

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480011618.2

[51] Int. Cl.

*G12N 15/09 (2006.01)*

*G12P 21/08 (2006.01)*

*G12Q 1/68 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61P 43/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2006年5月31日

[11] 公开号 CN 1780911A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 37/02 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[22] 申请日 2004.4.30

[21] 申请号 200480011618.2

[30] 优先权

[32] 2003.4.30 [33] JP [31] 125948/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/006403 2004.4.30

[87] 国际公布 WO2004/097019 日 2004.11.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.31

[71] 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

共同申请人 财团法人化学及血清疗法研究所

[72] 发明人 杉村和久 中西宪司 中岛敏博

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 卢素华 郑霞

权利要求书 4 页 说明书 38 页 序列表 10 页  
附图 13 页

[54] 发明名称

人抗人白介素 - 18 抗体及其片断和它们的利用方法

[57] 摘要

本发明的源自人的人抗人 IL - 18 抗体是对于人的 IL - 18 的抗体, 其含有由以下 (a) 或 (b) 的多肽组成的 H 链的互补性决定区, 和由 (c) 或 (d) 的多肽组成的、对人白介素 - 18 的 L 链的互补性决定区。  
(a) 由序列号 4 ~ 6 所示的氨基酸序列组成的多肽。  
(b) 在 (a) 中所述的多肽的异构体、成为 H 链的互补性决定区的多肽。  
(c) 由序列号 10 ~ 12 所示的氨基酸序列组成的多肽。  
(d) 在 (c) 中所述的多肽的异构体、成为 L 链的互补性决定区的多肽。由此, 提供人抗人 IL - 18 抗体及其利用方法成为可能。

1. 一种人抗人白介素-18抗体, 是对于人白介素-18的人抗人白介素-18抗体。
2. 根据权利要求1所述的人抗人白介素-18抗体, 含有由以下(a)或(b)的多肽组成的H链的互补性决定区, 和由(c)或(d)的多肽组成的L链的互补性决定区;
  - (a) 由序列号4~6所示的氨基酸序列组成的多肽;
  - (b) 在序列号4~6所示的氨基酸序列中, 由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成, 且成为对于人白介素-18的H链互补性决定区的多肽;
  - (c) 由序列号10~12所示的氨基酸序列组成的多肽;
  - (d) 在序列号10~12所示的氨基酸序列中, 由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成, 且成为对于人白介素-18的L链互补性决定区的多肽。
3. 根据权利要求1或2所述的人抗人白介素-18抗体, 含有由以下(e)或(f)的多肽组成的H链可变区, 和由(g)或(h)的多肽组成的L链可变区;
  - (e) 由序列号3所示的氨基酸序列组成的多肽;
  - (f) 在序列号3所示的氨基酸序列中, 有一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成, 且成为对于人白介素-18的H链可变区的多肽;
  - (g) 由序列号9所示的氨基酸序列组成的多肽;
  - (h) 在序列号9所示的氨基酸序列中, 有一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成, 且成为对于人白介素-18

的L链可变区的多肽。

4. 一种对于人白介素-18的源自人的抗体的H链可变区片断,由以下(e)或(f)的多肽组成;

(e)由序列号3所示的氨基酸序列组成的多肽;

5 (f)在序列号3所示的氨基酸序列中,由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成,且成为对于人白介素-18的H链可变区的多肽。

5. 一种对于人白介素-18的源自人的抗体的L链可变区片断,由以下(g)或(h)的多肽组成;

10 (g)由序列号9所示的氨基酸序列组成的多肽;

(h)在序列号9所示的氨基酸序列中,由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成,且成为对于人白介素-18的L链可变区的多肽。

6. 一种对于人白介素-18的源自人的抗体的单链可变区片断,将含有权利要求2所述的H链的互补性决定区的H链可变区片断、或权利要求4所述的H链可变区片断,和含有权利要求2所述的L链的互补性决定区的L链可变区片断、或权利要求5所述的L链可变区片断进行连结而成。

7. 一种对于人白介素-18的源自人的抗体或其片断,在含有权利要求2所述的H链的互补性决定区的H链可变区片断、或权利要求4所述的H链可变区片断,和/或在含有权利要求2所述的L链的互补性决定区的L链可变区片断、或权利要求5所述的L链可变区片断上,连结源自人的恒定区而成。

8. 根据权利要求7所述的抗体的片断,所述抗体的片断为Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scAb或scFvFc。

25 9. 一种修饰抗体,在权利要求1~8中任意一项所述的抗体或其片断上,结合了修饰剂而成。

10. 一种基因，是将权利要求 1~8 中任意一项所述的抗体或其片断进行编码的基因。
11. 根据权利要求 10 所述的基因，具有作为开放阅读框区的序列号 1 或 7 所示的碱基序列。
- 5 12. 一种重组表达载体，是含有权利要求 10 或 11 中所述的基因的重组表达载体。
13. 一种转化体，是导入了权利要求 10 或 11 中所述的基因的转化体。
14. 一种生产源自人的人抗人白介素-18 抗体或其片断的方法，通过使权利要求 10 或 11 中所述的基因在宿主中表达来生产。
- 10 15. 一种检测人白介素-18 的器具，使用权利要求 1~8 中任意一项所述的抗体或其片断，或权利要求 9 中所述的修饰抗体。
16. 一种免疫疾病的诊断试剂盒，使用含有权利要求 1~8 中任一项所述的抗体或其片断、或权利要求 9 中所述的修饰抗体的检测人白介素-18 的试剂，来测定被检测样品中人白介素-18 的量。
- 15 17. 一种诊断免疫疾病的方法，以使用权利要求 16 中所述的检测试剂来测定的被检测样品中人白介素-18 的量为基础进行诊断。
18. 一种人白介素-18 活性阻碍剂，以人白介素-18 拮抗剂作为有效成分。
19. 根据权利要求 18 所述的人白介素-18 活性阻碍剂，其中，所述人白介素-18 拮抗剂，为以下任意一项物质；
- 20 i) 权利要求 1~3 中任意一项所述的人抗人白介素-18 抗体；  
ii) 权利要求 4~8 中任意一项所述的抗体的片断；  
iii) 权利要求 9 所述的修饰抗体；  
iv) 以上述 i) ~ iii) 中任意一项所述的抗体、抗体的片断、或修饰抗体识别的人白介素-18 上的抗原决定区为基础进行分子设计的低分子化合物。
- 25 20. 一种基因治疗药物，含有权利要求 10 或 11 中所述的基因。
21. 一种免疫疾病治疗药物，含有权利要求 18 或 19 中所述的人白介素-18 活性阻碍剂、或权利要求 20 中所述的基因治疗药物。
22. 一种免疫疾病的治疗方法，通过用权利要求 21 中所述的免疫疾病治

疗药物来治疗。

23. 根据权利要求 21 中所述的免疫疾病治疗药物，其特征在于：阻碍通过抗原和人白介素 - 18 刺激而从辅助 T1 细胞产生的细胞因子。

24. 根据权利要求 21 或 23 所述的免疫疾病治疗药物，其特征在于：适

5 用于与人 IL - 18 相关的变态反应、炎症和慢性免疫异常疾病。

## 人抗人白介素 - 18 抗体及其片断和它们的利用方法

### 技术领域

5 本发明涉及人抗人白介素 - 18 抗体及其片断和它们的利用方法。详细地说, 是涉及与人白介素 - 18 (以下称为人 IL-18) 结合并阻碍其生理活性的人抗人 IL-18 抗体及其抗体片断和它们的利用方法。这种抗体及抗体片断作为由 IL-18 引起的炎症和免疫异常性疾病的治疗药而受到期待。

### 10 背景技术

特异性皮炎 (atopic dermatitis (AD)) 主要是对外部刺激产生的炎症性皮肤病变, 是伴有慢性反复性的强烈瘙痒的疾病。AD 的发病机理有很多不清楚的地方, AD 的发病有遗传的背景, AD 患者的血清中存在高水平的 IgE。另外, AD 的发病机制中, 与活性化 T 细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞有很深的关系。特别是通过与变态反应原引起的肥大细胞或嗜碱性粒细胞上的 Fcε 受体 (FcεR) 结合的 IgE 分子的桥连, 这些细胞被活性化。其结果引起来自于 2 型辅助 T 细胞 (Th2) 的细胞因子和化学传递的产生, 从而 AD 发病。作为 Th2 细胞因子, 重要的有 IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 等; 作为化学传递, 重要的有组胺、5-羟色胺、白三烯等辅助 T 细胞 (Th) 受到抗原刺激后产生细胞因子, 由其产生的模式可分类为两个亚群 (Th1 和 Th2 细胞)。1 型辅助 T 细胞 (Th1) 受到刺激后产生 IFN-γ、IL-2、TNF-β 等 Th1 细胞因子; 2 型辅助 T 细胞 (Th2) 受到刺激后产生 IL-4、IL-5、IL10、IL-13 等 Th2 细胞因子。前者 (Th1 细胞) 主要诱导细胞性免疫, 后者 (Th2 细胞) 诱导体液性免疫, 有时诱导变态反应的应答。幼稚 T 细胞在 IL-12 的存在下受到抗原刺激后分化成 Th1 细胞, 在 IL-4 的存在下受到抗原刺激后分化成 Th2 细胞。

IL-18 在发现之初, 作为从 T 细胞或 NK 细胞 (自然杀伤细胞) 诱导产生 IFN- $\gamma$  的因子而受到瞩目 (Okamura, H. et al. Nature 378, 88(1995)). 然而, IL-18 发挥这样的功能是在与 IL-12 共存的情况下发生的 (Nakanishi, K. et al., Annu. Rev. Immunol., 19, 423(2001)). 另外, 作为 Th1 细胞因子的 IFN- $\gamma$  阻止了作为 Th2 细胞因子的 IL-4 的作用, 因而认为诱导 IFN- $\gamma$  的 IL-18 可抑制 Th2 细胞引起的免疫反应, 显示出抗变态反应的作用。

小鼠感染了寄生虫后, 引起 Th2 细胞诱导的 IgE 的产生。发明人在感染后立即给药 IL-12 和 IL-18 后, 可以抑制从 T 细胞、NK 细胞、B 细胞等的 IFN- $\gamma$  的产生所诱导的 IgE 的产生 (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 3948(1997)).

进而, 只给药 IL-18 时, IgE 的产生得到增强 (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 13962(1999)). 另外, 通过随后的解析可知, 将 IL-18 给药于正常的小鼠后, 可以诱导 IgE 的产生 (Yoshimoto, T. et al., Nat. Immunol., 1, 132(2000)).

给药于机体的 IL-18, 作用于 CD4 阳性 T 细胞 (CD4<sup>+</sup>T 细胞), 从而诱导 CD40 配位体 (CD40L) 的表达, 以及 IL-4、IL-5、IL-13 等的产生 (Yoshimoto, T. et al., J. Exp. Med., 197, 997(2003)). 另外, 机体内的 B 细胞受到 CD40L 和 IL4 的刺激从而产生 IgE, 其中 CD40L 是受到 IL-18 刺激的 CD4 阳性 T 细胞表达的。

IL-18 在体外试验中, 作用于由 IL-3 诱导产生的嗜碱性粒细胞和肥大细胞, 从而诱导 IL-4、IL-13、组胺等的产生 (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002)).

过去认为, 如前所述的那样, 通过肥大细胞上的 Fc $\epsilon$ R 上的 Fc 部位而结合的多个 IgE 分子上结合变态反应原, 通过桥连这些 IgE 分子, 可以使肥大细胞活性化。现在这种定论虽然也还正确, 但发明人明确了 IL-18 在没有变态反应原及 IgE 介导的情况下, 可以直接活性化肥大细胞及嗜碱性粒细胞、并诱导 IL-4、IL-13、组胺等的产生 (Yoshimoto, T. et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA., 96, 13962(1999) )。这时也会引起变态反应性炎症。

IL-18 作为生物学上非活性的前体 (IL-18 前体) 而产生, 在半胱氨酸蛋白酶 1 的作用下开裂, 变成活性型, 并被分泌到细胞外 (Gu, Y. et al., Science, 275, 206(1997) )。由于在皮肤的角质形成细胞上, 产生并蓄积 IL-18 前体, 从而发明人制作出皮肤角质形成细胞特异性地过剩表达半胱氨酸蛋白酶 1 的小鼠 (半胱氨酸蛋白酶 1 转基因小鼠) (Yamanaka, K. et al., J. Immunol., 165, 997(2000) )。其结果是该小鼠大量产生了具有生物学活性的 IL-18。另外, 该小鼠的血中产生了大量的 IgE (Yoshimoto, T. et al., Nat. Immunol., 1, 132(2000), Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002) )。该小鼠即使在没有变态反应原的环境下喂养, 也会发生很严重的特异性皮炎 (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002) )。

因此可知 IL-4 和 IL-13 的信号, 通过 Stat6 被传递到靶细胞的核内, 由此发挥这些细胞因子的作用。发明人等明确了缺失 stat6 的小鼠不产生 IgE (Takeda, K. et al., Nature, 380, 627(1996) )。接着, 将这种缺失了 Stat6 基因的小鼠与皮肤角质形成细胞特异性过剩表达半胱氨酸蛋白酶 1 的小鼠 (半胱氨酸蛋白酶 1 转基因小鼠) 进行交配, 制作出缺失 Stat6 基因的半胱氨酸蛋白酶 1 转基因小鼠。其结果是, 该小鼠虽然完全不能产生 IgE, 但却患了很严重的特异性皮炎 (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002) )。

另一方面, 发明人通过将缺失 IL-18 基因的小鼠与半胱氨酸蛋白酶 1 转基因小鼠进行交配, 也制作出缺失 IL-18 的半胱氨酸蛋白酶 1 转基因小鼠。其结果是, 该小鼠虽然抑制了 IgE 的产生, 但血中也发现有大量的 IgE。然而, 该小鼠尽管产生了 IgE, 但却完全抑制了特异性皮炎的发病。(Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002) )。

从这些结果可知, 与抑制 IgE 的产生相比, 抑制 IL-18 的作用对特异性皮炎的治疗更有效。

正如 IL-18 在发现之初被称作 IFN- $\gamma$  诱导因子一样,它与 IL-12 协同作用于 Th1 和 NK 细胞,从而强力地诱导 IFN- $\gamma$  的产生(Okamura, H. et al. Nature 378, 88(1995)、Nakanishi, K. et al., Annu. Rev. Immunol., 19, 423(2001) )。进而, IL-18 增强了这些细胞上的 Fas 配位体 (FasL) 的表达 (Tsutsui, H. et al., J. Immunol., 159, 3961(1997) )。FasL 成为三聚物时,诱导细胞的凋亡。

发明人发现,服用了粉刺丙酸菌的小鼠的肝脏中存在的 Kupffer 细胞显示出表达 Fas,在受到 FasL 的刺激后,产生出活性型的 IL-18(Tsutsui, H. et al., Immunity, 11, 359(1999) )。进而, IL-18 作用于 NK 细胞及 Th1 细胞,从而增强 FasL 的表达。这样,也明确了 IL-18 和 FasL 之间具有正相关性(positive feedback loop)(Tsutsui, H. et al., J. Immunol., 159, 3961(1997)、Tsutsui, H. et al., Immunity, 11, 359(1999)、Tsutsui, H. et al., Immunol. Rev., 174, 192(2000) )。因此,机体中如果过量产生 IL-18,就会引起肝脏及肠道的严重的脏器损伤。这样, IL-18 也成为所谓的 Th1 病的病因。

除了这样的疾病之外,在被 Th1 细胞诱导的支气管哮喘及其它各种疾病中,也指出 IL-18 对病情的影响。

如上所述,控制 IL-18 的产生或活性,作为以这种依赖于 IL-18 的特异性皮炎为首的依赖于 IL-18 的疾病的的治疗方法,或作为诱导或加剧因 IL-18 过量产生所导致的疾病的发病的 Th1 病的的治疗方法,是极为重要的。

因此如果能开发出中和 IL-18 的生理活性的特异性单克隆抗体,可以期待成为与 IL-18 相关的多种疾病的有效治疗手段。

然而,作为对于人 IL-18 的抗体(抗人 IL-18 抗体),只是得到了几种源自小鼠和大鼠的单克隆抗体(例如日本国公开特许公报 特开 2000-236884 号(2000 年 9 月 5 日公开),W000/56771 的国际出愿(2000 年 9 月 28 日公开))。

但是,过去的抗人 IL-18 抗体主要是源自人以外的异种动物的单克隆抗体,因此在对人给药时,作为异物被识别并排斥。因此,将过去的抗人

IL-18 的抗体作为与 IL-18 相关的疾病的治疗药物而使用是很困难的。特别是在治疗慢性自身免疫性疾病时，由于需要长时间持续给药，出现对给药抗体的抗体成为问题。

5 作为解决这样问题的方法，考虑将对人 IL-18 的小鼠单克隆抗体，用基因工程的方法进行人型化。

10 然而，如果将小鼠的单克隆抗体进行人型化，其抗原性降低，但是对于患有慢性自身免疫性疾病的患者，在进行反复给药或长期给药时，不能否认可能会产生出阻碍其人型化抗 IL-18 抗体的活性的抗体（阻碍抗体）。其结果是，不能获得显著的治疗效果，有时还会有可能出现重大副作用的问题。

因而，非常希望开发出即使是进行反复给药或长期给药时，也具有很高安全性的抗人 IL-18 抗体。

本发明是鉴于上述课题而作出的，其目的是提供兼具安全性和治疗效果的人抗人白介素-18 的抗体及其片断，同时提出它们的利用方法。

15

### 发明内容

20 本发明人鉴于上述课题进行了锐意研究，结果从表达将由健康人的末梢血 B 淋巴细胞制备的免疫球蛋白的 H 链及 L 链的可变区 ( $V_H, V_L$ ) 进行编码的基因的噬菌体表面展示文库中，获得了完整的人抗人 IL-18 抗体的单链可变区 (scFv) 分子（抗体片断），其氨基酸序列及将其编码的 cDNA 的碱基序列得到明确。进而，发现该 scFv 可以阻碍人 IL-18 的生理活性，从而完成了本发明。

即，本发明作为在医学上或产业上有用的方法和物质，包含以下的 A) ~ X) 的发明。

25

A) 一种对人白介素—18 的人抗人白介素—18 抗体。

B) 如上述 A) 中所述的人抗人白介素-18 抗体，其含有由以下 (a) 或

(b)的多肽组成的H链的互补决定区,和由(c)或(d)的多肽组成的L链的互补决定区。

(a)由序列号4~6所示的氨基酸序列组成的多肽。

5 (b)在序列号4~6所示的氨基酸序列中,由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成,且成为对于人白介素-18的H链的互补性决定区的多肽。

(c)由序列号10~12所示的氨基酸序列组成的多肽。

(d)在序列号10~12所示的氨基酸序列中,由一个或一个以上氨基酸

10 置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成,且成为对于人白介素-18的L链的互补性决定区的多肽。

C)如上述A)或B)所述的人抗人白介素-18抗体,其含有由以下(e)或(f)的多肽组成的H链可变区,和由(g)或(h)的多肽组成的L链可变区。

15

(e)由序列号3所示的氨基酸序列组成的多肽。

(f)在序列号3所示的氨基酸序列中,由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成,且成为对于人白介素-18的H链的可变区的多肽。

20

(g)由序列号9所示的氨基酸序列组成的多肽。

(h)在序列号9所示的氨基酸序列中,由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成,且成为对于人白介素-18的L链的可变区的多肽。

D)一种对于人白介素-18的源自人的抗体(人抗人IL-18抗体)的H链

可变区的片断，其由以下 (e) 或 (f) 的多肽组成。

(e) 由序列号 3 所示的氨基酸序列组成的多肽。

(f) 在序列号 3 所示的氨基酸序列中，由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成，且成为对于人白介素-18 的 H 链的可变区的多肽。

5

E) 一种对于人白介素-18 的源自人的抗体 (人抗人 IL-18 抗体) 的 L 链可变区的片断，其由以下 (g) 或 (h) 的多肽组成。

(g) 由序列号 9 所示的氨基酸序列组成的多肽。

(h) 在序列号 9 所示的氨基酸序列中，由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入、和/或附加而得的氨基酸序列组成，且成为对于人白介素-18 的 L 链的可变区的多肽。

10

F) 一种对于人白介素-18 的源自人的抗体的单链可变区片断，其是将上述 B) 所述的含有 H 链的互补性决定区的 H 链可变区片断、或上述 D) 所述的 H 链可变区片断，和上述 B) 所述的含有 L 链的互补性决定区的 L 链可变区片断、或上述 E) 所述的 L 链可变区片断连结而成的。

15

G) 一种对于人白介素-18 的源自人的抗体 (人抗人 IL-18 抗体) 或其片断，其是在含有上述 B) 所述的 H 链的互补性决定区的 H 链可变区片断、或上述 D) 所述的 H 链可变区片断上，和/或在含有上述 B) 所述的 L 链的互补性决定区的 L 链可变区片断、或上述 E) 所述的 L 链可变区片断上，连结源自人的恒定区而成的。

20

H) 一种上述 G) 中所述的抗体的片断，其中所述抗体的片断为 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scAb 或 scFvFc。

I) 一种修饰抗体，其是在上述 A) ~ H) 中任意一项所述的抗体或其片断上结合了修饰剂而成的。

25

J) 一种将上述 A) ~ H) 中任意一项所述的抗体或其片断进行编码的基

因。

K) 如上述 J) 中所述的基因, 其具有作为开放阅读框区的序列号 1 或 7 所示的碱基序列。

L) 一种含有上述 J) 或 K) 中所述的基因的重组表达载体。

5 M) 一种导入了上述 J) 或 K) 中所述的基因的转化体。

N) 一种生产源自人的人抗人白介素-18 抗体或其片断的方法, 其是通过使上述 J) 或 K) 中所述的基因在宿主中表达来生产。

O) 一种检测人白介素-18 的器具, 其使用上述 A) ~ H) 中任意一项所述的抗体或其片断, 或上述 I) 中所述的修饰抗体。

10 P) 一种免疫疾病的诊断试剂盒, 其使用含有上述 A) ~ H) 中任意一项所述的抗体或其片断、或上述 I) 中所述的修饰抗体的检测人白介素-18 的试剂, 来测定被检测样品中人白介素-18 的量。

Q) 一种诊断免疫疾病的方法, 其以使用上述 P) 中所述的检测试剂来测定被检测样品中的人白介素-18 的量为基础进行诊断。

15 R) 一种人白介素-18 活性阻碍剂, 其以人白介素-18 的拮抗剂为有效成分。

S) 如上述 R) 中所述的人白介素-18 活性阻碍剂, 其中所述人白介素-18 的拮抗剂, 为以下的任意一项物质。

含有以下的任意一项的物质的人白介素-18 活性阻碍剂。

20 i) 上述 A) ~ C) 中任意一项所述的人抗人白介素-18 抗体。

ii) 上述 D) ~ H) 中任意一项所述的抗体的片断。

iii) 上述 I) 所述的修饰抗体。

iv) 以上述 i) ~ iii) 中任意一项所述的抗体、抗体的片断、或修饰抗体识别的人白介素-18 上的抗原决定区为基础进行分子设计的低分子

化合物。

T) 一种基因治疗药物, 其含有上述 J) 或 K) 中所述的基因。

U) 一种免疫疾病治疗药物, 其含有上述 R) 或 S) 中所述的人白介素-18 活性阻碍剂、或上述 T) 中所述的基因治疗药物。

5 V) 一种免疫疾病的治疗方法, 其通过用上述 U) 中所述的免疫疾病治疗药物来治疗。

W) 如上述 U) 中所述的免疫疾病治疗药物, 其阻碍通过抗原和人白介素-18 刺激而从辅助 T1 细胞产生的细胞因子。

10 X) 如上述 U) 或 W) 中所述的免疫疾病治疗药物, 其适用于人白介素-18 相关的变态反应、炎症和慢性免疫异常疾病。

通过本发明, 可以提供不是如目前为止的嵌合体抗体或人型化抗体, 而是源自人的对于人 IL-18 的抗体及其片断和它们的利用方法。因而在人 IL-18 直接或间接关联的疾病的治疗中, 可以提供即使反复给药或长期给药, 也能维持显著的治疗效果和较高安全性的治疗药物。

15 本发明的另外的目的、特征及优点可以通过以下所述而得到充分说明。另外, 本发明的好处可以通过参照附图的如下说明来知晓。

### 附图说明

20 图 1 为表示用 ELISA 法来评价在实施例 1 中分离的克隆 scFv 的对人 IL-18 的特异性的结果的图。

图 2 为表示用 ELISA 法来评价在实施例 1 中精制的源自人的 scFv 的对人 IL-18 的特异性的结果的图。

图 3 为表示在实施例 1 中的 scFv (h18-40、h18-108) 阻碍因 IL-18 所致的从人骨髓单核细胞 KG-1 细胞中的 IFN- $\gamma$  的产生的图。

25 图 4 为表示在实施例 1 中的 scFv (h18-108) 阻碍 IL-18 向人骨髓

单核细胞 KG-1 细胞结合的图。

图 5 为表示在图 4 中 scFv (对照组) 的结果的图。

图 6 为表示 scFv (h18-108) 的免疫印迹法的结果的图。

图 7 为表示 scFv (h18-108) 的凝胶过滤色谱法的结果的图。

5 图 8 为表示在实施例 2 中, 通过 Th1 细胞及 Th2 细胞的刺激, 从各种细胞产生的细胞因子的量的图。

图 9 为表示在实施例 2 中, 通过 Th1 细胞及 Th2 细胞的刺激, 各种细胞的表面的 IL-18R $\alpha$  链的表达水平的图。

10 图 10 为表示在实施例 2 中 IL-18 的用量与从 Th1 细胞产生的细胞因子的量的关系的图。

图 11 为表示在实施例 2 中, 对 Th1 细胞进行刺激后的培养时间与从 Th1 细胞中产生的细胞因子的量的关系的图。

图 12 为表示在实施例 2 中, 在受到 IL-18 刺激的 Th1 细胞, FACS 分析细胞质 IFN- $\gamma$  和/或 IL-13 中阳性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例的结果的图。

15 图 13 为表示在实施例 2 中, 受到抗 CD3 抗体刺激的 Th1 细胞中的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞的比例和 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞的阳性区别例的图。

图 14 为表示在实施例 2 中, 通过抗 CD3 和 IL-18 刺激 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞时, 产生细胞因子的量的图。

## 20 具体实施方式

如对本发明的具体实施方式进行说明, 如下所述。在此, 本发明并不限于这些。

### (1) 本发明的抗体及其片断

本发明人研究了对于人白介素 - 18 (IL-18) 的人抗人 IL-18 抗体,

发现用噬菌体展示法得到的源自人的单链可变区片断 (scFv) 可以阻碍人 IL-18 诱导的信号传递及 IFN- $\gamma$  的产生。进而确定了在该单链可变区片断 (scFv) 中, 互补性决定区 (CDR)、H 链及 L 链的可变区的氨基酸序列以及编码它们的基因的碱基序列。

5            序列号 3 中显示了  $V_H$  链的氨基酸序列。序列号 4~6 显示了该  $V_H$  链中的互补性决定区 (CDR1~3) 的氨基酸序列。即, 在序列号 3 中显示的  $V_H$  链的氨基酸序列中, 对应为第 31 个~第 35 个氨基酸序列为 CDR1 (序列号 4)、第 50 个~第 66 个氨基酸序列为 CDR2 (序列号 5)、第 99 个~第 108 个氨基酸序列为 CDR3 (序列号 6)。

10           另一方面, 序列号 9 显示了  $V_L$  链的氨基酸序列。序列号 10~12 显示了该  $V_L$  链中的互补性决定区 (CDR1~3) 的氨基酸序列, 对应为第 33 个氨基酸序列为 CDR1(序列号 10)、第 49 个~第 55 个氨基酸序列为 CDR2 (序列号 11)、第 88 个~第 98 个氨基酸序列为 CDR3 (序列号 6)。

15           本发明的抗体及其片断, 作为上述的  $V_H$  链和  $V_L$  链以及它们的 CDR, 并不只限于序列号 3~6 及序列号 9~12 所示的序列, 改变它们的一部分的异构多肽亦可。

20           即, 作为  $V_H$  链的 CDR, 不只是 (a) 由序列号 4~6 所示的氨基酸序列组成的多肽, 还包括 (b) 在序列号 4~6 所示的氨基酸序列中, 由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成, 且成为对于人白介素-18 的 H 链的互补性决定区的多肽。

             另一方面, 作为  $V_L$  链的 CDR, 不只是 (c) 由序列号 10~12 所示的氨基酸序列组成的多肽, 还包括 (b) 在序列号 10~12 所示的氨基酸序列中, 由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成, 且成为对于人白介素-18 的 L 链的互补性决定区的多肽。

25           另外,  $V_H$  链的可变区, 不只是 (e) 由序列号 3 所示的氨基酸序列组成的多肽, 还包括 (f) 在序列号 3 所示的氨基酸序列中, 由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成, 且成为对于人白介素-18 的 H 链的可变区的多肽。

同样，V<sub>H</sub>链的可变区，不只是(g)由序列号9所示的氨基酸序列组成的多肽，还包括(h)在序列号9所示的氨基酸序列中，由一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加而得的氨基酸序列组成，且成为对于人白介素-18的L链的可变区的多肽。

5           在此，所述“一个或一个以上氨基酸置换、缺失、插入和/或附加的”是指，通过部位特异性地诱发突变的方法等众所周知的变异蛋白质的制作方法，来置换、缺失、插入和/或附加可以置换、缺失、插入和/或附加程度的数目的氨基酸。因此，例如上述(b)的多肽为上述(a)的多肽的变异多肽，在此所说的“变异”主要是指通过公知的变异蛋白质的制  
10           作方法来人为地导入的变异，但也可以分离精制的天然(例如人)中存在的同样的变异多肽。

          另外，所述“变异”在将如后所述的本发明的抗体或其片断作为治疗药物使用(对人给药时)时，和在源自人的结构或不引起人的免疫反应的范围内进行，并作为检测器具或诊断试剂盒等使用时(不对人给药时)，  
15           没有特别的限制。另外，在将本发明的抗体或其片断对人给药时，在维持识别抗原的CDR的高级结构的范围内，优选进行变异。

          另外，本发明所涉及的抗体及其片断，亦可以是含有附加的多肽的物质。在这种附加了多肽的情况，可以列举出，例如用His、Myc、Flag等将本发明的蛋白质进行表位标记的情况。

20           另外，因为CDR是识别抗原的区域，所以人IL-18被本发明所述抗体或其片断的互补性决定区(CDR)所识别。因此，至少具有上述CDR的抗体可以特异性地识别人IL-18。即上述V<sub>H</sub>链及V<sub>L</sub>链至少含有上述V<sub>H</sub>链及V<sub>L</sub>链的CDR即可，除此之外，只要是源自人的V<sub>H</sub>链及L链的氨基酸序列即可。由此，可保持对于人IL-18的特异性。不过，CDR通过H链  
25           及L链的可变区的一级结构和高级结构，被特异性地构建。因此至少含有上述V<sub>H</sub>链及V<sub>L</sub>链的CDR，除此之外，从源自人的V<sub>H</sub>链及L链来构成人抗IL-18抗体时，可以成为具有对于人IL-18特异性的抗体。例如，通过至少维持CDR的高级结构，可以成为具有对于人IL-18特异性的抗体。

更具体而言，作为本发明所述的抗体及其片断，是源自于人的，例如可列举出如下甲~丁所示的物质。

甲) 含有上述(a)或(b)所述的H链的互补性决定区的 $V_H$ 链，

乙) 由上述(e)或(f)的多肽组成的 $V_H$ 链，

5 丙) 含有上述(c)或(d)所述的L链的互补性决定区的 $V_L$ 链，

丁) 由(g)或(h)的多肽组成的 $V_L$ 链，

戊) 上述甲)或乙)的 $V_H$ 链和上述丙)或丁)的 $V_L$ 链连结而成的单链可变区片断(scFv)，

己) 上述甲)或乙)的 $V_H$ 链和/或丙)或丁)的 $V_L$ 链上连结源自  
10 人的恒定区而成的片断等亦可。

在上述戊)和己)中，在连结上述 $V_H$ 链和 $V_L$ 链时，通常是通过适当的连接肽等来连结。作为这种连接肽，例如可使用由10~25个氨基酸残基组成的任意的单链肽。

另外，在上述己)中所述的在上述 $V_H$ 链和/或 $V_L$ 链上连结源自人的  
15 恒定区而形成的片断(flagment)可以是Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、或至少具有一部分Fc部的scAb或scFvFc，也可以是完全抗体。在此，scAb是指在scFv上结合了L链或H链的恒定区的一部分的结构域(C结构域)的物质，scFvFc是指在scFv上结合了H链及L链的全恒定区的物质。

在本发明的抗体及其片断中，为使稳定性及抗体效价提高，也可结  
20 合修饰剂。即，本发明的抗体及其片断也可以是修饰抗体。作为这种修饰剂，可列举出例如糖链或高分子等。进行糖链修饰时，该糖链可能具有某种生理活性，但在进行聚乙二醇(PEG)等的单纯高分子修饰时，不显示其自身的生理活性。通过PEG化可以抑制在肝脏中的吸收，提高在血中的稳定性。即，作为修饰剂，优选PEG等单纯高分子。

25 另外，通过本发明的抗体及其断片的修饰剂的修饰，与制作上述变

异多肽同样，在作为治疗药物使用时，在不引起人的免疫反应的范围内实施；在作为检测器具或诊断试剂盒使用时，没有特别的限制。另外，将本发明的抗体或其片断对人给药时，在维持识别抗原的 CDR 的高级结构的范围内，优选进行修饰。

5           另外，上述抗体也意味着包括与抗体在构造上相关的蛋白质，即也指免疫球蛋白。本发明的抗体可以为 IgA、IgD、IgE、IgG、IgM 的任意一种。换言之，可以是单体，也可以是 2 聚物、3 聚物、4 聚物、5 聚物的多聚物。

10           如后述实施例所示，对上述 scFv 进行详细的解析，结果如后述实施例所详细描述的那样，得到了关于其作用和性质的以下见解。

[1] 与人 IL-18 特异性地结合。

[2] 阻碍由人 IL-18 诱导的信号传递以及 IFN- $\gamma$  的产生。

15           这样，上述 scFv 由于具有来源于人的氨基酸序列，所以形成阻碍抗体活性的阻碍抗体的可能性非常小。因为通过与人 IL-18 牢固地结合，而具有阻碍其生理活性的作用，因而可以阻碍因 IL-18 所引起的各种免疫应答。从而，上述 scFv 及含有其的抗体或其片断，可以用于治疗与人 IL-18 直接或间接相关的疾病，例如，由该免疫应答引起的变态反应、炎症以及慢性免疫异常疾病。如果开发出这样的治疗药物，有望确立人 IL-18 相关疾病的新型治疗方法。

20           (2) 本发明所涉及的基因

          本发明所涉及的基因是将上述(1)说明的抗体或其片断进行编码的基因，是具有将序列号 1 或 7 所示的碱基序列作为开放阅读框(ORF)区的基因，以及包括改变了其碱基序列的一部分的改变基因等。

25           上述基因编码了本发明的抗体或其片断，因而可以导入至适当的宿主(例如细菌、酵母)，使本发明的抗体或其片断表达。

          上述“基因”也可以是含有在编码上述(1)的抗体或其片断的序列之

外的非翻译区(UTR)的序列或载体序列(含有表达载体序列)等序列的基因。例如,将序列号1或7中所述的序列与载体序列相连、从而构成本发明的基因,通过将其在适当的宿主中扩增,可以将本发明的基因按需要扩增。另外,可以将本发明的基因的一部分序列用于探针。如后所述,本发明的基因,可以用作治疗与IL-18相关的疾病的基因治疗药物(基因治疗药)。

### (3) 本发明的抗体及其片断的获得方法和生产方法

上述(1)中所述的抗体及其片断,例如,如后述实施例所示,可以通过利用所谓的噬菌体展示法来获得。另外,上述(1)中所述的抗体及其片断可以通过将上述(2)中所述的基因在宿主中表达来生产。抗体及其片断的获得方法及生产方法,并不限于这些。

更具体而言,从健康人的末梢血B淋巴细胞中提取mRNA,使用规定免疫球蛋白基因的 $V_H$ 链、 $V_L$ 链两端的引物对,通过RT-PCR法进行扩增,从而得到具有多样序列的H链、L链的V区集团。接着,进一步将编码多肽连结链部分的DNA,及可以将其两端与各种H链、L链相连结的规定的引物对组合来扩增,根据H链、L链的V区的随机组合,制备出多样的scFv DNA集团。将得到的scFv DNA重组到噬菌体中间载体pCANTAB5E中,制作scFv的表面展示噬菌体文库,将该文库与在塑料管中固相化的人IL-18反应,通过洗涤来除去未反应的scFv的展示噬菌体,然后将与人IL-18结合的scFv的噬菌体克隆用酸来溶出。从分离的噬菌体克隆来制备scFvDNA,将其重组入表达载体,将通过该表达载体而被转化的宿主按照通常的方法来培养,从而只得到目的物scFv蛋白。

在此,序列号1及7是通过噬菌体展示抗体法,将对于所得的人IL-18的单链可变区(scFv)的 $V_H$ 链及 $V_L$ 链进行编码的cDNA的碱基序列。

作为scFv DNA的表达方法,例如可以在大肠杆菌中表达。在大肠杆菌的情况下,常用的有效启动子、用于抗体分泌的信号序列等,可以将表达的scFv进行功能性结合来表达。作为启动子,可以列举出例如lacZ启动子、araB启动子等。作为用于scFv分泌的信号序列,在大肠杆菌

的胞质中表达时，可以使用 pelB 信号序列 (Lei, SP., et al, J. Bacteriol., 1987, 169: 4379-4383)。在培养上清液中分泌时，也可使用 M13 噬菌体的 g3 蛋白的信号序列。

5 如上所述表达的 scFv 可以从细胞内外、宿主中分离并精制至均匀。本发明中表达的 scFv，在其 C 末端附加了 E tag 序列，因而采用使用抗 E tag 抗体的亲和性色谱法，可以容易地在短时间内进行精制。此外，也可以组合通常的蛋白质中所使用的分离、精制方法来进行精制。例如，可以组合超滤、盐析、凝胶过滤/离子交换/疏水色谱等柱色谱法，将抗体进行分离和精制。

10 如此得到的 scFv 蛋白(多肽)，如后述实施例所示，具有对人 IL-18 的结合活性。作为测定本发明的人抗人 IL-18 抗体的抗原结合活性的方法，有 ELISA、BIAcore 等方法。例如使用 ELISA 时，在固相化人 IL-18 的 96 孔板上，加入含有目的物抗 IL-18 抗体或抗体片断的试剂，例如大肠杆菌的培养上清液或精制抗体。接着，添加用碱性磷酸酶等酶标记的  
15 二次抗体，将板培养，洗涤后，加入显色物质对硝基苯磷酸脂，通过测定吸光度，可以评价抗原结合活性。

进而，明确了由本申请发明所得到的 scFv 蛋白，可以依赖体积地抑制从人 IL-18 诱导的人骨髓单核细胞 KG-1 细胞产生 IFN- $\gamma$ 。

20 因此，该 scFv 蛋白，由于抑制人 IL-18 的生物活性，有望有效预防或治疗因 IL-18 的作用而引起的疾病。

#### (4) 本发明的重组表达载体等

25 本发明的重组表达载体为含有上述(2)的基因，即编码上述(1)的抗体或其片断的基因的载体，可以列举出，例如插入具有序列号 1 或序列号 7 所示的任意一种碱基序列的 cDNA 的重组表达载体。重组表达载体的制作中，可以使用质粒、噬菌体、或粘端质粒等，并没有特别的限定。

这样，重组表达载体是含有本发明的基因的载体，载体的具体种类

没有特别的限定，只要适当选择在宿主细胞中可以表达的载体即可。即，根据宿主细胞的种类，为了可以确切地使基因表达，选择适当的启动子序列，将其与本发明所涉及的基因重组入各种质粒等中所得的物质作为表达载体来使用即可。

- 5            为了确定本发明的基因是否导入了宿主细胞，进而确定其是否在宿主细胞中确实地表达，可以使用各种标记物，例如将宿主细胞中缺失的基因作为标记物来使用，并将含有该标记物和本发明的基因的质粒等作为表达载体来导入宿主细胞中。由此，通过标记物基因的表达可以确定本发明的基因的导入。或者，可以将本发明所涉及的抗体或其片断作为
- 10          融合蛋白质而使其表达，例如，将源自多管水母属的绿色荧光蛋白质 GFP (Green Fluorescent Protein) 作为标记物使用，也可以将本发明所涉及的抗体或其片断作为 GFP 融合蛋白质来表达。

- 所述宿主细胞没有特别的限定，可以适用众所周知的各种细胞。具体而言，作为上述(2)基因是全长DNA时的宿主细胞，以源自人或小鼠的细胞为代表，可以列举出线虫 *Caenorhabditis elegans*、非洲爪蟾
- 15          (*Xenopus laevis*) 的卵母细胞、各种哺乳动物(大鼠、兔子、猪、猴等)的培养细胞、或者黑腹果蝇、家蚕等昆虫的培养细胞等的动物细胞；作为DNA片断时的宿主细胞，可以列举出大肠杆菌(*Escherichia coli*)等细菌、酵母(出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 或分裂酵母
- 20          *Schizosaccharomyces pombe*)等，并没有特别的限定。

            将上述表达载体导入至宿主细胞的方法，即转形变异方法也没有特别的限定，可以适用电穿孔法、磷酸钙法、核糖体法、DEAE葡聚糖法等众所周知的方法。

- 本发明的转化体是导入了上述(2)的基因，即编码上述(1)的抗体或其片断的基因的转化体。在此，“导入基因”是指，通过公知的基因工程的方法(基因操作技术)可以表达地导入到对象细胞(宿主细胞)
- 25          内。另外，上述“转化体”不仅是指细胞、组织和器官，还包括动物个体。成为对象的动物没有特别的限定，例示有牛、猪、羊、山羊、兔子、狗、

猫、豚鼠、仓鼠、小鼠、大鼠等哺乳动物。特别是小鼠或大鼠等啮齿类动物，作为实验动物和病态模型动物被广泛使用，其中优选制作出很多的近系，受精卵的培养和体外受精等技术完备的小鼠作为实验动物和病态模型动物，人工破坏特定基因的小鼠等对上述抗体或其片断的进一步功能解析、开发人 IL-18 的相关疾病的诊断方法及其治疗方法等很有用。

另外，上述(1)的抗体或其片断，可用本发明的重组表达载体来制作，也可用本发明的转化体来生产。

#### (5) 本发明的抗体及其片断的利用方法

##### (5-1) 人 IL-18 检测器具、免疫疾病的诊断试剂盒和诊断方法

上述(1)的抗体、其抗体片断或修饰抗体，对人 IL-18 可以特异性牢固结合，因此具有可以用于检出并测定人 IL-18 的可能性。即，通过上述人白介素-18 检测器具，可以高精度地检测出例如血液或尿等样品中所含有的人 IL-18。因而，可以用于进行人 IL-18 相关疾病的判定和治疗效果的评价的诊断用途和治疗用途。

另外，本发明的人 IL-18 检测器具，至少使用本发明抗体中的 CDR 的氨基酸序列即可。人 IL-18 检测器具，可以用于各种条件下的 IL-18 的检出和测定等。作为本发明的人 IL-18 检测器具，可以列举出，例如将与人 IL-18 特异性结合的本发明的抗体或其片断在基盘(载体)上固定化的抗体芯片或抗体柱等。

另外，本发明的抗体或其片断，对于通过免疫亲和性色谱法来精制人 IL-18 也是非常有用的。该精制方法包括下述工序：将本发明的抗体或其片断与人 IL-18 和除此之外的物质的混合物相接触，从而在抗体或其片断上吸附人 IL-18 的工序，和从抗体或其片断上将吸附的人 IL-18 脱离并采集的工序。通过该精制方法，可以将 IL-18 短时间且高精度地精制。

本发明的抗体或其片断以及它们的修饰抗体，作为用于检测人 IL-18 的试剂(人 IL-18 检测试剂)也具有广泛的用途。即，在适用通

- 过这些抗体或其片断的放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析等标记免疫分析时，可以迅速并正确地将被检测样品中的人 IL-18 进行定性或定量分析。在该标记免疫分析中，所述抗体或其片断可以通过例如放射性物质、酶和/或荧光物质来标记使用。另外，这些抗体及其片断与人
- 5 IL-18 特异性地反应，呈现出免疫反应，因此如果将该免疫反应以标记物质作为指标进行测定，可以高精度地检测出被检测样品中极微量的人 IL-18。标记免疫分析与生物分析相比，其特征为，可以一次分析很多的被检测样品，而且分析所需要的时间和劳动很少即可，还有很高的分析精度。
- 10 本发明的免疫疾病的诊断试剂盒以及诊断免疫疾病的方法是按照这样的人 IL-18 的检测方法，测定被检测样品（血液、体液或组织等）中的人 IL-18 的量，根据其测定结果进行免疫疾病的诊断。在此，所述“免疫疾病”是与人 IL-18 相关的疾病，可例示，如特异性皮炎、气管炎、气管过敏（AHR）和哮喘等。
- 15 这样，通过本发明的人 IL-18 检测器具的检测方法，在制造人 IL-18 时的工序管理和产品的质量管理方面是有用的。另外，本发明的免疫疾病的诊断试剂盒及诊断方法，用于进行将组织或体液中的人 IL-18 的水平作为指标的各种感染性疾病的诊断及各种免疫疾病的治疗评价，是非常有用的。
- 20 另外，一般的用于诊断的抗体，是将小鼠、兔子、山羊等人以外的动物进行免疫而制作成的。但是，在动物的免疫系统中，产生与构成自身机体的分子结合的抗体的淋巴细胞，被排除或失活性化。即将动物免疫而制成的抗人 IL-18 抗体中不含有将在人 IL-18 和动物 IL-18 上酷似的部分作为抗原决定区的抗体。
- 25 与此相对，本发明的抗体是从展示人抗人 IL-18 抗体的噬菌体文库中筛选的抗体。该噬菌体中不存在将动物样的抗体排除或失活性的机制。因而，本发明的抗体不能用动物免疫进行制作，其含有在人、猴子或其他各种动物的 IL-18 中共通的抗原决定区显示结合特异性的抗

IL-18 抗体。将这种抗体用于本发明的检测器具或诊断试剂盒，可以诊断不仅是人类，还有猴子之类的各种动物疾病模型中与 IL-18 相关的疾病。

#### (5-2) 人 IL-18 活性阻碍剂等

5 上述(1)的抗体，是特异性识别人 IL-18 的源自人的人抗人 IL-18 抗体。该抗体与人 IL-18 特异性结合的同时阻碍向人 IL-18 的受体的结合，并通过该受体阻碍信号传递，进而也阻碍通过人 IL-18 诱导的 IFN- $\gamma$  的产生。

10 因此，换而言之，该抗体是人 IL-18 的拮抗剂。该人 IL-18 拮抗剂可以用作人白介素 - 18 的活性阻碍剂。

作为所述“人 IL-18 拮抗剂”并没有特别的限定，可以列举出以下 i) ~ iv) 的物质。

i) 上述(1)所述的本发明的抗体。

ii) 上述(1)所述的本发明的抗体的片断。

15 iii) 上述(1)所述的本发明的抗体或其片断的修饰抗体。

iv) 以识别 i) ~ iii) 中所述的抗体、抗体的片断或修饰抗体的人 IL-18 上的抗原决定区为基础，进行分子设计的低分子化合物。

20 在此，所述“人白介素 - 18 活性阻碍剂”当然可以抑制人白介素 - 18 的活性，还可以是拮抗性地阻碍向人白介素 - 18 的受体的结合的物质，也可以是结合在人 IL-18 和 IL-18 受体的复合体上，阻碍信号传递的物质。

25 另外，上述(2)所述的本发明的基因，可以用作人 IL-18 相关的免疫疾病中的基因治疗药物。如果摄取该基因治疗药物，可以在体内形成本发明的抗体或其片断，因此可以得到与上述人 IL-18 活性抑制剂相同的效果。在此，人抗 IL-18 抗体，在生物体内持续形成后，会过度抑制人 IL-18 的作用，在人的情况下，即使 IL-18 缺失，IL-1 会显示与 IL-18

同样的作用，因此不会出现特别的问题。

本发明的抗体是特异性识别人 IL-18 的源自人的人抗人 IL-18。即，该抗体的氨基酸序列，与过去的嵌合抗体或人型化抗体不同，是完全源自于人的。

5 因此，没有形成阻碍本发明的抗体的作用的抗体（阻碍抗体）的危险。因而，例如即使将该抗体反复给药或长期给药，可在保持很高安全性的情况下，持续地发挥效果。

因而，本发明的人 IL-18 活性阻碍剂及基因治疗药物，作为与人 IL-18 相关的免疫疾病的治疗方法，可以用作有用的免疫疾病治疗药物（免疫治疗药）。  
10

另外，本发明的免疫疾病治疗药物，只要在体内发挥其效果即可，因此可以例如将由序列号 3 所示的氨基酸序列所组成的多肽（或含有其的人 IL-18 活性阻碍剂）进行给药，也可以药物前体化并在体内代谢，从而表达该多肽。即，本发明的免疫疾病治疗药物，可以是上述 i) ~ iv) 的人 IL-18 拮抗剂（人 IL-18 活性阻碍剂）或将上述基因治疗药物进行药物前体化。即，可以对免疫治疗药物进行修饰，使其在体内成为活性代谢物。  
15

另外，在本发明的免疫疾病治疗药物中，可以含有作为药品所允许的添加物，如一种或更多种的赋形剂、一种或更多种的结合剂、一种或更多种的崩解剂、一种或更多种的润滑剂、一种或更多种的缓冲剂等。  
20

如上所述，本发明的抗体（人单克隆抗体）及该抗体片断分子，具有源自人的抗人 IL-18 抗体的可变区，与人 IL-18 激烈反应，显示出对 IL-18 和 IL-18 受体间的结合的阻碍作用。进而，可以阻碍因 IL-18 引起的各种免疫应答，可以用作由该免疫应答引起的变态反应、炎症及免疫异常性疾病的预防或治疗药物，例如抗炎剂或用于自身免疫疾病的治疗及预防的药物。  
25

另外，本申请发明的对于人 IL-18 的源自人的 scFv，与 IL-18 特异

性结合，显示出阻碍由 IL-18 诱导的信号传递以及 IFN- $\gamma$  的产生。因此将该 scFv 以及 scFv 的 V<sub>H</sub>链及 V<sub>L</sub>链与人恒定区或其一部分结合而成的人抗人 IL-18 抗体或其抗体片断，有望适用于与 IL-18 相关的疾病，例如慢性炎症性疾病及自身免疫疾病等的治疗。另外，通过包括不显示与 IL-18 相结合的抑制作用的抗体的这些抗体，可以测定 IL-18 的血中浓度，并监控病情症状的变动。

另外，如前所述的本发明的抗体，因为阻碍对于 IL-18 的信号传递及 IFN- $\gamma$  的产生，所以只要将显示具有这种特性的抗体与人 IL-18 的结合特异性的 IL-18 上的抗原决定区明确的话，就可应用于开发低分子化合物的免疫疾病的治疗药物。该抗原决定区称为表位。该表位有时是氨基酸一级序列本身，有时是肽链折叠后构建的立体构造。在任何情况下，例如通过本发明人等提出的“使用单克隆抗体的分子模型设计法”，都可以设计出表位相的类似化合物（模拟分子）(T. Fukumoto et al., Nature Biotechnology, 16: 267-270, 1998.)。在此，“低分子化合物”不是指例如肽及抗体等分子量较大的化合物（分子量在 1 万或更多），而是作为一般的低分子药品所使用的、分子量不足 1 万，优选分子量不足 3000 的化合物。在此，低分子化合物的分子量越小越优选。

另外，在制作肽或更低分子量的化合物作为上述低分子化合物时，着眼于该模拟分子的分子构造来进行分子设计，可以通过所谓 in sillico 的过程进行设计。这样，通过用 in sillico 来进行分子设计，可以廉价且迅速地将可以成为治疗药物的低分子化合物作为引导化合物而选择出来。

具体而言，例如在后述的实施例中，人抗人 IL-18scFv 抗体的 CDR 在序列号 4~6、10~12 中显示。一般地，在抗体中 CDR 为识别抗原的区域（部位）。即，CDR 成为抗体的活性中心。也就是说，实施例 1 所示的 scFv，通过 CDR 特异性识别人 IL-18。因此，将低分子化合物设计成与该 CDR 的高级结构几乎一致（优选完全一致），就可以将该低分子化合物作为低分子药品来利用。换言之，将低分子化合物设计成与 CDR 的构造相近。另外，in sillico 过程的方法，并没有特别的限定，可以通过

例如 SBDD (structure Based Drug Design), CADD (Computer-Aided Drug Design) 等, 以具有 CDR 的官能团及 CDR 的高级结构为基础, 在计算机上进行设计。

5 如此设计的低分子化合物, 与抗体样的蛋白质相比(肽), 稳定性高。因此, 该低分子化合物可以用作易于处理的药品。

### (5-3) 免疫疾病治疗药物的适用例-1

如前所述, 本发明的人 IL-18 活性阻碍剂及基因治疗药物, 作为人 IL-18 相关的免疫疾病的治疗方法, 成为有用的免疫疾病治疗药物。在此, 对免疫疾病的治疗药物的适用例进行说明。

10 Th1 细胞优势的免疫应答, 一般在自身免疫疾病的病症中进行研究。但是, Th1 细胞优势的免疫应答, 对于 Th2 细胞相关的疾病(哮喘·特异性等)是防御性的。然而, 最近的研究表明, Th1 细胞与 Th2 细胞增强气管过敏有关系。进而, Th1 细胞通过中性粒细胞的增加及活化, 显示出诱导气管过敏(AHR)。

15 实际上, 哮喘患者的气管不只是中性粒细胞增加, 有时也会出现 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  以及 IL-8 水平的增加。尽管如此, Th1 细胞是以何种方式妨碍 Th2 细胞的影响从而显示出病症, 其作用机理还不明了。因此, 解释在诱导气管炎症及气管过敏时 Th1 细胞对病症的关联, 是很重要的。

20 IL-18 最初是作为在抗 CD3 抗体以及 IL-12 的存在下, 由 Th1 细胞产生的使 IFN- $\gamma$  增加的因子而被发现的。因此, 注入 IL-12 和 IL-18 的混合物后, 在体内诱导产生 IFN- $\gamma$  的细胞, 并阻碍 Th2 细胞诱导的 IgE 应答。然而, 根据本发明人等最近的研究, 将在体外诱导的抗原特异性的 Th1 细胞或 Th2 细胞被动移入到幼稚宿主小鼠(非致敏性宿主小鼠)中后, 将宿主小鼠无处置地放置约一个月, 发现移入的各种细胞变为记  
25 忆表现型的 Th1 细胞或 Th2 细胞, 并且这些细胞在受到经鼻给予的抗原、或抗原和 IL-18 的刺激时, 宿主动物发生气管炎症(T. Sugimoto et al., J. EXP. Med., 2004, 199, 535-545.)。过去的报告是 IL-13 的中和阻碍移入 Th2 细胞的小鼠的嗜酸性粒细胞的增加和 AHR。对此, 在进行同样

处理的移入 Th1 细胞的小鼠中，例如，该处理即使显著地减少了气管的嗜酸性粒细胞的增加，也不阻碍 AHR。

5 这些结果表明 Th1 细胞以与 Th2 细胞完全不同的方式诱导 AHR。Th1 细胞对于抗原和 IL-18 的刺激，显示出独特的应答，并产生 Th1 细胞因子 (IFN- $\gamma$ )、Th2 细胞因子 (IL-9、IL-13)、化学因子 (RANTES、MIP-1 $\alpha$  (源自巨噬细胞的炎症性蛋白质 - 1 $\alpha$ ) 及 GM-CSF。Th2 细胞因子和 GM-CSF，主要作为诱导支气管哮喘的因子而被广泛认识。从几个研究表明，Th1 细胞与 Th2 细胞并非是相互阻碍的，相反通过共同的作用来诱导支气管哮喘的发病，并且增强其症状。事实上，同时给予 IFN- $\gamma$  和 IL-13 10 时诱导最严重的支气管哮喘。本发明人等所发现的 Th1 细胞的新功能为，在受到抗原和 IL-18 的刺激后，通过产生 Th1 细胞因子、Th2 细胞因子、GM-CSF 以及化学因子，可以诱导各种炎症性病症。

因此，人 Th1 细胞在相同条件下，有显示病症的可能性。

15 在后述的实施例 2 中，确认了人 Th1 细胞在抗原和 IL-18 的存在下，产生 Th1 细胞因子、Th2 细胞因子、GM-CSF 以及化学因子。在该实施例中，强烈表达新诱导的 IL-18R $\alpha$  的 Th1 细胞，通过抗 CD3 抗体和 IL-18 的刺激，使 IFN- $\gamma$ 、IL-13、GM-CSF 以及 IL-8 的产生显著增加。其结果为，Th1 细胞不只是产生 Th1 细胞因子、Th2 细胞因子，还可能通过产生 GM-CSF、IL-8 来诱导组织损伤。

20 这样，IL-18 通过与抗原共同地刺激 Th1 细胞，使严重的气管炎及 AHR 发病。因此，例如前述的人 IL-18 拮抗剂 (前述的 i) ~ iv) ) 成为它的治疗药。

#### (5-4) 免疫疾病的治疗药物的适用例 - 2

接着，就免疫疾病的治疗药物的其他适用例进行说明。

25 迄今为止，特异性皮炎被认为是依赖于变态反应原特异性的 IgE 抗体的获得型特异性疾病。因此，将变态反应原特异性的 IgE 抗体作为目标，IgE 抗体阻碍剂、抗变态反应剂等被用作特异性皮炎的治疗药物。

但是，用这样的治疗药物并不能治愈，反复发作的变态反应患者正逐年增加。

5 如过去那样，对于以获得型特异性皮炎（IgE 抗体依赖性特异性皮炎）为标准的治疗方法中无效的、天然型特异性发病以及重症度发病来说，IL-18 发挥着重要的作用。

但是，对于这样的病症的有效治疗方法并未确立。

存在这样的问题：虽然可以通过给予 CpGDNA 等方法来诱导对于 Th2 细胞的功能显示拮抗作用的 Th1 细胞，但同时被诱导的 IL-18 作用于 Th1 细胞，从而诱导出 TH1 型的支气管哮喘。

10 作为获得型特异性皮炎（IgE 抗体依赖性特异性皮炎）的治疗方法，已知有抗原特异性减致敏的治疗方法，但其分子机理还不明了，且疗效很低。另外，所谓减致敏疗法是指，将作为 IgE 抗体相关的即时型变态反应（I 型变态反应）的原因抗原的变态反应原，特别是将吸入性变态反应原给予到生物体内（一般为注射），使对于变态反应原的过敏反应减轻的治疗方法。

15 对 IgE 抗体的 Fc 部位特异性地、阻碍与 FcR1 部位的结合的人型小鼠抗体由 Genentic 公司开发，并报道其作为变态反应治疗药是有效的（Milgrom H. et al., N, Engl. J. Med., 1999: 341, 1966-73.）。

20 另外，Th2 细胞因子阻碍剂，抗 IL-4 抗体、抗 IL-5 抗体、抗 IL-13 抗体，以及对它们受体的抗体，被认为可以成为作为变态反应治疗药物的抗体药品（医药品），但有效的抗体药品还未开发。

以 FK506 为代表的低分子免疫抑制剂的低量使用，可以发挥抗变态反应的作用，但报告它有肾障碍的副作用。

25 作为通过 TLR (Toll Like Receptor) 施加刺激，从而诱导 IL-12 产生的方法，CpGDNA 受到瞩目。该 CpGDNA 为具有非甲基化的 CpG 模体的结构域 (motif) DNA。CpGDNA 强烈引起特别是 Th1 反应（使巨噬细胞活化的反应），从而在临床应用方面受到期待的分子。但是，如前所述，

CpGDNA 同时诱导的 IL-18 作用于 Th1 细胞, 诱导 TH1 型的支气管哮喘成为一个问题。

5 这样, 迄今为止, 特异性疾病作为特异性依赖于变态反应原的 IgE 的获得型特异性疾病而被论及, 以此为基准的 IgE 阻碍剂及抗变态反应剂等作为治疗药物而被使用。但是, 用这些治疗药物不能治愈, 或反复复发的患者在逐年增加。

即, 在以过去的获得型特异性为基准的治疗方法中, 存在着无效的天然型特异性, IL-18 对其发病起着很重要的作用。

10 在过去的免疫学认知中, Th1 细胞的诱导, 通过抑制 Th2 细胞的功能, 可以发挥抗变态反应的作用。但是, 本发明人等发现, IL-18 通过在体内条件下刺激 Th1 细胞, 产生 IFN- $\gamma$ 、IL-8、9、13 等, 并诱导难知性的支气管哮喘。它颠覆了变态反应性炎症的发病是以 Th1 和 Th2 的平衡为原因的过去的定说。即, 将过去的以纠正平衡为目的的治疗方法作了明确的否定。

15 IL-4、5、9、13 是重要的 Th2 细胞因子。另一方面白三烯、组胺、5-羟色胺等是重要的化学介质。即使有将它们分别抑制(阻碍)的技术, 也不能从其上游抑制它们。即, 即使有直接作用于各细胞因子, 从而抑制(阻碍)它们的功能的技术, 也没有在上游阻碍各细胞因子的产生的技术。IL-18 处于上述各细胞因子的上游, 因而通过阻碍 IL-18 的活性, 20 可对变态反应性疾病(变态反应性炎症)有效。

变态反应性疾病的发病机制与活化的 T 细胞、嗜碱性粒细胞以及肥大细胞有很深的关系。特别是通过由变态反应原引起的肥大细胞或嗜碱性粒细胞上的 Fc $\epsilon$ R 上结合的 IgE 分子的桥连, 可使这些细胞活化。其结果产生 Th2 细胞因子和化学介质, 从而诱导变态反应性炎症(变态反应性疾病)。但是, 也有与变态反应原及 IgE 无关, 而是以感染为契机从而 25 诱导变态反应性炎症的情况。虽然存在抗变态反应剂、免疫抑制剂等非特异性的治疗方法, 但特异性地抑制 IL-18 的技术还没有开发。

迄今为止制作的抗 IL-18 抗体, 是将小鼠的抗体人型化后的物质,

因而不能成为可用于临床的抗体药品。

5 本发明的抗体，是对于诱导天然型特异性（IL-18 依赖性疾病）的 IL-18 的源自人的人抗人 IL-18 单克隆抗体（完全人型的抗体）。迄今为止，对于人 IL-18 的完全人型的抗体，还没有开发出来，本发明的抗体是国际唯一的。将该抗体适用于临床中，也不会显示出如小鼠抗体那样的抗原性。因此，该抗体可以用作没有副作用的优良的抗体药品。由此，可以确立变态反应性疾病、天然型特异性以及哮喘等的新的治疗方法。例如，该抗体可以确立用以过去型的获得性免疫系统的异常为基础的获得型特异性（IgE 依赖性）为标准的治疗方法无效的、以天然型特异性  
10 （IL-18 依赖性）为目标的新的治疗方法。

如后述实施例所示，该抗体在各种体外系统中抑制 IL-18 的活性。特别是，该抗体具有抑制从通过抗原和 IL-18 的刺激而产生的 Th1 细胞中产生 Th1 细胞因子和 Th2 细胞因子的功能。该功能从不损害 IL-12 的作用方面是很重要的。

15 因此，上述免疫疾病的治疗药物，作为现在疑难病之一的变态反应性炎症的治疗目标，起到重要的作用。进而，上述免疫疾病的治疗药物可用于创制与过去的变态反应性治疗药物完全不同的新型治疗药物。

如上所述，IL-18 刺激 Th1 细胞，并诱发支气管哮喘。

20 另外，IL-18 不仅从树枝状突起细胞、巨噬细胞等免疫系统的细胞中产生，还从皮肤角质形成细胞、肠道上皮细胞、气管上皮细胞等各种非免疫系统的细胞中产生。

另外，IL-18 在 IL-12 的存在下，从各种免疫系统或非免疫系统的细胞中诱导 IFN- $\gamma$  的产生。另一方面，IL-18 在没有 IL-12 的条件下，从 NKT 细胞、T 细胞、NK 细胞中诱导 IL-4、IL-13 等 Th2 细胞因子（从  
25 辅助 T2 中产生的细胞因子）产生，并抗原非特异性地诱导 IgE 的产生。

另外，IL-18 刺激受到抗原刺激的 Th1 细胞，不仅增强属于 Th1 细胞因子的 IFN- $\gamma$  的产生，还诱导属于 Th2 细胞活素的 IL-9、IL-13、以

及作为代表性的化学因子 IL-8 的产生。

5 另外，IL-18 通过经鼻与 OVA 一起给药（给药 IL-18 和 OVA）至移入了 OVA 特异性 Th1 型记忆 T 细胞的小鼠中，可以诱发 Th1 型的支气管哮喘，该病的特征为，在肺泡和间质内出现中性粒细胞·淋巴细胞·巨噬细胞·嗜酸粒细胞很强的浸润图像、并有气管过敏。

另外，IL-18 可以在不依赖于抗原/IgE 的条件下，直接刺激肥大细胞及嗜碱粒细胞。其结果诱导各种细胞因子及化学传递物质的产生，并诱导天然型特异性（IL-18 依赖性炎症）。

10 Th2 细胞依赖性的哮喘可以通过抗 IL-5 抗体或抗 IL-13 抗体而抑制。但是，对于受抗原和 IL-18 刺激的 Th1 细胞诱导的哮喘，用这些抗体的治疗是无效的。本发明的抗体，对于用上述抗体治疗无效的哮喘的治疗是有效的。即，本发明的抗体对于由 IL-18 诱导的哮喘（以感染为原因而发病的哮喘）有效。

15 本发明包括发现了与 IL-18 相关的哮喘的病症，并且在确立了用以过去的获得型免疫异常为基础的获得型特异性（IgE 依赖性）为标准的治疗方法无效的天然型特异性（IL-18 依赖性）为目标的新的治疗方法方面是很重要的。

20 另外，本发明的抗体为，对于在将天然免疫系统和获得免疫系统结合方面起到重要作用的人 IL-18 的人 IL-18 单克隆人抗体（抗人 IL-18 抗体）。

该抗体提供用以过去的获得型免疫系统的异常为基础的获得性特异性（IgE 依赖性）为标准的治疗方法无效的、天然型特异性（IL-18 依赖性）为目标的新的治疗方法。

25 该抗体不仅提供对于特异性皮炎疾病的新的治疗方法，还提供对于哮喘、鼻炎和其他的变态反应性疾病的新的治疗方法。特别是，IL-18 刺激 Th1 细胞，使难治性支气管哮喘发病。因此，感染于气管上皮，从而显示诱导 IL-18 从气管上皮细胞中产生的作用的病原体，成为支气管

哮喘的病因。因此，该抗体成为对于因感染而发病的哮喘有效的治疗药物。

5 本发明所涉及的抗体及其片断，是阻碍向人 IL-18 的受体结合的人抗人 IL-18 抗体及其片断。因此，可以用作以人 IL-18 为病因的各种炎症性疾病的治疗药物（治疗方法）或者预防药物（预防方法）。

另外，本发明例如如后述实施例所示，在 scFv 抗体中，通过以 CDR 的高级结构为基础来设计低分子化合物，从而提供依赖于 IL-18 的低分子药品（化学合成药物）的开发中重要的方法。

10 本发明得到的人抗 IL-18 抗体，对于以感染为契机而恶化的特异性皮炎、难治性支气管哮喘的治疗是有效的。

本发明的人抗 IL-18 抗体，可以确立对于不是变态反应原/IgE 为病因的 IL-18 依赖性炎症（例如，天然型特异性）的新的治疗方法。

15 如前所述，本发明的人抗 IL-18 抗体，阻碍向 IL-18 受体的结合。因此，该抗体对于治疗和预防如上所述的以 IL-18 为病因而发病的各种炎症性疾病有效。

在本发明中，从提示了人单链抗体（scFv）的噬菌体表面展示文库中，成功地分离出与 IL-18 特异性结合的 scFv。该单链抗体也会特异性地阻碍向 IL-18 受体的结合。

20 以下，通过实施例详细地说明本发明。本发明并不限于以下实施例所述的内容，在本发明的范围内可作各种变更。

#### [ 实施例 1 ]

##### (1-1) 构建源自健康人的噬菌体文库

25 噬菌体文库的构建，是参考了由 J.D. Marks 等（J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991）所报告的方法，以源自 20 名健康人的末梢血的淋巴细胞为起始材料来实施的。构建的  $V_{H(\gamma)}-V_K$ 、 $V_{H(\gamma)}-V_\lambda$ 、 $V_{H(\mu)}-V_K$ 、 $V_{H(\mu)}-V_\lambda$  的各亚文库，被评价为分别具有  $1.1 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $8.4 \times 10^7$ 、 $5.3 \times 10^7$

克隆的多样性。

### (1-2) 淘选

5 将人 IL-18 溶解于 1ml 的 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 中, 在 35mm 的培养皿(岩城) 中, 在 4°C 下反应一晚, 将其固定。接着, 用 0.5% 的明胶/PBS 在 20°C 进行 2 小时的阻断, 然后用 0.1% Tween20-PBS 洗涤 6 次。在其中加入 0.9ml (1×10<sup>12</sup>tu/ml) 的源自健康人的抗体噬菌体文库(提示单链可变区片断(scFv)的噬菌体液), 并使其反应。

10 接着, 将该反应液在 0.1% Tween20-PBS 中洗涤 10 次后, 加入 1.0ml 的甘氨酸缓冲液(pH2.2), 从而溶出与 IL-18 结合的 scFv 提示噬菌体。在溶出的噬菌体中, 加入 1M Tris (hydroxymethyl)aminomethane-HCl, (pH9.1) 来调整 pH 后, 将其感染到对数增殖期的大肠杆菌 TG1 中。将感染后的 TG1 以 3000×g 进行 10 分钟的离心分离, 除去上清液, 用 200μL 的 2×YT 的培养基悬浊, 并播种在 SOBAG 板上(含有 2% 葡萄糖、100μg/ml 的阿莫西林的 SOB 板), 在 30°C 的孵卵器中培养一晚。将生成的菌落加入适量的 2×YT 的培养基中, 用细胞培养板(Costar)进行悬浊并回收。

15 将 50μL 该 TG1 液植于 30ml 的 2×YTAG 培养基中, 用辅助噬菌体进行植入, 制备出筛选后的噬菌体文库。分别对源自健康人的噬菌体文库 V<sub>H(γ)</sub>-V<sub>K</sub>、V<sub>H(γ)</sub>-V<sub>λ</sub>、V<sub>H(μ)</sub>-V<sub>K</sub>、V<sub>H(μ)</sub>-V<sub>λ</sub>, 使用上述固化 IL-18 的板进行 2 次淘选。在第 2 次淘选后, 从 SOBAG 板上任意提取克隆, 进行 scFv 表达的确 20 确认以及用 ELISA 进行 IL-18 特异性的确认(筛选)和碱基序列的分析。

### (1-3) 用 ELISA 对 IL-18 进行筛选

25 用于筛选分离的克隆的 ELISA, 是将人 IL-18 固化在 ELISA 板上来进行的。具体而言, 将 2μg/ml 的人 IL-18、2.5μg/ml 的人血清白蛋白(HSA)加入 40μL/well 的 ELISA 板(Nunc)中, 4°C 下静置 16 小时, 进行固化。将含有 0.5% BSA、0.5% 明胶及 5% 脱脂乳的 PBS 溶液 400μl/well 放入 ELISA 板中, 将固化的板在 4°C 下静置 2 小时, 进行阻断。

接着, 在该 ELISA 板上, 加入含有 scFv 提示噬菌体的样品溶液 40 $\mu$ L/well 并使其反应, 然后弃去样品溶液用洗涤液洗 5 次。接着, 在该固化的 scFv 噬菌体中, 加入生物素标记的 M13 单克隆抗体(Pharmacia biotech), 将碱性磷酸酶脂 (AP) 标记的抗小鼠 IgG 抗体作为二次抗体使其反应。用洗涤液将该反应液洗 5 次后, 加入 50 $\mu$ L/well 的显色基质液 (含有 1g/ml p-nitrophenyl phosphate (Wako)、10% 二乙醇胺 (Wako) 的 PBS 溶液)、遮光、在室温 ~ 37 $^{\circ}$ C 下, 使其显色 5 ~ 10 分钟。用多板自动计数仪 NJ-2001 (Inter Med) 测定 405nm 的吸光度, 结果可以确认所评价的克隆全部对 IL-18 是特异性的。其结果如图 1 所示。

#### 10 (1-4) 克隆的序列分析

接着, 用 Dye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems) 来决定分离的克隆的 scFv 基因的 V<sub>H</sub> 链及 V<sub>L</sub> 链基因的 DNA 碱基序列, ELISA 及序列分析的结果为分离的克隆分为 2 种 (h18-40、h18-108)。

15 序列号 1 及序列号 7 中分别表示克隆号 h18-108 的 V<sub>H</sub> 链及 V<sub>L</sub> 链基因的碱基序列。另外, 序列号 3 及序列号 8 中表示该 V<sub>H</sub> 链及 V<sub>L</sub> 链的氨基酸序列。

#### (1-5) 人抗 IL-18scFv 的表达与精制

20 从前述(1-2,3)中分离的人 IL-18 中反应的 scFv 克隆(h18-40·h18-108)中回收质粒 DNA, 按照常用的方法将大肠杆菌 HB1251 进行转化, 在含有 2% 葡萄糖和 100 $\mu$ g/ml 的阿莫西林的 2 $\times$ YT 的培养基中, 将这些大肠杆菌提前一夜培养后, 将一部分移植到不含葡萄糖的 2 $\times$ YT 的培养基中, 加入终浓度为 1mM 的 IPTG、100 $\mu$ g/ml 的阿莫西林, 再培养一晚, 从而进行 scFv 的表达诱导。培养结束后, 离心回收菌体, 悬浊于含有 25 1mM EDTA 的 PBS 中, 并将菌体置于冰中 30 分钟。接着, 以 8900 $\times$ g 离心 30 分钟, 回收上清液, 用 0.45 $\mu$ m 的过滤器过滤后, 由胞质区分将 scFv 作为用于精制的起始材料。

将这样制备而得的用于精制的起始材料, 通过用抗 E tag 抗体的亲

和性色谱法，按照常用的方法来精制。用 PBS 透析后，用去除内毒素柱 Detoxi-gel (PIERCE 公司) 按照所附说明书去除内毒素。用分子量分离 10000 的 Centricon (Amicon) 浓缩后，用  $0.45\mu\text{m}$  的过滤器过滤后，得到精制的目标物。

5 (1-6) 精制的 scFv 对 IL-18 的结合性。

接着，用 ELISA 法测定精制的 scFv (h18-40·h18-108) 对 IL-18 的结合性。在将用 PBS 调制为  $0.5\mu\text{g/ml}$  的人 IL-18 固化的 96 孔板 (NUNC. MAXISORP) 上，加入  $100\mu\text{L}$  的精制 scFv，并使其在  $37^\circ\text{C}$  下反应 1 小时。用  $0.05\%$  Tween-PBS (以下也略称为 PBST) 洗涤 5 次后，进而与过氧化物酶标记的抗 E tag 抗体在  $37^\circ\text{C}$  下反应 1 小时。用 PBST 洗涤 5 次后，加入显色基质液使其呈色，测定  $405\text{nm}$  的吸光度，评价其结合性。其结果如图 2 所示。如图中所示，2 种抗体 (h18-40·h18-108) 都与 IL-18 特异性地结合。

15 (1-7) 对从由 IL-18 刺激的人骨髓单核细胞 KG-1 细胞中产生 IFN- $\gamma$  的作用

使 IL-18 ( $20\text{ng}/100\mu\text{L}$ ) 与 scFv 反应后，加入到 KG-1 细胞 ( $3\times 10^5$  cells/ $100\mu\text{L}$ ) 培养液中，用 ELISA (Biosource) 对 24 小时后的培养上清液中的 IFN- $\gamma$  的量进行测定。通过 KG-1 细胞的 IFN- $\gamma$  的产生来调查与 scFv (h18-40·h18-108) 相关的 IL-18 的阻碍活性，结果在对照组及 scFv (h18-40) 组中，未见活性被阻碍，而 scFv (h18-108) 浓度依赖性地阻碍了 KG-1 细胞的 IFN- $\gamma$  的产生。其结果如图 3 所示。

(1-8) 阻碍 IL-18 与人骨髓单核细胞 KG-1 细胞的结合的作用

使生物素标记的 IL-18 ( $400\text{ng}/50\mu\text{L}$ ) 与 scFv (对照组或 h18-108) 进行反应后，加入到 KG-1 细胞 ( $1\times 10^6$  cells/ $50\mu\text{L}$ ) 培养液中，与 phycoerythrin 标记的抗生蛋白链菌素 (Becton Dickinson) 进行反应，通过流式细胞计数仪 (Beckman Coulter) 进行解析。

如图 4 及图 5 所示，通过流式细胞计数仪研究了 scFv (h18-108)

是否阻碍 IL-18 向 KG-1 细胞的结合, 结果发现对照组 scFv 对于 IL-18 的结合未见有变化(图 4)、h18-108 组则浓度依赖性地阻碍了 IL-18 向 KG-1 细胞的结合(图 5)。

#### (1-9) scFv (h18-108) 的特性

- 5 关于显示出对于人 IL-18 特异性的 scFvh18-108, 用免疫印迹法检测的结果如图 6 所示, 分子量约为 30kDa。另外, 进行凝胶过滤色谱法的结果如图 7 所示, 从分离模式可以确认有 9 成形成了单体的 scFv, 剩余的 1 成形成了二聚体。

#### [ 实施例 2 ]

- 10 在实施例 2 中, 研究了从由 IL-18 刺激的 Th1 细胞及 Th2 细胞中产生的细胞因子。

#### (2-1) 试剂

- 15 重组人 IL-2、IL-4、IL-12 以及 IFN- $\gamma$  是由 R&D (Minneapolis, MN) 得到的。重组 IL-18 是由 MBL 公司(日本名古屋)得到的。FITC(异硫氰酸荧光素)-抗人 CD4mAb(单克隆抗体)或 CyChrome(细胞色素)-抗人 CD4mAb、FITC-抗人 CD45RAmAb、FITC-抗人 IFN- $\gamma$ mAb、PE-抗人 IL-13mAb 以及抗人 IL-12mAb 是由 Pharmingen (San diego, CA) 得到的。PE-抗人 IL-18RAmAb (克隆 70625)、抗人 CD3 $\epsilon$ mAb 以及抗人 IL-4mAb 是由 R&D 得到的。

- 20 (2-2) 制作在体外的 Th1 细胞或 Th2 细胞

- 25 从健康供者的末梢血中分离出幼稚 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>T 细胞 (CD4 及 CD45 阳性 T 细胞) (K. Nakanishi et. al., Int. Immunol. 12:151.)。将 PHA (1 $\mu$ g/ml)、IL-12 (50 $\mu$ g/ml) 以及中和抗 IL-4mAb (500ng/ml) 或者 PHA (1 $\mu$ g/ml)、IL-4 (200 $\mu$ g/ml) 以及中和抗 IL-12mAb (10 $\mu$ g/ml) 同时在 24 孔板中培养 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>T 细胞 ( $1 \times 10^6$ /ml), 由此来制作 Th1 细胞及 Th2 细胞。将如此刺激的 T 细胞, 在第 3 天洗涤, 在培养基中加入 100U/ml 的 IL-2, 再培养 4 天。

### (2-3) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞的分离

为了分离 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞, 将分极化了的 Th1 细胞与固化的 CD3 (5 $\mu$ g/ml) 及 IL-2 (100U/ml) 一起在 24 孔板中培养。接着, 在培养物中, 进行生存的 Th1 细胞使 IFN- $\gamma$  丰富表达的处理。3 小时后, 只将附着  
5 着的细胞回收, 与抗 CD45/抗 IFN- $\gamma$  二重特异性抗体 (Miltenyi Biotec) 一起, 在冰上培养 5 分钟。将处理过的细胞移入底部为圆锥状的 50ml 的试管中, 将该试管置于 37 $^{\circ}$ C 的水浴中, 在 20ml 的温的培养液中以  $5 \times 10^4$  细胞/ml 的浓度来培养细胞。30 分钟后, 用含有冷却的 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸缓冲溶液 (PBS) 洗涤细胞。用 PE-抗人 IFN- $\gamma$  来检测  
10 在细胞表面被捕捉到的 IFN- $\gamma$ 。另外, 通过使用自动 MACS 的抗 PE 微珠, 确实地将表面上表达 IFN- $\gamma$  的 Th1 细胞单独分离出来。

### (2-4) 在体外的培养

将重新分极化了的 Th1 细胞及 Th2 细胞, 以及从重新分极化了的 Th1 细胞中选出的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>细胞, 在各种浓度的 IL-18 的存在下, 在含有固化  
15 抗 CD3 (5 $\mu$ g/ml) 的  $1 \times 10^5$ /0.2ml/孔中再培养。从培养开始 6 小时起经过 72 小时后, 回收上清液, 用 ELISA (R&D) 测定 IL-4、IL-5、IL-8、IL-13、IFN- $\gamma$  以及 GM-CSF 的含有量。

### (2-5) 流式细胞测量法

将分极化了的 Th1 细胞 ( $1 \times 10^6$ /ml) 在 24 孔板中, 通过只有固化的  
20 CD3, 以及通过固化 CD3 和 IL-18 (100ng/ml), 进行 72 小时的再刺激。最后的 3 小时, 为阻碍细胞因子的分泌, 添加了 2 $\mu$ M 的莫能菌素。通过细胞质内的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>和/或 IL-13<sup>+</sup>细胞的染色的分析, 是按照文献 (K. Nakanishi et. al., J. EXP. Med., 2004, 199, 535-545.) 来进行的。为测定 Th1 细胞及 Th2 细胞上的 IL-18R $\alpha$  的表达量, 用人 IgG 进行 FcR  
25 的阻断后, 将各细胞用 FITC-抗人 CD4、及 PE-抗人 IL-18R $\alpha$  链 mAb 或对照的 PE-小鼠 IgG1mAb, 在含有 1% FCS 的 PBS 中, 在 4 $^{\circ}$ C 下培养了 30 分钟。将如此得到的样品, 用 FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, CA) 进行了分析。

## (2-6) 实验结果

按照(2-2)~(2-5), 将从健康供者的末梢血中单独分离出来的幼稚 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>T 细胞, 在体外和在诱导 Th1 细胞及 Th2 细胞的条件下, 连续刺激了 7 天。

5 其结果如图 8 所示。在图 8 中显示了只通过固化抗 CD3 刺激的结果( $\alpha$ -CD3) 与通过固化抗 CD3 及 IL-18 刺激( $\alpha$ -CD3+ IL-18) 的结果。

如图 8 所示, 在使用固化抗 CD3 的试验中, Th2 细胞产生了相当多的 IL-4、IL-5 以及 IL-13, 但没有产生 IFN- $\gamma$ 。另外, Th1 细胞主要产生了 IFN- $\gamma$ 、IL-8 和 GM-CSF。

10 另外, 如图 8 所示, 用固化抗 CD3 加上 IL-18 来刺激, 从 Th2 细胞中产生的 Th2 细胞因子没有增加。与此相对, 通过该处理, 从 Th1 细胞中产生的 IFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13 以及 GM-CSF 显著增加。

15 Th1 细胞与 Th2 细胞对于 IL-18 的应答的区分的根本机制, 可以主要通过向 Th1 细胞上的 IL-18R $\alpha$  链的表达的选择性来说明。图 9 是表示通过上述刺激, 各细胞表面的 IL-18R $\alpha$  链的表达水平的图。如图 9 所示, 人 Th1 细胞表达高水平的 IL-18R $\alpha$  链, 与此相对, Th2 细胞的 IL-18R $\alpha$  链的表达量非常少。因此, 表达 IL-18R 的 Th1 细胞显示对抗 CD3 及 IL-18 产生应答, 并产生 Th1 细胞因子、Th2 细胞因子以及 GM-CSF 的性质。

20 同时, 对受到固化抗 CD3 刺激的 Th1 细胞的根据 IL-18 的给药量的应答性(IFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13 的产生)进行了研究。因此, 将 Th1 细胞通过各种浓度的 IL-18(~500ng/ml)、在固化抗 CD3 存在的条件下, 刺激了 3 天。图 10 为表示 IL-18 的用量与从 Th1 细胞产生的细胞因子的量之间的关系的图。如图 10 所示, Th1 细胞在 IL-18 存在的条件下, 按照用量的需求, 增加 IFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13 的产生。将受到抗 CD3 刺激的  
25 Th2 细胞即使通过 IL-18 进行进一步的刺激, 细胞因子产生的应答也并不增加。因此, 如图 10 所示, 只有人 Th1 细胞对抗原和 IL-18 的刺激产生应答, 显示出不仅产生 Th1 细胞因子、Th2 细胞因子, 还产生 GM-CSF、IL-8 的特有的作用。

这样, IL-18从分极化的人Th1细胞中诱导产生了IFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13以及GM-CSF。

接着, 对抗CD3和IL-18刺激后的细胞因子的产生速度问题进行了研究。图11为表示Th1细胞刺激后的培养时间, 和从Th1细胞中产生的细胞因子的量之间的关系的图。如图11所示, Th1细胞在刺激后比较早地开始产生IFN- $\gamma$ 。用抗CD3刺激的细胞, 24小时后才检测出大量的IFN- $\gamma$ 。与此相对, 在该时刻检测不出IL-8和IL-13, 但在从刺激开始的72小时后, 检测出了IL-8及IL-13。因为通常是在48小时进行测定, 当初认为Th1细胞只产生IFN- $\gamma$ 。但是, 如图11所示, 在72小时后, 可以检测出IL-8和IL-13。对被抗CD3刺激的Th1细胞, 进一步用IL-18刺激, 更早、更多地产生了上述的细胞因子, 这是最重要的。这样, IL-18的刺激促进和增加从Th1细胞中产生IFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13。

如上所述, IL-18的刺激按照用量需求诱导IFN- $\gamma$ 、IL-13从受到抗CD3的刺激Th1细胞中产生出来(图10)。但是Th0细胞, 在对抗原和IL-18的应答中, 有必要排除产生IFN- $\gamma$ 、IL-13的可能性。因此, 为了排除这种可能性, 在受到IL-18刺激的Th1细胞中, 将细胞质IFN- $\gamma$ 和/或IL-13中阳性的CD4<sup>+</sup>细胞的比例, 通过FACS分析进行了研究。其结果如图12所示。

如图12所示, 通过固化抗CD3和IL-18而刺激的人Th1细胞的5.65%是细胞质IFN- $\gamma$ 和IL-13阳性的。但是, 只通过抗CD3处理的Th1细胞的仅1.21%为细胞质IFN- $\gamma$ 和IL-13阳性的。细胞内IFN- $\gamma$ 或IL-13染色的特异性由同种型适合的对照抗体不能被染色而显示出来。进而, 这样的染色用过量的重组人IFN- $\gamma$ 或IL-13进行前处理, 完全被阻碍(没有显示数据)。如此, Th1细胞在受到抗CD3和IL-18的刺激时, 产生了IFN- $\gamma$ 和IL-13。

接着, 就IL-18所致的诱导IL-13从IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1细胞中产生来进行研究。产生IFN- $\gamma$ 的Th1细胞, 在受到抗CD3和IL-18的刺激后, 对产生IL-13的可能性进行研究也是重要的。因此, 将表达IFN- $\gamma$ 的人Th1

细胞中分泌的 IFN- $\gamma$ ，通过固化于该 Th1 细胞表面的抗 IFN- $\gamma$  抗体得到而精制。

图 13 为表示在受到抗 CD3 抗体刺激的 Th1 细胞中的，IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞的比例和 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞的阳性区分例的图。如图 13 所示，受到抗 CD3 抗体刺激的 Th1 细胞的 23.1%，在细胞表面表达了 IFN- $\gamma$ 。接着，将在细胞表面表达 IFN- $\gamma$  的 Th1 细胞 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞)，用自动 MACS 进行阳性区分。可以精制出 99% 纯度的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Th1 细胞。将得到的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞与抗 CD3 和 IL-18 一起培养，进行刺激。图 14 为表示通过该刺激从 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1 细胞中产生细胞因子的量的图。如图 14 所示，通过该刺激，IFN- $\gamma$ 、IL-8 和 IL-13 的产生得到很大的增加，但 IL-4 的产生没有增加。因此，表达高度精制的 IFN- $\gamma$  的活的人 Th1 细胞，在其细胞表面很强烈地表达 IL-18R $\alpha$  链，在受到抗 CD3 和 IL-18 的刺激后，可以得出产生 IFN- $\gamma$ 、IL-8 和 IL-13 的结论。该结果表明，人 Th1 细胞在其 TCR (T 细胞抗原受体) 上抗原结合，进而 IL-18 对其作用，受到刺激的 Th1 细胞增强 IFN- $\gamma$ 、IL-8 和 IL-13 的产生。在此，图 8、10、11、13 及 14 是独立的 4 次实验的代表值，在各实验中得到了同样的结果。

如上所述，Th1 细胞在受到抗原和 IL-18 的刺激后，产生 Th1 细胞因子 (IFN- $\gamma$  等)、Th2 细胞因子 (IL-9, IL-13)、化学因子 (RANTES、MIP-1 $\alpha$ ) 以及 GM-CSF。对支气管上皮的 IFN- $\gamma$  和 IL-13 的刺激，诱发最严重的支气管哮喘。因此，通过给药实施例 1 的 scFv 来阻碍 IL-18 的活性，使治疗重症支气管哮喘成为可能。

另外，用于实施本发明的最佳实施方式中没有述及的具体实施方式或实施例，归根结底是明确本发明的内容的，并不是只限于这样的具体例作狭义的解释，只要在本发明的精神和所述权利要求的范围内，可以进行各种变更来实施。

(产业上利用的可能性)

如上所述，本发明的对于人 IL-18 的抗体及其片断，是源自人的物质。因而，对于人 IL-18 直接或间接相关的疾病的治疗中，即使进行反

---

复给药或长期给药，也可以发挥提供保持显著疗效和高安全性的治疗药物的效果。

<110> 独立行政法人科学技术振兴机构

<120> 人抗人白介素-18 抗体及其片断和它们的利用方法

<130> A211-04PCT

<150> JP 2003-125948

<151> 2003-04-30

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaggagge ctggggcctc agtgagggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttact agtcactata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg ggtggcaata atcaacccta gtgatggcag aacagactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccgtg accagggaca cgtccgcgag cagtgtctac 240
```

```

tctgcaagg catctggata caccttcaact agtcactata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt ggtggcaata atcaacccta gtgatggcag aacagactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccgtg accagggaca cgtccgcgag cagtgtctac 240
atgggaataa gcagcctgag atctgaggac acggccatgt attactgtgc gagaacagcg 300
cgtggattca gttatgacgac agactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

```

<210> 2

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 2

```

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg agg cct ggg gcc 48

```

```

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

```

```

1           5           10          15

```

```

tca gtg agg gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc act agt cac 96

```

```

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

```

```

20           25           30

```

tat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg gtg 144

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

gca ata atc aac cct agt gat ggc aga aca gac tac gca cag aag ttc 192

Ala Ile Ile Asn Pro Ser Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

cag ggc aga gtc acc gtg acc agg gac acg tcc gcg agc agt gtc tac 240

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Ser Val Tyr

65

70

75

80

atg gga ata agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288

Met Gly Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

gcg aga aca gcg cgt gga ttc agt tat gcg aca gac tgg ggc cag gga 336

Ala Arg Thr Ala Arg Gly Phe Ser Tyr Ala Thr Asp Trp Gly Gln Gly

100

105

110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca

357

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ile Ile Asn Pro Ser Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Ser Val Tyr

65 70 75 80

Met Gly Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Ala Arg Gly Phe Ser Tyr Ala Thr Asp Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser His Tyr Ile His

1

5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Ile Asn Pro Ser Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15



---

gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcagtg gtacttatgt ggtattcggc 300  
 ggagggaccc agctcaccgt ttaggt 327

<210> 8

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 8

tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga caa 48  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aaa aaa tat gct 96  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala  
 20 25 30

tat tgg tac cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg ctg gtg ata tat 144  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

aaa gac agt gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc 192

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

agc tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa 240

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu

65

70

75

80

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt act tat 288

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr

85

90

95

gtg gta ttc ggc gga ggg acc cag ctc acc gtt tta ggt 327

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

100

105

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1

5

10

15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala  
 20 25 30

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

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

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala Tyr

1                      5                      10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1                      5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Val Val

1                      5                      10

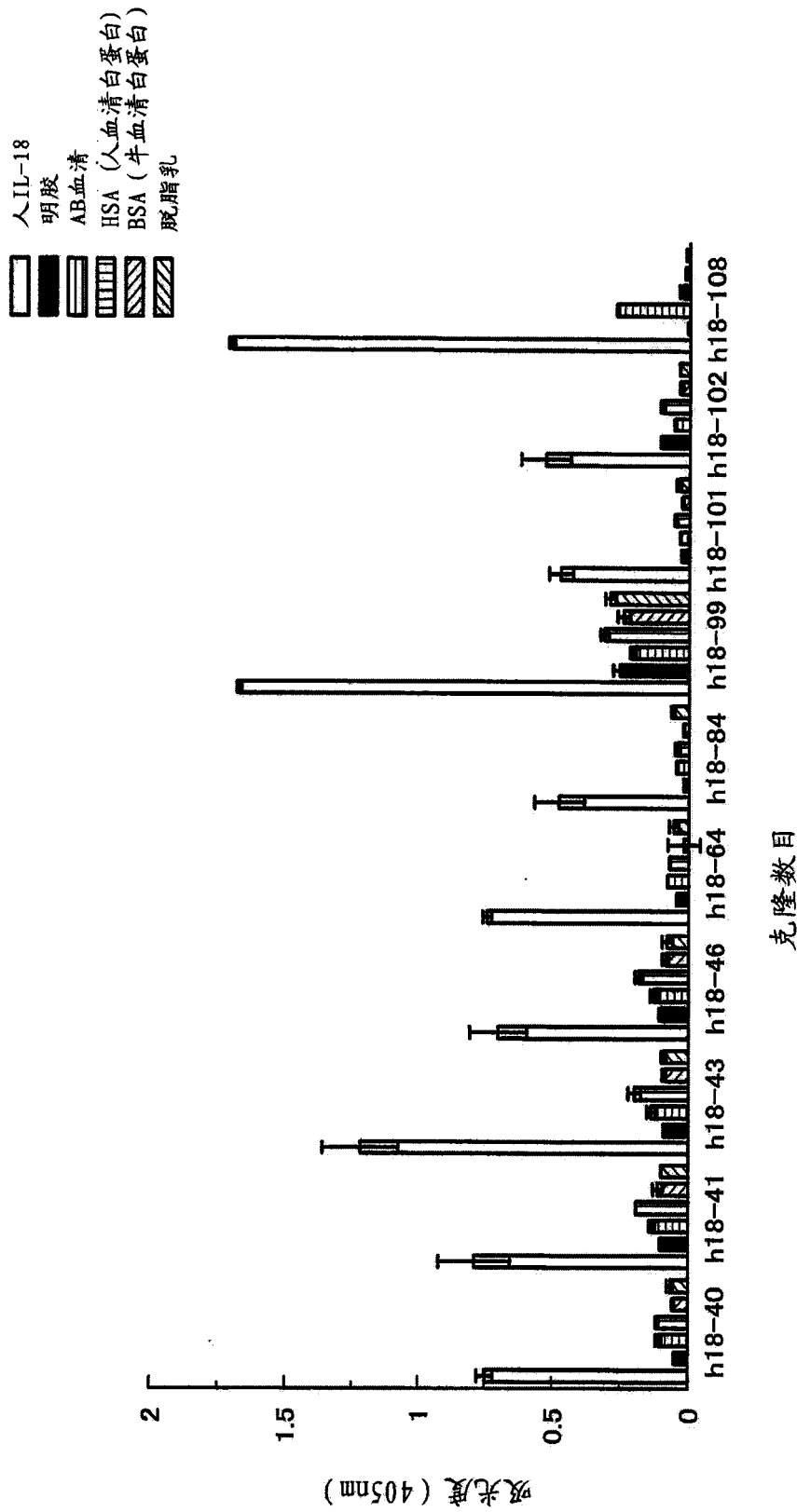


图 1

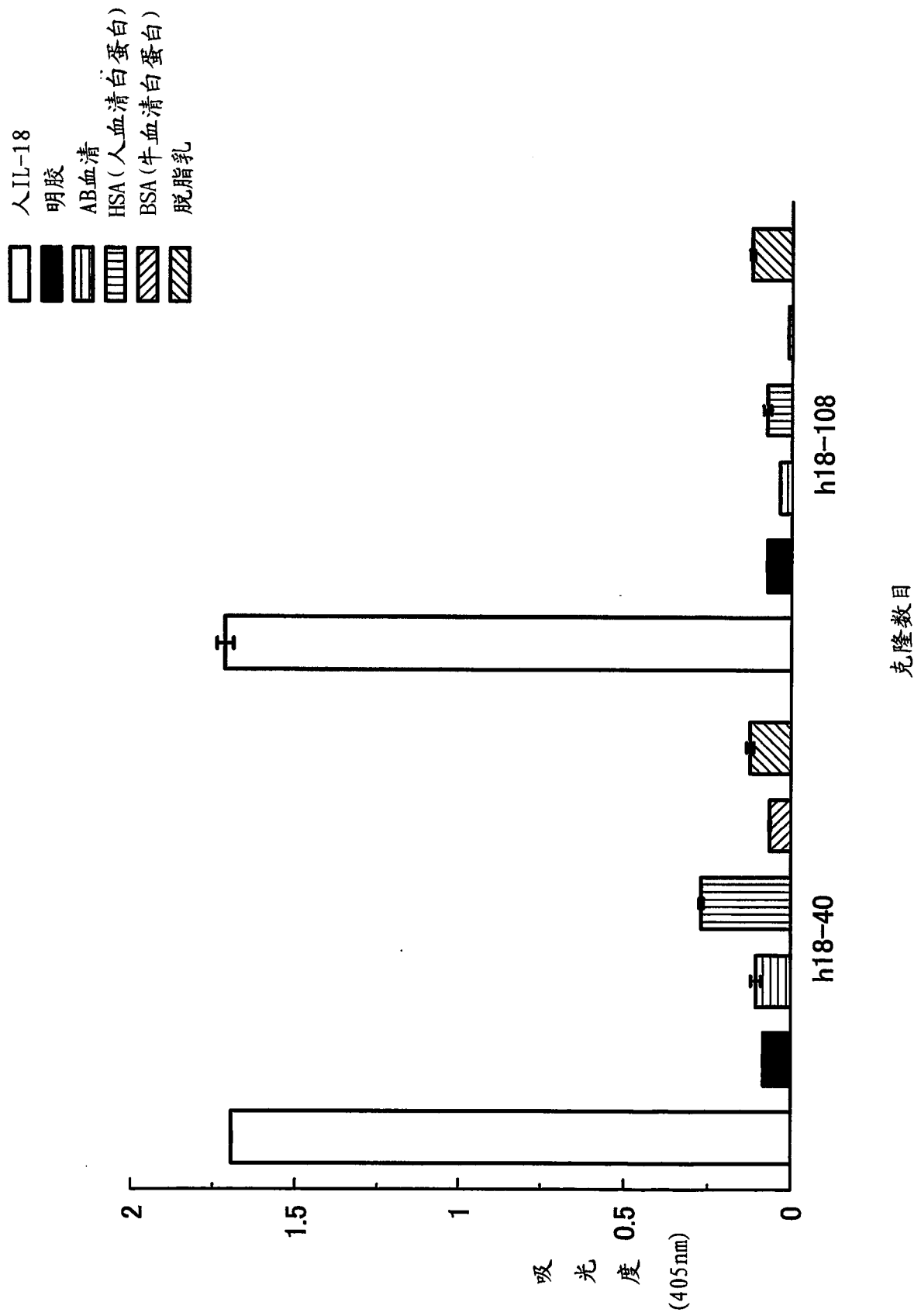


图2

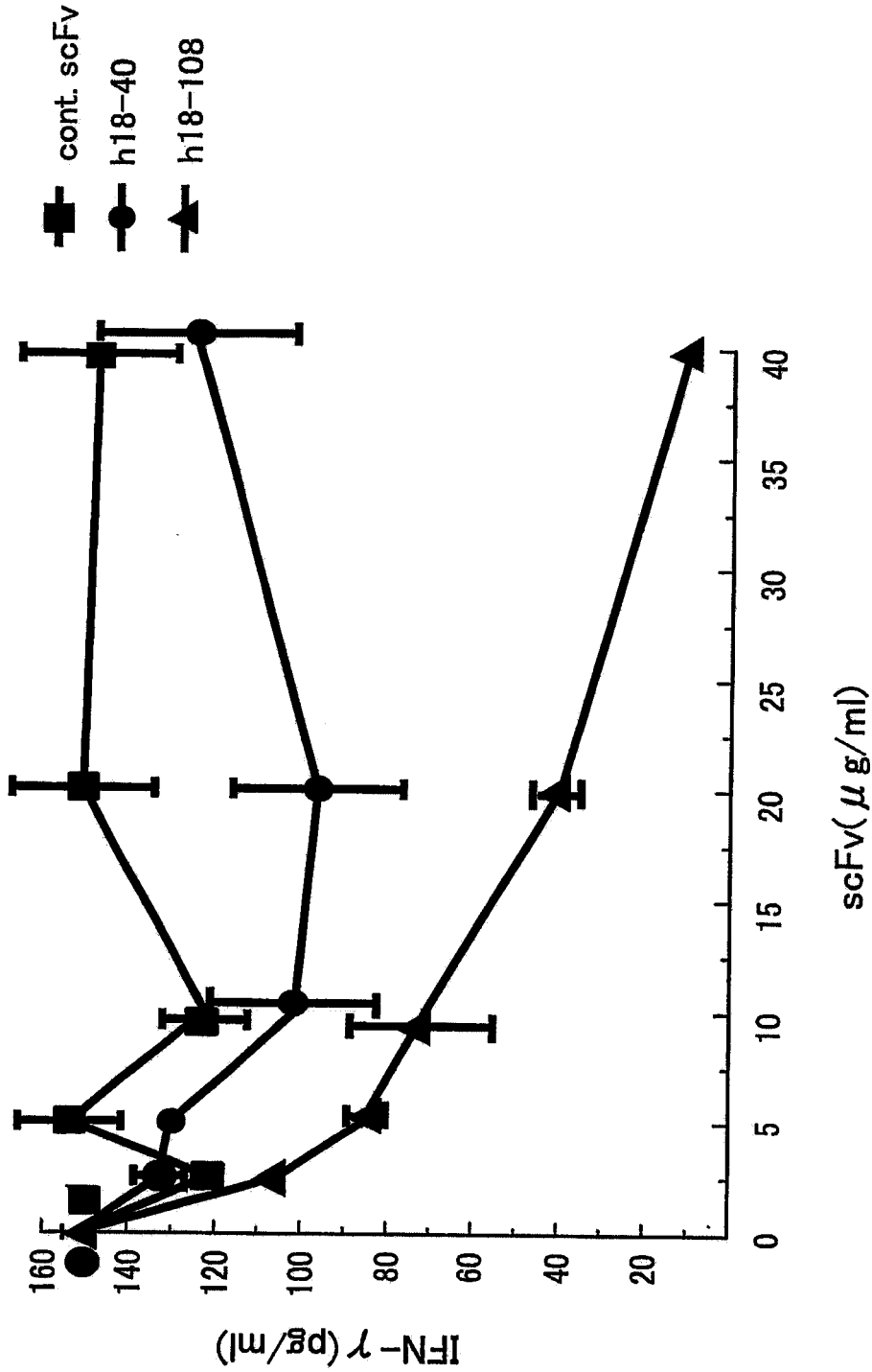


图3

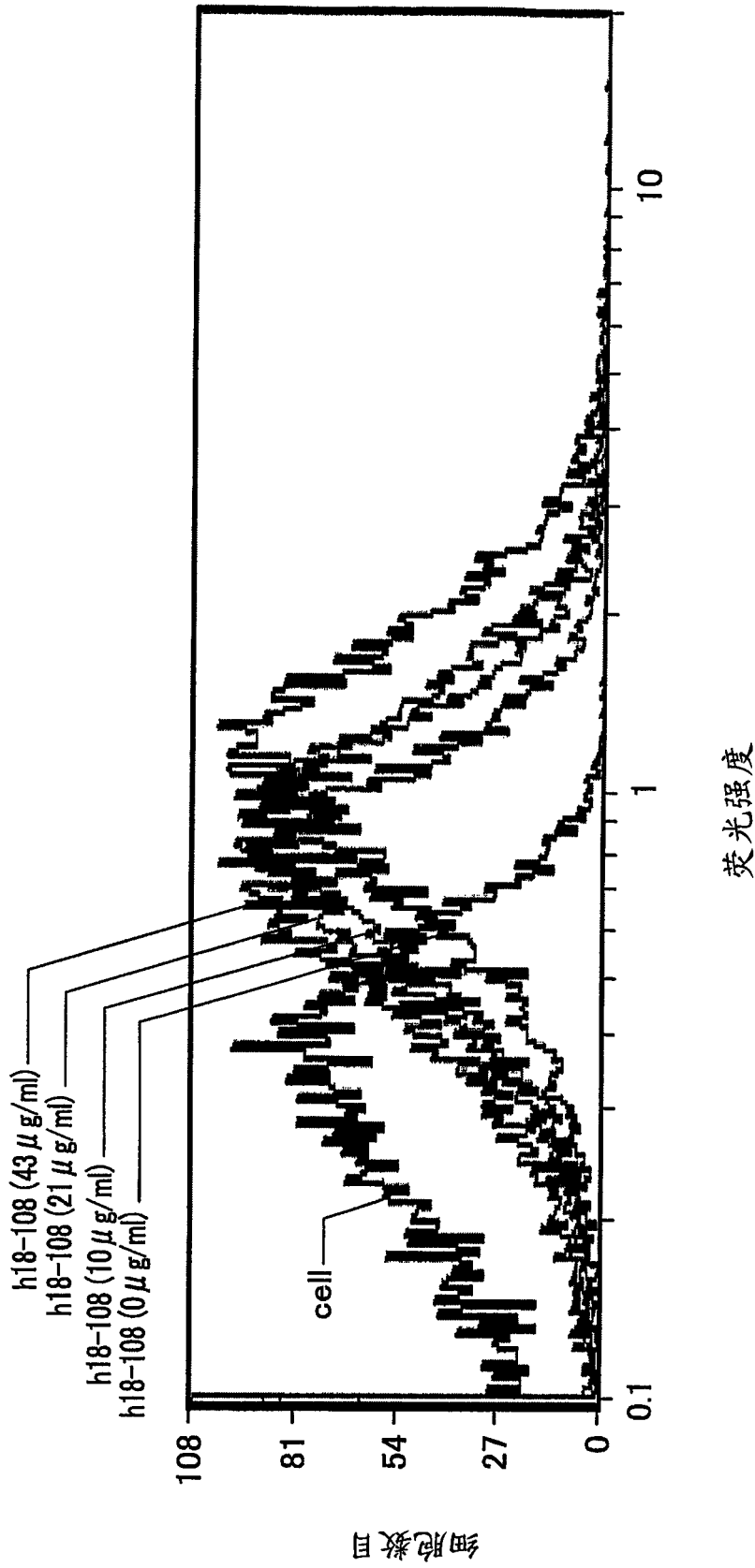
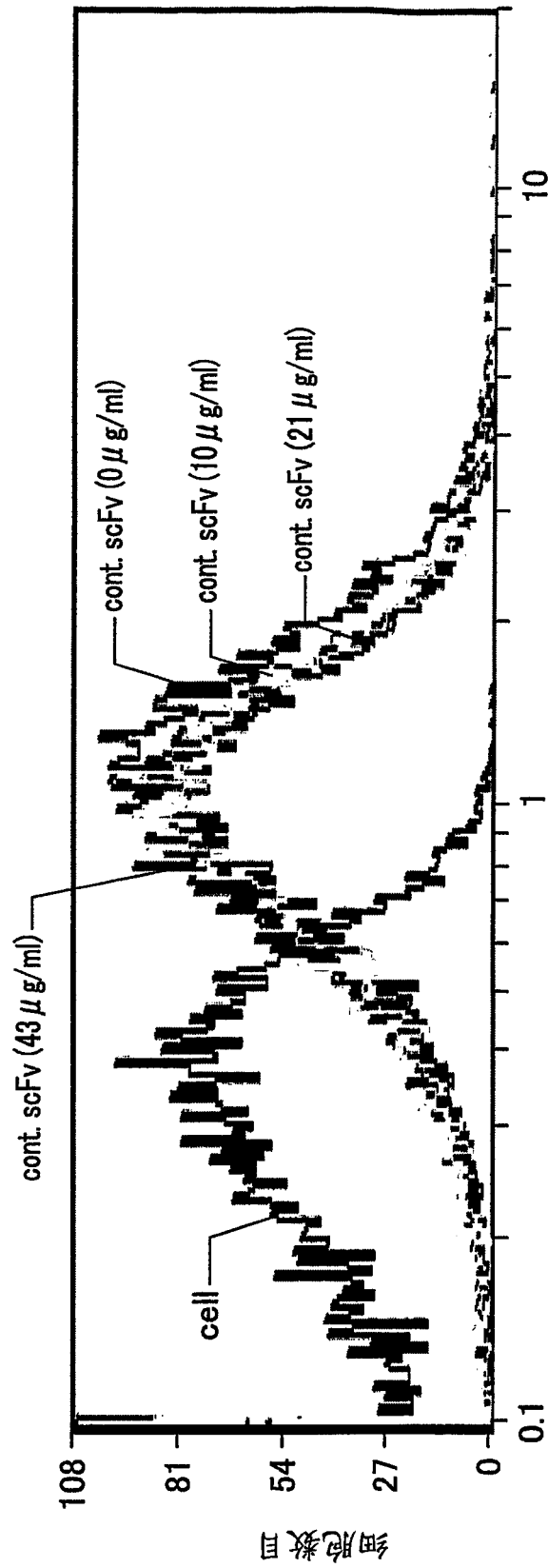


图4



荧光强度

图5

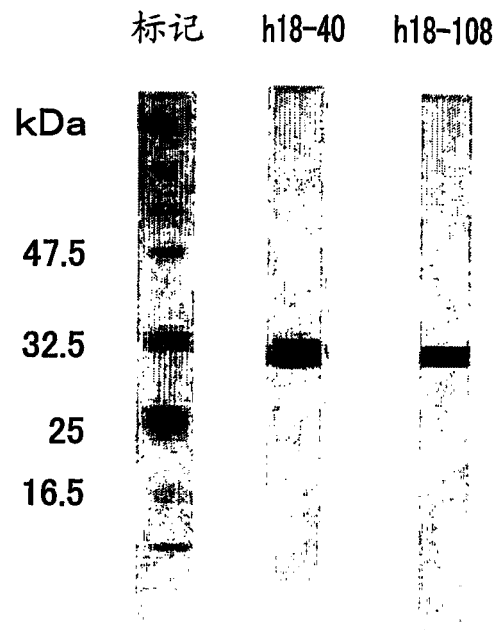


图6

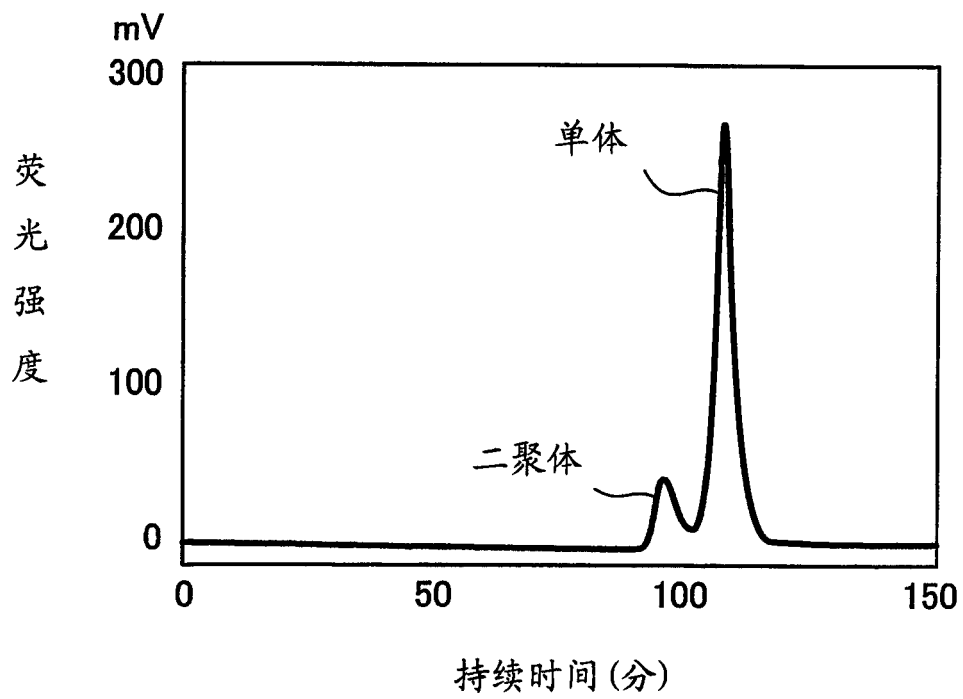


图7

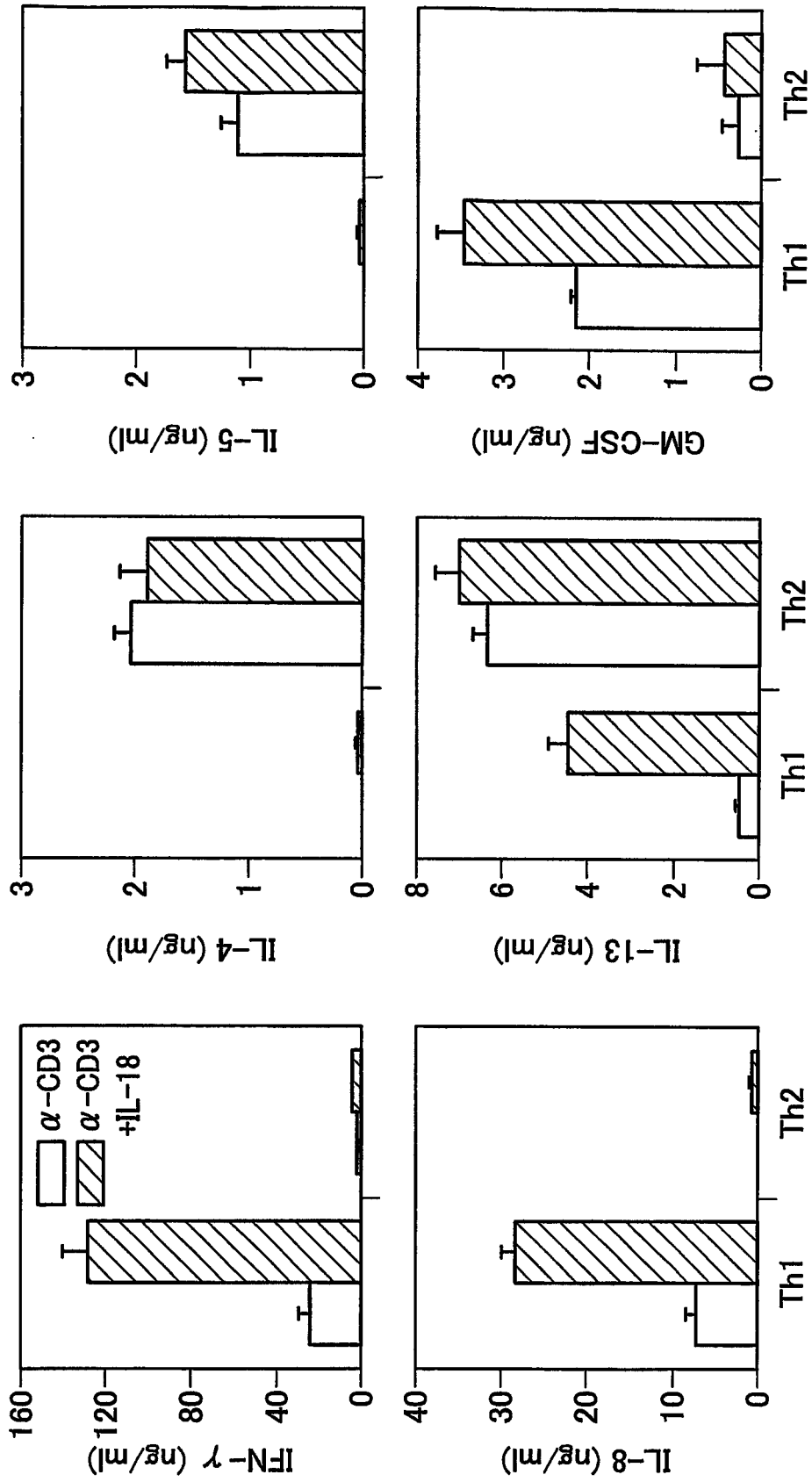


图8

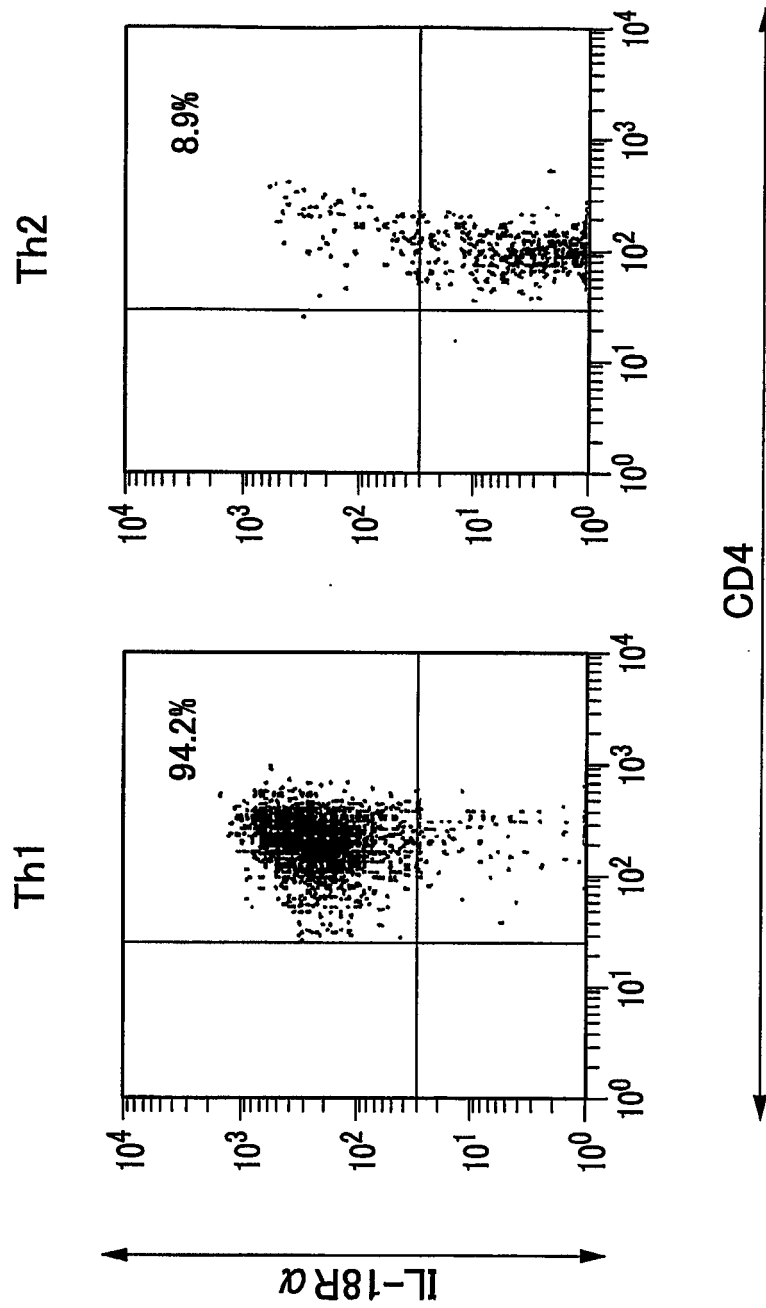


图9

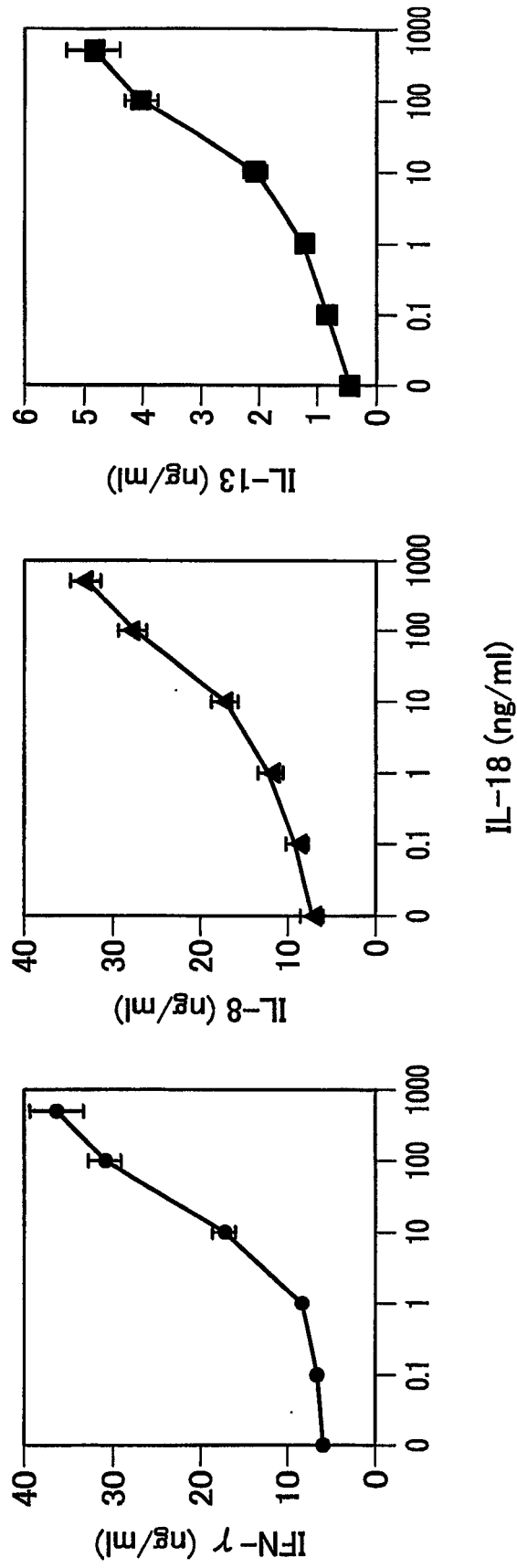
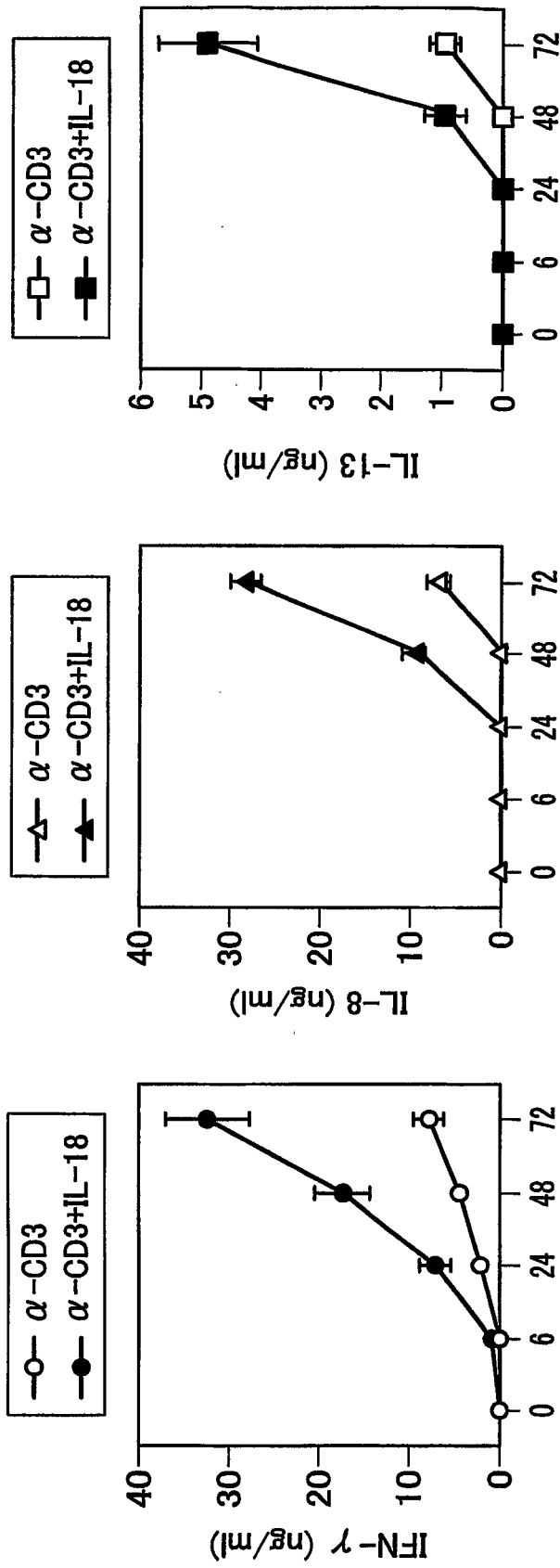


图10



培养时间 (h)

图11

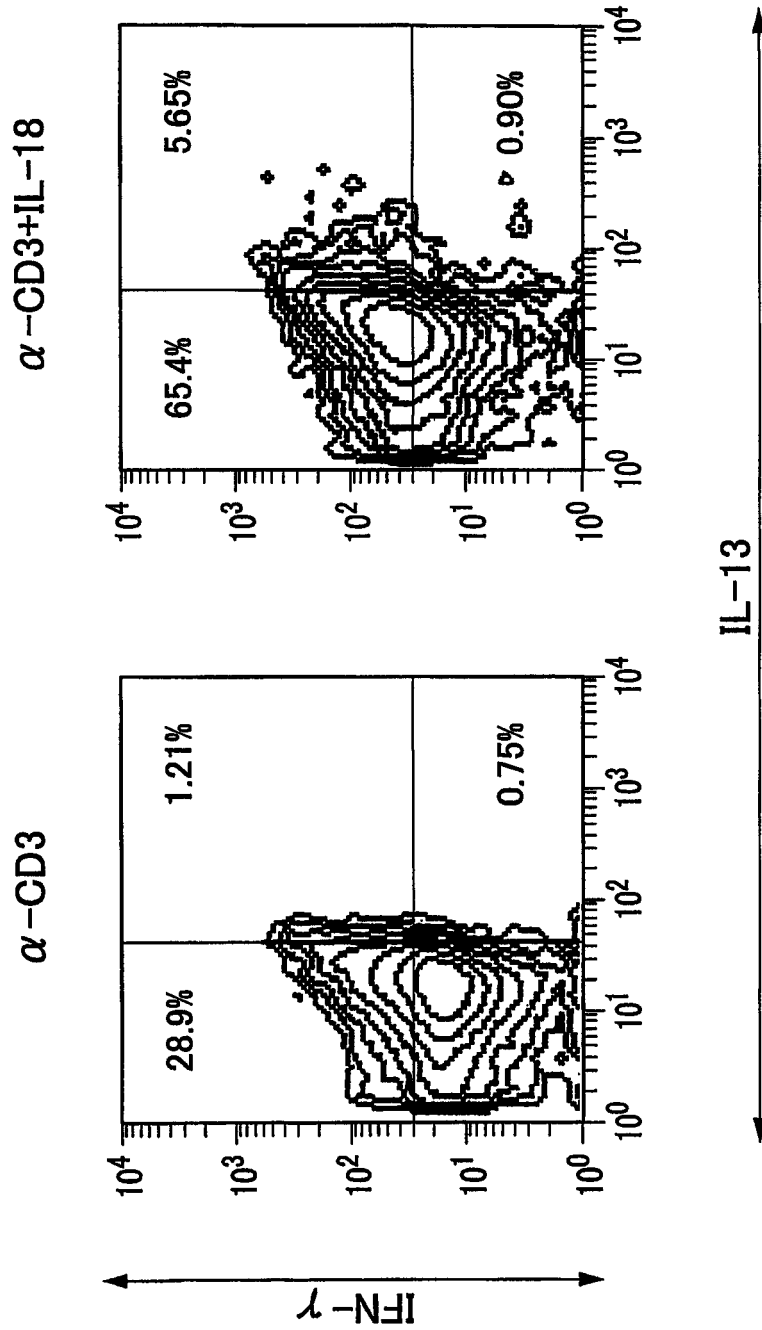


图12

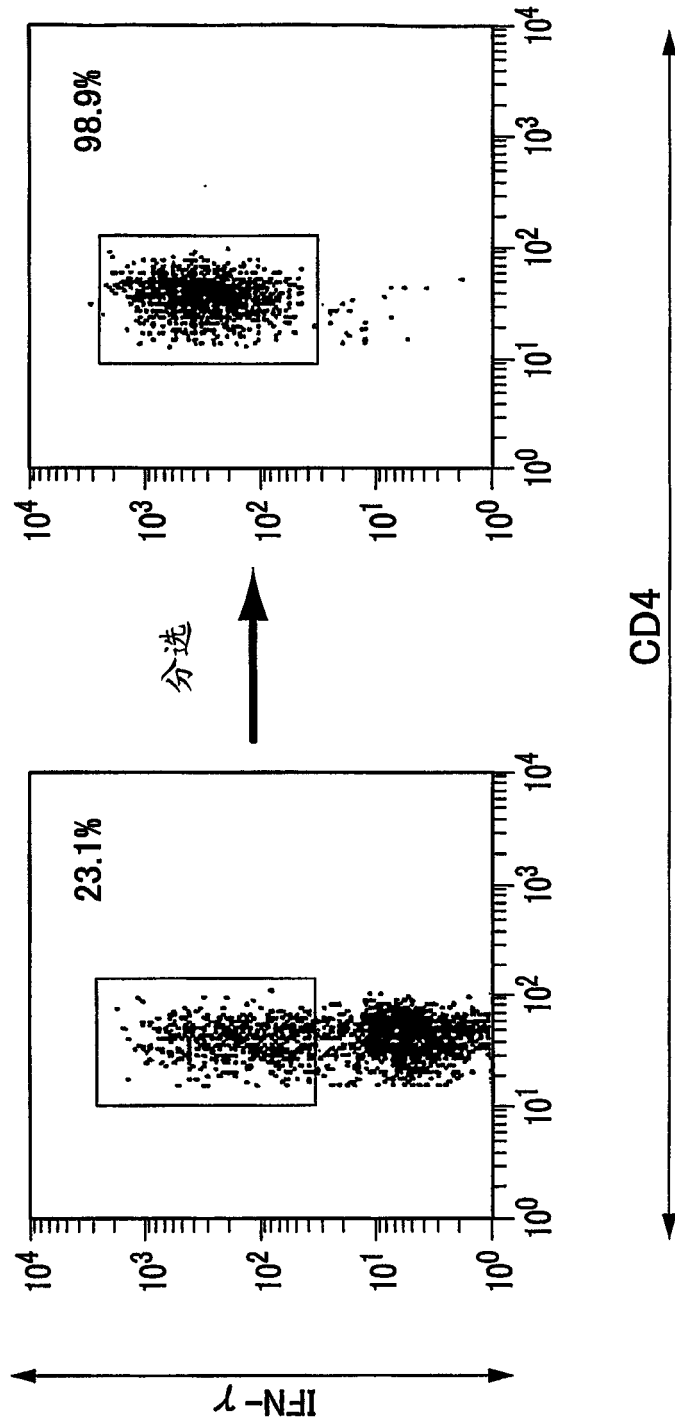


图13

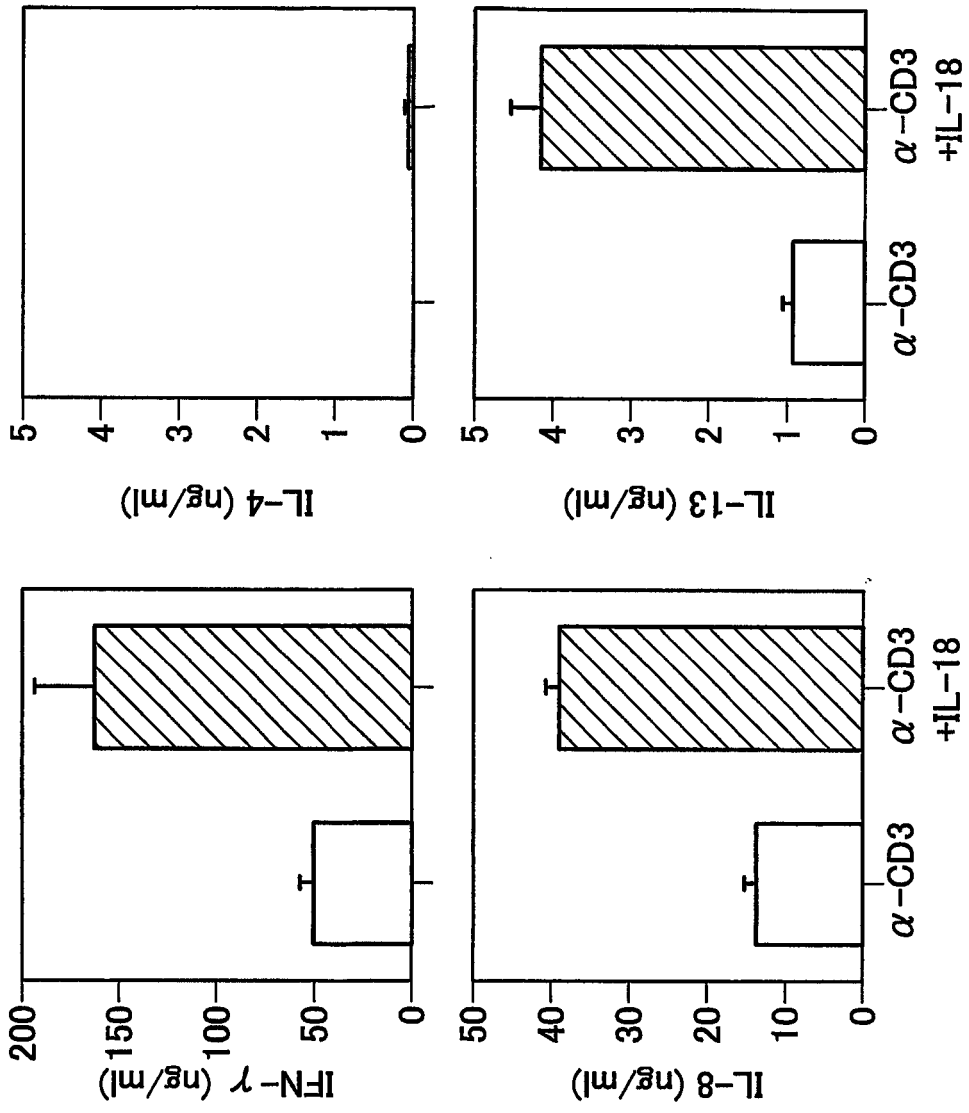


图14

专利名称(译)	人抗人白介素 - 18抗体及其片断和它们的利用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1780911A</a>	公开(公告)日	2006-05-31
申请号	CN200480011618.2	申请日	2004-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 财团法人化学及血清疗法研究所		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 财团法人化学及血清疗法研究所		
[标]发明人	杉村和久 中西宪司 中岛敏博		
发明人	杉村和久 中西宪司 中岛敏博		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61K48/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K16/24 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61P29/00 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/565		
代理人(译)	卢素华 郑霞		
优先权	2003125948 2003-04-30 JP		
其他公开文献	CN100457901C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的源自人的人抗人IL - 18抗体是对于人的IL - 18的抗体，其含有由以下(a)或(b)的多肽组成的H链的互补性决定区，和由(c)或(d)的多肽组成的、对人白介素 - 18的L链的互补性决定区。(a)由序列号4~6所示的氨基酸序列组成的多肽。(b)在(a)中所述的多肽的异构体、成为H链的互补性决定区的多肽。(c)由序列号10~12所示的氨基酸序列组成的多肽。(d)在(c)中所述的多肽的异构体、成为L链的互补性决定区的多肽。由此，提供人抗人IL - 18抗体以及其利用方法成为可能。

