

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 1 月 25 日 (25.01.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/010692 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県
川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).(71) 出願人 (日本についてのみ): 国立大学法人東北大学
(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県
仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 Miyagi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/312217

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2006 年 6 月 19 日 (19.06.2006)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菅村 和夫 (SUG-
AMURA, Kazuo) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青
葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学
内 Miyagi (JP). 石井 直人 (ISHII, Naoto) [JP/JP]; 〒
9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国
立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 小野 栄夫 (ONO,
Masao) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二
丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
村田 和子 (MURATA, Kazuko) [JP/JP]; 〒9808577 宮城
県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人
東北大学内 Miyagi (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

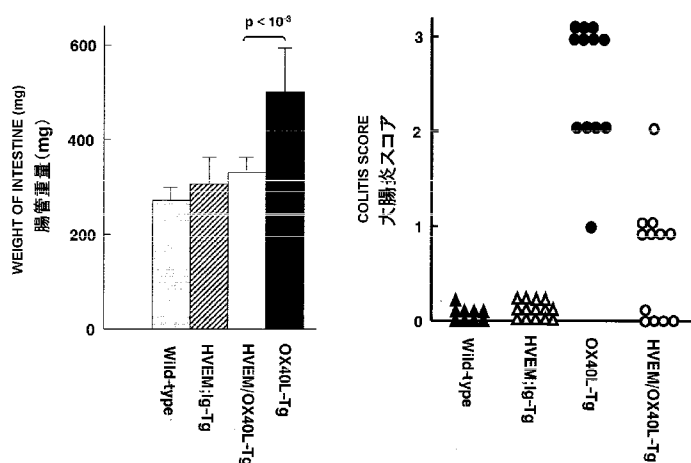
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-207929 2005 年 7 月 19 日 (19.07.2005) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND

[続葉有]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE WHICH
TARGETS AT HVEM AND BTLA, AND THERAPEUTIC METHOD

(54) 発明の名称: HVEM及びBTLAを標的とした炎症性腸疾患治療用医薬組成物及び治療方法

(57) Abstract: Disclosed are an effective therapeutic method and an effective pharmaceutical composition for an inflammatory
bowel disease such as ulcerative colitis or Crohn's disease. A method for treatment of an inflammatory bowel disease such as ul-
cerative colitis or Crohn's disease, the method comprising reacting a BTLA receptor with its ligand (e.g., soluble HVEM) or agonist
(e.g., anti-BTLA antibody) to increase the BTLA receptor signal on a T cell; and a pharmaceutical composition, particularly for the
treatment of an inflammatory bowel disease, comprising a ligand or agonist of a BTLA receptor as an active ingredient.(57) 要約: 本発明の目的は、潰瘍性大腸炎又はクローン病のような炎症性腸疾患に対する有効な治療方法及び医薬
組成物を提供することである。本発明は、BTLA受容体と、可溶性HVEMのようなそのリガンド又は抗BTLA
抗体のようなアゴニストを反応させること

[続葉有]

WO 2007/010692 A1



(74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目 1 4 番 1 号ダイアパレス津田沼 1 0 0 1 号 Chiba (JP).

(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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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, LV, 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).

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。

により、T 細胞上の BTLA 受容体シグナルを増強することによる、潰瘍性大腸炎又はクローン病のような炎症性腸疾患治療方法、並びに、BTLA 受容体のリガンド又はアゴニストを有効成分として含有する、医薬組成物、特に、炎症性腸疾患治療用医薬組成物に関する。

明 細 書

HVEM及びBTLAを標的とした炎症性腸疾患治療用医薬組成物及び治療方法

技術分野

[0001] 本発明は、T細胞上のBTLA受容体シグナルを増強することによる、炎症性腸疾患治療方法、及びそのための医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] ヒト炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎及びクローン病)は原因不明の重篤な疾患であり、先進国において近年患者数の急増が見られる。本疾患の発症感受性遺伝子座は少なくともIBD1～IBD8までの8つが知られており、一部のクローン病患者で、IBD5領域に位置するNOD2 (IBD5) 遺伝子変異が明らかにされた。しかし、感受性遺伝子としてNOD2は、そのコードする蛋白が細胞内分子であることなどから、それ自身を標的とした治療法開発には困難を伴い、実際、NOD2を標的にした治療法は存在しない。他方、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(以下「TNF」と称する)の機能を阻害する抗TNF抗体がクローン病の治療薬として臨床応用されている。

[0003] 単純ヘルペスウイルス侵入仲介物質(以下、「Herpes Virus Entry Mediator: HVEM」と称する)は、TNF受容体ファミリーに属し、当初、単純ヘルペスウイルス(以下「HSV」と称する)糖タンパクD結合物質として同定され、HSVの細胞感染を制御する分子として知られる。生体内のHVEM発現細胞としてT細胞、B細胞、単球、樹状細胞が知られHVEMの機能としてリンパ球を介した免疫反応制御が報告されている。その機構の一つとして、HVEMがそのリガンドと結合すると、HVEMからの細胞内シグナルがT細胞活性化反応に促進的に働くことが明らかにされた(Kwon et al. J. Biol. Chem 272: 14272, 1997, Harrop et al. J. Immunol.161: 1786, 1998)。

[0004] HVEMのリガンドはLIGHTとリンフォトキシン(以下、「LT」と称する) α 、BTLAの3つあることが知られる。一方、LIGHTの受容体は少なくとも、LT β 受容体、デコイ受容体3およびHVEMの3種が知られ、同様に、LT α の受容体はTNF受容体I、TNF受容体II、HVEMの3種が知られる。BTLAの受容体として証明されたのはHVEMのみで

ある。このようにHVEMが関連したリガンド・受容体系は複雑なネットワークを形成しており、それらの生体内における機能的関連性の詳細は明らかではない。

[0005] これまでに、疾患との関連においては、アレルギーや自己免疫疾患の患者血清中に、可溶性HVEMが検出されること、動脈硬化病変部にHVEMを発現するマクロファージが存在することが報告された(Jung HW et al. Exp Mol Med. 35:501-508, 2003, Lee WH et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21; 2004-2010, 2001)。しかし、これらの報告はHVEMを指標とした疾患重症度診断の可能性を示唆したに過ぎず、HVEMを標的とした疾患治療の可能性とは全く関連はない。又、動物実験において、可溶性LT β 受容体投与がLIGHT機能を抑制することにより、ラット特異的自己免疫性眼ブドウ膜炎およびマウス移植片対宿主病を抑制したとの報告がある(Shao H, et al, Eur J Immunol, 3: 1736, 2003, Tamada et al, Nat Med 6: 283, 2000, Tamada et al, J Clin Invest 109: 549, 2002)。これらの文献はLIGHTもしくは膜型LT機能を抑制することにより、ある種の異常免疫反応を抑制できることを示唆する。

[0006] HVEMの第3のリガンドであるBTLAはそれ自身T細胞上の受容体タンパクであり、HVEMがBTLAに結合することにより、T細胞活性化を強力に抑制する(Nat. Immunol., 6:90, 2004)。更に、HVEM遺伝子欠損マウスのT細胞の活性化能が正常マウスのT細胞よりも増強されていることが明らかにされ、生体内でのHVEM-BTLA結合が免疫抑制に重要である可能性が示唆された(Sedy et al, Nat Immunol, 6: 90-98, 2005, Gonzalez et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 102:1116-21, 2005)。又、一方で、HVEMシグナルが炎症性腸疾患発症を促進するとの結果が報告されている(Wang et al., J. Immunol.174:8173, 2005)。

非特許文献1:Nat. Immunol., 6:90, 2004

非特許文献2:Sedy et al, Nat Immunol, 6: 90-98, 2005, Gonzalez et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 102:1116-21, 2005

非特許文献3:Wang et al., The critical role of LIGHT in promoting intestinal inflammation and Crohn's disease, J. Immunol. 2005 Jun 15; 174 (12):8173-82

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 現在の処、炎症性腸疾患発症原因については未だ不明であり、BTLAの炎症性腸疾患発症に対する関与は全く明らかにされていない。更に、HVEM-BTLA系特異的にシグナルを制御した際の炎症性腸疾患発症抑制効果も不明である。

[0008] 本発明者は、動物モデルにおいて炎症性疾患、特に炎症性腸疾患の発症原因のひとつがHVEMの遺伝子変異と発現不全であることを見出し、炎症性腸疾患発症にHVEMシグナルが関与することを初めて明らかにした。本発明は、かかる知見に基づきなされたものである。

課題を解決するための手段

[0009] 即ち、本発明は以下の各態様に係る。

1. T細胞上のBTLA受容体シグナルを増強することによる、炎症性腸疾患治療方法。
2. BTLA受容体とそのリガンドを反応させることにより、T細胞上のBTLA受容体シグナルを増強する、上記1記載の方法。
3. リガンドが可溶型HVEMである、上記2記載の方法。
4. BTLA受容体とそのアゴニストを反応させることにより、T細胞上のBTLA受容体シグナルを増強する、上記1記載の方法。
5. アゴニストが抗BTLA抗体である、上記4記載の方法。
6. 炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又はクローン病である、上記1～5のいずれか一項に記載の方法。
7. BTLA受容体のリガンドを有効成分として含有する、医薬組成物。
8. リガンドが可溶型HVEMである、上記7記載の医薬組成物。
9. BTLA受容体のアゴニストを有効成分として含有する、医薬組成物。
10. アゴニストが抗BTLA抗体である、上記9記載の医薬組成物。
11. 炎症性腸疾患治療用医薬組成物である、上記8～10のいずれか一項に記載の医薬組成物。
12. 炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又はクローン病である、上記11記載の炎症性腸疾患治療用医薬組成物。
13. 配列番号1に示されるDNA配列から成るポリヌクレオチドにおける、333番目か

ら336番目までの4塩基欠損、1305番目のグアニン、1542番目のアデニン、1669番目のグアニン、2606番目のアデニン、4544番目のアデニン、5681番目のグアニン、5704番目のチミン、5832番目の1塩基欠損、5867番目のシトシン、5896番目のチミン、6295番目のチミン、6566番目のシトシンと6567番目のシトシン間へのグアニン2塩基の挿入、6567番目のシトシンと6568番目のチミン間へのグアニンの挿入、6568番目のチミンと6569番目のグアニン間へのアデニン-グアニン2塩基の挿入、又は6579番目のシトシンに対応する塩基を含む10～100の連続したDNA配列からなるオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド。

14. 上記13に記載のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを検出することによる、炎症性腸疾患の発症と関連するHVEM遺伝子の変異の測定法。

15. 上記14に記載の測定法を実施するための、炎症性腸疾患の発症と関連するHVEM遺伝子の変異の測定用キット。

発明の効果

[0010] 動物モデルにおいて炎症性疾患、特に炎症性腸疾患の発症原因のひとつがHVEMの遺伝子変異と発現不全であることが解明された。従って、HVEM-BTLAシグナルを制御することにより、炎症性腸疾患の治療が可能になる。具体的には、可溶型HVEM投与あるいは抗BTLA抗体投与等による人為的BTLAシグナルの増強が炎症性腸疾患治療に有効である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]疾患感受性系統(C57BL/6)と疾患抵抗性系統(BALB/c)の交配により作製した(C57BL/6 x (C57BL/6 x BALB/c))N2-OX40L-Tgマウス各個体の炎症性腸疾患重症度についての各遺伝子型によるQTL解析の結果を示す。縦軸はLodスコア、横軸は遺伝子座を表す。

[図2]疾患感受性系統(C57BL/6)と疾患抵抗性系統(BALB/c)の交配により作製した(C57BL/6 x (C57BL/6 x BALB/c))N2-OX40L-Tgマウス各個体の大腸重量／体重比について各遺伝子型によるQTL解析の結果を示す。縦軸はLodスコア、横軸は遺伝子座を表す。

[図3]マウスゲノム遺伝子配列とヒトゲノム遺伝子配列の対応を示す。棒線で示した部

位が、本発明で同定されたマウス炎症性腸疾患感受性遺伝子座、およびヒト炎症性腸疾患感受性遺伝子座IBD7(1p36)である。両者は完全に一致する。

[図4-1]疾患感受性系統C57BL/6(B6)と疾患抵抗性系統BALB/c(BALB)のHVEMゲノム遺伝子塩基配列の比較を示す。四角で囲んだ箇所に多型(変異)が同定された。

[図4-2]続き。

[図4-3]続き。

[図4-4]続き。

[図4-5]続き。

[図4-6]続き。

[図5]疾患感受性系統C57BL/6と疾患抵抗性系統BALB/c、129/Sv、FVBのHVEM cDNA塩基配列の解析により同定された、C57BL/6特異的アミノ酸変異を示す。HVE M膜貫通領域内のバリンがアラニンに置換している。

[図6]図A上段はHVEM下段は β アクチンの半定量的RT-PCR結果を示す。数字はマウス系統を示す(1:129/SvJ, 2:NOD, 3:C57BL/6, 4:C57BL/6xBALB/c F1, 5:DBA 2, 6:FVB, 7:BALB/c)。C57BL/6由来の脾臓と腸管ではHVEM mRNAがほとんど検出できない。図B: TaqMan probe (アプライドバイオシステム社)を用いたリアルタイムPCRによりHVEMおよび β アクチンmRNA量を定量した。 β アクチンmRNA量を内的対照として相対的HVEM mRNA量を計算し、グラフに示した。C57BL/6マウス脾臓および腸管におけるHVEM mRNA量はBALB/cマウスに比し、50分の1以下であった。

[図7]マウス脾臓より単離したT細胞をプレートに固着化した抗CD3抗体で刺激し、刺激後72時間後の ^3H -チミジンの取り込み量を測定した。その際に、可溶性HVEM(10 mg/ml)添加(白)と無添加(黒)でその取り込み量を比較した。可溶性HVEM添加により、T細胞活性化能が抑制された。

[図8]HVEM遺伝子導入マウス(Virology, 2004 Mar 15; 320 (2): 267-75)とOX40L-Tgマウスを交配し、HVEM- OX40L二重遺伝子導入マウスを作製した。20週齢の野生型マウス(n=9)、HVEM遺伝子導入マウス(n=14)、OX40L-Tgマウス(n=12)、及び、HVEM- OX40L二重遺伝子導入マウス(n=12)における腸管重量(左)及び

組織学的大腸炎重症度(右)の結果を示す。尚、左図においては各遺伝子型毎の腸管重量の平均値及び標準偏差(エラーバー)を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0012] 以下の実施例に示されるように、本発明は、HVEM遺伝子多型(異常)がHVEM mRNAの発現不全を引き起こし、その結果、特に、本来BTLAから供給されるはずの免疫抑制シグナルが欠如するために炎症性腸疾患が発症する、という新たな考えに基づくものである。従って、本発明の炎症性腸疾患治療方法はBTLAシグナルを増強させることを特徴とする。BTLAシグナルの増強の方法としては、当業者に公知の任意の手段を取ることが出来る。例えば、可溶型HVEMのようなBTLA受容体に対するリガンド、又は、抗BTLA抗体のようなBTLA受容体に対するアゴニストをBTLAと反応(結合)させることによりBTLAシグナル増強することができる。
- [0013] 本発明方法の主な治療対象としては、ヒトを含む哺乳動物等の高等生物を挙げることが出来る。
- [0014] 可溶型HVEMは市販されており容易に入手可能である。具体的には、HVEM (human):Fc (human) Alexis社)等を挙げることが出来る。或いは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=23200040>等にそのアミノ酸配列が記載されているので、それらに基づき当業者に公知の方法で作成することも可能である。
- [0015] 一方、ヒトBTLAのアミノ酸配列は、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=54607121>等に記載されて公知であるので、このような情報に基づき、当業者に公知の任意の方法で抗BTLA抗体を作成することが出来る。該抗体はモノクローナル抗体、又は、ポリクローナル抗体でも良く、更に、これらに基づき、当業者に公知の遺伝子工学的組換え技術で、抗BTLA活性を有する各種キメラ抗体(ヒト型化抗体)を作成することも可能である。
- [0016] BTLA受容体に対するリガンド又はアゴニストである有効成分と組合せて、本発明の医薬組成物に用いることのできる医薬キャリアー又は希釈剤の好適な例としては、塩化ナトリウム;塩化マグネシウム;塩化亜鉛、グルコース;サッカロース;ラクトース;エチルアルコール;グリセリン;マンニトール;ソルビトール;ペンタエリスリトール;ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ポリエチレングリコー

ル400、他のポリエチレングリコール；トリラウリン酸グリセリル、及びジステアリン酸グリセリルの如き脂肪酸のモノ、ジ及びトリグリセリド；ペクチン；でんぷん；アルギニン酸；キシロース；タルク；石松子；オリーブ油、ピーナツ油、ヒマシ油、コーン油、紅花油、小麦麦芽油、ゴマ油、棉実油、ヒマワリ油及びタラ肝油の如きオイル及び油脂；ゼラチン；レシチン；シリカ；セルロース；メチルヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースの如きセルロース誘導体；ステアリン酸カルシウム、ラウリン酸カルシウム、オレイン酸マグネシウム、パルミチン酸カルシウム、ベヘン酸カルシウム及びステアリン酸マグネシウム等の12～22の炭素原子を有する脂肪酸の塩；シクロデキストリン類（例えば、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- β -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、ジヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、カルボキシメチルエチル- β -シクロデキストリン、シクロアワオドリ、及びジメチル- β -シクロデキストリン等）；乳化剤（例えば、2～22の炭素原子、特に10～18の炭素原子を有する飽和及び不飽和の脂肪酸とグリコール、グリセリン、ジエチレングリコール、ペンタエリスリトール、エチルアルコール、ブチルアルコール、オクタデシルアルコールの如き1～20の炭素原子を有する一価の脂肪族アルコール又は多価アルコールとのエステル；及びジメチルポリシロキサン）の如きシリコン等が挙げられる。更に、医薬組成物に従来から用いられてきた当業者に公知の任意の追加のキャリアーも本発明の医薬組成物に使用することが出来る。

[0017] 本発明の化合物の薬学的な有効量及び投与方法又は投与手段は、感染症の原因となる寄生原虫の種類、原虫の寄生部位、病状の重さ、治療方針、患者の年齢、体重、性別、全般的な健康状態、及び患者の（遺伝的）人種的背景に応じて、当業者が適宜選択することができる。一般的には、本発明の化合物の投与量は1～10,000mg／日／体重70kg、より一般的には50～2000mg／日／体重70kgである。

[0018] 本発明医薬組成物は投与方法・投与経路等に応じて当業者に公知の任意の形状とすることが出来る。それらは適当な方法で投与することが出来る。例えば、形状としては、液体状、粉末状、及びコロイド状等があり、上記のキャリアー又は希釈剤を伴った形で、静脈内、腹腔内、皮下に注射するか、又は、経口投与等が挙げられる。尚、

有効成分は、本発明の医薬組成物の使用目的、対象、及び形状等に応じて、適当な量で含有されることが出来るが、通常、1mg～10,000mg程度、好ましくは、10mg～3,000mg程度含有されている。

[0019] 配列番号1に示されるDNA配列は、炎症性腸疾患発症マウス(C57BL/6系統)のHVEM遺伝子のゲノム塩基配列であり、この遺伝子に特有に見られる各種変異(一塩基置換、塩基欠損、塩基挿入等)の各位置に対応するヒト等の他の哺乳動物のHVEM遺伝子における同様な変異を含む適応な長さのオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド断片は、炎症性腸疾患の発症と関連するHVEM遺伝子の変異の検出に使用することが出来る。尚、配列番号1における各種変異の位置を示す塩基番号は、炎症性腸疾患発症マウス(C57BL/6系統)と疾患抵抗性系統BALB/cマウスのHVEM遺伝子ゲノム配列をそれらの間の同一性が最大となるようにアライメントさせた場合の、疾患抵抗性系統BALB/cマウスのHVEM遺伝子ゲノム配列における塩基番号に基づき付されたものである。

[0020] 尚、ここで、配列番号1における各種変異の位置と対応する他の哺乳動物のHVEM遺伝子における変異は、配列番号1の塩基配列と他の動物におけるHVEM遺伝子の塩基配列とを、それらの間の同一性(identity)が最大となるようにアライメントさせた場合、互いの塩基が同じ位置になることを意味し、必ずしも、対応する位置にある塩基が夫々の遺伝子において5'末端からの同じ位置(番目)存在することを意味するものではない。具体的には、図4で、疾患感受性系統C57BL/6(B6)の第1,300番目の塩基と疾患抵抗性系統BALB/c(BALB)の第1,305番目のような、両者のHVEMゲノム遺伝子の塩基配列の間の比較において四角で囲んだ塩基が夫々対応する位置にある塩基といえる。

[0021] このような変異を検出する様々な方法は当業者に公知であり、例えば、塩基配列決定(シーケンス法)、並びに、タクマン法(Taqman PCR)、侵入法(Invader method)、RCA法、MALDI-TOF/MS法、及びDNAチップ法等のスニップタイピングで使用される各種方法を挙げることが出来る。従って、本発明のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの具体的なDNAの長さは、このような検出方法等に応じて、当業者が適宜選択することが出来る。通常、10～100の連続したDNA配列からなる。又、

本発明のキットは、上記塩基配列における変異を測定するための具体的な方法・手段に応じて、適当な構成をとることが出来る。例えば、本発明キットには、本発明のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを増幅するために使用される適当な長さの塩基配列からなるプローブ又はプライマーを含有することが出来、それらは、図4に示された塩基配列情報に基づき当業者が適宜設計することが可能である。更に、必要に応じて、これらポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは放射性物質、蛍光物質、色素等の適当な標識物質によって標識されていても良い。更に、上記キットには、その構成・使用目的などに応じて、当業者に公知の他の要素又は成分、例えば、各種試薬、酵素、緩衝液、反応プレート(容器)等が含まれる。

実施例

- [0022] 以下に本発明を詳細に説明するために実施例を示す。尚、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。
- [0023] 本発明者らが作製したOX40リガンド遺伝子導入(以下、「OX40L-Tg」と記す)マウスは、ヒト潰瘍性大腸炎に極めて類似の炎症性腸疾患を加齢とともに自然発症する(特開2003-102330)。OX40L-Tgマウスでみられる炎症性腸疾患はC57BL/6系統のマウスでのみ発症し、BALB/c、DBA/2、DBA/1J系統では全く発症しない。すなわち、C57BL/6系統に疾患感受性遺伝子の存在が想定された。そこで、感受性系統(C57BL/6系統)と抵抗性系統(BALB/c)を交配し、339匹の交雑OX40L-Tgマウスを作製した。それらOX40L-Tgマウスが炎症性腸疾患を発症する20週齢に達した時点で、各個体の腸疾患重症度、腸管重量/体重比を測定すると共に、各種遺伝子マーカーを用いて遺伝子型を決定した。疾患の重症度は、以下に示すように、常法により判定した。
- [0024] 上行、横行結腸、直腸の3点からの標本を評価し、一番重症度スコアの高いものをもって個体の重症度とする。
- [重症度スコア]
- 0・・・粘膜炎症の徴候なし。
 - 1・・・粘膜炎症の徴候あり。白血球浸潤は軽度。
 - 2・・・粘膜炎症の徴候あり。白血球浸潤が中等度で腸管肥厚が認められる。

3・・・粘膜炎症の徴候あり。白血球浸潤が中等度以上で腸管肥厚が認められる。加えて、次の(1)～(4)のいずれかの徴候を満たす。

- (1)陰窩膿瘍形成が目立つ。
- (2)びらん形成が認められる。
- (3)粘膜壊死巣が認められる。
- (4)高度の粘膜線維化が認められる。

[0025] その結果、マウス第4染色体80 cM付近が両アレルとも感受性系統(C57BL/6系統)の場合に高頻度に疾患の発症が見られ、それに対して1アレルが疾患非発症マウス系統(BALB/c)由来であればほとんど疾患が発症しないことが明らかになった。

[0026] 更に、各個体の遺伝子型と腸疾患重症度(図1)および腸管重量/体重比(図2)とでQTL解析を行った結果、HVEM遺伝子部位に一致して高いピーク(Lodスコアはそれぞれ7.4(図1)、4.1(図2))を検出した。さらに、疾患重症群(スコア2以上)、疾患未発症群(スコア0)と、HVEM遺伝子多型の有無との相関を単点解析したところ χ^2 検定で $p = 4.6 \times 10^{-8}$ と疾患発症と遺伝子多型との間で極めて強い相関を認めた。以上より、同部位が炎症性腸疾患感受性遺伝子座であることが明らかになった。この遺伝子座はヒト炎症性腸疾患感受性遺伝子IBD7(1p36)に完全に一致していた(図3)。この事実はヒトにおいても同一の遺伝子が疾患感受性遺伝子である可能性を強く示唆するものである。

[0027] 更に、当業者に公知のダイレクトシーケンス法を用いて、同遺伝子座に存在する候補遺伝子のゲノム配列を解析したところ、疾患発症マウスが極めて高頻度にHVEM遺伝子多型(異常)を有することが明らかになった。図4において、炎症性腸疾患発症マウス(C57BL/6系統)のHVEM遺伝子のゲノム塩基配列(配列番号1)に見られる多型(変異)を図4に示す。

[0028] 次に、常法に従い、各系統のマウス脾臓細胞RNAを抽出し、得られたRNAを検体としてRT-PCR法によりHVEMcDNAを増幅し、ダイレクトシーケンス法により各系統のHVEMcDNA塩基配列を決定した。

こうして得られたcDNA配列より推定されるアミノ酸配列の比較により、炎症性腸疾患発症マウスでは図5に示すアミノ酸変異(HVEM膜貫通領域内のバリンがアラニンに

置換)を有していることが明らかになった。この変異は疾患を発症しないBALB/c、129/Sv、FVBの3系統には検出されなかった。

[0029] 次に、常法に従い、疾患感受性系統C57BL/6と疾患抵抗性系統BALB/cマウス脾臓細胞よりRNAを抽出し、オリゴdTプライマーを用いてcDNAを合成した。作製したcDNAを鋳型として半定量的RT-PCRを行った(TaqMan Gene Expression Assays(アプライドバイオシステム社))。更に、TaqMan probe(アプライドバイオシステム社)を用いたりアルタイムPCRによりHVEMおよび β アクトチンmRNA量を定量した。その結果、図6に示すように、各マウスの脾臓及び腸管の疾患発症マウス系統(C57BL/6)では、脾臓リンパ球におけるHVEM mRNAの発現量が疾患抵抗性マウス系統(BALB/c)に比し50分の1以下であった。

[0030] 以上の結果から、C57BL/6でみられたHVEM遺伝子多型(異常)がHVEM mRNAの発現不全を引き起こし、そのために本来BTLAから供給されるはずの免疫抑制シグナルが欠如するために炎症性腸疾患が発症することが推察される。従って、これらのことから、HVEM遺伝子がマウス炎症性腸疾患発症の感受性遺伝子であると結論した。

[0031] これを確認するために、常法に従い、マウス脾臓より単離したT細胞をプレートに固層化した抗CD3抗体(クローン名:145-2C11(BD Biosciences社))で刺激し、刺激後72時間後の³H-チミジンの取り込み量を測定した。ここで、実際にマウス可溶型HVEM(マウスHVEM蛋白のアミノ酸1番目~204番目の領域(細胞外領域)に一致)をT細胞に添加すると、T細胞免疫反応が抑制されることが明らかになった(図7)。

[0032] 更に、可溶型HVEM生体内に多量に産生する遺伝子改変マウス(HVEM遺伝子導入マウス:Virology, 2004 Mar 15; 320 (2): 267-75)とOX40L-Tgマウスを交配し、HVEM-OX40L二重遺伝子導入マウスを作製した。20週齢で炎症腸疾患重症度の指標の一つである腸管重量と組織学的大腸炎重症度を測定した。重症度の測定は、上記の[重症度スコア]に従った。HVEMの生体内発現によってOX40L-Tgマウスの腸管重量増加と腸管炎症反応が有意に抑制された(図8)。以上の結果から、可溶性HVEMあるいは抗BTLA抗体により、BTLAシグナルを人為的に供与することにより、T細胞により炎症性腸疾患惹起を抑制できると結論された。

産業上の利用可能性

- [0033] 可溶型HVEMあるいは抗BTLA抗体等のBTLA受容体に対するリガンド又はアゴニストを炎症性腸疾患モデルマウスに投与し、HVEM-BTLAシグナルを制御することにより炎症性腸疾患発症が抑制でき、疾患治療が可能である。さらにそれらの物質を医薬品として臨床応用できる。

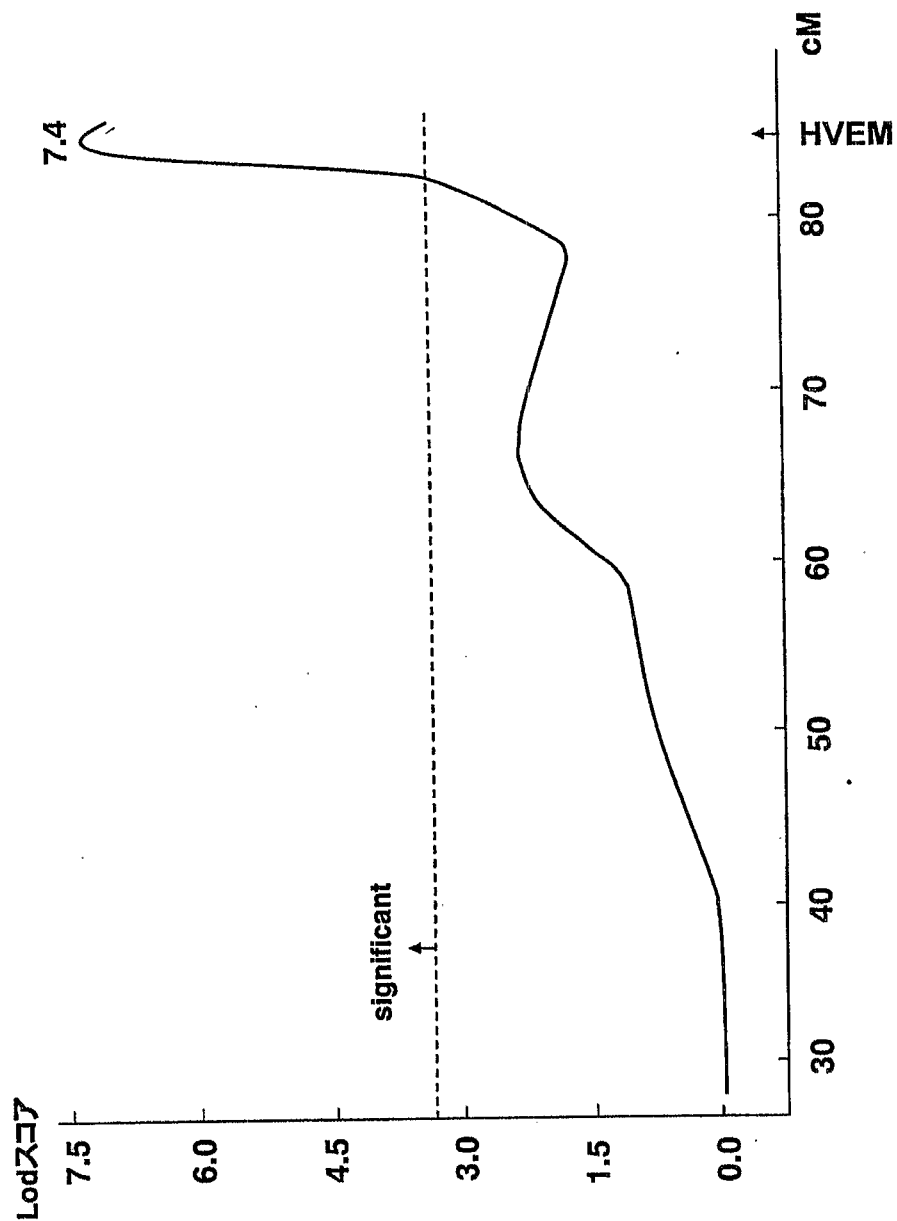
請求の範囲

- [1] T細胞上のBTLA受容体シグナルを増強することによる、炎症性腸疾患治療方法。
- [2] BTLA受容体とそのリガンドを反応させることにより、T細胞上のBTLA受容体シグナルを増強する、請求項1記載の方法。
- [3] リガンドが可溶型HVEMである、請求項2記載の方法。
- [4] BTLA受容体とそのアゴニストを反応させることにより、T細胞上のBTLA受容体シグナルを増強する、請求項1記載の方法。
- [5] アゴニストが抗BTLA抗体である、請求項4記載の方法。
- [6] 炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [7] BTLA受容体のリガンドを有効成分として含有する、医薬組成物。
- [8] リガンドが可溶型HVEMである、請求項7記載の医薬組成物。
- [9] BTLA受容体のアゴニストを有効成分として含有する、医薬組成物。
- [10] アゴニストが抗BTLA抗体である、請求項9記載の医薬組成物。
- [11] 炎症性腸疾患治療用医薬組成物である、請求項8～10のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [12] 炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項11記載の炎症性腸疾患治療用医薬組成物。
- [13] 配列番号1に示されるDNA配列から成るポリヌクレオチドにおける、333番目から336番目までの4塩基欠損、1305番目のグアニン、1542番目のアデニン、1669番目のグアニン、2606番目のアデニン、4544番目のアデニン、5681番目のグアニン、5704番目のチミン、5832番目の1塩基欠損、5867番目のシトシン、5896番目のチミン、6295番目のチミン、6566番目のシトシンと6567番目のシトシン間へのグアニン2塩基の挿入、6567番目のシトシンと6568番目のチミン間へのグアニンの挿入、6568番目のチミンと6569番目のグアニン間へのアデニン－グアニン2塩基の挿入、又は6579番目のシトシンに対応する塩基を含む10～100の連続したDNA配列からなるオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド。
- [14] 請求項13に記載のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを検出することによる、炎

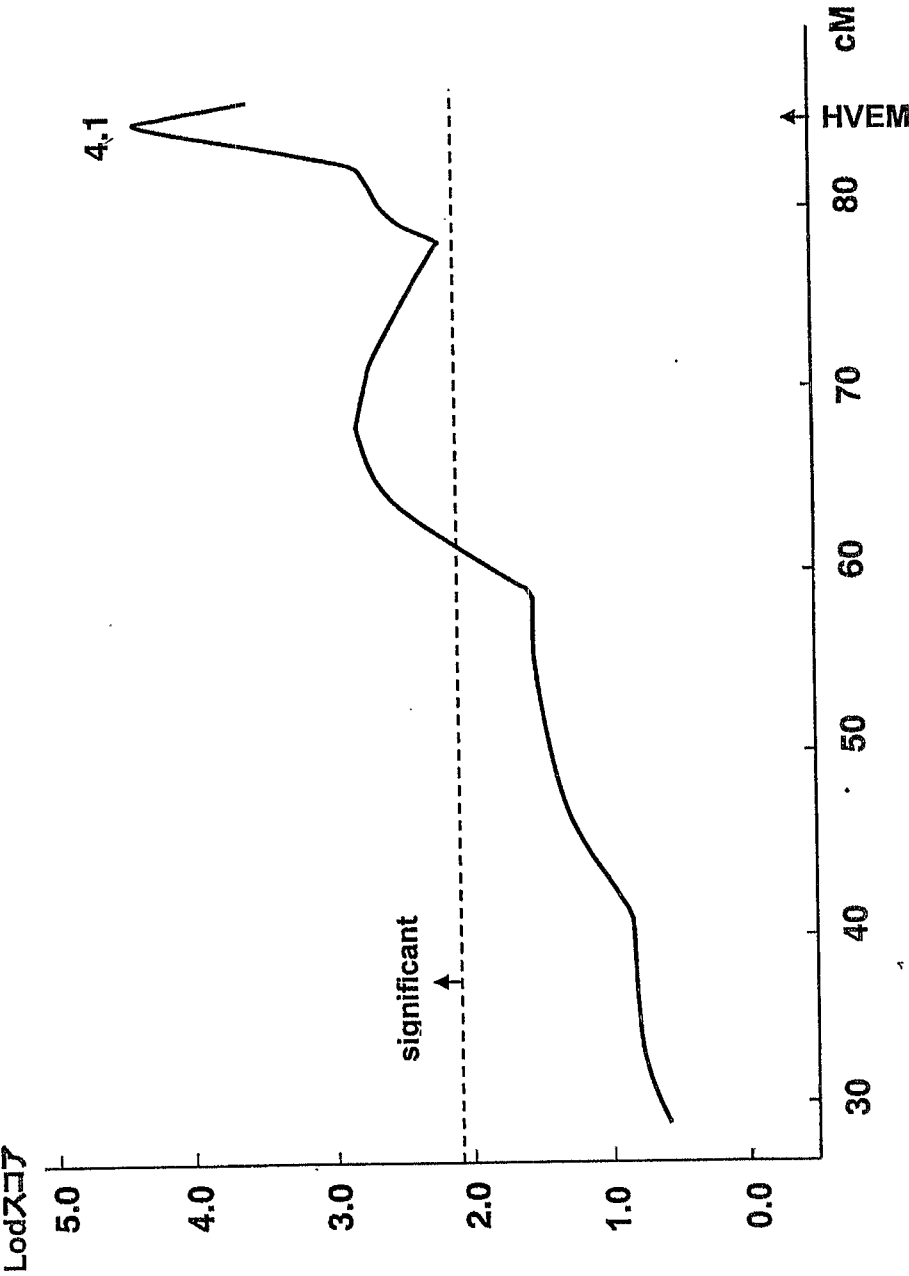
症性腸疾患の発症と関連するHVEM遺伝子の変異の測定法。

- [15] 請求項14に記載の測定法を実施するための、炎症性腸疾患の発症と関連するHVE
M遺伝子の変異の測定用キット。

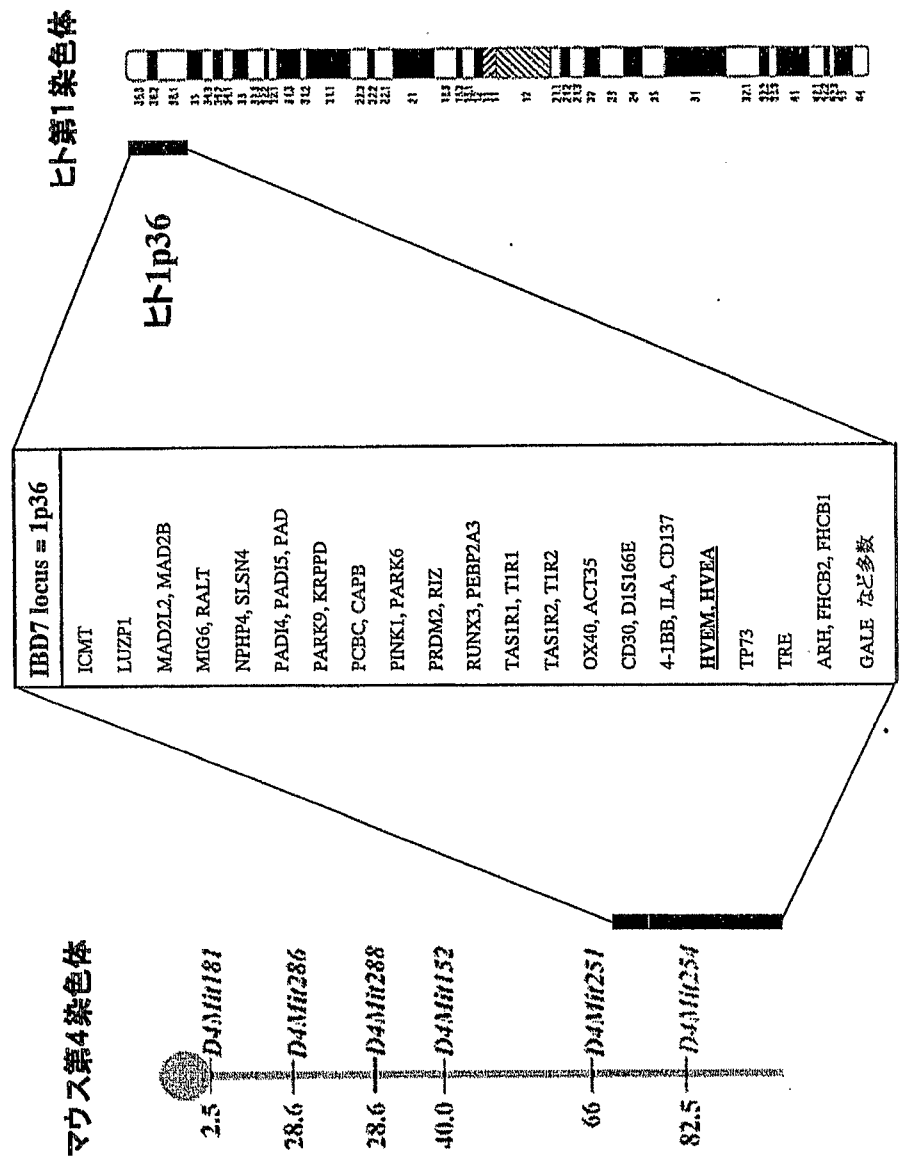
[図1]



[図2]



[図3]



[图4-6]

BALB:	8186	TAGGCGCTGTAAACCTTAGCGCTTAACCGCAGCTCAGCCTATTAACCTTAGGCGCTCTTCTAGTCAAGAGGCTTGTCTGAGCACTGCGCTCTCTGGGGCGGGGGTACATGTGA	8315
B6:	8186	TAGGCGCTGTAAACCTTAGCGCTTAACCGCAGCTCAGCCTATTAACCTTAGGCGCTCTTCTAGTCAAGAGGCTTGTCTGAGCACTGCGCTCTCTGGGGCGGGGGTACATGTGA	8315
BALB:	8316	GGAGTCATGCAACATGGCATTATTATAGACTTTACTTTGAC	8355
B6:	8316	GGAGTCATGCAACATGGCATTATTATAGACTTTACTTTGAC	8355

[図5]

C57BL/6
BALB/c, 129/Sv, FVB

1 mep lpgwg sa pwsqapt dnt f r l v p o v f l l n l l q r i s a q p s c r q e e f l v g
1 mep lpgwg sa pwsqapt dnt f r l v p o v f l l n l l q r i s a q p s c r q e e f l v g

51 deco p m c n p g y h v k q v c s e h t g t v c a p c p p q t y t a h a n g l s k c l p c g v c d
51 deco p m c n p g y h v k q v c s e h t g t v c a p c p p q t y t a h a n g l s k c l p c g v c d

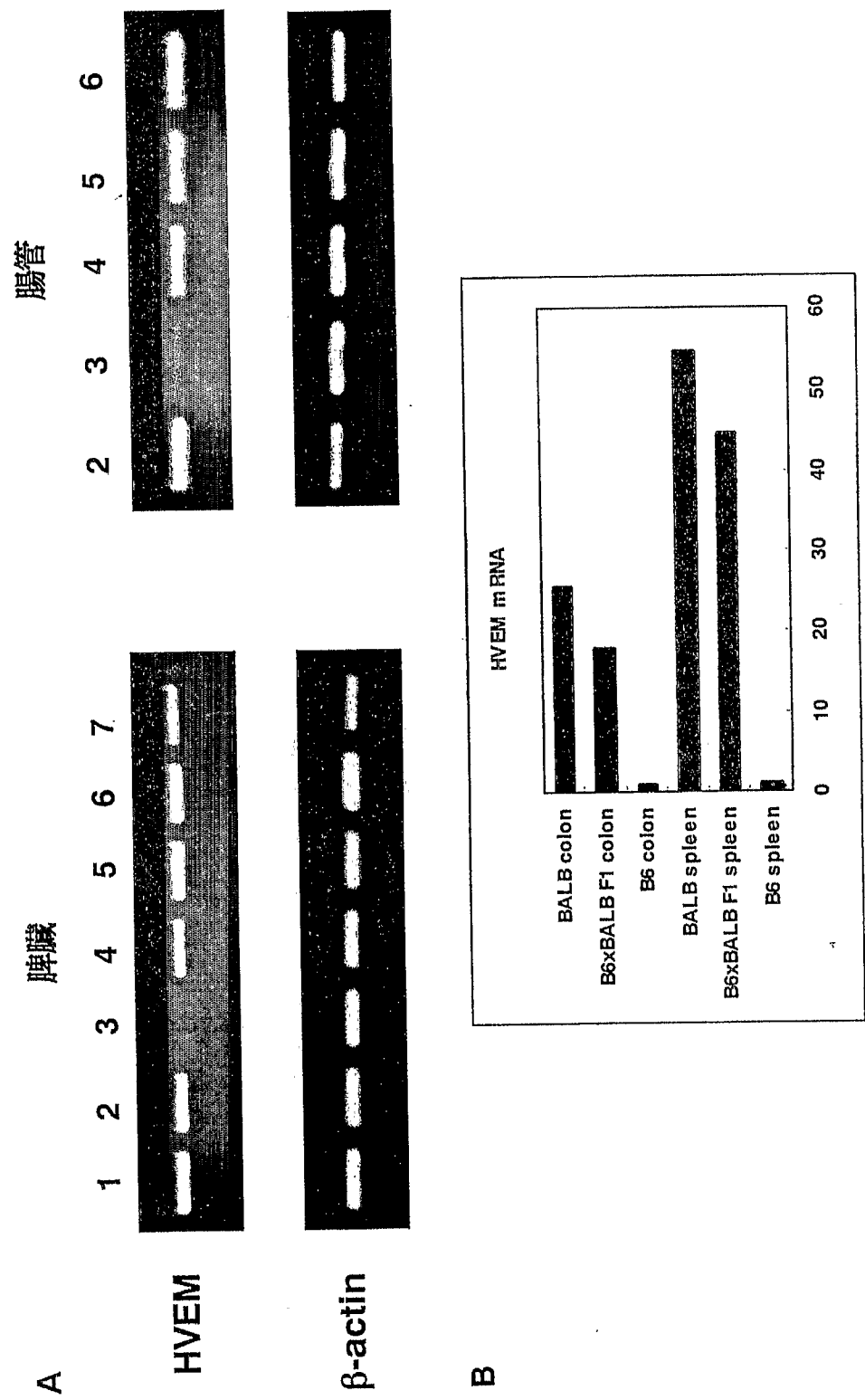
101 p d m g l l t w q e c s s w k d t v c r c i p g y f o e n q d g s h c s t c l q h t t c p p g q r v
101 p d m g l l t w q e c s s w k d t v c r c i p g y f o e n q d g s h c s t c l q h t t c p p g q r v

151 e k r g t h d q d t v c a d c l t g t f s l g g t q e e c l p w t n c s a f q q e v r r g t n s t d
151 e k r g t h d q d t v c a d c l t g t f s l g g t q e e c l p w t n c s a f q q e v r r g t n s t d

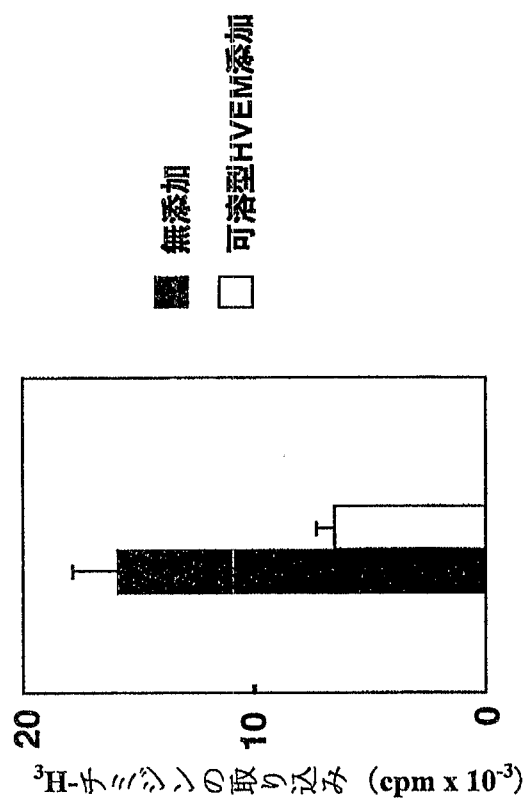
201 t t c s s q v v y y v v s i l l p l v i v g a p i a g f l i c t r r h l h t s s v a k e l e p f q q
201 t t c s s q v v y y v v s i l l p l v i v g v p i a g f l i c t r r h l h t s s v a k e l e p f q q

251 e q q e n t i r f p v t e v g f a e t e e e t a s n
251 e q q e n t i r f p v t e v g f a e t e e e t a s n

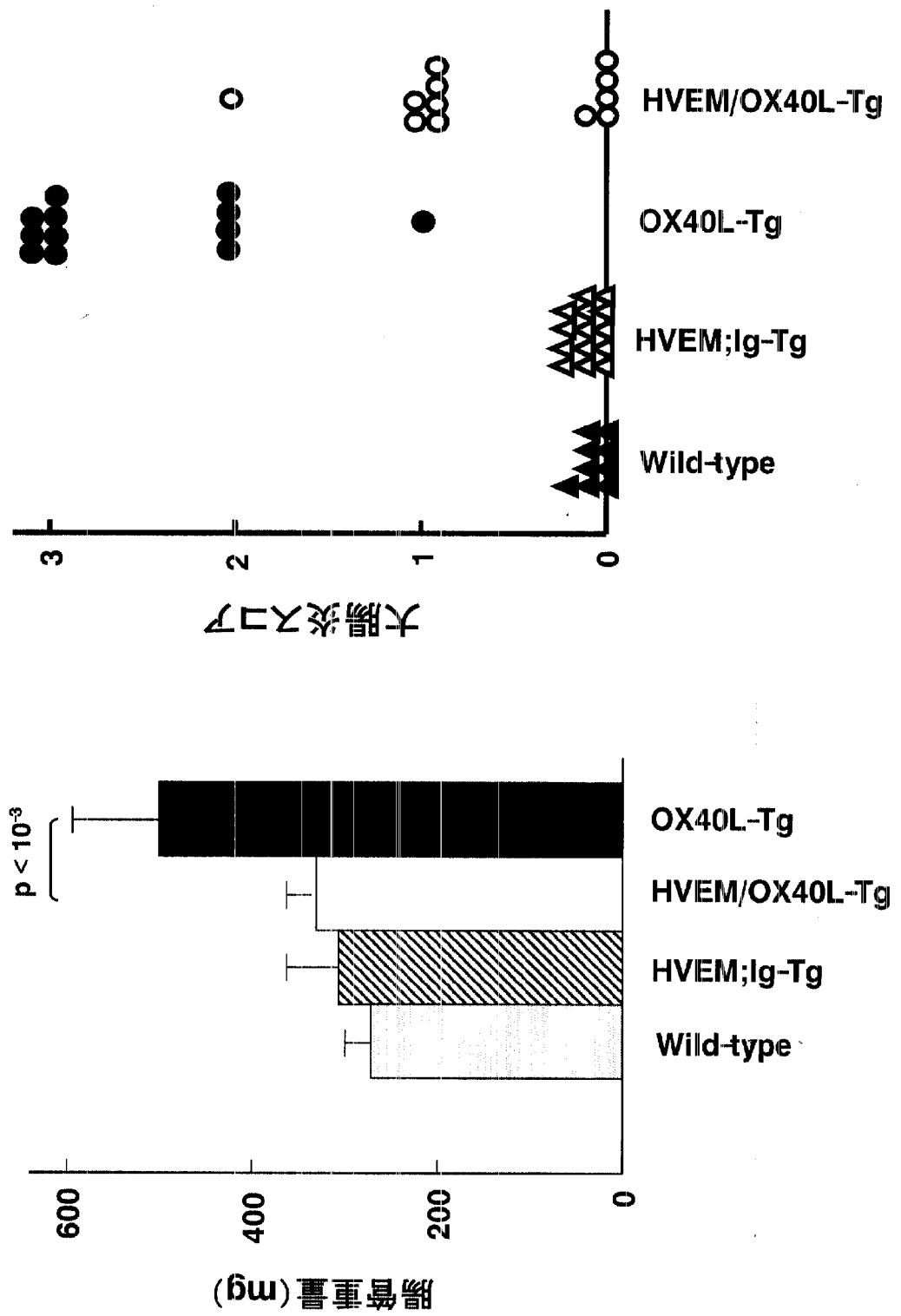
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01), A61K38/00(2006.01), A61K39/395(2006.01), A61P1/00(2006.01), A61P29/00(2006.01), C12N15/09(2006.01), C12Q1/68(2006.01)

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)

A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61P1/00, A61P29/00, C12N15/09, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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

WPI, BIOSIS (STN), CA (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/ GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, dbSNP, JMEDPlus (JDream2),

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2003-531152 A (La Jolla Cancer Research Foundation), 21 October, 2003 (21.10.03), Par. Nos. [0167] to [0170]; Figs. 9, 10 & WO 2001/079496 A2 & EP 1274840 A2 & AU 200153387 A & AU 2001253387 A2	7, 8 9-12
X A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. BX004788, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=28971500 > 13-MAR-2003 uploaded, HOWDEN, P., Definition: Mouse DNA sequence from clone RP24-89N4 on chromosome 4., Comment: RP24-89N4 is from a Male (C57BL/6J) mouse BAC Library VECTOR: pTARBAC1	13 14, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 September, 2006 (12.09.06)

Date of mailing of the international search report
26 September, 2006 (26.09.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312217

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AZ348754, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=10427991 > 29-SEP-2000 uploaded, DUNN, D. et.al., Definition: 1M0085N24F Mouse 10kb plasmid UUGC1M library Mus musculus genomic clone UUGC1M0085N24 F, genomic survey sequence., strain: C57BL/6J	13 14,15
X A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AZ973802, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=13845029 > 27-APR-2001 uploaded, DUNN, D. et.al., Definition: 2M0248I08F Mouse 10kb plasmid UUGC2M library Mus musculus genomic clone UUGC2M0248I08 F, genomic survey sequence., strain: C57BL/6J	13 14,15
A	ELSON, C.O. et.al., Hapten-Induced Model of Murine Inflammatory Bowel Disease, The Journal of Immunology, 1996, Vol.157, p.2174-2185, abstract	13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312217

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

JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/312217

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.: 1 - 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 6 pertain to methods for treatment of the human body by therapy. Consequently, claims 1 to 6 relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

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

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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

International application No.

PCT/JP2006/312217

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Claims 1-6 of the present international application relate to a method for treatment of the human body by therapy. Thus, the inventions of claims 1-6 relate to a subject matter which this international searching authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.

Grounded on the above statement, claims 7-15, which are now subjects of search, are examined on the requirement of unity of invention.

These claims include the following two groups of inventions (1) and (2).

(1) A group of inventions relating to a pharmaceutical composition comprising a ligand of BTLA receptor as recited in claims 7-12 as an active ingredient.

(2) A group of inventions relating to an oligonucleotide or polynucleotide as recited in claims 13-15 and a method for determination thereof.

The group of inventions (1) relate to a pharmaceutical composition, and the group of inventions (2) relate to an oligonucleotide or polynucleotide. However, the active ingredient of the pharmaceutical of (1) and the oligonucleotide or polynucleotide of (2) share no common structure or have a direct technical relationship. Thus, since there is no common technical feature between these groups of inventions, the claimed inventions cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept as defined in PCT Rule 13.1, and the number of inventions included in the claims is 2.

<Subject of search>

In claims 7-12, the active ingredient of the pharmaceutical composition is specified by the terms "ligand of BTLA receptor" (claim 7) and "agonist of BTLA receptor" (claim 9). Claims 7-10 include an invention relating to a pharmaceutical composition of which application for medical purposes is not specified.

With respect to the active ingredient in the inventions, soluble HVEM is disclosed as the "ligand of BTLA receptor" in paragraphs [0004], [0006], [0012] and [0014] of the description. However, there is found no specific explanation in the description about what types of compounds are included within the scope of the "ligand of BTLA receptor". Even though the common technical knowledge at the time of the filing of the present application is taken into the consideration, it appears that the scope of the compound having the property cannot be specified. Thus, claim 7 does not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6, too. Those compositions which are disclosed in the description in the meaning within PCT Article 5 and supported by the description in the meaning within PCT Article 6 are limited to the pharmaceutical compositions comprising, as an active ingredient, soluble HVEM as the ligand of BTLA receptor as defined in claim 8.

Further, an anti-BTLA antibody is disclosed as the "agonist of BTLA receptor" in paragraphs [0004], [0006], [0012] and [0015] of the description. However, there is found no specific explanation in the description about what types of compounds are included within the scope of the "agonist of BTLA receptor". Even though the common technical knowledge at the time of the filing of the present application is taken into the consideration, it appears that the scope of the compound having the property cannot be specified. Thus, claim 9 does not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6, too.

Such being the case, with respect to claims 7-12, the search over prior art documents of the present international application was made exclusively on the pharmaceutical compositions comprising soluble HVEM or anti-BTLA antibody as active ingredient.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K45/00 (2006.01), A61K38/00 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P1/00 (2006.01), A61P29/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01)													
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（I P C）） Int.Cl. A61K 38/00, A61K 39/395, A61K 45/00, A61P 1/00, A61P 29/00, C12N 15/09, C12Q 1/68													
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1 9 2 2－1 9 9 6年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1 9 7 1－2 0 0 6年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1 9 9 6－2 0 0 6年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1 9 9 4－2 0 0 6年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1 9 2 2－1 9 9 6年	日本国公開実用新案公報	1 9 7 1－2 0 0 6年	日本国実用新案登録公報	1 9 9 6－2 0 0 6年	日本国登録実用新案公報	1 9 9 4－2 0 0 6年		
日本国実用新案公報	1 9 2 2－1 9 9 6年												
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1－2 0 0 6年												
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6－2 0 0 6年												
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4－2 0 0 6年												
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） WPI, BIOSIS(STN), CA(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, dbSNP, JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)													
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>JP 2003-531152 A (ラ ホヤ インスティテュート フォーアラジ ー アンド イムノロジー) 2003.10.21, 段落【0 1 6 7】－【0 1 7 0】、【図9】及び【図10】参照 & WO 2001/079496 A2 & EP 1274840 A2 & AU 200153387 A & AU 2001253387 A2</td> <td>7、8 9－12</td> </tr> </tbody> </table>				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 A	JP 2003-531152 A (ラ ホヤ インスティテュート フォーアラジ ー アンド イムノロジー) 2003.10.21, 段落【0 1 6 7】－【0 1 7 0】、【図9】及び【図10】参照 & WO 2001/079496 A2 & EP 1274840 A2 & AU 200153387 A & AU 2001253387 A2	7、8 9－12				
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 A	JP 2003-531152 A (ラ ホヤ インスティテュート フォーアラジ ー アンド イムノロジー) 2003.10.21, 段落【0 1 6 7】－【0 1 7 0】、【図9】及び【図10】参照 & WO 2001/079496 A2 & EP 1274840 A2 & AU 200153387 A & AU 2001253387 A2	7、8 9－12											
☒ 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 <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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）</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				「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	
「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 1 2 . 0 9 . 2 0 0 6		国際調査報告の発送日 2 6 . 0 9 . 2 0 0 6											
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官（権限のある職員）</td> <td>4 C</td> <td>3 7 6 9</td> </tr> <tr> <td colspan="3">齋藤 恵</td> </tr> <tr> <td colspan="3">電話番号 03-3581-1101 内線 3490</td> </tr> </table>		特許庁審査官（権限のある職員）	4 C	3 7 6 9	齋藤 恵			電話番号 03-3581-1101 内線 3490			
特許庁審査官（権限のある職員）	4 C	3 7 6 9											
齋藤 恵													
電話番号 03-3581-1101 内線 3490													

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
X A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. BX004788, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide &val=28971500> 13-MAR-2003 uploaded, HOWDEN, P., Definition: Mouse DNA sequence from clone RP24-89N4 on chromosome 4., Comment: RP24-89N4 is from a Male (C57BL/6J) mouse BAC Library VECTOR: pTARBAC1	1 3 1 4、1 5
X A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. AZ348754, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide &val=10427991> 29-SEP-2000 uploaded, DUNN, D. <i>et. al.</i> , Definition: 1M0085N24F Mouse 10kb plasmid UUGC1M library Mus musculus genomic clone UUGC1M0085N24 F, genomic survey sequence., strain: C57BL/6J	1 3 1 4、1 5
X A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. AZ973802, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide &val=13845029> 27-APR-2001 uploaded, DUNN, D. <i>et. al.</i> , Definition: 2M0248I08F Mouse 10kb plasmid UUGC2M library Mus musculus genomic clone UUGC2M0248I08 F, genomic survey sequence., strain: C57BL/6J	1 3 1 4、1 5
A	ELSON, C. O. <i>et. al.</i> , Hapten-Induced Model of Murine Inflammatory Bowel Disease, The Journal of Immunology, 1996, Vol.157, p.2174-2185, 要約欄参照	1 3 — 1 5

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（P C T 17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 1 - 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 1 - 6 は治療による人体の処置方法に関するものである。したがって、請求の範囲 1 - 6 は、P C T 規則 3 9 . 1 (i v) の規定により、国際調査を要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 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ろの国際調査機関は認めた。
（特別ページを参照）

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ので、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ので、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

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

<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） の続き>

本件国際出願の請求の範囲 1－6 は治療による人体の処置方法に関するものである。したがって、請求の範囲 1－6 は、PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、国際調査を要しない対象にかかるものである。

上記を踏まえ、国際調査を要する対象となる請求の範囲 7－15 について、単一性の要件を検討する。

請求の範囲には、次の発明群（1）及び（2）が記載されている。

（1）請求の範囲 7－12 に記載された BTLA 受容体のリガンドを有効成分とする医薬組成物の発明。

（2）請求の範囲 13－15 に記載されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと、その測定法の発明。

発明群（1）は医薬組成物の発明であるが、発明群（2）はオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであって、（1）の医薬の有効成分と（2）のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとは共通の構造を有するものでも、技術的に直接関連性を有するものでもない。このように上記発明群の間には共通する技術的特徴がないから、請求の範囲に記載された発明は PCT 規則 13.1 に規定する一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲に記載された発明の数は 2 である。

＜調査の対象について＞

請求の範囲 7-12 には、医薬組成物の有効成分を「BTLA 受容体のリガンド」（請求の範囲 7）、「BTLA 受容体のアゴニスト」（請求の範囲 9）という表現にて特定する記載がある。また、請求の範囲 7-10 には、医薬用途を特定しない医薬組成物の発明が記載されている。

上記請求の範囲に係る発明の有効成分に関し、明細書段落[0004]、[0006]、[0012]及び[0014]には「BTLA 受容体のリガンド」として可溶型 HVEM が記載されているが、明細書には「BTLA 受容体のリガンド」が具体的にどのようなものまでを包含するかを説明する記載はなく、出願時の技術常識を勘案しても、そのようなものの範囲を特定することができないから、請求の範囲 7 の記載は PCT 第 6 条に規定する明確性を欠いている。また、PCT 第 5 条の意味において開示され、PCT 第 6 条の意味で裏づけられているのは、医薬組成物の有効成分が、請求の範囲 8 に規定する BTLA 受容体のリガンドのうち、可溶型 HVEM である場合のみである。

加えて、明細書段落 [0004]、[0006]、[0012]及び [0015] には「BTLA 受容体のアゴニスト」として抗 BTLA 抗体が記載されているが、明細書には「BTLA 受容体のアゴニスト」が具体的にどのようなものまでを包含するかを説明する記載はなく、出願時の技術常識を勘案しても、そのようなものの範囲を特定することができないから、請求の範囲 9 の記載は PCT 第 6 条に規定する明確性を欠いている。

よって、本国際出願の先行技術文献調査は、請求の範囲 7-12 については、明細書の記載も考慮して、有効成分が可溶型 HVEM 及び抗 BTLA 抗体の場合に限定して行っている。