



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104955846 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201380071400. 5 *A61P 9/10*(2006. 01)
(22) 申请日 2013. 12. 06 *A61P 11/00*(2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 13/12*(2006. 01)
2013-013602 2013. 01. 28 JP *A61P 25/04*(2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *A61P 25/28*(2006. 01)
2015. 07. 24 *A61P 29/00*(2006. 01)
(86) PCT国际申请的申请数据 *C07K 16/18*(2006. 01)
PCT/JP2013/082860 2013. 12. 06 *C12N 1/15*(2006. 01)
(87) PCT国际申请的公布数据 *C12N 1/19*(2006. 01)
W02014/115430 JA 2014. 07. 31 *C12N 1/21*(2006. 01)
C12N 5/10(2006. 01)
C12N 15/09(2006. 01)
(71) 申请人 株式会社伊贝克
地址 日本北海道
申请人 国立大学法人冈山大学
(72) 发明人 高田贤藏 寅岛崇 西堀正洋
(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219
代理人 鲁雯雯 金龙河
(51) Int. Cl.
C07K 16/46(2006. 01)
A61K 39/395(2006. 01)
A61P 1/16(2006. 01)

权利要求书2页 说明书29页
序列表43页 附图18页

(54) 发明名称

人源化抗 HMGB1 抗体或其抗原结合性片段

(57) 摘要

本发明提供与由 HMGB1 蛋白的 C 末端的 8 个氨基酸残基 (EEEDDDDE) 构成的序列特异性结合、对该蛋白质具有相关性的各种炎症性疾病的治疗或预防有效的人源化抗 HMGB1 抗体及其抗原结合性片段, 并且提供含有该抗体或其抗原结合性片段的药物组合物。

1. 一种人源化抗体或其抗原结合性片段,其与存在于 HMGB1 蛋白的 C 末端结构域的氨基酸序列 (EEEDDDDE (序列号 60)) 特异性结合,所述人源化抗体或其抗原结合性片段中,

(i) 重链可变区 (VH) 含有:

(a) 包含序列号 7 的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变的氨基酸序列的重链 CDR1 的氨基酸序列、

(b) 包含序列号 8 的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变的氨基酸序列的重链 CDR2 的氨基酸序列、以及

(c) 包含序列号 9 的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变的氨基酸序列的重链 CDR3 的氨基酸序列;

(ii) 轻链可变区 (VL) 含有:

(a) 包含序列号 10 的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变的氨基酸序列的轻链 CDR1 的氨基酸序列、

(b) 包含序列号 11 的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变的氨基酸序列的轻链 CDR2 的氨基酸序列、以及

(c) 包含序列号 12 的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变的氨基酸序列的轻链 CDR3 的氨基酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,

(i) 重链可变区 (VH) 含有:

(a) 包含序列号 7 的氨基酸序列的重链 CDR1 的氨基酸序列、

(b) 包含序列号 8 的氨基酸序列的重链 CDR2 的氨基酸序列、以及

(c) 包含序列号 9 的氨基酸序列的重链 CDR3 的氨基酸序列;

(ii) 轻链可变区 (VL) 含有:

(a) 包含序列号 10 的氨基酸序列的轻链 CDR1 的氨基酸序列、

(b) 包含序列号 11 的氨基酸序列的轻链 CDR2 的氨基酸序列、以及

(c) 包含序列号 12 的氨基酸序列的轻链 CDR3 的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,

(i) 重链可变区 (VH) 含有序列号 43、44、45 和 46 的氨基酸序列分别作为 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列,其中,FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列可以分别在序列号 43、44、45 和 46 的氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变,

(ii) 轻链可变区 (VL) 含有序列号 47、48、49 和 50 的氨基酸序列分别作为 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列,其中,FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列可以分别在序列号 47、48、49 和 50 的氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变。

4. 如权利要求 1~3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,含有:

(i) 在重链可变区 (VH) 中至少 49 位和 94 位这两个位置的氨基酸残基为来源于大鼠抗体 #10-22 的 H 的氨基酸残基 (均为丙氨酸) 的氨基酸序列、

(ii) 在轻链可变区 (VL) 中至少 44 位和 46 位这两个位置的氨基酸残基为来源于大鼠抗体 #10-22 的 L 链的氨基酸残基 (分别为异亮氨酸和精氨酸) 的氨基酸序列。

5. 如权利要求 1~4 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,含有:

(i) 包含与序列号 41 的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH)、以及

(ii) 包含与序列号 42 的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

6. 如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段, 其中, 含有:

(i) 包含序列号 41 的氨基酸序列的重链可变区 (VH)、以及

(ii) 包含序列号 42 的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

7. 如权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段, 其中, 所述人源化抗体的类别 (亚类) 为 IgG1(λ) 或 IgG2(λ)。

8. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段, 其中, 在 250ng/ml 下比较对人 HMGB1 蛋白的结合活性 (ELISA 法) 时, 所述的人源化抗体或其抗原结合性片段所具有的高活性是 #10-22 嵌合抗体的 2 倍以上。

9. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段, 其中, 将人 HMGB1 蛋白与 RAGE 的结合抑制 50% 的活性 (IC₅₀) 为 5 μ g/mL (约 33nM) 以下。

10. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段, 其中, 将人 PBMC 中由 HMGB1 蛋白刺激引起的 TNF- α 释放抑制 50% 的活性 (IC₅₀) 为 0.02 μ g/mL (约 0.13nM) 以下。

11. 一种药物组合物, 其含有权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段以及药学上可容许的载体。

12. 如权利要求 11 所述的药物组合物, 其用于由从细胞游离出的 HMGB1 诱发的各种 HMGB1 相关疾病的治疗或预防。

13. 如权利要求 10 所述的药物组合物, 其用于疾病的治疗或预防, 所述 HMGB1 相关疾病为脑梗塞、脑水肿、脑血管痉挛、外伤性脑损伤、动脉粥样硬化、神经源性疼痛、败血症、关节炎、急性肺外伤、脑缺血、肾缺血和肝缺血等中的任意一种。

14. 编码权利要求 1 ~ 10 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段的氨基酸序列的分离的核酸、或者在高严格条件下与这些核酸中的任意一种杂交的分离的核酸。

15. 一种重组表达载体, 其整合有权利要求 14 所述的分离的核酸。

16. 一种宿主细胞, 其导入有权利要求 15 所述的重组表达载体。

人源化抗 HMGB1 抗体或其抗原结合性片段

技术领域

[0001] 本发明涉及与 HMGB1 蛋白特异性结合、对 HMGB1 相关疾病的治疗、预防有效的人源化抗 HMGB1 抗体及其抗原结合性片段。

背景技术

[0002] HMGB1(High Mobility Group Box 1,高迁移率族蛋白 1) 是作为与在尚未确立充分的治疗法的脑梗塞、脑血管痉挛、脑外伤、动脉粥样硬化、外伤性脑损伤、败血症、神经源性疼痛及各种关节炎等中迄今为止发现的肿瘤坏死因子和各种白介素等炎症性细胞因子不同的早期炎症介质或迟发型炎症介质被重新发现并作为可能成为这些疾病的治疗法、预防法的标靶而受到广泛关注的蛋白质(非专利文献 1)。

[0003] HMGB1 是在约 40 年前作为普遍存在于真核生物的细胞核内且与染色质结合的非组蛋白蛋白质的一种、在电泳中显示出高迁移率的蛋白质被发现的。最初,作为属于高迁移率族(HMG)蛋白质家族的一种被称为 HMG1(High Mobility Group 1),认为其对染色质结构的维持、转录活性调节和 DNA 修复等发挥重要的功能。之后,作为膜结合性蛋白质(amphoterin)被重新发现,进而作为与各种炎症性疾病相关的炎症介质被屡次发现,2001 年修订了高迁移率蛋白质家族的命名法,将 HMG1 更名为 HMGB1。

[0004] HMGB1 蛋白为由富含赖氨酸残基的 215 个氨基酸构成的 25kDa 的蛋白质,具有在哺乳动物间非常高度保守的氨基酸序列。其结构由 3 个结构域构成,这 3 个结构域由被称为 A-box(或 box-A)和 B-box(或 box-B)的 2 个 DNA 结合结构域、以及仅由天冬氨酸和谷氨酸构成的羧基末端结构域(也称为 C 末端结构域或酸性尾部)构成。A-box 和 B-box 分别由高度保守的约 80 个氨基酸残基构成,带有强正电。B-box 中存在 TLR4(toll-like receptor 4, Toll 样受体 4)结合结构域和 RAGE(receptor for advanced glycation end products, 晚期糖基化终产物受体)结合结构域。通过 HMGB1 与 TLR4 的结合,诱导炎症性细胞因子从巨噬细胞/单核细胞的分泌。通过 HMGB1 与 RAGE 的结合,诱导内皮细胞和其他体细胞(包括肿瘤细胞)的增殖、分化、游走、细胞表面蛋白质的表达。第三结构域、羧基末端具有由仅含天冬氨酸和谷氨酸残基的 30 个氨基酸序列构成的结构,极端地带有负电。关于该 C 末端部分的氨基酸序列,已知在哺乳动物间也仅存在 2-3 个位置的差异,是高度保守的。

[0005] 作为 HMGB1 蛋白的功能,最初认为有染色质结构的维持功能、转录活性调节功能、DNA 修复功能等,特别是在 1999 年由 Tracey 等人的研究小组作为败血症中的迟发型炎症介质被重新发现之后,陆续发现其在各种疾病的炎症性细胞因子级联反应中担负重要的作用。已经阐明, HMGB1 不仅局限于细胞的核内,而且伴随巨噬细胞、各种免疫系统细胞的活化从核内向细胞质转移并向细胞外分泌(主动分泌)。或者,伴随由缺血、损伤引起的细胞的坏死或凋亡,局限于核内的 HMGB1 被迅速释放(被动释放)。近年来, HMGB1、热休克蛋白(HSP)等被认为是内源性损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns :DAMPs)之一,这些分子释放自由由于非微生物性的原因(例如,缺血、外伤等)而产生的损伤细胞。另一方面,来源于细菌的脂多糖(LPS)等被称为病原体相关分子模式

(pathogen-associated molecular patterns :PAMPs),包括微生物来源的各种各样的产物 (product)。在细胞表面和细胞质内这两者中对后者进行识别、应答的受体被称为模式识别受体 (pattern recognition receptors :PRRs),作为其代表性家族,有 Toll 样受体 (TLRs)。但是,TLR 家族的一部分特别是 TLR2、TLR4 和 TLR9 识别、活化上述的 DAMPs。特别是已知 HMGB1 活化 TLR4 信号转导等,诱导炎症反应,产生例如 TNF α 的分泌亢进等。另外,关于作为 HMGB1 的受体之一的 RAGE,在使用 RAGE 敲除动物的研究、使用抑制 RAGE 与 HMGB1 的结合的肽或特异性抗体的研究中显示,在由缺血引起的脑损伤 (非专利文献 2) 和细菌感染所伴随的败血症 (非专利文献 3) 等疾病中,RAGE 介导的炎症信息的传输对该 HMGB1 的炎症反应的增强发挥重要的作用。即,这些释放到细胞外的 HMGB1 经由 TLR4、RAGE 等作为强力的炎症介质起作用,进一步促进目前已知的炎症性免疫应答,由此导致各种严重疾病。

[0006] 这些 HMGB1 相关的疾病 (HMGB1 相关疾病 ;HMGB1-related disease) 大致分为两类。一类为败血症休克这样的可观察到来源于由微生物感染引起的免疫应答的 HMGB1 的细胞外分泌的疾病组,另一类为脑梗塞这样的可观察到起因于由非微生物性原因引起的细胞损伤的 HMGB1 的细胞外释放的疾病组。前者的情况下,例如,由感染产生的细菌来源成分 (细菌性脂多糖 (LPS) 等) 诱导 TLR4 的活化。与此相应,由单核细胞、巨噬细胞等产生主动的 HMGB1 的分泌,作为后期的炎症介质起作用。作为 HMGB1 相关疾病,可以列举败血症、关节炎、动脉粥样硬化、各种感染症和各种免疫疾病等。后者属于如下情况 :伴随着由缺血、外伤引起的细胞坏死,在此之前存在于核中的 HMGB1 在数小时以内被迅速释放到细胞外 (被动释放),作为早期的炎症介质诱导各种炎症性细胞因子的产生,作为相关疾病,可以列举脑梗塞、外伤性脑损伤、由器官移植时的缺血引起的疾病、心肌梗塞等。

[0007] 近年来,作为针对 HMGB1 相关疾病的治疗法或预防法,报道了关于使用 HMGB1 的抗体的方法 (专利文献 1、2、4、5)、使用 HMGB1 蛋白的一部分片段作为拮抗剂的方法 (专利文献 2 和 3)、使用抑制 HMGB1 的分泌的化合物的方法 (非专利文献 4) 等的探索研究等。特别是作为在使用抗 HMGB1 的抗体的动物模型中的治疗法,报道了在败血症 (专利文献 1、4 和 5)、急性肺损伤 (非专利文献 5)、由烧伤引起的结缔组织的损伤 (专利文献 2)、关节炎 (专利文献 4、5 和非专利文献 6)、脑缺血 (非专利文献 7)、淀粉样变性 (专利文献 6)、门静脉内胰岛移植时的肝损伤 (非专利文献 8) 和神经源性疼痛 (非专利文献 9) 等中应用的可能性,但可以说这些研究作为治疗药、预防药的研究都只是刚刚开始。

[0008] 其中,我们揭示了大鼠来源的抗 HMGB1 单克隆抗体在脑梗塞 (专利文献 8、非专利文献 10 和 11)、脑血管痉挛 (专利文献 9)、动脉粥样硬化 (专利文献 10 和非专利文献 12)、外伤性脑损伤 (专利文献 11 和非专利文献 13) 和神经源性疼痛 (非专利文献 9) 的动物模型中是有效的。但是,大鼠来源的抗体存在免疫原性的问题,难以在人体中使用。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献 1 :W02000/047104

[0012] 专利文献 2 :W02002/074337

[0013] 专利文献 3 :W02004/046345

[0014] 专利文献 4 :W02005/026209

[0015] 专利文献 5 :W02007/001422

- [0016] 专利文献 6 :W02008/075788
- [0017] 专利文献 7 :W02012/136250
- [0018] 专利文献 8 :W02007/049468
- [0019] 专利文献 9 :W02007/135992
- [0020] 专利文献 10 :W02011/037227
- [0021] 专利文献 11 :W02012/074043
- [0022] 非专利文献
- [0023] 非专利文献 1 :Annu. Rev. Immunol. , 2011. (vol. 29)p139
- [0024] 非专利文献 2 :J. Neuros. , 2008(vol. 28)p12023
- [0025] 非专利文献 3 :Crit. Care, 2007(vol. 11)pR122
- [0026] 非专利文献 4 :Biochem Pharmacol. 2012p1492
- [0027] 非专利文献 5 :J. Immunol. , 2000(165)p2950
- [0028] 非专利文献 6 :Mol. Med. , 2011(vol. 17)p1039
- [0029] 非专利文献 7 :J. Neurosci. , 2006(vol. 26)p6413
- [0030] 非专利文献 8 :Am. J. Transplant. , 2010(vol. 10)p1588
- [0031] 非专利文献 9 :PLoS One. 2013(vol. 8)e73640
- [0032] 非专利文献 10 :FASEB J. , 2007(vol. 21)p3904
- [0033] 非专利文献 11 :Stroke. , 2011(vol. 42)p1420
- [0034] 非专利文献 12 :Arterioscler Thromb Vasc Biol. , 2011(vol. 31)p313
- [0035] 非专利文献 13 :Ann Neurol. , 2012(72)p373

发明内容

[0036] 发明所要解决的问题

[0037] 抗 HMGB1 抗体作为针对成为在尚未确立充分的治疗法的缺血 / 再灌注损伤、外伤性脑损伤、神经源性疼痛和败血症等中观察到的致死性炎症反应的根源的炎症介质的拮抗剂,潜在有可能成为解开这些疾病的治疗法、预防法上的问题的药剂的可能性,从而受到广泛的关注。其中,我们揭示了大鼠来源的抗 HMGB1 单克隆抗体 (#10-22) 在脑梗塞 (专利文献 8)、脑血管痉挛 (专利文献 9)、动脉粥样硬化 (专利文献 10)、外伤性脑损伤 (专利文献 11) 和神经源性疼痛 (非专利文献 9) 的动物模型中是有效的。但是,大鼠来源的抗体难以在临床中使用,为了将该大鼠抗体用于人,需要将抗体的大鼠部分尽可能地与人抗体进行取代 (人源化) 以减弱抗体的免疫原性,并且需要维持或提高抗原特异性、亲和性、中和活性。

[0038] 用于解决问题的方法

[0039] 其中,获取存在于产生大鼠抗体 #10-22 的杂交瘤中的该大鼠抗体基因,对大鼠抗体 #10-22 的 H 链、L 链、它们的可变区及它们的 CDR 的氨基酸序列进行分析,选出同源性强的人来源的框架,反复进行了多次尝试,结果,成功地制作了抗原特异性、亲和性、体外中和活性与大鼠抗体同等或更高的人源化抗体。

[0040] 已报道了多种人来源的抗 HMGB1 单克隆抗体作为现有技术,作为对 HMGB1 与 RAGE 的结合的抑制活性最高且与 HMGB1 的 C 末端区域结合的人抗体,公开了

G4(WO2007/076200)。另外,作为最有力地抑制HMGB1与TLR4的结合介导的TNF α 从巨噬细胞/单核细胞的分泌诱导的人抗体,公开了S6(WO2007/001422)。但是,确认了本发明的人源化抗体在HMGB1与RAGE的结合抑制活性方面显著高于上述人抗体G4,在体外对HMGB1的TLR4介导的TNF α 分泌诱导的抑制活性方面也显著优于上述人抗体S6,此外,在败血症模型小鼠中也具有高的致死防御效果,从而完成了本发明。

[0041] 即,本发明提供以下[1]~[16]所述的与HMGB1蛋白特异性结合的人源化抗HMGB1抗体及其抗原结合性片段、含有该抗体或其抗原结合性片段的药物组合物等。

[0042] [1]一种人源化抗体或其抗原结合性片段,其与存在于HMGB1蛋白的C末端结构域的氨基酸序列(EEDDDDE(序列号60))特异性结合,所述人源化抗体或其抗原结合性片段中,

[0043] (i)重链可变区(VH)含有:

[0044] (a)包含序列号7的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有1个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和/或添加的突变的氨基酸序列的重链CDR1的氨基酸序列、

[0045] (b)包含序列号8的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有1个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和/或添加的突变的氨基酸序列的重链CDR2的氨基酸序列、以及

[0046] (c)包含序列号9的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有1个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和/或添加的突变的氨基酸序列的重链CDR3的氨基酸序列;

[0047] (ii)轻链可变区(VL)含有:

[0048] (a)包含序列号10的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有1个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和/或添加的突变的氨基酸序列的轻链CDR1的氨基酸序列、

[0049] (b)包含序列号11的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有1个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和/或添加的突变的氨基酸序列的轻链CDR2的氨基酸序列、以及

[0050] (c)包含序列号12的氨基酸序列、或者在其氨基酸序列中具有1个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和/或添加的突变的氨基酸序列的轻链CDR3的氨基酸序列。

[0051] [2]如[1]所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,

[0052] (i)重链可变区(VH)含有:

[0053] (a)包含序列号7的氨基酸序列的重链CDR1的氨基酸序列、

[0054] (b)包含序列号8的氨基酸序列的重链CDR2的氨基酸序列、以及

[0055] (c)包含序列号9的氨基酸序列的重链CDR3的氨基酸序列;

[0056] (ii)轻链可变区(VL)含有:

[0057] (a)包含序列号10的氨基酸序列的轻链CDR1的氨基酸序列、

[0058] (b)包含序列号11的氨基酸序列的轻链CDR2的氨基酸序列、以及

[0059] (c)包含序列号12的氨基酸序列的轻链CDR3的氨基酸序列。

[0060] [3]如[1]或[2]所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,

[0061] (i)重链可变区(VH)含有序列号43、44、45和46的氨基酸序列分别作为FR1、FR2、FR3和FR4的氨基酸序列,其中,FR1、FR2、FR3和FR4的氨基酸序列可以分别在序列号43、44、45和46的氨基酸序列中具有1个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和/或添加的突变,

[0062] (ii)轻链可变区(VL)含有序列号47、48、49和50的氨基酸序列分别作为FR1、

FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列,其中,FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列可以分别在序列号 47、48、49 和 50 的氨基酸序列中具有 1 个~数个氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变。

[0063] [4] 如 [1] ~ [3] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,含有:

[0064] (i) 在重链可变区 (VH) 中至少 49 位和 94 位这两个位置的氨基酸残基为来源于大鼠抗体 #10-22 的 H 的氨基酸残基(均为丙氨酸)的氨基酸序列、

[0065] (ii) 在轻链可变区 (VL) 中至少 44 位和 46 位这两个位置的氨基酸残基为来源于大鼠抗体 #10-22 的 L 链的氨基酸残基(分别为异亮氨酸和精氨酸)的氨基酸序列。

[0066] [5] 如 [1] ~ [4] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,含有:

[0067] (i) 包含与序列号 41 的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH)、以及

[0068] (ii) 包含与序列号 42 的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0069] [6] 如 [1] ~ [5] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,含有:

[0070] (i) 包含序列号 41 的氨基酸序列的重链可变区 (VH)、以及

[0071] (ii) 包含序列号 42 的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0072] [7] 如 [1] ~ [6] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,上述人源化抗体的类别(亚类)为 IgG1(λ) 或 IgG2(λ)。

[0073] [8] 如 [1] ~ [7] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,在 250ng/ml 下比较对人 HMGB1 蛋白的结合活性(ELISA 法)时,所述的人源化抗体或其抗原结合性片段所具有的高活性为 #10-22 嵌合抗体的 2 倍以上。

[0074] [9] 如 [1] ~ [7] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,将人 HMGB1 蛋白与 RAGE 的结合抑制 50% 时的活性(IC₅₀)为 5 μ g/mL(约 33nM) 以下。

[0075] [10] 如 [1] ~ [7] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段,其中,将人 PBMC 的由 HMGB1 蛋白刺激引起的 TNF- α 释放抑制 50% 时的活性(IC₅₀)为 0.02 μ g/mL(约 0.13nM) 以下。

[0076] [11] 一种药物组合物,其含有 [1] ~ [10] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段以及药学上可容许的载体。

[0077] [12] 如 [11] 所述的药物组合物,其用于由从细胞游离出的 HMGB1 诱发的各种 HMGB1 相关疾病的治疗或预防。

[0078] [13] 如 [11] 所述的药物组合物,其用于疾病的治疗或预防,上述 HMGB1 相关疾病为脑梗塞、脑水肿、脑血管痉挛、外伤性脑损伤、动脉粥样硬化、神经源性疼痛、败血症、关节炎、急性肺外伤、脑缺血、肾缺血和肝缺血等中的任意一种。

[0079] [14] 编码 [1] ~ [10] 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合性片段的氨基酸序列的分离的核酸、或者在高严格条件下与这些核酸中的任意一种杂交的分离的核酸。

[0080] [15] 一种重组表达载体,其整合有 [14] 所述的分离的核酸。

[0081] [16] 一种宿主细胞,其导入有 [15] 所述的重组表达载体。

[0082] 发明效果

[0083] 本发明中使用的抗 HMGB1 的大鼠抗体在尚未确立充分的治疗法的脑梗塞、脑血管

痉挛、外伤性脑损伤、动脉粥样硬化和神经源性疼痛等的动物模型中,显示出可成为解开针对这些相关疾病的治疗法、预防法上的问题的药剂的可能性,但由于为大鼠来源的抗体,因此难以在临床中使用。通过在使该大鼠抗体维持抗原特异性的同时维持或提高亲和性、中和活性而制成人源化抗体,使大鼠抗体的免疫原性减弱,由此,能够针对上述多种严重的 HMGB1 相关疾病提供新的治疗法、预防法。

附图说明

[0084] 图 1 示出由 #10-22 杂交瘤克隆的抗体基因产物的与 HMGB1 的反应性。

[0085] 图 2 示出 #10-22 嵌合抗体的与 HMGB1 的反应性。

[0086] 图 3 分别示出大鼠抗体 #10-22 的 L 链可变区、其人源化抗体 (VLhum10-22) 和人 FR(Human_VL) 的氨基酸序列、以及与 #10-22 的 L 链 FR 序列的同源性高的 8 种人来源抗体或种系 (GenBank 登记号 :Z73666、X97474、X97464、BAA20889、Z73647、AY701728、hLV3_cons(人 IGLV3 家族的共有序列 :W02011/080350) 和 JL2-germ(来源于人 λ 链 JL2 种系的序列)) 的 L 链可变区的氨基酸序列。本图中,对于作为 #10-22 的 FR 序列中在上述 8 种人来源序列中未观察到的氨基酸残基“大鼠氨基酸残基”的 14 个位置(图中,在 Human_VL 序列下用“H:human”或“R:rat”的记号表示),将它们全部取代为上述 8 种人 FR 序列的共有序列而得到的 FR 序列为 Human_VL。本图中,VLhum10-22 表示人源化抗体 (EV007156) 的 L 链可变区,44 位和 46 位以外的 FR 氨基酸残基与上述 Human_VL 的序列相同。关于 L 链可变区的 1 位 (1S),已知根据人抗体中使用的信号序列的种类在 S1-Y2 之间被切断,在本发明的人 FR(Human_VL) 和人源化抗体 (VLhum10-22) 中,选择与大鼠抗体 #10-20 的 L 链可变区的 N 末端同样地将“1S”切断的序列。需要说明的是,本图中的氨基酸残基的位置按照 Kabat 的编号法 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 来表示。

[0087] 图 4 示出 #10-22 嵌合抗体 L 链部位取代后的对 HMGB1 的结合性评价。使用固相化有 HMGB1 的酶标板,通过 ELISA 法来实施。作为对照,使用 #10-22 嵌合抗体,算出将其 OD 值设为 100% 时 #10-22 嵌合抗体 L 链部位取代体 (14 种) 对 HMGB1 的结合率。

[0088] 图 5 示出 #10-22 嵌合抗体 L 链人源化后的抗体对 HMGB1 的结合性评价。使用固相化有 HMGB1 的酶标板,通过 ELISA 法来实施。作为对照,使用 #10-22 嵌合抗体,算出将其 OD 值设为 100% 时 #10-22 (L 链) 人源化抗体 (EV007156L) 与 #10-22 嵌合抗体 (H 链) 共表达而得到的抗体对 HMGB1 的结合率。

[0089] 图 6 分别示出大鼠抗体 #10-22 的 H 链可变区、其人源化抗体 (VHhum10-22) 和人 FR(Human_VH) 的氨基酸序列、以及与 #10-22 的 H 链 FR 序列的同源性高的 6 种人来源抗体或种系 (GenBank 登记号 :AM940224、DQ926386、FJ488688、HM855402、DQ840895 和 Z12332) 的 H 链可变区的氨基酸序列。本图中,对于作为大鼠抗体 #10-22 的 FR 序列中在上述 6 种人来源序列中未观察到的氨基酸残基“大鼠氨基酸残基”的 15 个位置(图中,在 Human_VL 序列下用“H:human”或“R:rat”的记号表示),将它们全部取代为上述 6 种人 FR 序列的共有序列而得到的 FR 序列为 Human_VH。本图中,VHhum10-22 表示人源化抗体 (EV007156) 的 L 链可变区,49 位和 94 位以外的 FR 氨基酸残基与上述 Human_VH 的序列相同。需要说明的是,本图中的氨基酸残基的位置按照 Kabat 的编号法 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 来表示。

[0090] 图 7 示出 #10-22 嵌合抗体 H 链部位取代后的对 HMGB1 的结合性评价。使用固相化有 HMGB1 的酶标板,通过 ELISA 法来实施。作为对照,使用 #10-22 嵌合抗体的 H 链,算出将其 OD 值设为 100% 时 #10-22 嵌合抗体 H 链部位取代体 (15 种) 对 HMGB1 的结合率。

[0091] 图 8 示出 #10-22 嵌合抗体人源化后的对 HMGB1 的结合性评价。使用固相化有 HMGB1 的酶标板,通过 ELISA 法来实施。作为对照,使用 #10-22 嵌合抗体的 H 链,算出将其 OD 值设为 100% 时 #10-22 人源化抗体 (EV007156) 对 HMGB1 的结合率。

[0092] 图 9 示出抗 HMGB1 抗体 (#10-22 嵌合抗体、EV007156、S6、G4) 对重组 HMGB1 (Sf9 细胞来源) 的结合性评价。使用固相化有 HMGB1 的酶标板,通过 ELISA 法来实施 (A)。对于各 HMGB1 (牛胸腺来源和 Sf9 细胞来源),以 EV007156 的 OD 值为基准,算出抗体浓度 250ng/ml 下的各 HMGB1 抗体的结合性 (B)。○ :#10-22 嵌合体、■ :EV007156、▲ :S6、□ :G4

[0093] 图 10 示出抑制抗 HMGB1 抗体与 RAGE 的结合作用的效果。根据由 ELISA 得到的 OD 值对 HMGB1 量进行定量后,将结合抑制分析中使用的 HMGB1 量 (2 μg/ml) 设为 100%,算出 HMGB1 与 RAGE 的结合率。○ :#10-22 嵌合体、■ :EV007156、□ :G4、● :对照 Ig

[0094] 图 11 示出抗 HMGB1 抗体对 PBMC 的由 HMGB1 引起的 TNF-α 释放诱导活性的抑制效果。将由外周血得到的 PBMC 用 HMGB1 进行刺激,对 24 小时后得到的培养上清中含有的 TNF-α 的量进行定量 (eBioscience、Human TNF-α Ready-Set-Go!)。● :阴性对照 (EV2001)、▲ :EV007156、* :S6、○ :G4

[0095] 图 12 示出使用 EV007156 的小鼠体内的药物动态试验的结果。将 EV007156 以 10mg/kg 腹腔内给药于 C57BL/6N,利用 ELISA 对在给药后 0.25 天、给药后 3 天、7 天、14 天、24 天采集的血液中含有的 EV007156 进行定量。○ :利用抗人 IgG 固相的 EV007156 的定量、● :利用 HMGB1 固相的 EV007156 的定量

[0096] 图 13 示出 HMGB1 的结构域和制成的缺失构建体。各结构域的氨基酸范围为 -30 ~ 0 :His 标签和接头、1 ~ 88 :A-Box、89 ~ 185 :B-Box、186 ~ 125 :C-tail :186 ~ 125 (数字为自蛋氨酸起的氨基酸数)。分别示出附加有 His 标签的全长 HMGB1 和 6 种缺失构建体的构成结构域。

[0097] 图 14 示出制成的缺失构建体的利用抗 His 抗体的表达确认试验的结果。将附加有 His 标签的全长 HMGB1 和 6 种缺失构建体转染到 CHO-K1 中,使用抗 His 抗体进行染色,确认各缺失构建体的表达。A ~ H 分别表示 A :CHO-K1、B :His-HMGB1 (全长)、C :A-Box+B-Box、D :A-Box+C-tail、E :B-Box+C-tail、F :A-Box、G :B-Box、H :+C-tail。

[0098] 图 15 示出制成的缺失构建体的利用 CBB 染色的表达确认试验的结果。将附加有 His 标签的全长 HMGB1 和 6 种缺失构建体转染到 CHO-K1 中,制备细胞裂解液后,使用 Ni-琼脂糖对表达的蛋白质进行纯化。将各蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,使用 CBB 进行染色。

[0099] 图 16-a 示出利用免疫荧光染色法得到的 EV007156 的表位作图。将全长 HMGB1 和 6 种缺失构建体转染到 CHO-K1 中,使用 EV007156 进行染色,考察 EV007156 识别何种缺失构建体。A ~ H 分别表示 A :CHO-K1、B :His-HMGB1 (全长)、C :A-Box+B-Box、D :A-Box+C-tail、E :B-Box+C-tail、F :A-Box、G :B-Box、H :+C-tail。

[0100] 图 16-b 示出利用免疫荧光染色法得到的 S6 的表位作图。将全长 HMGB1 和 6 种缺失构建体转染到 CHO-K1 中之后,使用 S6 进行染色,考察其识别何种缺失构建体。A ~ H 分别表示 A :CHO-K1、B :His-HMGB1 (全长)、C :A-Box+B-Box、D :A-Box+C-tail、E :B-Box+C-tail、

F:A-Box、G:B-Box、H:+C-tail。

[0101] 图 16-c 示出利用免疫荧光染色法得到的 G4 的表位作图。将全长 HMGB1 和 6 种缺失构建体转染到 CHO-K1 中之后,使用 G4 进行染色,考察其识别何种缺失构建体。A~H 分别表示 A:CHO-K1、B:His-HMGB1(全长)、C:A-Box+B-Box、D:A-Box+C-tail、E:B-Box+C-tail、F:A-Box、G:B-Box、H:+C-tail。

[0102] 图 17-a 示出利用蛋白免疫印迹得到的 EV007156 的表位作图。将全长 HMGB1 和各缺失构建体在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,使用 EV007156 进行检测。

[0103] 图 17-b 示出利用蛋白免疫印迹得到的 S6 的表位作图。将全长 HMGB1 和各缺失构建体在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,使用 S6 进行检测。与 EV007156 不同,识别到含有 B-Box 的区域。

[0104] 图 17-c 示出利用蛋白免疫印迹得到的 G4 的表位作图。将全长 HMGB1 和各缺失构建体在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,使用 G4 进行检测。与 EV007156 不同,识别到含有 B-Box 的区域。

[0105] 图 18 示出利用 HMGB1 的 C 末端区域的合成肽得到的 EV007156 的表位作图。合成 #1~#10 这 10 种肽,通过斑点印迹法检测 EV007156 识别何种肽。形成斑点的肽量一律为 4 μg/斑点。

[0106] 图 19 示出使用败血症模型小鼠的通过给药 EV007156 得到的致死防御效果。对实施了 CLP 的小鼠以 10mg/kg 给药 EV007156,算出至术后 6 天为止的存活率。●:阴性对照组、▲:EV007156 给药组

具体实施方式

[0107] 1. 术语的说明

[0108] 本说明书中,与本发明相关地使用的科学术语和专业术语具有本领域技术人员通常理解的含义。此外,若非在根据上下文判断为特别必要的情况下,则单数术语包含复数,复数术语包含单数。一般而言,本说明书中记载的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、蛋白质与核酸化学以及杂交的技术相关地使用的命名法为该领域中公知且通常使用的命名法。

[0109] 本发明涉及与 HMGB1 蛋白特异性结合、对 HMGB1 相关疾病的治疗、预防有效的人源化抗 HMGB1 抗体及其抗原结合性片段。以下,通过明确本发明中使用的语句的含义来详细地对本发明的具体实施方式进行说明。

[0110] 1)HMGB1 蛋白

[0111] HMGB1 蛋白(或者,有时称为“HMGB1 多肽”)被认为具有染色质结构的维持功能、转录活性调节功能等,但在作为败血症中的迟发型炎症介质被重新发现之后,陆续发现其在各种疾病的炎症性细胞因子级联反应中担负重要的作用。HMGB1 的结构为由富含赖氨酸残基的 215 个氨基酸构成的 25kDa 的蛋白质,具有在哺乳动物间非常高度地保守的氨基酸序列。其结构由 3 个结构域构成,这 3 个结构域由被称为 A-box 和 B-box 的 2 个 DNA 结合结构域、以及仅由天冬氨酸和谷氨酸构成的羧基末端结构域(也称为 C 末端结构域或酸性尾部)构成。A-box 和 B-box 分别由彼此高度保守的约 80 个氨基酸残基构成,带有强正电。B-box 中存在 TLR4(toll-like receptor 4) 结合结构域、RAGE(receptor for advanced

glycation end products) 结合结构域。通过 HMGB1 与 TLR4 的结合,诱导炎症性细胞因子从巨噬细胞/单核细胞的分泌。需要说明的是,在最近的研究中表明,关于由 HMGB1 在体外引起的 TNF- α 等细胞因子的分泌诱导,作为 HMGB1 的受体,有 TLR4/MD2(髓样分化蛋白 2) 复合体以及 CD14 的参与 (Mol. Med., 2013(vol. 19)p88)。另一方面,通过 HMGB1 与 RAGE 的结合,诱导内皮细胞和其他体细胞(包括肿瘤细胞)的增殖、分化、游走、细胞表面蛋白质的表达。第三结构域、羧基末端具有由仅含天冬氨酸和谷氨酸残基的 30 个氨基酸序列构成的结构,极端地带有负电。关于该 C 末端部分的氨基酸序列,已知在哺乳动物间也仅存在 2-3 个位置的差异,是高度保守的。特别是关于 HMGB1 的 RAGE 结合结构域已揭示,在由缺血引起的脑损伤(非专利文献 2)和细菌感染所伴随的败血症(非专利文献 3)等疾病中,通过抑制 HMGB1 与 RAGE 受体的结合,能够抑制 HMGB1-RAGE 介导的 HMGB1 相关疾病中的炎症反应的增强。

[0112] 本说明书中使用的 HMGB1 为哺乳动物来源的 HMGB1(例如,人 HMGB1、牛胸腺 HMGB1 和啮齿类来源的 HMGB1 等),关于它们的氨基酸序列,公开在 GenBank 登记号 CAG33144、GenBank 登记号 CAE48262、GenBank 登记号 CAI15600、NCBI 参考序列登记号 NP_002119 和 UniProtKB/Swiss-Prot 登记号 P09429(以上为人来源)、GenBank 登记号 BC102929(牛胸腺来源)、GenBank 登记号 EGV93351(CHO-K1 细胞来源)和 UniProtKB/Swiss-Prot 登记号 P63159(大鼠来源)等中。本发明的抗体与存在于 HMGB1 蛋白的 C 末端结构域的氨基酸序列((EEEDDDDE(序列号 60)) 特异性结合。不仅在人来源 HMGB1 中,而且在上述牛胸腺来源、CHO 来源和大鼠来源 HMGB1 的 C 末端,也存在与序列号 60 完全相同的氨基酸序列。

[0113] 2)HMGB1 相关疾病

[0114] HMGB1 最初被认为具有染色质结构的维持功能、转录活性调节功能、DNA 修复功能等,但特别是在 1999 年以后作为败血症中的迟发型炎症介质被重新发现之后,陆续发现其在各种疾病的炎症性细胞因子级联反应中担负重要的作用。HMGB1 参与的炎症性细胞因子级联反应成为包括炎症和凋亡在内的多种障碍的有害特性的原因之一,认为其参与如下所述的 HMGB1 相关疾病(HMGB1-related disease)。虽然并非全部,但例如特别为:(i) 在属于炎症性疾病和自身免疫疾病的病症中,有风湿性关节炎/血清反应阴性关节症、变形性关节炎、炎症性肠疾病、克罗恩病、肠梗阻、系统性红斑狼疮、虹膜炎/葡萄膜炎、视神经炎、特发性肺纤维化、全身性血管炎/韦格纳肉芽肿、结节病、睾丸炎/输精管切除术、全身性硬化症和硬皮病。(ii) 在全身性炎症反应综合征中,有败血症综合征(包括革兰氏阳性菌败血症、革兰氏阴性菌败血症、培养阴性败血症、真菌性败血症、发热性中性粒细胞减少、尿路败血症、败血症结膜炎)、脑膜炎菌血症、外伤性出血、口吃、电离放射线暴露、急性和慢性前列腺炎、急性和慢性胰腺炎、阑尾炎、消化道、胃和十二指肠溃疡、腹膜炎、溃疡性、伪膜性、急性和缺血性结肠炎、憩室炎、弛缓不能、胆管炎、胆囊炎、肠炎、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)。(iii) 在再灌注损伤中,有泵衰竭后综合征和缺血再灌注损伤。在心血管疾病中,有心源性晕厥综合征、心肌梗塞和缺血、动脉粥样硬化、静脉血栓症、心内膜炎、心膜炎、充血性心力衰竭和再狭窄。(iv) 在产科和妇科疾病中,有早产、子宫内膜异位症、流产、阴道炎和不孕症。(v) 在感染性疾病中,有 HIV 感染/HIV 周围神经病变、脑膜炎、乙型和丙型肝炎、单纯疱疹病毒感染、败血症性关节炎、腹膜炎、大肠杆菌 0157:H7、肺炎会厌炎、溶血性尿毒症综合征/血栓性血小板减少性紫癜、念珠菌病、丝虫病、阿米巴病、疟疾、登革出血热、利什曼

病、麻风病、毒素性休克综合征、链球菌肌炎、气性坏疽、人型结核杆菌、细胞内鸟型结核杆菌、卡氏肺孢子虫肺炎、骨盆内炎症性疾病、睾丸炎 / 附睾炎、军团菌病、莱姆病、甲型流感病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、病毒相关性噬血细胞综合征、病毒性脑炎 / 无菌性脑膜炎。(vi) 在过敏性和特异性疾病中,有哮喘、过敏、过敏性休克、免疫复合物病、花粉症、过敏性鼻炎、湿疹、过敏性接触性皮炎、过敏性结膜炎、过敏性肺炎。(vii) 在恶性肿瘤(液态和固体肿瘤的病症)中,有 ALL、AML、CML、CLL、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、卡波氏肉瘤、结直肠癌、鼻咽癌、恶性组织细胞病和副肿瘤综合征 / 恶性高钙血症。(viii) 在移植病中,有器官移植排斥反应和移植抗宿主病。(ix) 在先天性疾病中,有囊性纤维化、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症和镰刀形红细胞贫血。(x) 在皮肤疾病中,有银屑病、银屑病关节炎和脱发。在神经疾病中,有神经变性疾病(多发性硬化症、偏头痛、头痛、淀粉样蛋白相关病症、朊病毒病 / 克雅氏病、阿尔海默茨病和帕金森病、多发性硬化症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症)和周围神经病、偏头痛、头痛。(xi) 在肾疾病中,有肾病综合征、血液透析和尿毒症。(xii) 在医源性中毒状态中,有 OKT3 疗法、抗 CD3 疗法、细胞因子疗法、化学疗法、放射线疗法和慢性水杨酸盐中毒。(xiii) 在代谢性或突发性疾病中,有威尔逊氏病、血色素沉着症、 α -1 抗胰蛋白酶缺乏症、糖尿病和糖尿病并发症、体重下降、食欲不振、恶病质、肥胖、桥本氏甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑-垂体-肾上腺系的评价和原发性胆汁性肝硬化。(xiv) 在眼科疾病中,有青光眼、视网膜病和干眼症。(xv) 在其他病症的杂集中,有多器官衰竭综合征、肌营养不良症、败血症性脑膜炎、动脉粥样硬化、会厌炎、惠普尔病、哮喘、过敏、过敏性鼻炎、器官坏死、发热、败血症、内毒素休克、高热症、嗜酸性粒细胞肉芽肿、肉芽肿病、结节病、感染流产、尿道炎、肺气肿、鼻炎、肺泡炎、支气管炎、咽炎、上皮屏障功能障碍、尘肺、胸膜炎、鼻窦炎、流感、呼吸道合胞病毒感染、播散性菌血症、包虫病、皮炎、烧伤、晒伤、荨麻疹、疣(warst)、风团、血管炎、脉管炎、心肌炎、动脉炎、结节性动脉周围炎、风湿热、脂泻病、脑炎、脑血栓、格林-巴利综合征、神经炎、神经痛、医源性并发症 / 末梢神经病变、脊髓损伤、麻痹、葡萄膜炎、关节炎、关节痛、骨髓炎、肌膜炎、佩吉特氏病、痛风、牙周病、滑膜炎、重症肌无力、古德帕斯彻氏综合征、白塞氏综合征、强直性脊柱炎、伯格氏病、莱特尔综合征、大疱性皮炎(大疱性类天疱疮)、类天疱疮和寻常性天疱疮和脱发。

[0115] 近年来已阐明, HMGB1 不仅局限于细胞的核内,而且伴随巨噬细胞、各种免疫系统细胞的活化从核内向细胞质转移并向 HMGB1 细胞外释放(主动释放),或者,伴随由缺血、损伤引起的细胞的坏死,局限于核内的 HMGB1 被迅速释放(被动释放)。即,认为这些 HMGB1 参与的疾病(HMGB1 相关疾病:HMGB1-related disease)大致分为两类。一类为败血症休克这样与由微生物感染引起的免疫应答类似的疾病组,此时,伴随免疫细胞的活化,在炎症反应的后期观察到 HMGB1 的细胞外分泌。另一类为脑梗塞这样起因于由非微生物性原因(例如,缺血、外伤等)引起的细胞损伤等的疾病组,伴随细胞损伤,观察到迅速的 HMGB1 的细胞外释放,由此产生各种细胞因子类。在前者的情况下,例如为从因感染而活化的单核细胞、巨噬细胞等的主动的 HMGB1 的分泌,作为后期的炎症介质起作用。作为相关疾病,可以列举败血症、关节炎、动脉粥样硬化、各种感染症和各种免疫疾病等。后者为如下情况:伴有由缺血、外伤引起的细胞坏死,在此之前存在于核中的 HMGB1 在数小时以内被迅速释放到细胞外(被动释放),作为早期的炎症介质诱导各种炎症性细胞因子的产生,作为相关疾病,可以列举脑梗塞、外伤性脑损伤、由器官移植时的缺血引起的疾病、心肌梗塞等。

[0116] 3) 抗体

[0117] 本说明书中使用的“抗体”这一术语是指,由4条多肽链、即2条重(H)链和2条轻(L)链通过二硫键相互结合而成的分子构成的免疫球蛋白分子。本发明中的单克隆抗体也由包含重链(H链)和轻链(L链)各2条的免疫球蛋白分子构成。各H链由H链可变区(有时称为“HCVR”或“VH”)和H链恒定区(H链恒定区由3个结构域构成,有时将其分别称为“CH1”、“CH2”、“CH3”(统称为CH))构成。各L链由L链可变区(有时称为“LCVR”或“VL”)和L链恒定区(L链恒定区由1个结构域构成,有时称为“CL”)构成,将到各恒定区(也称为不变区)起始之前的部分称为可变区(或者可变区)。

[0118] 重链根据恒定区的差异分为 γ 链、 μ 链、 α 链、 δ 链、 ϵ 链,根据该差异分别形成IgG、IgM、IgA、IgD、IgE这5个种类的类别(同种型)的免疫球蛋白。此外,在人的情况下,IgG存在IgG1~IgG4这4个亚类。另一方面,根据轻链恒定区的差异,分为 κ 链、 λ 链。

[0119] 另一方面,VH和VL在与抗体的结合特异性相关的方面是重要的。抗体主要通过VH和VL的氨基酸残基与靶抗原相互作用,因此,与位于可变区外的序列相比,可变区内的氨基酸序列在各抗体间的差异更大。此外,VH和VL也可以进一步细分为在各种抗体间保持更为恒定的被称为框架区(FR:framework region)的区域和被称为互补决定区(CDR:complementarity determining region)的超可变性区域。VH和VL各自由3个CDR和4个FR构成,它们按照FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序从氨基末端排列至羧基末端(参考图3和6)。

[0120] 另外,FR4在H链可变区的情况下也称为D/J区,在L链可变区的情况下也称为J区。氨基酸在各区域的分配原则上按照Kabat的定义(参考<http://www.bioinf.org.uk/abs/#kabatnum>)来进行。

[0121] 另外,虽然也有本说明书中关于这些抗体的生殖细胞系列(种系)来源的序列的记载,但这些生殖细胞系列来源序列的区分(家族:family)和基因编号的表示主要以VBASE2(<http://www.vbase2.org/vbase2.php>)中记载的“VBASE2ID”的表示为基准。具体而言,例如,关于轻链中的 λ (lambda)链的可变区序列的家族,以IGLV1、IGLV2或IGLV3等来表示,关于这些基因的“VBASE2ID”编号,以humIGLV104(=IGLV3-1*01)和humIGLV079(=IGLV3-25*02)来表示。另外,关于 λ 链的J片段(segment)的家族,以JL1、JL2或JL3等来表示。另外,关于重链的可变区的家族,以IGHV1、IGHV2、IGHV3或IGHV4等来表示,它们的基因编号的表示原则上以VBASE2(<http://www.vbase2.org/vbase2.php>)中记载的“VBASE2ID”的表示为基准,以humIGHV048(=IGHV3-73*01)、humIGHV240(=IGHV3-72)和humIGHV025(=IGHVH-15)来表示。另外,关于H链的J片段的家族,以JH1、JH2、JH3或JH4等来表示。

[0122] 4) 抗体的“抗原结合性片段”(或者仅称为“抗体片段”)

[0123] 本说明书中使用的抗体的“抗原结合性片段”(或者仅称为“抗体片段”)这一术语是指,具有与抗原(HMGB1蛋白)特异性结合的能力的1个或多个抗体的片段(例如VH)。需要说明的是,该片段也包括具有与抗原特异性结合的最低限度的氨基酸序列的肽。作为抗体的“抗原结合性片段”这一术语中包含的结合部分的例子,可以列举(i)Fab片段、(ii)F(ab')₂片段、(iii)由VH和CH1结构域构成的Fd片段、(iv)由抗体的单臂的VL和VH结

构域构成的 Fv 片段、(v) 由 VH 结构域构成的 dAb 片段 (Nature 341:544-546, 1989)、(vi) 具有足以进行特异性结合的框架的分离的互补决定区、(vii) 双特异性抗体、以及 (viii) 多特异性抗体等。需要说明的是,本说明书中,在未特别区分而称为“抗体”的情况下,不仅包含全长的抗体,也包含这些“抗原结合性片段”。

[0124] 这些抗体为与哺乳类 HMGB1 特异性结合的抗体,能够与该 HMGB1 的表位部位或 HMGB1 片段等结合。本说明书中,“抗 HMGB1 抗体”、“能够中和 HMGB1 的抗体”、“抗 HMGB1 蛋白抗体”、“与 HMGB1 的片段特异性结合的抗体”或“能够中和 HMGB1 的生物活性的抗体”都是指通过与 HMGB1 结合而抑制 HMGB1 的生物活性的抗体。

[0125] 5) 与 HMGB1 蛋白结合的抗体或其人源化抗体

[0126] 本发明的抗体为与哺乳类 HMGB1 特异性结合的抗体,特别地,与存在于该 HMGB1 蛋白的 C 末端结构域的氨基酸序列 (EEEDDDDE (序列号 60)) 特异性结合。本说明书中,“抗 HMGB1 抗体”、“能够中和 HMGB1 的抗体”、“抗 HMGB1 蛋白抗体”、“与 HMGB1 的片段特异性结合的抗体”或“能够中和 HMGB1 的生物活性的抗体”都是指通过与 HMGB1 的上述表位部位结合而抑制 HMGB1 的生物活性的抗体。如前所述, HMGB1 的 C 末端氨基酸序列 (序列号 60) 在哺乳动物间也非常高度地保守,在获取针对人 HMGB1 的上述表位的抗体时,不一定要使用人来源的 HMGB1,也可以使用大鼠来源、CHO 来源或牛胸腺来源的 HMGB1 蛋白。

[0127] 需要说明的是,本发明中的抗 HMGB1 的人源化抗体为以上述啮齿类来源抗 HMGB1 抗体为供体、原则上将 CDR 移植到人来源 FR 中而得到的抗体,是指在 FR 序列的一部分中含有啮齿类来源的氨基酸残基,具有与原来的啮齿类来源抗体或其嵌合抗体同等以上的 HMGB1 结合活性或中和活性的全长抗体或其抗原结合性片段。基于本专利申请中公开的表示可变区的氨基酸序列、互补决定区 (CDR) 的氨基酸序列,利用本技术领域中公知的技术,容易得到与 HMGB1 蛋白特异性结合且具有更高的结合活性的人源化抗体、或者免疫原性更低的人源化抗体、或其抗原结合性片段,这些人源化抗体包括在本发明的技术范围内。

[0128] 6) 嵌合抗体和人源化抗体

[0129] “嵌合抗体”这一术语是指,其 L 和 H 链基因典型地由属于不同种属的免疫球蛋白基因通过基因工程方法构建而成的抗体。典型地为将小鼠单克隆抗体来源的可变区部位与人来源的 IgG1 或 IgG4 的恒定区部位结合而成的抗体。通过基因工程的方法进行改造来获取嵌合抗体的典型方法的详细内容公开在 US483457 (Genentech 专利) 等中。“人源化抗体”这一术语是指,含有包含实质上来自人抗体链 (称为受体免疫球蛋白或抗体) 的可变区框架残基和实质上来自小鼠抗体 (也称为供体免疫球蛋白或抗体) 的最少 1 个互补决定区的最少 1 条链的抗体。典型地为将嵌合抗体进一步改造成包含 FR 序列在内接近人序列的结构从而使非人来源抗体在人体内的免疫原性降低的方法,代表性的改造方法公开在 EP0239400 ;MRC 专利、W090/07861 ;Protein Design Labs 专利或 EP0626390 ;Celltech 专利) 等中。在进行人源化、即向人可变区的 FR 中插入小鼠 CDR 时,需要提高保持正确的空间定位 (spacial orientation) 的可能性。为了实现这一点,所使用的人抗体的可变区的 FR 的序列通过如下方法获得:从与供体可变区的 FR 序列具有高度的序列同一性的人抗体获得 FR 序列。此时,作为所使用的人抗体序列,有使用天然存在的人抗体的序列的情况、或者使用人抗体的共有序列或生殖细胞系列 (种系) 来源序列等的情况等。

[0130] 7) 等效物

[0131] 在本发明的抗体的氨基酸序列中缺失、取代、插入、添加 1 个或数个氨基酸残基、或者发生了上述任意 2 种以上的组合的突变、且保持了原抗体的活性（例如：对抗原的结合能力）的物质与本发明为等效物。这种情况下，可以在同一序列中的任意的 1 个或多个氨基酸序列中的位置具有 1 个或数个氨基酸残基的缺失、取代、插入或添加，也可以同时发生缺失、取代、插入和添加中的 2 种以上突变。

[0132] 构成自然界的蛋白质的氨基酸可以根据其侧链的特性来分组，例如，作为具有同样特性的氨基酸组，可以分为：芳香族氨基酸（酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸）、碱性氨基酸（赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性氨基酸（天冬氨酸、谷氨酸）、中性氨基酸（丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺）、具有烃链的氨基酸（丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸）、以及其他氨基酸（甘氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸）的组等。

[0133] 作为将非天然型氨基酸也包括在内的可相互取代的氨基酸残基的例子，还有如下所述的分组法，同一组中所含的氨基酸残基可相互取代。A 组：亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、蛋氨酸、邻甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸；B 组：天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸；C 组：天冬酰胺、谷氨酰胺；D 组：赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙酸；E 组：脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸；F 组：丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸；G 组：苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸。

[0134] 本说明书中，在对抗体序列的某一部位的氨基酸残基进行取代的情况下，例如使用“ANB”的文字来表示。此时，“N”为该取代部位的编号（用 Kabat 编号法来表示），“A”为将取代前的氨基酸残基用 1 个字母来表示，“B”为将取代后的氨基酸残基用 1 个字母来表示。

[0135] 氨基酸序列、碱基序列的同一性可以使用 Karlin 和 Altschul 的算法 BLAST (PNAS, 1990 (vol. 87) p2264 ; PNAS, 1993 (vol. 90) p5873) 来确定。已开发了基于 BLAST 算法的称为 BLASTN、BLASTX 的程序 (J Mol Biol, 1990 (vol. 215) p403)。在使用 BLASTN 对碱基序列进行分析的情况下，参数例如设定为分数 (score) = 100、字长 (wordlength) = 12。另外，在使用 BLASTX 对氨基酸序列进行分析的情况下，参数例如设定为分数 (score) = 50、字长 (wordlength) = 3。在使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序的情况下，使用各程序的默认参数。或者，在求取蛋白质的氨基酸序列的同一性时，也可以将所比较的 2 种蛋白质的氨基酸序列并排，通过目视计数作为相同的氨基酸残基的部分的数量，通过“(相同的氨基酸残基数 / 蛋白质全长的氨基酸残基数) × 100 (%)”求出蛋白质的氨基酸序列的同一性。

[0136] 2. 本发明中抗体产生杂交瘤的制作方法

[0137] 为了使用上述 HMGB1 抗原蛋白质来制作本发明中使用的大鼠来源的单克隆抗体产生杂交瘤，使用该抗原对大鼠进行免疫，从该动物采集淋巴细胞，按照常规方法使其与骨髓瘤细胞融合而获取杂交瘤，由此能够得到产生大鼠抗 HMGB1 单克隆抗体的杂交瘤。

[0138] 即，首先，例如，使用牛胸腺来源 HMGB1 与完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂的混合物作为免疫原对大鼠进行免疫。免疫时的免疫原的给药方法可以为皮下注射、腹腔内注射、静脉内注射、肌肉内注射中的任意一种，但优选皮下注射或腹腔内注射。免疫可以进行 1 次或者以适当的间隔进行多次，优选以 1 周至 5 周的间隔进行多次。接着，按照常规方法从免疫后的动物采集淋巴结，使从其中以无菌方式得到的淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行细

胞融合,通过 ELISA 法等确认对 HMGB1 的结合性,反复进行目标抗体产生杂交瘤的克隆操作,由此能够得到单克隆的抗体产生细胞。

[0139] 3. 获取本发明的大鼠抗体的基因的步骤

[0140] 按照常规方法从产生大鼠抗体的杂交瘤细胞中纯化总 RNA,接着合成 cDNA。由所得到的 cDNA 使用各自的引物进行 PCR 来扩增全长的 H 链和 L 链的抗体基因,由此获取各自的基因片段。将这些基因片段连接到真核细胞表达用载体中,由此能够克隆该抗体的基因。对于这些抗体的 H 链和 L 链的氨基酸序列,利用 ABI 测序仪确认编码上述氨基酸序列的质粒载体的碱基序列,基于此,能够确定该抗体的氨基酸序列。

[0141] 4. 人源化抗体的获取方法

[0142] 以下,记述从啮齿类抗体制作人源化抗体的情况的一例。以下记载的方法为人源化的原则上的方法,当然也可以为该方法的变法。例如,首先,按照“Kabat 等的定义”和/或“Chothia 的定义”确定大鼠抗体的可变区中的互补决定区(CDR)的氨基酸。将该大鼠抗体的 CDR 序列移植到作为受体的人抗体 FR 中,设计具有大鼠抗体的 CDR 和人抗体的 FR 的可变区氨基酸序列。设计编码该可变区氨基酸序列的 DNA 的碱基序列,利用 PCR 法和基因重组技术制作具有所设计的核酸序列的可变基因片段。然后,将该可变区基因与人抗体的适当类别的恒定区基因、优选 IgG 类的抗体的恒定区基因连接,制作人源化抗体基因。接着,将该人源化抗体基因连接到适当的表达载体中,并导入培养细胞中。最后,对该培养细胞进行培养,从培养上清中能够得到人源化抗体。

[0143] 上述人源化抗体的制作方法中,大鼠抗体的可变区基因中的互补决定区基因可以从基于上述的“Kabat 的定义”的互补决定区的范围内确定。但是,本说明书中,仅对于 H 链的 CDR1,将同时符合“Kabat 的定义”和“Chothia 的定义”这两种定义的区域作为 CDR1 来处理。另外,可变区的氨基酸残基的位置表示按照 Kabat 的编号法(参考 <http://www.bioinf.org.uk/abs/#kabatnum> 和 <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)来表示。

[0144] 另一方面,作为成为模板的人抗体的框架区基因,例如从人抗体或人抗体的种系、人抗体种系的共有序列等中选择与上述大鼠抗体的框架区的氨基酸序列的同源性高的序列,通过常规方法制作编码该氨基酸序列的碱基序列,并使用该碱基序列即可。

[0145] 将上述的大鼠抗体的互补决定区基因与作为模板的人抗体的框架区基因连接,进而,将该基因片段与人抗体的恒定区基因连接,制作人源化抗体基因(以下仅称为“人源化抗体基因”)。

[0146] 需要说明的是,一般而言,在仅取代了互补决定区的氨基酸而得到的人源化抗体的情况下,抗原结合活性大多比原来的大鼠抗体大幅降低。因此,多采用将供体的大鼠的抗体和互补决定区周围的若干个氨基酸合并移植等方法。上述的人源化抗体具有与原大鼠抗体同等或更高的抗原结合活性,并且与大鼠抗体相比消除了引起抗原性、半衰期缩短等问题。但是,关于用于获取具有与原来的大鼠抗体同等以上的结合活性或中和活性等的人源化抗体的氨基酸取代,没有定律,要求进行多次的反复尝试。

[0147] 5. 本发明的人源化抗体或其抗原结合性片段

[0148] 本发明在一个实施方式中提供与 HMGB1 特异性结合且能够中和 HMGB1 的生物活性的人源化抗体或其抗原结合性片段(以下称为本发明的抗体)。如本发明中所示,示出了大鼠抗 HMGB1 抗体(#10-22)、其嵌合抗体及其人源化抗体的氨基酸序列的序列号、以及作

为人 FR 序列的参考的人抗体序列或者人生殖细胞系列（种系）来源氨基酸序列的序列号（表 1、2 和 3）。

[0149] 作为本发明的人源化抗体或其抗原结合性片段，包括包含表 3 中序列号所示的 EV007156 的全长、可变区或框架区的氨基酸序列的人源化抗体及其抗原结合性片段、以及包含与这些氨基酸序列等效的氨基酸序列的人源化抗体及其抗原结合性片段。

[0150] [表 1]

[0151] (表 1) 大鼠 #10-22 抗体相关的氨基酸序列的序列编号

[0152]

大鼠#10-22抗体						
	全长 (+信号)	全长 (-信号)	可变区序列	CDR序列(氨基酸序列)		
				CDR1	CDR2	CDR3
H链	1	3	5	7	8	9
L链	2	4	6	10	11	12

[0153] [表 2]

[0154] (表 2) 人来源可变区的氨基酸序列等的序列编号

[0155]

可变区	序列编号	序列名称(登记号): 部位
L区	15	Z73666
	16	X97474
	17	X97464
	18	BAA20889
	19	Z73647
	20	AY701728
	21	hLV3_cons;FR1
	22	hLV3_cons;FR2
	23	hLV3_cons;FR3
	24	JL2-germ
VH区	29	AM940224
	30	DQ926386
	31	FJ488688
	32	HM855402
	33	DQ840895
	34	Z12332

[0156] [表 3]

[0157] (表 3) 嵌合抗体、Human_VH、VL 和人源化抗体 (EV007156) 的氨基酸序列编号

[0158]

	嵌合抗体	Human_VH或VL				EV007156					
		全长	FR1	FR2	FR3	FR4	全长	可变区	FR1	FR2	FR3
H链	13	35	36	37	38	39	41	43	44	45	46
L链	14	25	26	27	28	40	42	47	48	49	50

[0159] 考察 GenBank 等中登记的 IGLV3- 家族的 L 链可变区时，可以发现多数情况下报道了其 N 末端以“S”起始，但在 IGLV3- 家族的序列中，在选择 3j 的氨基酸序列 (MAWTALLSLLAHFTGSVA) 或 3r 的氨基酸序列 (MAWIPLFLGVLAYCTGSVA) 作为信号序列的情况下，有时也在 2 位的“Y”的前面被切断，因此，本发明中，作为人源化的模板的人 FR 序列（序列号 25 ~ 28；图 3 中表示为 Human_VL），选择了 1 位的“Y”被切断后的序列。

[0160] 本发明的优选的抗体或抗原结合性片段例如为如下的人源化抗体或其抗原结合性片段的情况：轻链的可变区含有 (a) 包含序列号 7 的氨基酸序列的重链 CDR1 的氨基酸序列、(b) 包含序列号 8 的氨基酸序列的重链 CDR2 的氨基酸序列和 (c) 包含序列号 9 的氨基酸序列的重链 CDR3 的氨基酸序列、以及轻链的可变区含有 (a) 包含序列号 10 的氨基酸序列的轻链 CDR1 的氨基酸序列、(b) 包含序列号 11 的氨基酸序列的轻链 CDR2 的氨基酸序列和 (c) 包含序列号 12 的氨基酸序列的轻链 CDR3 的氨基酸序列。但是，只要是与存在于 HMGB1 的 C 末端结构域的序列号 60 所示的氨基酸序列 (EEEDDDDE) 特异性结合且能够中和其生物活性的单克隆抗体，则不需要仅限于上述 CDR 序列的组合，可是在序列号 7~12 这 6 个 CDR 序列中具有 1 个~数个（具体而言为 1~9 个、1~8 个、1~7 个、1~6 个、1~5 个、1~4 个、1~3 个、1~2 个或 1 个）氨基酸残基的缺失、取代、插入、添加或者其中任意 2 种以上突变的组合的氨基酸序列。如果考虑到本发明为人源化抗体，则作为本发明的更优选的方式，当然优选 6 个 CDR 序列以及至少 H 链的 49 位和 94 位及 L 链的 44 位和 46 位这 4 个位置的氨基酸残基为小鼠来源，但除此以外的部分的 FR 的氨基酸序列为人源序列。

[0161] 将本申请发明中 L 链可变区的人 FR 序列 (human_VL；序列号 25~28 (依次为 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的序列)) 部分与人 λ (lamda) 链生殖细胞系列的 LV3 家族来源的序列进行比较时，相当于 FR1、2 和 3 的部分与人 λ (lamda) 链 IGHLV3 家族生殖细胞系列的 humIGLV104 (= IGLV3-1*01)、humIGLV034 (= IGLV3-25*03)、humIGLV079 (= IGLV3-25*02)、humIGLV135、humIGLV094 (= IGLV3-10*01) 和 humIGLV077 (= IGLV3-27*01) (基因编号由“VBASE2ID”表示) 的同一性高，仅有几个残基 (少于 10 个) 的差异。另外，IGLV3 的共有序列 (例如，参考 W02011/080350) 中，与上述 Human_VL 也仅有几个氨基酸残基的差异。另一方面，相当于人 FR 序列的 FR4 的部分 (序列号 28) 的氨基酸序列与人 λ (lamda) 链生殖细胞系列 J 片段的 JL2 (序列号 22；GenBank 登记号 M15641)、JL3 (VVFGGGKLTVL) 和 JL7 (AVFGGGTQLTVL) 的氨基酸序列一致。关于本申请说明书中的 H 链可变区的人 FR 序列 (序列号 35~38；图 6 中表示为 Human_VH)，与人 H 链生殖细胞系列的 IGHV3 家族来源的序列进行比较时，相当于 FR1、2 和 3 的部分的序列与 humIGHV048 (= HV3-73*1；GenBank 登记号 L15467) 和 IGHV3-73*2 (GenBank 登记号 AM940224) 100% 一致。此外，在 IGHV3 家族内考察与 humIGHV048 的同一性高的序列时，可以列举 humIGHV025、humIGHV178、humIGHV215 和 humIGHV240 (均为 VBASE2ID)，与 humIGHV048 所编码的氨基酸序列仅在 5 个位置以下的氨基酸残基观察到差异，在 IGHV3 家族内存在多个具有高同一性的生殖细胞系列的序列。IGHV3 的共有序列 (例如，参考 W02011/080350) 与上述 Human_VH 也仅有几个氨基酸残基的差异。另外，关于 Human_VL 中的 FR4 部分的序列 (WGQGLTVTVSS)，与人 H 链生殖细胞系列 J 片段的 JH1、JH4 和 JH5 一致 (参考 GenBank 登记号 J00256)。

[0162] 鉴于上述情况，作为本发明的更优选的方式，只要是与存在于 HMGB1、优选存在于 HMGB1 的 C 末端结构域的序列号 60 所示的氨基酸序列 (EEEDDDDE) 特异性结合且能够中和其生物活性的单克隆抗体或其抗原结合性片段，则下述的人源化抗体或其抗原结合性片段也包含在本发明中：(i) 在重链可变区 (VH) 中，含有序列号 7、8 和 9 的氨基酸序列作为 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列，含有序列号 43、44、45 和 46 的氨基酸序列作为 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列，其中，FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列可以分别在序列号 43、

44、45 和 46 的氨基酸序列中具有 1 个~数个（具体而言为 1~9 个、1~8 个、1~7 个、1~6 个、1~5 个、1~4 个、1~3 个、1~2 个或 1 个）氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变；

[0163] (ii) 在轻链可变区 (VL) 中, 含有序列号 10、11 和 12 的氨基酸序列作为 CDR1、CDR2 及 CDR3 的氨基酸序列, 含有序列号 47、48、49 和 50 的氨基酸序列作为 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列, 其中, FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列可以分别在序列号 47、48、49 和 50 的氨基酸序列中具有 1 个~数个（具体而言为 1~9 个、1~8 个、1~7 个、1~6 个、1~5 个、1~4 个、1~3 个、1~2 个或 1 个）氨基酸残基的缺失、取代、插入和 / 或添加的突变。上述的 FR 序列中, 在 H 链的情况下, 进一步优选至少 49 位和 94 位这 2 个位置的氨基酸残基为大鼠抗体 #10-22 来源的氨基酸残基的序列, 在 L 链的情况下, 进一步优选至少 44 位和 46 位这 2 个位置的氨基酸残基为大鼠抗体 #10-22 来源的序列的序列。进而, 最优选为分别含有包含序列号 33 的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和包含序列号 34 的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 中所含的 FR 序列的人源化抗体或其抗原结合性片段。这种情况下, 只要是与存在于 HMGB1 的 C 末端结构域的序列号 60 所示的氨基酸序列 (EEEDDDDE) 特异性结合且能够中和其生物活性的单克隆抗体, 则含有包含与序列号 33 的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和包含与序列号 34 的氨基酸序列具有 90% 以上的同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 的人源化抗体或其抗原结合性片段也包含在本发明中。

[0164] 另外, 作为本申请发明的人源化抗体, 优选的类别 (亚类) 为 IgG1(λ) 和 IgG2(λ) 等, 但 IgG3(λ) 和 IgG4(λ) 也包含在本发明中。

[0165] 6. 编码本发明的抗体等的核酸

[0166] 根据本发明的另一个实施方式, 下述核酸以及与该核酸具有高同一性的分离的核酸也包含在本发明中: 该核酸为编码与存在于 HMGB1、优选存在于 HMGB1 的 C 末端结构域的序列号 60 所示的氨基酸序列 (EEEDDDDE) 特异性结合且能够中和其生物活性的人源化抗体或其抗原结合性片段的核酸 (核苷酸), 其编码序列号 7~9 的组、10~12 的组、39、40、41 或 42 中的任意一个氨基酸序列。在此, “具有高同一性”是指能够在高严格条件下与预定的核酸序列杂交的程度的序列同一性, 例如是指具有 60%、70%、80%、90%、或 95% 或更高的同一性。提供从在高严格条件下杂交的核酸中选择出来的分离的核酸。上述核酸优选为 DNA 或 RNA, 更优选为 DNA。

[0167] “在高严格条件下”例如为 $5\times$ SSC、 $5\times$ 邓哈特 (Denhardt's) 溶液、0.5% SDS、50% 甲酰胺、50°C 的条件 (例如, 参考 J. Sambrook 等的 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (分子克隆实验指南), 第二版, 冷泉港实验室出版社 (1989), 特别是 11.45 节 “Conditions for Hybridization of Oligonucleotide Probes (寡核苷酸探针的杂交条件)”)。在这些条件下, 越提高温度, 越可以期待高效地得到具有高同一性的多核苷酸 (例如, DNA)。其中, 作为影响杂交的严格度的要素, 考虑有温度、探针浓度、探针的长度、离子强度、时间、盐浓度等多个要素, 本领域技术人员可以通过对这些要素进行适当选择来实现同样的严格度。

[0168] 作为上述在高严格条件下杂交的核酸, 包含与编码氨基酸序列的核酸具有例如 70% 以上、80% 以上、90% 以上、95% 以上、97% 以上或者 99% 以上的同一性的核酸。

[0169] 碱基序列的同一性可以利用上述的同一性检索算法等来确定 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990 ;Proc Natl Acad Sci USA 90:5873, 1993)。

[0170] 需要说明的是,本发明中,作为人源化抗 HMGB1 抗体,优选的核酸为编码序列号 39 或 41 的氨基酸序列中的任意一个序列的分离出的基因、或者编码序列号 40 或 42 的氨基酸序列中的任意一个序列的分离出的基因、或者在高严格条件下与这些核酸 (DNA) 中的任意一种杂交的分离的核酸。进而,作为更优选的核酸,为同时编码序列号 41 和 42 的氨基酸序列的分离的核酸 (DNA),作为最优选的核酸之一,为同时编码序列号 39 和序列号 40 的氨基酸序列的分离的核酸。

[0171] 7. 本发明的载体、宿主细胞和抗体的制作方法

[0172] 本发明还涉及整合有上述核酸的载体和导入有该载体的宿主细胞、以及使用该载体和该宿主细胞的抗体的制作方法。

[0173] 本发明的抗体也可以作为使用公知的方法得到的重组人抗体来制作 (参考 Nature, 312:643, 1984、Nature, 321:522, 1986 等)。例如,本发明的抗体可以通过如下方法来制作:对导入有本发明的载体的宿主细胞进行培养,从培养上清等中纯化所产生的抗体。更具体而言,可以通过如下方法来制作:将编码 VH 和 VL 的 cDNA 分别插入到含有由同一细胞或不同的人细胞制作的编码人抗体 CH 和 / 或人抗体 CL 的基因的动物细胞用表达载体中,构建人抗体表达载体,导入动物细胞中使其进行表达。

[0174] 作为用于整合编码本发明的抗体的 VH 或 VL 的核酸的载体,不一定是限定的,优选在蛋白质基因等的表达中通用、特别适合于抗体基因的表达的载体或高表达用载体。作为优选的例子,可以列举含有 EF 启动子和 / 或 CMV 增强子的载体。另外,通常分别制作整合有编码 VH 或 VL 的核酸的表达载体并将其共转染到宿主细胞中,但也可以整合到单一的表达载体中。

[0175] 作为用于导入表达载体的宿主细胞,不一定是限定的,优选在蛋白质基因等的表达中通用、特别适合于抗体基因的表达的细胞。例如,可以列举细菌 (大肠杆菌等)、放线菌、酵母、昆虫细胞 (SF9 等)、哺乳类细胞 (COS-1、CHO、骨髓瘤细胞、YB2/0 细胞等)。

[0176] 为了在工业上生产重组抗体,一般利用稳定地高产该抗体的重组动物细胞株、例如 CHO 细胞株。这种重组细胞株的制作、克隆化、用于高表达的基因扩增和筛选可以使用公知的方法 (例如,参考 Omasa T. :J. Biosci. Bioeng. , 94, 600-605, 2002 等)。

[0177] 本发明除了包含由 2 条重链和 2 条轻链构成的抗体以外,还包含本发明的抗体的抗原结合性片段。作为抗原结合性片段,例如有 Fab (fragment of antigen binding, 抗体结合片段)、Fab'、F(ab')₂, 作为将抗体的活性片段用接头等结合而成的片段,例如有单链抗体 (single chain Fv :scFv)、二硫键稳定化抗体 (disulfide stabilized Fv :dsFv), 作为含有抗体的活性片段的肽,例如可以列举含有 CDR 的肽。这些片段可以通过将本发明的抗体用适当的蛋白分解酶进行处理的方法或者基因重组技术等公知的方法来制造。

[0178] 抗体的纯化可以使用盐析法、凝胶过滤法、离子交换层析法或亲和层析法等公知的纯化手段来进行。具体而言,为了纯化抗 HMGB1 抗体,可以使筛选出的细胞在培养皿、转瓶、2 升的旋转烧瓶或其他培养体系中增殖。将所得到的培养上清过滤、浓缩后,供于利用蛋白 A 或蛋白 G-琼脂糖 (GE Healthcare 公司) 等的亲和层析,能够对该蛋白质进行纯化。将缓冲液更换为 PBS,通过 OD280 或优选通过浊度仪分析,能够判定浓度。同种型可以通过对

同种型抗原具有特异性的方法来考察。这样得到的人源化抗 HMGB1 抗体与大鼠抗体相比,可以期待对抗体的免疫原性低。

[0179] 可以通过近年来开发的抗体的糖链部分的修饰、恒定区的修饰、取代来获得对效应活性进行了修饰的抗体等,这样得到的人源化抗体也属于本发明的技术范围。另外,若是应用为了对该抗体附加耐蛋白酶能力、使抗体能够口服给药而进行的 Fc 片段的部分取代技术(参考 W02006/071877)而得到的抗体或其抗原结合性片段,则也属于本发明的技术范围内。

[0180] 8. 含有本发明的抗体的药物组合物

[0181] 接下来,本发明提供含有上述抗体或其抗原结合部分以及药学上可容许的载体的、用于治疗或预防 HMGB1 相关疾病的药物组合物。

[0182] 特别地,本发明的人源化抗 HMGB1 抗体或其抗原结合性片段与 HMGB1 特异性结合且具有中和 HMGB1 的生物活性的高活性,因此,作为 HMGB1 相关的疾病的预防或治疗药有用。本说明书中使用的“作为药品可容许的载体”包括生理学上可适合的任意的或全部的溶剂、分散介质、包衣剂、等渗剂和吸收延缓剂等。作为药品可容许的载体的例子包括水、盐类溶液、磷酸缓冲生理盐水、右旋糖、甘油、乙醇等中的 1 种或多种、以及它们的组合。在以注射剂等的形式使用的情况下,优选在组合物中含有 pH 调节剂、等渗剂,例如糖、甘露醇、山梨醇等多元醇或氯化钠。作为药品可容许的载体中可以进一步含有润湿剂、乳化剂、防腐剂、缓冲剂、稳定剂等增强抗体或抗体部分的保存性或有效性的少量的辅助物质。

[0183] 本发明的组合物可以制成各种剂型。这样的组合物包括例如溶液(例如可注射、可输液的溶液)或分散液、悬浊液、片剂、胶囊、含片、丸剂、粉末、脂质体、栓剂等液体、半固体、固体的剂型。优选的形式根据所需的给药方式和治疗的适用例而不同。一般而言,优选的组合物为与用于使用其他抗体对人进行被动免疫的组合物同样的组合物等可注射或可输液的溶液的形式。优选的给药方式为非口服方式(例如经由静脉内、皮下、腹腔内、肌肉内)。在优选的实施方式中,抗体通过静脉输液或静脉注射来给药。在另一优选的实施方式中,抗体通过肌肉内注射或皮下注射来给药。

[0184] 本发明的抗体和抗体片段可以掺入到适合于非口服给药的药品组合物中。抗体或抗体部分在使用单一种类的情况下,优选制备成含有 0.1 ~ 250mg/mL 的抗体的可注射的制剂。另一方面,在混合使用多个种类的抗体的情况下,优选制备成含有 0.001 ~ 100mg/mL 的抗体的可注射的制剂。需要说明的是,该多个种类的抗体的混合比例可以适当设定。

[0185] 可注射的制剂可以通过将有效成分溶解于液体而成的制剂或者将有效成分冷冻干燥而成的制剂装入透明玻璃瓶、棕色玻璃瓶、安瓿瓶或预充式注射器而构成。缓冲剂可以使用 pH5.0 ~ 7.0(最佳的情况下为 pH6.0)的 L-组氨酸(1 ~ 50mM)、最佳的情况下为 5 ~ 10mM 的 L-组氨酸。其他适当的缓冲剂包括琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾,但不限于这些。为了改变浓度为 0 ~ 300mM 的溶液(就液体剂型而言,最佳的情况下为 150mM)的渗透压,可以使用氯化钠。冷冻干燥的剂型中可以含有冷冻保护物质,主要为 0 ~ 10%(最佳的情况下为 0.5 ~ 5.0%)的蔗糖。其他适当的冷冻保护物质包括甘露醇、海藻糖和乳糖。冷冻干燥的剂型中可以含有增量剂,主要为 1 ~ 10%的甘露醇(最佳的情况下为 2 ~ 4%)。液体和冷冻干燥的剂型这两者中可以使用稳定剂,主要为 1 ~ 50mM(最佳的情况下为 5 ~ 10mM)的 L-蛋氨酸。其他适当的稳定剂包括甘氨酸、精氨酸和聚山梨醇酯 80 等,在

聚山梨醇酯 80 的情况下,可以含有 0 ~ 0.05% (最佳的情况下为 0.005 ~ 0.01%)。其他表面活性剂包括聚山梨醇酯 20 和 BRIJ 表面活性剂,但不限于这些。

[0186] 本药物组合物通常在制造和储存的条件下必须无菌或稳定。该组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。无菌的可注射的溶液可以通过将所需量的活性化合物(即,抗体或抗体部分)根据需要与上述成分中的 1 种或组合一同混合到适当的溶剂中、然后进行过滤灭菌来制备。通常,将活性化合物混合到含有基本的分散介质和选自上述列举的成分中的必要的其他成分的无菌载体(vehicle)中,由此制备分散液。在用于制备无菌的可注射的溶液的无菌粉末制剂的情况下,优选的制备方法为如前所述的该灭菌过滤溶液的冷冻真空干燥和喷雾干燥,由此,得到除了活性成分的粉末以外还含有任意的其他期望成分的组合物。溶液的适当的流动性例如可以通过如下方法来维持:使用卵磷脂等的包衣;另外,在分散液的情况下,维持所需的粒度;另外,使用表面活性剂。可注射的组合物长时间的吸收可以通过在该组合物中含有延缓吸收的药剂例如单硬脂酸盐、明胶来进行。

[0187] 9. 评价在体外的活性的步骤

[0188] 抗体或抗体组合物的生物学特性可以通过试验该抗体在体外抑制 HMGB1 的生物活性的能力来评价。抗体的体外评价包括 ELISA 等结合分析法和中和分析法等。

[0189] 1) 结合活性

[0190] 在此,“特异性结合”或“特异性的结合”是指识别预定的抗原并与其结合。测定抗体与 HMGB1 的结合亲和性可以使用公知的方法。例如,可以使用固定化于芯片上的 F 蛋白,通过 Biacore T200(注册商标)这样的蛋白质相互作用分析装置来测定。结合亲和性(K_D 值)用该测定法中得到的 K_d (解离常数)与 K_a (结合常数)之比($K_D = K_d/K_a$)来表示。制作固相化有人来源 HMGB1 抗原的酶标板,通过 ELISA 法,也可以考察抗原结合活性的差异。

[0191] 作为本发明的人源化抗体或其抗原结合性片段的、在 250ng/ml 下比较对人来源 HMGB1 蛋白(重组)的结合活性(ELISA 法)时具有 #10-22 嵌合抗体的 1.5 倍以上、优选 2 倍以上、最优选 2.5 倍以上的高活性的人源化抗体或其抗原结合性片段也包含在本发明中。另外,在通过相同的方法与人抗 HMGB1 抗体 G4(WO2007/001422) 进行比较时具有 G4 的 5 倍以上、优选 10 倍以上、更优选 20 倍以上的高活性的人源化抗体或其抗原结合性片段也包含在本发明中。

[0192] 2) RAGE 结合抑制活性

[0193] 抗 HMGB1 抗体的 RAGE 结合抑制活性例如可以使用 RAGE-Fc 来评价。制作固相化有 RAGE-Fc 的酶标板,将一定量的 HMGB1 与各种浓度的抗 HMGB1 抗体(#10-22、EV007156、G4)混合、孵育,检测与 RAGE 结合的 HMGB1 量,由此,可以考察各种抗体抑制 HMGB1 与 RAGE 的结合的活性。需要说明的是,在迄今为止报道的人单克隆抗体中,显示 G4 具有最高的 RAGE 结合抑制活性(WO2007/001422)。

[0194] 3) 人 PBMC 中的 TNF- α 释放抑制活性

[0195] 抗 HMGB1 抗体的 TNF- α 释放抑制活性可以使用人的外周血单个核细胞(PBMC)来评价。从正常人分离 PBMC,考察抗 HMGB1 抗体的添加能否抑制用 HMGB1 刺激时观察到的 TNF- α 的释放量。如果考虑到在体外由 HMGB1 引起的 TLR4 信号转导系统的活化时共存有 MD2、CD14 等,则可以说该使用人 PBMC 的体外评价法与单纯地评价抗 HMGB1 抗体对 TLR4 分

子与 HMGB1 的结合的抑制效果的方法相比是更有意义的评价系统。

[0196] 10. 评价在体内的活性的系统

[0197] 抗 HMGB1 抗体的体内活性可以使用各种动物模型来评价,作为其 1 例,有通过计算抗体给药后的存活率来评价对由败血症引起的致死的防御效果的方法。作为小鼠的败血症模型,有 CLP 法 (Cecal ligation and puncture, Lutterloh et. al.), 详见实施例。

[0198] 本说明书中使用的“中和”、“抑制效果”、“抑制”、“阻抑”、“能够抑制”等术语是指,使由抗原 (HMGB1) 引起的生物活性降低约 5 ~ 100%, 优选降低 10 ~ 100%, 更优选降低 20 ~ 100%, 更优选降低 30 ~ 100%, 更优选降低 40 ~ 100%, 更优选降低 50 ~ 100%, 更优选降低 60 ~ 100%, 更优选降低 70 ~ 100%, 进一步优选降低 80 ~ 100%。

[0199] 将 HMGB1 蛋白与 RAGE 的结合抑制 50% 的活性 (IC₅₀) 分别为 20 μg/mL (约 0.13 μM) 以下、优选为 10 μg/mL (约 67nM) 以下、更优选为 5 μg/mL (约 33nM)、最优选为 4.05 μg/mL (约 27nM) 以下的人源化抗体或其抗原结合性片段包含在本发明中。另外,抗体在 2 μg/mL 的浓度下对 HMGB1 蛋白与 RAGE 的结合的抑制率 (%) 为 40% 以上的人源化抗体或其抗原结合性片段包含在本发明中。

[0200] 将人 PBMC 中的由 HMGB1 蛋白引起的 TNF-α 释放抑制 50% 的活性 (IC₅₀) 为 0.05 μg/mL (约 0.33nM) 以下、优选为 0.02 μg/mL (约 0.13nM) 以下、最优选为 0.016 μg/mL (约 0.11nM) 以下的人源化抗体或其抗原结合性片段包含在本发明中。另外,添加 0.01 μg/mL 的抗体时 TNF-α 释放抑制效果为 30% 以上、优选为 40% 以上、最优选为 42.0% 以上的人源化抗体或其抗原结合性片段包含在本发明中。

[0201] 以下,通过实施例更具体地对本发明进行说明,但本发明不受这些实施例的任何限制。本实施例中使用的程序若非特别提及,则可以参考 Molecular Cloning : A Laboratory Manual (第 3 版) (Sambrook 等, 冷泉港实验室出版社, 2001)。

[0202] 实施例

[0203] 实施例 1 抗 HMGB1 大鼠单克隆抗体的制备

[0204] 本专利申请中使用的产生抗 HMGB1 抗原的大鼠抗体 #10-22 的杂交瘤细胞的获取方法,公开在 (W02007/049468、US2009/0252739 和 FASEB J, 2007 (21) p3904 等) 中,以下记述其要点。

[0205] (a) 大鼠的免疫

[0206] 将市售的牛胸腺来源 HMGB1 与 HMGB2 的混合物 (和光纯药工业公司制造,编号: 080-070741) 与完全弗氏佐剂一同给药于大鼠的后肢足底,在 2 周后确认抗体效价的升高,接着,在 5 周后从肿大的髂骨淋巴结在无菌条件下取出淋巴结细胞。

[0207] (b) 细胞融合和抗 HMGB1 抗体产生细胞的克隆

[0208] 使用聚乙二醇使上述髂骨淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0-Ag14 (SP2) 细胞融合,将所得到的融合细胞在 96 孔微孔板中培养,经过利用 ELISA 的一次筛选和利用蛋白免疫印迹的二次筛选,克隆出抗 HMGB1 抗体产生细胞。

[0209] 实施例 2 抗体基因的克隆

[0210] (a) 抗体基因克隆

[0211] 使用 QIAamp RNA 血液小量提取试剂盒 (QIAGEN) 从产生 #10-22 的杂交瘤细胞中纯化总 RNA,接着,使用 Cells-to-cDNA II (Ambion) 合成 cDNA。进而,使用 5' RACE (Rapid

Amplification of cDNA Ends, cDNA 末端快速扩增)-PCR 法, 由所得到的 cDNA 使用各自的引物进行 PCR 来扩增全长的 H 链和 L 链的抗体基因。将扩增得到的 #10-22 抗体的 H 链、L 链的基因片段克隆到真核细胞表达用载体中。

[0212] (b) 克隆得到的 #10-22 的抗原结合性确认

[0213] 将编码 H 链、L 链的质粒同时导入 CHO-K1 细胞中。基因导入使用 Lipofectamine LTX 和 plus 试剂 (Invitrogen)。2 天后回收培养上清, 与固相化于酶标板 (Nunc, Maxisorp) 上的牛胸腺来源的 HMGB1 (Shino-Test, #326059683, 100ng/孔) 在室温下反应 1 小时。接着, 与 HRP 标记抗大鼠 IgG 抗体 (DAKO, P0450) 在室温下反应 1 小时。添加 TMB (3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯二胺; SureBlue, KPL, #52-00-03), 通过 450nm 的吸光度确认了培养上清中的抗体与 HMGB1 结合 (图 1)。

[0214] (c) 基于碱基序列的 #10-22 的氨基酸序列的确定

[0215] 利用 ABI 测序仪确认 #10-22 的 H 链、L 链的碱基序列。通过所得到的碱基序列, 确定 #10-22 的 H 链、L 链的氨基酸序列。将包含信号序列的 H 链、L 链的氨基酸序列示于序列号 1 和 2, 将不含信号序列的 H 链、L 链的氨基酸序列示于序列号 3 和 4, 将可变区 (VH 和 VL) 的氨基酸序列示于序列号 5 和 6。

[0216] 另外, 抗体的互补决定区 (CDR) 的分析使用“Kabat 的定义” ([www.bioinf.org.uk:Dr. Andrew C. R. Martin's Group, Antibodies:General Information](http://www.bioinf.org.uk:Dr.Andrew.C.R.Martin's.Group,Antibodies:General.Information))。其中, 关于 H 链 CDR1, 设定为由“Kabat 的定义”和“Chothia 的定义” (<http://www.bioinf.org.uk/abs/#kabatnum>) 这两个定义覆盖的序列。将 #10-22 的 H 链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列示于序列号 7、8 和 9, 将 L 链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列示于序列号 10、11 和 12。

[0217] 实施例 3 嵌合抗体和人源化抗体的制作

[0218] (a) #10-22 嵌合抗体的制作

[0219] 为了使大鼠抗体能够作为抗体药物使用, 以保持抗体的抗原结合性且减轻免疫原性为目的, 利用抗体基因工程制作嵌合抗体和人源化抗体。首先, 制作将大鼠抗体的恒定区取代为人来源的氨基酸序列 (IgG1(λ)) 的嵌合抗体。所制作的嵌合抗体的抗原结合性通过与大鼠抗体同样的方法来检测, 确认维持了抗原结合性 (图 2)。将嵌合抗体的 H 链和 L 链的氨基酸序列示于序列号 13 和 14。

[0220] (b) #10-22 嵌合抗体 L 链的人源化

[0221] 为了实现人源化, 需要保留 #10-22 嵌合抗体的 6 个 CDR 区域 (#10-22VL-CDR1/2/3 和 #10-22VH-CDR1/2/3), 并将大鼠抗体 #10-22 来源的框架区 (FR) 重组为人 FR (FR1、FR2、FR3 和 FR4)。首先, 使用 V-BASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 和 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行与 #10-22 嵌合抗体 L 链的 FR 序列的同源性高的候补人 FR 序列的检索, 选择出 8 种人来源的 L 链可变区序列 (序列号 15 ~ 24)。使用这些可变区的氨基酸序列和 #10-22 嵌合抗体的氨基酸序列进行比对, 选出未见于人 FR 序列中的“大鼠氨基酸残基”, 确定将这 14 个位置 (5 位、11 位、14 位、15 位、17 位、19 位、41 位、42 位、44 位、46 位、59 位、60 位、76 位和 77 位) 全部取代为上述 8 种人 FR 序列的共有序列的 L 链 FR 的人氨基酸序列 (Human_VL; 序列号 25 ~ 28) (图 3)。接着, 分别制作对大鼠氨基酸残基部位的 14 个位置逐个进行 1 个氨基酸残基取代的部位取代嵌合抗体 (L 链) (I5T、A11V、T14S、

L15P、N17Q、V19A、D41G、K42Q、I44P、R46L、S59P、D60E、R76S 和 D77G) 的基因。将所得到的 14 种 #10-22 嵌合抗体 (L 链) 的部位取代体基因分别与 #10-22 嵌合抗体 (H 链) 基因同时导入 CHO-K1 细胞中。通过使用固相化有抗 IgG 抗体的酶标板的 ELISA 法对所制作的 14 种抗体进行定量,使抗体浓度一致后,对抗原结合性进行考察。这些部位取代体中, L 链可变区内的 I44P 和 R46L 这 2 种部位取代体的抗原结合性均比嵌合抗体显著降低 (图 4)。需要说明的是,取代部位的位置表示按照 Kabat 编号法。

[0222] 制作编码如下 L 链的人源化抗体 (L 链) 基因: #10-11 嵌合抗体 L 链中 44 位、46 位和 3 个 CDR 序列原样保留大鼠抗体 L 链可变区来源的氨基酸序列,除此以外的可变区的氨基酸序列全部重组为上述 Human_VL 的氨基酸序列。将所得到的 #10-22 人源化抗体 (L 链) (以下称为 EV007156L) 基因和 #10-22 嵌合抗体 (H 链) 基因同时导入 CHO-K1 细胞中。通过使用固相化有抗 IgG 抗体的酶标板的 ELISA 法对所制作的抗体进行定量,使抗体浓度一致后,对抗原结合性进行考察。该抗体的抗原结合性与嵌合抗体相比为同等水平或稍见提高 (图 5)。

[0223] (c) #10-22 嵌合抗体 H 链的人源化

[0224] 与 L 链同样地进行与 #10-22 嵌合抗体的 H 链 FR 序列的同源性高的候补人 FR 序列的检索,选择 6 种人来源的 H 链序列 (序列号 29 ~ 34),使用它们的可变区和大鼠抗体 #10-22 来源 H 链可变区的氨基酸序列进行比对 (图 6)。选出未见于人 FR 序列中的“大鼠氨基酸残基”的 15 个位置 (1 位、15 位、16 位、20 位、41 位、49 位、76 位、77 位、78 位、82a 位、82b 位、89 位、94 位、107 位和 108 位),确定将它们全部取代为上述 6 种人 FR 序列的共有序列的 H 链 FR 的人氨基酸序列 (Human_VH;序列号 35 ~ 38) (图 6)。接着,分别制作对上述嵌合抗体 H 链将位于 FR 序列上的非人氨基酸残基部位的 15 个位置逐个进行 1 个氨基酸残基取代的部位取代嵌合抗体 (H 链) (A1E、K15G、E16G、I20L、P41S、A49G、S76N、M77T、V78A、D82aN、N82bS、M89V、A94R、V107T 和 M108L) 的基因。将所得到的 15 种 #10-22 嵌合抗体 (H 链) 的部位取代体基因分别与 EV007156L 基因同时导入 CHO-K1 细胞中。通过使用固相化有抗 IgG 抗体的酶标板的 ELISA 法对所制作的 15 种抗体进行定量,使抗体浓度一致后,对抗原结合性进行考察。这些部位取代抗体中, H 链可变区内的 A49G 和 A94R 这 2 种部位取代体的抗原结合性与由嵌合抗体 (H 链) 基因和 EV007156L 基因的共表达得到的抗体相比均显著降低 (图 7)。

[0225] 制作编码如下 H 链的人源化抗体 (H 链) 基因: #10-11 嵌合抗体 H 链中 49 位、94 位和 3 个 CDR 序列原样保留大鼠抗体 H 链可变区来源的氨基酸序列,除此以外的 H 可变区的氨基酸序列全部重组为上述 Human_VH 的氨基酸序列。将所得到的 #10-22 人源化抗体 (H 链) (以下称为 EV007156H) 基因和 EV007156L 基因同时导入 CHO-K1 细胞中。通过使用固相化有抗 IgG 抗体的酶标板的 ELISA 法对所制作的抗体进行定量,使抗体浓度一致后,对抗原结合性进行考察。该抗体的抗原结合性与由 #10-22 嵌合抗体 (H 链) 基因和 EV007156L 基因的共表达得到的抗体相比,观察到显著的提高 (图 8)。将 #10-22 人源化抗体 (以下称为 EV007156) 的 H 链和 L 链的全长氨基酸序列示于序列号 39 和 40,将可变区的氨基酸序列示于序列号 41 和 42。另外,将 H 链可变区的 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列示于序列号 43、44、45 和 46,将 L 链可变区的 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的氨基酸序列示于序列号 47、48、49 和 50。

[0226] 需要说明的是,为了评价 #10-22 嵌合抗体和 EV007156 对 HMGB1 的结合活性(ELISA 法),在将牛胸腺来源的 HMGB1 以 25ng/孔的浓度在 4℃ 下固相化过夜的酶标板(Nunc、Maxisorp)中加入 N101(日本油脂),将板封闭 2 小时后,以将 #10-22 嵌合抗体和 EV007156 分别从 4 μg/ml 起稀释 4 倍后得到的样品(7 个浓度)作为一次抗体,在室温下反应 1 小时。接着,使 HRP 标记抗人 IgG γ 抗体(MBL, #208)在室温下反应 1 小时。加入 TMB 后,通过 450nm 的吸光进行检测。其结果,使抗体浓度为 250ng/ml 时的人源化抗体 EV007156 显示出比 #10-22 嵌合抗体高约 5 倍的抗原结合性。

[0227] 实施例 4 与各种 HMGB1 的结合性

[0228] (a) 各种 HMGB1 的制备

[0229] (a-1) 牛胸腺来源的 HMGB1

[0230] 牛胸腺来源的 HMGB1 从 Shino-Test 公司或 Chondrex 公司获得。

[0231] (a-2) 人来源的重组 HMGB1(Sf9 表达)

[0232] 人来源的重组 HMGB1 以 N 末端结合有 His 标签的形式从感染了杆状病毒的 Sf9 细胞中纯化。即,使 Sf9 细胞感染表达 HMGB1 的杆状病毒后,旋转培养 72 小时,通过离心得到细胞团块。然后,将细胞悬浊于含有蛋白酶抑制剂的缓冲液中,进行超声(1 分钟 × 4 次),将细胞破碎。接着,以 15000rpm 离心 15 分钟,回收含有 HMGB1 的上清。使用 QIAGEN Ni-NTA 吸附、纯化上清中含有的 HMGB1,使用 100mM 咪唑洗脱,在磷酸缓冲液(PBS(-))中进行透析。

[0233] (a-3) 核 HMGB1

[0234] 核 HMGB1 由在 10% FCS-DMEM 中培养的 CHO-K1 细胞制作。即,在 10% FCS-DMEM、5% CO₂、37℃ 的条件下培养 CHO-K1,在细胞密度达到铺满时将 CHO 细胞用 PBS(-) 清洗 2 次,使用细胞刮(Nunc, #179693)刮取后,回收至离心沉淀管中。在细胞溶液中以达到 0.2% 的方式加入 TritonX-100,通过超声进行细胞破坏。将溶液作为核型抗原。

[0235] (a-4) 坏死 HMGB1

[0236] 坏死 HMGB1 由在 10% FCS-DMEM 中培养的 CHO-K1 细胞制作。即,在 10% FCS-DMEM、5% CO₂、37℃ 的条件下培养 CHO-K1,在细胞密度达到铺满时加入 PBS(-) 清洗 2 次。然后,加入适量超纯水后,使用细胞刮刮取细胞。使用恒温槽和干冰,反复进行 5 次冷冻融化,将细胞破坏,以 12000rpm 离心 10 分钟,将细胞屑除去。将上清作为坏死 HMGB1,在 -80℃ 保存。

[0237] (a-5) 凋亡 HMGB1

[0238] 凋亡 HMGB1 由在 10% FCS-DMEM 中培养的 CHO-K1 细胞制作。在 10% FCS-DMEM、5% CO₂、37℃ 的条件下培养 CHO-K1,在细胞密度达到铺满时对 CHO 细胞照射 2 分钟 UV,置换为无血清 DMEM 培养基后,回收培养 16 小时后的培养基。将通过离心除去细胞后的上清作为凋亡 HMGB1。

[0239] (a-6) 继发坏死 HMGB1

[0240] 继发坏死 HMGB1 由在 10% FCS-DMEM 中培养的 CHO-K1 细胞制作。在 10% FCS-DMEM、5% CO₂、37℃ 的条件下培养 CHO-K1,在细胞密度达到铺满时对 CHO 细胞照射 2 分钟 UV,置换为无血清 DMEM 培养基。培养 48 小时后回收培养基,将通过离心除去细胞后的上清作为继发坏死 HMGB1。

[0241] (a-7) 活化 HMGB1

[0242] 活化 HMGB1 由在 10% FCS-RPMI 中培养的 RAW 细胞(理研)制作。在 10% FCS-RPMI、

5% CO₂、37℃的条件下培养 RAW 细胞,在细胞密度达到铺满时将 RAW 细胞用 PBS(-) 清洗 2 次,置换为无血清 RPMI 培养基后,用 1 μg/ml 的 PolyIC 进行刺激。回收刺激后 24 小时的培养上清,将通过离心除去细胞后的上清作为活化 HMGB1。

[0243] (b) 利用蛋白免疫印迹得到的 EV007156 与各种 HMGB1 的结合性

[0244] 通过蛋白免疫印迹考察 #10-22、其人源化抗体 (EV007156)、S6 (MedImmune 公司) 和 G4 (MedImmune 公司) 的抗体对上述中制作的各种 HMGB1 的结合性。即,分别在牛胸腺来源的 HMGB1、Sf6 表达重组人 HMGB1、核 HMGB1、坏死 HMGB1、凋亡 HMGB1、继发坏死 HMGB1、活化 HMGB1 中加入 5×SDS 样品缓冲液,在 95℃下煮沸 5 分钟。将 HMGB1 样品的梯度稀释物在 12% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳后,将蛋白质转印到 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉-TBST 封闭 2 小时后,使 #10-22、EV007156、S6 和 G4 (各自为 2 μg/ml) 在室温下反应 1 小时。接着,使 HRP 标记的二次抗体在室温下反应 1 小时,使用 ECL prime (GE Healthcare, RPN2232) 进行检测 (表 4)。需要说明的是,作为阳性对照抗体,对于 WO2007/001422 记载的人抗 HMGB1 抗体 (S6 和 G4),合成编码该专利中公开的氨基酸序列的基因,进行抗体产生、纯化,供于试验。

[0245] [表 4]

[0246] 表 4. 抗体对各种抗原的结合性评价 (蛋白免疫印迹)

[0247]

抗原种类	抗 HMGB1 抗体			
	#10-22	EV007156	S6	G4
牛胸腺	++	++	++	++
重组	++	++	+	+
核	++	++	-	+
坏死	++	++	+	++
凋亡	++	+	-	++
继发坏死	+	+	-	-
活化	++	++	-	++

[0248] HMGB1 抗体 (#10-22、EV007156、S6、G4) 对各种 HMGB1 (牛胸腺、重组、核、坏死、凋亡、继发坏死和活化 HMGB1) 的结合性评价。

[0249] - :未观察到结合、+ :观察到弱结合、++ :观察到强结合

[0250] (c) #10-22 嵌合抗体、EV007156 的抗原结合 ELISA

[0251] 在将上述人来源的重组 HMGB1 以 25ng/孔的浓度在 4℃下固相化过夜的酶标板 (Nunc, Maxisorp) 中加入 N101 (日本油脂),将板封闭 2 小时后,以将 #10-22 嵌合抗体、EV007156、S6 和 G4 分别从 4 μg/ml 起稀释 4 倍后得到的样品 (7 个浓度) 作为一次抗体,在室温下反应 1 小时。接着,使 HRP 标记抗人 IgG γ 抗体 (MBL, #208) 在室温下反应 1 小时。加入 TMB 后,通过 450nm 的吸光进行检测 (图 9 的 (A))。另外,将使抗体浓度为 250ng/ml 时的各 HMGB1 抗体对各 HMGB1 (重组) 的结合率示于图 9 的 (B)。人源化抗体 EV007156 对重组 HMGB1 显示出比 #10-22 嵌合抗体高约 2.5 倍的抗原结合性。另外, EV007156 对重组 HMGB1 显示出比 S6 高 45 倍、比 G4 高 22 倍的结合性。

[0252] 实施例 5 结合抑制分析

[0253] RAGE 结合抑制分析

[0254] 在将 RAGE-Fc(R&D, 250ng/孔) 在 4℃ 下固相化过夜的酶标板(Nunc, Maxisorp) 中加入 5% 的 BSA(Bovine Serum Albumin, 牛血清白蛋白), 将板封闭 2 小时后, 加入人单克隆抗体(Control Ig, 对照 Ig), 将板封闭 2 小时。在 HMGB1(Sf6 来源重组 HMGB1, 终浓度 2 μg/ml) 中, 以使终浓度为 (0 μg/ml、0.02 μg/ml、0.2 μg/ml、2 μg/ml、20 μg/ml) 的方式混合抗 HMGB1 抗体(#10-22 嵌合体、EV007156、G4) 和作为阴性对照抗体的对 HMGB1 不具有特异性的人单克隆抗体(Control Ig), 孵育 60 分钟。接着, 将反应溶液加到酶标板中, 反应 2 小时。然后, 使利用生物素标记试剂盒(Dojindo, LK03) 进行了生物素化的抗 HMGB1 抗体(Abnova, #H00003146-M08, 1 μg/ml) 在室温下反应 1 小时。最后, 使 HRP 标记链亲合素在室温下反应 1 小时。加入 TMB(3, 3', 5, 5'-四甲基联苯二胺; SureBlue, KPL, #52-00-03), 通过 450nm 的吸光检测与 RAGE 结合的 HMGB1(图 10)。#10-22 嵌合体、EV007156、G4 均以依赖于所添加的抗体浓度的方式抑制 HMGB1 与 RAGE 的结合。另外, 该抑制效果在添加 2 μg/ml 的抗体时 #10-22 嵌合体为 44.0%、EV007156 为 46.2%, 与此相对, G4 为 1.4%。另外, 在添加 20 μg/ml 的抗体的情况下, #10-22 嵌合体为 77.0%、EV007156 为 58.6%, 与此相对, G4 为 36.9%。另外, 50% 抑制浓度(IC50) 在 #10-22 嵌合体为 3.04 μg/ml (20.3nM), 在 EV007156 为 4.05 μg/ml (27nM), 在 G4 为 20 μg/ml (130nM) 以上。因此可知, #10-22 嵌合体、EV007156 对 HMGB1 与 RAGE 的结合的抑制效果显著强于 G4。

[0255] 实施例 6 TNF-α 释放抑制分析

[0256] 从正常人分离外周血单个核细胞(PBMC), 考察 EV007156 的添加是否抑制用 HMGB1 刺激时观察到的 TNF-α 的释放量。首先, 使用 Histopaque(SIGMA, #10771) 对人外周血进行离心(1400rpm, 30 分钟), 分离、回收 PBMC。接着, 将所得到的 PBMC 使用 Opti-MEM(Gibco) 以达到 2×10^5 个细胞/孔的方式接种到 96 孔多孔板(BD, #353072) 中。其中预先加入有在 37℃ 下预孵育了 30 分钟的牛胸腺来源 HMGB1(Chondrex, 终浓度 1 μg/ml) 和抗 HMGB1 抗体(EV007156、S6、G4) 或作为阴性对照抗体的对 HMGB1 不具有特异性的人单克隆抗体(从终浓度 10 μg/ml 开始梯度稀释) 的混合液。将添加培养后 24 小时的培养上清回收, 使用人 TNF-α ELISA Ready-SET-Go!(eBioscience, #88-7346) 进行 TNF-α 的定量(图 11)。另外, 该抑制效果在添加 0.01 μg/ml 的抗体时, EV007156 为 42.0%, 与此相对, S6 为 21.3%, G4 为 25.5%。另外, 在添加 0.1 μg/ml 的抗体的情况下, EV007156 为 75.9%, 与此相对, S6 为 49.4%, G4 为 68.5%。另外, 50% 抑制浓度(IC50) 在 EV007156 为 0.016 μg/ml (0.106nM), 与此相对, 在 S6 为 0.106 μg/ml (0.706nM), 在 G4 为 0.026 μg/ml (0.173nM) 以上。由此表明, EV007156 的 TNF-α 释放抑制效果显著强于 S6 和 G4。

[0257] 由此显示, 本发明的人源化抗体 EV007156 对巨噬细胞和单核细胞细胞中的由 HMGB1 引起的 TLR-4 受体介导的信号传导活化的抑制效果实质上很高。

[0258] 实施例 7 亲和性测定

[0259] 使用通过表面等离子共振检测生物体分子的结合相互作用的 Biacore T200 装置, 测定抗体对 HMGB1 的亲和性。首先, 使 EV007156、S6 或 G4 以 0.5 μg/ml 的浓度吸附到传感芯片(CM5) 上作为配体。接着, 使从 10nM 起以 2 倍稀释系列制备的重组 HMGB1 流到传感芯片上作为分析物, 测量结合亲和性。由所得到的结果可知, 各抗体的 K_D (M) 值如下: EV007156 为 3.29×10^{-10} M, S6 和 G4 分别为 2.67×10^{-10} 、 6.79×10^{-10} M(表 5)。

[0260] [表 5]

[0261]

抗体名称	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
EV007156	7.11×10^6	2.34×10^{-3}	3.29×10^{-10}
S6	4.11×10^6	1.18×10^{-3}	2.67×10^{-10}
G4	3.32×10^6	2.26×10^{-3}	6.79×10^{-10}

[0262] 实施例 8 药物动态试验

[0263] 将 EV007156 以 10mg/kg 腹腔内给药于 8 周龄的 C57BL/6N(雌性), 在给药后 6 小时 (0.25 天)、3 天、7 天、14 天、24 天采血。通过 3500rpm、10 分钟的离心分离血清, 使所得到的血清在预先将抗人 IgG 抗体以 250ng/孔的浓度固相化过夜的酶标板 (Nunc, Maxisorp) 中反应 1 小时。接着, 使 HRP 标记的抗人 IgG 抗体 (MBL, #208) 反应 1 小时。加入 TMB (3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯二胺; SureBlue, KPL, #52-00-03) 后, 通过 450nm 的吸光进行抗体浓度的定量。另外, 为了确认 EV007156 对抗原的结合性, 使用将重组 HMGB1 以 25ng/孔的浓度固相化过夜的酶标板 (Nunc, Maxisorp), 按照与抗体定量同样的程序进行检测。将结果示于图 12 中。从抗体给药 6 小时开始, 血中抗体浓度已升高, 在给药后 3 天血中抗体浓度稳定于 80 μ g/ml。然后, 在给药后 24 天逐渐减少, 最终达到 40 μ g/ml。所给药的 EV007156 在小鼠体内的半衰期计算为 22.8 天。关于每单位抗体的抗原结合性, 由于从给药后 3 天至 24 天相对于抗体量的抗原结合性不降低, 因此可知, EV007156 即使在小鼠体内经过 24 天, 也具有与抗体量相符的抗原结合性, 保持了作为抗体的稳定性。

[0264] 实施例 9 表位作图

[0265] (a) 缺失构建体的制作

[0266] 在缺失构建体的制作之前, 从 HEK293 克隆人来源的 HMGB1 基因。即, 使用 Cells to cDNA II (ambion, #AM1723) 对 HEK293 进行 RT-PCR, 在 N 末端附加组氨酸标签, 将扩增的 PCR 片段克隆到 pcDNA3.1(+) 载体中。利用测序仪 (ABI, 3130Genetic Analyzer) 确认所得到的基因序列与人 HMGB1 的基因没有差异。

[0267] 接着, 为了确定 EV007156 的表位, 将 HMGB1 分类为 A-BOX、B-BOX、C-tail 这 3 个区域, 制作总计 6 个种类的缺失构建体 (全长 HMGB1、A-Box+B-Box、A-Box+C-tail、B-Box+C-tail、A-Box、B-Box 和 C-tail) (图 13)。各缺失构建体的表达通过免疫荧光染色和 CBB 染色法来确认。作为利用免疫荧光染色的确认, 将表达各片段 (包括全长在内的总计 7 个种类) 的质粒使用 Lipofectamine LTX (Invitrogen) 转染到 CHO-K1 细胞中。24 小时后将细胞用 4% 多聚甲醛固定, 然后, 使抗 His 抗体 (MBL, PM032) 以 1 μ g/ml 的浓度反应 1 小时。接着, 使 Alexa488 抗兔 IgG 抗体 (Invitrogen, A11070) 以 1 μ g/ml 的浓度反应 1 小时, 使用落射型荧光显微镜观察荧光信号 (图 14)。另一方面, 作为利用 CBB 法的确认, 在转染后 24 小时的细胞中加入裂解缓冲液 (PBS, 0.2% TritonX-100, 1mM EDTA), 将细胞溶解。使用 Ni-琼脂糖 6B (GE Healthcare) 对细胞裂解液中含有的缺失构建体进行纯化。在利用洗脱液 (50mM Tris-HCl (pH8.0)、500mM NaCl、500mM 咪唑) 洗脱出来的样品中加入 5 \times SDS 样品缓冲液, 在 95 $^{\circ}$ C 下煮沸 5 分钟。将各样品在 12% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳后, 使用 CBB 进

行染色,确认了缺失构建体的表达(图15)。由结果可知,免疫荧光染色、CBB染色法均确认到C-tail以外的缺失构建体的表达。

[0268] (b) 利用免疫荧光染色法的表位区域的检测

[0269] 使用Lipofectamine LTX(Invitrogen)将表达各片段(包括全长在内的总计7个种类)的质粒转染到CHO-K1细胞中。24小时后将细胞用4%多聚甲醛固定,然后,使EV007156(1 μ g/ml)反应1小时。接着,使Alexa488抗人IgG抗体以1 μ g/ml的浓度反应1小时,使用落射型荧光显微镜观察荧光信号(图16)。可知EV007156除了与全长HMGB1反应以外,还与A-Box+C-tail和B-Box+C-tail、即包含C末端的构建体反应。由此判断,EV007156的表位存在于HMGB1的C末端区域的可能性高。接着,对S6和G4也进行同样的实验。由结果可知,S6(图16-b)和G4(图16-c)均与包含B-Box的构建体反应。得到了与EV007156的染色图案不同的结果。

[0270] (c) 利用蛋白免疫印迹法的表位区域的检测

[0271] 使用Lipofectamine LTX(Invitrogen)将表达各片段的质粒转染到CHO-K1细胞中。24小时后将细胞中加入裂解缓冲液(PBS,0.2% TritonX-100,1mM EDTA),将细胞溶解。接着,加入5 \times SDS样品缓冲液,在95 $^{\circ}$ C下煮沸5分钟。将各样品在12%聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,以100mA、1小时的条件将蛋白质转印到PVDF膜上。将转印后的PVDF膜用5%脱脂奶粉-TBST封闭2小时后,使EV007156(1 μ g/ml)在室温下反应1小时。接着,使作为二次抗体的HRP标记抗人IgG(MBL,#208)在室温下反应1小时。使用ECL prime(GE Healthcare,RPN2232)检测EV007156(图17)。由结果可知,与免疫荧光染色的结果同样,EV007156除了与全长HMGB1反应以外,还与包含C末端的构建体(A-Box+C-tail和B-Box+C-tail)反应。因此判断,EV007156的表位存在于C末端区域。接着,对S6和G4也进行同样的实验。可知S6和G4也与免疫荧光染色的结果同样地与包含B-Box的构建体(A-Box+B-Box、B-Box+C-tail、仅B-Box)反应。因此判断,S6和G4的表位存在于B-Box。由此表明,EV007156具有与S6和G4不同的表位。

[0272] (d) 肽作图(斑点印迹)

[0273] 为了确定EV007156对HMGB1的表位位于构成HMGB1的C末端的哪个氨基酸,实施了肽作图。即,设计了包括9种间隔3个残基的长度为12个残基的氨基酸和最靠C末端的8个残基的1条肽在内的总计10种肽(#1.EEEEEDEEDEE(序列号51)、#2.EDEEDEDEEEEE(序列号52)、#3.EDEEDEEEEEDE(序列号53)、#4.EEDEEEEEDEED(序列号54)、#5.DEEEEDEEDED(序列号55)、#6.EEEEEDEEDED(序列号56)、#7.EEDEEDEDEEED(序列号57)、#8.DEEDEDEEEDDD(序列号58)、#9.EDEDEEEDDDDE(序列号59)、#10.EEEDDDDE(序列号60)),囊括了构成HMGB1的C末端区域的氨基酸。将合成的肽(SIGMA-ALDRICH,PEPScreen)用0.1M乙酸铵溶液以达到4mg/ml的方式溶解,以4 μ g/斑点滴加到硝酸纤维素膜上。干燥后,用5%脱脂奶粉-TBST封闭90分钟。接着,使EV007156以1 μ g/ml的浓度反应1小时。接着,使HRP标记的抗人IgG抗体(MBL,#208)反应1小时后,使用ECL prime(GE Healthcare,RPN2232)进行检测(图18)。由结果可知,EV007156强烈识别HMGB1的最靠C末端的区域即#9.EDEDEEEDDDDE,更详细而言,识别最靠C末端的8个残基(#10.EEEDDDDE(序列号60))。

[0274] 实施例10EV007156对败血症模型小鼠的效果

[0275] 通过计算抗体给药后的存活率来考察 EV007156 能否防御由败血症引起的致死。小鼠的败血症模型基于 CLP 法 (Cecal ligation and puncture (盲肠结扎穿孔), Lutterloh et. al.) 来制作。即, 以达到 80mg/kg 的方式对 BALB/c (日本 SLC, 雌性, 8 周龄, 16 只) 腹腔内给药苯巴比妥钠 (Nacalai Tesque, #26427-14) 将其麻醉。从正中切开约 1cm 后, 取出盲肠, 将其约 90% 用缝合线结扎。接着, 使用 23G 的注射器针头 (Terumo, #NN-2332S) 将盲肠壁在上下各贯通 1 次 (总计 2 次)。将盲肠放回至腹腔的预定部位, 用缝合线缝合切开部。在切开部涂抹终浓度为 1% 的赛罗卡因 (AstraZeneca) 和 125U/g 的バラマイシン (baramycin) (小野药品)。进而, 以达到 25mg/kg 的方式肌肉内给药组胺 (日医工)。次日, 在术后 24 小时, 作为抗体给药组, 以达到 10mg/kg 的方式腹腔内给药 EV007156。另外, 在对照组中, 仅腹腔内给药生理盐水。然后, 实施状态观察直至抗体给药后 6 天为止, 算出各组的存活率 (图 19)。结果, 在术后 48 小时对照组中存活率减少至 50%, 但在给药 EV007156 的抗体给药组中存活率维持 100%。该存活率的维持持续至术后 5 天。另外, 术后 6 天的存活率在对照组中为 37.5%, 与此相对, 在抗体给药组中高达 87.5%。由该结果表明, EV007156 的给药在基于 CLP 法的败血症模型小鼠中显著提高了小鼠的存活率, 该抗体的给药对败血症带来的致死为极其有效的手段。

[0276] 产业上的可利用性

[0277] 本发明的人源化抗 HMGB1 抗体或其抗原结合性片段与迄今为止的人来源抗 HMGB1 抗体相比, 对哺乳动物来源的 HMGB1 具有高的亲和性、中和活性, 并且通过人源化减弱了大鼠抗体的免疫原性, 因此, 在对人应用的方面有利, 作为能够对多种严重的 HMGB1 相关疾病提供新的治疗法、预防法的抗体是有用的。

[0001]

序列表

- <110> 株式会社伊贝克 (Evec Incorporated)
 国立大学法人 冈山大学 (Okayama University)
- <120> 人源化抗 HMGB1 抗体或其抗原结合性片段 (Humanized Anti-HMGB1 Antibody or Antigen-Binding Fragment Thereof)
- <130> PCT13-0063
- <150> JP 2013-013602
 <151> 2013-01-28
- <160> 60
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
- <400> 1

Met Leu Val Leu Gln Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Gln Gly Val
 1 5 10 15

His Cys Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 35 40 45

Asn Ala Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

[0002]

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 85 90 95

Ser Met Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 100 105 110

Met Tyr Tyr Cys Thr Ala Pro Arg Arg Thr Glu Gly Ile Val Ser Ser
 115 120 125

Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu
 145 150 155 160

Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr
 195 200 205

Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val Thr
 210 215 220

Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile
 225 230 235 240

Val Pro Arg Glu Cys Asn Pro Cys Gly Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser
 245 250 255

[0003]

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Thr Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
 260 265 270

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asn Asp
 275 280 285

Pro Glu Val Arg Phe Ser Trp Phe Ile Asp Asp Val Glu Val His Thr
 290 295 300

Ala Gln Thr His Ala Pro Glu Lys Gln Ser Asn Ser Thr Leu Arg Ser
 305 310 315 320

Val Ser Glu Leu Pro Ile Val His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Thr
 325 330 335

Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Gly Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

Ser Ile Ser Lys Pro Glu Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Met Ala Pro Pro Lys Glu Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile Thr
 370 375 380

Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp Lys
 385 390 395 400

Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met
 405 410 415

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys
 420 425 430

[0004]

Glu Thr Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
 435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 2

Met Ser Trp Thr Ser Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Leu Tyr Ala Gly
 1 5 10 15

Ser Val Thr Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Thr
 20 25 30

Leu Gly Asn Thr Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys
 35 40 45

Arg Tyr Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ser Ile Val Arg
 50 55 60

Val Ile Tyr Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Thr
 85 90 95

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Thr Tyr Ser Asp

[0005]

100	105	110
Asp Lys Leu Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 115	120	125
Gln Pro Lys Ser Thr Pro Thr Leu Thr Val Phe Pro Pro Ser Thr Glu 130	135	140
Glu Leu Gln Gly Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe 145	150	155 160
Tyr Pro Ser Asp Val Glu Val Ala Trp Lys Ala Asn Gly Ala Pro Ile 165	170	175
Ser Gln Gly Val Asp Thr Ala Asn Pro Thr Lys Gln Gly Asn Lys Tyr 180	185	190
Ile Ala Ser Ser Phe Leu Arg Leu Thr Ala Glu Gln Trp Arg Ser Arg 195	200	205
Asn Ser Phe Thr Cys Gln Val Thr His Glu Gly Asn Thr Val Glu Lys 210	215	220
Ser Leu Ser Pro Ala Glu Cys Ser 225	230	
<210> 3		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> Rattus norvegicus		
<400> 3		
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu 1	5	10 15

[0006]

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Pro Arg Arg Thr Glu Gly Ile Val Ser Ser Gly Val
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr
 115 120 125

Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser
 130 135 140

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr Ser Ser
 180 185 190

[0007]

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val Thr Cys Asn
 195 200 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
 210 215 220

Arg Glu Cys Asn Pro Cys Gly Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val
 225 230 235 240

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Thr Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr
 245 250 255

Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asn Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Arg Phe Ser Trp Phe Ile Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln
 275 280 285

Thr His Ala Pro Glu Lys Gln Ser Asn Ser Thr Leu Arg Ser Val Ser
 290 295 300

Glu Leu Pro Ile Val His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Thr Phe Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Ser Gly Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Ser Ile
 325 330 335

Ser Lys Pro Glu Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr Thr Met Ala
 340 345 350

Pro Pro Lys Glu Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile Thr Cys Met
 355 360 365

[0008]

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp Lys Met Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr
385 390 395 400

Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Thr
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu
420 425 430

His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 4
<211> 212
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 4

Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Thr Leu Gly Asn Thr
1 5 10 15

Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Arg Tyr Ala Tyr
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ser Ile Val Arg Val Ile Tyr Lys
35 40 45

Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
50 55 60

[0009]

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Pro Arg Arg Thr Glu Gly Ile Val Ser Ser Gly Val
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Thr Leu Gly Asn Thr

[0011]

Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 9

Pro Arg Arg Thr Glu Gly Ile Val Ser Ser Gly Val Asp Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 10

Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Arg Tyr Ala Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 11

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 11

[0013]

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 12

His Ser Thr Tyr Ser Asp Asp Lys Leu Pro Val
1 5 10

<210> 13

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> H-chain of a chimera antibody

<400> 13

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Pro Arg Arg Thr Glu Gly Ile Val Ser Ser Gly Val

[0014]

	100		105		110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr					
	115		120		125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser					
	130		135		140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu					
145		150		155	160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His					
	165		170		175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser					
	180		185		190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys					
	195		200		205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu					
	210		215		220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro					
225		230		235	240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys					
	245		250		255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val					
	260		265		270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp					

[0015]

450

455

<210> 14

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-chain of a chimera antibody

<400> 14

Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Thr Leu Gly Asn Thr
 1 5 10 15

Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Arg Tyr Ala Tyr
 20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ser Ile Val Arg Val Ile Tyr Lys
 35 40 45

Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Thr Gln Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Thr Tyr Ser Asp Asp Lys Leu Pro
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
 115 120 125

[0017]

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
 130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
 180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
 195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 15
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Leu Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Gly Glu Asn Tyr Ala
 20 25 30

Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Glu Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

[0018]

Glu Asp Ser Glu Arg Tyr Pro Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Asn Thr Thr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Leu Thr Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Gly Asp Glu Asp Asn
85 90

<210> 16

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
85 90 95

<210> 17

[0019]

<211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95

<210> 18
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Ala Lys Lys Tyr Ala
 20 25 30

[0020]

Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Asp Asn Asn Leu
 85 90 95

<210> 19

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

[0021]

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala
 85 90 95

<210> 20
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Val Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Gly Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Ser Val Val Phe
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 21
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0022]

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 25
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL FR1 of Human_VL

<400> 25

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr
 1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL FR2 of Human_VL

<400> 26

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

[0024]

<210> 27
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL FR3 of Human_VL

<400> 27

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL FR4 of Human_VL

<400> 28

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 29
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser

[0025]

	20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala	50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	65	70	75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	85	90	95
Tyr Cys Thr Arg	100		
<210> 30			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 30			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser	20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala	50	55	60

[0026]

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Cys Gly Gly Asp Cys Ser His Phe Gly Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

[0028]

Tyr Cys Thr Arg
100

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Leu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Tyr Glu Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 34

[0029]

<220>

<223> VH FR4 of Human_VH

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 39

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> H-chain of EV007156

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

[0032]

Tyr Cys Thr Ala Pro Arg Arg Thr Glu Gly Ile Val Ser Ser Gly Val
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

[0033]

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

[0034]

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 40
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L-chain of EV007156

<400> 40

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Arg Tyr Ala Tyr
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Ile Val Arg Val Ile Tyr Lys
35 40 45

Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp
65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Thr Tyr Ser Asp Asp Lys Leu Pro
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115 120 125

[0035]

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
 130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
 180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
 195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 41
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> H-chain VR of EV007156

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

[0036]

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Pro Arg Arg Thr Glu Gly Ile Val Ser Ser Gly Val
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L-chain VR of EV007156

<400> 42

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr
 1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Arg Tyr Ala Tyr
 20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Ile Val Arg Val Ile Tyr Lys
 35 40 45

[0037]

Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Thr Tyr Ser Asp Asp Lys Leu Pro
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 43
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH FR1 of EV007156

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VH FR2 of EV007156

[0038]

<400> 44

Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH FR3 of EV007156

<400> 45

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala
 20 25 30

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH FR4 of EV007156

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0039]

<223> VL FR1 of EV007156

<400> 47

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL FR2 of EV007156

<400> 48

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Ile Val Arg Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL FR3 of EV007156

<400> 49

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

[0040]

<210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> VL FR4 of EV007156

<400> 50

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> #1

<400> 51

Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu
 1 5 10

<210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> #2

<400> 52

Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu
 1 5 10

<210> 53
 <211> 12

[0041]

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> #3

<400> 53

Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu
1 5 10

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> #4

<400> 54

Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp
1 5 10

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> #5

<400> 55

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp
1 5 10

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

[0042]

<220>

<223> #6

<400> 56

Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu
1 5 10

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> #7

<400> 57

Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp
1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> #8

<400> 58

Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp
1 5 10

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0043]

<223> #9

<400> 59

Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
1 5 10

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> #10

<400> 60

Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
1 5

	OD 450 nm
阳性对照 (杂交瘤来源抗体、500ng/ml)	1.777
阴性对照 (10%FCS-DMEM)	0.052
大鼠H链+大鼠L链 (培养上清)	3.414

图 1

	OD 450 nm
阳性对照 (#10-22、500 ng/ml)	1.250
阴性对照 (10%FCS-DMEM)	0.043
#10-22嵌合体 (培养上清)	2.787

图 2

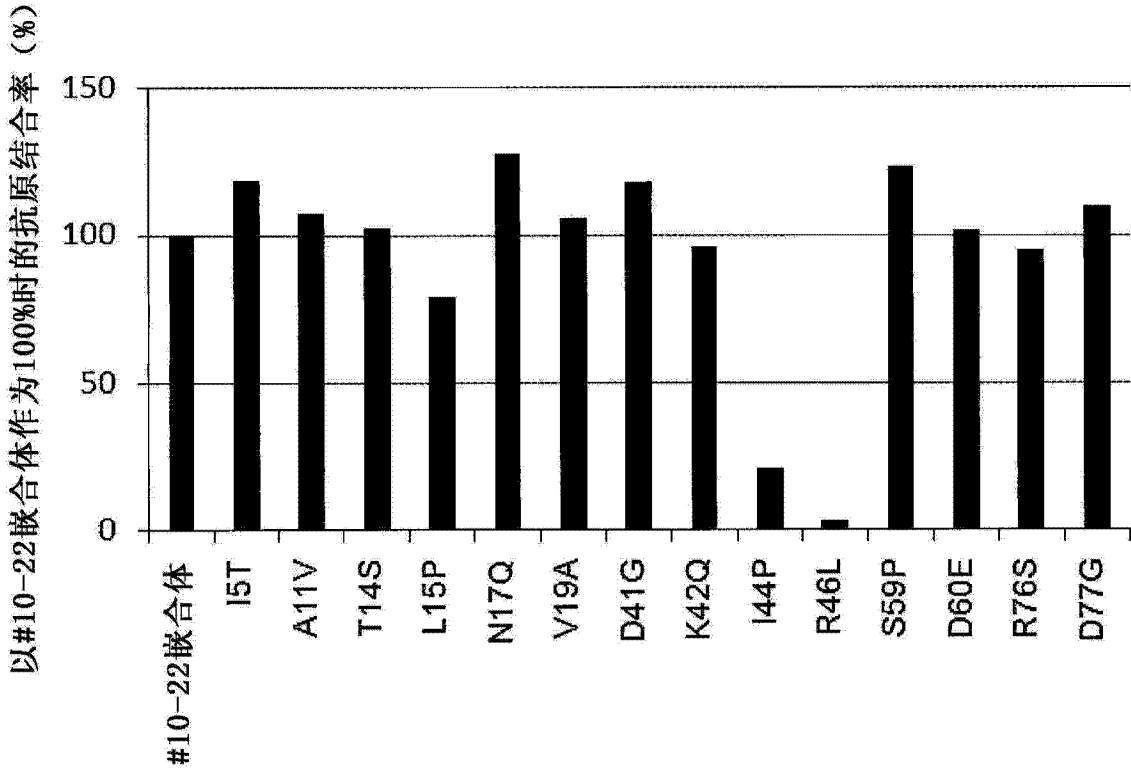


图 4

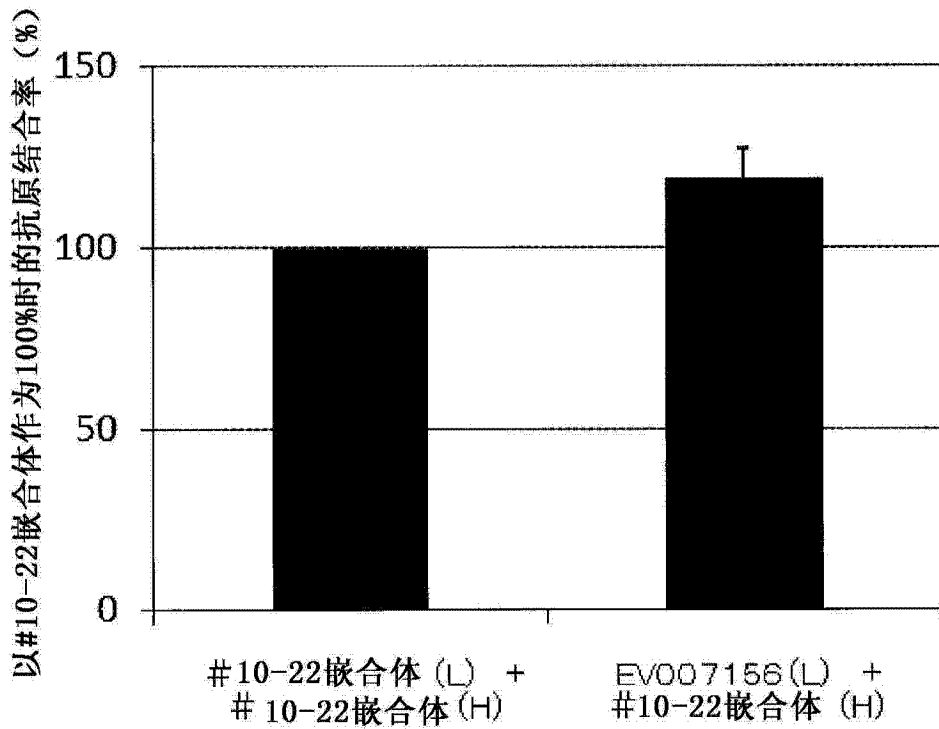


图 5

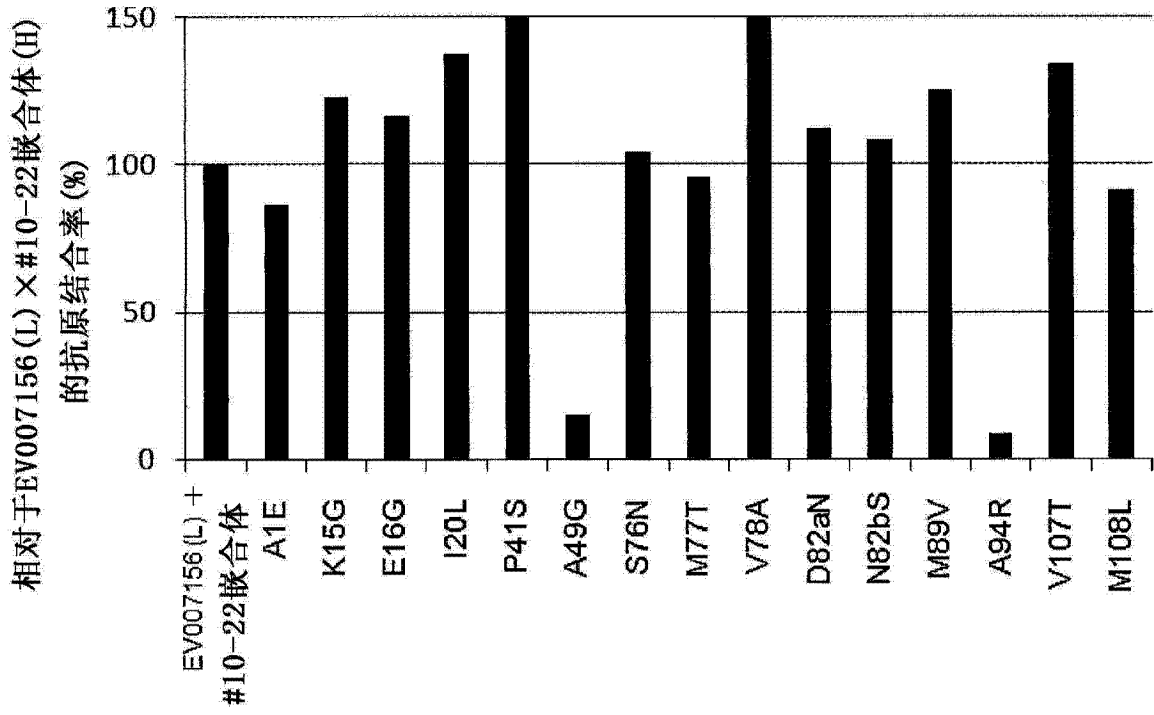


图 7

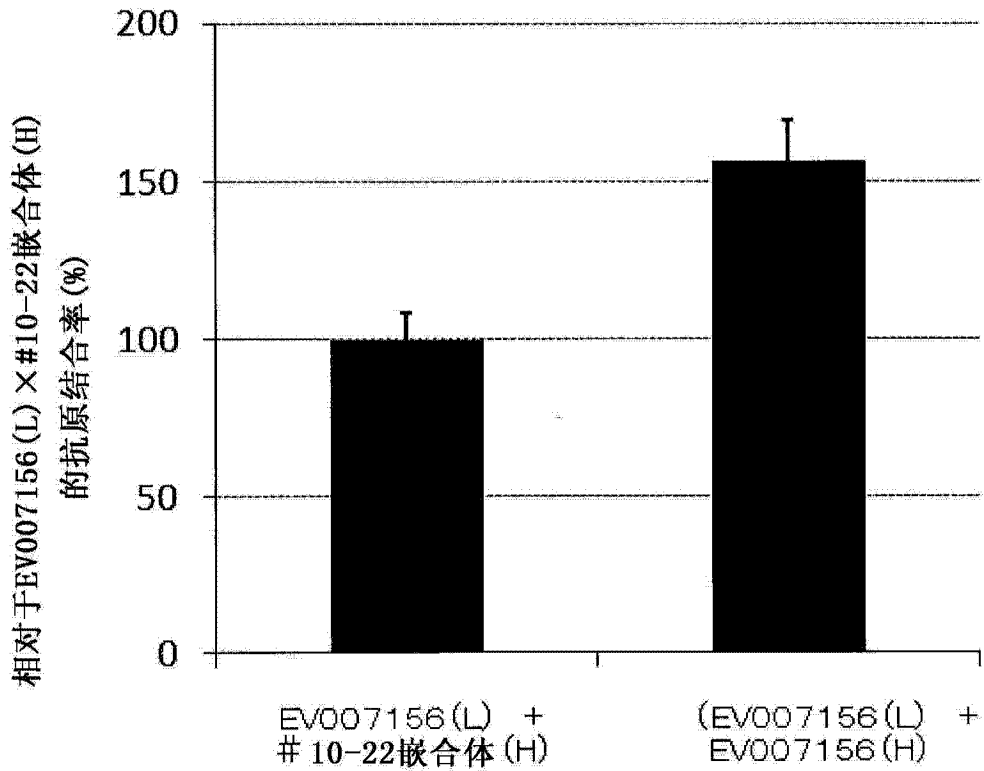


图 8

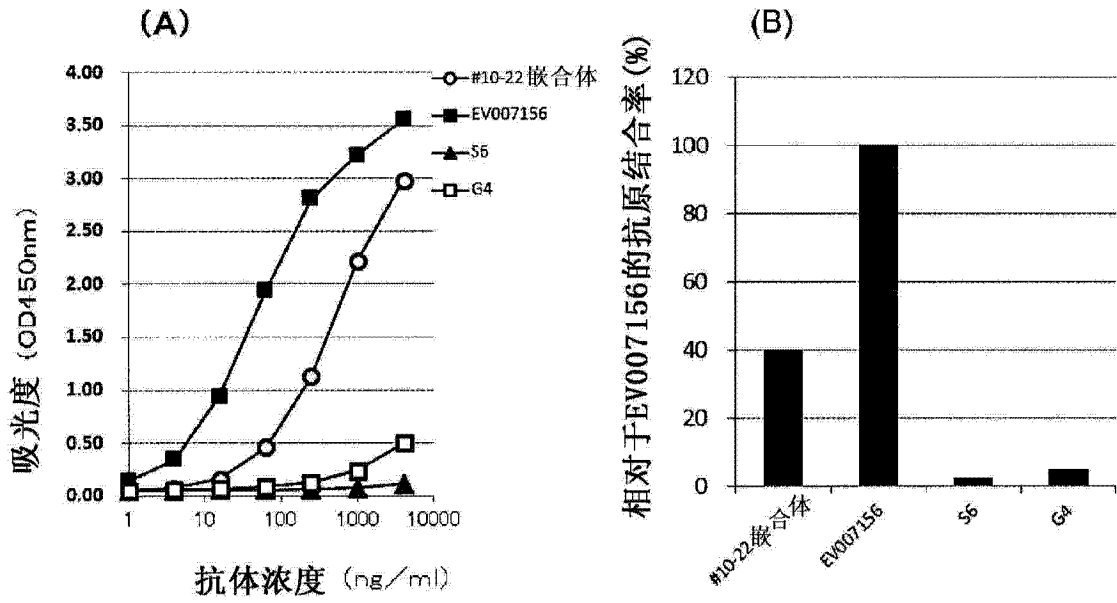


图 9

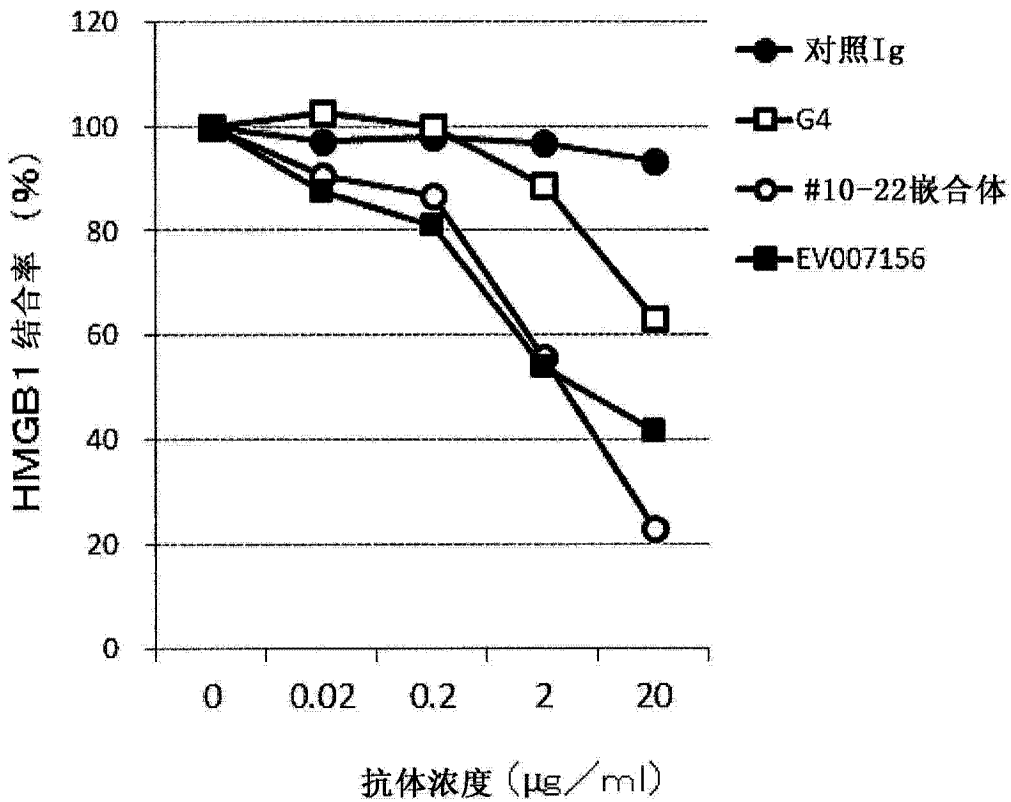


图 10

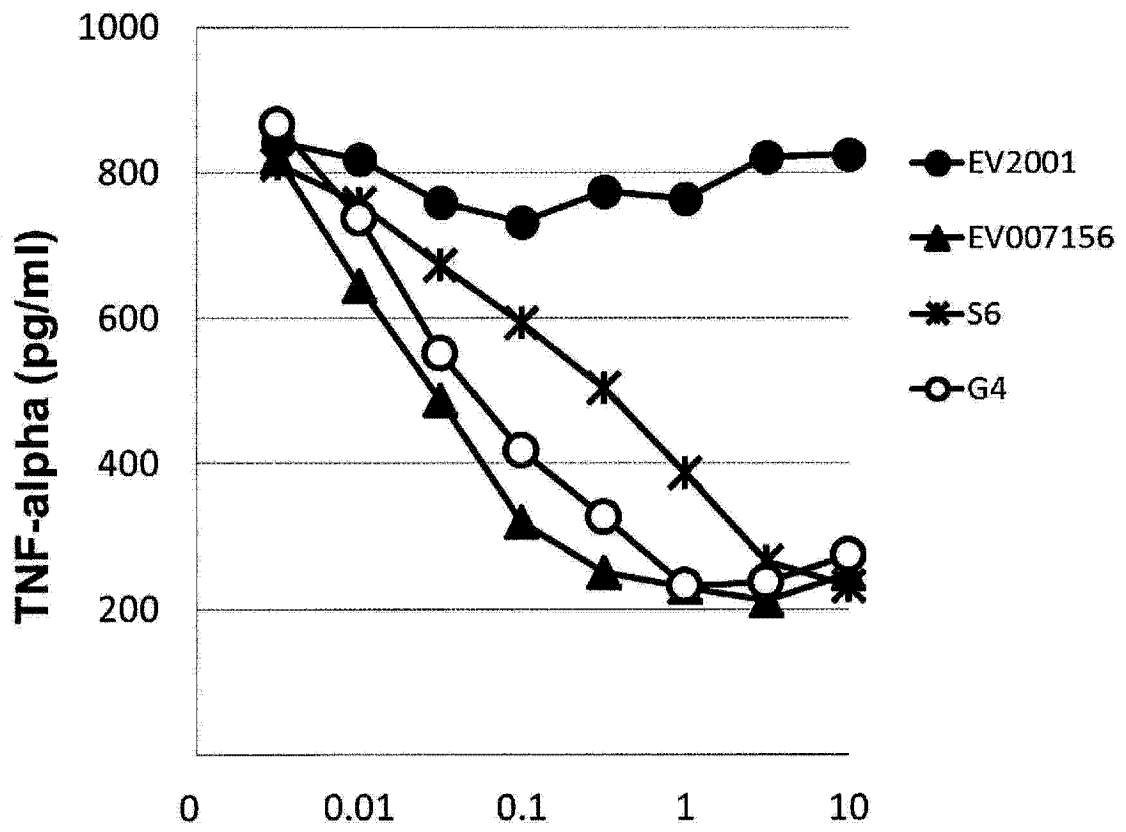


图 11

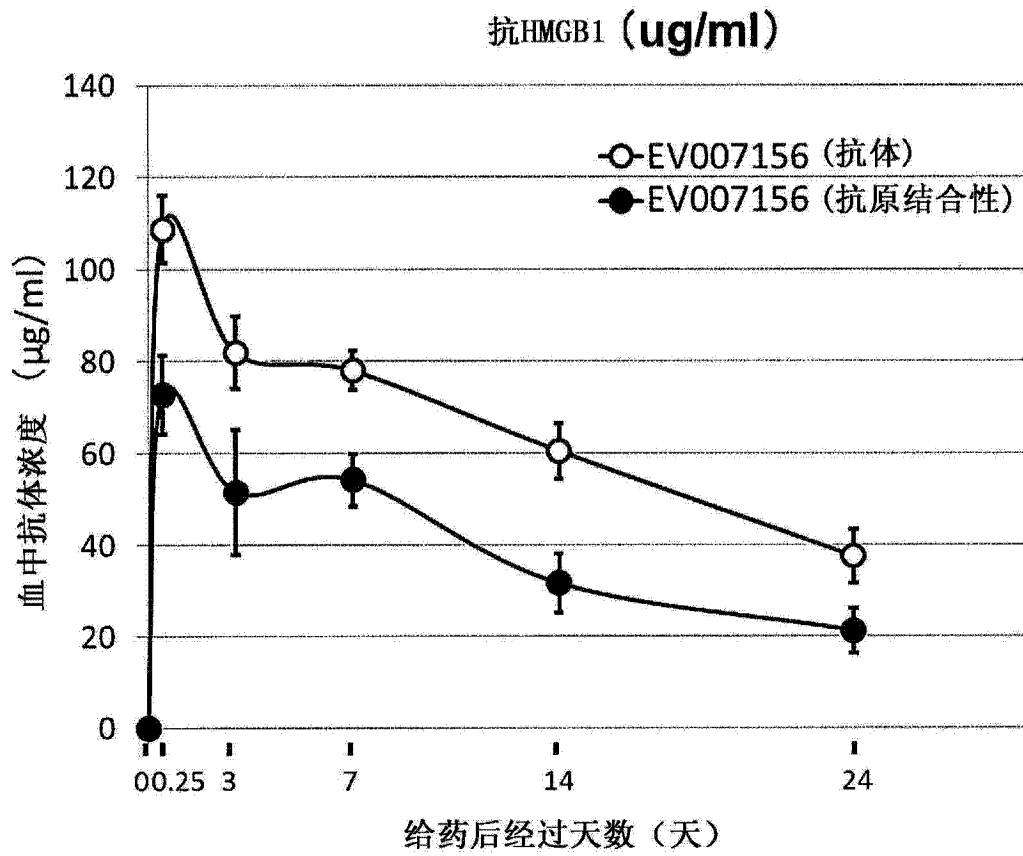


图 12

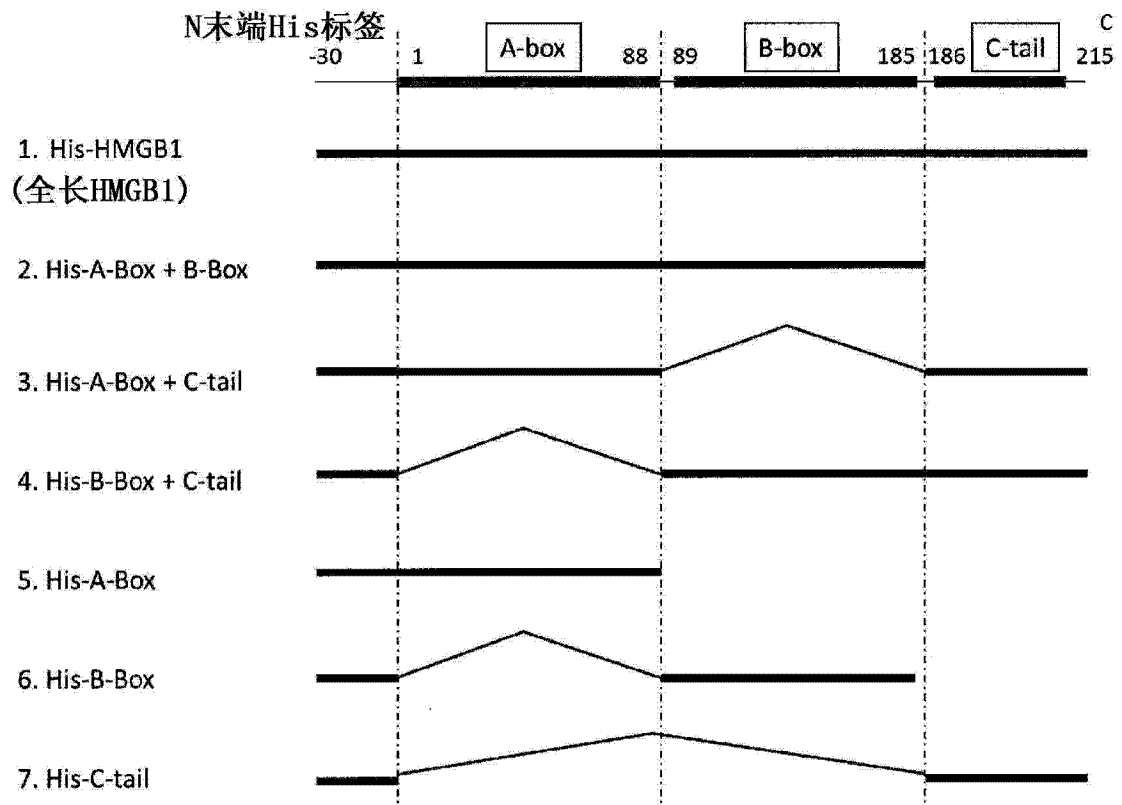


图 13

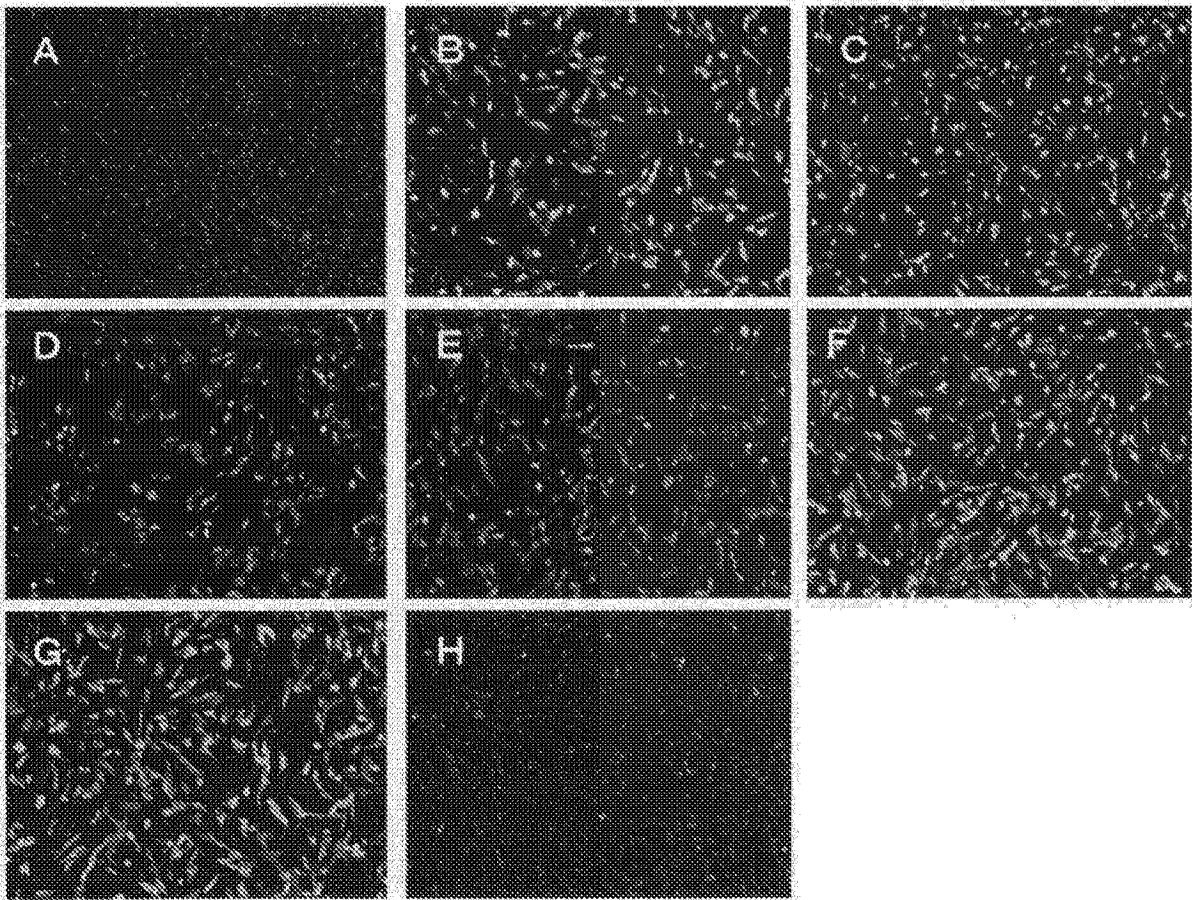


图 14

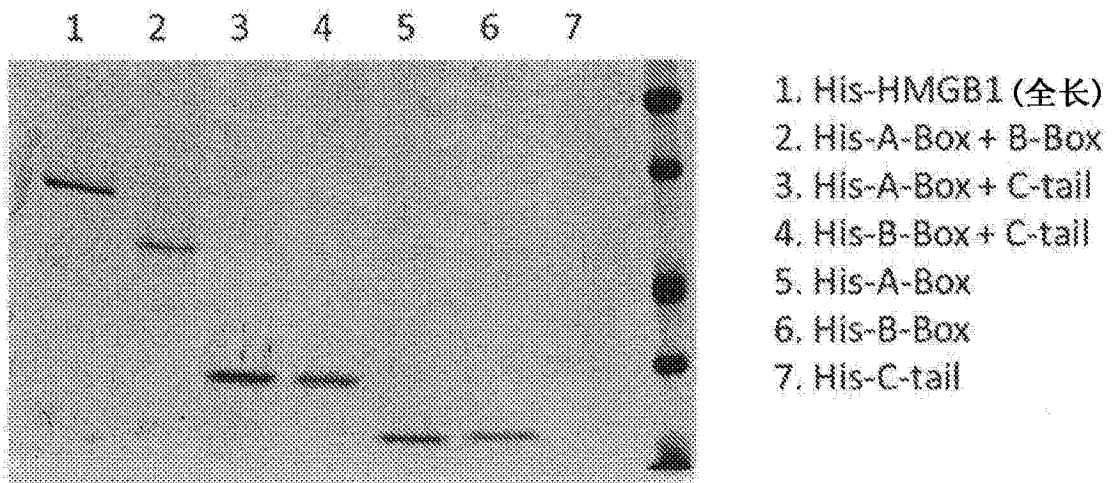


图 15

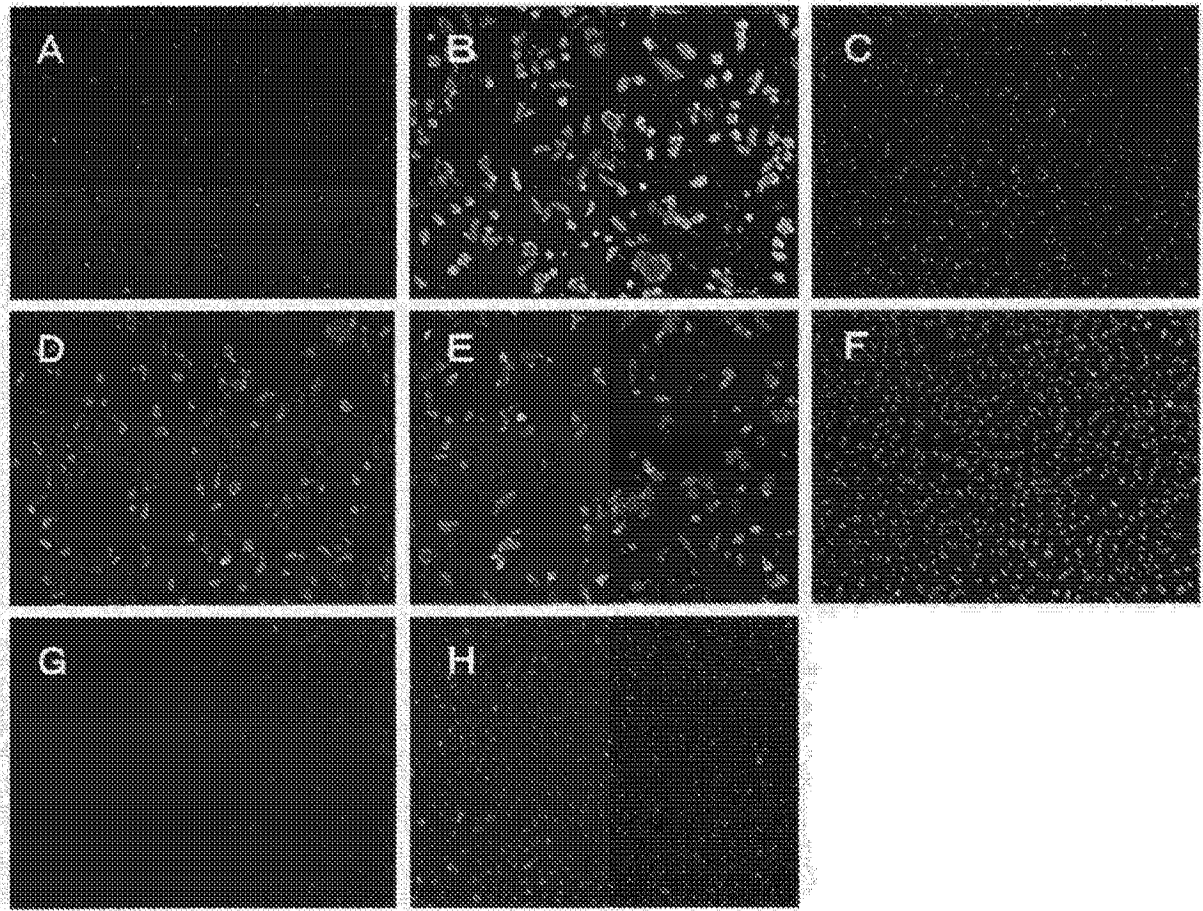


图 16-a

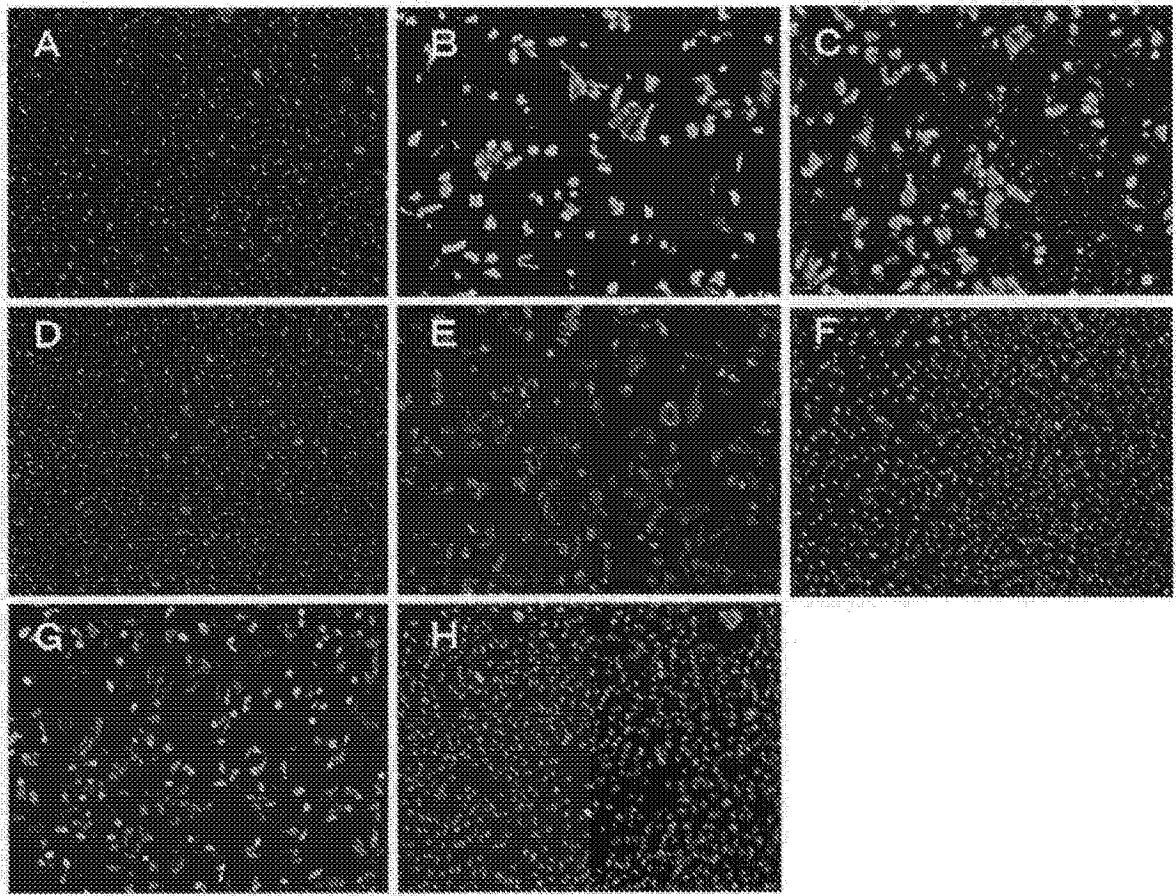


图 16-b

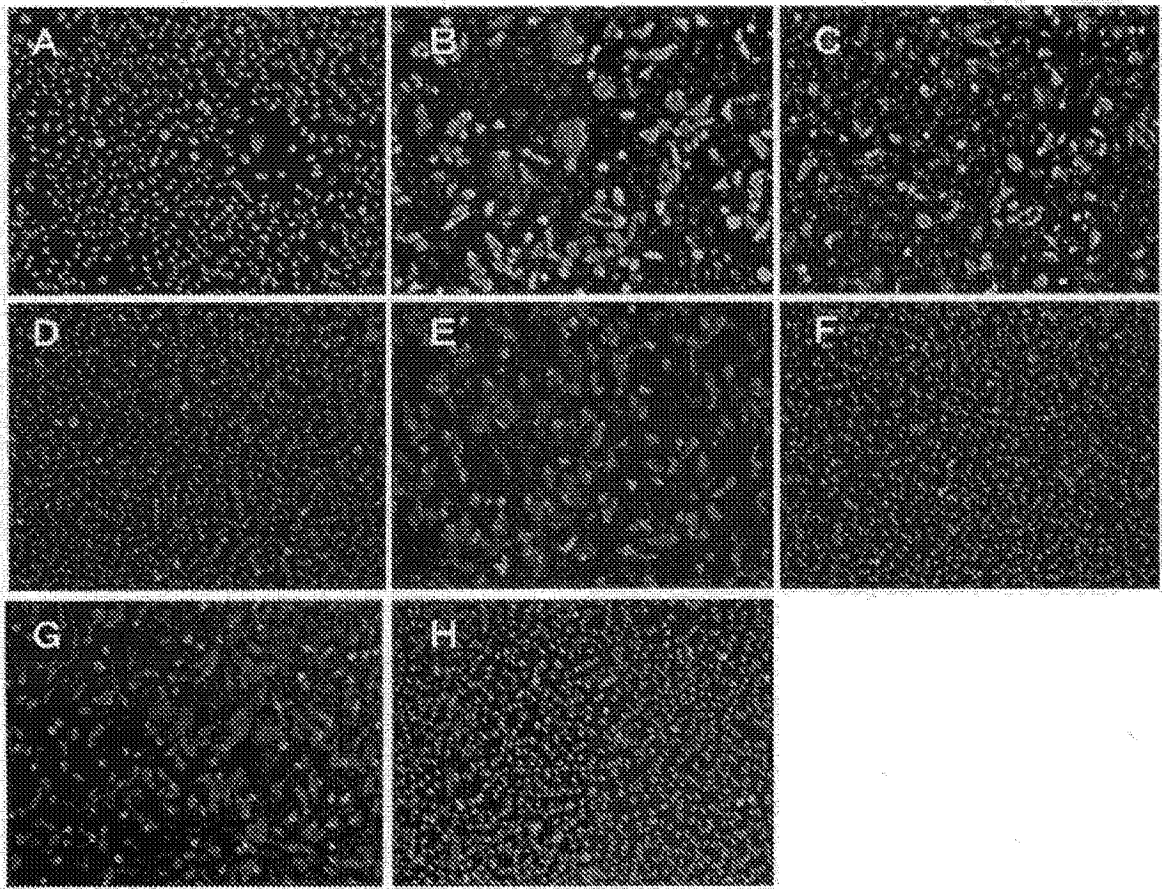


图 16-c

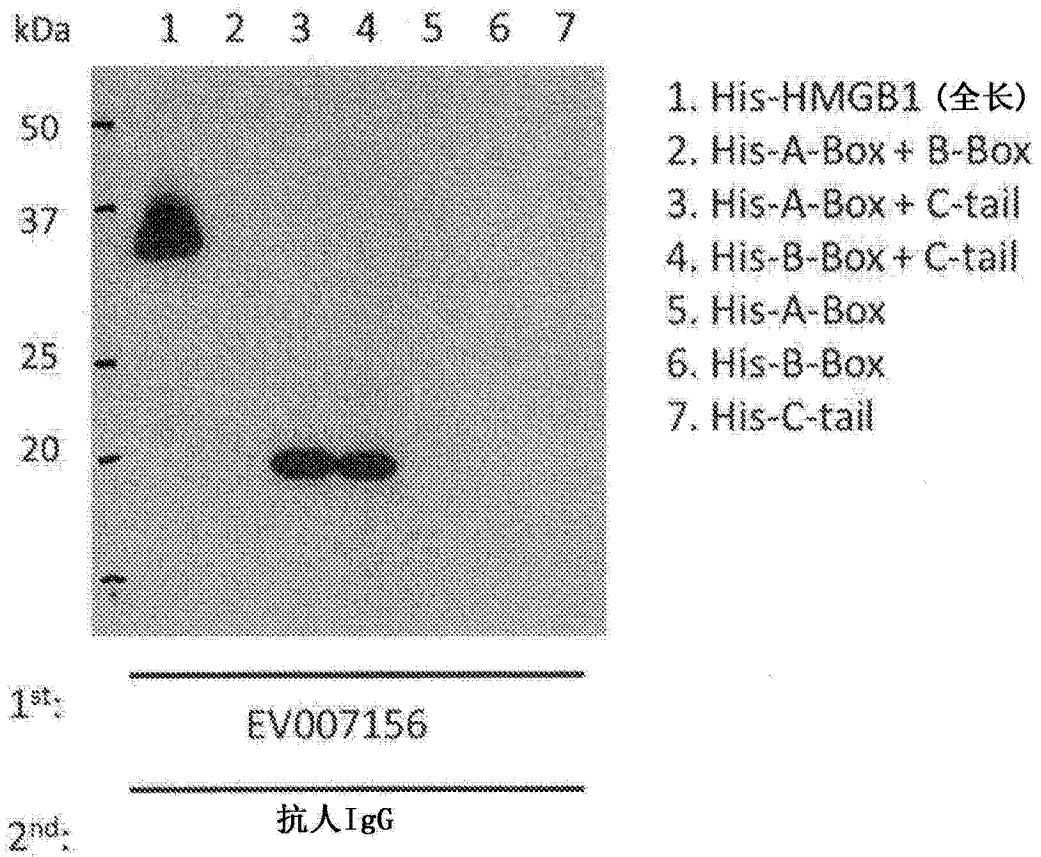


图 17-a

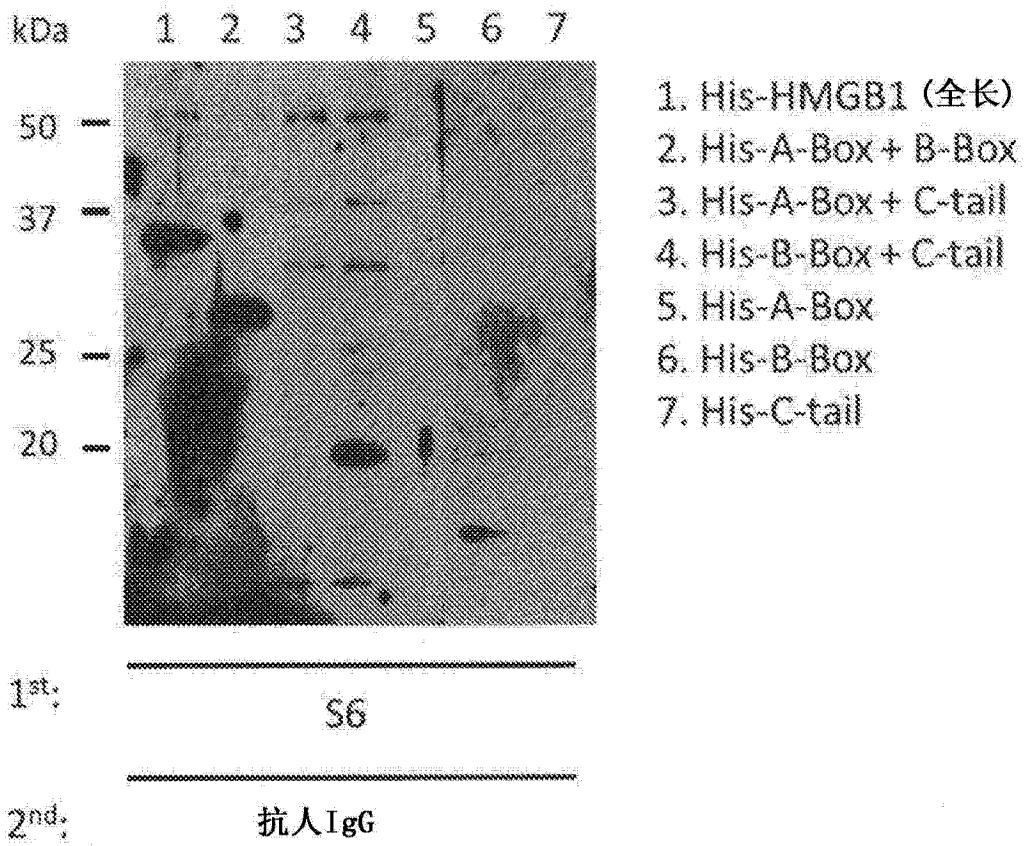


图 17-b

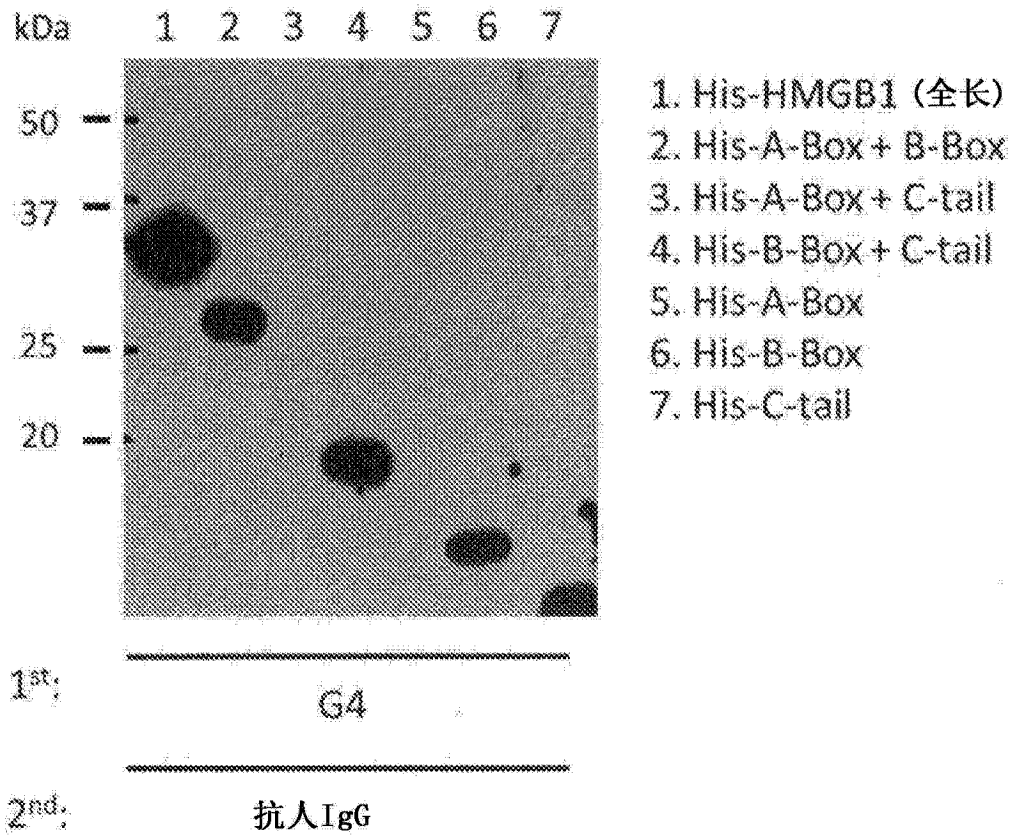


图 17-c

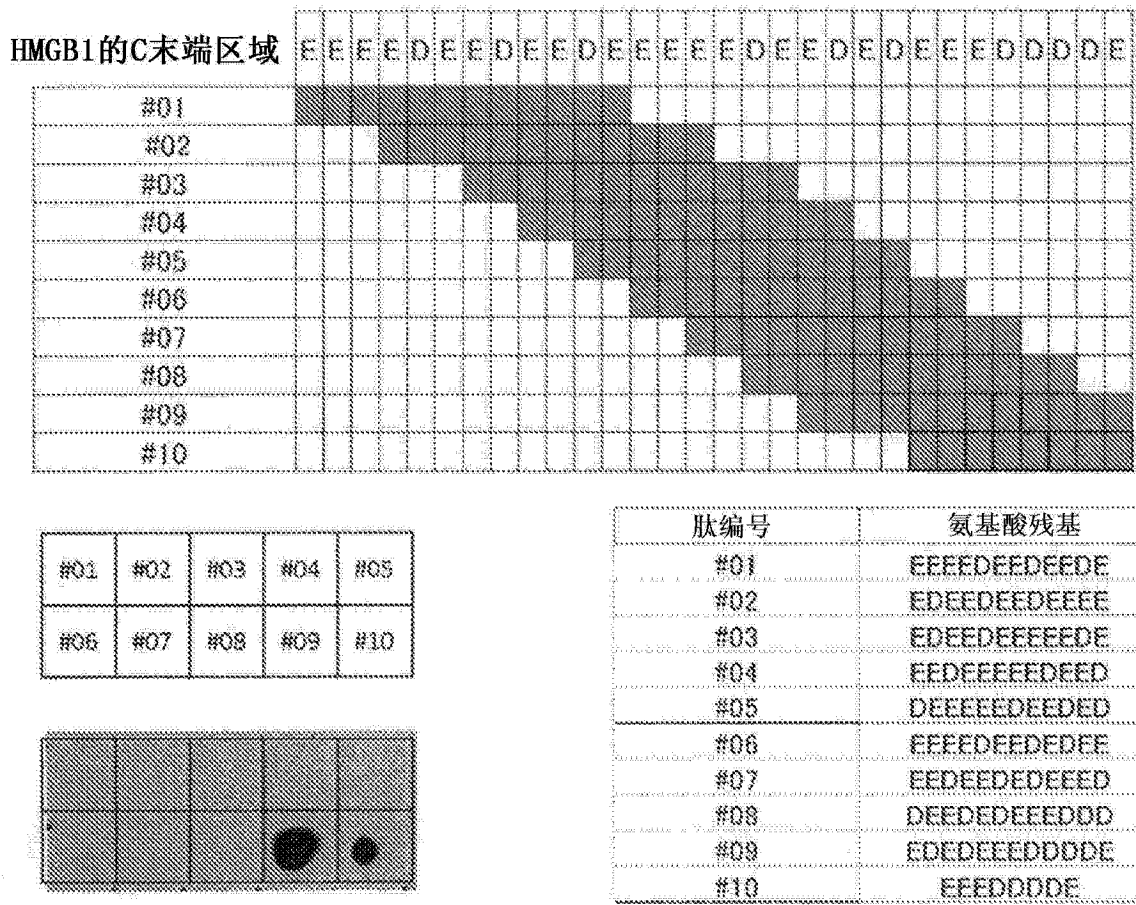


图 18

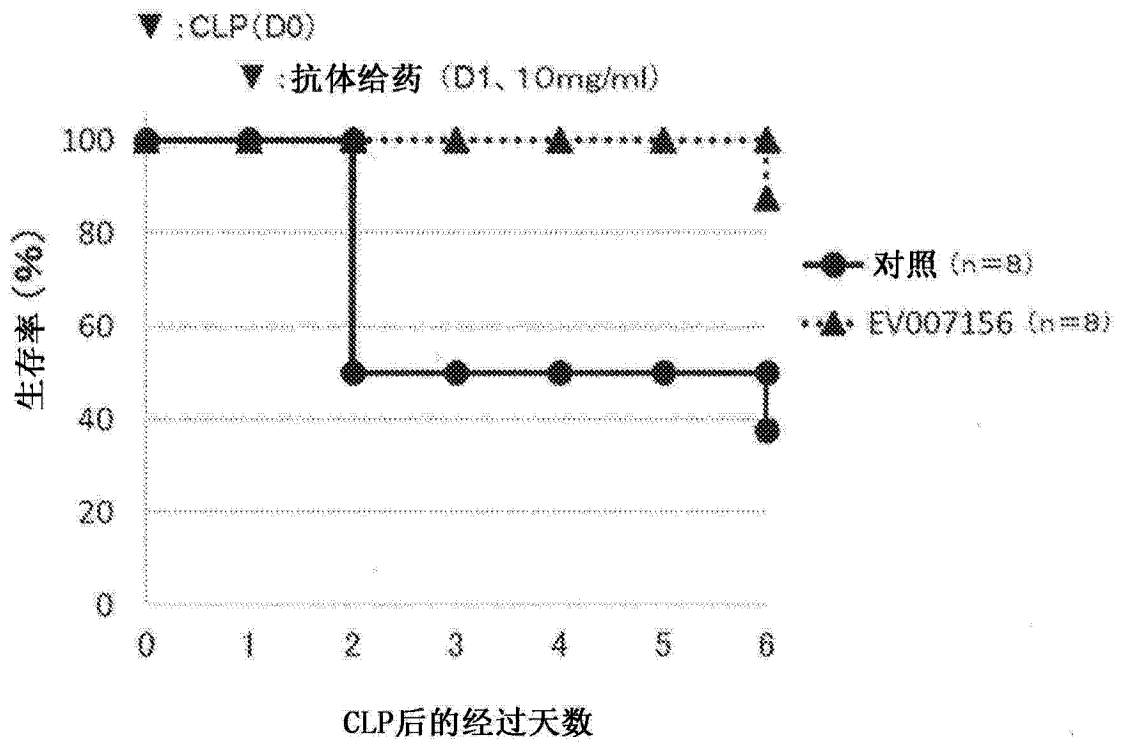


图 19