

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4744763号
(P4744763)

(45) 発行日 平成23年8月10日(2011.8.10)

(24) 登録日 平成23年5月20日(2011.5.20)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/66 G
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 48/00

請求項の数 28 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-561349 (P2001-561349)	(73) 特許権者	591091353
(86) (22) 出願日	平成13年2月20日 (2001.2.20)		イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2003-523403 (P2003-523403A)		YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LIMITED
(43) 公表日	平成15年8月5日 (2003.8.5)		イスラエル国、レホボト、ピーオー ボックス 95 (番地なし)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/001867	(74) 代理人	100098464
(87) 国際公開番号	W02001/062285		弁理士 河村 洵
(87) 国際公開日	平成13年8月30日 (2001.8.30)	(74) 代理人	100149630
審査請求日	平成20年1月22日 (2008.1.22)		弁理士 藤森 洋介
(31) 優先権主張番号	00103590.6	(74) 代理人	100154449
(32) 優先日	平成12年2月21日 (2000.2.21)		弁理士 谷 征史
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	00103597.1		
(32) 優先日	平成12年2月21日 (2000.2.21)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-18阻害剤の用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

慢性肝傷害の治療および/または予防用医薬の製造における、IL-18に対する抗体およびIL-18結合タンパク質からなる群より選択されるIL-18阻害剤の使用であって、該慢性肝傷害がアルコール性肝炎である使用。

【請求項2】

前記IL-18抗体がヒトに適応させたIL-18抗体である請求項1記載の使用。

【請求項3】

前記IL-18抗体がヒトIL-18抗体である請求項1記載の使用。

【請求項4】

前記IL-18結合タンパク質がペギレーションされている請求項1記載の使用。

【請求項5】

前記IL-18結合タンパク質が、免疫グロブリンの全てまたは一部と融合されたIL-18結合タンパク質を含む融合タンパク質であって、IL-18と結合する融合タンパク質である、請求項1記載の使用。

【請求項6】

前記融合タンパク質が免疫グロブリンの定常領域の全てまたは一部を含む請求項5記載の使用。

【請求項7】

前記免疫グロブリンがIgG1またはIgG2アイソタイプである請求項6記載の使用

10

20

。

【請求項 8】

前記医薬がさらにインターフェロンを含有する請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

前記インターフェロンがインターフェロン - である請求項 8 記載の使用。

【請求項 10】

前記 IL - 18 阻害剤がインターフェロンと同時に、連続的にまたは別々に用いられる請求項 8 または 9 記載の使用。

【請求項 11】

前記医薬がさらに腫瘍壊死因子 (TNF) アンタゴニストを含有する請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 12】

前記 TNF アンタゴニストが T B P I および / または T B P I I である請求項 11 記載の使用。

【請求項 13】

前記 IL - 18 阻害剤および / または前記インターフェロンが、TNF アンタゴニストと同時に、連続的にまたは別々に用いられる、請求項 11 または 12 記載の使用。

【請求項 14】

前記医薬がさらに COX 阻害剤を含有する請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の使用

。

【請求項 15】

前記 COX 阻害剤が COX - 2 阻害剤である請求項 14 記載の使用。

【請求項 16】

前記 IL - 18 阻害剤が、約 0 . 0001 から 10 mg / 体重 kg、または約 0 . 01 から 5 mg / 体重 kg、または約 0 . 1 から 3 mg / 体重 kg、または約 1 から 2 mg / 体重 kg の量で使用される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 17】

前記 IL - 18 阻害剤が、約 0 . 1 から 1000 μ g / 体重 kg、または約 1 から 100 μ g / 体重 kg、または約 10 から 50 μ g / 体重 kg の量で使用される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 18】

前記 IL - 18 阻害剤が皮下に投与される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 19】

前記 IL - 18 阻害剤が筋肉内に投与される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 20】

前記 IL - 18 阻害剤が毎日投与される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の使用

。

【請求項 21】

前記 IL - 18 阻害剤が 1 日おきに投与される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 22】

慢性肝傷害の治療および / または予防用医薬の製造における、IL - 18 結合タンパク質をコードする配列を含む発現ベクターの使用であって、該慢性肝傷害がアルコール性肝炎である使用。

【請求項 23】

遺伝子治療のための請求項 22 記載の使用。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

慢性肝傷害の治療および/または予防用医薬の製造における、IL-18阻害剤を産生するように遺伝的に改変された細胞の使用であって、該IL-18阻害剤がIL-18に対する抗体およびIL-18結合タンパク質からなる群より選択され、該慢性肝傷害がアルコール性肝炎である使用。

【請求項25】

IL-18阻害剤を含む慢性肝傷害の治療用医薬組成物であって、該IL-18阻害剤がIL-18に対する抗体およびIL-18結合タンパク質からなる群より選択され、該慢性肝傷害がアルコール性肝炎である医薬組成物。

【請求項26】

さらにインターフェロンを含む請求項25記載の医薬組成物。

10

【請求項27】

さらにTNFアンタゴニストを含む請求項25または26記載の医薬組成物。

【請求項28】

さらにCOX-2阻害剤を含む請求項25～27のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、さまざまな病的な状況におけるIL-18阻害剤の治療適用に関する。さらに詳しくは、本発明は関節炎の治療および/または予防、肝疾患の治療および/または予防、ならびに炎症性の腸疾患(IBD)の治療および/または予防に関する。

20

【0002】

[発明の背景]

1989年に、マウスの脾臓細胞から得られるインターフェロン-(IFN-)を誘導する、エンドトキシン誘導血清の活性が記載された(Micallef et al., 1996)。この血清の活性はIFN-の直接的な誘導物質として作用するのではなく、むしろIL-2またはマイトジェンといっしょに共刺激剤として作用する。ポスト-エンドトキシンマウス血清から活性を精製しようとしたところ、おそらく均質の50~55kDaのタンパク質であることが示された。ほかのサイトカインがIFN-産生に対して共刺激剤として働くことができるため、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6またはTNFに対する中和抗体で血清活性の中和を試みたが失敗に終わったことで、該タンパク質は異なる因子であると示唆された。1995年に同科学者らによって、IFN-産生に対するエンドトキシンによって誘導される共刺激剤は、P.アクネス(P. acnes)によってあらかじめ調整されたマウス由来の肝臓の抽出物内に存在することが証明された(Novick et al., 1992)。このモデルにおいて肝臓のマクロファージ数(クッパー細胞)は増加し、バクテリアのリポ多糖(LPS)の低い投与量(あらかじめ調整されていないマウスでは致死ではない)が、これらマウスにおいては致死量であった。IFN-誘導因子(IGIF)と名づけられ最近インターロイキン-18(IL-18)と呼ばれるその因子が、P.アクネス処理されたマウスの肝臓1200グラムから均質物に精製された。精製されたIL-18のアミノ酸配列に基づき得られた変性オリゴヌクレオチドは、マウスIL-18cDNAをクローン化するために使用された(Novick et al., 1992)。IL-18は

18~19kDaの157アミノ酸からなるタンパク質で、データベースに掲載されるどのペプチドとも明らかに類似性がなかった。IL-18およびインターロイキン-12(IL-12)のメッセンジャーRNAは、クッパー細胞および活性化マクロファージにおいて容易に検出された。組換えIL-18は、おそらく別の経路を介し、IL-12よりもより強力にIFN-を誘導するようである(Novick et al., 1992)。エンドトキシンによって誘導される血清活性と同様に、IL-18は単独ではIFN-を誘導しないが、主にマイトジェンまたはIL-2との共刺激剤として機能する。IL-18は、おそらくIL-2に依存した経路を介してT細胞の増殖を促進し、インビトロにおいてTh1サイトカイン産生を促進し、そして増強されたIFN-産生に関してはIL-12を組み合わせた場合に相乗作用を示す(Maliszewski et al., 1990)。

30

40

50

【0003】

マウスIL-18の中和抗体は、あらかじめP.アクネスで調整されたマウスの低い投与量のLPSによる致死を予防することが示された。このほかにも、あらかじめ調整されたマウスにおけるLPS致死性のメディエーターとしてのIFN- γ の重要性について報告された。たとえば、抗IFN- γ 中和抗体は、シュワルツマン様ショック (Shwartzman-like shock) からマウスを保護する (Fantuzzi et al., 1998)、そしてガラクトサミン処理されたIFN- γ 受容体欠損マウスは、LPSによって誘導される死に対して耐性である (Byrn, 1990)。したがって、マウスIL-18の中和抗体が、P.アクネスであらかじめ調整されたマウスを致死のLPSから保護することは予想されていなかった (Novick et al., 1992)。抗マウスIL-18処理もまた、深刻な肝臓細胞毒性から生存マウスを保護する。

10

【0004】

マウスのフォームがクローニングされた後、IL-18に対するヒトcDNA配列が1996年に報告された (Okamura et al., 1995)。組換えヒトIL-18は天然のIL-18活性を示す (Okamura et al., 1995)。ヒト組換えIL-18は、ヒトT細胞における直接的なIFN- γ 誘導活性はないが、IFN- γ およびほかのT-ヘルパー細胞1 (Th1) サイトカイン産生のための共刺激剤として作用する (Okamura et al., 1995)。今まで、IL-18は、主にTh1サイトカイン産生のための共刺激剤として (IFN- γ 、IL-2および顆粒細胞マクロファージコロニー刺激因子) (Izaki, 1978)、およびマウスナチュラルキラー細胞クローンのFASリガンドに仲介される細胞毒性のための共刺激剤として (Novick et al., 1992) 考えられている。

20

【0005】

影響を受けた組織からIL-18をクローニングし、IL-18遺伝子発現を研究することによって、自己免疫疾患とこのサイトカインとの詳細な関連性が見出された。肥満でない糖尿病 (non-obese diabetic) (NOD) のマウスは、シクロホフスアミドの単独注射によって促進および同時進行され得る、自己免疫インスリン炎および糖尿病に自然に進行する。IL-18 mRNAは、初期段階のインスリン炎のNODマウスのすい臓における逆転写PCRによって明らかにされた。IL-18のmRNAのレベルは、シクロホフスアミドの処理後、IFN- γ のmRNAの増加に先だって急激に増加し、糖尿病を発症した。興味深いことに、それらの動力学はIL-12-p40のmRNAの動力学と似ており、個々のmRNAレベルは密接に相関する。すい臓RNA由来のIL-18cDNAのクローニングについて配列決定により、クッパー細胞およびインビボにおける活性化前のマクロファージからクローニングされたIL-18配列との同一性が明らかになった。また、NODマウスのマクロファージは、シクロホフスアミドに反応してIL-18遺伝子を発現したが、並行して処理されたBalb/cマウス由来のマクロファージでは反応しなかった。したがって、IL-18発現は、自己免疫NODマウスにおいて異常に調節され、糖尿病発症に密接に関連している (Novick et al., 1992)。

30

【0006】

IL-18は、Th1細胞におけるFasリガンドの機能的活性を増大させることによる免疫調節または炎症性において潜在的な役割を担っている (Conti et al., 1997)。IL-18はまた、副腎皮質において発現され、したがって、ストレスのある経験につづく免疫系を調節する際に重要役割を担う分泌型の神経-免疫調節剤であり得る (Chater, 1986)。

40

【0007】

インビボにおいて、IL-18は、IL-18前駆体の切断によって形成され、その内因性の活性はP.アクネスおよびLPSに仲介される致死性におけるIFN- γ 産生を説明するように思われる。成熟IL-18は、IL-1変換酵素 (IL-1ベータ-変換酵素、ICE、カスパーゼ-1) によって、その前駆体から産生される。

【0008】

IL-18受容体は、リガンドの結合において共作用する、少なくとも2つの成分からな

50

る。IL-18に対する高親和性および低親和性の結合部位がマウスIL-12に刺激されるT細胞において見出され(Yoshimoto et al., 1998)、多鎖受容体複合体(multiple chain receptor complex)であることが示唆される。2つの受容体サブユニットはこれまでに同定され、どちらもIL-1受容体ファミリーに属している(Parnet et al., 1996)。IL-18のシグナルトランスダクションはNF- κ Bの活性化を含む(DiDonato et al., 1997)。

【0009】

いくつかの既知のサイトカイン結合タンパク質は、可溶性のサイトカイン受容体であり、それらのそれぞれの細胞表面サイトカイン受容体の細胞外リガンド結合ドメインに相当する。それらは、細胞表面受容体に共通したmRNA前駆体の選択的スプライシング、または細胞表面受容体のタンパク質分解性切断のどちらかによって得られる。今までに、このような可溶性受容体は記載されており、とくに、IL-6およびIFN- γ の可溶性受容体(Nakamura et al., 1989)、TNFの可溶性受容体(Dao et al., 1996; Engelmann et al., 1989)、IL-1およびIL-4の可溶性受容体(John, 1986)、IFN- γ /IL-6の可溶性受容体(Mizushima and Nagata, 1990)などを含む。オステオプロテグリン(Osteoprotegerin)(OPG、破骨細胞阻害因子-OCIFとしても知られる)と呼ばれTNFR/Fasファミリーのメンバーである1つのサイトカイン結合タンパク質は、分泌タンパク質としてのみ存在する可溶性受容体の最初の例であると思われる(Anderson, 1997; Bollon, 1980)。

【0010】

最近、IL-18に高い親和性を有する可溶性タンパク質がヒトの尿から単離され、ヒトおよびマウスのcDNAが記載された(Novick et al., 1999; 国際公開第99/09063号パンフレット)。そのタンパク質はIL-18結合タンパク質(IL-18BP)と呼ばれている。

【0011】

IL-18BPは、既知のIL-18受容体の1つの細胞外ドメインではないが、分泌され、通常循環しているタンパク質である。IL-18BPは、分泌タンパク質の新しいファミリーに属する。さらに、そのファミリーは、IL-18BPに高い相同性を有し、ポックスウイルスにコードされるいくつかのタンパク質を含む(Novick et al., 1999)。IL-18BPは脾臓において構成的に発現され、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、IL-1の2型受容体にわずかな相同性を有する。IL-18BPの遺伝子はヒト染色体の11q13に位置し、8.3kbのゲノム配列中において膜貫通ドメインをコードするエクソンは見つかっていない(Novick et al., 1999)。

【0012】

ヒトにおいて4つ、マウスにおいて2つのIL-18BPのアイソフォームは、mRNAスプライシングによって得られ、さまざまなcDNAライブラリーにおいて見出されており、そして発現され、精製され、ついて結合およびIL-18の生物学的活性の中和に対して評価されてきた(Kim et al., 2000)。ヒトIL-18BPのアイソフォームa(IL-18BP a)は、急速な吸着速度、遅い離脱速度、および399 pMの解離定数(K(d))を有し、最も高いIL-18への親和性を示した。IL-18BP cは、29のC末端アミノ酸を除くIL-18BP aのIgドメインを有し; IL-18BP cのK(d)は、10倍低い(2.94 nM)。それにもかかわらず、IL-18BP aおよびIL-18BP cは、2つのモル過剰により、95%を超えるIL-18を中和する。IL-18BP bおよびIL-18BP dアイソフォームは、完全なIgドメインを欠き、IL-18に対する結合能力または中和能力を欠く。マウスのIL-18BP cおよびIL-18BP dのアイソフォームは同一のIgドメインを有し、また、2つのモル過剰により、95%を超えるマウスIL-18を中和する。しかしながら、ヒトIL-18BP aとの共通したC末端モチーフを有するマウスIL-18BP dはまた、ヒトIL-18を中和する。分子モデルは、IL-18BPのIgドメインにおいて、多数の混合された静電気性および疎水性の結合部位を同定し、そのリガンドとの結合に対する高い親和性を説

10

20

30

40

50

明した (Kim et al., 2000)。

【 0 0 1 3 】

最近、インターロイキン 18 は、エンドトキシンショック、肝炎および自己免疫糖尿病を含む慢性炎症疾患における発病の進行に関連することが示唆された (Kahiwamura and Okamura, 1998)。実験から得られた、肝傷害の発症において IL - 18 が役割を果たす可能性の指摘は、ツジらによって公開され (Tsuji et al., 1999)、マウスモデルのリポ多糖で誘導される急性肝傷害において IL - 18 レベルが上昇することが示された。しかしながら、肝傷害の発症において、多機能な因子である IL - 18 のメカニズムは、今までに明らかにされていない。

【 0 0 1 4 】

肝臓の損傷または傷害は、さまざまな原因を有する。それは、たとえばウイルスまたは細菌の感染、アルコール乱用、免疫疾患あるいはガンが原因となり得る。

【 0 0 1 5 】

たとえば B 型肝炎ウイルス、および C 型肝炎ウイルスによるウイルス性肝炎は、世界中の多くの人々をさいなます、対処が不十分な疾患である。既知の肝炎ウイルスの数は絶えず増加している。B 型および C 型肝炎ウイルスのほかに、ウイルスが関連する肝炎を引き起こす少なくとも 4 つのほかのウイルスが今までに発見されており、それらは A 型、D 型、E 型および G 型肝炎ウイルスと呼ばれている。

【 0 0 1 6 】

アルコール性肝疾患は、慢性のアルコール消費に関連したもう 1 つの広範に存在する疾患である。免疫肝炎は充分に対処されていない稀な自己免疫疾患である。肝傷害にはまた、胆管の損傷も含まれる。原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は、肝臓内の胆管の破壊によって特徴付けられる自己免疫性肝疾患である。

【 0 0 1 7 】

アルコール性肝炎、肝硬変、ウイルス性肝炎および原発性胆汁性肝硬変などの、疾患による肝臓の損傷が T ヘルパー細胞 1 (Th1) 応答に関連することを、いくつかの研究が証明した。1 つの研究において、新しい肝傷害モデルは、オボアルブミン含有リポソームの標的を肝臓にすることにより、続くオボアルブミン特異的 Th1 細胞の選択的な移動によって、マウスで確立されたオボアルブミン含有リポソームと Th1 細胞の移動との組み合わせによるマウスの処理によって、血清 IFN - γ レベルの上昇と並行して血清トランスアミナーゼ活性の増加が引き起こされる。きわめて対照的に、オボアルブミン特異的 Th2 細胞の移動によって血清 IL - 4 レベルの上昇が起こるが、肝傷害は誘導されない。肝傷害は、抗 IFN - γ 抗体および抗腫瘍壊死因子 (TNF) - α 抗体によって妨害された。これらの調査結果は、Th1 細胞が急性肝傷害における主要なエフェクター細胞であることを示す (Nishimura and Ohta, 1999)。ほかの一連の研究において、IFN - γ を過剰に発現するマウスは、何の病原体またはほかの刺激もなしに、自然に肝炎を示すことが明らかになった (Okamoto et al., 1998)。

【 0 0 1 8 】

ほかの研究は、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における Th1 応答の関わりを示した。PBC は肝臓内胆管の破壊によって特徴づけられる自己免疫性肝疾患である。一般に、とくに T 細胞を含む細胞の免疫メカニズムによって、この胆管の損傷が引き起こされると思われる。Th1 応答および Th2 応答の相関強度は、さまざまな自己免疫疾患の疾病生理学 (pathophysiology) において重要な因子であることが最近提唱されている。本研究では、2 つの T 細胞のサブセットに特異的なサイトカインの検出、すなわち Th1 細胞に対する INF - γ および Th2 細胞に対する IL - 4 の検出によって、PBC におけるサブセットのバランスを評価した。PBC 患者 18 人および慢性活動性 C 型肝炎、肝臓外胆汁閉塞を含むコントロール疾患患者 35 人ならびに正常な肝臓から得られた肝臓切片において、INF - γ および IL - 4 メッセンジャー RNA (mRNA) 陽性細胞が、非放射性インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学を用いて数えられた。INF - γ および IL - 4 の mRNA を発現する単核細胞は、PBC の肝臓における炎症性の門

10

20

30

40

50

脈管に密集したが、肝臓外胆汁閉塞、アルコール性線維症 (alcoholic fibrosis) または正常の肝臓切片では稀にしか存在しなかった。コントロールの肝臓と比較して、PBCの肝臓におけるIFN- γ およびIL-4のmRNA陽性細胞が顕著に多数検出された (P < 0.01)。さらに、PBCの肝臓において、IFN- γ のmRNA発現はIL-4発現と比較してより共通して検出され、IFN- γ のmRNA発現レベルは、門脈の炎症活性の程度とより密接に相関した。IFN- γ のmRNA陽性細胞は、リンパの密集によって覆われた損傷のある胆管のいたるところで主に検出された。そのデータは、Th1細胞がPBCのリンパの浸潤において、より重要なT細胞サブセットであることを示す (Hara et al., 1997)。

【0019】

ウイルス抗原認識におけるサイトカインのパターンはまた、ウイルス感染の解消およびウイルス排除において大きな影響を及ぼすものと思われる。ある研究において、Th2型応答に対するサイトカインの不均衡性は慢性B型肝炎における役割を担うのかどうか調べられた。慢性B型肝炎に関連する抹消血単核細胞のサイトカインの特徴は、RT-PCRによって解析された。B型肝炎表面抗原 (HbsAg) 刺激を受けて、IFN- γ 、IL-2、IL-4およびIL-10の発現は、それぞれ41%、8%、41%および50%の患者において検出された。それらのサイトカインの中でも、Th1のサイトカインIFN- γ の発現は、肝傷害の典型的なマーカーに相当する高レベルの血清AST/ALT (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ/アラニンアミノトランスフェラーゼ) に関連していた。Th2型サイトカインは、肝細胞に対して保護効果を発揮することは示されていない。つまり、HbsAg反応細胞によるTh1サイトカイン、IFN- γ の産生は、慢性B型肝炎における肝細胞損傷に関連していた (Lee et al., 1999)。高レベルのFASリガンドおよびその受容体 (CD95) は、B型肝炎の患者の肝臓において報告されている (Luo et al., 1997)。FASリガンドは、肝細胞アポトーシスを導く主な細胞毒性薬剤の1つであると考えられる。

【0020】

ほかの研究により、C型肝炎ウイルス/RNA (HCV/RNA) 陽性の何の処置も受けていない30人の慢性肝炎患者において、肝傷害の増加に関連する因子が同定された。壊死炎症性および構造上の損傷は、イスハック採点 (Ishak's score) を用いて評価された。活性化肝星状細胞 (HSC) は、 α -平滑筋アクチン (SMA) に対する免疫組織化学により視覚化され、モルフォメトリー (morphometry) により定量化された。血漿HCV/RNAは競合的RT-PCR法を用いて評価された。肝傷害の進行に関する免疫応答のタイプを研究するために、IFN- γ 陽性細胞 (Th1様応答の発現など) は、免疫組織化学的に評価され、モルフォメトリーにより定量化された。HSCは主に小葉の壊死炎症の領域近くまたは線維症の中隔の内壁に近い部分で検出されることが明らかになった。

SMA陽性およびシリウスレッド陽性実質 (Sirius Red-positive parenchyma) は、壊死炎症性および構造上の採点に顕著な相関関係があった。IFN- γ 陽性細胞は炎症性浸潤に関連する門脈周囲の部分で検出され、構造上の損傷に顕著に相関関係があった。したがって、HSC活性化および肝傷害の進行は、Th1様応答に関連していることが考えられた (Baroni et al., 1999)。B型肝炎の場合と同様に、FASリガンドおよびその受容体は、C型肝炎の患者の肝臓および血清において見出された (Hiramatsu et al., 1994; Okazaki et al., 1996; Lio et al., 1998)。

【0021】

Th1サイトカインおよびほかのTh1標識は、アルコール性肝炎および肝硬変に関連していることが明らかにされた。炎症性刺激および脂質の酸化 (lipid peroxidation) は、核因子 B (NF- κ B) を活性化させ、前炎症性の (proinflammatory) サイトカインおよびケモカインをアップレギュレーションさせる。ある研究において、病的な肝傷害、内毒血症、脂質の酸化およびNF- κ B活性化ならびに前炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインとの不均衡性のあいだの関係について評価された。ラット (各群5匹) は、エタノールと、ヤシ油、トウモロコシ油または魚油といった飽和脂肪を含有する制限食を

10

20

30

40

50

胃内注入によって与えられた。コントロールラットにおいては、エタノールの代わりに等カロリーのデキストロースとした。脂質の酸化、NF- κ Bならびに前炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、INF- γ およびIL-12)、C-Cケモカイン(活性を調節され、正常T細胞で発現および分泌される[RANTES]、単球走化性タンパク質[MCP]-1、マクロファージ炎症性タンパク質[MIP]-1)、C-X-Cケモカイン(サイトカインによって誘導される好中球化学性誘引物質[CINC]、MIP-2、IP-10および上皮好中球活性化タンパク質[ENA]-78)、および抗炎症性サイトカイン(IL-10、IL-4およびIL-13)のメッセンジャーRNA(mRNA)レベルについて、病的解析が行なわれ、エンドトキシンの測定が行なわれた。NF- κ Bの活性化ならびに前炎症性サイトカインC-CおよびC-X-Cケモカインの上昇した発現は、壊死炎症性の傷害を示すラットにおいて見られた(魚油-エタノールおよびトウモロコシ油-エタノール)。それらの群はまた、エンドトキシンおよび脂質の酸化において最も高いレベルを有した。IL-10およびIL-4のmRNAのレベルは炎症性肝傷害を示す群においてより低かった。したがって、NF- κ Bの活性化は前炎症誘発刺激が存在すると起こり、Th1前炎症性サイトカインおよびケモカインの発現増加を生じる(Naji et al., 1999)。FASリガンドおよびその受容体はまた、アルコール性肝傷害において増加したため、Th1サイトカインがアルコール性肝炎において誘導される自己免疫作用に関連することが再び示唆された(Galle et al., 1995; Taieb et al., 1998; Fiore et al., 1999)。

10

【0022】

TNF- α はまた、アルコールが関連した肝臓の壊死炎症の発病における通常の経路として明らかにされた。肝臓および血清のTNFの上昇したレベルは、アルコール性肝疾患の動物モデルおよびヒトアルコール性肝疾患において証拠が提供された。この異常調節されたTNF代謝は、多くの代謝の合併症およびアルコール性肝疾患からなる肝傷害で役割を担うことが仮定される(Grove et al., 1997; McClain and Cohen, 1989)。たとえば、ある研究において、アルコール性肝炎の患者が(平均、26.3 ng/L; 95% CI、21.7から30.9)、正常な被験者(6.4 ng/L; CI、5.4から7.4)よりも高いTNF- α レベルを有することが明らかにされた。後に死亡した患者(34.7 ng/L; CI、27.8から41.6)は、生存者(16.6 ng/L; CI、14.0から19.2)よりも高いTNF- α レベルを有していた。アルコール性肝炎の患者において、TNF- α レベルは血清ビリルビン($r=0.74$ 、 $P=0.0009$)および血清クレアチニン($r=0.81$ 、 $P=0.0003$)に正の相関関係を有していた。アルコール性肝炎の患者は、非活動性アルコール性肝硬変の患者(11.1 ng/L; CI、8.9から13.3)、および肝疾患ではない重症アルコール中毒患者(6.4 ng/L; CI、5.0から7.8)よりも、高いTNF- α レベルを有していた。腎臓機能が異常な患者は、アルコール性肝炎の患者よりも低いTNF- α レベルを有していた(14.1 ng/L; CI、5.4から22.8)。したがって、アルコール性肝炎におけるTNF- α の上昇は、深刻な状態において最も顕著であると考えられ、TNF- α は病原体として作用することが示唆された(Bird et al., 1990)。

20

30

【0023】

TNFはエンドトキシンの多くの生物学的な作用を仲介する。最近の研究により、TNF投与により肝傷害が引き起こされること、および、TNFが肝臓毒素ガラクトサミンの致死性を仲介することが明らかにされた。最も有力なTNF誘導物質は、エンドトキシンである。アルコール性肝疾患の患者はしばしば内毒血症を有しており、また多くのアルコール性肝炎の臨床的な徴候はTNFの生物学的な作用であることが知られているため、TNFの活性がアルコール性肝炎の患者において評価された。主なTNF産生源である抹消血単球からの基礎的およびリポ多糖により刺激されるTNF放出は、アルコール性肝炎の16人の患者および健康な16人のボランティアにおいて測定された。アルコール性肝炎の患者16人のうち8人、および健康なボランティア16人のうち2人が、検出可能な自然発生的なTNF活性を有した(p は0.05以下)。リポ多糖での刺激後、アルコール性

40

50

肝炎の患者由来の平均的な単球 T N F 放出は、健康なコントロールの単球 T N F 放出に比べて 2 倍以上顕著に増加した (1 m l 当たり 2 5 . 3 + / - 3 . 7 対 1 0 . 9 + / - 2 . 4 ユニット、 p は 0 . 0 0 5 以下) 。したがって、アルコール性肝炎の患者由来の単球は、健康なボランティア由来の単球と比較して、自然発生的にもリポ多糖刺激によっても T N F 放出を顕著に上昇させることが考察された (McClain and Cohen, 1989) 。

【 0 0 2 4 】

リポ多糖 (L P S) 結合タンパク質 (L B P) および C D 1 4 は、エンドトキシンによる細胞の活性化において鍵となる仲介の役割を担う。消化管由来の L P S は、アルコール性肝疾患において病的な肝傷害を促進させる働きがあると仮定されている。エタノールを含む油を 4 週間胃内に与えられたラットにおいて、そのマウスのクッパー細胞および肝細胞それぞれでの C D 1 4 および L B P のレベルが上昇したことが証明された。また、C D 1 4 の m R N A の発現についても、無髄の細胞において上昇した。促進された L B P および C D 1 4 の発現は、L P S に誘導されるさまざまな前炎症性サイトカインの発現を急激に上昇させ、アルコール性肝傷害における病的な肝傷害の存在と相関関係を有する (Su et al., 1998; Lukkari et al., 1999) 。

10

【 0 0 2 5 】

関節炎は、関節の炎症からなる疾患である。その関節は、腫脹、コリ、圧痛、赤みまたは熱っぽさ (warmth) を示す。その前兆は、体重減少、発熱または虚弱によって表れる。それらの徴候が 2 週間以上続くとき、炎症性関節炎たとえば慢性関節リウマチがその原因であり得る。関節の炎症はまた、感染によっても引き起こされ、それは敗血性関節炎 (septic arthritis) を誘発する。関節炎の最も一般的なタイプは、進行性の関節疾患 (骨関節炎) である。

20

【 0 0 2 6 】

関節炎および関連する病気に対して一般的に処方される医薬は、非ステロイド性抗炎症薬 (N S A I D s) である。N S A I D s はアスピリンおよびアスピリン様薬剤を含む。それらは、関節痛、関節のコリおよび腫脹を引き起こす炎症を押さえる。しかしながら、N S A I D s は、胃の出血を含む多くの副作用を有する非特異的な薬剤である (フレデリック マトソン (Frederick Matsen) (会長) 、関節炎に関するワシントン大学の整形外科科学科のホームページ、www.orthop.washington.edu) 。 N S A I D s に加えて、C e l e b r e x (登録商標) 、シクロオキシゲナーゼ (C O X - 2) 阻害剤は、成人の骨関節炎および慢性関節リウマチの徴候および前兆を緩和させるために使用される。それは家族性腺腫様ポリポシスの患者の治療用にも指示されている。

30

【 0 0 2 7 】

国際公開第 0 1 / 0 0 2 2 9 号パンフレットには、炎症の治療のための腫瘍壊死因子 (T N F) アンタゴニストと C O X - 2 阻害剤との組み合わせが記載されている。

【 0 0 2 8 】

T N F アンタゴニストはまた、関節炎の治療のためにも使用される。T N F アンタゴニストは、たとえば国際公開第 9 1 0 3 5 5 3 号パンフレットに記載されている。

【 0 0 2 9 】

最近の研究は、インターロイキン I L - 1 8 が関節の代謝において前炎症性の役割を果たすことを示す。オリーら (Olee et al) (1999) は、I L - 1 8 が関節の軟骨細胞によって産生され、炎症前応答および分解代謝の応答を誘導することを示した。I L - 1 8 の m R N A は、軟骨細胞の I L - 1 によって誘導される。軟骨細胞は、I L - 1 8 前駆体を産生し、I L - 1 刺激に応答して成熟した形の I L - 1 8 を分泌した。軟骨細胞における I L - 1 8 の効果についての研究によって、さらに、I L - 1 8 が T N F - によって誘導された増殖を阻害し、酸化窒素産生を促進させることが示された。I L - 1 8 は、正常なヒトにおける関節の軟骨細胞において、誘導性の酸化窒素合成、誘導性のシクロオキシゲナーゼ、I L - 6 およびストロメライシンを含むいくつかの遺伝子の発現を刺激した。遺伝子発現は、対応するタンパク質の合成に関連していた。I L - 1 8 による正常なヒトの関節軟骨の処理は、グリコサミノグリカンの放出を上昇させた。これらの調査結果は、

40

50

軟骨細胞応答を調節し、かつ軟骨の分解に関与するサイトカインとしてIL-18を認定した。

【0030】

ヒトの骨関節炎組織におけるインターロイキン-1-変換酵素(ICE)/カスパーゼ-1の局在ならびにインターロイキン-1ベータおよびインターロイキン-18の成熟におけるその役割は、サハラ(Saha et al)によって明らかにされた(1999)。サハラは、正常および骨関節炎(OA)のヒト軟骨および滑膜におけるカスパーゼ-1の発現および産生について研究し、軟骨細胞のアポトーシスだけでなく、ICE、インターロイキン-1(IL-1)およびIL-18の局所解剖的な分布との関係について調べた。この研究において行なわれた実験によって、ICEはヒトの滑膜および軟骨のどちらでも発現され合成されることが、正常組織よりもOA組織において研著に多量の染色陽性細胞により明らかにされた。ICE産生は優先的に関節の軟骨の表面および中間より上部の層に位置していた。OAの軟骨移植片および軟骨細胞における成熟IL-1ベータの産生は、IL-18陽性細胞の数をも著しく減少させる、特異的なICE阻害剤による処理によって完全に妨害される。活性IL-1ベータとICEとの関係は、ICEが前炎症性サイトカインを活性化することによってOAの進行を促進させること、およびIL-18が軟骨の病状に役割を担うことが示唆される。

10

【0031】

グラシーら(Gracie et al)(1999)は、慢性関節リウマチにおけるIL-18の前炎症性作用を示唆した。グラシーらは、骨関節炎コントロールに比べて顕著に高いレベルで、慢性関節リウマチの滑膜組織内においてIL-18のmRNAおよびタンパク質を検出した。また、インビトロにおいて、IL-12またはIL-15と、IL-18との組み合わせによって、滑膜組織によるIFN- γ 産生が誘導されることが明らかにされた。さらに、コラーゲン/不完全フロイントアジュバントで免疫されたマウスにIL-18を投与することによって、侵食性の進行、炎症性関節炎が促進されたことから、IL-18はインビボにおいて前炎症性であることが示唆される。

20

【0032】

しかしながら、今まで、化学化合物のほかに、可溶性受容体またはモノクローナル抗体を用いたTNFおよびIL-1の妨害のみが、マウスのコラーゲン誘導性関節炎(CIA、慢性関節リウマチのためのマウスモデル)を押さえることを明らかにされていたため(Williams et al., 1994)、慢性関節リウマチに対する治療として考えられていた。

30

【0033】

「慢性または特発性の炎症性腸疾患」という用語は、少なくとも2つの症状、クローン病および潰瘍性結腸炎を含む。どちらも胃腸の管の疾患であり、クローン病は最も一般的には小腸を冒す。また、結腸をも含む場合、潰瘍性結腸炎からの鑑別診断(以下参照)は、問題となり得る。

【0034】

クローン病における慢性的な炎症および潰瘍化は、急性虫垂炎によく似た小腸閉塞または腹痛のどちらかでたいてい始まり、そのほかの呈示はその合併症に関連している可能性がある。その疾患の進行は慢性的であり、治療しているにもかかわらず、悪化と軽減があり得る。始まりはたいてい成人期初期であり、全体の約半分の場合が年齢20から30歳のあいだに始まり、90%が10から40歳のあいだである。

40

【0035】

顕微鏡検査によって、総体的な徴候が示される。炎症の関与は断続的であって、集中的または斑点状である。リンパ球および血漿細胞の堆積は、おもに粘膜および粘膜下層で見られるが、たいてい全ての層に影響する(経壁の炎症)。クローン病の典型的な顕微鏡検査による特徴は、カフのリンパ球によって囲まれた顆粒細胞の存在である。特発性の炎症性腸疾患の出現頻度は、かなり地理的に多様性が見られる。それらの疾患は、北ヨーロッパおよび米国の方が、南ヨーロッパ、アフリカ、南アメリカおよびアジアよりも出現率がより高いが、進行する都市化および繁栄は南ヨーロッパおよび日本の一部で高い出現率を導

50

いている（一般のおよび系統的な病理学、チャーチル リビングストーン (Churchill Livingstone)、第3版、2000年、JCE Underwood、Ed)。

【0036】

クローン病において、まず、発症から3年のあいだに疾患が継続的な緩解となる患者、2つめに3年以上疾患が持続する患者からなる、臨床的に主に2つの群がある。

【0037】

因果関係が何であっても、炎症性サイトカイン、とくにインターロイキン (IL) 1、2、6および8、インターフェロン (IFN) - α ならびに腫瘍壊死因子 (TNF) の産生が上昇したクローン病において、持続性ならびに不適当なT細胞およびマクロファージの活性化の証拠がある。クローン病は、腺維症に伴って持続的な (慢性の) 炎症によって特徴付けられている。繊維芽細胞の増殖およびコラーゲンの堆積の進行は、抗炎症作用、すなわち繊維芽細胞の供給、マトリックスの合成および炎症細胞のダウンレギュレーションを有するトランスフォーミング増殖因子 β によって仲介されるが、多くのほかのメディエーターが関与しているようである。

【0038】

潰瘍性結腸炎は、大腸に特有でない炎症性の疾患で、たいてい直腸で始まって、さまざまな程度で近辺に広がる。クローン病とは異なり、潰瘍性結腸炎は大腸に限られる。

【0039】

潰瘍性結腸炎は変化した自己免疫反応の結果であるが、粘膜傷害もまた不適当なT細胞の活性化ならびにマクロファージおよび好中球由来のサイトカイン、プロテアーゼおよび反応性酸素代謝物によって受けた間接的な損傷により生じることを示す増大する証拠がある。結腸上皮に対する後者の損傷のメカニズムは、「ただの通りすがりの (innocent bystander)」損傷と呼ばれる。自己免疫に対する証拠は、結腸上皮細胞および内皮細胞に対して向けられた自己反応性のTリンパ球および自己抗体ならびに抗好中球細胞質自己抗体 (ANCA) の存在である。しかしながら、潰瘍性結腸炎は、粘膜傷害が自己抗原に対する免疫学的反応の直接的な結果である自己免疫疾患として考えるべきではない (前述の一般のおよび系統的な病理学)。

【0040】

クローン病の治療に関して、ほとんどの人々はまず、炎症の制御を助ける物質メサラミンを含有する薬剤で治療される。その効果が得られない人またはそれに対して耐性のない人は、一般的に5-ASA剤として知られるほかのメサラミン含有薬剤を与えられる。メサラミン調合剤の可能性のある副作用は、吐き気、嘔吐、胸やけ、下痢および頭痛を含む。

【0041】

なかには、炎症を制御するためにコルチコステロイド類が処方される患者がいる。それらの薬剤は、活動性クローン病に対して最も効果があるが、感染に対するより強い感受性を含む深刻な副作用を引き起こし得る。

【0042】

免疫系を抑制する薬剤はまた、クローン病を治療するために使用される。6-メルカプトプリンおよび関連する薬剤アザチオプリンが、最も一般的に処方される。免疫抑制剤は炎症に貢献する免疫反応を妨害することによって働く。これらの薬剤は、吐き気、嘔吐および下痢のような副作用を引き起こし、感染に対するヒトの抵抗力を低下させ得る。患者がコルチコステロイド類および免疫抑制剤の組み合わせで治療される場合、コルチコステロイド類の投与量は、結局は低下され得る。いくつかの研究において、免疫抑制剤がコルチコステロイド類の有効性を増強させることが示唆されている。

【0043】

米国食品医薬品局 (The U.S. Food and Drug Administration) は、標準的な治療 (メサラミン物質、コルチコステロイド類、免疫抑制剤) が効かない中程度から重度までのクローン病の治療のため、および切開、排出フィステルからなる治療のために、インフリキシマブ (infliximab) という薬剤を是認している。クローン病において特別に初期治療として認められているインフリキシマブは、抗腫瘍壊死因子 (TNF) モノクローナル抗体で

10

20

30

40

50

ある。抗TNFは、TNFが腸に到達する前に血流からTNFを除去することによって、炎症を予防する。

【0044】

抗生物質は、狭窄病、フィステルまたは以前の手術によって引き起こされた、小腸における細菌の過剰増殖の治療に使用される。この一般的な問題は、医師が以下の抗生物質、アンピシリン、スルホンアミド、セファロスポリン、テトラサイクリンまたはメトロニダゾルの1つ以上処方することである。

【0045】

炎症が静まると、下痢および急激な腹痛はしばしば和らぐが、付加的な薬物治療もまた必要であり得る。ジフェノキシラート、ロペラミドおよびコデインを含む抗下痢剤のいくつかが使用され得る。下痢のために脱水状態の患者は、通常、流体および電解質で治療される。

10

【0046】

副作用が減少した、または理想的には副作用がほとんどない、炎症性腸疾患、とくにクローン病および潰瘍性結腸炎の治療ならびに/または予防に効果的な治療が依然として必要とされている。

【0047】

組織学的および免疫学的観察のどちらも、細胞が仲介した免疫性およびT細胞の活性化がCDの鍵となる特徴であることを示す。ヒトおよび実験モデルによる研究から、CDにおいて局所的な免疫応答は主にタイプはTh1である傾向にあること(Desreumaux et al., 1997)、およびIFN- γ 、IL-1 およびTNF- α などの局所的に放出されるサイトカインが炎症応答を促進し広げることに寄与すること(Reimund et al., 1996)が示唆される。

20

【0048】

サイトカインIL-18はサイトカインIL-12と共同して、IFN- γ の分泌を刺激し、ナチュラルキラー細胞の細胞毒性を促進し、TH1細胞の分化を刺激することによって、Th1が仲介する免疫応答において重要な役割を担う(Uschito et al., 1996)。

【0049】

IL-18はIL-12、IL-12、抗原、マイトジェンおよびほかに可能性のある因子と共に働き、IFN- γ の産生を誘導する。IL-18はまた、GM-CSFおよびIL-2の産生を増強し、抗CD3に誘導されるT細胞の増殖を強化し、そしてFasが仲介するナチュラルキラー細胞の殺傷性を上昇させる。成熟IL-18は、その前駆体からIL-1変換酵素(ICCE、カスパーゼ1)によって産生される。IL-18受容体は、リガンドの結合に共に働く、少なくとも2つの成分からなる。IL-18における高親和性および低親和性の結合部位が、マウスIL-12で刺激されたT細胞において見出され(Okamoto et al., 1998)、多鎖受容体複合体であることが示唆された。2つの受容体サブユニットは、これまで同定されておらず、どちらもIL-1受容体ファミリーに属する(Okamoto et al., 1999)。IL-18のシグナルトランスダクションは、NF- κ Bの活性化に関わる(Matsumoto et al., 1997)。

30

【0050】

最近、IL-18は炎症性腸疾患において何らかの影響を及ぼすことが示唆されている(Pizarro et al., 1999; Monteleone et al., 1999)。

40

【0051】

ピザローら(Pizarro et al)(1999年)は、結腸の標本においてIL-18の発現および局在を特徴づけ、クローン病の患者から粘膜細胞の群を単離した。半定量的RT-PCRプロトコルを使用することにより、潰瘍性結腸炎および炎症を起こしていないコントロールの患者に比べて、CDから新たに単離された腸の上皮細胞および粘膜固有層の単核細胞においてIL-18のmRNA転写産物が増加していることが明らかになった。IL-18のmRNA転写産物は、粘膜固有層の単核細胞よりも腸の上皮細胞においてより豊富であった。外科的に切除された結腸組織の免疫組織化学的解析は、腸の上皮細胞と同

50

様、粘膜固有層の単核細胞（とくに、マクロファージおよび樹状細胞）のどちらともIL-18を局在化した。ウエスタンブロット解析によって、組換えおよび成熟ヒトIL-18タンパク質と一致する18.3 kDaのバンドがCDおよびUCの腸粘膜バイオプシーにおいて主に見られ、不活性なIL-18前駆体と一致する24 kDaの第二のバンドが、CDおよびUCのバイオプシーから非炎症領域において検出され、非炎症コントロールにおいては単一の形が見られることが明らかになった。

【0052】

モンテレオンら (Monteleone et al) (1999) は、それらの調査結果を確認した。12人のクローン病患者および9人の潰瘍性結腸炎患者、ならびに炎症性腸疾患でないコントロール由来の、全粘膜腸組織および粘膜固有層の単核細胞について、半定量的RT-PCRおよびウエスタンブロット解析によってIL-18に関するテストを行なった。IL-18の転写産物は、テストされた全ての試料で見られた。しかしながら、潰瘍性結腸炎およびコントロールに比べて、クローン病の粘膜および粘膜固有層の単核細胞のどちらの試料においても、増加したIL-18のmRNAの蓄積が検出された。クローン病において、IL-18の転写産物は、関連している部分から採取された粘膜試料においてより豊富であった。成熟IL-18と一致する18 kDaのバンドは主にクローン病の粘膜試料において見られた。IBDでないコントロール由来の粘膜試料において、IL-18は24 kDaのポリペプチドとして存在していた。一貫して、活性IL-1ベータ変換酵素 (ICE) サブユニット (p20) は、CDかUC由来の試料のどちらかで発現しているが、IBDでないコントロール由来の結腸の粘膜において、ICEは前駆体 (p45) としてのみ合成されていた。

【0053】

デイヤ (Dayer) (1999) は、IL-18のさまざまに部分的に矛盾している機能について再検討を行なった。要約すると、IL-18は炎症性を増強および低減させるどちらの機能も有する多面作用のインターロイキンである。一方では、IL-18はTNFのように前炎症性サイトカインの産生を増強することによって、炎症を促進する。逆に、IL-18はカスパーゼ-1の阻害剤であるNOの産生を誘導することで、IL-1およびIL-18の成熟化を妨害し、炎症性を減じさせているのかもしれない。このIL-18の不明瞭な役割は、炎症性疾患におけるIL-18阻害剤の有効性を深刻に問うものである。さらに、炎症の調節における無限に多様なさまざまなサイトカインおよびケモカインとの相互作用のため、たった1つの役者だけを妨害することによる炎症性疾患の治療および予防における有効な効果は予想できない。

【0054】

[発明の要約]

本発明は、IL-18の阻害剤がさまざまな疾患および障害の治療および/または予防に効果的であるという調査結果に基づく。

【0055】

本発明の第一の目的は、肝傷害の治療および/または予防における新しい方法を提供することである。したがって、本発明は急性または慢性の肝傷害の治療および/または予防用医薬の製造におけるIL-18阻害剤の用途に関する。さらに詳細には、本発明はアルコール性肝炎、ウイルス性肝炎、免疫性肝炎 (immune hepatitis)、劇症肝炎、肝硬変および原発性胆汁性肝硬変の治療および/または予防に関する。

【0056】

本発明の第二の目的は、関節炎の治療および/または予防における新しい方法を提供することである。したがって、本発明は関節炎の治療および/または予防用医薬の製造におけるIL-18阻害剤の用途に関する。IL-18阻害剤の有効な効果は、疾患の進行の予防だけでなく、疾患の重症度を減じさせることを含む。この調査結果は、前記要約した技術内容からは予想できず、関節炎に関係する1つの特異的な因子、すなわちインターロイキンIL-18の妨害が、関節炎の緩和または病気にかかった関節炎の関節の治療までも導くことは結論付けられていなかった。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

関節炎のマウスモデルにおいて、IL - 18 阻害剤の投与は顕著に軟骨の侵食を減じることが明らかになっている。このように、本発明はさらに、軟骨破壊の治療および/または予防用医薬の製造においてIL - 18 阻害剤の用途に関する。

【 0 0 5 8 】

本発明の第三の目的は、炎症性腸疾患 (IBD)、とくにクローン病および潰瘍性結腸炎の治療および/または予防における新しい方法を提供することである。したがって本発明はまた、IBDの治療および/または予防用医薬の製造におけるIL - 18 阻害剤の用途にも関する。本発明により今では、クローン病患者由来のバイオプシーの粘膜の炎症領域において、IL - 18 の mRNA およびタンパク質の濃度が上昇することが明らかにされた。さらに、炎症性腸疾患のマウスモデルにおいて、2つの異なるIL - 18 阻害剤が動物を疾患から保護することが明らかにされた。

10

【 0 0 5 9 】

また、IL - 18 阻害剤および/またはインターフェロンおよび/またはTNFアンタゴニストおよび/またはCOX - 2 阻害剤の組み合わせの用途も、本発明によって考えられる。病気にかかった組織または細胞にIL - 18 阻害剤を送達するための遺伝子治療的なアプローチを適用するために、本発明のさらなる局面は、その病気にかかった状態の治療および/または予防用の、IL - 18 阻害剤をコードする配列を含む発現ベクターの用途に関する。本発明はさらに、IL - 18 阻害剤の内因性遺伝子の活性化の用途、ならびに肝傷害、関節炎およびIBDの予防および/または治療用のIL - 18 阻害剤を発現する

20

【 0 0 6 0 】

[発明の詳細な説明]

本発明は、さまざまな疾患および異常におけるIL - 18 の阻害剤の有効な効果の調査結果に基づく。

【 0 0 6 1 】

本発明において用語「IL - 18 の阻害剤」は、IL - 18 の産生および/または作用を減じさせ、縮小させ、または部分的、実質的もしくは完全に予防または妨害するというような方法で、IL - 18 産生および/または作用を調節するあらゆる分子を意味する。用語「IL - 18 阻害剤」は、IL - 18 作用の阻害剤だけでなくIL - 18 産生の阻害剤

30

【 0 0 6 2 】

産生の阻害剤は、IL - 18 の合成、プロセッシングまたは成熟化に負の影響を及ぼすあらゆる分子であり得る。本発明によると、阻害剤は、たとえばインターロイキンIL - 18 の遺伝子発現のサプレッサー、IL - 18 mRNA の転写を減少させるもしくは妨げるまたはmRNAの分解を導くアンチセンスmRNA、正しい折りたたみを損なわせる、または部分的もしくは実質的にIL - 18 の分泌を妨げるタンパク質、IL - 18 が合成された場合にIL - 18 を分解するプロテアーゼ、カスパーゼ1の阻害剤などの、成熟IL - 18 を産生するためにIL - 18 前駆体を切断するプロテアーゼの阻害剤であり得る。

【 0 0 6 3 】

IL - 18 の作用の阻害剤は、たとえばIL - 18 アンタゴニストであり得る。アンタゴニストは、IL - 18 のリガンド(たとえばIL - 18 の受容体など)にIL - 18 が結合するための能力を有するIL - 18 またはIL - 18 結合部位を部分的または実質的に中和するのに十分な親和性および特異性により、IL - 18 分子そのものと結合またはIL - 18 分子そのものを隔離することができる。アンタゴニストは、また、IL - 18 / 受容体の結合した細胞内で活性化されるIL - 18 シグナル伝達経路をも阻害し得る。

40

【 0 0 6 4 】

IL - 18 作用の阻害剤は、また、可溶性IL - 18 受容体またはその受容体に似た分子、またはIL - 18 受容体を妨害する薬剤、またはポリクローナルもしくはモノクローナル抗体などのIL - 18 抗体、またはIL - 18 とその標的との結合を妨げる分子であっ

50

てもよく、このようにIL-18によって仲介される細胞内または細胞外の反応の誘発を減じさせるかまたは妨げる。

【0065】

本発明の第一の局面によると、IL-18の阻害剤は、肝傷害の治療および/または予防用医薬の製造において使用される。好ましくは、本発明は、急性および慢性の肝傷害、よりとくにアルコール性肝炎、ウイルス性肝炎、免疫性肝炎、劇症肝炎、肝硬変および原発性胆汁性肝硬変の治療および/または予防用医薬の製造におけるIL-18阻害剤の用途に関する。

【0066】

本明細書中で使用される肝傷害または肝疾患という用語は、さまざまな病的症状を含む。本発明において観察されたいくつかの症状は、前記「本発明の技術分野」において詳細に述べている。さらに、本発明によって治療および/または予防され得る肝疾患は、たとえば発熱性の肝膿瘍 (pyrogenic liver abscess) を含む。それはまた最近性肝臓とも呼ばれ、それは肝臓内の膿を産生する場である。肝膿瘍の原因は多様である。肝膿瘍は、盲腸炎、憩室炎または手術された腸などの腹部における感染；血液における感染；胆汁の（肝臓が分泌する）管からの感染；または傷ついた肝臓が感染したときのトラウマから、進行し得る。肝膿瘍を引き起こす最も一般的な生物は、大腸菌、プロテウス バルガリス (Proteus vulgaris) およびエンテロバクター アエロゲネス (Enterobacter aerogenes) である。出願頻度は、10000人に1人である。

【0067】

アルコール性肝疾患は、本発明したがいIL-18阻害剤を用いて治療および/または予防され得る。アルコール性肝疾患はアルコールの乱用によって引き起こされる急性および慢性の肝臓の炎症を含む。アルコール性肝炎は、通常、何年もの過度の飲酒の後起こる。アルコールの飲用期間が長ければ長いほど、また、アルコールの消費が多くなるほど、肝疾患が発症する確率は高くなる。栄養失調は、アルコール、食欲減退および吸収不良（腸管からの栄養物の不十分な吸収）に由来するカロリーを欠いた結果として発症する。栄養失調は肝臓疾患に関与する。エタノールの肝臓に対する毒性、アルコールによって誘導される肝臓疾患に対する個人的な感受性および遺伝的な因子もまた、アルコール性肝疾患の発症に関与する。

【0068】

本発明によると、肝硬変はIL-18阻害剤を用いて治療および/または予防され得る。硬変は、肝臓組織への損傷、肝臓の傷（腺維症；小結節の再生）、肝機能の進行性の減退、腹腔内の過剰の体液（腹水症）、出血異常（凝固障害）、血管内の増圧（門脈圧亢進症）および脳機能異常（肝性脳症）を引き起こす慢性の肝疾患である。損傷し傷ついた肝臓は、血液から老廃物（毒素）を充分に取り除くことができず、傷ついた組織の形成は、肝臓へ向かう腸と脾臓とのあいだの血管内の増圧（門脈圧亢進症）を導く。アルコールの飲みすぎは、硬変を導く原因である。ほかの原因は、感染（肝炎など）、胆汁排水系の疾患および欠陥（胆汁の狭窄または閉塞など）、嚢胞性腺維症ならびに増加した鉄および銅の吸収をふくむ。

【0069】

硬変のタイプは、疾患の原因に依存している。硬変の合併症は深刻であり得る。米国では、硬変は9番目の主要な死亡原因である。神経学的問題（肝性脳症など）が発症しうる。腹腔における増大した体液の貯蔵（腹水症）は、体のタンパク質の減少、ナトリウムの増加、および肝臓の血管内の増圧（門脈圧亢進症）によって引き起こされる。門脈圧亢進症は、食道（食道静脈瘤）の血管の血圧、サイズおよび充満さの増大を引き起こす。出血および凝固を伴う問題が起こり得る。その血管内の増圧およびその血液凝固を伴う問題は、深刻で生命を脅かす出血の可能性を増大させ得る。

【0070】

さらに、本発明における「肝傷害」という用語に含まれることを意図される異常は、自己免疫性肝炎である。自己免疫肝炎は免疫系との相互関係により生じる肝臓の炎症である。

10

20

30

40

50

自己免疫性肝炎は、慢性活動性肝炎のタイプである。細胞の免疫応答は、慢性活動性肝炎の原因になり得る。さまざまな循環自己抗体は、慢性活動性肝炎の患者の血液から見出された。ほかの自己免疫疾患は、慢性活動性肝炎に関連し得るし、または慢性活動性肝炎患者の親族に起こり得る。これらの疾患は、甲状腺炎、真性糖尿病、潰瘍性結腸炎、クーンズ陽性溶血性貧血 (Coombs-positive hemolytic anemia)、増殖性糸球体腎炎およびシェーグレン症候群である。危険因子は、それらの疾患を含み得るし、または危険因子は慢性活動性肝炎に関連し得る。出現頻度は10000人に4人である。

【0071】

さらに、胆道閉鎖は「肝傷害」という用語の範囲内の疾患である。胆道閉鎖は、通常、産まれる前に（子宮内で）胆道が発達しないことによって引き起こされる胆管の閉塞である。胆道閉鎖は、肝内または肝外の胆管の異常および不十分な発達によって引き起こされる。胆管系の目的は、肝臓からの老廃物の除去、および脂肪消化に必要な胆汁酸塩の小腸への運搬である。この病気において、肝臓から胆嚢へ流れる胆汁は遮断される。これは、治療しなければ最終的に死に至る、肝臓への損傷および肝硬変を誘導する。

10

【0072】

本発明によると、IL-18阻害剤は、慢性悪性肝炎 (chronic aggressive hepatitis) とも呼ばれる慢性活動性肝炎の治療および/または予防用医薬の製造においても使用され得る。慢性活動性肝炎は肝臓細胞に損傷を与える継続的な肝臓の炎症である。慢性活動性肝炎の原因は、ウイルスの感染、薬物反応/摂取、代謝異常または自己免疫疾患を含む。明らかな原因はないかもしれない。この疾患は、肝傷害、硬変および死を導き得る肝臓細胞の壊死または死滅、活動性の炎症および腺維症によって特徴付けられる。出現頻度は10000人に1人である。危険因子は、自己免疫疾患、以前に感染したC型肝炎、あるいは6ヵ月以上のA型肝炎またはB型肝炎の抗原陽性である。

20

【0073】

慢性持続性肝炎 (chronic persistent hepatitis) は軽く、肝臓の炎症に進行しない状態であり、これもまた本発明によると「肝傷害」という用語に含まれる疾患である。

【0074】

本発明によると、IL-18阻害剤は、また原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の治療および/または予防用医薬の製造においても使用される。PBCは、肝細胞を損傷させる肝臓内の胆汁の流出の遮断によって起こる炎症症状である。肝臓内の胆管は、未知の原因により炎症を起こす。その疾患は、最も頻繁に中年女性に影響を及ぼす。前兆の始まりはなだらかであり、最初の前兆としては皮膚のかゆみである。肝臓内の胆管の炎症は起こる。そのうち、肝硬変に進行する。その疾患は、自己免疫疾患に関係し得る。出現頻度は10000人に8人である。本明細書中で考えられるIL-18阻害剤は、また、たとえば大量のパラセタモールによって引き起こされる急性肝臓中毒症の治療にも使用され得る。このような急性肝臓中毒症は、偶発的または故意のパラセタモールの過剰な服用量によるものであり得る。

30

【0075】

以下の実施例に示されるように、本発明の発明者らは驚くべきことに、IL-18阻害剤が劇症肝炎 (急性肝炎) の予防および治療においてとくに有効であることを見出した。したがって、本発明は、好ましくは劇症肝炎の予防および/または治療に関する。

40

【0076】

本発明の第二の局面によると、IL-18阻害剤は、関節炎の治療および/または予防用医薬の製造において使用される。

【0077】

本明細書中で使用される「関節炎」という用語は、たとえば、関節炎に関するワシントン大学の整形外科科のホームページ (www.orthop.washington.edu) に定義されているように、全てのさまざまなタイプの関節炎ならびに関節炎の症状、急性および慢性関節炎を含む。関節炎の症状の例としては、強直性脊椎炎、腰痛 (back pain)、手根堆積症候群 (carpal deposition syndrome)、エーレルス-ダンロー症候群、痛風、若年性関節炎、

50

紅斑性狼瘡、筋炎、骨形成不全、骨粗しょう症、多発関節炎、多発筋炎、乾癬性関節炎、ライター症候群、強皮症、腸疾患を伴う関節炎、ベーチェット病、小児関節炎 (children's arthritis)、変形性関節症、腺維筋痛症 (fibromyalgia)、感染性関節炎 (infectious arthritis)、ライム病、マルファン症候群、変形性関節症、骨壊死、パジエット病、リウマチ性多発筋痛症 (Polymyalgia rheumatica)、偽痛風、反射性交感神経性ジストロフィー、慢性関節リウマチ、リウマチ、シェーグレン症候群、家族性腺腫性ポリポシス (familial adenomatous polyposis) などがある。

【 0 0 7 8 】

好ましくは、本発明によると、IL - 18 阻害剤は、炎症性関節炎の治療および/または予防に対して提供される。炎症性関節炎は、その疾患の持続性、継続性または再発性の推移に基づいて慢性関節炎として分類される。

10

【 0 0 7 9 】

本発明の好ましい実施態様における炎症性関節炎は、慢性関節リウマチ (RA) である。RA は関節のライニング (lining) (滑膜、1つの上皮の細胞層) および/または内臓において炎症を引き起こす。この疾患は、何年も持続する傾向にあり、通常、体全体の多くのさまざまな関節に影響を及ぼし、ついには軟骨、骨、腱および靭帯に損傷を与え得る。RA によって影響され得る関節は、たとえば首、肩、ひじ、臀部、手首、手、膝、くるぶしおよび足の関節である。多くの場合、RA によって対称的な形式で炎症がおこる。

【 0 0 8 0 】

RA は、米国では人口の約 1% で広く行き渡っており、全ての民族および年齢の間で分布している。それは、全世界で起こっており、RA を有する患者において、女性は 3 対 1 で男性より数が勝っている。

20

【 0 0 8 1 】

以下の実施例に示されるように、IL - 18 阻害剤は、軟骨侵食において非常に有効で有益な効果を示すことが証明された。したがって、本発明はさらに、軟骨破壊の治療および/または予防用医薬の製造における IL - 18 阻害剤の用途、すなわち軟骨保護剤としての IL - 18 の用途に関する。IL - 18 阻害剤は、軟骨の破壊または侵食が起こっているあらゆる症状において使用され得る。軟骨破壊は、関節軟骨の構造的に無傷の状態における進行性の減退である。それは、たとえば慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチまたは骨壊死などの関節軟骨に影響を及ぼす症状において起こるが、たとえば感染性滑膜炎 (infectious synovitis) においても起こる。

30

【 0 0 8 2 】

本発明の第 3 の局面は、炎症性腸疾患の治療および/または予防用医薬の製造における IL - 18 阻害剤の用途に関する。それは、IL - 18 阻害剤が CD 患者の炎症粘膜においてアップレギュレーションされたという調査結果に基づく。さらにそれは、さまざまな IL - 18 阻害剤の投与は結腸炎のマウスモデルにおいて保護効果を有するという調査結果に基づく。

【 0 0 8 3 】

CD 患者に由来の疾患粘膜における IL - 18 のアップレギュレーションは、技術分野において既に関示されている (Monteleone, et al. 1999; Pizarro, et al. 1999)。

40

【 0 0 8 4 】

本発明によって腸粘膜の炎症領域において大量の IL - 18 B P の存在が証明されたのち、さらに驚くべきことに、IL - 18 B P を全身に投与したところ、動物モデルにおける結腸炎の発症および症状に対して有効な効果を示すことが見出された。IL - 18 B P は既に CD 患者の腸において内因的にアップレギュレーションされているが、以下の実施例において説明されるように、体内で産生することができる IL - 18 B P の量は疾患と戦えるほど充分であるとは思えない。

【 0 0 8 5 】

本発明において炎症性腸疾患とは、好ましくは、クローン病または潰瘍性結腸炎である。

【 0 0 8 6 】

50

本発明の好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、カスパーゼ-1(ICE)、IL-18に対する抗体、いずれかのIL-18受容体サブユニットに対する抗体、IL-18シグナル伝達経路の阻害剤、IL-18と拮抗およびIL-18受容体を妨害するIL-18のアンタゴニスト、ならびにIL-18結合タンパク質、アイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質、機能的な誘導体、活性断片または同じ活性を有する循環的に改変されたその誘導体から選択される。

【0087】

「IL-18結合タンパク質」という用語は、本明細書中では「IL18BP」と同義で使用される。それは国際公開第99/09063号パンフレットまたは1999年にノービック(Novick)らによって定義されたIL-18結合タンパク質からなり、2000年にキム(Kim)らによって定義されたIL-18結合タンパク質のスプライシング変性体および/またはアイソフォームを含む。とくに、IL-18BPのヒトアイソフォームaおよびcは、本発明によると有効である。本発明においての有効なタンパク質は、グリコシル化または非グリコシル化のものであってよく、尿などの天然源由来のものであってよく、または好ましくは組換え的に産生されてよい。組換え体の発現は、大腸菌のような原核生物の発現系、または真核生物および好ましくは哺乳動物の発現系において行なわれ得る。

【0088】

本明細書中で使用されるように、「ムテイン」という用語は、天然のIL-18BPまたはウイルス性IL-18BPの1つまたはそれ以上のアミノ残基が異なるアミノ残基に置換または欠失され、または、IL-18BPまたはウイルス性IL-18BPの天然の配列に1つまたはそれ以上のアミノ残基が付加され、野生型のIL-18BPまたはウイルス性のIL-18BPと比較して、得られた産物の活性があまり変化していない、IL-18BPのアナログまたはウイルス性IL-18BPのアナログを示す。それらムテインは、既知の合成および/または位置指定突然変異誘発技術、またはこの場合に適した他の既知の技術によって製造される。

【0089】

そのようなムテインは、好ましくは、IL-18BPと実質的に類似する活性を有するほど、IL-18BPの配列に充分似た、またはウイルス性IL-18BPに充分似たアミノ酸配列を有する。IL-18BPのある活性は、IL-18に結合する能力である。ムテインがIL-18との十分な結合能力を有するかぎり、アフィニティークロマトグラフィーの方法などによって、IL-18の精製において使用されることができ、IL-18BPと実質的に類似した活性を有すると考えることができる。したがって、得られたムテインが、IL-18BPと実質的に同じ活性を有するかどうかは、たとえば、放射線免疫検定法またはELISA法などラベルされたIL-18に適当にムテインが結合するかどうか決定するための単純なサンドウィッチ競合アッセイにそのムテインを供することからなるルーチンの実験方法によって、決定されることができる。

【0090】

本発明において使用されることができ、IL-18BPポリペプチドのムテインまたはウイルス性IL-18BPのムテイン、もしくはそれをコードする核酸は、本明細書中に表現された教授および指導に基づいて、過度の実験をすることなく、当業者によって決まりきった手順で得られる置換ペプチドまたはポリペプチドと実質的に一致する配列の有限の一群を含む。

【0091】

本発明におけるムテインの好ましい変更は、「保存的な」置換として知られるものである。IL-18BPポリペプチドまたはタンパク質またはウイルス性IL-18BPの保存的なアミノ酸置換は、メンバー間における置換は分子の生物学的機能を保存しているという、実質的に類似した物理化学的な特性を有する群における同義アミノ酸を含み得る(Grantham, 1974)。とくに挿入または欠失が、たとえば30以下、好ましくは10以下のわずかなアミノ酸に関するのみであり、たとえばシステイン残基など機能的構造に重要な

10

20

30

40

50

アミノ酸の除去または入れ替えをしない場合、アミノ酸の挿入および欠失もまた、その機能を変化させることなく前記配列においてなされることは明らかである。このような欠失および/または挿入によって産生されるタンパク質およびムテインは、本発明の範囲内である。

【0092】

好ましくは、同義アミノ酸群は表Iに表示されているものである。より好ましくは、同義アミノ酸群は表IIに表示されているものであり；最も好ましくは、同義アミノ酸群は表IIIに表示されているものである。

【0093】

【表1】

10

表I

同義アミノ酸の好ましい群

アミノ酸	同義の群	
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn	
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His	
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu	
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro	20
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr	
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala	
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val	
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile	
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe	
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr	30
Cys	Ser, Thr, Cys	
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His	
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln	
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn	
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys	
Asp	Glu, Asn, Asp	
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu	40
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	
Trp	Trp	

【0094】

【表2】

表II

より好ましい同義アミノ酸の群

アミノ酸	同義の群	
Ser	Ser	
Arg	His, Lys, Arg	
Leu	Leu, Ile, Phe, Met	
Pro	Ala, Pro	10
Thr	Thr	
Ala	Pro, Ala	
Val	Val, Met, Ile	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu	
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe	
Tyr	Phe, Tyr	20
Cys	Cys, Ser	
His	His, Gln, Arg	
Gln	Glu, Gln, His	
Asn	Asp, Asn	
Lys	Lys, Arg	
Asp	Asp, Asn	
Glu	Glu, Gln	
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu	30
Trp	Trp	

【 0 0 9 5 】

【 表 3 】

表III

同義アミノ酸の最も好ましい群

アミノ酸	同義の群	
Ser	Ser	
Arg	Arg	
Leu	Leu, Ile, Met	
Pro	Pro	10
Thr	Thr	
Ala	Ala	
Val	Val	
Gly	Gly	
Ile	Ile, Met, Leu	
Phe	Phe	
Tyr	Tyr	20
Cys	Cys, Ser	
His	His	
Gln	Gln	
Asn	Asn	
Lys	Lys	
Asp	Asp	
Glu	Glu	
Met	Met, Ile, Leu	30
Trp	Met	

【0096】

本発明において使用されるための、IL-18BPのポリペプチドもしくはタンパク質のムテイン、またはウイルス性IL-18BPsのムテインを得るために用いられ得る、タンパク質のアミノ酸置換の産生の例は、マーク(Mark)らによる米国特許第RE33,653号明細書、米国特許第4,959,314号明細書、同第4,588,585号明細書および同第4,737,462号明細書；コース(Kohts)らによる同第5,116,943号明細書、ナーメン(Namen)らによる同第4,965,195号明細書、コング(Chong)らによる同第4,879,111号明細書、リー(Lee)らによる同第5,017,691号明細書などの周知の方法手順；および米国特許第4,904,584号明細書に示されたリジンを置換されたタンパク質(Shaw et al)を含む。

【0097】

「融合タンパク質」という用語は、たとえば体液内において長時間に延びた滞在時間を有する他のタンパク質と融合された、IL-18BPまたはウイルス性IL-18BPまたはそのムテインもしくは断片からなるポリペプチドのことを指す。IL-18BPまたはウイルス性IL-18BPは、このようにたとえば免疫グロブリンまたはその断片といった他のタンパク質、ポリペプチドなどと融合され得る。

【0098】

本明細書中で用いられる「機能的誘導体」は、本技術分野において周知の方法で、残基もしくはN末またはC末基の側鎖として生じる官能基から調整され得るIL-18BPsまたはウイルス性IL-18BPの誘導体、ならびに、そのムテインおよび融合タンパク質を含み、薬学的に許容し得るかぎり、すなわちIL-18BPまたはウイルス性IL-18BPsの活性と実質的に類似しているタンパク質の活性を破壊せず、それを含む組成物において毒性を与えないかぎり、本発明に含まれる。

【0099】

それらの誘導体は、たとえば、抗原部位を覆い、体液内でIL-18BPまたはウイルス性IL-18BPの滞在を延ばし得るポリエチレングリコール側鎖を含み得る。他の誘導体は、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは第一もしくは第二アミンを用いた反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部分（たとえばアルカノイル基または炭素環式アロイル基）で形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体、アシル部分で形成される遊離水酸基（たとえばセリルまたはトレオニル残基）のO-アシル誘導体を含む。

【0100】

IL-18BPまたはウイルス性IL-18BP、ムテインおよび融合タンパク質の「活性断片」がIL-18BPと実質的に類似した活性を有する場合、本発明では、該断片として、タンパク質分子のみまたは関連分子もしくはそれと結合する残基（たとえば糖もしくはリン酸塩残基、またはタンパク質分子の集合体または糖残基）を伴うタンパク質分子のポリペプチド鎖の断片または前駆体を含む。

【0101】

本発明のさらに好ましい実施態様において、IL-18阻害剤はIL-18抗体である。抗IL-18抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル、キメラ、ヒトに適應させた、または完全にヒトのものであり得る。組換え抗体およびその断片は、インビボにおいてIL-18と結合する高い親和性および低毒性によって特徴付けられる。本発明において用いられる抗体は、病的な症状またはあらゆる徴候または病的な症状に関連する徴候群を極めて軽減または緩和するために十分な期間、患者を治療することができる能力、および低毒性によって特徴付けられる。

【0102】

中和抗体は、IL-18で免疫されたウサギ、ヤギまたはマウスなどの動物によって容易に作製することができる。免疫されたマウスはとくに、ハイブリドーマの製造するためのB細胞の供給源を提供するのに有効であり、その結果、ハイブリドーマは大量の抗IL-18モノクローナル抗体を産生するために培養される。

【0103】

キメラ抗体は、さまざまな動物種由来の2つまたはそれ以上の切片または一部によって特徴づけられた免疫グロブリン分子である。一般的に、キメラ抗体の可変領域は、マウスモノクローナル抗体のようなヒトではない哺乳動物の抗体由来であり、免疫グロブリンの定常領域はヒトの免疫グロブリン分子由来である。好ましくは、両方の領域およびその組み合わせは、決まりきった手順によって決定されたように低い免疫原性を有する（Elliott et al., 1994）。ヒトに適應させた抗体は、マウスの定常領域をマウスの抗原結合領域に残したままヒトの対応物で置き換えるという、遺伝子工学技術によって創出された免疫グロブリン分子である。得られるマウス-ヒトキメラ抗体は、ヒトにおいて、好ましくは免疫原性が減少し、薬物動態が改善される（Knight et al., 1993）。

【0104】

したがって、さらに好ましい実施態様において、IL-18抗体はヒトに適應させたIL-18抗体である。ヒトに適應させた抗IL-18抗体の好ましい例は、たとえば欧州特許出願第0974600号明細書に記載されている。

【0105】

さらになお好ましい実施態様において、IL-18抗体は、完全にヒト由来のものである。ヒトの抗体を産生する技術は、たとえば国際公開第00/76310号パンフレット、

10

20

30

40

50

国際公開第99/53049号パンフレット、米国特許第6,162,963号明細書またはオーストラリア特許第5336100号明細書に詳細に記載されている。完全なヒトの抗体は、好ましくは、全てまたは一部の機能的なヒトのIg座を含み、たとえば異種マウスといったトランスジェニック動物によって産生される組換え抗体である。

【0106】

本発明の非常に好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、IL-18BPまたはアイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質、機能的な誘導体、その活性断片または循環的に改変された誘導体である。それらアイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質または機能的な誘導体は、とくにIL-18との結合するというIL-18BPの生物学的活性を残し、好ましくは、本質的には少なくともIL-18BPと類似した活性を有する。理想的には、そのようなタンパク質は、非修飾のIL-18BPと比較して非常に増大した生物学的活性を有する。好ましい活性断片は、IL-18BPの活性よりも優れた活性を有するか、もしくはより優れた安定性またはより低い毒性もしくは免疫原性などのさらなる利点を有し、または大量に産生することがより容易であるか、もしくは精製がより容易である。

10

【0107】

IL-18BPおよびそのスプライシング変異体/アイソフォームの配列は、2000年のキムらによるものだけでなく、国際公開第99/09063号パンフレットまたは1999年のノービクらによって提供される。

【0108】

IL-18BPの機能的誘導体は、安定性、半減期、生物学的利用能、人体による寛容または免疫原性などのタンパク質の性質を改善するために、ポリマーと結合されてもよい。これらの目標を達成するために、IL-18BPはたとえばポリエチレングリコール(PEG)と結合されてもよい。ペギレーション(PEGylation)は、たとえば国際公開第92/13095号パンフレットに記載されている周知の方法によって行なわれる。

20

【0109】

したがって、本発明の好ましい実施態様において、IL-18BPはペギレーションされる。

【0110】

本発明のさらに好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、免疫グロブリンの全てまたは一部に融合したIL-18結合タンパク質の全てまたは一部からなる融合タンパク質である。得られる融合タンパク質が、とくにIL-18への結合といったIL-18BPの生物学的活性を保持することは、当業者には理解されるだろう。融合は、直接または、1から3アミノ酸残基の長さ、またはより長いたとえば13アミノ酸残基の長さの短いリンカーペプチドを介するものであってよい。該リンカーは、たとえば配列E-F-M(Glu-Phe-Met)のトリペプチド、またはIL-18BP配列と免疫グロブリン配列との間に導入されるGlu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Metからなる13アミノ酸リンカー配列であり得る。得られる融合タンパク質は、体液内での延びた滞在時間(半減期)、増大した特異的な活性、上昇した発現レベルまたは融合タンパク質の精製が容易になるなどの改善された性質を有する。

30

40

【0111】

好ましい実施態様において、IL-18BPはIg分子の定常領域に融合される。好ましくは、それは、たとえばヒトのIgG1のCH2およびCH3ドメインのような重鎖領域に融合される。IL-18BPおよび免疫グロブリンの部分からなる特異的な融合タンパク質の産生は、たとえば国際公開第99/09063号パンフレットの実施例11に記載されている。IgG₂もしくはIgG₄、またはたとえばIgMもしくはIgAのような他のIgクラスのアイソフォームなど、Ig分子の他のアイソフォームもまた、本発明における融合タンパク質の産生に適する。融合タンパク質はまた、モノマーまたはマルチマー、ヘテロもしくはホモのマルチマーであり得る。

50

【0112】

インターフェロンは、主に、ウイルス複製および細胞増殖に対する阻害効果のために知られている。たとえば、インターフェロン- β は、免疫および炎症反応を促進するのに重要な役割を果たす。インターフェロン（IFN- β 、I型インターフェロン）は、抗炎症的な役割を果たすと言われている。トリアンタフィロポーロら（Triantaphyllopoulos et al）（1999）によって公開された研究は、疾患のマウスモデル、すなわちコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデルにおいて明らかにされたように、IFN- β が慢性関節リウマチの治療において有効な効果を有することを示した。このIFN- β の有効な効果は、以下の実施例において確認された。

【0113】

本発明は、また、関節炎、とくに慢性関節リウマチの治療用医薬の製造におけるIL-18阻害剤とインターフェロンとの組み合わせの用途に関する。

【0114】

インターフェロンは、また、タンパク質の安定性を改善するためにポリマーと結合され得る。インターフェロンとポリオール（ポリエチレングリコール（PEG））との結合は、たとえば国際公開第99/55377号パンフレットに記載されている。

【0115】

本発明の他の好ましい実施態様において、インターフェロンはインターフェロン- β （IFN- β ）であり、より好ましくはIFN- β 1aである。

【0116】

IL-18産生および/または作用の阻害剤は、好ましくはインターフェロンと同時に、連続してまたは別々に用いられる。

【0117】

なおさらなる本発明の実施態様において、IL-18阻害剤はTNFアンタゴニストと組み合わせて用いられる。TNFアンタゴニストは、いくつかの方法でその活性を発揮する。まず、アンタゴニストは、TNFエピトープまたはTNF受容体結合能力を有するエピトープを部分的または実質的に中和するために十分な親和性および特異性により、TNF分子そのものに結合またはTNF分子そのものを隔離することができる（以下「隔離アンタゴニスト」と呼ぶ）。隔離アンタゴニストは、たとえば、TNFに対して誘導される抗体である。

【0118】

さらに、TNFアンタゴニストは、TNF結合後、細胞表面の受容体によって活性化されるTNFシグナル伝達経路を阻害することができる（以下「シグナリングアンタゴニスト」と呼ぶ）。アンタゴニストの両群は、関節炎とくに慢性関節リウマチの治療に対して、IL-18阻害剤と組み合わせて、単独または併用のどちらでも有益である。

【0119】

TNFアンタゴニストは、また、たとえばTNFによって増殖および免疫グロブリン分泌を引き起こすヒトB細胞といった、インビトロでの感受性細胞株における本来のTNF活性に関する効果に対して、決まりきった手順で候補をスクリーニングすることによって容易に同定、評価される。そのアッセイは、アッセイで用いられるTNFのモル量をたとえば0.1から100倍にした候補アンタゴニストの希釈によるTNF処方およびTNFなしまたはアンタゴニストのみのコントロールを含む（Tucci et al., 1992）。

【0120】

隔離アンタゴニストは、本発明によって用いられる好ましいTNFアンタゴニストである。隔離アンタゴニストの間でも、高い親和性でTNFに結合し、および低い免疫原性を有するポリペプチドが好ましい。可溶性のTNF受容体分子およびTNFに対する中和抗体は、とくに好ましい。たとえば、可溶性のTNF-R IおよびTNF-R IIは、本発明において有効である。その受容体の細胞外ドメインまたは機能的な部分からなる切断型のそれらの受容体は、本発明によると、よりとくに好ましいアンタゴニストである。切断型の可溶性のI型TNF受容体およびII型TNF受容体は、たとえば欧州特許第9144

10

20

30

40

50

31号明細書に記載されている。

【0121】

切断型のTNF受容体は、可溶性であり、尿および血清において30kDaおよび40kDaのTNF阻害結合タンパク質として検出され、それぞれTBPIおよびTBPIIと呼ばれている(Engelmann et al., 1990)。同時的、連続的または別々の、TNFアンタゴニストおよび/またはインターフェロンを伴うIL-18阻害剤の用途は、本発明によると好ましい。

【0122】

本発明によると、TBPIおよびTBPIIはIL-18阻害剤と組み合わせて使用されるための好ましいTNFアンタゴニストである。受容体分子の誘導体、断片、領域および生物学的活性部位は、本発明においても使用することができる受容体分子に機能的に似ている。受容体分子の生物学的に活性な相当物または誘導体は、十分な大きさであって、かつ膜貫通TNF受容体との相互作用が阻害または妨害されるような親和性によりTNFと結合できる、ポリペプチドまたは受容体分子をコードする配列の一部をいう。

【0123】

さらに好ましい実施態様において、ヒトの可溶性TNF-R1(TBPI)は、本発明によって使用されるTNFアンタゴニストである。天然および組換えの可溶性TNF受容体分子ならびにその産生の方法は、欧州特許第308378号明細書、同第398327号明細書および同第433900号明細書において記載されている。

【0124】

IL-18阻害剤は、TNF阻害剤と共に、同時的、連続的または別々に使用され得る。有効的には、IL-18抗体または抗血清と、TNF阻害活性を有するTNFの可溶性受容体との組み合わせが用いられる。

【0125】

本発明のさらに好ましい実施態様において、医薬はさらにCOX阻害剤、好ましくはCOX-2阻害剤を含有する。COX阻害剤は、本技術分野において周知である。特異的なCOX-2阻害剤は、国際公開第01/00229号パンフレットにおいて記載されている。

【0126】

本発明は、IL-18阻害剤および/またはインターフェロンおよび/またはTNFアンタゴニストおよび/またはCOX-2阻害剤の組み合わせの用途に関する。その組み合わせは、関節炎とくに慢性関節リウマチの治療および/または予防、肝傷害の治療および/または予防、ならびに炎症性腸疾患とくにクローン病および潰瘍性結腸炎の治療および/または予防に適している。その活性成分は、同時的、連続的または別々に使用され得る。

【0127】

本発明の好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、約0.0001から10mg/体重kg、または約0.01から5mg/体重kgまたは約1から2mg/体重kgの量で使用される。さらになお好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、約0.1から1000μg/体重kg、または約1から100μg/体重kgまたは約10から50μg/体重kgの量で使用される。

【0128】

本発明は、さらに、関節炎の症状または関節炎、とくに慢性関節リウマチの予防および/または治療用、肝傷害の治療用、および炎症性結腸炎の治療用の医薬の製造における、IL-18阻害剤をコードする配列からなる発現ベクターの用途に関する。したがって、遺伝子治療的アプローチは、その疾患を治療および/または予防に対して用いられる。有効的には、IL-18阻害剤はその後インサイチュで発現され、その疾患によって冒された組織または細胞内で直接効率的にIL-18を妨害するであろう。

【0129】

関節炎を治療および/または予防するために、IL-18産生および/または作用の阻害剤の配列からなる遺伝子治療ベクターは、たとえば、遺伝子治療ベクターの全身投与に関

10

20

30

40

50

する、ベクターの希釈、標的細胞または組織への到達および標的化、および副作用などの問題を避けるために、病的な関節へ直接注入され得る。

【0130】

通常はIL-18阻害剤が発現されていない細胞、または充分量ではない阻害剤を発現している細胞において、IL-18阻害剤の内因的な産生を誘導および/または促進させるベクターの用途は、本発明においても観察された。そのベクターは、阻害剤またはIL-18を発現することが所望される細胞において機能的な調節配列からなる。そのような調節配列は、たとえばプロモーターまたはエンハンサーであり得る。その調節配列は、そののち相同組換えによってゲノムの適当な座に導入されてもよく、調節配列と遺伝子とを結合させることにより遺伝子発現が誘導または促進される。その技術は、通常「内性遺伝子活性化」(EGA)と呼ばれ、たとえば国際公開第91/09955号パンフレットに記載されている。

10

【0131】

同じ技術、すなわち、たとえばサイレンシング因子のような負の調節因子をIL-18の遺伝子座に導入することによって、IL-18発現を停止させることができ、したがって、IL-18発現のダウンレギュレーションまたは妨害を導くことは、当業者によって理解されるだろう。そのようなIL-18発現のダウンレギュレーションまたはサイレンシングが、疾患を予防および/または治療するためのIL-18阻害剤の用途として同じ効果を有することは、当業者に理解されるだろう。

【0132】

本発明はさらに、肝傷害、関節炎または炎症性腸疾患の治療および/または予防用医薬の製造における、IL-18阻害剤を産生するための遺伝子的に改変された細胞の用途に関する。

20

【0133】

本発明はさらに、治療に有効量のIL-18阻害剤および治療に有効量のインターフェロンからなる、炎症性関節炎、肝傷害または炎症性腸疾患の予防および/または治療にとくに有効な、医薬組成物に関する。IL-18阻害剤として、その組成物はカスパーゼ-1阻害剤、IL-18に対する抗体、あらゆるIL-18受容体サブユニットに対する抗体、IL-18シグナル伝達経路の阻害剤、IL-18と競合しIL-18受容体を妨害するIL-18のアンタゴニスト、ならびにIL-18結合タンパク質、アイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質、機能的な誘導體、同じ活性を有するその活性断片または循環的に改変された誘導體からなり得る。

30

【0134】

前記IL-18BPおよびそのアイソフォーム、ムテイン、融合タンパク質、機能的な誘導體、活性断片または循環的に改変された誘導體は、医薬組成物の好ましい活性成分である。

【0135】

医薬組成物に含まれるインターフェロンは、好ましくはIFN- γ である。

【0136】

なお他の好ましい実施態様において、医薬組成物は、治療に有効量のIL-18阻害剤、任意にはインターフェロンおよびTNFアンタゴニストを含有する。TNFアンタゴニストは、TNF活性を中和する抗体、または可溶性の切断型TNF受容体の断片であり得、TBP IおよびTPB Iとも呼ばれる。本発明の医薬組成物は、さらに1つまたはそれ以上のCOX阻害剤、好ましくはCOX-2阻害剤を含有する。

40

【0137】

「薬学的に許容し得る」という定義は、活性成分の生物学的活性の効果を妨げず、投与される宿主に対する毒性がないあらゆる担体を含むことを意味する。たとえば、非経口投与において、活性タンパク質は、食塩水、デキストロース溶液、血清アルブミンおよびリンガー溶液などのビヒクルで注射用の単位投与量に処方されてもよい。

【0138】

50

本発明の医薬組成物の活性成分は、さまざまな方法で個体に投与されることができる。投与経路は、皮内、経皮的（たとえば、徐放性の処方で）、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経口、硬膜外麻酔、局部および鼻腔内の経路を含む。その他に、たとえば上皮または内皮組織を介した吸収作用、または活性剤をコードするDNA分子を（ベクターを介して）患者へ投与し、インビボでその活性剤を発現および分泌させる遺伝子治療を、治療に有効な投与経路として用いることができる。さらに、本発明におけるタンパク質は、薬学的に許容し得る界面活性剤、賦形剤、担体、希釈剤、ビヒクルなどの他の生物学的活性剤の構成要素と共に投与することができる。

【0139】

非経口（たとえば、静脈内、皮下、筋肉内）投与において、薬学的に許容し得る非経口ビヒクル（たとえば、水、食塩水、デキストロス溶液）および等張を維持する添加物（たとえばマンニトール）または化学的安定性を維持する添加物（たとえば防腐剤および緩衝液）に関連して、活性タンパク質は、溶液、懸濁液、乳液または親水性の粉末として処方されることができる。その処方は、よく用いられる技術によって滅菌される。

10

【0140】

本発明において活性タンパク質の生物学的利用能もまた、たとえばPCT特許出願の国際公開第92/13095号パンフレットに記載されているように、分子をポリエチレングリコールに結合するなど、ヒトの体内で分子の半減期を延ばす接合方法を用いることによって改良されることができる。

【0141】

活性タンパク質の治療に有効な量は、アンタゴニストのタイプ、IL-18に対するアンタゴニストの親和性、アンタゴニストによって示された未解決の細胞毒性の活性、投与経路、患者の臨床状態（内因性のIL-18活性を毒性がないレベルに維持することの望ましさを含む）を含む、要素の相互関係であるだろう。

20

【0142】

「治療に有効な量」とは、投与されると、IL-18阻害剤が、IL-18の生物学的な活性を阻害する結果となるような量である。単回投与または複数回投与として固体に投与される用量は、IL-18阻害剤の薬学動態的性質、投与経路、患者の症状および特徴（性別、年齢、体重、健康状態、大きさ）、徴候の程度、同時進行中の治療、治療頻度および望ましい効果を含むさまざまな因子に依存して変化するだろう。確立された投与量の範囲の調節および取扱いは、個体においてIL-18の阻害を測定するインビトロおよびインビボでの方法と同様、当業者の能力の範囲内で充分である。

30

【0143】

本発明において、IL-18阻害剤は、約0.0001から10mg/体重kgまたは約0.01から5mg/体重kg、または約0.01から5mg/体重kgまたは約0.1から3mg/体重kgまたは約1から2mg/体重kgの量で使用される。さらに好ましいIL-18阻害剤の量は、約0.1から1000μg/体重kgまたは約1から100μg/体重kgまたは約10から50μg/体重kgの量である。

【0144】

本発明において好ましい投与経路は、皮下経路による投与である。筋肉内投与は、本発明においてさらに好ましい。

40

【0145】

さらに好ましい実施態様において、IL-18阻害剤は、毎日または1日おきに投与される。

【0146】

毎日の投与は、望ましい結果を得るために有効な、間隔をあけた投与または持続的な放出処方通常与えられる。2回目または継続的な投与は、個体に最初またはあらかじめ投与された用量と同じ、それ以下またはそれ以上の用量で行なうことができる。2回目または継続的な投与は、病気の襲来中またはそれ以前に投与されることができる。

【0147】

50

本発明において、IL-18阻害剤は、治療に有効な量で、ほかの治療養生法または薬剤（たとえば多様な薬剤養生法）とともに、とくにインターフェロンおよび/またはTNFアンタゴニストおよび/またはCOX阻害剤とともに、あらかじめ、同時または連続的に、個体に予防的または治療的に投与されることができる。他の治療薬と同時に投与される活性剤は、同じまたは異なる組成物において投与されることができる。

【0148】

本発明はさらに、薬学的に許容し得る担体と共に、有効量のIL-18阻害剤および/またはインターフェロンおよび/またはTNFアンタゴニストおよび/またはCOX阻害剤を混合することからなる医薬組成物の製造方法に関する。

【0149】

今や本発明を説明したが、実例として提供され本発明を制限しようとすることを意図されていない以下の実施例を参考にすることによって、容易に理解されるだろう。

【0150】

[実施例]

第一部：肝傷害におけるIL-18インヒビターの用途に関する実施例1から8
実施例1：IL-18BP-Hisタグ(His tag)の産生

Hisタグを含有する、精製された組換えヒトIL18BP(r-hIL-18BP-Hisタグ)は、CHO細胞で産生された。真核細胞での組換えタンパク質の産生は、当業者にとって周知である。IL-18BPをコードするDNAを運び、かつ組換えIL-18BPを産生するための真核細胞へのトランスフェクションに適する適当なベクターを構築するために、周知の方法を利用することができる。細胞における発現においては、IL-18BPをコードするDNA(たとえば(Novick et al., 1999)参照)は切り出され、細胞へのトランスフェクションに適する発現ベクターに挿入される。あるいはまた、そのようなDNAは適当なセンスおよびアンチセンスプライマーを用いたPCRによって調製することができる。得られたcDNA構築物について、本分野における周知の技術により、適当に構築された真核細胞の発現ベクターに挿入される(Manaitis, 1982)。その組換えタンパク質は95%以上の精度で精製され、そのリガンドに対する高い親和性を有しインビトロおよびインビボにおいて生物学的に活性であることが明らかにされた。

【0151】

実施例2：マウスモデルにおける、内毒素誘導死に対するIL18BPの保護効果
マウスモデルは、リポ多糖(LPS)の高い投与量に対して、IL-18の阻害剤であるIL18BPがマウスを保護するかどうかをテストするために使用した。LPSは急性の肝傷害を誘導し、つづいてマウスは急死する。

【0152】

4mg/kgの組換え体である、Hisタグを含むヒトIL-18BP(rhIL18BPHis)(そのタンパク質の組換え産物から得られた)は、C57BL/6マウスへ腹腔内(i.p.)注射された。1時間後、60mg/kgのLPSが、注射された(致死量)。マウスの生存は、LPSのみ(IL18BPなし)を投与された動物群と比較された。

【0153】

3日間で全ての動物が死んだコントロールマウスとは対照に、rhIL-18BP-hisを注射されたマウス7匹中5匹が、LPS注射から生き残った。

【0154】

血液試料は、rhIL-18BP-hisの量を増加せずに、または増加してLPS注入から5時間後に採取され、循環するIFN- γ に対するELISAによって解析された(図1)。0.4および4mg/kgのrhIL-18BPは、血清IFN- γ を2分の1にした。低い投与量のrhIL-18BP(0.004および0.4mg/kg)では、この阻害は失われた。

【0155】

実施例3：IL18BPは疾患のマウスモデルにおける肝傷害に対して保護効果を有する

10

20

30

40

50

劇症肝炎のマウスモデルは、IL-18BPの効果进行测试するために使用した。プロピオニバクテリウム アクネス (Propionibacterium acnes) (P. acnes) およびリポ多糖 (LPS) を続けて投与されると、マウスは急性肝傷害を発症する。

【0156】

C57BL/6 P. acnes 感受性マウスにLPSを注射する前に、さまざまな時間 (1時間、20分、同時に) でrhIL-18BP-his (4; 0.4; 0.04; 0 mg/kg) の増加させた投与量を用い、マウスに注射した。rhIL-18BP-hisがLPSと同じ時間にi.p.投与されたとき、生き残るマウスはなく、循環IFN- γ およびTNF- α のレベルは影響されない。驚くべきことに、rhIL-18BP (4 および0.4 mg/kg) は、図2に示したように、循環アラニンアミノトランスフェラーゼ (肝傷害のマーカー) の70%の減少を誘導した。

10

【0157】

これに加えて、マウスの生存について調べた (図3) : rhIL-18BPがLPSの20分前にi.p.で与えられたとき、IL-18BPの最も高い2つの投与量 (4 および0.4 mg/kg) は、IL-18BPの代わりにNaClを与えられたコントロールマウスと比較して10時間まで死を遅らせた。

【0158】

血清IFN- γ レベルの測定の結果は、図4に示す。rhIL-18BP (4 mg/kg) は、循環IFN- γ レベルの90%および循環アラニンアミノトランスフェラーゼの80%を阻害した (示すものはなし (not shown))。

20

【0159】

rhIL-18BP-hisがLPSの1時間前に与えられたとき、生存曲線および循環IFN- γ レベルは、rhIL-18BP-hisをLPSの20分前に与えたときに観察されたものと類似しているが、循環アラニンアミノトランスフェラーゼのレベルは影響されなかった (示すものはなし)。

【0160】

これに加えて、マウスの肝組織は、トンネル顕微鏡検査によってだけでなく、ヘマトキシリン-エオシン染色によって解析された。以前に深刻な肝炎を誘導されたマウスの肝臓は、正常な肝組織と比較して深刻な壊死を示した。これとは対照に、IL-18BPで処置されたマウスの肝組織は、未処置のマウスより壊死の患部が顕著に少ないことを示した。

30

【0161】

実施例4 : 抗IL-18抗体は致死的内毒血症から保護する

IL-18抗体によるIL-18の妨害が、致死量のバクテリアリポ多糖からマウスを保護するかどうかを評価するために、C57BL/6Jマウスはまず、中和ウサギ抗マウスIL-18抗体 (ポリクローナル)、またはコントロールとして正常ウサギ血清 (NDS) を注射された。抗体処置から30分後、大腸菌 (図5A) またはS.チフィムリウム (S. typhimurium) (図5B) のどちらか由来のLPSの致死量を注射した。実験は10~12匹マウス/群を含み、2つの異なる場合において2回行なった。

【0162】

図5Aに示されたように、抗-IL-18抗血清でのマウスの処置は、40 mg/kgの大腸菌LPSによって誘導される死を予防した。正常ウサギ血清で処置されたマウスの10%の生存に対して、抗-IL-18処置後100%のマウスが生き残った ($p < 0.05$)。

40

【0163】

図5Bは、抗体で処置されたマウスは、S.チフィムリウムの致死効果から保護されたことを示す (50%対0%生存; $p < 0.05$)。

【0164】

実施例5 : IL-18およびTNF- α の妨害は、ConA-およびPEA-誘導肝毒性からマウスを保護する

50

肝毒性の2つの実験モデルは、肝傷害におけるIL-18およびTNF- α の役割を評価するために使用した。コンカナバリンA (Con A) および緑膿菌 (PEA) のマウスへの注射は、どちらも肝傷害を誘導し、T細胞媒介性肝炎のモデルである。

【0165】

C57BL/6Jマウスは抗-IL-18抗血清または可溶性TNF- α 受容体すなわちTNF sR p55で前処理された。血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) レベルは、肝傷害の指標として測定された (図6)。

【0166】

図6に示されたように、IL-18抗血清および可溶性TNF受容体はどちらも、賦形剤のみのコントロールの注射 (ピロゲンなしの食塩水) と比較して、Con Aが誘導する血清ALTレベルを顕著に減少させた。可溶性TNF受容体およびIL-18抗血清の共投与は、Con-A誘導肝傷害の完全な阻害を導いた。

10

【0167】

図6Bに示されたように、PEAを注射したマウスにおいて、TNF- α 阻害剤または抗-IL-18抗体のどちらかの中和は、それぞれ血清ALTレベルを93%および83%阻害するという結果になった。両方を組み合わせた妨害により、99%の保護となった。

【0168】

実施例6: IL-18結合タンパク質の血漿レベルは、慢性肝疾患の患者で上昇するIL-18BP血漿レベルは、さまざまな病因の慢性肝疾患 (CLD) 患者133人、および健康なコントロール31人において、IL-18BPモノクローナル抗体を用いた特異的なELISAによって測定された。

20

【0169】

IL-18BPの血漿レベルは、健康な被験者 (4.96 ± 0.43 ng/ml, $p < 0.001$) よりもCLD患者 (12.91 ± 0.89 ng/ml; 平均 \pm SEM) において顕著に高かった。肝硬変の患者は肝硬変でないCLDの患者よりも顕著に高いレベルを有した (19.23 ± 1.28 ng/ml, $n = 67$ 、対 6.49 ± 0.51 ng/ml, $n = 66$, $p < 0.001$)。チャイルド-ピュー (Child-Pugh) 分類が段階Bの患者は、段階Aの患者よりもIL-18BPの高いレベルを有した (22.48 ± 2.44 ng/ml 対 9.57 ± 1.25 ng/ml, $p < 0.001$)。しかしながら、チャイルドBおよびCのあいだでは、顕著な違いはなかった (22.48 ± 2.44 ng/ml 対 20.62 ± 4.75 ng/ml, $p = 0.7$)。IL-18BPの血漿レベルは、GOT、ビリルビンおよび赤血球沈降速度とは正の相互関係がある。プロトロンビン期間 (prothrombin time) は負の相互関係が見られた。

30

【0170】

要するに、その結果は、IL-18BP血漿レベルはCLDにおいて上昇し、かつ疾患の病因とは無関係な疾患の厳しさと相互関係があることを示す。炎症性 (proinflammatory) IL-18の内因性アンタゴニストであるにもかかわらず、IL-18BPの増加したレベルは、CLDにおける圧倒的な炎症性メディエーターに対抗するのに充分でないと思われる。

【0171】

実施例7: IL-18BPによるアルコール性肝炎の阻害
ラットの4群 (5匹/群) は、4週間、胃内注入によってエタノールとトウモロコシ油を含む制限食とを与えた。コントロールラットにおいては、エタノールを同量のカロリーのデキストロースに置き換えた。そのラットは、毎日マウスIL-18BP (1 mg/kg)、または食塩水を注射された。病理解析が肝臓切片に関して実施され、血清中の肝臓酵素、TNF- α 、FASリガンド、およびINF- γ の測定が行なわれた。炎症壊死性 (necroinflammatory injury) 傷害ならびに肝臓の酵素、TNF- α 、FASリガンドおよびINF- γ の発現は、食塩水を注射されエタノールを与えられたラットで見られた。

40

【0172】

IL-18BPを注射されたラットは、炎症壊死性傷害から保護され、肝臓の酵素、TN

50

F - 、F A SリガンドおよびI N F - のレベルが顕著に減少した (> 90%)。

【0173】

実施例8：コンカナバリンA誘導肝炎のI L - 18 B Pによる阻害

B a l b / cマウスに毎日、C o n A投与の2時間前に、マウスI L - 18 B P (1 m g / k g)を注射してまたは注射せずに、12 m g / k gのコンカナバリンA (C o n A)を注射した。肝臓の損傷は、肝臓の酵素、T N F - 、F A SリガンドおよびI N F - の血清レベルを決定することで評価した。肝炎の組織病理学はコンカナバリンAのみで処置したマウスと比較した。

【0174】

C o n Aで処置されたコントロールマウスと比較すると、I L - 18 B Pでの前処理により、組織病理学的検査において炎症の兆候がないとともに肝臓の酵素および、T N F - の血清レベルを顕著に減少させた。

10

【0175】

第二部：関節炎におけるI L - 18阻害剤の用途に関する、実施例9および10
実施例9：I L - 18 B P - H i s タグの産生

以下の実施例10において詳細に記載される実験のために、6残基のH i s タグを含む組換えI L - 18 B P (r - h I L - 18 B P - H i s タグ)が、C H O細胞で産生され、キム(kim)ら、2000年に記載されたように精製された。その組換えタンパク質は、95%以上の精度で精製され、そのリガンドに対して親和性を有しインビトロおよびインビボにおいて生物学的に活性であることを明らかにした。

20

【0176】

組換えタンパク質の精製を用意にするタグを用いる、または用いないほかの真核生物の系におけるその組換えタンパク質の産生は、当業者に周知である。I L - 18 B PをコードするD N Aを運び、かつ組換えI L - 18 B Pを産生するための真核細胞のトランスフェクションに適する適当なベクターを構築するために、周知の方法を利用することができる。細胞における発現においては、I L - 18 B PをコードするD N A (たとえばNovick e t al., 1999参照)はクローニングベクターから切り出され、細胞のトランスフェクションに適する発現ベクターに挿入される。あるいはまた、そのようなD N Aは適当なセンスおよびアンチセンスプライマーを用いたP C Rによって調製できる。得られたc D N A構築物について、適当に構築された真核細胞の発現ベクターへ、本分野において既知の技術により挿入される(Maniatis e t al., 1982)。

30

【0177】

実施例10：関節炎のマウスモデルにおける内因性I L - 18の妨害

方法

コラーゲン誘導関節炎(C I A)の誘導

先に記載されているように(Plater-Zyberk e t al., 1995)、C I Aは、天然の2型ウシコラーゲン(C I I)で免疫することによってオスのD B A / 1マウス(8~12週齢)において誘導された。C I I免疫後25日から、マウスは疾患の発症について毎日検査された。

【0178】

40

r h I L - 18 B P - 6 h i sでの処置

C I Iで免疫されたD B A / 1マウスの処置は、疾患の臨床的な兆候が初めて現れたときに始めた。6ヒスチジンのタグを含む組換え体、ヒトI L - 18 B P (r h - I L - 18 B P 6 h i s)は、コラーゲン処理されたマウスにおいて内因性I L 18を中和するために使用した。r h - I L - 18 B P a 6 h i sは、7日間毎日、5つの異なる濃度10、3、1、0.5、0.25 m g / k g / 注射で腹腔内(i . p .)注射された。その偽薬コントロールマウスには、賦形剤のみ(0.9% N a C l)を与えた。

【0179】

疾患の進行評価

臨床評価(臨床スコア)

50

初めて臨床兆候が現れてから、マウスは毎日、その処理が何か知らされていない調査員によって検査された。各肢は疾患の重傷度について採点された（スコア 0 ~ 3 . 5、最大スコア = 1 4 / マウス）。浮腫（炎症）の進行は、最初に疾患の兆候を示した肢において精密ノギス（プロクテスト（Proctest） 2 T、クロエプリン ランゲンメステクニク社（Kroeplin Langenmesstechnik）製）を用いて測定された。

【 0 1 8 0 】

疾患の進行は、開始後 8 日間毎日評価され、その後全てのマウスは犠牲にされ、肢が組織病理学的検査のために集められた。

【 0 1 8 1 】

軟骨侵食および微視的な炎症の組織病理学的検査

その実験の終了時、すなわち開始から 8 日後、マウスは殺されて、始めに疾患の兆候が進行した肢は切り離された。関節は固定され、石灰質を除去され、パラフィンに埋め込まれた。その関節の標準切片（5 から 7 μm ）が作製され、ヘマトキシリン / エオシン / サフラニン O で染色された。各関節は、処置プロトコルを知らない 2 人の調査員によって採点された（破壊されていない軟骨または骨 = 0 ; 局所の軟骨侵食 = 1 ~ 2 ; より広範囲の侵食 = 3 ; 全体的な軟骨破壊および骨侵食の存在 = 4）。各マウスの最終的なスコアは、採点された関節全ての結果の平均である。微視的な炎症または滑膜炎は、以下のように 0 から 4 で採点された：炎症なし = 0 ; 少し厚くなったライニング層（lining layer）および / またはやや下のライニング層（sublining layer）内における細胞の浸潤 = 1 ~ 2 ; 厚いライニング層および / やや下のライニング層内のより著しい細胞の浸潤 = 3 ; 滑膜炎部分内の細胞の存在、および多くの炎症性の細胞で高度に浸潤された滑膜 = 4。

【 0 1 8 2 】

抗コラーゲン抗体の測定

ウシ 2 型コラーゲンに対する抗体は、固相酵素免疫検定法（ELISA）を用いて調べられた。IgG 1 および IgG 2 a の力価が測定された。つまり、プレートは 10 μg のウシコラーゲンで覆われ、その後非特異的結合部位は、0 . 1 M のエタノラミン（シグマ社（Sigma）製）で遮断される。血清を順に 1 : 2 希釈したものを添加し、アイソタイプの特異的ヤギ抗マウスペルオキシダーゼ（サザン バイオテクノロジー アソシエイト社（Southern Biotechnology Associates）製、バーミングハム、アラバマ州、アメリカ合衆国）および基質（5 - アミノサリシル酸、シグマ社（Sigma）製）を用いてインキュベーションした。プレートは 492 nm で読み込まれた。力価は最大値の半分を与える平均 \pm SD 希釈として表された。

【 0 1 8 3 】

IL - 6 検定

IL - 6 のレベルは、市販用の ELISA（R & D システムズ社（R&D Systems）製、ミネアポリス、ミネソタ州、アメリカ合衆国）によって測定した。IL - 6 の生物活性は、B9 細胞を用いた増殖検定（proliferative assay）によって検出された。つまり、ウェルあたり 200 μl の 5 % FCS - RPMI 1640 培地内の 5×10^3 の B9 細胞は、丸底のマイクロタイタープレートに置かれ、基準としてヒト組換え IL - 6（R & D システムズ社、ミネアポリス、ミネソタ州、アメリカ合衆国）を用いて 3 日間インキュベーションした。インキュベーションの最後に、0 . 5 μCi の ^3H チミジン（ネン - ドュポン社（NEN-Dupont）製、ボストン、マサチューセッツ州、アメリカ合衆国（USA））が、各ウェルに加えられた。3 時間後、細胞は採取され、チミジンの取り込みが測定された。IL - 6 生物活性の検出限界は、1 pg / ml であった。

【 0 1 8 4 】

統計解析

顕著な違いは、シグマスタッド統計解析プログラム（SigmaStat statistical analysis program）およびグラフパッド プリズム プログラム（GraphPad Prism program）を用いるマン ウィットニー テスト（Mann Whitney test）によって判断された。

【 0 1 8 5 】

10

20

30

40

50

結果

実験モデルマウスCIA（コラーゲン誘導関節炎）は、関節炎治療剤としてのIL-18BPの効能を判断するために使用された。DBA/1マウスへのコラーゲンおよびフロイント不完全アジュバントの投与は、侵食による炎症性の関節炎の進行を誘導し、IL-18BPの治療能力を探るための理想的な機会となる。この目的のために、内因性IL-18は、IL-18BPを用いて中和され、さまざまな病原性パラメーターにおける効果が評価された。

【0186】

投与に関する研究を行なった。コラーゲン誘導関節炎DBA/1マウスの3群は、i.p.（腹腔内）に5投与量のIL-18BPにより治療された（すなわち疾患の発症後）。10、3、1、0.5または0.25mg/kgの濃度のIL-18BPは、初めて疾患の臨床的兆候が現れた時、投与された。生理食塩水（塩化ナトリウム、NaCl）の注入は、コントロールとして使用した。これに加えて、10000IUのインターフェロン（IFN- γ ）は、この関節炎の実験モデルにおいてIFNの影響を評価するためにi.p.で投与された。疾患の重傷度における効果は、先に述べたように、個々の肢を視覚的に採点することによって毎日調べられた。マウスは開始から8日後に犠牲にされた。

10

【0187】

以下の値を計測した。

- ・視覚的な臨床的スコア（0～3.5/肢）（図7AおよびB）
- ・後肢の場合、最初に疾患を現した肢の関節の膨張/浮腫（mmで、ノギスで計測された）（図8）
- ・疾患になった肢の数（図9）
- ・最初に疾患となった肢の侵食スコア（0～4軟骨破壊、図10）
- ・最初に関節炎を発症した肢の組織病理学的検査（図11）
- ・抗2型コラーゲン抗体のレベル（図12）
- ・IL-6のレベル（図13）

20

【0188】

疾患の臨床的な重傷度

図7AおよびBに示したように、その疾患の臨床的な深刻さは、rhIL-18BPを1mg/ml（ $P < 0.01$ ）および0.5mg/ml（ $0.01 < P < 0.05$ ）で処置された群において顕著に減少した。少量のrhIL-18BP（0.25mg/kg）または大量の10mg/kgを与えられたマウスは、偽薬群と類似した臨床的スコアを有した。その投与量が1mg/kgのIL-18BPは、インターフェロン（図7A中にIFN γ と記載）とおおよそ同じ効果である。

30

【0189】

関節の炎症および肢の膨張（浮腫）

微視的炎症（膨張）は、疾患の発症後1日目から実験の最終日の8日目まで、肢の浮腫を計測することによって研究された。その結果は、図8AおよびBに示す。IL-18BPの有効量は、1、3および10mg/kgである。少量の投与では肢の膨張に有効な効果は得られなかった。図8Aおよび8Bに示したように、10000IUの濃度のインターフェロン（IFN γ ）は肢の膨張に有効な効果を示した。

40

【0190】

微視的な滑膜炎は、組織病理学的切片における実験の最後に検出され、スコア（「滑膜炎スコア」）として表された。炎症（膨張）および滑膜炎スコアの結果は、表1に要約している。1および3mg/kgの投与量のrhIL-18BPを用いた処置では、膨張が減少する傾向にあったが、少量のIL-18BPを投与する処置は、炎症性の滑膜炎において限られた効果しかない（表1）。

【0191】

【表4】

表 1 : 関節の炎症におけるIL-18BP処理の効果

処置	膨張 (AUC,平均±sem)	滑膜炎 (平均±sem)	スコア
RhIL-18BP-6his 3mg / kg	1.55±0.64	2.17±0.5	
1mg / kg	1.53±0.60	1.98±0.4	
0.5mg / kg	3.38±0.70	1.92±0.5	
0.25mg / kg	3.06±0.90	2.08±0.5	
偽薬	3.11±0.77	2.23±0.3	

10

【 0 1 9 2 】

図 9 は、疾患によって冒された肢の数が IL - 1 8 B P の投与後減少したことを示す。とくに、1 および 0 . 5 m g / k g の投与量での IL - 1 8 B P の治療的注入は、疾患になる肢の数を減少させ、インビボでの IL - 1 8 の妨害によってほかの肢への関節炎の広がりを停止させることを証明している。1 および 0 . 5 m g / k g の IL - 1 8 B P での処置は、いくつかの関節炎の関節を正常に回復することをさらに示す。

20

【 0 1 9 3 】

関節の破壊からの保護

r h I L - 1 8 B P でのマウスの処置は、関節を破壊から保護する (図 1 0) 。半定量的採点システムは、1 0 および 3 m g / k g で顕著である投与量に関する保護効果を骨の侵食が示すことを証明した (P < 0 . 0 5 、 図 1 0) 。1 m g / k g の r h I L - 1 8 B P を与えられたマウスは、ピヒクルのみを与えられたマウスよりも少ない侵食を示した。0 . 5 m g / k g および 0 . 2 5 m g / k g の投与量では、保護は観察されなかった。興味深いことに、IL - 1 8 B P が 3 および 1 0 m g / k g の投与量での関節保護における効果は、1 0 0 0 0 I U のインターフェロン (I F N -) の有効な効果と同等またはさらににより顕著であった。

30

【 0 1 9 4 】

図 1 1 は、IL - 1 8 B P で処置された動物 (C) 由来の関節を比較した健康な関節 (A) および疾患 (B) の関節の微細構造を示す。実験の最後に、最初に関節炎を発症した肢から切断をとった。

【 0 1 9 5 】

関節炎のマウスからの関節は、炎症した滑膜において軟骨の減少および侵食ならびに大量の炎症性細胞を伴う、深刻な破壊的な関節炎を示した。r h I L - 1 8 B P で処置されたマウスからの関節では、滑膜部分に炎症性の細胞が存在しているのにもかかわらず、軟骨はほとんど正常であった。大量に軟骨が存在しているだけでなく、その軟骨はより滑らかな状態であった。

40

抗 IL - 1 8 処置は、抗 2 型コラーゲン抗体のレベルを調節する。

【 0 1 9 6 】

C I A マウスは、血液循環において I g G 1 および I g G 2 a 抗 2 型コラーゲン抗体のレベルが上昇している。アイソタイプ I g G 1 の抗体は、T H 2 が仲介する疾患に関連し、一方、アイソタイプ I g G 2 a および I g G 2 b の抗体は T H 1 を仲介する疾患に関連する。関節炎は通常、T H 1 が仲介した疾患と分類される。

【 0 1 9 7 】

抗 2 型コラーゲン (C I I) I g G 1 および I g G 2 a 抗体アイソタイプは、IL - 1 8 B P で処置された動物の血清中で測定された (図 1 2) 。I g G アイソタイプである I g

50

G 1 および I g G 2 a の抗 C I I のレベルは、臨床疾患の 4 日後または 8 日後 (D 4、D 8) での I L - 1 8 B P 処置によっては顕著には調節されなかった。しかしながら、コラーゲン特異的 I g G 1 / I g G 2 a 比において、r h I L - 1 8 B P 処置の 8 日後に、1 および 3 m g / k g でそれぞれ、2 . 6 および 3 . 4 倍の減少が観察された。図 1 2 は 3 m g / k g での実験が用いられたことを示す。本質的に、1 m g / k g の量の I L - 1 8 B P を用いることにより、同じ結果が得られた。抗 C I I 抗体の減少した I g G 1 / I g G 2 a 比は、アイソタイプ I g G 2 a の抗 2 型コラーゲン抗体の減少した濃度、およびアイソタイプ I g G 1 の抗 2 型コラーゲン抗体の上昇した濃度を示し、このモデルの関節炎では、T H 2 に仲介された疾患への変化が示唆された。

【 0 1 9 8 】

I L - 1 8 中和後の I L - 6 レベルの減少

I L - 1 8 封鎖の効果を洞察するために、I L - 1 8 B P 処理された動物の血清中で I L - 6 が計測された。図 1 3 は、生物学的に活性な I L - 6 レベルが、計測された全ての投与量、すなわちインターフェロン - (I F N b) とともに 1、3 および 1 0 m g / k g で I L - 1 8 B P 処置を受けた動物において、顕著に減少していることを示す。3 m g / k g の r h I L - 1 8 B P で処置された動物の血清中で計測された I L - 6 の免疫活性レベルは、食塩水で処置された動物と比較して顕著に減少した (P < 0 . 0 0 2 3)。1、3 または 1 0 m g の I L - 1 8 B P または 1 0 0 0 0 I U の I N F - で処置された疾患動物の I L - 6 血清レベルは、健康な動物すなわち炎症性の疾患を有していない動物由来の正常マウス血清 (N M S) と類似していた。

【 0 1 9 9 】

これらの調査結果は、疾患の発症中 I L - 1 8 が I L - 6 レベルを制御していることを証明する。I L - 6 は炎症のマーカーであるため、これらの調査結果は I L - 1 8 B P での疾患マウスの処置がその動物内の炎症を減少させることを示す。

【 0 2 0 0 】

前記略述した実験から、以下の推論が導かれる。

- ・ I L - 1 8 B P の投与は関節炎の臨床的重傷度を減少させる
- ・ I L - 1 8 B P はその疾患のさらなる進行または広がりを阻害する
- ・ I L - 1 8 B P の投与は、浮腫を減少させる
- ・ I L - 1 8 B P の投与は、軟骨の破壊を減少させる
- ・ I L - 1 8 B P 治療後、血清 I L - 6 レベルは減少し、I g G 1 / I g G 2 a 抗 C I I 比は減少する。

【 0 2 0 1 】

前記データは、疾患発症後の I L - 1 8 生物活性の中和が疾患を調節する抗リユーマチ治療に相当することを示す。その結果は明らかに、I L 1 8 封鎖が関節炎の臨床的進行を減らし、より重要なことには、軟骨および骨の破壊の進行を停止させることを証明している。したがって、I L - 1 8 B P、抗 I L - 1 8 抗体による、または I L - 1 8 を妨害するほかの薬剤による I L 1 8 の封鎖は、新規な疾患を調節する抗リユーマチ治療に相当する。

【 0 2 0 2 】

前述の記載の特異的な実施態様は、最新の知識、容易な修正を適用することにより、および / またはさまざまな適用に対して適応させることによって、一般的な概念から逸脱することなしにそのような特異的な実施態様を他者が行うことができるように本発明の全体的な特徴を示すものであって、したがって、そのような適応および修正は、開示された実施態様に相当する意味および範囲内に含まれることを意図する。ここに使用されている表現または専門用語は記載のためであって、制限するものではないことは理解されるだろう。

【 0 2 0 3 】

第三部：炎症性の腸疾患に関する実施例 1 1 および 1 2

実施例 1 1：活動性クローン病における内皮細胞およびマクロファージによる I L - 1 8 B P 発現

試料の収集

腸粘膜バイオプシーは、CDまたはUCの患者から外科的切除により単離された。平均年齢が37.8歳(20~78歳の範囲)であり、疾患の継続年数が8.3年(1~21年の範囲)の14人のCD患者(3人の男性および11人の女性)が含まれる。8人の患者は回腸に疾患があり、6人は結腸に疾患がある。12人の患者は、免疫抑制剤を処方されている。活動性CDの診断は、組織病理学的検査によって以下の基準、潰瘍の存在、炎症性細胞の増加数および経壁の炎症に基づいて行なわれた。活動性CDの7人の患者および非活動性疾患の7人の患者が同定された。活動性および非活動性のCD患者間で、年齢、疾患、部位、性別、薬剤および疾患継続年数に顕著な違いは見られなかった。5人のUC患者(3人の男性および2人の女性)の平均年齢は、37.6歳(30~44歳の範囲)であった。全ての患者において、疾患は結腸に位置し、全員が免疫抑制治療を受けていた。平均疾患継続年数は4年(1~9年の範囲)であった。コントロール試料は、IBDに關しない疾患において切除を受けた5人の患者からえた(3人の男性および2人の女性)。この群の平均年齢は55.2歳(24~76歳の範囲)であった。全ての患者において、疾患は結腸に位置している。

【0204】

ヒトIL-18およびIL-18bpにおける半定量的RT-PCR

全RNAは、CD、UCまたはコントロールの患者の凍結された腸粘膜から抽出された。RNA抽出は、トライゾル(ギブコ社(Gibco)製)を用いて、製品の取扱い説明書にしたがって行なった。得られた試料は、吸光度260nmで測定することによって定量化した。もとのRNAは1%のアガロースゲル電気泳動法によって評価された。cDNAは、プロメガ逆転写システムを用いて、製品の取扱い説明書にしたがって、1μgの全RNAから合成された。PCR反応は、1Uのアンプリタック(AmpliTaq)DNAポリメラーゼ(パーキンエルマー社(Perkin Elmer)、ロシュ社(Roche)、アメリカ合衆国)、2.5mMのdNTPs(アマシャム社(Amersham)製、アメリカ合衆国)、および50pmolのフォワードおよびリバースPCRプライマーが存在する、全量50μlで行なった。反応では、PTC-200ペルタイターエフェクトサーマルサイクラー(PTC-200 PelTier Effect Thermal Cycler)(エムジェーリサ-チ社(MJ Reaseach)製、アメリカ合衆国)を用いて以下の条件、変性1分間94、アニーリング1分間55および伸長1分間72でインキュベートした。バンドが飽和する前のIL-18BP、IL-18および-アクチンの最適なサイクル数が決定された(それぞれ31、28および25回)。PCRプライマーは、公表された配列(AF110799、D49950、X00351)をもとに、以下のようにデザインされた: IL-18、リバース 5'-GCGTCACTACACTCAGCTAA-3'; フォワード 5'-GCC TAGAGGTATGGCTGTAA-3'; IL-18BP、フォワード 5'-ACCTGTCTACCTGGAGTGAA-3'; リバース 5'-GCACGAAGATAGGAAGTCTG-3'; -アクチン、リバース 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'; フォワード 5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3'。試料に混在しているゲノムDNAの増幅を除外するために、PCR反応はcDNA鋳型の不在下で行なった。PCR産物(10μl)は、1×TAE緩衝液における1%のアガロースゲル電気泳動法によって解析された。PCR産物のサイズは、ゲルの染色後1Kbラダー(ギブコ社製)との比較によって確認された。エチジウム-プロマイドによって染色されたバンドの相対的な定量は、コダック デジタル サイエンス解析ソフトウェア(Kodak Digital Sciences analytical software)を用いてUV照射下で行ない、標的遺伝子(hIL-18BP、hIL-18)とハウスキーピング遺伝子(h-アクチン)との比率として報告された。

【0205】

hIL-18BPに対して誘導されるモノクローナル抗体の産生

BALB/cマウスは、アジュバント(MPL+TDM エマルジョン、RIBIイムノケムリサーチ社(RIBI Immunochem Research, Inc.)製)とともにPBSにおけるrhIL-1

10

20

30

40

50

8 B P - 6 h i s (チャイニーズハムスター卵巣細胞から精製されたもの、インターファーム ラボラトリー社、ネセ ジオナ、イスラエル)の50 μ gのアイソフォームを、0日、7日後および28日後に、内頂部 (intranuckally) だけでなく四肢の皮下に注入された。3回目の免疫から4日後、リンパ節を得、2.4 ? g / m lのコラゲナーゼ (コラゲナーゼ I V、ワシントン バイオケミカル社 (Worthington Biochemical) 製) および0.1%デオキシリボヌクレアーゼ (シグマ社製) によって消化した。単離された細胞は、ついで、P E G 1 0 0 0 (フルカ社 (FLUKA) 製) を用いて S p 2 / 0 ミエローマ細胞と融合した。その細胞は、H A T (ヒポキサンチン、アミノペクチン、チミジン) の存在下で D M E M - F 1 2、10% F C S (ギブコ社製) で再び懸濁され、96穴プレートに 5×10^{-4} 細胞 / m l の濃度で配分された。ハイブリドーマ培養上清試料は、直接的なスクリーニング解析で、反応する抗体の存在に対してスクリーニングした。この際、E L I S A プレートはヤギ抗マウス F (a b)₂ 抗体 (ジャクソン イムノ リサーチ社 (Jackson Immuno Research)、ミラン アナライティカ (Milan analytica)、スイス) でコートされ、ハイブリドーマ培養上清を添加し、r h I L - 1 8 (組換え大腸菌から精製されたもの、セロノ ファーマシューティカル リサーチ インスティテュート社 (Serono Pharmaceutical Research Institute)、ジェネバ (Geneva)) を含むまたは含まない、ビオチン標識された r h I L - 1 8 B P - 6 h i s (記載されているように C O S 細胞から精製されたもの (Novick et al. 1999))、および最後に O - フェニレンジアミン (O P D) (シグマ社製) を用いて開発されたストレプトアビジン - ホースラデッシュ ペルオキシダーゼ (H R P) (ジャクソン イムノ リサーチ社、ミラン アナライティカ、スイス) を加えた。中和されない抗体が選択され、サブクローニングされた。本研究において、95 - H 2 0 すなわちマウス I g G 1 モノクローナル抗体が使用された。

【 0 2 0 6 】

I L - 1 8 b p 陽性細胞の位置における免疫組織化学的研究

組織試料は、- 8 0 ですばやく凍結保存された。一連の凍結切片 (10 μ l) が得られ、ポリ-L-リジンでコートされたスーパーフロスト/プラス (Superfrost / Plus) ガラススライド (ポリラボ社 (Polylabo) 製、プラン-レス-オーテス (Plan-les-Ouates)、スイス) に乗せ、氷冷したアセトンで固定した。ヒト I L - 1 8 B P タンパク質の位置は、M a b 9 5 - H 2 0 を用いて免疫組織化学によって解析された。P B S による単時間での水分補給後、2%のウシ胎仔血清 (F C S) (カンセラ社 (cansera) 製、オンタリオ、カナダ)、1%のヒト血清 (A B⁺血清、トランスフュージョン センター社 (Transfusion Center) 製、アンネマッセ (Annemasse)、フランス) および0.5%のウシ血清アルブミン (B S A) (シグマ社製、セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国) で補充された P B S で30分間ブレインキュベーションされた。内因性ペルオキシダーゼ活性は、P B S、2% F C S、1%ヒト血清、0.5% B S A および1%過酸化水素 (H₂O₂) (フルカ社製、スイス) 溶液に1時間そのスライドを置くことによってブロッキングされた。P B S ですすいだのち、切片を M a b 9 5 - H 2 0 の希釈されない培養上清で一晩インキュベーションした。P B S によりさらに洗ったのち、0.5% B S A を含む P B S においてビオチン標識されたヤギ抗マウス抗体 (ジャクソン イムノ リサーチ社、ミラン アナライティカ、スイス) (5 ? g / m l) とともに、切片を1時間インキュベーションした。染色の感度は、アビジン D H / ビオチン標識された H R P 複合体 (ベクタステイン エライト A B C キット (Vectastain Elite ABC kit)、ベクターラボラトリー社 (Vector laboratories) 製、カルフォルニア州、アメリカ合衆国) で30分インキュベーションすることによって増大された。スライドはそれから P B S で洗われ、p H 5 のアセトン緩衝液における30%のH₂O₂、3,3 - アミノ - 9 - エチル カルバゾール (A E C) (シグマ社製)、N, N - ジメチルホルムアミド (メルク社 (Merck) 製) の溶液を用いて進めた。ヘマトキシリン (シグマ社製) を用いた対比染色したのち、切片をグリセロールでカバーし、そしてカバースリップを適用した。マウス I g G 1 抗体 (R アンド D システム社 (R and D system) 製) が、アイソタイプのコントロールとして用いられた。

10

20

30

40

50

【0207】

ヒトIL-18BPの細胞内位置を同定するために、二色免疫組織化学的研究が腸粘膜の切片上で行なわれた。PBSで水分補給されてから10分後、切片は2%FCS、1%ヒト血清および0.5%のBSAで補充されたPBSで30分間プレインキュベーションされた。内皮細胞との共局在性 (colocalization) に対しては、切片は、PBS/0.5%BSAにおいてFITC-複合マウス抗ヒトCD31(1:50)(ファーマンゲン社(Pharmingen)製、カルフォルニア州、アメリカ合衆国)を混合したビオチン標識されたMab 95-H20(20 μ g/ml)で一晩インキュベーションされた。マクロファージとの共局在性に対しては、切片は、FITC-複合抗ヒトCD68(1:25)(ダコ社(Dako)製、デンマーク(Denmark))を混合したビオチン標識されたMab 95-H20(20 μ g/ml)で一晩インキュベーションされた。PBSでの洗いののち、ストレプトアビジン テキサス-レッド(サザン バイオテクノロジー アソシエイト社(Southern Biotechnology Associates)製、アラバマ州、アメリカ合衆国)が添加して1時間おいた。スライドは再びムビオール(moviol)で洗われ、切片をムビオールでコートし、カバースリップを適用した。ストレプトアビジン テキサス-レッドにおいて、ビオチン標識されたマウスIgG1抗体(ファーマンゲン社製)は、アイソタイプのコントロールとして使用された。

10

【0208】

細胞培養

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)(クロネチクス社(Clonetics)製、サンディエゴ、カルフォルニア州)は、ヒト組換え上皮増殖因子(hEGF)(10ng/ml)、ヒドロコルチゾン(1 μ g/ml)、ゲンタマイシンおよびアンフォテリシンB(50 μ g/ml)、ウシ脳抽出物(BBE)(3mg/ml)および2%ウシ胎仔血清(FBS)(クロネチクス社製、サンディエゴ、カルフォルニア州)で補充された内皮細胞増殖培地(EGM)を用いて、その製品の取扱い説明書にしたがって培養された。組織培養皿はヒトフィブロネクチン(10 μ g/cm²)(ベーリンガー社(Boehringer)製、マンハイム)でプレコートされた。細胞は加湿した5%CO₂インキュベーターでインキュベーションされ、実験は継代培養3のHUVECsを用いて行なわれた。HUVECsは、ヒトIL-1(10ng/ml)、TNF(10ng/ml)およびINF(20ng/ml)(RアンドDシステム社製、ドイツ)で24時間処理された。培養期間の最後に、細胞は収集されてRNAが単離され、IL-18BPおよびIL-18mRNA転写解析のためにRT-PCRに供された。上清は収集され、ELISAによってIL-18BPおよびIL-18タンパク質発現について解析された。

20

30

【0209】

ヒト単球細胞株THP-1は、10%の熱不活化FCS、L-グルタミン(2mM)、ペニシリン-ストレプトマイシン(10U/ml)(ギブコBRL社(Gibco BRL)、ライフテクノロジーズ(Life Technologies))および β -メルカプトエタノール(50 μ M)(フルカ社製)で補充されたRPMI培地による懸濁培養で維持された。それらを加湿した5%CO₂インキュベーターでインキュベーションし、1:10で5日毎に継代培養した。実験から3日前に、ヒト単球細胞は、ビタミンD₃(80nM)(バイオモル リサーチ ラボラトリーズ社(Biomol Research Laboratories)製、アメリカ合衆国)を用いて、0.4 \times 10⁶細胞個/mlの濃度で分化させ、付着させたままにした。分化してから、LPS(100ng/ml)(カルバイオケム社(Calbiochem)製)、ヒトIL-1(10ng/ml)、TNF(10ng/ml)およびINF(20ng/ml)が細胞培養物に添加された。48時間で、上清は収集されELISAによってIL-18BPおよびIL-18タンパク質発現について解析された。

40

【0210】

ヒトIL-18bpおよびIL-18産生の測定

サイトカイン(IL-1、TNF、INF)の混合物で24時間刺激を与えなかったHUVECsおよび与えたHUVECsから得られた細胞を含まない上清において、な

50

らびに (L P S 、 I L - 1 、 T N F 、 I F N) の混合物で 48 時間刺激を与えなかった T H P - 1 および与えた T H P - 1 細胞株から得られた細胞を含まない上清において、 I L - 18 B P の存在が E L I S A によって評価された。この際、プレートは r h I L - 18 B P (アイソフォーム a) に対して誘導される捕捉 M a b (クローン 657.27 が 0.5 μ g / 100 μ l / 穴、インターファーム ラボラトリーズ社製、ネス ジオナ、イスラエル) で一晩コートした。可溶性 h I L - 18 B P は、ついで r h I L - 18 B P - 6 h i s (チャイニーズハムスター卵巣細胞から精製されたもの、インターファーム ラボラトリーズ社製、ネス ジオナ、イスラエル) に対して誘導されるウサギポリクローナル抗体 (1 / 10000 希釈) を用いて検出され、次に、アフィニティー精製されたヤギ抗ウサギ I g G (1 / 20000 希釈) (ジャクソン イムノ リサーチ社、ミラン アナライティカ、スイス) とペルオキシダーゼを用いてインキュベーションすることによって検出された。捕捉 M a b 同様ウサギポリクローナル抗体は、 I L - 18 B P 特異性を確認するためにウエスタンブロットによって検査された。組換え h I L - 18 B P - 6 h i s は、基準として使用された。 E L I S A の感度は 100 p g / m l であった。並行して、 I L - 18 のレベルはヒト I L - 18 E L I S A キット (M B L 、 イムノテック社 (Immunotech) 製) を用いて定量化した。 E L I S A の感度は 12.5 p g / m l であった。

【 0211 】

C H O 細胞における h I L - 18 B P a - H i s 6 の発現

組換えヒト I L - 18 B P (h I L - 18 B P a H i s 6 - t a g) は、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (インターファーム ラボラトリーズ社、ネス ジオナ、イスラエル) から精製された。

【 0212 】

結果

腸バイオプシーにおける I L - 18 B P m R N A 転写産物の発現

I L - 18 B P m R N A 発現に対する解析は、活動性 C D 、非活動性 C D 、または U C のいずれかの患者から得た結腸外科用試料からの組織ホモジネート、および非炎症腸組織からの組織ホモジネートの R T - P C R によって行われた (図 14) 。 I L - 18 B P およびアクチンの転写産物は、テストされた全ての腸のホモジネートについて検出された。同様に、 I L - 18 の転写産物は、 C D 、 U C または I B D でないコントロールのいずれかから得られた全ての組織ホモジネートで見られた (図 14 A) 。コントロールのアクチンに対する I L - 18 B P または I L - 18 の m R N A レベルの比は、非活動性の C D 、 U C および I B D でないコントロールの患者のバイオプシーと比較して、活動性 C D の患者から得られたバイオプシーにおける I L - 18 B P および I L - 18 の双方の転写産物の量において、統計学的に顕著に増加すること (以下に説明する) が証明された (図 14 B および C) 。それらのデータは、活動性 C D の粘膜組織において I L - 18 B P はアップレギュレーションされることを示し、 I L - 18 B P の発現レベルは、非活動性 C D 、 U C および I B D でないコントロールと活動性 C D とでは明らかに区別されるという最初の証拠を提供する。

【 0213 】

腸のバイオプシーにおける I L - 18 B P の m R N A 転写産物の発現に対する統計学的解析

分散解析が行なわれ、利用できる全てのデータとともに集められた。出力により、活動性 C D 群における 1 人の患者の結果に関して明らかに統計的部外者であると示された (I L 18 に対する非常に高い O D 比、すなわち 16252、および I L 18 B P に対して非常に低い O D 比、すなわち 1058) 。この単一で非常に変則的な一組の測定は、 A N O V A モデルを立証させるものではない (残りの常態に対するシャピロ - ウィルクス (Shapir o - Wilks) のテストの P 値) 。したがって、統計的解析において、この一組の測定は採用しないことに決定した。

【 0214 】

ANOVAモデルは、因子群（コントロール、活動性CD、非活動性CDおよびUC）、タンパク質（IL-18またはIL-18BP）、および患者数（23人）を考慮して使用された。群のあいだで顕著な違いがあった（P値<0.0001）。興味深いことに、IL-18とIL-18BPとの間のOD比の違いが顕著でないことにも気がついた（P値=0.369）。さらに、IL-18発現とIL-18BP発現との相互関係についても行なった。IL-18とIL-18BPとのあいだの相互関係の係数は、0.67に等しく、このことは、IL-18およびIL-18BPにおいて測定されたOD比のあいだの強いつながりを示唆する。その群の影響に関する結果に加え、異なる群を比較するためにシェフェの方法が用いられた。活動性CDに対するOD比は、IL-18BPおよびIL-18の両方の発現に対して、コントロール（+3280）、UC（+2590）なら

10

【0215】

腸組織におけるIL-18BPの免疫組織化学的位置

インサイチュでのIL-18BPの細胞内での発現を評価するために、抗hIL-18BP特異的モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学を、活動性CDの患者およびIBDでないコントロールから得られた腸組織から調製された凍結切片において行なった。IL-18BP陽性細胞は、粘膜固有層、粘膜下組織および筋層内において検出された（示されていない）。陽性に染色された単核細胞が、豊富な細胞質、小胞の網状の核を有する粘膜固有層および粘膜下組織に存在し、それは構造的に組織マクロファージと一致した。筋層

20

【0216】

粘膜バイオプシーにおけるil-18bp産生細胞の存在の同定

炎症した腸組織に存在するIL-18BP陽性細胞は、マクロファージの特異的なマーカー（抗CD68）、および内皮細胞（抗CD31）を用いて同定された（示されていない）。CD68陽性細胞（緑）およびIL-18BP陽性細胞（赤）は、活動性CDからの腸組織の粘膜固有層および粘膜下組織内で検出された（示されていない）。マクロファージおよび内皮細胞もまたIL-18BPに対して陽性であることを確かめるために、両方の色、抗CD68または抗CD31からの緑および抗IL-18BPからの赤について解析され、それとともに抗IL-18BP抗体と結合する全ての細胞がCD68陽性またはCD31陽性のどちらかであることを証明した（橙色～黄色の色）。その二重免疫染色によって、マクロファージおよび内皮細胞は、CDの患者から得られた炎症組織内で染色されるIL-18BPの主な産生源であることが証明された。

30

【0217】

内皮細胞によるil-18bpのmRNAおよびタンパク質の発現

ヒト内皮細胞のIL-18BPの産生能力を調べることにともな、トータルバイオプシーにおける免疫染色およびRT-PCRによって明らかにされた結果を確かめるために、さらに、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVES）においてRT-PCRを行なった（図15A）。内皮細胞は、サイトカインの混合物（hIL-1、hTNF、hIFN）で処理され、24時間後RNA抽出およびPCR解析のために収集された。コントロールのアクチンのmRNAレベルに対するIL-18BPの比により、24時間後刺激されなかった細胞と比較して、処理された細胞における、IL-18BPの転写産物の量が増加していることを証明した。さらに、IL-18BPのmRNAは、内皮細胞において構造的に発現されているように思われる。そのIL-18BPのmRNAレベルもまた解析

40

50

され、処理された細胞においてわずかな増加が証明された。しかしながら、IL-18BPのmRNAは、刺激されていない内皮細胞においては発現されていなかった。

【0218】

刺激されていない細胞（培地）および24時間処理されたHUVECsの培養上清を用いたELISAによって、IL-18BPは両培地に存在し、刺激された細胞で24時間の刺激ののちに30倍に増加することが示された（図15B）。

【0219】

単球細胞株（THP-1）によるIL-18bpタンパク質の発現

IL-18およびIL-18BPの発現は、刺激されていないおよび刺激された分化したTHP-1細胞の培養上清において、ELISAによって解析された（図15C）。この実験により、LPS、hIL-1、hTNF、hIFNでの48時間の刺激の後、IL-18BP発現の増加が示された。並行して、IL-18の分泌は、刺激後増加した（図15C）。

【0220】

要約

本研究において、IL-18BPの発現、ならびにクローン病および潰瘍性結腸炎の患者から得られた粘膜組織内での位置が特徴づけられた。半定量的RT-PCRプロトコルの使用により、潰瘍性結腸炎および炎症でないコントロールの患者と比較して、活動性クローン病患者の粘膜バイオプシーにおいて、IL-18BPのmRNA転写産物が増加していることが明らかになった。粘膜バイオプシーの免疫組織化学的解析により、IL-18BPタンパク質は、内皮細胞内およびクローン病の粘膜に浸潤するマクロファージに位置していた。内皮細胞および活性化マクロファージによるIL-18BP発現は、まず、インビトロにおいて刺激されたヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVECs）およびTHP-1単球細胞株で確認された。刺激の後、それらの細胞は生物活性のあるIL-18BPを分泌した。

【0221】

実施例12：IL-18阻害剤での処置は、実験的な結腸炎を改善する

材料と方法

マウスおよび結腸炎の誘導

オランダのアムステルダム大学の動物研究倫理委員会は、全ての実験を承認している。BALB/cマウスは、ハーラン スプラーク ダウリー社（Harlan Sprague Dawley Inc）から得た（ホルスト（Horst）、オランダ）。マウスは標準状態で飼育、飲み水と食べ物を与えた（AM-11、10mm、ホープ ファームズ社（Hope Farms）製、ウーエルデン（Woerden）、オランダ）。

【0222】

実験は、8および10週齢のメスのBALB/cマウスで行なった。結腸炎は、40%エタノール（メルク社、ダームスタット（Darmstadt）、ドイツ）に溶かした2mgの2,4,6-トリニトロベンゼン硫酸（TNBS）（シグマ ケミカル社（Sigma Chemical Co）、セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国）を、肛門から3センチメートルの位置に定められたピニルカテーテルを用いて、2回直腸投与することによって誘導された（1群につきマウス10匹）。点滴中に、マウスはイソフルラン（1-クロロ-2,2,2-トリフルオロエチルイソフルラン-ジフルオロメチル-エーテル、アボット ラボラトリーズ社（Abbott Laboratories Ltd.）製、クイーンボロウ（Queenborough）、ケント州、UK）を用いて麻酔され、点滴の後、60秒間垂直に保たれた。コントロールマウスも、同様の手順を受けたが、生理食塩水が点滴された。全てのマウスが、最初のTNBS投与から9日後犠牲された（すなわち2回目のTNBSの挑戦から48時間後）。

【0223】

マウスは、ヒトIL-18BPを含有する500μlの0.9%の食塩水を腹腔内投与することによりに処置された。

【0224】

10

20

30

40

50

H I L - 1 8 B P は、C H O 発現系において産生される 6 つのヒスチジンのタグをつけたヒト組換えタンパク質である。h I L - 1 8 B P は、K G - 1 細胞株において I F N 産生を阻害したり、マウス脾臓細胞による I F N 産生を減少させるなど、生物学的に活性である (Kim et al., 2000)。

【 0 2 2 5 】

炎症の評価

体重は毎日記録された。脾臓、尾のリンパ節および結腸は、犠牲して収集された。結腸は、正中切開により取り出され、縦に開かれた。糞便成分を取り除いた後、抹消の 6 c m の湿ったままの重量が記録され、疾患に関連した腸壁の厚くなった部分の指標として用いた。次に、結腸を縦に 2 つに裂き、その一方を組織学的評価のために使用した。

10

【 0 2 2 6 】

組織学的評価

縦に裂かれた結腸は巻かれて、4 % のホルマリンで固定し、組織学ではルーチンの方法でパラフィンに埋め込まれた。マウスへの処置配分量を知らない 2 人の調査員によって、以下の特性、1) 関連領域の割合、2) 小胞の集合体の増殖、3) 浮腫、4) 浸潤 / 潰瘍、5) 陰窩破壊 (crypt loss) および 6) 単核および多形核細胞の浸潤、について採点された。関連領域の割合および陰窩破壊は、以下の 0 から 4 の範囲の段階で採点された。0、通常 ; 1、1 0 % 未満 ; 2、1 0 % ; 3、1 0 から 5 0 % ; 4、5 0 % 以上。浸潤は、上皮が無傷であるならば 0 と定義し、1 は粘膜固有層の関与、2 は粘膜下組織への潰瘍の関与、および 3 は潰瘍が経壁であるときとした。そのほかの特性の重傷度については、以下の 0 から 3 の段階 : 0、なし ; 1、わずか ; 2、中程度 ; 3、重症で採点された。この得点の範囲は 0 から最大 2 6 ポイントであった。

20

【 0 2 2 7 】

結腸ホモジネート

結腸は収集され、ホモジネートは、9 容量のグリーンバーガー (Greenburger) 溶解緩衝液 (3 0 0 m M N a C l , 1 5 m M T r i s , 2 m M M g C l , 2 m M T r i t o n (X - 1 0 0) 、ペプスタチン A、ロイペプチン、アプロチニン (全て 2 0 n g / m l) 、p H 7 . 4) において、組織ホノジナイザーを用いて作製された。組織は 3 0 分間氷上で溶かし、次いで 2 回の遠心分離を行なった (1 0 分間、1 4 0 0 0 g) 。ホモジネートは、使用するまで - 2 0 で保存された。

30

【 0 2 2 8 】

細胞培養およびサイトカインに対する E L I S A

脾臓および尾のリンパ節細胞の懸濁を調製するために、フィルター セル ストレイナー (filter cell strainers) (ベクトン / ディッキンソン ラブウェア社 (Becton / Dickinson labware) 製、ニュージャージー州、アメリカ合衆国) が使用された。細胞は 1 0 % F C S およびシプロキシ (ciproxin) (1 0 μ g / m l) (シグマ ケミカル社製、セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国) を含有する R P M I 1 6 4 0 培地 (バイオウィットカー - ベーリンガー社 (BioWhittaker - Boehringer) 製、ベルバイアーズ (Verviers) 、ベルギー) に懸濁された。脾臓細胞は、滅菌フィコール (ファルマシア社製、ウプサラ (Uppsala) 、スウェーデン) で遠心分離し、単核細胞は R P M I へ移され、細胞懸濁液は数えられる。1 匹のマウスあたり全部で 1×10^5 細胞個が、抗生物質および 1 0 % のウシ胎仔血清を含有する 2 0 0 μ l の R P M I (バイオウィットカー ヨーロッパ社 (BioWhittaker Europe) 製、カンプレックス カンパニー (A Cambrex Company) 、ベルバイアーズ (Verviers) 、ベルギー) で、3 組の穴においてインキュベーションされた。細胞は、抗 C D 3 抗体 (1 : 3 0 濃度 ; 1 4 5 . 2 C 1 1 クローン) および可溶性の抗 C D 2 8 抗体 (1 : 1 0 0 0 濃度 ; ファーミンゲン社製) でプレコートすることによって刺激された。4 8 時間後上清は取り除かれ、I F N - (ファーミンゲン社製) および T F N - (R & D システムズ社、アピンドン (Abingdon) 、イギリス王国) の濃度は E L I S A 分析によって測定された。

40

【 0 2 2 9 】

50

流動細胞計測法

単離された脾臓細胞は、F a c s 緩衝液 (0 . 5 % の B S A , 0 . 3 m m o l / L の E D T A および 0 . 0 1 % の アジ化ナトリウムを含有する P B S) で洗われ、残りの手順のあいだは、氷上で維持した。各ウェル (9 6 穴 V 形マイクロプレート、グレイナー B . V . 、レイバー テクニク社 (Greiner B . V . labor techniek)、アルフェン アアン デ リジン (Alphen aan de Rijn)、オランダ) の 2×10^5 細胞は、以下の抗体 (m A b s)、C y クロム複合ラット抗マウス C D 4 (クローン R M 4 - 5)、F i t c 複合ラット抗マウス C D 6 9 および F i t c 複合ラット抗マウス C D 2 5 (ファーミンゲン社製、サンディエゴ、カルフォルニア州) でインキュベートされた。リンパ球は、F a c s c a n ソフトウェアを結合した F A C S c a n フローサイトメーター (ベクトン ディッキソン社製、マウンテン ビュー (Mountain View)、アメリカ合衆国) を用いることにより前方および側面散布によりゲートでコントロールされ、5 0 0 0 細胞が数えられた。結果は、使用された m A b s に対して陽性のゲートされた細胞の割合として表された。

10

【 0 2 3 0 】

統計的解析

値は処理された各群の平均および S E M として与えられた。群間の相違はノンパラメトリック マン - ウィズニー U 検定 (non-parametric Mann-Withney U test) を用いて解析された。順を追った体重の変化は、分散の一方的解析によって解析された。 $P < 0 . 0 5$ は、顕著であると考えられる。 S P S S 統計ソフトウェア (S P S S 社 (SPSS Inc.)、シカゴ、アメリカ合衆国) は、全ての解析において使用された。

20

【 0 2 3 1 】

結果

I L - 1 8 B P は結腸炎のマウスモデルにおける体重の減少に対して保護する。

【 0 2 3 2 】

実験的な結腸炎における I L - 1 8 の役割、およびとくに I L - 1 8 結合タンパク質 (I L - 1 8 B P) の保護効果について調べるために、T N B S 結腸炎を B A L B / c マウスにおいて誘導した。このモデルは、4 0 % エタノールに含有されるトリニトロベンゼン硫酸 (T N B S) の局所的な暴露からなる。ハプテン (トリニトロフェニル) に緩和される自己抗原のために、遅延タイプの過度の過敏症を誘導し、その反応は前炎症性サイトカイン産生を促す T h 1 型である。

30

【 0 2 3 3 】

マウスは、ヒト I L - 1 8 B P またはコントロールを毎日のペースで腹腔内に処理された。

【 0 2 3 4 】

h I L - 1 8 B P の $12 . 5 \mu g$ から $50 \mu g$ の範囲内の毎日の腹腔内投与量は、疾患の深刻さに影響しなかった (示すデータなし)。しかしながら、毎日腹腔内に投与された $200 \mu g$ の h I L - 1 8 B P の投与量は、疾患の誘導に関連して体重の減少を低減させるのに有効であった。

【 0 2 3 5 】

予想通り、T B S の直腸内点滴は、下痢および体重減少の結果となった。図 1 6 に示したように、処理群のどちらの動物も、3 日後に標準体重の 1 5 % を減少した。しかしながら、コントロールマウスとは対照的に、実験開始日から 4 日後の T N B S 点滴から、h I L - 1 8 B P 処理された動物は急速に最初の体重減少から回復し、8 日後には標準体重に戻った。コントロールマウスにおいては、8 日後の T N B S の 2 回目の投与により再び顕著に体重が減少したことから、h I L - 1 8 B P の投与によって体重減少は十分に保護されている。食塩水処理されたマウスにおける h I L - 1 8 B P の投与は、何の影響もなかった (示すデータなし)。したがって、h I L - 1 8 B P の投与は、T N B S により誘導された結腸炎に関連する体重減少を顕著に減じさせる ($P < 0 . 0 5$)。

40

【 0 2 3 6 】

炎症性特性の効果

50

10日後にマウスは犠牲にされ、結腸の後ろの6センチメートルの重さが決定された(図17A)。TNBS結腸炎において、結腸の重量は食塩水処理されたマウスと比較して増加した。この重さの増加は、hIL-18BP処理されたマウスにおいて顕著に減少した(食塩水処理されたマウスにおける $268\text{mg} \pm 27.3$ と比較して、 $181.6\text{mg} \pm 11.4$ ($P < 0.05$)。TNBS結腸炎は大量の細胞が尾のリンパ節へ移動することに関連していることが既に報告されている(Camoglio et al, 2000)。食塩水処理されたTNBSマウスの尾のリンパ節への細胞の数と比較して、IL-18BP処理は尾のリンパ節に侵入する細胞の数を減少させる(図17B)。

【0237】

早期のTリンパ球活性化のマーカーであるCD69発現における変化は、FacsCan解析によって決定された(図17C)。CD69を発現するCD4⁺脾臓細胞の割合は、TNBS処理されたマウスにおいて11.4%であったが、hIL-18BP処理されたTNBSマウスのCD4⁺/CD69⁺の割合は7.3%であった($P < 0.05$)。

【0238】

脾臓、尾のリンパ節細胞のサイトカイン産生および結腸ホモジネート

T細胞受容体の活性化に続く生合成である、Tリンパ球の炎症性サイトカイン前駆体の産生能力におけるhIL-18BPの効果を知るために、尾のリンパ節および脾臓から細胞を単離し、その細胞を48時間抗CD3/CD28抗体で刺激した。その上清において、IFNおよびTNF産生について測定された(図18)。hIL-18BPマウスおよびコントロール処理されたマウスのサイトカイン産生のあいだで顕著な違いは見られなかった。したがって、hIL-18BPによるIL-18の中和は、T細胞受容体の活性化に反応するTリンパ球の能力の総合的な減少を引き起こさなかった。

【0239】

結腸ホモジネートは、それらのサイトカインレベルに対して解析され、それによって局所的なサイトカインの産生を測定された(図19)。TNBSマウスおよびhIL-18BPで処理されたTNBSマウスの結腸ホモジネートにおいて、IFNレベルに違いは検出されなかった(それぞれ $134\text{pg/ml} \pm 7.8$ および $139\text{pg/ml} \pm 23$)。しかしながら、結腸ホモジネートにおいて、TNFレベルは、hIL-18BPで処理されたTNBSマウスの $110\text{pg/ml} \pm 3$ から、TNBS処理されたマウスの $59\text{pg/ml} \pm 2.7$ まで顕著に減少した。

【0240】

組織学的結果

炎症性特性の減少を仲介するhIL-18BPが組織学的採点にも影響するのかどうか調べるために、パラフィン切片において組織病理学を行なった。組織学的な炎症性の全採点は、おもに粘膜に浸潤しているリンパ球の数の減少の結果として、コントロール処理されたマウスと比較してhIL-18BP処理されたマウスにおいて顕著に減少した(hIL-18BP処理されたマウスにおける 9.8 ± 1.3 と比較して、処理されていないマウスにおいて 15.9 ± 1.1)。IL-18BP処理されたマウスにおいて粘膜の潰瘍が完全に存在しなかったことが顕著な結果であった($P < 0.05$)。結果は以下の表2に要約した。IL-18BP処理されたマウスにおける潰瘍の完全な予防が、とくに顕著であった。

【0241】

【表5】

10

20

30

40

表2：食塩水またはrhIL-18BPαで処理されたTNBSマウスの結腸炎中心部のさまざまな特徴

	コントロール処理された TNBSマウス	hIL-18BPα処理された TNBSマウス
関連する面積%	3.4 ± 0.4	3.2 ± 0.5
小胞の集合体	2.0 ± 0.4	1.5 ± 0.4
浮腫	2.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3
腺維症	0.85 ± 0.26	0.50 ± 0.2
潰瘍化	2.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0*
陰窩破壊	1.7 ± 0.3	1.0 ± 0.3
多形核細胞	2.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2*
単核細胞	1.1 ± 0.1	0.33 ± 0.21*

データは0から4の段階で平均±SEMとして表され、★は顕著な相違を示す。

【0242】

抗mIL-18ポリクローナル抗体は、デキストラン硫酸ナトリウムによって誘導された結腸炎のマウスモデルにおける疾患から保護した。

【0243】

このデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)のモデルにおいて、イド(id)は開始日0日からその動物が犠牲にされるまで、飲み水内において与えた。抗IL-18BPポリクローナル抗体は、0日、4日および8日にi.p.で投与された。その投与量は、ウサギ血清の200および400 μ lであった。最も高い投与量(400 μ l)は、体重の減少、臨床スコア、直腸の出血および結腸の短縮化を顕著に減じさせた(示すものはなし)。ウサギ抗mIL-18処理は疾患の始まりを遅れさせ、進行を予防した(示すものはなし)。

【0244】

要約

前記実施例12は、hIL-18BPまたはIL-18に対するポリクローナル抗血清の投与によるIL-18の中和は、マウスにおける実験的に誘導した結腸炎の深刻さを効果的に減じさせる。

【0245】

毎日hIL-18BPを腹腔内処置されたマウスは、コントロール処理されたマウスと比

10

20

30

40

50

較して最初の体重減少から急速に回復した。尾のリンパ節において、結腸重量および細胞の流入によって測定された結腸の炎症のほかの特性は、h I L - 1 8 B P 処理されたマウスにおいて減じられた。処理されたマウスの組織病理学は、その組織の破壊（潰瘍）の重傷度の低減、およびかなり減少した浸潤細胞の量によって特徴付けられた。h I L - 1 8 B P の効果はまた全身においてであり、脾臓細胞による C D 6 9 の発現の減少によって証明された。

【 0 2 4 6 】

結腸ホモジネートにおいて測定された T N F の局所的な産生は、h I L - 1 8 B P で処理された T N B S マウスにおいて顕著に減少した。このことは、T N F が疾患の進行において重要な役割を担うことを示す。I F N レベルは、T N B S マウスと h I L - 1 8 B P で処理された T N B S マウスとは同様であり、これは過剰な I F N によって誘導される刺激によって説明され得る。

10

【 0 2 4 7 】

結論として、前記データから、炎症性腸疾患の処置において I L - 1 8 の阻害剤としての有効な効果が証明される。

【 0 2 4 8 】

【参考文献】

1. Afford, S.C., et al., Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol*, 1998. 186(1): p. 82-9.
2. Anderson, D.M., et al., A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997. 390(6656): P. 175-179.
3. Baroni, G.S., et al., Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver*, 1999. 19(3): P. 212-9.
4. Bird, G.L., et al., Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med*, 1990. 112(12): P.917-20.
5. Bollon, D.P., et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48.
6. Botstein, D., et al. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19:265-274.
7. Broach, J.R., in "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 445-470(1981).
8. Broach, J.R., (1982) *Cell* 28:203-204.
9. Byrn R.A. et al., 1990, *Nature (London)* 344:667-670.
10. Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 2000;30:1486-95.
11. Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gallay, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 179:1437-44 issn: 0022-1007.
12. Chater, K. F. et al., in "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54).
13. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.
14. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* 173:230-5 issn: 0008-8749.
15. Dayer, J-M (1999). *J. Clin. Inv.* 104, 1337-1339.

20

30

40

50

16. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:118-126.
17. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E and Karin, M. (1997), *Nature* 388, 16514-16517.
18. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, *Lancet* 344, 1125-1127.
19. Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallach. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980. 10
20. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536.
21. Fantuzzi, G., et al., IL-18 regulation of IFN-g production and cell proliferation as revealed in interleukin-1b converting enzyme-deficient mice. *Blood*, 1998. 91: p. 2118-2125.
22. Fiore, G., et al., Liver tissue expression of CD80 and CD95 antigens in chronic hepatitis C: relationship with biological and histological disease activities. *Microbios*, 1999. 97(386): p. 29-38 20
23. Galle, P.R., et al., Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*, 1995. 182(5): P.1223-30.
24. Gracie, A J, Forsey, R J, Chan, W L, Gilmour, A, Leung, B P, Greer, A R, Kennedy, K, Carter, R, Wei, X-Q, Xu, D., Field, M, Foulis, A, Liew, F Y, and McInnes, I B.(1999). *J. Clin. Inv.* 104: 1393-1401
25. Grantham (1974), *Science*, 185. 862-864.
26. Grove, J., et al., Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis [see comments]. *Hepatology*, 1997. 26(1): P. 143-6. 30
27. Gryczan, T., "The Molecular Biology of the Bacilli", Academic Press, NY (1982), pp. 307-329).
28. Gutkind, J.S., et al., A novel c-fgr exon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes. *Molec. Cell. Biol.*, 1991. 11: p. 1500-1507.
29. Harada, K., et al., In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology*, 1997. 25(4): p. 791-6.
30. Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans, and A. Billiau. 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Schwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171:1853-69 issn: 0022-1007. 40
31. Hill, D.B., et al., Increased plasma interleukin-6 concentrations in alcoholic hepatitis. *J Lab Clin Med*, 1992. 119(5) : p. 547-52.
32. Hill, D.B., L.S. Marsano, and C.J. McClain, Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1993. 18: p. 576-580.
33. Hiramatsu, N., et al., Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1994. 19(6): p. 1354-9
34. Huang, Y.S., et al., Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepat* 50

ol, 1996. 24(4): p. 377-84.

35. Iio, S., et al., Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, 1998. 29(4): p. 517-23.

36. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742).

37. John, J. F., et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8:693-704).

38. Kahiwamura, S., Okamura, H. (1998), *Nippon. Rinsho.* 56, pp. 1798-1806.

39. Kendall, K. J. et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4177-4183).

40. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1190-1195. 10

41. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993 Nov 30: 16 1443-53

42. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158:1541-1550.

43. Lee, M., et al., Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci*, 1999. 14(2): p. 175-81. 20

44. Lukkari, T.A., et al., Short-term ethanol exposure increases the expression of Kupffer cell CD14 receptor and lipopolysaccharide binding protein in rat liver. *Alcohol Alcohol*, 1999. 34(3): p. 311-9.

45. Luo, K.X., et al., In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. *J Viral Hepat*, 1997. 4(5): P. 303-7.

46. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann, and K. H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. *J. Immunol.* 144:3028-3033. 30

47. Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3; Gene Expression", Academic Press, NY, pp. 563-608(1980).

48. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.

49. Martinez, F., et al., Ethanol and cytokine secretion. *Alcohol*, 1992. 9(6): p. 455-8.

50. McClain, C.J., et al., Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998. 22(5 Suppl): p. 248S-252S.

51. McClain, C.J. and D.A. Cohen, Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 1989. 9(3): p. 349-51. 40

52. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 26: 1647-51 issn: 0014-2980.

53. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* 18:5322-5328.

54. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzo F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999;163:143-147. 50

55. Muhl H, Kampfer H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J. Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:960-963.
56. Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, and T. Tamura. 1989. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect-Immun* 57:590-5 issn: 0019-9567.
57. Nanji, A.A., et al., Activation of nuclear factor B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology*, 1999. 30(4): p. 934-43.
58. Nishimura, T. and A. Ohta, A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J. Immunol*, 1999. 162: p. 6503-6509. 10
59. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The Human Interferon alpha/beta Receptor - Characterization and Molecular Cloning. *Cell* 77:391-400.
60. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. *FEBS Lett* 314:445-448.
61. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* 170:1409-1414.
62. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
63. Ohlinger W., et al., Immunohistochemical detection of tumor necrosis factor- , other cytokines and adhesion molecules in human livers with alcoholic hepatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993. 423(3): P. 169-76. 20
64. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378:88-91.
65. Okamoto, T., et al., Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon- transgenic mouse liver. *Jpn J Pharmacol*, 1998. 78(2): p. 233-5.
66. Okazaki, M., et al., Hepatic Fas antigen expression before and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 1996. 41(12): p. 2453-8. 30
67. Okamoto, T., K. Yamamura, and O. Hino, The mouse interferon- transgene chronic hepatitis model (Review). *Int J Mol Med*, 1999. 3(5): p. 517-20.
68. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. (1999). *J Immunol* 162:2 1096-100
69. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J E. (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
70. Plater-Zyberk C, Bonnefoy JY. Marked amelioration of established collagen-induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 in vivo. *Nat Med* 1995;1:781-785. 40
71. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;162:6829-6835.
72. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996;16:144-150.
73. Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997 Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J-Clin-Invest*.t 99:469-74 issn: 0021-9738. 50

74. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. (1999). *Arthritis Rheum* 42:8 1577-87.
75. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory .
76. Simonet, W.S., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997. 89(2): p. 309-319.
77. Sheron, N., et al., Elevated plasma interleukin-6 and increased severity and mortality in alcoholic hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 1991. 84(3): p. 449-53.
78. Sompayrac, L. H. and K.L. Danna, Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981. 78: p. 7575-7578. 10
79. Sparks, C.A., et al., Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. *Genomics*, 1993. 17: p. 222-224.
80. Su, G.L., et al., CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol*, 1998. 152(3): p. 841-9.
81. Taieb, J., et al., Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease [letter]. *Lancet*, 1998. 351(9120): p. 1930-1.
82. Triantaphyllopoulos, K A, Williams, R, Tailor, H, and Chernakovsky, Y (1999) . *Arthritis and Rheumatism* 42, 90-99.
83. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 157:3967-73 issn: 0022-1767. 20
84. Tsuij, H., Mukaida, N., Harada A., Kaneko, S., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, m Y, Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K.(1999), *J. Immunol.* 162, pp. 1049-1055.
85. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zuber, R.H., 1992, *J. Immunol.* 148, 2778-2784.
86. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. Cloning of the cDNA for human INF-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 156:4274-4279.34. Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 3:280-289. 30
87. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, Maini RN. Synergy between anti-CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 29 91:7 2762-6.
88. Yasuda, H., et al., Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998. 139: p. 1329-1337. 40
89. Yoshimoto T. Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998), *J. Immunol.* 161, 3400-3407.

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、LPSの注射1時間前にマウスにさまざまな量の組換えIL18BP(0; 0.04; 0.4; 4mg/kg)をマウスへ注射した後のIFN- γ の血清レベル(pg/ml)を表すヒストグラムを示す。血液試料はLPS注射から5時間後に採取され、循環IFN- γ に対するELISAによって解析された。

【図2】 図2は、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の血清レベルを表すヒストグラムを示す。P.アクネスに感染させたマウスにLPSを注射する前に、組換えヒ 50

トIL18BPの増加する投与量(0; 0.04; 0.4; 4 mg/kg)をマウスに注射した。血液試料は、LPS注射から5時間後に採取され、ALTの血清レベルが測定された。SF = シグマ - フランケル: AST/ALTの1SFユニットは、pH7.5で25 のとき、1分間あたり $4.82 \times 10^{-4} \mu\text{mol}$ グルタミン酸塩を形成する。

【図3】 図3は、LPS注射後のマウスの生存時間を示す。P.アクネスに感染させたマウスにLPSを注射する20分前に、組換えヒトIL18BPをさまざまな投与量(0; 0.04; 0.004; 4 mg/kg)で注射した。三角形: 4 mg/kg; 小さいひし形: 0.4; 大きいひし形: 0.04; 丸形: IL18BPなし(LPSのみ)。

【図4】 図4は、P.アクネスに感染させたマウスにLPSを注射する20分前にさまざまな投与量のIL18BP(0; 0.4; 4 mg/kg)を投与し、その注射から5時間後に測定されたIFN- の血清レベルを表すヒストグラムを示す。

10

【図5】 図5は、大腸菌(図5A)またはS.チフィウム(図5B)由来の40 mg/ml(致死投与量)のLPSを注射する30分前に、ポリクローナルIL-18抗血清または正常なウサギ血清(NDS = コントロール)のどちらかを注射したマウスの生存を示す。三角形: マウスはIL-18抗血清を注射された; 丸形: マウスはNDSで注射された。x軸において、LPSテスト後の日数が表される。 $p < 0.05$ 。

【図6】 図6は、以下の方法で処置された各群5匹のマウスにおける平均 + SEMを表すヒストグラムを示す。マウスは、抗IL-18抗血清、可溶性TNF- 受容体(TNFsRp55)または賦形剤(食塩水)のいずれかを腹腔内(i.p.)注射され、すぐにコンカナバリンA(ConA; 図6A)またはPEA(緑膿菌、図6B)を静脈内(i.v.)投与された。 $p < 0.01$; $p < 0.001$ およびConAまたはPEAのみ; # $p < 0.01$ およびTNFsRp55または抗IL-18階乗のANOVAのどちらか。

20

【図7】 図7は、関節炎のマウスモデルの臨床スコアにおけるIL-18BPの効果を示す。図7Aは、さまざまな量のIL-18BPまたはIFN- または賦形剤(NaCl)をマウスに毎日i.p.(腹腔内)投与した後測定された臨床スコアを表すグラフを示す。記号: 塗りつぶしの三角形: 10000 IU IFN- ; 白抜きの三角形: 10 mg/kg IL-18BP、逆三角形: 3 mg/kg IL-18BP、ひし形: 1 mg/kg IL-18BP; 丸形: 0.5 mg/kg IL-18BP; 白抜きの四角形: 0.25 mg/kg IL-18BP、および塗りつぶしの四角形: NaCl。x軸において処置日数が表され、y軸において臨床スコア(平均値)が表される。統計はマンウイットニータストによって計算された。図7Bは図7Aのグラフから推論されるAUC(曲線下の面積)を表すヒストグラムを示す。n = 動物の数。

30

【図8】 図8は、肢の膨張におけるIL-18BPの効果を示す。図8Aは、さまざまな量のIL-18BPで処置された個々の動物の病気にかかった後肢の肢の太さ(膨張)を計測することによって得られた結果を表すグラフを示す。y軸は処置の開始からのミリメートルでの肢の太さの変化を示す。記号は図7と同じである。図8Bは図8Aから推論されるAUCを表すヒストグラムを示す。n = 動物の数。

【図9】 図9は、ほかの肢に疾患が広がっていく急性関節炎のときの病気にかかった後肢の数の解析を示す。記号: 塗りつぶしの四角形: NaCl(コントロール)、三角形: 10 mg/kg IL-18BP、逆三角形: 3 mg/kg IL-18BP、ひし形: 1 mg/kg IL-18BP; 丸形: 0.5 mg/kg IL-18BPおよび白抜きの四角形: 0.25 mg/kg IL-18BP。

40

【図10】 図10は、病気にかかった関節の軟骨の侵食スコアを表すヒストグラムを示す。

【図11】 図11は、マウスの関節の組織病理学を示す。実験の最後に、最初に関節炎が発症した肢を切断し、固定し実施例10に記載したように処理した。図11A: 正常なマウスの関節; 図11B: 関節炎のマウス由来の関節; 図11C: rhIL-18BPで処置されたマウス由来の関節。

【図12】 図12は、それぞれ3 mg/kgのIL-18BPまたは食塩水(賦形剤)

50

で処理されたマウスの、アイソタイプ I g G 1 (白抜きの支柱)または I g G 2 a (線影がついた支柱)の抗 2 型コラーゲン抗体のレベルを表すヒストグラムを示す。測定は、疾患の 4 日後 (D 4) または 8 日後 (D 8) に行なった。

【図 1 3】 図 1 3 は、1、3 または 10 m g / k g の I L - 1 8 B P、1 0 0 0 0 I U のインターフェロン (I F N - b)、正常マウス血清 (N M S) または食塩水 (N a C l) でそれぞれ処置された動物の I L - 6 レベルを p g / m l で表すヒストグラムを示す。

【図 1 4】 図 1 4 は、活動性クローン病、潰瘍性結腸炎を患った患者または正常で健康な個体由来の腸パイオプシーにおける、h I L - 1 8 B P および I L - 1 8 の m R N A 転写産物の発現を示す。I L - 1 8 B P、I L - 1 8 およびハウスキーピング遺伝子 (- アクチン) に対して、対応する R T - P C R 産物は表される (図 1 4 A)。エチジウムブロマイド染色されたバンドの比較的な定量化は、コダックデジタルイメージングソフトウェアを用いて行なわれ、標的遺伝子と - アクチンとの比として報告される。その標的遺伝子は図 1 4 B において I L - 1 8、図 1 4 C において I L - 1 8 B P である。

10

【図 1 5】 図 1 5 は、H U V E C s (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) による h I L - 1 8 B P の m R N A の転写産物およびタンパク質の発現、ならびに T H P 1 (ヒト単球細胞株) によるタンパク質の発現を示す。R N A は処置されていない内皮細胞 (培地) および、I L - 1、T N F、I F N で刺激された内皮細胞から単離された。陽性コントロール: クローン病の患者からの結腸、陰性コントロール: c D N A なし。I L - 1 8 B P および I L - 1 8 の発現は、半定量 R T - P C R によって解析された (図 1 5 A)。処置されていない (培地) 培養上清および I L - 1、T N F、I F N で 2 4 時間活性化した H U V E C s (図 1 5 B) または T H P 1 (図 1 5 C) 細胞の培養上清は、E L I S A によって I L - 1 8 B P および I L - 1 8 のタンパク質産生について解析された。

20

【図 1 6】 図 1 6 は、食塩水 (N a C l) または I L - 1 8 B P (8 m g / k g) のどちらかの腹腔内 (i p) 投与後、I B D のマウスモデルにおいて 1 日から 1 0 日のあいだの体重の発達を示す。重さの変化は、第 1 日からの体重の変化の割合として表される。2 つの群の平均値および S E M は、各群 8 匹のマウスで示される。

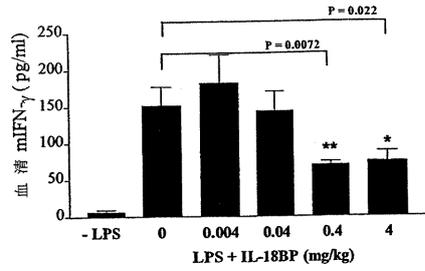
【図 1 7】 図 1 7 は、I L - 1 8 B P 処理された I B D マウスおよび処理されていない I B D マウス由来の結腸、尾のリンパ節および脾臓の解析の結果を示す。図 1 7 A は、結腸の最後 6 センチメートルの重さを m g で表す。図 1 7 B は、尾のリンパ節に存在する細胞全ての数を示す。図 1 7 C は脾臓において C D 4⁺ / C D 6 9⁺ について陽性染色される細胞の割合を表す。データは平均値と S E M を表す。 は顕著な違いを示す。

30

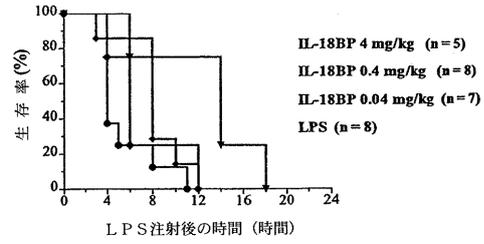
【図 1 8】 図 1 8 は、上清に存在する C D 3 / C D 2 8 による刺激後の、尾のリンパ節細胞 (図 1 8 5 A および C) および脾臓細胞 (図 1 8 B および D) によって 4 8 時間後産生された I F N (図 1 8 A および B) および T N F (図 1 8 C および D) の量を示す。平均および S E M が示される。

【図 1 9】 結腸ホモジネート内の T N F (図 1 9 A) および I F N (図 1 9 B) の内容量を示す。データは結腸の重さに対して補正されている。平均値および S E M を示す。 は顕著な違いを示す。

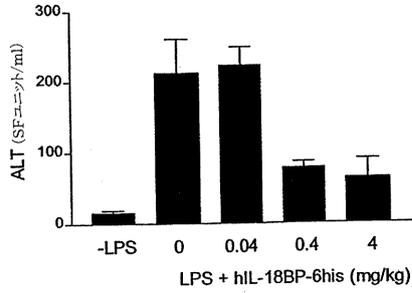
【 図 1 】



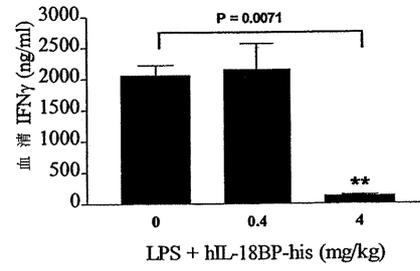
【 図 3 】



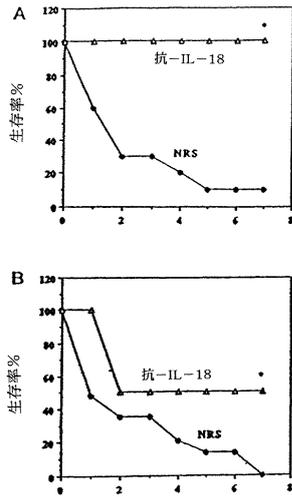
【 図 2 】



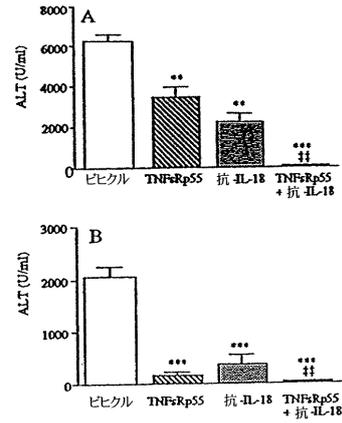
【 図 4 】



【 図 5 】

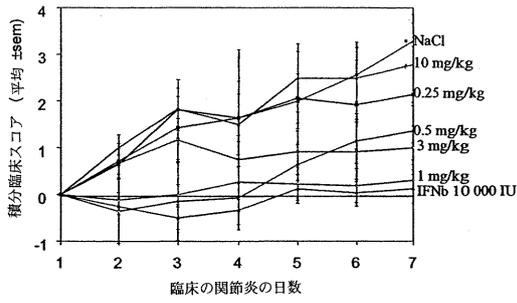


【 図 6 】

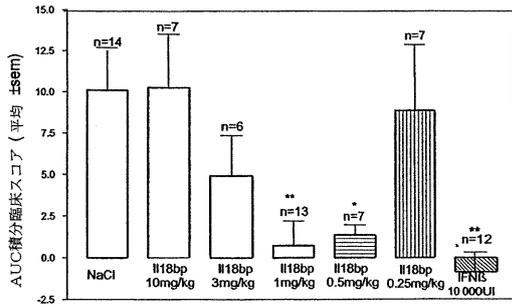


【 図 7 】

A

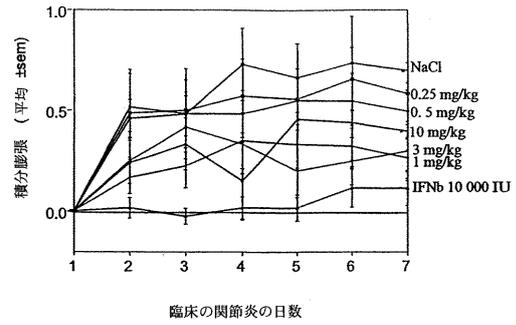


B

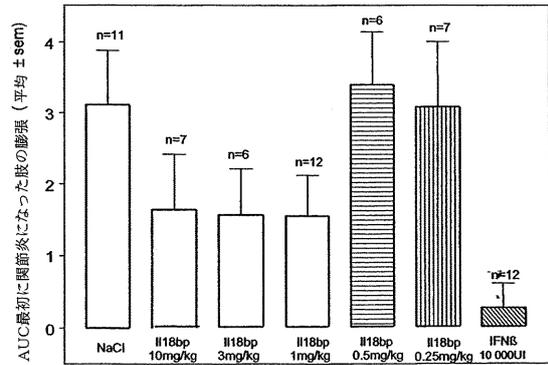


【 図 8 】

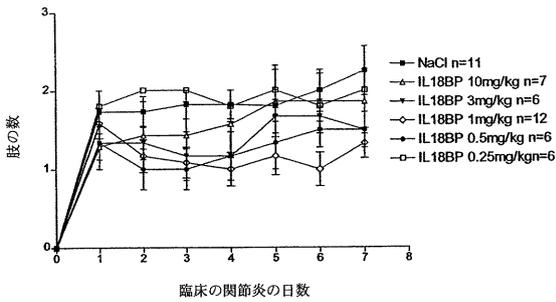
A



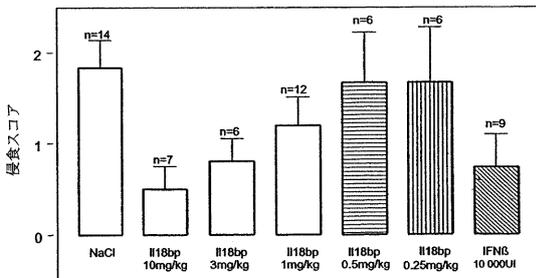
B



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

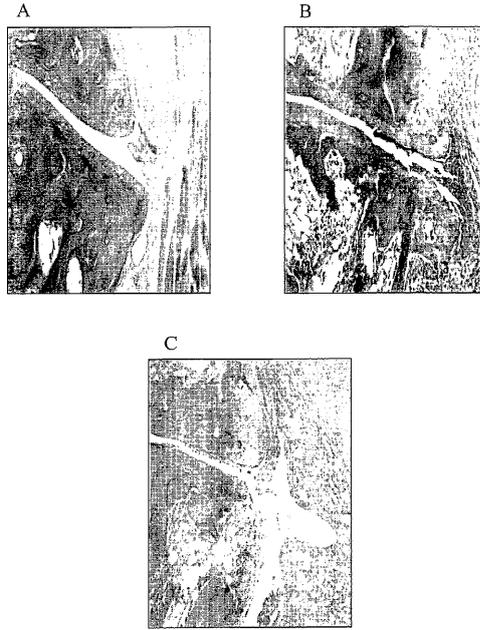
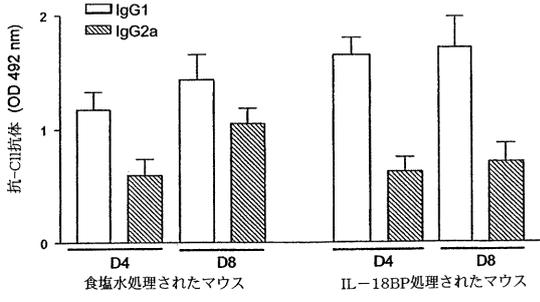


Fig. 11

【 1 2 】



【 1 3 】

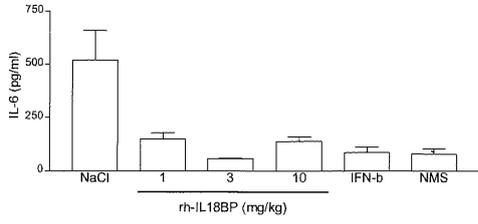
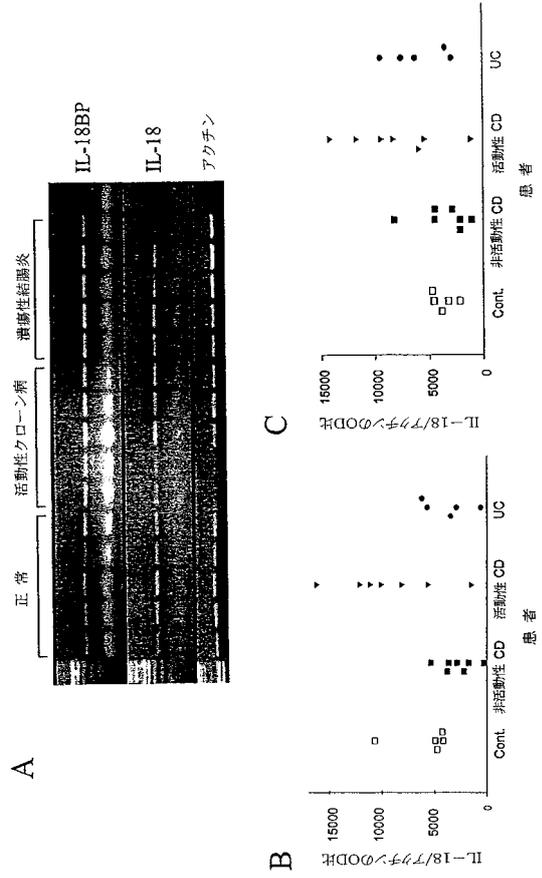
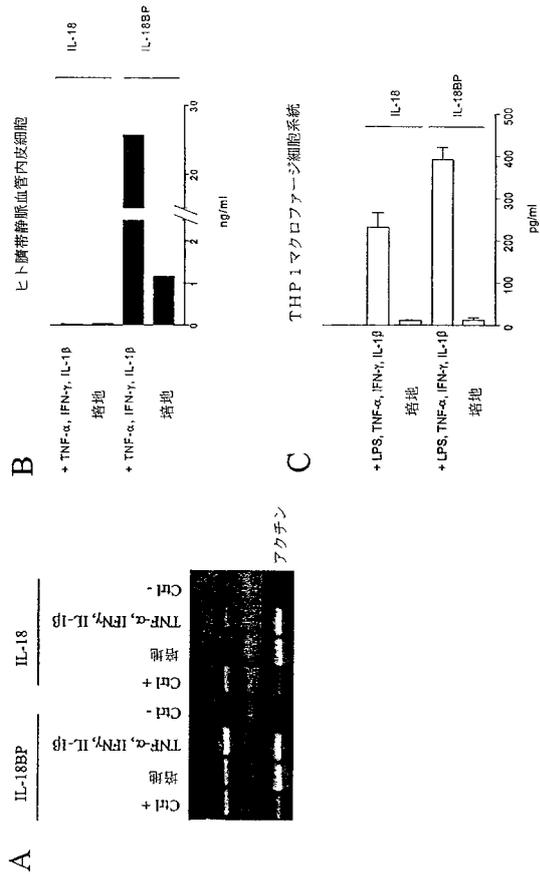


Fig.13

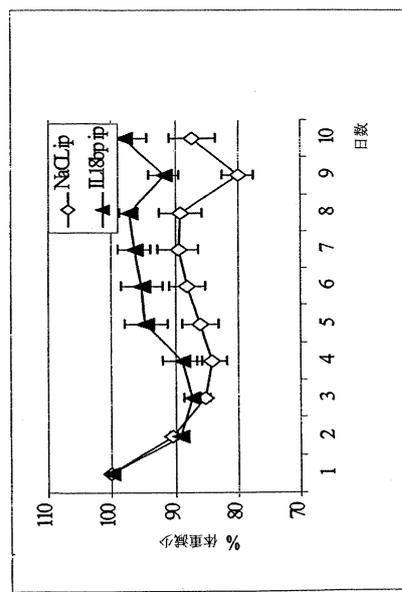
【 1 4 】



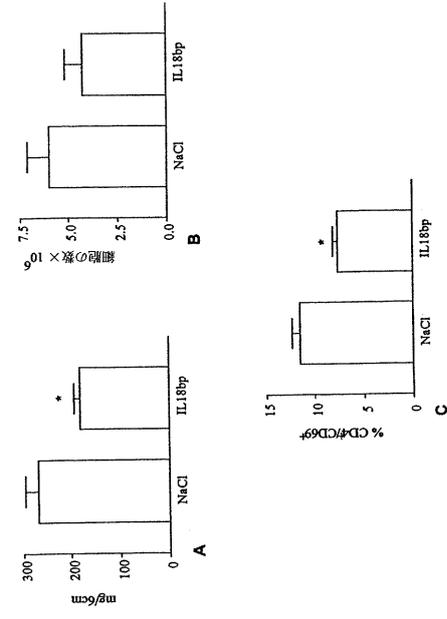
【 1 5 】



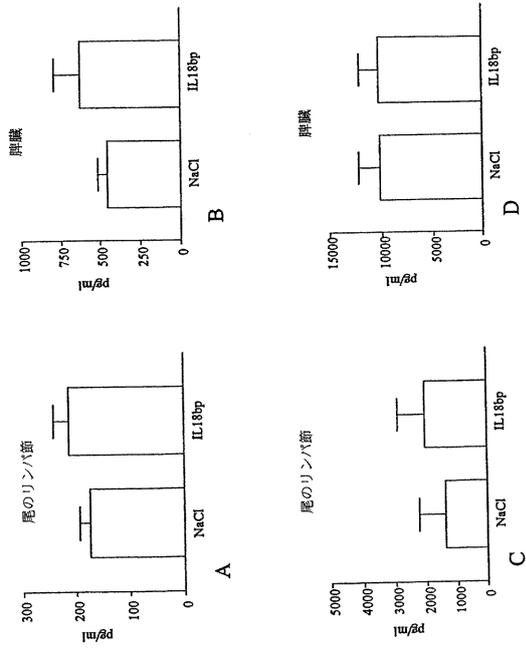
【 1 6 】



【 17 】



【 18 】



【 19 】

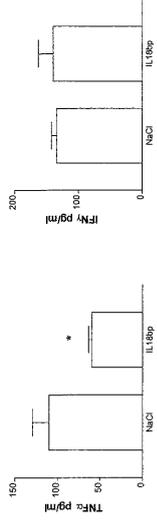


Fig. 19

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 1/16

- (31)優先権主張番号 00121651.4
 (32)優先日 平成12年10月4日(2000.10.4)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 00125633.8
 (32)優先日 平成12年11月23日(2000.11.23)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (74)代理人 100098257
 弁理士 佐木 啓二
 (74)代理人 100117112
 弁理士 秋山 文男
 (74)代理人 100117123
 弁理士 田中 弘
- (73)特許権者 508066979
 メルク セロノ ソシエテ アノニム
 スイス連邦、ヴォ、クワンシン 1 2 6 7、サーントル アンデュストリエル(番地なし)
- (74)代理人 100098464
 弁理士 河村 洸
 (74)代理人 100149630
 弁理士 藤森 洋介
 (74)代理人 100154449
 弁理士 谷 征史
- (72)発明者 チバツコ、ヨランダ
 スイス連邦、セアシュ - 1 2 3 2 コンフィグノン、シュメン デュ ヴエイローネ(番地なし)
- (72)発明者 ディナレロ、チャールズ
 アメリカ合衆国、8 0 3 0 2 コロラド州、ボールダー、フィフティーンズ ストリート 3 3 3
- (72)発明者 プラテル - チベルク、クリスティーネ
 スイス連邦、セアシュ - 1 2 2 7 ジュネーヴ、ケ デュ シュヴァル - ブラン、1 6
- (72)発明者 ファン デーフェンテル、サンタール
 オランダ王国、エンエル - 2 0 1 2 セーハー ハールレム、クレイネ ホウトウェッヒ 6
- (72)発明者 ルピンステイン、メナケム
 イスラエル国、5 4 0 4 2 ギバット シュミュエル、ハトマー ストリート 1 6
- (72)発明者 ノビック、ダニエラ
 イスラエル国、7 6 3 0 2 レホボト、ハナシ ハリション 4 0
- (72)発明者 キム、ソーヒュン
 アメリカ合衆国、8 0 2 2 4 コロラド州、デンバー、サウス オネイダ ストリート 8 6 0、
 アパート シー - 1 1 2 (番地なし)

審査官 安居 拓哉

- (56)参考文献 国際公開第99/009063(WO, A1)
 特開平11-240898(JP, A)
 欧州特許出願公開第00974600(EP, A1)
 H.TSUTSUI, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1997年10月15日, Vol.159, No.8, pp.3961-3967

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 45/00

A61K 38/00

A61P 1/16

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)