

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 204466

(P2001 - 204466A)

(43)公開日 平成13年7月31日(2001.7.31)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/02	ZNA		A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/395				N
			A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12			C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 16/24			C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L ( 全 21数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 349160(P2000 - 349160)

(22)出願日 平成12年11月16日(2000.11.16)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 324860

(32)優先日 平成11年11月16日(1999.11.16)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72)発明者 栢野 徹

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社

林原生物化学研究所内

(72)発明者 谷口 睦子

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社

林原生物化学研究所内

(72)発明者 山内 宏

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社

林原生物化学研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インターロイキン18前駆体に対する抗体

(57)【要約】

【課題】 I L - 1 8 前駆体に対して選択的に免疫反応性を示す抗体と、その製造方法ならびに用途を提供する。

【解決手段】 インターロイキン18前駆体のアミノ酸配列の一部又は全部を含むポリペプチドで免疫感作した温血動物から得ることができる、インターロイキン18に特異的な抗体と、インターロイキン18前駆体のアミノ酸配列の一部又は全部を含むポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程を含む抗体の製造方法と、I L - 1 8 前駆体の検出方法ならびに精製方法を含む当該抗体の用途を提供することにより解決する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターロイキン18前駆体のアミノ酸配列の一部又は全部を含むポリペプチドで免疫感作した温血動物から得ることができる、インターロイキン18前駆体に特異的な抗体。

【請求項2】 成熟型インターロイキン18に対する免疫反応性が、インターロイキン18前駆体に対する免疫反応性の1/10以下である請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 温血動物を免疫感作するためのポリペプチドが、インターロイキン18前駆体における前駆ペプチド配列の一部又は全部を含む請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】 インターロイキン18前駆体が霊長類又は齧歯類起源である請求項1、2又は3に記載の抗体。

【請求項5】 インターロイキン18前駆体が、前駆ペプチド配列として、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列を含む請求項1乃至4のいずれかに記載の抗体。

【請求項6】 ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体としての請求項1乃至5のいずれかに記載の抗体。

【請求項7】 請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体を産生し得る単離された細胞。

【請求項8】 ハイブリドーマとしての請求項7に記載の細胞。

【請求項9】 請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体を含んでなる免疫測定キット。

【請求項10】 インターロイキン18前駆体のアミノ酸配列の一部又は全部を含むポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程と、該免疫感作された温血動物の体液から請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。

【請求項11】 温血動物を免疫感作するためのポリペプチドが、インターロイキン18前駆体の一部として、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列の一部又は全部を含む請求項10に記載の抗体の製造方法。

【請求項12】 請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体を産生し得る単離された細胞を生体内又は生体外で培養する工程と、その体液又は培養物から該抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。

【請求項13】 抗体を産生し得る単離された細胞がハイブリドーマである請求項12に記載の抗体の製造方法。

【請求項14】 塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動から選ばれる1種又は2種以上を含む精製方法により抗体を採取する請求項10乃至13のいずれかに記載の抗体の製造方法。

【請求項15】 請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体を被験試料に接触させ、免疫反応によりインターロイキ

\*ン18前駆体を検出することを特徴とするインターロイキン18前駆体の検出方法。

【請求項16】 請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体を利用するラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ又は蛍光イムノアッセイである請求項15に記載の検出方法。

【請求項17】 被験試料が生体から採取した生物学的試料である請求項15又は16に記載の検出方法。

【請求項18】 請求項15、16又は17に記載の検出方法と成熟型インターロイキン18に対する抗体を用いる成熟型インターロイキン18の検出方法とを組み合わせ実施する検出方法。

【請求項19】 成熟型インターロイキン18関連疾患又はインターロイキン18前駆体関連疾患の診断方法としての請求項15乃至18のいずれかに記載の検出方法。

【請求項20】 請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体をインターロイキン18前駆体と夾雑物質とを含む混合物に接触させて抗体に該前駆体を吸着させる工程と、吸着した該前駆体を抗体から脱着させる工程を含むインターロイキン18前駆体の精製方法。

【請求項21】 抗体が水不溶性担体に結合している請求項20に記載の精製方法。

【請求項22】 請求項1乃至6のいずれかに記載の抗体を含んでなる医薬用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は新規な抗体に関するものであり、詳細には、インターロイキン18前駆体に特異的な抗体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】インターロイキン18(以下、「IL-18」と略記する。)は、免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの一種である。IL-18は、特開平8-27189号公報、特許第2724987号公報及びハルキ・オカムラら『ネイチャー』、第378巻、第6552号、88乃至91頁(1995年)に見られるように、発見当初はインターフェロン誘導因子(IGIF)と記載されていたが、その後、シンペイ・ウシオら、『ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー』、第156巻、4274乃至4279頁(1996年)における提案にしたがって、「IL-18」と呼称されるようになった。IL-18は、免疫担当細胞におけるインターフェロン(以下、「IFN-」と略記する。)の産生を誘導することに加えて、キラー細胞の生成を誘導したり、キラー細胞による細胞障害性を増強することがこれらの刊行物に記載されているように、その生理作用は多様性に富んでいることが明らかとなっている。

【0003】IL-18の生合成に関しては、同じ特許出願人による特開平10-80270号公報や、ケンジ・アキタら、『ザ・ジャーナル・オブ・バイオリジカル

・ケミストリー』、第272巻、第42号、26595乃至26603頁(1997年)に記載のとおり、IL-18は細胞内で分子量約24キログルトンの前駆体として産生された後、細胞内酵素によるプロセッシングを受けてN末端に存在する前駆ペプチド(プロペプチド)配列が除去されることにより、活性を有する成熟型に変換されて細胞外に分泌されることが知られている。因みに、配列表における配列番号3及び4は、それぞれ、ヒトIL-18の成熟型及び前駆体のアミノ酸配列を、また、配列表における配列番号5及び6は、それぞれ、マウスIL-18の成熟型及び前駆体のアミノ酸配列を例示している。また、配列表における配列番号1及び2には、それぞれ、ヒト及びマウスIL-18の前駆体における前駆ペプチド配列を別記している。

【0004】IL-18は、他のサイトカインと同様に、生体においては、適切な時期に適切な部位でその活性が発現されるように厳密に制御され、この制御が免疫系をはじめとする生体の諸機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。この活性発現の制御に変調が現れると生体は諸種の悪影響を受け、結果として疾患の発症に至る場合がある。例えば、マサノリ・カワシマら、『リウマトロジー・イン・ヨーロッパ, ジャーナル・フォー・エデュケーション・アンド・インフォメーション・イン・リウマトロジー』、第26巻、増補2号、77頁(1997年)には、自己免疫疾患の患者の体液にIL-18が特異的に高いレベルで認められたことが報告されており、この報告は、自己免疫疾患の発症と生体内での過剰なIL-18の活性発現との関連を示唆している。IL-18の活性発現の制御には、上記のような前駆体から成熟型への変換が関わる可能性がある。したがって、成熟型IL-18のみならずその前駆体の生体におけるレベルをそれぞれ正確に測定し、健常者及び諸種の患者の間で比較することは、IL-18関連疾患の診断や、斯かる疾患の発症の機序を解析する上で極めて重要である。

【0005】同じ特許出願人による特開平8-217798号及び特開平8-231598号には、モノクローナル抗体を含む、IL-18に対する抗体と、斯かる抗体を用いるポリペプチドの検出方法が開示されている。これらの検出方法は、成熟型IL-18の定性及び定量分析に利用することができる。これに対してIL-18前駆体に関しては、該前駆体が通常は活性を示さず、バイオアッセイが適用できないことに加えて、選択性高く該前駆体に対して免疫反応性を示す抗体に関しては現在のところ一切開示がなく、免疫測定法による分析もできないことから、その定性及び定量分析のための方法は現在のところ確立されていないというのが現状である。また、本発明者らは、成熟型IL-18の分析方法を検討する過程で、成熟型IL-18に対する公知の抗体が、弱いながらも、IL-18前駆体に対しても免疫反応す

る場合があることを独自の知見として見出した。この知見により、IL-18前駆体に対しても免疫反応性を示すこのような抗体を利用する検出方法を実施する場合、被験試料に成熟型IL-18とともにその前駆体が含まれると、測定結果に誤差を生じる可能性が示唆された。IL-18前駆体の定性的ないしは定量的分析方法が確立されれば、このような誤差の解消にも大いに役立つものと期待される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、高い選択性でIL-18の前駆体に対して免疫反応性を示す抗体を提供することにある。

【0007】この発明の第二の課題は、斯かる抗体の製造方法を提供することにある。

【0008】この発明の第三の課題は、斯かる抗体の用途を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らが上記の課題を解決すべく、IL-18ならびに諸種の関連物質で温血動物を免疫感作し、その動物が産生する抗体の免疫反応性について鋭意比較検討した。その結果、IL-18前駆体の一部又は全部を含有するポリペプチドで免疫感作した温血動物の体液から該前駆体に特異的な抗体が得られた。また、このようにして免疫感作した温血動物より抗体産生細胞を採取し、これを常法にしたがい無限増殖可能な樹立細胞株と融合して、ハイブリドーマを樹立した。斯くして得られたハイブリドーマが産生した抗体も、上記の抗体と同様に、IL-18前駆体に対して特異的に免疫反応性を示すことが確認された。以上のようにして得られた抗体は、IL-18前駆体の検出をはじめとする諸種の用途に有利に用い得ることも確認された。本発明は以上の知見に基づいて確立されたものである。

【0010】すなわち、この発明は、上記第一の課題を、IL-18前駆体のアミノ酸配列の一部又は全部を含むポリペプチドで免疫感作した温血動物から得ることができる、IL-18前駆体に特異的な抗体を提供することにより解決するものである。

【0011】この発明は、上記第二の課題を、IL-18前駆体のアミノ酸配列の一部又は全部を含有するポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程と該温血動物から当該抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法、あるいは、当該抗体の産生能を有する細胞を生体内外で培養する工程とその培養物又は体液から当該抗体を採取する工程を含んでなる抗体の製造方法を提供することにより解決するものである。

【0012】この発明は、上記第三の課題を、当該抗体を用いるIL-18前駆体の検出方法ならびに精製方法を含む当該抗体の用途を提供することにより解決するも

のである。

【0013】

【発明の実施の形態】この発明はIL-18前駆体に特異的な抗体に関するものである。この発明でいうIL-18前駆体とは、成熟型IL-18の生合成の過程で細胞内に産生される前駆体蛋白質ならびに、その産生工程に関わらず、斯かる前駆体蛋白質と構造的に同一の物質を意味する。ここでいう成熟型IL-18とは、免疫担当細胞におけるIFN- $\gamma$ の産生を誘導することに加え、キラー細胞の生成を誘導したり、キラー細胞による細胞障害性を増強する生理活性を示し、通常、157個のアミノ酸からなる配列を含む蛋白質を意味するものであり、その起源は問わない。成熟型IL-18の具体例として、配列表における配列番号3及び5に、それぞれ、霊長類の一種であるヒト及び齧歯類の一種であるマウス起源のIL-18のアミノ酸配列（配列番号3において「Xaa」はトレオニン又はイソロイシンを表し、配列番号5において「Xaa」はメチオニン又はトレオニンを表す。）を示している。配列表における配列番号3及び5のアミノ酸配列の間には全体に互って明らかな相同性が認められ、例えば、配列番号3のアミノ酸配列におけるXaaがトレオニンである場合のアミノ酸配列と、配列番号5のアミノ酸配列におけるXaaがメチオニンである場合のアミノ酸配列とを常法により比較すると、両者の間で一致するアミノ酸が101個認められ、両者の間の相同性は64.3%と求められる。したがってこの発明でいう成熟型IL-18は、アミノ酸配列としては、配列表における配列番号3又は5に示すアミノ酸配列と全体に互る相同性、一致するアミノ酸の数に基づいて計算した場合、通常、64.3%以上、望ましくは、70%以上、より望ましくは、80%以上の相同性を有するものと特徴づけられる。

【0014】この発明でいうIL-18前駆体（以下、単に「前駆体」という場合がある。）とは、上記のとおり、成熟型IL-18に対する前駆体蛋白質であって、成熟型IL-18が有するアミノ酸配列を含む一方、成熟型IL-18が示す生理活性を実質的に示さない蛋白質を意味する。アミノ酸配列としては、詳細には、IL-18（本明細書を通じて、単に「IL-18」という場合、活性を示す成熟型IL-18を意味するものとする。）のアミノ酸配列と、そのN末端部に付加された通常三十数個のアミノ酸からなる余剰なアミノ酸配列、いわゆる、前駆ペプチド（プロペプチド）配列とを含有することにより特徴づけられる。配列表における配列番号1及び2には、該前駆ペプチド配列の具体例として、それぞれ、ヒト及びマウス起源のIL-18前駆体に含有され得る前駆ペプチド配列が示されている。また、配列表における配列番号4及び6には、それぞれ、ヒト及びマウス起源のIL-18前駆体が有し得る、全体としてのアミノ酸配列が例示されている。

【0015】この発明の抗体は、上記に示されるIL-18前駆体に特異的なイムノグロブリン全般を包含し、特定の起源・クラス・形態（ポリクローナル及びモノクローナル）に限定されるものではない。この発明の抗体は、IL-18前駆体の一部又は全部を含むポリペプチド、通常は、該前駆体における前駆ペプチド配列の一部又は全部を含むポリペプチドで免疫感作した温血動物から得ることができる。この発明でいう「温血動物から得ることができる」とは、この発明の抗体が、所望のポリペプチドで免疫感作した温血動物から得られた抗体そのものと、調製方法に関わらず、該温血動物から得られた抗体と免疫反応性（後述）において同等の性質を有するイムノグロブリンを包含することを意味する。この発明の抗体の「IL-18前駆体に特異的な」性質とは、当該抗体のIL-18前駆体に対する免疫反応性に比べて、当該抗体の他の物質に対する免疫反応性が明らかに低いものであることを意味する。ここでいう免疫反応とは、抗体と該抗体によって認識され得る物質との間の結合反応、すなわち、通常、「抗原抗体反応」とも呼ばれる反応を意味し、免疫反応性とは、斯かる免疫反応の強度を意味する。詳細には、IL-18前駆体と成熟型IL-18に対する免疫反応性を比較した場合、当該抗体は、前駆体に対する場合と比較して、IL-18に対して明らかに低い、通常、1/10以下、望ましくは、1/50以下、より望ましくは、1/100以下のレベルでのみ免疫反応性を示す。免疫反応性を数値化して比較するには、抗体を分析するための慣用の免疫測定法（イムノアッセイ）によればよい。例えば、後記実施例に詳述するように、通常のエンザイム・イムノアッセイで比較することにより、この発明の抗体のIL-18前駆体に対して特異的な性質を確認することができる。

【0016】この発明の抗体は、目的とする抗体の形態に応じて選択される、以下に詳述するこの発明の抗体の製造方法により得ることができる。

【0017】この発明で用いる抗原は、IL-18前駆体のアミノ酸配列の一部又は全部を含んでなり、温血動物に感作したとき該動物において所期の抗体の産生を誘導するポリペプチドであればよく、特定の構造のものに限定されない。例えば、IL-18前駆体そのものや、その断片であって、通常、該前駆体における前駆ペプチド配列としてのアミノ酸配列の少なくとも一部を含むペプチド、さらには、該前駆ペプチド配列の少なくとも一部と別異のアミノ酸配列の1種又は2種以上とからなる融合蛋白質などが抗原の具体例として挙げられる。ここでいうアミノ酸配列の一部とは、IL-18前駆体又は該前駆体における前駆ペプチド配列の部分アミノ酸配列であって、通常、5個以上、望ましくは、10個以上、より望ましくは、15個以上の連続するアミノ酸からなる配列を意味する。以上のようなこの発明で用いる抗原は、調製方法も問わず、例えば、天然型又は組換え型蛋

白質のほか、化学合成により得られるものであってもよい。組換え型蛋白質としての抗原は、例えば、同じ特許出願人による特許第2724987号公報に記載の方法によるか又はこれに準じて、ヒト、マウスなど所望の起源のIL-18前駆体をコードするDNAを単離し、斯かるDNAの一部又は全部を用いて通常の組換えDNA技術により得ることができる。因みに、配列表における配列番号7及び13には、それぞれ、ヒト及びマウス起源のIL-18前駆体をコードする塩基配列が例示されている。組換えDNA技術によるヒトIL-18前駆体の調製に関しては、より詳細には、同じ特許出願人による特開平10-80270号公報にその方法が例示されている。ヒトIL-18前駆体における前駆ペプチド配列と他のアミノ酸配列を含む融合蛋白質は、例えば、後記実施例に詳述する方法により得ることができる。ヒト以外の起源のIL-18前駆体の場合は、該前駆体に対するDNAを一旦得た後、斯かるDNAを用いて以上の方法に準じて操作することにより得ることができる。

【0018】ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体いずれの形態のものも、この発明の抗体を得る際には、通常、先ず、上記のような抗原で温血動物を免疫感作する。免疫感作は慣用の方法によればよく、例えば、抗原を単独で、又は、適宜アジュバントとともに温血動物の静脈、皮内、皮下又は腹腔内に注射接種し、その後一定期間飼育する。免疫感作の対象とする温血動物に特に限定はなく、所期の抗体を産生し得るかぎり、いずれの種類、体重、年齢、雌雄のものもこの発明に利用できる。通常はマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモットなどの齧歯類、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄類を含む哺乳類や、ニワトリ、ウズラなどのキジ類を含む鳥類などが用いられ、用いる抗原の起源や調製する抗体の形態・用途などを勘案して最適のものが選択される。抗原の接種量は、対象とする動物の種類や大きさに応じて常法にしたがって適宜選択される。齧歯類を免疫感作する場合、通常、抗原の総接種量を約5乃至500 $\mu$ g/匹とし、これを約1乃至4週間の間隔を置いて2乃至20回に分けて接種（一般に、初回の接種は「初回免疫」、2回目以降の接種は「追加免疫」、最後の接種は「最終免疫」と呼ばれる。）する。そして、通常、免疫感作の期間中及び/又は終了後に、免疫感作に用いたのと同じ抗原を使用して酵素抗体法など慣用の方法により免疫感作動物における抗体価の上昇を確認する。

【0019】この発明の抗体の一形態であるポリクローナル抗体を得るには、上記のような免疫感作の後、通常、1乃至4週間程度経過した免疫感作動物から、その動物の種に応じて選択される適宜の部位より血清（抗血清）を採取すればよい。斯くして得られる抗血清を、さらに必要に応じて、IgG、IgA、IgMなど所望のクラスのイムノグロブリンの精製のための慣用の方法に供すれば、所望のレベルにまで精製されたポリクローナ

ル抗体を得ることもできる。

【0020】この発明の抗体は、斯かる抗体を産生し得る単離された細胞からも得ることができる。ここでいう「単離された」細胞とは、生体から単離された形態にある細胞を意味し、具体的には、この発明の抗体を産生し得る、ハイブリドーマ、生体から単離された脾細胞やリンパ球、形質転換体細胞などが挙げられる。この発明は以上のような単離された細胞を提供するものでもある。これらの単離された細胞はいずれもこの発明の抗体の製造に用いることができ、ハイブリドーマとしての斯かる細胞は、この発明の抗体の一形態であるモノクローナル抗体の製造にとりわけ有用である。斯かるハイブリドーマを得るには、先ず、上記のような免疫感作の後、通常、3乃至5日程度経過後、免疫感作動物から脾臓を摘出し、分散して、脾細胞を抗体産生細胞として得る。脾細胞は、必要に応じて生体外でさらに免疫感作することもできる。斯くして得られる脾細胞を、次に温血動物起源の無限増殖可能な細胞と融合させる。無限増殖可能な細胞としては、例えば、SP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL-1581)、Y3-Ag1.2.3(ATCC CRL-1631)、P3/NSI/1-Ag4-1細胞(ATCC TIB-18)及びP3X63Ag8細胞(ATCC TIB-9)などのマウス又はラット骨髓腫由来の細胞株ないしはその変異株が挙げられ、上記脾細胞との適合性などを勘案して、より適したものが選択される。細胞の融合には、例えば、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスを始めとする融合促進剤や電気パルスによる慣用の方法が適宜採用される。次に、細胞融合産物を、常法にしたがってHAT培地などの選択培地中で培養し、融合した細胞すなわちハイブリドーマを選択的に増殖させる。増殖したハイブリドーマを、慣用の方法にしたがって、その培養上清を用いて、IL-18前駆体及びIL-18に対する免疫反応性の有無を試験し、所期の免疫反応性を示したものを選択すれば、この発明によるハイブリドーマが得られる。選択されたハイブリドーマに限界希釈法など慣用の方法を適用すれば、目的とするハイブリドーマのクローンが得られる。斯くしてクローンとして得られるハイブリドーマを生体内又は生体外で培養し、必要に応じて、その体液又は培養物を、目的とするイムノグロブリンを採取・精製するための慣用の方法を適用すれば、所望のレベルにまで精製されたこの発明によるモノクローナル抗体が得られる。

【0021】上記で説明した、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体としての形態を含むこの発明の抗体は、抗体一般を精製するための斯界における慣用の精製方法により、所望のレベルにまで精製された標品として得ることができる。個々の精製方法としては、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー

一、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動が挙げられ、これらは必要に応じて適宜組合せて用いられる。精製した抗体は、その後用途に応じて、濃縮・乾燥し、液状又は固状とする。

【0022】この発明の抗体は、以上に説明した方法以外の方法によっても得ることができる。例えば、斯界においては、組換えDNA技術を利用する抗体の製造方法が種々提案されており、そのような方法によってもこの発明の抗体は得ることができる。概略としては、先ず、上記のようにして温血動物を免疫感作し、該免疫感作動物から脾細胞を調製するか又はハイブリドーマを調製したり、常法によりヒトを含む温血動物から選ばれるいずれかの動物から採取したリンパ球を生体外で抗原刺激することにより、この発明の抗体の産生能を有する細胞を得る。次に、斯かる抗体産生細胞からRNAを採取し、そのRNAを鋳型として用いて、エス・タラン・ジョーンズら、『バイオテクノロジー』、第9巻、88乃至89頁(1991年)に記載されたRT-PCR法に準じて、この発明の抗体における相補性決定領域を含む部分をコードするDNAをクローン化する。斯かるDNAのクローンは、エス・ポール監修、『メソズ・イン・モレキュラー・バイオロジー』、第51巻、355乃至394頁(1995年、ヒューマナ・プレス発行)などに記載された発現ライブラリー(ファージ・ディスプレイ・ライブラリー)の検索によることもできる。斯くしてクローン化されるDNAを、適宜のイムノグロブリンの定常領域をコードする慣用のDNAと連結すれば、この発明の抗体をコードするDNAが得られる。得られたDNAを用いて、IL-18前駆体に対する特異性を実質的に消失させない範囲でその一次構造を改変するように蛋白質工学的手法を実施することもできる。斯かるDNAを適宜の発現系を用いて形質転換細胞により発現させ、発現された抗体を精製すれば、組換えDNA技術によるこの発明の抗体が得られる。以上のような組換えDNA技術を適宜組み合わせることで、本来ヒト以外の温血動物のリンパ球が産生する抗体と実質的に同等の構造・機能の抗体のほか、ヒトのリンパ球が産生する抗体における定常領域を含む、いわゆる、「ヒト化抗体」及び「キメラ抗体」、さらには、ヒトのリンパ球が産生する抗体と実質的に同等の構造・機能を有する、いわゆる、「ヒト抗体」を得ることもできる。なお、トリスタン・ジェイ・ボーンら、『ネイチャー・バイオテクノロジー』、第16巻、535乃至539頁(1998年)には、ヒト化抗体、キメラ抗体及びヒト抗体に関する手法が概説されている。ヒト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体としてのこの発明による抗体は、後述するように、ヒトへの投与を前提とする医薬用途にとりわけ有利に用いることができる。

【0023】以上のようにして得られるこの発明の抗体

は、IL-18前駆体の検出を必要とする諸分野に広範な用途を有する。IL-18前駆体は、通常、成熟型IL-18が示すような生理活性を示さないため、活性に基づく検出は実質的に不可能である。この発明の抗体はIL-18前駆体に特異的に免疫反応性を示すので、被験試料とこの発明の抗体を接触させ、その際に生じた免疫反応の有無及び/又は強度を検査ないしは測定すればIL-18前駆体を検出することができる。この発明は斯かる検出方法を提供するものでもある。この発明の検出方法は、この発明の抗体を用いて、例えば、標識物質を利用して免疫反応の有無及び/又は強度を検査ないしは測定する慣用のイムノアッセイにしたがって操作することにより実施することができる。慣用のイムノアッセイの例としては、放射性物質、酵素、又は蛍光物質を標識物質として用いるものが挙げられ、これらはそれぞれ一般に、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と呼称されている。なお、エンザイムイムノアッセイは、エライザ(ELISA、enzyme-linked immunosorbent assay)と呼ばれることもある。慣用のイムノアッセイの別の例としては、例えば、金コロイドなどの金属イオン、ユウロピウムイオンやサマリウムイオンなどの金属イオンを含むキレート化合物を標識物質として利用するものなどが挙げられる。以上のようなイムノアッセイにおいては、この発明の抗体は、常法により、上記のような標識物質の一種以上で直接的に標識して利用することができる。一方、この発明の抗体を間接的に標識してイムノアッセイを実施することもできる。例えば、この発明の抗体にビタミンの1種であるビオチンを常法により結合させた後、これに、ビオチンに対して親和性を示すアビジンに所望の標識物質を結合させた物質を接触させれば、この発明の抗体は間接的に標識されることとなる。この発明の抗体はIL-18前駆体に対して特異的に免疫反応性を示すので、免疫反応を示した抗体を、以上のような標識物質を指標に測定すれば、被験試料中のごく微量のIL-18前駆体を迅速かつ正確に定性的又は定量的に分析することができる。なお、一般的なイムノアッセイにおいては、互いに異なる2種以上の抗体を利用する場合がある(例えば、いわゆる「サンドイッチ型イムノアッセイ')。この発明の検出方法においても同様に、例えば、互いに異なるハイブリドーマが産生するこの発明の抗体(モノクローナル抗体)や、ポリクローナル抗体としてのこの発明の抗体から適宜選ばれる2種以上を組み合わせる用いることができる。さらに、後記実施例2に詳述するように、抗体の種類によっては、この発明の抗体とIL-18に対する抗体とを組み合わせることによって、極めて感度よく、かつ、選択的にIL-18前駆体を検出できる場合もある。したがって、この発明の検出方法は、この発明の抗体の少なくとも一種を用い、IL-18前駆体を検出し得るもの全般

を包含するものであり、組み合わせて用いる抗体の種類は問わない。

【0024】既に述べたように、IL-18に対する公知の抗体は、反応性は比較的低いながらも、前駆体に対しても免疫反応性を示す場合がある。IL-18に対するこのような抗体を用いるイムノアッセイを、IL-18の成熟型と前駆体が混在する試料に適用する場合には、測定値は真のIL-18量を上回る可能性がある。IL-18に対するこのような抗体を用いるイムノアッセイを実施する際に、この発明の抗体を用いる検出方法を組み合わせることで、この発明の検出方法の結果により、上記イムノアッセイによるIL-18の測定結果を補正し、より正確な値を求めることが可能となる。したがって、この発明の検出方法は、IL-18前駆体の検出が必要とされる分野のみならず、IL-18の検出が必要とされる分野においても有利に利用できる。

【0025】以上のようなこの発明による検出方法は、例えば、生体におけるIL-18産生の増強ないしは減弱や、IL-18の前駆体から成熟型への変換の異常などに伴う成熟型IL-18ないしはIL-18前駆体が関連する疾患の診断や、斯かる疾患の発症機序の解析、さらには、IL-18前駆体を經由するIL-18の製造における工程管理やその製品分析などに極めて有用である。したがって、この発明の検出方法は、対象とする被験試料の種類は問わず、例えば、生体から採取した、血液、血清、リンパ液、骨髄液、唾液、汗、尿、糞便、細胞・組織・器官ないしはその破砕物などや、生体外で培養した、樹立細胞株を含む細胞、斯かる細胞の上澄液、斯かる細胞の破砕物などの生物学的試料はいずれも目的に応じて被験試料として用いることができる。また、この発明の抗体とともに、以上のようなこの発明の検出方法を実施するための試薬、例えば、通常イムノアッセイに用いられる緩衝剤、希釈剤、発色剤などや、容器類、さらには、標準試料としてのIL-18前駆体、さらに必要に応じて、成熟型IL-18に対する抗体や標準試料としての成熟型IL-18などをパッケージとして梱包し、免疫測定キットとすることもできる。斯かるキットは、この発明の検出方法を簡便に実施する上でとりわけ有用である。この発明は、斯かる免疫測定キットを提供するものでもある。以上説明した抗体の調製やイムノアッセイの一般的手順に関しては、例えば、ウィルフリッド・アール・バット編集、『プラクティカル・イムノアッセイ』、1984年、マーセル・デッカー社発行に種々詳述されており、エンザイム・イムノアッセイに関しては、同書、37乃至69頁に具体的な記載がある。これらの手順は適宜この発明の実施に応用することができる。

【0026】この発明の抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによるIL-18前駆体の精製にもきわめて有用である。斯かる精製方法は、この発明の抗

体を、IL-18前駆体と該前駆体以外の夾雑物質との混合物に接触させて抗体に該前駆体を選択的に吸着させる工程と、吸着した前駆体を抗体から脱着させる工程を含んでなり、両工程は、通常、水性媒体中で行なわれる。斯かる精製方法においては、この発明の抗体は、通常、ゲル状の水不溶性担体に結合した状態で用いられ、その水不溶性担体を円筒管などにカラム状に充填し、これに、例えば、形質転換体の培養液又はそれらの部分精製品を通液すると、実質的にIL-18前駆体のみが水不溶性担体上の抗体に吸着する。吸着物は、抗体周囲の水素イオン濃度を変えることにより、容易に脱着させることができ、例えば、IgGのクラスに属する抗体を用いる場合は酸性側のpH、通常、pH2乃至3で、一方、IgMのクラスに属する抗体を用いる場合はアルカリ側のpH、通常、pH10乃至11で脱着・溶出させる。斯かる精製方法によるときは、IL-18前駆体を比較的容易にかつ精製度高く調製することができる。

【0027】上記でも述べたように、IL-18は免疫系の調節をはじめとする多様な生理作用を生体において発揮する一方、正常な範囲から逸脱してその機能が亢進又は減弱すると、時としてその生体には疾患の発症をもたらされる場合がある。自己免疫疾患の発症とIL-18の生体内レベルの上昇との相関はこのことを示す一例と言える。一方、IL-18の前駆体から成熟型への変換の異常などにより、生体の体液中又は細胞内に過剰に蓄積した前駆体が、その生体に障害や疾患をもたらす可能性もある。例えば、生体における過剰なIL-18前駆体が成熟型IL-18本来の生理作用を阻害することによる障害・疾患の発症が考えられる。この発明の抗体は、IL-18前駆体に対して特異的に免疫反応性を示すので、生体における斯かる過剰な前駆体の中和や無毒化に奏効し得る。このことから、この発明の抗体は、IL-18前駆体に起因する疾患・障害に対する治療・予防効果を発揮し得る。また、例えば、IL-18に対する阻害剤や中和剤を用いてIL-18関連疾患を治療する際に、その患者の生体内に存在するIL-18前駆体が斯かる阻害剤ないしは中和剤による効果を減衰させる可能性もある。このことから、この発明の抗体は、IL-18に起因する疾患・障害に対する治療・予防効果を調整する作用をも発揮し得る。したがって、この発明の抗体は、それが直接又は間接的に作用して効果を発揮する疾患、例えば、IL-18前駆体関連疾患ないしはIL-18関連疾患を予防・治療・緩和するための医薬用組成物の有効成分又は補助成分のひとつとして有利に用いることができる。上記で述べた、ヒト化抗体、キメラ抗体又はヒト抗体としてのこの発明の抗体は、ヒト以外の動物起源の抗体に比べて、ヒトに投与した際に抗原性を示し難いので、ヒトへの投与を前提とするこれらの医薬用途にとりわけ有用である。一方、ヒト以外の動物を対象とする医薬用途としては、この発明の抗体は、対象

とする動物と同一ないしは近縁の動物起源のものをを用いるのが望ましい。

【0028】この発明による医薬用組成物の対象となる疾患としては、より具体的には、肝炎、ヘルペス症、尖圭コンジロム、後天性免疫不全症候群などのウイルス感染症、カンジダ症、マラリヤ症などの細菌感染症、腎細胞癌、菌状息肉腫、慢性肉芽腫などの固形悪性腫瘍、成人T細胞白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、非T細胞性白血病、非ホジキンリンパ腫、悪性リンパ腫などの血球系悪性腫瘍、平滑筋肉腫、線維肉腫、眼類肉腫、肺類肉腫などの肉腫及び類肉腫、移植に伴う拒絶反応、慢性移植片対宿主疾患、悪性貧血、萎縮性胃炎、インスリン抵抗性糖尿病、ウェジナー肉芽腫症、円板状エリテマトーデス、血球貪食症候群、潰瘍性大腸炎、寒冷凝集素症、グッドパスチャー症候群、クローン病、交感性眼炎、甲状腺機能亢進症、若年性糖尿病、シェーグレン症候群、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、進行性全身性硬化症、全身性エリテマトーデス、多発性寒冷色素尿症、多発性筋炎、多発性結節性動脈炎、多発性硬化症、特発性アジソン病、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病、白血球減少症、血球貪食症候群、ベーチェット病、早発性更年期、慢性関節リウマチ、成人スチル病、スチル病、リウマチ熱、慢性甲状腺炎、ホジキン病、デイ・ジョージ症候群、急性移植片対宿主疾患、HIV感染症、喘息、アトピー性皮膚炎、接触皮膚アレルギー、アレルギー性鼻炎、花粉症及びハチ毒アレルギーを含む、自己免疫疾患、アレルギー性疾患及び免疫不全症のほか、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、中毒性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、劇症肝炎、ウイルス性肝硬変、アルコール性肝硬変、中毒性肝硬変、胆汁性肝硬変、胆汁うっ滞性肝障害、肝細胞癌、急性肝炎、脂肪肝、肝臓腫瘍、肝血管障害などの肝疾患、胆管炎、胆嚢炎、原発性硬化性胆管炎、胆嚢腫瘍、胆管腫瘍などの胆嚢・胆道疾患、急性膵炎、慢性膵炎、膵機能不全、膵臓腫瘍及び膵嚢胞などの膵疾患、急性腎炎、慢性腎不全、腎癌、腎虚血、腎結石、糸球体腎炎、糸球体炎、糸球体硬化などの腎臓並びに糸球体疾患、虚血、虚血性心筋症、脳虚血、脳底動脈片頭痛、脳底部異常血管網症、脳卒中、脳底部動脈瘤、動脈硬化症、血管内皮障害、糖尿病、腸管膜血管閉塞症及び上腸管膜動脈症候群を含む循環器系疾患、パーキンソン病、脊髄筋肉萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、痴呆症、脳血管性痴呆症、エイズ痴呆症及び脳脊髄炎を含む神経系疾患などを挙げることができる。なお、これらの対象疾患は、上記で述べた、疾患の診断方法としてのこの発明の検出方法の対象疾患ともなり得る。

【0029】この発明による医薬用組成物は、この発明の抗体単独の形態はもとより、それ以外の生理的に許容される、例えば、担体、賦形剤、希釈剤、溶剤、アジュ

バント、安定剤、さらには、必要に応じて、他の生理活性物質の1若しくは複数種類との組成物としての形態をも包含する。安定剤としては、例えば、血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、マンニトール、ラクチトールなどの糖質及びクエン酸塩若しくはリン酸塩を主体とする緩衝剤が、また、併用し得る他の生理活性物質としては、例えば、FK506、グルココルチコイド、シクロフォスファミド、ナイトロゲンマスタード、トリエチレンチオフォスファミド、プズルファン、フェニラミンマスタード、クロランブシル、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、6-アザグアニン、8-アザグアニン、フルオロウラシル、シタラビン、メトトレキセート、アミノプテリン、マイトマイシンC、塩酸ダウノルビシン、アクチノマイシンD、クロモマイシンA3、塩酸プレオマイシン、塩酸ドキシソルピシン、サイクロスポリンA、L-アスバラギナーゼ、ピンクリスチン、ピンラスチン、ヒドロキシウレア、塩酸プロカルバジン、副腎皮質ホルモン、金コロイド、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン18などの他に、サイトカインの受容体アンタゴニストやサイトカインの中和剤、例えば、インターロイキン1受容体蛋白質、インターロイキン2受容体蛋白質、インターロイキン5受容体蛋白質、インターロイキン6受容体蛋白質、インターロイキン8受容体蛋白質及びインターロイキン12受容体蛋白質に対するそれぞれの抗体、さらには、TNF-受容体、TNF-受容体、インターロイキン1受容体、インターロイキン5受容体及びインターロイキン8受容体に対するそれぞれのアンタゴニストなどが挙げられる。以上のようなこの発明による医薬用組成物は、対象疾患の種類や、適用患者の種・年齢などにもよるけれども、固形物重量換算で、通常、0.00001% (w/w)乃至100% (w/w)、望ましくは、0.00001% (w/w)乃至20% (w/w)の含量でこの発明の抗体を含有する。

【0030】さらに、この発明による医薬用組成物は投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、投薬に適した物理的に一体の剤型にあって、この発明の抗体を、例えば、1回当たりの用量の整数倍(4倍まで)若しくはその約数(1/40まで)に相当する量を含んでなるものを意味する。このような投薬単位形態の薬剤の剤型としては、注射剤、液剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、錠剤、カプセル剤、外用剤などが挙げられる。当該医薬用組成物の用量は、対象疾患の種類や、対象患者の種・年齢などに応じて適宜設定することができ、例えば、成人を対象とする場合、当該医薬用組成物の1回・1人あたりの用量は、この発明の抗体の固形物重量換算で、通常、約0.1µg乃至約1g、望ましくは、約1µg乃至約100mgとし、1日あたり1乃至4

回、又は1週間あたり1乃至30回の頻度で、症状を観察しながら投与される。投与経路は、この発明の抗体による症状の緩和、治療、予防などの所期の効果が発揮されるものであればよく、例えば、経口投与や、皮内、皮下、筋肉内、静脈内などの非経口投与から、対象疾患の種類や、当該医薬用組成物の剤型に応じて適宜選ばれる経路を選択することができる。

【0031】ところで、一般に、抗体は交差反応性を示す場合がある。この発明の抗体も、種類によっては交差反応性を示す場合があり、斯かる抗体はIL-18前駆体と構造的に類似するものの完全には一致しない物質やIL-18前駆体と部分構造が共通するものの全体としては異なる構造の物質に対しても免疫反応性を示し得る。交差反応性を有するこの発明の抗体を用いて、細胞、細胞培養上澄液、細胞破砕物、血液、血清、組織、組織破砕物などの生物学的試料を該抗体との免疫反応性に基づき試験すれば、斯かるIL-18前駆体関連物質をスクリーニングすることができる。また、例えば、化学合成又は組換えDNA技術により得られる、数個乃至数十個のアミノ酸からなる無作為な配列のペプチドを同様に試験することによっても、斯かる関連物質をスクリーニングすることができる。したがって、この発明の抗体は、IL-18前駆体関連物質のスクリーニング用試薬として有用である。斯かる関連物質は、IL-18の生理活性の発現に関わる、ペプチドなどの低分子物質の形態を含む、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、中和剤などとして機能する可能性があるので、IL-18調節剤やIL-18関連疾患剤などとして利用し得る。また、以上のようなスクリーニングにより得られる物質を構造と機能について解析し、相互に比較することにより、さらに別の、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、中和剤などのIL-18調節物質の分子設計を行うこともできる。

【0032】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明はこれらの実施例のみに限定されるべきではない。

【0033】

【実施例1】 IL-18前駆体に特異的な抗体

【0034】

【実施例1-1】 抗原の調製 抗原のひとつとして、ヒトIL-18前駆体における前駆ペプチド配列(配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列、以下、「該前駆ペプチド配列」という。)の一部とマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ(以下、「DHFR」という。)及び(His)<sub>6</sub>タグを含む融合蛋白質を以下のように組換えDNA技術により調製した。

【0035】

【実施例1-1(a)】 抗原をコードするDNAの調製 該前駆ペプチド配列におけるN末端のメチオニンを

除く配列をコードするDNAを、同じ特許出願人による特許第2724987号公報に記載の方法に準じて調製した配列表における配列番号7の塩基配列を含んでなるcDNAを鋳型とし、配列表における配列番号8及び9の塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いて、慣用のPCR法により増幅した。なお、ここで用いたセンスプライマーは配列番号1における第1のメチオニンを除いたN末端部の配列に対応するとともに、制限酵素Bgl I I Iによる認識部位を含むものであり、また、アンチセンスプライマーは、配列番号1におけるC末端部の配列とそれに続く(His)<sub>6</sub>タグに対応するとともに、制限酵素Hind I I Iによる認識部位を含むものである。増幅されたDNA断片を慣用のクローニングベクターにクローン化した後、斯かるDNA断片が所期の構造を有することを塩基配列を解読して確認した。

【0036】このクローニングベクターから上記DNA断片を制限酵素Bgl I I I及びHind I I Iを用いて消化することにより切り出し、予めBgl I I I及びHind I I Iで消化しておいたプラスミドDNA『pQE-16』(キアゲン社製)に常法により挿入した。なお、ここで用いたプラスミドDNAは、プロモーターの制御下に配置されたマウスデヒドロ葉酸レダクターゼをコードする塩基配列とその下流に位置する制限酵素Bgl I I I及びHind I I Iによる認識部位を含む、大腸菌を宿主とする発現ベクターである。この結果得られた組換えDNAは、図1に示すとおり、マウスDHFRのアミノ酸配列、該前駆ペプチド配列の一部、(His)<sub>6</sub>タグを含むアミノ酸配列をコードする塩基配列がプロモーターの下流に配置されていた。斯くして得た組換えDNAを『pQDPR16』と命名した。

【0037】

【実施例1-1(b)】 抗原の発現と精製 実施例1-1(a)で得た組換えDNA『pQDPR16』を大腸菌JM109株に常法により導入して形質転換した。得られた形質転換体をLプロス中で前培養した後、この前培養物を、500ml容三角フラスコに1本当たり150mlずつ調製しておいた、合計2.4lの2xYT培地に液量で1%植菌し、ロータリーシェイカーを用いて37℃で、培地の600nmにおける吸光度を測定しながらインキュベートして形質転換体を培養した。吸光度が0.9に到達した時点でIPTGを最終濃度1mMになるように培地に加え、さらに一晚培養を続けた。培養物より菌体を採取し(湿重量で約12.1g)、菌体を、8M尿素、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01M Trisを含む緩衝液(pH8.0)に懸濁し可溶化した後、可溶化物より、形質転換体による発現産物をNi-NTAアガロースゲルのカラム(ゲル量12ml、キアゲン社製)を用い、製造元の説明書にしたがって精製した。このカラムによる精製標品を、次に、0.05%

(w/v) 界面活性剤 (商品名『TWEEN20』)、5mM 2-メルカプトエタノール、0.5M 塩化ナトリウム、1.7M 尿素、10mM Trisを含む緩衝液 (pH7.2) に対して4で一晩透析した。透析後の溶液を遠心分離して上清を採取し、採取した上清を限外濾過により蛋白質濃度約1mg/mlにまで濃縮した (液量約16ml)。濃縮物は、ジチオトレイトール存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約33キロダルトンの均一なバンドを示した。

【0038】 対照として、組換えDNA『pQDPR16』に代えて発現ベクター『pQE-16』を用いて上記にしたがって操作したところ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約28キロダルトンの均一なバンドを示す標品が得られた。このことは、上記で得た濃縮物が、マウスDHFR、該前駆ペプチド配列の一部、及び(His)<sub>6</sub>タグを含む融合蛋白質の精製標品であることを裏づけている。斯くして抗原のひとつを精製した。

#### 【0039】

【実施例1-2】 抗原の調製 別の抗原として、ヒトIL-18前駆体の全配列 (配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列) に(His)<sub>6</sub>タグが付加された配列を含む融合蛋白質を以下のように組換えDNA技術により調製した。

#### 【0040】

【実施例1-2(a)】 抗原をコードするDNAの調製 配列表における配列番号4に示すヒトIL-18前駆体のアミノ酸配列を含有するポリペプチドのコード配列と、そのコード配列の5'末端及び3'末端にそれぞれ付加された制限酵素Nhe I及びXho Iによる認識部位を含むDNA断片を、以下のPCRにより増幅した。鋳型として同じ特許出願人による特許第2724987号公報に記載の方法に準じて調製した配列表における配列番号7の塩基配列を含むcDNAを1ng、センスプライマーとして配列表における配列番号10に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを10ng、アンチセンスプライマーとして配列表における配列番号11に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを100ngと、通常のPCRで用いるこれら以外の成分を常法どおりの配合で含むPCR反応混合液100μlを、94℃で30秒、53℃で30秒及び72℃で30秒インキュベートするサイクルを5回繰り返した。その後、この反応混合液に、配列表における配列番号12のオリゴヌクレオチドを100ng加え、94℃で30秒、55℃で30秒及び72℃で30秒インキュベートするサイクルを3回繰り返し、引き続き、さらに、94℃で30秒、60℃で30秒及び72℃で30秒インキュベートするサイクルを32回繰り返した。このPCRで増幅されたDNA断片を慣用のクローニングベクターにクローン化し、斯かるDNA断片が所期の構造を有することを塩基配列を解

読して確認した。

【0041】 このクローニングベクターから上記DNA断片を制限酵素Nhe I及びXho Iを用いて消化することにより切り出した後、予め制限酵素Nhe I及びXho Iで消化しておいたプラスミドDNA『pRSETB』 (インビトロジェン社製) に常法により挿入した。なお、ここで用いたプラスミドDNAは、プロモーターの制御下に配置された開始コドン及び(His)<sub>6</sub>タグを含むコード配列とそれに続くNhe I及びXho Iによる認識部位とを含む、大腸菌を宿主とする発現ベクターである。この結果得られた組換えDNAは、図2に示すとおり、ヒトIL-18前駆体のアミノ酸配列と、そのN末端部に連結された(His)<sub>6</sub>タグを含む別のアミノ酸配列とからなる配列をコードする塩基配列がプロモーターの下流に配置されていた。斯くして得た組換えDNAを『pRS-hproIL18』と命名した。

#### 【0042】

【実施例1-2(b)】 抗原の発現と精製 実施例1-2(a)で得た組換えDNA『pRS-hproIL18』を大腸菌株『BL21(DE3)pLysS』のコンピテントセル (東洋紡績株式会社販売) に常法により導入して形質転換した。得られた形質転換体をLプロス中で前培養した後、この前培養物を、500ml容三角フラスコに1本当たり150mlずつ調製しておいた、合計1.0lのL培地に液量で1%植菌し、ロータリーシェイカーで37℃で、培地の600nmにおける吸光度を測定しながらインキュベートして形質転換体を培養した。吸光度が0.5程度に達した時点でIPTGを最終濃度0.4mMになるように加え、さらに約5時間培養を続けた。培養物より菌体を湿重量で約3.5g採取した。この菌体を40mlの0.5M尿素、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01M Trisを含む緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、超音波処理したのち、遠心分離により沈澱部を採取して封入体画分を得た。封入体画分を、再度同様に、懸濁、超音波処理、遠心分離に供して洗浄した。洗浄後の封入体画分を、10mlの8M尿素を含む緩衝液 (pH8.0) で可溶化し、可溶化物より、形質転換体による発現産物をNi-NTAアガロースゲルのカラム (ゲル量5ml、キアゲン社製) を用い、製造元の説明書にしたがって精製した。このカラムによる精製標品を、次に、5mM EDTA、0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び10mM Trisを含む緩衝液 (pH7.2) に対して4で一晩透析した。透析後の溶液を遠心分離して上清を採取し、採取した上清を限外濾過により蛋白質濃度約1mg/mlにまで濃縮した (液量約4ml)。濃縮物は、ジチオトレイトール存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において約30キロダルトンの均一なバンドを示した。

【0043】 対照として、組換えDNA『pRS-hp

roIL18』に代えて発現ベクター『pRSETB』を用いて上記にしたがって操作したところ、組換えDNA『pRS-hproIL18』を用いた場合に見られたような顕著なバンドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において示す蛋白質の産生は認められなかった。このことは、上記で得た濃縮物が、ヒトIL-18前駆体のアミノ酸配列を含む融合蛋白質の精製標品であることを裏づけている。斯くして別の抗原を精製した。

【0044】

【実施例1-3】 ハイブリドーマの樹立とモノクローナル抗体の調製

【0045】

【実施例1-3(a)】 免疫感作と抗体産生細胞の調製 8週齢の雌性BALB/cマウスを以下のスケジュールで免疫感作した。初回免疫として、常法により完全フロイントアジュバントとともに実施例1-1で得た抗原を20μg/匹の用量で腹腔内に注射投与した。その後2週間おきに、追加免疫として、不完全フロイントアジュバントとともに同じ抗原を同じ用量で腹腔内に計2回注射投与した。常法によりマウスの尾静脈より血液を採取し、その血液から分離した血清の該抗原との免疫反応性を常法により調べ、所期の抗体価の上昇を確認した。引き続いて、上記と同様に追加免疫を2回おこなった。さらに2週間後に最終免疫として、実施例1-2で得た抗原をアジュバントを用いずに10μg/匹の用量で静脈内に1回注射投与した。最終免疫の終了後3日めにマウスより脾臓を摘出し、分散して脾細胞を抗体産生細胞として得た。なお、上記の操作により、マウスの血清において所期の抗体価の上昇が確認されたことは、この血清がヒトIL-18前駆体に特異的なポリクローナル抗体を含む抗血清であることを示している。したがって、本実施例1-3(a)の方法によれば本発明によるポリクローナル抗体を調製することができる。

【0046】

【実施例1-3(b)】 ハイブリドーマの樹立 上記で得た脾細胞の約 $1 \times 10^8$ 個とマウス骨髄腫由来のSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)の約 $3 \times 10^7$ 個を、37°Cに予温しておいた血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)(以下、単に「無血清培地」という。)の適量に浮遊させ、両細胞を十分に混和した。この細胞浮遊液を遠心分離し、上澄液を十分に除去した。沈澱部の細胞に、平均分子量1,500ダルトンの50%(w/v)ポリエチレングリコールを含む無血清培地1mlを1分間かけて滴々加え、その後37°Cで1分間インキュベートして細胞融合に供した。これに、無血清培地を全量が50mlになるまで滴々加え、細胞融合の反応を停止した。この細胞融合産物を遠心分離して上澄液を十分に除去した後、沈澱部にHAT培地を加え、細胞密度約 $2 \times 10^5$ 個/mlの細胞浮遊液とした。この細胞浮遊液を96ウェルプレートに

150μl/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37°Cで約10日間インキュベートしてハイブリドーマを選択的に培養した。

【0047】各ウェルの培養上澄液を、ヒトIL-18前駆体及びヒトIL-18に対する免疫反応性の有無について、通常のエンザイムイムノアッセイにより調べた。まず、配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列からなるヒトIL-18前駆体と同じ特許出願人による特開平10-80270号公報の方法に準じて調製し、これを常法によりプラスチックプレートのウェル内に固定化し、該前駆体に対する免疫反応性の試験用プレートとした。一方、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含有するヒトIL-18を同じ特許出願人による特許第2724987号公報に記載の方法にしたがって調製し、同様にしてプラスチックプレートのウェル内に固定化し、成熟型IL-18に対する免疫反応性の試験用プレートとした。いずれかのウェルに、ハイブリドーマの上澄液を個々に加え、ウェルを洗浄した後、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgG抗体を加え、さらにウェルを洗浄した後、常法にしたがってo-フェニレンジアミンと過酸化水素とを基質とする反応に供した。反応後の反応液の発色の有無により免疫反応性を判定した。その結果、ヒトIL-18前駆体に対して免疫反応性を示す一方、ヒトIL-18に対しては顕著な免疫反応を示さない培養上澄液が11種類認められた。これらの培養上澄液のウェルよりそれぞれハイブリドーマを採取し、限界希釈法を適用して、15株のハイブリドーマのクローンを樹立した。常法にしたがって培養し、分析したところ、これらのハイブリドーマのクローンのうち、1株がIgG<sub>2b</sub>のクラスに属するモノクローナル抗体を、2株がIgG<sub>3</sub>のクラスに属するモノクローナル抗体を、残る12株がIgMのクラスに属するモノクローナル抗体をそれぞれ産生するものであった。

【0048】

【実施例1-3(c)】 モノクローナル抗体の調製 実施例1-3(b)で得たハイブリドーマのクローン11株を以下のとおりそれぞれ操作してモノクローナル抗体を調製した。まず、常法にしたがい、いずれかのハイブリドーマを細胞密度約 $1 \times 10^5$ 個/mlになるように5%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に浮遊させ、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで所期の細胞密度に達するまで培養した。11週齢のBALB/cマウスの腹腔内にプリスタン0.5ml/匹の用量で腹腔内に接種した。上記培養物よりハイブリドーマを採取し、プリスタン処理したマウスの腹腔内に約 $1 \times 10^7$ 個/匹の用量で接種した。その後マウスを通常の方法で約1週間飼育した。

【0049】IgG<sub>2b</sub>又はIgG<sub>3</sub>のクラスのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのいずれかを接種

し、飼育したマウスからのモノクローナル抗体の精製は以下のとおり行った。まず、プロテインA固定化ゲル『プロテインA - セファロースCL - 4B』(ファルマシア社製)を充填したカラムに、3M 塩化ナトリウムを含む1.5M グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液(pH 8.9)(以下、「平衡化緩衝液」という。)を通液して平衡化した。飼育後のマウスから腹水を採取し、通常の遠心分離により不溶物を除去し、平衡化緩衝液で2倍希釈した後、平衡化したカラムに負荷した。引き続きこのカラムに十分量の平衡化緩衝液を通液して洗10 浄した後、適量の0.1M グリシン - 塩酸緩衝液(pH 3.0)を通液し、カラムに吸着した抗体を溶出させた。溶出液を採取し、PBSに対して4で一晚透析した後、透析内液を採取した。以上の操作をハイブリドーマごとにそれぞれ実施し、IgG<sub>2b</sub>クラスのモノクローナル抗体1種類とIgG<sub>3</sub>クラスのモノクローナル抗体2種類それぞれの精製標品を得た。

【0050】IgMクラスのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのいずれかを接種し、飼育したマウスから腹水を採取し、通常の遠心分離により不溶物を除去した後、50%飽和硫酸を用いて塩析し、生成した沈澱部を採取した。この沈澱部を0.15M 塩化ナトリウムを含む50mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.8)に対して4で一晚透析した。透析内液を採取し、上記と同じ組成の緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに負荷した後、カラムに上記と同じ組成の緩衝液を十分量通液し、洗浄した。引き続き、カラムに、0.15M 塩化ナトリウムを含み、50mMから300mMまでの直線的濃度勾配をもたせたリン酸カリウム緩衝液(pH 6.8)を通液し、濃度200mM以上10 30 上の該緩衝液の通液により溶出された画分を採取した。以上の操作をそれぞれのハイブリドーマごとに実施し、IgMクラスのモノクローナル抗体12種類の精製標品を得た。

【0051】上記で得たモノクローナル抗体を実施例1-3(b)と同様にしてエンザイムイムノアッセイに供したところ、これらの標品は、ヒトIL-18前駆体に対して免疫反応性を示す一方、ヒトIL-18に対しては顕著な免疫反応性を示さないことが確認された。斯くして、15種類のこの発明によるモノクローナル抗体を40 得た。エンザイムイムノアッセイにおける発色の強度からヒトIL-18前駆体に対してとりわけ高い免疫反応性を示すと判断された、IgG<sub>2b</sub>のクラスのモノクローナル抗体を『mAb - proHuIL18#75』と命名した。

【0052】

【実施例2】 エンザイムイムノアッセイ 2種類の抗体を用いるエンザイムイムノアッセイを以下のとおり実施した。まず、第一の抗体として、実施例1-3(c)の方法にしたがってモノクローナル抗体『mAb - pr 50

oHuIL18#75』を調製した。一方、同じ特許出願人による特開平8-231598号公報に記載の方法にしたがってヒトIL-18に対するモノクローナル抗体を調製した。これらヒトIL-18に対するモノクローナル抗体を通常のウェスタンブロッティング法に供したところ、ヒトIL-18に対して免疫反応性を示す一方、ヒトIL-18前駆体に対して、ヒトIL-18に対する場合に匹敵するレベルの免疫反応性を示すもの(『mAb - HuIL18#25-2G』)が見出された。このモノクローナル抗体『mAb - HuIL18#25-2G』を常法にしたがい西洋ワサビパーオキシダーゼで標識し、第二の抗体とした。測定用試料として、配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列からなるヒトIL-18前駆体を同じ特許出願人による特開平10-80270号公報の方法に準じて調製するとともに、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を含むヒトIL-18を同じ特許出願人による特許第2724987号公報の方法にしたがって調製した。

【0053】上記で得た第一の抗体を蛋白質濃度20μg/mlにPBSで調整した後、マイクロプレートの各ウェルに100μlずつ分注し、室温で3時間静置してウェル内に該抗体を固定化した。ウェルをPBSで洗浄後、それぞれに、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン(以下、「BSA」と略記する。)を含むPBSを200μlずつ加え、4で16時間静置した。ウェルをPBSで洗浄後、それぞれに、図3に示す各種の蛋白質濃度にPBSで調製したヒトIL-18前駆体又はヒトIL-18のいずれかを50μlと、アッセイ用緩衝液(1%(w/v)BSA、5%(w/v)ウシ胎児血清、1M 塩化ナトリウムを含むPBS)を50μlずつ加え、室温で1時間半穏やかに振盪した。ウェルを洗浄用緩衝液(0.05%(w/v)界面活性剤『Tween20』を含むPBS)で3回洗浄後、それぞれに、上記で調製した、標識した第二の抗体(蛋白質濃度0.5μg/ml)を100μlずつ加え、室温で1.5時間振盪した。ウェルを洗浄用緩衝液で3回洗浄後、それぞれを、常法にしたがってo-フェニレンジアミンと過酸化水素とを基質とするペルオキシダーゼ反応に供した。反応後、各ウェル中の反応液の490nm及び650nmにおける吸光度を常法により測定し、前者と後者の値の差を求め、各ウェル内で起こった免疫反応の強弱の指標とした。

【0054】図3に、ヒトIL-18前駆体を用いた結果(黒塗り四角、-)とヒトIL-18を用いた結果(黒塗り丸、-)を併せて示した。なお、ヒトIL-18又はヒトIL-18前駆体に代えて0.1%(w/v)BSAを用いて上記と同様に操作した場合には、吸光度の値の差は0.01未満であった。このことは、吸光度の値の差が0.01を明らかに上回る値(例えば、0.05以上)を示した場合、その値に基づいて

対象とする蛋白質の有無が判定でき、その濃度が測定できることを意味している。この基準に基づくと、図3に示すとおり、本実施例によるエンザイムイムノアッセイは、約5 ng/ml以上の濃度のヒトIL-18前駆体を検出し得るものであった。また、図3に示すとおり、本実施例によるアッセイは濃度約5 ng乃至1000 ng/mlの範囲で定量的に該前駆体を検出し得るものであった。これに対し、本実施例によるアッセイは、ヒトIL-18を、濃度約1000 ng/mlを上回る高濃度で存在する場合にのみ検出し得るものであった。以上の結果は、本実施例のアッセイによれば、ヒトIL-18に対する検出感度の200倍程度の感度で、選択性高くヒトIL-18前駆体を検出できることを意味している。

【0055】本実施例において第二の抗体として用いた抗体は、上記でも述べたように、ヒトIL-18のみならずヒトIL-18前駆体に対しても免疫反応性を示す。このことから、図3に示される、本実施例によるアッセイのヒトIL-18及びヒトIL-18前駆体に対する検出感度の違いは、第一の抗体の免疫反応性を反映していると判断される。したがって、上記の結果は、斯かる第一の抗体がヒトIL-18前駆体に対して免疫反応性を示す一方、ヒトIL-18に対してはその1/200程度の低いレベルでのみ免疫反応性を示す、ヒトIL-18前駆体に特異的な抗体であることを示している。なお、本実施例に準じて実施例1-3(c)で得た他のモノクローナル抗体を調べたところ、ヒトIL-18前駆体に対する場合と比較したときのヒトIL-18に対する免疫反応性は1/10程度から1/50以下の\*

\*レベルまで個々に異なるものの、いずれもヒトIL-18前駆体に特異的であることが確認された。

【0056】なお、詳細なデータは割愛したけれども、本発明の開示によれば、ヒト以外のIL-18の前駆体に対して免疫反応性を示す抗体を実施することもできる。例えば、配列表における配列番号13はマウスIL-18前駆体をコードする塩基配列であり、この塩基配列の一部又は全部を利用して、上記実施例1乃至2を参考にして操作すれば、所期の抗体を入手し、該抗体を用いる検出方法を提供することができる。また、以上に示したようにこの発明の抗体がIL-18前駆体に特異的なものであることから、斯かる抗体は、IL-18前駆体の精製のためのアフィニティークロマトグラフィーや、生体内でのIL-18前駆体の中和・無毒化などにも有利に用いることができる。

【0057】

【発明の効果】以上説明したとおり、この発明の抗体は、IL-18前駆体に対して特異的に免疫反応性を示す。したがって、この発明の抗体は、IL-18前駆体の検出及び精製をはじめとする多種多様の用途を提供するものである。斯くも有用なこの発明の抗体はこの発明による抗体の製造方法により所望量を容易に得ることができる。

【0058】この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると言える。

【0059】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Kabushiki Kaisha Hayashib
ara Seibutsu Kagaku Kenkyujo
<120> Antibody specific to interleukin 18 precursor
<130> 10082702
<160> 13
<210> 1
<211> 36
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys
Ile Asn Phe Val Ala Met
      1           5           10           15
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile
Ala Glu Asp Asp Glu Asn
                        20           25           30
Leu Glu Ser Asp
                        35
<210> 2
<211> 35
<212> PRT

```

<400> 2  
 Met Ala Ala Met Ser Glu Asp Ser Cys Val  
 Asn Phe Lys Glu Met Met  
 1 5 10 15  
 Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Pro  
 Glu Glu Asn Gly Asp Leu  
 20 25 30  
 Glu Ser Asp  
 35  
 <210> 3  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (73)  
 <223> Xaa is Ile or Thr  
 <400> 3  
 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser  
 Val Ile Arg Asn Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn  
 Arg Pro Leu Phe Glu Asp  
 20 25 30  
 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala  
 Pro Arg Thr Ile Phe Ile  
 35 40 45  
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg  
 Gly Met Ala Val Thr Ile  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu  
 Ser Cys Glu Asn Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp  
 Asn Ile Lys Asp Thr Lys  
 85 90 95  
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val  
 Pro Gly His Asp Asn Lys  
 100 105 110  
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly  
 Tyr Phe Leu Ala Cys Glu  
 115 120 125  
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu  
 Lys Lys Glu Asp Glu Leu  
 130 135 140  
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln  
 Asn Glu Asp  
 145 150 155  
 <210> 4  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<223> Xaa is Ile or Thr  
 <400> 4  
 Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys  
 Ile Asn Phe Val Ala Met  
           -35                  -30                  -25  
 Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile  
 Ala Glu Asp Asp Glu Asn  
 -20                  -15                  -10  
 -5  
 Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu  
 Ser Lys Leu Ser Val Ile  
                           1                          5                          10  
 Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile  
 Asp Gln Gly Asn Arg Pro  
                   15                          20                          25  
 Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys  
 Arg Asp Asn Ala Pro Arg  
           30                          35                          40  
 Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp  
 Ser Gln Pro Arg Gly Met  
   45                          50                          55                          60  
  
 Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys  
 Ile Ser Xaa Leu Ser Cys  
                           65                          70                          75  
 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met  
 Asn Pro Pro Asp Asn Ile  
                           80                          85                          90  
 Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe  
 Gln Arg Ser Val Pro Gly  
                           95                          100                          105  
 His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser  
 Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe  
           110                          115                          120  
 Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe  
 Lys Leu Ile Leu Lys Lys  
 125                          130                          135                          1  
 40  
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met  
 Phe Thr Val Gln Asn Glu  
                           145                          150                          155  
 Asp  
 <210> 5  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (70)  
 <223> Xaa is Met or Thr  
 <400> 5  
 Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala  
 Val Ile Arg Asn Ile Asn

Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe  
 Leu Ala Cys Gln Lys Glu  
 115 120 125  
 Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys  
 Lys Asp Glu Asn Gly Asp  
 130 135 140  
 Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu  
 His Gln Ser  
 145 150 155  
 <210> 6  
 <211> 192  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> PROPEP  
 <222> (-35)...(-1)  
 <220>  
 <221> CHAIN  
 <222> (1)...(157)  
 <220>  
 <221> UNSURE  
 <222> (70)  
 <223> Xaa is Met or Thr  
 <400> 6  
 Met Ala Ala Met Ser Glu Asp Ser Cys Val  
 Asn Phe Lys Glu Met Met  
 -35 -30 -25 -  
 20  
 Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Pro  
 Glu Glu Asn Gly Asp Leu  
 -15 -10 -5  
 Glu Ser Asp Asn Phe Gly Arg Leu His Cys  
 Thr Thr Ala Val Ile Arg  
 1 5 10  
 Asn Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp  
 Lys Arg Gln Pro Val Phe  
 15 20 25  
 Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala  
 Ser Glu Pro Gln Thr Arg  
 30 35 40 45  
 Leu Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu  
 Val Arg Gly Leu Ala Val  
 50 55 60  
 Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser  
 Thr Leu Ser Cys Lys Asn  
 65 70 75  
 Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro  
 Pro Glu Asn Ile Asp Asp  
 80 85 90  
 Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys  
 Arg Val Pro Gly His Asn  
 95 100 105

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(582)
<220>
<221> mat peptide
<222> (109)...(579)
<220>
<221> UNSURE
<222> (325)...(327)
<223> Xaa is Ile or Thr
<400> 7
atg gct gct gaa cca gta gaa gac aat tgc
atc aac ttt gtg gca atg 48
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys
Ile Asn Phe Val Ala Met
      -35          -30          -25
aaa ttt att gac aat acg ctt tac ttt ata
gct gaa gat gat gaa aac 96
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile
Ala Glu Asp Asp Glu Asn
-20          -15          -10
-5
ctg gaa tca gat tac ttt ggc aag ctt gaa
tct aaa tta tca gtc ata 144
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu
Ser Lys Leu Ser Val Ile
              1          5          10
aga aat ttg aat gac caa gtt ctc ttc att
gac caa gga aat cgg cct 192
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile
Asp Gln Gly Asn Arg Pro
      15          20          25
cta ttt gaa gat atg act gat tct gac tgt
aga gat aat gca ccc cgg 240
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys
Arg Asp Asn Ala Pro Arg
      30          35          40
acc ata ttt att ata agt atg tat aaa gat
agc cag cct aga ggt atg 288
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp
Ser Gln Pro Arg Gly Met
      45          50          55          60

gct gta act atc tct gtg aag tgt gag aaa
att tca ayt ctc tcc tgt 336
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys
Ile Ser Xaa Leu Ser Cys
              65          70          75
gag aac aaa att att tcc ttt aag gaa atg
aat cct cct gat aac atc 384
Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met
Asn Pro Pro Asp Asn Ile
              80          85          90

```

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide  
 as a sense primer for PCR  
 to amplify a DNA fragment containing a  
 coding sequence for a  
 part of propeptide sequence of human I  
 L-18 precursor  
 <400> 8  
 agagatctgc tgctgaacca gtagaag  
 27

<210> 9  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide  
 as an antisense primer for  
 PCR to amplify a DNA fragment containi  
 ng a coding sequence for  
 a part of propeptide sequence of human  
 IL-18 precursor  
 <400> 9  
 tcaagcttag tgatggtgat ggtgatgac tgat  
 tccagg ttttc 45

<210> 10  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide  
 as a sense primer for PCR  
 to amplify a DNA fragment containing a  
 coding sequence for human  
 IL-18 precursor  
 <400> 10  
 ggtcgggac tgtacgacga tgacgataag atgg  
 ctgctg aaccagtag 49

<210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide  
 as an antisense primer for  
 PCR to amplify a DNA fragment containi  
 ng a coding sequence for  
 human IL-18 precursor  
 <400> 11  
 tgctcgagtt agtcttcggt ttgaacagtg

```

ggctagcatg actggtggac agcaaattggg tcgg
gatctg tacgacg          47
<210> 13
<211> 579
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(579)
<220>
<221> mat peptide
<222> (106)...(576)
<220>
<221> UNSURE
<222> (313)...(315)
<223> Xaa is Met or Thr
<400> 13
atg gct gcc atg tca gaa gac tct tgc gtc
aac ttc aag gaa atg atg  48
Met Ala Ala Met Ser Glu Asp Ser Cys Val
Asn Phe Lys Glu Met Met
-35          -30          -25          -
20
ttt att gac aac acg ctt tac ttt ata cct
gaa gaa aat gga gac ctg  96
Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Pro
Glu Glu Asn Gly Asp Leu
          -15          -10          -5
gaa tca gac aac ttt ggc cga ctt cac tgt
aca acc gca gta ata cgg 144
Glu Ser Asp Asn Phe Gly Arg Leu His Cys
Thr Thr Ala Val Ile Arg
          1          5          10
aat ata aat gac caa gtt ctc ttc gtt gac
aaa aga cag cct gtg ttc 192
Asn Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp
Lys Arg Gln Pro Val Phe
          15          20          25
gag gat atg act gat att gat caa agt gcc
agt gaa ccc cag acc aga 240
Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala
Ser Glu Pro Gln Thr Arg
          30          35          40          45
ctg ata ata tac atg tac aaa gac agt gaa
gta aga gga ctg gct gtg 288
Leu Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu
Val Arg Gly Leu Ala Val
          50          55          60
acc ctc tct gtg aag gat agt aaa ayg tct
acc ctc tcc tgt aag aac 336
Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser
Thr Leu Ser Cys Lys Asn

```

Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu  
Thr Asn Leu His Gln Ser

25 145

150

155

26

【図面の簡単な説明】ag

【図1】この発明で用いる抗原のひとつを発現する組換えDNA『pQDPR16』の構造を示す模式図である。

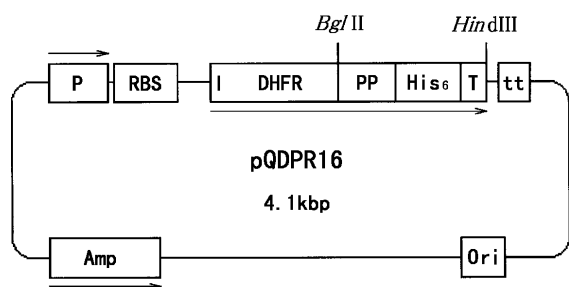
【図2】この発明で用いる別の抗原を発現する組換えDNA『pRS-hproIL18』の構造を示す模式図である。

【図3】この発明による抗体『mAb-proHuIL18#75』を用いる検出方法により、IL-18前駆体を選択的に検出する様子を示す図である。縦軸は、ペルオキシダーゼ反応後のウェル内の反応液の490nmにおける吸光度と650nmにおける吸光度の差を示す。横軸は、ウェルに添加したヒトIL-18前駆体（黒塗り四角、- -）又はヒトIL-18（黒塗り丸、- -）の濃度を示す。

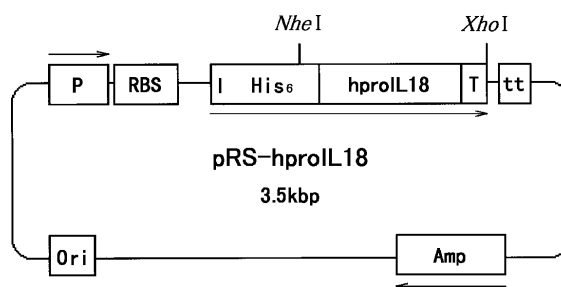
【符号の説明】

- \* P P ヒトIL-18前駆体における前駆ペプチド配列の一部をコードする領域
- hproIL18 ヒトIL-18前駆体をコードする領域
- His<sub>6</sub> (His)<sub>6</sub>タグをコードする領域
- I 開始コドン
- T 終止コドン
- DHFR マウスジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする領域
- P プロモーター
- Ori 大腸菌における複製起点
- Amp アンピシリン耐性遺伝子
- RBS リボゾーム結合部位
- tt 転写終結配列

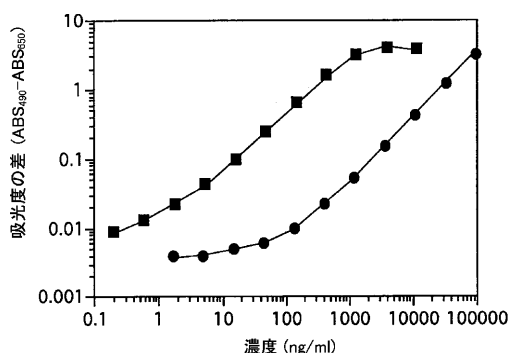
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 5/10  
C 1 2 P 21/02

識別記号

F I

C 1 2 P 21/08  
G 0 1 N 33/53

テマコード<sup>4</sup>(参考)

P

	21/08	C 0 7 K	14/54	
G 0 1 N	33/53	C 1 2 R	1:91)	
// C 0 7 K	14/54	(C 1 2 P	21/02	C
(C 1 2 N	5/10	C 1 2 R	1:91)	
C 1 2 R	1:91)	(C 1 2 P	21/08	
(C 1 2 P	21/02	C 1 2 R	1:91)	
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 N	15/00	Z N A C
(C 1 2 P	21/08		5/00	B
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 R	1:91)	

(72)発明者 栗本 雅司  
 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式  
 会社林原生物化学研究所内

专利名称(译)	针对白细胞介素18前体的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001204466A</a>	公开(公告)日	2001-07-31
申请号	JP2000349160	申请日	2000-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社林原生物化学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社林原生物化学研究所		
[标]发明人	栢野 徹 谷口 睦子 山内 宏 栗本 雅司		
发明人	栢野 徹 谷口 睦子 山内 宏 栗本 雅司		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P31/12 C07K14/54 C07K16/24 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/91		
CPC分类号	Y02A50/412 Y02A50/58		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/12 C07K16/24 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/53.P C07K14/54 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA26 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG03 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC02 4C085/CC11 4C085/DD33 4C085/DD34 4C085/DD35 4C085/DD36 4C085/DD38 4C085/DD41 4C085/DD43 4C085/DD72 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA15 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/EA61 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA21 4H045/GA30		
优先权	1999324860 1999-11-16 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

解决的问题：提供一种与IL-18前体选择性免疫反应的抗体及其生产方法和用途。可从温血动物获得的白介素18特异性抗体，该动物用含有白介素18前体的部分或全部氨基酸序列和白介素18前体的多肽免疫。抗体的制造方法，其包括用包含上述氨基酸序列的一部分或全部的多肽对温血动物进行免疫的步骤以及该抗体的用途，包括检测IL-18前体的方法及其纯化方法。解决它。

【図3】

