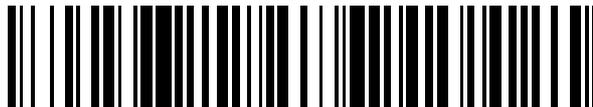


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 413**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2013 PCT/JP2013/081057**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14080866**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2013 E 13857248 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2924117**

54 Título: **Nuevo anticuerpo humano contra IL-18**

30 Prioridad:

21.11.2012 JP 2012254893

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.02.2020

73 Titular/es:

KM BIOLOGICS CO., LTD. (100.0%)
1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi
Kumamoto 860-8568, JP

72 Inventor/es:

SHIMIZU, HIROYUKI;
MATSUMOTO, MIYUKI;
SOEJIMA, KENJI;
TORIKAI, MASAHARU y
NAKASHIMA, TOSHIHIRO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 742 413 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo anticuerpo humano contra IL-18

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano y un fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con las reivindicaciones que se une a la interleucina-18 humana (en adelante denominada "IL-18 humano") e inhibe su actividad biológica. El anticuerpo y el fragmento de anticuerpo son útiles como un medicamento.

Antecedentes del estado de la técnica

10 En 1989, la interleucina-18 (IL-18) se consideraba como factor inductor de interferón- γ (IFN- γ) (IGIF). Ahora, se sabe que IL-18 es una citoquina proinflamatoria que tiene varias funciones además de la capacidad de inducir interferón- γ . IL-18 tiene funciones tales como la activación de NF- κ B, la expresión del ligando Fas, la inducción de quimioquinas CC y CXC y el aumento de la producción de virus de inmunodeficiencia humana competente. Dado que IL-18 tiene la capacidad de inducir la producción de interferón- γ en las células T y los macrófagos, desempeña un papel importante en la respuesta inmune de tipo Th1 y participa tanto en la inmunidad congénita como en la inmunidad adquirida. IL-18 está relacionado con la familia IL-1 tanto en términos de estructuras como en términos de funciones. Se han realizado revisiones con respecto a la estructura, funciones y actividad biológica de IL-18 (por ejemplo, documentos no de patente 1 a 5). El documento de patente 6 se refiere a un anticuerpo anti IL-18 humano derivado de humano. El documento de patente 7 se refiere a anticuerpos que se unen a IL-18 y su uso para inhibir la actividad de IL-18 en sujetos humanos que sufren de un trastorno en el que la actividad de IL-18 es nociva.

20 La pro-IL-18 intracelular se trata de manera proteolítica con caspasa 1 en células estimuladas con endotoxina (Documentos no de patente 6 y 7) así como con caspasas 4, 5 y 6 en Fas-L o células estimuladas con ADN bacteriano (documento no patentada 8) para convertirse en una forma activa de 18 kDa. Pro-IL-18 también se activa de manera proteolítica por otras proteasas, incluidas la quimasa derivada de mastocitos (documento no de patente 9), la proteinasa de neutrófilos 3 (documento no de patente 10), la caspasa 3 (documento no de patente 11) y la elastasa y catepsina (documento no de patente 12), que son serina proteasas. La IL-18 tanto en humanos como en ratones carece de una secuencia líder, y el mecanismo que subyace a la liberación de IL-18 madura de las células aún no se ha dilucidado lo suficiente.

30 La actividad biológica de IL-18 está mediada por la unión de IL-18 al receptor heterodímero de IL-18 (IL-18R) que consta de dos subunidades: subunidad α (un miembro de la familia IL-1R también llamada proteína-1 relacionada con IL-1R o IL-1Rrp1) y la subunidad β (también llamada proteína accesoria de IL-18R, IL-18AP o AcPL). La subunidad α de IL-18R se une directamente a IL-18, pero no puede inducir la transducción de señales. La subunidad β de IL-18R no se une a IL-18 misma, sino que forma un receptor de alta afinidad (KD = aproximadamente 0,3 nM) necesario para la transducción de señales, en colaboración con la subunidad α (documento no de patente 13). La transducción de señal de IL-18 mediada por el complejo $\alpha\beta$ de IL-18R es similar a aquella IL-1R del sistema receptor similar a toll (TLR). La transducción de la señal IL-18R emplea moléculas de transducción de señal tales como MyD88, IRAK y TRAF6 para provocar respuestas como en el caso de IL-1, por ejemplo, activación de NIK, I κ B quinasa, NF- κ B, JNK y p38MAP quinasa. Se ha confirmado el uso de la subunidad IL-18R α (documento no de patente 14) y MyD88 (documento no de patente 15) o variantes inactivadas IRAK (documento no de patente 16) que IL-18R α y las moléculas de transducción de señales, respectivamente, son necesarias para la exhibición de actividad biológica de IL-18.

40 Neumonía intersticial (documento no de patente 17), enfermedad de Still de inicio en el adulto (documento no de patente 18), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (documento no de patente 19), enfermedad ósea metabólica (documento de patente 1), esclerosis múltiple (documento no de patente 20), diabetes mellitus (documento no de patente 20), daño renal isquémico (documento no de patente 21), y similares han sido reportadas previamente como enfermedades con sobreexpresión de IL-18. Además, la sobreexpresión de IL-18 es responsable de las llamadas enfermedades por Th1, tales como la dermatitis atópica (documento no de patente 22) y daños orgánicos graves en el hígado y el intestino (documento no de patente 23).

Además de estas enfermedades, se ha señalado la implicación de IL-18 en las condiciones patológicas del asma bronquial inducida por células Th1 y otras diversas enfermedades.

50 El control de la producción o actividad de IL-18 es muy importante como terapia para tales enfermedades dependientes de IL-18 o como terapia para enfermedades cuyo inicio es inducido o que se exacerban debido a la producción excesiva de IL-18.

Listado de citaciones

Documentos de patente

Documento de patente 1: Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005074434

Documento de patente 2: Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 20050100965

ES 2 742 413 T3

- Documento de patente 3: Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 20070292432
- Documento de patente 4: Patente de Estados Unidos No. 6706487
- Documento de patente 5: Publicación internacional No. WO 2004/097019
- Documento de patente 6: Publicación europea No. EP 1621616 A1
- 5 Documento de patente 7: Publicación europea No. EP 2395020 A2
- Documentos no de patente
- Documento no de patente 1: Dinarello, C. Et al. (1998) *J. Leukoc. Biol.* 63: 658-654
- Documento no de patente 2: Dinarello, C. A. (1999) *Methods* 19: 121-132
- Documento no de patente 3: Dinarello, C. A. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: 11-24
- 10 Documento no de patente 4: McInnes, B. et al. (2000) *Immunology Today* 21: 312-315
- Documento no de patente 5: Nakanishi, K. et al (2001) *Ann. Rev. Immunol.* 19: 423-474
- Documento no de patente 6: Ghayur, T. et al. (1997) *Nature* 386: 619-623
- Documento no de patente 7: Gu, et al. (1997) *Science* 275: 206-209
- Documento no de patente 8: Tsutsui, H. et al. (1999) *Immunity* 11: 359-67
- 15 Documento no de patente 9: Omoto, Y. et al. (2006) *J. Immunol.* 177: 8315-8319
- Documento no de patente 10: Sugawara, S. et al. (2001) *J. Immunol.* 167: 6568-6575
- Documento no de patente 11: Akita, K. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 26595-26603
- Documento no de patente 12: Gracie J. A. et al. (2003) *Journal of Leukocyte Biology* 73: 213-224
- Documento no de patente 13: Sims, J. E. et al (2002) *Current Opin. Immunol.* 14: 117-122
- 20 Documento no de patente 14: Hoshino K. et al (1999) *J. Immunol.* 162: 5041-5044
- Documento no de patente 15: Adachi O. et al. (1998) *Immunity* 9: 143-150
- Documento no de patente 16: Kanakaraj P. et al. (1999) *J. Exp. Med.* 189: 1129-1138
- Documento no de patente 17: Hoshino, T. et al. (2009) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41: 661-670
- Documento no de patente 18: Kawaguchi, Y. et al. (2001) *Arthritis Rheum.* 44: 1716-1717
- 25 Documento no de patente 19: Imaoka, H. et al. (2008) *Eur. Respir. J.* 31: 287-297
- Documento no de patente 20: Nakanishi, K. et al. (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19: 423-474
- Documento no de patente 21: Melnikov, V.Y. et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 107: 1145-1152
- Documento no de patente 22: Konishi, H. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11340-11345
- Documento no de patente 23: Nakanishi, K. et al. (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19: 423-474
- 30 Documento no de patente 24: Novick, D. et al. (1999) *Immunity* 10: 127-136
- Documento no de patente 25: Arend, W.P. et al. (2008) *Immunol. Rev.* 223: 20-38
- Documento no de patente 26: Tak PP. et al. (2006) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 31: 109-116
- Documento no de patente 27: Lei, SP. et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4379-4383
- Documento no de patente 28: T. Fukumoto et al. (1998) *Nature Biotechnology* 16: 267-270
- 35 Documento no de patente 29: Okamoto M. et al. (2002) *Blood* 99: 1289-98
- Documento no de patente 30: *Antibody Phage Display Methods and protocols* editado por Philippa M. O'Brien and Robert Aitken

Documento no de patente 31: Kimura T., et al. (2008) Allergology International 57: 367-3766

Documento no de patente 32: Hamasaki T. et al. (2005) J. Biochem. 138: 433-442

Documento no de patente 33: Li, A. et al. (2003) Protein Expr Purif 32:110-118

Resumen de la invención

5 Problemas a resolver por la invención

Se sabe que una proteína que se une a IL-18, llamada proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), está presente en los cuerpos humanos. IL-18BP se une a IL-18, inhibiendo así la unión entre IL-18 y el receptor de IL-18 y regulando la actividad (documento no de patente 24). En el caso de la IL-18BP humana, están presentes cuatro isoformas (IL-18BP_a, IL-18BP_b, IL-18BP_c e IL-18BP_d) obtenidas mediante el empalme de ARNm (Documento no de patente 25). De ellas, la que tiene la mayor afinidad por IL-18 es IL-18BP_a, y su capacidad de neutralización (IC₅₀) es del orden de 0,4 nM. IL-18BP también tiene la característica de que no se une al precursor IL-18, que carece de actividad, sino que se une a la forma madura (forma activa) de IL-18. Se informa que las concentraciones de IL-18BP en la sangre de humanos sanos son de 0,5 a 0,7 ng/mL, y que IL-18BP inhibe la actividad de una cantidad traza de IL-18 de forma madura presente en la sangre.

10

15

A partir de estas, se propone que IL-18BP, que originalmente está presente *in vivo*, también es segura como fármaco terapéutico y tiene un mecanismo de trabajo definido para IL-18, se utiliza como agente terapéutico para las enfermedades mencionadas anteriormente. Sin embargo, IL-18BP ha sido susceptible de mejorar, por ejemplo, la necesidad de una administración frecuente para mantener la eficacia, porque la vida media en sangre es tan corta como 34 a 40 horas (documento no de patente 26).

20

Por lo tanto, si se puede desarrollar un anticuerpo monoclonal específico que neutralice la actividad biológica de IL-18 bajo un mecanismo más cercano a aquel *in vivo*, se espera que se convierta en un enfoque terapéutico más seguro y efectivo para enfermedades en las que IL-18 está involucrada, es decir, enfermedades asociadas con cambios en el nivel de expresión de IL-18.

25

En este contexto, aunque hasta ahora se ha obtenido una pluralidad de inhibidores de la actividad de IL-18, se ha demostrado que no se unen al mismo sitio que un sitio de IL-18 al que se une IL-18BP (región de reconocimiento de IL-18BP), y no tienen un mecanismo inhibidor similar al de IL-18BP (documentos de patente 2 y 3). Esto significa que, en la detección de inhibidores de IL-18, es difícil exponer la región de reconocimiento de IL-18BP presente en IL-18 y mantenerla, y en consecuencia significa que la obtención de inhibidores de la actividad de IL-18 basados en un mecanismo inhibidor similar a aquel de IL-18BP es muy difícil.

30

A la luz de los problemas mencionados anteriormente, la presente invención ha logrado la producción de un inhibidor de actividad de IL-18 de acción más prolongada que IL-18BP mediante el uso de una molécula de anticuerpo que tiene un mecanismo inhibidor similar al del inhibidor IL-18BP de la actividad IL-18 natural *in vivo* (es decir, se une al mismo sitio que la región de reconocimiento de IL-18BP), es más seguro y tiene una vida media más larga en sangre.

Medios para resolver los problemas

35

Los presentes inventores han realizado estudios diligentes a la luz de los problemas mencionados anteriormente y, en consecuencia, completaron la presente invención. Una proteína objetivo (en este caso, IL-18) que generalmente se usa en la detección de anticuerpos (paneos) de una biblioteca de presentación en fagos generalmente se inmoviliza directamente en una placa de ELISA. En contraste con esto, los presentes inventores han estudiado diversas condiciones para el paneo, tales como el paneo en métodos de fase líquida y métodos de fase sólida que controlan la orientación o conformación de IL-18 a través de varios anticuerpos anti-IL-18 existentes.

40

Como resultado, los presentes inventores han logrado exponer la región de reconocimiento de IL-18BP y mostrar que IL-18 mantiene el estado expuesto.

45

Los presentes inventores también han logrado obtener un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano completo deseado de una biblioteca de presentación en fagos que expresa genes que codifican regiones variables (VH y VL) de una cadena H y una cadena L de inmunoglobulina preparadas a partir de los linfocitos B de sangre periférica de una persona sana.

Los presentes inventores han descubierto además que este fragmento de anticuerpo y un anticuerpo preparado con base en el fragmento que inhibe la actividad biológica de IL-18 humano.

La presente invención se define en las reivindicaciones

50

Efectos de la invención

El anticuerpo anti-IL-18 humano y el fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones tienen las siguientes características y, como tales, son útiles como antagonistas de IL-18 más seguros y más eficientes:

(1) que tiene el mismo mecanismo de trabajo que en IL-18BP, que es un antagonista natural de IL-18 derivado de un organismo; y

(2) que pueden administrarse a una concentración más baja ya que IC₅₀ en la inhibición de la producción de IFN- γ es baja, en comparación con los antagonistas informados previamente (IL-18BP y anticuerpos).

5 Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de actividad de unión en un anticuerpo anti-IL-18 humano.

[Figura 2] La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de unión al receptor de IL-18 por ELISA.

10 [Figura 3] Cada una de las Figuras 3 (a) y 3 (b) es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de unión al receptor de IL-18 usando células KG-1.

[Figura 4] La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de neutralización usando IL-18 recombinante.

[Figura 5] La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del análisis del epítipo en un anticuerpo anti-IL-18 humano mediante ELISA competitivo.

15 [Figura 6] La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de unión al receptor de IL-18 en presencia de un anticuerpo anti-IL-18 humano e IL-18BP.

[Figura 7] La Figura 7 es un gráfico que muestra los resultados del análisis del epítipo en un anticuerpo anti-IL-18 usando una variante K53A de IL-18.

20 [Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados del análisis sobre la reactividad de un anticuerpo anti-IL-18 humano con un complejo de IL-18 e IL-18BP.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

Los aspectos específicos de la presente invención se describirán a continuación.

(1) Anticuerpo y fragmento del mismo.

25 Los presentes inventores han realizado estudios sobre un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano contra la interleuquina 18 humana (IL-18). Como resultado, se ha revelado que un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de humano obtenido mediante un método de presentación en fagos y un anticuerpo derivado del fragmento inhiben la transducción de señales y la producción de IFN- γ inducida por IL-18 humano. Además, se han identificado las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y las regiones variables de la cadena H y la cadena L en este fragmento variable de cadena sencilla (scFv) y las secuencias de nucleótidos de los genes que las codifican (SEQ ID NOS: 1 y 2). Como resultado del análisis de un epítipo para un anticuerpo IL-18 humano, también se ha revelado que el epítipo es una región que comprende lisina en la posición 53 de la IL-18 humano.

30

En el presente documento se describe, un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano que reacciona con la IL-18 humano y no reacciona con una variante K53A de la IL-18 humano.

35 En el presente documento, la frase "el anticuerpo anti-IL-18 humano de humano reacciona con IL-18 humano" significa que el anticuerpo anti-IL-18 humano de humano se une a la IL-18 humano. Más específicamente, significa que la capacidad del anticuerpo anti-IL-18 humano de humano para unirse a IL-18 humano es significativamente mayor que la capacidad de un anticuerpo de control negativo para unirse a la IL-18 humano. Un anticuerpo para el cual es evidente que la IL-18 humano no es un antígeno se puede usar como el anticuerpo de control negativo y, por ejemplo, se pueden usar anticuerpos humanos anti-HB. La capacidad del anticuerpo de control negativo o del anticuerpo anti-IL-18 humano de humano para unirse a la IL-18 humano puede medirse mediante un método habitual tal como ELISA.

40

Además, la frase "el anticuerpo IL-18 humano antihumano no reacciona con una variante K53A de IL-18 humano" significa que la capacidad del anticuerpo anti-IL-18 humano de humano de unirse a una variante K53A de IL-18 humano es significativamente menor que la capacidad del anticuerpo anti-IL-18 humano de humano para unirse a la IL-18 humano. La capacidad del anticuerpo anti-IL-18 humano de humano para unirse a IL-18 humano o la variante K53A de la IL-18 humano se puede medir mediante un método habitual tal como ELISA.

45

En lo sucesivo, los significados de los términos "reacciona" y "no reacciona" son los mismos que los mencionados anteriormente.

50 El anticuerpo anti-IL-18 humano de humano puede ser recombinante. El recombinante significa una molécula producida por un enfoque de ingeniería genética. El anticuerpo anti-IL-18 humano de humano puede liofilizarse.

Alternativamente, el anticuerpo anti-IL-18 humano de humano puede estar en forma de una composición mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo anti-IL-18 humano es un anticuerpo que reacciona con IL-18 humano y no reacciona con un complejo de IL-18 humano e IL-18BP humano.

5 El anticuerpo anti-IL-18 humano de humano de acuerdo con las reivindicaciones es un anticuerpo en el que la región determinante de complementariedad (CDR)1 de una cadena H consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7

CDR2 de la cadena H consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8,

CDR3 de la cadena H consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9,

10 CDR1 de una cadena L consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10

CDR2 de la cadena L consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y

CDR3 de la cadena L consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, en la que

el anticuerpo reacciona con IL-18 humano y no reacciona con un complejo de IL-18 humano e IL-18BP humano.

15 El anticuerpo anti-IL-18 humano de humano es un anticuerpo en el que una región variable de cadena H consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena L consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o

una región variable de cadena H consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena L consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 en la que

el anticuerpo reacciona con IL-18 humano y no reacciona con un complejo de IL-18 humano e IL-18BP humano.

20 El fragmento de la región variable de cadena L exhibe la reactividad mencionada anteriormente solo o en combinación con un fragmento arbitrario de la región variable de cadena H.

También se describe en el presente documento, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo anti-IL-18 humano de humano en el que se enlazan el siguiente fragmento de región variable de cadena H y el fragmento de región variable de cadena L:

25 fragmento de región variable de cadena H:

un fragmento de región variable de cadena H que consiste en

CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 se eliminan, sustituyen o añaden,

30 CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 se eliminan, sustituyen o añaden, y

CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 se eliminan, sustituyen o añaden, o

35 un fragmento de región variable de cadena H que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o 5 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o 5 se eliminan, sustituyen, o añaden; y

fragmento de región variable de la cadena L:

un fragmento de región variable de cadena L que consiste en

CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 se eliminan, sustituyen o añaden,

40 CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 se eliminan, sustituyen o añaden, y

CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 se eliminan, sustituyen o añaden, o

45 un fragmento de región variable de cadena L que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 6 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 4 o 6 se eliminan, sustituyen, o añaden.

También se describe en el presente documento, un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano en el que una región constante de un anticuerpo derivado de humano está unida al siguiente fragmento de región variable de cadena H y/o fragmento de región variable de cadena L:

5 fragmento de región variable de cadena H:

un fragmento de región variable de cadena H que consiste en

CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 se eliminan, sustituyen o añaden,

10 CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 se eliminan, sustituyen o añaden, y

CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 se eliminan, sustituyen o añaden, o

15 un fragmento de región variable de cadena H que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o 5 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o 5 se eliminan, sustituyen, o añaden; y

fragmento de región variable de la cadena L:

un fragmento de región variable de la cadena L que consiste en

CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 se eliminan, sustituyen o añaden,

20 CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 se eliminan, sustituyen o añaden, y

CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 se eliminan, sustituyen o añaden, o

25 un fragmento de región variable de la cadena L que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 6 o una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o 6 se eliminan, sustituyen, o añaden.

El anticuerpo descrito en el presente documento o el fragmento del mismo incluye anticuerpos y fragmentos del mismo mostrados en los siguientes (i) a (vii):

30 (i) Un fragmento de cadena VH (fragmento de la región variable de cadena H) que comprende polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 7 a 9, o polipéptidos que consisten en secuencias de aminoácidos en las que uno o varios aminoácidos en las secuencias de aminoácido mostradas en las SEQ ID NOs: 7 a 9 se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden, y sirven como regiones determinantes de complementariedad de una cadena H contra IL-18 humano.

35 La frase "que sirve como regiones determinantes de complementariedad de una cadena H contra IL-18 humano" significa que exhibe reactividad con IL-18 humano solamente o en combinación con un fragmento arbitrario de región variable de cadena L .

40 La secuencia de aminoácidos de una cadena VH se muestra en las SEQ ID NOs: 3 y 5. Las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3) en esta cadena VH se muestran en las SEQ ID NOs: 7 a 9. Específicamente, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 31 a 35 en la secuencia de aminoácidos de una cadena VH mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 3 y 5 corresponde a CDR1 (SEQ ID NO: 7), la secuencia de aminoácidos de las posiciones 50 a 66 allí corresponde a CDR2 (SEQ ID NO: 8), y la secuencia de aminoácidos de las posiciones 99 a 109 allí corresponde a CDR3 (SEQ ID NO: 9).

45 (ii) Un fragmento de cadena VH (fragmento de la región variable de cadena H) que consiste en un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5, o un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 3 o 5 se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden, y sirven como una región variable de cadena H contra la IL-18 humano.

50 (iii) Un fragmento de cadena VL (fragmento de región variable de cadena L) que comprende polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 10 a 12, o polipéptidos que consisten en secuencias de aminoácidos en las que uno o varios aminoácidos en las secuencias de aminoácido mostradas en las SEQ ID NO:

10 a 12 se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden, y sirven como regiones determinantes de complementariedad de una cadena L contra IL-18 humano.

La frase "que sirve como regiones determinantes de complementariedad de una cadena L contra IL-18 humano" significa que exhibe reactividad con IL-18 humano solamente o en combinación con un fragmento arbitrario de región variable de la cadena H.

Las SEQ ID NOs: 4 y 6 muestran la secuencia de aminoácidos de una cadena VL. Las SEQ ID NOs: 10 a 12 muestran las secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3) en esta cadena VL. Específicamente, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 23 a 36 en la secuencia de aminoácidos de una cadena VL mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 y 6 corresponde a CDR1 (SEQ ID NO: 10), la secuencia de aminoácidos de las posiciones 52 a 58 allí corresponde a CDR2 (SEQ ID NO: 11), y la secuencia de aminoácidos de las posiciones 91 a 101 allí corresponde a CDR3 (SEQ ID NO: 12).

(iv) Un fragmento de cadena VL (fragmento de región variable de cadena L) que consiste en un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6, o un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 o 6 se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden, y sirven como una región variable de cadena L contra IL-18 humano.

(v) Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) preparado uniendo la cadena VH de (i) o (ii) anteriores y la cadena VL de (iii) o (iv) anteriores.

(vi) Un anticuerpo derivado de humano preparado uniendo una región constante derivada de humano a la cadena VH de (i) o (ii) anteriores y/o la cadena VL de (iii) o (iv) anteriores, o un fragmento del mismo.

(vii) Un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano cuyo epítipo es una región que comprende lisina en la posición 53 de IL-18 humano.

En el caso de unir la cadena VH y la cadena VL en (v) y (vi) anteriores, generalmente están unidas por un enlace peptídico apropiado o similar. Por ejemplo, se usa un péptido arbitrario de cadena sencilla que consiste en 10 a 25 residuos de aminoácidos como este conector peptídico. Los ejemplos específicos del enlazador peptídico incluyen (GGGGG)₃.

El anticuerpo preparado uniendo una región constante derivada de humano a la cadena VH y/o la cadena VL, o el fragmento de la misma, descrito en (vi) anterior, puede ser un anticuerpo completo (anticuerpo de longitud completa), Fab, Fab', F(ab')₂, o scAb o scFvFc que tienen al menos una fracción Fc parcial. El scAb es uno en el que un dominio parcial (dominio C) de una región constante de una cadena L o una cadena H está se une con scFv, y el scFvFc es uno en el que CH1 y CH2 de una cadena H se unen con scFv.

Además, el anticuerpo de la presente realización puede ser cualquier clase de IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En otras palabras, puede ser un monómero o puede ser un multímero tal como un dímero, un trímero, un tetrámero o un pentámero.

En el presente documento, la frase "uno o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden" significa que el número de aminoácidos hasta un cierto grado que pueden ser sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos por un método de preparación de proteína variante conocido hasta ahora, tal como mutagénesis dirigida al sitio, se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden. Por lo tanto, por ejemplo, los polipéptidos de las "secuencias de aminoácidos en las que uno o varios aminoácidos en las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 7 a 9 se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden" son péptidos variantes de los polipéptidos de las "secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 7 a 9", y la "variación" descrita en el presente documento significa principalmente una variación artificialmente introducida por un método de preparación de proteína variante conocido hasta ahora.

Por ejemplo, la "secuencia de aminoácidos en la que uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 se eliminan, sustituyen o añaden" puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene 85% o más, 90% o más, o 95% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ NO: 7. Lo mismo se aplica a las secuencias de aminoácidos diferentes a la SEQ ID NO: 7.

Como las CDR son regiones que reconocen el antígeno, IL-18 humano se reconoce por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo de acuerdo con la presente realización o el fragmento del mismo. Por lo tanto, un anticuerpo o un fragmento que tiene al menos las CDR mencionadas anteriormente puede reconocer específicamente IL-18 humano. Es decir, la cadena VH y la cadena VL mencionadas anteriormente pueden ser secuencias de aminoácidos que comprenden al menos CDR de la cadena VH y la cadena VL, en donde las otras regiones son una cadena VH y una cadena VL derivadas de humano. Por esto, se retiene la especificidad para IL-18 humano. Sin embargo, las CDR están construidas específicamente por las estructuras primarias y las estructuras de orden superior de las regiones variables de una cadena H y una cadena L. Por lo tanto, en el caso de constituir un anticuerpo anti-IL-18 humano que comprende al menos CDR de la cadena VH y la cadena VL, en donde las otras

regiones son una cadena VH y una cadena VL derivadas de humano, es preferible prepararlo como un anticuerpo que tiene especificidad por IL-18 humano. Por ejemplo, es preferible preparar el anticuerpo que tiene la especificidad por IL-18 humano manteniendo las estructuras de orden superior de al menos la CDR.

5 Como se muestra en los ejemplos mencionados más adelante, como resultado de llevar a cabo un análisis detallado del scFv mencionado anteriormente, se obtuvieron los siguientes hallazgos en cuanto a sus efectos y propiedades:

unión específica a IL-18 humano y IL-18 de mono, y

inhibición de la transducción de señales y producción de IFN- γ inducida por IL-18 humano e IL-18 de mono.

Además, el anticuerpo de la presente realización o el fragmento del mismo puede comprender un polipéptido adicional. Los ejemplos del caso en el que dicho polipéptido se añade incluyen el caso en el que el anticuerpo de la presente realización o el fragmento del mismo es un epítipo marcado con His, Myc, Flag o similares. Específicamente, los ejemplos del polipéptido adicional incluyen His, Myc y Flag.

Además, el anticuerpo de la presente realización y el fragmento del mismo pueden unirse con un modificador para mejorar la estabilidad y el título del anticuerpo. Específicamente, el anticuerpo de la presente realización y el fragmento del mismo pueden ser un anticuerpo modificado. Los ejemplos de este modificador incluyen cadenas de azúcar y polímeros. En el caso de realizar una modificación con una cadena de azúcar, existe la posibilidad de que la cadena de azúcar tenga cierta actividad biológica. En el caso de realizar la modificación con un polímero simple tal como el polietilenglicol (PEG), el polímero mismo no exhibe actividad biológica. Además, existe la posibilidad de que, mediante la PEGilación, se suprima la absorción en el hígado o se mejore la estabilidad en la sangre. En resumen, un polímero simple tal como PEG es preferible como modificador.

20 En el caso del uso de un fármaco terapéutico, la modificación del anticuerpo y el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones con el modificador se realiza en un intervalo en el que un humano no causa una respuesta inmune. En el caso del uso como un aparato de detección, un kit de diagnóstico o similar, no existe una limitación particular. Además, en el caso en el que anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones se administre a un humano, es preferible realizar la modificación en un intervalo que mantenga las estructuras de orden superior de las CDR que reconocen el antígeno.

Como el anticuerpo de la presente realización y el fragmento del mismo tienen una secuencia de aminoácidos derivada de humano, la posibilidad de que un anti-anti-anticuerpo que inhiba la actividad del anticuerpo se forme es muy baja. Además, el anticuerpo de la presente realización y el fragmento del mismo tienen el efecto de unirse fuertemente a IL-18 humano, inhibiendo así la actividad biológica tal como la producción de IFN- γ , y por lo tanto se espera que inhiban diversas respuestas inmunes provocadas por IL-18 humano. Por consiguiente, el anticuerpo de la presente realización y el fragmento del mismo pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad mencionada más adelante en la que IL-18 humano está implicado directa o indirectamente.

(2) Gen

35 Un gen que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 se incluye en una realización de la presente invención. Los genes que consisten en las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NO: 1 y 2, genes que consisten en secuencias de nucleótidos que tienen una homología del 85% o más, 90% o más, o del 95% o más con las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NOs: 1 y 2, los genes que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NOs: 3 a 6, los genes que tienen estos genes como regiones marco de lectura abierta (ORF), y los genes alterados en los que se ha alterado una porción de las secuencias de nucleótidos de estos genes, etc., se describen en el presente documento.

El gen mencionado anteriormente es un gen recombinante obtenido de una biblioteca de presentación en fagos y no está presente de forma natural. Además, el gen puede ser ADNc.

45 El gen que codifica el anticuerpo de la realización anterior o el fragmento del mismo y, por lo tanto, puede introducirse en un huésped apropiado (por ejemplo, una bacteria o una levadura) para expresar el anticuerpo de la realización anterior o el fragmento del mismo.

Además, el "gen" puede comprender secuencias tales como una secuencia de una región no traducida (UTR) y una secuencia del vector (que incluye una secuencia del vector de expresión), además de la secuencia que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo". Por ejemplo, los genes que consisten en las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NOs: 1 y 2 o los genes que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 3 a 6 se ligan con secuencias de vectores, que luego pueden amplificarse en un huésped apropiado, amplificando de ese modo el gen de la presente realización según se desee. Además, una secuencia parcial del gen de la presente realización puede usarse como una sonda. Además, como se menciona más adelante, el gen de la presente realización puede usarse como agente terapéutico génico para una enfermedad en la que está implicado IL-18 humano.

55 (3) Métodos para obtener y producir anticuerpos y fragmentos de los mismos

El anticuerpo y el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo" pueden obtenerse, como se muestra en los Ejemplos mencionados más adelante, por ejemplo, mediante el uso del denominado método de presentación en fagos (por ejemplo, MRC, UC, CAT, MedImmune, XOMA, Dyax o Morphosys) y un método de detección en un estado en el que se expone y mantiene una región de reconocimiento de IL-18BP presente en la molécula de IL-18.

Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para preparar el anticuerpo o el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo", que comprende unir IL-18 a un soporte en forma de perlas a través de un enlazador y luego hacer reaccionar el soporte con una biblioteca de presentación en fagos bajo condiciones que exponen y mantienen una región de reconocimiento de IL-18BP del IL-18.

Alternativamente, el anticuerpo y el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo" pueden producirse permitiendo que un huésped exprese el gen descrito anteriormente en "(2) Gen". Los métodos para obtener y producir el anticuerpo y el fragmento del mismo no están limitados a los mismos.

Más específicamente, los ARNm se extraen de linfocitos B de sangre periférica de una persona sana y se amplifican mediante RT-PCR usando pares cebadores que definen tanto los extremos de las cadenas VH como cadenas VL de genes de inmunoglobulina para obtener poblaciones de región V de cadenas H y cadenas L que tienen diversas secuencias. A continuación, un ADN que codifica una fracción enlazadora de peptídico se amplifica adicionalmente en combinación con un par cebador que lo define de modo que ambos extremos del mismo se unan a una cadena H y una cadena L, respectivamente, para preparar diversas poblaciones de ADN de scFv mediante combinaciones aleatorias de las regiones V de cadenas H y cadenas L. Los ADN de scFv obtenidos se incorporan en vectores fagémicos para preparar una biblioteca de presentación en fagos de scFv. La calidad y diversidad de esta biblioteca son factores muy importantes para obtener un anticuerpo efectivo.

Aunque IL-18 humano, que es una proteína objetivo, generalmente se inmoviliza como primera opción en una placa de plástico, IL-18 humano se biotinila usando un reactivo de biotilación que comprende un enlazador de una longitud adecuada para exponer y mantener una región de reconocimiento de IL-18BP presente en la molécula de IL-18. La longitud del enlazador es, por ejemplo, de 3 a 100 angstrom, por ejemplo, de 5 a 50 angstrom, o, por ejemplo, de 10 a 30 angstrom.

A continuación, esta biblioteca se hace reaccionar en una fase líquida con IL-18 humano biotilado unido con perlas magnéticas de estreptavidina, y la presentación en fagos de scFv sin reaccionar se eliminan mediante lavado, seguido de la elución de un clon del fago de scFv unido con IL-18 humano usando un ácido. El ADN de scFv se prepara a partir del clon del fago separado, y este se incorpora en un vector de expresión. Un huésped transformado con el vector de expresión se cultiva de acuerdo con un método convencional para obtener solamente la proteína de scFv de interés.

Las SEQ ID NOs: 1 y 2 son las secuencias de nucleótidos de los ADNc que codifican las regiones variables de cadena sencilla (scFv) contra IL-18 humano obtenido por el método de anticuerpos de presentación en fagos. Además, las SEQ ID NOs: 3 y 5 son las secuencias de aminoácidos de las cadenas VH de los anticuerpos anti-IL-18 humanos obtenidos, y las SEQ ID NOs: 4 y 6 son las secuencias de aminoácidos de las cadenas VL de los anticuerpos anti-IL-18 humanos obtenidos.

El gen que codifica scFv puede expresarse, por ejemplo, en *Escherichia coli*. En el caso de *Escherichia coli*, puede expresarse enlazando funcionalmente un promotor útil usado convencionalmente, una secuencia señal para la secreción de anticuerpos y similares al gen que codifica scFv que se va a expresar. Los ejemplos del promotor incluyen el promotor lacZ y el promotor araB. En el caso de la expresión en el periplasma de *Escherichia coli*, es preferible utilizar la secuencia señal pelB (documento no de patente 27) como la secuencia señal para la secreción de scFv. La secuencia señal de la proteína g3 del fago M13 también se puede usar para la secreción en un sobrenadante de cultivo.

El scFv expresado como se describió anteriormente puede separarse del interior o exterior de las células huésped y purificarse en forma homogénea. El scFv expresado en la presente realización puede purificarse fácilmente en corto tiempo mediante cromatografía de afinidad usando una columna de níquel, porque se agrega una secuencia de etiqueta His a su terminal C. Además, también es posible purificar el scFv combinando los métodos habituales de separación y purificación utilizados para las proteínas. El anticuerpo puede separarse y purificarse combinando, por ejemplo, ultrafiltración, lavado y cromatografía en columna tal como filtración en gel/intercambio iónico/cromatografía hidrofóbica. Se ha revelado que la proteína scFv (polipéptido) así obtenida tiene actividad de unión contra IL-18 humano como se muestra en los Ejemplos mencionados más adelante.

Un método tal como ELISA o BIAcore se usa como un método para medir la actividad de unión al antígeno del anticuerpo de acuerdo con la presente realización o el fragmento del mismo contra IL-18 humano. En el caso de usar, por ejemplo, ELISA, una muestra que contiene el anticuerpo anti-IL-18 o el fragmento de anticuerpo de interés, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo de *Escherichia coli* o un anticuerpo purificado, se agrega a un IL-18 humano inmovilizado en una placa de 96 pozos. A continuación, se agrega un anticuerpo secundario marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina, y la placa se incuba y se lava. Luego, se agrega un sustrato cromogénico fosfato de

paranitrofenilo al mismo, y se puede medir la absorbancia, evaluando así la actividad de unión al antígeno.

(4) Vector de expresión recombinante y transformante

Un vector de expresión recombinante que comprende el gen descrito anteriormente en "(2) Gen", es decir, el gen que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo", se incluye en una realización de la presente invención. Los ejemplos de los mismos incluyen vectores de expresión recombinantes en los que se insertan los ADNc de genes que consisten en las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NOs: 1 y 2 o genes que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 3 a 6. Se puede usar un plásmido, un fago o un cósmido o similares en la preparación del vector de expresión recombinante, aunque no está particularmente limitado a los mismos.

Como se mencionó anteriormente, el vector de expresión recombinante comprende el gen de la realización precedente. El tipo específico del vector no está particularmente limitado, y se puede seleccionar apropiadamente un vector que permita la expresión en células huésped. Específicamente, una secuencia promotora se selecciona apropiadamente de acuerdo con el tipo de células huésped para expresar de forma segura el gen, y puede usarse una en la que este y el gen de acuerdo con la realización anterior se incorporan en diversos plásmidos como un vector de expresión.

Se pueden usar varios marcadores para confirmar si el gen de la realización anterior se introduce o no en las células huésped y, además, si el gen de la realización anterior se expresa de forma segura en las células huésped. Por ejemplo, un gen eliminado en las células huésped se usa como marcador, y un plásmido o similar que comprende este marcador y el gen de la realización anterior se introduce como un vector de expresión en las células huésped. Mediante esto, la introducción del gen de la realización anterior se puede confirmar a partir de la expresión del gen marcador. Alternativamente, el anticuerpo de acuerdo con la realización anterior o el fragmento del mismo puede expresarse como una proteína de fusión, y el anticuerpo de acuerdo con la realización anterior o el fragmento del mismo puede expresarse, por ejemplo, como una proteína de fusión GFP usando proteína fluorescente verde GFP derivada de *Aequorea Victoria* como marcador.

Las células huésped no están particularmente limitadas, y se pueden usar preferiblemente varias células conocidas convencionalmente. Específicamente, los ejemplos de las células huésped en el caso del gen que codifica el anticuerpo de longitud completa, descrito anteriormente en "(2) Gen", incluyen células animales que incluyen células derivadas de humanos o ratones, así como ovocitos de *Caenorhabditis elegans* y *Xenopus laevis*, células cultivadas de varios mamíferos (ratas, conejos, cerdos, monos, etc.) y células cultivadas de insectos como *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*, y los ejemplos de las células huésped en el caso del gen que codifica el fragmento de anticuerpo incluyen bacterias como *Escherichia coli* y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), aunque no particularmente limitado a los mismos.

El método para introducir el vector de expresión en las células huésped, es decir, el método de transformación, no está particularmente limitado, y se puede usar preferiblemente un método convencionalmente conocido tal como un método de electroporación, un método de fosfato de calcio, un método de liposoma o un método de dextrano.

El transformante de la realización presente es un transformante en el que se introduce el gen descrito anteriormente en "(2) Gen", es decir, el gen que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) anticuerpo y fragmento del mismo". En el presente documento, la frase "se introduce el gen" significa que el gen se introduce expresamente en las células previstas (células huésped) mediante un enfoque de ingeniería genética conocido anteriormente (técnica de manipulación de genes).

También es posible producir el anticuerpo o el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo" con el transformante de la presente realización preparado usando el vector de expresión recombinante de la presente realización.

(5) Métodos para usar anticuerpos y fragmentos de los mismos

(5-1) Aparato de detección de IL-18 humano, vehículo para purificación, reactivo de detección, kit de diagnóstico de enfermedad y método de diagnóstico.

El anticuerpo o el fragmento del mismo, o el anticuerpo modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se une específicamente y fuertemente a IL-18 humano y como tal, y puede usarse en un aparato de detección para IL-18 humano, un vehículo para la purificación, un reactivo de detección, un kit de diagnóstico para una enfermedad o similares mencionados más adelante.

El aparato de detección de la presente realización puede usarse con el propósito de, por ejemplo, detectar IL-18 humano contenido en una muestra tal como sangre u orina. El aparato de detección para IL-18 humano puede usarse en la detección, medición o similares de IL-18 bajo diversas condiciones.

El vehículo para purificación descrito en el presente documento puede ser preparado mediante la unión del anticuerpo, etc., mediante un método general a un vehículo utilizado habitualmente en cromatografía. El vehículo para la

purificación se puede utilizar en la purificación de IL-18 humano mediante cromatografía de inmunoafinidad. Este método de purificación comprende las etapas de: poner en contacto el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones con una mezcla de IL-18 humano y otras sustancias para adsorber el IL-18 humano sobre el anticuerpo o el fragmento del mismo; y desorber y recoger el IL-18 humano adsorbida del anticuerpo o el fragmento del mismo.

De acuerdo con el reactivo de detección de IL-18 humano descrito en el presente documento, IL-18 humano en una muestra de prueba puede analizarse rápida y exactamente de manera cualitativa o cuantitativa mediante un inmunoensayo de marcación tal como radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo fluorescente. En este inmunoensayo de marcación, el anticuerpo o el fragmento del mismo se marca con, por ejemplo, una sustancia radiactiva, una enzima y/o un material fluorescente y se usa. Dado que el anticuerpo y el fragmento del mismo reaccionan específicamente con IL-18 humano para provocar una respuesta inmune, la respuesta inmune puede medirse con el material de marcación como un índice, detectando con precisión una cantidad muy pequeña de IL-18 humano en la muestra de prueba. El inmunoensayo de marcación, comparado con un bioensayo, se caracteriza porque: puede analizar una gran cantidad de muestras de prueba a la vez; el tiempo y la mano de obra necesarios para el análisis son pequeños; y el análisis es muy preciso.

El kit de diagnóstico para una enfermedad descrita en el presente documento comprende el reactivo de detección de IL-18 humano. El kit de diagnóstico se puede utilizar para medir un nivel de IL-18 humano en una muestra de prueba y diagnosticar una enfermedad asociada con un cambio en el nivel de expresión de IL-18. El kit de diagnóstico puede comprender un estándar de IL-18 humano que sirve como índice de concentración de IL-18 humano, además del reactivo de detección.

El método de diagnóstico descrito en el presente documento comprende medir un nivel de IL-18 humano en una muestra de prueba (sangre, un fluido corporal, un tejido, etc.) usando el kit de diagnóstico y diagnosticando una enfermedad con base en los resultados de la medición. La "enfermedad" es una enfermedad asociada con un cambio en el nivel de expresión de IL-18, y se incluye hiper-IL-18-naemia en un humano mencionado más adelante. Además, los ejemplos de la "enfermedad" incluyen alergia, inflamación y trastorno inmunitario crónico y más específicamente incluyen neumonía intersticial, enfermedad de Still de inicio en adultos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad ósea metabólica, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, dermatitis atópica, inflamación de las vías respiratorias, hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR), asma y daños orgánicos graves en el hígado, el riñón y el intestino.

El método de detección con el aparato de detección para IL-18 humano descrito en el presente documento es útil en el control del proceso en la producción de IL-18 humano y el control de calidad de productos. Además, el kit de diagnóstico y el método de diagnóstico para una enfermedad descrita en el presente documento son muy útiles para realizar el diagnóstico de diversas enfermedades sensibles, la evaluación del tratamiento de diversas enfermedades, el control patológico de enfermedades, etc., usando los niveles de IL-18 humano en tejidos y fluidos corporales como un índice.

En general, un anticuerpo usado para el diagnóstico se prepara inmunizando un animal no humano tal como un ratón, un conejo o una cabra. Sin embargo, en el sistema inmune de un animal, los linfocitos que producen anticuerpos que se unen a las moléculas que constituyen el cuerpo del mismo son eliminados o desactivados. En resumen, un anticuerpo para el cual una porción muy similar entre IL-18 humano y IL-18 animal es un determinante antigénico no se incluye en un anticuerpo anti-IL-18 humano preparado inmunizando al animal.

En contraste con esto, el anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo seleccionado a partir de una biblioteca de fagos que comprende una presentación en fagos de un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano. El mecanismo que elimina o desactiva los anticuerpos, como en el animal, no está presente en este fago. Por lo tanto, un anticuerpo anti-IL-18 que exhibe especificidad de unión por un determinante antigénico común en IL-18 de humanos y otros animales, que no puede prepararse en inmunidad animal, se incluye en el anticuerpo descrito en el presente documento. Siempre y cuando dicho anticuerpo se use en el aparato de detección y el kit de diagnóstico descrito en el presente documento, se puede diagnosticar una enfermedad asociada con IL-18 no solo en humanos sino también en diversos modelos de enfermedad en animales, incluidos los monos.

(5-2) Inhibidor de actividad de IL-18 humano, inhibidor de unión, inhibidor de producción de IFN- γ y agente terapéutico génico

El anticuerpo o el fragmento del mismo descrito en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo" se une a IL-18 humano mientras inhibe la unión al receptor de IL-18 humano, que también inhibe la transducción de señales mediada por este receptor y además inhibe la producción de IFN- γ inducida por IL-18 humano. Por lo tanto, el anticuerpo, en otras palabras, es un antagonista de IL-18 humano. Además, este antagonista de IL-18 humano puede usarse como un inhibidor de la actividad de IL-18 humano.

Específicamente, los inhibidores de la actividad de IL-18 humano que contienen antagonistas de los siguientes (I) a (IV) como ingredientes activos se describen en el presente documento:

(I) el anticuerpo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo",

(II) el fragmento del anticuerpo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo",

(III) un anticuerpo modificado del anticuerpo o el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo", y

5 (IV) un compuesto de bajo peso molecular diseñado molecularmente sobre la base de un determinante antigénico en IL-18 humano reconocido por el anticuerpo, el fragmento del anticuerpo o el anticuerpo modificado descrito anteriormente en (I) a (III).

En el presente documento, el "inhibidor de actividad de IL-18 humano" inhibe la actividad de IL-18 humano y puede ser una inhibición antagónica de la unión al receptor de IL-18 humano o una inhibición de la transducción de la señal de IL-18 humano uniéndose al complejo con receptor de IL-18.

10 Los inhibidores de unión a IL-18 humano que contienen los antagonistas de los anteriores (I) a (IV) como ingredientes activos, en los que los inhibidores inhiben la unión entre IL-18 humano y el receptor de IL-18 humano también se describen en el presente documento. El "inhibidor de unión a IL-18 humano" puede inhibir de forma antagonista la unión al receptor de IL-18 humano.

15 Los inhibidores de producción de IFN- γ que contienen los antagonistas de los anteriores (I) a (IV) como ingredientes activos se describen adicionalmente en el presente documento. El "inhibidor de la producción de IFN- γ " puede ser uno que inhibe la producción de IFN- γ .

20 Además, el gen descrito anteriormente en "(2) Gen" puede usarse como un agente terapéutico génico para una enfermedad en la que está implicada IL-18 humano. Por lo tanto, los agentes terapéuticos génicos que comprenden el gen descrito anteriormente en "(2) Gen" se describen en el presente documento. Este agente terapéutico génico puede diseñarse de tal manera que el anticuerpo de la realización anterior o el fragmento del mismo se exprese *in vivo* después de la ingestión, formando así el anticuerpo de la realización anterior o el fragmento del mismo *in vivo* después de la ingestión del agente terapéutico e impartiendo efectos similares a aquellos de los inhibidores mencionados anteriormente.

(5-3) Agente terapéutico para la enfermedad

25 El anticuerpo o el fragmento del mismo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo" tiene regiones variables de un anticuerpo anti-IL-18 humano derivado de humano y reacciona fuertemente con IL-18 humano para exhibir un efecto inhibidor en la unión entre IL-18 y el receptor de IL-18. Además inhibe varias respuestas inmunes (inhibe la producción de IFN- γ) evocada por IL-18. Por lo tanto, el inhibidor de actividad de IL-18 humano, el inhibidor de la unión de IL-18 humano, el inhibidor de la producción de IFN- γ o el agente terapéutico génico pueden usarse
30 como agente terapéutico para una enfermedad en la que está involucrado IL-18 humano (enfermedad asociada con IL-18).

35 El anticuerpo descrito anteriormente en "(1) Anticuerpo y fragmento del mismo" es un anti-IL-18 humano de humano derivado de humano que reconoce IL-18 humano. Específicamente, la secuencia de aminoácidos de este anticuerpo, a diferencia de los anticuerpos quiméricos convencionales y los anticuerpos humanizados, se deriva completamente de un humano. Por lo tanto, no existe riesgo de formación de un anticuerpo (anti-anticuerpo) que bloquee los efectos del anticuerpo de la realización anterior. Por lo tanto, este anticuerpo puede mantener los efectos mientras mantiene una alta seguridad, incluso si se realiza una administración repetida o una administración a largo plazo.

40 Un agente terapéutico para uso como un medicamento (en adelante, también denominado como un "agente terapéutico para la enfermedad") que comprende el anticuerpo o un fragmento de acuerdo con las reivindicaciones se incluye en una realización de la presente invención. La hiper-IL-18-naemia en un humano se describe en el presente documento. La hiper-IL-18-naemia en un humano es varias enfermedades causadas principalmente por una forma activa de IL-18 humano producido en exceso por alguna estimulación derivada del interior o exterior de las células. Además, los ejemplos de la enfermedad incluyen alergia, inflamación y trastorno inmunitario crónico y más
45 específicamente incluyen neumonía intersticial, enfermedad de Still de inicio en adultos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad ósea metabólica, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, dermatitis atópica, inflamación de las vías respiratorias, hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR), asma y daños orgánicos graves en el hígado, el riñón y el intestino.

50 Dado que solo es necesario que el agente terapéutico para la enfermedad de la presente realización ejerza sus efectos *in vivo*, el agente terapéutico para la enfermedad de la presente realización puede ser uno en el que el anticuerpo o fragmento esta en forma de un profármaco. Específicamente, puede modificarse para convertirse en un metabolito activo *in vivo*.

Alternativamente, el agente terapéutico para uso de acuerdo con las reivindicaciones puede estar en una composición que comprende aditivos farmacéuticamente aceptables tales como uno o más tipos de excipientes, uno o más tipos de aglutinantes, uno o más tipos de desintegrantes, uno o más tipos de lubricantes, y uno o más tipos de reguladores.

55 Dado que el anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones inhibe la transducción de señales y la producción de IFN-

y inducida por la estimulación de IL-18 como se mencionó anteriormente, un determinante antigénico en IL-18 que exhibe la especificidad de unión entre el anticuerpo que tiene tales características e IL-18 humano puede dilucidarse, permitiendo así la aplicación al desarrollo de un agente terapéutico para la enfermedad que es un compuesto de bajo peso molecular. Este determinante antigénico se llama epítipo. Este epítipo puede ser una secuencia de aminoácidos primaria en sí misma y puede ser una conformación construida de manera plegada de una cadena peptídica. En cualquier caso, por ejemplo, se puede diseñar un compuesto similar (molécula de imitación) del epítipo mediante un "método de diseño de plantilla molecular que usa anticuerpos monoclonales" propuesto por Fukumoto et al., (documento no de patente 28). En el presente documento, el "compuesto de bajo peso molecular" se refiere, por ejemplo, a un compuesto que tiene un peso molecular menor a 10.000, por ejemplo, un peso molecular menor a 3.000, generalmente usado como un fármaco de molécula pequeña, no un compuesto que tiene un peso molecular relativamente grande (peso molecular: 10.000 o mayor) tal como un péptido o un anticuerpo. Un peso molecular más pequeño del compuesto de bajo peso molecular es más preferible.

En el caso de desarrollar un péptido o un compuesto de bajo peso molecular como el compuesto de bajo peso molecular, puede diseñarse mediante un denominado proceso *in silico* para realizar un diseño molecular enfocándose en la estructura molecular de esta molécula de imitación. Al realizar así el diseño molecular *in silico*, un compuesto de bajo peso molecular que puede servir como fármaco terapéutico puede seleccionarse como un compuesto principal de forma económica y rápida.

Específicamente, por ejemplo, en los Ejemplos mencionados más adelante, las CDR de un anticuerpo scFv anti-IL-18 humano de humano se muestran en las SEQ ID NOs: 7 a 9 y 10 a 12. En general, las CDR en un anticuerpo son regiones (sitios) que reconocen el antígeno. Específicamente, las CDR sirven como centros activos del anticuerpo. En resumen, el scFv mostrado en los Ejemplos reconoce específicamente el IL-18 humano a través de las CDR.

Por lo tanto, siempre que un compuesto de bajo peso molecular esté diseñado para ser sustancialmente idéntico (preferiblemente, completamente idéntico) a las estructuras de orden superior de estas CDR, el compuesto de bajo peso molecular puede usarse como un fármaco de molécula pequeña. En otras palabras, el compuesto de bajo peso molecular está diseñado para estar más cerca de las conformaciones de las CDR. Aunque el método del proceso *in silico* no está particularmente limitado, el diseño se puede hacer en un ordenador con base en los grupos funcionales portados por las CDR y las estructuras de orden superior de las CDR, por ejemplo mediante, SBDD (diseño de fármacos con base en la estructura) o CADD (diseño de fármacos asistido por ordenador).

El compuesto de bajo peso molecular así diseñado tiene una alta estabilidad, en comparación con las proteínas (péptidos) tales como los anticuerpos. Por lo tanto, este compuesto de bajo peso molecular se puede usar como un medicamento fácil de manejar.

(5-4) Ejemplo de aplicación del agente terapéutico 1 para la enfermedad

Como se menciona en adelante, se mostrarán los ejemplos de la aplicación del agente terapéutico para la enfermedad.

La neumonía intersticial es un nombre genérico para 200 o más enfermedades con la inflamación del intersticio del pulmón (que incluye el tabique alveolar pulmonar en sentido estrecho y el tabique interlobular, la vecindad del revestimiento del tórax, etc., en el sentido amplio), entre las enfermedades en las que se observan sombras difusas bilaterales en las imágenes de rayos X del tórax. De ellos, muchos casos de neumonía intersticial de causas desconocidas están presentes. Con el fin de dilucidar el papel de IL-18 *in vivo*, el grupo de la Universidad de Kurume ha administrado IL-2 a ratones y ha observado cambios derivados de la administración de IL-18 en un estado activado de linfocitos (documento no de patente 29). Como resultado, se ha encontrado que la neumonía intersticial es evocada por la administración de IL-18 la, y se encontró que IL-18 está profundamente involucrado en la patogénesis de la neumonía intersticial. El grupo ha considerado además que el inicio de la neumonía intersticial se previene al suprimir el inicio de la acción excesiva de IL-18, y realizó estudios utilizando ratones inactivados con el receptor de IL-18 (IL-18R α) para verificar esta hipótesis. Como resultado, se ha confirmado que la aparición de neumonía intersticial se previene al suprimir la acción de IL-18.

Mientras tanto, en el Ejemplo 6 mencionado más adelante, se ha confirmado usando células humanas KG-1 que el anticuerpo anti-IL-18 obtenido por los presentes inventores tiene la capacidad de suprimir el inicio de la acción de IL-18.

Como se mencionó anteriormente, IL-18 estimula los linfocitos en colaboración con IL-2, causando así una neumonía intersticial grave. Por lo tanto, por ejemplo, el agente terapéutico para la enfermedad mencionado anteriormente puede usarse en el tratamiento de la neumonía intersticial.

(5-5) Ejemplo de aplicación del agente terapéutico 2 para la enfermedad

La enfermedad de Still de inicio en el adulto es una enfermedad inflamatoria sistémica que manifiesta fiebre alta, dolor poliarticular y erupción como signos principales. Aunque aún se desconoce mucho sobre la causa de la enfermedad, se ha informado desde Canadá que HLAB17, B18, B35 y DR2 están vinculados como factores genéticos. Recientemente, se ha señalado la posibilidad de que los polimorfismos de los genes de las citoquinas tales como la IL-18 se conviertan en riesgos para el inicio. Casos que aparecen después de la infección por un virus como el

5 parvovirus humano, el virus de la rubéola, el virus de EB, el ecovirus, el citomegalovirus, la influenza, la parainfluenza, el virus Coxsackie, el virus del herpes, el virus de la hepatitis B o el virus de la hepatitis C o una bacteria tal como *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Yersinia*, o *Brucella* han sido reportados previamente como factores ambientales. Por lo tanto, también se ha propuesto la teoría de inducción por infección en la que la infección por un virus o una bacteria parece ser un factor que induce la enfermedad de Still. También se sabe que las citoquinas juegan un papel importante en el inicio y la patogénesis. En pacientes con enfermedad de Still, IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α , M-CSF e IL-18 están sobreexpresadas. Entre ellos, se ha encontrado un aumento notable de IL-18, lo que sugiere que IL-18 es una causa de la enfermedad de Still. Por lo tanto, se espera que se prevenga la aparición de la enfermedad de Still suprimiendo la aparición de la acción de IL-18.

10 En el Ejemplo 6 mencionado más adelante, se ha confirmado usando células humanas KG-1 que el anticuerpo anti-IL-18 obtenido por los presentes inventores tiene la capacidad de suprimir el inicio de acción de IL-18. Por lo tanto, por ejemplo, el agente terapéutico para la enfermedad mencionada anteriormente puede usarse para la enfermedad de Still de inicio en adultos o similares.

(5-6) Ejemplo de aplicación del agente terapéutico 3 para la enfermedad

15 La IL-18 se produce no solo a partir de células del sistema inmune, tales como células dendríticas y macrófagos, sino también a partir de diversas células de sistemas no inmunes, que incluyen queratinocitos dérmicos, células epiteliales intestinales y células epiteliales respiratorias.

20 Además, IL-18 induce la producción de IFN- γ a partir de diversas células del sistema inmune o sistemas no inmunes en presencia de IL-12. Por otro lado, IL-18 induce la producción de citoquinas Th2 (citoquinas producidas a partir de células T2 auxiliares) tales como IL-4 e IL-13 a partir de células NKT, células T y células NK en ausencia de IL-12 para inducir la producción de IgE de una manera no específica de antígeno.

Además, IL-18 no solo potencia la producción de IFN- γ que pertenece a las citoquinas Th1 al estimular las células Th1 estimuladas por antígeno, sino que también induce la producción de IL-9 e IL-13 que pertenecen a las citoquinas Th2 y además IL-8, que es una quimioquina típica.

25 Además, IL-18 se puede administrar transnasalmente junto con OVA (se administran IL-18 y OVA) a ratones a los que se transfieren células T de memoria tipo Th1 específicas de OVA, lo que induce asma bronquial de tipo Th1 caracterizada por fuertes infiltrados de neutrófilos, linfocitos, macrófagos y eosinófilos en los alvéolos y el intersticio y la hiperreactividad de las vías respiratorias.

30 Además, IL-18 estimula directamente mastocitos y basófilos de una manera independiente de antígeno/IgE. Como resultado, induce la producción de varias citoquinas y transmisores químicos para inducir un tipo natural de atopia (inflamación dependiente de IL-18).

Como se muestra en los ejemplos mencionados más adelante, el anticuerpo anti-IL-18 obtenido por los presentes inventores inhibió la actividad de IL-18 en diversos sistemas *in vitro*. Particularmente, este anticuerpo tiene la función de inhibir la producción de IFN- γ , que es una citoquina Th1.

35 Como se describió anteriormente, IL-18 es importante para las inflamaciones alérgicas como el asma bronquial y un tipo natural de dermatitis atópica, y los antagonistas de IL-18 humanos (I) a (IV) anteriores) mencionados anteriormente pueden ser utilizados como fármacos terapéuticos para las mismas.

40 El anticuerpo de acuerdo con la realización anterior y el fragmento del mismo son un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano y un fragmento del mismo que inhibe la unión al receptor de IL-18 humano. Por lo tanto, pueden usarse como fármacos terapéuticos (métodos de tratamiento) o agentes preventivos (métodos de prevención) para diversas enfermedades inflamatorias causadas por IL-18 humano.

La presente invención también proporciona, por ejemplo, un enfoque importante para desarrollar un fármaco de molécula pequeña (fármaco químicamente sintético) que inhibe la actividad de IL-18 diseñando un compuesto de bajo peso molecular sobre la base de las estructuras de orden superior de las CDR de un anticuerpo scFv.

45 Como se mencionó anteriormente, el anticuerpo anti-IL-18 humano de humano de la realización precedente inhibe la unión al receptor de IL-18. Por lo tanto, este anticuerpo es eficaz para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades causadas por IL-18, además de las descritas anteriormente.

50 Los presentes inventores han logrado aislar scFv que se une específicamente a IL-18 a partir de una biblioteca de presentación en fagos que muestra fragmentos variables de cadena sencilla humana (scFv). Este fragmento variable de cadena sencilla también puede inhibir específicamente la unión al receptor de IL-18.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los Ejemplos. La presente invención no pretende estar limitada por la descripción de los ejemplos a continuación

(Ejemplo 1) Biotinilación de citoquinas

Las Citoquinas IL-18 humanas (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.), IL-18 de mono (Thermo Fisher Scientific KK), IL-18 de rata (Acris Antibodies GmbH IL-18 de), IL-18 de ratón (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.), IL-1 β humanas (Funakoshi Corp.) e IL-33 humanas (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.) se biotinilaron usando Biotin-PEAC₅-maleimida (Dojindo Laboratories) o Biotina-AC₅Sulfo-OSu (Dojindo Laboratories). Los tampones de las citoquinas después del tratamiento de biotinilación fueron reemplazados con PBS (Sigma-Aldrich Corp.) mediante diálisis.

(Ejemplo 2) Aislamiento del anticuerpo anti-humano IL-18

Una biblioteca de presentación de fagos scFv preparada usando ADNc de VH y VL humanos a partir de ARNm derivados de células B humanas (por ejemplo, amígdalas o bazo) se seleccionaron para aislar anticuerpos contra IL-18 humano. La biblioteca de anticuerpos utilizada fue una excelente y comprendía 10¹¹ o más moléculas de anticuerpos diversas.

El IL-18 humano biotinilada se unió a estreptavidina de unión a Biomag (Polysciences, Inc.) mediante el uso de procedimientos estándar para obtener fagos scFv que se unen específicamente a IL-18 humano (documento no de patente 30). Los clones de los fagos scFv obtenidos se designaron como "4A6D" y "4A6S". La actividad de unión de los fagos scFv obtenidos se evaluó mediante el siguiente método:

(Ejemplo 3) Prueba de actividad de unión en anticuerpo anti-IL-18

La actividad de unión de los fagos scFv obtenidos, scFv e IgG preparados mediante un método estándar (método convencional) se evaluaron mediante ELISA. El IL-18 humano biotinilada o el IL-18 de ratón biotinilada se diluyeron hasta 1 μ g/mL con PBS (Sigma-Aldrich Corp.), se agregaron a razón de 100 μ L/pozo a placas de estreptavidina (Nunc), y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas para inmovilizar el IL-18. Después de la inmovilización, las placas se lavaron con PBST, y cada fago de scFv, scFv o IgG obtenidos se añadió a razón de 100 μ L/pozo a las placas y se incubaron a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST y se añadió un anticuerpo de detección anti-M13/HRP (GE Healthcare Japan Corp.), etiqueta anti-His/HRP (Bethyl Laboratories, Inc.), etiqueta anti-V5/HRP (Bethyl Laboratories, Inc.), anti-IgG/HRP de ratón (Invitrogen Corp.) o anti-hFc/HRP (Cosmo Bio Co., Ltd., The binding site), a razón de 100 μ L/pozo a las placas y se incubó a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST y se añadió TMB (Sigma-Aldrich Corp.) a razón de 100 μ L/pozo a las placas para desarrollar color. Después de 30 minutos, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 2 N, y los valores de color (DO 450 nm/650 nm) se midieron usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Inc.).

La actividad de unión de la molécula de IgG tipo 4A6D contra IL-18 humano y la actividad de unión de la molécula de IgG tipo 4A6S contra IL-18 humano se muestran en la Figura 1. 4A6D y 4A6S tuvieron una actividad de unión significativa contra IL-18 humano, en comparación con un anticuerpo de control negativo (anticuerpo anti-HBs humano).

(Ejemplo 4) Análisis de secuencia del anticuerpo anti-IL-18

Se confirmaron las secuencias de nucleótidos de los anticuerpos anti-IL-18 obtenidos. Las secuencias de nucleótidos de ADN de los genes de cadena VH y de cadena VL de los genes de scFv aislados se determinaron usando el kit de secuenciación del ciclo Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de 4A6D y 4A6S se muestran en las SEQ ID NOs: 1 y 2.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena VH y la cadena VL de 4A6D se muestran en las SEQ ID NOs: 3 y 4 de la Tabla 1, y las secuencias de aminoácidos de la cadena VH y la cadena VL de 4A6S se muestran en las SEQ ID NOs : 5 y 6. Los sitios que difieren entre las secuencias de aminoácidos de 4A6D y 4A6S están subrayados.

[Tabla 1]

Nombre del clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
4A6D	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCTASGFTFDEYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISTGGGGTYADSV ^{GRFTISRDN} SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAK ^{PWLSGSRSGDFW} QGTLVT VSS	SEQ ID NO 3

Nombre del clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLLIYEVSHRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSFTSSSSLYVFGTGKLTVL	SEQ ID NO 4
4A6S	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCTASGFTFSEYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISTGGGGTYADSVGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKPWLSGSRSGDFWGQGLVT VSS	SEQ ID NO 5
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLLIYEVSHRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSFTSSSSLYVFGTGKLTVL	SEQ ID NO 6

Las secuencias de aminoácidos de las CDR (regiones determinantes de complementariedad) importantes para la actividad de unión de 4A6D y 4A6S se muestran en las SEQ ID NOs: 7 a 12 de la Tabla 2.

[Tabla 2]

Región		Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH	CDR1	EYAMS	SEQ ID NO 7
	CDR2	GISTGGGGTYADSVEG	SEQ ID NO 8
	CDR3	PWLSGSRSGDF	SEQ ID NO 9
VL	CDR1	TGTSSDVGGYNYVS	SEQ ID NO 10
	CDR2	EVSHRPS	SEQ ID NO 11
	CDR3	SSFTSSSSLYV	SEQ ID NO 12

5

(Ejemplo 5) Ensayo de unión al receptor de IL-18

(5-1) Ensayo de unión al receptor de IL-18 por ELISA

Con el fin de evaluar las funciones del anticuerpo anti-IL-18 humano, se construyó un sistema de ensayo de unión al receptor de IL-18.

- 10 Se añadió IL-18R β -hFc (R&D Systems, Inc.) a razón de 100 μ L/pozo a una concentración de 1 μ g/mL a las placas Covalink (Nunc) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS (solución salina regulada con fosfato) y se bloquearon con BSA al 1% (albúmina de suero bovino)-PBS. Se preparó IL-18 humano (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.) a una concentración de 0,5 μ g/mL con BSA-PBS al 1%, y se preparó IL-18R α -hFc-His (R&D Systems, Inc.) a una
- 15 concentración de 2 μ g/mL con BSA-PBS al 1%. Ambas soluciones se mezclaron (50 μ L cada una). El anticuerpo anti-IL-18 obtenido se añadió adicionalmente a la solución mixta de IL-18/IL-18R α -hFc-His. Esta solución mixta se añadió

a las placas Covalink inmovilizadas con IL-18R β -hFc y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST (solución salina regulada con fosfato-Tween 20), y se añadió un anticuerpo de detección anti-etiqueta His/HRP (Bethyl Laboratories, Inc.) a razón de 100 μ L/pozo a las placas y se incubó a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST y se añadió TMB (Sigma-Aldrich Corp.) a razón de 100 μ L/pozo a las placas para desarrollar color. Después de 30 minutos, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 2 N, y los valores de color (DO 450 nm)/650 nm) se midieron usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Inc.).

La actividad inhibidora de 4A6D contra la unión entre el IL-18 humano y el receptor de IL-18 se muestra en la Figura 2. 4A6D inhibió significativamente la unión entre el IL-18 humano y el receptor de IL-18, en comparación con un anticuerpo de control negativo (anticuerpo humano anti-HBs).

(5-2) Ensayo de unión al receptor de IL-18 utilizando células KG-1

Para confirmar la capacidad del anticuerpo anti-IL-18 obtenido para inhibir la unión al receptor de IL-18 nativo, se construyó un sistema de ensayo de unión al receptor de IL-18 usando células KG-1 (ATCC # CCL- 246).

Se diluyó IL-18 humano (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.) hasta 100 ng/mL con BSA-PBS al 1%-NaN₃ al 0,05%-suero de conejo al 2%, mezclado con el anticuerpo anti-IL-18 obtenido, y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego, la solución mixta de IL-18 humano/anticuerpo anti-IL-18 se añadió a células KG-1 (1 x 10⁵ células) cultivadas mediante una técnica estándar (por ejemplo, un medio en el que se suplementó un medio RPMI1640 con suero bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, 50 U/mL de penicilina y 50 μ g/mL de estreptomycin), y reaccionó en hielo. Después de 30 minutos, el sobrenadante se eliminó por centrifugación (1.200 rpm, 3 min, 4 °C), y un anticuerpo 125-2H anti-IL-18 biotinilado (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.) sin inhibir la unión entre IL-18 y el receptor de IL-18 se añadió a la misma y reaccionó en hielo. Después de 30 minutos, el sobrenadante se eliminó por centrifugación (1.200 rpm, 3 min, 4 °C), y se añadió estreptavidina-PE (BD Becton, Dickinson and Company) al mismo y se hizo reaccionar en hielo durante 30 minutos. Después de la reacción, el sobrenadante se eliminó por centrifugación (1.200 rpm, 3 min, 4 °C), y las células KG-1 se hicieron flotar con BSA-PBS al 1%-NaN₃ al 0,05%-suero de conejo al 2%. La intensidad de fluorescencia en las células KG-1 que reaccionaron se midió usando FACScan (BD Becton, Dickinson and Company).

La actividad inhibidora de la molécula de IgG de tipo 4A6D contra la unión entre IL-18 humano y el receptor de IL-18 nativo se muestra en las Figuras 3(a) y 3(b). La molécula de IgG de tipo 4A6D inhibió significativamente la unión entre IL-18 humano y el receptor de IL-18, en comparación con un anticuerpo de control negativo (anticuerpo anti-HBs humano).

(Ejemplo 6) Prueba de neutralización en anticuerpo anti-IL-18

(6-1) Prueba de neutralización usando IL-18 recombinante

Para probar la actividad neutralizante de cada anticuerpo anti-IL-18 humano, se realizó una prueba de neutralización confirmada en la técnica como una prueba para monitorizar la actividad de IL-18.

En pocas palabras, la prueba de neutralización emplea células KG-1 (ATCC # CCL-246) cultivadas mediante una técnica estándar (por ejemplo, un medio en el que un medio RPMI1640 se suplementó con suero bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, 50 U/mL de penicilina y 50 μ g/mL de estreptomycin). Para realizar la prueba de neutralización, las células KG-1 se inocularon a razón de 3 x 10⁵ células/mL y se cultivaron (37 °C, 5% de CO₂) durante 4 días. Después de 4 días, las células KG-1 se prepararon a razón de 3 x 10⁶ células/mL, y se añadieron IL-18 recombinante y el anticuerpo anti-IL-18 obtenido a las concentraciones finales de 4 ng/mL, seguido de cultivo durante 24 horas (37 °C, 5% de CO₂). Después de 24 horas, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se detectó la cantidad de IFN- γ producida con un kit de ELISA cuantitativo de IFN- γ disponible en el mercado (Invitrogen Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como resultado, como se muestra en la Figura 4, la molécula de IgG de tipo 4A6D y 4A6S inhibió la producción de IFN- γ a partir de las células KG-1. Los resultados del cálculo adicional de IC₅₀ de 4A6D y 4A6S se muestran en la Tabla 3. Los valores de IC₅₀ de 4A6D y 4A6S fueron 0,007 nM y 0,013 nM, respectivamente. Esto demostró que 4A6D y 4A6S son muy superiores en la capacidad neutralizante de los inhibidores de IL-18 previamente informados.

[Tabla 3]

Nombre del clon	Capacidad neutralizante (IC ₅₀ , nM)
4A6D	0,007
4A6S	0,013

Nombre del clon	Capacidad neutralizante (IC ₅₀ , nM)
ABT-325 *1	0,2
2C10*2	0,1
IL-18BP *3	0,4
H18.108 *4	5

*1: descrito en el documento de patente 2. *2: descrito en el documento de patente 3 o 4. *3: en el documento no de patente 31. *4: descrito en el documento de patente 5 y en el documento no de patente 32.

(6-2) Prueba de neutralización utilizando IL-18 natural derivado de células humanas

5 Se usaron células KG-1 (ATCC # CCL-246) y células THP-1 (ATCC # TIB-202) cultivadas mediante una técnica estándar (por ejemplo, un medio en el que se suplementó un medio RPMI1640 con suero bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina). Para realizar la prueba de neutralización, las células KG-1 se inocularon a razón de 3×10^5 células/mL y se cultivaron (37°C, 5% de CO₂) durante 4 días. Además, las células THP-1 se inocularon a razón de 3×10^5 células/mL y se cultivaron (37°C, 5% de CO₂) durante 2 días. Después del cultivo, las células KG-1 y las células THP-1 se prepararon a razón de 6×10^6 células/mL y 1×10^6 células/mL, respectivamente, y se mezclaron en cantidades iguales. Se agregaron LPS (lipopolisacárido, Sigma-Aldrich Corp.) y el anticuerpo anti-IL-18 obtenido a las concentraciones finales de 1 µg/mL, seguido de cultivo durante 24 horas (37 °C, 5% de CO₂). Después de 24 horas, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se detectó la cantidad de IFN-γ producida con un kit de ELISA cuantitativo de IFN-γ disponible en el mercado (Invitrogen Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Los resultados se muestran en la Tabla 4. El IFN-γ no se produjo incluso agregando LPS a las células THP-1 y las células KG-1 solamente, mientras que el IFN-γ se produjo solo cuando todos, THP-1, KG -1 y LPS, estaban presentes. Además, la producción de IFN-γ se inhibió al agregar 4A6D y 4A6S. Estos resultados demostraron que IL-18 natural se produce usando dos tipos de células humanas y, como resultado, se construye el sistema de ensayo para producir IFN-γ. Además, estos resultados demostraron que las moléculas de IgG de tipo 4A6D y 4A6S inhiben a IL-18 natural derivado de células humanas.

[Tabla 4]

THP-1	KG-1	LPS	Anticuerpo	Cantidad producida de IFN-γ (pg/mL)
+	-	-	-	9
-	+	-	-	9
+	+	-	-	28
+	+	+	-	144
+	-	+	-	22
-	+	+	-	15
+	+	+	4A6D	33
+	+	+	4A6S	36
+	+	+	Control negativo	134

(6-3) Prueba de neutralización utilizando escisión con quimasa tipo IL-18

Se preparó la escisión con quimasa de tipo IL-18 de acuerdo con el informe anterior (documento no de patente 9).

En pocas palabras, se expresó un precursor proIL-18 con *Escherichia coli* como huésped y se purificó. Se añadió quimasa (Funakoshi Corp.) a razón de 10 U al proIL-18 preparado (100 µg/mL) y se incubó a 37 °C durante 80 minutos. Esto se usó como escisión con quimasa tipo IL-18.

- 5 Por otra parte, las células KG-1 se inocularon a razón de 3×10^5 células/mL y se cultivaron (37°C, 5% de CO₂) durante 4 días. Después de 4 días, las células KG-1 se prepararon a razón de 3×10^6 células/mL. La escisión con quimasa de tipo IL-18 se añadió a un volumen de 1/20 del sistema de reacción, y el anticuerpo anti-IL-18 obtenido se añadió adicionalmente al mismo, seguido de cultivo durante 24 horas (37 °C, 5% de CO₂) . Después de 24 horas, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se detectó la cantidad de IFN-γ producido con un kit de ELISA cuantitativo de IFN-γ
- 10 disponible en el mercado (Invitrogen Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la Tabla 5. La producción de IFN-γ se inhibió mediante la adición de la molécula de IgG de tipo 4A6D y 4A6S. Este resultado demostró que 4A6D y 4A6S inhiben la escisión con quimasa del tipo de la forma activa de IL-18.

[Tabla 5]

proIL-18	quimasa	Anticuerpo	Cantidad producida de IFN-γ (pg/mL)
+	+	-	91
+	-	-	18
-	+	-	22
+	+	4A6D	22
+	+	4A6S	26
+	+	Control negativo	109

15

(Ejemplo 7) Análisis de epítomos (ELISA competitivo)

El análisis del epítomo en el anticuerpo anti-IL-18 obtenido se realizó mediante ELISA competitivo.

- 20 El IL-18 humano biotinilado se diluyó hasta 1 µg/mL con PBS (Sigma-Aldrich Corp.), añadido a razón de 100 µL/pozo a placas de estreptavidina (Nunc), y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas para inmovilizar el IL-18 humano. Después de la inmovilización, las placas se lavaron con PBST, y se añadió α9 scFv-mFc anti-ratón (control negativo) o 4A6D scFv-mFc a razón de 100 µL/pozo a las placas y se incubaron a 37 °C. Después de 1 hora, se preparó IL-18BPa-hFc humano (R&D Systems, Inc.) a razón de 30 ng/mL con BSA-PBS al 1%, a razón de 100 µL/pozo a las placas, y se incubó a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST, y se añadió un anticuerpo de detección anti-hFc/HRP (Cosmo Bio Co., Ltd., The binding site) a razón de 100 µL/pozo a las placas y se incubó a 37
- 25 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST y se añadió TMB (Sigma-Aldrich Corp.) a razón de 100 µL/pozo a las placas para desarrollar color. Después de 30 minutos, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 2 N, y se midieron los valores de color (DO 450 nm/650 nm) usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Inc.).

- 30 Los resultados del análisis del epítomo en el anticuerpo anti-humano IL-18 se muestran en la Figura 5. Se encontró que 4A6D compite con IL-18BPa-hFc humano. Esto significa que 4A6D y la IL-18BPa humana reconocen el mismo epítomo y 4A6D tiene una forma de inhibición similar a aquella *in vivo*.

(Ejemplo 8) Ensayo de unión al receptor de IL-18 en presencia de anticuerpo anti-IL-18 humano e IL-18BP

Con base en el "ensayo de unión al receptor de IL-18 anterior usando células KG-1", se añadió IL-18BPa-Fc humano (R&D Systems, Inc.) al mismo tiempo con el anticuerpo anti-IL-18 obtenido para probar si sus efectos eran sinérgicos.

- 35 Los resultados se muestran en la Figura 6. La molécula de IgG de tipo 4A6D e IL-18BPa humano cada una por sí sola inhibió la unión de IL-18 a las células KG-1 en decenas de %, mientras que la coexistencia de las mismas exhibió un efecto inhibitor mayor que el de la adición de cada una por sí sola.

(Ejemplo 9) Prueba de reactividad cruzada

5 La IL-18 humana biotinilada (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.), la IL-18 de mono biotinilada (Thermo Fisher Scientific KK), la IL-18 de rata biotinilada (Acris Antibodies GmbH), la IL-18 de ratón biotinilada (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.), la IL-1 β humana biotinilada (Funakoshi Corp.) y la IL-33 humana biotinilada (MBL Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.) descritas anteriormente en "Biotinylation of Cytokine", se diluyeron cada una hasta 1 μ g/mL con PBS (Sigma-Aldrich Corp.), se añadieron a razón de 100 μ L/pozo a placas de estreptavidina (Nunc), y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas para inmovilizar estas diversas citoquinas. Después de la inmovilización, las placas se lavaron con PBST, y cada anticuerpo obtenido se añadió a razón de 100 μ L/pozo a las placas y se incubaron a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST, y se añadió un anticuerpo de detección anti-IgG/HRP de ratón (Invitrogen Corp.) o anti-hFc/HRP (Cosmo Bio Co., Ltd., The binding site) a razón de 100 μ L/pozo a las placas y se incubaron a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST y se añadió TMB (Sigma-Aldrich Corp.) a razón de 100 μ L/pozo a las placas para desarrollar color. Después de 30 minutos, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 2 N, y los valores de color (DO 450 nm/650 nm) se midieron usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Inc.).

15 Los resultados se muestran en la Tabla 6. Los anticuerpos anti-IL-18 humanos obtenidos 4A6D y 4A6S exhibieron actividad de unión contra IL-18 humano y de mono, pero no mostraron actividad de unión contra IL-18 de rata y ratón. Por otro lado, los anticuerpos anti-IL-18 obtenidos carecían de actividad de unión contra IL-1 β e IL-33, que eran otros miembros de la familia IL-1.

[Tabla 6]

Nombre del clon del anticuerpo-IL-18	Diversas citoquinas					
	IL-18 humana	IL-18 de mono	IL-18 de rata	IL-18 de ratón	IL-1 β humana	IL-33 humana
4A6D	+	+	-	-	-	-
4A6S	+	+	-	-	-	-

20 (Ejemplo 10) Análisis de epítomos (análisis de reactividad usando la variante de sustitución Ala)

IL-18 humano de tipo silvestre o una variante K53A de IL-18 humano se expresaron como una proteína de fusión GST que contiene un sitio de escisión del factor Xa como un enlazador, con *Escherichia coli* como huésped y se unieron a una columna de glutatión celulosa 4B (GE Healthcare Japan Corp.). Luego, el IL-18 humano de tipo silvestre o la variante K53A de IL-18 humano se eluyó agregando el factor Xa. El factor Xa contenido en el eluato se eliminó usando agarosa Xarrest (Novagen). Este eluato se usó como IL-18 humano de tipo silvestre o la variante K53A de la IL-18 humano.

30 A continuación, estas proteínas IL-18 humanos se biotinilaron, luego cada una se diluyó hasta 1 μ g/mL con PBS (Sigma-Aldrich Corp.), se añadieron a 100 μ L/pozo a placas de estreptavidina (Nunc), y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas para inmovilizarlas. Después de la inmovilización, las placas se lavaron con PBST, y se preparó IL-18BPa-hFc humano (R&D Systems, Inc.) o la molécula de IgG tipo 4A6D a razón de 1 μ g/mL con BSA-PBS al 1%, añadida a razón de 100 μ L/pozo a las placas, y se incubaron a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST, y se añadió un anticuerpo de detección anti-hFc/HRP (Cosmo Bio Co., Ltd., The binding site) a razón de 100 μ L/pozo a las placas y se incubó a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST y se añadió TMB (Sigma-Aldrich Corp.) a razón de 100 μ L/pozo a las placas para desarrollar color. Después de 30 minutos, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 1 M, y se midieron los valores de color (DO 450 nm)/650 nm) usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Inc.).

40 Los resultados de ELISA se muestran en la Figura 7. Al igual que con IL-18BPa-hFc humano, 4A6D ha reducido la reactividad con la variante K53A de IL-18 humano en comparación con IL-18 humano de tipo silvestre. Esto significa que la lisina, que es un residuo de aminoácido en la posición 53 de IL-18 humano, es importante como epítomo para 4A6D, e indica que IL-18BPa humano también reconoce esta región. Específicamente, se demostró que 4A6D reconoce, como un epítomo, la misma región que el sitio de reconocimiento de IL-18BPa humano.

(Ejemplo 11) Análisis de reactividad con complejo de IL-18 e IL-18BP

Se evaluó la reactividad del anticuerpo anti-IL-18 obtenido por ELISA con un complejo de IL-18 e IL-18BP.

45 IL-18 humano biotinilado se diluyó hasta 1 μ g/mL con PBS (Sigma-Aldrich Corp.), se añadió a razón de 100 μ L/pozo a placas de estreptavidina (Nunc), y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para inmovilizar IL-18 humano. Las placas se lavaron con PBST, y se añadió IL-18BPa-hFc humano (R&D Systems, Inc.) diluido hasta 10 μ g/mL con

5 BSA-PBS al 1% a razón de 100 µL/pozo a las placas y se incubó a 37 °C durante 1 hora para formar un complejo de IL-18 e IL-18BP. Las placas se lavaron con PBST, y se añadió 4A6D scFv-mFc a 100 µL/pozo a las placas y se incubó a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST, y se añadió un anticuerpo de detección anti-IgG/HRP de ratón (Invitrogen Corp.) a razón de 100 µL/pozo a las placas y se incubó a 37 °C. Después de 1 hora, las placas se lavaron con PBST y se añadió TMB (Sigma-Aldrich Corp.) a razón de 100 µL/pozo a las placas para desarrollar color. Después de 30 minutos, la reacción se terminó con ácido sulfúrico 1 M, y se midieron los valores de color (DO 450 nm)/650 nm) usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Inc.).

Los resultados del análisis sobre la reactividad con el complejo de IL-18 e IL-18BP se muestran en la Figura 8. 4A6D se unió a IL-18, pero no reaccionó con el complejo de IL-18 e IL-18BP.

10 Aplicabilidad industrial

El anticuerpo de la presente invención contra IL-18 humano y el fragmento del mismo son aplicables a una enfermedad en la que IL-18 humano está implicado directa o indirectamente.

Listado de secuencias

<110> THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

15 <120> Nuevo anticuerpo humano contra IL-18

<130> 13-0505-00

<150> JP 2012-254893

<151> 2012-11-21

<160> 12

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 747

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(747)

30 <400> 1

ES 2 742 413 T3

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc atg aga ctc tcc tgt acc gcc tct gga ttc acc ttt gac gaa tat 96
 Ser Met Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Glu 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 ggt att agt act ggt ggt ggt ggc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Gly Ile Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

gag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat 240
 Glu 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 acg gcc gta tac tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ggg aaa ccc tgg ctc tct ggt tcg agg agt ggg gac ttc tgg ggc cag 336
 Ala Lys Pro Trp Leu Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asp Phe Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc acc ggc gga ggc ggt agt 384
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

gga ggc ggt gga tct gga ggc ggt ggc tcg caa tct gcc ctg act cag 432
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln
 130 135 140

cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct ggg cag tcg atc acc atc tcc tgc 480
 Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys
 145 150 155 160

act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac 528
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr
 165 170 175

caa cag cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc ttg att tat gag gtc agt 576
 Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser
 180 185 190

cat cgg ccc tca ggg gtt tct gac cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc 624
 His Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 195 200 205

aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct 672
 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 210 215 220

gat tat tat tgt agc tca ttt act agc agt agc tct ctc tat gtc ttc 720
 Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Ser Ser Ser Leu Tyr Val Phe
 225 230 235 240

gga act ggg acc aag ctg acc gtc cta 747
 Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 245

<210> 2

<211> 747

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 742 413 T3

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(747)

<400> 2

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15	48
tcc atg aga ctc tcc tgt acc gcc tct gga ttc acc ttt agc gaa tat Ser Met Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr 20 25 30	96
gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45	144
tca ggt att agt act ggt ggt ggt ggc aca tac tac gca gac tcc gtg Ser Gly Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60	192
gag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240

ES 2 742 413 T3

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta tac tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aaa ccc tgg ctc tct ggt tcg agg agt ggg gac ttc tgg ggc cag 336
 Ala Lys Pro Trp Leu Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asp Phe Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc acc ggc gga ggc ggt agt 384
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

gga ggc ggt gga tct gga ggc ggt ggc tcg caa tct gcc ctg act cag 432
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln
 130 135 140

cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct ggg cag tcg atc acc atc tcc tgc 480
 Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys
 145 150 155 160

act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac 528
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr
 165 170 175

caa cag cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc ttg att tat gag gtc agt 576
 Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser
 180 185 190

cat cgg ccc tca ggg gtt tct gac cgg ttc tct ggc tcc aag tct ggc 624
 His Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 195 200 205

aac acg gcc tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct 672
 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 210 215 220

gat tat tat tgt agc tca ttt act agc agt agc tct ctc tat gtc ttc 720
 Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Ser Ser Leu Tyr Val Phe
 225 230 235 240

gga act ggg acc aag ctg acc gtc cta 747
 Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 245

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 3

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

Ser Met Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Glu Tyr
 20 25 30

ES 2 742 413 T3

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

Ser Gly Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu 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 Lys Pro Trp Leu Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asp Phe Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 4

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr Glu Val Ser His Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Ser
 85 90 95

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

10 <210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 742 413 T3

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 5

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

Ser Met Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu 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 Lys Pro Trp Leu Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia Artificial

<400> 6

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

ES 2 742 413 T3

Leu Ile Tyr Glu Val Ser His Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Ser
 85 90 95

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

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 7

Glu Tyr Ala Met Ser
 1 5

10 <210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia Artificial

<400> 8

Gly Ile Ser Thr Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 9

25 Pro Trp Leu Ser Gly Ser Arg Ser Gly Asp Phe
 1 5 10

<210> 10

<211> 14

ES 2 742 413 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

5 <400> 10

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 11

Glu Val Ser His Arg Pro Ser
1 5

15 <210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Secuencia Artificial

<400> 12

Ser Ser Phe Thr Ser Ser Ser Ser Leu Tyr Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano o un fragmento del mismo, en el que el fragmento es scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, scAb o scFvFc, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo reacciona con un IL-18 humano y no reacciona con un complejo de IL-18 humano y proteína de unión a IL-18 humano (IL-18BP humano) y en el que:
- 5 una región variable de cadena H consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena L consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o
una región variable de cadena H consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena L consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6
- 10 2. Un fragmento de la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-IL-18 humano de humano, el fragmento de región de cadena H que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o 5.
3. El anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que un modificador se une al anticuerpo o al fragmento
4. Un gen que codifica el anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que opcionalmente el gen codifica una secuencia de aminoácidos de cualquiera de a) las SEQ ID NOs: 3 o 5, b) las SEQ ID NOs: 3 y 4, c) las SEQ ID NOs: 5 y 6 como una región marco de lectura abierto
- 15 5. Un vector de expresión recombinante que comprende el gen de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula huésped en la que se introduce el gen de acuerdo con la reivindicación 4.
7. Un método para producir el anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende permitir que una célula huésped exprese el gen de acuerdo con la reivindicación 4.
- 20 8. Un agente terapéutico que comprende el anticuerpo o el fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como un medicamento.
9. El agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en neumonía intersticial, enfermedad de Still de inicio en adultos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad ósea metabólica, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, dermatitis atópica, inflamación de las vías respiratorias, hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR), asma y daños orgánicos graves en el hígado, el riñón y el intestino.
- 25

Fig.1

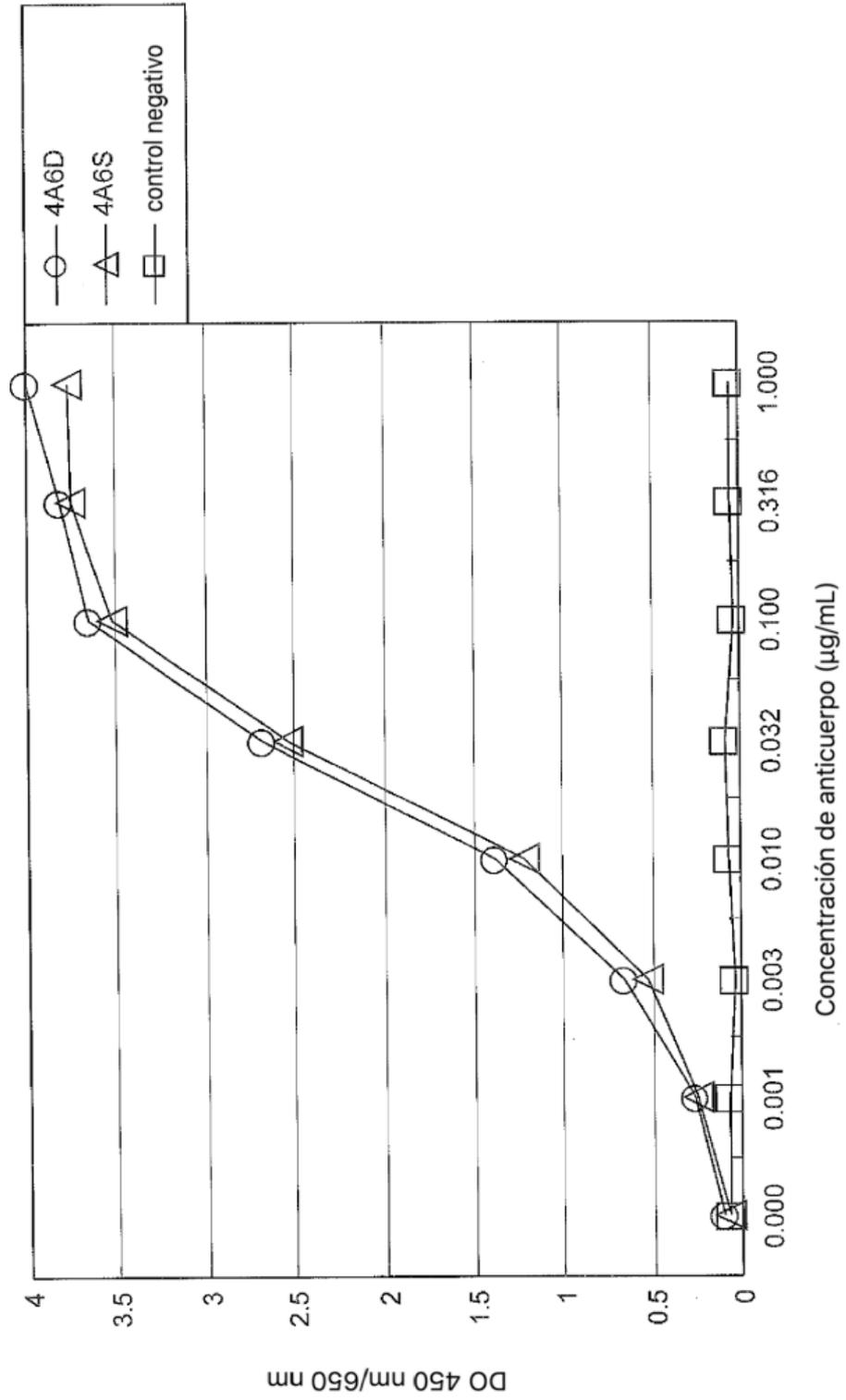


Fig.2

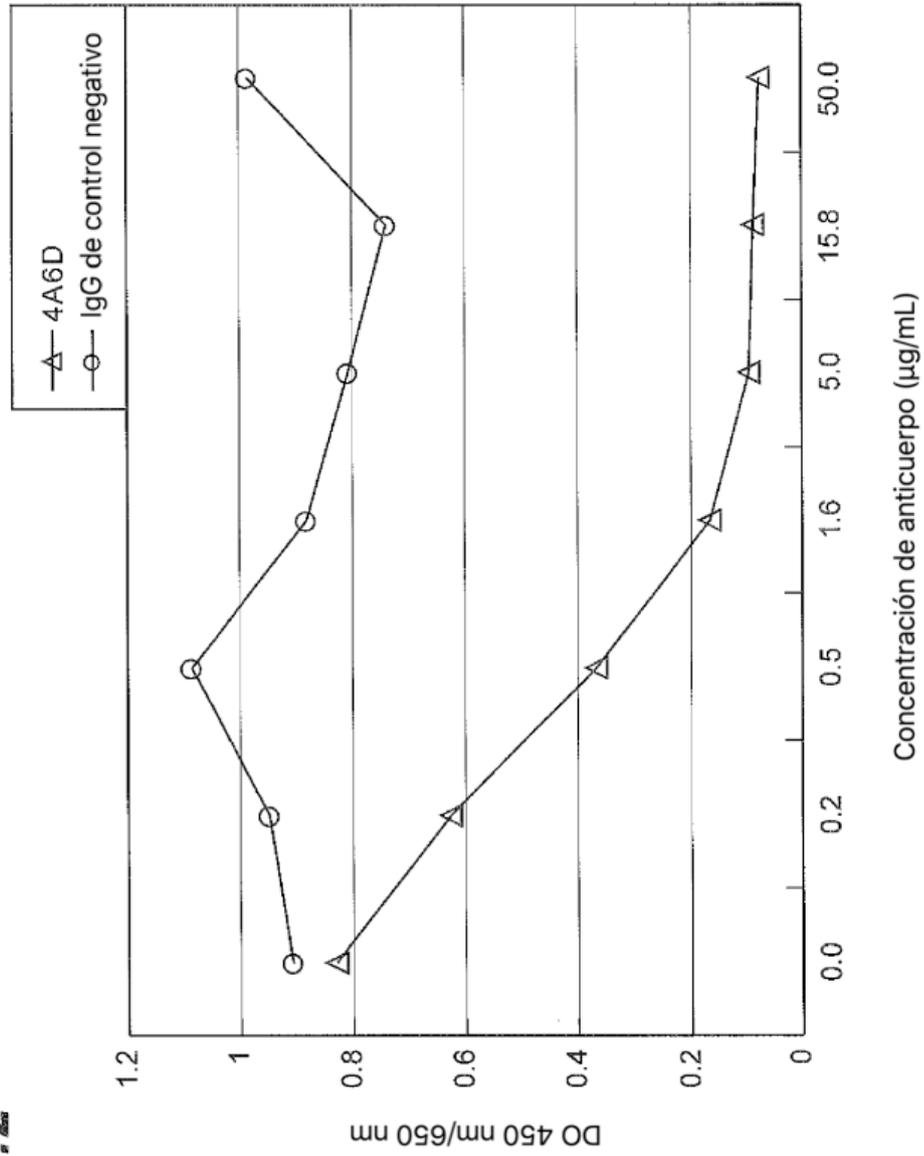


Fig.3

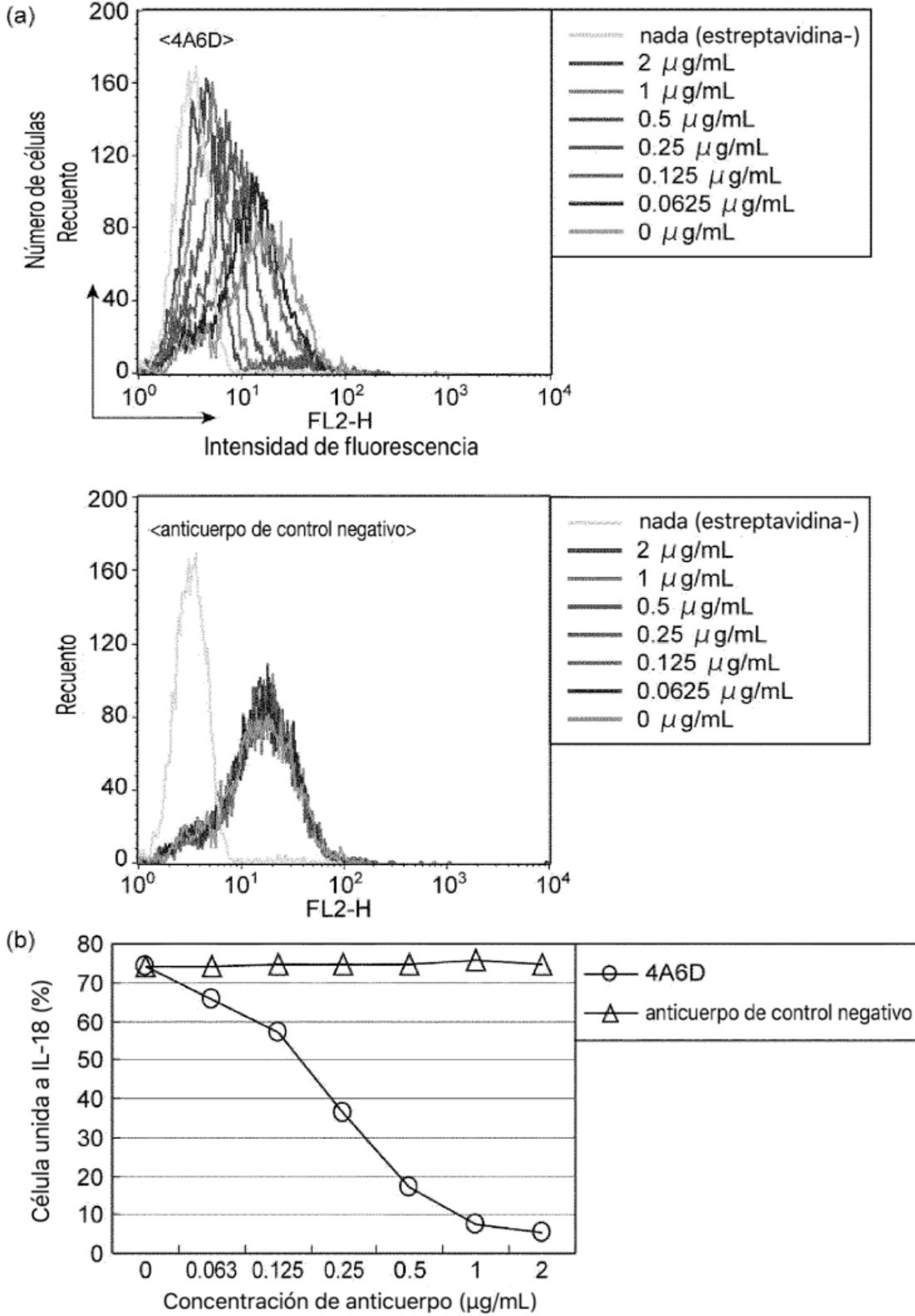


Fig.4

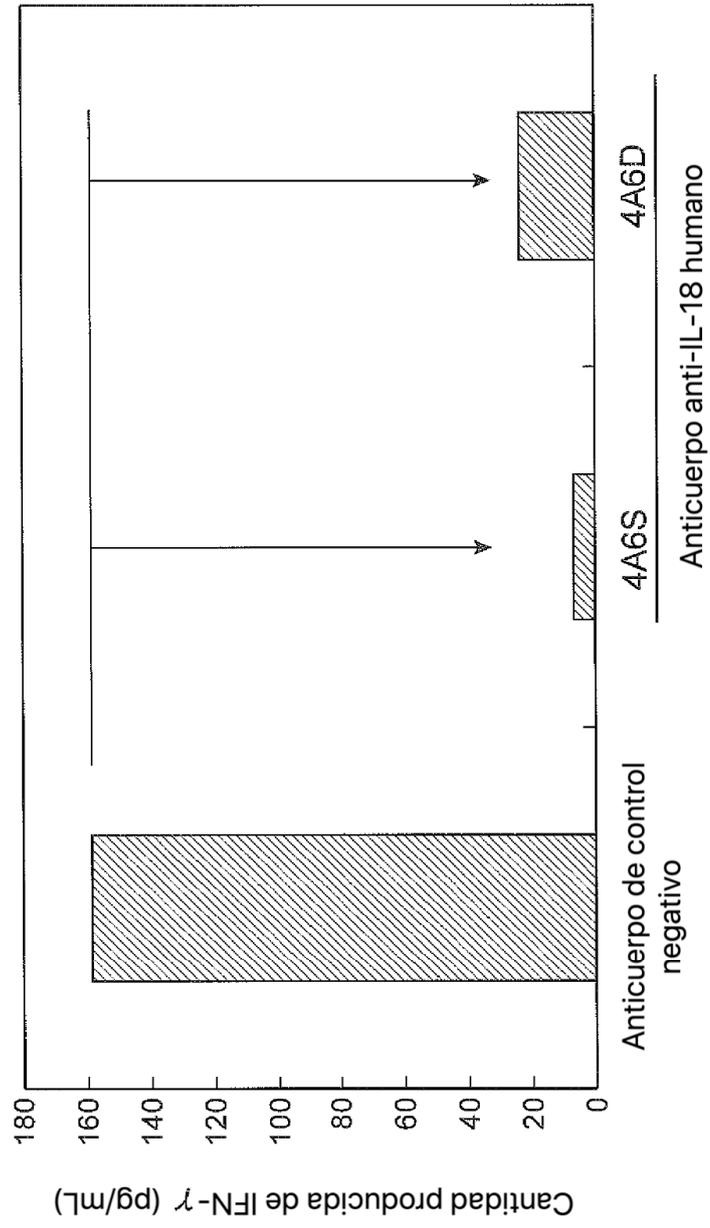


Fig.5

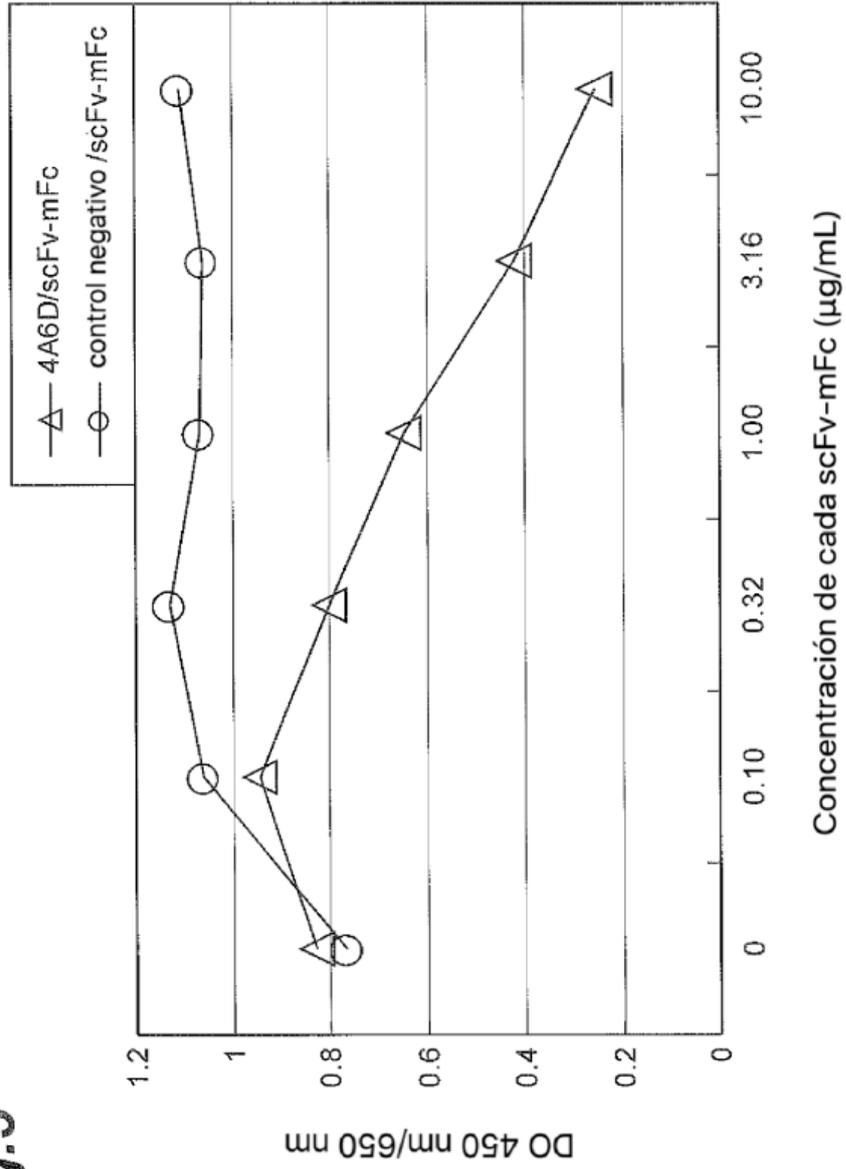


Fig.6

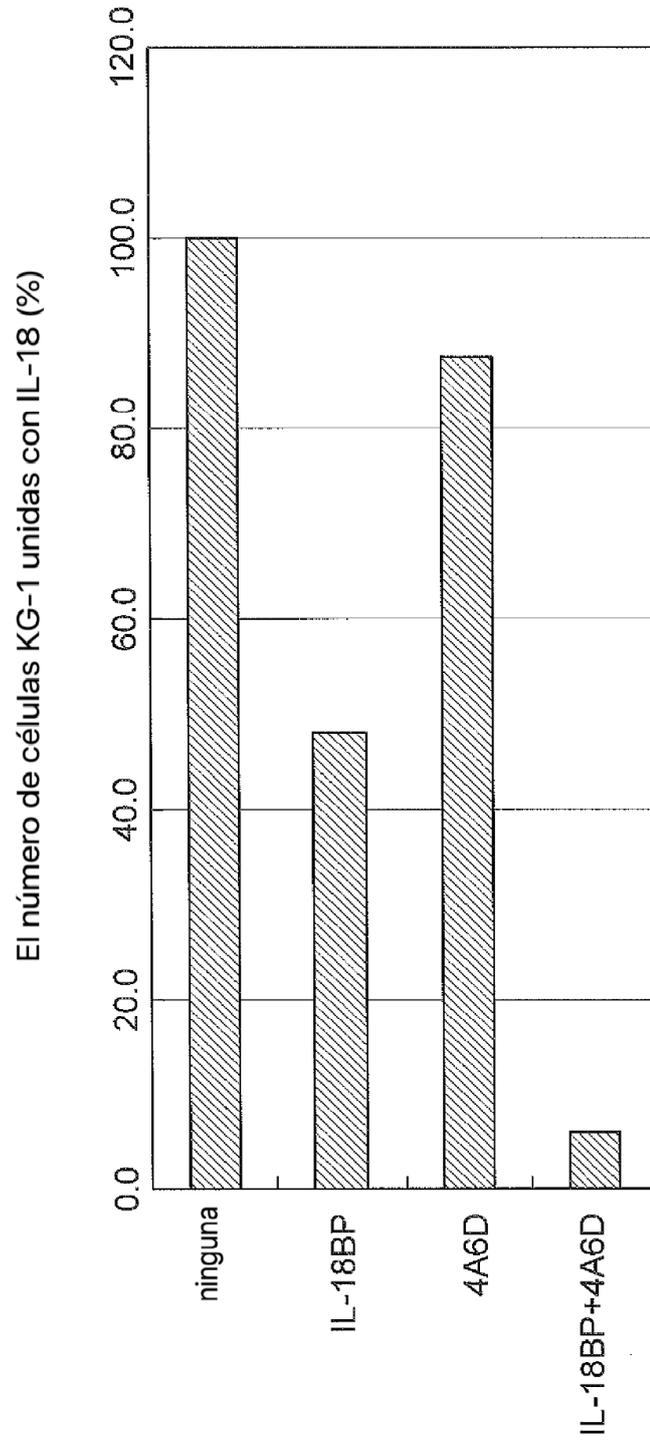


Fig.7

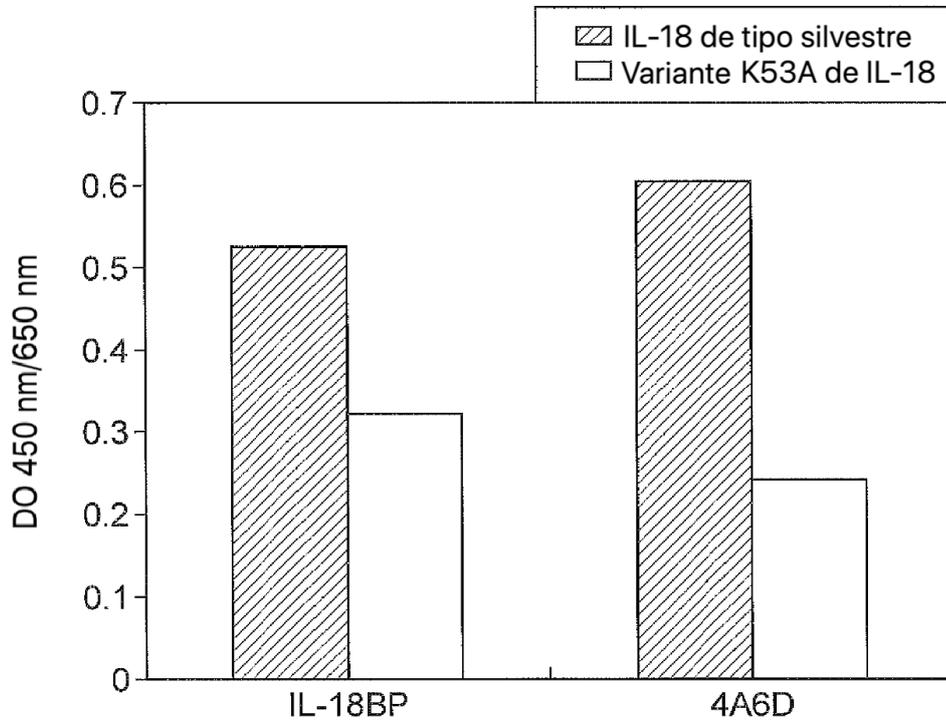


Fig.8

