(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118159562 A
(43)申请公布日 2024.06.07

(21)申请号 202280072046.7
(22)申请日 2022.10.25
(30)优先权数据
21204904.3 2021.10.27 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.04.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/079744 2022.10.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/072916 EN 2023.05.04
(71)申请人 花岗岩生物股份公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 马蒂亚斯·马克
(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
专利代理师 陈知宇
(51)Int.Cl.
*C07K 16/28*(2006.01)

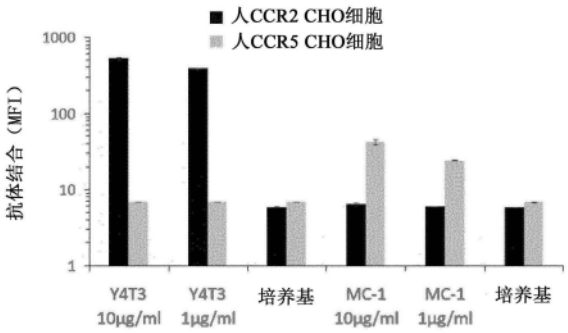
权利要求书1页 说明书29页
序列表（电子公布） 附图13页

(54)发明名称

靶向CCR2的抗体

(57)摘要

本公开涉及对CCR2特异的抗体和抗体片段。抗体耗尽CCR2阳性细胞并且阻断MCP-1(CCL2)诱导的人白细胞上CCR2的下调。此外,它们具有有利的生物物理特性。抗体可用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤和潜在的其他疾病。




CN 118159562 A

1.一种对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

2.根据权利要求1所述的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:22的VH和SEQ ID NO 23的VL。

3.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体为人lgG1类别。

4.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体与所述人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)结合。

5.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体与狨猴CCR2具有交叉反应性,但与恒河猴CCR2无交叉反应性。

6.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体不与人CCR5(SEQ ID NO:6)结合。

7.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其中,与包含SEQ ID No.28可变重链和SEQ ID No.29可变重链的抗体相比,所述抗体或抗体片段具有对在人单核细胞上表达的人CCR2的更高的亲和力,优选高至少5倍的结合亲和力。

8.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体阻断MCP-1诱导的人白细胞上CCR2的下调。

9.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其中所述分离的抗体或者抗体片段是单克隆抗体或抗体片段和/或人源化抗体或抗体片断。

10.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗体片段,其用于医学,优选地其中所述治疗是炎症性疾病、自身免疫性疾病或血液恶性肿瘤的治疗。

11.一种核酸组合物,其包含编码根据权利要求1至9中任一项所述的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列。

12.一种载体,其包含权利要求11所述的核酸组合物。

13.一种宿主细胞,其包含权利要求12所述的载体或权利要求11所述的核酸组合物。

14.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至9所述的分离的抗体或抗体片段和药学上可接受的载体或赋形剂。

15.一种对人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:22的VH和SEQ ID NO 23的VL,其中所述抗体或抗体片段与狨猴CCR2具有交叉反应性,但与恒河猴CCR2无交叉反应性,并且其中,与包含SEQ ID No.28可变重链和SEQ ID No.29可变重链的抗体相比,所述抗体或抗体片段在0.1-1.0μg/ml的抗体浓度下具有对在人单核细胞上表达的人CCR2的更高的亲和力。

# 靶向CCR2的抗体

## 技术领域

[0001] 本公开涉及对CCR2特异的抗体和抗体片段。抗体耗尽CCR2阳性细胞并且阻断MCP-1(CCL2)诱导的人白细胞上CCR2的下调。此外,它们具有有利的生物物理特性。抗体可用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤和潜在的其他疾病。

## 背景技术

[0002] 单核细胞在趋化因子和细胞因子的影响下迁移到炎症部位。一种这样的趋化因子是与趋化因子受体CCR2结合的MCP-1,它导致单核细胞从骨髓中排出。MCP-1在炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤和其他疾病过程中由细胞分泌。

[0003] 几种靶向MCP-1/CCR2通路的分子已被测试或仍在测试,其中一些显示出有希望的结果,但迄今为止没有一种得到批准。大多数开发的药物都是小的有机分子。例如,由Takeda and Tobira Therapeutics开发的小分子cenicrivirc目前正在进行3期临床试验。然而cenicrivirc对CCR2不是特异性的,同时也抑制CCR5。

[0004] STI-B0201是索伦托医疗(Sorrento)生产的一种抗体,但尚无临床开发报告。索伦托医疗(Sorrento)的抗CCR2抗体公开于WO2013/192596中。与本公开的抗体不同,WO2013/192596的抗体确实与小鼠CCR2发生交叉反应。抗CCR2抗体的抗体也公开于WO2007/115713和US9068002中。然而,这些都是鼠抗体,同样,它们从未被开发出来。MLNM1202(洛扎利珠单抗)是另一种抗CCR2抗体,但Millennium中断其开发。Takeda/Millennium的抗体公开于WO2016/079276中。安进公司(Amgen)的抗体公开于US2011/0274696中。US2011/0274696的抗体显示出对食蟹猴CCR2的反应性,而本公开的抗体不与食蟹猴CCR2发生交叉反应。然而,本公开的抗体确实与狨猴CCR2发生交叉反应。雷根斯堡大学/Yeda/特拉维夫医学中心的针对CCR2的抗体公开于US 9,068,002中。辉瑞的针对CCR2的抗体公开于WO2010021697中。然而,没有开发报告。

[0005] 因此,尽管人们对开发特异性抗CCR2靶向部分有需求和极大兴趣,但目前还没有处于高级开发阶段的抗CCR2抗体。本发明公开了对CCR2具有高度特异性、具有高亲和力和有利于成功临床开发的生物物理特性的新抗体。

## 发明内容

[0006] 本公开涉及对人CCR2具有特异性的新抗体和抗体片段。这些抗体对狨猴CCR2具有交叉反应性,这是一种用于临床开发的相关动物模型。与现有技术中的抗体相比,本公开的抗体和抗体片段具有几个优点。一个优点是对靶抗原的高亲和力。本发明的抗体和抗体片段的亲和力比任何现有技术的抗体的亲和力高至少一个量级。此外,本公开的抗体和抗体片段具有优越的生物物理性质。这包括高温稳定性、反复冻融时的高稳定性、在宽pH范围内的稳定性以及在人血浆中的高稳定性。因此,抗体的可开发性大大增加。粘合剂的稳定性还导致抗体的血清水平延长,这使得以较低剂量施用抗体成为可能,从而减少潜在的副作用。

[0007] 本公开涉及对人CCR2特异的抗体和抗体片段,其阻断MCP-1诱导的人白细胞上

CCR2的下调。

[0008] 本公开还涉及对人CCR2特异的抗体和抗体片段,其结合人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)。

[0009] 本公开还涉及对人CCR2特异的抗体和抗体片段,其不结合人CCR5(SEQ ID NO:6)。

[0010] 本公开还涉及对人CCR2特异的抗体和抗体片段,其与狨猴CCR2具有交叉反应性。

[0011] 本公开还涉及对人CCR2特异的抗体和抗体片段,其对人CCR2具有比抗体DOC2高至少10倍的亲和力。本公开还涉及抗体和抗体片段,其中所述抗体或抗体片段对在人单核细胞上表达的人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28可变重链和SEQ ID No.29可变重链的抗体更高。优选地,所述抗体或抗体片段在0.1-1.0μg/ml的抗体浓度下具有高出至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍的亲和力。

[0012] 本公开的优选抗体和抗体片段属于人lgG类别。本公开的甚至更优选的抗体或抗体片段属于lgG1类别。

[0013] 本公开的优选抗体和抗体片段是单克隆抗体或抗体片段。

[0014] 本公开的优选抗体和抗体片段是人源化抗体或抗体片段。

[0015] 本公开还涉及对人CCR2特异的抗体和抗体片段,其具有优异的生物物理性质。这包括高温稳定性、反复冻融时的高稳定性、在宽pH范围内的稳定性以及在人血浆中的高稳定性。

[0016] 本公开的优选抗体和抗体片段包括SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0017] 本公开的优选抗体和抗体片段包括SEQ ID NO:22的可变重链和SEQ ID NO 23的可变轻链。

[0018] 本公开还涉及核酸组合物,其包含编码抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列,所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0019] 本公开涉及核酸组合物,其包含编码抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列,所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:22的可变重链和SEQ ID NO 23的可变轻链。

[0020] 本公开还涉及包含这样的核酸或核酸组合物的载体。

[0021] 本公开还涉及包含这样的核酸、核酸组合物或载体的宿主细胞。

[0022] 本公开的抗体和抗体片段可用于医学。用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤和潜在的其他疾病的本公开的抗体和抗体片段是优选的。

[0023] 本公开还涉及药物组合物,其包含本公开的抗体和抗体片段以及药学上可接受的

## 附图说明

[0024] 图1示出了本发明的抗体与人CCR2的特异性结合。未观察到与人CCR5的结合。抗CCR5抗体MC-1对人CCR5是特异的,但未显示出与人CCR2的任何结合。

[0025] 图2示出了本发明的抗体与CD16阴性单核细胞结合(上图),但不与CD16阳性单核细胞结合(下图)。

[0026] 图3示出了抗体Y4T3与CD16阴性狨猴单核细胞结合(上图),但不与CD16阳性狨猴单核细胞结合(下图)。抗体Y1T2和Y2T63不与CD16阴性和CD16阳性狨猴单核细胞结合。

[0027] 图4示出了人CCR2的ECL2结构域对Y4T3的结合至关重要。Y4T3不与人CCR2b的变体结合,其中ECL2结构域被恒河猴CCR2b的ECL2结构域取代。

[0028] 图5示范了在37℃下用MCP-1将人CCR2下调30分钟减少Y4T3与人单核细胞的结合。

[0029] 图6示出了Y3T3的人源化变体与人单核细胞上表达的CCR2的结合。所有抗体均以0.5μg/ml进行测试。HOLO表示Y4T3的人IgG1嵌合版本。H1L1-H5L5是Y4T3的人源化变体。

[0030] 图7证实了抗体hY4T3与CCR2+人单核细胞的结合。所用抗体的浓度显示在x轴上。

[0031] 图8证实了抗体hY4T3与CCR2+狨猴单核细胞的结合。所用抗体的浓度显示在x轴上。

[0032] 图9示出了Y4T3(Y4T3-chim)和hY4T3的人IgG1嵌合变体与用人CCR2转染的CHO细胞的结合。Y4T3-chim和hY4T3不与用人CCR5转染的CHO细胞结合。所用抗体的浓度显示在x轴上。

[0033] 图10证实了hY4T3在各种白细胞亚群中阻断MCP-1诱导的CCR2下调。细胞首先与hY4T3、MCP-1或培养基(RPMI)在37℃下以指示的不同浓度(以μg/ml计)孵育30分钟。此后,加入MCP-1、hY4T3或RPMI,然后在37℃下再次孵育30分钟。在第一和第二孵育步骤之间不洗涤细胞。用PE标记的山羊抗人IgG抗体检测表面结合的hY4T3。

[0034] 图11示出了hY4T3治疗对来自狨猴的PBMC的影响。在时间点0用5mg/kg的hY4T3治疗绒猴。在治疗前和治疗后的不同时间点,通过流式细胞术定量全血中的白细胞亚群。相对细胞计数显示为PBMC的%。

[0035] 图12示出了hY4T3在指示温度下孵育3小时后的SEC色谱图(左上=参考;右上=55℃;左下=65℃;右下=75℃)。

[0036] 图13示出了在指示温度下将抗体孵育2小时后,hY4T3与CHO细胞上的CCR2的结合。

[0037] 图14示出了抗体制剂反复冻融循环后,hY4T3与CHO细胞上CCR2的结合。

[0038] 图15示出了在指示pH下以各种抗体浓度孵育抗体2小时后,hY4T3与CHO细胞上CCR2的结合。

[0039] 图16示出了抗体在PBS和人血浆中孵育不同时间间隔后,hY4T3与CHO细胞上CCR2的结合。将抗体以1mg/ml的浓度孵育指示的时间间隔。此后,在各种稀释液中测试抗体的结合。

[0040] 图17示出了抗体Y4T4与现有技术抗体DOC2、1D9和克隆48607在人单核细胞上的结合的比较。

[0041] 图18示出了hY4T3与人CCR2结合,但不与小鼠CCR2结合。MC-21确实与小鼠CCR2结合,但不与人CCR2结合。

[0042] 图19示出了hY4T3有效阻断趋化因子受体CCR2。

## 具体实施方式

[0043] 本公开涉及特异性结合CCR2的抗体。

[0044] 术语“CCR2”是指一种称为C-C基序趋化因子受体2的蛋白质,也称为CD192或MCP-1受体。人CCR2存在于两种主要的亚型中,即CCR2a和CCR2b,这两种亚型是通过选择性剪接产

生的。CCR2a和CCR2b仅在胞质C末端部分不同。治疗性抗体和抗体片段可接近的细胞外部分在两种亚型中是相同的。

[0045] 人CCR2b的氨基酸序列为(UniProtKB/Swiss-Prot:P41597):MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLILINCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTIMRNILGLVLPLLIMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRRYLSVFFRKHITKRFCKQCPVFYRETVDGVTSTNTPSTGEQEVSAGL(SEQ ID NO:1)

[0046] 人CCR2的胞外结构域2(ECL2)的氨基酸序列为

[0047] TKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTIMR(SEQ ID NO:2)

[0048] 狨猴(普通狨(Callithrix jacchus))CCR2b的氨基酸序列为MLSTSHSRFIRNTESGEEVTTIFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLILINCKKLKSLTDIYLLNLAVSDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAVCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWFVAVFASVPGIIFTKSQKEDSVYVCGPYFPRGWNHFHTIMRNLLGLVLPLLVMIICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRLIFTIMIVYFLFWTPYNIVVLLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRRYLSVFFRKHIAKRFCKQCPVFYRETVDGVTSTNTPSTGEQEVSAGL(SEQ ID NO:3)

[0049] 恒河猴(猕猴(Macaca mulatta))CCR2b的氨基酸序列为MLSTSRSRFIRNTNGSGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLILINCKKLKSLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYLGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQEEDSVYICGPYFPRGWNNFHTIMRNILGLVLPLLIMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRLIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTRQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRRYLSMFFRKYITKRFCKQCPVFYRETVDGVTSTNTPSTAEQEVSVGL(SEQ ID NO:4)

[0050] CCR2是MCP-1的关键功能受体。其与MCP-1的结合介导单核细胞和巨噬细胞的趋化性和迁移。

[0051] 术语“MCP-1”是指被称为单核细胞趋化蛋白1的蛋白质。它也被称为CCL2(C-C基序趋化因子配体2)。人MCP-1的氨基酸序列为(UniProtKB/Swiss-Prot:P13500):

[0052] MKVSAALLCLLLIAATFIPQGLAQPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLA

[0053] SYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPK T(SEQ ID NO:5)

[0054] 术语“CCR5”是指被称为C-C基序趋化因子受体5的蛋白质。它也被称为CD195。人CCR5的氨基酸序列为(UniProtKB/Swiss-Prot:P51681):MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVILILINCKRLKSMTDIYLLNLAISDLFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGNTMCQLLTGLYFIGFFSGIFFIILLTIDRYLAVVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWVVAVFASLPGIIFTRSQKEGLHYTCSSHFPYSQYQFWKNFQTLKIVILGLVLPLLVMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRLIFTIMIVYFLFWAPYNIVLLLNTFQEFFGLNNCSSSNRLDQAMQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRNYLLVFFQKHIAKRFCKCCSIFQQEAPERASSVYTRSTGEQEISVGL(SEQ ID NO:6)

[0055] 在本公开的某些实验中,使用了以下另外的构建体。

[0056] 具有恒河猴ECL2结构域的人CCR2b:

[0057] MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLY

[0058] SLVFIFGFVGNMLVVLILINCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAH

[0059] SAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALK

[0060] ARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQEEDSVYICGPYFPRGWNN

[0061] FHTIMRNILGLVLPLLIMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIV

[0062] YFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCIN

[0063] PIIYAFVGEKFRRYLSVFFRKHITKRFCKQCPVFYRETVDGVTSTNTPSTGEQEVSAGL(SEQ ID NO:7)

[0064] 恒河猴ECL2结构域在两个氨基酸残基上与人ECL2结构域不同。

[0065] 具有恒河猴ECL3结构域的人CCR2b：

[0066] MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLY

[0067] SLVFIFGFVGNMLVVLILINCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAH

[0068] SAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALK

[0069] ARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWN

[0070] NFHTIMRNILGLVLPLLIMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMI

[0071] VYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTRQLDQATQVTETLGMTHCC

[0072] INPIIYAFVGEKFRRYLSVFFRKHITKRFCKQCPVFYRETVDGVTSTNTPSTGEQEVSAGL(SEQ ID NO:8)

[0073] 恒河猴ECL3结构域在一个氨基酸残基上与人ECL2结构域不同。

[0074] 具有恒河猴N-末端的人CCR2b：

[0075] MLSTSRSRFIRNTNGSGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLY

[0076] SLVFIFGFVGNMLVVLILINCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAH

[0077] SAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALK

[0078] ARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWN

[0079] NFHTIMRNILGLVLPLLIMVICYSGILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMI

[0080] VYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCI

[0081] NPIIYAFVGEKFRRYLSVFFRKHITKRFCKQCPVFYRETVDGVTSTNTPSTGEQEVSAGL(SEQ ID NO:9)

[0082] 恒河猴CCR2的N末端在一个氨基酸残基上与人CCR2不同。

[0083] 如本文使用的,术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的蛋白质,其与抗原相互作用。每个重链由重链可变区(在本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每个轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域(CL)组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),穿插有更保守的区,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。术语“抗体”包括例如单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体和嵌合抗体。抗体可以是任何同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如Igd、lgG2、lgG3、lgG4、lgA1和lgA2)或亚类。轻链和重链都被划分为结构和功能同源的区域。

[0084] 如本文使用的,术语“抗体片段”是指抗体的一个或多个部分,其保留与抗原特异性相互作用(例如,通过结合、空间位阻、稳定空间分布)的能力。结合片段的示例包括但不限于Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)2片段,包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域组成的dAb片段(Ward et al.,(1989)Nature 341:544-546);和分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头连接,该合成接头使它们能够被制成单个蛋白链,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird et al.,(1988)Science 242:423-426;和Huston et al.,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。此类单链抗体也旨在被包括在术语“抗体片段”中。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式对片段进行实用性筛选。抗体片段也可以掺入单域抗体、巨型抗体(maxibodies)、微抗体、内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双scFv中(参见例如,Hollinger和Hudson,(2005)Nature Biotechnology 23:1126-1 136)。抗体片段可以接枝到基于多肽如III型纤连蛋白(Fn3)的支架中(参见美国专利号6,703,199,该专利描述了纤连蛋白多肽单抗体)。抗体片段可以掺入包含一对串联Fv片段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合位点(Zapata et al.,(1995)Protein Eng.8:1057-1062);和美国专利号5,641,870)。

[0085] 免疫球蛋白可变结构域(例如CDR)的结构和定位可以使用熟知的编号方案来定义,例如Kabat编号方案、Chothia编号方案或Kabat和Chothia的组合(参见例如,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services(1991)eds.Kabat et al.;Lazikani et al.,(1997)J.Mol.Bio.273:927-948);Kabat et al.,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication no.91-3242U.S.Department of Health and Human Services;Chothia et al.,(1987)J.Mol.Biol.196:901 -917;Chothia et al.,(1989)Nature 342:877-883;and Al-Lazikani et al.,(1997)J.Mol.Biol.273:927-948;Annals of the New York Academy of Sciences,764,47-49(1995);Nucleic Acids Research,25,206-211(1997))。

[0086] 如本文使用的,“人抗体”或“人抗体片段”是具有可变区的抗体和抗体片段,其中框架区和CDR区均来自人来源的序列。人抗体也可以从合成文库或从转基因小鼠(例如基因转殖鼠(Xenomouse))中分离,前提是具有可变区的抗体的相应系统产量,其中框架区和CDR区均衍生自人类来源的序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自这样的序列。人类来源包括例如,人类种系序列,或人类种系测序的突变版本,或含有衍生自人类框架序列分析的共有框架序列的抗体,例如,如Knappik et al.,(2000)J Mol Biol 296:57-86)中所述。

[0087] “人源化抗体”或“人源化抗体片段”在本文中定义为抗体分子,其具有衍生自人类来源的序列的恒定抗体区域,并且可变抗体区或其部分或仅CDR衍生自另一物种。例如,人源化抗体可以是CDR接枝的,其中可变结构域的CDR来自非人类来源,而可变结构域中的一个或多个框架是人类来源,并且恒定结构域(若有)是人类来源。

[0088] 术语“嵌合抗体”或“嵌合抗体片段”在本文中定义为抗体分子,其具有衍生自或对应于在一种物种中发现的序列的恒定抗体区和衍生自另一种物种的可变抗体区。优选地,

恒定抗体区衍生自或对应于在人类中发现的序列,且可变抗体区(例如VH、VL、CDR或FR区)衍生自在非人动物(例如小鼠、大鼠、兔或仓鼠)中发现的序列。

[0089] 术语“分离的抗体”是指基本上不含其他抗体或具有不同抗原特异性的抗体片段的抗体或抗体片段。此外,分离的抗体或抗体片段可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。因此,在一些方面,提供的抗体是分离的抗体,其已与具有不同特异性的抗体分离。分离的抗体可以是单克隆抗体。分离的抗体可以是重组单克隆抗体。然而,特异性结合靶标的表位、同种型或变体的分离的抗体可能对其他相关抗原(例如来自其他物种(例如物种同源物)的抗原)具有交叉反应性。

[0090] 如本文使用的,术语“重组抗体”包括通过自然界中不存在的手段制备、表达、产生或分离的所有抗体。例如,从转化以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体,从重组的、组合的人抗体文库中选择和分离的抗体以及通过涉及剪接人免疫球蛋白基因的全部或部分的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体,从人免疫球蛋白基因转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或从其制备的杂交瘤分离的其他DNA序列或抗体的序列。优选地,这样的重组抗体具有可变区,其中框架和CDR区衍生自人类种系免疫球蛋白序列。然而,在某些实施方式中,这样的重组人抗体可以进行体外诱变(或者,当使用人Ig序列的动物转基因时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是衍生自人类种系VH和VL序列并与之相关的序列,可能在体内不天然存在于人类抗体种系库中。重组抗体可以是单克隆抗体。在一个实施方式中,本文公开的抗体和抗体片段从HuCAL文库中分离(Rothe et al., J.Mol.Biol.(2008)376,1 182-1200)。

[0091] 如本文使用的,抗体“特异性结合(binds specifically to)”、“特异地结合(specifically binds to)”是抗原(如人CCR2)“对抗原特异的”或“特异性识别抗原”(如人CCR2),如果这种抗体能够区分这种抗原和一种或多种参考抗原,因为结合特异性不是绝对的,而是相对的性质。例如,可以进行标准ELISA测定或标准流式细胞术测定。可以通过标准显色法(例如用辣根过氧化物的第二抗体和用过氧化氢的四甲基联苯胺)或通过用PE或另一种染料或标记物标记的第二抗体的结合来进行评分。某些孔中的反应通过例如在450nm下的光密度(OD)或通过流式细胞术中的平均荧光强度(MFI)来评分。典型的背景(=阴性反应)可以是0.1OD;典型的阳性反应可以是1OD。背景和阳性反应MFI高度依赖于仪器设置。阳性/阴性差异可能大于10倍。通常,结合特异性的测定不是通过使用单一的参考抗原,而是通过使用一组约三到五种不相关的抗原(例如奶粉、BSA、转铁蛋白等)来进行。对于流式细胞术,可以使用各种抗原阴性细胞。然而,特异性结合抗原的抗体可能对来自其他物种(例如,物种同源物)的相应直系同源抗原具有交叉反应性。在某些实施方式中,这种对直系同源抗原的交叉反应性甚至是优选的。

[0092] 如本文使用的,如果抗体与来自其他物种的直系同源抗原结合,则抗体具有“交叉反应性”或是“交叉反应性的”。例如,如果抗体与人CCR2和狨猴CCR2结合,则抗体是交叉反应性的。

[0093] 如本文使用的,术语“亲和力”是指多肽与其靶标之间在单个位点上的相互作用强度。在每个位点内,多肽的结合区通过弱的非共价力与其在多个位点的靶标相互作用;相互作用越多,亲和力就越强。

[0094] 术语“表位”包括被抗体或其抗体片段特异性识别或以其他方式与分子相互作用

的任何蛋白质区。通常,表位是分子的化学活性表面分组,例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链,并且通常可以具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。如本领域技术人员将理解的,实际上抗体能够特异性结合的任何东西都可以是表位。

[0095] 术语“结构域”或“蛋白质结构域”是指蛋白质多肽链中形成功能单元和/或独立形成三维结构的区域。例如,CCR2的ECL2是蛋白质结构域。

[0096] 本公开的“组合物”可用于治疗或预防应用。因此,本公开包括含有本文所公开的抗体或抗体片段并因此含有药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在相关方面,本公开提供了一种用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤和潜在的其他疾病的方法。这种方法包括向有此需要的受试者施用有效量的药物组合物的步骤,所述药物组合物含有本文描述的抗体或抗体片段。

[0097] 本公开提供了治疗方法,包括向需要这种治疗的受试者施用治疗有效量的如本文公开的抗体或抗体片段。如本文使用的,“治疗有效量”或“有效量”是指引发所需生物反应所需的CCR2抗体的量。根据本公开,治疗有效量是治疗和/或预防疾病所必需的CCR2抗体的量。

[0098] “施用(administered)”或“施用(administration)”包括但不限于通过可注射形式递送药物,例如,如静脉内、肌内、皮内或皮下途径或粘膜途径,例如作为吸入用鼻喷雾剂或气雾剂,或作为可摄入溶液、胶囊或片剂。优选地,通过可注射形式施用。

[0099] 如本文使用的,“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”或“治疗(treating)”等是指试图改变被治疗受试者的疾病自然病程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。所期望的治疗效果包括但不限于,预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理结果、防止转移、降低疾病进展率、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。在一些实施方式中,根据本公开的抗体或抗体片段用于延缓疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0100] “预防(preventing)”或“预防(prevention)”是指降低患病或发展疾病的风险(即,使可能暴露于致病剂或在疾病发作前易患这种疾病的受试者不出现疾病的至少一种临床症状)。“预防(prevention)”还指旨在预防疾病或其症状的发作或延缓疾病或其症状发作的方法。

[0101] 该上下文中使用的“受试者(subject)”或“物种”是指任何哺乳动物,包括啮齿动物,如小鼠或大鼠以及灵长类动物,如食蟹猴(食蟹猴(Macaca fascicularis))、绒猴(普通狨(Callithrix jacchus))、恒河猴(猕猴(Macaca mulatta))或人类(智人(Homo sapiens))。优选地,受试者是灵长类动物,最优选为人类。

[0102] 术语“效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的非限制性示例包括C1 q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP);细胞表面受体(例如B细胞受体)下调;以及直接细胞激活或直接细胞抑制。

[0103] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种细胞毒性形式,其中与存在于某些细胞毒性细胞(如NK细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)结合的抗体使这些细胞毒性效应细胞能够特异性地结合携带抗原的靶细胞,随后用细胞毒素杀死靶细胞。介导ADCC的原代细胞(即NK细胞)仅表达FcγRIII,而单核细胞/巨噬细胞表达FcγRI、

FcyRII、和FcyRIII。

[0104] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下对靶细胞的裂解。经典补体通路的激活是通过补体系统的第一组分(C1q)与本公开的(适当亚类)抗体的结合而启动的,所述抗体与其同源抗原结合。

[0105] “抗体依赖性细胞吞噬作用”或“ADCP”是指通过诸如巨噬细胞或树突状细胞的吞噬细胞的内化来消除抗体包被的靶细胞的机制。

[0106] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”、“具有(have)”和“包括(include)”及其相应变体如“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“具有(has)”、“具有(having)”、“包括(includes)和“包括(including)将被理解为暗示包括所述元素或整数或元素或整数的组,但不排除任何其他元素或整数或元素或整数的组。

[0107] 如本文使用的,术语“工程化的”或“修饰的”包括通过合成手段(例如,通过重组技术、体外肽合成、通过肽的酶促或化学偶联或这些技术的一些组合)操纵核酸或多肽。优选地,根据本公开的抗体或抗体片段被工程化或修饰以改善一种或多种性质,例如抗原结合、稳定性、半衰期、效应子功能、免疫原性、安全性等。

[0108] 如本文使用的,“变体”是指通过一种或多种修饰(例如氨基酸替换、插入或缺失)与参考多肽不同的多肽。变体多肽通常保留参考多肽的大部分特性,例如与靶抗原结合,但引入了新的附加特征或性质,例如变体多肽与参考多肽相比对靶抗原具有更高的亲和力,或者变体多肽是参考多肽的人源化版本。

[0109] 如本文使用的,术语“氨基酸突变”意指包括氨基酸替换、缺失、插入和修饰。只要最终构建体具有所需特征,例如减少与Fc受体的结合,就可以进行替换、缺失、插入和修饰的任何组合。氨基酸序列缺失和插入包括氨基酸残基的N末端和/或C末端缺失和插入。特定的氨基酸突变是氨基酸替换。氨基酸替换包括由非天然存在的氨基酸或由二十种标准氨基酸的天然存在的氨基衍生物取代。氨基酸突变可以使用本领域熟知的基因或化学方法产生。基因方法可以包括定点诱变、PCR、基因合成等。可以设想,也可以使用通过基因工程化以外的方法改变氨基酸残基的侧链基团的方法(例如化学修饰)。本文中可以使用各种名称来指示相同的氨基酸突变。例如,从Fc区327位的甘氨酸替换为丙氨酸可以表示为237A、G337、G337A或Gly329Ala。

[0110] 如本文使用的,术语“EC50”是指抗体或抗体片段的浓度,其在测定中在基线和最大值之间的一半处诱导反应。因此,它代表观察到50%最大效果的抗体或配体浓度。

[0111] 术语“抑制(inhibition)”或“抑制(inhibit)”、或“减少(reduction)”或“减少(reduce)”、或“中和(neutralization)”或“中和(neutralize)”是指任何表型特征(如结合或生物活性或功能)的减少或停止,或该特征的发生率、程度或可能性的减少或停止。“抑制(inhibition)”、“减少(reduction)”或“中和(neutralization)”不需要完全,只要使用适当的测定法可以检测到即可。在一些实施方式中,“减少”或“抑制”或“中和”意指引起20%或更大的减少的能力。在另一个实施方式中,“减少”或“抑制”或“中和”意指引起50%或更大的减少的能力。在又一个实施方式中,“减少”或“抑制”或“中和”意指引起75%、85%、90%、95%或更大的总体减少的能力。

[0112] 如本文使用的,术语“拮抗性”抗体是指与抗原相互作用并部分或完全抑制或中和靶抗原的生物活性或功能或任何其他表型特征的抗体或抗体片段。

[0113] “野生型”蛋白质是自然界中发现的蛋白质的一种版本或变体。野生型蛋白质的氨基酸序列(例如人lgG1抗体的Fc区)是该蛋白质在自然界中存在时的氨基酸序列。由于同种异型差异,野生型蛋白质可能有多于一个氨基酸序列。例如,存在几种天然存在的人IGg1重链恒定区的同种异型(参见例如,Jeffries et al.,(2009)mAbs 1:1)。

[0114] “Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区。免疫球蛋白的Fc区通常包括两个恒定结构域,即CH2结构域和CH3结构域。尽管IgG重链的Fc区的边界可能略有变化,但人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226或Pro230延伸到重链的C末端。然而,Fc区的C-末端赖氨酸(Lys447)可能存在,也可能不存在。除非本文另有规定,Fc区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所描述的。

[0115] 本发明的实施方式

[0116] 多肽

[0117] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0118] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段含有如通过Kabat定义的SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0119] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段含有如通过IMGT定义的SEQ ID NO:16的HCDR1区、SEQ ID NO:17的HCDR2区、SEQ ID NO:18的HCDR3区、SEQ ID NO:19的LCDR1区、SEQ ID NO:20的LCDR2区和SEQ ID NO:21的LCDR3区。

[0120] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含由表3中公开的任何一种抗体的Kabat定义的6个CDR。

[0121] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含由表3中公开的任何一种抗体的IMGT定义的6个CDR。

[0122] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含由表3中公开的任何一种抗体的Chothia定义的6个CDR。

[0123] 在本公开的一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段是单克隆抗体或抗体片段。

[0124] 在本公开的一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段是人、人源化或嵌合抗体或抗体片段。在本公开的另一个优选实施方式中,分离的抗体或抗体片段是人源化抗体或抗体片段。

[0125] 在本公开的一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段是重组抗体或抗体片段。

[0126] 在本公开的一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段是IgG同种型。

[0127] 在本公开的一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段是lgG1类别。

[0128] 在本公开的另一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段结合人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)。

[0129] 在本公开的另一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段结合包含人CCR2的ECL-2结构域的多肽(SEQ ID NO:2)。

[0130] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与狨猴CCR2具有交叉反应性。

[0131] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与狨猴CCR2具有交叉反应性,但与恒河猴CCR2不具有交叉反应性。

[0132] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段不与恒河猴CCR2结合。

[0133] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段不与小鼠CCR2结合。

[0134] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段不与人CCR5(SEQ ID NO:6)结合。

[0135] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段阻断MCP-1诱导的人白细胞上CCR2的下调。

[0136] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于DOC2至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍。优选地,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于抗体DOC2至少10倍。

[0137] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于包含SEQ ID No.28的可变重链和SEQ ID No.29的可变重链的抗体至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍。优选地,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于包含SEQ ID No.28的可变重链和SEQ ID No.29的可变重链的抗体至少10倍。

[0138] 本公开还涉及对人CCR2特异的抗体和抗体片段,其对人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28的可变重链和SEQ ID No.29的可变重链的抗体高至少10倍。

[0139] 本公开还涉及抗体和抗体片段,其中所述抗体或抗体片段对在人单核细胞上表达的人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28可变重链和SEQ ID No.29可变重链的抗体更高。优选地,所述抗体或抗体片段对在人单核细胞上表达的人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28的可变重链和SEQ ID No.29的可变重链的抗体高至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍。

[0140] 本公开还涉及抗体和抗体片段,其中所述抗体或抗体片段在0.1-1.0μg/ml的抗体浓度下对在人单核细胞上表达的人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28可变重链和SEQ ID No.29可变重链的抗体更高。优选地,所述抗体或抗体片段对在人单核细胞上表达的人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28的可变重链和SEQ ID No.29的可变重链的抗体高至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍。

[0141] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段对人CCR2的亲和力比DOC2高至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍。优选地,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段对人CCR2的亲和力比抗体DOC2高至少10倍。

[0142] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段对人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28的可变重链和SEQ ID No.29的可变重链的抗体高至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍。优选地,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段对人CCR2的亲和力比包含SEQ ID No.28的可变重链和SEQ ID No.29的可变重链的抗体高至少10倍。

[0143] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于抗体1D9至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍或至少30倍。优选地,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于抗体1D9至少30倍。

[0144] 在本公开的另一个实施方式中,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于抗体克隆48607至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少50倍或至少100倍。优选地,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于抗体克隆48607至少30倍。优选地,对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段与人CCR2的结合优于抗体克隆48607至少100倍。

[0145] 本文中称为“克隆48607”或“抗体克隆40867”的抗体是指CD指出的抗体克隆48607。该抗体克隆可商购(R&D Systems;目录号:MAB150)。

[0146] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含SEQ ID NO:22的可变重链(VH)和SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)。

[0147] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其具有SEQ ID NO:22的可变重链(VH)和SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)。

[0148] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含表3中公开的任何一种抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)。

[0149] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含与SEQ ID NO:22的VH具有至少80%同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少80%同一性的可变轻链(VL)。

[0150] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含与SEQ ID NO:22的VH具有至少85%同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少85%同一性的可变轻链(VL)。

[0151] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含与SEQ ID NO:22的VH具有至少90%同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少90%同一性的可变轻链(VL)。

[0152] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其包含与SEQ ID NO:22的VH具有至少95%同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少95%同一性的可变轻链(VL)。

[0153] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区、SEQ ID NO:15的LCDR3区,和与SEQ ID NO:22的VH具有至少80%同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少80%同一性的可变轻链(VL)。

[0154] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区、SEQ ID NO:15的LCDR3区,和与SEQ ID NO:22的VH具有至少85%同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少85%同一性的可变轻链(VL)。

[0155] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所

述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区、SEQ ID NO:15的LCDR3区，和与SEQ ID NO:22的VH具有至少90％同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少90％同一性的可变轻链(VL)。

[0156] 在一个实施方式中，本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区、SEQ ID NO:15的LCDR3区，和与SEQ ID NO:22的VH具有至少95％同一性的可变重链(VH)和与SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)具有至少95％同一性的可变轻链(VL)。

[0157] 核酸

[0158] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0159] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，其中所述抗体或抗体片段含有如通过Kabat定义的SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0160] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，其中所述抗体或抗体片段含有如通过IMGT定义的SEQ ID NO:16的HCDR1区、SEQ ID NO:17的HCDR2区、SEQ ID NO:18的HCDR3区、SEQ ID NO:19的LCDR1区、SEQ ID NO:20的LCDR2区和SEQ ID NO:21的LCDR3区。

[0161] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:22的可变重链(VH)和SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)。

[0162] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，其中所述抗体或抗体片段含有SEQ ID NO:22的可变重链(VH)和SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)。

[0163] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，所述人CCR2包含由表3中公开的任何一种抗体的Kabat定义的6个CDR。

[0164] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，所述人CCR2包含由表3中公开的任何一种抗体的IMGT定义的6个CDR。

[0165] 在一个实施方式中，本公开涉及一种核酸组合物，其包含编码对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列，所述人CCR2包含由表3中公开的任何一种抗体的Chothia定义的6个CDR。

[0166] 在一个实施方式中，分离所述核酸组合物和/或所述核酸序列和/或多个核酸序列。

[0167] 载体

[0168] 在一个实施方式中,本公开提供了一种载体组合物,其包含载体或多个载体,所述载体包含核酸组合物,所述核酸组合物包含编码根据本公开的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列。

[0169] 在一个实施方式中,本公开提供了一种载体组合物,其包含载体或多个载体,所述载体包含核酸组合物,所述核酸组合物包含编码表3中公开的对人CCR2特异的任何一种分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列。

[0170] 在一个实施方式中,分离所述载体组合物和/或载体和/或多个载体。

[0171] 宿主细胞

[0172] 在一个实施方式中,本公开提供了一种包含载体组合物的宿主细胞,所述载体组合物包含载体或多个载体,所述载体包含核酸组合物,所述核酸组合物包含编码根据本公开的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列。

[0173] 在一个实施方式中,本公开是指一种包含载体组合物的宿主细胞,所述载体组合物包含载体或多个载体,所述载体包含核酸组合物,所述核酸组合物包含编码表3中公开的对CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列。

[0174] 在一个实施方式中,根据本公开的宿主细胞能够表达由载体组合物或核酸组合物编码的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段。

[0175] 在进一步的实施方式中,宿主细胞是分离的宿主细胞。在进一步的实施方式中,所述宿主细胞是哺乳动物细胞。在一个实施方式中,所述哺乳动物细胞是人类细胞。在另一个实施方式中,所述哺乳动物细胞是CHO细胞。在一个实施方式中,所述细胞是HEK细胞。在另一个实施方式中,所述细胞是PERC.6细胞。在一个实施方式中,所述细胞是HKB1 1细胞。

[0176] 本领域技术人员将认识到,编码本公开的抗体或抗体片段的重链和/或轻链的核酸序列或多个核酸序列可以被克隆到不同的载体或相同的载体中。

[0177] 可以通过本领域熟知的方法将载体引入适当的宿主细胞,例如原核(例如细菌)或真核(例如酵母或哺乳动物)细胞(参见例如,“Current Protocol in Molecular Biology”,Ausubel et al.(eds.),Greene Publishing Assoc和John Wiley Interscience,New York,1989and 1992)。许多克隆载体是本领域技术人员已知的,并且选择合适的克隆载体是选择的问题。该基因可以置于启动子、核糖体结合位点(用于细菌表达)和任选的操作子(本文统称为“控制”元件)的控制下,使得编码所需蛋白质的核酸序列在由包含该表达构建体的载体转化的宿主细胞中转录成RNA。编码序列可以包含也可以不包含信号肽或前导序列。在宿主细胞中表达后,获得本公开的抗体或抗体片段。如本领域技术人员所知,这些步骤可以以不同的方式实现。通常,这样的步骤通常包括用编码抗体或抗体片段的核酸组合物或载体组合物或感染性颗粒转化或转染合适的宿主细胞。此外,这样的步骤通常包括在适合所述宿主细胞增殖(扩增、生长)的条件下培养所述宿主细胞,以及在适合产生(表达、合成)编码的抗体或抗体片段的条件下的培养步骤。在适合增殖或表达的条件下培养宿主细胞通常在包含适合细胞生长或诱导表达的组分的培养基存在下完成。特别地,在实施方式中,本公开的抗体或抗体片段的生产方法还包括从宿主细胞或培养基中分离和纯化产生的抗体或抗体片段的步骤。如果表达系统将蛋白质分泌到生长培养基中,则可以直接从培养基中纯化蛋白质。如果不分泌蛋白质,则从细胞裂解物中分离或从细

胞膜级分中回收蛋白质。适当生长条件和回收方法的选择在本领域技术范围内。然后可以通过本领域技术人员已知的多种技术来纯化本公开的抗体或抗体片段。

[0178] 在一个实施方式中,本公开涉及生产表3中公开的任何抗体的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段的方法。在一个实施方式中,提供了根据本公开的生产分离的抗体或抗体片段的方法,其中所述方法包括在适合抗体或抗体片段表达的条件下培养包含载体组合物的宿主细胞,以及从宿主细胞或宿主细胞培养基中分离的抗体或抗体片段,所述载体组合物包含一种或多种载体,所述载体包含核酸组合物,所述核酸组合物包含编码根据本公开的抗体或抗体片段的核酸序列或多个核酸序列。如本文所述的分离的抗体或抗体片段可以是使用本领域已知的技术纯化,例如高效液相色谱(HPLC)、离子交换色谱、凝胶电泳、亲和色谱、尺寸排阻色谱等。用于纯化特定抗体或抗体片段的条件将部分取决于诸如净电荷、疏水性、亲水性等的因素,并且对于本领域技术人员来说是显而易见的。对于亲和色谱纯化,可以使用抗体或抗体片段结合的抗体、配体、受体或抗原。例如,对于根据本公开的抗体或抗体片段的亲和色谱纯化,可以使用具有蛋白质A或蛋白质G的基质。抗体或抗体片段的纯度可以通过包括凝胶电泳、高压液相色谱等的各种熟知的分析方法中的任何一种来测定。

[0179] 特异性

[0180] 在一个实施方式中,本公开涉及表3中公开的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段。

[0181] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段。

[0182] 在一个实施方式中,本公开涉及对由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽特异的分离的抗体或抗体片段。

[0183] 在一个实施方式中,本公开涉及对包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽特异的分离的抗体或抗体片段。

[0184] 在一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段与人CCR2的细胞外结构域结合。在一个实施方式中,分离的抗体或抗体片段与人CCR2的细胞外结构域2(ECL2)结合。

[0185] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)特异的分离的抗体或抗体片段。

[0186] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)结合。

[0187] 在一个实施方式中,本公开涉及对狨猴CCR2特异的分离的抗体或抗体片段。

[0188] 在一个实施方式中,本公开涉及对由SEQ ID NO:2的氨基酸序列编码的多肽特异的分离的抗体或抗体片段。

[0189] 在一个实施方式中,本公开涉及对包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽特异的分离的抗体或抗体片段。

[0190] 在一个实施方式中,本公开涉及对狨猴CCR2具有交叉反应性的分离的抗体或抗体片段。

[0191] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2和狨猴CCR2特异的分离的抗体或抗体片段。

[0192] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2和狨猴CCR2特异的分离的抗体或抗体片

段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0193] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2和狨猴CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段含有SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0194] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异性且不与恒河猴CCR2结合的分离的抗体或抗体片段。

[0195] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异性且不与恒河猴CCR2结合的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0196] 在一个实施方式中,本公开涉及对人CCR2特异性且不与恒河猴CCR2结合的分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段含有SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0197] 在一个实施方式中,本公开涉及不与人CCR5结合的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段。

[0198] 在一个实施方式中,本公开涉及对由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽特异的分离的抗体或抗体片段,其不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合。

[0199] 在一个实施方式中,本公开涉及不与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽结合的分离的抗体或抗体片段,并且其不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合。

[0200] 在一个实施方式中,本公开涉及与人CCR2的细胞外结构域2(ECL2)结合并且不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合的分离的抗体或抗体片段。

[0201] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)结合并且不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合。

[0202] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与人CCR2的ECL-2结构域(SEQ ID NO:2)结合,与由SEQ ID NO:3的氨基酸序列编码的多肽结合,并且不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合。

[0203] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽结合,与由SEQ ID NO:3的氨基酸序列编码的多肽结合,并且其不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合。

[0204] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽结合,与由SEQ ID NO:3的氨基酸序列编码的多肽结合,并且不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0205] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽结合,与由SEQ ID NO:3的氨基酸序列编码的多肽结合,并且不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合,其中所述抗体或抗体片段具有SEQ ID NO:10的HCDR1区、SEQ ID NO:11的HCDR2区、SEQ ID NO:12的HCDR3区、SEQ ID NO:13的LCDR1区、SEQ ID NO:14的LCDR2区和SEQ ID NO:15的LCDR3区。

[0206] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽结合,与由SEQ ID NO:3的氨基酸序列编码的多肽结合,并且不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合,其中所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:22的可变重链(VH)和SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)。

[0207] 在一个实施方式中,本公开涉及分离的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列编码的多肽结合,与由SEQ ID NO:3的氨基酸序列编码的多肽结合,并且不与由SEQ ID NO:6的氨基酸序列编码的多肽结合,其中所述抗体或抗体片段具有SEQ ID NO:22的可变重链(VH)和SEQ ID NO:23的可变轻链(VL)。

[0208] 对白细胞的影响

[0209] CCR2和MCP-1在单核细胞迁移到炎症部位中起关键作用。本公开的抗体和抗体片段在这一过程中起关键作用,并且形成本公开的抗体和抗体片段的治疗有用性的基础。

[0210] 在一个实施方式中,本公开涉及阻断MCP-1诱导的白细胞上CCR2下调的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开涉及阻断MCP-1诱导的人白细胞上CCR2下调的分离的抗体或抗体片段。

[0211] 在一个实施方式中,本公开涉及阻断MCP-1诱导的单核细胞上CCR2下调的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开涉及阻断MCP-1诱导的人单核细胞上CCR2下调的分离的抗体或抗体片段。

[0212] 在一个实施方式中,本公开涉及阻断MCP-1诱导的嗜碱性粒细胞和浆细胞样树突状细胞上CCR2下调的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开涉及阻断MCP-1诱导的人嗜碱性粒细胞和浆细胞样树突状细胞上CCR2下调的分离的抗体或抗体片段。

[0213] 在一个实施方式中,本公开涉及抑制白细胞中CCR2诱导的趋化性的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开涉及抑制单核细胞中CCR2诱导的趋化性的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开涉及抑制嗜碱性粒细胞和浆细胞样树突状细胞中CCR2诱导的趋化性的分离的抗体或抗体片段。

[0214] 效应子功能

[0215] 免疫球蛋白的Fc区通常赋予抗体有利的药代动力学性质,例如在血清中的延长的半衰期,以及通过与细胞上表达的Fc受体结合来诱导效应子功能的能力。另一方面,与Fc受体的结合也可能导致某些细胞表面受体的不希望的激活,导致不希望的细胞因子释放和全身施用的严重副作用。

[0216] 因此,对于某些治疗情况,希望减少或消除抗体的野生型Fc区,例如野生型IgG Fc区与一种或多种或所有Fc受体的正常结合和/或与补体组分(例如C1q)的正常结合以减少或消除该抗体诱导效应子功能的能力。例如,可能希望减少或消除抗体的Fc区与一种或多种或所有Fcγ受体(例如:FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa)的结合。效应子功能可以包括但不限于以下一种或多种:补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、与NK细胞结合、与巨噬细胞结合、与单核细胞结合、与多形核细胞结合、诱导细胞凋亡的直接信号传导、靶向结合抗体的交联、树突状细胞成熟或T细胞启动。

[0217] 减少或消除Fc区与Fc受体和/或C1q的结合通常通过突变野生型Fc区,例如lgG1-Fc区,更特别为人lgG1 Fc区,产生所述野生型Fc区的变体或工程化Fc区(例如变体人lgG1 Fc区)来实现。导致结合减少的替换可能是有用的。为了减少或消除Fc区与Fc受体的结合性质,非保守氨基酸替换(即用具有不同结构和/或化学性质的另一个氨基酸替换一个氨基酸)是优选的。

[0218] 因此,在一个实施方式中,根据本公开的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段包含变体Fc区,与野生型Fc区相比,该变体Fc区与Fc受体和/或C1q的结合减少或消除。在一个这样的实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段包含变体Fc区,其减少或消除抗体诱导效应子功能的能力。在另一个实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段基本上不诱导效应子功能。

[0219] 在某些实施方式中,效应子功能是选自CDC、ADCC和ADCP的一种或多种。在一个实施方式中,效应子功能是ADCC。在一个实施方式中,效应子功能是CDC。在一个实施方式中,效应子功能是ADCP。在一个实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段基本上不诱导ADCC和/或CDC和/或ADCP。在一个实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段在体外不诱导ADCC或ADCP。

[0220] 在一个实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段的变体Fc区包含一个或多个氨基酸替换,当与野生型Fc区相比时,所述一个或多个氨基酸替换减少或消除变体Fc区域与一个或多个Fc受体和/或C1q的结合。在一个实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段的变体Fc区包含一个或多个氨基酸替换,与野生型Fc区相比时,所述一个或多个氨基酸替换减少或消除抗体诱导效应子功能的能力。在特定实施方式中,与野生型Fc区相比,所述一个或多个氨基酸替换可将变体Fc区对一个或多个Fc受体和/或对C1q的结合亲和力降低至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍或甚至至少50倍。在替代实施方式中,与野生型Fc区相比,一个或多个氨基酸替换可将根据本公开的分离的抗体或抗体片段诱导效应子功能的能力降低至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍或甚至至少50倍。

[0221] 在一个实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段的变体Fc区基本上不与一个或多个Fc受体和/或C1q结合。在一个实施方式中,根据本公开的抗体的变体Fc区基本上消除了所述抗体诱导效应子功能的能力。在一个实施方式中,根据本公开的抗体或抗体片段基本上不诱导效应子功能。在一个实施方式中,所述效应子功能是ADCC和/或ADCP和/或CDC。在一个实施方式中,根据本公开的抗体或抗体片段基本上不诱导效应子功能,这意味着在不存在所述抗体的情况下测量的诱导的效应子功能的水平不显著高于背景。

[0222] 在一个实施方式中,Fc受体是人Fc受体。在一个实施方式中,Fc受体是Fey受体。在一个实施方式中,Fc受体是人FcyRIIIa、FcyRI、FcyRIla和/或FcyRIlb。

[0223] 在一个实施方式中,根据本公开的分离的抗体或抗体片段包含变体人lgG1 Fc区,与野生型人lgG1 Fc区相比,其包含一个或多个氨基酸替换。在一个实施方式中,与野生型Fc区相比,一个或多个氨基酸替换减少或消除变体Fc区与Fc受体和/或C1q的结合和/或降低所述抗体诱导效应子功能的能力。

[0224] 根据本公开的分离的抗体或抗体片段可以与或可以不与一个或多个其他氨基酸残基、多肽或部分融合。这种融合蛋白可以以任何合适的方式制备,包括基因或化学方法。所述连接部分可以含有分泌或前导序列,有助于检测、表达、分离或纯化的序列,或赋予增加的蛋白质稳定性的序列(例如在重组生产过程中)。潜在部分的非限制性示例包括β-半乳糖苷酶、谷胱甘肽-S-转移酶、荧光素酶、T7聚合酶片段、分泌信号肽、抗体或抗体片段、毒素、报告酶、能够结合金属离子的部分如多组氨酸标签、适于检测和/或纯化的标签、同源或异源结合结构域、增加蛋白质溶解度的部分或包含酶促切割位点的部分。

[0225] 因此,根据本公开的分离的抗体或抗体片段可以任选地含有一个或多个用于结合其他靶标或感兴趣的靶标蛋白的部分。应该清楚的是,根据本公开,这样的另外的部分可以或可以不向抗体提供另外的功能,并且可以或可以不对分离的抗体或抗体片段的性质进行修饰。

[0226] 治疗方法

[0227] 根据本公开的分离的抗体或抗体片段可以用于治疗方法。根据本公开的抗体或抗体片段可以用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤和潜在的其他疾病。

[0228] 在一个实施方式中,该疾病与人CCR2中不期望的CCR2存在有关。在另一个实施方式中,该疾病与不期望的CCR2阳性细胞,特别是人CCR2阳性细胞的存在有关。人CCR2阳性细胞包括CD16阴性单核细胞、嗜碱性粒细胞和浆细胞样树突状细胞。此外,约20%的CD4+和CD8+T细胞表达CCR2。

[0229] 在一个实施方式中,待治疗的疾病是自身免疫性疾病或炎症性疾病。自身免疫性疾病或炎症性疾病的非限制性示例包括类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑病性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、I型糖尿病、格雷夫斯病、炎症性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)、溃疡性结肠炎(UC)、肠易激综合征、多发性硬化症(MS)、格林-巴利综合征、自身炎症性疾病如家族性地中海热(FMF)、隐热蛋白相关周期综合征(CAPS)、IL-1-受体拮抗剂缺乏(DIRA)、高IgD综合征(HIDS)、自身免疫性心肌炎、川崎病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、间质性肺病、自身免疫性甲状腺炎、硬皮病、系统性硬化症、骨关节炎、特应性皮炎、白癜风、移植物抗宿主病、干燥综合征、自身免疫肾炎、肺出血肾炎综合征、慢性炎症性脱髓鞘多发性神经病、ANCA相关性血管炎、葡萄膜炎、硬皮病、大疱性类天疱疮、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿舞蹈症、囊性纤维化、痛风、年龄相关性黄斑变性、过敏、哮喘、抗磷脂综合征(APS)、动脉粥样硬化、C3肾小球病和IgA肾病、缺血/再灌注损伤、腹膜炎、败血症和其他由急性或慢性炎症引起的自身免疫性疾病。

[0230] 在一个实施方式中,待治疗的疾病是增殖性疾病。在特别的实施方式中,疾病是癌症。癌症的非缓解性示例包括血液恶性肿瘤,如慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)、急性髓系白血病(AML)、骨髓增生异常综合征、肥大细胞增多症和非血液恶性肿瘤如膀胱癌、脑癌、头颈癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食管癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、血癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、骨癌、黑色素瘤、肾细胞癌和肾癌。

[0231] 在一个实施方式中,本公开提供了一种用于治疗疾病的方法。

[0232] 在一个实施方式中,本公开提供了一种用于治疗疾病的方法,包括向患者施用本公开的抗体或抗体片段。

[0233] 在一个实施方式中,本公开提供了一种用于治疗疾病的方法,包括向有此需要的受试者施用本公开的抗体或抗体片段。

[0234] 在一个实施方式中,本公开提供了一种用于预防疾病的方法。

[0235] 在一个实施方式中,本公开提供了一种用于预防疾病的方法,包括向受试者施用本公开的抗体或抗体片段。

[0236] 在一个实施方式中,本公开提供了用于治疗疾病的根据本公开的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开提供了在疾病治疗中使用的根据本公开的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开提供了用于治疗有此需要的受试者的疾病的根据本公开的分离的抗体或抗体片段。

[0237] 在一个实施方式中,本公开提供了根据本公开的分离的抗体或抗体片段用于制备药物的用途。在一个实施方式中,本公开提供了用作药物的根据本公开的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开提供了用于医学的根据本公开的分离的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开提供了用作用于治疗有此需要的受试者的药物的根据本公开的分离的抗体或抗体片段。

[0238] 在一个实施方式中,本公开提供了根据本公开的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段,用于治疗患有疾病的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的根据本公开的抗体或抗体片段。

[0239] 在一个实施方式中,该方法还包括向受试者施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂。需要治疗的受试者通常是哺乳动物,更具体为人类。为了在治疗方法中使用,根据本公开的分离的抗体或抗体片段将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。

[0240] 药物组合物

[0241] 在一个实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,其包含根据本公开的分离的抗体或抗体片段和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0242] 药物组合物可以进一步包含至少一种其他药物活性化合物。根据本公开的药物组合物可以用于诊断、预防和/或治疗与不期望的CCR2(特别是人CCR2)存在相关的疾病。根据本公开的药物组合物可以用于诊断、预防和/或治疗与不期望的CCR2阳性细胞(特别是人CCR2阳性细胞)存在相关的疾病。特别地,本公开提供了包含根据本公开的抗体或抗体片段的药物组合物,其适用于哺乳动物,更特别是人类的预防、治疗和/或诊断用途。

[0243] 通常,根据本公开的抗体或抗体片段可配制为药物组合物,其包含至少一种根据本公开抗体或抗体片段和至少一种药学上可接受的载体或赋形剂,以及任选的一种或多种另外的药学活性化合物。这种制剂可以适于口服、肠胃外、局部施用或通过吸入施用。因此,包含至少一种根据本公开的抗体或抗体片段的药物组合物可以肠胃外施用,例如静脉内、肌肉内或皮下施用。替代地,本发明的抗体可以通过非肠胃外途径施用,例如通过口服或局部施用。在优选的实施方式中,包含根据本公开的抗体或抗体片段的药物组合物通过静脉内或皮下施用。

[0244] 特别地,根据本公开的抗体或抗体片段可以与一种或多种药物活性化合物组合使用,所述药物活性化合物用于或可用于预防和/或治疗涉及感兴趣的靶抗原的疾病,其结果可获得或不可获得协同作用。此类化合物的示例以及它们的施用途径、方法和药物制剂或组合物对临床医生来说是清楚的。

[0245] 在一个实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,其包含根据本公开的抗体或抗体片段,用于预防和/或治疗与不期望的CCR2(特别是人CCR2)的存在相关的疾病。在一个实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,其包含根据本公开的抗体或抗体片段,用于预防和/或治疗与不期望的CCR2阳性细胞(特别是人CCR2阳性细胞)的存在相关的疾病。在一个实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,其包含用作药物的根据本公开的抗体或抗体片段。在一个实施方式中,本公开提供了包含根据本公开的抗体或抗体片段的药物组合物,其用于预防和/或治疗自身免疫性疾病和/或炎症性疾病和/或癌症。

[0246] 在一个实施方式中,本公开提供了一种使用包含根据本公开的抗体或抗体片段的药物组合物治疗有此需要的受试者的自身免疫性疾病和/或炎症性疾病和/或癌症的方法。

[0247] 进一步提供了一种以适合体内施用的形式生产根据本公开的抗体或抗体片段的方法,该方法包括(a)通过根据本公开的方法获得抗体或抗体片段,以及(b)用至少一种药学上可接受的载体或赋形剂配制所述抗体或抗体片断,由此制备用于体内施用的抗体或抗体片段的制剂。根据本公开的药物组合物包含溶解在药学上可接受的载体或赋形剂中的治疗有效量的一种或多种根据本公开的抗体或抗体片段。

[0248] 诊断用途

[0249] 在一个实施方式中,本公开提供了根据本公开的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段用于诊断疾病的用途。在一个实施方式中,本公开提供了根据本公开的抗体或抗体片段用于检测CCR2(特别是人CCR2和/或狨猴CCR2)的用途。在一个实施方式中,本公开提供了一种用于检测受试者或样品中CCR2的方法,包括使所述受试者或样品与本公开的对人CCR2特异的分离的抗体或抗体片段接触的步骤。在一个实施方式中,本公开提供了一种用于诊断受试者中疾病的方法,包括使所述受试者或样品与根据本公开的分离的抗体或抗体片段接触的步骤。抗体也可用于测定来自患者的细胞中CCR2的表达水平。CCR2表达水平可以充当治疗生物标志物,例如用于患者分层。

[0250] 实施例

[0251] 实施例1:使用杂交瘤技术产生抗CCR2抗体

[0252] 使用经典杂交瘤技术产生抗CCR2抗体。简言之,用稳定转染有人CCR2b的1000万个CHO细胞以4周时间间隔免疫BALB/c小鼠6次。将脾细胞与X63Ag8骨髓瘤细胞融合,并筛选杂交瘤以与CCR2转染的CHO细胞特异性结合且不与CCR5转染的CHO细胞结合。通过有限稀释技术克隆和重新克隆杂交瘤。

[0253] 鉴定和表征几种抗CCR2抗体,包括抗体Y4T3、Y2T63和Y1T2。

[0254] 实施例2:人CCR2的特异性和与CCR5无交叉反应性

[0255] 测试杂交瘤抗体与转染的CHO细胞中表达的人CCR2的结合。作为对照,CHO细胞也用人CCR5转染。作为另一对照,还测试抗CCR5抗体MC-1(Mol Biol Cell.2002年2月;13(2):723-737,内部生产)与转染的CHO细胞的结合。以10μg/ml和1μg/ml的浓度测试抗体,并与细胞在冰上孵育45分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE标记的多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白抗体(来自Agilent Dako的R0439,在PBS中以1:200稀释)在冰上检测结合的抗体30分钟。在两个用PBS的洗涤步骤后,通过流式细胞术分析细胞。测定PE的平均荧光强度,并对其进行描述。

[0256] 示例性抗体Y4T3的结果如图1所示。抗CCR2抗体Y4T3对人CCR2是特异的,但未显示

出与人CCR5的任何结合。抗CCR5抗体MC-1对人CCR5是特异的,但未显示出与人CCR2的任何结合。

[0257] 实施例3:与人单核细胞结合

[0258] 为了发挥其功能作用,本发明的抗体需要与人单核细胞上表达的CCR2结合。测量与CD16阳性和CD16阴性单核细胞的结合。将60μl的肝素锂抗凝的人全血与PBS中指示浓度的指示抗体在冰上孵育45分钟。在三个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE标记的多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白抗体(来自Agilent Dako的R0439,在PBS中以1:200稀释)在冰上检测结合的抗体30分钟。在三个用PBS的洗涤步骤后,加入10%的小鼠血清并在冰上孵育10分钟。在不进一步洗涤的情况下,在30分钟内在冰上加入直接标记的抗CD3、CD8、CD4、CD123、CD304、CD116和CD16的抗体。在2个用0.9%的NaCl的洗涤步骤后,用裂解溶液(BDBioscience)在黑暗中裂解红细胞10分钟。用PBS将细胞洗涤一次,并通过流式细胞术分析以鉴定CD16阳性和CD16阴性单核细胞。测定这些细胞群的PE的平均荧光强度,并对其进行描述。CCR2仅在CD16阴性单核细胞中表达,而在CD-16阳性单核细胞中不表达。还测试了另外两种抗CCR2抗体:1D9(先前由Millennium(BDBioscience)开发的MLN1202的亲本抗体)和克隆48607(商购抗CCR2抗体)(R&D Systems;目录号:MAB150)。

[0259] 结果如图2所示。示例性抗体Y4T3与CD16阴性单核细胞反应,但不与CD16阳性单核细胞结合。此外,对照抗体1D9和克隆48607显示与CD16阴性单核细胞结合,但不与CD16阳性单核细胞结合。然而,Y4T3的结合明显强于1D9和克隆48607的结合。

[0260] 实施例4:与狨猴单核细胞结合

[0261] 狨猴是一种已建立的动物模型。因此,与狨猴CCR2的结合是非常希望的。

[0262] 测量与CD16阳性和CD16阴性狨猴单核细胞的结合。DOC-3是一种对狨猴CCR2具有已知反应性的抗CCR2抗体(WO2007/115713),用作对照。将狨猴脾细胞与PBS中指示浓度的指示抗体在冰上孵育30分钟。在三个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE标记的多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白抗体(来自Agilent Dako的R0439,在PBS中以1:200稀释)在冰上检测结合的抗体30分钟。在三个用PBS的洗涤步骤后,加入10%的小鼠血清并在冰上孵育10分钟。在不进一步洗涤的情况下,在20分钟内在冰上加入直接标记的抗CD14、CD11b、CD16和CD20的抗体。在2个用0.9%的NaCl的洗涤步骤后,用裂解溶液(BDBioscience)在黑暗中裂解红细胞10分钟。用PBS将细胞洗涤一次,并通过流式细胞术分析以鉴定CD16阳性和CD16阴性单核细胞。测定这些细胞群的PE的平均荧光强度,并对其进行描述。

[0263] 结果如图3所示。示例性抗体DOC-3和Y4T3证明与CD16阴性狨猴单核细胞结合,但不与CD16阳性狨猴单核细胞结合。抗体Y1T2和Y2T63既不与CD16阴性单核细胞结合,也不与CD16阳性狨猴单核细胞相结合。

[0264] 抗体Y4T3不与食蟹猴的CCR2结合(数据未示出)。食蟹猴、恒河猴和Janaver的CCR2在细胞外区域具有相同的氨基酸序列。

[0265] 实施例5:Y4T3与人CCR2的ECL2结构域的结合

[0266] 为了进一步研究本发明抗体的特异性,测试Y4T3与各种CCR2构建体的结合。还测试了抗体1D9和克隆48607(见上文)。用表1中所示的CCR2构建体稳定地转染CHO细胞。还分析了未转染的CHO细胞(空的)。抗体以10μg/ml的浓度进行测试,并与细胞在冰上孵育30分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE标记的多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白抗体(来自

Agilent Dako的R0439,在PBS中以1:200稀释)在冰上检测结合的抗体30分钟。在两个用PBS的洗涤步骤后,通过流式细胞术分析细胞。在细胞上测定PE的平均荧光强度,并对其进行描述。

[0267] 测试了以下结构:

[0268] 表1:

[0269]

| 构建体 | SEQ ID No. |
|---|---|
| 人CCR2b(hCCR2b) | 1 |
| 狨猴CCR2b(Marmo-CCR2b) | 3 |
| 恒河猴CCR2b(rh-CCR2B) | 4 |
| 具有恒河猴CCR2b的ECL2结构域(ECL2-hCCR2b)的人CCR2b | 7 |
| 具有恒河猴CCR2b的ECL3结构域(ECL2-hCCR2b)的人CCR2b | 8 |
| 具有恒河猴CCR2b的N末端(ECL2-hCCR2b)的人CCR2b | 9 |

[0270] 结果如图4所示。抗体Y4T3确实与人CCR2b和狨猴CCR2b结合,但不与恒河猴CCR2b结合。抗体Y4T3也确实与人CCR2b变体结合(其中ECL3结构域被恒河猴CCR2b的ECL3结构域取代),并与人CCR2b变体结合(其中CCR2b的N末端被恒河猴CCR2b的N末端取代)。抗体Y4T3不再与人CCR2b变体结合,其中ECL2结构域被恒河猴CCR2b的ECL2结构域取代。因此,ECL2结构域含有对Y4T3的结合至关重要的氨基酸残基。相反,抗体1D9和克隆48607也显示出与恒河猴CCR2b的反应性。

[0271] 实施例6:MCP-1诱导的人单核细胞表面的CCR2的下调导致Y4T3与人单核细胞的结合减少

[0272] 为了研究当CCR2被MCP-1从细胞表面下调时Y4T3与人单核细胞的结合是否减少,进行了以下实验。将人PBMC与不同浓度的人MCP-1(Peprotec)在37℃下预孵育30分钟。此后,将细胞冷却至4℃,并在30分钟内在冰上以10μg/ml添加Y4T3。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE标记的多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白抗体(来自Agilent Dako的R0439,在PBS中以1:200稀释)在冰上检测结合的抗体30分钟。在两个用PBS的洗涤步骤后,通过流式细胞术分析细胞,并通过光散射特性鉴定单核细胞。PE的平均荧光强度在单核细胞上测定,如所描绘的。

[0273] 结果如图5所示。在浓度为2μg/ml的MCP-1下,使用Y4T3获得的表面CCR2信号损失了大于70%。当使用较低浓度的MCP-1时,表面CCR2信号恢复。

[0274] 该实验证明Y4T3与可以被MCP-1下调的表面分子结合。

[0275] 实施例7:用于人源化的候选抗体的选择

[0276] 基于迄今为止获得的实验数据,选择了用于人源化的候选抗体。前导抗体性质的概述如下表所示。

[0277] 表2:

[0278]

| 性质 | Y4T3 | Y2T63 | Y1T2 |
|---|---|---|---|
| 同种型 | 小鼠 BALB/c | 小鼠 BALB/c | 小鼠 BBALB/c |

[0279]

| | IgG1 κ | IgG1 κ | IgG2a κ |
|---|---|---|---|
| 对人PBMC上表达的CCR2的亲和力 | 优异 | 良好 | 良好 |
| 对狨猴 PBMC 上表达的 CCR2 的亲和力 | 优异 | 无结合 | 无结合 |
| 对 Janaver 单核细胞上表达的 CCR2 的亲和力 | 无结合 | 培养基 | 良好 |
| 与人 CCR5 结合 | 无结合 | 无结合 | 无结合 |
| 结合结构域 | ECL2 | 未测试 | 未测试 |
| 阻断 MCP-1 诱导的人 PBMC 上 CCR2 的下调 | 是 | 未测试 | 未测试 |

[0280] 基于现有的实验数据,选择抗体Y4T3进行人源化。标准包括粘合剂对人PBMC上CCR2的亲和力高,以及粘合剂对狨猴CCR2的优异交叉反应性。

[0281] 实施例8:Y4T3的人源化

[0282] 通过CDR接枝使Y4T3人源化,得到hY4T3。使用BLAST搜索算法搜索人IgG序列和人种系序列的数据库,以与鼠VH结构域和VL结构域以及选自前200个BLAST结果的候选人类可变结构域进行比较。基于框架同源性、保持关键框架残基和规范环结构的组合,这些被减少到VH的五个候选(HC1-HC5或H1-H5)和VL的五个候选(LC1-LC5或L1-L5)。总共产生了25种Y4T3的人源化变体。通过流式细胞术测试人源化Y4T3变体与人全血中的人CCR2+单核细胞的结合。将60μl的肝素锂抗凝的人全血与PBS中浓度为0.5μg/ml的指示抗体在冰上孵育45分钟。在三个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE-F(ab)2山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-116-098)以及直接标记的抗CD8、CD4、CD123和CD116的抗体检测结合的抗体。在2个用0.9%的NaCl的洗涤步骤后,用裂解溶液(BDBioscience)在黑暗中裂解红细胞10分钟。用PBS将细胞洗涤一次,并通过流式细胞术分析以鉴定包括单核细胞的各种细胞类型上的CCR2表达。测定这些细胞群的PE的平均荧光强度(MFI),并对其进行描述。

[0283] 结果如图6所示。大多数粘合剂能够与人单核细胞上表达的CCR2结合。

[0284] 所选择的粘合剂H3L1显示出对CCR2阳性单核细胞以及其他CCR2阳性细胞如嗜碱性粒细胞、pDC和T细胞的优越结合。所选择的粘合剂被称为hY4T3。

[0285] 实施例9:Y4T3和hY4T3的序列测定。

[0286] 通过标准测序技术测定Y4T3和hY4T3的序列。

[0287] 根据Kabat和根据IMGT命名法的可变重链和可变轻链,以及CDR区如下表所示

[0288] 表3:

[0289]

| SEQ ID No. | 描述 | 序列 |
|---|---|---|
| 24 | Y4T3 VH | MERHWIFLLLLSVTAGVHSQVHLQQSGTELARPGASIKLS CKTSGSTFTRYTMHWIKQRPGQGLEWIGFIVPSTGYTKYN QKFKDKATLTADKSSSTAYMHLNSLTSEDSALYYCARNKE VDYGASWGQGTLVTVSA |
| 25 | Y4T3 VL | MSPAQFLFLLVLWIRVSEINGDVVMTQSPLTLSVTIGQPASI SCKSSQSLLDSDGRTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDS GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGSHFPQ TFGGGTKLEIK |
| 22 | hY4T3 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSTFTRYTMHWVR QAPGQRLEWIGFIVPSTGYTKYNQKFKDRVTITRDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARNKEVDYGASWGQGTLVTV SS |
| 23 | hY4T3 VL | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGRTYLNW |

[0290]

| | | |
|---|---|---|
| | | FQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIT RVEAEDVGVYYCWQGSHFPQTFGQGTKVEIK |
| 10 | hY4T3 HCDR1 Kabat | RYTMH |
| 11 | hY4T3 HCDR2 Kabat | FIVPSTGYTKYNQKFKD |
| 12 | hY4T3 HCDR3 Kabat | NKEVDYGAS |
| 13 | hY4T3 LCDR1 Kabat | KSSQSLLDSDGRTYLN |
| 14 | hY4T3 LCDR2 Kabat | LVSKLDS |
| 15 | hY4T3 LCDR3 Kabat | WQGSHFPQT |
| 16 | hY4T3 HCDR1 IMGT | GSTFTRYT |
| 17 | hY4T3 HCDR2 IMGT | IVPSTGYT |
| 18 | hY4T3 HCDR3 IMGT | ARNKEVDYGAS |
| 19 | hY4T3 LCDR1 IMGT | QSLLDSDGRTY |
| 20 | hY4T3 LCDR2 IMGT | LVS |
| 21 | hY4T3 LCDR3 IMGT | WQGSHFPQT |

[0291] 最接近hY4T3可变重链的种系是IGHV1-3*01。最接近hY4T3可变轻链的种系基因是IGKV2-30*01。参见表4。

[0292] 表4：

[0293]

| SEQ ID No. | 描述 | 序列 |
|---|---|---|
| 26 | IGHV1-3*01 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAM HWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR |
| 27 | IGKV2-30*01 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNT YLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP |

[0294] 与最接近的种系序列相比，hY4T3的可变重链相差一个氨基酸。在框架区域2中，蛋

氨酸残基被异亮氨酸残基取代以减少氧化。类似地,在可变轻链的框架区3中,丝氨酸残基被苏氨酸残基取代。

[0295] 实施例10:hY4T3与CCR2+人单核细胞结合

[0296] 用人PBMC通过流式细胞术检测hY4T3与CCR2+人单核细胞的结合。将人PBMC与PBS中的各种浓度的hY4T3在冰上孵育30分钟。在三个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE-F(ab)2山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-116-098)检测结合的抗体。在3个用PBS的洗涤步骤后,在10分钟内在冰上加入5%小鼠和5%大鼠血清。在不洗涤的情况下,加入直接标记的抗CD20、CD14、CD11b、CD16的抗体。在2个用0.9%的NaCl的洗涤步骤后,用裂解溶液(BDBioscience)在黑暗中裂解红细胞10分钟。用PBS将细胞洗涤一次,并通过流式细胞术分析以鉴定单核细胞上的CCR2表达。测定并描述PE的平均荧光强度(MFI)。hY4T3保留了与人单核细胞结合的性质。结果如图7所示。

[0297] 实施例11:hY4T3与CCR2+狨猴单核细胞结合

[0298] 如实施例10中所述,用狨猴脾细胞测试hY4T3与CCR2+狨猴单核细胞的结合。hY4T3保留了与狨猴单核细胞结合的性质。结果如图8所示。

[0299] 实施例12:hY4T3不与转染的CHO细胞中表达的CCR5结合

[0300] 与Y4T3一样,Y4T3的人IgG1嵌合变体(Y4T3-chim)和hY4T3也不与用人CCR5转染的CHO细胞结合。Y4T3-chim和hY4T3确实与用人CCR2转染的CHO细胞结合。以10μg/ml和1μg/ml的浓度测试抗体,并与细胞在冰上孵育45分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE-F(ab)2山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-116-098)在冰上检测结合的抗体30分钟。在两个用PBS的洗涤步骤后,通过流式细胞术分析细胞。测定PE的平均荧光强度(MFI),并对其进行描述。结果如图9所示。

[0301] 实施例13:hY4T3阻断MCP-1诱导的白细胞中CCR2的下调

[0302] 为了研究hY4T3的功能活性,在不同的白细胞亚群中测量MCP-1诱导的CCR2的下调。测试了嗜碱性粒细胞、浆细胞样树突状细胞和CD16低单核细胞。

[0303] 细胞首先与hY4T3、MCP-1或培养基(RPMI)在37℃下以不同浓度孵育30分钟。此后,加入MCP-1、hY4T3或RPMI,然后在37℃下再次孵育30分钟。在第一和第二孵育步骤之间不洗涤细胞。在第二孵育后,用PBS将细胞洗涤3次。用PE-F(ab)2山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-116-098)以及直接标记的抗CD3、CD8、CD4、CD123、CD304、CD116和CD16的抗体检测表面结合抗体。在2个用0.9%的NaCl的洗涤步骤后,用裂解溶液(BDBioscience)在黑暗中裂解红细胞10分钟。用PBS将细胞洗涤一次,并通过流式细胞术分析以鉴定包括嗜碱性粒细胞、浆细胞样树突状细胞和CD16低单核细胞的各种细胞类型上的CCR2表达。测定这些细胞群的PE的平均荧光强度(MFI),并对其进行描述。

[0304] 结果如图10所示。与MCP-1预孵育导致hY4T3与CCR2的结合以剂量依赖性方式降低。当细胞首次与hY4T3孵育时,结合强度几乎不受随后与MCP-1孵育的影响。

[0305] 这表明hY4T3阻断白细胞中MCP-1诱导的CCR2的下调,表明hY4T3阻断MCP-1对CCCR2的激活。

[0306] 实施例14:hY4T3处理狨猴中的细胞耗竭

[0307] 在时间点0,通过缓慢静脉注射5mg/kg的hY4T3治疗狨猴。在治疗前和治疗后的不同时间点,通过流式细胞术分析全血。用EDTA抗凝的全血在冰上与PBS中的3μg/ml的hY4T3

孵育30分钟。在三个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE-F(ab)2山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-116-098)以及直接标记的抗CD3、CD20、CD14、CD11b和CD16的抗体检测结合的抗体。在2个用0.9%的NaCl的洗涤步骤后,用裂解溶液(BDBioscience)在黑暗中裂解红细胞10分钟。用PBS将细胞洗涤一次,并通过流式细胞术分析以鉴定各种细胞群。实验使用三只猴子进行。

[0308] 一只猴子的代表性结果如图11所示。CD3阳性细胞、CD3阳性/CCR2阳性细胞、CD16阳性NK细胞和浆细胞样树突状细胞(pDC)的百分比没有显著变化。B细胞的比例在用hY4T3治疗后增加,但在第23天回落到原始水平(即治疗前水平)。嗜碱性粒细胞的数量在用hY4T3治疗后强烈减少,但在治疗后约1-2周时恢复到原始水平。对于CD16阴性单核细胞观察到了相同的模式,其在用hY4T3治疗后强烈减少。治疗后约2周,数字又恢复到原始水平。

[0309] 这表明本公开的抗体和抗体片段可用于治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤和可能与CCR2表达相关的其他疾病。

[0310] 实施例15:可开发性-hY4T3具有良好的温度稳定性

[0311] 为了测试hY4T3是否具有指示成功临床开发的熔点,使用Microcal VP-DSC(Malvern)通过差示扫描量热法测量熔点。8.44mg/ml的hY4T3在PBS加100mM的L-精氨酸中的溶液的温度以1℃/分钟的速度从25℃升高到130℃。

[0312] CH2结构域的熔点测定为70.9℃(Tm1)。Fab结构域和CH3结构域的熔点为75.1℃(Tm2)。分子的完全熔化发生在82.5℃(Tm3)。

[0313] 通过分析级尺寸排阻色谱法(SEC)进一步研究hY4T3的稳定性。将8.44mg/ml的hY4T3在PBS加100mM的L-精氨酸的溶液分别在55℃、65℃或75℃下孵育3小时,然后使用Superdex 200Increase进行分析SEC,并在280nm下进行蛋白质光度检测。结果如图12所示。hY4T3在55℃下孵育3小时的SEC模式与参考(即抗体保持在4℃)无法区分。在65℃下孵育3小时后,由于产生不溶性变性蛋白质,大于50%的信号丢失。hY4T3在75℃下孵育3小时,由于产生不溶性变性蛋白,大部分抗体丢失。几乎没有裂解产物或可溶性聚集体。

[0314] 同样检查hY4T3与CHO细胞上CCR2的结合。将8.44mg/ml的hY4T3在PBS溶液加100mM的L-精氨酸的溶液分别在55℃、65℃和75℃下孵育2小时。然后如上所述测试抗体制剂与CHO细胞上的CCR2的结合。结果如图13所示。hY4T3在55℃下孵育2小时,与CHO细胞的结合程度与参考相同,即抗体保持在4℃。在65℃下孵育2小时后,观察到轻微的结合损失。hY4T3在75℃下孵育2小时导致结合损失。

[0315] hY4T3在PBS和血清中在各种抗体浓度(0.015625μg/ml、0.0625μg/ml、0.25μg/ml和1μg/ml)下,在37℃下也稳定至少14天(测试的最长时间点)(数据未示出)。这些数据表明hY4T3的熔点非常有利,支持了成功的临床开发。抗体在55℃下稳定至少2小时。

[0316] 实施例16:可开发性-hY4T3具有良好的冻融稳定性

[0317] 为了测试hY4T3对反复冻融的行为,对hY4T3(8,44mg/ml在PBS与100mM的L-精氨酸混合物中)进行反复冻融循环。在十个冻融循环后,对样品进行SEC,与参考相比,没有观察到差异(数据未示出)。

[0318] 在各种冻融循环后,还测试hY4T3样品(8,44mg/ml在PBS与100mM的L-精氨酸混合物中)与CHO细胞上的CCR2的结合。结果如图14所示。在长达10个冻融循环后,制剂显示出与CHO细胞上表达的CCR2的结合没有损失。

[0319] 这些数据进一步表明hY4T3是稳定的,支持成功的临床开发。

[0320] 实施例17:可开发性-hY4T3在宽pH范围内稳定

[0321] 为了测试hY4T3在各种pH范围下的行为,在各种pH的缓冲液中以各种抗体浓度将hY4T3孵育两小时。

[0322] 为此,将8.44mg/ml的hY4T3在PBS加100mM的L-精氨酸中的溶液用水以1:5溶解,并用HCl/NaOH将pH调节至所需值。然后将样品在室温下孵育2小时,然后用HCl/NaOH将pH重新调节至7.2。

[0323] 使用不同浓度的pH暴露的抗体测量样品与CHO细胞上表达的CCR2的结合。结果如图15所示。

[0324] 与参考样品(pH 6,82)相比,孵育到低至2的pH对与CHO细胞上表达的CCR2的结合没有影响。在pH=9下孵育显示出轻微的结合损失。

[0325] 同样,这些数据表明hY4T3即使在非常低的pH下也是高度稳定的,再次有力地支持了成功的临床开发。抗体在pH3.0和22℃下稳定至少2小时。

[0326] 实施例18:可开发性-hY4T3在血浆中稳定

[0327] 为了测试hY4T3在血浆中的行为,进行了各种实验。hY4T3在PBS和人血浆中以不同浓度孵育48小时、7天和14天。

[0328] 为此,将23.7μl的hY4T3(8.44mg/ml在PBS与100mM的Ll-精氨酸中)与176.3μl的PBS或人肝素锂血浆(1mg/ml)混合,并在37℃下孵育0小时、48小时或14天。此后,使用不同浓度的暴露抗体测量样品与CHO细胞上表达的CCR2的结合。结果如图16所示。

[0329] 与CHO细胞上表达的CCR2的结合不依赖于孵育的时间间隔。在PBS中孵育和在人血浆中孵育之间也没有差异。

[0330] 该实验进一步证实了hY4T3的有利的生物化学性质。

[0331] 实施例19:与现有技术抗体的比较

[0332] 将抗体Y4T3与现有技术的抗体DOC2、1D9(BDBioscience)和克隆48607(R&D Systems;目录号:MAB150)比较。DOC-2抗体具有以下氨基酸序列:

[0333] VH:

[0334] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCVASGFTLSNYAMSWVRQSPEKRLEWV

[0335] AEVSSSGIYIYYSDTVTGRFSISRDNAKNTLYLEMSSLRSEDTAIYYCAR

[0336] DRYAYAMDYWGHGTSVIVSS

[0337] (SEQ ID No.28)

[0338] VL:

[0339] DIVMTQSPSSLAISVGQRVTLSCKSSQSLLNSYNQKNSLAWYQQKPGQS

[0340] PKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTYFTLTITSVQAGDLADYFCQQHY

[0341] SNPRTFGGGTRLEIK

[0342] (SEQ ID No.29)

[0343] 将人肝素化全血与指示的抗体在冰上孵育45分钟,用冷PBS洗涤三次,然后用第二PE标记的兔抗小鼠Ig(R0439,DakoCytomation 1:200)在冰上染色30分钟,用冷PBS洗涤3次。在10分钟内加入10%小鼠血清,然后直接标记的抗CD3-APCCy7、CD8-PE-Cy7、CD4-V500、CD123-PerCP、CD304-APC、CD116-FITC、CD16-PB的抗体。在用BD裂解溶液洗涤和裂解红细胞

后,在FACSCanto-II上采集细胞并通过FACS-DIVA软件进行分析。通过光散射性质、CD116的表达以及CD16和CD123的缺失来鉴定经典单核细胞。描绘了经典单核细胞上PE的中值荧光强度。

[0344] 结果如图17所示。Y3T3的亲和力比测试的现有技术抗体的亲和力高出5倍以上。

[0345] 实施例20:hY4T3不与小鼠CCR2交叉反应

[0346] 用PBS或各种浓度的MC-21(针对小鼠CCR2的大鼠单克隆抗体;雷根斯堡大学(University of Regensburg))在冰上孵育小鼠CCR2 CHO细胞和人CCR2 CHO细胞45分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,用生物素抗大鼠IgG2b抗体(5μg/ml;BD克隆RG7/11.1,目录号553898)在冰上对细胞染色30分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,用链霉亲和素-PE(1:100)在冰上将细胞染色30分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,通过FACS分析细胞以测量平均荧光强度(MFI)。

[0347] 将小鼠CCR2 CHO细胞和人CCR2 CHO细胞在冰上与PBS或各种浓度的hY4T3孵育45分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,用PE-F(ab)2山羊抗人IgG(1:300;Jackson,目录号109-116-098)在冰上将细胞染色30分钟。在3个用冷PBS的洗涤步骤后,通过FACS分析细胞以测量平均荧光强度(MFI)。

[0348] 结果如图18所示。hY4T3不与小鼠CCR2结合。MC-21不与人CCR2结合。

[0349] 实施例21:hY4T3的拮抗作用,有效阻断趋化因子受体CCR2

[0350] PathHunter® eXpress CCR2CHO-K1β-抑制蛋白GPCR测定法(DiscoverX;目录号93-0192E2CP0M)用于按照制造商方案评估hY4T3的拮抗活性。将试剂盒中的CCR2 CHO K1β-抑制蛋白GPCR细胞解冻、接种并在37℃和5%$CO_2$下孵育48小时。孵育后,制备不同浓度的CCL2(MCP-1)、hY4T3、用固定浓度的CCL2(EC20、EC50和EC80)预孵育30分钟的hY4T3或用抗IgG抗体(Biorad;#MCA5748G)预孵育30分钟的hY4T3,并将其添加到细胞中。在37℃和5%$CO_2$下孵育90分钟后,将检测试剂添加到平板中,60分钟后在Envision酶标仪上测量发光。

[0351] 结果如图19所示。该实验证明hY4T3是一种在任何测试条件下都没有激动活性的强效CCR2拮抗剂。

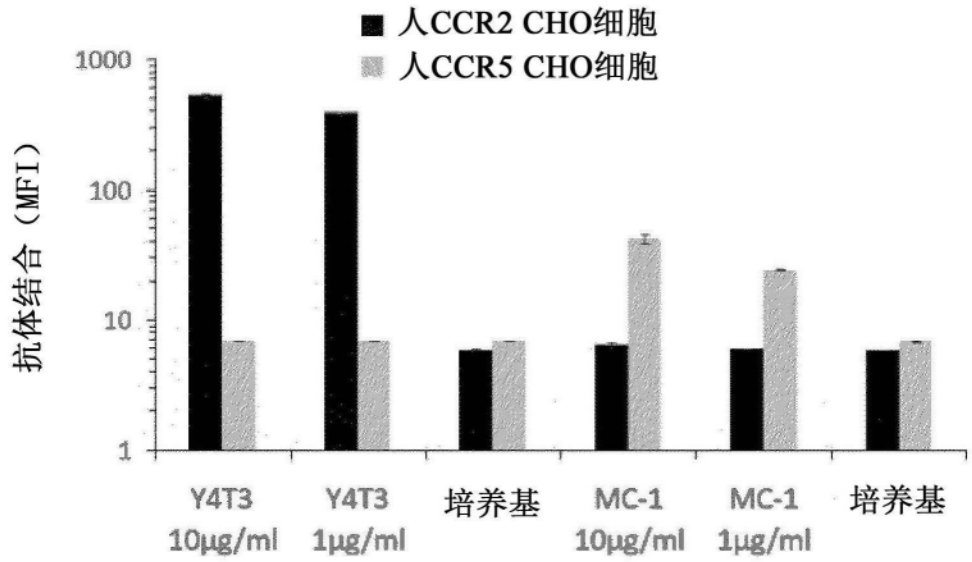

人CCR2 CHO细胞
人CCR5 CHO细胞
抗体结合（MFI）
1000
100
10
1
Y4T3 10μg/ml
Y4T3 1μg/ml
培养基
MC-1 10μg/ml
MC-1 1μg/ml
培养基

图1

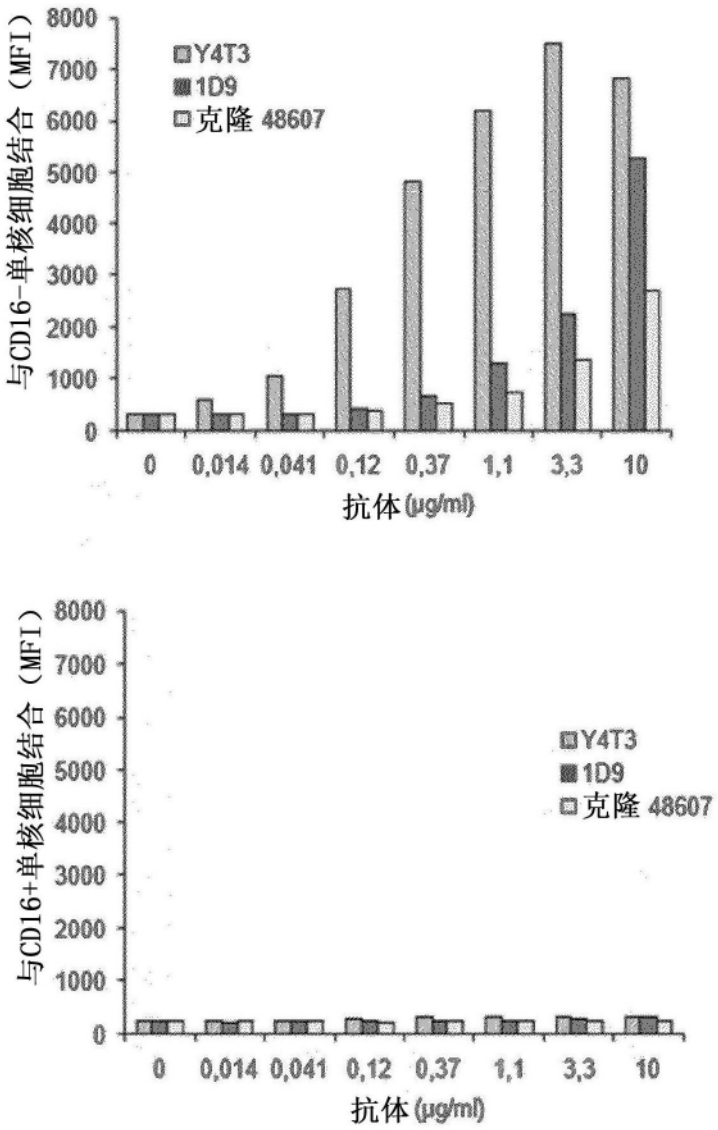

与CD16-单核细胞结合（MFI）
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Y4T3
1D9
克隆 48607
0
0,014
0,041
0,12
0,37
1,1
3,3
10
抗体(μg/ml)
与CD16+单核细胞结合（MFI）
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Y4T3
1D9
克隆 48607
0
0,014
0,041
0,12
0,37
1,1
3,3
10
抗体(μg/ml)

图2

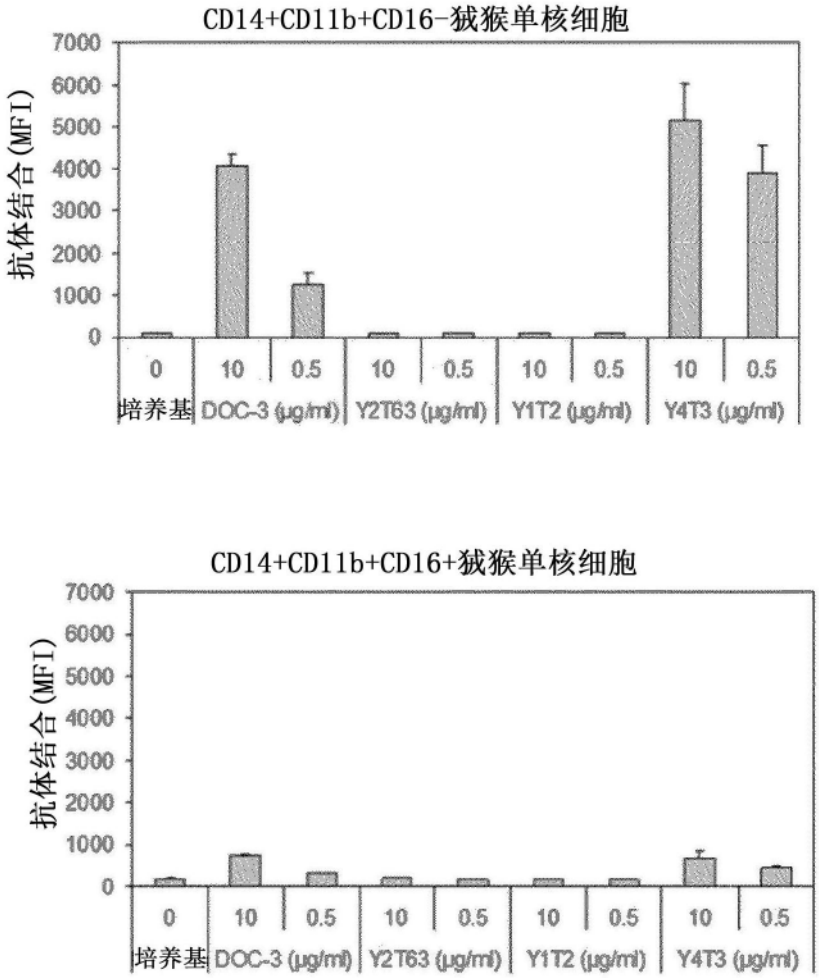

CD14+CD11b+CD16-猕猴单核细胞
抗体结合(MFI)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
0.5
10
0.5
10
0.5
10
0.5
培养基
DOC-3 (μg/ml)
Y2T63 (μg/ml)
Y1T2 (μg/ml)
Y4T3 (μg/ml)
CD14+CD11b+CD16+猕猴单核细胞
抗体结合(MFI)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
0.5
10
0.5
10
0.5
10
0.5
培养基
DOC-3 (μg/ml)
Y2T63 (μg/ml)
Y1T2 (μg/ml)
Y4T3 (μg/ml)

图3

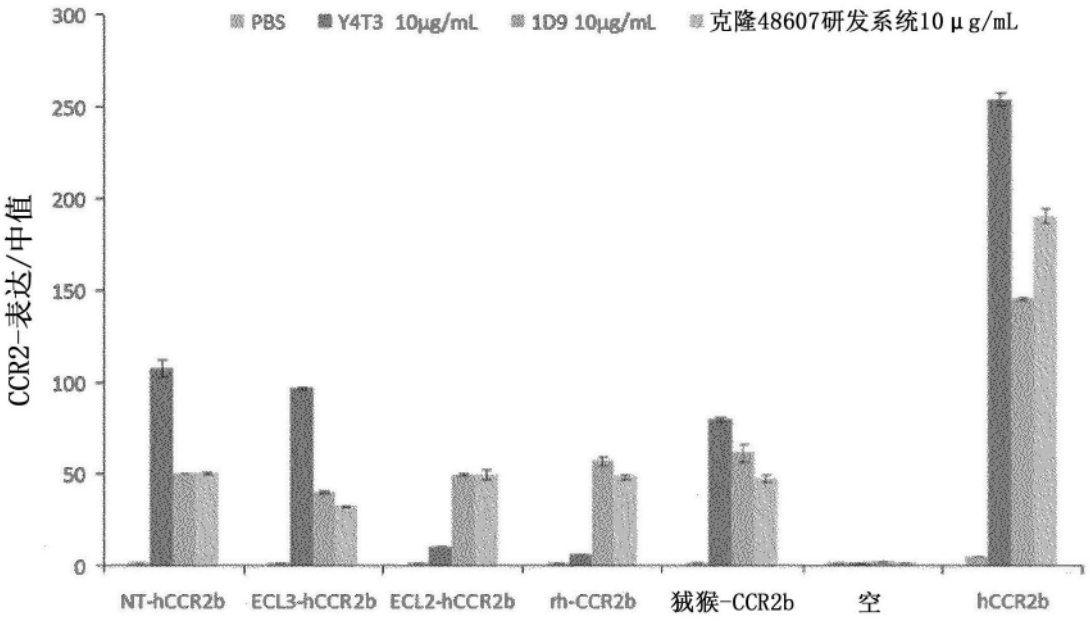

PBS
Y4T3 10μg/mL
1D9 10μg/mL
克隆48607研发系统10μg/mL
CCR2-表达/中值
300
250
200
150
100
50
0
NT-hCCR2b
ECL3-hCCR2b
ECL2-hCCR2b
rh-CCR2b
狨猴-CCR2b
空
hCCR2b

图4

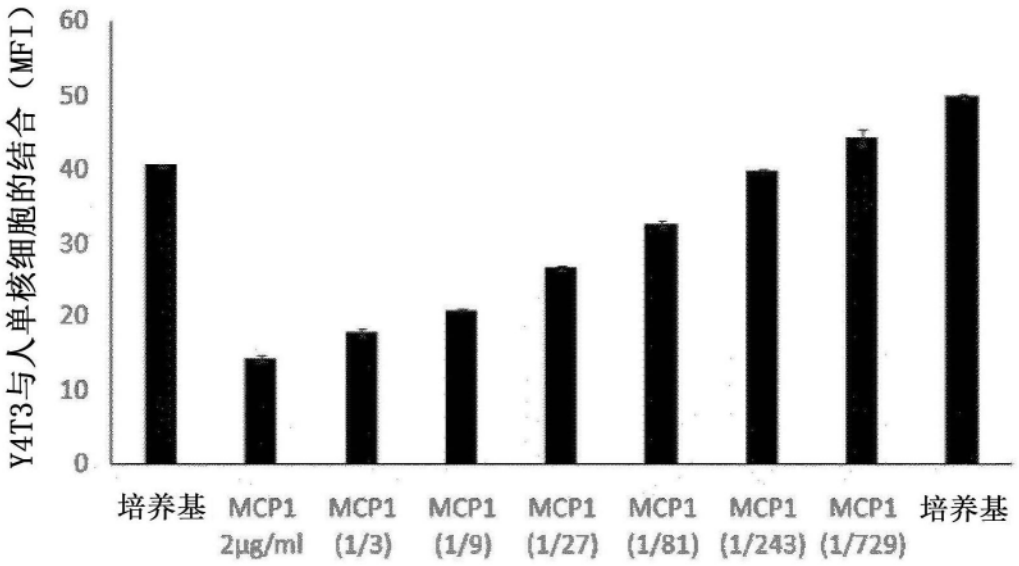

Y4T3与人单核细胞的结合（MFI）
60
50
40
30
20
10
0
培养基
MCP1 2μg/ml
MCP1 (1/3)
MCP1 (1/9)
MCP1 (1/27)
MCP1 (1/81)
MCP1 (1/243)
MCP1 (1/729)
培养基

图5

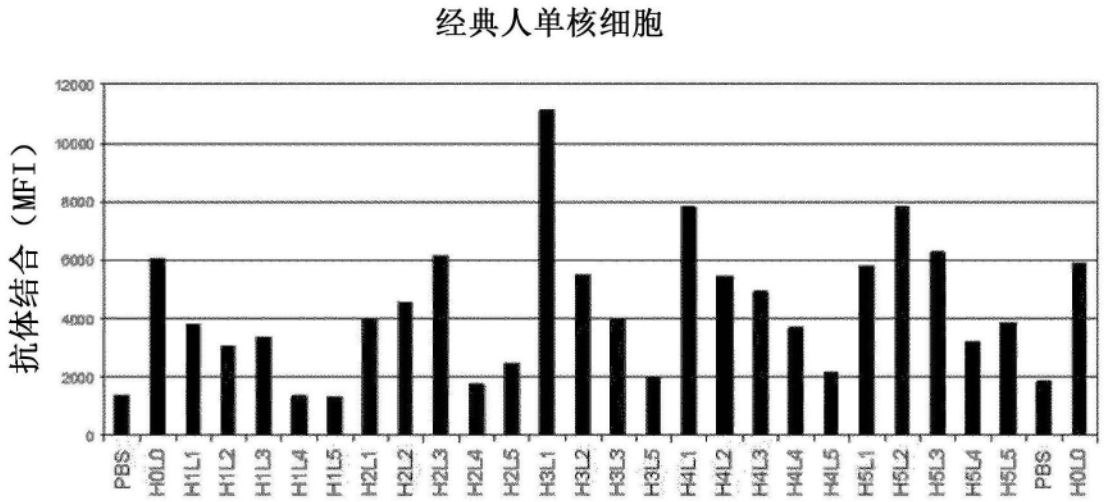

经典人单核细胞
抗体结合（MFI）
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
PBS
H0L0
H1L1
H1L2
H1L3
H1L4
H1L5
H2L1
H2L2
H2L3
H2L4
H2L5
H3L1
H3L2
H3L3
H3L5
H4L1
H4L2
H4L3
H4L4
H4L5
H5L1
H5L2
H5L3
H5L4
H5L5
PBS
H0L0

图6

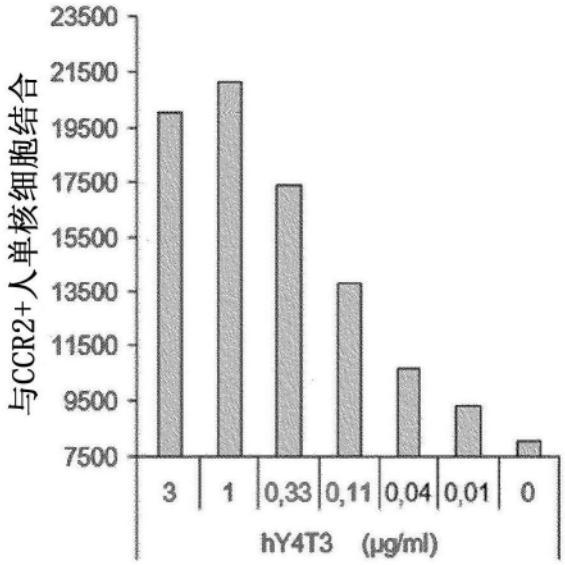

与CCR2+人单核细胞结合
23500
21500
19500
17500
15500
13500
11500
9500
7500
3
1
0,33
0,11
0,04
0,01
0
hY4T3 (μg/ml)

图7

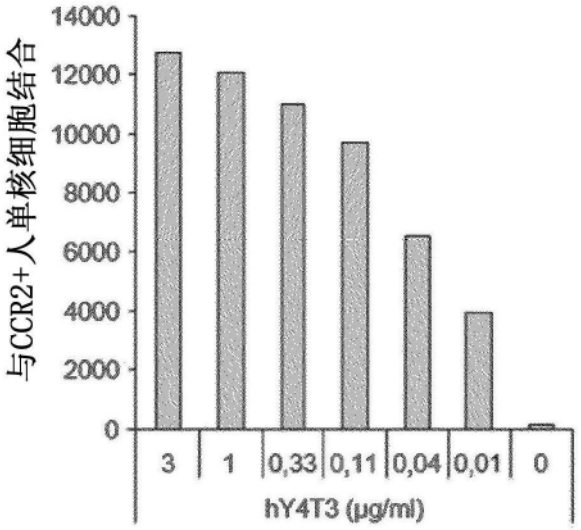

与CCR2+人单核细胞结合
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
3
1
0,33
0,11
0,04
0,01
0
hY4T3 (μg/ml)

图8

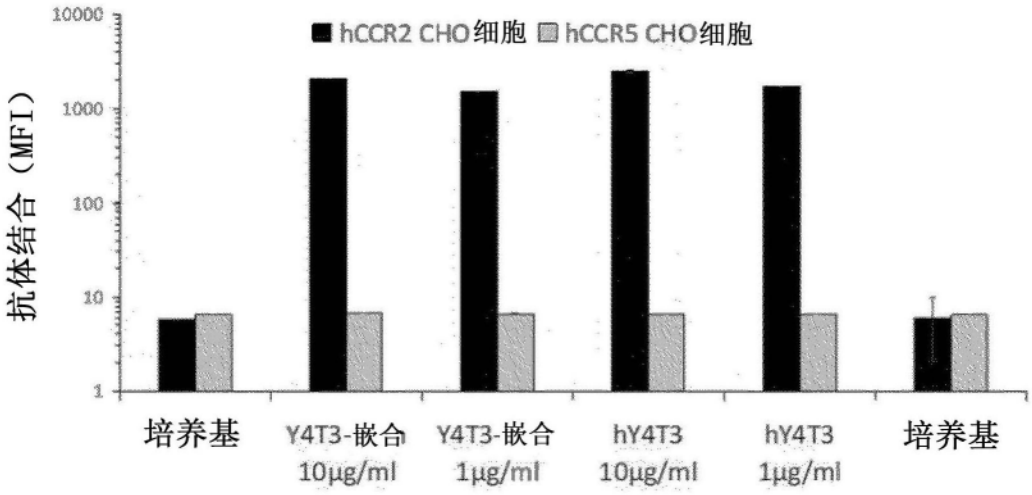

抗体结合（MFI）
10000
1000
100
10
1
hCCR2 CHO细胞
hCCR5 CHO细胞
培养基
Y4T3-嵌合 10μg/ml
Y4T3-嵌合 1μg/ml
hY4T3 10μg/ml
hY4T3 1μg/ml
培养基

图9

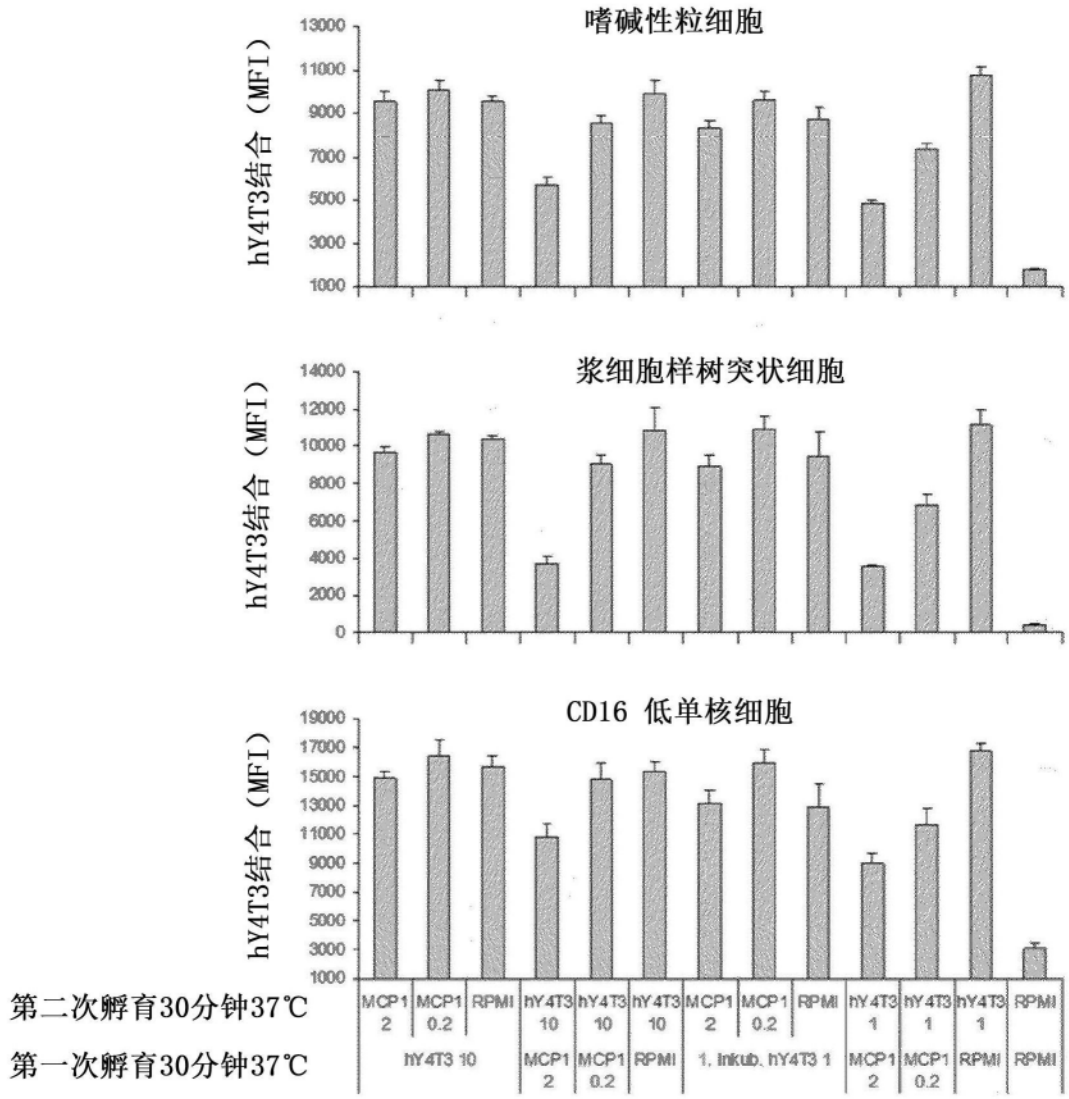

嗜碱性粒细胞
hY4T3结合（MFI）
13000
11000
9000
7000
5000
3000
1000
浆细胞样树突状细胞
hY4T3结合（MFI）
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CD16 低单核细胞
hY4T3结合（MFI）
19000
17000
15000
13000
11000
9000
7000
5000
3000
1000
第二次孵育30分钟37℃
第一次孵育30分钟37℃
MCP1 2
MCP1 0.2
RPMI
hY4T3 10
hY4T3 1
hY4T3 10
MCP1 2
MCP1 0.2
RPMI
1, Inkub. hY4T3 1
MCP1 2
MCP1 0.2
RPMI

图10

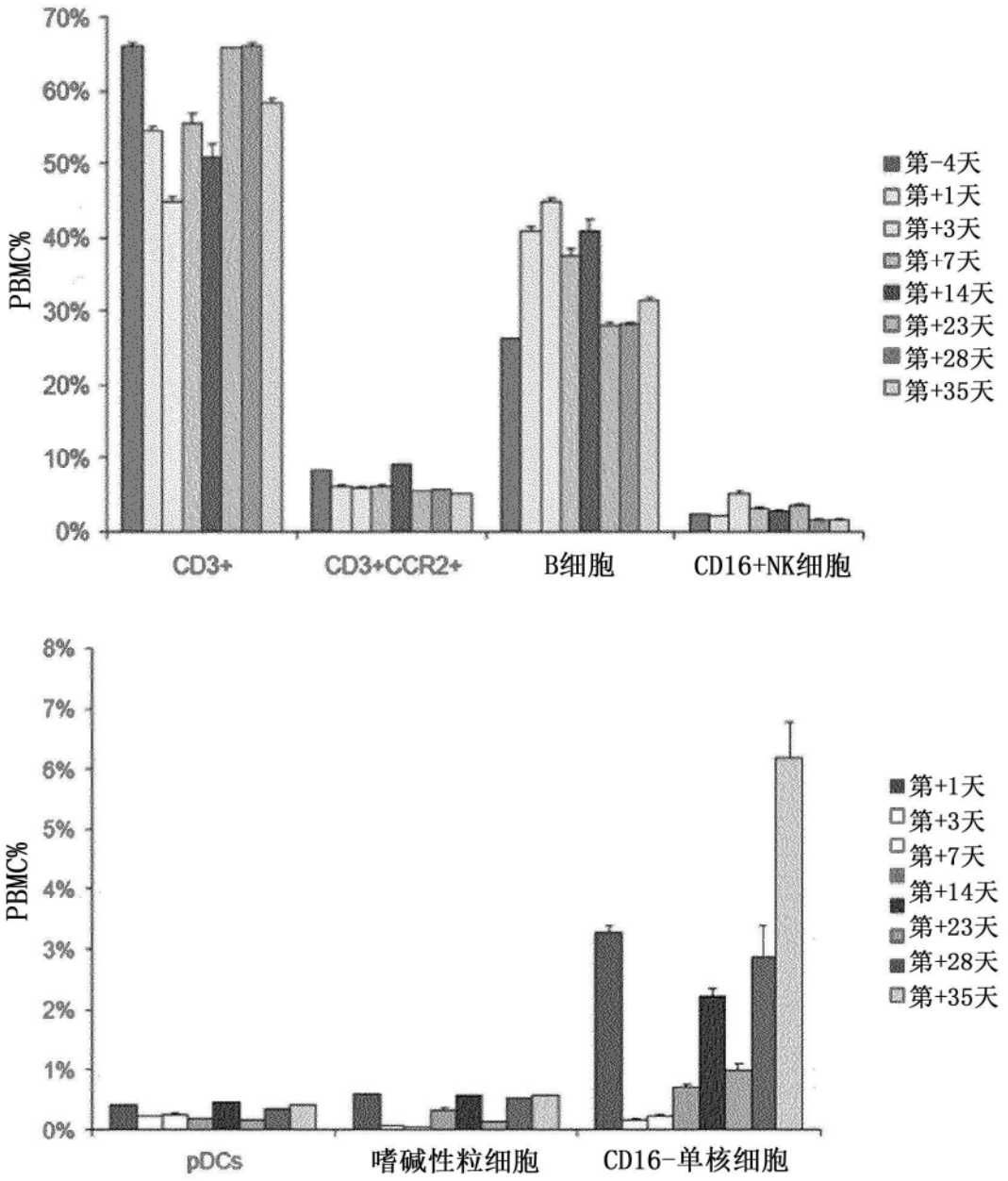

70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
PBMC%
CD3+
CD3+CCR2+
B细胞
CD16+NK细胞
第-4天
第+1天
第+3天
第+7天
第+14天
第+23天
第+28天
第+35天
8%
7%
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
PBMC%
pDCs
嗜碱性粒细胞
CD16-单核细胞
第+1天
第+3天
第+7天
第+14天
第+23天
第+28天
第+35天

图11

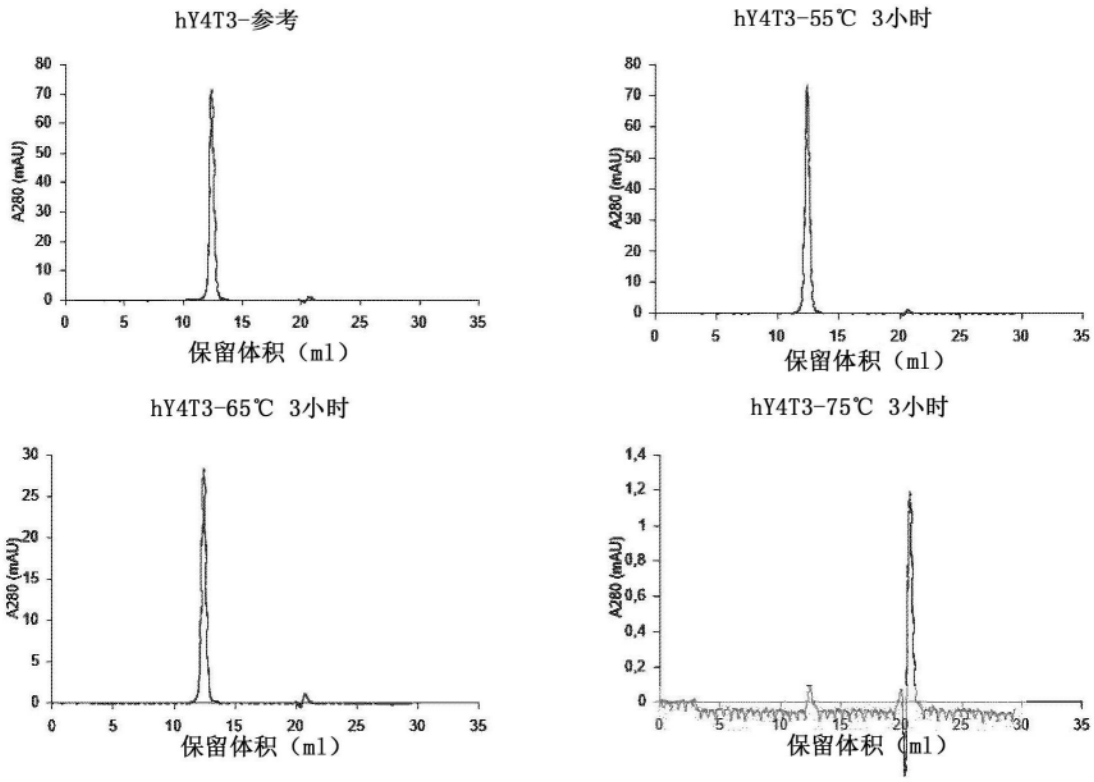

hY4T3-参考
hY4T3-55℃ 3小时
hY4T3-65℃ 3小时
hY4T3-75℃ 3小时
A280 (mAU)
保留体积（ml）

图12

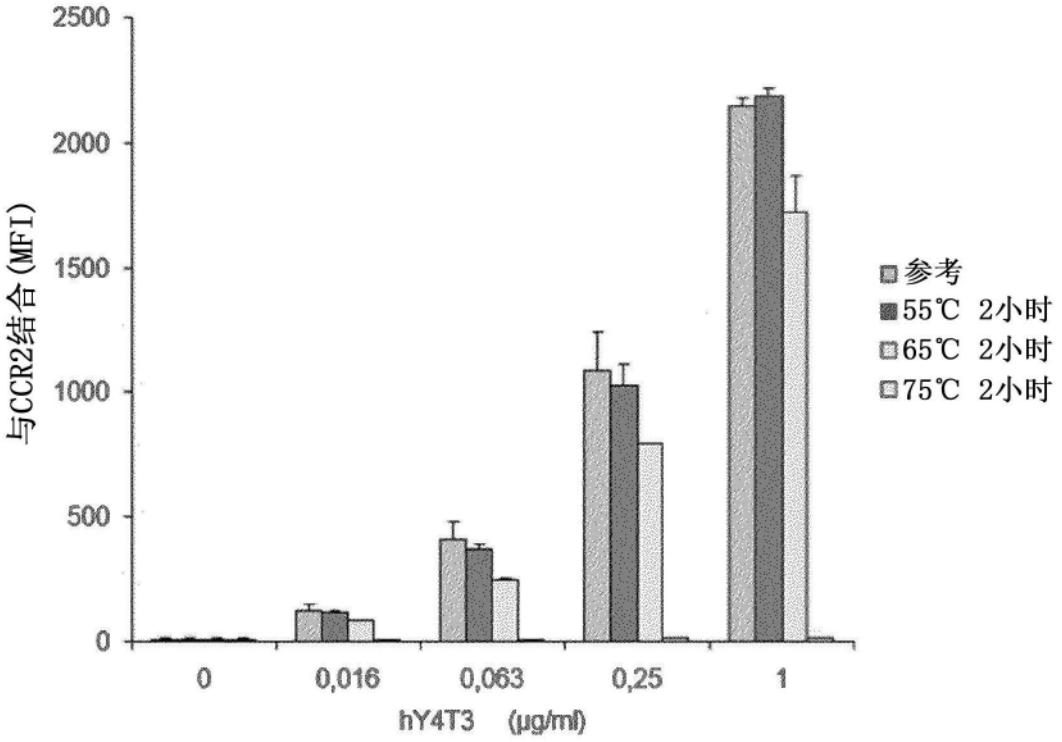

与CCR2结合(MFI)
hY4T3 (μg/ml)
0
0,016
0,063
0,25
1
参考
55℃ 2小时
65℃ 2小时
75℃ 2小时

图13

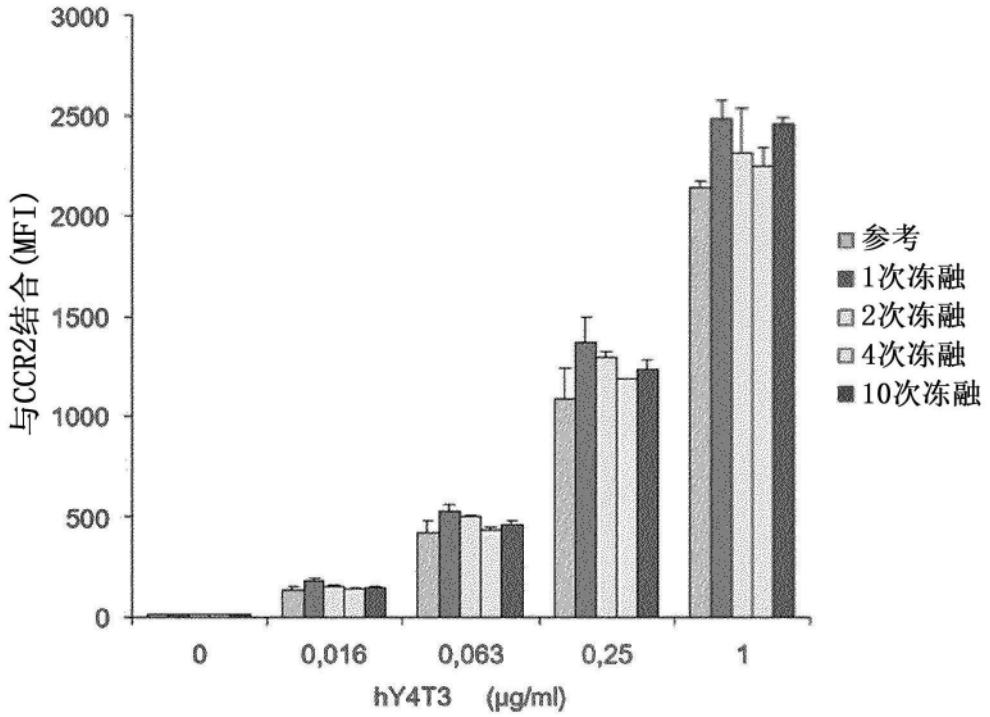

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
与CCR2结合(MFI)
0
0,016
0,063
0,25
1
hY4T3 (μg/ml)
参考
1次冻融
2次冻融
4次冻融
10次冻融

图14

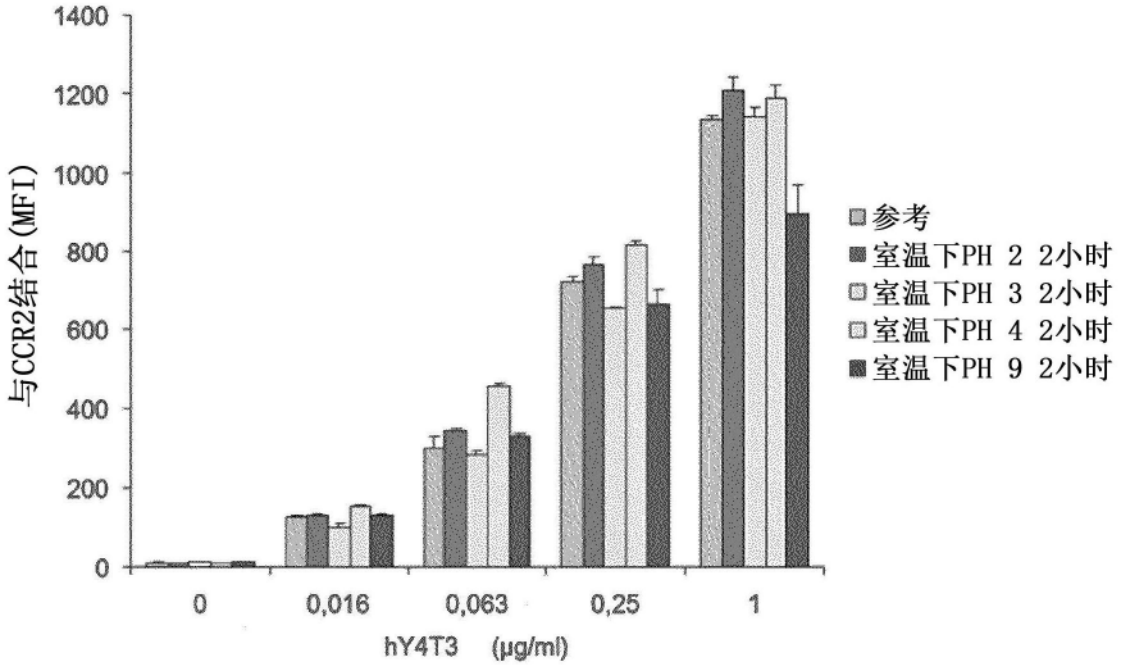

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
与CCR2结合(MFI)
0
0,016
0,063
0,25
1
hY4T3 (μg/ml)
参考
室温下PH 2 2小时
室温下PH 3 2小时
室温下PH 4 2小时
室温下PH 9 2小时

图15

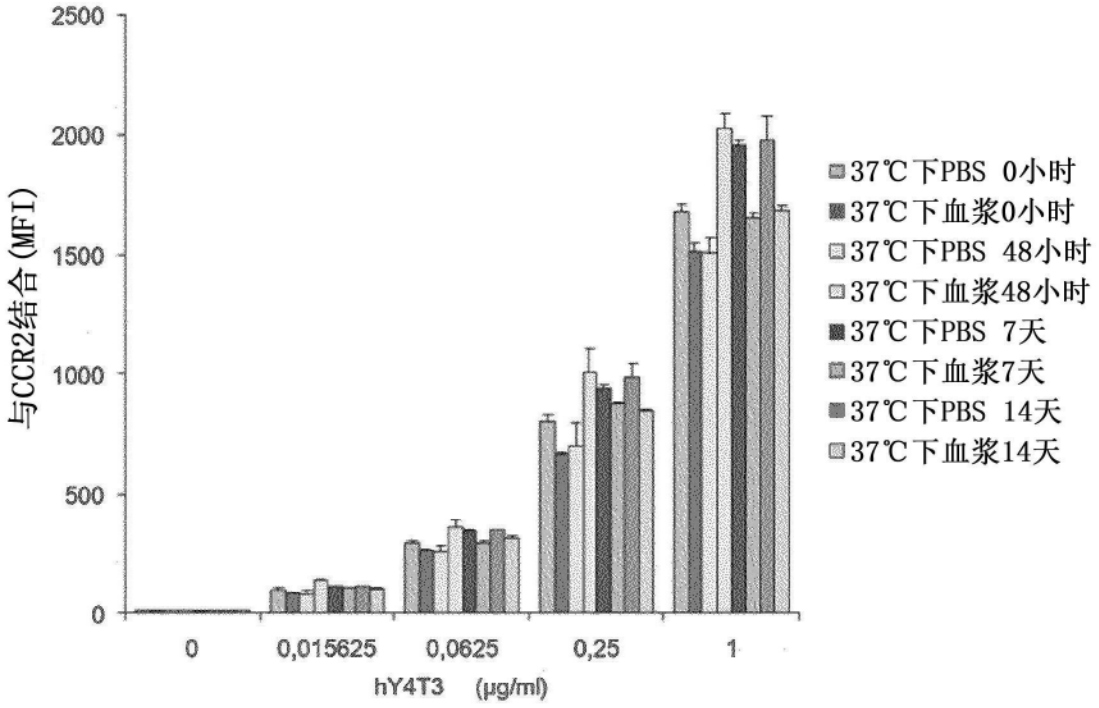

2500
2000
1500
1000
500
0
与CCR2结合(MFI)
0
0,015625
0,0625
0,25
1
hY4T3 (μg/ml)
37℃下PBS 0小时
37℃下血浆0小时
37℃下PBS 48小时
37℃下血浆48小时
37℃下PBS 7天
37℃下血浆7天
37℃下PBS 14天
37℃下血浆14天

图16

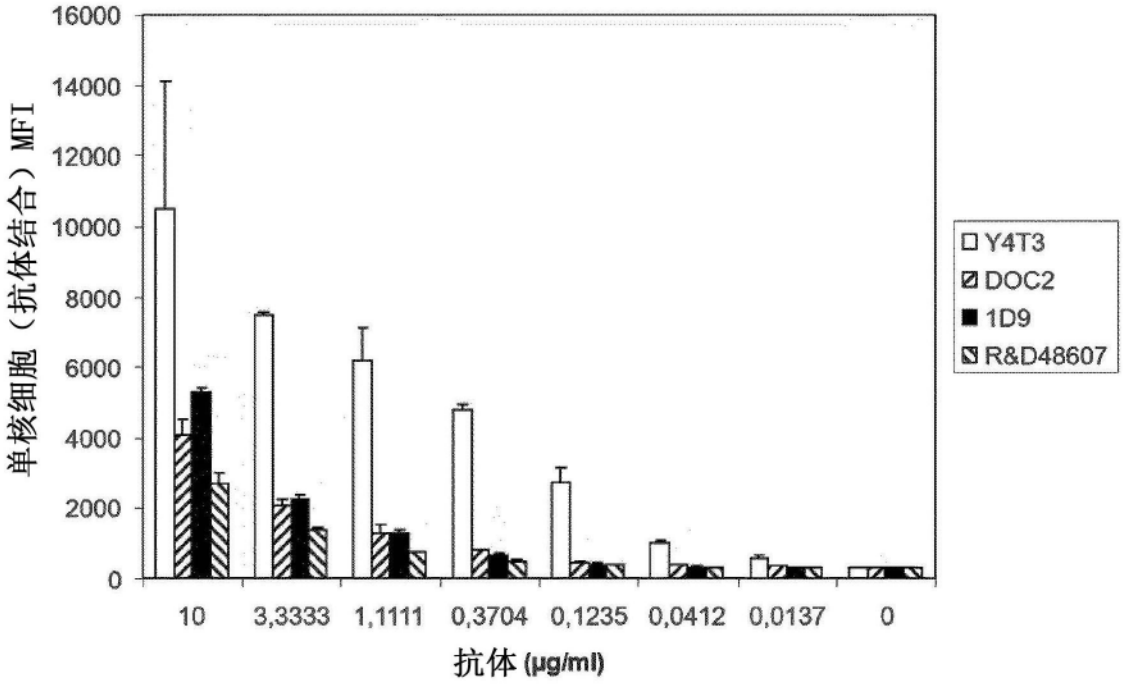

16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
单核细胞（抗体结合）MFI
10
3,3333
1,1111
0,3704
0,1235
0,0412
0,0137
0
抗体 (μg/ml)
Y4T3
DOC2
1D9
R&D48607

图17

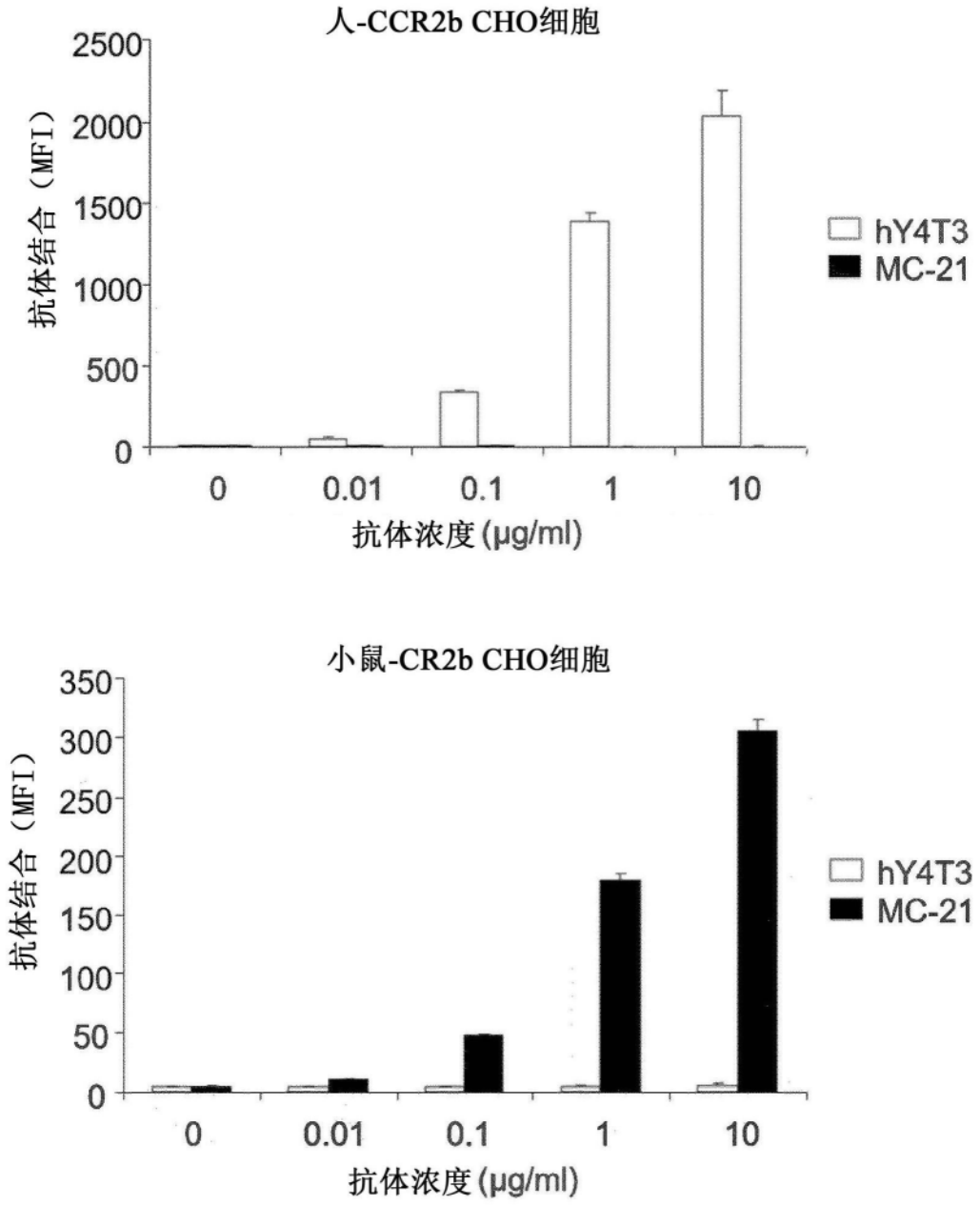

人-CCR2b CHO细胞
抗体结合（MFI）
2500
2000
1500
1000
500
0
0
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/ml)
hY4T3
MC-21
小鼠-CR2b CHO细胞
抗体结合（MFI）
350
300
250
200
150
100
50
0
0
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/ml)
hY4T3
MC-21

图18

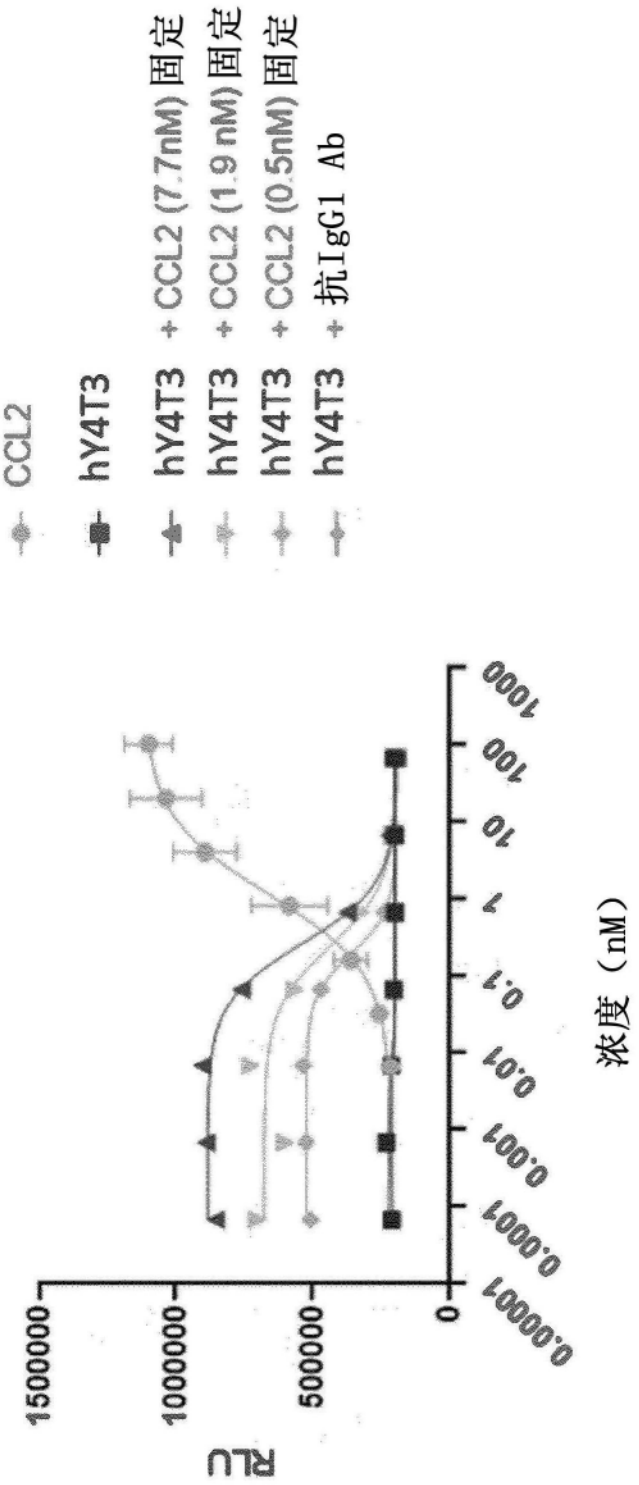

CCL2
hY4T3
hY4T3 + CCL2 (7.7nM) 固定
hY4T3 + CCL2 (1.9 nM) 固定
hY4T3 + CCL2 (0.5nM) 固定
hY4T3 + 抗IgG1 Ab
RLU
1500000
1000000
500000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度（nM）

图19