

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-523352

(P2011-523352A)

(43) 公表日 平成23年8月11日(2011.8.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 7/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/00	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 6 5
<b>C O 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18	4 H O 4 5
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-506792 (P2011-506792)  
 (86) (22) 出願日 平成21年4月29日 (2009. 4. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年12月28日 (2010. 12. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2009/005435  
 (87) 国際公開番号 W02009/133452  
 (87) 国際公開日 平成21年11月5日 (2009. 11. 5)  
 (31) 優先権主張番号 M12008A000799  
 (32) 優先日 平成20年4月30日 (2008. 4. 30)  
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 510288482  
 アレータ インテルナツィオナル ソチ  
 エタ ア レスポンサビリタ リミタータ  
 イタリア国 イー20129 ミラノ ヴ  
 イアーレ レジーナ ジョヴァンナ 17  
 (74) 代理人 100060759  
 弁理士 竹沢 莊一  
 (74) 代理人 100087893  
 弁理士 中馬 典嗣  
 (74) 代理人 100086726  
 弁理士 森 浩之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HMGA 1モノクローナル抗体、それらの作製のための方法およびHMGA 1の定量のためのそれらの使用

(57) 【要約】

【課題】 肥満および糖尿病などの病変におけるインスリン抵抗性の新しい治療アプローチのためおよび/または予防/診断/治療のためのツールを提供する。

【解決手段】 本発明は、高速移動群A 1タンパク質(HMGA 1)に対するモノクローナル抗体のパネルおよびそれらを作製するための方法、ならびに生体液中またはリンパ球細胞に由来するタンパク質溶解産物中のHMGA 1の定量のための前記抗体の使用に関する。本発明はまた、HMGA 1タンパク質の発現に関連する危険因子を評価するための診断キットに関する。

【選択図】 図 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

H M G A 1 遺伝子のセンスまたはアンチセンス配列の発現のための、アデノウイルス構築物 A d - Y s または A d - Y a s 。

## 【請求項 2】

細胞株の感染のための、請求項 1 に記載のアデノウイルス構築物 A d - Y s または A d - Y a s の使用。

## 【請求項 3】

前記細胞株が H E K - 2 9 3 であることを特徴とする、請求項 2 に記載の使用。

## 【請求項 4】

H M G A 1 タンパク質を得るための、請求項 1 に記載の構築物の使用。

## 【請求項 5】

マウスの免疫のための、請求項 4 に記載の H M G A 1 タンパク質の使用。

## 【請求項 6】

前記 H M G A 1 タンパク質が精製されていることを特徴とする、請求項 5 に記載の使用。

## 【請求項 7】

前記精製タンパク質が B A L B / c マウスの免疫のために使用されることを特徴とする、請求項 6 に記載の使用。

## 【請求項 8】

H M G A 1 で免疫されたマウスの脾細胞と不死化細胞株の融合工程を含む、ハイブリドーマの作製のための方法。

## 【請求項 9】

前記不死化細胞株が腫瘍性であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記腫瘍細胞株がマウスであることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記マウス腫瘍細胞株が非分泌性骨髄腫であることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記の非分泌性骨髄腫の株が N S O であることを特徴とする、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記ハイブリドーマの前記融合工程が P E G 1 5 0 0 の存在下で実施されることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 14】

D M E M 培地における前記ハイブリドーマの増殖工程を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 15】

H A T および H y b r i d i m a x が前記 D M E M 培地に添加されることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

1 0 % H A T および 2 % H y b r i d i m a x が前記 D M E M 培地に添加されることを特徴とする、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

マルチウエルプレートにおける平板培養によって実施されることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記ハイブリドーマの一次および二次選択ならびに同定工程を含み、前記工程が E L I S A およびアイソタイプ分析によって実施されることを特徴とする、請求項 8 に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 19】

前記選択および同定が間接 E L I S A および I s o s t r i p キットによって得られることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 8 ~ 19 に記載の方法によって得られるクローン集団。

【請求項 21】

クローン 2 G 1 6 ( P D 0 8 0 0 1 ) 。

【請求項 22】

クローン 2 G 1 6 / 1 8 ( P D 0 8 0 0 2 ) 。

10

【請求項 23】

請求項 20 に記載の前記クローン集団によって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 24】

請求項 21 に記載のクローン 2 G 1 6 ( P D 0 8 0 0 1 ) によって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 25】

請求項 22 に記載のクローン 2 G 1 6 / 1 8 ( P D 0 8 0 0 2 ) によって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 26】

無血清培地 ( S F M ) およびハイブリドーマ用完全培地における任意のクローンの接種および増殖工程を含む、請求項 23 ~ 25 に記載のモノクローナル抗体の作製のための方法。

20

【請求項 27】

バイオリクターにおいて実施されることを特徴とする、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記バイオリクターが、miniPermまたはViva Science Sartoriusバイオリクターであることを特徴とする、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記接種および増殖が 75% S F M および 25% ハイブリドーマ用培地で実施されることを特徴とする、請求項 26 に記載の方法。

30

【請求項 30】

アフィニティークロマトグラフィー工程を含む、請求項 23 ~ 25 に記載のモノクローナル抗体の精製のための方法。

【請求項 31】

生体液中の H M G A 1 の定量のための、請求項 23 ~ 24 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 32】

生体液中の H M G A 1 の定量のための、請求項 25 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 33】

請求項 23 ~ 25 に記載の前記モノクローナル抗体を含む、H M G A 1 の定量のためのキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高速移動群 A 1 タンパク質 ( H M G A 1 ) に対するモノクローナル抗体のパネルおよびそれらを作製するための方法、ならびに H M G A 1 タンパク質の発現に関連する危険因子を評価するための診断キットの開発に関する。

【背景技術】

【0002】

50

H M G A 構造タンパク質は、真核生物における遺伝子発現の活性化を調節する核生化学的プロセスにおいて重要な役割を果たす。増殖および分化過程を調節するうえでのこれらのタンパク質の役割の可能性は、H M G A タンパク質がヒトにおいていくつかのタイプの新生物の病因に関与するという所見によって裏付けられる。インスリン受容体 ( I R ) の遺伝子発現の調節へのこれらのタンパク質の関与の可能性が最近記述され、インスリン作用の生理病理学および、ホルモンシグナルの伝達におけるその役割という仮説が立てられた。

#### 【 0 0 0 3 】

癌および、しばしば腫瘍性疾患に結びつく、インスリン抵抗性の一部の状態 ( 2 型糖尿病および肥満 ) で、ホルモンおよび増殖シグナルの伝達において H M G A タンパク質が果たす正確な役割を理解するために、適合された生物学および分子的試験が実施されてきた。H M G A タンパク質による I R の遺伝子発現の調節に関する研究は、インスリン抵抗性症候群の生理病理学的理解において、ならびに I R の欠損およびインスリンシグナルの伝達異常を有する個体でのその他の病的状態において適切である。

10

#### 【 0 0 0 4 】

いくつかの実験証拠は、癌において異常発現される H M G A タンパク質が、癌でその変化が頻繁に起こり、形質転換された表現型の発現と維持のために重要であると思われる、インスリン様増殖因子 ( I G F ) ( I R はその成分の 1 つである ) 系の機能的調節において役割を有し得ることを示す。

#### 【 0 0 0 5 】

I G F 系の調節不全を導く分子的因子の説明は、新しい抗腫瘍治療の開発における重要な支援となり得る。I G F の変化を引き起こす腫瘍マーカーの同定およびそれらの生物学的機能の理解は、この疾患の診断と治療における重要な要素であり得る。

20

#### 【 0 0 0 6 】

増殖シグナルの伝達における H M G A タンパク質の分子的役割の理解は、従って、選択的な抗腫瘍治療の創製のために新たな示唆を与えることができるであろう。

#### 【 0 0 0 7 】

H M G A 核タンパク質のファミリー ( 高速移動群 A ) は、H M G A 1 a、H M G A 1 b および H M G A 2 として知られる低分子量 ( 約 1 1 k D a ) の 3 つのタンパク質から成る。これらのタンパク質は一般に転写活性クロマチンに関連する。タンパク質 H M G A 1 a と H M G A 1 b は同じ遺伝子によってコードされ、染色体 6 p 2 1 に位置しており、選択的スプライシング機構の結果として発現される。タンパク質 H M G A 1 a と H M G A 1 b は、1 1 アミノ酸の内部領域が異なる。その代わりに、タンパク質 H M G A 2 は、実際上染色体 1 2 q 1 4 . 3 に位置する異なる遺伝子によってコードされる。タンパク質 H M G A 1 および H M G A 2 の遺伝子は物理的に異なる染色体上に位置するが、それにもかかわらずそれらは相同である。H M G A 遺伝子は胚発生の間に高発現され、反対に、細胞および完全に分化した組織ではそれらの発現レベルは低下する。

30

#### 【 0 0 0 8 】

H M G A タンパク質は約 1 0 0 アミノ酸残基から成り、互いに高度に相同である。それらは、「A T フック」と呼ばれる 3 つの D N A 結合ドメインの存在によって特徴づけられる。これらの部位は、二重螺旋の副溝のレベルでアデニンおよびチミンに富む D N A 配列に選択的に結合する。H M G A タンパク質は、D N A の構造修飾の誘導および他の核タンパク質との相互作用を介して遺伝子活性を調節するそれらの能力のゆえに、しばしば「構造転写因子」と定義される。

40

#### 【 0 0 0 9 】

実際に、それらの固有の柔軟性のために、H M G A タンパク質は特異的なタンパク質 - D N A 相互作用またはタンパク質間相互作用に干渉し、クロマチンの構造変化および、数多くの遺伝子の発現を調節する、プロモーター / エンハンサー D N A 配列上の「エンハンセオソーム」と呼ばれる高分子量 ( 高次 ) の立体特異的複合体の形成の両方を誘導する。

H M G A タンパク質はクロマチンタンパク質のネットワークにおける重要な節と見なさ

50

れるが、それらの役割および生理的/病理学的意味はあまり明らかではない。このため、これらのタンパク質をコードする遺伝子がより高いレベルで発現される(トランスジェニックマウス)かまたは発現されない(ノックアウト)、動物または細胞モデルが実験室において作製されてきた。

#### 【0010】

実験的細胞および/またはトランスジェニック動物モデルは、いくつかのタイプの腫瘍に関して、腫瘍性形質転換におけるHMG Aタンパク質の役割を明らかにした。この所見は非常に明白であり、認められたHMG Aタンパク質の高濃度は、腫瘍性形質転換およびより高い転移の可能性についての実際のマーカーとみなすことができる。例えば、HMG A 1の発現レベルの上昇は、前立腺、甲状腺、子宮頸、結腸-直腸、膵臓、乳房および卵巣腫瘍などの種々のタイプの腫瘍の診断マーカーとして示唆されてきた。全体として、これらの所見は腫瘍性形質転換および腫瘍転移進行におけるHMG Aタンパク質の役割を有効に支持する。

10

#### 【0011】

HMG A 2タンパク質についての実験的細胞および/またはノックアウト動物モデルは、HMG A 2の部分的または完全な欠損を有するマウスが、食餌による肥満の誘導に対して抵抗性であることを明らかにし、脂肪細胞の増殖におけるHMG A 2タンパク質の役割を示唆し、この遺伝子を肥満の治療における可能性のある標的として提案した。実際に「ピグミー」ノックアウトマウスは、その大きさのかなりの縮小(野生型マウスにおけるよりも約60%小さい)によって特徴づけられる脂肪組織の病変と表現型異常を呈する。このHMG A 2タンパク質の完全なまたは部分的欠失は、脂肪組織の重度の欠損に関連する身体寸法の縮小を生じさせる。

20

#### 【0012】

HMG A 1タンパク質についての実験的ノックアウト動物モデルは、2型糖尿病に関連する心肥大を示し、心筋細胞の増殖およびグリシド代謝の調節におけるHMG A 1タンパク質の役割を示唆する。

#### 【0013】

従って、これらのタンパク質が、その構造的および機能的特徴により、いかにして細胞において重要な役割を果たし、DNAおよび他の核タンパク質の両方と相互作用して、数多くの生理的過程(成長、増殖、分化、アポトーシス)および病的過程(肥満、腫瘍の増殖と進行)に影響を及ぼすかは明らかである。

30

#### 【0014】

また、HMG Aタンパク質が、シスエレメントの立体配座変化を誘導し、他の転写因子と直接相互作用して隣接する核因子を相互に連結する、遺伝子調節に関与することは公知である。

#### 【0015】

特に、ウイルス感染後のヒトINF- $\gamma$ の転写誘導の研究は、HMG A 1の2つの分子が協力してこの遺伝子のエンハンサー領域に結合し、二本鎖DNAのアロステリック立体配座を変化させて、それによりNF- $\kappa$ BおよびATF-2/c-Junのハウジングを可能にすることを示した。このようにしてエンハンセオソームの構築が開始し、HMG A 1と転写活性化因子の間でのタンパク質間相互作用を介してその形成が完了する。この多タンパク質構造の構築の結果として、様々な転写因子の活性化ドメインが、転写を誘導する、CREB結合タンパク質(CBP)ならびにP/CAFおよびRNAポリメラーゼIIホロ酵素などのそれに関連するタンパク質を動員することができる新たな活性化表面を作製する。その後、CBPによって媒介されるHMG A 1のアセチル化がDNAに対するHMG A 1の親和性の低下を生じさせ、その結果としてエンハンセオソームの破壊を引き起こす。従ってHMG A 1タンパク質は、ヒトINF- $\gamma$ の遺伝子発現を調節するうえでの実際の分子スイッチとして挙動する。

40

#### 【0016】

HMG A 1タンパク質の発現は、免疫系の遺伝子が発現される、リンパ球の活性化の間

50

または炎症応答において一時的に誘導される。

【0017】

成体組織では、HMG A 1タンパク質の発現はサイレントであるかまたは著明に低下する。ヒトインスリン受容体の遺伝子発現の調節へのHMG A 1タンパク質の関与は完全には説明されていないが、HMG A 1タンパク質は、他の転写因子(Sp1およびC/EBP)と結合することにより、IR遺伝子の転写を制御する核タンパク質複合体の構築を画策することができると思われる。

【0018】

インスリンの生物学的作用における最初の段階は、標的細胞の細胞質膜上に位置する糖タンパク質、インスリン受容体(IR)とのその相互作用であり、その役割はインスリン作用の生理病理学において必須である。末梢組織(筋、肝臓および脂肪)のレベルでのインスリン抵抗性は、糖尿病の病因・病態(aetiopathogenesis)における主要な特徴である。糖尿病の高い罹患率を有する集団に関して実施された研究は、インスリン抵抗性(同じ代謝効果を得るために、どの程度より多くの量のインスリンが必要とされるかを示す、糖代謝の特定の状態)が本格的な糖尿病の発症に先行し、この疾患についての実際の予測マーカーを構成することを示す。多くの糖尿病患者においてIRは正常であり、インスリン作用の欠陥は受容体後である。また別の症例(2型糖尿病を有する患者の10%超)では、機能的異常および/またはIR遺伝子のコード領域のレベルでの特異的な遺伝的欠陥の存在によるIRの発現異常が存在する。これらの症例の多くにおいて、異常な受容体タンパク質の合成を決定する点突然変異または欠失が存在する。その代わりに、別の症例では、遺伝子は正常であり、欠陥は、IR遺伝子の機能調節に関する他の遺伝子に影響を及ぼす異常(トランスでの欠陥)によるものである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の目的は、肥満および糖尿病などの病変におけるインスリン抵抗性の新しい治療アプローチのためおよび/または予防/診断/治療のためのツールを提供することである。

【0020】

本発明の目的はまた、腫瘍性疾患の診断および/または観測のためのツールを提供することである。

【0021】

本発明の目的はさらに、肥満および糖尿病などの病変におけるインスリン抵抗性の新しい治療アプローチのためおよび/または予防/診断/治療のためのツールとして使用されるのに適した生成物のクラスを提供することである。

【0022】

本発明のさらなる目的は、長期化した高インスリン血症を有する個体における癌の予防としての、インスリン抵抗性の新しい治療アプローチのためおよび/または予防/診断/治療のための生成物のクラスを提供することである。

【0023】

本発明の目的はまた、HMG A 1の生理的レベルを回復するための方法である。

【0024】

本発明のさらなる目的は、細胞においてHMG A 1の生理的レベルを回復するための特異的発現ベクターの使用である。

【0025】

本発明のもう一つの目的は、生体液中のHMG A 1タンパク質を認識し、それに結合して、その存在を測定することができる組換え抗HMG A 1モノクローナル抗体のパネルを提供することである。

【0026】

本発明のもう一つの目的は、組換え抗HMG A 1モノクローナル抗体を選択するための

10

20

30

40

50

方法である。

【0027】

本発明のさらにもう1つの目的は、組換え抗HMG A 1モノクローナル抗体の作製と発酵のための方法、ならびにインスリン抵抗性病変の診断および/または予防のためのキットの使用である。

【0028】

以下でより詳細に説明されるこれらや他の目的およびさらなる利点は、肥満および糖尿病などの病変におけるインスリン抵抗性の新しい治療アプローチのためおよび/または予防/診断/治療のためのツールの実現ならびにツールとして使用されるのに適した生成物のクラスの実現を通して達成される。

10

【課題を解決するための手段】

【0029】

HMG A 1タンパク質がヒトIRをコードする遺伝子に関連すること、および特異的調節タンパク質(しばしば、Sp1およびC/EBPなどの他の公知の転写因子と共に立体特異的多タンパク質複合体の形態で組織化される)がHMG A 1タンパク質を含むことの証拠は、HMG A 1タンパク質は、IR遺伝子のプロモーター領域に結合することにより、Sp1およびC/EBPのこのレベルで、動員を介してその転写を活性化することができることを主張することを可能にする。

【0030】

高レベルのIRを有する細胞(IM-9ヒトリンパ芽球様細胞およびHepGwヒト肝細胞癌細胞)におけるHMG A 1の機能的障害は、これらの細胞の細胞質膜上での受容体の発現を有意に低下させることができる。逆に、低レベルのIRを有する細胞におけるHMG A 1の発現誘導は受容体タンパク質の発現を上昇させ、HMG A 1タンパク質がIR遺伝子の転写活性化において重要な役割を果たすことを明らかにする。

20

【0031】

IR発現の欠損が、IR遺伝子の突然変異不在で、インスリン抵抗性症候群および2型糖尿病を有する患者において報告されている。これらのすべての症例において、受容体異常は、ほとんど常にその後、インスリン作用によって標的される組織のレベルでのホルモンシグナルの伝達異常が起こり、その結果として正常な生化学的プロセスの変化を伴う。

30

【0032】

これらの所見は、低いIRレベルを有し、IR遺伝子の遺伝子突然変異が存在しない個体におけるインスリン抵抗性および2型糖尿病の形態でのHMG A 1タンパク質の病因的関与の可能性という仮説を可能にする。この仮説は、低いIRレベルを有する一部の糖尿病個体の細胞および組織に関して得られた所見に基づくものであり、個体では、HMG A 1の発現が極めて低く、Sp1およびC/EBPによるIRプロモーターのトランス活性化が健常対照被験者の細胞および組織で認められるよりも有意に低かった。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】細胞溶解産物からのHMG A 1の発現のウェスタンブロット分析の結果を示す図。

40

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明は、従ってまた、HMG A 1遺伝子のアンチセンス配列をコードすることができる、Ad-Yasと呼ばれるアデノウイルス構築物に関する。HMG A 1のコード化を抑制することができるこのウイルスはまた、ヒトまたはラットの、未分化癌に由来する様々な甲状腺細胞株(AROおよびFB-1など)の死を導くことができるが、正常な甲状腺細胞の死は誘導しない。その代わりに、同じ細胞を対照アデノウイルス構築物に感染させた場合には作用は得られなかった。

【0035】

50

従って、その態様の1つによれば、本発明は、HMGA1タンパク質のアデノウイルス構築物に関する。

【0036】

粘着末端を作製するために制限酵素HindIIで切断した後、1,500塩基対(bp)の長さを有するHMGA1のcDNAをベクターpac-CMVpLpaにセンス(s)およびアンチセンス(as)方向で挿入し、以下の構築物：pac-CMV-HMGA1s pac-CMV-HMGA1asを作製した。両方の構築物をアデノウイルスpJM17と共にヒト胚腎293(HEK-293)細胞株(ATCC番号：CRL-1573)に同時トランスフェクトし、細胞内でのベクターの融合により、最終的構築物Ad5CMV-HMGA1(Y)s(Ad-Ys)およびAd5CMV-HMGA1(Y)as(Ad-Yas)を作製する。(Ad-Ys)または(Ad-Yas)に感染させた細胞株HEK-293(ATCC)を感染の36~40時間後に溶解し、ウイルス力価を測定する。

10

【0037】

従って、そのもう1つの態様によれば、本発明は組換えHMGA1タンパク質に関する。組換えHMGA1は、好ましくはヒスチジンまたはGSTなどの尾部もしくはタグまたは精製のための等価物を提示し得る。

【0038】

従って、そのもう1つの態様によれば、本発明は精製HMGA1タンパク質に関する。

【0039】

特に、精製HMGA1タンパク質を、このタンパク質に対する抗体の産生を刺激するためにBALB/cマウスを免疫するのに使用した。前記マウスの免疫は、高い抗体力価を得るために、好ましくは3回のサイクルで、好ましくは腹腔内注射を介して実施した。細胞融合操作に使用する脾臓を採取するために前記免疫マウスを犠牲させた。

20

【0040】

従って、本発明はまた、免疫マウスの脾細胞と不死化細胞株の融合によって得られるハイブリドーマに関し、好ましくは、前記不死化細胞株は腫瘍性であり、好ましくは、前記不死化細胞株はマウスであり、より好ましくは、前記マウス細胞株は免疫グロブリンを分泌しない骨髓腫であり、さらに一層好ましくは、前記非分泌性骨髓腫のマウス細胞株は、例えばNSO(免疫グロブリンを分泌しないBALB/cマウスのマウス骨髓腫細胞株)である。好ましくは、脾細胞とマウス細胞株の融合の操作はPEG1500の存在下で実施される。特に、免疫マウスの脾臓を、均質化後に、骨髓腫細胞と融合し、適切な培養条件下に置く。

30

【0041】

前記適切な培養条件は、例えば、前記ハイブリドーマの増殖のための適切な培地の使用、例えばDMEM、より好ましくはHATおよびHybridimaxを添加したDMEM培地の使用から成り、さらに一層好ましくは、添加物を含む前記DMEMは、培地の総容量に対して少なくとも10%のHATおよび2%のHybridimaxを含有する。

【0042】

上述したように作製されたハイブリドーマは、HMGA1タンパク質に対するmAb(モノクローナル抗体)を産生する。HMGA1タンパク質に対する認識および結合の高い親和性を有するmAbを得るため、ハイブリドーマの細胞を、マルチウエルプレートでの平板培養を介して制限増殖条件下に置いた。前記平板培養操作は、各々のウエルについて、HMGA1に対する1つの種類の抗体だけを特異的に発現するクローン株を産生する。

40

【0043】

従って、そのもう1つの態様によれば、本発明はまた、クローン集団および個々のクローンの増殖と選択の方法、ならびに組換え抗HMGA1抗体を精製するための方法に関する。

【0044】

好ましくは、増殖方法は、特殊なマルチウエルプレートで前記ハイブリドーマを平板培

50

養し、増殖させ、収集することから成る。

【 0 0 4 5 】

本発明のさらなる態様は、前記増殖方法によって生成された細胞クローンの選択および同定である。好ましくは、前記選択および同定は、間接 E L I S A およびアイソタイプ分析による、一次および二次の 2 つの連続工程で達成される。従って、40 クローンを一次工程から陽性として同定し、二次工程から 32 クローンを同定する。前記培養方法による安定化後、32 のクローンの群から、表 1 に列挙する 20 クローン、特に 15、詳細には 4 クローンを選択し、これらの中で特に 2 G 1 6 または 2 1 G 6 (従って本明細書では 2 G 1 6 と 2 1 G 6 という用語は正確に同じクローンを指す)として同定されたものを 2008 年 3 月 18 日に「Centro Biotecnologie Avanzate」(CBA) in Genoa, Italy に以下の番号: PD 08001 で寄託した。

【 0 0 4 6 】

【表 1】

安定化クローン	
2E3	
3E7	
6F4	
8G6	10
12B3	
15F4	
16C10	
16B10	
16G10	20
18C6	
19C7	
21F7	
21G6	
22E2	30
23H3	
25G1	
26E8	
27B9	
28C8	40
29D8	

## 【0047】

本発明のもう一つの目的は、上述した培養、増殖、選択および同定の前記方法に従って、前記の好ましいクローン2G16 (PD 08001) によって産生されたクローンの亜集団、好ましくは、2008年3月18日にCentro Biotecnologie Avanzate (CBA) in Genoa, Italyに以下の番号：PD 08002で寄託された、21G6/18としても同定されるクローン2G16/18 (従

って本明細書では2 G 1 6 / 1 8と2 1 G 6 / 1 8という用語は正確に同じクローンを指す)の亜集団である。

【0048】

特に、本発明のさらなる目的は、あらゆる単一選択クローンによって産生され、かつ精製工程を介してHMGA1タンパク質を対象とするモノクローナル抗体である、前記細胞クローンによって産生される抗体のパネルである。前記精製工程は、クロマトグラフィーによって、より好ましくはアフィニティークロマトグラフィーによって、さらに一層好ましくはHiTrap-Proteina Gカラム(General Electric)でのアフィニティークロマトグラフィーによって実施される。

【0049】

本発明に従って生産される抗HMGA1 mAbはIgG型である。アイソタイプの評価は、好ましくはISOTRIPキットの指示に従って実施される。

【0050】

さらなる目的は、HMGA1タンパク質に対する前記mAbの工業的生産の方法であり、好ましくは、前記生産方法はバイオリクターにおいて、より好ましくは12.5Kdaのカットオフ値を有するminiPerm/Viva Science Sartoriusバイオリクターにおいて実施される。特に、前述した内容に従ってパネルから選択される任意のクローン細胞を、無血清培地(SFM)およびハイブリドーマ用完全培地、好ましくは75%濃度のSFMおよび25%濃度のハイブリドーマ用完全培地を含む一定容量の培地に接種し、増殖させる。

【0051】

本発明のさらなる目的は、前述したようなクロマトグラフィーによる、HMGA1タンパク質に対するmAbの精製である。

【0052】

本発明のもう1つの目的は、前述したクローンパネルからのmAbの任意の1つを使用した生体液中のHMGA1の定量であり、好ましくは、定量は精製mAb 2 G 1 6 / 1 8を用いて実施される。前述した方法に従って得られる前記mAb 2 G 1 6 / 1 8を、未変性条件および還元条件下でのSDS-PAGEによって、ならびにウエスタンブロット分析(WB)によってさらに特徴づけた。分子量はIgGクラスのもの、すなわち約150Kdであり、WBは、選択した抗体がHMGA1に対して特異的であることを明らかにした。好ましくは、生体液中のHMGA1の定量は、競合型のELISAによって実施される。

【0053】

精製抗体2 1 G 6 / 1 8を、生体液中のHMGA1を定量するためのアッセイの調製に使用した。アッセイは、抗原に対する特異的抗体の存在下で、固相中のHMGA1と溶液中のHMGA1の間での結合の競合に基づく競合的ELISAである。HMGA1濃度の定量は、精製HMGA1タンパク質を使用して得られる標準曲線に対して試料を定量化して実施する。最初のアッセイは、マルチウエルプレートに被覆するために使用するHMGA1の量を決定するためおよび抗体の標準曲線を作成するために実施した。種々のタンパク質濃度を、種々の抗体濃度を有するマイクロタイタープレートに分注し、被覆のために使用すべきHMGA1の最適濃度が0.5 μg/ml(0.05 ml/ウエル)であり、最適抗体濃度が0.002 μg/mlであることを確認した。ペルオキシダーゼに結合した二次抗体の最良希釈を最適化するため、標準抗体の4つの濃度を研究し、二次抗体の希釈を変化させた。選択した希釈は1:2000であった。

【0054】

アッセイおよび結果の再現性と精度を評価するため、マトリックスの等価性に関する検討も実施し、抗体標準曲線の希釈緩衝液への10%および20%血清の添加の影響を研究して、好ましくは、適切な条件は10%である。

【0055】

アッセイの感受性を定義するため、HMGA1の標準曲線を、mAbの任意の1つ、例

10

20

30

40

50

例えば 21G6/18 を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  から  $0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$  の間の様々な濃度の HMGA1 タンパク質と共にインキュベートすることによって決定した。HMGA1 の  $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の区間で用量反応曲線を得た。アッセイの感受性は、生体液中またはリンパ球細胞に由来するタンパク質溶解産物中の HMGA1 の定量を許容するものである。

【0056】

好ましくは、各々のアッセイは以下の同時分析を企図する：

- 種々の濃度（二重/三重盲検評価で  $8 - 2 - 0.5 - 0.125 - 0.031 - 0.0078 - 0.002 - 0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）の精製 HMGA1 に関して得られる標準競合曲線
- 希釈せずに、かつ 1 : 2 希釈して評価される分析試料
- スパイクを添加した分析試料 [スパイクは、回復の完全性を明らかにするために溶液に添加する既知量の分析物を意味する]。

10

生体液を定量するための数値の決定のために、以下を計算するための分析を実施した：

- 標準曲線の競合パーセンテージの平均値
- 相対濃度の対数
- 補間法による線形回帰
- 勾配および  $r^2$ 。

【0057】

アッセイは、 $0.96 < r^2 < 1$  の間の  $r^2$  値に関しておよび予想される既知の値の 25% 未満の変動で HMGA1 のスパイクの回復を示す分析試料に関して信頼できる。アッセイは、分析する試料、例えば検査し得る生体液の試料、例えばリンパ球成分などの、前記液体の成分中に存在する HMGA1 の濃度を計算するための曲線を得ることを可能にする。HMGA1 の定量のためのアッセイは、約  $0.035 \mu\text{g}/\text{ml}$  の測定限界の感受性を示す。

20

【0058】

本発明のさらなる目的は、生体液中またはリンパ球細胞に由来するタンパク質溶解産物中の HMGA1 タンパク質の濃度に関してレベル間の関係をアッセイによって確認するための方法である。

【0059】

本発明はまた、2型糖尿病および肥満などの、インスリン抵抗性に密接に関係する一部の病変の存在（または素因）をアッセイによって確認するための方法に関する。特に、アッセイは、HMGA1 タンパク質の低レベルと、多大の社会的および医学的影響を及ぼすインスリン抵抗性病変の発症の素因（または本格的な存在）との間の関係の測定を可能にする。表 2 に示す結果の場合には、健常被験者についての値は  $7.5 \sim 18.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ （平均  $\pm$  SEM、 $11.51 \pm 0.79$ 、 $n = 15$ ）にわたる濃度区間内にあり、一方インスリン抵抗性被験者については、同じ値は  $2.9 \sim 7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ （平均  $\pm$  SEM、 $5.92 \pm 0.31$ 、 $n = 17$ ）にわたる濃度区間内にある（ $P < 0.0001$ ）。

30

【0060】

本発明はまた、構築物および組換え抗 HMGA1 モノクローナル抗体の使用に関する。

【0061】

本発明の目的はまた、肥満および糖尿病などのインスリン抵抗性に関連する病変の予防/診断/治療のためのキットを含む。

40

【0062】

前記説明に基づき、本発明は以下の態様および目的から成る：

- ・ HMGA1 タンパク質をコードする遺伝子のセンスおよびアンチセンス配列をコードする組換えアデノウイルス構築物の作製
- ・ 作製したアデノウイルス構築物による HEK-293 細胞株の感染
- ・ HEK-293 細胞からの組換え HMGA1 タンパク質の精製
- ・ BALB/c マウスにおける精製組換え HMGA1 タンパク質の接種および免疫
- ・ 犠死させた免疫マウスからの脾臓の切除

50

- ・採取した脾細胞と腫瘍細胞、好ましくは免疫グロブリンを分泌しない骨髓腫の細胞との融合を介したハイブリドーマの作製
- ・適切な増殖および培養条件下での、すなわちマルチウエルプレートでの平板培養を介した、ハイブリッド細胞のプールの増殖
- ・最良クローンを同定するための、E L I S Aによって得たクローンパネルの一次選択（1回目のスクリーニング）
- ・最良クローンの同定および限界増殖条件でのさらなる選択工程である二次選択（2回目のスクリーニング）
- ・アイソタイプの評価
- ・クロマトグラフィーによる抗H M G A 1 m A bの精製
- ・バイオリクターでの生産およびその後のクロマトグラフィーによる抗H M G A 1 m A bの精製

10

先の箇所で述べたようにして得られたm A bの使用を介した、生体液中またはリンパ球細胞に由来するタンパク質溶解産物中のH M G A 1の量を測定するためのアッセイ

生体液中およびリンパ球細胞に由来するタンパク質溶解産物中のH M G A 1タンパク質の濃度に関してのレベル間の関係、ならびに糖尿病または肥満などのインスリン抵抗性に関連する病変の存在または何らかの素因を評価するための方法

- ・肥満、糖尿病などのインスリン抵抗性に関連する病変の予防／診断／治療のためのキット。

20

【0063】

[実施例]

実験部分

【0064】

[実施例1]

【0065】

[組換えアデノウイルス構築物の作製]

1,500塩基対(b p)の長さを有するH M G A 1のc D N Aをベクターp a c - C M V p L p aにセンス(s)およびアンチセンス(a s)方向で挿入し、制限酵素H i n d I Iで切断した後、粘着末端を利用して組換え構築物：p a c - C M V - H M G A 1 sおよびp a c - C M V - H M G A 1 a sを作製した。得られたベクターとアデノウイルスp J M 17をヒト胚腎細胞株H E K 2 9 3 ( A T C C )に同時トランスフェクトし、組換えウイルス構築物A d 5 C M V - H M G A 1 ( Y ) s ( A d - Y s )およびA d 5 C M V - H M G A 1 ( A d - Y a s )を作製した。ウイルス株をH E K 2 9 3細胞において増殖させ、注入の36~40時間後に収集した後、溶解した。ウイルス力価を測定し、H E K 2 9 3細胞におけるプラーク形成単位(p f u)を評価した。ベクターA d C M V - l a c Z ( A d - l a c Z ) ( Q u a n t u m B i o t e c h n o l o g y )を対照として使用した。

30

【0066】

[組換えH M G A 1タンパク質の作製]

H M G A 1 bのc D N Aをプラスミドp E T 2 c / H i sにクローニングした。大腸菌B L 2 1株の細胞を発現ベクターp E T 2 c / H i s - H m g a 1 bで形質転換し、L B中で増殖させた。1 Mイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド(I P T G) ( P r o m e g a ) 2 0 0 μ lを添加することによってタンパク質の発現を誘導した。細菌を、フッ化フェニルメチルスルホニル(P M S F)、プロテアーゼ阻害剤(R o c h e)およびT r i t o n X - 1 0 0を添加した冷P B S ( 1 4 0 m M N a C l、2 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 4 ) 2 0 m l中に最終濃度1%で再懸濁した。フレンチプレスを使用して細菌の溶解を実施した。硫酸ニッケル活性化樹脂を溶解試料の上清に添加した。P B S中最終濃度5 0 0 m Mのイミダゾールから成る溶液で溶出を実施した。

40

【0067】

[B A L B / cマウスの免疫]

50

精製組換えHMG A 1タンパク質を使用して、7週齢の3匹の雌性BALB/cマウスを免疫した。マウスに、融合の60日前に腹腔内経路で不完全フロイントアジュバント中のタンパク質50 $\mu$ gを注射した。同じ操作を同じ条件で30日後に実施した。マウス血清中の抗体力価を、処置動物の尾から採取した試料から間接ELISAによって測定した。タンパク質50 $\mu$ gのさらなる注射を、融合の3日前に1:10,000より高い抗体力価を示した動物に関して実施した。

【0068】

[ハイブリドーマの作製および1回目の限界希釈(LD)]

60日間の免疫の終了時にマウスを犠牲させ、無菌条件下で各々の動物から脾臓を採取して、ハイブリドーマの形成用と凍結用の2つの部分に分けた。凍結する脾臓部分は、FCS(90%)および10%DMSO(ジメチルスルホキシド)中に保持する。

10

【0069】

脾臓の部分を機械的解離によって均質化し、以下のように処理した：

- DMEM培地5ml中で1回目の洗浄
- DMEM培地30~40ml中で2回目の洗浄
- 脾細胞と、免疫グロブリンを分泌しないマウスの骨髓腫のNSOマウス細胞株との融合。5 $\times$ 10<sup>7</sup>のNSO細胞の量を、PEG1500を添加した培地20mlに懸濁した(5個の脾細胞に対して約1個のNSO細胞)。

- 10%HAT、2%Hybridimaxを添加したDMEMへのハイブリドーマの再懸濁

20

- 96穴を有する10のプレートへのハイブリドーマの接種

一次スクリーニング、1回目のLD

【0070】

陽性クローン、すなわちHMG A 1-GSTタンパク質に対する組換えモノクローナル抗体を産生するクローンを同定するためにクローン集団に関して間接ELISAを実施した。

【0071】

96穴のプレート(Hysorb NUNC)をpH7.2のPBS 1x中1mg/mlの濃度のHMG A 1溶液で被覆した。溶液50 $\mu$ lの容量を各々のウエルに分配し、4で約12時間インキュベートした。

30

【0072】

このように操作したプレートをPBS-Tween20 0.05%中で3~4回洗浄し、次に室温で1時間、PBS-BSA 3%中で飽和させた。この操作により非特異的結合を回避することができる。

【0073】

プレートから内容物を取り出し、50 $\mu$ l/ウエルの容量のハイブリドーマの上清を室温で1時間半のインキュベーション時間中添加した。

【0074】

次のプレートを洗浄し、1:1000希釈のペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体と共に室温で1時間インキュベートした。

40

【0075】

3~4回洗浄した後、プレートを、クエン酸緩衝液、pH5、1.7mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中1mg/mlのOPD(O-フェニレンジアミン)の溶液200 $\mu$ l/ウエルと共にインキュベートした。対照条件(抗原なしおよび抗体なし)に関して490nmの光学密度で色の発現を観察する。

【0076】

40の陽性クローンを同定し、これらの中でクローン21G6(PD 08001)が好ましかった。

【0077】

[二次スクリーニング、2回目のLD]

50

H M G A 1 を認識する特異的組換え抗体を産生する 40 の陽性クローンを L D 法でさらに選択した。クローンを 30 細胞 / プレート ( 96 穴のプレートにおいて ) の細胞密度で接種し、3 プレート / クローンの三重サンプリングとした。

【 0078 】

制限増殖条件は、抗原に対する特異的抗体を産生するモノクローナル細胞株を得ることを可能にする。一次選択についての表 1 に示すように、それぞれ選択した 40 および 32 クローンのうちで、および 20 クローンの培養での安定化後に、好ましいクローンは 2 G 16 / 18 ( P D 08002 ) である。

【 0079 】

[アイソタイプによるクローンの分類]

10

[組換え抗 H M G A 1 モノクローナル抗体のアイソタイプの決定]

I s o s t r i p キットを使用して免疫グロブリンのサブクラスを決定した。試験する上清を P B S 中で 1 / 10 希釈し、マウス免疫グロブリンの軽鎖に対する直接抗体で被覆した凍結乾燥ビーズを含む試験管に 150  $\mu$  l を分注した。特異的抗マウス抗体が固定化されたストリップを、再懸濁した試薬を含む試験管に挿入した。キットの製造者によって提供される指示に従って、対照レーンの出現後に、特異的抗体クラスの特徴的なレーン、すなわち I g G の存在を認めた。

【 0080 】

[ S D S - P A G E およびウエスタンブロット法]

レムリ緩衝液中の前記 m A b を、適切な対照と共に、均一な密度 ( 20 % ポリアクリルアミド ) および勾配 ( 4 ~ 15 % または 8 ~ 25 % のポリアクリルアミド ) を有する前充填アクリルアミドゲル ( P h a s t G e l , G E ) 上に置いて、産生された抗体の分子量の正確さを評価する。S D S - P A G E 用の緩衝液 ( S D S - B u f f e r S t r i p s , G E ) を使用して、電気泳動システム ( P h a s t S y s t e m , G E ) を用いて 15 で電気泳動を実施する。次に試料をニトロセルロースに転写するために、図 1 に示すように別のゲルを調製する。転写装置 ( G E ) を用いて転写を実施し、転写後、ニトロセルロース膜で E L I S A を実施して、二次ペルオキシダーゼ結合抗マウス I g G 抗体 ( S i g m a ) と共にインキュベートし、その後 N , N - ジメチルホルムアミドで複合体を明らかにする。

20

【 0081 】

30

[実施例 2]

【 0082 】

[ m i n i P E R M バイオリアクターにおけるモノクローナル抗体の生産]

m i n i P E R M バイオリアクターにおいて S M F ( 無血清培地 ) での適応後にモノクローナル抗体の選択生産を実施した。この単回使用の円筒形バイオリアクターは、細胞を接種する培養チャンパー ( 容積 30 m l ) および細胞に栄養を与えるための培地を入れる、培養チャンパーに取り付けられたプラスチック容器 ( 容積 350 m l ) を含んだ。チャンパーと容器は、栄養分だけを培養チャンパーに通過させ、抗体が容器内に拡散して希釈されるのを防ぐ限外ろ過膜によって分離されている。バイオリアクターを 37 、 5 % C O <sub>2</sub> のインキュベーター内の回転ローラー上に置く。この方法は、非常に濃縮された容積

40

【 0083 】

[実施例 3]

【 0084 】

[クロマトグラフィーによる精製]

H i T r a p - P r o t e i n G ( G e n e r a l E l e c t r i c ) でのアフィニティークロマトグラフィーによって I g G クラス抗体の精製を実施する。カラムを 20 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 4 で再生し、リン酸緩衝液 p H 8 で再平衡させて、抗体を含む初期試料をカラムに負荷する。同じ緩衝液で洗浄した後、抗体をグリシン緩衝液 ( 再蒸留水中 0 . 1 M グリシン、p H 2 . 7 ) で溶出し、次に 70 % 飽和の硫酸アンモニウム中の

50

沈殿で濃縮し、その後6～8000Daのカットオフ値を有する膜(Millipore)を使用してPBSに対して透析する。透析した試料を分光光度計によってタンパク質量に関して定量し(Biorad)、280nmで読み取る。

【0085】

[SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法]

産生された抗体の分子量の正確さを調べるため、それらを、適切な対照と共に、レムリ緩衝液中で均一な密度(20%ポリアクリルアミド)および勾配(4～15%または8～25%のポリアクリルアミド)を有する前充填アクリルアミドゲル(PhastGel, GE)に負荷する。SDS-PAGE用の緩衝液(SDS-Buffer Strips, GE)を使用して、電気泳動システム(PhastSystem, GE)を用いて15  
10  
で電気泳動を実施する。試料をニトロセルロースに転写するために別のゲルを調製する。転写装置(GE)を用いて転写を実施し、転写後、ニトロセルロース膜上でELISAを実施して、二次ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗体(Sigma)と共にインキュベートし、その後N,N-ジメチルホルムアミドで複合体を明らかにした。

【0086】

[無血清培地への適応および生産速度]

選択した細胞クローンを $1 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>の濃度で四重に反復して24穴のプレートに接種し、24穴のプレートにおいて、ひとたびそれらが集密に達すれば、漸次、ハイブリドーマ用完全培地中のより高い濃度の無血清培地(SFM)(0%、25%、50%、75%、100%)中に入れた。細胞の適応を、細胞の生存能および組換え抗HMG A  
20  
1モノクローナル抗体の産生として評価した。適応細胞を6日間、フラスコでの生産速度検査(production kinetic)に供し、同時に以下のパラメータ：生存能、グルコース消費、乳酸産生、抗HMG A 1抗体の産生を制御した。

【0087】

[実施例4]

【0088】

[バイオリクターにおける生産]

少なくとも80%の生存能を有する選択細胞クローンを計数し、トリパンブルーで着色した。 $5.5 \times 10^7$ 細胞を、75%SF Mおよび25%ハイブリドーマ用完全培地を含む一定容量の培地に接種した。接種は、12.5Kdaのカットオフ値を有するmini  
30  
Perm/Vivascience Sartorius生産モジュールにおいて滅菌シリンジによって実施した。生産モジュールを供給モジュールに取り付け、バイオリクター全体をCO<sub>2</sub>インキュベーター中の回転支持体上で攪拌した。生存能、生産および代謝パラメータを調べるため、生産モジュールにおいて層流フード下で滅菌シリンジを使用して試料を採取した。生産工程の終了時に、約35mlの容量の抗体を細胞と共に生産モジュールから採取し、次に抗体を遠心分離によって細胞から分離した。実施例3で述べた方法に従って、抗体をHiTrap-Proteina Gカラム(General Electric)でのアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

【0089】

[生体液中のHMG A 1を定量するための競合的ELISA]

ELISA用の96穴のプレート(Maxisorp-NUNC)をPBS pH7.3中のHMG A-hisの溶液0.05ml/ウエル(1μg/ml)と共に4  
40  
で約12時間インキュベートした。インキュベーション後、PBSを捨てて満たすという工程によってプレートを洗浄し、その後PBS中のBSAの溶液0.1ml/ウエルにより室温で2時間ブロックした。

【0090】

プレートを洗浄せずに空にした。あらかじめPBS中室温で2時間インキュベートした以下の成分：0.3%BSA、0.05%Tween 20の溶液0.05ml/ウエルをプレートに添加した。種々の実験条件を試験した：

【0091】

10

20

30

40

50

1) 固定量のHMGA1と漸減濃度の抗HMGA1抗体(1 $\mu$ g/ml~0.001 $\mu$ g/ml)

2) 固定濃度の抗HMGA1抗体と漸減濃度のHMGA1またはHMGA1を含有する生物学的試料

3) 対照細胞に関して1)および2)の条件、次に漸減濃度の抗HMGA1抗体および/または緩衝液単独。

プレートを室温で2時間インキュベートし、その後PBS-Tween 0.05%で洗浄した。

#### 【0092】

PBS-Tween 0.05%中で1:1000希釈した二次ペルオキシダーゼ結合抗マウスIg抗体F(ab')<sub>2</sub> 0.05ml/ウエルをプレートに添加し、室温で1時間半放置してインキュベートした。プレートをPBS-Tween 0.05%で洗浄し、その発色基質0.15ml(0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5中1g/Lのo-フェニレンジアミン(OPD)および3.5mmol/Lの過酸化水素)を添加した。30分後に0.05ml/ウエルの4.5M硫酸を添加することによって発色を停止させ、10分後にTEKSCANを用いて492nmで吸光度を測定した。mAb濃度の関数としてプロットすることによって、すなわち吸光度(1mg/Lでの最大吸光度)の対数変換によって標準曲線を得た。

10

#### 【0093】

#### [HMGA1の定量]

精製抗体21G6/18を、生体液中のHMGA1を定量するためのアッセイの調製に使用した。アッセイは、抗原に対する特異的抗体の存在下で、固相中のHMGA1と溶液中のHMGA1の間での結合の競合に基づく競合的ELISAである。HMGA1濃度の定量は、精製HMGA1タンパク質を使用して得られた標準曲線に対して試料を滴定して実施する。最初のアッセイは、マルチウエルプレートを被覆するために使用するHMGA1の量を決定するためおよび抗体の標準曲線を作成するために実施した。種々のタンパク質濃度を、種々の抗体濃度を有するマイクロタイタープレートに分注し、被覆のために使用するべきHMGA1の最適濃度が0.5 $\mu$ g/ml(0.05ml/ウエル)であり、最適抗体濃度が0.002 $\mu$ g/mlであることを確認した。ペルオキシダーゼに結合した二次抗体の最良希釈を最適化するため、標準抗体の4つの濃度を試験し、二次抗体の希釈を変化させた。選択した希釈は1:2000であった。

20

30

#### 【0094】

アッセイおよび結果の再現性と精度を確実にするため、マトリックスの等価性に関する検討も実施し、抗体標準曲線の希釈緩衝液への10%および20%血清の添加の影響を試験した。最適条件は10%であった。

#### 【0095】

ひとたび使用する最良抗体濃度が決定されれば、アッセイの感受性を定義するため、抗体を10 $\mu$ g/ml~0.001 $\mu$ g/mlの間の様々な濃度のタンパク質と共にインキュベートすることによってHMGA1の標準曲線を決定した。HMGA1の0.01~0.1 $\mu$ g/mlの区間で用量反応曲線を得た。アッセイの感受性は、生体液中またはリンパ球細胞に由来するタンパク質溶解産物中のHMGA1の定量を許容するものである。

40

#### 【0096】

各々のアッセイは以下の同時分析を企図する:

- 二重/三重盲検評価で種々の濃度(8-2-0.5-0.125-0.031-0.0078-0.002-0 $\mu$ g/ml)の精製HMGA1に関して得られる標準競合曲線
- 希釈せずに、かつ1:2希釈して評価される分析試料
- スパイクを添加した分析試料。

#### 【0097】

標準曲線の競合パーセンテージの平均値および相対濃度の対数を計算した。切片、勾配および $r^2$ パラメータを、線形回帰関数を用いて計算した。 $r^2$ 値<0.96の場合および

50

／またはH M G A 1スパイクを含む試料が期待値から > 2 5 % 逸脱する場合は、アッセイを反復しなければならない。このようにして得られた曲線から、分析する試料中に存在するH M G A 1の濃度を計算することが可能である。このようにして調製したアッセイは、0 . 0 3 5  $\mu$  g / m l の測定限界を示す。

【 0 0 9 8 】

生物学的試料の血清中のH M G A 1を定量するための競合的E L I S Aの結果を表2に示す。

【 0 0 9 9 】

特にシリーズ1とシリーズ2に関する表2では、異なる被験者の試料を異なる時点で定量した。特に、シリーズ1では試料1、2、4、5、6、7、8、10、11は健常対照被験者を示し、列挙される残りの試料は、おそらくインスリン抵抗性または糖尿病被験者を示す。特に、シリーズ2では試料1、2、3、4、5、6は健常対照被験者を示し、列挙される残りの試料は、おそらくインスリン抵抗性または糖尿病被験者を示す。 $\mu$  g / m lで示す数値は、試料中のH M G A 1タンパク質の濃度を表す。

【 0 1 0 0 】

【表 2】

シリーズ 1		シリーズ 2	
試料番号	HMGA1 $\mu\text{g/ml}$	試料番号	HMGA1 $\mu\text{g/ml}$
1	10.3	1	11.7
2	11.9	2	7.5
4	10.1	3	9.7
5	15.4	4	12.8
6	11.6	5	8.1
7	12.4	6	7.8
8	14.8	7	7.0
10	18.7	8	5.2
11	9.9	9	2.9
12	6.6	10	4.2
13	5.6	11	7.3
14	7.2	12	6.0
15	5.3	13	6.1
16	5.2	14	4.1
17	7.5	15	6.9
18	6.8	16	6.8
19	タンパク質なし	19	タンパク質なし

10

20

30

【0101】

40

[実施例 5]

【0102】

[HMGA1の定量]

精製抗体 21G6 / 18 を、リンパ球からの核タンパク質抽出物中の HMGA1 の量を測定するために使用した。アッセイは、抗原に対する特異的抗体の存在下で、固相中の HMGA1 と溶液中の HMGA1 の間での結合の競合に基づく競合的 ELISA である。HMGA1 濃度の定量は、精製 HMGA1 タンパク質を使用して得られる標準曲線に対して試料を定量化して実施する（実施例 4 で述べたように）。

【0103】

リンパ球からの核タンパク質抽出物中の HMGA1 を定量するための競合的 ELISA

50

の結果を表 3 に示す。

【 0 1 0 4 】

特に、健常被験者と罹患被験者に関する表 3 において、種々の個体の定量した試料を示す。表に示す値は、実施例 4 の結果から既に明らかになった内容を確認する、すなわち H M G A 1 の低濃度は糖尿病またはインスリン抵抗性の病的状態に関連する。μ g / m l で表した表 3 に示す値は、試料中の H M G A 1 タンパク質の濃度を表す。健常被験者についての欄では、一部の試料 ( 1 1、1 2、1 8、2 0、2 3、2 4、2 5、2 9 ) は、H M G A 1 の高濃度が健常被験者の特徴であるという一般的傾向から逸脱する。試験は、再現性および統計的有意性として理解される、その信頼性を確認する。P 値は、実際に 0 . 0 5 より低く、詳細には  $P < 0 . 0 0 1 5$  である。表 3 に示すデータは、従って、試験の高い信頼性を確認する。

10

【 0 1 0 5 】

また、罹患被験者からの試料中の H M G A 1 タンパク質の濃度の値を分析することにより、タンパク質濃度の検出限界が具体的にどの程度有効であり、非常に低い濃度値でも識別することができ、極めて近い数値範囲でも高い感受性を有するかを確認することも可能である。データは、 $0 . 0 3 5 \mu g / m l$  をアッセイにおける H M G A 1 の濃度の検出限界として示す、実施例 4 から既に明らかになった内容を確認する。

【 0 1 0 6 】

【表 3】

生物学的試料中のHMG A 1の定量

健常被験者		罹患被験者	
試料	µg/ml	試料	µg/ml
1	5.12	31	2.60
2	5.65	32	1.23
3	10.90	33	1.51
4	10.90	34	1.55
5	16.49	35	1.99
6	7.52	36	3.38
7	7.42	37	6.20
8	7.63	38	4.12
9	4.70	39	3.82
10	8.43	40	1.89
11	2.02	41	4.13
12	2.65	42	3.61
13	6.57	43	4.52
14	7.92	44	4.37
15	8.50	45	3.18
16	4.56	46	1.38
17	3.25	47	3.46
18	2.88	48	5.63
19	7.72	49	4.28
20	1.84	50	1.23
21	5.99	51	2.95
22	6.39	52	2.35
23	2.15	53	4.40
24	1.99	55	2.80
25	2.32	56	5.24
26	4.56	57	6.90
27	5.87	58	3.66
28	4.04	59	4.01
29	2.77	60	5.13
30	3.54		

10

20

30

40

## 【 図 1 】

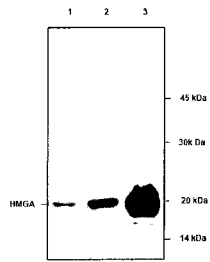


図 1 : 細胞溶解産物からの HMGA 1 の発現のウエスタンブロット分析。  
ライン (1) トランスフェクトしていない HEK 293 細胞、(2) HMGA で  
トランスフェクトした HEK 293 細胞、(3) 組換え HMGA 1 タンパク質。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2009/005435
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61K39/00 C07K16/18 A61P3/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCALA S ET AL: "Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 11 APR 2000, vol. 97, no. 8, 11 April 2000 (2000-04-11), pages 4256-4261, XP002540049 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-33
	----- -/--	
<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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  12 August 2009		Date of mailing of the international search report  21/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Rankin, Robert

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2009/005435

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SCHLUETER C ET AL: "HMGA1 proteins in human atherosclerotic plaques" PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE, GUSTAV FISCHER, STUTTGART, DE, vol. 201, no. 2, 8 April 2005 (2005-04-08), pages 101-107, XP025338646 ISSN: 0344-0338 [retrieved on 2005-04-08] the whole document</p>	1-33
A	<p>HOCK ROBERT ET AL: "HMG chromosomal proteins in development and disease." TRENDS IN CELL BIOLOGY FEB 2007, vol. 17, no. 2, February 2007 (2007-02), pages 72-79, XP005876271 ISSN: 1879-3088 the whole document</p>	1-33

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>		C 1 2 N 15/00		C
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, 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, JP, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アルフレード フスコ  
 イタリア国 イ - 8 0 1 3 1 ナポリ ヴィア パンシーニ 5 シーオー インスティトゥート  
 ディ エンドクリノロジア エド オンコロジア スペリメンターレ デル コンシリオ ナツ  
 ィオナーレ デレ リチェルケ

(72)発明者 アントニオ オルランディ  
 イタリア国 イ - 2 0 1 2 9 ミラノ ヴィアーレ レジーナ ジョヴァンナ 17 シーオー  
 アレータ インテルナツィオナール ソチエタ ア レスポンサビリタ リミタータ

(72)発明者 マリア ルイーザ ノッリ  
 イタリア国 イ - 2 0 1 2 9 ミラノ ヴィアーレ レジーナ ジョヴァンナ 17 シーオー  
 アレータ インテルナツィオナール ソチエタ ア レスポンサビリタ リミタータ

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 BA80 CA02 CA04 DA02 GA01 HA03 HA15  
 4B064 AG01 AG27 CA20 CC15 CC24 CE12 CE13 DA13  
 4B065 AA90X AA90Y AA95X AB01 AB04 AC14 BA01 CA24 CA25 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 DA86 EA50 FA72 FA74  
 GA26

专利名称(译)	抗HMGA1单克隆抗体，其制备方法及其用于定量HMGA1的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011523352A</a>	公开(公告)日	2011-08-11
申请号	JP2011506792	申请日	2009-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	数组数据国际米兰哦单克隆Sochie数据数组赞助拓弥塔里首发		
申请(专利权)人(译)	Areta国际米兰哦单克隆Sochietà一个Resuponsabirita Rimitata		
[标]发明人	アルフレードフスコ アントニオオルランディ マリアルイーザノッリ		
发明人	アルフレード フスコ アントニオ オルランディ マリア ルイーザ ノッリ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N7/00 C12N5/10 C07K16/18 C12P21/08 C12N15/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0008 A61K2039/5256 A61P3/08 C07K16/24 C12N2710/10022		
FI分类号	C12N15/00.A C12N7/00 C12N5/00.102 C07K16/18 C12P21/08 C12N15/00.C G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/CE13 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	森裕之		
优先权	102008901622835 2008-04-30 IT		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一组针对高迁移率族A 1蛋白 ( HMGA1 ) 的单克隆抗体及其制备方法，以及所述抗体用于定量测定生物体液或蛋白质中HMGA1的用途。淋巴细胞。本发明还涉及用于评估与HMGA1蛋白表达相关的风险因子的诊断试剂盒。

安定化クローン
2E3
3E7
6F4
8G6
12B3
15F4
16C10
16B10
16G10
18C6
19C7
21F7
21G6
22E2
23H3
26G1
26E8
27B9
28C8
29D8