

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6467225号
(P6467225)

(45) 発行日 平成31年2月6日 (2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月18日 (2019.1.18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 Z N A

C O 7 K 16/24 (2006.01)

C O 7 K 16/24

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

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

請求項の数 30 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-548554 (P2014-548554)
 (86) (22) 出願日 平成25年11月18日 (2013.11.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/081057
 (87) 国際公開番号 W02014/080866
 (87) 国際公開日 平成26年5月30日 (2014.5.30)
 審査請求日 平成28年8月26日 (2016.8.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-254893 (P2012-254893)
 (32) 優先日 平成24年11月21日 (2012.11.21)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

前置審査

(73) 特許権者 318010328
 K M バイオロジクス株式会社
 熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号
 (74) 代理人 100088155
 弁理士 長谷川 芳樹
 (74) 代理人 100128381
 弁理士 清水 義憲
 (74) 代理人 100176773
 弁理士 坂西 俊明
 (74) 代理人 100165526
 弁理士 阿部 寛
 (72) 発明者 清水 裕之
 熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 一
 般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究
 所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なヒト抗 IL-18 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H鎖の相補性決定領域 (CDR) 1が、配列番号7のアミノ酸配列からなり、
 H鎖の CDR 2が、配列番号8のアミノ酸配列からなり、
 H鎖の CDR 3が、配列番号9のアミノ酸配列からなり、
 L鎖の CDR 1が、配列番号10のアミノ酸配列からなり、
 L鎖の CDR 2が、配列番号11のアミノ酸配列からなり、
 L鎖の CDR 3が、配列番号12のアミノ酸配列からなる、ヒトインターロイキン-18 (ヒト IL-18) に反応し、ヒト IL-18 の K53A 変異体に反応しない、ヒト抗ヒト IL-18 抗体。

【請求項 2】

H鎖の相補性決定領域 (CDR) 1が、配列番号7のアミノ酸配列からなり、
 H鎖の CDR 2が、配列番号8のアミノ酸配列からなり、
 H鎖の CDR 3が、配列番号9のアミノ酸配列からなり、
 L鎖の CDR 1が、配列番号10のアミノ酸配列からなり、
 L鎖の CDR 2が、配列番号11のアミノ酸配列からなり、
 L鎖の CDR 3が、配列番号12のアミノ酸配列からなる、ヒト IL-18 に反応し、ヒト IL-18 とヒト IL-18 結合タンパク質 (ヒト IL-18 BP) との複合体に反応しない、ヒト抗ヒト IL-18 抗体。

【請求項 3】

10

20

H鎖可変領域が、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列、又は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖可変領域が、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列、又は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号3若しくは5のアミノ酸配列からなり、ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18のK53A変異体又はヒトIL-18とヒトIL-18BPとの複合体に反応しない、H鎖可変領域断片。

10

【請求項5】

請求項1若しくは2に記載の抗体のH鎖可変領域断片又は請求項4に記載のH鎖可変領域断片と、請求項1又は2に記載の抗体のL鎖可変領域断片とを連結してなる、ヒト抗ヒトIL-18抗体の1本鎖可変領域断片。

【請求項6】

請求項1若しくは2に記載の抗体のH鎖可変領域断片若しくは請求項4に記載のH鎖可変領域断片に、又は請求項1若しくは2に記載の抗体のH鎖可変領域断片若しくは請求項4に記載のH鎖可変領域断片、及び請求項1若しくは2に記載の抗体のL鎖可変領域断片に、ヒト由来の抗体の定常領域を連結してなる、ヒト抗ヒトIL-18抗体。

20

【請求項7】

請求項6に記載の抗体の断片であって、

少なくとも請求項6に記載の抗体におけるCDRを有し、ヒトIL-18を特異的に認識する、断片。

【請求項8】

Fab、Fab'、F(ab')₂、scAb又はscFvFcである、請求項7に記載の断片。

【請求項9】

請求項1～3、6のいずれか一項に記載の抗体又は請求項4、5、7、8のいずれか一項に記載の断片に、修飾剤が結合されてなる修飾抗体。

【請求項10】

30

請求項1～3、6のいずれか一項に記載の抗体又は請求項4、5、7、8のいずれか一項に記載の断片をコードする遺伝子。

【請求項11】

配列番号3～6のいずれかのアミノ酸配列をコードする遺伝子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10に記載の遺伝子。

【請求項12】

請求項10又は11に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【請求項13】

請求項10又は11に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【請求項14】

40

請求項10又は11に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、請求項1～3、6のいずれか一項に記載の抗体又は請求項4、5、7、8のいずれか一項に記載の断片を生産する方法。

【請求項15】

請求項1～3、6のいずれか一項に記載の抗体、請求項4、5、7、8のいずれか一項に記載の断片又は請求項9に記載の修飾抗体を含むヒトIL-18の検出器具。

【請求項16】

請求項1～3、6のいずれか一項に記載の抗体、請求項4、5、7、8のいずれか一項に記載の断片又は請求項9に記載の修飾抗体からなるヒトIL-18検出試薬を含む、IL-18の発現量の変化に関連する疾患の診断キット。

50

【請求項 17】

上記疾患が、ヒト I L - 18 亢進症である、請求項 16 に記載の診断キット。

【請求項 18】

上記疾患が、アレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患からなる群から選択される、請求項 16 又は 17 に記載の診断キット。

【請求項 19】

上記疾患が、間質性肺炎、成人性 S t i l l 病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（A H R）、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管での重篤な臓器障害からなる群から選択される、請求項 16～18 のいずれか一項に記載の診断キット。

10

【請求項 20】

請求項 1～3、6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 4、5、7、8 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 9 に記載の修飾抗体を有効成分として含有する、ヒト I L - 18 活性阻害剤。

【請求項 21】

請求項 1～3、6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 4、5、7、8 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 9 に記載の修飾抗体を有効成分として含有し、ヒト I L - 18 とヒト I L - 18 レセプターとの結合を阻害する、ヒト I L - 18 結合阻害剤。

【請求項 22】

請求項 1～3、6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 4、5、7、8 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 9 に記載の修飾抗体を有効成分として含有する、インターフェロン- γ 産生抑制剤。

20

【請求項 23】

請求項 10 又は 11 に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【請求項 24】

請求項 20 に記載のヒト I L - 18 活性阻害剤、請求項 21 に記載のヒト I L - 18 結合阻害剤、請求項 22 に記載のインターフェロン- γ 産生抑制剤、又は請求項 23 に記載の遺伝子治療剤を含む、I L - 18 関連疾患の治療剤。

【請求項 25】

上記疾患が、ヒト I L - 18 亢進症である、請求項 24 に記載の治療剤。

30

【請求項 26】

上記疾患が、アレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患からなる群から選択される、請求項 24 又は 25 に記載の治療剤。

【請求項 27】

上記疾患が、間質性肺炎、成人性 S t i l l 病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（A H R）、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管での重篤な臓器障害からなる群から選択される、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項 28】

ヒト I L - 18 とヒト I L - 18 レセプターとの結合の阻害用である、請求項 24～27 のいずれか一項に記載の治療剤。

40

【請求項 29】

ヘルパー T 1 細胞からのインターフェロン- γ 産生の阻害用である、請求項 24～28 のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項 30】

ヒト I L - 18 をリンカーを介してビーズ形状の支持体に結合させた後、ヒト I L - 18 の I L - 18 B P 認識領域を露呈及び維持する条件下でファージディスプレイライブラリーと該支持体を反応させることを含む、請求項 1～3、6 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 4、5、7、8 のいずれか一項に記載の断片の作製方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトインターロイキン-18（以下、「ヒトIL-18」という。）に結合し、その生理活性を阻害するヒト抗ヒトIL-18抗体及びその抗体断片、並びにそれらの利用方法に関する。この抗体及び抗体断片は、IL-18が原因となって惹起される疾患の診断及び治療に有用である。

【背景技術】

【0002】

1989年において、インターロイキン-18（IL-18）は、インターフェロン- γ （IFN- γ ）誘発因子（IGIF）と言われていた。現在では、IL-18がインターフェロン- γ を誘発する能力以外にも各種機能を有するプロ炎症性サイトカインであることが知られている。IL-18は、NF- κ Bの活性化、Fasリガンドの発現、CC及びCXCケモカインの両方の誘発、コンピテントヒト免疫不全ウイルスの産生増加などの機能を有する。IL-18は、T細胞及びマクロファージ内でインターフェロン- γ 産生を誘発する能力を有することから、Th1型の免疫応答において重要な役割を果たし、先天性免疫及び後天性免疫の両方に関与する。IL-18は、構造及び機能の両方の点でIL-1ファミリーに関係する。IL-18の構造、機能及び生理活性については総説が出されている（例えば、非特許文献1～非特許文献5）。

【0003】

細胞内プロIL-18は、カスパーゼ1によってエンドトキシン刺激細胞で（非特許文献6、非特許文献7）、並びにカスパーゼ4、5及び6によってFas-L又は細菌DNA刺激細胞で（非特許文献8）、タンパク質分解的に処理されて18kDaの活性型となる。プロIL-18はまた、マスト細胞由来のキマーゼ（非特許文献9）、好中球プロテイナーゼ3（非特許文献10）、カスパーゼ3（非特許文献11）、セリンプロテアーゼであるエラスターゼ及びカテプシン（非特許文献12）などの他のプロテアーゼによってもタンパク質分解的に活性化される。ヒト及びマウスの両方のIL-18ともリーダー配列を持たず、細胞による成熟IL-18放出の機序については十分に解明されていない。

【0004】

IL-18の生理活性には、 α -サブユニット（IL-1R-関連タンパク質-1又はIL-1Rrp1とも称されるIL-1Rファミリーの1構成員）及び β -サブユニット（IL-18R付属タンパク質、IL-18AP又はAcPLとも称される）という2つのサブユニットからなるヘテロ二量体IL-18レセプター（IL-18R）へのIL-18の結合が介在している。IL-18R α サブユニットはIL-18に直接結合するが、シグナル伝達することはできない。IL-18R β -サブユニットはそれ自体ではIL-18に結合しないが、 α -サブユニットと共同で、シグナル伝達に必要な高親和性レセプター（KD=約0.3nM）を形成する（非特許文献13）。IL-18R $\alpha\beta$ 複合体を介したIL-18シグナル伝達は、IL-1R及びトール様レセプター（TLR）系と類似している。IL-18Rシグナル伝達は、MyD88、IRAK、TRAF6などのシグナル伝達分子を使用し、IL-1の場合と同様の応答、例えば、NIK、IKBキナーゼ、NF- κ B、JNK、p38MAPキナーゼの活性化を生じる。IL-18の生理活性発現においてIL-18R α 及びシグナル伝達分子が必要であることは、それぞれIL-18R α サブユニット（非特許文献14）、MyD88（非特許文献15）又はIRAK（非特許文献16）ノックアウト変異体を用いて確認されている。

【0005】

IL-18の亢進を伴う疾患として、これまで間質性肺炎（非特許文献17）、成人性Still病（非特許文献18）、慢性閉塞性肺疾患（非特許文献19）、代謝性骨疾患（特許文献1）、多発性硬化症（非特許文献20）、糖尿病（非特許文献20）、虚血性の腎障害（非特許文献21）などが報告されている。また、IL-18の亢進は、アトピー性皮膚炎（非特許文献22）、肝臓及び腸管での重篤な臓器障害（非特許文献23）な

10

20

30

40

50

ど、いわゆる T h 1 病の原因にもなる。

【0006】

このような疾患以外にも、T h 1 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、I L - 1 8 の病態への関与が指摘されている。

【0007】

I L - 1 8 の産生又は活性の制御は、このような I L - 1 8 依存性疾患の治療法として、あるいは I L - 1 8 の過剰産生が原因となり疾患の発症を誘導又は増悪する疾患の治療法として、極めて重要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0008】

【特許文献1】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 7 4 4 3 4 号明細書

【特許文献2】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 1 0 0 9 6 5 号明細書

【特許文献3】 米国特許出願公開第 2 0 0 7 0 2 9 2 4 3 2 号明細書

【特許文献4】 米国特許第 6 7 0 6 4 8 7 号明細書

【特許文献5】 国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 7 0 1 9 号パンフレット

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】 Dinarello, C. Et al. (1998) J. Leukoc. Biol.63: 658-654

【非特許文献2】 Dinarello, C. A. (1999) Methods 19: 121-132

20

【非特許文献3】 Dinarello, C. A. (1999) J. Allergy Clin.Immunol. 103: 11-24

【非特許文献4】 McInnes. B.et. Al. (2000) Immunology Today 21: 312-315

【非特許文献5】 Nakanishi,K. et al (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423-474

【非特許文献6】 Ghayur, T. et al. (1997) Nature 386: 619-623

【非特許文献7】 Gu, et al. (1997) Science 275: 206-209

【非特許文献8】 Tsutsui, H. et al. (1999) Immunity 11: 359-67

【非特許文献9】 Omoto, Y. et al. (2006)J. Immunol. 177:8315-8319

【非特許文献10】 Sugawara, S. et al. (2001) J. Immunol. 167:6568-6575

【非特許文献11】 Akita, K. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:26595-26603

【非特許文献12】 Gracie J. A. Et al. (2003)Journal of Leukocyte Biology 73: 213 -224 30

【非特許文献13】 Sims, J.E. et al (2002) Current Opin. Immunol.14: 117-122

【非特許文献14】 Hoshino K. et al (1999) J. Immunol. 162:5041-5044

【非特許文献15】 Adachi O. et al. (1998) Immunity 9: 143-150

【非特許文献16】 KanakarajP. et al. (1999) J. Exp. Med. 189: 1129-1138

【非特許文献17】 Hoshino,T.et al. (2009) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 41: 661 -670

【非特許文献18】 Kawaguchi,Y. et al. (2001) Arthritis Rheum. 44: 1716-1717

【非特許文献19】 Imaoka, H.et al. (2008) Eur. Respir. J. 31: 287-297

【非特許文献20】 Nakanishi, K. et al. (2001) Annu. Rev.Immunol. 19: 423-474 40

【非特許文献21】 Melnikov, V.Y. et al. (2001) J. Clin. Invest.107: 1145-1152

【非特許文献22】 Konishi, H. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11340-11345

【非特許文献23】 Nakanishi, K. et al. (2001) Annu. Rev.Immunol. 19: 423-474

【非特許文献24】 Novick, D. et al. (1999) Immunity 10: 127-136

【非特許文献25】 Arend, W.P. et al. (2008) Immunol. Rev. 223: 20-38

【非特許文献26】 Tak PP. et al. (2006) Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 31: 1 09-116

【非特許文献27】 Lei, SP. Et al. (1987) J. Bacteriol. 169: 4379-4383

【非特許文献28】 T. Fukumoto et al. (1998) Nature Biotechnology 16: 267-270 50

【非特許文献 29】Okamoto M. et al. (2002) Blood 99: 1289-98

【非特許文献 30】Antibody Phage Display Methods and protocols Edited by Philippa M. O'Brien and Robert Aitken

【非特許文献 31】Kimura T., et al. (2008) Allergology International 57: 367-3766

【非特許文献 32】Hamasaki T. et al. (2005) J. Biochem. 138:433-442

【非特許文献 33】Li, A. et al. (2003) Protein Expr Purif. 32:110-118

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

ヒトの生体内には、IL-18 結合タンパク質 (IL-18BP) と呼ばれる IL-18 へ結合するタンパクが存在することが知られている。IL-18BP は、IL-18 と結合することによって IL-18 と IL-18 レセプターとの結合を阻害し活性の調節をしている (非特許文献 24)。ヒト IL-18BP の場合、mRNA のスプライシングによって得られた 4 つのアイソフォーム (IL-18BP a、IL-18BP b、IL-18BP c、IL-18BP d) が存在している (非特許文献 25)。このうち IL-18 との親和性が最も高いのが IL-18BP a であり、その中和能 (IC_{50}) は 0.4 nM 程度とされている。IL-18BP は、活性を有していない前駆体の IL-18 には結合しないが、成熟型 (活性型) IL-18 には結合する特徴も有する。健常なヒトの血中 IL-18BP 濃度は、0.5-0.7 ng/mL であるとされており、IL-18BP は、血中に存在している微量の成熟型 IL-18 の活性を抑制している。

【0011】

これらのことから、元々生体内に存在し、治療薬としても安全で、且つ IL-18 との作用メカニズムが明確な IL-18BP を上記の疾患の治療剤として使用することが提案される。しかしながら、IL-18BP は血中半減期が 34-40 時間と短いため、薬効を維持するには頻回投与が必要になるなど改善の余地があった (非特許文献 26)。

【0012】

それゆえ、IL-18 の生理活性をより生体内に近いメカニズムで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 の関与する疾患、すなわち、IL-18 の発現量の変化に関連する疾患に対して、より安全且つ有効な治療手段になることが期待される。

【0013】

このような背景のもと、これまでに IL-18 活性抑制剤が複数取得されているが、IL-18BP が結合する IL-18 の部位 (IL-18BP 認識領域) と同じ部位に結合するものではなく、IL-18BP と同様の抑制メカニズムではないことが示されている (特許文献 2、特許文献 3)。これは、IL-18 抑制剤をスクリーニングする際に IL-18 に存在する IL-18BP 認識領域を露呈させ、それを維持することが困難であることを意味しており、結果として、IL-18BP と同様の抑制メカニズムに基づく IL-18 活性抑制剤の取得が非常に困難であることを意味する。

【0014】

本発明は、上記の課題に鑑み、生体内の天然の IL-18 活性抑制剤である IL-18BP と同様の抑制メカニズムであり (いわゆる IL-18BP 認識領域と同じ部位に結合する)、より安全で、かつ血中半減期の長い抗体分子を利用することで IL-18BP よりも、より長期作用性の IL-18 活性抑制剤の作出を達成したものである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、上記課題に鑑みて鋭意に検討し本発明を完成させた。ファージディスプレイライブラリーからの抗体スクリーニング (パンニング) の際に通常用いられるターゲットタンパク質 (この場合 IL-18) は、ELISA プレートへ直接固相化されるのが通常である。これに対し、本発明者らは、液相法でのパンニングあるいは種々の既存抗 IL-18 抗体を介して IL-18 の配向、立体構造を制御した固相法など、パンニング時

の条件を種々検討した。

【0016】

その結果、本発明者らは、IL-18BP認識領域を露呈させ、露呈状態を維持したIL-18を提示させることに成功した。

【0017】

また本発明者らは、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鎖及びL鎖の可変領域（VH、VL）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、所望の完全ヒト抗ヒトIL-18抗体の1本鎖可変領域断片（scFv）の取得に成功した。

【0018】

さらに、本発明者らは、この抗体断片及び当該断片に基づき作製された抗体が、ヒトIL-18の生理活性を阻害することを見出した。

【0019】

すなわち、本発明は、医学上又は産業上有用な方法・物質として下記の発明を含むものである。

【0020】

〔1〕：ヒトインターロイキン-18（ヒトIL-18）に反応し、ヒトIL-18のK53A変異体に反応しない、ヒト抗ヒトIL-18抗体。

【0021】

〔2〕：ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18とヒトIL-18BPとの複合体に反応しない、ヒト抗ヒトIL-18抗体。

【0022】

〔3〕：H鎖の相補性決定領域（CDR）1が、配列番号7のアミノ酸配列、又は、配列番号7のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

H鎖のCDR2が、配列番号8のアミノ酸配列、又は、配列番号8のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

H鎖のCDR3が、配列番号9のアミノ酸配列、又は、配列番号9のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖のCDR1が、配列番号10のアミノ酸配列、又は、配列番号10のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖のCDR2が、配列番号11のアミノ酸配列、又は、配列番号11のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖のCDR3が、配列番号12のアミノ酸配列、又は、配列番号12のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、〔1〕又は〔2〕に記載の抗体。

【0023】

〔4〕：H鎖可変領域が、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列、又は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖可変領域が、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列、又は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の抗体。

【0024】

〔5〕：配列番号3若しくは5のアミノ酸配列、又は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18のK53A変異体又はヒトIL-18とヒトIL-18BPとの複合体に反応しない、H鎖可変領域断片。

10

20

30

40

50

【0025】

〔6〕：配列番号4若しくは6のアミノ酸配列、又は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18のK53A変異体又はヒトIL-18とヒトIL-18BPとの複合体に反応しない、L鎖可変領域断片。

【0026】

〔7〕：〔3〕に記載の抗体のH鎖可変領域断片又は〔5〕に記載のH鎖可変領域断片と、〔3〕に記載の抗体のL鎖可変領域断片又は〔6〕に記載のL鎖可変領域断片とを連結してなる、ヒト抗ヒトIL-18抗体の1本鎖可変領域断片。

【0027】

10

〔8〕：〔3〕に記載の抗体のH鎖可変領域断片若しくは〔5〕に記載のH鎖可変領域断片、及び／又は、〔3〕に記載の抗体のL鎖可変領域断片若しくは〔6〕に記載のL鎖可変領域断片に、ヒト由来の抗体の定常領域を連結してなる、ヒト抗ヒトIL-18抗体。

【0028】

〔9〕：〔8〕に記載の抗体の断片。

【0029】

〔10〕：Fab、Fab'、F(ab')₂、scAb又はscFvFcである、〔9〕に記載の断片。

【0030】

20

〔11〕：〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体又は〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片に、修飾剤が結合されてなる修飾抗体。

【0031】

〔12〕：〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体又は〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片をコードする遺伝子。

【0032】

〔13〕：配列番号3～6のいずれかのアミノ酸配列をコードする遺伝子をオープンリーディングフレーム領域として有する、〔12〕に記載の遺伝子。

【0033】

〔14〕：〔12〕又は〔13〕に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

30

【0034】

〔15〕：〔12〕又は〔13〕に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【0035】

〔16〕：〔12〕又は〔13〕に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体又は〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片を生産する方法。

【0036】

〔17〕：〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体、〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片又は〔11〕に記載の修飾抗体を含むヒトIL-18の検出器具。

40

【0037】

〔18〕：〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体、〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片又は〔11〕に記載の修飾抗体からなるヒトIL-18検出試薬を含む、IL-18の発現量の変化に関連する疾患の診断キット。

【0038】

〔19〕：上記疾患が、ヒトIL-18亢進症である、〔18〕に記載の診断キット。

【0039】

〔20〕：上記疾患が、アレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患からなる群から選択される、〔18〕又は〔19〕に記載の診断キット。

【0040】

50

〔21〕：上記疾患が、間質性肺炎、成人性Still病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（AHR）、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管での重篤な臓器障害からなる群から選択される、〔18〕～〔20〕のいずれかに記載の診断キット。

【0041】

〔22〕：〔18〕～〔21〕のいずれかに記載の診断キットを用いて測定した被検試料中のヒトIL-18量に基づいて疾患を診断する方法。

【0042】

〔23〕：〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体、〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片又は〔11〕に記載の修飾抗体を有効成分として含有する、ヒトIL-18活性阻害剤。

10

【0043】

〔24〕：〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体、〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片又は〔11〕に記載の修飾抗体を有効成分として含有し、ヒトIL-18とヒトIL-18レセプターとの結合を阻害する、ヒトIL-18結合阻害剤。

【0044】

〔25〕：〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体、〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片又は〔11〕に記載の修飾抗体を有効成分として含有する、インターフェロン- γ 産生抑制剤。

20

【0045】

〔26〕：〔12〕又は〔13〕に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【0046】

〔27〕：〔23〕に記載のヒトIL-18活性阻害剤、〔24〕に記載のヒトIL-18結合阻害剤、〔25〕に記載のインターフェロン- γ 産生抑制剤、又は〔26〕に記載の遺伝子治療剤を含む、IL-18関連疾患の治療剤。

【0047】

〔28〕：上記疾患が、ヒトIL-18亢進症である、〔27〕に記載の治療剤。

【0048】

〔29〕：上記疾患が、アレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患からなる群から選択される、〔27〕又は〔28〕に記載の治療剤。

30

【0049】

〔30〕：上記疾患が、間質性肺炎、成人性Still病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（AHR）、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管での重篤な臓器障害からなる群から選択される、〔27〕～〔29〕のいずれかに記載の治療剤。

【0050】

〔31〕：ヒトIL-18とヒトIL-18レセプターとの結合の阻害用である、〔27〕～〔30〕のいずれかに記載の治療剤。

【0051】

40

〔32〕：ヘルパーT1細胞からのインターフェロン- γ 産生の阻害用である、〔27〕～〔31〕のいずれかに記載の治療剤。

【0052】

〔33〕：〔27〕～〔32〕のいずれかに記載の治療剤を投与することによるIL-18関連疾患の治療方法。

【0053】

〔34〕：ヒトIL-18をリンカーを介してビーズ形状の支持体に結合させた後、ヒトIL-18のIL-18BP認識領域を露呈及び維持する条件下でファージディスプレイライブラリーと該支持体を反応させることを含む、〔1〕～〔4〕、〔8〕のいずれかに記載の抗体又は〔5〕～〔7〕、〔9〕、〔10〕のいずれかに記載の断片の作製方法

50

。

【0054】

〔35〕：ヒトIL-18BP認識領域と同じ部位に結合する、ヒト抗ヒトIL-18抗体。

【0055】

〔36〕：ヒトIL-18活性を阻害する、〔35〕に記載の抗体。

【0056】

〔37〕：ヒトIL-18とヒトIL-18レセプターとの結合を阻害する、〔35〕又は〔36〕に記載の抗体。

【0057】

〔38〕：インターフェロン- γ （IFN- γ ）産生を阻害する、〔35〕～〔37〕のいずれかに記載の抗体。

【0058】

〔39〕：エピトープがヒトIL-18の53番目のリジンを含む領域である、〔35〕～〔38〕のいずれかに記載の抗体。

【0059】

〔40〕：以下の（a）又は（b）のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域と、（c）又は（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、〔35〕～〔39〕のいずれかに記載の抗体。

（a）配列番号7～9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7～9に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-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／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-18に対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

【0060】

〔41〕：以下（e）又は（f）のポリペプチドからなるH鎖可変領域と、（g）又は（h）のポリペプチドからなるL鎖可変領域とを含む〔40〕に記載のヒト抗ヒトIL-18抗体。

（e）配列番号3又は配列番号5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又は配列番号5に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-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4又は配列番号6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4又は配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

【0061】

〔42〕：以下（e）又は（f）のポリペプチドからなる、ヒトIL-18に対するヒト由来の抗体のH鎖可変領域断片。

（e）配列番号3又は配列番号5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又は配列番号5に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

【0062】

〔43〕：以下（g）又は（h）のポリペプチドからなる、ヒトIL-18に対するヒト由来の抗体のL鎖可変領域断片。

（g）配列番号4又は配列番号6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 4 又は配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒト I L-18 に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド。

【0063】

〔44〕：〔40〕に記載の H 鎖の相補性決定領域を含む H 鎖可変領域断片又は〔42〕に記載の H 鎖可変領域断片と、〔40〕に記載の L 鎖の相補性決定領域を含む L 鎖可変領域断片又は〔43〕に記載の L 鎖可変領域断片とを連結してなる、ヒト I L-18 に対するヒト由来の抗体の 1 本鎖可変領域断片。

【0064】

〔45〕：〔40〕に記載の H 鎖の相補性決定領域を含む H 鎖可変領域断片又は〔42〕に記載の H 鎖可変領域断片、及び／又は、〔40〕に記載の L 鎖の相補性決定領域を含む L 鎖可変領域断片又は〔43〕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 I L-18 に対するヒト由来の抗体又はその断片。

【0065】

〔46〕：上記抗体の断片が、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c A b、又は s c F v F c である〔45〕に記載の抗体の断片。

【0066】

〔47〕：〔35〕～〔46〕のいずれかに記載の抗体又はその断片に、修飾剤が結合されてなる修飾抗体。

【0067】

〔48〕：〔35〕～〔47〕のいずれかに記載の抗体又はその断片をコードする遺伝子。

【0068】

〔49〕：配列番号 3～6 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〔48〕に記載の遺伝子。

【0069】

〔50〕：〔48〕又は〔49〕に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【0070】

〔51〕：〔48〕又は〔49〕に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【0071】

〔52〕：〔48〕又は〔49〕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 I L-18 抗体又はその断片を生産する方法。

【0072】

〔53〕：〔35〕から〔46〕のいずれかに記載の抗体又はその断片、又は〔47〕に記載の修飾抗体を含むヒト I L-18 の検出器具。

【0073】

〔54〕：〔35〕から〔46〕のいずれかに記載の抗体又はその断片、又は〔47〕に記載の修飾抗体からなるヒト I L-18 検出試薬を含む、被検試料中のヒト I L-18 量を測定する疾患の診断キット。

【0074】

〔55〕：上記疾患が、ヒト I L-18 亢進症である、〔54〕に記載の診断キット。

【0075】

〔56〕：上記疾患が、アレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患からなる群から選択される 1 以上の疾患である、〔54〕又は〔55〕に記載の診断キット。

【0076】

〔57〕：上記疾患が、間質性肺炎、成人性 S t i l l 病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性 (A H R)、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管での重篤な臓器障害からなる群から選択される 1 以上の疾患である、〔54〕～〔56〕のいずれかに記載の診断キット。

【0077】

10

20

30

40

50

〔５８〕：〔５４〕～〔５７〕のいずれかに記載の診断キットを用いて測定した被検試料中のヒトＩＬ－１８量に基づいて疾患を診断する方法。

【００７８】

〔５９〕：以下のいずれかのアンタゴニストを有効成分として含有する、ヒトＩＬ－１８活性阻害剤。

ｉ）〔３５〕～〔４６〕のいずれかに記載の抗体又はその断片。

ｉｉ）〔４７〕に記載の修飾抗体。

ｉｉｉ）上記ｉ）又はｉｉ）のいずれかに記載の抗体、抗体の断片、又は修飾抗体が認識するヒトＩＬ－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。

【００７９】

〔６０〕：〔５９〕に記載のアンタゴニストを有効成分として含有する、ヒトＩＬ－１８とヒトＩＬ－１８レセプターとの結合を阻害するヒトＩＬ－１８結合阻害剤。

【００８０】

〔６１〕：〔５９〕に記載のアンタゴニストを有効成分として含有する、インターフェロン－γ産生抑制剤。

【００８１】

〔６２〕：〔４８〕又は〔４９〕に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【００８２】

〔６３〕：〔５９〕に記載のヒトＩＬ－１８活性阻害剤、〔６０〕に記載のヒトＩＬ－１８結合阻害剤、〔６１〕に記載のインターフェロン－γ産生抑制剤、又は〔６２〕に記載の遺伝子治療剤を含む疾患治療剤。

【００８３】

〔６４〕：上記疾患が、ヒトＩＬ－１８亢進症である、〔６３〕に記載の疾患治療剤。

【００８４】

〔６５〕：上記疾患が、アレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患からなる群から選択される１以上の疾患である、〔６３〕又は〔６４〕に記載の疾患治療剤。

【００８５】

〔６６〕：上記疾患が、間質性肺炎、成人性Ｓｔｉｌｌ病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（ＡＨＲ）、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管などでの重篤な臓器障害からなる群から選択される１以上の疾患である、〔６３〕から〔６５〕のいずれかに記載の疾患治療剤。

【００８６】

〔６７〕：ヒトＩＬ－１８とヒトＩＬ－１８レセプターとの結合を阻害する、〔６３〕から〔６６〕のいずれかに記載の疾患治療剤。

【００８７】

〔６８〕：ヘルパーＴ１細胞からのインターフェロン－γ産生を阻害する、〔６３〕から〔６７〕のいずれかに記載の疾患治療剤。

【００８８】

〔６９〕：〔６３〕から〔６８〕のいずれかに記載の疾患治療剤を投与することによる疾患の治療方法。

【００８９】

〔７０〕：ヒトＩＬ－１８をリンカーを介してビーズ形状の支持体に結合させた後、ヒトＩＬ－１８のＩＬ－１８ＢＰ認識領域を露呈及び維持する条件下でファージディスプレイライブラリーと該支持体を反応させることを含む、〔３５〕から〔６９〕のいずれかに記載の抗体又はその断片の作製方法。

【００９０】

さらに、本発明によれば、これまでのようにキメラ抗体又はヒト化抗体ではなく、ヒト由来のヒトＩＬ－１８に対する抗体及びその断片、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が直接又は間接的に関与する疾病の治療において、反復投与及び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が期待される

10

20

30

40

50

。

【0091】

本発明のさらに他の目的、特徴、及び優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。

【発明の効果】

【0092】

本発明のヒト抗IL-18抗体及び抗体断片は、以下の特徴を有することから、より安全で、より効率的なIL-18アンタゴニストとして有用である。

(1) 生体由来の天然のIL-18アンタゴニストであるIL-18BPと同じ作用メカニズムを有する。

(2) IL-18BPと相乗的に作用することができる。

(3) 既報のアンタゴニスト(IL-18BP、その他抗体)と比較して、IFN- γ 産生抑制におけるIC₅₀が低いため、より低い濃度で投与できる。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】抗ヒトIL-18抗体の結合活性試験の結果を示すグラフである。

【図2】ELISAによるIL-18レセプター結合アッセイの結果を示すグラフである。

。

【図3】(a)及び(b)は、KG-1細胞を用いたIL-18レセプター結合アッセイの結果を示すグラフである。

【図4】組換えIL-18を用いた中和試験の結果を示すグラフである。

【図5】競合ELISAによる抗ヒトIL-18抗体のエピトープ解析の結果を示すグラフである。

【図6】抗ヒトIL-18抗体及びIL-18BPの存在下における、IL-18レセプター結合アッセイの結果を示すグラフである。

【図7】IL-18のK53A変異体を用いた抗IL-18抗体のエピトープ解析の結果を示すグラフである。

【図8】抗ヒトIL-18抗体の、IL-18とIL-18BPとの複合体への反応性解析の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0094】

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。

【0095】

(1) 抗体及びその断片

本発明者らは、ヒトインターロイキン-18(IL-18)に対するヒト抗ヒトIL-18抗体について検討した。その結果、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(scFv)及び当該断片に由来する抗体が、ヒトIL-18により誘導されるシグナル伝達及びIFN- γ 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(scFv)における、相補性決定領域(CDR)、H鎖及びL鎖の可変領域のアミノ酸配列及びそれらをコードする遺伝子の塩基配列を同定した(配列番号1、2)。また、ヒトIL-18抗体のエピトープを解析した結果、ヒトIL-18の53番目のリジンを含む領域であることが明らかになった。

【0096】

一実施形態において、ヒト抗ヒトIL-18抗体は、ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18のK53A変異体に反応しない抗体である。

【0097】

ここで、ヒト抗ヒトIL-18抗体がヒトIL-18に反応するとは、ヒト抗ヒトIL-18抗体がヒトIL-18に結合することを意味する。より具体的には、ヒト抗ヒトIL-18抗体のヒトIL-18に対する結合能が、ネガティブコントロール抗体のヒトI

10

20

30

40

50

L-18に対する結合能よりも、有意に高いことを意味する。ネガティブコントロール抗体としては、ヒトIL-18を抗原としないことが明らかである抗体が使用でき、例えばヒト抗HBs抗体が使用できる。ネガティブコントロール抗体又はヒト抗ヒトIL-18抗体と、ヒトIL-18との結合能は、ELISA法等の通常の方法によって測定することができる。

【0098】

また、ヒト抗ヒトIL-18抗体がヒトIL-18のK53A変異体に反応しないとは、ヒト抗ヒトIL-18抗体のヒトIL-18のK53A変異体に対する結合能が、ヒト抗ヒトIL-18抗体のヒトIL-18に対する結合能よりも有意に低いことを意味する。ヒト抗ヒトIL-18抗体と、ヒトIL-18又はヒトIL-18のK53A変異体との結合能は、ELISA法等の通常の方法によって測定することができる。

10

【0099】

以下、用語「反応する」及び「反応しない」の意味は上述したものと同様である。

【0100】

ヒト抗ヒトIL-18抗体は組換え体であってもよい。組換え体とは、遺伝子工学的手法により作出された分子であることを意味する。ヒト抗ヒトIL-18抗体は凍結乾燥されていてもよい。あるいは、ヒト抗ヒトIL-18抗体は、薬学的に許容可能な担体と混合された組成物の形態であってもよい。

【0101】

一実施形態において、ヒト抗ヒトIL-18抗体は、ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18とヒトIL-18BPとの複合体に反応しない抗体である。

20

【0102】

一実施形態において、ヒト抗ヒトIL-18抗体は、

H鎖の相補性決定領域(CDR)1が、配列番号7のアミノ酸配列、又は、配列番号7のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

H鎖のCDR2が、配列番号8のアミノ酸配列、又は、配列番号8のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

H鎖のCDR3が、配列番号9のアミノ酸配列、又は、配列番号9のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

30

L鎖のCDR1が、配列番号10のアミノ酸配列、又は、配列番号10のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖のCDR2が、配列番号11のアミノ酸配列、又は、配列番号11のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖のCDR3が、配列番号12のアミノ酸配列、又は、配列番号12のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる抗体であって、

ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18のK53A変異体に反応しない抗体であるか、又は、ヒトIL-18に反応し、ヒトIL-18とヒトIL-18BPとの複合体に反応しない抗体である。

40

【0103】

一実施形態において、ヒト抗ヒトIL-18抗体は、

H鎖可変領域が、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列、又は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

L鎖可変領域が、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列、又は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる抗体であって、

50

ヒト I L-18 に反応し、ヒト I L-18 の K 5 3 A 変異体に反応しない抗体であるか、又は、ヒト I L-18 に反応し、ヒト I L-18 とヒト I L-18 B P との複合体に反応しない抗体である。

【0104】

一実施形態において、H鎖可変領域断片は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列、又は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、ヒト I L-18 に反応し、ヒト I L-18 の K 5 3 A 変異体又はヒト I L-18 とヒト I L-18 B P との複合体に反応しない抗体断片である。

【0105】

H鎖可変領域断片は、単独で又は任意のL鎖可変領域断片と組み合わせることによって、上記の反応性を示す。

【0106】

H鎖可変領域断片とL鎖可変領域断片とを組み合わせるとは、H鎖可変領域断片とL鎖可変領域断片とを、完全長抗体、1本鎖可変領域断片(s c F v)、F a b、F a b'、F (a b)'₂、s c A b、s c F v F c 等の構造にすることを含む。

【0107】

一実施形態において、L鎖可変領域断片は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列、又は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、ヒト I L-18 に反応し、ヒト I L-18 の K 5 3 A 変異体又はヒト I L-18 とヒト I L-18 B P との複合体に反応しない抗体断片である。

【0108】

L鎖可変領域断片は、単独で又は任意のH鎖可変領域断片と組み合わせることによって、上記の反応性を示す。

【0109】

一実施形態において、ヒト抗ヒト I L-18 抗体の1本鎖可変領域断片(s c F v)は、次のH鎖可変領域断片とL鎖可変領域断片とを連結したものである。

H鎖可変領域断片：

C D R 1 が、配列番号7のアミノ酸配列、又は、配列番号7のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

C D R 2 が、配列番号8のアミノ酸配列、又は、配列番号8のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

C D R 3 が、配列番号9のアミノ酸配列、又は、配列番号9のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、H鎖可変領域断片、又は

配列番号3若しくは5のアミノ酸配列、又は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるH鎖可変領域断片。

L鎖可変領域断片：

C D R 1 が、配列番号10のアミノ酸配列、又は、配列番号10のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

C D R 2 が、配列番号11のアミノ酸配列、又は、配列番号11のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

C D R 3 が、配列番号12のアミノ酸配列、又は、配列番号12のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、L鎖可変領域断片、又は

配列番号4若しくは6のアミノ酸配列、又は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、L鎖可変領域断片。

10

20

30

40

50

【0110】

一実施形態において、ヒト抗ヒトIL-18抗体は、次のH鎖可変領域断片及び／又はL鎖可変領域断片に、ヒト由来の抗体の定常領域を連結したものである。

H鎖可変領域断片：

CDR1が、配列番号7のアミノ酸配列、又は、配列番号7のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

CDR2が、配列番号8のアミノ酸配列、又は、配列番号8のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

CDR3が、配列番号9のアミノ酸配列、又は、配列番号9のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、H鎖可変領域断片、又は

配列番号3若しくは5のアミノ酸配列、又は、配列番号3若しくは5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるH鎖可変領域断片。

L鎖可変領域断片：

CDR1が、配列番号10のアミノ酸配列、又は、配列番号10のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

CDR2が、配列番号11のアミノ酸配列、又は、配列番号11のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

CDR3が、配列番号12のアミノ酸配列、又は、配列番号12のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、L鎖可変領域断片、又は

配列番号4若しくは6のアミノ酸配列、又は、配列番号4若しくは6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、L鎖可変領域断片。

【0111】

本実施形態に係る抗体又はその断片には、以下の(i)～(vii)に示される抗体及びその断片が含まれる。

【0112】

(i) 配列番号7～9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、配列番号7～9に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-18に対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチドを含むVH鎖断片(H鎖可変領域断片)。

【0113】

ヒトIL-18に対するH鎖の相補性決定領域となるとは、単独で又は任意のL鎖可変領域断片と組み合わせることによって、ヒトIL-18に対する反応性を示すことを意味する。

【0114】

配列番号3及び5には、VH鎖のアミノ酸配列が示される。配列番号7～9には、このVH鎖における相補性決定領域(CDR1～3)のアミノ酸配列が示される。すなわち、配列番号3及び5に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号7)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号8)、99番目～109番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号9)に対応している。

【0115】

(ii) 配列番号3及び5に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、配列番号3及び5に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-18に対するH鎖可変領域となるポリペプチドからなるVH鎖断片(H鎖可変領域断片)。

【0116】

(i i i) 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、又は、配列番号10～12に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-18に対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチドを含むVL鎖断片(L鎖可変領域断片)。

【0117】

ヒトIL-18に対するL鎖の相補性決定領域となるとは、単独で又は任意のH鎖可変領域断片と組み合わせることによって、ヒトIL-18に対する反応性を示すことを意味する。

【0118】

配列番号4及び6は、VL鎖のアミノ酸配列を示している。配列番号10～12は、このVL鎖における相補性決定領域(CDR1～3)のアミノ酸配列を示している。すなわち、配列番号4及び6に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～36番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号10)、52番目～58番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号11)、91番目～101番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号12)に対応している。

10

【0119】

(i v) 配列番号4及び6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、配列番号4及び6に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ヒトIL-18に対するL鎖可変領域となるポリペプチドからなるVL鎖断片(L鎖可変領域断片)。

20

【0120】

(v) 上記(i)又は(ii)のVH鎖及び上記(i i i)又は(i v)のVL鎖を連結してなる1本鎖可変領域断片(scFv)。

【0121】

(v i) 上記(i)又は(ii)のVH鎖及び／又は上記(i i i)又は(i v)のVL鎖にヒト由来の定常領域を連結してなるヒト由来の抗体又はその断片。

【0122】

(v i i) エピトープがヒトIL-18の53番目のリジンを含む領域であるヒト抗ヒトIL-18抗体。

【0123】

上記(v)及び(v i)において、VH鎖とVL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。具体的なペプチドリンカーとしては、例えば、(GGGGS)₃が例示できる。

30

【0124】

また、上記(v i)に記載の、VH鎖及び／又はVL鎖にヒト由来の定常領域を連結してなる抗体又はその断片(フラグメント)は、完全抗体(完全長抗体)、Fab、Fab'、F(ab')₂、又は、少なくとも一部のFc部を有するscAb若しくはscFvFcであってもよい。なお、scAbとはscFvにL鎖又はH鎖の定常領域の一部のドメイン(Cドメイン)が結合したものであり、scFvFcとはscFvにH鎖のCH1及びCH2が結合したものである。

40

【0125】

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、本実施形態の抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM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。

【0126】

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

50

ることを意味する。したがって、例えば、上記「配列番号7～9に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」のポリペプチドは、上記「配列番号7～9に示されるアミノ酸配列」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。

【0127】

例えば、「配列番号7のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」は、配列番号7のアミノ酸配列と85%以上、90%以上又は95%以上の相同性を有するアミノ酸配列であってもよい。配列番号7以外のアミノ酸配列においても同様である。

10

【0128】

なお、上記「変異」は、後述のように本実施形態の抗体又はその断片を、治療薬として利用する場合（ヒトに投与する場合）には、ヒト由来の構造又はヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検出器具、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、本実施形態の抗体又はその断片を、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。

【0129】

なお、CDRは抗原を認識する領域であるため、ヒトIL-18は、本実施形態に係る抗体又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を有する抗体又は断片は、ヒトIL-18を特異的に認識できる。すなわち、上記VH鎖及びVL鎖は、少なくとも前記VH鎖及びVL鎖のCDRを含み、それ以外は、ヒト由来のVH鎖及びVL鎖のアミノ酸配列であってもよい。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鎖及び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VH鎖及びVL鎖のCDRを含み、それ以外を、ヒト由来のVH鎖及びVL鎖からヒト抗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好ましい。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好ましい。

20

【0130】

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

30

- ・ヒトIL-18及びサルIL-18と特異的に結合する。
- ・ヒトIL-18及びサルIL-18により誘導されるシグナル伝達及びIFN- γ の産生を阻害する。

【0131】

また、本実施形態の抗体又はその断片は、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、Myc、Flag等によって本実施形態の抗体又はその断片がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。すなわち、付加的なポリペプチドとしては、His、Myc、Flag等が挙げられる。

40

【0132】

さらに、本実施形態の抗体及びその断片には、安定性及び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、本実施形態の抗体及びその断片は、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、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などの単純な高分子が好ましい。

【0133】

50

なお、本実施形態の抗体及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、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、本実施形態の抗体又はその断片を、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。

【0134】

本実施形態の抗体及びその断片は、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抗抗体が形成される可能性は極めて低い。さらに、本実施形態の抗体及びその断片は、ヒトIL-18と強く結合することにより、IFN- γ 産生等の生理活性を阻害する作用があるため、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期待される。よって、本実施形態の抗体及びその断片は、後述するヒトIL-18が直接又は間接的に関与する疾患の治療のために利用してもよい。

10

【0135】

(2) 遺伝子

本発明の実施形態には、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片をコードする遺伝子が含まれる。本実施形態には、配列番号1及び2に示される塩基配列からなる遺伝子、配列番号1及び2に示される塩基配列と85%以上、90%以上又は95%以上の相同性を有する塩基配列からなる遺伝子、配列番号3～6に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子、これらの遺伝子をオープンリーディングフレーム(ORF)領域として有する遺伝子、及びこれらの遺伝子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。

20

【0136】

上記の遺伝子は、ファージディスプレイライブラリーから取得した組換え遺伝子であり、天然に存在するものではない。また、上記の遺伝子はcDNAであってもよい。

【0137】

上記の遺伝子は、上記実施形態の抗体又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、上記実施形態の抗体又はその断片を発現させることができる。

【0138】

さらに、上記「遺伝子」は、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片をコードする配列以外に、非翻訳領域(UTR)の配列、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及び2に示される塩基配列からなる遺伝子、又は、配列番号3～6に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子をベクター配列につなぎ、これを適当な宿主で増幅させることにより、本実施形態の遺伝子を所望に増幅させることができる。また、本実施形態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、本実施形態の遺伝子は、ヒトIL-18が関与する疾患用の遺伝子治療剤として利用してもよい。

30

【0139】

(3) 抗体及びその断片の取得方法・生産方法

上記「(1) 抗体及びその断片」に記載の抗体及びその断片は、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(例えば、MRC、UC、CAT、MedImmune、XOMA、Dyax、Morphosys)及びIL-18分子上に存在するIL-18BP認識領域を露呈且つ維持させた状態でスクリーニングする方法を利用することにより、取得することができる。

40

【0140】

そのため、本発明は、IL-18がリンカーを介してビーズ形状の支持体に結合させた後、IL-18のIL-18BP認識領域を露呈及び維持する条件下でファージディスプレイライブラリーと該支持体を反応させることを含む、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片の作製方法を含む。

【0141】

50

また、上記「(1) 抗体及びその断片」に記載の抗体及びその断片は、上記「(2) 遺伝子」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、抗体及びその断片の取得方法及び生産方法は、これに限定されるものではない。

【0142】

より具体的には、健常人の末梢血Bリンパ球からmRNAを抽出し、免疫グロブリン遺伝子のVH鎖、VL鎖を、その両端を規定するプライマー対を用いてRT-PCR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DNA、及びその両端を各々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scFv DNA集団を調製する。得られたscFv DNAをファージミドベクターに組み込み、scFvディスプレイファージライブラリーを作製する。このライブラリーの品質と多様性は有効な抗体を取得する上では非常に重要な因子となる。

10

【0143】

ターゲットタンパクであるヒトIL-18は、通常第一選択としてプラスチックプレートに固相化するが、IL-18分子上に存在するIL-18BP認識領域を露呈且つ維持させるために、適切な長さのリンカーを含むビオチン化試薬を用いて、ヒトIL-18をビオチン化する。リンカーの長さは、例えば3~100 Åであり、例えば5~50 Åであり、例えば10~30 Åである。

【0144】

次に、このライブラリーをStreptavidinマグネティックビーズに結合させたビオチン化ヒトIL-18と液相中で反応させ、洗浄により未反応のscFvディスプレイファージを除去した後に、ヒトIL-18と結合しているscFvファージクロンを酸で溶出する。分離したファージクロンからscFv DNA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したがって培養して目的のscFvタンパクのみを得るというものである。

20

【0145】

なお、配列番号1及び2は、ファージディスプレイ抗体法によって、取得したヒトIL-18に対する1本鎖可変領域(scFv)をコードするcDNAの塩基配列である。また、配列番号3及び5は取得した抗ヒトIL-18抗体のVH鎖のアミノ酸配列であり、配列番号4及び6は取得した抗ヒトIL-18抗体のVL鎖のアミノ酸配列である。

30

【0146】

scFvをコードする遺伝子は、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を、発現させるscFvをコードする遺伝子と機能的に結合させて発現させることができる。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。scFv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、pelBシグナル配列(非特許文献27)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g3タンパクのシグナル配列を用いることもできる。

【0147】

前記のように発現されたscFvは、宿主の細胞内外から分離し均一にまで精製することができる。本実施形態で発現されるscFvは、そのC末端にHis tag配列が付加されているので、ニッケルカラム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。このようにして得られたscFvタンパク(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。

40

【0148】

本実施形態に係る抗体又はその断片のヒトIL-18に対する抗原結合活性を測定する

50

方法としては、E L I S A、B I A c o r e等の方法がある。例えばE L I S Aを用いる場合、ヒトI L - 1 8を固相化した9 6穴プレートに目的の抗I L - 1 8抗体又は抗体断片を含む試料、例えば大腸菌の培養上清又は精製抗体を加える。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できる。

【0149】

(4) 組換え発現ベクター及び形質転換体

本発明の実施形態には、上記「(2) 遺伝子」で説明した遺伝子、すなわち、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターが含まれる。例えば、配列番号1及び2に示される塩基配列からなる遺伝子、配列番号3～6に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子の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。

【0150】

このように、組換え発現ベクターは、上記実施形態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、これと上記実施形態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。

【0151】

上記実施形態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、このマーカーと上記実施形態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上記実施形態の遺伝子の導入を確認することができる。あるいは、上記実施形態に係る抗体又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 (G r e e n F l u o r e s c e n t P r o t e i n) をマーカーとして用い、上記実施形態に係る抗体又はその断片をG F P融合タンパク質として発現させてもよい。

【0152】

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」で説明した、完全長抗体をコードする遺伝子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 (C a e n o r h a b d i t i s e l e g a n s)、アフリカツメガエル (X e n o p a s l a e v i s) 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、キイロショウジョウバエ、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、抗体断片をコードする遺伝子の場合の宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)、分裂酵母 (S c h i z o s a c c h a r o m y c e s p o m b e)) などを挙げることができるが、特に限定されるものではない。

【0153】

上記発現ベクターを宿主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、D E A E 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。

【0154】

本実施形態の形質転換体は、上記「(2) 遺伝子」で説明した遺伝子、すなわち、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又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、遺伝子が、公知の遺伝子工学的な手法 (遺伝子操作手技) により、対象細胞 (宿主細胞) 内に発現可能に導入されたこ

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、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いる。なかでも、マウスは、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おり、実験動物・病態モデル動物として利用できる。ノックアウトマウス等は、上記抗体又は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、その治療方法の開発などに有用である。

【0155】

なお、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片は、本実施形態の組換え発現ベクターを用いて作製した、本実施形態の形質転換体によっても生産することが可能である。

【0156】

(5) 抗体及びその断片の利用方法

(5-1) ヒトIL-18の検出器具、精製用担体、検出試薬、疾患の診断キット、診断方法

上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体若しくはその断片、又は修飾抗体は、ヒトIL-18に対して、特異的に強く結合するため、後述するヒトIL-18の検出器具、精製用担体、検出試薬、疾患の診断キットなどに利用してもよい。

【0157】

本実施形態の検出器具は、例えば、血液、尿などの試料中に含まれるヒトIL-18を検出する用途に用いることができる。さらに、ヒトIL-18が関与する疾患の診断、治療効果の評価を行うための診断用、治療用に用いることができる。本実施形態のヒトIL-18の検出器具は、少なくとも「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体のCDRのアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む。ヒトIL-18の検出器具は、種々の条件下でのIL-18の検出・測定などに利用できる。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、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片を基板(担体)上に固定化した抗体チップ、抗体カラム等が挙げられる。

【0158】

また、本実施形態に係るヒトIL-18の精製用担体は、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体若しくはその断片、又は修飾抗体を含む。上記の精製用担体は、クロマトグラフィーにおいて通常使用される担体に対して、一般的な方法で抗体等を結合させることによって作製することができる。上記の精製用担体は、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の精製に利用できる。この精製方法は、上記実施形態の抗体又はその断片をヒトIL-18とそれ以外の物質の混合物に接触させて抗体又はその断片にヒトIL-18を吸着させる工程と、吸着したヒトIL-18を抗体又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。

【0159】

本実施形態のヒトIL-18を検出するための試薬(ヒトIL-18検出試薬)は、上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体若しくはその断片、又は修飾抗体からなる。上記ヒトIL-18検出試薬によれば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイにより、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、上記抗体又はその断片は、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、これらの抗体及びその断片は、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すみ、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。

【0160】

本実施形態の疾患の診断キットは、上記ヒト I L - 1 8 検出試薬を含む。上記診断キットは、被検試料中のヒト I L - 1 8 量を測定し、I L - 1 8 の発現量の変化に関連する疾患を診断するために用いることができる。上記診断キットには、上記検出試薬以外にヒト I L - 1 8 の濃度指標となるヒト I L - 1 8 の標準品を含んでいてもよい。

【0161】

本実施形態の診断方法は、上記診断キットを用いて被検試料（血液、体液、組織など）中のヒト I L - 1 8 量を測定し、その測定結果に応じて疾患の診断を行うものである。なお、上記「疾患」は、I L - 1 8 の発現量の変化に関連する疾患であり、後述するヒト I L - 1 8 亢進症が含まれる。また、上記「疾患」としては、アレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患が例示され、より具体的には、間質性肺炎、成人性 S t i l l 病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性（A H R）、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管での重篤な臓器障害などが例示される。

10

【0162】

本実施形態のヒト I L - 1 8 の検出器具による検出方法は、ヒト I L - 1 8 を製造する際の工程管理及び製品の品質管理に有用である。また、本実施形態の疾患の診断キット及び診断方法は、組織及び体液におけるヒト I L - 1 8 のレベルを指標とする種々の感受性疾患の診断、各種疾患の治療評価、疾患の病態管理などを行うために極めて有用である。

【0163】

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、排除又は不活性化される。つまり、動物を免疫して作成した抗ヒト I L - 1 8 抗体には、ヒト I L - 1 8 と動物の I L - 1 8 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。

20

【0164】

これに対し、上記実施形態の抗体は、ヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体を提示させたファージを含む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又は不活性化する機構は存在しない。それゆえ、上記実施形態の抗体には動物の免疫では作製できない、ヒトその他の動物の I L - 1 8 に共通した抗原決定領域に結合特異性を示す抗 I L - 1 8 抗体が含まれる。このような抗体を本実施形態の検出器具及び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 I L - 1 8 関連疾患を診断することができる。

30

【0165】

（5-2）ヒト I L - 1 8 活性阻害剤、結合阻害剤、I F N - γ 産生抑制剤、遺伝子治療剤

「（1）抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片は、ヒト I L - 1 8 に結合するとともに、ヒト I L - 1 8 レセプターへの結合を阻害してこのレセプターを介したシグナル伝達も阻害し、さらには、ヒト I L - 1 8 によって誘導される I F N - γ の産生も阻害する。したがって、当該抗体は、言い換えれば、ヒト I L - 1 8 アンタゴニストである。そして、このヒト I L - 1 8 アンタゴニストは、ヒト I L - 1 8 活性阻害剤として利用できる。

40

【0166】

すなわち、本発明の実施形態には、以下の（I）～（I V）のアンタゴニストを有効成分として含有するヒト I L - 1 8 活性阻害剤が含まれる。

（I）上記「（1）抗体及びその断片」で説明した抗体。

（I I）上記「（1）抗体及びその断片」で説明した抗体の断片。

（I I I）上記「（1）抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片の修飾抗体。

（I V）上記（I）～（I I I）に記載の抗体、抗体の断片、又は修飾抗体が認識するヒト I L - 1 8 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。

【0167】

ここで、上記「ヒト I L - 1 8 活性阻害剤」は、ヒト I L - 1 8 の活性を抑制するもの

50

であり、ヒト I L-18 レセプターへの結合を拮抗的に阻害するもの、又は、ヒト I L-18 と I L-18 レセプター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。

【0168】

また、本実施形態には、上記 (I) ~ (IV) のアンタゴニストを有効成分として含有し、ヒト I L-18 とヒト I L-18 レセプターとの結合を阻害するヒト I L-18 結合阻害剤が含まれる。上記「ヒト I L-18 結合阻害剤」は、ヒト I L-18 レセプターへの結合も拮抗的に阻害するものであってもよい。

【0169】

さらに、本実施形態には、上記 (I) ~ (IV) のアンタゴニストを有効成分として含有する、I F N- γ 産生抑制剤が含まれる。上記「I F N- γ 産生抑制剤」は、I F N- γ の産生を抑制するものであってよい。

【0170】

また、上記「(2) 遺伝子」で説明した遺伝子は、ヒト I L-18 が関与する疾患における遺伝子治療剤として利用してもよい。そのため、本発明の実施形態には、上記「(2) 遺伝子」で説明した遺伝子を含む遺伝子治療剤が含まれる。この遺伝子治療剤は摂取後に上記実施形態の抗体又はその断片を体内で発現するように設計することによって、該治療剤を摂取後に体内で上記実施形態の抗体又はその断片を形成させ、上記阻害剤と同様の効果を持たせてもよい。

【0171】

(5-3) 疾患の治療剤

上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体又はその断片は、ヒト由来抗ヒト I L-18 抗体の可変領域を有し、ヒト I L-18 と強く反応して、I L-18 と I L-18 レセプター間の結合に阻害作用を示す。さらに、I L-18 によって惹起される種々の免疫応答を阻害する (I F N- γ 産生を阻害)。そのため、上記のヒト I L-18 活性阻害剤、ヒト I L-18 結合阻害剤、I F N- γ 産生抑制剤、又は遺伝子治療剤は、ヒト I L-18 が関与する疾患 (I L-18 関連疾患) の治療剤として利用してもよい。

【0172】

上記「(1) 抗体及びその断片」で説明した抗体は、ヒト I L-18 を認識するヒト由来のヒト抗ヒト I L-18 である。すなわち、この抗体のアミノ酸配列は、従来のキメラ抗体及びヒト化抗体とは異なり、すべてヒト由来である。したがって、上記実施形態の抗体の作用を阻止する抗体 (抗抗体) 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又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できる。

【0173】

本発明の実施形態には、上記のヒト I L-18 活性阻害剤、ヒト I L-18 結合阻害剤、I F N- γ 産生抑制剤、又は遺伝子治療剤を含む、疾患の治療剤が含まれる (以下、「疾患治療剤」という場合がある。)。疾患としては、ヒト I L-18 亢進症が含まれる。ヒト I L-18 亢進症とは、生体内外に由来する何らかの刺激によって過剰に産生された活性型のヒト I L-18 が主因となって引き起こされる種々の疾患である。また、疾患としてはアレルギー、炎症、慢性免疫異常疾患が例示され、より具体的には、間質性肺炎、成人性 S t i l l 病、慢性閉塞性肺疾患、代謝性骨疾患、多発性硬化症、糖尿病、アトピー性皮膚炎、気道炎症、気道過敏性 (A H R)、喘息、並びに肝臓、腎臓及び腸管での重篤な臓器障害が例示される。

【0174】

なお、本実施形態の疾患治療剤は、体内でその効果を発揮すればよいので、例えば、配列番号 1 に示される塩基配列によりコードされるポリペプチド (又はこれを含むヒト I L-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、本実施形態の疾患治療剤は、上記 (I) ~ (IV) のヒト I L-18 アンタゴニスト (ヒト I L-18 活性阻害剤) 又は上記遺伝子治療

剤がプロドラッグ化されたものであってもよい。すなわち、体内で活性代謝物となるように修飾されていてもよい。

【0175】

また、本実施形態の疾患治療剤は、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、医薬品として許容される添加物を含む組成物であってもよい。

【0176】

なお、前述のように上記実施形態の抗体は、IL-18刺激によるシグナル伝達及びIFN- γ 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、低分子化合物である疾患治療剤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及びペプチド鎖の折り畳まれ方で構築された立体構造である場合がある。いずれの場合でも、例えば、Fukumotoらが提案した「モノクローナル抗体を用いた分子鑄型デザイン法」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（非特許文献28）。ここで、「低分子化合物」とは、例えば、ペプチド、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、例えば、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。

【0177】

なお、上記低分子化合物として、ペプチド又は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。

【0178】

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7～9及び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、実施例に示したscFvは、CDRによって、ヒトIL-18を特異的に認識する。

【0179】

したがって、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、SBD（Structure Based Drug Design）、CADD（Computer-Aided Drug Design）などにより、CDRが有する官能基及び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。

【0180】

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。

【0181】

（5-4）疾患治療剤の適用例-1

前述のように、上記実施形態のヒトIL-18活性阻害剤、ヒトIL-18結合阻害剤、IFN- γ 産生抑制剤、又は遺伝子治療剤は、ヒトIL-18が関与する疾患の治療剤として使用してもよい。以下に、疾患治療剤の適用例を例示する。

【0182】

間質性肺炎とは胸部X線画像上両側びまん性の陰影を認める疾患のうち、肺の間質（狭義では肺泡隔壁、広義では小葉間隔壁、胸膜近傍等を含む）を炎症の場とする200種以

10

20

30

40

50

上の疾患の総称である。このうち、原因が明らかでない間質性肺炎が多く存在している。久留米大学のグループは、IL-18の生体内での役割を明らかにするために、マウスにIL-2を投与してリンパ球を活性化させた状態で、IL-18を投与した際の変化を観察した（非特許文献29）。その結果、IL-18の投与により間質性肺炎が惹起されることを見出し、間質性肺炎の病態形成にIL-18が深く係っていることを見出した。さらに、同グループは、IL-18の過剰な作用発現を抑えることによって間質性肺炎の発症が抑えられると考え、この仮説を実証するためにIL-18レセプター（IL-18R α ）ノックアウトマウスを用いて検討した結果、IL-18の働きを抑えることによって間質性肺炎の発症が抑えられることを確かめている。

【0183】

10

一方、後述の実施例6では、ヒト細胞であるKG-1を用いて、本発明者が取得した抗IL-18抗体にIL-18の作用発現を抑える能力があることを確認している。

【0184】

このように、IL-18は、IL-2と共同してリンパ球を刺激することにより、重篤な間質性肺炎を発症する。したがって、例えば、前述した疾患治療剤を間質性肺炎の治療に使用してもよい。

【0185】

（5-5）疾患治療剤の適用例-2

成人発症Still病は、高熱、多関節痛、皮疹を主徴とする全身性の炎症性疾患である。病因は明らかになっていないところも多いが、遺伝要因として、カナダよりHLA B17、B18、B35、DR2が連鎖することが報告されている。最近では、IL-18などのサイトカイン遺伝子の多型性が発症のリスクとなる可能性が指摘されている。環境要因として、過去にヒトパルボウイルス、風疹ウイルス、EBウイルス、エコーウイルス、サイトメガロウイルス、インフルエンザ、パラインフルエンザ、コクサッキーウイルス、ヘルペスウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなどのウイルス、Mycoplasma、Chlamydia、Yersinia、Brucellaなどの細菌感染後に発症した例が報告されている。したがって、ウイルス又は細菌の感染がStill病の誘発因子と考える感染惹起説も提唱されている。また発症病態の形成にサイトカインが重要な役割を果たしていることも知られている。Still病患者ではIL-1、IL-6、IL-8、IFN- γ 、TNF- α 、M-CSF、IL-18が過剰に発現している。その中でも特にIL-18が著増していることが示されており、IL-18がStill病の原因の1つとして考えられている。したがって、IL-18の作用発現を抑えることによってStill病の発症が抑えられることが期待される。

20

30

【0186】

後述の実施例6では、ヒト細胞であるKG-1を用いて、本発明者が取得した抗IL-18抗体にIL-18の作用発現を抑える能力があることを確認している。したがって、例えば、前述した疾患治療剤を成人発症Still病等へ使用してもよい。

【0187】

（5-6）疾患治療剤の適用例-3

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される。

40

【0188】

また、IL-18は、IL-12の存在下で、様々な免疫系又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（ヘルパーT2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IgE産生を誘導する。

【0189】

また、IL-18は、抗原刺激を受けたTh1細胞を刺激して、Th1サイトカインに属するIFN- γ の産生を増強するばかりか、Th2サイトカインに属するIL-9、I

50

IL-13、さらに代表的なケモカインである IL-8 の産生を誘導する。

【0190】

また、IL-18 は、OVA 特異的 Th1 型メモリー T 細胞を移入したマウスに、経鼻的に OVA と共に投与する (IL-18 と OVA 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 Th1 型の気管支喘息を誘導できる。

【0191】

また、IL-18 は、抗原/IgE 非依存的に、直接、肥満細胞及び好塩基球を刺激する。その結果、様々なサイトカイン及び化学伝達物質の産生を誘導し、自然型アトピー (IL-18 依存性炎症) を誘導する。

10

【0192】

後述する実施例に示すように、本発明者が取得した抗 IL-18 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、Th1 サイトカインである IFN- γ 産生抑制機能を有している。

【0193】

以上より、IL-18 は、気管支喘息、自然型アトピー性皮膚炎などのアレルギー性炎症に重要であり、前述したヒト IL-18 アンタゴニスト (前述の (I) ~ (IV)) は、その治療薬として使用しても構わない。

【0194】

上記実施形態に係る抗体及びその断片は、ヒト IL-18 レセプターへの結合を阻害するヒト抗ヒト IL-18 抗体及びその断片である。したがって、ヒト IL-18 が原因となる様々な炎症性疾患の治療薬 (治療方法) 又は予防薬 (予防方法) として利用可能である。

20

【0195】

また、本発明は、例えば、scFv 抗体の CDR 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、IL-18 活性を抑制する低分子医薬品 (化学合成薬剤) を開発する重要な手段を提供する。

【0196】

前述のように、上記実施形態のヒト抗ヒト IL-18 抗体は、IL-18 レセプターへの結合を阻害する。したがって、この抗体は、上記以外にも、IL-18 が原因となって発症する、様々な疾患の治療と予防に有効となる。

30

【0197】

本発明者らは、ヒト 1 本鎖可変領域断片 (scFv) を提示するファージディスプレイライブラリーから、IL-18 に特異的に結合する scFv の単離に成功した。この 1 本鎖可変領域断片も、IL-18 レセプターへの結合を、特異的に阻害することが可能である。

【実施例】

【0198】

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。

40

【0199】

(実施例 1) サイトカインのビオチン化

Biotin-PEAC₅-maleimide (同仁化学) 又は Biotin-AC₅-Sulfo-OSu (同仁化学) を用いて、サイトカインであるヒト IL-18 (MBL)、サル IL-18 (thermo)、ラット IL-18 (Acris)、マウス IL-18 (MBL)、ヒト IL-1 β (フナコシ)、ヒト IL-33 (MBL) をビオチン化した。ビオチン化処理後のサイトカインのバッファーは、透析により PBS (SIGMA) に置換した。

【0200】

(実施例 2) 抗ヒト IL-18 抗体の単離

50

ヒトB細胞（例えば扁桃腺、脾臓）由来のmRNAからヒトVH及びVL cDNAを使用して調製されたscFvファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒトIL-18に対する抗体を単離した。用いた抗体ライブラリーは 10^{11} 種以上の多様な抗体分子を含む極めて優れたものであった。

【0201】

標準の手順を使用してBiomag Binding Streptavidin (Polysciences) にビオチン化ヒトIL-18を結合させることにより、ヒトIL-18に特異的に結合するscFvファージを取得した（非特許文献30）。取得したscFv-phageのclone名を「4A6D」及び「4A6S」と命名した。取得したscFvファージの結合活性は以下の方法で評価した。

10

【0202】

（実施例3）抗IL-18抗体の結合活性試験

取得したscFvファージ、scFv、及び定法（常法）により作成されるIgGの結合活性はELISAによって評価した。ビオチン化ヒトIL-18又はビオチン化マウスIL-18をPBS (SIGMA) で $1\mu\text{g/mL}$ に希釈し、Streptavidin plate (Nunc) に $100\mu\text{L}$ 入れ、2時間室温でインキュベートすることによってIL-18を固相化した。固相化後、plateをPBSTで洗浄し、取得したscFvファージ、scFv又はIgGをplateのwellに $100\mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、検出抗体 anti-M13/HRP (GEヘルスケア)、anti-His tag/HRP (Bethyl)、anti-V5 tag/HRP (Bethyl)、anti-mouse IgG/HRP (invitrogen) 又はanti-hFc/HRP (コスモバイオ、The binding site) をplateのwellに $100\mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、TMB (SIGMA) をplateのwellに $100\mu\text{L}$ 加えることによって発色させた。30分後、2N 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（モレキュラーデバイス）で発色値（O. D. $450\text{nm}/650\text{nm}$ ）を測定した。

20

【0203】

IgG分子型4A6DとヒトIL-18の結合活性ならびにIgG分子型4A6SとヒトIL-18の結合活性を図1に示した。4A6D及び4A6Sはネガティブコントロール抗体（ヒト抗HBs抗体）と比較して有意にヒトIL-18への結合活性を有していた。

30

【0204】

（実施例4）抗IL-18抗体のシーケンス解析

取得した抗IL-18抗体の塩基配列を確認した。単離したscFv 遺伝子のVH鎖及びVL鎖遺伝子のDNA塩基配列をBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。

【0205】

4A6D及び4A6Sの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号1、2に示した。

40

【0206】

なお、表1の配列番号3及び4には、4A6DのVH鎖及びVL鎖のアミノ酸配列を示しており、配列番号5及び6には、4A6SのVH鎖及びVL鎖のアミノ酸配列を示している。4A6D及び4A6Sでアミノ酸配列の異なる部位を下線部にて示している。

【0207】

【表 1】

clone name	部位	アミノ酸配列	配列番号
4A6D	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCTASGFTFDEYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISTGGGGTTYADSVEGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPWLSGSRSGDFWGQGT LVT VSS	配列番号 3
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLLIYEVSHRPSGVSDRFGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSFTSSSSLYVFGTGTKLTVL	配列番号 4
4A6S	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCTASGFTFSEYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISTGGGGTTYADSVEGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPWLSGSRSGDFWGQGT LVT VSS	配列番号 5
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLLIYEVSHRPSGVSDRFGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSFTSSSSLYVFGTGTKLTVL	配列番号 6

10

【0208】

4A6D及び4A6Sの結合活性に重要なCDR（相補性決定領域）のアミノ酸配列を表2の配列番号7から12に示している。

【0209】

【表 2】

20

部位		アミノ酸配列	配列番号
VH	CDR1	EYAMS	配列番号 7
	CDR2	GISTGGGGTTYADSVEG	配列番号 8
	CDR3	PWLSGSRSGDF	配列番号 9
VL	CDR1	TGTSSDVGGYNYVS	配列番号 10
	CDR2	EVSHRPS	配列番号 11
	CDR3	SSFTSSSSLYV	配列番号 12

【0210】

（実施例 5）IL-18 レセプター結合アッセイ

（5-1）ELISA 法による IL-18 レセプター結合アッセイ

30

抗ヒト IL-18 抗体の機能を評価するために、IL-18 レセプター結合アッセイ系を構築した。

【0211】

Covalink plate (nunc) に IL-18 R β -hFc (R&D) を 1 μ g/mL の濃度で 100 μ L/well 入れて、室温で 1 時間インキュベート後、4 $^{\circ}$ C で終夜インキュベートした。翌日、そのプレートを PBS（リン酸緩衝液）で洗浄し、1 % BSA（ウシ血清アルブミン）-PBS でブロッキングした。ヒト IL-18 (MBL) を 1 % BSA-PBS で 0.5 μ g/mL の濃度に調製し、IL-18 R α -hFc-His (R&D) を 1 % BSA-PBS で 2 μ g/mL の濃度に調製し、両者を 50 μ L ずつ混合した。さらに、取得した抗 IL-18 抗体を IL-18/IL-18 R α -hFc-His 混合液に加えた。この混合液を、IL-18 R β -hFc を固相化した Covalink plate に入れ、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。1 時間後、PBST（リン酸緩衝液-Tween 20）で洗浄し、検出抗体 anti-His tag/HRP (Bethyl) を plate の well に 100 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。1 時間後、PBST で洗浄し、TMB (SIGMA) を plate の well に 100 μ L 加えることによって発色させた。30 分後、2N 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（モレキュラーデバイス）で発色値（O.D. 450 nm/650 nm）を測定した。

40

【0212】

4A6D によるヒト IL-18 と IL-18 レセプター間の結合阻害活性を図 2 に示し

50

た。4A6Dはネガティブコントロール抗体（ヒト抗HBs抗体）と比較して有意にヒトIL-18とIL-18レセプター間の結合を阻害した。

【0213】

（5-2）KG-1細胞を用いたIL-18レセプター結合アッセイ

取得した抗IL-18抗体のnativeなIL-18レセプターに対する結合阻害能を確認するため、KG-1細胞（ATCC # CCL-246）を用いたIL-18レセプター結合アッセイ系を構築した。

【0214】

ヒトIL-18（MBL）を1%BSA-PBS-0.05%NaN₃-2%ウサギ血清で100ng/mLに希釈し、取得した抗IL-18抗体と混合し、室温で60分インキュベートした。その後、標準的な技法（例えば、RPMI1640培地に10%ウシ血清、2mM L-グルタミン、50U/mL ペニシリン、50μg/mLストレプトマイシンを加えた培地）により培養されたKG-1細胞（1×10⁵ cells）にヒトIL-18/抗IL-18抗体混合液を加え、氷上で反応させた。30分後、遠心（1200rpm, 3min, 4℃）により上清を除去し、IL-18とIL-18レセプター間の結合を阻害しないビオチン化抗IL-18抗体125-2H（MBL）を加え、氷上で反応させた。30分後、遠心（1200rpm, 3min, 4℃）により上清を除去し、streptavidin-PE（BD）を加え、氷上で30分反応させた。反応後、遠心（1200rpm, 3min, 4℃）により上清を除去し、1%BSA-PBS-0.05%NaN₃-2%ウサギ血清でKG-1細胞を浮遊させた。反応させたKG-1細胞はFACScan（BD）により蛍光強度を測定した。

【0215】

IgG分子型4A6DによるヒトIL-18とnativeなIL-18レセプター間の結合阻害活性を図3（a）及び（b）に示した。IgG分子型4A6Dはネガティブコントロール抗体（ヒト抗HBs抗体）と比較して有意にヒトIL-18とIL-18レセプター間の結合を阻害した。

【0216】

（実施例6）抗IL-18抗体の中和試験

（6-1）組換えIL-18を用いた中和試験

抗ヒトIL-18抗体の中和活性を試験するために、IL-18活性をモニターするための試験として当技術分野で認められている、中和試験を行った。

【0217】

簡単に述べると、その中和試験は、標準的な技法（例えば、RPMI1640培地に10%ウシ血清、2mM L-グルタミン、50U/mL ペニシリン、50μg/mLストレプトマイシンを加えた培地）により培養されたKG-1細胞（ATCC # CCL-246）を使用する。中和試験を行うため、KG-1細胞を3×10⁵ cells/mLで播種し、4日間培養（37℃、5%CO₂）した。4日後、KG-1細胞を3×10⁶ cells/mLに調製し、最終濃度4ng/mLになるように組換えIL-18及び取得した抗IL-18抗体を加え、24時間培養（37℃、5%CO₂）した。24時間後の培養上清を回収し、IFN-γ産生量を製造業者の指示にしたがって、市販のIFN-γ定量ELISA kit（invitrogen）で検出した。

【0218】

その結果、図4に示すようにIgG分子型4A6D及び4A6Sは、KG-1細胞からのIFN-γ産生を阻害した。さらに4A6D及び4A6SのIC₅₀を算出した結果を表3に示す。4A6D及び4A6SのIC₅₀はそれぞれ0.007nM、0.013nMであった。これは4A6D及び4A6Sが既報のIL-18阻害剤の中和能を大きく凌駕することを実証している。

【0219】

【表 3】

clone名	中和能 (IC ₅₀ , nM)
4A6D	0.007
4A6S	0.013
ABT-325 ※ 1	0.2
2C10 ※ 2	0.1
IL-18BP ※ 3	0.4
H18.108 ※ 4	5

※ 1 特許文献 2 に記載。※ 2 特許文献 3 又は 4 に記載。※ 3 非特許文献 3 1 に記載。※ 4 特許文献 5 及び非特許文献 3 2 に記載。

10

【0220】

(6-2) ヒト細胞由来の natural IL-18 を用いた中和試験

標準的な技法 (例えば、RPMI 1640 培地に 10% ウシ血清、2 mM L-グルタミン、50 U/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシンを加えた培地) により培養された KG-1 細胞 (ATCC # CCL-246) 及び THP-1 細胞 (ATCC # TIB-202) を使用した。中和試験を行うため、KG-1 細胞を 3×10^5 cell/mL で播種し、4 日間培養 (37°C、5% CO₂) した。また THP-1 細胞を 3×10^5 cell/mL で播種し、2 日間培養 (37°C、5% CO₂) した。培養後の KG-1 細胞及び THP-1 細胞をそれぞれ 6×10^6 cell/mL、 1×10^6 cell/mL に調製し、等量混合した。最終濃度 1 µg/mL になるように LPS (リポポリサッカライド、SIGMA) 及び取得した抗 IL-18 抗体を加え、24 時間培養 (37°C、5% CO₂) した。24 時間後の培養上清を回収し、IFN-γ 産生量を製造業者の指示にしたがって、市販の IFN-γ 定量 ELISA kit (invitrogen) で検出した。

20

【0221】

結果を表 4 に示す。THP-1 細胞及び KG-1 細胞単独に LPS を加えても IFN-γ は産生されないが、THP-1、KG-1 及び LPS の 3 者が存在する時のみ IFN-γ を産生した。さらに 4A6D 及び 4A6S を加えることで、IFN-γ 産生が阻害された。以上の結果は、2 種類のヒト細胞を用いることで natural な IL-18 を産生し、その結果として IFN-γ を産生するアッセイ系の構築を実証した。また、以上の結果は、IgG 分子型 4A6D 及び 4A6S がヒト細胞由来の natural な IL-18 を阻害することも実証した。

30

【0222】

【表 4】

THP-1	KG-1	LPS	antibody	IFN-γ 産生量 (pg/mL)
+	-	-	-	9
-	+	-	-	9
+	+	-	-	28
+	+	+	-	144
+	-	+	-	22
-	+	+	-	15
+	+	+	4A6D	33
+	+	+	4A6S	36
+	+	+	Negative control	134

40

【0223】

(6-3) Chymase 切断型 IL-18 を用いた中和試験

Chymase 切断型の IL-18 は既報 (非特許文献 9) にしたがって調製した。

50

【0224】

簡単に述べると、大腸菌を宿主として、前駆体である proIL-18 を発現し、精製した。調製した proIL-18 ($100 \mu\text{g/mL}$) に、 Chymase (フナコシ) を 10 U 加え、 37°C で 80 分インキュベーションした。これを chymase 切断型の IL-18 とした。

【0225】

一方、 KG-1 細胞を $3 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ で播種し、4日間培養 (37°C 、 $5\% \text{CO}_2$) した。4日後、 KG-1 細胞を $3 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ に調製し、 chymase 切断型の IL-18 を反応系の $1/20$ 容量加え、さらに取得した抗 IL-18 抗体を加え、24時間培養 (37°C 、 $5\% \text{CO}_2$) した。24時間後の培養上清を回収し、 $\text{IFN-}\gamma$ 産生量を製造業者の指示にしたがって、市販の $\text{IFN-}\gamma$ 定量 ELISA kit (invitrogen) で検出した。

10

【0226】

結果を表5に示す。 IgG 分子型 4A6D 及び 4A6S を加えることで、 $\text{IFN-}\gamma$ 産生が阻害された。この結果は、 4A6D 及び 4A6S が chymase 切断型の活性型 IL-18 を阻害することを実証している。

【0227】

【表5】

proIL-18	chymase	antibody	IFN- γ 産生量 (pg/mL)
+	+	-	91
+	-	-	18
-	+	-	22
+	+	4A6D	22
+	+	4A6S	26
+	+	Negative control	109

20

【0228】

(実施例7) エピトープ解析 (競合 ELISA)

競合 ELISA 法により、取得した抗 IL-18 抗体のエピトープ解析を行った。

【0229】

ビオチン化ヒト IL-18 を PBS (SIGMA) で $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈し、 $\text{Streptavidin plate}$ (Nunc) に $100 \mu\text{L}$ 入れ、2時間室温でインキュベートすることによってヒト IL-18 を固相化した。固相化後、 plate を PBST で洗浄し、抗マウス $\alpha 9 \text{ scFv-mFc}$ (ネガティブコントロール) 或いは 4A6D scFv-mFc を plate の well に $100 \mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、ヒト IL-18 BP a-hFc ($\text{R\&D}$) を 30 ng/mL に $1\% \text{BSA-PBS}$ で調製し、 plate の well に $100 \mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、 PBST で洗浄し、検出抗体 anti-hFc/HRP (コスモバイオ、 The binding site) を plate の well に $100 \mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、 PBST で洗浄し、 TMB (SIGMA) を plate の well に $100 \mu\text{L}$ 加えることによって発色させた。30分後、 2 N 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイス) で発色値 ($\text{O.D. } 450 \text{ nm}/650 \text{ nm}$) を測定した。

30

40

【0230】

抗ヒト IL-18 抗体のエピトープ解析の結果を図5に示す。 4A6D は、ヒト IL-18 BP a-hFc と競合することがわかった。これは、 4A6D とヒト IL-18 BP a が同一エピトープを認識しており、 4A6D は生体内と同様の阻害様式を有することを意味する。

【0231】

(実施例8) 抗ヒト IL-18 抗体及び IL-18 BP の存在下における、 IL-18レ

50

セプター結合アッセイ

上記「K G-1細胞を用いたI L-18レセプター結合アッセイ」を基として、取得した抗I L-18抗体と同時にヒトI L-18 B P a-F c (R & D) を添加することでその効果が相乗的かどうかを検証した。

【0232】

結果を図6に示す。I g G分子型4 A 6 D及びヒトI L-18 B P aが単独ではK G-1細胞へのI L-18の結合を数十%阻害するのに対して、その両者が存在することで単独で加えるよりも高い阻害効果を示した。

【0233】

(実施例9) 交差反応性試験

上記「サイトカインのビオチン化」に記載したビオチン化ヒトI L-18 (M B L)、ビオチン化サルI L-18 (t h e r m o)、ビオチン化ラットI L-18 (A c r i s)、ビオチン化マウスI L-18 (M B L)、ビオチン化ヒトI L-1 β (フナコシ)、ビオチン化ヒトI L-33 (M B L) をP B S (S I G M A) で1 μ g/mLに希釈し、S t r e p t a v i d i n p l a t e (N u n c) に100 μ L入れ、2時間室温でインキュベートすることによって各種サイトカインを固相化した。固相化後、p l a t e をP B S Tで洗浄し、取得した抗体をp l a t e のw e l l に100 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。1時間後、P B S Tで洗浄し、検出抗体 a n t i - m o u s e I g G / H R P (i n v i t r o g e n) 又はa n t i - h F c / H R P (コスモバイオ、T h e b i n d i n g s i t e) をp l a t e のw e l l に100 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。1時間後、P B S Tで洗浄し、T M B (S I G M A) をp l a t e のw e l l に100 μ L加えることによって発色させた。30分後、2 N 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイス) で発色値 (O . D . 450 nm / 650 nm) を測定した。

【0234】

結果を表6に示す。取得した抗ヒトI L-18抗体4 A 6 D及び4 A 6 Sは、ヒト及びサルI L-18への結合活性を示すが、ラット及びマウスI L-18への結合活性を示さなかった。一方、取得した抗I L-18抗体は、他のI L-1ファミリーであるI L-1 β 及びI L-33への結合活性を有していなかった。

【0235】

【表6】

抗IL-18抗体 clone名	各種サイトカイン					
	ヒト IL-18	サル IL-18	ラット IL-18	マウス IL-18	ヒト IL-1 β	ヒト IL-33
4A6D	+	+	-	-	-	-
4A6S	+	+	-	-	-	-

【0236】

(実施例10) エピトープ解析 (A l a置換体を用いた反応性解析)

大腸菌を宿主として、野生型ヒトI L-18又はヒトI L-18のK 5 3 A変異体を、ファクターX a 切断サイトをリンカーにしてG S T融合タンパク質として発現させ、グルタチオンセファロース4 B (G Eヘルスケア) カラムに結合させた。その後、ファクターX aを加えることにより野生型ヒトI L-18又はヒトI L-18のK 5 3 A変異体を溶出した。溶出液中に含まれるファクターX aは、X a r r e s t アガロース (ノバジェン) を用いて除去した。この溶出液を野生型ヒトI L-18又はヒトI L-18のK 5 3 A変異体とした。

【0237】

次に、これらのヒトI L-18をビオチン化後、P B S (S I G M A) で1 μ g/mLに希釈し、S t r e p t a v i d i n p l a t e (N u n c) に100 μ L入れ、2時間室温でインキュベートすることによって固相化した。固相化後、p l a t e をP B S T

で洗浄し、ヒト IL-18BP a-hFc (R&D) 又は IgG 分子型 4A6D を 1% BSA-PBS で $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、plate の well に $100\mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、PBST で洗浄し、検出抗体 anti-hFc/HRP (コスモバイオ、The binding site) を plate の well に $100\mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、PBST で洗浄し、TMB (SIGMA) を plate の well に $100\mu\text{L}$ 加えることによって発色させた。30分後、1M 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイス) で発色値 (O. D. $450\text{nm}/650\text{nm}$) を測定した。

【0238】

ELISA の結果を図 7 に示す。ヒト IL-18BP a-hFc と同様に、4A6D は、野生型ヒト IL-18 と比較して、ヒト IL-18 の K53A 変異体への反応性が低下していた。これは、4A6D のエピトープとして、ヒト IL-18 の 53 番目のアミノ酸残基であるリジンが重要であることを意味し、かつ、ヒト IL-18BP a もこの領域を認識していることを示している。すなわち 4A6D はヒト IL-18BP a の認識部位と同じ領域をエピトープとして認識していることが示された。

10

【0239】

(実施例 11) IL-18 と IL-18BP との複合体への反応性解析

ELISA 法により取得した抗 IL-18 抗体の、IL-18 と IL-18BP との複合体への反応性を評価した。

【0240】

ビオチン化ヒト IL-18 を PBS (SIGMA) で $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、Streptavidin plate (Nunc) に $100\mu\text{L}$ 入れ、1時間室温でインキュベートすることによってヒト IL-18 を固相化した。Plate を PBST で洗浄し、1% BSA-PBS で $10\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したヒト IL-18BP a-hFc (R&D) を plate の well に $100\mu\text{L}$ ずつ加えた。 37°C で1時間インキュベーションすることで、IL-18 と IL-18BP との複合体を形成させた。その plate を PBST で洗浄し、4A6D scFv-mFc を plate の well に $100\mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、PBST で洗浄し、検出抗体 anti-mouse IgG/HRP (invitrogen) を plate の well に $100\mu\text{L}$ 加え、 37°C でインキュベーションした。1時間後、PBST で洗浄し、TMB (SIGMA) を plate の well に $100\mu\text{L}$ 加えることによって発色させた。30分後、1M 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイス) で発色値 (O. D. $450\text{nm}/650\text{nm}$) を測定した。

20

30

【0241】

IL-18 と IL-18BP との複合体への反応性解析の結果を図 8 に示す。4A6D は、IL-18 と結合するが、IL-18 と IL-18BP との複合体とは反応しなかった。

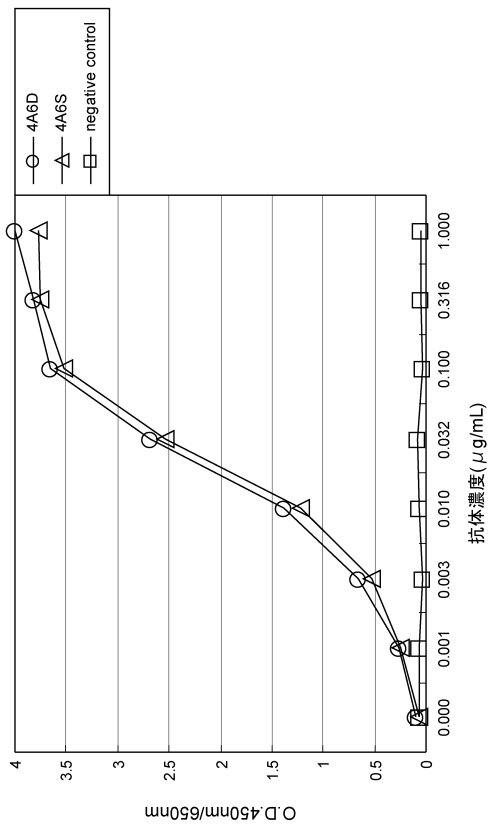
【産業上の利用可能性】

【0242】

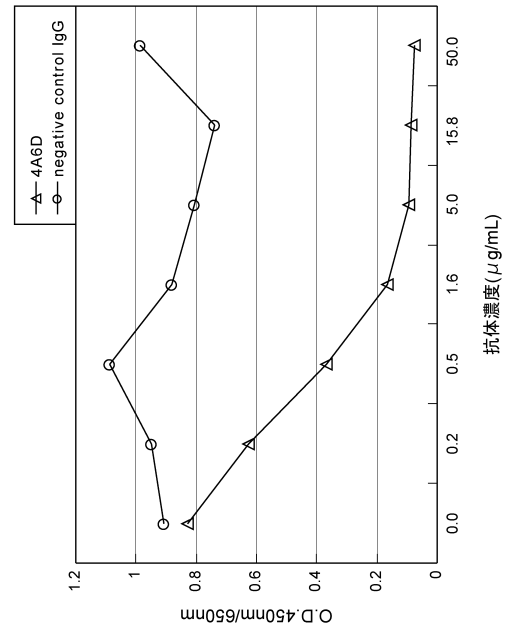
本発明のヒト IL-18 に対する抗体及びその断片は、ヒト IL-18 が直接又は間接的に関与する疾病に対して利用可能性がある。

40

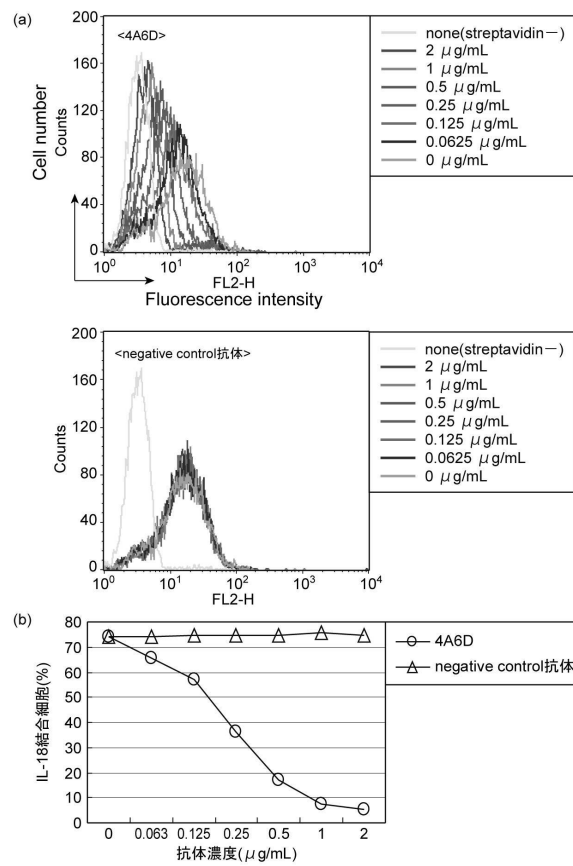
【図 1】



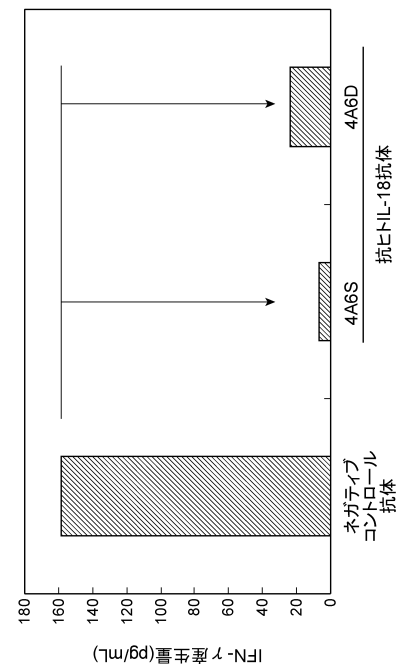
【図 2】



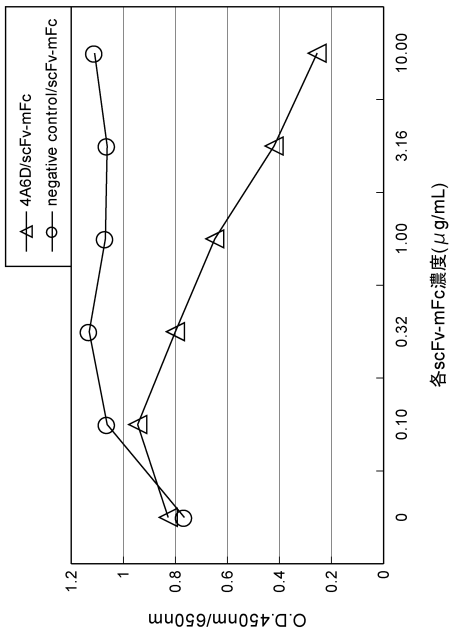
【図 3】



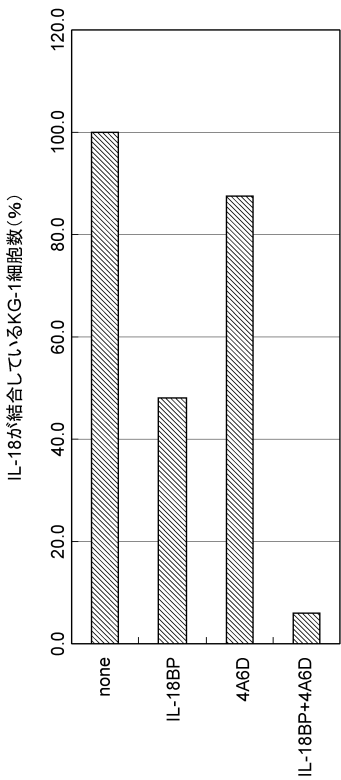
【図 4】



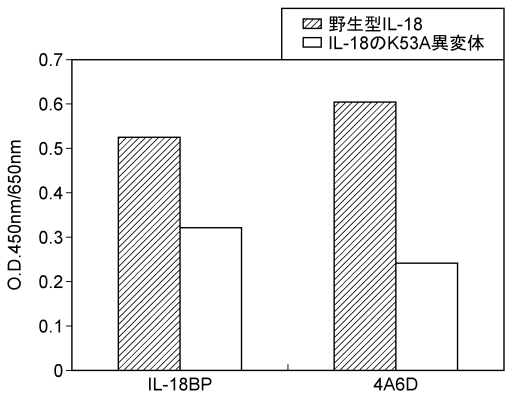
【図 5】



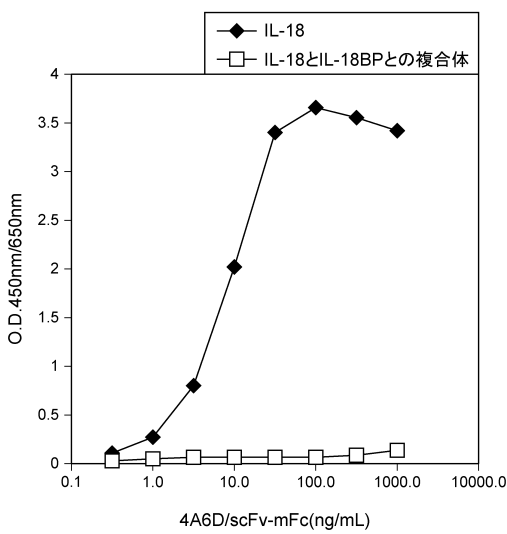
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

0006467225000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34 F
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 P
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 Q
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	G 0 1 N 33/50 T
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 U
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/04
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/08
			A 6 1 P 43/00 1 1 1

- (72)発明者 松本 みゆき
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
- (72)発明者 副島 見事
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
- (72)発明者 鳥飼 正治
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
- (72)発明者 中島 敏博
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 0 0 7 6 4 8 (WO, A 1)
 特表 2 0 0 4 - 5 0 0 0 8 6 (JP, A)
 国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 7 0 1 9 (WO, A 1)
 HAMASAKI, T. et al., "Human anti-human IL-18 antibody recognizing the IL-18-binding site 3 with IL-18 signaling blocking activity.", JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2 0 0 5 年 1 0 月, Vol.138, No.4, P.433-442
 MENG, X. et al., "Variola virus IL-18 binding protein interacts with three human IL-18 residues that are part of a binding site for human IL-18 receptor alpha subunit.", VIROLOGY, 2 0 0 7 年 2 月 5 日, Vol.358, No.1, P.211-220
 KRUMM, B. et al., "A unique bivalent binding and inhibition mechanism by the yatapoxvirus interleukin 18 binding protein.", PLOS PATHOGENS, 2 0 1 2 年 8 月, Vol.8, No.8, e1002876(P.1-15)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	新型人抗IL-18抗体		
公开(公告)号	JP6467225B2	公开(公告)日	2019-02-06
申请号	JP2014548554	申请日	2013-11-18
申请(专利权)人(译)	一般財団法人化学及血清療法研究所		
[标]发明人	清水裕之 松本みゆき 副島見事 鳥飼正治 中島敏博		
发明人	清水 裕之 松本 みゆき 副島 見事 鳥飼 正治 中島 敏博		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/24 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12M1/34 G01N33/53 G01N33/50 A61K39/395 A61K31/7088 A61P1/16 A61P1/00 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/00 A61P17/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00		
CPC分类号	A61P37/06 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/622 C07K2317/76 C12N15/62 G01N33/6869 C12N15/1037 G01N33/538 G01N33/54353 G01N33/6857		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/24 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12M1/34.F G01N33/53.P G01N33/53.Q G01N33/50.T A61K39/395.U A61K31/7088 A61P1/16 A61P1/00 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/00 A61P17/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.111		
代理人(译)	长谷川良树 清水义 俊明Sakanishi 阿部宽		
审查员(译)	野村 英雄		
优先权	2012254893 2012-11-21 JP		
其他公开文献	JPWO2014080866A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及人抗人IL-18抗体，其与人白细胞介素-18 (人IL-18) 反应并且不与人IL-18K53A突变体反应。

(51) Int. Cl.			F 1		
C 1 2 N	15/13	(2006. 01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
C O 7 K	16/24	(2006. 01)	C O 7 K	16/24	
C O 7 K	16/46	(2006. 01)	C O 7 K	16/46	
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	

請求項の数 30 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-548554 (P2014-548554)	(73) 特許権者	318010328	
(86) (22) 出願日	平成25年11月18日 (2013.11.18)		K Mバイオロジクス株式会社	
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/081057		熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号	
(87) 国際公開番号	W02014/080866	(74) 代理人	100088155	
(87) 国際公開日	平成26年5月30日 (2014. 5. 30)		弁理士 長谷川 芳樹	
審査請求日	平成28年8月26日 (2016. 8. 26)	(74) 代理人	100128381	
(31) 優先権主張番号	特願2012-254893 (P2012-254893)		弁理士 清水 義憲	
(32) 優先日	平成24年11月21日 (2012.11.21)	(74) 代理人	100176773	
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 坂西 俊明	
前置審査		(74) 代理人	100165526	
			弁理士 阿部 寛	
		(72) 発明者	清水 裕之	
			熊本県菊池市旭志川辺1314番地1	
			一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究	
			所内	
			最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規なヒト抗 I L - 1 8 抗体