

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/003999

発行日 平成20年7月31日 (2008. 7. 31)

(43) 国際公開日 平成18年1月12日 (2006. 1. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2006-528814 (P2006-528814)	(71) 出願人	000173555
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/012094		財団法人化学及血清療法研究所
(22) 国際出願日	平成17年6月30日 (2005. 6. 30)		熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(31) 優先権主張番号	特願2004-198224 (P2004-198224)	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成16年7月5日 (2004. 7. 5)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100100158
			弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100087114
			弁理士 齋藤 みの里
		(74) 代理人	100126778
			弁理士 品川 永敏
		(72) 発明者	杉村 和久
			鹿児島県鹿児島市皇徳寺台5-20-5
最終頁に続く			

(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) 【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。

【特許請求の範囲】**【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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）CDR 1として配列番号 1～3のいずれか一つ、CDR 2として配列番号 4～6のいずれか一つ、およびCDR 3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）CDR 1～3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。

10

【請求項 9】

CDR 1～3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。

【請求項 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。

20

【請求項 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。

【請求項 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）CDR 1として配列番号 10～12のいずれか一つ、CDR 2として配列番号 13～15のいずれか一つ、およびCDR 3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）CDR 1～3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。

30

【請求項 13】

CDR 1～3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。

【請求項 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。

40

【請求項 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

50

メント。

【請求項 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。

【請求項 17】

当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、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。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【請求項 22】

請求項 20 に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 25】

請求項 20 に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【請求項 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。

【請求項 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体。

【請求項 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。

【請求項 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。

【発明の詳細な説明】

【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、「B7R

10

20

30

40

50

P-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。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

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。

【 0 0 0 8 】

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）。

【 0 0 0 9 】

【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】

【 0 0 1 0 】

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。

【 0 0 1 1 】

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。

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

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。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

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。

【 0 0 1 5 】

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。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 6 】

本発明者は、上記課題に対して検討した結果、健康人の末梢血B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。

【 0 0 1 7 】

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。

20

【 0 0 1 8 】

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。

30

【 0 0 1 9 】

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。

【 0 0 2 0 】

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;

40

(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

50

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) CDR 1 として配列番号 10 ~ 12 のいずれか一つ、CDR 2 として配列番号 13 ~ 15 のいずれか一つ、および CDR 3 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) CDR 1 ~ 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) CDR 1 ~ 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')₂、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

10

20

30

40

50

メントをコードする遺伝子。

【 0 0 3 9 】

2 1) 上記 2 0) に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【 0 0 4 0 】

2 2) 上記 2 0) に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【 0 0 4 1 】

2 3) 上記 2 0) 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。

【 0 0 4 2 】

2 4) 上記 1) から 1 7) 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 1 8) に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記 1 9) 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。

【 0 0 4 3 】

2 5) 上記 2 0) に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【 0 0 4 4 】

2 6) 上記 1) から 1 7) 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 1 8) に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記 1 9) 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。

【 0 0 4 5 】

2 7) 上記 1) から 1 7) 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 1 8) に記載の融合抗体またはそのフラグメント、または上記 1 9) 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。

【 0 0 4 6 】

2 8) 上記 2 7) 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。

【 0 0 4 7 】

2 9) 上記 2 6) または上記 2 8) 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 】

【 0 0 4 8 】

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 】

【 0 0 4 9 】

【 図 1 】 クローン化した単鎖 F v 抗体ファージのB7RP-1-Fcに対する結合特異性を評価した E L I S A の結果を示す図。

【 0 0 5 0 】

【 図 2 】 クローン化した単鎖 F v 抗体のB7RP-1-Fcに対する結合特異性を評価した E L I S A の結果を示す図。

【 0 0 5 1 】

【 図 3 】 単離した抗B7RP-1単鎖 F v 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。

【 0 0 5 2 】

【 図 4 】 単離された抗B7RP-1単鎖 F v 抗体によるICOS-Fc とB7RP-1-Fc間の結合阻害活性を評価した E L I S A の結果を示す図。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

【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B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scFvDNAを作製した。

【0057】

このscFvDNAをファージミドベクターpCANTAB5Eに組み込み、 10^6 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, S. P.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'):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

10

20

30

40

50

ストレプトアビジンを添加し、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 Fcγ 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 s c F v であれば s c F v 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ー解析を行い、末梢血 B 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')₂ 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 s c F v 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 s c F v (223、323、325) の V H 鎖および V L 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 V H 鎖のアミノ酸配列を配列番号 19 に示した。当該 V H 鎖の C D R 1 ~ 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 V H 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 C D R 1 (配列番号 1)、50 番目 ~ 66 番目のアミノ酸配列が C D R 2 (配列番号 4)、99 番目 ~ 109 番目のアミノ酸配列が C D R 3 (配列番号 7) に対応している。また、当該 V H 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 V L 鎖のアミノ酸配列を配列番号 22 に示した。当該 V L 鎖の C D R 1 ~ 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 V L 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 C D R 1 (配列番号 10)、51 番目 ~ 57 番目のアミノ酸配列が C D R 2 (配列番号 13)、90 番目 ~ 98 番目のアミノ酸配列が C D R 3 (配列番号 16) に対応している。また、当該 V L 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 V H 鎖のアミノ酸配列を配列番号 20 に示した。当該 V H 鎖の C D R 1 ~ 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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')₂、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【0085】

これらの低分子化合物またはその誘導体も、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体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

50

免疫異常性疾患の予防または治療薬として有効である。

【 0 0 8 7 】

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】

【 0 0 8 8 】

《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 V H (γ) - V κ、V H (γ) - V λ、V H (μ) - V κ、V H (μ) - V λ の各サブライブラリーはそれぞれ 1.1×10^8 、 2.1×10^8 、 8.4×10^7 、 5.3×10^7 クローンの多様性を有すると評価された。

【 0 0 8 9 】

《実施例 2：パンニング》

ヒト B7RP-1-Fc ($10 \mu\text{g}$) を 0.1M NaHCO₃ 溶液 1ml に溶解し、イムノチューブ (Nunc) に一晚、4℃ にてコートした。0.1% Tween20 を含む P B S で 1 回洗浄後、0.5% ゼラチン / P B S で、2 時間、室温にてブロックした。0.1% Tween / P B S 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 1 ml 加え、2 時間、室温で反応させた。

【 0 0 9 0 】

非特異的なファージを 0.1% Tween20 / P B S 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 / P B S 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℃ 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 × Y T A G に換えた後、30℃ にて一晚培養した。培養液を 2200rpm × 10 分で遠心後、沈殿した大腸菌を 3ml の 2 × Y T A G 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 T G 1 液を、2 × Y T A G 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。

【 0 0 9 1 】

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。

【 0 0 9 2 】

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 F v 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。

【 0 0 9 3 】

《実施例 3：スクリーニング B7RP-1 E L I S A》

分離した単鎖 F v 抗体ファージの E L I S A による結合特異性の確認は、以下の方法で行った。E L I S A プレート (Nunc) に B7RP-1-Fc (80ng/well) を 4℃ で一晚コートし、0.5% ゼラチン / P B S でブロッキングを行った。0.1% Tween20 / P B S で洗浄後、単離した単鎖 F v ファージクローン (1×10^{13} pfu/ml) 40 μl 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 標識したストレプトアビジン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 1 mg/ml PNP-リン酸の P B S 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 (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)。

【 0 0 9 4 】

《実施例 4 : クローンの配列分析》

単離したクローンの s c F v 遺伝子の V H および V L の D N A 塩基配列を Dye terminat or cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。 E L I S A および配列分析の結果、単離したクローンは 4 種の s c F v に分類された。

【 0 0 9 5 】

《実施例 5 : ヒト由来抗ヒト B7RP-1 s c F v 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 s c F v クローンからプラスミド D N A 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 100 μ g/mL のアンピシリンを含む 2 $\times$ Y T 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 $\times$ Y T 培地に一部移植し、終濃度 1 mM IPTG、100 μ g/mL のアンピシリンを加えて 4 時間培養して s c F v の発現誘導を行った。培養終了後菌体を遠心回収し、1 mM E D T A を含む P B S に懸濁して氷中に 3 0 分菌体を放置した。次いで 8,900 $\times$ g で 3 0 分間遠 心し、上清を 0.45 μ m フィルター濾過したものをペリプラズム画分とし、s c F v の精製 出発材料とした。

【 0 0 9 6 】

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。P B S で透析後、エンドトキシン除去カラム De toxi-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 μ m フィルター濾過して精製標品とした。保存は -20 で行った。

【 0 0 9 7 】

《実施例 6 : 精製 s c F v のヒト B7RP-1 との結合性》

精製した単鎖 F v 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。E L I S A 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 F v 抗体 (20 μ g/ml) と抗 E-tag 抗体を混合したものを 40 μ 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 γ 抗体を加え 6 0 分反応させた後、基質溶液を加え、 405nm で吸光度を、マルチプレートリーダー NJ-2001 にて測定した。その結果、最 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) 。

【 0 0 9 8 】

また、クローン 2 2 3 について、単鎖 F v 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 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')₂ 抗体 (各 10 μ g/mL) をそれぞれ流速 5 μ L/分 で固定化した。HBS 緩衝液 (100m M 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(a b')₂ 抗体にキャプチャーさせた。引き続き、各 s c F v サンプル (100nM に調整) を流速 1 0 μ 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 s c F v 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')₂ 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、 2 3 3 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')₂ 抗体に B 7-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-F c には結合性を示さなかったことから、2 3 3 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。B7RP-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) 。

【 0 0 9 9 】

《実施例 7 : 抗 B7RP-1 単鎖 F v 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 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F ν 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標識したストレプトアビジンを加え、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F ν 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F ν 抗体の末梢血B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F ν 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F ν 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)。

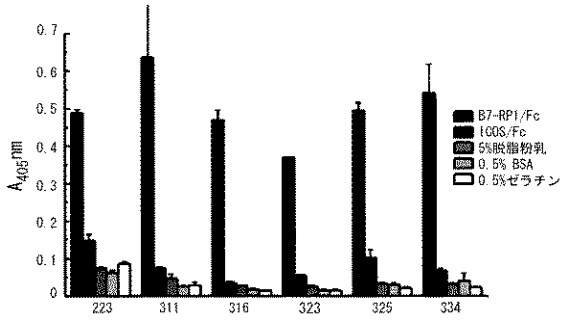
【0101】

《実施例9：ヒト抗B7RP-1単鎖F ν 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》

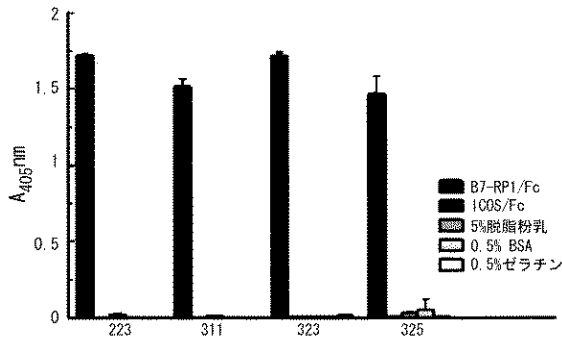
抗原提示細胞上のB7RP-1とT細胞上のICOS間の補助シグナルの伝達に対する、得られた単鎖F ν 抗体の阻害活性をT細胞増殖活性を指標に解析した。96穴の丸底プレートに、抗CD3抗体 (2 μ g/ml)と抗ヒトIgG FcフラグメントF(ab')₂抗体 (2.4 μ g/ml)の混合液を37

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 μ g/ml)を加えて37 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F ν 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 $\times 10^5$ 細胞/well)を加え、37 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 μ 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F ν 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F ν 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)。

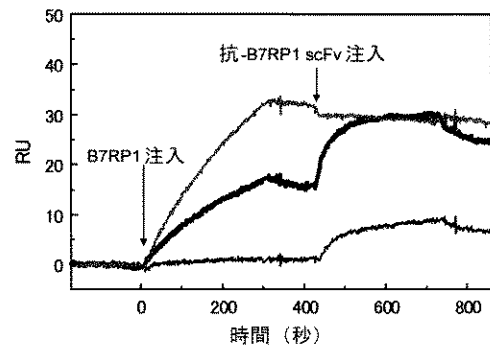
【図 1】



【図 2】

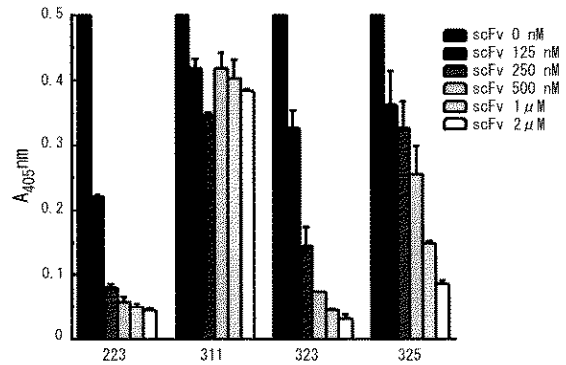


【図 3】

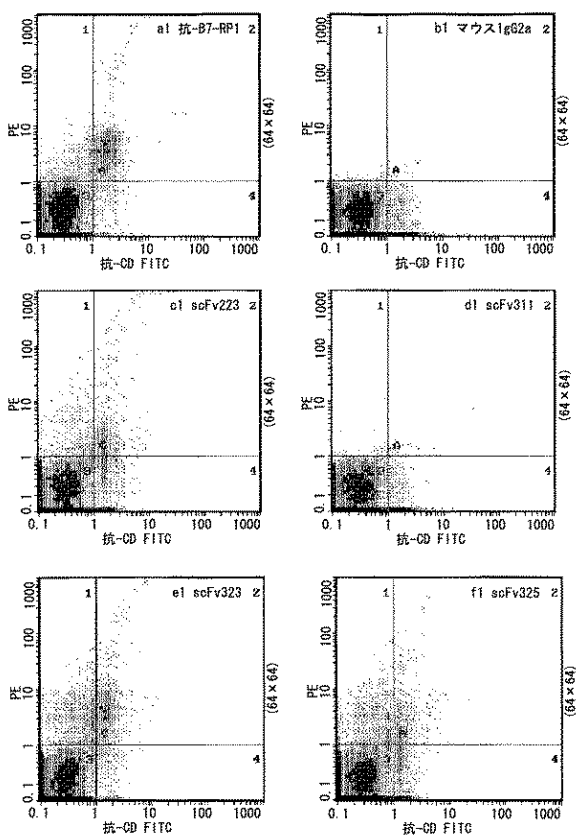


— 固定化抗ヒトFc Fab/B7RP1-Fc/抗-B7RP1 scFv223
 — 固定化B7RP1-Fc/B7RP1-Fc/抗-B7RP1 scFv223
 — 固定化ICOS-Fc/B7RP1-Fc/抗-B7RP1 scFv223

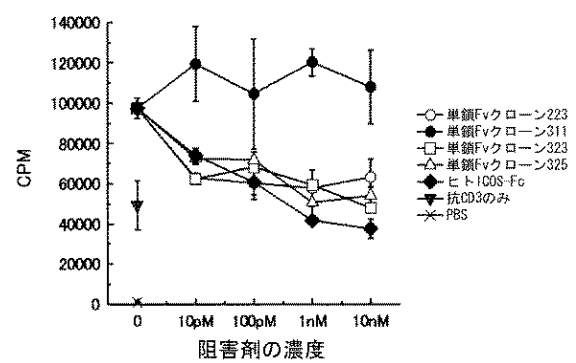
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

2006003999000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年5月2日(2006.5.2)

【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】

【書類名】請求の範囲

10

【請求項1】(削除)

【請求項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、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:

(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;

20

(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。

【請求項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2に記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体。

30

【請求項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。

【請求項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2から4のいずれかに記載のヒト抗ヒトB7RP-1抗体:

40

(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。

50

【請求項 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 2 から 5 のいずれかに記載のヒト抗ヒト B7RP-1 抗体。

【請求項 7】(削除)

【請求項 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、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：

(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；

10

(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。

【請求項 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。

【請求項 10】以下の(e)または(f)のアミノ酸配列を有する、請求項 8 または 9 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：

20

(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。

【請求項 11】(削除)

【請求項 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、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：

(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；

30

(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。

【請求項 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。

【請求項 14】以下の(g)または(h)のアミノ酸配列を有する、請求項 12 または 13 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：

40

(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。

【請求項 15】請求項 8 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 12 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。

【請求項 16】請求項 8 から 10 のいずれかに記載のヒト抗ヒト B7RP-1 抗体の H鎖

50

可変領域フラグメント、および/または請求項 12 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。

【請求項 17】当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、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。

【請求項 18】請求項 2 から 6、8 から 10、または 12 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。

【請求項 19】請求項 2 から 6、8 から 10、または 12 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。

10

【請求項 20】請求項 2 から 6、8 から 10、または 12 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。

【請求項 21】請求項 20 に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【請求項 22】請求項 20 に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

【請求項 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。

【請求項 24】請求項 2 から 6、8 から 10、または 12 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。

20

【請求項 25】請求項 20 に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

【請求項 26】請求項 2 から 6、8 から 10、または 12 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。

【請求項 27】請求項 2 から 6、8 から 10、または 12 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体。

30

【請求項 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。

【請求項 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。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/012094												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ 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 ⁷ 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 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2004/003544 A1 (MILLENNIUM PHARMATEUTICALS, INC.), 08 January, 2004 (08.01.04), & US 2004/001831 A1 & AU 2002322349 A1 & EP 1516179 A1</td> <td>1-26,29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>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</td> <td>1-26,29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>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</td> <td>1-26,29</td> </tr> </tbody> </table>			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
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												
☒ 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 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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/012094	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ 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. ⁷ 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)			
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 「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		の日の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 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	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/012094

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, ファ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

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 1 2 0 9 4

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を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。

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)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
			G 0 1 N	33/53	D	

(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,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,L
 T,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

(72)発明者 伊東 祐二

鹿児島県鹿児島市紫原 3 丁目 5 3 - 2 7 - 2 0 1

(72)発明者 中島 敏博

熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

(72)発明者 鳥飼 正治

熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA11 DA06
 EA03 EA04 FA02 FA10 GA11 GA19 HA03 HA08 HA14 HA17
 4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA93Y AA98X AB01 AC14 BA02 BA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA13 NA14 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZC022
 4C085 AA13 AA14
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA22
 EA50 FA72 FA74 GA26

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) 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 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 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)	人抗人B7RP-1抗体及其抗体片段		
公开(公告)号	JPWO2006003999A1	公开(公告)日	2008-07-31
申请号	JP2006528814	申请日	2005-06-30
申请(专利权)人(译)	财团法人化学及血清疗法研究所		
[标]发明人	杉村和久 伊東祐二 中島敏博 鳥飼正治		
发明人	杉村 和久 伊東 祐二 中島 敏博 鳥飼 正治		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K48/00 A61K39/395 A61P43/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P37/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61P29/00 C07K16/2827 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 A61K48/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P29/00 A61P37/06 A61P37/08 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZC022 4C085/AA13 4C085/AA14 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	2004198224 2004-07-05 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明旨在提供人抗人B7相关蛋白1 (以下称为B7RP-1) 抗体, 其抗体片段及其使用方法。通过使用噬菌体抗体方法, 获得对人B7RP-1及其抗体片段具有高亲和力的人抗人B7RP-1抗体。预期由此获得的抗体及其抗体片段可用作炎症和免疫异常的补救措施。

