

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4134166号  
(P4134166)

(45) 発行日 平成20年8月13日(2008.8.13)

(24) 登録日 平成20年6月6日(2008.6.6)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 16/24	(2006.01)	C O 7 K 16/24	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 19 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-505960 (P2005-505960)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(86) (22) 出願日	平成16年4月30日(2004.4.30)	(73) 特許権者	000173555 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/006403	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02004/097019	(72) 発明者	杉村 和久 日本国鹿児島県鹿児島市皇徳寺台5-20-5
(87) 国際公開日	平成16年11月11日(2004.11.11)	(72) 発明者	中西 憲司 日本国兵庫県宝塚市中山桜台7-7-7
審査請求日	平成18年4月6日(2006.4.6)	(72) 発明者	中島 敏博 日本国熊本県熊本市出水7-77-21
(31) 優先権主張番号	特願2003-125948 (P2003-125948)		最終頁に続く
(32) 優先日	平成15年4月30日(2003.4.30)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 ヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体およびその断片、並びにそれらの利用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト免疫グロブリンVH鎖のCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号4、5および6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、かつ、

ヒト免疫グロブリンVL鎖のCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを特徴とする、ヒトインターロイキン-18に特異的に結合するヒト抗体。

【請求項2】

配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、および、配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする、ヒトインターロイキン-18に特異的に結合するヒト抗体。

【請求項3】

配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、および、配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが連結されていることを特徴とするヒトインターロイキン-18に特異的に結合する、ヒト抗体のフラグメント。

【請求項4】

ヒトインターロイキン-18によって誘導されるINF- $\gamma$ の産生を抑制することを特徴とする請求項1または2に記載のヒトインターロイキン-18に特異的に結合するヒト抗体。

【請求項5】

10

20

ヒトインターロイキン - 18 によって誘導される INF - の産生を抑制することを特徴とする請求項 3 に記載のヒトインターロイキン - 18 に特異的に結合する、ヒト抗体のフラグメント。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 18 に特異的に結合するヒト抗体またはそのフラグメントに、修飾剤が結合されてなる修飾抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 18 に特異的に結合するヒト抗体またはそのフラグメントをコードする遺伝子。

【請求項 8】

配列番号 1 または 7 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する請求項 7 に記載の遺伝子。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 7 または 8 に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【請求項 11】

請求項 7 または 8 に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒトインターロイキン - 18 に特異的に結合するヒト抗体またはそのフラグメントを生産する方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 18 に特異的に結合するヒト抗体またはそのフラグメント、または請求項 6 に記載の修飾抗体を用いたヒトインターロイキン - 18 の検出器具。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 18 に特異的に結合するヒト抗体またはそのフラグメント、または請求項 6 に記載の修飾抗体を含むヒトインターロイキン - 18 検出試薬を用いて、被検試料中のヒトインターロイキン - 18 量を測定する免疫疾患の診断キット。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の検出試薬を用いて測定した非ヒトの被検試料中のヒトインターロイキン - 18 量に基づいて免疫疾患を診断する方法。

【請求項 15】

ヒトインターロイキン - 18 アンタゴニストを有効成分とするヒトインターロイキン - 18 活性阻害剤であって、上記ヒトインターロイキン - 18 アンタゴニストが、以下のいずれかの物質であるヒトインターロイキン - 18 活性阻害剤。

i) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 18 に特異的に結合するヒト抗体またはそのフラグメント

ii) 請求項 6 に記載の修飾抗体。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のヒトインターロイキン - 18 活性阻害剤を含む免疫疾患治療剤。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の免疫疾患治療剤を非ヒトに対し投与することによる免疫疾患の治療方法。

【請求項 18】

抗原とヒトインターロイキン - 18 とによる刺激によってヘルパー T 1 細胞から産生するサイトカインを阻害することを特徴とする請求項 16 に記載の免疫疾患治療剤。

【請求項 19】

ヒトインターロイキン - 18 が関与するアレルギーまたは炎症に適用するものであることを特徴とする請求項 16 または 18 に記載の免疫疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒト抗ヒトインターロイキン - 18 抗体およびその断片、並びにそれらの利用方法に関し、より詳細には、ヒトインターロイキン - 18 (以下、ヒトIL-18とする) に結合し、その生理活性を阻害するヒト抗ヒトIL-18抗体およびその抗体フラグメント、並びにそれらの利用方法に関するものである。この抗体及び抗体フラグメントは、IL-18が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

## 【背景技術】

## 【0002】

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis (AD)) は、主に外的刺激に対する炎症性皮膚病変で、慢性反復性の強い掻痒を伴う疾患である。AD発症のメカニズムは不明な点が多いが、AD発症には遺伝的背景があり、AD患者の血清中には高いレベルのIgEが存在する。また、AD発症のメカニズムには、活性化T細胞、好塩基球、肥満細胞が深く関与する。特に、アレルゲンによる肥満細胞あるいは好塩基球上のFc 受容体 (Fc R) に結合したIgE分子の架橋によって、これらの細胞が活性化される。その結果、2型ヘルパーT (Th2) 細胞由来のサイトカインとケミカルメディエーターとの産生が起こり、ADが発症すると考えられている。Th2サイトカインとして重要なものは、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13等であり、ケミカルメディエーターとして重要なものは、ヒスタミン、セロトニン、ロイコトリエン等である。

## 【0003】

ヘルパーT細胞 (Th) は、抗原刺激を受けるとサイトカインを産生するが、その産生パターンから2つの亜集団 (Th1とTh2細胞) に分類される。1型ヘルパーT (Th1) 細胞が刺激を受けるとIFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  などのTh1サイトカインを産生し、2型ヘルパーT (Th2) 細胞が刺激を受けるとIL-4、IL-5、IL-10、IL-13などのTh2サイトカインを産生する。前者 (Th1細胞) はおもに細胞性免疫を誘導し、後者 (Th2細胞) は液性免疫を誘導し、ときにはアレルギー応答を誘導する。ナイーブT細胞は、IL-12の存在下で抗原刺激を受けるとTh1細胞に、またIL-4の存在下で抗原刺激を受けるとTh2細胞に分化する。

## 【0004】

IL-18は、発見当初、T細胞やNK (ナチュラルキラー) 細胞からIFN- $\gamma$  の産生を誘導する因子として注目されていた (Okamura, H. et al. Nature 378, 88(1995).)。しかし、IL-18がこの様な機能を発揮するのはIL-12が共存した場合である (Nakanishi, K. et al., Annu. Rev. Immunol., 19, 423 (2001))。また、Th1サイトカインであるIFN- $\gamma$  は、Th2サイトカインであるIL-4の作用を阻止するので、IFN- $\gamma$  を誘導するIL-18は、Th2細胞による免疫反応を抑制し、抗アレルギー作用を示すと考えられた。

## 【0005】

寄生虫をマウスに感染させると、Th2細胞が誘導されIgE産生がおこる。発明者は、感染直後からIL-12とIL-18とを投与すると、T細胞、NK細胞、B細胞などから、IFN- $\gamma$  の産生が誘導されIgE産生が抑制されることを明らかにした (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 3948(1997))。

## 【0006】

さらに、IL-18だけを投与するとIgE産生が増強されることも明らかにした (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 13962(1999))。また、その後の解析から、IL-18を正常なマウスに投与するとIgE産生が誘導されることも明らかとなった (Yoshimoto, T. et al., Nat. Immunol., 1, 132(2000))。

## 【0007】

生体内に投与されたIL-18は、CD4陽性T細胞 (CD4<sup>+</sup>T細胞) に作用してCD40リガンド (CD40L) の発現と、IL-4、IL-5、IL-13等の産生とを誘導する (Yoshimoto, T. et al., J. Exp. Med., 197, 997(2003))。また、生体内でB細胞は、IL-18の刺激を受けたCD4陽性T細胞が発現するCD40Lと、IL-4との刺激を受けてIgEを産生する。

## 【0008】

IL-18は、*in vitro*で、IL-3によって誘導された好塩基球と肥満細胞とに作用して、IL-4、IL-13、ヒスタミン等の産生を誘導する (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

【 0 0 0 9 】

従来の定説では、初めに述べた様に、肥満細胞上のFc RにFc部位を介して結合する複数のIgE分子に、アレルゲンが結合して、これらのIgE分子を架橋することによって、肥満細胞が活性化されると考えられていた。今もこの定説は正しいが、発明者らはIL-18が、アレルゲンおよびIgEの介在無しに、直接的に肥満細胞や好塩基球を活性化してIL-4、IL-13、ヒスタミン等の産生を誘導することを明らかにした (Yoshimoto, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 13962(1999))。この様な場合もアレルギー性炎症がおこる。

10

【 0 0 1 0 】

IL-18は、生物学的に不活性な前駆体 (IL-18前駆体)として産生され、カスパーゼ1の作用で開裂されて活性型となり、細胞外に分泌される (Gu, Y. et al., Science, 275, 206(1997))。発明者は、皮膚のケラチノサイトで、IL-18前駆体が産生されて蓄積されていることから、皮膚のケラチノサイト特異的にカスパーゼ1を過剰発現させたマウス (カスパーゼ1トランスジェニックマウス) を作製した (Yamanaka, K. et al., J. Immunol., 165, 997(2000))。その結果、このマウスは、生物学的に活性のあるIL-18を大量に産生した。また、このマウスは、血中に大量のIgEを産生していた (Yoshimoto, T. et al., Nat. Immunol., 1, 132(2000), Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。さらに、このマウスは、アレルゲンのない環境で飼育されているにも関わらず、強いアトピー性皮膚炎を発症した (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

20

【 0 0 1 1 】

ところで、IL-4とIL-13のシグナルは、Stat 6を介して標的細胞の核内に伝達されることで、これらのサイトカインの作用を発揮することが明らかにされている。発明者らは、stat6を欠損させたマウスが、IgEを産生しないことを明らかにした (Takeda, K. et al., Nature, 380, 627(1996))。そして、この様なStat 6遺伝子を欠損させたマウスと、皮膚のケラチノサイト特異的にカスパーゼ1を過剰発現させたマウス (カスパーゼ1トランスジェニックマウス) とを交配して、stat6遺伝子欠損カスパーゼ1トランスジェニックマウスを作製した。その結果、このマウスは、全くIgEを作らなかったが、強いアトピー性皮膚炎を発症することが明らかとなった (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

30

【 0 0 1 2 】

一方、発明者は、IL-18遺伝子を欠損したマウスとカスパーゼ1トランスジェニックマウスとを交配することにより、IL-18欠損カスパーゼ1トランスジェニックマウスも作製した。その結果、このマウスは、IgE産生を抑制されてはいたが、なおも大量のIgEを血中に認めた。ところが、このマウスは、IgEを産生しているにもかかわらず、アトピー性皮膚炎の発症が完全に抑制されていた (Konishi, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 11340(2002))。

40

【 0 0 1 3 】

これらの結果から、IgEの産生を抑制することよりも、IL-18の作用を抑制することが、アトピー性皮膚炎の治療に有効と考えられる。

【 0 0 1 4 】

IL-18は、発見当初IFN- $\gamma$ 誘導因子とよばれていたように、IL-12と相乗的に、Th1細胞やNK細胞に作用してIFN- $\gamma$ の産生を強力に誘導する (Okamura, H. et al. Nature 378, 8(1995).、Nakanishi, K. et al., Annu. Rev. Immunol., 19, 423 (2001))。さらに、IL-18は、これらの細胞上にFasリガンド (FasL) の発現を増強する (Tsutsui, H. et al., J. Immunol., 159, 3961(1997))。FasLは、三量体になると、細胞のアポトーシスを誘導する。

50

## 【 0 0 1 5 】

発明者は、Propionibacterium acnesを投与したマウスの肝臓に存在するKupffer細胞が、Fasを発現しており、FasLの刺激を受けると、活性型のIL-18を産生することを示した(Tsutsui, H. et al., Immunity, 11, 359(1999))。さらに、IL-18は、NK細胞およびTh1細胞に作用してFasLの発現を増強する。このように、IL-18とFasLの間には、正の相関性(positive feedback loop)があることも明らかになった(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))。そのため、生体内でIL-18が過剰に産生されると、肝臓や腸管で重篤な臓器障害が起こることが明らかとなった。このように、IL-18は、いわゆるTh1病の原因にもなる。

10

## 【 0 0 1 6 】

このような疾患以外にも、Th1細胞に誘導される気管支喘息、その他の様々な疾患において、IL-18の病態への関与が指摘されている。

## 【 0 0 1 7 】

以上のように、IL-18の産生あるいは活性の制御は、このようなIL-18依存性のアトピー性皮膚炎をはじめとする、IL-18依存性疾患の治療法として、あるいはIL-18の過剰産生が原因となり疾患の発症を誘導あるいは増悪するTh1病の治療法として、極めて重要である。

## 【 0 0 1 8 】

それゆえ、IL-18の生理活性を中和する特異的なモノクローナル抗体を開発することができれば、IL-18の関与する多くの疾患の有効な治療手段になることが期待される。

20

## 【 0 0 1 9 】

ところが、ヒトIL-18に対する抗体(抗ヒトIL-18抗体)としては、マウスやラット由来のモノクローナル抗体がいくつか取得されているに過ぎない(例えば、日本国公開特許公報 特開2000-236884号(2000年9月5日公開)、WO00/56771の国際出願(2000年9月28日公開))。

## 【 0 0 2 0 】

しかしながら、従来の抗ヒトIL-18抗体は、主に、ヒト以外の異種動物由来のモノクローナル抗体であるため、ヒトに対して投与した場合、異物として認識・排除される。したがって、従来の抗ヒトIL-18抗体を、ヒトIL-18の関与する疾患の治療薬剤として利用することは困難である。特に、慢性の自己免疫性疾患の治療では、長期間の継続投与が行われるので、投与抗体に対する抗体の出現が問題となる。

30

## 【 0 0 2 1 】

この問題を解決する方法として、ヒトIL-18に対するマウスモノクローナル抗体を、遺伝子工学的手法を用いてヒト化することが考えられる。

## 【 0 0 2 2 】

しかしながら、マウスモノクローナル抗体をヒト化すれば、抗原性は低下するものの、慢性の自己免疫性疾患患者に対する反復投与や長期投与を行った際には、そのヒト化抗IL-18抗体の活性を阻害するような抗体(阻止抗体)が作り出される可能性も否定できない。その結果、顕著な治療効果は期待できず、場合によっては重大な副作用が生じる可能性もあるという問題を有している。

40

## 【 0 0 2 3 】

それゆえ、反復投与や長期投与を行った場合でも、安全性の高い抗ヒトIL-18抗体の開発が強く望まれている。

## 【 発明の開示 】

## 【 0 0 2 4 】

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、安全性と治療効果を兼ね備えたヒト抗ヒト抗インターロイキン-18抗体およびその断片を提供するとともに、それらの利用方法を提案することにある。

## 【 0 0 2 5 】

50

本発明者は、上記課題に鑑みて鋭意に検討した結果、健常人の末梢血Bリンパ球より調製した免疫グロブリンH鎖およびL鎖の可変領域（ $V_H$ 、 $V_L$ ）をコードする遺伝子を発現したファージディスプレイライブラリーから、完全ヒト抗ヒトIL-18抗体の1本鎖可変領域（scFv）分子（抗体断片）を取得し、そのアミノ酸配列およびそれをコードするcDNAの塩基配列を明らかにした。さらに、このscFvが、ヒトIL-18の生理活性を阻害することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0026】

すなわち、本発明は、医学上または産業上有用な方法・物質として下記A)～X)の発明を含むものである。

【0027】

A) ヒトインターロイキン-18に対する、ヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

【0028】

B) 以下の(a)または(b)のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域と、(c)または(d)のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域とを含む上記A)に記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

(a) 配列番号4～6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号4～6に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

(c) 配列番号10～12に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号10～12に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

【0029】

C) 以下(e)または(f)のポリペプチドからなるH鎖可変領域と、(g)または(h)のポリペプチドからなるL鎖可変領域とを含む上記A)またはB)に記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体。

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

(g) 配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

【0030】

D) 以下(e)または(f)のポリペプチドからなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体（ヒト抗ヒトIL-18抗体）のH鎖可変領域断片。

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

【0031】

E) 以下(g)または(h)のポリペプチドからなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体（ヒト抗ヒトIL-18抗体）のL鎖可変領域断片。

(g) 配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

【0032】

10

20

30

40

50

F) 上記B)に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または上記D)に記載のH鎖可変領域断片と、上記B)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または上記E)に記載のL鎖可変領域断片とを連結してなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体の1本鎖可変領域断片。

【0033】

G) 上記B)に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または上記D)に記載のH鎖可変領域断片、および/または、上記B)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または上記E)に記載のL鎖可変領域断片に、ヒト由来の定常領域を連結してなる、ヒトインターロイキン-18に対するヒト由来の抗体(ヒト抗ヒトIL-18抗体)またはその断片。

【0034】

H) 上記抗体の断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scAb、またはscFvFcである上記G)に記載の抗体の断片。

【0035】

I) 上記A)~H)のいずれかに記載の抗体またはその断片に、修飾剤が結合されてなる修飾抗体。

【0036】

J) 上記A)~H)のいずれかに記載の抗体またはその断片をコードする遺伝子。

【0037】

K) 配列番号1または7に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する上記J)に記載の遺伝子。

【0038】

L) 上記J)またはK)に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【0039】

M) 上記J)またはK)に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【0040】

N) 上記J)またはK)に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト由来のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体またはその断片を生産する方法。

【0041】

O) 上記A)~H)のいずれかに記載の抗体またはその断片、または上記I)に記載の修飾抗体を用いたヒトインターロイキン-18検出器具。

【0042】

P) 上記A)~H)のいずれかに記載の抗体またはその断片、または上記I)に記載の修飾抗体を含むヒトインターロイキン-18検出試薬を用いて、被検試料中のヒトインターロイキン-18量を測定する免疫疾患の診断キット。

【0043】

Q) 上記P)に記載の検出試薬を用いて測定した被検試料中のヒトインターロイキン-18量に基づいて免疫疾患を診断する方法。

【0044】

R) ヒトインターロイキン-18アンタゴニストを有効成分とするヒトインターロイキン18活性阻害剤。

【0045】

S) 上記ヒトインターロイキン-18アンタゴニストが、以下のいずれかの物質である上記R)に記載のヒトインターロイキン18活性阻害剤。

以下のいずれかの物質を含むヒトインターロイキン-18活性阻害剤。

i) 上記A)~C)のいずれかに記載のヒト抗ヒトインターロイキン-18抗体

ii) 上記D)~H)のいずれかに記載の抗体の断片

iii) 上記I)に記載の修飾抗体

iv) 上記i)~iii)のいずれかに記載の抗体、抗体の断片、または修飾抗体が認識するヒトインターロイキン-18上の抗原決定領域に基づいて分子設計された低分子化合物。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

T) 上記 J) または K) に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

## 【 0 0 4 7 】

U) 上記 R) または S) に記載のヒトインターロイキン - 18 活性阻害剤、または上記 T) に記載の遺伝子治療剤を含む免疫疾患治療剤。

## 【 0 0 4 8 】

V) 上記 U) に記載の免疫疾患治療剤を投与することによる免疫疾患の治療方法。

## 【 0 0 4 9 】

W) 抗原とヒトインターロイキン - 18 とによる刺激によってヘルパー T 1 細胞から産生するサイトカインを阻害することを特徴とする上記 U) に記載の免疫疾患治療剤。

10

## 【 0 0 5 0 】

X) ヒト IL - 18 が関与するアレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患に適用するものであることを特徴とする上記 U) または W) に記載の免疫疾患治療剤。

## 【 0 0 5 1 】

本発明によれば、これまでのようにキメラ抗体またはヒト化抗体ではなく、ヒト由来のヒト IL - 18 に対する抗体およびその断片、並びにそれらの利用方法を提供できる。それゆえ、ヒト IL - 18 が直接または間接的に関与する疾病の治療において、反復投与や長期投与を行っても、顕著な治療効果と高い安全性とを維持した治療薬を提供できる。

## 【 0 0 5 2 】

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

20

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 5 3 】

図 1 は、実施例 1 において分離したクローン s c F v のヒト IL - 18 に対する特異性を E L I S A によって評価した結果を示すグラフである。

## 【 0 0 5 4 】

図 2 は、実施例 1 において精製したヒト由来の s c F v のヒト IL - 18 に対する特異性を E L I S A によって評価した結果を示すグラフである。

## 【 0 0 5 5 】

図 3 は、実施例 1 における s c F v ( h 1 8 - 4 0 、 h 1 8 - 1 0 8 ) が、IL - 18 によるヒト骨髓単核球 K G - 1 細胞からの I N F - の産生を阻害することを示すグラフである。

30

## 【 0 0 5 6 】

図 4 は、実施例 1 における s c F v ( h 1 8 - 1 0 8 ) が、IL - 18 のヒト骨髓単核球 K G - 1 細胞への結合を阻害することを示すグラフである。

## 【 0 0 5 7 】

図 5 は、図 4 において、s c F v ( コントロール ) の結果を示すグラフである。

## 【 0 0 5 8 】

図 6 は、s c F v ( h 1 8 - 1 0 8 ) のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

40

## 【 0 0 5 9 】

図 7 は、s c F v ( h 1 8 - 1 0 8 ) のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示すグラフである。

## 【 0 0 6 0 】

図 8 は、実施例 2 における、T h 1 細胞および T h 2 細胞の刺激により、各細胞から産生されたサイトカインの量を示すグラフである。

## 【 0 0 6 1 】

図 9 は、実施例 2 における、T h 1 細胞および T h 2 細胞の刺激により、各細胞の表面の IL - 18 R 鎖の発現レベルを示す図である。

50

## 【 0 0 6 2 】

図 1 0 は、実施例 2 における、I L - 1 8 の用量と、T h 1 細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。

## 【 0 0 6 3 】

図 1 1 は、実施例 2 における、T h 1 細胞への刺激後の培養時間と、T h 1 細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。

## 【 0 0 6 4 】

図 1 2 は、実施例 2 において、I L - 1 8 刺激を受けた T h 1 細胞における、細胞質 I F N -  $\gamma$  および/または I L - 1 3 に陽性の C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の割合を、F A C S 分析した結果を示す図である。

10

## 【 0 0 6 5 】

図 1 3 は、実施例 2 における、抗 C D 3 抗体刺激を受けた T h 1 細胞中の、I F N -  $\gamma$  <sup>+</sup> T h 1 細胞の割合と、I F N -  $\gamma$  <sup>+</sup> T h 1 細胞の陽性選別例とを示す図である。

## 【 0 0 6 6 】

図 1 4 は、実施例 2 における、I F N -  $\gamma$  <sup>+</sup> T h 1 細胞を、抗 C D 3 と I L - 1 8 とにより刺激した場合の、サイトカインの産生量を示すグラフである。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 6 7 】

本発明の具体的態様について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

20

## ( 1 ) 本発明の抗体およびその断片

本発明者は、ヒトインターロイキン - 1 8 ( I L - 1 8 ) に対するヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体について検討した結果、ファージディスプレイ法によって得られたヒト由来の 1 本鎖可変領域断片 ( s c F v ) が、ヒト I L - 1 8 により誘導されるシグナル伝達および I N F -  $\gamma$  産生を阻害することを明らかにした。さらに、この 1 本鎖可変領域断片 ( s c F v ) における、相補性決定領域 ( C D R )、H 鎖および L 鎖の可変領域のアミノ酸配列およびそれらをコードする遺伝子の塩基配列を同定した。

## 【 0 0 6 8 】

配列番号 3 には、V<sub>H</sub> 鎖のアミノ酸配列が示される。配列番号 4 ~ 6 は、この V<sub>H</sub> 鎖における相補性決定領域 ( C D R 1 ~ 3 ) のアミノ酸配列が示される。すなわち、配列番号 3 に示す V<sub>H</sub> 鎖のアミノ酸配列において、3 1 番目 ~ 3 5 番目のアミノ酸配列が C D R 1 ( 配列番号 4 )、5 0 番目 ~ 6 6 番目のアミノ酸配列が C D R 2 ( 配列番号 5 )、9 9 番目 ~ 1 0 8 番目のアミノ酸配列が C D R 3 ( 配列番号 6 ) に対応している。

30

## 【 0 0 6 9 】

一方、配列番号 9 は、V<sub>L</sub> 鎖のアミノ酸配列を示している。配列番号 1 0 ~ 1 2 は、この V<sub>L</sub> 鎖における相補性決定領域 ( C D R 1 ~ 3 ) のアミノ酸配列を示している 2 3 番目 ~ 3 3 番目 のアミノ酸配列が C D R 1 ( 配列番号 1 0 )、4 9 番目 ~ 5 5 番目のアミノ酸配列が C D R 2 ( 配列番号 1 1 )、8 8 番目 ~ 9 8 番目のアミノ酸配列が C D R 3 ( 配列番号 6 ) に対応している。

## 【 0 0 7 0 】

本発明の抗体およびその断片は、上記 V<sub>H</sub> 鎖および V<sub>L</sub> 鎖、並びにそれらの C D R として、配列番号 3 ~ 6 および 9 ~ 1 2 に示される配列に限定されるものではなく、それらの一部が改変された変異ポリペプチドであってもよい。

40

## 【 0 0 7 1 】

すなわち、V<sub>H</sub> 鎖の C D R としては、( a ) 配列番号 4 ~ 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、( b ) 配列番号 4 ~ 6 に示されるアミノ酸配列において、1 または 数個 のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン - 1 8 に対する H 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド、も含まれる。

## 【 0 0 7 2 】

50

一方、 $V_L$ 鎖のCDRとしては、(c)配列番号10~12に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、(d)配列番号10~12に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド、も含まれる。

【0073】

また、 $V_H$ 鎖可変領域は、(e)配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、(f)配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド、も含まれる。

10

【0074】

同様に、 $V_H$ 鎖可変領域は、(g)配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、のみならず、(h)配列番号9に示されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトインターロイキン-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド、も含まれる。

【0075】

ここで、上記「1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、及び/又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されることを意味する。したがって、例えば、上記(b)のポリペプチドは、上記(a)のポリペプチドの変異ペプチドであり、ここにいう「変異」は、主として公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然(例えばヒト)に存在する同様の変異ポリペプチドを単離精製したものであってもよい。

20

【0076】

なお、上記「変異」は、後述のように本発明の抗体またはその断片を、治療薬として利用する場合(ヒトに投与する場合)には、ヒト由来の構造またはヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検出器具や診断キットなどとして利用する場合(ヒトに投与しない場合)には、特に制限されない。また、本発明の抗体またはその断片を、ヒトに投与する場合、抗原を認識するCDRの高次構造を維持する範囲で、変異を行うことが好ましい。

【0077】

また、本発明に係る抗体およびその断片は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、HisやMyc、Flag等によって本発明のタンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

30

【0078】

なお、CDRは抗原を認識する領域であるため、ヒトIL-18は、本発明にかかる抗体またはその断片の相補性決定領域(CDR)に認識される。したがって、少なくとも上記CDRを有する抗体は、ヒトIL-18を特異的に認識できる。すなわち、上記 $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖は、少なくとも前記 $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖のCDRを含んでいればよく、それ以外は、ヒト由来の $V_H$ 鎖およびL鎖のアミノ酸配列であればよい。これにより、ヒトIL-18に対する特異性は保持される。ただし、CDRは、H鎖およびL鎖の可変領域の1次構造と高次構造とによって、特異的に構築されている。このため、少なくとも前記 $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖のCDRを含み、それ以外を、ヒト由来の $V_H$ 鎖およびL鎖からヒト抗ヒトIL-18抗体を構成する場合、ヒトIL-18に対する特異性を有する抗体とすることが可能である。例えば、少なくともCDRの高次構造を維持することによって、ヒトIL-18に対する特異性を有する抗体とすることが可能である。

40

【0079】

より具体的には、本発明にかかる抗体およびその断片としては、ヒト由来のものであって、例えば、以下に示すイ)~ニ)に示すものが挙げられる。

イ)上記(a)または(b)に記載のH鎖の相補性決定領域を含む $V_H$ 鎖、

ロ)上記(e)または(f)のポリペプチドからなる $V_H$ 鎖、

50

八) 上記(c)または(d)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むV<sub>L</sub>鎖、  
 二)(g)または(h)のポリペプチドからなるV<sub>L</sub>鎖、  
 ホ)上記イ)またはロ)のV<sub>H</sub>鎖および上記八)または二)のV<sub>L</sub>鎖とを連結してなる1  
 本鎖可変領域断片(s c F v)、  
 へ)上記イ)またはロ)のV<sub>H</sub>鎖および/または上記八)または二)V<sub>L</sub>鎖にヒト由来の  
 定常領域を連結してなる断片などであってもよい。

【0080】

上記ホ)およびへ)において、上記V<sub>H</sub>鎖とV<sub>L</sub>鎖とを連結する場合、通常、適当なペ  
 プチドリンカーなどによって連結される。このペプチドリンカーとしては、例えば、10  
 ~25アミノ酸残基からなる任意の1本鎖ペプチドが用いられる。

10

【0081】

また、上記へ)に記載の上記V<sub>H</sub>鎖および/またはV<sub>L</sub>鎖にヒト由来の定常領域を連結  
 してなる断片(フラグメント)は、F a b、F a b'、F(a b')<sub>2</sub>や、少なくとも一  
 部のFc部を有したs c A b、またはs c F v F c、さらには完全抗体であってもよい。  
 なお、s c A bとはs c F vにL鎖またはH鎖の定常領域の一部のドメイン(Cドメイン  
 )が結合したもので、s c F v F cとはs c F vにH鎖およびL鎖の全定常領域が結合した  
 ものである。

【0082】

さらに、本発明の抗体およびその断片には、安定性や抗体価を向上させるために、修飾  
 剤が結合されていてもよい。すなわち、本発明の抗体およびその断片は、修飾抗体であ  
 ってもよい。この修飾剤としては、例えば、糖鎖や高分子などが挙げられる。糖鎖修飾を行  
 った場合には、その糖鎖が何らかの生理活性を有する可能性があるが、ポリエチレングリ  
 コール(PEG)などの単純な高分子修飾を行った場合にはそれ自体生理活性を示さない  
 。さらに、PEG化によって肝臓での吸収を抑制したり、血中での安定性を向上したりす  
 る可能性がある。つまり、修飾剤としては、PEGなどの単純高分子が好ましい。

20

【0083】

なお、本発明の抗体およびその断片の修飾剤による修飾は、前述の変異ペプチドの作製  
 と同様に、治療薬として利用する場合には、ヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検  
 出器具や診断キットなどとして利用する場合には、特に制限されない。また、本発明の抗  
 体またはその断片を、ヒトに投与する場合、抗原を認識するCDRの高次構造を維持する  
 範囲で、修飾することが好ましい。

30

【0084】

また、上記抗体は、抗体と構造的に関連したタンパク質も包含する意味、すなわち免疫  
 グロブリンの意味である。さらに、本発明の抗体は、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、  
 Ig Mの何れのクラスでもよい。言い換えると、単量体であってもよいし、2量体、3量  
 体、4量体、5量体といった多量体であってもよい。

【0085】

後述する実施例に示すように、上記s c F vについて詳細な解析を進めた結果、後の実  
 施例において詳述するように、その作用・性質について以下の知見が得られた。

(1) ヒトIL-18と特異的に結合する。

40

(2) ヒトIL-18により誘導されるシグナル伝達およびINF- $\gamma$ の産生を阻害する。  
 。

【0086】

このように、上記s c F vは、ヒト由来のアミノ酸配列を有しているため、抗体の活性  
 を阻害する阻害抗体が形成される可能性は極めて低い。さらに、ヒトIL-18と強く結  
 合することにより、その生理活性を阻害する作用があるので、ヒトIL-18によって惹  
 起される種々の免疫応答を阻害することができる。よって、上記s c F vおよびそれを含  
 む抗体またはその断片は、ヒトIL-18が直接または間接的に関与する疾患、例えば、  
 この免疫応答によって惹起されるアレルギー、炎症、および慢性免疫異常疾患の治療のた  
 めに利用することができる。このような治療薬が開発されれば、ヒトIL-18が関与す

50

る疾患の新しい治療方法の確立が期待される。

【 0 0 8 7 】

( 2 ) 本発明にかかる遺伝子

本発明にかかる遺伝子は、上記( 1 )で説明した抗体またはその断片をコードする遺伝子であり、配列番号 1 または 7 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム( O R F )領域として有する遺伝子、およびその塩基配列の一部を改変した改変遺伝子などが含まれる。

【 0 0 8 8 】

上記の遺伝子は、本発明の抗体またはその断片をコードしているので、適当な宿主( 例  
えば細菌、酵母)に導入して、本発明の抗体またはその断片を発現させることができる。

10

【 0 0 8 9 】

さらに、上記「遺伝子」は、上記( 1 )の抗体またはその断片をコードする配列以外に、非翻訳領域( U T R )の配列やベクター配列( 発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。例えば、配列番号 1 または 7 に記載の配列をベクター配列につ  
ないで本発明の遺伝子を構成し、これを適当な宿主で増幅させることにより、本発明の遺  
伝子を所望に増幅させることができる。また、本発明の遺伝子の一部配列をプローブに用  
いてもよい。また、後述するように、本発明の遺伝子は、ヒト I L - 1 8 が関与する疾患  
用の遺伝子治療剤( 遺伝子治療薬)として利用できる。

【 0 0 9 0 】

( 3 ) 本発明の抗体およびその断片の取得方法・生産方法

20

上記( 1 )に記載の抗体およびその断片は、例えば、後述する実施例に示すように、い  
わゆるファージディスプレイ法を利用することにより、取得することができる。また、上  
記( 1 )に記載の抗体およびその断片は、上記( 2 )に記載の遺伝子を宿主に発現させる  
ことによって、生産することができる。なお、抗体およびその断片の取得方法および生産  
方法は、これに限定されるものではない。

【 0 0 9 1 】

より具体的には、健常人の末梢血 B リンパ球から m R N A を抽出し、免疫グロブリン遺  
伝子の V<sub>H</sub> 鎖、V<sub>L</sub> 鎖を、その両端を規定するプライマー対を用いて R T - P C R 法によ  
り増幅し、多様な配列を有する H 鎖、L 鎖の V 領域集団を得る。次に、更にペプチドリン  
カー部分をコードする D N A、およびその両端を各々 H 鎖、L 鎖と連結されるように規定  
するプライマー対を組み合わせて増幅して、H 鎖、L 鎖の V 領域のランダムな組み合わせ  
による多様な s c F v D N A 集団を調製する。得られた s c F v D N A をファージミド  
ベクター pCANTAB5E に組み込み、s c F v ディスプレイファージライブラリを作製する。こ  
のライブラリをプラスチックチューブに固相化したヒト I L - 1 8 と反応させ、洗浄により未  
反応の s c F v ディスプレイファージを除去した後に、ヒト I L - 1 8 と結合している s c F  
v ファージクローンを酸で溶出する。分離したファージクローンから s c F v D N A を  
調製し、これを発現ベクターに組み込み、該発現ベクターにより形質転換された宿主を常  
法に従って培養して目的の s c F v 蛋白のみを得るといものである。

30

【 0 0 9 2 】

なお、配列番号 1 および 7 は、ファージディスプレイ抗体法によって、取得したヒト I  
L - 1 8 に対する 1 本鎖可変領域( s c F v )の V<sub>H</sub> 鎖および V<sub>L</sub> 鎖をコードする c D N  
A の塩基配列である。

40

【 0 0 9 3 】

s c F v D N A の発現方法としては、例えば、大腸菌で発現させることができる。大  
腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列等、発現さ  
せる s c F v を機能的に結合させて発現させることが出来る。例えば、プロモーターとし  
ては、lacZ プロモーター、araB プロモーター等を挙げることができる。s c F v の分泌の  
ためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに発現させる場合、peI B シグナル配  
列( Lei, SP., et al, J. Bacteriol., 1987, 169 : 4379-4383 )を用いるとよい。培養  
上清中に分泌させるには M13 ファージの g 3 蛋白のシグナル配列を用いることもできる。

50

## 【 0 0 9 4 】

前記のように発現された s c F v は細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本願発明で発現される s c F v は、その C 末端に E tag 配列が付加されているので、抗 E tag 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、容易に短時間で精製することができる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を組み合わせて精製することも可能である。例えば、限外濾過、塩析、ゲル濾過 / イオン交換 / 疎水クロマト等のカラムクロマトグラフィーを組み合わせれば抗体を分離・精製することができる。

## 【 0 0 9 5 】

このようにして得られた s c F v 蛋白 (ポリペプチド) は、後述する実施例に示すようにヒト IL-18 に対する結合活性を有することが明らかになった。本発明のヒト抗ヒト IL-18 抗体の抗原結合活性を測定する方法としては、E L I S A、BIAcore 等の方法がある。例えば E L I S A を用いる場合、ヒト IL-18 を固相化した 9 6 穴プレートに目的の抗ヒト IL-18 抗体や抗体フラグメントを含む試料、例えば大腸菌の培養上清や精製抗体を加える。次にアルカリホスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、発色基質パラニトロフェニルホスフェートを加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することが出来る。

10

## 【 0 0 9 6 】

さらにまた、本願発明により得られた s c F v 蛋白は、ヒト IL-18 により誘導されるヒト骨髄単核球 KG-1 細胞からの IFN- 産生を容量依存的に抑制することも明らかとなった。

20

## 【 0 0 9 7 】

従って、この s c F v 蛋白は、ヒト IL-18 の生物活性を抑制する事から、IL-18 の作用により惹起される疾患の予防または治療に有効であると期待される。

## 【 0 0 9 8 】

## ( 4 ) 本発明の組換え発現ベクター等

本発明の組換え発現ベクターは、前記 ( 2 ) の遺伝子、すなわち、上記 ( 1 ) の抗体またはその断片をコードする遺伝子を含むものであり、例えば、配列番号 1 又は 7 に示される何れかの塩基配列を有する c D N A が挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを用いることができるが特に限定されるものではない。

30

## 【 0 0 9 9 】

このように、組換え発現ベクターは、本発明の遺伝子を含むものである。ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明に係る遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。

## 【 0 1 0 0 】

本発明の遺伝子が宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認するために、各種マーカーを用いてもよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと本発明の遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。あるいは、本発明に係る抗体またはその断片を融合タンパク質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 G F P (Green Fluorescent Protein) をマーカーとして用い、本発明に係る抗体またはその断片を G F P 融合タンパク質として発現させてもよい。

40

## 【 0 1 0 1 】

上記宿主細胞は、特に限定されるものではなく、従来公知の各種細胞を好適に用いることができる。具体的には、上記 ( 2 ) 遺伝子が全長 D N A の場合の宿主細胞としては、ヒト又はマウス由来の細胞をはじめとして、線虫 *Caenorhabditis elegans*、アフリカツ

50

メガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞、各種哺乳動物 (ラット、ウサギ、ブタ、サル等) の培養細胞、あるいは、キイロシヨウジヨウバエ、カイコガ等の昆虫の培養細胞等などの動物細胞が挙げられ、DNAフラグメントの場合のホスト細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*) などを挙げるができるが、特に限定されるものではない。

#### 【0102】

上記発現ベクターをホスト細胞に導入する方法、すなわち形質転換方法も特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

10

#### 【0103】

本発明の形質転換体は、前記(2)の遺伝子、すなわち、上記(1)の抗体またはその断片をコードする遺伝子が導入された形質転換体である。ここで、「遺伝子が導入された」とは、公知の遺伝子工学的的手法(遺伝子操作技術)により、対象細胞(宿主細胞)内に発現可能に導入されることを意味する。また、上記「形質転換体」とは、細胞・組織・器官のみならず、動物個体を含む意味である。対象となる動物は、特に限定されるものではないが、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどの哺乳動物が例示される。特に、マウスやラット等の齧歯目動物は、実験動物・病態モデル動物として広く用いられており、なかでも近交系が多数作出されており、受精卵の培養、体外受精等の技術が整っているマウスが実験動物・病態モデル動物として好ましく、ノックアウトマウス等は、上記抗体やその断片の更なる機能解析、ヒトIL-18が関与する病気の診断方法の開発や、その治療方法の開発などに有用である。

20

#### 【0104】

なお、上記(1)の抗体またはその断片は、本発明の組換え発現ベクターを用いて作製した、本発明の形質転換体によっても生産することが可能である。

#### 【0105】

(5) 本発明の抗体およびその断片の利用方法

(5-1) ヒトIL-18検出器具・免疫疾患の診断キット・診断方法

上記(1)の抗体、その抗体断片、または修飾抗体は、ヒトIL-18に対して、特異的に強く結合するため、ヒトIL-18の検出・測定などに利用できる可能性がある。すなわち、上記ヒトインターロイキン-18検出器具によれば、例えば、血液や尿などの試料中に含まれるヒトIL-18を高精度に検出できる。それゆえ、ヒトIL-18が関与する疾患の判定や治療効果の評価を行うための診断用、治療用として利用できる。

30

#### 【0106】

なお、本発明のヒトIL-18検出器具は、本発明の抗体における少なくともCDRのアミノ酸配列を用いればよい。ヒトIL-18検出器具は、種々の条件下でのIL-18の検出・測定などに利用できる。本発明のヒトIL-18検出器具としては、例えば、ヒトIL-18と特異的に結合する本発明の抗体またはその断片を基盤(担体)上に固定化した抗体チップや抗体カラム等が挙げられる。

#### 【0107】

また、本発明の抗体またはその断片は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによるヒトIL-18の精製にも極めて有用である。この精製方法は、本発明の抗体またはその断片をヒトIL-18とそれ以外の物質の混合物に接触させて抗体またはその断片にヒトIL-18を吸着させる工程と、吸着したヒトIL-18を抗体またはその断片から脱着させ、採取する工程を含むものである。この精製方法によれば、IL-18を短時間かつ高精度に精製できる。

40

#### 【0108】

本発明の抗体またはその断片、およびそれらの修飾抗体は、ヒトIL-18を検出するための試薬(ヒトIL-18検出試薬)としても広範な用途を有する。すなわち、これらの抗体またはその断片によるラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イ

50

ムノアッセイなどの標識イムノアッセイを適用するときには、被検試料中のヒトIL-18を迅速且つ正確に定性又は定量分析することができる。この標識イムノアッセイでは、上記抗体またはその断片は、例えば、放射性物質、酵素及び/又は蛍光物質により標識して用いられる。また、これらの抗体およびその断片は、ヒトIL-18に特異的に反応し、免疫反応を呈するので、その免疫反応を標識物質を指標に測定すれば、被検試料中のごく微量のヒトIL-18を精度良く検出することができる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。

【0109】

本発明の免疫疾患の診断キット、および免疫疾患を診断する方法は、このようなヒトIL-18の検出方法に従い、被検試料（血液や体液、組織など）中のヒトIL-18量を測定し、その測定結果に応じて免疫疾患の診断を行うものである。なお、上記「免疫疾患」は、ヒトIL-18が関与する疾患であり、例えば、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（AHR）、喘息などが例示される。

【0110】

このように、本発明のヒトIL-18の検出器具による検出方法は、ヒトIL-18を製造する際の工程管理や製品の品質管理に有用である。また、本発明の免疫疾患の診断キットおよび診断方法は、組織や体液におけるヒトIL-18のレベルを指標とする種々の感受性疾患の診断や、各種免疫疾患の治療評価を行うために極めて有用である。

【0111】

なお、一般に診断用に用いる抗体は、マウス、ウサギ、ヤギなどのヒト以外の動物を免疫して作成される。しかし、動物の免疫系では、自己の体を構成する分子に結合する抗体を産生するリンパ球は、排除または不活性化される。つまり、動物を免疫して作成した抗ヒトIL-18抗体のうち、ヒトIL-18と動物のIL-18とで酷似した部分を抗原決定領域とした抗体は含まれない。

【0112】

これに対し、本発明の抗体は、ヒト抗ヒトIL-18抗体を提示させたファージライブラリーからスクリーニングされた抗体である。このファージには、動物のように抗体を排除または不活性化する機構は存在しない。それゆえ、本発明の抗体には動物の免疫では作製できない、ヒト、サル、その他各種の動物のIL-18に共通した抗原決定領域に結合特異性を示す抗IL-18抗体が含まれる。このような抗体を本発明の検出器具や診断キットに用いれば、ヒトのみならずサルをはじめとする各種動物疾患モデルにおけるIL-18関連疾患を診断することができる。

【0113】

（5-2）ヒトIL-18活性阻害剤など

上記（1）の抗体は、ヒトIL-18を特異的に認識するヒト由来のヒト抗ヒトIL-18抗体である。さらに、この抗体は、ヒトIL-18に特異的に結合するとともに、ヒトIL-18の受容体への結合を阻害してこの受容体を介したシグナル伝達も阻害し、さらには、ヒトIL-18によって誘導されるIFN- $\gamma$ の産生も阻害する。

【0114】

したがって、この抗体は、言い換えれば、ヒトIL-18アンタゴニストである。そして、このヒトIL-18アンタゴニストは、ヒトインターロイキン-18活性阻害剤として利用することができる。

【0115】

上記「ヒトIL-18アンタゴニスト」としては、特に限定されるものではないが、例えば、以下のi)~iv)の物質が挙げられる。

i)上記（1）に記載の本発明の抗体。

ii)上記（1）に記載の本発明の抗体の断片。

iii)上記（1）に記載の本発明の抗体またはその断片の修飾抗体。

iv) i)~iii)に記載の抗体、抗体の断片、または修飾抗体が認識するヒトIL-18上の

10

20

30

40

50

抗原決定領域に基づいて分子設計された低分子化合物。

【0116】

ここで、上記「ヒトインターロイキン - 18 活性阻害剤」は、ヒトインターロイキン - 18 の活性を抑制するのはもちろん、ヒトインターロイキン - 18 の受容体への結合も拮抗的に阻害するもの、さらには、ヒトIL - 18 とIL - 18 受容体との複合体に結合して、シグナル伝達を阻害するものであってもよい。

【0117】

また、上記(2)に記載の本発明の遺伝子は、ヒトIL - 18 が関与する免疫疾患における遺伝子治療剤として利用することができる。この遺伝子治療剤を摂取すれば、体内で本発明の抗体またはその断片が形成されるので、上記ヒトIL - 18 活性抑制剤と同様の効果が得られる。なお、ヒト抗ヒトIL - 18 抗体が、生体内で形成され続けると、ヒトIL - 18 の作用を過剰に抑制してしまうが、ヒトの場合、IL - 18 が欠失したとしても、IL - 1 がIL - 18 と同様の作用を示すため、特に問題は生じない。

10

【0118】

本発明の抗体は、ヒトIL - 18 を特異的に認識するヒト由来のヒト抗ヒトIL - 18 である。すなわち、この抗体のアミノ酸配列は、従来のキメラ抗体やヒト化抗体とは異なり、すべてヒト由来である。

【0119】

したがって、本発明の抗体の作用を阻止する抗体(阻止抗体)が形成される虞はない。それゆえ、たとえ、この抗体を反復投与または長期投与したとしても、高い安全性を保持したまま、効果も持続することが可能である。

20

【0120】

それゆえ、本発明のヒトIL - 18 活性阻害剤および遺伝子治療剤は、ヒトIL - 18 が関与する免疫疾患の治療法として有用な免疫疾患治療剤(免疫治療薬)として利用可能である。

【0121】

なお、本発明の免疫疾患治療剤は、体内でその効果を発揮すればよいので、例えば、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(またはこれを含むヒトIL - 18 活性阻害剤)を投与してもよいし、プロドラッグ化して体内で代謝されて当該ポリペプチドが発現されてもよい。すなわち、本発明の免疫疾患治療剤は、上記i)~iv)のヒトIL - 18 アンタゴニスト(ヒトIL - 18 活性阻害剤)または上記遺伝子治療剤がプロドラッグ化されていてもよい。すなわち、体内で、活性代謝物となるように、免疫治療薬剤を修飾してもよい。

30

【0122】

また、本発明の免疫疾患治療薬剤には、1種類以上の賦形剤、1種類以上の結合剤、1種類以上の崩壊剤、1種類以上の滑沢剤、1種類以上の緩衝剤などのように、医薬品として許容される添加物が含まれていてもよい。

【0123】

以上のように、本発明の抗体(ヒトモノクローナル抗体)及び、当該抗体フラグメント分子は、ヒト由来抗ヒトIL-18抗体の可変領域を有し、ヒトIL-18と強く反応して、IL-18 とIL-18受容体間の結合に阻害作用を示す。さらに、IL-18によって惹起される種々の免疫応答を阻害することができ、当該免疫応答により惹起されるアレルギー、炎症及び免疫異常性疾患の予防または治療薬、例えば、抗炎症剤あるいは自己免疫疾患の治療及び予防のための薬剤として使用することができる。

40

【0124】

また、本願発明のヒトIL-18に対するヒト由来s c F vは、IL-18と特異的に結合し、IL-18により誘導されるシグナル伝達及びIFN- $\gamma$  産生を阻害するものであることが示された。従って、当該s c F v及びs c F vのV<sub>H</sub>鎖及びV<sub>L</sub>鎖をヒト定常領域またはその一部と結合させたヒト抗ヒトIL-18抗体またはその抗体フラグメントは、IL-18の関与する疾患、例えば慢性炎症性疾患や自己免疫疾患等の治療への適用が期待される。また、IL-18と

50

は結合するが抑制作用を示さなかった抗体を含めてこれらの抗体で、IL-18の血中濃度を測定し、病態の症状の変動をモニターすることもできる。

【0125】

なお、前述のように本発明の抗体は、ヒトIL-18に対するシグナル伝達及びINF- $\gamma$ 産生を阻害するので、そのような特性を有する抗体とヒトIL-18との結合特異性を示すIL-18上の抗原決定領域を明らかにすれば、低分子化合物の免疫疾患治療薬の開発への応用が可能となる。この抗原決定領域を、エピトープという。このエピトープは、アミノ酸の1次配列そのものである場合や、もしくは、ペプチド鎖の折り畳まれ方で構築した立体構造である場合がある。いずれの場合でも、例えば、本発明者等が提案した「モノクローナル抗体を用いた分子鋳型デザイン法」によって、エピトープの類似化合物(ミミック分子)をデザインすることができる(T. Fukumoto et al., Nature Biotechnology, 16:267-270, 1998.)。ここで、「低分子化合物」とは、例えば、ペプチドや抗体などの比較的分子量の大きい化合物(分子量1万以上)のものではなく、一般に低分子医薬として用いられている、分子量1万未満、好ましくは、分子量3000未満の化合物を示している。なお、低分子化合物の分子量は、小さいほど好ましい。

10

【0126】

なお、上記低分子化合物として、ペプチドやさらに低分子量の化合物を創製する場合、このミミック分子の分子構造に着目して分子設計を行う、いわゆるin silicoプロセスによって、設計することができる。このように、in silicoによる分子設計を行うことにより、安価かつ迅速に、治療薬となりうる低分子化合物を、リード化合物として選抜できる。

20

【0127】

具体的には、例えば、後述の実施例では、ヒト抗ヒトIL-18 scFv抗体のCDRは、配列番号4~6, 10~12に示されている。一般に、抗体において、CDRは、抗原を認識する領域(部位)である。すなわち、CDRは、抗体の活性中心となる。つまり、実施例1に示したscFvは、CDRによって、ヒトIL-18を特異的に認識する。従って、このCDRの高次構造と略一致(好ましくは完全に一致)するように、低分子化合物を設計すれば、その低分子化合物は、低分子医薬品として利用できる。言い換えれば、低分子化合物は、CDRのコンフォメーションに近づくように設計する。なお、in silicoプロセスの方法は、特に限定されるものではないが、例えば、SBDD(Structure Based Drug Design), CADD(Computer-Aided Drug Design)などにより、CDRが有する官能基や、CDRの高次構造に基づいて、コンピューター上で設計できる。

30

【0128】

このようにして設計した低分子化合物は、抗体のようなタンパク質(ペプチド)に比べて、安定性が高い。このため、この低分子化合物は、取り扱いやすい医薬品として利用できる。

【0129】

(5-3)免疫疾患治療薬剤の適用例-1

前述のように、本発明のヒトIL-18活性阻害剤および遺伝子治療剤は、ヒトIL-18が関与する免疫疾患の治療法として有用な免疫疾患治療薬剤となる。ここで、免疫疾患治療薬剤の適用例について説明する。

40

【0130】

Th1細胞優位な免疫応答は、一般に、自己免疫疾患の病態に検討される。しかし、Th1細胞優位な免疫応答は、Th2細胞が関与する疾患(喘息・アトピーなど)に対して、防御的である。しかしながら、最近の研究で、Th1細胞が、Th2細胞が関与する気道過敏を増大させることに関与することが明らかとなった。さらに、Th1細胞が、好中球の増加と活性化によって、気道過敏性(AHR)を誘導することが示された。

【0131】

実際、喘息患者の気道は、好中球数の増加だけでなく、INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , およびIL-8レベルの増加も見られる場合がある。それにもかかわらず、どのようにTh1細胞

50

胞がTh2細胞の影響を妨げ、病態を示すのか、そのメカニズムは、未だ解明されていない。従って、気道炎症および気道過敏性が誘導された場合の、Th1細胞の病態への関与を解明することは重要である。

【0132】

IL-18は、本来は、抗CD3抗体およびIL-12存在下、Th1細胞から産生するIFN- $\gamma$ を増加させる因子として、発見された。このため、IL-12とIL-18との混合物を注入すると、in vivoでIFN- $\gamma$ 産生細胞を誘導して、Th2細胞が誘導するIgE応答を阻害する。しかしながら、本発明者等の最近の研究によって、in vitroで誘導した抗原特異的Th1細胞あるいはTh2細胞を、ナイーブ宿主マウス（非感受性宿主マウス）に受動移入後、宿主マウスを約1ヶ月間、無処置で放置しておく、移入した各細胞が、メモリー表現型のTh1細胞あるいはTh2細胞となること、および、これらの細胞を、経鼻的に投与した抗原、または、抗原とIL-18とにより刺激された場合に、宿主動物が、気道炎症を発症することが明らかとなった（T.Sugimoto et al., J. EXP. Med., 2004, 199, 535-545.）。従来の報告は、IL-13の中和は、Th2細胞が移入されたマウスの、好酸球の増加とAHRとを阻害するというものであった。これに対し、同様の処理をしたTh1細胞が移入されたマウスでは、たとえ、この処理が、著しく気道の好酸球の増加を減少させるものであっても、AHRが阻害されない。

【0133】

これらの結果は、Th1細胞が、Th2細胞とは全く異なる様式で、AHRを誘導することを示唆している。Th1細胞は、抗原とIL-18とによる刺激に対して、ユニークな応答を示し、Th1サイトカイン（IFN- $\gamma$ ）、Th2サイトカイン（IL-9、IL-13）、ケモカイン（RANTES、MIP-1 $\alpha$ （マクロファージ由来炎症性タンパク質-1））、およびGM-CSFを産生する。Th2サイトカインとGM-CSFは、主に、気管支喘息を誘導する因子として、広く認められている。いくつかの研究から、Th1細胞とTh2細胞とは互いに阻害しあうものではなく、むしろ共同することで、気管支喘息の発症を誘導するとともに、その症状を増幅することが示唆されている。実際、IFN- $\gamma$ とIL-13との同時投与は、最も重篤な気管支喘息を誘導する。本発明者等が見出したTh1細胞の新規機能は、抗原とIL-18とで刺激を受けると、Th1サイトカイン、Th2サイトカイン、GM-CSFおよびケモカインを産生することにより、様々な炎症性病態を誘導することである。

【0134】

従って、ヒトTh1細胞も、同条件下で、病態を示す可能性がある。

【0135】

後述の実施例2では、ヒトTh1細胞が、抗原とIL-18存在下で、Th1サイトカイン、Th2サイトカイン、GM-CSFおよびケモカインを産生することが確認された。この実施例では、新たに誘導されたIL-18R $\alpha$ を強く発現するTh1細胞が、抗CD3抗体とIL-18とによる刺激によって、IFN- $\gamma$ 、IL-13、GM-CSF、およびIL-8の産生を著しく増加させることが示された。この結果は、Th1細胞が、Th1サイトカイン、Th2サイトカインだけでなく、GM-CSF、IL-8の産生により、組織の損傷を誘導する可能性を示している。

【0136】

このように、IL-18は、抗原と共同してTh1細胞を刺激することにより、重篤な気道炎症およびAHRを発症する。従って、例えば、前述したヒトIL-18アンタゴニスト(前述のi)~iv))は、その治療薬となる。

【0137】

(5-4)免疫疾患治療薬剤の適用例-2

次に、免疫疾患治療薬剤の別の適用例について説明する。

【0138】

これまで、アトピー性皮膚炎は、アレルゲン特異的IgE抗体依存性の獲得型アトピーとして考えられていた。このため、アレルゲン特異的IgE抗体を標的とする、IgE抗

10

20

30

40

50

体障害剤や、抗アレルギー剤などが、アトピー性皮膚炎の治療薬として用いられてきた。しかし、これらの治療薬では治癒できない、または、再燃を繰り返すアレルギー患者が、年々増加している。

【0139】

従来のように、獲得型アトピー性皮膚炎（I g E抗体依存性アトピー性皮膚炎）を照準とした治療法では無効な、自然型アトピーの発症および重症度には、I L - 1 8が重要な役割を果たしている。

【0140】

しかし、そのような症例に対する有効な治療法は、未だ確立されていない。

【0141】

T h 2細胞の機能に対し拮抗作用を示すT h 1細胞を、C p G D N A投与するなどの方法で誘導できるが、同時に誘導されるI L - 1 8はT h 1細胞に作用して、T H 1型の気管支喘息を誘導することが問題となる。

【0142】

獲得型アトピー性皮膚炎（I g E抗体依存性アトピー性皮膚炎）の治療法として、抗原特異的減感作療法が知られているが、その分子機構は、未だ解明されておらず、治療の有効性も低い。なお、減感作療法とは、I g E抗体が関与する即時型アレルギー反応（I型アレルギー反応）の原因抗原であるアレルギー、特に吸入性アレルギーを生体内に投与（一般には注射）、アレルギーに対する過敏反応を軽減させようとする治療法である。

【0143】

I g E抗体のF c部に特異的で、F c R 1部への結合を阻害するヒト型マウス抗体が、Genentic社で開発され、アレルギー治療薬として有効であることが報告されている（Milgrom H. et al., N. Engl. J. Med., 1999:341, 1966-73.）。

【0144】

また、T h 2サイトカイン障害剤は、抗I L - 4抗体、抗I L - 5抗体、抗I L - 1 3抗体、および、これらの受容体に対する抗体は、アレルギー治療薬としての抗体医薬（医薬品）になり得ると考えられるが、未だ、有効な抗体医薬は開発されていない。

【0145】

F K 5 0 6に代表される低分子免疫抑制剤の低量使用は、抗アレルギー作用を発揮するが、副作用として、腎障害などが報告されている。

【0146】

T L R (Toll Like Receptor) を介する刺激を加え、I L - 1 2の産生を誘導する手段として、CpGDNAが目ざされている。このCpGDNAは、非メチル化 CpGモチーフを有するDNAである。CpGDNAは、特にTh1反応（マクロファージを活性化する反応）を強く惹起し、臨床面での応用が期待されている分子である。しかし、CpGDNAは、前述のように、同時に誘導されるI L - 1 8はT h 1細胞に作用して、T H 1型の気管支喘息を誘導することが問題となる。

【0147】

このように、アトピー性疾患は、これまで、アレルギー特異的I g E依存性の獲得型のアトピー疾患として論じられ、それを照準としたI g E障害剤や抗アレルギー剤などが、治療薬として用いられている。しかし、これらの治療薬では、治癒しない、あるいは、再燃を繰り返す患者が年々増加している。

【0148】

すなわち、従来の獲得型アトピーを照準とした治療法では、無効な自然型アトピーが存在しており、その発症には、I L - 1 8が重要な役割を果たしている。

【0149】

従来の免疫学の考え方では、T h 1細胞誘導は、T h 2細胞機能を抑制することによって、抗アレルギー作用を発揮するものと考えられてきた。しかし、本発明者等は、I L - 1 8が、T h 1細胞をin vivo条件下で刺激することにより、I N F - , I L - 8 , 9 , 1 3などを産生し、難知性の気管支喘息を誘導することを見出した。これは、アレルギー

10

20

30

40

50

一性炎症発症が、Th1とTh2とのバランスが原因であるという、従来の定説を覆すものである。つまり、従来のバランス是正を目指す治療法を明確に否定するものである。

【0150】

IL-4, 5, 9, 13は、重要なTh2サイトカインである。一方、ロイコトリエン、ヒスタミン、セロトニンなどは、重要なケミカルメディエーターである。これらを個々に抑制(阻害)する技術はあっても、その上流から阻止するものではない。すなわち、各サイトカインに直接作用して、それらの機能を抑制(阻害)する技術はあっても、各サイトカインの産生を上流で、阻害する技術はない。IL-18は、上記各サイトカインの上流にあることから、IL-18の活性を阻害することによって、アレルギー性疾患(アレルギー性炎症)に有効であると考えられる。

10

【0151】

アレルギー性疾患の発症メカニズムには、活性化T細胞、好塩基球、および肥満細胞が深く関与する。特に、アレルゲンによる肥満細胞または好塩基球上のFcεRに結合したIgE分子の架橋によって、これらの細胞が活性化される。その結果、Th2サイトカインとケミカルメディエーターとが産生され、アレルギー性炎症(アレルギー性疾患)が誘導されると考えられている。しかし、アレルゲンやIgE関与がなく、感染を契機にアレルギー性炎症が誘導される場合がある。抗アレルギー剤、免疫抑制剤など、非特異的な治療法は存在するものの、IL-18を特異的に抑制する技術は開発されていない。

【0152】

そして、これまで作製されている抗ヒトIL-18抗体は、マウス抗体をヒト化したものであるため、臨床応用できる抗体医薬にはなりえない。

20

【0153】

本発明の抗体は、自然型アトピー(IL-18依存性疾患)を誘導するIL-18に対する、ヒト由来のヒト抗ヒトIL-18モノクローナル抗体(完全ヒト抗体)である。これまで、ヒトIL-18に対する完全ヒト抗体は、開発されておらず、本発明の抗体が、国際的に唯一のものである。この抗体は、臨床適用しても、マウス抗体のように、抗原性を示さない。従って、この抗体は、副作用のない優れた抗体医薬として利用できる。これにより、アレルギー性疾患、自然型アトピー、および喘息などの新規な治療法を確立できる。例えば、この抗体は、従来型の獲得免疫系の異常に基づく獲得型アトピー(IgE依存性)を標準とした治療法では無効な、自然型アトピー(IL-18依存性)を標的とした新規な治療法と確立できる。

30

【0154】

後述する実施例に示すように、この抗体は、種々のin vitro系で、IL-18の活性を抑制した。特に、この抗体は、抗原とIL-18とによる刺激によって生じるTh1細胞からのTh1サイトカインとTh2サイトカインとの産生抑制機能を有している。この機能は、IL-12の作用を損なわない点で重要である。

【0155】

従って、上記免疫疾患治療薬は、現在の難病の1つであるアレルギー性炎症の治療標的として、重要な役割を果たす。さらに、上記免疫疾患治療薬は、従来のアレルギー性炎症治療薬と全く異なる新しいタイプの治療薬を創製するために有用である。

40

【0156】

以上のように、IL-18は、Th1細胞を刺激して、気管支喘息を誘導する。

【0157】

また、IL-18は、樹状細胞、マクロファージなどの免疫系の細胞だけでなく、皮膚ケラチノサイト、腸管上皮細胞、気道上皮細胞など、種々の非免疫系の細胞からも産生する。

【0158】

また、IL-18は、IL-12の存在下で、様々な免疫系または非免疫系の細胞から、IFN-γの産生を誘導する。一方、IL-18は、IL-12の非存在下で、NK細胞、T細胞、NK細胞から、IL-4, IL-13などのTh2サイトカイン(ヘルパ

50

ー T 2 細胞から産生するサイトカイン) の産生を誘導して、抗原非特異的に I g E 産生を誘導する。

【 0 1 5 9 】

また、I L - 1 8 は、抗原刺激を受けた T h 1 細胞を刺激して、T h 1 サイトカインに属する I F N - の産生を増強するばかりか、T h 2 サイトカインに属する I L - 9 , I L - 1 3、さらに代表的なケモカインである I L - 8 の産生を誘導する。

【 0 1 6 0 】

また、I L - 1 8 は、O V A 特異的 T h 1 型メモリー T 細胞を移入したマウスに、経鼻的に O V A と共に投与する ( I L - 1 8 と O V A とを投与 ) ことにより、肺胞と間質内への好中球・リンパ球・マクロファージ・好酸球の強い湿潤像と、気道過敏性とを特徴とする T h 1 型の気管支喘息を誘導できる。

【 0 1 6 1 】

また、I L - 1 8 は、抗原 / I g E 非依存的に、直接、肥満細胞や高塩基球を刺激する。その結果、様々なサイトカインや化学伝達物質の産生を誘導し、自然型アトピー ( I L - 1 8 依存性炎症 ) を誘導する。

【 0 1 6 2 】

T h 2 細胞依存性の喘息は、抗 I L - 5 抗体、あるいは、抗 I L - 1 3 抗体によって、抑制できる。しかし、抗原と I L - 1 8 とにより刺激された T h 1 細胞が誘導する喘息に対しては、これらの抗体による治療は無効である。本発明の抗体は、上記の抗体では無効な喘息の治療に有効である。すなわち、本発明の抗体は、I L - 1 8 によって誘導される喘息 ( 感染が原因で発症する喘息 ) に対して有効である。

【 0 1 6 3 】

本発明は、I L - 1 8 が関与する喘息病態の発見を含み、かつ、従来型の獲得免疫系の異常に基づく獲得型アトピー ( I g E 依存性 ) を標準とした治療法では無効な自然型アトピー ( I L - 1 8 依存性 ) を標的とする新規な治療法を確立する上で重要となる。

【 0 1 6 4 】

また、本発明の抗体は、自然免疫系と獲得免疫系とを結合する上で重要な役割を果たすヒト I L - 1 8 に対するヒト I L - 1 8 モノクローナルヒト抗体 ( 抗ヒト I L - 1 8 抗体 ) である。

【 0 1 6 5 】

この抗体は、従来型の獲得免疫系の異常に基づく獲得型アトピー ( I g E 依存性 ) を標準とした治療法では無効な自然型アトピー ( I L - 1 8 依存性 ) を標的とした新しい治療法を提供するものである。

【 0 1 6 6 】

さらに、この抗体は、アトピー性皮膚炎疾患だけでなく、喘息や鼻炎、その他のアレルギー性疾患に対する新規な治療法を提供するものである。特に、I L - 1 8 は、T h 1 細胞を刺激して、難治性の気管支喘息を発症する。このため、気道上皮に感染して、気道上皮細胞から I L - 1 8 の産生を誘導する作用を示す病原体は、気管支喘息を発症する原因となる。従って、この抗体は、感染によって発症した喘息に対して有効な治療薬となる。

【 0 1 6 7 】

本発明にかかる抗体およびその断片は、ヒト I L - 1 8 の受容体への結合を阻害するヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体およびその断片である。従って、ヒト I L - 1 8 が原因となる様々な炎症性疾患の治療薬 ( 治療方法 ) または予防薬 ( 予防方法 ) として利用可能である。

【 0 1 6 8 】

また、本発明は、例えば、後述の実施例に示した、s c F v 抗体のうち、C D R の高次構造に基づき、低分子化合物を設計することにより、I L - 1 8 依存の低分子医薬品 ( 化学合成薬剤 ) の開発に重要な手段を提供する。

【 0 1 6 9 】

本発明で得られたヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体は、感染を契機に増悪するアトピー性皮膚炎、難知性の気管支喘息の治療に対して有効である。

10

20

30

40

50

## 【0170】

本発明のヒト抗ヒトIL-18抗体は、アレルギー/IgEを原因としないIL-18依存性炎症（例えば、自然型アトピー）に対して新規な治療法を確立できる。

## 【0171】

前述のように、本発明のヒト抗ヒトIL-18抗体は、ヒトIL-18の受容体への結合を阻害する。従って、この抗体は、上記のような、ヒトIL-18が原因となって発症する、様々な炎症性疾患の治療と予防に有効となる。

## 【0172】

本発明では、ヒト1本鎖抗体(s c F v)を提示するファージディスプレイライブラリーから、ヒトIL-18に特異的に結合するs c F vの単離に成功した。この1本鎖抗体も、ヒトIL-18の受容体への結合を、特異的に阻害することが可能である。

10

## 【0173】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例の記載に限定されるものではなく、本発明の範囲内で種々の変更が可能である。

## 【実施例1】

## 【0174】

## (1-1) 健常者からのファージライブラリーの構築

ファージライブラリーの構築は、J. D. Marks ら (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) により報告されている方法を参考に、健常者20名の末梢血由来リンパ球を出発材料として行った。構築した $V_H(\ )-V$ 、 $V_H(\ )-V$ 、 $V_H(\mu)-v$ 、 $V_H(\mu)-V$ の各サブライブラリーは、それぞれ $1.1 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $8.4 \times 10^7$ 、 $5.3 \times 10^7$ クローンの多様性を有すると評価された。

20

## 【0175】

## (1-2) パンニング

ヒトIL-18を0.1M NaHCO<sub>3</sub> 1mLに溶解し、35mmのディッシュ(岩城)に4で一晚反応させて固定化した。次いで、0.5%ゼラチン/PBSを用いて20で2時間ブロッキングした後、0.1%Tween20-PBSで6回洗浄した。これに、健常人由来の抗体ファージライブラリー(1本鎖可変領域断片(s c F v)提示ファージ液)を0.9mL( $1 \times 10^{12}$ tu/mL)に加え、反応させた。

## 【0176】

次に、この反応液を、0.1%Tween20-PBSで10回洗浄した後、1.0mLのグリシン緩衝液(pH2.2)を加え、IL-18と結合するs c F v提示ファージを溶出した。溶出したファージに、1M Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl, (pH9.1)を加えてpHを調製した後、対数増殖期の大腸菌TG1に感染させた。感染後のTG1を3000×g, 10分で遠心分離して、上清を除き、200μLの2×YT培地で懸濁し、SOBAGプレート(2%グルコース、100μg/mlのアンピシリン含有SOBプレート)に播き、30のふ卵器中で一晚培養した。生じたコロニーは適量の2×YT培地を加えスクレイパー(Costar)を使って懸濁、回収した。

30

## 【0177】

このTG1液50μLを、30mLの2×YTAG培地に植え、ヘルパーファージを用いてレスキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。健常人由来ファージライブラリー $V_H(\ )-V$ 、 $V_H(\ )-V$ 、 $V_H(\mu)-V$ 、 $V_H(\mu)-V$ 、それぞれについて、前述のIL-18固定化プレートを用いてパンニングを計2回行った。2回目のパンニング後に、SOBAGプレートから任意にクローンを抽出し、s c F vの発現の確認及びIL-18 ELISAによる特異性の確認(スクリーニング)と塩基配列の解析とを行った。

40

## 【0178】

## (1-3) IL-18 ELISAによるスクリーニング

分離したクローンをスクリーニングするためのELISAは、ヒトIL-18をELISAプレートに固定化して行った。具体的には、2μg/mLのヒトIL-18、2.5μg/mLのヒト血清

50

アルブミン (HSA) を、40  $\mu$ L/well の ELISA プレート (Nunc) に入れ、4 で 16 時間静置し、固定化した。固定化プレートは、0.5% BSA、0.5%ゼラチン及び 5% スキムミルクを含む PBS 溶液 400  $\mu$ L/well を ELISA プレートに入れ、4 で 2 時間静置し、ブロッキングを行った。

#### 【0179】

次に、この ELISA プレートに、scFv 提示ファージを含む試料液 40  $\mu$ L/well を入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で 5 回洗った。続いて、この固定化された scFv ファージに、ビオチン標識した抗 M13 モノクローナル抗体 (Pharmacia biotech) を加え、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識した抗マウス IgG 抗体を二次抗体として反応させた。この反応液を洗浄液で 5 回洗った後、発色基質液 (1g/mL p-nitrophenyl phosphate (Wako)、10% ジエタノールアミン (Wako) を含む PBS 溶液) を 50  $\mu$ L/well 入れ、遮光し、室温 ~ 37 で、5 ~ 10 分発色させた。マルチプレートオートリーダー NJ-2001 (Inter Med) で 405nm の吸光度を測定した結果、評価したクローン全てが、IL-18 に特異的であることが確認できた。その結果を図 1 に示す。

#### 【0180】

##### (1-4) クローンの配列分析

次に、単離したクローンの scFv 遺伝子の V<sub>H</sub> 鎖及び V<sub>L</sub> 鎖遺伝子の DNA 塩基配列を Dye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。ELISA 及び配列分析の結果、単離したクローンは 2 種に分類された (h18-40、h18-108)。

#### 【0181】

なお、配列番号 1 および 7 にはクローン番号 h18-108 の V<sub>H</sub> 鎖及び V<sub>L</sub> 鎖遺伝子の塩基配列がそれぞれ示される。また、配列番号 3 および 8 にはこの V<sub>H</sub> 鎖及び V<sub>L</sub> 鎖のアミノ酸配列が示される。

#### 【0182】

##### (1-5) ヒト抗ヒト IL-18 scFv の発現と精製

前記 (1-2、3) で単離したヒト IL-18 に反応する scFv クローン (h18-40・h18-108) からプラスミド DNA を回収して、常法に従って大腸菌 HB1251 を形質転換した。2% グルコース及び 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 2 x YT 培地でこれらの大腸菌を一夜前培養後、グルコースフリーの 2 x YT 培地に一部移植し、終濃度 1mM IPTG、100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを加えて更に一夜培養して scFv の発現誘導を行った。培養終了後菌体を遠心回収し、1mM EDTA を含む PBS に懸濁して氷中に 30 分菌体を放置した。次いで 8,900 x g で 30 分間遠心し、上清を回収して 0.45  $\mu$ m フィルターを通過後、ペリプラズム画分から scFv を精製するための出発材料とした。

#### 【0183】

このようにして調製した精製のための出発材料を、抗 E tag 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、常法に従って精製した。PBS で透析後、エンドトキシン除去カラム Detoxi-gel (PIERCE 社) で添付のプロトコルに従いエンドトキシンを除去した。分子量カット 10,000 の Centricon (Amicon 社) で濃縮後、0.45  $\mu$ m フィルターを濾過して精製標品とした。

#### 【0184】

##### (1-6) 精製 scFv の IL-18 に対する結合性

次に、精製 scFv (h18-40・h18-108) の IL-18 に対する結合性を ELISA 法で測定した。PBS で 0.5  $\mu$ g/mL に調製したヒト IL-18 を固相化した 96 穴プレート (NUNC. MAXISORP) に、精製 scFv を 100  $\mu$ L 加えて 37 で 1 時間反応させた。0.05% Tween-PBS (以下 PBST と省略することもある) で 5 回洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗 E tag 抗体と更に 37 で 1 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、発色基質液を加えて呈色させ、405nm の吸光度を測定して結合性を評価した。その結果を図 2 に示す。同図に示すように、2 種の抗体 (h18-40・h18-108) は全て IL-18 と特異的に結合した。

#### 【0185】

(1-7) IL-18に刺激されたヒト骨髄単核球KG-1細胞からのIFN- $\gamma$ 産生に対する作用  
IL-18(20ng/100 $\mu$ L)とscFvとを反応させた後に、KG-1 cell( $3 \times 10^5$  cells/100 $\mu$ L)培養液に加え、24時間後の培養上清中におけるIFN- $\gamma$ 量をELISA(Biosource)により測定した。scFv(h18-40・h18-108)に関してIL-18阻害活性をKG-1 cellのIFN- $\gamma$ 産生で調べた結果、コントロールおよびscFv(h18-40)では阻害活性は見られなかったが、scFv(h18-108)は濃度依存的にKG-1 cellのIFN- $\gamma$ 産生を抑制した。図3に、その結果を示す。

#### 【0186】

(1-8) IL-18のヒト骨髄単核球KG-1細胞への結合阻害作用

ビオチン標識IL-18(400ng/50 $\mu$ L)とscFv(コントロールまたはh18-108)とを反応させた後にKG-1 cell( $1 \times 10^6$  cells/50 $\mu$ L)培養液に加え、phycoerythrin標識ストレプトアビジン(Becton Dickinson)を反応させフローサイトメトリー解析(Beckman Coulter)を行った。

10

#### 【0187】

図4および5に示すように、scFv(h18-108)がIL-18のKG-1 cellへの結合を阻害するかをフローサイトメトリー解析で調べた結果、コントロールscFvはIL-18の結合に変化は見られなかったが(図4)、h18-108はIL-18のKG-1 cellへの結合を濃度依存的に阻害した(図5)。

#### 【0188】

(1-9) scFv(h18-108)の特性

20

ヒトIL-18に対する特異性を示したscFv h18-108について、ウェスタンブロッティングを行った結果、図6に示すように、分子量は約30kDaであった。また、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、図7に示すように、分離パターンから、9割がモノマーのscFvを形成し、残りの1割がダイマーを形成していることが確認された。

#### 【実施例2】

#### 【0189】

実施例2では、IL-18によって刺激したTh1細胞およびTh2細胞から産生するサイトカインについて検討した。

#### 【0190】

(2-1) 試薬

30

組み換えヒトIL-2, IL-4, IL-12, およびIFN- $\gamma$ は、R&D(Minneapolis, MN)から入手した。組み換えIL-18は、MBL社(名古屋 日本)から入手した。FITC(フルオレセインイソチオシアネート)-抗ヒトCD4mAb(モノクローナル抗体)またはCyChrome(シトクロム)-抗ヒトCD4mAb, FITC-抗ヒトCD45RAmAb, FITC-抗ヒトIFN- $\gamma$ mAb, PE-抗ヒトIL-13mAb, および抗ヒトIL-12mAbは、Pharmingen(San Diego, CA)から入手した。PE-抗ヒトIL-18RmAb(クローン70625), 抗ヒトCD3mAb, および抗ヒトIL-4mAbは、R&Dから入手した。

#### 【0191】

(2-2) in vitroでのTh1細胞またはTh2細胞の作製

40

健常なドナー末梢血から、ナイーブCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>T細胞(CD4およびCD45陽性T細胞)を単離した(K. Nakanishi et.al., Int. Immunol. 12:151.). PHA(1 $\mu$ g/mL), IL-12(50 $\mu$ g/mL), および中和抗IL-4mAb(500ng/mL)、または、PHA(1 $\mu$ g/mL), IL-4(200 $\mu$ g/mL), および中和抗IL-12mAb(10 $\mu$ g/mL)とともに、24ウェルプレートで、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>T細胞( $1 \times 10^6$ /mL)を培養することにより、Th1細胞およびTh2細胞を作製した。このようにして刺激したT細胞を、3日目に洗浄し、培地にIL-2を100U/mLを加え、さらに4日間培養した。

#### 【0192】

(2-3) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞の単離

IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞を単離するため、分極化したTh1細胞を、固定化抗CD3(

50

5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および  $\text{IL}-2$  (100  $\text{U}/\text{mL}$ ) とともに、24 ウェルプレート中で培養した。次に、その培養物に、生存する  $\text{Th}1$  細胞が  $\text{IFN}-\gamma$  の発現を豊富にする処理を行った。3 時間後、付着細胞のみを、回収し、抗  $\text{CD}45$  / 抗  $\text{IFN}-\gamma$  二重特異性抗体 (Miltenyi Biotec) と共に、5 分間氷上でインキュベートした。処理した細胞を 50  $\text{mL}$  の底部が円錐状の試験管に移し、その試験管を 37  $^{\circ}\text{C}$  の水浴に配し、20  $\text{mL}$  の温めた培養液中で  $5 \times 10^4$  細胞/ $\text{mL}$  の濃度で細胞を培養した。30 分後、冷却した 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝液溶液 (PBS) で、細胞を洗浄した。細胞表面で捕捉された  $\text{IFN}-\gamma$  を、PE-抗ヒト  $\text{IFN}-\gamma$  を用いて検出した。また、自動 MACS を用いる抗 PE マイクロビーズにより、表面に  $\text{IFN}-\gamma$  を発現した  $\text{Th}1$  細胞を、確実に単離した。

10

## 【0193】

## (2-4) in vitro 培養

新たに分極化した  $\text{Th}1$  細胞および  $\text{Th}2$  細胞、および、新たに分極化した  $\text{Th}1$  細胞から選別した  $\text{IFN}-\gamma^+$  細胞を、種々の濃度の  $\text{IL}-18$  存在下、固定化抗  $\text{CD}3$  (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含んだ  $1 \times 10^5$  /0.2 $\text{mL}$ /ウェルで再培養した。培養開始から 6 時間から 72 時間経過後、上澄を回収し、 $\text{IL}-4$ ,  $\text{IL}-5$ ,  $\text{IL}-8$ ,  $\text{IL}-13$ ,  $\text{IFN}-\gamma$ , および  $\text{GM-CSF}$  の含有量を、ELISA (R & G) により測定した。

## 【0194】

## (2-5) フローサイトメトリー

分極化した  $\text{Th}1$  細胞 ( $1 \times 10^6$  / $\text{mL}$ ) を、24 ウェルプレートで、固定化  $\text{CD}3$  のみ、および、固定化  $\text{CD}3$  と  $\text{IL}-18$  (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) とにより、72 時間再刺激した。最後の 3 時間は、サイトカインの分泌を阻害するため、2  $\mu\text{M}$  のモネンシンを添加した。細胞質内の  $\text{IFN}-\gamma^+$ 、および/または  $\text{IL}-13^+$  細胞の染色による分析は、文献 (K. Nakanishi et.al., J. EXP. Med., 2004, 199, 535-545.) に従って行った。 $\text{Th}1$  細胞および  $\text{Th}2$  細胞上の  $\text{IL}-18\text{R}$  の発現量を測定するため、ヒト  $\text{IgG}$  による  $\text{FcR}$  のブロッキング後、各細胞を、FITC 抗ヒト  $\text{CD}4$ 、および PE 抗ヒト  $\text{IL}-18\text{R}$  鎖  $\text{mAb}$  またはコントロール PE-マウス  $\text{IgG}1\text{mAb}$  により、30 分間、4  $^{\circ}\text{C}$  で、1% FCS を含む PBS 中でインキュベーションした。このようにして得られたサンプルを、FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, CA) によって分析した。

20

## 【0195】

## (2-6) 実験結果

(2-2) ~ (2-5) に従い、健常なドナー末梢血から単離したナイーブ  $\text{CD}4^+ \text{CD}45\text{RA}^+ \text{T}$  細胞を、in vitro で、 $\text{Th}1$  細胞および  $\text{Th}2$  細胞を誘導する条件下、連続して 7 日間刺激した。

30

## 【0196】

その結果を、図 8 に示す。なお、図 8 では、固定化抗  $\text{CD}3$  のみにより刺激した結果 ( $-\text{CD}3$ ) と、固定化抗  $\text{CD}3$  と  $\text{IL}-18$  とにより刺激した結果 ( $-\text{CD}3 + \text{IL}-18$ ) を示している。

## 【0197】

図 8 に示すように、固定化抗  $\text{CD}3$  を用いた試験では、 $\text{Th}2$  細胞は、かなりの量の  $\text{IL}-4$ ,  $\text{IL}-5$ , および  $\text{IL}-13$  を産生したが、 $\text{IFN}-\gamma$  を産生しなかった。また、 $\text{Th}1$  細胞は、主に、 $\text{IFN}-\gamma$ ,  $\text{IL}-8$ ,  $\text{GM-CSF}$  を産生した。

40

## 【0198】

また、図 8 に示すように、固定化抗  $\text{CD}3$  に加えて  $\text{IL}-18$  により刺激しても、 $\text{Th}2$  細胞からの  $\text{Th}2$  サイトカインの産生は、増加しなかった。これに対し、その処理によって、 $\text{Th}1$  細胞からの  $\text{IFN}-\gamma$ ,  $\text{IL}-8$ ,  $\text{IL}-13$ , および  $\text{GM-CSF}$  の産生は、著しく増加した。

## 【0199】

$\text{Th}1$  細胞と  $\text{Th}2$  細胞との  $\text{IL}-18$  に対する応答の違いの根本となるメカニズムは、主に、 $\text{Th}1$  細胞上への  $\text{IL}-18\text{R}$  鎖の発現の選択性によって説明できる。図 9 は

50

、上記の刺激による、各細胞の表面のIL-18R鎖の発現レベルを示す図である。図9に示すように、ヒトTh1細胞は、高レベルのIL-18R鎖を発現するのに対し、Th2細胞は、IL-18R鎖の発現量は、わずかである。したがって、IL-18Rを発現するTh1細胞は、抗CD3とIL-18とに反応して、Th1サイトカイン、Th2サイトカイン、およびGM-CSFを産生する性質を示す。

#### 【0200】

同時に、固定化抗CD3により刺激を受けたTh1細胞の、IL-18投与量による応答性(IFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13の産生)について検討した。そこで、Th1細胞を、種々の濃度のIL-18(~500ng/mL)により、固定化抗CD3存在下、3日間、刺激した。図10は、IL-18の用量と、Th1細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。図10に示すように、Th1細胞は、IL-18存在下、用量依存的に、IFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13の産生が増加した。なお、抗CD3刺激を受けたTh2細胞を、IL-18によりさらに刺激しても、サイトカイン産生の応答は、増加しなかった。したがって、図10に示すように、ヒトTh1細胞のみが、抗原とIL-18との刺激に反応し、Th1サイトカイン、Th2サイトカインばかりでなく、GM-CSF、IL-8を産生するという、特有の作用を示した。

#### 【0201】

このように、IL-18は、分極化したヒトTh1細胞からのIFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13およびGM-CSF産生を誘導した。

#### 【0202】

次に、抗CD3とIL-18による刺激後のサイトカインの産生の速度論を検討した。図11は、Th1細胞の刺激後の培養時間と、Th1細胞からのサイトカインの産生量との関係を示すグラフである。図11に示すように、Th1細胞は、刺激後、比較的早期に、IFN- $\gamma$ を産生し始めた。抗CD3による刺激の24時間後でさえ、大量のIFN- $\gamma$ が検出された。これに対し、その時点では、IL-8もIL-13も検出されなかったが、刺激から72時間後、IL-8およびIL-13が検出された。通常は48時間の測定を行うため、当初、Th1細胞は、IFN- $\gamma$ のみを産生するとみなしていた。しかし、図11に示すように、72時間後に、IL-8およびIL-13を検出することができた。抗CD3に刺激されたTh1細胞を、さらにIL-18によって刺激することにより、上記のサイトカインを、より早く、より多く産生することが、最も重要である。このように、IL-18刺激は、Th1細胞からのIFN- $\gamma$ 、IL-8、IL-13の産生を促進し、増加させた。

#### 【0203】

前述のように、IL-18刺激は、用量依存的に、抗CD3の刺激を受けたTh1細胞からのIFN- $\gamma$ 、IL-13の産生を誘導する(図10)。しかし、Th0細胞が、抗原とIL-18とに対する反応に、IFN- $\gamma$ およびIL-13を産生する可能性を排除する必要がある。そこで、この可能性を排除するために、IL-18刺激を受けたTh1細胞における、細胞質IFN- $\gamma$ および/またはIL-13に陽性のCD4<sup>+</sup>T細胞の割合を、FACS分析によって検討した。その結果を、図12に示す。

#### 【0204】

図12に示すように、固定化抗CD3とIL-18とにより刺激されたヒトTh1細胞の5.65%が、細胞質INF- $\gamma$ およびIL-13に陽性であった。ところが、抗CD3のみによって処理したTh1細胞のわずか1.21%が、細胞質INF- $\gamma$ およびIL-13に陽性であった。細胞内INF- $\gamma$ またはIL-13染色の特異性は、アイソタイプが適合するコントロール抗体では染色されないことから示されている。さらに、このような染色は、過剰の組み換えヒトINF- $\gamma$ 、または、IL-13による前処理によって完全に阻害される(データは示さず)。このように、Th1細胞が、抗CD3とIL-18とにより刺激された時に、IFN- $\gamma$ およびIL-13を産生した。

#### 【0205】

次に、IL-18によるIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞からのIL-13産生の誘導について

検討した。IFN- $\gamma$ を産生するTh1細胞も、抗CD3とIL-18とによる刺激を受けると、IL-13を産生する可能性を検討することは重要である。そこで、IFN- $\gamma$ を発現するヒトTh1細胞から分泌されたIFN- $\gamma$ を、そのTh1細胞の表面に固定化した抗IFN- $\gamma$ 抗体によって得ることにより精製した。

#### 【0206】

図13は、抗CD3抗体刺激を受けたTh1細胞中の、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞の割合と、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞の陽性選別例とを示す図である。図13に示すように、抗CD3抗体で刺激を受けたTh1細胞の23.1%が、細胞表面でIFN- $\gamma$ を発現した。次に、IFN- $\gamma$ を細胞表面に発現するTh1細胞(IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞)を、自動MACSを用いて、陽性選別した。99%の純度でIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Th1細胞を、  
10  
精製できた。得られたIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞を、抗CD3とIL-18と共に培養し、刺激した。図14は、この刺激による、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th1細胞からのサイトカインの産生量を示すグラフである。図14に示すように、その刺激によって、IFN- $\gamma$ 、IL-8、およびIL-13の産生は、かなり増加するが、IL-4の産生は増加しなかった。従って、高度に精製されたIFN- $\gamma$ を発現する生きたヒトTh1細胞は、その細胞表面にIL-18R $\alpha$ 鎖を強く発現しており、抗CD3とIL-18とによる刺激を受けると、IFN- $\gamma$ 、IL-8、およびIL-13を産生すると結論づけることができる。この結果は、ヒトTh1細胞が、そのTCR(T細胞抗原レセプター)に抗原が結合し、さらに、IL-18が作用すると、刺激を受けたTh1細胞が、IFN- $\gamma$ 、IL-8、およびIL-13の産生を増強することを示している。なお、図8、10、11、13および  
20  
14では、独立した4回の実験の代表値であり、各実験では、同様の結果が得られた。

#### 【0207】

以上のように、Th1細胞が、抗原とIL-18とによって刺激されると、Th1サイトカイン(IFN- $\gamma$ など)、Th2サイトカイン(IL-9、IL-13)、ケモカイン(RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、およびGM-CSF)を産生する。気管支上皮に対するIFN- $\gamma$ とIL-13との刺激が、最も重篤な気管支喘息を誘導する。従って、実施例1のscFvを投与して、IL-18の活性を阻害することにより、重篤な気管支喘息の治療が可能となる。

#### 【0208】

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0209】

以上のように、本発明のヒトIL-18に対する抗体およびその断片は、ヒト由来のものである。それゆえ、ヒトIL-18が直接または間接的に関与する疾病の治療において、反復投与や長期投与を行っても、顕著な治療効果と高い安全性とを維持した治療薬を提供できるという効果を奏する。

10

20

30

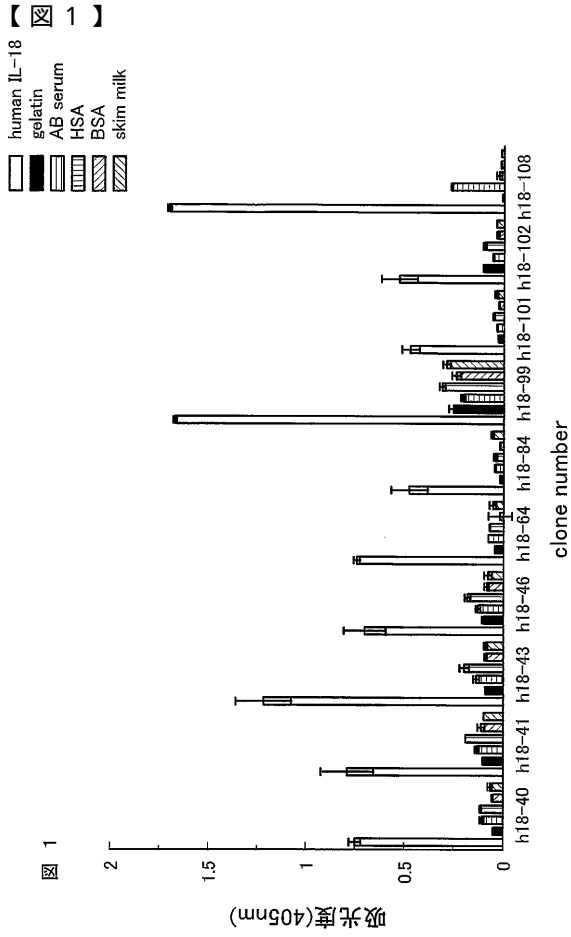


图 1

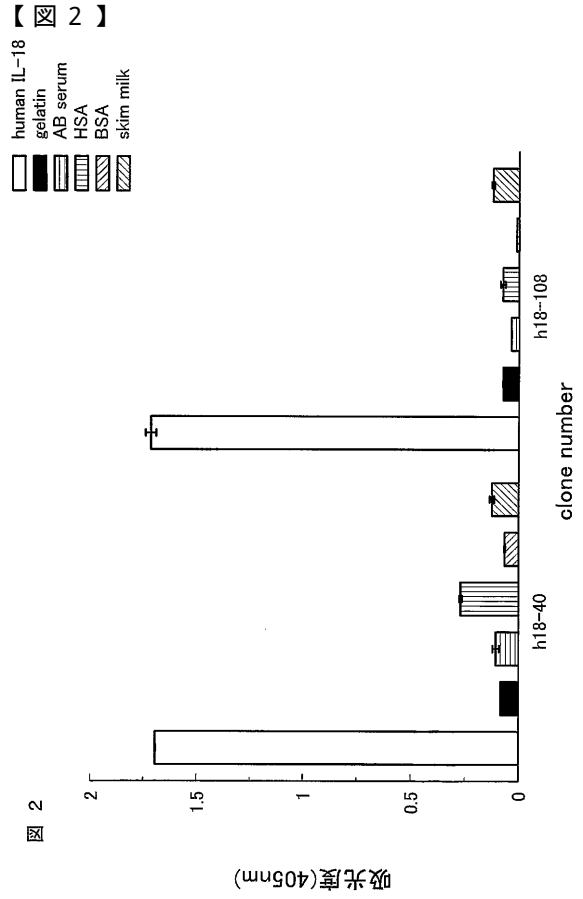


图 2

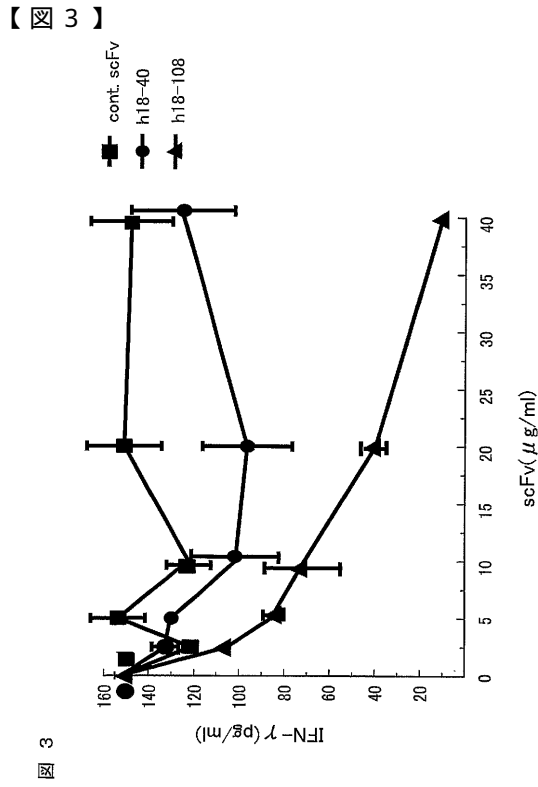


图 3

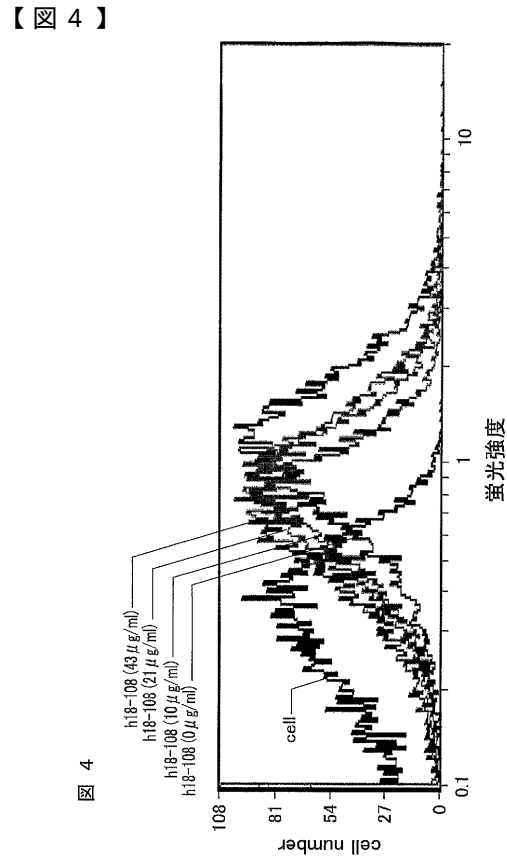


图 4

【 図 5 】

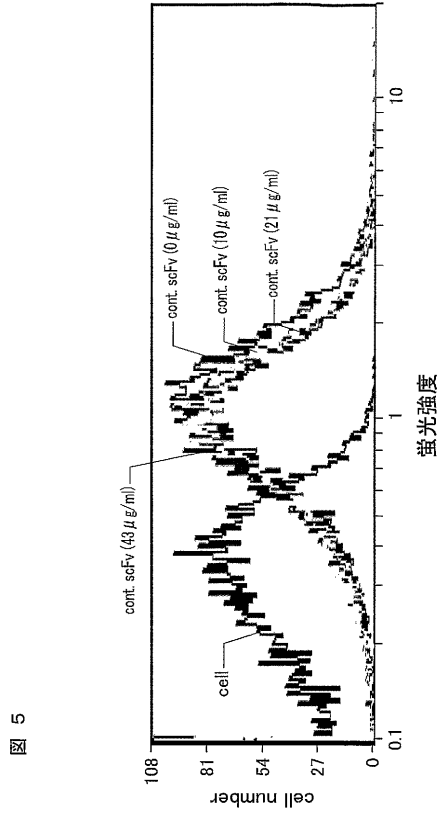


図 5

【 図 6 】

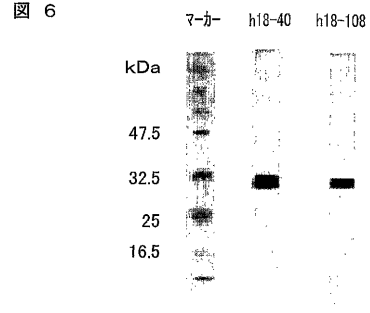
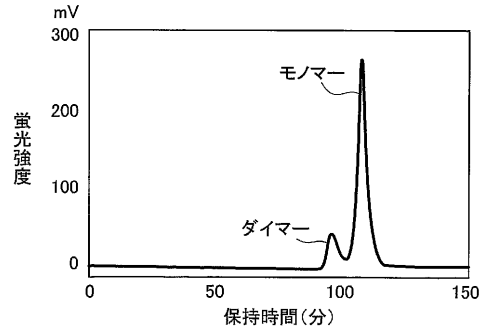


図 6

【 図 7 】

図 7



【 図 8 】

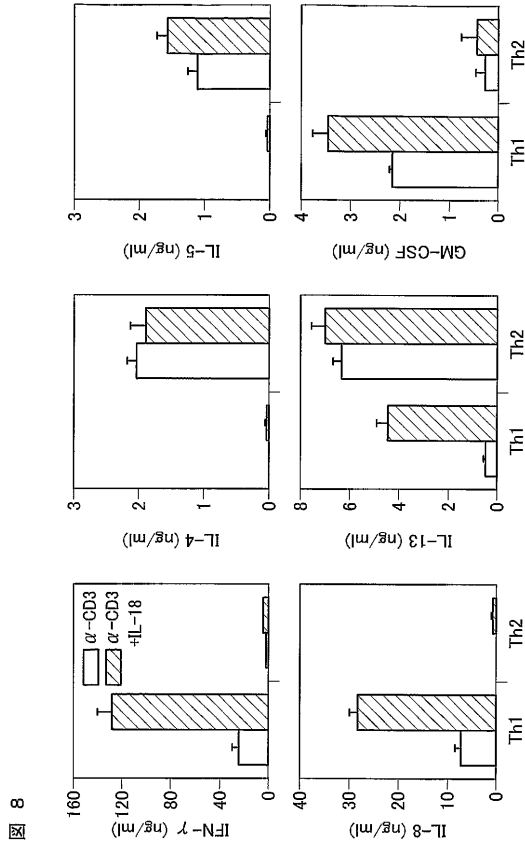
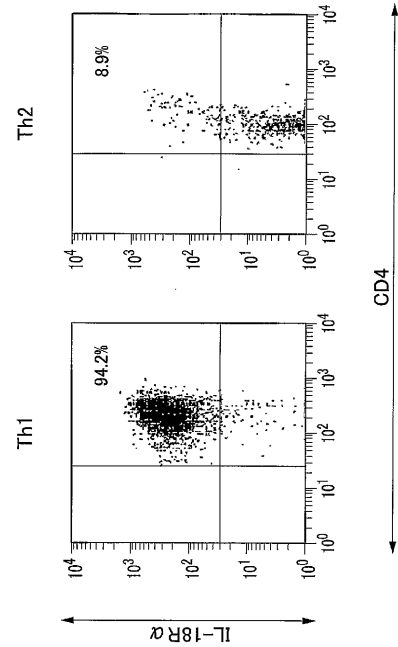


図 8

【 図 9 】

図 9



【 10 】

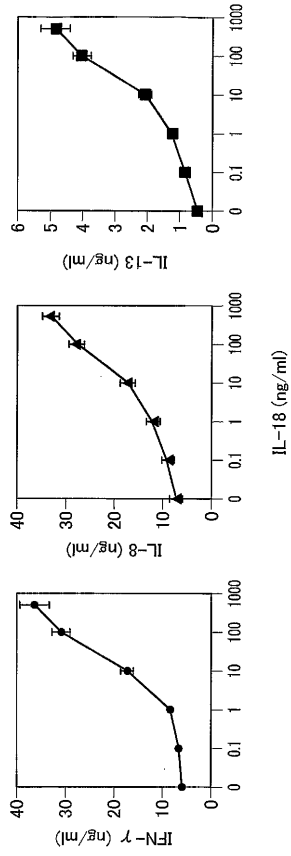


图 10

【 12 】

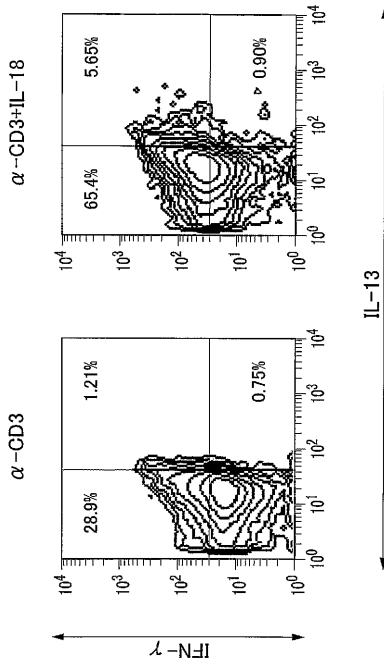


图 12

【 11 】

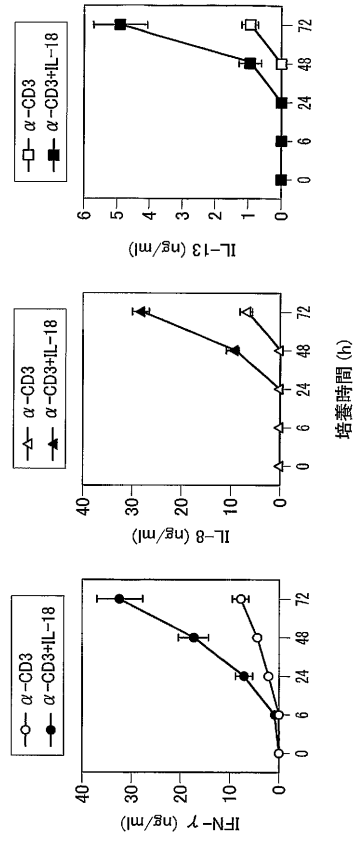


图 11

【 13 】

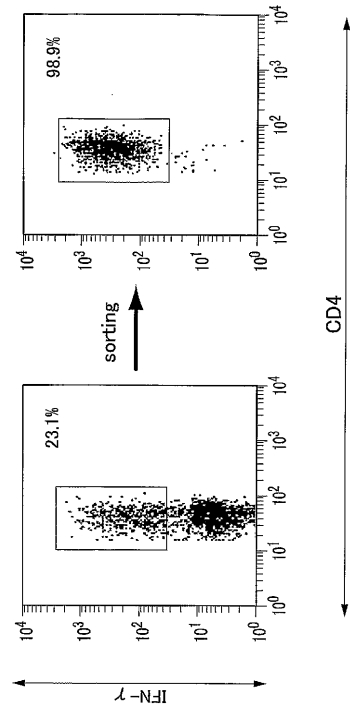


图 13

【 図 1 4 】

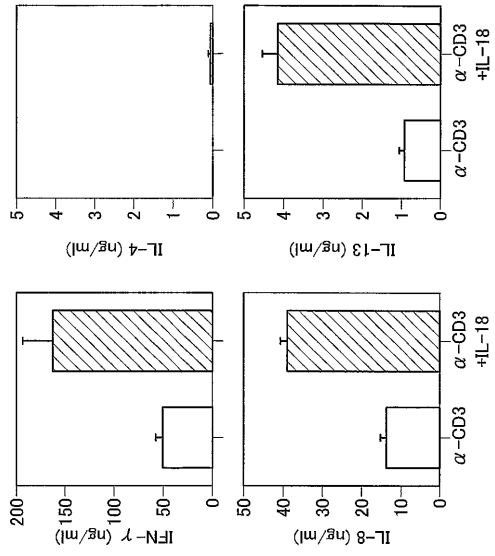


図 1 4

【 配列表 】

[0004134166000001.app](#)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N 5/00 A</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 P 21/08</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53 (2006.01)</i>	<i>G 0 1 N 33/53 P</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>45/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K 45/00</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P 37/00</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P 37/08</i>

審査官 山形 亜希子

- (56) 参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 1 0 2 1 1 ( J P , A )  
 特表平 1 1 - 5 0 4 5 1 6 ( J P , A )  
 特表昭 6 2 - 5 0 1 4 4 9 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 4 - 5 0 4 0 0 7 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 4 - 5 0 0 0 8 6 ( J P , A )  
 BIO INDUSTRY , 2 0 0 3 年 7 月 , Vol.20, No.7 , pp.34-42  
 J. Mol. Biol. , 2 0 0 2 年 , Vol.317, No.1 , pp.85-94  
 生化学辞典 , 東京化学同人 , 1 9 9 9 年 , 第 3 版第 3 刷 , p. 1 0 9  
 PNAS , 2 0 0 2 年 8 月 2 0 日 , Vol.99, No.17 , pp.11340-11345

## (58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/09  
 A61K 45/00  
 A61P 37/00  
 A61P 37/08  
 C07K 16/24  
 C12N 1/15  
 C12N 1/19  
 C12N 1/21  
 C12N 5/10  
 C12P 21/08  
 G01N 33/53  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
 CA(STN)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 SwissProt/PIR/GeneSeq  
 JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	人抗人白细胞介素-18抗体及其片段，以及使用它们的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4134166B2</a>	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	JP2005505960	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 中西憲司 中島敏博		
发明人	杉村 和久 中西 憲司 中島 敏博		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 A61K45/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P37/02 A61P43/00		
CPC分类号	A61P29/00 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 G01N33/53.P A61K45/00 A61P37/00 A61P37/08		
优先权	2003125948 2003-04-30 JP		
其他公开文献	JPWO2004097019A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的人源人抗人IL-18抗体是抗人IL-18的抗体，并且是由以下 (a) 或 (b) 多肽组成的重链的互补决定区：或人白细胞介素-18的L链的互补决定区，其包含 (d) 的多肽。(a) 由SEQ ID NO：4至6中所示的氨基酸序列组成的多肽。(b) 根据 (a) 的多肽的变体，其是决定H链互补性的区域。(c) 由SEQ ID NO：10-12中所示的氨基酸序列组成的多肽。(d) 根据 (c) 的多肽的变体，其是决定L链互补性的区域。这使得可以提供人抗人IL-18抗体及其使用方法。

【图 3】

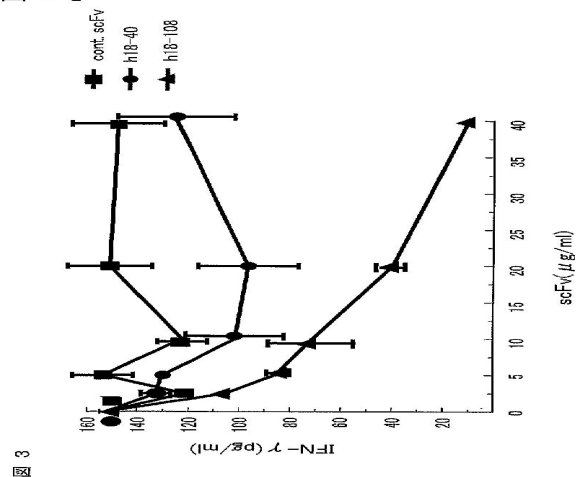


图 3