

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年3月31日(31.03.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/037227 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/066683
- (22) 国際出願日: 2010年9月27日(27.09.2010)
- (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 2009-223472 2009年9月28日(28.09.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP). 医療法人 創和会(SOWAKAI MEDICAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒7100051 岡山県倉敷市幸町2-30 Okayama (JP). ベイカー アイディアイ ハート アンド ダイアベーツ インスティテュート ホールディングス リミテッド(BAKER IDI HEART AND DIABETES INSTITUTE HOLDINGS LIMITED) [AU/AU]; 3004 ヴィクトリア メルボルン コマーシャル ロード 75 Victoria (AU).

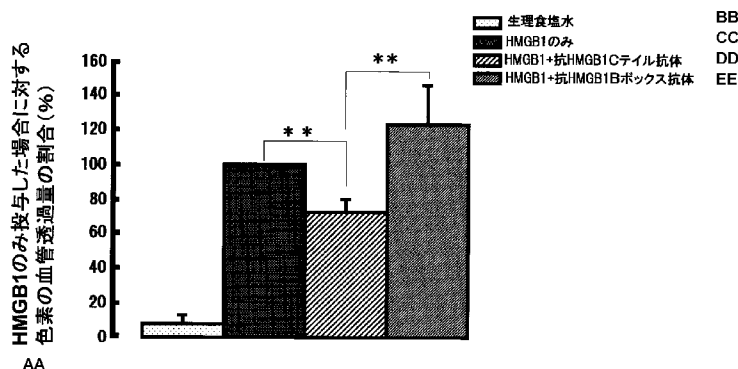
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 西堀 正洋(NISHIBORI, Masahiro) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 高橋 英夫(TAKAHASHI, Hideo) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 森 秀治(MORI, Shuji) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学医学部内 Okayama (JP). 劉 克約(LIU, Keyue) [CN/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 友野 靖子(TOMONO, Yasuko) [JP/JP]; 〒7010202 岡山県岡山市南区山田2-1-17 重井医学研究所内 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 植木 久一, 外(UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番16号 フジタ東洋紡ビル9階 Osaka (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,

[続葉有]

(54) Title: AGENT FOR PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS

(54) 発明の名称: アテローム動脈硬化抑制剤

[図1]



AA RATIO OF QUANTITY OF DYE PERMEATED THROUGH BLOOD VESSEL RELATIVE TO THAT ACHIEVED WHEN ONLY HMGB1 IS ADMINISTERED (%)
 BB PHYSIOLOGICAL SALINE
 CC HMGB1 ALONE
 DD HMGB1 + ANTI-HMGB1 C-TAIL ANTIBODY
 EE HMGB1 + ANTI-HMGB1 B-BOX ANTIBODY

(57) Abstract: Disclosed is a medicinal agent which is effective on the actual prevention of atherosclerosis and has fewer adverse side effects. Specifically disclosed is an agent for preventing atherosclerosis, which is characterized by comprising an anti-HMGB1 monoclonal antibody that can bind to the C-tail of HMGB1 as an active ingredient.

(57) 要約: 本発明は、実際のアテローム動脈硬化の抑制に有効であり、且つ副作用の少ない薬剤を提供することを目的とする。本発明に係るアテローム動脈硬化抑制剤は、HMGB1のCテイルに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする。



WO 2011/037227 A1



CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, 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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：アテローム動脈硬化抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、アテローム動脈硬化を抑制するための薬剤、アテローム動脈硬化の抑制方法、およびアテローム動脈硬化の抑制に用いる抗HMGB1モノクローナル抗体に関するものである。

背景技術

[0002] アテローム動脈硬化は、アテローム硬化プラークと呼ばれる沈着物が動脈血管内膜層で発達し、血流が減少したり遮断される疾患である。さらに、アテローム硬化プラークは、線維性被膜の消化やカルシウムイオンの蓄積などにより硬くなって破裂する場合がある。破裂したアテローム硬化プラークでは、血栓が高頻度で形成される。また、破裂したアテローム硬化プラークへは血液が流れ込み、プラーク自体が増大し得る。また、破裂したアテローム硬化プラークから脂肪性の内容物が血液中へ流入し、別の箇所でも血管を閉塞することもある。このようにアテローム動脈硬化は、進行すると血栓症や臓器虚血の原因となり、脳梗塞、心筋梗塞、腎不全などを引き起こす。

[0003] ある統計によれば、日本における死因は、上位から、がんなどの悪性新生物、心臓病、脳血管疾患となっている。しかし、心臓病と脳血管疾患は動脈硬化が原因であり得、動脈硬化の中でもアテローム動脈硬化の割合が最も高いことから、実はアテローム動脈硬化こそが死因の第一位であるともいわれている。よって、アテローム動脈硬化の改善は非常に重要である。

[0004] アテローム動脈硬化に対しては、一般的に、スタチンなどの抗高脂血症薬や、アンギオテンシン受容体遮断薬などの抗高血圧薬が用いられる。しかし、アテローム動脈硬化の発生や進行には様々な要因が複雑に関与していることから、これらと作用機序の異なるアテローム動脈硬化抑制剤が求められていた。

[0005] アテローム動脈硬化は、血液中の単球が活性化されて血管内皮細胞下に侵

入することから始まるといわれている。血管内膜層に侵入した単球はマクロファージへと変化し、さらにコレステロールなどの脂肪性物質を取り込んで泡沫細胞へと変化する。かかる泡沫細胞や平滑筋細胞が形質転換した上で遊走して蓄積し、アテローム硬化プラークが形成される。ここで、単球やマクロファージの活性化は、炎症反応で見られる現象である。よって、炎症反応を抑制する因子によりアテローム動脈硬化を治療することが検討されている。

[0006] 例えば特許文献1には、HMG（高移動度群タンパク質）の一部を構成するAボックスを含むポリペプチドや、或いはHMGの一部を構成するBボックスへ特異的に結合する抗体により起炎症性サイトカインの放出を阻害し、炎症性サイトカインカスケードを原因とする疾患を処置することが記載されている。かかる疾患の一つとして、アテローム動脈硬化が記載されている。

[0007] また、特許文献2には、HMGのボックスに結合する抗体によりアテローム動脈硬化などの血管疾患を治療することが記載されている。

[0008] 上記特許文献において、HMGとして利用されているのは、HMGB1（High Mobility Group Box 1）である。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特表2005-512507号公報

特許文献2：特表2004-523579号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 上述したように、HMGB1のボックスに結合する抗体によりアテローム動脈硬化を治療するというアイデアはあった。しかし、上記特許文献に開示されている実験結果はインビトロの基礎的なものであり、かかる抗体によりアテローム動脈硬化を実際に抑制できるかは不明である。

[0011] 具体的には、特許文献1に記載されているアテローム動脈硬化は、炎症性

サイトカインカスケードに関係するものとして例示されている多数の疾患のうちの一つに過ぎない。また、特許文献1で開示されている実験例では、HMGB1のBボックスに結合する抗体が腫瘍壊死因子(TNF)の放出を阻害するといった基礎的な知見が主に示されているのみであって、改善結果が実際に示されている疾患は敗血症のみである。

[0012] また、特許文献2で実験的に示されているのは、HMGB1に対する抗体が平滑筋細胞(RSMC)の移動や形態的变化を阻害することなどのみであり、かかる抗体が実際に血管疾患の治療に用い得ることを実証する試験は開示されていない。さらに、特許文献2に記載されているのはインビトロ試験のみであり、実験動物を用いたインビボ試験や臨床試験の結果は記載されていない。また、確かに平滑筋細胞の遊走はアテローム動脈硬化の部分的な現象ではあるが、平滑筋細胞の遊走を阻害したからといって単球の活性化やアテローム硬化プラークそのものを抑制できるとは限らない。

[0013] 以上の状況下、本発明が解決すべき課題は、実際のアテローム動脈硬化の抑制に有効であり、且つ副作用の少ない薬剤を提供することにある。また、本発明は、アテローム動脈硬化の抑制方法、およびアテローム動脈硬化の抑制に用いる抗HMGB1モノクローナル抗体を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を進めた。その結果、HMGB1のCテイルに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体が、実際のアテローム動脈硬化の抑制に極めて有効であることを見出して、本発明を完成した。

[0015] より詳しくは、従来、HMGB1に対するモノクローナル抗体としては、主にAボックスやBボックスに結合するものが検討されていた。これは、HMGB1のボックス部位が、平滑筋細胞や神経細胞など様々な細胞で発現しているマルチリガンド受容体であるRAGE(receptor for advanced glycation endproducts)に対する結合部位の一つであることによると考えられる。一方、本発明者らは、独自にHMGB1のCテイルに結合するモノクロー

ナル抗体につき研究を進め、HMGB 1のボックスに結合するモノクローナル抗体がHMGB 1による血管透過性の亢進を全く阻害しないのに対して、Cテイルに対するモノクローナル抗体が有意に亢進を阻害できることを見出した。よって、HMGB 1のCテイルに結合するモノクローナル抗体は血管内皮細胞下への単球の侵入の促進を含む、HMGB 1の作用を効率良く阻害でき得る。その上、アテローム動脈硬化を総合的に抑制できることを、モデル動物を用いて実験的に証明した。

[0016] 本発明に係るアテローム動脈硬化抑制剤は、HMGB 1のCテイルに結合する抗HMGB 1モノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする。

[0017] 本発明に係るアテローム動脈硬化の抑制方法は、HMGB 1のCテイルに結合する抗HMGB 1モノクローナル抗体を投与する工程を含むことを特徴とする。

[0018] 本発明に係る抗HMGB 1モノクローナル抗体は、アテローム動脈硬化を抑制するために用いられ、HMGB 1のCテイルに結合する。また、本発明は、アテローム動脈硬化を抑制するための薬剤を製造における、HMGB 1のCテイルに結合する抗HMGB 1の使用に関する。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]実験用ラットの背部皮内に、生理食塩水、HMGB 1のみ、HMGB 1 + 本発明に係る抗HMGB 1モノクローナル抗体、またはHMGB 1 + HMGB 1のBボックスに結合するモノクローナル抗体を投与した後における色素（エバンスブルー）の血管透過量の相対割合を示すグラフである。なお、図中の「**」は、t-テストで危険率 $p < 0.001$ で有意差がある場合を示す。

[図2]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するHMGB 1を免疫染色した写真である。(1)は一次抗体として抗HMGB 1抗体を用いた場合の写真であり、(2)は一次抗体として非特異的IgG抗体を用いた場合の写真である。

[図3]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面を、O i l

Red Oで染色した写真を示す。(1)は対照としてKeyhole Limpet Hemo cyanin抗体を投与したマウスの写真であり、(2)は本発明に係る抗HMGB 1抗体を投与したマウスの写真である(以下、図4~10において同様である)。

[図4]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するCD68を免疫染色した写真である。

[図5]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するVCAM-1を免疫染色した写真である。

[図6]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するMCP-1を免疫染色した写真である。

[図7]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するCD11cを免疫染色した写真である。

[図8]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するCD83を免疫染色した写真である。

[図9]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するCD4を免疫染色した写真である。

[図10]アテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面に存在するPCNAを免疫染色した写真である。

[図11]対照であるIgG抗体または本発明に係る抗HMGB1抗体を投与したアテローム動脈硬化モデルマウスの大動脈洞スライスの断面を、Oil Red Oで染色した場合、または抗原を免疫染色した場合における、染色部位の面積や割合、または染色された細胞数を示すグラフである。(1)はOil Red Oで染色した場合であり、(2)~(8)はそれぞれCD68、VCAM-1、MCP-1、CD11c、CD83、CD4、PCNAを免疫染色した場合の結果である。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明のアテローム動脈硬化抑制剤は、HMGB1のCテイルに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体を有効成分とする。

- [0021] 本発明に係る抗体は、投与後、血液内において単球の活性化を抑制し、その血管内膜層への侵入を顕著に抑制する。また、血管内壁におけるマクロファージの泡沫化や、単球の血管内皮細胞への接着を促進する因子の発現を抑制する。これら作用により、本発明に係る抗体は、実際にアテローム動脈硬化の病巣を減少させる。その上、モノクローナル抗体としての特性から、他の化合物などには作用せず、副作用が生じる可能性は無いが、極めて少ないと考えられる。
- [0022] 本発明に係る抗HMGB1モノクローナル抗体の調製は、常法に従えばよい。例えば、市販のHMGB1を用いてマウスやラット等を免疫し、その抗体産生細胞や脾細胞と骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを得る。このハイブリドーマをクローニングし、HMGB1のCテイルへ特異的に反応する抗体を産生しているクローンをスクリーニングする。このクローンを培養し、分泌されるモノクローナル抗体を精製すればよい。
- [0023] 本発明で使用する抗HMGB1モノクローナル抗体の種類は、特に制限されない。例えば、ヒト型抗体や完全ヒト抗体を用いることができる。好適には、投与対象である動物に由来する抗体を用いる。
- [0024] 本発明に係るアテローム動脈硬化抑制剤の剤形は特に問わないが、有効成分である抗HMGB1モノクローナル抗体がペプチドであることを考慮すれば、注射剤としての投与を志向して、溶液やエマルジョン製剤などの液状製剤とすることが好ましい。
- [0025] 液状製剤の溶媒としては、pHを調整した生理食塩水やグルコース水溶液など、血漿の等張液を用いることができる。また、抗体を塩類等と共に凍結乾燥した場合には、純水、蒸留水、滅菌水等も使用できる。その濃度も通常の抗体製剤のものとすればよく、一般的には0.1mg/mL以上、1mg/mL以下程度、点滴用では0.02mg/mL以上、0.2mg/mL以下程度とすることができる。但し、注射剤の浸透圧は、血漿と同等にする必要がある。
- [0026] 本発明における「抑制」には、アテローム動脈硬化の発生の抑制、即ち「

予防」と、発生したアテローム動脈硬化の軽減や進行の抑制、即ち「治療」の両方の概念が含まれる。従って、本発明のアテローム動脈硬化抑制剤は、アテローム動脈硬化の憎悪因子の上昇から実際にアテローム動脈硬化が発生する前に予防的に投与してもよいし、アテローム動脈硬化の発生後に治療的に投与してもよい。

[0027] 本発明に係るアテローム動脈硬化抑制剤の投与頻度や投与量は、患者の重症度、年齢、性別などに応じて適宜調整すればよい。後述する実施例で示す通り、体重約25gのモデルマウスに対して1回当たり400 μ gの抗HMGB1モノクローナル抗体を週当たり2回投与した場合に、顕著なアテローム動脈硬化の抑制効果が得られた。斯かる結果から考えると、ヒトに対する投与量は、1回当たり抗HMGB1モノクローナル抗体を0.1mg/kg以上、2mg/kg以下程度とし得、後述する実験結果より、より好適には0.2mg/kg以上、2mg/kg以下とし、1週間当たり2回から1日当たり3回程度投与することができる。

[0028] 投与形態も特に制限されず、適宜調整すればよいが、本発明に係る抗HMGB1モノクローナル抗体は、血液中の単球やアテローム硬化プラークに作用させる必要があることから、血中への注射投与、特に静脈注射投与が好ましい。上記抗体を障害部位へ速やかに送達できるからであり、また、本発明者らの実験によって、モデルマウスに上記抗体を静脈注射で投与することによりアテローム動脈硬化が顕著に改善されることが実証されている。

実施例

[0029] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適宜に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

[0030] 実施例1 HMGB1のCテイルに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体の調製

(a) ラットの免疫

市販のウシ胸腺由来HMGB 1とHMGB 2との混合物（和光純薬工業社製、コード番号：080-070741）1mg/mLを2mLガラス製注射筒にとり、別の2mLガラス製注射筒にとった等容量のフロイント完全アジュバンドと連結管を通じて徐々に混和することによって、エマルジョンとした。セボフルレンにより麻酔したラットの後肢足蹠に、得られたエマルジョンを0.1mLずつ、計0.2mL注射投与した。2週間後、頸静脈から試験採血し、抗体価の上昇を確認した。次いで、腫大した腸骨リンパ節を前記注射投与から5週間後に無菌的に取り出した。得られた2個のリンパ節から、約 6×10^7 個の細胞を回収することができた。

[0031] (b) 細胞融合とクローニング

上記腸骨リンパ節細胞とマウスミエローマSP2/O-Ag14 (SP2)細胞を、ポリエチレングリコールを用いて融合させ、得られた融合細胞を96穴マイクロプレートに蒔いた。1週間後、最初のELISAスクリーニングを行ない、陽性ウェルについて、ウェスタンブロットにより二次スクリーニングを行なった。陽性を示すウェル細胞を24穴マイクロプレートに移し、細胞をほぼコンフルエントな状態（約 2×10^5 ）に殖やしてから、0.5mLの凍結培地（GIT培地にウシ胎児血清を10%とジメチルスルホキシドを10%添加したもの）を用いて、液体窒素中で凍結保存した。この凍結保存細胞を解凍した後、96穴マイクロプレートでクローニングした。

[0032] (c) 抗体の精製

回転培養装置（Vivascience社製）により上記陽性細胞を2週間大量培養し、濃度2~3mg/mLの抗体液を得た。中性pH下、この抗体液をアフィニティゲル（インビトロジェン社製、MEP-HyperCell）と混和し、抗HMGB 1抗体をゲルへ特異的に結合させた。特異的にゲルに結合した抗体を、グリシン-塩酸バッファー（pH4）により溶出した。溶出液を限外濾過装置により濃縮した後、セファロースCL6Bゲル濾過カラム（直径2cm×長さ97cm）によって、得られた抗体を単離精製した。

[0033] 得られたモノクローナル抗体のうちの一つは、HMGB 1のCテイル中のアミノ酸配列である208EEEDDDDE215（Eはグルタミン酸を示し、Dはアスパラギン酸を示す）をエピトープとして特異的に認識する抗体であった。例えば、HMGB 1に類似するタンパク質としてHMGB 2があるが、HMGB 2には211以下のDDDDDEの配列が存在しないため、本発明に係るモノクローナル抗体はHMGB 2に結合せず、HMGB 1のみを特異的に認識して結合することができる。

[0034] 比較例1 HMGB 1のBボックスに結合する抗HMGB 1モノクローナル抗体の調製

上記実施例1と同様にして、HMGB 1のBボックス（配列：LKEKYEKDIA）をエピトープとして認識する抗HMGB 1モノクローナル抗体を単離精製した。

[0035] 試験例1 抗体の結合部位の決定

上記実施例1および比較例1のモノクローナル抗体のHMGB 1における結合部位を、改めて決定した。

[0036] 具体的には、HMGB 1のアミノ酸配列のうちN末端から1~15、6~20、11~25・・・といった15個のアミノ酸配列を有する41のペプチドを合成した。これらペプチドの1mg/mL溶液を、Ultra Bind Membrane（PALL Life Science社製）に、0.5μLずつ重ならないように滴下した。また、ポジティブコントロールとして、ウシ胸腺由来の精製HMG-1, 2の1mg/mL溶液も0.5μL滴下した。滴下後、当該Membraneを室温で1時間風乾した。風乾後、20%スキムミルク/PBS溶液で1時間ブロッキングした。次いで、MembraneをPBSで5分間ずつ2回洗浄した後、室温で1時間風乾した。当該MembraneをPBSに浸した後、1%BSA/PBS溶液で500倍に希釈した各抗体溶液（1mL）をナイロン膜に入れてパッキングし、4°Cで一晩反応させた。その後、0.1% Tween 20/PBS溶液で5分間ずつ3回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識された抗RAT抗体を1%

BSA/PBS溶液で1000倍に希釈し、当該溶液（1 mL）を加え、室温で一晩反応させた。次いで、0.1% Tween 20/PBS溶液で5分間ずつ3回洗浄した後、ケミルミネッセンス法により発色させた。

[0037] 発色が認められたスポットのアミノ酸配列から、上記実施例1で得られた抗体はHMGB1のCテイル（配列：EEEDDDDE）へ特異的に結合し、上記比較例1で得られた抗体はHMGB1のBボックス（配列：LKEKYEKDIA）へ特異的に結合することを確認することができた。

[0038] 試験例2 血管透過性試験

アテローム動脈硬化は、血液中の単球が動脈血管内皮細胞間隙を通過して、内皮細胞の基底膜下に侵入することから始まるといわれており、HMGB1は単球の活性化と血漿タンパク質の漏出に関与していると考えられている。そこで、HMGB1による血管透過性亢進の阻害試験を行い、各抗体の活性を調べた。

[0039] 8匹のウイスター系雄性ラット（体重：300～400 g）を、2%ハロタン、49%酸素、49%笑気ガスからなる混合ガスで麻酔した。麻酔中、ラットは自発呼吸させた。麻酔したラットをうつ伏せにして背中の中線を剃り、脊椎を中線として、1 cmの間隔で両側10箇所印を付けた。別途、昆虫細胞Sf9を用い、ヒトHMGB1組換え体を調製した。ラットの印を付けた箇所へ、生理食塩水のみ（0.1 mL）、HMGB1の2.5 μg/mL溶液のみ（0.1 mL）、HMGB1の2.5 μg/mL溶液（0.1 mL）とCテイルに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体（実施例1）の25 μg/mL溶液（0.1 mL）、またはHMGB1の2.5 μg/mL溶液（0.1 mL）とBボックスに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体（比較例1）の25 μg/mL溶液（0.1 mL）を、2箇所ずつ皮下注射した。

[0040] 皮下注射から1時間後、エヴァンスブルーの2%生理食塩水溶液を、体重kg当たり2 mLの割合で静脈注射した。エヴァンスブルーの静脈注射から2時間後、体重kg当たり50 mgの割合でペントバルビタールナトリウム

を腹腔内投与して深麻酔状態とした。左心室から生理食塩水（100mL）を還流し、右心房から脱血した。背部の皮膚を剥離し、裏面から写真撮影した。得られた写真を医療用画像解析ソフト（ImageJ, NIH）により解析し、血液中から血管外へ漏出した色素の濃度と面積を測定し、その量を計算した。HMGB1を単独投与した場合における色素の血管外漏出量を100%とした場合の割合を、図1に示す。

[0041] 図1のとおり、HMGB1のみを投与した場合においては、生理食塩水のみを投与した場合に比べて、血液中から血管内皮細胞を透過して漏出した色素の量は当然に増加している。しかし、HMGB1に加えて、Bボックスに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体を投与した場合であっても、有意差こそないものの、血管外へ漏出した色素の量はかえって増加する傾向にあった。

[0042] それに対して、HMGB1に加えて、Cテイルに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体を投与した場合、HMGB1を単独投与した場合のみならず、さらにBボックスに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体を投与した場合に比べても、 $p < 0.001$ の危険率で色素の血管透過を有意に抑制している。

[0043] 従って、本発明に係るCテイルに結合する抗HMGB1モノクローナル抗体は、血漿タンパク質のアテローム硬化プラークへの漏出を顕著に低減し、アテローム動脈硬化の発生や進行を抑制できることが実証された。

[0044] 試験例3 動脈硬化症病態のマウスの大動脈壁におけるHMGB1の免疫組織化学染色

(1) アテローム動脈硬化モデルマウスの作製

一般的な実験用マウスであるC57BLに由来する雄性ApoE^{-/-}マウス（6週齢）をPrecinct Animal Facility（AMREP,メルボルン,オーストラリア）から入手し、コレステロール0.15%と脂肪分21%を含む高脂肪餌を8週間にわたり与えた。

[0045] (2) 免疫染色

過剰量のペントバルビタール（120mg/kg）を腹腔内投与することにより上記マウスを殺し、心臓と近位大動脈を切除し、OCTコンパウンド（製品名「Tissue-tek」）に包埋し、 -80°C で凍結した。大動脈洞の6 μm 厚スライスを作製した。

[0046] 当該大動脈洞スライスを、 -20°C のアセトンで20分間固定化した。次いで、3%過酸化水素、10%血清およびビオチン/アビジンブロッキング剤（Vector Laboratories製）を含むPBS溶液中でインキュベートした。当該スライスを、血清中、一次抗体と1時間インキュベートした。使用した一次抗体は、ウサギ由来の抗HMGB1抗体（0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、BD Pharmingen製、cat#556528）または非特異的なウサギ由来IgG抗体である。次いで、当該スライスを洗浄した後、二次抗体と40分間インキュベートした。使用した二次抗体は、ビオチン化抗ウサギ抗体（Vector Laboratories製、cat#BA-1000）である。続いて、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体（Vector Laboratories製）とインキュベートした。抗原を、3,3'-ジアミノベンジジンを用いて可視化した。各スライスを、ヘマトキシリンで対比染色した。両写真を図2として示す。

[0047] 抗HMGB1抗体により免疫染色された部分は、動脈血管内膜層に限局しており、この部分に存在する細胞核と細胞質が広範囲で陽性に染色された。一方、血管中膜層には、陽性細胞はほとんどなかった。以上の結果は、アテローム動脈硬化巣において、浸潤するマクロファージ、リンパ球、遊走し形質転換した平滑筋細胞などがHMGB1を発現していることを示唆し、HMGB1が細胞外へ供給される状態になっていることが分かる。

[0048] 試験例4 抗アテローム動脈硬化試験

本発明に係る抗HMGB1抗体の実際のアテローム動脈硬化に対する効果を、アテローム動脈硬化モデルマウスを用いて試験した。なお、この実験は、the Alfred Medical Research Education Precinct (AMREP) Animal Ethics Com

mitteeに認可されたものである。

[0049] (1) アテローム動脈硬化モデルマウスの作製

一般的な実験用マウスであるC57BLに由来する雄性ApoE^{-/-}マウス(6週齢)をPrecinct Animal Facility (AMREP,メルボルン,オーストラリア)から入手し、コレステロール0.15%と脂肪分21%を含む高脂肪餌を8週間にわたり与えた。また、当該期間中、実施例1で得た抗HMGB1抗体、または対照としてヘモシアニン的一种であるKeyhole Limpet hemocyaninに対するIgG2aを、それぞれマウス1匹当たり400 μ gの用量で1週間当たり2回静脈注射した。

[0050] (2) Oil Red O染色

過剰量のペントバルビタール(120mg/kg)を腹腔内投与することにより上記マウスを殺し、心臓と近位大動脈を切除し、OCTコンパウンド(製品名「Tissue-tek」)に包埋し、-80°Cで凍結した。大動脈洞の6 μ m厚スライスを作製し、大動脈内膜断面におけるアテローム動脈硬化病巣部位を、脂肪変性部位を特定できるOil Red Oで染色した。各マウスの上行大動脈において、大動脈弁尖から180 μ mの間で60 μ mごとの内膜断面において、染色されたアテローム動脈硬化病巣部位の面積を測定し、その平均値を算出した。代表的な断面写真を図3に示す。

[0051] (3) 免疫染色

上記の大動脈洞スライスを、-20°Cのアセトンで20分間固定化した。次いで、3%過酸化水素、10%血清およびビオチン/アビジンブロッキング剤(Vector Laboratories製)を含むPBS溶液中でインキュベートした。当該スライスを、血清中、一次抗体と1時間インキュベートした。使用した一次抗体は、ラット由来の抗マウスCD68抗体(Serotec製, cat#MCA1957)、ラット由来の抗マウスVACM-1抗体(BD Pharmingen製, cat#550547)、ウサギ由来の抗ラットMCP-1抗体(Abcam製, cat#ab7202)、

アルメニアンハムスター由来の抗マウスCD11c抗体（eBioscience製，cat#14-0114）、ラット由来の抗マウスCD83抗体（eBioscience製，cat#14-0831）、ラット由来の抗マウスCD4抗体（BD Pharmingen製，cat#550274）、またはウサギ由来の抗ヒトPCNA抗体（Abcam製，cat#ab2426）である。次いで、当該スライスを洗浄した後、由来動物に応じた二次抗体と40分間インキュベートした。使用した二次抗体は、マウス由来のビオチン化抗ラット抗体（BD Pharmingen製，cat#550325）、マウス由来のビオチン化抗アルメニアンハムスター抗体（eBioscience製，cat#13-4113-85）、またはビオチン化抗ウサギ抗体（Vector Laboratories製，cat#BA-1000）である。続いて、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体（Vector Laboratories製）とインキュベートした。各抗原を、3,3'-ジアミノベンジジンを用いて可視化した。各スライスを、ヘマトキシリンで対比染色した。

[0052] Oil Red Oによる染色部位および各抗原の発現状況を、Optimus 6.2 VideoPro-32により染色範囲を測定するか、或いは対応する細胞を計数することにより、定量化した。

[0053] Oil Red Oで染色した写真を図3に、CD68、VCAM-1、MCP-1、CD11c、CD83、CD4、PCNAを免疫染色した写真を図4~10に示す。なお、図3~10中、(1)は対照であるIgGを投与した結果であり、(2)は本発明に係る抗HMGB1抗体を投与した結果である。また、各例において、アテローム動脈硬化病巣部位の面積、陽性領域の面積比または陽性細胞数を定量化した結果のグラフを図11に示す。図11中、(1)はOil Red Oで染色した結果であり、(2)~(8)はそれぞれCD68、VCAM-1、MCP-1、CD11c、CD83、CD4、PCNAを免疫染色した結果である。また、図11において、「*」はt-テストより危険率 $p < 0.05$ で有意差がある場合を示す。

- [0054] Oil Red Oは脂肪変性部位を染色できるため、図3の写真中の染色部位はアテローム動脈硬化病巣部位を示す。図3のとおり、IgG抗体を投与した場合に比して、本発明に係るHMGB1抗体を投与した場合には、アテローム動脈硬化病巣部位が顕著に低減されていることが分かる。
- [0055] CD68、CD11c、CD83およびCD4は白血球抗原であり、それぞれマクロファージ、未熟樹状細胞、成熟樹状細胞、Tーリンパ球で高発現している。図4、図7～9および図11のとおり、対照であるIgG抗体を投与した場合に比して、本発明に係るHMGB1抗体を投与した場合にはこれら白血球抗原の発現が顕著に抑制されており、血管内膜層におけるマクロファージ、樹状細胞およびCD4陽性Tーリンパ球の浸潤が顕著に抑制されていることが分かる。
- [0056] VCAM-1は、血管内皮細胞の活性化によりその細胞形質膜における発現量が増大する。特に動脈硬化の形成に関与すると考えられている。従って、免疫組織化学染色によりVCAM-1陽性細胞数の増減を調べることにより、内皮細胞の活性化に対する抗体の効果を評価できる。図5と図11のとおり、本発明に係るHMGB1抗体を投与した場合には対照に比してVCAM-1陽性細胞数がおよそ半減しており、当該抗体により動脈硬化の形成に関与する血管内皮細胞の活性化を抑制できることが明らかにされた。
- [0057] MCP-1は、単球、マクロファージおよび樹状細胞の遊走因子である。図6のとおり、本発明に係るHMGB1抗体を投与した場合には対照に比してMCP-1陽性の領域が約30%にまで低減されているので、当該抗体は動脈硬化の形成に関与する単球等の遊走を抑制できることが証明された。
- [0058] PCNAは、DNAの合成と修復に関与する核内因子である。血管壁内では、遊走平滑筋の増殖性細胞で多く発現していると考えられる。図10と図11のとおり、本発明に係るHMGB1抗体を投与した場合には対照に比してPCNA陽性の細胞数が約35%低下しているため、当該抗体により動脈硬化が抑制されることが分かった。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明に係る薬剤は、活性化された単球の血管内膜層への集積を阻害することなどにより、脳梗塞や心筋梗塞など様々な臓器障害の原因となるアテローム動脈硬化を効果的に抑制することができる。また、現在使用されている抗体薬剤を考慮すれば、重篤な副作用を生じる可能性は極めて少ないと考えられる。従って、本発明のアテローム動脈硬化抑制剤は、抗高脂血症薬や抗高血圧薬などこれまで実用化されている薬剤とは異なる作用機序によりアテローム動脈硬化を抑制可能な実用的薬剤として、極めて有用である。

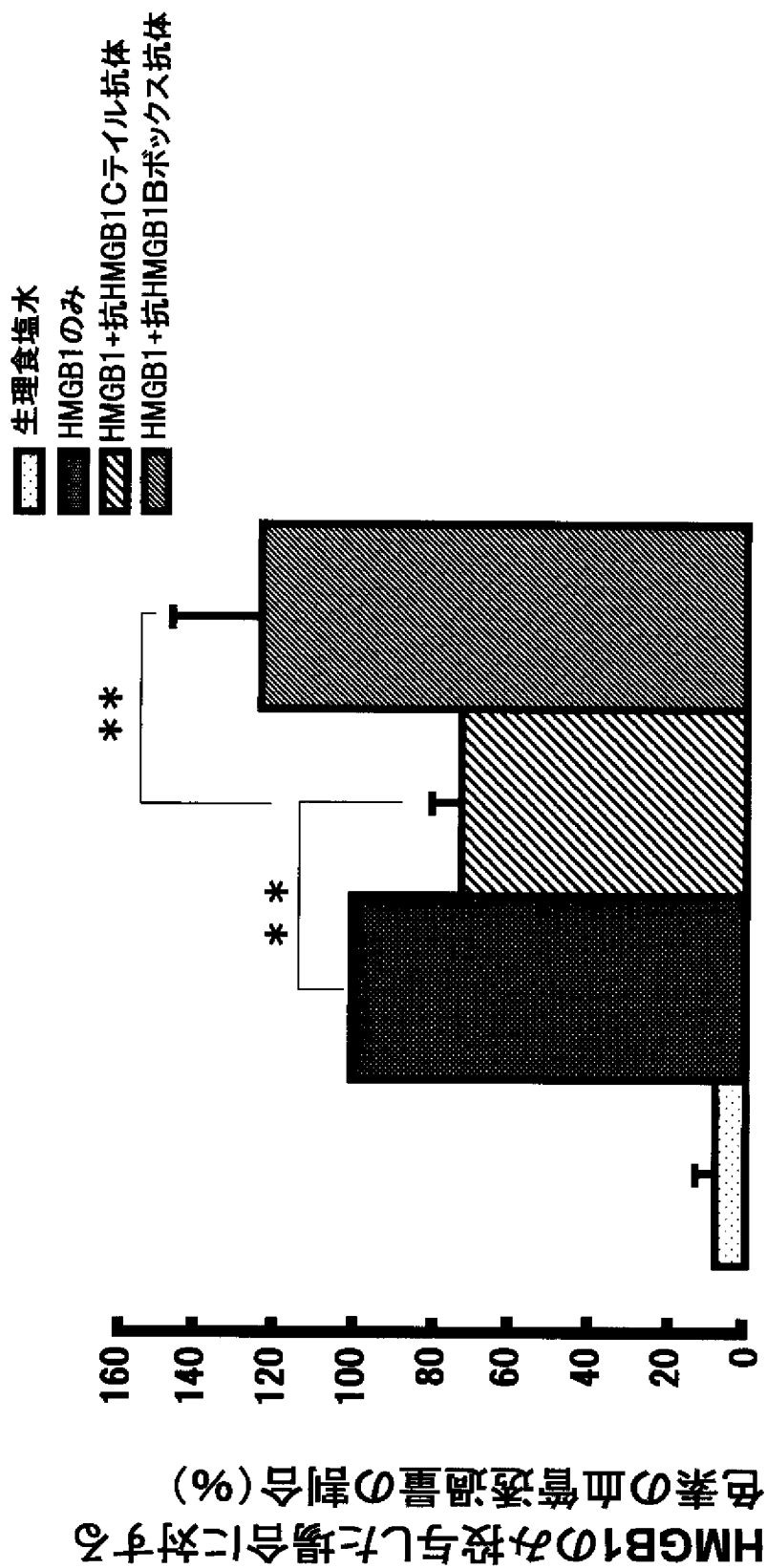
請求の範囲

- [請求項1] HMGB 1のCテイルに結合する抗HMGB 1モノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とするアテローム動脈硬化抑制剤。
- [請求項2] 抗HMGB 1モノクローナル抗体が、HMGB 1のCテイル中のアミノ酸配列であるEEE D D D D Eを特異的に認識するものである請求項1に記載のアテローム動脈硬化抑制剤。
- [請求項3] 静脈注射投与するものである請求項1または2に記載のアテローム動脈硬化抑制剤。
- [請求項4] 抗HMGB 1モノクローナル抗体を、1回当たり0.2mg/kg以上、2mg/kg以下投与するものである請求項3に記載のアテローム動脈硬化抑制剤。
- [請求項5] HMGB 1のCテイルに結合する抗HMGB 1モノクローナル抗体を投与する工程を含むことを特徴とするアテローム動脈硬化の抑制方法。
- [請求項6] 抗HMGB 1モノクローナル抗体が、HMGB 1のCテイル中のアミノ酸配列であるEEE D D D D Eを特異的に認識するものである請求項5に記載のアテローム動脈硬化の抑制方法。
- [請求項7] 抗HMGB 1モノクローナル抗体を静脈注射投与する請求項5または6に記載のアテローム動脈硬化の抑制方法。
- [請求項8] 抗HMGB 1モノクローナル抗体を、1回当たり0.2mg/kg以上、2mg/kg以下投与する請求項7に記載のアテローム動脈硬化の抑制方法。
- [請求項9] アテローム動脈硬化を抑制するために用いられ、HMGB 1のCテイルに結合する抗HMGB 1モノクローナル抗体。
- [請求項10] HMGB 1のCテイル中のアミノ酸配列であるEEE D D D D Eを特異的に認識するものである請求項9に記載の抗HMGB 1モノクローナル抗体。
- [請求項11] 静脈注射投与するものである請求項9または10に記載の抗HMG

B 1 モノクローナル抗体。

[請求項12] 1回当たり0.2 mg/kg以上、2 mg/kg以下投与するものである請求項11に記載の抗HMGB1モノクローナル抗体。

[図1]



[図2]

(1) 抗HMGB1抗体染色



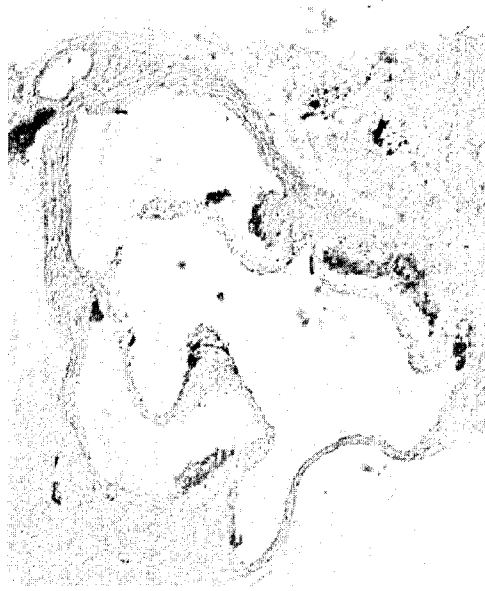
(2) IgG抗体染色



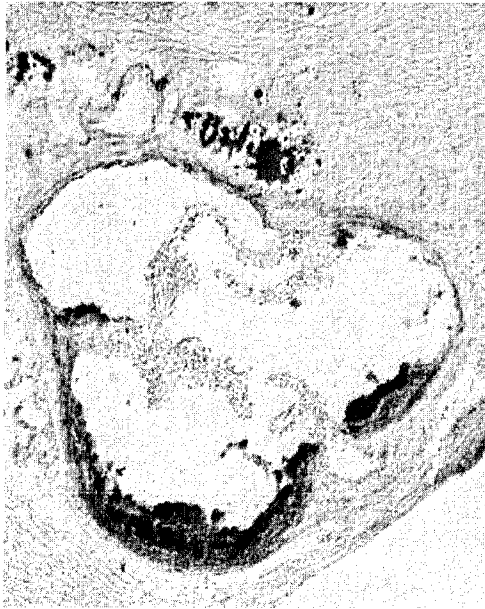
100 μ m

[图3]

(2) 抗HMGB1抗体投与

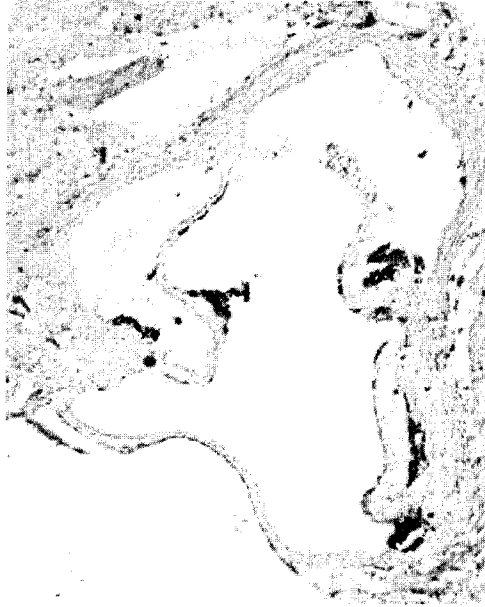


(1) 对照抗体投与

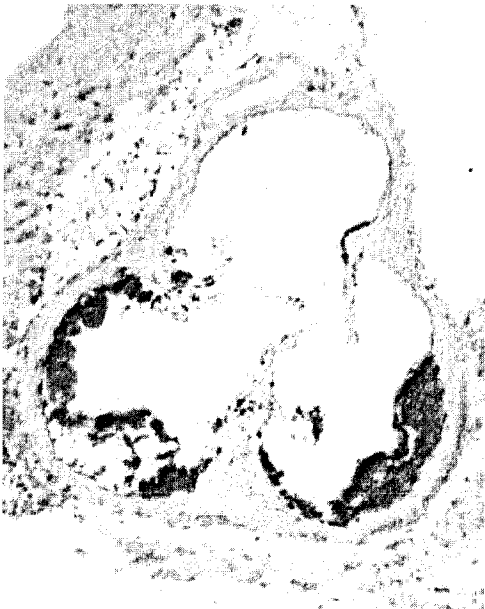


[图4]

(2) 抗HMGB1抗体投与

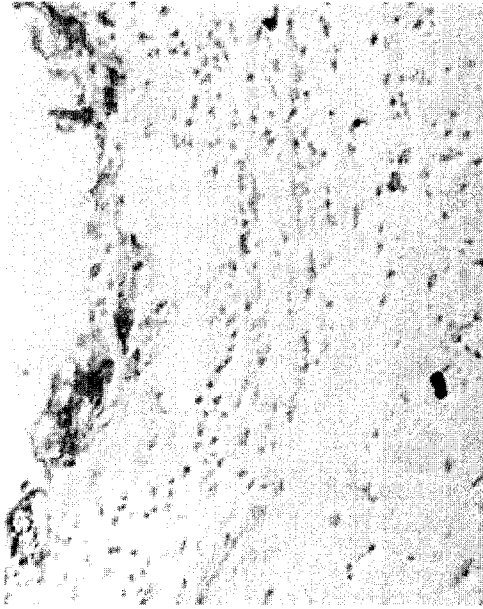


(1) 对照抗体投与

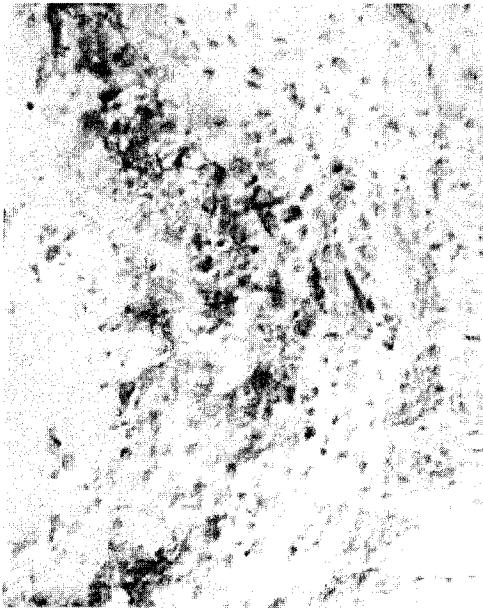


[图5]

(2) 抗HMGB1抗体投与



(1) 对照抗体投与

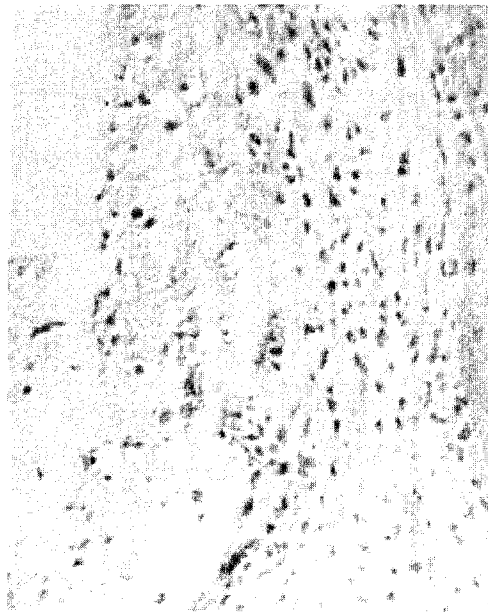


[图6]

(2) 抗HMGB1抗体投与

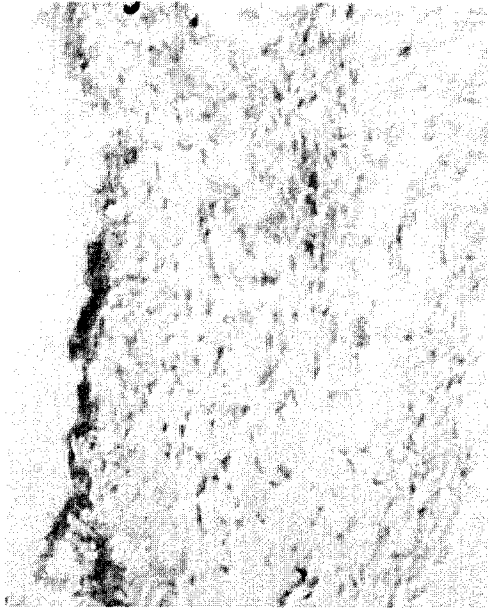


(1) 对照抗体投与

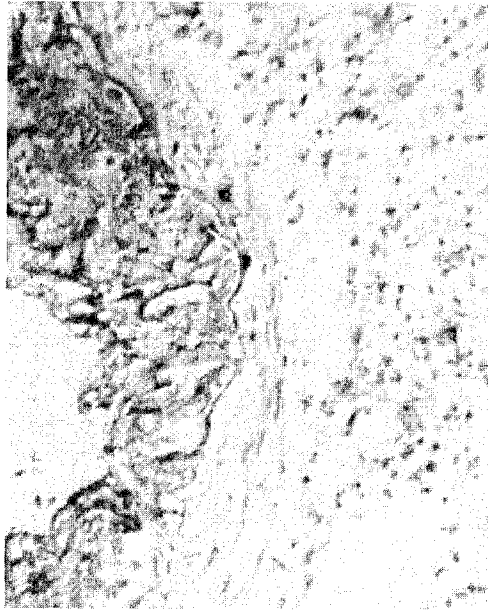


[图7]

(2) 抗HMGB1抗体投与

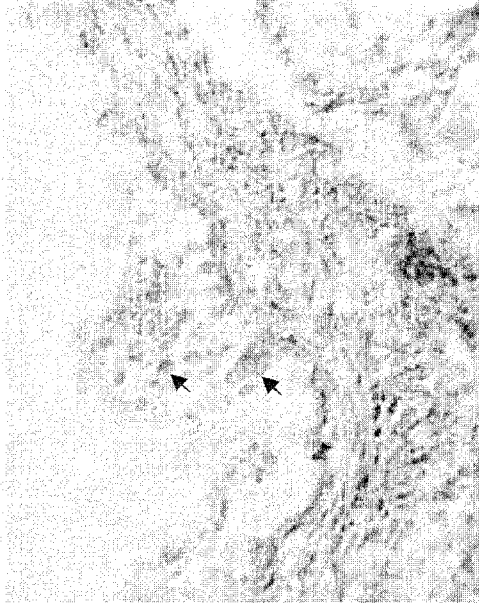


(1) 对照抗体投与

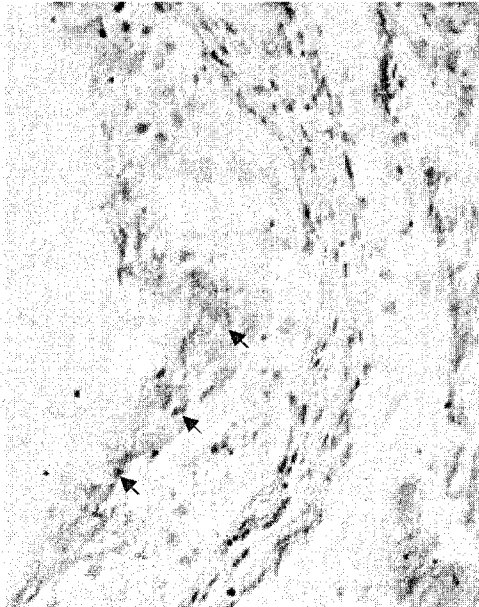


[图8]

(2) 抗HMGB1抗体投与



(1) 对照抗体投与

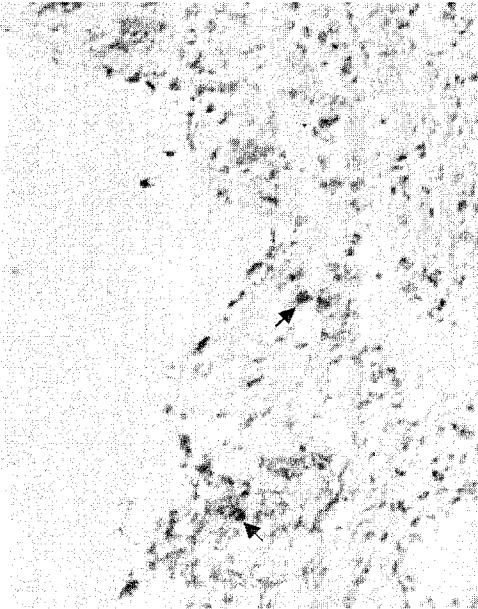


[图9]

(2) 抗HMGB1抗体投与

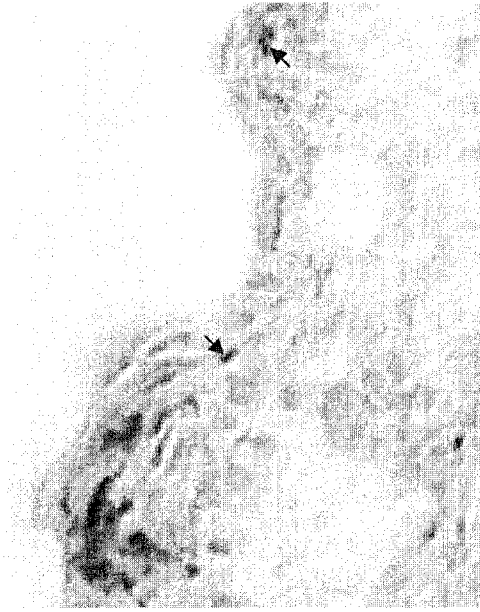


(1) 对照抗体投与

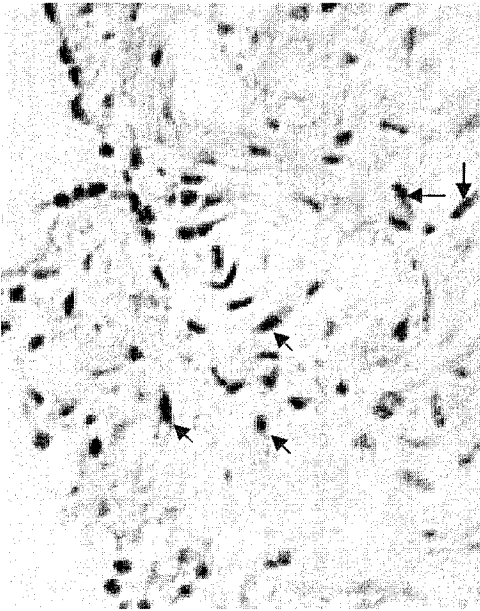


[图10]

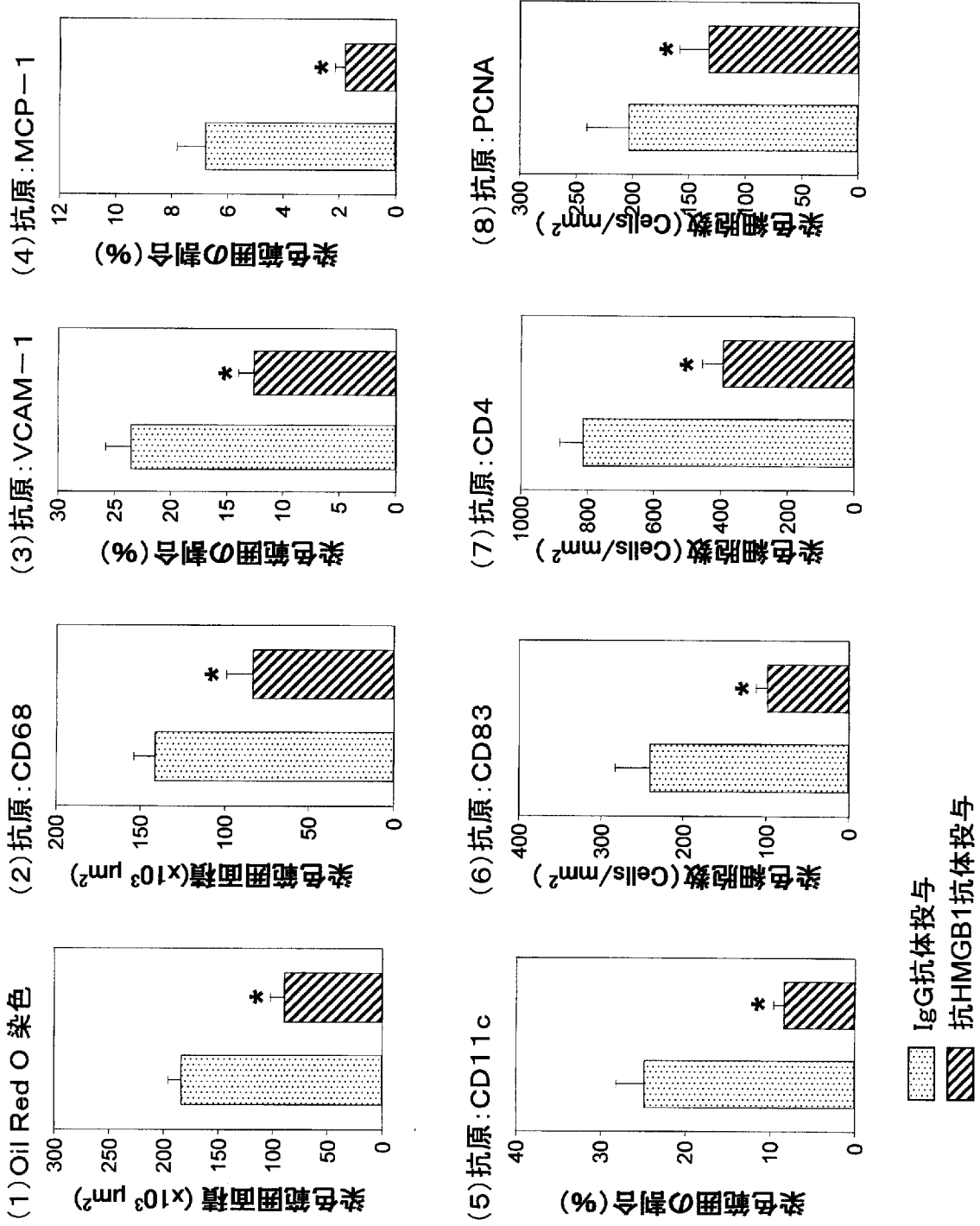
(2) 抗HMGB1抗体投与



(1) 对照抗体投与



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/066683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/395(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

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)

A61K39/395, A61P9/10, C07K16/18, C12P21/08

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	LIU, K. et al, Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats, FASEB J, 2007, Vol.21, No.14, p.3904-16, entire text, particularly, Abstract	9-12 1-4, 9-12
X A	JP 2009-096739 A (UNIV OKAYAMA, JP), 07 May 2009 (07.05.2009), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	9-12 1-4
X A	WO 2007/135992 A1 (UNIV OKAYAMA), 29 November 2007 (29.11.2007), entire text; particularly, claims; examples & JP 3882090 B1 & JP 2007-308436 A & EP 2020241 A1 & US 2009/175878 A1	9-12 1-4

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
08 November, 2010 (08.11.10)

Date of mailing of the international search report
16 November, 2010 (16.11.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/066683

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WAUTIER, J.L. et al, Blood cells and vascular cell interactions in diabetes, Clin Hemorheol Microcirc, 2001, Vol.25, No.2, p.49-53, entire text, particularly, Abstract	1-4, 9-12
Y	JP 2004-523579 A (BIO3 RES SRL), 05 August 2004 (05.08.2004), entire text; particularly, claims; examples & WO 2002/74337 A1 & EP 1368060 A1 & US 2004/136979 A1 & US 2008/171052 A1	1-4, 9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/066683

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.: 5-8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 5 to 8 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K39/395 (2006.01)i, A61P9/10 (2006.01)i, C07K16/18 (2006.01)i, C12P21/08 (2006.01)n

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. A61K39/395, A61P9/10, C07K16/18, 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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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)
 CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

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 請求項の番号
X Y	LIU, K. et al, Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats, FASEB J, 2007, Vol.21, No.14, p.3904-16, 全文, 特に Abstract	9-12 1-4, 9-12
X A	JP 2009-096739 A (UNIV OKAYAMA, JP) 2009.05.07, 全文, 特に請求項, 実施例 (ファミリーなし)	9-12 1-4

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

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な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 08.11.2010	国際調査報告の発送日 16.11.2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/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	特許庁審査官 (権限のある職員) 小堀 麻子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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 請求項の番号
X A	WO 2007/135992 A1 (UNIV OKAYAMA) 2007. 11. 29, 全文, 特に請求項, 実施例 & JP 3882090 B1 & JP 2007-308436 A & EP 2020241 A1 & US 2009/175878 A1	9-12 1-4
Y	WAUTIER, J.L. et al, Blood cells and vascular cell interactions in diabetes, Clin Hemorheol Microcirc, 2001, Vol.25, No.2, p. 49-53, 全文, 特に Abstract	1-4, 9-12
Y	JP 2004-523579 A (BI03 RES SRL) 2004. 08. 05, 全文, 特に請求項, 実施例 & WO 2002/74337 A1 & EP 1368060 A1 & US 2004/136979 A1 & US 2008/171052 A1	1-4, 9-12

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. 請求項 5-8 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、
本願請求項5-8は治療による人体の処置方法に関するものであって、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. 請求項 _____ 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. 請求項 _____ 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ろ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項について作成した。
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項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項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項について作成した。

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はあったが、異議申立てはなかった。