



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106068456 A

(43)申请公布日 2016.11.02

(21)申请号 201580003726.3

DSM25863 2012.04.12

(22)申请日 2015.01.02

DSM25864 2012.04.12

(30)优先权数据

DSM28180 2013.12.19

61/923,464 2014.01.03 US

DSM28181 2013.12.19

DSM28182 2013.12.19

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

DSM28183 2013.12.19

2016.07.04

(86)PCT国际申请的申请数据

(71)申请人 百深有限责任公司

PCT/EP2015/050005 2015.01.02

地址 瑞士奥普菲孔市

申请人 百深公司

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/106973 EN 2015.07.23

(72)发明人 A·席纳格尔 M·蒂勒

P·杜亚尔 G·安托万

R·克施鲍默

(83)生物保藏信息

DSM25110 2011.08.31

DSM25111 2011.08.31

DSM25112 2011.08.31

DSM25113 2011.08.31

DSM25114 2011.08.31

DSM25115 2011.08.31

DSM25859 2012.04.12

DSM25860 2012.04.12

DSM25861 2012.04.12

DSM25862 2012.04.12

(74)专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 王金英

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

C07K 16/42(2006.01)

权利要求书2页 说明书23页

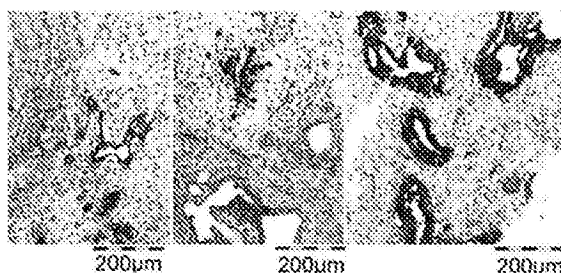
序列表22页 附图12页

(54)发明名称

抗-MIF免疫组织化学

(57)摘要

本发明涉及对组织中的MIF、特别是oxMIF、以及抗-oxMIF抗体的特异性检测。提供一种检测方法,其使用免疫组织化学或免疫荧光法,以及其中使用特异性抗-oxMIF抗体和特异性独特型单克隆兔抗体。



1. 一种免疫组织化学(IHC)检测方法,用于oxMIF的体外检测,其中oxMIF是在个体的组织样品中与抗体RAB4、RAB9和/或RAB0差异性结合的MIF,所述检测包括体外测定化合物与所述样品中的oxMIF的结合,其中执行下述一个以上步骤:

a)可选的使用封闭缓冲液的封闭步骤,和

b)使用一级抗-oxMIF抗体的结合步骤而没有在前的固定步骤,特别是没有使用甲醛或丙酮;

c)可选的固定步骤;

d)与二级抗体的温育,其中所述二级抗体是针对抗-oxMIF抗体的抗-独特型兔单克隆抗体;和/或

e)检测一级抗-oxMIF抗体和二级抗体之间的结合。

2. 如权利要求1所述的IHC检测,其中在结合步骤b)之前,不使用有机或无机固定剂进行固定,特别是甲醛或丙酮。

3. 如权利要求1或2所述的IHC检测,其中所述样品被风干,优选被风干约30分钟。

4. 如权利要求1至3中任一项或多项所述的IHC检测,其中,所述一级抗体没有被标记,例如没有被生物素化,和/或所述一级抗体优选包含在一级稀释缓冲液中和/或其中所述一级抗体与样品温育,优选温育45至90分钟,更优选约60分钟。

5. 如权利要求1至4中任一项或多项所述的IHC检测,其中,在结合步骤b)之后进行冲洗步骤,以洗去多余的抗体,以及其中可选地,在全部后续步骤之后进行进一步的冲洗步骤。

6. 如权利要求1至5中任一项或多项所述的IHC检测,其中,所述检测步骤e)包括染色步骤或由染色步骤构成,和/或其中在检测步骤之后进行进一步的(复)染步骤,其包括三级抗体的使用。

7. 如权利要求1至6中任一项或多项所述的IHC检测,其中,在步骤e)之后,使用苏木精进行所述(复)染步骤。

8. 如前述权利要求中任一项所述的IHC检测,其中,通过荧光、或荧光直接标记的二级抗体(例如标记的抗-Ram9)、优选使用荧光团标记的针对二级抗体的三级抗体,来检测一级抗体和二级抗体之间的结合。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的IHC检测,其中所述二级抗体是选自于由抗-RAM9抗体、抗-RAM0抗体和抗-RAM4抗体构成的组中的二级单克隆抗体,最优选抗-RAM9抗体,甚至更优选兔抗-RAM9抗体。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的IHC检测,其中所述一级抗体结合oxMIF、但不结合redMIF。

11. 如权利要求10所述的IHC检测,其中差异性结合是指结合oxMIF的 $K_D$ 值小于100nM,优选小于50nM,甚至更优选小于10nM;以及不结合redMIF的特征在于其 $K_D$ 值大于400nM。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的IHC检测,其中所述一级抗体选自于由oxMIF结合物,例如抗体RAB4、RAB9和/或RAB0和/或RAM4、RAM9和/或RAM0构成的组。

13. 如前述权利要求中任一项所述的IHC检测,其中所述样品是组织活检,优选冰冻组织活检,优选OCT包埋切片,或针芯活检。

14. 一种独特型抗体,其可以特异性结合于抗-oxMIF抗体,优选结合于抗-RAM9抗体。

15. 如权利要求14所述的独特型抗体,其中,所述抗体的特征在于,其在使用固定的MIF

和RAM9的中和ELISA中的IC<sub>50</sub>为≤60ng/ml。

16. 一种独特型抗体, 优选如权利要求14或15所述的独特型抗体, 用于例如如前述权利要求中任一项或多项所述的方法或试剂盒, 其特征在于SEQ ID NO:15和/或16, 或其特征在于SEQ ID NO:17和/或18。

17. 一种抗独特型抗体, 用于例如如前述权利要求中任一项或多项所述的方法或试剂盒, 其特征在于以保藏编号DSM 28180在DSMZ保藏的重链和/或以保藏编号DSM 28181在DSMZ保藏的轻链; 或其特征在于以保藏编号DSM 28182在DSMZ保藏的重链和/或以保藏编号DSM 28183在DSMZ保藏的轻链。

18. 一种检测抗-oxMIF抗体的方法, 所述抗-oxMIF抗体优选RAM9、RAM0或RAM4, 其特征在于使用针对所述抗-oxMIF抗体的独特型单克隆兔抗体, 优选如权利要求14-17中任一项所述的独特型抗体。

19. 一种IHC检测试剂盒, 适于执行如前述权利要求中任一项或多项所述的方法。

## 抗-MIF免疫组织化学

### 技术领域

[0001] 本发明涉及组织中MIF、特别是oxMIF的特异性检测。本发明的检测方法也使得允许检测组织中的抗-MIF抗体,例如RAM9。提供了一种检测方法,其使用免疫组织化学或免疫荧光,以及其中使用特异性抗-oxMIF抗体和单克隆兔抗-oxMIF-抗体。本发明同样提供了有利的检测抗体和一种提供该检测抗体的方法。本发明进一步涉及一种用于测定靶标饱和度的方法。

### 背景技术

[0002] 巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)是一种细胞因子,最初基于其抑制结核菌素过敏豚鼠(含有巨噬细胞)的腹腔渗出细胞的体外随机迁移能力而被分离(Bloom等,Science 1966年,153,80-2;David等,PNAS 1966年,56,72-7)。今天,MIF作为具有广谱活性的先天性和获得性免疫应答的关键性上游调控子而被众所周知。

[0003] 1989年,人的MIF的cDNA被克隆(Weiser等,PNAS 1989,86,7522-6),其基因定位映射于22号染色体。人的MIF基因产物是具有114个氨基酸(N-末端蛋氨酸裂解后)且表观分子量大约为12.5kDa的蛋白质。MIF与任何其他蛋白质没有显著的序列同源性。该蛋白质结晶为相同亚基的三聚体。每个单体包含两个反向平行的 $\alpha$ -螺旋, $\alpha$ -螺旋堆集成四链的 $\beta$ -折叠。所述单体具有另外两个 $\beta$ 链,该两 $\beta$ 链与相邻亚单位的 $\beta$ -折叠相互作用从而形成单体之间的交界面。三个亚单位排布成一个包含溶剂可及的通道管道,该管道沿分子的三重轴穿过蛋白质的中心(Sun等,PNAS 1996,93,5191-5196)。

[0004] 据报道,低浓度的糖皮质激素可诱导巨噬细胞分泌MIF(Calandra等,Nature 1995,377,68-71)。然而,MIF也反向调节糖皮质激素的作用并刺激其它细胞因子如肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$ 和白介素IL-1 $\beta$ 的分泌(Baugh等,Crit Care Med 2002,30,S27-35)。MIF还显示出,例如表现为促血管生成、促增殖和抗细胞凋亡的特性,从而促进肿瘤细胞的生长(Mitchell,R.A.,Cellular Signalling,2004.16(1):p.13-19;Lue,H.等,Oncogene 2007.26(35):p.5046-59)。它也与例如淋巴瘤,黑素瘤和结肠癌的生长直接有关(Nishihira等,J Interferon Cytokine Res.2000,20:751-62)。

[0005] MIF是许多病理状况的中介体,因而与多种疾病相关,其包括但不限于,尤其是炎症性肠病(IBD)、类风湿性关节炎(RA)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、哮喘、血管球性肾炎、IgA肾病、心肌梗死(MI)、败血症和癌症。

[0006] 多克隆抗体和单克隆抗MIF抗体已被研发,用来抵抗重组的人MIF(Shimizu等,FEBS Lett.1996;381,199-202;Kawaguchi等,Leukoc.Biol.1986,39,223-232,和Weiser等,Cell.Immunol.1985,90,167-78)。

[0007] 已经有人建议抗MIF抗体用于治疗用途。据报道,Calandra等(J.Inflamm.(1995),47,39-51)使用抗MIF抗体保护动物使其免于来自实验性诱导的革兰氏阴性和革兰氏阳性败血性休克。这表明抗MIF抗体可用作一种治疗手段来调节感染性休克和其它炎性疾病状态中细胞因子的产生。

[0008] 美国专利6,645,493公开了来源于杂交瘤细胞的单克隆抗MIF抗体,其能够中和MIF的生物学活性。在动物模型中表明这些源于小鼠的抗MIF抗体在内毒素引起的休克的治疗上取得了有益的效果。

[0009] 美国专利200310235584公开了一种在动物中制备MIF高亲和性抗体的方法,其中MIF基因已经被纯合敲除。

[0010] Galat等人描述了糖基化抑制因子(GIF)是一种蛋白质(Eur. J. Biochem, 1994, 224, 417-21)。MIF和GIF现在被认为是相似的。Watarai等(PNAS2000, 97, 13251-6)描述了与不同的GIF表位结合的多克隆抗体,以识别Ts细胞中的经翻译后修饰的GIF的生化性质。同上,Watarai等报告了体外GIF呈现出不同构象的同种型。一类异构体通过单个半胱氨酸残基的化学修饰而产生。该化学修饰导致了GIF蛋白内的构象变化。

[0011] 各种疾病在起始之后,特别是炎症疾病或癌症起始之后,可以检测到MIF水平上升-即MIF总体水平上升。然而,MIF也循环于健康个体内,这使得难以清楚地区分。相反地,oxMIF不存在于健康个体。oxMIF在疾病状态下升高,并且在病人的样品例如血液、血清和尿中可以检测到oxMIF。

[0012] 通过对MIF及其抗体的深入研究,已经发现抗体RAB9、RAB4和RAB0能够特异性结合oxMIF(其不能结合redMIF)。

[0013] 根据本申请发明人的早期研究,表明氧化过程例如胱氨酸介导的氧化、GSSG(ox-谷胱甘肽)-介导的氧化或MIF与Proclin300或蛋白质交联剂(如BMOE)的温育会引起MIF与上述抗体的结合。

[0014] 本申请发明人得出了以下令人惊异的结论:

[0015] • 重组MIF(人、鼠、大鼠、CHO、猴)的氧化还原调节(胱氨酸/GSSG-介导的轻度氧化)或使用Proclin300或蛋白质交联剂处理重组MIF将导致其与百特的抗-MIF抗体RAB9、RAB4和RAB0的结合

[0016] • oxMIF的还原导致抗体结合减少

[0017] • oxMIF-同种型的特异性与体外生物抗体功效相关

[0018] • oxMIF水平与疾病状态相关。

[0019] 关于(ox)MIF的上述额外知识作为本申请发明人的进一步研究的基础。

[0020] 已经表明,MIF蛋白质以不同的同种型存在。通过免疫组织化学(以下也称为IHC)或免疫荧光(IF)法针对自然产生的、被认为是组织中(例如玻璃片中的组织切片)的MIF相关疾病状态的强且可靠的标志物oxMIF的特异性检测受阻于下述事实:当实施标准的IHC或IF方法时,oxMIF的结构会受影响或完全丧失。在一些IHC或IF方法中,含有内源性生物素或亲和素结合蛋白质和内源性过氧化物酶的组织存在很高的背景噪声。

[0021] 因此,目前显然需求一种可靠地检测oxMIF同种型的方法。本申请发明人解决了该需求,并且通过以下关于本发明的描述实现了其目标。特别地,下面描述的本发明能够高灵敏地和特异地检测组织中的oxMIF和抗-oxMIF抗体,且其背景噪声低。同样地,在即使已经使用抗-oxMIF抗体治疗过的病人的组织中,也可以执行该方法。

## 发明内容

[0022] 本发明涉及一种检测oxMIF(ox巨噬细胞迁移抑制因子)的检测方法。本发明还涉

及抗-oxMIF抗体的检测。该检测方法是基于免疫组织化学检测的原则。它用于组织样品,特别是组织切片。

[0023] 优选地,这些组织切片被提供在玻璃或塑料载体上,例如载玻片或塑料片。

[0024] 该方法使用特异性oxMIF结合抗体(“oxMIF结合物”,抗-oxMIF抗体或一级抗体;这些表达在本申请中可交替使用)以及特异性独特型抗-oxMIF结合物抗体(“独特型抗体”或二级抗体;这些表达在本申请中可交替使用)。

[0025] 在本发明中用作oxMIF结合物的抗体优选是单克隆抗体。在一个特别优选的实施方式中,如下详细所述的,单克隆抗-oxMIF抗体选自由RAB9、RAB0和/或RAB4构成的组,或选自由RAM9、RAM0和/或RAM4构成的组。

[0026] 而且,本发明是特别有利的,因为本申请发明人成功地识别了针对上述oxMIF结合抗体的独特型单克隆抗体,这可以可靠地且特异地检测与oxMIF结合的这些oxMIF结合抗体。因此,本发明-在一个实施方式中-涉及此处所述的一级抗体的独特型抗体。它们也能特异地结合到这些一级抗体。优选地,当一级抗体也结合于oxMIF时,它们也可以特异地结合这些一级抗体。在一个优选的实施方式中,该独特型抗体是兔独特型抗体。

[0027] 最优选的二级抗体是命名为54-5和68-1的那些,其均已在下面进行了详细描述。

[0028] 在一个优选的实施方式中,本发明提供了一种用于提供该二级抗体的方法,其中执行含有oxMIF抗体的Fab片段的免疫方法,随后执行中和(neutralizing)ELISA筛选。如果抗体在中和ELISA中的 $IC_{50} \leq 60 \text{ ng/ml}$ ,则被认为是适当的二级抗体。

[0029] 通过对下述同种型对照抗体(其不能检测MIF/oxMIF,从而适于用作阴性对照)或其它抗-oxMIF单克隆抗体(其可以结合oxMIF但不能被例如抗-RAM9独特型抗体检测到)进行染色可以显示本发明所述方法的有利的特异性(也可参见下述的实施例部分),而且该有利的特异性已经通过本申请发明人的其它发现(表明oxMIF仅仅可以在病变的例如癌组织中被检测到)得到进一步证实。

[0030] 在优选的实施方式中,检测方法包括染色步骤。该创造性的检测/染色方案被设计用于保护组织切片中的oxMIF天然结构。本发明之前已知的标准技术会使得MIF向oxMIF的转变,因而在免疫组织化学技术中产生假阳性染色。

[0031] 本发明的详细说明

[0032] 本发明(部分地)如以下几项所述:

[0033] 1. 一种免疫组织化学(IHC)检测方法,用于oxMIF的体外检测,其中oxMIF是在个体的组织样品中与抗体RAB4、RAB9和/或RAB0差异性结合的MIF,所述检测包括测定在体外所述样品中化合物与oxMIF的结合,其中执行下述一个以上步骤:

[0034] a) 可选的封闭步骤,其使用封闭缓冲液,和

[0035] b) 使用一级抗-oxMIF抗体的结合步骤而没有使用有机或无机固定剂特别是甲醛或丙酮的在先固定步骤;

[0036] c) 可选的固定步骤;

[0037] d) 与二级抗体进行温育,其中所述二级抗体是针对抗-oxMIF抗体的抗-独特型兔单克隆抗体;和/或

[0038] e) 检测一级抗-oxMIF抗体和二级抗体之间的结合。

[0039] 2. 如项目1所述的IHC检测,其中在第一结合步骤b)之前,不使用有机或无机固定

剂进行固定,特别是甲醛或丙酮。

[0040] 3.如项目1或2所述的IHC检测,其中所述样品是被风干的,优选被风干约30分钟。

[0041] 4.如项目1至3中任一项或多项所述的IHC检测,其中,所述一级抗体没有被标记,例如没有被生物素化,和/或所述一级抗体优选包含在一级稀释缓冲液中和/或其中所述一级抗体与样品温育,优选温育45至90分钟,更优选约60分钟。

[0042] 或者,一级抗体和样品的温育时间可以是30至90分钟,更优选约30分钟。

[0043] 5.如项目1至4中任一项或多项所述的IHC检测,其中,在结合步骤b)之后进行冲洗步骤以洗去多余的抗体,以及其中可选地,在全部后续步骤之后执行进一步的冲洗步骤。

[0044] 6.如项目1至5中任一项或多项所述的IHC检测,其中,所述检测步骤e)包括染色步骤或由染色步骤构成,和/或其中在检测步骤之后进行进一步的(复)染色步骤,其包括三级抗体的使用。

[0045] 7.如项目1至6中任一项或多项所述的IHC检测,其中,在步骤e)之后使用苏木精进行所述(复)染步骤。

[0046] 8.如前述项目中任一项所述的IHC检测,其中,通过荧光、优选通过使用荧光团标记的针对二级抗体的三级抗体,来检测一级抗体和二级抗体之间的结合。

[0047] 9.如项目1至8中任一项所述的IHC检测,其中所述二级抗体是选自于由抗-RAM9抗体、抗-RAM4抗体构成的组,最优选抗-RAM9抗体,甚至更优选兔抗-RAM9抗体。

[0048] 10.如项目1至9中任一项所述的IHC检测,其中所述一级抗体结合 $\alpha$ xMIF、但不结合redMIF。

[0049] 11.如项目10所述的IHC检测,其中差异性结合是指结合 $\alpha$ xMIF的 $K_D$ 值小于100nM,优选小于50nM,甚至更优选小于10nM;以及不结合redMIF的特征在于 $K_D$ 值大于400nM。

[0050] 12.如项目1至11中任一项所述的IHC检测,其中所述一级抗体选自于由 $\alpha$ xMIF结合物,例如抗体RAB4、RAB9和/或RAB0和/或RAM4、RAM9和/或RAM0构成的组。

[0051] 13.如前述项目中任一项所述的IHC检测,其中所述样品是组织活检,优选冰冻组织活检,优选OCT包埋切片,或针芯活检。

[0052] 14.一种独特型抗体,其可以特异性结合于抗- $\alpha$ xMIF抗体,优选结合于抗-RAM9抗体。

[0053] 15.如项目14所述的独特型抗体,其中,所述抗体的特征在于,其在含有固定的MIF和RAM9的中和(neutralizing)ELISA中的 $IC_{50} \leq 60ng/ml$ 。

[0054] 16.一种独特型抗体,优选如项目14或15所述的独特型抗体,用于例如如前述项目中任一项或多项所述的方法或试剂盒,其特征不在于SEQ ID NO:15和/或16,或SEQ ID NO:17和/或18。

[0055] 17.一种独特型抗体,用于例如如前述项目中任一项或多项所述的方法或试剂盒,其特征不在于以保藏编号DSM 28180保藏在DSMZ的重链和/或以保藏编号DSM 28181保藏在DSMZ的轻链;或其特征在于以保藏编号DSM 28182保藏在DSMZ的重链和/或以保藏编号DSM 28183保藏在DSMZ的轻链。

[0056] 18.一种检测抗- $\alpha$ xMIF抗体的方法,所述抗- $\alpha$ xMIF抗体优选RAM9、RAM0或RAM4,其特征不在于使用针对所述抗- $\alpha$ xMIF抗体的独特型单克隆兔抗体,优选如项目14-17中任一项所述的独特型抗体。

- [0057] 19. 在一个优选的实施方式中, 如上述项目18中的检测方法检测RAM9。
- [0058] 20. 一种IHC检测试剂盒, 适于执行如前述权利要求中任一项或多项所述的方法, 和或包含前述项目中任一项或多项所述的抗体。
- [0059] 在一个更优选的实施方式中, 本申请发明人还提供了如下所述的方法:
- [0060] 21. 一种通过抗-MIF抗体(优选如上述项目1和10至12中所述)测定目标组织中的靶标饱和度的方法, 其中所述靶标饱和度通过如上述项目1-13中任一项所述的方法测定。
- [0061] 用于测定靶标饱和度的方法也适用于测定在给药所述抗-MIF抗体后, 抗-MIF抗体是否真正到达了目标组织及其到达程度。
- [0062] 在特别优选的实施方式中, 该方法也适于测定目标组织例如基质和肿瘤细胞之间的饱和度差异。
- [0063] 下述实施例5和图6显示了该方法的一个可能的实施例。
- [0064] 上述(一级)抗体(“oxMIF结合物”)通过它们的序列和通过保藏为大肠杆菌的质粒(TG1菌株)而表征和支持, 包括上述每个抗体RAB0、RAB4和RAB9, 以及RAM0、RAM4和RAM9各自的轻链或重链。
- [0065] 质粒的特征在于它们的DSM编号, DSM是根据布达佩斯条约在德国微生物保藏和细胞培养中心(DSMZ)(位于Mascheroder Weg 1b, 布伦瑞克, 德国)保藏时得到的官方编号。这些质粒分别保存在大肠杆菌菌株。
- [0066] 编号为DSM25110的质粒包含抗-MIF抗体RAB4的轻链序列。
- [0067] 编号为DSM25112的质粒包含抗-MIF抗体RAB4的重链(IgG4)序列。
- [0068] 质粒DSM25110和DSM25112在适宜的宿主细胞内的共表达导致了优选的抗-MIF抗体RAB4的产生。
- [0069] 编号为DSM25111的质粒包含抗-MIF抗体RAB9的轻链序列。
- [0070] 编号为DSM25113的质粒包含抗-MIF抗体RAB9的重链(IgG4)序列。
- [0071] 质粒DSM25111和DSM25113在适宜的宿主细胞内的共表达导致优选的抗-MIF抗体RAB9的产生。
- [0072] 编号为DSM25114的质粒包含抗-MIF抗体RAB0的轻链序列。
- [0073] 编号为DSM25115的质粒包含抗-MIF抗体RAB0的重链(IgG4)序列。
- [0074] 质粒DSM25114和DSM25115在适宜的宿主细胞内的共表达导致优选的抗MIF抗体RAB0的产生。
- [0075] 同样被保存的还有抗体RAM0、RAM9和RAM4; 均按照布达佩斯条约于2012年4月12日被保藏于DSMZ(德国, 布伦瑞克), 使用以下命名:
- [0076] RAM9-重链: 大肠杆菌GA.662-01.pRAM9hc-DSM 25860。
- [0077] RAM4-轻链: 大肠杆菌GA.906-04.pRAM4lc-DSM 25861。
- [0078] RAM9-轻链: 大肠杆菌GA.661-01.pRAM9lc-DSM 25859。
- [0079] RAM4-重链: 大肠杆菌GA.657-02.pRAM4hc-DSM 25862。
- [0080] RAM0-轻链: 大肠杆菌GA.906-01.pRAM0lc-DSM 25863。
- [0081] RAM0-重链: 大肠杆菌GA.784-01.pRAM0hc-DSM 25864。
- [0082] 同样保存了抗体54-5、及68-1; 均按照布达佩斯条约于2013年12月19日被保藏于DSMZ(德国, 布伦瑞克), 使用以下命名:

[0083] 54-5-重链:大肠杆菌TG1抗-RAM9抗体-DSM 28180。

[0084] 54-5-轻链:大肠杆菌TG1抗-RAM9抗体-DSM 28181。

[0085] 68-1-轻链:大肠杆菌TG1抗-RAM9抗体DSM 28183。

[0086] 68-1-重链:大肠杆菌TG1抗-RAM9抗体-DSM 28182。

[0087] 在本申请的文中,在优选的实施方式中,生物样本是组织样本,优选组织活检,组织活检的冰冻切片(新鲜冷冻或例如OCT包埋),或针芯活检。然而,除了上述优选的样本,本领域技术人员所知的所有已知的组织或细胞样本均可以用于本发明的方法。在本文中OCT包埋涉及一种用于包埋冷冻组织的包埋介质,其为一种经常使用的程序并在本领域是已知的。OCT代表最佳切割温度,其通过使用例如该介质得以确保。OCT介质可以防止冰冻人工痕迹例如由水导致的组织破坏的形成。

[0088] OCT介质由10.24%聚乙烯醇、4.26%聚乙二醇和85.50%非反应性成份组成。该介质,或根据基本常识的类似介质用于在例如低温恒温器上进行切片前包埋组织。该介质的轻微变化对本发明没有影响。

[0089] 检测病人的样品中的oxMIF对于提供可靠的疾病或紊乱的诊断中,特别是诊断正经受MIF相关疾病如(ox)MIF参与的疾病的折磨的病人而言是特别重要的步骤。

[0090] 术语“预防性”或“治疗性”治疗是现有技术中已知的,其涉及给药于病人。如果在临床上表现出不期望的状态(例如宿主,例如人体或动物,出现疾病或其他不期望的状态)之前给药给定化合物,该治疗是预防性的,即它保护宿主免于发展成不期望的状态,其中如果是在临床上表现出不期望的状态之后,该治疗是治疗性的(即它的目的在于减小、改良或维持现存的不期望的状态或其副作用)。

[0091] 此处,抗-(ox)MIF化合物指能够减弱、抑制、抵制、抵消或降低(ox)MIF的生物学活性的任意试剂。抗(ox)MIF化合物可以是能够抑制或中和(ox)MIF活性的任意试剂,例如抗体,特别优选本文所述的抗体,更优选抗体RAB9、RAB4、和/或RAB0、或RAM9、RAM4和/或RAM0。

## 附图说明

[0092] 根据下列附图进一步描述本发明:

[0093] 图1A:通过对浸润性胰腺导管癌进行免疫组织化学来原位检测oxMIF,其中RAM9为一级抗体、以及兔抗-RAM9(独特型,68-1)作为二级抗体。

[0094] 图1B:图1A的阴性对照。

[0095] 图2A:通过对正常肺进行IHC来原位检测oxMIF,其中一级抗体为RAM9,二级抗体为兔抗-RAM9(独特型)。

[0096] 图2B:通过对鳞状细胞癌进行IHC来原位检测oxMIF,其中一级抗体为RAM9,二级抗体为兔抗-RAM9(独特型)。

[0097] 图3:单克隆兔抗-RAM9抗体的初级ELISA筛选。

[0098] 图4a:单克隆兔抗-RAM9抗体的次级ELISA筛选。

[0099] 图4b:终纯化单克隆兔抗-RAM9抗体68-1和54-5的次级ELISA筛选。

[0100] 图5:通过对浸润性胰腺导管癌进行免疫组织化学来原位检测oxMIF,其中RAM9为一级抗体、以及兔抗-RAM9(独特型)、克隆54-5(左)和克隆68-1(右)作为二级抗体。

[0101] 图6:检测组织中的抗-MIF抗体RAM9。

[0102] 图6a:CLL淋巴结,采用RAM9处理。

[0103] 图6b:CLL淋巴结,采用赋形剂处理。

[0104] 图7:在本发明的免疫组织化学之后计算靶标饱和度的代表性图和步骤。

[0105] 图8:第一列显示了CLL淋巴结组织微阵列的全部玻片扫描(同样见于实施例5)。每组一个淋巴结并且染色被选择性地显示细节(第一列的黑色矩形显示在第二列中)。然而,针对所有淋巴结执行如实施例5所述的计算。在第二列中,深灰色的标记强调组织区域,其为手动注释的(从上面数第3张和第4张图片)或通过软件自动注释的(从上面数第1张和第2张)。由于例如坏死、组织折叠等排除浅灰色区域。第三列显示了以放大后的来自第二列的注释区域的代表性原始图。第四列中显示了在通过软件算法(深灰色至黑色区域)自动注释棕色色原(=RAM9或oxMIF染色的标志物区域)之后的相同的代表性图。在最后一列中,所有淋巴结的平均标志物区域描绘在RAM9和oxMIF染色的柱状图中。

[0106] 图9:靶标饱和度的计算

[0107] 图10:肿瘤、基质中的靶标饱和度以及总体靶标饱和度,数据表示含有四分差的中位数。

## 具体实施方式

[0108] 定义和一般技术

[0109] 除非此处另有定义,与本发明相关的科学和专业词汇应当具有本领域中的技术人员共同理解的含义。通常,此处所用的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、基因学以及蛋白质和核酸化学相关的命名及其技术是本领域中为人所熟知的和被共同使用的。本发明的方法和技术通常是根据本领域中为人所熟知的常规方法来操作的,如本说明书中引用和讨论的各种一般的和更具体的参考文献中所描述的一样,除非另有说明。例如,如Sambrook等的《分子克隆:实验室手册》,第二版,美国冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(1989),和Ausubel等的《当代分子生物学实验指南》,Greene出版协会(1992),以及Harlow和Lane的《抗体:实验室手册》,美国冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(1990),并入此文以供参考。

[0110] “MIF”或者“巨噬细胞迁移抑制因子”指的是蛋白质,其是已知的免疫和炎症反应中的关键的中介体,特别是作为糖皮质激素的反向调节剂。MIF包括哺乳动物MIF,特别是人MIF(Swiss-Prot最初登录号:P14174),其中单体形式被编码成具有115个氨基酸的蛋白质,但是由于初始的甲硫氨酸被切除,产生具有114个氨基酸的蛋白质。“MIF”也包括“GIF”(糖基化抑制因子)及其它形式的MIF如MIF融合蛋白。MIF中氨基酸的编号起始于N末端甲硫氨酸(氨基酸1)并结束于C末端丙氨酸(氨基酸115)。

[0111] 根据本发明的目的,“氧化的MIF”或oxMIF被定义为MIF的同种型,其通过采用温和的氧化剂例如胱氨酸处理MIF得到。如本发明已经显示的,用这种方法处理的重组oxMIF包括MIF的同种型,该同种型和oxMIF共享结构重排,其在(例如)动物被细菌攻击后在体内发生。

[0112] 根据本发明的目的,redMIF定义为还原的MIF,其为不和RAB0、RAB9和/或RAB4结合的MIF。

[0113] 本发明所述的抗-oxMIF抗体能够区分oxMIF和red MIF,所述oxMIF和red MIF分别

通过轻度氧化或还原得到。抗-oxMIF抗体可用于特异性检测oxMIF。这些构象体之间的区别可通过酶联免疫吸附(ELISA)或表面等离子体共振进行评估。

[0114] 通过Biacore评估抗体的差异结合。

[0115] 使用Biacore3000系统,通过表面等离子体共振分析来检测oxMIF和redMIF与抗体RAB9和RAB0的结合动力学。所述抗体涂覆于CM5(=羧甲基葡聚糖)芯片,并且注射与0.2% Proclin300预培养的重组MIF蛋白。(Proclin300由氧化异噻唑酮构成,其能够通过避免oxMIF向redMIF转化而稳定oxMIF结构)。在不添加ProClin300的天然HBS-EP缓冲液(=Biacore运行缓冲液)中,不能与RAB9、RAB0或相关抗体(不相关的同型对照抗体)结合的重组MIF蛋白用作阴性(背景)结合对照。

[0116] 在一个优选的实施方式中,oxMIF是与抗体RAB9、RAB4和/或RAB0或其抗原-结合片段差异性结合的MIF,这意味着这些抗体能与oxMIF结合,而redMIF不能与这些抗体中的任何一个结合。

[0117] 在其它实施方式中,抗-oxMIF抗体(“oxMIF结合物”),例如上述抗体或结合oxMIF的抗原结合部分的 $K_D$ 值小于100nM,优选 $K_D$ 值小于50nM,更优选 $K_D$ 值小于10nM。特别优选本发明的抗体结合oxMIF的 $K_D$ 值低于5nM。

[0118] 针对抗体例如RAB9,RAB4或RAB0(与oxMIF或redMIF)的结合或不结合的测定,对于本领域技术人员来说是基本已知的,实施例是下述方法中的任何一个:用重组MIF差异性地结合至酶联免疫吸附ELISA,或用还原或氧化状态下的重组MIF的表面等离子共振,例如众所周知的上述的Biacore测定方法。

[0119] 对于确定结合的一个优选方法是抗体与例如rec.(ox)MIF的表面等离子体共振,在此的“结合”意味着 $K_D$ 值低于100nM、优选低于50nM、甚至更优选低于10nM,其中不结合redMIF,其特征在于 $K_D$ 值超过400nM。“结合”和“特异性结合”在本文可交换使用,定义如上所述。在本申请中,“差异性结合”是指一种化合物,尤其是如本文中所述的抗体,其可以结合oxMIF(例如具有上述 $K_D$ 值)但不结合redMIF(如上所述的不结合)。

[0120] “抗体”指的是完整的抗体或者可与完整的抗体进行(特异性)结合竞争的抗原结合部分。通常参见《基础免疫学》,第7章(Paul,W.编著,第2版。Raven出版社,纽约(1989))(通过引用包含在本文)。术语抗体包括但不限于人类抗体、哺乳动物抗体、分离的抗体和基因工程形式的抗体例如嵌合抗体、骆驼化抗体或人源化抗体。

[0121] 术语抗体的“抗原结合部分”指的保留特异性结合抗原(如(ox)MIF)的能力的抗体一个或多个片段。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或者通过酶法或化学法裂解完整的抗体来生成。抗原结合部分包括但不限于例如下述:Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv和互补性决定簇区域(CDR)片段、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、抗体和多抗体,以及含有至少一部分抗体的多肽,使得特异性抗原足以与该多肽即ox或redMIF结合。从N末端至C末端,成熟轻链和重链可变区域两者都包含区域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。氨基酸至每个结构域的排列与下述文献中的定义保持一致:Kabat,参见“免疫学上感兴趣的蛋白质序列”(国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1987和1991)),Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987),或者Chothia等,Nature.342:878-883(1989)。抗体或者其抗原结合部分可以被衍生化或者被连接至另一个功能性分子(如另一种肽或蛋白质)。例如,抗体或者其抗原结合部分可以被功能性地连接至一个或多个其它分子实体比如另一个抗体(如双特异性抗体或者双抗体)、

可检测的试剂、细胞毒素试剂、药物试剂和/或连接分子。

[0122] 按照本领域技术人员的公知常识,术语“ $K_D$ ”在这里是指,特定抗体相对于各自抗原的平衡解离常数。这种平衡解离常数可以测量较大物体(这里指oxMIF或red MIF复合物/抗体)的分离倾向,即分解成更小的成分(这里指oxMIF或redMIF和抗体)。

[0123] 术语“人的抗体”是指任何其中可变结构域和恒定结构域序列是人的序列的抗体。该术语包含具有来源于人类基因但却被改变过的序列的抗体,所述改变比如为了减少可能的免疫原性、增加亲和性、去除可能引起不良折叠的半胱氨酸等等。该术语包含了在非人类细胞中重组制备的抗体,其能够如给予人类细胞非典型的糖基化。

[0124] 术语“人源化抗体”是指包含人类序列及也包含非人类序列的抗体。

[0125] 术语“骆驼化抗体”是指抗体的结构或序列已改变成更接近于来自于骆驼的抗体,也被命名为骆驼抗体。骆驼化抗体的设计和生产方法对本领域技术人员来说是一般常识。

[0126] 术语“嵌合抗体”是指包含来自两种或以上的不同种类的区域抗体。

[0127] 术语“分离的抗体”或者“其分离的抗原结合部分”指的是从抗体源比如使噬菌体展示文库或者B细胞谱中被识别和挑选的一种抗体或其抗原结合部分。

[0128] 本发明的抗-(ox)MIF抗体(“oxMIF结合物”)的制备包含采用基因工程生产重组DNA的任意方法,例如通过反向转录RNA和/或扩增DNA和将其克隆到表达载体中。在一些实施例中,所述载体是病毒载体,其中额外的DNA片段可以连接到病毒基因组中。在一些实施方式中,所述载体能够在被引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型(episomal)哺乳动物载体)。在其它实施方式中,所述载体(例如非-游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞时可以整合进宿主细胞的基因组中,从而随着宿主基因组一起复制。此外,特定的载体能够引导与它们可操作地连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为,“表达载体”)。

[0129] 抗-(ox)MIF抗体(“oxMIF结合物”)尤其可以通过常规的表达载体来制备,常规的表达载体例如为细菌载体(例如,pBR322中和其衍生物)或真核载体。编码所述抗体的那些序列可由调节宿主细胞的复制,表达和/或分泌的调控序列一起被提供。这些调控序列包括例如启动子(例如,巨细胞病毒CMV或SV40)和信号序列。表达载体还可以包括选择和扩增标记物,如二氢叶酸还原酶基因(DHFR)、潮霉素-B-磷酸转移酶和胸苷激酶。所用载体的组分例如选择标记物、复制子、增强子可以购买得到或通过常规方法制备。载体可以构建为在不同的细胞培养物中的表达,例如哺乳动物细胞例如CHO、COS、HEK293、NS0、纤维组织母细胞,昆虫细胞、酵母或细菌例如大肠杆菌。在一些情况下,使用允许给予所表达蛋白质最佳糖基化的细胞。

[0130] 抗-(ox)MIF抗体的轻链基因(s)和抗(ox)MIF抗体的重链基因(s)可以被插入到不同的载体或插入到同一表达载体中。所述抗体基因通过标准方法被插入到表达载体中,例如通过抗体基因片段和载体上的互补限制性位点的连接,或如果没有限制位点则通过平末端连接。

[0131] 抗-(ox)MIF抗体(“oxMIF结合物”)或其抗原结合片段的制备可以包括本领域已知的通过转染将重组DNA导入真核细胞的任何方法,例如通过电穿孔或显微注射。例如,抗-(ox)MIF抗体的重组表达可通过下述方式实现:在受一种或多种调控序列例如强启动子的控制下,将包含编码抗-(ox)MIF抗体的DNA序列的表达质粒通过适当的转染方法转入适当

的宿主细胞株,从而得到所转入的序列已经稳定整合到基因组的细胞。根据本发明,脂转染法是可使用转染方法中的一个例子。

[0132] 抗-(ox)MIF抗体(“oxMIF结合物”)的生产也可以包括本领域中已知的用于培养所述转化的细胞的任意方法,例如以连续或分批培养,及抗-(ox)MIF抗体的表达,例如组成性或诱导性表达。特别是进一步参考在WO 2009/086920中提及的抗-(ox)MIF抗体的生产。在一个优选的实施方式中,根据本发明产生的抗-(ox)MIF抗体可以结合oxMIF或其表位。根据本发明,特别优选的抗体是RAB9、RAB4和/或RAB0以及RAM9、RAM4和/或RAM0。

[0133] 这些抗体的序列的一部分已经公开于WO2009/086920;本申请的其它序列如下所示:

[0134] RAB9的轻链的氨基酸序列:SEQ ID NO:1

[0135] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQRIM TYLNWYQQKP GKAPKLLIFV ASHSQSGVPS

[0136] RFRGSGSETD FTLTISGLQP EDSATYYCQQ SFWTPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP

[0137] SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD

[0138] STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK,

[0139] RAB4的轻链的氨基酸序列:SEQ ID NO:2

[0140] DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVSS SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP

[0141] DRFSGSASGT DFTLTISRLLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP

[0142] SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD

[0143] STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK,

[0144] RAB0的轻链的氨基酸序列:SEQ ID NO:3

[0145] DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVSS SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP

[0146] DRFSGSASGT DFTLTISRLLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP

[0147] SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD

[0148] STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK,

[0149] RAB2的轻链的氨基酸序列:SEQ ID NO:4

[0150] DIQMTQSPVT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSSLAWYQQK PGQTPRLLIY GASNRATGIP

[0151] DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGNLSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP

[0152] SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD

[0153] STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK,

[0154] RAB9的重链的氨基酸序列:SEQ ID NO:5

[0155] EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS

[0156] IGSSGGTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ

[0157] WLYGMDVWGQ GTTIVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY

[0158] FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT

[0159] CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM

[0160] ISRTPEVTCV VVDVSDQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV

[0161] VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLT

[0162] PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG

[0163] SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSLGGK,

- [0164] RAB4的重链的氨基酸序列:SEQ ID NO:6
- [0165] EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
- [0166] IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
- [0167] VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA
- [0168] ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
- [0169] SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
- [0170] PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVV  
SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
- [0171] REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
- [0172] TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
- [0173] SLGK,
- [0174] RAB0的重链的氨基酸序列:SEQ ID NO:7
- [0175] EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
- [0176] IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
- [0177] VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA
- [0178] ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
- [0179] SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
- [0180] PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
- [0181] EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
- [0182] REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
- [0183] TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
- [0184] SLGK,
- [0185] RAB2的重链的氨基酸序列:SEQ ID NO:8
- [0186] EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
- [0187] IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
- [0188] VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA
- [0189] ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
- [0190] SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
- [0191] PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
- [0192] EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
- [0193] REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
- [0194] TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
- [0195] SLGK,
- [0196] RAM0hc的氨基酸序列:SEQ ID NO:9
- [0197] EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
- [0198] IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
- [0199] VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA
- [0200] ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
- [0201] SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT

- [0202] LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY  
[0203] RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT  
[0204] LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN  
[0205] YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK,  
[0206] RAM01c的氨基酸序列:SEQ ID NO:10  
[0207] DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVSS SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP  
[0208] DRFSGSASGT DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
[0209] SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD  
[0210] STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK,  
[0211] RAM9hc的氨基酸序列:SEQ ID NO:11  
[0212] EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS  
[0213] IGSSGGTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ  
[0214] WLYGMDVWGQ GTTIVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY  
[0215] FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTQTYI  
[0216] CNVNHKPSNT VDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV  
[0217] TCVVVDVSHED DPEVKFNWYVD DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL  
[0218] HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT  
[0219] KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLDS SDGSFFLYSK  
[0220] LTVDKSRWQQ GNVFSCSVME EALHNHYTQK SLSLSPGK,  
[0221] RAM91c的氨基酸序列:SEQ ID NO:12  
[0222] DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRSSQRIM TYLNWYQQKPK GKAPKLLIFV ASHSQSGVPS  
[0223] RFRGSGSETD FTLTISGLQP EDSATYYCQQ SFWTPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
[0224] SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD  
[0225] STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK,  
[0226] RAM4hc的氨基酸序列:SEQ ID NO:13  
[0227] EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG  
[0228] IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN  
[0229] VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA  
[0230] ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC  
[0231] NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPC APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT  
[0232] CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK  
[0233] PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK  
[0234] GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN  
[0235] YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK,  
[0236] RAM41c的氨基酸序列:SEQ ID NO:14  
[0237] DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVSS SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP  
[0238] DRFSGSASGT DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
[0239] SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD  
[0240] STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK.

- [0241] 抗-RAM9-68-1hc的氨基酸序列:SEQ ID NO:15
- [0242] Q EQLKESGGRL VKPGGTLTLT CKASGDMFN YYYMAWVRQA PGKGLEWIGY
- [0243] ISGGGSPYYA SWAKGRFTIS RTSTTVDLKM TSLTTEDTAT YFCGRYTDIN NGIDLWGPQT
- [0244] LVTVSSGQPK APSVFPLAPC CGDTPSSTVT LGCLVKGYLP EPVTVTWNSG TLTNGVRTFP
- [0245] SVRQSSGLYS LSSVVSSTSS SQPVTCNVAH PATNTKVDKT VAPSTCSKPT CPPPELLGGP
- [0246] SVFIFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ DDPEVQFTWY INNEQVRTAR PPLREQQFNS
- [0247] TIRVVSTLPI AHQDWLRGKE FKCKVHNKAL PAPIEKTISK ARGQPLEPKV YTMGPPREEL
- [0248] SSRSVSLTCM INGFYPSDIS VEWEKNGKAE DNYKTTPAVL DSDGSYFLYS
- [0249] KLSVPTSEWQ RGDVFTCSVM HEALHNHYTQ KSISRSPGK
- [0250] 抗-RAM9-68-11c的氨基酸序列:SEQ ID NO:16
- [0251] DIVMTQT PSSVSEPVGG TVTINCQASE NIYSNLAWYQ QKPGQPPKLL IYLASSLTSG
- [0252] VPSRFKSGS GTEFTLTISD LECADAAIYY CQNNYGDVRY GRNAFGGGTE
- [0253] VVVKGDPVAP TVLIFPPAAD QVATGTVTIV CVANKYFPDV TVTWEVDGTT
- [0254] QTTGIENSKT PQNSADCTYN LSSTLTST QYNHKEYTC KVTQGTTSVV QSFNRGDC
- [0255] 抗-RAM9-54-5hc的氨基酸序列:SEQ ID NO:17
- [0256] Q SLEESGGDLV KPGASLTLTC TASGFSFSSG YDMCWVRQAP GKGLEWIACI
- [0257] YDGDVRTYYA SWAKGRFTIS RTSSTMTLQ MTGLTAADTA TYLCARGASG
- [0258] YLSALYLWGP GTLTVVSSGQ PKAPSVFPLA PCCGDTPSST VTLGCLVKGY
- [0259] LPEPVTVTWN SGTLTNGVRT FPSVRQSSGL YSLSSVVSST SSSQPVCNV
- [0260] AHPATNTKVD KTVAPSTCSK PTCPPPELLG GPSVFIFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV
- [0261] SQDDPEVQFT WYINNEQVRT ARPPLREQQF NSTIRVVSTL PIAHQDWLRG
- [0262] KEFKCKVHNK ALPAPIEKTI SKARGQPLEP KVYTMGPPRE ELSSRSVSLT CMINGFYPSD
- [0263] ISVEWEKNGK AEDNYKTPA VLSDGSYFL YSKLSVPTSE WQRGDVFTCS
- [0264] VMHEALHNHY TQKSISRSPG K
- [0265] 抗-RAM9-54-51c的氨基酸序列:SEQ ID NO:18
- [0266] SEQ ID NO:18for the amino acid sequence of anti-RAM9-54-51c DVVMTQTP  
ASVSEPVGGT
- [0267] VTIKQASFT ITSNLAWYQQ KPGQPPKLLI YGASNLASGV SSRFRGSGFG TEFTLTISDL
- [0268] ECADAATYYC QCAAVLSSWT FGGGTEVVVK GDPVAPTCLI FPPAADQVAT
- [0269] GTVTIVCVAN KYFPDVTVTW EVDGTTQTTG IENSKTPQNS ADCTYNLSST
- [0270] LTLTSTQYNS HKEYTCKVTQ GTTSVVQSFN RGDC
- [0271] 本发明的抗MIF抗体优选分离的单克隆抗体。该抗-MIF抗体可以是IgG、IgM、IgE、IgA、或IgD分子。在其它实施方式中,抗-MIF抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类。在其它实施方式中,抗体是亚类IgG1或IgG4的任何一个。在其它实施方式中,抗体是亚类IgG4。在一些实施方式中,所述的IgG4抗体具有一个单一突变,其将丝氨酸(丝氨酸228,根据Kabat编号排列)改变为脯氨酸。因此,IgG4的Fc区的子序列CPSC亚序列变为CPPC,其为IgG1的亚序列(Angal等,Mol Immunol,1993,30,105-108)。
- [0272] 此外,抗-(ox)MIF抗体(“oxMIF结合物”)的生产可以包括本领域中已知的用于抗体纯化的任何方法,例如通过阴离子交换色谱法或亲和色谱法。在一个实施方式中,抗-

(ox)MIF抗体可以通过体积排阻色谱法从细胞培养物上清液纯化而来。

[0273] 术语MIF的“中心区域”和“C末端区域”分别是指包含氨基酸第35-68位和氨基酸第86-115位的区域的人类MIF,优选分别包含人类MIF氨基酸第50-68位和氨基酸第86到102位的区域。

[0274] 本发明的特别优选的抗体(即“oxMIF结合物”)可以结合至人类MIF的氨基酸第50-68位或氨基酸第86-102位的任一区域。这也可以通过优选的抗体RAB0、RAB4、RAB2和RAB9的结合以及RAM4、RAM9和RAM0的结合来反映,上述结合如下所示:

[0275] RAB4和RAM4:氨基酸86-102

[0276] RAB9和RAM9:氨基酸50-68

[0277] RAB0和RAM0:氨基酸86-102

[0278] RAB2:氨基酸86-102

[0279] 术语“表位”包括任何能够与免疫球蛋白或者抗体片段特异性地结合的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由化学性质活跃的表面分子基团比如暴露的氨基酸、氨基糖或者其他碳水化合物侧链组成,并且通常有特定的三维结构特征以及特定的荷电特性。

[0280] 术语“载体”指的是能够转运另一个与之相连接的核酸的核酸分子。在一些实施方式中,载体是质粒,即额外的DNA片段可与之相连接的环状双链DNA环。

[0281] 术语“寄主细胞”指的是在引入表达载体后能够制备重组蛋白质的细胞系。术语“重组细胞系”指的是已经引入重组表达载体的细胞系。应当理解,“重组细胞系”不仅指特定的个体细胞系,也指该细胞系的后代。由于突变或者环境影响,而在后代中可能出现某些修饰,所以其后代事实上可能和母细胞不一致,但是仍然包括在此处使用的术语“重组细胞系”的范围中。

[0282] 根据本发明的宿主细胞的类型例如是COS细胞、CHO细胞或例如HEK293细胞,或本领域技术人员公知的任何其他宿主细胞,也包括例如细菌细胞,例如大肠杆菌细胞。在一个实施方式中,抗-MIF抗体在缺乏DHFR的CHO细胞系中例如DXB11中被表达,其中添加G418作为选择标志物。当将编码抗体基因的重组表达载体引入到CHO宿主细胞时,通过将宿主细胞培养一段足够长的时间以使得抗体足以在宿主细胞中表达或抗体足以分泌到宿主细胞生长的培养基中,从而制备抗体。

[0283] 可以使用标准蛋白质纯化方法将抗(ox)MIF抗体(即“oxMIF结合物”)从培养基中回收。

[0284] 令人非常意外的是,本申请发明人表明可以避免现有技术中在结合之前的甲醛固定步骤,并且具有重要的意义。如果使用(有机或无机)溶剂,即使使用熟知的并通常有用的固定剂甲醛或丙酮(其在组织切片领域是最常用的固定剂)执行固定,样品中的MIF仍可能改变它的构象,继而产生假阳性结果。这可能是由于,虽然仅仅是理论上,固定剂/溶剂诱导的MIF蛋白质中的结构重排,从而导致与oxMIF表位类似的结构。

[0285] 令人惊异地,本申请发明人表明如果在与一级抗-oxMIF抗体的结合步骤之前不使用固定步骤,可以获得良好的、可靠的结果。这与本领域技术人员的期望不同,本领域技术人员一般认为固定步骤对于提供适当的结果是必要的,因为它已经通过该领域所有常用方法的实践而得到广泛的证实。

[0286] 而且,在一个特别优选的实施方式中,二级检测抗体是独特型单克隆抗体,优选独

特型兔单克隆抗体。已经表明这些抗体是特别有利地,因为它们允许oxMIF结合物抗体例如RAM9的直接检测,而不必标记oxMIF结合物。有些时候,标记是不利的,因为它可能导致例如活性损失。本发明的二级抗体(独特型)使得允许信号放大和降低检测方法的背景噪声。

[0287] 本发明是特别有利的,因为本申请发明人成功地识别了针对上述oxMIF结合抗体的独特型单克隆抗体,所述oxMIF结合抗体可以可靠地且特异地检测结合了oxMIF的这些oxMIF结合抗体。因此,本发明-在一个实施方式中-涉及对于此处所述的一级抗体而言是独特型的抗体。它们也特异地结合这些一级抗体。优选地,当一级抗体被结合于oxMIF时,它们可以特异地结合这些一级抗体。在一个优选的实施方式中,独特型是单克隆抗体。在一个更优选的实施方式中,独特型抗体是单克隆兔独特型抗体。

[0288] 最优选的二级抗体是被命名为54-5和68-1的那些,其如上文或下文中所述。54-5和68-1抗体是抗-RAM9抗体。

[0289] 在一个优选的实施方式中,本发明提供了一种用于提供这种二级抗体的方法,其中使用oxMIF抗体的Fab片段执行免疫方案,随后进行中和ELISA筛选。如果在中和ELISA中,抗体的 $IC_{50} \leq 60ng/ml$ ,则该抗体被认为适合用作二级抗体。

[0290] 在一个非常优选的实施方式中,本发明的独特型抗体选自下组:

[0291] -独特型(兔)单克隆抗-RAM9抗体,

[0292] -独特型(兔)单克隆抗-RAM0抗体,和

[0293] -独特型(兔)单克隆抗-RAM4抗体。

[0294] 最优选的,独特型抗体是

[0295] -独特型(兔)单克隆抗-RAM9抗体。

[0296] 通过这些独特型单克隆抗体,可以有利地将早期方法的背景噪声最小化,并在已经使用oxMIF结合抗体例如RAM9治疗过的病人组织中可靠地检测oxMIF。

[0297] 本发明的兔独特型单克隆抗体模拟oxMIF的结合表位。它们自身不结合oxMIF,但反而结合一级oxMIF结合抗体,因此可以提高信号强度。它们可以特异地结合一级抗体。令人惊异的是,可以提供特异性抗体和使用Fab-片段的免疫方法。“特异性结合”通过 $IC_{50}$ 值进行定义。在中和ELISA中,如果 $IC_{50} \leq 60$ ,则抗体被认为适用做二级抗体以及特异性结合。中和ELISA作为“二级”ELISA在下文中详细描述。

[0298] 本发明也公开了一种提供这种二级抗体的方法。特别地,抗-oxMIF抗体的Fab-片段被用于免疫。在一个优选的实施方式中,RAM9的Fab-片段用于兔子的免疫。优选地,根据下面的实施例3所描述的进行免疫。免疫方法对于本领域技术人员而言是熟知的。在免疫之后,选择表现出最高免疫反应的那些动物。用于监测免疫反应的一种优选的方法是区分型(differential)ELISA,特别是如下所述的初步筛选ELISA。该ELISA例如可以通过使用抗-oxMIF抗体相对于对照来执行,如实施例3。通过标准方法得到的兔淋巴细胞与适当的伙伴(partner)细胞进行融合,并且执行适当的、熟知的克隆和亚克隆步骤(见实施例3)。

[0299] 优选地,执行初步筛选ELISA。初步筛选使用抗-MIF抗体和非特异性人类同种型和/或纯化的总人类IgG(作为阴性对照)。测定二级抗体的结合。如果抗体的信号高出抗-RAM抗体的至少50倍,则认为该抗体适用于初级筛选,相应地,抗-RAM抗体为阴性对照。

[0300] 在二次筛选中,继续评估那些认为适用于初步筛选的抗体。将(人类)MIF涂覆于ELISA板上。添加二级抗体的样品。然后,将抗-oxMIF抗体的系列稀释用于校准, $IC_{50} \leq 60ng/$

ml被认为是适当的且有利的。

[0301] 在本发明的一个优选的实施方式中,组织样品的切片应当具有2至15 $\mu\text{m}$ 的厚度。在一个更优选的实施方式中,这些切片的厚度为5至10 $\mu\text{m}$ 。优选的厚度为10 $\mu\text{m}$ 。

[0302] 根据本领域技术人员已知的现有技术制备新鲜冷冻的或例如OCT包埋的活组织检查,并制备具有上述厚度的切片。如果没有另外的说明,优选在室温下进行下述方法和染色步骤。

[0303] 在一个优选的实施方式中,在开始真正的步骤之前,将切片风干20至45分钟,优选约30分钟。

[0304] 在本申请的IHC检测方法中的一个优选的实施方式中,样品,特别是组织样品,没有被固定,特别是没有使用任何无机或有机固定剂或溶剂例如甲醛或丙酮来固定。然而,在可选的实施方式中,可以在第一结合之前,风干样品。特别重要的是,以避免样品特别是可能包含(ox)MIF的样品被氧化的方式执行干燥步骤,可以根据本申请发明人所述的风干来满足该要求。需要在没有干燥成分例如酒精成分的情况下,完成干燥步骤,所述酒精成分含有氧化特性。

[0305] 特别地,本申请发明人表明,通过在第一结合步骤之前不使用固定程序(其意味着在可选的封闭步骤之前没有固定),可以避免MIF的氧化;使用其它方式,MIF的结构可能被重排,因此在随后的抗体与oxMIF的结合中导致假阳性结果。然而,样品可以在第一结合步骤之前被风干。

[0306] 针对本发明的结合化合物的特异性结合,优选地,使用上述一级抗-oxMIF抗体。这些抗体不需要被生物素化或另外标记。

[0307] 在另一个实施方式中,可以直接检测经该抗体治疗过的病人组织中的抗-oxMIF抗体。然后根据本申请所述的方法完成检测,且如本领域技术人员已知的该检测适用于直接检测。在一个非限制性实施例中,它可以通过风干开始,然后是固定(例如甲醛)、透化、内源性的过氧化物酶封闭、使用封闭缓冲液的封闭,以及然后通过添加独特型抗-RAM9抗体进行。当然,在该实施方式中,不必添加一级抗体来进行该特定的检测。可以参考实施例4,其为该方法的工作实施方式。

[0308] 本发明的优选的实施方式中的特异性结合(即一级抗体和oxMIF之间的结合),在优选的实施方式中可以通过使用封闭缓冲液进行,其可以阻止非特异性结合。在该实施方式的一个有利的替换中,封闭缓冲液包含山羊血清、溶于Tris缓冲盐水(TBS)的血清白蛋白和鱼胶;在一个更优选的实施方式中,其包含20%的正常山羊血清、溶于TBS的2%的血清白蛋白和0.2%的鱼胶。在另一个实施方式中,封闭缓冲液包含20%的正常山羊血清、溶于杜氏磷酸缓冲液(DPBS)的2%的牛血清白蛋白和明胶。

[0309] 在使用一级抗oxMIF抗体的特异性结合步骤之前,使用封闭缓冲处理样品优选进行15至45分钟,更优选进行30分钟。已经表明,如果封闭缓冲也处理进行少于15分钟,信号/噪声比将劣化,即背景信号相对于特异信号将变得太高。

[0310] 而且,在一个优选的实施方式中,一级抗-oxMIF抗体的浓度为0.3至20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间。特别有利的是,抗oxMIF抗体的浓度范围在0.5至16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间。甚至更优选,抗oxMIF抗体的浓度范围在1至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 稀释缓冲液之间,更优选1至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间。优选地,使用oxMIF抗体溶液完全覆盖该切片,基于该目的,在大部分情况下500 $\mu\text{l}$ 是足够的。

[0311] 优选地,将一级抗-oxMIF抗体稀释在一级稀释缓冲液中。在一个优选的实施方式中,该一级稀释缓冲液包含溶于TBS的牛血清白蛋白和鱼胶,在更优选的实施方式中,包含溶于TBS的2%的牛血清白蛋白和0.2%的鱼胶。与oxMIF抗体的温育优选进行30至90分钟,更优选进行50-70分钟,更优选进行约60分钟。

[0312] 在结合步骤之后,该切片-在优选的实施方式中-应当短暂地浸在新鲜的TBS(或例如DPBS;洗涤缓冲液)中以洗去多余的抗体;在另一个实施方式中,当封闭缓冲液和稀释缓冲液使用DPBS而不是TBS时,所述浸泡应该是在新鲜的DPBS中。在浸泡之后,在新鲜的洗涤缓冲液中的洗涤步骤应该进行约5至15分钟,在一个更优选的实施方式中进行10分钟。

[0313] 作为可选的但非优选的步骤-应该再第一结合步骤之后进行-它可能在适当的固定溶液例如磷酸缓冲甲醛中将样品固定10至25分钟,优选15至20分钟。使用甲醛的固定步骤是可选的,虽然不是优选的,其起到维持组织结构的作用。该步骤对(ox)MIF结构没有负面影响,也不会导致假阳性结果。

[0314] 在该可选的步骤之后,优选再次浸在TBS(或DPBS)中以洗去多余的甲醛;浸泡时间如上所述;之后可以在新鲜的TBS(或DPBS,分别地)温育5-15分钟,优选10分钟。

[0315] 可选地,然后封闭内源性过氧化物酶。这可以通过将组织切片在例如溶于甲醇的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,优选在溶于甲醇0.3%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中温育20-30分钟而完成。优选,通过在TBS中冲洗5-10分钟而去掉多余的甲醇。过氧化物酶的封闭(PB)可以通过市售过氧化物酶封闭剂例如来自DAKO的双重内源性酶阻断剂来完成(参见例如实施例4)。如果使用这些市售PB,可以在固定步骤之后额外地进行透化步骤。在此,可能的工作实施方式为在TBS+0.2%的TritonX-100中温育5分钟。

[0316] 其它方法对于本领域技术人员是已知的。

[0317] 通过向反应溶液中添加独特型抗体来进行检测步骤。以稀释缓冲液的形式提供独特型抗体。浓度优选为约0.5 $\mu$ g/ml。该稀释缓冲液和上述一级抗体的相同。优选的温育时间为15至45分钟之间,更优选20至40分钟之间。在另一种方法中,也可以直接使用荧光标记或例如过氧化物酶标记的独特型抗体。本领域技术人员可以意识到能够直接冲洗和形成(标记的过氧化物酶)或直接冲洗和固定(荧光团标记)。

[0318] 根据优选的实施方式,在这些步骤之后,应该在适当的染色试剂中进行染色。可以使用已知的兔IHC检测试剂例如SignalStain®Boost IHC检测试剂(兔)来完成染色。可选地,本领域技术人员已知的其它检测方法也是合适的,例如荧光团-标记的抗体可以用作(第三)检测工具,例如作为Alexa Fluor标记的抗兔抗体或通过荧光标记二级抗体。根据本申请发明人,使用荧光标记的实体的检测表明适于本发明(参见例如实施例2)。这作为可选的方式,在实施例3中描述的更详细且普遍适用的。

[0319] 优选的染色试剂是SignalStain Boost IHC检测试剂(兔)。染色周期持续至少20分钟,优选至少30分钟,在一个非常优选的实施方式中,持续至少45分钟。

[0320] 如本领域技术人员已知的,也可以使用适当的三级抗体来检测一级和二级抗体之间的结合。

[0321] 优选地,将切片再次短暂地浸在TBS(可选地DPBS,如上)以洗去多余的二级试剂;然后在一个优选的实施方式中,进一步在新鲜的TBS或新鲜的DPBS中进行温育5至15分钟,优选10分钟。

[0322] 在优选的实施方式中,得到的玻片是通过基质例如本领域技术人员已知的适于形成(development)的基质例如ImmPACT DAM基质经过1至10分钟,优选5分钟而形成的。

[0323] 然后,在优选的实施方式中,将切片短暂地浸在TBS(或DPBS中,如上所述)以洗去多余的基质,然后在新鲜的TBS或可选地DPBS中温育5至15分钟,优选10分钟。

[0324] 在上述步骤之后,优选进行复染色步骤来染色核酸;此处可以使用所有已知的用于免疫组织化学步骤的染色剂。在一个优选的实施方式中,使用苏木精。该染色应该进行0.5至3分钟,优选1至2分钟。

[0325] 然后切片使用自来水进行冲洗并短暂地浸渍(优选还是再自来水中)以洗去多余的染色试剂。然后,在可选的实施方式中,进行温育1至5分钟,优选1至2分钟。在苏木精的情况下,温育时间不同并取决于从紫色到蓝色的颜色变化的发生。

[0326] 对于显微镜检查,组织切片优选根据本领域技术人员而言是熟知的下述方式进行干燥:例如在70%、随后是90%、以及纯乙醇中进行例如各自2分钟,然后优选在例如二甲苯中进行至少3分钟而清除。在另一个实施方式中,干燥步骤在96%至纯乙醇中进行2x 20秒。为了切片的长期储存,切片使用VECTASTAIN Permount来封固,并使用盖玻片覆盖。干燥和封固步骤对于本领域技术人员而言属于基本常识的一部分。

[0327] 通过下述实施例将进一步解释本发明,然而下述实施例不是对本发明范围的限制,本发明的范围由权利要求决定。

[0328] 实施例

[0329] 实施例1:在浸润性导管癌病人的胰腺中,通过免疫组织化学(IHC)进行原位检测 $\alpha$ MIF(图1)

[0330] 使用商购获得的来自64岁的浸润性导管癌病人的活组织检查的冰冻切片。使用RAM9或不使用RAM9,通过抗独特型单克隆兔RAM9抗体检查 $\alpha$ MIF的检测。

[0331] 材料和方法

[0332] 根据本领域专家已知的技术制备新鲜冷冻的或OCT包埋的玻片(slide),以10 $\mu$ m进行切片,并在切片后保存在 $\leq -80^{\circ}\text{C}$ 的条件下。在室温下进行以下步骤。将冰冻切片风干30分钟,并使用封闭缓冲液(BB:20%正常山羊血清/2%牛血清白蛋白/0.2%溶于TBS的鱼胶)封闭非特异性结合15分钟。然后在没有一级抗体或在含有溶于一级抗体稀释缓冲液(PADB:2%牛血清白蛋白/0.2%溶于TBS的鱼胶)中的浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗 $\alpha$ MIF抗体RAM9中,温育切片60分钟。在TBS冲洗之后,将样品固定在4%PBS缓冲的甲醛中20分钟。通过在TBS中冲洗5-10分钟洗去多余的甲醛。通过将组织切片在溶于甲醇的0.3%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 中温育20分钟,封闭内源性的过氧化物酶。通过在TBS中冲洗5-10分钟洗去多余的甲醇/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 。通过将组织切片与稀释在PADM中的1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗-独特型兔单克隆抗体(68-1)进行温育30分钟,完成检测。通过在TBS中清洗5-10分钟,去除多余的检测抗体。使用SignalStain<sup>®</sup>Boost IHC检测试剂(兔)进行染色30分钟。然后,将切片再次在TBS中彻底冲洗10分钟。通过使用ImmPACT DAB底物进行5分钟,染色可视化为棕色。在TBS中冲洗玻片,并且使用苏木精复染细胞核1-2分钟。通过在自来水下冲洗玻片,复染的颜色从紫色变为蓝色。为了用于显微镜,通过将组织切片各自在96%乙醇随后是纯乙醇条件下进行2x 20秒以干燥组织切片,随后在二甲苯中进行2分钟以清洁组织切片。为了长期保存,使用VECTASTAIN Permount固定切片,并使用盖玻片覆盖切片。

[0333] 结果

[0334] 和观察不到染色的正常胰腺组织相比(数据未显示),通过在PanIN导管结构中进行主染色(深灰染色;即图1A的深灰色)可以检测到来自患有浸润性胰腺导管癌的病人胰腺中的oxMIF。切片中观察到的深色结构(附图1A中的点样)是来自细胞的细胞核(苏木精染色)。应该注意到,当使用相同的条件而没有使用上述一级检测抗体(图1B)进行染色时,在来自正常或胰腺癌组织的冷冻切片中没有观察到染色。

[0335] 通过进行进一步研究,本申请发明人可以确定,在优选的实施方式中,厚度为2至16 $\mu\text{m}$ ,或5-10 $\mu\text{m}$ 的切片是特别有利的。而且,一级抗-oxMIF抗体的浓度范围在0.5至16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,优选0.5-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,是特别有利的。

[0336] 结论

[0337] 在病变器官例如患浸润性胰腺导管癌的病病人的胰腺中,可以通过本发明的IHC技术检测到oxMIF,然而在来自健康胰腺的组织中没有检测到oxMIF。

[0338] 实施例2(图2):

[0339] 通过对人类肺中的组织活检进行免疫荧光,可以执行原位检测oxMIF。样品均来自于66岁女性捐赠者的正常的肺(图2A)和来自61岁女性病人的鳞状细胞癌(图2B)。

[0340] 步骤:

[0341] 根据本领域专家已知的技术制备新鲜冷冻的或OCT包埋玻片,以10 $\mu\text{m}$ 进行切片,并在切片后保存在 $\leq -80^{\circ}\text{C}$ 的条件下。在室温下进行以下步骤。将冰冻切片风干30分钟,并使用封闭缓冲液(BB:20%正常山羊血清/2%牛血清白蛋白/0.2%溶于TBS的鱼胶)封闭非特异性结合20分钟。然后在含有溶于一级抗体稀释缓冲液(PADB:2%牛血清白蛋白/0.2%溶于TBS的鱼胶)中的浓度为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗-oxMIF抗体RAM9中,温育切片60分钟。在TBS冲洗之后,将样品固定在4%PBS缓冲甲醛中20分钟。通过在TBS中冲洗5-10分钟去除多余的甲醛。通过在甲醇中温育5分钟来透化组织切片,(或者,在PADB+0.25% TritonX-100中温育5-10分钟也是可行的)。通过在TBS中冲洗5-10分钟去除多余的甲醇(组织切片未风干)。通过将组织切片与稀释在PADM中的1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗-独特型兔单克隆抗-RAM9抗体温育30分钟,完成RAM9的检测。通过在TBS中清洗5-10分钟,去除多余的检测抗体。使用稀释在PADB中的2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Alexa Fluor®555标记的抗-兔抗体进行30分钟,完成染色。然后,将切片在PBST(PBS+0.1% Tween20)中彻底冲洗10分钟。为了用于显微镜,使用DAPI将组织切片固定在ProLong®Gold Antifade试剂中(核复染)。

[0342] 结果

[0343] 通过本发明的方法,可以观察到oxMIF在癌组织中的清晰染色。而在正常肺中没有染色。

[0344] 结论

[0345] 在病变器官例如患肺部鳞状细胞癌的病病人的肺中,可以通过本发明的IF技术原位检测到oxMIF,然而在健康肺组织中没有检测到oxMIF。

[0346] 实施例3

[0347] 制备单克隆兔RAM9抗-独特型抗体

[0348] 材料和方法

[0349] 单克隆兔抗oxMIF抗体的免疫步骤

[0350] 为了制备特异性单克隆兔独特型抗体,使用RAM9的Fab片段免疫兔子,所述RAM9的Fab片段是通过木瓜蛋白酶酶切和随后的在Poros S离子交换柱上的纯化而制备的。在SDS-PAGE之后,通过考马斯亮蓝染色证实其纯度。

[0351] 使用五次注射的标准免疫来完成免疫。

[0352] 针对起始免疫:将0.4mg重组RAM9-Fab与等份的CFA(弗氏完全佐剂)一起混合。动物皮下接受200 $\mu$ l(4x 50 $\mu$ l)的混合物。如上所述,使用IFA(弗氏不完全佐剂)对每个动物每隔3周使用0.2mg剂量,执行放大免疫。在第一之前,即在最终免疫加强和通过ELISA的初步筛选的测试之间和之后,取得血清。在最后一次加强之后,兔子通过静脉注射巴比妥酸盐进行人工安乐死。

[0353] 细胞融合

[0354] 通过初级筛选ELISA(RAM9相对于预涂了人类对照抗体,通过山羊抗兔IgG/HRP检测)监测,在兔子中执行的脾切除术显示出最高的免疫反应。将脾脏浸渍在新鲜的充满含有1%盘尼西林/链霉素/两性霉素B的RPMI 1640的Petri盘中,冲洗若干次,并使用3ml的注射器的无菌活塞压碎成粉。通过将压碎的脾脏通过2个100 $\mu$ m-细胞过滤器,从残渣中分离出淋巴细胞。在冲洗若干次之后,将 $2 \times 10^8$ 个淋巴细胞和 $1 \times 10^8$ 个融合搭档(partner)细胞进行融合,并且每个融合置于20个96孔板。

[0355] 制备多克隆和亚克隆

[0356] 通过初级筛选ELISA,检测针对免疫原(RAM9)的多克隆上清液。使用有限次细胞稀释方法,亚克隆所选择的阳性多克隆。如上所述检测亚克隆的上清液。在介质级别的方法中,使用最好的克隆用于生产兔抗RAM9抗体。

[0357] 生产单克隆兔抗-RAM9抗体

[0358] 始于冷冻的细胞小平,将每个杂交瘤克隆接种到125ml的摇瓶中的15ml的细胞培养基中,所述细胞培养基中添加有2-巯基乙醇、盘尼西林/链霉素和5%的超低IgG FBS,并在37 $^{\circ}$ C、且5%CO<sub>2</sub>的气氛下,以120rpm进行摇晃。耗费更大体积的培养基,并定期取得上清液。

[0359] 在发酵末期,将细胞培养基上清液进行离心以去除细胞和碎片。在通过0.2 $\mu$ m的膜过滤之后,将上清液储存在 $< -20^{\circ}$ C或立即施用于抗体纯化。

[0360] 单克隆兔抗-RAM9抗体的纯化

[0361] 将生产抗体的兔杂交瘤的细胞培养基上清液施用于HiTrap MabSelect Sure柱(GE医疗)。通过使用10倍柱体积的pH为7.2的20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>缓冲液进行冲洗,以去除杂质。在低pH条件下,使用100mM的pH为2.8的甘氨酸缓冲液,执行单克隆抗-RAM9抗体的洗脱。然后,然后通过PBS(pH 7.2)中进行稀释,来中和一步纯化的单克隆抗体,并浓缩和储存在 $-20^{\circ}$ C下用于进一步实验。

[0362] 在HEK293细胞中克隆和生产所选的(selected)单克隆兔抗-RAM9抗体

[0363] 使用市售TuboCapture试剂盒(Qiagen:第72232号),根据生厂商的建议分离杂交瘤细胞的mRNA,然后使用寡-dT引物反转录为cDNA。重链的可变区(VH)进行PCR扩增。对整个轻链(LC)进行PCR扩增。使用限制性酶HindIII和KpnI酶切PCR片段的VH区域。使用HindIII和NotI酶切LC PCR片段。使用Qiagen PCR纯化试剂盒(编号#28016)纯化所有的酶切产物。在纯化之后,将VH或LC片段连接到相应的重链或轻链表达载体中,并转化到感受态细胞DH5

$\alpha$ (MC实验室,编号#DA-100)中。选择转化的克隆,并使用相应的限制性内切酶证实其插入(根据期望的大小:VH为大约440bp,以及LC为740bp)。

[0364] 插入了期望大小的质粒进行测序(SEQ ID NO 15-18)。轻链和重链共转染至6孔板的HEK293细胞。在转染四天之后,收集上清液,并在初级筛选ELISA中测试其针对相应的抗原。而且,测定兔IgG的浓度。选择最好的生产性特异性克隆用于大规模生产。然后,根据上述方法纯化细胞培养基上清液。

[0365] 而且,使用HindIII和NotI将整个轻链或重链片段从相应的表达载体中切除,并随后使用Qiagen PCR纯化试剂盒(编号#28016)纯化。将cDNA插入物克隆至pcDNA3.1质粒中。

#### [0366] 初级筛选ELISA

[0367] 将溶于PBS的1 $\mu$ g/ml的RAM9(靶标)和非特异性人类同种型和/或纯化的人类总IgG(阴性对照)以100 $\mu$ l/孔固定到微平板上。使用200 $\mu$ l 20% HAS(人类血清白蛋白)/TBST(含有0.1%吐温20的TBS)封闭微平板。在所有温育步骤之间都包含冲洗步骤。将兔杂交瘤细胞系的细胞培养上清液以选定的稀释比例溶于30% HAS/TBST施用到这些微平板中。使用山羊抗-兔IgG(H+L)-HRP检测抗体测定抗-RAM9抗体的结合。使用TMB或其它染色粒过氧化物酶底物分析信号。相比阴性对照,针对RAM9的特异性抗体表现高至少50倍的信号(见图3)。

#### [0368] 次级筛选ELISA

[0369] 使用人类MIF(10 $\mu$ g/ml PBS,100 $\mu$ l/孔)涂覆微平板,并使用250 $\mu$ l 1.5%的溶于PBS的鱼胶进行封闭。在所有温育步骤之间都包含冲洗步骤(每孔4x 250 $\mu$ l PBS)。样品进行系列预稀释(溶于1%新鲜鱼胶/PBS)至2x最终稀释,并和相同体积的生物素化的RAM9(30ng/ml)(等于1:2稀释,RAM9的最终浓度为15ng/ml)进行混合。这些混合物允许形成复合物30分钟。溶于1%的鱼胶/PBS的生物素化的RAM9(25-0.2ng/ml)的系列稀释被用于校准,以及15ng/ml的生物素化的RAM9被用作阴性对照(对应于在相同制剂中的生物素化的RAM9的最终浓度)。将样品(100 $\mu$ l/孔)施用到微平板中2小时。使用HRP偶联的链霉亲和素和TMB作为发色底物检测被捕捉到平板上的生物素化的RAM9。每孔的吸收值和通过线性回归的标准曲线的吸收值相关,并表达为ng/ml。样品中生物素化的RAM9的计算浓度与阴性对照中生物素化的RAM9的计算浓度(%回收=(100%/阴性对照中生物素化的RAM9的测量浓度)x样品中RAM9的测量浓度)相关。通过兔抗-RAM9的印迹(blotting)log浓度相对于%回收,以及非线性4-参数曲线与图4a的可变斜率进行拟合,来计算抗-RAM9抗体的半数最大结合抑制值(IC<sub>50</sub>)。

[0370] 在最终的纯化步骤之后,在上述次级筛选中再次检测两种特定的有期望的抗体(命名为68-1和54-5),并且IC<sub>50</sub>值分别为:68-1几乎为29.65,以及54-5几乎为5.958,见图4b。

[0371] 两种抗体非常适合为次级检测抗体。例如参见图1和图5所示的浸润性导管癌中 $\alpha$ xMIF的原位检测。

#### [0372] 实施例4

##### [0373] 检测组织中的RAM9

[0374] 将来自慢性淋巴细胞性白血病小鼠模型的淋巴结进行新鲜冷冻和OCT包埋,其中一组使用RAM9处理,一组使用抗体赋形剂处理。组织块以10 $\mu$ m进行冷冻切割,并在切片之后保存在 $\leq -80^{\circ}\text{C}$ 。以下步骤均在室温下进行。将冷冻切片风干30分钟,随后在4%PBS缓冲甲

醛中进行固定15-20分钟。同时,透化组织切片,并通过在TBS+0.2%TritonX-100中冲洗5-10分钟以去除多余的甲醛。通过将组织切片与双重的内源性封闭酶(enzyme block)(Dako)温育10分钟来封闭内源性过氧化物酶。通过在TBS中冲洗5-10分钟去除多余的双重内源性封闭酶。使用封闭缓冲液(BB:20%正常山羊血清/2%牛血清白蛋白/0.2%溶于TBS的鱼胶)来封闭非特异性结合15-20分钟。通过将组织切片与稀释在PDAB中的0.5 $\mu$ g/ml的单克隆兔抗-RAM9抗体(68-1)温育30分钟,完成RAM9的检测。通过在TBS中冲洗5-10分钟,去除多余的检测抗体。使用高度交叉吸附的稀释在PDAM中的1.6 $\mu$ g/ml的山羊抗-兔HRP结合物(赛默飞世尔)进行染色30分钟。然后,将切片再次在TBS中彻底冲洗10分钟。通过使用DAB底物(Dako)染色5-10分钟,使得着色变得可视化。将玻片在TBS进行冲洗,并使用苏木精复染细胞核10秒至1分钟。通过将玻片在自来水中冲洗,使得复染的颜色由紫色变为蓝色。为了用于显微镜,将组织切片在96%然后是纯乙醇中分别干燥2x 20秒,之后在二甲苯中清洗约3分钟。为了长期保存,使用VECTASTAIN Permount固定切片,并覆盖盖玻片。

[0375] 结果:

[0376] 在病变器官例如来自患慢性淋巴细胞性白血病小鼠的淋巴结中,可以通过本发明的IHC技术原位检测到RAM9结合于 $\alpha$ xMIF中(黑色箭头)(图6A)。在来自赋形剂处理的对照小鼠中的淋巴结中没有观察到背景染色(图6B)。

[0377] 实施例5:

[0378] 该实施例的目的在于半定量测定RAM9含量,所述RAM9能够在治疗性静脉施用之后在恶性组织中渗透和累积,并且RAM9能够将它与半定量测定肿瘤活检两个连续玻片中相同组织区域中的靶标(= $\alpha$ xMIF)含量相关联。如果半定量测定RAM9和 $\alpha$ xMIF(=靶标)各自的含量相等,获得100%靶标饱和度。

[0379] 动物模型:

[0380] 将来自慢性淋巴细胞性白血病小鼠模型的淋巴结切除并速冻,其中一组使用RAM9处理,一组使用抗体赋形剂处理。冷冻淋巴结包埋在OCT中以制备组织微阵列(来自一个组织块的一组全部淋巴结),组织块以10 $\mu$ m进行冷冻切割,并在切片之后保存在 $\leq -80^{\circ}\text{C}$ 。

[0381] 免疫组织化学:

[0382] 如上述实施例4所述执行RAM9的染色。

[0383]  $\rightarrow$ 该方法检测施用于体内的RAM9,但不能区分结合于 $\alpha$ xMIF的RAM9和累积在组织中的自由RAM9

[0384]  $\alpha$ xMIF(靶标)染色:

[0385]  $\rightarrow$ 该方法可以检测结合于 $\alpha$ xMIF的RAM9,并且没有被RAM9结合的 $\alpha$ xMIF(自由 $\alpha$ xMIF),所述RAM9施用于体内。通过将外源性RAM9施用于未固定的组织,没有被体内施用的RAM9结合的 $\alpha$ xMIF是饱和的。在施用外源RAM9之后,以及在组织固定之前的冲洗可以避免检测到未结合的RAM9,其中通过该免疫组织化学方法仅能检测到 $\alpha$ xMIF。

[0386] 所有以下步骤均在室温下进行。将冻干切片风干30分钟,并使用封闭缓冲液(BB:20%正常山羊血清白蛋白/2%牛血清白蛋白/0.2%溶于TBS的鱼胶)经过15-20分钟封闭非特异性结合。通过将切片和稀释在PADB(2%牛血清白蛋白/0.2%溶于TBS的鱼胶)中的1 $\mu$ g/ml的RAM9温育30分钟,检测 $\alpha$ xMIF。通过在TBS中清洗5-10分钟去除多余的RAM9。随后在4%PBS缓冲甲醛中固定15-20分钟,组织切片被透化,并且通过在TBS+0.2%TritonX-100中冲

洗5-10分钟以去除多余的甲醛。通过将组织切片和双重(dua1)的内源性封闭酶(enzyme block)(Dako)温育10分钟以封闭内源性过氧化物酶。通过在TBS中冲洗5-10分钟去除多余的双重内源性封闭酶(enzyme block)。通过将组织切片与稀释在PADB中的0.5 $\mu$ g/ml的单克隆兔抗-RAM9抗体温育30分钟,完成RAM9的检测。通过在TBS中冲洗5-10分钟,去除多余的检测抗体。使用高度交叉吸附的稀释在PDAM中的1.6 $\mu$ g/ml的山羊抗-兔HRP结合物(赛默飞世尔)进行染色30分钟。然后,将切片再次在TBS中彻底冲洗10分钟。通过使用DAB底物(Dako)染色5-10分钟,使得着色变得可视化。将玻片在TBS中进行冲洗,并使用苏木精复染细胞核10秒至1分钟。通过将玻片在自来水中冲洗,使得复染的颜色由紫色变为蓝色。为了用于显微镜,将组织切片在96%然后是纯乙醇中分别进行2x 20秒以干燥,之后在二甲苯中清洗约3分钟。为了长期保存,使用VECTASTAIN Permamount固定切片,并覆盖盖玻片。通过奥林巴斯扫描显微镜(VS120)以20x放大扫描全部的玻片。

[0387] 评估:

[0388] 使用Definiens Tissue Studio™V3.6分析数字玻片全图像。组织区域通过人工标记或通过软件自动标记。将坏疽区域或褶皱组织从进一步分析中排除。一旦组织区域被标记,软件能够区分棕色免疫染色(oxMIF或RAM9)和蓝色复染(苏木精),并计算整个组织区域的免疫染色面积。通过将计算的RAM9染色的染色区域(%)除以计算的oxMIF(=靶标)染色的染色区域(%),得到靶标饱和度的比例。

[0389] 结果参见图8-9。该方法非常适于获得靶标饱和度的测定,并因此使得治疗变得合适并提供治疗成功性的预测。

[0390] 实施例6:

[0391] 上述实施例5中描述的方法施用于来自患有晚期转移性直肠癌的病人的活检。每周使用10mg/kg RAM9治疗病人7个月。在第一次施用RAM9之前,以及在使用RAM9处理1个月、2个月和6个月之后获取活组织检查。将活检在N<sub>2</sub>中速冻,包埋在OCT中,然后以10 $\mu$ m进行切片。将冰冻切片进行针对oxMIF和RAM9的免疫组织化学分析。如实施例5所述,评估靶标饱和度。除了先前实施例,在活检的数字图像分析期间,病理学家标记了肿瘤细胞。因此,也可以计算肿瘤细胞、基质(总体组织区域-肿瘤细胞区域)和总组织区域中的靶标饱和度。

[0392] 结果:

[0393] 使用10mg/kg的RAM9每隔一周治疗病人,导致在治疗过程中RAM9在肿瘤细胞和基质组织中的累积。数据代表来自一个病人的每个时间点的2-5个的活检的平均值,其中误差棒表示范围(见图10)。

## 序列表

<110> 巴克斯特保健股份有限公司  
巴克斯特国际公司

<120> 抗-MIF 免疫组织化学

<130> 164 996

<160> 18

<170> BiSSAP 1,2

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RAB9 的轻链

[0001]

<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 的轻链

<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  
 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

[0002]

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

<220>  
 <223> RAB0 的轻链

<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  
 [0003]                   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 的轻链

<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  
 [0004]                    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 的重链

<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



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 的重链

<400> 6

[0006] 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



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  
 [0008] 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



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  
 [0010] 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  
 [0011] 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  
 [0012] 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

&lt;210&gt; I1

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; RAM9hc

&lt;400&gt; I1

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

[0013]

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

[0014]

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; RAM91c

&lt;400&gt; 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



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  
 [0016] 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



Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Met Asp Phe Asn Asn Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg  
 85 90 95  
 Tyr Thr Asp Ile Asn Asn Gly Ile Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 115 120 125  
 Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys  
 130 135 140  
 Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser  
 165 170 175  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser  
 180 185 190  
 [0018] Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val  
 195 200 205  
 Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro  
 210 215 220  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 245 250 255  
 Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile  
 260 265 270  
 Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln  
 275 280 285  
 Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln  
 290 295 300  
 Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala  
 305 310 315 320  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro  
 325 330 335  
 Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser  
 340 345 350  
 Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser  
 355 360 365  
 Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr

370 375 380  
 Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe  
 405 410 415  
 Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 420 425 430  
 Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 435 440

<210> 16  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗-RAM9-68-11c

<400> 16  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Glu Pro Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Asp Val Arg  
 85 90 95  
 Tyr Gly Arg Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly  
 100 105 110  
 Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln  
 115 120 125  
 Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe  
 130 135 140  
 Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr  
 165 170 175  
 Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His  
 180 185 190  
 Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln  
 195 200 205

[0019]

Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys  
210 215

<210> 17

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-RAM9-54-5hc

<400> 17

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

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

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

Ala Cys Ile Tyr Asp Gly Asp Val Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala  
50 55 60

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

[0020] Gln Met Thr Gly Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Leu Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Ser Ala Leu Tyr Leu Trp Gly Pro Gly  
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg  
165 170 175

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

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

Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys  
210 215 220

Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
225 230 235 240

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp

	260	265	270
	Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu		
	275	280	285
	Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala		
	290	295	300
	His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn		
	305	310	315
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly		
	325	330	335
	Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu		
	340	345	350
	Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr		
	355	360	365
	Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp		
	370	375	380
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe		
	385	390	395
	Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp		
	405	410	415
	Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
	420	425	430
	Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys		
[0021]	435	440	

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗-RAM9-54-51c

&lt;400&gt; 18

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

[0022]

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

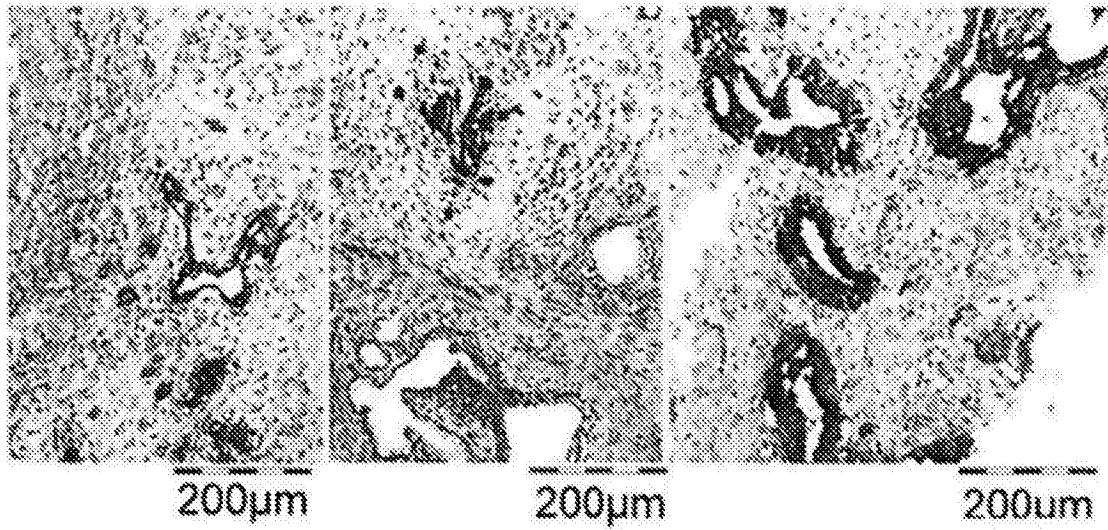


图1A

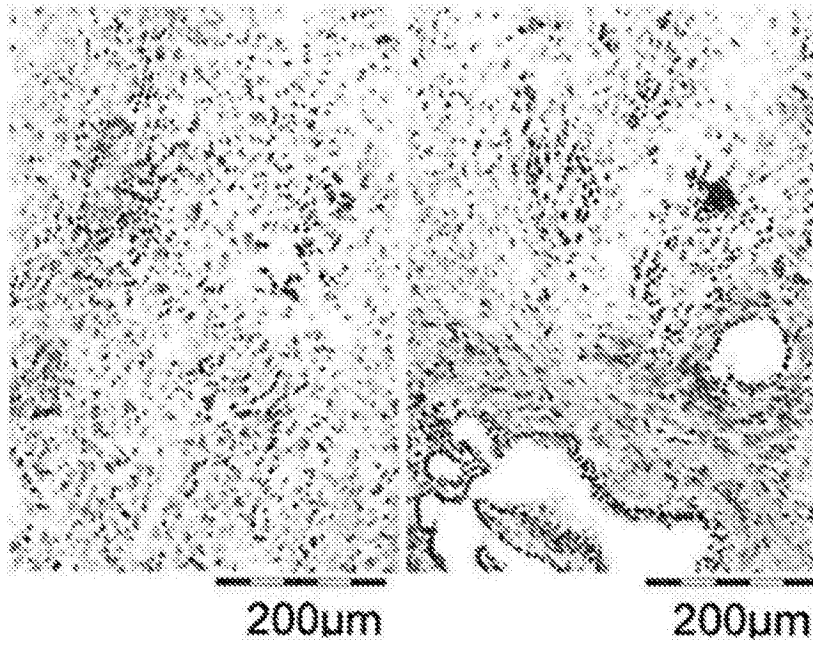


图1B

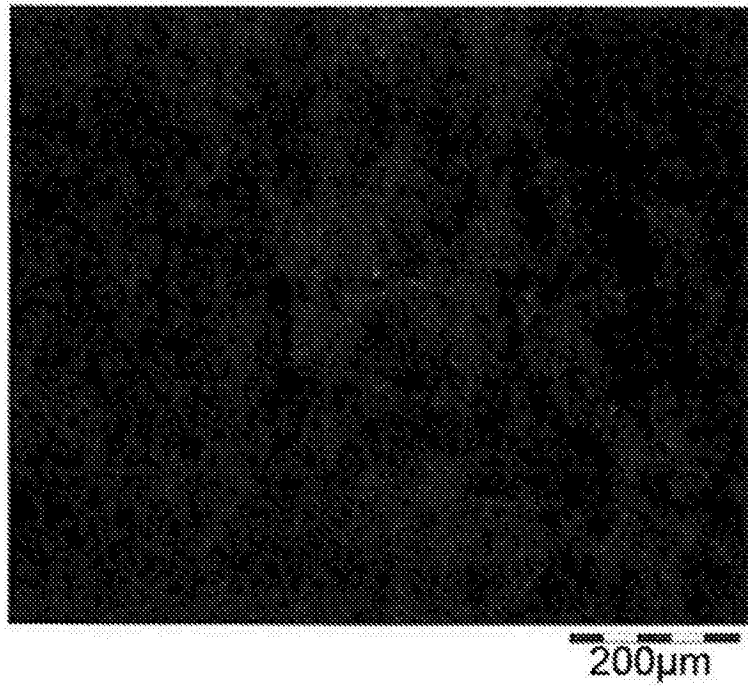


图2A

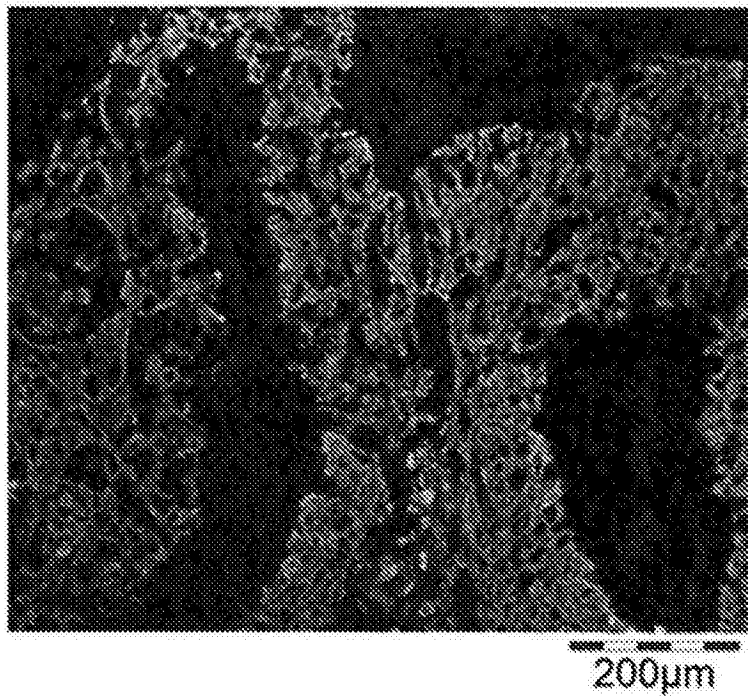
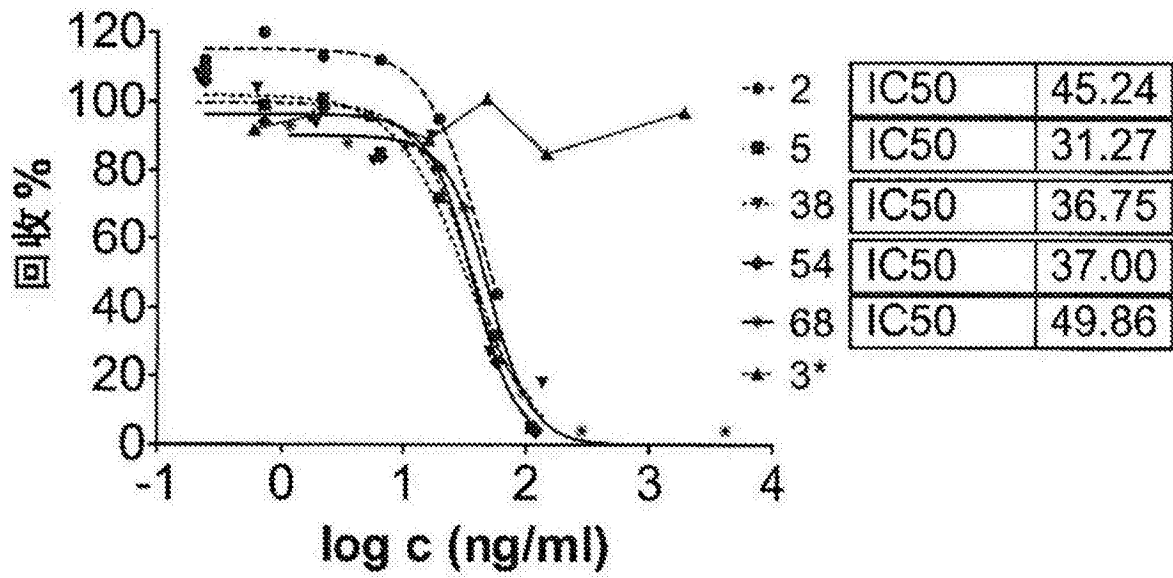


图2B

克隆编号	RAM9	人类 IgG	因子
1	1.12	0.92	1.2
2	2.53	1.00	2.5
3	2.20	1.96	1.1
4	1.35	1.24	1.1
5	2.81	0.01	234.1
6	4.13	3.90	1.1
37	2.14	1.90	1.1
38	3.09	0.02	140.5
42	0.83	0.65	1.3
43	2.65	3.23	0.8
47	2.36	2.93	0.8
48	2.99	3.54	0.8
49	1.57	1.70	0.9
51	2.78	2.27	1.2
52	0.93	-0.02	61.8
54	2.88	0.00	961.3
55	3.85	3.78	1.0
56	3.86	4.02	1.0
58	1.04	1.01	1.0
58	0.30	0.59	0.5
64	1.46	1.37	1.1
65	4.02	3.98	1.0
66	0.28	0.12	2.3
67	3.78	3.75	1.0
68	3.58	0.01	255.6
74	1.89	1.51	1.3

图3



\* 克隆编号3被包含作为阴性对照，因为它不能通过初级筛选ELISA

图4A

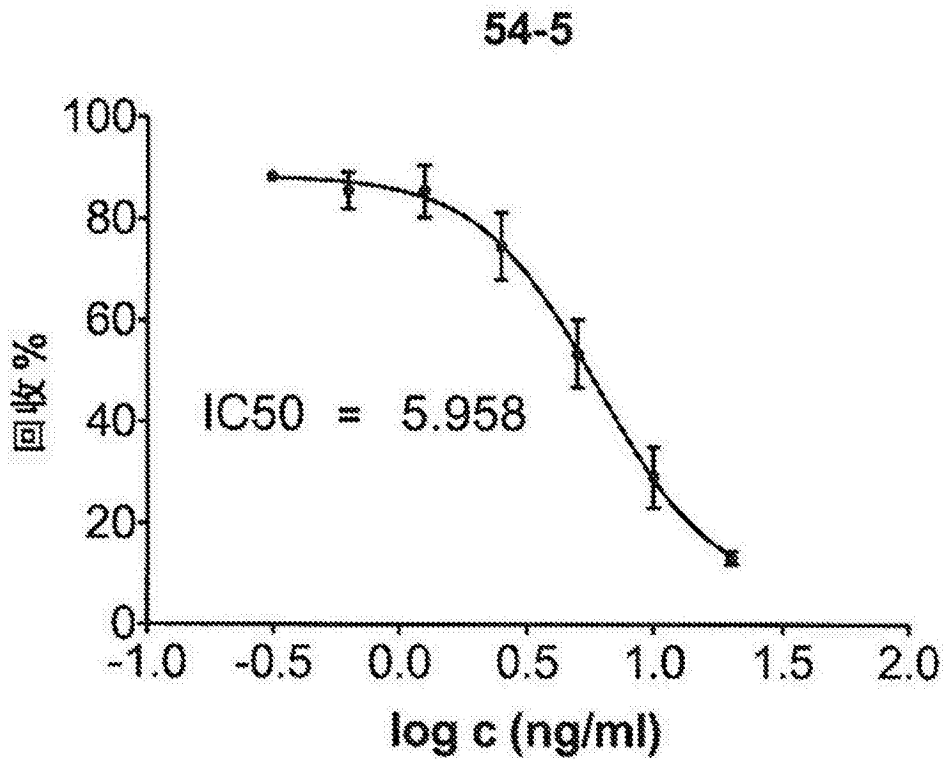
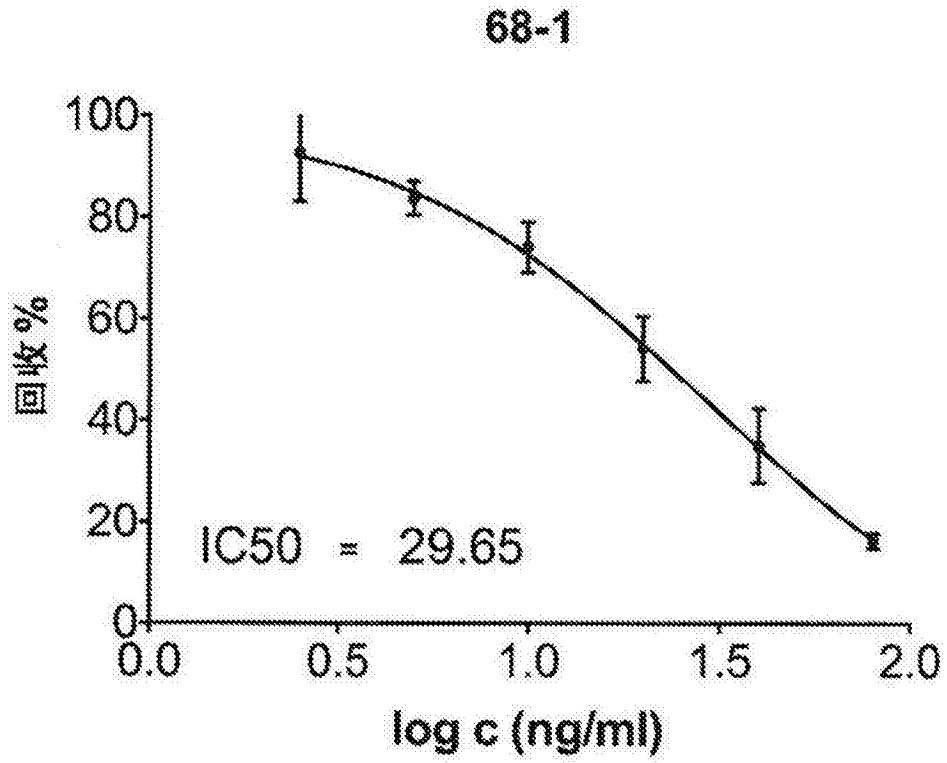


图4B

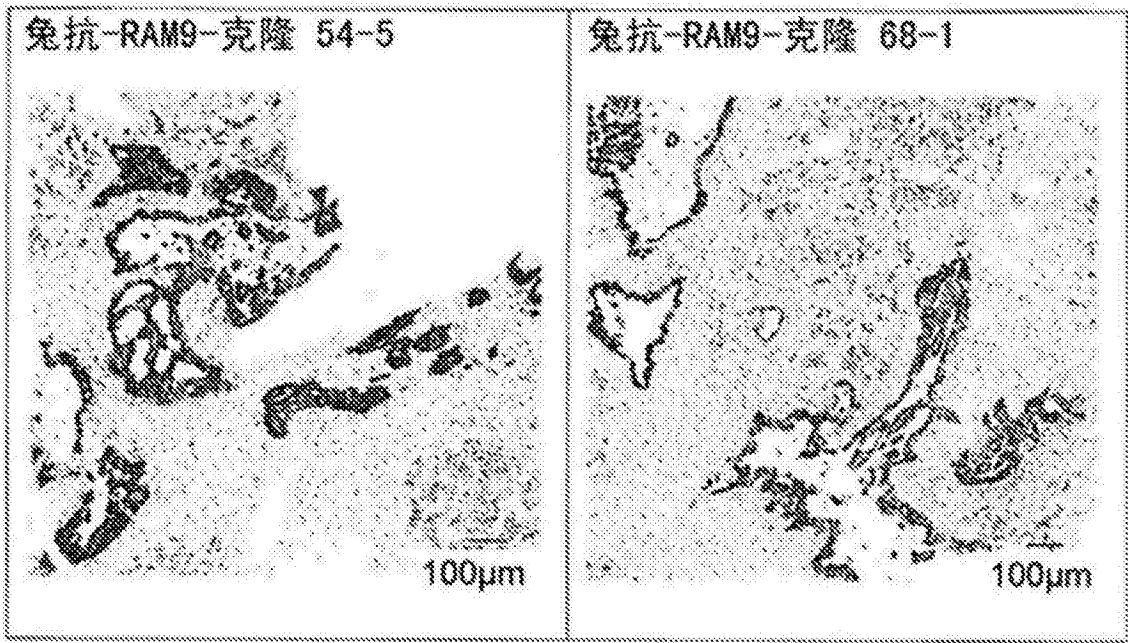


图5

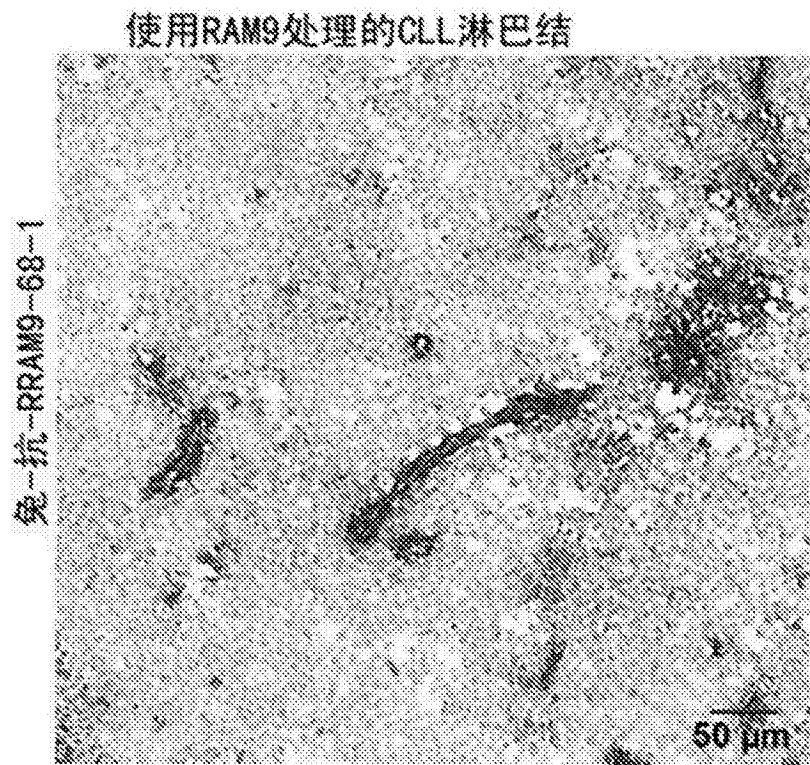


图6A

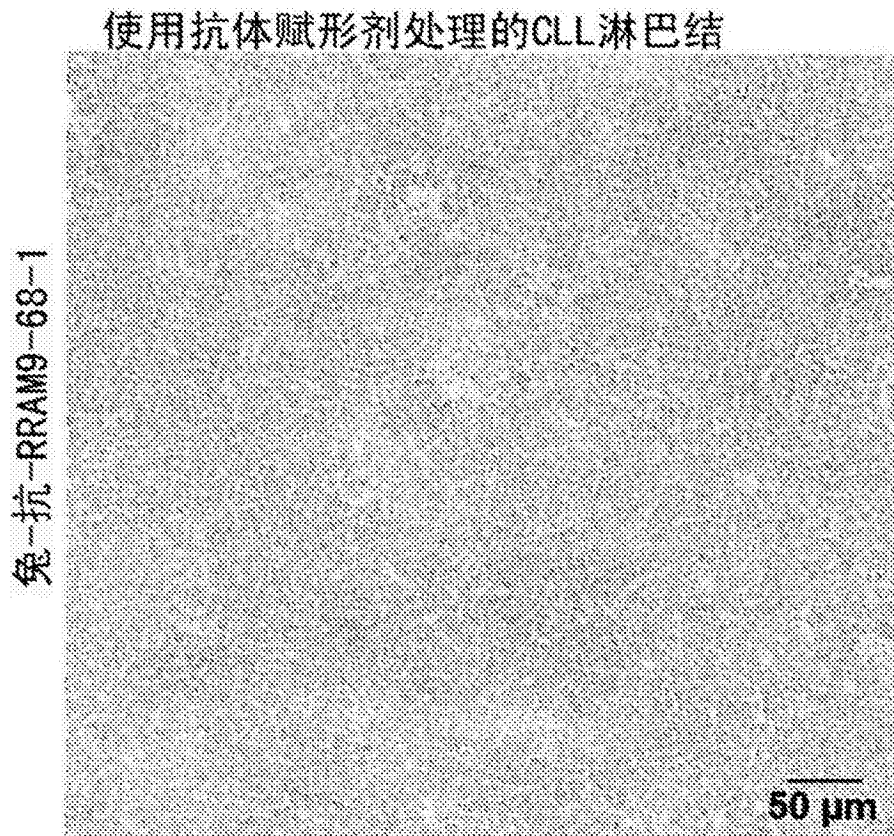


图6B

# RAM9的检测

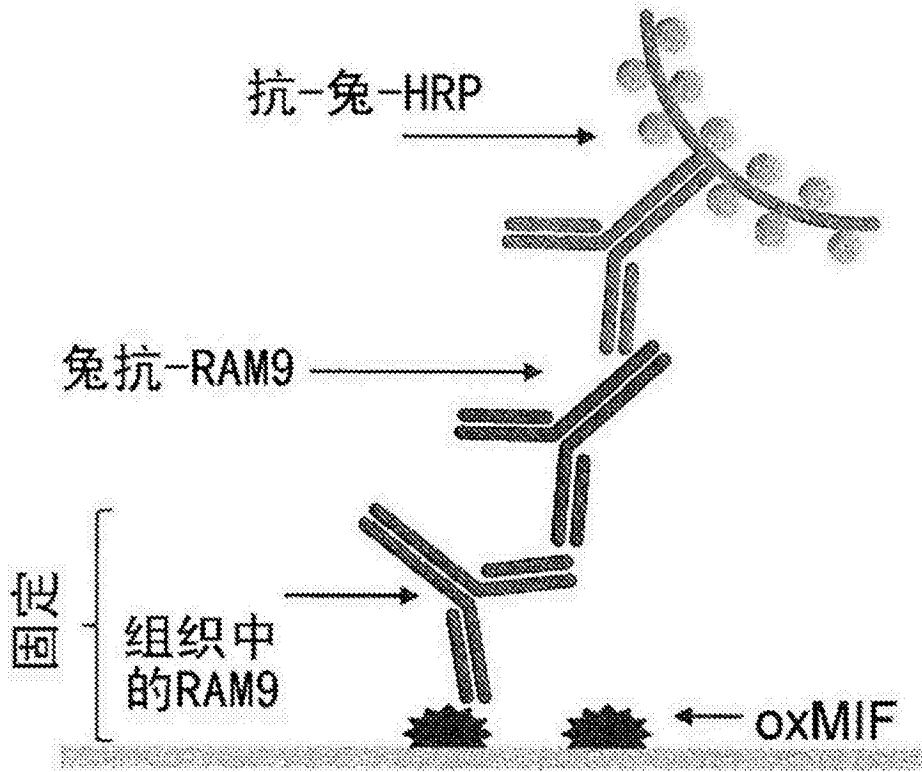


图7A

# 靶标 (oxMIF) 的检测

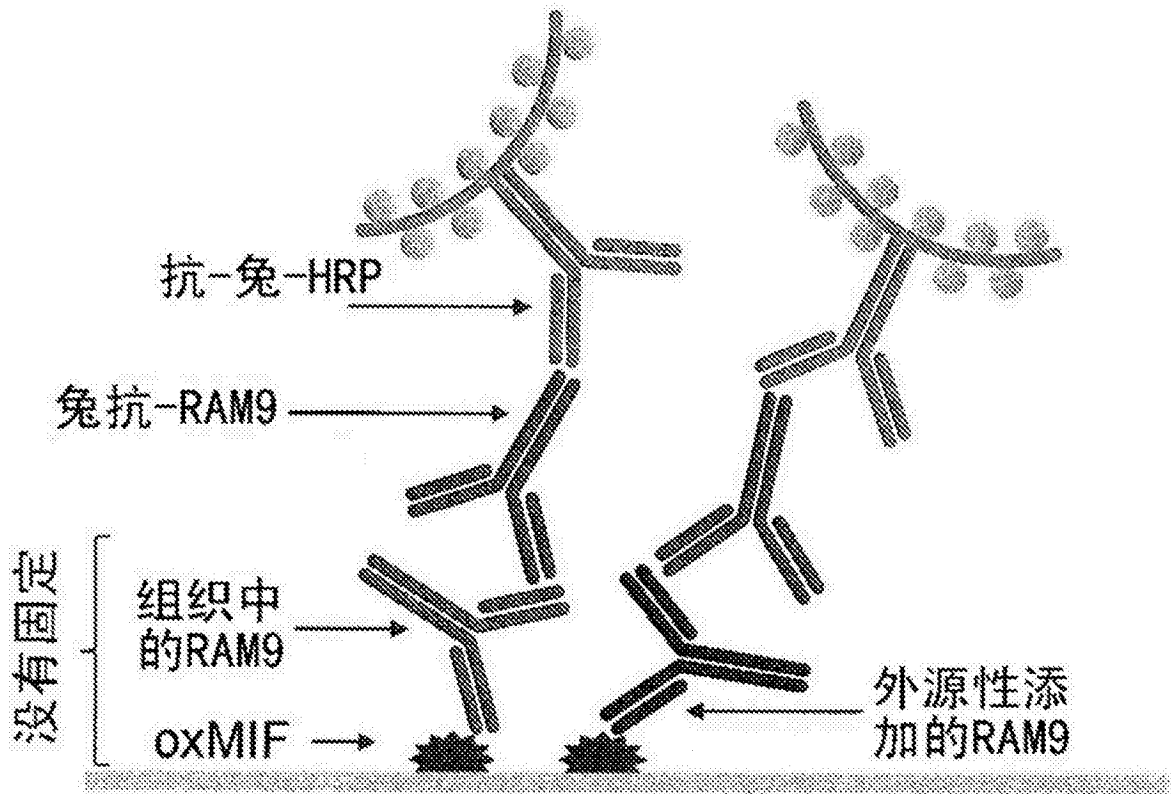


图7B

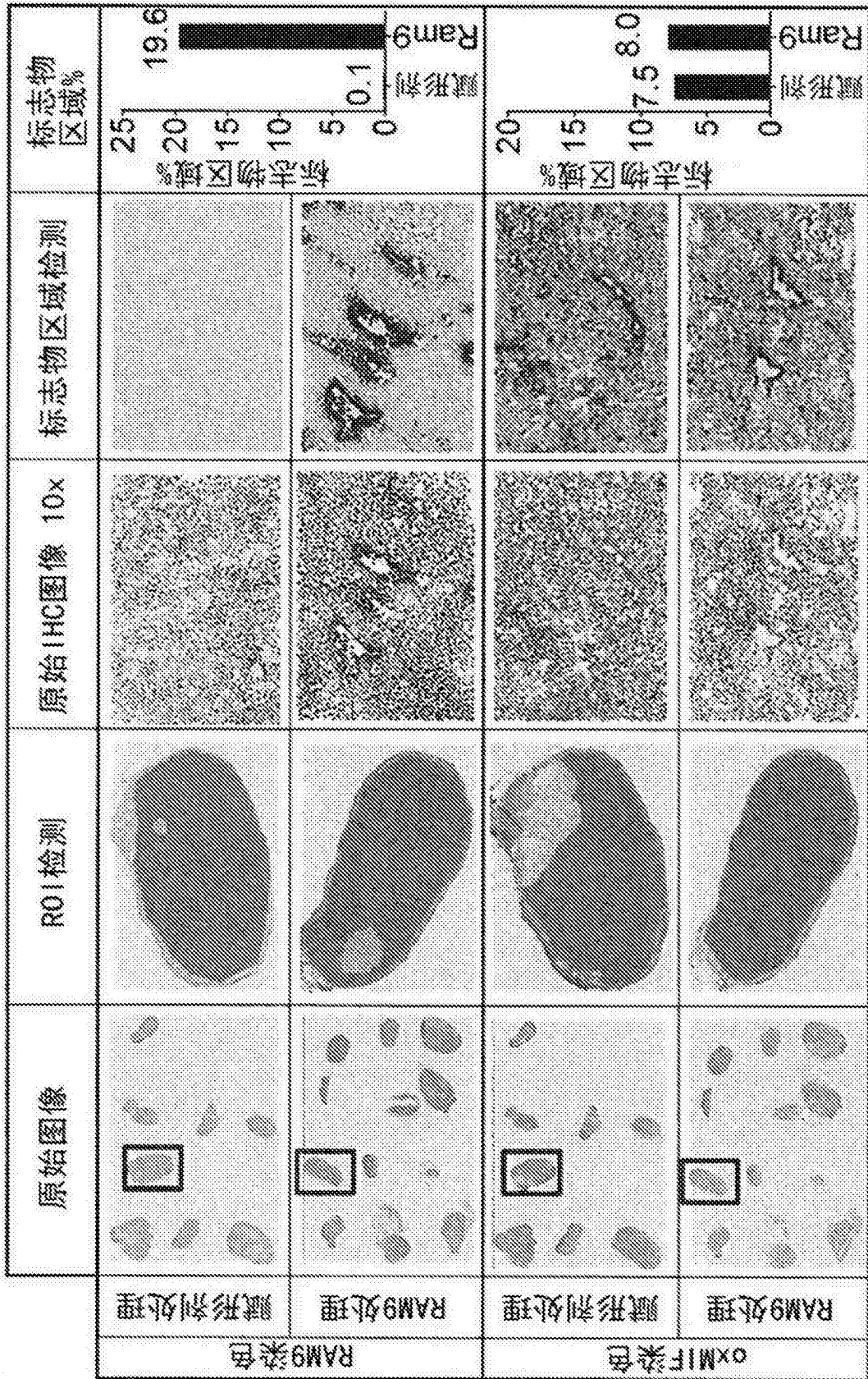


图8

### 计算靶标饱和度 (%)

$$\% \text{靶标饱和度} = \frac{\text{RAM9 染色区域 (\%总组织)}}{\text{oxMIF 染色区域 (\%总组织)}}$$

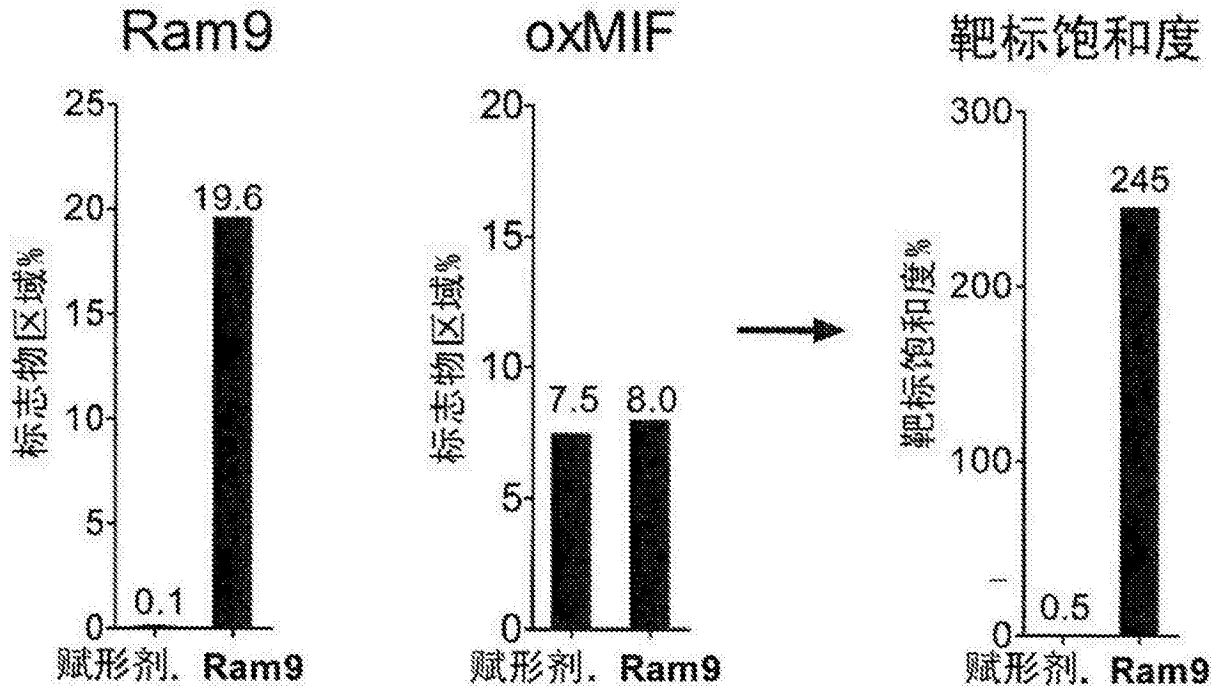


图9

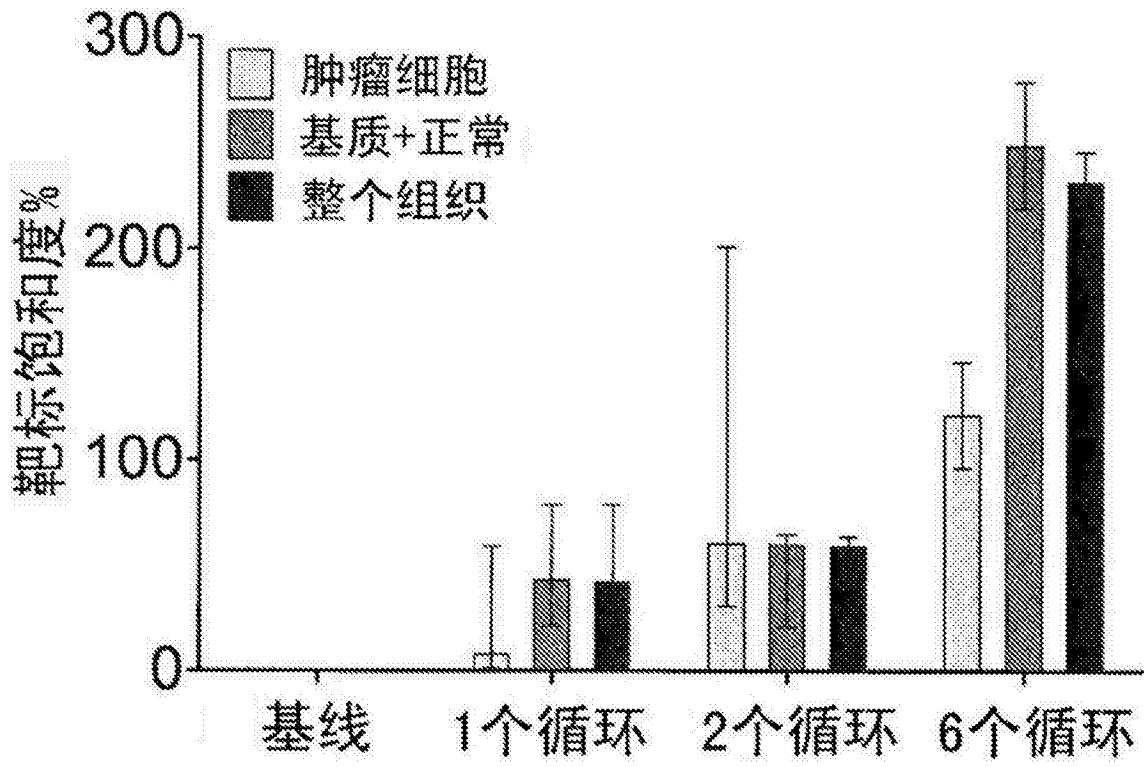


图10