

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102046199 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 200980109905. X

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

(22) 申请日 2009. 03. 20

代理人 刘国伟

(30) 优先权数据

- 61/038, 381 2008. 03. 20 US
- 61/039, 371 2008. 03. 25 US
- 61/045, 807 2008. 04. 17 US
- 61/121, 095 2008. 12. 09 US

(51) Int. Cl.

- A61K 39/395 (2006. 01)
- A61P 9/10 (2006. 01)
- A61P 35/00 (2006. 01)
- A61K 39/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/037883 2009. 03. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02009/117706 EN 2009. 09. 24

(71) 申请人 卡罗勒斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 于尔根·伯恩哈根

乔舒亚·罗伯特·舒尔茨

贝内迪克特·福尔拉特

阿尔玛·策内克 克里斯蒂安·韦伯

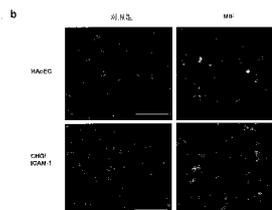
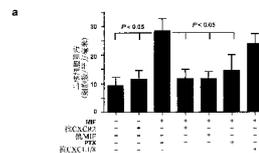
权利要求书 3 页 说明书 52 页 附图 27 页

(54) 发明名称

使用抗 MIF 抗体的治疗方法

(57) 摘要

在某些实施例中, 本文公开一种治疗炎症性病症的方法。在一些实施例中, 所述方法包含投予一种活性剂, 所述活性剂可抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的结合, 和 / 或 (ii) MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 的活化; (iii) MIF 形成同源多聚体的能力; 或其组合。



1. 一种治疗 MIF 介导的病症的方法,其包含对有需要的个体授予治疗有效量的抗体,所述抗体抑制 (i)MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合 ;(ii)MIF 对 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的活化 ;(iii)MIF 形成同源多聚体的能力 ;(iv)MIF 与 CD74 的结合 ;或其组合。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗体特异性结合于 MIF 的 N 环基元的全部或一部分,或与 MIF 的 N 环基元竞争。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗体特异性结合于 MIF 的假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗体选自抗 CXCR2 抗体 ;抗 CXCR4 抗体 ;抗 MIF 抗体 ;特异性结合于 MIF 的所述 N 环基元的全部或一部分的抗体 ;特异性结合于所述假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分的抗体 ;抑制 MIF 与 CXCR2 结合的抗体 ;抑制 MIF 与 CXCR4 结合的抗体 ;以及抑制 MIF 与 JAB-1 结合的抗体 ;抑制 MIF 与 CD74 结合的抗体 ;特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :DQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ;特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :PRASVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ;特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :FGGSSEPCALCSLHSI 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ;或其组合。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗体选自抗 CXCR4 抗体 701、708、716、717、718、12G5 和 4G10 ;抗 MIF 抗体 IID. 9、IIID. 9、XIF7、I31、IV2. 2、XI17、XIV14. 3、XII15. 6 和 XIV15. 4 ;或其组合。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在授予本文公开的抗体后,巨噬细胞成为泡沫细胞的转化受到抑制。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在授予本文公开的抗体后,心肌细胞的凋亡受到抑制。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在授予本文公开的抗体后,浸润巨噬细胞的凋亡受到抑制。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在授予本文公开的抗体后,腹部动脉瘤的形成受到抑制。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在授予本文公开的抗体后,腹部动脉瘤的直径减小。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在授予本文公开的抗体后,动脉瘤中的结构蛋白得以再生。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包含共授予第二活性剂。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包含共授予烟酸、贝特 (fibrate)、他汀 (statin)、Apo-A1 模拟肽 (例如 DF-4, 诺华公司 (Novartis))、apoA-I 转录上调剂、ACAT 抑制剂、CETP 调节剂、糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 受体拮抗剂、P2Y12 受体拮抗剂、Lp-PLA2 抑制剂、抗 TNF 剂、IL-1 受体拮抗剂、IL-2 受体拮抗剂、细胞毒性剂、免疫调节剂、抗生素、T 细胞共刺激阻断剂、改良病症的抗风湿剂、B 细胞消耗剂、免疫抑制剂、抗淋巴细胞抗体、烷化剂、抗代谢物、植物碱、类萜、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、单克隆抗体、激素疗法或其组合。

14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述病症是动脉粥样硬化 ;腹部动脉瘤 ;急性

播散性脑脊髓炎 ; 烟雾病 (Moyamoya disease) ; 高安氏病 (Takayasu disease) ; 急性冠状动脉综合症 ; 心脏同种异体移植物血管病变 ; 肺炎 ; 急性呼吸窘迫综合症 ; 肺纤维化 ; 爱迪森氏病 (Addison' s disease) ; 强直性脊柱炎 ; 抗磷脂抗体综合症 ; 自体免疫性溶血性贫血 ; 自体免疫性肝炎 ; 自体免疫性内耳病 ; 大疱性类天疱疮 ; 查格斯病 (Chagas disease) ; 慢性阻塞性肺病 ; 腹腔疾病 ; 皮炎 ; 1 型糖尿病 ; 2 型糖尿病 ; 子宫内膜异位症 ; 古巴士德氏综合症 (Goodpasture' s syndrome) ; 格雷夫斯氏病 (Graves' disease) ; 格林 - 巴利综合症 (Guillain-Barrésyndrome) ; 桥本氏病 (Hashimoto' s disease) ; 特发性血小板减少性紫癜 ; 间质性膀胱炎 ; 全身性红斑狼疮 (SLE) ; 代谢综合症 ; 多发性硬化症 ; 重症肌无力 ; 心肌炎 ; 发作性睡病 ; 肥胖症 ; 寻常性天疱疮 ; 恶性贫血 ; 多发性肌炎 ; 原发性胆汁性肝硬化 ; 类风湿性关节炎 ; 精神分裂症 ; 硬皮病 ; 修格连氏综合症 (Sjögren's syndrome) ; 血管炎 ; 白癜风 ; 韦格纳肉芽肿 (Wegener' s granulomatosis) ; 过敏性鼻炎 ; 前列腺癌 ; 非小细胞肺癌 ; 卵巢癌 ; 乳腺癌 ; 黑色素瘤 ; 胃癌 ; 结肠直肠癌 ; 脑癌 ; 转移性骨病 ; 胰腺癌 ; 淋巴瘤 ; 鼻息肉 ; 胃肠癌 ; 溃疡性结肠炎 ; 克隆恩氏病 (Crohn' s disorder) ; 胶原性结肠炎 ; 淋巴细胞性结肠炎 ; 缺血性结肠炎 ; 改道性结肠炎 ; 贝塞特氏综合症 (Behcet' s syndrome) ; 感染性结肠炎 ; 未定型结肠炎 ; 发炎性肝病 ; 内毒素休克 ; 脓毒症休克 ; 类风湿性脊柱炎 ; 强直性脊柱炎 ; 痛风性关节炎 ; 类风湿性多肌痛 ; 阿尔茨海默氏症 (Alzheimer' s disorder) ; 帕金森氏症 (Parkinson' s disorder) ; 癫痫 ; 艾滋病痴呆 ; 哮喘 ; 成人呼吸窘迫综合症 ; 支气管炎 ; 囊性纤维化 ; 急性白细胞介导性肺损伤 ; 远端直肠炎 ; 韦格纳肉芽肿 ; 纤维肌痛 ; 支气管炎 ; 葡萄膜炎 ; 结膜炎 ; 牛皮癣 ; 湿疹 ; 皮炎 ; 平滑肌增殖病症 ; 脑膜炎 ; 带状疱疹 ; 脑炎 ; 肾炎 ; 结核病 ; 视网膜炎 ; 异位性皮炎 ; 胰腺炎 ; 齿龈炎 ; 凝固性坏死 ; 液化性坏死 ; 纤维蛋白样坏死 ; 血管内膜增生 ; 心肌梗塞 ; 中风 ; 器官移植排斥 ; 或其组合。

15. 一种用于治疗 MIF 介导的病症的医药组合物, 其包含抗体, 所述抗体抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的结合 ; 和 / 或 (ii) MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 的活化 ; (iii) MIF 形成同源多聚体的能力 ; 或其组合。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物, 其中所述抗体特异性结合于 MIF 的 N 环基元的全部或一部分。

17. 根据权利要求 15 所述的组合物, 其中所述抗体特异性结合于 MIF 的假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分。

18. 根据权利要求 15 所述的组合物, 其中所述抗体选自抗 CXCR2 抗体 ; 抗 CXCR4 抗体 ; 抗 MIF 抗体 ; 特异性结合于 MIF 的所述 N 环基元的全部或一部分的抗体 ; 特异性结合于所述假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分的抗体 ; 抑制 MIF 与 CXCR2 结合的抗体 ; 抑制 MIF 与 CXCR4 结合的抗体 ; 抑制 MIF 与 JAB-1 结合的抗体 ; 抑制 MIF 与 CD74 结合的抗体 ; 特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 : DQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ; 特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 : PRASVPDGLSELTTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ; 特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 : FGGGSSEPCALCSLHSI 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ; 或其组合。

19. 根据权利要求 15 所述的组合物, 其中所述抗体选自抗 CXCR4 抗体 701、708、716、717、718、12G5 和 4G10 ; 抗 MIF 抗体 IID. 9、IIID. 9、XIF7、I31、IV2. 2、XI17、XIV14. 3、

XIII15.6 和 XIV15.4 ;或其组合。

20. 根据权利要求 15 所述的组合物,其进一步包含第二活性剂。

21. 根据权利要求 15 所述的组合物,其进一步包含烟酸、贝特、他汀、Apo-A1 模拟肽(例如 DF-4, 诺华公司)、apoA-I 转录上调剂、ACAT 抑制剂、CETP 调节剂、糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 受体拮抗剂、P2Y12 受体拮抗剂、Lp-PLA2 抑制剂、抗 TNF 剂、IL-1 受体拮抗剂、IL-2 受体拮抗剂、细胞毒性剂、免疫调节剂、抗生素、T 细胞共刺激阻断剂、改良病症的抗风湿剂、B 细胞消耗剂、免疫抑制剂、抗淋巴细胞抗体、烷化剂、抗代谢物、植物碱、类萜、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、单克隆抗体、激素疗法或其组合。

## 使用抗 MIF 抗体的治疗方法

### [0001] 交叉参考

[0002] 本申请案主张 2008 年 3 月 20 日申请的美国临时申请案第 61/038, 381 号 ;2008 年 3 月 25 日申请的美国临时申请案第 61/039, 371 号 ;2008 年 4 月 17 日申请的美国临时申请案第 61/045, 807 号 ;和 2008 年 12 月 9 日申请的美国临时申请案第 61/121, 095 号的权益, 所述申请案都以全文引用的方式并入本文中。

### 背景技术

[0003] 某些发炎性病状部分以淋巴细胞迁移到受影响组织中为特征。淋巴细胞的迁移会诱发组织损伤, 并使发炎性病状恶化。许多白细胞会跟随 MIF 梯度到达受影响组织。一般说来, MIF 与白细胞上的 CXCR2 和 CXCR4 受体相互作用, 由此触发并维持白细胞迁移。

### 发明内容

[0004] 在某些实施例中, 本文公开一种治疗 MIF 介导的病症的方法, 其包含投予有需要的个体治疗有效量的抗体, 所述抗体可抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合 ;(ii) MIF 对 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的活化 ;(iii) MIF 形成同源多聚体的能力 ;(iv) MIF 与 CD74 的结合 ;或其组合。在一些实施例中, 所述抗体特异性结合于 MIF 中假 ELR 基元的全部或一部分。在一些实施例中, 所述抗体特异性结合于 MIF 中 N 环基元的全部或一部分。在一些实施例中, 所述抗体特异性结合于 MIF 中假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分。在一些实施例中, 所述抗体选自抗 CXCR2 抗体 ;抗 CXCR4 抗体 ;抗 MIF 抗体 ;特异性结合于 MIF 中假 ELR 基元的全部或一部分的抗体 ;特异性结合于 MIF 中 N 环基元的全部或一部分的抗体 ;特异性结合于假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分的抗体 ;抑制 MIF 与 CXCR2 结合的抗体 ;抑制 MIF 与 CXCR4 结合的抗体 ;抑制 MIF 与 JAB-1 结合的抗体 ;抑制 MIF 与 CD74 结合的抗体 ;特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :DQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ;特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :PRASVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ;特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :FGGSSEPCALCSLHSI 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ;或其组合。在一些实施例中, 所述抗体选自抗 CXCR4 抗体 :701、708、716、717、718、12G5 和 4G10 ;抗 MIF 抗体 :IID. 9、IIID. 9、XIF7、I31、IV2. 2、XI17、XIV14. 3、XIII15. 6 和 X1V15. 4 ;或其组合。在一些实施例中, 在投予本文公开的抗体后, 巨噬细胞成为泡沫细胞的转化受到抑制。在一些实施例中, 在投予本文公开的抗体后, 心肌细胞的凋亡受到抑制。在一些实施例中, 在投予本文公开的抗体后, 浸润巨噬细胞的凋亡受到抑制。在一些实施例中, 在投予本文公开的抗体后, 腹部主动脉瘤的形成受到抑制。在一些实施例中, 在投予本文公开的抗体后, 腹部主动脉瘤的直径减小。在一些实施例中, 在投予本文公开的抗体后, 动脉瘤中的结构蛋白得以再生。在一些实施例中, 所述方法进一步包含共投予第二活性剂。在一些实施例中, 所述方法进一步包含共投予烟酸、贝特 (fibrate)、他汀 (statin)、Apo-A1 模拟肽 (例如 DF-4,

诺华公司 (Novartis))、apoA-I 转录上调剂 (apoA-I transcriptional up-regulator)、ACAT 抑制剂、CETP 调节剂、糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 受体拮抗剂、P2Y12 受体拮抗剂、Lp-PLA2 抑制剂、抗 TNF 剂、IL-1 受体拮抗剂、IL-2 受体拮抗剂、细胞毒性剂、免疫调节剂、抗生素、T 细胞共刺激阻断剂、改良病症的抗风湿剂 (disorder-modifying anti-rheumatic agent)、B 细胞消耗剂 (B cell depleting agent)、免疫抑制剂、抗淋巴细胞抗体、烷化剂、抗代谢物、植物碱、类萜、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、单克隆抗体、激素疗法或其组合。在一些实施例中, MIF 介导的病症是动脉粥样硬化; 腹部主动脉瘤; 急性播散性脑脊髓炎; 烟雾病 (Moyamoya disease); 高安氏病 (Takayasu disease); 急性冠状动脉综合征; 心脏同种异体移植血管病变; 肺炎; 急性呼吸窘迫综合征; 肺纤维化; 爱迪森氏病 (Addison's disease); 强直性脊柱炎; 抗磷脂抗体综合征; 自体免疫性溶血性贫血; 自体免疫性肝炎; 自体免疫性内耳病; 大疱性类天疱疮; 查格斯病 (Chagas disease); 慢性阻塞性肺病; 腹腔疾病; 皮炎; 1 型糖尿病; 2 型糖尿病; 子宫内膜异位症; 古巴士德氏综合征 (Goodpasture's syndrome); 格雷夫斯氏病 (Graves' disease); 格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome); 桥本氏病 (Hashimoto's disease); 特发性血小板减少性紫癜; 间质性膀胱炎; 全身性红斑狼疮 (SLE); 代谢综合征; 多发性硬化症; 重症肌无力; 心肌炎; 发作性睡病; 肥胖症; 寻常性天疱疮; 恶性贫血; 多发性肌炎; 原发性胆汁性肝硬化; 类风湿性关节炎; 精神分裂症; 硬皮病; 修格连氏综合征 (Sjogren's syndrome); 血管炎; 白癜风; 韦格纳肉芽肿 (Wegener's granulomatosis); 过敏性鼻炎; 前列腺癌; 非小细胞肺癌; 卵巢癌; 乳腺癌; 黑色素瘤; 胃癌; 结肠直肠癌; 脑癌; 转移性骨病; 胰腺癌; 淋巴瘤; 鼻息肉; 胃肠癌; 溃疡性结肠炎; 克隆恩氏病 (Crohn's disorder); 胶原性结肠炎; 淋巴细胞性结肠炎; 缺血性结肠炎; 改道性结肠炎; 贝塞特氏综合征 (Behcet's syndrome); 感染性结肠炎; 未定型结肠炎; 发炎性肝病; 内毒素休克; 脓毒症休克; 类风湿性脊柱炎; 强直性脊柱炎; 痛风性关节炎; 类风湿性多肌痛; 阿尔茨海默氏症 (Alzheimer's disorder); 帕金森氏症 (Parkinson's disorder); 癫痫; 艾滋病痴呆; 哮喘; 成人呼吸窘迫综合征; 支气管炎; 囊性纤维化; 急性白细胞介导性肺损伤; 远端直肠炎; 韦格纳肉芽肿; 纤维肌痛; 支气管炎; 囊性纤维化; 葡萄膜炎; 结膜炎; 牛皮癣; 湿疹; 皮炎; 平滑肌增殖病症; 脑膜炎; 带状疱疹; 脑炎; 肾炎; 结核病; 视网膜炎; 异位性皮炎; 胰腺炎; 齿龈炎; 凝固性坏死; 液化性坏死; 纤维蛋白样坏死; 血管内膜增生; 心肌梗塞; 中风; 器官移植排斥; 或其组合。在一些实施例中, 所述病症是腹部主动脉瘤。在一些实施例中, 所述病症是动脉粥样硬化。

[0005] 在某些实施例中, 本文公开一种用于治疗 MIF 介导的病症的医药组合物, 其包含一种抗体, 所述抗体可抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的结合; (ii) MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 的活化; (iii) MIF 形成同源多聚体的能力; 或其组合。在一些实施例中, 所述抗体特异性结合于 MIF 中假 ELR 基元的全部或一部分。在一些实施例中, 所述抗体特异性结合于 MIF 中 N 环基元的全部或一部分。在一些实施例中, 所述抗体特异性结合于 MIF 中假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分。在一些实施例中, 所述抗体选自抗 CXCR2 抗体; 抗 CXCR4 抗体; 抗 MIF 抗体; 特异性结合于 MIF 中假 ELR 基元的全部或一部分的抗体; 特异性结合于 MIF 中 N 环基元的全部或一部分的抗体; 特异性结合于假 ELR 基元和 N 环基元的全部或一部分的抗体; 抑制 MIF 与 CXCR2 结合的抗体; 抑制 MIF 与 CXCR4 结合的抗体; 抑制 MIF 与 JAB-1 结合的抗体; 抑制 MIF 与 CD74 结合的抗体; 特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗

体 :DQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ; 特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :PRASVPDGFSELTTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCALCSL 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ; 特异性结合于以下肽序列的全部或一部分的抗体 :FGGSSEPCALCSLHSI 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域 ; 或其组合。在一些实施例中, 所述抗体选自抗 CXCR4 抗体 701、708、716、717、718、12G5 和 4G10 ; 抗 MIF 抗体 IID. 9、IIID. 9、XIF7、I31、IV2. 2、XI17、XIV14. 3、XIII15. 6 和 XIV15. 4 ; 或其组合。在一些实施例中, 所述组合物进一步包含第二活性剂。在一些实施例中, 所述组合物进一步包含烟酸、贝特、他汀、Apo-A1 模拟肽 (例如 DF-4, 诺华公司)、apoA-I 转录上调剂、ACAT 抑制剂、CETP 调节剂、糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 受体拮抗剂、P2Y<sub>12</sub> 受体拮抗剂、Lp-PLA<sub>2</sub> 抑制剂、抗 TNF 剂、IL-1 受体拮抗剂、IL-2 受体拮抗剂、细胞毒性剂、免疫调节剂、抗生素、T 细胞共刺激阻断剂、改良病症的抗风湿剂、B 细胞消耗剂、免疫抑制剂、抗淋巴细胞抗体、烷化剂、抗代谢物、植物碱、类萜、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、单克隆抗体、激素疗法或其组合。

### 附图说明

[0006] 本发明的新颖特征将在随附权利要求书中予以具体陈述。参照以下陈述利用本发明原理的说明性实施例的详细描述和其随附图式, 将会对本发明的特征和优点获得更好的理解, 在图式中:

[0007] 图 1 说明 MIF 触发的单核细胞阻滞是由 CXCR2/CXCR4 和 CD74 介导的。如所示, 在存在或不存在 MIF (以及抗 MIF 抗体、抗 CXCL1 和 CXCL8 抗体或同型对照)、CXCL8、CXCL10 或 CXCL12 的情况下, 预培育人类主动脉内皮细胞 (Human aortic endothelial cell, HAoEC)、稳定表达 ICAM-1 的 CHO 细胞 (CHO/ICAM-1) 和小鼠微血管内皮细胞 (mouse microvascular endothelial cell, SVEC) 2 小时。如所示, 用抗 CXCR1、CXCR2、 $\beta_2$ 、CXCR4、CD74 的抗体或同型对照预处理单核细胞 30 分钟, 或用百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 预处理 2 小时。(a) 用原代人类单核细胞灌注 HAoEC ; (b) 使用抗 MIF 抗体进行的免疫荧光检测显示, 预处理 2 小时后, MIF (绿色) 呈递于 HAoEC 和 CHO/ICAM-1 细胞的表面, 但预处理 30 分钟后没有 (图中未示); 相比之下, 在缓冲液处理的细胞中没有 MIF (对照)。比例条, 100  $\mu$ m。(c、d) 用 MonoMac6 细胞灌注 CHO/ICAM-1 细胞 ; (e) 用 T 细胞灌注 HAoEC。(f、g) 用 Jurkat T 细胞 (f) 和用 Jurkat CXCR2 转染子或载体对照 (g) 灌注 CHO/ICAM-1 细胞。在 c、d、f 和 g 中, 减去结合于经载体转染的 CHO 细胞的背景值。(h) 在 CXCR4 拮抗剂 AMD3465 存在下, 用稳定表达 CXCR1、CXCR2 或 CXCR3 的 L1.2 转染子和用仅表达内源 CXCR4 的对照灌注小鼠 SVEC。细胞阻滞是以每平方毫米的细胞数或对照细胞粘附的百分比定量。a 和 c-g 中的数据表示 3 到 8 个独立实验的平均值  $\pm$  标准差 ; h 中的数据是由四个实验中的一个代表性实验得到的结果。

[0008] 图 2 说明 MIF 触发的单核细胞趋化性是由 CXCR2/CXCR4 和 CD74 介导的。使原代人类单核细胞 (a-e)、CD3<sup>+</sup>T 细胞 (f) 和嗜中性粒细胞 (g、h) 分别在存在或不存在 MIF 的情况下进行反式迁移分析 (transmigration analysis)。CCL2(a)、CXCL8(a、g、h) 和 CXCL12(f) 用作阳性对照, 或用于测试由 MIF (或 CXCL8, h) 引起的脱敏。MIF、CCL2 和 CXCL8 对单核细胞 (a) 或 MIF 对嗜中性粒细胞 (g) 的趋化作用遵循钟形剂量 - 反应曲线。利用抗 MIF 抗

体、煮沸 (b) 或利用指定浓度的 MIF (顶腔室中, c) 可消除由 MIF 触发的单核细胞趋化性。(d) 如通过用百日咳毒素组分 A 和 B (PTX A+B)、单独 PTX 组分 B 或者用 Ly294002 处理所证实, 由 MIF 触发的单核细胞趋化性是由  $G_{\alpha_i}$ / 磷酸肌醇-3- 激酶信号传导介导的。(e) 利用抗 CD74 或抗 CXCR1/CXCR2 的抗体, 可阻断 MIF 介导的单核细胞趋化性。(f) 利用抗 MIF 和抗 CXCR4 的抗体, 可阻断由 MIF 诱导的 T 细胞趋化性。(g) 嗜中性粒细胞趋化性是由 MIF 诱导的。(h) MIF 诱导的嗜中性粒细胞趋化性与 CXCL8 诱导的嗜中性粒细胞趋化性的比较、抗 CXCR2 或抗 CXCR1 抗体的作用, 以及 MIF 引起的 CXCL8 脱敏。a 和 f-h 中的数据表示为趋化性指数; c 中的数据表示为对照组的百分比; 而 b、d 和 e 中的数据表示为输入的百分比。数据都表示 4 到 10 个独立实验的平均值  $\pm$  标准差, 但图 a、c 和 g; b 中煮沸的 MIF; 以及 b 和 e 中的单独抗体对照组除外, 这些图中数据为 2 个独立实验的平均值。

[0009] 图 3 说明 MIF 触发快速整合素 (integrin) 活化和钙信号传导。(a) 用 MIF 或 TNF- $\alpha$  刺激人类主动脉内皮细胞 2 小时。利用实时 PCR 分析 CXCL1 和 CXCL8 mRNA, 并相对于对照组进行正规化。借助于 ELISA 评估来源于上清液的 CXCL8 ( $n = 3$  个独立实验, 一式两份执行)。(b) 用 MIF 或 CXCL8 直接刺激 MonoMac6 细胞 1 分钟, 并于 CHO-ICAM-1 细胞上灌注 5 分钟 (8 个独立实验的平均值  $\pm$  标准差)。(c) 用 MIF 刺激 MonoMac6 细胞指定时间。利用 FACS Aria 监测 LFA-1 的活化 (用 327C 抗体检测), 并表示为平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 的增加。(d) 与 c 中相同, 但针对原代单核细胞; 数据是相对于利用  $Mg^{2+}$ /EGTA 得到的最大活化表示。(e) 用抗  $\alpha_4$  整合素、CD74 或 CXCR2 的抗体预处理 MonoMac6 细胞, 用 MIF 刺激 1 分钟, 在 VCAM-1. Fc 上灌注 5 分钟。细胞粘附表示为对照组的百分比。c-e 中的阻滞数据表示 5 个独立实验的平均值  $\pm$  标准差。(f) 用 MIF、CXCL8 或 CXCL7 刺激经 Fluo-4 AM 标记的嗜中性粒细胞发生钙瞬变。利用 FACS Aria 纪录由钙引起的 MFI, 持续 0-240 秒。对于脱敏, 在刺激之前 120 秒添加刺激物。所示迹线表示 4 个独立实验。(g) L1. 2-CXCR2 转染子中由指定浓度的 CXCL8、CXCL7 或 MIF 触发的钙内流的剂量-反应曲线。数据表示为基线与峰值 MFI (4-8 个独立实验的平均值  $\pm$  标准差) 之间的差异。

[0010] 图 4 说明 MIF 与 CXCR2/CXCR4 的相互作用以及 CXCR2/CD74 复合物的形成。使 HEK293-CXCR2 转染子 (a) 或带有 CXCR4 的 Jurkat T 细胞 (c) 分别经历受体结合分析, 分析 MIF 或冷同源配体对  $[I^{125}]$ CXCL8 (a) 或  $[I^{125}]$ CXCL12 (c) 的竞争 (平均值  $\pm$  标准差,  $n = 6-10$ )。(b) 如所示, HEK293-CXCR2 或 RAW264. 7-CXCR2 转染子中 MIF 和 CXCL8 诱导的 CXCR2 内化 (插图显示代表性柱形图); 通过 FACS 分析表面 CXCR2 的表达来评估 (缓冲剂 (浓) 百分比, 平均值  $\pm$  标准差,  $n = 5$ )。(d) 与 b 中相同, Jurkat T 细胞中由 MIF 和 CXCL12 诱导的 CXCR4 内化 (平均值  $\pm$  标准差,  $n = 4-6$ )。(e) 利用 FACS 分析荧光素-MIF 与 HEK293-CXCR2 转染子或载体对照的结合。插图显示 HEK293-CXCR2 转染子中与载体对照中生物素-MIF 与 CXCR2 的结合的比较, 所述结合是利用蛋白免疫印迹法 (western blot), 使用抗 CXCR2 抗体在抗生物素链菌素 (streptavidin, SA<sub>v</sub>) 离析后进行评估的。(f) 针对 CXCR2、CD74 和核 (赫希斯特公司 (Hoechst)) 进行染色的 RAW264. 7-CXCR2 转染子中 CXCR2 与 CD74 (橙色-黄色重叠) 的共定位, 其是利用荧光显微镜 (上图) 或激光共聚焦扫描显微镜 (下图) 进行分析的。比例条, 10  $\mu$  m。(g) 在表达经 His 标记的 CD74 的 HEK293-CXCR2 转染子的 CHAPS0 提取物中 CXCR2/CD74 复合物的免疫共沉淀。相继进行抗 His 免疫沉淀 (IP) 和抗 CXCR2 或抗 His-CD74 蛋白免疫印迹 (WB; 上图), 或相继进行抗 CXCR2 免疫沉淀和抗 His-CD74 或抗

CXCR2 蛋白免疫印迹 (下图)。对照组:不会发生免疫沉淀的溶解产物或单独珠粒。(h) 与 g 中相同,但针对 L1.2-CXCR2 转染子。由 L1.2-CXCR2 转染子进行的抗 CXCR2 免疫沉淀之后进行抗 CD74 或抗 CXCR2 蛋白免疫印迹 (上图)。利用同型 IgG 或 CXCR2 阴性 L1.2 细胞进行的免疫沉淀 (下图) 用作对照。数据表示 3 个独立实验 (e-h)。

[0011] 图 5 说明活体内 MIF 经由 CXCR2 诱发的致动脉粥样硬化炎症和微血管炎症,以及 MIF 阻断对斑块消退的影响。(a) 在喂食饲料 30 周的  $Mif^{+/+}Ldlr^{-/}$  和  $Mif^{-/}Ldlr^{-/}$  小鼠 ( $n = 4$ ) 中测定活体内单核细胞的内腔粘附以及原生主动脉根中损伤巨噬细胞的含量。显示代表性影像。箭头指示粘附于内腔表面的单核细胞。比例条,  $100 \mu m$ 。(b、c) 活体内暴露于 MIF 诱导的 CXCR2 依赖性白细胞募集。阴囊内注射 MIF 后,利用活体显微镜观察提睾肌微血管。如与 IgG 对照组 ( $n = 4$ ) 相比较,用阻断 CXCR2 的抗体预处理可消除粘附和迁移。(d) 在用野生型而非  $I18rb^{-/}$  骨髓重建的野生型小鼠 ( $n = 3$ ) 中,腹膜内注射 MIF 或媒介引起嗜中性粒细胞募集。(e-h) 阻断 MIF 而非 CXCL1 或 CXCL12,使动脉粥样硬化晚期斑块消退和稳定。 $Apoe^{-/}$  小鼠接收高脂肪饮食 12 周,并随后用抗 MIF、CXCL1 或 CXCL12 的抗体或者媒介 (对照组) 再处理 4 周 ( $n = 6$  到 10 只小鼠)。使用油红 O (Oil-Red-O) 对主动脉根中的斑块染色。代表性影像显示于 e 中 (比例条,  $500 \mu m$ )。F 中的数据表示基线 (12 周) 以及 16 周后的斑块面积。MOMA-2<sup>+</sup> 巨噬细胞的相对含量显示于 g 中,而每一切片中 CD3<sup>+</sup>T 细胞的数量显示于 h 中。数据表示平均值  $\pm$  标准差。

[0012] 图 6 说明在动脉粥样化形成的情况下 MIF 的细胞机制。利用各种促动脉粥样硬化刺激物,例如氧化型 LDL (oxLDL) 或血管紧张素 II (angiotensin II, ATII),来诱导血管壁细胞和内膜巨噬细胞中的 MIF 表达。随后, MIF 上调内皮细胞粘附分子 (例如血管 [VCAM-1] 和细胞内 [ICAM-1] 粘附分子) 和趋化因子 (例如 CCL2),并通过结合其七螺旋 (趋化因子) 受体 CXCR2 和 CXCR4 并经由这些受体传导信号,触发各别整合素受体 (例如 LFA-1 和 VLA-4) 的直接活化。此举要求单核细胞 (单核细胞和 T 细胞) 的募集和巨噬细胞转化成为泡沫细胞,由此抑制了 SMC 的凋亡,并调控 (例如减弱) SMC 的迁移或增殖。通过诱导 MMP 和组织蛋白酶, MIF 促进弹性蛋白和胶原蛋白降解,最终导致发展成不稳定斑块。ROS 表示活性氧物质 (reactive oxygen species); PDGF-BB 表示血小板源性生长因子 BB。

[0013] 图 7 说明经由功能性 MIF 受体复合物进行的信号传导。糖皮质激素通过调控细胞因子的产生覆盖其功能来诱导 MIF,并且在其内吞后,可与细胞内蛋白质 (即 JAB-1) 相互作用,由此下调 MAPK 信号,并调节细胞氧化还原内平衡。在一些实施例中,细胞外 MIF 结合于细胞表面蛋白 CD74 (恒定链 Ii)。CD74 缺乏信号转导细胞内结构域,但与蛋白聚糖 CD44 相互作用,并经由 CD44 介导信号传导,以诱导 Src 家族 RTK 和 MAPK/ 细胞外信号调控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的活化、活化 PI3K/Akt 路径或启动 p53 依赖性细胞凋亡抑制。MIF 也仅结合 G 蛋白偶联趋化因子受体 (CXCR2 和 CXCR4),并经由所述细胞因子受体进行信号传导。CXCR2 与 CD74 形成复合物,可启动附属结合 (accessory binding),从而促进 GPCR 的活化以及类 GPCR-RTK 信号传导复合物的形成,由此触发钙内流以及整合素的迅速活化。

[0014] 图 8 说明 MIF 对于心肌病理学的影响。在缺血再灌注的情况下,脓毒病中的缺氧、活性氧物质 (ROS) 和内毒素 (例如脂多糖 [LPS]) 诱导心肌细胞经由蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 依赖性机制分泌出 MIF,并引起细胞外信号调控激酶 (ERK) 活化,这将引起

心肌细胞凋亡。在一些实施例中,用存活心肌细胞或用于治疗性注射的内皮祖细胞(例如 eEPC)表达的 MIF 经由其受体 CXCR2 和 CXCR4 促进血管生成,此过程需要 MAPK 和 PI3K 的活化。

[0015] 图 9 说明干扰 CXCR4 但不同时干扰 CXCR2 将使动脉粥样硬化恶化。经由微型渗透泵,用媒介(对照组)或 AMD3465 处理接收高脂肪饮食的 Apo<sup>e</sup>-/- 小鼠 12 周(n = 每组 6 只)。用油红 O 染色,随后定量主动脉根(图 14a)和胸腹主动脉(图 14b)中的动脉粥样硬化斑块。在指定时间点,利用流式细胞分析或标准细胞测量术测定末梢血液中嗜中性粒细胞的相对数量(图 14c)。

[0016] 图 10 说明 MIF 三聚体的晶体结构。假 ELR 结构域在所述三聚体中形成一个环,而 N 环结构域从所述假 ELR 环向外延伸。

[0017] 图 11 说明 MIF 的核苷酸序列,其中注解显示对应于 N 环结构域和假 ELR 结构域的序列。

### 具体实施方式

[0018] 在某些实施例中,本文公开抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导的方法。在一些实施例中,通过用抗体占据 CXCR2 和 CXCR4 的 MIF 结合结构域,来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中,通过占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域,来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中,通过用抗体占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域,并由此破坏 CXCR2 和 / 或 CXCR4 与 MIF 的结合,来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中,通过用抗体占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域,并由此破坏 MIF 的三聚化,来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。

[0019] 尽管所属领域中教示了抗 MIF 抗体,但所属领域并未认识到,对于白细胞相互作用, MIF 中的某些部分比其它部分更重要。本文所解决的一个问题是,鉴别和产生结合 MIF 中对于白细胞趋化性重要的选择性部分的抗体。

[0020] 此外,所属领域中还教示了抗 CXCR2 和抗 CXCR4 抗体。然而,这些受体也涉及与其它配体(例如 IL-8/CXCL8、GRO $\beta$ /CXCL2 和 / 或基质细胞源性因子 1a(Stromal Cell-Derived Factor-1a, SDF-1a)/CXCL12)的相互作用。如果抑制后面所述的这些相互作用,通常就会产生有害副作用。本文解决了所属领域中没能设计出选择性抑制与 MIF 的相互作用的抗 CXCR2 和抗 CXCR4 抗体的问题。

### [0021] 某些定义

[0022] 术语“个体”、“受检者”或“患者”可互换使用。本文使用的这些术语是指任何哺乳动物(即,分类学分类动物界:脊索动物门:脊椎动物亚门:哺乳纲内的任何目、科和属的物种)。在一些实施例中,所述哺乳动物为人类。在一些实施例中,所述哺乳动物是非人类。在一些实施例中,哺乳动物是以下分类学目的成员:灵长目(例如狐猴、懒猴(lorid)、婴猴、眼镜猴、猴子、猿和人类);啮齿目(例如小鼠、大鼠、松鼠、花鼠和地鼠);复齿目(例如野兔、家兔和鼠兔);猬形目(例如猬和毛猬);鼯形目(例如鼯鼠、鼯鼠和沟齿鼠);翼手目(例如蝙蝠);鲸目(例如鲸、海豚和白鲸);食肉目(例如猫、狮子和其它猫型亚目;狗、熊、鼬属和海豹);奇蹄目(例如马、斑马、貘和犀牛);偶蹄目(例如猪、骆驼、牛和鹿);长

鼻目(例如象);海牛目(例如海牛(manatee)、儒艮和海牛(sea cow));有甲贫齿亚目(例如犰狳);披毛目(例如食蚁兽和树懒);负鼠目(例如美洲负鼠);新袋目(例如袋鼠);微兽目(例如南猯(Monito del Monte));袋鼯目(例如袋鼯);袋鼯目(例如袋类肉食兽(marsupial carnivore));袋狸目(例如袋狸和兔耳袋狸);或双门齿目(例如袋熊、树袋熊、负鼠、袋鼯、袋鼠、大袋鼠和小袋鼠)。在一些实施例中,所述动物是爬行动物(即,分类学分类动物界:脊索动物门:脊椎动物亚门:爬行纲内的任何目、科和属的物种)。在一些实施例中,所述动物是鸟类(即动物界:脊索动物门:脊椎动物亚门:鸟纲)。这些术语都不需要或不局限于以护理人员(例如医生、注册护士、从业护士、医师助手、男护理员或收容所工作人员)管理(例如持久或间歇)为特征的情形。

[0023] 术语“抗原”是指能够诱导抗体产生的物质。在一些实施例中,抗原是特异性结合于抗体可变区的物质。

[0024] 术语“抗体”是指单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、移植抗体、人类抗体、人类化抗体、合成抗体、嵌合抗体、骆驼化抗体(camelized antibody)、单链Fv(single-chain Fv, scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(disulfide-linked Fv, sdFv)、胞内抗体(intrabody)和抗独特型(anti-idiotypic, 抗Id)抗体,以及任一上述抗体的抗原结合片段。具体地说,抗体包括免疫球蛋白分子,以及免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即含有抗原结合位点的分子。视免疫球蛋白重链恒定结构域的氨基酸序列而定,免疫球蛋白可归为不同类别。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定结构域(Fc)分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。众所周知不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型。免疫球蛋白分子属于任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>)或亚类。术语“抗体”与“免疫球蛋白”在最广泛的意义上可互换使用。在一些实施例中,抗体是抗体与一个或多个其它蛋白质或肽共价或非共价缔合而形成的较大分子的一部分。

[0025] 对于抗体,术语“可变结构域”是指各特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中所使用的抗体的可变结构域。然而,可变性并不是均匀分布于整个抗体可变结构域。相反,其实际上是集中于轻链和重链可变结构域中三个称为高变区(也称为CDR)的区段中。可变结构域中保守性较高的部分称为“框架区”或“FR”。未经过修饰的重链和轻链的可变结构域各含有四个FR(FR1、FR2、FR3和FR4),主要采用 $\beta$ -折叠构型,其间杂有三个CDR,这些CDR形成环连接,并且在一些情况下,形成 $\beta$ -折叠结构的一部分。各链中的CDR通过FR紧接地固持在一起,并与来自另一链的CDR一起帮助形成抗体的抗原结合位点(参见卡贝特(Kabat)等人,免疫相关蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,美国国立卫生研究院公共卫生部(Public Health Service, National Institutes of Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda, Md.)(1991),第647-669页)。

[0026] 术语“高变区”和“CDR”当用于本文中时,指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。CDR包含以互补方式结合于抗原的三个序列区的氨基酸残基,而且这三个序列区称为V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>链各自的CDR1、CDR2和CDR3。根据卡贝特等人,免疫相关蛋白质的序列,第5版,美国国立卫生研究院公共卫生部,马里兰州贝塞斯达(1991),在轻链可变结构域中,CDR通常大致对应于残基24-34(CDRL1)、50-56(CDRL2)和89-97(CDRL3),而在重链可变结构域中,CDR通常大致对应于残基31-35(CDRH1)、50-65(CDRH2)和95-102(CDRH3)。应了解,

不同抗体的 CDR 可含有插入序列,因此,氨基酸编号可能不同。卡贝特编号系统 (Kabat numbering system) 所用的编号方案利用附接于特定残基的字母 (例如轻链中 CDRL1 的 27A、27B、27C、27D、27E 和 27F) 来反映不同抗体之间任何插入序列的编号,由此说明所述插入序列。或者,根据查希亚 (Chothia) 和勒斯克 (Lesk),分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.), 196 :901-917(1987),在轻链可变结构域中,CDR 通常大致对应于残基 26-32(CDRL1)、50-52(CDRL2) 和 91-96(CDRL3),而在重链可变结构域中,CDR 通常大致对应于残基 26-32(CDRH1)、53-55(CDRH2) 和 96-101(CDRH3)。

[0027] 本文使用的“框架区”或“FR”是指形成抗原结合袋或沟的一部分的框架氨基酸残基。在一些实施例中,框架残基形成作为抗原结合袋或沟的一部分的环,并且环中的氨基酸残基可以或不接触抗原。框架区一般包含介于 CDR 之间的区域。根据卡贝特等人,免疫相关蛋白质的序列,第 5 版,美国国立卫生研究院公共卫生部,马里兰州贝塞斯达 (1991),在轻链可变结构域中,FR 通常大致对应于残基 0-23(FRL1)、35-49(FRL2)、57-88(FRL3) 和 98-109,而在重链可变结构域中,FR 通常大致对应于残基 0-30(FRH1)、36-49(FRH2)、66-94(FRH3) 和 103-133。如同上文关于轻链的卡贝特编号所论述,重链也以类似方式说明插入序列 (例如在重链中 CDRH1 的 35A、35B)。或者,根据查希亚和勒斯克,分子生物学杂志,196 :901-917(1987),在轻链可变结构域中,FR 通常大致对应于残基 0-25(FRL1)、33-49(FRL2) 53-90(FRL3) 和 97-109(FRL4),而在重链可变结构域中,FR 通常大致对应于残基 0-25(FRH1)、33-52(FRH2)、56-95(FRH3) 和 102-113(FRH4)。

[0028] 可以通过观测抗体重链和 / 或抗体轻链的三维结构,评估和确定 FR 的环氨基酸。可以分析所述三维结构中的溶剂可及氨基酸位置,因为这些位置可能会形成环和 / 或提供抗体可变结构域中的抗原接触。一些溶剂可及位置能容许氨基酸序列多样性,而其它位置 (例如结构位置) 一般变化较少。抗体可变结构域的三维结构可以由晶体结构或蛋白质建模得到。

[0029] 抗体的恒定结构域 (Fc) 不直接涉及抗体与抗原的结合,而是展现各种效应功能,例如抗体通过与例如 Fc 受体 (FcR) 相互作用来参与抗体依赖性细胞毒性。在将抗体授予患者后,Fc 结构域还可以增加循环中抗体的生物利用率。

[0030] 根据抗体恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任何脊椎动物物种的抗体 (免疫球蛋白) “轻链”归为两个明显不同的类型中的一类,即“ $\kappa$ ” (kappa) 或“ $\lambda$ ” (lambda)。

[0031] 在抗体情形中,术语“衍生物”是指包含通过引入氨基酸残基取代、缺失或添加而改变的氨基酸序列的抗体。术语“衍生物”还指经过修饰 (即,通过将任何类型的分子共价连接至抗体) 的抗体。例如,在一些实施例中,例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、用保护基 / 阻隔基衍生化、蛋白水解裂解、连接至细胞配体或其它蛋白质等,来修饰抗体。在一些实施例中,通过使用适合的技术,包括 (但不限于) 特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素 (tunicamycin) 的代谢合成等进行化学修饰,来制造抗体和其衍生物。在一些实施例中,抗体的衍生物与得到所述衍生物的抗体具有相似或相同的功能。

[0032] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“完全抗体”在本文中可以互换使用,指的是实质上完整形式的抗体,而不是下文所定义的抗体片段。这些术语特指重链含有 Fc 区的抗体。在一些实施例中,本文所提供的抗体变异体是全长抗体。在一些实施例中,全长抗体是人、人类化、嵌合和 / 或亲和力成熟抗体。

[0033] “亲和力成熟”抗体是在抗体的一个或多个 CDR 中具有一种或多种变异的抗体,与不具有这些变异的亲本抗体相比,所述变异将引起抗体对抗原亲和力的改良。优选的亲和力成熟抗体将对目标抗原具有纳摩尔浓度或甚至皮摩尔浓度的亲和力。亲和力成熟抗体是通过适合的程序产生。参见例如马克斯 (Marks) 等人, (1992) 生物技术 (Biotechnology) 10 :779-783,其描述通过可变重链 (VH) 与可变轻链 (VL) 结构域改组进行亲和力成熟。CDR 和 / 或框架残基的随机诱变描述于例如:巴贝丝 (Barbas) 等人 (1994),美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91 :3809-3813;斯奇尔 (Schier) 等人 (1995),基因 (Gene) 169 :147-155;耶尔顿 (Yelton) 等人,1995,免疫学杂志 (J. Immunol.) 155 :1994-2004;杰克森 (Jackson) 等人,1995,免疫学杂志,154(7) :3310-9;和哈金斯 (Hawkins) 等人, (1992),分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 226 :889-896 中。

[0034] 出于说明书和权利要求的目的,本文使用的术语“结合片段”、“功能片段”、“抗体片段”或“抗原结合片段”意思指完整抗体分子的一部分或片段,优选其中所述片段保留抗原结合功能。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd (V<sub>H</sub> 和 C<sub>H1</sub> 结构域)、Fd' 和 Fv (抗体单一臂的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域) 片段、微型双功能抗体 (diabody)、线性抗体 (泽帕塔 (Zapata) 等人 (1995) 蛋白质工程 (Protein Eng) 10 :1057)、可变轻链 (VL)、可变重链 (VH)、单链抗体分子、单链结合多肽、scFv、scFv2 (链中两个 scFv 分子头尾串联)、二价 scFv、四价 scFv、一半抗体、dAb 片段、可变 NAR 结构域,以及由抗体片段形成的双特异性或多特异性抗体 (例如双特异性 Fab<sub>2</sub> 和三特异性 Fab<sub>3</sub> 等)。

[0035] “Fab”片段通常是由木瓜蛋白酶消化抗体产生,致使产生两个相同的抗原结合片段,所述片段各具有单一抗原结合位点和残余“Fc”片段。胃蛋白酶处理得到 F(ab')<sub>2</sub> 片段,其具有能够交联抗原的两个抗原结合位点。“Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在双链 Fv 种类中,此区域由一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域紧密非共价缔合而成的二聚体组成。在单链 Fv (scFv) 种类中,一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域通过柔性肽连接子共价连接,以致轻链与重链缔合成与双链 Fv 种类相似的“二聚”结构。在此构型中,各可变结构域的三个 CDR 相互作用,由此界定 VH-VL 二聚体表面上的抗原结合位点。总之,六个 CDR 赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单一可变结构域 (或仅包含对抗原具特异性的三个 CDR 的一半 Fv) 能够识别和结合抗原,但通常亲和力低于完整结合位点。

[0036] Fab 片段也含有轻链恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (C<sub>H1</sub>)。Fab 片段与 Fab' 片段的不同之处在于,在重链 C<sub>H1</sub> 结构域的羧基端增加了数个残基,包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab' -SH 在本文中指恒定结构域的半胱氨酸残基带有自由巯基的 Fab'。F(ab')<sub>2</sub> 抗体片段最初是以 Fab' 片段对的形式产生,其间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶合方式也是适合的。有关由单克隆 Ab 制造各种片段的方法包括例如普卢克顿 (Plückthun),1992,免疫学研究 (Immunol. Rev.) 130 :152-188。

[0037] “Fv”是指含有完整抗原识别和抗原结合位点的抗体片段。此区域由一个重链与一个轻链可变结构域紧密非共价缔合而成的二聚体组成。在此构型中,各可变结构域的三个 CDR 相互作用,由此界定 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 二聚体表面上的抗原结合位点。总之,来自各 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 链的一个或多个 CDR 的组合赋予抗体抗原结合特异性。例如,应了解,例如 CDRH3 和 CDRL3 当转移到受者抗体 (recipient antibody) 或其抗原结合片段的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 链时,足以赋予抗体抗原

结合特异性,而且可以使用本文所述的技术测试所述 CDR 组合的结合、亲和力等。即使单一可变结构域(或仅包含对抗原具特异性的三个 CDR 的一半 Fv)能够识别和结合抗原,但亲和力可能会低于当与第二可变结构域组合时的亲和力。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域( $V_L$  及  $V_H$ )是由单独基因编码,但可以使用重组方法,借助于合成连接子将其连接在一起,使其能够成为  $V_L$  与  $V_H$  区配对形成单价分子的单一蛋白质链(称为单链 Fv(scFv);博德(Bird)等人(1988)科学(Science)242:423-426;霍斯顿(Huston)等人(1988)美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)85:5879-5883;和奥斯伯恩(Osborn)等人(1998)自然-生物技术(Nat. Biotechnol.)16:778)。所述 scFv 也意欲涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”内。特定 scFv 的任何  $V_H$  和  $V_L$  序列可连接至 Fc 区 cDNA 或基因组序列,以便产生编码完整 Ig(例如 IgG)分子或其它同型的表达载体。也可以使用  $V_H$  和  $V_L$ ,利用蛋白质化学或重组 DNA 技术,来产生 Fab、Fv 或其它 Ig 片段。

[0038] “单链 Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的  $V_H$  和  $V_L$  结构域,其中这些结构域都存在于单一多肽链中。在一些实施例中,Fv 多肽还在  $V_H$  与  $V_L$  结构域之间包含多肽连接子,其使 sFv 能够形成抗原结合所需的结构。有关 sFv 的评述,参见例如普卢克顿(Pluckthun),单克隆抗体的药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies),第 113 卷,罗斯伯格(Rosenburg)和莫尔(Moore)编,纽约斯普林格-维拉格出版社(Springer-Verlag, New York),第 269-315 页(1994)。

[0039] 术语“Avimer™”是指一类来源于人类的治疗性蛋白质,其与抗体和抗体片段无关,并且是由数个可再使用的模块化结合结构域(称为 A 结构域;也称为 A 类模块、互补型重复序列或 LDL 受体 A 类结构域)构成。这些结构域可利用活体外外显子改组和噬菌体呈现技术从人类细胞外受体结构域开发得到(斯维曼(Silverman)等人,2005,自然-生物技术(Nat. Biotechnol.)23:1493-1494;斯维曼等人,2006,自然-生物技术,24:220)。所得蛋白质可含有多个不相关的结合结构域,与单抗原决定基结合蛋白相比较,其可展现提高的亲和力(在一些情况下,亚纳摩尔浓度)和特异性。参见例如美国专利申请公开案第 2005/0221384 号、第 2005/0164301 号、第 2005/0053973 号以及第 2005/0089932 号、第 2005/0048512 号和第 2004/0175756 号,其各以全文引用的方式并入本文中。

[0040] 已知的 217 个人类 A 结构域各包含约 35 个氨基酸(约 4kDa);而且各结构域由平均长度为 5 个氨基酸的连接子分隔开。天然 A 结构域迅速而有效地折叠成均一、稳定的结构,此过程主要是由钙结合和二硫键形成所介导。此共用结构只需要 12 个氨基酸的保守支架基元。最终结果是含有多个结构域的单一蛋白质链,所述结构域各提供单独的功能。蛋白质的各个结构域独立地特异性结合,而且各结构域的贡献是加和性的。这些蛋白质就是由亲合力多聚体得到的“Avimers™”。

[0041] 术语“微型双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含重链可变结构域( $V_H$ )与同一多肽链( $V_H$ - $V_L$ )中的轻链可变结构域( $V_L$ )连接。通过使用过短以致同一链上的两个结构域之间无法配对的连接子,迫使各结构域与另一链的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点。微型双功能抗体更充分描述于例如 EP404,097;WO 93/11161;和霍林格(Hollinger)等人,美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90:6444-6448(1993)中。

[0042] 抗原结合多肽还包括重链二聚体,例如来自骆驼和鲨鱼的抗体。骆驼和鲨鱼抗体

包含类 V 和类 C 结构域两条链的同源二聚体对（都不含轻链）。由于骆驼中重链二聚体 IgG 的  $V_H$  区不与轻链发生疏水相互作用，故在骆驼中，重链中通常接触轻链的区域变为亲水性氨基酸残基。重链二聚体 IgG 的  $V_H$  结构域就是  $V_{HH}$  结构域。鲨鱼的 Ig-NAR 包含一个可变结构域（称为 V-NAR 结构域）与 5 个类 C 恒定结构域（C-NAR 结构域）的同源二聚体。在骆驼中，抗体谱系的多样性是由  $V_H$  或  $V_{HH}$  区的 CDR1、2 和 3 决定。骆驼  $V_{HH}$  区中的 CDR3 的特征在于，其长度相对较长，平均为 16 个氨基酸（穆德曼 (Muyldermans) 等人，1994，蛋白质工程 (Protein Engineering) 7(9) :1129)。这与许多其它物种的抗体的 CDR3 区形成对比。例如，小鼠  $V_H$  的 CDR3 平均有 9 个氨基酸。可以借助于美国专利申请案第 20050037421 号中公开的方法，制造骆驼源性抗体可变区文库，其保留了骆驼可变区的活体内多样性。

[0043] 本文使用的术语“单克隆抗体”或“mAb”是指由实质上同源的抗体群体获得的抗体，即，构成群体的个别抗体除可能以少量存在的天然存在的突变外均相同。在一些实施例中，单克隆抗体是例如通过最初由科勒 (Kohler) 和米尔斯坦 (Milstein) (1975) 自然 (Nature) 256 :495 描述的杂交瘤法制成，或通过例如美国专利第 4,816,567 号中描述的重组法制成。在一些实施例中，单克隆抗体是使用克拉克森 (Clackson) 等人，自然 (Nature) 352 :624-628(1991) 以及马克斯 (Marks) 等人，分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 222 :581-597(1991) 中描述的技术，从噬菌体抗体文库分离得到。

[0044] 本文中的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、嵌合抗体、人类化抗体、双特异性抗体、移植抗体、人类抗体和其片段，包括借助于任何方式改变以致在人体中具有较低免疫原性的抗体。因此，例如，本文中的单克隆抗体和片段等包括“嵌合”抗体和“人类化”抗体。一般说来，嵌合抗体包括的一部分重链和 / 或轻链与来源于特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列一致或同源，而剩余链与来源于另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体中的相应序列一致或同源，只要其展现出所需的生物活性即可（美国专利第 4,816,567 号）；莫里森 (Morrison) 等人，美国国家科学院院刊，81 :6851-6855(1984)。例如，在一些实施例中，嵌合抗体含有来源于小鼠的可变区和来源于人类的恒定区，其中所述恒定区含有与人类 IgG2 和人类 IgG4 同源的序列。

[0045] 非人类（例如鼠类）抗体的“人类化形式”或片段是含有来源于非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或抗体的其它抗原结合子序列）。人类化抗体包括移植抗体或 CDR 移植抗体，其中来源于非人类动物抗体的一个或多个互补决定区 (CDR) 中的部分或全部氨基酸序列被移植到人类抗体的适宜位置，同时仍保持原始非人类抗体的所需结合特异性和 / 或亲和力。在一些实施例中，相应的非人类残基置换人类免疫球蛋白的 Fv 框架残基。在一些实施例中，人类化抗体包含在受体抗体和输入的 CDR 或框架序列中都没有发现的残基。这些修饰将进一步改进和优化抗体性能。在一些实施例中，人类化抗体包含至少一个且通常两个可变结构域的实质上全部序列，其中所有或实质上所有 CDR 区都对应于非人类免疫球蛋白的 CDR 区，并且所有或实质上所有框架区是具有人类免疫球蛋白共同序列的 FR 区。更多细节，请参见例如：琼斯 (Jones) 等人，自然 (Nature) 321 :522-525(1986)；瑞奇曼 (Riechmann) 等人，自然，332 :323-329(1988)；和普雷斯塔 (Presta)，结构生物学新观点 (Curr. Op. Struct. Biol.) 2 :593-596(1992)。

[0046] 本文使用的术语“亲和力 (affinity)”是指两种试剂可逆结合的平衡常数，并

且以 Kd 表示。结合蛋白对配体的亲和力,例如抗体对抗原决定基的亲和力,可例如为约 100nM(纳摩尔浓度)到约 0.1nM、约 100nM 到约 1pM(皮摩尔浓度),或约 100nM 到约 1fM(飞摩尔浓度(femtomolar))。本文使用的术语“亲合力(avidity)”是指稀释后两种或两种以上试剂的复合物的耐解离能力。

[0047] 当提到抗体或其它结合分子与蛋白质或多肽或抗原决定基相互作用时,短语“特异性结合”通常是指抗体或其它结合分子识别并以高亲和力可检测地特异性结合于相关目标。优选在指定条件或生理条件下,特定抗体或结合分子结合于特定多肽或蛋白质或抗原决定基,但不以显著或不合需要的量结合于样品中存在的其它分子。换句话说,特定抗体或结合分子不会不合需要地与非目标抗原和/或抗原决定基交叉反应。可以使用多种免疫分析型式来选择与特定多肽发生免疫反应并具有所需特异性的抗体或其它结合分子。例如,固相 ELISA 免疫分析、BIAcore(表面等离子共振)、流式细胞术和放射免疫分析都可用于选择具有所需免疫反应性和特异性的单克隆抗体。有关适用于测定或评估免疫反应性和特异性的免疫分析型式的描述,参见哈罗瓦(Harlow),1988,抗体,实验室手册(ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL),冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Publications),纽约(New York)(下文中称为“哈罗瓦”)。

[0048] “选择性结合”、“选择性”等词是指与一个分子相比较,抗体优先与另一分子相互作用。抗体、特别是调节剂与蛋白质之间的相互作用优选具有特异性和选择性。应注意,在一些实施例中,抗体是设计成“特异性结合”和“选择性结合”两种不同但类似的目标,而不结合其它不合需要的目标。

[0049] “抗原决定基”或“结合位点”是抗体或其抗原结合片段“优先结合”或“特异性结合”的一个或多个氨基酸序列。抗原决定基可以是线性肽序列(即“连续的”),或者可以由非邻接的氨基酸序列构成(即,“构象的”或“不连续的”)。可以通过所属领域中众所周知的肽图分析(peptide mapping)和序列分析技术确定本文所述的抗体或其抗原结合片段所识别的抗原决定基。

[0050] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,用于指氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物,以及一个或多个氨基酸残基为非天然存在的氨基酸(例如氨基酸类似物)的氨基酸聚合物。所述术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质(即抗原),其中氨基酸残基是通过共价肽键连接的。

[0051] 术语“经分离的”和“经纯化的”是指物质是在天然环境中实质上或基本上移出或浓缩得到的。例如,经分离核酸是与样品中至少一些通常侧接于其的核酸或者其它核酸或组分(蛋白质、脂质等)分离者。在另一实例中,如果多肽是在其天然环境中实质上移出或浓缩得到的,那么多肽经过纯化。纯化和分离核酸和蛋白质的方法是已证明的方法。例如,可以通过饱和硫酸铵沉淀法、优球蛋白沉淀法(euglobulin precipitation method)、己酸法、辛酸法、离子交换色谱法(DEAE 或 DE52),或使用抗 Ig 色谱柱或者蛋白质 A、G 或 L 色谱柱的亲色色谱法,从上文所述的培养物上清液或腹水中分离和纯化出抗体。“实质上”的实施例包括至少 20%、至少 40%、至少 50%、至少 75%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99%。

[0052] 本文使用的术语“治疗”和其它语法等效形式包括缓解、抑制或减轻症状;减轻或抑制疾病或病状的严重程度;降低疾病或病状的发生率;预防性治疗疾病或病状;减少或

抑制疾病或病状的复发；预防、延缓疾病或病状发作；延缓疾病或病状的复发；缓和或改善疾病或病状症状；改善症状的潜在代谢成因；抑制疾病或病状，例如停滞疾病或病状的发展、减轻疾病或病状、使疾病或病状消退、减轻由疾病或病状引起的病状，或停止疾病或病状的症状。所述术语还包括获得治疗益处。治疗益处是指所治疗的潜在病症的根除或改善，和 / 或由潜在病症引起的一种或多种生理学症状的根除或改善，由此观察到个体情况的改良。

[0053] 本文使用的术语“预防”和其它语法等效形式包括预防其它症状，预防症状的潜在代谢成因，抑制疾病或病状，例如停滞疾病或病状的发展，并且打算包括防治。所述术语还包括获得防治益处。对于防治益处，任选将组合物投予有发展特定疾病的风险的个体、报导有一种疾病的一种或多种生理学症状的个体或有疾病复发风险的个体。

[0054] 本文使用的术语“有效量”或“治疗有效量”是指所投予的至少一种药剂足以达成预定结果的量，例如在某种程度上减轻所治疗的疾病或病状的一种或多种症状，在某些情况下，所述结果是减轻和 / 或缓解疾病的病征、症状或成因，或者生物系统的任何其它所需的变化。在特定情况下，所述结果是减少至少一种异常增殖细胞（例如癌症干细胞）的生长、杀死所述细胞或诱使所述细胞凋亡。在某些情况下，适于治疗应用的“有效量”是在临床上明显减轻疾病所需的包含本文所述药剂的组合物的量。可使用例如剂量递增研究等任何适合的技术测定适宜任何个别情况的“有效”量。

[0055] 本文使用的术语“投予”、“投药”等是指使药剂或组合物能够递送到所需生物作用位点而使用的方法。这些方法包括（但不限于）口服途径、十二指肠内途径、非经肠注射（包括静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内、血管内或输注）、局部和直肠投药。任选用于投予本文所述药剂和方法的技术包括例如古德曼 (Goodman) 和奥尔曼 (Oilman), 治疗学的药理基础 (The Pharmacological Basis of Therapeutics), 现行版；贝加蒙 (Pergamon)；和雷明登氏制药科学 (Remington's, Pharmaceutical Sciences) (现行版), 默克出版公司 (Mack Publishing Co.), 宾夕法尼亚州伊斯顿 (Easton, Pa) 中所论述的技术。在某些实施例中，本文所述的药剂和组合物是经口投予的。

[0056] 本文使用的术语“医药学上可接受的”是指物质不会消除本文所述药剂的生物活性或特性，而且相对无毒（即，所述物质的毒性明显不能超过所述物质的益处）。在一些情况下，将医药学上可接受的物质投予个体，不会引起显著不合需要的生物作用，或不会以有害方式与含有所述物质的组合物的任何组分显著相互作用。

[0057] 巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)

[0058] 在一些实施例中，本文公开的方法和 / 或组合物抑制（部分或完全）MIF 的活性。在某些情况下，MIF 是促炎性细胞因子。在某些情况下，MIF 是由活化的免疫细胞（例如淋巴细胞 (T 细胞)）回应于感染、炎症或组织损伤所分泌。在某些情况下，MIF 是在下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴受到刺激后由垂体腺前叶所分泌。在某些情况下，MIF 与胰岛素一起由胰腺  $\beta$  细胞分泌，并充当自分泌因子刺激胰岛素的释放。在某些情况下，MIF 是受体 CXCR2、CXCR4 和 CD74 的配体。在一些实施例中，本文公开的方法和 / 或组合物抑制（部分或完全）CXCR2、CXCR4 和 / 或 CD74 的活性。

[0059] 在某些情况下，MIF 诱导邻近白细胞（例如淋巴细胞、粒细胞、单核细胞 / 巨噬细胞以及 TH-17 细胞）沿 MIF 梯度的趋化性。在一些实施例中，本文公开的方法和 / 或组合

物阻止沿 MIF 梯度的趋化性,或降低沿 MIF 梯度的趋化性。在某些情况下,MIF 诱导白细胞(例如淋巴细胞、粒细胞、单核细胞/巨噬细胞以及 TH-17 细胞)向感染、炎症或组织损伤部位的趋化性。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物阻止或降低白细胞向感染、炎症或组织损伤部位的趋化性。在某些情况下,白细胞(例如淋巴细胞、粒细胞、单核细胞/巨噬细胞以及 TH-17 细胞)沿 MIF 梯度的趋化性将在感染、炎症或组织损伤部位引起炎症。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物可治疗感染、炎症或组织损伤部位的炎症。在某些情况下,单核细胞沿 RANTES 梯度的趋化性将在损伤或炎症部位引起单核细胞阻滞(即,单核细胞沉积于上皮上)。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物阻止或减少损伤或炎症部位处的单核细胞阻滞。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物可抑制治疗淋巴细胞介导的病症。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物可治疗粒细胞介导的病症。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物可治疗巨噬细胞介导的病症。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物可治疗 Th-17 介导的病症。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物可治疗胰腺  $\beta$  细胞介导的病症。

[0060] 在某些情况下,MIF 可由糖皮质激素诱导,这是一种会加速与许多需要糖皮质激素疗法的疾病相关的动脉粥样硬化的机制。因此,在一些实施例中,本文公开的组合物和方法可抑制糖皮质激素对 MIF 表达的诱导。

[0061] 在某些情况下,人类 MIF 多肽是由位于 22 号染色体上细胞发生带型 22q 11.23 的核苷酸序列编码的。在某些情况下,MIF 蛋白是一种 12.3kDa 蛋白质。在某些情况下,MIF 蛋白是包含三个具有 115 个氨基酸的多肽的同源三聚体。在某些情况下,MIF 蛋白包含模拟细胞因子中所见的 ELR 基元的假 ELR 基元。在某些情况下,所述假 ELR 基元包含两个不相邻但适当间隔开的残基(Arg12 和 Asp45,参见图 11)。在一些实施例中,假 ELR 基元包含氨基酸 12 到氨基酸 45 的氨基酸序列(所述编号包括第一位的甲硫氨酸残基)。这相当于氨基酸 11 到氨基酸 44 的假 ELR 基元,其中第一位的甲硫氨酸残基未计算在内(在所述情况下,假 ELR 基元包含 Arg 11 和 Asp44)。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物通过抑制假 ELR 基元与 CXCR2 和/或 CXCR4 的结合来治疗 MIF 介导的病症。

[0062] 在某些情况下,MIF 蛋白包含 10 个到 20 个残基的 N 端环基元(N 环)。在某些情况下,MIF N 环介导与 CXCR2 和/或 CXCR4 受体的结合。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含 MIF 的连续残基(47-56)(即 L47 M48 A49 F50 G51 G52 S53 S54 E55 P56;参见图 11)。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 45-60。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 44-61。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 43-62。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 42-63。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 41-64。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 40-65。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 46-59。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 47-59。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 48-59。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 50-59。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 47-58。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 47-57。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 47-56。在某些情况下,MIF 的 N 环基元包含氨基酸 48-58。在一些实施例中,N 环基元包含氨基酸 48-57。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物通过抑制 N 环基元与 CXCR2 和/或 CXCR4 的结合来治疗 MIF 介导的病症。

[0063] 在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物通过抑制(1)N 环基元与 CXCR2 和

/ 或 CXCR4 的结合 ; 和 / 或 (2) 假 ELR 基元与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合, 来治疗 MIF 介导的病症。

[0064] 在某些情况下, CD74 活化 G 蛋白偶联受体 (GPCR)、活化 CXCR2, 和 / 或与这些分子缔合, 以形成信号传导复合物。因此, 在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物通过用 CD74 抑制 GPCR 或 CXCR2 的活化, 来治疗 MIF 介导的病症。

[0065] 在某些情况下, MIF 是在动脉损伤后由内皮细胞、SMC、单核细胞和 / 或巨噬细胞表达的。在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物可抑制内皮细胞、SMC、单核细胞和 / 或巨噬细胞在动脉损伤后表达 MIF。在某些情况下, MIF 是在暴露于氧化低密度脂蛋白 (oxLDL)、CD40 配体、血管紧张素 II 或其组合后由内皮细胞、SMC、单核细胞、巨噬细胞表达的。在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物可抑制内皮细胞、SMC、单核细胞和 / 或巨噬细胞在暴露于氧化低密度脂蛋白、CD40 配体、血管紧张素 II 或其组合后表达 MIF。

[0066] 在某些情况下, MIF 诱导内皮细胞中 CCL2、TNF 和 / 或 ICAM-1 的表达。在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物可抑制内皮细胞中 MIF 诱导的 CCL2、TNF 和 / 或 ICAM-1 的表达。

[0067] 在某些情况下, MIF 诱导 SMC 中 MMP 和组织蛋白酶的表达。在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物可抑制 SMC 中 MIF 诱导的 MMP 和组织蛋白酶的表达。

[0068] 在某些情况下, MIF 通过 CXCR2 或 CXCR4 触发钙内流、诱导整合素的迅速活化、诱导 MAPK 活化, 并介导单核细胞和 T 细胞的  $G\alpha i$ - 和整合素依赖性阻滞和趋化性 (图 2 和 3)。因此, 在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物可抑制单核细胞和 / 或 T 细胞中的钙内流、抑制 MAPK 活化、抑制整合素活化、抑制单核细胞和 T 细胞的  $G\alpha i$ - 和整合素依赖性阻滞, 或其组合。

[0069] 在一些实施例中, 本文所述的方法包含抗 CXCR2 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 MIF 抗体或其组合。在一些实施例中, 本文公开的抗体通过结合于 MIF 的假 ELR 基元, 来抑制 MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合。在一些实施例中, 本文公开的抗体通过结合于 MIF 的 N 环基元, 来抑制 MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合。在一些实施例中, 本文公开的抗体通过同时结合于 MIF 的 N 环基元和假 ELR 基元, 来抑制 MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合。在一些实施例中, 本文公开的抗体是抗 MIF 抗体。

[0070] 在某些情况下, MIF 诱导的单核细胞募集涉及 MIF 结合蛋白 CD74。在某些情况下, MIF 结合蛋白 CD74 可诱导钙内流、有丝分裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 活化或  $G\alpha i$  依赖性整合素活化 (图 7)。在一些实施例中, 本发明包含一种抑制有需要的个体体内 MIF 介导的 MAPK 激酶活化的方法。在一些实施例中, 本发明包含一种抑制有需要的个体体内 MIF 介导的  $G\alpha i$  依赖性整合素活化的方法。

[0071] 在某些情况下, MIF 经由 CD74 诱导的信号传导涉及 CD44 和 Src 激酶。在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物抑制 CD74 介导的 Src 激酶活化。

[0072] 在某些情况下, 借助内吞作用吸收的 MIF 与 JAB-1 直接相互作用。在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物抑制 MIF 的内吞。

[0073] 在某些情况下, 抑制蛋白 (arrestin) 促进 G 蛋白偶联受体募集至介导 MIF 内化的披网格蛋白小泡 (clathrin-coated vesicle)。因此, 在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物还包含抑制蛋白拮抗剂。抑制抑制蛋白与 GPCR 的结合的试剂的实例包含卡维地

洛 (carvedilol)、异丙去甲肾上腺素 (isoprenaline)、异丙肾上腺素 (isoproterenol)、福莫特罗 (formoterol)、西马特罗 (cimeterol)、克仑特罗 (clenbuterol)、L-肾上腺素、脊亲和蛋白 (spinophilin) 和沙美特罗 (salmeterol)。

[0074] 在某些情况下, MIF 的泛素化引起 (部分或完全) MIF 的迅速内化和后续降解。因此, 在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物还包含抑制 MIF 的泛素化。抑制泛素化的试剂的实例包括 (但不限于) PYR-41 和相关吡唑酮。

[0075] 在某些情况下, MIF 使用网格蛋白介导的内吞作用进入细胞。因此, 在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物还包含抑制网格蛋白介导的 MIF 内吞。

[0076] 在某些情况下, MIF 负面调控 MAPK 信号传导, 或通过经由 JAB-1 调控细胞氧化还原内平衡来调节细胞功能。在某些情况下, MIF 下调 p53 的表达。在某些情况下, MIF 下调 p53 的表达将引起巨噬细胞的凋亡受到抑制并延长其存活。因此, 在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物可抑制由 MIF 调节的巨噬细胞存活。

[0077] 在某些情况下, MIF 在易损斑块中诱导 MMP-1 和 MMP-9。在某些情况下, 易损斑块中 MMP-1 和 MMP-9 的诱导将引起 (部分或完全) 胶原蛋白降解、纤维帽弱化以及斑块去稳定。在一些实施例中, 本文公开的方法和 / 或组合物可抑制 (部分或完全) 胶原蛋白降解、纤维帽弱化和斑块去稳定。

[0078] MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导的抑制剂

[0079] 在某些实施例中, 本文公开抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导的方法。在一些实施例中, 通过用抗体占据 CXCR2 和 CXCR4 的 MIF 结合结构域 (即 GPCR 拮抗剂法), 来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中, 通过占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域 (即细胞因子抑制剂法), 来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中, 通过用抗体占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域, 并由此破坏 CXCR2 和 / 或 CXCR4 与 MIF 的结合, 来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中, 通过用抗体占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域, 并由此破坏 MIF 的三聚化, 来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在某些情况下, 占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域不会影响由其它激动剂 / 配体 (例如 IL-8/CXCL8、GRO $\beta$ /CXCL2 和 / 或基质细胞源性因子 1a(SDF-1a)/CXCL12) 介导的 CXCR2 和 CXCR4 信号传导。

[0080] 破坏 MIF 结构域的药剂

[0081] 在某些实施例中, 通过占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域 (例如 N 环和 / 或假 ELR 基元), 来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在某些实施例中, 通过用抗体占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域, 并由此破坏 CXCR2 和 / 或 CXCR4 与 MIF 的结合, 来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在某些实施例中, 抗体可抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的结合, 和 / 或 (ii) MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 的活化; 或 (iii) (i) 与 (ii) 的任何组合。在某些情况下, 占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域不会影响由其它激动剂 / 配体 (例如 IL-8/CXCL8、GRO $\beta$ /CXCL2 和 / 或基质细胞源性因子 1a(SDF-1a)/CXCL12) 介导的 CXCR2 和 CXCR4 信号传导。

[0082] 在某些情况下, N 端细胞外结构域以及第一和 / 或第二细胞外环是配体结合于 MIF 的介体。在某些实施例中, 抗体通过结合于 MIF 的假 ELR 基元, 来抑制 MIF 与 CXCR2 和 / 或

CXCR4 的结合。在一些实施例中,抗体通过结合于 MIF 的 N 环基元,来抑制 MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合。在一些实施例中,抗体调节关键残基,和 / 或引起 MIF 构象的改变,此举将阻止受体或底物相互作用。在一些实施例中,抗体干扰与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 结合和信号传导相关的基元。

#### [0083] 破坏 MIF 三聚化的药剂

[0084] 在某些实施例中,本文公开抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导的方法。在一些实施例中,通过占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域,来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中,通过用抗体占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域,并由此破坏 MIF 的三聚化,来抑制 MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 进行的信号传导。在一些实施例中,削弱 MIF 肽形成同源三聚体的能力将破坏(部分或完全)MIF 结合于受体(例如 CXCR2 或 CXCR4)的能力。在某些情况下,占据、遮蔽或以其它方式破坏 MIF 上的结构域不会影响由其它激动剂 / 配体(例如 IL-8/CXCL8、GRO  $\beta$  /CXCL2 和 / 或基质细胞源性因子 1a(SDF-1a)/CXCL12)介导的 CXCR2 和 CXCR4 信号传导。

[0085] 在某些情况下,MIF 包含三个 MIF 多肽序列(即三聚体)。在某些情况下,三聚体中各 MIF 多肽的假 ELR 基元形成环。在某些情况下,各 MIF 多肽的 N 环基元从假 ELR 环向外延伸(参见图 10)。在某些情况下,破坏三聚体将破坏 MIF 与其目标受体的高亲和力结合。在某些情况下,一个亚基的残基 38-44( $\beta$ -2 链)与另一亚基的残基 48-50( $\beta$ -3 链)相互作用。在某些情况下,一个亚基的残基 96-102( $\beta$ -5 链)与另一亚基的残基 107-109( $\beta$ -6 链)相互作用。在某些情况下,一个亚基上由 N73 R74 S77 K78 C81 形成的结构域与另一亚基的 N111 S112 T113 相互作用。

[0086] 在一些实施例中,抗 MIF 抗体是来源于和 / 或特异性结合于 MIF 氨基酸残基 38-44( $\beta$ -2 链)中的任何残基或全部。在一些实施例中,抗 MIF 抗体是来源于和 / 或特异性结合于 MIF 氨基酸残基 48-50( $\beta$ -3 链)中的任何残基或全部。在一些实施例中,抗 MIF 抗体是来源于和 / 或特异性结合于 MIF 氨基酸残基 96-102( $\beta$ -5 链)中的任何残基或全部。在一些实施例中,抗 MIF 抗体是来源于和 / 或特异性结合于 MIF 氨基酸残基 107-109( $\beta$ -6 链)中的任何残基或全部。在一些实施例中,抗 MIF 抗体是来源于和 / 或特异性结合于 MIF 氨基酸残基 N73、R74、S77、K78 和 C81 中的任何残基或全部。在一些实施例中,抗 MIF 抗体是来源于和 / 或特异性结合于 MIF 氨基酸残基 N111、S112 和 T113 中的任何残基或全部。

#### [0087] 抗体

[0088] 在某些实施例中,本文公开一种治疗有需要的个体的 MIF 介导的病症的方法。在一些实施例中,所述方法包含授予治疗有效量的抗 CXCR2 抗体;抗 CXCR4 抗体;抗 MIF 抗体;或其组合。在一些实施例中,本文所述的方法包含抗 CXCR2 抗体。在一些实施例中,本文所述的方法包含抗 CXCR4 抗体。在一些实施例中,本文所述的方法包含抗 MIF 抗体。

[0089] 在一些实施例中,抗体是特异性结合于 MIF 中假 ELR 基元的全部或一部分的抗体。在一些实施例中,MIF 的假 ELR 基元中与抗体结合的部分是暴露或在 MIF 三聚体外侧的假 ELR 基元的一部分。在一些实施例中,抗体特异性结合于以下肽序列的全部或一部分:PRAS VPDGFLSELTLQQLAQATGKPPQYI AVHVVPDQ 以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域。在一些实施例中,抗体特异性结合于氨基酸 11 到氨基酸 44 的氨基酸序列(参见 Seq ID No. 1)以及 MIF 单体或 MIF 三聚体中至少一者的相应特征 / 结构域的全部或一部

分。

[0090] 在一些实施例中,抗体是特异性结合于MIF中N环基元的全部或一部分的抗体。在一些实施例中,MIF的N环基元中与抗体结合的部分是暴露或在MIF三聚体外侧的N环基元的一部分。在一些实施例中,抗体特异性结合于以下肽序列的全部或一部分:DQLMAFGGSSEPCALCSL以及MIF单体或MIF三聚体中至少一者的相应特征/结构域。在一些实施例中,抗体特异性结合于氨基酸40到氨基酸65的氨基酸序列(参见Seq ID No. 1)以及MIF单体或MIF三聚体中至少一者的相应特征/结构域的全部或一部分。

[0091] 在一些实施例中,抗体是特异性结合于MIF中假ELR基元的全部或一部分以及MIF中N环基元的全部或一部分的抗体。在一些实施例中,MIF的N环和假ELR基元中与抗体结合的部分是暴露或在MIF三聚体外侧的部分。在一些实施例中,抗体特异性结合于以下肽序列的全部或一部分:PRASVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCALCSL以及MIF单体或MIF三聚体中至少一者的相应特征/结构域。在一些实施例中,抗体特异性结合于氨基酸11到氨基酸65的氨基酸序列(参见Seq ID No. 1)以及MIF单体或MIF三聚体中至少一者的相应特征/结构域的全部或一部分。

[0092] 在一些实施例中,抗体特异性结合于MIF的CXCR2结合结构域。

[0093] 在一些实施例中,抗体特异性结合于MIF的CXCR4结合结构域。

[0094] 在一些实施例中,抗体抑制MIF三聚体的形成。

[0095] 在一些实施例中,抗体是抗CD74抗体。在一些实施例中,抗体抑制MIF与CD74的结合。在一些实施例中,抗CD74抗体是或来源于M-B741(华瑞康公司(Pharmingen))。

[0096] 在一些实施例中,抗体是抗Jab-1抗体。在一些实施例中,抗体抑制MIF与JAB-1的结合。在一些实施例中,抗体特异性结合于氨基酸50到氨基酸65的氨基酸序列(参见Seq ID No. 1)以及MIF单体或MIF三聚体中至少一者的相应特征/结构域的全部或一部分。在一些实施例中,抗体特异性结合于以下肽序列的全部或一部分:FGGSSEPCALCSLHSI以及MIF单体或MIF三聚体中至少一者的相应特征/结构域。

[0097] 在一些实施例中,抗体是抗CXCR2抗体。在一些实施例中,抗体拮抗剂是单克隆抗体。在一些实施例中,抗体拮抗剂是多克隆抗体。在一些实施例中,抗体拮抗剂选自CXCR2抗体,克隆48311.211;CXCR2抗体,克隆5E8/CXCR2;CXCR2抗体,克隆19;或其衍生物。

[0098] 在一些实施例中,抗体是选自以下的抗CXCR4抗体:CXCR4抗体,克隆701;CXCR4抗体,克隆708;CXCR4抗体,克隆716;CXCR4抗体,克隆717;CXCR4抗体,克隆718;CXCR4抗体,克隆12G5;CXCR4抗体,克隆4G10;或其组合。

[0099] 在一些实施例中,抗体是选自以下的抗MIF抗体:MIF抗体,克隆IID.9;MIF抗体,克隆IIID.9;MIF抗体,克隆XIF7;MIF抗体,克隆I31;MIF抗体,克隆IV2.2;MIF抗体,克隆XI7;MIF抗体,克隆XIII15.6;MIF抗体,克隆XIV15.4;或其组合。

[0100] 单克隆抗体的产生

[0101] 在一些实施例中,针对本文公开的肽的单克隆抗体(mAb)是使用杂交瘤产生的。在某些情况下,杂交瘤是一种永生化的抗体产生细胞。在一些实施例中,用抗原接种实验室动物(例如小鼠或家兔)。在一些实施例中,从实验室动物的脾中提取出B细胞。在一些实施例中,通过将(1)提取的B细胞与(2)骨髓瘤细胞(即,次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶阴性、永生化的骨髓瘤细胞)融合,产生杂交瘤。在一些实施例中,将B细胞与骨髓瘤细

胞一起培养,并暴露于使其细胞膜渗透性更强的试剂(例如 PEG)。

[0102] 在一些实施例中,培养物包含多个杂交瘤、多个骨髓瘤细胞和多个 B 细胞。在一些实施例中,使细胞经历选择杂交瘤的培养条件(例如用 HAT 培养基培养)。

[0103] 在一些实施例中,分离出个别杂交瘤(即克隆)并加以培养。在一些实施例中,将杂交瘤注射至实验室动物(例如家兔或大鼠)体内。在一些实施例中,在细胞培养物中培养杂交瘤。

[0104] 在一些实施例中,本文所述的方法包含人类化单克隆抗体。在一些实施例中,人类化单克隆抗体包含来自人类来源的重链和轻链恒定区以及来自鼠类来源的可变区。

[0105] 在一些实施例中,利用基因工程技术构建人类化免疫球蛋白,包括人类化抗体。在一些实施例中,人类化免疫球蛋白包含与特定人类免疫球蛋白链(即受体或接受者)的框架一致的框架,以及三个来自非人类(供体)免疫球蛋白链的 CDR。在一些实施例中,人类化免疫球蛋白链的框架中的少数氨基酸经鉴别并选择与供体而非受体中这些位置的氨基酸相同者。

[0106] 在一些实施例中,所用框架是来自与待人类化的供体免疫球蛋白同源的特定人类免疫球蛋白。例如,小鼠重链(或轻链)可变区的序列与数据库(例如美国国家生物医学研究基因会的蛋白质序列鉴定数据库(National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource),或美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information-NCBI)的蛋白质序列数据库)中的人类重链(或轻链)可变区的比较显示,与不同人类区的同源性程度可变化极大,例如约 40%到约 60%、约 70%、约 80%或更高。通过选择与供体免疫球蛋白的重链可变区最具同源性的人类重链可变区中的一者作为受体免疫球蛋白,将会使供体免疫球蛋白中的少数氨基酸变为人类化免疫球蛋白。通过选择与供体免疫球蛋白的轻链可变区最具同源性的人类轻链可变区中的一者作为受体免疫球蛋白,将会使供体免疫球蛋白中的少数氨基酸变为人类化免疫球蛋白。

[0107] 在一些实施例中,人类化免疫球蛋白包含来自同一人类抗体的轻链和重链作为受体序列。在一些实施例中,人类化免疫球蛋白包含来自不同人类抗体生殖系序列的轻链和重链作为受体序列;当使用此类组合时,可使用常规分析(例如 ELISA)来容易地确定 VH 和 VL 是否结合于相关抗原决定基。在一些实施例中,所选人类抗体中轻链和重链可变区序列一起整体与供体轻链和重链可变区序列最具同源性。在一些实施例中,通过选择人类化免疫球蛋白链的框架中与供体而非受体中某些位置的氨基酸相同的少量氨基酸,来获得较高亲和力。

[0108] 本文中涵盖任何修饰框架区的适合方法。在一些实施例中,欲改变的相关框架氨基酸是根据供体与受体分子之间氨基酸框架残基的差异来选择。在一些实施例中,欲改变的氨基酸位置是已知对 CDR 构象重要或有助于 CDR 构象的残基(例如典型框架残基对于 CDR 构象和/或结构重要)。在一些实施例中,欲改变的相关框架氨基酸是根据特定框架位置处氨基酸残基的频率来选择(例如,将所选框架与其子家族内的其它框架序列相比较,可揭示一个或多个特定位置处出现频率最少的残基)。在一些实施例中,欲改变的相关框架氨基酸是根据与 CDR 的接近性来选择。在一些实施例中,欲改变的相关框架氨基酸是根据已知或预测的与抗原-CDR 界面的接近性或者所预测的对于 CDR 活性的调节来选择。在一些实施例中,欲改变的相关框架氨基酸是已知或预测会在重链(VH)和轻链(VL)可变区界

面之间形成接触的框架残基。在一些实施例中,欲改变的相关框架氨基酸是溶剂不可及的框架残基。

[0109] 在一些实施例中,将一些或所有所选位置的氨基酸改变并入受体可变区框架和供体 CDR 的编码核酸中。在一些实施例中,变异的框架或 CDR 序列个别地制造和测试,或者连续或同时进行组合和测试。

[0110] 在一些实施例中,任何或所有变异位置的可变性是来自几个或多个不同的氨基酸残基,包括全部 20 种天然存在的氨基酸或其功能等效物和类似物。在一些实施例中,考虑非天然存在的氨基酸。

[0111] 在一些实施例中,将人类化抗体序列克隆到载体中。在一些实施例中,使用任何适合的载体。在一些实施例中,所述载体为质粒,病毒,例如噬菌体或噬菌粒(适当时)。更多细节,请参见例如分子克隆:实验室指南(Molecular Cloning:a Laboratory Manual):第 2 版,萨布鲁克(Sambrook)等人,1989,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)。用于操作核酸,例如核酸构筑体制备、诱变、测序、将 DNA 引入细胞中以及基因表达和蛋白质分析的许多已知技术和方案详细描述于精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology),第 2 版,奥苏贝尔(Ausubel)等人编,约翰威立出版公司(John Wiley & Sons),1992 中。萨布鲁克等人和奥苏贝尔等人的公开内容的相关公开内容都以引用的方式并入本文中。

[0112] 在一些实施例中,用表达人类化抗体序列的载体转化任何适合的宿主细胞。在一些实施例中,宿主细胞是细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。在原核细胞(例如大肠杆菌(E. coli))中表达抗体和抗体片段的技术在所属领域中沿用已久。相关评述,请参见例如 A. 普卢克顿(Plückthun, A.),生物技术(Bio/Technology)9:545-551(1991)。所属领域的技术人员也可使用通过培养在真核细胞中表达,作为产生本文所述的抗体和抗原结合片段的的选择,近期评述,请参见例如 M. E. 雷夫(Raff, M. E.)(1993)生物技术近期述评(Curr. Opinion Biotech.)4:573-576;J. J. 斯瑞尔(Trill J. J.)等人(1995)生物技术近期述评,6:553-560,所述文献的相关公开内容各以引用的方式并入本文中。

[0113] 在一些实施例中,使用哺乳动物表达系统。在一些实施例中,哺乳动物表达系统是二氢叶酸还原酶缺陷型("dhfr-")中国仓鼠卵巢细胞。在一些实施例中,用含有功能性 DHFR 基因以及编码所需人类化抗体的基因的表达载体转染 dhfr-CHO 细胞。

[0114] 在一些实施例中,借助于任何适合的方法转化 DNA。对于真核细胞,适合的技术包括例如磷酸钙转染、DEAE 葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染,以及使用反转录病毒或其它病毒(例如牛痘,或对于昆虫细胞,杆状病毒)进行转导。对于细菌细胞,适合的技术包括例如氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体进行转染。

[0115] 在一些实施例中,以合成方法而非克隆法制备编码抗体或其抗原结合片段的 DNA 序列。在一些实施例中,DNA 序列经设计具有抗体或抗原结合片段氨基酸序列的适合密码子。总的说来,如果打算将序列用于表达,那么可以选择适于预定宿主的优选密码子。在一些实施例中,由借助于标准方法制备的重叠寡聚核苷酸组装完整序列,并将其组装成完整的编码序列。参见例如埃吉(Edge),自然(Nature),292:756(1981);纳姆贝尔(Nambair)等人,科学(Science),223:1299(1984);杰伊(Jay)等人,生物化学杂志(J. Biol. Chem.),259:6311(1984),所述文献的相关公开内容各以引用的方式并入本文中。

**[0116] 细胞株**

[0117] 在某些实施例中,本文公开一种表达重组人类 CXCR4 加上人类 CD74 的细胞株。在某些实施例中,所述表达重组人类 CXCR4 加上人类 CD74 的细胞株是人类细胞株(例如 HEK293)。在某些实施例中,所述表达重组人类 CXCR4 加上人类 CD74 的细胞株是非人类细胞株(例如 CHO)。

**[0118] 炎症**

[0119] 在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗 MIF 介导的病症。在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗炎症(例如急性或慢性炎症)。在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗(部分或完全)由感染引起的炎症。在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗(部分或完全)由组织损伤(例如由烧伤、冻伤、暴露于细胞毒性剂或外伤引起的组织损伤)引起的炎症。在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗(部分或完全)由自体免疫病症引起的炎症。在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗(部分或完全)由存在外来物体(例如碎片)引起的炎症。在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗(部分或完全)由暴露于毒素和/或化学刺激物引起的炎症。

[0120] 本文使用的“急性炎症”是指具有以下特征的炎症:其在数分钟或数小时时间内发展,并且在去除了刺激物后就会停止(例如,已经通过免疫反应或通过授予治疗剂杀死感染物;已经通过免疫反应或提取去除了外来物质,或受损组织已经治愈)。急性炎症的持续时间较短是由大部分发炎性介体的半衰期较短所引起的。

[0121] 在某些情况下,急性炎症始于白细胞(例如树突状细胞、内皮细胞和肥大细胞)活化。在某些情况下,白细胞释放出发炎性介体(例如组胺、蛋白聚糖、丝氨酸蛋白酶、类二十烷酸和细胞因子)。在某些情况下,发炎性介体会引起(部分或完全)与炎症相关的症状。例如,在某些情况下,发炎性介体使毛细血管后微静脉扩张,并增加血管渗透性。在某些情况下,血管舒张后血流增加将引起(部分或完全)潮红和灼热。在某些情况下,血管渗透性增加将使血浆渗出到组织中,引起水肿。在某些情况下,后者使白细胞沿趋化梯度迁移到发炎性刺激物的部位。此外,在某些情况下,出现血管(例如毛细血管和小静脉)结构的改变。在某些情况下,所述结构改变是(部分或完全)由单核细胞和/或巨噬细胞所诱导的。在某些情况下,所述结构改变包括(但不限于)血管重塑和血管生成。在某些情况下,血管生成通过使白细胞转运增加,来帮助维持慢性炎症。另外,在某些情况下,组胺和缓激肽(bradykinin)刺激神经末梢,引起瘙痒和/或疼痛。

[0122] 在某些情况下,慢性炎症是由存在持久性刺激物(例如持久性急性炎症、细菌感染(例如结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)引起的感染)、长时间暴露于化学试剂(例如二氧化硅或烟草烟雾)和自体免疫反应(例如类风湿性关节炎))引起的。在某些情况下,持久性刺激物引起持续性炎症(例如,由单核细胞的连续募集以及巨噬细胞增殖所引起)。在某些情况下,持续性炎症还会损伤组织,这将导致单核细胞的再募集,由此维持炎症并使炎症加重。在某些情况下,对炎症的生理反应还包括血管生成和纤维化。

[0123] 在某些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗与炎症相关的病症(即,发炎性病症)。发炎性病症包括(但不限于)动脉粥样硬化;腹部主动脉瘤;急性播散性脑脊髓炎;烟雾病;高安氏病;急性冠状动脉综合症;心脏同种异体移植血管病变;肺炎;

急性呼吸窘迫综合症;肺纤维化;爱迪森氏病;强直性脊柱炎;抗磷脂抗体综合症;自体免疫性溶血性贫血;自体免疫性肝炎;自体免疫性内耳病;大疱性类天疱疮;查格斯病;慢性阻塞性肺病;腹腔疾病;皮炎;1型糖尿病;2型糖尿病;子宫内膜异位症;古巴士德氏综合症;格雷夫斯氏病;格林-巴利综合症;桥本氏病;特发性血小板减少性紫癜;间质性膀胱炎;全身性红斑狼疮(SLE);代谢综合症;多发性硬化症;重症肌无力;心肌炎;发作性睡病;肥胖症;寻常性天疱疮;恶性贫血;多发性肌炎;原发性胆汁性肝硬化;类风湿性关节炎;精神分裂症;硬皮病;修格连氏综合症;血管炎;白癜风;韦格纳肉芽肿;过敏性鼻炎;前列腺癌;非小细胞肺癌;卵巢癌;乳癌;黑色素瘤;胃癌;结肠直肠癌;脑癌;转移性骨病;胰腺癌;淋巴瘤;鼻息肉;胃肠癌;溃疡性结肠炎;克隆恩氏病;胶原性结肠炎;淋巴细胞性结肠炎;缺血性结肠炎;改道性结肠炎;贝塞特氏综合症;感染性结肠炎;未定型结肠炎;炎性肝病;内毒素休克;脓毒症休克;类风湿性脊柱炎;强直性脊柱炎;痛风性关节炎;风湿性多肌痛;阿尔茨海默氏症;帕金森氏症;癫痫;艾滋病痴呆;哮喘;成人呼吸窘迫综合症;支气管炎;囊性纤维化;急性白细胞介导性肺损伤;远端直肠炎;韦格纳肉芽肿;纤维肌痛;支气管炎;囊性纤维化;葡萄膜炎;结膜炎;牛皮癣;湿疹;皮炎;平滑肌增殖病症;脑膜炎;带状疱疹;脑炎;肾炎;结核病;视网膜炎;异位性皮炎;胰腺炎;齿龈炎;凝固性坏死;液化性坏死;纤维蛋白样坏死;血管内膜增生;心肌梗塞;中风;器官移植排斥;或其组合。

#### [0124] 动脉粥样硬化

[0125] 在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗动脉粥样硬化。本文使用的“动脉粥样硬化”是指动脉壁的炎症,并且包括动脉粥样硬化形成的所有阶段(例如脂质沉积、内膜-中膜变厚和内膜下单核细胞浸润)以及所有动脉粥样硬化病变(例如I型病变到VIII型病变)。在某些情况下,动脉粥样硬化是(部分或完全)由巨噬细胞聚集所引起。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止巨噬细胞聚集、减少聚集的巨噬细胞的数量,和/或降低巨噬细胞聚集的速率。在某些情况下,动脉粥样硬化是(部分或完全)由氧化型LDL的存在所引起。在某些情况下,氧化型LDL会损伤动脉壁。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止氧化型LDL诱导的动脉壁损伤、减小由氧化型LDL损伤的动脉壁部分、降低动脉壁损伤的严重程度,和/或降低氧化型LDL损伤动脉壁的速率。在某些情况下,单核细胞可对受损的动脉壁作出反应(即循趋化梯度到达受损的动脉壁)。在某些情况下,单核细胞可分化成巨噬细胞。在某些情况下,巨噬细胞可内吞氧化型LDL(具有内吞LDL的细胞(例如巨噬细胞)称为“泡沫细胞”)。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止泡沫细胞的形成、减少泡沫细胞的数量,和/或降低泡沫细胞的形成速率。在某些情况下,泡沫细胞死亡,并随后破裂。在某些情况下,泡沫细胞的破裂使氧化型胆固醇沉积到动脉壁中。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止所沉积氧化型胆固醇沉积到动脉壁上、减少沉积到动脉壁上的氧化型胆固醇的量,和/或降低氧化型胆固醇沉积到动脉壁上的速率。在某些情况下,动脉壁会因氧化型LDL所引起的损伤而发炎。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止动脉壁发炎、减小发炎的动脉壁部分,和/或降低炎症的严重程度。在某些情况下,动脉壁炎症引起(部分或完全)基质金属蛋白酶(MMP)-2、CD40配体和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 的表达。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止基质金属蛋白酶(MMP)-2、CD40配体和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 的表达,或

减少所表达的基质金属蛋白酶 (MMP)-2、CD40 配体和肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  的量。在某些情况下,细胞在发炎区域上形成硬覆盖层。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止形成硬覆盖层、减小受硬覆盖层影响的动脉壁部分,和 / 或降低形成硬覆盖层的速率。在某些情况下,细胞覆盖层使动脉变窄。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可防止动脉变窄、减小变窄的动脉部分、降低变窄的严重程度,和 / 或降低动脉变窄的速率。

[0126] 在某些情况下,动脉粥样硬化斑块引起 (部分或完全) 狭窄 (即,血管变窄)。在某些情况下,狭窄会引起 (部分或完全) 血流减少。在一些实施例中,本文所述的方法和 / 或组合物可治疗狭窄和 / 或再狭窄。在某些情况下,经皮介入 (例如球囊血管成形术或支架置入) 对狭窄的动脉粥样硬化病变造成的机械损伤,将会诱发血管内膜增生。在某些情况下,血管壁的急性损伤将诱发急性内膜剥脱和血小板粘附,以及中间血管壁中 SMC 的凋亡。在某些情况下,内膜层内表型独特的 SMC 回应于损伤而聚集会起到恢复动脉血管壁的完整性的作用,但随后将导致血管逐渐变窄。在某些情况下,单核细胞募集会触发持续时间更长的慢性炎症反应。在一些实施例中,本文公开的方法和组合物可抑制内膜层内表型独特的 SMC 聚集。在某些情况下,单核细胞募集会触发持续时间更长的慢性炎症反应。在一些实施例中,本文公开的方法和组合物可抑制以球囊血管成形术或支架置入治疗的个体的内膜层内表型独特的 SMC 聚集。

[0127] 在某些情况下,动脉粥样硬化斑块破裂将引起 (部分或完全) 组织梗塞 (例如心肌梗塞或中风)。在某些情况下,在急性心肌缺血损伤后,存活的心肌细胞和巨噬细胞中心肌 MIF 的表达上调。在某些情况下,缺氧和氧化应激诱导心肌细胞经由非典型蛋白激酶 C 依赖性输出机制分泌 MIF,并引起细胞外信号调控的激酶活化。在某些情况下,在患有急性心肌梗塞的个体体内检测到较高的 MIF 血清浓度。在某些情况下,MIF 促成梗塞区中巨噬细胞聚集,并且促进梗塞期间肌细胞诱导的损伤的促炎性作用。在一些实施例中,本文所述的方法和 / 或组合物可治疗梗塞。在某些情况下,梗塞后会发生再灌注损伤。在一些实施例中,本文所述的方法和 / 或组合物可治疗再灌注损伤。

[0128] 在一些实施例中,授予本文公开的抗体以鉴别和 / 或定位动脉粥样硬化斑块。在一些实施例中,所述抗体经过标记,以供成像。在某些情况下,所述抗体经过标记,以供医学成像。在某些情况下,所述抗体经过标记,以供放射成像、PET 成像、MRI 成像和荧光成像。在某些情况下,所述抗体定位于循环系统中具有高 MIF 浓度的区域。在某些情况下,循环系统中具有高 MIF 浓度的区域是动脉粥样硬化斑块。在某些情况下,利用任何适合的方法 (例如,使用  $\gamma$  摄影机、MRI、PET 扫描仪、x 射线计算机断层摄影 (CT)、功能磁共振成像 (fMRI) 和单光子发射计算机断层摄影 (SPECT)), 来检测经过标记的抗体。

[0129] 腹部主动脉瘤

[0130] 在某些情况下,动脉粥样硬化斑块导致 (部分或完全) 发生动脉瘤。在某些情况下,授予本文所述的方法和组合物来治疗动脉瘤。在某些情况下,授予本文所述的方法和组合物来治疗腹部主动脉瘤 (“abdominal aortic aneurysm, AAA”)。本文使用的“腹部主动脉瘤”是以正常动脉直径增加至少 50% 为特征的腹部主动脉局部扩张。在某些情况下,授予本文所述的方法和组合物来治疗动脉瘤。在某些情况下,授予本文所述的方法和组合物来治疗腹部主动脉瘤 (“abdominal aortic aneurysm, AAA”)。本文使用的“腹部主动脉瘤”是以正常动脉直径增加至少 50% 为特征的腹部主动脉局部扩张。在某些情况下,本文所述的方法和组合物可减小腹部主动脉的扩张。

[0131] 在某些情况下,腹部主动脉瘤是 (部分或完全) 由结构蛋白 (例如弹性蛋白和胶原蛋白) 分解所引起的。在某些情况下,本文公开的方法和 / 或组合物部分或完全抑制结构蛋白 (例如弹性蛋白和胶原蛋白) 的分解。在某些情况下,本文公开的方法和 / 或组合物

物促进结构蛋白（例如弹性蛋白和胶原蛋白）的再生。在某些情况下，结构蛋白的分解是由活化的 MMP 所引起。在一些实施例中，本文公开的方法和 / 或组合物部分或完全抑制 MMP 的活化。在一些实施例中，本文公开的方法和 / 或组合物可抑制 MMP-1、MMP-9 或 MMP-12 的上调。在某些情况下，在一部分腹部主动脉经白细胞（例如巨噬细胞和嗜中性粒细胞）浸润后，MMP 被活化。

[0132] 在一些实施例中，本文所述的方法和组合物可减少白细胞浸润。在某些情况下，在早期腹部主动脉瘤中，MIF 上调。在某些情况下，白细胞循 MIF 梯度到达腹部主动脉中易发展 AAA 的部分中（例如，主动脉中受动脉粥样硬化斑块、感染、中膜囊性坏死、关节炎、外伤、导致吻合口裂开的假性动脉瘤影响的部分）。在一些实施例中，本文公开的方法和 / 或组合物部分或完全抑制 MIF 的活性。在一些实施例中，本文公开的方法和 / 或组合物部分或完全抑制 MIF 充当巨噬细胞和嗜中性粒细胞的趋化因子的能力。

[0133] 在一些实施例中，授予本文公开的抗体以鉴别和 / 或定位有需要的个体体内的 AAA。在一些实施例中，有需要的个体呈现出一个或多个发展 AAA 的风险因素（例如，60 岁或更大年龄；男性；吸烟；高血压；高血清胆固醇；糖尿病；动脉粥样硬化）。在一些实施例中，所述抗体经过标记，以供成像。在一些实施例中，所述抗体经过标记，以供医学成像。在一些实施例中，所述抗体经过标记，以供放射成像、PET 成像、MRI 成像和荧光成像。在一些实施例中，所述抗体定位于循环系统中具有高 MIF 浓度的区域。在一些实施例中，循环系统中具有高 MIF 浓度的区域是 AAA。在一些实施例中，利用任何适合的方法（例如，使用  $\gamma$  摄影机、MRI、PET 扫描仪、x 射线计算机断层摄影 (CT)、功能磁共振成像 (fMRI) 和单光子发射计算机断层摄影 (SPECT)），来检测经过标记的抗体。

#### [0134] 杂类病症

[0135] 在一些实施例中，本文所述的方法和 / 或组合物可治疗 T 细胞介导的自体免疫病症。在某些情况下，T 细胞介导的自体免疫病症以 T 细胞介导的针对自身（例如原生细胞和组织）的免疫反应为特征。T 细胞介导的自体免疫病症的实例包括（但不限于）结肠炎、多发性硬化症、关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、青少年关节炎、牛皮癣关节炎、急性胰腺炎、慢性胰腺炎、糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM 或 I 型糖尿病)、胰岛炎、发炎性肠病、克隆恩氏病、溃疡性结肠炎、自体免疫性溶血性综合症、自体免疫性肝炎、自体免疫性神经病变、自体免疫性卵巢衰竭、自体免疫性睾丸炎、自体免疫性血小板减少症、反应性关节炎、强直性脊柱炎、硅酮植入物相关性自体免疫疾病、修格连氏综合症、全身性红斑狼疮 (SLE)、血管炎综合症（例如巨细胞性动脉炎、贝塞特氏病和韦格纳肉芽肿）、白癜风、自体免疫疾病继发性血液学表现（例如贫血）、药物诱发的自体免疫性、桥本氏甲状腺炎、垂体炎、特发性血小板减少性紫癜、金属诱发的自体免疫性、重症肌无力、天疱疮、自体免疫性耳聋（例如梅尼埃氏病）、古巴士德氏综合症、格雷夫斯氏病、HIV 相关性自体免疫综合症和格林 - 巴利病。

[0136] 在一些实施例中，本文所述的方法和 / 或组合物可治疗疼痛。疼痛包括（但不限于）急性疼痛、急性发炎性疼痛、慢性发炎性疼痛和神经痛。

[0137] 在一些实施例中，本文所述的方法和 / 或组合物可治疗超敏反应。本文使用的“超敏反应”是指不需要的免疫系统反应。超敏反应分为四类。I 型超敏反应包括过敏症（例如先天性过敏症、过敏性反应或哮喘）。II 型超敏反应是细胞毒性 / 抗体介导的（例如自

体免疫性溶血性贫血、血小板减少症、胎儿成红细胞增多症或古巴士德氏综合症)。III型超敏反应是免疫复合物病(例如血清病、阿尔图斯氏反应(Arthus reaction)或SLE)。IV型超敏反应是迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)、细胞介导的免疫记忆反应,并且与抗体无关(例如接触性皮炎、结核菌素皮肤测试或慢性移植排斥)。

[0138] 本文使用的“过敏症”是指以肥大细胞和嗜碱细胞被IgE过度活化为特征的病症。在某些情况下,肥大细胞和嗜碱细胞被IgE过度活化引起(部分或完全)发炎性反应。在某些情况下,发炎性反应是局部的。在某些情况下,发炎性反应导致气道变窄(即支气管收缩)。在某些情况下,发炎性反应导致鼻子发炎(即鼻炎)。在某些情况下,发炎性反应是全身性的(即过敏性反应)。

[0139] 在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗血管生成。本文使用的“血管生成”是指形成新的血管。在某些情况下,血管生成是伴随慢性炎症发生的。在某些情况下,血管生成是由单核细胞和/或巨噬细胞所诱发的。在一些实施例中,本文公开的方法和/或组合物可抑制血管生成。在某些情况下,MIF是在内皮祖细胞中表达。在某些情况下,MIF是在肿瘤相关性新生血管中表达。

[0140] 在一些实施例中,本发明包含一种治疗瘤形成的方法。在某些情况下,肿瘤细胞诱导发炎性反应。在某些情况下,针对肿瘤细胞的发炎性反应部分是血管生成。在某些情况下,血管生成促进瘤形成的发展。在一些实施例中,瘤形成为:血管肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)、骨肉瘤和其它肉瘤、乳癌、盲肠癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、咽癌、直肠乙状结肠癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌、胃癌、肝癌、头颈癌、乳癌和其它癌瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkins lymphoma)和其它淋巴瘤、恶性黑色素瘤和其它黑色素瘤、腮腺肿瘤、慢性淋巴细胞白血病和其它白血病、星形细胞瘤、神经胶质瘤、血管瘤、成视网膜细胞瘤、成神经细胞瘤、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼和化脓性肉芽肿。

[0141] 在一些实施例中,本文公开促进新血管生成的方法,其包含对所述个体投予MIF或MIF类似物。

[0142] 本文使用的“脓毒病”是以全身炎症为特征的病症。在某些情况下,抑制MIF的表达或活性可增加患有脓毒病的个体的存活率。在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗脓毒病。在某些情况下,脓毒病引起(部分或完全)心肌功能障碍(例如心肌功能障碍)。在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗由脓毒病引起的心肌功能障碍(例如心肌功能障碍)。

[0143] 在某些情况下,MIF可诱导心脏中的激酶活化和磷酸化(即,心脏抑制的指标)。在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗由脓毒病引起的心肌功能障碍(例如心肌功能障碍)。

[0144] 在某些情况下,LPS可诱导MIF表达。在某些情况下,MIF在脓毒病期间被内毒素诱导并充当心肌发炎性反应、心肌细胞凋亡和心脏功能障碍的起始因子(图8)。

[0145] 在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可抑制由内毒素暴露引起的心肌发炎性反应。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可抑制由内毒素暴露引起的心肌细胞凋亡。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物可抑制由内毒素暴露引起的心脏功能障碍。

[0146] 在某些情况下,抑制MIF将(部分或完全)使存活因子(例如Bcl-2、Bax和磷

酸-Akt) 明显增加,并使心肌细胞存活率和心肌功能得到改良。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物将使 Bcl-2、Bax 或磷酸-Akt 的表达增加。

[0147] 在某些情况下,MIF 介导烧伤相关性和/或主要组织损伤后的晚期和长期心脏抑制。在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗烧伤后的长期心脏抑制。在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗主要组织损伤后的长期心脏抑制。

[0148] 在某些情况下,MIF 是在脓毒病期间由肺释放的。

[0149] 在某些情况下,抗体中和 MIF 将抑制自体免疫性心肌炎的发作,并降低其严重程度。在一些实施例中,本文所述的方法和/或组合物可治疗自体免疫性心肌炎。

[0150] 组合

[0151] 在某些实施例中,本文公开调节心血管系统病症的方法和医药组合物,其包含以下各物的协同组合:(a) 抗体,所述抗体抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的结合和/或 (ii) MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 的活化、(iii) MIF 形成同源多聚体的能力、或其组合;与 (b) 第二活性剂。

[0152] 在某些实施例中,本文公开调节心血管系统病症的方法和医药组合物,其包含以下各物的协同组合:(a) 抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的结合和/或 (ii) MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 的活化、(iii) MIF 形成同源多聚体的能力、或其组合的抗体;与 (b) 选自可治疗一种组分为炎症的病症的药剂的第二活性剂。

[0153] 在某些实施例中,本文公开调节心血管系统病症的方法和医药组合物,其包含以下各物的协同组合:(a) 抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的结合和/或 (ii) MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 的活化、(iii) MIF 形成同源多聚体的能力、或其组合的抗体;与 (b) 选自副作用为不合需要的炎症的药剂的第二活性剂。在某些情况下,他汀(例如阿托伐他汀(atorvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)和辛伐他汀(simvastatin))可诱发炎症。在某些情况下,投予他汀会(部分或完全)引起肌炎。

[0154] 本文使用的术语“医药组合”、“投予另一疗法”、“投予另一治疗剂”等是指通过将一种以上活性成分混合或组合所产生的药物疗法,并且其包括活性成分的固定和非固定组合。术语“固定组合”意味着,将至少一种本文所述的药剂与至少一种辅剂以单一实体形式或剂型同时投予个体。术语“非固定组合”意味着,将至少一种本文所述的药剂与至少一种辅剂以单独实体形式同时、并行地或以不同间隔时间限制依次投予个体,其中所述投药将向个体体内提供有效量的两种或两种以上药剂。在一些情况下,投予辅剂一次或持续一段时间,随后,投予本文所述药剂一次或持续一段时间。在其它情况下,投予辅剂一段时间,随后投予包含投予辅剂与本文所述药剂的疗法。在其它实施例中,投予本文所述药剂一次或持续一段时间,随后投予辅剂一次或持续一段时间。这些方法同样适用于药物混合疗法,例如投予三种或三种以上活性成分。

[0155] 本文使用的术语“共投药”、“与……组合投予”和其语法等效形式意欲涵盖将所选治疗剂投予单一个体,并且拟包括以相同或不同投药途径或在相同或不同时间投予各药剂的治疗方案。在一些实施例中,本文所述的药剂将与其它药剂共投予。这些术语涵盖投予动物两种或两种以上药剂,从而使药剂和/或其代谢物同时存在于动物体内。其包括以独立组合物形式同时投予、以独立组合物形式在不同时间投予,和/或以存在两种药剂的组合物形式投予。因此,在一些实施例中,本文所述药剂与其它药剂是以单一组合物投予。在

一些实施例中,将本文所述药剂与其它药剂混合于组合物中。

[0156] 在涵盖组合治疗或预防方法的情况下,预期本文所述药剂不受所述组合的特定性质限制。例如,任选组合授予本文所述药剂的简单混合物以及化学混合物。后者的实例是所述药剂共价连接至靶向载体或活性药物的情形。共价结合可以多种方式实现,例如(但不限于)使用市售交联剂。此外,任选分别或伴随授予组合治疗。

[0157] 在一些实施例中,共授予(a)本文公开的抗体与(b)第二活性剂(部分或完全)允许医学专家增加发炎性病症的治疗剂的处方剂量。在某些情况下,他汀诱发的肌炎具剂量依赖性。在一些实施例中,开具活性剂处方(部分或完全)允许医学专家增加他汀的处方剂量。

[0158] 在一些实施例中,共授予(a)抗体与(b)第二活性剂(部分或完全)使医学专家能够开具第二活性剂的处方(即,共投药可辅助发炎性病症的治疗剂)。

[0159] 在一些实施例中,第二活性剂是以间接方式(例如 CETP 抑制)靶向 HDL 含量的活性剂。在一些实施例中,组合非选择性 HDL 疗法与本文公开的抗体;(2) RANTES 与血小板因子 4 之间相互作用的调节剂;或(3) 其组合,可将以间接方式靶向 HDL 含量的第二活性剂转化成更为有效的疗法。

[0160] 在一些实施例中,在授予炎症调节剂之前、之后或同时,授予第二活性剂。

[0161] 药物治疗

[0162] 在一些实施例中,第二活性剂是烟酸、贝特、他汀、Apo-A1 模拟肽(例如 DF-4, 诺华公司)、apoA-I 转录上调剂、ACAT 抑制剂、CETP 调节剂、糖蛋白(GP) IIb/IIIa 受体拮抗剂、P2Y<sub>12</sub> 受体拮抗剂、Lp-PLA<sub>2</sub> 抑制剂、抗 TNF 剂、IL-1 受体拮抗剂、IL-2 受体拮抗剂、细胞毒性剂、免疫调节剂、抗生素、T 细胞共刺激阻断剂、改良病症的抗风湿剂、B 细胞消耗剂、免疫抑制剂、抗淋巴细胞抗体、烷化剂、抗代谢物、植物碱、类萜、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、单克隆抗体、激素疗法(例如芳香酶抑制剂)或其组合。

[0163] 在一些实施例中,第二活性剂是烟酸、苯扎贝特 (bezafibrate); 环丙贝特 (ciprofibrate); 氯贝丁酯 (clofibrate); 吉非贝齐 (gemfibrozil); 非诺贝特 (fenofibrate); DF4 (Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH<sub>2</sub>); DF5; RVX-208 (瑞瓦罗吉公司 (Resverlogix)); 阿伐麦布 (avasimibe); 硫酸帕替麦布 (pactimibe sulfate) (CS-505); CI-1011 ([ (2,4,6-三异丙基苯基) 乙酰基 ] 氨基磺酸 2,6-二异丙基苯酯); CI-976 (2,2-二甲基-N-(2,4,6-三甲氧基苯基) 十二烷酰胺); VULM1457 (1-(2,6-二异丙基-苯基)-3-[4-(4'-硝基苯硫基) 苯基] 脲); CI-976 (2,2-二甲基-N-(2,4,6-三甲氧基苯基) 十二烷酰胺); E-5324 (正丁基-N'-(2-(3-(5-乙基-苯基-1H-咪唑-1-基) 丙氧基)-6-甲基苯基) 脲); HL-004 (N-(2,6-二异丙基苯基) 十四烷硫基乙酰胺); KY-455 (N-(4,6-二甲基-1-戊基吡啶-7-基)-2,2-二甲基丙酰胺); FY-087 (N-[2-[N'-(戊基)-(6,6-二甲基-2,4-庚二炔基) 氨基] 乙基]-(2-甲基-1-萘基-硫基) 乙酰胺); MCC-147 (三菱制药株式会社 (Mitsubishi Pharma)); F12511 ((S)-2',3',5'-三甲基-4'-羟基- $\alpha$ -十二烷硫基乙酰苯胺); SMP-500 (住友制药株式会社 (Sumitomo Pharmaceuticals)); CL 277082 (2,4-二氟-苯基-N[[4-(2,2-二甲基丙基) 苯基] 甲基]-N-(庚基) 脲); F-1394 (3-[N-(2,2,5,5-四甲基-1,3-二噁烷-4-羰基) 氨基] 丙酸 (1s,2s)-2-[3-(2,2-二甲基丙基)-3-壬基脲基] 氨

基环己烷-1-基酯);CP-113818(N-(2,4-双(甲硫基)-6-甲基吡啶-3-基)-2-(己硫基)癸酸酰胺);YM-750;托彻普(torcetrapib);阿那曲匹(anacetrapid);JTT-705(日本烟草公司(Japan Tobacco)/罗氏公司(Roche));阿昔单抗(abciximab);埃替菲巴肽(eptifibatide);替罗非班(tirofiban);罗西非班(roxifiban);变异草痹素(variabilin);XV 459(N(3)-(2-(3-(4-甲脒基苯基)异噁唑啉-5-基)乙酰基)-N(2)-(1-丁氧基羰基)-2,3-二氨基丙酸酯);SR 121566A(3-[N-{4-[4-(氨基亚氨基甲基)苯基]-1,3-噻唑-2-基}-N-(1-羧甲基哌啶-4-基)氨基丙酸三盐酸盐]);FK419((S)-2-乙酰基氨基-3-[(R)-[1-[3-(哌啶-4-基)丙酰基]哌啶-3-基羰基]氨基]丙酸三水合物);氯吡格雷(clopidogrel);普拉格雷(prasugrel);坎格雷拉(cangrelor);AZD6140(阿斯利康公司(AstraZeneca));MRS 2395(2,2-二甲基-丙酸3-(2-氯-6-甲基氨基嘌呤-9-基)-2-(2,2-二甲基-丙酰氧基甲基)-丙酯);BX 667(波雷斯生物科技公司(Berlex Biosciences));BX 048(波雷斯生物科技公司);达雷迪布(darapladib)(SB 480848);SB-435495(葛兰素史克(GlaxoSmithKline));SB-222657(葛兰素史克);SB-253514(葛兰素史克);阿法赛特(alefacept)、依法利株单抗(efalizumab)、甲氨喋呤(methotrexate)、阿曲汀(acitretin)、异维A酸(isotretinoin)、羟基脲、霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil)、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、6-硫鸟嘌呤、达力士(Dovonex)、塔克尼斯(Taclonex)、倍他米松(betamethasone)、他扎罗汀(tazarotene)、羟氯喹(hydroxychloroquine)、柳氮磺吡啶、依那西普(etanercept)、阿达木单抗(adalimumab)、英利昔单抗(infliximab)、阿巴西普(abatacept)、利妥昔单抗(rituximab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、抗CD45单克隆抗体AHN-12(NCI)、碘-131抗B1抗体(柯瑞希公司(Corixa Corp.))、抗CD66单克隆抗体BW 250/183(NCI,南安普敦总医院(Southampton General Hospital))、抗CD45单克隆抗体(NCI,贝勒医学院(Baylor College of Medicine))、抗体抗anb3整合素(NCI)、BIW-8962(拜尔瓦公司(BioWa Inc.))、抗体BC8(NCI)、抗体muJ591(NCI)、(铟 In 111单克隆抗体MN-14(NCI)、钷 Y 90单克隆抗体MN-14(NCI)、F105单克隆抗体(NIAID)、单克隆抗体RAV12(瑞文生物技术公司(Raven Biotechnologies))、CAT-192(人类抗TGF- $\beta$ 1单克隆抗体,基因酶公司(Genzyme))、抗体3F8(NCI)、177Lu-J591(康奈尔大学威尔医学院(Weill Medical College of Cornell University))、TB-403(生物科技国际公司AB(BioInvent International AB))、阿那白滞素(anakinra)、硫唑嘌呤(azathioprine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、环孢素A(cyclosporine A)、来氟米特(leflunomide)、d-青霉胺(d-penicillamine)、阿米替林(amitriptyline)或去甲替林(nortriptyline)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氮芥(nitrogen mustard)、普拉睾酮(prasterone)、LJP 394(阿贝莫司钠(abetimus sodium))、LJP 1082(拉佐拉制药公司(La Jolla Pharmaceutical))、艾库组单抗(eculizumab)、贝利布单抗(belibumab)、rhuCD40L(NIAID)、依帕珠单抗(epratuzumab)、西罗莫司(sirolimus)、他克莫司(tacrolimus)、美克莫斯(pimecrolimus)、沙立度胺(thalidomide)、抗胸腺细胞球蛋白-马(antithymocyte globulin-equine)(阿特姆公司(Atgam),法玛西亚普强公司(Pharmacia Upjohn))、抗胸腺细胞球蛋白-兔(兔抗胸腺细胞球蛋白,基因酶公司(Genzyme))、莫罗莫那-CD3(Muromonab-CD3)(美国食品药品监督管理局少见病产品开发办公室(FDA Office of Orphan Products Development))、

巴利昔单抗 (basiliximab)、达克珠单抗 (daclizumab)、利鲁唑 (riluzole)、克拉屈滨 (cladribine)、那他珠单抗 (natalizumab)、干扰素  $\beta$ -1b、干扰素  $\beta$ -1a、替扎尼定 (tizanidine)、巴氯芬 (baclofen)、美沙拉秦 (mesalazine)、亚沙可 (asacol)、颇得斯安 (pentasa)、美塞拉明 (mesalamine)、巴柳氮 (balsalazide)、奥沙拉秦 (olsalazine)、6-巯基嘌呤、AIN457 (抗 IL-17 单克隆抗体, 诺华公司)、茶碱 (theophylline)、D2E7 (人类抗 TNF mAb, 来自科诺尔制药公司 (Knoll Pharmaceuticals))、美泊利单抗 (Mepolizumab) (抗 IL-5 抗体, SB 240563)、卡那奴单抗 (Canakinumab) (抗 IL-1 $\beta$  抗体, NIAMS)、抗 IL-2 受体抗体 (达克珠单抗 (Daclizumab), NHLBI)、CNT0 328 (抗 IL-6 单克隆抗体, 森提科公司 (Centocor))、ACZ885 (完全人类抗白细胞介素 -1 $\beta$  单克隆抗体, 诺华公司)、CNT0 1275 (完全人类抗 IL-12 单克隆抗体, 森提科公司)、(3S)-N-羟基-4-({4-[(4-羟基-2-丁炔基)氧基]苯基}磺酰基)-2,2-二甲基-3-硫代吗啉甲酰胺 (阿帕斯塔 (apratatstat))、戈利木单抗 (golimumab) (CNT0 148)、奥那西普 (Onercept)、BG9924 (拜尔吉埃迪公司 (Biogen Idec))、赛妥珠单抗 (Certolizumab Pegol) (CDP870, UCB 制药公司 (UCB Pharma))、AZD9056 (阿斯利康公司)、AZD5069 (阿斯利康公司)、AZD9668 (阿斯利康公司)、AZD7928 (阿斯利康公司)、AZD2914 (阿斯利康公司)、AZD6067 (阿斯利康公司)、AZD3342 (阿斯利康公司)、AZD8309 (阿斯利康公司)、[(1R)-3-甲基-1-({(2S)-3-苯基-2-[(吡嗪-2-基羰基)氨基]丙酰基}氨基)丁基]硼酸 (硼替佐米 (Bortezomib))、AMG-714 (抗 IL 15 人类单克隆抗体, 安进公司 (Amgen))、ABT-874 (抗 IL-12 单克隆抗体, 艾伯特实验室 (Abbott Labs))、MRA (托西珠单抗 (Tocilizumab), 抗 IL-6 受体单克隆抗体, 中外制药公司 (Chugai Pharmaceutical))、CAT-354 (人类抗白细胞介素 -13 单克隆抗体, 牛津抗体技术 (Cambridge Antibody Technology), 医学免疫公司 (MedImmune))、阿斯匹林 (aspirin)、水杨酸、龙胆酸、水杨酸胆碱镁、水杨酸胆碱、水杨酸胆碱镁、水杨酸胆碱、水杨酸镁、水杨酸钠、二氟尼柳 (diflunisal)、卡洛芬 (carprofen)、非诺洛芬 (fenoprofen)、非诺洛芬钙、氟比洛芬 (flurobiprofen)、布洛芬 (ibuprofen)、酮洛芬 (ketoprofen)、萘丁酮 (nabutone)、酮咯酸 (ketolorac)、酮咯酸缓血酸胺 (ketorolac tromethamine)、萘普生 (naproxen)、奥沙普秦 (oxaprozin)、双氯芬酸 (diclofenac)、依托度酸 (etodolac)、吲哚美辛 (indomethacin)、舒林酸 (sulindac)、托美丁 (tolmetin)、甲氯芬那酸盐 (meclofenamate)、甲氯芬那酸钠、甲氯芬那酸、吡罗昔康 (piroxicam)、美洛昔康 (meloxicam)、塞来昔布 (celecoxib)、罗非昔布 (rofecoxib)、伐地考昔 (valdecoxib)、帕瑞昔布 (parecoxib)、依托昔布 (etoricoxib)、罗美昔布 (lumiracoxib)、CS-502 (三洋公司 (Sankyo))、JTE-522 (日本烟草公司)、L-745,337 (埃尔米洛公司 (Almirall))、NS398 (西格玛公司 (Sigma))、倍他米松 (betamethasone) (天石易通公司 (Celestone))、泼尼松 (prednisone) (德拉斯通公司 (Deltasone))、阿氯米松 (alclometasone)、醛甾酮 (aldosterone)、安西奈德 (amcinonide)、倍氯米松 (beclometasone)、倍他米松 (betamethasone)、布地奈德 (budesonide)、环索奈德 (ciclesonide)、氯倍他索 (clobetasol)、氯倍他松 (clobetasone)、氯可托龙 (clocortolone)、氯泼尼醇 (cloprednol)、可的松 (cortisone)、可的伐唑 (cortivazol)、地夫可特 (deflazacort)、脱氧皮质酮 (deoxycorticosterone)、地奈德 (desonide)、去羟米松 (desoximetasone)、去氧皮质酮 (desoxycortone)、地塞米松 (dexamethasone)、二氟拉松 (diflorasone)、二氟

可龙 (diflucortolone)、二氟泼尼酯 (difluprednate)、氟氯缩松 (fluclorolone)、氟氢可的松 (fludrocortisone)、氟氢缩松 (fludroxycortide)、氟米松 (flumetasone)、氟尼缩松 (flunisolide)、醋酸氟轻松 (fluocinolone acetonide)、氟轻松 (fluocinonide)、氟可丁 (fluocortin)、氟可龙 (fluocortolone)、氟米龙 (fluorometholone)、氟培龙 (fluperolone)、氟泼尼定 (fluprednidene)、氟替卡松 (fluticasone)、福莫可他 (formocortal)、福莫特罗、哈西奈德 (halcinonide)、卤米松 (halometasone)、氢化可的松 (hydrocortisone)、醋丙氢化可的松 (hydrocortisone aceponate)、丁丙氢化可的松 (hydrocortisone buteprate)、丁酸氢化可的松 (hydrocortisone butyrate)、氯替泼诺 (loteprednol)、甲羟松 (medrysone)、甲泼尼松 (meprednisone)、甲泼尼龙 (methylprednisolone)、醋丙甲泼尼龙 (methylprednisolone aceponate)、糠酸莫米他松 (mometasone furoate)、帕拉米松 (paramethasone)、泼尼卡酯 (prednicarbate)、泼尼松 (prednisone)、利美索龙 (rimexolone)、替可的松 (tixocortol)、曲安西龙 (triamcinolone)、乌倍他索 (ulobetasol) ; 顺铂 (cisplatin) ; 卡铂 (carboplatin) ; 奥沙利铂 (oxaliplatin) ; 双氯乙基甲胺 (mechlorethamine) ; 环磷酰胺 ; 苯丁酸氮芥 ; 长春新碱 (vincristine) ; 长春花碱 (vinblastine) ; 长春瑞宾 (vinorelbine) ; 长春地辛 (vindesine) ; 硫唑嘌呤 ; 巯基嘌呤 ; 氟达拉滨 (fludarabine) ; 喷司他丁 (pentostatin) ; 克拉屈滨 (cladribine) ; 5- 氟尿嘧啶 (5FU) ; 氟尿苷 (floxuridine) (FUDR) ; 阿糖胞苷 (cytosine arabinoside) ; 甲氨喋呤 ; 三甲氧苄啶 (trimethoprim) ; 乙胺嘧啶 (pyrimethamine) ; 培美曲塞 (pemetrexed) ; 紫杉醇 (paclitaxel) ; 多烯紫杉醇 (docetaxel) ; 依托泊苷 (etoposide) ; 替尼泊苷 (teniposide) ; 伊立替康 (irinotecan) ; 拓扑替康 (topotecan) ; 安吡啶 (amsacrine) ; 依托泊苷 ; 磷酸依托泊苷 ; 替尼泊苷 ; 更生霉素 (dactinomycin) ; 多柔比星 (doxorubicin) ; 道诺霉素 (daunorubicin) ; 戊柔比星 (valrubicin) ; 依达比星 (idarubicin) ; 表柔比星 (epirubicin) 博来霉素 (bleomycin) ; 普卡霉素 (plicamycin) ; 丝裂霉素 (mitomycin) ; 曲妥珠单抗 (trastuzumab) ; 西妥昔单抗 (cetuximab) ; 利妥昔单抗 (rituximab) ; 贝伐单抗 (bevacizumab) ; 非那雄胺 (finasteride) ; 戈舍瑞林 (goserelin) ; 氨鲁米特 (aminoglutethimide) ; 阿那曲唑 (anastrozole) ; 雷曲唑 (letrozole) ; 伏氯唑 (vorozole) ; 依西美坦 (exemestane) ; 4- 雄烯 -3,6,17- 三酮 (“6-OXO”) ; 1,4,6- 雄甾三烯 -3,17- 二酮 (ATD) ; 福美坦 (formestane) ; 睾内酯 (testolactone) ; 法屈唑 (fadrozole) ; 米拉图单抗 (milatuzumab) ; 接合多柔比星的米拉图单抗 ; 或其组合。

#### [0164] 基因疗法

[0165] 在某些实施例中, 本文公开一种调节发炎性病症的组合物, 其包含 (a) 本文公开的抗体与 (b) 基因疗法的组合。在某些实施例中, 本文公开一种调节发炎性病症的方法, 其包含共授予 (a) 本文公开的抗体与 (b) 基因疗法的组合。

[0166] 在一些实施例中, 基因疗法包含调节有需要的个体血液中脂质和 / 或脂蛋白 (例如 HDL) 的浓度。在一些实施例中, 调节血液中脂质和 / 或脂蛋白 (例如 HDL) 的浓度包含将 DNA 转染至有需要的个体体内。在一些实施例中, 所述 DNA 编码 Apo A1 基因、LCAT 基因、LDL 基因、IL-4 基因、IL-10 基因、IL-1ra 基因、半乳糖素 -3 (galectin-3) 基因或其组合。在一些实施例中, 将所述 DNA 转染至肝细胞中。

[0167] 在一些实施例中,使用超声波将所述 DNA 转染至肝细胞中。有关使用超声波转染 ApoA1 DNA 的技术的公开内容,参见美国专利第 7,211,248 号,所述专利的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0168] 在一些实施例中,对个体授予经过工程改造以携带人类基因的载体(“基因载体”)。有关建立 LDL 基因载体的技术的公开内容,参见美国专利第 6,784,162 号,所述专利的公开内容以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,基因载体为逆转录病毒。在一些实施例中,基因载体不是逆转录病毒(例如,其为腺病毒、慢病毒,或聚合物递送系统,例如 METAFECTENE、SUPERFECT®、EFFECTENE®或 MIRUS TRANSIT)。在某些情况下,逆转录病毒、腺病毒或慢病毒将具有突变,以致所述病毒机能不全。

[0169] 在一些实施例中,载体是活体内(即,将载体直接注射至个体体内,例如注射至肝细胞中)、离体(即,使来自个体的细胞在活体外生长,并用基因载体转导,包埋于载体中,并随后植入个体体内)或其组合授予。

[0170] 在某些情况下,在授予基因载体后,基因载体感染投药部位(例如肝)处的细胞。在某些情况下,基因序列被并入个体的基因组中(例如当基因载体是逆转录病毒时)。在某些情况下,将需要定期再投药所述疗法(例如,当基因载体不是逆转录病毒时)。在一些实施例中,一年一次再授予所述疗法。在一些实施例中,半年一次再授予所述疗法。在一些实施例中,当个体的 HDL 含量降低到约 60mg/dL 以下时,再授予所述疗法。在一些实施例中,当个体的 HDL 含量降低到约 50mg/dL 以下时,再授予所述疗法。在一些实施例中,当个体的 HDL 含量降低到约 45mg/dL 以下时,再授予所述疗法。在一些实施例中,当个体的 HDL 含量降低到约 40mg/dL 以下时,再授予所述疗法。在一些实施例中,当个体的 HDL 含量降低到约 35mg/dL 以下时,再授予所述疗法。在一些实施例中,当个体的 HDL 含量降低到约 30mg/dL 以下时,再授予所述疗法。

[0171] RNAi 疗法

[0172] 在某些实施例中,本文公开调节发炎性病症的组合物,其包含以下各物的组合:(a) 本文公开的抗体;和 (b) RNAi 分子,其设计成使参与 MIF 介导的病症的发展和/或进展的基因(“目标基因”)的表达沉默。在某些实施例中,本文公开一种调节发炎性病症的方法,其包含授予以下各物的组合:(a) 本文公开的抗体;和 (b) RNAi 分子,其设计成使参与 MIF 介导的病症的发展和/或进展的基因(“目标基因”)的表达沉默。在一些实施例中,目标基因是载脂蛋白 B(Apo B)、热休克蛋白 110(Heat Shock Protein 110,Hsp 110)、前蛋白转化酶枯草溶菌素可欣 9(Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9,Pcsk9)、CyD1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、心房利钠肽受体 A(Atrial Natriuretic Peptide Receptor A,NPRA)、GATA-3、Syk、VEGF、MIP-2、FasL、DDR-1、C5aR、AP-1 或其组合。

[0173] 在一些实施例中,利用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)使目标基因沉默。在一些实施例中,RNAi 疗法包含使用 siRNA 分子。在一些实施例中,产生(例如,利用 PCR 技术)序列与欲沉默的基因(例如 Apo B、Hsp 110 和 Pcsk9)的 mRNA 序列互补的双链 RNA(dsRNA)分子。在一些实施例中,产生序列与欲沉默的基因的 mRNA 序列互补的 20-25bp siRNA 分子。在一些实施例中,所述 20-25bp siRNA 分子具有位于各链的 3' 末端上的 2-5bp 突出序列以及 5' 磷酸末端和 3' 羟基末端。在一些实施例中,所述 20-25bp siRNA 分子具有平末端。有关产生 RNA 序列的技术,参见分子克隆:实验室指南(Molecular Cloning:A

Laboratory Manual), 第二版(萨布鲁克(Sambrook)等人,1989)和分子克隆:实验室指南,第三版(萨布鲁克和鲁塞尔(Russel),2001),在本文中统称为“萨布鲁克”);现代分子生物学规程(Current Protocols in Molecular Biology)(F.M. 奥索贝尔(F.M. Ausubel)等人编,1987,包括2001年的增刊);现代核酸化学规程(Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry),约翰威立父子出版公司(John Wiley & Sons, Inc.),纽约(New York),2000),所述文献的所述公开内容以引用的方式并入本文中。

[0174] 在一些实施例中, siRNA 分子与目标基因“完全互补”(即,100%互补)。在一些实施例中,反义分子与目标基因“大部分互补”(例如99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%或70%互补)。在一些实施例中,存在1bp错配、2bp错配、3bp错配、4bp错配或5bp错配。

[0175] 在某些情况下,在授予 dsRNA 或 siRNA 分子后,投药部位的细胞(例如肝和/或小肠的细胞)经所述 dsRNA 或 siRNA 分子转化。在某些情况下,转化后, dsRNA 分子裂解成多个约20-25bp的片段,得到 siRNA 分子。在某些情况下,所述片段在各链的3'末端具有约2bp的突出序列。

[0176] 在某些情况下,利用 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced Silencing Complex, RISC),将 siRNA 分子分成两条链(引导链和反引导链)。在某些情况下,将引导链并入 RISC 的催化组分(即亚尔古家族蛋白(argonaute))中。在某些情况下,引导链特异性结合于互补的 RB1 mRNA 序列。在某些情况下, RISC 裂解欲沉默的基因的 mRNA 序列。在某些情况下,欲沉默的基因的表达受到下调。

[0177] 在一些实施例中,将与目标基因的 mRNA 序列互补的序列并入载体中。在一些实施例中,将所述序列置放于两个启动子之间。在一些实施例中,所述启动子是以相反方向定向。在一些实施例中,使所述载体与细胞接触。在某些情况下,用载体转化细胞。在某些情况下,转化后,产生所述序列的有义链和反义链。在某些情况下,所述有义链与反义链杂交形成 dsRNA 分子,其将被裂解成 siRNA 分子。在某些情况下,各链杂交形成 siRNA 分子。在一些实施例中,所述载体是质粒(例如 pSUPER ;pSUPER. neo ;pSUPER. neo+gfp)。

[0178] 在一些实施例中,将 siRNA 分子授予活体内(即,将载体直接注射至个体体内,例如注射至肝细胞或小肠细胞中,或注射至血流中)。

[0179] 在一些实施例中,将 siRNA 分子与递送媒介剂(例如脂质体、生物可降解聚合物、环糊精、PLGA 微球、PLCA 微球、生物可降解纳米囊、生物粘附微球或蛋白质载体)、载剂和稀释剂以及其它医药学上可接受的赋形剂一起调配。有关调配核酸分子和将其授予有需要个体的方法,参见阿科塔(Akhtar)等人,1992,细胞生物学前沿(Trends Cell Bio.),2,139;反义寡聚核苷酸治疗的递送策略(Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics),阿科塔编,1995;默瑞尔(Maurer)等人,1999,分子膜生物学(Mol. Membr. Biol.),16,129-140;霍夫兰(Hofland)和黄(Huang),1999,药理学实验手册(Handb. Exp. Pharmacol.),137,165-192;李(Lee)等人,2000,ACS 专题座谈会(ACS Symp. Ser.),752,184-192;贝尔吉曼(Beigelman)等人,美国专利第6,395,713号;苏尔文(Sullivan)等人,PCTWO 94/02595;古泽雷(Gonzalez)等人,1999,生物接合物化学(Bioconjugate Chem.),10,1068-1074;王(Wang)等人,国际 PCT 公开案第 W0 03/47518 号和第 W003/46185 号;美国专利第6,447,796号;美国专利申请公开案第 US 2002130430 号;奥海尔(O' Hare)和诺

曼德 (Normand), 国际 PCT 公开案第 WO 00/53722 号和美国专利申请公开案第 20030077829 号; 美国临时专利申请案第 60/678, 531 号, 所有文献的所述公开内容都以引用的方式并入本文中。

[0180] 在一些实施例中, 利用任何适合的方式将本文所述的 siRNA 分子投予肝 (例如参见文 (Wen) 等人, 2004, 世界胃肠病学杂志 (World J Gastroenterol.), 10, 244-9; 穆拉 (Murao) 等人, 2002, 药物研究 (Pharm Res.), 19, 1808-14; 刘 (Liu) 等人, 2003, 基因疗法 (Gene Ther.), 10, 180-7; 洪 (Hong) 等人, 2003, 制药与药理学杂志 (J Pharm Pharmacol.), 54, 51-8; 海尔曼 (Herrmann) 等人, 2004, 病毒学文献 (Arch Virol.), 149, 1611-7; 和松野 (Matsuno) 等人, 2003, 基因疗法, 10, 1559-66)。

[0181] 在一些实施例中, 将本文所述的 siRNA 分子以离子电渗方式投予例如特定器官或代谢区 (例如肝或小肠)。离子电渗递送法的非限制性实例描述于例如 WO 03/043689 和 WO 03/030989 中, 所述专利的所述公开内容以引用的方式并入本文中。

[0182] 在一些实施例中, 全身性投予本文所述的 siRNA 分子 (即, 活体内全身性吸收, 或 siRNA 分子聚集在血流中随后分布于全身)。预期用于全身性投药的投药途径包括 (但不限于) 静脉内、皮下、门静脉、腹膜内和肌肉内。这些投药途径各自将本发明的 siRNA 分子暴露于可及的患病组织 (例如肝)。

[0183] 在某些情况下, 所述疗法需要定期再投予。在一些实施例中, 一年一次再投予所述疗法。在一些实施例中, 半年一次再投予所述疗法。在一些实施例中, 每月一次投予所述疗法。在一些实施例中, 每周一次投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 60mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 50mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 45mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 40mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 35mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 30mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。

[0184] 有关使 Apo B 和 / 或 Hsp 110 的表达沉默的技术的公开内容, 参见美国公开案第 2007/0293451 号, 其相关公开内容以引用的方式并入本文中。有关使 Pcsk9 的表达沉默的技术的公开内容, 参见美国公开案第 2007/0173473 号, 其相关公开内容以引用的方式并入本文中。

[0185] 反义疗法

[0186] 在某些实施例中, 本文公开一种调节发炎性病症的组合物, 其包含以下各物的组合: (a) 本文公开的抗体; 和 (b) 反义分子, 其设计成可抑制参与 MIF 介导的病症的发展和 / 或进展的 DNA 或 RNA 序列 (“目标序列”) 的表达和 / 或活性。在某些实施例中, 本文公开一种调节发炎性病症的方法, 其包含共投予 (a) 本文公开的抗体; 和 (b) 反义分子, 其设计成可抑制参与 MIF 介导的病症的发展和 / 或进展的 DNA 或 RNA 序列 (“目标序列”) 的表达和 / 或活性。在一些实施例中, 抑制目标序列的表达和 / 或活性包含使用与目标序列互补的反义分子。在一些实施例中, 目标序列是微 RNA-122 (miRNA-122 或 mRNA-122)、分泌型磷脂酶 A2 (secretory phospholipase A2, sPLA2)、细胞内粘附分子 -1 (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、GATA-3、NF-KB、Syk 或其组合。在某些情况下, 抑制 miRNA-122 的表达和 / 或活性将 (部分或完全) 使血液中胆固醇和 / 或脂质的浓度降低。

[0187] 在一些实施例中,产生(例如利用 PCR 技术)与目标序列互补的反义分子。在一些实施例中,反义分子为约 15 到约 30 个核苷酸。在一些实施例中,反义分子为约 17 到约 28 个核苷酸。在一些实施例中,反义分子为约 19 到约 26 个核苷酸。在一些实施例中,反义分子为约 21 到约 24 个核苷酸。有关产生 RNA 序列的技术,参见分子克隆:实验室指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第二版(萨布鲁克(Sambrook)等人,1989)和分子克隆:实验室指南,第三版(萨布鲁克和鲁塞尔(Russel),2001),在本文中统称为“萨布鲁克”;现代分子生物学规程(Current Protocols in Molecular Biology)(F.M. 奥索贝尔(F.M. Ausubel)等人编,1987,包括 2001 年的增刊);现代核酸化学规程(Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry),约翰威立父子出版公司(John Wiley & Sons, Inc.),纽约(New York),2000),所述文献的所述公开内容以引用的方式并入本文中。

[0188] 在一些实施例中,反义分子是单链、双链、环状或发夹状分子。在一些实施例中,反义分子含有结构元件(例如内部或末端凸出,或环)。

[0189] 在一些实施例中,反义分子与目标序列“完全互补”(即,100%互补)。在一些实施例中,反义分子与目标 RNA 序列“大部分互补”(例如 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%或 70%互补)。在一些实施例中,存在 1bp 错配、2bp 错配、3bp 错配、4bp 错配或 5bp 错配。

[0190] 在一些实施例中,反义分子与目标序列杂交。本文使用的“杂交”是指反义分子的核苷酸与目标序列的相应核苷酸配对。在某些情况下,杂交涉及在配对的核苷酸之间形成一个或多个氢键(例如沃特森-科雷克(Watson-Crick)、霍氏(Hoogsteen)或反霍氏(reversed Hoogsteen)氢键)。

[0191] 在某些情况下,杂交引起(部分或完全)RNA 序列的降解、裂解和/或整合。

[0192] 在一些实施例中,将 siRNA 分子与递送媒剂(例如脂质体、生物可降解聚合物、环糊精、PLGA 微球、PLCA 微球、生物可降解纳米囊、生物粘附微球或蛋白质载体)、载剂和稀释剂以及其它医药学上可接受的赋形剂一起调配。有关调配核酸分子和将其投予有需要个体的方法,参见阿科塔(Akhtar)等人,1992,细胞生物学前沿(Trends Cell Bio.),2,139;反义寡聚核苷酸治疗的递送策略(Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics),阿科塔编,1995;默瑞尔(Maurer)等人,1999,分子膜生物学(Mol. Membr. Biol.),16,129-140;霍夫兰(Hofland)和黄(Huang),1999,药理学实验手册(Handb. Exp. Pharmacol.),137,165-192;李(Lee)等人,2000,ACS 专题座谈会(ACS Symp. Ser.),752,184-192;贝尔吉曼(Beigelman)等人,美国专利第 6,395,713 号;苏尔文(Sullivan)等人,PCT WO 94/02595;古泽雷(Gonzalez)等人,1999,生物接合物化学(Bioconjugate Chem.),10,1068-1074;王(Wang)等人,国际 PCT 公开案第 WO 03/47518 号和第 W003/46185 号;美国专利第 6,447,796 号;美国专利申请公开案第 US 2002130430 号;奥海尔(O' Hare)和诺曼德(Normand),国际 PCT 公开案第 WO 00/53722 号;和美国专利申请公开案第 20030077829 号;美国临时专利申请案第 60/678,531 号,所有文献的所述公开内容都以引用的方式并入本文中。

[0193] 在一些实施例中,利用任何适合的方式将本文所述的 siRNA 分子投予肝(例如参见文(Wen)等人,2004,世界胃肠病学杂志(World J Gastroenterol.),10,244-9;穆拉(Murao)等人,2002,药物研究(Pharm Res.),19,1808-14;刘(Liu)等人,2003,基因疗法

(Gene Ther.), 10, 180-7; 洪 (Hong) 等人, 2003, 制药与药理学杂志 (J Pharm Pharmacol.), 54, 51-8; 海尔曼 (Herrmann) 等人, 2004, 病毒学文献 (Arch Virol.), 149, 1611-7; 和松野 (Matsuno) 等人, 2003, 基因疗法, 10, 1559-66)。

[0194] 在一些实施例中, 将本文所述的 siRNA 分子以离子电渗方式投予例如特定器官或代谢区 (例如肝或小肠)。离子电渗递送法的非限制性实例描述于例如 WO 03/043689 和 WO 03/030989 中, 所述专利的所述公开内容以引用的方式并入本文中。

[0195] 在一些实施例中, 全身性投予本文所述的 siRNA 分子 (即, 活体内全身性吸收, 或 siRNA 分子聚集在血流中随后分布于全身)。预期用于全身性投药的投药途径包括 (但不限于) 静脉内、皮下、门静脉、腹膜内和肌肉内。这些投药途径各自将本发明的 siRNA 分子暴露于可及的患病组织 (例如肝)。

[0196] 在某些情况下, 所述疗法需要定期再投予。在一些实施例中, 一年一次再投予所述疗法。在一些实施例中, 半年一次再投予所述疗法。在一些实施例中, 每月一次投予所述疗法。在一些实施例中, 每周一次投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 60mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 50mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 45mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 40mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 35mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 30mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。

[0197] 有关使 miRNA-122 的表达沉默的技术的公开内容, 参见 WO 07/027775A2, 其相关公开内容以引用的方式并入本文中。

[0198] 装置介导的疗法

[0199] 在一些实施例中, 装置介导的策略包含去除有需要个体体内的 HDL 分子中的脂质 (脱脂)、去除有需要个体的血液或血浆中的 LDL 分子 (脱脂) 或其组合。有关去除 HDL 分子中的脂质以及去除有需要个体的血液或血浆中的 LDL 分子的技术的公开内容, 参见美国公开案第 2008/0230465 号, 所述公开案的相关公开内容以引用的方式并入本文中。

[0200] 在某些情况下, 所述脱脂疗法需要定期再投予。在一些实施例中, 一年一次再投予所述脱脂疗法。在一些实施例中, 半年一次再投予所述脱脂疗法。在一些实施例中, 每月一次再投予所述脱脂疗法。在一些实施例中, 半周一次再投予所述脱脂疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 60mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 50mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 45mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 40mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 35mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。在一些实施例中, 当个体的 HDL 含量降低到约 30mg/dL 以下时, 再投予所述疗法。

[0201] 医药组合物

[0202] 在某些实施例中, 本文公开一种调节炎症和 / 或 MIF 介导的病症的医药组合物, 其包含治疗有效量的本文公开的抗体。

[0203] 医药组合物是使用一种或多种生理学上可接受的载剂调配的, 所述生理学上可接受的载剂包括便利将活性剂加工成医药学上使用的制剂的赋形剂和佐剂。适当调配物

视所选投药途径而定。医药组合物的概述见于例如雷明顿：药学技术与实践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy), 第 19 版 (宾夕法尼亚州伊斯顿: 默克出版公司 (Easton, Pa.: Mack Publishing Company), 1995); 约翰 E. 霍温 (Hoover, John E.), 雷明顿：药学技术与实践, 默克出版公司, 宾夕法尼亚州伊斯顿, 1975; H. A. 利伯曼 (Lieberman, H. A.) 和 L. 拉奇曼 (Lachman, L.) 编, 药物剂型 (Pharmaceutical Dosage Forms), 马塞尔戴克 (Marcel Decker), 纽约州纽约 (New York, N. Y.), 1980; 和药物剂型与药物递送系统 (Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems), 第 7 版 (利平科特威廉姆斯 & 威尔金斯 (Lippincott Williams & Wilkins), 1999) 中。

[0204] 在某些实施例中, 用于调节心血管系统病症的医药组合物还包含医药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载剂。在一些实施例中, 所述医药组合物包括其它药剂或医药剂、载剂、佐剂, 例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐和 / 或缓冲剂。此外, 医药组合物还含有其它具有治疗价值的物质。

[0205] 任选通过多种投药途径, 包括 (但不限于) 口服、非经肠 (例如静脉内、皮下、肌肉内)、鼻内、口腔、局部、直肠或透皮投药途径, 授予个体本文所述的医药调配物。本文所述的医药调配物包括 (但不限于) 水性分散液、半乳化分散液、固溶体、脂质体分散液、气雾剂、固体剂型、散剂、速释调配物、控制释放调配物、快速熔融调配物、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放调配物、缓释调配物、脉冲释放调配物、多颗粒调配物以及速释与控制释放混合型调配物。

[0206] 本文所述的医药组合物可调配成任何适合的剂型, 包括 (但不限于) 水性口服分散液、液体、凝胶、糖浆、酏剂、浆液、悬浮液等, 以供欲治疗个体口服摄取, 固体口服剂型、气雾剂、控制释放调配物、快速熔融调配物、泡腾调配物、冻干调配物、片剂、散剂、丸剂、糖衣药丸、胶囊、改良释放调配物、延迟释放调配物、缓释调配物、脉冲释放调配物、多颗粒调配物以及速释与控制释放混合型调配物。

[0207] 在一些实施例中, 本文所述的医药组合物调配成多颗粒调配物形式。在一些实施例中, 本文所述的医药组合物包含第一颗粒群体以及第二颗粒群体。在一些实施例中, 第一群体包含活性剂。在一些实施例中, 第二群体包含活性剂。在一些实施例中, 第一群体中活性剂的剂量等于第二群体中活性剂的剂量。在一些实施例中, 第一群体中活性剂的剂量不等于 (例如大于或小于) 第二群体中活性剂的剂量。

[0208] 在一些实施例中, 第一群体的活性剂是在第二群体活性剂之前释放。在一些实施例中, 第二颗粒群体包含改良释放 (例如延迟释放、控制释放或缓释) 包衣。在一些实施例中, 第二颗粒群体包含改良释放 (例如延迟释放、控制释放或缓释) 基质。

[0209] 用于本文所述医药组合物的包覆材料包括 (但不限于) 聚合物包覆材料 (例如, 乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙酸偏苯三酸纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯); 胺基甲基丙烯酸共聚物 (例如, **Eudragit®** RS 和 RL); 聚丙烯酸以及聚丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯共聚物 (例如 Eudragite S 和 L, 聚乙烯基二乙缩醛氨基乙酸酯、乙酸酯琥珀酸羟丙基甲基纤维素、虫胶); 水凝胶和形成凝胶的材料 (例如羧基乙烯基聚合物、褐藻酸钠、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、羧甲基淀粉钠、聚乙烯醇、羟乙基纤维素、甲基纤维素、明胶、淀粉、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、交联淀粉、微晶纤维素、几丁质、氨基丙烯酸酯基 - 甲基丙烯酸酯共聚物、普鲁兰多糖 (pullulan)、胶原蛋白

白、酪蛋白、琼脂、阿拉伯胶、羧甲基纤维素钠、(可膨胀亲水性聚合物)聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)(分子量约 5k-5,000k)、聚乙烯吡咯烷酮(分子量约 10k-360k)、阴离子型和阳离子型水凝胶、具有较少乙酸酯残余的聚乙烯醇、琼脂与羧甲基纤维素的可膨胀混合物、顺丁烯二酸酐与苯乙烯、乙烯、丙烯或异丁烯的共聚物、果胶(分子量约 30k-300k)、聚糖(例如琼脂、阿拉伯胶、刺梧桐胶、黄芪胶、藻胶和瓜尔胶、聚丙烯酰胺、Polyox®聚环氧乙烷(分子量约 100k-5,000k)、AquaKeep®丙烯酸酯共聚物、聚葡萄糖二酯、交联聚乙烯醇和聚 N-乙基-2-吡咯烷酮、淀粉钠;亲水性聚合物(例如聚糖、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或钙、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、硝基纤维素、羧甲基纤维素、纤维素醚、聚环氧乙烷、甲基乙基纤维素、乙基羟乙基纤维素、乙酸纤维素、丁酸纤维素、丙酸纤维素、明胶、胶原蛋白、淀粉、麦芽糊精、普鲁兰多糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯、甘油脂肪酸酯、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸、甲基丙烯酸共聚物或甲基丙烯酸、其它丙烯酸衍生物、脱水山梨糖醇酯、天然胶、卵磷脂、果胶、褐藻酸盐、褐藻酸铵、褐藻酸钠、褐藻酸钙、褐藻酸钾、褐藻酸丙二醇酯、琼脂、阿拉伯胶、刺梧桐胶、槐豆胶、黄芪胶、角叉菜胶、瓜尔胶、黄原胶、小核菌葡聚糖胶);或其组合。在一些实施例中,包衣包含增塑剂、润滑剂、溶剂或其组合。合适的增塑剂包括(但不限于)乙酰化单酸甘油酯;羟乙酸丁基邻苯二甲酰丁酯;酒石酸二丁酯;邻苯二甲酸二乙酯;邻苯二甲酸二甲酯;羟乙酸乙基邻苯二甲酰乙酯;甘油;丙二醇;三乙酸甘油酯;柠檬酸酯;三丙酸甘油酯;二乙酸甘油酯;邻苯二甲酸二丁酯;乙酰基单酸甘油酯;聚乙二醇;蓖麻油;柠檬酸三乙酯;多羟基醇、甘油、乙酸酯、甘油三乙酸酯、柠檬酸乙酰基三乙酯、邻苯二甲酸二苯甲酯、邻苯二甲酸二己酯、邻苯二甲酸丁酯辛酯、邻苯二甲酸二异壬酯、邻苯二甲酸丁酯辛酯、壬二酸二辛酯、环氧树脂酸酯、偏苯三酸三异辛酯、邻苯二甲酸二乙基己酯、邻苯二甲酸二正辛酯、邻苯二甲酸二异辛酯、邻苯二甲酸二异癸酯、邻苯二甲酸二正十一烷酯、邻苯二甲酸二正十三烷酯、偏苯三酸三-2-乙基己酯、己二酸二-2-乙基己酯、癸二酸二-2-乙基己酯、壬二酸二-2-乙基己酯、癸二酸二丁酯。

[0210] 在一些实施例中,第二颗粒群体包含改良释放的基质材料。用于本文所述的医药组合物的材料包括(但不限于)微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、羟烷基纤维素(羟丙基甲基纤维素和羟丙基纤维素)、聚环氧乙烷、烷基纤维素(例如甲基纤维素和乙基纤维素)、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙酸偏苯三酸纤维素、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯、聚甲基丙烯酸烷酯、聚乙酸乙烯酯或其组合。

[0211] 在一些实施例中,第一颗粒群体包含心血管病症治疗剂。在一些实施例中,第二颗粒群体包含(1)MIF 调节剂;(2)RANTES 与血小板因子 4 之间的相互作用的调节剂;或(3)其组合。在一些实施例中,第一颗粒群体包含(1)MIF 调节剂;(2)RANTES 与血小板因子 4 之间的相互作用的调节剂;或(3)其组合。在一些实施例中,第二颗粒群体包含心血管病症治疗剂。

[0212] 糖衣核具有适合的包衣。为此,一般使用浓缩糖溶液,其可任选含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液(lacquersolution)和合适的有机溶剂或溶剂混合物。任选将染料或颜料添加到片剂或糖衣药丸包衣中以供鉴别或表征不同的活性化合物剂量组合。

[0213] 在一些实施例中,本文公开的固体剂型呈以下形式:片剂(包括悬浮片剂、快速熔融片剂、口嚼崩解片剂、快速崩解片剂、泡腾片或囊片)、丸剂、散剂(包括无菌包装散剂、可

分散的散剂或泡腾散剂)、胶囊(包括软或硬胶囊,例如由来源于动物的明胶或来源于植物的 HPMC 制成的胶囊,或“撒布胶囊(sprinkle capsule)”)、固体分散体、固溶体、生物蚀解剂型、控制释放调配物、脉冲释放剂型、多颗粒剂型、药丸、颗粒剂或气雾剂。在其它实施例中,医药调配物为粉末形式。在其它实施例中,医药调配物为片剂形式,包括(但不限于)快速熔融片剂。此外,本文公开的医药调配物任选以单胶囊或多胶囊剂型投予。在一些实施例中,医药调配物是以两粒或三粒或者四粒胶囊或片剂形式投予。

[0214] 另一方面,剂型包括微胶囊调配物。在一些实施例中,在微胶囊材料中存在一种或多种其它相容性材料。例示性材料包括(但不限于)pH 值调节剂、促蚀解剂(erosion facilitator)、消泡剂、抗氧化剂、调味剂,和载剂材料,例如粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、润湿剂和稀释剂。

[0215] 适用于延迟包括 MIF 受体抑制剂的调配物释放的例示性微胶囊材料包括(但不限于)羟丙基纤维素醚(hydroxypropyl cellulose ether, HPC),例如 **Klucel®** 或 **Nisso HPC**;低度取代的羟丙基纤维素醚(low-substituted hydroxypropyl cellulose ether, L-HPC);羟丙基甲基纤维素醚(hydroxypropyl methyl cellulose ether, HPMC),例如 **Seppifilm-LC**、**Pharmacoat®**、**Metolose SR**、**Methocel® -E**、**Opadry YS**、**PrimaFlo**、**Benecel MP824** 和 **Benecel MP843**;甲基纤维素聚合物,例如 **Methocel® -A**;羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯 **Acoat (HF-LS, HF-LG, HF-MS)** 和 **Metolose®**;乙基纤维素(**Ethylcellulose, EC**) 和其混合物,例如 **E461**、**Ethocel®**、**Aqualon® -EC**、**Surelease®**;聚乙烯醇(**Polyvinyl alcohol, PVA**),例如 **Opadry AMB**;羟乙基纤维素,例如 **Natrosol®**;羧甲基纤维素和羧甲基纤维素(carboxymethylcellulose, CMC) 的盐,例如 **Aqualon® -CMC**;聚乙烯醇和聚乙二醇共聚物,例如 **Kollicoat IR®**;单酸甘油酯(**Myverol**);三酸甘油酯(**KLX**);聚乙二醇;改良型食用淀粉;丙烯酸系聚合物以及丙烯酸系聚合物与纤维素醚的混合物,例如 **Eudragit® EP0**、**Eudragit® L30D-55**、**Eudragit® FS 30D** **Eudragit® L100-55**、**Eudragit® L100**、**Eudragit® S100**、**Eudragit® RD100**、**Eudragit® E100**、**Eudragit® L12.5**、**Eudragit® S12.5**、**Eudragit® NE30D** 和 **Eudragit® NE 40D**;乙酸邻苯二甲酸纤维素;sepifilm,例如 HPMC 与硬脂酸的混合物;环糊精;以及这些材料的混合物。

[0216] 用于口服投药的液体调配物剂型任选为水性悬浮液,其选自包括(但不限于)以下各物的群组:医药学上可接受的水性口服分散液、乳液、溶液、酞剂、凝胶和糖浆。例如参见辛格(Singh)等人,制剂技术百科全书(*Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*),第2版,第754-757页(2002)。除 MIF 受体抑制剂外,所述液体剂型还任选包括添加剂,例如:(a) 崩解剂;(b) 分散剂;(c) 润湿剂;(d) 至少一种防腐剂;(e) 增粘剂;(f) 至少一种甜味剂;和(g) 至少一种调味剂。在一些实施例中,水性分散液另外包括晶体形成抑制剂。

[0217] 在一些实施例中,本文所述的医药调配物是自乳化药物递送系统(elf-emulsifying drug delivery system, SEDDS)。乳液是一种不混溶相于另一种中的分散液,通常为液滴形式。通常,乳液是由剧烈机械分散所产生。与乳液或微乳液相对,SEDDS 当添加到过量的水中时,无需任何外部机械分散或搅动,即自发形成乳液。SEDDS 的优点在于,只需轻柔混合,即可将液滴分散于整个溶液中。此外,任选在临投药前添加水或水相,这将确保不稳定或疏水性活性成分的稳定性。因此,SEDDS 提供适于口服和非经肠递送疏水

性活性成分的有效递送系统。在一些实施例中, SEDDS 提高疏水性活性成分的生物利用率。制造自乳化剂型的方法包括(但不限于)例如美国专利第 5, 858, 401 号、第 6, 667, 048 号 and 第 6, 960, 563 号。

[0218] 合适的鼻内调配物包括例如美国专利第 4, 476, 116 号、第 5, 116, 817 号 and 第 6, 391, 452 号中描述者。鼻用剂型除含有活性成份外, 一般还含有大量水。任选存在少量其它成分, 例如 pH 值调节剂、乳化剂或分散剂、防腐剂、表面活性剂、胶凝剂或缓冲剂, 以及其它稳定剂和增溶剂。

[0219] 对于经吸入投药, 本文公开的医药组合物任选呈气雾剂、薄雾或粉末的形式。宜使用例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适当气体等合适推进剂, 由加压包装或喷洒器以气雾剂喷雾形式递送本文所述的医药组合物。在加压气雾剂情况下, 通过提供阀递送指定量来确定剂量单位。用于吸入器或吹入器中的胶囊和药包(仅举例来说, 由明胶制成) 是调配成含有粉末混合物和适当粉末基质, 例如乳糖或淀粉。

[0220] 口腔调配物包括(但不限于)美国专利第 4, 229, 447 号、第 4, 596, 795 号、第 4, 755, 386 号 and 第 5, 739, 136 号。此外, 本文所述的口腔剂型任选另外包括生物蚀解(可水解)聚合载剂, 其也用于使剂型粘附至口腔粘膜。口腔剂型是制造成经一段预定时间逐渐蚀解。口腔药物递送避免了口服投予药物所遇到的缺点, 例如吸收缓慢、活性剂会被胃肠道中存在的流体降解和/或肝中的首过失活。生物蚀解(可水解)聚合载剂一般包含亲水性(水溶性和遇水膨胀)聚合物, 其会粘附于湿润的口腔粘膜表面。适用于本文中的聚合载剂的实例包括丙烯酸聚合物和共聚物, 例如称为“卡波姆”(Carbopol®), 其是由 B F. 古德瑞琪(B J. Goodrich) 获得的一种此类聚合物)者。也可并入本文所述的口腔剂型中的其它组分包括(但不限于)崩解剂、稀释剂、粘合剂、润滑剂、调味剂、着色剂、防腐剂等。对于口腔或舌下投药, 所述组合物任选呈以常规方式调配的片剂、锭剂或凝胶的形式。

[0221] 本文公开的医药组合物的透皮调配物是例如通过以下美国专利所述者投予: 3, 598, 122、3, 598, 123、3, 710, 795、3, 731, 683、3, 742, 951、3, 814, 097、3, 921, 636、3, 972, 995、3, 993, 072、3, 993, 073、3, 996, 934、4, 031, 894、4, 060, 084、4, 069, 307、4, 077, 407、4, 201, 211、4, 230, 105、4, 292, 299、4, 292, 303、5, 336, 168、5, 665, 378、5, 837, 280、5, 869, 090、6, 923, 983、6, 929, 801 和 6, 946, 144。

[0222] 本文所述的透皮调配物包括至少三种组分:(1) 活性剂;(2) 渗透增强剂;和(3) 水性佐剂。此外, 透皮调配物还包括例如(但不限于)胶凝剂、乳膏和油膏基质等组分。在一些实施例中, 透皮调配物还包括纺织或非纺织衬底材料, 以增强吸收并防止透皮调配物从皮肤移开。在其它实施例中, 本文所述的透皮调配物保持饱和或过饱和状态以促进扩散到皮肤中。

[0223] 在一些实施例中, 适于透皮投予的调配物采用透皮递送装置和透皮递送贴片, 并且是溶解和/或分散于聚合物或胶粘剂中的亲脂性乳液或缓冲水溶液。此类贴片任选构造造成连续、脉冲或按需递送医药剂的形式。此外, 任选借助于离子电渗贴片等实现透皮递送。另外, 透皮贴片提供控制递送。任选通过使用速率控制膜, 或通过将活性剂截留在聚合物基质或凝胶内, 来减慢吸收速率。相反, 可使用吸收增强剂来增加吸收。吸收增强剂或载剂包括医药学上可接受的可吸收溶剂, 以帮助通过皮肤。例如, 透皮装置呈包含衬底部件的绷带形式; 含有活性剂和任选使用的载剂、任选使用的速率控制屏障的储集器形式, 用于以受控

的预定速率经一段较长时间将活性剂递送到主体的皮肤,并确保递送到皮肤。

[0224] 适于肌肉内、皮下或静脉内注射的调配物包括生理学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液,以及供复原成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。适合的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒剂的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、十六醇聚氧乙烯醚等)、其合适混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射有机酯(例如油酸乙酯)。例如,利用例如卵磷脂等包衣、在分散液的情况下通过保持所需粒度以及利用表面活性剂,来保持适当流动性。适于皮下注射的调配物还含有任选使用的添加剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0225] 对于静脉内注射,任选在水溶液中,优选在例如汉克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水缓冲液等生理学相容性缓冲液中调配活性剂。对于透粘膜投药,调配物中可使用适于障壁的渗透剂。对于其它非经肠注射,适宜调配物包括优选生理学相容性缓冲液或赋形剂制成的水性或非水性溶液。

[0226] 非经肠注射优选涉及快速注射或连续输注。注射用调配物任选以单位剂型于加有防腐剂的例如安瓿或多剂量容器中提供。在一些实施例中,本文所述的医药组合物呈适于非经肠注射的形式,如于油性或水性媒剂中的无菌悬浮液、溶液或乳液,并且含有例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂等调配剂。供非经肠投药的医药调配物包括水溶性形式的活性剂水溶液。此外,任选将悬浮液制备为适宜的油性可注射悬浮液。

[0227] 在一些实施例中,局部授予本文公开的活性剂,并调配成多种可局部授予的组合物,例如溶液、悬浮液、洗液、凝胶、糊剂、药用棒(medicated stick)、香膏、乳膏或油膏。所述医药组合物任选含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0228] 也任选将本文公开的活性剂调配成直肠组合物,例如灌肠剂、直肠凝胶、直肠泡沫剂、直肠气雾剂、栓剂、胶浆栓剂,或保留灌肠剂,其含有习知栓剂基质,例如可可脂或其它三酸甘油酯,以及合成聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮、PEG等。对于栓剂形式组合物,首先将低熔点蜡熔融,所述低熔点蜡为例如(但不限于)脂肪酸甘油酯混合物,任选组合可可脂。

[0229] 任选使用本文公开的活性剂来制备供预防性和/或治疗性治疗发炎性病状或至少部分从改善获益的病状的药物。此外,治疗需要所述治疗的个体的本文所述的任何疾病或病状的方法涉及授予所述个体治疗有效量的医药组合物,所述医药组合物含有本文公开的活性剂,或其医药学上可接受的盐、医药学上可接受的N-氧化物、医药活性代谢物、医药学上可接受的前药或医药学上可接受的溶剂化物。

[0230] 在医生处置后,个体的病状未获改良的情况下,任选长期授予本文公开的活性剂,也就是说,投药持续一段较长时间,包括个体终生,以便改善或者以其它方式控制或限制个体疾病或病状的症状。

[0231] 在医生处置后,个体的状态有所改良的情况下,任选继续授予本文公开的活性剂;或者,暂时减少或暂时中止所授予的药物的剂量一段时间(即“休药期(drug holiday)”)。休药期的长度任选在2天与1年之间变化,包括例如仅2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。休药期间,剂量减少包括10%–100%,包括例如仅10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0232] 在个体的病状出现改良后,必要时,投予维持剂量。随后根据症状,将投药的剂量或频率或二者降低到能够维持得到改良的疾病、病症或病状的水平。在一些实施例中,个体需要针对症状的任何复发进行长期间歇式治疗。

[0233] 在一些实施例中,本文所述的医药组合物是适于单次投予精确剂量的单位剂型。在单位剂型中,调配物被分成含有适量本文公开的活性剂的单位剂量。在一些实施例中,单位剂量呈含有不连续量调配物的包装的形式。非限制性实例是包装片剂或胶囊,或装在小瓶或安瓿中的散剂。在一些实施例中,将水性悬浮液组合物包装于不可再密封的单剂量容器中。或者,使用可再密封的多剂量容器,在此情况下,所述组合物中通常包括防腐剂。仅举例来说,非经肠注射用调配物是以单位剂型提供,其包括(但不限于)安瓿或加有防腐剂的多剂量容器。

[0234] 本文公开的活性剂的适宜每日剂量为每公斤体重约 0.01mg 到 3mg。对于较大的哺乳动物,包括(但不限于)人类,指定每日剂量范围为约 0.5mg 到约 100mg,通常以分剂量投予,包括(但不限于)每日达 4 次,或以缓释形式投予。适于口服投药的单位剂型包括约 1 到 50mg 活性成分。由于针对个体治疗方案的变数极大,而且与这些推荐值偏差相当大的情形也很常见,故前述范围仅供参考。视多种变数而定,任选改变所述剂量,所述变数(不限于)所用 MIF 受体抑制剂的活性、待治疗的疾病或病状、投药模式、个体的需求、所治疗的疾病或病状的严重程度和从业人员的判断。

[0235] 所述治疗方案的毒性和治疗功效任选在细胞培养物或实验动物中确定,包括(但不限于)测定 LD<sub>50</sub>(50%群体致死的剂量)和 ED<sub>50</sub>(对于 50%群体治疗有效的剂量)。毒性与治疗功效之间的剂量比率为治疗指数,其表示为 LD<sub>50</sub> 与 ED<sub>50</sub> 之间的比率。优选展现高治疗指数的本文公开的活性剂。任选使用从细胞培养分析和动物研究获得的数据,制订出用于人类的剂量范围。本文公开的所述活性剂的剂量优选在循环浓度(包括 ED<sub>50</sub> 及最低限度毒性)的范围内。视所用剂型和/或所用投药途径而定,任选在此范围内改变剂量。

[0236] 实例

[0237] 以下具体实例应视为说明性的,而非限制本发明或权利要求书。

[0238] 实例 1

[0239] 细胞株和试剂

[0240] 如所述,使用人类主动脉(A. 斯奇博(Schober, A.)等人,(2004)循环学(Circulation)109,380-385)和脐静脉(K. S. 维博(Weber, K. S.)等人,(1999)欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol.)29,700-712)内皮细胞(普罗默塞尔公司(PromoCell))、MonoMac6 细胞(C. 维博(Weber, C.)等人,(1993)欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol.)23,852-859)和中国仓鼠卵巢(CHO) ICAM-1 转染子(G. 奥斯特曼(Ostermann, G.)等人,(2002)自然-免疫学(Nat. Immunol.)3,151-158)。用 pcDNA3-CXCR2 转染 Jurkat 细胞和 RAW264.7 巨噬细胞。用 pcDNA3.1/V5-HisTOP0-TA-CD74 或载体对照(Nucleofector 试剂盒 V, 艾玛希公司(Amaxa))转染 HL-60 细胞。用 pcDNA3-CXCR 或 pcDNA-CCR5(UMR cDNA 资源中心(UMR cDNA Resource Center))转染 L1.2 细胞,以对经猿猴病毒-40 转化的小鼠微血管内皮细胞(SVEC)进行分析。由白细胞层制得末梢血单核细胞,借助于粘附或免疫磁性分离技术(immunomagnetic separation;密特异生物技术公司(Miltenyi))得到单核细胞,通过植物血球凝集素(phytohaemagglutinin)/白细胞介素-2(生物资源公司(Biosource))

刺激和 / 或免疫磁性选择 ( 抗 CD3 抗体 /Dynabead M-450) 得到原代 T 细胞, 并借助于菲柯尔 (Ficoll) 梯度离心得到嗜中性粒细胞。先前已经描述过人类胚肾 -CXCR2 转染子 (HEK293-CXCR2) (A. 本 - 鲍奇 (Ben-Baruch, A.) 等人, (1997) 细胞因子 (Cytokine) 9, 37-45)。

[0241] 如所述, 表达并纯化重组 MIF (J. 伯恩汉阁 (Bernhagen, J.) 等人, (1993) 自然 (Nature) 365, 756-759)。趋化因子来自佩普技术公司 (PeproTech)。使用人类 VCAM-1.Fc 嵌合体、抗 CXCR1 (42705, 5A12)、CXCR2 (48311)、CXCR4 (44708, FABSP2 混合液, R&D 公司)、人类 MIF 和小鼠 MIF (NIHIII, D. 9) (H. Y. 兰 (Lan, H. Y.) 等人, (1997) 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 185, 1455-1465)、CD74 (M-B741, 华瑞康公司 (Pharmingen))、 $\beta_2$  整合素 (TS1/18)、 $\alpha_4$  整合素 (HP2/1) (C. 维博 (Weber, C.) 等人, (1996) 细胞生物学杂志 (J. Cell Biol.) 134, 1063-1073) 和 CXCR2 (RII115) 的阻断抗体, 以及抗  $\alpha_L$  整合素的抗体 (327C) (R. 夏姆瑞 (Shamri, R.) 等人, (2005) 自然 - 免疫学 (Nat. Immunol.) 6, 497-506)。PTX 和 B- 寡聚物都来自默克公司 (Merck)。

[0242] 实例中所用的方法

[0243] 粘附分析

[0244] 在平行壁腔室中以流动方式 (1.5 达因 / 平方厘米, 5 分钟) 定量经钙黄绿素乙酸甲酯 (calcein-AM; 分子探针公司 (Molecular Probes)) 标记的单核细胞、T 细胞和 L1.2 转染子的阻滞 (A. 斯奇博等人, (2004) 循环学 109, 380-385; G. 奥斯特曼等人, (2002) 自然 - 免疫学 3, 151-158; C. 维博等人, (1996) 细胞生物学杂志 (J. Cell Biol.) 134, 1063-1073)。用 MIF、趋化因子或抗体预处理汇合的内皮细胞、CHO-ICAM-1 细胞、包覆 VCAM-1.Fc 的血小板和白细胞。用抗 MIF Ka565 的抗体 (L. 李格 (Leng, L.) 等人, (2003) 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 197, 1467-1476) 和接合 FITC 的抗体对与 MIF 一起培育的 CHO-ICAM-1 细胞 (2 小时) 进行染色。

[0245] 趋化性分析

[0246] 使用 Transwell 腔室 (柯斯达公司 (Costar)), 可利用荧光显微镜或使用钙黄绿素乙酸甲酯标记和 FluoroBlok 过滤器 (发康公司 (Falcon)) 来定量原代白细胞朝向 MIF 或趋化因子的迁移。用 PTX/B- 寡聚物、Ly294002、MIF (用于脱敏)、抗 CXCR 或 CD74 的抗体, 或同型 IgG 预处理细胞。孔径和时间间隔为 5 微米和 3 小时 (单核细胞)、3 微米和 1.5 小时 (T 细胞) 以及 3 毫米和 1 小时 (嗜中性粒细胞)。

[0247] Q-PCR 和 ELISA

[0248] 使用寡聚 dT 引物反转录 RNA。使用含 SYBR 绿 (SYBRGreen) 的 QuantiTect 试剂盒 (奇格公司 (Qiagen))、特定引物和 MJ Opticon2 荧光仪 (拜尔泽姆公司 (Biozym)) 进行 RTPCR。用 Quantikine ELISA (R&D 公司) 对 CXCL8 进行定量。

[0249]  $\alpha_L\beta_2$  整合素活化分析

[0250] 将经过 MIF 或  $Mg^{2+}$ /EGTA (阳性对照) 刺激的单核细胞固定, 使其与抗体 327C 和接合 FITC 的抗小鼠 IgG 抗体反应。用流式细胞术分析的 LFA-1 活化报导为平均荧光强度 (MFI) 的增加, 或相对于阳性对照加以报导 (R. 夏姆瑞等人, (2005) 自然 - 免疫学, 6, 497-506)。

[0251] 钙移动

[0252] 用 Fluo-4 AM (分子探针公司) 标记嗜中性粒细胞或 L1.2 CXCR2 转染子。在添加第一或后续刺激物 (MIF、CXCL8 或 CXCL7) 后, 通过使用 BD FACSAria 型流式细胞仪测量胞质  $Ca^{2+}$  浓度 120 秒, 来监测 MFI。L1.2 对照物显示出可以忽略不计的钙内流。

[0253] 受体结合分析

[0254] 由于碘化 MIF 无活性 (L. 李格等人, (2003) 实验医学杂志 197, 1467-1476 ; R. 柯里曼 (Kleemann, R.) 等人, (2002) 干扰素与细胞因子研究杂志 (J. Interferon Cytokine Res.) 22, 351-363), 故使用放射性碘化示踪剂 (安玛夏公司 (Amersham)) :  $[I^{125}]CXCL8$  (以 4nM (80  $\mu$  Ci/ml) 复原至 40pM 浓度)、 $[I^{125}]CXCL12$  (以 5nM (100  $\mu$  Ci/ml) 复原至 50pM 浓度), 进行竞争性受体结合 (S. 林 (Hayashi, S.) 等人, (1995) 免疫学杂志 (J. Immunol.) 154, 814-824)。对于在平衡结合分析中,  $[I^{125}]CXCL8$  与 MIF 竞争与 CXCR2 结合, 或  $[I^{125}]CXCL12$  与 MIF 竞争与 CXCR4 结合, 将冷 MIF 和 / 或 CXCL 与示踪剂添加到 HEK293-CXCR2 或带有 CXCR4 的 Jurkat 细胞中。通过液体闪烁计数来进行分析。为计算  $EC^{50}$  和  $K_d$  值, 采用单位点受体-配体结合模型, 并使用程 / 普鲁索夫方程式 (Cheng/Prusoff-equation) 和 GraphPad Prism 软件。

[0255] 对于生物素-MIF-CXCR 复合物的离析, 将 HEK293-CXCR2 转染子或对照组与经生物素标记的 MIF (R. 柯里曼等人, (2002) 干扰素与细胞因子研究杂志 22, 351-363) 一起培育, 洗涤并用免疫共沉淀 (coimmunoprecipitation, CoIP) 缓冲液溶解。利用包覆抗生蛋白链菌素的磁珠 (M280, 戴诺公司 (Dyna1)), 从澄清溶解产物中分离出复合物, 并借助于蛋白免疫印迹法, 使用抗 CXCR2 抗体或抗生蛋白链菌素-过氧化物酶进行分析。对于流式细胞术, 将用 AMD3465 和 / 或 20 倍过量未经标记的 MIF 预处理过的 HEK293-CXCR2 转染子或 Jurkat 细胞与经荧光素标记的 MIF 一起培育, 并使用 BDFACSCalibur 流式细胞仪进行分析。

[0256] CXCR 内化分析

[0257] 分别用 CXCL8 或 CXCL12 处理 HEK293-CXCR2 或 Jurkat 细胞, 用 MIF 处理, 用酸性甘氨酸缓冲液洗涤, 利用抗 CXCR2 或 CXCR4 的抗体染色, 并利用流式细胞术分析。相对于缓冲剂处理的细胞 (100% 对照) 和同型对照染色 (0% 对照) 的表面表达计算内化:  $\text{几何 MFI}[\text{实验}] - \text{MFI}[0\% \text{对照}] / \text{MFI}[100\% \text{对照}] - \text{MFI}[0\% \text{对照}] \times 100$ 。

[0258] CXCR2 与 CD74 的共定位

[0259] 依次用 CXCR2 和抗小鼠 CD74 的大鼠抗体 (In-1, 华瑞康公司), 以及接合 FITC 的抗大鼠 IgG 抗体和接合 Cy3 的抗小鼠 IgG 抗体, 对 RAW264.7-CXCR2 转染子进行共染色, 并利用激光共聚焦扫描显微镜 (蔡斯公司 (Zeiss)) 加以分析。

[0260] CXCR2 与 CD74 的免疫共沉淀

[0261] 在非变性 CoIP 缓冲液中溶解经 pcDNA3.1/V5-HisTOP0-TA-CD74 瞬时转染的 HEK293-CXCR2 细胞。将上清液与 CXCR2 抗体 RII115 或同型对照一起培育, 并用蛋白质 G-琼脂糖凝胶预先阻断整夜。借助于蛋白免疫印迹法, 使用针对 His 标签的抗体 (圣塔克鲁兹公司 (Santa Cruz)), 分析蛋白质。类似地, 分别使用抗 His 标签和 CXCR2 的抗体执行 CoIP 和免疫印迹。将 L1.2-CXCR2 细胞用抗 CXCR2 抗体免疫沉淀, 并用抗小鼠 CD74 抗体进行免疫印迹。

[0262] 颈动脉的离体灌注和活体显微镜检查

[0263] 对由  $Mif^{-/-}$  (G. 费格勒-劳森 (Fingerle-Rowson, G.) 等人, (2003) 美国国家科学

院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 100, 9354-9359) 和 Ldlr<sup>-/-</sup> 小鼠 (查里斯河 (Charles River)) 杂交的 Mif<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup> 小鼠和 Mif<sup>+/+</sup>Ldlr<sup>-/-</sup> 同窝仔畜对照, 以及 Apoe<sup>-/-</sup> 小鼠喂食致动脉粥样硬化饮食 (21% 脂肪, 埃尔托明实验室 (Altromin)), 持续 6 周。已经在 C57BL/6 背景中回交所有单一基因敲除品系 10 次。用 TNF- $\alpha$  处理 Mif<sup>+/+</sup> 和 Mif<sup>-/-</sup> 小鼠 (腹膜内 (i. p.), 4 小时)。将外植的动脉转移到外荧光显微镜平台上, 并用经抗 CD74 或 CXCR2 的抗体处理的经钙黄绿素乙酸甲酯标记的 MonoMac6 细胞、同型对照 IgG 以 4  $\mu$  l/min 灌注, 或不加处理 (Y. 霍 (Huo, Y.) 等人, (2001) 临床研究杂志 (J. Clin. Invest.) 108, 1307-1314)。用抗 MIF 抗体阻断后, 灌注未经处理的单核细胞, 持续 30 分钟。对于活体显微镜检查, 经静脉内 (i. v.) 投予罗丹明 -G (rhodamine-G; 分子探针公司), 并暴露麻醉小鼠的颈动脉。利用外荧光显微镜 (蔡斯 Axiotech 型显微镜 (Zeiss Axiotech), 20x 水浸物镜) 分析经标记白细胞的阻滞 (大于 30 秒)。所有研究都经过当地管理机构 (科隆的特区政府 (Bezirksregierung Köln)) 批准, 并且遵照德国动物保护法 Az :50. 203. 2-AC 36, 19/05。

#### [0264] 小鼠动脉粥样硬化疾病发展模型

[0265] 用抗 MIF (NIH11D. 9)、CXCL12 (79014) 或 CXCL1 (124014, R&D 公司) (n = 6-10 只小鼠) 的抗体注射喂食致动脉粥样硬化饮食 12 周的 Apoe<sup>-/-</sup> 小鼠, 再持续 4 周。通过原位灌注固定主动脉根, 并通过用油红 O (Oil-Red-O) 染色来定量动脉粥样硬化。通过用抗 MOMA-2 抗体 (MCA519, 塞洛泰克公司 (Serotec)) 或抗 CD3 抗体 (PC3/188A, 达科公司 (Dako)) 和接合 FITC 的抗体染色, 测定相对巨噬细胞和 T 细胞含量。如所述, 在喂食饲料 30 周的 Mif<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup> 和 Mif<sup>+/+</sup>Ldlr<sup>-/-</sup> 小鼠 (n = 4) 中测定内腔单核细胞和主动脉根中损伤巨噬细胞的分布量 (L. 维奇任 (Verschuren, L.) 等人, (2005) 动脉粥样硬化、血栓和血管生物学 (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 25, 161-167)。

#### [0266] 提睾肌微循环模型

[0267] 在经过抗 CXCR2 抗体处理 (100  $\mu$  g, 腹膜内) 的小鼠中, 经阴囊内注射人类 MIF (1  $\mu$  g), 并用手术取出提睾肌。4 小时后, 在毛细血管后静脉中执行活体显微镜检查 (蔡斯 Axioplan 型显微镜; 20x) (J. L. 乔治 (Gregory, J. L.) 等人, (2004) 关节炎与风湿病 (Arthritis Rheum.) 50, 3023-3034; M. P. 凯尼 (Keane, M. P.) 等人 (2004) 免疫学杂志 (J. Immunol.) 172, 2853-2860)。粘附是以白细胞固定超过 30 秒测量, 迁移是以每一区域中血管外白细胞的数量测量。

#### [0268] 骨髓移植

[0269] 在无菌条件下, 从供体 Il8rb<sup>-/-</sup> (杰克逊实验室 (Jackson Laboratories)) 或 BALB/c 小鼠中取出大腿骨和胫骨。在进行全身消融照射后 24 小时, 将从骨髓腔冲洗出来的细胞经静脉内投予至 Mif<sup>+/+</sup> 或 Mif<sup>-/-</sup> 小鼠中 (A. 泽奈克 (Zernecke, A.) 等人, (2005) 临床研究 (Circ. Res.) 96, 784-791)。

#### [0270] 急性腹膜炎模型

[0271] 向恢复 Il8rb<sup>+/+</sup> 或 Il8rb<sup>-/-</sup> 骨髓的小鼠经腹膜内注射 MIF (200ng)。4 小时后, 执行腹腔灌洗, 并通过流式细胞术, 使用相关接合抗体, 对 Gr-1<sup>+</sup>CD115<sup>-</sup>F4/80<sup>-</sup> 嗜中性粒细胞进行定量。

#### [0272] 统计学分析

[0273] 使用单向方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 和纽曼-库尔氏

事后检验 (Newman-Keuls post-hoc test) 或非成对学生 t 检验 (unpaired Student' s t-test) 和韦尔奇氏校正 (GraphPad Prism 软件), 执行统计学分析。

[0274] 实例 2:

[0275] 表面结合的 MIF 经由 CXCR2 诱导单核细胞阻滞

[0276] 使用单克隆抗体和百日咳毒素 (PTX) 研究单核细胞阻滞是否取决于 CXCR2 的  $G_{\alpha_i}$  偶联活性。经重组 MIF 预处理 2 小时的人类主动脉内皮细胞在流动条件下使原代人类单核细胞阻滞实质上增加, 此效应可被抗 MIF 抗体阻断 (图 1a)。值得注意的是, MIF 触发 (但非自发) 的单核细胞阻滞可被抗 CXCR2 抗体或 PTX 消除, 提示  $G_{\alpha_i}$  偶联的 CXCR2。使用单核 Mono-Mac6 细胞证实 MIF 经由 CXCR2 诱导单核细胞阻滞的能力, 并且此活性与 MIF 固定于主动脉内皮细胞上有关 (图 1b)。此数据表明, MIF 是存在于内皮细胞表面上, 并作为非同源 CXCR2 配体而发挥趋化因子的阻滞作用。阻断典型的 CXCR2 激动剂 (CXCL1/CXCL8) 不能干扰 MIF 的这些作用 (图 1a)。

[0277] 使用表达  $\beta_2$  整合素配体、ICAM-1 (细胞内粘附分子-1) 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 转染子, 剖析 MIF 促进整合素依赖性阻滞的机制。当在流动条件下定量时, 使 CHO 转染子暴露于 MIF 达 2 小时导致其呈现于表面 (图 1b), 而且与所述转染子暴露于 CXCL8 的情形相似, 单核细胞阻滞增加 (图 1c)。此效应对 PTX 和抗  $\beta_2$  整合素抗体十分敏感 (图 1c), 证实了  $G_{\alpha_i}$  在由 MIF 诱导的  $\beta_2$  整合素介导的阻滞中的作用。原代单核细胞和 MonoMac6 细胞表达 CXCR1 和 CXCR2 (K. S. 维博 (Weber, K. S.) 等人 (1999) 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol.) 29, 700-712)。尽管阻断 CXCR1 没有作用, 但阻断 CXCR2 实质上但不完全减弱由 MIF 触发和由 CXCL8 触发的单核细胞阻滞。添加抗 CXCR1 和 CXCR2 的抗体将完全抑制 MIF 或 CXCL8 的阻滞作用 (图 1d 和图 8)。使用抗 CD74 抗体提示与 CXCR2 一起的此蛋白质牵涉于 MIF 诱导的阻滞中 (图 1d)。自发阻滞不受影响 (图 8)。因此, CXCR2 在 CD74 的帮助下介导 MIF 诱导的阻滞。

[0278] MIF 经由 CXCR4 诱导 T 细胞阻滞

[0279] 固定于主动脉内皮细胞上的 MIF 或 CXCL12 触发原代人类效应 T 细胞的阻滞 (图 1e)。MIF 诱导 (但非自发) 的 T 细胞阻滞对 PTX 敏感, 而且受抗 CXCR4 抗体抑制 (图 1e)。表达 ICAM-1 的 CHO 转染子上 MIF (或 CXCL12) 的呈现尽管不如表达 CXCR2 的单核细胞 (图 1d) 中显著, 但也能引起  $\alpha_L\beta_2$  依赖性 Jurkat T 细胞阻滞, 此为由 CXCR4 介导的作用 (图 1f)。

[0280] Jurkat T 细胞中 CXCR2 的异位表达使 MIF 触发的阻滞增加 (图 1g), 确证一个观点, 即白细胞中 CXCR2 赋予对 MIF 的反应性。在 CXCR4 拮抗剂 AMD3465 存在下, 使用表达 CXCR1、CXCR2 或 CXCR3 的 L1.2 前体 B 细胞淋巴瘤转染子, 以及使用仅表达内源 CXCR4 的细胞的对照组。MIF 触发内皮细胞上 CXCR2 转染子和带有 CXCR4 的对照组阻滞的功效与典型配体 CXCL8 和 CXCL12 类似, 而 CXCR1 和 CXCR3 转染子分别对 CXCL8 和 CXCL10 起反应, 但不对 MIF 起反应 (图 1h)。此数据证实, CXCR2 和 CXCR4 支持 MIF 诱导的阻滞, 但 CXCR1 或 CXCR3 不能。

[0281] 实例 3

[0282] MIF 经由 CXCR2/4 活化诱导的白细胞趋化性

[0283] 趋化因子又名趋化性诱导剂 (M. 贝格里尼 (Baggiolini, M.) 等人 (1994) 免疫学

进展 (Adv. Immunol.) 55, 97-179 ;C. 维博 (Weber, C.) 等人 (2004) 动脉粥样硬化、血栓和血管生物学 (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 24, 1997-2008)。最初曾荒谬地认为 MIF 会干扰“随机”迁移 (T. 卡兰德拉 (Calandra, T.) 等人 (2003) 自然 - 免疫学研究 (Nat. Rev. Immunol.) 3, 791-800)。尽管此观点可能归因于定向迁移的主动排斥或脱敏, 但由 MIF 调控迁移所引起的特定机制仍有待阐明。显示 MIF 诱导  $G_{\alpha_i}$  介导的 CXCR2 和 CXCR4 功能的结果促使研究人员检验 MIF 是否经由这些受体直接引起白细胞趋化性。

[0284] 使用 transwell 系统, 比较 MIF 与 CXCL8 对来源于原代人类末梢血单核细胞的单核细胞的促迁移作用。还使用 CCL2 作为单核细胞的原型趋化因子。与 CXCL8 和 CCL2 类似, 将 MIF 添加到下部腔室中会诱导迁移, 其遵循趋化因子典型的钟形剂量 - 反应曲线, 其中在 25-50ng/ml 下最佳, 不过仅具有较小的峰迁移指数 (图 2a)。热处理或抗 MIF 的中和抗体可消除 MIF 诱导的反式迁移。相比之下, 同型匹配的免疫球蛋白 (IgG) 没有作用 (图 2b)。当将 MIF 添加到上部腔室中时, 使下部腔室中朝向 MIF 的迁移以依赖于 MIF 剂量的方式脱敏 (图 2c), 但当只存在于上部腔室中时, 没有引起迁移, 表明 MIF 引起真实的趋化现象, 而不是化学增殖现象。与经由磷酸肌醇-3-激酶进行的  $G_{\alpha_i}$  依赖性信号传导一致, MIF 诱导的单核细胞趋化性对 PTX 敏感, 并且可由 Ly294002 消除 (图 2d)。CXCR2 与 CD74 都特异性促成 MIF 触发的单核细胞趋化性 (图 2e)。在经 CXCR2 转染的 L1.2 细胞中所显示的由 MIF 介导的 CXCL8 诱导的趋化性的交叉脱敏, 可证实 CXCR2 的作用。在 RAW264.7 巨噬细胞 (图 8) 和 THP-1 单核细胞中验证了 MIF 的趋化活性。这些数据表明, MIF 经由 CXCR2 触发单核细胞趋化性。

[0285] 为证明功能性 MIF-CXCR4 相互作用, 评估无 CXCR1 和 CXCR2 的原代  $CD3^+$ T 淋巴细胞的反式迁移。类似于 CXCL12, 已知的 CXCR4 配体和 T 细胞化学引诱物以依赖于 MIF 剂量的方式诱导反式迁移, 此过程具趋化性并经由 CXCR4 转导, 如通过抗体阻断和 CXCL12 的交叉脱敏所显示 (图 2f 和图 8)。因此, MIF 经由 CXCR4 引起定向 T 细胞迁移。在原代人类嗜中性粒细胞 (一种带有 CXCR2 的主要细胞类型) 中, MIF 发挥 CXCR2 介导但非 CXCR1 介导的趋化活性, 展现钟形剂量 - 反应曲线并使 CXCL8 交叉脱敏 (图 2g, h)。嗜中性粒细胞朝向 MIF 的适度趋化活性很可能与嗜中性粒细胞上不存在 CD74 相关, 因为 CD74 在  $CD74^-$  骨髓 HL-60 细胞中的异位表达增强 MIF 诱导的迁移 (图 8)。尽管与其它 CXCR2 配体类似, MIF 可用作阻滞趋化因子, 但本发明的数据揭示, MIF 对单核细胞和嗜中性粒细胞也具有明显的趋化特性。

[0286] 实例 4

[0287] MIF 触发快速整合素活化和钙流动

[0288] MIF 的阻滞功能可反映直接 MIF/CXCR 信号传导, 但它不能完全排除 MIF 会在固定 MIF 所需的时间内诱导其它阻滞趋化因子。为进一步证实 MIF 直接诱导白细胞阻滞 (图 1), 执行实时 PCR 和 ELISA, 并发现, 将人类主动脉 (或静脉) 内皮细胞与 MIF 一起预培育 2 小时无法上调已知会连结 CXCR2 的典型阻滞趋化因子 (图 3a)。

[0289] 短时间暴露于存在于溶液或邻近整合素配体 (例如血管细胞粘附分子 (VCAM)-1) 固定的趋化因子可迅速上调整合素活性, 此活性将介导白细胞阻滞 (C. 劳丹纳 (Laudanna, C.) 等人 (2006) 血栓与止血学杂志 (Thromb. Haemost.) 95, 5-11)。这可通过在配体结合前群集 (例如  $\alpha_4\beta_1$ ) 或构象改变 (例如  $\alpha_L\beta_2$ ) 来实现。用 MIF (或 CXCL8)

刺激单核细胞 1 到 5 分钟,将触发 CHO/ICAM-1 细胞上的  $\alpha_L\beta_2$  依赖性阻滞 (图 3b)。为了证实单核细胞整合素的直接刺激,使用报导抗体 327C,其可识别  $\alpha_L\beta_2$  延伸的高亲和力构象 (R. 夏姆瑞等人, (2005) 自然 - 免疫学 6, 497-506)。这些分析揭示, MonoMac6 细胞 (图 3c) 和人类血液单核细胞 (图 3d) 中的  $\alpha_L\beta_2$  活化是早在暴露于 MIF 后 1 分钟内便已发生,并持续 30 分钟。为评估 MIF 的作用是否局限于  $\alpha_L\beta_2$ ,将研究 VCAM-1 上的  $\alpha_4\beta_1$  依赖性单核细胞阻滞。暴露于 MIF 达 1 到 5 分钟即诱导明显阻滞,这是由 CXCR2、CD74 和  $\alpha_4\beta_1$  介导的 (图 3e)。与 CXCL12 的作用类似,用 MIF 刺激 Jurkat T 细胞 1 到 5 分钟,可触发在 VCAM-1 上的 CXCR4 依赖性粘附 (图 8)。

[0290] 由于 CXCR2 可介导由 CXCL8 引起的胞质钙含量增加 (S. A. 琼斯 (Jones, S. A.) 等人 (1997) 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 272, 16166-16169),故可测试 MIF 刺激钙内流和使 CXCL8 信号脱敏的能力。事实上,与 CXCL8 类似, MIF 在原始人类嗜中性粒细胞中诱导钙内流,并回应于 CXCL8 或 MIF 使钙瞬变脱敏 (图 3f),证实 MIF 可活化 GPCR/ $G_{\alpha_i}$  信号传导。在嗜中性粒细胞中发现的 MIF 使 CXCL8 信号传导部分脱敏与利用其它 CXCR2 配体得到的发现形成对照 (S. A. 琼斯等人 (1997) 生物化学杂志 227, 16166-16169),并反映 CXCR1 的存在。在表达 CXCR2 的 L1.2 转染子中, MIF 使 CXCL8 诱导的钙内流完全脱敏,而且在嗜中性粒细胞中, MIF 使选择性 CXCR2 配体 CXCL7 所诱导的瞬变脱敏 (且 CXCL7 使 MIF 所诱导的瞬变脱敏) (图 3f)。在 CXCR2 转染子中, MIF 以剂量依赖方式诱导钙内流,且效力和功效略低于 CXCL8 或 CXCL7 (图 3g)。总之, MIF 对 CXCR2 和 CXCR4 作用,引起快速整合素活化和钙内流。

[0291] 实例 5

[0292] MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 相互作用

[0293] 为评估 MIF 与 CXCR2 和 CXCR4 的物理相互作用,进行受体结合竞争和内化研究。在异位表达 CXCR2 的 HEK293 细胞中, MIF 在平衡条件下与经  $^{125}\text{I}$  标记的 CXCL8 有力竞争与 CXCR2 的结合。CXCL8 示踪剂与 CXCR2 的结合受 MIF 抑制,其中半数最大反应 ( $EC_{50}$ ) 的效应物浓度为 1.5nM (图 4a)。CXCR2 对 MIF 的亲和力 ( $K_d = 1.4\text{nM}$ ) 接近其对 CXCL8 的亲和力 ( $K_d = 0.7\text{nM}$ ),并且在诱导最佳趋化性的 MIF 浓度的范围内 (2-4nM)。为证实与 CXCR2 的结合,使用受体内化分析来报导特异性受体 - 配体相互作用。在稳定 HEK293 转染子上进行的表面 CXCR2 的 FACS 分析显示, MIF 以类似于 CXCL8 的剂量反应诱导 CXCR2 内化 (图 4b)。在经 CXCR2 转染的 RAW264.7 巨噬细胞中,获得相当的数据 (图 4b 的插图)。

[0294] 为验证 MIF 与 CXCR4 的相互作用,在内源性表达 CXCR4 的 Jurkat T 细胞中进行受体结合研究。MIF 与经  $^{125}\text{I}$  标记的 CXCL12 竞争与 CXCR4 的结合 (CXCL12 的  $K_d = 1.5\text{nM}$ ;  $EC_{50} = 19.9\text{nM}$ ; MIF 的  $K_d = 19.8\text{nM}$ ) (图 4c)。所述  $K_d$  与诱导 T 细胞趋化性的 MIF 浓度一致。与 CXCL12 类似, MIF 始终以剂量依赖方式引起 CXCR4 内化 (图 4d)。因为与同源配体 CCL5 不同, MIF 不能在 L1.2 CCR5 转染子中诱导 CCR5 内化,所以 MIF 诱导的 CXCR2 和 CXCR4 内化对这些受体具特异性。

[0295] 为确证其与 CXCR 的相互作用,用生物素或荧光素标记 MIF,与碘化 MIF 相比,此举允许进行直接受体结合分析。CXCR2 转染子支持经标记 MIF 的直接结合,但载体对照组不能,如利用流式细胞术 (图 4e)、用抗生蛋白链菌素珠粒进行的离析试验 (图 4e 的插图) 和荧光显微镜检查术所证实。此外,荧光素 - MIF 与带有 CXCR4 的 Jurkat 细胞的特异性结合受 CXCR4 拮抗剂 AMD3465 抑制。

[0296] CXCR2 与 CD74 之间形成复合物

[0297] 本发明的数据表明一个可能性,即功能性MIF受体复合物包含GPCR和CD74。因此,使用共聚焦荧光显微镜,观测表达人类CXCR2的RAW264.7巨噬细胞中内源CD74和CXCR2的共定位。使用此技术,在约50%细胞中以极化模式观察到显著共定位(图4f)。

[0298] 此外,免疫共沉淀分析揭示,CXCR2与CD74物理相互作用。在稳定过表达CXCR2和瞬时表达经His标记的CD74的HEK293细胞中检测到CXCR2/CD74复合物。通过用抗CXCR2抗体沉淀,并借助于针对His标签的蛋白免疫印迹检测共沉淀的CD74,来观察这些复合物。当所用抗体的次序颠倒时,也能观察到共沉淀(图4g)。也在稳定表达人类CXCR2的L1.2转染子中利用CD74检测到复合物,如通过与抗CXCR2免疫共沉淀所评估。相比之下,利用L1.2对照组或同型对照组没有观察到复合物(图4h)。所述数据与CD74与CXCR2形成信号传导复合物以介导MIF功能的模型一致。

[0299] 实例6

[0300] CXCR2介导动脉中MIF诱导的单核细胞阻滞

[0301] MIF促进复合物斑块形成以及大量细胞增殖、巨噬细胞浸润和脂质沉积(C. 维博等人,(2004)动脉粥样硬化、血栓与血管生物学24,1997-2008;E.F. 莫兰(Morand, E.F.)等人,(2006)自然评论:药物发现(Nat. Rev. Drug Discov.)5,399-410)。这与oxLDL诱导内皮MIF从而触发单核细胞阻滞相关(A. 斯奇博(Schober, A.)等人(2004)循环学(Circulation)109,380-385)。CXCR2配体CXCL1也可以在具有早期动脉粥样硬化内皮的小鼠的离体灌注的颈动脉中引起 $\alpha_4\beta_1$ 依赖性单核细胞聚集(Y. 霍(Huo, Y.)等人(2001)临床研究杂志(J. Clin. Invest.)108,1307-1314)。此系统可用于测试MIF是否经由CXCR2起作用诱导募集。喂食高脂肪饮食的Apoe<sup>-/-</sup>小鼠的颈动脉中单核细胞阻滞受抗CXCR2、CD74或MIF的抗体抑制(图5a和图9),表明MIF经由CXCR2和CD74促成致动脉粥样硬化募集。在阻断MIF、CXCR2和CD74达24小时后,在经肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 处理(模仿急性血管炎症)的野生型小鼠的动脉中观察到类似的单核细胞阻滞模式(图5b)。在经TNF- $\alpha$ 处理的Mif<sup>-/-</sup>小鼠的动脉中,针对CD74的抑制作用减弱,并且阻断MIF无效,但存在残余CXCR2抑制,表明涉及其它可诱导配体(图5c)。与利用TNF- $\alpha$ 刺激观察到的缺乏MIF的影响相比较,在Mif<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup>小鼠的动脉中,缺乏MIF使单核细胞聚集明显较少(与致动脉粥样硬化的Mif<sup>+/+</sup>Ldlr<sup>-/-</sup>小鼠相比较;图5d、e)。在无MIF的情况下,CXCR2没有明显作用。此外,阻断MIF也没有影响(图5d、e)。加载内源MIF,将使阻断CXCR2的抑制作用恢复(图5f)。

[0302] 为进一步证实在活体内MIF介导的单核细胞募集需要CXCR2的观点,对用野生型或I18rb<sup>-/-</sup>骨髓重建的嵌合野生型Mif<sup>+/+</sup>和Mif<sup>-/-</sup>小鼠的颈动脉执行活体显微镜检查(I18rb编码CXCR2;图5g、h)。用TNF- $\alpha$ 处理4小时后,与利用野生型骨髓重建的野生型小鼠相比较,在用野生型骨髓重建的Mif<sup>-/-</sup>小鼠中,经罗丹明G标记的白细胞的聚集较少。在嵌合野生型小鼠中,因骨髓中CXCR2缺乏引起的白细胞聚集减少明显高于嵌合Mif<sup>-/-</sup>小鼠(图5g、h)。

[0303] 实例7

[0304] 活体内MIF诱导的炎症依赖于CXCR2

[0305] 在活体内确证在致动脉粥样硬化或发炎性条件下CXCR2对于MIF介导的白细胞募集的重要性。患有原发性动脉粥样硬化的Mif<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup>小鼠相对于Mif<sup>+/+</sup>Ldlr<sup>-/-</sup>小鼠来说,

主动脉根内腔表面上单核细胞的粘附有所减少,而且这可通过损伤巨噬细胞含量的明显降低反映出来(图 6a)。提睾肌中微循环的活体显微镜检查揭示,将 MIF 注射到提睾肌附近引起(主要是 CD68<sup>+</sup>)白细胞粘附明显增加以及在毛细血管后静脉中的迁移,这会受到抗 CXCR2 抗体抑制(图 6b、c)。循环单核细胞计数不受影响。

[0306] 接下来,使用以野生型或 I18rb<sup>-/-</sup>骨髓重建的嵌合小鼠的 MIF 诱导的腹膜炎模型。在用野生型骨髓重建的小鼠中,腹膜内注射 MIF 于 4 小时后引起嗜中性粒细胞募集,这在用 I18rb<sup>-/-</sup>骨髓重建的小鼠中消除(图 6d)。总的来说,这些结果表明,在致动脉粥样硬化和炎性条件下,MIF 在活体内经由 CXCR2 触发白细胞募集。

#### [0307] 靶向 MIF 引起动脉粥样硬化消退

[0308] 如本文所述,MIF 经由 CXCR2 和 CXCR4 起作用。鉴于 MIF 和 CXCR2 于动脉粥样硬化病变发展中的作用,故研究靶向 MIF 而非 CXCL1 或 CXCL12 作为一种改良晚期病变以及其 CXCR2<sup>+</sup> 单核细胞和 CXCR4<sup>+</sup>T 细胞含量的方法。用抗 MIF、CXCL1 或 CXCL12 的中和抗体处理已接收高脂肪饮食 12 周并出现严重动脉粥样硬化病变的 Apoe<sup>-/-</sup> 小鼠,持续 4 周。使用免疫印迹和粘附分析验证 MIF 抗体的特异性。这些分析证实,MIF 抗体阻断 MIF 诱导的而非 CXCL1- 或 CXCL12 诱导的阻滞(图 10)。

[0309] 与 12 周时的基线水平相比较,阻断 MIF 而非 CXCL1 或 CXCL12 在 16 周时引起主动脉根的斑块面积减小以及显著(P < 0.05) 斑块消退。此外,如由巨噬细胞和 CD3<sup>+</sup>T 细胞含量较低所证实,阻断 MIF 而非 CXCL1 或 CXCL12 与 16 周时炎性斑块表型减少有关(图 6g、h)。因此,通过靶向 MIF 以及抑制 CXCR2 和 CXCR4 活化,将实现晚期动脉粥样硬化病变的治疗性消退和稳定。在一些实施例中,本发明包含一种减少有需要个体体内斑块面积的方法,其包含对所述个体投予一种或多种药剂,所述药剂抑制(i) MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合,和 / 或(ii) MIF 对 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的活化;或(iii) (i) 和 (ii) 的任何组合。

#### [0310] 实例 8

##### [0311] 干扰 CXCR4 使动脉粥样硬化恶化

[0312] 为了研究 CXCR4 于动脉粥样硬化中的作用,经由微型渗透泵,利用 CXCR4 拮抗剂 AMD3465 或媒介(对照组)连续处理喂食致动脉粥样硬化饮食的 Apoe<sup>-/-</sup> 小鼠,并在 12 周后分析动脉粥样硬化斑块的形成。与对照组相比较,在经油红 O 染色的主动脉根切片(图 9a)中和对应(en face)制备的胸腹主动脉(图 9b)中,AMD3465 处理明显加剧病变形成。此外,用 AMD3465 连续处理 Apoe<sup>-/-</sup> 小鼠还在 2 天内诱导明显的末梢血白细胞增多,这种情形在整个研究期间始终存在,且循环嗜中性粒细胞的相对数量增多,而这在疾病发展期间将进一步增加(图 9c)。

#### [0313] 实例 9

##### [0314] 在小鼠多发性硬化症模型中阻断 Th-17 发育

[0315] 在腹膜内注射前一天以及在腹膜内注射 5mg/kg 以下各物后每周,预处理 8 周龄到 12 周龄的 C57BL/6 小鼠(从美国缅因州巴港的杰克逊实验室(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Main, USA)获得):对照抗体(第 1 组);拮抗性抗小鼠 MIF 抗体(第 2 组);阻断 MIF 结合 CXCR2 和 / 或对 CXCR2 的活化的抗 CXCR2 抗体(第 3 组);阻断 MIF 结合 CXCR4 和 / 或对 CXCR4 的活化的抗 CXCR4 抗体(第 4 组);或阻断 MIF 结合 CXCR4 和 / 或对 CXCR4 的活化的抗 CXCR4 抗体和阻断 MIF 结合 CXCR2 和 / 或对 CXCR2 的活化的抗 CXCR2 抗体(第

5 组)。次日(实验当天),通过在小鼠( $n = 30$  只/组)背部两次皮下注射总计  $200 \mu\text{l}$  MOG35-55 肽(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK;巴亨公司(Bachem AG),瑞士布本多夫(Bubendorf, Switzerland))于 CFA 中的乳液,对小鼠进行免疫。肽和结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)的最终浓度分别为每只小鼠  $150 \mu\text{g}$  和每只小鼠  $1\text{mg}$ 。实验当天和第 2 天,腹膜内注射 PTX( $400\text{ng}$ ;李斯特生物实验室(LIST Biological Laboratories Inc.),美国加利福尼亚州坎贝尔(Campbell, California, USA))。每天根据上文所述的 0-6 个等级测量麻痹,由此监测疾病。使用单向 ANOVA,比较各组之间的平均最大疾病评分。

[0316] 比较第 2 组小鼠与第 1 组之间的麻痹测量值,以确定拮抗性抗 MIF 抗体用于治疗或预防 EAE 的功效。将第 5 组小鼠与第 1 组小鼠比较,以确定阻断 MIF 结合 CXCR2 和 CXCR4 和 / 或对 CXCR2 和 CXCR4 的活化的药剂用于治疗或预防 EAE 的功效。将第 5 组小鼠与第 3 组和第 4 组小鼠相比较,以确定阻断 MIF 结合 CXCR2 和 CXCR4 和 / 或对 CXCR2 和 CXCR4 的活化的作用相对于单独阻断 CXCR2 或 CXCR4 的作用。

[0317] 在免疫后第 7 到第 11 天,从引流淋巴结和脾制备混合 T 细胞。在添加(再刺激)或不添加各种浓度 MOG 肽(氨基酸 35-55)的完全培养基中培养活细胞( $3.75 \times 10^6$  个/ml)。72 小时后收集活化细胞的上清液,并利用 ELISA(BD 华瑞康公司(BD Pharmingen))测量 TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-23 和 IL-17。高 IL-17 和 IL-23 含量指示 Th-17 细胞发育和 Th-17 介导的疾病表型的发生。通过用 MIF 阻断抗体处理小鼠或细胞培养物(第 2 组),或通过阻断 MIF 结合 CXCR2 和 CXCR4 和 / 或对 CXCR2 和 CXCR4 的活化(第 5 组)来抑制这些细胞因子,将说明 MIF 在 Th-17 细胞发育和 Th-17 介导的炎症性疾病(即多发性硬化症)发展中的关键调控作用。

[0318] 对于细胞内细胞因子染色,用肽抗原刺激从经免疫小鼠得到的脾和淋巴结细胞 24 小时,并在最后 5 小时添加 GolgiPlug(BD 华瑞康公司),或添加 GolgiPlug 加  $500\text{ng/ml}$  离子霉素(ionomycin)和  $50\text{ng/ml}$  佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA;西格玛-阿尔德里奇公司(Sigma-Aldrich)),保持 5 小时。对于细胞染色,根据制造商的方案,用 Cytofix/Cytoperm Plus 试剂盒(BD 华瑞康公司)预渗透细胞。利用流式细胞术,分析门控 CD4+T 细胞中细胞内 IL-17、IL-23 或细胞表面 IL23 受体(IL23R)的存在。CD4+、IL-17+ 双阳性 T 细胞的存在表明驱动疾病发展的 Th-17 表型的出现。此外,上调 CD4+、IL-17 双阳性 T 细胞上的 IL-23R 将支持有关 Th-17 表型的证据。CD4+、IL-17 双阳性细胞中或任何白细胞中大量细胞内 IL-23 的存在将进一步支持有关 IL-23 驱动 Th-17 细胞增殖和 / 或维持的证据。根据上述实验中所描述的,如借助于较低 IL-17、IL-23R 或 IL-23 含量所确定,用 MIF 阻断剂(第 2 组小鼠)或阻断 MIF 结合 CXCR2 和 CXCR4/ 或对 CXCR2 和 CXCR4 活化的药剂(第 5 组小鼠)处理小鼠可抑制 Th-17 细胞发育,表明 MIF 在驱动 Th-17 介导的自体免疫性疾病发展中起主要作用。在小鼠中通过阻断 MIF 使 Th-17 细胞发育受抑制并使 EAE 发展受抑制,表明抑制 (i) MIF 与 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的结合和 / 或 (ii) MIF 对 CXCR2 和 / 或 CXCR4 的活化;或 (iii) (i) 和 (ii) 的任何组合的药剂用于治疗 and / 或预防 Th-17 介导的自体免疫性疾病(例如多发性硬化症)的有益效用。

[0319] 实例 10

[0320] 有关治疗纯合家族性高胆固醇血症的人类临床试验

[0321] 研究目的:本研究的主要目的是,评估抗 MIF 抗体 1 (AB1) 在患有纯合家族性高胆

固醇血症 (HoFH) 的个体中的功效。AB1 特异性结合于 MIF 肽序列 DQLMAFGGSSEPCALCSL。

[0322] 方法

[0323] 研究设计:本研究是利用 AB1 在  $\geq 18$  岁的患有 HoFH 的男性和女性个体中进行的多中心、开放标记、单组研究。在初始筛选后,符合条件的个体进入为期 4 周的筛选期,其由 2 次随访(实验前 4 周和前 1 周)组成,在此期间,停止所有降脂药(胆汁酸螯合剂和胆固醇吸收抑制剂除外),并根据国家胆固醇教育计划(National Cholesterol Education Program, NCEP)成人治疗报告(Adult Treatment Panel, ATP-III)临床原则或相当的内容,起始治疗生活方式改变的咨询(therapeutic lifestyle change counseling, TLC)。已经历采成分血的个体继续其治疗方案,在研究期间保持一致的条件和时间间隔。第 3 次随访(第 0 周)时,测定基线功效/安全性值,并每日一次(QD)用 AB1 的初始剂量开始个体治疗。治疗频率为每周一次,持续 12 周。研究随访的时间是(适合时)根据临随访程序之前进行的个体的采成分血治疗来制定。当采成分血治疗之间的时间间隔与研究药物治疗期不重合时,使个体与药物治疗期保持一致,直到下一次预定的采成分血时间,以及直到时间间隔回到最初的时间长度。功效测量是在前一次采成分血后至少 2 周以及恰在预定研究随访时间的采成分血程序之前进行。

[0324] 参与人员数量:介于 30 位与 50 位个体之间。

[0325] 纳入的诊断和主要标准:筛选满足以下条件的 18 岁或 18 岁以上的男性和女性参与研究:根据世界卫生组织原则确定具有家族性高胆固醇血症(FH)纯合子,且对于超过 20 岁的个体,血清禁食三酸甘油酯(TG)  $\leq 400\text{mg/dL}$  ( $4.52\text{mmol/L}$ ) 以及对于 18 到 20 岁的个体, TG 为  $200\text{mg/dL}$  ( $2.26\text{mmol/L}$ )。

[0326] 研究处理:将 AB1 的初次投药以  $50\text{mg/hr}$  速率输注到受检者体内。在无输注毒性的情况下,每 30 分钟以  $50\text{mg/hr}$  增量增加输注速率,直到达到  $400\text{mg/hr}$  的最大速率。此后每周,以  $100\text{mg/hr}$  速率输注 AB1。在无输注毒性的情况下,每 30 分钟间隔以  $100\text{mg/hr}$  增量增加速率,直到达到  $400\text{mg/hr}$  的最大速率。

[0327] 功效评估:主要终点是到第 3 周、第 6 周和第 12 周时 HDL-C 和 LDL-C 相对于基线的平均变化百分比。在每次研究随访时,获取包括 HDL-C 和 LDL-C 在内的脂质分布。

[0328] 实例 11

[0329] 有关治疗腹部主动脉瘤(AAA)的动物模型

[0330] 如下制备动物模型:对成年雄性大鼠输注弹性蛋白酶,历时 2 小时。输注后 12 到 24 小时执行组织学分析,以确定分段而无组织的弹性蛋白的存在。每日执行超声波处理,以鉴别和监测主动脉扩张的面积。

[0331] 投予弹性蛋白酶后 2 周,投予大鼠 AB1(结合于 MIF 肽序列 DQLMAFGGSSEPCALCSL)。将 AB1 的初次投药以  $0.5\text{mg/hr}$  速率输注到受检者体内。在无输注毒性的情况下,每 30 分钟以  $0.5\text{mg/hr}$  增量增加输注速率,直到达到  $2.0\text{mg/hr}$  的最大速率。此后每周,以  $1.0\text{mg/hr}$  速率输注 AB1。在无输注毒性的情况下,以 30 分钟间隔以  $1.0\text{mg/hr}$  增量增加速率,直到达到  $4.0\text{mg/hr}$  的最大速率。

[0332] 功效评估:主要终点为第 3、第 6 和第 12 周时 AAA 尺寸(即主动脉直径)相对于基线的平均变化百分比。

[0333] 实例 12

[0334] 有关治疗腹部主动脉瘤 (AAA) 的人类临床试验

[0335] 研究目的:本研究的主要目的是,评估抗 MIF 抗体 1 (AB1) 在患有早期 AAA 的个体中的功效。AB1 特异性结合于 MIF 肽序列 DQLMAFGGSSEPCALCSL。

[0336] 方法

[0337] 研究设计:本研究是利用 AB1 在  $\geq 18$  岁的患有早期 AAA 的男性和女性个体中进行的多中心、开放标记、单组研究。利用连续截面成像 (serial cross-sectional imaging) 确认早期 AAA 的存在。第 0 周,测定基线功效 / 安全性值,并用 AB1 初始剂量开始个体的治疗。每周一次对受检者授予 AB1,持续 12 周。

[0338] 参与人员数量:介于 30 位与 50 位个体之间。

[0339] 研究处理:将 AB1 的初次投药以 50mg/hr 速率输注到受检者体内。在无输注毒性的情况下,每 30 分钟以 50mg/hr 增量增加输注速率,直到达到 400mg/hr 的最大速率。此后每周,以 100mg/hr 速率输注 AB1。在无输注毒性的情况下,以 30 分钟间隔以 100mg/hr 增量增加速率,直到达到 400mg/hr 的最大速率。

[0340] 功效评估:主要终点为第 3、第 6 和第 12 周时 AAA 尺寸 (即主动脉直径) 相对于基线的平均变化百分比。

[0341] 实例 13

[0342] 产生多克隆抗 MIF 抗体

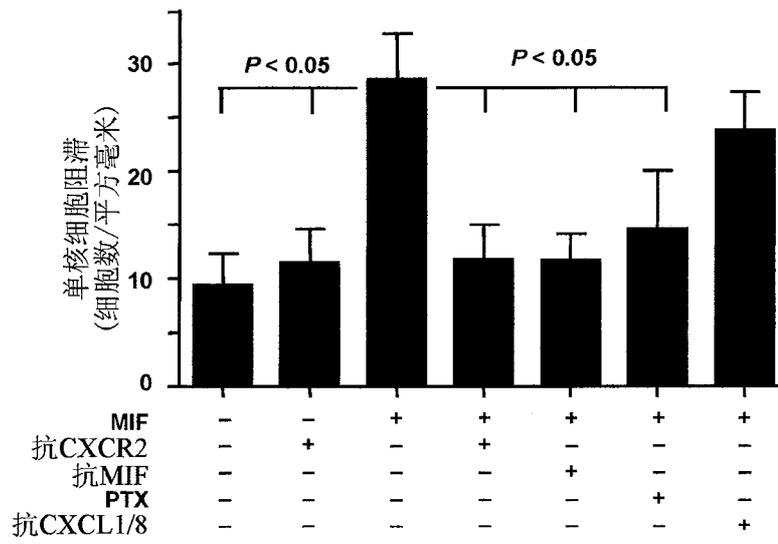
[0343] 产生针对以下肽序列的抗体:PRASVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSS EPCALCSL。新西兰白兔 (New Zealand White rabbit) 作为用于产生所述抗体的宿主动物。

[0344] 经由 GMBS 接合法产生肽 BSA 接合物。随后,使用弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant) 将所述接合物调配成溶液。

[0345] 第 0 天,对白兔进行抽血 (25mL)。随后用 0.2mg 抗原性组合物对白兔进行免疫。第 21 天,再授予白兔 0.1mg 剂量。第 32 天,对白兔进行抽血 (25mL)。借助于蛋白免疫印迹法,通过将第 0 天获得的白兔血清的相互作用与第 32 天获得的白兔血清的相互作用相比较,来确定所产生的抗体针对 MIF 单体或 MIF 三聚体的特异性抗原的相互作用。

[0346] 尽管本文中已经显示和描述本发明的优选实施例,但所属领域的技术人员将易于了解,这些实施例只是以实例的方式提供。在不偏离本发明的情况下,所属领域的技术人员现将进行多种变更、改变和取代。应了解,本文所述本发明各实施例的各种替代方案都可用于实施本发明。意欲本发明的范围是由以下权利要求书界定,并由此涵盖这些权利要求和其等效内容范围内的方法和结构。

**a**



**b**

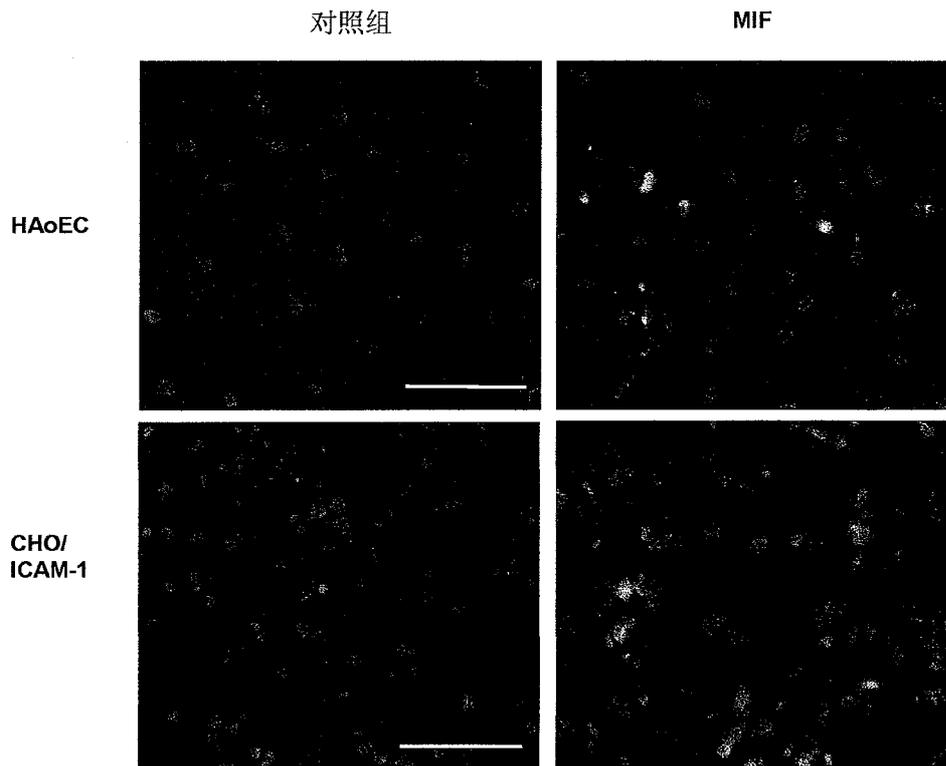
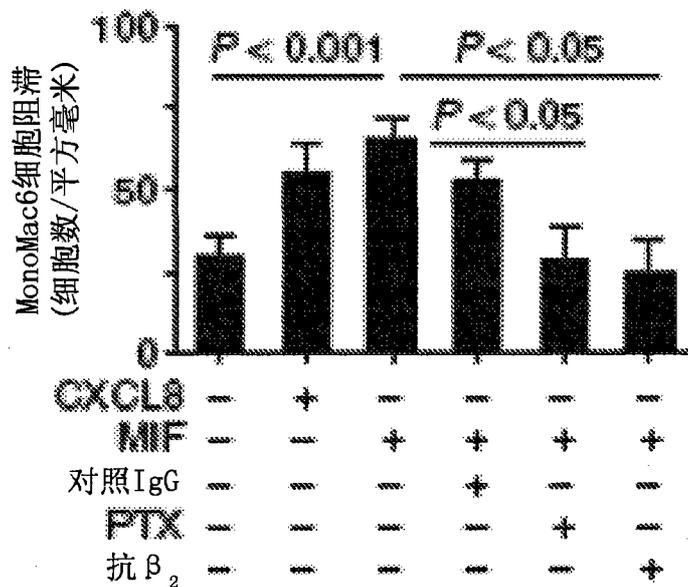


图 1

**c**



**d**

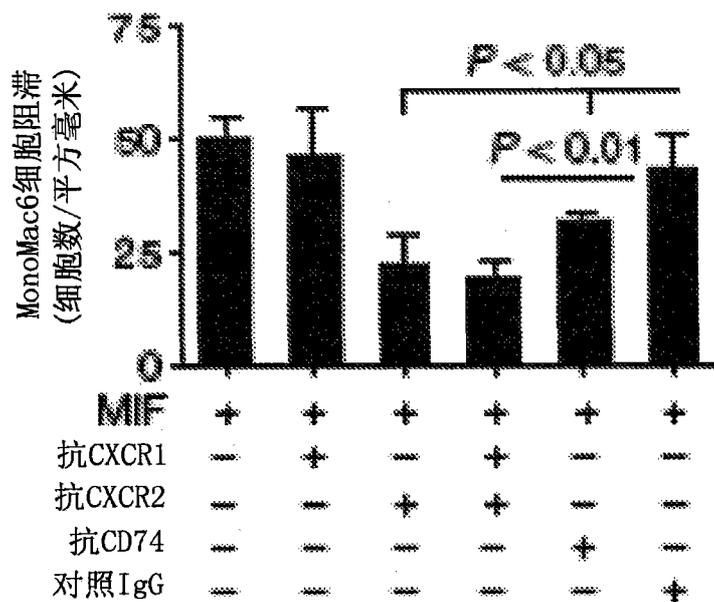
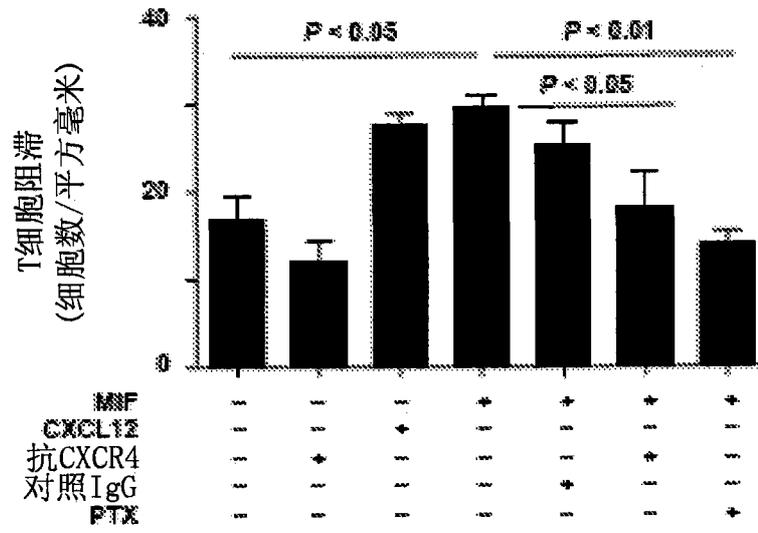


图 1 续

g



h

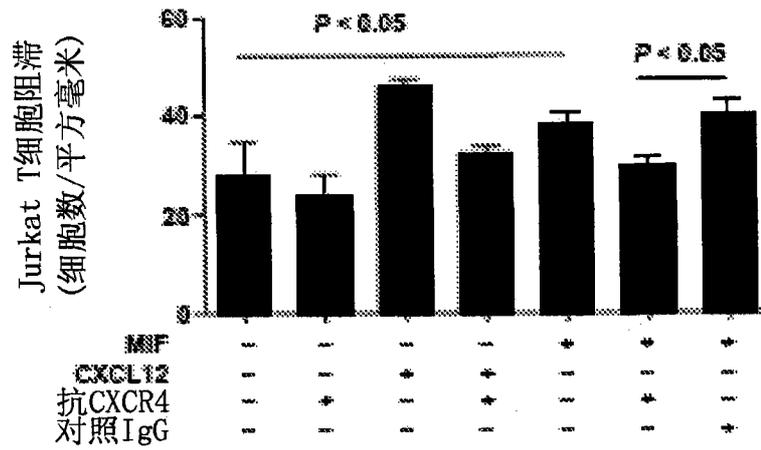


图 1 续

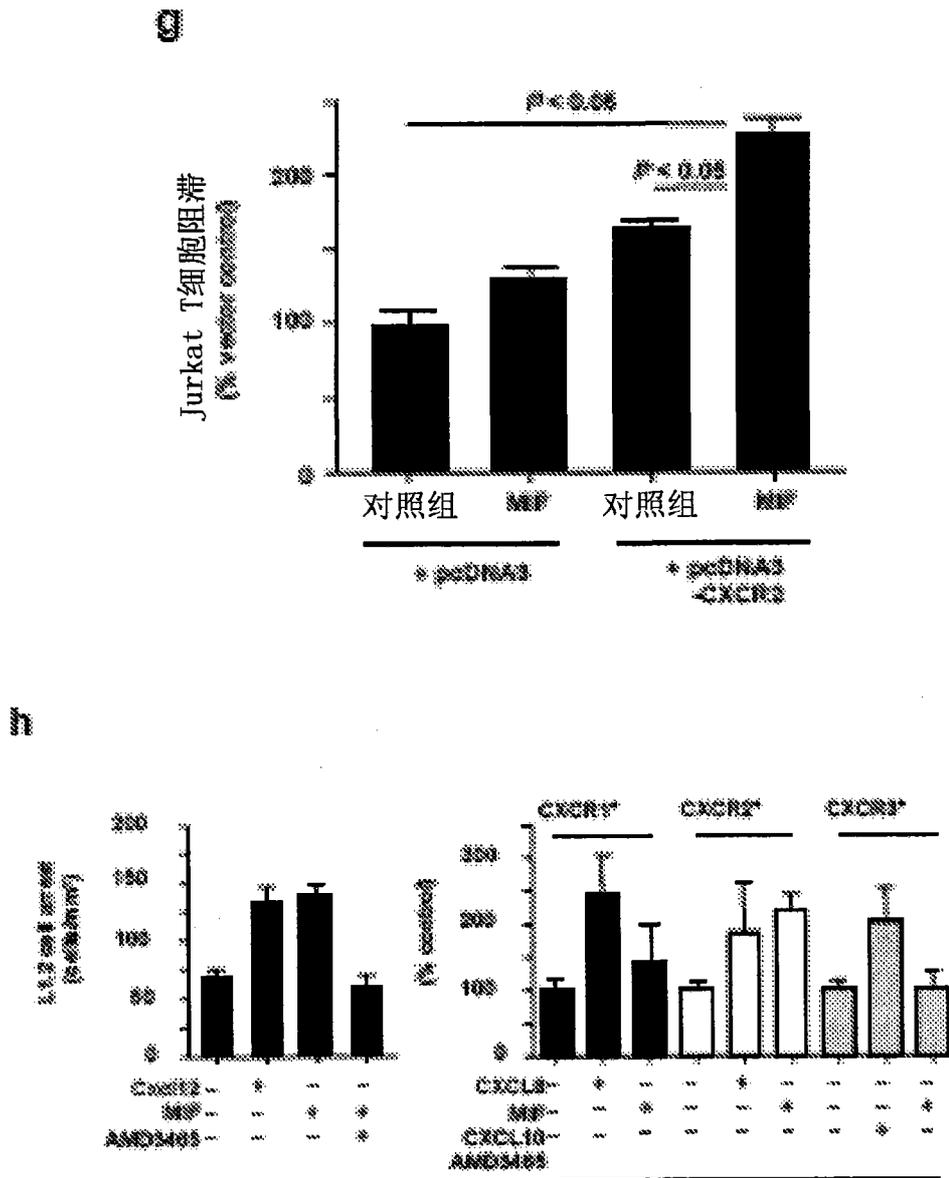


图 1 续

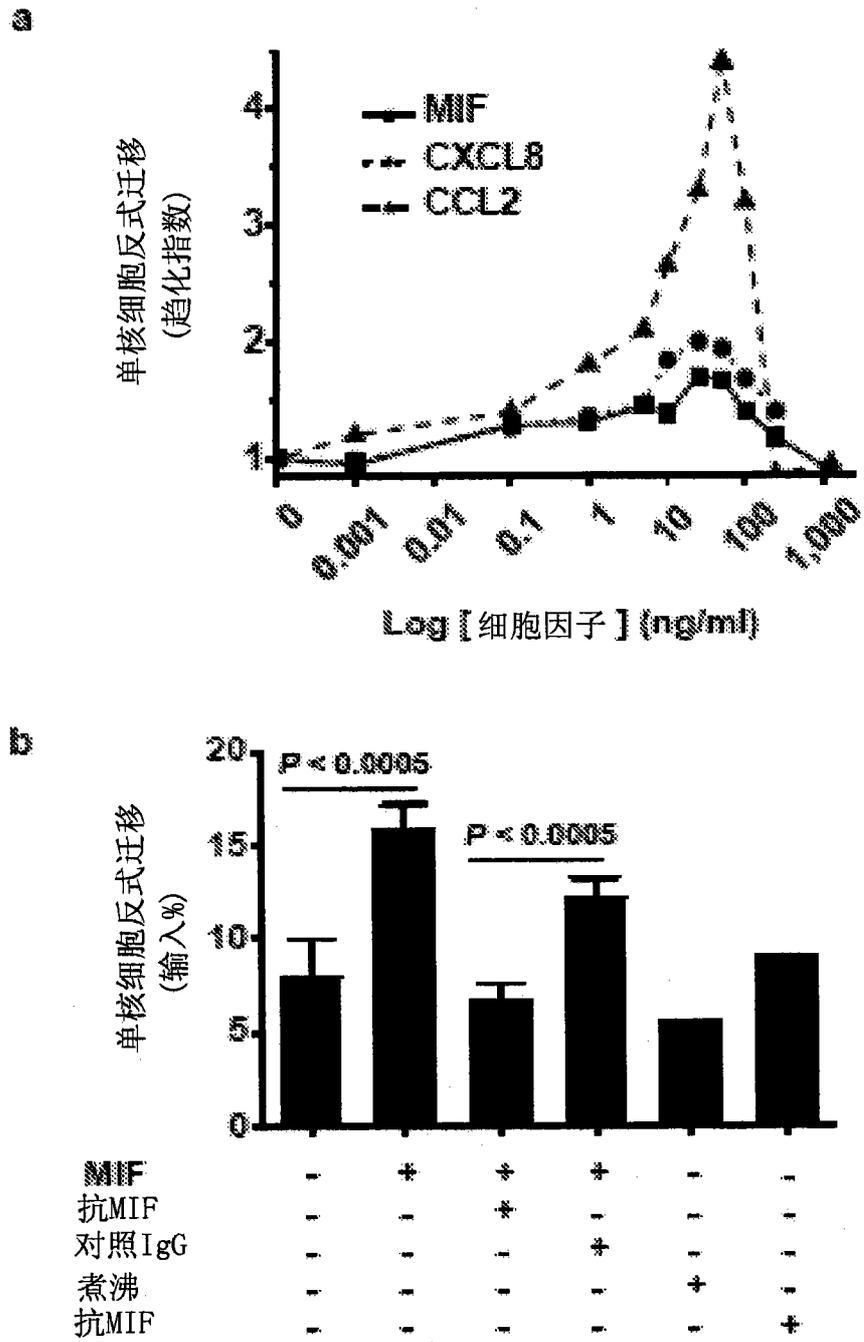
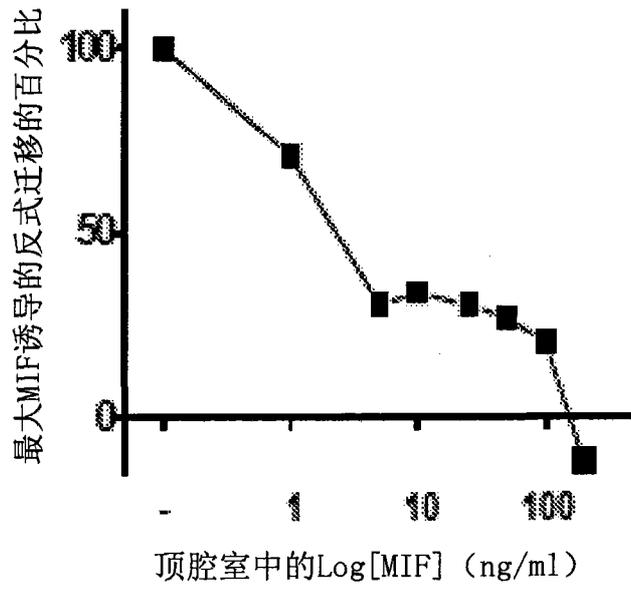


图 2

c



d

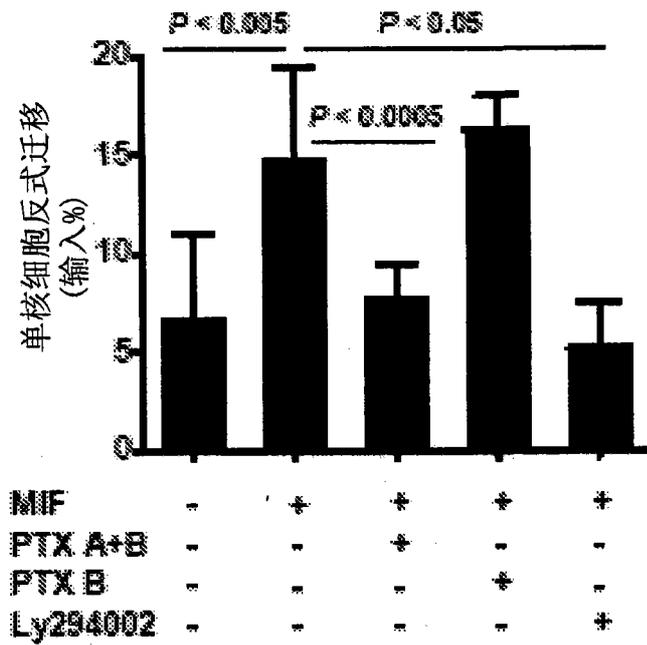


图 2 续

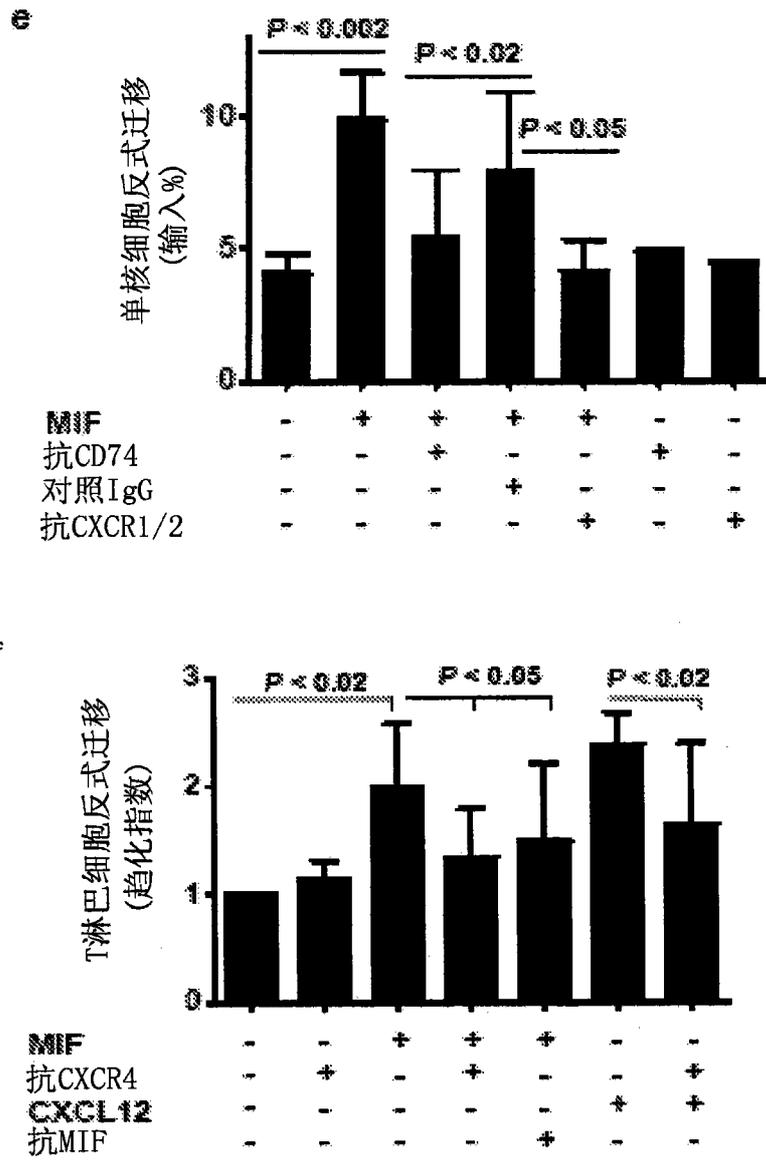


图 2 续

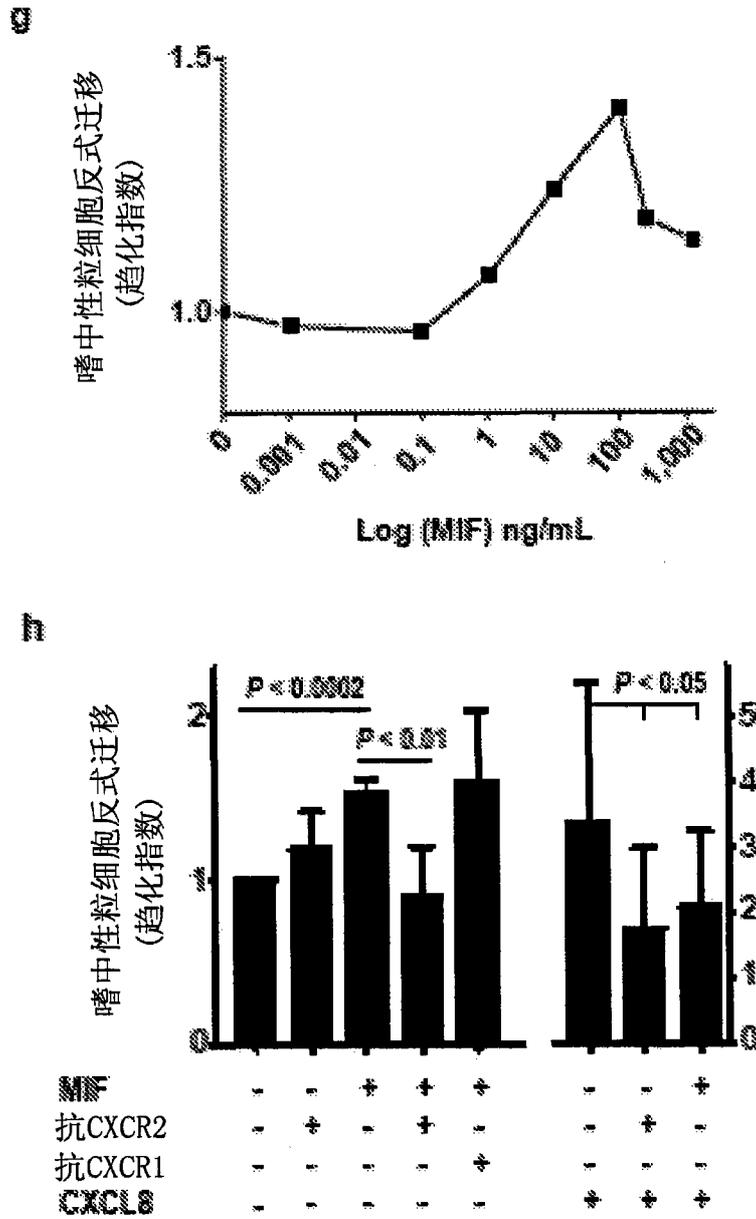


图 2 续

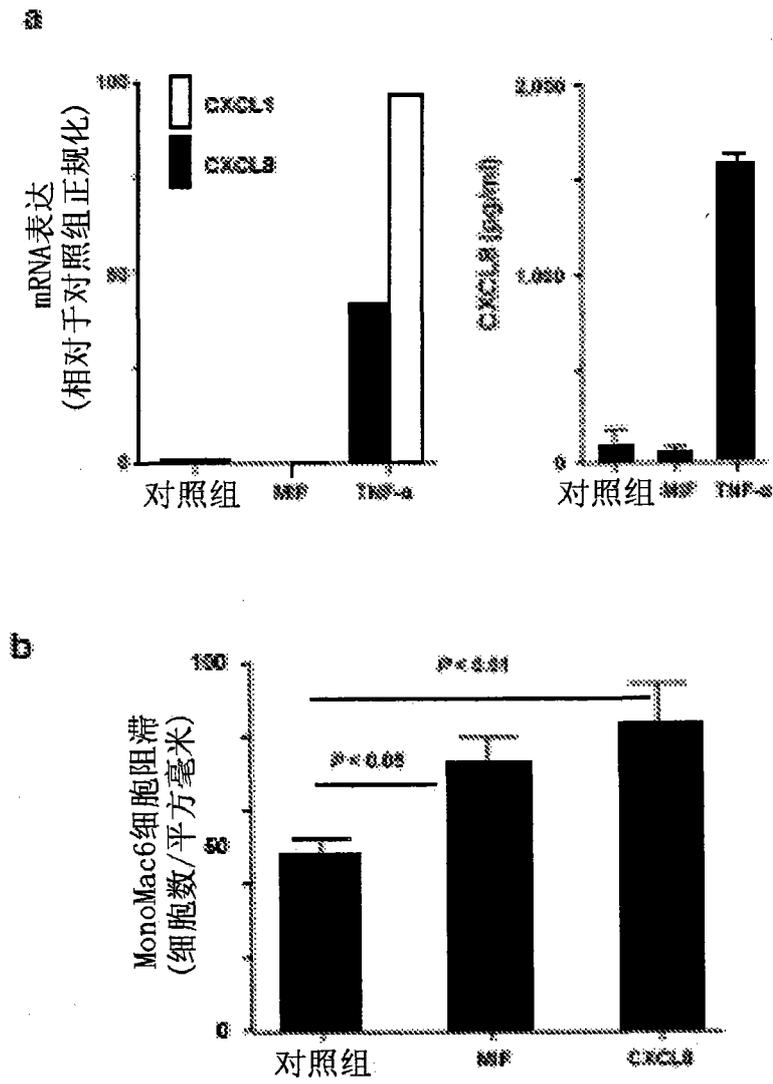


图 3

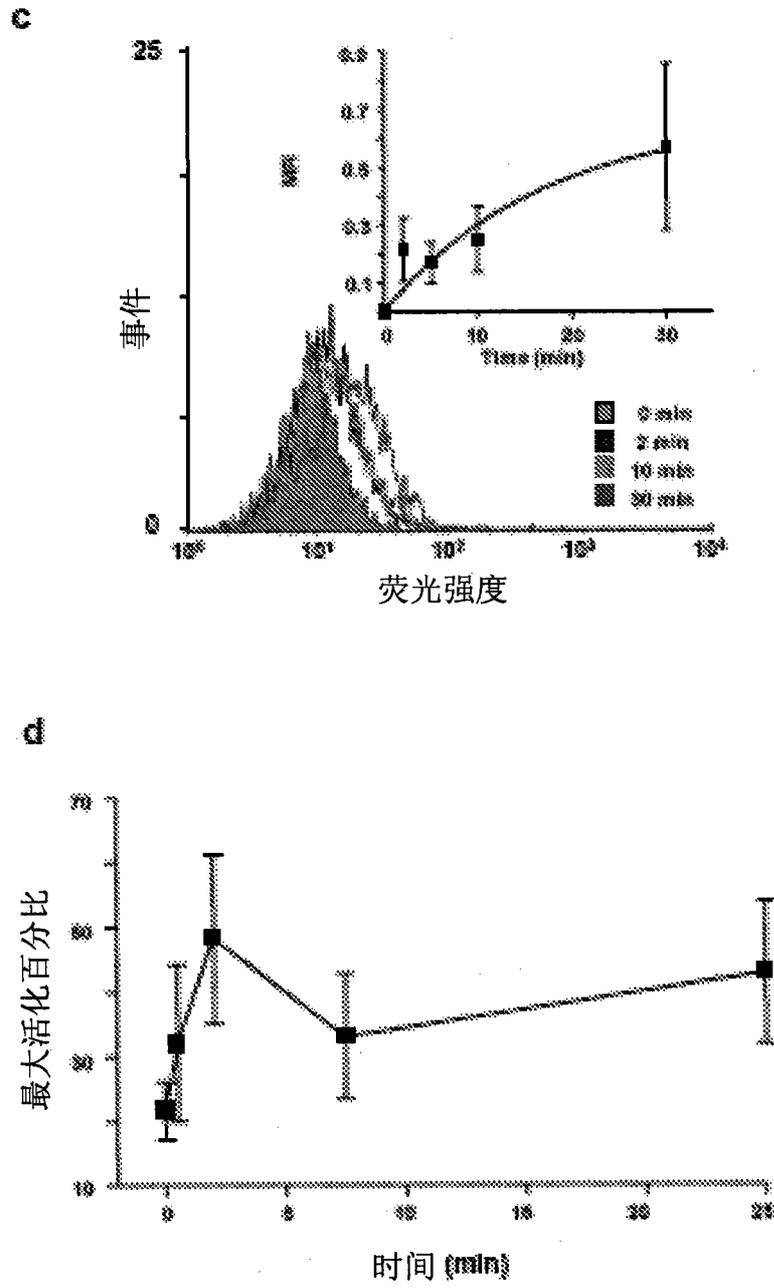


图 3 续

c

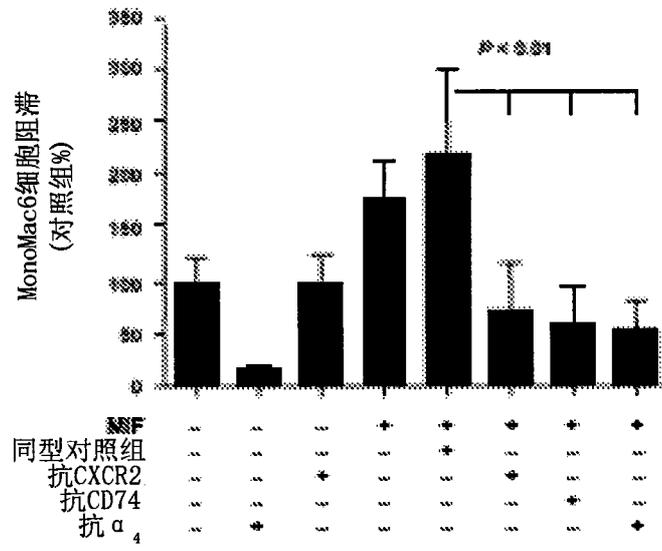


图 3 续

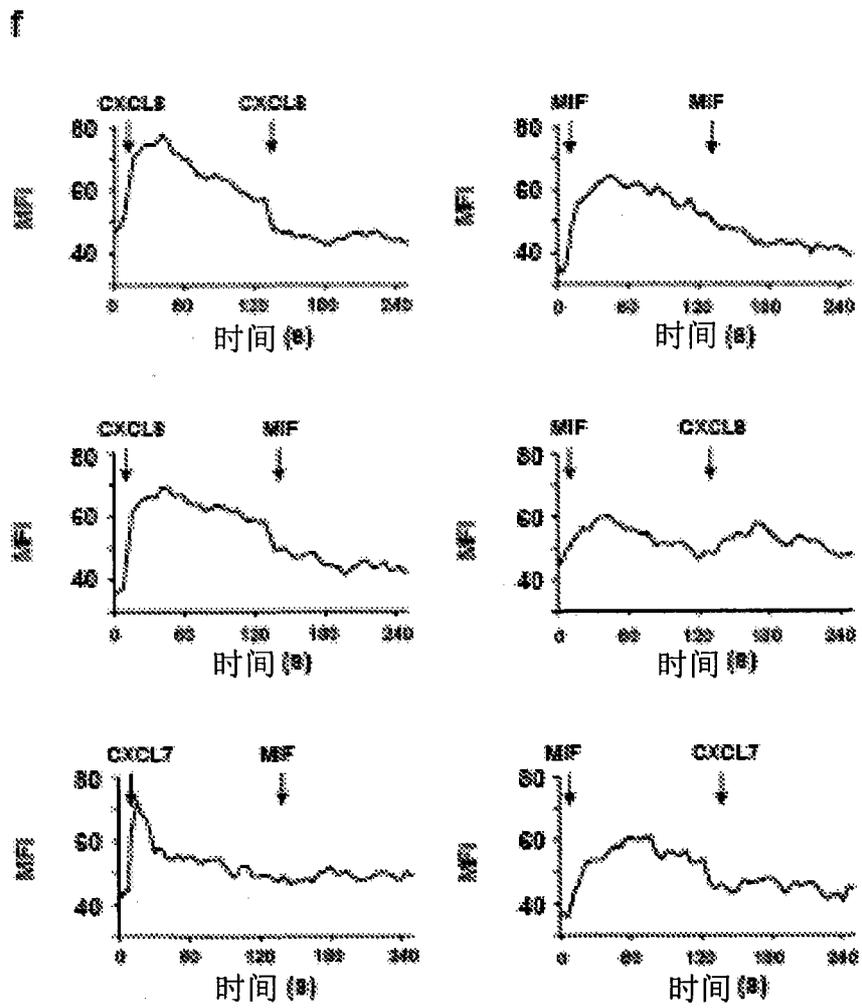


图 3 续

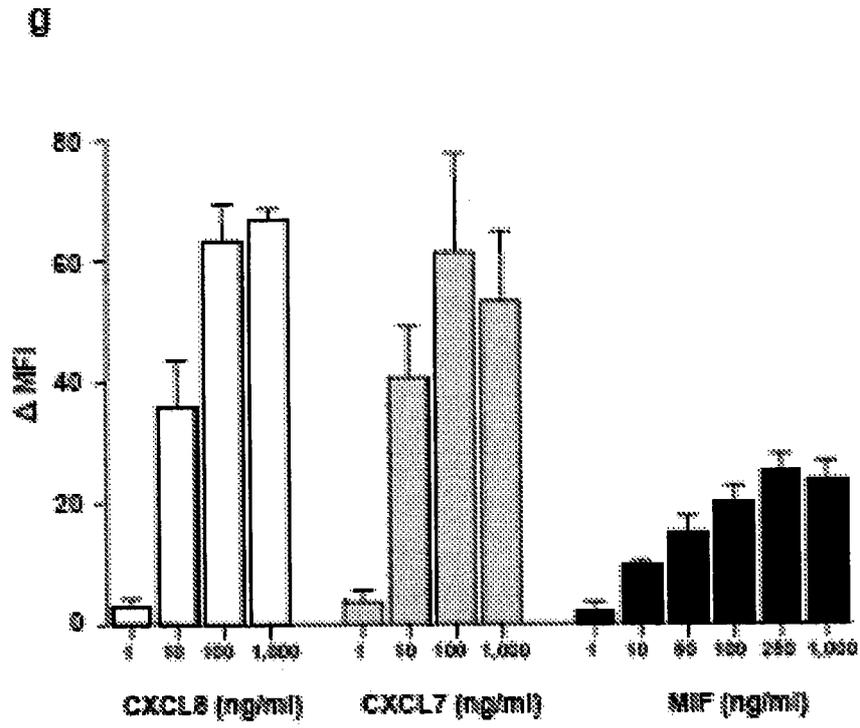


图3续

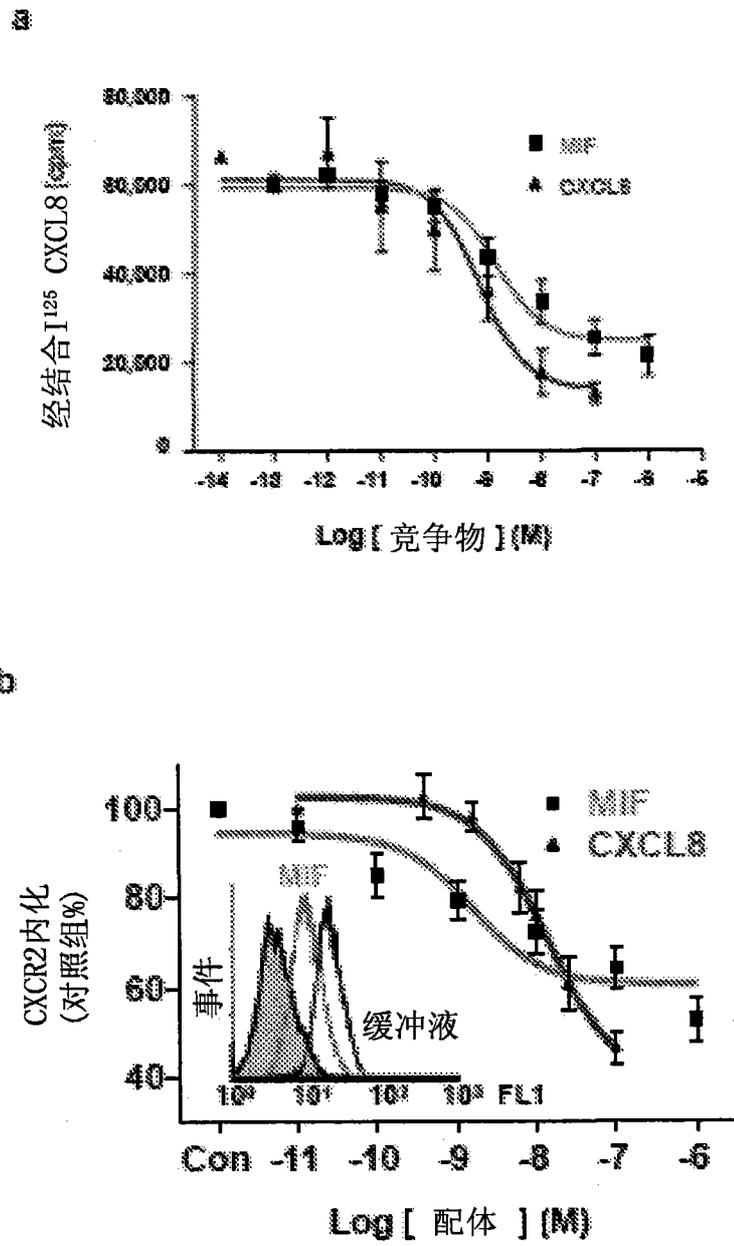
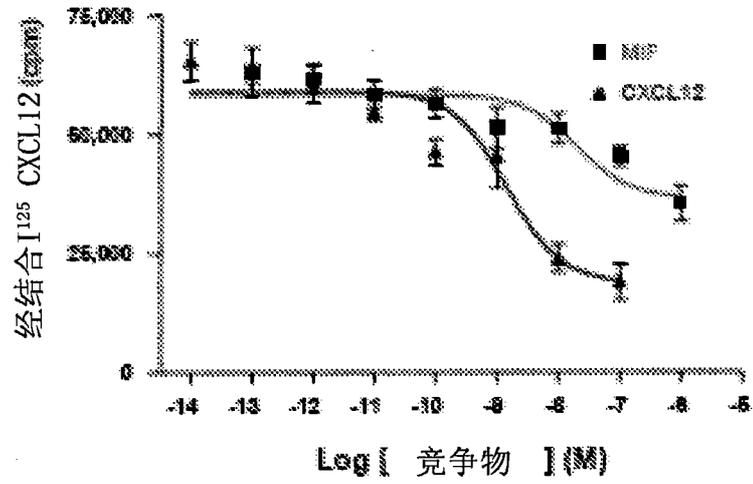


图 4

c



d

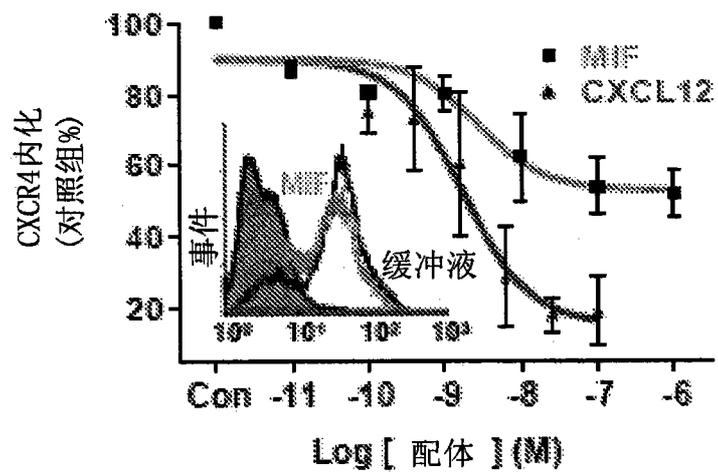
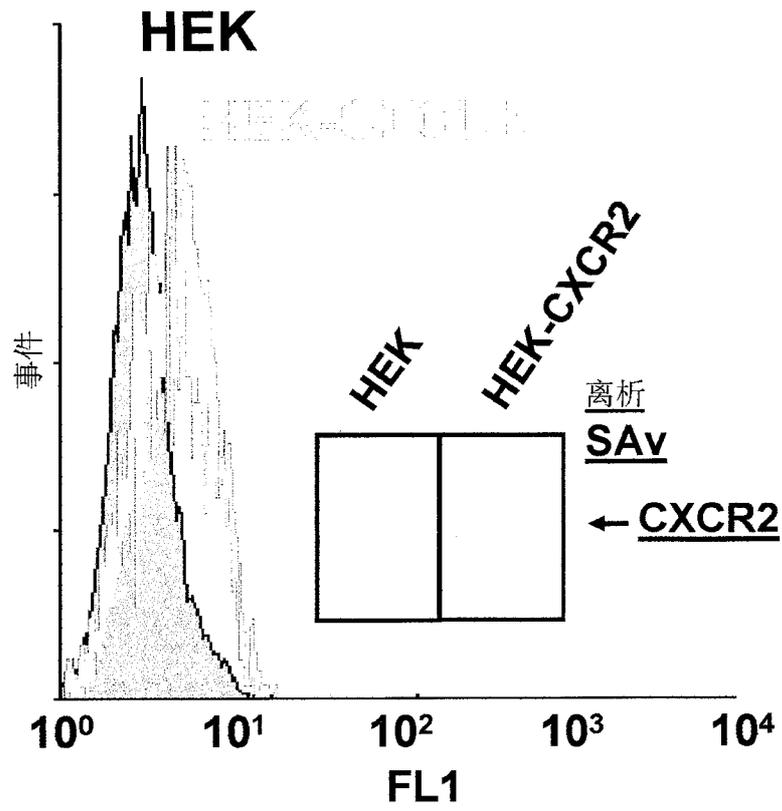


图 4 续

e



f

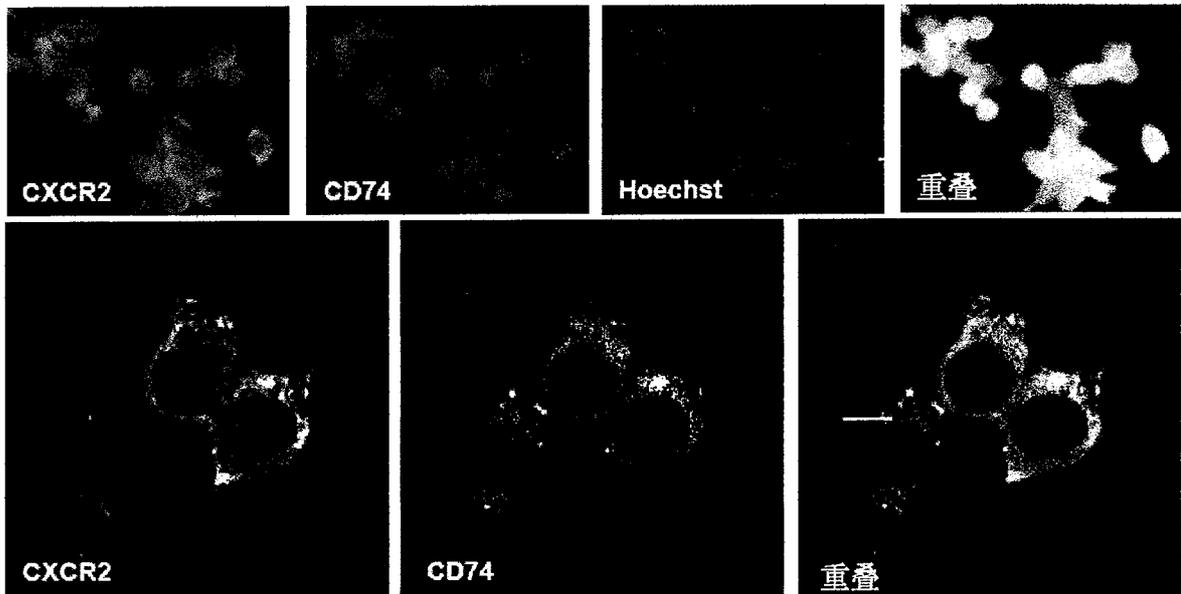
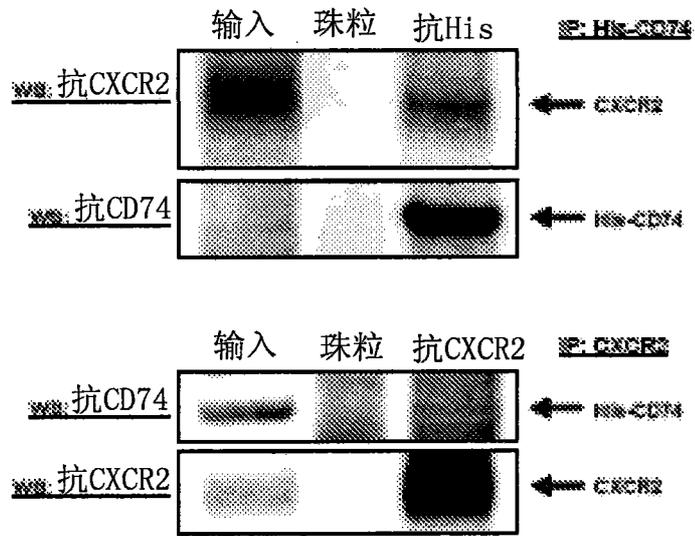


图 4 续

g



h

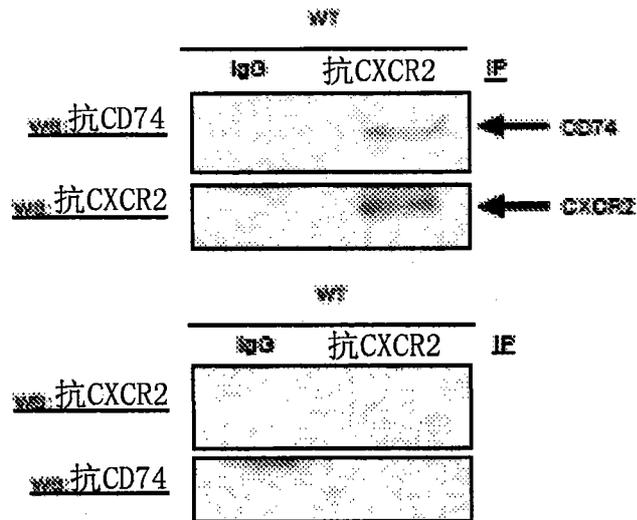


图 4 续

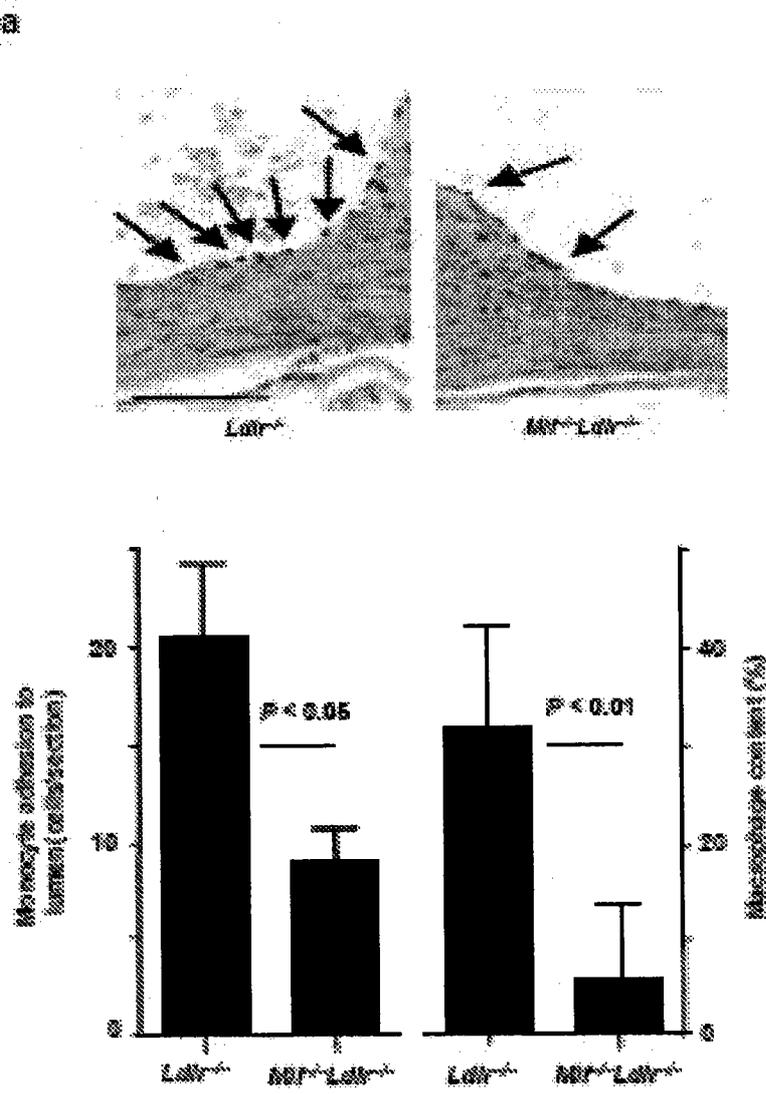
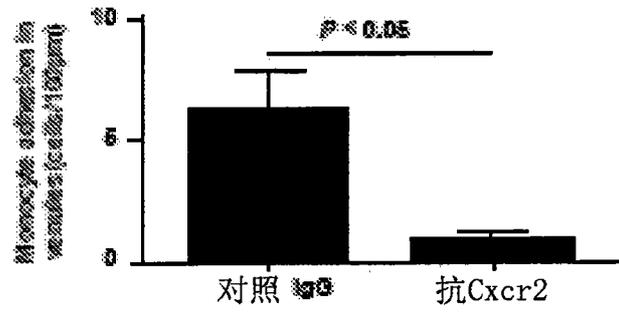


图 5

**b**



**c**

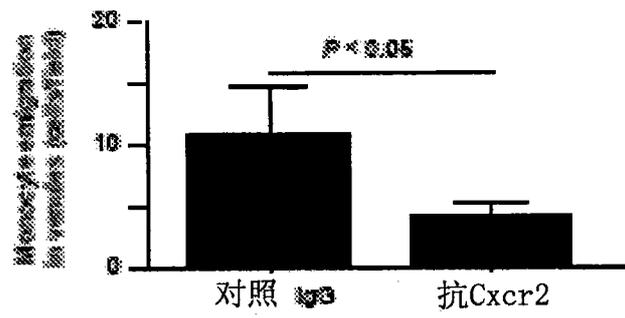


图 5 续

d

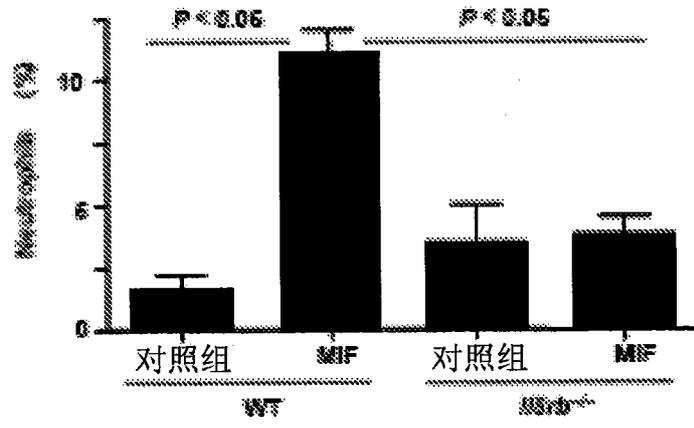


图 5 续

e

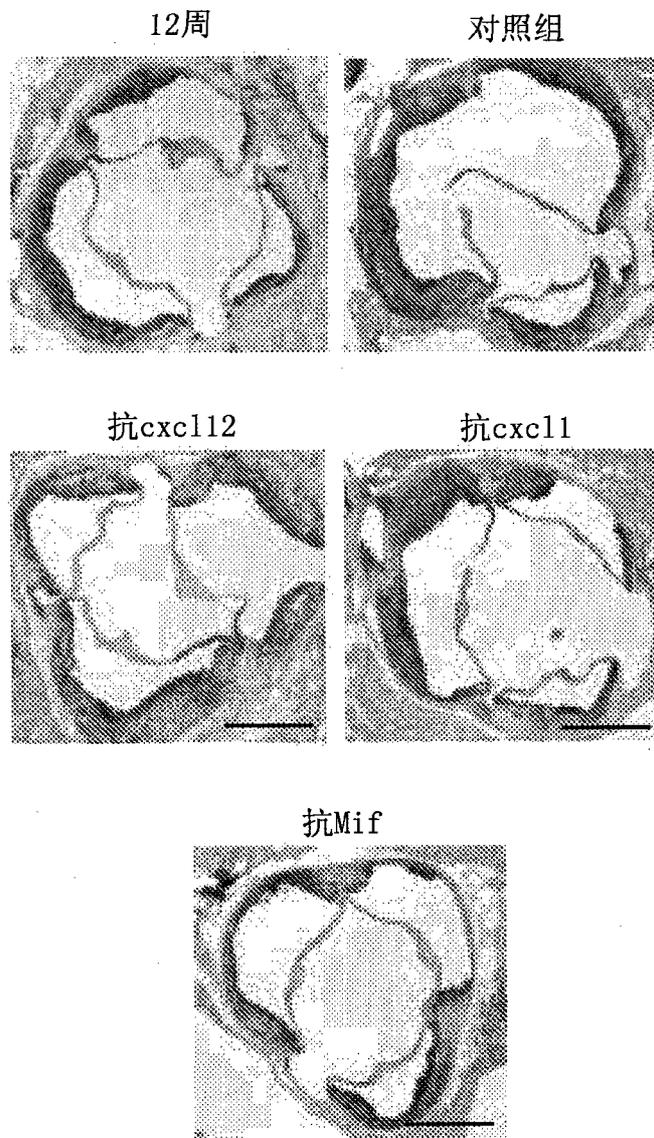
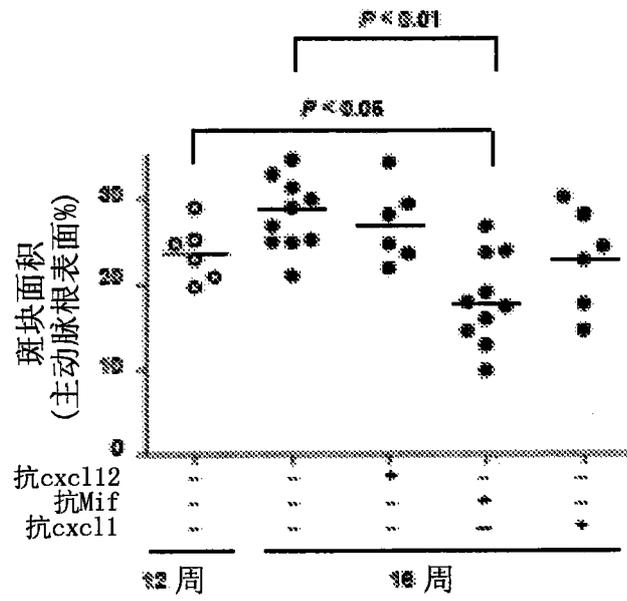


图5续

f



g

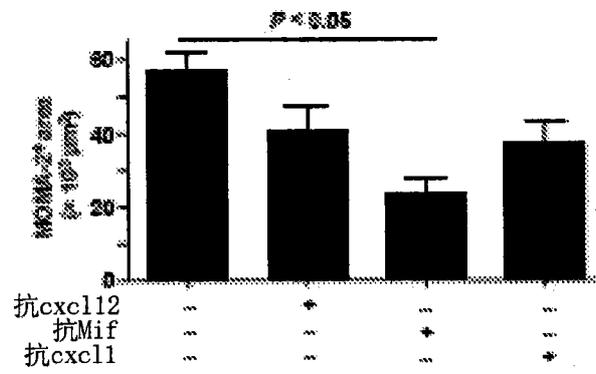


图5续

h

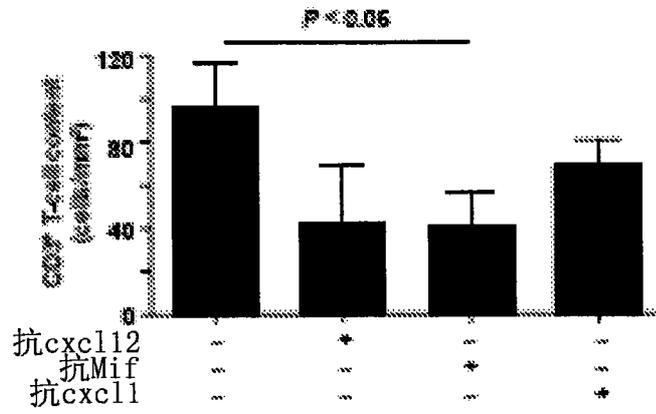


图 5 续

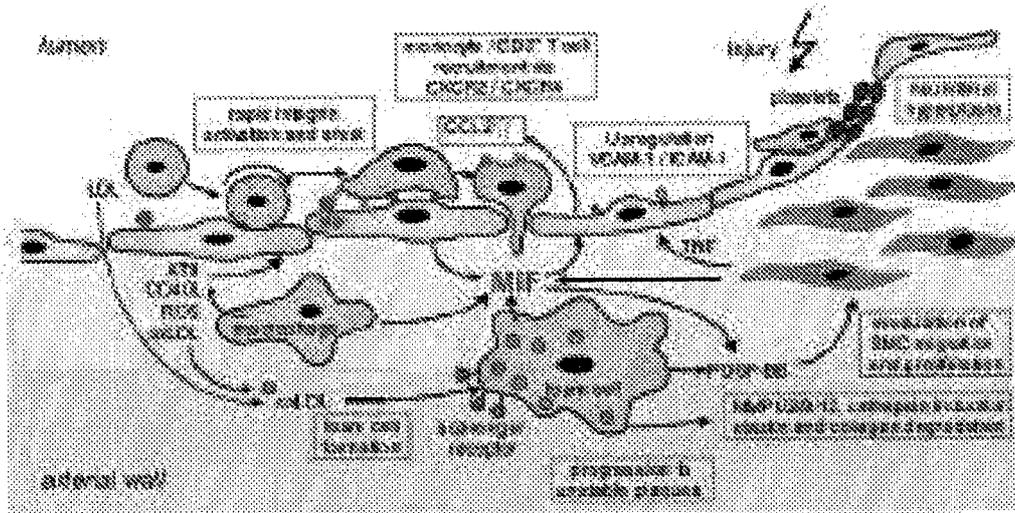


图 6

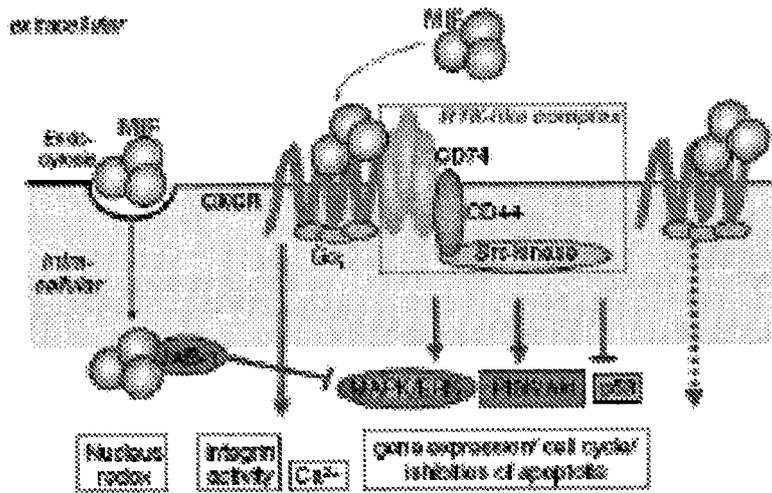


图 7

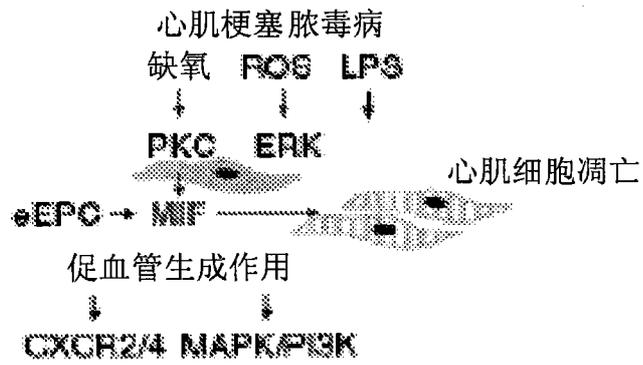
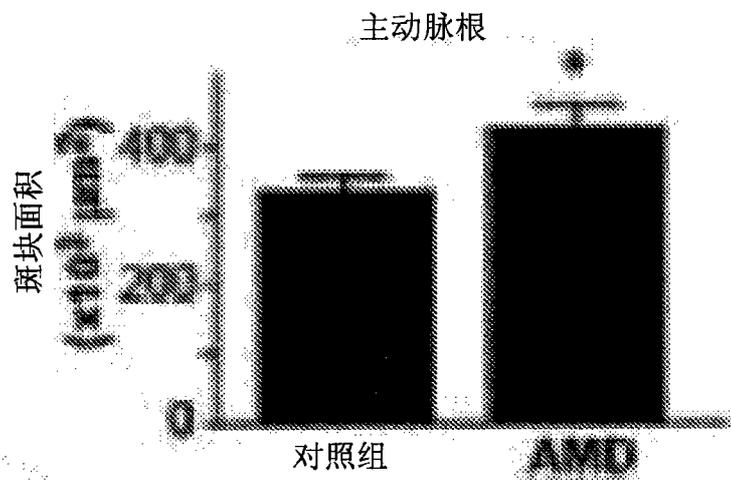


图 8

**A**



**B**

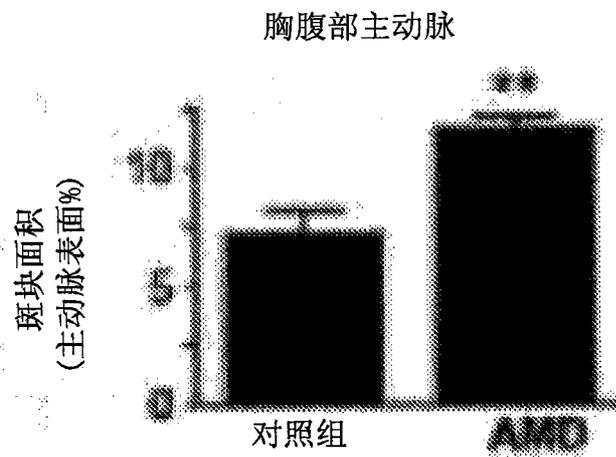


图 9

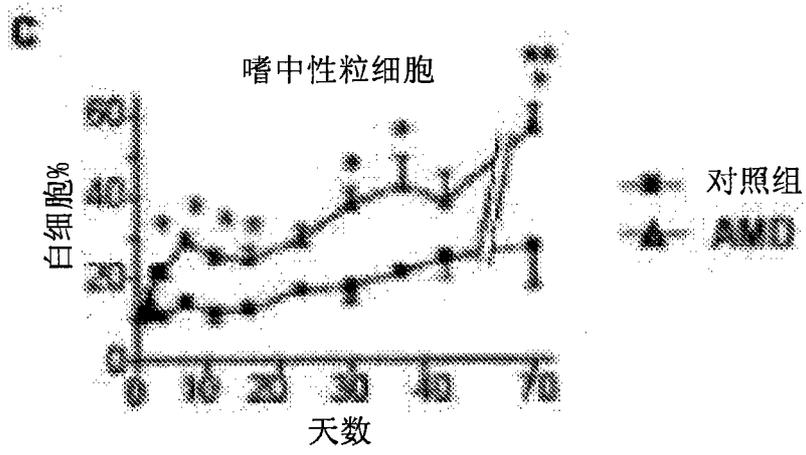


图 9 续

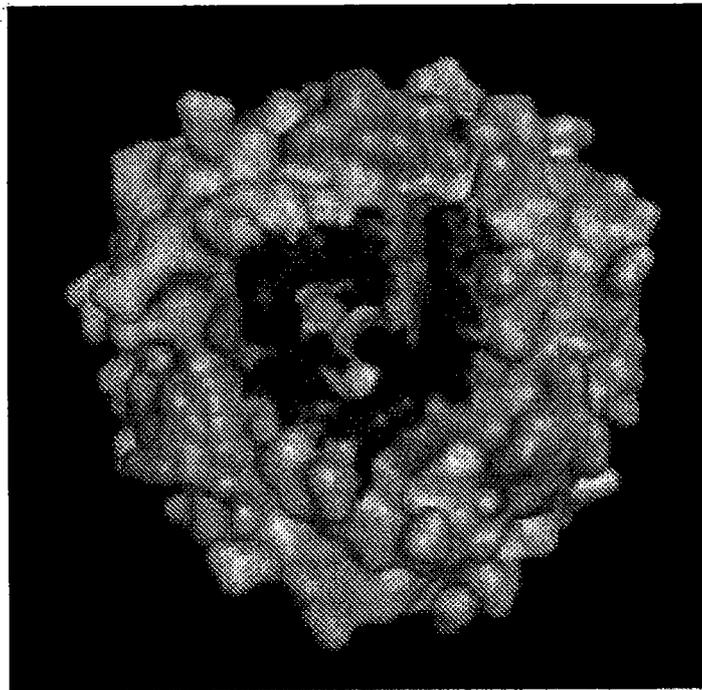


图 10

MIF的氨基酸序列  
Seq. ID No. 1

1	10	20	30	40
*	*	*	*	*
<b>NPMFIYNTNVPRA</b> <u><b>SVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQYIAV</b></u>				
				假ELR基元
	50	60	70	80
	*	*	*	*
	<b>HVVFDQLMAFGGSSEPCALCSLHSIGKIGGAQNRSYKLL</b>			
	~~~~~			
				N环基元
	90	100	110	
	*	*	*	
	<b>CGLLAERLRISPDEVYINYYDMNAANVGNNSFAL</b>			

\* 假ELR基元以单下划线指示  
\*\* N环基元以虚下划线指示

图 11