

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/025345

発行日 平成20年5月8日(2008.5.8)

(43) 国際公開日 平成18年3月9日(2006.3.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18 ZNA	2GO45
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 N	4BO24
<b>A61P 37/02 (2006.01)</b>	A61P 37/02	4BO64
<b>GO1N 33/50 (2006.01)</b>	GO1N 33/50 Z	4CO85
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 P	4HO45
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 23 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2006-532689 (P2006-532689)	(71) 出願人 000163006 興和株式会社 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2005/015696	
(22) 国際出願日 平成17年8月30日(2005.8.30)	
(31) 優先権主張番号 60/605,516	(71) 出願人 597018716 竹内 勤 東京都世田谷区赤堤2-20-7
(32) 優先日 平成16年8月31日(2004.8.31)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 507055512 吉本 桂子 東京都国分寺市光町3-6-1-3-M
	(74) 代理人 100102668 弁理士 佐伯 憲生
	(72) 発明者 竹内 勤 東京都世田谷区赤堤2-20-7
	(72) 発明者 吉本 桂子 東京都国分寺市光町3-6-1-3-M
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトBAFF抗体

## (57) 【要約】

本発明は、ヒトBAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family) タンパク質の134~146番目の、AVQGPEETVT QDC (アミノ酸1文字表記によるアミノ酸配列) からなるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体、好ましくは当該モノクローナル抗体に関する。また、本発明は、前記本発明の抗体の製造方法、当該抗体を含有してなる医薬組成物、当該抗体の使用、及び当該抗体を用いたBAFFの阻害作用又は活性化作用をスクリーニングする方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト B A F F (B cell activating factor belonging to the TNF family) タンパク質の 1 3 4 ~ 1 4 6 番目の、A V Q G P E E T V T Q D C (アミノ酸 1 文字表記によるアミノ酸配列) からなるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体。

## 【請求項 2】

抗体が、モノクローナル抗体である請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

少なくとも A V Q G P E E T V T Q D C (アミノ酸 1 文字表記によるアミノ酸配列) からなるアミノ酸配列を有するペプチドを含有する抗原を用いて、動物を感作し、当該動物の抗体産生細胞から前記ペプチドに対する抗体を製造する方法。 10

## 【請求項 4】

ペプチドが、A V Q G P E E T V T Q D C (アミノ酸 1 文字表記によるアミノ酸配列) からなるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

抗原がハプテンをさらに現有するものである請求項 3 又は 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

動物が、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ニワトリ又はウサギである請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載の抗体、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。 20

## 【請求項 8】

医薬組成物が、自己免疫疾患を予防・治療するためのものである請求項 7 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

自己免疫疾患が、S L E、R A、S S、自己免疫性糖尿病、A I D S、又は B 細胞の活性化を伴う自己免疫疾患である請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

請求項 1 又は 2 に記載の抗体を含有してなる自己免疫疾患の診断剤。 30

## 【請求項 11】

自己免疫疾患が、S L E、R A、S S、自己免疫性糖尿病、A I D S、又は B 細胞の活性化を伴う自己免疫疾患である請求項 10 に記載の診断剤。

## 【請求項 12】

診断が、E L I S A によるものである請求項 10 又は 11 に記載の診断剤。

## 【請求項 13】

検体中に請求項 1 又は 2 に記載の抗体を添加して、当該抗体と結合した B A F F を測定することからなる検体中の B A F F を検出又は定量する方法。

## 【請求項 14】

B A F F が、ヒト B A F F である請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

抗体と結合した B A F F を測定する方法が、E L I S A によるものである請求項 13 又は 14 に記載の方法。 40

## 【請求項 16】

B A F F を含有する試料中に試験物質を添加し、試験物質の添加による B A F F の量の変化を請求項 1 又は 2 に記載の抗体を用いて測定することからなる、試験物質が有する B A F F の阻害作用又は活性化作用をスクリーニングする方法。

## 【請求項 17】

B A F F が、ヒト B A F F である請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

B A F F の阻害作用をスクリーニングする方法が、自己免疫疾患の予防・治療薬のスク 50

リーニングである請求項 16 又は 17 に記載の方法。

【請求項 19】

自己免疫疾患の予防・治療用の医薬組成物を製造するための、請求項 1 又は 2 に記載の抗体の使用。

【請求項 20】

自己免疫疾患の診断用組成物を製造するための、請求項 1 又は 2 に記載の抗体の使用。

【請求項 21】

自己免疫疾患が、SLE、RA、SS、自己免疫性糖尿病、AIDS、又は B 細胞の活性化を伴う自己免疫疾患である請求項 19 又は 20 に記載の使用。

【請求項 22】

自己免疫疾患の患者又は自己免疫疾患の可能性のある患者に、請求項 1 又は 2 に記載の抗体の有効量を投与することからなる自己免疫疾患を予防又は治療する方法。

【請求項 23】

自己免疫疾患が、SLE、RA、SS、自己免疫性糖尿病、AIDS、又は B 細胞の活性化を伴う自己免疫疾患である請求項 22 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な抗ヒトBAFF抗体、好ましくは抗ヒトBAFFモノクローナル抗体、及びその製造方法に関する。また、本発明は、当該抗体、好ましくは当該モノクローナル抗体を用いた、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防・治療のための医薬組成物、それを含有してなる診断剤及び診断方法、並びに当該抗体の有効量を投与することからなる自己免疫疾患の予防・治療方法に関する。さらに本発明は、当該抗体、好ましくは当該モノクローナル抗体を用いた、BAFFの定量方法、及びBAFFに対する阻害作用又は活性化作用を有する物質をスクリーニングする方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)は、T細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞等から産生・分泌され、B細胞上の3種の受容体を介してB細胞の分化、活性化、生存等を制御することが知られている(Mooreら Science(1999)285,260-263)。

30

【0003】

ヒトBAFFは、285個アミノ酸からなる膜貫通型の蛋白質である。そのアミノ酸配列中には、46アミノ酸の細胞質ドメインと218アミノ酸の細胞外ドメインが存在し、また、Nグリコシル化部位が2ヶ所あり、3量体を形成するといった構造的な特徴を有する。さらにC末端から152アミノ酸の細胞外ドメインは、Furinファミリーのプロテアーゼによって切断され、可溶性として遊離されることが知られている。ヒトBAFFのアミノ酸配列は当初、Neutrokin $\alpha$ との名称で、国際特許出願公開WO98/18921号公報中の配列番号1又は2として開示された。この他別名称として、Kay、TNFSF13B、Blyis、TALL-1、THANK、zTNF4等も知られている。

40

【0004】

BAFFの受容体としては、BAFF-R、TACI(transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor)、及びBCMA(B cell maturation antigen)が知られている。BAFF-R及びBCMAは主にB細胞に発現しており、TACIはB細胞と活性化T細胞に発現している。

【0005】

50

B A F Fの生理的作用は、上述のようにB細胞の分化、活性化、生存等の制御であるが、近年、病態との関わりも次第に明らかとなった。即ち、B A F Fを過剰に発現するマウスでは、末梢血B細胞の増多、リンパ節や脾臓の肥大、血清中I g G濃度上昇、抗核抗体産生、腎内に免疫複合体の沈着、蛋白尿、腎炎等の、S L E様の症状を示すことが報告されている (Mackayら J.Exp.Med., (1999)190,1697-1710、及びKhareら Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA (2000)97,3370-3375)。さらにこのマウスは、加齢と共に唾液腺炎、唾液腺破壊等の、S S様の症状を示すことも判明した (Groomら J.Clin.Invest.(2002)109,59-68)。またS L E、R A、S Sの患者において、血清中B A F F濃度が増加していることも報告されており (Groomら J.Clin.Invest.(2002)109,59-68、Zhangら J.Immunol.(2001)166,6-10、及びCheemaら Arthritis Rheum.(2001)44,1313-1319)、さらにはR A患者の滑液中B A F Fレベルは血清中に比べて高いこと (Cheemaら Arthritis Rheum.(2001)44,1313-1319) や、S S患者の唾液腺浸潤白血球におけるB A F Fの発現 (Groomら J.Clin.Invest.(2002)109,59-68)、S L E患者における血清B A F Fレベルとイムノグロブリンや抗ds DNA抗体との相関性 (Zhangら J.Immunol.(2001)166,6-10)、R A患者におけるB A F Fとリウマトイド因子との相関性 (Cheemaら Arthritis Rheum.(2001)44,1313-1319) 等、数多くの報告がある。

10

20

30

40

#### 【0006】

これらの事実から、S L E、R A、S S等の自己免疫疾患の患者はもとより、その発症前においても、血清中あるいは組織中 (例えば、R A患者の滑液など) のB A F Fを測定することは、病態の進展の把握、即ち診断に役立つということが出来る。また、B A F Fの機能を阻害することにより、S L E、R A、S S等の自己免疫疾患の予防・治療も可能となる。

#### 【0007】

B A F Fのような蛋白質の測定には、その蛋白質を認識できる抗体を用いる方法が一般的である。実際、B A F Fに対する抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体併せていくつかの市販品 (例えば、R&D Systems社の抗ヒトモノクローナル抗体(Catalog Number:MAB124)や、Santa Cruz Biotech社のヤギ抗ヒトB A F Fポリクローナル抗体(Catalog Number:SC-5743)、ALEXIS社のマウス抗ヒトB A F Fモノクローナル抗体(Catalog Number:ALX-804-128-C100)など) が存在するが、これらの抗体は、B A F Fの全長又はC末端側のアミノ酸配列を抗原として作製されたものであり、ウェスタンブロット法においてヒトリコンビナントB A F Fに対する高い特異性を示さず、また、E L I S Aにおける検出限界の面においても充分とはいえず、高感度の診断に耐えうるほど満足できるものは知られていない。

#### 【0008】

また、S L E、R A、S S等の自己免疫疾患の予防・治療としてB A F Fの機能を阻害する方法としては、B A F F遺伝子発現抑制等のB A F F産生を抑制又は阻害する方法、B A F F受容体拮抗薬等によるB A F F受容体を阻害する方法、及び、抗B A F F抗体等によるB A F Fの機能自体を阻害する方法等が考えられる。例えば、Human Genome Sciences社による抗ヒトB A F F(B L y S<sup>T M</sup>)モノクローナル抗体 (開発名: LymphoStat-B<sup>T M</sup>) の、S L E、R A患者に対する臨床試験が、米国で第2相の臨床試験まで進められていることが知られているが、その治療薬としての可能性は必ずしも充分とはいえず、予防薬あるいは治療薬としてさらに有効な作用効果を有する抗体の開発が求められている。

#### 【発明の開示】

#### 【0009】

本発明の目的は、自己免疫疾患の診断に使用しうるより高感度の抗ヒトB A F F抗体を提供することにある。また、そのような抗ヒトB A F F抗体を用いることにより、多くの自己免疫疾患をより効率的に予防・治療することが可能となり、本発明はこのような医薬組成物、それを用いた予防・治療方法を提供する。さらに、そのような抗ヒトB A F F抗体を用いることにより、ヒトB A F Fの阻害薬又は活性化薬のスクリーニング方法をも提供できることになる。

50

## 【0010】

そこで本発明者らは鋭意検討した結果、ヒトBAFFのアミノ酸配列中、細胞外ドメインの膜近傍に相当する13アミノ酸(配列番号1)をハプテンとして、KLH(Keyhole limpet hemocyanin)を結合させたものを抗原として作製した新規なモノクローナル抗体(以下4H4と表記する)が、ヒトBAFFを検出するELISAにおいてこれを検出抗体として用いる場合には、0.5ng/mLの検出限界が得られるという驚くべき高感度での検出が可能となることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、ヒトBAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)タンパク質の134~146番目の、AVQGPEETVT QDC(アミノ酸1文字表記によるアミノ酸配列)からなるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体、好ましくは当該モノクローナル抗体に関する。

また、本発明は、前記本発明の抗体の製造方法を提供するものであり、本発明は、少なくともAVQGPEETVT QDC(アミノ酸1文字表記によるアミノ酸配列)からなるアミノ酸配列を有するペプチドを含有する抗原を用いて、動物、好ましくはヒト以外の動物を感作し、当該動物の免疫産生細胞から前記ペプチドに対する抗体を製造する方法に関する。

## 【0011】

本発明は、前記した本発明の抗体の各種の用途又は使用を提供するものである。

即ち、本発明は、前記本発明の抗体、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物、好ましくは自己免疫疾患を予防・治療するための医薬組成物に関する。また、本発明は、自己免疫疾患の患者又は自己免疫疾患の可能性が有る患者に、前記本発明の抗体の有効量を投与することからなる自己免疫疾患の予防又は治療方法に関する。さらに本発明は、自己免疫疾患の予防・治療用の医薬組成物、又は自己免疫疾患の診断用の組成物を製造するための前記本発明の抗体の使用に関する。

## 【0012】

また、本発明は、前記本発明の抗体を含有してなる自己免疫疾患の診断剤、及びそれを用いた診断方法に関する。

## 【0013】

さらに、本発明は、検体中に前記本発明の抗体を添加して、当該抗体と結合したBAFFを測定することからなる検体中のBAFFを検出又は定量する方法に関する。

## 【0014】

また、本発明は、BAFFを含有する試料中に試験物質を添加し、試験物質の添加によるBAFFの量の変化を前記本発明の抗体を用いて測定することからなる、試験物質が有するBAFFの阻害作用又は活性化作用をスクリーニングする方法に関する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0015】

【図1】 図1は、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体(4H4)及び対照としてChemicon製ウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(Chem)を用い、常法のウエスタンブロッティング法にてリコンビナントのヒトBAFF(Chemicon製)を検出した図である。

【図2】 図2は、4H4を用いて確立したELISAによる、リコンビナントのヒトBAFF(Chemicon製)を用いて作成した標準曲線である。

【図3】 図3は、健常人由来又はSLE患者由来のPBLに対し抗CD3抗体刺激により誘導されたIgGの産生に対する4H4の効果を示す図である。

【図4】 図4は、健常人由来又はSLE患者由来のPBLに対し抗CD3抗体刺激により誘導されたIFN $\gamma$ の産生に対する4H4の効果を示す図である。

【図5】 図5は、健常人由来又はSLE患者由来のPBLに対し抗CD3抗体刺激により誘導されたTNF $\alpha$ の産生に対する4H4の効果を示す図である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0016】

本発明の抗体は、285個のアミノ酸からなるヒトBAFFのアミノ酸配列中における

細胞外ドメインの膜近傍に相当する134～146番目の次に示す、

AVQGPEETVT QDC

のアミノ酸配列（配列番号1参照）からなるペプチドを含有する抗原を用いて製造されたものであることを特徴とするものである。

通常の抗体は、タンパク質のN末端側やC末端側のアミノ酸配列を抗原として使用して製造される。タンパク質の中央部付近のアミノ酸配列は、立体的にタンパク質の内部に来る場合があり、抗原として不適切である場合が多々あるからである。タンパク質のN末端側やC末端側は、多くの場合立体的に露出した構造となり、このようにして製造された抗体が十分な感度を有することが多いこともよく知られていることである。このようなことから、抗ヒトBAFF抗体も従来はN末端側やC末端側のアミノ酸配列に基づいて製造されてきた。しかし、本発明者らは、このようにして製造された抗ヒトBAFF抗体が必ずしも十分な感度を有するものではないことを見出した。その理由の詳細については明確ではないが、ヒトBAFFのN末端側又はC末端側が、通常のタンパク質とは異なり十分に露出した構造になっていないことが予想される。即ちヒトBAFFの特異的な3次元構造のためと考えられるが、その詳細は明らかでない。今後、ヒトBAFFの3次元構造が解明されることにより明確になると予想される。

10

【0017】

本発明の抗体は、ヒトBAFFのほぼ中央部のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として使用することを特徴とするものであり、このような中央部のアミノ酸配列が抗原として適切であることは驚くべきことであり、ヒトBAFFタンパク質の特異的な3次元構造によるものと予測される。

20

【0018】

本発明の抗体は、前記ペプチドを抗原として使用することを特徴とするものであり、抗体としては、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、特異性の観点からはモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0019】

本発明の抗体は、抗体製造方法の常法にしたがって抗原を非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得る組換えキメラモノクローナル抗体及び組換えヒト型モノクローナル抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体を包含する。またモノクローナル抗体の場合には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgG又はIgMが挙げられる。

30

【0020】

より具体的には、例えば、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法に従って、本発明の特徴であるヒトBAFFのアミノ酸配列中における細胞外ドメインの膜近傍に相当する13アミノ酸（配列番号1）をハプテンとして、KLHを結合させたものを抗原として、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）と共に、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモット又はウサギに免疫することにより得られる当該抗体産生細胞（脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓のB細胞）と抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを免疫学的測定法（ELISAなど）により選択することによって製造される。

40

【0021】

さらに具体的には、次のようにして本発明のモノクローナル抗体を製造することができる。即ち、本発明の、ヒトBAFFのアミノ酸配列中における細胞外ドメインの膜近傍に相当する13アミノ酸（配列番号1）をハプテンとして、KLH（Keyhole limpet hemocy

50

anin)を結合させたものを抗原として、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) と共に、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ニワトリあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター (ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む) の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞を取得し、上述の方法に従ってモノクローナル抗体を産生するクローンを得ることができる。

#### 【0022】

好ましくは、次のようにして本発明のモノクローナル抗体を製造することができる。即ち、100  $\mu$ Lの1mg/mL上記抗原ペプチド生理食塩水溶液を、フロイント完全アジュバントを超音波処理によってエマルジョン化し、マウス (Balb/c, 6週齢) 腹腔内に免疫する。初回免疫2週間後に100  $\mu$ Lの1mg/mL抗原ペプチド生理食塩水溶液、フロイント完全アジュバントを超音波処理によってエマルジョン化したものを追加免疫し、以降2週間毎に追加免疫を2回行い、その後は上述の方法に従ってモノクローナル抗体を産生するクローンを得ることができる。

#### 【0023】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法 (Nature (1975)256, 495-497) 及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラット又はヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

#### 【0024】

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8.653(653; ATCC No. CRL1580)、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)、SP2/O-Ag14(Sp2/0, Sp2)、PAI、FOあるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、DIR11あるいはCEM-T15を使用することができる。

#### 【0025】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウエルの培養上清の前述のマウス免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、又はマウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等、好ましくはマウス又はラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、又は哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特異性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

#### 【0026】

基本培地としては、例えばHam's F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム

10

20

30

40

50

培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／又は種々の無機あるいは有機物質等を含むことができる。モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAE又はDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。また、当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、トランスジェニック動物作製技術を用いて当該抗体コーディング遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウサギ、ヤギ、ヒツジ又はブタを作製し、当該トランスジェニック動物のミルク中から当該抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（日経サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。 10

#### 【0027】

以上のごとく得られる本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体は、後記実施例に示すように0.5 ng/mLの検出限界が得られるという驚くべき特徴を有するので、感度の良い自己免疫疾患の診断方法はもとより、自己免疫疾患の予防・治療方法、さらにはヒトBAFFの阻害薬又は活性化薬のスクリーニング方法を実現することができる。なお実施において本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体は、抗体、その抗体の断片及びそれらの誘導体として利用することができる。また、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体は、細胞又は血液由来のBAFFの精製に利用することもできる。さらに本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体を利用し精製されたヒトBAFF蛋白質及びその誘導体は、B細胞の活性化薬などの試薬あるいは医薬品としても利用されうる。またさらに、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体、その抗体の断片及びそれらの誘導体を利用し、免疫染色など当該分野で公知な技術によりBAFF蛋白質の画像化を行うことができる。 20

#### 【0028】

本発明の医薬組成物における製薬上許容される担体としては、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。本発明の医薬組成物は、非経口的に投与することができる。非経口投与のための形態としては、本発明の抗体を含有し、常法により処方される注射剤、腸溶内投与のための坐剤及びペッサリーの他、点眼剤、点鼻剤などが含まれる。 30

#### 【0029】

本発明の医薬組成物の有効成分の投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき1 µgから1000 mg、好ましくは10 µgから500 mgの範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。例えば、注射剤の場合には、生理食塩水あるいは注射用蒸留水等の非毒性の製薬上許容される担体中に0.1 µg抗体/mL担体～10 mg抗体/mL担体の濃度となるように溶解又は懸濁することにより製造することができる。 40

#### 【0030】

このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において1 kg体重あたり、1 µg～100 mgの割合で、好ましくは50 µg～50 mgの割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製すること 50

もできる。そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合又は照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水又は他の溶媒に溶解して使用することができる。

【0031】

本発明の医薬組成物は、自己免疫疾患、例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SSS)、自己免疫性糖尿病、AIDS、又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防及び/又は治療に有用である。

【0032】

また、本発明の診断剤は、本発明の抗体を含有するものであり、検体中のBAFFタンパク質に特異的にかつ高感度で結合し、形成された複合体を測定可能にする各種の試薬を含有するものである。本発明の診断用の組成物は、前記した本発明の診断剤又は当該診断剤及び診断用の担体からなるものである。また、本発明の抗体自体を測定可能にするために標識化することもできる。このような標識化としては、放射性元素や蛍光物質などによる通常の方法を採用することができる。

【0033】

本発明における自己免疫疾患の診断方法としては、例えば、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体を用いて後記する実施例に記載のごとくELISA系を構築し、このELISA系にて自己免疫疾患の患者等の被験者から採取された血清中あるいは組織中のBAFF濃度を測定することにより、自己免疫疾患の進行度合いを調べることができる。さらにまた、治療の効果をj知るためのモニタリングや予後の予測にも利用できる。

【0034】

本発明のBAFFを検出又は定量する方法としては、検体中に本発明の抗体を添加して、当該抗体と結合したBAFFを測定することにより行うことができる。本発明の抗体と結合したBAFFを測定する方法としては、公知の各種の抗原-抗体反応による検出又は定量化の手法を使用することができ、例えば、ELISA法などを使用することができる。

本発明の診断方法や検出又は定量化方法におけるBAFFとしては、ヒトBAFFが好ましい。

本発明における自己免疫疾患の予防・治療方法の場合、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体を薬学的に許容される担体と共に、自己免疫疾患の予防・治療が必要な患者に投与することにより、その予防・治療が実現できる。

【0035】

本発明におけるヒトBAFFの阻害薬又は活性化薬のスクリーニング方法の場合、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体を用いて後記実施例に記載のごとくELISA系を構築し、このELISA系にてBAFF受容体を発現している細胞もしくはBAFF受容体蛋白質又はその断片及びそれらの誘導体と被験物質のBAFF結合活性を測定することにより実現することができる。また、ヒトBAFFを産生する細胞に被験物質を接触させ、細胞より産生されるBAFFの測定をELISA等、当該分野において公知慣用である免疫学的技術にて行うことにより、ヒトBAFFの産生阻害薬又は促進薬のスクリーニングを行うことができる。

【0036】

本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体は、後記実施例に示すように0.5ng/mLの検出限界が得られるという驚くべき特徴を有するので、極めて実用性に優れたものである。また、膜タンパク質の中央付近のアミノ酸配列からなるペプチドから得られる抗体が、特異性及び親和性において極めて優れた抗体となるということも、BAFF特有の予想外のことである。

【0037】

本発明の抗体は、抗原とされる部位が特徴的であるだけでなく、特異性及び親和性(感

10

20

30

40

50

度)において極めて優れており、実用的な自己免疫疾患の診断方法はもとより、自己免疫疾患の予防・治療方法、さらにはヒトBAFFの阻害薬又は活性化薬のスクリーニング方法を実現することができる。

また、本発明の抗体を用いることにより、自己免疫疾患に対する優れた医薬組成物、及び診断剤を提供することができる。

【0038】

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例1】

10

【0039】

抗ヒトBAFF抗体の作製

配列表の配列番号2に示したBAFFの285個のアミノ酸から細胞外ドメインの膜近傍に該当する13アミノ酸を選択し、MBS法を用いてKLHとコンジュゲートし、抗原とした。100 $\mu$ Lの1mg/mL抗原ペプチド生理食塩水溶液、フロイント完全アジュバントを超音波処理によってエマルジョン化し、マウス(Balb/c, 6週齢)腹腔内に免疫した。2週間後に100 $\mu$ Lの1mg/mL抗原ペプチド生理食塩水溶液、フロイント完全アジュバントを超音波処理によってエマルジョン化したものを追加免疫し、以降2週間毎に追加免疫を2回行った。初回免疫後2ヶ月目に脾臓を摘出し、RPMI 1640培地(ペニシリン, ストレプトマイシン入り)中でリンパ球を分離した。分離したリン

20

パ球をポリエチレングリコール(PEG)法によりマウス骨髄腫由来のミエローマ細胞P3U1株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。ハイブリドーマ細胞をフィーダー細胞入りのHAT培地に懸濁し96穴プレート(Greiner)に分注し15日間培養した。ハイブリドーマ細胞を培養したウェルから培養上清を回収し、ELISA法(enzyme-linked immunosorbent assay)によって抗原ペプチドと反応がある抗体産生細胞を選択した。

30

。即ち、まず96穴プレートに50 $\mu$ Lの10 $\mu$ g/mL抗原ペプチドをしき、4 $^{\circ}$ C、一晚底面に吸着させた後、100 $\mu$ Lの2%BSA/PBSで37 $^{\circ}$ C、2時間ブロッキングさせた。ハイブリドーマ細胞の上清100 $\mu$ Lを4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた後、HRP標識抗マウスIgGを1000倍希釈して37 $^{\circ}$ C、1時間反応させ、オルトフェニレンジアミンを基質に用いて発色させた。50 $\mu$ Lの2N硫酸で反応を停止させた後、492nmの吸光度を測定して1.0以上の値が得られたハイブリドーマを選択し、限界希釈法によるクローニングを行った。

【0040】

7日前、3日前にそれぞれ0.5mLのプリスタンを腹腔内投与したマウス(Balb/c)に、選択したハイブリドーマ細胞を腹腔内注射し、約10日後に腹水を採取した。採取した腹水は室温で30分おいた後、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置し、15Krpm、10分間遠心して上清を回収し、マウスIgG画分をプロテインA-Sepharoseカラムにて分離精製した。

以上の方法にて、抗ヒトBAFF抗体(4H4、アイソタイプはIgG1)を産生するハイブリドーマ細胞株、並びに該抗体(4H4)を得た。得られた4H4、及び対照としてChemicon製ウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(AB16530: 図中、Chemと表記)を、常法のウエスタンブロッティング法にてリコンビナントのヒトBAFF(Chemicon製)の検出に用いた結果、図1に示すように可溶性ヒトBAFFに該当する17kDaのバンドが確認された。

40

【実施例2】

【0041】

ELISAの確立

1次抗体としてウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(AB16530、Chemicon製)を用い、96穴プレートに1 $\mu$ g/wellで4 $^{\circ}$ C一晚コーティングした。0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄後Block Ace(大日本製薬製)を150 $\mu$

50

L/well加え、37℃、2時間反応させた。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後検体50 $\mu$ L及びビオチン標識した4H4を50 $\mu$ L(8ng/mL)加え、室温にて2時間反応させた。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、0.05% Tween 20を含むPBSで1000倍に希釈したストレプトアビジン標識HRP (Horse radish peroxidase) を50 $\mu$ L添加し、室温にて30分反応させた。0.05% Tween 20を含むPBSで5回洗浄後TMB One Solution(Clonetech製)を50 $\mu$ L加え、5分間室温にて反応させた後、1N HCl 50 $\mu$ Lを添加後プレートリーダー(PerkinElmer製)で450nmの吸光度を測定した。標準物質としてリコンビナントのヒトBAFF (Chemicon製)を用い、標準曲線を作成した。

#### 【0042】

10

その結果図2に示すように、BAFF濃度が25ng/mLから0.2ng/mLまで、良好な直線関係を示すELISA系の確立が確認された。特に2ng/mLから0.5ng/mLの範囲は、従来の抗ヒトBAFF抗体では検出できない濃度であるため、この濃度まで信頼性良く検出できるということは、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体を用いた自己免疫性疾患の診断、あるいはBAFFの阻害薬又は活性化薬のスクリーニングに極めて有用であることを表す。

#### 【実施例3】

#### 【0043】

ヒトPBLに対する作用

健常人又はSLEと診断された患者より血液を採取し、Ficollを用いた比重遠心法によりリンパ球層を分離採取し、ヒト末梢血リンパ球 (Peripheral Blood Lymphocytes : PBL) とした。PBLを10% FBS (Fetal bovine serum)を含むRPMI 1640培地に懸濁し、PBSにより10 $\mu$ g/mLに希釈した抗CD3抗体を24ウェル培養プレートにしき、4℃一晩で底面吸着させた後、5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/wellとなるようにPBLを播種した。これと同時に4H4を最終濃度が10 $\mu$ g/mLとなるように添加し、4日間あるいは7日間37℃、7%CO<sub>2</sub>にてCO<sub>2</sub>インキュベータを用いて培養した。培養上清を回収し、培養上清中のIgG、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ をそれぞれに特異的に反応するモノクローナル抗体 (IgG : 1次抗体 : BDPharmingen製 Cat. No. 555784、2次抗体 (ビオチン標識) BDPharmingen製 Cat. No.555785、IFN $\gamma$  : 1次抗体 : BDPharmingen製 Cat. No. 554698、2次抗体 (ビオチン標識) BDPharmingen製 Cat. No.554550、TNF $\alpha$  : 1次抗体 : BDPharmingen製 Cat. No. 551220、2次抗体 (ビオチン標識) BDPharmingen製 Cat. No.554511) を用いたサンドイッチELISA法にて測定した。

20

30

#### 【0044】

結果を図3~5に示す。健常人由来及びSLE患者由来のPBL共に、抗CD3抗体刺激により誘導されたIgG (図3)、IFN $\gamma$  (図4)及びTNF $\alpha$  (図5)の産生 (全て、図中の左 (オープン) カラム) が、4H4の添加 (全て、図中の右 (ソリッド) カラム) により抑制された。特に患者PBLにおいては抗CD3抗体によるIgG、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ の産生誘導が健常人と比較して増強しており、4H4によるこれらの産生抑制率も高いことが明らかとなった。特に本抗体のTNF $\alpha$ 産生に関しては有意に抑制することが明らかとなった (t検定)。これらの産生促進は病態形成に深く関与していると考えられ、その産生を抑制することはSLEなどの自己免疫疾患の治療への新しい試みとなると考えられる。従って、本発明の抗ヒトBAFFモノクローナル抗体が、自己免疫疾患の治療薬開発にむけて極めて有用であることが示唆された。

40

#### 【産業上の利用可能性】

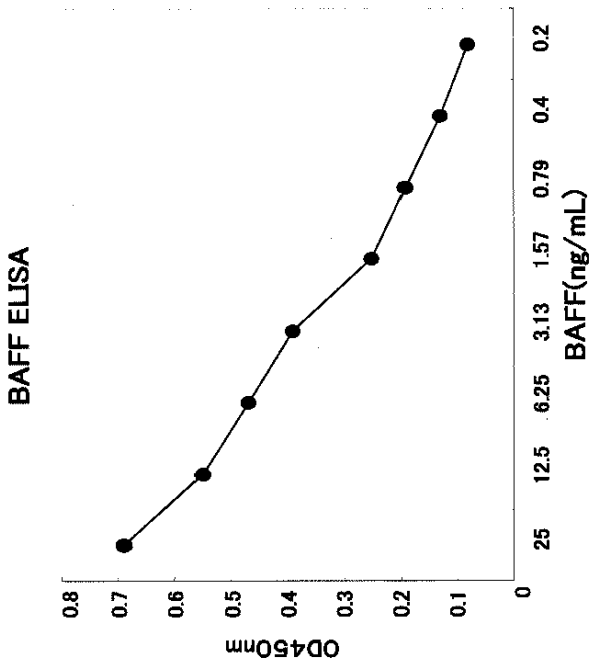
#### 【0045】

本発明は、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患との関係が明らかにされてきているBAFF、特にヒトBAFFに対する極めて特異的かつ高感度の抗体を提供するものであり、自己免疫疾患の治療、予防、診断に有用なだけでなく、自己免疫疾患の治療や予防に有効な新しい物質をスクリーニングす

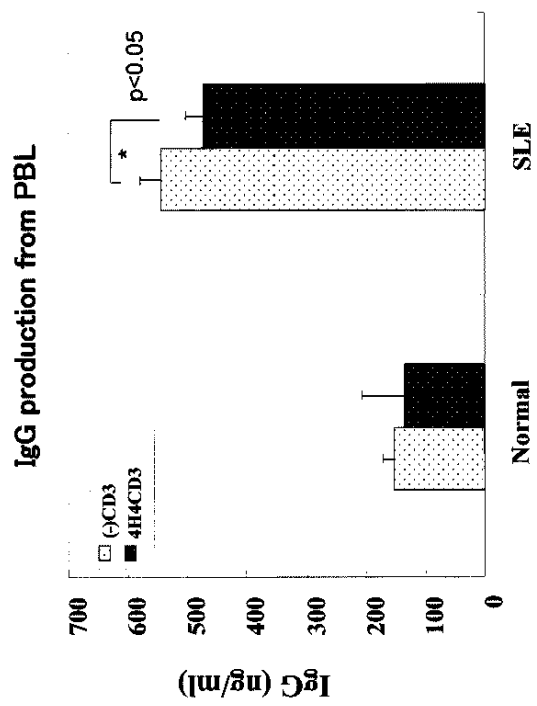
50

るための手法を提供するものであり、産業上の利用可能性がある。

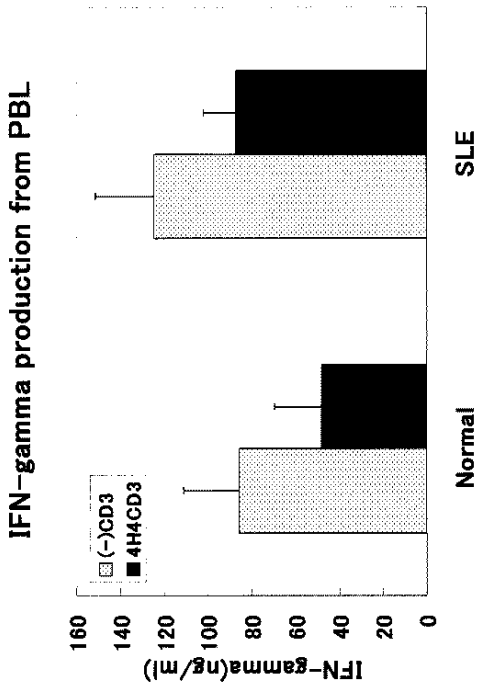
【図 2】



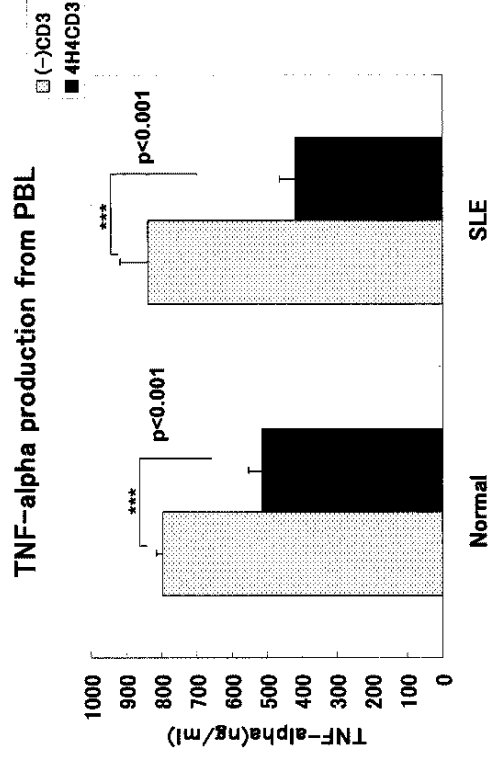
【図 3】



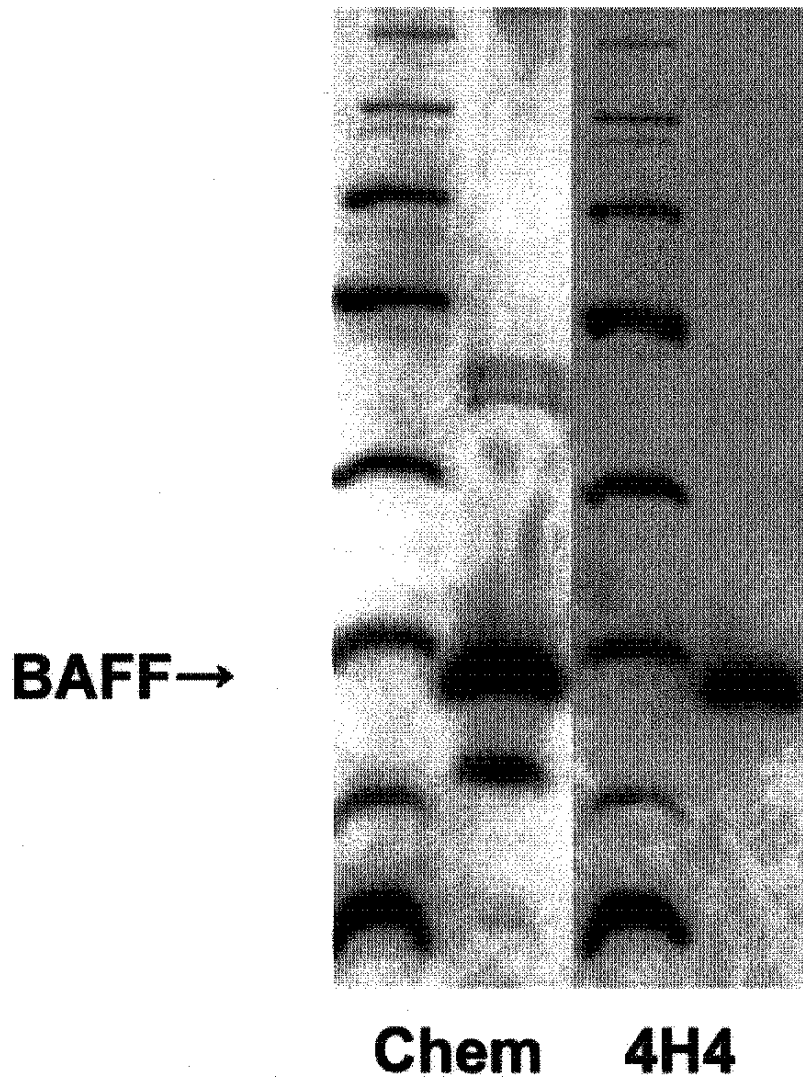
【 4 】



【 5 】



【図 1】



## 【配列表】

2006025345000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成20年3月5日(2008.3.5)

## 【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】

ヒトBAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)タンパク質の134～146番目の、AVQGPEETVT QDC (アミノ酸1文字表記によるアミノ酸配列) からなるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体。

【請求項2】

抗体が、モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

少なくともAVQGPEETVT QDC (アミノ酸1文字表記によるアミノ酸配列)

からなるアミノ酸配列を有するペプチドを含有する抗原を用いて、動物を感作し、当該動物の抗体産生細胞から前記ペプチドに対する抗体を製造する方法。

【請求項 4】

ペプチドが、AVQGPEETVT QDC（アミノ酸 1 文字表記によるアミノ酸配列）からなるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

抗原がハプテンをさらに現有するものである請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

動物が、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ニワトリ又はウサギである請求項 3～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載の抗体、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

【請求項 8】

医薬組成物が、自己免疫疾患を予防・治療するためのものである請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

自己免疫疾患が、SLE、RA、SS、自己免疫性糖尿病、AIDS、又は B 細胞の活性化を伴う自己免疫疾患である請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 1 又は 2 に記載の抗体を含有してなる自己免疫疾患の診断剤。

【請求項 11】

自己免疫疾患が、SLE、RA、SS、自己免疫性糖尿病、AIDS、又は B 細胞の活性化を伴う自己免疫疾患である請求項 10 に記載の診断剤。

【請求項 12】

診断が、ELISA によるものである請求項 10 又は 11 に記載の診断剤。

【請求項 13】

検体中に請求項 1 又は 2 に記載の抗体を添加して、当該抗体と結合したBAFFを測定することからなる検体中のBAFFを検出又は定量する方法。

【請求項 14】

BAFFが、ヒトBAFFである請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

抗体と結合したBAFFを測定する方法が、ELISAによるものである請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 16】

BAFFを含有する試料中に試験物質を添加し、試験物質の添加によるBAFFの量の変化を請求項 1 又は 2 に記載の抗体を用いて測定することからなる、試験物質が有するBAFFの阻害作用又は活性化作用をスクリーニングする方法。

【請求項 17】

BAFFが、ヒトBAFFである請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

BAFFの阻害作用をスクリーニングする方法が、自己免疫疾患の予防・治療薬のスクリーニングである請求項 16 又は 17 に記載の方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015696

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <b>C07K16/24</b> (2006.01), <b>C12N15/02</b> (2006.01), <b>C12P21/08</b> (2006.01), <b>A61K39/395</b> (2006.01), <b>A61P37/00</b> (2006.01), <b>A61P3/10</b> (2006.01), <b>A61P29/00</b> (2006.01), <b>A61P19/02</b> (2006.01), <b>G01N33/53</b> (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) <b>C07K16/24</b> (2006.01), <b>C12N15/02</b> (2006.01), <b>C12P21/08</b> (2006.01), <b>A61K39/395</b> (2006.01), <b>A61P37/00</b> (2006.01), <b>A61P3/10</b> (2006.01), <b>A61P29/00</b> (2006.01), <b>A61P19/02</b> (2006.01), <b>G01N33/53</b> (2006.01), 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	JP 2004-509615 A (HUMAN GENOME SCI. INC.), 02 April, 2004 (02.04.04), & WO 2002/02641 A1 & AU 200168427 A & US 2003/059937 A1 & EP 1294769 A1 & KR 2003038557 A & US 2003/223996 A1 & CN 1492878 A	1-21
X	WO 2003/055979 A2 (HUMAN GENOME SCI. INC.), 10 July, 2003 (10.07.03), & AU 2002364954 A1 & EP 1456347 A2	1-21
<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 29 September, 2005 (29.09.05)		Date of mailing of the international search report 18 October, 2005 (18.10.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015696

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-535285 A (BIOGEN IDEC. MA. INC., US.), 22 October, 2002 (22.10.02), & WO 2000/43032 A2 & AU 200032142 A & NO 200103641 A & EP 1146892 A2 & CZ 200102696 A3 & BR 200007719 A & SK 200101044 A3 & US 2002/037852 A1 & KR 2001105331 A & HU 200105283 A2 & CN 1347326 A & US 2003/095967 A1 & AU 762839 B & EP 1146892 B1 & DE 60004635 E & NZ 513284 A & MX 2001007464 A1 & EP 1415659 A1 & ES 2204528 T3 & US 6869605 B2 & US 2005/100548 A1	1-21
X	WO 2003/016468 A2 (LILLY & CO., ELI), 27 February, 2003 (27.02.03), & EP 1432735 A2 & AU 2002322436 A1 & KR 2004030088 A & BR 20211630 A & MX 2004001344 A1 & NO 200400603 A & CN 1541224 A & US 2005/070694 A1 & JP 2005-517384 A	1-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/015696

**Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
(International Patent Classification (IPC))**G01N33/15** (2006.01)

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

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

**G01N33/15** (2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015696

**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.: 22-23  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in those claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus 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:

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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/015696
<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int.Cl. <sup>7</sup> C07K16/24 (2006.01), C12N15/02 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P37/00 (2006.01), A61P3/10 (2006.01), A61P29/00 (2006.01), A61P19/02 (2006.01), G01N33/53 (2006.01), G01N33/15 (2006.01)		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>7</sup> C07K16/24 (2006.01), C12N15/02 (2006.01), C12P21/08 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P37/00 (2006.01), A61P3/10 (2006.01), A61P29/00 (2006.01), A61P19/02 (2006.01), G01N33/53 (2006.01), G01N33/15 (2006.01)		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JOIS)		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
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	JP.2004-509615 A (HUMAN GENOME SCI INC) 2004.04.02, & WO 2002/02641 A1 & AU 200168427 A & US 2003/059937 A1 & EP 1294769 A1 & KR 2003038557 A & US 2003/223996 A1 & CN 1492878 A	1-21
X	WO 2003/055979 A2 (HUMAN GENOME SCI INC) 2003.07.10, & AU 2002364954 A1 & EP 1456347 A2	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
* 引用文献のカテゴリー 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29.09.2005	国際調査報告の発送日 18.10.2005	
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

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 1 5 6 9 6

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	JP 2002-535285 A (BIOGEN IDEC MA INC, US) 2002. 10. 22, & WO 2000/43032 A2 & AU 200032142 A & NO 200103641 A & EP 1146892 A2 & CZ 200102696 A3 & BR 200007719 A & SK 200101044 A3 & US 2002/037852 A1 & KR 2001105331 A & HU 200105283 A2 & CN 1347326 A & US 2003/095967 A1 & AU 762839 B & EP 1146892 B1 & DE 60004635 E & NZ 513284 A & MX 2001007464 A1 & EP 1415659 A1 & ES 2204528 T3 & US 6869605 B2 & US 2005/100548 A1	1-21
X	WO 2003/016468 A2 (LILLY & CO ELI) 2003. 02. 27, & EP 1432735 A2 & AU 2002322436 A1 & KR 2004030088 A & BR 200211630 A & MX 2004001344 A1 & NO 200400603 A & CN 1541224 A & US 2005/070694 A1 & JP 2005-517384 A	1-21

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/015696

## 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 22-23 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、上記請求の範囲は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすること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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続表(2)) (2004年1月)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	V
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 15/00	C

(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,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,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

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA25 CA11 CB01 DA36 DA44 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA44 CA02 GA05  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13  
 4C085 AA14 BB11 BB24 CC02 DD62 DD63 DD88 EE01  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA14 DA76 EA22 EA28 EA50  
 FA72 GA26

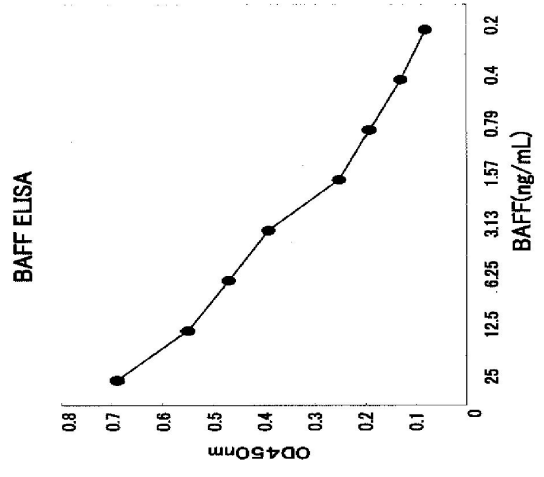
(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗人BAFF抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2006025345A1</a>	公开(公告)日	2008-05-08
申请号	JP2006532689	申请日	2005-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	兴和株式会社 竹内勉 吉本惠子		
申请(专利权)人(译)	兴和株式会社 竹内勉 吉本惠子		
[标]发明人	竹内勤 吉本桂子		
发明人	竹内 勤 吉本 桂子		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P37/02 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C07K14/47 C12P21/08 C12N15/02		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P3/10 A61P19/02 A61P29/00 C07K14/70575 C07K16/241 G01N33/564 G01N33/74 G01N2500/00 G01N33/68		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.N A61P37/02 G01N33/50.Z G01N33/53.P G01N33/53.V G01N33/15.Z C07K14/47 C12P21/08 C12N15/00.C		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/CA11 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA44 2G045/FB03 4B024 /AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/GA05 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB24 4C085 /CC02 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA14 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045 /FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	60/605516 2004-08-31 US		
其他公开文献	JP5570681B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明的人BAFF (属于TNF家族的B细胞活化因子) 蛋白134-146th是针对具有由AVQGPEETVT QDC (由一个氨基酸字母表示的氨基酸序列) 组成的氨基酸序列的肽的抗体, 优选单克隆抗体 关于抗体。此外, 本发明涉及本发明的抗体的制备方法, 含有该抗体的药物组合物, 该抗体的用途以及使用该抗体筛选BAFF抑制活性或活化活性的方法。。

【图 2】



【图】

IgG production from PBL