

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006年1月12日 (12.01.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/003999 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, A61K 39/395, 48/00, A61P 29/00, 37/06, 37/08, C07K 16/18, 19/00, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/08
- (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/012094
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2005年6月30日 (30.06.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2004-198224 2004年7月5日 (05.07.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉村 和久 (SUGIMURA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒8910103 鹿児島県鹿児島市皇徳寺台 5-20-5 Kagoshima (JP). 伊東 祐二 (ITO, Yuji) [JP/JP]; 〒8900082 鹿児島県鹿児島市紫原 3 丁目 53-27-201 Kagoshima (JP). 中島 敏博 (NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺 1314 番地 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 鳥飼 正治 (TORIKAI, Masaharu) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺 1314 番地 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN ANTIHUMAN B7RP-1 ANTIBODY AND ANTIBODY FRAGMENT THEREOF

(54) 発明の名称: ヒト抗ヒトB7RP-1抗体およびその抗体フラグメント

(57) Abstract: It is intended to provide a human antihuman B7 related protein 1 (hereinafter referred to as B7RP-1) antibody, its antibody fragment and a method of using the same. By using the phage antibody method, a human antihuman B7RP-1 antibody having a high affinity for human B7RP-1 and its antibody fragment are obtained. The antibody and its antibody fragment thus obtained are expected as useful as remedies for inflammation and immune abnormality.

(57) 要約: ヒト抗ヒトB7 Related Protein 1 (以下、B7RP-1) 抗体、該抗体フラグメントおよびその利用方法を提供する。ファージ抗体法を用いて、ヒトB7RP-1に対して高い親和性を有するヒト抗ヒトB7RP-1抗体および該抗体フラグメントを得た。得られた抗体および該抗体フラグメントは、B7RP-1が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

WO 2006/003999 A1

## 明 細 書

## ヒト抗ヒトB7RP-1抗体およびその抗体フラグメント

## 技術分野

- [0001] 本発明は、ヒトB7 Related Protein 1(別名、B7h、GL50、ICOSリガンド、以下、「B7RP-1」とする)に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトB7RP-1抗体または該抗体フラグメントに関する。当該抗体および抗体フラグメントは、B7RP-1が、そのT細胞上のレセプターであるICOS(Inducible costimulator)と結合することによって惹起されるT細胞の過度な活性化を抑えることで、臓器移植時の免疫抑制剤、アレルギー・自己免疫などの免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

## 背景技術

- [0002] ICOSは、T細胞の補助刺激レセプターCD28ファミリーの第3番目の分子として発見され、ホモダイマーを形成する膜結合型蛋白であり、TCRを介したシグナルによってT細胞を刺激することでT細胞表面上に誘導される(非特許文献1)。この分子を介する補助刺激は、CD4、CD8双方のT細胞の増殖を増大させ、IL-4、IL-10などのサイトカインの分泌とともに、T細胞のCD154(CD40リガンド)の発現を誘導する。このことから、ICOSは特に、活性化T細胞における様々なエフェクター機能において重要であると考えられる。実際に、ICOSをノックアウトしたマウスでは、抗原刺激によるT細胞の増殖やIL-4産生能が消失する(非特許文献2)。
- [0003] ICOSのリガンドとして同定されたB7RP-1は、もうひとつの補助刺激分子であるCD28のリガンドであるB7分子(CD80、CD86)のファミリーに属し、B細胞やマクロファージ、LPSなどで刺激された非免疫細胞に発現する膜結合蛋白である(非特許文献3)。B7RP-1は、現在知られている唯一のICOSのリガンドであり、生理学的な条件下では、CD28やCTLA4(CD154)などとの交差結合性は示さない。ICOSとB7RP-1間の結合は、T細胞のヘルパー機能に非常に重要であり、ICOSのノックアウトマウスでは、ヘルパー機能による抗体のクラススイッチが著しく抑制される(非特許文献2)。しかし、この抑制は抗CD40抗体を用いたCD40からのB細胞刺激によって、部分的に回復することが知られている(非特許文献4)。

- [0004] オボアルブミン(OVA)により免疫したマウスを用いたOVAの吸気によるマウス気管支炎症モデル実験で、抗ICOS阻害抗体あるいはICOS-FcによるICOS/B7RP-1間のシグナルブロックの前処理をしたマウスでは、気管支肺胞洗浄液(BAL: bronchoalveolar lavage)中でのリンパ球、好中球の侵入が減少し、IL-4、IL-10などのサイトカインの産生も抑えられた。このような抑制は、CTLA4-FcによるCD28/B7間のシグナルのブロックによってもみられたが、特に、これらの阻害剤の投与時期の違いに伴い、IL-4産生のパターンが顕著に異なっていた。このことから、補助刺激CD28/B7とICOS/B7RP-1の役割の違いとして、前者はT細胞の活性化開始において重要な役割を果たすのに対し、後者はその活性化後のエフェクター機能を制御する上で主要な役割を担っていることが示された(非特許文献5)。
- [0005] ヒトの分類不能型免疫不全(CVID: common variable immunodeficiency)の原因が、ICOSのホモザイゴートによる遺伝子欠損によることが明らかにされている。このことは、ヒトB細胞の成熟、抗体産生へと導くヘルパーT細胞機能におけるICOSの重要性を示しているとともに、ICOSが種々の免疫疾患の原因遺伝子となることを強く示唆している(非特許文献6)。
- [0006] マウスを用いた心臓の同種異個体(アロ)移植において、抗ICOS阻害抗体の投与は、急性の拒絶反応を遅延させるだけでなく、移植断片へのCD4、CD8陽性T細胞、マクロファージの浸潤も抑制した。この抗ICOS阻害抗体によるこのような効果は、免疫抑制剤として使用されているシクロスポリンAと相乗的な免疫抑制効果を示し、拒絶までの時期を遅延させた(非特許文献7)。免疫抑制を目的とした蛋白製剤として、CTLA4-IgによるCD28/B7間のシグナルの阻害や、抗CD40リガンド抗体によるCD40/CD40リガンド(CD154)間のシグナルの阻害が検討されているが、ICOS/B7RP-1間の阻害による抑制効果は、それらと同等もしくは、格段に優れた結果をもたらしている。
- [0007] 実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE: experimental allergic encephalomyelitis)モデルを用いたマウスの実験では、抗ICOS阻害抗体の投与により、EAEの発症までの期間を延ばすことができた。しかしながら、EAE誘導のための抗原ペプチド感作と同時期に抗ICOS阻害抗体の投与を行うと、症状が劇的に増悪する結果となった(非特許

文献8)。このことは、臨床において抗ICOS抗体でシグナルを阻害することは、アレルギー症状などを増悪する危険性を孕むことを示唆している。

[0008] 一方、B7RP-1に対するモノクローナル抗体の使用例は、これまであまり報告されていないが、マウスB7RP-1に対するラットモノクローナル抗体が、マウスのコラーゲン誘導関節炎(CIA:collagen type II-induced arthritis)に対して治療的投与により効果を示したことが報告されており、自己免疫疾患の病態形成にもICOS/B7RP-1間のシグナルが重要な寄与を果たしていることが示唆されている(非特許文献9)。

[0009] 非特許文献1:Hutloff, A.ら、(1999) Nature, 397(6716), p.263-266

非特許文献2:Dong, C.ら、(2001) Nature, 409(6816), p.97-101

非特許文献3:Yoshinaga, S. K.ら、(1999) Nature, 402(6763), p.827-832

非特許文献4:McAdam, A. J.ら、(2001) Nature, 409(6816), p.102-105

非特許文献5:Gonzalo, J. A.ら、(2001) Nat. Immunol., 2(7), p.597-604

非特許文献6:Grimbacher, B.ら、(2003) Nat. Immunol., 4(3), p.261-268

非特許文献7:Ozkaynak, E.ら、(2001) Nat. Immunol., 2(7), p.591-596

非特許文献8:Rottman, J. B.ら、(2001) Nat. Immunol., 2(7), p.605-611

非特許文献9:Iwai, H.ら、(2002) J. Immunol., 169(8), p.4332-4339

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 臓器移植の拒絶反応、アレルギーなどの免疫異常性疾患の症状の増悪には、T細胞の増殖、患部への浸潤、エフェクター機能が決定的な関与をしている。そのような機能に関与するICOS/B7RP-1間のシグナルの阻害、あるいは制御を行う医薬品は、臓器移植時の免疫抑制、アレルギーなどの免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

[0011] ICOS/B7RP-1間のシグナルをブロックする特異的なモノクローナル抗体を開発することができれば、ICOS/B7RP-1のシグナルによって発症、増悪する多くの疾患の有効な治療手段になることが期待される。

[0012] ICOS/B7RP-1の補助シグナルをブロックする抗体として、抗ICOS抗体と抗B7RP-1抗体が考えられる。抗体の抗原結合部は2価であり、それゆえ、抗体と標的分子との

結合によって細胞にシグナルを入れる可能性があり、特に抗ICOS抗体の場合、ICOSのシグナルを阻害する目的での投与が、逆にシグナルを送ることで、T細胞の増殖を促す可能性も除外できない。その意味で、抗B7RP-1抗体によるICOS/B7RP-1間のシグナル阻害は、ICOSを介してT細胞の増殖活性化を促すことは考えられない。たとえB細胞上のB7RP-1への抗B7RP-1抗体の結合によりB細胞へシグナルが送られたとしても、ICOS/B7RP-1シグナルにより、B7RP-1は発現が減少することが知られており、T細胞のエフェクター機能を抑制する方向に働くため、阻害抗体として抗B7RP-1抗体は優れていると考えられる。

[0013] 現在、ヒトB7RP-1に対する抗体(抗ヒトB7RP-1抗体)としては、マウスやラット由来のモノクローナル抗体がいくつか取得されているに過ぎない。このような従来の抗ヒトB7RP-1抗体は、非ヒト由来のため、その高い免疫原性によって、ヒトに対して投与した場合、異物として認識・排除される。したがって、従来の抗ヒトB7RP-1抗体を、疾患の治療薬剤として用いることは困難である。

[0014] この問題を解決する方法として、ヒトB7RP-1に対するマウスモノクローナル抗体を、蛋白工学的手法を用いてヒト化することが考えられるが、マウスモノクローナル抗体由来の配列を一部含むため、反復投与や長期投与により、投与するヒト化抗B7RP-1抗体の活性を阻害するような抗体が作られ、その効果を著しく減弱するだけでなく、重篤な副作用を招く可能性がある。また、ヒト化により活性が低下することも多く、構築には多大な労力とコストを要する。

[0015] 本発明は、安全性と治療効果を兼ね備えたヒト抗ヒトB7RP-1抗体およびその断片を提供するとともに、それらの利用方法を提案するものである。

#### 課題を解決するための手段

[0016] 本発明者は、上記課題に対して検討した結果、健常人の末梢血リンパ球より調製した免疫グロブリンH鎖およびL鎖の可変領域(VH,VL)をコードする遺伝子を発現したヒト単鎖Fv抗体ファージディスプレイライブラリーから、抗ヒトB7RP-1単鎖Fv抗体分子(抗体断片)を取得し、そのアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の塩基配列を明らかにした。さらに、この単鎖Fv抗体が、ヒトのB7RP-1の生理活性を阻害することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0017] 本発明による抗体は、ヒト抗体遺伝子に由来する抗体ファージライブラリーを用いて単離したものであり、これらの抗体は完全にヒト由来の配列をもち、このままヒトへの治療用として利用しても、免疫原性としては問題ないものである。その意味では、従来のマウスモノクローナル抗体からヒト化技術によって作製されたヒト化抗体において危惧されるマウス由来の配列に対する免疫原性についても解決されている。また、その開発コストは、ヒト化抗体に比べて非常に低い。一方で、近年、ヒトの染色体をもつトランスクロモソームマウスによるヒト抗体産生も行われているが、ヒトの分子に対する阻害作用を有するヒト抗体を作製する技術が、本発明のようにまったく動物を使用せずに作製できることは、大きなメリットである。

[0018] すなわち、本発明は、医学上または産業上有用な方法・物質として下記1)～29)の発明を含むものである。

[0019] 1)ヒトB7 Related Protein 1(以下、B7RP-1)に結合性を有するヒト抗ヒトB7RP-1抗体。

[0020] 2)H鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有し、L鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、上記1)に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体:

(a)CDR1として配列番号1～3のいずれか一つ、CDR2として配列番号4～6のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号7～9のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;

(b)CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号1～3、4～6、または7～9、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの;

(c)CDR1として配列番号10～12のいずれか一つ、CDR2として配列番号13～15のいずれか一つ、CDR3として配列番号16～18のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;

(d)CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号10～12、13～15、または16～18、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠

失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するL鎖の相補性決定領域となりうるもの。

[0021] 3) H鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号1、4および7、配列番号2、5および8、または配列番号3、6および9の組み合わせから選択されるアミノ酸配列であり、L鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号10、13および16、配列番号11、14および17、または配列番号12、15および18の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である上記1)または2)に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体。

[0022] 4) H鎖のCDR1～3とL鎖のCDR1～3との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号1、4および7と配列番号10、13および16、配列番号2、5および8と配列番号11、14および17、または配列番号3、6および9と配列番号12、15および18とのいずれか一つの組み合わせである、上記3)に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体。

[0023] 5) H鎖可変領域が以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有し、L鎖可変領域が以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、上記1)から4)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体:

(e) 配列番号19～21のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(f) 配列番号19～21に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖可変領域となりうるもの;

(g) 配列番号22～24のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(h) 配列番号22～24に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するL鎖可変領域となりうるもの。

[0024] 6) H鎖可変領域とL鎖可変領域との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号19と配列番号22、配列番号20と配列番号23、または配列番号21と配列番号24との組み合わせにより示されるアミノ酸配列である、上記1)から5)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体。

[0025] 7) ヒトB7RP-1に結合性を有するヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント。

[0026] 8) 相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有する、上記7

)に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント:

(a) CDR1として配列番号1~3のいずれか一つ、CDR2として配列番号4~6のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号7~9のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;

(b) CDR1~3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号1~3、4~6、または7~9、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの。

[0027] 9) CDR1~3のアミノ酸配列が、配列番号1、4および7、配列番号2、5および8、または配列番号3、6および9の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、上記8)に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント。

[0028] 10) 以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有する、上記7)から9)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント:

(e) 配列番号19~21のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;

(f) 配列番号19~21に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖可変領域となりうるもの。

[0029] 11) ヒトB7RP-1に結合性を有するヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント。

[0030] 12) 相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、上記11)に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント:

(c) CDR1として配列番号10~12のいずれか一つ、CDR2として配列番号13~15のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号16~18のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;

(d) CDR1~3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号10~18、13~15のいずれか一つ、または16~18、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖の相補性決定領域となりうるもの。



- [0031] 13) CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号10、13および16、配列番号11、14および17、または配列番号12、15および18の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、上記12)に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント。
- [0032] 14) 以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、上記11)から13)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント:  
(g) 配列番号22～24のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;  
(h) 配列番号22～24に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するL鎖可変領域となりうるもの。
- [0033] 15) 上記7)から10)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメントと、上記11)から14)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメントとを連結してなる、ヒトB7RP-1に対するヒト由来の抗体の一本鎖可変領域フラグメント。
- [0034] 16) 上記7)から10)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント、および/または上記11)から14)のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメントに、ヒト由来の抗体定常領域を連結してなる、B7RP-1に対するヒト由来の抗体またはその抗体フラグメント。
- [0035] 17) 当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scAb、またはscFv-Fcである上記16)に記載の抗体フラグメント。
- [0036] 18) 上記1)から17)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントとペプチド或いは他のタンパク質とを融合させた融合抗体またはそのフラグメント。
- [0037] 19) 上記1)から18)のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントに修飾剤が結合されてなる修飾抗体またはそのフラグメント。
- [0038] 20) 上記1)から19)のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントをコードする遺伝子。
- [0039] 21) 上記20)に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
- [0040] 22) 上記20)に記載の遺伝子が導入された形質転換体。
- [0041] 23) 上記20)に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト抗B7RP-1抗体

またはその断片を生産する方法。

[0042] 24) 上記1)から17)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記18)に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記19)に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたB7RP-1の検出試薬。

[0043] 25) 上記20)に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

[0044] 26) 上記1)から17)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記18)に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記19)に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたB7RP-1とICOSとの結合活性阻害剤。

[0045] 27) 上記1)から17)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記18)に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記19)に記載の修飾抗体またはそのフラグメントが認識するB7RP-1上の抗原決定領域に基づいて分子設計された低分子化合物またはその誘導体。

[0046] 28) 上記27)に記載の低分子化合物またはその誘導体を用いたB7RP-1とICOSとの結合活性阻害剤。

[0047] 29) 上記26)または上記28)に記載の結合活性阻害剤を用いたB7RP-1とICOSとの相互作用により惹起される炎症および免疫異常性疾患の予防または治療薬。

### 発明の効果

[0048] 本発明のヒトモノクローナル抗体および該抗体フラグメント分子は、ヒト由来抗ヒトB7RP-1抗体の可変領域を有し、ヒトB7RP-1と強く反応して、そのICOSとの相互作用を阻害する。このことから、本発明の抗体および該抗体フラグメントはB7RP-1とICOSとの結合により惹起される炎症および免疫異常性疾患の予防または治療薬として使用することができる。

### 図面の簡単な説明

[0049] [図1]クローン化した単鎖Fv抗体ファージのB7RP-1-Fcに対する結合特異性を評価したELISAの結果を示す図。

[0050] [図2]クローン化した単鎖Fv抗体のB7RP-1-Fcに対する結合特異性を評価したELISAの結果を示す図。

[0051] [図3]単離した抗B7RP-1単鎖Fv抗体とセンサーチップ上に固定化されたB7RP1との

結合の速度論的解析を表面プラズモン共鳴によって評価した結果を示す図。

[0052] [図4]単離された抗B7RP-1単鎖Fv抗体によるICOS-FcとB7RP-1-Fc間の結合阻害活性を評価したELISAの結果を示す図。

[0053] [図5]フローサイトメータを用いた単離した抗B7RP-1単鎖Fv抗体のB細胞への結合性を評価した結果を示す図(FITC並びにPEでともに染色された集団をボックスで示してある)。

[0054] [図6]単離した抗B7RP-1単鎖Fv抗体を用いたICOS補助刺激シグナルのブロックによるT細胞増殖阻害活性を評価した結果を示す図。

### 発明を実施するための最良の形態

[0055] 本発明の抗体および抗体フラグメントに使用されるscFvは以下のようにして得られた。

[0056] 健常者20名分の末梢血リンパ球より、RT-PCR法にて、免疫グロブリン重(H)鎖、軽(L)鎖cDNAを増幅、更に両者をリンカーDNAで結合し、健常者リンパ球由来のH鎖可変領域(VH鎖またはVH)とL鎖可変領域(VL鎖またはVL)のランダムな組み合わせによるscFv DNAを作製した。

[0057] このscFv DNAをファージミドベクターpCANTAB5Eに組み込み、 $10^9$ クローンからなる健常者由来scFvディスプレイファージライブラリーを作製した。このライブラリーを、固相に固定化されたヒトB7RP-1と結合させて回収、濃縮し、抗ヒトB7RP-1 scFvディスプレイファージクローンをスクリーニングした。その結果、スクリーニングされた各クローンは、ヒトB7RP-1と結合するscFvを産生した。

[0058] scFvの発現方法としては、例えば、大腸菌で発現させることができる。大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列等、発現させるscFvを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーター等を挙げることができる。scFvの分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに発現させる場合、pelBシグナル配列(Lei, SPら、J. Bacteriol., 1987, 169 : 4379-4383)を用いるとよい。培養上清中に分泌させるにはM13ファージのg3蛋白のシグナル配列を用いることもできる。

[0059] 発現されたscFvは細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本

発明で発現されるscFvは、そのC末端にE tag配列が付加されているので、抗E tag抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、容易に短時間で精製することができる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を組み合わせて精製することも可能である。例えば、限外濾過、塩析、ゲル濾過／イオン交換／疎水クロマト等のカラムクロマトグラフィーを組み合わせれば抗体を分離・精製することができる。

- [0060] 得られた抗体や抗体フラグメントのヒトB7RP-1に対する結合活性を測定する方法としては、ELISA、BIAcore等の方法がある。例えばELISAを用いる場合、ヒトB7RP-1-Fcを固相化した96穴プレートに目的の抗体や抗体フラグメントを含む試料、例えば大腸菌の培養上清や精製抗体を加える。次にパーオキシダーゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、発色基質TMBZを加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。また、BIAcoreを用いる場合、センサーチップにB7-RP1-Fcを固定化するか、または抗ヒトFc F(ab<sub>2</sub>)抗体にB7-RP1-Fcをキャプチャーさせて、目的の試料の結合解離定数を測定することができる。
- [0061] また、得られた抗体や抗体フラグメントのB7RP-1/ICOS結合阻害活性を測定する方法として、ELISA、BIAcore等の方法がある。例えばELISAを用いる場合、ヒトB7RP-1-Fcを固相化した96穴プレートに目的の抗体や抗体フラグメントを含む試料と、ビオチン標識したICOS-Fcを混合したものを加える。次にパーオキシダーゼ等の酵素で標識したstreptavidinを添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、発色基質TMBZを加えて吸光度を測定することでB7RP-1/ICOS結合阻害活性を評価することができる。
- [0062] 更に、得られた抗体や抗体フラグメントについて、末梢血Bリンパ球上のB7RP-1への結合性を調べる方法として、フローサイトメータを用いる方法がある。例えば、ヒト末梢血リンパ球を用いて、蛍光フローサイトメータで解析する場合、ヒト末梢血より末梢血リンパ球を精製し、PMAとPHAで刺激した後、ヒトIgG抗体を加えてヒトIgG Fc $\gamma$ レセプターのブロックを行い、目的の抗体や抗体フラグメントを含む試料(E tagを付加したscFvであればscFvを含む試料と抗E tag抗体の混合物)を加え反応させる。細胞

を洗浄後、PEラベル化したストレプトアビジンならびに、ヒトB細胞特異的マーカーとして、FITCでラベル化した抗CD19抗体を反応させ、蛍光ラベル化する。洗浄後、蛍光フローサイトメータを用いて、PEならびにFITCチャンネルでの2次元フローサイトメトリ解析を行い、末梢血リンパ球上のB7RP-1への結合性を評価することができる。

[0063] 上記の抗体や抗体フラグメントについて、T細胞補助刺激シグナルに対する阻害活性を調べる方法としては、T細胞増殖刺激アッセイがある。例えば、96穴プレートに、抗CD3抗体と抗ヒトIgG FcフラグメントF(ab')<sub>2</sub>抗体の混合液をコートし洗浄したのち、B7RP-1-Fcを加えて反応させる。再度プレートを洗浄した後、目的の抗体や抗体フラグメントを含む試料を加え反応させ、その後ヒト末梢血から調製した末梢血リンパ球を加え、培養する。培養中にトリチウムチミジンを添加し、細胞が取り込んだトリチウムチミジン量を測定することで、T細胞補助刺激シグナルに対する阻害活性を評価することができる。

[0064] 上記の方法により、抗ヒトB7RP-1 scFvを分離し評価した結果、B7RP-1に特異的に結合すること、しかもその親和性はレセプターであるICOSに匹敵する程高いものであること、抗原提示細胞上に発現されているB7RP-1にも結合しうること、B7RP-1とICOSとの結合を阻害すること、およびB7RP-1/ICOSを介した補助刺激によるT細胞の増殖を抑制することが示された。従ってこれらの抗体は、生体内でも同様の効果を示し、B7RP-1/ICOSの結合およびT細胞の増殖を抑制する薬剤として有用であると考えられる。

[0065] 上記阻害活性を有する3種類のscFv(223、323、325)のVH鎖およびVL鎖のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、下記の通りである。

(1)クローン223

クローン223のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号19に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号1、4および7に示した。すなわち、配列番号19に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号1)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号4)、99番目～109番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号7)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号25に示した。

[0066] また、クローン223のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号22に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号10、13および16に示した。すなわち、配列番号22に示すVL鎖のアミノ酸配列において、24番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号10)、51番目～57番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号13)、90番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号16)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号28に示した。

[0067] (2)クローン323

クローン323のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号20に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号2、5および8に示した。すなわち、配列番号20に示すVH鎖のアミノ酸配列において、30番目～34番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号2)、49番目～65番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号5)、98番目～108番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号8)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号26に示した。

[0068] また、クローン323のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号23に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号11、14および17に示した。すなわち、配列番号23に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号11)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号14)、88番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号17)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号29に示した。

[0069] (3)クローン325

クローン325のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号21に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号3、9および15に示した。すなわち、配列番号21に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号3)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号9)、99番目～108番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号15)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号27に示した。

[0070] また、クローン325のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号24に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号12、15および18に示した。すなわち、配列番号

24に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号12)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号15)、88番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号18)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号30に示した。

[0071] 本発明により得られたクローン毎にアミノ酸配列および塩基配列について上述したが、配列表に記載された各アミノ酸配列情報(VH鎖、VL鎖、各CDR1～3)をもとに、単独または複数の配列を適宜組み合わせ使用することも可能である。

[0072] 本発明の抗体およびその抗体フラグメントは、上記VH鎖およびVL鎖、並びにそれらのCDRとして、上記配列番号に示される配列に限定されるものではなく、それらの一部が改変された変異ポリペプチドであってもよい。

[0073] すなわち、各配列番号に記載されたアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒトB7RP-1に対するH鎖またはL鎖の相補性決定領域、H鎖またはL鎖の可変領域となるポリペプチドも含まれる。

[0074] ここで、「1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、および/または付加できる程度の数、例えば、1ないし6程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されることを意味する。このような「変異」としては、主として、公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然(例えばヒト)に存在する同様の変異ポリペプチドを単離精製したものであってもよい。

[0075] なお、上記「変異」は、本発明の抗体またはその抗体フラグメントを、治療薬として利用する場合(ヒトに投与する場合)には、ヒト由来の構造を保持またはヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検出器具や診断キットなどとして使用する場合(ヒトに投与しない場合)には、その範囲は特に制限されない。

[0076] 本発明で開示されるVH鎖および/またはVL鎖は、ファージ抗体法を用いて主としてscFvの形で得られたものであるが、原則としてその適用はscFvに限定されることはない。例えば、開示したVH鎖および/またはVL鎖をヒト免疫グロブリンの定常領

域と連結した完全分子型、またヒト免疫グロブリンの定常領域の一部と組み合わせた Fab、Fab'またはF(ab')<sub>2</sub>、さらにscFvをヒト免疫グロブリンのL鎖の定常領域と結合させた一本鎖抗体(scAb)や、scFvをヒト免疫グロブリンのH鎖の定常領域と結合させたscFv-Fcなどの他の抗体フラグメントもその適用範囲に含まれる。

[0077] また、本発明の抗体またはそのフラグメントは、当該抗体またはフラグメントにペプチド或いは他のタンパク質と融合させた融合抗体またはそのフラグメントとすることもできる。

[0078] また、これらの抗体および抗体フラグメントあるいは上記融合抗体またはそのフラグメントに、ポリエチレングリコールなどの高分子修飾剤を結合させた修飾抗体またはそのフラグメントとすることもできる。

[0079] H鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたscFvを調製する場合、ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸10～25残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0080] 本発明の抗体または抗体フラグメントは、配列番号25から30に示した本発明により得られた各クローンのVH鎖およびVL鎖をコードする遺伝子配列情報をもとに、適当な宿主(例えば、細菌、酵母)に導入して、本発明の抗体またはそのフラグメントを発現させることができる。

[0081] また本発明の遺伝子は、B7RP-1とICOSとの相互作用を調節するための、遺伝子治療の補助剤としても利用できる。

[0082] 本発明の抗体またはその抗体フラグメントは、B7RP-1とICOSとの結合活性阻害剤として利用可能である。

[0083] また、これらの抗体またはそのフラグメントが認識するヒトB7RP-1上の抗原決定領域に基づき分子設計することにより、B7RP-1/ICOSのシグナリングに作用する低分子化合物の開発に重要な手段を提供する。

[0084] その低分子化合物には、本発明の抗体またはそのフラグメントが認識するアミノ酸配列からなるペプチドおよびその立体構造を模した化合物が含まれる。そのペプチドのアミノ酸配列に非天然アミノ酸を加えた改変ペプチドも同様に使用できる。また、それらのペプチドを他のタンパク質と融合させた融合蛋白質も同様である。上記のペプ



チドまたは化合物に、ポリエチレングリコールなどの高分子修飾剤を結合させた修飾分子も同様である。

[0085] これらの低分子化合物またはその誘導體も、B7RP-1とICOSとの結合活性阻害剤として利用可能である。

[0086] さらに、本発明の抗体またはその抗体フラグメント、並びに低分子化合物またはその誘導體からなる結合活性阻害剤は、B7RP-1とICOSとの相互作用により惹起される炎症および免疫異常性疾患の予防または治療薬として有効である。

[0087] 以下、本発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

### 実施例

[0088] 《実施例1:健常者からのファージライブラリーの構築》

ファージライブラリーの構築は、J. D. Marks ら(J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991)により報告されている方法を参考に、健常者20名由来末梢血由来リンパ球を出発材料に、構築した。構築したVH( $\gamma$ )-V $\kappa$ 、VH( $\gamma$ )-V $\lambda$ 、VH( $\mu$ )-V $\kappa$ 、VH( $\mu$ )-V $\lambda$ の各サブライブラリーはそれぞれ $1.1 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $8.4 \times 10^7$ 、 $5.3 \times 10^7$ クローンの多様性を有すると評価された。

[0089] 《実施例2:パンニング》

ヒトB7RP-1-Fc(10  $\mu$ g)を0.1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液1mlに溶解し、イムノチューブ(Nunc)に一晩、4°Cにてコートした。0.1%Tween20を含むPBSで1回洗浄後、0.5%ゼラチン/PBSで、2時間、室温にてブロックした。0.1%Tween/PBSで、6回洗浄した後、健常人由来の抗体ファージライブラリー(一本鎖抗体提示ファージ液、 $10^{12}$  TU/ml)を1ml加え、2時間、室温で反応させた。

[0090] 非特異的なファージを0.1%Tween20/PBSで20回の洗浄によって除いた後、B7RP-1-Fcに結合したファージクローンを1mg/ml BSA(ウシ血清アルブミン)を含む0.1Mグリシン-HCl(pH2.2)で溶出し、直ちに1.0M Tris-HCl(pH9.1)で中和した。中和したファージ溶液を、ヒトIgGをコートし0.5%ゼラチン/PBSでブロックしたイムノチューブに加え、2時間、室温で反応させた。その上清を、対数増殖期の大腸菌TG1(20ml)に加え、30°Cにて、30分、放置後、一部をSOBAGプレートに撒き、残りについては

培地を30mlの2×YTAGに換えた後、30℃にて一晩培養した。培養液を2200rpm×10分で遠心後、沈殿した大腸菌を3mlの2×YTAGに懸濁し、1次パンニングの大腸菌ライブラリーとした。このTG1液を、2×YTAG培地に植え、ヘルパーファージを用いてレスキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。

[0091] 上記のバイオパンニングの操作を、合計で3回行い、それぞれ、2次、3次のパンニングで得られたファージ溶液を、2次ファージライブラリー、3次ファージライブラリーとした。ただし、2次パンニング、3次パンニングでは、ブロッキング溶液にそれぞれ、5%スキムミルク、0.5%BSAを用いた。

[0092] 2次パンニング、ならびに3次パンニング後のSOBAGプレートから任意にクローンを抽出し、短鎖Fv抗体ファージクローンを調製して、B7RP-1-Fcに対する特異性の確認ならびに抗体遺伝子の配列解析を行った。

[0093] 《実施例3:スクリーニングB7RP-1 ELISA》

分離した単鎖Fv抗体ファージのELISAによる結合特異性の確認は、以下の方法で行った。ELISAプレート(Nunc)にB7RP-1-Fc(80ng/well)を4℃で一晩コートし、0.5%ゼラチン/PBSでブロッキングを行った。0.1%Tween20/PBSで洗浄後、単離した単鎖Fvファージクローン( $1 \times 10^{13}$  pfu/ml) 40  $\mu$  lを加え、常温で2時間反応させた。結合ファージの検出は、一次抗体としてビオチン化抗M13ファージ抗体(Pharmacia)を、二次抗体としてAP標識したstreptavidinを加え反応させた後、基質溶液(10% 2,2-イミノジエタノールを含む1mg/ml PNP-リン酸のPBS溶液)を加え、405nmでの吸光度を、マルチプレートオトリダーNJ-2001(Nunc社)にて測定した。その結果、最終的に評価したクローンすべてが、B7RP-1に特異的であることがわかった(図1)。

[0094] 《実施例4:クローンの配列分析》

単離したクローンのscFv遺伝子のVHおよびVLのDNA塩基配列をDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems)を用いて決定した。ELISAおよび配列分析の結果、単離したクローンは4種のscFvに分類された。

[0095] 《実施例5:ヒト由来抗ヒトB7RP-1scFvの発現と精製》

前記実施例2、3で単離したヒトB7RP-1に反応するscFvクローンからプラスミドDNAを回収して、常法に従って大腸菌HB2151を形質転換した。2%グルコースおよび1

00  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含む2×YT培地でこれらの大腸菌を一夜前培養後、グルコースフリーの2×YT培地に一部移植し、終濃度1mM IPTG、100  $\mu$ g/mLのアンピシリンを加えて4時間培養してscFvの発現誘導を行った。培養終了後菌体を遠心回収し、1mM EDTAを含むPBSに懸濁して氷中に30分菌体を放置した。次いで8,900×gで30分間遠心し、上清を0.45  $\mu$ mフィルター濾過したものをペリプラズム画分とし、scFvの精製出発材料とした。

[0096] このようにして調製した精製の出発材料を、抗E tag抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで常法に従って精製した。PBSで透析後、エンドトキシン除去カラムDetoxi-gel (PIERCE社)で添付のプロトコルに従いエンドトキシンを除去した。分子量カット10,000のCentricon (Amicon社)で濃縮後、0.45  $\mu$ mフィルター濾過して精製標品とした。保存は-20°Cで行った。

[0097] 《実施例6:精製scFvのヒトB7RP-1との結合性》

精製した単鎖Fv抗体のB7RP-1に対する結合活性の測定は、以下の方法で行った。ELISAプレート(Nunc)にB7RP-1-Fc (80ng/well)を4°Cで一晩コートし、0.5%ゼラチン/PBSでブロッキングを行った、0.1%Tween20/PBSで洗浄後、単離した単鎖Fv抗体(20  $\mu$ g/ml)と抗E-tag抗体を混合したものを40  $\mu$ l加え、2時間反応させた。検出は、二次抗体としてAP標識した抗マウスIgG Fc  $\gamma$  抗体を加え60分反応させた後、基質溶液を加え、405nmでの吸光度を、マルチプレートオートリーダーNJ-2001にて測定した。その結果、最終的に評価したクローンすべてが、B7RP-1に特異的であることがわかった(図2)。

[0098] また、クローン223について、単鎖Fv抗体とB7RP-1との結合解離定数をBIAcoreを用いて検討した。センサーチップCM5 (Biacore AB, Uppsala, Sweden)上の4つのフローセルに20°Cで10mM酢酸緩衝液(pH4.0)で希釈したB7RP-1-Fc、ICOS-Fc、CTLA-4-Fc、抗ヒトFc F(ab')<sub>2</sub>抗体(各10  $\mu$ g/mL)をそれぞれ流速5  $\mu$ L/分で固定化した。HBS緩衝液(100mM HEPES/5M NaCl/0.5M EDTA/0.005%Tween20 (Pharmacia biotech))によりセンサーチップを洗浄した後、HBS緩衝液/0.01%BSAで希釈したB7RP-1-Fcを反応させ、抗ヒトFc F(ab')<sub>2</sub>抗体にキャプチャーさせた。引き続き、各scFvサンプル(100nMに調整)を流速10  $\mu$ L/分で注入して反応させ、サンプル毎の結合

解離定数を測定した。また、各サンプルを反応させる工程の前に、200mM NaCl を含む200mMグリシン-HCl緩衝液 (pH2.2) によりscFvを溶出し洗浄した。データ解析にはBIAevaluationソフトを使用した。その結果、まずB7RP-1-FcはICOS-Fcと抗ヒトFc F(ab')<sub>2</sub> 抗体を固定したチップにのみ反応を示し、その結果から、B7RP-1とICOSとの結合解離定数は約7nMであることが分かった。引き続き、233を反応させたところ、B7-RP1-Fcを固定したチップと、抗ヒトFc F(ab')<sub>2</sub> 抗体にB7-RP1-Fcをキャプチャーさせたチップにのみ結合性を示し、ICOSと結合しているB7-RP1-Fcには結合性を示さなかったことから、233についてはICOSとの結合部位に結合することが推定された。B7 RP-1との結合解離定数は約13~15nMと算出されたことから、レセプターであるICOS とほぼ同等であることが確認された(図3)。

[0099] 《実施例7:抗B7RP-1単鎖Fv抗体によるICOS-FcとB7RP-1-Fc間の結合阻害》

96穴プレートにB7RP-1-Fc (40ng/well)を4°Cで一晩コートし、0.5%ゼラチン/PBS でブロックした後、0.1%Tween20 /PBSで洗浄した。125nM~2 μ Mの抗B7RP-1単鎖 Fv抗体溶液とビオチン標識したICOS-Fcを混合したものを加え、90分反応させた。洗浄後、AP標識したstreptavidinを加え、30分反応させた後、基質溶液を加え、405nmの吸光度を測定した。その結果、クローン223、323、325については、加えた単鎖Fv抗体の用量依存的に、ICOSとB7RP-1間の結合を阻害していることがわかった(図4)。

[0100] 《実施例8:単鎖Fv抗体の末梢血リンパ球上のB7RP-1への結合のフローサイトメータによる解析》

単離したヒト抗B7RP-1単鎖Fv抗体の細胞上に発現されたB7RP-1分子に対する結合活性を確認するために、ヒト末梢血リンパ球を用いて、蛍光フローサイトメータを使って解析した。ヒトヘパリン末梢血からフィコールを用いた定法によりPBMCを精製した。PMA (5ng/ml)とPHA (2 μ g/ml)で41時間刺激した後、ヒトIgG抗体を加えることでヒトIgG Fc γレセプターのブロックを行い、単鎖Fv抗体と抗E tag抗体の混合物を加え90分反応させた。細胞を洗浄後、PEラベル化したstreptavidinならびに、ヒトB細胞特異的マーカーとして、FITCでラベル化した抗CD19抗体で30分間反応させ、蛍光ラベル化した。洗浄後、Coulter EPICS XL (Coulter 社 Miami, FL) フローサイトメ

ータを用いて、PEならびにFITCチャンネルでの2次元フローサイトメトリー解析を行った。その結果、クローン名、223、323、325において、抗CD19抗体によってFITCラベル化されたB細胞集団のPEによる染色が確認されたことから、これらのクローンについては、B細胞上のB7RP-1に対する結合活性を有することが示された(図5)。

[0101] 《実施例9:ヒト抗B7RP-1単鎖Fv抗体によるT細胞補助刺激シグナルに対するT細胞増殖阻害活性》

抗原提示細胞上のB7RP-1とT細胞上のICOS間の補助シグナルの伝達に対する、得られた単鎖Fv抗体の阻害活性をT細胞増殖活性を指標に解析した。96穴の丸底プレートに、抗CD3抗体(2 $\mu$ g/ml)と抗ヒトIgG FcフラグメントF(ab')<sub>2</sub>抗体(2.4 $\mu$ g/ml)の混合液を37°Cで90分間コートした。プレートをPBSで洗浄したのち、B7RP-1-Fc(1 $\mu$ g/ml)を加えて37°Cで2時間反応させた。再度プレートを洗浄した後、RPMI1640で調製した1nM~500nMの単鎖Fv抗体および抗B7RP-1抗体を加え30分反応させ、その後ヒト末梢血から調製した末梢血リンパ球(1 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/well)を加え、37°Cで培養した。培養開始から48時間後にトリチウムチミジン(0.5 $\mu$  Ci/well)を加え、さらに18時間培養した。細胞のDNAをガラスフィルターに吸着させた後、液体シンチレータに溶かし、DNA中のトリチウムチミジン量をシンチレーションカウンターで測定した。すべてのクローンで、ヒトICOS-Fcを加えた場合とほぼ同等の単鎖Fv抗体による用量依存的なT細胞増殖阻害が起こっており、これらの単鎖Fvクローン223、323、325のICOSシグナルに対する阻害活性が示された(図6)。

## 請求の範囲

- [1] ヒトB7 Related Protein 1 (以下、B7RP-1)に結合性を有するヒト抗ヒトB7RP-1抗体。
- [2] H鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有し、L鎖の相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体：  
(a) CDR1として配列番号1～3のいずれか一つ、CDR2として配列番号4～6のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号7～9のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；  
(b) CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号1～3、4～6、または7～9、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの；  
(c) CDR1として配列番号10～12のいずれか一つ、CDR2として配列番号13～15のいずれか一つ、CDR3として配列番号16～18のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；  
(d) CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号10～12、13～15、または16～18、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するL鎖の相補性決定領域となりうるもの。
- [3] H鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号1、4および7、配列番号2、5および8、または配列番号3、6および9の組み合わせから選択されるアミノ酸配列であり、L鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号10、13および16、配列番号11、14および17、または配列番号12、15および18の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である請求項1または2に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体。
- [4] H鎖のCDR1～3とL鎖のCDR1～3との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号1、4および7と配列番号10、13および16、配列番号2、5および8と配列番号11、14および17、または配列番号3、6および9と配列番号12、15および18とのいずれか一つの組み合わせである、請求項3に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体。

- [5] H鎖可変領域が以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有し、L鎖可変領域が以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、請求項1から4のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体:
- (e) 配列番号19~21のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;
- (f) 配列番号19~21に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖可変領域となりうるもの;
- (g) 配列番号22~24のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列;
- (h) 配列番号22~24に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するL鎖可変領域となりうるもの。
- [6] H鎖可変領域とL鎖可変領域との組み合わせのアミノ酸配列が、配列番号19と配列番号22、配列番号20と配列番号23、または配列番号21と配列番号24との組み合わせにより示されるアミノ酸配列である、請求項1から5のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体。
- [7] ヒトB7RP-1に結合性を有するヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント。
- [8] 相補性決定領域(CDR)が以下の(a)または(b)のアミノ酸配列を有する、請求項7に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント:
- (a) CDR1として配列番号1~3のいずれか一つ、CDR2として配列番号4~6のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号7~9のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列;
- (b) CDR1~3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号1~3、4~6、または7~9、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖の相補性決定領域となりうるもの。
- [9] CDR1~3のアミノ酸配列が、配列番号1、4および7、配列番号2、5および8、または配列番号3、6および9の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、請求項8に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント。

- [10] 以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有する、請求項7から9のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント：  
(e)配列番号19～21のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列；  
(f)配列番号19～21に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するH鎖可変領域となりうるもの。
- [11] ヒトB7RP-1に結合性を有するヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント。
- [12] 相補性決定領域(CDR)が以下の(c)または(d)のアミノ酸配列を有する、請求項11に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント：  
(c)CDR1として配列番号10～12のいずれか一つ、CDR2として配列番号13～15のいずれか一つ、およびCDR3として配列番号16～18のいずれか一つによりそれぞれ示されるアミノ酸配列；  
(d)CDR1～3のアミノ酸配列として、それぞれ、配列番号10～18、13～15のいずれか一つ、または16～18、またはこれらアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、ヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖の相補性決定領域となりうるもの。
- [13] CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号10、13および16、配列番号11、14および17、または配列番号12、15および18の組み合わせから選択されるアミノ酸配列である、請求項12に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント。
- [14] 以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、請求項11から13のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメント：  
(g)配列番号22～24のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列；  
(h)配列番号22～24に示されるアミノ酸配列において1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列であって、ヒトB7RP-1に対するL鎖可変領域となりうるもの。
- [15] 請求項7から10のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメントと、請求項11から14のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメントとを連結してなる、ヒトB7RP-1に対するヒト由来の抗体の一本鎖可変領域

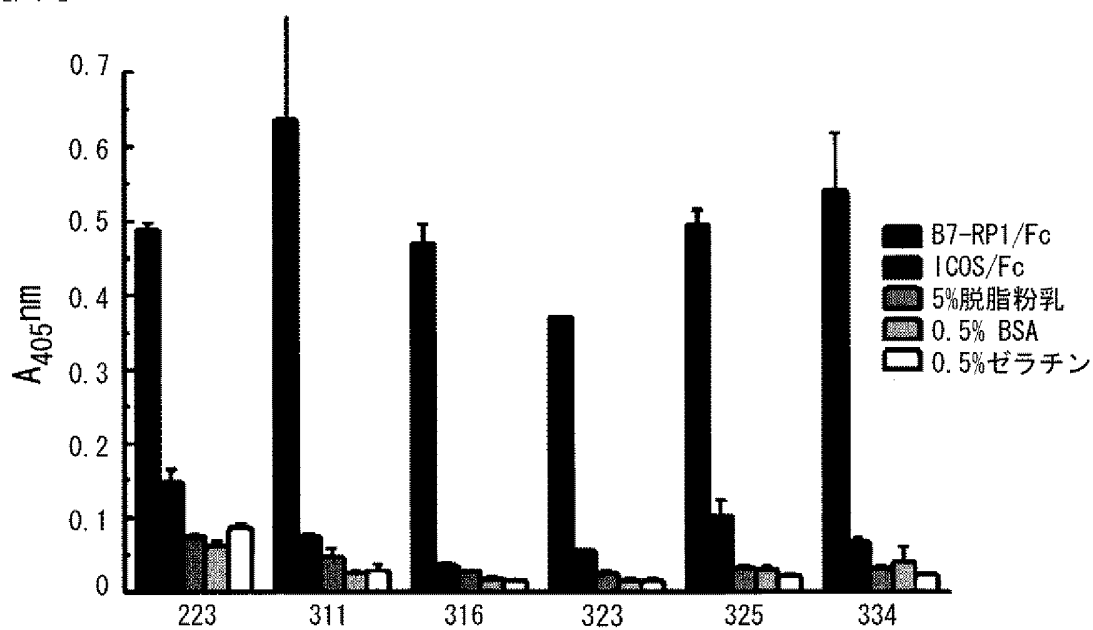


フラグメント。

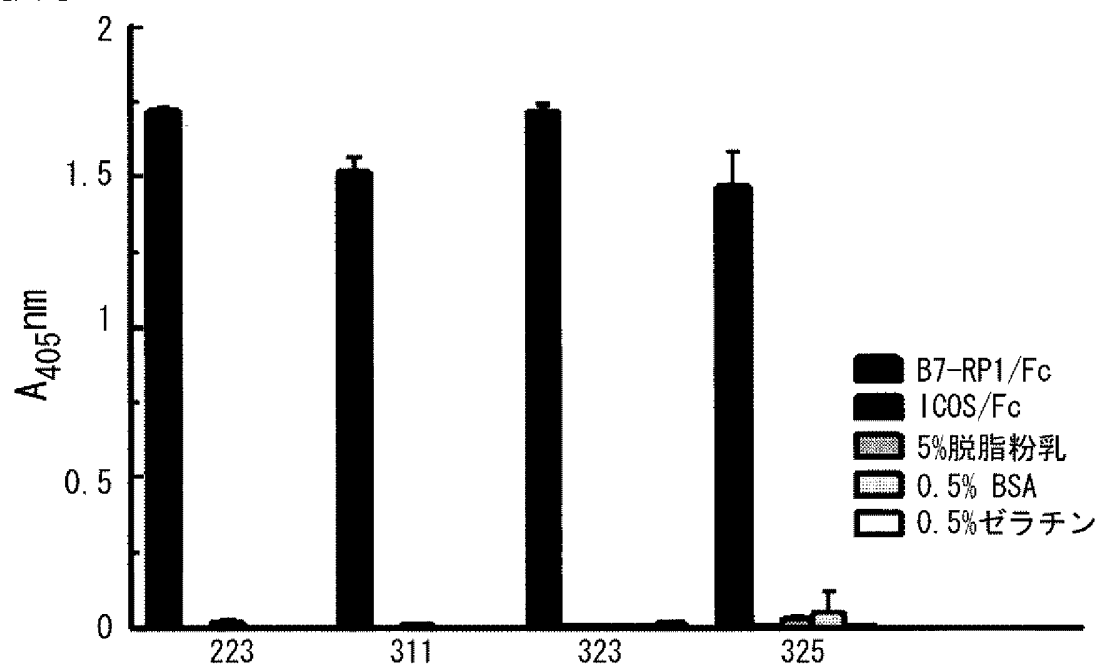
- [16] 請求項7から10のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のH鎖可変領域フラグメント、および／または請求項11から14のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体のL鎖可変領域フラグメントに、ヒト由来の抗体定常領域を連結してなる、ヒトB7RP-1に対するヒト由来の抗体またはその抗体フラグメント。
- [17] 当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scAb、またはscFv-Fcである請求項16に記載の抗体フラグメント。
- [18] 請求項1から17のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントとペプチド或いは他のタンパク質とを融合させた融合抗体またはそのフラグメント。
- [19] 請求項1から18のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントに修飾剤が結合されてなる修飾抗体またはそのフラグメント。
- [20] 請求項1から19のいずれかに記載の抗体もしくは融合抗体またはそのフラグメントをコードする遺伝子。
- [21] 請求項20に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
- [22] 請求項20に記載の遺伝子が導入された形質転換体。
- [23] 請求項20に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト抗B7RP-1抗体またはその断片を生産する方法。
- [24] 請求項1から17のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項18に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または請求項19に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたB7RP-1の検出試薬。
- [25] 請求項20に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。
- [26] 請求項1から17のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項18に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または請求項19に記載の修飾抗体またはそのフラグメントを用いたB7RP-1とICOSとの結合活性阻害剤。
- [27] 請求項1から17のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項18に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または請求項19に記載の修飾抗体またはそのフラグメントが認識するB7RP-1上の抗原決定領域に基づいて分子設計された低分子化合物またはその誘導體。

- [28] 請求項27に記載の低分子化合物またはその誘導体を用いたB7RP-1とICOSとの結合活性阻害剤。
- [29] 請求項26または請求項28に記載の結合活性阻害剤を用いたB7RP-1とICOSとの相互作用により惹起される炎症および免疫異常性疾患の予防または治療薬。

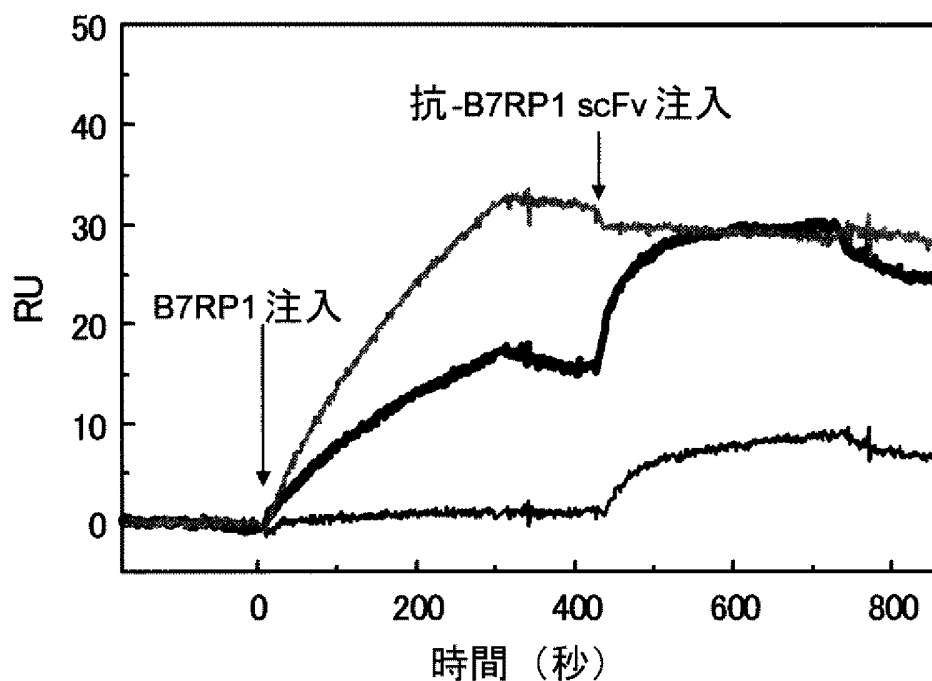
[図1]



[図2]

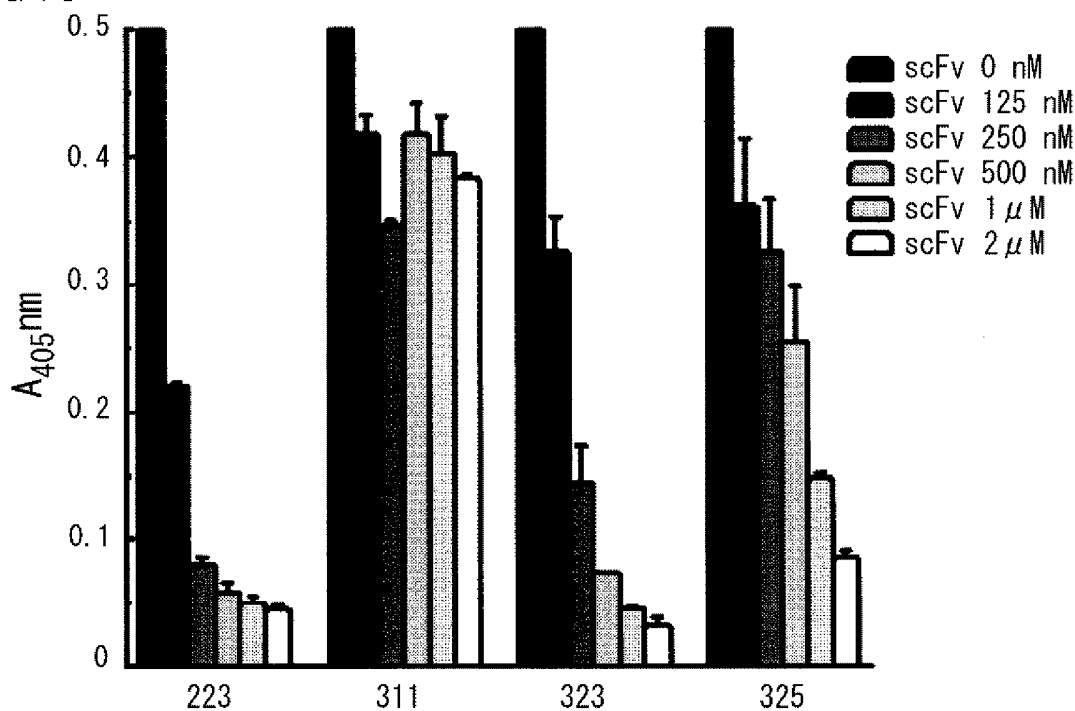


[図3]

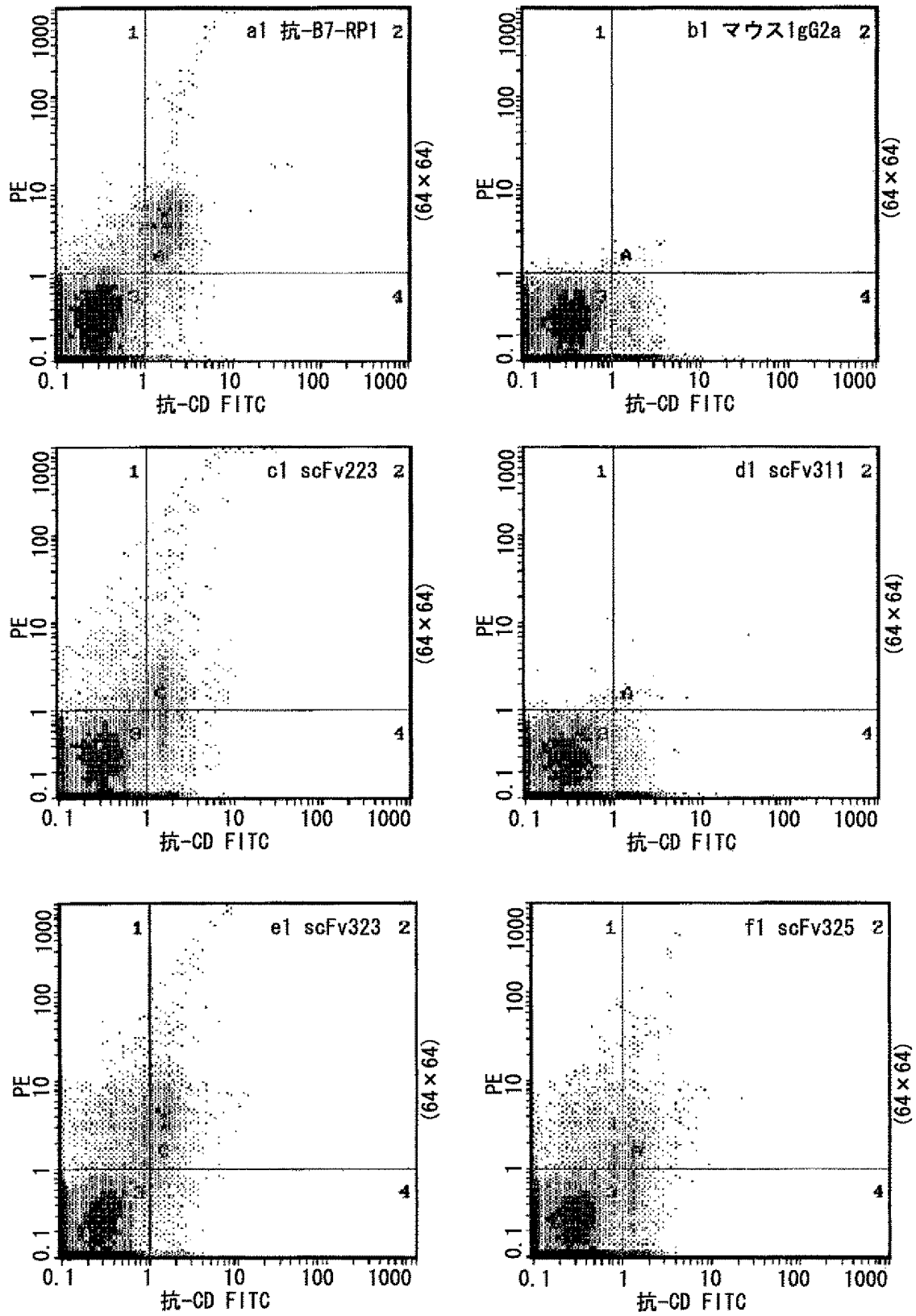


- 固定化抗ヒトFc Fab/B7RP1-Fc/抗-B7RP1 scFv223
- 固定化B7RP1-Fc/B7RP1-Fc/抗-B7RP1 scFv223
- 固定化ICOS-Fc/B7RP1-Fc/抗-B7RP1 scFv223

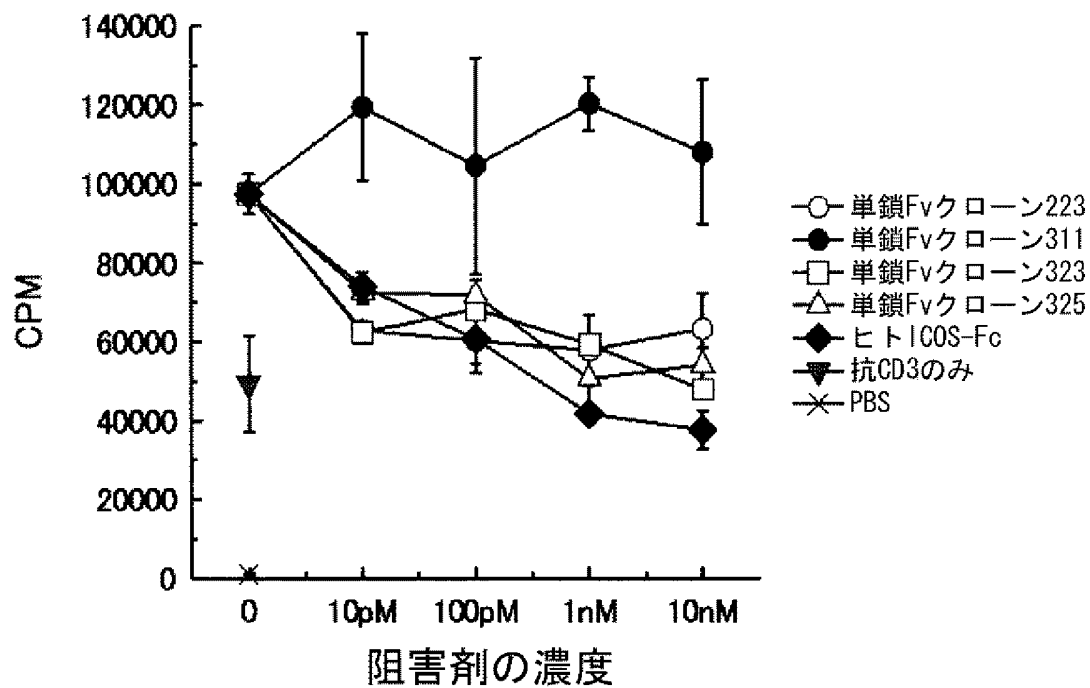
[図4]



[図5]



[図6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/012094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/09, A61K39/395, 48/00, A61P29/00, 37/06, 37/08, C07K16/18, 19/00, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/09, A61K39/395, 48/00, A61P29/00, 37/06, 37/08, C07K16/18, 19/00, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/003544 A1 (MILLENNIUM PHARMATEUTICALS, INC.), 08 January, 2004 (08.01.04), & US 2004/001831 A1 & AU 2002322349 A1 & EP 1516179 A1	1-26,29
Y	Nakazawa, A. et al., The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells, Gastroenterology, 2004 May, Vol.126, No.5, pages 1347 to 1357	1-26,29
Y	Mark, D.J. et al., By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage, J.Mol.Biol., 1991, Vol.222, No.3, pages 581 to 597	1-26,29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 July, 2005 (14.07.05)		Date of mailing of the international search report 02 August, 2005 (02.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/012094

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kazuhisa SUGIMURA et al., "Pharge Display to Hito Kotai Engineering", Dojin News, Jan 2004, No.109, pages 1 to 7	1-26,29
Y	Isao ISHIDA, "Hitogata Kotai Iyaku", Bioscience & Industry, 2005, Vol.60, No.5, pages 296 to 301	1-26,29



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/012094

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 27-28  
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:  
Concerning "a low-molecular weight compound or its derivative" as claimed in the above claims, no specific compound is presented in the description. Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely (continued to extra sheet)
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/012094

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

unknown what specific compounds are involved in the scope thereof. Thus, the above claims are described in an unclear manner and no meaningful search can be made thereon.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A61K39/395, 48/00, A61P29/00, 37/06, 37/08, C07K16/18, 19/00, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/08

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, A61K39/395, 48/00, A61P29/00, 37/06, 37/08, C07K16/18, 19/00, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2004/003544 A1 (MILLENNIUM PHARMATEUTICALS, INC) 2004.01.08 & US 2004/001831 A1 & AU 2002322349 A1 & EP 1516179 A1	1-26, 29
Y	Nakazawa, A. et al., The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells, Gastroenterology, 2004 May, Vol.126, No.5, pp.1347-1357	1-26, 29

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 14.07.2005	国際調査報告の発送日 02.8.2005
--------------------------	-------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936
--	--	---------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Mark, D.J. et al., By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage, J Mol Biol, 1991, Vol. 222, No. 3, pp. 581-597	1-26, 29
Y	杉村和久他, フェージディスプレイとヒト抗体エンジニアリング, Dojin News, Jan 2004, No. 109, pp. 1-7	1-26, 29
Y	石田功, ヒト型抗体医薬, バイオサイエンスとインダストリー, 2005, Vol. 60, No. 5, pp. 296-301	1-26, 29

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

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

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
  
2.  請求の範囲 27-28 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲の「低分子化合物またはその誘導体」について、明細書には、何ら具体的に記載されていない。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのようなものが包含されるのか全く不明である。したがって、前記請求の範囲の記載は不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。