

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480033217.7

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 13 日

[11] 公开号 CN 1878793A

[22] 申请日 2004.9.10

[21] 申请号 200480033217.7

[30] 优先权

[32] 2003.9.11 [33] US [31] 60/502,568

[86] 国际申请 PCT/US2004/029527 2004.9.10

[87] 国际公布 WO2005/026209 英 2005.3.24

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.11

[71] 申请人 鉴定医疗有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 沃特·纽曼 秦世欣

特丽萨·奥基夫 罗伯特·奥巴

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 14 页 说明书 71 页 序列表 33 页
附图 37 页

[54] 发明名称

拮抗 HMGB1 的单克隆抗体

[57] 摘要

在不同的实施方案中，本发明关注于结合脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽的抗体或其抗原片段，测定和/或鉴定结合 HMGB 多肽的药剂的方法，对以炎症因子级联放大活性为特征的病人情况给予治疗的方法和测定样本中 HMGB 多肽的方法。

1. 一种特异地结合脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) A 匣, 但并不特异地结合非-A 匣 HMGB 表位的抗体或其抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段抑制经高迁移率族蛋白处理的脊椎动物细胞中促炎症细胞因子的释放。
2. 根据权利要求 1 的抗体或抗原-结合片段, 其中所述的脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) A 匣是一种哺乳动物 HMGB A 匣。
3. 根据权利要求 2 的抗体或抗原-结合片段, 其中所述的哺乳动物高迁移率族匣 (HMGB) A box 是一种人 HMGB A box。
4. 根据权利要求 2 的抗体或抗原-结合片段, 这里所述的哺乳动物高迁移率族匣 (HMGB) A 匣是一种 HMGB1 A 匣。
5. 根据权利要求 4 的抗体或抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是从包括 Fab 片段, Fab' 片段, F(ab')₂ 片段和 Fv 片段的组中选择的抗原-结合片段。
6. 根据权利要求 4 的抗体或抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是单克隆抗体或其抗原-结合片段。
7. 根据权利要求 4 的抗体或抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是从 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb 和 10D4 HMGB1 mAb 组中选择的。

8. 根据权利要求4的抗体或抗原-结合片段,其中所述的结合高迁移率族匣(HMGB)A匣的抗体或抗原-结合片段能被从6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb和10D4 HMGB1 mAb组中选择的抗体抑制。
9. 根据权利要求4的抗体或抗原-结合片段,其中所述的抗体或抗原-结合片段具有6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb和/或4 HMGB1 mAb的特定表位。
10. 根据权利要求4的抗体或抗原-结合片段,其中所述的抗体或抗原-结合片段具有6H9 HMGB1 mAb的特定表位。
11. 由鼠杂交瘤6E6 HMGB1 mAb制备的抗体或抗原-结合片段,保存于ATCC, 编码号PTA-5433。
12. 由鼠杂交瘤6H9 HMGB1 mAb制备的抗体或抗原-结合片段,保存于ATCC, 编码号PTA-5434。
13. 由鼠杂交瘤10D4 HMGB1 mAb制备的抗体或抗原-结合片段,保存于ATCC, 编码号PTA-5435。
14. 鼠杂交瘤6E6 HMGB1 mAb, 保存于ATCC, 编码号PTA-5433。
15. 鼠杂交瘤6H9 HMGB1 mAb, 保存于ATCC, 编码号PTA-5434。
16. 鼠杂交瘤10D4 HMGB1 mAb, 保存于ATCC, 编码号PTA-5435。

17. 根据权利要求 4 的抗体或抗原-结合片段,其中所述的抗体或抗原-结合片段是从人抗体,人源抗体,嵌合抗体和任何抗原-结合片段的组中选择的。
18. 一种分离的细胞,其产生特异结合脊椎动物高迁移率族匣(HMGB)A 匣,但并不特异地结合非-A 匣 HMGB 表位的抗体或其抗原-结合片段。
19. 根据权利要求 18 的分离细胞,其中所述的脊椎动物高迁移率族匣(HMGB)A 匣是一种哺乳动物 HMGB A 匣。
20. 根据权利要求 19 的分离细胞,其中所述的哺乳动物高迁移率族匣(HMGB)A 匣是一种人 HMGB A 匣。
21. 根据权利要求 19 的分离细胞,其中所述的哺乳动物高迁移率族匣(HMGB)A 匣是一种哺乳动物 HMGB 1A 匣。
22. 根据权利要求 18 的分离细胞,其中所述的分离细胞是从包括永生 B 细胞,杂交瘤和包括一种或更多编码所述抗体或其抗原-结合片段的外源核酸的重组细胞组中选择的。
23. 根据权利要求 18 的分离细胞,其中所述的抗体或抗原-结合片段是单克隆抗体或其抗原-结合片段。
24. 根据权利要求 18 的分离细胞,其中所述的抗体或抗原-结合片段是从 6E6 HMGB1 mAb,6H9 HMGB1 mAb 和 10D4 HMGB1 mAb 组中选择的。

25. 根据权利要求 18 的分离细胞, 其产生抗体或其抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段与高迁移率族匣(HMGB)A 匣的结合能被从 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb 和 10D4 HMGB1 mAb 组中选择的抗体抑制。
26. 根据权利要求 18 的分离细胞, 其产生抗体或其抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段有从 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb 和 10D4 HMGB1 mAb 组中选择的抗体的特定表位。
27. 由鼠杂交瘤 2E11 HMGB1 mAb 产生的抗体或其抗原-结合片段, 保存于 ATCC, 编码号 PTA-5431。
28. 一种抗体或其抗原-结合片段, 其中所述的结合高迁移率族匣(HMGB)蛋白的抗体或抗原-结合片段能被 2E11 HMGB1 mAb 抑制。
29. 一种抗体或其抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段有 2E11 HMGB1 mAb 的特定表位。
30. 鼠杂交瘤 2E11 HMGB1 mAb, 保存于 ATCC, 编码号 PTA-5431。
31. 一种分离的细胞, 其产生 2E11 HMGB1 mAb。
32. 根据权利要求 31 的分离细胞, 其中所述的分离细胞是从包括永生 B 细胞, 杂交瘤和包括一种或更多编码所述抗体或其抗原-结合片段的外源核酸的重组细胞组中选择的。

33. 一种分离的细胞，其产生抗体或其抗原-结合片段，其中所述的结合高迁移率族匣（HMGB）蛋白的抗体或抗原-结合片段能被 2E11 HMGB1 mAb 抑制。
34. 根据权利要求 33 的分离细胞，其中所述的分离细胞是从包括一种永生 B 细胞，一种杂交瘤和包括一种或更多编码所述抗体或其抗原-结合片段的外源核酸的重组细胞组中选择的。
35. 一种分离细胞，其产生抗体或其抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段有 2E11 HMGB1 mAb 的特定表位。
36. 根据权利要求 35 的分离细胞，其中所述的分离细胞是从包括一种永生 B 细胞，一种杂交瘤和包括一种或更多编码所述抗体或其抗原-结合片段的外源核酸的重组细胞组中选择的。
37. 由鼠杂交瘤 2G7 HMGB1 mAb 产生的抗体或其抗原-结合片段，保存于 ATCC，编码号 PTA-5432。
38. 一种抗体或其抗原-结合片段，这里所述的结合高迁移率族匣（HMGB）蛋白的抗体或抗原-结合片段能被抑制。
39. 一种抗体或其抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段有 2G7 HMGB1 mAb 的特定表位。
40. 鼠杂交瘤 2G7 HMGB1 mAb，保存于 ATCC，编码号 PTA-5432。
41. 一种分离细胞，其产生 2G7 HMGB1 mAb。

42. 根据权利要求 41 的分离细胞，其中所述的分离细胞是从包括一种永生 B 细胞，一种杂交瘤和包括一种或更多编码所述抗体或其抗原-结合片段的外源核酸的重组细胞组中选择的。
43. 一种分离细胞，其产生抗体或其抗原-结合片段，其中所述的结合高迁移率族匣（HMGB）蛋白的抗体或抗原-结合片段能被 2G7 HMGB1 mAb 抑制。
44. 根据权利要求 43 的分离细胞，其中所述的分离细胞是从包括一种永生 B 细胞，一种杂交瘤和包括一种或更多编码所述抗体或其抗原-结合片段的外源核酸的重组细胞组中选择的。
45. 一种分离细胞，其产生抗体或其抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段有 2G7 HMGB1 mAb 的特定表位。
46. 根据权利要求 45 的分离细胞，其中所述的分离细胞是从包括一种永生 B 细胞，一种杂交瘤和包括一种或更多编码所述抗体或其抗原-结合片段的外源核酸的重组细胞组中选择的。
47. 一种抗体或抗原-结合片段，其结合 SEQ ID NO:1 的 151-168 氨基酸残基。
48. 根据权利要求 47 的抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段是一种单克隆抗体或其抗原-结合片段。
49. 一种抗体或抗原-结合片段，其结合 SEQ ID NO:1 的 156-161 氨基酸残基。

- 50.** 一种抗体或抗原-结合片段，其结合的多肽从下列组中选择：
SEQ ID NO:1 的 155-161 氨基酸残基；
SEQ ID NO:1 的 155-162 氨基酸残基；
SEQ ID NO:1 的 156-162 氨基酸残基；
SEQ ID NO:1 的 156-163 氨基酸残基。
- 51.** 一种抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段结合 SEQ ID NO:1 的 151-168 氨基酸残基能被 2E11 HMGB1 mAb 抑制。
- 52.** 一种抗体或抗原-结合片段，其结合 SEQ ID NO:1 的 61-78 氨基酸残基。
- 53.** 根据权利要求 52 的抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段是单克隆抗体或抗原-结合片段。
- 54.** 一种抗体或抗原-结合片段，其结合 SEQ ID NO:1 的 67-78 氨基酸残基。
- 55.** 一种抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段与 SEQ ID NO:1 的 61-78 氨基酸残基的结合能被从 6E6 HMGB1 mAb 和 6H9 HMGB1 mAb 组中选择的抗体抑制。
- 56.** 一种抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段与 SEQ ID NO:1 的 67-78 氨基酸残基结合能被 6E6 HMGB1 mAb 抑制。
- 57.** 一种抗体或抗原-结合片段，其结合 SEQ ID NO:1 的 46-63 氨基酸残基。

58. 根据权利要求 57 的抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体不结合 SEQ ID NO:54 的 46-63 氨基酸残基。
59. 根据权利要求 57 的抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段是单克隆抗体或抗原-结合片段。
60. 一种抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段与 SEQ ID NO:1 的 46-63 氨基酸残基的结合能被 2G7 HMGB1 mAb 抑制。
61. 一种抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或片段包括从 6E6 HMGB1 mAb ， 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb ,10D4 HMGB1 mAb 和 2G7 HMGB1 mAb 组中选择的抗体的轻链 CDRs (CDR1, CDR2, CDR3) 和重链 CDRs (CDR1, CDR2, CDR3)。
62. 根据权利要求 61 的抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段进一步包括一种人框架区。
63. 根据权利要求 1 的抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段是从包括 Fab 片段, Fab' 片段, F(ab')₂ 片段和 Fv 片段组中选择的抗原-结合片段。
64. 一种组合物，其包括权利要求 1 的抗体或抗原-结合片段和制药学上可接受的赋形剂。
65. 一种组合物，其包括抗体或其抗原-结合片段和制药学上可接受的赋形剂，其中所述的抗体或其抗原-结合片段是从 6E6 HMGB1 mAb ， 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 和任何抗原-结合片段的组中选择的。

- 66.** 根据权利要求 1 的抗体或抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是从人抗体, 人源抗体, 嵌合抗体和任何抗原-结合片段的组中选择的。
- 67.** 一种抗体或其抗原-结合片段, 其中所述的抗体或其抗原-结合片段是从下列组中选择的:
- a) 6E6 HMGB1 mAb;
 - b) 6H9 HMGB1 mAb;
 - c) 2G7 HMGB1 mAb;
 - d) 10D4 HMGB1 mAb;
 - e) 2E11 HMGB1 mAb;
 - f) 有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体;
 - g) 能与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争与脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽结合的抗体;
 - h) 一种 a), b), c), d), e), f), 或 g) 的抗原-结合片段。
- 68.** 根据权利要求 67 的抗体或抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是从包括人抗体, 人源抗体, 嵌合抗体和任何抗原-结合片段的组中选择的。

69. 一种检测和/或鉴定结合脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽试剂的方法, 该方法包括, 结合:

i) 能结合 HMGB 的抗体或抗原-结合片段;

ii) 测试试剂; 和

iii) 包括脊椎动物 HMGB 多肽的组合物;

和检测或测定在所述的抗体或抗原-结合片段和所述的 HMGB 多肽之间的组合物构成, 其中相对于合适对照的所述组合物构成的减少, 表示所述的试剂结合所述的 HMGB 多肽, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是从下列组中选择的:

a) 6E6 HMGB1 mAb;

b) 6H9 HMGB1 mAb;

c) 2G7 HMGB1 mAb;

d) 10D4 HMGB1 mAb;

e) 2E11 HMGB1 mAb;

f) 有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体;

g) 能与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争同脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽相结合的抗体;

h) 一种 a), b), c), d), e), f) 或 g) 的抗原-结合片段。

70. 一种治疗病人情况的方法，该情况以炎症因子的级联活性为特征，包括给予病人抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段是从下列组中选择的：

a)6E6 HMGB1 mAb;

b)6H9 HMGB1 mAb;

c)2G7 HMGB1 mAb;

d)10D4 HMGB1 mAb;

e)2E11 HMGB1 mAb;

f)有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体;

g)能与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争同脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽相结合的抗体;

h)一种 a), b), c), d), e), f) 或 g) 的抗原-结合片段。

71. 根据权利要求 70 的方法，这里所述的情况是从包括脓血症，同种异体移植物抑制，关节炎，哮喘，狼疮，成人呼吸窘迫综合征，银屑病，胰腺炎，腹膜炎，烧伤，缺血，Behcet's 疾病，移植物抗宿主病，炎症性肠疾病，多重硬化症和恶疾的组中选择的。

72. 一种治疗病人脓血症的方法，包括给予病人抗体或抗原-结合片段，其中所述的抗体或抗原-结合片段是从下列组中选择的：

a)6E6 HMGB1 mAb;

b)6H9 HMGB1 mAb;

c)2G7 HMGB1 mAb;

d)10D4 HMGB1 mAb;

e)2E11 HMGB1 mAb;

f)有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体;

g)能与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争结合脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽的抗体;

h)一种 a), b), c), d), e), f) 或 g) 的抗原-结合片段。

73. 一种治疗病人关节炎的方法, 包括给予病人抗体或抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是从下列组中选择的:

a) 6E6 HMGB1 mAb;

b) 6H9 HMGB1 mAb;

c) 2G7 HMGB1 mAb;

d) 10D4 HMGB1 mAb;

e) 2E11 HMGB1 mAb;

f)有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体;

g) 能与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争结合脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽的抗体;

h) 一种 a), b), c), d), e), f) 或 g) 的抗原-结合片段。

74. 一种治疗病人狼疮的方法, 包括给予病人抗体或抗原-结合片段, 其中所述的抗体或抗原-结合片段是从下列组中选择的:

- a) 6E6 HMGB1 mAb;
- b) 6H9 HMGB1 mAb;
- c) 2G7 HMGB1 mAb;
- d) 10D4 HMGB1 mAb;
- e) 2E11 HMGB1 mAb;

f) 有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体;

g) 能与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争结合脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽的抗体;

h) 一种 a), b), c), d), e), f) 或 g) 的抗原-结合片段。

75. 一种检测样本中脊椎动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽的方法, 包括:

a) 将样本与权利要求 62 的抗体或抗原-结合片段接触, 在合适的条件下, 使所述的抗体或抗原-结合片段与所述样本中的所述的 HMGB 多肽结合;

b) 检测抗体-HMGB 组合物或抗原-结合片段-HMGB 复合物, 其中检测到所述的抗体-HMGB 复合物或抗原-结合片段-HMGB 复合物即表示所述样本中存在 HMGB 多肽。

76. 根据权利要求 75 的方法，其中所述的抗体或其抗原-结合片段是从包括 6E6 HMGB1 mAb，6H9 HMGB1 mAb，2G7 HMGB1 mAb，10D4 HMGB1 mAb，2E11 HMGB1 mAb 和任何上述抗原-结合片段的组中选择的。
77. 根据权利要求 75 的方法，其中所述的抗体或抗原-结合片段包括可检测的标签。
78. 根据权利要求 75 的方法，其中所述的抗体-HMGB 复合物或抗原-结合片段-HMGB 复合物的检测是通过免疫测定进行的。
79. 根据权利要求 78 的方法，其中所述的免疫测定是 ELISA。
80. 一种试剂盒，用于检测样本中脊髓动物高迁移率族匣 (HMGB) 多肽或其蛋白是否存在，包括：
- a) 权利要求 62 的抗体或抗原-结合片段；
 - b) 一种或更多种适合检测在所述的抗体或抗原-结合片段与所述 HMGB 多肽或其蛋白质之间的复合物是否存在的辅助试剂。

拮抗 HMGB1 的单克隆抗体

相关应用

本申请主张 2003 年 11 月 11 日提交的美国临时申请 No.60/502568 的利益。通过在此引述将上述申请的全部教导都合并于本文。

发明背景

炎症通常是由促炎症细胞因子诱导的，例如肿瘤凋亡因子 (TNF)，白细胞介素 (IL) - α ，IL-1 β ，IL-6，巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)，和其他化合物。这些促炎症细胞因子是由许多不同类型的细胞产生的，特别是免疫细胞 (例如，单核细胞，巨噬细胞和嗜中性粒细胞)，但也有非-免疫细胞如纤维原细胞，造骨细胞，平滑肌细胞，上皮细胞，和神经细胞。这些促炎症细胞因子导致在促炎症细胞因子级联的早期阶段的多种失调。

早期的促炎症细胞因子(例如：TNF, IN-1,等)介导炎症，并导致高迁移率族匣蛋白 B1 (HMGB1;也称为 HMG-1 和 HMG1) 的释放，该蛋白聚集于血清中并介导滞后的致命性及早期促炎症细胞因子的进一步诱导。HMGB1 最初被认为是 DNA-结合蛋白家族中的一员，定义为高迁移率族匣 (HMGB) 蛋白，其对于 DNA 的结构和稳定性是必要的。其被认为是一种普遍存在的非序列特异性结合双链 DNA 的核蛋白。HMGB1 分子具有三个域：两个 DNA 结合基，定义为 HMGB A 匣和 HMGB B 匣，及一个酸性

羧基末端。两个 HMGB 匣是高度保守的 80 氨基酸, L-型域。HMG 匣在其他转录因子中也有表达, 包括 RNA 聚合酶 I 转录因子, 人下游-结合因子和淋巴-特异因子。

最近的证据已经暗示 HMG1 是一种引发内毒素血症中滞后破坏性的细胞因子介导者 (Andersson, U., et al., J. Exp. Med. 192(4):565-570(2000))。该工作显示细菌内毒素 (脂多糖 (LPS)) 激活单核细胞/巨噬细胞释放 HMG1 作为活化作用的随后应答反应, 并导致具毒性的血清 HMG1 水平的升高。即使在早期细胞因子应答反应之后再给予随后的抗体治疗, 针对 HMG1 的抗体仍可以防止内毒素的致命性。与其他促炎症细胞因子类似, HMG1 是一种单核细胞的蛋白质催化剂。HMG1 在气管内的应用导致急性肺损害, 而抗-HMG1 抗体可保护内毒素-引发的肺水肿 (Abraham, E., et al., J. Immunol. 165:2950-2954(2000))。血清 HMG1 水平在脓血病或出血性休克的急性病人中升高, 并且其在非生还者中的水平要远高于生还者。

HMG1 已经被认为是 RAGE 的一个配基, 它是一种免疫球蛋白超家族的多-配基受体。RAGE 在内皮细胞, 平滑肌细胞, 单核细胞, 神经中表达, 并且配基交互作用在 MAP 激酶, P21 ras, NF-kB 中转换信号。HMG1 在内毒素血症中显示的滞后动力学特性使其成为一种潜在的良好治疗目标, 但对于 HMG1 信号传导和毒性的分子基础了解得很少。

因此, 基于 HMG1 蛋白在介导炎症中的重要性, 确定用于诊断和治疗的结合 HMGB 的抗体显得十分有益。

发明概述

在不同的实施方案中，本发明关注于结合脊椎动物高迁移率族匣蛋白（HMGB）多肽的抗体或其抗原-结合片段，检定并且/或者鉴别结合 HMGB 多肽的药剂的方法，对促炎症细胞因子级联活化作用特征化的病人情况给予治疗的方法和测定样品中 HMGB 多肽的方法。

在某一实施方案中，本发明指特异地结合脊椎动物 HMGBA box，但并不特异地结合非-A boxHMGB 表位的抗体或其抗原-结合片段，结合的抗体或抗原-结合片段可抑制 HMGB 蛋白处理的脊椎动物细胞中促炎症细胞因子的释放。

在某些实施方案中，本发明指鼠科杂交瘤 6E6 HMGB1 mAb，鼠科杂交瘤 6H9 HMGB1 mAb，鼠科杂交瘤 2G7 HMGB1 mAb，鼠科杂交瘤 2E11 HMGB1 mAb，或鼠科杂交瘤 10D4 HMGB1 mAb 产生的抗体。在其他实施方案中，本发明指抗体或其抗原结合片段，其与脊椎动物 HMGB1 多肽的结合可以被 6E6 HMGB1 mAb,6H9 HMGB1 mAb,2G7 HMGB1 mAb,2E11 HMGB1 mAb 和/或 10D4 HMGB1 mAb 抑制。在另一方面，本发明指含有 6E6 HMGB1 mAb,6H9 HMGB1 mAb,2G7 HMGB1 mAb,2E11 HMGB1 mAb 和/或 10D4 HMGB1 mAb 特定表位的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方案中，本发明指抗体或抗原结合片段，其可结合由 SEQ ID NO:1 中 46 至 63 氨基酸残基，SEQ ID NO:1 中 61 至 78 氨基酸残基和/或 SEQ ID NO:1 中 151 至 168 氨基酸残基组成的多肽。在某一实施方案中，本发明指抗体或抗原结合片段，其可结合由 SEQ ID NO:1 中 46 至 63 氨基酸残基组成的多肽，该

结合可被 2G7 HMGB1 mAb 抑制。在另一实施方案中，本发明指抗体或抗原结合片段，其可结合由 SEQ ID NO:1 中 61 至 78 氨基酸残基组成的多肽，该结合能被 6E6 HMGB1 mAb 和/或 6H9 HMGB1 mAb 抑制。在另一实施方案中，本发明指抗体或抗原结合片段，其可结合由 SEQ ID NO:1 中 151 至 168 氨基酸残基组成的多肽，该结合能被 2E11 HMGB1 mAb 抑制。

在某些实施方案中，本发明指从 6E6 HMGB1 mAb,6H9 HMGB1 mAb,2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb 和 2E11 HMGB1 mAb 组选取的，包括抗体的 CDRs (CDR1,CDR2 和 CDR3) 轻链和 CDRs (CDR1,CDR2,CDR3) 重链的抗体或抗原结合片段。

在其它实施方案中，本发明指鼠科杂交瘤 6E6 HMGB1 mAb, 鼠科杂交瘤 6H9 HMGB1 mAb, 鼠科杂交瘤 2G7 HMGB1 mAb, 鼠科杂交瘤 2E11 HMGB1 mAb, 或鼠科杂交瘤 10D4 HMGB1 mAb。

在另一实施方案中，本发明指一种分离细胞，其可产生特异结合脊髓动物 HMGB A box 但不特异结合非-A box HMGB 表位的抗体或抗原结合片段。在其它实施方案中，本发明指一种分离细胞，可制备 6E6 HMGB1 mAb,6H9 HMGB1 mAb,2G7 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 或 10D4 HMGB1 mAb。在另一实施方案中，本发明指一种分离细胞，产生抗体或其抗原结合片段，其与脊髓动物 HMGB1 多肽的结合可被 6E6 HMGB1 mAb,6H9 HMGB1 mAb,2G7 HMGB1 mAb,2E11 HMGB1 mAb 和/或 10D4 HMGB1 mAb 抑制。在另一实施方案中，本发明指一种分离细胞，产生有 6E6 HMGB1 mAb,6H9 HMGB1 mAb,2G7 HMGB1 mAb,2E11 HMGB1 mAb 和/或 10D4 HMGB1 mAb 特定表位的抗体或其抗原结合片段。

在其他实施方案中，本发明指一种组合物，包括本发明的抗体或抗原结合片段和制药学上可接受的赋形剂。

在另一实施方案中，本发明是一种检测和/或鉴定结合脊髓动物 HMGB 多肽的，包括结合本发明的抗体或抗原结合片段的制剂的方法，一种检测试剂，以及包括脊髓动物 HMGB 多肽的组合物。在该方法中，抗体或抗原结合片段与 HMGB 多肽之间的联合体形式能被检测或测量，并且当与合适的对照相比，联合体形式的减少表示测试药剂结合了 HMGB 多肽。

在另一实施方案中，本发明指对以促炎症细胞因子级联活化作用为特征的病人情况给予治疗的方法，包括对病人给药本发明的抗体或抗原结合片段。

在某些实施方案中，这种情况指脓血症，关节炎，狼疮。

在另一实施方案中，本发明指在样本中检测脊髓动物 HMGB 多肽的方法。在该方法中，在适合抗体或抗原结合片段结合样本中 HMGB 多肽的条件下，样本与本发明的抗体或抗原结合片段相互作用。如果能检测到抗体-HMGB 联合体或抗原结合片段-HMGB 联合体，则表示在样本中存在 HMGB 多肽。

在另一实施方案中，本发明指用于检测是否在样本中存在脊髓动物 HMGB 多肽或其部分的试剂盒。该试剂盒包括本发明的抗体或抗原结合片段，和一种或更多种适合的辅助试剂，检测抗体或抗原结合片段与 HMGB 多肽之间是否存在联合体。

附图简述

图 1 是人 (Homo sapiens) HMGB1 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)。有下划线的氨基酸残基表示 A box, B box 和 HMGB1 多肽的酸性尾巴区域。

图 2A 是包括人 (Homo sapiens) HMGB1 A box 的多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。有下划线的氨基酸残基表示 HMGB1 多肽的 A box, 其在人, 大鼠, 小鼠中相同。

图 2B 是包括人 (Homo sapiens) HMGB1 B box 的多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)。有下划线的氨基酸残基表示 HMGB1 多肽的 B box, 其在人, 大鼠, 小鼠中相同。

图 3A 是编码作为免疫原引发单克隆抗体的重组体 CBP-鼠 HMGB1 多肽的核酸序列 (SEQ ID NO:4)。

图 3B 是作为免疫原引发单克隆抗体的重组体 CBP-鼠 HMGB1 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)。被凝血酶剪切的 CBP 亲和标签以小写字体表示, 而 HMGB1 的正常翻译起始氨基酸以下划线标示。

图 4A 是编码 6E6 HMGB1 mAb 的 V_H 区域的核酸序列 (SEQ ID NO:6)。

图 4B 是 6E6 HMGB1 mAb 的 V_H 区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7); 有下划线的是 CDRs。

图 4C 是编码 6E6 HMGB1 mAb 的 V_K 区域的核酸序列 (SEQ ID NO:8)。

图 4D 是 6E6 HMGB1 mAb 的 V_K 区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9); 有下划线的是 CDRs。

图 5A 是编码 2E11 HMGB1 mAb 的 V_H 区域的核酸序列 (SEQ ID NO:10)。

图 5B 是 2E11 HMGB1 mAb 的 V_H 区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:11); 有下划线的是 CDRs。

图 5C 是编码 2E11 HMGB1 mAb 的 V_K 区域的核酸序列 (SEQ ID NO:12)。

图 5D 是 2E11 HMGB1 mAb 的 V_K 区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13); 有下划线的是 CDRs。

图 6A 是编码 10D4 HMGB1 mAb 的 V_H 区域的核酸序列 (SEQ ID NO:14)。

图 6B 是 10D4 HMGB1 mAb 的 V_H 区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:15); 有下划线的是 CDRs。

图 6C 是编码 10D4 HMGB1 mAb 的 V_K 区域的核酸序列 (SEQ ID NO:16)。

图 6D 是 10D4 HMGB1 mAb 的 V_K 区域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:17); 有下划线的是 CDRs。

图 7 是一张总结了各种抗-HMGB1 单克隆抗体特征的图表。显示了克隆名称, 产生单克隆抗体的免疫原 (鼠 HMGB1-CBP (SEQ ID NO:5 (见图 3B)) 或人 HMGB1 多肽的 B box

(SEQ ID NO:3(见图 2B)), 同种型, 抗体的结合区域和体内 CLP 分析结果。

图 8 是一张描述了抗-HMGB1 单克隆抗体对 TNF 释放阻遏作用的柱状图。用 0.1ug/ml 的 CBP-鼠 HMGB1 多肽(SEQ ID NO:5) 重组体刺激 RAW064.7 细胞诱导产生鼠 TNF。图中显示了, 分别加入 20ug/ml 的 6E6 HMGB1 mAb (6E6), 10D4 HMGB1 mAb (10D4), 2E11 HMGB1 mAb (2E11), 9G2 HMGB1 mAb (9G2), 或鼠 IgG 抗体对照 (mIgG) 的情况。所有样本重复两次, 并且显示错误条。

图 9 是一张柱状图, 描述了各种抗-HMGB1 单克隆抗体对 TNF 释放的阻遏作用。用 0.01ug/ml 或 0.1ug/ml 的 CBP-鼠 HMGB1 多肽(SEQ ID NO:5)重组体刺激 RAW064.7 细胞诱导产生鼠 TNF。图中显示了, 加入 20ug/ml 的 3G8 HMGB1 mAb (3G8), 1A9 HMGB1 mAb (1A9), 9G2 HMGB1 mAb (9G2), 6E6 HMGB1 mAb (6E6), 2E11 HMGB1 mAb (2E11), 10D4 HMGB1 mAb (10D4), 6H9 HMGB1 mAb(6H9)或鼠 IgG 抗体对照 (IgG) 的情况。

图 10 是一张图表, 反应了在盲肠结扎穿孔 (CLP) 一段时间后, 各种抗-HMGB1 单克隆抗体 (6E6 HMGB1 mAb (6E6), 2E11 HMGB1 mAb (2E11), 9G2 HMGB1 mAb (9G2)) 和对照 IgG 抗体 (Ctrl IgG) 对鼠存活率的影响。

图 11 描绘了包含 CHO HMGB1 或 CHO HMGB2 和重组体 HMGB1-His₆ (作为 CHO HMGB2 和 rec-HMGB1-His₆ 被标签) 样本的一系列分离 Western blots, 样本的探针为抗-His Tag 抗体, 抗-HMGB2 抗体, 抗-HMGB1/2 单克隆抗体或特殊的抗-HMGB1 单克隆抗体 (如, 2E11 HMGB1 mAb (CT3-2E11),

1G3HMGB1 mAb(CT3-1G3), 6H9 HMGB1 mAb(CT3-6H9),2G7 HMGB1 mAb (CT3-2G7) , 2G5 HMGB1 mAb (CT3-2G5) , 6E6 HMGB1 mAb (CT3-6E6)).

图 12 是 HMGB1 多肽的氨基酸序列队列, 序列来源于大鼠 (SEQ ID NO:18;以“大鼠#P07155”或“大鼠”(GenBank 编号 No.P07155) 作为标签), 小鼠 (Mus musculus) (SEQ ID NO:18; 作为“小鼠#AAA20508”或“小鼠”(GenBank 编号 No.AAA20508) 被标签)和人(Homo sapiens) (SEQ ID NO:1;以“人#AAA64970”或“人”(GenBank 编号 No.AAA64970) 作为标签)。正如显示的, A box 和 B box 区域以下划线标记。

图 13A 是一张描绘了对应于人 HMGB1 特定区域的各个多肽, 它们各自的氨基酸序列, 分子量, 需要产生 1mM 储液的计算量和可用的数量的表格。

图 13B 是一张描绘 HMGB1 多肽结合实验的结果的柱状图。通过 ELISA, 生物素标记的对应于人 HMGB1 特定 18 个氨基酸区域的多肽和对应于人 HMGB1 的 9-85 氨基酸残基的更长多肽(图 13A 中列出)被制备并且分析了与特殊的抗-HMGB1 单克隆抗体(如 2E11 HMGB1 mAb (2E11) , 6E6 HMGB1 mAb (6E6) , 6H9 HMGB1 mAb (6H9) ,2G7 HMGB1 mAb (2G7) 的结合情况。

图 14 是一张描述抗-HMGB1 单克隆抗体 ELISAs 的结果的示意图。在 ELISAs 实验中, 特异的抗-HMGB1 单克隆抗体 (2E11 HMGB1 mAb(2E11),2G5 HMGB1 mAb(2G5),2G7 HMGB1 mAb(2G7) 和 6E6 HMGB1 mAb(6E6)) 作为捕获抗体使用, 多克隆 HMGB1 抗体作为检测抗体使用。

图 15 是一张描述抗-HMGB1 单克隆抗体 ELISAs 的结果的示意图。在 ELISAs 实验中，特异的抗-HMGB1 单克隆抗体（2E11 HMGB1 mAb(2E11), 2G5 HMGB1 mAb(2G5), 2G7 HMGB1 mAb(2G7) 和 6E6 HMGB1 mAb(6E6)）作为捕获抗体使用，6E6 HMGB1 mAb 作为检测抗体使用。

图 16 是一张描述在盲肠结扎穿孔(CLP)后一段时间内(天)，抗-HMGB1 多克隆抗体 6E6 HMGB1 mAb (6E6;见标记，分别以 1 μ g/小鼠，10 μ g/小鼠或 100 μ g/小鼠的剂量)或对照 IgG 抗体(对照 IgG)对于小鼠存活率的剂量效应曲线。

图 17 是分别在 CHO 细胞 (CHOHMGB1;SEQ ID NO:36); 大鼠(大鼠 HMGB1;SEQ IN NO:18), 小鼠 (musHMGB1; SEQ ID NO:18), 人 (huHMGB1;SEQ ID NO:74), 猪 (susHMGB1;SEQ ID NO:37) 和牛 (bosHMGB1;SEQ ID NO:38) 中表达的 HMGB1 多肽的 HMGB1 多肽序列阵列。

图 18A 是编码包括 5' 6HIS 标签的人重组 HMGB1 多肽核酸序列 (rec-HMGB1-His;SEQ ID NO:39)。克隆序列以小写字母显示。

图 18B 是包括 5' 6HIS 标签的人重组 HMGB1 多肽的编码氨基酸序列 (rec-HMGB1-His;SEQ ID NO:40)。

图 19A 是编码 2G7HMGB1 mAb 的 V_H 区域的核酸序列(SEQ ID NO:41)。

图 19B 是 2G7HMGB1 mAb 的 V_H 区域的编码氨基酸序列 (SEQ ID NO:42); CDRs 以下划线显示。

图 19C 是编码 2G7HMGB1 mAb 的 V_K 区域的核酸序列(SEQ ID NO:43)。

图 19D 是 2G7HMGB1 mAb 的 V_K 区域的编码氨基酸序列 (SEQ ID NO:42); CDRs 以下划线显示。

图 20 是描述 HMGB1 多肽结合实验结果的柱状图。对应于 HMGB1 上 46-63 或 61-78 位氨基酸残基的生物素标记的多肽被制备并通过 ELISA 分析其与 2G7 HMGB1 mAb(2G7)的结合情况。

图 21 是描述 HMGB1 多肽结合实验结果的柱状图。对应于 HMGB1 上 46-63 或 151-168 位氨基酸残基的生物素标记的多肽被制备并通过 ELISA 分析其与 21E11 HMGB1 mAb(2E11)的结合情况。

图 22 是描述 HMGB1 和 HMGB2 多肽结合实验结果的柱状图。分别对应于人 HMGB1 上 46-63 位氨基酸残基(标记为“huHMGB1-46-63-B”),人 HMGB2 上 46-63 位氨基酸残基(标记为“huHMGB2-46-63-B”),人 HMGB1 上 53-70 位氨基酸残基(标记为“huHMGB1-53-70”),或人 HMGB1 上 61-78 位氨基酸残基(标记为“huHMGB1-61-78-B”)的多肽被制备并通过 ELISA 分析其与 2G7 HMGB1 mAb(2G7)或抗生物素蛋白的结合情况。

图 23 是描述 HMGB1 和 HMGB2 多肽结合实验结果的表。表中列出了各种多肽,它们各自的氨基酸序列和该多肽是否结合 2G7 HMGB1 mAb 的情况。列出的多肽包括:对应人 HMGB1 上 40-57 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-40-57”),人 HMGB1 上 46-63 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-46-63-B”),人 HMGB1 上 53-70 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-53-70”),人 HMGB2 上 46-63 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-46-63-B”)

和由不规则氨基酸序列组成的多肽，包括人 HMGB1 上 46-63 位不规则的氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-46-63-scr”)。

图 24 是描述 HMGB1 多肽结合实验结果的表。表中列出了各种多肽，它们各自的氨基酸序列和该多肽是否结合 6E6 HMGB1 mAb 的情况。列出的多肽包括：对应人 HMGB1 上 53-70 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-53-70”)，人 HMGB1 上 61-78 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-61-78-B”)，人 HMGB1 上 67-84 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-67-84”)和由不规则氨基酸序列组成的多肽，包括人 HMGB1 上 61-78 位不规则的氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-61-78-scr”)。

图 25 是描述 HMGB1 多肽结合实验结果的表。表中列出了各种多肽，它们各自的氨基酸序列和该多肽是否结合 2E11 HMGB1 mAb 的情况。列出的多肽包括：对应人 HMGB1 上 143-160 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-143-160”)，人 HMGB1 上 151-168 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-151-168-B”)，人 HMGB1 上 157-174 位氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-157-174”)和由不规则氨基酸序列组成的多肽，包括人 HMGB1 上 151-168 位不规则的氨基酸残基(标记为“人 HMGB1-151-168-scr”)。

图 26 是一张柱状图，总结了多肽结合实验的结果和描述了被 2G7 HMGB1 mAb (2G7)，6E6 HMGB1 mAb (6E6)，2G5 HMGB1 mAb(2G5)，6H9 HMGB1 mAb(6H9)，2E11 HMGB1 mAb (2E11) 识别的 HMGB1 表位图。

图 27A 是完整的，未-裂解的 6E6 HMGB1mAb 的质谱图。

图 27B 是经过 DTT 裂解的 6E6 HMGB1mAb 的质谱图。

图 27C 是经过 DTT 裂解的 6E6 HMGB1mAb 轻链的质谱图。

图 27D 是经过 DTT 裂解的 6E6 HMGB1mAb 重链的质谱图。

图 28 是一张描述在盲肠结扎穿孔(CLP)后一段时间内(天),使用不同剂量的 2G7 HMGB1mAb(0.004mg/kg,0.04 mg/kg 或 0.4 mg/kg)或对照 IgG 抗体 (0.4mg/kg)对于小鼠存活率的效果图。

图 29 是一张分别使用不同剂量(如 4mg/kg, 0.4mg/kg, 0.04mg/kg, 或 0.004mg/kg)的 6E6 HMGB1 mAb(6E6), 2G7 HMGB1 mAb(2G7), 或对照 IgG 后,小鼠的 CLP 存活率百分比示意图。

图 30 是人(Homo sapiens)HMGB2 多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:54; GenBank Accession No.M83665)。

图 31A 是人(Homo spaiens)HMGB1 多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:74)。

图 31B 是人(Homo spaiens)HMGB1 多肽的的 A 匣(SEQ ID NO:75)。

图 31C 是人(Homo spaiens)HMGB1 多肽的的 B 匣(SEQ ID NO:76)。

图 32 是一张描述不同抗-HMGB1 单克隆抗体对 TNF 释放的抑制作用柱状图。以 0.1 μ g/ml 重组 CBP-鼠 HMGB1 多肽(SEQ ID NO:5)刺激 RAW264.7 细胞可介导鼠 TNF 的释放。介导的同时,加入不同的 HMGB1 单克隆抗体(培养上清中),使之终浓度为 13%。下列抗体被测试: 1A9 HMGB1 mAb(1A9); 2E11 HMGB 1 mAb(2E11); 2G5 HMGB1 mAb(2G5); 2G7 HMGB1

mAb(2G7); 3G8 HMGB1 mAb(3G8); 4H11 HMGB1 mAb(4H11); 3-5A6 HMGB1 mAb(5A6); 6E6 HMGB1 mAb(6E6); 9G2 HMGB1 mAb(9G2); 4C9 HMGB1 mAb(4C9); 和 6H9 HMGB1 mAb(6H9). 第一个深色柱表示在缺失任何抗体的条件下 TNF 的释放情况。

图 33 是一张描述不同抗-HMGB1 单克隆抗体对 TNF 释放的抑制作用柱状图。以 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 重组 CBP-鼠 HMGB1 多肽 (SEQ ID NO:5) 刺激 RAW264.7 细胞可介导鼠 TNF 的释放。介导的同时, 加入不同的 HMGB1 单克隆抗体 (培养上清中), 使之终浓度为 13%。下列抗体被测试: 7H3 HMGB1 mAb(7H3); 9H3 HMGB1 mAb(9H3); 10D4 HMGB1 mAb(10D4); 1C3 HMGB1 mAb(1C3); 3E10 HMGB1 mAb(3E10); 4A10 HMGB1 mAb(4A10); 5C12 HMGB1 mAb(5C12); 和 7G8 HMGB1 mAb(7G8). 第一个深色柱表示在缺失任何抗体的条件下 TNF 的释放情况。

发明的详细描述

在不同的实施方案中, 本发明关注于与脊椎动物高迁移率簇匣 (HMGB) 多肽结合的抗体或抗原-结合片段, 测定并且/或者鉴定结合 HMGB 多肽的试剂的方法, 对以细胞因子级联活性为特性的病人给予治疗的方法及测定样本中 HMGB 多肽的方法。

抗体和制备抗体的细胞

在某一实施方案中, 本发明包括结合 HMGB 多肽的抗体或抗原-结合片段。本发明的抗体可以是多克隆或单克隆抗体, 术语“抗体”包括多克隆或单克隆抗体。术语多克隆和单克隆指所制备抗体的相同程度, 而非限定于特定的制备方法。在某一实施方案中, 抗体或抗原-结合片段是一个单克隆抗体或其抗原-结合片段。这里使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指仅含有一种能够与本发明中特异多肽表位起免疫反应的抗原

结合位点类型的抗体分子群。单克隆抗体组合物特异地显示与其发生免疫反应特异多肽的单一结合亲和力。

这里使用的术语“抗体”也包括抗体的功能片段，包括嵌合，人工，灵长源，镶嵌的或单链抗体的片段。功能片段包括与 HMGB 多肽（例如，哺乳动物 HMGB 多肽（如哺乳动物 HMGB1 多肽））结合的抗原-结合片段。例如，能够结合 HMGB 多肽或其配基的抗体片段，包括，但不局限于 Fv, Fab, Fab' 和 F(ab')₂ 片段。这些片段可以通过酶切或重组技术制备。例如，分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶酶解可以得到 Fab 和 F(ab')₂ 片段。其他需要底物特异性的蛋白酶也可以被用于制备 Fab 和 F(ab')₂ 片段。也可以通过在抗体基因的自然终止位点上游引入一个或多个终止密码子来制备多种抗体缩短形式。例如，编码 F(ab')₂ 重链配基的嵌合基因可以通过设计引入编码 CH1 区域和重链绞链区的 DNA 序列。

单链抗体，及嵌合，人工或灵长源（CDR-嵌合），或嵌合抗体，如嵌合，CDR-嵌合或嵌合单链抗体，包括了来源于不同物种的配基，并且被目前的发明和术语“抗体”所包括。这些抗体的不同配基可以通过常规技术化学性地结合在一起，或可以通过遗传工程技术制备成一种相似的蛋白。见，例如，Cabilly et al., 美国专利号 4,816,567; Cabilly et al., 欧洲专利号 0,125,023 B1; Boss et al., 美国专利号 4,816,397; Boss et al., 欧洲专利号 0,120,694 G1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., 欧洲专利号 0,194,276 B1; Winter, 美国专利号 5,225,539; Winter, 欧洲专利号 0,239,400 B1; Queen et al., 欧洲专利号 10 451 216 B1; and Padian, E.A. et al., EP0519596 A1。也可见，Newman, R. et al., *BioTechnology*, 10:1455-1460(1992), 关于灵长源抗体，和 Ladner et al., 美国专利号 4,946,778, and Bird, R.E. et al., *Science*, 242:423-426(1988)) 关于单链抗体。

按照标准方法或其他合适的技术通过合成或重组 DNA 技术可以制备人源抗体。编码人源可变区域的核酸（例如，cDNA）序列可以通过 PCR 突变法来构建，改变编码人或人源链的 DNA 序列，如来源于先前的人源可变区域的 DNA 模板。（见，Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res., 17:5404(1989)）；Sato, K., et al., Cancer Research, 53:851-856(1993)；Daugherty, G.L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9):2471-2476(1991)；and Lewis, A.P. and S.Crowe, Gene, 101:297-302(1991)）。利用这些或其他合适的方法，也可以制备可变区。在某一方面，克隆的可变区可以是突变的，从而可以挑选所期望的编码可变区的特异序列（例如，从噬菌体文库中；见，Krebber et al., U.S.5,514,548；Hoogenboom et al., WO 93/06213）。

抗体可以是人源抗体，其包括一种或多种免疫球蛋白链（例如，包括非人类来源的 CDR（如，从非人类来源的抗体中得到的一种或多种 CDRs）的抗体，及来源于人源轻链并且/或者重链的框架区域（如：带有或不带有框架改变的 CDR-嵌合抗体））。在某一实施方案中，抗体或其抗原-结合片段包括特定免疫球蛋白的轻链 CDRs（CDR1,CDR2,CDR3）和重链 CDRs（CDR1, CDR2, CDR3）。在另一实施方案中，抗体或抗原-结合片段进一步包括人类框架区域。

这里所叙述的抗体可以与一种试剂连接。在某一实施方案中，该试剂是一种标签，例如，放射性同位素，表位标签（标签），亲和标签（如，生物素，抗生物素蛋白），自旋标记，酶，荧光基团或化学发光基团。该发明中被标记的抗体或抗原-结合片段可以用于，例如，这里叙述的诊断和/或预测方法。在另一实施方案中，抗体与药物、毒素或抗-炎症药剂连接。本发明中药物，毒素或抗-炎症药剂与抗-HMGB 抗体和抗原-结合片段的结合可以将这些药剂定位于 HMGB 表达和/或活跃的位置。该发明中可以与抗体连接的药物和毒素包括，例如，化疗药剂（如，丝裂霉

素 C, paclitaxol, 氨甲蝶呤, 5-氟尿嘧啶, cisplatin, cyclohexamide), 毒素(如, 蓖麻毒素, gelonin)和其他这里所叙述的药剂(例如, 所述的用于联合治疗的药剂)。能够连接的抗-炎症药剂包括, 例如, 这里所述的那些药剂。

HMGB 多肽(例如, 哺乳动物 HMGB 多肽)的特异抗体可以由适当的免疫原引发, 如分离的和/或重组 HMGB 多肽或其配基(包括合成分子, 如合成多肽)。抗体也可以通过用表达 HMGB 多肽的细胞免疫合适的宿主(如小鼠)的方法而产生, 这些细胞如 GH3 细胞垂体后叶, 巨噬细胞(例如 RAW 246.7 细胞, 人巨噬细胞), 外周血单核细胞(PBMCs(例如, 人 PBMCs)), 初级 T 细胞(例如, 人初级 T 细胞), 肾上腺细胞(例如, 鼠肾上腺 PC-12 细胞, 人肾上腺细胞)和肾细胞(例如, 鼠原初肾细胞, 人原初肾细胞)。免疫合适的宿主(如, 小鼠)。另外, 表达重组 HMGB 多肽(如, 哺乳动物 HMGB 多肽)的细胞, 如转化细胞, 可以作为免疫原或筛选与其结合的抗体而运用(见, chuntharapai et al., J. Immunol., 152:1783-1789(1994); Chuntharapai et al., 美国专利号 5,440,021)。

免疫抗原, 多克隆和单克隆抗体的制备可以通过任何适合的技术完成。许多方法已经被描述(见, Kohler et al., Nature, 256:495-497(1975) and Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976); Milstein et al., Nature 266:550-552(1977); Koprowski et al., 美国专利号 4,172,124; Harlow, E. and D. Lane, 1988, antibodies: A laboratory Manual, (cold spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY); current Protocols Inmolecular Biology, Vol.2 (Supplement 27, Summer 94). Ausubel, F.M.et al., Eds., (John wiley & Sons: New York, NY), Chapter 11, (1991))。通常, 如这里所举例, 杂交瘤可以通过将合适的永生细胞系(如, 骨髓瘤细胞 SP2/0, P3X63A g 8.653 或 heteromyeloma)与抗体表达细胞融合而制备。

抗体表达细胞可以从经目标抗原免疫的人或动物的外周血或，更适宜地从脾或淋巴结中获得。融合细胞（杂交瘤）通过选择性培养基分离，并用有限稀释法克隆。特异表达目标抗体的细胞可以运用合适的方法挑选（例如，ELISA）。

其他合适的制备或分离具备必要特异性的抗体（例如，人类抗体或抗原-结合片段）的方法也可以运用，包括，例如，从文库中（例如，噬菌体显示文库）筛选重组抗体的方法。能够产生全套人类抗体的转基因动物（例如，异种小鼠（Abgenix, Fremont, CA））可以通过合适的方法生产（见，Jakobovits et al., Proc. Natl. acad. Sci. USA, 90:2552-2555(1993); jakobovits et al., Nature, 362:255-258(1993)）。其他合适的生产能够产生全套人类抗体的转基因动物的方法已有叙述（例如，Lonberg et al., 美国专利号 5,545,806; Surani et al., 美国专利号 5,545,807; Lonberg et al., WO97/13852）。

在某一实施方案中，抗体或其抗原-结合片段对于 HMGB 多肽（例如，哺乳动物 HMGB 多肽）具有特异性。在另一方面，抗体或其抗原-结合片段对于 HMGB1 多肽（例如，在 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:74 中叙述的人类 HMGB1 多肽）具有特异性。在另一实施方案中，抗体或其抗原-结合片段是 IgG 或 IgG 的抗原-结合片段。在另一实施方案中，抗体或其抗原-结合片段是 IgG1 或 IgG1 的抗原-结合片段。在另一实施方案中，抗体或其抗原-结合片段是 IgG2a, IgG2b, IgG3, 或任何前述的抗原-结合片段。

在另一实施方案中，抗体或抗原-结合片段可以结合 HMGB 多肽并抑制（减少或防止）HMGB 多肽的异种或多种功能。这些 HMGB 功能包括，例如，增强炎症反应（见，例如，PCT 公开号 WO 02/092004），增加细胞促炎症因子的释放（见，例如 PCT 公

开号 WO 02/092004), 结合 RAGE, TLR2, 化学吸引力 (见, 例如, Degryse et al., J, Cell biol. 152(6):1197-1206(2001); 它们的全部教导都通过在这里引述而合并于本文)。

在某一实施方案中, 抗体是人类抗体或其抗原-结合片段。在另一实施方案中, 抗体是人工类抗体或其抗原-结合片段。而在另一实施方案中, 抗体或抗原-结合片段能够抑制多肽 (如 RAGE, TLR2) 与 HMGB 多肽的结合并且/或抑制一种或多种由结合 HMGB 多肽或其他多肽引发的功能。

在某些实施方案中, 抗体或其抗原-结合片段特异地结合 HMGB 表位或抗原决定簇 (例如, HMGB 表位, HMGB A 匣表位, HMGB B 匣表位)。正如这里所叙述的, 抗体或其抗原-结合片段可以根据其抑制促炎症因子释放的能力运用标准方法进行筛选, 而不必使用不适当的实验方案。可以抑制细胞中促炎症因子的产生和/或促炎症因子的释放, 并且/或者抑制以炎症因子级联活性为特征的状况的抗-HMGB A-匣抗体和抗-HMGB B-匣抗体, 也在本发明的范围内。在某一实施方案中, 本发明中的抗体或抗原-结合片段可以抑制 TNF, IL-1 β , 和/或 IL-6 的产生。在另一方面, 本发明中的抗体或抗原-结合片段可以抑制 TNF 的产生 (例如, TNF- α)。

正如这里所述, 命名为 “6E6 HMGB1 mAb”, “2E11 HMGB1 mAb”, “6H9 HMGB1 mAb”, “10D4 HMGB1 mAb”, “2G7 HMGB1 mAb” 的结合 HMGB1 的单克隆抗体已经被制备。此外, 其他命名为 “9G2 HMGB1 mAb”, “1A9 HMGB1 mAb”, “3G8 HMGB1 mAb”, “2G5 HMGB1 mAb”, “4H11 HMGB1 mAb”, “7H3 HMGB1 mAb”, “3-5A6 HMGB1 mAb”, “9G1 HMGB1 mAb”, “4C9 HMGB1 mAb”, “9H3 HMGB1 mAb”, “1C3 HMGB1 mAb”, “5C12 HMGB1 mAb”, “3E10 HMGB1 mAb”, “7G8 HMGB1 mAb”, “4A10

HMGB1 mAb”，的单克隆抗体已经被制备。除了 9G2 HMGB1 mAb 和 1A9 HMGB1 mAb 之外所有的抗体都能与 HMGB1 结合。9G2 HMGB1 mAb 和 1A9 HMGB1 mAb 似乎与免疫原的 CBP 区域（其占免疫原中的一小部分，并未被分割）结合。

6E6 HMGB1 mAb，也称为 6E6-7-1-1 或 6E6，可以由鼠杂交瘤 6E6 HMGB1 mAb 制备，其于 2003 年 9 月 3 日以 Critical Therapeutics 有限公司的名义，675 Massachusetts Avenue, 14 楼，Cambridge, MA 02139, 美国，被保存于美国典型培养物保存中心，10801 学院大道，Manassas, Virginia 20110, 美国，保藏号，PTA-5431。本发明涉及鼠杂交瘤 6E6 HMGB1 mAb，其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

2E11 HMGB1 mAb，也称为 2E11-1-1-2 或 2E11，可以由鼠杂交瘤 2E11 HMGB1 mAb 制备，其于 2003 年 9 月 3 日以 Critical Therapeutics 有限公司的名义，675 Massachusetts Avenue, 14 楼，Cambridge, MA 02139, 美国，保藏于美国典型培养物保存中心，10801 学院大道，Manassas, Virginia 20110, 美国，保藏号，PTA-5431。本发明涉及鼠杂交瘤 2E11 HMGB1 mAb，其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

6H9 HMGB1 mAb，也称为 6H9-1-1-2 或 6H9，可以由鼠杂交瘤 6H9 HMGB1 mAb 制备，其于 2003 年 9 月 3 日以 Critical Therapeutics 有限公司的名义，675 Massachusetts Avenue, 14 楼，Cambridge, MA 02139, 美国，保藏于美国典型培养物保存中心，10801 学院大道，Manassas, Virginia 20110, 美国，保藏号，PTA-5434。本发明涉及鼠杂交瘤 6H9 HMGB1 mAb，其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

10D4 HMGB1 mAb, 也称为 10D4-1-1-1-2 或 10D4, 可以由鼠杂交瘤 10D4 HMGB1 mAb 制备, 其于 2003 年 9 月 3 日以 Critical Therapeutics 有限公司的名义, 675 Massachusetts Avenue, 14 楼, Cambridge, MA 02139, 美国, 保藏于美国典型培养物保存中心, 10801 学院大道, Manassas, Virginia 20110, 美国, 保藏号, PTA-5435。本发明涉及鼠杂交瘤 10D4 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

2G7 HMGB1 mAb, 也称为 3-2G7-1-1-1 或 2G7, 可以由鼠杂交瘤 2G7 HMGB1 mAb 制备, 其于 2003 年 9 月 3 日以 Critical Therapeutics 有限公司的名义, 675 Massachusetts Avenue, 14 楼, Cambridge, MA 02139, 美国, 保藏于美国典型培养物保存中心, 10801 学院大道, Manassas, Virginia 20110, 美国, 保藏号, PTA-5432。本发明涉及鼠杂交瘤 2G7 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

培养以上鉴定了的鼠杂交瘤 (例如, 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb), 需要加入 DMEM, 10% FCS, 1% IL-6, 1% L-谷氨酸和 1% Pen-Strep。

9G2 HMGB1 mAb, 也称为 9G2-7-1-1-1 或 9G2, 可以由鼠杂交瘤 9G2 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 9G2 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

1A9 HMGB1 mAb, 也称为 1A9-1-2-1-4 或 1A9, 可以由鼠杂交瘤 1A9 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 1A9 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

3G8 HMGB1 mAb, 也称为 3G8 -7-2-1-5 或 3G8, 可以由鼠杂交瘤 3G8 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 3G8 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

2G5 HMGB1 mAb, 也称为 3-2G5-4-1-2 或 2G5, 可以由鼠杂交瘤 2G5 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 2G5 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

4H11 HMGB1 mAb, 也称为 4H11, 可以由鼠杂交瘤 4H11 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 4H11 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

7H3 HMGB1 mAb, 也称为 7H3, 可以由鼠杂交瘤 7H3 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 7H3 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

3-5A6 HMGB1 mAb, 也称为 3-5A6 或 5A6, 可以由鼠杂交瘤 3-5A6 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 3-5A6 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

9G1 HMGB1 mAb, 也称为 9G1, 可以由鼠杂交瘤 9G1 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 9G1 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

4C9 HMGB1 mAb, 也称为 9G1, 可以由鼠杂交瘤 9G1 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 9G1 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

9H3 HMGB1 mAb, 也称为 9H3, 可以由鼠杂交瘤 9H3 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 9H3 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

1C3 HMGB1 mAb, 也称为 1C31-1-1-1 或 1C3, 可以由鼠杂交瘤 1C3 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 1C3 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

5C12 HMGB1 mAb, 也称为 5C12-1-1-1-1 或 5C12, 可以由鼠杂交瘤 5C12 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 5C12 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

3E10 HMGB1 mAb, 也称为 3E10-5-4-1-1 或 3E10, 可以由鼠杂交瘤 3E10 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 3E10 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

7G8 HMGB1 mAb, 也称为 7G8, 可以由鼠杂交瘤 7G8 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 7G8 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

4A10 HMGB1 mAb, 也称为 4A10-1-3-1-1 或 4A10, 可以由鼠杂交瘤 4A10 HMGB1 mAb 制备, 本发明涉及鼠杂交瘤 4A10 HMGB1 mAb, 其表达的抗体及编码该抗体的核酸。

某一个实施方案中, 抗体或其抗原-结合片段是从含有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 及上述的任何抗原-结合片段的组群中挑选的。

在另一实施方案中, 抗体或抗原-结合片段具有与从组群中挑选出的抗体或抗原-结合片段相同或相似的特异表位, 该组群包含 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 及上述的任何抗原-结合片段。与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4

HMGB1 mAb, 和/或 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性相同或相似的抗体或抗原-结合片段可以通过多种合适的方法鉴定。例如, 与, 例如, 6E6 HMGB1 mAb 的表位特异性相同或相似的抗体或抗原-结合片段, 可以基于其与 6E6 HMGB1 mAb 竞争结合 HMGB (例如, 哺乳动物 HMGB 多肽 (例如, 哺乳动物 HMGB1 多肽)) 的能力进行鉴定。在另一个例子中, 例如, 6E6 HMGB1 mAb 的结合, 以及具有相同或相似的 HMGB 多肽表位特异性的抗体的结合, 可以被单一的多肽抑制 (例如, 自然多肽, 合成多肽)。在许多方面, 多肽可以包括, 例如, 9 到 50 氨基酸, 9 到 40 氨基酸, 9 到 30 氨基酸, 9 到 25 氨基酸或 9 到 20 氨基酸。

如这里所示例, 对应于人类 HMGB1 多肽特异区域的 18 氨基酸多肽显示其能与多种 HMGB1 单克隆抗体结合。这里叙述的研究定位了 HMGB1 中特异结合 HMGB1 抗体的表位。

例如, 2E11 HMGB1mAb 显示其可以结合对应于人类 HMGB1 151-168 氨基酸 (SEQ ID NO:1 中 151-168 位氨基酸; 即 LKEKYEKDIAAYRAKGKP (SEQ ID NO:30)) 的多肽。进一步的研究表明 2E11 HMGB1mAb 识别 HMGB1 中带有 156-161, 155-161, 155-162, 156-162 和/或 156-163 位氨基酸残基的表位 (见例 14)。

6E6 HMGB1mAb 和 6H9 HMGB1mAb 显示其可以结合对应于人类 HMGB1 61-78 位氨基酸 (SEQ ID NO:1 中 61-78 氨基酸; 即 EDMAKADKARYEREMKTY (SEQ ID NO:24)) 的多肽。进一步的研究表明 6E6 HMGB1mAb 识别 HMGB1 中带有 61-78 位氨基酸残基的表位 (见例 13)。

2G7 HMGB1 mAb 显示其可以结合对应于人类 HMGB1 46-63 位氨基酸 (SEQ ID NO:1 中 46-63 氨基酸; 即

SERWKTMSAKERGKFEDM(SEQ ID NO:23))的多肽(见例10)。进一步的研究表明2G7 HMGB1mAb识别HMGB1中带有53-63位氨基酸残基的表位(见例12)。此外,2G7 HMGB1mAb不结合HMGB246-63为氨基酸残基(SEQ ID NO:48),尽管在HMGB1 46-63多肽和HMGB2 46-63多肽间仅有一个氨基酸的差异(见例12)。这样,在某一实施方案中,本发明地抗体或抗原结合片断与HMGB1结合,而不与HMGB2结合。在其它实施方案中,本发明中的抗体或抗原-结合片段与HMGB1或HMGB2都结合。

这些18氨基酸多肽,或其他对应于HMGB1特定区域的多肽,可以用于表位研究,鉴定某抗体或抗原-结合片段是否能抑制某多肽与抗体的结合,而己知该抗体可与该多肽结合(例如,6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb, 其他这里叙述的抗体)。这样,例如,抗体或抗原-结合片段的表位特异性可以用,例如,2E11 HMGB1 mAb及对应于人类HMGB1(己知可与2E11 HMGB1 mAb结合)的151-168氨基酸的多肽进行试验。

在另一个例子中,具有与本发明中的抗体(例如6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 和/或2E11 HMGB1 mAb)相同或相似表位特异性的抗体可以用嵌合HMGB多肽进行鉴定(见,例如, Banks, G. C., et al., J. biol. Chem. 274(23): 16536-16544(1999))。

在某一实施方案中,抗体或抗原-结合片段可以与6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb和/或上述的任何抗原-结合片段竞争结合HMGB多肽(例如,哺乳动物HMGB多肽(例如哺乳动物HMGB1多肽))。正如这里所述,结合的抑制可以是对相同或相似表位的竞争或位点干涉(例如,在此处抗体结合交迭表

位或邻近表位)的结果。6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 和/或上述的任何抗原-结合片段引起的抑制,也可以归因于 HMGB 多肽结构的变化,该变化是由抗体或抗原-结合片段与 HMGB 多肽的结合引起的。

在另一实施方案中,抗体或抗原-结合片段是从包括了 3G8 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb,4H11 HMGB1 mAb,7H3 HMGB1 mAb,3-5A6 HMGB1 mAb,9G1 HMGB1 mAb,4C9 HMGB1 mAb,9H3 HMGB1 mAb,1C3 HMGB1 mAb,5C12 HMGB1 mAb,3E10 HMGB1 mAb,7G8 HMGB1 mAb,4A10 HMGB1 mAb,和上述的任何抗原-结合片段的群组中挑选出的。

在某一实施方案中,具有与群组中挑选出的,抗体或抗原-结合片段相同或相似的表位特异性,该群组包括了 3G8 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb,4H11 HMGB1 mAb,7H3 HMGB1 mAb,3-5A6 HMGB1 mAb,9G1 HMGB1 mAb,4C9 HMGB1 mAb,9H3 HMGB1 mAb,1C3 HMGB1 mAb,5C12 HMGB1 mAb,3E10 HMGB1 mAb,7G8 HMGB1 mAb,4A10 HMGB1 mAb。如上所述,具有与一个或多个这些抗体或抗原-结合片段相同或相似表位特异性的抗体或抗原-结合片段可以用多种合适的方法鉴定(例如,用这里叙述的和/或此领域中已知的方法)。

在另一实施方案中,抗体或抗原-结合片段可以与 3G8 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb,4H11 HMGB1 mAb,7H3 HMGB1 mAb,3-5A6 HMGB1 mAb,9G1 HMGB1 mAb,4C9 HMGB1 mAb,9H3 HMGB1 mAb,1C3 HMGB1 mAb,5C12 HMGB1 mAb,3E10 HMGB1 mAb,7G8 HMGB1 mAb,4A10 HMGB1 mAb,和/或上述任何抗原-结合片段竞争结合 HMGB 多肽(例如,哺乳动物 HMGB 多肽)。正如这里所述,结合的抑制可以是对相同或相似表位的竞争或位点干涉(例如,在此处抗体结合交迭表位或

邻近表位)的结果。抑制也可以归因于 HMGB 多肽结构的变化,该变化是由抗体或抗原-结合片段与 HMGB 多肽的结合引起的。

在某一实施方案中,抗体或其抗原-结合片段包括了从含有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的群组中挑选出的抗体的 6 个 CDR s (轻链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3) 和重链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3))。在另一实施方案中,抗体是一个人源抗体,其包括从含有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的群组中挑选出的抗体的轻链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3) 和重链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3)。在另一实施方案中,抗体或其抗原-结合片段包括任何这里叙述的其他抗体的 6 个 CDR s (轻链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3) 和重链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3))。

在另一实施方案中,抗体或其抗原-结合片段可以包括本发明中的任何抗体(例如 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb)的 1 到 6 个轻链和重链 CDR s。例如,抗体或其抗原-结合片段可以包括 1, 2, 3, 4, 5, 6 个轻链和重链 CDR s。另一实施方案中,抗体或其抗原-结合片段包括本发明中某一种抗体的至少一个轻链 CDR 或重链 CDR,及本发明中另一种抗体(例如,6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb)的至少一个轻链 CDR 或重链 CDR。例如,抗体或其抗原-结合片段可以包括一个或多个 6E6 HMGB1 mAb 的及一个或多个 6H9 HMGB1 mAb CDR s。联合了本发明中其他不同抗体的 CDR s 组合物的抗体或其抗原-结合片段也包括在内。

在另一实施方案中,抗体或其抗原-结合片段包括了从含有 3G8 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb, 4H11 HMGB1 mAb, 7H3

HMGB1 mAb,3-5A6 HMGB1 mAb,9G1 HMGB1 mAb,4C9 HMGB1 mAb,9H3 HMGB1 mAb,1C3 HMGB1 mAb,5C12 HMGB1 mAb,3E10 HMGB1 mAb,7G8 HMGB1 mAb,4A10 HMGB1 mAb 的群组中挑选出的抗体的 6 个 CDR s (轻链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3) 和重链 CDR s (CDR1,CDR2,CDR3))。另一方面,抗体或其抗原-结合片段包括上述抗体中一种抗体的 1 到 6 个轻链和重链 CDR s。

在某些实施方案中,抗体或其抗原-结合片段包括的一种或多种 CDR s 与本发明中的抗体(例如 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb)的 CDR s 分别至少有 80%, 或至少 90%, 或至少 95% 的一致性。在其它的实施方案中,抗体或其抗原-结合片段包括的一种或多种 CDR s 与本发明中的抗体的 CDR s 分别至少有 80%, 或至少 90%, 或至少 95% 的相似性。测定两种多肽序列的一致性和相似性的方法在这里有所叙述,并且/或者在本领域中是熟知的。

本发明也涉及一种双特异性抗体,或其功能片段(如 $F(ab')_2$), 其可以与 HMGB 多肽及至少其他一种抗原(例如,肿瘤抗原,病毒抗原)结合。在具体的实施方案中,双特异性抗体,或其功能片段,具有与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb 和/或 2E11 HMGB1 mAb, 及其他至少一种抗体相同或相似的表位特异性。双特异性抗体可以由 triomas 和 hybrid 杂交瘤分泌。通常, triomas 是通过杂交瘤与淋巴细胞(例如,抗体-分泌 B 细胞)的融合构建而成,而 hybrid 杂交瘤是通过两种杂交瘤融合构建而成。每一种融合细胞(例如,杂交瘤,淋巴细胞)都分泌单一的抗体。然而, triomas 和 hybrid 杂交瘤可以产生含有识别不同抗原的抗原-结合位点的抗体。triomas 和 hybrid 杂交瘤的培养上清可以通过适合的方法(例如,

ELISA) 来化验其双特异性抗体, 并且双特异性抗体可以用常规的方法纯化(见, 例如, 美国专利号 5,959,084 (Ring et al.), U.S. Patent No. 5,141,7369 (Iwasa et al.), U.S. Patent Nos. 4,444,878, 5,292,668, 5,523,210 (all to Paulus et al.) 和美国专利号 5,496,549(Yamazaki et al.))。

在某一实施方案中, 本发明涉及一种产生本发明中的抗体或抗原-结合片段的分离的细胞。在特定实施方案中, 本发明中分离的抗体-制备细胞是一种永生细胞, 如杂交瘤, 异种杂交瘤, 淋巴瘤母细胞或重组细胞。除了制备抗体, 本发明中的抗体-制备细胞还有其他应用。例如, 本发明中的抗体-制备细胞可以与其他细胞融合(如合适的药物-标记的人骨髓瘤, 鼠骨髓瘤, 人-鼠异源骨髓瘤或人异源骨髓瘤细胞)以制备, 例如, 额外的杂交瘤, 这样则提供了编码抗体的基因的转移方法。此外, 该细胞可以作为能被分离和表达的抗-HMGB 免疫球蛋白链的编码核酸的来源而被应用,(例如, 通过运用任何适合的技术转化至其他细胞中(见, 例如, Cabilly et al., U. S. Patent No. 4, 816, 567, Winter, U. S. Patent No. 5, 225, 539))。例如, 包括了编码重排抗-HMGB 轻和/或重链的序列的克隆可以被分离出来(例如, 通过 PCR)。此外, cDNA 文库可以由合适的细胞系中分离的 mRNA 制备, 从而可以分离编码抗-HMGB 免疫球蛋白链的 cDNA 克隆。这样, 可以得到编码抗体, 或其配基的重和/或轻链的核酸, 并用于在不同宿主细胞或体外转录系统中制备特异的免疫球蛋白, 免疫球蛋白链, 或其变量形式(例如, 人工免疫球蛋白)。例如, 包括 cDNAs, 或编码其派生物如人工免疫球蛋白或免疫球蛋白链等变量形式的核酸, 可以被连接入合适的原核或真核载体(例如, 表达载体), 并利用适当的方法介导入合适的宿主细胞(例如, 转化, 转染, 电转化, 感染), 经改造, 该核酸与一种或多种表达调控元件相接(例如, 存在于载体上或共同插入宿主细胞基因组中), 以制

备重组抗体-制备细胞。这样，在某些实施方案中，本发明是一种核酸，其编码属于该发明的抗体或抗原-结合片段。在其它实施方案中，本发明是一种载体，其包括了编码本发明的抗体或抗原-结合片段的核酸。

HMGB 多肽，HMGB A 匣和 HMGB B 匣

如所述，在某一实施方案中，本发明是结合 HMGB 多肽的抗体或其抗原-结合片段。

这里使用的“HMGB 多肽”是一种多肽，其序列与从包括 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:74 的群组中挑选的序列有至少 60%，优选地，至少 70%，75%，80%，85%，或 90%，或更优选地至少 95% 的一致性（例如，运用 BLAST 程序和这里叙述的参数进行测定）。在某一实施方案中，HMGB 多肽加强了炎症反应并且/或者增加了细胞中促炎症因子的释放。

术语“多肽”涉及氨基酸的聚合体，并不限定特定的长度；这样，多肽的定义包括了缩氨酸，寡肽和蛋白质。在某一实施方案中，HMGB 多肽是一种哺乳动物 HMGB 多肽，例如，一种哺乳动物 HMGB 多肽（如，人 HMGB 多肽）。在另一实施方案中，如述，HMGB 多肽包括了 B 匣 DNA 结合区域和/或 A 匣 DNA 结合区域和/或羧基末端。

其他 HMGB 多肽的例子在 genebank 编号为 AAA64970, AAB08987, P07155, AAA20508, S29857, P09429, NP_002119, CAA31110, S02826, U11431, X67668, NP_005333, NM_016957, J04179 中有所叙述。它们的全部教导都通过在这里引述而被合并于本文。HMGB 多肽的额外的例子包括，但不局限于，哺乳动物 HMG1(例如，在 genebank 编号 U51677 中叙述的(HMGB1))，

HMG2(例如,在 genebank 编号 M83665 中叙述的 (HMGB2)),HMG-2A(例如,在 genebank 编号 NM_005342 和 NP_005333 中叙述的 (HMGB3,HMG-4)),HMG14(例如,在 genebank 编号 P05114 中叙述),HMG17(例如,在 genebank 编号 X13546 中叙述),HMGI(例如,在 genebank 编号 L17131 中叙述),HMGY(例如,在 genebank 编号 M23618 中叙述),非哺乳动物 HMG T1(例如,在 genebank 编号 X02666 中叙述)和 HMG T2(例如,在 genebank 编号 L32859 中叙述)(彩虹鲑鱼);HMG-X(例如,在 genebank 编号 D30765 中叙述)(爪蟾),HMG D(例如,在 genebank 编号 X71138 中叙述)和 HMG Z(例如,在 genebank 编号 X71139 中叙述)(果蝇);NHP 10 蛋白(HMG 蛋白同源物 NHP 1)(例如,在 genebank 编号 Z48008 中叙述)(酵母);非-组蛋白染色体蛋白(例如,在 genebank 编号 O00479 中叙述)(酵母);HMG1/2 类似蛋白(例如,在 genebank 编号 Z11540 中叙述)(小麦,玉米,大豆);上游结合因子(UBF-1)(例如,在 genebank 编号 X53390 中叙述);PMS1 蛋白类似物 1(例如,在 genebank 编号 U13695 中叙述);单链识别蛋白(SSRP,结构-特异识别蛋白)(例如,在 genebank 编号 M86737 中叙述);HMG 类似物 TDP-1(例如,在 genebank 编号 M74017 中叙述);哺乳动物性-决定区域 Y 蛋白(SRY,睾丸-决定因子)(例如,在 genebank 编号 X53772 中叙述);真菌蛋白:mat-1(例如,在 genebank 编号 AB009451 中叙述),stell1(例如,在 genebank 编号 X53431 中叙述)和 Mc 1;SOX 14(例如,在 genebank 编号 AF107043 中叙述)(如同 SOX 1(例如,在 genebank 编号 Y13436 中叙述),SOX 2(例如,在 genebank 编号 Z31560 中叙述),SOX 3(例如,在 genebank 编号 X71135 中叙述),SOX 6(例如,在 genebank 编号 AF309034 中叙述),SOX 8(例如,在 genebank 编号 AF226675 中叙述),SOX 10(例如,在 genebank 编号 AJ001183 中叙述),SOX 12(例如,在 genebank 编号 X73039 中叙述)和 SOX 21(例如,在 genebank 编号 AF107044 中叙述));

淋巴特异因子(LEF-1)(例如,在 genebank 编号 X58636 中叙述);T-细胞特异转录因子(TCF-1)(例如,在 genebank 编号 X59869 中叙述);MTT1(例如,在 genebank 编号 M62810 中叙述);SP100-HMG 核心自身抗原(例如,在 genebank 编号 U36501 中叙述)。

其他 HMGB 蛋白的例子是由 HMGB 核酸序列编码的多肽,这些核酸属于 genebank 编码 NG_000897(HMG1L10)(特别地 NG_000897 的 658-1305 位核苷酸);AF076674(HMG1L1)(特别地 AF076674 的 1-633 位核苷酸);AF076676(HMG1L4)(特别地 AF076676 的 1-564 位核苷酸);AC010149(来源于 BAC 克隆 RP11-395A23 的 HMG 序列)(特别地 AC010149 的 75503-76117 位核苷酸);AF165168(HMG1L9)(特别地 AF165168 的 729-968 位核苷酸);XM_063129(LOC122441)(特别地 XM_063129 的 319-558 位核苷酸);XM_066789(LOC139603)(特别地 XM_066789 的 1-258 位核苷酸);AF165167(HMG1L8)(特别地 AF165167 的 456-666 位核苷酸)。

本发明的抗体和抗原-结合片段结合 HMGB 多肽(例如,一种或多种上述的 HMGB 多肽)。在某一实施方案中,抗体和抗原-结合片段结合脊椎动物 HMGB 多肽。在另一实施方案中,抗体和抗原-结合片段结合哺乳动物 HMGB 多肽(例如,大鼠 HMGB,小鼠 HMGB,人 HMGB)。另一实施方案中,(例如,大鼠 HMGB1,小鼠 HMGB1,人 HMGB1)。在特定的实施方案中,抗体和抗原-结合片段结合人 HMGB1 多肽(例如,在 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:74 中叙述的人 HMGB1 多肽)。

本发明的组合物和方法也反应了针对高迁移簇 B(HMGB) A 匣的抗体特征。在某一实施方案中,抗体和其抗原-结合片段结合 HMGB A 匣但不与 HMGB 的非-A 表位特异结合。在另一实施

方案中，抗体和其抗原-结合片段结合脊椎动物 HMGB A 匣但不与 HMGB 的非-A 表位特异结合。另一方面，抗体和其抗原-结合片段结合哺乳动物（例如，人类，鼠，鼠）HMGB A 匣但不与 HMGB 的非-A 表位特异结合。另一实施方案中，抗体和其抗原-结合片段结合 HMGB1 多肽的 A 匣（例如，哺乳动物 HMGB1 多肽（例如，人类 HMGB1，大鼠 HMGB1，小鼠 HMGB1））但不与 HMGB1 的非-A 表位特异结合。

如本文中所使用，“HMGB A 匣”，同时也指“A 匣”或“HMG A 匣”，是一种蛋白质或多肽，其与 HMGB A 匣（例如，这里所述的 HMGB A 匣）相比，至少有 50%，60%，70%，75%，80%，85%，90，95% 的序列一致性。在一个实施方案中，HMGB A 匣具有一种或多种下列的生物活性：抑制由 HMGB 介导的炎症和/或抑制细胞中促炎症因子的释放（见，例如，PCT 公开号 WO02/092004，其全部教导都通过在此引述而合并于本文）。在某一实施方案中，HMGB A 匣多肽具有上述的一种生物活性。特别地，HMGB A 匣多肽皆具上述的两种生物活性。在某一实施方案中，A 匣与在图 2A (SEQ ID NO:2 的 9-85 残基) 或图 31B (SEQ ID NO:75) 中描述的 A 匣相比，具有至少 50%，60%，70%，75%，80%，85%，90%，95% 的序列一致性。在另一实施方案中，A 匣包括或由哺乳动物 HMGB 蛋白中相应区域的氨基酸序列组成。HMGB A 匣也可以是与这里描述的 A 匣氨基酸序列相同的重组-制备多肽。优选地，HMGB A 匣是一种脊椎动物 HMGB A 匣，例如，一种哺乳动物 HMGB A 匣，更优选地，哺乳动物 HMGB1 A 匣，例如，人类 HMGB1 A 匣，而最优选地，HMGB1 A 匣包括或由在图 2A (SEQ ID NO:2 中的 9-85 残基) 或 31B (SEQ ID NO:75) 中描述的 A 匣序列组成。

HMGB A 匣通常不多于 85 个氨基酸,并不少于 4 个氨基酸。在其它实施方案中, HMGB A 匣可以包括 10-85 个氨基酸, 20-85 个氨基酸, 30-85 个氨基酸, 40-85 个氨基酸。具备 A 匣序列的多肽例子包括, 但不局限于上述的 HMGB 多肽。在这些 HMGB 多肽中的 A 匣序列可以通过这里叙述的方法测定并分离, 例如, 利用这里叙述的与 A 匣的序列比对, 并利用这里叙述的方法测定其生物活性, 和/或其他本领域中已知的方法。

HMGB A 匣多肽序列的额外例子包括下列序列:

PDASVNFSEF SKKCSERWKT MASKEKGGKFE
 DMARKADKARYEREMKTYIPPKGET(人 HMGB1; SEQ
 IDNO:55);
 DSSVNFAEFSKKCSERWKTMSAKERSKFEDMAKSDDARYDR
 EMKNYVPPKGDK(人 HMGB2;SEQ ID NO:56);
 PEVPVNFAEFSKKCSERWKT VSGKEKSKFD EMARKADKVRY
 DREMKDYGPA KGGK (人 HMGB3;SEQ ID NO:57);
 PDASVNFSEF SKKCSERWKT MSAKEKGGKFE DMAKADKARY
 EREMKTYIPP KGET(人 HMG1L10;SEQ ID NO:58);
 SDASVNFSEF SNKCSERWK MSAKEEKGKFE DMAKADKTHY
 ERQMKTYP KGET (人 HMG1L1;SEQ ID NO:59);
 PDASVNFSEF SKKCSERWKA MSAKDKGGKFE
 DMARKVDKADY EREMKTYIPP KGET (HMG1L4; SEQ ID
 NO:60); PDASVKFSER LKKCSETWKT IFAKEKGGKFE
 DMARKADKAHY EREMKTYIPP KGEK (来源于 BAC 克隆
 RP11-395A23 的 HMG 序列; SEQ ID NO:61); PDASINFSEF
 SQKCPETWKT TIAKEKGGKFE DMARKADKAHY EREMKTYIPP
 KGET(HMG1L9; SEQ ID NO:62); PDASVNSSER
 SKKCSERWKTMPKQGGKFE DMAKADRAH (HMG1L8; SEQ ID
 NO:63); PDASVNFSEF SKKCLVRGKT MSAKEKGGQFE
 AMARADKARY EREMKTYIP PKGET (LOC12244;SEQ ID
 NO:64); LDASVSFSEF SNKCSER WKT MSVKEKGGKFE

DMAKADKACY EREMKIYPYL KGRQ (LOC139603;SEQ ID NO:65); 和 GKGDPPKPRG KMSSYAFFVQ TCREEHKKKH PDASVNFSEF SKKCSERWKT MSAKEKKGKFE DMAKADKARY EREMPTYIPP KGET(人 HMGB1 A 匣; SEQ ID NO:66).

本发明中的组合物和方法也以针对高迁移率簇 B (HMGB) B 匣的抗体为特征。在某一实施方案中, 抗体或其抗原-结合片段结合 HMGB B 匣, 但不特异结合 HMGB 的非-B 匣表位。在另一实施方案中, 抗体或其抗原-结合片段结合脊椎动物 HMGB B 匣但不特异结合 HMGB 的非-B 匣表位。另一实施方案中, 抗体或其抗原-结合片段结合哺乳动物 (例如, 人, 大鼠, 小鼠) HMGB B 匣但不特异结合 HMGB 的非-B 匣表位。而另一实施方案中, 抗体或其抗原-结合片段结合 HMGB1 多肽 (例如, 哺乳动物 HMGB1 多肽 (例如, 人 HMGB1, 大鼠 HMGB1, 小鼠 HMGB1)) B 匣但不特异结合 HMGB1 的非-B 匣表位。

这里使用的术语“HMGB B 匣”, 也指“B 匣”, 或“HMG B 匣”, 是一种与 HMGB1 多肽 (例如, 这里叙述的 HMGB B 匣) 相比, 具有至少 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 或 95% 序列一致性的多肽。在某一实施方案中, HMGB1 匣具有以下一种或多种生物学活性: 增加炎症和/或增加细胞中炎症细胞因子的释放 (见, 例如, PCT 公开号 WO 02/092004)。在某一实施方案中, HMGB B 匣多肽具有上述一种生物学活性。特别地, HMGB B 匣多肽具有以上一种或多种生物学活性。在某一实施方案中, HMGB B 匣与图 2B (SEQ ID NO:3) 或图 31C (SEQ ID NO:76) 中描述的 B 匣相比具有至少 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 或 95% 的序列一致性。在另一实施方案中, B 匣包括或包含哺乳动物 HMGB 蛋白中对应区域的氨基酸序列。HMGB B 匣也可以是一种重组方法制备的产物, 其氨基酸序列与这里叙述的 B 匣序列相同。较合适地, HMGB B 匣是一种脊椎

动物 HMGB B 匣，例如，哺乳动物 HMGB B 匣，例如，人类 HMGB1 B 匣，而更合适地，HMGB1 B 匣包括或包含图 2B (SEQ ID NO:3) 或图 31C (SEQ ID NO:76) 中描述的 B 匣序列。

HMGB B 匣通常不多于 85 个氨基酸并且不少于 4 个氨基酸。具有 B 匣序列的多肽例子包括，但不局限于上述的 HMGB 多肽。在这些多肽中的 B 匣序列可以通过这里叙述的方面测定和分离，例如，通过与这里叙述的 B 匣序列比对和测试其生物学活性。

其他的 HMGB B 匣多肽序列例子包括以下序列：
 FKDPNAPKRP PSAFFLFCSE YRPKIKGEHP GLSIGDVAKK
 LGEMWNNTAA DDKQPYEKKA AKLKEYEKD IAAY(人
 HMGB1;SEQ ID NO:67);KKDPNAPKRP PSAFFLFCSE
 HRPKIKSEHP GLSIGDTAKK LGEMWSEQSA KDKQPYEQKA
 AKLKEYEKD IAAY(人 HMGB2;SEQ ID
 NO:68);PKDPNAPKRL PSAFFLFCSE YRPKIKGEHP
 GLSIGDVAKK LGEMWNNTAA DDKQPYEKKA AKLKEYEKD
 IAAY(HMG1L10;SEQ ID NO:69);FKDPNAPKRP PSAFFLFCSE
 YHPKIKGEHP GLSIGDVAKK LGEMWNNTAA DDKQPGEKKA
 ADLKEYEKD IAAY(HMG1L1;SEQ ID NO:70);FKDSNAPKRP
 PSAFLFCSE YCPKIKGEHP GLPISDVAKK LVEMWNNTFA
 DDKQLCEKKA AKLKEYKKD TATY (HMG1L4;SEQ ID
 NO:71);FKDPNAPKRP PSAFFLFCSE YRPKIKGEHP
 GLSIGDVVKK LAGMWNNTAA ADKQFYEKKA
 AKLKEYKKD IAAY(来源于 BAC 克隆 RP11-359A23 的 HMG
 序列，SEQ ID NO:72);及 FKDPNAPKRP PSAFFLFCSE
 YRPKIKGEHP GLSIGDVAKK LGEMWNNTAA DDKQPYEKKA
 AKLKEYEKD IAAYRAKGKP DAAKKGVVKA EK(人 HMGB1
 匣，SEQ ID NO:73)。

这里叙述的 HMGB 多肽, HMGB A 匣, HMGB B 匣, 无论其是自然产生或非-自然产生的, 包括了与 HMGB 多肽, HMGB A 匣, 和/或 HMGB B 匣具有序列一致性的多肽。这里所使用的, 在其氨基酸序列具有至少 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 或更高的同源性或一致性时, 两种多肽 (或多肽区域) 具有充分的同源性或一致性。通过适合的比较目的进行序列排列 (例如, 第一个序列中可以插入间隔) 可以测定两种氨基酸序列 (或两种核酸序列) 的一致性百分比。通过比较相应位置的氨基酸或核酸, 以相一致位置的数量在该序列中所占比例作为两个序列间的一致性百分比 (例如, % 一致性 = #一致性位置/全部#位置 * 100)。在某些实施方案中, HMGB 多肽, HMGB A 匣多肽, 或 HMGB B 匣多肽的长度, 以比较目的进行阵列比对, 至少占参考序列的长度的 30%, 更适合地 40%, 更适合地 60%, 更适合地 70%, 80%, 90%, 或 100%, 参考序列的例子为这里叙述的对应于 HMGB 多肽的序列 (例如, SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:74), 一种 HMGB A 匣多肽 (例如, SEQ ID NO:29-85 位残基, SEQ ID NO:75) 或 HMGB B 匣多肽 (例如, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 76)。目前两种序列间的比较可以通过熟知的方法完成, 例如, 数学运算。Karlin 等论述了一种首选的, 非-特异性的数学运算的例子 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 (1993))。如 Schaffer 等所叙述, 这些运算被合并入 BLASTN 和 BLASTX 程序 (版本 2.2) (Nucleic Acids Res, 29:2994-3005 (2001))。当运用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时, 各自程序的默认参数 (例如, BLASTN; 在国家生物技术信息中心的互联网上提供) 可以被使用。在某一方面, 搜索的数据库是一种非-多于的 (NR) 数据库, 参数和序列比较可以设定为: 无过滤; 期望值为 10; 文字大小为 3; 矩阵为 BLOSUM62; 缺口的现实值为 11, 变动范围为 1。

另一种非-限制的运用数学运算进行序列比较的例子是 Myers 和 Miller 的运算法则, CABIOS(1989)。此运算法则被合并入 ALIGN 程序(版本 2.0), 其是 GCG (Acelrys, san Diego, California) 序列运算软件包的一部分。当运用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时, PAM120 重量残基表, 缺口长度罚分为 12, 及缺口罚分为 4 等设定值被应用。其他序列分析的运算法则在本领域中是熟知的, 包括 Torellis 和 Robotti 所述的 ADVANCE 和 ADAM(Comput. Appl. Biosci, 10:3-5, 1994);及 Pearson 和 Lipman 所述的 FASTA (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85: 2444- 2448, 1988)。

在另一实施方案中, 两个氨基酸序列间一致性百分比可以运用 GCG 软件包 (Acelrys, san Diego, California) 中的 GAP 程序完成, 可以使用 Blosson63 矩阵或 PAM250 矩阵, 缺口重量为 12, 10, 80, 6, 4, 长度量为 2, 3, 4。在另一方面, 两个核苷酸序列间一致性百分比可以运用 GCG 软件包 (Acelrys, san Diego, California) 中的 GAP 程序完成, 缺口量为 50, 长度量为 3。

抑制促炎症因子的释放和治疗方法

在某一实施方案中, 本发明是抑制哺乳动物细胞中促炎症因子释放的方法。在某一实施方案中, 该方法包括用本发明的抗体或抗原-结合片段对细胞进行治疗。这里叙述了合适的抗体或抗原-结合片段, 包括, 例如, 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb, 及具有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体, 及可以与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争结合脊椎动物高迁移率簇匣 (HMGB) 多肽的抗体, 及上述任何抗体的抗原-结合片段。

这里使用的，“细胞因子”是一种由哺乳动物细胞自然产生的调节免疫反应并介导细胞-细胞交互作用的可溶性的蛋白或多肽。无论在正常或病理情况下，细胞因子可以调节单个细胞和组织的功能活性。促炎症因子是一种可以引发一种或多种与下列炎症或炎症情况相关生理反应的细胞因子：血管舒张，充血，与水腫相关的血管渗透性的增加，粒细胞和单核巨噬细胞的聚集，纤维蛋白的沉淀。某些情况下，促炎症细胞因子也可以导致凋亡。例如，在慢性心脏失调中，已经显示了 TNF 刺激心肌凋亡(Pulkki, *Ann. med.* 29:339-343(1997); and Tsutsui, et al., *Immunol. Rev.* 174:192-209(2000))。非限制性的促炎症细胞因子例子是肿瘤坏死因子(TNF), 白细胞介素(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, 干扰素 γ , HMG-1, 血小板-激活因子(PAF), 和巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)。

在另一实施方案中，本发明是一种治疗病人情况的方法，包括给予病人本发明中的抗体或抗原-结合片段以治疗，在这里该情况以炎症因子的级联活性为特征。合适的抗体或抗原-结合片段是这里所叙述的，包括，例如，6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb, 具有 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 的表位特异性的抗体，及可以与 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb 竞争结合脊椎动物高迁移率簇匣(HMGB)多肽的抗体，及上述任何抗体的抗原-结合片段。

在某一实施方案中，治疗的方法包括给予病人本发明中有效量的抗体或抗原-结合片段。这里使用的，“有效量”或“治疗有效量”是阻止或减少炎症反应，并且/或者改善和/或减短与促炎症因子反应相关的症状时间的足够剂量。在治疗中起效的，阻止

或控制特定情况的本发明中组合物的有效量可以被测定，例如，对在此叙述的动物模型和/或在本领域中所熟知的动物模型给予组合物治疗。此外，体外试验可以被使用以帮助测定最佳剂量范围。

在考虑几种对于本领域中的技术所熟知的因素的基础上，本领域的技术人员可以测定合适的有效剂量（例如，通过临床试验）。这些因素包括，例如，情况或被治疗的情况，病人症状的严重程度，选择何种抗体或抗原-结合片段用于治疗，病人的年龄，病人的体质，病人的免疫情况，个别病人的反应，及其他本领域的技术人员所知的因素，以反应所治疗的药物组合物的精确度。

在具体制剂中的精确剂量也可以依赖于治疗的路径，情况的严重程度，并将由研究者的判断和每个病人的情况来决定。有效剂量可以通过体外试验或动物模型试验系统得到的剂量-效应曲线推算出。例如，如这里所示例，运用体外盲肠结扎穿孔(CLP)试验，进行了抗-HMGB1 单克隆抗体 6E6 HMGB1mAb 的剂量效应试验（剂量 1 μ g/小鼠，101 μ g/小鼠，或 1001 μ g/小鼠）。

对于抗体而言，以病人的体重计算，给予病人（例如，人类病人）治疗的剂量可以具体地为 0.1mg/kg 到 100mg/kg 之间。优选地，给予病人的治疗剂量在 0.1mg/kg 到 20 mg/kg 之间，更优选地，在 1mg/kg 到 10mg/kg 之间。本发明中的某些实施方案中，根据患者体重，剂量至少为 1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg。通常，由于对外源多肽具有免疫反应，人源或人工抗体比其他物种的抗体在人体内具有更长的半衰期。这样，人源抗体更低的剂量和更少的治疗频率是可能的。例如，可以每天，或每星期，每两星期，每月给予 0.01mg/kg 到 5 或 10mg/kg 之间的抗体的有效剂量的治疗。

测定抗体或抗原-结合片段是否抑制促炎症因子情况的方对本领域技术人员是熟知的。例如，细胞中促炎症因子释放的抑制可以通过本领域中熟知的技术方法被测定。例如，如这里所述和示例，细胞中 TNF 的释放可以通过标准鼠纤维细胞 L929(ATCC, 美国典型培养保存中心, Rockville, Maryland) (Bianchi et al., Journal of Experimental Medicine 183:927-936(1996)), 以 30pg/ml 的最小检出浓度进行细胞毒素生物测定。L929 细胞毒素生物测定按以下方案进行。RAW264.7 细胞在含有 10% 胎牛血清 (Gemini, Catabases, California), 青霉素和链霉素 (Life Technologies) 的 RPMI1640 培养基 (Life Technologies, Grand Island, New York) 中培养。加入多粘菌素 (Sigma, St. Louis, Missouri) 使之终浓度为 100 单位/ml, 以抑制任何污染的 LPS 的活性。细胞与这里所述的抗体共同在 Opti-MEM I 培养基中培养 8 小时, 上清 (含有从细胞中释放的 TNF) 被收集。从细胞中释放的 TNF 用标准鼠纤维细胞 L929(ATCC) 以最小检出值 30pg/ml 进行细胞毒素生物测定 (Bianchi et al., supra)。重组鼠 TNF 可以从 R&D Systems Inc. (Minneapolis, Minnesota) 得到并在此试验中作为对照使用。测定细胞释放的其他因子的方法在本领域中是熟知的。

以这里所述的方法进行治疗的适合的炎症情况可以是具有炎症因子级联活性情况中的一种。在某一实施方案中, 炎症因子级联引起系统反应, 如内毒素休克。在另一实施方案中, 炎症情况是由局部的炎症因子级联介导的, 如在类风湿关节炎中。可以用本发明中的抗体和抗原-结合片段进行有效治疗的炎症情况的非限制性例子包括, 例如, 肠胃和相关组织的疾病 (例如肠梗阻, 阑尾炎, 消化道, 胃和十二指肠溃疡, 腹膜炎, 胰腺炎, 溃疡性结肠炎, 假膜性, 急性和缺血性结肠炎, 憩室炎, 会厌炎, 失弛缓症, 胆管炎, 胆囊炎, 乳糜泄, 肝炎, 节段性回肠炎, 肠炎,

和 Whipple 氏病);系统或局部炎症疾病和情况(如哮喘,过敏,过敏性休克,免疫组合物疾病,组织缺血,再灌注损伤,器官坏死,花粉热,脓血症,败血病,内毒素休克,恶性溃疡,高烧,嗜酸性肉芽肿,肉芽肿病,肉状瘤病);泌尿生殖器系统和相关组织的疾病(如感染性流产,附睾炎,阴道炎,前列腺炎,尿道);呼吸系统和相关组织的疾病(如支气管炎,肺气肿,鼻炎,囊肿性纤维化,肺炎,成人呼吸窘迫综合征, pneumoultramicroscopic silico volcano coniosis, alveolitis, 细支气管炎,咽炎,胸膜炎,窦炎);由不同病毒感染导致的疾病(如流感,呼吸合胞病毒, HIV, 乙肝病毒, 丙肝病毒, 疱疹), 细菌(如弥漫性菌血症, 登革热), 真菌(如念珠菌病)和原生动物和多细胞寄生物(如疟原虫, 丝虫, 阿米巴虫, 包虫囊肿);皮肤的疾病和情况(如烧伤, 皮炎, 皮肤炎, 晒斑, 风疹, 水疱);心血管系统和相关组织的疾病(如(器官)狭窄, 再狭窄, 血管炎, 血管炎, 心内膜炎, 动脉炎, 动脉硬化症, 血栓(性)静脉炎, 心包炎, 充血性心力衰竭, 心肌炎, 心肌缺血, 结节性动脉周围炎, 风湿热);阿滋海默症, 脑膜炎, 脑炎, 多发性硬化症, 脑梗塞, 脑栓, guillame-barre 综合症, 神经炎, 神经痛, 脊髓损伤, 麻痹, 眼色素层炎);骨, 关节, 肌肉和连接组织的疾病(如多种 arthritides 和关节痛, 骨髓炎, 筋膜炎, 帕哲氏病, 痛风, 牙周疾病, 风湿性关节炎, 关节膜炎);其他自体免疫的和发炎疾病(如重症肌无力, thyroiditis, 全身红斑性狼疮, 肺出血-肾炎综合征, 白塞氏综合征, 同种异体移植物注射, 移植物抗宿主病, I 型糖尿病, 僵直性脊椎炎, Berger's 疾病和 Retier's 综合症);及各种癌, 肿瘤和类风湿性疾病(如 Hodgkins 疾病);和宿主对于任何原发性病的炎症或免疫应答。

在某一实施方案中, 该情况是从一种组群中挑选出的, 该组群包括脓血症, 移植排斥, 关节炎(例如, 风湿性关节炎), 哮

喘，动脉硬化症，再狭窄，狼疮，成人呼吸窘迫综合征，银屑病，胰腺炎，腹膜炎，烧伤，心肌缺血，器官缺血，缺血-再灌注，白塞氏病，移植物抗宿主病，Crohn's 疾病，溃疡性结肠炎，肠梗阻，多发性硬化，恶疾。在另一方面，该情况是从含有脓血症，关节炎（例如，风湿性关节炎），哮喘，狼疮，银屑病，炎症性肠疾病和 Crohn's 疾病的组群中挑选出的。

优选地，足够剂量的抗体和抗原-结合片段被用于病人所需要的治疗，以用于抑制细胞中促炎症因子的释放和/或炎症情况的治疗。在某一实施方案中，运用这里叙述的方法或其他本领域中已知的方法，至少 10%，20%，25%，50%，75%，80%，90%，95% 的促炎症因子的释放被抑制。

这里使用的术语“治疗”，“治疗的”和“治疗”，指改善疾病或情况相关的症状，例如，炎症疾病或炎症情况，包括阻止或减缓疾病症状的发作，和/或减少疾病或情况的症状的严重程度或发生次数。这里定义的术语“主体”和“个体”包括动物，如哺乳动物，包括但不局限于，灵长类，牛，绵羊，山羊，马，狗，猫，兔，豚鼠，鼠，鼠或其他牛，绵羊，马，犬，猫，啮齿类，或鼠科动物。在某一实施方案中，该动物是人类。

在某一实施方案中，赋形剂可以包含在本发明中的抗体和抗原-结合片段中。赋形剂的选择可以基于治疗应用中运用抗体或抗原-结合片段治疗的期望通道的基础。组合物治疗的通道依赖于所治疗的情况。例如，静脉内注射可以用于系统性紊乱的治疗，如内毒素休克，而口服治疗适合于肠胃紊乱，如胃溃疡。如上所述，用于治疗抗体或抗原-结合片段的剂量可以由本领域的技术人员决定，而不用进行联合标准剂量-效应研究的试验。根据情况，抗体或抗原-结合片段可以通过口服，注射，鼻内，鞘内，直肠内，舌，舌下，口腔，口腔内，透皮的方式给予病人治疗。

相应地，以口服，舌，舌下，口腔和口腔内方式设计的抗体和抗原-结合片段可以用本领域中已知的方法制备，例如，与惰性稀释剂和/或口服载体联合，而不用进行其他试验。抗体和抗原-结合片段可以装入凝胶胶囊或制备成药片形式。基于口服治疗的目的，本发明中的抗体和抗原-结合片段可以与赋形剂联合并制备成药片，片剂，胶囊，西也剂，悬液，糖浆，薄片，橡皮糖，及其他类似物。

药片，药丸，胶囊，片剂，及其他类似物，也可以含有结合剂，接受剂，分解剂，润滑剂，甜味剂，调味剂。粘结剂的例子包括微晶纤维素，黄著胶，凝胶。赋形剂的例子包括淀粉和乳糖。分散剂的例子包括褐藻酸，玉米淀粉，及其类似物。润滑剂的例子包括硬脂酸镁和硬脂酸钾。滑动剂的例子是二氧化硅胶。甜味剂的例子包括蔗糖，糖精，及其类似物。调味剂的例子包括薄荷油，甲基水杨酸盐，橙味调味料，及其类似物。制备这些不同的组合物的材料应当是药物纯和无-内毒素的。

本发明中的抗体和抗原-结合片段可以通过注射途径给药，例如，静脉内，肌肉内，胸腔或皮下注射。注射给药可通过将本发明中的抗体和抗原-结合片段混合入溶液或悬液的方法完成。这些溶液或悬液包括无菌稀释剂，如注射用水，盐溶液，抑菌盐溶液(包含 0.9% mg/ml 苯甲醇)，磷酸缓冲盐(这里指 PBS)，Hank's 液，Ringer's 乳酸盐，不挥发油，聚乙二醇，甘油，丙二醇，和其他合成溶剂。注射剂也包括抗菌药剂(例如，苯甲醇，甲基对羟基苯甲酸酯)，抗氧化剂(例如，抗坏血酸维生素 C，亚硫酸氢钠)，和螯合剂(例如，EDTA)。也可以加入缓冲液，如醋酸盐，柠檬酸盐或磷酸盐及调节渗透压的试剂如氯化钠和葡萄糖。注射剂可以装在安瓿瓶，注射器或玻璃或塑料制备的多剂量瓶。

直肠注射包括将抗体和抗原-结合片段注射入直肠或大肠内。这可以通过栓剂或灌肠剂来完成。栓剂的形式可通过该领域已知的方法制备。如，可通过加热甘油至 120℃ 左右，将抗体或抗原-结合片段溶解在甘油中并与加热的甘油混合，然后加入净化的水，最后将热组合物倒入栓剂模具中，来制备栓剂形式。

皮下给药包括通过皮肤抗体或抗原-结合片段的经皮肤的吸收。皮下形式包括贴剂，油膏，乳油，凝胶，药膏等类似物。

本发明的抗体和抗原-结合片段能被通过鼻腔给药进入主体。通过鼻腔给药或鼻腔给药的方法，包括使抗体或抗原-结合片段进入主体鼻腔通路黏液膜或鼻腔。用于鼻腔给药的抗体或抗原-结合片段的药物学组合物，包括治疗性有效剂量的抗体或抗原-结合片段。用于鼻腔给药的众所周知的方法包括，如，鼻腔喷雾，滴鼻，悬浮液，凝胶，药膏，乳油，或粉剂。抗体或抗原-结合片段的给药也可以用鼻腔棉球或鼻腔海绵替代。

正如上面描述的，不同的给药方式包括，如，口服，食疗，局部的，皮下的，直肠的，非肠道的（如，静脉内的，动脉内的，肌肉的，皮下的，皮内的注射），和吸入（如，支气管内的，鼻内的，口服，鼻内滴入）。正如显示的，给药可以是局部或全身的。给药首选的模式可以根据被用于给药的抗体或抗原-结合片段和被治疗特殊条件（如疾病）而变化，但是口头或非肠道的给药一般是首选的模式。

如果期望，这里描述的抗体或抗原-结合片段可以带着一种或多种额外成分被治疗（如用于治疗发炎条件的成分）。抗体或抗原-结合片段的其中一部分和额外成分能在单独的组合物中出现或作为分离的组合物进行治疗。如果作为分离成分进行治疗，抗

体或抗原-结合片段的其中部分和额外成分能被同时或分别治疗。

在某一实施方案中，本发明的抗体或抗原-结合片段与抗-炎症药剂一起被给予治疗。这些药剂对于本领域中的技术人员是熟知的。在某一方面，该试剂是早期脓血症介导因子的拮抗剂。这里使用的，早期脓血症介导因子是由炎症因子级联（例如，暴露于 LPS）引发的一种细胞快速分泌（例如，30-60 分钟内）的促炎症因子。这些因子的非限制性例子是 IL-1 α , IL-1 β , L-6, PAF, MIF。这些因子的受体（例如，肿瘤坏死因子受体类型 1）和产生这些因子所需要的酶（例如，白介-1 β 转化酶）也可以是早期脓血症介导因子的例子。已知的或今后发现的任何早期脓血症介导因子的拮抗剂，通过进一步抑制炎症因子级联作用而显示其在这些情况下的可用性。

早期脓血症介导因子拮抗剂的非限制性例子是结合早期脓血症介导因子 mRNA 并抑制其表达的反义链组合物，（见，例如 Ojwang et al., *Biochemistry* 36:6033-6045(1997); Pampfer et al., *Biol. Reprod.* 52:1316-1326(1995); 美国专利号 6,228,642; Yahata et al., *antisense Nucleic acid drug Dev.* 6:55-61(1996); and Taylor et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8:199-205(1998)），特异切断早期脓血症介导因子 mRNA 的核酸酶（见，Leavitt et al. *antisense Nucleic acid Drug Dev.* 10:409-414(2000); Kisich et al., *J. Immunol.* 163(4):2008-2016(1999)；and Hendrix et al., *Biochem. J.* 314(Pt.2):655-661 (1996)），和结合并抑制早期脓血症介导因子的抗体（见，例如，Kam and Targan, *Expert Opin. Pharmacother.* 1:615-622(2000); agahira et al., *J. Immunol. methods* 222:83-92 (1999); Lavine et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18:52-58 (1998); and Holmes et al., *Hybridoma* 19:363-367(2000)）。已知的或今后发现的早期脓血症介导因子拮抗剂，预计属于本发明范围内。本领域

域技术人员可以决定抑制任何特定炎症因子级联作用的早期脓血症介导因子的使用量，而不需要进行例常剂量-效应研究试验。

其他可以与本发明中的抗体和抗原-结合片段共同治疗的试剂包括，例如 VitaxinTM 和其他针对 $\alpha v \beta 3$ 粘合素的抗体（见，例如，美国专利号 5,753,230，PCT 公开号 WO 00/78815 和 WO 02/070007，其全部教导都通过在此引述而合并于本文）和抗-IL-9 抗体（见，例如，PCT 公开号 WO 97/08321；其全部教导都通过在此引述而合并于本文）。

在某一实施方案中，本发明中的抗体和抗原-结合片段可与 TNF 生物学活性抑制剂（例如，TNF- α 生物学活性抑制剂）共同治疗。这些 TNF 生物学活性抑制剂包括，例如，多肽，蛋白，合成分子，如合成有机分子，自然-产生分子，如自然产生的有机分子，核酸分子，及其成分。抑制 TNF 生物学活性的试剂的首选例子包括 infliximab（Remicade；Centocor, Inc., Malvern, Pennsylvania），etanercept（Immunex；Seattle, Washington），adalimumab（D2E7；Abot Laboratories, Abbot Park Illinois），CDP870（Pharmacia Corporation；Bridgewater, New Jersey）CDP571（Celltech Group plc, United Kingdom），Lenercept（Roche, Switzerland），和镇静剂。

在某些实施方案中，本发明特指一种组合物，其包括这里所叙述的抗体或抗原-结合片段与药物-可接受的赋形剂。如上所述，该组合物中与抗体或抗原-结合片段联合的赋形剂的选择是基于此成分的期望的治疗通道。合适的药物-可接受赋形剂包括上述的和其他本领域中熟知的那些赋形剂。

在某一实施方案中，本发明特指 HMGB 的适体（aptamers）（例如，HMGB1 的适体）。在本领域中所知，适体是核酸（例如，

RNA, DNA)的大分子组合物,其与特定分子目标(例如, HMGB 蛋白, HMGB 匣(例如 HMGB A 匣, HMGB B 匣),这里所述的 HMGB 多肽和/或 HMGB 表位)紧密结合。一种特定的适体可以是一条线性核酸序列,特定地为 15-60 核苷酸长度。适体中核苷间的链通过分子内的相互作用使该分子折叠形成三维结构。依据在所有可能的核酸序列中广泛存在的分子形态的特定差别,适体可以从广泛的分子目标队列中获得,包括蛋白和小分子。除了高度特异性,适体对其目标物具有高亲和性(例如,与从皮摩尔到微摩尔蛋白的亲和性)。适体具有化学稳定性,并在煮沸或冻结时也不失去其活性。因其为合成分子,可以进行多种形式的修饰,从而可以优化其功能,以用于特定应用。例如,适体可以被修饰以极大地减少其在血液中对于酶解的敏感性,以利于体内应用。此外,适体可以被修饰以改变其生物分布性或血浆残留时间。

结合 HMGB 或其片段(例如 HMGB1 或其片段)的适体的选择方法可以从本领域中已知的方法获得。例如,适体可利用 SELEX(配基系统进展指数增长)方法选择(Tuerk, C., and Gold, L., Science249: 505-510 (1990))。在 SELEX 方法中,大量核酸分子文库(例如, 10^{15} 种不同的分子)被制备,并且/或者用目标分子进行筛选(例如, HMGB 蛋白, HMGB 匣(例如 HMGB A 匣, HMGB B 匣),这里所述的 HMGB 多肽和/或 HMGB 表位)。目标分子可以与核酸序列文库共同孵育一段时间。本领域中的多种方法,组合物中的适体目标分子可以与未结合并被丢弃的分子分离从而物理地分离出来。与目标分子具有高度亲和性的适体可以从目标分子上分离纯化并通过酶放大作用制备新的分子文库,其对于可结合目标分子的适体是足够充足的。该充足的文库可以被用于发起新的选择,分离和扩大循环。约 5-15 次重复的选择,分离和扩大循环后,文库减少为紧密结合目标分子的少数

适体。组合物中单独的分子可以被分离出来，其核酸序列可被测定，其结合亲和力和特异性的特征可被测定和比较。分离的适体可以进一步被精制以除去任何对结合目标和/或适体结构无关的核酸，由此制备适体核心结合区域的截短形式。见 Jayasena, S.D. Clin. Chem. 45:1628-1650(1999)关于适体技术的综述；其全部教导都通过在此引述而合并于本文)。

在特定实施方案中，本发明的适体具有与这里所述的抗体的结合特异性和/或功能活性。这样，例如，在某些实施方案中，本发明是关于适体的，如这里所述，其具有与本发明中的抗体相同或相似的结合特异性（例如，与脊椎动物 HMGB 多肽，脊椎动物 HMGB 多肽片段（例如，HMGB A 匣，HMGB B 匣），脊椎动物 HMGB 多肽表位区域（例如，与一种或多种本发明中的抗体结合的 HMGB1 表位区域）的结合特异性）。在特定实施方案中，本发明中的适体可以结合 HMGB 多肽或其片段并抑制一种或多种 HMGB 多肽的功能。如本文所述，HMGB 多肽的功能包括，例如，增强炎症反应，增加细胞中促炎症因子的释放，结合 RAGE，结合 TLR2，化学亲和力。在特定实施方案中，适体具有结合 HMGB1（例如，人 HMGB1（例如，在 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:74 中描述）和其片段（例如，A 匣（例如，SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:75 中的 9-85 位残基），B 匣（例如，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:76），这里所述的 HMGB1 抗体结合表位）及抑制一种或多种 HMGB 多肽的功能（例如，抑制经 HMGB 刺激的细胞中的促炎症抑制的释放）。

诊断和/或预测的方法

在另一实施方案中，本发明进一步提供了测定样本中高迁移率簇蛋白匣（HMGB）多肽的诊断和/或预测方法。在本方法的某一实施方案中，在适合于抗体或抗原-结合片段与样本中存在的

HMGB 多肽相互结合的条件下，样本与本发明中的抗体或抗原-结合片段相结合。此方法进一步包括测定抗体-HMGB 组合物或抗原-结合片段-HMGB 组合物，抗体-HMGB 组合物或抗原-结合片段-HMGB 组合物的测定结果显示样本中存在 HMGB 多肽。此方法中所使用的合适的抗体或抗原-结合片段包括这里所述的，例如，6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 任何上述抗原-结合片段。

在另一实施方案中，抗体或抗原-结合片段包括了可检测的标签。合适的用于测定 HMGB 多肽（例如，哺乳动物 HMGB 多肽）和抗体或抗原-结合片段形成的组合物的标签包括，例如，放射性同位元素，表位标签（标记），亲和标签（例如，生物素，抗生物素蛋白），自旋标签，酶，荧光簇或化学发光簇。

如本文所述，这里所述的抗体或抗原-结合片段可以用于测定或测量 HMGB 多肽的表达。例如，本发明中的抗体可以用于测定或测量生物样本（例如，细胞，组织或来源于个体的体液如血液，血清，白血球（例如，活性 T 淋巴细胞），支气管肺泡灌洗液，唾液，肠液，滑液，活体组织样本）中的 HMGB 多肽。在某一实施方案中，该样本是血液或血清。例如，可以从某个体中获得样本（例如，组织和/或体液）并用合适的方法测试 HMGB 多肽的存在或数量情况。合适的方法包括免疫学或免疫化学方法如流式细胞计数（例如，FACS 分析方法）和免疫吸收方法，包括酶联免疫吸收方法(ELISA)，放射免疫试验（RIA），化学发光试验，免疫印迹（例如，western blot），免疫细胞化学和免疫组织学。通常，适合于形成 HMGB 多肽和抗体或抗原-结合片段组合物的条件下，本发明中的样本和抗体或抗原-结合片段相互结合，（通过直接或非直接的方法）这些组合物的构成被评估。在

某一实施方案中，诊断和/或预测是运用 ELISA 和/或 western blot 方法进行的。

如本领域中所熟知，从个体获得的样本（例如，组织样本）中的 HMGB 多肽（例如，HMGB1）水平的增高可以作为诊断和/或预测指标，用于预测和监控脓血症相似病例的严重性，而该病人显示了与以炎症因子级联活性为特征的情况相关的症状（见美国专利号 6,303,321，其全部教导都在此通过引述而合并于本文）。这样，在某一实施方案中，本发明中的抗体和抗原-结合片段可以用于诊断和预测方法，预测与 HMGB 表达相关的炎症情况临床相似病例（例如，这里所述的情况）并/或监控其严重性。在某些实施方案中，诊断和/或预测方法包括测试样本的浓度，优选地为血清样本中 HMGB 的浓度，并将其与类似样本中 HMGB 正常水平范围的表达标准相比较，在这里高水平的 HMGB 表明较差的预后性或毒素作用的可能性。诊断方法也可以应用于其他组织或体液，如脑脊髓的液体或尿。

在另一实施方案中，本发明是一种用于测定样本中高迁移率簇匣(HMGB)多肽或其配基的存在情况的检测试剂盒。这些检测试剂盒包括，例如，抗体或抗原-结合片段及一种或多种适合的辅助试剂，用于检测抗体或抗原-结合片段和 HMGB 多肽或其配基形成的组合物的存在情况。本发明中的抗体或抗原-结合片段可以单独或与特异结合其他表位的附加的抗体联合，以冻干形式提供。标记或非标记的抗体或抗原-结合片段，可以与佐剂成分（例如，缓冲液，如 Tris(Tris(羟甲基)氨基甲烷)，磷酸盐和碳酸盐，稳定剂，赋形剂，生物杀灭剂和/或惰性蛋白，例如，牛血清白蛋白）联合包括在试剂盒中。例如，抗体或抗原-结合片段可以与佐剂成分混合的冻干形式提供，或者佐剂成分可以分开提供，由使用者进行混合。通常这些佐剂材料以小于占活性抗体重

量的 5% 的量存在，或其总量小于抗体重量的 0.001%。当需要使用可以结合抗-HMGB 抗体或抗原-结合片段的二抗或其抗原-结合片段时，这些二抗或其抗原-结合片段可由试剂盒提供，例如，独立包装在瓶内或容器内。这些二抗或其抗原-结合片段，如果存在，是被特异地标记的，并可以由与这里所述的抗体配制方法相似的方式进行配制。抗体，试剂盒中的抗原-结合片段和/或附属试剂可以用合适的容器（如瓶，盒子，封袋，管子）单独或合并包装。当试剂盒包括一系列单独的包装成分，这些单独包装可以包含在一个大的单独的包装形式中（例如，瓶，盒子，封袋，管子）。

筛选的方法

在另一实施方案中，该发明是一种测定或鉴定结合 HMGB 多肽（例如，哺乳动物 HMGB 多肽（例如，HMGB1 多肽））的试剂的方法。在某一实施方案中，测定或鉴定结合 HMGB 多肽的方法是一种竞争结合试验，其中被测试试剂对本发明的抗体或抗原-结合片段的抑制能力被检测。例如，抗体或抗原-结合片段可以被这里所述的合适的标记物标记，在此试验中饱和 HMGB 多肽所需的标记抗体或抗原-结合片段的量可以被测定。例如，在适合于结合和组合物形成的条件下，饱和 HMGB 多肽所需的标记抗体或抗原-结合片段的量及被测试试剂的不同的量可以与 HMGB 多肽相联系。在这种测试类型中，标记的抗体或抗原-结合片段和 HMGB 多肽形成的组合物量的减少表明被测试试剂可以与 HMGB 多肽结合。在另一实施方案中，HMGB 多肽可以被标记。适合的标记抗体，抗原-结合片段和/或 HMGB 多肽的标记物包括以上所述的示例。

各种不同的试剂，如蛋白质（如抗体），多肽，虚拟缩氨酸，小组织分子，核酸和其类似物，可以测定其与 HMGB 多肽（例如，哺乳动物 HMGB 多肽（例如，HMGB1 多肽））的结合情况。

根据本发明的方法，试剂可以单独地进行筛选或一种或多种试剂可以同时进行测试。当测试某种组合物时，通过所述的方法进行选择性的组合物可以利用合适的方法（例如，测序，色谱）被分离（适当的）和鉴定。被测试样本中的一种或多种混合成分（例如，配基，抑制子，启动子）也可以由这些方法进行检测。

如此所述，可以利用这里所述的或其他合适的方法，通过对分子文库或收集库，如，国家癌症中心化学库，进行筛选，从而对结合 HMGB 多肽并有益于治疗方法的试剂进行鉴定。由组合化学或其他方法制备的组合物（例如，组织成分，重组或合成多肽，“peptoids”，核酸）的文库，如组合文库，可以被鉴定（见，例如，Zuckerman, R.N et al., J. Med Chem., 37:2678-2685(1994)及其中引用的参考文献；也可见，Ohlmeyer, M.H.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926 (1993) and DeWitt, H.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909-6913 (1993), relating to tagged compounds; Rutter W.J et al . 美国专利号 5,010,175; Huebner, V.D.et al., 美国专利号 5,182,366; 和 Geysen, H.M., 美国专利号 4,833,092)。当从文库中挑选的组合物带有唯一的标记时，用色谱方法鉴定单独的成分是可行的。

本发明将由以下的例子进行阐明，这些例子并非是限制性的。在此之前还未被清楚地合并于本文的被引用的所有出版物的相关技术，都将在此通过引述而合并于本文。

例 1: 材料和方法

HMGB1 的单克隆抗体的制备

每间隔 2 星期用 20 μ g 与 Freund's 佐剂混合的重组 CBP-鼠 HMGB1（小鼠 HMGB11-215 位氨基酸联接了 CBP；CBP-鼠

HMGB1 的核酸序列被描述为 SEQ ID NO:4 而氨基酸序列被描述为 SEQ ID NO:5(见图 3A 和 3B)) 腹膜内免疫 BALB/c 小鼠, 为期 6 周。8 周后用溶解在 PBS 中的 $10\ \mu\text{g}$ CBP-鼠 HMGB1 腹膜内免疫 BALB/c 小鼠作为最后一次加强免疫。最后一次加强免疫后 4 天, 小鼠的脾细胞被分离并用于融合。根据标准杂交技术进行融合。脾脏通过细胞滤网的轻缓挤压, 得到单细胞悬液。充分洗涤后, 脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞混合。缓慢加入聚乙二醇 (PEG), 孵育 5 分钟。细胞经过洗涤并重新悬浮在含有 20% FCS 和 HAT 的 DMEM 中, 转移至 96 孔板并在 37°C , 10% CO_2 条件下培养 10-14 天。

在另一试验中, 人 HMGB1 B 匣多肽 (SEQ ID NO:3;图 2B) 作为免疫原被使用。每间隔 3 周用 $10\ \mu\text{g}$ /混合了 Freund's 佐剂的注射用 HMGB1 B 匣对 5 只雌性 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫。每次加强免疫后 1 周进行采血。第三次加强免疫后 3 周, 给予最后一次小鼠 HMGB1 B 匣的腹膜内注射免疫 ($10\ \mu\text{g}$ /小鼠)。最后加强免疫的 72 小时后, 如上所述进行杂交瘤融合试验。杂交瘤在含有 20% FBS, HAT, CondiMed 和 1% pen/strep 的 DMEM 中培养。通过光学读数并鉴定那些 5 被高于背景值的克隆, 从而对阳性克隆进行鉴定。

CBP-大鼠 HMGB1 和人 HMGB1 B 匣的抗体可通过有限稀释和 ELISA 筛选。ELISA 板用 $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的重组 HMGB1 包被过夜, 并用含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸缓冲盐 (PBS) 封闭。ELISA 板中加入杂交瘤上清, 室温孵育 30 分钟。板经洗涤后加入连接了辣根过氧化酶的抗-鼠 Ig。室温孵育 30 分钟后, 板经洗涤并显影。从阳性细胞中得到的细胞被转入到 24 孔板并通过有限稀释进行克隆。

HMGB1 刺激 TNF 的释放

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7(可从美国典型培养中心(ATCC)获得, Manassas, VA)与不同浓度的 HMGB1 在无血清的 Opti-MEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)中于 37°C 共同培养 4 小时。收集上清并用 ELISA 试剂盒(R&D 系统, Minneapolis, NM)测试 TNF 水平。此方法也可以运用于肝素处理的全血。在这种情况下, HMGB1 用 Opti-MEM 稀释, 加入 100 全血使终浓度至 200 μ l, 移至 U-形底 96 孔板。将板置于 37°C 4 小时并收集血浆用于 ELISA 试验。

为了筛选抑制 HMGB1 的 mAbs, 纯化的 mAbs 用 Opti-MEM 稀释并与鼠 HMGB1 在室温下混合。5 分钟后, 该组合物被转移至含有 RAW 264.7 细胞的组织培养孔中。将板置于 37°C 4 小时并收集血浆用于 ELISA 试验。

HMGB1 单克隆抗体的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, Western Blot 分析和筛选

为了测定 HMGB1 mAbs 和 HMGB1, 样本与 4X NuPAGE LDS 样本缓冲液混合, 10X NuPAGE 样本浓缩试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)。样本在沸水中加热 5 分钟, 立即置于冰上并上样至 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。利用标准技术可进行 Western Blot 分析。

对于测定 HMGB1 单克隆抗体的选择性的试验(例如, 对于 HMGB1 和/或 HMGB2 的选择性), Western Blot 分析可用于以下样本, 如来源于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的含有非-重组(例如, 自然的)HMGB1 的样本(图 11; 标记为 CHO HMGB1; SEQ

ID NO:36) 或来源于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的含有非-重组 (例如, 自然的) HMGB2 的样本及一些可测定的重组人 HMGB1-His₆ (图 11; 标记为 CHO HMGB2,rec-HMGB1- His₆)。图 18A 和 18B 显示了带有 5' HIS 标签的人重组 HMGB1 多肽的核酸和编码的氨基酸序列 (rec-HMGB1- His₆; SEQ ID Nos: 39 和 40)。

对于含有 CHO HMGB1 的样本, 含有 ~2.5-5ng/ μ l 非-重组 (如, 自然的) HMGB1 的来源于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的样本。20 μ l 的样本 (例如, ~50-100ng HMGB1) 被上样至凝胶并进行 SDS-PAGE。为了分离 CHO HMGB1 多肽, CHO 细胞经裂解后离心分离上清。运用离子交换色谱和肝磷脂-亲和色谱, 具有 HMGB1 免疫反应但无可检测到 HMGB2 免疫反应的峰区域被收集并作为 CHO HMGB1 来源。

对于来源于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的含有非-重组 (例如, 自然的) HMGB2 和一些可检测的重组 HMGB1- His₆ 的样本 (图 11; 标记为 CHO HMGB2, HMGB1- His₆), 转染重组 HMGB1- His₆-表达质粒的 CHO 细胞可以被利用。为了分离 CHO HMGB2 多肽, CHO 细胞被裂解并经离心分离上清。运用离子交换色谱和肝磷脂-亲和色谱, 具有 HMGB2 免疫反应, 但无可检测到自然 HMGB1 免疫反应的峰区域被收集并作为 CHO HMGB2 来源。在一些情况下, 收集的 CHO HMGB2 部分含有可测出量的重组 HMGB-1- His₆ 多肽, 然而在 SDS-PAGE 中, 基于其较慢的迁移率 (并显示了更高分子量) 重组 HMGB-1- His₆ 多肽很容易与 HMGB2 相区分。如图 11, 运用凝胶系统进行的 Western blots 示, 非-重组 CHO HMGB2 的分子量显示为 ~27000, 非-重组 CHO HMGB1 的分子量显示为 ~29000, 重组 HMGB-1-His₆ 的分子量显示为 31000。对于 CHO HMGB2, rec-HMGB1- His₆ 样本, 20 μ

1 的样本（例如，~ 10-20ng HMGB2）被上样至凝胶并进行 SDS-PAGE。

对于图 11 中描述的 Western blots，可以使用抗-His 标签抗体（Santa Cruz, CA; 2 μ g/ml），抗-HMGB2 抗体（PharMingen, San Diego, CA; 2 μ g/ml），抗-HMGB1/2mAb（MBL International, Watertown, MA; 2 μ g/ml）或特异抗-HMGB1 单克隆抗体（例如，2E11 HMGB1 mAb (CT3-2E11), 1G3 HMGB1 mAb (CT3-1G3), 6H9 HMGB1 mAb (CT3-6H9), 2G7 HMGB1 mAb(CT3-2G7), 2G5 HMGB1 mAb(CT3-2G5)和 6E6 HMGB1 mAb(CT3-6E6); 每种 2 μ g/ml)。

单克隆抗体的测序

根据试剂盒的程序，运用 Rneasy MiniKit（Qiagen, Valencia, CA）从杂交瘤细胞中提取全部 RNA。根据试剂盒程序，运用 ProtoScript first Strand cDNA Synthesis Kit（New England Biolabs, Catalog#E6500S）合成第一条 cDNA 链。在 PCR 反应体系中加入 5 μ g cDNA（如鼠 Ig-引物设计程序中描述，Catalog#69831-3, Novagen, Madison, WI），该体系还含有 25pmol 适当的 5' 引物（如 Novagen Ig-引物设计程序中描述，重链引物 MuIgGV_H5'-A, MuIgGV_H5'-B, MuIgGV_H5'-C, MuIgGV_H5'-D, MuIgGV_H5'-E, MuIgGV_L5'-A, MuIgGV_L5'-B, MuIgGV_L5'-C, MuIgGV_L5'-D, MuIgGV_L5'-E）和 3' 引物（如 Novagen Ig-引物设计程序中描述，重链引物 MuIgGV_H3'-2 和轻链引物 MuIgGV_L3'-2）。PCR 反应条件为 94°C 1 分钟，50°C 1 分钟，72°C 2 分钟共 35 个循环，随后 72°C 延长 6 分钟。PCR 产物克隆入 TOPO（Invitrogen, San Diego, CA）。用 Genassance Pharmaceuticals（New Haven, CT）进行 DNA 序列分析。

HMGB1 多肽结合试验

结合抗-结合链霉亲和素-包被板 (Pierce, rockford, IL, 目录号 #15501) 的生物素化多肽和结合聚-D-赖氨酸包被 ELISA 板的非-生物素化多肽被用于抗-多肽 ELISAs。对应于人 HMGB1 特定的 18 个氨基酸区域的生物素化多肽, 及对应于人 HMGB1 特定的 9-85 个氨基酸区域的更长的多肽, 被制备, 并用 ELISA 分析其结合特异抗-HMGB1 单克隆抗体的情况。这些多肽, 及其相应序列, 在图 13A 中已有描述。通过加入 60-100 μg /孔的 0.1mg/ml 聚-D-赖氨酸水溶液制备聚-D-赖氨酸包被 ELISA 板。板置于室温 5 分钟并水漂洗除去溶液。

简要地, 运用相应多肽的分子量, 可用无-热源-水制备 1mM 多肽溶液并稀释入 1X 磷酸盐缓冲液中。并在指定孔中加入 100 μl 不同量的多肽溶液。板子覆盖后在室温放置 60 分钟。然后用大于 100 μl 的含有 0.05% 聚氧乙烯山梨聚糖(这里指 Tween20TM) 的 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 200 μl 封闭剂 (溶于 PBS 的 5% 脱脂奶粉, 0.05% Tween20TM)。板子覆盖后在室温放置 60 分钟。用大于 100 μl 的含有 0.05% Tween20TM 的 PBS 洗 3 遍。

在指定孔中加入 100 μl 一抗体 (例如, 2E11 HMGB1 mAb, 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7HMGB1 mAb, 以 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶解在封闭液中), 板子覆盖后在室温放置 30 分钟。用大于 100 μl 的含有 0.05% Tween20TM 的 PBS 洗 3 遍。

每孔中加入 100 μl 羊-抗鼠辣根过氧化物酶 (HRP) -连接的二抗 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, 目录号 115-035-071; 1: 2000 稀释使用)。板子覆盖后在室温放置 30 分钟, 随后用大于 100 μl 的含有 0.05% Tween20TM 的 PBS 洗 3 遍。每孔中加入 50 μl 1X TMB (Sigma, St.Louis, MO),

在室温放置 10 分钟，用 iCroplate / Manager 软件和 BioRad 680 型读板仪在 655nm 处测量吸收值。平均背景值均从每个样本值中减去。

盲肠结扎穿孔

盲肠结扎穿孔 (CLP) 按上述方法进行 (Fink and Heard, *J. Surg. Res.* 49: 186-196 (1990); Wichmann et al., *Crit. Care Med.* 26:2078-2086 (1998); and Remick et al., *Shock* 4:89-95(1995))。简言之，BALB/c 小鼠按 75mg/kg 克他命 (Fort Dodge, Fort Dodge, Iowa) 和 20mg/kg 甲苯噻嗪 (Bohringer Ingelheim, St. Joseph, MO) 肌肉内注射麻醉。按中线进行切口，分离出盲肠。在远离回盲阀方向的盲肠端 5mm 处用 6-0 聚丙烯纺织纤维缝合绷带结扎。

结扎的盲肠末端用 22-规格针头刺孔，不需直接挤出粪便。盲肠被放回入正常的腹腔位置。腹部用 6-0 聚丙烯纺织纤维进行双层连续缝合缝合，腹膜和绷带应分离以防止流液渗漏。所有的动物以 20ml/kg 体重皮下注射正常盐溶液使之复苏。复苏后 30 分钟，每只小鼠皮下注射 imipenem (0.5mg/小鼠) (Primaxin, Merck & Co., Inc., West Point, PA)。动物随之复原。一星期后记录死亡率；存活者接着观察 2 星期以确保无死亡发生。

从进行 CLP 的第二天开始，用 100 μ g 特异的抗-HMGB1 单克隆抗体 (例如，6E6 HMGB1 mAb (Mab (6E6)); 2E11 HMGB1 mAb (Mab(2E11)); 9G2 HMGB1 mAb (Mab (9G2)); 和对照 IgG 抗体每 1 天或 2 天对小鼠进行腹腔内注射，共 5 次。图 16 的数据显示，不同剂量 (1 μ g/小鼠，10 μ g/小鼠，100 μ g/小鼠) 6E6 HMGB1 mAb 或对照 IgG 抗体进行了腹腔内注射。

HMGB1 ELISA

用不同的 HMGB1 单克隆抗体进行两种 ELISA 方法。

用单克隆(捕获)+多克隆(测定)抗体对进行 HMGB1 ELISA

在第一种方法中, ELISA 板包被了许多纯化的抗-HMGB1 mAbs(例如, 2E11 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 6E6 HMGB1 mAb), 4℃孵育过夜。板子用含 1% BSA 的 PBS 置 37℃封闭 1 小时。冲洗后, 加入指示浓度的重组鼠 HMGB1, 板子置 37℃ 1 小时。板子冲洗后与 2 μg/ml 兔抗 HMGB1 多克隆抗体孵育(见美国专利号 6,303,321, 6,448,223 和 6,468,533)。室温 1 小时后, 板子冲洗后与用 PBS 1: 1000 稀释的羊抗-兔 Ig-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 孵育 30 分钟。冲洗后, 板子用 TMB 显色 (Invitrogen, San Diego, CA) 并用读板机在 655nm 处测定吸收值。

用单克隆抗体对进行 HMGB1 ELISA (用 6E6 HMGB1 mAb 测定)

ELISA 板经覆盖和封闭, 按上述随后加入重组鼠 HMGB1。洗去非结合的 HMGB1 多肽后, 加入 2 μg/ml 生物素标记的 6E6 HMGB1 mAb 并在室温下孵育 1 小时。链霉素亲和素-HRP 被用于测定结合的 6E6 HMGB1 mAb, 板子按上述方法用 TMB 显色。

例如 2: 鉴定和描述抗-HMGB1 单克隆抗体

用重组全长大鼠 HMGB1 (SEQ ID NO:4; 图 3A 和 3B) 或人 HMGB1 B-匣多肽 (SEQ ID NO:3; 图 2B) 免疫, 已经分离和纯化出许多新的抗-HMGB1 单克隆抗体。图 7 显示了描述这些抗体特

征的表格(克隆名称,免疫原,同型,纯化抗体结合区域,体内 CLP 试验结果)。

例 3: 测定抗-HMGB1 单克隆抗体的选择性

测定 HMGB1 单克隆抗体选择性的试验(例如, ELISA, Western blot 试验)显示了特异的抗-HMGB1 单克隆抗体可以结合 HMGB1 A 匣区域, HMGB1 B 匣区域和/或完整的 HMGB1 蛋白。例如,图 7 显示,经鉴定抗-HMGB1 单克隆抗体可以结合 HMGB1 A 匣(例如, 6E6 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb, 4H11 HMGB1 mAb, 7H3 HMGB1 mAb, 9H3 HMGB1 mAb)。其他单克隆抗体经鉴定可以结合 HMGB1 B 匣(例如, 2E11 HMGB1 mAb, 3G8 HMGB1 mAb, 3-5A6 HMGB1 mAb, 9G1 HMGB1 mAb, 4C9 HMGB1 mAb, 1C3 HMGB1 mAb, 5C12 HMGB1 mAb, 3E10 HMGB1 mAb, 7G8 HMGB1 mAb, 4A10 HMGB1 mAb)。

例 4: 测定抗-HMGB1 单克隆抗体的核酸和氨基酸序列

对于特异的 HMGB1 单克隆抗体(6E6 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb),也可以得到 V_H 区域和 V_K 区域包括 CDRs 的核酸和氨基酸序列(图。4A-4D,5A-5D,6A-6D,19A-19D)。

例 5: 利用抗-HMGB1 单克隆抗体抑制 TNF 的释放

特异的 HMGB1 单克隆抗体抑制 TNF 的释放的能力被测试。图 8 和 9 显示了此项研究的结果,柱状图显示了分别运用 HMGB1, HMGB1 加上特异 HMGB1 单克隆抗体,或对照 IgG 抗

体对 RAW 264.7 细胞作用后 TNF 释放的情况。图 8 显示了 6E6 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb, 9G2HMGB1 mAb, 和对照 IgG 抗体引发的对 HMGB1-介导的 TNF 释放的抑制结果。图 9 显示了 3G8 HMGB1 mAb, 1A9 HMGB1 mAb, 9G2HMGB1 mAb, 6E6 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 和对照 IgG 抗体等引发的对 HMGB1-介导的 TNF 释放的抑制结果。如图 8 和 9 所示, 特异的 HMGB1 单克隆抗体 (例如, 6E6 HMGB1 mAb, 10D4 HMGB1 mAb) 抑制 TNF 释放, 显示这些抗体可以用于调节一种或多种 HMGB 的功能 (例如, 如此所述)。例如, 这些阻抑抗体可以用于综合 HMGB1 的生物学活性 (例如, HMGB1-介导的细胞因子级联效应)。

例 6: 用抗-HMGB1 单克隆抗体对脓血症小鼠进行治疗增加小鼠的存活率

一种由外科手术-创造的盲肠支囊脓血症特定模型, 并导致多微生物腹膜炎和脓血症 (Fink and Heard, supra; Wichmann et al., Supra; and Remick et al., supra) 的盲肠结扎穿孔 (CLP) 实施于小鼠后, 以特异抗-HMGB1 单克隆抗体 (6E6 HMGB1 mAb, 2E11 mAb 或 9G2 HMGB1) 或对照 IgG 抗体 (以 100 μ l 抗体每天两次) 进行治疗。存活率被监视 7 天。图 10 显示了此研究的结果, 柱状图表示脓血症小鼠在经对照抗体或特异抗-HMGB1 单克隆抗体治疗后的存活率。结果显示在盲肠穿孔后 24 小时后, 与对照 IgG 抗体治疗相比, 抗-HMGB1 单克隆抗体进行治疗可减少动物的死亡率。对于 6E6 HMGB1 mAb, 第 7 天的存活率仍非常显著 (与对照相比 $p < 0.03$, Fisher 的准确试验)。

6E6 HMGB1 mAb 对脓血症小鼠进行治疗的剂量效应曲线也被实践。图 16 显示, 1, 10 和 100 μ g 剂量的 6E6 HMGB1 mAb

作用于小鼠。结果显示经 10 μ g 剂量的 6E6 HMGB1 mAb 治疗的脓血症小鼠具有最大的存活率。

例 7: 抗-HMGB1 单克隆抗体的选择性

如上所述, 特异抗-HMGB1 单克隆抗体可以进行 western blot 分析。图 11 显示了含有 CHO 或 CHO HMGB2 或者重组 HMGB1-His₆ (标记 CHO HMGB2, rec-HMGB1-His₆) 的样本的 western blot, 这些样本用抗-His 标记抗体, 抗-HMGB1 抗体, 抗-HMGB1/1 单克隆抗体, 或特异抗-HMGB1 单克隆抗体(例如, 2E11 HMGB1 mAb, 1G3 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 2G5HMGB1 mAb, 6E6 HMGB1 mAb) 作为探针。试验结果显示 2G7 HMGB1 mAb 可结合 HMGB1 但不与 HMGB2 结合, 而 2E11 HMGB1 mAb, 1G3 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb 可检测 HMGB2 及 HMGB1。

例 8: HMGB1 多肽结合试验

对应于人 HMGB1 特异 18 个氨基酸区域的生物素标记多肽及更长的对应于人 HMGB1 9-85 位氨基酸残基的多肽被制备并通过 ELISA 试验分析其特异抗-HMGB1 单克隆抗体的结合。图 13A 显示了这些多肽和其对应序列。

图 13B 显示了这些多肽结合试验结果。如图 13B 显示, 2E11 HMGB1 mAb 结合对应于人 HMGB1 151-168 氨基酸残基的多肽(例如, 氨基酸残基 151-168 SEQ ID NO:1)。6E6 HMGB1 mAb 和 6H9 HMGB1 mAb 结合对应于人 HMGB1 61-78 氨基酸残基的多肽(例如, 氨基酸残基 61-78 SEQ ID NO:1)。2G7 HMGB1 mAb 结合对应于人 HMGB1 46-63 氨基酸残基的多肽(例如, 氨基酸残基 46-63 SEQ ID NO:1)。此外, 2G7 HMGB1 mAb 和 6E6

HMGB1 mAb 也可以结合更长的对应于人 HMGB1 9-85 位氨基酸残基的多肽。这些试验显示特异的抗-HMGB1 单克隆抗体识别 HMGB1 多肽上的不同表位。例如, 6E6 HMGB1 mAb, 其结合了包含于 HMGB1 61-78 位氨基酸的表位并显示了对 HMGB1-介导的 TNF 释放抑制。HMGB1 特定区域中阻抑表位的发现可以用于额外的阻抑药剂的筛选(例如, 抑制 HMGB1 功能(例如, HMGB1-介导的细胞级联活性)的药剂)。

例 9: HMGB1 ELISA

如图 S14 和 15 显示, 两种不同的 ELISA 方法被用于测试特异抗-HMGB1 单克隆抗体的特性。在某一方法中, HMGB1 单克隆抗体 2E11 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 6E6 HMGB1 mAb 作为捕获抗体使用, 而 HMGB1 多克隆抗体作为检测抗体使用。在另一种 ELISA 方法中, HMGB1 单克隆抗体 2E11 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb, 2G7 HMGB1 mAb, 6E6 HMGB1 mAb 作为捕获抗体使用, 而 6E6 HMGB1 mAb 作为检测抗体使用。两种 ELISA 方法的结果都显示单克隆 HMGB1 抗体可以检测 HMGB1 并适用于这里所述的诊断和/或预兆方法。

例 10: 2G7 HMGB1 mAb 与 HMGB1 的结合被对应于 HMGB1 46-63 位氨基酸残基的多肽抑制

用 2G7 HMGB1 mAb 进行 HMGB1 多肽结合试验。如述, 对应于人 HMGB1 46-63 位氨基酸残基或人 HMGB1 61-78 位氨基酸残基的生物素标记合成多肽被制备并用 ELISA 分析其与 2G7 HMGB1 mAb (2G7) 的结合情况。简要地, $2 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 2G7 HMGB1 mAb 1 的被加入到含有指示浓度 (0, 0.33, 1, 3, 9, 27, 81, $243 \mu\text{M}$ 多肽) 的 HMGB1 46-63 多肽或 HMGB1 61-78 多肽的孔中, 置于 25°C 1 小时以制备抗体-多肽样本。ELISA 板子用 10μ

g/ml 重组鼠 HMGB1 包被, 4°C 孵育过夜。板子用再造奶粉封闭, 置 37°C 1 小时。加入以上所列浓度的抗体-多肽样本并于室温孵育 1 小时。板子经洗涤并用辣根过氧化物酶-HRP 孵育。洗涤后, 板子用 TMB 显色(Invitrogen, San Diego, CA)并用读板仪在 655nm 出测量吸收值。

图 20 显示最大信号百分比的结果(y-轴)。如图 20 显示, 任何浓度的 HMGB1 46-63 多肽抑制了 2G7 HMGB1 mAb 同 HMGB1 的结合(以最大信号减少量百分比显示)。相反, HMGB1 61-78 多肽不抑制 2G7 HMGB1 mAb 同 HMGB1 的结合。这些试验进一步验证 2G7 HMGB1 mAb 与位于 HMGB1 46-63 位氨基酸的表位相结合。

例 11: 与 HMGB1 的结合被高浓度的对应于 HMGB1 151-168 位氨基酸残基的多肽抑制

如本文所述, 用 2E11 HMGB1 mAb 和对应于人 HMGB1 46-63 位氨基酸残基(SEQ ID NO:23)或人 HMGB1 151-168 位氨基酸残基(SEQ ID NO:30)的生物素标记的合成多肽进行 HMGB1 多肽结合试验。图 21 显示了这些试验的结果(最大信号百分比的结果(y-轴))。图 21 显示, 9 或更高浓度的 HMGB1 151-168 多肽显著地抑制 2E11 HMGB1 mAb 同 HMGB1 的结合。3 μ M 或更低浓度的 HMGB1 151-168 多肽不能显著地抑制 2E11 HMGB1 mAb 同 HMGB1 的结合(图 21)。此外, HMGB1 46-63 多肽不能抑制 2E11 HMGB1 mAb 同 HMGB1 的结合。这些试验验证 2E11 HMGB1 mAb 与位于 HMGB1 151-168 位氨基酸的表位相结合。

例 12: 2G7HMGB1 mAb 识别位于 HMGB1 53-63 位氨基酸的表位

不同的合成多肽被制备。这些合成多肽包括对应于人 HMGB1 46-63 位氨基酸残基的生物素标记多肽 (SEQ ID NO:23; 标记为 “huHMGB1-46-63-B” 或 “Human HMGB1-46-63-B”), 对应于人 HMGB2 46-63 位氨基酸残基的生物素标记多肽 (SEQ ID NO: 48; 标记为 “ huHMGB2-46-63-B” 或 “ Human HMGB2-46-63-B”), 对应于人 HMGB1 53-70 位氨基酸残基的非-生物素标记多肽 (SEQ ID NO:47; 标记为 “huHMGB1-53-70” 或 “Human HMGB1-53-70”), 对应于人 HMGB1 61-78 位氨基酸残基的生物素标记多肽 (SEQ ID NO:24; 标记为 “huHMGB1-61-78-B”), 对应于人 HMGB1 40-57 位氨基酸残基的非-生物素标记多肽 (SEQ ID NO:46; 标记为 “ Human HMGB1-40-57”) 及由混杂的氨基酸序列组成的生物素标记多肽, 其中的混杂的氨基酸残基属于人 HMGB1 46-63 位氨基酸残基 (SEQ ID NO:45; 标记为 “Human HMGB-46-63-scr”)。如此所述, 运用 ELISA, 通过分析 2G7HMGB1 mAb 与这些交迭多肽的结合情况进一步特定地确定 HMGB1 中结合 2G7HMGB1 mAb 的表位。图 23 显示了这些多肽和其对应序列。

图 22 和 23 显示了多肽结合试验的结果。如图 22 和 23 显示, 2G7HMGB1 mAb 结合 HMGB1 46-63 多肽 (例如, SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:23 中的 46-63 位氨基酸残基) 但不结合人 HMGB2 对应区域 (例如, HMGB2 46-63 多肽, SEQ ID NO:54 或 SEQ ID NO:48 中 46-63 位氨基酸残基)。此外, 2G7HMGB1 mAb 结合 HMGB1 53-70 多肽但不结合 HMGB1 40-57 多肽。2G7HMGB1 mAb 也不结合由 HMGB1 46-63 位氨基酸残基混杂序列组成的多

肽。除了显示 2G7HMGB1 mAb 与不同合成多肽的结合情况，图 22 还显示了抗生物素蛋白与这些合成多肽的结合情况。

在例 8 中，具显示 2G7HMGB1 mAb 结合包含 HMGB1 46-63 氨基酸残基的表位。已知 2G7HMGB1 mAb 结合 HMGB1 46-63 为多肽和 HMGB1 53-70 位多肽，这些试验显示识别位于由 HMGB1 53-63 氨基酸残基构成的氨基酸区域的表位。这些试验进一步表明 2G7HMGB1 mAb 不结合 HMGB2 46-63 多肽，尽管在 HMGB1 46-63 多肽和 HMGB2 46-63 多肽间仅有一个氨基酸的差别。同样地，HMGB1 的第 58 位甘氨酸残基 ((Gly-58)，其对应于 HMGB2 中的丝氨酸残基，在 2G7HMGB1 mAb 识别的 HMGB1 表位中是一个重要的氨基酸残基 (图 23)。

例 13: 6E6 HMGB1 mAb 识别位于 HMGB1 67-78 位氨基酸的表位

不同的合成多肽被制备。这些合成多肽包括对应于人 HMGB1 53-70 位氨基酸残基的非-生物素标记多肽 (SEQ ID NO:47; 标记为 “Human HMGB1-53-70-B”; 如上述)，对应于人 HMGB1 67-84 位氨基酸残基的非-生物素标记多肽 (SEQ ID NO:50; 标记为 “Human HMGB1-67-84”; 如上述)，对应于人 HMGB1 61-78 位氨基酸残基的生物素标记多肽 (SEQ ID NO:24; 标记为 “Human HMGB1-61-78-B”; 如上述) 及由混杂的氨基酸序列组成的非-生物素标记多肽，其中的混杂的氨基酸残基属于人 HMGB1 61-78 位氨基酸残基 (SEQ ID NO:49; 标记为 “Human HMGB-61-78_ser”)。如此所述，运用 ELISA，通过分析 6E6 HMGB1 mAb 与这些交迭多肽的结合情况进一步特定地确定 HMGB1 中结合 6E6 HMGB1 mAb 的表位。这些多肽和其对应序列及结合 6E6 HMGB1 mAb 的多肽多肽显示在图 24 中。

图 24 显示了多肽结合试验的结果。如图 24 显示, 6E6 HMGB1 mAb 结合 HMGB1 61-78 多肽 (SEQ ID NO:24)。此外, 6E6 HMGB1 mAb 结合 HMGB1 67-84 多肽 (SEQ ID NO:50) 但不结合 HMGB1 53-70 多肽 (SEQ ID NO:47)。6E6 HMGB1 mAb 也不结合由 HMGB1 61-78 位氨基酸残基混杂序列组成的多肽 (SEQ ID NO:49) (图 24)。在例 8 中, 显示 6E6 HMGB1 mAb 结合包含 HMGB1 61-78 位氨基酸残基的表位。根据 6E6 HMGB1 mAb 结合 HMGB1 61-78 位多肽和 HMGB1 67-84 为多肽, 这些试验显示 6E6 HMGB1 mAb 识别存在于 HMGB1 67-78 为氨基酸残基构成的氨基酸区域的表位。

例 14: 2E11 HMGB1 mAb 的 HMGB1 多肽结合试验

不同的合成多肽被制备。这些合成多肽包括对应于人 HMGB1 151-168 位氨基酸残基的生物素标记多肽 (SEQ ID NO:30; 标记为 “Human HMGB1-151-168-B”), 对应于人 HMGB1 143-160 位氨基酸残基的非-生物素标记多肽 (SEQ ID NO:52; 标记为 “Human HMGB1-143-160”), 对应于人 HMGB1 157-174 位氨基酸残基的生物素标记多肽 (SEQ ID NO:53; 标记为 “Human HMGB1-157-174”) 及由混杂的氨基酸序列组成的非-生物素标记多肽, 其中的混杂的氨基酸残基属于人 HMGB1 151-168 位氨基酸残基 (SEQ ID NO:51; 标记为 “Human HMGB-151-168_ser”)。如此所述, 运用 ELISA, 通过分析 2E11 HMGB1 mAb 与这些交迭多肽的结合情况进一步特定地确定 HMGB1 中结合 2E11 HMGB1 mAb 的表位。这些多肽和其对应序列及结 2E11 HMGB1 mAb 的多肽显示在图 25 中。

如图 25 显示, 2E11 HMGB1 mAb 结合 HMGB1 151-168 多肽 (SEQ ID NO:30), 但不结合 HMGB1 143-160 多肽 (SEQ ID NO:52) 或 HMGB1 157-174 多肽 (SEQ ID NO:53)。在本领域中

所熟知，存在两种类型的表位或抗原决定簇：线性的，连续的或持续的及非-线性的，构象的或非连续的表位。典型的抗体表位常常由 6 个氨基酸残基构成，但也可能为不同大小。这些试验显示 2E11 HMGB1 mAb 识别的表位可能包含 HMGB1 的 156-161 位氨基酸残基。然而，2E11 HMGB1 mAb 也可识别包括此区域侧翼氨基酸的表位，例如，HMGB1 155-161，155-162，156-162 和 /或 156-163 位氨基酸残基。

图 26 显示：多肽结合结果概要显示了图示的 HMGB1 表位，其可被不同 HMGB1 mAbs(例如，2G7 HMGB1 mAb, 6E6 HMGB1 mAb, 2G5 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb, 2E11 HMGB1 mAb) 识别。

例 15: 6E6 HMGB1 mAb 的质谱分析

6E6 HMGB1 mAb 的质量通过质谱分析测定。6E6 HMGB1 mAb 被送至 Novatia, LLC (Princeton, NJ) 进行 LC/MS 分析。简要地，抗体，无论是原始的或经 DTT 处理（分离重链和轻链），用 RLRP-s 4000A 反相 HPLC 柱（HPLC/ESI-MS 系统）和质谱分析（Rinnigan TSQ7000 质谱分析）进行分析。蛋白的质量精确性通常为 $\pm 0.01\%$ ，此精确性可通过测定 6E6 轻链质量进行（例如， $2\text{Da}/23917\text{Da} * 100\% = 0.008\%$ ）。

图 27A-27D 显示了这项分析的结果，其显示了质谱图。6E6 HMGB1 mAb 的总质量为 146.5kDa（图 27A；显示原始 6E6 HMGB1 mAb 的质谱）。6E6 HMGB1 mAb 轻链和重链的质量经测定分别为 23.9kDa（图 27B 和 27C）及 49.34kDa（图 27B 和 27D）。根据氨基酸分子量计算的轻链和重链的质量预测值，分别为 23.9 kDa 和 47.9 kDa。

例 16: 单剂量 2G7 HMGB1 mAb 治疗增加了脓血症小鼠的存活率

如上述进行小鼠的盲肠结扎穿孔手术 (CLP)。在一项试验中, 手术后 24 小时, 小鼠按 0.004mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.4 mg/kg 的 2G7 HMGB1 mAb 每天进行腹腔内注射治疗。在第二中试验中, 手术后 24 小时, 小鼠按 0.04 mg/kg 的 2G7 HMGB1 mAb 或 0.4mg/kg 对照 IgG (IgG 对照) 每天进行腹腔内注射治疗。两组试验小鼠的存活率均监视 14 天。两组试验的合并和结果显示在图 28 中。以 0.4mg/kg 的 2G7 HMGB1 mAb 治疗的小鼠在 CLP14 天后的存活率约为 85%, 而相对以 IgG 对照治疗的小鼠其在 CLP14 天后的存活率约为 40% (图 28)。此外, 图 28 显示, 分别以 0.04mg/kg 和 0.004mg/kg 2G7 HMGB1 mAb 治疗其 CLP14 天后的存活率分别约为 60% 和 50%。

图 29 是用不同剂量 (4mg/kg, 0.4mg/kg, 0.04mg/kg, 0.004mg/kg), 或对照 IgG 治疗小鼠, 其 CLP 存活百分率的比较图表。如图 29 所示, 小鼠一日内进行四次腹腔内注射。结果显示以 0.4 mg/kg 6E6 HMGB1 mAb 或 2G7 HMGB1 mAb 治疗, CLP14 天后脓血症小鼠的存活率大于 80%, 相比较, 以对照 IgG 治疗的小鼠 CLP14 天后脓血症小鼠的存活率仅为 40%。

例 17: 抗-HMGB1 单克隆抗体已知 TNF 的释放

如例 5, 特异 HMGB1 单克隆抗体抑制 TNF 释放的能力被测试。图 32 和 33 显示了此研究的结果, 柱状图标示 RAW 24607 细胞经 HMGB1 (黑柱), 或 HMGB1 加上特异 HMGB1 单克隆抗体处理后 TNF 的释放情况。图 32 显示了 1A9 HMGB1 mAb (1A9); 2E11 HMGB1 mAb (2E11); 2G5 HMGB1 mAb (2G5); 2G7 HMGB1 mAb (2G7); 3G8 HMGB1 mAb (3G8); 4H11 HMGB1

mAb (4H11); 5A6 HMGB1 mAb (5A6); 6E6 HMGB1 mAb (6E6); 9G2 HMGB1 mAb (9G2); 4C9 HMGB1 mAb (4C9)和 6H9 HMGB1 mAb (6H9)对 HMGB1-介导的 TNF 释放的抑制结果。图 33 显示了 7H3 HMGB1 mAb(7H3); 9H3 HMGB1 mAb (9H3); 10D4 HMGB1 mAb (10D4); 1C3 HMGB1 mAb (1C3); 3E10 HMGB1 mAb (3E10); 4A10 HMGB1 mAb (4A10); 5C12 HMGB1 mAb(5C12); HMGB1 mAb(7G8)对 HMGB1-介导的 TNF 释放的抑制结果。

如图 32 和 33 所示, 以及例 5 中所示的结果, 特异 HMGB1 单克隆抗体 (例如 2E11 HMGB1 mAb, 4H11 HMGB1 mAb, 6H9 HMGB1 mAb 和 10D4 HMGB1 mAb) 抑制 TNF 的释放, 表明这些抗体可以用于调节 HMGB1 的一种或多种功能 (例如, 如此所述)。例如, 这些阻抑抗体可以中和 HMGB1 的生物学活性 (例如, HMGB1-介导的细胞因子级联活性)。

虽然本发明已经参考最佳实施方案被具体地显示和描述, 但本领域技术人员应该可以理解的是, 在不超出权利要求书的发明范围的条件下, 可以进行形式和细节方面的不同的变化。

<110> 鉴定医疗有限公司
 沃特·纽曼
 秦世欣
 特丽萨·奥基夫
 罗伯特·奥巴

<120> 拮抗 HMGB1 的单克隆抗体

130> 3258.1033-003

<140> PCT/US2004/029527

<141> 2004-09-10

<150> 60/502, 568

<151> 2003-09-11

<160> 76

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 216

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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 Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 2

<211> 85

<212> PRT

<213> 智人

<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
 85

<210> 3

<211> 74

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

```

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> 4

<211> 755

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> 69

<223> n = A, T, C or G

<223> CBP-Rat HMGB1

<400> 4

```

atgaagcgac gatggaaaaa gaatttcata gccgtctcag cagccaaccg cttaagaaa 60
atctcatent cgggggcaact tctggttccg cgtggatcca tcgaggaag gatgggcaaa 120
ggagatccta agaagccgag aggcaaatg tctcatatg cattcttgt gcaaacctgc 180
cgggaggagc acaagaagaa gcaccggat gcttctgtca acttctcaga gttctcaag 240
aagtgctcag agaggtgaa gaccatgtct gctaaagaaa aggggaaatt tgaagatatg 300
gcaaaggctg acaaggctcg ttatgaaaga gaaatgaaa cctacatccc ccccaaaggg 360
gagacaaaaa agaagttcaa ggaccccaat gcccccaaga ggctctcttc ggctctcttc 420
ttgttctggt ctgagtaccg cccaaaaatc aaaggcgagc atcctggctt atccattggt 480
gatgttgca agaaactagg agagatgtgg aacaactg ctgcgatga caagcagccc 540
tatgaaaaga aggccgcaa gctgaaggag aagtatgaga aggatattgc tgcctacaga 600
gctaaaggaa aacctgatgc agcgaaaaag ggggtggtca aggctgagaa gagcaagaaa 660
aagaaggaag aggaagacga cgaggaggat gaagaggatg aggaagagga ggaagaagag 720
gaagatgaag atgaagaaga agatgatgat gatga 755

```

<210> 5

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CBP-Rat HMGB1

<400> 5

Met Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn
 1 5 10 15
 Arg Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu Leu Val Pro Arg Gly
 20 25 30
 Ser Ile Glu Gly Arg Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly
 35 40 45
 Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His
 50 55 60
 Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys
 65 70 75 80
 Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys
 85 90 95
 Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met
 100 105 110
 Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser
 130 135 140
 Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly
 145 150 155 160
 Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp
 165 170 175
 Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr
 180 185 190
 Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala
 195 200 205
 Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu
 210 215 220
 Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 245 250

<210> 6
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 6
 gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcttcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
 gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagcctac 240
 ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc taggggcgct 300
 tactggggcc aagggactct ggctcactgtc tctgca 336

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 100 105 110

<210> 8
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 8

gacattgtgc tgacceaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg atagttatat gaactgggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactatg ctgcatccaa tctagaatct 180
 gggatccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccattc 300
 acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaa 333

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 9

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

<210> 10

<211> 345

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 10

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagata 60
 tcttgcaaga cttctggcta taccttctc acctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gccttgagtg gattggacag attttctctg caagtgataa tacttactac 180
 aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240
 attcatctca gcagcctgac atctgaggac actgctgtct atttctgtgc aagagaggac 300
 tctatggact actggggctca gggaacctca gtcaccgtca gctca 345

<210> 11
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 11
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Leu Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 12
 gatattcaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgect ctctgggaga cagagtcacc 60
 gtcagttgca gtgcaagtcg gggcattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaattcct gatctattac acateagtt tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctetca ccatcagcaa cctggaacct 240
 gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttgac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaattcaa a 321

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 13

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

<210> 14

<211> 354

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 14

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc cgtgaagatg 60
 tcttgcaagg cttctggcta cagctttacc agctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctagaatg gattggtgct atttatcctg gaaatcgiga tgetagctac 180
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240
 ttggagctca gcagcctgac aatgaggac tctgcggtct attactgtac aagggactac 300
 ggtagtttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 15

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

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

<210> 16
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 16
 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatntaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatagc ttccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Mouse/Rat

<400> 18
 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 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 Asp Asp Glu Glu
 180 185 190
 Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 195 200 205
 Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19
 Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1 5 10 15
 Ala Phe

<210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20
 Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His
 1 5 10 15
 Pro Asp

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 21
 Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys
 1 5 10 15
 Lys

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 22
 His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser
 1 5 10 15
 Glu Arg

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23
Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu
1 5 10 15
Asp Met

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24
Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys
1 5 10 15
Thr Tyr

<210> 25
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25
Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp
1 5 10 15
Pro Asn

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26
Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys
1 5 10 15
Ser Glu

<210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27
 Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser
 1 5 10 15
 Ile Gly

<210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28
 Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr
 1 5 10 15
 Ala Ala

<210> 29
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29
 Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu
 1 5 10 15
 Lys Glu

<210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30
 Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 Lys Pro

<210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31
 Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser
 1 5 10 15
 Lys Lys

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32
 Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys
 1 5

<210> 33
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33
 Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Glu Glu

<210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34
 Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Asp Asp Asp Glu
 20

<210> 35
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 35
 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 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> 36
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Chinese hamster ovary

<400> 36
 Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr
 1 5 10 15
 Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp
 20 25 30
 Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly
 35 40 45
 Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro
 50 55 60
 Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly
 65 70 75 80
 Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu
 85 90 95
 Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys
 100 105 110
 Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg
 115 120 125
 Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu
 130 135 140

Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu
 145 150 155 160
 Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp
 165 170 175
 Asp Asp Asp Glu
 180

 <210> 37
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Pig

 <400> 37
 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 His 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 Glu
 195 200 205
 Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 38
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Cow

<400> 38
 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 Glu Glu
 195 200 205
 Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 39
 <211> 690
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> rec-HMGB1-His6

<400> 39

```

ccggaattcc tcaccatgca ccatcatcac catcacggca aaggagatcc taagaagccg 60
agaggcaaaa tgcatacata tgcatttttt gtgcaaactt gtcgggagga gcataagaag 120
aagcaccag atgcttcagt caacttctca gagttttcta agaagtgctc agagaggttg 180
aagacatgt ctgctaaaga gaaaggaaaa ttggaagata tggcaaaagc ggacaaggcc 240
cgttatgaaa gagaaatgaa aacctatata cctcccaaag gggagacaaa aaagaagttc 300
aaggatccca atgcacccaa gaggcctcct tcggccttct tcctcttctg ctctgagtat 360
cgccccaaaa tcaaaggaga acatcctggc ctgtccattg gtgatgttgc gaagaaactg 420
ggagagatgt ggaataacac tgctgcagat gacaagcagc cttatgaaaa gaaggctgcg 480
aagctgaagg aaaaatacga aaaggatata gctgcatata gagctaaagg aaagcctgat 540
gcagcaaaaa agggagttgt caaggctgaa aaaagcaaga aaaagaagga agaggaggaa 600
gatgaggaag atgaagagga tgaggaggag gaggaagatg aagaagatga agatgaagaa 660
gaagatgatg atgatgaata atctagagca                                     690

```

<210> 40

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> rec-HMGB1-His6

<400> 40

```

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

```


Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile
 115 120 125
 Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala
 130 135 140
 Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys
 145 150 155 160
 Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala
 165 170 175
 Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu
 180 185 190
 Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp
 195 200 205
 Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215 220

<210> 41
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 41
 caggttcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
 tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatacctg gagatggatga tactaactac 180
 aatggaaaagt tcaagggtaa agccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaggag 300
 ccttatggta gctacgtggg gtttggtttc tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360
 gca 363

<210> 42
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 42
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

<210> 43
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 43
 gaaaatgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60
 atgacctgca gtgccagttc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca aaagtcaagc 120
 acctccccca aactctggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcagca tcagcagcat ggaggetgaa 240
 gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cacccacgtt cggagggggg 300
 accaagctgg aaataaaa 318

<210> 44
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 44
 Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Human HMGB1-46-63-scr

<400> 45

Arg Met Lys Glu Glu Ser Ser Ala Lys Asp Gly Trp Phe Thr Glu Met
 1 5 10 15

Lys Lys

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 46

Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys
 1 5 10 15

Glu Lys

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys
 1 5 10 15

Ala Arg

<210> 48
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 48
 Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu
 1 5 10 15
 Asp Met

<210> 49
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Human HMGB1-61-78_scr

<400> 49
 Ala Lys Asp Tyr Met Glu Ala Arg Lys Asp Thr Glu Tyr Lys Met Ala
 1 5 10 15
 Arg Glu

<210> 50
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 50
 Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Gly Glu

<210> 51
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Human HMGB1-151-168_scr

<400> 56

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

<210> 57

<211> 54

<212> PRT

<213> 智人

<400> 57

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

<210> 58

<211> 54

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59
 Ser Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Asn Lys Cys Ser Glu
 1 5 10 15
 Arg Trp Lys Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 20 25 30
 Lys Ala Asp Lys Thr His Tyr Glu Arg Gln Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 35 40 45
 Pro Lys Gly Glu Thr
 50

<210> 60
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 60
 Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
 1 5 10 15
 Arg Trp Lys Ala Met Ser Ala Lys Asp Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 Ala Lys Val Asp Lys Ala Asp Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Pro Lys Gly Glu Thr
 50

<210> 61
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 61
 Pro Asp Ala Ser Val Lys Phe Ser Glu Phe Leu Lys Lys Cys Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Trp Lys Thr Ile Phe Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
 20 25 30

Ala Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Pro Lys Gly Glu Lys
 50

<210> 62
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 62
 Pro Asp Ala Ser Ile Asn Phe Ser Glu Phe Ser Gln Lys Cys Pro Glu
 1 5 10 15
 Thr Trp Lys Thr Thr Ile Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 Ala Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Pro Lys Gly Glu Thr
 50

<210> 63
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 63
 Pro Asp Ala Ser Val Asn Ser Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
 1 5 10 15
 Arg Trp Lys Thr Met Pro Thr Lys Gln Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 20 25 30
 Lys Ala Asp Arg Ala His
 35

<210> 64
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 64

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

<210> 65

<211> 54

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

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

<210> 66

<211> 84

<212> PRT

<213> 智人

<400> 66

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

<210> 69
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 69
 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> 70
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 70
 Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu
 1 5 10 15
 Phe Cys Ser Glu Tyr His 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 Gly Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 50 55 60
 Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
 65 70

<210> 71
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 71

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

<210> 72

<211> 74

<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro 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 Val Lys Lys Leu Ala Gly Met Trp Asn Asn Thr
 35 40 45
 Ala Ala Ala Asp Lys Gln Phe Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 50 55 60
 Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
 65 70

<210> 73

<211> 92

<212> PRT

<213> 智人

<400> 73

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro 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 Arg Ala Lys Gly Lys Pro
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys
 85 90

<210> 74
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 74
 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 Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 195 200 205
 Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 75
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 75

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 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> 76
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 76

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro 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

人 HMGB1 氨基酸序列

MGKGDPPKPTGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASV

(A 匣)

NFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYE

REMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRLPSAFFLFCSEY

(B 匣)

RPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNNTAADDKQPYE

KKAAKLKEKEYEKDIAAYRAK GKPDAAKKG VVKAEKS

KKKKEEEEDEEDEEDEEEDDEEEDDDDE

(酸性末端)

SEQ ID NO:1

图 1

A 匣：

MGKGDPKKPTGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASV
NFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYER
EMKTYIPPKGET SEQ ID NO: 2

图 2A

B 匣：FKDPNAPKRLPSAFFLFCSEY RPKIKGEHP
GLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYE
KKAAKLKEKYEKDIAAY SEQ ID NO: 3

图 2B

ATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGCTTTAA
 GAAAATCTCATCNTCCGGGGCACTTCTGGTTCGCGTGGATCCATCGAGGGAAGGA
 GGGCAAAGGAGATCCTAAGAAGCCGAGAGGCAAAATGTCCTCATATGCATTCTTTG
 TGCAAACCTGCCGGGAGGAGCACAAAGAAGAAGCACCCGGATGCTTCTGTCAACTTC
 TCAGAGTTCTCCAAGAAGTGCTCAGAGAGGTGGAAGACCATGTCTGCTAAAGAAAA
 GGGGAAATTTGAAGATATGGCAAAGGCTGACAAGGCTCGTTATGAAAGAGAAATG/
 AAACCTACATCCCCCCAAAGGGGAGACCAAAAAGAAGTTCAAGGACCCCAATGCC
 CCAAGAGGCCTCCTTCGGCCTT'CTTCTTGTCTGTTCTGAGTACCGCCAAAAATC
 AAAGGCGAGCATCCTGGCTTATCCATTGGTGATGTTGCGAAGAACTAGGAGAGAT
 GTGGAACAACACTGCTGCGGATGACAAGCAGCCCTATGAAAAGAAGGCCGCCAAGC
 TGAAGGAGAAGTATGAGAAGGATATTGCTGCCTACAGAGCTAAAGGAAAACCTGAT
 GCAGCGAAAAAGGGGGTGGTCAAGGCTGAGAAGAGCAAGAAAAAGAAGGAAGAG
 GAAGACGACGAGGAGGATGAAGAGGATGAGGAAGAGGAGGAAGAAGAGGAAGAT
 GAAGATGAAGAAGAAGATGATGATGATGA (SEQ ID NO:4)

图 3A

MkrrwknfiavsaanrfkksissgallvprgsIEGRMGKGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHP
 DASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIPKGETKKKFK
 DPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAA
 KLKEYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAEKSKKKKEEEDDEEDEDEDEDEDEDEDEDE
 EEEDDDDE (SEQ ID NO:5)

图 3B

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAA
 GTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGAA
 GCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTA
 AACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCC
 TCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTAT
 TACTGTGCTAGGGGGCGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 (SEQ ID NO:6)

图 4 A

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNT
KYDPKFOGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIVYYCARGAYWGQGLVTVSA (SEQ
 ID NO:7)

图 4 B

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCC
 ACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAAC
 TGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAAT
 CTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACC
 CTC AACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTA CTGTCAGCAAAGT
 AATGAGGATCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID
 NO:8)

图 4 C

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGD SYMNWYQQKPGQP P KLLIYAASNLE
SGIPARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYYCQOSNEDPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID
 NO:9)

图 4 D

CAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTCAGTGAA
GATATCCTGCAAGACTTCTGGCTATACCTTCCTCACCTACTGGATGAACTGGGTGAA
GCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGACAGATTTTCTGCAAGTGATAA
TACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCCTC
CAGCACAGCCTACATTCATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCTGTCTATTT
CTGTGCAAGAGAGGACTCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCA
GCTCA (SEQ ID NO:10)

图 5A

QVQLQOSGPELVRPGTSVKISCKTSGYTFLYWMNWVKQRPGGLEWIGQIFPASDNTY
YNEMFKDKATLTVDTSSSTAYIHLSSLTSEDTAVYFCAREDSMDYWGQGTSVTVSS
(SEQ ID NO:11)

图 5B

GATATTCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTC
ACCGTCAGTTGCAGTGCAAGTCGGGGCATTAAACAATTATTTAAACTGGTATCAGCAG
AAACCAGATGGAAGTGTAAATTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTACACTCAGGA
GTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCATCAGC
AACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTTCCT
TGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATTCAA (SEQ ID NO:12)

图 5C

DIQMTQTSSLSASLGDRVTVSCSASRGINNYLNWYQQKPDGTVKFLIYYTSSLHSGVPS
RFGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCOOYSKLPWTFGGGTKLEFK (SEQ ID NO:13)

图 5D

GAGGTT CAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTA
ACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGCTATTTATCCTGGAAATCGTGA
TGCTAGCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCG
CCAGCACTGCCTACTTGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATT
ACTGTACAAGGGACTACGGTAGTTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTC
TCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:14)

图 6A

EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGNRD
ASYNQKFKGKAKLTAVTSASTAYLELSSLNEDSAVYYCTRDYGSFYFDYWGQGTLLT
VSS (SEQ ID NO:15)

图 6B

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTC
ACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAG
AAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGA
GTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGC
AACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCG
TGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:16)

图 6C

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQOGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:17)

图 6D

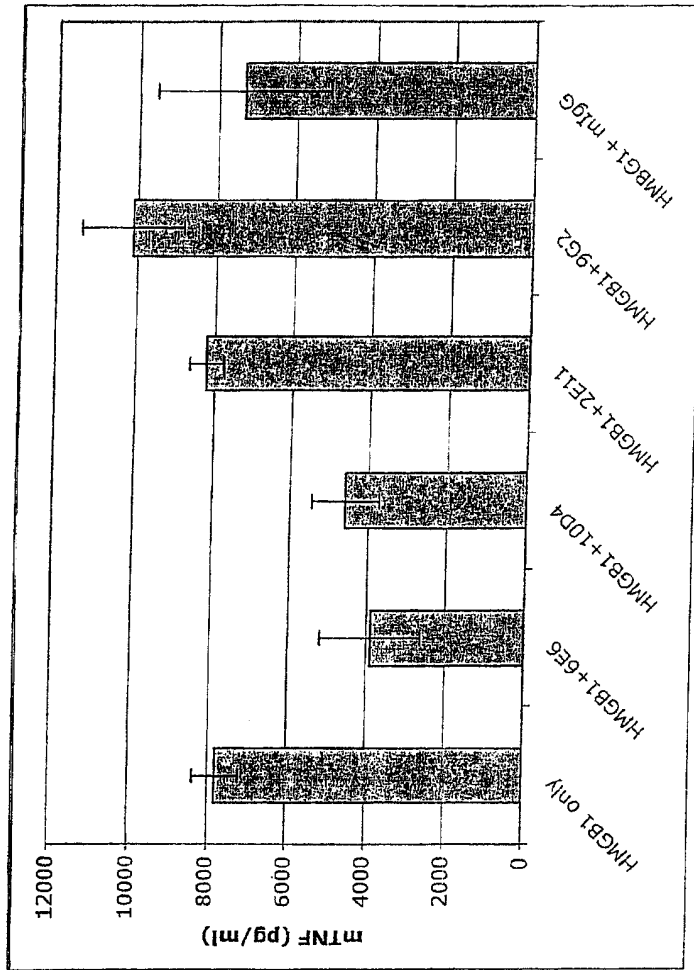
Anti-HMG Antibodies

克隆名称	免疫原	同种型	纯化的抗体结合区域	体内试验
6E6-7-1-1	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	A-匣, 全部HMG	CLP; 保护的
2E11-1-1-2	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	B-匣, 全部HMG	CLP; 保护的
9G2-7-1-1-1	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	*	CLP; 保护的
6H9-1-1-2	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	A-匣, 全部HMG	CLP; 否定的
10D4-1-1-1-2	小鼠HMGB1-CBP	IgG2b	A-匣, 全部HMG	
1A9-1-2-1-4	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	*	
3G8-7-2-1-5	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	B-匣, 全部HMG	
3-2G7-1-1-1	小鼠HMGB1-CBP	IgG2b	A-匣, 全部HMG	
3-2G5-4-1-2	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	A-匣, 全部HMG	
4H11	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	A-匣, 全部HMG	
7H3	小鼠HMGB1-CBP	IgG1, IgG3	A-匣, 全部HMG	
3-5A6	小鼠HMGB1-CBP	IgG2a, IgG2b	B-匣, 全部HMG	
9G1	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	B-匣, 全部HMG	
4C9	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	B-匣, 全部HMG	
9H3	小鼠HMGB1-CBP	IgG1	A-匣, 全部HMG	
1C3-1-1-1-1	B-匣	IgG1	B-匣, 全部HMG	
5C12-1-1-1-1	B-匣	IgG1	B-匣, 全部HMG	
3E10-5-4-1-1	B-匣	IgG1	B-匣, 全部HMG	
7G8	B-匣	IgG1	B-匣, 全部HMG	
4A10-1-3-1-1	B-匣	IgG1	B-匣, 全部HMG	

* 显示与小部分HMGB-1免疫原中的CBP区域结合

图 7

抗HMGB1抑制TNF释放



用 1 μ g/ml 重组 HMGB1 刺激 Raw264.7 细胞引发小鼠 TNF 分泌。如示，加入 20 μ g/ml HMGB1 mAbs 6E6 和 10D4 或鼠 IgG。所有样本重复两次。

图 8

针对 HMGB1 的单克隆抗体抑制 HMGB1-介导的 TNF 的释放

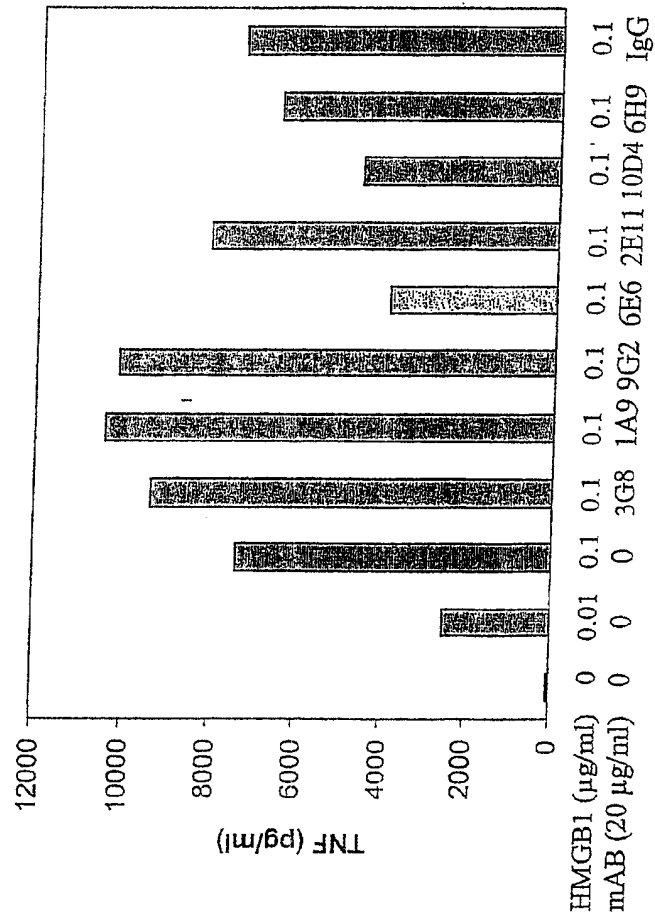
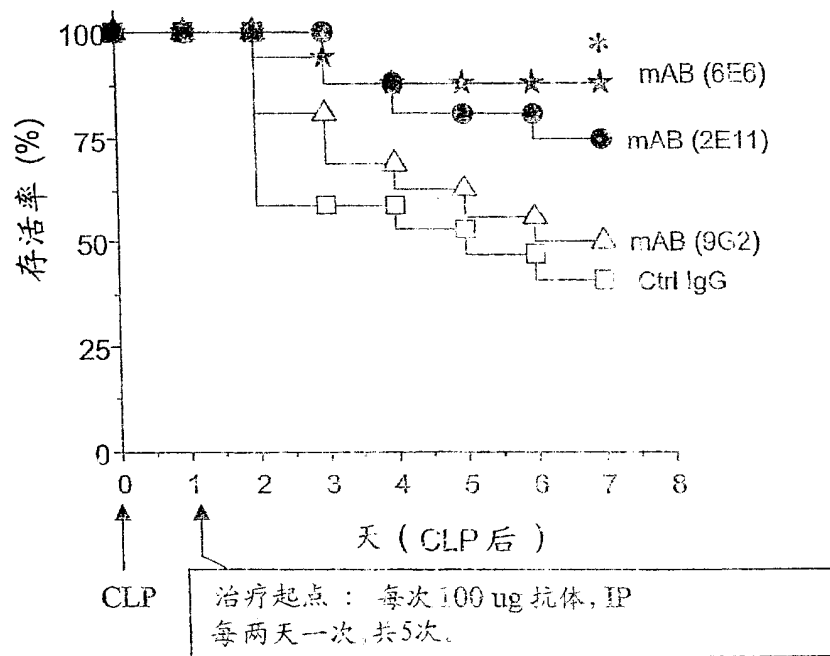


图 9

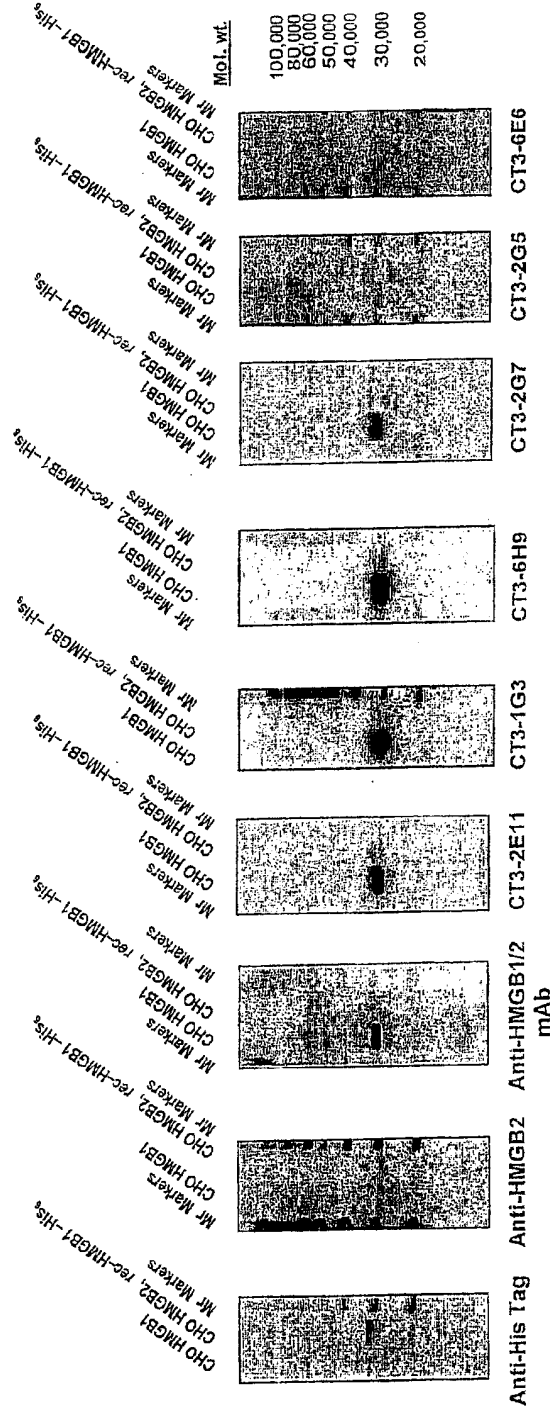
单克隆抗-HMGB1抗体对 CLP 小鼠存活率的作用



*: $p < 0.03$ vs. ctrl. N=16-17 mice per group.

图 10

Western Blot 选择抗-HMGB1 单克隆抗体



结论:

2G7 识别 HMGB1 但无证据

显示识别 HMGB2。

2E11, 1G3, 6H9 识别

HMGB1 和 HMGB2。

图 11

1 mgkgdpkkpr gkmssyaffv qtoreehkkk hpdasvnfse fskkoserwk tmsakekgkf 小鼠 # P07155
 1 mgkgdpkkpr gkmssyaffv qtoreehkkk hpdasvnfse fskkoserwk tmsakekgkf 小鼠 #AAA20508
 1 mgkgdpkkpr gkmssyaffv qtoreehkkk hpdasvnfse fskkoserwk tmsakekgkf 人类 #AAA64970

(A 匣)

61 edmakadkar yeremktyip pkgetkkkfk dnapkrpps afffcseyr pkikgehpgl 小鼠
 61 edmakadkar yeremktyip pkgetkkkfk dnapkrpps afffcseyr pkikgehpgl 小鼠
 61 edmakadkar yeremktyip pkgetkkkfk dnapkrpps afffcseyr pkikgehpgl 人类

(B 匣)

121 sigdvakkig emwnntaadd kqpyekkaak lkkyekdia ayrakgkpa akkgvkaek 小鼠
 121 sigdvakkig emwnntaadd kqpyekkaak lkkyekdia ayrakgkpa akkgvkaek 小鼠
 121 sigdvakkig emwnntaadd kqpyekkaak lkkyekdia ayrakgkpa akkgvkaek 人类

181 skkkkeeedd eedeedeede eedeede deee dddde 小鼠 SEQ ID NO: 18
 181 skkkkeeedd eedeedeede eedeede deee dddde 小鼠 SEQ ID NO: 18
 181 skkkkeeedd eedeedeede eedeede deee dddde 人类 SEQ ID NO: 1

图 12

huHMGB1-1-18	biotin-MGKGDPKKPRGKMSSYAF (SEQ ID NO:19)	2,323.83	2.32	25.4
huHMGB1-16-33	biotin-YAFFVQTCREEHKKKHPD (SEQ ID NO:20)	2,602.04	2.60	21.6
huHMGB1-28-44	biotin-KKKHPDASVNFSEFSKK (SEQ ID NO:21)	2,315.72	2.32	23.1
huHMGB1-31-48	biotin-HPDASVNFSEFSKKCSER (SEQ ID NO:22)	2,406.73	2.41	22.4
huHMGB1-46-63	biotin-SERWKTMSAKEKGFEDM (SEQ ID NO:23)	2,526.99	2.53	22.6
huHMGB1-61-78	biotin-EDMAKADKARYEREMKTY (SEQ ID NO:24)	2,574.00	2.57	22.6
huHMGB1-76-93	biotin-KTYIPPKGETKKKFKDPN (SEQ ID NO:25)	2,457.95	2.46	23.1
huHMGB1-91-108	biotin-DPNAPKRPPSAFFLFCSE (SEQ ID NO:26)	2,361.78	2.36	21.4
huHMGB1-106-123	biotin-CSEYRPKIRGEHPGLSIG (SEQ ID NO:27)	2,309.75	2.31	24.1
huHMGB1-121-138	biotin-SIGDVAKKLGEMWNNTAA (SEQ ID NO:28)	2,243.64	2.24	25.6
huHMGB1-136-153	biotin-TAADDKQPYEKKAACLKE (SEQ ID NO:29)	2,372.77	2.37	22.3
huHMGB1-151-168	biotin-LKEKYEKDIAAYRAKGKP (SEQ ID NO:30)	2,446.94	2.45	25.5
huHMGB1-166-183	biotin-GKPDAAKKGVVKAESKK (SEQ ID NO:31)	2,207.70	2.21	25.9
huHMGB1-179-185	biotin-EKSKKKK (SEQ ID NO:32)	1,213.54	1.21	21.7
huHMGB1-181-198	biotin-SKKKKEEEDEEEDDEE (SEQ ID NO:33)	2,592.68	2.59	22.2
huHMGB1-196-215	biotin-DEEEDEEEDDEEEDDDDE (SEQ ID NO:34)	2,826.60	2.83	23.1
huHMGB1-9-85	PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNF SEFSKKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADK ARYEREMKTYIPPKGET (SEQ ID NO:35)	9,070.35	9.11	18.8

图13A

抗-HMGB1单克隆抗体的表位图谱

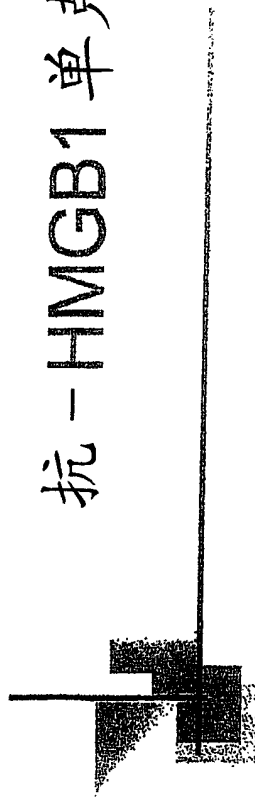
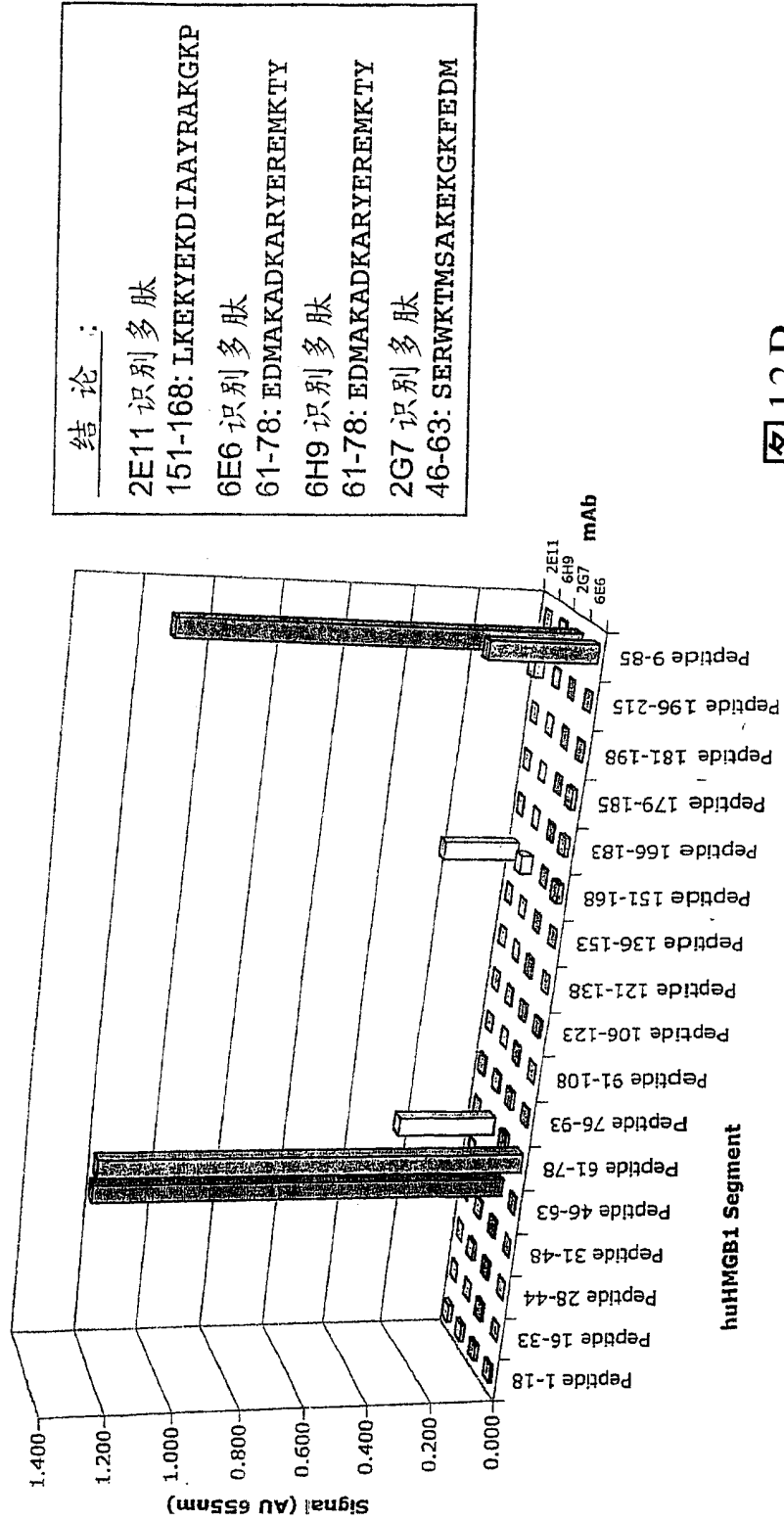


图6E6 图2G7 □ 6H9 □ 2E11



结论：
 2E11 识别多肽
 151-168: LKEKYEKDI AAYRAKGKP
 6E6 识别多肽
 61-78: EDMAKADKARYEREMKTY
 6H9 识别多肽
 61-78: EDMAKADKARYEREMKTY
 2G7 识别多肽
 46-63: SERWKTMSAKEKGFEDM

图13B

单克隆抗体 (捕获) + 多克隆 (检测) 抗体对进行 HMGB1 ELISAs

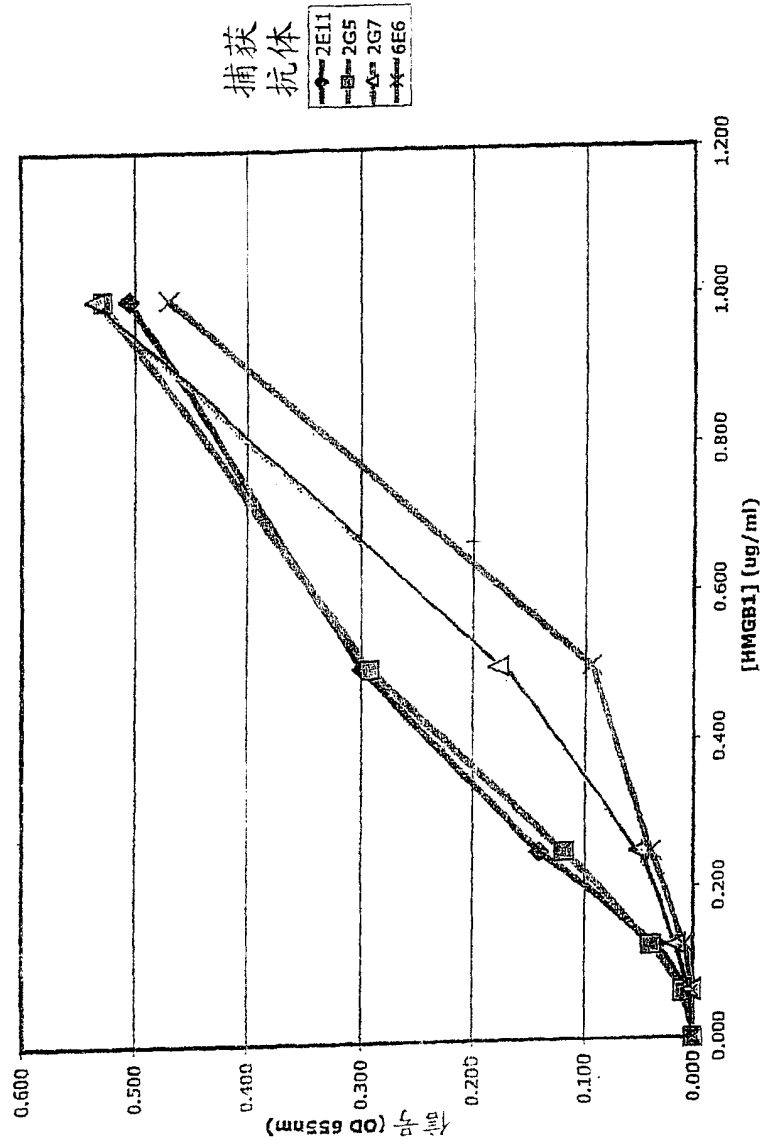


图14

单克隆抗体对 (6E6 检测) 进行 HMGB1 ELISAs

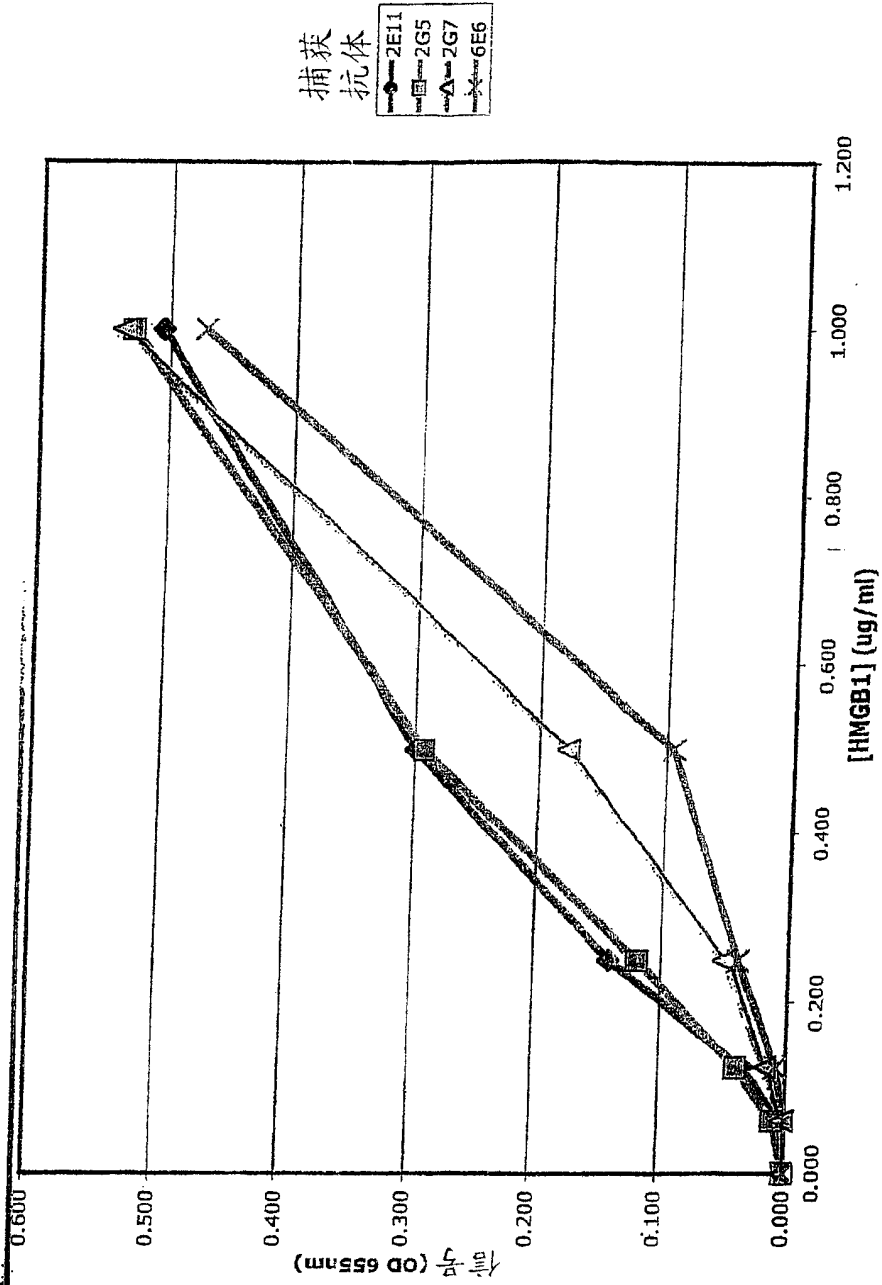


图15

CLP 中单克隆 HMGB1 抗体的

剂量效应曲线

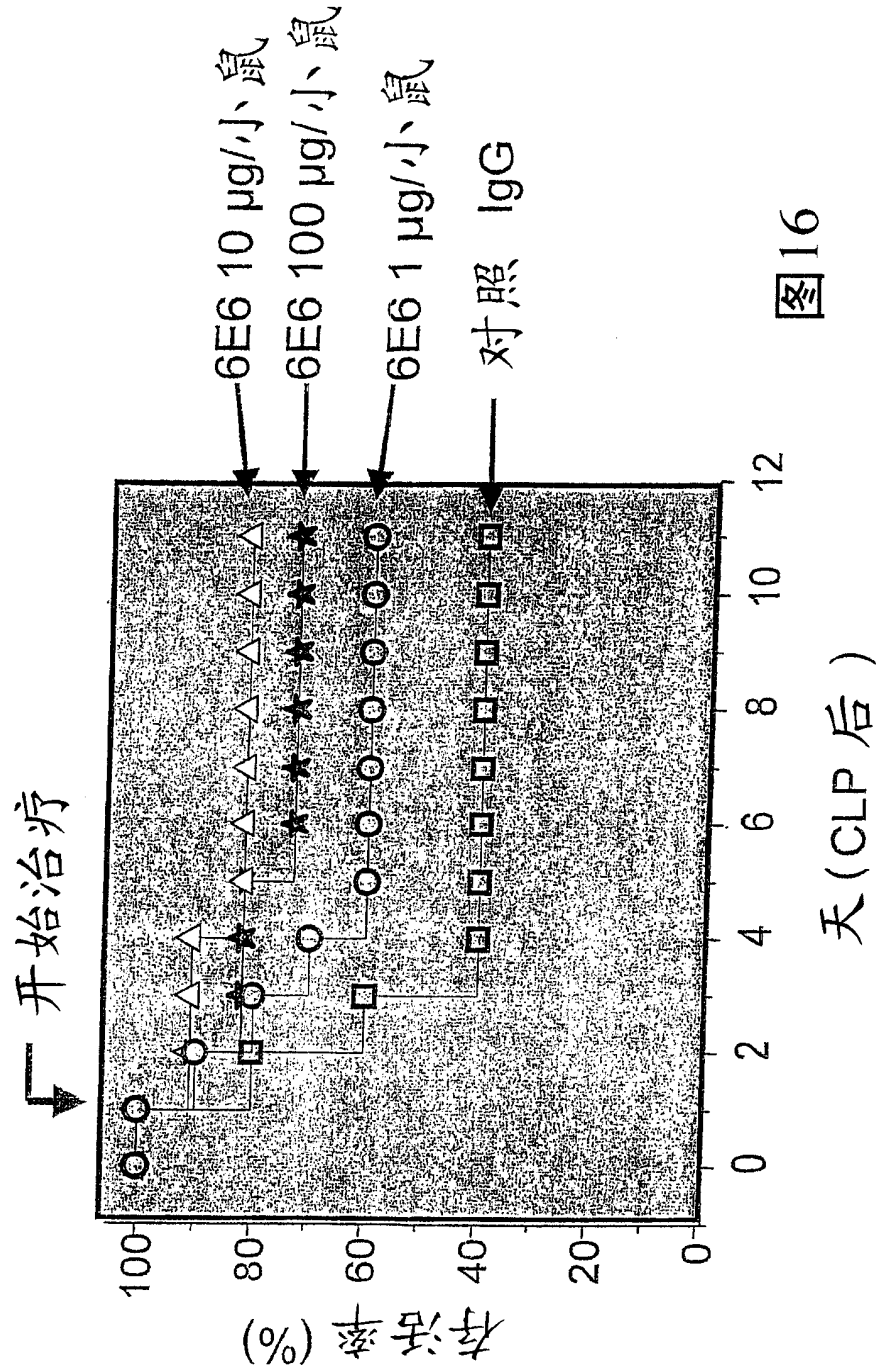


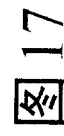
图16


```

CHOHMB1 .....VNFSESKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIIPKGETKKFKDPNAPKPPSAFFLFCSE
raHMB1 MGKGDPPKPRGKMSYAFFVQTCREHHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIIPKGETKKFKDPNAPKPPSAFFLFCSE
muSHMB1 MGKGDPPKPRGKMSYAFFVQTCREHHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIIPKGETKKFKDPNAPKPPSAFFLFCSE
huHMB1 MGKGDPPKPRGKMSYAFFVQTCREHHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIIPKGETKKFKDPNAPKPPSAFFLFCSE
suSHMB1 MGKGDPPKPRGKMSYAFFVQTCREHHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIIPKGETKKFKDPNAPKPPSAFFLFCSE
boSHMB1 MGKGDPPKPRGKMSYAFFVQTCREHHKKHPDASVNFSEFSKCSERWKTMSAKEKGFEDMAKADKARYEREMKTYIIPKGETKKFKDPNAPKPPSAFFLFCSE

CHOHMB1 YRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACLKEKYEKDIAYRAKGPDAAKGVVKAESKSKKKEEEDDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
(SEQ ID NO: 36)
raHMB1 YRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACLKEKYEKDIAYRAKGPDAAKGVVKAESKSKKKEEEDDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
(SEQ ID NO: 18)
muSHMB1 YRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACLKEKYEKDIAYRAKGPDAAKGVVKAESKSKKKEEEDDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
(SEQ ID NO: 18)
huSHMB1 YRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACLKEKYEKDIAYRAKGPDAAKGVVKAESKSKKKEEEDDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
(SEQ ID NO: 1)
suSHMB1 YRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKHPYEKKAACLKEKYEKDIAYRAKGPDAAKGVVKAESKSKKKEEEDDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
(SEQ ID NO: 37)
boSHMB1 YRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAACLKEKYEKDIAYRAKGPDAAKGVVKAESKSKKKEEEDDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
(SEQ ID NO: 38)

```



ccggaattcctcaccATGCACCATCATCACCATCACGGCAAAGGAGATCCTAAGAAGCCGAG
AGGCAAATGTCATCATATGCATTTTTTTGTGCAAACCTTGTCGGGAGGAGCATAAGAA
GAAGCACCCAGATGCTTCAGTCAACTTCTCAGAGTTTTCTAAGAAGTGCTCAGAGAG
GTGGAA GACCATGTCTGCTAAAGAGAAAAGGAAAATTTGAAGATATGGCAAAGCGG
ACAAGGCCCGTTATGAAAGAGAAATGAAAACCTATATCCCTCCCAAAGGGGAGACA
AAAAAGAAGTTCAAGGATCCCAATGCACCCAAGAGGCCTCCTTCGGCCTTCTTCCTC
TTCTGCTCTGAGTATCGCCCAAAAATCAAAGGAGAACATCCTGGCCTGTCCATTGGT
GATGTTGCGAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAAACTGCTGCAGATGACAAGCA
GCCTTATGAAAAGAAGGCTGCGAAGCTGAAGGAAAAATACGAAAAGGATATAGCTG
CATATCGAGCTAAAGGAAAGCCTGATGCAGCAAAAAGGGAGTTGTCAAGGCTGAA
AAAAGCAAGAAAAAGAAGGAAGAGGAGGAAGATGAGGAAGATGAAGAGGATGAG
GAGGAGGAGGAAGATGAAGAAGATGAAGATGAAGAAGAAGATGATGATGATGAAa
atctagagca (SEQ ID NO:39)

图 18 A

MHHHHHGGKDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKT
MSAKEKGKGFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEY
RPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKA AKLKEKYEKDIAAYRAGK
KPDAAKKGVVKA EKSKKKKEEEDEEDEEEDDEEEDDEEEDDEEEDDDDE (SEQ ID
NO:40)

图 18 B

CAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAA
GATTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAA
GCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTG
ATACTA ACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACACTGACTTCAGACAAATCC
TCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
TTCTGTGCAAGAAGGGAGCCTTATGGTAGCTACGTGGGGTTTGGTTTCTGGGGCCAA
GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO:41)

图 19 A

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDT
NYNGKFKGKATLTSDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARREPYGSYVGFGFWGQGL
VTVSA (SEQ ID NO:42)

图 19 B

GAAAATGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTC
ACCATGACCTGCAGTGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAAAA
GTCAAGCACCTCCCCAAACTCTGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGT
CCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACTTTACTCTCTCACGATCAGCAG
CATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCACC
CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:43)

图 19 C

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQKSSSTSPKLWIYDTSKLA SGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQSGYPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:44)

图 19 D

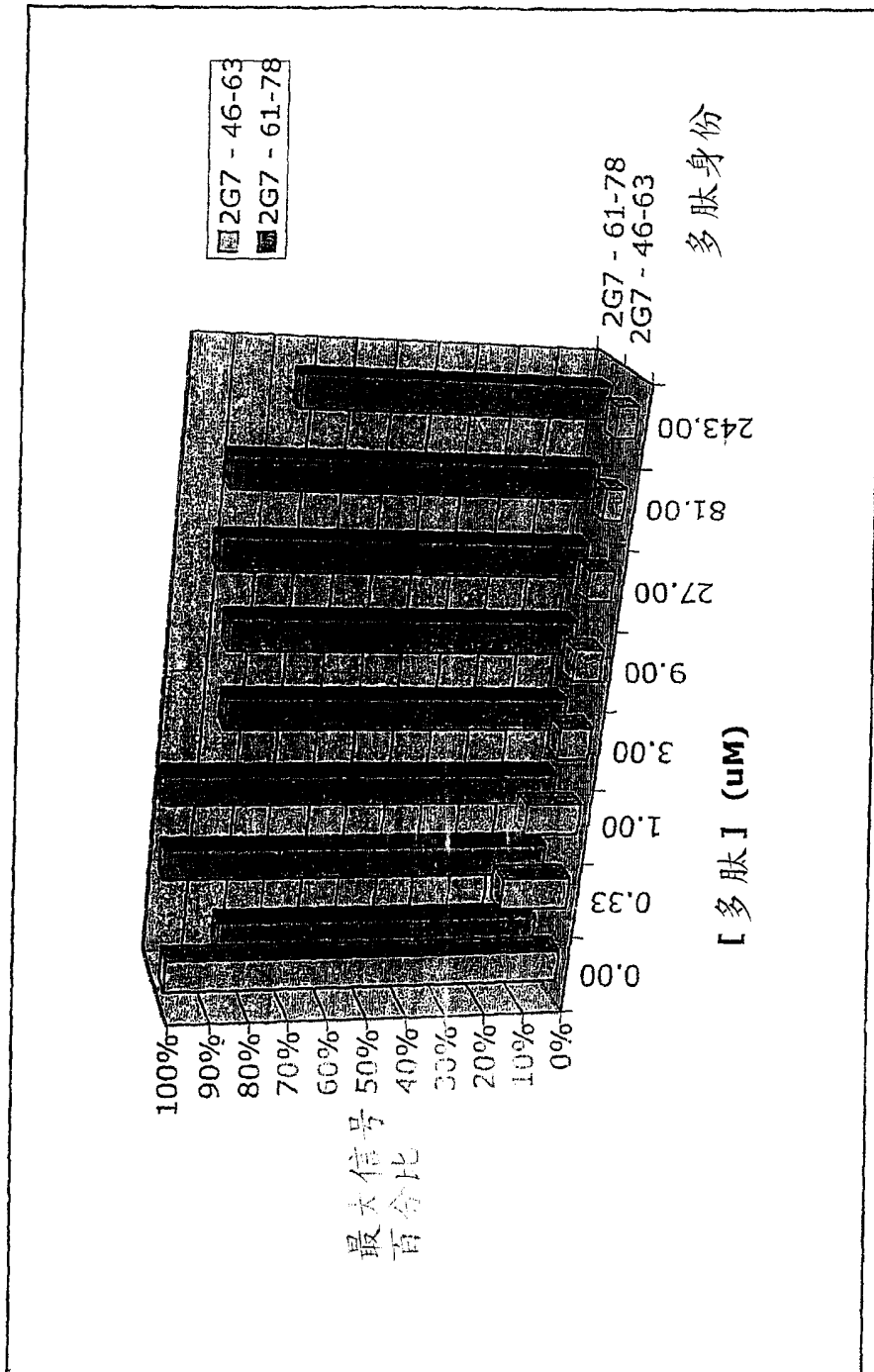


图20

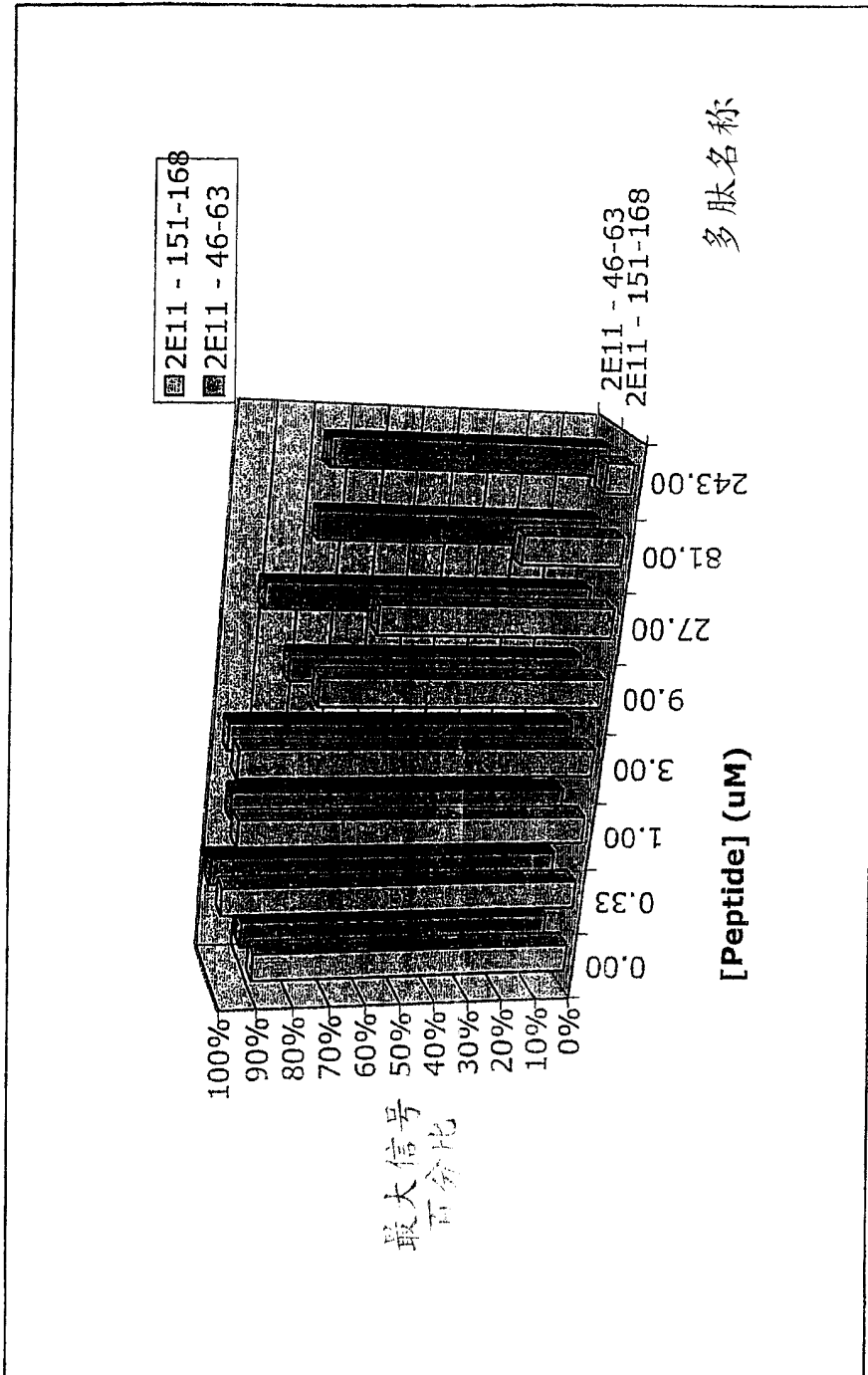
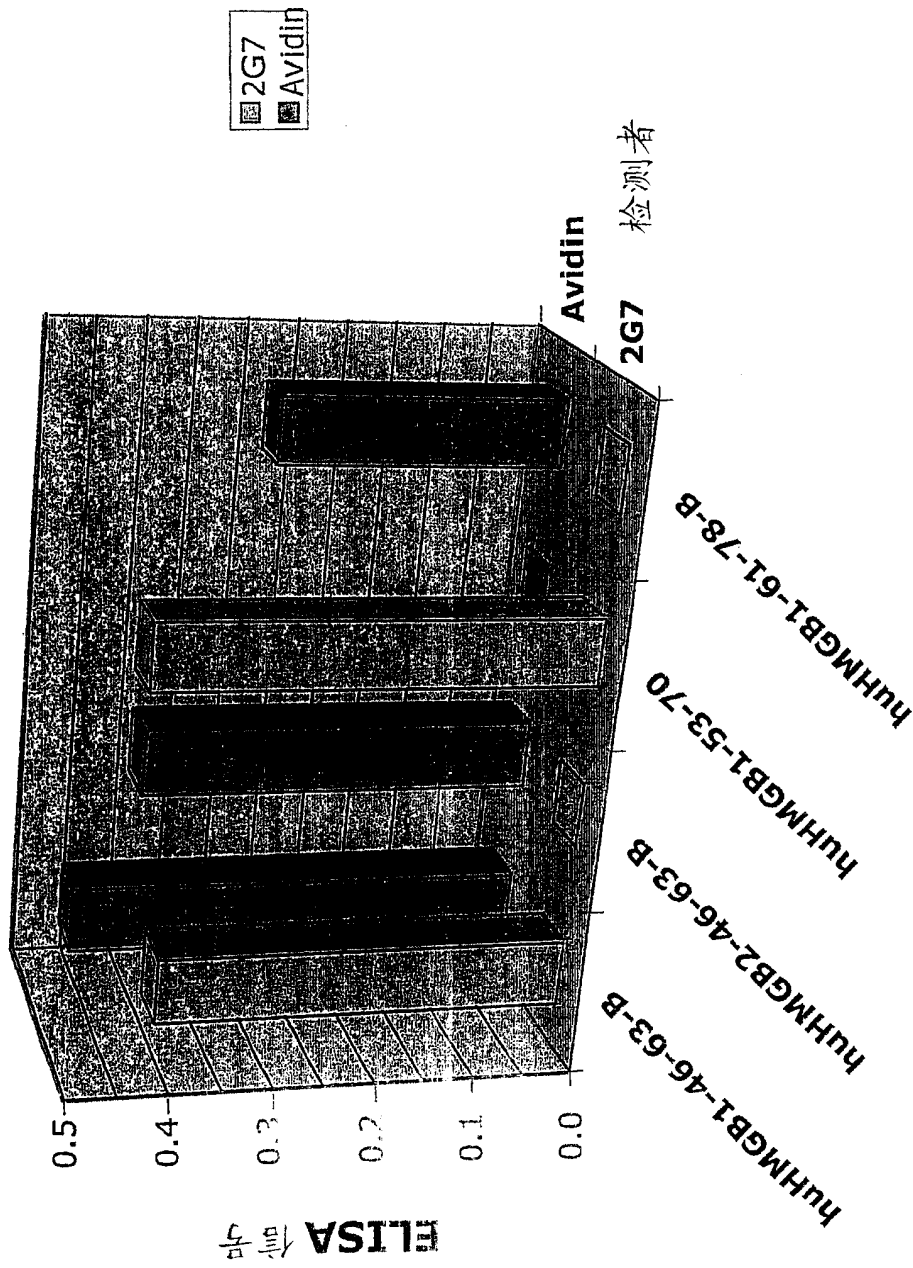


图 21



多肽 图 22

<u>多肽名称</u>	<u>序列</u>	<u>结合 2G7?</u>
Human HMGB1-46-63-scr (SEQ ID NO: 45)	RMKESSAKDGWFTEMKK	否
Human HMGB1-40-57 (SEQ ID NO: 46)	EFSKKCSERWKTMSAKEK 	否
Human HMGB1-46-63-B (SEQ ID NO: 23)	SERWKTMSAKEKGFEDM 	是
Human HMGB1-53-70 (SEQ ID NO: 47)	SAKEKGFEDMAKADKAR	是
Human HMGB2-46-63-B (SEQ ID NO: 48)	SERWKTMSAKEKSKFEDM	否

图 23

scr = 混杂的

<u>多肽名称</u>	<u>序列</u>	<u>结合 6E6?</u>
Human HMGB1-61-78_scr (SEQ ID NO:49)	AKDYMEARKDTEYKMARE	否
Human HMGB1-53-70 (SEQ ID NO:47)	SAKEKGKFEDMAKADKAR 	否
Human HMGB1-61-78-B (SEQ ID NO:24)	B-EDMAKADKARYEREMKTY 	是
Human HMGB1-67-84 (SEQ ID NO:50)	DKARYEREMKTYIPPKGE	是

图 24

scr = 混杂的

<u>多肽名称</u>	<u>序列</u>	<u>结合 2E11?</u>
Human HMGB1-151-168_scr (SEQ ID NO:51)	KEYREPKYAIKAKKGLDA	否
Human HMGB1-143-160 (SEQ ID NO:52)	PYEKKAAKLKEKYEKDIA 	否
Human HMGB1-151-168-B (SEQ ID NO:30)	B-LKEKYEKDIAAYRAKGGP 	是
Human HMGB1-157-174 (SEQ ID NO:53)	KDIAAYRAKGGPDAAKKG	否

图 25

scr = 混杂的

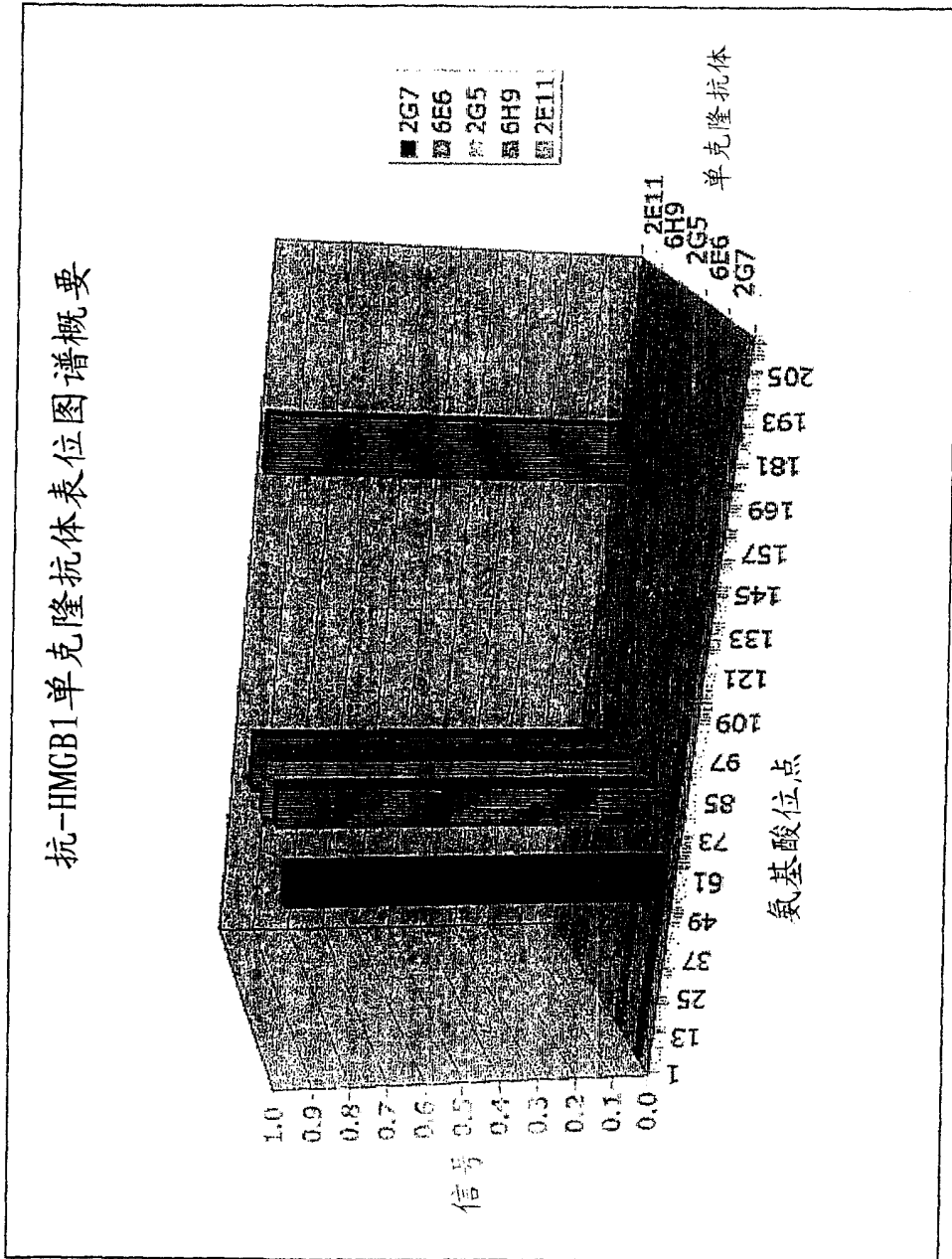


图 26

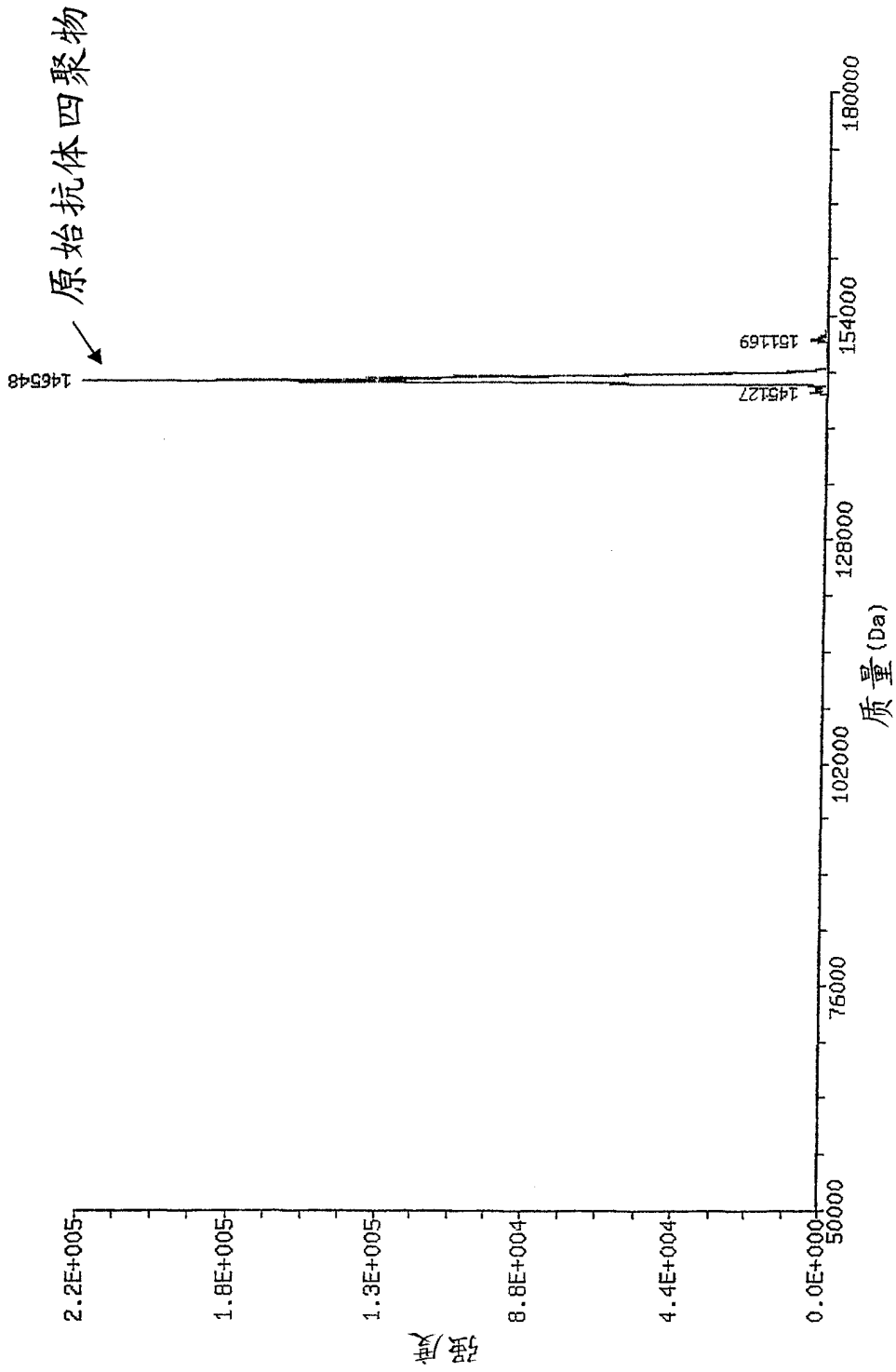


图 27A

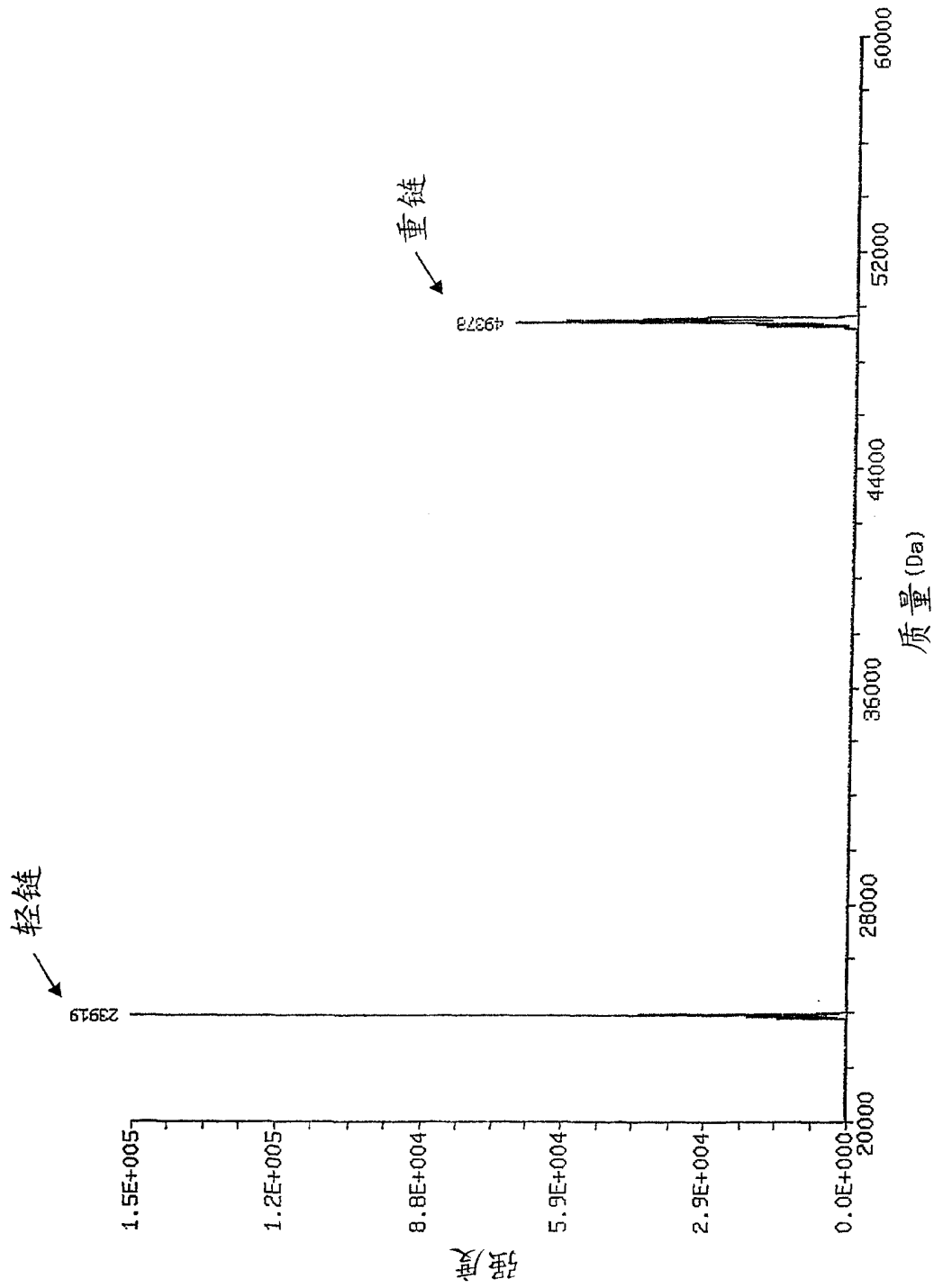


图 27B

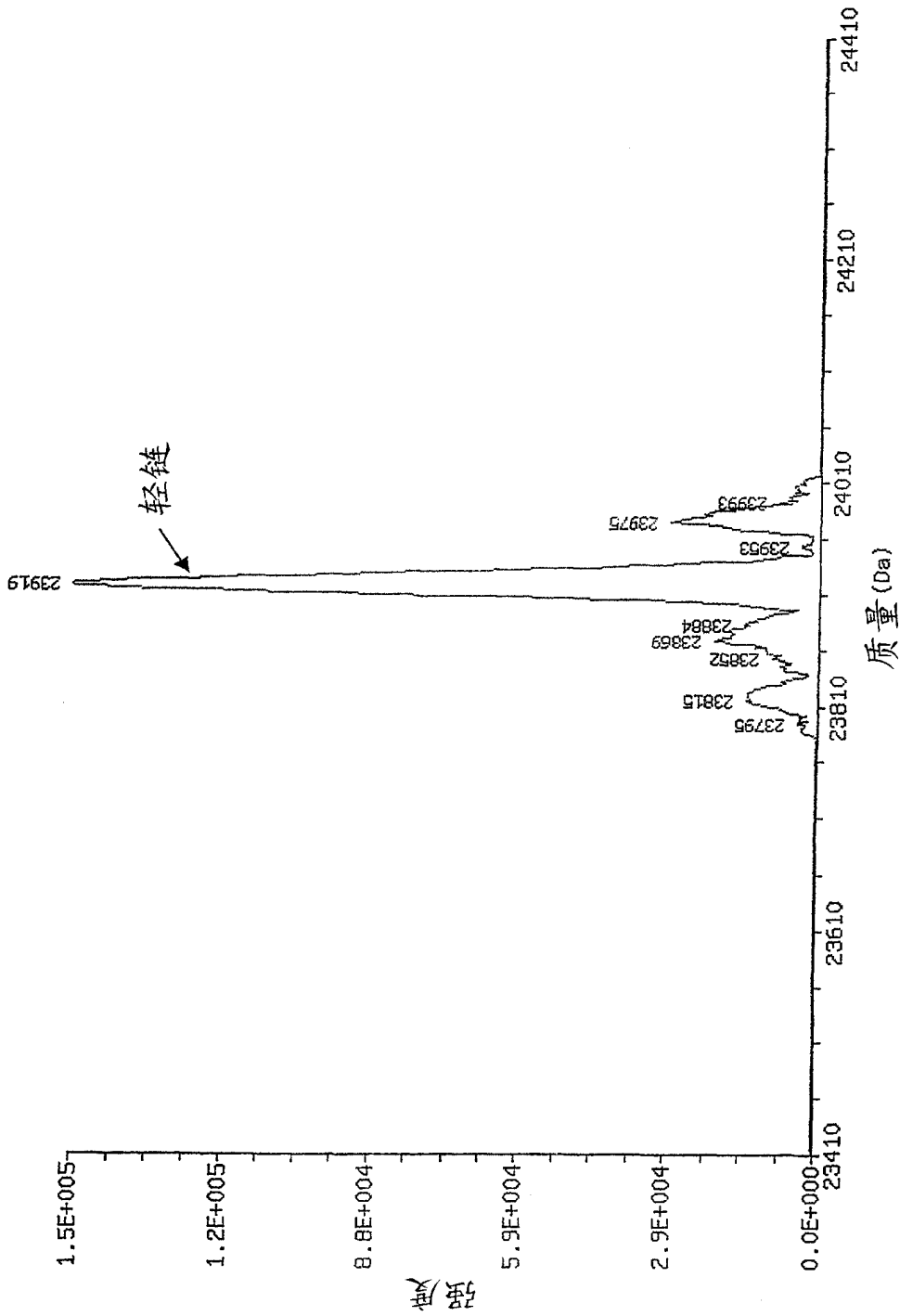


图 27C

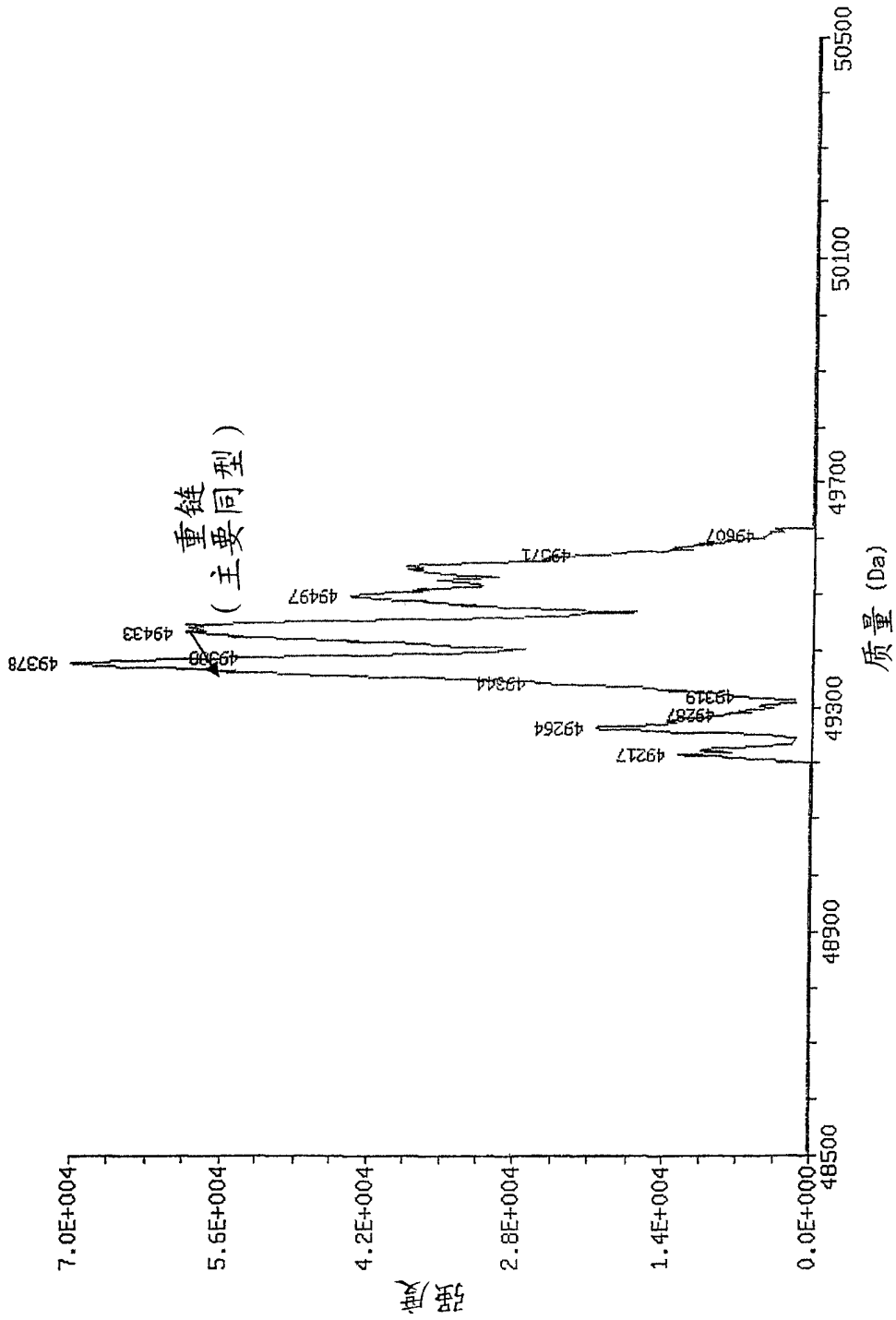
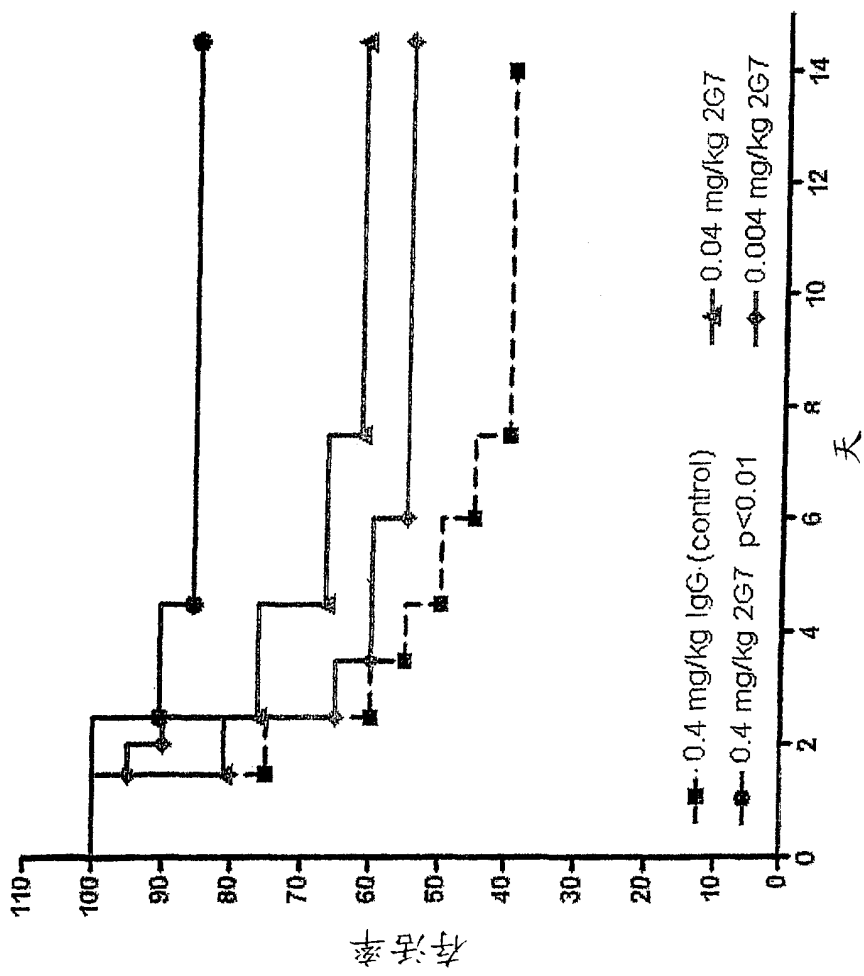


图 27D



2G7比对照 $p < 0.01$ Logrank 检验趋向 $p < 0.01$

图 28

剂量	6E6 (qd 1和3天给药) N = 1 expt	对照 IgG	2G7 (qd 1和3天给药) N = 2 expts	对照 IgG
100 ug/小鼠 (4 mg/kg)	73	40		
10 ug/小鼠 (0.4 mg/kg)	82		85.7	40
1 ug/小鼠 (0.04 mg/kg)	60		61.9	
0.1 ug/小鼠 (0.004 mg/kg)			55	

图 29

MGKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFAEFSKKCSERWKTMSAKEK
SKFEDMAKSDKARYDREMKNYVPPKGDKKGKKKDPNAPKRPPSAFFLFCSEHRPKIKSE
HPGLSIGDTAKKLGEMWSEQSAKDKQPYEQKAAKLKEKYEKDIA
AYRAKGKSEAGKKGPRPTGSKKKNEPEDEEEEEEEDEDEEEDEDEE (SEQ ID
NO:54)

图 30

mgkgdpkpr gkmssyaffv qcreehkkk hpdasvnfse fskkcserwk tmsakekgkf
edmakadkar yeremktyip pkgetkkkfk dnapkrpps afflcseyr pkikgehpgl
sigdvakklg emwnntaadd kqpyekkaak lkeyekdia ayrakgpda akkgvkaek
skkkkeeed eedeedeeed edeededee dddde (SEQ ID NO:74)

图 31A

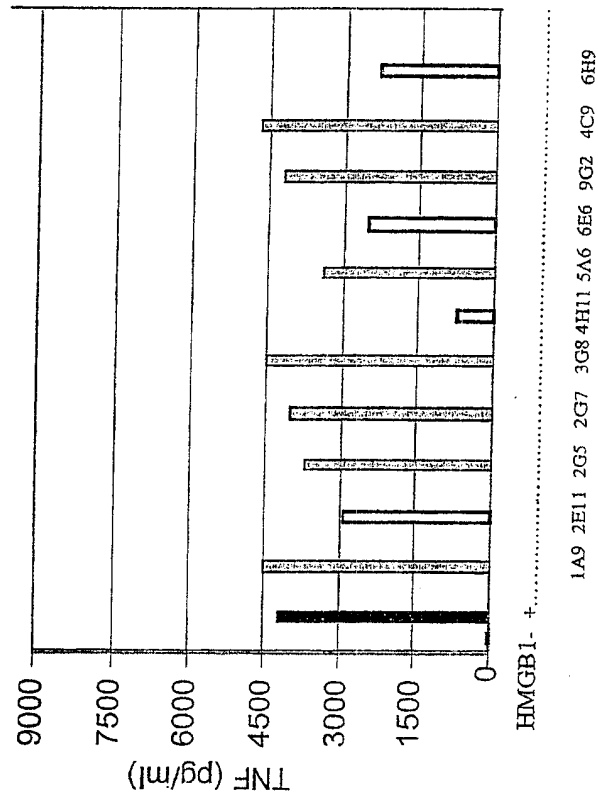
A 匣：
pr gkmssyaffv qcreehkkk hpdasvnfse fskkcserwk tmsakekgkf
edmakadkar yeremktyip pkget (SEQ ID NO:75)

图 31B

B 匣：
fk dnapkrpps afflcseyr pkikgehpgl
sigdvakklg emwnntaadd kqpyekkaak lkeyekdia ay (SEQ ID NO:76)

图 31C

HMGB1 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) + 单克隆抗体 (终浓度 13%) 刺激 RAW 细胞后 TNF 释放量



所有抗体取培养上清使用

图 32

HMGB1 (0.1 ug/ml) + 单克隆抗体 (终浓度 13%) 刺激 RAW 细胞后 TNF 释放量

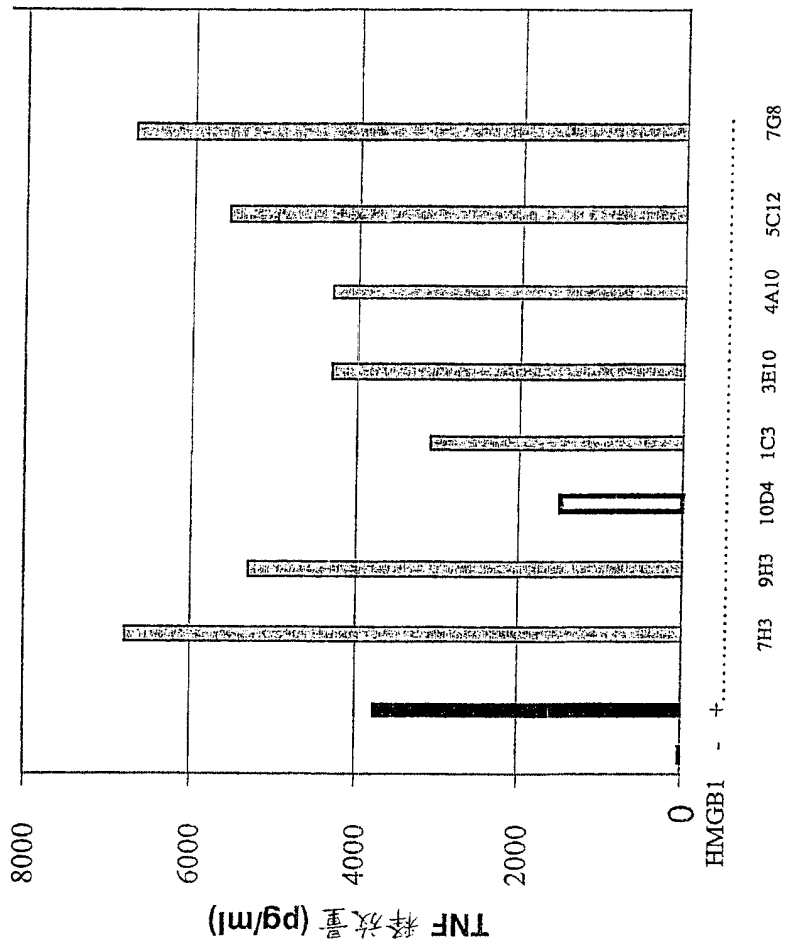


图 33