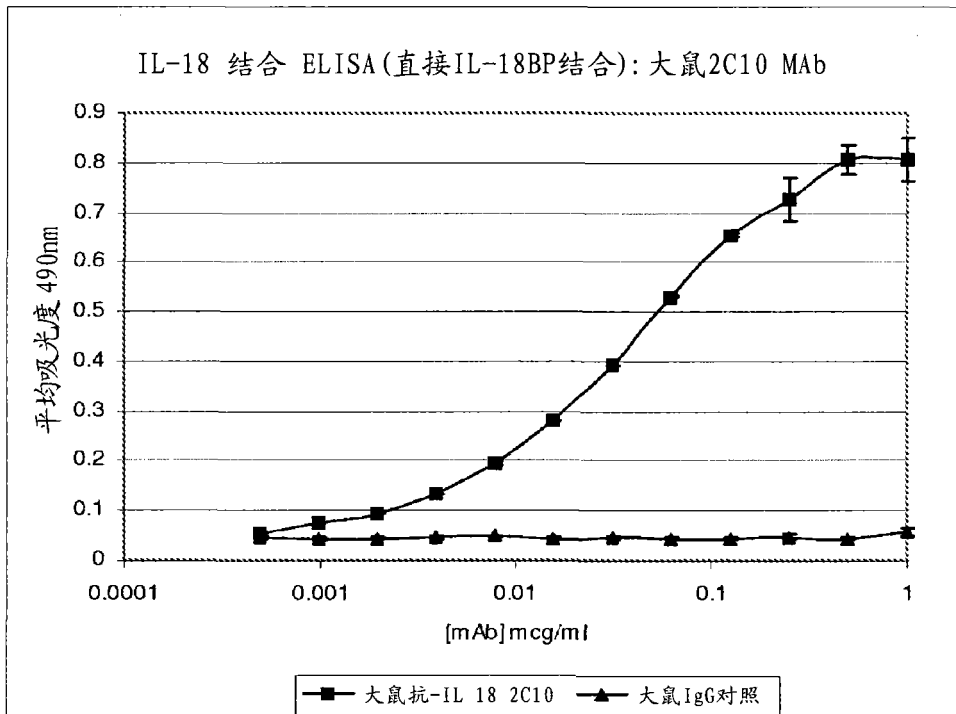


图 18A和18B

专利名称(译)	修饰的人源化的抗 - 干扰素 - 18抗体		
公开(公告)号	CN101454343A	公开(公告)日	2009-06-10
申请号	CN200780018859.3	申请日	2007-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
[标]发明人	JH艾利斯 V格尔马谢夫斯基 PA汉布林 I柯比		
发明人	J·H·艾利斯 V·格尔马谢夫斯基 P·A·汉布林 I·柯比		
IPC分类号	C07K16/24 C07K14/54 A61P37/06 G01N33/53		
代理人(译)	付磊		
优先权	2006010438 2006-05-25 GB 2006011046 2006-06-05 GB		
其他公开文献	CN101454343B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了人源化的抗 - IL - 18抗体、生产方法和用该抗体治疗的方法。还公开了使用例如样品表面等离子共振的筛选方法来鉴别具有治疗潜力的抗体。

在不同温度下H1L1和H1L2对比Hu IL18的Ka

在不同温度下的Ka

