

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-523572

(P2015-523572A)

(43) 公表日 平成27年8月13日(2015.8.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 2GO45
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P 4BO24
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y 4BO64
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U 4HO45
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	GO 1 N 33/536	C

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-520953 (P2015-520953)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月9日 (2013.7.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月19日 (2015.2.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/064461
 (87) 国際公開番号 W02014/009355
 (87) 国際公開日 平成26年1月16日 (2014.1.16)
 (31) 優先権主張番号 61/669,964
 (32) 優先日 平成24年7月10日 (2012.7.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/719,793
 (32) 優先日 平成24年10月29日 (2012.10.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/778,117
 (32) 優先日 平成25年3月12日 (2013.3.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501453189
 バクスター・ヘルスケア・ソシエテ・ア
 ノニム
 Baxter Healthcare S
 A
 スイス国 8152 グラットパーク (オ
 プフィコン), サーガウアーシュトラ
 ーセ 130

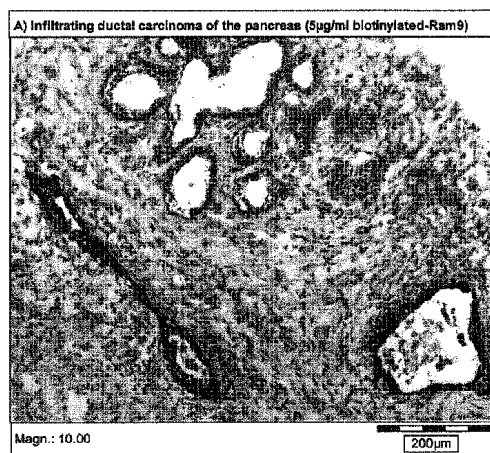
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗M I F 免疫組織化学法

(57) 【要約】

本発明は、組織中のM I F、特に酸化型M I Fの特異的検出に関する。免疫組織化学を使用し、特異的酸化型M I F抗体を使用する検出方法が提供される。

Figure 2A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の組織サンプルで抗体RAB4、RAB9および/またはRAB0に示差的に結合するM I Fである酸化型M I Fのインビトロ検出のための免疫組織化学(I H C)アッセイ法であって、インビトロで当該サンプルの酸化型M I Fへの化合物の結合を測定する工程を含む、アッセイ法。

【請求項 2】

酸化型M I Fに結合する化合物が、酸化型M I Fに特異的に結合する抗体である、請求項 1 に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 3】

抗体が、酸化型M I Fに結合するが、還元型M I Fに結合しない、請求項 2 に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 4】

示差結合が、100 n M未満、好ましくは50 n M未満、さらにより好ましくは10 n M未満の K_D 値で起こる酸化型M I Fへの結合であり、還元型M I Fへの非結合が、400 n Mより大きい K_D によって特徴付けられる、請求項 3 に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 5】

抗体が、酸化型M I F結合体、例えば抗体RAB4、RAB9および/またはRAB0および/またはRAM4、RAM9および/またはRAM0からなる群から選択される、請求項 2 ~ 4 の何れか1項に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 6】

サンプルが、組織生検材料、好ましくは凍結組織生検材料、好ましくはO C T包埋切片、またはコア針生検材料である、請求項 1 ~ 5 の何れか1項に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 7】

下記の1つ以上の工程：

- a) ブロッキング緩衝液を用いる任意のブロッキング工程；
- b) 先の固定化工程を伴わない、第1抗酸化型M I F抗体との結合工程；
- c) 任意の固定化工程；
- d) 第2抗体とのインキュベーション工程；および/または
- e) 染色工程；

を行う、請求項 1 ~ 6 の何れか1項に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 8】

結合工程の前に、無機または有機固定化試薬で、特にホルムアルデヒドまたはアセトンを用いる固定化を行わない、請求項 7 に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 9】

任意の固定化工程後、および/または第1結合工程前に、サンプルを、好ましくは約30分間空気乾燥する、請求項 7 または8 に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 10】

第1抗体が、ビオチン化されており、および/または、好ましくは第1希釈緩衝液に含まれ、および/または、第1抗体を、サンプルと、好ましくは45 ~ 90分間、より好ましくは約60分間インキュベートする、請求項 7 ~ 9 の何れか1項以上に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 11】

洗浄工程が、過剰の抗体を洗い流すために、結合工程c)の後に行われる、請求項 7 ~ 10 の何れか1項以上に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 12】

第2抗体が、西洋わさびペルオキシダーゼ(H R P)結合ストレプトアビジンである、請求項 7 ~ 11 の何れか1項以上に記載のI H Cアッセイ法。

【請求項 13】

洗浄工程が、インキュベーション工程d)の後に行われる、請求項 7 ~ 12 の何れか1

10

20

30

40

50

項以上に記載の I H C アッセイ法。

【請求項 1 4】

染色工程をヘマトキシリンを用いて行う、請求項 7 ~ 1 3 の何れか 1 項以上に記載の I H C アッセイ法。

【請求項 1 5】

結合工程を、ビオチン化または蛍光標識結合試薬を用いて行う、請求項 1 ~ 1 4 の何れか 1 項に記載の I H C アッセイ法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 5 の何れか 1 項以上に記載の方法を行うために適合させた、I H C アッセイ用キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、組織中の M I F、特に酸化型 M I F の特異的な検出に関する。免疫組織化学法を使用し、そこで、特異的な抗酸化型 M I F 抗体を使用する検出方法を提供する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

マクロファージ遊走阻害因子(M I F)は、ツベルクリン過敏性モルモットの腹膜滲出細胞(マクロファージを含む)のインビトロでのランダムな遊走を阻害する能力に基づいて、最初に単離されたサイトカインである(Bloom et al. Science 1966, 153, 80-2; David et al. PNAS 1966, 56, 72-7)。今日、M I Fは、多面的な活性を示す自然免疫応答および後天性免疫応答の重大な上流調節因子として知られている。

20

【0 0 0 3】

ヒト M I F c D N A は1989年にクローン化され(Weiser et al., PNAS 1989, 86, 7522-6)、そのゲノム局在は染色体22に位置付けられた。ヒト M I F 遺伝子産物は、1 1 4 アミノ酸(N末端メチオニン切断後)および約 1 2 . 5 kDaの見かけの分子量を有するタンパク質である。M I Fは、他の何れのタンパク質とも有意な配列相同性を有さない。このタンパク質は、同一のサブユニットの三量体として結晶化する。各モノマーは、4本鎖シートとまとまった2本の逆平行ヘリックスを含む。モノマーは、隣接するサブユニットのシートと相互作用してモノマー間のインターフェースを形成する、さらに2本の鎖を有する。3つのサブユニットは、分子の3回軸に沿ってタンパク質の中心を通過する、溶媒が接近可能なチャンネルを含むパレルを形成するように配置される(Sun et al. PNAS 1996, 93, 5191-5196)。

30

【0 0 0 4】

極低濃度のグルココルチコイドで、マクロファージからの M I F 分泌が誘発されることが報告された(Calandra et al. Nature 1995, 377, 68-71)。しかし、M I Fはまた、グルココルチコイドの作用を対抗制御し、腫瘍壊死因子 T N F - α やインターロイキン I L - 1 などの他のサイトカインの分泌を刺激する(Baugh et al., Crit Care Med 2002, 30, S27-35)。M I Fはまた、例えば、血管新生促進性、増殖促進性および抗アポトーシスを示し、それによって腫瘍細胞増殖を促進する(Mitchell, R.A., Cellular Signalling, 2004. 16(1): p. 13-19; Lue, H. et al., Oncogene 2007. 26(35): p. 5046-59)。また、それは、例えばリンパ腫、黒色腫および結腸癌の増殖に直接関連している(Nishihira et al. J Interferon Cytokine Res. 2000, 20:751-62)。

40

【0 0 0 5】

M I Fは、多くの病状のメディエーターであり、それゆえに、とりわけ炎症性腸疾患(I B D)、関節リウマチ(R A)、急性呼吸窮迫症候群(A R D S)、喘息、糸球体腎炎、I g A 腎症、心筋梗塞(M I)、敗血症および癌を含むがこれらに限定されない多様な疾患に関連している。

【0 0 0 6】

50

ポリクローナルおよびモノクローナル抗MIF抗体が、組み換えヒトMIFに対して開発されている(Shimizu et al., FEBS Lett. 1996; 381, 199-202; Kawaguchi et al., Leukoc. Biol. 1986, 39, 223-232, および Weiser et al., Cell. Immunol. 1985, 90, 167-78)。

【0007】

抗MIF抗体は、治療的使用が示唆されている。Calandraら (J. Inflamm. (1995); 47, 39-51)は、グラム陰性およびグラム陽性敗血症ショックの実験的誘発から動物を保護するために抗MIF抗体を使用したことを報告した。抗MIF抗体は、敗血症ショックおよび他の炎症性疾患状態におけるサイトカイン産生を調節するための治療手段として提案された。

【0008】

US 6,645,493 は、MIFの生物学的活性を中和するハイブリドーマ細胞由来モノクローナル抗MIF抗体を開示している。マウス由来抗MIF抗体は、エンドトキシン誘発ショックの処置に有益な効果を有することが動物モデルで示された。

【0009】

US 200310235584は、MIF遺伝子をホモ接合的にノックアウトした動物中で、MIFに対する高親和性抗体を生産する方法を開示する。

【0010】

グリコシル化阻害因子(GIF)は、Galatら(Eur. J. Biochem, 1994, 224, 417-21)によって記載されたタンパク質である。現在、MIFおよびGIFは同一であると認識されている。Wataraiら(PNAS 2000, 97, 13251-6)は、Ts細胞中のGIFの翻訳後修飾の生化学的性質を識別するための、異なるGIFエピトープに結合するポリクローナル抗体を記載している。Wataraiら(上掲)は、GIFが、インピトロで異なる立体配座のアイソフォームを生じることを報告した。1つのタイプのアイソマーは、1個のシステイン残基の化学修飾によって生じる。化学修飾は、GIFタンパク質内の立体配座変化を起こす。

【0011】

様々な疾患の発症後に、とりわけ炎症性疾患または癌の発症後に、MIFレベル、すなわち全体的MIFレベルの上昇が検出される。しかし、健常対象でもMIFは循環しており、そのことが明確な区別を難しくしている。酸化型MIFは、対照的に、健常対象では存在しない。酸化型MIFは疾患状態で増加し、血液、血清および尿などの患者のサンプルで検出可能である。

【0012】

MIFおよびそれに対する抗体の詳細な研究により、抗体RAB9、RAB4およびRAB0は、酸化型MIFに特異的に結合する(そして還元型MIFに結合できない)ことが判明した。

【0013】

本発明者らによって行われた先の実験において、酸化的操作、例えばシスチン媒介酸化、GSSG(酸化型グルタチオン)媒介酸化、または、MIFのProclin300またはタンパク質クロスリンカー(例えばBMOE)とのインキュベーションが、MIFの上記抗体への結合をもたらすことが示された。

【0014】

本発明者らが到達した驚くべき結論は、次の通りである。

- ・ 組み換えMIF(ヒト、マウス、ラット、CHO、サル)の酸化還元調節(システイン/GSSGが媒介する穏やかな酸化)、または、組み換えMIFのProclin300またはタンパク質クロスリンカーでの処理が、Baxterの抗MIF抗体 RAB9、RAB4 および RAB0の結合をもたらす。
- ・ 酸化型MIFの還元が、Ab結合喪失をもたらす。
- ・ 酸化型アイソフォームに対する特異性は、インピボでの生物学的Ab有効性と関連する。
- ・ 酸化型MIFレベルは疾患状態と関連し得る。

この(酸化型)MIFに関するさらなる知識は、本発明者らのさらなる研究の基礎として

10

20

30

40

50

貢献した。

【0015】

今まで、組織切片中の酸化型MIFの検出方法または検出のための染色方法は存在しなかった。MIFタンパク質は種々のアイソフォームで存在することが示されている。MIF関連疾病状態の強力かつ信頼できるマーカーと考えられる自然に生じる酸化型MIFの、組織、例えばガラススライド上の組織切片における、免疫組織化学法(以降、IHCとも記載)または免疫蛍光法(IF)による特異的検出は、標準的なIHC法またはIF法を適用する際に、酸化型MIFの構造が影響を受けるか、または、しばしば完全に失われるという事実によって妨げられている。

従って、酸化型MIFアイソフォームのための信頼できる検出方法について、明確な必要性が存在する。この必要性は本発明者らによって対処され、この目的は、下記の通りに本発明によって達成された。

【発明の概要】

【0016】

本発明の概要

本発明は、酸化型MIF(酸化型マクロファージ遊走阻害因子)の検出のための検出方法を目的とする。本検出方法は、免疫組織化学的検出の原理に基づく。これは、組織サンプル、特に組織切片で使用される。

好ましくは、これらの組織切片は、ガラスまたはプラスチック担体、例えばガラスまたはプラスチックスライド上に提供される。

【0017】

本方法は、特異的酸化型MIF結合抗体を使用する。

本発明に使用するのに好ましい抗体は、モノクローナル抗体である。特に好ましい態様において、モノクローナル抗酸化型MIF抗体は、下にさらに詳細に記載する通り、RAB9、RAB0 および/または RAB4からなる群から選択されるか、または、RAM9、RAM0 および/または RAM4からなる群から選択される。

【0018】

本発明の方法の好都合な特異性は、アイソタイプ対照抗体(酸化型MIFを検出できないため陰性対照として適している)、または、ポリクローナル抗MIF抗体(還元型MIF + 酸化型MIFからなる全MIFに結合し、陽性対照として適している)による対照染色によって示されており(下記の実施例の章を参照のこと)、さらに、酸化型MIFが、罹患組織、例えば癌性組織でのみ検出されるという証拠を伴う本発明者らの発見によってさらに確認されている。

【0019】

本検出方法は、好ましい態様において、染色工程を含む。本発明の検出/染色プロトコル自体、組織切片中の未変性の酸化型MIF構造を保つよう設計された。本発明の時点までに知られていた標準的な方法は、MIFの酸化型MIFへの変換を起こし、そのため、免疫組織化学法で偽陽性染色となる。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明の詳細な説明

本発明は、次の項によって一部記載される。

1. 対象の組織サンプルで抗体RAB4、RAB9および/またはRAB0に示差的に結合するMIFである酸化型MIFのインビトロ検出のための免疫組織化学(IHC)アッセイ法であって、インビトロで当該サンプルの酸化型MIFへの化合物の結合を測定する工程を含む、アッセイ法。

2. 酸化型MIFに結合する化合物が、酸化型MIFに特異的に結合する抗体である、項1に記載のIHCアッセイ法。

3. 抗体が、酸化型MIFに結合するが、還元型MIFに結合しない、項2に記載のIHCアッセイ法。

10

20

30

40

50

4. 示差結合が、100 nM未満、好ましくは50 nM未満、さらにより好ましくは10 nM未満の K_D 値で起こる酸化型MIFへの結合であり、還元型MIFへの非結合が、400 nMより大きい K_D によって特徴付けられる、項3に記載のIHCアッセイ法。

5. 抗体が、酸化型MIF結合体、例えば抗体RAB4、RAB9および/またはRAM0および/またはRAM4、RAM9および/またはRAM0からなる群から選択される、項2~4の何れか1つに記載のIHCアッセイ法。

6. サンプルが、組織生検材料、好ましくは凍結組織生検材料、好ましくはOCT包埋切片、またはコア針生検材料である、項1~5の何れかに記載のIHCアッセイ法。

【0021】

7. 下記の1つ以上の工程：

- a) ブロッキング緩衝液を用いる任意のブロッキング工程；
- b) 先の固定化工程を伴わない、第1抗酸化型MIF抗体との結合工程；
- c) 任意の固定化工程；
- d) 第2抗体とのインキュベーション工程；および/または
- e) 染色工程；

を行う、項1~6の何れかに記載のIHCアッセイ法。

8. 第1結合工程の前に、無機または有機固定化試薬、特にホルムアルデヒドまたはアセトンを用いる固定化を行わない、項1~7の何れかに記載のIHCアッセイ法。

9. 任意の固定化工程後、および/または第1結合工程前に、サンプルを、好ましくは約30分間空気乾燥する、項7または8に記載のIHCアッセイ法。

10. 第1抗体が、ビオチン化されており、および/または、好ましくは第1希釈緩衝液に含まれ、および/または、第1抗体を、サンプルと、好ましくは45~90分間、より好ましくは約60分間インキュベートする、項7~9の何れか1つ以上に記載のIHCアッセイ法。

11. 洗浄工程が、過剰の抗体を洗い流すために、インキュベーション工程d)の後に行われる、項7~10の何れか1項以上に記載のIHCアッセイ法。

12. 第2抗体が、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)結合ストレプトアビジンである、項7~11の何れか1つ以上に記載のIHCアッセイ法。

13. 洗浄工程が、インキュベーション工程d)の後に行われる、項7~12の何れか1つ以上に記載のIHCアッセイ法。

14. 染色工程をヘマトキシリンを用いて行う、項7~13の何れか1つ以上に記載のIHCアッセイ法。

15. 結合工程をビオチン化または蛍光標識結合試薬を用いて行う、項1~14の何れか1つに記載のIHCアッセイ法。

16. 項1~15の何れか1つ以上に記載の方法を行うために適合させた、IHCアッセイ用キット。

【0022】

上記抗体は、その配列によりならびに上記抗体RAB0、RAB4およびRAB9それぞれのならびにRAM0、RAM4およびRAM9それぞれの軽鎖または重鎖の何れかを含む大腸菌(*E. coli*)(TG1株)中のプラスミドとしての寄託によって特徴づけられ、かつ支持される。

【0023】

プラスミドは、ブダペスト条約に基づき、German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Germanyに寄託して得られた公式番号であるDSM番号によって特徴付けられる。プラスミドは、それぞれ大腸菌株で寄託した。

【0024】

DSM 25110の番号を有するプラスミドは、抗MIF抗体 RAB4の軽鎖配列を含む。

DSM 25112の番号を有するプラスミドは、抗MIF抗体 RAB4の重鎖(IgG4)配列を含む。

適当な宿主細胞中でのプラスミド DSM 25110 および DSM 25112の共発現により、好ま

10

20

30

40

50

しい抗 M I F 抗体 RAB4 が生産される。

【 0 0 2 5 】

DSM 25111 の番号を有するプラスミドは、抗 M I F 抗体 RAB9 の軽鎖配列を含む。

DSM 25113 の番号を有するプラスミドは、抗 M I F 抗体 RAB9 の重鎖 (I g G 4) 配列を含む。

適当な宿主細胞中でのプラスミド DSM 25111 および DSM 25113 の共発現により、好ましい抗 M I F 抗体 RAB9 が生産される。

【 0 0 2 6 】

DSM 25114 の番号を有するプラスミドは、抗 M I F 抗体 RAB0 の軽鎖配列を含む。

DSM 25115 の番号を有するプラスミドは、抗 M I F 抗体 RAB0 の重鎖 (I g G 4) 配列を含む。

適当な宿主細胞中でのプラスミド DSM 25114 および DSM 25115 の共発現により、好ましい抗 M I F 抗体 RAB0 が生産される。

【 0 0 2 7 】

また、抗体 RAM0、RAM9 および RAM4 を全て、ブダペスト条約に基づき、2012年4月12日に、D S M Z (Braunschweig, Germany) に寄託した。下記の記号を用いた：

RAM9 - 重鎖：大腸菌 GA.662-01.pRAM9hc - DSM 25860.

RAM4 - 軽鎖：大腸菌 GA.906-04.pRAM4lc - DSM 25861.

RAM9 - 軽鎖：大腸菌 GA.661-01.pRAM9lc - DSM 25859.

RAM4 - 重鎖：大腸菌 GA.657-02.pRAM4hc - DSM 25862.

RAM0 - 軽鎖：大腸菌 GA.906-01.pRAM0lc - DSM 25863.

RAM0 - 重鎖：大腸菌 GA.784-01.pRAM0hc - DSM 25864.

【 0 0 2 8 】

生物学的サンプルは、本明細書の内容において、好ましい態様において、組織サンプルであり、好ましくは組織生検材料、組織生検材料の凍結切片 (新鮮凍結または例えば O C T 包埋)、またはコア針生検材料である。しかし、上記の好ましいサンプルに加えて、全てのさらなる既知の組織または細胞サンプルを、当業者に知られている通りに、本発明の方法で使用できる。O C T 包埋は、この内容において、凍結組織を包埋するための包埋媒体をいい、当技術分野で十分に用いられよく知られている手順である。O C T は、最適切削温度 (Optimal Cutting Temperature) を表し、例えばこの媒体を使用することによって確保される。O C T 媒体は、凍結アーチファクトの形成、例えば水による組織の破壊を防ぐ。O C T 媒体は、10.24% のポリビニルアルコール、4.26% のポリエチレングリコールおよび 85.50% の非反応性成分からなる。この媒体または一般的な知識に従い同様の媒体は、例えばクリオスタットでの切断前に組織を包埋するために使用される。この媒体の僅かな変化は、本発明に影響しない。

【 0 0 2 9 】

患者からのサンプル中の酸化型 M I F の検出は、特に M I F 関連疾患、すなわち (酸化型) M I F の関与がある疾患に罹患している患者を診断するために、疾患または障害の信頼できる診断をするのに重要な過程である。

【 0 0 3 0 】

用語 “ 予防的 ” または “ 治療的 ” 処置は、当技術分野で認識されているものであり、患者への薬物の投与をいう。望ましくない状態 (宿主、例えばヒトまたは動物の疾患または他の望ましくない状態) の臨床的顕在化の前に、示された化合物を投与するならば、処置は予防的であり、すなわち、望ましくない状態の発症から宿主を守る。一方、望ましくない状態の顕在化後の投与ならば、処置は、治療的である (すなわち、現存する望ましくない状態またはその副作用を軽減する、改善するまたは維持することを意図する)。

【 0 0 3 1 】

本明細書で用いられるとき、抗 (酸化型) M I F 化合物は、(酸化型) M I F の生物学的活性を減弱する、阻害する、対抗する、相殺するまたは減少させる何らかの薬物を言う。抗 (酸化型) M I F 化合物は、(酸化型) M I F 活性を阻害するかまたは中和する薬物であって

10

20

30

40

50

よく、例えば抗体であり、特に好ましいのは本明細書に記載された抗体であり、さらにより好ましいのは、抗体 RAB9、RAB4 および / または RAB0、または、RAM9、RAM4 および / または RAM0 である。

【0032】

本発明は、以下に記載する図によって、さらに記載される。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1A】慢性腎炎の免疫組織化学による酸化型MIFのその場検出

【図1B】慢性腎炎の対照染色

【図2A】膵臓浸潤性腺管癌の免疫組織化学による酸化型MIFのその場検出

10

【図2B】正常膵臓の対照染色

【図3】乳房のコア針生検の模式図

【図4A】線維形成型腺管癌ステージIBの48歳アジア人女性のビオチン化RAM9を用いるIHCによる酸化型MIFのその場検出

【図4B】線維形成型腺管癌ステージIBの48歳アジア人女性のビオチン化対照抗体を用いるIHCによる酸化型MIFのその場検出

【図5A】中～低分化腺管癌ステージIBの54歳アジア人男性のビオチン化RAM9を用いるIHCによる酸化型MIFのその場検出

【図5B】中～低分化腺管癌ステージIBの54歳アジア人男性のビオチン化対照抗体を用いるIHCによる酸化型MIFのその場検出

20

【図6】中程度分化腺管癌ステージIの58歳患者のビオチン化RAM9を用いるIHCによる酸化型MIFのその場検出

【図7】浸潤性腺管癌ステージ“II B”の64歳患者における蛍光色素標識ストレプトアビジンを用いて検出するIFによる酸化型MIFのその場検出。A：ビオチン化対照抗体。B：ビオチン化RAM9。

【図8】膵臓浸潤性腺管癌ステージ“II B”の64歳患者における直接蛍光色素標識RAM9を用いて検出するIFによる酸化型MIFのその場検出

【図9】脳のIHCによる酸化型MIFのその場検出 - 頭蓋咽頭腫(32歳男性患者)(患者)および正常脳(60歳男性ドナー)。A：ビオチン化RAM9/頭蓋咽頭腫。B：ビオチン化RAM9/正常脳。C：ビオチン化対照抗体/頭蓋咽頭腫。D：ビオチン化対照抗体/正常脳。

30

【図10】肺のIHCによる酸化型MIFのその場検出 - 乳頭状腺癌(64歳女性患者)、扁平上皮細胞癌(52歳男性患者)および正常肺(66歳女性ドナー)における。A：ビオチン化RAM9/腺癌。B：ビオチン化RAM9/扁平上皮細胞癌。C：ビオチン化RAM9/正常肺。D：ビオチン化対照抗体/腺癌。E：ビオチン化対照抗体/扁平上皮細胞癌。F：ビオチン化対照抗体/正常肺。

【0034】

定義および一般的な方法

本明細書で別途定義しない限り、本発明に関して用いられる科学用語および技術用語は、当業者に一般的に理解される意味を有する。一般的に、本明細書に記載された細胞、組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学およびタンパク質および核酸化学に関連して用いられる命名法および技術は、当技術分野で周知のものであって、一般的に用いられているものである。本発明の方法および技法は、特に断りのない限り、一般的に、当技術分野で周知の慣用の方法に従って、本明細書全体で引用され、かつ説明された様々な一般のおよび具体的引用文献に記載された通りに行われる。例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) および Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), および Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)(これらは、引用することによって本明細書に組み込まれる)を参照

40

50

のこと。

【0035】

“MIF”または“マクロファージ遊走阻害因子”は、免疫および炎症応答に重要なメディエーターとして、およびグルココルチコイドの対抗制御因子として知られるタンパク質をいう。MIFは、哺乳動物MIF、特にヒトMIF (Swiss-Prot primary accession number: P14174)を含み、単量体型は、115アミノ酸タンパク質としてコードされるが、最初のメチオニンの切断により、114アミノ酸として生産される。また、“MIF”は、“GIF”(グリコシル化阻害因子)および他の型のMIF、例えばMIFの融合タンパク質を含む。MIFのアミノ酸のナンバリングは、N末端メチオニン(アミノ酸1)から始まり、C末端アラニン(アミノ酸115)で終わる。

10

【0036】

“酸化されたMIF”または酸化型MIFは、本発明の目的のために、MIFを穏やかな酸化剤、例えばシスチンで処理することによって生じるMIFのアイソフォームとして定義される。本発明によって示される通り、この方法で処理された組み換え酸化型MIFは、(例えば)動物を細菌に暴露した後にインビボで生じる酸化型MIFと構造的再配列を共有するMIFのアイソフォームを含む。

【0037】

還元型MIFは、本発明の目的のために、還元されたMIFと定義され、RAB9、RAB9および/またはRAB4に結合しないMIFである。

【0038】

本発明で記載された抗酸化型MIF抗体は、それぞれ穏やかな酸化または還元によって生じる酸化型MIFと還元型MIFを区別することができ、特異的に酸化型MIFを検出するのに有用である。これらの配座異性体の区別は、ELISAまたは表面プラズモン共鳴によって評価される。

20

【0039】

Biacoreによる抗体の示差的結合の評価

酸化型MIFおよび還元型MIFの抗体RAB9およびRAB9に対する結合動態を、Biacore 3000 Systemを用いた表面プラズモン共鳴によって調べる。抗体をCM5(=カルボキシメチル化デキストラン)チップにコートし、0.2% Proclin300とブレインキュベートした組み換えMIFタンパク質を注入した(Proclin300は、酸化イソチアゾロンからなり、これは酸化型MIFから還元型MIFへの変換を回避することによって酸化型MIF構造を安定化する)。ProClin300を添加しない未変性HBS-E P緩衝液(=Biacoreランニング緩衝液)中では、組み換えMIFタンパク質は、RAB9、RAB9または陰性(バックグランド)結合対照として用いられる参照抗体(無関係なアイソタイプ対照抗体)に一切結合しなかった。

30

【0040】

好ましい態様において、酸化型MIFは、抗体RAB9、RAB4および/またはRAB9、またはその抗原結合フラグメントに示差的に結合するMIFであり、すなわち、これらの抗体は酸化型MIFと結合するが、これらの抗体のどれも還元型MIFによって結合されないことを意味する。

40

【0041】

他の態様において、抗酸化型MIF抗体、例えば上記の抗体またはその抗原結合部分は、100nM未満の K_D で、好ましくは50nM未満の K_D で、さらにより好ましくは10nM未満の K_D で酸化型MIFに結合する。特に好ましくは、本発明の抗体は、5nM未満の K_D で酸化型MIFに結合する。

【0042】

抗体、例えばRAB9、RAB4またはRAB9の(酸化型MIFまたは還元型MIFへの)(非)結合は、一般的に当業者に知られている通りに決定でき、その例は、下記の方法の何れか1つである：組み換えMIFを用いる示差的結合ELISA、または、上に記載した周知のBiacoreアッセイのような還元状態または酸化状態の組み換えMIFを用いた表面プラズモ

50

ン共鳴。

【0043】

好ましい結合決定方法は、例えば還元型(酸化型)M I Fに対する、抗体の表面プラズモン共鳴であり、ここで、“結合”は、100 nM未満、好ましくは50 nM未満、さらにより好ましくは10 nM未満の K_D を表すことを意味し、一方、還元型M I Fへの非結合は、400 nMより大きい K_D によって特徴付けられる。“結合”および“特異的結合”は、本明細書で、このことを表すために互換的に用いられる。“示差的結合”は、本明細書の内容において、化合物が、特に本明細書に記載の抗体が、酸化型M I Fに(例えば上記の K_D 値で)結合する一方、それらが、還元型M I Fに結合しない(非結合も上で定義している)ことを意味する。

10

【0044】

“抗体”は、完全な抗体か、または、(特異的)結合について完全な抗体と競合する抗原結合部分と言う。一般的には、Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (引用により組み込まれる)を参照のこと。用語抗体は、ヒトの抗体、哺乳動物の抗体、単離した抗体および遺伝子改変形態、例えばキメラ、ラクダ化またはヒト化抗体を含み、これらに限定されない。

【0045】

用語抗体の“抗原結合部分”は、抗原(例えば(酸化型)M I F)に特異的に結合する能力を保持する1種以上の抗体フラグメントと言う。抗原結合部分は、組み換えDNA法によって、または、完全な抗体の酵素切断または化学的切断によって製造され得る。抗原結合部分は、例えば、下記のものを含むが、これらに限定されない：F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、および相補性決定領域(C D R)フラグメント、一重鎖抗体(s c F v)、キメラ抗体、ポリペプチド、すなわち酸化型または還元型M I Fに対して特異的な抗原結合をするのに十分な抗体の少なくとも一部を含む抗体およびポリペプチド。N末端からC末端までの成熟軽鎖および重鎖の可変ドメインは、領域F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3およびF R 4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabatt, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), Chothia et al. J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、または、Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989)の定義に従う。抗体またはその抗原結合部分は、他の機能性分子(例えば他のペプチドまたはタンパク質)に誘導できるかまたは結合できる。例えば、抗体またはその抗原結合部分は、1つ以上の他の分子部分、例えば他の抗体(例えば二重特異性抗体または二特異性抗体)、検出可能な物質、細胞傷害剤、薬物および/または結合分子と機能的に結合できる。

20

30

【0046】

用語“ K_D ”は、本明細書で、当業者の一般的な知識に従って、特定の抗体とその抗原との平衡解離定数を言う。この平衡解離定数は、より大きい対象(ここでは酸化型または還元型M I F - 抗体複合体)が、より小さい対象(ここでは酸化型または還元型M I F と抗体)に、分離、すなわち解離する傾向を測るものである。

【0047】

用語“ヒト抗体”は、可変および定常ドメインがヒトの配列である何らかの抗体を言う。本用語は、ヒトの遺伝子から誘導されるが、例えば可能性のある免疫原性を減少させる、親和性を増大させる、望ましくないフォールディングを起こすかもしれないシステインを除くなどの変更をした配列を有する抗体を包含する。本用語は、例えばヒト細胞に典型的でないグリコシル化を授けるはずである、非ヒト細胞で組み換えにより産生した抗体を包含する。

40

用語“ヒト化抗体”は、ヒト配列を含み、かつ非ヒト配列も含む抗体を言う。

【0048】

用語“ラクダ化抗体”は、抗体構造または配列が、ラクダ由来の抗体により酷似するように変更された抗体をいい、ラクダ科抗体とも命名される。ラクダ化抗体の設計および生産は、当業者に一般的な知識の一部である。

50

【0049】

用語“キメラ抗体”は、2種以上の異なる種由来の領域を含む抗体を言う。

用語“単離された抗体”または“その単離された抗原結合部分”は、抗体ソース、例えばファージディスプレイライブラリーまたはB細胞レポトリーから同定され、選択された、抗体またはその抗原結合部分を言う。

【0050】

本発明による抗(酸化型)MIF抗体の生産は、遺伝子操作によって、例えばRNAの逆転写および/またはDNAの増幅および発現ベクターへのクローニングによって、組み換えDNAを作製する何らかの方法を含む。幾つかの態様において、ベクターは、さらなるDNAセグメントをウイルスのゲノムにライゲートし得るウイルスベクターである。幾つかの態様において、ベクターは、導入される宿主細胞中で自己複製できる(例えば細菌由来の複製を有する細菌ベクターおよびエピソームの哺乳動物ベクター)。他の態様において、ベクター(例えば非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入により宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって、宿主のゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、動作可能に結合した遺伝子の発現の指示ができる。このようなベクターは、本明細書で“組み換え発現ベクター”(または単に“発現ベクター”)と言う。

10

【0051】

抗(酸化型)MIF抗体は、とりわけ、慣用の発現ベクター、例えば細菌ベクター(例えばpBR322およびその誘導体)、または、真核生物ベクターによって生産できる。抗体をコードするこれらの配列は、宿主細胞からの複製、発現および/または分泌を制御する制御配列と共に提供され得る。これらの制御配列は、例えばプロモーター(例えばCMVまたはSV40)およびシグナル配列を含む。また、発現ベクターは、選択マーカーおよび増幅マーカー、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(DHFR)、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼおよびチミジンキナーゼも含み得る。用いるベクターの構成要素、例えば選択マーカー、レプリコン、エンハンサーは、商業的に得られるか、または、慣用の方法によって作製できる。ベクターは、様々な細胞培養物、例えば哺乳動物細胞、例えばCHO、COS、HEK293、NSO、線維芽細胞、昆虫細胞、酵母または細菌、例えば大腸菌における発現のために構築され得る。幾つかの例において、発現されたタンパク質の最適なグリコシル化を可能とする細胞を用いる。

20

【0052】

抗(酸化型)MIF抗体軽鎖遺伝子および抗(酸化型)MIF抗体重鎖遺伝子は、別のベクターに挿入され得るか、または、これらの遺伝子は、同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法、例えば抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限部位のライゲーションによって、または、制限部位が存在しないならば平滑末端ライゲーションによって発現ベクターに挿入される。

30

【0053】

抗(酸化型)MIF抗体またはその抗原結合フラグメントの生産は、例えばエレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションによるトランスフェクションによって組み換えDNAを真核生物細胞に導入するための当技術分野で知られているいかなる方法も含み得る。例えば、抗(酸化型)MIF抗体の組み換え発現は、抗(酸化型)MIF抗体をコードするDNA配列を含む発現プラスミドを、1種以上の制御配列、例えば強力なプロモーターの制御下で適切なトランスフェクション法によって適当な宿主細胞株に導入することによって達成でき、その結果、ゲノムに安定に組み込まれた導入配列を有する細胞が得られる。リポフェクション法は、本発明に従って用いられ得るトランスフェクション法の一例である。

40

【0054】

また、抗(酸化型)MIF抗体の生産は、例えば連続的またはバッチ式方法での形質転換した細胞の培養、および、例えば構成的または導入による抗(酸化型)MIF抗体の発現について当業者に知られている何らかの方法を含む。抗(酸化型)MIF抗体の生産についてのさらなる参考として、特に、WO 2009/086920を指定する。好ましい態様において、本発

50

明によって生産された抗(酸化型)MIF抗体は、酸化型MIFまたはそのエピトープに結合する。本発明によると、特に好ましい抗体は、抗体 RAB9、RAB4および/またはRAB0、ならびにRAM9、RAM4および/またはRAM0である。

【 0 0 5 5 】

これらの抗体の配列は、一部WO 2009/086920に開示されている。さらに、本出願の配列表および次に示すものを参照のこと。

配列番号 1 : RAB9の軽鎖のアミノ酸配列

【表 1】

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRSSQRIM TYLNWYQQKP GKAPKLLIFV ASHSQSGVPS RFRGSGSETD
 FTLTISGLQP EDSATYYCQQ SFWTPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY
 PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
 RGEC,

10

【 0 0 5 6 】

配列番号 2 : RAB4の軽鎖のアミノ酸配列

【表 2】

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVS SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP DRFSGSASGT
 DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY
 PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
 RGEC,

20

【 0 0 5 7 】

配列番号 3 : RAB0の軽鎖のアミノ酸配列

【表 3】

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGVS SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP DRFSGSASGT
 DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY
 PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
 RGEC,

30

【 0 0 5 8 】

配列番号 4 : RAB2の軽鎖のアミノ酸配列

【表 4】

DIQMTQSPVT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SSSLAWYQQK PGQTPRLLIY GASNRATGIP DRFSGSGSGT
 DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGNLSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY
 PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
 RGEC,

40

【 0 0 5 9 】

配列番号 5 : RAB9の重鎖のアミノ酸配列

【表 5】

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
 IGSSGGTTY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ
 WLYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCV VDV SQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSL GK,

10

【 0 0 6 0 】

配列番号 6 : RAB4の重鎖のアミノ酸配列

【表 6】

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
 IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
 VIAVAGTGYY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA
 ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
 SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDV SQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TTPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 SLGK,

20

【 0 0 6 1 】

配列番号 7 : RAB0の重鎖のアミノ酸配列

【表 7】

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA PGKGLEWVSG
 IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN
 VIAVAGTGYY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA
 ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS
 SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDV SQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TTPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 SLGK,

40

【 0 0 6 2 】

配列番号 8 : RAB2の重鎖のアミノ酸配列

【表 8】

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI
SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP
CSRSTSESTA

ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS
SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVEISKYK PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVW VDVQEDPEV QFNWYVDGVE VHNATKPRE
EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSL
SLGK,

10

【 0 0 6 3 】

配列番号 9 : RAM0hcのアミノ酸配列

【表 9】

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYAMDWVRQA PGKGLEWVSG IYPSGGRTKY ADSVKGRFTI
SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP
SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS
SSLGQTQYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK,

20

【 0 0 6 4 】

配列番号 10 : RAM0lcのアミノ酸配列

【表 10】

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

30

【 0 0 6 5 】

配列番号 11 : RAM9hcのアミノ酸配列

【表 11】

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYSMNWVRQA PGKGLEWVSS IGSSGGTTY ADSVKGRFTI
SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAGSQ WLYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT
AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVPS SSSLGQTQYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKHTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCWVDVSHED
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGGSFFLYSK
LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK,

40

【 0 0 6 6 】

配列番号 12 : RAM9lcのアミノ酸配列

50

【表 1 2】

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCRSSQRIM TYLNWYQQKP GKAPKLLIFV ASHSQSGVPS RFRGSGSETD
 FTLTISGLQP EDSATYYCQQ SFWTPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY
 BREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
 RGEC.

【 0 0 6 7 】

配列番号 1 3 : RAM4hcのアミノ酸配列

【表 1 3】

EVQLLESQGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYAMDWVRQA PGKGLEWVSG IVPSGGFTKY ADSVKGRFTI
 SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVN VIAVAGTGY YGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
 ALHNHYTQKS LSLSPGK,

10

20

【 0 0 6 8 】

配列番号 1 4 : RAM4lcのアミノ酸配列

【表 1 4】

DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQGV SSSLAWYQQK PGQAPRLLIY GTSSRATGIP DRFSGSASGT
 DFTLTISRLQ PEDFAVYYCQ QYGRSLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY
 BREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
 RGEC.

30

【 0 0 6 9 】

本発明の抗(酸化型)M I F抗体は、好ましくは、単離されたモノクローナル抗体である。抗M I F抗体は、I g G、I g M、I g E、I g AまたはI g D分子であり得る。他の態様において、抗M I F抗体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4サブクラスである。他の態様において、抗体は、サブクラスI g G 1またはI g G 4の何れかである。他の態様において、抗体は、サブクラスI g G 4である。幾つかの態様において、I g G 4抗体は、セリン(セリン228, Kabatナンバリングスキームによる)をプロリンに変更した単一突然変異を有する。従って、I g G 4のFc領域におけるC P S C部分配列は、I g G 1の部分配列であるC P P Cとなる(Angal et al. Mol Immunol. 1993, 30, 105-108)。

40

【 0 0 7 0 】

さらに、抗(酸化型)M I F抗体の生産は、当技術分野に知られている何らかの抗体精製方法、例えばアニオン交換クロマトグラフィーまたは親和性クロマトグラフィーによる精製方法を含み得る。一つの態様において、抗(酸化型)M I F抗体は、サイズ排除クロマトグラフィーによって、細胞培養物上清から精製できる。

【 0 0 7 1 】

用語M I Fの“中心領域”および“C末端領域”は、それぞれアミノ酸35~68およびaa 86~115を含むヒトM I Fの領域、好ましくは、それぞれaa 50~68およびaa 86~102のヒトM I Fを言う。

【 0 0 7 2 】

50

本発明の特に好ましい抗体は、aa 50～68領域またはaa 86～102領域のヒトMIFの何れかに結合する。また、これは、次の通りに結合する好ましい抗体RAB0、RAB4、RAB2およびRAB9、ならびにRAM4、RAM9およびRAM0の結合に反映される：

RAB4 および RAM4 : aa 86～102

RAB9 および RAM9 : aa 50～68

RAB0 および RAM0 : aa 86～102

RAB2 : aa 86～102

【0073】

用語“エピトープ”は、免疫グロブリンまたは抗体フラグメントに特異的に結合できる何らかのタンパク質決定因子を含む。エピトープ決定因子は、通常、分子の化学的に活性な表面の基からなり、例えば、露出したアミノ酸、アミノ糖または他の炭水化物側鎖であって、通常、特異的な3次元構造特性および特異的電荷特性を有する。

10

【0074】

用語“ベクター”は、それが結合している他の核酸を輸送できる核酸分子をいう。幾つかの態様において、ベクターは、プラスミドであり、すなわち、さらなるDNAセグメントをライゲートし得る円形の二重鎖DNAループである。

【0075】

用語“宿主細胞”は、発現ベクター導入後に組み換えタンパク質を生産できる細胞株を言う。用語“組み換え細胞株”は、組み換え発現ベクターが導入されている細胞株を言う。“組み換え細胞株”は、特定の対象の細胞株のみならず、当該細胞株の子孫も意味すると理解されるべきである。突然変異または環境的影響の何れかのために後の世代に特定の修飾が生じ得ることから、このような後代は、実際は親細胞と同一ではないが、それでも本明細書で用いられる用語“組み換え細胞株”の範囲内に含まれる。

20

【0076】

本発明による宿主細胞のタイプは、例えばCOS細胞、CHO細胞、または、例えばHEK293細胞、または当業者に知られている他の何れかの宿主細胞であり、それ故、例えば大腸菌細胞のような細菌の細胞を含む。一つの態様において、抗MIF抗体は、G418を選択マーカーとして加えたDHFR欠損CHO細胞株、例えばDXB11中で発現される。抗体遺伝子をコードする組み換え発現ベクターがCHO宿主細胞に導入されるとき、抗体は、宿主細胞中で抗体が発現するのに十分な時間または宿主細胞を増殖させた培養培地に抗体を分泌するのに十分な時間、宿主細胞を培養することによって、抗体を生産する。

30

【0077】

抗(酸化型)MIF抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて、培養培地から回収できる。

【0078】

非常に驚くべきことに、本発明者らは、結合前に最先端のホルムアルデヒド固定化工程を避けることが、可能であり、かつ特に重要であることを示した。この固定化は、(無機または有機)溶媒を用いて行ったとき、たとえ非常によく知られ通常有用な固定化剤であるホルムアルデヒドまたはアセトン(組織切片のために当技術分野で最も一般的に用いられる固定化剤である)の使用であっても、サンプル中のMIFのコンホメーションが変化する傾向があり、偽陽性の結果を生じ得る。これは、一つの見解に過ぎないが、酸化型MIFエピトープに似た構造を生じるこの固定化剤/溶媒が誘発するMIFタンパク質の構造再配置の結果であろう。

40

【0079】

本発明者らは、驚くべきことに、抗酸化型MIF抗体との結合工程前に固定化工程を使用しなかった場合に、良好で信頼できる結果が得られることを示す。これは、当技術分野で通常用いられる方法の実質的に全てで広く確認されるように、固定化工程が適当な結果を得るために必須であろうと見なす当業者の予測に反する。

【0080】

本発明の好ましい態様において、組織サンプルの切片は、2～15μmの厚さを有する

50

べきである。より好ましい態様において、これらの切片は5 ~ 10 μm の厚さを有する。

【0081】

生検材料は、それ自体、新鮮凍結または例えばOCT包埋の何れかで、当業者に知られている最先端技術に従って調製され、上記の厚さを有する切片を調製した。その後の方法の工程および染色手順を、断りのない限り、好ましくは環境温度で行う。

【0082】

好ましい態様において、切片を実際の手順を開始する前に20 ~ 45分間、好ましくは約30分、空気乾燥する。

【0083】

本発明のIHCアッセイ法の好ましい態様において、サンプルは、特に組織サンプルは、固定化されず、特にホルムアルデヒドまたはアセトンのような無機または有機固定化剤または溶媒で固定化されない。任意の態様において、いずれにしても、最初の結合前にサンプルを乾燥させることが可能である。乾燥工程が、サンプル、特にサンプルに含まれると推定される(酸化型)MIFの酸化を避けるように行うことが特に重要である。空気乾燥は、本発明者らによって、この要請を満たすことが示された。乾燥工程は、例えばアルコール性成分のような酸化的性質を有する乾燥成分なしで行う必要がある。

10

【0084】

特に、本発明者らは、最初の結合工程の前に固定化手順を使用しない(任意のプロッキング工程前にも固定化しないことを意味する)ことによって、MIFの酸化を回避することができること；他の手順を使用することによって、MIF構造が再配列し、その結果、その後の抗体の酸化型MIFへの結合において偽陽性をもたらす可能性があることを示した。しかし、サンプルは、最初の結合工程の前に空気乾燥できる。

20

【0085】

本発明の結合化合物と特異的結合するために、好ましくは、上記の抗酸化型MIF抗体を使用する。好ましい態様において、これらの抗体は、当技術分野で知られている通りビオチン化されるか、または、蛍光色素で直接標識される。特異的結合の前に、好ましい態様において、非特異的結合をブロックするプロッキング緩衝液を使用できる。この態様の好都合な選択肢において、プロッキング緩衝液は、トリス緩衝食塩水(TBS)中にヤギ血清、血清アルブミンおよび魚ゼラチンを含み、より好ましい態様において、TBS中に20% 正常ヤギ血清、2% 血清アルブミンおよび0.2% 魚ゼラチンを含む。他の態様において、プロッキング緩衝液は、ダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)中の20% 正常ヤギ血清、2% ウシ血清アルブミンおよびゼラチンを含む。プロッキング緩衝液でのサンプルの処理は、好ましくは、15 ~ 45分間行い、非常に好ましくは30分間行う。プロッキング緩衝液処理の実施が15分未満である場合、シグナル/ノイズ比は低下し、すなわち特異的シグナルに対してバックグラウンドシグナルが高すぎることを示された。

30

【0086】

さらに、好ましい態様において、抗酸化型MIF抗体の濃度範囲は、0.3 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ である。特に好都合な抗酸化型MIF抗体の濃度範囲は、0.5 ~ 16 $\mu\text{g/ml}$ である。より好ましい抗酸化型MIF抗体の濃度範囲は、5 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ 希釈緩衝液である。好ましくは、切片を酸化型MIF抗体溶液で完全に覆い、この目的のためには、大部分の場合で、500 μl の溶液で十分である。

40

【0087】

抗酸化型MIF抗体を、好ましくは、第1希釈緩衝液で希釈する。好ましい態様において、この第1希釈緩衝液は、TBS中にウシ血清アルブミンおよび魚ゼラチンを含み、より好ましい態様において、TBS中に2% ウシ血清アルブミンおよび0.2% 魚ゼラチンを含む。酸化型MIF抗体とのインキュベーションは、好ましくは、45 ~ 90分間、より好ましくは50 ~ 70分間、非常に好ましくは約60分間行われる。

【0088】

結合工程後、過剰の抗体を洗い流すために、切片を新しいTBS(または例えばDPB

50

S ; 洗浄緩衝液)に短時間浸漬するべきである。他の態様において、ブロッキング緩衝液および希釈緩衝液に、TBSではなくDPBSを用いたとき、浸漬は、新鮮DPBSで行うべきである。浸漬後、新鮮洗浄緩衝液での洗浄工程は、約5～15分間、より好ましい態様では10分間行うべきである。

【0089】

任意工程として - 但しこれは第1結合工程の後にのみ行われるべきであるが - 適当な固定化溶液中で、例えばリン酸緩衝ホルムアルデヒド中で、10～25分間、好ましくは15～20分間、検体を固定することが可能である。このホルムアルデヒドによる固定化工程は任意であり、組織構造を維持する働きがある。この工程は(酸化型)MIF構造に負の影響を有さず、偽陽性結果をもたらさない。

10

【0090】

この任意工程後、過剰のホルムアルデヒドを洗い流すために、再度TBS(あるいはDPBS)に短時間浸漬することが好ましい；浸漬時間は上に説明した通りであり；その後、それを、5～15分間、好ましくは10分間、新鮮TBS(またはDPBS、それぞれ)中でインキュベートし得る。

【0091】

所望により、次いで、外因性ペルオキシダーゼをブロックする。これは、組織切片を、例えばメタノール中の H_2O_2 、好ましくはメタノール中0.3%の H_2O_2 中で、20～30分間インキュベートすることによって行い得る。次いで、好ましくは、TBSで5～10分間洗浄することによって、過剰のメタノールを除去する。

20

【0092】

これらの工程後、好ましい態様に従って、適当な染色試薬での染色を行うべきである。好ましい態様において、この染色は、HRP結合ストレプトアビジン(ここで、HRPは、西洋わさびペルオキシダーゼを表す。)による。あるいは、当業者に知られている他の検出方法が適当である；例えばフルオロフォア標識抗体を検出ツールとして使用できるか、または、ストレプトアビジンをフルオロフォアで標識できる。フルオロフォア標識部分での検出は、本発明の内容において、本発明者らによって適当であることが示されている(例えば実施例5を参照のこと)。これは、実施例5の、変法1および2として、詳細に、しかし一般的に応用可能に記載される。

【0093】

好ましい染色試薬は、VECTASTAIN Elite ABC 試薬である。染色時間は、少なくとも20分、好ましくは少なくとも30分、非常に好ましい態様において、少なくとも45分続けるべきである。

30

【0094】

好ましくは、過剰の二次試薬を洗い流すために、再度切片をTBS(あるいはDPBS、上記参照)に短時間浸漬する。その後、好ましい態様において、さらに、5～15分間、好ましくは10分間、新鮮TBSまたは新鮮DPBS中でインキュベーションを行う。

【0095】

得られたスライドを、好ましい態様において、基質で、例えば展開に適した基質で、HRPを用いて、当業者に周知の通り、例えばImmPACT DAB 基質を用いて5～15分間、好ましくは10分間展開する。

40

【0096】

その後、好ましい態様において、過剰の基質を洗い流すために、切片をTBS(またはDPBS、上記参照)に浸漬し、次いで5～15分間、好ましくは10分間、新鮮TBSまたはDPBS中でインキュベートする。

【0097】

上記工程後、好ましくは、核を染色する対比染色工程を行う。免疫組織化学の手順でよく知られている染色試薬は全て、ここで使用できる。好ましい態様において、ヘマトキシリンを用いる。染色を、0.5～3分間、好ましくは1～2分間行うべきである。

【0098】

50

その後、過剰の染色試薬を洗い流すために、切片を水道水で濯ぎ、(好ましくは水道水中で再度)短時間浸漬する。その後、任意の態様において、それを2～6分間、好ましくは2～5分間インキュベートする。インキュベーション時間は多様であり、ヘマトキシリンの場合では、紫色から青色への色の変化が起こる時間に依存する。

【0099】

顕微鏡法のために、好ましくは、組織切片を、当業者に周知の通り、例えば70%、続いて90%、そして無水エタノールで、例えばそれぞれ2分間乾燥し、その後、好ましくは、例えばキシレンで、例えば少なくとも3分間透徹した。他の態様において、乾燥工程を、96%～無水エタノールで、2×20秒間行った。長期間保存のために、切片を、VECTASTAIN Permountを用いてマウントし、カバーガラスで覆った。乾燥およびマウント工程は、当業者の一般的な知識の一部である。

10

【0100】

本発明を、さらに、下記の実施例によって説明するが、これは、請求の範囲によって決定される本発明の範囲を、決して限定しない。

【実施例】

【0101】

実施例1：慢性腎炎患者由来腎臓の免疫組織化学(IHC)による酸化型MIFのその場検出

67歳の解剖した慢性腎炎患者(下位診断(subdiagnosis)として糸球体硬化症)の腎臓凍結切片を、商業的に得た。酸化型MIFの検出を、ビオチン化RAM9抗体を用いて行った。

20

【0102】

材料および方法

腎臓組織スライドを、専門家に知られた最先端技術に従って、新鮮凍結またはOCT包埋の何れかで調製し、10μmの薄片を作製し、その後-80℃で保存した。その後の工程を全て環境温度で行った。凍結切片を30分間空気乾燥し、非特異的結合を、ブロッキング緩衝液(TBS中20% 正常ヤギ血清/2% ウシ血清アルブミン/0.2% 魚ゼラチン)で30分間ブロックした。次いで、切片を、第1抗体希釈緩衝液(TBS中2% ウシ血清アルブミン/0.2% 魚ゼラチン)中、濃度5μg/mlで、好ましくはビオチン化された第1抗酸化型MIF抗体(ビオチン化RAM9)と60分間インキュベートした。TBSで洗浄した後、検体を4% PBS緩衝ホルムアルデヒドで15～20分間固定化した。過剰のホルムアルデヒドを、TBSで10分間洗うことによって除去した。染色を、VECTASTAIN Elite ABC 試薬(HRP結合ストレプトアビジン)を用いて30分間行った。次いで、切片をTBSで再度10分徹底的に洗浄した。ImmPACT DAB 基質を10分間使用することによって、染色を褐色として可視化し、これを図1Aに濃い灰色で示す。スライドをTBSで洗浄し、核をヘマトキシリンで1～2分間対比染色した。スライドを水道水で洗浄することによって、対比染色の色が、紫色から青色に変化する。顕微鏡法のために、組織切片を、70%、続いて90%および無水エタノールでそれぞれ2分間乾燥し、その後、キシレンで、少なくとも3分間透徹した。長期保存のために、切片を、VECTASTAIN Permountを用いてマウントし、カバーガラスで覆った。

30

【0103】

40

結果

染色が観察されなかったアイソタイプ対照(Synagis(登録商標)抗体, ヒトIgG1)(図1B)に比べて、酸化型MIFは慢性腎炎患者の腎臓で検出され、主に尿細管が染色された(図1Aの濃い灰色)。ほんの少数だけRAM9染色細胞が糸球体で観察された。切片で観察された青色(すなわち添付の図1AおよびBで点状)の構造は、細胞の核(ヘマトキシリン染色)である。注目すべきことに、同じ条件を用いて染色を行ったとき、正常腎臓の凍結切片で、酸化型MIFは検出されなかった。

【0104】

結論

患部臓器、例えば慢性腎炎患者の腎臓において、酸化型MIFは、IHC法によってそ

50

の場で検出できるが、正常腎臓には存在しない。

【0105】

実施例2：浸潤性腺管癌患者の膵臓における免疫組織化学(IHC)による酸化型MIFの
その場検出

64歳の浸潤性腺管癌患者の生検材料および58歳の浸潤性腺管癌患者の膵臓組織の健常部分の生検材料の両方の凍結切片を商業的に得た。酸化型MIFの検出を、ビオチン化RAM9を用いて行った。

【0106】

材料および方法

膵臓組織生検用スライドを、専門家に知られた最先端技術に従って、新鮮凍結またはOCT包埋の何れかで調製し、4～16μmの薄片を作製し、その後-80℃で保存した。その後の工程を全て環境温度で行った。凍結切片を30分間空気乾燥し、非特異的結合を、ブロッキング緩衝液(TBS中20% 正常ヤギ血清/2% ウシ血清アルブミン/0.2% 魚ゼラチン)で30分間ブロックした。次いで、切片を、第1抗体希釈緩衝液(TBS中2% ウシ血清アルブミン/0.2% 魚ゼラチン)中、濃度5μg/mlで、好ましくはビオチン化された第1抗酸化型MIF抗体(ビオチン化RAM9)と60分間インキュベートした。TBSで洗浄した後、検体を、4% PBS緩衝ホルムアルデヒドで、15～20分間固定化した。過剰のホルムアルデヒドを、TBSで10分間洗うことによって除去した。染色を、VECTASTAIN Elite ABC 試薬(HRP結合ストレプトアビジン)を用いて30分間行った。次いで、切片をTBSで再度10分徹底的に洗浄した。ImmPACT DAB基質を10分間使用することによって、染色を褐色として可視化した(図2の濃灰色)。スライドをTBSで洗浄し、核をヘマトキシリンで1～2分間対比染色した。スライドを水道水で洗浄することによって、対比染色の色が、紫色から青色に変化する。顕微鏡法のために、組織切片を、70%、続いて90%および無水エタノールでそれぞれ2分間乾燥し、その後、キシレンで、少なくとも3分間透徹した。長期保存のために、切片を、VECTASTAIN Permamountを用いてマウントし、カバーガラスで覆った。

【0107】

結果

染色が観察されなかった正常な膵臓組織(図2B)に比べて、酸化型MIFは膵臓の浸潤性腺管癌の患者の膵臓で検出され、主にPanIN管構造が染色された(褐色染色;すなわち図2Aの濃灰色)。切片で観察された青色の構造(すなわち添付の図で点状)は、細胞の核(ヘマトキシリン染色)である。注目すべきことに、上記アイソタイプ対照抗体で、同じ条件を用いて染色を行ったとき、正常または癌性膵臓組織の凍結切片で、染色は検出されなかった。

【0108】

さらなる研究を行うことによって、本発明者らは、好ましい態様において、厚さ2～16μm、または5～10μmの切片が、特に好都合であると決定した。さらに、抗酸化型MIF抗体の0.5～16μg/mlの濃度範囲が、特に好都合であることが示された。

【0109】

結論

患部臓器、例えば膵臓の浸潤性腺管癌に罹った患者の膵臓において、酸化型MIFはIHC法によってその場で検出できるが、健康な腎臓組織には存在しない。

【0110】

実施例3：乳房コア針生検

一つの新鮮凍結した腫瘍サンプル(浸潤性小葉癌、ステージIIB、年齢45歳)または正常乳房サンプル(浸潤性小葉癌に隣接、ステージI、年齢43歳)を部分的に解凍した。幾つかのコア針生検材料(CNB)を16または18ゲージの針を用いて採取した。

【0111】

生検材料をOCTに包埋し、再度凍結した。得られた産物は、垂直または水平に向いたCNBの混合物の凍結ブロックであろう。その後、凍結ブロックサンプル毎に連続組織切

10

20

30

40

50

片として、サンプル毎に新しいマイクロトームブレードを用いて、約10 μ mの切片を取った。切片を、固定媒体またはマウント媒体なしで、Superfrost Plus スライドガラスにマウントし、 -80° で保存した(図3も参照のこと)。

【0112】

材料および方法

実施例2の「材料および方法」の項で記載した通りに、IHC染色を行った。

【0113】

結論

患部臓器、例えば乳房浸潤性小葉癌に罹った患者の乳房において、酸化型MIFはIHC法によってその場で確実に検出できるが、健康な乳房組織には存在しない。

10

【0114】

実施例4：2人の患者のステージIB浸潤性腺管癌の膵臓における酸化型MIFの免疫組織化学(IHC)によるその場検出

膵臓癌において、癌は、幾つかの段階を経て発達する。ステージIAは、浸潤性癌の再初期段階である。この癌は、完全に膵臓自体の内部にある。2cm未満であり、リンパ節に癌は存在せず、癌の広がり(転移)もない。

【0115】

ステージIIb(実施例2に示す)は、癌自体はどんな大きさであってもよく、膵臓周囲の組織に増殖しているかもしれないときの癌を示す。また、癌は、隣接リンパ節に見出されるが、大血管では見られない。

20

【0116】

実施例2に記載された手順と同じ手順に従って、酸化型MIFを、下記の生検サンプルで検出できた：

- ・線維形成型腺管癌ステージIBの48歳アジア人女性からのサンプル；結果を図4A(RAM9抗体)および4B(対照抗体)に示す。
- ・腺管癌中～低分化ステージIBの54歳アジア人男性からのサンプル；結果を図5A(RAM9抗体)および5B(対照抗体)に示す。
- ・腺管癌中程度分化ステージIの58歳患者からのサンプル；結果を図6(RAM9抗体)に示す。
- ・健常膵臓との比較のために、図2Bを参照のこと。

30

これらのデータから、癌の初期段階で、すなわちステージIの癌で、すでに酸化型MIFを検出できることが明確に導かれる。

【0117】

実施例5：

変法1(図7も参照)：

膵臓組織生検用スライドを、専門家に知られた最先端技術に従って、新鮮凍結またはOCT包埋の何れかで調製し、10 μ m(4～16 μ m)の薄片を作製し、その後 -80° で保存した。その後の工程を全て環境温度で行った。凍結切片を30分間(適当な範囲：20～30分間)空気乾燥し、非特異的結合を、ブロッキング緩衝液(BB：TBS中20% 正常ヤギ血清/2% ウシ血清アルブミン/0.2% 魚ゼラチン)で、20分間(適当な範囲：15～30分間)ブロックした。次いで、切片を、第1抗体希釈緩衝液(PADB：TBS中2% ウシ血清アルブミン/0.2% 魚ゼラチン)中、濃度5 μ g/ml(0.5～16 μ g/ml)で、好ましくはビオチン化された第1抗酸化型MIF抗体(ビオチン化RAM9)と60分間インキュベートした。TBSで洗浄した後、検体を、4% PBS緩衝ホルムアルデヒドで、20分間(適当な範囲：15～30分間)固定化した。過剰のホルムアルデヒドを、TBSで5～10分間洗うことによって除去した。染色を、PADB+0.25% TritonX-100で希釈した蛍光色素標識ストレプトアビジン2 μ g/ml(適当な範囲：1～2.5 μ g/ml、すなわちストレプトアビジン-Alexa Fluor(登録商標)555)の使用によって、60分間(適当な範囲：30～60分間)、暗所で行った。次いで、スライドを、PBST(PBS+0.1% Tween20)で、10分間(適当な範囲：5～10分間)洗浄した。顕

40

50

顕微鏡法のために、組織切片を、96%、続いて無水エタノールでそれぞれ2×20秒間乾燥し、DAPI(核対比染色)含有ProLong(登録商標) Gold Antifade 試薬でマウントした。

【0118】

変法2(図8も参照):

膵臓組織生検用スライドを、専門家に知られた最先端に従って、新鮮凍結またはOCT包埋の何れかで調製し、10μm(4~16μm)の薄片を作製し、その後-80℃で保存した。その後の工程を全て環境温度で行った。凍結切片を30分間(適当な範囲:20~30分間)空気乾燥し、非特異的結合を、ブロッキング緩衝液(BB:TB S中20%正常ヤギ血清/2%ウシ血清アルブミン/0.2%魚ゼラチン)で、20分間(適当な範囲:15~30分間)ブロックした。染色を、PADBで希釈した蛍光色素標識RAM9(例えばRAM9-DyeLight(登録商標)488)を、濃度10μg/ml(適当な範囲:5~20μg/ml)で、60分間直接使用することによって行った。TB Sで洗浄した後、検体を、4%PBS緩衝ホルムアルデヒドで20分間(適当な範囲:15~30分)で固定化した。過剰のホルムアルデヒドを、PBST(PBS+0.1%Tween20)で、10分間(適当な範囲:5~10分間)洗浄することによって除去した。顕微鏡法のために、組織切片を、96%、続いて無水エタノールでそれぞれ2×20秒間乾燥し、DAPI(核対比染色)含有ProLong(登録商標) Gold Antifade 試薬でマウントした。

10

【0119】

酸化型MIFを、上記手順、すなわちDye-Light(登録商標)488標識RAM-9抗体による直接免疫蛍光法(変法2;図8は酸化型MIFの鮮やかな染色および検出を示す)、および、ビオチン化抗体および蛍光標識ストレプトアビジンを用いた間接免疫蛍光法(変法1;図7は結果を示す)で検出された。

20

【0120】

実施例6:

手順

膵臓組織生検用スライドを、専門家に知られた最先端技術に従って、新鮮凍結またはOCT包埋の何れかで調製し、4~16μmの薄片を作製し、その後-80℃で保存した。その後の工程を全て環境温度で行った。凍結切片を30分間空気乾燥し、非特異的結合を、ブロッキング緩衝液(BB:TB S中20%正常ヤギ血清/2%ウシ血清アルブミン/0.2%魚ゼラチン)で、20分間(適当な範囲:15~30分間)ブロックした。次いで、切片を、第1抗体希釈緩衝液(PADB:TB S中2%ウシ血清アルブミン/0.2%魚ゼラチン)中、濃度5μg/ml(適当な範囲:0.5~16μg/ml)で、好ましくはビオチン化された第1抗酸化型MIF抗体(ビオチン化RAM9)と60分間インキュベートした。TB Sで洗浄した後、検体を、4%PBS緩衝ホルムアルデヒドで、20分間(適当な範囲:15~30分間)固定化した。過剰のホルムアルデヒドを、TB Sで10分間洗うことによって除去した。メタノール中0.3% H₂O₂中で、20分間(適当な範囲:20~30分間)インキュベートすることによって、外因性ペルオキシダーゼをブロックした。TB Sで10分間洗浄することによって、過剰のメタノール/H₂O₂を除去した。染色を、VECTASTAIN Elite ABC試薬(HRP結合ストレプトアビジン)を用いて、30分間(適当な範囲:30~45分間)行った。次いで、切片をTB Sで再度10分徹底的に洗浄した。ImmPACT DAB 基質を5分間(5~10分間)使用することによって、染色を褐色として可視化した。スライドをTB Sで洗浄し、核をヘマトキシリンで1分間(1~2分間)対比染色した。スライドを水道水で洗浄することによって、対比染色の色が、紫色から青色に変化する。顕微鏡法のために、組織切片を、96%、続いて無水エタノールでそれぞれ2×20秒間乾燥し、その後、キシレンで、2分間(1~5分間)透徹した。長期保存のために、切片を、VECTASTAIN Permountを用いてマウントし、カバーガラスで覆った。

30

40

【0121】

この手順に従って、酸化型MIFを、下記の組織でも示差的に検出できた:

50

- ・脳頭蓋咽頭腫(図9A～9D参照)
- ・肺腺癌および扁平上皮細胞癌(図10A～10F)および
- ・結腸腺癌。

【 0 1 2 2 】

【 表 1 5 】

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) 寄託された微生物又はその他の 生物材料に関する表示 (PCT Rule 13bis)は、右記によつて 作成された。	PCT Online Filing Version 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20	10
0-1-1			
0-2	国際出願番号		
0-3	出願人又は代理人の書類番号	165544aa/sis	
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に 記載された微生物又は生物材料に関 連している。		
1-1	記載頁	4	
1-2	行	8 + 下から5行目	20
1-3	寄託の表示		
1-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH	
1-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
1-3-3	寄託の日付	2011年8月31日(31.08.2011)	
1-3-4	受託番号	DSMZ 25110	
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に 記載された微生物又は生物材料に関 連している。		
2-1	記載頁	4	30
2-2	行	下から3行目 + 5頁1行	
2-3	寄託の表示		
2-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH	
2-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
2-3-3	寄託の日付	2011年8月31日(31.08.2011)	
2-3-4	受託番号	DSMZ 25111	
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	

【 0 1 2 3 】

40

【表 16】

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

3	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
3-1	記載頁	4	
3-2	行	5 + 下から7行目	
3-3	寄託の表示		
3-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	10
3-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
3-3-3	寄託の日付	2011年8月31日(31.08.2011)	
3-3-4	受託番号	DSMZ 25112	
3-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	
4	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
4-1	記載頁	4	
4-2	行	下から2行目 + 5頁1行	
4-3	寄託の表示		
4-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	20
4-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
4-3-3	寄託の日付	2011年8月31日(31.08.2011)	
4-3-4	受託番号	DSMZ 25113	
4-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	
5	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
5-1	記載頁	5	
5-2	行	3, 6	30
5-3	寄託の表示		
5-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
5-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
5-3-3	寄託の日付	2011年8月31日(31.08.2011)	
5-3-4	受託番号	DSMZ 25114	
5-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	

【 0 1 2 4 】

【表 17】

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

6	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
6-1	記載頁	5	
6-2	行	4, 6	
6-3	寄託の表示		
6-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	10
6-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
6-3-3	寄託の日付	2011年8月31日(31.08.2011)	
6-3-4	受託番号	DSMZ 25115	
6-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	
7	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
7-1	記載頁	5	
7-2	行	14	
7-3	寄託の表示		20
7-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
7-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
7-3-3	寄託の日付	2012年4月12日(12.04.2012)	
7-3-4	受託番号	DSMZ 25859	
7-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	
8	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
8-1	記載頁	5	30
8-2	行	12	
8-3	寄託の表示		
8-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
8-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
8-3-3	寄託の日付	2012年4月12日(12.04.2012)	
8-3-4	受託番号	DSMZ 25860	
8-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	

【 0 1 2 5 】

40

【表 1 8】

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

9	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
9-1	記載頁	5	
9-2	行	13	
9-3	寄託の表示		
9-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	10
9-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
9-3-3	寄託の日付	2012年4月12日 (12.04.2012)	
9-3-4	受託番号	DSMZ 25861	
9-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	
10	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
10-1	記載頁	5	
10-2	行	15	
10-3	寄託の表示		20
10-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
10-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
10-3-3	寄託の日付	2012年4月12日 (12.04.2012)	
10-3-4	受託番号	DSMZ 25862	
10-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	
11	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
11-1	記載頁	5	30
11-2	行	16	
11-3	寄託の表示		
11-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
11-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
11-3-3	寄託の日付	2012年4月12日 (12.04.2012)	
11-3-4	受託番号	DSMZ 25863	
11-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	

【 0 1 2 6 】

【表 19】

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)
 (This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

12	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。		
12-1	記載頁	5	
12-2	行	17	
12-3	寄託の表示		
12-3-1	寄託機関の名称	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	10
12-3-2	寄託機関のあて先	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany	
12-3-3	寄託の日付	2012年4月12日 (12.04.2012)	
12-3-4	受託番号	DSMZ 25864	
12-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国	

受理官庁記入欄

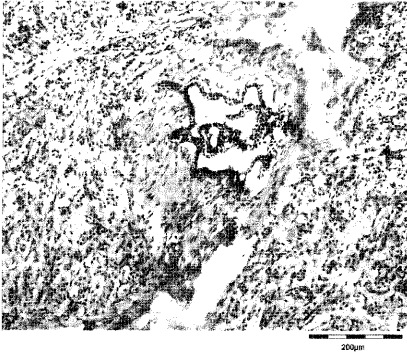
0-4	この用紙は国際出願と共に受理した (はい/いいえ)		20
0-4-1	権限のある職員		

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日		
0-5-1	権限のある職員		

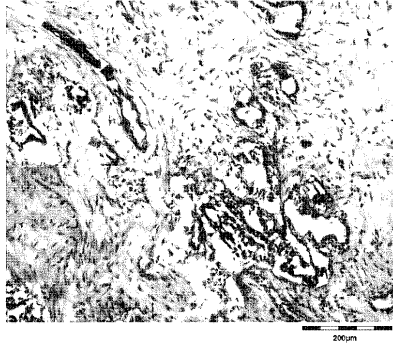
【 図 4 A 】

Figure 4A



【 図 5 A 】

Figure 5A



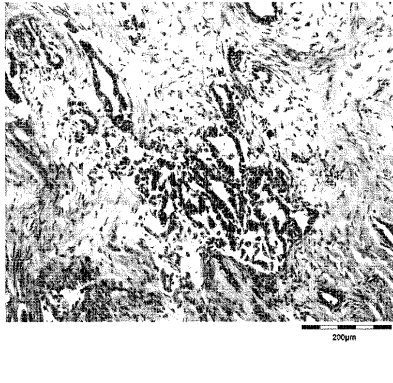
【 図 4 B 】

Figure 4B



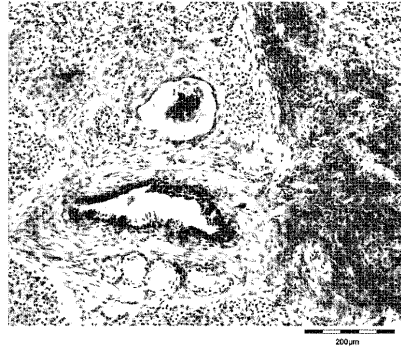
【 図 5 B 】

Figure 5B



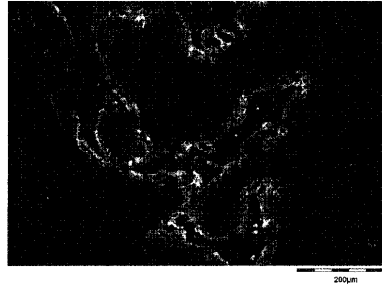
【 図 6 】

Figure 6



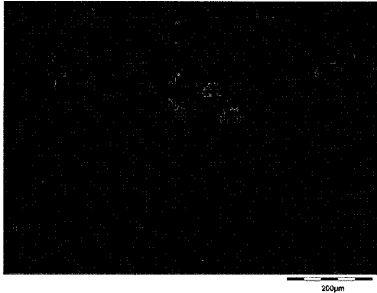
【 図 7 B 】

Figure 7B



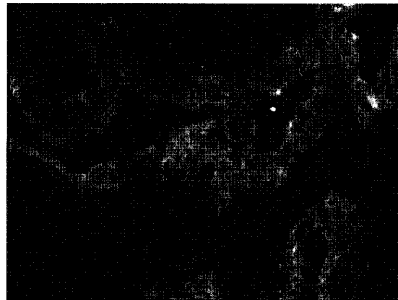
【 図 7 A 】

Figure 7A



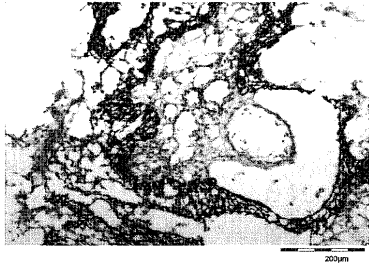
【 図 8 】

Figure 8



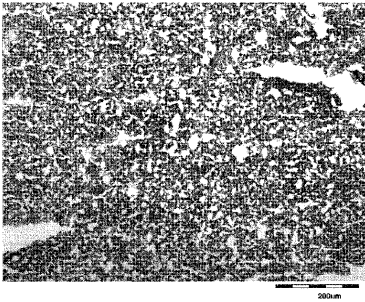
【 図 9 A 】

Figure 9A



【 図 9 B 】

Figure 9B



【 図 9 C 】

Figure 9C



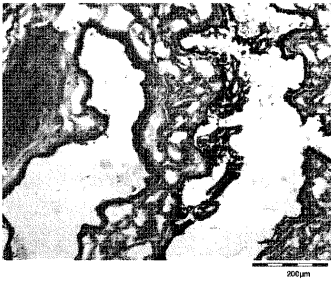
【 図 9 D 】

Figure 9D



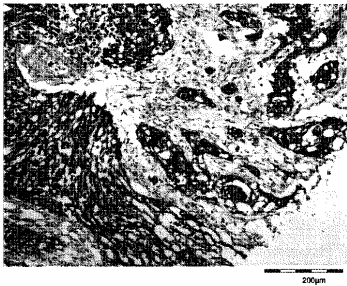
【 図 10 A 】

Figure 10A



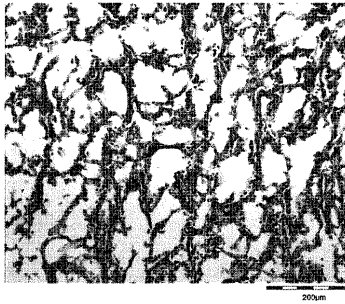
【 図 10 B 】

Figure 10 B



【 図 10 C 】

Figure 10C



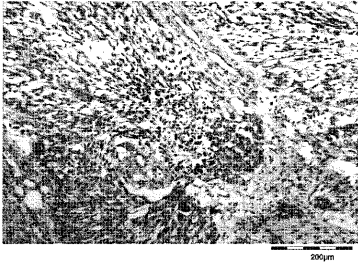
【 図 10 D 】

Figure 10D



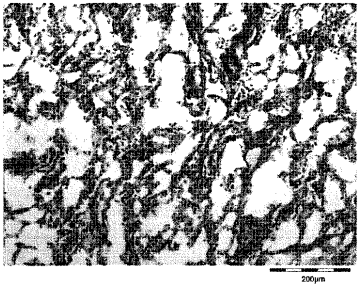
【 図 1 0 E 】

Figure 10E



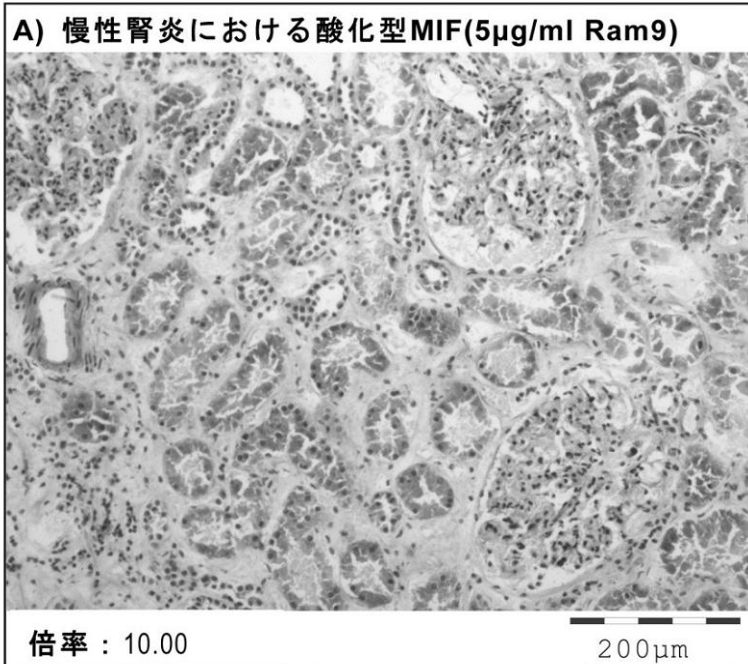
【 図 1 0 F 】

Figure 10F



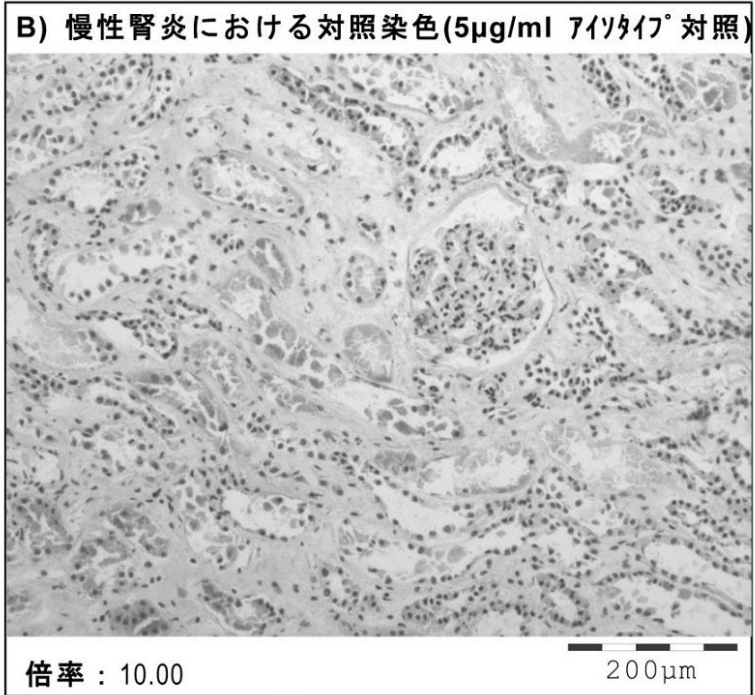
【 図 1 A 】

Figure 1A



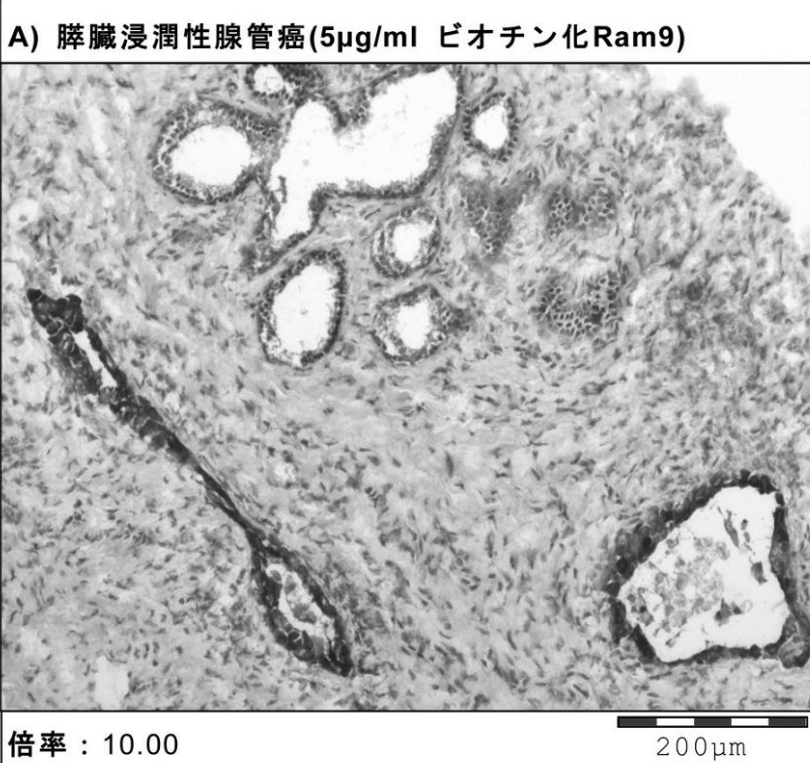
【図 1 B】

Figure 1B



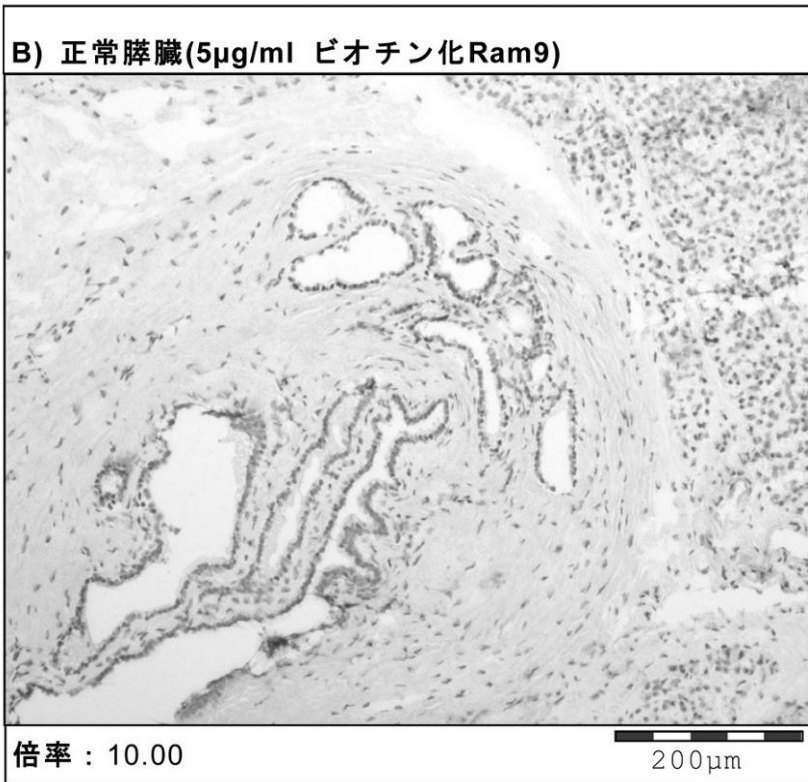
【図 2 A】

Figure 2A



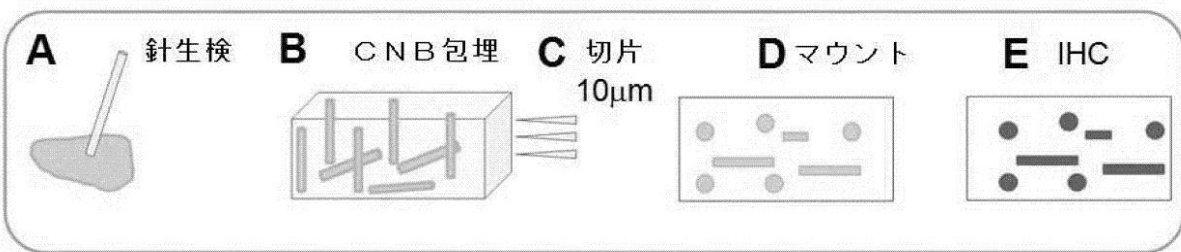
【図 2 B】

Figure 2B



【図 3】

Figure 3



【配列表】

[2015523572000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/064461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/086920 A1 (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; DYAX CORP [US]; KERSCHBAUM) 16 July 2009 (2009-07-16) cited in the application pages 4,13,16	1-16
X,P	WO 2013/050453 A1 (BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; BAXTER INT [US]) 11 April 2013 (2013-04-11) pages 7,39	1-16
X,P	WO 2013/050457 A1 (BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; BAXTER INT [US]) 11 April 2013 (2013-04-11) page 7	16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 August 2013		Date of mailing of the international search report 21/08/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lunter, Pim

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/064461

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009086920 A1	16-07-2009	AU 2008346517 A1	16-07-2009
		CA 2711029 A1	16-07-2009
		CN 101983207 A	02-03-2011
		EP 2231707 A1	29-09-2010
		EP 2548890 A1	23-01-2013
		JP 2011510616 A	07-04-2011
		KR 20100102197 A	20-09-2010
		NZ 586600 A	25-05-2012
		NZ 596409 A	31-05-2013
		RU 2010132647 A	10-02-2012
		US 2009220521 A1	03-09-2009
		US 2010260768 A1	14-10-2010
		WO 2009086920 A1	16-07-2009
WO 2013050453 A1	11-04-2013	AU 2012320597 A1	09-05-2013
		WO 2013050453 A1	11-04-2013
WO 2013050457 A1	11-04-2013	AU 2012327159 A1	16-05-2013
		TW 201319571 A	16-05-2013
		WO 2013050457 A1	11-04-2013

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	G 0 1 N 33/536 D	
	C 1 2 P 21/08 Z N A	
	C 1 2 N 15/00 A	
	C 0 7 K 16/18	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(71) 出願人 591013229
 パクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
 BAXTER INTERNATIONAL INCORPORATED
 アメリカ合衆国 60015 イリノイ州、ディアフィールド、ワン・パクスター・パークウェイ
 (番地なし)

(74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二

(74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 葆

(74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

(74) 代理人 100183243
 弁理士 野呂 祐司

(72) 発明者 ミヒャエル・ティーレ
 オーストリア、アー - 1030 ウィーン、リンケ・パーンガッセ 9 / 24 番

(72) 発明者 ランドルフ・ケルシュバオマー
 オーストリア、アー - 3400 クロスターノイブルク、ヘーエンシュトラッセ 19 アー番

(72) 発明者 デルク・フェルケル
 オーストリア、アー - 1220 ウィーン、シュタードルブライトナー・アンガー 17 番

(72) 発明者 パトリス・ドゥイヤール
 オーストリア、アー - 1020 ウィーン、シュトゥヴァーシュトラッセ 9 - 11 / 9 番

(72) 発明者 フリードリッヒ・シャイフリンガー
 オーストリア、アー - 1090 ウィーン、ミヒェルボイエルンガッセ 4 / 17 番

(72) 発明者 アレクサンダー・シナグル
 オーストリア、アー - 1200 ウィーン、ハンデルスカイ 78 / 7 / 907 番

F ターム(参考) 2G045 BB22 BB24 BB46 CB01 FB03
 4B024 AA01 AA12 BA44 BA54 CA02 CA09 DA05 EA04 GA11 HA15
 4B064 CA01 CA19 CC24 DA01 DA14
 4H045 AA30 BA10 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	抗MIF免疫组织化学法		
公开(公告)号	JP2015523572A	公开(公告)日	2015-08-13
申请号	JP2015520953	申请日	2013-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	巴克斯特医疗保健股份有限公司 巴克斯特国际公司		
申请(专利权)人(译)	巴克斯特Herusukeya , 兴业ANONYME 巴克斯特国际公司		
[标]发明人	ミハエルティーレ ランドルフケルシュバオマー ディルクフェルケル パトリスドゥイヤール フリードリッヒシャイフリンガー アレクサンダーシナグル		
发明人	ミハエル・ティーレ ランドルフ・ケルシュバオマー ディルク・フェルケル パトリス・ドゥイヤール フリードリッヒ・シャイフリンガー アレクサンダー・シナグル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/536 C12P21/08 C12N15/09 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N1/30		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.U G01N33/536.C G01N33/536.D C12P21/08.ZNA C12N15/00.A C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB46 2G045/CB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/BA54 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	山田卓司		
优先权	61/669964 2012-07-10 US 61/719793 2012-10-29 US 61/778117 2013-03-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及组织中MIF，特别是oxMIF的特异性检测。提供了一种使用免疫组织化学的检测方法，其中使用了特异性的anfi-oxMIF抗体。

(21) 出願番号	特願2015-520953 (P2015-520953)	(71) 出願人	501453189
(86) (22) 出願日	平成25年7月9日 (2013. 7. 9)		バクスター・ヘルスケア・ソシエテ・ア ノニム
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月19日 (2015. 2. 19)		Baxter Healthcare S A
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/064461		スイス国 8152 グラットパーク (
(87) 国際公開番号	WO2014/008355		オブフィコン), サーガウアーシュトラ ーセ 130
(87) 国際公開日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)		
(31) 優先権主張番号	61/669, 964		
(32) 優先日	平成24年7月10日 (2012. 7. 10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/719, 793		
(32) 優先日	平成24年10月29日 (2012. 10. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/778, 117		
(32) 優先日	平成25年3月12日 (2013. 3. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く