

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/079393

発行日 令和1年9月12日(2019.9.12)

(43) 国際公開日 平成30年5月3日(2018.5.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 6 4
C07K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5
C12P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
GO1N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
GO1N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

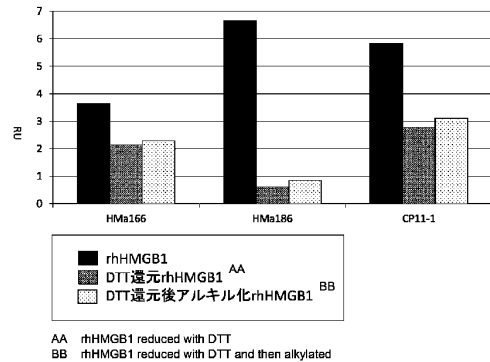
出願番号 特願2018-547610 (P2018-547610)	(71) 出願人 000238201 扶桑薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/037789	
(22) 国際出願日 平成29年10月19日(2017.10.19)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-209510 (P2016-209510)	(74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日 平成28年10月26日(2016.10.26)	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝
	(74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊
	(74) 代理人 100142929 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジスルフィド型HMGB1 特異的抗体、ジスルフィド型HMGB1 の測定方法および測定用キット、ならびに、還元型HMGB1、ジスルフィド型HMGB1、トロンビン分解HMGB1等の

(57) 【要約】

ジスルフィド型HMGB1 に特異的な反応を示す抗体が提供された。また、当該抗体によるジスルフィド型HMGB1 を特異的に測定する方法および測定用キットまたは試薬が提供された。さらに、当該抗体およびジスルフィド型HMGB1 と還元型HMGB1 の両方に結合し d e s - HMGB1 に結合しない抗体による全てのHMGB1 の測定方法および測定用キットまたは試薬が提供された。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジスルフィド型 H M G B 1 に特異的に結合する抗体。

【請求項 2】

ジスルフィド型 H M G B 1 の 2 3 番目のシステイン (C ₂₃) と 4 5 番目のシステイン (C ₄₅) によるジスルフィド結合を含む抗原決定基を認識する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

M D - 2 への結合活性を有するジスルフィド型 H M G B 1 および / またはサイトカイン誘導能を持つジスルフィド型 H M G B 1 に対する中和活性を有する、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の重鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の軽鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む抗体であって、

配列番号 : 2 5 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、

配列番号 : 2 7 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、

配列番号 : 2 9 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3、

配列番号 : 3 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、および

配列番号 : 3 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 を含む、

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体。

20

【請求項 5】

受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体であって、配列番号 : 4 7 または 7 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 : 4 9 または 7 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

30

【請求項 6】

受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の抗体の断片であって、ジスルフィド型 H M G B 1 に対して特異的な結合活性を有する断片。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体のキメラ抗体またはヒト化抗体。

40

【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体のヒト抗体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 に記載の抗体の可変領域をコードする DNA を定常領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込み、当該ベクターを宿主に導入し、抗体の可変領域および定常領域を産生させる工程を含む、請求項 9 に記載の抗体の製造方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 7、9 および 10 のいずれかに記載の抗体と試料とを接触させる工程を含む、該試料中のジスルフィド型 H M G B 1 の測定または検出方法。

50

【請求項 13】

ジスルフィド型 H M G B 1 の測定または検出を免疫試験方法によって行うことを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 7、9 および 10 のいずれかに記載の抗体を含む、ジスルフィド型 H M G B 1 の測定または検出用キットまたは試薬。

【請求項 15】

免疫試験方法において使用するための、請求項 14 に記載のキットまたは試薬。

【請求項 16】

以下 (a) および (b) に記載の抗体と試料とを接触させる工程を含む、該試料中の全ての H M G B 1 の測定または検出方法： 10

(a) 請求項 1 ~ 7、9 および 10 のいずれかに記載の抗体、および

(b) ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体。

【請求項 17】

全ての H M G B 1 がジスルフィド型 H M G B 1、還元型 H M G B 1 およびトロンピン分解 H M G B 1 を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、ジスルフィド型 H M G B 1 の 2 番目のグリシン (G ₂) と 17 番目のアラニン (A ₁₇) の間のアミノ酸残基を含む抗原決定基を認識する抗体である、請求項 16 または 17 に記載の方法。 20

【請求項 19】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の重鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の軽鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む抗体であって、 30

配列番号：51 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、

配列番号：53 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、および

配列番号：55 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 を含む抗体である、

請求項 16 ~ 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体であって、配列番号：63 または 74 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗体である、請求項 16 ~ 19 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 21】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 である、請求項 16 ~ 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

全ての H M G B 1 の測定または検出を免疫試験方法によって行うことを特徴とする、請求項 16 ~ 21 のいずれかに記載の方法。 50

【請求項 23】

以下 (a) および (b) に記載の抗体を含む、試料中の全ての H M G B 1 の測定または検出用キットまたは試薬：

(a) 請求項 1 ~ 7、9 および 10 のいずれかに記載の抗体、および

(b) ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体。

【請求項 24】

全ての H M G B 1 がジスルフィド型 H M G B 1、還元型 H M G B 1 およびトロンピン分解 H M G B 1 を含む、請求項 23 に記載のキットまたは試薬。

【請求項 25】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、ジスルフィド型 H M G B 1 の 2 番目のグリシン (G ₂) と 17 番目のアラニン (A ₁₇) の間のアミノ酸残基を含む抗原決定基を認識する抗体である、請求項 23 または 24 に記載のキットまたは試薬。

【請求項 26】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の重鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の軽鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む抗体であって、

配列番号：51 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、

配列番号：53 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、および

配列番号：55 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 を含む抗体である、

請求項 23 ~ 25 のいずれかに記載のキットまたは試薬。

【請求項 27】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体であって、配列番号：63 または 74 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗体である、請求項 23 ~ 26 のいずれかに記載のキットまたは試薬。

【請求項 28】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 である、請求項 23 ~ 27 のいずれかに記載のキットまたは試薬。

【請求項 29】

免疫試験方法において使用するための、請求項 23 ~ 28 のいずれかに記載のキットまたは試薬。

【請求項 30】

ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体。

【請求項 31】

ジスルフィド型 H M G B 1 の 2 番目のグリシン (G ₂) と 17 番目のアラニン (A ₁₇) の間のアミノ酸残基を含む抗原決定基を認識する、請求項 30 に記載の抗体。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の重鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の軽鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む抗体であって、

配列番号：51 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、

配列番号：53 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、および

配列番号：55 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 を含む、

請求項 30 または 31 に記載の抗体。

10

【請求項 33】

受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体であって、配列番号：63 または 74 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 30 ~ 32 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 34】

受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 。

20

【請求項 35】

受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 1 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 C P 1 1 - 1 。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炎症反応を惹起し TNF などのサイトカインを放出するジスルフィド型 H M G B 1 に特異的な抗体、ジスルフィド型 H M G B 1 の測定方法および測定試薬、ならびに、還元型 H M G B 1、ジスルフィド型 H M G B 1、トロンビン分解 H M G B 1 等の全ての H M G B 1 を定量することが可能な測定方法および測定試薬等に関する。本発明は臨床検査、臨床病理学、免疫学、医学などの生命科学分野、とくに炎症や敗血症など重篤な病態の治療、診断、研究等の分野に属する。

30

【背景技術】

【0002】

High Mobility Group Protein BOX 1 (以下「H M G B 1」) は、クロマチン構造に含まれる非ヒストンタンパク質であり、多くの高等動植物に共通して含まれるタンパク質である。H M G B 1 は樹状細胞や単球などに作用し、成熟化・浸潤・サイトカインや炎症メディエーターの放出を誘導する。

【0003】

1999年、Wangら(非特許文献1)により、H M G B 1 が敗血症のマーカーとなり得ることが示され、H M G B 1 は敗血症性ショック時の晩期に発現するメディエーターとして注目されるようになった。また、H M G B 1 は、敗血症発症時に核外へと遊離され、重度の細胞障害性を示すことから、敗血症時の致死性に関与する可能性が指摘されている。

40

【0004】

敗血症とは、細菌感染などの外因性因子、pathogen-associated molecular patterns (病原体関連分子パターン：PAMPs)、生体内で生じた壊死細胞、障害を受けた組織由来の分子類 (Damage Associated Molecular Patterns：DAMPs) 等により、内因性炎症メディエーターであるサイトカインが血流へ放出され、全身症状を伴う急性炎症反応である。H M G B 1 は DAMPs の一種であると考えられている。

50

【 0 0 0 5 】

一方、HMGB1は、複数の酸化還元状態で存在し、HMGB1のジスルフィド型のみが炎症を引き起こすことが知られている（非特許文献2）。Yangらは、HMGB1のジスルフィド型のみが*in vitro*において高い親和性でMD-2に結合し、マウスマクロファージが、炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子（TNF）を分泌するのを促進することを発見した（非特許文献3）。また、還元型のHMGB1はケモカイン誘導能を持つことが知られている（非特許文献4）。

【 0 0 0 6 】

また、WO2014/147873 A1（特許文献1）では、HMGB1はトロンピンにより10番目のアルギニン（R₁₀）と11番目のグリシン（G₁₁）の間で切断され（全長HMGB1からHMGB1のN末端側のアミノ酸M1-R10が切断され）、新たに露呈したN末端アミノ酸残基「GKMSS・・・」を有するHMGB1の分解物が生じることが報告され、当該分解物がdes-HMGB1と名付けられている。また、WO2014/147873 A1では、des-HMGB1は不活性化され、細胞障害性が低くなることが報告されている。

10

【 0 0 0 7 】

敗血症等の重篤な患者の状態を把握し、必要に応じて血液浄化療法を行うなどの治療介入の為にジスルフィド型HMGB1の測定が特に重要である。また、ジスルフィド型HMGB1に加え、分解されたdes-HMGB1や還元型HMGB1などを含め、全HMGB1量とジスルフィド型HMGB1量の比などを検討する事で、患者の病態背景の正確な把握などが可能となる。しかしながら、ジスルフィド型HMGB1のみを特異的に測定出来るキットや、様々な構造の異なるHMGB1を測定出来るキットは未だ存在しなかった。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 WO2014/147873 A1 公報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 SCIENCE、 285、 248～251、 1999

30

【 非特許文献 2 】 Journal of Leukocyte Biology, Volume 93, page 865-873, June 2013

【 非特許文献 3 】 The Journal of Experimental Medicine, Vol. 212, No. 1, 5-14, 2015

【 非特許文献 4 】 The Journal of Experimental Medicine, Vol. 209 No. 9 1519-1528, 2012

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

前述したように、ジスルフィド型HMGB1のみを特異的に認識する抗体や、ジスルフィド型HMGB1のみを特異的に測定出来るキット、様々な構造の異なるHMGB1を測定出来るキットはこれまで存在しなかった。そのため、これまでは、サイトカイン誘導能のあるジスルフィド型HMGB1も、その他の生理活性が乏しい構造を持ったHMGB1と同時に量り込まれていた可能性が有る。したがって、HMGB1の血中濃度と病態との関連性を正確に把握できていなかった可能性を否定できない。

40

【 0 0 1 1 】

また、モノクローナル抗体などの作製の際ペプチド等を用いて免疫する事があるが、抗原が酸化されて期待しない構造をとってしまうことがあるため、通常、Cysが複数個入っている部分を免疫原として使用することは避けられる。また、抗体産生のためには抗原が細胞内でプロセシングされて、抗原提示細胞に提示される必要があるが、その際にも、抗原が酸化還元されて期待しない構造を取ることが考えられる。したがって、ジスルフィド

50

型 H M G B 1 を含め、ジスルフィド結合を有する構造を認識する抗体は、一般的に作製が困難である。

【 0 0 1 2 】

このように、ジスルフィド型 H M G B 1 を特異的に測定する手段の確立が求められている一方で、ジスルフィド結合を有する H M G B 1 に対する抗体の作成は困難であった。また、患者の病態背景の正確な把握のためには、様々な構造の異なる H M G B 1 を測定する必要がある。

本発明はこのような状況を鑑みてなされたものであり、ジスルフィド型 H M G B 1 特異的抗体、ジスルフィド型 H M G B 1 の測定方法および測定試薬、ならびに、還元型 H M G B 1、ジスルフィド型 H M G B 1、トロンビン分解 H M G B 1 (d e s - H M G B 1) 等の全ての H M G B 1 を定量することが可能な測定方法および測定試薬等を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を行った。その結果、本発明者らは、ジスルフィド型 H M G B 1 に特異的な反応を示す抗体を見出すとともに、当該抗体を使用してジスルフィド型 H M G B 1 を特異的に測定する方法を確立した。また本発明者らは、ジスルフィド型 H M G B 1 特異的抗体と、ジスルフィド型 H M G B 1 および還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体等、複数の特徴的な抗体を組み合わせることで、全 H M G B 1 を定量できる測定法を作製した。本発明はこのような知見

【 0 0 1 4 】

〔 1 〕ジスルフィド型 H M G B 1 に特異的に結合する抗体。

〔 2 〕ジスルフィド型 H M G B 1 の 2 3 番目のシステイン (C ₂₃) と 4 5 番目のシステイン (C ₄₅) によるジスルフィド結合を含む抗原決定基を認識する、〔 1 〕に記載の抗体。

〔 3 〕 M D - 2 への結合活性を有するジスルフィド型 H M G B 1 および / または サイトカイン誘導能を持つジスルフィド型 H M G B 1 に対する中和活性を有する、〔 1 〕または〔 2 〕に記載の抗体。

〔 4 - 1 〕 受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の重鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の軽鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む、〔 1 〕 ~ 〔 3 〕 のいずれかに記載の抗体。

〔 4 - 2 〕 配列番号 : 2 5 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の C D R 1、配列番号 : 2 7 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の C D R 2、配列番号 : 2 9 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の C D R 3、配列番号 : 3 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の C D R 1、配列番号 : 3 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の C D R 2 を含む、〔 1 〕 ~ 〔 4 - 1 〕 のいずれかに記載の抗体。

〔 4 - 3 〕 配列番号 : 3 5 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の F R 1、配列番号 : 3 7 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の F R 2、配列番号 : 3 9 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の F R 3、配列番号 : 4 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の F R 1、配列番号 : 4 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の F R 2、配列番号 : 4 5 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖の F R 3 を含む、〔 1 〕 ~ 〔 4 - 2 〕 のいずれかに記載の抗体。

〔 5 - 1 〕 受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、〔 1 〕 ~ 〔 4 - 3 〕 のいずれかに記載の抗体。

〔 5 - 2 〕 配列番号： 47 または 70 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号： 49 または 72 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、〔 1 〕 ~ 〔 5 - 1 〕 のいずれかに記載の抗体。

〔 6 〕 受託番号 N I T E B P - 0 2 0 1 9 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 。

〔 7 〕 〔 1 〕 ~ 〔 6 〕 のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。

〔 8 〕 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕 のいずれかに記載の抗体の断片であって、ジスルフィド型 H M G B 1 に対して特異的な結合活性を有する断片。

〔 9 〕 〔 1 〕 ~ 〔 6 〕 のいずれかに記載の抗体のキメラ抗体またはヒト化抗体。

〔 10 〕 〔 1 〕 ~ 〔 6 〕 のいずれかに記載の抗体のヒト抗体。

〔 11 〕 〔 1 〕 ~ 〔 6 〕 に記載の抗体の可変領域をコードする DNA を定常領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込み、当該ベクターを宿主に導入し、抗体の可変領域および定常領域を産生させる工程を含む、〔 9 〕 に記載の抗体の製造方法。

〔 12 〕 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕、〔 9 〕 および 〔 10 〕 のいずれかに記載の抗体と試料とを接触させる工程を含む、該試料中のジスルフィド型 H M G B 1 の測定または検出方法。

〔 13 〕 ジスルフィド型 H M G B 1 の測定または検出を免疫試験方法によって行うことを特徴とする、〔 12 〕 に記載の方法。

〔 14 〕 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕、〔 9 〕 および 〔 10 〕 のいずれかに記載の抗体を含む、ジスルフィド型 H M G B 1 の測定または検出用キットまたは試薬。

〔 15 〕 免疫試験方法において使用するための、〔 14 〕 に記載のキットまたは試薬。

〔 16 〕 以下 (a) および (b) に記載の抗体と試料とを接触させる工程を含む、該試料中の全ての H M G B 1 の測定または検出方法：

(a) 〔 1 〕 ~ 〔 7 〕、〔 9 〕 および 〔 10 〕 のいずれかに記載の抗体、および

(b) ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体。

〔 17 〕 全ての H M G B 1 がジスルフィド型 H M G B 1、還元型 H M G B 1 およびトロンピン分解 H M G B 1 を含む、〔 16 〕 に記載の方法。

〔 18 〕 ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、ジスルフィド型 H M G B 1 の 2 番目のグリシン (G ₂) と 17 番目のアラニン (A ₁₇) の間のアミノ酸残基を含む抗原決定基を認識する抗体である、〔 16 〕 または 〔 17 〕 に記載の方法。

〔 19 - 1 〕 ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の重鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 および受託番号 N I T E B P - 0 2 0 2 0 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 の軽鎖の C D R 1、C D R 2、C D R 3 と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む抗体である、〔 16 〕 ~ 〔 18 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 19 - 2 〕 ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、配列番号： 51 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の C D R 1、配列番号： 53 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の C D R 2、配列番号： 55 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の C D R 3 を含む抗体である、〔 16 〕 ~ 〔 19 - 1 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 19 - 3 〕 ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体が、配列番号： 57 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の F R 1、配列番号： 59 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の F R 2、配列番号： 61 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖の F R 3 を含む抗体である、〔 16 〕 ~ 〔 19 - 2 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 20 - 1 〕 ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M

10

20

30

40

50

GB1に結合しない抗体が、受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体である、〔16〕～〔19-3〕のいずれかに記載の方法。

〔20-2〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、配列番号：63または74に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗体である、〔16〕～〔20-1〕のいずれかに記載の方法。

〔21〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166である、〔16〕～〔20-2〕のいずれかに記載の方法。

〔22〕全てのHMGB1の測定または検出を免疫試験方法によって行うことを特徴とする、〔16〕～〔21〕のいずれかに記載の方法。

〔23〕以下(a)および(b)に記載の抗体を含む、試料中の全てのHMGB1の測定または検出用キットまたは試薬：

(a)〔1〕～〔7〕、〔9〕および〔10〕のいずれかに記載の抗体、および

(b)ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体。

〔24〕全てのHMGB1がジスルフィド型HMGB1、還元型HMGB1およびトロンビン分解HMGB1を含む、〔23〕に記載のキットまたは試薬。

〔25〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、ジスルフィド型HMGB1の2番目のグリシン(G₂)と17番目のアラニン(A₁₇)の間のアミノ酸残基を含む抗原決定基を認識する抗体である、〔23〕または〔24〕に記載のキットまたは試薬。

〔26-1〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、CDR2、CDR3および受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、CDR2、CDR3を含む抗体である、〔23〕～〔25〕のいずれかに記載のキットまたは試薬。

〔26-2〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、配列番号：51に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のCDR1、配列番号：53に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のCDR2、配列番号：55に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のCDR3を含む抗体である、〔23〕～〔26-1〕のいずれかに記載のキットまたは試薬。

〔26-3〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、配列番号：57に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のFR1、配列番号：59に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のFR2、配列番号：61に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のFR3を含む抗体である、〔23〕～〔26-2〕のいずれかに記載の方法。

〔27-1〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体である、〔23〕～〔26-3〕のいずれかに

10

20

30

40

50

記載のキットまたは試薬。

〔27-2〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、配列番号：63または74に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗体である、〔23〕～〔27-1〕のいずれかに記載のキットまたは試薬。

〔28〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166である、〔23〕～〔27-2〕のいずれかに記載のキットまたは試薬。

〔29〕免疫試験方法において使用するための、〔23〕～〔28〕のいずれかに記載のキットまたは試薬。

〔30〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体。

〔31〕ジスルフィド型HMGB1の2番目のグリシン(G₂)と17番目のアラニン(A₁₇)の間のアミノ酸残基を含む抗原決定基を認識する、〔30〕に記載の抗体。

〔32-1〕受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、CDR2、CDR3および受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、CDR2、CDR3を含む、〔30〕または〔31〕に記載の抗体。

〔32-2〕配列番号：51に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のCDR1、配列番号：53に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のCDR2、配列番号：55に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のCDR3を含む、〔30〕～〔32-1〕のいずれかに記載の抗体。

〔32-3〕ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体が、配列番号：57に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のFR1、配列番号：59に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のFR2、配列番号：61に記載のアミノ酸配列を有する重鎖のFR3を含む、〔30〕～〔32-2〕のいずれかに記載の抗体。

〔33-1〕受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、〔30〕～〔32-3〕のいずれかに記載の抗体。

〔33-2〕配列番号：63または74に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、〔30〕～〔33-1〕のいずれかに記載の抗体。

〔34〕受託番号NITE BP-02020で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体HMa166。

〔35〕受託番号NITE BP-02021で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体CP11-1。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、ジスルフィド型HMGB1特異的抗体、試料中のジスルフィド型HMGB1を特異的に測定または検出する方法および試料中のジスルフィド型HMGB1を特異的に測定または検出するためのキットが提供された。また本発明により、試料中の全HMGB1を測定または検出する方法および試料中の全HMGB1を測定または検出するためのキットが提供された。本発明は、臨床検査、臨床病理学、免疫学、医学などの生命科学分野、とくに炎症や敗血症など重篤な病態の治療、診断、研究に有用である。特に、ジスルフィド型HMGB1を特異的に測定または検出すること、および、還元型HMGB1、ジスルフィド型HMGB1、トロンピン分解HMGB1(des-HMGB1)の合計量

10

20

30

40

50

を測定または検出することにより、これらHMGB1と敗血症をはじめとするHMGB1が関与する疾患の病態との関連性を詳細に診断および解析することが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】ヒトHMGB1のアミノ酸配列(配列番号:9)を示す図である。

【図2】各抗体とHMGB1ペプチドとの反応性を示すグラフである。

【図3】各抗体とHMGB1-NTペプチドとの反応性を示すグラフである。

【図4】ドットプロットによる各抗体の反応性を示す写真である。

【図5】ヒトHMGB1ペプチドに対する各抗体の反応性の模式図を示す図である。

【図6】HMGB1の酸化還元状態の模式図を示す図である。

10

【図7】組換えヒトHMGB1のSDS-PAGEを示す写真である。

【図8】各抗体とジスルフィド型/還元型/アルキル化rhHMGB1の反応性を示すグラフである。

【図9】トロンピン消化HMGB1のSDS-PAGEとN末端アミノ酸配列(配列番号:8)の解析を示す写真である。

【図10】トロンピン消化rhHMGB1(des-HMGB1)に対するHMa166、HMa186抗体の反応性を示すグラフである。

【図11】HMa186固相化によるジスルフィド型特異的HMGB1測定ELISAの結果を示すグラフである。

【図12】HMa186、HMa166両抗体固相化によるトータルHMGB1測定ELISAの結果を示すグラフである。

20

【図13】トータルHMGB1測定ELISAの至適化の検討結果を示す図である。

【図14】HMa186V_H領域のIGBLAST解析アライメントを示す図である。

【図15】HMa186V_K領域のIGBLAST解析アライメントを示す図である。

【図16】HMa166V_H領域のIGBLAST解析アライメントを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下に示す実施の形態はあくまでも一例であって、本発明は必ずしも以下の内容に限定されるものではない。

【0018】

30

本発明は、ジスルフィド型HMGB1に特異的に結合する抗体に関する。本発明においてジスルフィド型HMGB1とは、HMGB1の23番目のシステインと45番目のシステインとの間でジスルフィドが形成されているHMGB1をいう。したがって、本発明のジスルフィド型HMGB1特異的抗体は、これに限定されるものではないが、ジスルフィド型HMGB1の23番目のシステイン(C₂₃)と45番目のシステイン(C₄₅)により形成されるジスルフィド結合を含む抗原決定基を認識する抗体であることが好ましい。あるいは本発明のジスルフィド型HMGB1特異的抗体は、これに限定されるものではないが、ジスルフィド型HMGB1の23番目のシステイン(C₂₃)から45番目のシステイン(C₄₅)からなるアミノ酸配列をエピトープとして認識する抗体であることが好ましい。

40

【0019】

また本発明は、ジスルフィド型HMGB1に特異的に結合する抗体であって、MD-2への結合活性を有するジスルフィド型HMGB1および/またはサイトカイン誘導能を持つジスルフィド型HMGB1に対する中和活性を有する抗体に関する。ジスルフィド型HMGB1は、in vitroにおいて高い親和性でMD-2に結合し、マウスマクロファージによる炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子(TNF)の分泌を促進することが知られている。また、ジスルフィド型HMGB1は炎症を刺激(サイトカイン分泌等)することが知られている。本発明の抗体は、ジスルフィド型HMGB1が有するこのような活性を中和することができる。ジスルフィド型HMGB1に結合する抗体がジスルフィド型HMGB1活性を中和するか否かは、ピアコア(GE Healthcare)等の生体分子相互作用解

50

析機を用いて、センサーチップに固定化したMD - 2に結合したジスルフィド型HMGB 1に対する抗体が当該活性を中和する現象を観察することによって判定することが出来る。もしくはマクロファージ等の免疫担当細胞やRAW 264.7細胞などの樹立細胞株にジスルフィド型HMGB 1を添加し、分泌されるTNF、IL - 6、IL - 10、IL - 1、MIP - 2等のサイトカイン類の分泌を抗体が中和する現象を測定する事によって判定することができる。

【0020】

また本発明は、ジスルフィド型HMGB 1を特異的に認識できるHMGB 1抗体の断片に関する。抗体断片は、例えば抗体を酵素で消化して生成させることができる。抗体断片を生成する酵素として、例えばパパイン、ペプシン、あるいはプラスミンなどが挙げられる。あるいは、これら抗体断片をコードするDNAを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることもできる。

10

【0021】

なお本発明のジスルフィド型HMGB 1に特異的に結合する抗体は、HMGB 1の23番目のシステインと45番目のシステインとの間でジスルフィドが形成されているHMGB 1を特異的に認識することができるものであれば特に限定されない。例えば、後述の、全長HMGB 1からHMGB 1のN末端側のアミノ酸M1 - R10が切断されたアミノ酸配列を有するトロンピン分解HMGB 1 (des - HMGB 1)もまた、ジスルフィド型HMGB 1と同様に、全長HMGB 1における23番目のシステイン(C₂₃)と45番目のシステイン(C₄₅)により形成されるジスルフィド結合を含む。本発明のジスルフィド型HMGB 1に特異的に結合する抗体は、このような、全長HMGB 1からHMGB 1のN末端側のアミノ酸M1 - R10が切断されたアミノ酸配列を有するHMGB 1であって全長HMGB 1における23番目のシステインと45番目のシステイン(全長HMGB 1からHMGB 1のN末端側のアミノ酸M1 - R10が切断されたアミノ酸配列における13番目のシステインと35番目のシステイン)との間でジスルフィドが形成されているHMGB 1にも結合活性を有していてもよい。本発明のジスルフィド型HMGB 1に特異的に結合する抗体は、HMGB 1の23番目のシステイン(C₂₃)と45番目のシステイン(C₄₅)により形成されるジスルフィド結合を含む抗原決定基に特異的な抗体ということもできる。また本発明のジスルフィド型HMGB 1に特異的に結合する抗体は、トロンピン分解HMGB 1における13番目のシステイン(C₁₃)と35番目のシステイン(C₃₅)により形成されるジスルフィド結合を含む抗原決定基に特異的な抗体ということもできる。すなわち本発明のジスルフィド型HMGB 1に特異的に結合する抗体は、HMGB 1のジスルフィド結合を認識する。

20

30

【0022】

また本発明は、ジスルフィド型HMGB 1を特異的に認識できるHMGB 1抗体の低分子化抗体に関する。本発明における低分子化抗体は、全長抗体の一部(抗体断片)を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明における低分子化抗体は、VH(重鎖可変領域)又はVL(軽鎖可変領域)を含んでいることが好ましく、VHおよびVLの両方を含むことが特に好ましい。本発明における低分子化抗体として、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv(single-chain Fv)、ダイアボディー(Diabody)、sc(Fv)₂(single-chain (Fv)₂等)、これらの多量体(例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー)などを挙げる事ができるが、これらに限定されない。

40

【0023】

scFvは、抗体のVHとVLとを連結することにより得られる。scFvにおいて、VHとVLは、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される。V領域を連結するペプチドリンカーには、特に制限はない。例えば3から25残基程度からなる任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。ダイアボディーは、2本のscFvから構成されるダイマーである。sc(Fv)₂は、2つのVHおよび2つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である。sc(Fv)₂は、例えば、2

50

つの scFv をリンカーで結ぶことによって作製できる。

【0024】

また本発明は、ジスルフィド型 H M G B 1 を特異的に認識できる H M G B 1 抗体のキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体に関する。

【0025】

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体である。キメラ抗体は、例えば、ジスルフィド型 H M G B 1 を特異的に認識できる H M G B 1 抗体の重鎖、軽鎖の可変領域をコードする DNA を取得し、これらとヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込み、当該ベクターを宿主に導入し、抗体重鎖および軽鎖の可変領域と定常領域を産生させることにより得ることができる。定常領域としては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、犬、猫、牛、馬、豚、ヤギ、アカケザル、カニクイザル、チンパンジー、鶏、ゼブラフィッシュ等由来の定常領域を使用することができる。本発明のキメラ抗体は、抗体の産生の安定性の改善のために、アミノ酸の置換、欠失、付加などの改変がされていてもよい。

10

【0026】

ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものである。ヒト化抗体は、例えば、ジスルフィド型 H M G B 1 を特異的に認識できる H M G B 1 抗体の重鎖、軽鎖の CDR をコードする DNA とヒト抗体のフレームワーク領域 (FR) とが連結するように設計した DNA 配列を作製し、これを発現ベクターに組み込み、当該ベクターを宿主に導入し、当該 DNA によりコードされるタンパク質を発現させることにより得ることができる。本発明のヒト化抗体は、抗体の産生の安定性の改善などのために、アミノ酸の置換、欠失、付加などの改変がされていてもよい。

20

【0027】

アミノ酸を改変する場合には、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、及び、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる。あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個 (例えば 2、3、4、5、10、20、30、40、50、又は 100 個) のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1984)81:5662-6; Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res.(1982)10:6487-500; Wang, A. et al., Science(1984)224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1982)79:6409-13)。このような変異体は、アミノ酸改変前のアミノ酸配列と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列の同一性を有する。本明細書において配列の同一性は、配列同一性が最大となるように必要に応じ配列を整列化し、適宜ギャップを導入した後、元となった重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列の残基と同一の残基の割合として定義される。

30

40

【0028】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore = 100、wo

50

rdlength = 12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメータは、例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

【0029】

ヒト抗体は、ヒト抗体を産生するマウスから調整した抗体である。ヒト抗体は、例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させて取得することができる。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することにより取得することができる。

10

【0030】

また本発明は、モノクローナル抗体HMa186の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2、CDR3、および、モノクローナル抗体HMa186の軽鎖CDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2、CDR3を含む抗体に関する。本発明の抗体は、さらにFR領域および定常領域を有していてもよい。

モノクローナル抗体HMa186の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：25、27、29に示す。

モノクローナル抗体HMa186の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3の塩基配列をそれぞれ、配列番号：24、26、28に示す。

20

モノクローナル抗体HMa186の重鎖のFR1、FR2、FR3のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：35、37、39に示す。

モノクローナル抗体HMa186の重鎖のFR1、FR2、FR3の塩基配列をそれぞれ、配列番号：34、36、38に示す。

モノクローナル抗体HMa186の軽鎖のCDR1、CDR2のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：31、33に示す。

モノクローナル抗体HMa186の軽鎖のCDR1、CDR2の塩基配列をそれぞれ、配列番号：30、32に示す。

モノクローナル抗体HMa186の軽鎖のFR1、FR2、FR3のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：41、43、45に示す。

30

モノクローナル抗体HMa186の軽鎖のFR1、FR2、FR3の塩基配列をそれぞれ、配列番号：40、42、44に示す。

【0031】

このような抗体は、例えば、次の方法により取得することができる。当業者公知の方法により、モノクローナル抗体HMa186を産生するハイブリドーマから、重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3をコードするmRNAを単離する。そして、得られたmRNAから逆転写酵素を用いて重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3を合成する。これを所望の抗体定常領域をコードするDNA、FR領域をコードするDNAと連結し、発現ベクターへ組み込む。当該発現ベクターを各種の発現細胞で発現させ、当業者に公知の方法により回収すればよい。

40

【0032】

また本発明は、重鎖の可変領域としてモノクローナル抗体HMa186の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、軽鎖の可変領域としてモノクローナル抗体HMa186の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体に関する。本発明の抗体は、さらに定常領域を有していてもよい。このような抗体もまた、上述のような当業者に周知の方法により取得することができる。

モノクローナル抗体HMa186の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：47に、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：49に示す。

モノクローナル抗体HMa186の重鎖可変領域の塩基配列を配列番号：46に、軽鎖可変領域の塩基配列を配列番号：48に示す。

50

なお本発明のモノクローナル抗体 H M a 1 8 6 は、1 または複数のアミノ酸(例えば、20 アミノ酸以内、10、9、8、7、6、5、4、3、2 アミノ酸以内など)が置換、欠失、付加および/または挿入されていてもよい。

【0033】

本発明においては、ジスルフィド型 H M G B 1 を特異的に認識できる H M G B 1 抗体として、モノクローナル抗体 H M a 1 8 6 を挙げることができる。モノクローナル抗体 H M a 1 8 6 は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されているハイブリドーマより産生される。以下に、寄託を特定する内容を示す。

- (1) 寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構
- (2) 連絡先：〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
- (3) 受託番号：N I T E B P - 0 2 0 1 9
- (4) 識別の表示：H M a 1 8 6
- (5) 国内寄託日：2015年3月5日
- (6) 国際寄託への移管請求日：2016年11月4日

10

【0034】

また本発明は、本発明のジスルフィド型 H M G B 1 に特異的に結合する抗体と試料とを接触させる工程を含む、該試料中のジスルフィド型 H M G B 1 を特異的に測定または検出する方法に関する。

【0035】

また本発明は、以下(a)および(b)に記載の抗体と試料とを接触させる工程を含む、該試料中の全ての H M G B 1 の測定または検出方法に関する。

20

- (a) ジスルフィド型 H M G B 1 に特異的に結合する抗体
- (b) ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合しトロンピン分解 H M G B 1 (d e s - H M G B 1) に結合しない抗体

【0036】

また本発明は、ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合しトロンピン分解 H M G B 1 (d e s - H M G B 1) に結合しない抗体に関する。

なお本発明のジスルフィド型 H M G B 1 に特異的に結合する抗体は、全長 H M G B 1 の N 末端側のアミノ酸 M 1 - R 1 0 が切断されたアミノ酸配列を有する、トロンピン分解 H M G B 1 (d e s - H M G B 1) を認識することもできる。ジスルフィド型 H M G B 1 がトロンピンで分解され、トロンピン分解 H M G B 1 となってもまた、トロンピン分解 H M G B 1 の13番目のシステインと35番目のシステイン(全長 H M G B 1 の23番目のシステインと45番目のシステインに対応する)との間でジスルフィド結合が維持されているからである。

30

【0037】

本発明における「全ての H M G B 1」は、H M G B 1 のアミノ酸配列が改変(付加、欠失、挿入、置換等)されたものや化学修飾されたもの、酵素処理物などを含む。より具体的には、ジスルフィド型 H M G B 1、還元型 H M G B 1 およびトロンピン分解 H M G B 1 並びにこれらのアミノ酸が改変されたものや化学修飾されたもの、酵素処理物などが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0038】

また本発明において還元型 H M G B 1 とは、3つの全てのシステイン(C₂₃、C₄₅、C₁₀₆)が還元されている状態の H M G B 1 をいう。細胞核内で遺伝情報制御に関するほか、細胞外ではケモタキシス(化学遊走誘導)活性を持つことが知られている。

トロンピン分解 H M G B 1 (d e s - H M G B 1) とは、トロンピンまたはトロンピン・トロンボモジュリン複合体により、H M G B 1 の10番目のアルギニン(R10)11番目のグリシン(G11)間が切断され、H M G B 1 のN末端の10個のアミノ酸残基によるペプチド断片が分離して新たに生じたN末端「G K M S S . . .」を有する H M G B 1 の分解産物を指す。この H M G B 1 の分解産物は H M G B 1 に比べその生理活性が低いことが知られている。トロンピン分解 H M G B 1 は、13番目のシステインと35番目

50

のシステイン（全長HMGB1の23番目のシステインと45番目のシステインに対応する）との間にジスルフィド結合を有する。本発明においては、ジスルフィド型HMGB1とジスルフィド結合を維持したトロンピン分解HMGB1をあわせて、非還元型HMGB1またはジスルフィド結合を有するHMGB1と表現することもできる。また本発明においては、「ジスルフィド型HMGB1に特異的に結合する抗体」を「非還元型HMGB1に特異的に結合する抗体」または「ジスルフィド結合を有するHMGB1に特異的に結合する抗体」と表現することもできる。

【0039】

本発明においては、ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体は、例えば、ジスルフィド型HMGB1の2番目のグリシン(G₂)と17番目のアラニン(A₁₇)の間のアミノ酸残基を含む抗原決定基を認識する抗体とすることができるが、これに限定されない。あるいは本発明において当該抗体は、例えば、ジスルフィド型HMGB1の2番目のグリシン(G₂)と17番目のアラニン(A₁₇)の間のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列をエピトープとして認識する工程とすることができるが、これに限定されない。

10

【0040】

また本発明においては、ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体として、モノクローナル抗体HMa166の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2、CDR3、および、モノクローナル抗体HMa166の軽鎖CDR1、CDR2、CDR3と同一のアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2、CDR3を含む抗体を挙げることができるがこれに限定されない。このような抗体は、さらにFR領域および定常領域を有していてもよい。

20

モノクローナル抗体HMa166の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：51、53、55に示す。

モノクローナル抗体HMa166の重鎖のCDR1、CDR2、CDR3の塩基配列をそれぞれ、配列番号：50、52、54に示す。

モノクローナル抗体HMa166の重鎖のFR1、FR2、FR3のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：57、59、61に示す。

モノクローナル抗体HMa166の重鎖のFR1、FR2、FR3の塩基配列をそれぞれ、配列番号：56、58、60に示す。

30

【0041】

また本発明においては、ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体として、重鎖の可変領域としてモノクローナル抗体HMa166の重鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する可変領域、軽鎖の可変領域としてモノクローナル抗体HMa166の軽鎖可変領域と同一のアミノ酸配列を有する可変領域を有する抗体に関する。このような抗体は、さらに定常領域を有していてもよい。

モノクローナル抗体HMa166の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：63に示す。

モノクローナル抗体HMa166の重鎖可変領域の塩基配列を配列番号：62に示す。

40

これら抗体は、上述のような当業者に周知の方法により取得することができる。

なお本発明のモノクローナル抗体HMa166は、1または複数のアミノ酸（例えば、20アミノ酸以内、10、9、8、7、6、5、4、3、2アミノ酸以内など）が置換、欠失、付加および/または挿入されていてもよい。

【0042】

本発明におけるジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合しdes-HMGB1に結合しない抗体として、モノクローナル抗体HMa166を挙げることができる。モノクローナル抗体HMa166は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されているハイブリドーマより産生される。以下に、寄託を特定する内容を示す。

50

- (1) 寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構
 (2) 連絡先：〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
 (3) 受託番号：NITE BP-02020
 (4) 識別の表示：HMa166
 (5) 国内寄託日：2015年3月5日
 (6) 国際寄託への移管請求日：2016年11月4日

【0043】

また本発明は、上記方法に使用するためのキットまたは試薬に関する。本発明のキットまたは試薬は、少なくとも以下(a)および(b)に記載のジスルフィド型HMG B1に特異的に結合する抗体を含むキットまたは試薬であって、試料に含まれるジスルフィド型HMG B1を特異的に測定または検出するためのキットまたは試薬に関する。また本発明のキットまたは試薬は、少なくとも以下の(a)および(b)に記載の抗体を含むキットまたは試薬であって、試料中の全てのHMG B1の測定または検出用キットまたは試薬に関する。

- (a) ジスルフィド型HMG B1に特異的に結合する抗体
 (b) ジスルフィド型HMG B1と還元型HMG B1の両方に結合しトロンピン分解HMG B1(des-HMG B1)に結合しない抗体

【0044】

本発明においては、HMG B1抗体(例えば、ジスルフィド型HMG B1に特異的に結合する抗体、ジスルフィド型HMG B1と還元型HMG B1の両方に結合しdes-HMG B1に結合しない抗体など)の種類や由来などは限定されない。例えば、Mouse、Rabbit、Goat等の種々の免疫動物から獲得される抗体が含まれる。また、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体からなる抗血清、モノクローナル抗体、またはこれらの抗体の断片(例えば、Fab、F(ab')₂、Fab'等)や低分子化抗体(例えば、scFv(single-chain Fv)、ダイアボディー(Diabody)、sc(Fv)₂(single-chain (Fv)₂等)、これらの多量体(例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー)も利用することができる。

【0045】

例えば、ポリクローナル抗体は、精製したHMG B1(例えば、ジスルフィド型HMG B1、還元型HMG B1など)若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血べいを除去することにより調製することが可能である。またモノクローナル抗体は、HMG B1若しくはその一部のペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単クローンの細胞(ハイブリドーマ)を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。

【0046】

本発明においては、HMG B1の由来は限定されない。本発明においては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、犬、猫、牛、馬、豚、ヤギ、アカケザル、カニクイザル、チンパンジー、鶏、ゼブラフィッシュ等由来のHMG B1を測定または検出することができるが、これらに限定されない。

【0047】

以下に、様々な動物由来のHMG B1のアミノ酸配列のNCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) databaseにおけるアクセッション番号と、本願明細書における配列番号を示す。

- ・ヒト[Homo sapiens] CAG33144.1 / 配列番号：9
- ・マウス[Mus musculus] AA110668.1 / 配列番号：10
- ・ラット[Rattus norvegicus] NP_037095.1 / 配列番号：11
- ・ウサギ[Oryctolagus cuniculus] NP_001164752.1 / 配列番号：12
- ・イヌ[Canis lupus familiaris] AAN11319.1 / 配列番号：13
- ・ネコ[Felis catus] XP_006927254.1 / 配列番号：14

10

20

30

40

50

- ・ウシ[Bos taurus] AA102930.1 / 配列番号 : 1 5
- ・ウマ[Equus caballus] BAF33339.1 / 配列番号 : 1 6
- ・ブタ[Sus scrofa] NP_001004034.1 / 配列番号 : 1 7
- ・ヤギ[Capra hircus] XP_005687595.1 / 配列番号 : 1 8
- ・アカケザル[Macaca mulatta] AFJ72047.1 / 配列番号 : 1 9
- ・カニクイザル[Macaca fascicularis] NP_001270285.1 / 配列番号 : 2 0
- ・チンパンジー[Pan troglodytes] XP_509611.1 / 配列番号 : 2 1
- ・ニワトリ[Gallus gallus] NP_990233.1 / 配列番号 : 2 2
- ・ゼブラフィッシュ[Danio rerio] AAH67193.1 / 配列番号 : 2 3

【 0 0 4 8 】

10

本発明において試料とは、H M G B 1（例えば、ジスルフィド型 H M G B 1、還元型 H M G B 1、トロンピン分解 H M G B 1 など）が含まれるもしくは含まれると疑われる溶液を意味する。例えば、ヒトやその他の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、犬、猫、牛、馬、豚、ヤギ、羊、サル（例えば、アカケザル、カニクイザル）、チンパンジー、鶏、ゼブラフィッシュなど）由来の血液、血清、血漿、尿、精液、ずい液、唾液、汗、涙、腹水、羊水など単離された生体試料、あるいはそれらを含む希釈液などを挙げるができるが、これらに限定されない。さらに、H M G B 1 が含まれるもしくは含まれると疑われる溶液を緩衝液などと混合して得られる溶液も、本発明の試料に含まれる。これらの試料の取得方法は当業者に周知である。混合あるいは希釈する溶媒としては、各種の水系溶媒を用いることができる。例えば、精製水、生理食塩水、またはトリス緩衝液、リン酸緩衝液もしくはリン酸緩衝液生理食塩水などの各種緩衝液を挙げるができるがこれらに限定されない。さらに、緩衝液の pH についても特に限定されず、適宜、好適な pH を選択することができる。一般的には、pH 3 ~ 12 の範囲内の pH を選択して用いることができるが、これに限定されない。また溶媒には、被測定物質の構造的な保護を目的として、ウシ血清アルブミン（B S A）、ヒト血清アルブミン（H S A）、カゼインなどのタンパク質、各種糖類、脱脂粉乳、正常ウサギ血清などの各種動物血清、アジ化ナトリウムもしくは抗生物質などの各種防腐剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等のうち 1 種または 2 種以上を適宜含有させてもよい。

20

【 0 0 4 9 】

30

H M G B 1 抗体（例えば、ジスルフィド型 H M G B 1 に特異的に結合する抗体、ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体など）と試料を接触させる手段は、特に限定されない。即ち、試料の存在する容器に H M G B 1 抗体が加えられてもよい。あるいは、H M G B 1 抗体の存在する容器に試料を加えてよい。

【 0 0 5 0 】

本発明においては、H M G B 1（例えば、ジスルフィド型 H M G B 1、全ての H M G B 1 など）の測定または検出のために、公知の手法が利用できる。例えば、酵素免疫測定法（E L I S A、E I A）、蛍光免疫測定法（F I A）、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、免疫沈降法、放射免疫測定法（R I A）、発光免疫測定法（L I A）、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法などの免疫試験方法を挙げるができるが、これらに限定されない。また、本発明における測定または検出は、用手法で行ってもよいし、分析装置等の装置を用いて行ってもよい。

40

【 0 0 5 1 】

例えば、酵素免疫測定法を用いる場合は、第一の H M G B 1 抗体（例えば、ジスルフィド型 H M G B 1 に特異的に結合する抗体、ジスルフィド型 H M G B 1 と還元型 H M G B 1 の両方に結合し d e s - H M G B 1 に結合しない抗体など）が固相化されたマイクロプレートと、H R P 等の酵素が修飾された第二の H M G B 1 抗体、洗浄緩衝液、及び発光 / 発色基質溶液、標準物質（ヒト組換え体 H M G B 1）、陽性コントロール（ヒト組換え体 H

50

M G B 1)、検体希釈液、反応停止液などを用いて行うことができる。またH M G B 1の測定または検出は、第二のH M G B 1抗体に修飾されている酵素に、その至適条件下で前記酵素の基質を反応させ、その酵素反応生成物の量を光学的方法により測定することによって行うことができる。第二のH M G B 1抗体(検出抗体)は、第一のH M G B 1抗体(固相抗体)が認識するエピトープとは異なるエピトープを認識する抗体であることが好ましい。

【0052】

また、蛍光免疫測定法を用いる場合には、第一のH M G B 1抗体が固相化された光導波路やマイクロプレートと、蛍光物質が修飾された第二のH M G B 1抗体、洗浄緩衝液を用いて行うことができる。H M G B 1の測定または検出は、第二のH M G B 1抗体に修飾されている蛍光物質に励起光を照射し、その蛍光物質が発する蛍光強度を測定することにより行うことができる。さらに放射免疫測定法を用いる場合には、前述した方法と同様の操作により、放射性物質による放射線量を測定することによって、発光免疫測定法を用いる場合には、発光反応系による発光量を測定することによって、H M G B 1を測定または検出することができる。

10

【0053】

ウエスタンブロット法やドットブロット法を用いる場合は、電気泳動後の転写膜や直接サンプルをアプライしたメンブレンをBSAやスキムミルクでブロッキングした後、H R P等の酵素が修飾されたH M G B 1抗体、洗浄緩衝液、及び発光/発色基質溶液等を用いて行うことができる。また、第一のH M G B 1抗体に対して、酵素や蛍光色素等で直接標識した二次抗体を反応させてもよい。

20

H M G B 1の測定または検出は、H M G B 1抗体や二次抗体に修飾されている酵素に、その至適条件下で前記の基質を反応させ、その酵素反応生成物の量を光学的方法により測定することにより行うことができる。

【0054】

免疫沈降法を用いる場合は、サンプルとH M G B 1抗体等を反応させる際にBSAやスキムミルク等のブロッキング剤を添加しておくことができる。沈降はH M G B 1抗体に直接結合させた磁気ビーズやアガロース単体等を用いて行う、もしくはそれらのビーズ等を結合した二次抗体を用いて行うことができる。

30

【0055】

また、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法などを用いる場合には、エンドポイント法またはレート法により透過光や散乱光を測定することによりH M G B 1を測定または検出することができる。そして、イムノクロマトグラフィ法を用いる場合には、テストライン上に現れる標識物質の色を目視的に確認することができる。なお、この目視的に確認する代わりに、分析装置等の機器を用いてもよい。

【0056】

前記免疫測定方法に用いる固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ラテックス、リポソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス、または、磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック、メンブレン、または試験片等の形状の固相担体などを用いることができるが、これらに限定されない。

40

【0057】

前記H M G B 1抗体の固相化方法としては、公知の固相化方法が利用できる。例えば、物理吸着法としては、抗体と担体を緩衝液などの溶液中で混合し接触させる方法、また、緩衝液などに溶解した抗体と担体を接触させる方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

また、化学的結合法によりH M G B 1抗体を固相化する場合も公知の方法に従い調整することができる。例えば、抗体と担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエ

50

ステルまたはマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させて、抗体と担体双方のアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、または水酸基等と反応させる方法などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0059】

さらに、非特異的反応や、H M G B 1 抗体を固相化させた担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要がある場合は、公知の方法により処理することができる。例えば、抗体を固相化させた担体の表面または内壁面に、ウシ血清アルブミン (B S A)、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミンもしくはその塩などのタンパク質、界面活性剤または脱脂粉乳等を接触させ、被覆させる方法などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0060】

前記第二の H M G B 1 抗体への標識物質の修飾方法としては、公知の修飾方法が利用できる。物理吸着法としては、第二の H M G B 1 抗体と標識物質を緩衝液などの溶液中で混合し接触させる方法、緩衝液などに溶解した抗体と標識物質を接触させる方法などが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、標識物質が金コロイドやラテックスである場合は物理吸着法が有効であり、抗体と金コロイドとを緩衝液中で混合し接触させることで、金コロイド標識を有する抗体を得ることができる。

【0061】

また、化学的結合法により第二の H M G B 1 抗体に標識物質を修飾させる場合には、公知の方法に従い調整することができる。例えば、抗体と標識物質をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステルまたはマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させて、抗体と標識物質双方のアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、または水酸基等と反応させる方法などが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、標識物質が蛍光物質や酵素、または化学発光物質である場合、化学結合法が有効である。

【0062】

また、非特異的反応や、標識物質を修飾させた抗体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要がある場合は、公知の方法により処理することができる。例えば、標識物質を結合させた抗体に、ウシ血清アルブミン (B S A)、カゼイン、ゼラチン、卵白アルブミンもしくはその塩などのタンパク質、界面活性剤または脱脂粉乳等を接触させ、被覆させる方法などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0063】

また標識物質としては、酵素免疫測定法の場合、ペルオキシダーゼ (P O D)、アルカリフォスファターゼ (A L P)、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素、またはアミラーゼ等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0064】

また、蛍光免疫測定法の場合には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジンイソチオシアネート、シアニン、またはメロシアニン等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0065】

また、放射免疫測定法の場合には、トリチウム、ヨウ素 1 2 5 またはヨウ素 1 3 1 等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0066】

また、発光免疫測定法の場合には、ルミノール系、ルシフェラーゼ系、アクリジニウムエステル系、またはジオキセタン化合物系等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0067】

また、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法の場合には、ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合

10

20

30

40

50

体、酢酸ビニル - アクリル酸共重合体、ポリアクリロイン、スチレン - メタクリル酸共重合体、スチレン - グリシジル (メタ) アクリル酸共重合体、スチレン - ブタジエン酸共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、金属コロイド、セラミックス、または磁性体等の材質よりなる微粒子を用いることができるが、これらに限定されない。

【0068】

本発明のキットや試薬は、HMGB1抗体と試料を接触させて使用することを特徴とする。本発明のキットや試薬は、試料中のHMGB1 (例えば、ジスルフィド型HMGB1、還元型HMGB1、トロンビン分解HMGB1など) とHMGB1抗体 (例えば、ジスルフィド型HMGB1に特異的に結合する抗体、ジスルフィド型HMGB1と還元型HMGB1の両方に結合し得るHMGB1に結合しない抗体など) の結合が起こるように構成される限り特に限定されない。

10

【0069】

本発明のキットや試薬の構成においては、その他の試薬と組み合わせてもよいし、あるいは、固相にあらかじめ付着させておいてもよい。例えば、その他の試薬に組み合わせる場合、組み合わせる試薬としては、試料中のHMGB1とHMGB1抗体の結合に必要な緩衝液、試料希釈液、酵素などの標識物質を含有するHMGB1抗体溶液、発色などのシグナルを生成する物質を含有する試薬、発色などのシグナルの生成に關与する物質を含有する試薬、校正 (キャリブレーション) を行うための物質を含有する試薬、又は精度管理を行うための物質を含有する試薬などが挙げられる。また、前記固相の例としては、免疫試験キットに用いられる担体や試験紙、マイクロプレート、ガラス板、マイクロチューブ、ろ紙、ポリマー樹脂等を挙げることができる。

20

【0070】

本発明におけるキットや試薬は、HMGB1の測定または検出に必要なものを含む。HMGB1の測定または検出に必要な種々のセットを含むキットや試薬、HMGB1の測定または検出に必要な種々の物質を充填した使いきりタイプのキットや試薬、複数の試料を同時に測定するためのマイクロプレートタイプの試験キットや試薬、内部に試薬等を含み目視による結果の判定が可能なイムノクロマトグラフィーや、試験紙も、本発明のキットや試薬に含まれる。

30

【0071】

例えば、使いきりタイプのキットや試薬の形態の一例としては、第一のHMGB1抗体が固相化された球状や棒状の担体、試薬希釈液、ALP等の酵素が修飾された第二のHMGB1抗体、洗浄液、および発光基質溶液、標準物質 (ヒト組換え体HMGB1)、陽性コントロール (ヒト組換え体HMGB1)、検体希釈液、反応停止液などを、検査容器に充填する構成が考えられるがこれらに限定されない。

【0072】

検査容器の形状は、試料中のHMGB1の測定または検出を行うことができる限り特に限定されるものではない。例えば、反応槽や試薬格納槽が複数並んだ舟型の容器や、板状の基体に溝を設け、反応槽や格納槽を流路で繋いだ流路型の容器が挙げられるがこれらに限定されない。また、検査容器の大きさも特に限定されるものではないが、自動分析装置等に組み込んで用いるためには、10センチメートル×10センチメートル程度以下の小型であることが望ましい。さらに、反応槽への異物の混入や、試薬格納槽に充填しておいた試薬の蒸発・劣化を避けるために、各槽の上部をシールすることもできる。例えば、アルミニウム箔や高分子フィルム等を検査容器の反応槽と格納槽の上部に接着させる方法があげられる。特に、アルミニウム箔によるシールは、分析装置の穿孔機構や分注チップの先端で容易に開封できるので好ましい。検査容器の素材としては、被測定物質を測定するための反応を阻害しない限り特に限定されるものではない。例えば、ポリスチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂等が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0073】

50

また、マイクロプレートタイプのキットや試薬の形態としては、以下の構成が考えられる。例えば、第一のH M G B 1抗体が固相化されたマイクロプレートと共に、試料希釈液、H R P等の酵素が修飾された第二のH M G B 1抗体、洗浄液、および発色基質溶液、標準物質（ヒト組換え体H M G B 1）、陽性コントロール（ヒト組換え体H M G B 1）、検体希釈液、反応停止液などを、それぞれ試薬ボトルとして付属する構成である。

【0074】

イムノクロマトグラフィーの形態としては、ハウジングケース、サンプルパット、コンジュゲートパット、メンブレンフィルター、吸収パットから構成されるラテラルフローが好適である。また、ラテラルフローは以下の手順により作製される。まず、金コロイドや着色ビーズを標識した第一のH M G B 1抗体を作製し、これをコンジュゲーションパットに塗布・乾燥させる。一方で、第二のH M G B 1抗体をメンブレンフィルターのテストライン上に塗布・乾燥させる。さらに、前記第二のH M G B 1抗体を特異的に認識する第三の抗体をメンブレンフィルターのコントロールライン上に塗布・乾燥させる。最後に、このフィルターに前記コンジュゲーションパット、サンプルパット、吸収パットを貼りつけたものをラテラルフローとする。

10

【0075】

本発明において、試薬の形状は特に限定されず、H M G B 1抗体を含む溶液であってもよい。あるいは、それらのタブレット、粉末、容器に付着させた乾燥状態など、目的となる試験にあわせた容量、形状をとることができる。

【0076】

本発明のキットまたは試薬は、本発明のジスルフィド型H M G B 1に特異的に結合する抗体と検出用標識抗体を含む、サンドイッチE L I S A用のキットまたは試薬とすることができる。特に、ジスルフィド型H M G B 1、還元型H M G B 1、トロンビン分解H M G B 1を含む全てのH M G B 1を測定または検出する場合、一実施態様として、固相抗体としてモノクローナル抗体H M a 1 6 6およびモノクローナル抗体H M a 1 8 6を、検出抗体としてモノクローナル抗体C P 1 1 - 1を使用するサンドイッチE L I S A法によって行うことができる。モノクローナル抗体C P 1 1 - 1は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されているハイブリドーマより産生される。以下に、寄託を特定する内容を示す。

20

(1) 寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構

30

(2) 連絡先：〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8

(3) 受託番号：N I T E B P - 0 2 0 2 1

(4) 識別の表示：C P 1 1 - 1

(5) 国内寄託日：2015年3月5日

(6) 国際寄託への移管請求日：2016年11月4日

【0077】

また本発明は、本発明の測定または検出方法を使用して試料中のH M G B 1（ジスルフィド型H M G B 1、または全てのH M G B 1）を測定または検出する工程を含む、敗血症、もしくは全身性炎症等の敗血症関連疾患の診断方法に関する。

また本発明は、ジスルフィド型H M G B 1特異的抗体、または、ジスルフィド型H M G B 1と還元型H M G B 1の両方に結合しd e s - H M G B 1に結合しない抗体を含む、敗血症、もしくは全身性炎症等の敗血症関連疾患の診断用キットまたは試薬に関する。

40

【0078】

本発明の診断方法および診断用キットまたは試薬においては、例えば、ジスルフィド型H M G B 1が検出された場合、被験者は敗血症もしくはその関連疾患に罹患していると判定される。本発明においては、H M G B 1が検出された被験者に対し公知の敗血症もしくはその関連疾患の治療薬を投与するもしくは公知の治療法を施す工程を含むことができる。

【0079】

敗血症やその関連疾患の重症度とH M G B 1の血中濃度の相関性について、今後のさら

50

なる研究が必要であるが、敗血症患者ではH M G B 1の血中濃度が高い事が知られている (W a n g、S C I E N C E、 2 8 5、 2 4 8 ~ 2 5 1、 1 9 9 9)。また、H M G B 1血中濃度と敗血症の診断基準の一つであるS O F Aスコアやl a c t a t e値、p r o c a l c i t o n i n値などと、高い相関性が報告されている (Gibot、Intensive Care Medicine、33、1347~1353、2007)。また、敗血症発症後、死亡しなかった患者では時間経過に伴ってジスルフィド型H M G B 1の血中濃度が低下するが、予後が悪く、発症後死亡した患者では、ジスルフィド型H M G B 1の血中濃度が時間経過に伴って高くなる事が報告されている (Gibot、Intensive Care Medicine、33、1347~1353、2007)。また、敗血症患者に血液浄化療法を行ったところ、高かったH M G B 1濃度が正常にまで回復し、最終的に退院した治療例も報告されている (Nakamura、Blood Purification、32、139-142、2011)。このようにH M G B 1の血中濃度は様々な治療の開始や離脱に重要な情報となる。

10

【0080】

以下に、モノクローナル抗体H M a 1 8 6およびH M a 1 6 6の配列と配列表における該列番号の関係をまとめる。

モノクローナル抗体H M a 1 8 6

- 重鎖C D R 1塩基配列 配列番号：24
- 重鎖C D R 1アミノ酸配列 配列番号：25
- 重鎖C D R 2塩基配列 配列番号：26
- 重鎖C D R 2アミノ酸配列 配列番号：27
- 重鎖C D R 3塩基配列 配列番号：28
- 重鎖C D R 3アミノ酸配列 配列番号：29
- 軽鎖C D R 1塩基配列 配列番号：30
- 軽鎖C D R 1アミノ酸配列 配列番号：31
- 軽鎖C D R 2塩基配列 配列番号：32
- 軽鎖C D R 2アミノ酸配列 配列番号：33
- 重鎖F R 1塩基配列 配列番号：34
- 重鎖F R 1アミノ酸配列 配列番号：35
- 重鎖F R 2塩基配列 配列番号：36
- 重鎖F R 2アミノ酸配列 配列番号：37
- 重鎖F R 3塩基配列 配列番号：38
- 重鎖F R 3アミノ酸配列 配列番号：39
- 軽鎖F R 1塩基配列 配列番号：40
- 軽鎖F R 1アミノ酸配列 配列番号：41
- 軽鎖F R 2塩基配列 配列番号：42
- 軽鎖F R 2アミノ酸配列 配列番号：43
- 軽鎖F R 3塩基配列 配列番号：44
- 軽鎖F R 3アミノ酸配列 配列番号：45
- 重鎖可変領域塩基配列 配列番号：46
- 重鎖可変領域アミノ酸配列 配列番号：47
- 軽鎖可変領域塩基配列 配列番号：48
- 軽鎖可変領域アミノ酸配列 配列番号：49

20

30

40

【0081】

モノクローナル抗体H M a 1 6 6

- 重鎖C D R 1塩基配列 配列番号：50
- 重鎖C D R 1アミノ酸配列 配列番号：51
- 重鎖C D R 2塩基配列 配列番号：52
- 重鎖C D R 2アミノ酸配列 配列番号：53
- 重鎖C D R 3塩基配列 配列番号：54
- 重鎖C D R 3アミノ酸配列 配列番号：55

50

- 重鎖 F R 1 塩基配列 配列番号 : 5 6
- 重鎖 F R 1 アミノ酸配列 配列番号 : 5 7
- 重鎖 F R 2 塩基配列 配列番号 : 5 8
- 重鎖 F R 2 アミノ酸配列 配列番号 : 5 9
- 重鎖 F R 3 塩基配列 配列番号 : 6 0
- 重鎖 F R 3 アミノ酸配列 配列番号 : 6 1
- 重鎖可変領域塩基配列 配列番号 : 6 2
- 重鎖可変領域アミノ酸配列 配列番号 : 6 3

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

10

【実施例】

【0082】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

【0083】

1. 大腸菌組換えヒトHMG B 1の作製

大腸菌を用いた組換えヒトHMG B 1の作製方法を以下に示す。

GenBankに登録されたヒトHMG B 1遺伝子 (GenBank : CR456863.1 / 配列番号 : 7) の配列を元に、クローニングの為に制限酵素サイトNdeIを上流に、BamHIを下流に付加した遺伝子を化学合成により作製した。N末側にヒスチジントグを付加することができるpET15bプラスミドベクターに合成したヒトHMG B 1遺伝子をライゲーションし、シークエンスを確認した後、大腸菌BL21(DE3)にトランスフォームした。また、ヒトHMG B 1のN末端から82番目のリジン (M₁ - K₈₂)までをコードする遺伝子HMG B 1 - NTも同様に作製した。

20

【0084】

得られたヒトHMG B 1遺伝子を移入した大腸菌BL21(DE3)すなわち大腸菌BL21(DE3) (HMG B 1 / pET15b) および大腸菌BL21(DE3) (HMG B 1 - NT / pET15b)をそれぞれ2 L程度のサークルグロー (フナコシ) や2x YT (DIFCO) 等の大腸菌培養培地で培養し、濁度 (OD_{600 nm}) が0.5付近となった時に0.5 mM IPTGを加えて30 で3時間誘導し、組換えヒトHMG B 1タンパクを発現させた。

30

【0085】

発現させた大腸菌BL21(DE3) (HMG B 1 / pET15b) および大腸菌BL21(DE3) (HMG B 1 - NT / pET15b)を遠心分離して菌体を回収し、-80 で急速凍結させた後、20 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100を加え、懸濁した。懸濁液を氷上に移し、超音波破碎機を用いて菌体を破碎した。

その後、遠心分離を行い、破碎上清を0.22 μmの濾過滅菌用フィルターで濾過滅菌した。

【0086】

濾過した破碎上清に50 mM Imidazoleを加え、ヒスチジントグを用いた精製を行う為にHisTrap HP 5 mLカラム (GE Healthcare) にアプライし、洗浄後、75 mM、100 mM、500 mMのImidazoleでステップワイズ溶出した。目的のタンパクが認められる分画を10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) にバッファー置換した後、ヒスチジントグHiTrap Heparin HP 1mLカラム (GE Healthcare) にアプライし、50-1100 mM NaClのリニアグラジエントで溶出した。

40

目的のタンパクが認められる分画を10 mM Hepesで5倍希釈し、Hitrap CMFFカラム (GE Healthcare) にアプライし、0-180 mM NaClのリニアグラジエントで溶出し、目的のタンパクが認められる分画を限外濾過膜で濃縮し、50 mM Hepes (pH8.0)、500 mM NaClにバッファー置換し、精製した。

【0087】

2. モノクローナル抗体の作製

50

(1) モノクローナル抗体 C P 1 1 - 1 作製法

ハプテンとしてヒト H M G B 1 のアミノ酸配列 167 ~ 180 番のペプチド No.5 (K P D A A K K G V V K A E K / 配列番号 : 6) の C 末にシステイン (C) を付加し、システインの S H 基を用いて、キャリアーである K L H (Keyhole limpet hemocyanin) と結合させて作製したハプテン - キャリアータンパク質複合体抗原 1 0 0 μ g を Freund の完全アジュバント (F C A) と共にマウス (B a l b / c) に初回免疫し、1 4 日後に追加免疫として初回免疫に用いたハプテン - キャリアータンパク質複合体 5 0 μ g を Freund の不完全アジュバント (F I A) と共に免疫した。以降 1 4 日間隔で 5 0 μ g のハプテン - キャリアータンパク質複合体を F I A と共に計 4 回免疫を行った。最終免疫後、脾臓を取り出し、定法に従ってリンパ球を調整し、ミエローム Sp2/0-Ag14 (ATCC : CRL-1581) と融合した。融合したハイブリドーマを C l o n a C e l l - H Y ハイブリドーマクローニングキット (S T E M C E L L T E C H N O L O G I E S) を用いて培養、クローニングを行った。得られたクローンをピアコア (G E H e a l t h c a r e) を用いてさらに詳細に検討し、C P 1 1 - 1 を選択した。

10

なお、モノクローナル抗体 C P 1 1 - 1 は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに受託番号「N I T E B P - 0 2 0 2 1」として寄託されているハイブリドーマより産生される。

【 0 0 8 8 】

(2) モノクローナル抗体 H M a 1 6 6、H M a 1 8 6 の作製法

r h H M G B 1 抗原 1 0 0 μ g を Freund の完全アジュバント (F C A) と共にマウス (B a l b / c) に初回免疫した。1 4 日後に追加免疫として初 r h H M G B 1 抗原 5 0 μ g を Freund の不完全アジュバント (F I A) と共に免疫した。以降 1 4 日間隔で 5 0 μ g の r h H M G B 1 抗原を F I A と共に計 4 回免疫を行った。最終免疫後、脾臓を取り出し、定法に従ってリンパ球を調整し、ミエローム Sp2/0-Ag14 (ATCC : CRL-1581) と融合した。融合したハイブリドーマを定法に従い、限界希釈法により培養、クローニング、E L I S A によるスクリーニングを行い、1 8 個のクローンを得た。得られた 1 8 クローンと C P 1 1 - 1 を合わせた 1 9 クローンについて、それぞれをピアコア (G E H e a l t h c a r e) のセンサーチップに抗マウス I g G 抗体を介して固相化し、r H M G B 1 を結合させた後、それぞれの抗体を加えて、r H M G B 1 に対する結合性を詳細に検討し、エピトープの異なる抗体の組み合わせを選択した。結果、H M a 1 6 6 と H M a 1 8 6 はどちらを固相に用いても r H M G B 1 と強く反応し、かつ、それぞれの抗体と H M G B 1 との結合に干渉しないことから、H M a 1 6 6 と H M a 1 8 6 はエピトープが異なると考えられた (表 1) 。

20

30

【 0 0 8 9 】

【表 1】

HMGB1モノクローナル抗体のエピトープマッピング

1次抗体	1-2	2	11-2	33	34-2	74	87	91	94	115	135	145	166	168	176	186	231	235	CP11-1
1-2	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-2	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
33	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
34-2	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
74	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
87	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
91	+	+	+	-	+	+++	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
94	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
115	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
135	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
145	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
166	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
168	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
176	+	+	+	+	+	+	+	-	+++	+++	-	+	+	+	+	-	+	+	+
186	+	+++	+	-	+	+	+	+	+	+++	+	-	+	+	+	+	+	+	+
231	+	+	+	-	+	+++	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
235	+	-	-	-	+	+	-	+++	-	-	+++	-	+	+	+	+	-	+	+
CP11-1	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++

+++ 二次抗体の結合は明確 (エピトープは異なる) / 1 次抗体と 2 次抗体を逆にしても反応性は同じ。この抗体ペアの中から最適ペアを選抜。
 + 二次抗体の結合は明確 (エピトープは異なる) / 1 次抗体と 2 次抗体を逆にすると反応性が異なる。
 - 二次抗体の結合は小さい (認識部位が重なっているか、近い領域にある)。
 - 二次抗体の結合は全く観察されない (エピトープが同じ)。

なお、モノクローナル抗体 H M a 1 6 6、H M a 1 8 6 は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに受託番号「N I T E B P - 0 2 0 2 0」、「N I T E B P - 0 2 0 1 9」としてそれぞれ寄託されているハイブリドーマより産生される。

【 0 0 9 1 】

(3) モノクローナル抗体作製の為のスクリーニング法

スクリーニングは各クローンの培養上清を 5 0 μ L の r h H M G B 1 (2 μ g / m L) を定法にて固相化し、精製水で 5 倍希釈したイムノブロック (D S ファーマバイオメディカル) でブロッキングした E L I S A プレ - トに加え、 2 時間インキュベートした後洗浄し、続いて 2 次抗体として H R P 標識した抗マウス I g G を加え、 2 時間インキュベートした後洗浄し、定法に従って発色基質 T M B Z (K P L) を加え、リン酸で反応を終了させ、マイ

10

【 0 0 9 2 】

3 . H M a 1 6 6、H M a 1 8 6 モノクローナル抗体のエピトープ解析

H M a 1 6 6 と H M a 1 8 6 モノクローナル抗体のエピトープについて、H M G B 1 の各種ペプチドと抗体との結合をピアコアで解析し、検討を行った。コントロールとして、ペプチド peptide No. 5 (K P D A A K K G V V K A E K / 配列番号 : 6) を免疫して得られたモノクローナル抗体 C P 1 1 - 1 を用いて同様の検討を行った。

結果、H M a 1 6 6 に peptide No. 1 (G ₂ - A ₁₇) (G K G D P K K P R G K M S S Y A / 配列番号 : 1) は結合し、かつ洗浄後の結合量を示す抗原抗体複合体安定性も見られた。peptide No . 3 (K ₆₅ - Y ₇₈) (K A D K A R Y E R E M K T Y / 配列番号 : 3) も H M a 1 6 6 に結合しているが

20

、複合体安定性が低いため、これは非特異的吸着であると思われる (図 2 A) 。

また、H M a 1 8 6 は No. 1、No. 2、No. 3、No. 4、No. 5 のどの peptide とも結合性は見られなかった (図 2 B) 。

C P 1 1 - 1 は免疫に用いた peptide No. 5 (K P D A A K K G V V K A E K / 配列番号 : 6) にのみ結合性、抗原抗体複合体安定性がみとめられた (図 2 C) 。

【 0 0 9 3 】

また、モノクローナル抗体 H M a 1 6 6 と H M a 1 8 6 について、H M G B 1 - N T との結合性をピアコアで解析し、検討を行った。コントロールとして組換えヒト H M G B 1 を用いた。

結果、H M G B 1 - N T (M ₁ - K ₈₂) (M G K G D P K K P R G K M S S Y A F F V Q T C R E E H K K K H P - D A S V N F S E F S K K C S E R W K T M S A K E K G K F E D M A K A D K A R Y E R E M K T Y I P P K / 配列番号 : 4) はモノクローナル抗体 H M a 1 6 6 と H M a 1 8 6 のどちらにも結合性を示した (図 3 A , B) 。

30

【 0 0 9 4 】

さらに、H M G B 1 - N T (M ₁ - K ₈₂) (M G K G D P K K P R G K M S S Y A F F V Q T C R E E H K K K H - P D A S V N F S E F S K K C S E R W K T M S A K E K G K F E D M A K A D K A R Y E R E M K T Y I P P K / 配列番号 : 4) と組換えヒト H M G B 1 と各モノクローナル抗体との反応性をドットプロット法を用いて確認した。

各タンパクを PVDF 膜に 100 ng スポットし、20% イムノブロック (D S ファーマ) で 2 時間室温でブロッキングし、TBS_t で洗浄後、各抗体を 1 μ g / ml となるように 10% イムノブロック含有 P B S に加え、2 時間室温でインキュベートした。洗浄後、10% イムノブロック含有 P B S で 1 0 0 0 0 倍に希釈した H R P 標識抗マウス I g G (G E H e a l t h c a r e # N A 9 3 1 V) を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (G E H e a l t h c a r e # R P M 2 2 3 6) で発色させた。

40

結果、モノクローナル抗体 H M a 1 6 6 と H M a 1 8 6 は H M G B 1 - N T と組換えヒト H M G B 1 に結合性を示した。C P 1 1 - 1 は組換えヒト H M G B 1 にのみ結合性を示した (図 4) 。

【 0 0 9 5 】

H M a 1 6 6 と H M a 1 8 6 はエピトープが異なると考えられ (表 1)、なおかつ、peptide No. 2 (C ₂₃ - F ₃₈) (C R E E H K K K H P D A S V N F / 配列番号 : 2) と peptide No. 3 (K ₆₅ - Y ₇₈) (K A D K A R Y E R E M K T Y / 配列番号 : 3) には反応しなかった為、H M a 1 8 6 は

50

45番目のシステイン(C₄₅)付近の構造もしくは23番目のシステイン(C₂₃)と45番目のシステイン(C₄₅)がジスルフィド結合した立体構造を認識している可能性が考えられた(図5)。

【0096】

4. 大腸菌組換えヒトHMGB1の酸化還元状態の確認

精製した組換えヒトHMGB1の酸化還元状態は以下の方法で確認した。

サイトカイン誘導能を持つジスルフィド型HMGB1は23番目のシステインC₂₃と45番目のシステインC₄₅がジスルフィド結合を持っており、サイトカイン誘導能は無く、ケモタキシスに關与する還元型HMGB1はこのジスルフィド結合が還元されていることが報告されている。精製した組換えヒトHMGB1がこれらのどのような酸化還元状態になっているかを簡易的に調べるため、SDS-PAGEを行い、両者の分子量を比較した。

10

【0097】

精製した組換えヒトHMGB1に酸化防止(ジスルフィド結合形成防止)の目的で10 mM glutathione、1 mM EDTAを加え、10% -ME非存在下、存在下の2xサンプルバッファー(第一化学薬品)(0.125 M Tris-HCl [pH 6.8]、4.3% SDS、30% Glycerol、0.01% BPB)を加え、室温で10分インキュベートしたのち、4-15%のアクリルアミドグラジエントゲル(Bio-Rad)を用いてSDS-PAGEを行った。コントロールとして、市販ジスルフィドHMGB1(HMGBiotech)を用いて同様にSDS-PAGEを行った。

【0098】

結果、市販ジスルフィドHMGBを-ME非存在下の非還元状態でSDS-PAGEしたものはジスルフィド結合を保持している為、分子が折りたたまれ、SDS-PAGEにおける計算上の分子量が23.3 kDaと低くなる(図7レーン4)。一方、市販ジスルフィドHMGBを-ME存在下の還元状態でSDS-PAGEした物はジスルフィド結合が切断され、分子の折りたたみ構造が解消されるためにSDS-PAGEにおける計算上の分子量が24.9 kDaと高くなる(図7レーン5)。

20

【0099】

組換えヒトHMGB1の場合、N末端に発現ベクター由来の付加配列を持つため、市販のHMGB1より高い分子量を示すが、非還元状態では26.7 kDaと低く(図7レーン2)、還元状態では27.4 kDaと高い値を示した(図7レーン3)。これらのことより、組換えヒトHMGB1はジスルフィド型HMGB1と同様、ジスルフィド結合を保持していると考えられた。

30

【0100】

5. 還元型ヒト組換えHMGB1の作製

還元型HMGB1は以下の方法で作製した。精製した組換えヒトHMGB1(1 mg/ml)に20 mMとなるようにDTTを加え、37 °Cで60分インキュベートした。その後、20 mM glutathioneを含むPBSで平衡化したバッファー交換用カラムNap-5(GE Healthcare)を用いてバッファー置換を行った。

【0101】

6. アルキル化ヒト組換えHMGB1の作製

アルキル化HMGB1は還元型ヒト組換えHMGB1と同様、20 mMとなるようにDTTを加え、37 °Cで60分インキュベートし、還元した後、40 mMとなるようにヨードアセトアミド(GE Healthcare)を加え、30分室温でインキュベートした。その後、過剰なヨードアセトアミドを不活性化するため、10 mMとなるようにDTTを加えた。引き続き、20 mM glutathioneを含むPBSで平衡化したバッファー交換用カラムNap-5(GE Healthcare)を用いてバッファー置換を行った。

40

ジスルフィド型HMGB1は、20 mM glutathioneを含むPBSで平衡化したバッファー交換用カラムNap-5(GE Healthcare)を用いてバッファー置換を行った。

タンパク定量はBradford色素結合法(Bio-Rad)で行った。

【0102】

7. ジスルフィドヒト組換えHMGB1特異的抗体

50

3種の抗HMGB1モノクローナル抗体HMa116、HMa186、CP11-1についてジスルフィド型ヒト組換えHMGB1、還元型ヒトHMGB1、アルキル化ヒト組換えHMGB1に対する反応性について、分子間相互作用測定装置、ピアコア(GE Healthcare)を用いて検討した。

センサーチップに抗マウスIgG抗体を共有結合で固定化し、マウスIgG(ロックランド社)でブロッキングした後、20 µg/mlの各モノクローナル抗体をそれぞれ結合させた。洗浄後、20 µg/mlのジスルフィド型ヒト組換えHMGB1、還元型ヒト組換えHMGB1、アルキル化ヒト組換えHMGB1を結合させ、その結合量を測定した。

【0103】

結果、モノクローナル抗体HMa166およびCP11-1にはジスルフィド型ヒト組換えHMGB1、還元型ヒト組換えHMGB1、アルキル化ヒト組換えHMGB1の3種の構造のHMGB1が結合した。一方、HMa186にはジスルフィド型ヒト組換えHMGB1のみが結合し、還元型ヒト組換えHMGB1、アルキル化ヒト組換えHMGB1には結合しなかった(図8)。すなわち、HMa186モノクローナル抗体はサイトカイン誘導能を持つジスルフィド型HMGB1の23番目のシステインC₂₃と45番目のシステインC₄₅によるジスルフィド結合領域を特異的に認識する抗体であった。

【0104】

8. トロンピン分解HMGB1の作製

WO2014/147873 A1では、HMGB1はトロンピンにより10番目のアルギニン(R₁₀)と11番目のグリシン(G₁₁)の間で切断され(HMGB1のN末端M1-R10が切断され)、新たに露呈したN末端アミノ酸残基として「GKMSS・」を有するHMGB1の分解物des-HMGB1が生じることが報告されている。また、WO2014/147873 A1では、des-HMGB1は不活性化され、細胞障害性が低くなることが報告されている(WO2014/147873 A1 P.315-22行目)。

そこで、各モノクローナル抗体のトロンピン分解HMGB1に対する反応性を調べた。トロンピン分解はSigma-Aldrich社製Thrombin Clean Cleave Kitを用いて取扱説明書に準じて行った。1 mg/mlのヒト組換えHMGB1 90 µlに10 µlの10Xバッファーを加え、その後、洗浄したトロンピン-アガロースを加えて37 °Cで3時間および20時間インキュベートした。インキュベーション後、500 × gで遠心してトロンピン-アガロースを取り除き、SDS-PAGEを行い、分子量の低下を確認した(図9)。さらに、SDS-PAGE後、トランスブロッター(Bio-Rad)を用いてPVDF膜に定法により電気転写し、トロンピン分解HMGB1と思われるバンドを切り出し、プロテインシークエンサー(ABI)を用いてN末端アミノ酸配列解析を行った。結果、N-GKMSSYAFFVQTXXE EHKKK C(X:未知アミノ酸/配列番号:8)と配列決定でき、des-HMGB1と同等の配列が確認できた(図9)。

【0105】

9. des-HMGB1に対する抗体の反応性

ピアコア(GE Healthcare)を用いてdes-HMGB1と抗HMGB1モノクローナル抗体HMa166、HMa186との結合性を検討した。

センサーチップに抗マウスIgG抗体を共有結合で固定化し、マウスIgG(ロックランド社)でブロッキングした後、20 µg/mlの各モノクローナル抗体をそれぞれ結合させた。洗浄後、20 µg/mlのdes-HMGB1を結合させ、その結合量を測定した。

結果、HMa166はdes-HMGB1とは反応しなくなったが、HMa186はdes-HMGB1とも結合できた(図10)。

【0106】

10. ジスルフィド型HMGB1を測定出来るELISAの作製

96 well ELISA plate (Maxsorp, Nunc)に10 µg/mLの抗HMGB1抗体HMa186を100 µL加え、定法に従い、固相化し、イムノブロック(DSファーマバイオメディカル)を精

10

20

30

40

50

製水で5倍希釈したものを200 μ L分注し、ブロッキングを行った。TBS_t (10 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)で洗浄した後、0-80 ng/mLとなるように組換えHMG B 1を加え、室温で2時間反応させ、TBS_tで洗浄後、HRP標識した抗HMG B 1抗体CP11-1を加え、洗浄後、定法に従って発色基質TMBZ (KPL)を加え、リン酸で反応を終了させ、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸収を測定した。

結果、2.5-80 ng/mLの組換えHMG B 1で直線性が得られた(図11)。

【0107】

11. 全てのHMG B 1 (トータル)を測定出来るELISAの作製

病態の進行状態、経過等の正確な把握にはサイトカイン誘導能のあるジスルフィド型HMG B 1のみならず、還元型HMG B 1や、分解されたdes-HMG B 1の測定も重要である。そこで、HMa166、HMa186を併用することによりジスルフィド型HMG B 1、還元型HMG B 1、des-HMG B 1の全てのHMG B 1 (トータルHMG B 1)を測定出来るELISAを作製した。

96 well ELISA plate (Maxsorp, Nunc)に、10 μ g/mLとなるように混合したHMa166とHMa186を100 μ L加え、定法に従い、固相化し、イムノブロック (DSファーマバイオメディカル)を精製水で5倍希釈したものを200 μ L分注し、ブロッキングを行った。TBS_t (50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)で洗浄した後、0-80 ng/mLとなるように組換えHMG B 1を加え、室温で2時間反応させ、TBS_tで洗浄後、HRP標識した抗HMG B 1抗体CP11-1を加え、洗浄後、定法に従って発色基質TMBZ (KPL)を加え、リン酸で反応を終了させ、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸収を測定した。

結果、2.5-80 ng/mLの組換えHMG B 1で直線性が得られた(図12)。

【0108】

12. トータルHMG B 1測定ELISAの至適化

ELISA等の抗原抗体反応において、一部の抗体では一般的な抗原抗体反応で用いられる塩濃度やpH範囲であっても、干渉をうけ、良く反応出来ないことがある。そこで、当該トータルHMG B 1測定ELISAの反応バッファーについて至適塩濃度およびpHの検討を添加回収実験により行った。96 well ELISA plate (Maxsorp, Nunc)に、10 μ g/mLとなるように混合したHMa166とHMa186を100 μ L加え、定法に従い固相化し、100 mM Tris-HCl (pH8.8)、1% BSAを300 μ L分注し、ブロッキングを行った。TBS_t (50 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.05% Tween-20)で洗浄した。pHを7.0、7.5、8.0、8.5、9.0に調製した5% BSA、0.1% Tween-20含有100 mM Tris-HCl、100 mM NaCl緩衝液(総塩濃度200 mM)、5% BSA、0.1% Tween-20含有100 mM Tris-HCl、40 mM NaCl緩衝液(総塩濃度140 mM)、5% BSA、0.1% Tween-20含有20 mM Tris-HCl、100 mM NaCl緩衝液(総塩濃度120 mM)にてヒトプール血漿(コージンバイオ)を10倍希釈し、さらに20 ngの組換えHMG B 1を加え、37 °Cで2時間反応させた。TBS_tで洗浄した後、HRP Protector (CANDOR Bioscience GmbH)で2 μ g/mLとなるように希釈したHRP標識抗HMG B 1抗体CP11-1を加え、室温で1時間反応させ、洗浄後、定法に従って発色基質TMBZ (KPL)を加え、リン酸で反応を終了させ、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸収を測定した。回収率は実測のHMG B 1値から各条件で測定したプール血漿中のHMG B 1濃度を減算した数値を添加量20で除して算出した。

【0109】

結果、ヒトプール血漿に添加回収したHMG B 1の添加回収率を比較した場合、100 mM Tris-HCl (pH7.0)、40 mM NaClの緩衝液を用いた時の121%を除いて、どの塩濃度の緩衝液を用いてもほぼ100% \pm 10%の回収率に収まっており、大きな違いは認められなかった。当該ELISAはELISA等で良く用いられる生理的塩濃度である150 mM前後では緩衝液の塩濃度の違いに影響がない事が分かった。また、pHについてもELISA等で良く用いられるpH7.0からpH9.0の間でも大きな影響がないことが分かった(図13)。

【0110】

13. HMa166、HMa186のCDR領域のシーケンス

(1) RNA抽出

10

20

30

40

50

HMa166、HMa186産生ハイブリドーマ(1×10^7 cell)に0.75 mlのTrizol LS Reagent (Invitrogen社)を加え、上下にピペティングし、直接細胞を溶解した。5分間室温でインキュベートした後、0.2 mlのクロロホルムを加え、15秒間激しく震とう混和した。室温で15分インキュベートした後、12,000g、15分、4で遠心した。遠心後、水層を回収し、0.5 mlのイソプロパノールを加え、10分間室温でインキュベートし、12,000g、10分、4で遠心した。得られた沈殿に1 mlの80%エタノールを加え、沈殿を洗浄し、乾燥させた後、RNase-free水に溶解し、RNAとした。

【0111】

(2) cDNAの合成

cDNA合成はPrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社)を用いて行った。2 μ gのRNAにoligo dTプライマー 5 μ M、dNTP 1mM、RNase-free水を加え10 μ lとし、65で5分間インキュベートした。その後、5xPrimeScript II Buffer、RNase Inhibitor 20U、PrimeScript IIRNase 200U、RNase-free水を加えて20 μ lとした。混合液を42で45分間インキュベートした後、72で15分熱処理した。

【0112】

(3) CDR領域のPCR

CDR領域のクローニングはWangら (J. Immunol. Method 2000, 233, 167-177)の方法に従って行った。PCR酵素はTakara ExTaq (タカラバイオ社)を用いた。重鎖のPCRにはそれぞれIgG1プライマー (5'-ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC-3' / 配列番号: 64)、5'MH1プライマー (5'-SARGTNMAGCTGSAGSAGTC-3' / 配列番号: 65)のセット、軽鎖のPCRには3'KCプライマー (5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATC-3' / 配列番号: 66)、5'MKプライマー (5'-GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA-3' / 配列番号: 67)のセットを用いた。

cDNA 1 μ l、10x ExTaq Buffer 4 μ l、dNTP 3.2 μ l、各0.5 μ Mのプライマーセット、1U ExTaq、滅菌精製水を加えて40 μ lとした。混合液を94 3分の変性の後、94 30秒 - 48 30秒 - 72 30秒を30サイクル繰り返し、72 3分伸長反応を行った。

【0113】

(4) CDR領域のクローニング

得られたそれぞれの重鎖、軽鎖のPCR産物を精製し、pT7 T-vector (Novagen社)にTAクローニングした。16で一昼夜インキュベーションし、ライゲーションした産物を大腸菌JM109にトランスフォームし、50 μ g/mlのアンプシリン含有LB寒天培地に植菌し、一晚培養した。生育したコロニーをピックアップし、ポイル法にて鑄型DNAを調整し、PCRに供した。

【0114】

(5) CDR領域のシーケンス

PCR酵素はTakara ExTaq (タカラバイオ社)を用いた。鑄型DNA 1 μ l、10x ExTaq Buffer 4 μ l、dNTP 3.2 μ l、各0.5 μ MのM13Uプライマー (5'-TGTAACAACGACGGCCAGT-3' / 配列番号: 68)、M13Rプライマー (5'-GAAACAGCTATGACCATG-3' / 配列番号: 69)、1U ExTaq、滅菌精製水を加えて40 μ lとした。混合液を94 3分の変性の後、94 30秒 - 55 30秒 - 72 30秒を30サイクル繰り返し、72 3分伸長反応を行った。得られたPCR産物を精製し、それぞれM13Uプライマー、M13Rプライマーを用いて定法によりシーケンス反応を行い、ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems

10

20

30

40

50

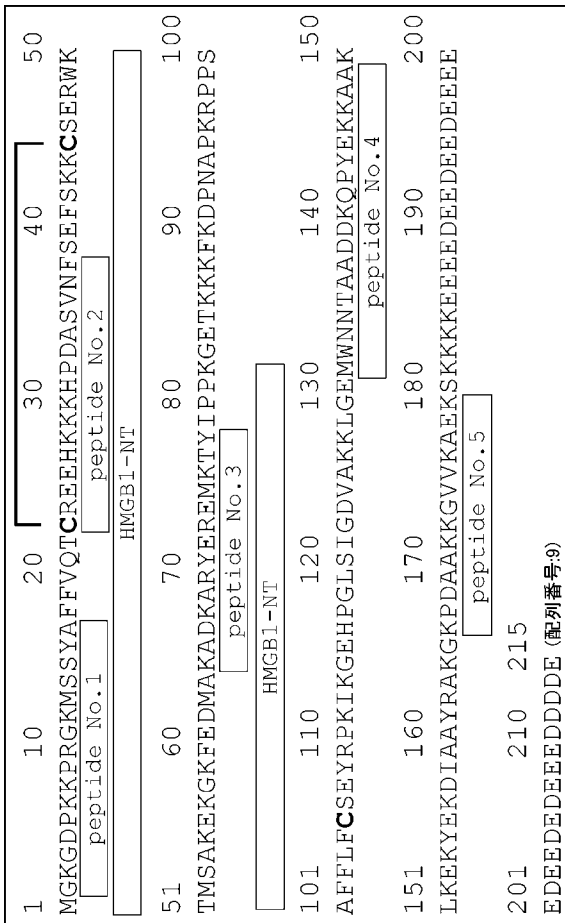
社)を用いて、シーケンスを行った。

【0115】

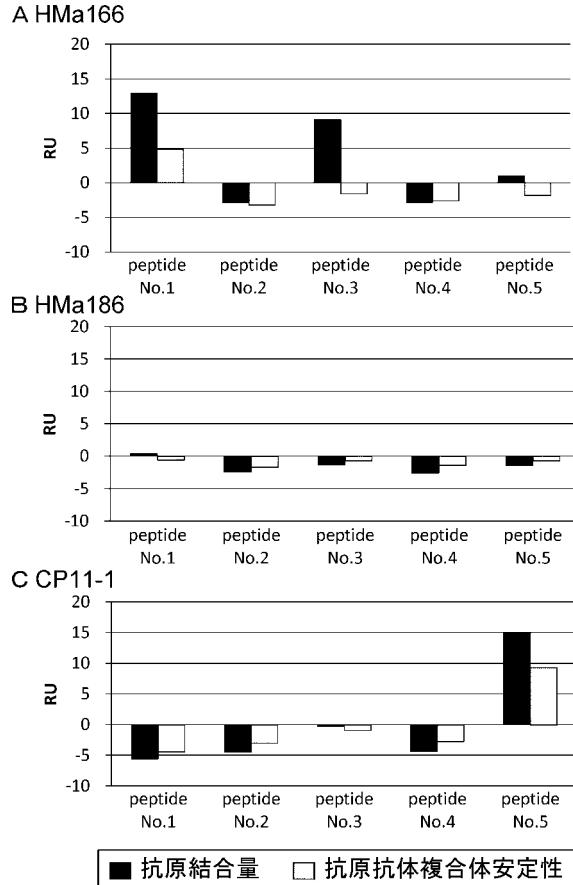
(6) CDR領域の配列解析

シーケンサーにより、得られた配列を確認し、IGBLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)を用いてCDR領域の解析を行った。その結果を図14~16に示した。

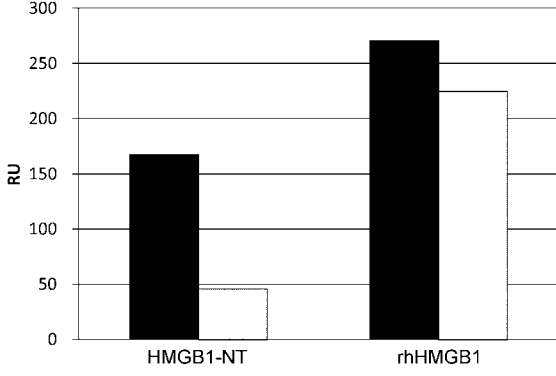
【図1】



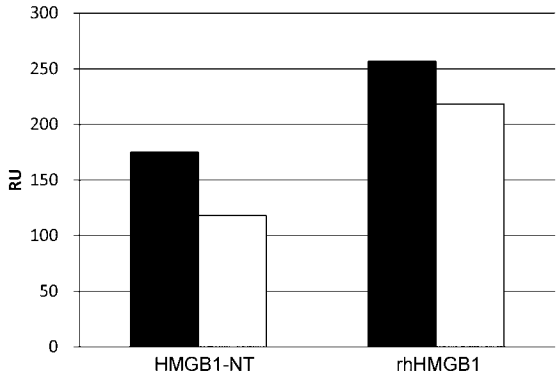
【図2】



【 図 3 】
A HMa166

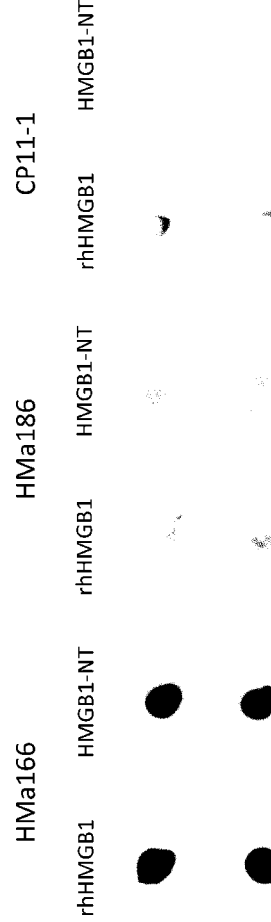


B HMa186

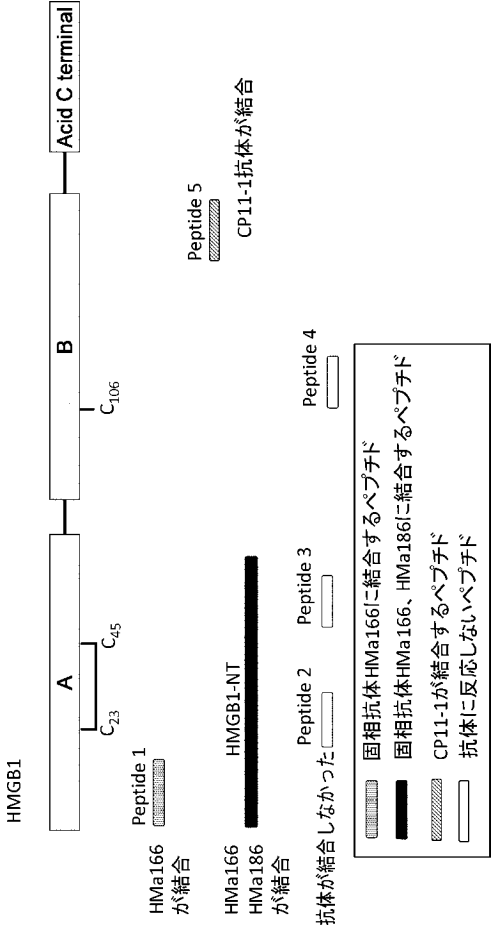


■ 抗原結合量 □ 抗原抗体複合体安定性

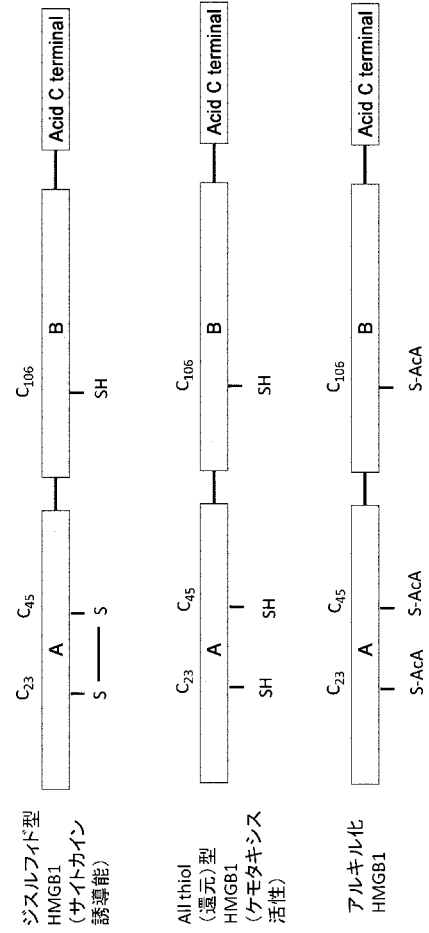
【 図 4 】



【 図 5 】

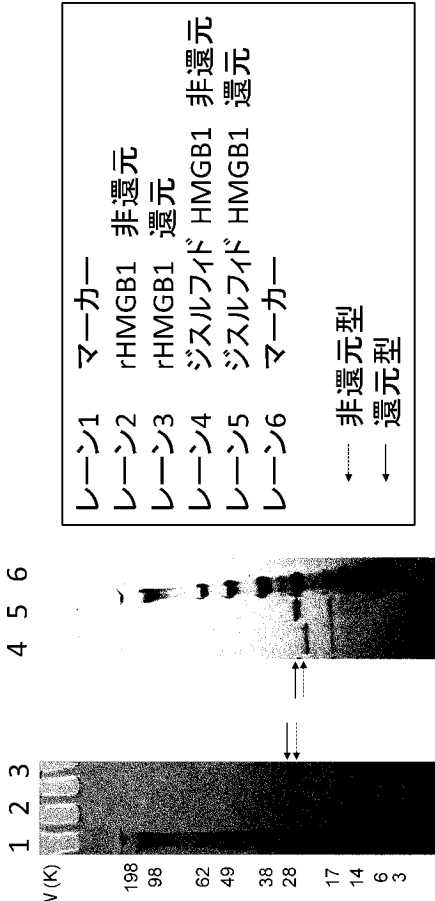


【 図 6 】

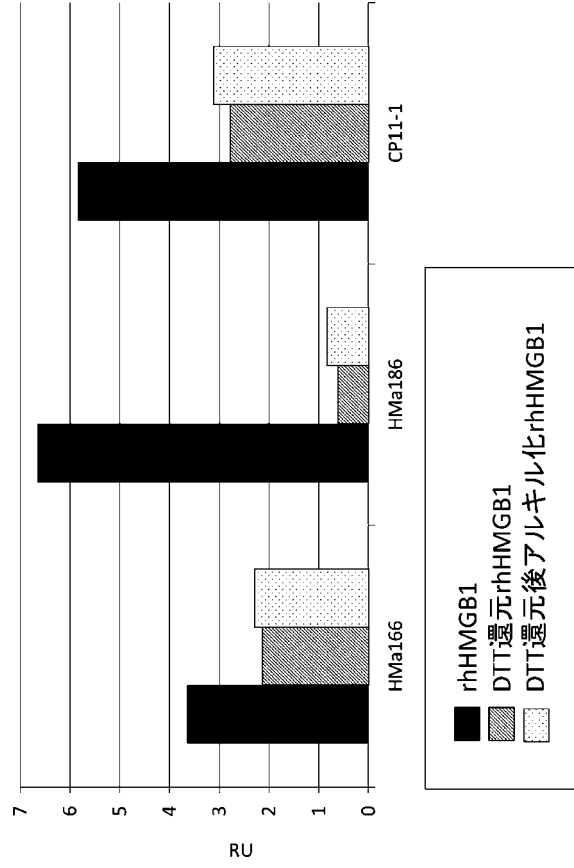


S-AcA: エーアドアセトアミドによりアルキル化された官能基

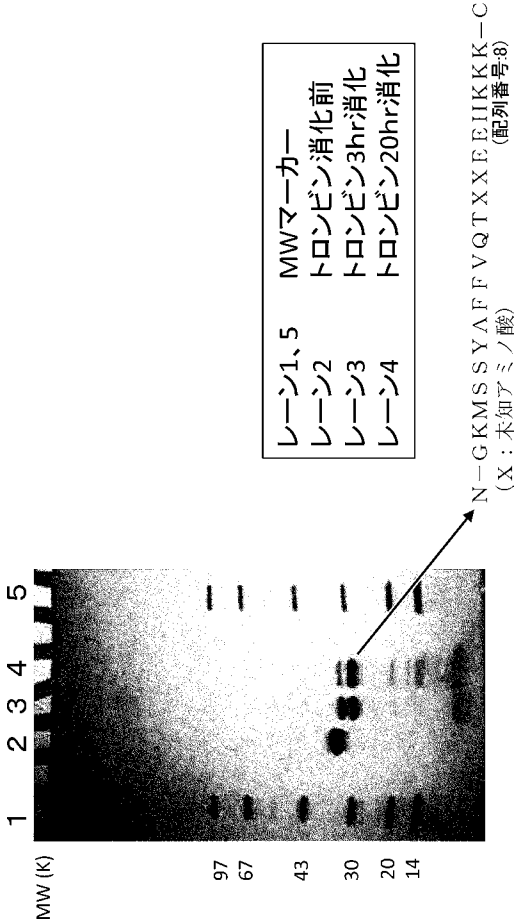
【 図 7 】



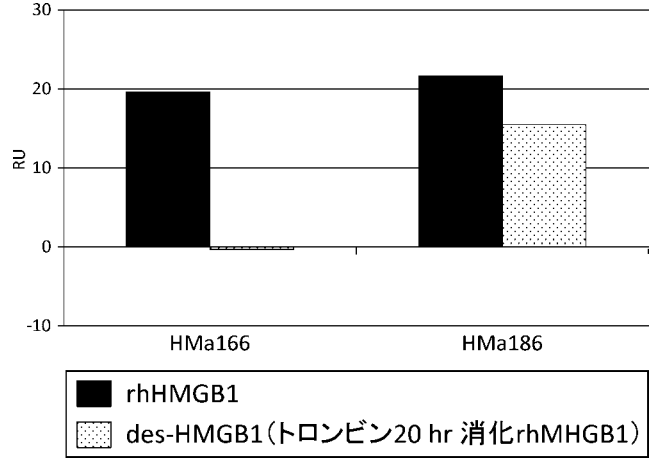
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 5 】

HMa186V_H領域のIGBLAST解析アライメント

```

<-----FR1-IMGT-----><----->
D T V I T Q S P A S I A V S I G Q R A T I S Y R A S K S V S
HMa186VK 183 GACATTGTGTCAGACAGTCTCCTTCCTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGCCACCACTCATACAGGGCAGCAAAAGTGCAT 272
-----FR2-IMGT-----><----->
T S G Y S Y M H W N Q Q K P Q P P R L L I Y L V S N I E S
HMa186VK 273 ACATCTGGCTATAGTATATGCAACCAACAGAAACCCAGAGCCAGCCAGACTCTCTATCTTCTATCCAACTAGAAATCT 362
-----FR3-IMGT-----><----->
G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E D A A P
HMa186VK 363 GSEETCCCTCCAGCTCTATGTCAGTGGTCTTGGACAGACTTCCCTCAACVCCATCTCTGGAGAGAGATGCTGCACCA(配列番号70)449

```

【 配列表 】

2018079393000001.app

【 図 1 6 】

HMa166 V_H領域のIGBLAST解析アライメント

```

<-----FR1-IMGT-----><-----COR1-IM
E V K L E S G G I V K P G S L K L S C A A S G P T F S
HMa166VH 2 GAGTCTCAGCTGGAGAGTCTGGGGAGGCTTAGTAGAGCTCTGAACTCTCCCTGAACTCTCCCTGCAAGCCCTCTGGATTCACTTCGCT 91
-----FR2-IMGT-----><-----COR2-IMGT
S Y A M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S S G S Y T Y
HMa166VH 92 ACCTATGCCATCTCTTGGCTTCCAGACTCCGAGAGAGGCTGAGTGGCTGCAACCATTTAGTGTAGTGTAGTACACTACTT 181
-----FR3-IMGT-----><-----FR3-IMGT
L D S V K G R F T I S R D N R K N T L Y L Q M S S L K S E D
HMa166VH 182 CTAGCACTGTGAAGGGCGATTTCACATCTCAGAGCAATCCAGAGACCCCTTATCTGCAATGAGGAGGAGCTCCGCTCTGAGGC 271
-----COR3-IMGT-----><-----
T A Y Y C A R R D Y R C F D Y W G O C T I T V S S
HMa166VH 272 ACGCCCTGTATTCTGCAAGAGAGGAGGATTCAGAGGGGTTTGTACTAGGGGCGAGCCACCTCTCAAGTCTCTCTG 359

```

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/037789
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(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) Int.Cl. C07K16/18, C07K16/46, C12P21/08, G01N33/53, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2016/118531 A1 (UNIVERSITY OF HAWAII) 28 July 2016, claims, examples 4-5, paragraphs [0094]-[0096] (Family: none)	1-5, 7-35 6
Y A	JP 2011-241219 A (CORNERSTONE THERAPEUTICS INC.) 01 December 2011, example 1, fig. 7 & US 2005/0152903 A1, example 1, fig. 7 & WO 2005/026209 A2 & EP 1668035 A & CN 1878793 A	1-5, 7-35 6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2018 (12.01.2018)		Date of mailing of the international search report 23 January 2018 (23.01.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037789

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2014/147873 A1 (SHINO-TEST CORPORATION) 25 September 2014, page 3, lines 15-22 & JP 14-147873 A1	1-5, 7-35 6
P, Y P, A	WO 2017/077001 A1 (INSTITUT PASTEUR) 11 May 2017, claims, example VII. & EP 3165927 A1	4-5, 7-29, 32-33 1-3, 6, 30-31, 34-35
A	WAKO BIO WINDOW, no. 147, WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., 21 October 2016, page 25 http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/indev.htm , http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/biowindx_2.htm , http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/biowin/pdf/biol47.pdf [retrieved on 11 January 2018]	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037789

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.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037789

"Continuation of Box No. III"

Document 1: JP 2011-241219 A (CORNERSTONE THERAPEUTICS INC.) 2011.

12.01, Example 1, Fig. 7 & US 2005/0152903 A1, Example
1, Fig. 7 & WO 2005/026209 A2 & EP 1668035 A & CN 1878793
A

Claims are divided into the three inventions below.

(Invention 1) Claims 1-29

Claims 1-29 have the special technical feature of an "antibody specifically coupled to a disulfide form of HMGB1". Thus, the inventions as in claims 1-29 are classified as Invention 1.

(Invention 2) Claims 30-34

The inventions as in claims 30-34 have the technical feature of an "antibody linked to HMGB1" in common with claim 1 classified as Invention 1. However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1 (particularly Example 1, Fig. 7) and thus cannot be said to be a special technical feature. In addition, there are no other identical or corresponding special technical features between claims 30-34, and claim 1.

In addition, none of claims 30-34 are dependent on claim 1. In addition, claims 30-34 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as Invention 1.

Thus, claims 30-34 cannot be classified as Invention 1.

In addition, claims 30-34 have the special technical feature of an "antibody which is coupled to both a disulfide form of HMGB1 and a reduced form of HMGB1, and is not coupled to des-HMGB1", and thus are classified as Invention 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037789

(Invention 3) Claim 35

The invention as in claim 35 has the technical feature of an "antibody coupled to HMGB1" in common with claim 1 classified as Invention 1, and claim 30 classified as Invention 2. However, said technical feature does not make a contribution over the prior art and thus cannot be said to be a special technical feature. In addition, there are no other identical or corresponding special technical features between claim 35 and claim 1, or between claim 35 and claim 30.

In addition, claim 35 is not dependent on either claim 1 or claim 30. In addition, claim 35 is not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as Invention 1 or 2.

Thus, claim 35 cannot be classified as either Invention 1 or Invention 2.

In addition, claim 35 has the special technical feature of a "monoclonal antibody CP11-1 produced from a hybridoma having deposit number NITE BP-02021", and thus is classified as Invention 3.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 7 7 8 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/09(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. C07K16/18, C07K16/46, C12P21/08, G01N33/53, C12N15/09		
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 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
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
Y A	WO 2016/118531 A1 (UNIVERSITY OF HAWAII) 2016.07.28, 特許請求の範囲、Example 4-5、[0094]-[0096] (ファミリーなし)	1-5, 7-35 6
Y A	JP 2011-241219 A (コーナーストーン セラピューティクス イン コーポレイテッド) 2011.12.01, 実施例1、図7 & US 2005/0152903 A1, Example 1, Fig.7 & WO 2005/026209 A2 & EP 1668035 A & CN 1878793 A	1-5, 7-35 6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 12.01.2018	国際調査報告の発送日 23.01.2018	
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) 厚田 一拓 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 5575

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 7 7 8 9
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
Y A	WO 2014/147873 A1 (株式会社シノテスト) 2014.09.25, 第3頁第15-22行 & JP 14-147873 A1	1-5, 7-35 6
P, Y P, A	WO 2017/077001 A1 (INSTITUT PASTEUR) 2017.05.11, 特許請求の範囲、EXAMPLE VII. & EP 3165927 A1	4-5, 7-29, 32-33 1-3, 6, 30-31, 34-35
A	WAKO BIO WINDOW, No.147, 和光純薬工業株式会社, 2016.10.21, 第25頁, < http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/indev.htm , http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/biowindx_2.htm , http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/biowin/pdf/biol47.pdf > [retrieved on 2018-01-11]	1-35

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2017/037789

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 _____ は、この国際調査機関が調査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の国際調査機関は認めた。
特別ページに記載

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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2015年1月)

第Ⅲ欄の続き

文献 1 : JP 2011-241219 A (コーナーストーン セラピューティクス インコーポレイテッド)
2011.12.01, 実施例 1、図 7
& US 2005/0152903 A1, Example 1, Fig. 7
& WO 2005/026209 A2 & EP 1668035 A & CN 1878793 A

請求の範囲は、以下の 3 つの発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1-29

請求項 1-29 は、「ジスルフィド型 HMGB1 に特異性に結合する抗体」という特別な技術的特徴を有している。したがって、請求項 1-29 に係る発明を発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 30-34

請求項 30-34 に係る発明は、発明 1 に区分された請求項 1 と、「HMGB1 に結合する抗体」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 1 の開示内容（特に実施例 1、図 7）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項 30-34 と、請求項 1 との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項 30-34 は、請求項 1 の従属請求項ではない。また、請求項 30-34 は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 30-34 は発明 1 に区分できない。

そして、請求項 30-34 は「ジスルフィド型 HMGB1 と還元型 HMGB1 の両方に結合し des-HMGB1 に結合しない抗体」という特別な技術的特徴を有しているため、発明 2 に区分する。

(発明 3) 請求項 35

請求項 35 に係る発明は、発明 1 に区分された請求項 1 及び発明 2 に区分された請求項 30 と、「HMGB1 に結合する抗体」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、上述のように先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項 35 と、請求項 1 又は 30 との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項 35 は、請求項 1 及び 30 のいずれの従属請求項でもない。また、請求項 35 は、発明 1 又は 2 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 35 は発明 1-2 に区分できない。

そして、請求項 35 は「受託番号 NITE BP-02021 で特定されるハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体 CP11-1」という特別な技術的特徴を有しているため、発明 3 に区分する。

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 15/13 (2006.01) C 1 2 N 15/13

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

特許法第30条第2項適用申請有り (1)平成28年10月21日、和光純薬工業株式会社発行の刊行物「WAKO BIO WINDOW No.147 (2016.11)」第25頁に発表。(2)平成28年10月21日、<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/index.htm> http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/biowin/article/biowinx__2.htm及び<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/biowin/pdf/bio147.pdf> を通じて発表。

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 朝倉 昌博
 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内
- (72)発明者 芥子 亜矢
 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内
- (72)発明者 安部 加奈子
 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内
- (72)発明者 坂本 奈々
 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内
- (72)発明者 山 崎 志保
 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内
- (72)発明者 上原 啓嗣
 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 FA74

(54)【発明の名称】ジスルフィド型HMGB1特異的抗体、ジスルフィド型HMGB1の測定方法および測定用キット、ならびに、還元型HMGB1、ジスルフィド型HMGB1、トロンビン分解HMGB1等の全てのHMGB1を定量することが可能な測定方法および測定用キット

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

专利名称(译)	二硫化物型HMGB1特异性抗体，二硫化物型HMGB1的测定方法和测定试剂盒以及能够定量还原的HMGB1，二硫化物型HMGB1和凝血酶降解的HMGB1等所有HMGB1的测定方法和测定试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2018079393A1	公开(公告)日	2019-09-12
申请号	JP2018547610	申请日	2017-10-19
申请(专利权)人(译)	扶桑制药工业有限公司		
[标]发明人	朝倉昌博 芥子亜矢 安部加奈子 上原啓嗣		
发明人	朝倉 昌博 芥子 亜矢 安部 加奈子 坂本 奈々 山▲崎▼ 志保 上原 啓嗣		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/46 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/13		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/46 G01N33/6875 C07K16/24 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/76 G01N33/6863 G01N2333/52		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/543.501.D C12N15/13		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2016209510 2016-10-26 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供对二硫化物型HMGB1显示特异性反应性的抗体。此外，本发明提供了使用抗体特异性测量二硫化物型HMGB1的方法，以及用于测量的试剂盒或试剂。本发明还提供了使用这样的抗体和与二硫键型HMGB1和还原型HMGB1都结合但不与des-HMGB1结合的抗体测量总HMGB1的方法，以及用于测量的试剂盒或试剂。

