

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2020年3月26日(26.03.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/059847 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/13* (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 1/15* (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/036926
- (22) 国際出願日: 2019年9月20日(20.09.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2018-176802 2018年9月21日(21.09.2018) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4 5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 岡澤 均 (OKAZAWA, Hitoshi); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4 5号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号 アドレスビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY BINDING SPECIFICALLY TO HUMAN HMGB1, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING ALZHEIMER'S DISEASE CONTAINING SAID HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称: ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、及びそれを含有するアルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a human monoclonal antibody that binds specifically to human HMGB1 and has high activity to inhibit phosphorylation of Ser46 of human MARCKS; and a pharmaceutical composition, etc., for treating or preventing Alzheimer's disease, the pharmaceutical composition having said antibody as an active ingredient. There is used a human monoclonal antibody that binds specifically to human HMGB1, wherein the human monoclonal antibody includes: a heavy chain CDR1, a heavy chain CDR2, and a heavy chain CDR3 that have specific amino acid sequences; and a light chain CDR1, a light chain CDR2, and a light chain CDR3 that have specific amino acid sequences. Such a human monoclonal antibody can also be used as a pharmaceutical composition for treating or preventing Alzheimer's disease.

(57) 要約: 本発明は、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する活性が高い、ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、該抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物等を提供することをと課題とする。ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体であって、特定のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3と、特定のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3とを含むヒトモノクローナル抗体を用いる。かかるヒトモノクローナル抗体は、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物として用いることもできる。

WO 2020/059847 A1

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
（規則5.2(a)）

## 明 細 書

発明の名称：

ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、及びそれを含有するアルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体（すなわち、抗ヒトHMGB1ヒトモノクローナル抗体）、及びそれを含有するアルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物等に関する。

### 背景技術

[0002] アルツハイマー病（アルツハイマー型認知症、AD）は、初老期～老年期に生じる進行性の神経変性疾患である。その主な症状は、記憶障害、認識障害、高次脳機能障害（失語、失行、失認、構成失行）、人格の変化等である。そして、このような症状故、患者本人の生活の質の低下のみならず、家族等の周囲の生活にも多大な影響を与えている。さらに、その患者数は人口の高齢化に伴い増加の一途を辿っており、アルツハイマー病は世界的に現代社会の抱える深刻な問題となっている。

[0003] そのため、アルツハイマー病については精力的に研究が進められており、例えば、アルツハイマー病は、老人斑の沈着、神経原線維変化（神経原線維のもつれ、対らせん状繊維（PHF））の沈着によっても神経病理学的に特徴づけられることが明らかになっている。そして、これら構造体の沈着が、前述の諸症状に関与する神経機能障害や神経細胞死（神経細胞の脱落）を引き起こすと考えられている。

[0004] また、老人斑は、アミロイドβ（Aβ）と称される40アミノ酸程度のポリペプチドが凝集し、神経細胞の外部に高密度に沈着して生じる構造体であることが明らかになっている。さらに、神経原線維変化についても、微小管結合タンパク質であるタウ（tau）がリン酸化されることにより、細胞骨格を形成する微小管から解離し、tau同士が重合することによって生じる

構造体であることが明らかになっている。

[0005] このように、アルツハイマーの病因及び発症機構については、 $A\beta$ の凝集（アミロイド病変）が生じ、該凝集によって  $\tau$  のリン酸化及び重合（ $\tau$  病変）が促進され、ひいては神経細胞死等に至るという機構（アミロイドカスケード仮説）が有力視されているものの、アルツハイマー病の発症機構等については未だ完全には解明されておらず、根治薬の提供に至っていないのが現状である。

[0006] ところで、DNAの構造維持や転写調節に関わる非ヒストンクロマチン関連タンパク質の一つとして、HMGB1（High Mobility Group Box 1）タンパク質が知られている。また近年、このHMGB1に関しては、このような核内の機能のみならず、細胞の壊死により細胞外に遊離し、又は血管炎症性シグナル応答で細胞外に能動的に分泌される等により、所謂DAMPs（損傷関連分子パターン）として機能することも注目されている。さらに、HMGB1は、ミクログリアによる貪食作用を抑制することも報告されている。そして、この貪食作用によって $A\beta$ の凝集が除去されることから、HMGB1はアルツハイマー病等の病変に関連することが示唆されている（特許文献1及び2）。

[0007] 一方、本発明者らは、アルツハイマー病モデルマウス及びアルツハイマー病患者の死後脳を対象に網羅的なプロテオーム解析を行い、アルツハイマー病に共通する異常リン酸化シグナルネットワークの分析を行った。その結果、本発明者らは、MARCKSというリン酸化酵素の基質のリン酸化が、アルツハイマー病発症前の早い段階から生じているという知見を得た（非特許文献1）。本発明者らはさらに、MARCKSの46番目のセリン（Ser 46）のリン酸化が、アルツハイマー病発症前の早い段階から生じていること、ニューロンのネクロシスにより細胞内から漏出したHMGB1が、MARCKSのリン酸化を誘導し、神経突起の変性を誘導するという知見を得て、HMGB1に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、かかるマウスモノクローナル抗体が、MARCKSのSer 46のリン酸化を阻害すると

いう知見を得た（非特許文献2）。本発明者らは、かかるマウスモノクローナル抗体が、アルツハイマー病モデルマウスにおける認識障害を回復すること、大脳皮質におけるDNA損傷を減少させること、及び、A $\beta$ 及びHMGB1双方の多量体形成を阻害することを確認している（非特許文献2、特許文献3）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0008] 特許文献1：特開2004-107260号公報

特許文献2：国際公開第2008/099913号パンフレット

特許文献3：国際公開第2018/030405号パンフレット

### 非特許文献

[0009] 非特許文献1：Human Molecular Genetics, 2015 Jan 15;24(2):540-58

非特許文献2：SCIENTIFIC REPORT, 2016 Aug 25;6:31895

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する活性が高い、ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、該抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物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

[0011] 上記のような背景技術の状況下において、本発明者は、ヒトにおいて、アルツハイマー病に対して、特許文献3のマウスモノクローナル抗体よりも優れた予防又は治療効果が期待されるヒトモノクローナル抗体を取得するべく、鋭意研究を行った。具体的には、本発明者らは、ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を9種類作製し、これらの各ヒトモノクローナル抗体が、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する活性を調べたところ、かかるリン酸化阻害活性が特に高い4種のヒトモノクロー

ナル抗体を見だし、さらに、これらの各ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、並びに、各々の相補性決定領域（CDR）1～3のアミノ酸配列等も決定した。さらに、本発明者は、アルツハイマー病モデルマウスに上記ヒトモノクローナル抗体を皮下投与又は静脈注射することによって、認知機能障害が抑制・改善されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち、本発明は

(1) ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、下記(A)～(D)のいずれかに記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

(A) 配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（CDR）1、配列番号4に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号8に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号9に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(B) 配列番号13に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（CDR）1、配列番号14に示され

るアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号18に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号19に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号20に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(C) 配列番号23に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号24に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号25に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号28に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号29に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号30に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖C

D R 3 とを含む；

(D) 配列番号 33 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 34 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2、及び配列番号 35 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 と、

配列番号 38 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、配列番号 39 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、及び配列番号 40 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 とを含む；や、

(2) (A) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (a) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(B) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (b) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(C) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (c) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(D) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (d) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体である上記 (1) に記載のヒトモノクローナル抗体；

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列か

らなる軽鎖可変領域とを含む；

(b) 配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(c) 配列番号 22 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(d) 配列番号 32 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；や、(3) (A) 及び (a) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (a1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(B) 及び (b) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (b1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(C) 及び (c) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (c1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(D) 及び (d) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (d1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体である上記 (2) に記載のヒトモノクローナル抗体；

(a1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(b1) 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列から

なる軽鎖とを含む；

(c 1) 配列番号 21 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(d 1) 配列番号 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 36 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；や、

(4) 上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を含む組成物；や、

(5) 上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物；や、

(6) 上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子；や、

(7) プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている上記 (6) に記載の抗体遺伝子とを含むベクター；や、

(8) 上記 (7) に記載のベクターが導入されていることを特徴とする宿主細胞；

に関する。

## 発明の効果

[0013] 本発明によれば、ヒト MARCKS の Ser 46 のリン酸化を阻害する活性が高い、ヒト HMGB 1 に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、該抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物等を提供することができる。

## 図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明のヒトモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより、

ヒトHMGB1タンパク質を検出した結果を示す図である。図中、「#127」、「#129」、「#194」、「#459」、「#130-008」、「#213-012」、「#213-001」、「#283-010」、及び「#370-010」は一次抗体として本発明のヒトモノクローナル抗体を用いた結果を、「(-)」は一次抗体無添加（ネガティブコントロール）の結果を、「A社製市販抗体」は一次抗体として市販の抗ヒトHMGB1抗体（ポジティブコントロール）を用いた結果をそれぞれ示す。また、図中、「HMGB1」はヒトHMGB1タンパク質のシグナル（バンド）を示す。

[図2]本発明のヒトモノクローナル抗体（モノクローナル抗体#127）とヒトHMGB1タンパク質との相互作用を、表面プラズモン共鳴法（SPR）によって調べた結果を示す図である。解析の結果、モノクローナル抗体#127の解離定数（KD）は $2.17 \times 10^{-11}$ Mであり、極めて親和性の高い抗体であることが明らかとなった。

[図3]本発明のヒトモノクローナル抗体（モノクローナル抗体#129）とヒトHMGB1タンパク質との相互作用を、SPRによって調べた結果を示す図である。解析の結果、モノクローナル抗体#129の解離定数（KD）は $3.79 \times 10^{-11}$ Mであり、極めて親和性の高い抗体であることが明らかとなった。

[図4]本発明のヒトモノクローナル抗体（モノクローナル抗体#213-001）とヒトHMGB1タンパク質との相互作用を、SPRによって調べた結果を示す図である。解析の結果、モノクローナル抗体#213-001の解離定数（KD）は $5.54 \times 10^{-9}$ Mであることが明らかとなった。

[図5]本発明のヒトモノクローナル抗体によるヒトMARCKSリン酸化阻害活性を調べるための実験スケジュールを示す図である。図中、「Preparation」はマウス胚（E15）から初代培養皮質ニューロンを採取した時点を示し、「Harvest」は培養後の初代培養皮質ニューロンを回収した時点を示す。また、図中、「 $\alpha$ -HMGB1」は本発明のヒトモノク

ローナル抗体又は市販の抗HMGB1抗体を示し、「HMGB1」はヒトHMGB1タンパク質を示す。本実験では、7日間培養した初代培養皮質ニューロンに、本発明のヒトモノクローナル抗体又は市販の抗HMGB1抗体を添加し、次いで、ヒトHMGB1タンパク質を添加して、HMGB1によるMARCKSリン酸化に及ぼす各抗体の影響を調べた。

[図6]本発明のヒトモノクローナル抗体によるヒトMARCKSリン酸化阻害活性を調べた結果を示す図である。図の上の写真は、ウエスタンブロットによってリン酸MARCKS及びアクチンを検出した結果を示し、図の下のグラフは、上記ウエスタンブロットの結果に基づきリン酸MARCKS量を数値化した結果を示す。図中、「 $\alpha$ -HMGB1」は各抗体を、「HMGB1」はヒトHMGB1タンパク質を、「pSer46-MARCKS」はリン酸化MARCKSタンパク質をそれぞれ示す。また、グラフ縦軸は、アクチン（内部標準）量に基づいて補正したリン酸化MARCKSタンパク量を示しており、グラフ横軸は各抗体を示している。グラフ中、「\*\*」は抗体無添加区（左端の「 $\alpha$ -HMGB1(-)/HMGB1(+)」のカラム）と比較して、リン酸MARCKS量が有意に低いことを示している（ $p < 0.01$ ）。この実験から、モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012は、HMGB1によるMARCKSリン酸化を阻害することが明らかとなった。なお、「A社製市販抗体」は、市販の抗ヒトHMGB1抗体であり、ポジティブコントロールとして用いた。また、「MBL」は、発明者の先行特許出願である国際公開第2018/030405号（特許文献3）の2C8C抗体（抗HMGB1マウス抗体）である。

[図7]本発明のヒトモノクローナル抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列（配列番号41）を示す図である。かかる重鎖定常領域のアミノ酸配列は本発明のヒトモノクローナル抗体（モノクローナル抗体#127、#129、#194、#459、#130-008、#213-001、#213-012、#283-010、及び#370-010）に共通のものである。

[図8]本発明のヒトモノクローナル抗体の軽鎖定常領域 ( $\kappa$ 鎖) のアミノ酸配列 (配列番号42) を示す図である。かかる軽鎖定常領域のアミノ酸配列は本発明のヒトモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体#127、#129、#194、#459、#130-008、#213-001、#213-012、#283-010、及び#370-010) に共通のものである。

[図9]本発明のヒトモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012) の重鎖可変領域のアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号2、12、22及び32のアミノ酸配列) のアラインメントを示す図である。

[図10]本発明のヒトモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号7、17、27及び37のアミノ酸配列) のアラインメントを示す図である。

[図11]アルツハイマー病モデルマウスの認知機能及び樹状突起スパイン密度に及ぼす、本発明のヒトモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体#129) の皮下投与の影響を示す図である。図11Aはマウスへの抗体投与スケジュールの概要を示し、図11BはY-mazeテストにより各投与グループの認知機能を数値化した結果を示す。また、図11Eの左写真は2光子励起顕微鏡によりイメージングした後シナプス (樹状突起スパイン) を示し、図11Eの右グラフは各投与グループの樹状突起10 $\mu$ m当たりのスパイン数を示す。図中、「B6/SJL」は、B6/SJL非トランスジェニックマウス (正常マウス) を示し、「5xFAD」は5xFADトランスジェニックマウスを示す。また、図中、「B6/SJL+ctrl IgG」は、コントロールヒトIgGを投与した正常マウスを、「B6/SJL+ $\alpha$ -HMGB1」は、モノクローナル抗体#129を投与した正常マウスを、「5xFAD+ctrl IgG」は、コントロールヒトIgGを投与したアルツハイマー病モデルマウスを、「5xFAD+ $\alpha$ -HMGB1」は、モノクローナル抗体#129を投与したアルツハイマー病モデルマウスをそれぞれ示

す。なお、図11B及び図11Eの棒グラフはそれぞれ左から、「B6/SJL+ctrl IgG」、「B6/SJL+ $\alpha$ -HMGB1」、「5xFAD+ctrl IgG」、「5xFAD+ $\alpha$ -HMGB1」の結果を表す。

[図12]アルツハイマー病モデルマウスの認知機能に及ぼす、本発明のヒトモノクローナル抗体（モノクローナル抗体#129）の皮下投与又は静脈注射の影響を示す図である。図12Aはマウスへの抗体投与スケジュールの概要を示し、図12BはY-mazeテストにより各投与グループの認知機能を数値化した結果を示す。図中、「s. c.」は皮下注射を、「i. v.」は静脈注射をそれぞれ示す。また、図中、「B6/SJL」は、B6/SJL非トランスジェニックマウス（正常マウス）を示し、「5xFAD」は5xFADトランスジェニックマウスを示す。さらに、図中、「B6/SJL+ctrl IgG」は、コントロールヒトIgGを投与した正常マウスを、「B6/SJL+ $\alpha$ -HMGB1」は、モノクローナル抗体#129を投与した正常マウスを、「5xFAD+ctrl IgG」は、コントロールヒトIgGを投与したアルツハイマー病モデルマウスを、「5xFAD+ $\alpha$ -HMGB1」は、モノクローナル抗体#129を投与したアルツハイマー病モデルマウスをそれぞれ示す。なお、図12Bの左グラフ、右グラフのいずれにおいても、棒グラフはそれぞれ左から、「B6/SJL+ctrl IgG」、「B6/SJL+ $\alpha$ -HMGB1」、「5xFAD+ctrl IgG」、「5xFAD+ $\alpha$ -HMGB1」の結果を表す。

[図13]モノクローナル抗体#129を、皮下投与（s. c. injection）又は静脈注射（i. v. injection）した、マウス脳組織におけるモノクローナル抗体#129の局在を示す図である。図中「no injection」は、抗体を投与していない正常マウス脳の染色結果を示す。

### 発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、

[1] ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、下記(A)～(D)のいずれかに記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体(以下、「本発明のヒトモノクローナル抗体」とも表示する。);

(A) 配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号4に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号8に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号9に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む;

(B) 配列番号13に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号14に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び/又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号18に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しく

は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号19に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号20に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(C) 配列番号23に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号24に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号25に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号28に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号29に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号30に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(D) 配列番号33に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号34に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR

2、及び配列番号35に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号38に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号39に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号40に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；や、

[2] 本発明のヒトモノクローナル抗体を含む組成物（以下、「本発明の組成物」とも表示する。）；や、

[3] 本発明のヒトモノクローナル抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物（以下、「本発明の医薬組成物」とも表示する。）；や、

[4] 本発明のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子（以下、「本発明の抗体遺伝子」とも表示する。）；や、

[5] プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている本発明の抗体遺伝子とを含むベクター（以下、「本発明のベクター」とも表示する。）；や、

[6] 本発明のベクターが導入されていることを特徴とする宿主細胞（以下、「本発明の宿主細胞」とも表示する。）；

などの実施態様を含んでいる。

#### [0016] <本発明のヒトモノクローナル抗体>

本発明のヒトモノクローナル抗体としては、ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、下記(A)～(D)のいずれかに記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体である限り特に制限されない。

(A) 配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号4に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号8に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号9に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(B) 配列番号13に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号14に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号18に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号19に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は

挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号20に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(C) 配列番号23に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号24に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号25に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号28に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号29に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号30に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(D) 配列番号33に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号34に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号35に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号 38 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 1、配列番号 39 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 2、及び配列番号 40 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 3 とを含む；

[0017] 上記 (A) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (a) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく、上記 (B) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (b) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく、上記 (C) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (c) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく、上記 (D) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (d) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく挙げられる。

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(b) 配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(c) 配列番号 22 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配

列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(d) 配列番号 32 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

[0018] 上記 (A) 及び (a) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (a1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく、上記 (B) 及び (b) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (b1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく、上記 (C) 及び (c) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (c1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく、上記 (D) 及び (d) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体としては、さらに以下の (d1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が好ましく挙げられる。

(a1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(b1) 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(c1) 配列番号 21 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(d1) 配列番号 31 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 36 に示されるア

ミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

[0019] なお、上記（A）に記載の配列番号3～5のアミノ酸配列は、127抗体のそれぞれ重鎖CDR1～3のアミノ酸配列を示し、  
上記（A）に記載の配列番号8～10のアミノ酸配列は、127抗体のそれぞれ軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を示し、  
上記（a）に記載の配列番号2のアミノ酸配列は、127抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、配列番号7のアミノ酸配列は、127抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、  
上記（a1）に記載の配列番号1のアミノ酸配列は127抗体の重鎖（すなわち、重鎖可変領域及び重鎖定常領域）のアミノ酸配列を示し、配列番号6のアミノ酸配列は127抗体の軽鎖（すなわち、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域）のアミノ酸配列を示す。

また、上記（B）に記載の配列番号13～15のアミノ酸配列は、129抗体のそれぞれ重鎖CDR1～3のアミノ酸配列を示し、  
上記（B）に記載の配列番号18～20のアミノ酸配列は、129抗体のそれぞれ軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を示し、  
上記（b）に記載の配列番号12のアミノ酸配列は、129抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、配列番号17のアミノ酸配列は、129抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、  
上記（b1）に記載の配列番号11のアミノ酸配列は、129抗体の重鎖（すなわち、重鎖可変領域及び重鎖定常領域）のアミノ酸配列を示し、配列番号16のアミノ酸配列は、129抗体の軽鎖（すなわち、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域）のアミノ酸配列を示す。

また、上記（C）に記載の配列番号23～25のアミノ酸配列は、213-001抗体のそれぞれ重鎖CDR1～3のアミノ酸配列を示し、  
上記（C）に記載の配列番号28～30のアミノ酸配列は、213-001抗体のそれぞれ軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を示し、

上記(c)に記載の配列番号22のアミノ酸配列は、213-001抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、配列番号27のアミノ酸配列は、123-001抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、

上記(c1)に記載の配列番号21のアミノ酸配列は、213-001抗体の重鎖(すなわち、重鎖可変領域及び重鎖定常領域)のアミノ酸配列を示し、配列番号26のアミノ酸配列は、213-001抗体の軽鎖(すなわち、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域)のアミノ酸配列を示す。

また、上記(D)に記載の配列番号33~35のアミノ酸配列は、213-012抗体のそれぞれ重鎖CDR1~3のアミノ酸配列を示し、

上記(D)に記載の配列番号38~40のアミノ酸配列は、213-012抗体のそれぞれ軽鎖CDR1~3のアミノ酸配列を示し、

上記(d)に記載の配列番号32のアミノ酸配列は、213-012抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、配列番号37のアミノ酸配列は、213-012抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示し、

上記(d1)に記載の配列番号31のアミノ酸配列は、213-012抗体の重鎖(すなわち、重鎖可変領域及び重鎖定常領域)のアミノ酸配列を示し、配列番号36のアミノ酸配列は、213-012抗体の軽鎖(すなわち、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域)のアミノ酸配列を示す。

[0020] 本発明において、「HMGB1 (High Mobility Group Box 1)」は、HMG1、HMG3、SBP-1、HMG-1とも称されるタンパク質である。ヒト由来のものとして、典型的には、NCBIレファレンスシーケンス：NP\_002119.1で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質(NCBIレファレンスシーケンス：NM\_002128.5で特定されるヌクレオチド配列がコードするタンパク質)が挙げられる。しかしながら、遺伝子のDNA配列は、その変異等により、自然界において(すなわち、非人工的に)変異し、それにコードされるタンパク質のアミノ酸配列もそれに伴い改変される。したがって、本発明に係る「HMGB1」は、前記典型的なアミノ酸配列からなるタンパク質に特定される

ことなく、このような天然の変異体も含まれる。

[0021] 本発明において、「ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体」とは、抗原-抗体間の特異性の高い認識機構によって、ヒトHMGB1を認識し結合する抗体を意味する。本発明のヒトモノクローナル抗体は、分離されているものが好ましい。ここで「分離されている」とは、人為的操作によって、抗体を、本来存在する環境から取り出したり、抗体が本来存在する環境とは別の環境下で発現させる等して、抗体が本来存在している状態とは異なった状態で存在していることを意味する。すなわち、「分離されている抗体」には、ある個体由来の抗体であって、かつ外的操作（人為的操作）が施されずに、当該個体の体内中又は体内由来の組織若しくは体液（血液、血漿、血清等）中に含まれる状態の抗体は含まれない。また、本発明のヒトモノクローナル抗体は、人為的操作によって作製した生物又は細胞から産生される抗体（例えば、ハイブリドーマから産生される抗体）が好ましい。かかる「人為的操作によって作製した生物又は細胞から産生される抗体」には、（人為的操作の施されていない）天然に存在する生物又はB細胞から産生される抗体は含まれない。

[0022] 本発明において「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体（抗体の機能的断片を含む）を意味する。モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本発明における「抗体」は、ヒトの免疫グロブリンのクラス、サブクラスを含み、また、かかる抗体の機能的断片の形態も含む意である。本発明のヒトモノクローナル抗体のクラス、サブクラスには、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのIgG；IGA1、IGA2などのIgA；IgD；IgE；IgM；などが含まれ、中でも、IgG及びIgMが好ましく挙げられる。

[0023] 本発明のヒトモノクローナル抗体は、典型的には、重鎖CDR1、重鎖CDR2、及び重鎖CDR3、並びに、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2、及び軽鎖CDR3を含み、及び、これらのCDR1～3の各領域のアミノ（N）末端及びカルボキシル（C）末端には、フレームワーク領域（FR）が連結さ

れている。これらCDRとしては、本発明のヒトモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖が立体構造を形成したときに、各CDRが相互に近接することにより、ヒトHMGB1に対する特異性が生じるものであればよく、具体的なCDR1～3の組合せとしては、上記(A)に記載の組合せ、上記(B)に記載の組合せ、上記(C)に記載の組合せ、上記(D)に記載の組合せが好ましく挙げられる。

[0024] 上記FRのうち重鎖FRとしては、重鎖CDR1のN末端に連結されている重鎖FR1；重鎖CDR1のC末端と重鎖CDR2のN末端の間に連結されている重鎖FR2；重鎖CDR2のC末端と重鎖CDR3のN末端の間に連結されている重鎖FR3；及び、重鎖CDR3のC末端に連結されている重鎖FR4；を挙げることができる。また、上記FRのうち軽鎖FRとしては、軽鎖CDR1のN末端に連結されている軽鎖FR1；軽鎖CDR1のC末端と軽鎖CDR2のN末端の間に連結されている軽鎖FR2；軽鎖CDR2のC末端と軽鎖CDR3のN末端の間に連結されている軽鎖FR3；及び、軽鎖CDR3のC末端に連結されている軽鎖FR4；を挙げることができる。

[0025] 上記重鎖FR1としては、具体的には、(HF1)配列番号1で示されるアミノ酸配列の1～30番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号21で示されるアミノ酸配列の1～30番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、あるいは、(HF1')これらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、  
上記重鎖FR2としては、具体的には、(HF2)配列番号1で示されるアミノ酸配列の36～49番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号21で示されるアミノ酸配列の36～49番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、あるいは、(HF2')これらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、

上記重鎖FR3としては、具体的には、(HF3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の67～98番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、配列番号11で示されるアミノ酸配列の67～98番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号21で示されるアミノ酸配列の67～98番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、あるいは、(HF3') これらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、

上記重鎖FR4としては、具体的には、(HF4) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の117～127番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、配列番号11で示されるアミノ酸配列の105～115番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は、配列番号21で示されるアミノ酸配列の104～114番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、あるいは、(HF4') これらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

[0026] 上記軽鎖FR1としては、具体的には、(LF1) 配列番号6で示されるアミノ酸配列の1～23番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号26で示されるアミノ酸配列の1～23番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、あるいは、(LF1') これらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、

上記軽鎖FR2としては、具体的には、(LF2) 配列番号6で示されるアミノ酸配列の35～49番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は(LF2') このポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、

上記軽鎖FR3としては、具体的には、(LF3) 配列番号6で示されるアミノ酸配列の57～88番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号26で示されるアミノ酸配列の57～88番目のアミノ酸残基からな

るポリペプチド、あるいは、(L F 3') これらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、

上記軽鎖FR4としては、具体的には、(L F 4) 配列番号6で示されるアミノ酸配列の98~107番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号26で示されるアミノ酸配列の98~107番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは(L F 4') これらのいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

[0027] 本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒト抗体である。本発明における「ヒト抗体」には、ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体等が含まれ、中でも、ヒト化抗体、完全ヒト抗体が好ましく含まれる。

[0028] 本発明において「ヒトキメラ抗体」とは、非ヒト動物（例えば、ニワトリ、マウス、ラット、ウシ等の非ヒト哺乳動物）由来の抗体の可変領域と、ヒト由来の抗体の定常領域とを連結した抗体である。ヒトキメラ抗体は、例えば、抗原を非ヒト動物（好ましくは非ヒト哺乳動物）に免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髄由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。

[0029] ヒトキメラ抗体のヒトの定常領域としては、例えば重鎖においては、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4、C $\mu$ 、C $\delta$ 、C $\alpha$ 1、C $\alpha$ 2、及びC $\epsilon$ が挙げられ、また軽鎖においては、C $\kappa$ やC $\lambda$ が挙げられる。これらの定常領域のアミノ酸配列、並びにそれをコードする塩基配列は公知である。また、抗体自体の安定性、又は抗体の産生の安定性を改善するために、ヒト由来の抗体定常領域中の1又は複数のアミノ酸を置換、欠失、付加及び／又は挿入を

することができる。

[0030] 本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト動物（例えば、ニワトリ、マウス、ラット、ウシ等の非ヒト哺乳動物）由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト由来の抗体遺伝子に移植（CDRグラフティング）した抗体であり、その作製方法は、オーバーラップエクステンションPCR等、公知である（例えば、欧州特許出願公開第239400号明細書、欧州特許出願公開第125023号明細書、国際公開第90/07861号、国際公開第96/02576号）。抗体の可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域（framework region:FR）には含まれた3つのCDRで構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む一方、FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い相同性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるといわれている。また、CDRの機能の維持の観点から、非ヒト由来CDRのヒトFRへの移植においては、その非ヒト動物由来のFRと相同性の高いヒトFRが選択される。すなわち、CDR内のアミノ酸は、抗原を認識するばかりでなく、CDRの近傍にあるFRのアミノ酸と配位し、CDRのループ構造の維持にも関与しているため、移植すべきCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用することが好ましい。

[0031] 非ヒト動物由来のFRと相同性の高い公知のヒトFRの検索を、例えば、インターネットで利用可能な抗体に特化した検索システム（<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>）を利用して行うことができる。このようにして得られたヒトFRの配列と一致するように、非ヒト由来の抗体のCDR以外の配列に変異を導入することができる。あるいは、検索によって得られたヒトFRのアミノ酸配列をコードする遺伝子（cDNA）が入手可能な場合は、その配列中に非ヒト由来CDRを導入してもよい。変異の導入等は核酸合成、部位特異的変異誘発などの当該分野で公知

の技術を用いて行うことができる。

[0032] このようにして作製されたヒト化抗体の抗原への親和性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト由来の抗体のFRが好適に選択できる。また必要に応じ、Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856等に記載の方法に沿って、ヒト化抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもでき、さらに当該アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への親和性を測定して評価することによって、所望の性質を有する変異FR配列を選択することができる。

[0033] 本発明において「完全ヒト抗体」とは、抗体のすべての配列がヒト由来の配列である抗体である。完全ヒト抗体は、例えば、ヒト重鎖および軽鎖抗体の遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製することができる。ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの調製方法は、例えば、国際公開第02/43478号パンフレット、米国特許第6657103号明細書 (Abgenix) 等に記載されている。次いで、所望の抗体を産生するトランスジェニックマウス由来のB細胞が融合されて、抗体の連続産生用のハイブリドーマ細胞株が作製され得る。例えば、米国特許第5569825号明細書；米国特許第5625126号明細書；米国特許第5633425号明細書；米国特許第5661016号明細書；および米国特許第5545806号明細書；ならびにJakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42 (1998)；Green, et al., J. Exp. Med. 188:483-95 (1998) 参照。

[0034] 前述したように、本発明のヒトモノクローナル抗体には、抗体の全体からなる抗体の他、抗体の一部（部分断片）であって、HMGB1タンパク質を特異的に認識する機能的断片も含まれる。かかる機能的断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合

F<sub>v</sub>、一本鎖F<sub>v</sub> (s c F<sub>v</sub>)、s c (F<sub>v</sub>)<sub>2</sub>、ダイアボディー、多特異性抗体、及びこれらの重合体等が挙げられる。

[0035] ここで「F a b」とは、1つの軽鎖及び重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「F a b'」は、抗体のヒンジ領域の1つ又はそれより多いシステインを含めて、重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、F a bとは異なる。「F (a b')<sub>2</sub>」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二価の抗原結合断片を意味する。

[0036] 「可変領域断片 (F<sub>v</sub>)」は、完全な抗原認識及び結合部位を有する最少の抗体断片である。F<sub>v</sub>は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。「一本鎖F<sub>v</sub> (s c F<sub>v</sub>)」は、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「s c (F<sub>v</sub>)<sub>2</sub>」は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。「ダイアボディー」とは、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同一ポリペプチド鎖の中に軽鎖可変領域に結合した重鎖可変領域を含み、各領域は別の鎖の相補的領域とペアを形成している。「多特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。例えば、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現により調製することができる。

[0037] 本発明のヒトモノクローナル抗体には、望ましい活性（抗原に対する親和性及び／又は他の生物学的特性）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾されたヒトモノクローナル抗体が含まれる。このようなアミノ酸配列変異体は、例えば、1 2 7 抗体、1 2 9 抗体、2 1 3 - 0 0 1 抗体、又は2 1 3 - 0 1 2 抗体の抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、ヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列内の残基の置換、欠失、付加及

び／又は挿入を含む。ヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前のヒトモノクローナル抗体と同等の活性（好ましくは、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する活性）を有する限り、抗体の重鎖又は軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（FR及びCDR）であってもよいが、定常領域であることが好ましい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（PNAS, 102: 8466-8471 (2005)、Protein Engineering, Design&Selection, 21: 485-493 (2008)、国際公開第2002/051870号、J. Biol. Chem., 280: 24880-24887 (2005)、Protein Engineering, Design&Selection, 21: 345-351 (2008)、MAbs, Mar-Apr; 6 (2): 437-45 (2014)）。また、現在では、統合計算化学システム等（例えば、Molecular Operating Environment、カナダCCG社製）を利用することにより、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をモデリングすることもできる（例えば、<http://www.rsi.co.jp/kagaku/cs/ccg/products/application/protein.html> 参照）。さらに、Protein Eng Des Sel. 2010 Aug; 23 (8): 643-51に記載の通り、抗原へのアフィニティーにおいて、重鎖可変領域のCDR1及び軽鎖可変領域のCDR3は関与していない例が知られている、また同様に、Molecular Immunology 44: 1075-1084 (2007)には、大抵の抗体においては、軽鎖可変領域のCDR2は抗原へのアフィニティーに関与していないということが報告されている。このように、抗体の抗原へのアフィニティーにおいては、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域各々のCDR1~3の全てを要せずとも、同等の活性を発揮し得る

。実際に、Biochem Biophys Res Commun, 2003 Jul 18; 307 (1) : 198-205、J Mol Biol, 2004 Jul 9; 340 (3) : 525-42、J Mol Biol, 2003 Aug 29; 331 (5) : 1109-20においては、元の抗体の少なくとも1のCDRを保持することによって、抗原へのアフィニティーが維持された例が報告されている。したがって、本発明のヒトモノクローナル抗体は、127抗体、129抗体、213-001抗体及び213-012抗体からなる群から選択されるいずれか1つの抗体の少なくとも1のCDRを含む抗体でもあり得る。

[0038] また、本発明のヒトモノクローナル抗体に関し、改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、さらに好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）である。すなわち、本明細書において、「複数のアミノ酸」とは、好ましくは10個以下のアミノ酸、より好ましくは5個以下のアミノ酸、さらに好ましくは3個以下、より好ましくは2個以下である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。

[0039] また、前述したように、所定のアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、所定のアミノ酸配

列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むヒトモノクローナル抗体（抗体の機能的断片を含む）も本発明のヒトモノクローナル抗体に含まれる。かかる配列同一性としては、少なくとも80%であればよいが、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、100%）である。また、配列の相同性は、BLASTP（アミノ酸レベル）のプログラム（Altschul et al. J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990）を利用して決定することができる。該プログラムは、KarlinおよびAltschulによるアルゴリズムBLAST（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993）に基づいている。BLASTPによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschulら（Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997）に記載されているように行うことができる。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0040] また、「同等の活性を有する」とは、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する活性が、対象抗体（代表的には、127抗体、129抗体、213-001抗体及び213-012抗体からなる群から選択されるいずれか1つの抗体）と同等（例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、より好ましくは100%以上）であることを意味する。さらに、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する活性は、例えば、後述の実施例4に示す通り、Ser46がリン酸化したヒトHMGB1に特異的に結合する抗体を用いたウ

エスタンプロッキング等を利用して、当業者であれば適宜評価することができる。ヒトMARCKSのヌクレオチド配列やアミノ酸配列は公知であり（Genbank アクセッション番号M68956.1）、当業者は公知の手法によりヒトMARCKSタンパク質を作製することができる。

[0041] また、本発明のヒトモノクローナル抗体の改変は、例えば、グリコシル化部位の数又は位置を変化させる等の抗体の翻訳後プロセスの改変であってもよい。これにより、例えば、抗体のADCC活性（抗体依存性細胞障害活性）を向上させることができる。抗体のグリコシル化とは、典型的には、N-結合又はO-結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入又は欠失等の公知の方法で行うことができる（特開2008-113663号公報、米国特許第5047335号、米国特許第5510261号、米国特許第5278299号、国際公開第99/54342号）。さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

[0042] 本発明のヒトモノクローナル抗体は、公知のハイブリドーマ法や、公知の組換えDNA法によって作製することができる。ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラー及びミルスタインの方法（Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975)）が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、抗原（HMGB1タンパク質、その部分ペプチド、それらにFcタンパク質等が融合してあるタンパク質、またはこれらを発現する細胞等）で免疫された動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ等の哺乳動物）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球等である。免疫されていない動物から予

め単離された上記の細胞又はリンパ球等に対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞及びミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでもよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、HMGB1タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。HMGB1タンパク質に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

[0043] 組換えDNA法は、上記本発明のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子をハイブリドーマやB細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば、HEK細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞等）に導入し、本発明のヒトモノクローナル抗体を組換え抗体として産生させる手法である（例えば、P. J. Delves, *Antibody Production: Essential Techniques*, 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean *Monoclonal Antibodies*, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A. M. et al., *Eur. J. Biochem.* 192: 767-775 (1990)）。本発明のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子の発現においては、重鎖又は軽鎖をコードする抗体遺伝子を別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖及び軽鎖をコードする抗体遺伝子を単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（国際公開第94/11523号公報 参照）。本発明のヒトモノクローナル抗体は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液

から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、本発明の抗体遺伝子に由来するヒトモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

[0044] <HMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を含む組成物>

本発明のヒトモノクローナル抗体を含む組成物としては、本発明のヒトモノクローナル抗体を含んでいる組成物である限り特に制限されない。かかる組成物において、ヒトモノクローナル抗体以外の物質としては、水等の担体や、安定化剤が挙げられる。

[0045] 本発明のヒトモノクローナル抗体は、後述の実施例において示す通り、ヒトHMGB1タンパク質に対して高い親和性を示し、また、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する高い活性も有している。本発明者らは、HMGB1に対するマウスモノクローナル抗体であって、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する抗体が、アルツハイマー病モデルマウスにおける認識障害を回復すること、大脳皮質におけるDNA損傷を減少させること、及び、A $\beta$ 及びHMGB1双方の多量体形成を阻害することを確認している（非特許文献2、特許文献3）。これらの知見を考慮すると、本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒトのアルツハイマー病の治療又は予防に利用することができるものといえる。したがって、本発明は、本発明のヒトモノクローナル抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物、並びに本発明のヒトモノクローナル抗体の治療上又は予防上の有効量を、ヒトに投与する工程を含んでなる、アルツハイマー病の治療又は予防の方法をも提供するものである。

[0046] 本発明において「アルツハイマー病」とは、アルツハイマー型認知症、ADとも称される神経変性疾患であり、遺伝子の変異に起因する「家族性アルツハイマー病」及び「遺伝性アルツハイマー病」や、生活習慣やストレスと

いった環境因子による「孤発性アルツハイマー病」も含まれる。さらに、「アルツハイマー病」には、記憶障害、認識障害、高次脳機能障害（失語、失行、失認、構成失行）、人格の変化といった症状の発現、画像診断によって判断される脳の萎縮の出現等の臨床症候が確認される段階のみならず、その前段階とされる軽度認知障害（MCI）、さらにその前の、認知機能は正常であるがアミロイド $\beta$ （ $A\beta$ ）の凝集（アミロイド病変）が脳内に生じている前臨床期アルツハイマー病（プレクリニカルAD）も含まれる。また、アルツハイマー病の治療には、アミロイド病変も含めたアルツハイマー病の病変の回復、改善のみならず、その進行の抑制も含まれる。

[0047] 本発明の医薬組成物は、本発明のヒトモノクローナル抗体と任意の成分、例えば生理食塩水、葡萄糖水溶液又はリン酸塩緩衝液等を含有する組成物の形態で使用することができる。本発明の医薬組成物は、必要に応じて液体又は凍結乾燥した形態で製形成しても良く、任意に薬学的に許容される担体若しくは媒体、例えば、安定化剤、防腐剤、等張化剤等を含有させることもできる。

[0048] 薬学的に許容される担体としては、凍結乾燥した製剤の場合、マンニトール、ラクトース、サッカロース、ヒトアルブミン等を例として挙げることができる。液状製剤の場合には、生理食塩水、注射用水、リン酸塩緩衝液、水酸化アルミニウム等を例として挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

[0049] 本発明の医薬組成物の投与方法は、投与対象の年齢、体重、性別、健康状態等により異なるが、非経口投与（例えば、皮下投与、静脈投与、動脈投与、局所投与）、経口投与のいずれかの投与経路で投与することができる。好ましい投与方法は、非経口投与であり、より好ましくは皮下投与又は静脈投与である。医薬組成物の投与量は、患者の年齢、体重、性別、健康状態、症状の進行の程度及び投与する医薬組成物の成分により変動するが、通常、成人には体重1kg当たり1日0.1～1000mg、好ましくは1～1000mgである。本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病の治療に用いられ

る公知の医薬品と併用してもよい。

[0050] <本発明のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子>

本発明のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子としては、本発明のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子である限り特に制限されず、具体的には、本発明のヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなる抗体遺伝子が挙げられる。本発明の抗体遺伝子がコードする本発明のヒトモノクローナル抗体としては、上記の<本発明のヒトモノクローナル抗体>に記載の本発明のヒトモノクローナル抗体のうち、いずれの態様の本発明のヒトモノクローナル抗体であってもよい。かかる本発明のヒトモノクローナル抗体としては具体的に以下の抗体（該抗体の機能的断片を含む）が挙げられる。

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（A）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（B）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（C）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（D）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（A）及び（a）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（B）及び（b）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（C）及び（c）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（D）及び（d）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（A）、（a）及び（a1）

に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（B）、（b）及び（b1）

に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（C）、（c）及び（c1）

に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、上記（D）、（d）及び（d1）

に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体；

[0051] 本発明の抗体遺伝子のヌクレオチド配列は、本発明のヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列と、公知のコドン表を参照することにより、当業者はかかるアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列を具体的かつ明確に把握することができる。

[0052] <本発明のベクターや宿主細胞>

本発明のベクターとしては、プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている本発明の抗体遺伝子とを含むベクターである限り特に制限されない。本発明のベクターにおけるベクターや、本発明のベクターは、導入する宿主細胞（又は宿主生物）の種類に応じて適宜選択することができる。

[0053] 宿主細胞として哺乳動物細胞（例えば、ヒト由来のナマルバ [Namalwa] 細胞、サル由来のCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞等）を用いる場合、本発明のベクターとしては、例えば、pcDNA1、pcDM8（フナコシ社製）、pAGE107（特開平3-22979号公報；Cytotechnology, 3, 133, (1990)）、pAS3-3（特開平2-227075号公報）、pCDM8（Nature, 329, 840, (1987)）、pcDNA1/Amp（Invitrogen社製）、pREP4（Invitrogen社製）、pAGE103（J.Biochemistry, 101, 1307 (1987)）、pAGE210等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）のIE（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネ

インプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を挙げるができる。

[0054] 本発明のベクターとしては、遺伝子発現効率をさらに高めるために、エンハンサー領域やリボソーム結合領域（RBS ; ribosome binding site）の塩基配列をさらに含むものや、本発明の宿主細胞のスクリーニングのために、宿主細胞の種類に応じた薬剤耐性遺伝子（例えば、スペクチノマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ジェネティシン耐性遺伝子等）をさらに含むものが好ましい。エンハンサー領域は、通常プロモーターの上流に配置され、RBSは、通常プロモーターと本件遺伝子の間に配置される。本発明のベクターに組み込む本件抗体遺伝子のヌクレオチド配列は、発現させる宿主細胞に合わせてコドン配列の最適化がされていてもよい。本発明のベクターは、遺伝子組み換え技術を用いて公知の方法により作製することができる。

[0055] 本件宿主細胞の生物種としては、本件抗体遺伝子のmRNAが転写され、本件抗体タンパク質が発現されるものであればよく、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、サル等）、酵母（例えば、*Saccharomyces Cerevisiae*、*Schizosaccharomyces Pombe*等）が挙げられ、中でも、哺乳動物が好ましく挙げられる。

[0056] 本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしては、本件抗体を産生する、2又は3以上の細胞（好ましくは哺乳動物細胞）が融合して得られた細胞（融合細胞）であればよく、本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するB細胞と、増殖能を有する細胞（例えば、ミエローマ細胞）との融合細胞が好ましい。

[0057] 本発明の宿主細胞は、本発明のベクターを、宿主細胞の種類に応じた方法により、宿主細胞へ導入（トランスフェクション）することにより得ることができる。

- [0058] 宿主細胞として上記哺乳動物細胞を用いる場合、本発明のベクターの哺乳動物細胞への導入方法としては、哺乳動物細胞にDNAを導入する方法であればよく、例えば、エレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990))、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075号公報)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 7413 (1987)) 等の方法を挙げることができる。
- [0059] 本発明のベクターが導入されている宿主細胞を培養し、本発明のヒトモノクローナル抗体を回収することを含む、本発明のヒトモノクローナル抗体の生産方法；も、本発明の態様に含まれる。
- [0060] 以上、本発明の抗体の好適な実施形態 (用途) について説明したが、本発明の抗体は上記実施形態に限定されるものではない。本発明の抗体はヒトHMGB1タンパク質に対する高い親和性を有することから、例えば、ヒトHMGB1タンパク質を検出するための試薬及び診断薬にも好適に用いられる。
- [0061] ヒトHMGB1タンパク質を検出するための試薬及び診断薬に用いられる場合には、その検出のために、本発明のヒトモノクローナル抗体は直接又は間接的に標識物質が結合しているものであってもよい。かかる標識物質としては、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質が挙げられる。
- [0062] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 実施例 1

- [0063] [抗ヒトHMGB1モノクローナル抗体の作製]

ADLib (登録商標) システム (カイオム・バイオサイエンス社製) を用いて、ヒトHMGB1タンパク質を特異的に認識するヒト型モノクローナル抗体を作製した。具体的には、まず、全長ヒトHMGB1タンパク質 (HMGBiotech社製) を磁気ビーズに固定化した。DT40細胞 (ニワトリBリンパ細胞株) にヒト免疫グロブリン遺伝子を組み込んで構築された

ヒト抗体遺伝子細胞ライブラリーに、前述の磁気ビーズを添加した。30分程度のインキュベートによって、ヒトHMGB1タンパク質を認識する抗体を産生する細胞（以下、「抗体産生細胞」と称する）と、磁気ビーズとを結合させた後に、磁気ビーズを磁石で引き付けることによって、磁気ビーズとそれに結合した抗体産生細胞とを回収した。得られた複数の抗体産生細胞を1週間程度培養して増殖させるとともに、それぞれの培養液中に分泌されたヒト型IgG抗体を単離・取得した。このようにして作製したヒト型モノクローナル抗体をそれぞれ、「#127」、「#129」、「#194」、「#459」、「#130-008」、「#213-012」、「#213-001」、「#283-010」、及び「#370-010」と名付けた（以下、これら9種又はそのうちの何種かのモノクローナル抗体を「本発明のヒトモノクローナル抗体群」と総称する場合がある）。

## 実施例 2

### [0064] [ウエスタンブロット法による抗体結合能の解析]

本発明のヒトモノクローナル抗体のヒトHMGB1への結合能を、ウエスタンブロット法を用いて比較検討した。具体的には、1. 0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  のジスルフィドHMGB1 (HMGB i o t e c h社製) 2. 5  $\mu\text{L}$  に、2. 5  $\mu\text{L}$  のサンプルバッファー (125mM T r i s - H C l (pH6. 8、S i g m a社製)、4%SDS (S i g m a社製)、10%グリセロール (S i g m a社製)、5%メルカプトエタノール (W a k o社製) 及び0. 05%BPB (S i g m a社製)) を添加して100°Cで5分間加熱し、SDS-PAGE用HMGB1サンプルを調製した。かかるサンプルを用いてSDS-PAGEを行い(1レーン当たり2. 5  $\mu\text{g}$  のジスルフィドHMGB1をロード)、セミドライ法にて、イモビロン(登録商標)-Pポリフッ化ビニリデンのメンブレン(M i l l i p o r e社製)に転写し、2%BSA (N a c a l a i社製)又は5%ミルク含有TBST(10mM T r i s - H C l、pH8. 0、150mM N a C l、0. 05%T w e e n - 20)によるブロッキング処理を行った。

[0065] 次に、本発明のヒトモノクローナル抗体群及び市販の抗ヒトHMGB1抗体（ポジティブコントロール）を、0.2%BSA又は免疫反応促進用試薬（Can Get Signal（登録商標）Immunoreaction Enhancer solution；東洋紡社製）を含むTBSTを用いてそれぞれ1.0 $\mu$ g/mLの濃度に希釈し、一次抗体溶液を調製した。また、HRP標識抗ヒトIgG抗体（MBL社製）を、0.2%BSA又は免疫反応促進用試薬を含むTBSTを用いて1:3000倍に希釈し、二次抗体溶液を調製した。上記メンブレンを一次抗体溶液とともに4℃で一晩インキュベートし、洗浄後に、二次抗体溶液とともに室温で1時間インキュベートした。インキュベート後のメンブレンを洗浄し、ECL Select ウェスタンブロット検出試薬（GE Healthcare社製）及びルミノイメージアナライザ（ImageQuant LAS 500；GE Healthcare社製）を用いて、各レーンのシグナルを検出した。

[0066] 結果を図1に示す。モノクローナル抗体#129及び#213-001を用いたレーンでは、市販の抗ヒトHMGB1抗体と同様に、HMGBタンパク質の分子量に対応する位置に強いシグナルが検出された。また、モノクローナル抗体#194、#213-012、#283-010、及び#370-010を用いたレーンでも、同様の位置に弱いシグナルが検出された。一方、モノクローナル抗体#127、#459、及び#130-008を用いたレーンでは、シグナルを検出することはできなかった。

### 実施例 3

[0067] [表面プラズモン共鳴法（SPR）による抗体親和性の解析]

本発明のヒトモノクローナル抗体群とヒトHMGB1タンパク質との相互作用を、SPRを用いて比較検討した。具体的には、本発明のヒトモノクローナル抗体を固定化したセンサーチップと、アナライトとしてヒトHMGB1タンパク質とを用い、表面プラズモン共鳴測定装置（「Biacore T100」；GE healthcare社製）によって経時的に相互作用を測定し、抗体親和性の指標である平衡解離定数（KD値）を算出した。得られた代表的なセンサーグラ

ムを図2～4に示す。本発明のヒトモノクローナル抗体のうち、モノクローナル抗体#127、#129、及び#213-001のKDはそれぞれ、 $2.17 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $3.79 \times 10^{-11} \text{M}$ 、及び $5.54 \times 10^{-9} \text{M}$ であった。一般的な抗体医薬のKDが $10^{-9} \text{M} \sim 10^{-10} \text{M}$ であることを考えると、#127及び#129は極めて親和性の高い抗体であり、また、#213-001も十分に親和性の高い抗体であると言える。

また、実施例2のウエスタンブロット解析においては、モノクローナル抗体#127を用いてもHMGB1タンパク質を検出することができなかった。このような結果の相違は、実験に使用したHMGB1タンパク質（抗原）の調整方法の違いに起因するものと推測される。すなわち、実施例2及び3の結果から、モノクローナル抗体#127はSDS-PAGEのために変性させたHMGB1タンパク質とは結合できないが、高次構造を維持したHMGB1タンパク質とは高い親和性で結合できると考えられる。

#### 実施例 4

[0068] [本発明のヒトモノクローナル抗体群によるヒトMARCKSリン酸化阻害活性の検討]

本発明者らのこれまでの研究によって、アルツハイマー病発症前から脳内のMARCKSタンパク質のリン酸化が起こること（非特許文献1）、また、かかるリン酸化はHMGB1によって誘導されることが明らかにされている（非特許文献2）。実施例4では、このようなHMGB1によるMARCKSタンパク質のリン酸化に対して、本発明のヒトモノクローナル抗体群が阻害作用を奏するかをインビトロで比較検討した。

[0069] 具体的には、マウス胚（E15）から採取した初代培養皮質ニューロンを7日間培養した後に、本発明のヒトモノクローナル抗体又は市販の抗ヒトHMGB1抗体（ポジティブコントロール）を添加し、さらに30分後に、ヒトHMGB1タンパク質を添加して3時間インキュベートした（図5）。インキュベート後の細胞を回収し、溶解バッファー（100mM Tris-HCl（pH7.5、Sigma社製）、2%SDS（Sigma社製）、1

mM DTT (Sigma社製) 及びプロテアーゼ阻害剤カクテル (Calbiochem社製、1:200にて希釈) を添加した後、プラスチックホモジェナイザー (製品名: バイオマッシャー11、株式会社ニッピ製) を用いてホモジェナイズした。得られたタンパク質溶解液を、4℃で30分間回転させながらインキュベートした後、100℃で15分間ボイルした。次に、遠心処理 (16,000×g、10分間、4℃) を行い、得られた上清に、等量のサンプルバッファー (125mM Tris-HCl (pH6.8、Sigma社製)、4% SDS (Sigma社製)、20% グリセロール (Wako社製)、12%メルカプトエタノール (Wako社製) 及び0.05% BPB (Nacalai社製) ) を添加して希釈した。

[0070] 以上のようにして調製したサンプルをSDS-PAGEによって分画し、セミドライ法にて、イモビロン (登録商標) -Pポリフッ化ビニリデンのメンブレン (Millipore社製) に転写し、2% BSA (Nacalai社製) 又は5% ミルク含有TBST (10mM Tris-HCl、pH8.0、150mM NaCl、0.05% Tween-20) によるブロッキング処理を行った。次に、0.2% BSA又は免疫反応促進用試薬を含むTBSTを用いて、ウサギ抗リン酸化MARCKS抗体 (1:100,000、GE Healthcare社製) 及びマウス抗アクチン抗体 (1:1000、Santa Cruz Biotechnology社製) を希釈して一次抗体溶液を調製した。また、0.2% BSA又は免疫反応促進用試薬を含むTBSTを用いて、HRP標識抗ウサギIgG抗体 (1:3000、GE Healthcare社製) 及びHRP標識抗マウスIgG抗体 (1:3000、GE Healthcare製) を希釈して二次抗体溶液を調製した。上記メンブレンを一次抗体溶液とともに4℃で一晩インキュベートし、洗浄後に、二次抗体溶液とともに室温で1時間インキュベートした。インキュベート後のメンブレンを洗浄し、ECL Prime ウェスタンブロット検出試薬及びルミノイメージアナライザを用いて、各レーンのシグナルを検出した。

[0071] ウェスタンブロットの結果（写真）を図6上に示し、各レーンのリン酸化ヒトMARCKSタンパク質の量をアクチン（内部標準）量を用いて補正した結果（グラフ）を図6下に示す。モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012を添加した細胞群では、抗体無添加群（グラフ左端の「-」で示されるカラム）と比較して、リン酸化ヒトMARCKSタンパク質の量が有意に低下することが明らかとなった。また、これらのモノクローナル抗体によるMARCKSのリン酸化阻害活性は、市販の抗体（グラフ右端の「A社製市販抗体」で示されるカラム）と比較して、強い傾向にあることが明らかとなった。以上の結果から、モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012は、ヒトHMGB1によるヒトMARCKSタンパク質のリン酸化を阻害（抑制）する活性を有することが示された。したがって、これらの実験結果と、非特許文献1、2及び特許文献1の結果を併せ考慮することにより、これらの抗体はアルツハイマー病の治療剤又は予防剤として用いることができると考えられる。

## 実施例 5

[0072] [モノクローナル抗体のアミノ酸配列]

実施例1で作製した抗体産生細胞（モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012を産生する細胞）からDNAを抽出し、抗体重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNA配列を解析した。さらに、かかるDNA配列に基づいて、各モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を同定した。モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012のアミノ酸配列は以下の通りである。また、本発明のヒトモノクローナル抗体であるモノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012の重鎖可変領域のアミノ酸配列（それぞれ、配列番号2、12、22及び32のアミノ酸配列）のアラインメントを図9に示し、それらの軽鎖可変領域のアミノ酸配列（それぞれ、配列番号7、17、27及び37のアミノ酸配列）のアラインメ

ントを図10に示す。図9から分かるように、モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、例えば配列番号22のアミノ酸配列(#213-001の重鎖可変領域のアミノ酸配列)のアミノ酸番号1~4、7~8、14~15、17、21~22、24~26、28~30、31~33、35~42、44~47、51、56、60~61、66~67、69~70、73、75、78、80、85~87、89~96、102、104~108、110~114のアミノ酸が共通している。また、図10から分かるように、モノクローナル抗体#127、#129、#213-001、及び#213-012の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、例えば配列番号27のアミノ酸配列(#213-001の軽鎖可変領域のアミノ酸配列)のアミノ酸番号1~14、16~27、32~49、51~52、54、57~75、77~88、90、92~93、95、97~102、104~107のアミノ酸が共通している。

[0073] <モノクローナル抗体#127>

#127の重鎖(重鎖可変領域及び重鎖定常領域) :

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAM  
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF  
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKDGYS  
SSWDYYYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVF  
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG  
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL

DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK (配列番号1)

#127の重鎖可変領域:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAM  
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF  
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKDGYS  
SSWDYYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号2)

#127の重鎖CDR1:

SYAMS (配列番号3)

#127の重鎖CDR2:

AISGSGGSTYYADSVKG (配列番号4)

#127の重鎖CDR3:

DGYSSSWDYYYYYYGMDV (配列番号5)

#127の軽鎖(軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSYLA  
WYQQKPGKAPKLLIYEASNLQAGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTINSLQPEDFATYYCLQHNSNPLTFGQGT  
KLEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN  
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
TKSFNRGEC (配列番号6)

#127の軽鎖可変領域:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSYLA  
WYQQKPGKAPKLLIYEASNLQAGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTINSLQPEDFATYYCLQHNSNPLTFGQGT  
KLEIK (配列番号7)

#127の軽鎖CDR1:

RASQSVSSYLA (配列番号8)

# 1 2 7 の軽鎖 C D R 2 :

E A S N L Q A (配列番号 9)

# 1 2 7 の軽鎖 C D R 3 :

L Q H N S N P L T (配列番号 1 0)

[0074] <モノクローナル抗体 # 1 2 9 >

# 1 2 9 の重鎖 (重鎖可変領域及び重鎖定常領域) :

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M  
S W V R Q A P G K G L E W V S D I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F  
T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G Y G M  
D V W G Q G T M V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G  
T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A  
V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P  
S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V  
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K  
F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V  
L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q  
P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D  
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L  
T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S  
P G K (配列番号 1 1)

# 1 2 9 の重鎖可変領域 :

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M  
S W V R Q A P G K G L E W V S D I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F  
T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G Y G M  
D V W G Q G T M V T V S S (配列番号 1 2)

# 1 2 9 の重鎖 C D R 1 :

S Y A M S (配列番号 1 3)

# 1 2 9 の重鎖 C D R 2 :

DISGSGGSTYYADSVKG (配列番号14)

#129の重鎖CDR3:

GYGMDV (配列番号15)

#129の軽鎖(軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVTNYLA  
 WYQQKPGKAPKLLIYGASILETGVPSTRFSGSGSG  
 TDFTLTINSLQPEDFATYYCLQHNSTPLTFGQGT  
 KLEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN  
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (配列番号16)

#129の軽鎖可変領域:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVTNYLA  
 WYQQKPGKAPKLLIYGASILETGVPSTRFSGSGSG  
 TDFTLTINSLQPEDFATYYCLQHNSTPLTFGQGT  
 KLEIK (配列番号17)

#129の軽鎖CDR1:

RASQSVTNYLA (配列番号18)

#129の軽鎖CDR2:

GASILET (配列番号19)

#129の軽鎖CDR3:

LQHNSTPLT (配列番号20)

[0075] <モノクローナル抗体#213-001>

#213-001の重鎖(重鎖可変領域及び重鎖定常領域):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA I  
 SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGRANYAQKFQGRV  
 TITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASLVTD  
 YWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT

AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (配列番号21)

#213-001の重鎖可変領域:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA  
ISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGRANYAQKFQGRV  
TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASLVTD  
YWGQGTLLVTVSS (配列番号22)

#213-001の重鎖CDR1:

SYAIS (配列番号23)

#213-001の重鎖CDR2:

GIIPIFGRANYAQKFQG (配列番号24)

#213-001の重鎖CDR3:

LVTDY (配列番号25)

#213-001の軽鎖(軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域):

DIQMTQSPSSLSASTGDRVITCRASQGISSYLA  
WYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGT  
RLEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN  
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV

TKSFNRGEC (配列番号26)

#213-001の軽鎖可変領域:

DIQMTQSPSSLSASTGDRVITICRASQGISSYLA  
WYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGT  
RLEIK (配列番号27)

#213-001の軽鎖CDR1:

RASQGISSYLA (配列番号28)

#213-001の軽鎖CDR2:

AASTLQS (配列番号29)

#213-001の軽鎖CDR3:

QQANSFPIT (配列番号30)

[0076] <モノクローナル抗体#213-012>

#213-012の重鎖(重鎖可変領域及び重鎖定常領域):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA I  
SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRV  
TITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASLVTD  
YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (配列番号31)

# 213-012の重鎖可変領域：

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYA I  
SWVRQAPGQGLEWMGG I I P I FGTANYA QKFQGRV  
TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASLVTD  
YWGQGT L V T V S S (配列番号32)

# 213-012の重鎖CDR1：

SYA I S (配列番号33)

# 213-012の重鎖CDR2：

G I I P I FGTANYA QKFQ G (配列番号34)

# 213-012の重鎖CDR3：

L V T D Y (配列番号35)

# 213-012の軽鎖（軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域）：

D I Q M T Q S P S S L S A S T G D R V T I T C R A S Q G I S S Y L A  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G  
T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P I T F G Q G T  
R L E I K T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N  
N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S  
T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V  
T K S F N R G E C (配列番号36)

# 213-012の軽鎖可変領域：

D I Q M T Q S P S S L S A S T G D R V T I T C R A S Q G I S S Y L A  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G  
T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P I T F G Q G T  
R L E I K (配列番号37)

# 213-012の軽鎖CDR1：

R A S Q G I S S Y L A (配列番号38)

# 213-012の軽鎖CDR2：

A A S T L Q S (配列番号39)

# 2 1 3 - 0 1 2 の軽鎖 CDR 3 :

Q Q A N S F P I T (配列番号 4 0)

[0077] <本発明のヒトモノクローナル抗体の重鎖定常領域>

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P  
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V  
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S  
C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I  
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A  
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C  
K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R  
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N  
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F  
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 4 1)

[0078] <本発明のヒトモノクローナル抗体の軽鎖定常領域 ( $\kappa$ 鎖)>

T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R  
E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S  
S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N  
R G E C (配列番号 4 2)

## 実施例 6

[0079] [モノクローナル抗体 # 1 2 9 の皮下投与]

アルツハイマー病モデルマウスにモノクローナル抗体 # 1 2 9 を皮下投与して、認知障害に及ぼす影響を調べた。上記アルツハイマー病モデルマウスとして、ジャクソン研究所 (米国) より購入した 5 x F A D トランスジェニックマウス (以下、「5 x F A D マウス」と称する ; Oakley et al., J Neurosci 26, 10129-10140 (2006)) を用いた。5 x F A D マウスは、S w e d i s h 型 (K M 6 7 0 / 6 7 1 N L)、F l o r i d a 型 (I 7 1 6 V)、及び L o n d o n 型 (V 7 1 7 I) 家族性アルツハイマー病 (F A D) 変異を含む変異型ヒト A P P (7 7 0) と、2 つの F A D 変異を含むヒト P S 1 と

を過剰発現するアルツハイマー病モデルマウスである。また、かかるマウスのバックグラウンドは、C57BL/6J雌マウスとSJL/J雄マウスを交配させて得られたC57BL/SJL系統である。このため、以下の実験においては、5xFADマウス及び同胞種であるB6/SJL非トランスジェニックマウスをコントロールマウス（正常マウス）として用いた。

[0080] 図11Aに示すスケジュールに沿って、正常マウス及び発病直後の6ヶ月齢の5xFADマウスに、モノクローナル抗体#129又はコントロールヒトIgG（IgG1κ鎖）を皮下投与した。各抗体の1回当たりの投与量は、1μg/kg体重、又は10μg/kg体重であり、8週間に渡って合計数9回投与した。このような処置を行った4つのグループのマウスについて、8ヶ月齢の時点での認知機能及び樹状突起スパイン密度をそれぞれ調べた。

認知機能に関する結果を図11Bに示す。図11Bの4本の棒グラフはそれぞれ左から、「B6/SJL+ctrl IgG」、「B6/SJL+α-HMGB1」、「5xFAD+ctrl IgG」、「5xFAD+α-HMGB1」の結果を表す。Y-mazeテストにより認知機能を調べた結果、コントロールヒトIgGを投与した5xFADマウスでは、正常マウスと比較して有意な認知機能の低下が認められ、8ヶ月齢の5xFADマウスにおいて認知機能障害が進行していることが明らかとなった。一方、モノクローナル抗体#129を投与した5xFADマウスでは、正常マウスと比較して認知機能に有意な差は認められなかった。さらに、モノクローナル抗体#129を投与した5xFADマウスでは、コントロールヒトIgGを投与した5xFADマウスと比較して、認知機能が有意に改善することが明らかとなった。

また、樹状突起スパイン密度に関する結果を図11Eに示す。図11Eの棒グラフはそれぞれ左から、「B6/SJL+ctrl IgG」、「B6/SJL+α-HMGB1」、「5xFAD+ctrl IgG」、「5xFAD+α-HMGB1」の結果を表す。

2光子励起顕微鏡を用いて、上記マウスにおける、頭頂葉皮質の1層（脳梁膨大後部顆粒層皮質）の樹状突起スパイン密度を調べた結果、コントロールヒトIgGを投与した5×FADマウスでは、正常マウスと比較して、樹状突起スパイン数の有意な低下が認められた。一方、モノクローナル抗体#129を投与した5×FADマウスでは、正常マウスと比較して樹状突起スパイン数に有意な差は認められなかった。さらに、モノクローナル抗体#129を投与した5×FADマウスの樹状突起スパイン数は、コントロールヒトIgGを投与した5×FADマウスと比較して、有意に増加することが明らかとなった。

これらの結果から、モノクローナル抗体#129の皮下投与は、アルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能障害の進行及び樹状突起スパイン密度の低下を抑制し、正常マウスと同等のレベルまで改善する効果を奏することが示された。

## 実施例 7

[0081] [異なる投与経路によるモノクローナル抗体#129の治療効果の比較]

次に、5×FADマウスにモノクローナル抗体#129を皮下注射（s.c.）又は静脈注射（i.v.）して、投与経路による効果の違いを比較した。モノクローナル抗体#129及びコントロールヒトIgGを、発病直後の6ヶ月齢の5×FADマウス及び正常マウスに、8週間に渡って皮下投与又は静脈注射した。図12Aに、投与スケジュールの概要を示す。皮下投与の場合には、マウスに対して $10\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重の抗体を合計9回投与した（マウス当たりの総投与量は $2.7\mu\text{g}$ ）。また、静脈注射の場合には、マウスに対して $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重の抗体を合計3回投与した（マウス当たりの総投与量は $18\mu\text{g}$ ）。このような処置を行ったマウスについて、8ヶ月齢の時点での認知機能及び樹状突起スパイン密度をそれぞれ調べた。かかる投与実験のスケジュールを図12Aに示す。

[0082] 図12Bの左グラフに示すように、上記マウスの認知機能をY-mazeテストにより調べた結果、皮下注射投与したグループでは実施例6と一致す

る結果が得られた。また、図12Bの右グラフに示すように、静脈注射したグループにおいても、皮下投与したグループと同様の結果が得られた。すなわち、皮下投与及び静脈注射のいずれの経路であっても、コントロールヒトIgGを投与した5xFADマウスでは、正常マウスと比較して有意な認知機能の低下が認められたが、モノクローナル抗体#129を投与した5xFADマウスでは、正常マウスと比較して認知機能に有意な差は認められなかった。さらに、モノクローナル抗体#129を投与した5xFADマウスでは、コントロールヒトIgGを投与した5xFADマウスと比較して、認知機能が有意に改善することが明らかとなった。また同様に、5xFADマウスにおける樹状突起スパイン密度の低下についても、モノクローナル抗体#129の皮下投与及び静脈注射は類似した抑制作用を示すことが明らかとなった（データは示さず）。

## 実施例 8

### [0083] [モノクローナル抗体#129の脳組織への移行]

実施例7と同様のスケジュールで、モノクローナル抗体#129を正常マウスに8週間投与して、モノクローナル抗体#129のマウス脳組織への移行を確認した。具体的には、モノクローナル抗体#129を皮下投与又は静脈注射したマウスから脳組織を採取し、ビオチン標識抗ヒトIgG抗体を用いたビオチン-アビジンシステム免疫組織化学染色を行った。図13に結果を示すように、皮下投与 (s. c. injection) 及び静脈注射 (i. v. injection) したいずれのマウスにおいても、脳組織におけるモノクローナル抗体#129の染色シグナルが得られた。これらの結果から、皮下投与及び静脈注射されたモノクローナル抗体#129が、マウス脳内に移行していることが示された。

## 実施例 9

### [0084] [モノクローナル抗体#129の副作用の検討]

さらに、本発明者は、実施例7と同様のスケジュールで、コントロールヒトIgG又はモノクローナル抗体#129を正常マウスに8週間投与して、

モノクローナル抗体#129が好ましくない副作用を生じるか否かを調べた。コントロールヒトIgG又はモノクローナル抗体#129を投与した8ヶ月齢のマウスの外観を比較した結果、いずれのグループでも体型及び表皮に異常は認められなかった。また、皮下投与及び静脈注射のそれぞれのグループにおいて、6ヶ月齢(24週齢)から8ヶ月齢(32週齢)までの体重変化を比較した結果、モノクローナル抗体#129とコントロールヒトIgGとの間に差は認められなかった。

[0085] さらに、上記8ヶ月齢のマウスから、肝臓、肺、腎臓、脾臓、心臓、腸、筋肉、及び皮膚組織を採取して病理学的検査を行ったところ、コントロールヒトIgGと比較して、モノクローナル抗体#129の投与による異常な所見はいずれの組織においても認められなかった。また、抗体を投与していない正常マウスと比較しても、モノクローナル抗体#129投与による形態的な違いは認められなかった。以上のことから、モノクローナル抗体#129は、顕著な副作用を伴うことなく、アルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能障害を改善し得ることが示された。

### 産業上の利用可能性

[0086] 本発明によれば、ヒトMARCKSのSer46のリン酸化を阻害する活性が高い、ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、該抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物等を提供することができる。

## 請求の範囲

### [請求項1]

ヒトHMGB1に特異的に結合し、かつ、下記(A)～(D)のいずれかに記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体。

(A) 配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号4に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号8に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号9に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(B) 配列番号13に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号14に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重

鎖CDR3と、

配列番号18に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号19に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号20に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(C) 配列番号23に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(CDR)1、配列番号24に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号25に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号28に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号29に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号30に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

(D) 配列番号33に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入さ

れているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（CDR）1、配列番号34に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR2、及び配列番号35に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖CDR3と、

配列番号38に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号39に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2、及び配列番号40に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3とを含む；

[請求項2]

（A）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記（a）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、（B）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記（b）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、（C）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記（c）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、（D）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記（d）に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体である請求項1に記載のヒトモノクローナル抗体。

（a）配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(b) 配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(c) 配列番号 22 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

(d) 配列番号 32 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

[請求項3]

(A) 及び (a) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (a1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(B) 及び (b) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (b1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(C) 及び (c) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (c1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体であり、(D) 及び (d) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体が、さらに下記 (d1) に記載の特徴を有するヒトモノクローナル抗体である請求項2に記載のヒトモノクローナル抗体。

(a1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(b1) 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有す

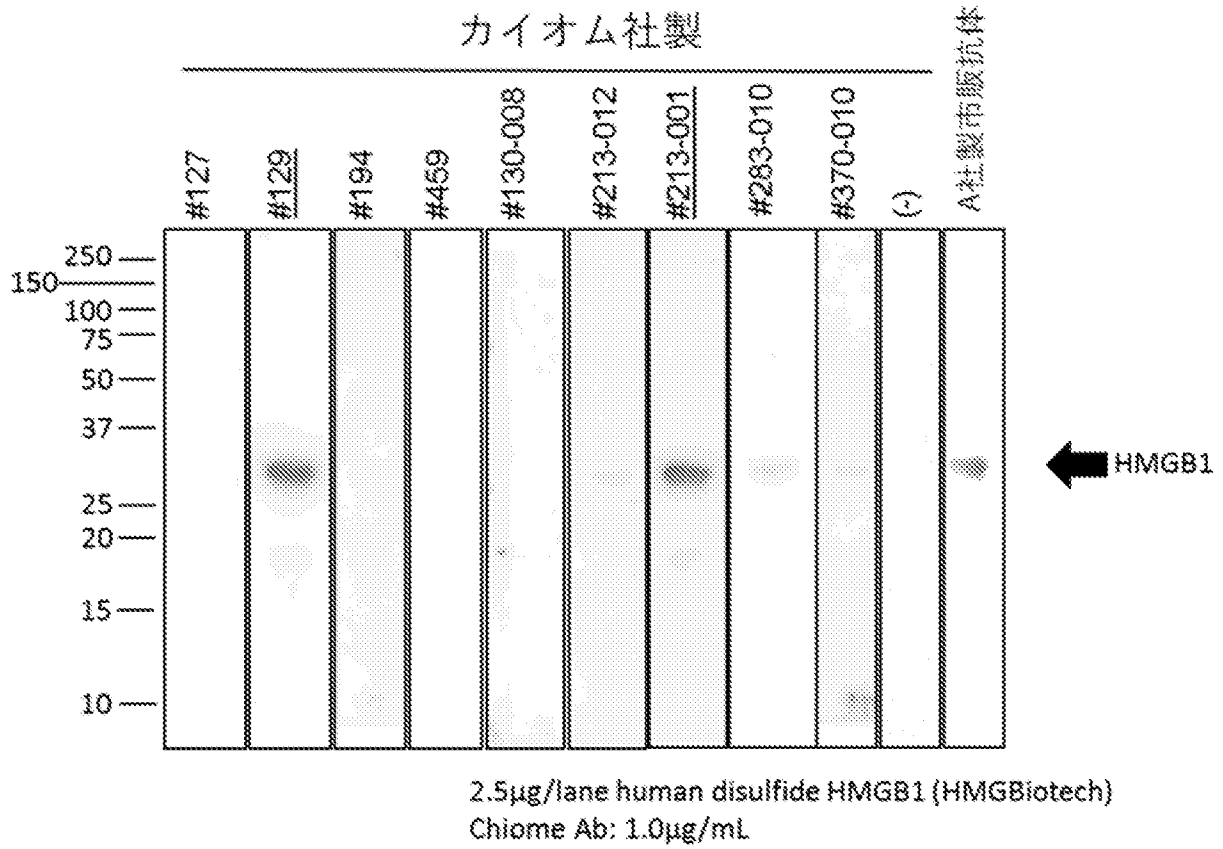
るアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(c 1) 配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

(d 1) 配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 3 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

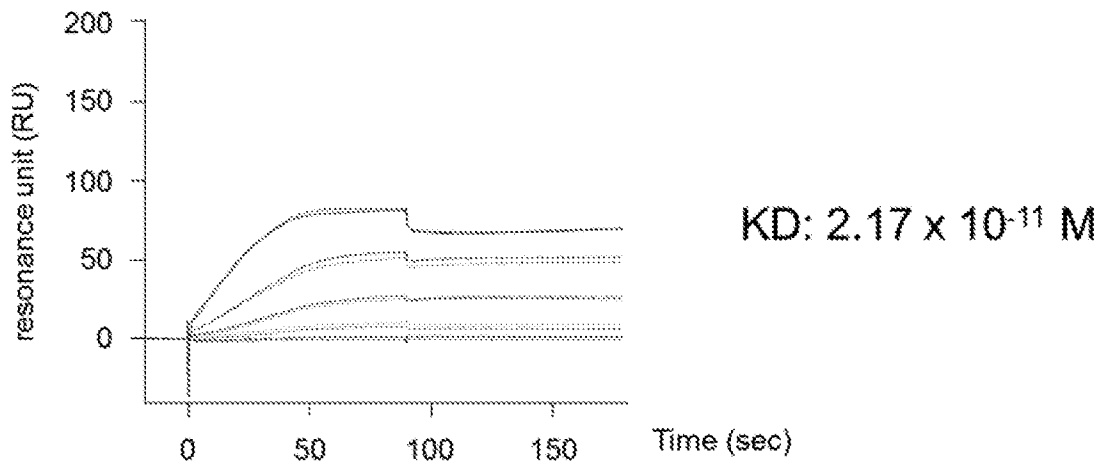
- [請求項4] 請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を含む組成物。
- [請求項5] 請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を有効成分とする、アルツハイマー病を治療又は予防するための医薬組成物。
- [請求項6] 請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体をコードする抗体遺伝子。
- [請求項7] プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている請求項 6 に記載の抗体遺伝子とを含むベクター。
- [請求項8] 請求項 7 に記載のベクターが導入されていることを特徴とする宿主細胞。

[図1]



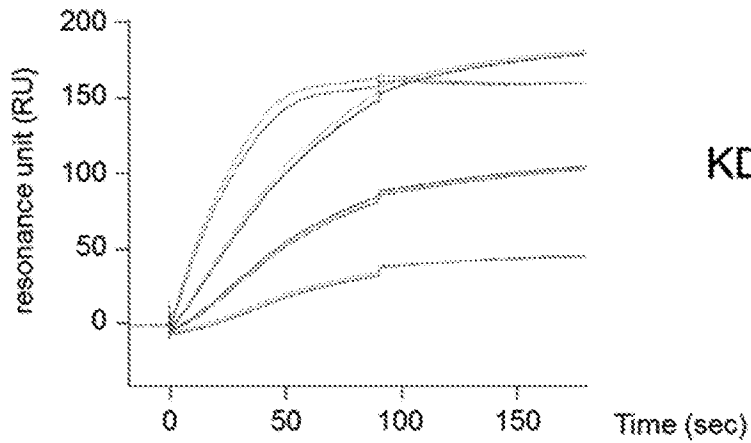
[図2]

Chione antibody #127



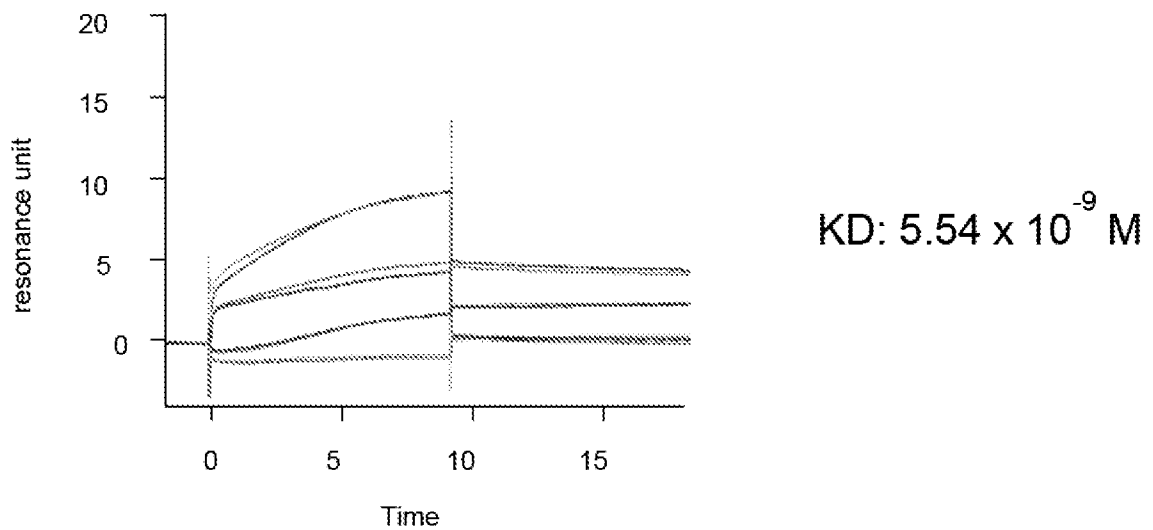
[図3]

## Chiome antibody #129



[図4]

## Chiome antibody

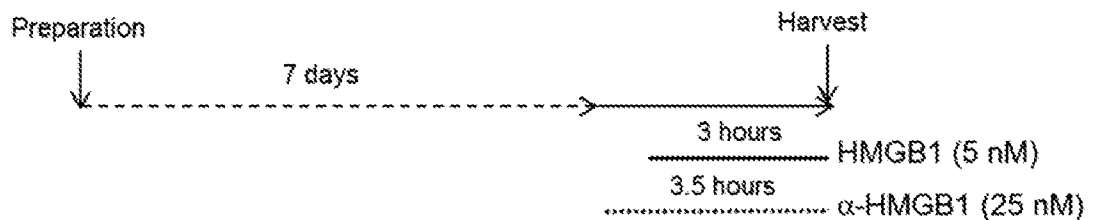


[図5]

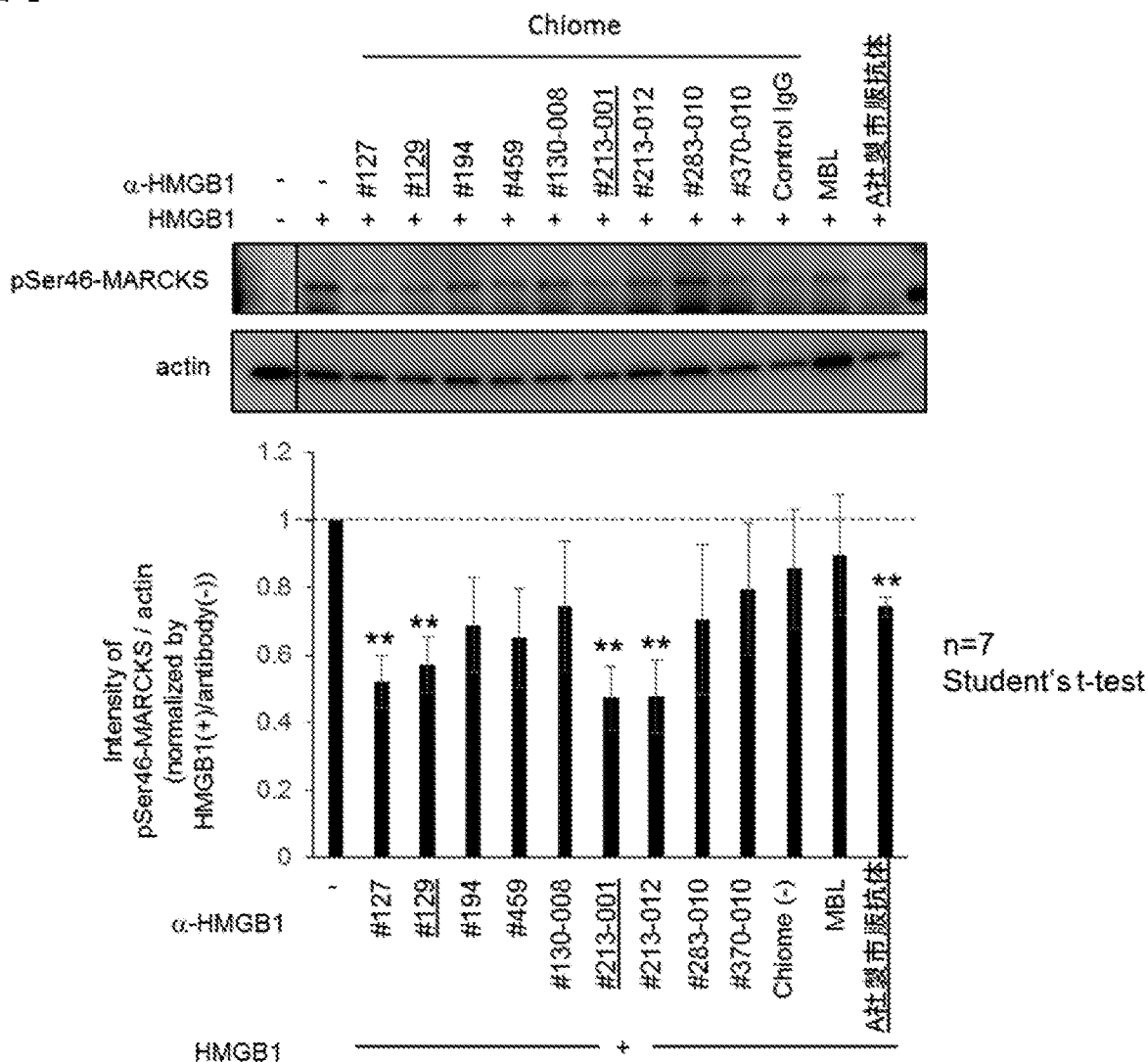
## Mouse primary cortical neuron (E15)

培養7日後、HMGB1 (5 nM)を3時間インキュベート。

抗HMGB1抗体 (25 nM)はHMGB1刺激開始30分前からインキュベートを開始。



[図6]



name	#127	#129	#194	#459	#130-008	#213-001	#213-002	#283-010	#370-010	chlome (-)	MBL	A社製市販抗体
p-value	0.0008	0.0019	0.0687	0.0571	0.2352	0.0026	0.0029	0.3331	0.2406	0.4447	0.5805	0.0009

[図7]

**hIgG1 heavy chain 定常領域アミノ酸配列 (pFUSE-CHIg-hG1)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
 PELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[図8]

**Human kappa light chain 定常領域アミノ酸配列 (pFUSE2-CLlIg-hK)**

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
 QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[ 9 ]

127-H EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS---SYAMS---WVRQAPGKGLEWVS---AISGS  
 129-H EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS---SYAMS---WVRQAPGKGLEWVS---DISGS  
 213-001-H EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS---SYAIS---WVRQAPGGGLEWVG---GIIP  
 213-012-H EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS---SYAIS---WVRQAPGGGLEWVG---GIIP

\*\*\*\*\*[\*\*] : [\*\*][\*\*] \*\* \*\* \*\* \*\* \* \*\*\*\*\*[\*\*] \* \*

127-H GGSTYYADSVKG---RFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCTK---DGYSSWDYVVY  
 129-H GGSTYYADSVKG---RFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAR-----  
 213-001-H FGRANYAQKFGG---RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAS-----  
 213-012-H FGTANYAQKFGG---RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAS-----

\* : \*\*[\*\*] \* \*\* \* [\*\*] \* [\*\*] \*\* [\*\*] \*\*\*\*\*:

127-H YGMDV---WGQGTITVTVSS  
 129-H YGMDV---WGQGTMTVTVSS  
 213-001-H -LVTDY---WGQGTITVTVSS  
 213-012-H -LVTDY---WGQGTITVTVSS

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

[ 10 ]

127-L DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC---RASQSVSSYLA---WYQQKPGKAPKLLIY---EASNL  
 129-L DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC---RASQSVTNYLA---WYQQKPGKAPKLLIY---GASIL  
 213-001-L DIQMTQSPSSLSASTGDRVTITC---RASQGISSYLA---WYQQKPGKAPKLLIY---AASTL  
 213-012-L DIQMTQSPSSLSASTGDRVTITC---RASQGISSYLA---WYQQKPGKAPKLLIY---AASTL

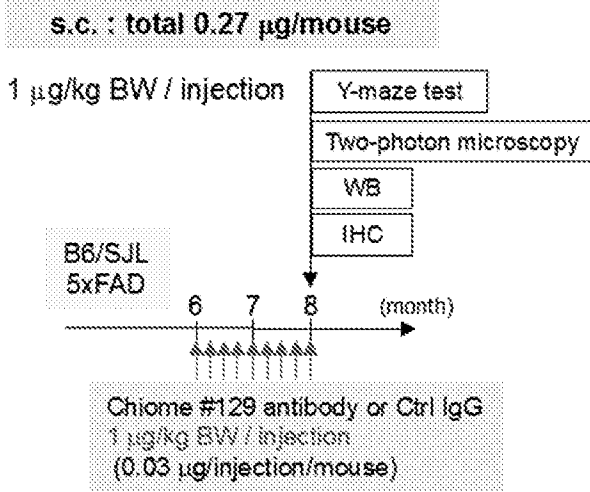
\*\*\*\*\*[\*\*] \*\*\*\*\* \*\* \* [\*\*] \*\*\*\*\*[\*\*] \*\* \*

127-L QA---GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYC---LQHNSNPLT---FGQGTRLEIK  
 129-L ET---GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYC---LQHNSTPLT---FGQGTRLEIK  
 213-001-L QS---GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC---QQANSFPIT---FGQGTRLEIK  
 213-012-L QS---GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC---QQANSFPIT---FGQGTRLEIK

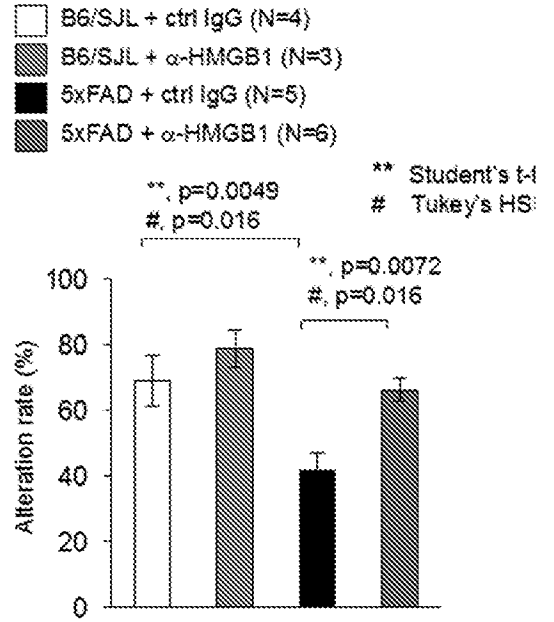
[\*\*] \*\*\*\*\*[\*\*] \*\*\*\*\* \*\* \* [\*\*] \*\*\*\*\*[\*\*]

[11]

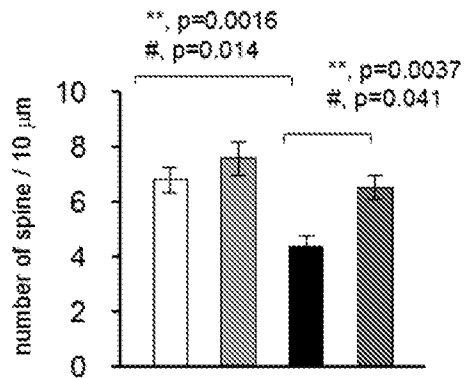
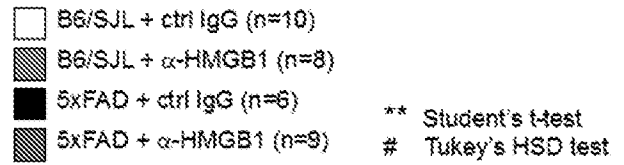
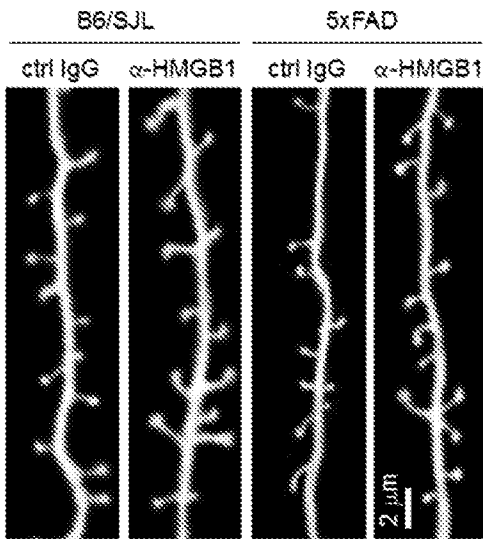
**A**



**B**



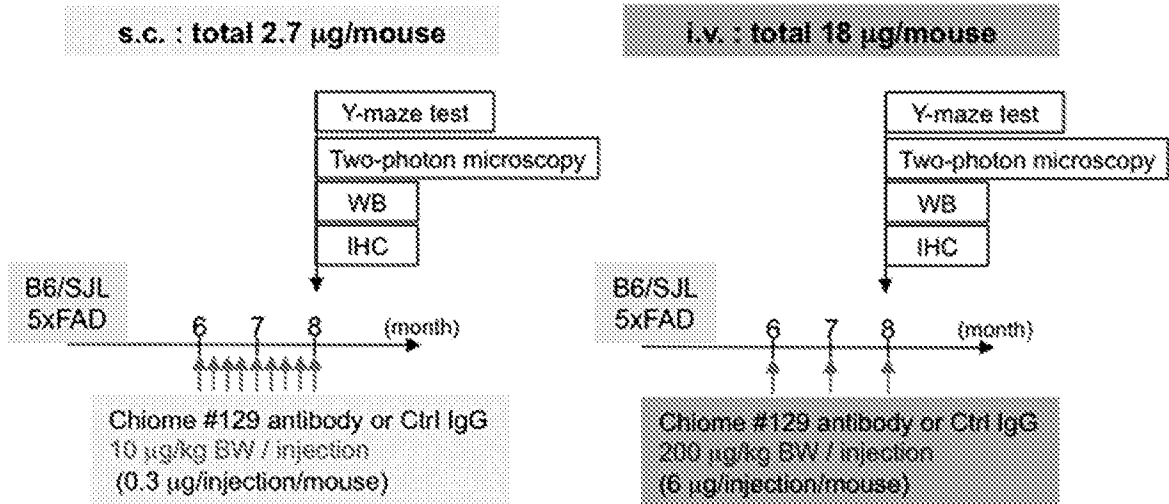
**E**



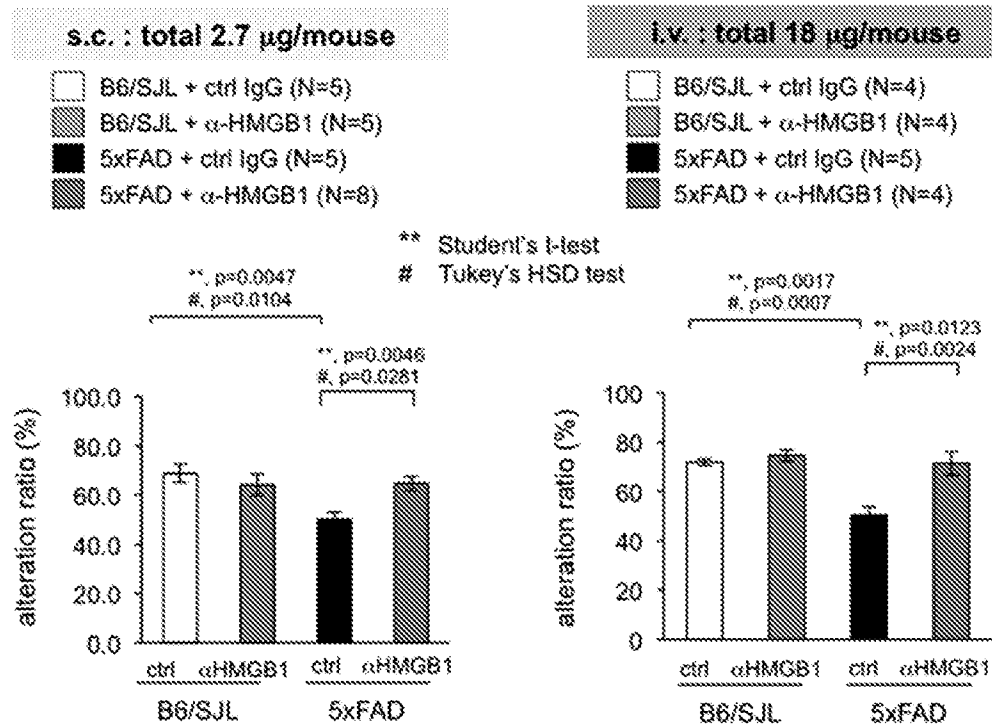
[12]

## Comparison of s.c and i.v. administrations

A

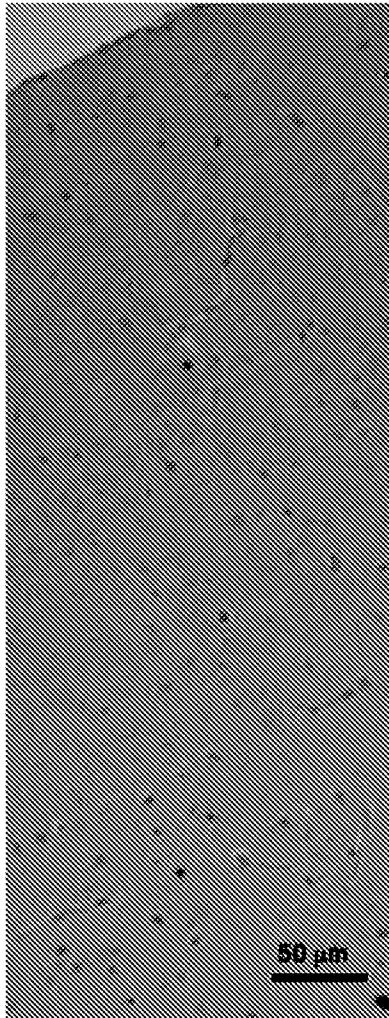


B

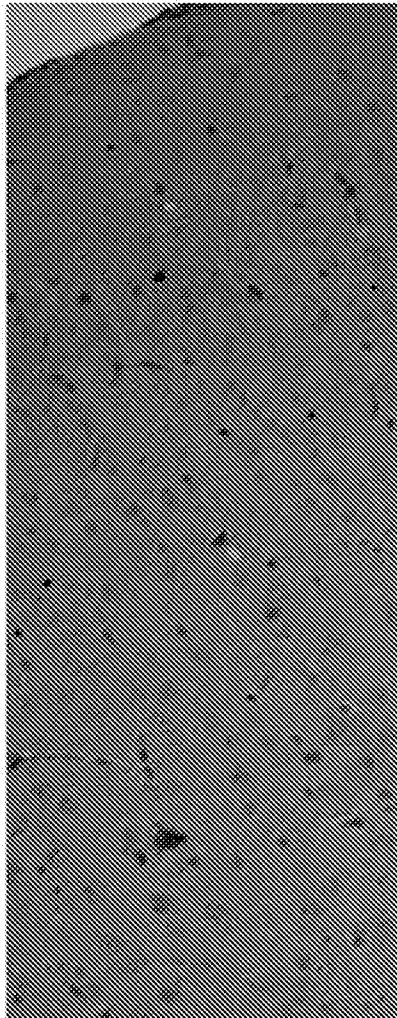


[図13]

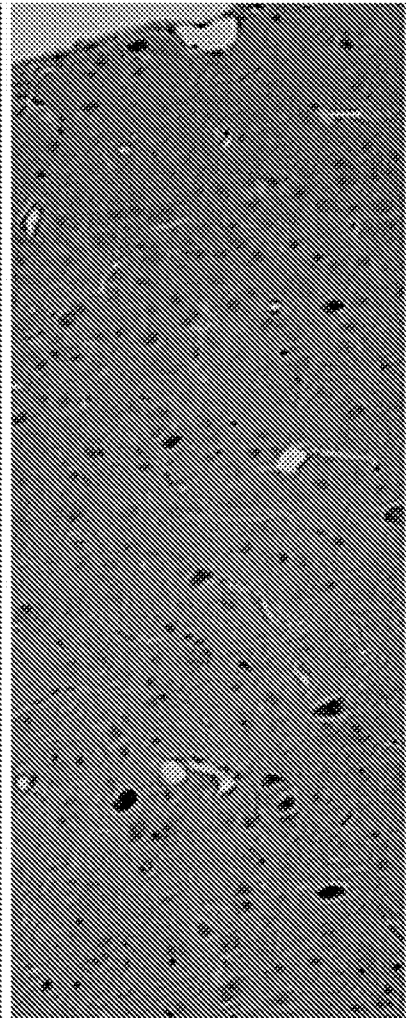
no injection



s.c. injection



i.v. injection



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/036926

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. C12N15/13 (2006.01) i, A61K39/395 (2006.01) i, A61P25/28 (2006.01) i,  
C07K16/18 (2006.01) i, C12N1/15 (2006.01) i, C12N1/19 (2006.01) i,  
C12N1/21 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12N15/63 (2006.01) i,  
C12P21/08 (2006.01) n

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/13, A61K39/395, A61P25/28, C07K16/18, C12N1/15,  
C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/63, C12P21/08

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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/030405 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 15 February 2018, paragraphs [0009]-[0012], [0019]-[0024] & US 2019/0211092 A1, paragraphs [0009]-[0018], [0058]-[0063] & EP 3502248 A1	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 15 November 2019 (15.11.2019)	Date of mailing of the international search report 26 November 2019 (26.11.2019)
--	---

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/JP2019/036926

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-520552 A (MEDIMMUNE, INC.) 19 June 2008, claims, paragraphs [0138]-[0143], [0218], examples 1-2 & WO 2007/001422 A2, claims, paragraphs [0164]-[0169], [0245], examples 1-2 & US 2006/0099207 A1 & US 2009/0169546 A1 & US 2010/0061987 A1 & US 2011/0287023 A1 & EP 1812065 A2 & CA 2585043 A1 & KR 10-2007-0090890 A & CN 101132811 A & CN 102731654 A & AU 2005333602 A1	1-8

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/13(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/13, A61K39/395, A61P25/28, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/63, C12P21/08</p>											
<p>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</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2019年										
日本国実用新案登録公報	1996-2019年										
日本国登録実用新案公報	1994-2019年										
<p>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)</p> <p>WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">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</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">X</td> <td>WO 2018/030405 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 2018.02.15 段落[0009]-[0012], [0019]-[0024] &amp; US 2019/0211092 A1, [0009]-[0018], [0058]-[0063] &amp; EP 3502248 A1</td> <td style="text-align:center;">1-8</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2018/030405 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 2018.02.15 段落[0009]-[0012], [0019]-[0024] & US 2019/0211092 A1, [0009]-[0018], [0058]-[0063] & EP 3502248 A1	1-8		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	WO 2018/030405 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 2018.02.15 段落[0009]-[0012], [0019]-[0024] & US 2019/0211092 A1, [0009]-[0018], [0058]-[0063] & EP 3502248 A1	1-8									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>									
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>									
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">15.11.2019</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">26.11.2019</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">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</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2"> <p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">星 功介</p> </td> <td style="width:10%; text-align:center;">4B</td> <td style="width:10%; text-align:center;">4439</td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> </td> </tr> </table>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">星 功介</p>		4B	4439	<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>			
<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">星 功介</p>		4B	4439								
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2008-520552 A (メディミューン, インコーポレーテッド) 2008.06.19 特許請求の範囲, 段落[0138]-[0143], [0218], 実施例 1-2 & WO 2007/001422 A2, Claims, [0164]-[0169], [0245], Example1-2 & US 2006/0099207 A1 & US 2009/0169546 A1 & US 2010/0061987 A1 & US 2011/0287023 A1 & EP 1812065 A2 & CA 2585043 A1 & KR 10-2007-0090890 A & CN 101132811 A & CN 102731654 A & AU 2005333602 A1	1-8