

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-537507  
(P2009-537507A)

(43) 公表日 平成21年10月29日(2009.10.29)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
<b>A61K 39/00</b> (2006.01)	A 61 K 39/00	H	4 C 0 8 5
<b>A01K 67/027</b> (2006.01)	A 01 K 67/027		
<b>A61P 9/10</b> (2006.01)	A 61 P 9/10	1 O 1	
<b>A61P 43/00</b> (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1	
<b>A61K 39/39</b> (2006.01)	A 61 K 39/39		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2009-510567 (P2009-510567)
(86) (22) 出願日	平成19年5月15日 (2007.5.15)
(85) 翻訳文提出日	平成20年12月17日 (2008.12.17)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2007/001264
(87) 國際公開番号	W02007/132338
(87) 國際公開日	平成19年11月22日 (2007.11.22)
(31) 優先権主張番号	60/800,029
(32) 優先日	平成18年5月15日 (2006.5.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	508031944 エクスバイオテク インコーポレーティッド カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト ヘイスティング ス ストリート 1055 スイート 3 OO
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(74) 代理人	100129506 弁理士 小林 智彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アテローム性動脈硬化症に対して保護的な自己抗体を誘導する IL-1  $\alpha$  免疫法

## (57) 【要約】

哺乳動物のIL-1 自己抗体産生を引き起こすIL-1 による哺乳動物の免疫法を用いて、哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を減少させるか、またはその進行を軽減させることができる。本処置を用いて、末梢虚血性心疾患、冠動脈疾患、脳血管疾患、および末梢動脈性疾患などのアテローム性動脈硬化症関連疾患の進行を緩和することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳動物においてアテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を減少させるための薬物の調製における、IL-1 の使用。

**【請求項 2】**

哺乳動物においてアテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を減少させるための薬物の調製における、IL-1 をコードする組換えウイルスの使用。

**【請求項 3】**

哺乳動物においてアテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を減少させるための薬物の調製における、IL-1 に化学的に結合したウイルス様粒子の使用。 10

**【請求項 4】**

哺乳動物が、マウス、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、およびヒツジからなる群より選択される、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 5】**

哺乳動物がマウスであり、かつマウスがApoE-/-である、請求項3記載の使用。

**【請求項 6】**

哺乳動物がヒトである、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 7】**

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢動脈疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。 20

**【請求項 8】**

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢虚血性心疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 9】**

アテローム性動脈硬化症関連疾患が冠動脈疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 10】**

アテローム性動脈硬化症関連疾患が脳血管疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。 30

**【請求項 11】**

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢動脈性疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 12】**

IL-1 が組換えIL-1 である、請求項1または3記載の使用。

**【請求項 13】**

組換えIL-1 がマウスまたはヒトである、請求項2または12記載の使用。

**【請求項 14】**

IL-1 が担体に結合している、請求項1記載の使用。

**【請求項 15】**

担体がツベルクリンの精製タンパク質誘導体（PPD）である、請求項14記載の使用。 40

**【請求項 16】**

IL-1 がアジュvantの存在下で使用される、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

**【請求項 17】**

アジュvantが水酸化アルミニウムである、請求項16記載の使用。

**【請求項 18】**

IL-1 で免疫されたApoE-/-マウス。

**【請求項 19】**

IL-1 自己抗体を含むApoE-/-マウス。

**【請求項 20】**

哺乳動物をIL-1 で免疫する段階を含む、アテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクお 50

より重症度を減少させるために哺乳動物を処置する方法。

【請求項 2 1】

哺乳動物が、マウス、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、およびヒツジからなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項 2 2】

哺乳動物がマウスであり、かつマウスがApoE-/-である、請求項21記載の方法。

【請求項 2 3】

哺乳動物がヒトである、請求項20記載の方法。

【請求項 2 4】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢動脈疾患である、請求項20記載の方法。 10

【請求項 2 5】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢虚血性心疾患である、請求項20記載の方法。

【請求項 2 6】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が冠動脈疾患である、請求項20記載の方法。

【請求項 2 7】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が脳血管疾患である、請求項20記載の方法。

【請求項 2 8】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢動脈性疾患である、請求項20記載の方法。

【請求項 2 9】

哺乳動物が組換えIL-1 で免疫される、請求項20記載の方法。 20

【請求項 3 0】

組換えIL-1 がマウスまたはヒトである、請求項20記載の方法。

【請求項 3 1】

哺乳動物が、担体に結合したIL-1 で免疫される、請求項20記載の方法。

【請求項 3 2】

担体がツベルクリンの精製タンパク質誘導体（PPD）である、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

哺乳動物がアジュバントの存在下でIL-1 で免疫される、請求項20記載の方法。

【請求項 3 4】

アジュバントが水酸化アルミニウムである、請求項33記載の方法。 30

【請求項 3 5】

哺乳動物がIL-1 をコードする組換えウイルスを用いて免疫される、請求項20記載の方法。

【請求項 3 6】

哺乳動物がIL-1 に化学的に結合したウイルス様粒子を用いて免疫される、請求項20記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2006年5月15日に出願された特許出願第60/800,029号の恩典を主張し、参照により該出願を組み入れる。 40

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

IL-1 は炎症の基本的な調節因子として十分に特徴決定されており、炎症関連疾患におけるその役割はいくつかの動物モデルにおいて示唆されている。インターロイキン(IL)-1 に対するヒトIgG自己抗体(aAb)は一般的な集団において比較的高頻度で検出されている。実際に、表面上は健常なヒトの20%よりも多くが高度に特異的なIL-1 aAbを有することが報告されている。天然IL-1 aAbを有する男性の所見により、アテローム性動脈硬化症または関節リウマチなどの炎症関連疾患の進行のリスクの減少における内因性IL-1 50

の中和に関する役割が示唆されてきたが、これらの研究は上記個体における他の自己抗体の存在を排除しておらず、因果関係を確立することは難しく、これらの抗IL-1a抗体の生理学的役割ははっきりと確立されていない。

#### 【発明の開示】

##### 【0003】

###### 発明の詳細な説明

ApoE-/-マウスは、主要動脈においてアテローム性動脈硬化症様plaqueの急速な進行をもたらす、操作された脂質輸送欠損を有する。これらのマウスは高コレステロール血症であり、かつ動脈性病変を自発的に発症するため、ヒトアテローム性動脈硬化症の最も説得力のあるモデルと考えられている。したがって、ApoE-/-マウスは、アテローム性動脈硬化症および処置を研究するためのモデル系として広範に使用されている。10

##### 【0004】

本発明は、例えばApoE-/-マウスをIL-1に対して免疫することによって取得され得る、IL-1aの抗体中和についての動物モデルを提供する。すべての免疫動物は、高レベルで持続するIL-1に対するIgG aAbを発生させる。免疫マウスの血清由来のIL-1 aAbは、IL-1応答性マウスT細胞株であるNOB-1へのIL-1の結合を阻害し、かつインビボでIL-1を中和する（しかしIL-1で誘導されたIL-6は中和しない）。

##### 【0005】

高脂肪の食餌を与えられる対照ApoE-/-マウスは、主要動脈においてアテローム性動脈硬化症様病変を発症する。病変は、マクロファージの浸潤、壊死性コア、および様々な量の細胞外マトリクスを伴う増殖した平滑筋細胞によって示される。対照的に、IL-1に対して免疫されたApoE-/-動物は、アテローム性動脈硬化性病変レベルの激しい低下、およびアテローム性動脈硬化症の進行に対する著しい耐性を有する。免疫前に脂肪線条（アテローム性動脈硬化性病変の初期段階）を有するマウスにおいて、IL-1による免疫は、血管床が本質的に健常なままであるように、アテローム性動脈硬化性病変の発症を停止させる。20

##### 【0006】

免疫によって產生された内因性IL-1自己抗体の存在によって、ApoE-/-マウスはアテローム性動脈硬化症関連障害（例えば、末梢虚血性心疾患、冠動脈疾患、脳血管疾患、末梢動脈性疾患）に対して十分に保護される。したがって本発明は、天然のIL-1 aAbを有する男性は、中和IL-1 aAbを有さない男性と比較してアテローム性動脈硬化症関連心疾患の発生率が低下するという本発明者らの以前の臨床所見を支持する明解な動物モデルを提供する。30

##### 【0007】

天然にIL-1 aAbを產生するヒトはアテローム性動脈硬化症の発症のリスクがより低いことが見出されているため、天然のIL-1 aAbは、血管内皮中でのIL-1の有害な炎症性効果の中和における生理学的な役割を果たし得る可能性が高いようである。したがって、本発明はまた、疾患に対して保護的なIL-1自己抗体を誘導することによって、アテローム性動脈硬化症関連障害（例えば、末梢虚血性心疾患、冠動脈疾患、脳血管疾患、末梢動脈性疾患）の発症のリスクを有する、ヒトを含む個体を処置する方法も提供する。明らかな健康障害を有さない集団の約20%におけるIL-1自己抗体の臨床所見により、IL-1に対する中和自己抗体の投与が健康リスクを引き起こさないと考えられることが示唆される。さらに、IL-1ノックアウトマウスもまた明らかに健康であり、本アプローチが安全であることを支持する。そのため、ヒトにおけるIL-1 aAbの誘導は、アテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を低下させるための安全かつ有効な方法である。40

##### 【0008】

当技術分野において公知である任意の免疫法が、動物モデルまたは哺乳動物（例えば、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ヤギ；好ましくはヒト）患者のいずれかにおいて所望の自己抗体応答を得るために使用され得る（下記参照）。

アジュバント	例
無機塩	水酸化アルミニウム、リン酸カルシウム、水酸化ベリリウム
送達系	不完全フロイントアジュバント
細菌生成物	完全フロイントアジュバント、BCG、プラスミド
DNA	CpGモチーフ
免疫刺激複合体 (ISCOMS)	ウイルスタンパク質を含むQuil Aの混合物
サイトカイン	GM-CSF、IL-12、IL-1、IL-2
組換えウイルス	インフルエンザ
ウイルス様粒子接合体	ウシロタウイルスVP2およびヒトロタウイルスVP6を含む2/6 VLP
組換え細菌	弱毒化ネズミチフス菌( <i>Salmonella typhimurium</i> )

10

20

30

40

50

## 【0009】

本開示において引用されるすべての特許、特許出願、および参照文献は、特に参照により本明細書に組み入れられる。上記の開示は本発明を概説する。例証の目的のためのみに提供されかつ本発明の範囲を限定することを意図するものではない以下の具体例を参考することによって、より完全な理解を得ることができる。

## 【0010】

## 実施例1

## ApoEノックアウトマウス

ApoE-/マウスはJackson Laboratory, Bar Harbor, MEより取得する。血管病変の発症に対する性別の潜在的な影響を回避するために、雄の動物のみを使用する；さらに、アテローム性動脈硬化症の進行におけるIL-1 $\alpha$ Abの保護的役割を観察する臨床研究は、この時点で男性においてのみ行われてきた。10週齢のマウスを使用し、高コレステロール含量(1.25%コレステロール、0%コレート；Research Diets, New Brunswick, NJ)の食餌を与える。マウスに10週間食餌を与え、その後屠殺する。標準的な方法にしたがって、血液を採取し、かつ大動脈を灌流して、部分に切断し、固定するかまたは凍結する。

## 【0011】

## 実施例2

## マウスIL-1による免疫

Svenson et al., J Immunol Methods. 2000 Mar 6;236(1-2):1-8により記載された方法にしたがって、0.41(w/w)の割合でツベルクリンの精製タンパク質誘導体(PPD)と接合したマウスIL-1 $\alpha$ Abを解析するため、各注射の2週間後にマウスの後眼窩叢から採血する。対照動物は、IL-1 $\alpha$ Abを含まないPPD溶液を用いた同一の接種スケジュールを受ける。

## 【0012】

## 実施例3

## アッセイ

IL-1 $\alpha$ に対するマウスIgGの応答は、Svenson et al., 2000により記載されたように測定する。IgGへのIL-1 $\alpha$ の飽和結合解析は、記載されたように(Svenson et al., J Clin Invest. 1993 Nov;92(5):2533-9)行う。血清IgGに結合した<sup>125</sup>I-IL-1 $\alpha$ を血清への全結合と比較するために、同一の試料を並行してプロテインG SepharoseカラムおよびSephadex G-75 superfineを含むカラムに流す(Svenson et al., Cytokine. 1992 Mar;4(2):125-33)。

## 【0013】

Svenson et al., 2000に記載されたようにNOB-1マウスT細胞株を用いて細胞受容体アッセイを行う。IL-1 RIAおよびIL-6 ELISAもまたSvenson et al., 2000に記載されたように行う。

## 【0014】

IL-6のインビオ誘導はSvenson et al., 2000に記載されたように行う。

## 【0015】

## 実施例4

ApoE-/-マウスにおける天然の抗IL-1 aAbの欠如

10週齢～10ヶ月齢の15匹のApoE-/-マウス由来の血清は、IgG抗IL-1 aAbについてすべて陰性である。 10

## 【0016】

## 実施例5

ApoE-/-マウスにおけるIL-1 aAbの產生

PPDと接合したIL-1 を4回接種した後、すべてのマウスは高いIL-1 IgG aAb力を有する。PPDのみを接種された対照マウスの血清においてaAbは見出されない。ワクチン投与から3ヶ月後の群の間で有意な重量の差異は無い。

## 【0017】

## 実施例6

誘導されたIL-1 aAbの特徴決定

陽性マウスのワクチン投与から2週間後および6週間後に採取された血清を試験する。血清への全IL-1 の結合およびIgGへの結合の間に差異は見られない。 $K_d$ は0.1 nM～1.3 nMの範囲（例えば、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3 nM）にわたる。 20

## 【0018】

## 実施例7

誘導された抗IL-1 aAbの特徴決定

IL-1 aAbはRIAを用いて試験する。抗血清はSvenson et al., 2000において開示されたものと同様に機能する。

## 【0019】

## 実施例8

受容体結合の抑制

マウス細胞株NOB-1への<sup>125</sup>I-IL-1 の結合は、ワクチン投与から2週間後に採取されてSvenson et al., 2000に記載されたように試験されるすべてのaAb陽性血清によって、少なくとも10%（例えば、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95%）抑制される。aAb陰性対照は陰性である。 30

## 【0020】

## 実施例9

IL-1 のインビオ中和

代表的な抗血清の中和活性をSvenson et al., 2000に記載されたように試験する。データは、IL-1 aAbがNOB-1細胞においてIL-1 活性を中和することを示す。 40

## 【0021】

## 実施例10

アテローム性動脈硬化性病変の解析

マウスを様々な時点で屠殺し、アテローム性動脈硬化症の程度を評価する。プラーク沈着およびアテローム性動脈硬化性病変は、標準化された方法にしたがって（例えば、Trogan et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 19;99(4):2234-9; Chaabane et al., Invest Radiol. 2003 Aug;38(8):532-8）、大動脈基部および胸腹部大動脈において評価し、定量する。IL-1 で免疫したApoE-/-マウスにおける大動脈基部アテローム性動脈硬化性病変領域は、ApoE-/-対照マウスと比較して有意に（例えば、少なくとも10、15、20 50

、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95% ) 減少している。アテローム性動脈硬化性病変の発症はまた、スタンIVで染色された下行大動脈の標本において検査する。IL-1 で免疫されたApoE-/-マウスの腹部大動脈におけるスタン親和性の脂質に富む病変の形成は、その同腹仔対照群と比較して有意に(例えば、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95% ) 減少している。同様に、ヘマトキシリン エオシンで染色した後に現れる大動脈弓切片におけるアテローム性動脈硬化性病変の形成は、IL-1 で免疫された動物において、対照と比較して有意に(例えば、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95% ) 減少している。

## 【0022】

10

冠動脈の管腔領域は、対照ApoE-/-マウスにおいて、対照マウスと比較して有意に(例えば、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95% ) 縮小している。大動脈基部の組織学的解析は、ApoE-/-対照において新生内膜中のCD68陽性細胞の存在を実証するが、IL-1 で免疫された動物においては実証しない。

## 【0023】

## 実施例11

## 材料および方法

## ELISAによる抗IL-1 抗体力価の測定

ヒトまたはマウスIL-1 をそれぞれ、1ウェルあたり100 μlの容量で0.5 μg/mlを用いて、96ウェルELISAプレート上で一晩インキュベーションする。その後プレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) + 0.05% Tween 20で4回洗浄し、その後PBS中の1%ウシ血清アルブミン (BSA) + 0.05% Tween 20を含むプロッキング溶液で飽和させる。1ウェルあたり200 μlの本プロッキング緩衝液を1~2時間室温で使用する。その後プレートを再びPBS + 0.05% Tween 20 (PBST) で4回洗浄する。その後、100 mlの連続希釈した血清試料 (PBST + 1% BSA中で1:2希釈) を添加し、室温で1時間、または4 で一晩インキュベーションする。その後プレートを再びPBSTで4回洗浄する。その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗Fc抗体を二次抗体として添加する(1% BSAを含むPBST中で1:2000希釈、1ウェルあたり100 μl、1時間、室温)。ヒト: 400 μl PBST + 1% BSA中、0.2 μlヤギ抗ヒトIgG-HRP。マウス: 0.5 μl HRPヤギ抗マウスIgG(H+L)。その後プレートを再びPBSTで4回洗浄する。着色反応はABTS緩衝液を用いて行う。ABTS緩衝液 (500 ml中、3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸、Sigma カタログ番号A-1888、150 mg、0.1 Mクエン酸、Fisher無水物、カタログ番号A-940; pHをNaOHペレットで4.35に調整し、11 mlのアリコートを -20 で保存する、40% SDS (200 ml dd H<sub>2</sub>O中、80 g SDS)、200 ml DMF (N,N-ジメチルホルムアミド)を添加)。100 μl のABTS緩衝液を各ウェルに添加する。良好なコントラストが見えたたら、100 μlの2%シュウ酸溶液を添加することによって反応を停止する。その後、ELISAリーダーを用いて波長405 nmで光学濃度を測定する。

20

30

30

## 【0024】

## マウス

ApoE-/-マウスはJackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, B6.129P2-Apoe<sup>tm1Unc</sup>/J系統) から取得した。Apoe<sup>tm1Unc</sup>変異について同型接合であるマウスは、年齢や性別に影響を受けない著しい総血漿コレステロールレベル増加を示す。近位大動脈における脂肪線条は3ヶ月齢で認められる。病変は年齢と共に増加し、脂質がより少ないがより伸長した細胞を有する、プレアテローム性動脈硬化性病変のより進んだ段階に典型的な病変へと進行する。穏やかに増加したトリグリセリドレベルが、C57BL/6 × 129交配の遺伝的背景上で本変異を有するマウスにおいて報告されている。高齢ApoE欠損マウス(>17ヶ月)は、主として結晶性コレステロール裂、脂質小滴、および泡沫細胞からなる黄色腫性病変を脳において発症することが示されている。より小さな黄色腫が、脈絡叢および腹側脳弓において見られた。最近の研究は、ApoE欠損マウスが、ストレス応答の変化、空間学習および記憶の減退、長期増強の変化、およびシナプス損傷を有することを示す。C57BL/6およびSCID

40

50

マウスはHarlan (Horst, the Netherlands) から取得した。

【0025】

PPDと接合したIL-1 およびIL-1 によるマウスの免疫

IL-1 およびIL-1 はeBioscience (San Diego, CA) から取得した。PPDはStatens Serum Institute (Copenhagen, Denmark) から取得した。接合法はSvensonら (Svenson M. 2000) から適合させた。IL-1 またはIL-1bを4%で48時間、0.41 (w/w) の割合のPPDと0.1%グルタルアルデヒドの存在下でインキュベーションした (IL-1/PPD = 0.41)。対照として、PPDをIL-1 またはIL-1 無しで並行して処置した。その後、最終容量において1.5% Al(OH)<sub>3</sub>になるように、接合体をAl(OH)<sub>3</sub> (Rehydragel; Reheis Chemical, Dublin, Ireland) に吸着させた。

10

【0026】

アラムとのインキュベーションは、室温で90分間であった。その後、粒子を0.9% NaClで洗浄し、11 μg IL-1 /100 μl懸濁液で0.9% NaClに再懸濁し、Al(OH)<sub>3</sub>へのIL-1 の70%吸着を仮定した (<sup>125</sup>I-IL-1 を用いたパイロット研究において見出された)。IL-1接合体は同じ方法で調製した。IL-1 -PPD接合体におけるPPDの量と一致するように、対照懸濁液を等しく希釈した。接合体は使用まで4週で保存した。

【0027】

実施例12

C57BL/6マウスにおける抗IL-1 抗体応答の產生

免疫系はサイトカインなどの自己タンパク質に対して寛容であるため、能動ワクチン投与は自己寛容を破壊する必要がある。大部分の自己タンパク質の場合、免疫寛容は、胸腺におけるネガティブ選択の結果としての特異的T細胞の欠如によって引き起こされる。対照的に、潜在的に自己反応性のB細胞は通常存在する。IL-1 のような自己タンパク質のみを注射する場合、T細胞ヘルプがないためにこれらのB細胞は応答しない。PPDなどの外来性タンパク質を自己抗原IL-1 に結合させると、T細胞がPPDを認識するので、B細胞刺激のためのT細胞ヘルプが提供され、これは、IL-1 およびPPDに対する刺激されたB細胞の抗体産生をもたらす。

20

【0028】

したがって本発明者らは、IL-1 特異的B細胞に対する有効なT細胞ヘルプを確実にするため、アラム中のIL-1 -PPD接合体をマウスにワクチン投与した。抗体力価はELISAによって測定した。5匹のマウス群に、グルタルアルデヒドとのインキュベーション段階を用いて、10 μgのPPDと接合した15 μgの組換えIL-1 による皮下免疫を行った。その後、IL-1 -PPD接合体をアラムに吸着させる。マウスにそのような皮下免疫を3回、2週間間隔で行った。本免疫は高力価の抗IL-1 抗体を産生させたが、アラム中のPPDで免疫された対照マウスは検出可能な抗体力価を誘導できなかった(図1)。抗IL-1 抗体の誘導は少なくとも2回の注射を必要とした。アラム中の組換えIL-1 -PPD接合体のわずか1回の注射の後、血清において抗体応答は検出されなかった。しかし、アラム中の組換えIL-1 -PPD接合体の3回目の注射後、すべてのワクチン投与されたマウスが抗IL-1 抗体を産生した。

30

【0029】

実施例13

アテローム性動脈硬化症の形成を予防する、IL-1 に対する能動免疫

ApoEノックアウトマウス (6週齢) を、水酸化アルミニウム中の10 μg PPD (結核菌 (M. tuberculosis) 由来の精製タンパク質誘導体) と接合した15 μgのマウスIL-1 で、0、1、4、および28日目に首領域への皮下投与によって能動免疫した。注射容量は100 μlであり、水酸化アルミニウムの量は約1 mgであった。対照マウスを同様に、しかし、同じ量のPPDおよび水酸化アルミニウムを含むがIL-1 を含まない調製物で処置した。ELISAにより抗IL1 抗体応答を測定するために、0、28、42、および56日目に尾静脈から血液を採取した。最初の免疫の4週間後に、アテローム性動脈硬化症を加速することが公知の食餌である、16%脂肪、1.16%コレステロール、および0.5%コール酸を含む食物ペレットによるアテローム発生性食餌をマウスに与え始めた。その後、18週齢でマウスを安樂死させた。肉

40

50

眼的および顕微鏡的解析のために大動脈を取り出した。組織学的切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン(HE)、ならびにスダンを用いて染色した。

#### 【0030】

この時点の後、切開した大動脈の双眼顕微鏡下での検査により、IL-1に対する能動的に免疫されたApoE-/-マウスにおいてアテローム性動脈硬化性plaquesの著しい減少が示されたが、PPDのみに対して免疫されたApoE-/-対照マウスにおいては示さなかった。

#### 【0031】

##### 実施例14

アテローム性動脈硬化症の形成を予防する、IL-1に対する受動免疫

C57BL/6マウスを、アラム中のIL-1-PPD接合体の3回の皮下注射により、IL-1に対する能動的に免疫した。56日後に血清を収集して、抗IL-1自己抗体力値の生成をELISAにより確認した。そのような血清200μlを、6週齢のApoEノックアウトマウスに受動的に導入した。これらの受動血清導入を毎週繰り返した。対照ApoE-/-マウスには、未処理のC57BL/6マウス由来の血清の受動導入を毎週行った。アテローム性動脈硬化症の形成を加速するため、これらの受動血清導入と共に、16%脂肪、1.16%コレステロール、および0.5%コール酸を含む食物ペレットによるアテローム発生性食餌をApoE-/-マウスに与え始めた。対照ApoE-/-マウスには未処理のC57BL/6マウス由来の血清200mlを1週間間隔で受動的に導入した。大動脈の肉眼的および組織学的な解析のためにマウスを6週間後に安樂死させた。組織学的解析は、横断面のヘマトキシリンおよびエオシン染色、ならびにスダン染色を含んだ。

10

20

#### 【0032】

これらの6週間後、切開した大動脈の双眼顕微鏡下での検査により、抗IL-1抗血清が受動的に導入されたApoE-/-マウスにおいてアテローム性動脈硬化性plaquesの著しい減少が示されたが、未処理の血清を導入されたApoE-/-対照マウスにおいては示されなかった。

#### 【0033】

##### 実施例15

アテローム性動脈硬化症に対する効果が無いままであった、IL-1に対する能動免疫

ApoEノックアウトマウス(6週齢)を、水酸化アルミニウム中の10μgPPD(結核菌由来精製タンパク質誘導体)と接合した15μgのマウスIL-1で、0、14、および28日目に首領域への皮下投与によって能動的に免疫した。注射容量は100μlであり、水酸化アルミニウムの量は約1mgであった。対照マウスを、同様に、しかし、同じ量のPPDおよび水酸化アルミニウムを含むがIL-1は含まない調製物で処置した。ELISAにより抗IL1抗体応答を測定するために、0、28、42、および56日目に尾静脈から血液を採取した。初回免疫の4週間に、アテローム性動脈硬化症を加速することが公知の食餌である、16%脂肪、1.16%コレステロール、および0.5%コール酸を含む食物ペレットによるアテローム発生性食餌をマウスに与え始めた。その後、18週齢でマウスを安樂死させた。肉眼的および顕微鏡的な解析のために大動脈を除去した。組織学切片は、ヘマトキシリンおよびエオシン(HE)、ならびにスダンを用いて染色した。

30

40

#### 【0034】

この時点の後、切開した大動脈の双眼顕微鏡下での検査により、IL-1抗血清に対して免疫されたApoE-/-マウス、または対照ApoE-/-マウスの両方において同程度を有するアテローム性動脈硬化性plaquesが示された。

#### 【0035】

##### 実施例16

アテローム性動脈硬化症に対する効果が無いままであった、IL-1に対する受動免疫

C57BL/6マウスを、アラム中のIL-1-PPD接合体の3回の皮下注射によりIL-1に対する能動的に免疫した。56日後にその血清を採取して、抗IL-1自己抗体力値の生成をELISAにより確認した。そのような血清200μlを、6週齢のApoEノックアウトマウスに受動的に導入した。これらの受動血清導入を毎週繰り返した。対照ApoE-/-マウスには未処理のC57

50

BL/6マウスから200 μlの血清導入を行った。アテローム性動脈硬化症の形成を加速するため、これらの受動血清導入と共に、16%脂肪、1.16%コレステロール、および0.5%コール酸を含む食物ペレットによるアテローム発生性食餌をApoE-/-マウスに与え始めた。対照ApoE-/-マウスには未処理のC57BL/6マウス由来の血清200 mlを1週間間隔で受動的に導入した。大動脈の肉眼的および組織学的な解析のためにマウスを6週間後に安樂死させた。組織学的解析には、断面のヘマトキシリンおよびエオシン染色、ならびにスダン染色が含まれた。

#### 【0036】

これらの6週間後、切開した大動脈の双眼顕微鏡下での検査は、抗IL-1 抗血清または未処理マウス由来の血清を導入されたApoE-/-マウスの両方において同程度を有するアテローム性動脈硬化性プラークを示した。10

#### 【0037】

##### 実施例17

##### ADCK 抗体依存性補体媒介性殺傷

C57BL/6マウスを、アラム中のIL-1 -PPD接合体の3回の皮下注射によりIL-1 に対して能動的に免疫した。56日目にその血清を採取して、抗IL-1 自己抗体力価の生成をELISAにより確認した。血清を熱不活性化した。50 μlのEL-4細胞懸濁液を96ウェルプレート中に播種した。これらのウェル各々に熱不活性化血清の1：2連続希釈物15 μlを添加した。その後、プレートを20分間37 °Cでインキュベーションした。その後、25mlのマウス血清を各ウェルに添加した。37 °Cでのインキュベーションをさらに5時間行った後、ウェルの写真撮影を行い、その後、死細胞を生細胞から識別するためにトリパンブルーを用いて血球計算盤中で細胞を計数した。20

#### 【0038】

ポリクローナルマウス抗マウスIL-1 抗血清は、EL-4腫瘍細胞の補体依存性殺傷を濃度依存性様式で媒介した。図2を参照されたい。

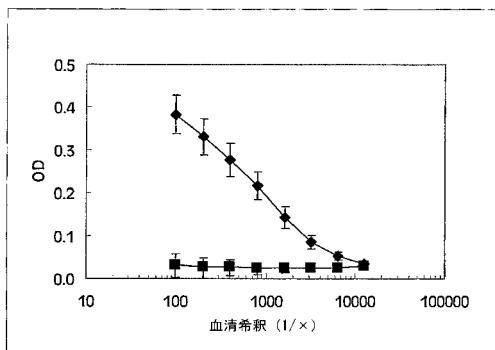
#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0039】

【図1】アラム中のIL-1 -PPD接合体を3回皮下注射した後56日目のC57BL/6マウスにおける抗IL-1 自己抗体形成（○）。アラム中のPPDのみで免疫した対照マウス（△）。

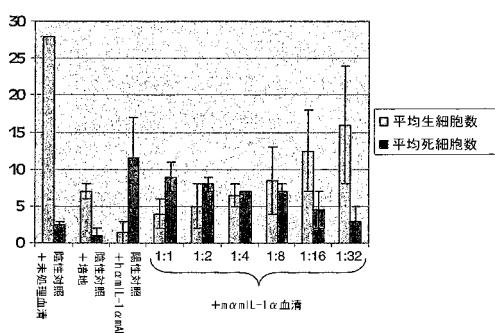
【図2】EL-4細胞の抗体依存性補体媒介性殺傷。EL-4細胞をマウス抗マウスIL-1 ポリクローナル抗血清の連続希釈物とインキュベーションした。生細胞に対する死細胞の割合は、血清濃度に比例する。ヒト抗マウスIL-1 モノクローナル抗体を陽性対照として使用した。未処理のマウス血清または培地のみを用いるインキュベーションは、二つの陰性対照となつた。30

【図1】



【図2】

EL-4細胞を用いたADCK



## 【手続補正書】

【提出日】平成21年1月20日(2009.1.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

哺乳動物においてアテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を減少させるための薬物の調製における、IL-1 の使用。

## 【請求項2】

哺乳動物においてアテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を減少させるための薬物の調製における、IL-1 をコードする組換えウイルスの使用。

## 【請求項3】

哺乳動物においてアテローム性動脈硬化症関連疾患のリスクおよび重症度を減少させるための薬物の調製における、IL-1 に化学的に結合したウイルス様粒子の使用。

## 【請求項4】

哺乳動物が、マウス、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、およびヒツジからなる群より選択される、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

## 【請求項5】

哺乳動物がマウスであり、かつマウスがApoE-/-である、請求項3記載の使用。

## 【請求項6】

哺乳動物がヒトである、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

## 【請求項7】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢動脈疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

【請求項8】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢虚血性心疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

【請求項9】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が冠動脈疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

【請求項10】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が脳血管疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

【請求項11】

アテローム性動脈硬化症関連疾患が末梢動脈性疾患である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

【請求項12】

IL-1 が組換えIL-1 である、請求項1または3記載の使用。

【請求項13】

組換えIL-1 がマウスまたはヒトである、請求項2または12記載の使用。

【請求項14】

IL-1 が担体に結合している、請求項1記載の使用。

【請求項15】

担体がツベルクリンの精製タンパク質誘導体（PPD）である、請求項14記載の使用。

【請求項16】

IL-1 がアジュバントの存在下で使用される、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

【請求項17】

アジュバントが水酸化アルミニウムである、請求項16記載の使用。

【請求項18】

IL-1 で免疫されたApoE-/-マウス。

【請求項19】

IL-1 自己抗体を含むApoE-/-マウス。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

実施例15

アテローム性動脈硬化症に対する効果が無いままであった、IL-1<sub>—</sub>に対する能動免疫 ApoEノックアウトマウス（6週齢）を、水酸化アルミニウム中の10 μg PPD（結核菌由来精製タンパク質誘導体）と接合した15 μgのマウスIL-1<sub>—</sub>で、0、14、および28日目に首領域への皮下投与によって能動的に免疫した。注射容量は100 μlであり、水酸化アルミニウムの量は約1 mgであった。対照マウスを、同様に、しかし、同じ量のPPDおよび水酸化アルミニウムを含むがIL-1<sub>—</sub>は含まない調製物で処置した。ELISAにより抗IL1<sub>—</sub>抗体応答を測定するために、0、28、42、および56日目に尾静脈から血液を採取した。初回免疫の4週間に後に、アテローム性動脈硬化症を加速することが公知の食餌である、16%脂肪、1.16%コレステロール、および0.5%コール酸を含む食物ペレットによるアテローム発生性食餌をマウスに与え始めた。その後、18週齢でマウスを安樂死させた。肉眼的および顕微鏡的な解析のために大動脈を除去した。組織学切片は、ヘマトキシリンおよびエオシン（HE）、ならびにスダンを用いて染色した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

この時点の後、切開した大動脈の双眼顕微鏡下での検査により、IL-1抗血清に対して免疫されたApoE-/-マウス、または対照ApoE-/-マウスの両方において同程度を有するアテローム性動脈硬化性プラークが示された。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

実施例16

アテローム性動脈硬化症に対する効果が無いままであった、IL-1に対する受動免疫

C57BL/6マウスを、アラム中のIL-1-PPD接合体の3回の皮下注射によりIL-1に対して能動的に免疫した。56日後にその血清を採取して、抗IL-1自己抗体力値の生成をELISAにより確認した。そのような血清200μlを、6週齢のApoEノックアウトマウスに受動的に導入した。これらの受動血清導入を毎週繰り返した。対照ApoE-/-マウスには未処理のC57BL/6マウスから200μlの血清導入を行った。アテローム性動脈硬化症の形成を加速するため、これらの受動血清導入と共に、16%脂肪、1.16%コレステロール、および0.5%コレル酸を含む食物ペレットによるアテローム発生性食餌をApoE-/-マウスに与え始めた。対照ApoE-/-マウスには未処理のC57BL/6マウス由来の血清200mlを1週間間隔で受動的に導入した。大動脈の肉眼的および組織学的な解析のためにマウスを6週間後に安樂死させた。組織学的解析には、断面のヘマトキシリンおよびエオシン染色、ならびにスダン染色が含まれた。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

これらの6週間後、切開した大動脈の双眼顕微鏡下での検査は、抗IL-1抗血清または未処理マウス由来の血清を導入されたApoE-/-マウスの両方において同程度を有するアテローム性動脈硬化性プラークを示した。

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/IB2007/001264												
<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>            IPC: <b>A61K 48/00</b> (2006.01), <b>A61K 67/027</b> (2006.01), <b>A61K 31/7088</b> (2006.01), <b>A61K 35/76</b> (2006.01), <b>A61K 38/20</b> (2006.01),  <b>A61K 39/00</b> (2006.01), <b>A61K 39/39</b> (2006.01), <b>A61K 47/48</b> (2006.01), <b>A61P 9/10</b> (2006.01)            According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b>            Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)            IPC: <b>A61K 48/00</b> (2006.01), <b>A61K 67/027</b> (2006.01), <b>A61K 31/7088</b> (2006.01), <b>A61K 35/76</b> (2006.01), <b>A61K 38/20</b> (2006.01),  <b>A61K 39/00</b> (2006.01), <b>A61K 39/39</b> (2006.01), <b>A61K 47/48</b> (2006.01), <b>A61P 9/10</b> (2006.01)</p>														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) <b>Databases:</b> Canadian Patent Database, Delphion, Questel-Orbit, CAPlus, Pubmed and Scopus. <b>Keywords:</b> interleukin, IL-1, alpha, atherosclerosis, cardiovascular, disease, immunization, vaccine, autoantibod*, neutralizing, antibod*, gene therapy, injection, Simard														
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2004/100987 A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 25 November 2004 Paragraphs 0004 - 0012, 0043 and 0044.</td> <td>18 &amp; 19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MERHII-SOUSSI F et al. Interleukin-1 Plays A Major Role In Vascular Inflammation And Atherosclerosis In Male Apolipoprotein E-Knockout Mice. CARDIOVASC RES. 1 Jun 2005 Vol. 66, pages 583 - 593. ISSN 0008-6363. Whole document</td> <td>1 - 17 &amp; 20 - 36  &amp; 20 - 36</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>MERHII-SOUSSI F et al. Interleukin-1 Plays A Major Role In Vascular Inflammation And Atherosclerosis In Male Apolipoprotein E-Knockout Mice. CARDIOVASC RES. 1 Jun 2005 Vol. 66, pages 583 - 593. ISSN 0008-6363. Whole document</td> <td>18 &amp; 19  1 - 17</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2004/100987 A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 25 November 2004 Paragraphs 0004 - 0012, 0043 and 0044.	18 & 19	Y	MERHII-SOUSSI F et al. Interleukin-1 Plays A Major Role In Vascular Inflammation And Atherosclerosis In Male Apolipoprotein E-Knockout Mice. CARDIOVASC RES. 1 Jun 2005 Vol. 66, pages 583 - 593. ISSN 0008-6363. Whole document	1 - 17 & 20 - 36  & 20 - 36	X	MERHII-SOUSSI F et al. Interleukin-1 Plays A Major Role In Vascular Inflammation And Atherosclerosis In Male Apolipoprotein E-Knockout Mice. CARDIOVASC RES. 1 Jun 2005 Vol. 66, pages 583 - 593. ISSN 0008-6363. Whole document	18 & 19  1 - 17
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 2004/100987 A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 25 November 2004 Paragraphs 0004 - 0012, 0043 and 0044.	18 & 19												
Y	MERHII-SOUSSI F et al. Interleukin-1 Plays A Major Role In Vascular Inflammation And Atherosclerosis In Male Apolipoprotein E-Knockout Mice. CARDIOVASC RES. 1 Jun 2005 Vol. 66, pages 583 - 593. ISSN 0008-6363. Whole document	1 - 17 & 20 - 36  & 20 - 36												
X	MERHII-SOUSSI F et al. Interleukin-1 Plays A Major Role In Vascular Inflammation And Atherosclerosis In Male Apolipoprotein E-Knockout Mice. CARDIOVASC RES. 1 Jun 2005 Vol. 66, pages 583 - 593. ISSN 0008-6363. Whole document	18 & 19  1 - 17												
[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.		[X] See patent family annex.												
<table> <tr> <td>* Special categories of cited documents :</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents :	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents :	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report													
7 January 2008 (07 - 01 - 2008)	10 March 2008 (10-03-2008)													
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage L, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Authorized officer  Jacinth Abraham 819- 934-7598													

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/IB2007/001264
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SVENSON, M. et al. Cytokine Vaccination: Neutralising IL-1 $\alpha$ Autoantibodies Induced By Immunisation With Homologous IL-1 $\alpha$ . J IMMUNOL METHODS 6 Mar 2000 Vol.236, pages 1 - 8, ISSN 0022-1759, Whole document	1 - 17 & 20 - 36
X, P	WO 2007/015128 A1 (XBIOTECH INC.) 8 Feb 2007 Whole document	1 - 17 & 20 - 36
X, P	WO 2007/039552 A1 (CYTOS BIOTECHNOLOGY AG) 12 Apr 2007 Whole document	1 - 17 & 20 - 36

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. PCT/IB2007/001264
----------------------------------------------------

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

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

1.  Claim Nos. : 20 - 36  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :  
Claims 20 - 36 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and are not required to be searched nor is a written opinion required by this Authority. Regardless, this Authority has established a written opinion based on the alleged effect or purpose/use of the product defined in claims 20 - 36.
2.  Claim Nos. :  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3.  Claim Nos. :  
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

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

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInternational application No.  
PCT/IB2007/001264

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO 2004100987A2	25-11-2004	US 2004224893A1 WO 2004100987A3	11-11-2004 26-05-2005
WO 2007015128A1	08-02-2007	None	
WO 2007039552A1	12-04-2007	None	

---

フロントページの続き

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

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 シマード ジヨン

カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 ウエスト バンクーバー オルタモント クレセント

2960

F ターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BB11 EE06 FF19