



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101132811 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200580041546. 0

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22) 申请日 2005. 10. 21

代理人 范征

(30) 优先权数据

60/620, 726 2004. 10. 22 US

60/651, 512 2005. 02. 10 US

60/658, 572 2005. 03. 07 US

60/662, 944 2005. 03. 18 US

60/713, 712 2005. 09. 06 US

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 06. 04

(56) 对比文件

US 2003/0143194 A1, 2003. 07. 31, 说明书第
7 页第 0165 段.

US 2004/0141948 A1, 2004. 07. 22, 说明书第
13 页第 0134-0136 段, 第 8 页第 0095 段.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/037734 2005. 10. 21

Balint RF et al..Antibody engineering
by parsimonious mutagenesis..Gene137

(87) PCT申请的公布数据

W02007/001422 EN 2007. 01. 04

1. 1993, 137(1), 109-118.

(73) 专利权人 米迪缪尼有限公司

地址 美国特拉华州

Tim Clackson, et al..Making antibody
fragments using phage display libraries..
Nature352 6336. 1991, 352(6336), 624-628.

(72) 发明人 H·吴 C·B·埃兰 高长寿

L·-L·安 P·基纳 毛素毅

A·科伊尔

审查员 刘树柏

权利要求书 1 页 说明书 71 页

序列表 44 页 附图 54 页

(54) 发明名称

抗 HMGB1 的高亲和力抗体及其用法

(57) 摘要

公开了抑制脊椎动物细胞释放促炎细胞因子和抑制患者的炎性细胞因子级联反应的组合物和方法。所述组合物含有, 例如能与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合的高亲和力抗体。本发明高亲和力抗体和含有它的药物组合物可用于许多目的, 例如作为抵御各种炎性疾病和病症的治疗剂, 所述疾病和病症是例如脓毒症、类风湿性关节炎、腹膜炎、克罗恩病、再灌注损伤、败血症、内毒素性休克、囊性纤维化、心内膜炎、银屑病、银屑病关节炎、关节炎、过敏性休克、器官局部缺血、再灌注损伤和同种异体移植物排斥。此外, 本发明高亲和力抗体可用作诊断抗体。

1. 一种与人 HMGB1 多肽特异性结合的分离的单克隆抗体,其中,所述抗体轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO :92-94 所示,所述抗体重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO :95-97 所示。
2. 如权利要求 1 所述的抗体,其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO :17 所示,重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO :19 所示。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体,其特征在于,所述抗体与由 SEQ ID NO :28 所示氨基酸序列构成的多肽特异性结合。
4. 一种含有如权利要求 1-3 中任一项所述抗体的组合物。
5. 如权利要求 4 所述的组合物,其为药物组合物。
6. 权利要求 1-3 中任一项所述抗体或权利要求 4 或 5 所述组合物用于制造抑制人 HMGB1 活性的药物的用途。
7. 如权利要求 6 所述的用途,所述药物用于治疗关节炎、脓毒症、腹膜炎和急性肺损伤。
8. 一种质粒,其保藏号为 ATCC PTA-6258。

抗 HMGB1 的高亲和力抗体及其用法

[0001] 1. 发明背景

[0002] 炎症通常由促炎细胞因子,例如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6、血小板活化因子(PAF)、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)和其它化合物诱导。几种不同类型的细胞能产生这些促炎细胞因子,最重要的是免疫细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞和嗜中性白细胞),但非免疫细胞,例如成纤维细胞、成骨细胞、平滑肌细胞、上皮细胞和神经元也能产生。这些促炎细胞因子在炎性细胞因子级联反应的早期可导致各种疾病。

[0003] 炎性细胞因子级联反应导致许多疾病的有害特征,包括炎症和凋亡。包括特征为局部和全身性反应的慢性和急性疾病,包括但不限于:涉及胃肠道及相关组织的疾病(例如阑尾炎、消化道、胃和十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、溃疡性伪膜急性和局部缺血性结肠炎、憩室炎、会厌炎、失迟缓症、胆管炎、胆囊炎、腹部疾病、肝炎、克罗恩病、肠炎和惠普尔病);全身性或局部炎性疾病和病症(例如哮喘、过敏、过敏性休克、免疫复合物病、器官局部缺血、再灌注损伤、器官坏死、枯草热、脓毒症、败血症、内毒素性休克、恶病质、高烧、嗜酸性肉芽肿、肉芽肿病和结节病);涉及泌尿生殖系统和相关组织的疾病(例如脓毒性流产、附睾炎、阴道炎、前列腺炎和尿道炎);涉及呼吸系统和相关组织的疾病(例如支气管炎、肺气肿、鼻炎、囊性纤维化病、肺炎、COPD、成人呼吸窘迫综合征、pneumoultramicroscopic silico-volcanoconiosis、肺泡炎、细支气管炎、咽炎、胸膜炎和鼻窦炎);各种病毒(例如流感病毒、呼吸道合胞病毒、HIV、乙肝病毒、丙肝病毒和疱疹病毒)、细菌(例如弥散性菌血症、登革热)、真菌(例如念珠菌病)和原生动物及多细胞寄生虫(例如疟疾、丝虫病、阿米巴病和棘球囊(hydatid cysts))感染导致的疾病;皮肤病和皮肤病症(例如银屑病、烧伤、皮炎、皮炎、灼伤、荨麻疹、疣和风疹);涉及心血管系统和相关组织的疾病(例如血管炎、脉管炎、心内膜炎、动脉炎、动脉粥样硬化、血栓性静脉炎、心包炎、充血性心力衰竭、心肌炎、心肌局部缺血、结节性多动脉炎、再狭窄和风湿热);涉及中枢和外周神经系统和相关组织的疾病(例如阿耳茨海默病、脑膜炎、脑炎、多发性硬化症、脑梗塞、脑栓塞、格-巴综合征(Guillame-Barresyndrome)、神经炎、神经痛、脊髓损伤、麻痹和眼色素层炎);骨、关节、肌肉和结缔组织的疾病(例如各种关节炎和关节痛、骨髓炎、筋膜炎、佩吉特病、痛风、牙周病、类风湿性关节炎和滑膜炎);其它自身免疫疾病和炎性疾病(例如重症肌无力、甲状腺炎、全身性红斑狼疮、古德帕斯丘综合征、贝切特综合征、同种异体移植物排斥、移植物抗宿主病、I型糖尿病、强直性脊柱炎、贝格尔病、I型糖尿病、强直性脊柱炎、贝格尔病和莱特综合征);以及各种癌症、肿瘤和增殖性疾病(例如何杰金病);以及在任何情况中,对任何原发性疾病的宿主炎性或免疫应答。

[0004] 早期促炎细胞因子(例如,TNF、IL-1等)介导炎症,诱导高迁移率族蛋白1(HMG1)(也称为HMG-1、HMG1和HMGB1)的后期释放,该蛋白在血清中累积,介导迟发性致死并进一步诱导早期促炎细胞因子。

[0005] HMG1先前鉴定为称为高迁移率族(HMG)DNA-结合蛋白家族的奠基成员(founding member),这些蛋白对DNA结构和稳定性至关重要。几乎在40年前鉴定它为能结合双链DNA,但不具序列特异性的遍在表达的核蛋白。

[0006] HMG1 结合使 DNA 弯曲从而促进核蛋白复合物的形成和稳定,有利于,例如糖皮质激素受体和 RAG 重组酶的基因转录。HMG1 分子有 3 个结构域:称为 HMG A 和 HMG B 框 (box) 的两个 DNA 结合基序,和酸性羧基末端。两个 HMG 框是高度保守的 80 个氨基酸,L- 形结构域。HMG 框也在其它转录因子,包括 RNA 聚合酶 I 转录因子、人上游结合因子和淋巴特异性因子中表达。

[0007] 近年来,发现 HMG A 框用作 HMG 促炎作用的竞争性抑制剂,HMG B 框具有 HMG 的主要促炎活性(参见,例如 US20040005316)。与诱导炎症的凋亡细胞相反,已证明 HMG1 是长期找寻的坏死(细胞)被动释放的核危险信号。HMG1 也显示在需要乙酰化该分子的过程中由激活的巨噬细胞或单核细胞主动分泌,从而能从核中易位至分泌性溶酶体并分泌 HMG1 的乙酰化形式。参见 PCT/IB2003/005718。因此,坏死细胞被动释放的 HMG1 和炎性细胞主动分泌的 HMGB1 是不同的分子。

[0008] 此外,HMG1 涉及作为内毒素血症中迟发性致死的细胞因子介质。参见,例如美国专利 6,468,533 和 6,448,223。更具体地说,已证明细菌内毒素(脂多糖(LPS))能激活单核细胞/巨噬细胞释放 HMG1 作为激活的晚期效应,从而导致有毒的血清 HMG1 水平升高。抗 HMG1 的抗体显示能防止内毒素的致死作用,即使当抗体给药延迟至早期细胞因子效应后。与其它促炎细胞因子相似,HMG1 是单核细胞的强效激活物。气管内应用 HMG1 可导致急性肺损伤,而抗-HMG1 抗体可保护避免内毒素诱导的肺水肿。此外,在患有脓毒症或失血性休克的危急病人中血清 HMG1 水平升高,与存活者相比,未存活者的水平显著较高。

[0009] 胞外 HMG1 通过高级糖基化终产物的受体(RAGE)和 To11 样受体(TLR)家族成员转导信号而成为炎性级联反应的强效介质。参见,例如美国专利公布号 US20040053841。

[0010] 高迁移率族蛋白 2(HMG2)(也称为 HMGB2 和 HMG-2)是同样源于基因复制的 HMG1 近亲。其存在于许多细胞类型中,并且与 HMG1 共有许多(如果不是所有)生化特性(Bustin,1999, Mol. Cell. Biol.,19,5237-46 和 Thomas 等,2001, Trends Biochem. Sci.,26,167-74)。虽然在成年小鼠组织中,HMG2 不及 HMG1 丰富,并且分布更有限,但其在淋巴器官、睾丸和肺中较为丰富,在这些器官中也起到炎症介质的作用。与 HMG1 相似,在许多自身免疫疾病中 HMG2 也是自身抗体(如核外周抗嗜中性白细胞胞质抗体)的明显靶抗原,所述疾病包括全身性风湿病(Uesugi 等,1998, J Rheumatol.,25 :703-9),溃疡性结肠炎(Sobajima 等,1998, Clin Exp Immunol.,111 :402-7)和青少年特发性关节炎(Wittmann 等,1990, Arthritis Rheum.,33 :1378-83 ;Rosenberg 等,2000, J Rheumatol.,27,2489-93)。

[0011] 鉴于能与 HMG1 及其多肽片段(例如,HMG A 和 HMG B 框)结合的抗体已显示能调节 HMG1 的活性(例如,促炎活性),和调节人 HMG1 活性可能对于许多疾病和病症具有深远的治疗应用,本领域需要鉴定具有 HMG1 高亲和力和低免疫原性并能与 HMG1 及其多肽片段特异性结合的抗体。类似地,对于许多疾病和病症,能调节 HMG2 活性的分子(例如,能与 HMG2 及其多肽片段特异性结合的抗体)也可以是有用的治疗剂。

[0012] 2. 发明概述

[0013] 本发明部分根据发现了能与 HMG1(在本文也称为“HMGB1”)及其抗原性片段特异性结合的高亲和力抗体。本发明的高亲和力抗体和含有其的药物组合物可用于许多目的,例如作为抵御各种炎性疾病和病症的治疗剂,所述疾病和病症例如是:脓毒症、类风湿性关

节炎、腹膜炎、克罗恩病、再灌注损伤、败血症、内毒素性休克、囊性纤维化病、心内膜炎、银屑病、关节炎（如，银屑病关节炎）、过敏性休克、器官局部缺血、再灌注损伤、脊髓损伤和同种异体移植排斥。此外，本发明的高亲和力抗体可用于诊断性应用。

[0014] 在本发明的一个实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人或其它动物（例如哺乳动物和无脊椎动物）的 HMG1 多肽或由其构成（或基本上由其构成）。在一具体实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人 HMG1 多肽（SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2）或由其构成。本领域熟知人和其它动物的全长 HMG1 多肽（参见，例如 US20040005316 ;6, 468, 533 和 6, 448, 223）。

[0015] 人 HMGB1 的氨基酸序列（GenBank 登录号 NP_002119）

[0016] MGKGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKAAKLKEKYEKDI AAYRAKGPDAAKKGVVKAESKSKKKEEEEEDEEDEDEEEEEDEEDEDEE DDDDE (SEQ ID NO:1)

[0017] 人 HMGB1 的氨基酸序列（GenBank 登录号 AAA64970）

[0018] MGKGDPPKPTGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKFKDPNAPKRLPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKAAKLKEKYEKDI AAYRAKGPDAAKKGVVKAESKSKKKEEEEEDEEDEDEEEEEDEEDEDEE DDDDE (SEQ ID NO:2)

[0019] 在本发明的另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人或其它动物（例如哺乳动物和无脊椎动物）的 HMG2 多肽或由其构成（或基本上由其构成）。在另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人 HMG2 多肽（SEQ ID NO:21）或由其构成。本领域熟知人和其它动物的全长 HMG2 多肽。参见，例如 Majumdar 等，1991, Nucleic Acids Res. ,19 :6643 ;Shirakawa 等，1992, J Biol Chem, 267 :6641-6645。

[0020] 人 HMGB2 的氨基酸序列（GenBank 登录号 AAA58659）

[0021] MGKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKSKFEDMAKSDKARYDREMKNYVPPKGDKKGKDPNAPKRPPSAFFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGEMWSEQSAKDKQPYEQAAKLKEKYEKDI AAYRAKKGSEAGKKGPRPTGSKKKNPEDEEEEEDEEDEEEEEDEEDEE (SEQ ID NO:21)

[0022] 在本发明的另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有哺乳动物（或其它动物）的 HMG1A 框或 HMG1B 框多肽（优选人 HMG1 多肽）或由其构成（或基本上由其构成）。本领域熟知人和其它动物的 HMG1A 框及 HMG1B 框多肽的氨基酸序列高度保守（参见，例如 US20040005316 ;6, 468, 533 ;6, 448, 223 和 US20040053841）。

[0023] 人 HMGB1A 框（SEQ ID NO:3）

[0024] PTGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

[0025] 人 HMGB1B 框（SEQ ID NO:4）

[0026] FKDPNAPKRLPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKAAKLKEKYEKDI AAY

[0027] 在本发明还有另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有哺乳动物（或其它动物）的 HMG2A 框或 HMG2B 框多肽（优选人 HMG2 多肽）或由其构成（或

基本上由其构成)。本领域熟知人和其它动物的 HMG 框多肽的氨基酸序列高度保守。参见,例如 Jantzen 等,1990, Nature, 344 :830-6 ;Kolodrubetz,1990, Nucleic Acids Res. , 18 :5565 ;Laudet 等,1993, Nucleic Acids Res. , 21 :2493-501 和 Thomas 等,2001, Trends Biochem Sci. , 26 :167-74。

[0028] 人 HMGB2 A 框 (SEQ ID NO:22)

[0029] PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFAEFSSKKCSERWKTMSAKEKSKFEDMAKSDKARYDREMKN YVPPKGDK

[0030] 人 HMGB2B 框 (SEQ ID NO:23)

[0031] KKKDPNAPKRPPSAFFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGEMWSEQS AKDKQPYEQKAAKLKEKYEKDIAAY

[0032] 本发明也包括能与含有衍生自 HMG1 和 / 或 HMG2 的 A 框和 B 框的氨基酸残基或者由其构成 (或基本上由其构成) 的表位特异结合的抗体。衍生自 A 框及 B 框的氨基酸残基的表位可以是 A 和 B 框相连得到的线形多肽,或者可以是含有 A 和 B 框氨基酸残基的三维构象多肽。

[0033] 在本发明的另一实施方式中,本发明高亲和力抗体能与含有人 (或其它动物) HMGB1 的多肽片段或由其构成 (或基本上由其构成) 的抗原性 HMGB1 多肽片段特异性结合。

[0034] 在本发明的另一实施方式中,本发明高亲和力抗体能与含有人 (或其它动物) HMGB2 的多肽片段或由其构成 (或基本上由其构成) 的抗原性 HMGB2 多肽片段特异性结合。

[0035] 特别考虑的本发明高亲和力抗体能与乙酰化和 / 或非乙酰化 HMG1 及其抗原性片段特异性结合。也特别考虑了本发明高亲和力抗体能区分这两种形式。还特别考虑本发明高亲和力抗体能与乙酰化和 / 或非乙酰化 HMG2 及其抗原性片段特异性结合。也特别考虑了本发明高亲和力抗体能区分这两种形式。

[0036] 在本发明的具体实施方式中,能与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合的抗体是人源化抗体或人抗体。在本发明的另一具体实施方式中,能与 HMG2 及其抗原性片段特异性结合的抗体是人源化抗体或人抗体。

[0037] 本发明的另一实施方式是能以小于 10^{-5}M 、或小于 10^{-6}M 、或小于 10^{-7}M 、或小于 10^{-8}M 、或小于 10^{-9}M 、或小于 10^{-10}M 、或小于 10^{-11}M 、或小于 10^{-12}M 、或小于 10^{-13}M 的解离常数或 $K_d(k_{\text{off}}/k_{\text{on}})$ 与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合的抗体。

[0038] 本发明的另一实施方式是能以小于 10^{-5}M 、或小于 10^{-6}M 、或小于 10^{-7}M 、或小于 10^{-8}M 、或小于 10^{-9}M 、或小于 10^{-10}M 、或小于 10^{-11}M 、或小于 10^{-12}M 、或小于 10^{-13}M 的解离常数或 $K_d(k_{\text{off}}/k_{\text{on}})$ 与 HMG2 及其抗原性片段特异性结合的抗体。

[0039] 在另一实施方式中,本发明抗体能以小于 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、或小于 $3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 与 HMG1 和 / 或其抗原性片段结合。在其它实施方式中,本发明抗体与 HMG1 和 / 或其抗原性片段结合的 K_{off} 小于 10^{-3}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-4}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-5}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-6}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-7}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-8}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-9}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ 或小于 10^{-10}s^{-1} 。

[0040] 在另一实施方式中,本发明抗体能以小于 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、或小于 $3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 与 HMG2 和 / 或其抗原性片段结合。在其它实施方式中,本发明抗体与 HMG2 和 / 或其抗原性片段结合的 K_{off} 小于 10^{-3}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-4}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-5}s^{-1} 、小

于 $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-6}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-7}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-8}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-9}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-9} \text{s}^{-1}$ 或小于 10^{-10}s^{-1} 。

[0041] 在另一实施方式中,本发明抗体与 HMG1 和 / 或其抗原性片段结合的缔合速率常数或 k_{on} 速率至少是 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、或至少 $10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

[0042] 在另一实施方式中,本发明抗体与 HMG2 和 / 或其抗原性片段结合的缔合速率常数或 k_{on} 速率至少是 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、或至少 $10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

[0043] 考虑本发明高亲和力抗体能与 HMG1 特异性结合而不与 HMG2 结合,或者能与 HMG2 特异性结合而不与 HMG1 结合。还考虑本发明高亲和力抗体与 HMG1 和 HMG2 都能特异性结合(例如,能特异性识别存在于 HMG1 和 HMG2 中的表位的抗体)。考虑本发明高亲和力抗体分别能与 HMG1 或能与 HMG2 特异性结合,和能与 HMG2 或能与 HMG1 交叉反应。还考虑本发明高亲和力抗体能以相同或不同的结合亲和力与 HMG1 和 HMG2 结合。

[0044] 本发明的高亲和力抗体包括但不限于:合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、合成抗体、单链 Fv(scFv)、Fab 片段、F(ab') 片段、二硫键连接的 Fv(sdFv)(包括双特异性 sdFv) 和抗独特型(抗-Id)抗体及以上任何抗体的表位结合片段。

[0045] 本发明的其它非排他性实施方式包括具有某些优选生化特征(例如特定的等电点(pI)或解链温度(Tm))的本发明高亲和力抗体。

[0046] 在一个实施方式中,本发明的高亲和力抗体具有 5.5-9.5 的 pI。

[0047] 在一个实施方式中,本发明的高亲和力抗体具有约 65°C - 约 120°C 的 Tm。

[0048] 本发明的具体实施方式也包括能以高亲和力与 HMG1 特异性结合的具体抗体(及其片段),所述抗体由美国模式培养物保藏所(10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209)保藏并分别指定了 ATCC 保藏号 PTA-6142(2004 年 8 月 4 日保藏)、PTA-6143(2004 年 8 月 4 日保藏)、PTA-6259(2004 年 10 月 19 日保藏)和 PTA-6258(2004 年 10 月 19 日保藏)(在本文也分别称为“S2”、“S6”、“S16”和“G4”)。这些保藏物按照国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约的条款而维持。由于提及的这些抗体株按照布达佩斯条约的条款而维持,则签署了布达佩斯条约的专利局可获得这些抗体株。

[0049] 本发明的其它具体实施方式也包括能以高亲和力与 HMG1 特异性结合并含有至少一个本文所述可变区(参见,例如图 2A-J 和 SEQ ID NO:5-20、24-27 和 30-73)的具体抗体(及其片段)。具有本文所述抗体的至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个 CDR(参见,例如图 2A-J 中下划线所示的 CDR 和 SEQ ID NO:74-103)的抗体是本发明的具体实施方式。具有所保藏抗体的至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个 CDR 的抗体是本发明的具体实施方式。本发明实施方式也考虑编码这些抗体(及其片段)的分离的多核苷酸。

[0050] 此外,本发明包括能与本文所述抗-HMG1 抗体的相同表位(例如, HMG1 肽中的 91-169 或 150-183 表位)特异性结合的任何抗体。在一具体实施方式中,本发明包括能与所保藏抗体的相同表位特异性结合的抗体。具体考虑了这些抗体能以至少相等的亲和力、或更好的亲和力、或较低的亲和力与所保藏抗体的相同表位特异性结合。编码这些抗体(及

其片段) 的分离的多核苷酸也是本发明的具体实施方式。

[0051] 本发明的实施方式包括编码任何本发明高亲和力抗体的分离的多核苷酸。

[0052] 在其它实施方式中, 本发明涉及含有本发明高亲和力抗体和药学上可接受的赋形剂的组合物, 例如药物组合物。

[0053] 在一具体实施方式中, 组合物含有能与 HMG1 的 A 框 (例如, SEQ ID NO :3 内的表位) 特异性结合的本发明高亲和力抗体。在另一具体实施方式中, 组合物含有能与 HMG1 的 B 框 (例如, SEQ ID NO :4、28、29 内的表位) 特异性结合的本发明高亲和力抗体。在还有另一具体实施方式中, 组合物含有与衍生自 HMG1 和 / 或 HMG2 的 A 框及 B 框的表位特异性结合的本发明高亲和力抗体。也考虑本发明组合物可含有本发明高亲和力抗体的组合, 例如与 A 框特异性结合的抗体和与 B 框特异性结合的抗体的组合。

[0054] 本发明组合物含有单独的本发明高亲和力抗体或其与其它活性治疗性分子和 / 或佐剂, 例如类固醇, 其它抗炎分子或其它抗体治疗剂的组合。更具体地说, 本发明组合物含有早期脓毒症介质的拮抗剂。早期脓毒症介质的拮抗剂是一种实施方式, 细胞因子的拮抗剂选自 TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、MIF 和 IL-6。

[0055] 在本发明的另一实施方式中, 本文所述组合物能抑制由炎性细胞因子级联反应激活所介导或以其为特征的病症, 包括急性和慢性炎症病症。

[0056] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在动物 CLP 脓毒症模型 (例如, 小鼠或小猪 CLP 模型) 中比对照组合物的保护力更高 (高至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0057] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在动物关节炎模型 (例如, 大鼠 AIA、小鼠被动或主动 CIA 模型) 中比对照组合物的保护力更高 (高至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0058] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在动物关节炎模型 (例如, 大鼠 AIA、小鼠被动或主动 CIA 模型) 中减少骨丧失和 / 或软骨损伤比对照组合物更低 (低至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0059] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在人中减少骨丧失和 / 或软骨损伤比对照组合物更低 (低至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0060] 在本发明另一实施方式中, 本文所述组合物在啮齿类关节炎模型中比 Renbrel® (加或不加氨甲喋呤) 的保护力更高 (高至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0061] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在人中比 Etenbrel® (加或不加氨甲喋呤) 的保护力更高 (高至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0062] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在小鼠腹膜炎模型中比对照组合物的保护力更高 (高至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0063] 本发明考虑的其它实施方式包括治疗或预防关节炎, 例如类风湿性关节炎、破骨

细胞介导的疾病或其它炎性关节疾病的方法,其包括给予本文所述抗体组合物。

[0064] 在另一实施方式中,本发明包括治疗或预防关节炎,例如类风湿性关节炎、破骨细胞介导的疾病或其它炎性疾病的方法,其包括给予能与 HMG1 或其抗原性片段(例如,HMG B 框)特异性结合的任何抗体(或抗体组合物),而无论该抗体的结合亲和力。

[0065] 在另一实施方式中,本发明包括治疗或预防关节炎,例如类风湿性关节炎、破骨细胞介导的疾病或其它炎性疾病的方法,其包括给予能与 HMG2 或其抗原性片段(例如,HMG B 框)特异性结合的任何抗体(或抗体组合物),而无论该抗体的结合亲和力。

[0066] 在另一实施方式中,本发明包括治疗或预防关节炎,例如类风湿性关节炎、破骨细胞介导的疾病或其它炎性疾病的方法,其包括给予能与 HMG1 和 / 或 HMG2 或其抗原性片段(例如,HMG B 框)特异性结合的抗体组合(或抗体组合物),而无论该抗体的结合亲和力。

[0067] 在本发明还有另一实施方式中,本文所述组合物在人或啮齿类 SCI 模型中缓解脊髓损伤(SCI)的严重性比对照组合物更好(好至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%)。

[0068] 在其它具体实施方式中,本发明涉及给予和利用本发明组合物和抗体来治疗和预防各种炎性病症的方法,所述病症包括慢性和急性病症,例如阑尾炎、消化道、胃和十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、溃疡性伪膜急性和局部缺血性结肠炎、憩室炎、会厌炎、失迟缓症、胆管炎、胆囊炎、肝炎、克罗恩病、肠炎和 惠普尔病、哮喘、过敏、过敏性休克、免疫复合物病、器官局部缺血、再灌注损伤、器官坏死、枯草热、脓毒症、败血症、内毒素性休克、恶病质、高烧、嗜酸性肉芽肿、肉芽肿病、结节病、脓毒性流产、附睾炎、阴道炎、前列腺炎和尿道炎、支气管炎、肺气肿、鼻炎、囊性纤维化病、肺炎、pneumoultramicroscopic silico-volcanocniosis、肺泡炎、细支气管炎、咽炎、胸膜炎、鼻窦炎、流感、呼吸道合胞病毒感染、疱疹感染、HIV 感染、乙肝病毒感染、丙肝病毒感染、弥散性菌血症、登革热、念珠菌病、疟疾、丝虫病、阿米巴病、棘球囊、烧伤、皮炎、皮肤炎、灼伤、荨麻疹、疣、风疹、血管炎、脉管炎、心内膜炎、动脉炎、动脉粥样硬化、血栓性静脉炎、心包炎、心肌炎、心肌局部缺血、结节性多动脉炎、风湿热、阿耳茨海默病、腹部疾病、充血性心力衰竭、再狭窄、COPD、成人呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、多发性硬化症、脑梗塞、脑栓塞、格-巴综合征、神经炎、神经痛、脊髓损伤、麻痹、眼色素层炎、关节炎、关节痛、骨髓炎、筋膜炎、佩吉特病、痛风、牙周病、类风湿性关节炎、滑膜炎、重症肌无力、甲状腺炎、全身性红斑狼疮、古德帕斯丘综合征、贝切特综合征、同种异体移植物排斥、移植物抗宿主病、I 型糖尿病、强直性脊柱炎、贝格尔病、I 型糖尿病、强直性脊柱炎、贝格尔病和莱特综合征和何杰金病。

[0069] 本发明也涉及抑制哺乳动物细胞释放促炎细胞因子的方法。该方法包括用足够量的本发明抗体或抗体组合物处理细胞以抑制细胞释放促炎细胞因子。在这些实施方式中,所述细胞是能释放促炎细胞因子的任何细胞,包括但不限于外周血单核细胞和巨噬细胞。此外,所述促炎细胞因子可选自 TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、MIF 和 IL-6。在一具体实施方式中,所述细胞是巨噬细胞,所述促炎细胞因子选自 TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、MIF 和 IL-6。在一个实施方式中,可采用这些方法来处理患有以炎性细胞因子级联反应激活为特征的病症或处于患病风险的患者细胞。本文列举了具体的病症。

[0070] 在相关实施方式中,本发明涉及治疗以炎性细胞因子级联反应激活为特征的患者病症的方法。该方法包括给予患者本发明的抗体或抗体组合物。已列举了具体的病症。

[0071] 3. 附图简述

[0072] 图 1. 人 HMG1 和 HMG2 的比对。

[0073] 图 2. 本发明的人抗-HMG1 抗体的重链 (V_H) 和轻链 (V_L) 可变区的核苷酸序列和相应的氨基酸序列。下划线处:CDR(Kabat 定义)。A) S2 V_L (SEQ ID NO. :5-6); B) S2 V_H (SEQ ID NO. :7-8); C) S6 V_L (SEQ ID NO. :9-10); D) S6 V_H (SEQ ID NO. :11-12); E) S16 V_L (SEQ ID NO. :13-14); F) S16 V_H (SEQ ID NO. :15-16); G) G4 V_L (SEQ ID NO. :17-18); H) G4 V_H (SEQ ID NO. :19-20); I) E11 V_L (SEQ ID NO. :24-25); 和 J) E11 V_H (SEQ ID NO. :26-27)。SEQ ID NO. 指氨基酸序列和核苷酸序列, 详见表 3。

[0074] 图 3. 人抗-HMG1 抗体的物理特性。A) 人抗-HMG1 抗体的等电聚焦 (IEF) 分析图表明不同的人抗-HMG1 抗体的 pI 值范围广泛 (例如, 约 7.77-约 9.24)。B) 人抗-HMG1 抗体的示差扫描量热法 (DSC) 分析图表明不同的人抗-HMG1 抗体的 T_m 值范围广泛 (例如, 约 66°C - 约 90°C)。C) IEF 和 DSC 分析的图示表明 pI 和 T_m 值之间不直接相关。

[0075] 图 4. 人抗-HMG1 抗体的结合动力学和特异性。图 A) 几种人抗-HMG1 抗体的 HMG1 捕捉 ELISA 结合曲线, 显示这些抗体对大肠杆菌 (*E. coli*) 产生的重组 HMG1 具有不同的亲和力。图 B) 几种人抗-HMG1 抗体的 HMG1 捕捉 ELISA 结合曲线比较了对重组 HMG1 (左图) 和天然核 HMG1 (右图) 的捕捉情况, 表明 S16 和 G4 能与 HMG1 的两种形式结合, 而 S2、S6 和 S10 与重组 HMG1 的结合优于和天然核 HMG1 的结合。图 C) 几种人抗-HMG1 抗体的 HMG1 捕捉 ELISA 结合曲线比较了天然核的、坏死的和激活的 HMG1 的捕捉情况, 表明 S6 和 G4 (程度较低) 能以不同的亲和力与各种形式结合, 而 S16 不能。图 D) 为几种人抗-HMG1 抗体进行的捕捉 ELISA 试验结合曲线, 比较了两种不同的捕捉形式: 固定的抗体 (正方形) 和固定的 HMG1 (三角形), 表明 E11 和 S17 (程度较低) 对于可溶性 HMG1 具有较高亲和力, 而 G2、G4、G9 和 G12 显示与固定的或可溶性 HMG1 结合的差异小。图 E) ELISA 数据显示了人抗-HMG1 抗体对 HMG1 和 HMG2 的相对结合亲和力, 表明在该试验中, 所测试的大多数抗体 (G2、G4、G9、G12、S3、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S14 和 S17) 是 HMG1 特异性的, 而 S12 和 S16 显示与 HMG1 和 HMG2 均有一定结合, E11 显示对 HMG2 具有较高结合亲和力。这些试验的数据和其它未显示的数据总结于表 1。

[0076] 图 5. HMG1B 框表位的作图研究。显示了几种人抗-HMG1 抗体的 HMG1B 框肽 ELISA 结合曲线。这些曲线表明 S12、S16 和 G4 能与 HMG1 肽 91-169 结合 (图 A)。S12 也能与 HMG1 肽 150-183 结合 (图 B)。其余测试的抗体 (S2、S6、S10、G2 和 G9) 不能与该试验中测试的任一 HMG1B 框肽结合。

[0077] 图 6. 许多人抗-HMG1 抗体能抑制 HMG1 刺激人 PBMC 释放细胞因子。图 A 显示了几种人抗-HMG1 抗体 (G9、S14、G20、S2、S6 和 S17) 抑制重组 HMG1 刺激 IL-1B、IL-6 和 TNF- α 释放的活性的代表性剂量反应曲线。结果以所释放细胞因子的 pg/ml (上图) 和抑制百分比 (下图) 作图。图 B 显示了几种人抗-HMG1 抗体 (G4、S6、S16 和 S6+S16) 和 RAGE-Fc 融合蛋白抑制重组 HMG1 刺激 IL-6 释放的代表性剂量反应曲线。图 C 显示了 E11、S13、S16、S17、G4、G9、S6、RAGE-Fc 和 A 框融合蛋白抑制天然活化的 HMG1 刺激 IL-6 释放的代表性剂量反应曲线。从这些数据和其它未显示数据计算的 IC_{50} 值总结于表 1。

[0078] 图 7. 几种人抗-HMG1 抗体抑制小鼠巨噬细胞 (mM Φ) 中 HMG1 刺激的细胞因子基因表达。显示了用缓冲液, 单用重组 HMG1 (E-HMGB1), 联用 E-HMGB1 加人同种型对照 (HuIgG),

人抗-HMG1 抗体 (E11、G2、G4、S6 和寡克隆 (oligoclonal)) 以及小鼠和人 RAGE-Fc 融合蛋白处理的小鼠巨噬细胞中 IL-1 β (左) 或 TNF- α (右) 的相对基因表达。E11、G2、G4 和寡克隆以及两种 RAGE-Fc 融合蛋白均稳定地抑制 IL-1 β 表达。G2 和小鼠 RAGE-Fc 融合蛋白稳定地抑制 TNF- α 表达。这些数据和未显示的其它数据总结于表 1。

[0079] 图 8. 人抗-HMG1 抗体的亚组阻断重组 HMG1 与 RAGE 结合。采用 ELISA 结合试验检测 HMG1 与 RAGE-Ig 融合体的结合情况。显示了许多人抗-HMG1 抗体的抑制百分率。G2、G4、S10、S16、S2 和 S6 显示明显能阻断 HMG1 和 RAGE 的结合, 而 E11、G12、G16、G20、G34、G9、寡克隆、S12、S14 和 S17 不能阻断。这些数据和未显示的其它数据总结于表 1。

[0080] 图 9. E11 部分阻断 TLR4 激活。采用细胞萤光素酶报道系统检测 HMG1 诱导的 TLR4 激活。显示了单用培养基、单用重组 HMG1 (rHMGB) 和联用 rHMGB 加 S2、E11、S6、G4、S14 或多克隆抗体处理的细胞的萤光素酶总活性。E11 显示明显能阻断 HMG1 诱导的 TLR4 激活。这些数据和未显示的其它数据总结于表 1。

[0081] 图 10. 抑制重组 HMG1 与 Thp-1 细胞 (结合)。显示了 E11、G2 和 RAGE-Fc 融合蛋白抑制重组 HMG1 与 Thp-1 细胞结合的代表性剂量反应曲线。从这些数据和和其它未显示数据计算的 IC₅₀ 值总结于表 1。

[0082] 图 11. 人抗-HMG1 抗体在脓毒症小鼠 CLP 模型中具有保护作用。显示的脓毒症小鼠 CLP 模型的代表性存活曲线比较了用人抗-HMG1 抗体或人同种型对照抗体 (R3-47) 的处理。G4 (图 A 和 B)、S16 (图 A 和 D)、S6 (图 C)、E11 和寡克隆 (均在图 D 中) 抗-HMG1 抗体能改善存活率高达 60%。

[0083] 图 12. HMG1 在几种炎症性疾病模型中上调。在第 10 天收获的未处理被动 CIA 小鼠前爪中, 存在的 HMG1 水平发现比正常小鼠中存在的至少增加了 10 倍 (图 A)。在未处理主动 CIA 小鼠的关节中, 发现后爪 (右) 中 HMGB1、RAGE、TLR2、TLR4 和 TLR9 的相对基因表达水平升高, 而前爪 (左) 中只有 HMGB1、RAGE 和 TLR2 的相对基因表达水平升高 (均在图 B 中)。在未处理主动 CIA 小鼠中, 发现关节后爪 (图) 和前爪 (图) 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的相对基因表达水平平均升高 (图 C)。AIA 大鼠踝关节中 HMGB1 水平升高 (右上图) 与爪炎症评分增加 (左上图) 和相对体重降低 (左下图) 相关 (均在图 D 中)。发现用金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 攻击的动物血清中 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 水平升高 (图 E), 其中 HMGB1 水平从攻击后 2 小时开始恒定升高, TNF- α 在 2 小时显示早期高峰, 然后在约 7 小时降低至接近基线, 在约 12 小时出现第二高峰, 而 IL-6 在约 2 小时出现高峰, 然后缓慢升高。ALI 小鼠 BAL 液中 HMGB1 水平在给予 LPS 后 50 小时内增加至 16ng/ml 以上, 最显著升高始于约第 26 小时 (左图), 与 BAL 液中观察到的细胞总数最大增高相关 (右图) (均在图 F 中)。(显示了) 用 PBS、人同种型对照 (HuIgG)、抗-HMG1 抗体 G4、HMGB1-Fc 融合蛋白、氨甲喋呤 (Methyltrexate) (MTX)、MTX+HuIgG、MTX+Renbre1 和 MTX+G4 处理后 AIA 大鼠踝关节中 HMGB1 (左上图) 和 IL-6 (左下图) 的水平。也显示了用 HuIgG、G4 或 MTX+HuIgG 治疗后 AIA 大鼠踝关节中的 TNF- α 水平 (右上图)。单用 G4 和 MTX+HuIgG 或 MTX+Renbre1 显示 HMG1、IL-6 和 TNF- α 水平降低, 然而联用 MTX+G4 显示降低作用最惊人。这些数据与各种处理时爪炎症评分所见的降低相关 (见图 16B)。

[0084] 图 13. 人抗-HMG1 抗体在关节炎被动 CIA 小鼠模型中具有保护作用。图 A 显示了用 MTX 和 Renbre1 (左上图)、人抗-HMG1 抗体 S6 (右上图) 和 G16 (左下图) 和 HMGB1-Fc

融合蛋白（右下图）治疗的被动 CIA 小鼠随时间变化的爪炎症评分。在此模型中，MTX/Renbre1 联用和 S6 抗体均降低了临床评分，而 S6 的作用更显著。显示了对前爪和后爪（图 B）或单独前爪（图 C）组织学检查获得的骨（左上图）、软骨（右上图）和炎症（左下图）的评分图。图 D 显示用 MTX 和 Renbre1（左上图）、人抗-HMG1 抗体 S6（右上图）和 G16（左下图）及 HMG1A- 框-Fc 融合蛋白（左下图）治疗的小鼠体重指数随时间的变化。如临床评分所示，MTX/Renbre1 联用和 S6 显示了保护作用，而 S6 效力更好。

[0085] 图 14. 人抗-HMG1 抗体在关节炎被动 CIA 小鼠模型中具有保护作用。实验 2（图 A）显示了用 PBS、Renbre1 或 G4（右图）和用 PBS、G4 或同种型对照抗体（左图）治疗的被动 CIA 小鼠的爪炎症评分随时间的变化。实验 3（图 B）显示了用 PBS、G4 或同种型对照抗体治疗的被动 CIA 小鼠的爪炎症评分随时间的变化。此两项研究也追踪了正常小鼠的临床评分并作图。两个实验均证明在该模型中 G4 人抗-HMG1 抗体能保护（小鼠）免于发生炎症。在实验 2 中，G4 显示效力优于 Renbre1。

[0086] 图 15. 人抗-HMG1 抗体在关节炎主动 CIA 小鼠模型中具有保护作用。图 A 显示了用 PBS、同种型对照抗体或 G4 治疗的主动 CIA 小鼠（左图）和用 PBS 或 Renbre1 治疗的主动 CIA 小鼠（右图）的爪炎症评分随时间的变化。图 B 是显示同种型对照和 G4 抗体治疗组的相对体重随时间变化绘制的图。所有图也绘制了 PBS 处理小鼠和正常小鼠的评分。在此模型中，G4 人抗-HMG1 抗体对炎症和体重丧失的保护作用显示优于 Renbre1。

[0087] 图 16. 人抗-HMG1 抗体在关节炎 AIA 大鼠模型中具有保护作用。用 PBS、同种型对照抗体或 G4 治疗 AIA 大鼠（左图）和用 PBS 或 Renbre1 治疗的 CIA 小鼠（右图）爪炎症评分随时间变化作的图（均在图 A 中，也可参见图 B），显示在此模型中，与 PBS 对照相比 G4 抗-HMG1 抗体能降低爪炎症评分约 35%，而单用 Renbre1 只能降低爪炎症评分 25%（图 A）。联用氨甲喋呤和第二药物（同种型对照、G4 或 Renbre1）治疗的 AIA 大鼠爪炎症评分随时间变化作的图（图 16B）显示 MTX 和 G4 联用甚至比单用 G4 和 MTX/Renbre1 联用更有效。用 MTX 和 G4 治疗能降低爪炎症评分至接近正常（图 B）。也显示了用 HMG1A- 框-Fc 融合蛋白治疗的爪炎症评分，其效力低于单用 G4。

[0088] 图 17. 人抗-HMG1 抗体在腹膜炎小鼠模型中具有保护作用。与用 PBS 或同种型对照（R347）治疗的小鼠相比，在用热灭活金黄色葡萄球菌攻击诱导腹膜炎的小鼠中，96 小时的存活百分比显示 G4 能提高存活率近 30%（图 A）。抗体在 -30 分钟时给予（星形），金黄色葡萄球菌攻击在第 0 分钟时给予（三角形）。

[0089] 图 18. 人抗-HMG1 抗体在急性肺损伤（ALI）小鼠模型中具有保护作用。与用任一种同种型对照抗体（R347）治疗的小鼠相比，用 G4 或 E11 治疗的 ALI 小鼠 BAL 液中回收的总细胞降低了近 40%。用 HMG1A- 框-Fc 融合蛋白治疗只使回收的总细胞降低 23%。

[0090] 图 19. 多发性硬化症（MS）样品人脑组织中的 HMG1 染色模式。样品 A）含有激活小胶质细胞的 MS 病灶（plaque）背景染色，利用 $1 \mu\text{g/ml}$ 同种型对照；B）小胶质细胞的细胞质和含有激活小胶质细胞的 MS 病灶间质的特异性 HMGB1 染色，利用 $1 \mu\text{g/ml}$ 同种型对照；和 C）发现在含有脱髓鞘的、少量激活小胶质细胞和大量淋巴细胞 MS 病灶中染色降低，利用 $1 \mu\text{g/ml}$ G16。

[0091] 4. 表格简述

[0092] 表 1—抗体特征和保藏信息。

[0093] 表 2—保守性氨基酸取代家族。

[0094] 表 3—序列表的说明

[0095] 表 4—被动 CIA 小鼠模型治疗方案的说明

[0096] 表 5—AIA 大鼠模型治疗方案的说明

[0097] 表 6—腹膜炎模型治疗方案的说明

[0098] 5. 发明详述

[0099] 本发明部分根据发现能与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合的抗体（本文也称为“HMGB1”），所述抗体显示某些生物化学、结合和功能特征。能与 HMG1 特异性结合的抗体在本文专门称为“本发明的高亲和力抗体”、“高亲和力抗体”，也包括更宽泛的术语“本发明抗体”、“抗-HMG1 抗体”和简称的“HMG 抗体”以及类似术语。本发明也部分根据发现能与 HMG1 和 HMG2 都结合的抗体。

[0100] 本发明抗体的生物化学特征包括但不限于：等电点 (pI) 和解链温度 (T_m)。本发明抗体的结合特征包括但不限于：结合特异性、解离常数 (K_d)、表位、区分 HMG1 的各种形式（例如，重组的、天然的、乙酰化的）和/或 HMG1 制品的能力以及与可溶性和/或固定化抗原结合的能力。本发明抗体的功能特征包括但不限于：抑制 HMG1 诱导的细胞因子释放、抑制 HMG1 与一种或多种受体结合、抑制 HMG1 与细胞表面结合以及在一种或多种炎症疾病（例如，脓毒症、关节炎、急性肺损伤、腹膜炎）模型中的保护作用。

[0101] 本发明抗体和含有这些抗体的组合物可用于许多目的，例如作为抵御各种慢性和急性炎症疾病和病症的治疗剂，所述疾病和病症包括但不限于：脓毒症、类风湿性关节炎、腹膜炎、克罗恩病、再灌注损伤、败血症、内毒素性休克、囊性纤维化、心内膜炎、银屑病、关节炎（例如，银屑病关节炎）、过敏性休克、器官局部缺血、再灌注损伤、脊髓损伤和同种异体移植物排斥。

[0102] 此外，本发明高亲和力抗体可用于诊断性应用。本发明抗体可用于，例如但不限于：纯化、检测和靶向本发明的 HMG1 和/或 HMG2 多肽，包括体外和体内诊断和治疗方法。例如，所述抗体可用于免疫测定来定性和定量检测生物学样品中本发明 HMG1 和/或 HMG2 多肽的水平。参见，例如 Harlow 等，Antibodies: A Laboratory Manual（《抗体：实验室手册》），（冷泉港实验室出版社，第二版，1988）。

[0103] 5.1 本发明抗体

[0104] 本文所用的“能与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合”的高亲和力抗体或其片段指，例如所述高亲和力抗体或其片段能与 HMG1 多肽或 HMG1 多肽片段（例如，HMG1A 框和 HMG1B 框）或 HMG1 多肽的某表位特异性结合（用本领域熟知的检测特异性抗体-抗原结合的免疫测定来检测），但不与其它多肽特异性结合。在一个实施方式中，能与 HMG1 多肽或其片段特异性结合的高亲和力抗体或其片段不与其他抗原发生非特异性交叉反应（例如，不能用非 HMG1 蛋白，如 BSA 竞争除去结合）。本发明也包括能与 HMG2 多肽或 HMG2 多肽片段（例如，HMG2A 框和 HMG2B 框）或 HMG2 多肽的抗原性片段特异性结合的高亲和力抗体或其片段。

[0105] 本领域技术人员应知道虽然 HMG1 和 HMG2 是不同的蛋白质，但二者可具有同源性区域（参见图 1）。因此，预计所述高亲和力抗体或其片段可与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合，但不与 HMG2 或其抗原性片段结合。还预计所述高亲和力抗体或其片段可与 HMG2 及

其抗原性片段特异性结合,但不与 HMG1 或其抗原性片段结合。还预计本发明高亲和力抗体可与 HMG1 和 HMG2 共有的某表位特异性结合。HMG1 和 HMG2 中共有的表位可相同,在这种情况下,HMG1 和 HMG2 中含有该表位的氨基酸序列相同。因此,本发明高亲和力抗体与 HMG1 和 HMG2 都能特异性结合(例如,抗体能特异性识别同时存在于 HMG1 和 HMG2 中的相同表位)。或者,HMG1 和 HMG2 中均可能有相似的共有表位。例如 HMG1 和 HMG2 之间的相似表位可享有显著的同源性(例如,60% -99% 相同性)和/或采取相似的三维构象,因而本发明高亲和力抗体能与该共享表位交叉反应。因此,本发明高亲和力抗体能分别与 HMG1 或 HMG2 特异性结合,和能与 HMG2 或 HMG1 交叉反应。本发明高亲和力抗体对存在于 HMG1 和 HMG2 上的相似表位可具有不同亲和力。因此,还预计本发明高亲和力抗体可以相同或不同的亲和力与 HMG1 和 HMG2 结合。在一具体实施方式中,高亲和力抗体或其片段与 HMG1 和/或 HMG2 的特异性结合胜过其它抗原。

[0106] 在一个实施方式中,本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有 HMG1 和/或 HMG2 的 A 框(例如,分别是 SEQ ID NO. 3 和 22)或者由其构成(或基本上由其构成)。

[0107] 在另一实施方式中,本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有 HMG1 和/或 HMG2 的 B 框(例如,分别是 SEQ ID NO. 4 和 23)或者由其构成(或基本上由其构成)。

[0108] 本发明也包括能与含有衍生自 HMG1 和/或 HMG2 的 A 框及 B 框的氨基酸残基或者由其构成(或基本上由其构成)的表位特异性结合的抗体。衍生自 A 框及 B 框的氨基酸残基的表位可以是 A 和 B 框相连得到的线形多肽,或者可以是含有 A 和 B 框氨基酸残基的三维构象多肽。

[0109] 本发明也具体包括具有多种特异性的抗体(例如,对两个或多个不连续的抗原具有特异性的抗体(总结于 Cao 等,2003,Adv Drug Deliv Rev,55:171;Hudson 等,2003,Nat Med,1:129)。例如,双特异性抗体可含有融合在一起的两个不同的结合特异性(位点)。在最简单的情况中,双特异性抗体能与一个靶抗原上的两个毗邻表位结合,这种抗体不与其它抗原交叉反应(如上所述)。或者,双特异性抗体能与两个不同的抗原结合,这种抗体能与两个不同的分子(例如,HMG1 和 HMG2)结合,但不能与其它不相关的分子(例如,BSA)结合。此外,能与 HMG1 和/或 HMG2 特异性结合的抗体可能与相关的 HMG 蛋白交叉反应。

[0110] 本文所述的术语 HMG1 和/或 HMG2 “片段”包括含有 HMG1 和/或 HMG2 多肽(例如,人 HMG1 和/或 HMG2)氨基酸序列中以下数个氨基酸残基的氨基酸序列或者由其构成(或基本上由其构成)的 HMG1 和/或 HMG2 肽或多肽:至少 5 个毗连氨基酸残基、至少 10 个毗连氨基酸残基、至少 15 个毗连氨基酸残基、至少 20 个毗连氨基酸残基、至少 25 个毗连氨基酸残基、至少 40 个毗连氨基酸残基、至少 50 个毗连氨基酸残基、至少 60 个毗连氨基酸残基、至少 70 个毗连氨基酸残基、至少 80 个毗连氨基酸残基、至少 90 个毗连氨基酸残基、至少 100 个毗连氨基酸残基、至少 125 个毗连氨基酸残基、至少 150 个毗连氨基酸残基、至少 175 个毗连氨基酸残基、至少 200 个毗连氨基酸残基或至少 250 个毗连氨基酸残基。

[0111] 本文所述的术语 HMG1 和/或 HMG2 “片段”具体也包括含有 HMG A(例如,人 HMG1 和/或 HMG2A 框)框或 HMG B(例如,人 HMG1 和/或 HMG2B 框)框中以下数个氨基酸残基的氨基酸序列或者由其构成(或基本上由其构成)的多肽:至少 5 个毗连氨基酸残基、至少 10 个毗连氨基酸残基、至少 15 个毗连氨基酸残基、至少 20 个毗连氨基酸残基、至少 25 个毗连氨基酸残基、至少 40 个毗连氨基酸残基、至少 50 个毗连氨基酸残基、至少 60 个毗连氨基

酸残基、至少 70 个毗连氨基酸残基或至少 80 个毗连氨基酸残基。

[0112] 本发明“高亲和力抗体”（本文也称为“本发明高亲和力抗体”、“高亲和力抗体”，也包括更宽泛的术语“本发明抗体”和简称的“HMG 抗体”）包括但不限于：合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体（包括双特异性抗体）、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、合成抗体、单链 Fv(scFv)、Fab 片段、F(ab') 片段、二硫键连接的 Fv(sdFv)（包括双特异性 sdFv）和抗独特型（抗-Id）抗体和以上任何抗体的表位结合片段。本发明抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性或更高的多特异性。多特异性抗体可以是对本发明多肽不同表位特异性的，或者可对本发明多肽以及异源表位，例如异源多肽或固体支持材料特异。参见，例如 PCT 公开 W093/17715；W092/08802；W091/00360；W092/05793；Tutt 等, *J. Immunol.*, 147:60-69(1991)；美国专利号 4,474,893；4,714,681；4,925,648；5,573,920；5,601,819；Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148:1547-1553, (1992)。

[0113] 多特异性抗体至少对两种不同抗原具有结合特异性。虽然这种分子通常只与两种抗原结合（双特异性抗体, BsAbs），但本发明包括具有额外特异性的抗体，例如三特异性抗体。BsAbs 的例子包括但不限于一个臂针对 HMG1 和 / 或 HMG2 表位，而另一臂针对任何其它抗原的那些抗体。本领域已知制备双特异性抗体的方法。全长双特异性抗体的常规制备方法以共同表达两对免疫球蛋白重链为基础，其中所述两链具有不同特异性（Millstein 等, 1983, *Nature*, 305:537-539）。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机重配，这些杂交瘤（四源瘤 (quadroma)）产生了不同抗体分子的可能混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。纯化该正确的分子一般通过亲和层析步骤进行，这相当繁重并且产物收率低。类似的方法见 W093/08829 和 Traunecker 等, 1991, *EMBOJ.*, 10:3655-3659。更直接的方法是产生二（价）-双抗体，一种四价双特异性抗体。本领域已知产生二（价）-双抗体的方法（参见，例如 Lu 等, 2003, *J Immunol Methods*, 279:219-32；Marvin 等, 2005, *ActaPharmacologica Sinica*, 26:649）。

[0114] 按照另一种方法，将具有所需结合特异性的抗体可变区（抗体-抗原结合位点）与免疫球蛋白恒定区序列融合。优选与含有绞链区、CH2 和 CH3 区至少一部分的免疫球蛋白重链恒定区相融合。优选至少一种融合体中存在含轻链结合所需位点的第一重链恒定区（CH1）。将编码免疫球蛋白重链融合体和免疫球蛋白轻链（如果需要）的 DNA 插入不同的表达载体中，共同转染入合适的宿主生物体中。当构建所用这三种多肽链比例不等时可提供最佳产率，这对调节这三种多肽片段彼此的比例提供了高度灵活性。然而，当等比例表达至少两种多肽链获得高产率或者当所述比例不具有特别意义时，可将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0115] 在该方法的一个实施方式中，双特异性抗体由一对在一个臂中具有第一结合特异性（例如，HMG1 和 / 或 HMG2 表位，如 A-框、B-框）的杂交免疫球蛋白重链和另一臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对（提供第二结合特异性）构成。发现此不对称结构有助于分离所需的双特异性化合物和不要的免疫球蛋白链混合物，因为只在该双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链而提供了方便的分离方法。此方法见 W094/04690。产生双特异性抗体的其它细节可见，例如 Suresh 等, 1986, *Methods in Enzymology*, 121:210。根据 W096/27011 所述的另一方法，可工程改造一对抗体分子尽可能提高从重组细胞培养物中回收异源二聚体的百分比。优选的界面含有抗体恒定区 CH3 结构域的至少一部分。在此方法

中,用较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替代第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小侧链的氨基酸(例如,丙氨酸或苏氨酸)替代大侧链氨基酸可在第二抗体分子的界面上产生与大侧链大小相同或相似的补偿性“空穴”。这提供了增加异质二聚体产率超过不要终产物(例如同质二聚体)的机制。

[0116] 双特异性抗体包括交联的或“异质缀合物(heteroconjugate)”抗体。例如,该异质缀合物中的一种抗体可与亲和素偶联,另一抗体与生物素偶联。有人提出,例如这种抗体可使免疫系统细胞靶向不要的细胞(美国专利号 4,676,980)并可用于治疗 HIV 感染(W091/00360、W092/200373 和 EP03089)。可采用常规的交联方法制备异质缀合物抗体。本领域熟知合适的交联剂和许多交联技术,可参见美国专利号 4,676,980。

[0117] 考虑了具有两价以上的掺有至少一个本发明绞链修饰的抗体。例如,可制备三特异性抗体。参见,例如 Tutt 等, *J. Immunol.*, 147:60, (1991)。

[0118] 其它专门考虑的抗体是“寡克隆”抗体。本文所用的术语“寡克隆抗体”指不同单克隆抗体的预定混合物。本领域已知制备寡克隆抗体的方法。参见,例如“实施例章节”,实施例 1, PCT 公布 W095/20401; 美国专利号 5,789,208 和 6,335,163。在某些实施方式中,寡克隆抗体由在一个细胞中产生的针对一种或多种表位的抗体预定混合物构成。在其它实施方式中,寡克隆抗体含有多个重链,其能与共同的轻链配对从而产生具有多特异性的抗体(例如, PCT 公布 W004/009618)。当需要靶向一个靶分子(例如, HMG1)上的多个表位时,寡克隆抗体特别有用。本领域技术人员知道或能确定哪种类型的抗体或抗体混合物适用于所需目的和需要。具体地说,本发明抗体包含免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有能与 HMG1 抗原特异性结合的抗原结合位点(例如,抗-HMG1 抗体的一个或多个互补决定区(CRD))的分子。也专门考虑了本发明抗体可包含免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有能与 HMG2 抗原特异性结合的抗原结合位点(例如,抗-HMG2 抗体的一个或多个互补决定区(CRD))的分子。本发明免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可同时含有重链和轻链。IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY 重链的阵列可与 κ 或 λ 形式的轻链配对。

[0119] 本发明抗体也包含免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性片段,即含有抗原结合位点的分子,可将这些片段与或不与另一免疫球蛋白结构域(包括但不限于 Fc 区或其片段)融合。如本文所概述的,术语“抗体”包括能与本文所述 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合的抗体、全长抗体及其含有 Fc 区的 Fc 变体、或其与本文所述免疫球蛋白的免疫学活性片段或其它蛋白融合的含有至少一个本文所述新氨基酸残基的片段。这种变体 Fc 融合体包括但不限于: scFv-Fc 融合体、可变区(例如, VL 和 VH)-Fc 融合体、scFv-scFv-Fc 融合体。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类。

[0120] 本发明抗体也包括在哺乳动物(例如,人)中具有以下半衰期(例如,血清半衰期)的抗体: 5 天以上、10 天以上、15 天以上、20 天以上、25 天以上、30 天以上、35 天以上、40 天以上、45 天以上、2 个月以上、3 个月以上、4 个月以上或 5 个月以上。本发明抗体在哺乳动物(例如,人)中半衰期增加导致所述抗体或抗体片段在哺乳动物中的血清滴度较高,减少了所述抗体或抗体片段的给药频率和 / 或降低了给予所述抗体或抗体片段的浓度。可通

过本领域技术人员已知的技术制备体内半衰期增加的抗体。例如,可通过修饰(如,取代、缺失或添加)经鉴定参与 Fc 区和 FcRn 受体间相互作用的氨基酸残基来产生体内半衰期增加的抗体(参见,例如国际公布号 W097/34631 ;W004/029207 ;U. S. 6, 737056 和美国专利公布号 2003/0190311,下文将更详细讨论)。

[0121] 在一个实施方式中,本发明抗体可在其 Fc 区内包含修饰/取代和/或新的氨基酸,例如以下文献中所述的:Ghetie 等,1997, *Nat Biotech.*, 15 :637-40 ;Duncan 等, 1988, *Nature*, 332 :563-564 ;Lund 等,1991, *J. Immunol*, 147 :2657-2662 ;Lund 等,1992, *Mol Immunol*, 29 :53-59 ;Alegre 等,1994, *Transplantation*, 57 :1537-1543 ;Hutchins 等, 1995, *Proc Natl. Acad Sci USA*, 92 :11980-11984 ;Jefferis 等,1995, *Immunol Lett.*, 44 :111-117 ;Lund 等,1995, *Faseb J*, 9 :115-119 ; Jefferis 等,1996, *Immunol Lett*, 54 :101-104 ;Lund 等,1996, *J Immunol*, 157 :4963-4969 ;Armour 等,1999, *Eur J Immunol*, 29 :2613-2624 ;Idusogie 等,2000, *J Immunol*, 164 :4178-4184 ;Reddy 等,2000, *J Immunol*, 164 :1925-1933 ;Xu 等,2000, *Cell Immunol*, 200 :16-26 ;Idusogie 等,2001, *J Immunol*, 166 :2571-2575 ;Shields 等,2001, *J Biol Chem*, 276 :6591-6604 ;Jefferis 等,2002, *Immunol Lett*, 82 :57-65 ;Presta 等,2002, *Biochem Soc Trans*, 30 :487-490 ;美国专利号 5, 624, 821 ;5, 885, 573 ;5, 677, 425 ;6, 165, 745 ;6, 277, 375 ;5, 869, 046 ;6, 121, 022 ;5, 624, 821 ;5, 648, 260 ;6, 194, 551 ;6, 737, 056 ;6, 821, 505 ;6, 277, 375 ;美国专利申请号 10/370, 749 和 PCT 公开 W094/2935 ;W099/58572 ;W000/42072 ;W002/060919 ;W004/029207。本领域技术人员不难理解 Fc 区的其它修饰/取代。

[0122] 可通过本领域技术人员熟知的许多方法制备在 Fc 区域含有修饰/取代和/或新氨基酸残基的本发明抗体。非限制性例子包括分离抗体或编码区(例如,从杂交瘤分离),在该分离的抗体编码区中制作一个或多个所需取代。或者,可将本发明抗体的可变区亚克隆入编码含有一个或(多个)修饰/取代和/或新的氨基酸残基的 Fc 区的载体中。

[0123] 也可修饰本发明抗体而改变该抗体的糖基化,再次改变其一种或多种功能特性。

[0124] 在一个实施方式中,修饰本发明抗体的糖基化。例如,可制备去糖基化(aglycosylate)的抗体(即,该抗体缺乏糖基化)。可改变糖基化从而,例如提高该抗体对靶抗原的亲和力。这种碳水化合物修饰可伴有,例如抗体序列中一个或多个糖基化位点的改变。例如,可制作一个或多个氨基酸取代从而消除一个或多个可变区框架的糖基化位点进而消除该位点的糖基化。这种去糖基化可提高该抗体对抗原的亲和力。美国专利号 5, 714, 350 和 6, 350, 861 进一步详述了这种方法。

[0125] 或者,可将本发明抗体制成具有改变的糖基化类型,例如岩藻糖基残基含量减少的低岩藻糖基化(hypofucosylated)抗体或含有 GlcNAc 双剖面结构增强的抗体。已证明这种改变的糖基化模式提高了抗体的 ADCC 能力。这种碳水化合物修饰可伴有,例如在宿主细胞中表达改变了糖基化机制的抗体。本领域已描述了含有改变糖基化机制的细胞,这些细胞可用作宿主细胞来表达本发明重组抗体从而产生具有改变糖基化的抗体。可参见,例如 Shields, R. L. 等,(2002), *J. Biol. Chem.*, 277 :26733-26740 ;Umaña 等,(1999), *Nat. Biotech.*, 17 :176-1, 以及欧洲专利号 EP1, 176, 195 ;PCT 公开 W003/035835 ;W099/54342。

[0126] 如下文所详述的,可单独使用本发明抗体或与其它组合物联用。所述抗体还可在 N- 或 C- 末端与异源多肽重组融合,或与多肽或其它组合物化学缀合(包括共价和非共价

缀合)。例如,本发明抗体可与在检测试验中用作标记物的分子和效应分子,例如异源多肽、药物、放射性核素或毒素融合或缀合。参见,例如 PCT 公开 W092/08495 ;W091/14438 ; W089/12624 ;美国专利号 5, 314, 995 和 EP396, 387。

[0127] 本发明抗体包括经修饰的衍生物,即通过使任何类型的分子与该抗体共价连接,但该共价连接不会阻止该抗体与 HMG1 和 / 或 HMG2 多肽或其片段结合和 / 或产生所需反应。例如但不限于:抗体衍生物包括经修饰的抗体,例如用已知的保护 / 封闭基团、蛋白酶解切割、与细胞配体或其它蛋白质连接等(实现)糖基化、乙酰化、peg 化、磷酸化、酰胺化衍生。可通过已知技术,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等进行各种化学修饰。此外,所述衍生物可含有一个或多个非典型氨基酸。见下文,名为“抗体衍生物和缀合物”的章节 5.5。

[0128] 也可根据它们的交叉反应性描述或指定本发明抗体。包括不与本发明多肽的任何其它类似物、直向同源物或同源物结合的抗体。本发明也包括能与和本发明的人 HMG1 多肽(例如,人 HMG1A 框或 B 框)具有至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少 60%、至少 55%和至少 50%相同性(利用本领域已知和本文所述方法计算)的多肽结合的抗体。在具体的实施方式中,本发明抗体能与 HMG1 蛋白及其相应表位的小鼠、大鼠和 / 或家兔同源物交叉反应。本发明也包括能与和人 HMG2(例如,人 HMG2A 框或 B 框)具有至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 65%、至少 60%、至少 55%和至少 50%相同性(利用本领域已知和本文所述方法计算)的多肽结合的抗体。还考虑了能与 HMG2 多肽或其片段结合的抗体可与 HMG1 蛋白及其相应表位的小鼠、大鼠和 / 或家兔同源物交叉反应。

[0129] 本发明也包括不能与和本发明 HMG1 和 / 或 HMG2 多肽具有小于 95%、小于 90%、小于 85%、小于 80%、小于 75%、小于 70%、小于 65%、小于 60%、小于 55%和小于 50%相同性(利用本领域已知和本文所述方法计算)的多肽结合的抗体。

[0130] 在一个实施方式中,能与 HMG1 多肽或其片段特异性结合的抗体或其片段能预防 / 拮抗 / 抑制以下一种或多种情况:HMGB1 与 RAGE 结合、HMGB1 与一种或多种 Toll-样受体(例如,TLR2 和 TLR4)结合、HMGB1 与细胞表面(例如,THP-1 细胞)结合、HMG1-介导的促炎细胞因子释放、HMG1-介导的炎症、HMG1-介导的脓毒症、HMG1-介导的炎症(例如,关节的炎症)和 HMG1-介导的关节炎。可通过本领域已知的一种或多种方法检测这些活性。参见,例如 US20040005316 ;6, 468, 533 和 6, 448, 223 ;及下文名为“实施例”的章节 6。

[0131] 术语“50%抑制浓度”(简称为“IC₅₀”)表示抑制该抑制剂所靶向分子(例如, HMG1)某给定活性的 50%所需的抑制剂(例如,本发明抗体)浓度。本领域技术人员应该知道较低的 IC₅₀ 值对应于更强效的抑制剂。在一个实施方式中,本发明抗体抑制 HMG1-介导的促炎细胞因子释放的 IC₅₀ 值是:小于 5000ng/ml、或小于 4000ng/ml、或小于 3000ng/ml、或小于 2000ng/ml、或小于 1000ng/ml、或小于 500ng/ml、或小于 250ng/ml、或小于 100ng/ml、或小于 50ng/ml、或小于 10ng/ml 或小于 5ng/ml。在另一实施方式中,本发明抗体抑制 HMG1-介导的促炎细胞因子释放的 IC₅₀ 值是:小于 1000nM、或小于 500nM、或小于 250nM、或小于 100nM、或小于 50nM、或小于 25nM、或小于 10nM、或小于 5nM、或小于 0.25nM、或小于 0.1nM 或小于 0.01nM。

[0132] 在一个实施方式中,本发明抗体能预防 / 拮抗 / 抑制 HMG1 与 RAGE 结合,但基本上

不影响 HMG1 与一种或多种 Toll-样受体（例如，TLR2 和 TLR4）结合。在另一实施方式中，本发明抗体能预防 / 拮抗 / 抑制 HMG1 与一种或多种 Toll-样受体（例如，TLR2 和 TLR4）结合，但基本上不影响 HMG1 与 RAGE 结合。在还有另一实施方式中，本发明抗体能预防 / 拮抗 / 抑制 HMG1 与 RAGE 结合并抑制 HMG1 与一种或多种 Toll-样受体（例如，TLR2 和 TLR4）结合。可通过本领域已知的一种或多种方法检测这些活性。参见，例如 US20040005316；6, 468, 533 和 6, 448, 223；及下文名为“实施例”的章节 6。

[0133] 在一具体实施方式中，本发明抗体能抑制 HMG1 与 RAGE 的结合至少约 10%、或至少约 20%、或至少约 30%、或至少约 40%、或至少约 50%、或至少约 60%、或至少约 70%、或至少约 80%、或至少约 90%、或至少约 100%。在另一具体实施方式中，本发明抗体能抑制 HMG1 与一种或多种 Toll-样受体（例如，TLR2 和 TLR4）的结合至少约 10%、或至少约 20%、或至少约 30%、或至少约 40%、或至少约 50%、或至少约 60%、或至少约 70%、或至少约 80%、或至少约 90%、或至少约 100%。在另一具体实施方式中，本发明抗体能抑制 HMG1 与 RAGE 的结合至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%、或至少 100%。在另一具体实施方式中，本发明抗体能抑制 HMG1 与一种或多种 Toll-样受体（例如，TLR2 和 TLR4）的结合至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%、或至少 100%。

[0134] 如本文所述，这些抗体能区分从不同来源分离的同一种多肽。不希望受任何具体理论的束缚，但可通过许多差异来区分从不同来源分离的有相似或相同氨基酸序列的多肽，所述差异包括但不限于：翻译后修饰（例如，磷酸化、乙酰化、甲基化、糖基化等）、总体结构中的改变（例如，二硫键和 / 或折叠的改变）和可能与该多肽有关的任何其它分子的差异（例如，盐、其它亚基，如多核苷酸和 / 或其它多肽）。在一个实施方式中，与天然 HMG1（例如，从哺乳动物细胞或组织分离）相比，本发明抗体对大肠杆菌重组产生的 HMG1 特异性结合亲和力相同或较高。在另一实施方式中，与大肠杆菌重组产生的 HMG1 相比，本发明抗体对天然 HMG1（例如，从哺乳动物细胞或组织分离）特异性结合亲和力相同或较高。在还有另一实施方式中，本发明抗体能与天然 HMG1 的一种或多种形式结合，所述天然 HMG1 包括但不限于：核 HMG1（例如，通过冻融法从细胞中分离）、释放的 HMG1（例如，从坏死细胞上清液中分离）和激活的 HMG1（例如，从刺激的细胞，如 LPS 刺激的细胞中分离）。在还有另一实施方式中，本发明抗体不能与天然 HMG1 的一种或多种形式结合，所述天然 HMG1 包括但不限于：核 HMG1（例如，通过冻融法从细胞中分离）、释放的 HMG1（例如，从坏死细胞的上清液中分离）和激活的 HMG1（例如，从刺激的细胞，如 LPS 刺激的细胞中分离）。本文公开了获得天然和重组 HMG1 的具体方法（参见，下文实施例 2）。

[0135] 在一个实施方式中，本发明抗体能与可溶性 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合。在另一实施方式中，本发明抗体能与固定的 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合。在还有另一实施方式中，本发明抗体能与可溶性和不溶性的 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合。

[0136] 如上所述，已知 HMG1 和 HMG2 是结合多核苷酸（即，DNA 和 RNA）的蛋白质。在一个实施方式中，本发明抗体能与 HMG1 和 / 或 HMG2 结合，而所述 HMG1 和 / 或 HMG2 与某多核苷酸分子结合。在另一实施方式中，本发明抗体能预防 / 拮抗 / 抑制以下一种或多种情况：HMGB1 与 RAGE 结合、HMGB1 与一种或多种 Toll-样受体（例如，TLR2 和 TLR4）结合、HMGB1

与细胞表面（例如，THP-1 细胞）结合、HMG1- 介导的促炎细胞因子释放、HMG1- 介导的炎症、HMG1- 介导的脓毒症、HMG1- 介导的炎症（例如，关节的炎症）和 HMG1- 介导的关节炎，而所述 HMG1 与某多核苷酸结合。在具体的实施方式中，所述多核苷酸分子是能促进炎症反应的分子（例如，源自微生物或坏死细胞的多核苷酸）。

[0137] 在一具体实施方式中，本发明抗体与乙酰化 HMG1 结合的亲和力高于非乙酰化 HMG1 的。在另一具体实施方式中，本发明抗体与非乙酰化 HMG1 结合的亲和力高于乙酰化 HMG1 的。在还有另一具体实施方式中，本发明抗体与乙酰化 HMG1 和非乙酰化 HMG1 结合的亲和力基本相同。

[0138] 在另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人或其它动物，例如哺乳动物和无脊椎动物的 HMG1 多肽或其抗原性片段或由其构成（或基本上由其构成）。在一具体实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人 HMG1 多肽（SEQ ID NO :1 或 2）或由其构成（或基本上由其构成）。本领域熟知人和其它动物的 HMG1 多肽（参见，例如 US20040005316 ;6, 468, 533 和 6, 448, 223）。

[0139] 在一个实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有与 SEQ IDNO :1 或 2 所示人 HMG1 多肽具有至少 60% 相同性、至少 70% 相同性、至少 80% 相同性、至少 85% 相同性、至少 90% 相同性、至少 95% 相同性、至少 97% 相同性、至少 99% 相同性、或 100% 相同性的 HMG1 多肽或由其构成（或基本上由其构成）。

[0140] 在另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有与 SEQ IDNO :3 所示人 HMG1A 框多肽具有至少 60% 相同性、至少 70% 相同性、至少 80% 相同性、至少 85% 相同性、至少 90% 相同性、至少 95% 相同性、至少 97% 相同性、至少 99% 相同性、或 100% 相同性的多肽或由其构成（或基本上由其构成）。

[0141] 在还有另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有与 SEQ ID NO :4 和 / 或 SEQ ID NO :28 和 / 或 SEQ ID NO:29 所示人 HMG1B 框多肽具有至少 60% 相同性、至少 70% 相同性、至少 80% 相同性、至少 85% 相同性、至少 90% 相同性、至少 95% 相同性、至少 97% 相同性、至少 99% 相同性、或 100% 相同性的多肽或由其构成（或基本上由其构成）。

[0142] 在另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人或其它动物，例如哺乳动物和无脊椎动物的 HMG2 多肽或其抗原性片段或由其构成（或基本上由其构成）。在一具体实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有人 HMG2 多肽（SEQ ID NO :21）或由其构成（或基本上由其构成）。本领域熟知人和其它动物的 HMG2 多肽。参见，例如 Jantzen 等,1990, Nature, 344 :830-6 ;Kolodrubetz,1990, Nucleic Acids Res. ,18 :5565 ;Laudet 等,1993, Nucleic Acids Res. ,21 :2493-501 和 Thomas 等,2001, Trends Biochem Sci. ,26 :167-74。

[0143] 在一个实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有与 SEQ IDNO :21 所示人 HMG2 多肽具有至少 60% 相同性、至少 70% 相同性、至少 80% 相同性、至少 85% 相同性、至少 90% 相同性、至少 95% 相同性、至少 97% 相同性、至少 99% 相同性、或 100% 相同性的 HMG2 多肽或由其构成（或基本上由其构成）。

[0144] 在另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有与 SEQ IDNO :22 所示人 HMG2A 框多肽具有至少 60% 相同性、至少 70% 相同性、至少 80% 相同性、至少

85%相同性、至少 90%相同性、至少 95%相同性、至少 97%相同性、至少 99%相同性、或 100%相同性的多肽或由其构成（或基本上由其构成）。

[0145] 在还有另一实施方式中，本发明高亲和力抗体能特异性结合的多肽含有与 SEQ ID NO:23 所示人 HMG2B 框多肽具有至少 60%相同性、至少 70%相同性、至少 80%相同性、至少 85%相同性、至少 90%相同性、至少 95%相同性、至少 97%相同性、至少 99%相同性、或 100%相同性的多肽或由其构成（或基本上由其构成）。

[0146] 例如，可通过以最佳比较为目的比对序列（例如，可在第一条序列的序列中引入空位）来测定两条氨基酸序列（或两条核酸序列）的相同性百分比。然后比较相应位置的氨基酸或核苷酸，两条序列间的相同性百分比是两条序列所共有的相同位置数的函数（即，%相同性 = 相同位置数目 / 位置总数 × 100）。可通过熟知方法，例如利用数学算法进行两条序列的实际比较。这种数学算法的具体的非限制性例子描述于 Karlin 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, (1993)。如 Schaffer 等, Nucleic Acids Res., 29:2994-3005, (2001) 所述这种算法已纳入在 BLASTN 和 BLASTX 程序 (2.2 版) 中。当采用 BLAST 和空位 BLAST 程序时，可采用各程序（例如，BLASTN）的默认参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2002 年 4 月 10 日可用。在一个实施方式中，检索的数据库是非冗余 (NR) 数据库，用于序列比较的参数可设置为：无滤过 (no filters)；预期值 (Expect value) 为 10；字大小 (Word Size) 为 3；矩阵是 BLOSUM62；存在一个空位为 11 和延伸为 1。

[0147] 用于序列比较的数学算法的另一非限制性例子是 Myers 和 Miller 算法, CABIOS (1989)。该算法已纳入 ALIGN 程序 (2.0 版) 中，该程序是 GCG (Accelrys) 序列比对软件包的一部分。当利用 ALIGN 程序比对氨基酸序列时，可利用 PAM120 加权残差表 (weight residue table)、一个空位长罚分 12、一个空位罚分 4。本领域已知用于序列分析的其它算法，这些算法包括 Torellis 和 Robotti, Comput. Appl. Biosci., 10:3-5, (1994) 所述的 ADVANCE 和 ADAM，及 Pearson 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-8, (1988) 所述的 FASTA。

[0148] 在另一实施方式中，可利用 GCG 软件包的 GAP 程序 (<http://www.accelrys.com>, 2001 年 8 月 31 日可用) 测定两条氨基酸序列间的相同性百分比，该程序利用 Blossum63 矩阵或 PAM250 矩阵，空位加权 (gapweight) 12、10、8、6 或 4，长度加权 (length weight) 2、3 或 4。在还有另一实施方式中，可利用 GCG 软件包的 GAP 程序（在 <http://www.cgc.com> 得到）测定两条核酸序列间的相同性百分比，该程序采用空位加权 50，长度加权 3。

[0149] 在本发明的另一实施方式中，所述抗体与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合的解离常数或 $K_d(k_{off}/k_{on})$ 小于 $10^{-5}M$ 、或小于 $10^{-6}M$ 、或小于 $10^{-7}M$ 、或小于 $10^{-8}M$ 、或小于 $10^{-9}M$ 、或小于 $10^{-10}M$ 、或小于 $10^{-11}M$ 、或小于 $10^{-12}M$ 、或小于 $10^{-13}M$ 、或小于 $5 \times 10^{-13}M$ 、或小于 $10^{-14}M$ 、或小于 $5 \times 10^{-14}M$ 、或小于 $10^{-15}M$ 、或小于 $5 \times 10^{-15}M$ 。在还有另一实施方式中，本发明抗体与 HMG1 及其抗原性片段特异性结合的解离常数或 $K_d(k_{off}/k_{on})$ 介于约 $10^{-7}M$ - 约 $10^{-8}M$ 之间、介于约 $10^{-8}M$ - 约 $10^{-9}M$ 之间、介于约 $10^{-9}M$ - 约 $10^{-10}M$ 之间、介于约 $10^{-10}M$ - 约 $10^{-11}M$ 之间、介于约 $10^{-11}M$ - 约 $10^{-12}M$ 之间、介于约 $10^{-12}M$ - 约 $10^{-13}M$ 之间、介于约 $10^{-13}M$ - 约 $10^{-14}M$ 之间。在还有另一实施方式中，本发明抗体与 HMG1 及其抗原性片段结合的解离常数或 $K_d(k_{off}/k_{on})$ 介于约 $10^{-7}M$ - 约 $10^{-8}M$ 之间、介于约 $10^{-8}M$ - 约 $10^{-9}M$ 之间、介于约 $10^{-9}M$ - 约 $10^{-10}M$ 之间、介于约 $10^{-10}M$ - 约 $10^{-11}M$ 之间、介于约 $10^{-11}M$ - 约 $10^{-12}M$ 之间、介于约 $10^{-12}M$ - 约 $10^{-13}M$ 之间、介于约

10^{-13}M - 约 10^{-14}M 之间。

[0150] 在本发明的另一实施方式中,所述抗体与 HMG2 及其抗原性片段特异性结合的解离常数或 $K_d(k_{\text{off}}/k_{\text{on}})$ 小于 10^{-5}M 、或小于 10^{-6}M 、或小于 10^{-7}M 、或小于 10^{-8}M 、或小于 10^{-9}M 、或小于 10^{-10}M 、或小于 10^{-11}M 、或小于 10^{-12}M 、或小于 10^{-13}M 、或小于 $5 \times 10^{-13}\text{M}$ 、或小于 10^{-14}M 、或小于 $5 \times 10^{-14}\text{M}$ 、或小于 10^{-15}M 、或小于 $5 \times 10^{-15}\text{M}$ 。在还有另一实施方式中,本发明抗体与 HMG2 及其抗原性片段特异性结合的解离常数或 $K_d(k_{\text{off}}/k_{\text{on}})$ 介于约 10^{-7}M - 约 10^{-8}M 之间、介于约 10^{-8}M - 约 10^{-9}M 之间、介于约 10^{-9}M - 约 10^{-10}M 之间、介于约 10^{-10}M - 约 10^{-11}M 之间、介于约 10^{-11}M - 约 10^{-12}M 之间、介于约 10^{-12}M - 约 10^{-13}M 之间、介于约 10^{-13}M - 约 10^{-14}M 之间。在还有另一实施方式中,本发明抗体与 HMG2 及其抗原性片段结合的解离常数或 $K_d(k_{\text{off}}/k_{\text{on}})$ 介于约 10^{-7}M - 约 10^{-8}M 之间、介于约 10^{-8}M - 约 10^{-9}M 之间、介于约 10^{-9}M - 约 10^{-10}M 之间、介于约 10^{-10}M - 约 10^{-11}M 之间、介于约 10^{-11}M - 约 10^{-12}M 之间、介于约 10^{-12}M - 约 10^{-13}M 之间、介于约 10^{-13}M - 约 10^{-14}M 之间。

[0151] 本领域熟知平衡解离常数 (K_d) 定义为 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。一般知道具有低 K_d (即,高亲和力) 的结合分子 (例如,抗体) 优于具有高 K_d (即,低亲和力) 的结合分子 (例如,抗体)。然而在一些情况中, k_{on} 或 k_{off} 值比 K_d 值更相关。本领域技术人员能确定哪种动力学参数对于某给定抗体的应用最重要。在某些实施方式中,本发明抗体对某种抗原的 K_d 低于对其它抗原的。

[0152] 在另一实施方式中,所述抗体与 HMG1 及其抗原性片段结合的 k_{off} 值小于 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或小于 $3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 。在其它实施方式中,所述抗体与 HMG1 及其抗原性片段结合的 k_{off} 值小于 10^{-3}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-4}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-5}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-6}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-7}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-8}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-9}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ 或小于 10^{-10}s^{-1} 。

[0153] 在另一实施方式中,所述抗体与 HMG2 及其抗原性片段结合的 k_{off} 值小于 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或小于 $3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 。在其它实施方式中,所述抗体与 HMG2 及其抗原性片段结合的 k_{off} 值小于 10^{-3}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-4}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-5}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-6}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-7}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-8}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-9}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ 或小于 10^{-10}s^{-1} 。

[0154] 在另一实施方式中,本发明抗体与 HMG1 和 / 或其抗原性片段结合的缔合速率常数或 k_{on} 速率值是至少 $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、或至少 $10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。

[0155] 在另一实施方式中,本发明抗体与 HMG2 和 / 或其抗原性片段结合的缔合速率常数或 k_{on} 速率值是至少 $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、或至少 $10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。

[0156] 与所有多肽相似,所述抗体具有等电点 (pI),其通常定义为多肽不携带净电荷时的 pH。本领域已知当溶液的 pH 等于该蛋白质的等电点时,蛋白质溶解度通常最低。本文所用的 pI 值定义为主要带电荷形式的 pI。可通过各种方法,包括但不限于等电聚焦和各种计算机算法测定蛋白质的 pI (参见,例如 Bjellqvist 等,1993, Electrophoresis, 14 : 1023)。此外,抗体 Fab 结构域的热解链温度 (T_m) 可作为抗体热稳定性的良好指标,还可进一步表示保存期限。 T_m 较低表明凝聚较多 / 稳定性较差,而 T_m 较高表明凝聚较少 / 稳定

性较好。因此,某些实施方式优选 T_m 较高的抗体。可采用本领域已知的任何标准方法,例如示差扫描量热法检测蛋白质结构域(例如, Fab 结构域)的 T_m (参见,例如 Vermeer 等, 2000, *Biophys. J.*, 78 :394-404 ;Vermeer 等, 2000, *Biophys. J.*, 79 :2150-2154)。

[0157] 因此,本发明的其它非排他性实施方式包括具有某些优选生化特征(例如特定等电点(pI)或解链温度(T_m))的本发明高亲和力抗体。

[0158] 更具体地说,在一个实施方式中,本发明高亲和力抗体的 pI 范围是 5.5-9.5。在还有另一具体实施方式中,本发明高亲和力抗体的 pI 范围是约 5.5-约 6.0、或约 6.0-约 6.5、或约 6.5-约 7.0、或约 7.0-约 7.5、或约 7.5-约 8.0、或约 8.0-约 8.5、或约 8.5-约 9.0、或约 9.0-约 9.5。在其它具体实施方式中,本发明高亲和力抗体的 pI 范围是 5.5-6.0、或 6.0-6.5、或 6.5-7.0、或 7.0-7.5、或 7.5-8.0、或 8.0-8.5、或 8.5-9.0、或 9.0-9.5。甚至更具体地说,本发明高亲和力抗体的 pI 是至少 5.5、或至少 6.0、或至少 6.3、或至少 6.5、或至少 6.7、或至少 6.9、或至少 7.1、或至少 7.3、或至少 7.5、或至少 7.7、或至少 7.9、或至少 8.1、或至少 8.3、或至少 8.5、或至少 8.7、或至少 8.9、或至少 9.1、或至少 9.3、或至少 9.5。在其它具体的实施方式中,本发明高亲和力抗体的 pI 是至少 5.5、或至少 6.0、或至少 6.3、或至少 6.5、或至少 6.7、或至少 6.9、或至少 7.1、或至少 7.3、或至少 7.5、或至少 7.7、或至少 7.9、或至少 8.1、或至少 8.3、或至少 8.5、或至少 8.7、或至少 8.9、或至少 9.1、或至少 9.3、或至少 9.5。

[0159] 可能通过改变抗体中可电离残基的数目和位置来调节 pI 从而优化溶解性。例如,可通过制作合适的氨基酸取代(例如,用带电荷的氨基酸,如赖氨酸取代不带电荷的残基,如丙氨酸)来调节多肽的 pI。不希望受任何具体理论的束缚,抗体中导致所述抗体 pI 改变的氨基酸取代可提高抗体的溶解性和/或稳定性。本领域技术人员知道哪种氨基酸取代最适合具体抗体实现所需的 pI。在一个实施方式中,在本发明抗体中产生取代以改变 pI。特别考虑了能导致与 $Fc\gamma R$ 结合改变的 Fc 区取代(如上所述)也可导致 pI 改变。在另一实施方式中,专门选择 Fc 区取代以实现 $Fc\gamma R$ 结合(力)的改变和所需的 pI 改变。

[0160] 在一个实施方式中,本发明高亲和力抗体的 T_m 范围是 65°C -120°C。在具体的实施方式中,本发明高亲和力抗体的 T_m 范围是约 75°C -约 120°C、或约 75°C -约 85°C、或约 85°C -约 95°C、或约 95°C -约 105°C、或约 105°C -约 115°C、或约 115°C -约 120°C。在其它实施方式中,本发明高亲和力抗体的 T_m 范围是 75°C -120°C、或 75°C -85°C、或 85°C -95°C、或 95°C -105°C、或 105°C -115°C、或 115°C -120°C。在还有其它具体的实施方式中,本发明高亲和力抗体的 T_m 是至少约 65°C、或至少约 70°C、或至少约 75°C、或至少约 80°C、或至少约 85°C、或至少约 90°C、或至少约 95°C、或至少约 100°C、或至少约 105°C、或至少约 110°C、或至少约 115°C、或至少约 120°C。在还有其它具体的实施方式中,本发明高亲和力抗体的 T_m 是至少 65°C、或至少 70°C、或至少 75°C、或至少 80°C、或至少 85°C、或至少 90°C、或至少 95°C、或至少 100°C、或至少 105°C、或至少 110°C、或至少 115°C、或至少 120°C。

[0161] 在一具体实施方式中,本发明高亲和力抗体或其片段是人抗体或人源化抗体。

[0162] 在一个实施方式中,本发明也包括能以高亲和力与 HMG1 特异性结合的特定抗体(及其片段)。具体地说,本文将抗-HMG1 抗体分别称为“S2”、“S6”、“S16”和“G4”,这些抗体由美国模式培养物保藏所(10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209)保藏,分别指定了 ATCC 保藏号 PTA-6142、PTA-6143、PTA-6259 和 PTA-6258。这些保藏物按照

国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约的条款而维持。由于提及的这些抗体株按照布达佩斯条约的条款而维持,则签署了布达佩斯条约的专利局可获得这些抗体株。

[0163] 在另一实施方式中,本发明包括的抗体含有本文公开的一个或多个可变区(参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20、24-27 和 30-73)能与 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合。

[0164] 本发明也包括 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11(参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73)的变体,它们在轻链可变 (V_L) 结构域和 / 或重链可变 (V_H) 结构域中含有一个或多个氨基酸残基取代。本发明也包括 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11(参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73)的变体,它们在一个或多个 V_L CDR 和 / 或一个或多个 V_H CDR 中含有一个或多个其它氨基酸残基取代。可在体外或体内测试通过在 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11(参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73)的 V_H 结构域、 V_H CDR、 V_L 结构域和 / 或 V_L CDR 中引入取代而产生的抗体,例如测试其与 HMG1 和 / 或 HMG2 结合的能力(如通过免疫测定,包括但不限于:ELISA 和 BIAcore),或其抑制 HMG1 诱导细胞因子释放,预防、治疗、控制或缓解炎症性疾病或其一种或多种症状的能力。

[0165] 应该知道本文所提及的互补决定区(CDR)残基编号是 Kabat 等,(1991, NIH 出版物 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA)所述的那些(编号)。具体说是轻链可变区中的残基 24-34(CDR1)、50-56(CDR2)和 89-97(CDR3),重链可变区中的残基 31-35(CDR1)、50-65(CDR2)和 95-102(CDR3)。应注意抗体与抗体之间的 CDR 差别巨大(根据定义未显示与 Kabat 共有序列的同源性)。框架残基的最大比对往往需要将“间隔”残基插入要用于 Fv 区的编号系统。应该知道本文提及的 CDR 是 Kabat 等(同上)所述的那些(CDR)。此外,因为种间或等位基因趋异,位于任何给定 Kabat 位置编号的某些单个残基身份在抗体链与抗体链之间可能不同。

[0166] 在其它实施方式中,本发明包括含有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个本文所述 CDR(参见,例如图 2A-J, CDR 以下划线标出)的抗体。在还有其它实施方式中,本发明包括的抗体能与 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合,其含有的 V_H CDR 具有表 3 所列任一 V_H CDR 的氨基酸序列和 / 或衍生自表 3 所列任一抗体重链可变区的重链可变区。在另一具体实施方式中,本发明包括的抗体能与 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合,其含有的 V_L CDR 具有表 3 所列任一 V_L CDR 的氨基酸序列和 / 或衍生自表 3 所列任一抗体轻链可变区的轻链可变区。

[0167] 本发明包括的抗体能与 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合,其含有能与 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合的本文所述 V_H 结构域、 V_H CDR、 V_L 结构域或 V_L CDR 的衍生物。可采用本领域技术人员已知的标准技术将突变(例如,添加、缺失和 / 或取代)引入编码本发明抗体的核苷酸序列,所述技术包括例如常规采用定点诱变和 PCR-介导的诱变来产生氨基酸取代。在一个实施方式中,与最初的 V_H 和 / 或 V_L CDR 相比, V_H 和 / 或 V_L CDR 衍生物包含少于 25 个氨基酸取代、少于 20 个氨基酸取代、少于 15 个氨基酸取代、少于 10 个氨基酸取代、少于 5 个氨基酸取代、少于 4 个氨基酸取代、少于 3 个氨基酸取代或少于 2 个氨基酸取代。在另一实施方式中, V_H 和 / 或 V_L CDR 衍生物在一个或多个预计的非必需氨基酸残基(即,对于抗体与 HMG1 和 / 或 HMG2 特异性结合不是至关重要的氨基酸残基)处具有保守性氨基酸取代(例如,同上)。或者,可沿着整个 V_H 和 / 或 V_L CDR 编码序列或其一部分随机引入突变,例如通

过饱和诱变,可筛选得到的突变体的生物学活性以鉴定保留了活性的突变体。诱变后,可表达所编码的抗体,测定该抗体的活性。

[0168] 本发明也包括能与 HMG1 和 / 或 HMG2 或其片段特异性结合的抗体,所述抗体包含的重链可变区和 / 或轻链可变区的氨基酸序列与 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11 (参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73) 的重链和 / 或轻链可变区的氨基酸序列有至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 相同。本发明也包括能与 HMG1 和 / 或 HMG2 或其片段特异性结合的抗体,所述抗体包含的重链可变区和 / 或轻链可变区的氨基酸序列与 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11 (参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73) 的重链和 / 或轻链可变区的氨基酸序列有至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95% 或至少约 99% 相同。

[0169] 本发明还包括能与 HMG1 和 / 或 HMG2 或其片段特异性结合的抗体,所述抗体或抗体片段包含的一个或多个 CDR 的氨基酸序列与 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11 (参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73) 的一个或多个 CDR 的氨基酸序列有至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 相同。本发明还包括能与 HMG1 和 / 或 HMG2 或其片段特异性结合的抗体,所述抗体或抗体片段包含的一个或多个 CDR 的氨基酸序列与 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11 (参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73) 的一个或多个 CDR 的氨基酸序列有至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95% 或至少约 99% 相同。可采用本领域技术人员已知的任何方法 (包括 BLSAT 蛋白质检索) 测定两条氨基酸序列的相同性百分比。

[0170] 本发明也包括能与 HMG1 和 / 或 HMG2 或其片段特异性结合的抗体,所述抗体由能在严谨条件下与 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11 (参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73) 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码。在另一实施方式中,本发明包括能与 HMG1 和 / 或 HMG2 或其片段特异性结合的抗体,所述抗体含有的一个或多个 CDR 由能在严谨条件下与 G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11 (参见图 2A-J, SEQ ID NO :5-20, 24-27 和 30-73) 的一个或多个 CDR 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码。严谨杂交条件包括但不限于:约 45°C 在 6× 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中与滤膜结合的 DNA 杂交,然后在约 50-65°C 用 0.2× SSC/0.1% SDS 洗涤一次或多次,高度严谨性条件例如约 45°C 在 6× SSC 中与滤膜结合的 DNA 杂交,然后在约 60°C 用 0.1× SSC/0.2% SDS 洗涤一次或多次,或者本领域技术人员已知的任何其它严谨性杂交条件 (参见,例如, Ausubel, F. M. 等编, 1989, Current Protocols in Molecular Biology (《最新分子生物方法》), 第一卷, Green Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley and Sons, Inc., 纽约, 第 6.3.1-6.3.6 页和 2.10.3 页)。

[0171] 具有保藏抗体的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或所有六个 CDR 的抗体是本发明的具体实施方式。编码这些抗体 (及其片段) 的分离的多核苷酸也是

本发明的具体实施方式。“S2”、“S4”、“S16”和“G4”以及本发明其它几种特定抗-HMG1 抗体的结合与功能特征见表 1。

[0172] 表 1- 抗-HMG1 抗体^a的特征和保藏信息

[0173]

IgG	ATCC #	K _d (nM) ^b	与HMG1结合竞争 ^b	P ^c	T _m ^d	结合天然 HMG1 ^e			结合 HMG2 ^e	HMG1 的体外抑制: ^f				
						核内	释放的	激活的		Rage 结合	mMØ 激活	TLR4 激活	Thp-1 结合	
G2		101		7.78	67.1	-	-	-	-	~75%	+	-	-	73.30
G4	PTA-6258	30	G9, S2, S6	8.12	72.1	++	++	++	-	~80%	+/-	-	-	
G9		125		9.01	77.9				-	-	-	-	-	
G12		73		8.6	78.8				-	-	-	-	-	
G16		22							-	-	-	-	-	
G20		114		7.8	71.2	-	-	-	-	~25%	-	+	+	
G34		67	S2	~8.7	~75				-	~20%				
G35		242		8.61	69				-					
S2	PTA-6142	36	G4, G9, S6	8.53	79.2				-	~38		-	-	
S6	PTA-6143	39	G4, G9, S2	8.81	76.3	-	+	-	-	~40%	-	-	-	
S10		54		8.76	75.3				-	~45%				
S12		n.d.		8.73	66.9				+	-	-	-	-	
S14		205		8.62	70.7				-	-	-	-	-	
S16	PTA-6259	23		8.11	71.4	++	++	++	+	~45%	-	-	-	
S17		331		8.7	90.0	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	
E11		n.d.		8.92	66.3	+	+/-	+	+	-	+	+	+	48.10

- ^a 没有数值表明试验未进行或还未测定
- ^b 利用重组 HMG1 通过 BIAcore 分析测定(参见实施例章节, 实施例 1), 注意: E11 和 S12 的 K_d 值还未通过 BIAcore 测定。
- ^c 通过等电聚焦凝胶电泳测定(参见实施例章节, 实施例 1)
- ^d 通过示差扫描量热法测定(参见实施例章节, 实施例 1)
- ^e 通过 ELISA 研究测定的相对结合情况(参见实施例章节, 实施例 2)

表 1- 续

[0174]
[0175]

IgG	IC ₅₀ ^e					IC ₅₀ nm IL-6 天然 HMGB	体内 ^h					
	IL-12	IL-1β	TNF-α	IL-6	NO		CLP	CIA 被动	CIA 主动	AIA	金黄色葡 萄球菌	ALI
G2	1262	5029	1347	0.9941		-	60%	0%				
G4	715	5015	5510	0.8997		-	60%	36%	34%	30%	27%	40%
G9		211.4	247.7	0.246		-						
G12	2788	5908	796.5	1.119								
G16				1.061	21974							
G20		400.4	598.2	0.6521	20380	-						
G34				0.8580								
G35				0.5635								
S2		220	64.16	0.1628			15%					
S6		23.15	18.24	0.1739	4152	-	35-50%	60%				
S10	1132	2593	874.7	0.3235								
S12				1.								
S14		67.78	66.18	0.1914								
S16	1237	6051	1441	0.5597		38.89	60-75%	0%		0%		
S17		80.89		0.1623	41745	11.47						
E11				1.221	101321	1.733	35%	0%	0%	8%	37%	

^f 表明了 mMØ 和 TLR4 的相对抑制, 表明了 Thp-1 结合的 IC₅₀ (nM) (参见实施例章节, 实施例 4)
^g 利用重组 HMGI 通过细胞因子释放抑制分析测定 (参见实施例章节, 实施例 3) IL-6 的 IC₅₀ 值以 nM 列出, 其余以 ng/ml 列出
^h 通过扣除同种对照计算保护百分比 (参见实施例章节, 实施例 5-11).

[0176] 本发明另一实施方式包括将保守性氨基酸取代引入上述感兴趣的抗-HMGI 抗体的任何部分 (参见表 1)。本领域熟知“保守性氨基酸取代”指取代功能相当的氨基酸的氨基酸取代。保守性氨基酸改变导致得到肽的氨基酸序列中沉默性改变。例如, 一个或多个极性相似的氨基酸作为功能等价物, 在该肽的氨基酸序列内导致沉默性改变。带电荷为中性的取代和用较小残基替代某残基的取代也可认为是“保守性取代”, 即便该残基处于不同组中 (例如, 用较小的异亮氨酸替代苯丙氨酸)。本领域定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。保守性氨基酸取代的几个家族见表 2,

[0177] 表 2: 保守性氨基酸取代家族

[0178]	家族	氨基酸
[0179]	非极性	Trp、Phe、Met、Leu、Ile、 Val、Ala、Pro
[0180]	不带电极性	Gly、Ser、Thr、Asn、Gln、 Tyr、Cys
[0181]	酸性 / 带负电	Asp、Glu
[0182]	碱性 / 带正电	Arg、Lys、His
[0183]	β -支链的	Thr、Val、Ile
[0184]	影响链取向的残基	Gly、Pro
[0185]	芳族	Trp、Tyr、Phe、His

[0186] 术语“保守性氨基酸取代”也指利用氨基酸类似物或变体。有关如何利用表型沉默的氨基酸取代的指南见 Bowie 等,“解码蛋白质序列中信息:氨基酸取代的耐受”(Deciphering the Message in Protein Sequences:Tolerance to AminoAcid Substitutions), (1990, Science, 247 :1306-1310)。

[0187] 5.2 产生和筛选本发明抗体的方法

[0188] 可通过,例如免疫测定、BIAcore 或本领域技术人员已知的其它技术鉴定能与 HMG1 多肽特异性结合的高亲和力抗体或其片段。

[0189] 可通过本领域已知的任何合适方法制备本发明抗体。可通过本领域熟知的各种方法产生感兴趣抗原的多克隆抗体。例如,可将本发明 HMG1 多肽给予各种宿主动物(包括但不限于家兔、小鼠、大鼠等)以诱导产生含有该抗原特异性多克隆抗体的血清。根据宿主种类,可用各种佐剂提高免疫反应,所述佐剂包括但不限于:弗氏佐剂(完全和不完全)、矿物凝胶(例如氢氧化铝)、表面活性物质(例如,溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子)、肽、油乳剂、匙孔蕨血蓝蛋白、二硝基苯酚和可能有用的人佐剂,例如 BCG(卡芥菌)和小棒杆菌(Corynebacterium parvum)。本领域也熟知这种佐剂。

[0190] 可采用本领域已知的各种技术,包括利用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术或它们的组合来制备单克隆抗体。例如,可采用杂交瘤技术制备单克隆抗体,该技术包括本领域已知和以下文献所指导的那些:Harlow 等, Antibodies :A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》),(冷泉港实验室出版社,第二版,1988);Hammerling 等,刊于 Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas(《单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤》),563-681,(Elsevier,纽约,1981)。本文所用的术语“单克隆抗体”不局限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”指源自一个克隆(包括任何真核、原核或噬菌体克隆)的抗体,而不是指其产生方法。

[0191] “单克隆抗体”可以包含两种蛋白质,即重链和轻链,或由其构成。

[0192] 利用杂交瘤技术制备和筛选特异性抗体的方法是常规和本领域熟知的。在一非限制性例子中,可用本发明的某多肽或表达这种肽的细胞免疫小鼠。一旦检测到免疫反应,例如在小鼠血清中检测到该抗原特异性抗体,收集小鼠脾脏并分离脾细胞。然后通过熟知技术使脾细胞与任何合适的骨髓瘤细胞(例如可从 ATCC 得到的细胞系 SP20 细胞)融合。选出杂交瘤,通过有限稀释法克隆。然后通过本领域已知方法检验杂交瘤克隆中分泌能与本发明多肽结合的抗体的细胞。可通过阳性杂交瘤克隆免疫小鼠来产生通常含有高水平抗体

的腹水。

[0193] 因此,本发明提供制备单克隆抗体的方法以及用此方法产生的抗体,包括培养能分泌本发明抗体的杂交瘤细胞,所述杂交瘤最好用本发明抗原免疫的小鼠分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合获得;然后筛选融合得到的杂交瘤中分泌能与本发明多肽结合的抗体的杂交瘤克隆。

[0194] 可通过已知技术产生能识别特异性表位的抗体片段。例如,可利用酶,如木瓜蛋白酶(产生 Fab 片段)或胃胰蛋白酶(产生 F(ab')₂ 片段),通过蛋白酶解切割免疫球蛋白分子来制备本发明的 Fab 和 F(ab')₂ 片段。F(ab')₂ 片段含有可变区、轻链恒定区和重链的 CH1 结构域。

[0195] 也可采用本领域已知的各种嗜菌体展示方法产生本发明抗体。在嗜菌体展示方法中,功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的嗜菌体颗粒表面。在一具体实施方式中,可利用这种嗜菌体来展示从贮库或组合抗体库(例如,人或小鼠)表达的抗原结合结构域。可利用抗原,例如利用标记的抗原或结合或捕捉在固体表面或珠上的抗原来选择或鉴定嗜菌体表达的能与感兴趣抗原结合的抗原结合结构域。这些方法所用的嗜菌体通常是含有从嗜菌体表达的 fd 和 M13 结合结构域的丝状嗜菌体,其中 Fab、Fv 或二硫键稳定的 Fv 抗体结构域与嗜菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白重组融合。可用于制备本发明抗体的嗜菌体展示方法的例子包括以下文献所公开的:Brinkman 等, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50, (1995); Ames 等, *J. Immunol. Methods*, 184:177-186, (1995); Kettleborough 等, *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958, (1994); Persic 等, *Gene*, 187,9-18, (1997); Burton 等, *Advances in Immunology*, 57:191-280, (1994); PCT 申请号 PCT/GB91/01134; PCT 公开 W090/02809; W091/10737; W092/01047; W092/18619; W093/11236; W095/15982; W095/20401; 和美国专利号 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 和 5,969,108。

[0196] 如以上参考文献所述,嗜菌体选择后,可分离得到嗜菌体的抗体编码区用于产生全抗体(包括人抗体)或任何其它所需的抗原结合片段以及在任何宿主中表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母菌和细菌,例如下文详述的。例如,也可利用重组产生 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术,所述技术采用例如以下文献公开的本领域已知方法: PCT 公开 W092/22324; Mullinax 等, *BioTechniques*, 12(6):864-869, (1992); Sawai 等, *AJRI*, 34:26-34, (1995); 和 Better 等, *Science*, 240:1041-1043, (1988)。

[0197] 可用于产生单链 Fv 和抗体的技术的例子包括以下文献所述的:美国专利号 4,946,778 和 5,258,498; Huston 等, *Methods in Enzymology*, 203:46-88, (1991); Shu 等, *PNAS*, 90:7995-7999, (1993); 和 Skerra 等, *Science*, 240:1038-1040, (1988)。

[0198] 对于一些应用,包括人体内应用抗体和体外检测试验,优选利用嵌合型、人源化或人抗体。嵌合型抗体是该抗体中不同部分源自不同动物种类的分子,例如具有源自小鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。本领域已知产生嵌合型抗体的方法。参见,例如 Morrison, *Science*, 229:1202, (1985); Oi 等, *BioTechniques*, 4:214, (1986); Gillies 等, (1989), *J. Immunol. Methods*, 125:191-202; 美国专利号 5,807,715; 4,816,567 和 4,816,397。人源化抗体是能与所需抗原结合的非人种类抗体的抗体分子,其具有非人种

类(抗体)的一个或多个 互补决定区(CDR)和人免疫球蛋白分子的框架区。人框架区中的框架残基常被 CDR 供体抗体的相应残基取代以改变(最好提高)抗原结合(能力)。可通过本领域熟知的方法鉴定这些框架取代,例如通过模拟 CDR 和框架残基的相互作用来鉴定对于抗原结合重要的框架残基,和进行序列比较以鉴定位于特定位置的不寻常框架残基。(参见,例如 Queen 等,美国专利号 5,585,089 ;Riechmann 等, *Nature*, 332 :323, (1988))。可采用本领域已知的各种技术使抗体人源化,包括例如 CDR- 嫁接(EP239,400 ;PCT 公开 W091/09967 ;美国专利号 5,225,539 ;5,530,101 和 5,585,089)、镶面(veneering)或再铺平(resurfacing)(EP592,106 ;EP519,596 ;Padlan, *Molecular Immunology*, 28(4/5) :489-498, (1991) ;Studnicka 等, *Protein Engineering*, 7(6) :805-814, (1994) ;Roguska 等, *PNAS*, 91 :969-973, (1994))和链改组(美国专利号 5,565,332)。

[0199] 对于治疗性治疗人患者,完全的人抗体特别理想。可通过本领域已知的各种方法制备人抗体,包括利用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体库的上述嗜菌体展示方法。也参见美国专利号 4,444,887 和 4,716,111 ;PCT 公开 W098/46645、W098/50433、W098/24893、W098/16654、W096/34096、W096/33735 和 W091/10741。

[0200] 也可利用不能表达有功能的内源免疫球蛋白,但能表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生人抗体。例如,可将人免疫球蛋白重链和轻链基因随机或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞。或者,除了人重链和轻链基因外,可将人可变区、恒定区和多变区(基因)引入小鼠胚胎干细胞。可通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座分别或同时使小鼠免疫球蛋白重链和轻链基因无功能。具体地说,纯合删除 JH 区阻止了内源性抗体产生。扩增修饰的胚胎干细胞,将其显微注射入胚胎中以产生嵌合型小鼠。然后使嵌合型小鼠内交配以产生能表达人抗体的纯合后代。用选择的抗原,例如本发明多肽的全部或一部分以常规方式免疫该转基因小鼠。可采用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得针对该抗原的单克隆抗体。转基因小鼠所含有的人免疫球蛋白转基因在 B 细胞分化期间重排,然后经历类别转换和体细胞突变。因此,采用这种技术能产生治疗上有用的 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体。产生人抗体的该技术的综述可参见 Lonberg 和 Huszar, *Int. Rev. Immunol.* , 13 :65-93, (1995)。产生人抗体和人单克隆抗体的该技术及产生这种抗体的方案详述可参见,例如 PCT 公开 W098/24893 ;W092/01047 ;W096/34096 ;W096/33735 ;欧洲专利号 598877 ;美国专利号 5,413,923 ;5,625,126 ;5,633,425 ;5,569,825 ;5,661,016 ;5,545,806 ;5,814,318 ;5,885,793 ;5,916,771 ;和 5,939,598。此外,可雇用诸如 Abgenix, Inc. (Freemont, 加利福尼亚)和 Genpharm(圣何塞,加利福尼亚)等公司来采用上述相似技术来提供针对所选择抗原的人抗体。

[0201] 可采用称为“指导选择”的技术产生能识别所选择表位的完全人抗体。此方法利用所选择的非人单克隆抗体,例如小鼠抗体来指导选择能识别同一表位的完全人抗体(Jespersen 等, *Bio/technology*, 12 :899-903, (1988))。

[0202] 此外,可采用本领域技术人员熟知的技术(参见,例如 Greenspan 和 Bona, *FASEBJ.* , 7(5) :437-444, (1989) 和 Nissinoff, *J. Immunol.* , 147(8) :2429-2438, (1991))进而利用本发明多肽的抗体来产生能模拟本发明多肽的抗独特型抗体。例如利用能结合和竞争性抑制多肽多聚化和 / 或本发明多肽与配体结合的抗体来产生抗独特型(抗体),该抗独特型抗体能“模拟”多肽多聚化和 / 或结合结构域,从而结合并中和多肽和 / 或其配体。

这种中和性抗独特型（抗体）或这种抗独特型（抗体）的 Fab 片段可用于治疗方案以中和多肽配体。例如，可利用这种抗独特型抗体与本发明多肽结合和 / 或与本发明多肽的配体 / 受体结合从而阻断其生物学活性。

[0203] 如果所述抗体用于体内治疗，则最好修饰该抗体以使之在个体中的免疫原性减弱。例如，如果个体是人，则该抗体最好是“人源化”的；即将该抗体的互补决定区移植入人抗体（例如，Jones 等，Nature, 321 :522-525, 1986 ;和 Tempest 等，Biotechnology, 9 : 266-273, 1991 所述）。

[0204] 也可采用嗜菌体展示技术来选择具有抗 -B 框抗体的 PCR 扩增的所选人淋巴细胞 v- 基因库的多肽或对天然文库多肽具有结合活性的抗体基因 (McCafferty 等，Nature, 348 :552-554, 1990 ;和 Marks 等，Biotechnology, 10 :779-783, 1992)。也可通过链改组提高这些抗体的亲和力 (Clackson 等，Nature, 352 :624-628, 1991)。

[0205] 本领域技术人员不难选择用于制备的多肽。选择的多肽应使所产生的抗体不会与 HMG 蛋白家族的另一成员发生明显交叉反应或特异性结合。或者，可利用与 HMG 蛋白家族的两个或多个成员之间享有很大程度同源性的多肽来产生能与 HMG 蛋白家族的多个成员（例如，HMG1 和 HMG2）特异性结合（即，交叉反应）的抗体。

[0206] 5.3 编码抗体的多核苷酸

[0207] 本发明还提供含有编码本发明高亲和力抗体及其片段的核苷酸序列的多核苷酸。本发明也包括能在严谨条件或低严谨杂交条件下（例如本文所定义的）与编码能特异性结合本发明 HMG1 和 / 或 HMG2 多肽（例如，SEQ ID NO :1 或 2 或其片段）的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在一具体实施方式中，本发明多核苷酸编码能与具有 SEQ ID NO :1 或 2 所示氨基酸序列的多肽结合的抗体。在另一实施方式中，本发明多核苷酸编码能与具有 SEQ ID NO :3 所示氨基酸序列的多肽特异性结合的抗体。在另一优选的实施方式中，本发明多核苷酸编码能与具有 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列的多肽特异性结合的抗体。在另一实施方式中，本发明多核苷酸编码能与具有 SEQ ID NO :21 所示氨基酸序列的多肽特异性结合的抗体。在还有另一实施方式中，本发明多核苷酸编码能与具有 SEQ ID NO :22 所示氨基酸序列的多肽特异性结合的抗体。在还有另一实施方式中，本发明多核苷酸编码能与具有 SEQ ID NO :23 所示氨基酸序列的多肽特异性结合的抗体。在还有另一实施方式中，本发明多核苷酸编码能与具有 SEQ ID NO :28 和 / 或 29 所示氨基酸序列的多肽特异性结合的抗体。

[0208] “严谨杂交条件”指 42℃ 在含有以下成分的溶液中培育过夜：50% 甲酰胺、5×SSC (750mM NaCl, 75mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5×Denhardt 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20 μg/ml 变性剪切的鲑鱼精子 DNA，然后在约 65℃ 用 0.1×SSC 洗涤滤膜。

[0209] 可通过本领域已知的任何方法获得该多核苷酸及测定该多核苷酸的核苷酸序列。例如，如果抗体的核苷酸序列已知，可从化学合成的寡核苷酸装配编码该抗体的多核苷酸（例如，Kutmeier 等，BioTechniques, 17 :242, (1994) 所述），简言之，该方法包括合成含有编码该抗体序列各部分的重叠寡核苷酸，退火并连接那些寡核苷酸，然后通过 PCR 扩增连接的寡核苷酸。

[0210] 或者，可从合适来源的核酸产生编码抗体的多核苷酸。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆不可得，但该抗体分子的（核苷酸）序列已知，则可化学合成编码该免疫球蛋白的核酸或利用能与该序列 3' 和 5' 端杂交的合成引物通过 PCR 扩增获得，或者利用该特定

基因序列的特异性寡核苷酸探针进行克隆来鉴定,例如编码该抗体的 cDNA 文库中的 cDNA 克隆而从合适来源(例如,抗体 cDNA 文库或从表达该抗体的任何组织或细胞,例如选择用于表达本发明抗体的杂交瘤细胞产生的 cDNA 文库或从中分离的核酸,优选 polyA+RNA) 获得编码该免疫球蛋白的核酸。然后可采用本领域熟知的任何方法将 PCR 产生的扩增核酸克隆入可复制克隆载体中。

[0211] 一旦测定了该抗体的核苷酸序列和相应的氨基酸序列,可采用本领域熟知的操作核苷酸序列的方法,例如重组 DNA 技术、定点诱变、PCR 等(参见,例如以下文献所述的技术:Sambrook 等,1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*(《分子克隆,实验室手册》),第二版,冷泉港实验室,冷泉港,纽约和 Ausubel 等编,1998, *Current Protocols in Molecular Biology*(《最新分子生物学方法》), John Wiley&Sons, 纽约)来操作该抗体的核苷酸序列从而产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如产生氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0212] 在一具体的实施方式中,可通过本领域熟知的方法检查本发明抗体重链和/或轻链可变区的氨基酸序列来鉴定互补决定区(CDR)的序列,例如将已知氨基酸序列与其它重链和轻链可变区作比较来确定序列高变区。如上所述,采用常规重组 DNA 技术可将一个或多个 CDR 插入框架区中,例如插入人框架区从而人源化非人抗体。所述框架区可以是天然产生的或共有序列框架区,优选人框架区(人框架区列表可参见,例如 Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 278:457-479, (1998))。通过组合框架区和 CDR 产生的多核苷酸优选编码能与本发明多肽特异性结合的抗体。

[0213] 如上所述,优选在框架区内制作一个或多个氨基酸取代,这些氨基酸取代优选提高了该抗体与其抗原的结合(能力)。此外,可采用这些方法制作可变区内一个或多个参与链内二硫键形成的半胱氨酸残基的氨基酸取代或缺失从而产生缺乏一个或多个链内二硫键的抗体分子。本发明包括并且本领域技术人员已知多核苷酸的其它改变。

[0214] 此外,可通过剪接具有合适抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与具有合适生物学活性的人抗体分子的基因来产生“嵌合型抗体”而开发的技术(Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:851-855, (1984); Neuberger 等, *Nature*, 312:604-608, (1984); Takeda 等, *Nature*, 314:452-454, (1985))。如上所述,嵌合型抗体是其不同部分衍生自不同动物种类的分子,例如具有衍生自小鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些分子,如人源化抗体。

[0215] 或者,可采取产生单链抗体所述的技术(美国专利号 4,946,778; Bird, *Science*, 242:423-42, (1988); Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, (1988); 和 Ward 等, *Nature*, 334:544-54, (1989))来产生单链抗体。通过氨基酸桥连接 Fv 区的重链和轻链片段得到单链多肽从而形成单链抗体。也可采用在大肠杆菌中装配功能性 Fv 片段的技术(Skerra 等, *Science*, 242:1038-1041, (1988))。

[0216] 5.4 制备抗体的方法

[0217] 可通过本领域已知的合成抗体的任何方法,特别是化学合成或优选通过重组表达技术制备本发明抗体。

[0218] 本发明抗体、其片段、衍生物或类似物(例如,本发明抗体的重链或轻链或本发明的单链抗体)的重组表达需要构建含有编码该抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码本发明某抗体分子或某抗体的重链或轻链或其一部分的多核苷酸,可采用本领域熟知的

技术通过重组 DNA 技术制备产生抗体分子所用的载体。因此,本文描述了通过表达含有编码抗体的核酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。可采用本领域技术人员熟知的方法来构建含有编码抗体的序列及合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。因此,本发明提供含有编码本发明抗体分子、或其重链或轻链、或重链或轻链可变区并与启动子操作性相连的核苷酸序列的可复制载体。这种载体可包括编码该抗体分子恒定区的核苷酸序列(参见,例如 PCT 公开 W086/05807;PCT 公开 W089/01036;和美国专利号 5,122,464),可将该抗体的可变区克隆入这种载体来表达完整的重链或轻链。

[0219] 可通过常规技术将表达载体转运入宿主细胞中,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生本发明抗体。因此,本发明包括含有编码本发明抗体,或其重链或轻链或本发明单链抗体并与异源启动子操作性相连的多核苷酸的宿主细胞。在表达双链抗体的优选实施方式中,可在宿主细胞中共同表达编码重链和轻链的载体从而表达完整的免疫球蛋白分子,如下所详述。

[0220] 可利用各种宿主表达载体系统来表达本发明抗体分子。这种宿主表达系统提供了产生感兴趣编码序列后将其纯化的运载体,而且也提供了用合适的核苷酸编码序列转化或转染时能原位表达本发明抗体分子的细胞。这些系统包括但不限于:微生物,例如用含有抗体编码序列的重组细菌噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌(如大肠杆菌,枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*));用含有抗体编码序列的重组酵母菌表达载体转化的酵母菌(如酵母(*Saccharomyces*),毕赤酵母(*Pichia*));用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)感染或用含抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如, Ti 质粒)转化的植物细胞系统;或包含含有源自哺乳动物细胞基因组启动子(如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒启动子(如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒 7.5K 启动子)的重组表达构建物的哺乳动物细胞系统(如 COS、CHO、BHK-293、NS0、3T3、PerC6 细胞)。优选利用诸如大肠杆菌的细菌细胞,更优选用真核细胞(特别是对于表达完整的重组抗体分子)表达重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO))连同载体(如人巨细胞病毒的主要中早期基因启动子元件)是抗体的有效表达系统(Foecking 等, *Gene*, 45:101, (1986);Cockett 等, *Bio/Technology*, 8:2, (1990))。也参见,例如美国专利 5827739、5879936、5981216 和 5658759。

[0221] 在细菌系统中,可根据所要表达的抗体分子对许多表达载体进行优选。例如,当要产生大量这种蛋白质时,为产生某抗体分子的药物组合物,需要的载体应能指导表达不难被纯化的水平融合蛋白产物。这种载体包括但不限于:大肠杆菌表达载体 pUR278(Ruther 等, *EMBO J.*, 2:1791, (1983)),该载体中的抗体编码序列可单独与载体框中 lacZ 编码区连接从而产生融合蛋白;pIN 载体(Inouye 和 Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, (1985);Van Heeke 和 Schuster, *J. Biol. Chem.*, 24:5503-5509, (1989));等等。也可利用 pGEX 载体来表达外来多肽,例如含谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白。这种融合蛋白一般是可溶性的,通过与基质谷胱甘肽-琼脂珠吸附和结合然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱不难从裂解的细胞纯化获得。pGEX 载体设计为含有凝血酶或因子 Xa 蛋白酶切割位点,从而能从 GST 部分释放克隆的靶基因产物。

[0222] 在昆虫（细胞）系统中，苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（AcNPV）用作表达外来基因的载体。该病毒可在草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞中生长。可将抗体编码序列单独克隆入该病毒的非必需区域（例如多角体蛋白基因）并置于 AcNPV 启动子（例如多角体蛋白启动子）的控制下。

[0223] 在哺乳动物宿主细胞中可利用许多病毒表达系统。在利用腺病毒作为表达载体的情况中，可将感兴趣的抗体编码序列与腺病毒转录 / 翻译控制复合体，例如晚期启动子和三分前导序列相连。然后可通过体外或体内重组将该嵌合型基因插入腺病毒基因组。插入病毒基因组的非必需区域（例如，区域 E1 或 E3）可获得能存活并能在感染宿主中表达感兴趣抗体分子的重组病毒（例如，参见 Logan 和 Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 355-359, (1984)）。也需要特异性起始信号来有效翻译所插入的抗体编码序列。这些信号包括 ATG 起始密码子和毗邻序列。此外，起始密码子必须位于所需编码序列的读框相中以确保翻译整个插入（序列）。这些外源性翻译控制信号和起始密码子可以是各种来源，天然和合成的。可通过包含合适的转录增强子元件、转录终止子等提高表达的效率。（参见 Bittner 等, *Methods in Enzymol.*, 153 :51-544, (1987)）。

[0224] 此外，可选择能以所需特定方式调节插入序列的表达或修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这种修饰（例如，糖基化）和加工（例如，切割）可能对该蛋白质的功能至关重要。不同宿主细胞具有对（不同）蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特性和特定机制。选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达外来蛋白质的正确修饰和加工。为此目的，可利用具有初级转录物适当加工，基因产物糖基化和磷酸化细胞机制的真核宿主细胞。这种哺乳动物宿主细胞包括但不限于：CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、NS0、Per. C6，特别是乳腺癌细胞系，例如 BT483、Hs578T、HTB2、BT20 和 T47D，和正常乳腺细胞系，例如 CRL7030 和 Hs578Bst。

[0225] 为长期高产量的产生重组蛋白，最好稳定表达。例如，可工程改造能稳定表达抗体分子的细胞系。除了利用含有病毒复制起点的表达载体外，可用受合适表达控制元件（例如启动子、增强子序列、转录终止子、聚腺苷酸位点等）和可选择标记控制的 DNA 转化宿主细胞。引入外来 DNA 后，在富集培养基中培养工程改造的细胞 1-2 天。然后转入选择性培养基。重组质粒中的可选择标记能赋予对选择（压力）的抗性，使细胞能将质粒稳定地整合入它们的染色体并生长形成细胞灶，进而克隆和扩增为细胞系。优选采用该方法来工程改造表达抗体分子的细胞系。这种工程改造的细胞系特别可用于筛选和评估能与该抗体分子直接或间接相互作用的化合物。

[0226] 可采用许多选择系统，包括但不限于：单纯疱疹病毒胸苷激酶（Wigler 等, *Cell*, 11 :223, (1977)）、次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶（Szybalska 和 Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48 :202, (1992)）和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶（Lowy 等, *Cell*, 22 :817, (1980)）基因可分别用于 tk⁻、hgprt⁻ 或 aprt⁻ 细胞中。也可利用抗代谢物抗性作为选择以下基因的基础：赋予对氨甲喋呤抗性的 dhfr（Wigler 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 357, (1980)；0' Hare 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 :1527, (1981)）；赋予对霉酚酸抗性的 gpt（Mulligan 和 Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 :2072, (1981)）；赋予对氨基糖苷类 G-418 抗性的 neo（*Clinical Pharmacy*, 12 :488-505；Wu 和 Wu, *Biotherapy*, 3 :87-95, (1991)；Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32 :573-596, (1993)；Mulligan,

Science, 260 :926-932, (1993) ;Morgan 和 Anderson, Ann. Rev. Biochem. ,62 :191-217, (1993) ;May, 1993, TIB TECH, 11(5) :155-215) ;和赋予对潮霉素抗性的 *hygro* (Santerre 等, Gene, 30 :147, (1984))。可常规应用重组 DNA 技术领域的常规已知方法来选择所需的重组克隆, 这种方法描述于 Ausubel 等编, Current Protocols in Molecular Biology (《最新分子生物学方法》), John Wiley&Sons, 纽约, (1993) ;Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (《基因转移和表达, 实验室手册》), Stockton Press, 纽约, (1990) ;Dracopoli 等编, Current Protocols in Human Genetics (《人类基因组学最新方法》), 第 12 和 13 章, John Wiley&Sons, 纽约, (1994) ;Colberre-Garapin 等, J. Mol. Biol. , 150 :1, (1981)。通过载体扩增可提高抗体分子的表达水平 (综述见 Bebbington 和 Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning (《为在哺乳动物中表达克隆的基因而在 DNA 克隆中根据基因扩增利用载体》), 第三卷, (Academic Press, 纽约, 1987))。当某标记在表达抗体的载体系统中可扩增时, 提高宿主细胞培养液中存在的抑制剂水平将增加该标记基因的拷贝数。由于所扩增的区域与抗体基因相连, 抗体产量也得以增加 (Crouse 等, Mol. Cell. Biol. , 3 :257, (1983))。

[0227] 可用本发明的两种表达载体共同转染宿主细胞, 第一种载体编码重链衍生的多肽, 第二种载体编码轻链衍生的多肽。这两种载体可含有相同的可选择标记, 从而能等同表达重链多肽和轻链多肽。或者, 可利用能编码 (和能表达) 重链多肽和轻链多肽二者的一种载体。在这种情况下, 应将轻链置于重链之前以免有毒的游离重链过量 (Proudfoot, Nature, 322 :562, (1986) ;Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :2197, (1980))。重链和轻链的编码序列可含有 cDNA 或基因组 DNA。

[0228] 一旦通过动物、化学合成或重组表达产生了本发明抗体分子, 可通过免疫球蛋白分子纯化领域已知的任何方法来纯化, 例如层析 (如, 离子交换、亲和力, 特别是经 A 蛋白和分子大小柱层析后利用对该特定抗原的亲和力)、离心、差别溶解性或蛋白质纯化的任何其它标准技术。此外, 可将本发明抗体或其片段与本文所述或本领域其它已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0229] 此外, 可将本发明抗体或其片段与标记序列, 例如某肽融合以促进纯化。在某些实施方式中, 所述标记氨基酸序列是六个组氨酸的肽, 例如 pQE 载体 (QIAGEN, Inc. , 9259 Eton Avenue, Chatsworth, 加利福尼亚, 91311) 中提供的标签等, 其中许多标记可购得。如 Gentz 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 :821-824, (1989) 中所述, 六 - 组氨酸为融合蛋白的纯化提供了便利。用于纯化的其它肽标签包括但不限于 : 对应于衍生自流感血凝素蛋白某表位的 “HA” 标签 (Wilson 等, Cell, 37 :767, (1984)) 和 “flag” 标签。

[0230] 5.5 抗体缀合物和衍生物

[0231] 本发明抗体包括经修饰的 (例如, 将任何类型的分子与该抗体共价连接) 衍生物。例如但不限于, 所述抗体衍生物包括例如通过已知的保护 / 阻断基团、蛋白酶解切割、与细胞配体或其它蛋白质连接等来糖基化、乙酰化、peg 化、磷酸化、酰胺化而衍生化修饰的抗体。可采用已知的技术进行许多化学修饰, 包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外, 此种衍生物可含有一个或多个非典型氨基酸。

[0232] 可通过将所述抗体或抗体片段与聚合物分子, 例如高分子量聚乙二醇 (PEG) 相连

来产生体内半衰期延长的抗体或其片段。可利用或不用多功能接头将 PEG 与所述抗体或抗体片段的 N- 或 C- 末端位点特异性缀合或经赖氨酸残基上存在的 ϵ - 氨基将 PEG 和所述抗体或抗体片段连接。可采用线形或支链聚合物衍生以尽可能减少生物学活性丧失。可通过 SDS-PAGE 和质谱密切监测缀合程度确保 PEG 分子与抗体正确缀合。可通过, 例如分子大小或离子交换层析分离抗体-PEG 缀合物与分离未反应的 PEG。

[0233] 此外, 可将抗体与白蛋白缀合以制备在体内更稳定或体内半衰期更长的抗体或抗体片段。本领域熟知这些技术, 可参见例如国际专利公布号 W093/15199、W093/15200 和 W001/77137 ; 欧洲专利号 EP413, 622。本发明包括与一种或多种部分缀合或融合的抗体或其片段的应用, 所述部分包括但不限于: 肽、多肽、蛋白质、融合蛋白、核酸分子、小分子、模拟物质、合成药物、无机分子和有机分子。

[0234] 在一个实施方式中, 本发明包括利用抗体或其片段与异源蛋白或多肽 (或其片段, 特别是含有至少 10 个、至少 20 个、至少 30 个、至少 40 个、至少 50 个、至少 60 个、至少 70 个、至少 80 个、至少 90 个或至少 100 个氨基酸的多肽) 重组融合或化学缀合 (包括共价和非共价缀合) 以产生融合蛋白。在另一实施方式中, 本发明包括利用抗体或其片段与异源蛋白或多肽 (或其片段, 特别是含有至少约 10 个、至少约 20 个、至少约 30 个、至少约 40 个、至少约 50 个、至少约 60 个、至少约 70 个、至少约 80 个、至少约 90 个或至少约 100 个氨基酸的多肽) 重组融合或化学缀合 (包括共价和非共价缀合) 以产生融合蛋白。融合不一定非要直接 (融合), 而可通过接头序列融合。例如, 可通过将抗体与特定细胞表面受体的特异性的抗体融合或缀合从而能利用该抗体将异源多肽靶向体外或体内的特定细胞类型。也可在采用本领域已知方法的体外免疫测定和纯化方法中使用与异源多肽融合或缀合的抗体。参见, 例如国际公布号 W093/21232 ; 欧洲专利号 EP439, 095 ; Naramura 等, 1994, Immunol. Lett., 39 : 91-99 ; 美国专利号 5, 474, 981 ; Gillies 等, 1992, PNAS, 89 : 1428-1432 ; 和 Fell 等, 1991, J. Immunol., 146 : 2446-2452。

[0235] 本发明还包括含有与抗体片段融合或缀合的异源蛋白质、肽或多肽的制剂。例如, 异源多肽可与 Fab 片段、Fd 片段、Fv 片段、F(ab)₂ 片段、VH 结构域、VL 结构域、VH CDR、VL CDR 或其片段融合或缀合。本领域熟知将多肽与抗体蛋白融合或缀合的方法。参见, 例如美国专利号 5, 336, 603 ; 5, 622, 929 ; 5, 359, 046 ; 5, 349, 053 ; 5, 447, 851 和 5, 112, 946 ; 欧洲专利号 EP307, 434 和 EP367, 166 ; 国际公布号 W096/04388 和 W091/06570 ; Ashkenazi 等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 10535-10539 ; Zheng 等, 1995, J. Immunol., 154 : 5590-5600 ; 和 Vil 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 11337-11341。

[0236] 可通过基因改组、基序改组、外显子改组和 / 或密码子改组 (统称为“DNA”改组) 技术产生 (例如) 能与 HMG1 和 /HMG2 或其片段 (例如, 同上) 特异性结合的抗体的其它融合蛋白。可采用 DNA 改组改变本发明抗体或其片段的活性 (例如, 具有较高亲和力和较低解离速率的抗体或其片段)。一般可参见美国专利号 5, 605, 793 ; 5, 811, 238 ; 5, 830, 721 ; 5, 834, 252 和 5, 837, 458 ; Patten 等, 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8 : 724-33 ; Harayama, 1998, Trends Biotechnol., 16(2) : 76-82 ; Hansson 等, 1999, J. Mol. Biol., 287 : 265-76 ; Lorenzo 和 Blasco, 1998, Biotechniques, 24(2) : 308-313。可先进行易错 PCR 的随机诱变、随机核苷酸插入或其它方法, 然后重组来改变抗体或其片段或所编码的抗体或其片段。可将编码能与 C/CLP 特异性结合并编码抗体或抗体片段的多核苷酸的一个或多

个部分可与一种或多种异源分子的一个或多个组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组 (recombine)。

[0237] 此外,可将本发明抗体或其片段与标记序列,例如肽融合以促进纯化。在某些实施方式中,所述标记氨基酸序列是六个组氨酸的肽,例如 pQE 载体 (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, 加利福尼亚, 91311) 中提供的标签等,其中许多标记可购得。如 Gentz 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 :821-824 中所述,六-组氨酸为融合蛋白的纯化提供了便利。可用于纯化的其它肽标签包括但不限于:对应于衍生自流感血凝素蛋白某表位的血凝素“HA”标签 (Wilson 等, Cell, 37 :767, (1984)) 和“flag”标签。

[0238] 本发明还包括与诊断性或治疗性物质缀合的抗体或片段。例如,诊断上可用这些抗体作为临床检验方法的一部分来监测肿瘤的发生或进展从而能(例如)测定所给予治疗方案的效果。将抗体与可检测物质偶联有助于检测。可检测物质的例子包括:各种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性物质、利用各种正电子发射断层显像的正电子发射金属和非放射性顺磁性金属离子。可采用本领域已知的技术将可检测物质直接与抗体(或其片段)偶联或缀合或通过中间体间接偶联或缀合。可与抗体缀合用作本发明诊断剂的金属离子可参见,例如美国专利号 4,741,900。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的例子包括链霉素亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光试剂的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素 (dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光试剂的例子包括鲁米诺;生物发光物质的例子包括萤光素酶、萤光素和水母蛋白;合适的放射性试剂的例子包括但不限于: ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc ;除了利用各种正电子发射断层显像的发射正电子的金属外,可将非放射性顺磁金属离子和放射标记的或与特定放射性同位素缀合的分子与本发明抗体缀合。

[0239] 此外,可将本发明抗体或其片段与治疗性部分,例如细胞毒素,如抑制细胞或杀细胞,治疗性药物或放射性金属离子,如 α -(射线)发射体,如 ^{213}Bi 缀合。细胞毒素或细胞毒性药物是对细胞有害的任何药物。例子包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、鬼臼亚乙苷、表鬼臼毒噻吩糖苷 (tenoposide)、长春新碱、长春花碱、秋水仙素、阿霉素、道诺红霉素、二羟基蒽醌二酮 (dihydroxy anthracin dione)、二羟蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、和嘌呤霉素及它们的类似物或同系物。治疗性药物包括但不限于:抗代谢物(例如,氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-巯基鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺 (decarbazine))、烷化剂(例如,氮芥 (mechlorethamine)、thioepa chlorambucil、美法仑、亚硝基脲氮芥 (BSNU) 和洛莫司汀 (lomustine) (CCNU)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、白消安、二溴甘露醇、链脲菌素、丝裂霉素 C 和顺式二氯二胺铂 (II) (DDP) 顺铂)、蒽环类抗生素(例如,道诺红霉素(以前称为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如,放线菌素 D (dactinomycin)(以前称为放线菌素 (actinomycin))、博来霉素、光神霉素和氨基霉素 (AMC)) 和抗有丝分裂物质(例如,长春新碱和长春花碱)。治疗性部分的更详细列表可见 PCT 公开 W003/075957。

[0240] 可用本发明缀合物修饰给定的生物学反应,治疗性物质或药物部分不应理解为局限于典型的化疗物质。例如,药物部分可以是具有所需生物学活性的蛋白质或多肽。这种蛋白质包括,例如毒素,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白

质,如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活物、凋亡物质(如TNF- α 、TNF- β)、AIM I(参见国际公布号W097/33899)、AIM II(参见国际公布号W097/34911)、Fas配体(Takahashi等, Int. Immunol., 6:1567-1574, (1994))、VEGI(参见国际公布号W099/23105)、CD40配体、血栓形成物质或抗血管生成物质(如血管抑制素或内皮抑制素);或生物反应修饰剂,如淋巴因子、白介素-1(“IL-1”)、白介素-2(“IL-2”)、白介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其它生长因子。

[0241] 抗体也可连接于固体支持物上,这对靶抗原的免疫测定或纯化特别有用。这种固体支持物包括但不限于:玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0242] 将这种治疗性部分与抗体缀合的技术是熟知的,参见例如Amon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”(癌症治疗中用于药物免疫靶向的单克隆抗体),刊于Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy(《单克隆抗体和癌症治疗》),Reisfeld等编,第243-56页,(Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery”(用于药物递送的抗体),刊于Controlled Drug Delivery(《受控药物递送》)(第二版),Robinson等编,第623-53页,(Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”(癌症治疗中细胞毒性物质的抗体载体:综述),刊于Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications(《单克隆抗体'84:生物学和临床应用》),Pinchera等编,第475-506页,(1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy”(放射性标记的抗体在癌症治疗中的治疗性应用的分析、结果和前景),刊于Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy(《癌症检测和治疗的单克隆抗体》),Baldwin等编,第303-16页,(Academic Press, 1985)和Thorpe等,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”(抗体-毒素缀合物的制备和细胞毒性特性),Immunol. Rev., 62:119-58, (1982)。

[0243] 本发明抗体可以与其它多肽缀合。将抗体与多肽融合或缀合的方法是本领域已知的。可参见,例如U. S. 5, 336, 603; 5, 622, 929; 5, 359, 046; 5, 349, 053; 5, 447, 851 和 5, 112, 946; EP307, 434; EP367, 166; PCT公开W096/04388和W091/06570; Ashkenazi等, 1991, PNAS USA, 88:10535; Zheng等, 1995, J Immunol, 154:5590; 和Vil等, 1992, PNAS USA, 89:11337。抗体与某部分的融合不一定非要直接(融合),也可通过整个接头序列融合。这种接头分子是本领域常规已知的,描述于Denardo等, 1998, Clin Cancer Res, 4:2483; Peterson等, 1999, Bioconjug Chem, 10:553; Zimmerman等, 1999, Nucl Med Biol, 26:943; Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev, 53:171。

[0244] 或者,抗体可与二抗缀合形成如Segal在美国专利号4,676,980中所述的抗体异质缀合物。

[0245] 缀合有或未缀合有治疗性部分的抗体可作为治疗剂单独给予或与细胞毒性因子和/或细胞因子联合给予。

[0246] 5.6 抗体结合及活性试验

[0247] 可通过本领域已知的任何方法检验本发明抗体结合的特异性(即,免疫特异性)。

可采用的免疫测定包括但不限于：采用诸如 western 印迹技术的竞争性和非竞争性试验系统、放射免疫测定、ELISA（酶联免疫吸附测定）、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散试验、凝集试验、补体结合试验、免疫放射分析、荧光免疫测定、A 蛋白免疫测定，仅以这些为例。这种试验是常规的且为本领域所熟知（参见，例如 Ausubel 等编，1994，*Current Protocols in Molecular Biology*（《最新分子生物学方法》），第 1 卷，John Wiley&Sons, Inc.，纽约）。下文概述了示范性的免疫测定（但不是限制）。

[0248] 免疫沉淀方法通常包括用裂解缓冲液，例如补加了蛋白磷酸酶和 / 或蛋白酶抑制剂（例如，EDTA、PMSF、抑蛋白酶肽、钒酸钠）的 RIPA 缓冲液（1% NP-40 或 Triton X-100、1% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS、0.15M NaCl、0.01M 磷酸钠，pH7.2，1% Trasyol1）裂解细胞群，向细胞裂解物中加入感兴趣的抗体，在 4℃ 培育一段时期（例如，1-4 小时），向细胞裂解物中加入 A 蛋白和 / 或 G 蛋白琼脂糖珠，在 4℃ 培育约 1 小时或更长，用裂解缓冲液洗涤各珠后将这些珠重悬于 SDS/ 样品缓冲液中。可通过，例如 western 印迹分析评估感兴趣抗体使具体抗原免疫沉淀的能力。本领域技术人员知道可改进试验参数以提高抗体与抗原结合并降低背景（噪声）（例如，用琼脂糖珠预澄清细胞裂解物）。免疫沉淀方法的进一步讨论可参见，例如 Ausubel 等编，1994，*Current Protocols in Molecular Biology*（《最新分子生物学方法》），第 1 卷，John Wiley&Sons, Inc.，纽约，10.16.1。

[0249] Western 印迹分析一般包括制备蛋白质样品，在聚丙烯酰胺凝胶（例如，根据抗原分子量，用 8% -20% SDS-PAGE）中进行蛋白质样品的电泳，将聚丙烯酰胺凝胶的蛋白质样品转移至诸如硝酸纤维素、PVDF 或尼龙膜，用封闭缓冲液（例如，含 3% BSA 或脱脂奶的 PBS）封闭膜，用洗涤缓冲液（例如，PBS-吐温 20）洗涤膜，用以封闭缓冲液稀释的第一抗体（感兴趣的抗体）封闭膜，用洗涤缓冲液洗涤膜，用以封闭缓冲液稀释并与酶底物（例如，辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）或放射性分子（例如，³²P 或 ¹²⁵I）缀合的第二抗体（能识别第一抗体，例如抗-人抗体）封闭膜，用洗涤缓冲液洗涤膜和检测抗原的存在。本领域技术人员知道可改进试验参数以提高检测的信号并降低背景噪声。Western 印迹方法的进一步讨论可参见，例如 Ausubel 等编，1994，*Current Protocols in Molecular Biology*（《最新分子生物学方法》），第 1 卷，John Wiley&Sons, Inc.，纽约，10.8.1。

[0250] ELISA 包括制备抗原，用该抗原包被 96 孔板各孔，向孔中加入缀合有可检测化合物，例如酶底物（例如，辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）的感兴趣抗体，培育一段时期，然后检测抗原的存在。在 ELISA 中，感兴趣抗体不一定要和可检测化合物缀合；而是可向孔中加入缀合有可检测化合物的第二抗体（能识别感兴趣抗体）。此外，可不用抗原而用抗体包被孔。在此情况中，可向包被孔中加入缀合有可检测化合物的第二抗体，然后加入感兴趣的抗原。本领域技术人员知道可改进试验参数以提高检测的信号以及本领域已知的 ELISA 其它变化形式。ELISA 的进一步讨论参见，例如 Ausubel 等编，1994，*Current Protocols in Molecular Biology*（《最新分子生物学方法》），第 1 卷，John Wiley&Sons, Inc.，纽约，11.2.1。

[0251] 可通过本领域熟知的各种体外试验方法来测定抗体与抗原的结合亲和力和其它结合特性（例如，抗体-抗原相互作用的解离速率），所述方法包括例如平衡法（如，酶联免疫吸附测定（ELISA）；或放射免疫测定（RIA））或动力学（方法）（如，**BIACORE®**分析），

和其它方法,例如间接结合试验、竞争性结合试验、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和层析(如,凝胶过滤)。这些和其它方法可利用所检查的一种或多种组分上的标记和/或采用各种检测方法,所述标记包括但不限于:显色标记、荧光标记、发光标记或同位素标记。结合亲和力和动力学详述于 Paul, W. E. 编, *Fundamental Immunology* (《基础免疫学》), 第四版, Lippincott-Raven, 费城, (1999), 该文献集中讨论了抗体-免疫原相互作用。竞争性结合试验的例子是放射免疫测定, 包括在有含量递增的未标记抗原存在下培育标记抗原和感兴趣抗体, 检测与标记抗原结合的抗体。可通过 scatchard 图分析从数据中测定感兴趣抗体对特定抗原的亲和力和结合解离速率。也可采用放射免疫测定检测与第二抗体的竞争。在此情况中, 在含量递增的未标记第二抗体存在下培育抗原与缀合有标记化合物的感兴趣抗体。本文公开的其它具体方法可参见下文实施例 2-4。

[0252] 可通过本领域已知的任何方法检验本发明抗体的生物学活性。

[0253] 最好先在体外然后在体内测试本发明方法和制剂的所需治疗性或预防性活性, 再应用于人体。例如, 可采用体外试验确定表明是否要给予本发明的具体治疗方法、制剂或组合治疗, 所述体外试验包括体外细胞培养试验, 该试验(包括)培养患者的组织样品, 使之暴露于本发明制剂或与之接触, 观察这种制剂对组织样品的作用。可通过生物活检获得患者的组织样品。此测试能为各患者鉴定治疗上最有效的预防性或治疗性物质。在各种具体实施方式中, 可利用参与自身免疫疾病、炎症疾病、HMG1 和/或 HMG2 异常表达和/或活性相关疾病的细胞类型为代表的细胞进行体外试验来确定本发明制剂对这类细胞是否具有所需效力。例如, 接触后的细胞产生的 HMG1 和/或 HMG2 和/或促炎细胞因子的水平较低表明本发明组合物对治疗该患者的病症有效。或者, 不培养患者的细胞, 而是利用能被 HMG1 和/或 HMG2 激活的细胞, 例如外周血单核的细胞(PBMC)、THP-1 细胞或巨噬细胞(M ϕ s)来筛选本发明制剂。可采用本领域的许多标准试验评估细胞因子产量, 包括 ELISA 测定、实时 PCR 和本领域熟知的其它方法。本文也公开了具体方法(参见下文实施例 2 和 6)。

[0254] 可在合适的动物模型系统中测试预防性或治疗性物质, 然后在人体中测试, 所述动物模型包括大鼠、小鼠、鸡、母牛、猴子、家兔、仓鼠等。

[0255] 如上所述, 本领域已知并广泛应用的主要动物模型是本领域已知且描述过的。此外, 本文公开了脓毒症(参见实施例 5)、腹膜炎(参见实施例 10)和关节炎(参见实施例 7-9)的具体动物模型。

[0256] 此外, 可采用本领域技术人员已知的任何试验评估本文公开的联合疗法对于治疗或预防炎症疾病的预防性和/或治疗性应用。

[0257] 5.7 本发明抗体、抗体组合物和其治疗性和/或预防性给药

[0258] 本发明包括本文公开的抗-HMG1 抗体, 也涉及本文称为“本发明抗体组合物”、“本发明组合物”或更简单地称为“组合物”的抗体组合物。在某些实施方式中, 本发明组合物包含用药学上可接受的赋形剂配制的本发明抗体。本文所用的术语“药学上可接受的载体”表示可与本发明抗体混合, 在混合后可将本发明抗体给予对象的化学组合物。本文也将这些抗体组合物称为“药物组合物”。在其它实施方式中, 称为本发明组合物。

[0259] 本(发明)还包括治疗以炎症细胞因子级联反应激活为特征的病症(包括急性和慢性炎症病症)的方法, 其包括给予治疗有效量的本发明抗体或药物组合物。慢性炎症病症的特征在于炎症反应持续时间长(数周、数月或甚至无限期)可常能导致永久性组织损

伤。慢性炎症病症包括但不限于：关节炎（例如，类风湿性关节炎）、炎性肠病（例如，溃疡性结肠炎和克罗恩病）、胆囊炎。急性炎症病症的特征通常是症状突然发作，包括血管通透性增加、水肿、全身性发热，常导致组织坏死并可能导致死亡。急性炎症病症包括但不限于：脓毒症（例如，由于微生物感染）、超敏反应、组织坏死和阑尾炎。所述病症可以是由于炎症细胞因子级联反应导致全身性反应，例如内毒素性休克症状。或者，如类风湿性关节炎那样，由局部炎症细胞因子级联反应介导的疾病。

[0260] 在一个实施方式中，本发明组合物含有能与 HMG1 的 A 框（例如，SEQ ID NO :3 中的表位）特异性结合的高亲和力抗体。在另一实施方式中，组合物含有能与 HMG1 的 B 框（例如，SEQ ID NO :4、28、29 中的表位）特异性结合的本发明高亲和力抗体。在还有另一实施方式中，本发明组合物含有能与 HMG2 的 A 框（例如，SEQ ID NO :22 中的表位）特异性结合的高亲和力抗体。在另一实施方式中，组合物含有能与 HMG2 的 B 框（例如，SEQ ID NO :23 中的表位）特异性结合的本发明高亲和力 抗体。

[0261] 如上所述，HMG1 信号转导至少部分通过 RAGE 和 TLR 蛋白家族成员的介导。在受体结合和信号转导中，A 框和 B 框可能均起作用。因此，不希望受任何具体理论的束缚，考虑联用能与 A 框特异性结合的抗体（或其它拮抗剂）和能与 B 框特异性结合的抗体（或其它拮抗剂）能有效阻断 HMG1 与 RAGE 和 / 或 TLR 蛋白结合。因此，本发明组合物可含有本发明高亲和力抗体（或其它 HMGB1 抗体或拮抗剂）的组合，例如但不限于能与 HMG1A 框特异性结合的抗体和能与 HMG1B 框特异性结合的抗体的组合，或能与 HMG2A 框特异性结合的抗体和能与 HMG2B 框特异性结合的抗体的组合。在一具体实施方式中，组合物含有能与衍生自 HMG1 的 A 框及 B 框的某表位（例如，跨越 A 和 B 框间连接部位中的某表位）特异性结合的本发明高亲和力抗体。

[0262] 本发明组合物可单独含有本发明高亲和力抗体或含有其与其它活性治疗分子和 / 或佐剂，例如类固醇、其它抗炎分子或其它抗体治疗剂的组合。更具体地说，本发明组合物可含有早期脓毒症介质的拮抗剂。在一个实施方式中，早期脓毒症介质的拮抗剂是选自 TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、MIF 或 IL-6 细胞因子的拮抗剂。在一具体实施方式中，早期脓毒症介质的拮抗剂是抗 TNF 或 MIF 的抗体或 IL-1 受体拮抗剂。

[0263] 在一个实施方式中，本发明药物组合物是基本上不含内毒素和 / 或有关热源物质的无热源制剂。内毒素包括局限于微生物内部，只在微生物破坏或死亡时释放的毒素。热源性物质也包括细菌和其它微生物外膜中诱导发热的热稳定性物质（糖蛋白）。如果给予人，这些物质均可引起发热、低血压和休克。由于可能的有害作用，静脉内给予的药物溶液中必须除去即使低含量的内毒素。对于静脉内药物应用，食品药品监督管理局（“FDA”）设定了在 1 小时期间 5 单位 (EU) 内毒素 / 剂量 / 公斤体重的上限 (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum(美国药典大会, 药典论坛), 26(1) :223, (2000))。当以每公斤体重数百或上千毫克的用量给予治疗性蛋白时，例如单克隆抗体的情况，必须除去即使是痕量的有害或危险的内毒素。在某些具体实施方式中，组合物中内毒素和热源水平应低于 10EU/mg、或低于 5EU/mg、或低于 1EU/mg、或低于 0.1EU/mg、或低于 0.01EU/mg 或低于 0.001EU/mg。

[0264] 当用于体内给药时，本文所述组合物应无菌。通过，例如除菌过滤膜过滤或本领域熟知的其它方法不难实现无菌。可按照 Remington' s Pharmaceutical Sciences(《雷明

顿药物科学》)(180' 编, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990) 所述的常规药物实施配制用于注射的无菌组合物。含有抗生素, 例如本文所述的那些的组合物通常以冻干形式或溶液储存。考虑将含有本发明抗体的无菌组合物置于具有无菌入口, 例如静脉内输液袋的容器中或具有能回收该制剂的适配器, 例如可用皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶中。

[0265] 在本发明的一个实施方式中, 本文所述组合物能抑制炎症细胞因子级联反应激活所介导或以其为特征的病症, 包括急性和慢性炎症病症。在一具体实施方式中, 可用本文所述组合物治疗急性炎症病症, 例如脓毒症。在另一具体实施方式中, 可用本文所述组合物治疗慢性炎症病症, 例如类风湿性关节炎。在还有另一具体实施方式中, 可用本文所述组合物治疗急性和慢性炎症病症。

[0266] 考虑当将本发明组合物给予患炎症细胞因子级联反应激活所介导或以其为特征的病症的对象时, 其是保护性的。可通过本领域熟知的任何方法检测本发明组合物所赋予的保护作用。测定本发明组合物如何保护的方法根据所治疗和 / 或预防的病症和所检测的参数而不同。例如, 在啮齿类动物的关节炎模型中, 将用本发明组合物治疗的动物的爪炎症评分与用合适的对照组合物治疗的动物作比较来测定本发明组合物的保护作用。在脓毒症的 CLP 模型中, 将用本发明组合物治疗的动物的存活 (率) 与用合适对照组合物治疗的动物作比较来测定抗体治疗所赋予的保护作用。通常将用本发明组合物的治疗与某些对照治疗作比较。例如, 对照治疗可包括采用对照抗体或只包括赋形剂。在一些情况中, 对照可以是疾病治疗的护理标准品 (或合适的替代分子), 例如用于治疗关节炎的氨甲喋呤或抗 -TNF (例如, Enbrel、Humira)。在一些情况中, 对照可以是阴性对照 (例如, PBS)。当对照为护理标准品时, 可单独给予本发明组合物或与该护理治疗的标准品联合给予, 然后比较各组的保护水平。对照的选择取决于包括所治疗和 / 或预防的疾病和所检查的参数在内的因素, 本领域技术人员不难确定。本文提供了测定本发明组合物所赋予保护作用的方法的具体例子 (参见下文实施例 7-11)。

[0267] 在本发明另一实施方式中, 本文所述组合物在动物 CLP 脓毒症模型中比对照组合物的保护力更高 (高至少 10%、或至少 15%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%)。在一具体实施方式中, 本文所述组合物在选自小鼠 CLP 模型和幼猪 CLP 模型的动物 CLP 脓毒症模型中比对照组合物的保护力更高 (高至少 10%、或至少 15%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%)。在另一具体实施方式中, 动物 CLP 模型是小鼠 CLP 模型。

[0268] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在小鼠胶原诱导的关节炎模型中比对照组合物的保护力更高 (高至少 10%、或至少 15%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%)。在一具体实施方式中, 小鼠胶原诱导的关节炎模型是被动性胶原诱导关节炎模型。在另一具体实施方式中, 小鼠胶原诱导的关节炎模型是主动性胶原诱导关节炎模型。

[0269] 在本发明还有另一实施方式中, 本文所述组合物在小鼠胶原诱导的关节炎模型中比 Renbrel® (联用或不联用氨甲喋呤) 的保护力更高 (高至少 10%、或至少 15%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%)。在一具体实施方式中, 小鼠胶原诱导的关节炎模型是被动性胶原诱导关节炎模

型。在另一具体实施方式中,小鼠胶原诱导的关节炎模型是主动性胶原诱导关节炎模型。

[0270] 在本发明还有另一实施方式中,本文所述组合物在小鼠胶原诱导的关节炎模型中与对照组合物相比减少骨丧失和/或软骨损伤更佳(减少至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。在一具体实施方式中,小鼠胶原诱导的关节炎模型是被动性胶原诱导关节炎模型。在另一具体实施方式中,小鼠胶原诱导的关节炎模型是主动性胶原诱导关节炎模型。

[0271] 在其它实施方式中,本文所述组合物在大鼠佐剂诱导的关节炎模型中比对照组合物的保护力更高(高至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。

[0272] 在本发明还有另一实施方式中,本文所述组合物在大鼠佐剂诱导的关节炎模型中比Renbrel®(联用或不联用氨甲喋呤)的保护力更高(高至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。

[0273] 在本发明还有另一实施方式中,本文所述组合物在大鼠佐剂诱导的关节炎模型中与对照组合物相比减少骨丧失和/或软骨损伤更佳(减少至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。

[0274] 在本发明另一实施方式中,本文所述组合物在人中比Enbrel®(联用或不联用氨甲喋呤)的保护力更高(高至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。

[0275] 在本发明还有另一实施方式中,本文所述组合物在小鼠腹膜炎模型中比对照组合物的保护力更高(高至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。

[0276] 在本发明还有另一实施方式中,本文所述组合物在人或啮齿类SCI模型中与对照组合物相比减轻脊髓损伤(SCI)的严重性更佳(减轻至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。

[0277] 在本发明还有另一实施方式中,本文所述组合物在人中或啮齿类ALI模型中与对照组合物相比减轻急性肺损伤(ALI)的严重性程度的效果更佳(减轻至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%)。

[0278] 本发明也涉及抑制哺乳动物细胞释放促炎细胞因子的方法。该方法包括用足够量的本发明抗体或抗体组合物处理细胞来抑制细胞释放促炎细胞因子。在这些实施方式中,细胞优选是巨噬细胞。在某些实施方式中,促炎细胞因子选自:TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、MIF和IL-6。在其它实施方式中,所述细胞是巨噬细胞,所述促炎细胞因子选自TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、MIF和IL-6。在还有其它实施方式中,所述细胞是PBMC,所述促炎细胞因子选自TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、MIF和IL-6。在一个实施方式中,用所述方法处理患有以炎症细胞因子级联反应激活为特征的病症或处于患该病症风险中的患者的细胞。具体病症是本文所列举的。

[0279] 本发明也涉及抑制哺乳动物细胞释放 HMG1 和 / 或 HMG2 的方法。该方法包括用足够量的本发明抗体或抗体组合物处理细胞来抑制细胞释放 HMG1 和 / 或 HMG2。优选用所述方法处理患有以炎性细胞因子级联反应激活为特征的病症或处于患该病症风险中的患者的细胞。优选的病症是本文所列举的。

[0280] 通过本领域熟知的许多方法不难测定对细胞因子, HMG1 和 / 或 HMG2 释放的抑制作用, 例如本文上述和所公开的 (参见下文实施例 2-11)。

[0281] 本文所用的“治疗有效量”、“足够用量”等术语指足以治疗或控制 HMG1 和 / 或 HMG2 所介导疾病和病症的治疗性物质, 例如本发明 HMG1 抗体组合物的用量。治疗有效量指足以延迟或尽可能降低疾病发作, 例如延缓疾病或尽可能降低疾病严重性的治疗性物质用量。治疗有效量也可指能在炎性病症的治疗或控制中提供治疗益处的治疗性物质用量。此外, 本发明药物组合物有关的治疗有效量表示单独或与其它治疗剂联用时能在疾病, 例如炎性疾病的治疗或控制中提供治疗益处的用量。

[0282] 本发明还提供预防、控制、治疗或缓解炎性病症或其一种或多种症状的方法, 所述方法包括给予需要的对象本发明抗体组合物和 / 或一种或多种治疗剂。已知有用, 或已经应用或目前正用于预防、控制、治疗或缓解炎性病症或其一种或多种症状的任何药物或治疗剂可与本发明抗体组合物联用。这种物质的例子包括但不限于: 免疫调节剂、抗血管生成剂、抗炎药物和 TNF- α 拮抗剂。

[0283] 可用本发明抗体组合物 (即, 药物组合物) 治疗的病症的非限制性例子包括本说明书背景章节和下文列举的那些病症。所述病症优选: 阑尾炎、消化道、胃或十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、溃疡性伪膜急性或局部缺血性结肠炎、憩室炎、会厌炎、失迟缓症、胆管炎、胆囊炎、肝炎、克罗恩病、肠炎和惠普尔病、哮喘、过敏、过敏性休克、免疫复合物病、器官局部缺血、再灌注损伤、器官坏死、枯草热、脓毒症、败血症、内毒素性休克、恶病质、高烧、嗜酸性肉芽肿、肉芽肿病、结节病、脓毒性流产、附睾炎、阴道炎、前列腺炎和尿道炎、支气管炎、肺气肿、COPD、鼻炎、囊性纤维化病、肺炎、pneumoultramicroscopic silico-volcanocniosis、肺泡炎、细支气管炎、咽炎、胸膜炎、鼻窦炎、流感、呼吸道合胞病毒感染、疱疹感染、HIV 感染、乙肝病毒感染、丙肝病毒感染、弥散性菌血症、登革热、念珠菌病、疟疾、丝虫病、阿米巴病、棘球囊、烧伤、皮炎、皮肤炎、灼伤、荨麻疹、疣、风疹、血管炎、脉管炎、心内膜炎、动脉炎、动脉粥样硬化、再狭窄、血栓性静脉炎、心包炎、心肌炎、心肌局部缺血、结节性多动脉炎、风湿热、阿耳茨海默病、腹部疾病、充血性心力衰竭、成人呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、多发性硬化症、脑梗塞、脑栓塞、格-巴综合征、神经炎、神经痛、脊髓损伤、麻痹、眼色素层炎、关节炎、关节痛、骨髓炎、筋膜炎、佩吉特病、痛风、牙周病、类风湿性关节炎、滑膜炎、重症肌无力、甲状腺炎、全身性红斑狼疮、古德帕斯丘综合征、贝切特综合征、同种异体移植物排斥、移植物抗宿主病、I 型糖尿病、强直性脊柱炎、贝格尔病、I 型糖尿病、强直性脊柱炎、莱特综合征或何杰金病。在更优选的实施方式中, 病症是阑尾炎、胃溃疡、肠溃疡或十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、溃疡性伪膜急性或局部缺血性结肠炎、肝炎、克罗恩病、哮喘、过敏、过敏性休克、器官局部缺血、再灌注损伤、器官坏死、枯草热、脓毒症、败血症、内毒素性休克、恶病质、脓毒性流产、弥散性菌血症、烧伤、阿耳茨海默病、腹部疾病、充血性心力衰竭、成人呼吸窘迫综合征、脑梗塞、脑栓塞、脊髓损伤、麻痹、同种异体移植物排斥或移植物抗宿主病。

[0284] 在一优选的实施方式中,本发明涉及给予和利用本发明组合物和抗体来治疗和/或预防选自以下病症的方法:阑尾炎、胃溃疡、肠溃疡和十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、溃疡性伪膜急性和局部缺血性结肠炎、肝炎、克罗恩病、哮喘、过敏、过敏性休克、类风湿性关节炎、器官局部缺血、再灌注损伤、器官坏死、枯草热、脓毒症、败血症、内毒素性休克、恶病质、脓毒性流产、弥散性菌血症、烧伤、阿耳茨海默病、腹部疾病、充血性心力衰竭、成人呼吸窘迫综合征、脑梗塞、脑栓塞、脊髓损伤、麻痹、同种异体移植物排斥和移植物抗宿主病。在最优选的实施方式中,所述病症是内毒素性休克或同种异体移植物排斥。当所述病症是同种异体移植物排斥时,该组合物也优选包含用于抑制同种异体移植物排斥的免疫抑制剂,例如环孢菌素。

[0285] 本发明特别优选的实施方式涉及给予和利用本发明组合物和抗体来治疗和/或预防脓毒症和关节炎(例如,RA、银屑病关节炎、青少年类风湿性关节炎)的方法。此外,本发明特别优选的实施方式涉及给予和利用本发明组合物和抗体来治疗和预防银屑病和强直性脊柱炎的方法。

[0286] 本发明另一优选实施方式涉及给予和利用本发明组合物和抗体来治疗和预防再狭窄、血管疾病和心血管疾病的方法。

[0287] 本发明还有另一特别优选的实施方式涉及给予和利用本发明组合物和抗体来治疗和预防组织损伤及促进组织修复和再生的方法。

[0288] 如上所述,已知有用,或已经应用或目前正用于预防、控制、治疗或缓解炎症病症或其一种或多种症状的任何药物或剂剂可与本发明抗体组合物联用。可与本发明抗体组合物联合给予患炎症病症对象的免疫调节剂的具体例子包括但不限于:氨甲喋呤、来氟米特(leflunomide)、环磷酰胺、环磷氮芥、Immuran、环孢菌素A、米诺环素、硫唑嘌呤、抗生素(例如,FK506(他克莫司))、甲基泼尼松(MP)、皮质类固醇、类固醇、霉酚酸酯(mycophenolate mofetil)、雷帕霉素(西罗莫司)、优青糖苷、脱氧精胍菌素、布喹那(brequinar)、malononitriloamides(如,leflunamide)、抗-T细胞受体抗体(如,抗-CD4抗体(如,cM-T412(Boeringer)、IDEC-CE9.1.RTM.(IDEC and SKB)、mAB4162W94、Orthoclone和OKTcdr4a(Janssen-Cilag))、抗-CD3抗体(如,Nuvion(Product Design Labs)、OKT3(Johnson&Johnson))、抗-CD20抗体(如,Rituxan(IDEC&Genentech,美国和国际专利公布US2004/0202658、W000/67796)及其衍生物、HuMax-CD20(GenMab and Medarex,美国专利公布2004/0167319))、抗-CD19抗体(参见,例如美国和国际专利公布US20020041847、US20030133930和W005/012493)、抗-CD5抗体(如,抗-CD5蓖麻毒蛋白相連的免疫缀合物)、抗-CD7抗体(如,CHH-380(Novartis))、抗-CD8抗体、抗-CD40配体单克隆抗体(如,IDEC-131(IDEC))、抗-CD52抗体(如,CAMPATH1H(Ilex))、抗-CD2抗体(如,MEDI-507(MedImmune, Inc.,国际公布号W002/098370和W002/069904)、抗-CD11a抗体(如,Xanelim(Genentech))和抗-B7抗体(如,IDEC-114)(IDEC));抗-细胞因子受体抗体(如,抗-IFN受体抗体、抗-IL-2受体抗体(如,Zenapax(ProteinDesign Labs))、抗-IL-4受体抗体、抗-IL-6受体抗体、抗-IL-10受体抗体和抗-IL-12受体抗体)、抗-细胞因子抗体(如,抗-IFN抗体、抗-TNF- α 抗体、抗-IL- β 抗体、抗-IL-6抗体、抗-IL-8抗体(如,ABX-IL-8(Abgenix)) and 抗-IL-12抗体);抗-CD22抗体(如,非配体阻断性抗体,如伊帕组单抗(Epratuzumab)(Immunomedics)和配体阻断性抗体(如,美国专利公

布 2004/0001828 和 2003/0202975)) ;CTLA4- 免疫球蛋白 ;LFA-3TIP(Biogen, 国际公布号 W093/08656 和美国专利号 6, 162, 432) ;可溶性细胞因子受体 (如, TNF- α 受体的胞外结构域或其片段、IL-1 β 受体的胞外结构域或其片段、IL-6 受体的胞外结构域或其片段) ;细胞因子或其片段 (如, 白介素 (IL)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、TNF- α 、TNF- β 、干扰素 (IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 和 GM-CSF) ;和抗-细胞因子抗体 (如, 抗-IL-2 抗体、抗-IL-4 抗体、抗-IL-6 抗体、抗-IL-10 抗体、抗-IL-12 抗体、抗-IL-15 抗体、抗-TNF- α 抗体和抗-IFN- γ 抗体)。

[0289] 可与本发明抗体组合物联合给予患炎症病症对象的抗血管生成药物的非限制性例子包括 :**Vitaxin®** (MedImmune) 或其它抗- $\alpha v \beta 3$ 抗体 (例如, CNT095 (Centocor))、内皮抑制素、血管抑制素、apomigren、抗-血管生成性抗凝血酶 III、纤连蛋白的 29kDa N- 末端和 40kDa C- 末端的蛋白酶解片段、uPA 受体拮抗剂、促乳素的 16kDa 蛋白酶解片段、血小板因子-4 的 7.8kDa 蛋白酶解片段、血小板因子-4 的抗-血管生成性的 24 个氨基酸片段、称为 13.40 的抗-血管生成因子、血小板反应蛋白 I 的抗-血管生成性 22 个氨基酸肽片段、SPARC 的抗-血管生成性 20 氨基酸肽片段、含有 RGD 和 NGR 的肽、层粘连蛋白的抗-血管生成性小肽、纤连蛋白、前胶原和 EGF、酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF) 拮抗剂、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 拮抗剂、血管内皮生长因子 (VEGF) 拮抗剂、VEGF 受体 (VEGFR) 拮抗剂 (例如, 抗-VEGFR 抗体) 和 **Avastin®**。

[0290] 可与本发明抗体组合物联合给予患炎症病症对象的 TNF- α 拮抗剂的非限制性例子包括 :蛋白质, 多肽, 肽, 融合蛋白, 抗体 (例如, 人抗体、人源化抗体、嵌合型抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、Fv 片段、ScFv 片段、Fab 片段、F(ab)₂ 片段及其抗原结合片段), 例如能与 TNF- α 免疫特异性结合的抗体, 能阻断、降低、抑制或中和 TNF- α 的功能、活性和 / 或表达的核酸分子 (例如, 反义分子或三螺旋)、有机分子、无机分子和小分子。在各种实施方式中, 与对照, 例如磷酸缓冲盐水 (PBS) 相比, TNF- α 拮抗剂能使 TNF- α 的功能、活性和 / 或表达降低至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99%。能与 TNF- α 免疫特异性结合的抗体的例子包括但不限于 :英利昔单抗 (infliximab) (REMICADE. TM. ;Centacor)、D2E7 (Abbott Laboratories/Knoll Pharmaceuticals Co., Mt. Olive, 新泽西)、也称为 HUMICADE. TM. 的 CDP571 和 CDP-870 (二者均产自 Celltech/Pharmacia, Slough, 美国) 和 TN3-19.12 (Williams 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 :2762-2766 ;Thorbecke 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :7375-7379)。本发明也包括以下美国专利号所公开的能与 TNF- α 免疫特异性结合的抗体在本发明组合物和方法中的应用 :美国专利号 5, 136, 021 ;5, 147, 638 ;5, 223, 395 ;5, 231, 024 ;5, 334, 380 ;5, 360, 716 ;5, 426, 181 ;5, 436, 154 ;5, 610, 279 ;5, 644, 034 ;5, 656, 272 ;5, 658, 746 ;5, 698, 195 ;5, 736, 138 ;5, 741, 488 ;5, 808, 029 ;5, 919, 452 ;5, 958, 412 ;5, 959, 087 ;5, 968, 741 ;5, 994, 510 ;6, 036, 978 ;6, 114, 517 ;和 6, 171, 787。可溶性 TNF- α 受体的例子包括但不限于 :sTNF-R1 (Amgen)、依那西普 (etanercept) (ENBREL™ ;Immunex) 及其大鼠同源物 RENBREL™、衍生自 TNFrI、TNFrII 的 TNF- α 可溶性抑制剂 (Kohno 等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :8331-8335) 和 TNF- α Inh (Seckinger 等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :

5188-5192)。

[0291] 本发明包括的其它 TNF- α 拮抗剂包括但不限于：已知能通过干扰素 γ 激活的巨噬细胞阻断 TNF- α 产生的 IL-10 (Oswald 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 8676-8680)、TNFR-IgG (Ashkenazi 等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 10535-10539)、小鼠产品 TBP-1 (Serono/Yeda)、疫苗 CytoTAb (Protherics)、反义分子 104838 (ISIS)、肽 RDP-58 (SangStat)、沙立度胺 (Celgene)、CDC-801 (Celgene)、DPC-333 (Dupont)、VX-745 (Vertex)、AGIX-4207 (AtheroGenics)、ITF-2357 (Italfarmaco)、NPI-13021-31 (Nereus)、SC10-469 (Scios)、TACE 靶向物 (Immunix/AHP)、CLX-120500 (Calyx)、Thiazolopyrim (Dynavax)、金诺芬 (Ridaura) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals)、奎纳克林 (米帕林二氯水合物)、替尼达普 (tenidap) (Enablex)、黑色素 (Large Scale Biological) 和 Uriach 的抗-p38MAPK 试剂。

[0292] 可与本发明抗体组合物联合给予患炎症病症对象的抗炎药物的非限制性例子包括：非类固醇抗炎药 (NSAID)、类固醇抗炎药、 β -激动剂、抗胆碱能药物和甲基黄嘌呤。NSAID 的例子包括但不限于：阿司匹林、布洛芬、塞来考昔 (celecoxib) (CELEBREX. TM.)、二氯芬酸 (VOLTAREN. TM.)、依托度酸 (LODINE. TM.)、非诺洛芬 (NALFON. TM.)、吲哚美辛 (INDOCIN. TM.)、酮咯酸 (ketoralac) (TORADOL. TM.)、噁丙嗪 (DAYPRO. TM.)、萘丁美酮 (RELAFEN. TM.)、舒林酸 (CLINORIL. TM.)、托美汀 (tolmentin) (TOLECTIN. TM.)、罗非昔布 (rofecoxib) (VIOXX. TM.)、萘普生 (ALEVE. TM.、NAPROSYN. TM.)、酮基布洛芬 (ACTRON. TM.) 和萘丁美酮 (RELAFEN. TM.)。这种 NSAID 的功能是抑制环加氧酶 (例如, COX-1 和 / 或 COX-2)。类固醇抗炎药的例子包括但不限于：糖皮质激素、地塞米松 (DECADRON. TM.)、可的松、氢化可的松、泼尼松 (DELTASONE. TM.)、强的松龙、曲安西龙、柳氮磺胺吡啶和类十二烷酸, 例如前列腺素、凝血噁烷和白三烯。

[0293] 在具体实施方式中, 联合给予骨关节炎患者预防或治疗有效量的本发明抗体组合物和用于骨关节炎预防、治疗、控制或缓解的其它药物或治疗剂, 其包括但不限于：镇痛剂 (非限制性例子是对乙酰氨基酚、其剂量最多 4000mg/天; 非那西汀; 和曲马多, 其每日剂量是 200-300mg); NSAID (非限制性例子包括但不限于阿司匹林、二氟苯水杨酸、二氯芬酸、依托度酸、萘芬酸钠、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮基布洛芬、水杨酸甲酯、萘丁美酮、萘普生 (naproxin)、噁丙嗪、保泰松、吡罗昔康 (piroxicam)、舒林酸和托美汀)。优选低剂量的 NSAID, 例如 1200mg/天的布洛芬、500mg/天的萘普生。保胃剂, 例如米索前列醇、法莫替丁或奥美拉唑优选与 NSAID 药物联用; 非乙酰化水杨酸酯, 包括但不限于双水杨酸盐 (salsalate); 环加氧酶 (Cox)-2-特异性抑制剂 (CSI), 包括但不限于塞来考昔和罗非昔布; 长效糖皮质激素制品的关节内和关节周围注射剂; 透明质酸的关节内注射剂; 辣椒素乳膏; 大量冲洗骨关节炎膝关节以冲洗掉血纤蛋白、软骨碎片和其它碎片; 和关节置换手术。本发明抗体组合物也可与其它非药学方法联用来预防、治疗、控制和缓解骨关节炎, 包括但不限于：降低关节负荷 (非限制性例子是纠正错误姿势、支撑过度的腰部脊柱前凸; 避免患病关节过度负载; 避免长时间站立、下跪和下蹲); 热敷受伤关节; 有氧锻炼和其它物理治疗。

[0294] 在具体实施方式中, 联合给予类风湿性关节炎患者预防或治疗有效量的本发明抗体组合物和用于类风湿性关节炎预防、治疗、控制或缓解的其它药物或治疗剂, 其包括

但不限于：NSAID（非限制性例子包括但不限于阿司匹林、二氟苯水杨酸、二氯芬酸、依托度酸、氨芬酸钠、非诺洛芬、氟比洛酚、布洛芬、吲哚美辛、酮基布洛芬、水杨酸甲酯、萘丁美酮、萘普生（naproxin）、噁丙嗪、保泰松、吡罗昔康（piroxicam）、舒林酸和托美汀）；镇痛剂（非限制性例子是对乙酰氨基酚、非那西汀和曲马多）；CSI，包括但不限于塞来考昔和罗非昔布；糖皮质激素（优选低剂量口服糖皮质激素，例如 <7.5mg/ 天的泼尼松，或每月用高剂量糖皮质激素脉冲（给予），或关节内（给予）的糖皮质激素）；减轻症状类抗风湿药（DMARD），包括但不限于：氨甲喋呤（优选给予间歇性低剂量，例如 7.5-30mg 每周）、金化合物（例如，金盐）、D-青霉胺、抗疟疾药（例如，氯喹）和柳氮磺胺吡啶；TNF- α 中和药物，包括但不限于依那西普和英弗利昔单抗；免疫抑制和细胞毒性药物（例子包括但不限于硫唑嘌呤、来氟米特、环孢菌素和环磷酰胺）和外科手术（例子包括但不限于关节成形术、全关节置换术、重建手的手术、开放性或关节镜滑膜切除术和腰部的早期腱鞘切除术）。本发明抗体组合物也可与其它方法联用来预防、治疗、控制和缓解类风湿性关节炎，包括但不限于：休息、上夹板以减少发炎关节的不良运动、锻炼、利用各种矫型和辅助装置和其它物理治疗。本发明抗体组合物也可与一些非常规方法联用来预防、治疗、控制和缓解类风湿性关节炎，包括但不限于：饮食（例如，用在某些鱼油中发现的 Ω -3 脂肪酸，例如二十碳五烯酸替代肉中发现的食用 Ω -6 必需脂肪酸）、疫苗、激素和局部制剂。

[0295] 在具体实施方式中，可将预防或治疗有效量的本发明抗体组合物单独给予慢性阻塞性肺病（COPD）患者或与用于预防、治疗、控制和缓解 COPD 的其它药物或疗法联合给予，所述其它药物或疗法包括但不限于：支气管舒张剂，包括但不限于短效和长效 β_2 -肾上腺素激动剂（例子是短效 β_2 激动剂，包括但不限于舒喘宁、吡布特罗、特布他林和间羟异丙肾上腺素；长效 β_2 激动剂的例子包括但不限于口服缓释舒喘宁和吸入沙美特罗）；抗胆碱能药物（例子包括但不限于异丙托溴铵）和茶碱及其衍生物（茶碱的治疗范围优选 10-20 μ g/mL）；糖皮质激素；外源性 α 1AT（例如，源自合并的人血浆的 α 1AT，静脉内给予，每周剂量为 60mg/kg）；氧；肺移植；肺容积降低外科手术；气管内插管；呼吸支架（ventilation support）；含 23-价多糖的每年流感疫苗和肺炎球菌疫苗接种；锻炼 和戒烟。

[0296] 在具体实施方式中，可将预防或治疗有效量的本发明抗体组合物单独给予肺部纤维化患者或与有效量的用于肺部纤维化治疗的一种或多种其它药物联合给予，药物包括但不限于：氧；皮质激素（非限制性例子是以 1-5mg/kg/ 天的起始剂量（提高至 100mg/ 天）每日给予泼尼松六周，然后在 3-6 个月期间缓慢降低至 0.25mg/kg/ 天的最低维持剂量）；细胞毒性药物（非限制性例子是每日口服一次 100-120mg 的环磷酰胺，和每日口服一次 3mg/kg 到最高 200mg 的硫唑嘌呤）；支气管舒张剂（非限制性例子是短效和长效 β_2 -肾上腺素能激动剂、抗胆碱能药物和茶碱及其衍生物）；和抗组胺剂（非限制性例子是苯海拉明和抗敏安）。

[0297] 在具体实施方式中，可将预防或治疗有效量的本发明抗体组合物单独给予 SCI 患者或与有效量的用于 SCI 治疗的一种或多种其它药物联合给予，药物包括但不限于：糖皮质激素类固醇（非限制性例子是在 15 分钟期间推注甲强龙 30mg/kg，在推注甲强龙后 45 分钟开始进行 23 小时的 5.4mg/kg/ 小时甲强龙输液）、神经保护剂（neuroprotector）（例如，米诺环素）、再生治疗（例如，干细胞治疗、水凝胶）、弱电场治疗（例如，脊柱外振荡场刺激

器可植入医疗装置 (extraspinal oscillating field stimulator implantable medical device))。

[0298] 在具体实施方式中,可将预防或治疗有效量的本发明抗体组合物单独给予哮喘患者或与有效量的用于哮喘治疗的一种或多种其它药物联合给予,药物包括但不限于:肾上腺能刺激剂(例子包括但不限于儿茶酚胺类,例如肾上腺素、异丙基去甲肾上腺素和乙基异丙肾上腺素;间苯二酚类,例如间羟异丙肾上腺素、特布他林和酚丙喘宁;和水杨醇类,例如沙丁胺醇(吸入是给予肾上腺素刺激剂的优选途径);甲基黄嘌呤类,包括但不限于茶碱及其各种盐;抗胆碱能药物,包括但不限于硫酸阿托品、甲基硝酸阿托品(atropine methylnitrate)和异丙托溴铵;糖皮质激素类(例子包括但不限于全身性或口服类固醇和吸入性糖皮质激素);肥大细胞稳定剂(例子包括但不限于色甘酸钠和萘多罗米钠);白三烯改良剂(例子包括但不限于齐留通(Zileuton)、扎鲁司特(zafirlukast)和孟鲁司特(montelukast));免疫抑制剂(例子包括但不限于氨甲喋呤和金盐);和黏液溶解药物(例子包括但不限于乙酰半胱氨酸)。

[0299] 本发明提供通过给予对象有效量的本发明化合物或药物组合物,优选本发明抗体来治疗、抑制和预防的方法。在一优选实施方式中,所述化合物基本上是纯的(例如,基本上不含限制其作用或产生不良副作用的物质)。所述对象优选动物,包括但不限于:例如母牛、猪、马、鸡、猫、狗等,优选哺乳动物,最优选人。

[0300] 当所述化合物包括核酸或免疫球蛋白时,可利用的制剂和给药方法如上所述;其它合适的制剂和给药途径可选自下文所述的那些。

[0301] 可用的已知各种递送系统给予本发明化合物,例如包裹在脂质体、微粒、微胶囊中,能表达该化合物的重组细胞,受体介导的胞吞(参见,例如Wu和Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, (1987)), 构建作为逆转录病毒或其它载体一部分的核酸,等等。引入方法包括但不限于:真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。所述化合物或组合物可通过任何方便的途径给予,例如通过输液或推注,通过上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜、直肠和小肠粘膜)吸收,并可联同其它生物学活性药物一起给予。给药可以是全身或局部。此外,可能需要将本发明药学化合物或组合物通过任何合适的途径(包括心室内和鞘内注射)引入中枢神经系统;可通过,例如与储液器(如Ommaya储液器)相连的心室内导管来促进心室内注射。也可采用肺部给药,例如利用吸入器或喷雾器,和用雾化剂配制。

[0302] 在一具体实施方式中,可能需要将本发明药学化合物或组合物局部给予至需要治疗的区域;这可通过以下方式实现:例如(不限于)外科手术期间的局部灌注、局部应用(例如与手术后伤口包扎结合)、通过注射、利用导管、利用栓剂或利用植入物,所述植入物是有孔、无孔的凝胶状物质,包括膜,如唾液酸膜(sialastic membrane)或纤维。当给予本发明蛋白质,包括抗体时,最好要小心使用不吸附蛋白质的材料。

[0303] 在另一实施方式中,所述化合物或组合物可通过囊泡,特别是脂质体递送(参见Langer, *Science*, 249:1527-1533, (1990); Treat等,刊于 *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*(《感染性疾病和癌症治疗中的脂质体》), Lopez-Berestein和Fidler编, Liss, 纽约,第353-365, (1989); Lopez-Berestein, 同上, 第317-327页;总体可参见上文)。

[0304] 在还有另一实施方式中,可以受控释放系统递送所述化合物或组合物。一个实施方式可利用泵(参见 Langer, 同上; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:201; Buchwald 等, 1980, Surgery, 88:507; Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med., 321:574)。另一实施方式利用聚合材料(参见 Medical Applications of Controlled Release(《控释的医学应用》), Langer 和 Wise 编, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance(《受控的药物生物利用度, 药物产品设计和性能》), Smolen 和 Ball 编, Wiley, 纽约, (1984); Ranger 和 Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61; 也参见 Levy 等, 1985, Science, 228:190; During 等, 1989, Ann. Neurol., 25:351; Howard 等, 1989, J. Neurosurg., 71:105)。在还有另一实施方式中,可将控释系统置于毗邻治疗靶位之处(即大脑),因此只需要给予全身剂量的一部分(参见,例如 Goodson, 刊于 Medical Applications of Controlled Release(《控释的医学应用》), 同上, 第 2 卷, 第 115-138 页, (1984))。Langer (1990, Science, 249:1527-1533) 的综述讨论了其它控释系统。

[0305] 在本发明化合物是编码蛋白质的核酸的实施方式中,可将所述核酸构建为合适的核酸表达载体的一部分并通过以下方式体内给予从而进入细胞内而促进其编码的蛋白质表达:例如利用逆转录病毒载体(参见美国专利号 4,980,286)、或直接注射、或利用微粒轰击(例如,基因枪;生物射弹, Dupont)、或用脂质或细胞表面受体或转染试剂包被、或将其与已知能进入核的同源框样肽连接给予(参见,例如 Joliot 等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1864-1868), 等等。或者,可通过同源重组将核酸引入细胞内掺入宿主细胞 DNA 中进行表达。

[0306] 本发明也提供药物组合物。这种组合物含有治疗有效量的化合物和药学上可接受的载体。在一具体实施方式中,术语“药学上可接受的”表示经联邦管理局或州政府批准或列于美国药典或其它公认的药典中而可用于动物,更具体是用于人。术语“载体”指给予治疗剂的稀释剂、佐剂、赋形剂或运载体。这种药物载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内给予药物组合物时,水是优选的载体。盐水溶液和葡萄糖及甘油的水溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽糖、大米、面粉、白垩粉、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物也可含有少量润湿剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。这些组合物可采取溶液、混悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等剂型,可用常规黏合剂和载体,例如甘油三酯将组合物配制为栓剂。口服制剂可含有标准载体,例如药物级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”(《雷明顿药物科学》)描述了合适药物载体的例子。这种组合物含有治疗有效量的化合物(优选纯化形式)与合适量的载体,从而能提供适合给予患者的剂型。制剂应适合于给药形式。

[0307] 在一优选实施方式中,按照常规方法将组合物配制为适合于静脉内给予人类的药物组合物。静脉内给予的组合物通常是无菌等渗水性缓冲液配制的溶液。如果需要,组合物也可含有增溶剂和局部麻醉剂,例如利多卡因来减轻注射部位的疼痛。各成分通常可以分别提供或混合成单位剂型,例如装在标有活性物质含量的密封容器,如安瓿或袋

(sachette) 中的冻干粉末或无水浓缩物。当要输液给予组合物时,可用含有药物级无菌水或盐水的输液瓶分发。当通过注射给予组合物时,可先用一安瓿注射用无菌水或盐水来混合各成分,再给予。

[0308] 可将本发明化合物配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括用诸如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子形成的盐,和用诸如衍生自氢氧化钠、钾、铵、钙、铁,异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组胺、普鲁卡因等的阳离子形成的盐。

[0309] 可通过标准临床技术测定能有效治疗、抑制和预防本发明多肽表达和 / 或活性异常相关疾病或病症的本发明化合物用量。此外,也可任选采用体外试验来协助鉴定最佳剂量范围。制剂所用的精确剂量也取决于给药途径和疾病或病症的严重性,应根据执业医师的判断和各患者的情况决定。可从体外或动物模型测试系统获得的剂量 - 反应曲线外推得到有效剂量。

[0310] 对于抗体,给予患者的剂量通常是 0.1mg/kg—100mg/kg 患者体重。给予患者的剂量优选介于 0.1mg/kg-20mg/kg 患者体重间,更优选 1mg/kg-10mg/kg 患者体重。由于对外来多肽可产生免疫反应,人抗体在人体内的半衰期通常比其它物种的抗体长。因此,人抗体常可采取较低剂量和较少给药次数。此外,可通过例如脂质化修饰来提高抗体的摄取和组织渗透(例如,进入大脑)而减少本发明抗体的剂量和给药频率。

[0311] 本发明也提供装有一个或多个填充了本发明药物组合物诸成分的容器的药物包或试剂盒。这种容器中可任选装有管理药物或生物制品的生产、使用或销售的政府当局的通知,该通知反映了当局批准可生产、使用或销售该人用药物。

[0312] 这些组合物中多肽所包含的赋形剂根据组合物在治疗应用中的预计给药途径来选择。组合物的给药途径取决于待治疗的病症。例如,对于治疗全身性疾病,例如内毒素性休克,优选静脉内注射,对于治疗胃肠道病症,例如胃溃疡,优选口服给药。本领域技术人员结合标准剂量 - 反应的研究可决定给药途径和待给予组合物的剂量而无需过多实验。作出那些决定要考虑的相关情况包括待治疗的病症、选择待给予的组合物、患者个体的年龄、体重和反应、患者症状的严重性。因此,根据病症,抗体组合物可通过口服、胃肠外、鼻内、经阴道、经直肠、经舌、舌下、含服、口内和透皮给予患者。

[0313] 因此,可通过本领域熟知的方法制备设计经口服、经舌、舌下、含服和口内给药的组合物而无需过多实验,例如采用惰性稀释剂或可食用载体。这些组合物可包装在明胶胶囊中或压缩成片剂。为口服治疗性给药的目的,可掺合本发明药物组合物与赋形剂,以片剂、锭剂、胶囊、酞剂、混悬液、糖浆、薄片、咀嚼胶等剂型给予。

[0314] 片剂、丸剂、胶囊、锭剂等也可含有黏合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂和调味剂。黏合剂的一些例子包括微晶纤维素、黄蓍胶或明胶。赋形剂的例子包括淀粉或乳糖。崩解剂的一些例子包括海藻酸、玉米淀粉等。润滑剂的例子包括硬脂酸镁或硬脂酸钾。助流剂的例子是胶体二氧化硅。甜味剂的一些例子包括蔗糖、糖精等。调味剂的例子包括薄荷、水杨酸甲酯、橙味调料等。就用量而言,制备各种组合物所用的材料应是药学纯和无毒的。

[0315] 本发明组合物不难经胃肠外给予,例如通过静脉内、肌肉内、鞘内或皮下注射。可通过将本发明抗体组合物掺入溶液或混悬液来实现胃肠外给予。这种溶液和混悬液也可含有无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂。胃肠外制剂也可含有抗菌剂,例如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸

或亚硫酸氢钠和螯合剂,例如EDTA。也可加入诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐等缓冲液和用于调节张力的试剂,例如氯化钠或葡萄糖。可将胃肠外制剂包装在玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0316] 直肠给药包括将药物组合物给予直肠或大肠中。这可利用栓剂或灌肠剂实现。通过本领域已知方法不难制备栓剂。例如,可将甘油加热至约 120°C,将抗体组合物溶于甘油中,混合加热的甘油,然后加入纯水并将该热混合物倒入栓剂模具来制备栓剂。

[0317] 透皮给药包括使组合物经皮吸收。透皮制剂包括贴剂、软膏、乳膏、凝胶、油膏等。

[0318] 本文所述抗体组合物也可含有早期脓毒症介质的拮抗剂。本文所用的早期脓毒症拮抗剂是诱导炎性细胞因子级联反应(例如,接触LPS)后细胞立即(即,在30-60分钟内)释放的促炎细胞因子。这些细胞因子的非限制性例子是TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、PAF和MIF。早期脓毒症介质也包括这些细胞因子的受体(例如,1型肿瘤坏死因子受体)和产生这些细胞因子所需的酶(例如,白介素-1 β 转化酶)。这些实施方式可采用目前已知或以后发现的早期脓毒症介质的任何拮抗剂来进一步抑制炎性细胞因子级联反应。

[0319] 早期脓毒症介质拮抗剂的非限制性例子是能与早期脓毒症介质的mRNA结合并阻止其表达的反义化合物(参见,例如Ojwang等,1997, *Biochemistry*, 36:6033-6045; Pampfer等,1995, *Biol. Reprod.*, 52:1316-1326;美国专利号6,228,642;Yahata等,1996, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 6:55-61;和Taylor等,1998, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 8:199-205)、能特异性切割早期脓毒症介质的mRNA的核酶(参见,例如Leavitt等,2000, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 10:409-414;Kisich等,1999;和Hendrix等,1996, *Biochem. J.*, 314:655-661)和能与早期脓毒症介质结合并抑制其功能的抗体(参见,例如,Kam和Targan,2000, *Expert Opin. Pharmacother.*, 1:615-622;Nagahira等,1999, *J. Immunol. Methods*, 222,83-92;Lavine等,1998, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 18:52-58;和Holmes等,2000, *Hybridoma*, 19:363-367)。认为目前已知或以后发现的早期脓毒症介质的任何拮抗剂属于本发明范围内。技术人员采用常规剂量-反应的研究可决定这些组合物中抑制特定炎性细胞因子级联反应的早期脓毒症介质(拮抗剂)用量而无需过多实验。

[0320] 5.8 诊断和成像

[0321] 为诊断目的,可采用能与感兴趣多肽特异性结合的标记抗体及其衍生物和类似物来检测、诊断或监测本发明多肽表达和/或活性异常相关疾病和/或病症。本发明提供检验感兴趣多肽异常表达(的方法),包括(a)利用感兴趣多肽的一种或多种特异性抗体检验某个体的细胞或体液中感兴趣多肽的表达和(b)将基因表达水平与标准的基因表达水平作比较,藉此,与标准表达水平相比,检验到多肽基因表达水平升高或降低表明表达异常。

[0322] 本发明提供诊断病症的诊断试验,包括(a)利用感兴趣多肽的一种或多种特异性抗体检验某个体的细胞或体液中感兴趣多肽的表达和(b)将基因表达水平与标准的基因表达水平作比较,藉此,与标准表达水平相比,检验到多肽基因表达水平升高或降低表明患有具体病症。

[0323] 可采用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法(例如,参见Jalkanen等,1985, *J. Cell. Biol.*, 101:976-985;Jalkanen等,1987, *J. Cell. Biol.*, 105:3087-3096),利用本发明抗体检验生物学样品中的蛋白质水平。用于检测蛋白质基因表达的其它抗体方法

包括免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。

[0324] 可采用本领域已知的技术来标记本发明抗体。这种技术包括但不限于利用双功能缀合剂(conjugating agent)(参见,例如美国专利号 5,756,065;5,714,631;5,696,239;5,652,361;5,505,931;5,489,425;5,435,990;5,428,139;5,342,604;5,274,119;4,994,560 和 5,808,003)。

[0325] 本发明的一种实施方式是检测和诊断动物,优选哺乳动物,最优选人体中感兴趣多肽表达异常相关的疾病或病症。在一个实施方式中,诊断包括:(a)给予(例如,胃肠外、皮下或腹膜内)对象有效量的能与感兴趣多肽特异性结合的标记分子;(b)给药后等待一定时间以使标记分子优先集中于对象表达该多肽的部位(也使未结合的标记分子清除至背景水平);(c)测定背景水平;和(d)检测对象体内的标记分子,因而检测到标记分子高于背景水平表明对象具有与感兴趣多肽表达异常相关的特定疾病或病症。对于某特定系统,可通过各种方法,包括将检测到的标记分子含量与以前测定的标准值作比较来测定背景水平。

[0326] 本文也描述了用本发明抗体来治疗、诊断或预后患以下疾病的个体:脓毒症、类风湿性关节炎、腹膜炎、克罗恩病、再灌注损伤、败血症、内毒素性休克、囊性纤维化病、心内膜炎、银屑病、银屑病关节炎、关节炎、过敏性休克、器官局部缺血、再灌注损伤和同种异体移植排斥。

[0327] 本领域知道对象的体形和所用的成像系统将决定产生诊断性图像所需的成像部分数量。对于人对象,以放射性同位素部分为例,注射的放射量通常是约 5-20 毫居里的⁹⁹Tc。然后标记的抗体或抗体片段优先积累在含有特定蛋白的细胞部位。S. W. Burchiel 等,“Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments”(放射性标记的抗体及其片段的免疫药物动力学),(刊于 Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer(《肿瘤成像:癌症的放射性化学检测》),第 13 章, S. W. Burchiel 和 B. A. Rhodes 编, Masson Publishing Inc., (1982) 描述了体内肿瘤成像。

[0328] 取决于几种因素,包括所用标记的类型和给药方式,给药后使标记分子优先集中于对象体内各部位和使未结合的标记分子清除至背景水平所需的时间间隔是 6-48 小时或 6-24 小时或 6-12 小时。在另一实施方式中,给药后所需的时间间隔是 5-20 天或 5-10 天。

[0329] 在一个实施方式中,通过在,例如初始诊断后一个月、初始诊断后六个月、初始诊断后一年等重复疾病诊断方法来监测疾病或病症。

[0330] 可采用体内扫描领域已知的方法来检测患者体内标记分子的存在。这些方法取决于所用标记的类型。技术人员能确定检测特定标记的合适方法。本发明诊断方法可用的方法和装置包括但不限于:计算机化断层显像(CT)、全身扫描,例如正电子发射断层显像(PET)、磁共振成像(MRI)和声像图检查。

[0331] 在一具体实施方式中,利用辐射响应外科仪器检测患者体内用放射性同位素标记的所述分子(Thurston 等,美国专利号 5,441,050)。在另一实施方式中,利用荧光响应扫描仪器检测患者体内用荧光化合物标记的所述分子。在另一实施方式中,采用正电子发射断层分析检测患者体内用正电子发射金属标记的所述分子。在还有另一实施方式中,采用磁共振成像(MRI)检测患者体内用顺磁性标记物标记的所述分子。

[0332] 表 3:序列表的说明

[0333]

SEQ ID NO:	描述 ^a	SEQ ID NO:	描述 ^a
1	人 HMG1 aa Acc. # NP-002119	53	抗 HMG1 抗体 G34 V _H nt
2	人 HMG1 aa Acc, # AAA64970	54	抗 HMG1 抗体 G35 V _L aa
3	人 HMG1 A 框 aa	55	抗 HMG1 抗体 G35 V _L nt
4	人 HMG1 B 框 aa	56	抗 HMG1 抗体 G35 V _H aa
5	抗 HMG1 抗体 S2 V _L aa	57	抗 HMG1 抗体 G35 V _H nt
6	抗 HMG1 抗体 S2 V _L nt	58	抗 HMG1 抗体 S10 V _L aa
7	抗 HMG1 抗体 S2 V _H aa	59	抗 HMG1 抗体 S10 V _L nt
8	抗 HMG1 抗体 S2 V _H nt	60	抗 HMG1 抗体 S10 V _H aa
9	抗 HMG1 抗体 S6 V _L aa	61	抗 HMG1 抗体 S10 V _H nt
10	抗 HMG1 抗体 S6 V _L nt	62	抗 HMG1 抗体 S12 V _L aa
11	抗 HMG1 抗体 S6 V _H aa	63	抗 HMG1 抗体 S12 V _L nt
12	抗 HMG1 抗体 S6 V _H nt	64	抗 HMG1 抗体 S12 V _H aa
13	抗 HMG1 抗体 S16 V _L aa	65	抗 HMG1 抗体 S12 V _H nt
14	抗 HMG1 抗体 S16 V _L nt	66	抗 HMG1 抗体 S14 V _L aa
15	抗 HMG1 抗体 S16 V _H aa	67	抗 HMG1 抗体 S14 V _L nt
16	抗 HMG1 抗体 S16 V _H nt	68	抗 HMG1 抗体 S14 V _H aa
17	抗 HMG1 抗体 G4 V _L aa	69	抗 HMG1 抗体 S14 V _H nt
18	抗 HMG1 抗体 G4 V _L nt	70	抗 HMG1 抗体 S17 V _L aa
19	抗 HMG1 抗体 G4 V _H aa	71	抗 HMG1 抗体 S17 V _L nt
20	抗 HMG1 抗体 G4 V _H nt	72	抗 HMG1 抗体 S17 V _H aa
21	人 HMG2 aa	73	抗 HMG1 抗体 S17 V _H nt
22	人 HMG2 A 框 aa	74	S2 V _L CDR1 aa
23	人 HMG2 B 框 aa	75	S2 V _L CDR2 aa
24	抗 HMG1 抗体 E11 V _L aa	76	S2 V _L CDR3 aa
25	抗 HMG1 抗体 E11 V _L nt	77	S2 V _H CDR1 aa
26	抗 HMG1 抗体 E11 V _H aa	78	S2 V _H CDR2 aa
27	抗 HMG1 抗体 E11 V _H nt	79	S2 V _H CDR3 aa
28	HMG1 B-框 肽 aa 91-169	80	S6 V _L CDR1 aa
29	HMG1 B-框 肽 aa 150-183	81	S6 V _L CDR2 aa
30	抗 HMG1 抗体 G2 V _L aa	82	S6 V _L CDR3 aa
31	抗 HMG1 抗体 G2 V _L nt	83	S6 V _H CDR1 aa
32	抗 HMG1 抗体 G2 V _H aa	84	S6 V _H CDR2 aa
33	抗 HMG1 抗体 G2 V _H nt	85	S6 V _H CDR3 aa

[0334]

34	抗 HMG1 抗体 G9 V _L aa	86	S16 V _L CDR1 aa
35	抗 HMG1 抗体 G9 V _L nt	87	S16 V _L CDR2 aa
36	抗 HMG1 抗体 G9 V _H aa	88	S16 V _L CDR3 aa
37	抗 HMG1 抗体 G9 V _H nt	89	S16 V _H CDR1 aa
38	抗 HMG1 抗体 G12 V _L aa	90	S16 V _H CDR2 aa
39	抗 HMG1 抗体 G12 V _L nt	91	S16 V _H CDR3 aa
40	抗 HMG1 抗体 G12 V _H aa	92	G4 V _L CDR1 aa
41	抗 HMG1 抗体 G12 V _H nt	93	G4 V _L CDR2 aa
42	抗 HMG1 抗体 G16 V _L aa	94	G4 V _L CDR3 aa
43	抗 HMG1 抗体 G16 V _L nt	95	G4 V _H CDR1 aa
44	抗 HMG1 抗体 G16 V _H aa	96	G4 V _H CDR2 aa
45	抗 HMG1 抗体 G16 V _H nt	97	G4V _H CDR3 aa
46	抗 HMG1 抗体 G20 V _L aa	98	E11 V _L CDR1 aa
47	抗 HMG1 抗体 G20 V _L nt	99	E11 V _L CDR2 aa
48	抗 HMG1 抗体 G20 V _H aa	100	E11 V _L CDR3 aa
49	抗 HMG1 抗体 G20 V _H nt	101	E11 V _H CDR1 aa
50	抗 HMG1 抗体 G34 V _L aa	102	E11 V _H CDR2 aa
51	抗 HMG1 抗体 G34 V _L nt	103	E11 V _H CDR3 aa
52	抗 HMG1 抗体 G34 V _H aa		

[0335] ^a 核苷酸序列称为“nt”，氨基酸序列称为“aa”。

[0336] 6. 实施例

[0337] 现参考以下实施例描述本发明。给予这些实施例仅是为说明的目的，本发明不应理解为局限于这些实施例，而应理解为包括因本文的说明而显而易见的任何及所有改变形式。

[0338] 6.1 实施例 1

[0339] 人抗 HMG1 抗体的产生和物理特征鉴定

[0340] 通过用人 HMG1 (SEQ ID NO :1 和 2, 也可参见图 1) 进行几轮淘选从原初人 Fab 噬菌体展示文库中分离出一大组人抗 -HMG1 抗体。测序各克隆以除去重复的克隆, 将 Fab 片段亚克隆入表达载体来产生全长 IgG。序列表给出了几种抗体克隆 (G2、G4、G9、G12、G16、G20、G34、G35、S2、S6、S10、S12、S14、S16、S17 和 E11) 的轻链和重链可变区的核苷酸序列和相应的氨基酸序列 (具体 SEQ IDNO 见表 3)。图 2 代表了由美国模式培养物保藏所保藏 (保藏号分别是 PTA-6142、PTA-6143、PTA-6259 和 PTA-6258) 的几种抗体克隆 (S2、S6、S16 和 G4) 的重链和轻链可变区。图 2 也显示了抗 -HMG1 抗体 E11 的重链和轻链可变区。所述各抗体的 CDR 在图 2 中以下划线标出, 见序列表 (具体 SEQ ID NO 可参见表 3)。如下所述纯化得到的全长抗体并测定它们的物理特性。如表 1 所总结的, 这些分析显示产生的人抗 -HMG1 抗体显示特征范围很大。

[0341] 6.1.1 材料与方法

[0342] 分离人抗 -HMG1 抗体: 通过三轮下述淘选来筛选人 Fab 噬菌体展示文库 (Dyax, 剑桥, 马萨诸塞州): 第 1 天. I) 用以 0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 配制的 20 μg/ml 全长 HMGB-1 包被免疫试管 (immunotube)。4°C 静置过夜。第 2 天. I) 采用 100 倍噬菌体作为文

库大小。加入 1/5 体积的 PEG6000 (20%)。置于冰上 1 小时。14000rpm 离心 10 分钟。悬浮于 PBS (pH7.4) 中以沉淀噬菌体文库。II) 用 2% 牛奶 /PBS 封闭抗原包被的免疫试管和噬菌体。然后用 PBS2× 清洗免疫试管, 将噬菌体转移至免疫试管, 旋转混合 30 分钟, 然后再静置培育 1.5 小时。III) 用 PBST (PBS+0.1% 吐温 20) 洗涤免疫试管 10-20 次, 然后用 PBS 洗涤 10-20 次, 用 1ml 的 100mM 三乙胺洗脱噬菌体。用 0.5ml 的 1M Tris-HCl (pH7.5) 中和洗脱的噬菌体。IV) 混合 1 体积洗脱的中和噬菌体和 5 体积对数阶段的 TG1 及 4 体积 2YT。37°C 培育 30 分钟 (水浴)。离心收集受感染的细胞, 重悬在 2YT 中, 接种于含有羧苄青霉素和 2% 葡萄糖的 2YT 琼脂上。

[0343] 人抗-HMG1 寡克隆的表达和单克隆抗体: 第三轮淘选后提取几个细菌库的质粒。然后从质粒上切下 Fab 基因片段, 将其插入受 CMV 启动子控制的 IgG 表达载体中。将含 Fab 片段的 IgG 表达载体质粒瞬时转染入 293H 细胞, 使生长培养液通过 A 蛋白柱得到纯化的寡克隆抗体。检测寡克隆抗体各库对 HMG1 的反应性。进一步筛选检测阳性的那些库来鉴定各阳性克隆。

[0344] 等电聚焦凝胶电泳: 利用装有多种温度 3 个冷藏槽再循环部件和 EPS3501XL 电源的 Pharmacia Biotech Multiphor2 电泳系统测定等电点。将 5 μg 蛋白质加载于预浇铸的 ampholine 凝胶上 (Amersham Biosciences, pI 范围 2.5-10)。利用宽范围 pI 标记标准品 (Amersham, pI 范围 3-10, 8 μL) 测定 Mab 的相对 pI。用 1500V, 50mA 进行电泳 105 分钟。用纯水稀释至 1× 的 Sigma 固定溶液 (5×) 固定凝胶。在室温用 Simply 蓝染色剂 (Invitrogen) 染色过夜。用 25% 乙醇、8% 乙酸和 67% 纯水组成的溶液脱色。用 Bio-Rad 光密度计相对于标准品的校验曲线测定等电点。

[0345] 示差扫描量热法: 用 VP-DSC (MicroCal, LLC) 以 1.0°C / 分钟和 25-120°C 温度范围检测热解链温度 (T_m)。采用 8 秒过滤时间联同 5 分钟的预扫描恒温处理 (thermostating)。利用 Pierce 透析杯 (3.5kD) 以 25mM 组氨酸-HCl, pH6 透析来制备样品。通过 A_{280} 检测到平均 Mab 浓度是 50 μg/mL。利用该系统提供的原创软件, 按照生产商的方法测定解链温度。简言之, 利用样品和参比小室的缓冲液运行多根基线以建立热平衡。从样品差示热分析图中扣除基线后, 采用解卷积功能将数据按照浓度标准化并拟合。

[0346] 6.1.2 结果

[0347] 从一个噬菌体展示文库中分离了超过 35 个单独的 Fab 克隆, 其中 18 个转变为全长 IgG1 并从瞬时转染 (物) 中纯化。随后对这些克隆的分析显示它们的特征范围很大。例如, 它们显示解离常数 (K_d) 介于高值约 330nM- 低值恰好 22nM 之间 (总结于表 1)。表明稳定性的 T_m 值范围从低值恰好约 70°C - 高值约为 90°C (图 3B 和 3C)。表明抗体溶解性的 pI 值也显示宽范围, 其中抗体 pI 值为 7.8-9.0 (图 3A 和 3C)。在许多体外和体内研究中筛选具有各种特征的抗体 (见下文) 来测定其最理想的特征组合。此外, 可利用大量的其它克隆来进一步筛选。

[0348] 6.2 实施例 2

[0349] 人抗-HMG1 抗体的动力学分析

[0350] 采用各种技术检测了几种人抗-HMG1 抗体的结合动力学和特异性。此外, 利用几种肽极性表位作图研究。如表 1 所总结的, 这些分析显示所述人抗-HMG1 抗体具有不同结合动力学和特异性。另外, 数据表明抗-HMG1 抗体能与包括 HMG1B- 框和 A- 框在内的各种

表位结合。

[0351] 6.2.1 材料与方法

[0352] 重组 HMG1 的制备 / 分离:以钙调蛋白结合蛋白 (CBP) 融合蛋白 (CBP 与 HMGB1 的 N- 末端相融合) 从大肠杆菌中分离得到重组 HMG1。表达 CBP-HMG1 的大肠杆菌培育 2-3 小时,在 25mM Tris-HCl,150mM NaCl,2mM CaCl_2 ,pH8.0 中通过微流化释放该蛋白。裂解的细胞以 $125,000 \times g$ 离心 1 小时,在有 CaCl_2 存在下将过滤的上清液施加于钙调蛋白柱上。用 2-2.5 柱体积的裂解缓冲液洗涤柱,然后用 5 倍柱体积的线性梯度增加至 50mM Tris,400mM NaCl,2 mM CaCl_2 ,pH8.0 洗涤,蛋白质用 100mM Tris,400mM NaCl,5mM EGTA,pH8.0 洗脱。用 TritonX114 提取除去内毒素。所用 TX-114 的终浓度为 2%,4℃ 培育 30 分钟,转移至 37℃ 培育 30 分钟,离心分相。蛋白质提取两次。

[0353] 制备三种形式的天然 HMG1:按照 ATCC 的方法用含 10% FBS 的 DMEM 中培养 293H 细胞 (ATCC 号 CRL-1573,人肾,上皮),从中制备核 HMG1。室温在 1 分钟内加入胰蛋白酶 / EDTA 收集 80% 汇合的细胞。用 PBS 轻柔冲洗培养瓶然后 1100rpm 离心 3 分钟立即回收细胞。用 PBS 洗涤细胞两次,将其转移至 2mL eppendorf 管,用 PBS 配制为终浓度约 $2-5 \times 10^7$ / ml,然后在液氮中冷冻 2 分钟,再于室温在水浴中融化 5-10 分钟。冻融步骤重复两次以上。13,000rpm 离心裂解的细胞,将上清液转移至新的无菌试管,-70—-80℃ 保存。上清液的用量根据冻融前上清液的细胞浓度而定。

[0354] 从坏死的 293H 细胞的条件培养液中制备释放的 HMG1。293H 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中培养 10 天,不更换培养基。从培养瓶中收集培养基,3000rpm 离心 10 分钟,使上清液通过 0.2 μm 滤器后置于透析袋中用浓缩液 (PIERCE) 透析。如果需要可更换浓缩液直至培养液的体积减少约 10 倍。然后用 PBS (pH7.2) 透析浓缩的培养液。用纯化的 HMGB1 作为标准品通过夹心 ELISA (见下文) 测定浓缩样品中 HMGB1 的浓度。

[0355] 按照 ATCC 的方法用含 10% FBS、0.05mM 2- 巯基乙醇的 RPMI1640 (Cat#03-0078DJ) 中培养 THP-1 细胞 (ATCC 号 TIB-202,人单核细胞),从中制备活化的 HMG1。用 0.5ug/ml 终浓度的 LPS 处理细胞过夜 (14-16 小时) 后,细胞达到约 4×10^5 个细胞 /ml。1,100rpm 离心 3 分钟收集细胞,用 PBS 洗涤三次以完全除去含 LPS 的培养液,将其转移至 2ml eppendorf 试管,PBS 配制为终浓度约 $2-5 \times 10^7$ /ml,然后在液氮中冷冻 2 分钟,再于室温在水浴中融化 5-10 分钟。冻融步骤重复两次以上。13,000rpm 离心裂解的细胞,将上清液转移至新的无菌试管,-70—-80℃ 保存。上清液的用量根据冻融前上清液的细胞浓度而定。

[0356] 用 BIAcore 分析 HMG1 结合亲和力:所有实验用 BIAcore3000 仪器 (BIAcore, Inc., Piscataway, 新泽西) 进行。简言之,采用标准的胺偶联化学法将各 mAb 固定在 CM5 传感器芯片上。也分别制备了参比 (对照) 流式小室。用仪器缓冲液配制的 HMG1 两倍连续稀释液以低流速依次注射到各 mAb 和参比 流式小室表面上。HMG1 结合和解离后,用 1M NaCl-50mM NaOH 作简单脉冲再生 mAb 表面。各实验结束时,利用 BIAcore, Inc. (Piscataway, 新泽西) 提供的 BIA 评估软件的稳态模型评估结合曲线。这些研究所测定的 K_d 值见表 1。

[0357] 直接 ELISA (固定 HMG1):4℃ 用 PBS 配制的 5 μg /ml HMGB-1 包被 96- 孔免疫平板 (EIA/RIA 平板,高结合,Costar) 各孔过夜。然后在 37℃ 用溶解于 PBS 的 4% 奶粉封闭该平板 1 小时。除去封闭液,替换为各种浓度的人抗-HMG1 抗体 (参见图 4A)。洗涤 (ELX-405 平板洗涤器,BIO-TEK) 平板,加入终浓度 1:125,000 的第二抗体 (抗-人 IgG-HRP,PIERCE),

37℃ 1 小时。用 Sureblue HRP 底物 (KPL) 检测 HRP 活性。利用 Kinetic Microplate Reader (动力学微板读数器) (Molecular Devices) 读取平板的 450nm 读数。数据总结于表 1, 代表性的结合曲线见图 4A 和 D。

[0358] 夹心 ELISA (可溶性 HMGB1): 用 PBS (pH7.2) 配制的 10 μg/ml 抗人 IgG Fc 包被免疫平板 (EIA/RIA 平板, 高结合, Costar), 4℃ 培育过夜。除去包被试剂, 用 PBS 简单清洗各板。然后在 37℃ 用 4% 牛奶封闭各平板 1 小时, 用 PBS 清洗。用 4% 牛奶稀释抗-HMGB1 抗体。对于连续稀释, 使用 20 μg/ml 起始浓度的抗体。然后将稀释的抗-HMGB1 抗体加入板中, 37℃ 培育 1 小时。随后用 PBST (PBS/0.1% 吐温 20) 洗涤平板 10 次, 37℃ 与用 4% 牛奶配制的抗原 (HMGB1, 2 μg/ml; 或 0.7 μg/ml 的天然 HMGB1) 培育 1 小时。然后洗涤平板 10 次, 37℃ 与用 4% 牛奶配制的小鼠抗-HMGB1 (1 μg/ml) 培育 1 小时。洗涤平板 10 次, 37℃ 与 1:1000 的抗小鼠 IgG-HRP 培育 1 小时。洗涤平板后显色。用 Sureblue HRP 底物 (KPL) 检测 HRP 活性。用 Kinetic Microplate Reader (动力学微板读数器) (Molecular Devices) 读取平板的 450nm 读数。数据总结于表 1, 代表性的结合曲线见图 4B-D。

[0359] BIAcore 分析抗体 HMGB1 的结合竞争力: 所有实验用 BIAcore3000 仪器 (BIAcore, Inc., Piscataway, 新泽西) 进行。如 BIAcore 手册 (BIAcore, Inc., Piscataway, 新泽西) 所述, 用标准的胺偶联化学法将 HMGB-1 蛋白质固定在 CM5 传感器上。简言之, CM5 表面经 NHS/EDC 活化。活化后, 将浓度为 100nM 或 200nM (10mM NaOAc, pH4 配制) 的 HMGB-1 注射到表面至表面密度介于 1100-1200RU 之间。然后注射 1M 乙醇胺给传感器芯片表面上未反应位点“加帽”。为参比目的, 也采用与固定 HMGB-1 所用相同的方法制备了空白流式小室, 但无任何配体。

[0360] 制备 1μM 和 2μM 的 mAb G2、G4、G9、S6 和 Synagis。所有 mAb 溶液用 HBS-EP 缓冲液 (BIAcore, Inc., Piscataway, 新泽西) 制备。每轮开始时以 1 μM 注射第一 mAb 100 μL, 然后注射两种 mAb (两倍浓度) 的 1:1 混合物 100 μL, 使混合物中各 mAb 组分的终浓度与第一次注射相等。每轮注射后, 用 10mM HCl 脉冲 1 分钟再生 HMGB-1 表面。

[0361] 一旦收集了整组, 记录每轮注射后各 mAb 的最大 RU 反应。然后利用这些反应计算各 mAb 的平均反应水平。再用该平均结合反应计算用第一 mAb 饱和后与 HMGB-1 表面结合的各 mAb 百分比。可综合利用这些结合/封闭模式来测定 mAb 是否与 HMGB-1 上的无关或相关位点结合。这些数据总结于表 1。

[0362] 与 HMGB1 或 HMGB2 结合: 用磷酸缓冲盐水 (PBS), pH7.2 配制的 5 μg/mL 小牛胸腺 HMGB1 或 HMGB2 液包被超高-结合 ELISA 平板 (ThermoLab systems, 3855 号), 4℃ 培育过夜。用不含 Ca 和 Mg 的 PBS 洗涤各平板, 向各孔中加入 100 微升用 10mM PBS, pH7.2+1% 牛血清白蛋白 (BSA) 稀释至 10ug/mL 终浓度的抗-HMGB1 抗体, 室温培育各平板 1 小时。用 100 μl PBS, pH7.2 洗涤各孔三次。用 10mM PBS+1% BSA 将 HRP 标记的山羊-抗-人 IgG κ-链 (KPL, 14-10-10 号) 和山羊-抗-人 IgG λ-链 (KPL, 14-10-11 号) 稀释 1000 倍, 将 100 μl 加入各孔, 室温培育 1 小时。然后用 100 μl PBS, pH7.2 洗涤各孔三次。按照生产商的使用说明书制备 OPD 底物 (Pierce chemical company, 34006 号), 将 100 μl 制备的底物加入各孔, 室温闭光培育各平板 20-30 分钟。加入 100 μl 12MH₂SO₄ 终止反应, 利用平板读数器读取各平板 490nm 波长的读数。许多抗体的 OD 值见图 4E, 总结于表 1。

[0363] HMGB1B 框肽作图: 用 PBS 配制的 10 μg/ml HMGB1B 框肽氨基酸 91-169 (图 5A) 或氨

氨基酸 150-183(图 5B) 包被 96-孔免疫平板(EIA/RIA 平板,高结合, Costar) 的各孔, 4°C 培育过夜。然后在 37°C 用溶解于 PBS 的 4% 奶粉封闭平板 1 小时。除去封闭溶液, 替换为各种浓度的人抗 -HMG1 抗体(参见图 5A-B)。洗涤(ELX-405 平板洗涤器, BIO-TEK) 平板后加入终浓度 1:125,000 的第二抗体(抗-人 IgG-HRP, PIERCE), 37°C 1 小时。用 Sureblue HRP 底物(KPL) 检测 HRP 活性。利用 Kinetic Microplate Reader(动力学微板读数器)(Molecular Devices) 读取平板的 450nm 的读数。

[0364] 6.2.2 结果

[0365] ELISA 研究显示检测的大多数抗体能与固定的 rHMG1 结合(图 4A)。然而, 在该试验中, 观察到能与固定的和可溶性 rHMG1 都结合的大多数抗体 E11、G34 和 G20 与可溶性 rHMG1 的结合较好, 而 S10、S12、S16 和 G16 与固定的 rHMG1 结合略好(图 4D, 数据未显示)。测试的许多抗体显示与 rHMG1 或一种或多种天然形式 HMG1 结合有某种偏好(总结于表 1, 也参见图 4B-C)。例如, S16 与重组和天然 HMG1 均能结合, 而 G4 与天然 HMG1 结合较好, S2、S6 和 S10 均显示与 rHMG1 结合较好(图 4B)。令人感兴趣的是, 虽然 S6 与 HMG1 的任何天然形式结合不佳, 但其确实显示与释放的 HMG1 有一定结合(图 4C, 左上图)。S16 和 G4 显示与 HMG1 的各种天然形式结合差异很小(图 4C, 右上和左下图)。此外, 测试了抗体对高度相关 HMG2 蛋白的交叉反应性。E11、S12 和 S16 均显示与 HMG2 有一定结合。令人感兴趣的是, 当抗原固定时, 在本文所用的条件下 E11 显示与 HMG2 的结合优于 HMG1。

[0366] 利用对几乎所有抗体的 BIAcore 分析测定各抗体对重组 HMG1(rHMG1, 见表 1) 的 K_d 。通过 BIAcore 竞争试验分析几种抗体(G4、G9、S2 和 S6) 显示这些抗 -HMGB1 抗体似乎能与相同位点或高度相关也许重叠的多个位点结合(见表 1),

[0367] 对几种抗 -HMG1 抗体(S2、S6、S10、G2、G4、G9、S12 和 S16) 进行了作肽图研究来测它们定与 HMG1B 框的结合。如图 5A-B 所示, G4、S12 和 S16 能与 HMG1 肽 91-169 结合(图 5A), 而 S12 只能与 HMG1 肽 150-183 结合(图 5B)。此外, 发现 E11 能识别 HMG1A-框(数据未显示)。

[0368] 总之, 分离的人抗 -HMG1 抗体显示宽泛的结合特征, 其中一些能与所有形式的 HMG1 结合(例如, S16), 而其它能区分重组形式和天然形式(例如, S10 和 S2)。它们也能与包括 A- 和 B- 框在内的不同表位结合。选择几种人抗 -HMG1 抗体用于许多其它体外和体内实验(见下文)。

[0369] 6.3 实施例 3

[0370] 抗 -HMGB1 抗体抑制人 PBMC 释放细胞因子

[0371] 测定了一组人抗 -HMG1 抗体抑制 HMG1 诱导人外周血单核的细胞(PBMC) 释放细胞因子的能力。检测了对以下细胞因子的作用: IL-12、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6。许多抗 -HMG1 抗体能抑制 HMG1 诱导一种或多种这些细胞因子释放。此外, 测定到 HMG1 能刺激 NO 释放, 而抗 HMG1 的抗体能抑制这种释放。也证明几种人抗 -HMG1 抗体能降低小鼠巨噬细胞中 HMG1 诱导的细胞因子基因表达。

[0372] 6.3.1 材料与方法

[0373] 抑制细胞因子释放: 通过密度梯度离心从健康志愿者的外周血中分离人外周血单核的细胞(PBMC)。将新鲜提取的肝素化全血与两倍体积的 PBS 混合。将稀释的血液轻柔叠放在 Histopaque-1077(Sigma-Aldrich) 表面上, 室温下以 400 \times g 离心 30 分钟。收集介

于血浆和密度梯度液之间界面的 PBMC。PBS 许多 3 次后,将纯化的 PBMC 重悬于含 100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 50 μ M β -巯基乙醇的 RPMI-1640 培养基 (GIBCO BRL) 中。向 96-孔细胞培养平板的各孔中加入 1×10^5 个细胞。

[0374] 37°C, 5% CO₂ 培育 PBMC 2 小时。向各孔中加入 4 μ g/ml 重组 HMGI 或 2.4×10^5 个 LPS 刺激的 THP-1 细胞的天然活化 HMGI, 和不同浓度的人抗 -HMGB-1 单克隆抗体, RAGE-Fc 融合蛋白或 HMGI α - 框 -Fc 融合蛋白。培养基补加了 8U/ml (1 μ g/ml) 硫酸多粘菌素 B (Sigma-Aldrich) 以抑制可能的内毒素。来自同一供体但未用 HMGI 刺激的 PBMC 用作对照。14 小时后收集不含细胞的培养液, 保存于 -20°C。

[0375] 利用的 Upstate by Luminex100 (Luminex Corp.) 的 Beadlyte 人多价细胞因子弹性试剂盒分析培养液的炎性细胞因子。检测用重组 HMGI 刺激细胞的促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-12(p40)。此外, 检测用天然活化的 HMGI 刺激细胞的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-8。

[0376] 细胞因子释放数据以一式三份实验的平均值 \pm 标准偏差表示。抗 -HMGB1 单克隆抗体的 IC₅₀ 定义为产生半数最大抑制 HMGB1 刺激的 PBMC 释放细胞因子所需的抗体浓度。其利用 PRISM 程序计算。

[0377] 抑制 NO 释放: NO 试验所用的巨噬细胞包括得自 C57BL/6 小鼠的 RAW 细胞 (小鼠巨噬细胞细胞系) 以及骨髓衍生的巨噬细胞 (mBMMf)。在有 M-CSF 存在下培养三天成熟后用 mBMMf (“新鲜的 mBMMf”)。将该细胞以 10^5 个细胞 / 孔接种于 96-孔板中, 在 100 μ l 无血清培养基中用 HMGI 刺激过夜。各种浓度的 HMGB-1 (5 μ g/ml) 和 LPS (1 μ g/ml) 用作阳性对照来刺激巨噬细胞产生 NO; 用这些刺激观察剂量依赖性反应。以 4:1 的摩尔比测试抗 HMGI 抗体。第二天, 以 1500rpm 离心各板 5 分钟, 收集上清液。在另一 96-孔板中混合以下成分: 50 μ l 刺激的上清液和标准品 (用培养基稀释)、25 μ l NADH、25 μ l 硝酸盐还原酶、50 μ l Griess 试剂 I, 平板在 37°C 培育 30 分钟。然后向各孔中加入 50 μ l Griess 试剂 II, 室温培育平板 10 分钟。读取各孔 540nm 的吸光度, 根据标准曲线计算硝酸盐数值。

[0378] 用 HMGI 刺激小鼠巨噬细胞 (mM ϕ) 的 Taqman 分析: 通过冲洗正常 C57BL/6 小鼠的股骨收集小鼠骨髓。然后在补加了 10% 胎牛血清 (FBS) 和 50ng/ml M-CSF 的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) 中培养分离的骨髓细胞 24 小时, 收集不粘附细胞, 在 T-75 培养瓶 (1×10^7 个细胞 / 15ml / 瓶) 中利用补加了 10% FBS 和 50ng/ml M-CSF 的完全 DMEM 培养 6 天。在第 6 天收集粘附细胞, 其与 5ng/ml MCSF 再接种入 96-孔板 (1×10^5 个细胞 / 200 μ l / 孔) 中含 10% FBS 的 α -MEM 中培养过夜。

[0379] 将培养基更换为 α -MEM, 培育 2 小时, 然后刺激饥饿细胞。在室温将 HMGB1 (大肠杆菌产生的重组 CBP-HMGB1 融合蛋白, 10 μ g/ml)、小鼠 -RAGE-Fc 或人 -RAGE-Fc 融合蛋白和 α -MEM 配制的 100 μ g/ml 各种阻断试剂预先混合 20 分钟, 然后向细胞中加入 100 μ l 此混合物, 37°C 培育 2 小时。然后除去上清液, 用 Ambion 的 MagMAX™-96 总 RNA 分离试剂盒提取 RNA。用 SuperScript™ III 和寡聚 (dT) 引物 (Invitrogen) 将所有回收的 RNA 用于逆转录酶 (RT) 反应来合成 cDNA。利用 ABI Prism7700 或 7000 将 1 μ l 或 2 μ l 得到的 cDNA 用于实时定量 PCR 分析 (TaqMan)。

[0380] 6.3.2 结果

[0381] 图 6A-B 显示了几种抗体的代表性 HMGI- 诱导细胞因子释放滴定曲线。计算所检

测各抗体的 IC_{50} 值（见表 1）。也测试到少数抗体能阻断天然活化的 HMG1（得自 LPS 刺激的 THP-1 细胞，见上文）。E11、S16 和 S17 连同 RAGE-Fc 融合蛋白能阻断天然活化的 HMG1 诱导 IL-6 释放，而 S6、S13、G4 和 G9 效力较低（图 6C）。这些研究和未显示数据的许多其它研究的结果总结于表 1。几种抗体看来明显能在低抗体浓度抑制细胞因子释放。迄今为止检测的抗体中，S6 是 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 NO 释放的最佳抑制剂，而 G4 是 IL-12 的最佳抑制剂。应注意已检测的所有抗体不都能抑制所有细胞因子释放。也检测到少数抗体在分离的小鼠巨噬细胞（mM ϕ ）中能抑制 rHMG1- 诱导的细胞因子基因表达。E11、G2 和 G4 也能明显降低 HMG1- 诱导的 IL-1b 基因表达（图 7，左图和表 1）。G2 也能明显降低 HMG1- 诱导的 TNF- α 基因表达（图 7，右图和表 1）。选择几种抗体作进一步分析以测定它们对 HMG1 与细胞表面受体结合的作用。

[0382] 6.4 实施例 4

[0383] 抗-HMG1 抗体阻断 HMG1 与细胞表面受体的结合

[0384] RAGE 和 TLR4 均已鉴定为 HMG1 的假定受体。为证明人抗-HMG1 抗体能阻断 HMG1 与一种或多种这些假定受体相互作用，在 ELISA 试验中检验了几种人抗-HMG1 抗体能否阻断 HMG1 与 RAGE-Fc 融合体结合（图 8）和 / 或它们在细胞受体系统中能否阻断 HMG1- 诱导 TLR4 激活（图 9）。此外，也证明人抗-HMG1 抗体能特异性阻断 HMG1 与 THP-1 细胞的细胞表面结合（图 10）。

[0385] 6.4.1 材料与方法

[0386] HMG1 与 THP-1 细胞结合：用 PerkinElmer 的 Eu- 标记试剂盒标记重组大鼠 HMGB-1。HMGB-1 与 Eu 的摩尔比是 1:5。按照 ATCC 方法培养 THP-1。收集细胞，将其以 1×10^6 /ml 的浓度悬浮在含有 $1 \times$ DELFIA L*R 结合缓冲液 (PerkinElmer)、50% DELFIA 稳定剂 (PerkinElmer) 和 0.05% 叠氮钠的试验缓冲液中。将 100μ l 细胞 (1×10^5) 加入 96 孔细胞培养平板的各孔中。4 $^{\circ}$ C 轻摇培育平板 1 小时。将含 2nM 铕标记的 HMGB-1 的试验缓冲液与各种浓度的 (333、166.5、83.25、41.6、20.8、10.4 和 5.2nM) 人抗-HMGB1 抗体 E11 或 G2 或可溶性人 RAGE-Fc 混合，向各孔中分别加入 100μ l 该混合液。4 $^{\circ}$ C 轻摇培育 1 小时后，1200rpm 离心 5 分钟用 $1 \times$ L*R 洗涤缓冲液 (PerkinElmer) 洗涤细胞四次。向各孔中加入 200μ l 增强溶液以解离和增强 Eu 发出的 615nm 荧光。用 Wallac Victor 荧光计检测荧光。试验以一式三份进行，人抗体 R3-47 用作阴性 同种型对照。

[0387] 通过 ELISA (检测) HMG1 与 RAGE-Ig 结合：向 ELISA 平板的各孔中以 50μ l/ 孔加入 PBS 配制的 5μ g/ml RAGE-Fc 融合蛋白，4 $^{\circ}$ C 培育过夜。然后在 37 $^{\circ}$ C 用 200μ l 5% 牛奶封闭平板 1 小时，用 PBS/ 吐温洗涤三次。（加入） 50μ l/ 孔稀释的 HMGB1。对于剂量曲线，HMGB1 浓度始于 PBS 配制的 4μ g/ml。为（检测）抗体阻断，预先在另一平板中培育 HMGB1 与人抗-HMG1 抗体或缓冲液，然后转移至 RAGE- 包被的平板。然后在室温培育各平板 2 小时，洗涤三次。为检测与固定的 RAGE-Fc 结合的任何 HMG1，向各孔中加入 1μ g/ml 生物素化小鼠抗-HMG1mAb (10D4、4H11、3E10 和 5C12) 抗体 (Ab)，总 Ab 为 4μ g/ml，室温培育平板 1 小时。然后洗涤平板，向各孔中加入链霉亲和素-HRP，培育 15 分钟。然后洗涤平板三次，拍干。加入 100μ l TMB 显色液，读取板 650nm 读数。数值计算为单用 HMG1 抑制（等于 0% 抑制）的百分比。图 9 和表 1 所总结的数据表示两次独立实验的平均值。

[0388] TLR4 激活试验：将稳定表达 HuTLR4 和 CD14 的 293 细胞 (Invitrogen) 以 2×10^4 /

孔接种于 96 孔板中含 10% FCS 的 100 μ l DMEM 中,过夜。然后如试剂盒所示用 NF- κ B/Luc(Stratagene) 萤光素酶报道构建物转染细胞 24 小时。以 100 μ l/孔向细胞中加入 HMGB1 和抗-HMGB1 的混合物,过夜。然后检测萤光素酶活性以反映 TLR4 激活 (Promega)。

[0389] 6.4.2 结果

[0390] 这些研究证明在测试条件下几种测试的抗体 (例如,G2、G4、S10、S16、S2 和 S6) 抑制了 HMGB1 与 RAGE 结合至少 35%,两种测试的抗体, G2 和 G4 抑制了结合约 75% (图 8 和表 2)。几种抗体 (例如, G9、G12、G16、S14 等,见表 1) 不抑制 RAGE 结合。E11 和 G20 能抑制 HMGB1 激活 TLR4 (图 9 和表 1)。此外,E11 和 G2 人抗-HMGB1 抗体均能阻断 HMGB1 和 THP-1 细胞结合 (图 10 和表 1)。迄今为止用两种试验测试的抗体中无一显示能同时阻断 RAGE 结合与 TLR4 激活。然而,E11 能阻断 TLR4 激活和 HMGB1 与 THP-1 细胞结合。选出几种抗体作进一步分析以测定它们在体内对炎性反应的作用 (见下文)。

[0391] 实施例 5

[0392] 抗-HMGB1 抗体在盲肠结扎和穿孔 (CLP) 模型中抑制脓毒症

[0393] 为证明人抗-HMGB1 抗体能抑制脓毒症的致死率,我们建立了小鼠脓毒症并监测了几种抗体治疗方案的存活率。对小鼠进行导致多种微生物腹膜炎和脓毒症的盲肠结扎和穿孔 (CLP),这是通过对外科手术形成的盲肠憩室穿孔导致脓毒症的特征充分鉴定的模型 (Fink 和 Heard,同上;Wichmann 等,同上;和 Remick 等,同上)。将用几种人抗-HMGB1 抗体治疗小鼠的存活率与用同种型对照抗体治疗小鼠的作比较。几种人抗-HMGB1 抗体,包括 G4、S6 和 S16 在 CLP 模型中证明有明显保护作用 (图 11A-D 和表 1)。

[0394] 6.4.3 材料与方法

[0395] 脓毒症中的抗-HMGB1:为建立活的腹腔内感染和脓毒症,如上所述对 Balb/C 小鼠 (每组 9-11 只) 实施 CLP 方法 (Fink 和 Heard,1990, J Surg Res, 49:186-196;Wichmann 等,1996, J Surg Res, 65,109-114)。肌肉内注射氯胺酮 (75mg/kg, Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, IA) 和甲苯噻嗪 (20mg/kg, Boehringer Ingelheim) 麻醉后,作 15-mm 中线切口暴露盲肠。距尾端 5.0mm 结扎后,用 22-号针头穿刺盲肠端部一次,挤出少量粪便 (1-mm 长)。将盲肠放回其正常腹腔内位置,利用两层连续缝合闭合伤口。手术 30 分钟后,所有动物接受盐溶液 (0.9% 皮下, 20ml/kg 体重) 复苏和一剂量抗生素 (每只小鼠皮下注射 200 μ l 无菌盐水配制的 0.5mg 亚胺培南) (Primaxin, Merck)。

[0396] 在手术后 24 和 48 小时腹膜内给予抗-HMGB1 抗体或同种型对照抗体 (50 μ g/小鼠, 200 μ l 体积)。在某些后续实验中,在手术后 24 小时腹膜内给予抗-HMGB1 抗体或同种型对照抗体 (8mg/kg) (图 11C-D)。这些实验采用盲法,外科医师随机分笼,而由另一研究人员给予编号的抗体。每日两次监测小鼠的存活率,共 14 天。图 11A 和 11B 显示术后 24 和 48 小时以 50 μ g/小鼠递送抗体的几次代表性实验的存活率曲线。图 11C 显示手术后 24 小时以 8 μ g/kg 递送抗体的几次代表性实验联合得到的存活率曲线。测试了手术后 24 小时以 8mg/kg 给予的其它几种抗体和寡克隆抗体库 (图 11D)。

[0397] 6.4.4 结果

[0398] 这些研究证实人抗-HMGB1 抗体被动免疫垂危脓毒症小鼠具有保护作用。具体地说,人抗-HMGB1 抗体 S6、S16、E11 和 G4 在 CLP 模型中具有保护作用 (见图 11A-D)。在几项研究中,第 9 天的存活率优于第 14 天的 (图 11B)。长期存活率的这种差异可能是因为人

抗体在小鼠系统中半衰期降低。然而,用人抗-HMG1 抗体治疗的大多数小鼠不仅延迟了死亡,而且对致命的脓毒症赋予了完全的保护作用。抗-HMG1 抗体 S6 在此模型中得到最广泛研究,其在许多实验中可再现地提供至少 30%的保护作用(代表性累积数据见图 11C)。

[0399] 6.5 实施例 6

[0400] HMG1 在几种炎症病症动物模型中上调

[0401] 在人脓毒症/脓毒症休克期间血清 HMG1 水平显示升高。我们检测了许多炎症疾病的不同动物模型中 HMG1 蛋白和/或基因表达的水平,包括几种关节炎模型、急性肺损伤和腹膜炎(模型)。在迄今为止检测的所有模型中,我们发现 HMG1 水平随疾病进展而升高。此外,发现几种细胞因子和/或假定的 HMG1 受体分子的水平也升高。

[0402] 6.5.1 材料与方法

[0403] 诱导炎症性疾病:诱导各疾病模型所用方法的详述请见下文。检测了诱导疾病而未治疗动物的 HMG1 和各种细胞因子水平,与正常动物作比较。

[0404] 被动 CIA 小鼠的 HMG1 水平:在第 10 天收集正常或被动 CIA 小鼠的前爪,液氮快速冷冻,-80℃保存直至检测。将关节样品和裂解缓冲液加入预先装有专用裂解基质 A 颗粒(Q biogene)的耐冲击 2ml 试管中。用 FastPrep® 匀浆器匀浆关节,然后离心。收集上清液,采用 MesoScale 技术(Meso Scale Discovery)通过 ELISA 测定 HMG1 水平。图 12A 所示数据是各组 5 只爪子的平均值。

[0405] 主动 CIA 小鼠的 Taqman 分析:在第 35 天收集正常或主动 CIA 小鼠的前爪和后爪,液氮快速冷冻,-80℃保存直至检测。将关节样品和裂解缓冲液加入预先装有专用裂解基质 A 颗粒(Q biogene)的耐冲击 2ml 试管中。用 FastPrep® 匀浆器匀浆关节,按照生产商的使用说明书利用 Qiagen RNA 酶迷你试剂盒或 RNA STAT-60 从匀浆液制备 RNA。用 SuperScript™III 和寡聚(dT)引物(Invitrogen)将所有回收的 RNA 用于逆转录酶反应来合成 cDNA。利用 ABI Prism7700 或 7000 将 1 μl 或 2 μl cDNA 用于实时定量 PCR 分析(TaqMan)。分别检测后爪和前爪中 HMGB1 和几种假定的受体分子:RAGE、TLR2、TLR4 和 TLR9 的相对基因表达(图 12B)。也分别检测了后爪和前爪中几种细胞因子:IL-1b、IL-6 和 TNF-α 的相对基因表达(图 12C)。将正常小鼠中各分子的基因表达设置为 1,对各分子的相对基因表达作图。各分子下的数字表示其数值。

[0406] AIA 大鼠的 HMG1 水平:在第 0、5、10、15 和 20 天收集 AIA 大鼠的后爪,液氮快速冷冻,-80℃保存直至检测。采用与上述被动 CIA 小鼠所用相同的方法处理和检测 AIA 关节。关节匀浆液中 HMG1 水平对时间作的图见图 12D(右上图)。也对疾病进展的两个关键指标,关节炎和体重丧失作了图(分别是左上图和左下图)。

[0407] 金黄色葡萄球菌攻击后小鼠血清中的 HMG1 和细胞因子水平:在用金黄色葡萄球菌攻击后第 2、8 和 12 小时收集小鼠血清。采用 MesoScale 技术(MesoScale Discovery)通过 ELISA 测定 HMG1、IL-1b 和 TNF-α 水平。HMG1、IL-1b 和 TNF-α 的水平对时间作图(图 12E)。应注意 HMG1 和细胞因子所用的比例尺不同(分别是右轴和左轴)。单用半乳糖胺攻击或未攻击小鼠的 HMG1 或细胞因子未显示有相似增加(数据未显示)。

[0408] ALI 小鼠 BAL 液中的 HMG1 水平:用 PBS(对照)和 LPS(肺损伤)攻击小鼠后,在所指示时间收集小鼠的 BAL 液体,通过 MesoScale ELISA 测定 HMG1 的水平。HMG1 水平对时间作图(图 12F,左图)。存在的细胞总数(疾病进展的指标)也对时间作图(图 12F,右

图)。

[0409] 治疗后AIA大鼠的HMG1水平:如上所述处理治疗后(见下文实施例9)AIA大鼠的后爪,通过MesoScale ELISA测定HMG1、IL-6和TNF-a的水平。

[0410] MesoScale ELISA:简言之,用HMGB1或细胞因子(例如,IL-1b、TNF-a、IL-6等)的捕捉抗体预包被平板,用MSD封闭缓冲液(MSD,目录号R93AA-1)封闭1小时。将20 μ l体积的标准品(用合适的样品缓冲液稀释,例如,正常小鼠的BAL液、血清或关节匀浆液)和样品加入平板。将20ul第一抗体和检测抗体的混合物加入各孔,室温振荡培育4小时。然后洗涤各板,加入读数缓冲液(MSD,目录号R92TD-2),用Sector成像仪6000读数。用于HMG1检测的第一抗体是亲和力兔抗-HMGB1多克隆抗体(Becton Dickinson Biosciences, 目录号556528),检测抗体是山羊抗-兔MSD检测抗体(MSD,目录号R32AB-1)。

[0411] 6.5.2 结果

[0412] 检测了3种关节炎模型。在各模型中,发现关节的HMG1水平随疾病进展同时升高。在被动CIA小鼠中,HMG1水平在第10天升高约10倍(图12A),此时观察到广泛的关节炎炎症(见下文和图13A)。在主动CIA小鼠中,也观察到HMG1、已知参与炎症疾病的几种细胞因子和几种受体的水平随疾病的进展而同时升高(图12B-C和15A)。前爪和后爪中RAGE受体显示升高约2倍,TLR2和TLR4受体在前爪中显示分别中度升高2和3倍,后爪中分别惊人地升高19和17倍。TLR9水平只在后爪中升高(7倍)。细胞因子IL-1b、IL-6和TNF-a的表达水平显示相似的倾向,前爪中分别升高39、145和7倍,在后爪中分别惊人地升高247、361和76倍。在AIA大鼠模型中,关节匀浆液中HMG1水平从检测不到至第15天升高到200ng/ml以上,此时关节炎最严重(比较图12D,左图和右图1。当炎症在约20天减轻时,也观察到HMG1水平相应降低。

[0413] 也检测了其它两种疾病模型。图12E显示在金黄色葡萄球菌腹膜炎模型中HMG1水平从攻击后约2小时开始随时间一致性升高。TNF-a和IL-6水平在攻击后立即急剧升高,其中TNF-a水平在2小时达到峰值,随后降低,然后在攻击后约9小时再次升高。IL-6水平在约2小时达到峰值,然后通常维持稳定,随后只有略微升高。在急性肺损伤小鼠模型中,BAL液中HMG1水平从检测不到至LPS攻击后48小时升高到1500ng/ml以上(图12F,左图)。这种HMG1水平升高与LPS攻击小鼠的BAL液中细胞渗出(细胞总数)增加相关(比较图12F的左图和右图)。用PBS缓冲液攻击的小鼠的BAL液中HMG1水平检测不到(图12F左图1)。这些研究表明在许多炎症性疾病模型中HMG1水平随疾病进展而升高,所述模型包括三种关节炎模型、一种急性肺损伤模型和一种腹膜炎模型。选择几种人抗-HMG1抗体用于这些模型的其它研究来证实抗-HMG1抗体可用于HMG1水平升高相关的其它炎症性疾病。

[0414] 我们也检测了用PBS、一种人同种型对照(HuIgG)、G4、A-框-Fc融合体和氨甲喋呤(MTX)之一联用HuIgG或Renbre1或G4治疗后AIA大鼠关节中的HMG1、IL-6和TNF-a水平。图12G显示了各种治疗后HMG1(左上图)和IL-6(左下图)的水平。用HuIgG或A-框-Fc治疗未明显降低HMG1或IL-6水平。单用G4与联用MTX和HuIgG或Renbre1显示对HMG1和IL-6水平的降低作用相似,然而联用MTX和G4将该水平降至正常。G4也明显降低了TNF-a的水平,虽然MTX+HuIgG显示对此细胞因子的降低作用更强(图12G,右上图)。

[0415] 6.6 实施例7

[0416] 抗-HMG1 抗体抑制被动性胶原诱导关节炎 (CIA) 小鼠模型疾病进展的严重性

[0417] 为证实抗 HMG1 的人抗体是有用的治疗剂,我们在被动小鼠模型中测试了一组人抗-HMG1 抗体治疗胶原诱导关节炎 (的效果)。对于该系列实验,我们利用了临床关节炎发作前开始治疗的预防模型。在此项研究中,我们直接比较了抗-HMG1 抗体的效力和已知治疗方案,(即)单用 Renbrel(可接受用于啮齿类模型系统中的 Enbrel™ 替代分子)或联用 Renbrel™ 和氨甲喋呤 (MTX) 的效力。

[0418] 我们在本文中首次证实抗 HMG1 的抗体在被动 CIA 小鼠 RA 模型中显示有预防效力。事实上,在减轻爪炎症和减少骨丧失和软骨损伤中,抗-HMG1 抗体 G4 显示比单用 Renbrel 更有效,而抗-HMG1 抗体 S6 甚至比 MTX/Renbrel 治疗更有效。

[0419] 6.6.1 材料与方法

[0420] 被动性胶原诱导关节炎 (CIA) 的诱导:为建立关节炎模型,使用 6-8 周龄的雄性 DBA/1J 小鼠 (Jackson Labs, Bar Harbor, 缅因州)。一般每组使用 5-8 只小鼠。在第 0 天,在尾部静脉内注射 2mg/小鼠的抗-胶原 mAb 混合物 (Chemicon, ECM1100 号, 10mg/ml) 来免疫小鼠。然后在第 3 天对小鼠腹膜内注射 50 μg LPS/小鼠。各实验有如下所示几组:实验 1 有组 A-E,实验 2 有组 G-J 和组 L-N)。其它组小鼠 (组 F、K 和 O) 不治疗作为正常对照。给予如表 4 所示的以下治疗方案。

[0421] 表 4. CIA 小鼠模型的治疗组

[0422]

组	天	治疗
A	3、5、7、9、11、13	单用 PBS
B	3、6、9、12 3、10	0.2 mg Renbrel, 腹膜内 0.033 mg 氨甲喋呤, 腹膜内
C	3、5、7、9、11、13	2 mg 人 IgG 对照
D	3、5、7、9、11、13	2 mg 抗-HMG1 (G16)
E	3、5、7、9、11、13	2 mg 抗-HMG1 (S6)
F	N/A	无治疗
G	3、5、7、9、11、13	单用 PBS
H	3、5、7、9、11、13	10 mg/kg Renbrel
I	3、5、7、9、11、13	10 mg/kg 抗-HMG1 (G4)
J	3、5、7、9、11、13	10 mg/kg 人 IgG 对照
K	N/A	无治疗
L	3、6、9、12	单用 PBS
M	3、6、9、12	10 mg/kg 抗-HMG1 (G4)
N	3、6、9、12	10 mg/kg 人 IgG 对照
O	3、6、9、12	无治疗

[0423] 监测疾病:在第 0 天开始,每天观察所有动物,通过给每只爪作定性临床评分评估它们的疾病状况。每天,对每只动物的 4 只爪进行临床疾病状况评分。评分由两名观察人员进行,至少一人盲法。此外,在对爪评分之时称重各只小鼠跟踪体重变化 (见图 6A 和 6D)。

[0424] 踝/腕/中腿 (midfoot)/前腿的评分等级如下:

[0425] 0 = 正常 2 = 严重肿胀

[0426] 1 = 有限的肿胀 3 = 最严重肿胀不能承载体重

[0427] 各爪 4 趾的评分等级分级为涉及或不涉及, 即 1 或 0。例如, 最严重涉及的左后爪评分为: 踝 = 3、中腿 = 3、趾 = 4 (临床评分 = 10 分)。我们对各爪重复评分, 计算出评分总和。在第 14 天或在总临床评分达到 40 后马上无痛处死小鼠, 进行关节的组织学评估。

[0428] 组织学: 如 Badger et al., 2001, Arthritis&Rheumatism44:128-37 所述评估各小鼠后肢胫骨关节, 对组织学变化评分。简言之, 在第 32 天处死小鼠, 将后肢用福尔马林固定, 用 Cal-Rite (Richard-Allen Scientific, Kalamazoo, MI) 脱钙。然后从腿的胫骨远端骨干处切下爪子。常规处理后, 包埋样品, 切取通过胫骨和距骨 (talartarsal) 关节面中段的冠状切片。用 Safranin O 对切片染色, 用 fast Green 复染 (数据未显示)。

[0429] 盲法观察人员分别对骨和关节软骨 / 关节周围软组织的组织学特征评分 (图 13B 和 13C)。骨评分分级如下: 0 = 正常, 1 = 骨膜下纤维化同时形成骨膜编织骨 (periosteal woven bone), 2 = 骨髓炎症, 骨内膜和小梁骨重吸收, 3 = 广泛的炎症, 4 = 肉芽组织替代了骨髓, 剩余少许小梁骨, 皮层轮廓广泛破坏。软骨 / 滑膜评分分级如下: 0 = 正常, 1 = 滑膜和周围组织有轻微淋巴细胞炎症, 2 = 滑膜纤维化和水肿, 关节腔部分淋巴细胞渗出, 软骨有较小血管翳浸润, 3 = 关节腔广泛渗漏, 周围和软骨下软骨浸润, 软组织广泛纤维化伴有局部坏死液化。

[0430] 6.6.2 结果

[0431] 进行了几次实验来证实在被动 CIA 小鼠模型中用 HMG1 抗体治疗能预防或降低疾病的严重性。在实验 1 中, 小鼠注射 LPS 后第 3 天开始用抗 -HMG1 抗体 S6 或 G16 (0.2mg/小鼠) 治疗。小鼠在 13 天期间总共接受 6 个剂量。同时, 对照小鼠接受人 mAb (0.2mg/小鼠)。最后一组接受 MTX (0.2mg/小鼠, 12 天期间接受 4 个剂量) 和 Renbre1 (0.2mg/小鼠, 10 天期间接受 2 个剂量) 组合治疗。治疗开始后, 每天评估关节炎的发展情况。图 13A 显示了研究期间各治疗组的爪炎症评分。图 13B 显示了 CIA 预防模型的骨、软骨和炎症的组织学总评分。重要的是应注意到此模型中, 前爪疾病状态是更好的预测指标, 因为后爪受影响程度不同。图 13C 只是前爪的骨、软骨和炎症组织学评分。给予人 IgG 对关节炎发展没有作用。然而, 与对照小鼠相比, 用抗 -HMG1S6 抗体治疗小鼠骨、软骨和总炎症评分大大降低。令人惊奇的是, 用抗 -HMG1S6 抗体治疗小鼠明显好于用 MTX/Renbre1 联合治疗的小鼠 (图 13B 和 13C)。

[0432] 疾病进展的另一临床特征是体重丧失。对照小鼠的相对体重评分显示了研究期间为净降低。虽然用抗 -HMG1S6 抗体治疗的小鼠的临床评分显示出明显保护作用, 但该组小鼠也显示体重净降低。然而, 抗 -HMG1S6 抗体治疗的小鼠体重丧失低于对照组。MTX/Renbre1 治疗的小鼠也显示在研究早期体重净减少, 然而在结束时体重赶上了未治疗小鼠 (图 13D)。这些结果证实在疾病发作前给予抗 -HMG1 抗体能有效保护关节免遭破坏和其它症状。特别是, 这些结果表明在 CIA 小鼠中抗 -HMG1S6 抗体治疗在减轻疾病严重性方面具有深远作用。应注意该实验可能不代表 S6 在关节炎模型中具有保护作用。虽然抗 -HMG1S6 抗体治疗在脓毒症小鼠 CLP 模型中反复显示优秀的保护作用 (见以上的实施例 5), 但这些结果在关节炎模型中更易变。此变异可能反映了抗体制品、动物模型、抗体的药物动力学和其它类似参数的差异。

[0433] 在实验 2 和 3 中,小鼠注射 LPS 后第 3 天开始用抗-HMG1 抗体 G4(10mg/小鼠)治疗。在实验 2 中,小鼠在 13 天期间总共接受 6 个剂量,在实验 3 中同一时期小鼠接受总共 4 个剂量。同时,对照小鼠接受人 mAb(10mg/小鼠)或 PBS。实验 2 中,最后一组接受 Renbre1(剂量与 G4 的相同)。治疗开始后,每天评估关节炎发展情况。图 14A-B 显示了研究期间爪炎症的评分。从实验 2 明显可看出(图 14A)抗-HMG1 抗体 G4 在减轻爪炎症方面比单用 Renbre1 更有效(右图)。实验 3 的数据(图 14B)显示抗-HMG1 抗体 G4 可以较低频率给予而仍能(减轻)爪炎症。G4 抗体在该关节炎模型和其它几种关节炎模型中反复证明有明显保护作用(见下文实施例 8 和 9)。

[0434] 6.7 实施例 8

[0435] 抗-HMG1 抗体抑制主动性胶原诱导关节炎(CIA)小鼠模型疾病进展的严重性

[0436] 为证实抗 HMG1 的人抗体是有用的治疗剂,我们在小鼠模型中测试了一组抗-HMG1 抗体能否治疗主动性胶原诱导关节炎。对于该系列实验,我们利用了临床关节炎发作前开始治疗的预防模型。在此项研究中,我们比较了抗-HMG1 抗体的作用和 Renbre1 的作用。

[0437] 我们在本文中首次证实抗 HMG1 抗体在主动性 CIA 小鼠 RA 模型中显示有减轻爪炎症和减少体重丧失的作用。事实上,在减轻爪炎症中,抗-HMG1 抗体 G4 显示比单用 Renbre1 更有效。

[0438] 6.7.1 材料与方法

[0439] 主动性胶原诱导关节炎(CIA)的诱导:使用 6-8 周龄雄性 DBA/1J 小鼠(Jackson Labs, Bar Harbor, 缅因州)。在第 0 天,异氟烷麻醉小鼠在尾根部真皮内注射溶解于 50 μ l 10.1N 乙酸和用等体积完全弗氏佐剂(Chondrex, Redmond, WA)乳化的 200 μ g II 型牛胶原(CII)。三周后在第 21 天,给予小鼠第二次相似的真皮内注射溶解于 25 μ l 10.1N 乙酸和用等体积不完全弗氏佐剂(Difco, 底特律, MI)乳化的 100 μ g CII。

[0440] 监测疾病:在第 14 天开始,每天观察所有动物,通过给每只爪作定性临床评分来评估它们的疾病状况。每天,对每只动物 4 只爪进行临床疾病状况评分。评分由两名观察人员进行,至少一人盲法。此外,在对爪评分之时称重各只小鼠以跟踪体重变化。

[0441] 踝/腕/中腿/前腿的评分等级如下:

[0442] 0 = 正常 2 = 严重肿胀

[0443] 1 = 有限的肿胀 3 = 最严重肿胀且不能承载体重

[0444] 各爪 4 趾的评分等级分级为涉及或不涉及,即 1 或 0。例如,最严重涉及的左后爪评分为:踝=3、中腿=3、趾=4(临床评分=10 分)。我们对各爪重复评分,计算了评分总和。在第 36 天或在总临床评分达到 40 后马上无痛处死小鼠,进行关节的组织学评估。

[0445] 6.7.2 结果

[0446] 我们在主动 CIA 模型中检测用人抗-HMG1 抗体治疗是否能预防或减轻 CIA 的疾病严重性。在第 21 天开始,每 3 天用抗-HMG1 抗体 G4、同种型对照抗体或 Renbre1(10mg/kg)治疗小鼠。每天评估关节炎发展情况。图 15A 显示了研究期间各治疗组的爪炎症评分。给予人 IgG 对关节炎的发展没有作用。然而,与对照小鼠相比,抗-HMG1G4 抗体治疗的小鼠炎症评分大大降低。令人惊奇的是,用抗-HMG1G4 抗体治疗的小鼠明显优于用 Renbre1 治疗的小鼠(图 15 比较左图和右图)。

[0447] 在此模型中,疾病进展的另一临床特征是体重丧失。对照小鼠的相对体重评分显

示在研究期间为净降低。虽然用抗-HMG1G4 抗体治疗的小鼠的临床评分显示具有明显保护作用,但该组小鼠也显示体重净降低。然而,抗-HMG1G4 抗体治疗的小鼠体重丧失低于对照组。这些结果证实在疾病发作前给予抗-HMG1 抗体能有效保护关节免遭破坏和其它症状。特别是,这些结果表明在主动 CIA 小鼠模型中抗-HMG1G4 抗体治疗在减轻疾病严重性方面具有深远作用。

[0448] 6.8 实施例 9

[0449] 抗-HMG1 抗体抑制佐剂诱导关节炎 (AIA) 大鼠模型疾病进展的严重性

[0450] 我们还在佐剂诱导的关节炎 (AIA) 大鼠模型中检验了人抗-HMG1 抗体 G4。对于该系列实验,我们采用在临床关节炎发作前开始治疗的预防模型。在此项研究中,我们比较了抗-HMG1 抗体的作用和 Renbre1 的作用。

[0451] 我们在本文中首次证实抗 HMG1 的抗体 (G4) 在 AIA 大鼠 RA 模型中显示有减轻爪炎症的作用。事实上,在减轻爪炎症中,抗-HMG1 抗体 G4 显示比单用 Renbre1 更有效。抗-HMG1G4(治疗)的大鼠观察到临床评分降低约 34%,而 Renbre1 治疗的大鼠观察到只降低约 11%。此外,我们证实联用氨甲喋呤和 G4 在降低爪炎症评分中比联用氨甲喋呤和 Renbre1 更有效。

[0452] 6.8.1 材料与方法

[0453] 佐剂诱导的关节炎 (AIA) 的诱导:使用 6-8 周龄雄性 DA 大鼠 (Harlen)。在第 0 天,异氟烷麻醉大鼠在尾根部真皮内注射与 100 μ l 不完全弗氏佐剂 (Difco,底特律,MI) 混合的 0.75mg 丁酸分枝杆菌 (mycobacterium butyricum) (Difco,0640-33-7 号)。给予如表 5 所示的以下治疗方案。

[0454] 表 5. AIA 大鼠模型的治疗组

[0455]

组号	测试物质	剂量	动物总数
1	正常		6
2	PBS		6
3	HuIgG (R3-47)	10mg/kg	6
4	MTX+HuIgG (R3-47)	0.8mg/kg MTX 10mg/kg HuIgG	6
5	单用 Renbre1	2.5mg/kg	6
6	MTX+Renbre1	0.8mg/kg MTX2.5mg/kg Renbre1	6
7	抗-HMGB1 (G4)	10mg/kg	6
8	MTX+ 抗-HMGB1mAb (G4)	0.8mg/kg MTX10mg/kg G4	6
9	A-Box/Fc	10mg/kg	6

[0456] 在第0-15天,每3天给予10mg/kg人抗-HMG1抗体G4、A-框-Fc融合体和huIgG同种型对照。在第0-15天,每6天给予0.8mg/kg氨甲喋呤,对于治疗组5,在第0-15天,每2天给予2.5mg/kg的Renbre1,或对于治疗组6,在第0-15天,每3天给予4mg/kg的Renbre1。

[0457] 监测疾病:在第6天开始,每天观察所有动物,通过给每只爪作定性临床评分来评

估它们的疾病状况。每天,对每只动物 4 只爪进行临床疾病状况评分。评分由两名观察人员进行,至少一人是盲法。此外,在对爪评分之时称重各只小鼠以跟踪体重变化。

[0458] 踝/腕/中腿/前腿的评分等级如下所示:

[0459] 0 = 正常 1 = 刚可感觉到肿胀

[0460] 2 = 有限的肿胀但不严重 3 = 严重肿胀

[0461] 4 = 最严重肿胀且不能承载体重

[0462] 各爪 4 趾的关节评分分级为涉及或不涉及,即 1 或 0。例如,最严重涉及的左后爪评分为:踝 = 4、中腿 = 4、MTP = 4、PIP = 4、DIP = 4(20 分)。我们对各爪重复评分,计算了评分总和。在第 21 天或在总临床评分达到 80 后马上无痛处死大鼠,进行关节的组织学评估。

[0463] 6.8.2 结果

[0464] 我们证实人抗-HMG1 抗体 G4 能预防或降低大鼠 AIA 的严重性。在第 21 天开始每 3 天用 10mg/kg 的 PBS、抗-HMG1 抗体 G4、同种型对照抗体(HuIgG)或每 2 天用 2.5mg/kg 的 Renbre1 治疗 AIA 大鼠。此外,联用氨甲喋呤和其它几种治疗剂,包括 Renbre1、G4 或 HuIgG 治疗 AIA 大鼠。也用 HMG1A- 框-Fc 融合蛋白治疗 AIA 大鼠。每天评估关节炎发展情况。图 16A 显示研究期间各抗体或单用 Renbre1 治疗组以及 PBS 和正常对照组的爪炎症评分。给予人 IgG 对关节炎的发展没有作用。然而,与对照动物相比,用抗-HMG1G4 抗体治疗的动物炎症评分大大降低。令人惊奇的是,用抗-HMG1G4 抗体治疗的动物明显优于单用 Renbre1 治疗的动物(图 16A 比较左图和右图)。抗-HMG1 抗体 G4 显示比单用 Renbre1 更有效。抗-HMG1G4(治疗)的大鼠观察到临床评分降低约 30%,而 Renbre1 治疗的大鼠观察到只降低约 25%。

[0465] 图 16B 显示比较包括联合治疗组与单用抗体和 HMG1A- 框-Fc 融合蛋白治疗组的爪炎症评分。单用 A- 框-Fc 融合蛋白降低了炎症评分,但不如单用 G4 有效。与单用 G4 相比,联用 Renbre1 降低了炎症评分。MTX 可能对这种降低作用贡献最大,因为 MTX 和 HuIgG 对照抗体联用显示与 MTX/Renbre1 联用的炎症减轻作用相似。然而,MTX 和 G4 联用甚至比 MTX/Renbre1 联用更有效,能将炎症评分降低至几乎正常。各指治疗组中观察到的爪炎症评分降低与 AIA 大鼠关节中观察到的 HMG1、IL-6 和 TNF- α 水平降低相关(见图 12G)。

[0466] 6.9 实施例 10

[0467] 抗-HMG1 抗体提高金黄色葡萄球菌腹膜炎小鼠模型的存活率

[0468] 我们也在观察到 HMG1 血清水平升高的严重腹膜炎小鼠模型(见上文)中检验了几种人抗-HMG1 抗体。在本文中,我们证实与对照相比,用人抗-HMG1 抗体治疗能提高存活率约 30%。

[0469] 6.9.1 材料与amp;方法

[0470] 诱导腹膜炎:使用 4-6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。用与半乳糖胺预混合的热灭活金黄色葡萄球菌腹膜内攻击小鼠进行的初步研究显示 LD₁₀₀ 在 1×10^7 和 1×10^9 个细胞之间(数据未显示)。为测定 HMG1 水平,在第 0 天腹膜内给予 200 μ l PBS 配制的和 20mg 半乳糖胺预混合的约 10^9 个热灭活金黄色葡萄球菌(菌株 8325-4)细胞或单用半乳糖胺。第三组不攻击。攻击后 2、8 和 12 小时通过吸入 CO₂ 无痛处死小鼠,心脏穿刺收集血液。对于抗体治疗研究,在第 0 天腹膜内给予 200 μ l 和 20mg 半乳糖胺预混合的约 10^9 个热灭活金黄

色葡萄球菌（菌株 8325-4）细胞，攻击的 30 分钟前腹膜内给予表 6 所示 100 μ l 体积的以下治疗剂。

[0471] 表 6. 腹膜炎模型的治疗组

[0472]

组号	测试物质	剂 量 $1 \times LD_{100}$	半乳糖胺剂量 量	治疗	治疗时间	动物 总数
A	金黄色葡萄球菌	1×10^9	20mg	无		30
B	无	无	20mg	无		15
C	无	无	无	无		7
1	金黄色葡萄球菌	1×10^9	20mg	PBS	-30 分钟	10
2	金黄色葡萄球菌	1×10^9	20mg	R347 200ug	-30 分钟	10
3	金黄色葡萄球菌	1×10^9	20mg	G 4 - 1 2 - 3 200ug	-30 分钟	10

[0473] 临测疾病：从第 1 天开始持续到第 14 天，每天观察动物的发病迹象（活动严重减少、毛皮起皱纹和 / 或最高体重丧失 >20%）和死亡率。每周称重动物两次。无痛处死显示有明显患病迹象的动物。第 15 天无痛处死所有存活的动物（如果观察到明显患病则立即无痛处死）。

[0474] 6.9.2 结果

[0475] 也在革兰阳性细菌诱导的严重败血症模型中检验了人抗 -HMG1 抗体，该模型用致死剂量的热灭活金黄色葡萄球菌攻击小鼠。在此模型中，用 PBS 或抗体同种型对照 (R347) 治疗的小鼠无一存活。与用抗 HMG1 的人抗体 G4 治疗的小鼠有 27% 存活（图 17）相比，用 E11 治疗的小鼠有 8% 存活（数据未显示）。最早从治疗后 24 小时持续到整个研究期间均可观察到死亡率的差异。这些数据支持 CLP 研究（见上文），表明人抗 -HMG1 抗体可用于治疗各种病原性生物诱导的脓毒症。

[0476] 6.10 实施例 11

[0477] 抗 -HMG1 抗体减少急性肺损伤相关的细胞渗出

[0478] 在脂多糖 (LPS) 诱导的急性肺损伤 (ALI) 小鼠模型中检验了两种人抗 -HMG1 抗体。在本文我们首次证实与对照相比，用人抗 -HMG1 抗体治疗能降低总细胞渗出约 40%（图 18）。

[0479] 6.10.0 材料与方法

[0480] LPS 诱导的 ALI 的诱导：在第 1 天以 5-10 μ g / 小鼠的剂量将 50-100 μ l 的 LPS（大肠杆菌菌株 0111:B4... Sigma, St. Louis, MO）鼻内给予异氟烷 (Baxter Pharmaceuticals, Deerfield, IL) 麻醉的成年 BALB/c 小鼠。为测定 HMG1 水平，在给予 LPS 后 4、8、24、32 和 48 小时通过吸入 CO₂ 无痛处死小鼠，收集细支气管肺泡灌洗液 (Lavarge) (BAL) 和其它样品进行蛋白质分析和组织病理学（检验）。治疗方案是，给予 LPS 24 小时后，以 10mg/kg 的剂量腹膜内给予 100 μ l 抗 -HMGB1 抗体、HMG1A- 框 Fc 融合蛋白或对照。在第 3 天（给予 LPS 48 小时后），通过吸入 CO₂ 无痛处死小鼠，收集样品 (BAL、血液和肺) 用于分析。

[0481] BAL 样品收集：用装有导管的注射器以约 0.8ml 磷酸缓冲盐水 (PBS, pH7.2, GIBCO, Rockville, MD) 冲洗肺 3 次。收集的 BAL 样品在 4°C 以 1,200rpm 离心 10 分钟，收集上清液，-80°C 保存用于蛋白质（例如，HMGB1）定量，重悬沉淀物中的细胞并转移至细胞载玻片 (cytoslide)，固定，Giemsa 染色，借助显微镜目测 BAL 的细胞构成。

[0482] 6.10.2 结果

[0483] 在鼻内给予LPS诱导的急性肺损伤模型中检验了人抗-HMG1抗体。在此模型中,与对照相比,HMG1A-框(HMG促炎作用的一种已知竞争性抑制剂)仅降低渗出约23%。相反,与对照相比,G4和E11显示能将BAL液体中的总细胞渗出降低约37%-40%,表明抗-HMG1抗体可用于治疗急性肺损伤。

[0484] 6.11 实施例 12

[0485] 多发性硬化症(MS)病灶中HMGB1的染色模式

[0486] 利用G16人抗-HMGB抗体在人脑组织MS病灶中检测HMGB染色模式。检测了脱髓鞘和有许多活化小胶质细胞的病灶,以及主要是脱髓鞘有少数活化小胶质细胞和许多淋巴细胞的病灶。图19A显示用同种型对照抗体检测脱髓鞘和许多活化小胶质细胞的病灶背景染色水平低。利用人mAb G16在MS患者脑组织小胶质细胞的细胞质中检测到HMGB1。脱髓鞘和许多活化小胶质细胞的病灶显示小胶质细胞的细胞质和脱髓鞘间质中有广泛染色(图19B)。相反,当用人mAb G16检测时,主要是脱髓鞘有少数活化小胶质细胞和许多淋巴细胞的病灶显示很少或不染色(图19C)。这些结果加强了HMGB1作为胞外调节剂在炎症中的关键作用的认识,表明HMGB1可能参与MS的炎症过程。

[0487] 虽然出于清晰和理解的目的详细描述了以上发明,但在形式和细节中作出各种改变而不脱离本发明真实范围对于阅读了本文内容的本领域技术人员是显而易见的。例如,可以各种组合使用上述的所有技术和设备。如同每份出版物、专利、专利申请或其它文献单独表明出于所有目的纳为参考的程度一样,本申请引用的所有出版物、专利、专利申请或其它文献均出于所有目的全文纳为参考。此外,2004年10月22日提交的美国临时专利申请号60/620,726;2005年2月10日提交的60/651,512;2005年3月7日提交的60/658,572;2005年3月18日提交的60/662,944和2005年9月6日提交的60/713,712出于所有目的全文纳为参考。

序列表

<110> 米迪缪尼股份有限公司 (MedImmune, Inc.)

H. 吴 (Wu, Herren)

C. B. 埃兰 (Allan, Christian)

高长寿 (Gao, Changshou)

L. -L. 安 (An, Ling-Ling)

P. 基纳 (Kiener, Peter)

毛素毅 (Mao, Su-Yau)

A. 科伊尔 (Coyle, Anthony)

<120> 抗 HMGB1 的高亲和力抗体及其用法

<130>HB601PCT

<150>60/620, 726

<151>2004-10-22

<150>60/651, 512

<151>2005-02-10

<150>60/658, 572

<151>2005-03-07

<150>60/662, 944

<151>2005-03-18

<150>60/713, 712

<151>2005-09-06

<160>103

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>215

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>1

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1 5 10 15
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20 25 30
 Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45
 Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60
 Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65 70 75 80
 Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85 90 95
 Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
 100 105 110
 Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115 120 125
 Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130 135 140
 Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
 165 170 175
 Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
 180 185 190
 Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 195 200 205
 Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210>2

<211>215

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>2

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Thr Gly Lys Met Ser Ser Tyr

1	5	10	15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro			
	20	25	30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg			
	35	40	45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala			
	50	55	60
Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro			
65	70	75	80
Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys			
	85	90	95
Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys			
	100	105	110
Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys			
	115	120	125
Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr			
	130	135	140
Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala			
145	150	155	160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val			
	165	170	175
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu			
	180	185	190
Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp			
	195	200	205
Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu			
	210	215	

<210>3

<211>77

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>3

Pro Thr Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg			
1	5	10	15
Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu			
	20	25	30

Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu
 35 40 45
 Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu
 50 55 60
 Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr
 65 70 75

<210>4

<211>74

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>4

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Leu Pro Ser Ala Phe Phe Leu
 1 5 10 15
 Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu
 20 25 30
 Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr
 35 40 45
 Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 50 55 60
 Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
 65 70

<210>5

<211>115

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>5

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

50	55	60																
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr			
65					70					75				80				
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85					90				95					
Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val			
				100				105					110					
Glu	Ile	Lys																
			115															

<210>6

<211>345

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>6

```
gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca gactccctgg ctgtgtctct gggcgagagg 60
gccaccatca actgcaagtc cagccagagt gttttataca gctccaacaa taagaactac 120
ttagcttggg accagcagaa accaggacag cctcctaagc tgctcattta ctgggcatct 180
accgggaat ceggggtccc tgaccgattc agtggcagcg ggtctgggac agatttcact 240
ctcaccatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca gcaatattat 300
agtactcctc ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaaa 345
```

<210>7

<211>120

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>7

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
1			5						10				15					
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr			
			20						25				30					
Met	Met	Val	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
			35				40						45					
Ser	Arg	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
			50				55						60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Glu Glu Gly Gly Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

<210>8

<211>360

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>8

gaagttcaat tgttagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttagctctt	60
tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct ggttacatga tggtttgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctctg atctctcctt ctggtggcca gactggttat	180
gctgactccg ttaaaggteg ctccactatc tctagagaca actetaagaa tactctctac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaagag	300
ggtgggagct acggggcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcaagc	360

<210>9

<211>109

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>9

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser			
1	5	10	15
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser			
	20	25	30
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu			
	35	40	45
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu			
65	70	75	80
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr			

	85	90	95	
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
	100	105		
<210>10				
<211>327				
<212>DNA				
<213> 智人 (Homo sapiens)				
<400>10				
gcacaagaca tccagatgac ccagtetcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga				60
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attagcagct atttaaattg gtatcagcag				120
aaaccaggga aagcccctaa actcctgate tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc				180
ccctcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctctg				240
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtacccc tggacgttc				300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaa				327

<210>11
 <211>123
 <212>PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400>11

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly																	
1		5						10						15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr																	
		20						25						30			
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val																	
		35						40						45			
Ser Arg Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val																	
		50						55						60			
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr																	
65								70						75			80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																	
		85												90			95
Ala Arg Leu Glu Val Gly Ala Thr Ser Gly Gly Thr Ala Phe Asp Ile																	
		100												105			110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser																	

115

120

<210>12

<211>369

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>12

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt   60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagcagc tgtcttgggt tcgccaagct  120
cctggtaaag gtttggagtg gttttctctg atctctcctt ctggtggccta tactatgtat  180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac  240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcctgtg attactgtgc gagactcgag  300
gtgggagcta cttcgggggg tacggctttt gatatctggg gcccaaggac aatggtcacc  360
gtctcaagc

```

<210>13

<211>109

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>13

```

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser
1           5           10           15
Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn
           20           25           30
Ser Arg Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
           35           40           45
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
           50           55           60
Phe Ser Gly Ser Val Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65           70           75           80
Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser
           85           90           95
Tyr Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105

```

<210>14

<211>327

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>14

```
gcacaagaca tccagatgac ccagtetcca gacaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga   60
gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttaacagca ggaacttagc ctggtaccag   120
cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atctatgggtg catccaccag ggccactggc   180
atcccagaca ggttcagtgg cagtgtatct gggacagaat tcaactctcac catcagcagc   240
ctgcagcctg atgattttgc aacttattac tgccagcaat ataacagtta tttcactttt   300
ggccaggggga ccaagctgga gatcaaaa                                     327
```

<210>15

<211>120

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>15

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
          20           25           30
Ser Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Phe Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Trp Asp Tyr Asn Ser Gly Trp Tyr Tyr Asp His Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120
```

<210>16

<211>360

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>16

```

gaagttcaat tgttagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt    60
tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct tggtagtcta tgctttgggt tcgccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg gttttcttat atctctcctt ctggtggctt tactaattat    180
gctgactccg ttaaaggteg ctccactate tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggtgggac    300
tacaacagtg gctggtacta tgaccactgg ggccagggca ccctgggtcac cgtctcaagc    360

```

<210>17

<211>112

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>17

```

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1           5           10           15
Pro Gly Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
          20           25           30
Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
          35           40           45
Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Thr Pro Ala Arg
          50           55           60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser
65           70           75           80
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Arg His Asn
          85           90           95
Trp Pro Pro Gln Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
          100          105          110

```

<210>18

<211>336

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>18

```

gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaagga    60
gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttagcagca cctacttage ctggtaccag    120

```

cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atctatgaag cgtccaagag ggccacaggc 180
 accccagcca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcaactctcag catcagcagc 240
 ctagagcctg aagatthttgc agthttattac tgtcagcacc gtcacaactg gcctccacag 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggag gtcaaa 336

<210>19

<211>117

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>19

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30
 Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Glu Phe Tyr Asp Tyr Leu Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210>20

<211>351

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>20

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtggctc tttacgtctt 60
 tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct tggtagata tgacttgggt tcgccaaget 120
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttcc atctctcctt ctggtggcta tactaagtat 180
 gctgactcgc ttaaaggctc ctccactatc ttagagaca actetaagaa tactctctac 240

ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccgtgt attactgtac cacagaattc 300
 tacgattacc tggacgtctg gggcaaaggg accacgggtca ccgtctcaag c 351

<210>21

<211>209

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>21

Met Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1 5 10 15
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20 25 30
 Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Gln Lys Ala Ala Lys Leu
 50 55 60
 Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
 65 70 75

<210>24

<211>110

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>24

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg
 20 25 30
 Ser Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Ala Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
 85 90 95
 Ser Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Ser Arg Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210>25

<211>330

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>25

```
gcacaagaca tccagatgac ccagtetcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga   60
gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttaggagca acttcttggc ctggtaccag  120
cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atatatggtg catccaggag ggccagtggc  180
atcccagaca ggttcagtgg cagtgggttt ggggcagact tcaactctcag catcagcaga  240
ctggagcctg aagatttcgc agtgtattac tgtcagcagt atggtagctc acccaacact  300
tttggccagg ggtccagggt ggagatcaaa                                     330
```

<210>26

<211>121

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>26

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
          20           25           30
Gln Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60
Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
          35           40           45
Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala
          50           55           60
Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
65           70           75           80
Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
          85           90           95
Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His Arg Pro Lys
```

100	105	110	
Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys			
115	120	125	
Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr			
130	135	140	
Glu Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala			
145	150	155	160
Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly			
165	170	175	
Arg Pro Thr Gly Ser Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu			
180	185	190	
Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu			
195	200	205	
Glu			

<210>22

<211>77

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>22

Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg			
1	5	10	15
Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn Phe Ala Glu			
20	25	30	
Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu			
35	40	45	
Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp			
50	55	60	
Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Asp Lys			
65	70	75	

<210>23

<211>75

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>23

Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile
 20 25 30
 Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala
 35 40 45
 Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys
 50 55 60
 Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp
 65 70 75

<210>29

<211>34

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>29

Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys
 1 5 10 15
 Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser
 20 25 30

Lys Lys

<210>30

<211>111

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>30

Ala Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn
 20 25 30
 Asn Ala Val Ile Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Asn

85 90 95
 Leu Asn Gly Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210>31

<211>333

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>31

gcacagagcg aattgactca gccaccctcg gtgtctgaag cccccgggca gagggtcacc 60
 atctcctggt ctggaagcac ctccaacatc ggaaataatg ctgtaatctg gtaccagcag 120
 ctcccaggaa aggctcccaa actcctcacc tattatgatg atctgctgcc ctccagggtc 180
 tctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcaggct ccctggccat cagtgggctc 240
 cagtctgagg atgaggctga ctattactgt gcatcatggg atgacaacct gaatggtccg 300
 ctgttcggcg gagggaccaa gttgaccgtc cta 333

<210>32

<211>122

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>32

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30
 Lys Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Met Gly Leu Phe Asn Thr Gly Asn Ser Tyr Val Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210>33

<211>366

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>33

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc tttagctctt   60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagaaga tgcagtgggt tcgccaagct  120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggctc tactgcttat  180
gctgactccg ttaaaggteg cttcactate tctagagaca actctaagaa tactctctac  240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaaatgggg  300
ctttttaata ctgggaattc ctacgttgac tactggggac agggaaccct ggtcacctgc  360
tcaagc                                     366

```

<210>34

<211>110

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>34

```

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1           5           10           15
Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg
           20           25           30
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
           35           40           45
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
           50           55           60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65           70           75           80
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr
           85           90           95
Ser Arg Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100          105          110

```

<210>35

<211>330

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>35

```
gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga   60
gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttaggagca gctacttagc ctggtaccag   120
cagaaacctg gccaggctcc caggctcttc atctatggtg catccaccag ggccactggc   180
atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcaactctcac catcagcaga   240
ctggagcctg aagatthtgc agtgtattac tgtcagcagt atggtacctc acggtggacg   300
ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa                               330
```

<210>36

<211>122

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>36

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30
Asp Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ser Arg Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Ser Arg Gly Tyr Ala Phe Asp Ile Trp
           100          105          110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
           115          120
```

<210>37

<211>366

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>37

```

gaagttcaat tgttagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt   60
tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct tcttacgata tgttttgggt tcgccaagct  120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctctg atctctcctt ctggtggcta tacttattat  180
gctgactccg ttaaaggteg cttcactate tctagagaca actctaagaa tactctctac  240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcctgtg attactgtgc gaggctacga  300
tattttgact caaggggcta tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc  360
tcaagc

```

<210>38

<211>110

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>38

```

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1           5           10           15
Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Thr
           20           25           30
Ser Thr Tyr Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
           35           40           45
Leu Leu Ile His Gly Gly Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg
           50           55           60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ala Thr
65           70           75           80
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
           85           90           95
Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

<210>39

<211>330

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>39

gcacaagaca tccagatgac ccagtetcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60
gccaccctct cctgcagggc cagtgagagt cttaccagca cctacgtage ctggtaccag 120
cacaaacctg gccaggctcc caggctcctc atccatgggg gatccaccag ggccactggc 180
atcccagtca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcaactttac catcgccaca 240
ctggagccgg aagatthttgc agtgtattac tgtcagcagt atggtagttc accgtacact 300
tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 330

<210>40

<211>119

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>40

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30
Met Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Leu Ser Thr Gly Ser Phe Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210>41

<211>357

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>41

gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtett 60
tcttgcgctg cttecgatt cactttctct tattacatga tgacttgggt tcgccaagct 120

cctggtaaag gtttggagtg ggttttettct atctctcctt ctgggtggcta tactatttat 180
 gctgactccg ctaaaggteg ctctactate tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagccttg 300
 tctactggga gcttctggga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcaage 357

<210>42

<211>110

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>42

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Ser Gly Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Arg His Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Pro Thr Gly Ile Pro Asp Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Leu Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Tyr Tyr Gly Ser
 85 90 95
 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Lys
 100 105 110

<210>43

<211>330

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>43

gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggagage 60
 ggcaccctct cctgtagggc cagtgagagt gttagtagca gacacttcgc ctggtaccag 120
 cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atttatgggtg catccagcag gcccaactggc 180
 atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcaactctcac cctcagcaga 240
 ctggagcctg aggatthtgc agtgtatttc tgtcagtact atggtagctc accgtacact 300
 ttcgcgaggag ggaccaaggt ggagatgaaa 330

<210>44

<211>119

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>44

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Trp	Tyr
		20					25						30		
Lys	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Phe	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Asp	Leu	Asp	Ile	Arg	His	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105						110	
Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
															115

<210>45

<211>357

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>45

gaagttcaat	tgttagagtc	tggtggcggc	cttggtcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttccggatt	cactttctct	tggtacaaga	tgacttgggt	tcgccaaget	120
cctggt	aaag	gtttggagtg	ggttttctct	atctctcctt	ctggtggctt	tacttcttat 180
gctgactccg	ttaaaggtcg	cttcaactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagacctc	300
gatatccggc	atgcttttga	tatctggggc	caagggacaa	tggtcaccgt	ctcaage	357

<210>46

<211>109
 <212>PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400>46

Ala	Gln	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser
1			5					10					15		
Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
			20					25					30		
Ile	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
			35				40						45		
Leu	Ile	Phe	Gly	Ala	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
			50				55					60			
Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Ala	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Ser	Val
65					70					75				80	
Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Asp	Ser	Phe
					85					90				95	
Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
				100						105					

<210>47
 <211>327
 <212>DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400>47

gcacaagaca	tccagatgac	ccagtctccc	tcttccgtgt	ctgcatctgt	gggagacaga	60
gtcaccatca	cttgctgggc	gagtcaggat	gtagcatct	ggtagcctg	gtatcagcag	120
aaaccgggga	aagcccctaa	gctcctgac	tttggtgcgt	cccgtttgca	gagtggggtc	180
ccatcgaggt	tcagcggcag	tcgatctggg	gcagatttca	ctctcaccat	cgacagcgtg	240
cagcctgaag	atcttgcatc	ttactattgt	cagcaggctg	acagtttccc	tctcactttc	300
ggcggaggga	ccaaggtgga	aatcaaa				327

<210>48
 <211>126
 <212>PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400>48

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp
 20 25 30
 Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser
 85 90 95
 Pro Gly Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210>51

<211>330

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>51

gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca tctctcctgt ctgcatctgt gggagacaga 60
 gtcgccatca cttgccgcgc aagtcagagc atcgacacct atttaaattg gtatcagcag 120
 aaaccaggga aagcccctaa actcctgate tatgctgcat ccaagttgga agacggggtc 180
 ccatcaagat tcagtggcag tggaactggg acagatttca ctctcaccat cagaagtctg 240
 caacctgaag attttgcaag ttattttctgt caacagagct actctagtcc agggatcact 300
 ttcgccctg ggaccaaggt ggagatcaaa 330

<210>52

<211>125

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
 20 25 30
 Met Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45	
Ser Arg Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gly Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Gly Asn Trp Asn Tyr Ile Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Leu			
	100	105	110
Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	125

<210>53

<211>375

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>53

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt   60
tcttgcgctg ctccggatt cactttctct cattacatga tgggttgggt tcgccaagct  120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctcgt atctctcctt ctggtggcgg tactgtttat  180
gctgactccg ttaaaggteg ctccactatc tctagagaca actetaagaa tactctctac  240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggtggt  300
aactggaact acatatecta ctactactac tacctggacg tctggggcaa agggaccacg  360
gtcaccgtct caage                                     375

```

<210>54

<211>113

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>54

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr			
1	5	10	15
Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu			
	20	25	30
His Gly Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly			
	35	40	45

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly
 50 55 60
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95
 Gln Ser Leu Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210>55

<211>339

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>55

gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg 60
 gcctccatct cctgcagatc tagtcagagc ctctctcatg gtaatggata caactatttg 120
 gattgggtact tgcagaggcc agggcagttc ccacagctcc tgatctattc gggttctaata 180
 cgggcctccg gggtcctga caggttcagt ggcagtggtt caggcacaga ctttacttg 240
 aaaatcagca gagtggaggc tgaggatggt ggggtttatt actgcatgca atctctacaa 300
 agtcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210>56

<211>121

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>56

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30
 Lys Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Val Pro Ser Gly Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Arg Val Gln Gln Trp	Leu Gly Arg Pro Tyr Phe	Asp Tyr Trp Gly	
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr	Val Ser Ser		
	115	120	

<210>57

<211>363

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>57

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt   60
tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct tggtagaaga tggtttgggt tcgccaagct  120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atcgttcctt ctggtggcat tactatttat  180
gctgactccg ttaaaggteg ctccactatc tctagagaca actetaagaa tactctctac  240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagtgcag  300
cagtggtctg gacggcccta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctca  360
agc

```

<210>58

<211>110

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>58

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr	Gln Ser Pro Gly Thr	Leu Ser Leu Ser
1	5	10
Pro Gly Glu Arg Ala Thr	Leu Ser Cys Arg Ala Thr	Gln Ser Val Arg
	20	30
Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro Gly Gln	Ala Pro Arg
	35	45
Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser	Ser Arg Ala Thr Gly Ile	Pro Asp Arg
	50	60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr Leu Thr	Ile Ser Arg
65	70	75
		80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn
85 90 95
Ser Pro Ile Ile Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210>59
<211>330
<212>DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>59
gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggcgaaaga 60
gccaccctct cctgcagggc cactcagagt gttagaaaga acttcttagc ctggtatcag 120
cagaaacctg gccaggctcc caggctctc atctacgatg catccagcag ggccactggc 180
atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcaactctcac catcagcaga 240
ctggagcctg aagatthtgc agtgtattac tgtcagcagt atggtaactc acctatcatc 300
ttcgccaag ggacacgact ggagattaaa 330

<210>60
<211>119
<212>PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>60

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30
Asp Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Trp Ile Val Pro Ser Gly Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Pro Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210>61

<211>357

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>61

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt   60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagcagc tgtggtaggt tcgccaagct  120
cctggtaaag gtttagagtg gttttcttgg atcgttcctt ctggtggcat tactgtctat  180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac  240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccacat attactgtgc gagaggtaac  300
tacggcccat cgccgtttga ctactggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctcaage    357

```

<210>62

<211>110

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>62

```

Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Arg
1           5           10           15
Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn
           20           25           30
Asn Ala Val Thr Trp Tyr Gln Tyr Phe Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
           35           40           45
Leu Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
           50           55           60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65           70           75           80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Gly
           85           90           95
Leu Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
           100          105          110

```

<210>63

<211>330

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>63

```
gcacagagcg ctttgactca gccaccctcg gtgtctgcag cccccaggca gagggtcacc 60
atctcctggt ctggaagcac ttccaacate ggaataatg ctgtaacctg gtaccagtat 120
ttcccaggaa aggctcccaa actcctcctc tatagtgata atcagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcgtatg acagaggcct gagtgtggtt 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
```

<210>64

<211>117

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>64

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20           25           30
Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Leu Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85           90           95
Ala Lys Glu Ile Phe Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
115
```

<210>65

<211>351

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>65

```

gaagttgaat tgttagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt   60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacatta tgcattgggt tcgccaagct  120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggt atcgttcctt ctggtggcct tactgagtat  180
gctgactccg ttaaaggteg cttcactate tctagagaca actctaagaa tactctctac  240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccacat attactgtgc gaaagagatt  300
tttgacaat ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcaag c           351

```

<210>66

<211>109

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>66

```

Ala Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1           5           10           15
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Ile Cys Arg Ala Asn Glu Arg Ile Asn
          20           25           30
Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
          35           40           45
Leu Ile Ser Gly Thr Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu
65           70           75           80
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser
          85           90           95
Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Arg
          100          105

```

<210>67

<211>327

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>67

```

gcacaagaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga   60
gtcaccatca tttgcccggc aatgagcgc ataaacacct atttaaactg gtatcagcag  120

```

aagccaggaa aagcccctaa gttggtgatt tctggtacat ccagtttgga aagtggggtc 180
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctgga acagaattca ctctcagtat cagcagctctg 240
 caacctgaag attttgcate ttactactgt caacagagtt acagttcccc gtacactttt 300
 ggccagggga ccaacctgga gatcaga 327

<210>68

<211>120

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>68

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30
 Glu Thr Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Val Gly Ala Thr Lys Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>69

<211>360

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>69

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60
 tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct tggtagcaga cgggttgggt tcgccaaget 120
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcta tactcagtat 180
 gctgactcgg ttaaaggctg ctccactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagatcgggg 300

gtgggagcta ctaagatfff tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcaagc 360

<210>70

<211>109

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>70

Ala	Gln	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
1			5					10						15	
Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly
			20					25						30	
Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Val
			35					40						45	
Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
			50					55						60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
65							70							75	80
Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Asn	Thr
			85											90	95
Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys			
			100											105	

<210>71

<211>327

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>71

gcacaagaca	tcagatgac	ccagtctcca	tcctccctgt	ctgcatctgt	aggagacaga	60
gtcaccatca	cttgccgggc	aagtcagagc	attggcacct	atttaaattg	gtatcagcag	120
aaaccagga	cagcccctaa	ggctctgata	tatgctgcat	ccagtttgca	aagtggggtc	180
ccatcaaggt	tcagtggcag	tggatctggg	acagatttca	ctctcaccat	cagcagtctg	240
caacctgaag	atfittcaac	ttactactgt	caacagagtt	acaatacccc	tcgcactttt	300
ggccagggga	ccaaactgga	gatcaaaa				327

<210>72

<211>122

<400>74

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210>75

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>75

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210>76

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>76

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210>77

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>77

Gly Tyr Met Met Val
1 5

<210>78

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>78

Arg Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gln Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>79

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>79

Glu Glu Gly Gly Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210>80

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>80

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210>81

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>81

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210>82

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>82

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr

1 5

<210>83

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>83

Trp Tyr Asp Met Ser

1 5

<210>84

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>84

Arg Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>85

<211>14

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>85

Leu Glu Val Gly Ala Thr Ser Gly Gly Thr Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210>86

<211>12

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>86

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Arg Asn Leu Ala

1 5 10

<210>87

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>87

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210>88

<211>8

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>88

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Phe Thr

1 5

<210>89

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>89

Trp Tyr Ser Met Leu

1 5

<210>90

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>90

Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Phe Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210>91

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>91

Trp Asp Tyr Asn Ser Gly Trp Tyr Tyr Asp His

1

5

10

<210>92

<211>12

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>92

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu Ala

1

5

10

<210>93

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>93

<400>97

Glu Phe Tyr Asp Tyr Leu Asp Val
1 5

<210>98

<211>12

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>98

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Phe Leu Ala
1 5 10

<210>99

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>99

Gly Ala Ser Arg Arg Ala Ser
1 5

<210>100

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>100

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Asn Thr
1 5

<210>101

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>101

Arg Tyr Gln Met Asn

1 5

<210>102

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>102

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>103

<211>12

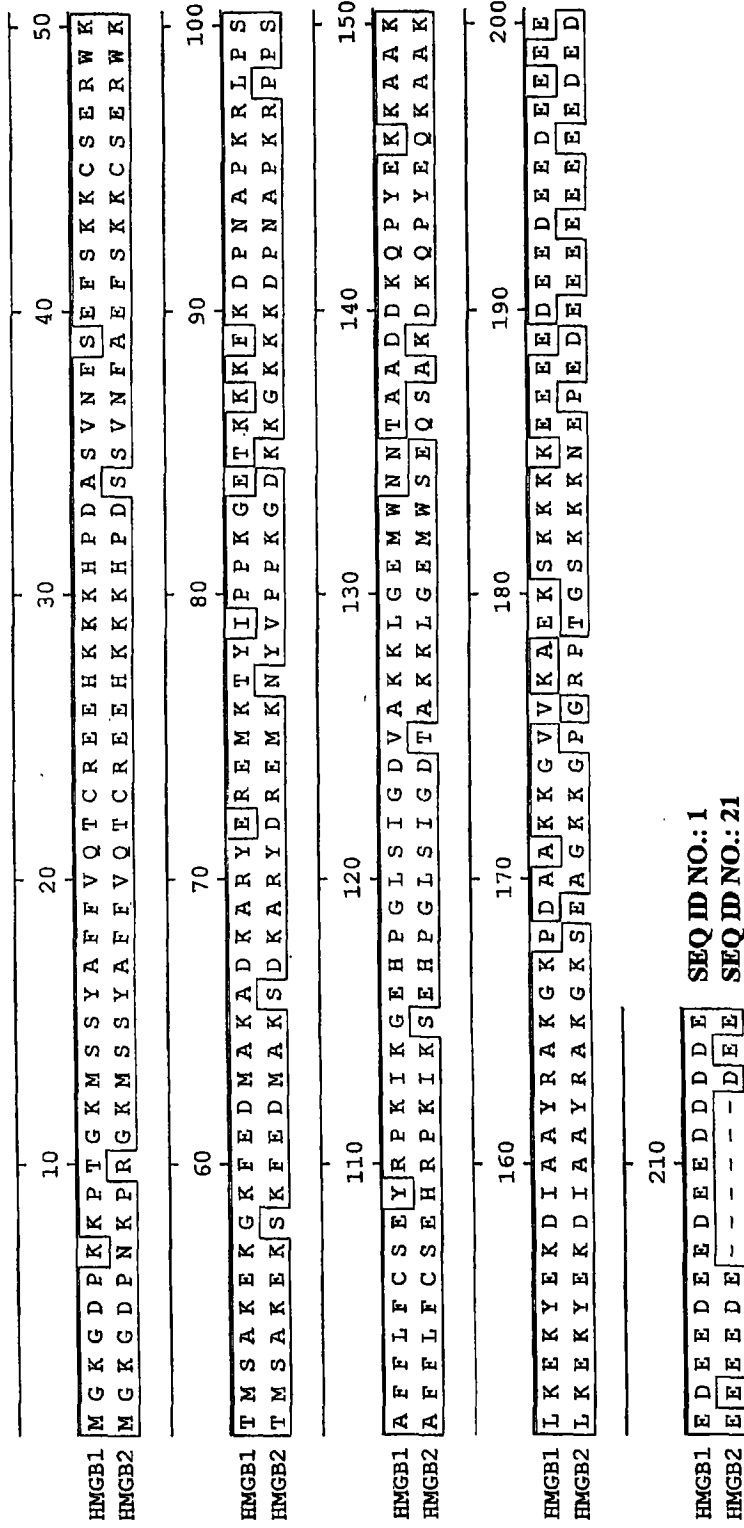
<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>103

Asp Gly Arg Gln Gly Lys Ile Ser Thr Val Asp His

1 5 10



SEQ ID NO:
6 GCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGCCGAGAGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCC 85
5 A Q D I O M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S CBRT
Extra
AGAGTGTATTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTGGTACCACAGAAACCAGGACAGCCTCCCTAAGCTGCTCATTTA 170
O S V L Y S S N N K N Y L A W Y Q O K P G O P P K L L I Y
CTGGCATCTACCCGGGATCCGGGTCCTGACCGATTGAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC 255
W A S T R E S G V P D R F S G S G T D F T L T I S S
CBRT
CTGCAGCTGAAGATGTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCTCGGACGTTTCGGCCAGGACCAAGGTGGAAA 340
L Q A E D V A V Y Y C O Q Y Y S T P R T F G O G T K V E
TCAA 345
I K

 2A

SEQ ID NO: 8 GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCCTTACGTCCTTCTTGCCTGCTTCCGGATTTCACCTTTCTCT 90
 7 E V Q L L E S G G L V Q P G S L R L S C A A S G F T F S
 GGTACATGATGGTTGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTCTCGTATCTCTCCTTCGTGGCCAGACTGGTTAT 180
 G Y M M V V R Q A P G K G L E W V S R I S P S G G O T G Y
 [CDR1] GCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTTAGAGACAACTCTAAGAATACTCTACTTCAGATGAACAGCTTAAGGCTGAGGAC 270
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L O M N S L R A E D
 [CDR2] ACGCCGTGATTACTGTCCGAGAGAAGAGGTTGGAGCTACGGGCTTTTGATATCTGGGCCAAGGACAA TGGTCAACCGTCTCAAGC 360
 T A V Y Y C A R E E G G S Y G A F D I W G O G T M V T V S S
 [CDR3]

图 2B

SEQ ID NO: 10 GCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACCTGCCGGCAAGTCAGAGC 90
 9 A Q D I Q M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S
 Extra CDR1
 ATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAGTGGGTC 180
 I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V
 CDR1 CDR2
 CCTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGT 270
 P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C
 CAACAGATTACAGTACCCCTCGGACCGTTCGGCCCAAGGACCAAGGTGGAATCAA 357
 Q O S Y S T P R T F G O G T K V E I K
 CDR3



SEQ ID NO: 12 GAA GTT CAA TTG TTAG AGT CTGG YGG GGG TCT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TAC GTC TTT TCT TGG C TGC TTT CCG GA TTC AC TTT CTCT

11 E V O L L E S G G L V O P G G S L R L S C A A S G F T F S

TGG TAC GAT ATG TCT TGG GTT CG CCA AGCT CCT GGT AAAG GTT TGG AGT GGG TTT CCG TAT CTCT CCT TCT GGT GGC TAT ACT ATG TAT

W Y D M S W V R O A P G K G L E W V S R I S P S G G Y T M Y

CDR1

GCT GACT CCG TTA AAG GTCG CTT CACT ATCTCT A G A C A A C T T A A G A C A A C T C T C T A C T T G C A G A T G A C A C C T T A A G G C T G A G G C T G A G G A C

270

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

CDR2

ACG GCG TGT ATT ACT GTG C G A G A C T C G A G T G G A G C T A C T T C G G G G G T A C G G C T T T T G A T A T C T G G G C C A A G G A C A A T G G T C A C C

360

T A V Y Y C A R L E V G A T S G G T A F D I W G O G T M V T

CDR3

GTC TCAAGC 369

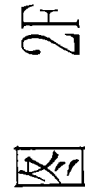
V S S



SEQ ID NO:
 14 GCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACACCCCTGTCCTTIGTCTCCAGGGGAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTTCAGAGTGTAAACAGCA 100
 13 A Q D I Q M T Q S P O T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V N S
 Extra
 GGAACCTTAGCCTGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATGGTGCATCCACAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGG 200
 R N L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P D R F S G
 CAGTGTATCTGGGACAGAAATTCATCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCTGATGATTTTGCACCTTATTACTGCCAGCAATATAACAGTTATTTCACITTTI 300
 S V S G T E F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C D O Y N S Y F T F
 GGC CAGGGACCAAGCTGGAGATCAA 327
 G Q G T K L E I K

图 2E

SEQ ID NO:
 16 GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGGGGCTCTGTTTCAGCCGTTGGTTCCTTACGCTCTTTCTTGGCGTGCCTCCGGATTCACITTTCTCT
 90
 15 E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
 TGGTACTCTATGCTTTGGGTTGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTCTTATATCTCCTTCTGGTGGCTTACTAATTAT
 180
 W Y S M L W V R Q A P G K G L E W V S Y I S P S G G F T N Y
 [CDR1]
 GCTGACTCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTAGAGCAACTTAAGAATAC TCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGAC
 270
 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L O M N S L R A E D
 [CDR2]
 ACGGCCGTGATTACTGTCCGAGGTGGGACTAACACAGTGGTGGTACTATGACCCACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCAAGC
 360
 T A V Y Y C A R W D Y N S G W Y Y D H W G O G T L V T V S S
 [CDR3]



SEQ ID NO:

18 GCACAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCCTGCTTTGTCTCCAGGGGAGGAGCCACCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGATGTTAGCAGCA 100

17 A Q D I O M T O S P G T L S L S P G E G A T L S C R A S Q S V S S
 Extra CCTACTTAGCCTGGTACCACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATGAGCGTCCAAGAGGGCCACAGGCACCCAGCCAGGTTTCAGTGG 200

T Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y E A S K R A T G T P A R F S G
 CAGTGGGCTCTGGGACAGACTTCACTCTCAGCATCAGCAGCTAGAGCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT CAGCA CCGTCAACAAC TGGCTCCACAG 300

S G S G T D F T L S I S S L E P E D F A V Y Y C O H R H N W P P Q

TGGACGTTTGGCC AAGGACCAAGGTGGAGGTCAAA 336

W T F G O G T K V E V K

图 2G

SEQ ID NO: 20 GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCITTTACGTCITTTTCITGGCGCTGCTTCCGGATT 80

19 E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F
 CACTTCTCTTGGTACGATGACTTGGGTTCCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCCATCTCTCCTT 160

T F S W Y D M T W V R Q A P G K G L E W V S S I S P
 CDR1

CTGGTGGCTATACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTAC 240

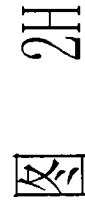
S G G Y T K Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 CDR2

TTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACACAGCCGTGATTACTGTACCACAGAAATTTCTACGATTACCTGGACGTCG 320

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T T E F Y D Y L D V W
 CDR3

GGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC 351

G K G T T V T V S S



SEQ ID NO: 25 GCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCCAGGCACCCCTGTCTTTGGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT 90
 24 A Q D I Q M T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S
 Extra CDR1
 GTTAGGACCACTTCTTGGCCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATATATGGTGCCATCCAGGAGGGCCAGTGGC 180
 V R S N F L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S R R A S G
 CDR2
 ATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTTGGGCGAGACTTCACCTCAGCATCAGCAGACTGGAGCCCTGAAGATTCGCGATGATAC 270
 I P D R F S G S G F A D F T L S I S R L E P E D F A V Y Y
 TGTACAGTATGGTAGCTCACCCACACTTTTGGCCAGGGTCCCAAGGTGGAGATCAA
 C Q Q Y G S S P N T F G Q G S K V E I K
 CDR3

 21

SEQ ID NO: 27
 G A A G T T C A A T T G T T A G A G T C T G G T G G G G T C T T G T T C A G C C T G G T G G T C T T T A C G T C T T T C T T G C G G T C T T C C G G A T T C A C T T T C T C T
 90
 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
 C G T T A C C A G A T G A A T G G T T C G C C A A G C T C C T G G T A A G G T T G G A G T G G T T C T T A T C T C C C T C T G G T G G C C A F A C T C A T T A T
 180
 R Y Q M N W V R Q A P G K G L E W V S S I S P S G G H T H Y
 CDR1
 G C T G A C T C C G T T A A A G G T C G C T T C A C T A T C T T A G A C A A C T C T A A G A A T A C T C T C T A C T T G C A G A T G A A C A G C T T A G G S C T G A G G A C
 270
 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
 CDR2
 A C G C C C G T G T A T T A C T G T C G G A A G A T G G A C G A C A G G T A A A T A A G T A C G G T T G A C C A C T G G G G C C A G G A A C C C C T G S T C A C C G T C T C A
 360
 T A V Y Y C A K D G R Q G K I S T V D H W G Q G T L V T V S
 CDR3
 A G C
 + + +
 S



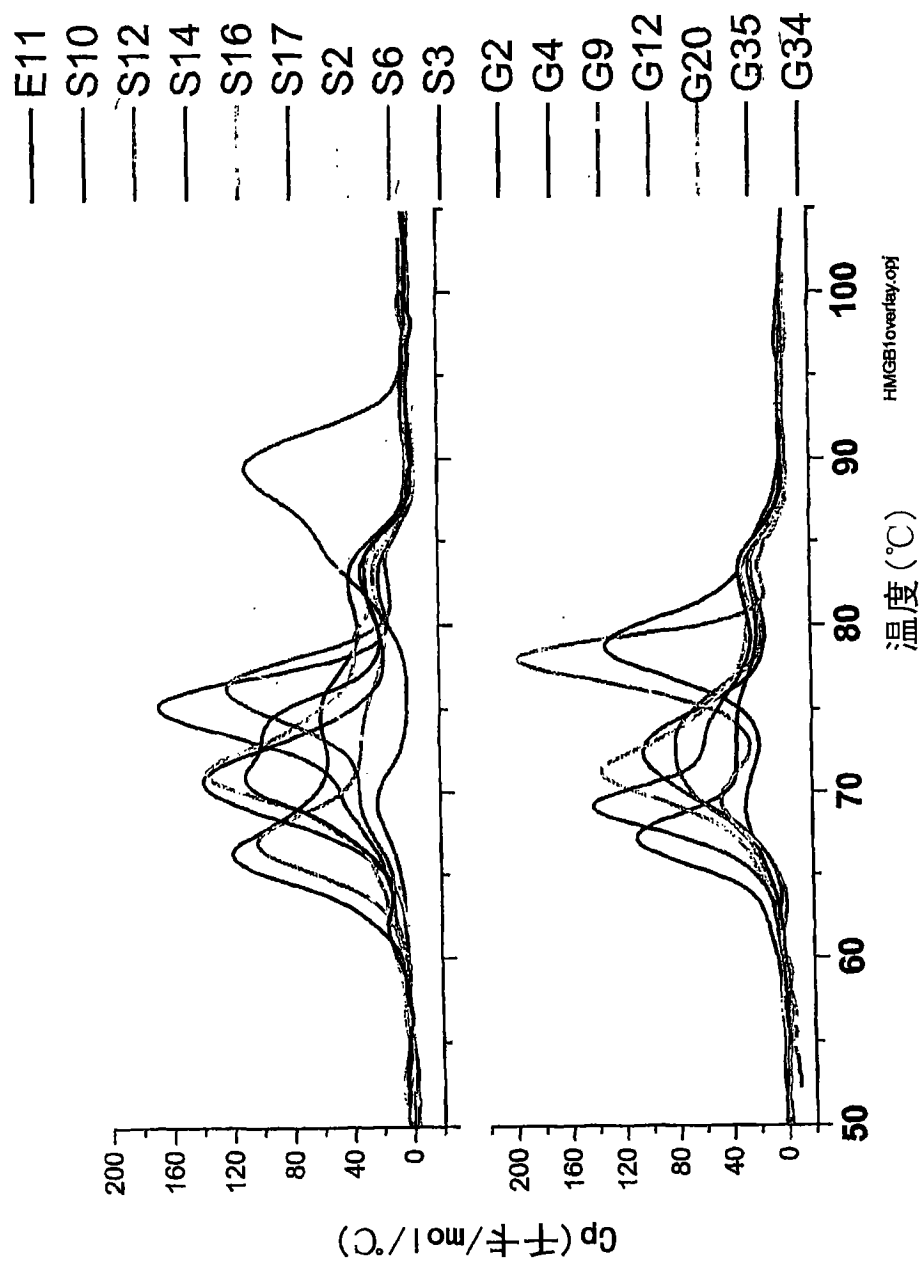
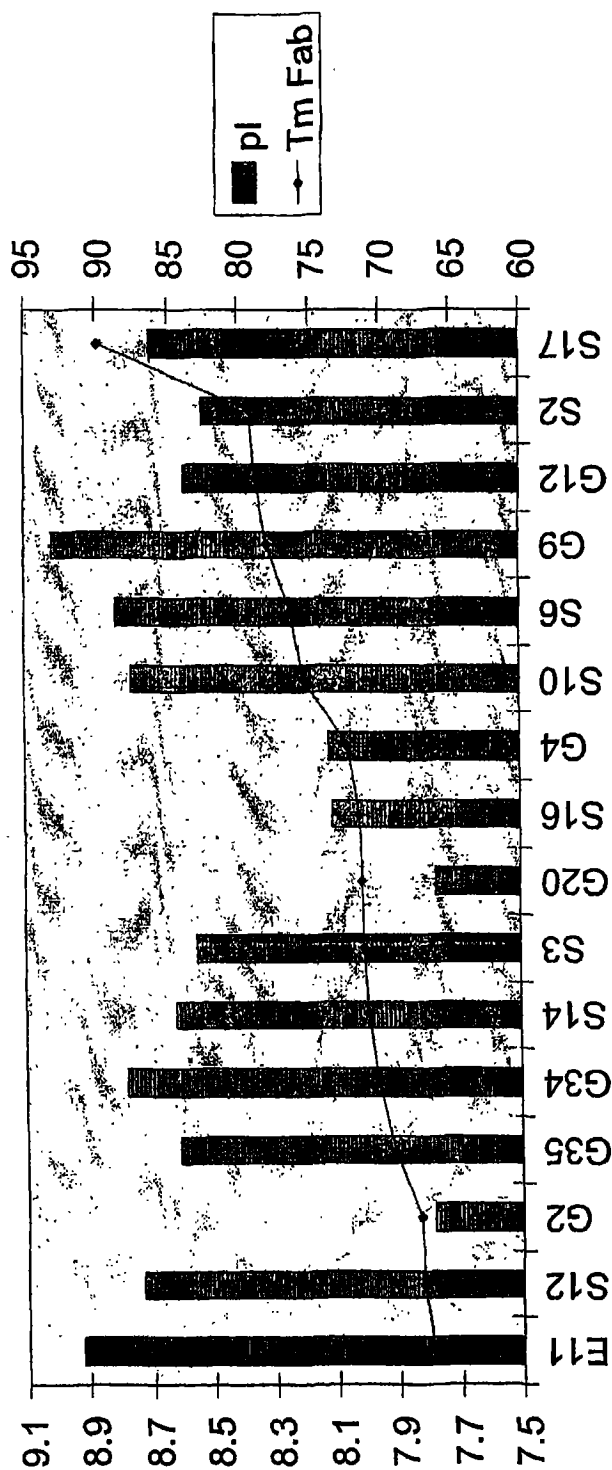


图 3B



克隆

图 3C

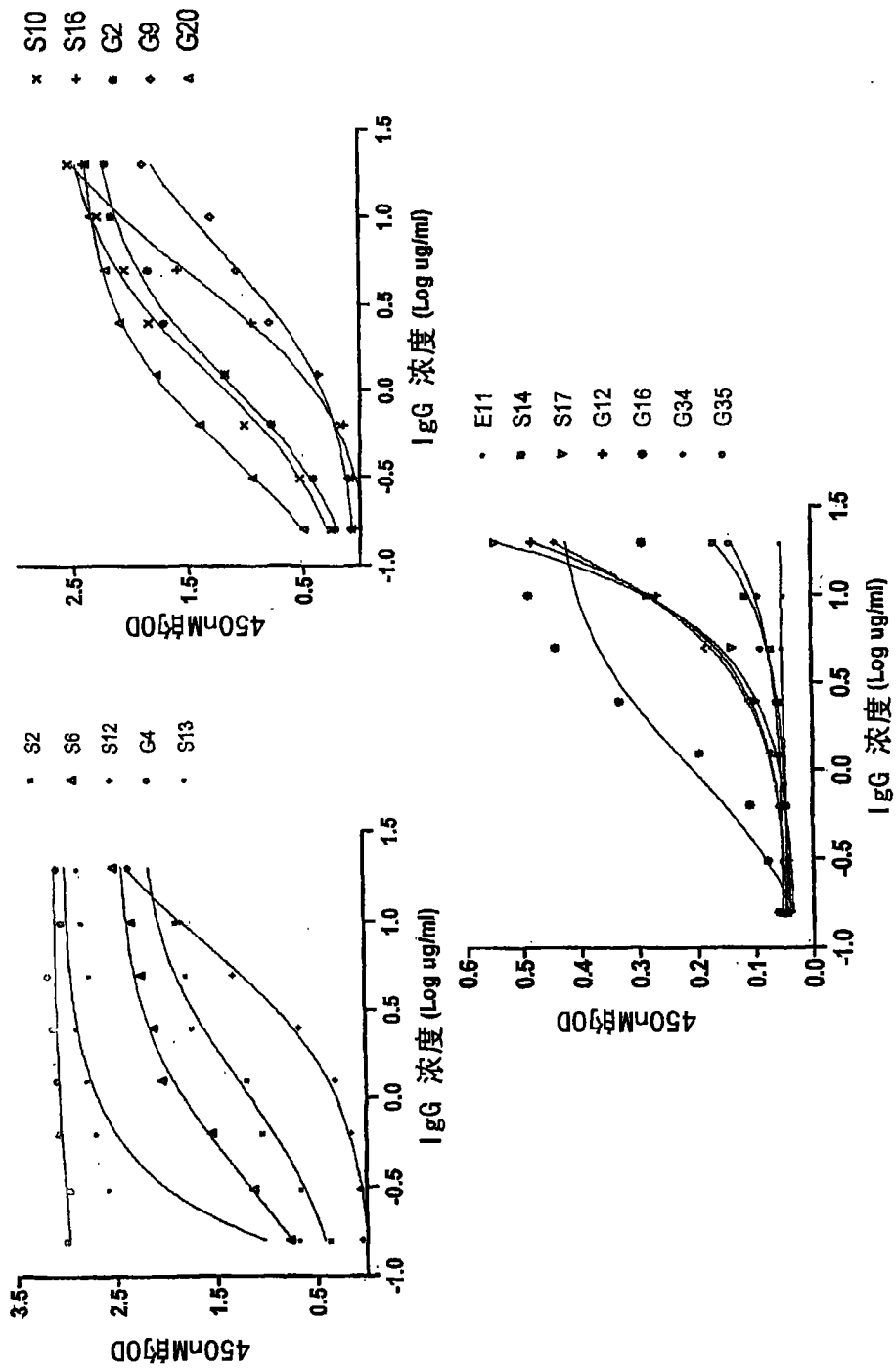
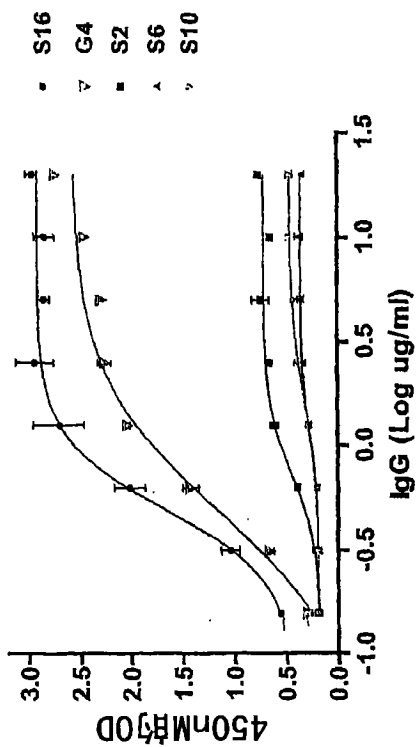
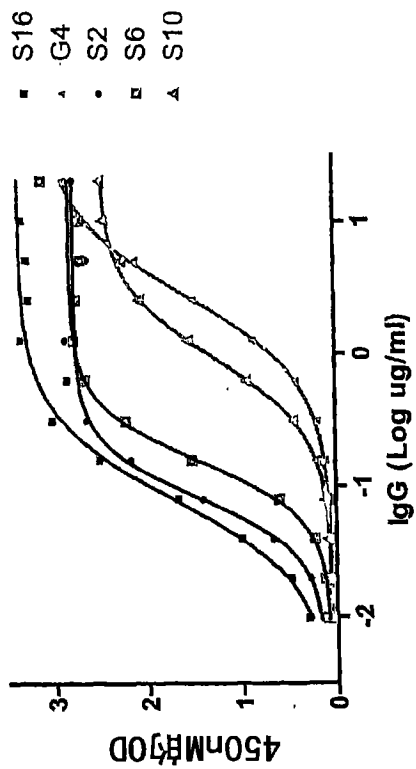


图 4A

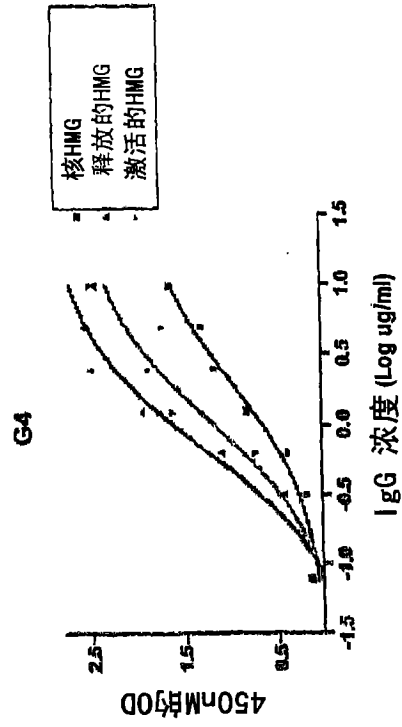
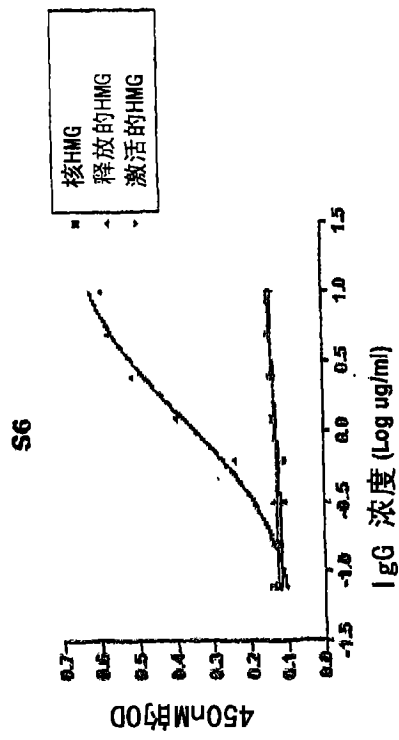
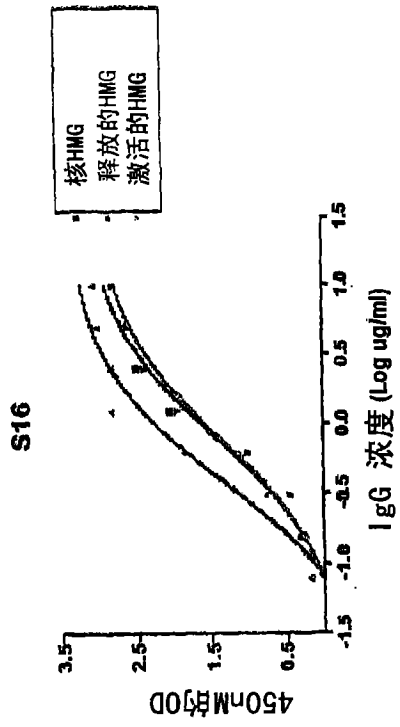
天然 HMGB1



rHMGB1



4B



4C

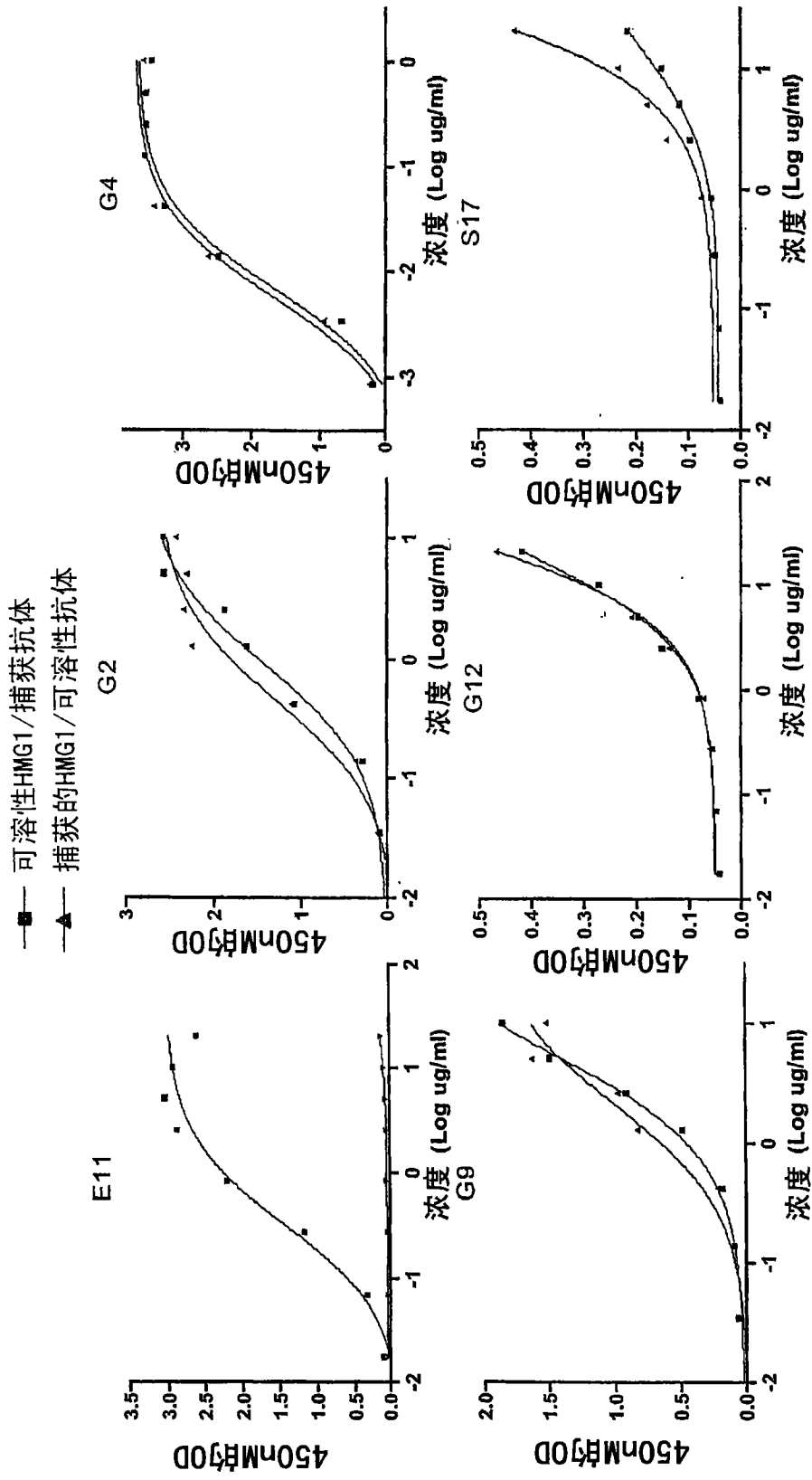
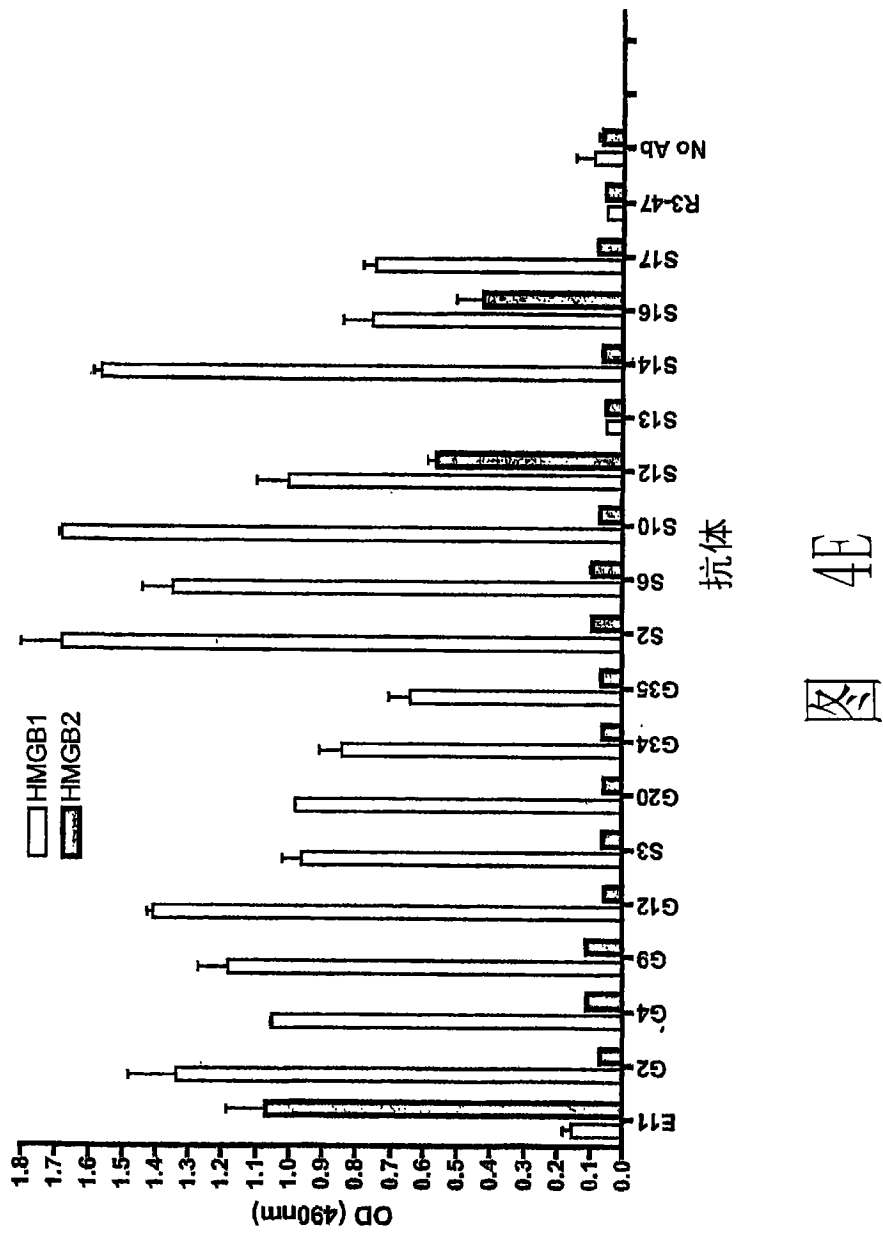


图 4D



4E

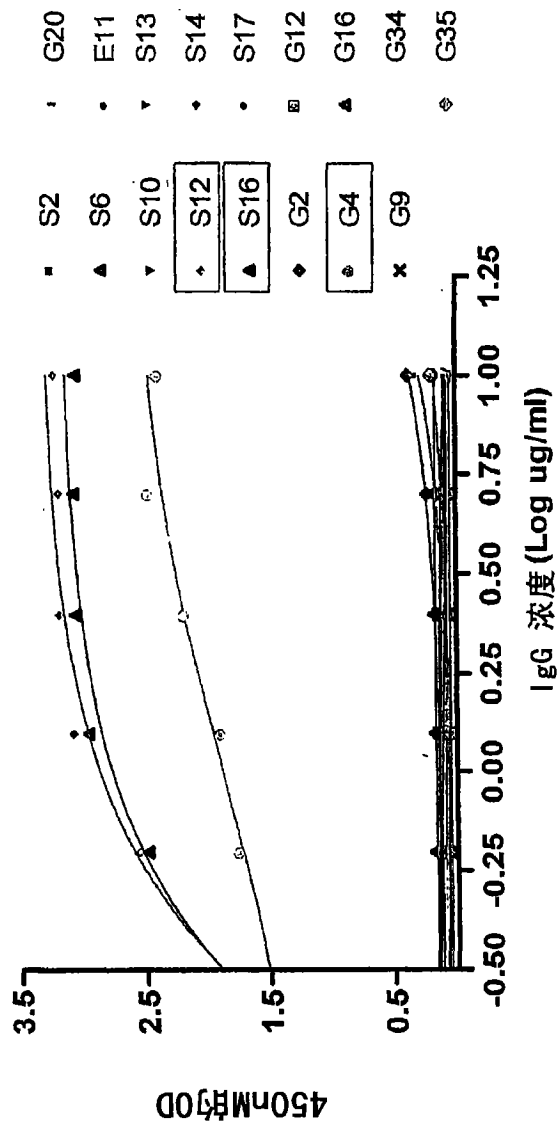


图 5A

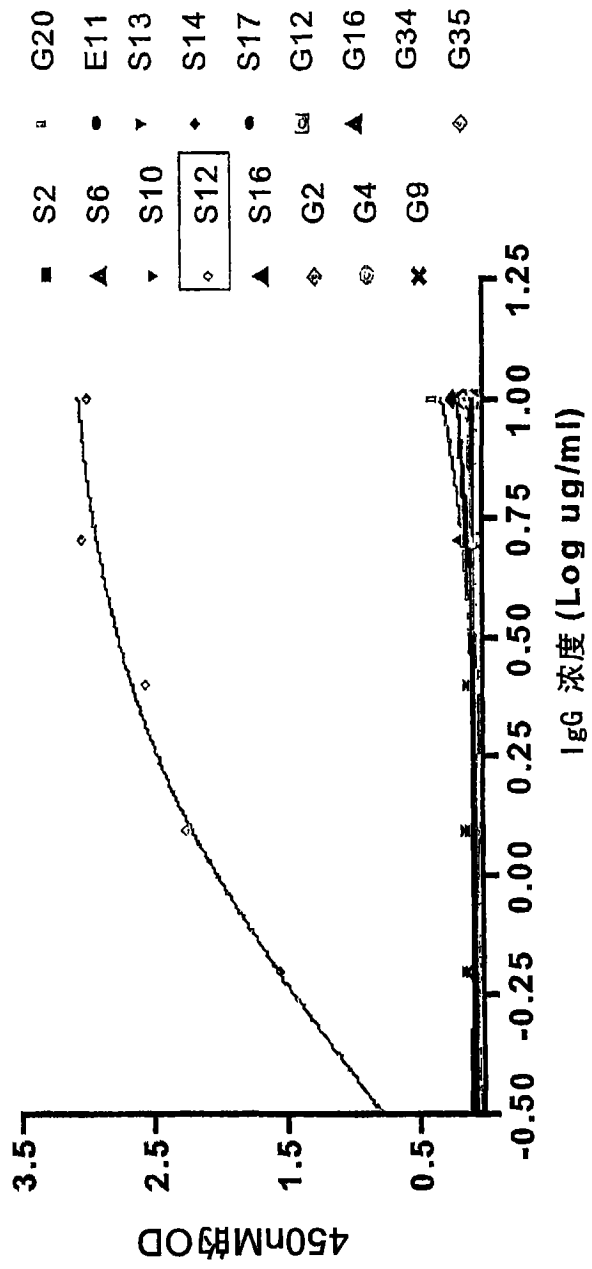


图 5B

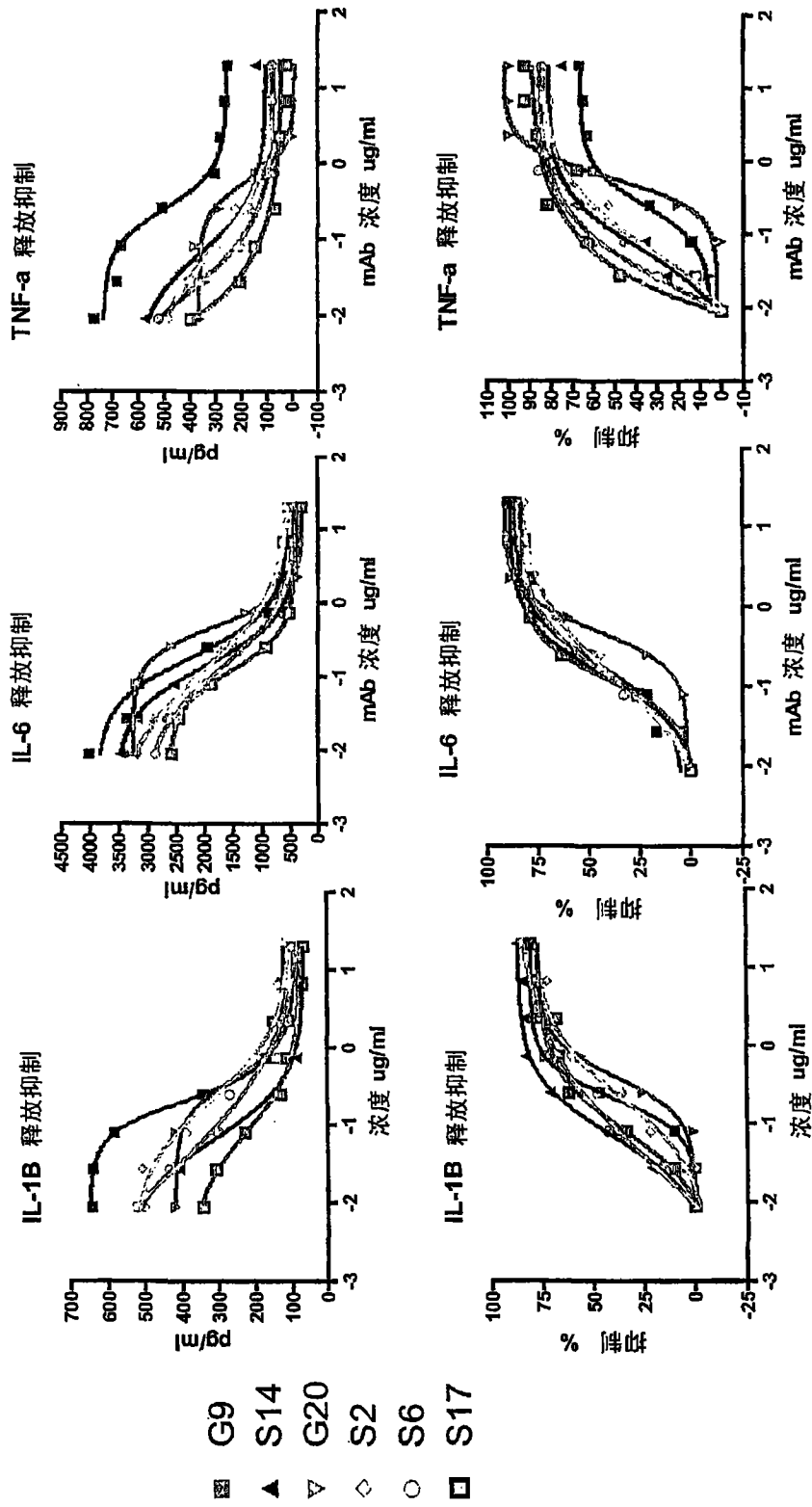


图 6A

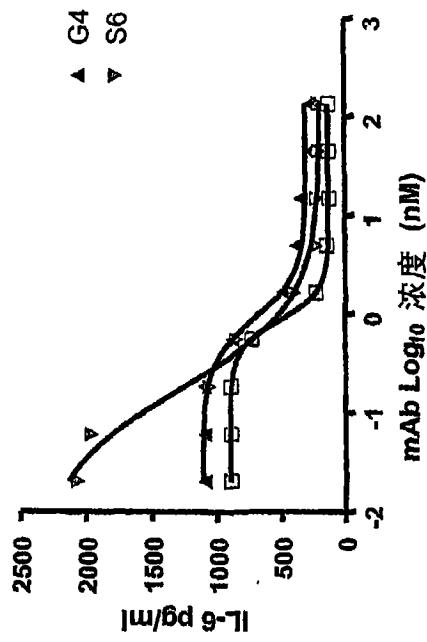
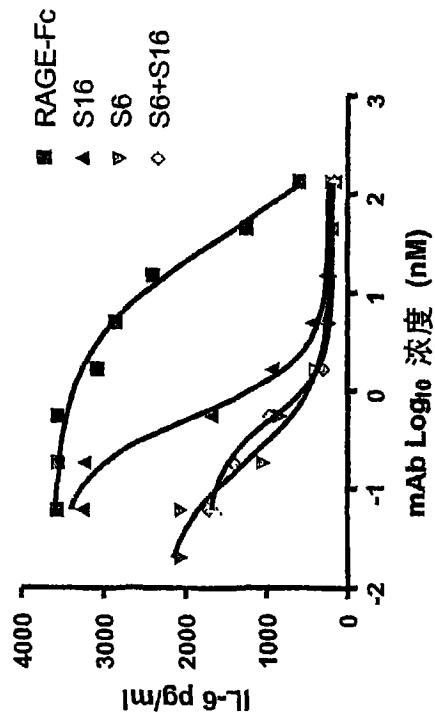
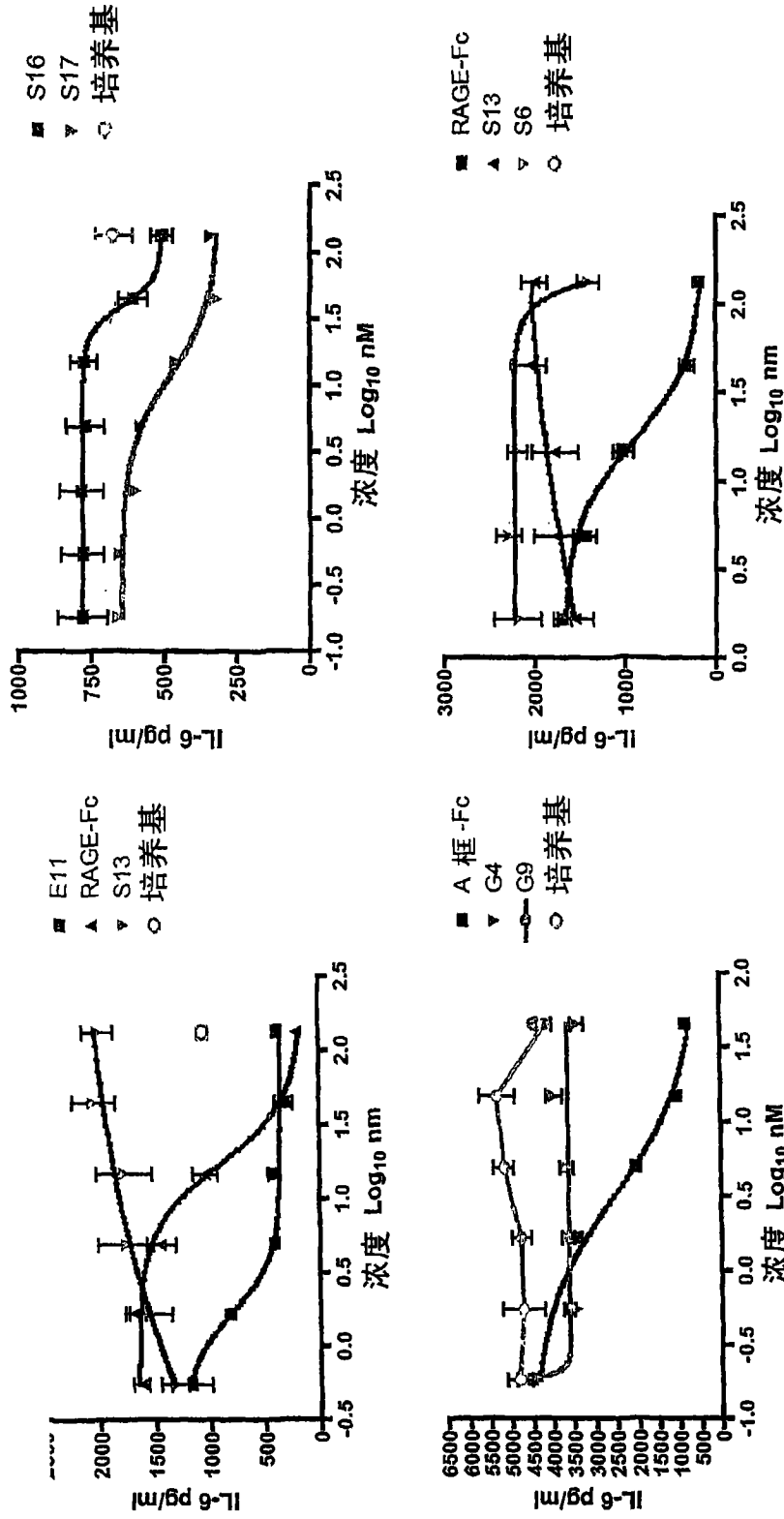
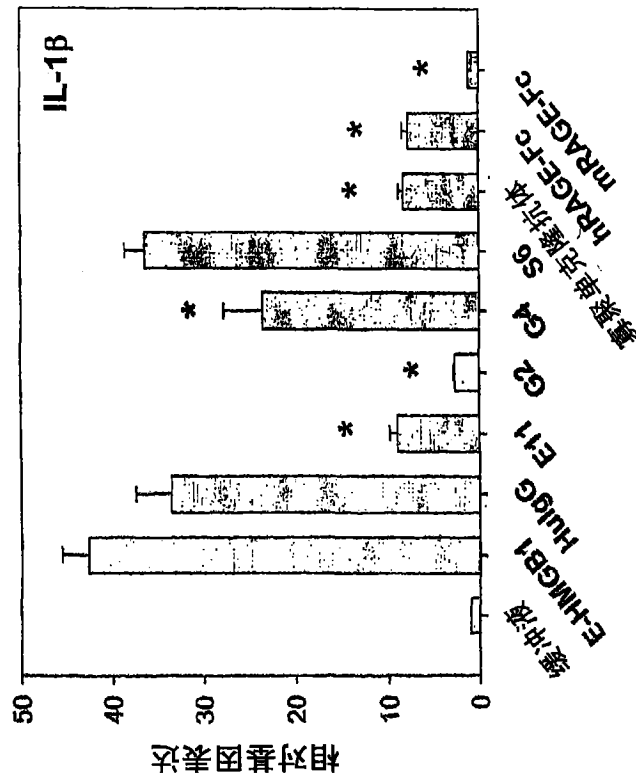
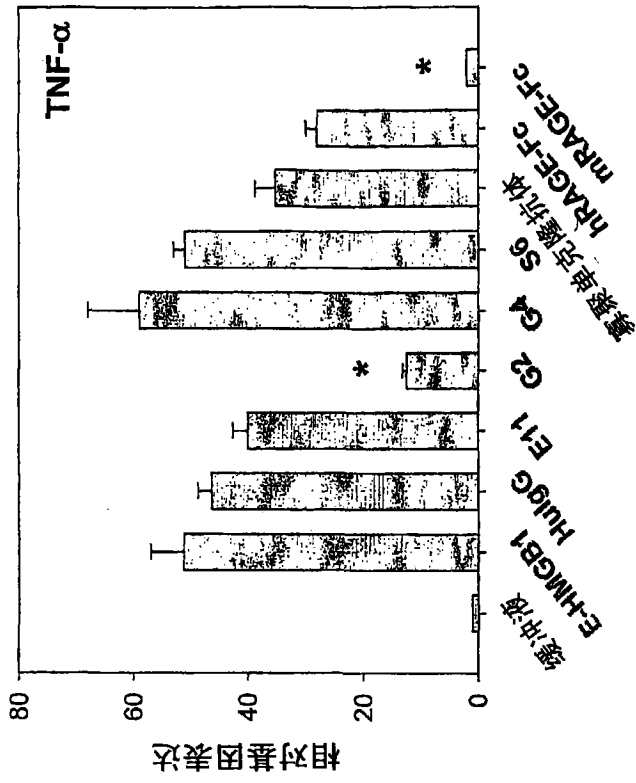


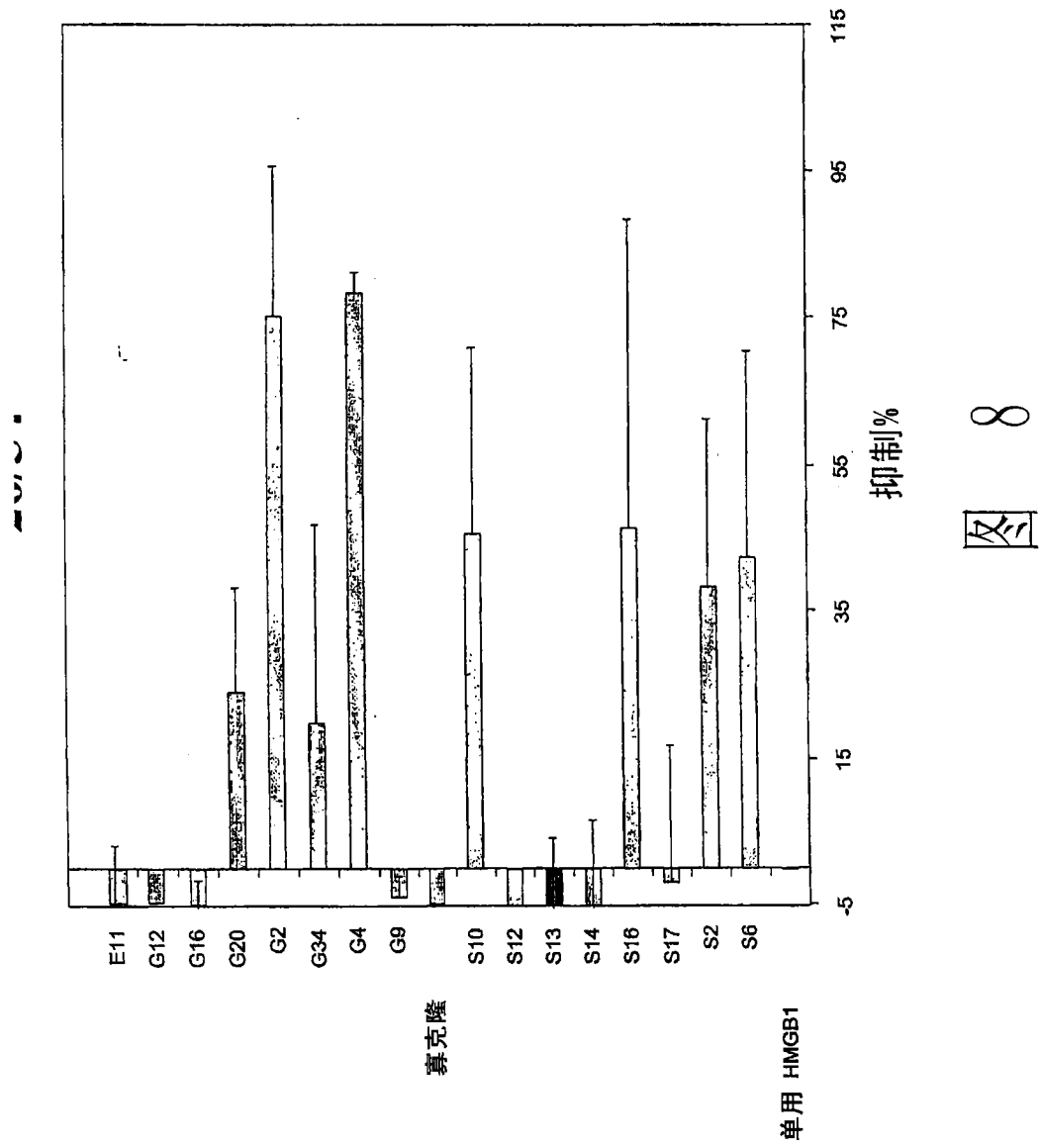
图 6B



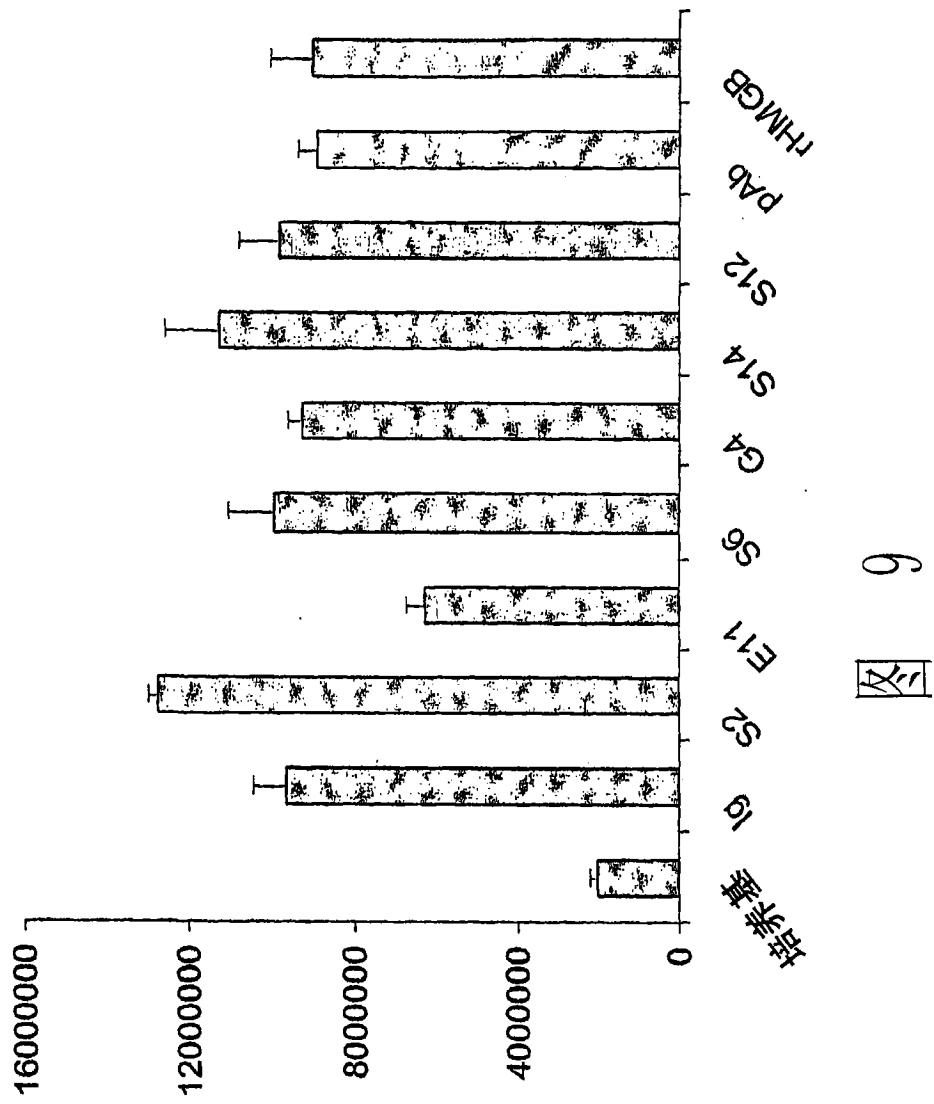
6C



7



8



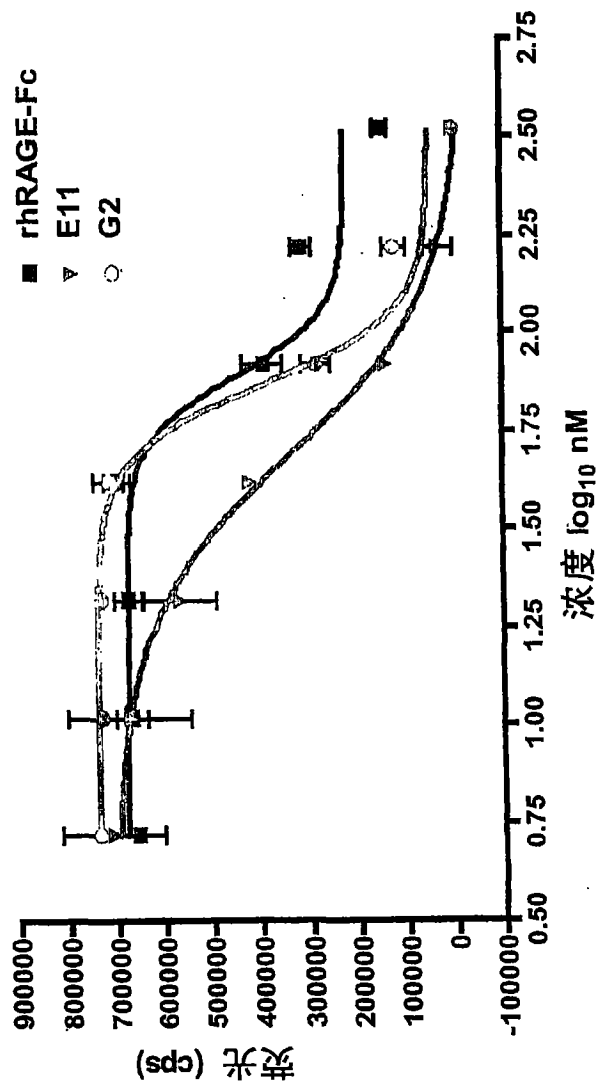


图 10

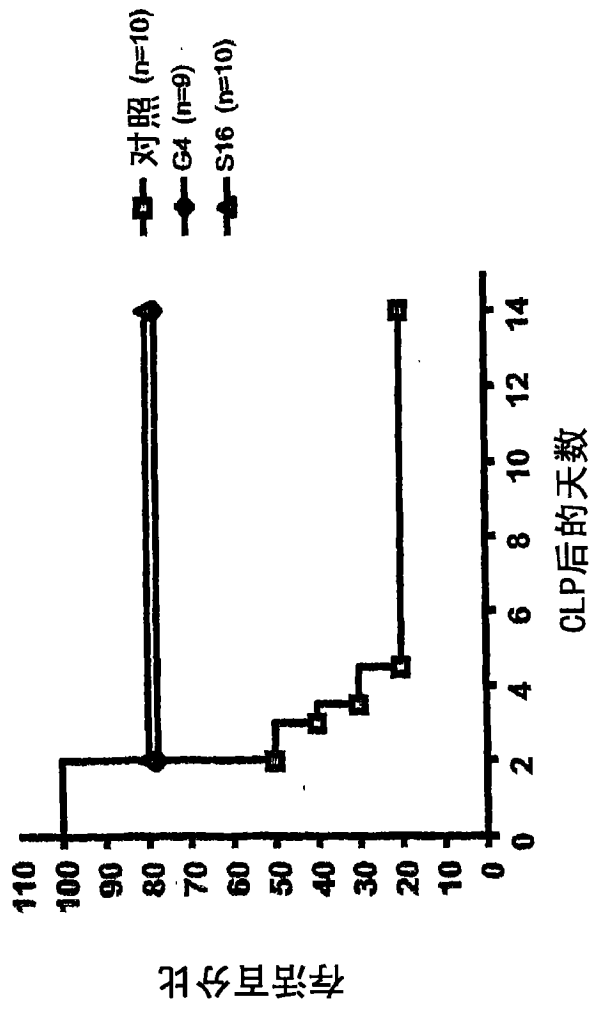


图 11A

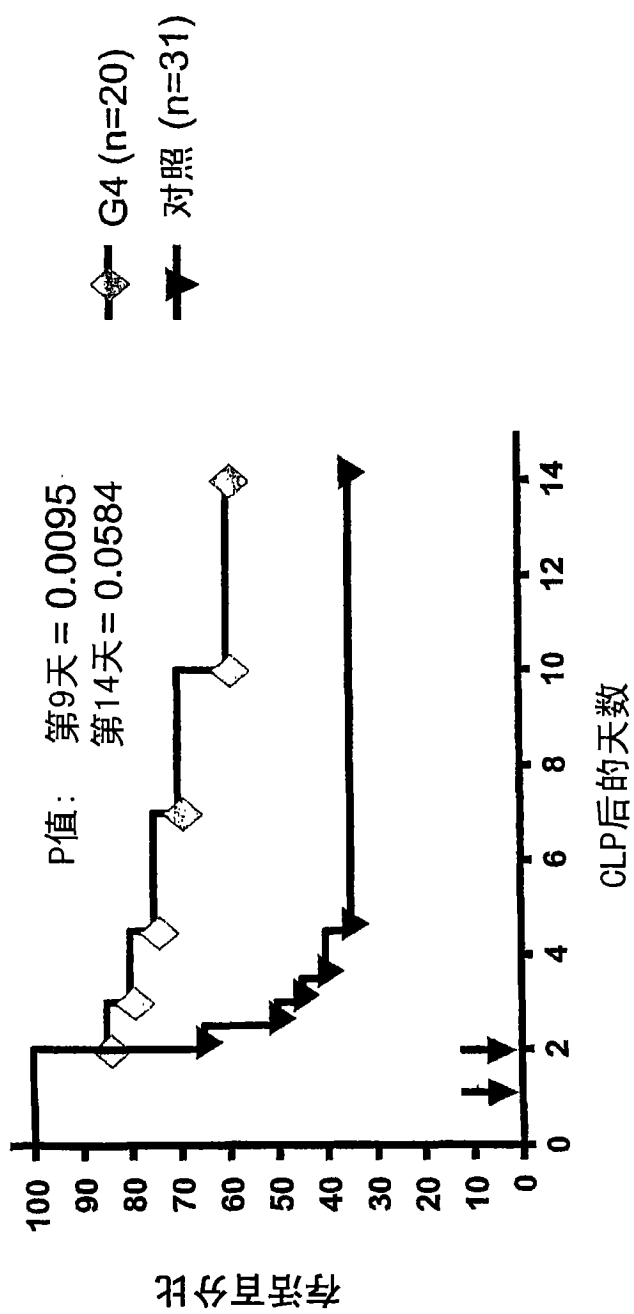


图 11B

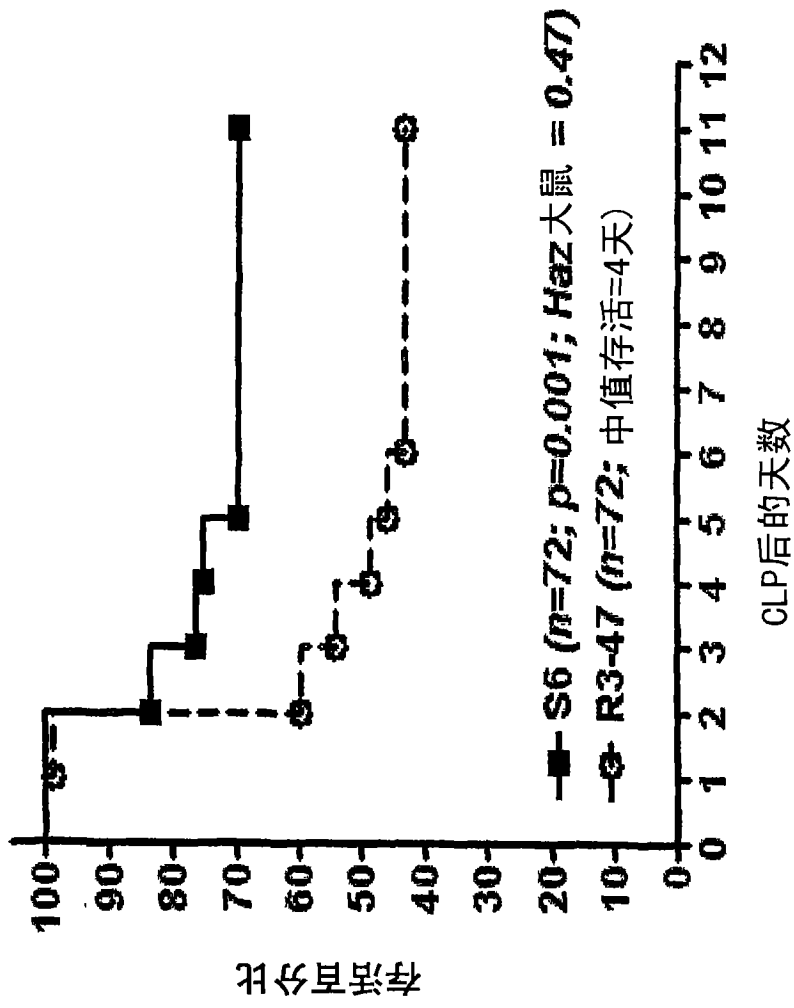


图 11C

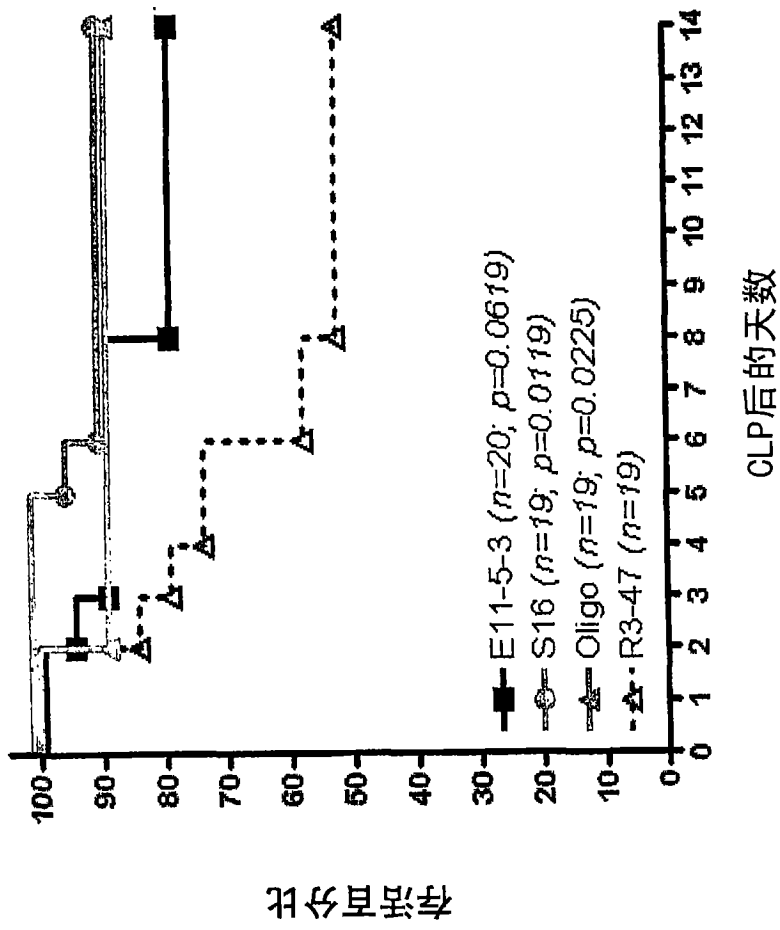
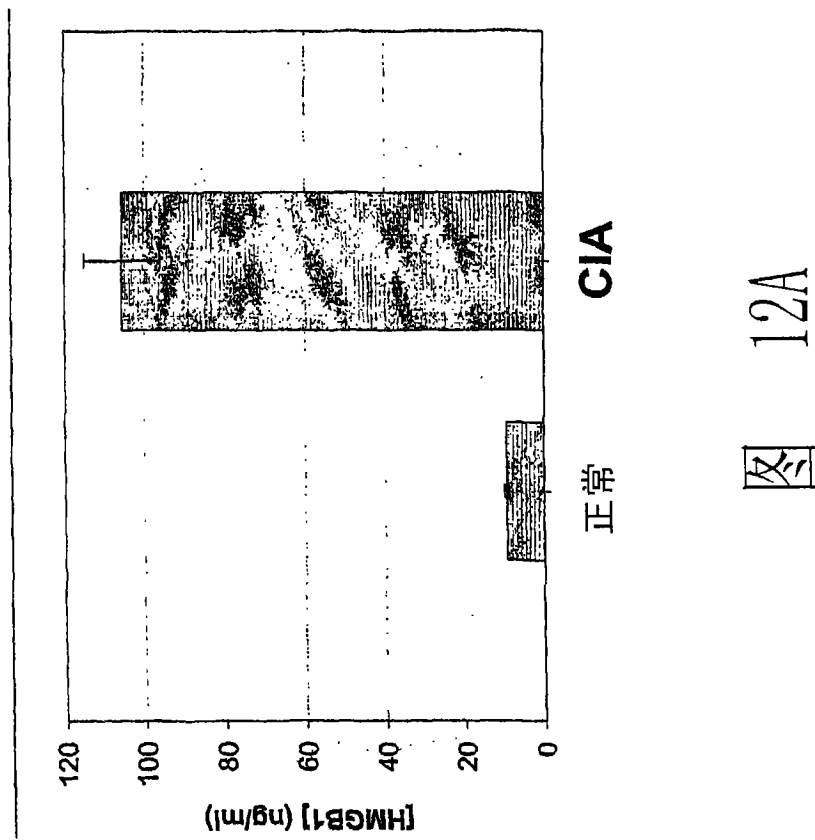


图 11D



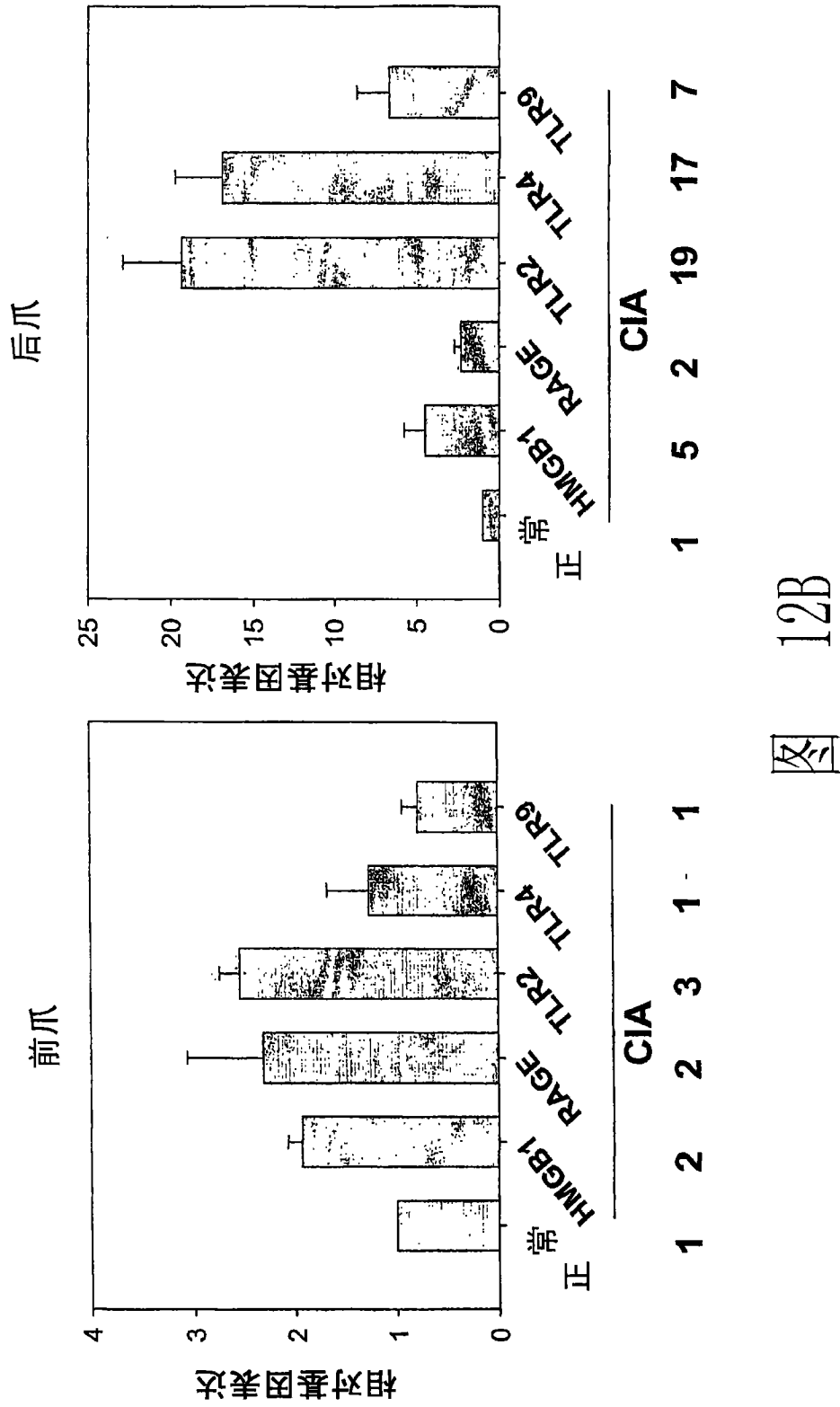
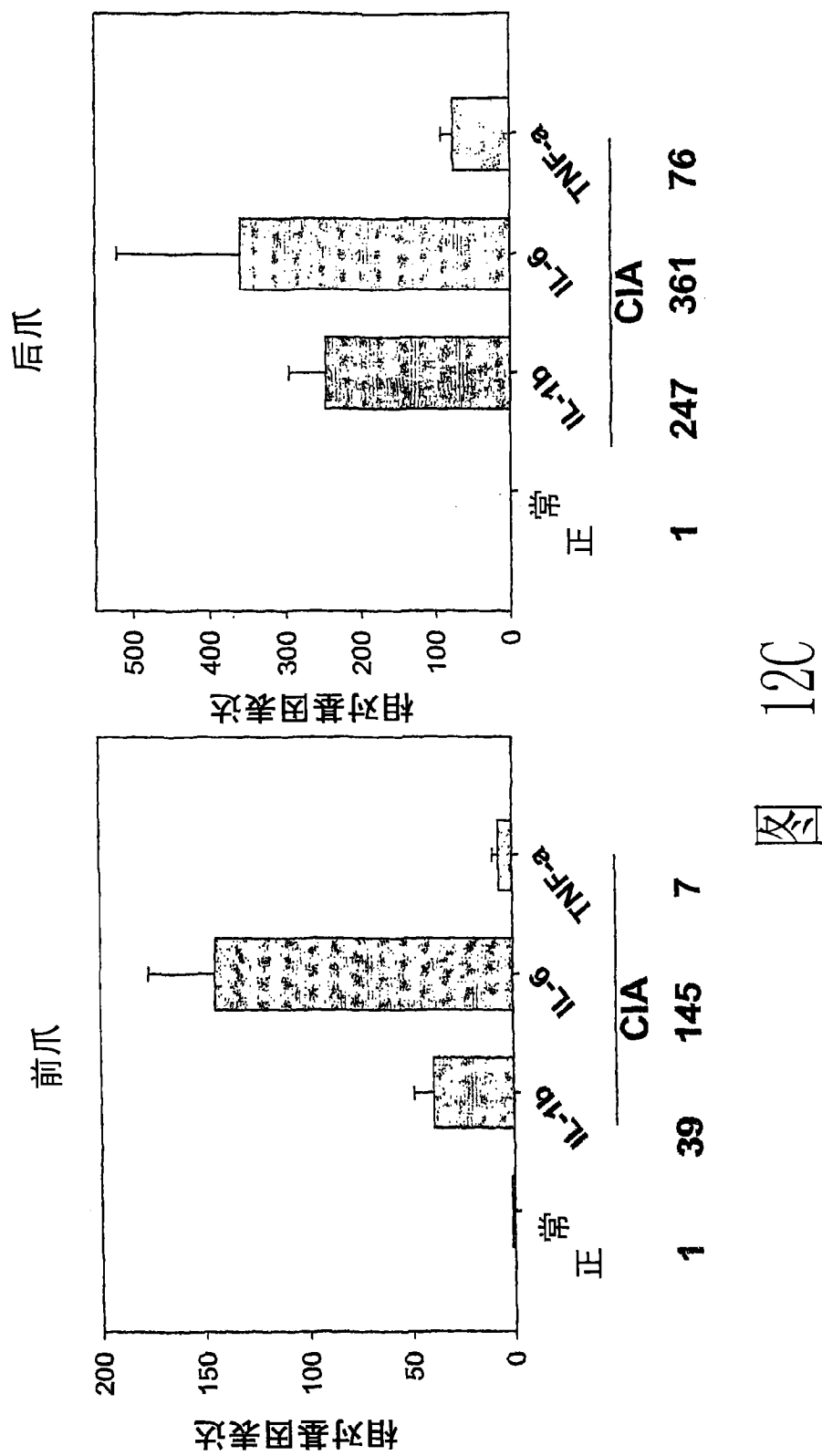


图 12B



12C

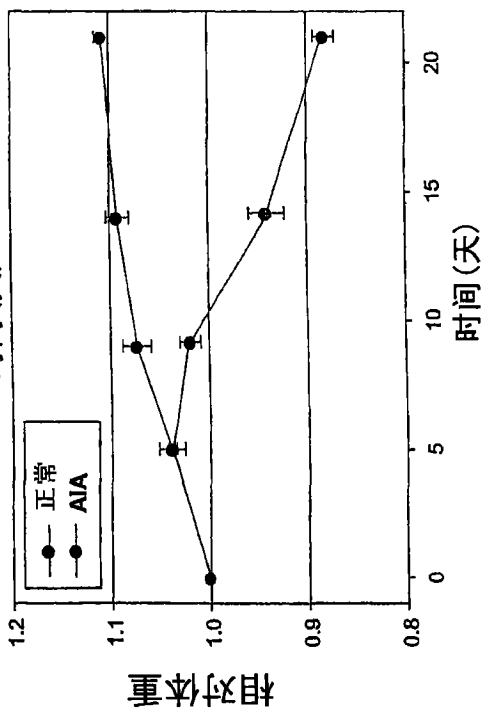
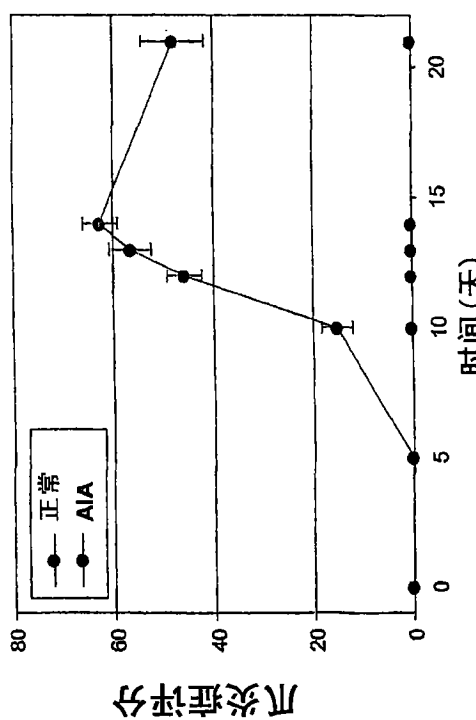
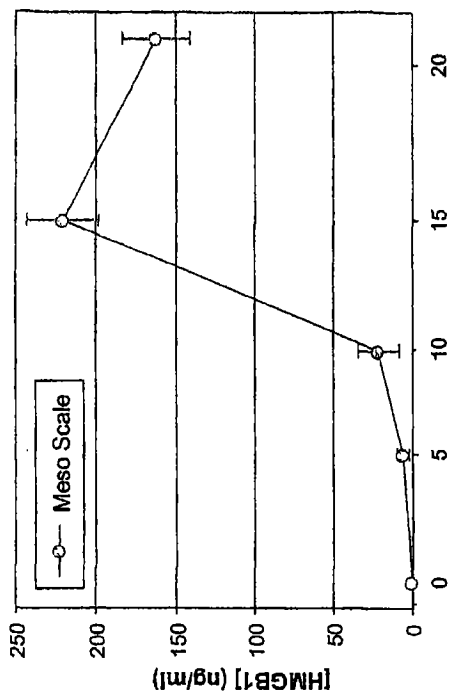


图 12D

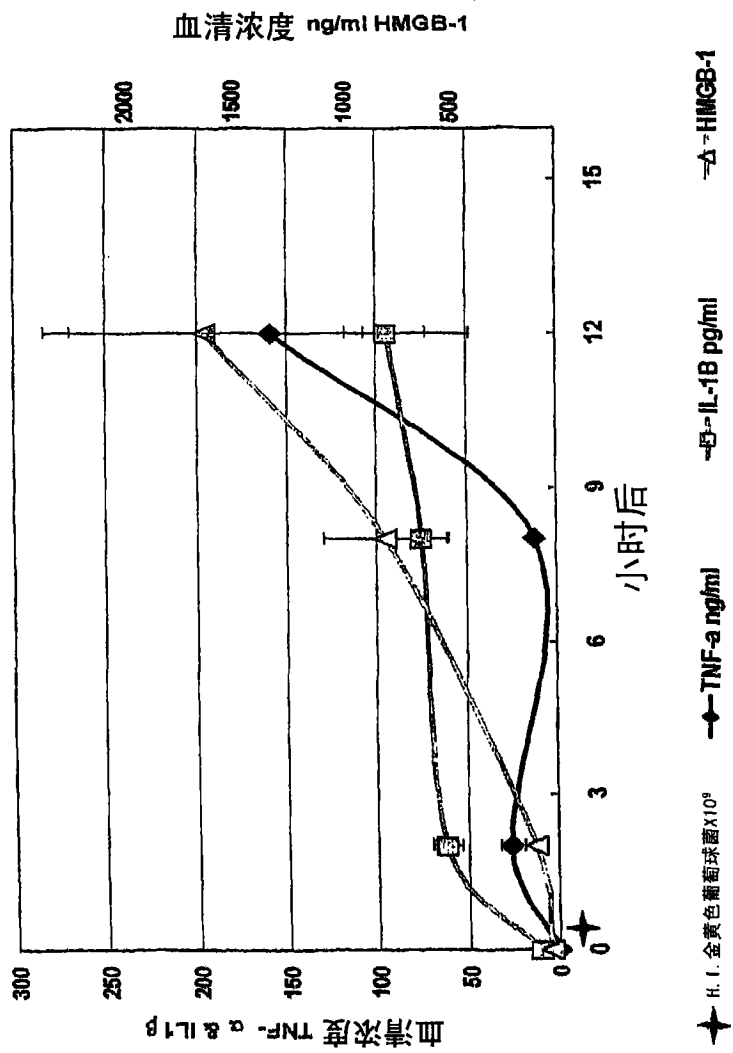


图 12E

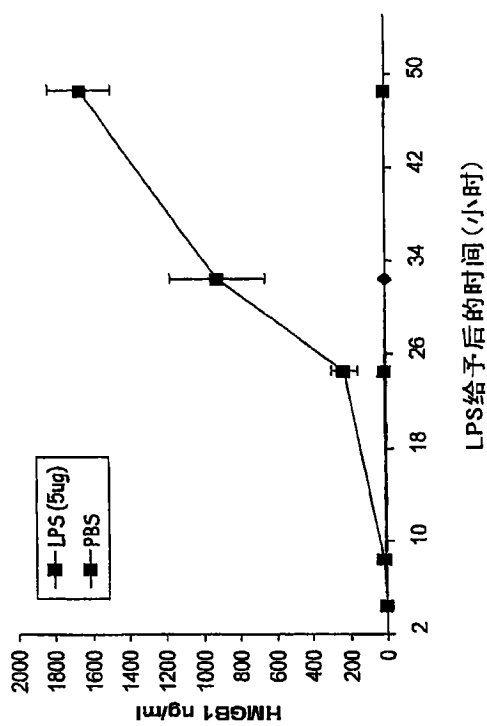
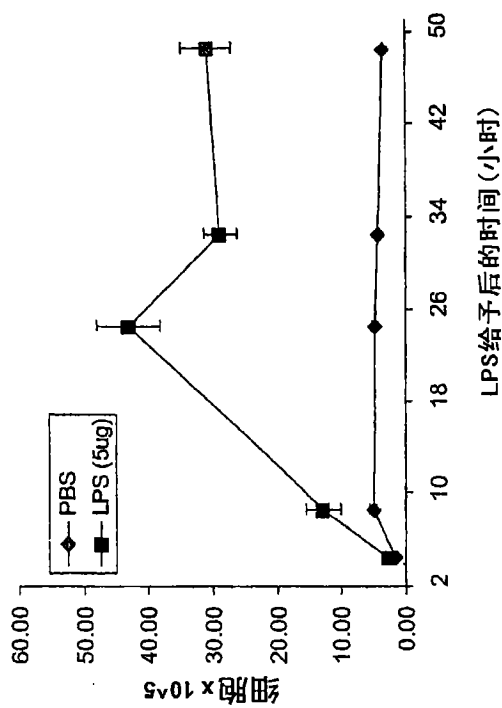
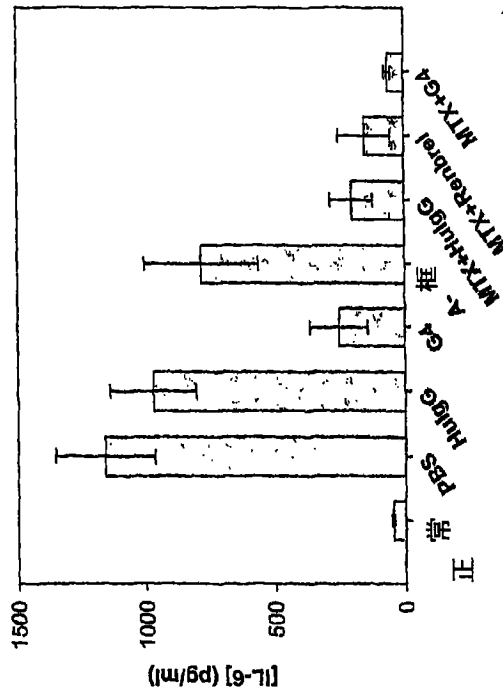
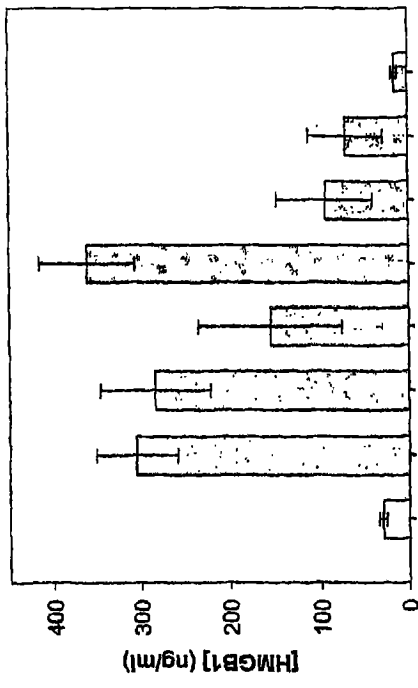
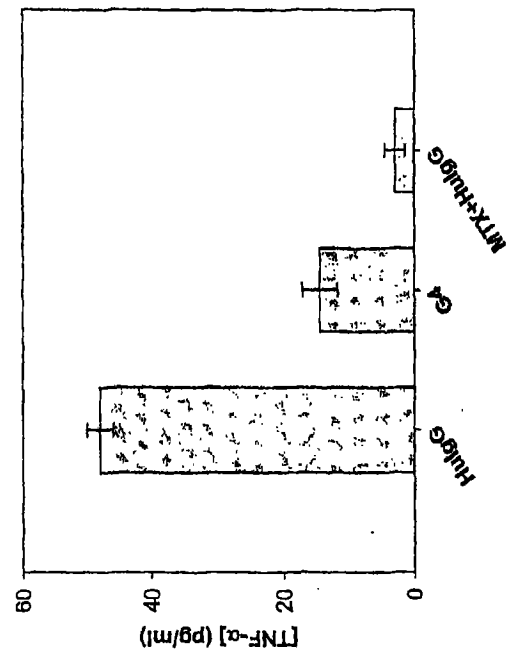


图 12F



12G

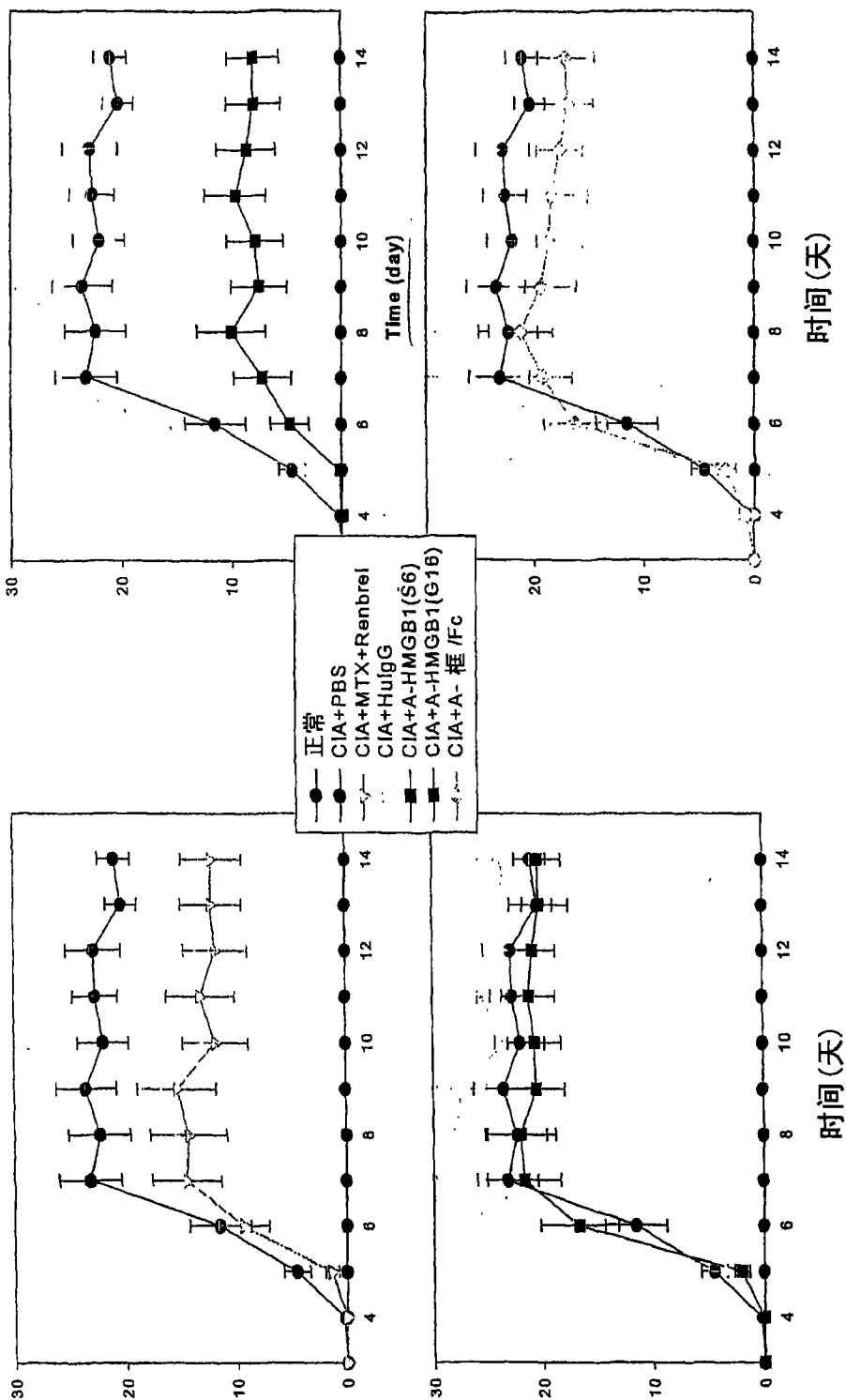
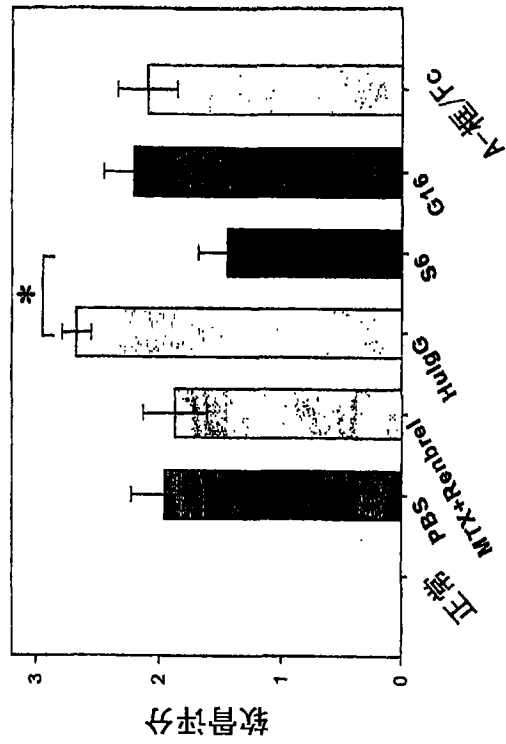
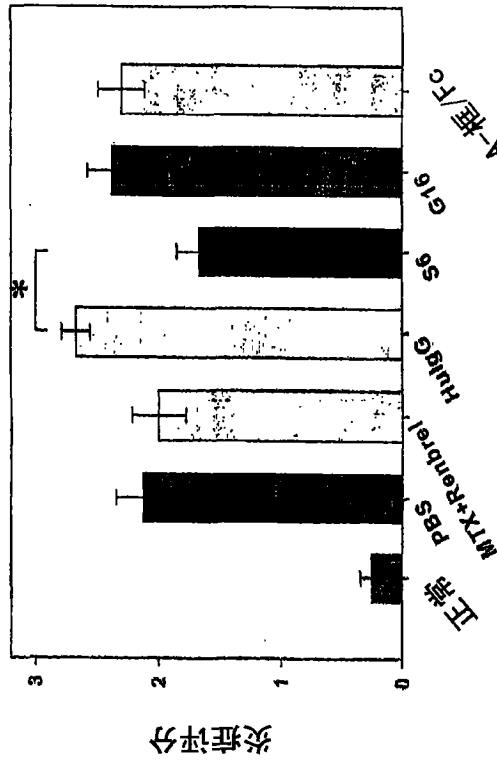
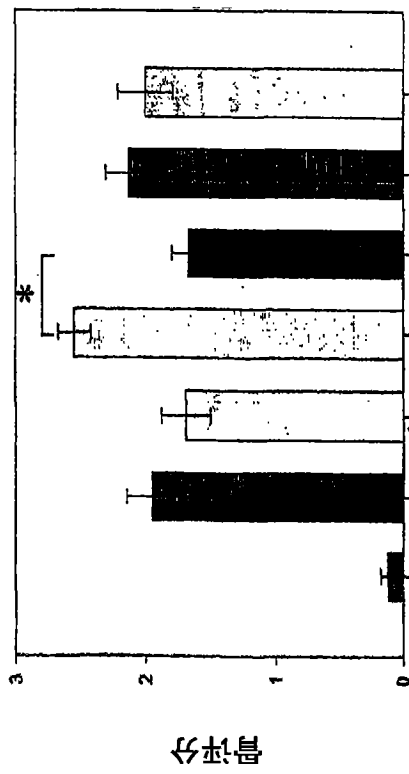


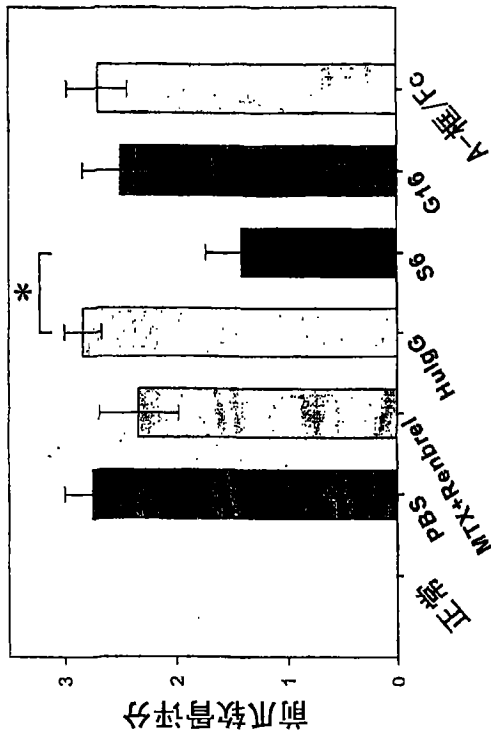
图 13A



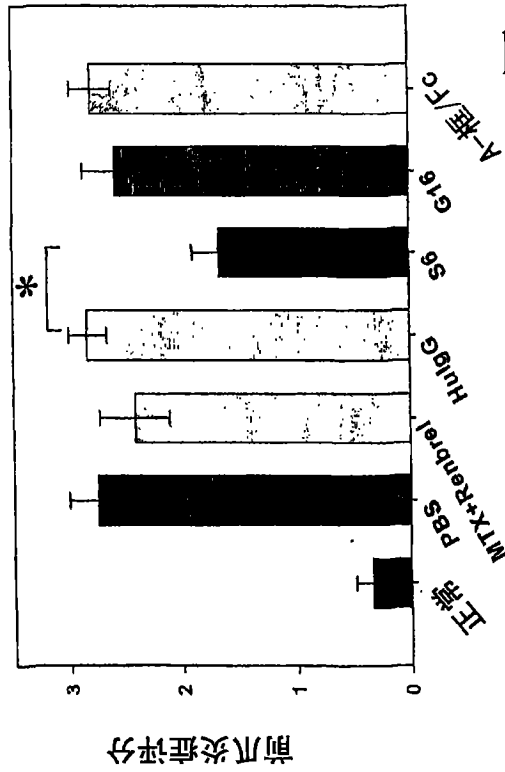
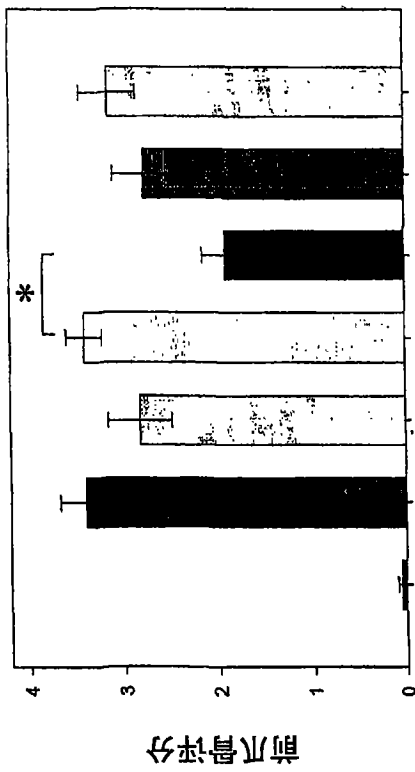
第14天前爪和后爪的平均值
* P < 0.01



13B



第14天前爪和后爪的平均值
* P < 0.01



13C

43/54

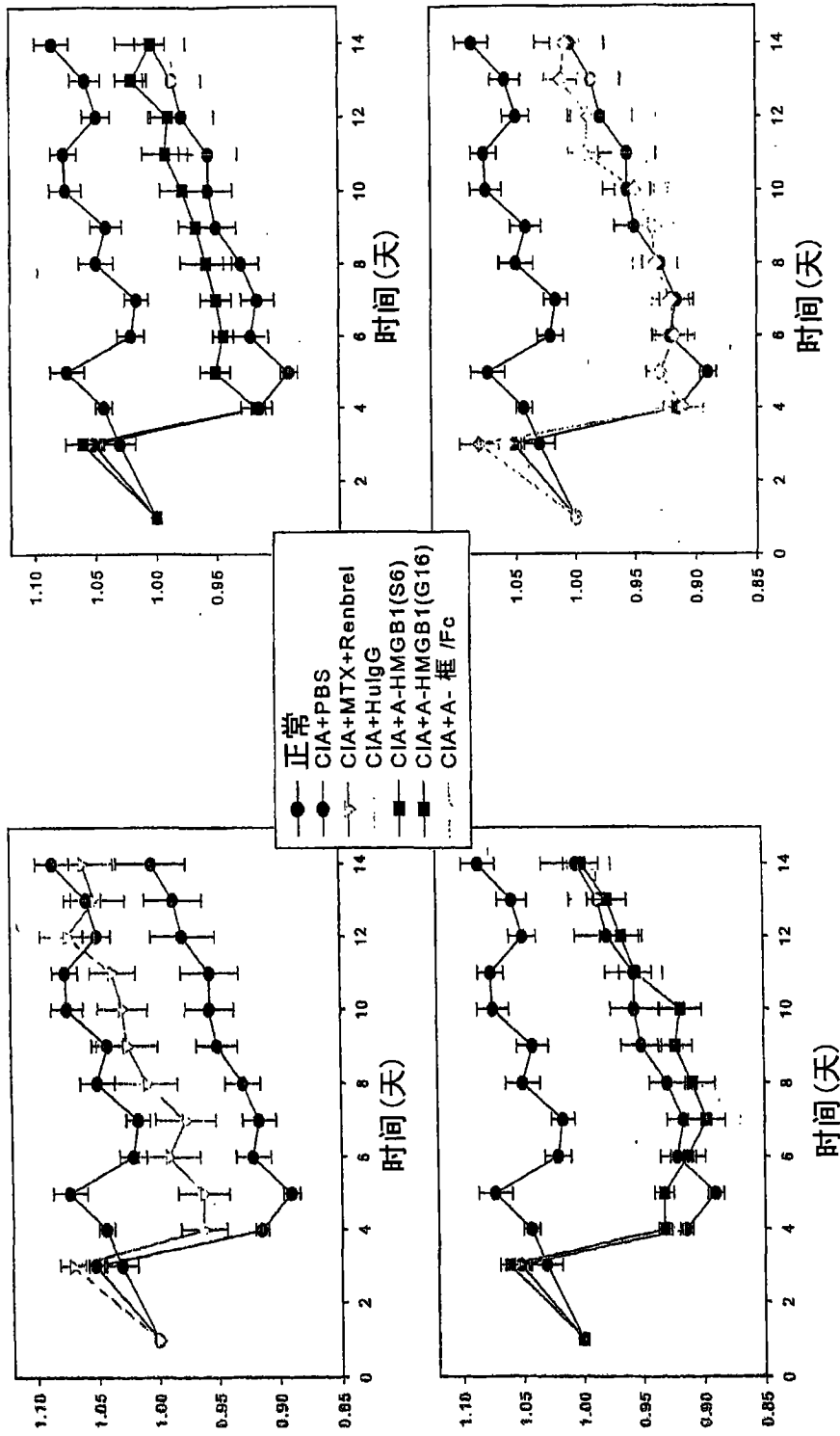


图 13D

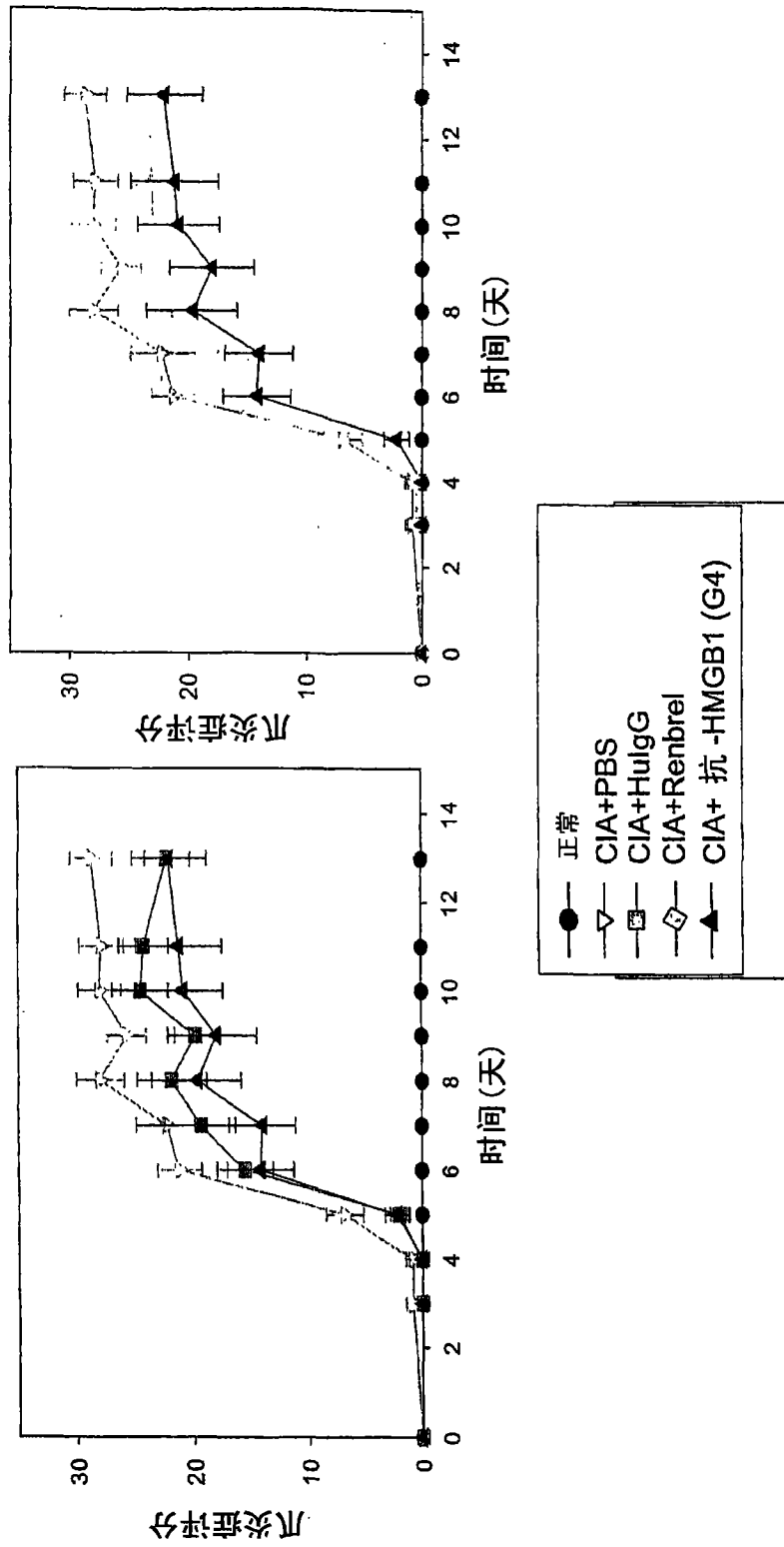


图 14A

45/54

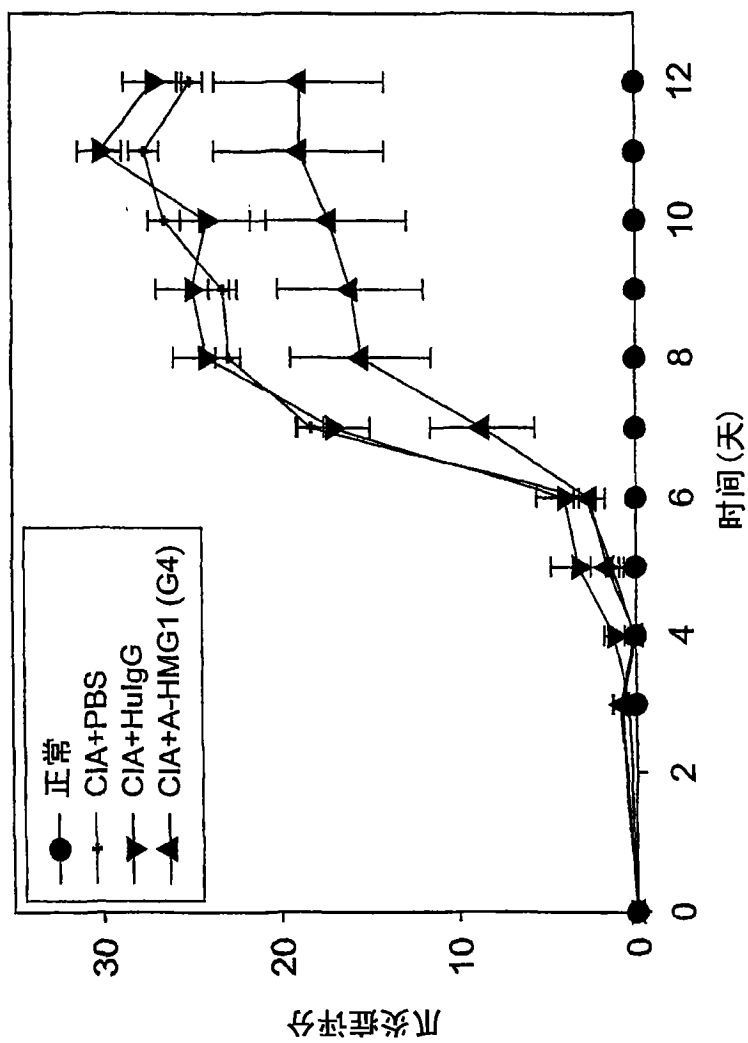


图 14B

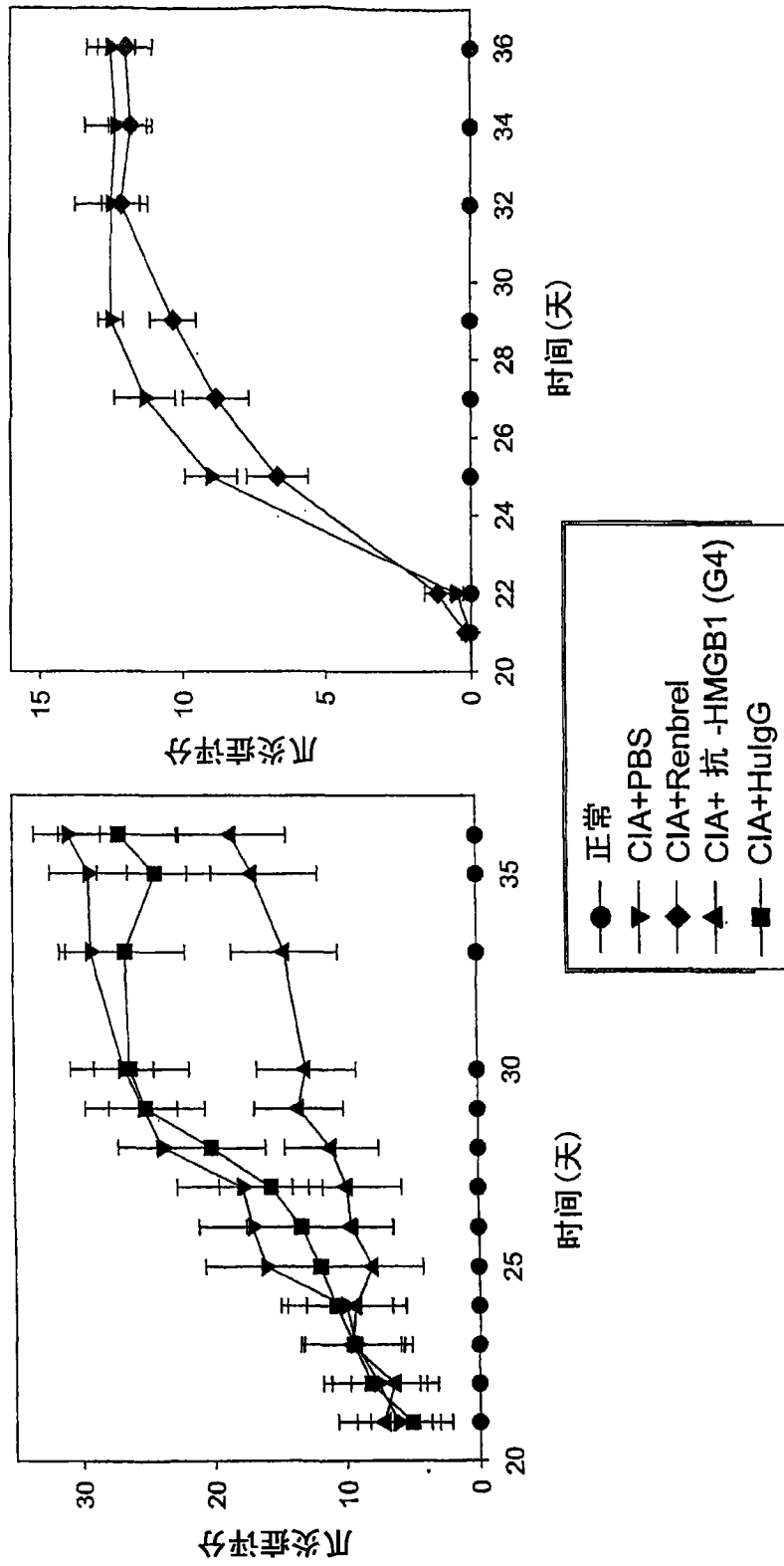


图 15A

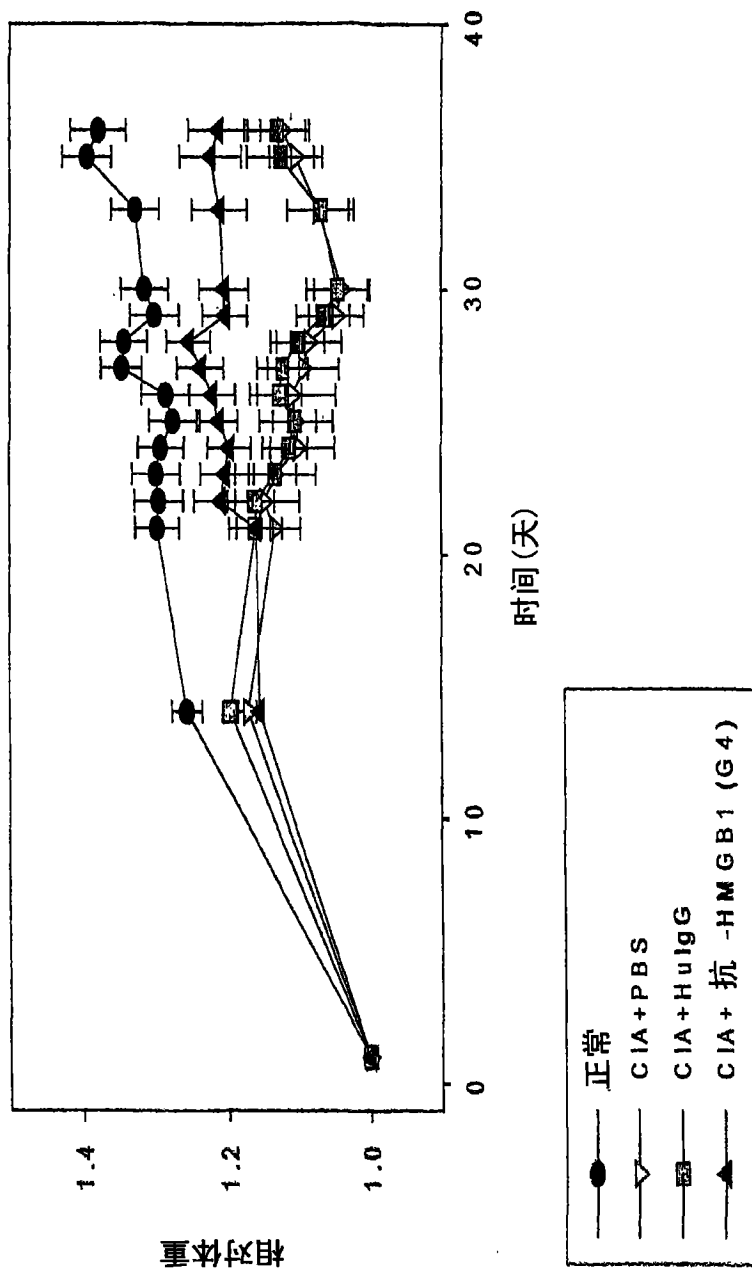


图 15B

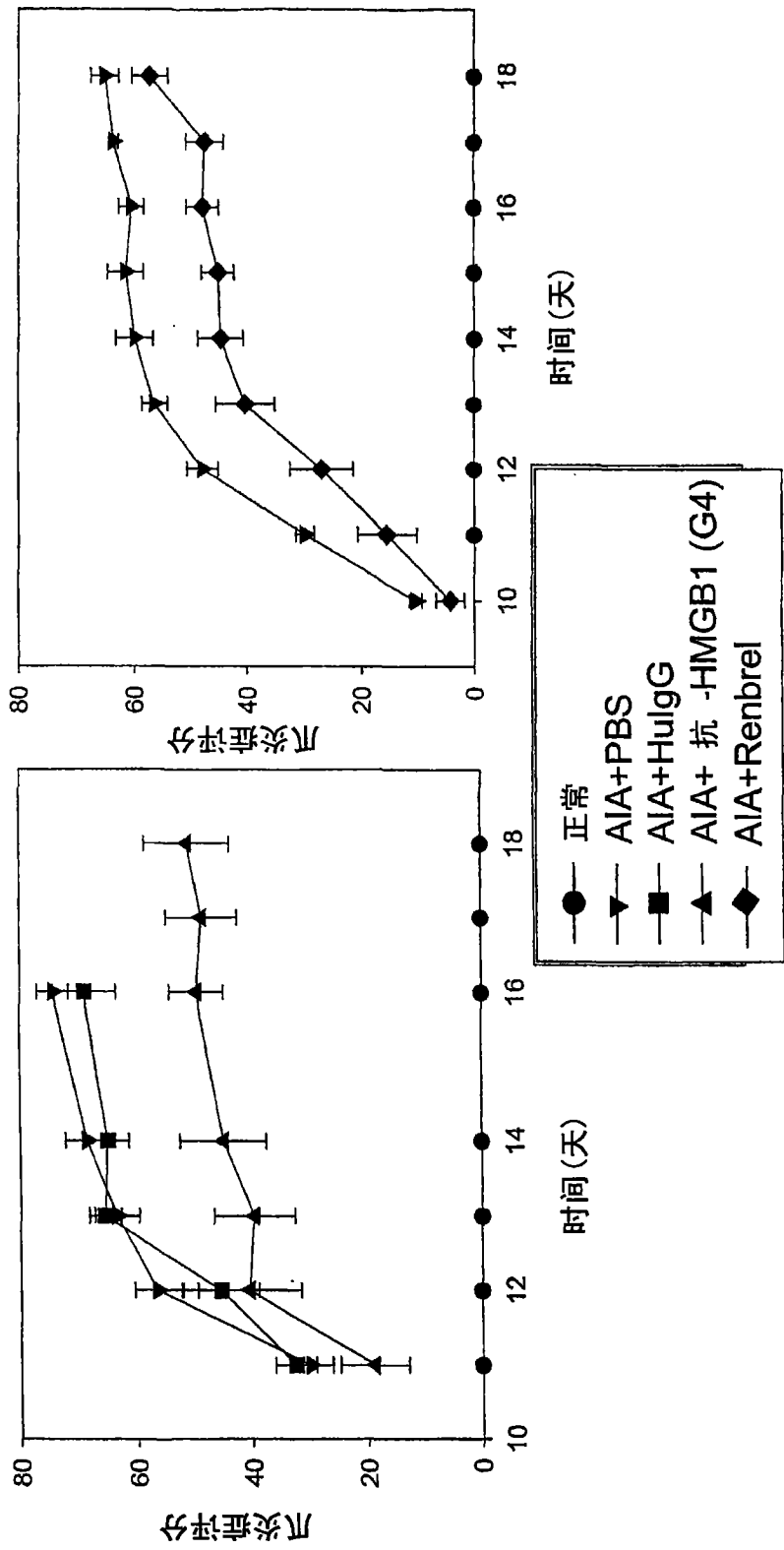


图 16A

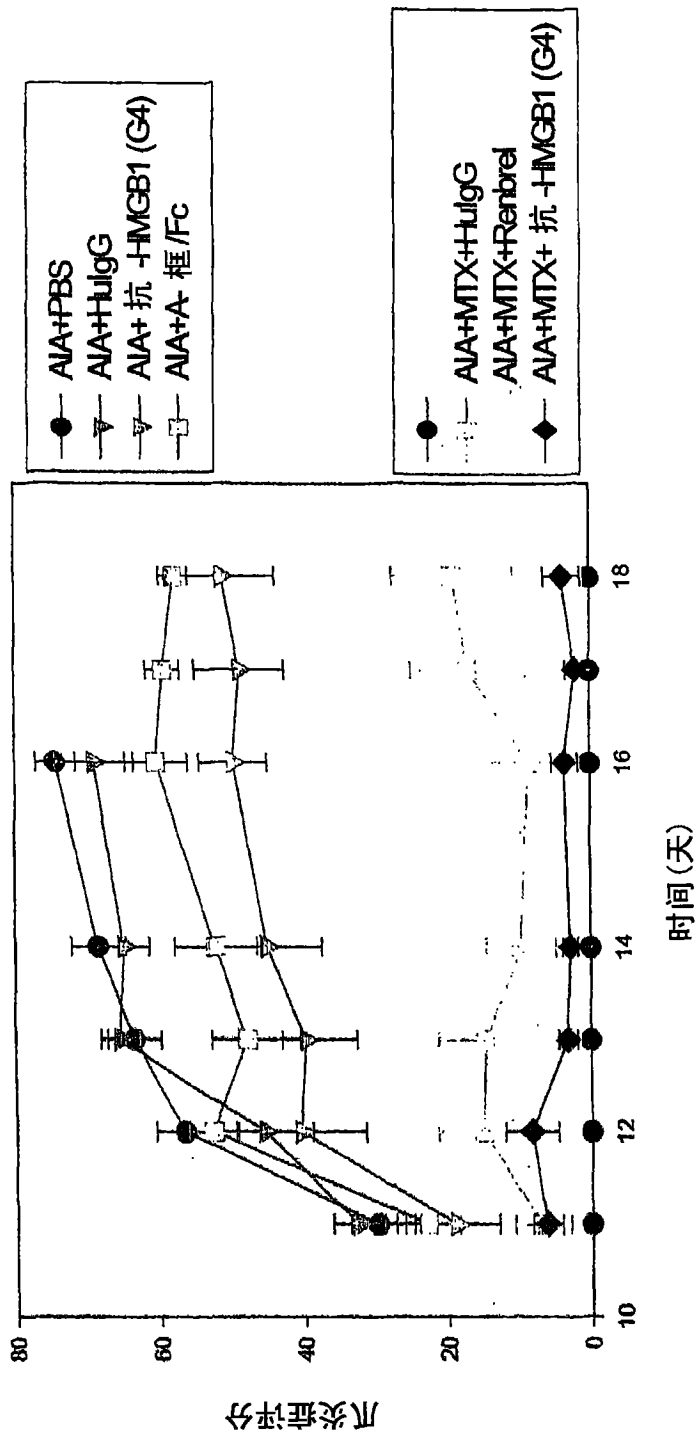


图 16B

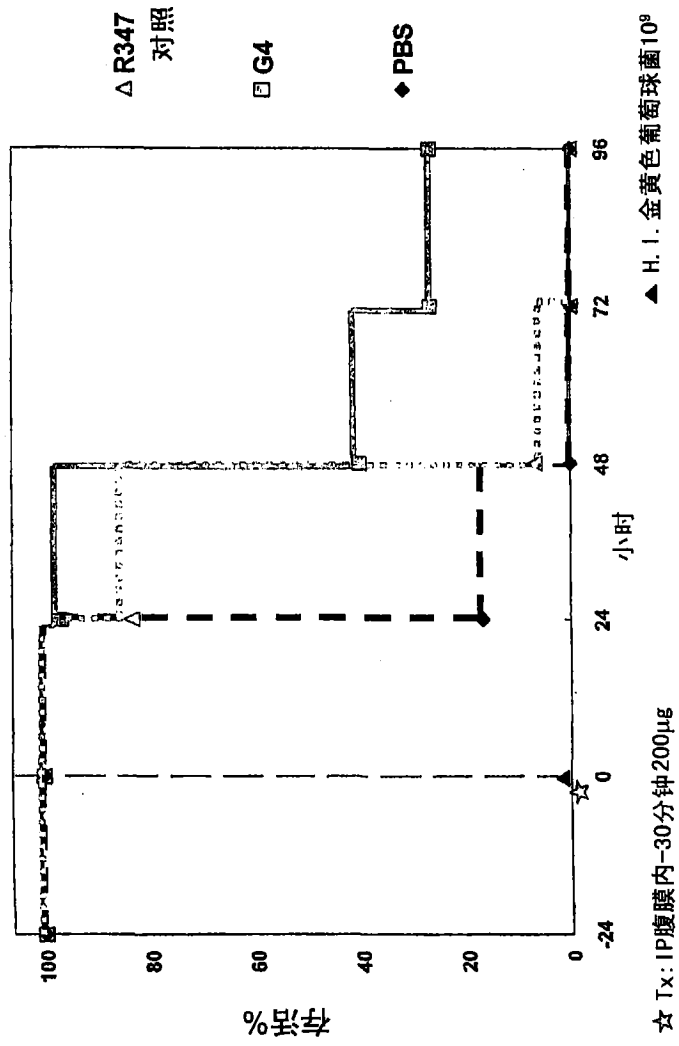


图 17

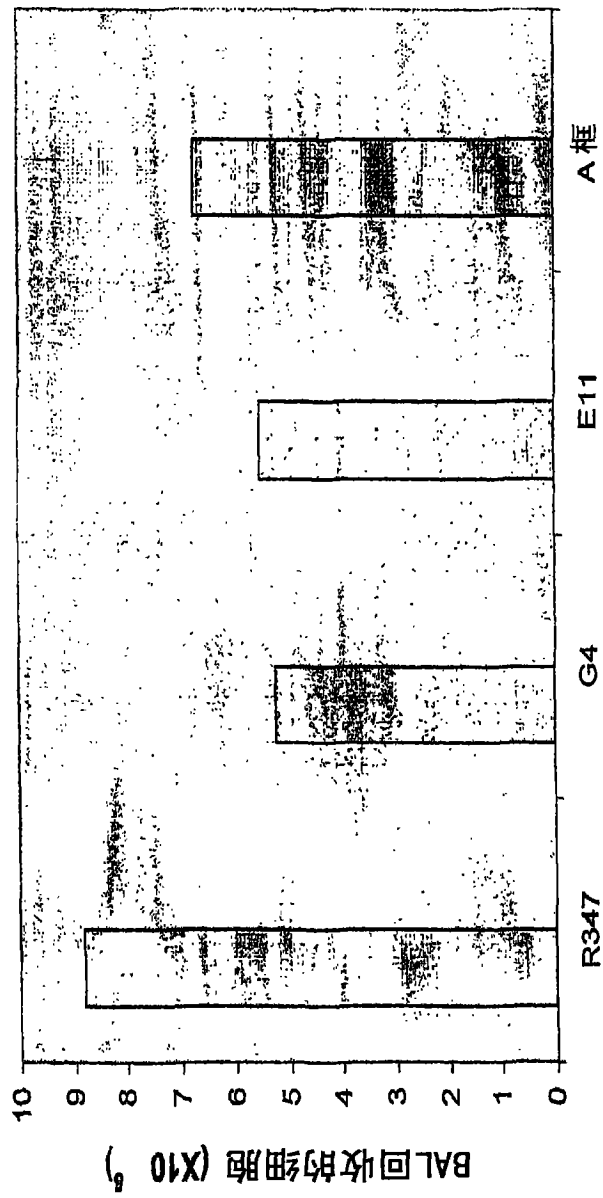


图 18

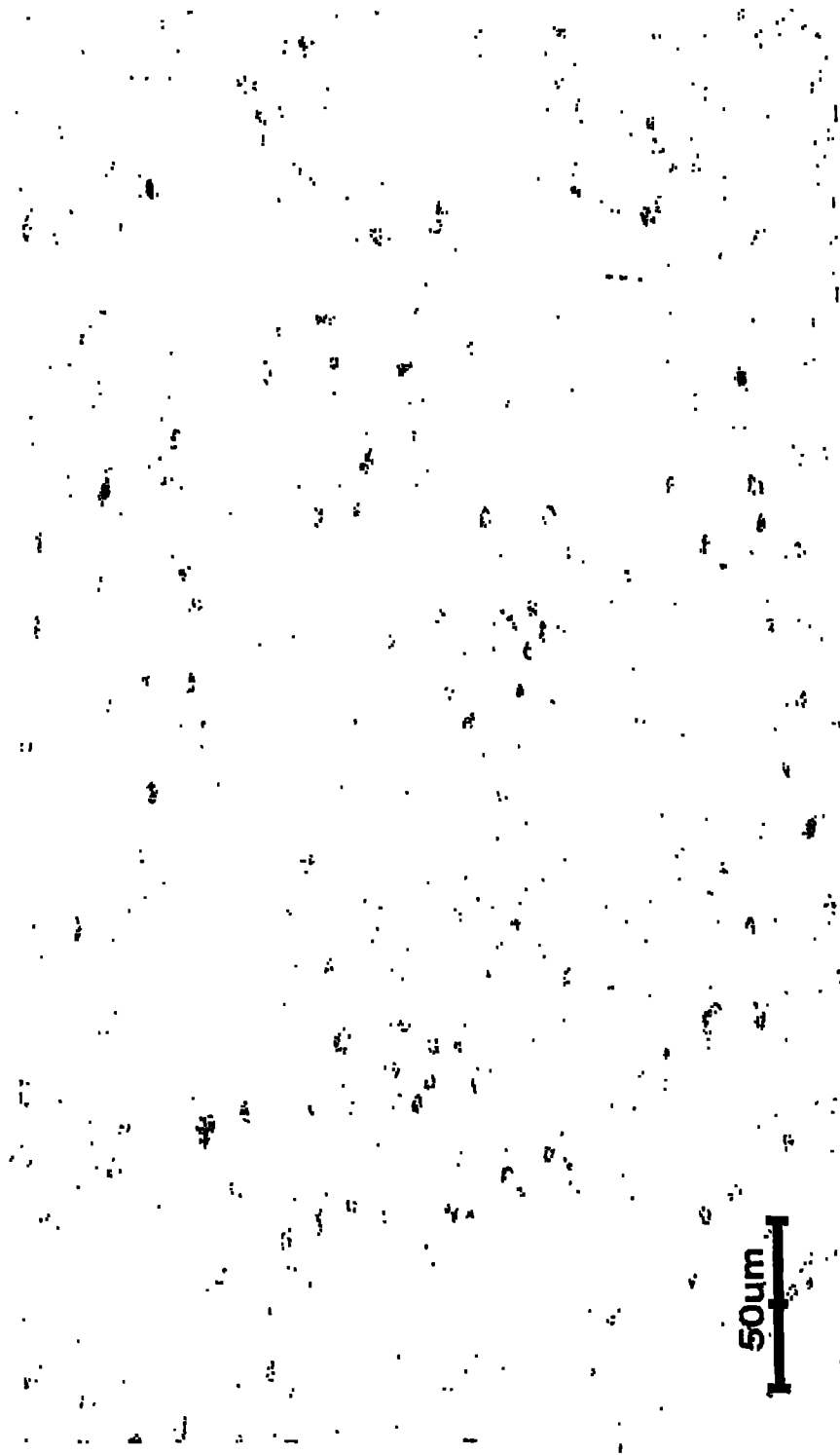


图 19A

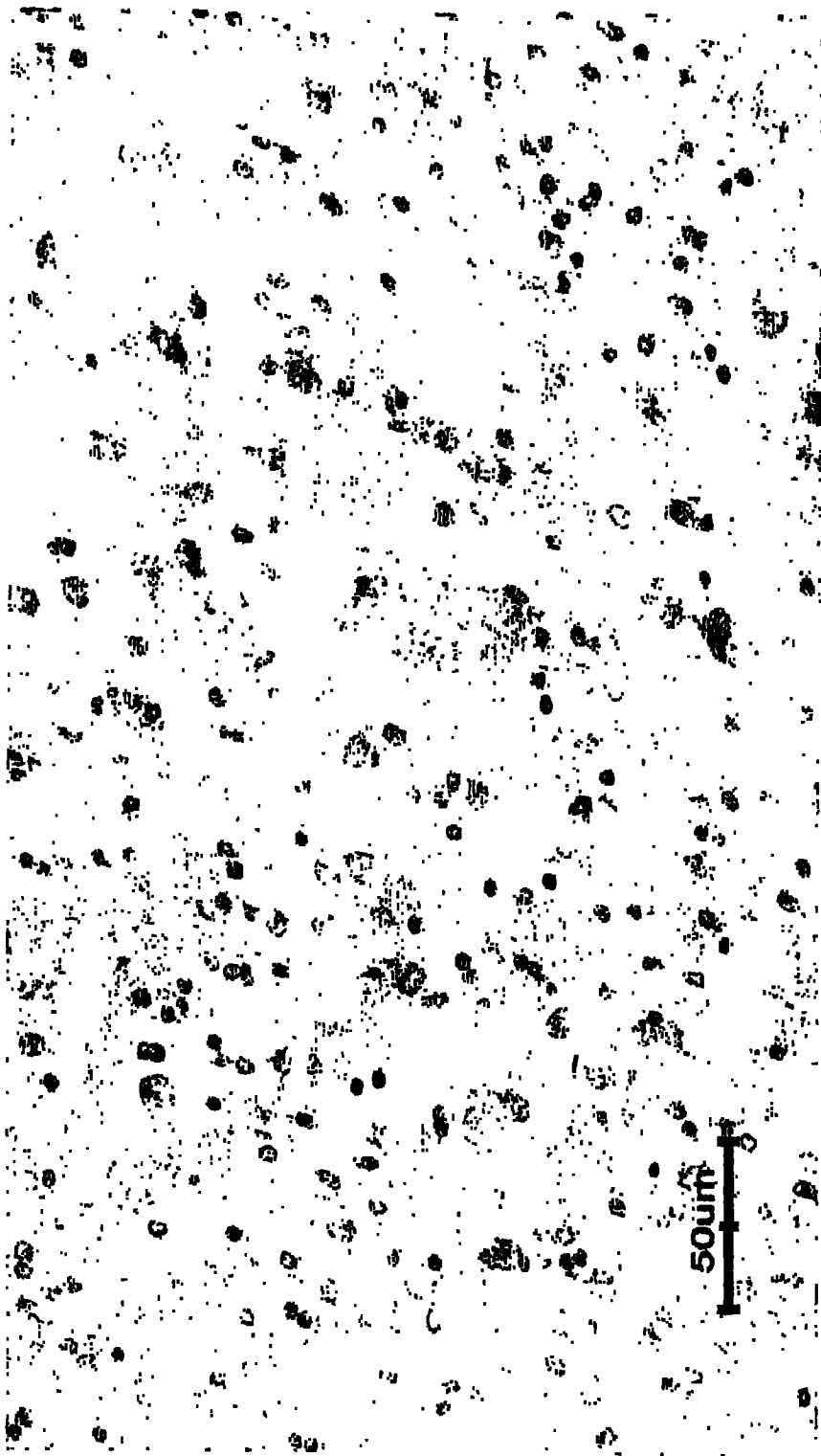
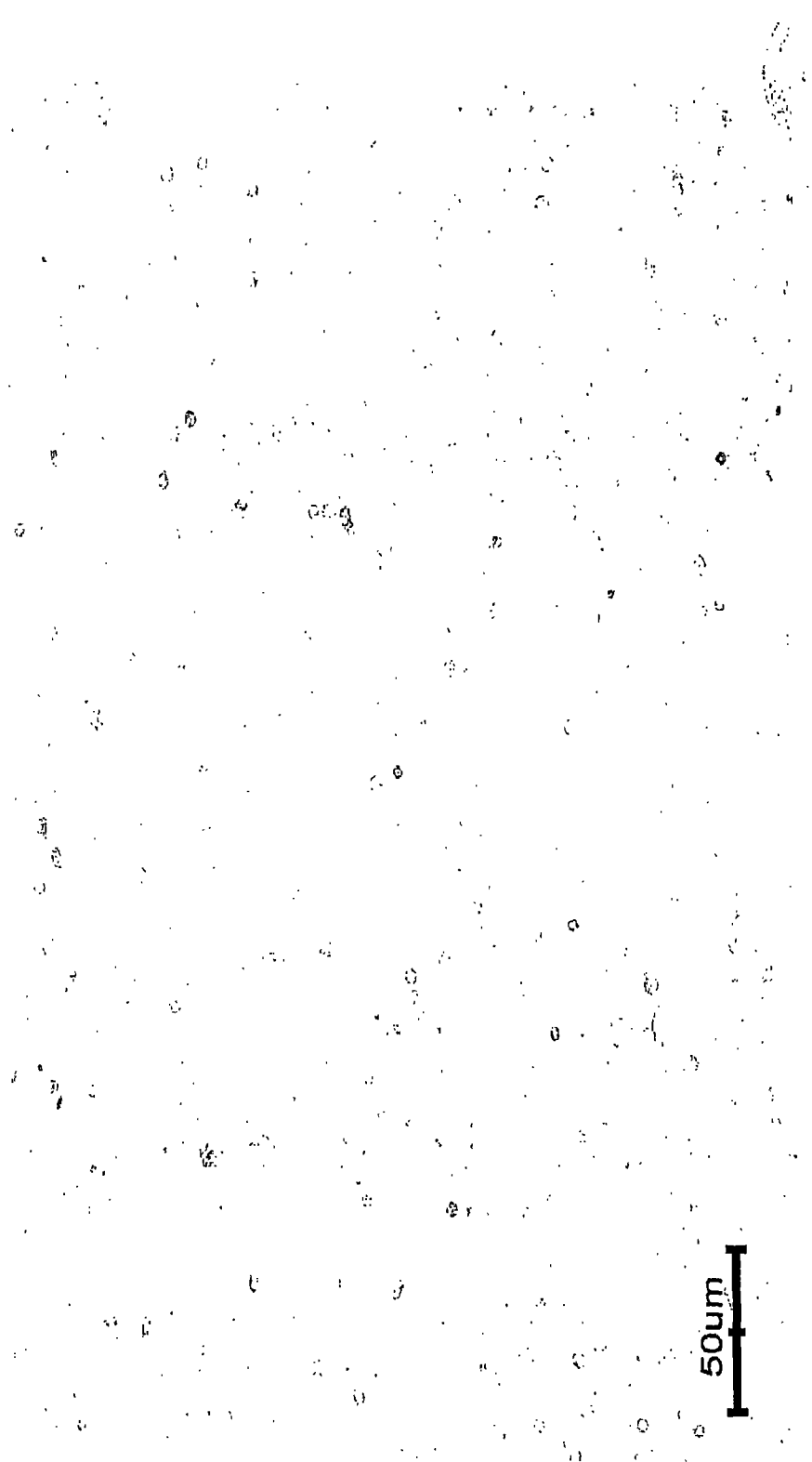


图 19B



50um



19C