

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/080866

発行日 平成29年1月5日 (2017.1.5)

(43) 国際公開日 平成26年5月30日 (2014.5.30)

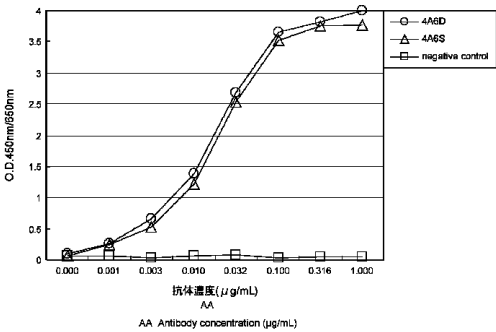
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B O 2 9
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2014-548554 (P2014-548554)	(71) 出願人 000173555
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/081057	一般財団法人化学及血清療法研究所
(22) 国際出願日 平成25年11月18日 (2013.11.18)	熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号
(31) 優先権主張番号 特願2012-254893 (P2012-254893)	(74) 代理人 100088155
(32) 優先日 平成24年11月21日 (2012.11.21)	弁理士 長谷川 芳樹
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100128381
	弁理士 清水 義憲
	(74) 代理人 100176773
	弁理士 坂西 俊明
	(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) 【要約】

本発明は、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抗体に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトインターロイキン - 18 (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、ヒト抗ヒト I L - 18 抗体。

【請求項 2】

ヒト I L - 18 に反応し、ヒト I L - 18 とヒト I L - 18 結合タンパク質 (ヒト I L - 18 B P) との複合体に反応しない、ヒト抗ヒト I L - 18 抗体。

【請求項 3】

H 鎖の相補性決定領域 (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、

H 鎖の 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、

H 鎖の 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り、

L 鎖の 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、

L 鎖の 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、

L 鎖の 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、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 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、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 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 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、H 鎖可変領域断片。

【請求項 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 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、L 鎖可変領域断片。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の抗体の H 鎖可変領域断片又は請求項 5 に記載の H 鎖可変領域断片と、請求項 3 に記載の抗体の L 鎖可変領域断片又は請求項 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 I L - 18 抗体の 1 本鎖可変領域断片。

【請求項 8】

請求項 3 に記載の抗体の H 鎖可変領域断片若しくは請求項 5 に記載の H 鎖可変領域断片、及び / 又は、請求項 3 に記載の抗体の L 鎖可変領域断片若しくは請求項 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 I L - 18 抗体。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の抗体の断片。

【請求項 10】

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、請求項 9 に記載の断片。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4、8 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 5 ~ 7、9、10 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 12】

請求項 1 ~ 4、8 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 5 ~ 7、9、10 のいずれか一項に記載の断片をコードする遺伝子。

10

【請求項 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、請求項 12 に記載の遺伝子。

【請求項 14】

請求項 12 又は 13 に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【請求項 15】

請求項 12 又は 13 に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【請求項 16】

請求項 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、請求項 1 ~ 4、8 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 5 ~ 7、9、10 のいずれか一項に記載の断片を生産する方法。

20

【請求項 17】

請求項 1 ~ 4、8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 5 ~ 7、9、10 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 11 に記載の修飾抗体を含むヒト I L - 18 の検出器具。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 4、8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 5 ~ 7、9、10 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 11 に記載の修飾抗体からなるヒト I L - 18 検出試薬を含む、I L - 18 の発現量の変化に関連する疾患の診断キット。

30

【請求項 19】

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

【請求項 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、請求項 18 又は 19 に記載の診断キット。

【請求項 21】

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 18 ~ 20 のいずれか一項に記載の診断キット。

40

【請求項 22】

請求項 18 ~ 21 のいずれか一項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 I L - 18 量に基づいて疾患を診断する方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 4、8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 5 ~ 7、9、10 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 11 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 24】

請求項 1 ~ 4、8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 5 ~ 7、9、10 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 11 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。

50

【請求項 25】

請求項 1～4、8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 5～7、9、10 のいずれか一項に記載の断片又は請求項 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。

【請求項 26】

請求項 12 又は 13 に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【請求項 27】

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

10

【請求項 28】

上記疾患が、ヒト IL-18 亢進症である、請求項 27 に記載の治療剤。

【請求項 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、請求項 27 又は 28 に記載の治療剤。

【請求項 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、請求項 27～29 のいずれか一項に記載の治療剤。

20

【請求項 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、請求項 27～30 のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項 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、請求項 27～31 のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項 33】

請求項 27～32 のいずれか一項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。

【請求項 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-18 BP 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 1～4、8 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 5～7、9、10 のいずれか一項に記載の断片の作製方法。

30

【発明の詳細な説明】**【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。

40

【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 CXCKE 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、

50

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 ファミリーに属する。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 18 kDa 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 0.3 nM）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、IKK キナーゼ、NF - κ B、JNK、p38 MAP 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）など、いわゆる Th1 病の原因にもなる。

【0006】

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。

【0007】

IL - 18 の産生又は活性の制御は、このような 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】

【0008】

【特許文献 1】米国特許出願公開第 2005074434 号明細書

【特許文献 2】米国特許出願公開第 20050100965 号明細書

【特許文献 3】米国特許出願公開第 20070292432 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 6706487 号明細書

10

20

30

40

50

【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】

【 0 0 0 9 】

【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

【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

10

【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

【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】Kanakaraj P. et al. (1999) J. Exp. Med. 189: 1129-1138

20

【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

【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

30

【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: 109-116

【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

【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

40

【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】

【 0 0 1 0 】

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

50

との親和性が最も高いのが I L - 1 8 B P a であり、その中和能 (I C ₅₀) は 0 . 4 n M 程度とされている。I L - 1 8 B P は、活性を有していない前駆体の I L - 1 8 には結合しないが、成熟型 (活性型) I L - 1 8 には結合する特徴も有する。健常なヒトの血中 I L - 1 8 B P 濃度は、0 . 5 - 0 . 7 n g / m L であるとされており、I L - 1 8 B P は、血中に存在している微量の成熟型 I L - 1 8 の活性を抑制している。

【 0 0 1 1 】

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 I L - 1 8 との作用メカニズムが明確な I L - 1 8 B P 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、I L - 1 8 B P は血中半減期が 3 4 - 4 0 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 2 6) 。

10

【 0 0 1 2 】

それゆえ、I L - 1 8 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、I L - 1 8 の関与する疾患、すなわち、I L - 1 8 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。

【 0 0 1 3 】

このような背景のもと、これまでに I L - 1 8 活性抑制剤が複数取得されているが、I L - 1 8 B P が結合する I L - 1 8 の部位 (I L - 1 8 B P 認識領域) と同じ部位に結合するものではなく、I L - 1 8 B P 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、I L - 1 8 抑制剤をスクリーニングする際に I L - 1 8 に存在する I L - 1 8 B P 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、I L - 1 8 B P と同様の抑制メカニズムに基づく I L - 1 8 活性抑制剤の取得が非常に困難であることを意味する。

20

【 0 0 1 4 】

本発明は、上記の課題に鑑み、生体内の天然の I L - 1 8 活性抑制剤である I L - 1 8 B P と同様の抑制メカニズムであり (いわゆる I L - 1 8 B P 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 I L - 1 8 B P よりも、より長期作動性の I L - 1 8 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】

【 0 0 1 5 】

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 I L - 1 8) は、E L I S A 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 I L - 1 8 抗体を介して I L - 1 8 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。

30

【 0 0 1 6 】

その結果、本発明者らは、I L - 1 8 B P 認識領域を露呈させ、露呈状態を維持した I L - 1 8 を提示させることに成功した。

【 0 0 1 7 】

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 (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、所望の完全ヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体の 1 本鎖可変領域断片 (s c F v) の取得に成功した。

40

【 0 0 1 8 】

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 I L - 1 8 の生理活性を阻害することを見出した。

【 0 0 1 9 】

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

50

【 0 0 2 0 】

[1] : ヒトインターロイキン - 1 8 (ヒト I L - 1 8) に反応し、ヒト I L - 1 8 の K 5 3 A 変異体に反応しない、ヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体。

【 0 0 2 1 】

[2] : ヒト I L - 1 8 に反応し、ヒト I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 B P との複合体に反応しない、ヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体。

【 0 0 2 2 】

[3] : H 鎖の相補性決定領域 (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、

H 鎖の 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、

H 鎖の 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り、

L 鎖の C D R 1 が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列、又は、配列番号 1 0 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 C D R 2 が、配列番号 1 1 のアミノ酸配列、又は、配列番号 1 1 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 C D R 3 が、配列番号 1 2 のアミノ酸配列、又は、配列番号 1 2 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。

【 0 0 2 3 】

[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。

【 0 0 2 4 】

[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 I L - 1 8 に反応し、ヒト I L - 1 8 の K 5 3 A 変異体又はヒト I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 B P との複合体に反応しない、H 鎖可変領域断片。

【 0 0 2 5 】

[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 I L - 1 8 に反応し、ヒト I L - 1 8 の K 5 3 A 変異体又はヒト I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 B P との複合体に反応しない、L 鎖可変領域断片。

【 0 0 2 6 】

[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 I L - 1 8 抗体の 1 本鎖可変領域断片。

【 0 0 2 7 】

[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 I L - 1 8 抗体。

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

50

[9] : [8] に記載の抗体の断片。

【 0 0 2 9 】

[1 0] : $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')_2$ 、 $s c A b$ 又は $s c F v F c$ である、[9] に記載の断片。

【 0 0 3 0 】

[1 1] : [1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体又は [5] ~ [7]、[9]、[1 0] 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。

【 0 0 3 1 】

[1 2] : [1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体又は [5] ~ [7]、[9]、[1 0] のいずれかに記載の断片をコードする遺伝子。

10

【 0 0 3 2 】

[1 3] : 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、[1 2] に記載の遺伝子。

【 0 0 3 3 】

[1 4] : [1 2] 又は [1 3] に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【 0 0 3 4 】

[1 5] : [1 2] 又は [1 3] に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【 0 0 3 5 】

[1 6] : [1 2] 又は [1 3] 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]、[1 0] のいずれかに記載の断片を生産する方法。

20

【 0 0 3 6 】

[1 7] : [1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体、[5] ~ [7]、[9]、[1 0] のいずれかに記載の断片又は [1 1] に記載の修飾抗体を含むヒト I L - 1 8 の検出器具。

【 0 0 3 7 】

[1 8] : [1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体、[5] ~ [7]、[9]、[1 0] のいずれかに記載の断片又は [1 1] に記載の修飾抗体からなるヒト I L - 1 8 検出試薬を含む、I L - 1 8 の発現量の変化に関連する疾患の診断キット。

【 0 0 3 8 】

30

[1 9] : 上記疾患が、ヒト I L - 1 8 亢進症である、[1 8] に記載の診断キット。

【 0 0 3 9 】

[2 0] : 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 8] 又は [1 9] に記載の診断キット。

【 0 0 4 0 】

[2 1] : 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 8] ~ [2 0] のいずれかに記載の診断キット。

【 0 0 4 1 】

40

[2 2] : [1 8] ~ [2 1] 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 I L - 1 8 量に基づいて疾患を診断する方法。

【 0 0 4 2 】

[2 3] : [1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体、[5] ~ [7]、[9]、[1 0] のいずれかに記載の断片又は [1 1] に記載の修飾抗体を有効成分として含有する、ヒト I L - 1 8 活性阻害剤。

【 0 0 4 3 】

[2 4] : [1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体、[5] ~ [7]、[9]、[1 0] のいずれかに記載の断片又は [1 1] に記載の修飾抗体を有効成分として含有し、ヒト I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 レセプターとの結合を阻害する、ヒト I L - 1 8 結

50

合阻害剤。

【 0 0 4 4 】

[2 5] : [1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体、[5] ~ [7]、[9]、[1 0] のいずれかに記載の断片又は [1 1] 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。

【 0 0 4 5 】

[2 6] : [1 2] 又は [1 3] に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【 0 0 4 6 】

[2 7] : [2 3] に記載のヒト I L - 1 8 活性阻害剤、[2 4] に記載のヒト I L - 1 8 結合阻害剤、[2 5] に記載のインターフェロン - γ 産生抑制剤、又は [2 6] に記載の遺伝子治療剤を含む、I L - 1 8 関連疾患の治療剤。

10

【 0 0 4 7 】

[2 8] : 上記疾患が、ヒト I L - 1 8 亢進症である、[2 7] に記載の治療剤。

【 0 0 4 8 】

[2 9] : 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、[2 7] 又は [2 8] に記載の治療剤。

【 0 0 4 9 】

[3 0] : 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、[2 7] ~ [2 9] のいずれかに記載の治療剤。

20

【 0 0 5 0 】

[3 1] : ヒト I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 レセプターとの結合の阻害用である、[2 7] ~ [3 0] のいずれかに記載の治療剤。

【 0 0 5 1 】

[3 2] : 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、[2 7] ~ [3 1] のいずれかに記載の治療剤。

【 0 0 5 2 】

[3 3] : [2 7] ~ [3 2] のいずれかに記載の治療剤を投与することによる I L - 1 8 関連疾患の治療方法。

30

【 0 0 5 3 】

[3 4] : ヒト I L - 1 8 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 - 1 8 の I L - 1 8 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、[1] ~ [4]、[8] のいずれかに記載の抗体又は [5] ~ [7]、[9]、[1 0] のいずれかに記載の断片の作製方法。

【 0 0 5 4 】

[3 5] : ヒト I L - 1 8 B P 認識領域と同じ部位に結合する、ヒト抗ヒト I L - 1 8 抗体。

【 0 0 5 5 】

[3 6] : ヒト I L - 1 8 活性を阻害する、[3 5] に記載の抗体。

40

【 0 0 5 6 】

[3 7] : ヒト I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 レセプターとの結合を阻害する、[3 5] 又は [3 6] に記載の抗体。

【 0 0 5 7 】

[3 8] : インターフェロン - γ (I F N - γ) 産生を阻害する、[3 5] ~ [3 7] のいずれかに記載の抗体。

【 0 0 5 8 】

[3 9] : エピトープがヒト I L - 1 8 の 5 3 番目のリジンを含む領域である、[3 5] ~ [3 8] のいずれかに記載の抗体。

50

【 0 0 5 9 】

[4 0] : 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、 [3 5] ~ [3 9] 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 - 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。

(c) 配列番号 1 0 ~ 1 2 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 1 0 ~ 1 2 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 - 1 8
に対する L 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

10

【 0 0 6 0 】

[4 1] : 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 [4 0] に記載のヒト抗ヒト IL -
1 8 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
- 1 8 に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド。

20

(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
- 1 8 に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド。

【 0 0 6 1 】

[4 2] : 以下 (e) 又は (f) のポリペプチドからなる、ヒト IL - 1 8 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
- 1 8 に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド。

30

【 0 0 6 2 】

[4 3] : 以下 (g) 又は (h) のポリペプチドからなる、ヒト IL - 1 8 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 IL
- 1 8 に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド。

【 0 0 6 3 】

[4 4] : [4 0] 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 [4 2
] に記載の H 鎖可変領域断片と、 [4 0] 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 [4 3] に記載の L 鎖可変領域断片とを連結してなる、ヒト IL - 1 8 に対
するヒト由来の抗体の 1 本鎖可変領域断片。

40

【 0 0 6 4 】

[4 5] : [4 0] 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 [4 2
] に記載の H 鎖可変領域断片、及び / 又は、 [4 0] 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 [4 3] 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 IL - 1 8 に対するヒト由来の抗体又はその断片。

【 0 0 6 5 】

[4 6] : 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

50

c F v F c である [4 5] に記載の抗体の断片。

【 0 0 6 6 】

[4 7] : [3 5] ~ [4 6] 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。

【 0 0 6 7 】

[4 8] : [3 5] ~ [4 7] 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。

【 0 0 6 8 】

[4 9] : 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 [4 8] に記載の遺伝子。

【 0 0 6 9 】

[5 0] : [4 8] 又は [4 9] に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【 0 0 7 0 】

[5 1] : [4 8] 又は [4 9] に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【 0 0 7 1 】

[5 2] : [4 8] 又は [4 9] 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 - 1 8 抗体又はその断片を生産する方法。

【 0 0 7 2 】

[5 3] : [3 5] から [4 6] のいずれかに記載の抗体又はその断片、又は [4 7] に記載の修飾抗体を含むヒト I L - 1 8 の検出器具。

【 0 0 7 3 】

[5 4] : [3 5] から [4 6] のいずれかに記載の抗体又はその断片、又は [4 7] に記載の修飾抗体からなるヒト I L - 1 8 検出試薬を含む、被検試料中のヒト I L - 1 8 量を測定する疾患の診断キット。

【 0 0 7 4 】

[5 5] : 上記疾患が、ヒト I L - 1 8 亢進症である、[5 4] に記載の診断キット。

【 0 0 7 5 】

[5 6] : 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、[5 4] 又は [5 5] に記載の診断キット。

【 0 0 7 6 】

[5 7] : 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、[5 4] ~ [5 6] のいずれかに記載の診断キット。

【 0 0 7 7 】

[5 8] : [5 4] ~ [5 7] 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 I L - 1 8 量に基づいて疾患を診断する方法。

【 0 0 7 8 】

[5 9] : 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 I L - 1 8 活性阻害剤。

i) [3 5] ~ [4 6] のいずれかに記載の抗体又はその断片。

i i) [4 7] に記載の修飾抗体。

i i i) 上記 i) 又は i i) 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 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。

【 0 0 7 9 】

[6 0] : [5 9] 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 I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 レセプターとの結合を阻害するヒト I L - 1 8 結合阻害剤。

【 0 0 8 0 】

[6 1] : [5 9] 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。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

[6 2] : [4 8] 又は [4 9] に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【 0 0 8 2 】

[6 3] : [5 9] に記載のヒト I L - 1 8 活性阻害剤、[6 0] に記載のヒト I L - 1 8 結合阻害剤、[6 1] に記載のインターフェロノー γ 産生抑制剤、又は [6 2] に記載の遺伝子治療剤を含む疾患治療剤。

【 0 0 8 3 】

[6 4] : 上記疾患が、ヒト I L - 1 8 亢進症である、[6 3] に記載の疾患治療剤。

【 0 0 8 4 】

[6 5] : 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、[6 3] 又は [6 4] に記載の疾患治療剤。

10

【 0 0 8 5 】

[6 6] : 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、[6 3] から [6 5] のいずれかに記載の疾患治療剤。

【 0 0 8 6 】

[6 7] : ヒト I L - 1 8 とヒト I L - 1 8 レセプターとの結合を阻害する、[6 3] から [6 6] のいずれかに記載の疾患治療剤。

【 0 0 8 7 】

[6 8] : ヘルパー T 1 細胞からのインターフェロノー γ 産生を阻害する、[6 3] から [6 7] のいずれかに記載の疾患治療剤。

20

【 0 0 8 8 】

[6 9] : [6 3] から [6 8] 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。

【 0 0 8 9 】

[7 0] : ヒト I L - 1 8 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 - 1 8 の I L - 1 8 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、[3 5] から [6 9] のいずれかに記載の抗体又はその断片の作製方法。

30

【 0 0 9 0 】

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 I L - 1 8 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 I L - 1 8 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。

【 0 0 9 1 】

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 】

40

【 0 0 9 2 】

本発明のヒト抗 I L - 1 8 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 I L - 1 8 アンタゴニストとして有用である。

(1) 生体由来の天然の I L - 1 8 アンタゴニストである I L - 1 8 B P と同じ作用メカニズムを有する。

(2) I L - 1 8 B P 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 (I L - 1 8 B P、その他抗体) と比較して、I F N - γ 産生抑制における I C ₅₀ 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 】

【 0 0 9 3 】

50

【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 - 18 BP 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 - 18 BP 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 IL - 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。

【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、遺伝子工学的な

10

20

30

40

50

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。

【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、

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。

【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、

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。

【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(scFv)、Fab、Fab'、

10

20

30

40

50

$F(ab)'_2$ 、 $scAb$ 、 $scFvFc$ 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。

10

【0109】

一実施形態において、ヒト抗ヒトIL-18抗体の1本鎖可変領域断片($scFv$)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：

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

20

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

30

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。

【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

40

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：

50

C D R 1 が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列、又は、配列番号 1 0 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 1 1 のアミノ酸配列、又は、配列番号 1 1 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 1 2 のアミノ酸配列、又は、配列番号 1 2 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

【0111】

本実施形態に係る抗体又はその断片には、以下の (i) ~ (v i i) 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 I L - 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を含む V H 鎖断片 (H 鎖可変領域断片) 。

【0113】

ヒト I L - 1 8 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 I L - 1 8 に対する反応性を示すことを意味する。

20

【0114】

配列番号 3 及び 5 には、V H 鎖のアミノ酸配列が示される。配列番号 7 ~ 9 には、この V H 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 及び 5 に示す V H 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 7) 、5 0 番目 ~ 6 6 番目のアミノ酸配列が C D R 2 (配列番号 8) 、9 9 番目 ~ 1 0 9 番目のアミノ酸配列が C D R 3 (配列番号 9) に対応している。

【0115】

(i i) 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 I L - 1 8 に対する H 鎖可変領域となるポリペプチドからなる V H 鎖断片 (H 鎖可変領域断片) 。

30

【0116】

(i i i) 配列番号 1 0 ~ 1 2 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 1 0 ~ 1 2 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 - 1 8 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 V L 鎖断片 (L 鎖可変領域断片) 。

【0117】

ヒト I L - 1 8 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 I L - 1 8 に対する反応性を示すことを意味する。

40

【0118】

配列番号 4 及び 6 は、V L 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 L 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。すなわち、配列番号 4 及び 6 に示す V L 鎖のアミノ酸配列において、2 3 番目 ~ 3 6 番目のアミノ酸配列が C D R 1 (配列番号 1 0) 、5 2 番目 ~ 5 8 番目のアミノ酸配列が C D R 2 (配列番号 1 1) 、9 1 番目 ~ 1 0 1 番目のアミノ酸配列が C D R 3 (配列番号 1 2) に対応している。

50

【0119】

(iv) 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)。

【0120】

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

【0121】

(vi) 上記(i)又は(ii)のVH鎖及び/又は上記(iii)又は(iv)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。

10

【0122】

(vii) 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(vi)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inkerなどによって連結される。このペプチドリinker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inkerとしては、例えば、(GGGGS)₃が例示できる。

【0124】

また、上記(vi)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。

20

【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。

30

【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。

40

【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。

【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

50

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。

10

【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。

- ・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。

20

【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、修飾剤であってもよい。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。

30

【0133】

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。

40

【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。

【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

50

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。

【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。

【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-18 BP 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。

【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-18 BP 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】

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。

【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-18 BP 認識領域を露呈且つ維持

10

20

30

40

50

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であり、例えば5～50であり、例えば10～30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。

10

【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。

【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。

20

【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。

30

【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方法としては、ELISA、BIAcore等の方法がある。例えばELISAを用いる場合、ヒトIL-18を固相化した96穴プレートに目的の抗IL-18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。

40

【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cDNA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】

50

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 GFP (Green Fluorescent Protein) 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 GFP 融合タンパク質として発現させてもよい。

10

【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 (*Caenorhabditis elegans*)、アフリカツメガエル (*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 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、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。

20

【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、リボソーム法、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。

30

【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技法 (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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。

30

【0160】

本実施形態の疾患の診断キットは、上記ヒトIL-18検出試薬を含む。上記診断キットは、被検試料中のヒトIL-18量を測定し、IL-18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IL-18の濃度指標となるヒトIL-18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IL-18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、IL-18の発現量の変化に関連する疾患であり、後述するヒトIL-18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などが例示される。

40

【0162】

本実施形態のヒト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

50

び診断方法は、組織及び体液におけるヒトIL-18のレベルを指標とする種々の感受性疾患の診断、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IL-18抗体には、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。

【0164】

これに対し、上記実施形態の抗体は、ヒト抗ヒトIL-18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IL-18関連疾患を診断することができる。

10

【0165】

(5-2) ヒトIL-18活性阻害剤、結合阻害剤、IFN- 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IL-18に結合するとともに、ヒトIL-18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IL-18によって誘導されるIFN- 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IL-18活性阻害剤として利用できる。

20

【0166】

すなわち、本発明の実施形態には、以下の(I)~(IV)のアンタゴニストを有効成分として含有するヒトIL-18活性阻害剤が含まれる。

(I) 上記「(1)抗体及びその断片」で説明した抗体。

(II) 上記「(1)抗体及びその断片」で説明した抗体の断片。

30

(III) 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。

(IV) 上記(I)~(III)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。

【0167】

ここで、上記「ヒトIL-18活性阻害剤」は、ヒトIL-18の活性を抑制するものであり、ヒトIL-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IL-18とIL-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結合阻害剤が含まれる。上記「ヒトIL-18結合阻害剤」は、ヒトIL-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。

40

【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、IFN- γ 産生抑制剤が含まれる。上記「IFN- γ 産生抑制剤」は、IFN- γ の産生を抑制するものであってもよい。

【0170】

また、上記「(2)遺伝子」で説明した遺伝子は、ヒトIL-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

50

）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IL-18抗体の変領域を有し、ヒトIL-18と強く反応して、IL-18とIL-18レセプター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（IFN- γ 産生を阻害）。そのため、上記のヒト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（IL-18関連疾患）の治療剤として利用してもよい。

10

【0172】

上記「（1）抗体及びその断片」で説明した抗体は、ヒトIL-18を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。

20

【0173】

本発明の実施形態には、上記のヒト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IL-18亢進症が含まれる。ヒトIL-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IL-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が例示される。

30

【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、本実施形態の疾患治療剤は、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）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。

40

【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

50

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。

10

【0178】

具体的には、例えば、後述の実施例では、ヒト抗ヒト IL-18 s c F v 抗体の C D R 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、C D R は、抗原を認識する領域（部位）である。すなわち、C D R は、抗体の活性中心となる。つまり、実施例に示した s c F v は、C D R 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 C D R 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、C D R 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、S B D D (S t r u c t u r e B a s e d D r u g D e s i g n)、C A D D (C o m p u t e r - A i d e d D r u g D e s i g n) などにより、C D R が有する官能基及び C D R の高次構造に基づいて、コンピューター上で設計できる。

20

【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、I F N - 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。

30

【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（狭義では肺胞隔壁、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-18 R 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。

40

【0183】

一方、後述の実施例 6 では、ヒト細胞である K G - 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

50

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 S t i l l 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 H L A B 17、B 18、B 35、D R 2 が連鎖することが報告されている。最近では、I L - 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、E B 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、M y c o p l a s m a、C h l a m y d i a、Y e r s i n i a、B r u c e l l a 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 S t i l l 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。S t i l l 病患者では I L - 1、I L - 6、I L - 8、I F N - γ 、T N F - α 、M - C S F、I L - 18 が過剰に発現している。その中でも特に I L - 18 が著増していることが示されており、I L - 18 が S t i l l 病の原因の1つとして考えられている。したがって、I L - 18 の作用発現を抑えることによって S t i l l 病の発症が抑えられることが期待される。

10

【0186】

後述の実施例6では、ヒト細胞である K G - 1 を用いて、本発明者が取得した抗 I L - 18 抗体に I L - 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 S t i l l 病等へ使用してもよい。

20

【0187】

(5-6) 疾患治療剤の適用例 - 3

I L - 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。

【0188】

また、I L - 18 は、I L - 12 の存在下で、様々な免疫系又は非免疫系の細胞から、I F N - γ の産生を誘導する。一方、I L - 18 は、I L - 12 の非存在下で、N K T 細胞、T 細胞、N K 細胞から、I L - 4、I L - 13 などの T h 2 サイトカイン（ヘルパー 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。

30

【0189】

また、I L - 18 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 - γ 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 - 13、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。

【0190】

また、I L - 18 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 - 18 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。

40

【0191】

また、I L - 18 は、抗原 / I g E 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（I L - 18 依存性炎症）を誘導する。

【0192】

後述する実施例に示すように、本発明者が取得した抗 I L - 18 抗体は、種々の i n v i t r o 系で、I L - 18 の活性を抑制した。特に、この抗体は、T h 1 サイトカインである I F N - γ 産生抑制機能を有している。

【0193】

50

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。

【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。

【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。

【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 - 1β（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

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10¹¹ 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（Poly sciences）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。

【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1μg/mLに希釈し、Streptavidin

10

20

30

40

50

plate (Nunc) 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 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 μ L 加え、37 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 μ L 加え、37 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、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。

10

【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。

【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。

20

【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。

【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。

30

【0207】

【表 1】

clone name	部位	アミノ酸配列	配列番号
4A6D	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCTASGFTFDEYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISTGGGGTTYADSVGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPWLSGSRSGDFWGQGLVT VSS	配列番号 3
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLLIYEVSHRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDADYYCSSFTSSSSLYVFGTGTKLTVL	配列番号 4
4A6S	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCTASGFTFSEYAMSWVRQ APGKGLEWVSGISTGGGGTTYADSVGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPWLSGSRSGDFWGQGLVT VSS	配列番号 5
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLLIYEVSHRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDADYYCSSFTSSSSLYVFGTGTKLTVL	配列番号 6

40

【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】

部位	アミノ酸配列	配列番号
VH	CDR1	EYAMS
	CDR2	GISTGGGGTTYADSVGE
	CDR3	PWLSGSRSGDF
VL	CDR1	TGTSSDVGGYNYVS
	CDR2	EVSHRPS
	CDR3	SSFTSSSSLYV

【0210】

(実施例5) IL-18レセプター結合アッセイ

10

(5-1) ELISA法によるIL-18レセプター結合アッセイ

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-18R 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-18R 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-18R α -hFc-His混合液に加えた。この混合液を、IL-18R β -hFcを固相化したCovalink plateに入れ、37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。

20

【0212】

30

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】

40

ヒトIL-18 (MBL) を1% BSA - PBS - 0.05% NaN₃ - 2% ウサギ血清で100 ng/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、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 μ g/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 (1×10^5 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 (1200 rpm, 3 min, 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 (1200 rpm, 3 min, 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 (1200 rpm, 3 min, 4) により上清を除去し、1% BSA - PBS - 0.

50

0.5% 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 FACSscan (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

10

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、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) を使用する。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。4 日後、KG-1 細胞を 3×10^6 cell/mL に調製し、最終濃度 4 ng/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 °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

【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 0.007 nM、0.013 nM 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】

30

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

31 に記載。※ 4 特許文献 5 及び非特許文献 32 に記載。

40

【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、 1×1

50

10^6 cell/mL に調製し、等量混合した。最終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 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% CO_2) 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。

【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。

10

【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

20

【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。

【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。

30

【0225】

一方、KG-1 細胞を 3×10^5 cell/mL で播種し、4 日間培養 (37°C 、5% CO_2) した。4 日後、KG-1 細胞を 3×10^6 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% CO_2) 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。

40

【0226】

結果を表 5 に示す。IgG 分子型 4A6D 及び 4A6S を加えることで、IFN- γ 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

【0228】

(実施例7) エピトープ解析 (競合 E L I S A)

競合 E L I S A 法により、取得した抗 I L - 18 抗体のエピトープ解析を行った。

【0229】

ビオチン化ヒト I L - 18 を P B S (S I G M A) で $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 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 I L - 18 を固相化した。固相化後、p l a t e を P B S T で洗浄し、抗マウス α 9 s c F v - m F c (ネガティブコントロール) 或いは 4 A 6 D s c F v - m F c を p l a t e の w e l l に $100 \mu\text{L}$ 加え、37 でインキュベーションした。1 時間後、ヒト I L - 18 B P a - h F c (R & D) を $30 \text{ ng} / \text{mL}$ に 1 % B S A - P B S で調製し、p l a t e の w e l l に $100 \mu\text{L}$ 加え、37 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 - h F c / H R P (コスモバイオ、The b i n d i n g s i t e) を p l a t e の w e l l に $100 \mu\text{L}$ 加え、37 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 $100 \mu\text{L}$ 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 (O . D . $450 \text{ nm} / 650 \text{ nm}$) を測定した。

【0230】

抗ヒト I L - 18 抗体のエピトープ解析の結果を図 5 に示す。4 A 6 D は、ヒト I L - 18 B P a - h F c と競合することがわかった。これは、4 A 6 D とヒト I L - 18 B P a が同一エピトープを認識しており、4 A 6 D 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 I L - 18 抗体及び I L - 18 B P の存在下における、I L - 18 レ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 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 加え、37 でイ

10

20

30

40

50

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 anti - mouse I g G / H R P (i n v i t r o g e n) 又は anti - h F c / H R P (コスモバイオ、The binding site) を plate の well に 100 μ L 加え、37 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 plate の well 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IL - 18抗体4A6D及び4A6Sは、ヒト及びサルIL - 18への結合活性を示すが、ラット及びマウスIL - 18への結合活性を示さなかつた。一方、取得した抗IL - 18抗体は、他のIL - 1ファミリーであるIL - 1 β 及びIL - 33への結合活性を有していなかつた。

【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 1 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IL - 18又はヒトIL - 18のK53A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4B (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IL - 18又はヒトIL - 18のK53A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IL - 18又はヒトIL - 18のK53A変異体とした。

【0237】

次に、これらのヒトIL - 18をビオチン化後、P B S (S I G M A) で1 μ g / m L に希釈し、S t r e p t a v i d i n plate (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、plate をP B S Tで洗浄し、ヒトIL - 18 B P a - h F c (R & D) 又はI g G分子型4A6Dを1 % B S A - P B S で1 μ g / m L に調製し、plate の well に100 μ L 加え、37 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 anti - h F c / H R P (コスモバイオ、The binding site) を plate の well に100 μ L 加え、37 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 plate の well に100 μ L 加えることによって発色させた。30分後、1 M 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。

【0238】

E L I S A の結果を図7に示す。ヒトIL - 18 B P a - h F c 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 - 18 B P 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 - 18 B P 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。

【0239】

(実施例 11) I L - 18 と I L - 18 B P との複合体への反応性解析

10

20

30

40

50

E L I S A 法により取得した抗 I L - 1 8 抗体の、I L - 1 8 と I L - 1 8 B P との複合体への反応性を評価した。

【 0 2 4 0 】

ビオチン化ヒト I L - 1 8 を P B S (S I G M A) で $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 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 I L - 1 8 を固相化した。P l a t e を P B S T で洗浄し、1 % B S A - P B S で $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ に希釈したヒト I L - 1 8 B P a - h F c (R & D) を p l a t e の w e l l に $100 \mu\text{L}$ ずつ加えた。3 7 °C で 1 時間インキュベーションすることで、I L - 1 8 と I L - 1 8 B P との複合体を形成させた。その p l a t e を P B S T で洗浄し、4 A 6 D s c F v - m F c を p l a t e の w e l l に $100 \mu\text{L}$ 加え、3 7 °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) を p l a t e の w e l l に $100 \mu\text{L}$ 加え、3 7 °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 $100 \mu\text{L}$ 加えることによって発色させた。3 0 分後、1 M 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。

10

【 0 2 4 1 】

I L - 1 8 と I L - 1 8 B P との複合体への反応性解析の結果を図 8 に示す。4 A 6 D は、I L - 1 8 と結合するが、I L - 1 8 と I L - 1 8 B P との複合体とは反応しなかった。

20

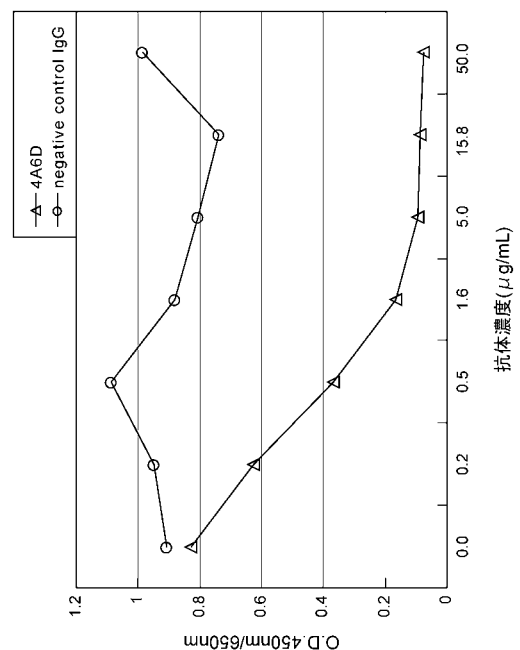
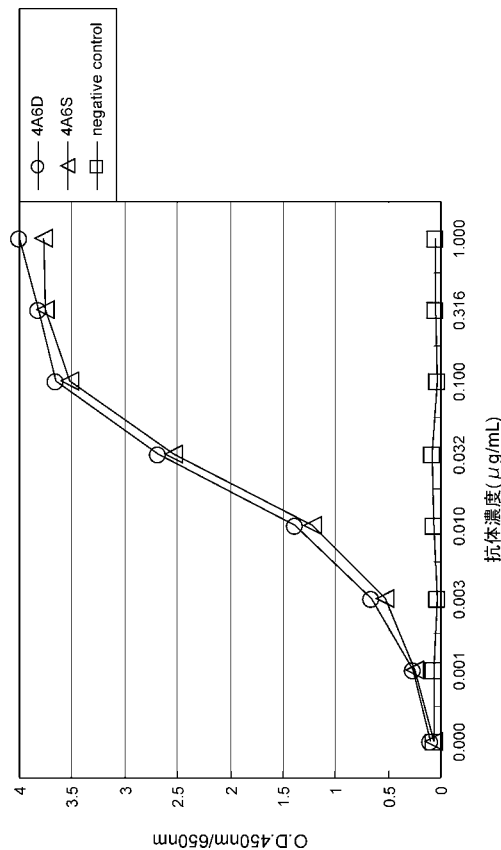
【 産業上の利用可能性 】

【 0 2 4 2 】

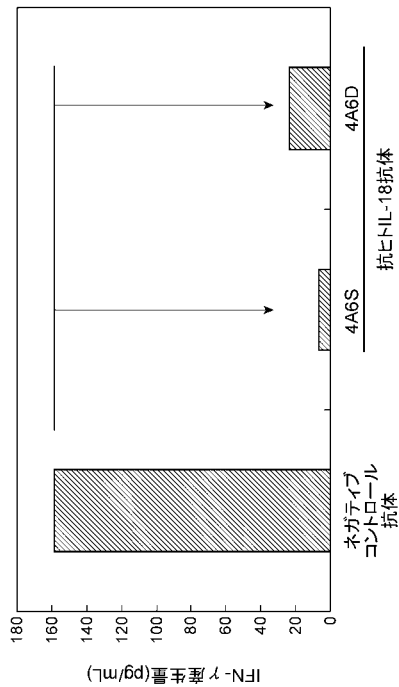
本発明のヒト I L - 1 8 に対する抗体及びその断片は、ヒト I L - 1 8 が直接又は間接的に関与する疾病に対して利用可能性がある。

【 図 1 】

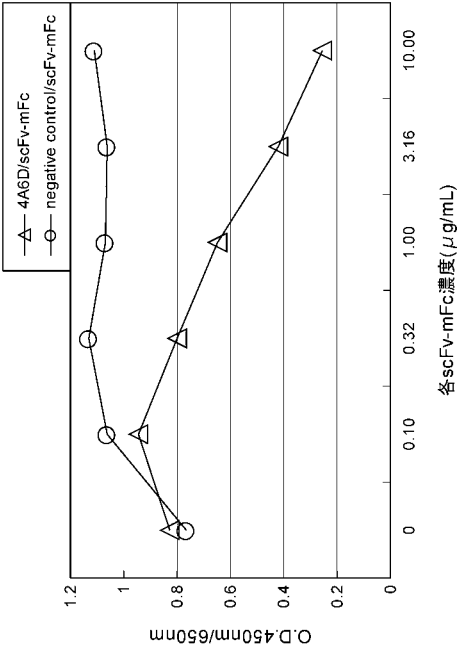
【 図 2 】



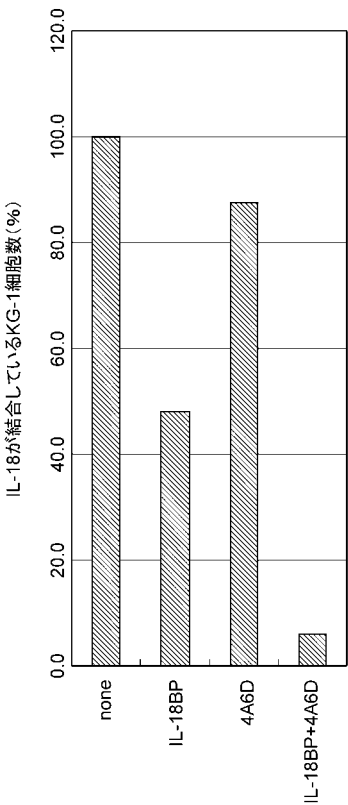
【 図 4 】



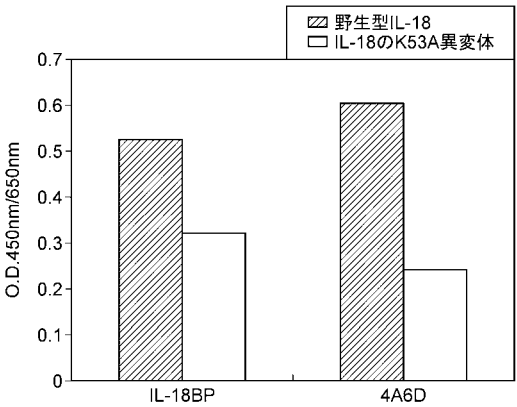
【 図 5 】



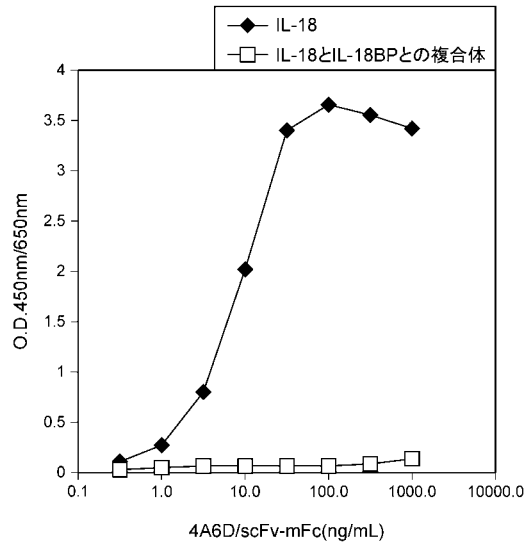
【 図 6 】



【 図 7 】



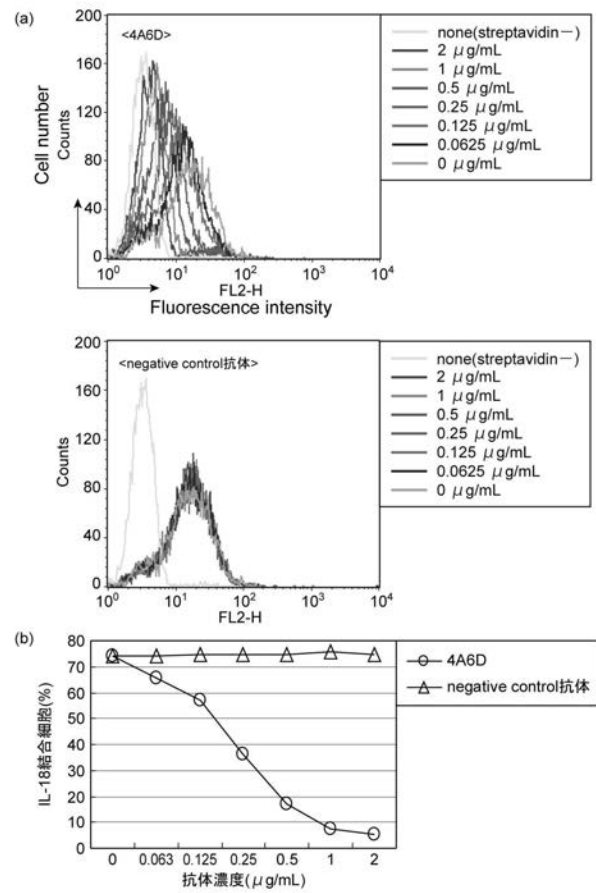
【 図 8 】



【 配 列 表 】

2014080866000001.app

【 図 3 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/081057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
C07K16/24(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i,
C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K31/713, A61K39/395, C07K16/24, C12M1/34, C12N1/15,
C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2004-500086 A (Abbot Laboratories), 08 January 2004 (08.01.2004), entire text & US 2010/0104563 A1 & EP 1257585 A2 & WO 2001/058956 A2	<u>9</u> 1-21, 23-32, 34
<u>X</u> Y	WO 2004/097019 A1 (Japan Science and Technology Agency), 11 November 2004 (11.11.2004), entire text & JP 4134166 B & US 2006/0292145 A1 & EP 1621616 A1 & KR 10-2006-0015558 A & CN 1780911 A	<u>9</u> 1-21, 23-32, 34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 January, 2014 (22.01.14)Date of mailing of the international search report
04 February, 2014 (04.02.14)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/081057

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	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, 2005.10, Vol.138, No.4, P.433-442	1-21, 23-32, 34
Y	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, 2007.02.05, Vol.358, No.1, P.211-220	1-21, 23-32, 34
Y	KRUMM, B. et al., "A unique bivalent binding and inhibition mechanism by the yatapoxvirus interleukin 18 binding protein.", PLOS PATHOGENS, 2012.08, Vol.8, No.8, e1002876 (P.1-15)	1-21, 23-32, 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/081057

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/081057

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22, 33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention of claim 22 pertains to a method for diagnosis.
The invention of claim 33 pertains to a method for surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 8 1 0 5 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C07K16/24(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K31/713, A61K39/395, C07K16/24, C12M1/34, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, Science Direct			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	JP 2004-500086 A (アボット・ラボラトリーズ) 2004.01.08, 全文 & US 2010/0104563 A1 & EP 1257585 A2 & WO 2001/058956 A2	9 1-21, 23-32, 34	
X Y	WO 2004/097019 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2004.11.11, 全文 & JP 4134166 B & US 2006/0292145 A1 & EP 1621616 A1 & KR 10-2006-0015558 A & CN 1780911 A	9 1-21, 23-32, 34	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 22.01.2014		国際調査報告の発送日 04.02.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 野村 英雄 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2013/081057

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	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, 2005.10, Vol.138, No.4, P.433-442	1-21, 23-32, 34
Y	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, 2007.02.05, Vol.358, No.1, P.211-220	1-21, 23-32, 34
Y	KRUMM, B. et al., "A unique bivalent binding and inhibition mechanism by the yatapoxvirus interleukin 18 binding protein.", PLOS PATHOGENS, 2012.08, Vol.8, No.8, e1002876(P.1-15)	1-21, 23-32, 34

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 8 1 0 5 7

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 2 2、3 3 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 2 2に係る発明は診断する方法に関するものである。
請求項 3 3に係る発明は手術又は治療する方法に関するものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2009年7月）

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	4 C 0 8 5	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 C 0 8 6	
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	F	4 H 0 4 5	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	P		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Q		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U		
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	48/00			
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		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(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

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA56 CA02 DA06 EA03 FA20 GA11 GA19 GA27

HA01

4B029 AA07 BB17 CC03 FA12

4B064 AG27 BJ12 CA02 CA12 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA26X AA98X AB01 AC14 BA02 BA24 BD14 CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 NA14 ZA021 ZA022 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA751 ZA752

ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA961 ZA962 ZB011 ZB012 ZB071 ZB072

ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZC351 ZC352 ZC411 ZC412

4C085 AA14 BB17 BB41 BB43 CC23 DD51 EE01

4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA59	ZA66
	ZA75	ZA81	ZA89	ZA96	ZB01	ZB07	ZB11	ZB13	ZC35	ZC41
4H045	AA11	BA09	BA50	BA57	CA42	DA76	EA20	EA22	EA50	FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	新型人抗IL-18抗体		
公开(公告)号	JPWO2014080866A1	公开(公告)日	2017-01-05
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	C12N15/09 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12M1/34 G01N33/53 A61K39/395 A61K48/00 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	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 C12M1/34.F G01N33/53.P G01N33/53.Q A61K39/395.U A61K48/00 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		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/GA27 4B024/HA01 4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/FA12 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA022 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB011 4C084/ZB012 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC23 4C085/DD51 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB01 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/BA50 4H045/BA57 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	长谷川良树 清水义 俊明Sakanishi		
优先权	2012254893 2012-11-21 JP		
其他公开文献	JP6467225B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与人白介素-18 (人IL-18) 反应且不与人IL-18的K53A突变体反应的人抗人IL-18抗体。

