



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201605886 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：103139463

(22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 11 月 14 日

(51) Int. Cl. : C07K14/52 (2006.01)

C07K16/24 (2006.01)

G01N33/566 (2006.01)

(30) 優先權：2013/11/14 美國

61/904,176

(71) 申請人：巴克斯特保健公司 (瑞士) BAXTER HEALTHCARE SA (CH)

瑞士

巴克斯特國際公司 (美國) BAXTER INTERNATIONAL INC. (US)

美國

(72) 發明人：提勒 米歇爾 R THIELE, MICHAEL R. (DE)；席那格 亞歷山大 SCHINAGL, ALEXANDER (AT)；雪佛玲格 費德瑞奇 SCHEIFLINGER, FRIEDRICH (AT)；克斯包姆 藍道夫 J KERSCHBAUMER, RANDOLF J. (AT)

(74) 代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：12 共 108 頁

(54) 名稱

作為治療標靶的 M I F

MIF AS THERAPEUTIC TARGET

(57) 摘要

本發明係關於 MIF 相關疾患中涉及 MIF 之特異性結構更改之認知，提供一種用於 MIF 相關疾患之治療及預防的新方法，以及其他特定的醫學應用，例如監測疾病進展、藥物篩選及診斷套組之診斷分析與各別用途。

The present invention pertains to the recognition that a specific structural alteration of MIF is involved in MIF-related disorders, providing a new approach to the treatment and prevention of MIF-related disorders, as well as other specific medical applications, e.g. for example monitoring of disease progression, drug screening and diagnostic assays and respective uses of diagnostic kits.

指定代表圖：

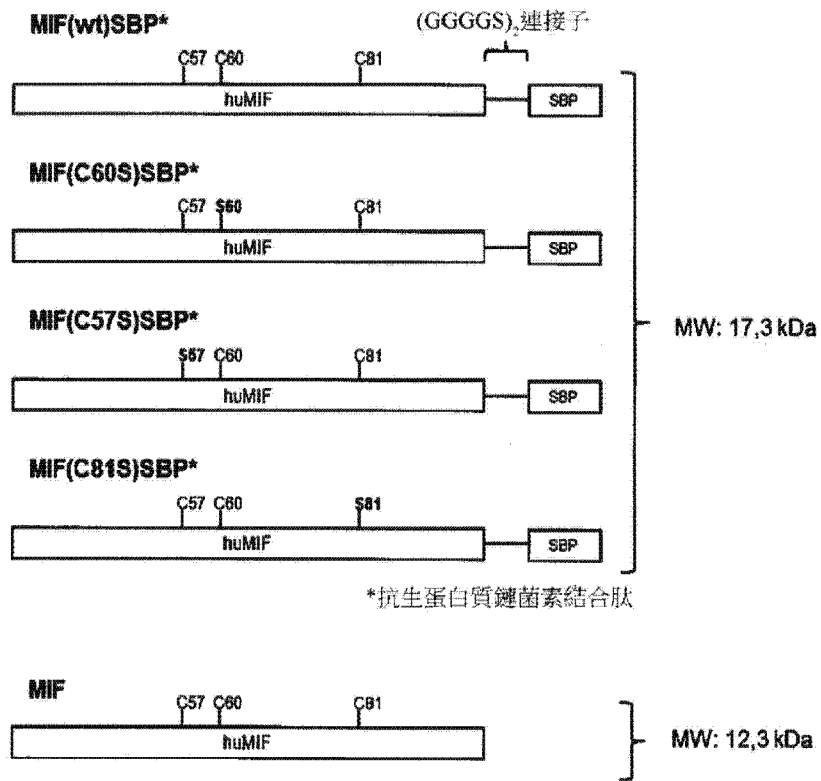


圖1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

作為治療標靶的 MIF

MIF AS THERAPEUTIC TARGET

【技術領域】

【0001】 本發明係關於特異性形式的 MIF 蛋白質在藥物中之應用。

本發明係基於以下認知：MIF 之位置 81 之修飾決定 MIF 向其疾病相關狀態之轉換。

【先前技術】

【0002】 巨噬細胞遷移抑制因子 (Macrophage migration inhibitory factor; MIF) 為最初基於其抑制結核菌素過敏性天竺鼠之腹膜滲出細胞 (含有巨噬細胞) 之試管內隨機遷移之能力分離的細胞激素 (Bloom 等人 Science 1966, 153, 80-2; David 等人 PNAS 1966, 56, 72-7)。現今，已知 MIF 為發揮廣譜活性之先天性與後天性免疫反應之關鍵上游調節劑。

【0003】 人類 MIF cDNA 選殖於 1989 年 (Weiser 等人, PNAS 1989, 86, 7522-6)，且其基因組定位映射至染色體 22。人類 MIF 基因之產物為具有 114 個胺基酸 (在 N 端甲硫胺酸裂解之後) 及約 12.5 kDa 之表觀分子質量之蛋白質。MIF 不具有與任何其他蛋白質的顯著序列同源性。蛋白質以相同次單位之三聚體形式結晶。各單體含有對 4 股 β 片進行封裝之兩個反向平行 α -螺旋。該單體具有額外兩個與鄰近次單位之 β 片相互作用之 β 股以形成單體之間的連接。三個次單位經排列以形成含有沿著分子 3 倍軸線穿過蛋白質中心之溶劑可進入通道之圓筒 (Sun 等人 PNAS 1996, 93, 5191-5196)。

【0004】 據報導，自巨噬細胞分泌 MIF 係在極低濃度之糖皮質激素下誘發 (Calandra 等人 Nature 1995, 377, 68-71)。然而，MIF 亦反調節糖皮質激素之效應且刺激諸如腫瘤壞死因子 TNF- α 及介白素 IL-1 β 之其他細胞激素之分泌 (Baugh 等人, Crit Care Med 2002, 30, S27-35)。亦展示例如 MIF 展現促血管生成、促增殖及抗細胞凋亡特性，從而促進腫瘤細胞生長 (Mitchell, R.A., Cellular Signalling, 2004. 16(1):第 13-19 頁；Lue, H.等人, Oncogene 2007. 26(35):第 5046-59 頁)。其亦例如與淋巴瘤、黑色素瘤及結腸癌之生長直接相關 (Nishihira 等人 J Interferon Cytokine Res. 2000, 20:751-62)。

【0005】 MIF 為許多病理性病狀 (亦即，MIF 相關疾患) 之介體且因此與包括尤其發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease ; IBD)、類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis ; RA)、急性呼吸窘迫症候群 (acute respiratory distress syndrome ; ARDS)、哮喘、絲球體腎炎、IgA 腎病、心肌梗塞 (myocardial infarction ; MI)、敗血症及癌症 (但不限於此) 之各種疾病相關，且 MIF 亦介導許多其他 MIF 相關疾患。

【0006】 已研發針對重組人類 MIF 之多株及單株抗 MIF 抗體 (Shimizu 等人, FEBS Lett. 1996; 381, 199-202；Kawaguchi 等人, Leukoc. Biol. 1986, 39, 223-232 及 Weiser 等人, Cell. Immunol. 1985, 90, 167778)。

【0007】 已推薦抗 MIF 抗體用於治療用途。Calandra 等人, (J. Inflamm. (1995); 47, 39-51) 據報導使用抗 MIF 抗體保護動物免於實驗上誘發的革蘭氏陰性 (gram-negative) 及革蘭氏陽性 (gram-positive) 敗血性休克。推薦抗 MIF 抗體作為調控敗血性休克及其他發炎性疾病狀態中之細胞激素產生之治療手段。

【0008】 US 6,645,493 揭示來源於融合瘤細胞之單株抗 MIF 抗體，其中和 MIF 之生物活性。在動物模型中可展示，此等來源於小鼠之抗 MIF 抗體在內毒素誘發的休克之治療方面具有有益效果。

【0009】 US 200310235584 揭示在已純合子地剔除 MIF 基因之動物中製備針對 MIF 之高親和力抗體之方法。

【0010】 糖基化抑制因子（Glycosylation-inhibiting factor；GIF）為由 Galat 等人(Eur. J. Biochem, 1994, 224, 417-21)描述之蛋白質。現認為 MIF 與 GIF 為相同的。Watarai 等人(PNAS 2000, 97, 13251-6)描述結合至不同 GIF 抗原決定基以辨別 Ts 細胞中的 GIF 之轉譯後修飾之生物化學性質之多株抗體。Watarai 等人（前述）報導 GIF 在試管內以不同構形同功異構物形式出現。根據 Watarai 等人，一種同功異構物藉由單一半胱胺酸殘基（亦即半胱胺酸 60）之化學修飾而出現，其出現在抑制 T（Ts）細胞中且根據 Watarai 等人，產生 GIF 之生物活性形式。

【0011】 歷經過去數十年，已展示，MIF 為參與眾多不同相互作用之分子。WO2013/050453 揭示可在（MIF 相關）疾患發作之後，例如在體液樣本中或在細胞或細胞表面上偵測到 MIF 氧化形式（oxidised form of MIF；oxMIF）且彼 oxMIF 與疾病狀態及/或疾病進展相關。特異性針對疾病相關、氧化形式之 MIF 之抗體（oxMIF 特異性抗體）為已知的。然而，需要更多關於 MIF 相關疾患中涉及 MIF 之資訊以便進一步改進 MIF 相關疾患之治療與預防及相關醫學應用。

【發明內容】

【0012】 本發明藉由揭露 MIF 自非病原性向疾病相關狀態之轉換，

亦即自 redMIF 向 oxMIF 之氧化還原轉換與位置 81 之修飾的存在相關且受位置 81 之修飾的存在促進來實現此目標。疾病相關、氧化形式之 MIF (oxMIF) 藉由 oxMIF 特異性抗體 (亦即相較於與疾病不特別相關之 redMIF 優先結合至 oxMIF 之抗體) 之結合來定義。本發明人已展示在位置 81 (半胱氨酸 81) 處藉由用硫氫基反應劑處理的 MIF 之修飾誘導此類 oxMIF 特異性抗體之結合。相比之下, 當野生型半胱氨酸 81 突變為絲氨酸 (其與半胱氨酸等排但不受硫氫基反應劑修飾) 時, 藉由硫氫基反應劑處理確實不誘導 oxMIF 特異性抗體之結合。本發明人已因此在 MIF 位置 81 之修飾與 MIF 相關疾患中涉及的蛋白質之 oxMIF 構形之間建立明顯的聯繫。

【0013】 人類 MIF 之序列由 SEQ ID NO: 15 表示。

【0014】 本發明因此提供攜帶 81 處的修飾之 MIF 作為 MIF 相關疾患之治療或預防之標靶之用途。

【0015】 本發明因此係關於在有需要之個體中治療或預防疾病狀態或疾病進展之治療方法, 其藉由向該個體投予有效量之以下化合物來

(a) 防止在位置 81 處的 MIF 之修飾, 或

(b) 與不含有位置 81 之修飾之 MIF 相比, 優先結合至攜帶該位置 81 處的修飾之 MIF。

該優先結合化合物可為抗體或包含抗體之抗原結合部分之分子, 及/或該優先結合化合物可誘導與在該化合物不存在下該經修飾之 MIF 相比在更小程度上結合抗體 RAM0、RAB0、RAM9 或 RAB9 (或任何其他 oxMIF 特異性抗體, 例如選自本文所揭示之 oxMIF 特異性抗體) 之形式的該經修飾之 MIF。

【0016】本文中，提及「在位置 81 處的 MIF 之修飾」或「在位置 81 處修飾之 MIF」或「攜帶位置 81 處的修飾之 MIF」及其類似者可藉由提及「經修飾之 MIF」簡化。此類修飾在整個本申請案中及在所有具體實例中係指 MIF 藉以呈其修飾形式或狀態結合至抗體 RAM9（及/或 RAB9、RAM0、RAB0，及/或任何其他 oxMIF 特異性抗體，例如選自以下本文所揭示之 oxMIF 特異性抗體中之任一者）之 MIF 之修飾。

【0017】通常，由於 MIF 之位置 81 為半胱胺酸，所以此類對經修飾之 MIF 的提及可與例如「攜帶半胱胺酸 81 處的修飾之 MIF」及其類似者或「經半胱胺酸 81 修飾之 MIF」（或等效地經 C81 修飾之 MIF）互換使用。

【0018】較佳地，本文中，修飾（特定言之在 MIF 位置 81 處）可為與未經修飾之半胱胺酸殘基相比或與自由半胱胺酸硫氫基相比之修飾。亦即，特定言之，在 MIF 位置 81 處的修飾可為 MIF 半胱胺酸 81 之修飾且較佳為在半胱胺酸 81 之硫原子上的修飾。亦即，如本文中所描述，若本文中提及攜帶修飾之 MIF 位置 81，則較佳地 MIF 半胱胺酸 81 攜帶與未經修飾之半胱胺酸相比之修飾，或更佳地半胱胺酸 81 之硫原子攜帶與自由半胱胺酸硫氫基相比之修飾。

【0019】修飾不涵蓋僅藉由氧替代半胱胺酸硫原子，亦即僅半胱胺酸 81 突變為絲胺酸。本文中，半胱胺酸殘基之硫氫基之修飾係指硫氫基之衍生作用，亦即硫氫基衍生化。亦即，半胱胺酸殘基之硫原子攜帶與半胱胺酸之自由硫氫基相比之修飾，亦即將半胱胺酸之硫原子連接至除 H 以外的部分（亦即修飾部分）。

【0020】本發明亦涵蓋一種監測 MIF 相關疾患之治療的有效性之方

法，其包含在於該治療之前及之後自個體分離的樣本中測定 MIF 位置 81 是否攜帶修飾之步驟，其中若治療後與治療前相比 MIF 位置 81 之修飾的程度較小，則該治療鑑定為有效的。

【0021】 本發明亦提供一種分析一測試化合物是否優先結合至在位置 81 處經修飾之形式的 MIF 之方法，該方法包含以下步驟

(a) 在位置 81 處修飾 MIF 以獲得經半胱胺酸 81 修飾之 MIF，

(b) 在測試樣本中及在其中 MIF 於位置 81 處未經修飾之對照樣本中組合待測試的化合物與該經修飾之 MIF，

(c) 評估該測試樣本中及該對照樣本中之該化合物與該經修飾之 MIF 之結合

其中，若該化合物在該測試樣本中與在該對照樣本中相比在更大程度上結合至該經修飾之 MIF，則選擇該化合物。

【0022】 舉例而言，若該化合物在測試樣本中與對照樣本相比優先或以不同方式結合至經修飾之 MIF，則可選擇該化合物。舉例而言，若該化合物在測試樣本中與在對照樣本中相比以更大親和力結合至經修飾之 MIF，則可選擇該化合物。

【0023】 在本文所揭示之根據本發明之方法中，測試化合物可（但不限於）較佳為抗體或包含抗體之抗原結合部分之分子。

【0024】 本發明亦提供一種篩選防止在半胱胺酸 81 處的 MIF 之修飾之化合物之方法，該方法包含以下步驟

(a) 在測試樣本中組合 MIF 與待測試的化合物，

(b) 在含有該化合物之該測試樣本中及在該化合物不存在之對照樣本

中藉由硫氫基反應試劑在該試劑至少在該對照樣本中修飾 MIF 之半胱胺酸 81 之硫氫基的條件下處理 MIF，

(c) 評估藉由硫氫基反應試劑之半胱胺酸 81 之修飾，

其中若該硫氫基反應試劑在該測試樣本中與在該對照樣本中相比半胱胺酸 81 之修飾的程度較小，則選擇該化合物。

【0025】 本發明亦提供一種分析測試化合物對在位置 81 處經修飾之 MIF 的構形影響之方法，該方法包含以下步驟

(a) 提供含有在位置 81 處經修飾之 MIF 之測試樣本，

(b) 在該測試樣本中組合測試化合物與該經修飾之 MIF，

(c) 評估與位置 81 攜帶修飾之 MIF 的構形 (i) (對照組 1) 及在位置 81 處含有未經修飾之半胱胺酸殘基之 MIF 的構形 (ii) (對照組 2) 相比的該測試樣本中之經修飾之 MIF 的構形，

其中若該構形評估指示與構形 (i) 相比該測試樣本中的經修飾之 MIF 的構形與構形 (ii) 具有可偵測的相似性程度，或若該構形評估指示該測試樣本中的經修飾之 MIF 的構形以其他方式可偵測地自構形 (i) 偏離，則選擇該化合物。

【0026】 MIF 之構形可藉由免疫分析評估。有利地，免疫分析採用選自 RAM0、RAB0、RAM9 及 RAB9 (及/或任何其他 oxMIF 特異性抗體，例如選自本文所揭示之 oxMIF 特異性抗體) 之抗體，且若測試樣本 (亦即在測試化合物存在下) 中的經修飾之 MIF 與在該化合物不存在下的該經修飾之 MIF (對照組 1) 相比在更小程度上結合抗體，則選擇該化合物。

【0027】 較佳地，在「對照組 1」之情況下的 MIF 位置 81 之修飾與

測試樣本中相同。

【0028】 通常，在根據本發明之方法中，MIF 之構形可藉由任何對 MIF 中的構形變化敏感之方法評估，該變化視位置 81 處的 MIF 之修飾的存在、特定言之 MIF 半胱胺酸 81 之修飾的存在或不存在、特定言之位置 81 處的 MIF 之硫原子而定。舉例而言，MIF 之構形可藉由例如使用一或多種如本文中所描述的構形敏感抗 MIF 抗體之免疫分析評估，亦即該等抗體之結合視 MIF 位置 81 之修飾狀態而定。例如，如本文中所描述，位置 81 之修飾之存在及/或不存在可藉由構形敏感位置-81-修飾-選擇性抗體（及/或構形-選擇性半胱胺酸 81 硫氫基-特異性抗體）之結合來評估。舉例而言，構形可藉由 ELISA 或表面電漿子共振來評估。

【0029】 在其他具體實例中，構形可藉由 X 射線晶體學分析來評估。構形可例如亦藉由核磁共振（nuclear magnetic resonance；NMR）分析或藉由圓二色性來評估。

【0030】 根據上文，本發明亦提供一種分析測試化合物對在位置 81 處經修飾之 MIF 的構形影響之方法，該方法包含以下步驟

- (a) 提供含有在位置 81 處經修飾之 MIF 之測試樣本，
- (b) 在該測試樣本中組合測試化合物與該經修飾之 MIF，
- (c) 評估該測試樣本中的經修飾之 MIF 與選自 RAM0、RAB0、RAM9 及 RAB9 及/或任何其他 oxMIF 特異性、oxMIF 構形敏感抗體（例如選自本文所揭示之 oxMIF 特異性抗體）之結合，使其與 (i) 在測試化合物不存在下，MIF 半胱胺酸 81 之硫原子攜帶與自由半胱胺酸硫氫基相比之修飾之 MIF（對照組 1）相比，

其中若該測試樣本（亦即在測試化合物存在下）中的經修飾之 MIF 與在該化合物不存在下的該經修飾之 MIF（對照組 1）相比在更小程度上結合抗體，則選擇該化合物。

【0031】 本發明亦提供一種藉由 X 射線晶體學分析用於結合至修飾形式的 MIF 之測試化合物之方法，該方法包含以下步驟

(a) 在位置 81 處修飾 MIF 以獲得經修飾之 MIF，

(b) 藉由在該測試化合物存在下結晶該經修飾之 MIF 或藉由結晶該經修飾之 MIF 且隨後使該測試化合物與該經修飾之 MIF 的晶體接觸來提供該經修飾之 MIF 的晶體，及

(c) 使用該等晶體測定 MIF 之三維結構。

【0032】 視情況，相同 X 射線晶體學方法可涵蓋藉由相同測試化合物但藉由其中位置 81 未經修飾之 MIF 另外地進行該結晶與該結構測定步驟。

【0033】 本發明亦提供含有具有位置 81 之修飾之 MIF 之晶體。該晶體可視情況進一步含有另一化合物，例如測試化合物，例如與該經修飾之 MIF 之結合為待評估的測試化合物。

【0034】 本文中，一種例如用於結合至在位置 81 處經修飾之 MIF 之化合物（例如用於治療或診斷方法之化合物或待分析的測試化合物）為不受特定限制的，但可例如為小分子，有機分子，小於 1000 Da、小於 500 Da 之分子或任何形式之結合至 MIF（尤其至其位置 81 修飾之形式）的抗體或抗體衍生物（例如 Fab 片段或包含抗體之抗原結合部分之任何分子）。

【0035】 本發明亦提供 MIF 蛋白質之位置 81 作為診斷標記及/或用於

監測 MIF 相關疾患之用途。特定言之，本發明提供 MIF 蛋白質之位置 81 之修飾狀態作為診斷標記及/或用於監測 MIF 相關疾患之用途。

【0036】 本發明提供一種診斷 MIF 相關疾患之方法，其包含在自個體分離的樣本中測定 MIF 位置 81 是否攜帶修飾之步驟，其中，若 MIF 位置 81 被識別為攜帶此類修飾，則診斷該個體患有 MIF 相關疾患。亦即，MIF 位置 81 攜帶此類修飾之發現指示 MIF 相關疾患。

【0037】 本發明提供一種診斷 MIF 相關疾患之方法，其包含在自個體分離的樣本中測定 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子與自由半胱胺酸硫氫基相比是否攜帶修飾之步驟，其中，若 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子被識別為攜帶該種修飾，則診斷該個體具有 MIF 相關疾患。亦即，半胱胺酸 81 之硫原子攜帶該種修飾之發現指示 MIF 相關疾患。

【0038】 本發明提供 MIF 位置 81 之修飾狀態作為診斷標記之用途，其中 MIF 位置 81 攜帶修飾之發現指示 MIF 相關疾患。

【0039】 本發明提供 MIF 半胱胺酸 81 之硫氫基之修飾狀態作為診斷標記之用途，其中 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子與自由半胱胺酸硫氫基相比攜帶修飾之發現指示 MIF 相關疾患。

【0040】 根據本發明之該等方法及用途涵蓋測定給定疾患或病理性病狀是否涉及經修飾之 MIF 或與經修飾之 MIF 相關之方法及用途。

【0041】 本發明亦提供根據本發明之方法或用途中的診斷套組之用途，其中該診斷套組包含優先結合至其中半胱胺酸 81 存在之 MIF 或結合至攜帶位置 81 處的修飾之 MIF (亦即，特定言之，在半胱胺酸 81 之硫原子上) 之化合物。該種套組可另外包含緩衝劑、對照試劑 (例如重組其中半胱胺

酸 81 存在或不存在之 MIF 或具有或不具有修飾位置 81 之 MIF，例如半胱胺酸 81 之硫原子上的修飾、優先結合至任何該等形式的 MIF 之化合物)、多株抗 MIF 抗體及/或結合偵測抗體。

【0042】 本文中，「MIF 相關疾患」表述涵蓋例如 (MIF 相關) 疾病、(MIF 相關) 疾病狀態、(MIF 相關) 疾病之進展的狀態。

【0043】 在根據本發明之篩選或分析測試化合物之方法及晶體之某些具體實例中，選擇性地修飾位置 81 (例如 MIF 半胱胺酸 81 之硫氫基)。亦即，MIF 實質上未藉由相同修飾部分在其他位置處修飾，或特定言之，MIF 實質上未藉由相同修飾部分在 MIF 序列中的其他半胱胺酸之硫原子處修飾 (亦即，實質上不攜帶相同修飾)。例如，MIF 在半胱胺酸 57 之硫原子上實質上不攜帶相同修飾。例如，MIF 在半胱胺酸 60 上實質上不攜帶相同修飾。在某些較佳具體實例中，MIF 之半胱胺酸 57 與半胱胺酸 60 實質上均不由與半胱胺酸 81 相同的修飾部分修飾。在某些較佳具體實例中，半胱胺酸 57 與半胱胺酸 60 之任一者或兩者可由除半胱胺酸以外的胺基酸取代 (亦即突變為，亦即由……替代)，例如由絲胺酸取代。在其他具體實例中，半胱胺酸 57 可為未經修飾的，亦即可包含自由硫氫基。在其他具體實例中，半胱胺酸 60 可為未經修飾的，亦即可包含自由硫氫基。在其他具體實例中，半胱胺酸 57 與半胱胺酸 60 兩者均為未經修飾的，亦即包含自由硫氫基。

【0044】 可藉由質譜分析、例如藉由製備肽質量指紋 (肽映射及質譜分析) 進行位置 (半胱胺酸) 81 (特定言之其硫原子或硫氫基) 是否在本發明之含義內經修飾之評估。亦即，本發明之方法 (例如診斷方法或篩選化合物之方法) 可涵蓋對 MIF 進行質譜分析。亦即，本發明之方法 (例如

診斷方法或篩選化合物之方法)可涵蓋製備包含 MIF 之樣本用於質譜分析。用以測定胺基酸殘基之修飾之肽質量指紋識別之方法為熟習相關技術領域者所熟知，作為熟習此項技術者的公共常識之一部分。本發明之方法可因此亦涵蓋在待評估的樣本中藉由蛋白質酶(例如胰蛋白質酶)消化 MIF。隨後，所得肽(MIF 片段)形成該消化，特定言之，可藉由質譜分析來分析含有半胱胺酸 81(且較佳不含有其他半胱胺酸殘基)之肽。

【0045】 亦可藉由免疫分析，亦即使用一或多種抗體進行位置(半胱胺酸) 81 是否經修飾之評估。亦即，本發明之方法(例如診斷方法或篩選化合物之方法)可涵蓋使 MIF 與一或多種抗體接觸。此可導致在 MIF(例如經 C81 修飾之 MIF)與抗體之間形成複合物。可因此使用選擇性地結合至其中位置 81(例如半胱胺酸 81 之硫氫基經修飾)之 MIF、亦即結合其中位置 81(例如半胱胺酸 81 之硫氫基)與在半胱胺酸 81 處具有自由硫氫基之 MIF 相比優先經修飾之形式的 MIF 之抗體進行位置 81 是否經修飾之評估。

【0046】 製備特異性抗體(例如單株抗體)之方法亦為熟習相關技術者所熟知。抗體之該種結合可視 MIF 蛋白質之位置 81 之修飾(例如具有硫氫基)的存在而定用於(或至少用於)在非還原及/或氧化及/或天然條件下使抗體結合至 MIF 蛋白質。結合抗原決定基可包括或可不包括位置 81。抗體可為抗 MIF 抗體(例如構形敏感抗體，其結合視位置 81 之修飾狀態而定)，例如半胱胺酸 81 修飾-特異性抗體，其在 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子與自由半胱胺酸硫氫基相比、與其結合至在該種修飾不存在下的 MIF(亦即在位置 81 處含有自由半胱胺酸硫氫基之 MIF)相比攜帶修飾時特定地、選

擇性地或優先地結合至 MIF。例如抗體之結合抗原決定基可為抗原決定基（例如線性或構形抗原決定基，其可或可不包括半胱胺酸 81），其用於抗體結合之可行性在位置 81 經修飾時與在 MIF 位置 81 未經修飾時相比提高。

【0047】 舉例而言，抗體與 MIF 之結合可視 MIF 蛋白質之位置 81 處的半胱胺酸之修飾的存在而定，亦即與在半胱胺酸 81 未經修飾（例如在還原條件下）時或在半胱胺酸 81 不存在時抗體結合至 MIF 相比，抗體可在半胱胺酸 81 經修飾時優先結合 MIF（例如在非還原條件下）。舉例而言，抗體可為 RAM9 或 RAB9。抗體亦可為 RAM0 或 RAB0。該結合可視半胱胺酸 57 及/或半胱胺酸 60 之存在（如在 RAM9 或 RAB9 之情況下）而定或可獨立於半胱胺酸 57 及/或半胱胺酸 60 之存在及/或僅僅視 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子上的修飾之存在而定。

【0048】 本發明之方法及用途亦可採用抗 MIF 抗體（例如構形敏感抗體，其結合視半胱胺酸 81 之修飾狀態而定），例如半胱胺酸 81 硫氫基選擇性抗體，其在 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子攜帶自由半胱胺酸硫氫基時與其結合至其中半胱胺酸 81 經修飾之 MIF 相比優先結合至 MIF。可採用該等抗體例如作為對照組。

【0049】 在本發明之含義內，若測定含有半胱胺酸 81（但無其他半胱胺酸）之 MIF 肽與含有半胱胺酸 81 處的自由硫氫基之相應肽相比質量改變，則位置 81（例如 MIF 半胱胺酸 81 之硫氫基）可被識別為經修飾。

【0050】 較佳地，MIF 蛋白質之何種胺基酸的 MIF 基因在位置 81 處編碼半胱胺酸（例如 MIF 基因是否在位置 81 處編碼半胱胺酸）之評估或測定係藉由包括聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction；PCR）之方法進行。

【0051】 本發明亦關於如本文所揭示之抗體，其特定地認知 MIF 位置 81 處的修飾之存在。本發明亦關於一種特定地結合至其中位置 81 攜帶修飾（例如在硫原子上，與自由半胱胺酸硫氫基相比）之抗 MIF 抗體，其中該抗體不可偵測地結合或藉由較低親和力結合至不含有該修飾之 MIF。本發明亦關於如本文中所提及之在具有位置 81 處的修飾之 MIF 與抗體之間的複合物。

【0052】 本文中，抗體可具有任何類型，例如較佳具有 IgG1 類型或 IgG4 類型。本文中，抗體稱為具有 IgG1 類型之「RAM」，且稱為「RAB」之抗體具有 IgG4 類型。

【0053】 本文中，除非另外指明，否則提及的結合（例如關於抗體或測試化合物）為在生理學上相關條件（在例如 1°C 與 45°C 之間的任何溫度下）下之結合。在 X 射線晶體學方法之情況下，提及的結合涵蓋在熟習此項技術者所熟知的結晶條件下之結合。

【0054】 較佳結合或增強型結合等（例如關於抗體或另一化合物）在本文中可亦稱為差異性結合。舉例而言，較佳增強型或差異性結合意謂化合物、特定言之如本文中所描述的抗體結合（藉由小於 100 nM、較佳小於 50 nM、又更佳小於 10 nM 之 KD 值）至 MIF 之第一形式；及在更小程度上（例如藉由較低親和力，例如以例如 400 nM 以上之 KD 或可偵測結合不存在（亦即該化合物不結合）為特徵）結合至 MIF 之第二形式。MIF 之該第一形式可為例如與 MIF 相關疾患相關的 MIF（例如特定言之經 C81 修飾之 MIF）之形式，及 MIF 之該第二形式可為非如此相關之形式（例如不含有 C81 之經修飾之硫原子），或反之亦然。

【0055】 舉例而言，差異性結合可指藉由小於 100 nM（較佳小於 50 nM，又更佳小於 10 nM）之 KD 值結合至攜帶位置 81 處（例如在半胱胺酸 81 之硫原子上）的修飾之 MIF，及例如以 400 nM 以上之 KD 或可偵測結合不存在（亦即，化合物不結合）為特徵較少結合至在半胱胺酸 81 之硫原子上不含有該修飾之 MIF（或反之亦然）。

【0056】 本文中，諸如「診斷標記」或「(MIF 相關) 疾病之診斷中的標記」之術語在本發明之上下文中將涵蓋 MIF 是否為涉及此 (MIF 相關) 疾病之因子之評價的可能性。在彼方面，作為標記之經修飾之 MIF 供應關於疾病狀態、其進展之資訊且充當標記以測定給定治療之有效性；此外，樣本 (例如體液樣本或細胞樣本) 中的經修飾之 MIF 偵測可充當較佳抗 MIF 治療之指標。經修飾之 MIF 之偵測因此用以改進給定疾病或疾患中之已知診斷技術。其對行醫者在其決策如何治療給定疾病或疾患中進行輔助且有助於改進診斷之特異性。經修飾之 MIF 因此為特異性及適合的二級標記。其偵測可在罹患 MIF 相關疾病之患者之管理中充當輔助測試。所討論之疾病在一較佳具體實例中為已知或懷疑為 MIF 相關之疾病 (參見以下詳細提及的疾病) 但亦可為迄今為止未被懷疑為 MIF 相關之疾病。

【0057】 在一較佳具體實例中，樣本中的經修飾之 MIF 之存在的偵測將向行醫者指示個體 (已自該個體 (或其) 採取樣本) 可能得益於針對 MIF 之治療。該種治療可選自抗 MIF 分子，例如抗經修飾之 MIF 抗體或針對經修飾之 MIF 的小分子。

【0058】 較高 MIF 含量，亦即通常在各種疾病之發作之後、尤其在癌症之發作之後偵測的 MIF 含量。然而，MIF 亦在健康個體中循環，其使

得明顯分化困難。相反，本發明連接至經修飾之 MIF 之 oxMIF 不存在於健康個體中且因此為 MIF 相關疾患之更強的診斷標記。根據本發明，可分析諸如血液、血清及尿之患者樣本與健康個體相比之經修飾之 MIF 的增加含量。

【0059】 如本文所示，特定言之，藉由連接部分至 C81 硫原子的 C81 硫氫基之衍生作用促進 MIF 向疾病相關狀態 oxMIF 之轉換。oxMIF 特異性抗體（其特異性結合至 oxMIF 且不能結合至 redMIF）在本發明之上下文中可為有用的。oxMIF 特異性抗體之非限制性實例為 Baxter 抗體 RAM9、RAB9、RAM4、RAB4、RAM0 及 RAB0。

【0060】 諸如胱胺酸介導之氧化、GSSG（ox. 麩胱甘肽）介導之氧化或藉由 Proclin300 或蛋白質交聯劑（例如 BMOE）之 MIF 培育之氧化程序均可致使與上文所提及的抗體之結合。

【0061】 上文所提及之抗體係藉由兩個其序列以及藉由在大腸桿菌（菌株 TG1）中沈積為質體來特性化及支撐，其包含上文所提及之抗體中之每一者之輕鏈或重鏈。質體以其 DSM 數目為特徵，該數目為如在藉由德國微生物及細胞培養物收集（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures；DSMZ），Mascheroder Weg 1b，Braunschweig，Germany，根據布達佩斯條約（Budapest Treaty）沈積時獲得的官方數目。該等質體分別沈積於大腸桿菌菌株中。

【0062】 具有 DSM 25110 數目之質體包含抗 MIF 抗體 RAB4 之輕鏈序列。具有 DSM 25112 數目之質體包含抗 MIF 抗體 RAB4 之重鏈（IgG4）序列。質體 DSM 25110 與 DSM 25112 在適合的宿主細胞中之共表現導致較

佳抗 MIF 抗體 RAB4 之產生。

【0063】 具有 DSM 25111 數目之質體包含抗 MIF 抗體 RAB9 之輕鏈序列。具有 DSM 25113 數目之質體包含抗 MIF 抗體 RAB9 之重鏈 (IgG4) 序列。質體 DSM 25111 與 DSM 25113 在適合的宿主細胞中之共表現導致較佳抗 MIF 抗體 RAB9 之產生。

【0064】 具有 DSM 25114 數目之質體包含抗 MIF 抗體 RAB0 之輕鏈序列。具有 DSM 25115 數目之質體包含抗 MIF 抗體 RAB0 之重鏈 (IgG4) 序列。質體 DSM 25114 與 DSM 25115 在適合的宿主細胞中之共表現導致較佳抗 MIF 抗體 RAB0 之產生。

【0065】 亦沈積抗體 RAM0、RAM9 與 RAM4；均已藉由根據布達佩斯條約之 2012 年 4 月 12 日的 DSZM, Braunschweig, Germany 沈積，具有以下名稱：

RAM9-重鏈：大腸桿菌 GA.662-01.pRAM9hc - DSM 25860。

RAM4-輕鏈：大腸桿菌 GA.906-04.pRAM4lc - DSM 25861。

RAM9-輕鏈：大腸桿菌 GA.661-01.pRAM9lc - DSM 25859。

RAM4-重鏈：大腸桿菌 GA.657-02.pRAM4hc - DSM 25862。

RAM0-輕鏈：大腸桿菌 GA.906-01.pRAM0lc - DSM 25863。

RAM0-重鏈：GA.784-01.pRAM0hc - DSM 25864。

【0066】 在本發明之上下文中的生物樣本較佳為將在其 (which/whom) 上進行診斷之個體之體液樣本。體液樣本為熟習此項技術者已知之任何體液樣本。該種例示性但非限制性樣本可為血液、血漿、血清、唾液、尿、鼻液、腹水、眼液、羊膜液、水狀液、玻璃狀液、淚液、考珀

液 (Cowper's fluid)、精液、間質液、淋巴液、母乳、黏液 (包括鼻涕與痰)、胸膜液、膿、月經、陰道潤滑、皮脂、腦脊髓液及滑液。在本申請案之上下文中的另外生物樣本可為 (中空) 體器官之灌洗 (沖刷) (例如支氣管肺泡灌洗、胃灌洗及腸道灌洗)。

【0067】 在本申請案之上下文中的替代具體實例中之生物樣本為將在其上進行診斷的個體之細胞樣本，最佳來自循環或患病組織之細胞樣本，更佳如單一細胞懸浮液樣本。

【0068】 根據本發明，本文所揭示之診斷方法、分析及用途，特定言之，如本文所揭示之診斷 MIF 相關疾患之方法涵蓋測定給定疾患或病理性病狀是否涉及經 C81 修飾之 MIF 或與經 C81 修飾之 MIF 相關之方法。

【0069】 本發明因此亦關於一種評估疾病之進展之方法；在本發明之上下文中，術語「疾病之狀態」或「疾病狀態」應理解為與術語「疾病之嚴重度」同義且係指疾病或病狀之嚴重性、程度或狀態 (亦即階段)。舉例而言，疾病可特性化為輕度、中度或重度。嚴重度或程度、亦即疾病之狀態之測定或評估為熟習此項技術者熟知的。就此評估而言將進行的實際方法當然視所討論之疾病或病狀而定。舉例而言，疾病之狀態可藉由比較患有疾病之個體的存活之可能性或長度與患有相同疾病之其他個體的存活之可能性或長度來測定。

【0070】 在其他具體實例中，疾病之狀態可藉由比較患有疾病之個體的疾病症狀與患有相同疾病之其他個體的症狀來測定。在又一具體實例中，疾病之狀態及其進展藉由同一患者體內歷經時間段之症狀之變化反映。

【0071】 在另一較佳態樣中，本發明亦可關於一種選擇如符合用抗經

修飾之 MIF 化合物治療之條件的個體之方法，其中該個體具有（MIF 相關）疾患或處於發展（MIF 相關）疾患的風險中，該方法包含偵測該個體中的經修飾之 MIF 之存在及/或含量及/或含量變化。可選擇具有較高含量的經修飾之 MIF 之個體用於藉由如上文所定義的抗經修飾之 MIF 化合物之預防性或治療性治療。

【0072】 術語「預防性」或「治療性」治療為技術認知的且係指向患者投予藥物。若在非吾人所樂見的病狀（例如宿主（例如人類或動物）之疾病或其他非吾人所樂見的狀態）之臨床表現之前投予其，則該治療為預防性，亦即，其使宿主免於發展非吾人所樂見的病狀，然而若在非吾人所樂見的病狀之表現之後投予，則該治療為治療性（亦即，意欲減少、改善或維持現存非吾人所樂見的病狀或其副作用）。

【0073】 如本文所用，抗經修飾之 MIF 化合物係指任何減輕、抑制、對抗、抵消或降低經修飾之 MIF 的生物活性之劑。抗經修飾之 MIF 化合物可為抑制或中和經修飾之 MIF 活性之劑，例如小分子或抗體。較佳抗體為如本文中所描述之抗體，特定言之，RAM9、RAB9、RAM4、RAB4、RAM0 及 RAB0；較佳 RAB9 或 RAB0；或 RAM9 或 RAM0。

【0074】 本文所揭示之診斷方法或分析可用於測定例如患者之體液樣本或細胞樣本中的經修飾之 MIF 之存在或含量。oxMIF 之存在或不存在適於區分疾病是否為 MIF 相關的或決定 oxMIF 治療是否為合理的。OxMIF 位準指示疾病進展或治療功效。

【0075】 在本發明之上下文中進一步揭示了包含抗經修飾之 MIF 抗體或其抗原結合部分之套組。套組可包括除抗體之外的另外診斷或治療劑

及其用途。套組亦可包括診斷性或治療性方法中之使用說明書。

定義及一般技術

【0076】 除非本文中另外定義，否則結合本發明使用之科學與技術術語應具有由一般技術者通常理解之含義。通常，本文中所描述之與細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白質與核酸化學結合使用的命名法及其技術為在此項技術中熟知且常用之彼等者。除非另外指明，否則本發明之方法及技術通常根據此項技術中熟知之習知方法且如本說明書通篇所引用及討論之各種一般及更特定文獻中所描述來進行。參見例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 及 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) 及 Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)，其各以引用之方式併入本文中。

【0077】 「MIF」或「巨噬細胞遷移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor)」係指蛋白質，其稱為免疫反應及發炎反應中的關鍵介體且稱為糖皮質激素之反調節劑。MIF 包括哺乳動物 MIF，具體言之人類 MIF (Swiss-Prot 主要寄存編號：P14174)，其序列由 SEQ ID NO：15 表示。單體形式編碼為 115 胺基酸蛋白質但由於初始甲硫胺酸之裂解生成為 114 胺基酸蛋白質。「MIF」亦包括「GIF」(糖基化抑制因子) 及其他形式的 MIF，如熟習此項技術者熟知的諸如 (例如) 藉由諸如抗生蛋白質鏈菌素結合肽 (streptavidin binding peptide；SBP) 之親和力標記 (其適用於蛋白質之純化) 視情況經由連接子 (例如(GGGGS)₂ 連接子) 之 MIF 融合蛋白質。根據 SEQ

ID NO : 15 , MIF 之胺基酸之編號以 N 端甲硫胺酸 (胺基酸 1) 開始且以 C 端丙胺酸 (胺基酸 115) 結束。

【0078】 「氧化 MIF (oxidized MIF)」 或 oxMIF 在本文中定義為藉由用諸如胱胺酸之輕度氧化試劑 (硫氫基反應試劑) 進行 MIF 治療產生的 MIF 同功異構物。該 oxMIF 包含與在用細菌攻擊動物之後 (例如) 活體內產生的 oxMIF 共用結構重組之 MIF 同功異構物。其特定地受本文所揭示之 oxMIF 特異性抗體約束。

【0079】 「還原 MIF (reduced MIF)」 或 redMIF 出於本發明的目的定義為還原 MIF 且為不結合至 RAB0、RAB9 及/或 RAB4 及/或至 RAM0、RAM9 及/或 RAM4 之 MIF。

【0080】 抗體與本文所揭示之各種形式的 MIF 之結合動力學可使用 Biacore 3000 系統藉由表面電漿子共振分析來檢查。將該等抗體包覆於 CM5 (=羧基甲基化聚葡萄糖) 晶片上且藉由 0.2% Proclin300 預培育 MIF 蛋白質且注射混合物。Proclin300 由藉由避免 oxMIF 向 redMIF 之轉化使 oxMIF 結構穩定之氧化異噻唑酮組成。

【0081】 抗體或其抗原結合部分較佳地藉由小於 100 nM 之 K_D 、較佳小於 50 nM 之 K_D 、甚至更佳藉由小於 10 nM 之 K_D 結合本文所揭示之特異形式的 MIF (例如經修飾之 MIF)。尤其較佳地，本發明之抗體藉由小於 5 nM 之 K_D 結合至本文所揭示之特異形式的 MIF (例如經修飾之 MIF)。

【0082】 抗體之 (非) 結合可測定為熟習此項技術者通常已知之為以下方法中之任一者之實例：差異性結合 ELISA 與重組 MIF，或使用本文所揭示之形式中的任一者之重組 MIF 之表面電漿子共振，類似上文所描述之

熟知的 Biacore 分析。

【0083】 用於結合之測定之較佳方法為將抗體表面電漿子共振至本文所揭示之形式的 MIF(例如經修飾之 MIF),其中「結合」係指小於 100 nM、較佳小於 50 nM 甚至更佳小於 10 nM 之 KD,然而,該非結合(例如在經修飾之 MIF 或 oxMIF 特異性抗體至 redMIF 之情況下)以 400 nM 以上之 KD 為特徵。「結合」及「特異性結合」在本文中可互換使用。本申請案之上下文中的「差異性結合」涵蓋化合物(特定言之如本文中所描述的抗體)或測試化合物,該等測試化合物結合至經修飾之 MIF(例如藉由上文所提及的 K_D 值)而其並不結合至 redMIF 及/或至不含有 C81 之經修飾之硫原子的 MIF。

【0084】 本文中,提及「抗體」涵蓋抗原結合抗體衍生物,其構造或片段為熟習相關技術者所已知,特定言之涵蓋包含抗體之抗原結合部分之抗原結合分子。「抗體(antibody)」係指完整抗體或由與該完整抗體競爭(特異性)結合之抗體的抗原結合部分組成或包含其之分子。通常參見 *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W.編, 第 2 版 Raven Press, N.Y. (1989)) (其全文以引用之方式併入本文中)。術語抗體包括人類抗體、哺乳動物抗體、分離抗體及諸如嵌合抗體、駱駝化抗體或人類化抗體之基因工程化形式,但不限於此。

【0085】 術語抗體之「抗原結合部分(antigen-binding portion)」係指抗體之一或多個保留特異性結合至抗原(例如經修飾之 MIF)之能力之片段。包含抗體之抗原結合部分之分子可藉由重組 DNA 技術或藉由完整抗體之酶或化學裂解產生。該等分子包括(但不限於)以下: Fab、Fab'、F(ab')₂、

Fv 及互補決定區 (complementarity determining region ; CDR) 片段、單域抗體及單鏈 Fv 抗體 (single-chain Fv antibody ; scFv)、嵌合抗體、雙功能抗體、抗體及含有足以賦予特異性結合至所關注的抗原之抗體之至少一部分之多肽，該抗原例如本文所揭示之形式的 MIF，例如至經修飾之 MIF、redMIF、oxMIF、在 C81 中含有自由硫氫基之 MIF、不含有 C81 之經修飾之硫原子之 MIF，或本文所揭示之其他形式的 MIF。自 N 端至 C 端，成熟輕鏈可變域與重鏈可變域兩者包含區域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4。胺基酸至各域之分配係根據 Kabat 的 Sequences of Proteins of Immunological Interest (美國國家衛生研究院 (National Institutes of Health), Bethesda, Md. (1987 及 1991))、Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 或 Chothia 等人, Nature 342:878-883 (1989) 之定義進行。抗體或其抗原結合部分可被衍生化或連接至另一官能分子 (例如另一肽或蛋白質)。舉例而言，抗體或其抗原結合部分可在功能上連接至一或多個其他分子實體，諸如另一抗體 (例如雙特異性抗體或雙功能抗體)、可偵測劑、細胞毒性劑、藥劑及/或連接分子。

【0086】 在本發明之上下文內，抗體可例如特性化為人類抗體、人類化抗體、駱駝化抗體。另外，抗體可為例如嵌合抗體。另外，抗體可為例如分離抗體。

【0087】 術語「KD」根據熟習此項技術者之公共常識係指兩個相互作用搭配物 (例如特定抗體與其各別抗原) 之平衡解離常數。

【0088】 術語「人類抗體 (human antibody)」係指其中可變域及恆定域為人類序列之任何抗體。該術語涵蓋具有來源於人類基因但已經改變以

例如降低可能的免疫原性、增加親和力、消除可能致使非所要摺疊之半胱胺酸等之序列之抗體。該術語涵蓋在非人類細胞中以重組方式產生的該等抗體，其可能例如賦予非典型的人類細胞之糖基化。

【0089】 術語「人類化抗體 (humanized antibody)」係指包含人類序列且亦含有非人類序列之抗體。

【0090】 術語「駱駝化抗體 (camelized antibody)」係指其中抗體結構或序列已改變為更接近於來自駱駝的抗體之抗體，亦指示駱駝抗體。駱駝化抗體之設計及產生方法為熟習此項技術者之常識之一部分。

【0091】 術語「嵌合抗體 (chimeric antibody)」係指包含來自兩種或兩種以上不同種類之區域之抗體。

【0092】 術語「分離抗體 (isolated antibody)」或「其分離抗原結合部分 (isolated antigen-binding portion thereof)」係指已經識別且選自諸如噬菌體呈現庫或 B 細胞抗體庫之抗體源之抗體或其抗原結合部分。

【0093】 本文所揭示之抗體可藉由任何用於產生重組 DNA 之方法藉由基因工程、例如經由 RNA 之反轉錄及/或 DNA 之擴增且選殖至表現載體中來產生。在一些具體實例中，載體為病毒載體，其中額外 DNA 片段可接合至病毒基因組。在一些具體實例中，載體能夠在引入其至其中的宿主細胞中自主複製（例如具有複製之細菌來源之細菌載體及游離型哺乳動物載體）。在其他具體實例中，載體（例如非游離型哺乳動物載體）在引入至宿主細胞中時可整合至宿主細胞之基因組中，且從而與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠導引其以操作方式連接的基因之表現。該等載體在本文中稱為「重組表現載體」（或簡言之「表現載體」）。

【0094】 本文所揭示之抗體可尤其藉助於習知表現載體、諸如細菌載體（例如 pBR322 及其衍生物）或真核載體產生。編碼抗體之彼等序列可具有調節來自宿主細胞的複製、表現及/或分泌之調節序列。此等調節序列包含（舉例而言）啟動子（例如 CMV 或 SV40）及信號序列。表現載體亦可包含選擇及擴增標記，諸如二氫葉酸還原酶基因（dihydrofolate reductase gene；DHFR）、潮黴素-B-磷酸轉移酶及胸苷-激酶。所用載體之組分，諸如選擇標記、複製子、增強子，可市售獲得或藉助於習知方法製備。可構建該等載體在各種細胞培養物中、例如在諸如 CHO、COS、HEK293、NSO、纖維母細胞、昆蟲細胞、酵母菌或細菌（諸如大腸桿菌）之哺乳動物細胞中的表現。在一些情況下，細胞用於允許表現蛋白質之最佳糖基化。

【0095】 可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入至分離載體中或將該等基因插入至相同表現載體中。藉由標準方法將抗體基因插入至表現載體中，該等方法例如抗體基因片段及載體上的互補限制部位之接合或若無限制部位存在時之鈍端接合。

【0096】 抗體或其抗原結合片段之產生可包括此項技術中已知的用於藉由轉染（例如經由電穿孔或顯微注射）將重組 DNA 引入真核細胞中之任何方法。舉例而言，抗體之重組表現可藉由適當轉染方法在一或多個調節序列（諸如強啟動子）之控制下將含有抗體編碼 DNA 序列之表現質體引入適合宿主細胞株中、產生細胞使引入的序列穩定地整合至基因組中來實現。脂質體轉染方法為可根據本發明使用的轉染方法之實例。

【0097】 抗體之產生亦可包括此項技術中已知的用於該等轉型細胞之培養（例如以連續或分批方式）及抗體之例如組成性或在誘導時的表現

之任何方法。其尤其參考 WO 2009/086920 作為抗 (ox) MIF 抗體之產生的進一步參考。

【0098】 oxMIF 特異性抗體之序列亦部分地揭示於 WO 2009/086920 中。另外 oxMIF 特異性抗體以以下序列為特徵：

RAB9 之輕鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 1 :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQRIM TYLNWYQQKP GKAPKLLIFV
 ASHSQSGVPS RFRGSGSETD FTLTISGLQP EDSATYYCQQ SFWTPLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC ,

RAB4 之輕鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 2 :

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGV SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GTSSRATGIP DRFSGSASGT DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC ,

RAB0 之輕鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 3 :

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGV SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GTSSRATGIP DRFSGSASGT DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC ,

RAB2 之輕鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 4 :

DIQMTQSPVT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSYLAWYQQK PGQTPRLLIY
 GASNRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGNSLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC ,

RAB9 之重鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 5 :

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
 IGSSGGTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ
 WLYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK ,

RAB4 之重鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 6 :

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
 IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
 VIAVAGTGY YYGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA
 ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
 SSSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCAPE FLGGPSVFLF

PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGIFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSGDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 SLGK ,

RAB0 之重鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 7 :

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA
 PGKGLEWVSG IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED
 TAVYYCARVN VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST
 KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF
 PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG
 PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV
 QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV
 SLTCLVKGIFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDGS FFLYSRLTVD
 KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK ,

RAB2 之重鏈之胺基酸序列 SEQ ID NO : 8 :

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
 IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
 VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA
 ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
 SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF

PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 SLGK ,

RAM0hc 之胺基酸序列 SEQ ID NO : 9 :

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA
 PGKGLEWVSG IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED
 TAVYYCARVN VIAVAGTGYG YYGMDVWGQG TTVTVSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF
 PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC
 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK ,

RAM0lc 之胺基酸序列 SEQ ID NO : 10 :

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVV SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GTSSRATGIP DRFSGSASGT DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK ,

RAM9hc 之胺基酸序列 SEQ ID NO : 11 :

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
 IGSSGGTTYI ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ
 WLYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT
 AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS
 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
 KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN
 NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 EALHNHYTQK SLSLSPGK ,

RAM9lc 之胺基酸序列 SEQ ID NO : 12 :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQRIM TYLNWYQQKP GKAPKLLIFV
 ASHSQSGVPS RFRGSGSETD FTLTISGLQP EDSATYYCQQ SFWTPLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC ,

RAM4hc 之胺基酸序列 SEQ ID NO : 13 :

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
 IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
 VIAVAGTGYY YYGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS

SSLGTQTYIC NVNHNKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS
 LSLSPGK ,

RAM4lc 之胺基酸序列 SEQ ID NO : 14 :

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVS SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GTSSRATGIP DRFSGSASGT DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC ,

人類 MIF 之序列 SEQ ID NO : 15

Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro
 Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly
 Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met
 Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Cys Ser Leu His Ser
 Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
 Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
 Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
 Thr Phe Ala ◦

【0099】 根據本發明之抗體較佳為分離單株抗體。抗 MIF 抗體可為 5

IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子。在其他具體實例中，抗 MIF 抗體為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亞綱。在其他具體實例中，抗體為亞綱 IgG1 或 IgG4。在其他具體實例中，抗體為亞綱 IgG4。在一些具體實例中，IgG4 抗體具有使絲胺酸（絲胺酸 228，根據 Kabat 編號方案）改變為脯胺酸之單一突變。因此，IgG4 之 Fc 區中的 CPSC 亞序列變為 CPPC，其為 IgG1 中的亞序列（Angal 等人 *Mol Immunol.* 1993, 30, 105-108）。

【0100】 可使用標準蛋白質純化方法，例如經由陰離子交換層析法或親和性層析法自培養基回收抗體。在一個具體實例中，可藉由尺寸排外層析法自細胞培養上清液純化抗（ox）MIF 抗體。

【0101】 術語 MIF「中心區域」及「C 端區域」係指分別包含胺基酸 35-68 及胺基酸 86-115 之人類 MIF、較佳分別包含胺基酸 50-68 及胺基酸 86 至 102 之人類 MIF 之區域。

【0102】 尤其較佳抗 oxMIF 抗體結合至人類 MIF 之區域胺基酸 50-68 或區域胺基酸 86-102。此亦藉由較佳抗體 RAB0、RAB4、RAB2 及 RAB9 以及 RAM4、RAM9 及 RAM0 之如下結合之結合來反映：

RAB4 與 RAM4：胺基酸 86-102

RAB9 與 RAM9：胺基酸 50-68

RAB0 與 RAM0：胺基酸 86-102

RAB2： 胺基酸 86-102。

【0103】 術語「抗原決定基」包括能夠特異性結合至免疫球蛋白或抗體片段之任何蛋白質決定子。抗原決定基決定子通常由諸如曝露的胺基酸、胺基糖或其他碳水化合物側鏈之分子之化學活性表面分組組成且通常

具有特異性三維結構特徵以及荷質比特徵。

【0104】 術語「載體 (vector)」係指能夠輸送另一核酸至其已連接之核酸之核酸分子。在一些具體實例中，載體為質體，亦即，額外 DNA 片段可接合至其中之環狀雙股 DNA 環。

【0105】 術語「宿主細胞 (host cell)」係指細胞株，其能夠在引入表現載體之後產生重組蛋白質。術語「重組細胞株 (recombinant cell line)」係指其中已引入重組表現載體之細胞株。應理解，「重組細胞株」意謂特定個體細胞株以及該種細胞株之後代。因為某些修飾可能由於突變或環境影響而於後代中發生，所以該後代可能實際上與母細胞不相同，但仍包括於如本文中所示之術語「重組細胞株」之範疇內。

【0106】 根據本發明之宿主細胞類型為例如 COS 細胞、CHO 細胞或例如 HEK293 細胞或熟習此項技術者已知的任何其他宿主細胞，因此亦例如包括細菌細胞，類似例如大腸桿菌細胞。在一個具體實例中，在 DHFR 缺乏的 CHO 細胞株（例如 DXB11）中且在添加 G418 作為選擇標記之情況下表現抗體。在將重組表現載體編碼抗體基因引入 CHO 宿主細胞中時，藉由培養宿主細胞持續足以允許在該等寄主細胞中的抗體之表現或使抗體分泌至其中生長宿主細胞之培養基中之時間段來產生抗體。

【0107】 本發明上下文中之「MIF 相關疾患」包括（但不限於）感染性疾病、炎症、自體免疫、癌症、細胞分化、動脈粥樣化形成及血管生成相關疾病。MIF 相關疾患為例如 I 型及 II 型糖尿病、急性肺損傷、哮喘、同種異體移植排斥反應、移植物抗宿主病、傷口癒合障礙及發炎性腸道疾病。癌症為另一 MIF 相關疾患。特定言之，MIF 相關癌症包括淋巴瘤、肉瘤、

前列腺癌及結腸癌、膀胱癌、胰臟癌、卵巢癌、黑色素瘤、肝細胞癌、卵巢癌、乳癌及胰臟癌。

【0108】 另外，動脈粥樣硬化為 MIF 相關疾患。

【0109】 此外，惡性腹水為 MIF 相關疾患。

【0110】 另外 MIF 相關疾患包括類肉瘤病、硬皮病、牛皮癬、(潰瘍性)結腸炎以及異位性皮膚炎，以及敗血性休克、遲發性過敏反應、急性呼吸窘迫症候群 (ARDS)、多發性硬化症、胰臟炎及缺血性心臟損傷。

【0111】 MIF 相關的免疫及發炎性疾患包括革蘭氏陰性與革蘭氏陽性敗血症，例如綠膿桿菌感染或敗血症、DTH、絲球體腎炎、關節炎、佐劑關節炎、幼年型關節炎、(自體免疫)腦脊髓炎/腦炎、(自體免疫)心肌炎、過敏性腦炎、胃炎、結腸炎；(免疫)絲球體腎炎；肺炎，毒性休克症候群，病毒感染，肺結核，B 型肝炎，登革熱 (dengue fever)，寄生蟲與蠕蟲 MIF 相關感染，特定言之瘧疾、利什曼病 (leishmaniasis)、錐蟲病、弓蟲病、阿米巴病 (amoebiasis)、血吸蟲病、囊蟲病、旋毛蟲病及絲蟲病；腎臟疾病，如白血球介導的腎損傷、非增殖性腎病、增殖性腎病、腎同種異體移植排斥反應及芬蘭 (Finnish) 型先天性腎病症候群、腎炎、如尿酸腎病及高血壓腎病之腎病、輸尿管梗阻及糖尿病腎病。

【0112】 神經痛為另一 MIF 相關疾患。

【0113】 根據本發明之待診斷的最佳疾病為：絲球體腎炎、敗血症、淋巴瘤、狼瘡、腎炎、牛皮癬、潰瘍性結腸炎及眼科病狀以及伯基特氏 (Burkitt's) 淋巴瘤、白血病、惡性腹水、前列腺腺癌、胰臟癌、卵巢癌、結腸直腸癌、頭頸癌、腎細胞癌、肝細胞癌、乳癌及肺癌。k-ras 野生型癌症

以及 k-ras 突變癌症兩者可根據本發明進行治療。

【0114】 特定言之，本發明亦涵蓋所有上文提及的疾患之第三線治療。

【0115】 本發明之一個態樣係關於個體之樣本中的經修飾之 MIF 之偵測。該偵測允許熟練的行醫者例如測定 MIF 是否為折磨個體之疾病或疾患之治療上重要組分。此測定將輔助行醫者對（額外）抗（ox）MIF 治療是否可有益於所討論之個體的決策。

【0116】 經修飾之 MIF 亦適用作標記來測定通常給定個體之健康或疾病病狀；較高位準的經修飾之 MIF 將允許發現個體罹患 MIF 相關疾病；經修飾之 MIF 可因此亦用作個體之健康/疾病病狀之（二級）一般標記，例如與當前及廣泛用作該種（二級）標記之 C-反應蛋白質（C-reactive protein；CRP）之測定相似。

【0117】 根據本發明，MIF 之半胱胺酸 81（C81）之存在對 MIF 向疾病相關狀態之轉換、亦即自 redMIF 向 oxMIF 之氧化還原轉換為至關重要的，且 C81 硫氫基之衍生作用促進（或負責）此轉換至 oxMIF 形式。因此，本發明提供 MIF 半胱胺酸 81 之硫氫基之修飾狀態作為診斷標記之用途，用於 MIF 相關疾患之診斷。

【0118】 在本說明書之上下文中的「診斷」涵蓋疾病之偵測、疾病狀態之評價及疾病進展之監測，其亦允許監測治療性治療之功效。

【0119】 在一較佳具體實例中，根據本發明之該等 MIF 相關疾患之診斷可涵蓋結合至經修飾之 MIF 的化合物之用途或另外用途，用於經修飾之 MIF 的偵測。此等有差異地結合經修飾之 MIF 之化合物可為有差異地結

合至經修飾之 MIF 之抗體或小分子。可用於本發明之診斷分析可為熟習此項技術者熟知的任何診斷分析。特定言之，可以例如 ELISA 格式、夾層 (ELISA) 格式，藉由使用 FACS、免疫螢光法、免疫組織化學法及各種其他適合方法中之任一者（其所有為此項技術中熟知的）進行診斷分析。

【0120】 在評估樣本的根據本發明之經修飾之 C81 之存在時，可能發生由 MIF（諸如經 C81 修飾之 MIF）的氧化形式產生的偽陽性結果。舉例而言，MIF 蛋白質（且因此 C81）中的半胱胺酸殘基之氧化可由生物樣本（例如溶血性血液樣本）中的氧化還原活性鐵及血紅素誘導，或若將氧化劑添加至樣本，則誘導該氧化。該等偽陽性結果可例如藉由採取如以下本文中所描述之措施、例如藉由去激活氧化還原活性鐵與血紅素及藉由避免例如氧化劑之添加來避免。

【0121】 對於血液中循環的 MIF 之分析，較佳採用特殊樣本程序，其包括以下措施及步驟。檸檬酸鹽血漿為較佳的。以 40 g 離心來自新鮮血液（在+4°C 下儲存不超過 12 h）之檸檬酸鹽血漿 5 min。將上清液轉移至新的管中且以 2000 g 再次離心 3 min。再次將不含細胞之上清液轉移至新的管中且以 16000 g 離心 3 min。在三個離心步驟之後，不含細胞之上清液可在-80°C 下儲存或直接用於 MIF 之分析。若在血清中分析 MIF，則較佳藉由經冷凍之存儲之前或運行 MIF ELISA 之前的相同三個離心步驟移除細胞及不可溶片段。

【0122】 尿樣本中的沈積物在用於 MIF ELISA 之前應亦較佳藉由離心步驟（16000 g，5 min）移除。通常，生物流體（例如淚液、唾液）中出現的細胞及其他常見粒子必須預先藉由離心步驟移除且接著儲存用於測試

MIF。

【0123】 此外，由於變性 MIF 亦可由特異性結合至 oxMIF 或至經修飾之 MIF 之抗體認知，待測試之 MIF 蛋白質在樣本製備期間（例如在體液之分離及製備期間）應保持其天然構形。因此，避免諸如沸騰、固定（在膜、塑膠（板）或晶片上）及化學治療（例如藉由還原劑、氧化劑及有機溶劑）之變性條件/步驟。

【0124】 對於細胞表面上的 MIF 之分析，較佳使用流動式細胞測量術分析。尤其重要的是，該等樣本在樣本製備期間並不進行溶血。因此，用於本發明流動式細胞測量術分析之所有樣本已經製備而無將導致在樣本內的細胞之溶血之任何步驟。

本發明之較佳具體實例之概述

1. 一種治療或預防有需要之個體中的 MIF 相關疾患之方法，該方法藉由向該個體投予有效量之以下化合物

(a) 防止在位置 81 處的 MIF 之修飾，或

(b) 優先結合至攜帶位置 81 處的修飾之 MIF，其係與不含有半胱胺酸 81 之該修飾之 MIF 相比。

2. 具體實例 1 之方法，其中該優先結合化合物為抗體或為包含抗體之抗原結合部分之分子，及/或該優先結合化合物誘導與在該化合物不存在下該經修飾之 MIF 相比在更小程度上使抗體 RAM0、RAB0、RAM9 或 RAB9 或另一 oxMIF 特異性抗體結合之形式的該經修飾之 MIF。

3. 在位置 81 處攜帶修飾之 MIF 之用途，其用作標靶用於 MIF 相關疾患之治療或預防。

在一較佳具體實例中，在（SEQ ID NO：15 之）位置 81 處攜帶修飾之 MIF 係用作標靶用於藥物發現分析。藥物發現分析為熟習此項技術者熟知之分析。其為藉以評估給定化合物/用於疾病或疾患之治療或預防（「作為藥物」）的給定化合物之（潛在）有用性之分析。

4. 一種監測 MIF 相關疾患之治療之有效性的方法，其包含在於該治療之前及之後自個體分離的樣本中測定 MIF 位置 81 是否攜帶修飾之步驟，其中若治療後與治療前相比 MIF 位置 81 之修飾的程度較小，則該治療被識別為有效的。

「有效性」及「功效」均為熟知術語且在本文中可互換使用。

5. 一種抗 MIF 抗體或包含抗體之抗原結合部分之分子，該抗體或分子結合在位置 81 處經修飾之 MIF 但不結合在位置 81 處未經修飾之 MIF。

6. 一種分析一測試化合物是否優先結合至在位置 81 處經修飾之形式的 MIF 之方法，該方法包含以下步驟

(a) 在位置 81 處修飾 MIF 以獲得經修飾之 MIF，

(b) 在測試樣本中及在其中 MIF 於位置 81 處未經修飾之對照樣本中組合待測試的化合物與該經修飾之 MIF，

(c) 評估該測試樣本中及該對照樣本中之該化合物與該經修飾之 MIF 之結合

其中，若該化合物在該測試樣本中與在該對照樣本中相比在更大程度上結合至該經修飾之 MIF，則選擇該化合物。

7. 一種分析測試化合物對在位置 81 處經修飾之 MIF 的構形影響之方法，該方法包含以下步驟

- (a) 提供含有在位置 81 處經修飾之鉬 MIF 之測試樣本，
- (b) 在該測試樣本中組合待測試的化合物與該經修飾之 MIF，
- (c) 評估該測試樣本中之與其中位置 81 攜帶修飾之 MIF 的構形(i)(對照組 1) 及/或在位置 81 處含有未經修飾之半胱氨酸殘基之 MIF 的構形(ii) (對照組 2) 相比的經修飾之 MIF 的構形，

其中若該構形評估指示該測試樣本中的經修飾之 MIF 的構形與構形(i) 相比具有構形(ii) 之可偵測的相似性程度，或若該構形評估指示該測試樣本中的經修飾之 MIF 的構形以其他方式可偵測地自構形(i) 偏離，則選擇該化合物。

8. 具體實例 7 之方法，其中在步驟(c) 中藉由免疫分析、較佳藉由 ELISA 評估 MIF 之構形。

9. 具體實例 7 之方法，其中在步驟(c) 中藉由 X 射線晶體學評估 MIF 之構形。

10. 一種分析測試化合物對在位置 81 處經修飾之 MIF 的構形影響之方法，該方法包含以下步驟

- (a) 提供含有在位置 81 處經修飾之 MIF 之測試樣本，
- (b) 在該測試樣本中組合測試化合物與該經修飾之 MIF，
- (c) 評估該測試樣本中的經修飾之 MIF 與在測試化合物不存在下的(i) 該經修飾之 MIF (對照組 1) 相比與選自 RAM0、RAB0、RAM9 及 RAB9 及/或任何其他 oxMIF 特異性、oxMIF 構形敏感抗體(例如選自本文所揭示之 oxMIF 特異性抗體) 之結合，

其中若該測試樣本(亦即在測試化合物存在下) 中的經修飾之 MIF 與

在該化合物不存在下的該經修飾之 MIF（對照組 1）相比在更小程度上結合抗體，則選擇該化合物。

11. 一種篩選防止在半胱胺酸 81 處的 MIF 之修飾之化合物之方法，該方法包含以下步驟

(a) 在測試樣本中組合 MIF 與待測試的化合物，

(b) 在含有該化合物之該測試樣本中及在該化合物不存在之對照樣本中藉由硫氫基反應試劑在該試劑至少在該對照樣本中修飾 MIF 之半胱胺酸 81 之硫氫基的條件下處理 MIF，

(c) 藉由該硫氫基反應試劑評估半胱胺酸 81 之修飾，

其中若該硫氫基反應試劑在該測試樣本中與在該對照樣本中相比半胱胺酸 81 之修飾的程度較小，則選擇該化合物。

12. 一種藉由 X 射線晶體學分析測試化合物結合至修飾形式的 MIF 之方法，該方法包含以下步驟

(a) 在位置 81 處修飾 MIF 以獲得經修飾之 MIF，

(b) 藉由在該測試化合物存在下結晶該經修飾之 MIF 或藉由在該測試化合物不存在下結晶該經修飾之 MIF 且隨後使所得晶體與該測試化合物接觸來提供該經修飾之 MIF 的晶體，及

(c) 使用該等晶體測定 MIF 之三維結構。

13. 一種含有具有在位置 81 處的修飾之 MIF 之晶體。

14. 具體實例 13 之晶體進一步含有另一化合物。

15. MIF 蛋白質之位置 81 之用途，其用作 MIF 相關疾患及/或用於監測 MIF 相關疾患之診斷標記。

16. 一種如具體實例 15 之用途，其中 MIF 蛋白質之位置 81 之修飾狀態係用作 MIF 相關疾患及/或用於監測 MIF 相關疾患之診斷標記。

17. MIF 位置 81 之修飾狀態作為診斷標記之用途，其中 MIF 位置 81 攜帶修飾之發現指示 MIF 相關疾患。

18. 一種如具體實例 16 之用途，其中 MIF 半胱胺酸 81 之硫氫基之修飾狀態用作診斷標記，其中 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子與自由半胱胺酸硫氫基相比攜帶修飾之發現指示 MIF 相關疾患。

19. 一種診斷 MIF 相關疾患之方法，其包含在自個體分離的樣本中測定 MIF 位置 81 是否攜帶修飾之步驟，其中，MIF 位置 81 被識別為經修飾、個體經診斷患有 MIF 相關疾患或易感染 MIF 相關疾患。

20. 一種診斷 MIF 相關疾患之方法，其包含在自個體分離的樣本中測定 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子與自由半胱胺酸硫氫基相比是否攜帶修飾之步驟，其中若 MIF 半胱胺酸 81 之硫原子被識別為攜帶該種修飾，則診斷該個體患有 MIF 相關疾患或易感染 MIF 相關疾患。

21. 一種如具體實例 15 至具體實例 18 中之任一項之用途或一種如具體實例 19 或 20 之方法，其為一種測定給定疾患或病理性病狀是否涉及在位置 81 處經修飾之 MIF 或與在位置 81 處經修飾之 MIF 相關之方法。

22. 如具體實例 15 至具體實例 18 中任一項之用途中的診斷套組之用途或一種如具體實例 19 至具體實例 21 中任一項之方法，其中該診斷套組包含優先結合至其中半胱胺酸 81 存在之 MIF 或至在位置 81 處攜帶修飾之 MIF 之化合物。

23. 一種如具體實例 22 之用途，其中該套組另外包含緩衝劑、對照試劑

(例如其中半胱胺酸 81 存在或不存在之 MIF，或在位置 81 處具有或不具有修飾之 MIF，例如與自由半胱胺酸硫氫基相比在半胱胺酸 81 之硫原子上的修飾，優先結合至任何該等形式的 MIF 之化合物)、多株抗 MIF 抗體及/或標記偵測抗體。

24. 一種如具體實例 1、2 或具體實例 6 至具體實例 12 中任一項之方法或如具體實例 22 或 23 之用途，其中該化合物為抗體或為包含抗體之抗原結合部分之分子。

25. 一種如具體實例 1、2、4、19、20 或 24 中任一項之方法或一種如具體實例 3、15 至 18、21 至 23 中任一項之用途，其中該 MIF 相關疾患為 MIF 相關疾病、MIF 相關疾病狀態或 MIF 相關疾病之進展之狀態。

26. 一種如具體實例 25 之用途或方法，其中該 MIF 相關疾患為發炎性疾病或贅生性疾病。

27. 一種如具體實例 25 之用途或方法，其中該 MIF 相關疾患係選自由以下者組成之群：結腸癌、前列腺癌、膀胱癌、胰臟癌、卵巢癌、黑色素瘤、淋巴瘤、肝細胞癌、哮喘、ARDS、類風濕性關節炎、敗血症、IgA 腎病、絲球體腎炎、狼瘡腎炎 (Lupus Nephritis, LN)、肝炎、胰臟炎 (+/-急性肺損傷)、克羅恩氏病 (Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、胃潰瘍、阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease)、多發性硬化症、格林-巴利症候群 (Guillain-Barre syndrome)、心臟功能障礙、血管成形術、動脈粥樣硬化、心肌炎、第 1 型糖尿病、糖尿病性視網膜病變、年齡相關性黃斑變性 (age-related macular degeneration; AMD)、異位性皮膚炎、牛皮癬、子宮內膜異位、神經痛及葡萄膜炎。

28. 一種如項 25 之用途或方法，其中該 MIF 相關疾患為惡性腹水，較佳為在第三線治療中者。

29. 一種 MIF 分子，其在 SEQ ID NO：15 之位置 81 上經修飾。

【0125】 以下實施例及如下文所描述之圖式說明本發明及可在執行或評估本發明中為有用之方法。該等實施例及圖式決不意欲限制本發明。

【圖式簡單說明】

【0126】

圖 1 展示了如本發明實施例中所採用的 MIF 與野生型 MIF 相比之野生型及突變重組融合構造之示意性圖示。

圖 2 展示了使用抗體 RAM9 進行圖 1 之 MIF 構造之西方墨點 (Western blot) 分析。

圖 3 展示了使用抗體 RAM0 進行圖 1 之 MIF 構造之西方墨點分析。

圖 4 展示了用於在化合物 R 或 MIF 上的硫氫基之衍生作用之硫氫基反應試劑之實例、所得反應產物及在衍生作用之後 R 或 MIF 之 Da 中的分子量之預期的增加。

圖 5 展示了用於評估 MIF 及其突變及/或衍生形式之 ELISA 分析之一般設置。

圖 6 展示了在 ELISA 分析中野生型人類 MIF 以其還原形式 (human MIF in its reduced form；huMIFred)、以半胱胺酸化形式 (Cys-MIF) 且在使用 5,5'-二硫基雙-(2-硝基苯甲酸)/DTNB (DTNB-MIF) 衍生時與抗體 RAM9 之結合。

圖 7 展示了藉由 ELISA 對 MIF 以其野生型 (MIF)、野生型融合

(MIF(wt)SBP) 及突變融合 (MIF(C57S)SBP 等) 形式在未經修飾時、在用 DNTB 衍生且在非還原條件下評估時或在 DTT 存在下在用 DNTB 衍生且在還原條件下評估時與抗體 RAM9 (圖 A) 及 RAM0 (圖 B) 結合之評估。

圖 8 (圖 A 及圖 B) 展示了藉由 MIF 以其野生型 (MIF)、野生型融合 (MIFwt-SBP) 及突變融合 (MIF(C57S)SBP 等) 形式獲得的質譜資料，用半胱胺酸或 DTNB (+NTB) 確認衍生作用。藉由 DTNB 之半胱胺酸化或衍生作用產生反映相應增加的分子量之峰。

圖 9 展示了自半胱胺酸化 MIF 之肽質量指紋識別獲得的質譜。

圖 10 展示了藉由肽質量指紋識別進行半胱胺酸化 MIF 之分析之結果。

圖 11 展示了自由 DTNB 衍生的 MIF 之肽質量指紋識別獲得的質譜。

圖 12 展示了藉由肽質量指紋識別進行由 DTNB 衍生的 MIF 之分析之結果。

【實施方式】

【0127】 以下描述在抗體及/或 MIF 之評估中為有用之若干分析或方法。

A) 抗體篩選之 GCO 分析：

【0128】 離心 THP1 懸浮培養物且使細胞再懸浮於新鮮的全培養基中達到每毫升 10^6 細胞之細胞密度。將此培養物轉移至 96 孔微板之孔中 (每孔 90 μ l) 且添加潛在的抗 MIF 抗體以得到 75 μ g/ml 之最終濃度。各抗體以一式三份進行測試。在 37°C 下 o/n 培育之後添加地塞米松 (dexamethasone) 以得到 2 nM 之濃度且在 37°C 下 1 小時培育之後添加 LPS (3 ng/ml 最終濃

度)。在 37°C 下另外 6 小時培育之後收穫上清液且在市售 ELISA 中測定 IL-6 濃度。一式三份之結果取平均值且相比於對照抗體測定 IL-6 分泌之百分比。導致 IL-6 分泌小於 75% 之抗體評估為陽性。

B) IC50 值之測定之分析

【0129】 如關於篩選分析所描述進行實驗程序，除了使用增加量的抗體（典型地為 1-125 nM）。所得劑量反應曲線表示為相比於陰性對照抗體之 % 抑制。此曲線用於抗體之最大抑制效果（% Inh max）及展示 50% 的最大抑制效果之抗體濃度（IC50）之計算。

C) 細胞增殖之抑制

【0130】 血清刺激 MIF 在靜止 NIH/3T3 中之分泌且 MIF 轉而刺激細胞增殖。抗體抑制此內源性 MIF，因此，減少靜止 NIH/3T3 細胞之增殖。增殖之減少係藉由 3H-胸苷之併入來測定。

【0131】 在含有 10% 血清之培養基中歷經週末在 37°C 下於 96 孔板中培育每孔 1000 NIH/3T3 細胞。接著在 37°C 下藉由在含有 0.5% 血清之培養基中之培育使細胞饑餓隔夜。移除 0.5% 培養基且由含有 10% 血清、75 $\mu\text{g/ml}$ 抗體及 5 $\mu\text{Ci/ml}$ 之 3H-胸苷之新鮮培養基替代。在 37°C 下於 CO₂ 培育箱中之 16 小時培育之後用每孔 150 μl 之冷 PBS 洗滌細胞兩次。使用多通道移液管添加每孔 150 μl 之 5% (w/v) TCA 溶液且在 4°C 下培育 30 分鐘。用 150 μl PBS 洗滌板。添加每孔 75 μl 之具有 0.5% SDS 之 0.5M NaOH 溶液，混合且在室溫下儲存。藉由混合 5 ml 之 Ultima Gold (Packard) 與 75 μl 樣本溶液以 β -計數器量測樣本。以一式三份進行各測定且藉由 t 檢驗對該等值與對照抗體之值進行比較。顯著減少增殖 ($P < 0.05$) 之抗體評估為陽性。

D) 結合研究：抗 MIF 抗體之抗原決定基測定

【0132】 在偶合緩衝液中稀釋各肽以得到典型地 1 $\mu\text{g/ml}$ 之肽濃度，將其添加至微板 (NUNC ImmobilizerTM Amino Plate F96 Clear) 且在 4°C 下培育隔夜 (每孔 100 μl)。使用重組全長 MIF 及 PBS 作為對照組。用 200 μl PBST 洗滌該板 3 次且添加 (每孔 100 μl) 抗體 (於 PBS 中之 2-4 $\mu\text{g/ml}$) 且在室溫下藉由平緩搖動培育 2 小時。用 200 μl PBST 洗滌該板 3 次且添加 (每孔 100 μl) 偵測抗體 (例如 Fc 特異性抗人類 IgG/HRP 標記, Sigma)。在室溫下藉由平緩搖動培育 1 小時之後，用 200 μl PBST 洗滌該板 3 次。用 100 μl TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺) 溶液 (T-0440, Sigma) 在暗處培育各孔 30 分鐘。藉由增加每孔 100 μl 之 1.8 M H₂SO₄ 溶液停止染色反應。在 450 nm 處量測樣本。

E) 藉由 Biacore 進行抗 MIF 抗體之親和力測定

【0133】 典型地，藉由 CM5 (=羧基甲基化聚葡萄糖) 基質 (Biacore) 將人類重組 MIF 之 40 RU 單元固定於感測器晶片上。在稀釋於 HBS-EP 中之典型的 6-100 nM 之濃度範圍下注入 Fab 片段。在各循環之後用 50 mM NaOH+1 M NaCl 更新晶片。根據 1:1 朗格繆爾 (Langmuir) 模型計算親和力。

F) 藉由 ELISA 進行血清樣本中之經 C81 修飾之 MIF 之量測

【0134】 藉由例如人類抗經 C81 修飾之 MIF 單株抗體包覆微量滴定板。以 1:25 在 0.5% 魚膠/PBS (pH 7.2) 中稀釋人類血清樣本且施加至該板。在洗滌該板之後，例如藉由親和力純化的多株兔抗體抗人類 MIF 進行由包被抗體捕獲的經 C81 修飾之 MIF 之偵測。在例如用 HRP 標記之山羊抗兔抗體 (BioRad, Cat.: 171-6516; 亦可在本文中使用的任何其他

山羊抗兔) 及 TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺; T-0440, Sigma) 作為顯色基質 (亦可使用如熟習此項技術者已知之任何其他適合基質) 之進一步培育之後進行 ELISA 之讀出。用 H₂SO₄ 停止 TMB 之顯色反應且在 450 nm 處量測 ELISA 板。

【0135】 ELISA 之校準可藉由在半胱胺酸 81 處新衍生的重組人類 MIF 例如使用在含有導致人造 oxMIF 構形之緩衝液之 ProClin 中稀釋的 DTNB 或 MIF 進行。在包括 0.2% ProClin300 及 4% 人類對照血漿 (亦即來自 50 個健康供體之血清樣本池) 之 0.5% 魚膠/PBS 中稀釋標準物。校準曲線之範圍可為例如 10 ng/ml 至 0.156 ng/ml。

G) 藉由流動式細胞測量術進行敗血症患者中之細胞表面上的經 C81 修飾之 MIF 之量測

【0136】 藉由 Alexa700 標記之抗 CD3 ϵ (用於 T 細胞) 及 PerCP-Cy5.5 標記之抗 Ly6G (用於粒細胞) 或 APC 標記之抗 CD14 (用於單核細胞) 及 PE-Cy7 標記之抗 CD19 (用於 B 細胞) 同時藉由 300 nM 抗經 C81 修飾之 MIF 抗體或對照組 IgG 在細胞染色緩衝液 (Biologend) 中染色血液 (例如來自患有敗血症之患者)。在洗滌之後, 使用山羊 R-PE 標記之抗人類 IgG 抗體偵測人類抗體。在洗滌之後, 用 BD FACSTM 裂解溶液 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) 裂解紅血球。藉由 DIVA™ 軟體 (軟體版本 6; Becton Dickinson) 使用 FACSTM Canto II (Becton Dickinson) 進行資料獲取且使用 FlowJo™ 軟體 (Treestar, Ashland, OR, USA) 分析資料。

H) 多株及親和力純化的多株兔抗人類 MIF 抗體之製備

多株兔抗 huMIF 抗體在新西蘭白兔中之免疫接種程序

【0137】 對於初次免疫接種，如實施例 1 中所描述獲得的 25 μg 之重組人類 MIF 稀釋於 100 μl PBS 中，與 100 μl 完全弗氏佐劑 (Complete Freund's Adjuvant; CFA) 混合。將 200 μl (4 \times 50 μl) 之混合物皮下施用至各兔之不同身體部分。在初次免疫接種之後的 2-3 週後，使具有 25 μg 之重組人類 MIF (懸浮於 100 μl PBS 中) 之第一增強免疫與 100 μl 不完全弗氏佐劑 (Incomplete Freund's Adjuvant; IFA) 混合。再次，將 200 μl (4 \times 50 μl) 之混合物皮下施用至各兔之不同身體部分。在第一增強免疫之後的 2-3 週進行第二增強免疫，使 25 μg 之重組人類 MIF (懸浮於 100 μl PBS 中) 與 100 μl 不完全弗氏佐劑 (Incomplete Freund's Adjuvant; IFA) 混合。再次，將 200 μl (4 \times 50 μl) 之混合物皮下施用至各兔之不同身體部分。在第二增強免疫之後的 2 週終止免疫接種程序。典型地，來自多個兔之血漿經合併且用於抗 MIF 抗體之分離。

蛋白質 A 純化及多株兔抗 huMIF 抗體之 huMIF 親和力純化程序

【0138】 兔抗 huMIF 抗體自免疫血漿之分離典型地藉由兩個親和層析法步驟進行。首先，血漿係藉由蛋白質 A 親和管柱 (MabSelect Sure, GE Healthcare) 純化。彼效用在於，用 20 mM Na_2HPO_4 緩衝液 (pH 7.0) 以 1:3 稀釋兔血漿且施加至親和管柱。在洗滌步驟 (5 個管柱體積用 20 mM Na_2HPO_4 緩衝液，pH 7.0) 之後，藉由 100 mM 甘胺酸 (pH 2.8) 進行整個兔 IgG 之洗提。洗提液經合併且使用 1 M Tris/HCl 中和至 pH 7.0。對於 hu-MIF 親和力純化，再次用 20 mM Na_2HPO_4 緩衝液 (pH 7.0) 以 1:3 稀釋整個兔 IgG 且施加至如由供應商建議與 25 mg rhuMIF 偶合的 5 ml NHS-親和管柱 (GE Healthcare)。在洗滌步驟 (5 個管柱體積用 20 mM Na_2HPO_4 緩衝液，pH 7.0)

之後，特異性兔抗 huMIF 抗體之洗提係藉由 100 mM 甘胺酸 (pH 2.8) 實現。洗提液經合併且使用 1 M Tris/HCl 中和至 pH 7.0。最後，hu-MIF 親和力純化之特異性兔抗人類 MIF 抗體(以下為「抗人類 MIF 親和力純化之多株抗體」) 針對 PBS 進行透析且在 -20°C 下儲存。

實施例

【0139】 以下實施例尤其說明 MIF 之半胱胺酸 81 (C81) 之存在對 MIF 向疾病相關狀態之轉換、亦即自 redMIF 至 oxMIF 之氧化還原轉換為至關重要的且 C81 硫氫基之衍生作用促進 (或負責) 此轉換。

實施例 1 重組野生型及突變形式之 MIF 之製備

【0140】 如圖 1 中所示，藉由抗生蛋白質鏈菌素結合肽 (streptavidin binding peptide ; SPB) 標記經由(GGGGS)₂-連接子(參見 SEQ ID NO:16)之人類 MIF (huMIF) 之野生型及半胱胺酸突變重組融合構造係藉由標準方法製備、選殖及表現。簡言之，在 pet25b 中選殖合成 DNA (Invitrogen, GeneArt) 且在大腸桿菌 Shuffle T7 Express 中表現其 (NEB)。使用 BugBuster® 蛋白質萃取主混合 (Protein Extraction Master Mix) (Novagen) 萃取可溶蛋白質且經由抗生蛋白質鏈菌素管柱及生物素洗提藉由親和層析法純化。使用尺寸排外層析法進行進一步純化。抗生蛋白質鏈菌素結合肽 (SPB) 標記之序列為：MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP (SEQ ID NO : 17)。因此製備具有 SBP (SEQ ID NO : 18) 之野生型人類 MIF 融合及在 MIF 之位置 57、60 與 81 處具有半胱胺酸向絲胺酸之單一突變之三個半胱胺酸突變 SBP 融合構造 (亦即單一突變分別為 C57S、C60S 及 C81S-SEQ ID NO : 19-21)。

【0141】 重組野生型未標記之 huMIF (SEQ ID NO : 15) 在包括具有人類 MIF 序列之表現系統之大腸桿菌細胞中產生。在+37°C 下於補充有安比西林 (Ampicillin) 之 Luria Bertani 培養基 (LB/Amp) 中培養新鮮解凍細胞隔夜。在第二天，用相等體積之新鮮 LB/Amp 培養基稀釋細菌細胞培養物且藉由在 30°C 下添加 4 小時 IPTG (最終濃度：1.0 mM) 誘導表現。藉由離心收穫細菌離心塊且在<-15°C 下儲存。

【0142】 對於細胞內人類 MIF 蛋白質之進一步純化，使冷凍細菌離心塊再懸浮於 20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.8) 中且藉由玻璃珠以機械方式破壞細胞。藉由離心移除細胞碎片且使用常見 0.2 μ m 過濾器進行過濾。將上清液直接施加至陰離子交換層析管柱 (HiTrap 26/16 DEAE FF, GE Healthcare, Waukesha, USA) 且藉由被動結合模式純化 MIF。在 20 mM Bis/Tris (pH 6.3) 中再緩衝溢流道且藉由陽離子交換層析法 (來源 30S, GE) 進行進一步純化。藉由 50 mM NaCl 之鹽梯度在 20 mM Bis/Tris 緩衝液 (pH 6.3) 中洗提高度純人類 MIF。最後，針對藉由超過濾濃縮的 PBS 再緩衝純化的人類 MIF 且以純度及官能度特性化。

實施例 2 藉由抗 oxMIF 抗體進行 MIF 半胱胺酸突變之西方墨點探測

【0143】 RAM9 為以上本文中以及 WO2013/050453 中所描述之單株抗體，與還原形式之 MIF (redMIF) 相比其優先結合至氧化、疾病相關形式之 MIF (oxMIF)。RAM0 為以上本文中以及 WO2013/050453 中所描述之單株抗體，與還原形式之 MIF (redMIF) 相比其優先結合至氧化、疾病相關形式之 MIF (oxMIF)。在生理條件下，抗體與 MIF 之結合僅在 MIF 向 oxMIF 之氧化還原依賴 (且可逆) 轉變之後發生。然而，在非生理或變性條件下，MIF

不可逆地改變其結構，其亦導致抗體結合。因此，例如將 MIF 固定於塑膠上或用強清潔劑（strong detergent；SDS）處理實現該等抗體之結合。

【0144】 抗體 RAM9 及 RAM0 因此用於根據標準程序進行的西方墨點分析中以便在變性條件下探測實施例 1 之 MIF 構造。結果展示於圖 2 中。在其上進行西方墨點之 SDS-PAGE 係在還原條件下進行。結果展示 C57 及 C60（但非 C81）對 RAM9 與 MIF 以線性分子形式之結合具有基本重要性。RAM9 在最高 MIF 濃度處之殘餘結合與其結合至野生型或在 C81S 突變之情況下相比不顯著。相比之下，RAM0 與 MIF 結合作為線性分子實質上並非受三個半胱氨酸突變中之任一者影響且偵測野生型構造且所有突變實質上相等。

實施例 3 不同半胱氨酸殘基之突變效果、硫氫基衍生作用效果及衍生作用缺乏之效果

【0145】 抗體 RAM9 及 RAM0 在 ELISA 分析中係用作固定捕獲抗體來探測不同半胱氨酸殘基之半胱氨酸至絲氨酸突變、硫氫基衍生作用及衍生作用缺乏對氧化、疾病相關形式之 MIF（oxMIF）之形成的影響效果。用於硫氫基在 MIF 中之衍生作用的硫氫基反應試劑之實施例展示於圖 4 中。ELISA 分析之一般設置展示於圖 5 中。

【0146】 在 ELISA 分析中野生型人類 MIF 以其還原形式（MIF）、以半胱氨酸化形式（Cys-MIF）或在使用 DTNB（DTNB-MIF）衍生時與抗體 RAM9 之結合展示於圖 6 中。根據 WO2013/050453 中之揭示內容，RAM9 不結合至還原形式之 MIF。然而，RAM9 展示了與半胱氨酸化及 DTNB 衍生的 MIF 兩者之顯著結合。由於 RAM9 特異於例如在 WO2013/050453 中描述為

oxMIF 之疾病相關形式，此展示 MIF 與半胱胺酸（藉由用胱胺酸處理）或 2-硝基-5-硫代苯甲酸（2-nitro-5-thiobenzoic acid；NTB）部分（藉由用 DTNB 處理產生「DTNB 衍生的 MIF」或 MIF+NTB）之衍生作用誘導疾病相關 oxMIF 形式之蛋白質。藉由 RAM0 獲得等效結果。

【0147】 藉由 ELISA 對 MIF 以其野生型及突變形式、以還原/未經修飾之形式（「MIF」、「MIF(wt)SBP」、「MIF(C57S)SBP」等），在用 DTNB 衍生且在非還原條件下評估（「DTNB：+」）時或在用 DTNB 衍生且在還原條件下評估（「DTNB +，DTT +」）時與抗體 RAM9 及 RAM0 之結合之評估分別展示於圖 7 及圖 8 中。

【0148】 此等資料再次確認藉由硫氫基反應化合物 DTNB 之硫氫基的修飾促進了抗體 RAM9 及 RAM0 優先與其結合之疾病相關 oxMIF 之形成。對於 RAM9，此效果在 C57 或 C60 由絲胺酸替代時並非觀測到。然而，看來此係因為 C60 及 C57 本身由於其為 RAM9 線性抗原決定基之一部分而對於 RAM9 之結合為必需的（描述於 Kerschbaumer 等人 *J Biol Chem.* 2012 Mar 2;287(10):7446-55 中）。並非由於在 MIF(C57S)SBP-DTNB 及 MIF(C60S)SBP-DTNB 中缺乏 oxMIF 形成。資料展示在 C57 或 C60 由絲胺酸替代時仍形成 oxMIF，因為此等突變體藉由 DTNB 之衍生作用仍強有力地促進 RAM0 之結合。後一 oxMIF 特異性抗體在與其結合至已轉化成 oxMIF 之 wtMIF（參見 MIF-DTNB 及 MIF(wt)SBP-DTNB）類似的程度上優先結合 MIF(C57S)SBP-DTNB 與 MIF(C60S)SBP-DTNB。相比之下，資料展示 C81 及其硫氫基之衍生作用與 C57 或 C60 相比在疾病相關 oxMIF 形式的蛋白質之形成中發揮更基本的作用：當 C81 由絲胺酸替代時，藉由 DTNB 處理突變

MIF 與非衍生形式相比並不增強兩種 oxMIF 特異性抗體中之任一者之結合 (參見 MIF(C81S)SBP 及 MIF(C81S)SBP-DTNB)。質譜分析資料 (參見以下實施例 4) 展示 C57 及 C60 在該種狀況下未經修飾。

【0149】 資料亦展示由野生型中之 DTNB 誘導的所有 oxMIF 物質且 C57S 或 C60S 突變體可藉由 DTT 還原。

實施例 4 衍生 MIF 及半胱胺酸突變體之質譜分析

【0150】 藉由半胱胺酸或 DTNB 進行的 MIF 及其半胱胺酸突變體之衍生作用係藉由質譜分析確認。

【0151】 藉由 MALDI-TOF 獲得的全長蛋白質之資料 (諸如圖 8 中所示之彼等者) 展示藉由 DTNB 之半胱胺酸化或衍生作用產生反映相應增加的分子量之峰。

【0152】 來自半胱胺酸化人類 MIF 之樣本之最強烈的信號為在 m/z 12470 處之單質子化分子離子、其次為在 m/z 6235 處對應於 12468 Da 之質量的 2 倍質子化離子。此很好地對應於不具有 N 端甲硫胺酸且具有單一半胱胺酸化 (+119 Da) 之人類 MIF 序列之理論質量。非半胱胺酸化人類 MIF 隨著在 m/z 12352 處的較弱信號而可見。在 m/z 12565 及 m/z 12684 處的額外峰係歸因於具有基質之芥子酸之加合物。

【0153】 來自藉由 DTNB 衍生的人類 MIF 之樣本之最強信號為在 m/z 12351 (未經修飾) 及 m/z 12549 (具有 NTB 部分, +197 Da) 處的單質子化分子離子以及在 m/z 6177 及 m/z 6275 處分別對應於 12352 Da (未經修飾) 及 12549 Da (具有 NTB 部分) 之質量的 2 倍質子化離子。在 m/z 12760 處的信號歸因於具有芥子酸之加合物, m/z 24693 為二聚體且未解釋在 m/z 11868

及 m/z 18083 處的兩個另外信號。

【0154】 來自融合於藉由 DTNB 創造的 SBP 之人類野生型 MIF (MIF wt-SBP + NTB) 之樣本的最強信號為在 m/z 17269 (未經修飾) 及 m/z 17467 (具有 DTNB, +197 Da) 處的單質子化分子離子以及在 m/z 8636 及 m/z 8732 處分別對應於 17270 Da (未經修飾) 及 17462 Da (具有 DTNB) 之質量的 2 倍質子化離子。在 m/z 17675 處的信號歸因於具有芥子酸之加合物。

【0155】 來自藉由 DTNB 創造的人類 MIF(C57S)SBP 之樣本之最強信號為在 m/z 17251 (未經修飾)、 m/z 17453 (具有 DTNB) 及 m/z 17651 (具有 2 個 DTNB) 處的單質子化分子離子。在 m/z 8627、 m/z 8726 及 m/z 8824 處的 2 倍質子化離子對應於 17252 Da、17450 Da 及 17646 Da 之質量。

【0156】 來自人類 MIF(C60S)SBP-DTNB 之樣本之最強信號為在 m/z 17246 處的單質子化分子離子。此很好地對應於序列之理論質量 17247。在 m/z 17460 處的信號被分配至藉由 DTNB 及額外氧化修飾之蛋白質。相應 2 倍質子化離子在 m/z 8624 (17246 Da) 及 m/z 8731 (17460 Da) 處為可見的。

【0157】 藉由 DTNB 創造的人類 MIF(C81S)SBP 之樣本並未產生指示蛋白質之衍生作用之任何信號。在 m/z 17249 處的主峰對應於單質子化未經修飾之分子離子。

【0158】 經硫氫基修飾之 MIF 之肽質量指紋識別 (MIF 之胰蛋白質酶消化之後的質譜分析) 允許衍生作用定位於特定半胱胺酸殘基、特定言之半胱胺酸 81。自人類 MIF 之胰蛋白質酶消化預期的肽展示於以下表 1 中：

表 1

#	殘基	預期的 MH+	SEQ ID NO :	序列
1	2 - 12	1287.7	22	<PMFIVNTNVPR>
2	13 - 67	5693.8	23	<ASVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQY IAVHVVPDQLMAFGGSSEPCALCSL HSIGK>
3	68 - 74	715.4	24	<IGGAQNR>
4	75 - 78	484.2	25	<SYSK>
5	79 - 87	987.6	26	<LLCGLLAER>
6	88 - 89	288.2	--	<LR>
7	90 - 94	587.3	27	<ISPDR>
8	95 - 115	2427.1	28	<VYINYDMNAANVGWNNSTFA>

【0159】 在半胱胺酸化 MIF 之該胰蛋白質酶消化且使用 4800 Proteomics Analyzer (AB Sciex) 藉由 MALDI-TOF 方法進行所得肽之質譜分析之後，由殘基 79-87 組成之肽 (LLCGLLAER) 被識別為經半胱胺酸化。除了預期此肽在 MH+ 987.57 處呈未經修飾之形式的信號，亦在 MH+ 1106.57 處觀測到具有 +119.00 Da 之額外質量、亦即對應於半胱胺酸之額外質量之對應於此肽的信號 (參見圖 9 及圖 10)。在具有殘基 13-67 之肽 (其含有半胱胺酸 57 及 60) 中未觀測到額外質量、亦即無半胱胺酸化。

【0160】 在已用 DTNB 處理 MIF 之該胰蛋白質酶消化且使用 4800 Proteomics Analyzer (AB Sciex) 藉由 MALDI-TOF 方法進行所得肽之質譜分析之後，由殘基 79-87 組成之肽 (LLCGLLAER) 被識別為經 DTNB 處理修飾。除了預期此肽在 MH+ 987.57 處呈未經修飾之形式的信號，亦在 MH+ 1184.54 處觀測到具有 +196.97 Da 之額外質量、亦即對應於 2-硝基-5-硫代苯甲酸部分之額外質量之對應於此肽的信號 (參見圖 11 及圖 12)。在具有殘基 13-67 之肽 (其含有半胱胺酸 57 及 60) 中未觀測到額外質量，亦即無 2-

硝基-5-硫代苯甲酸修飾。

【0161】 因此，肽質量指紋識別資料在兩種情況下均確認半胱胺酸 81 之衍生作用。

實施例 5 經 C81 修飾之 MIF 特異性抗體之產生

【0162】 抗體在哺乳動物細胞中、優先在 CHO 細胞中、優先在已基因剔除 MIF（內源性 CHO-MIF）之基因編碼之 CHO 細胞中產生。在基因剔除細胞中可消除具有內源性 CHO-MIF 之抗體之污染，其由於可提高分析之靈敏度而合乎需要。

【0163】 典型地，使用高達 25 L 體積之處置生物反應器（波系統）在分批醱酵過程中產生經 C81 修飾之 MIF 特異性抗體。將分別含有產生的抗體之重鏈及輕鏈之基因編碼之穩定 CHO 細胞株接種至 PowerCHO 培養基（Invitrogen 公司）中且在 37°C 及 5% CO₂ 下培育。

【0164】 在培育期間，各別人類抗體連續地表現至細胞培養基中。在培育（生存率<50%）結束時，藉由常見離心及過濾步驟分離該等細胞。澄清細胞培養上清液（cell culture supernatant；ccs）藉由超過濾濃縮且用於抗體之純化。

【0165】 藉由蛋白質 A 親和層析法自濃縮 ccs 純化人類抗體（MabSelect Sure，GE Healthcare）。在用 5 個管柱體積（column-volume；cv）之 20 mM 磷酸鈉操作緩衝液（pH 7）進行蛋白質 A 材料之平衡之後，將同型對照組之濃縮上清液完全施加至親和管柱。用操作緩衝液洗出雜質或非所要蛋白質。使用 100 mM 甘胺酸（pH 3）藉由 pH 移位洗提抗體且針對 250 mM 甘胺酸緩衝液進行透析。

【0166】 替代地，在用 5 cv 之包括 150 mM 氯化鈉緩衝液及 0.1%吐溫 (Tween) 80 之 20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7) 平衡之前可將濃縮細胞培養上清液施加至蛋白質 A 管柱。雜質可藉由兩個洗滌步驟洗出：1.) 在平衡緩衝液中添加 1 M NaCl 及 2.) 包括 0.1%吐溫 80 之 100 mM 磷酸鈉 (pH 5)。抗體可藉由包括 0.1%吐溫 80 之 100 mM 甘胺酸緩衝液 (pH 3) 洗提且接著針對 250 mM 甘胺酸緩衝液 (pH 5) 進行透析。

【0167】 本文中所引用之所有參照案均以全文引用之方式併入本文中。

【符號說明】

無

序列表

<110> 巴克斯特保健公司
巴克斯特國際公司

<120> 作為治療標靶的MIF

<130> 176986

<160> 28

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RAB9之輕鏈

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr
20 25 30

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

Phe Val Ala Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAB4之輕鏈

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 第 2 頁

100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAB0之輕鏈

<400> 3

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RAB2之輕鏈

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAB9之重鏈

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Gly Ser Gln Trp Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 6
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAB4之重鏈

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 325 330 335
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 405 410 415

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

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

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 7
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAB0之重鏈

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
195 200 205

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
210 215 220

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

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

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

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 8
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAB2之重鏈

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
195 200 205

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
210 215 220

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

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

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

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 9
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAM0hc

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAM01c

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 11
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAM9hc

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Gly Ser Gln Trp Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

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

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

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

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAM91c

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr
 20 25 30

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

Phe Val Ala Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 13
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAM4hc

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Asn Val Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 14
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RAM41c

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 15
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro
1 5 10 15

Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly
20 25 30

Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met
35 40 45

Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Cys Ser Leu His Ser
 50 55 60

Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
 85 90 95

Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
 100 105 110

Thr Phe Ala
 115

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> (GGGGS)₂-連接子

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗生蛋白質鏈菌素(Streptavidin)結合肽

<400> 17

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
 20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro
 35

<210> 18

<211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合蛋白質

<400> 18

Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro
 1 5 10 15

Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly
 20 25 30

Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met
 35 40 45

Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Cys Ser Leu His Ser
 50 55 60

Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
 85 90 95

Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
 100 105 110

Thr Phe Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Asp Glu
 115 120 125

Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly
 130 135 140

Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln
 145 150 155 160

Arg Glu Pro

<210> 19
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白質

<400> 19

Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro
 1 5 10 15

Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly
 20 25 30

Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met
 35 40 45

Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Ser Ala Leu Cys Ser Leu His Ser
 50 55 60

Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
 85 90 95

Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
 100 105 110

Thr Phe Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Asp Glu
 115 120 125

Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly
 130 135 140

Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln
 145 150 155 160

Arg Glu Pro

<210> 20

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白質

<400> 20

Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro
 1 5 10 15

Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly
 20 25 30

Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met
 35 40 45

Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Ser Ser Leu His Ser
 50 55 60

Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
 85 90 95

Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
 100 105 110

Thr Phe Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Asp Glu
 115 120 125

Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly
 130 135 140

Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln
 145 150 155 160

Arg Glu Pro

<210> 21

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白質

<400> 21

Met Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg Ala Ser Val Pro
 1 5 10 15

Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala Gln Ala Thr Gly
 20 25 30

Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro Asp Gln Leu Met
 35 40 45

Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Cys Ser Leu His Ser
 50 55 60

Ile Gly Lys Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg Ser Tyr Ser Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Ser Gly Leu Leu Ala Glu Arg Leu Arg Ile Ser Pro Asp Arg Val Tyr
 85 90 95

Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn Asn Ser
 100 105 110

Thr Phe Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Asp Glu
 115 120 125

Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly
 130 135 140

Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln
 145 150 155 160

Arg Glu Pro

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 22

Pro Met Phe Ile Val Asn Thr Asn Val Pro Arg
 1 5 10

<210> 23
 <211> 55

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 23

Ala Ser Val Pro Asp Gly Phe Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ala Thr Gly Lys Pro Pro Gln Tyr Ile Ala Val His Val Val Pro
 20 25 30

Asp Gln Leu Met Ala Phe Gly Gly Ser Ser Glu Pro Cys Ala Leu Cys
 35 40 45

Ser Leu His Ser Ile Gly Lys
 50 55

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 24

Ile Gly Gly Ala Gln Asn Arg
 1 5

<210> 25
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 25

Ser Tyr Ser Lys
 1

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26

Leu Leu Cys Gly Leu Leu Ala Glu Arg
 1 5

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Ile Ser Pro Asp Arg
1 5

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Val Tyr Ile Asn Tyr Tyr Asp Met Asn Ala Ala Asn Val Gly Trp Asn
1 5 10 15

Asn Ser Thr Phe Ala
20

201605886

發明摘要

※ 申請案號： 103139463

※ 申請日： 103.11.14

※IPC 分類：

C07K14/52 (2006.01)

C07K16/24 (2006.01)

G01N33/566 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

作為治療標靶的 MIF

MIF AS THERAPEUTIC TARGET

【中文】

本發明係關於 MIF 相關疾患中涉及 MIF 之特異性結構更改之認知，提供一種用於 MIF 相關疾患之治療及預防的新方法，以及其他特定的醫學應用，例如監測疾病進展、藥物篩選及診斷套組之診斷分析與各別用途。

【英文】

The present invention pertains to the recognition that a specific structural alteration of MIF is involved in MIF-related disorders, providing a new approach to the treatment and prevention of MIF-related disorders, as well as other specific medical applications, e.g. for example monitoring of disease progression, drug screening and diagnostic assays and respective uses of diagnostic kits.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種化合物之用途，其用於製造用於治療或預防有需要之個體中的 MIF 相關疾患之醫藥品，其中該化合物
 - (a) 防止在位置 81 處的 MIF 之修飾，或
 - (b) 優先結合至在位置 81 處攜帶修飾之 MIF，其係與不含有該位置 81 之修飾之 MIF 相比。
2. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該 MIF 相關疾患為 MIF 相關疾病、MIF 相關疾病狀態、或 MIF 相關疾病之進展之狀態。
3. 一種在 (SEQ ID NO: 15 之) 位置 81 處攜帶修飾之 MIF 之用途，其係用作 MIF 相關疾患之治療或預防之標靶或用作藥物發現分析之標靶。
4. 如申請專利範圍第 1 項或第 3 項之用途，其中該化合物為抗體或包含抗體之抗原結合部分之分子。
5. 如申請專利範圍第 3 項之用途，其中該 MIF 相關疾患為 MIF 相關疾病、MIF 相關疾病狀態、或 MIF 相關疾病之進展之狀態。
6. 如申請專利範圍第 2 項或第 5 項之用途，其中該 MIF 相關疾患為發炎性疾病或贅生性疾病。
7. 如申請專利範圍第 2 項或第 5 項之用途，其中該 MIF 相關疾患係選自由以下者組成之群：結腸癌、前列腺癌、膀胱癌、胰臟癌、卵巢癌、黑色素瘤、淋巴瘤、肝細胞癌、哮喘、ARDS、類風濕性關節炎、敗血症、IgA 腎病、絲球體腎炎、狼瘡腎炎 (Lupus Nephritis, LN)、肝炎、胰臟炎 (+/- 急性肺損傷)、克羅恩氏病 (Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、胃潰瘍、阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease)、多發性硬化症、格

林-巴利症候群 (Guillain-Barre syndrome)、心臟功能障礙、血管成形術、動脈粥樣硬化、心肌炎、第 1 型糖尿病、糖尿病性視網膜病變、年齡相關性黃斑變性 (age-related macular degeneration; AMD)、異位性皮膚炎、牛皮癬、子宮內膜異位、神經痛及葡萄膜炎。

8. 如申請專利範圍第 2 項或第 5 項之用途，其中該 MIF 相關疾患為惡性腹水，較佳為在第三線治療中者。
9. 一種監測 MIF 相關疾患之治療之功效的方法，其包含在於該治療之前及之後自個體分離的樣本中測定 MIF 位置 81 是否攜帶修飾之步驟，其中若治療後與治療前相比 MIF 位置 81 之修飾的程度較小，則該治療被識別為有效的。
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該 MIF 相關疾患為 MIF 相關疾病、MIF 相關疾病狀態、或 MIF 相關疾病之進展之狀態。
11. 一種抗 MIF 抗體或包含抗體之抗原結合部分之分子，該抗體或分子結合在位置 81 處經修飾之 MIF 但不結合在位置 81 處未經修飾之 MIF。
12. 一種分析一化測試合物是否優先結合至在位置 81 處經修飾之形式的 MIF 之方法，該方法包含以下步驟
 - (a) 在位置 81 處修飾 MIF 以獲得經修飾之 MIF，
 - (b) 在測試樣本中及在其中 MIF 於位置 81 處未經修飾之對照樣本中組合待測試的化合物與該經修飾之 MIF，
 - (c) 評估該測試樣本中及該對照樣本中之該化合物與該經修飾之 MIF 之結合其中，若該化合物在該測試樣本中與在該對照樣本中相比在更大程度

上結合至該經修飾之 MIF，則選擇該化合物。

13. 一種篩選防止在半胱胺酸 81 處的 MIF 之修飾之化合物的方法，該方法包含以下步驟
 - (a) 在測試樣本中組合 MIF 與待測試的化合物，
 - (b) 在該含有該化合物之測試樣本中及在該化合物不存在之對照樣本中藉由硫氫基反應試劑在該試劑至少在該對照樣本中修飾 MIF 之半胱胺酸 81 之硫氫基的條件下處理 MIF，
 - (c) 藉由該硫氫基反應試劑評估半胱胺酸 81 之修飾，其中若該硫氫基反應試劑在該測試樣本中與在該對照樣本中相比半胱胺酸 81 之修飾的程度較小，則選擇該化合物。
14. 如申請專利範圍第 13 項之方法，其中該化合物為抗體或包含抗體之抗原結合部分之分子。
15. 一種 MIF 位置 81 之修飾狀態作為診斷標記之用途，其中 MIF 位置 81 攜帶修飾之發現指示 MIF 相關疾患。
16. 一種診斷 MIF 相關疾患之方法，其包含在自個體分離的樣本中測定 MIF 位置 81 是否攜帶修飾之步驟，其中，MIF 位置 81 被識別為經修飾時，該個體被診斷患有 MIF 相關疾患或易感染 MIF 相關疾患。
17. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該 MIF 相關疾患為 MIF 相關疾病、MIF 相關疾病狀態、或 MIF 相關疾病之進展之狀態。
18. 如申請專利範圍第 10 項或第 17 項之方法，其中該 MIF 相關疾患為發炎性疾病或贅生性疾病。
19. 如申請專利範圍第 10 項或第 17 項之方法，其中該 MIF 相關疾患係選

自由以下者組成之群：結腸癌、前列腺癌、膀胱癌、胰臟癌、卵巢癌、黑色素瘤、淋巴瘤、肝細胞癌、哮喘、ARDS、類風濕性關節炎、敗血症、IgA 腎病、絲球體腎炎、狼瘡腎炎 (LN)、肝炎、胰臟炎 (+/- 急性肺損傷)、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、胃潰瘍、阿茲海默氏症、多發性硬化症、格林-巴利症候群、心臟功能障礙、血管成形術、動脈粥樣硬化、心肌炎、第 1 型糖尿病、糖尿病性視網膜病變、年齡相關性黃斑變性 (AMD)、異位性皮膚炎、牛皮癬、子宮內膜異位、神經痛及葡萄膜炎。

20. 如申請專利範圍第 10 項或第 17 項之方法，其中該 MIF 相關疾患為惡性腹水，較佳為在第三線治療中者。
21. 一種 MIF 分子，其在 SEQ ID NO：15 之位置 81 經修飾。

