

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101983207 A

(43) 申请公布日 2011.03.02

(21) 申请号 200880127872.7

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所
31210

(22) 申请日 2008.12.30

代理人 傅强国

(30) 优先权数据

61/018,988 2008.01.04 US

61/094,685 2008.09.05 US

(51) Int. Cl.

C07K 16/24(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.03

A61P 1/00(2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/011146 2008.12.30

A61P 13/12(2006.01)

(87) PCT申请的公布数据

W02009/086920 EN 2009.07.16

(71) 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特保健股份有限公司

戴克斯公司

(72) 发明人 兰道夫·凯尔施鲍默

弗里德里希·谢夫林格

曼弗雷德·里格尔 米夏埃尔·蒂勒

C·海尔特·穆德

于尔根·穆埃尔博格 勒内·霍尔

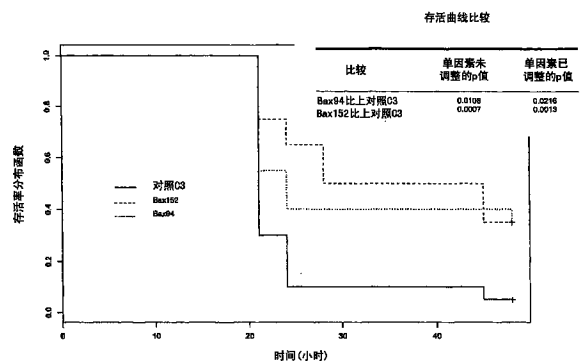
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 11 页

(54) 发明名称

抗 MIF 抗体

(57) 摘要

本申请涉及单克隆抗体和其抗原结合部分，特异性的结合至巨噬细胞游走抑制因子 (MIF) 的 C 末端或者中心区域。这些抗 MIF 抗体和其抗原结合部分进一步地抑制人 MIF 的生物功能。本申请也涉及来源于抗 MIF 抗体的被分离的免疫球蛋白重链和轻链以及编码这种免疫球蛋白的核酸分子。本申请也涉及识别抗 MIF 抗体的方法、含有这些抗体的组合物以及使用这些抗体和组合物用于治疗 MIF 相关疾病的方法。



1. 一种单克隆抗体或者其抗原结合部分,其特征在于,特异性地结合MIF的C末端和中心区域并且抑制人MIF的生物功能。

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体或者抗原结合部分,其特征在于,所述抗体或者抗原结合部分至少具有下面的一个特性:

- a) 抑制拮抗糖皮质激素(GCO)活性
- b) 抑制癌细胞或者成纤维细胞的增殖
- c) 与活性MIF结合
- d) 不与非活性MIF结合
- e) 与鼠抗MIF抗体III.D.9竞争。

3. 如权利要求1或2所述的单克隆抗体或者抗原结合部分,其特征在于,所述抗体或者抗原结合部分结合人MIF, K_p 小于500nM。

4. 如权利要求1所述的单克隆抗体或者抗原结合部分,其特征在于,所述抗体或者所述抗原结合部分结合活性MIF。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗体选自抗体Bax8、抗体Bax69、抗体Bax74、抗体Bax94、抗体Bax152和抗体BaxA10组成的组。

6. 如权利要求5所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗体是IgG4亚类抗体。

7. 如权利要求6所述的单克隆抗体,其特征在于,所述IgG4亚类有一个单突变,凭此IgG4的Fc区域中的CPSC亚序列变成CPPC。

8. 如权利要求1所述的单克隆抗体或者抗原结合部分,其特征在于,所述抗体或者抗原结合部分包含:

a) 各自选自抗体重链的重链CDR1、CDR2和CDR3,所述抗体选自抗体Bax8、抗体Bax69、抗体Bax74、抗体Bax94、抗体Bax152和抗体BaxA10组成的组

b) 各自选自抗体轻链的轻链CDR1、CDR2和CDR3,所述抗体选自抗体Bax8、抗体Bax69、抗体Bax74、抗体Bax94、抗体Bax152和抗体BaxA10组成的组。

9. 如权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗体包含:

c) 重链的氨基酸序列至少有90%等同于抗体Bax8、抗体Bax69、抗体Bax74、抗体Bax94、抗体Bax152和抗体BaxA10的重链氨基酸序列;

d) 轻链的氨基酸序列至少有90%等同于抗体Bax8、抗体Bax69、抗体Bax74、抗体Bax94、抗体Bax152和抗体BaxA10的轻链氨基酸序列。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的单克隆抗体或者抗原结合部分,用于治疗免疫性疾病,其特征在于,所述免疫性疾病是炎性疾病或者过度增生疾病。

11. 如权利要求10所述的单克隆抗体或者抗原结合部分,其特征在于,所述炎性疾病选自下组:脉管炎、关节炎、脓毒、败血性休克、内毒素休克、中毒性休克综合征、获得性呼吸窘迫综合征、肾小球肾炎、炎性肠病、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、腹膜炎、肾炎和牛皮癣。

12. 药物组合物包含如权利要求1至9中任一项所述的单克隆抗体或者抗原结合部分和药学上可接受的载体。

13. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在于,所述单克隆抗体是选自抗体Bax8、抗体Bax69、抗体Bax74、抗体Bax94、抗体Bax152和抗体BaxA10组成的组的抗体。

14. 一种治疗个体中包括人的免疫性疾病的方法,所述免疫性疾病选自炎性疾病或者

过度增生疾病,包括下述步骤:将如权利要求 1 至 9 中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合部分或者如权利要求 12 或 13 所述的药物组合物的治疗有效剂量给药于其需要的所述个体,其特征在于,所述抗体或者所述抗原结合部分进一步抑制人 MIF 生物功能。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述炎性疾病选自下组:脉管炎、关节炎、脓毒、败血性休克、内毒素休克、中毒性休克综合征、获得性呼吸窘迫综合征、肾小球肾炎、炎性肠病、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、腹膜炎、肾炎和牛皮癣。

16. 一种被分离的细胞系,产生如权利要求 1 至 9 中任一项所述的单克隆抗体或者抗原结合部分。

17. 一种被分离的核酸分子包含一种核苷酸序列,所述核苷酸序列编码如权利要求 1 至 9 中任一项所述的单克隆抗体或者抗原结合部分的重链或者轻链。

18. 一种载体包含如权利要求 17 所述的核酸分子,其特征在于,所述载体可选择的包含可操作地连接于所述核酸分子的表达控制序列。

19. 寄主细胞包含如权利要求 18 所述的载体,或者如权利要求 17 所述的核酸分子。

20. 如权利要求 19 所述的寄主细胞包含编码如权利要求 1 至 9 中任一项所述的单克隆抗体或者抗原结合部分的重链的核酸分子和编码轻链的核酸分子。

21. 一种生产单克隆抗体或者其抗原结合部分的方法,包括在适宜条件下培养如权利要求 19 所述的寄主细胞或者如权利要求 16 所述的细胞系和回收所述抗体或者其抗原结合部分。

22. 一种用于识别能够抑制人 MIF 生物功能并且诱导动物模型中的有益效果的抗 MIF 抗体的方法,通过进行下述步骤:a) 选择与活性 MIF 结合并且不与非活性 MIF 结合的抗体
b) 在体外试验中检测所述抗体
c) 选择抑制 GCO 和 / 或细胞增殖的抗体。

抗 MIF 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体和其抗原结合部分,其可特异性地结合至巨噬细胞游走抑制因子 (MIF) 的 C 末端或者中心区域。这些抗 MIF 抗体和其抗原结合部分进一步地抑制人 MIF 的生物功能。本发明也涉及来源于抗 MIF 抗体的被分离的免疫球蛋白重链和轻链以及编码这些免疫球蛋白的核酸分子。本发明也涉及识别抗 MIF 抗体的方法、含有这些抗体的组合物以及使用这些抗体和组合物用于治疗 MIF 相关疾病的方法。

背景技术

[0002] 巨噬细胞游走抑制因子 (MIF) 最初是基于能够抑制巨噬细胞体外随意移动的能力而被分离的细胞因子 (Bloom 等人, Science 1966, 153, 80-2; David 等人, PNAS 1966, 56, 72-7)。虽然自从 1966 年人们已经知道 MIF, 但是并不知道它在大多数细胞中准确的功能, 然而 MIF 似乎是天生的和获得性免疫反应的关键的上游调节剂。

[0003] 在 1989 年, 人 MIF 的 cDNA 被克隆 (Weiser 等人, PNAS 1989, 86, 7522-6), 并且它的基因组定位在染色体 22 上。MIF 基因产物是分子量为 12.5kDa 的氨基酸蛋白。此蛋白在人、小鼠、大鼠和牛的 MIF 之间的序列同源性上是高度保守的, 同源性为 90-96%。然而, MIF 与其他任何蛋白没有显著的序列同源性。MIF 的三维结构不像任何其他细胞因子或者脑垂体激素。蛋白结晶成相同亚基的三聚体。每个单体包含两个反向平行的 α -螺旋, α -螺旋堆集成有四条链的 β -折叠。该单体有另外两个 β -链, 它们与相邻的亚基的 β -折叠相互作用形成单体之间的交界面。三个 β -折叠排列形成桶, 该桶含有溶剂可到达的通道, 此通道沿着分子的三折叠轴穿过蛋白的中心 (Sun 等人, PNAS 1996, 93, 5191-5196)。

[0004] 已经有报导称很低浓度的糖皮质激素就可以诱导巨噬细胞分泌 MIF (Calandra 等人, Nature 1995, 377, 68-71)。然而, 作为促炎细胞因子 (proinflammatory cytokine), MIF 也可反向调节糖皮质激素的作用并刺激其它细胞因子如肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和白介素 $\text{IL-1}\beta$ 的分泌 (Baugh 等人, Crit Care Med 2002, 30, S27-35), 从而假定在炎症和免疫性疾病的发病机理上的作用。MIF 也与淋巴瘤、黑素瘤和结肠癌的生长直接相关 (Nishihira 等人, J Interferon Cytokine Res. 2000, 20 :751-62)。

[0005] MIF 是许多病理状况的中介体, 因此与多种疾病相关联, 包括炎症性肠病 (IBD)、类风湿性关节炎 (RA)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、哮喘、肾小球肾炎、IgA 肾小球肾炎、癌症、心肌梗死 (MI) 和脓毒。

[0006] 多克隆和单克隆抗 MIF 抗体已经被开发用来对抗重组人 MIF (Shimizu 等人, FEBS Lett. 1996 ;381, 199-202 ;Kawaguchi 等人, J. Leukoc. Biol. 1986, 39, 223-232, and Weiser 等人, Cell. Immunol. 1985, 90, 167-78)。

[0007] 已经有人建议, 抗 MIF 抗体可用于抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 释放的治疗应用。Calandra 等人 (J. Inflamm. 1995. 47, 39-51) 报导使用抗 MIF 抗体可以保护动物免于实验诱导的革兰氏阴性和革兰氏阳性的败血性休克。表明抗 MIF 抗体作为一种治疗方法可用来调节在败血性休克及其他炎症疾病状态下的细胞因子的产生。

[0008] 美国专利 6,645,493 公开了来源于杂交瘤细胞的单克隆抗 MIF 抗体,它压制了 MIF 的生物活性。在动物模型中可以看到这些来源于小鼠的抗 MIF 抗体在内毒素诱导的休克的治疗上取得了有益效果。一些被描述的抗 MIF 抗体 (III. D. 9, XIV. 14. 3 和 XIV. 15. 5) 在本发明中被用于比较试验。

[0009] 美国专利 2003/0235584 公开了在动物中制备 MIF 的高亲和性抗体的方法,其中 MIF 基因已经被纯合地敲除。

[0010] Galat 等人描述了糖基化抑制因子 (GIF) 蛋白 (Eur. J. Biochem. 1994, 224, 417-21)。MIF 和 GIF 现在被认为是相同的。Watarai 等人 (PNAS 2000, 97, 13251-6) 描述了与不同 GIF 抗原表位相结合的多克隆抗体以便确定 Ts 细胞中 GIF 翻译后修饰的生物化学本质。Watarai 等人 (PNAS 2000, 97, 13251-6) 报导了体外 GIF 出现的不同构象同工型。一种类型的异构体是通过单个半胱氨酸残基的化学修饰而生成的。该化学修饰导致了 GIF 蛋白内部的构象变化并改变了它的生物功能。

[0011] 考虑到 MIF 参与多种疾病的复杂性,迫切需要对抗原表位特异性的抗 MIF 抗体功能和其在医疗方法上的应用进行说明。因此,存在着抗原表位特异性抗 MIF 抗体的需求,该抗体抑制人 MIF 用于治疗被 MIF 介导的疾病和状况的生物功能。

发明内容

[0012] 本发明涉及抗体和其抗原结合部分,其可特异性地结合至巨噬细胞游走抑制因子 (MIF) 的 C 末端或者中心区域。

[0013] 本发明进一步地涉及编码这些抗体或者其抗原结合部分的核酸分子,并且涉及包含这种核酸的载体和包含这种载体的寄主细胞,而且还涉及用于重组生产被核酸分子编码的多肽的方法。

[0014] 本发明也涉及包含抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分的药物组合物。药物组合物也可以包含药学上可接受的载体或者其他治疗试剂。

[0015] 本发明也涉及抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分在制备用于治疗免疫性疾病如炎症性疾病和过度增生性疾病的药物中的应用。

[0016] 本发明进一步地涉及抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分用于治疗免疫性疾病如炎症性疾病和过度增生性疾病。

[0017] 本发明也涉及用抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分的有效剂量治疗各种免疫性疾病和症状的方法,比如炎症性疾病和过度增生性疾病。

[0018] 本发明还涉及诊断方法。抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分可用于检测生物样品中的 MIF。

[0019] 本发明进一步地涉及一种用于识别能够抑制活性 MIF 并在动物模型中诱导有益效果的抗 MIF 抗体的方法。

附图说明

[0020] 图 1. 显示本发明中人抗 MIF 抗体的轻链可变区域的氨基酸序列。

[0021] 图 2. 显示本发明中人抗 MIF 抗体的重链可变区域的氨基酸序列。

[0022] 图 3. 显示本发明中人抗 MIF 抗体的轻链可变区域的 DNA 序列和它的翻译。

[0023] 图 4. 显示本发明中人抗 MIF 抗体的重链可变区域的 DNA 序列和它的翻译。

[0024] 图 5. 小鼠 III. D. 9 对抗对照抗体 (C3) 和抗 MIF 抗体 Bax94 的竞争性实验。通过增加抗体 Bax94 的量, 可以观察到清楚的竞争。

[0025] 图 6. 在腹膜炎动物模型中, 与对照抗体 (C3) 相比, 抗体 Bax94 (点线) 和抗体 Bax152 (短划线) 显示了增加的存活率和延迟的死亡时间。

[0026] 图 7. 抗体 Bax94 与活性 MIF 和无活性 MIF 的差别结合。抗体 Bax94 在直接 ELISA 形式中与活性 MIF 结合, 然而没有与无活性 MIF 结合。

[0027] 图 8. 概括人抗 MIF 抗体的体外特性的表格。

[0028] 图 9. 在以细胞为基础的试验中, 抗 MIF 抗体的促凋亡作用。在用抗体处理 PC-3 细胞之后, 显示的细胞的胱天蛋白酶 -3 (效应物胱天蛋白酶) 活性。试验重复做三次并且数据表示为平均值 \pm 标准偏差。

[0029] 图 10. 抗 MIF 抗体的反入侵作用。检验 PC-3 前列腺癌细胞通过被 matrigel 涂敷的 Transwell™ 插片的入侵。每一个视野的入侵细胞数被计数 (400 倍放大下的显微镜检查)。来自于 3-10 个视野的数据被表示为平均值 \pm 标准偏差, 并且显示出显著性差异。

具体实施方式

[0030] 定义和一般技术

[0031] 除非此处另外定义, 与本发明相关的科学和专业词汇所具有的含义应当被本领域中的技术人员共同理解。通常, 此处描述的与细胞组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学相关的命名及其技术是本领域中为人所熟知的和被共同使用的。本发明的方法和技术通常是根据本领域中为人所熟知的常规方法来操作的, 正如贯穿本说明书被引用和被讨论的各种一般的和更具体的参考文献中所描述的一样, 除非另有陈述。参加, 如 Sambrook 等人的《分子克隆: 实验室手册》, 第二版, 美国冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约 (1999), 和 Ausubel 等人的《当代分子生物学流程》, Greene 出版协会 (1992), 以及 Harlow 和 Lane 的《抗体: 实验室手册》, 美国冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约 (1990), 并入此文以供参考。

[0032] “MIF” 或者 “巨噬细胞游走抑制因子” 指的是蛋白质, 其是已知的免疫和炎症反应中的关键的中介体, 特别是糖皮质激素的反向调节剂。MIF 包括哺乳动物 MIF, 特别是人 MIF (Swiss-Prot 最初登录号: P14174), 其中单体形式被编码成有 115 个氨基酸的蛋白质, 但是由于初始的甲硫氨酸被切除, 产生有 114 个氨基酸的蛋白质。“MIF” 也包括 “GIF” (糖基化抑制因子) 及其它形式的 MIF 如 MIF 融合蛋白。MIF 中氨基酸的编号起始于 N 末端甲硫氨酸 (氨基酸 1) 并结束于 C 末端丙氨酸 (氨基酸 115)。

[0033] 术语 “活性 (的) MIF” 指的是 MIF 天然存在的构象同工型, 与其生物功能相关。活性的 MIF 包括可以在细胞表面上被观察到的同工型 (如 THP1 等等)。活性 MIF 也包括存在于被细菌攻击后的哺乳动物血清中的 MIF 同工型。

[0034] “抗体” 指的是完整的抗体或者可与完整的抗体进行特异性结合竞争的抗原结合部分。通常参见《基础免疫学》, 第 7 章 (Paul, W. 编著, 第 2 版。Raven 出版社, 纽约 (1989)) (并入本文以供参考)。术语抗体包括基因工程化形式比如嵌合的或者人源化的抗体。

[0035] 术语抗体的 “抗原结合部分” 指的是抗体的有能力特异性地与抗原 (如 MIF) 结合

的一个或多个片段。抗原结合部分可以通过重组 DNA 技术或者通过酶法或化学法裂解完整的抗体来生成。抗原结合部分包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 和互补性决定簇区域 (CDR) 片段、单链抗体 (scFv)、嵌合抗体、双抗体和含有至少一部分足以使特异性抗原与多肽结合的抗体的多肽。从 N 末端至 C 末端,成熟轻链和重链可变区域两者都包含区域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。氨基酸至每个结构域的分配符合 Kabat 限定,参见“免疫兴趣的蛋白质序列”(国立卫生研究院, Bethesda, 马里兰州 (1987 和 1991)), Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987), 或者 Chothia 等人, Nature. 342 :878-883(1989)。抗体或者其抗原结合部分可以被衍生化或者被连接至另一个功能性分子(如另一个肽或者蛋白质)。例如,抗体或者其抗原结合部分可以被功能性地连接至一个或多个其他分子实体比如另一个抗体(如双特异性抗体或者双抗体)、可检测的试剂、细胞毒素试剂、药物试剂和/或连接分子。

[0036] 术语“人的抗体”指的是任何其中可变结构域和恒定结构域序列是人的序列的抗体。该术语包含具有来源于人基因的序列的抗体,但是该序列被改变过,比如为了减少可能的免疫原性、增加亲和性、删除可能引起不想要的折叠的半胱氨酸等等。该术语包含这种抗体:非人类细胞中重组产生的、或许可以给予人类细胞中一般没有的糖基化。

[0037] 术语“人源化抗体”指的是免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、片段、或者抗体中其他抗原结合部分),它们包含来源于非人类免疫球蛋白的序列。

[0038] 术语“嵌合抗体”指的是包含来自于两个或更多不同种类的区域的抗体。

[0039] 术语“被分离的抗体”或者“被分离的其抗原结合部分”指的是抗体或者其抗原结合部分已经被识别并从抗体来源中被选择,所述抗体来源比如使噬菌体展示文库或者 B 细胞库。

[0040] 术语“K_D”指的是特定抗体的 Fab 部分与各自的抗原的平衡解离常数。

[0041] 术语 MIF 的“中心区域”和“C 末端区域”指的是人 MIF 中分别包含氨基酸 35-68 和 86-115 的区域。

[0042] 术语“抗原表位”包括任何蛋白决定部位,其能够与免疫球蛋白或者抗体片段特异性地结合。抗原表位决定簇通常由化学活性表面集合的分子比如暴露的氨基酸、氨基糖或者其他碳水化合物侧链组成,并且通常有特定的三维结构特征以及特定的荷电特性。

[0043] 术语“载体”指的是能够转运另一个与之相连接的核酸的核酸分子。在一些实施方式中,载体是质粒,即附加的 DNA 片段可与之相连接的环状双股 DNA 环。

[0044] 术语“寄主细胞”指的是在引入表达载体后能够产生重组蛋白质的细胞系。术语“重组细胞系”指的是被导入重组表达载体的细胞系。应当理解,“重组细胞系”指的不仅是特定的个体细胞系而且是此种细胞系的后代。因为由于突变或者环境影响而在后续的世代中可能出现的某些修饰,所以此种后代实际上可以不必与亲细胞相同,但是仍然被包括在此处使用的术语“重组细胞系”的范围中。

[0045] 术语“药学上可接受的载体”指的是在生理上是相容的任何和所有的溶剂、分散剂、包衣、抗菌试剂和抗真菌试剂、等渗试剂和吸收延迟剂等等。

[0046] 抗 MIF 抗体

[0047] 在一个实施方式中,本发明涉及被分离的单克隆抗体或者其抗原结合部分,其可

特异性地与人 MIF 的 C 末端或中心区域相结合,并且进一步地抑制人 MIF 的生物功能。在一些实施方式中,单克隆抗体是人单克隆抗体。在其他实施方式中,单克隆抗体是人源化的单克隆抗体。

[0048] 在一些实施方式中,抗 MIF 抗体的轻链包含的氨基酸序列与以下抗体的 V_L 氨基酸序列相同:抗体 Bax8(SEQ IDNO:1)、抗体 Bax69(SEQ IDNO:2)、抗体 Bax74(SEQ IDNO:3)、抗体 Bax94(SEQ IDNO:4)、抗体 Bax152(SEQ IDNO:5)、抗体 BaxA10(SEQ IDNO:6),或者包含的氨基酸序列与上述的氨基酸序列有 85%、更优选 90% 的序列同源性。在一些实施方式中,轻链包含上述抗体中任何一个抗体的从 CDR1 开始至 CDR3 末端的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗 MIF 抗体的轻链至少包含图 1 中所示氨基酸序列中的轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3。

[0049] 在一些实施方式中,重链包含以下抗体的可变区 (V_H) 的氨基酸序列:抗体 Bax8(SEQ IDNO:7)、抗体 Bax69(SEQ IDNO:8)、抗体 Bax74(SEQ IDNO:9)、抗体 Bax94(SEQ IDNO:10)、抗体 Bax152(SEQ IDNO:12)、抗体 BaxA10(SEQ IDNO:12),或者包含的氨基酸序列与上述的氨基酸序列有 85%、更优选 90% 的序列同源性。在一些实施方式中,重链包含上述抗体中任何一个抗体的从 CDR1 开始至 CDR3 末端的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗 MIF 抗体重链至少包含图 2 中所示氨基酸序列中的重链 CDR1、CDR2 或 CDR3。

[0050] 抗 MIF 抗体的类别和亚类

[0051] 本发明的抗 MIF 抗体是被分离的单克隆抗体。抗 MIF 抗体可以是 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子。在其他实施方式中,抗 MIF 抗体是 IgG,并且是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类。在其他实施方式中,抗体是亚类 IgG1 或者 IgG4。在其他实施方式中,抗体是亚类 IgG4。在一些实施方式中,IgG4 抗体有一个将丝氨酸(丝氨酸 228,根据 Kabat 编号表)变成脯氨酸的单突变。因此,IgG4 的 Fc 区域中的 CPSC 亚序列变成 CPPC, CPPC 是 IgG1 中的亚序列(Angal 等人, Mol Immunol. 1993, 30, 105-108)。

[0052] 被抗 MIF 抗体识别的 MIF 抗原表位

[0053] 在一些实施方式中,本发明涉及抗 MIF 抗体或其抗原结合部分,其特异性地分别与跨越人 MIF 中的氨基酸 35-68 或 86-115 的区域相结合,优选抗 MIF 抗体特异性地分别与跨越氨基酸 50 至 68 或者 86 至 102 的区域相结合,并且抑制人 MIF 的生物功能。

[0054] 在其他实施方式中,本发明涉及抗 MIF 抗体,其特异性地与活性 MIF 相结合,并且进一步地抑制人 MIF 的生物功能。在一些实施方式中,活性 MIF 是膜结合性的。

[0055] 出人意料地发现,在与人 MIF 的结合研究中,本发明的抗 MIF 抗体具有能与抗 MIF 抗体 III.D.9 相竞争的令人惊奇的特性。III.D.9 的竞争能够按在实施例 5 中所描述的方法测定。

[0056] 抗 MIF 抗体对人 MIF 的结合亲和力

[0057] 本发明涉及抗 MIF 抗体或其抗原结合部分,其特异性地与人 MIF 相结合时的 K_D 是 $5 \times 10^{-7}M$ 以下。在其他实施方式中,抗体与人 MIF 相结合时的 K_D 是 $5 \times 10^{-8}M$ 以下、 $5 \times 10^{-9}M$ 以下或者 $5 \times 10^{-10}M$ 以下。

[0058] 抗 MIF 抗体或其抗原结合部分对人 MIF 的结合亲和力可以通过本领域中已知的方法进行测定。结合亲和力比如可以通过表面等离子共振(BIACORE)被测定。实施例 10 举例说明了一种方法,用于通过 BIACORE 技术确定抗 MIF 抗体的亲和常数。

[0059] 在一些实施方式中,本发明进一步地涉及抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分,其特异性地与活性 MIF 相结合时的 K_D 小于 500nM,并且进一步抑制人 MIF 的生物功能。在一些实施方式中,抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分与活性 MIF 相结合时的 K_D 小于 50nM。

[0060] 抗 MIF 抗体的生产

[0061] 根据本发明的抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分可以通过本领域的技术人员所熟知的许多方法来制备,比如筛选抗体片段的噬菌体展示文库。可以使用不同形式的噬菌体展示文库,比如 scFv 或者 Fab 片段文库等等。噬菌体展示文库被筛选用于对特定的 MIF 表面抗原具有期望的亲力的抗体片段,并且从合适的克隆中回收遗传材料。在产生和筛选文库的连续几轮操作中,可以分离出与被分离的最初抗体片段的亲和力相比具有增大的亲和力的抗体片段。被鉴定的抗 MIF 片段的亲和力可以通过亲和熟化而得到进一步提高。

[0062] 制备抗 MIF 抗体的核酸、载体、寄主细胞和重组体方法

[0063] 本发明进一步地涉及编码根据本发明的抗 MIF 的抗体或者其抗原结合部分的核酸分子,以及包含这种核酸的载体和包含这种载体的寄主细胞,以及重组生产被该核酸分子编码的多肽的方法。

[0064] 在一些实施方式中,编码抗 MIF 抗体的 V_L 区域的 DNA 序列包含的核苷酸序列与图 3 所示的下组抗体的 V_L 序列相同:抗体 Bax8(SEQ ID NO:13)、抗体 Bax69(SEQ IDNO:14)、抗体 Bax74(SEQ ID NO:15)、抗体 Bax94(SEQ ID NO:16)、抗体 Bax152(SEQ ID NO:17)、抗体 BaxA10(SEQ ID NO:18),或者包含的序列与上述的核苷酸序列中任一个有 85%、更优选 90% 的序列同源性。

[0065] 在一些实施方式中,编码抗 MIF 抗体的 V_H 区域的 DNA 序列包含的核苷酸序列与图 4 所示的以下抗体的 V_H 序列相同:抗体 Bax8(SEQ ID NO:19)、抗体 Bax69(SEQ IDNO:20)、抗体 Bax74(SEQ ID NO:21)、抗体 Bax94(SEQ ID NO:22)、抗体 Bax152(SEQ ID NO:23)、抗体 BaxA10(SEQ ID NO:24),或者包含的序列与上述的核苷酸序列中的任一个有 85%、更优选 90% 的序列同源性。

[0066] 根据本发明的抗 MIF 抗体的生产包括任何通过基因工程用于重组 DNA 产生的方法,比如通过 RNA 反转录和 / 或 DNA 扩增以及克隆进入表达载体。

[0067] 在一些实施方式中,载体是病毒载体,其中附加的 DNA 片段可以被连接至病毒基因组中。在一些实施方式中,在寄主细胞中能够自主复制的载体被导入寄主细胞(如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。在其他实施方式中,载体(如非游离型哺乳动物载体)一旦被导入寄主细胞中,就可以被整合入寄主细胞的基因组中,并且因此与寄主基因组一起被复制。此外,某些载体能够引导与它们可操作地连接的基因的表达。这些载体此处被称为“重组表达载体”(或简单地称为“表达载体”)。

[0068] 抗 MIF 抗体可以通过常规的表达载体如细菌载体(如 pBR322 和其衍生物)或者真核载体来被生产。这些编码抗体的序列可以具有调节序列,该调节序列调节复制、表达和 / 或寄主细胞的分泌。这些调节序列包含例如启动子(如 CMV 或 SV40)和信号序列。表达载体也可以包含选择性标记和扩增标记,如二氢叶酸还原酶基因(DHFR)、潮霉素 B 磷酸转移酶以及胸腺嘧啶核苷激酶。被使用的载体的组成部分,如选择性标记、复制子、增强子,可以购买或者通过常规方法来制备。载体可以被构建用于在不同的细胞培养物中例如在哺乳动物细胞如 CHO、COS、HEK293、NS0 中、在成纤维细胞、昆虫细胞、酵母或者细菌如大肠杆菌

中表达。在有些情况下,被使用的细胞使得被表达的蛋白最佳糖基化。

[0069] 抗 MIF 抗体轻链基因和抗 MIF 抗体重链基因可以被插入分开的载体中或者两个基因被插入同一个表达载体中。抗体基因通过标准方法被插入表达载体中,比如通过在抗体基因片段和载体上的互补限制性位点连接,或者如果没有限制性位点就通过平端连接。

[0070] 抗 MIF 抗体或其抗原结合部分的生产可以包括本领域中任何已知的通过转染例如通过电穿孔或者微量注射将重组 DNA 导入真核细胞的方法。例如,抗 MIF 抗体的重组表达可以通过下述方法来完成:通过合适的转染,将包含受一个或多个调节序列如强启动子控制的编码抗 MIF 抗体的 DNA 序列的表达质粒导入合适的寄主细胞系,导致细胞具有被稳定合并入基因组的序列。根据本发明,脂转染法是可以使用的转染方法的一个例子。

[0071] 抗 MIF 抗体的生产也可以包括本领域中任何已知的例如以连续方式或分批方式培养上述转化细胞的方法,并且抗 MIF 抗体的表达方法例如是组成型的或者诱导型的。

[0072] 根据本发明的寄主细胞可以是任何真核细胞。在一个实施方式中,细胞是能够进行抗 MIF 抗体翻译后修饰的哺乳动物细胞。例如上述的哺乳动物细胞来源于哺乳动物细胞系,比如选自由 SkHep、CHO、HEK293 以及 BHK 细胞所组成的组中的细胞系。在一个实施方式中,抗 MIF 抗体在 DHFR 缺乏型 CHO 细胞系如 DXB11 中表达,并且添加 G418 作为选择性标记。当编码抗体基因的重组表达载体被导入哺乳动物寄主细胞中时,抗体的生产是通过培养寄主细胞足以允许抗体在寄主细胞中表达或者允许抗体被分泌进入寄主细胞生长的培养基中的一段时间而进行。

[0073] 抗体 MIF 抗体可以通过使用标准蛋白质纯化方法从培养基中被回收。

[0074] 另外,抗 MIF 抗体的生产也可以包括本领域中任何已知的用于抗体纯化的方法,如通过阴离子交换层析或者亲和层析。在一个实施方式中,抗 MIF 抗体可以通过大小排阻层析而从被细胞培养上清液中提纯。

[0075] 抗 MIF 抗体的特点

[0076] 本发明涉及抗 mIF 抗体或其抗原结合部分,其具有以下特点中的至少一个特点:

[0077] a) 与人 MIF 的 C 末端或中心区域相结合;

[0078] b) 抑制拮抗糖皮质激素 (glucocorticoid overriding, GCO) 活性;

[0079] c) 抑制细胞系如成纤维细胞或者癌细胞 (如 NIH/3T3 或 PC-3) 的增殖;

[0080] d) 与活性 MIF 相结合;

[0081] e) 不与无活性 MIF 相结合;

[0082] f) 与鼠抗 MIF 抗体 III. D. 9 竞争。

[0083] 在一些实施方式中,活性的 MIF 是通过利用温和氧化剂比如胱氨酸处理人 MIF、或者通过将人 MIF 固定和支持物比如 ELISA 板或者小珠上而产生的活性 MIF 的同工型。在其他实施方式中,活性 MIF 是利用细菌攻击动物后在体内产生的活性 MIF 的同工型。在其他实施方式中,活性 MIF 是在细胞 (如 THP1、CFB) 的表面体内产生的活性 MIF 的同工型。

[0084] 在一些实施方式中,无活性 MIF 是被还原的 MIF (如在实施例 7 中所描述的) 或者在细胞内被储存的 MIF。

[0085] 在其他实施方式中,抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分与活性 MIF 相结合时的 K_D 小于 500nM。

[0086] 抗 MIF 抗体的药物组合物及治疗方法

[0087] 本发明也涉及包含抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分的组合物,用于需要治疗 MIF 相关疾病的个体的治疗,特别是免疫性疾病如炎症疾病和过度增生疾病。

[0088] 在一些实施方式中,需要治疗的受试者是人。过度增生疾病,如癌症,可以通过本发明的抗 MIF 抗体被治疗。癌症可以包括任何组织或器官的癌症,并且包括、但不限于脑、肺、鳞状上皮细胞、膀胱、胃的、胰的、心脏、头部、颈部、肝脏、肾脏、卵巢、前列腺、结肠直肠的、食道的、妇科的、鼻咽部的癌症、或者甲状腺癌、黑素瘤、淋巴瘤、白血病或者多发性骨髓瘤。尤其是,本发明的抗 MIF 抗体在治疗乳腺、前列腺、结肠和肺的恶性肿瘤上是有用的。

[0089] 本发明也包括用于治疗个体包括人中的下述炎症性疾病的方法:例如脉管炎、关节炎、脓毒、败血性休克、内毒素休克、中毒性休克综合征、获得性呼吸窘迫综合征、肾小球肾炎、炎性肠病、局部性回肠炎、溃疡性结肠炎、腹膜炎、肾炎、遗传过敏性皮炎、哮喘、结膜炎、发热、疟疾或者牛皮癣,该方法包括将抗 MIF 抗体或其抗原结合部分的治疗有效剂量给药于需要其的上述个体的步骤。

[0090] 在其他实施方式中,包含上述抗 MIF 抗体的组合物被用于治疗选自肾小球肾炎、炎性肠病、肾炎和腹膜炎所组成的组中的炎症性疾病。

[0091] 治疗可以包括将本发明一种或多种抗 MIF 抗体或者其抗原结合片段单独地或与药学上可接受的载体一起给药。药学上可接受的载体的一些例子是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等、以及其组合物。在很多情形里,优选组合物中包括等渗试剂,例如糖类,多元醇如甘露糖醇、山梨醇,或者氯化钠。药学上可接受的物质的另外的例子是湿润剂或者较小量的辅助物质比如润湿剂或者乳化剂、防腐剂或者缓冲剂,其提高了保存期限或者抗体的有效性。

[0092] 本发明的抗 MIF 抗体和包含它们的药物组合物,可以与一种或多种其它治疗试剂、诊断试剂或预防试剂一组合起被给药。取决于被治疗的疾病,附加的治疗试剂包括其他抗肿瘤转化、抗肿瘤、抗生成血管、化疗剂或者甾族化合物。

[0093] 本发明的药物组合物可以有多种形式,例如液体、半固体和固体剂型。例如液体溶液(如可注射的和浸制的溶液)、胶体溶液或者悬浮液、片剂、药丸、粉末、脂质体和栓剂。优选的形式取决于想要的给药模式和治疗用途。一般的优选组合物是可注射的或者浸制溶液的形式,如类似于被用于人被动免疫接种的组合物。给药的优选方式是肠胃外的(如静脉的、皮下的、腹膜的、肌肉的)方式。在优选的实施方式中,抗体通过静脉注入或者注射被给药。在另一个优选的实施方式中,抗体通过肌肉注射或者皮下注射被给药。正如本领域的技术人员所理解的那样,给药路径和/或方式将取决于想要的结果而变化。

[0094] 抗 MIF 抗体可以一次给药,然而更优选的是多次给药。例如,抗体给药可以是每天三次至每六个月或更长给药一次。给药可以按进度表进行,如每天三次、每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每星期一次、每两星期一次、每月一次、每两月一次、每三月一次和每六月一次。

[0095] 本发明也涉及包含抗 MIF 抗体或者其抗原结合片段在制备用于治疗免疫性疾病如炎症疾病和过度增生疾病的药物中的应用。

[0096] 本发明进一步地包括抗 MIF 抗体或者其抗原结合片段用于治疗免疫性疾病如炎症疾病和过度增生疾病。

[0097] 本发明也包括抗 MIF 抗体或者其抗原结合片段用于诊断的方法。在一个实施方式

中,抗 MIF 抗体或者其抗原结合部分可用于检测生物样品中的人 MIF。

[0098] 抗 MIF 抗体或其抗原结合部分也可以被用于测定组织或来源于组织的细胞中的细胞表面 MIF 的水平。在一些实施方式中,组织是有病的组织。组织然后可以被用于免疫测定以便确定如总 MIF 水平、MIF 的细胞表面水平或者 MIF 的定位。

[0099] 本发明进一步地涉及包含本发明的抗 MIF 载体或者抗原结合部分、或者包含这种抗体或其部分的药物组合物的试剂盒。试剂盒可以包括除抗体或者药物组合物之外的诊断试剂或者治疗试剂。试剂盒也可以包括用于诊断方法或者治疗方法的说明书。

[0100] 本发明进一步地涉及一种用于识别能够抑制人 MIF 生物功能并且诱导动物模型中有益效果的抗 MIF 抗体的方法,其通过下述步骤进行:

[0101] a) 选择与活性 MIF 结合而不与无活性 MIF 结合的抗体

[0102] b) 在体外测试如拮抗糖皮质激素 (GCO) 测试或者细胞增殖测试中检测上述抗体,

[0103] c) 选出抑制 GCO 和 / 或细胞增殖的抗体。

[0104] 结果表明,只与活性 MIF 结合而不与无活性 MIF 结合的、并进一步抑制 GCO 和 / 或细胞增殖的抗 MIF 抗体在动物模型中诱导了有益效果 (例如,见实施例 6)。

[0105] 本发明将通过下面的实施例进一步地举例说明,但也不限于此。

[0106] 实施例

[0107] 实施例 1 :抗体选择

[0108] 噬菌体展示技术被用来产生人抗 MIF 抗体片段。

[0109] 从噬菌体展示文库开始,进行了不同的筛选系列,它们中的三个使用了全长 MIF (被包被的人 MIF / 溶液中的人 MIF / 人 - 鼠交替的 MIF)。其它筛选系列使用六个 MIF 衍生的肽与全长 MIF 交替。通过将 MIF 蛋白划分为大约 30 个氨基酸的六个肽,重叠长度大约是 15 个氨基酸,设计出这六个肽。在几轮选择后,鉴别出独特的结合物,所有独特的结合物被表达并被纯化为人 IgG4 抗体。在一些试验中检测这些抗体,以便证明 MIF 的体外抑制。进行表位定位以便确定 MIF 蛋白内的结合区域。对 193 个抗体进行了试验,并且根据它们体外抑制 MIF 的活性被分类。体外试验如下所述。三种小鼠抗 MIF 抗体被用作对照 (III. D. 9, XIV. 14. 3 和 XIV. 15. 5)。

[0110] 实施例 2 :MIF 的拮抗糖皮质激素活性 (GCO) 的抑制

[0111] 该方法是建立在内源性 MIF 抑制的基础之上,即,MIF 是通过使用的细胞系而生产的。该方法被用于抗体筛选并用于剂量反应曲线的确定。

[0112] 用于抗体筛选的 GCO 试验 THP1 悬浮培养物被离心分离,并且细胞被再悬浮在新鲜的全培养基中至细胞密度是每毫升 10^6 个细胞。培养物被转移至 96 孔微量培养板 (90 μ l / 孔) 上,并且添加抗 MIF 抗体至最终浓度是 75 μ g/ml。每个抗体重复测试三次。在 37°C 下过夜温育后,添加地塞米松至最终浓度是 2nM,并且在 37°C 下温育 1 小时后,添加 LPS (3ng/ml 最终浓度)。在 37°C 下进一步温育六个小时后,收获上清液,并且在 ELISA (Cytoset 试剂盒,可在市场上买到) 中测定 IL-6 浓度。三次测定的结果被平均,并且与对照抗体比较确定 IL-6 的分泌百分比。导致 IL-6 分泌小于 75% 的抗体被评估为阳性。

[0113] 用于确定 IC50 值的试验

[0114] 按照筛选试验所描述的方法进行实验步骤,除了使用增加量的抗体之外 (一般地为 1 至 125nM)。生成物的剂量反应曲线被表示为与阴性对照抗体相比的 % 抑制。曲线被用

于计算抗体最大抑制效果(%抑制最大值)和显示50%最大抑制效果的抗体浓度(IC₅₀)。

[0115] 结果在图8中被概括,第3列(IC₅₀)和第4列(最大抑制)。对于对比,小鼠抗体XIV.14.3只显示了36%的GCO抑制(数据没有被显示)。

[0116] 实施例3:细胞增殖的抑制

[0117] 血清刺激静止期的NIH/3T3中MIF的分泌,并且MIF反过来刺激细胞增殖。抗体抑制内源性MIF,因此减少了静止期的NIH/3T3细胞的增殖。增殖的减少是通过掺入³H-胸腺嘧啶核苷而被测定的。

[0118] 每孔1000个NIH/3T3细胞在96孔板上于37°C下在含有10%血清的培养基中温育一周。然后使细胞于37°C下在含有0.5%的血清的培养基中温育饥饿过夜。除去0.5%培养基,并且用含有10%血清、75 μg/ml抗体和5 μCi/ml的³H-胸腺嘧啶核苷的新鲜培养基来代替。在37°C下在CO₂培养箱中温育16小时后,细胞用每孔150 μl的冷PBS洗涤两次。使用多管移液器,每孔添加150 μl的5% (w/v) TCA溶液,并且在4°C下温育30分钟。平板用150 μl PBS洗涤。每孔添加75 μl含有0.5% SDS的0.5M NaOH溶液,混合并在室温下储存。通过混合5ml的Ultima Gold(Packard)和75 μl的样品溶液,样品在β-计数器中被测定。每个测定重复三次,并且数值通过t-检验法与对照抗体的数值相比较。显著减少增殖(P < 0.05)的抗体被评估为阳性。结果被概括在图8第5列中。

[0119] 实施例4:结合性研究:抗MIF抗体的抗原表位测定

[0120] 将每个肽稀释在偶联缓冲液中至最终肽浓度一般是5 μg/ml,将其添加至微量培养板(NUNC Immobilizer™ Amino Plate F96Clear)上并在4°C下温育过夜(100 μl/孔)。作为对照的重组全长MIF和PBS被使用。平板用200 μl PBST洗涤3次,抗体(在PBS中4 μg/ml)被添加(100 μl/孔)并在室温下温育2小时,轻轻振荡。平板用200 μl PBST洗涤3次并且添加检测抗体(例如被标记的Fc特异性的抗人IgG/HRP, Sigma)(100 μl/孔)。在室温下轻轻振荡温育1小时后,平板用200 μl PBST洗涤3次。每个孔都用100 μl TMB溶液(T-0440, Sigma)在黑暗中温育30分钟。染色反应通过每孔添加100 μl的1.8M H₂SO₄而被终止。样品在450nm处被测定。

[0121] 实施例5:人抗MIF抗体和小鼠抗MIF抗体III.D.9的竞争

[0122] 抗体Bax94被用于与小鼠抗MIF抗体III.D.9的竞争。

[0123] 96孔板(NUNC Maxisorp)用重组人MIF涂敷。小鼠抗MIF抗体II.D.9和人抗MIF抗体被在TBST/2% BSA中稀释,并且被混合,然而III.D.9最终浓度维持在2 μg/ml,而人抗MIF抗体浓度从0 μg/ml增加至一般的32 μg/ml。在洗涤微量培养板后,施加抗体,并在室温下一般温育2小时。洗涤后,平板与抗小鼠IgG(Fc特异性)过氧化物酶偶联物一起温育,并在室温下温育1小时。洗涤后,平板与TMB溶液一起温育,并且染色反应通过添加H₂SO₄溶液而被终止。拟合生成的竞争曲线,并计算III.D.9结合的最大抑制。结果被概括在图8第6列中。

[0124] 实施例6:在活的大肠杆菌腹膜炎动物模型中抗MIF抗体的增加的存活率

[0125] 实验是根据Calandra等人(Nature Immunology, 2000)的方法进行的,使用雌性NMRI小鼠(25-30g, 6-10周龄),并用15%粘蛋白和4%血红蛋白中的6000CFU的大肠杆菌0111:B4悬浮液腹膜注射。来自于营养琼脂培养基平皿培养的两个或三个菌落(大肠杆菌0111:B04)被接种于10ml的TSB中,并且在36°C下振荡温育过夜。培养物被生理盐水稀

释至所需的浓度,过夜培养物一般达到 2×10^9 CFU/ml,并且与粘蛋白和血红蛋白混合(1 体积的稀释的接种物,2 体积的 15% 的粘蛋白,2 体积的 4% 血红蛋白)。因为接种物混合物倾向于沉淀出来,所以在注射间被混合。大的(如 23 规格)的针头被用于注射,以免针头被注射混合物中的微粒所堵塞。抗体 Bax94(IgG4) 和与同种型匹配的对照抗体在细菌攻击前 2 小时被腹膜间给药。抗体剂量一般是 $800 \mu\text{g}$ /小鼠,并且每组使用 20 只小鼠。人的抗 MIF 抗体的 IgG1 和 IgG4 同种型显示出在存活率/至死亡的时间上在统计学上有显著影响。图 6 显示由抗体 Bax94 和抗体 Bax152(IgG4) 得到的结果。Kaplan-Meier 统计法被用于存活曲线的评估。

[0126] 实施例 7:对活性 MIF 的结合特异性

[0127] 本发明描述的抗 MIF 抗体能够分别区分活性 MIF 和无活性 MIF,两者分别是通过轻度氧化或还原产生的。这些构象体之间的区别通过 ELISA 或者表面等离子共振来测定。

[0128] 用于测定抗体差别结合的 ELISA:

[0129] •通过轻度氧化 MIF 转化成它的活性构象。重组人 MIF(PBS 中 0.5mg/ml) 在 37°C 下与 3 倍过量(体积)的 PBS 中 L-胱氨酸饱和溶液(大约 $0.4\text{--}0.5\text{mM}$ 的 L-胱氨酸)一起温育 3 小时。然后在 Slide-A-Lyzer[®]透析盒中 MIF 用 PBS 透析两次,分子量截断值是 7kDa (Pierce)。

[0130] •MIF 转化成它的无活性构象。

[0131] 在 4°C 下 MIF 以 0.5mg/ml 的浓度与 $8\text{--}16\text{mM}$ 的二硫苏糖醇(最终浓度)一起温育过夜而被还原。

[0132] •ELISA 流程。

[0133] 抗 MIF 抗体被涂敷在 96 孔的微量培养板(NUNC Maxisorp[™])上,浓度是 $5 \mu\text{g/ml}$ (用涂敷缓冲剂稀释)。在用 TBST(含有 0.1% Tween-20(v/v)的 Tris 缓冲盐水)洗涤平板,并且用 TBST/2% BSA(TBST 和 2% 牛血清白蛋白(w/v))封闭后,添加活性的或者无活性的 MIF 的稀释系列,并在室温下温育 1-2 小时。被结合的 MIF 通过使用多克隆兔抗 MIF 抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(Biorad)来检测。TBST/2% BSA 被用来稀释 MIF、兔抗 MIF 抗体和过氧化物酶偶联物,以便减少非特异性的结合。图 7 显示了利用抗体 Bax94 得到的 ELISA 结果。

[0134] 通过 Biacore 评估抗体的差别结合

[0135] 活性和无活性的 MIF 与抗体 Bax94 的结合动力学通过使用 Biacore 3000 系统的表面等离子共振分析而被检测。因此,10000 应答单位的 Bax94 被用 CM5(为羧甲基葡聚糖)基质固定在传感器芯片上,并且与活性或无活性的 MIF huMIF 一起在促还原和促氧化的谷胱甘肽氧化还原缓冲剂中温育,缓冲剂范围是在 HBS-EP 缓冲液中(GE Healthcare)从 4.8mM GSH/ 0.2mM GSSG(GSSG = 氧化型谷胱甘肽)至 5mM GSSG。作为对照,在第二个含有固定的同种型对照抗体的流动池中,MIF 被用于结合分析。对照抗体和抗体 Bax94 的结合应答单位被减去用于评估。

[0136] 实施例 8:THP-1 细胞表面上活性 MIF 的检测

[0137] 细胞与抗 MIF 抗体 Bax94 一起温育。细胞用冰冷的 PBS 洗涤,并且再悬浮在冷的细胞裂解缓冲液(Cell Signaling Technology[®])中。磁性蛋白 G Dynabeads[®](Invitrogen)用 TBST+5%脱脂奶粉(w/v)封闭、洗涤并且被添加至被裂解的细胞中。在 4°C 下过夜,进行

免疫沉淀反应。然后用细胞裂解缓冲液和 TBST 洗涤小珠,并且在 SDS PAGE 样品缓冲液(没有还原剂)中煮沸。样品经过非还原性 SDS PAGE,用于蛋白质印迹分析。

[0138] 实施例 9:抗 MIF 抗体与膜结合性 MIF 的结合

[0139] THP-1 细胞用冰冷的 PBS 洗涤,并且再悬浮在添加了 200 μ g/ml 小鼠 IgG 的冷的细胞染色缓冲液(Biolegend)中。FITC 或者 TRITC 标记的抗 MIF 抗体被添加至最终浓度一般是 200-500nM,并且在 4°C 下温育。细胞随后用冰冷的细胞染色缓冲液洗涤,并再悬浮在添加了 Via-Prohe™ 细胞存活力溶液(BD Biosciences)的细胞染色缓冲液中。细胞在 FACS Canto™ II 流式细胞计系统(BD Biosciences)中被测定,并且将活细胞群体的中间 FITC-/TRITC- 位移与染色标记的同种型对照抗体相比较。

[0140] 实施例 10:通过 Biacore 抗 MIF 抗体的 Fab 片段的亲和力测定

[0141] 一般地,40RU 单位的人重组体 MIF 用 CM5(为羧甲基葡聚糖)基质(Biacore)固定在传感器芯片上。Fab 片段用 HBS-EP 稀释,一般以 6-10nM 的浓度范围被注射。在每个周期后,芯片用 50mM NaOH+1M NaCl 再生。根据 1:1 朗缪尔模型计算亲和力。结果被概括在图 8 第 7 列中。

[0142] 实施例 11:抗 MIF 抗体在新月体肾小球肾炎动物模型中的有益效果

[0143] 在 Frederick W. K. Tarn 等人(Nephrol Dial Transplant,1999,1658-1666)描述的新月体肾小球肾炎大鼠模型中检测抗 MIF 抗体。

[0144] 通过单一静脉注射抗大鼠肾小球基底膜血清,在 Wistar Kyoto 大鼠中诱导肾毒性肾炎。在试验的预防性建立中,用抗 MIF 抗体和同种型匹配对照抗体的治疗是在诱导肾炎时(第 0 天)通过腹腔注射抗体开始的。治疗一般是隔天重复,并且动物在第 7 天被拣出用于组织分析。尿液在实验前(底线)被收集,并且收集直至实验结束前(第 7 天)。在治疗建立中,用抗 MIF 抗体的治疗开始于诱导疾病后的第 4 天,并且每隔一天被重复。大鼠一般在第 8 天被拣出。尿液在实验前(底线)、治疗开始前(第 4 天)和动物拣出前(第 8 天)被收集。抗体剂量一般是每次注射 1-20mg/kg,并且每个组使用 6 至 8 只大鼠。通过测定蛋白尿、巨噬细胞渗透进肾小球和组织损害(新月体形成)来确定病重程度。在预防性实验中,用抗 MIF 抗体 Bax69(每个剂量 10mg/kg)治疗 7 天,与用对照抗体治疗的动物相比,导致 47% 的蛋白尿减少。与对照抗体治疗的动物相比较,被建立的疾病的治疗(治疗实验)导致了蛋白尿的剂量依赖性减少 16%(每个剂量 10mg/kg 的 Bax69)和 34%(每个剂量 20mg/kg 的 Bax69)。

[0145] 实施例 12:抗 MIF 抗体在溃疡性结肠炎(Rag-/-小鼠中天然 T 细胞的过继转移)动物模型中的有益效果

[0146] C57BL/6 小鼠被杀死,并且通过脾脏细胞群体的荧光激活细胞分类术来分类 CD45RBhi 细胞(天然 T 细胞)。CD45RBhi 细胞(5×10^5)通过腹膜内注射给 Rag-/-C57BL/6 小鼠(7-9 周龄),小鼠在大约 2 周后发展成溃疡性结肠炎(de Jong 等人,Nature immunology.,2001,1061-1066)。抗 MIF 抗体和同种型对照抗体腹膜内注射一周两次(1mg/小鼠/剂量)。在预防性建立中,治疗开始于注射 T 细胞时。在治疗建立中,治疗开始于诱导疾病后的 4 周。小鼠每周监控重量和病情发展。一般在 CD4CD45RBN 细胞转移进 Rag-/-C57BL/6 接收者之后的八个星期,计算疾病活动性指数(DAI),并且收集结肠切片用于组织指数(HI)评分。疾病活动性指数(DAI)和组织指数(HI)在动物模型结束时被确定

(DAI 是基于四个参数 :隆起和消瘦 (分数 0 或者 1), 结肠加厚 (0-3) 和粪便黏稠度 (0-3))。在治疗实验中, 抗 MIF 抗体 Bax69 和 BaxA10 被用于治疗已建立的疾病, 并且与同种型对照治疗的小鼠相比较, 平均值 DAI 显著地下降了大约 60% (Bax69) 和大约 40% (BaxA10)。此外, 平均值 HI 分数在用 Bax69 治疗后减少了大约 33%。

[0147] 实施例 13 :抗 MIF 抗体在溃疡性结肠炎动物模型拮抗性抗 CD40 模型) 中的有益效果

[0148] 该模型是基于巨噬细胞和树状细胞被拮抗性抗 CD-40 抗体活化, 该抗 CD-40 抗体可在 RagW 小鼠中诱导类似于 IBD 的肠道病变。

[0149] 年龄 / 性别匹配的 Rag-1^{-/-} 小鼠 (4-5 周龄) 购自杰克逊试验室, 并且在实验前在动物房中饲养两周。拮抗性抗 CD40 单克隆抗体 (FGK45, 1gG2a) 或者同种型对照大鼠 IgG2 以 1mg/ml 的浓度溶解在 PBS 中。5 组 (每组 10 只小鼠) 经腹膜注射 200 μ g 的拮抗性抗 CD40 单克隆抗体, 并且其中有 4 组在第 0 天和第 1 天 (2x1mg/ 小鼠) 用抗 MIF 抗体治疗。第 6 组 (10 只小鼠) 仅用同种型对照 (大鼠 IgG2a, 健康对照) 注射。小鼠在下一个 7 天称重。在第 7 天, 计算疾病活动性指数 (DAI), 并收集结肠切片用于组织指数 (HI) 评分。DAI 值是建立在以下基础之上 :隆起 (0-1)、消瘦 (0-1)、粪便黏稠度 (0-3) 和结肠加厚 (0-3)。组织评分建立在以下基础之上 :厚度 (0-3)、隐窝伸长、炎症 (0-3) 和脓肿 (0-1)。与同种型对照治疗的小鼠相比较, 用抗 MIF 抗体 Bax94、BaxA10 和 Bax69 治疗显著地减少了 DAI 分数 (BaxA10 :减少约 48% ;Bax94 减少约 62% ;Bax69 减少约 73%)。此外, 这些抗体也减少了 HI 平均分数。

[0150] 实施例 14 :通过抗 MIF 抗体抑制 Mf1 裸鼠中肿瘤的生长

[0151] 人前列腺腺癌细胞 (PC-3) 从指数增长期的培养物中获得, 并与去掉生长因子的 matrigel 混合。在 0.25ml matrigel 中的 2×10^6 个细胞通过皮下注射接种于 Mf1 裸鼠的右肋。使用抗 MIF 抗体 Bax94 和同种型对照 C3 的治疗开始于接种后一天 (0.6mg 抗体 / 小鼠 / 天), 并且每隔一天重复一次。肿瘤大小的测定一般开始于细胞注射后两周, 并且每隔一天做一次。使用公式 $V = 0.5 \times a \times b^2$ 计算体积 (此处 “a” 是最大直径并且 “b” 是最小直径)。用 Bax94 治疗的小鼠中肿瘤的生长显著地被减小, 而同种型对照治疗组中在肿瘤诱导后 28 天分析的肿瘤平均体积比 Bax94 治疗组高 4.3 倍。

[0152] 在实验的治疗建立中, 抗体治疗开始于肿瘤移入后一周。每剂量 50mg/kg 的同种型对照抗体 C3 和抗 MIF 抗体 Bax69 每隔一天通过腹膜注射。在治疗后 22 天, C3 治疗组中被测定的肿瘤体积的中位值比 Bax69 治疗组高 2.7 倍。

[0153] 实施例 15 :抗 MIF 抗体的促凋亡作用

[0154] 抗 MIF 抗体的促凋亡作用显示在使用人前列腺癌细胞系 PC-3 的以细胞为基础的胱天蛋白酶 -3 测试中。PC-3 细胞被接种在有 10% FCS 的 10cm 的培养皿 (约 10^6 个细胞 / 皿) 上。在 24 小时后添加含有 100nM 抗体 Bax94 或 100nM 对照抗体 C3 的新鲜培养基。在另一个 48 小时的温育期后, 制备细胞裂解液, 并且通过添加荧光标记的胱天蛋白酶底物来测定胱天蛋白酶 -3 活性 (图 9)。

[0155] 实施例 16 :肿瘤细胞入侵的抑制

[0156] 通过使用人前列腺癌细胞系 PC-3, 在 Transwell™ 入侵试验中检测抗 MIF 抗体 Bax94 和 Bax69。每孔 5×10^4 个 PC-3 细胞被接种在 24 孔的 Transwell™ 皿 (孔径大小

8 μ m) 中, Transwell™ 皿在聚碳酸酯膜的底面上涂敷聚 D- 赖氨酸, 并且在 Transwell™ 插入表面上涂敷去掉生长因子的 matrigel。在 10% FCS 存在的情况下, 使细胞附着 4 小时。然后, 培养基变成无血清的培养基, 并且经细胞饥饿过夜 (即 16 小时)。随后, 添加化合物 (10nMMIF, 500nM 抗体) 至下室。使得细胞迁移穿过多孔滤膜 24 小时。在温育期后, 膜下的表面上附着的迁移细胞通过吉姆萨溶液染色。粘附于膜下表面的细胞数在 400 倍放大倍数的独立视野中被计数 (图 10)。

名称/序列号	LV-FR1	LV-CDR1	LV-FR2	LV- CDR2	LV-FR3	LV-CDR3	LV-FR4
Bax8 / SEQ ID No. 1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQISSYLN	WYQOKPGKAPKLLIY	MAESLQD	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYSTRMT	FGGCTKVEIK
Bax69 / SEQ ID No. 2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RSSQRIMTYLN	WYQOKPGKAPKLLIF	VASHSQS	GVPSRFSGSGSETFTLTISGLQPEDSATYYC	QQSEWYPLT	FGGCTKVEIK
Bax74 / SEQ ID No. 3	DIQMTQSPSSLPASVGRVTITC	RASQSIQTYLS	WYQHKPGNAPKLLIY	ATSRLOQ	GVPSRFSGGSGTRFTLAISSLPQDDFATYFC	QOITYSTPLT	FGGCTKVDIK
Bax94 / SEQ ID No. 4	DIQMTQSPGTLSPGERATLSC	RASQGVSSSILA	WYQOKPGQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSASCTDFTLTISRLLQPEDFAVYYC	QQYGRSLT	FGGCTKVEIK
Bax152 / SEQ ID No. 5	DIQMTQSPVTLSPGERATLSC	RASQVRSBYLA	WYQOKPGQTPRLLIY	GASNRAT	GIPDRFSGSGCTDFTLTISRLEPEDEFAVYYC	QQYGNLSLT	FGGCTKVEIK
BaxA10 / SEQ ID No. 6	DIQMTQSPGTLSPGERATLSC	RASQGVSSSILA	WYQOKPGQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSASCTDFTLTISRLLQPEDFAVYYC	QQYGRSLT	FGGCTKVEIK

图 1

名称/序列号	HV-FR1	CDR1	HV-FR2	HV-CDR2	HV-FR3	HV-CDR3	HV-FR4
Bax8 / SEQ ID No. 7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYTHD	WVRQAPGKGLEWVS	YISPGGNTSYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTAVTYCAS	RQYVLRVFDMSADAFDI	WGCGTIVTVSS
Bax69 / SEQ ID No. 8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYKSN	WVRQAPGKGLEWVS	SIQSSGGTTYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTAVTYCAG	SQMLYGNQV	WGCGTIVTVSS
Bax74 / SEQ ID No. 9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	KYTHI	WVRQAPGKGLEWVS	MIGPSSGFTFYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTAVTYCAR	GTPDYGGNSLDH	WGCGTIVTVSS
Bax94 / SEQ ID No. 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYAND	WVRQAPGKGLEWVS	GIYPSGGFTKYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTAVTYCAR	VNVIYAVAGTGYTYTGMDV	WGCGTIVTVSS
Bax152 / SEQ ID No. 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	IYAND	WVRQAPGKGLEWVS	GIYPSGGFTKYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTAVTYCAR	VNVIYAVAGTGYTYTYGMDV	WGCGTIVTVSS
BaxA10 / SEQ ID No. 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	WTAND	WVRQAPGKGLEWVS	GIYPSGGRTKYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTAVTYCAR	VNVIYAVAGTGYTYTYGMDV	WGCGTIVTVSS

图 2

Bax8: 序列号13

```

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC
I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
61 ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA
G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
121 GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
181 AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P W T F G Q
241 GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT TGG ACG TTC GGC CAA
G T K V E I K
301 GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Bax69: 序列号14

```

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC
I T C R S S Q R I M T Y L N W Y Q Q K P
61 ATC ACT TGC CGG TCA AGT CAG AGA ATT ATG ACT TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAA AAA CCG
G K A G C P K L L I F V A S H S Q A S G V P S
121 GGG AAA GCC CCT AAA CTC CTG ATC TTT GTT GCA TCC CAT TCA CAA AGT GGG GTC CCA TCC
R F R G S G S E T D F T L T I S G L Q P
181 AGG TTC AGA GGC AGT GGG TCT GAG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC GGT CTG CAA CCT
E D S A T Y Y C Q Q S F W T P L T F G G
241 GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAA AGT TTT TGG ACC CCC CTC ACT TTC GGC GGA
G T K V E I K
301 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

Bax74: 序列号15

```

D I Q M T Q S P S S L P A S V G D R V T
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG CCT GCA TCT GTG GGA GAC AGA GTC ACC
I T C R A S Q S I G T Y L S W Y Q H K P
61 ATC ACT TGT CGG GCA AGT CAG AGC ATT GGT ACT TAT TTG AGT TGG TAT CAA CAC AAA CCG
G N A P K L L I Y A T S R L Q S G V P S
121 GGA AAT GCC CCC AAA CTC CTG ATC TAT GCT ACA TCT CGT TTG CAA AGT GGC GTC CCA TCG
R F S G G G S G T R F T L A I S S L Q P
181 AGG TTC AGT GGC GGT GGA TCT GGG ACA CGA TTC ACT CTC GCC ATC AGC AGT CTG CAA CCC
D D F A T Y F C Q Q T Y S T P L T F G G
241 GAC GAT TTT GCA ACT TAC TTC TGT CAG CAG ACT TAC AGT ACC CCG CTC ACT TTC GGC GGA
G T K V D I K
301 GGG ACC AAG GTG GAC ATC AAA

```

Bax94: 序列号16

```

D I Q M T Q S P G T L S L S P G E R A T
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
L S C R A S Q G V S S S L A W Y Q Q K
61 CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC AGC TCC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA
P G Q A P R L L I Y G T S S R A T G I P
121 CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT ACA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
D R F S G S A S G T D F T L T I S R L Q
181 GAC AGG TTC AGT GGC AGT GCG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG CAG
P E D F A V Y Y C Q Y G R S L T F G G
241 CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGG TCA CTC ACT TTC GGC GGA
G T K V E I K
301 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

Bax152: 序列号 17

```

      D   I   Q   M   T   Q   S   P   V   T   L   S   L   S   P   G   E   R   A   T
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GTC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
      L   S   C   R   A   S   Q   S   V   R   S   S   Y   L   A   W   Y   Q   Q   K
61   CTC TCT TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT CGG AGT AGT TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA
      P   G   Q   T   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   N   R   A   T   G   I   P
121  CCC GGC CAG ACT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCC TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
      D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E
181  GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG
      P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   N   S   L   T   F   G   G
241  CCT GAA GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AAC TCA CTC ACT TTC GGC GGA
      G   T   K   V   E   I   K
301  GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

BaxA10: 序列号 18

```

      D   I   Q   M   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R   A   T
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
      L   S   C   R   A   S   Q   G   V   S   S   S   L   A   W   Y   Q   Q   K
61   CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC AGC TCC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA
      P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   T   S   S   R   A   T   G   I   P
121  CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT ACA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
      D   R   F   S   G   S   A   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   Q
181  GAC AGG TTC AGT GGC AGT GCG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG CAG
      P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   R   S   L   T   F   G   G
241  CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGG TCA CTC ACT TTC GGC GGA
      G   T   K   V   E   I   K
301  GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

图 3

Bax8: 序列号19

```

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
S C A A S G F T F S I Y T M D W V R Q A
61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT ATT TAC ACT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
P G K G L E W V S Y I S P S G N T S Y
121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT TAT ATC TCT CCT TCT GGT GGC AAT ACT TCT TAT
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
L Q M N S L R A E D T A V Y C A S R Q
241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGT AGA CAA
Y V L R Y F D W S A D A F D I W G Q G T
301 TAC GTA TTA CGA TAT TTT GAC TGG TCG GCA GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA
M V T V S S
361 ATG GTC ACC GTC TCA AGC

```

Bax69: 序列号 20

```

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
S C A A S G F T F S I Y S M N W V R Q A
61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT ATT TAC TCT ATG AAT TGG GTT CGC CAA GCT
P G K G L E W V S S I G S S G G T T Y Y
121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT TCT ATC GGT TCT TCT GGT GGC ACT ACT TAT TAT
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A G S Q
241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG GGC TCA CAG
W L Y G M D V W G Q G T T V T V S S
301 TGG CTG TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

```

Bax74: 序列号 21

```

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
S C A A S G F T F S I Y Y M I W V R Q A
61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT AAG TAC TAT ATG ATT TGG GTT CGC CAA GCT
P G K G L E W V S W I G P S G G F T F Y
121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT TGG ATC GGT CCT TCT GGT GGC TTT ACT TTT TAT
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G T
241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG ACG
P D Y G G N S L D H W G Q G T L V T V S
301 CCC GAC TAC GGT GGT AAC TCC CTT GAC CAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA
S
361 AGC

```

Bax94: 序列号 22

```

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
1 GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
S C A A S G F T F S I Y A M D W V R Q A
61 TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT ATT TAC GCT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
P G K G L E W V S G I V P S G G F T K Y
121 CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT GGT ATC GRT CCT TCT GGT GGC TTT ACT AAG TAT
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R V N
241 TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG AAC
V I A V A G T G Y Y Y Y G M D V W G Q G
301 GTT ATA GCA GTG GCT GGT ACT GGA TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
T T V T V S S
361 ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

```

Bax152: 序列号 23

```

      E   V   Q   L   L   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R   L
1    GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
      S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   I   Y   A   M   D   W   V   R   Q   A
61   TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT AMT TAC GCT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
      P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I   V   P   S   G   G   F   T   K   Y
121  CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT GGT ATC GTT CCT TCT GGT GGC TTT ACT AAG TAT
      A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y
181  GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
      L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   V   N
241  TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG AAC
      V   I   A   V   A   G   T   G   Y   Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G
301  GTT ATA GCA GTG GCT GGT ACT GGA TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
      T   T   V   T   V   S   S
361  ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

```

BaxA10: 序列号 24

```

      E   V   Q   L   L   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R   L
1    GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT GGT TCT TTA CGT CTT
      S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   W   Y   A   M   D   W   V   R   Q   A
61   TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT TGG TAC GCT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT
      P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I   Y   P   S   G   G   R   T   K   Y
121  CCT GGT AAA GGT TTG GAG TGG GTT TCT GGT ATC TAT CCT TCT GGT GGC CGT ACT AAG TAT
      A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y
181  GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG AAT ACT CTC TAC
      L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   V   N
241  TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG AAC
      V   I   A   V   A   G   T   G   Y   Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G
301  GTT ATA GCA GTG GCT GGT ACT GGA TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
      T   T   V   T   V   S   S
361  ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

```

图 4

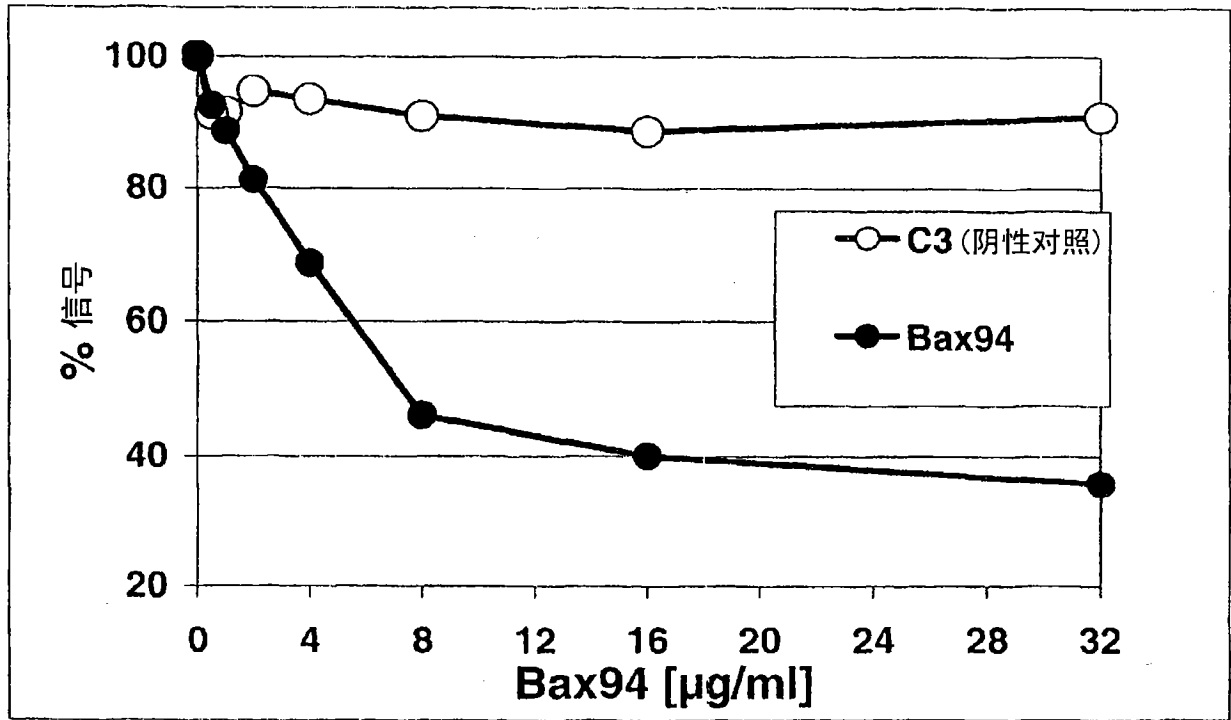


图 5

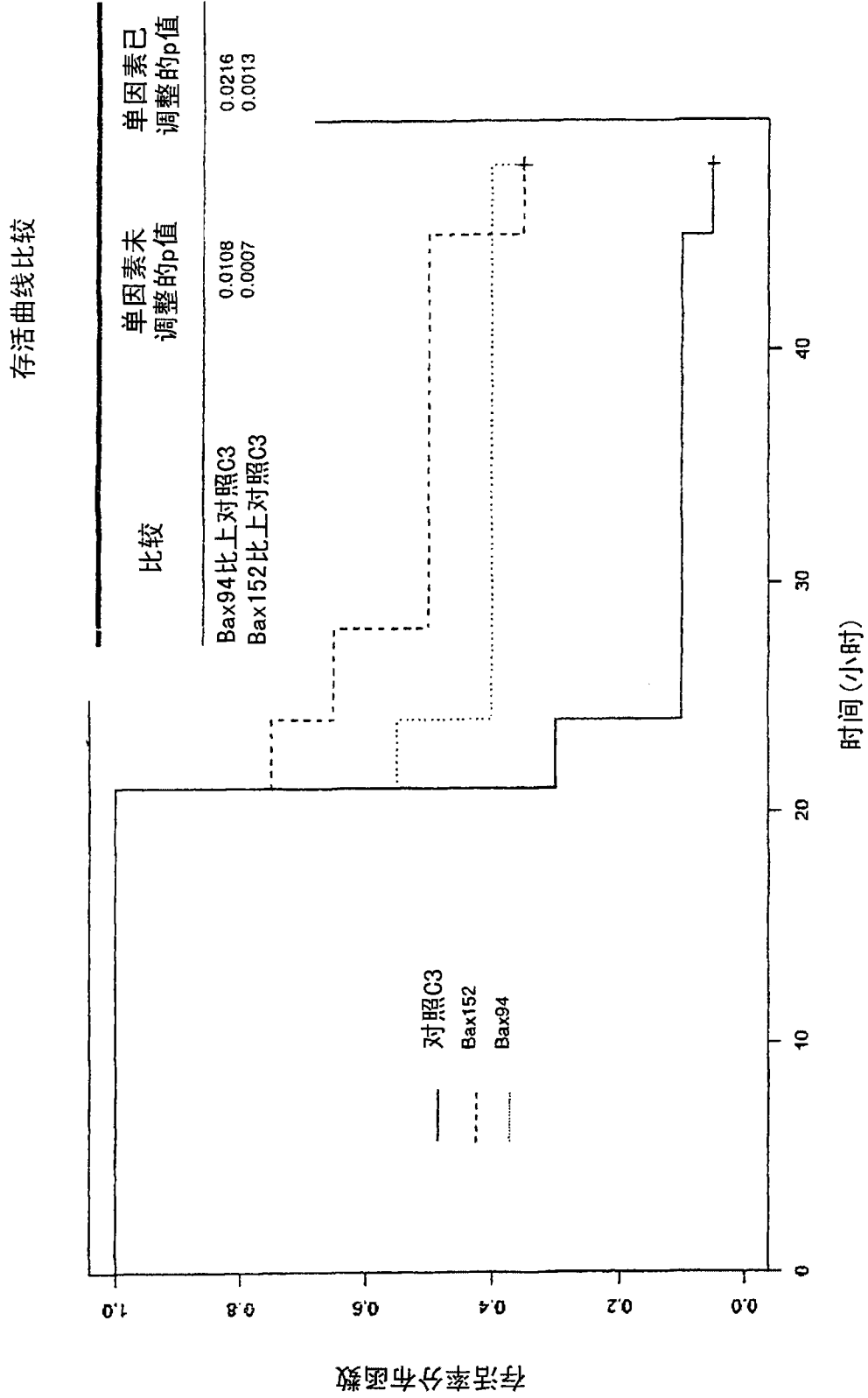


图 6

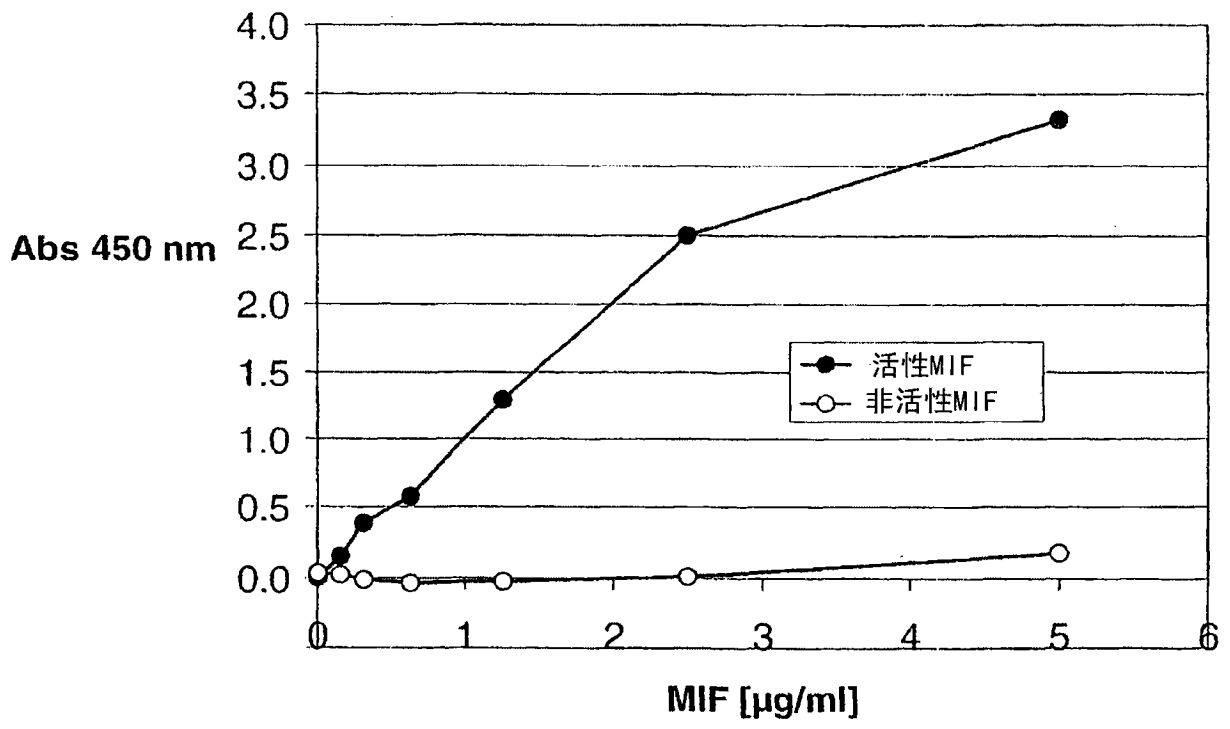


图 7

1	2	3	4	5	6	7
抗体	抗原表位	GCO IC50 (nM)	GCO 最大抑制 (%)	增殖试验 (P%)	与III.D.9的 最大竞争	亲和力 (nM)
Bax8	中心	5	93	0.037	12%	nd
Bax69	中心	7	98	0.035	53%	55
Bax74	C-端	2	29	0.021	81%	93
Bax94	C-端	1	63	0.017	82%	4
Bax152	C-端	5	56	0.003	81%	16
BaxA10	C-端	nd	nd	nd	nd	0.4

图 8

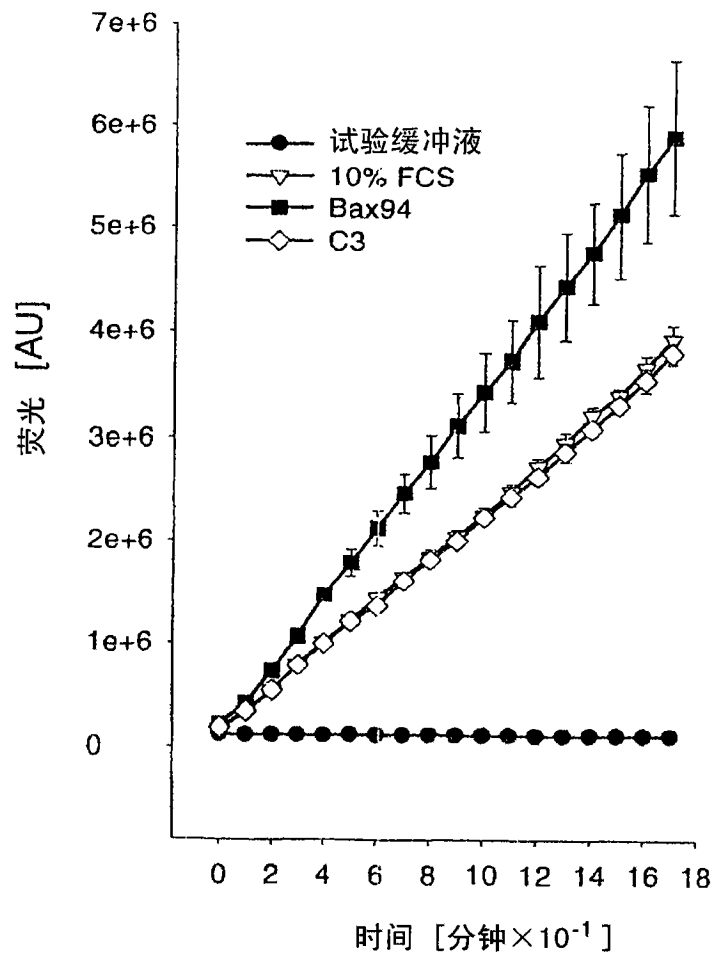


图 9

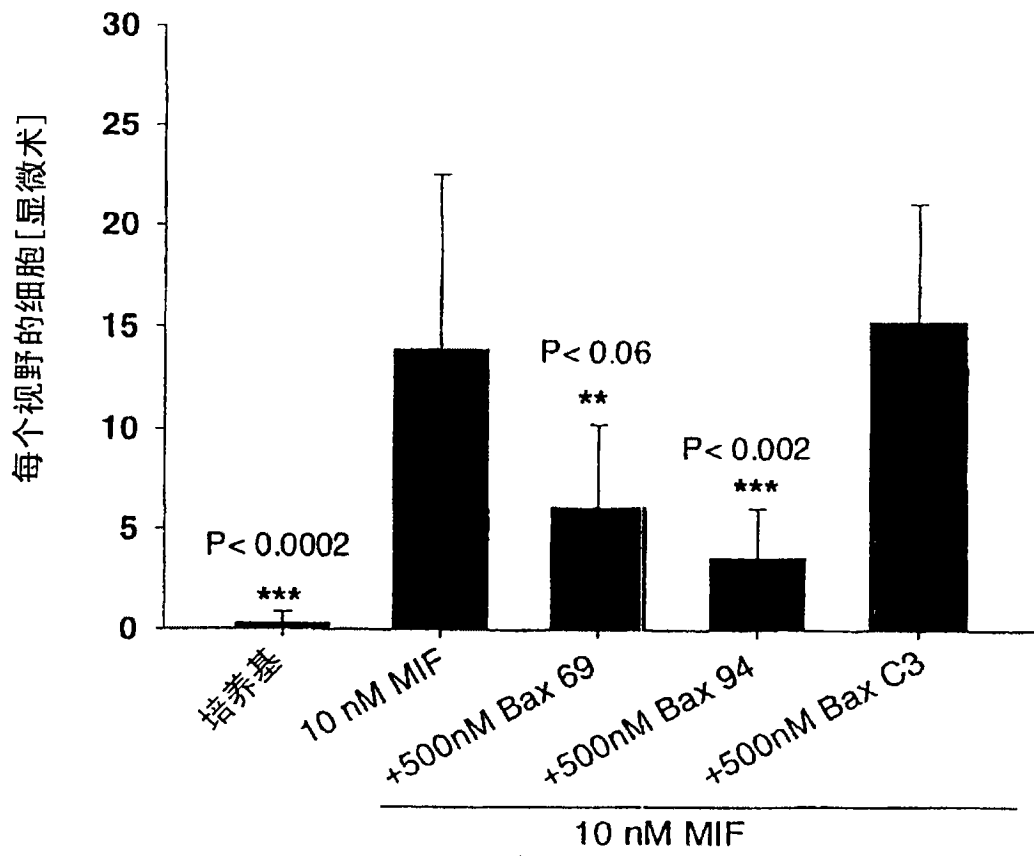


图 10