(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114502585 A
(43)申请公布日 2022.05.13

(21)申请号 202080038435.9
(22)申请日 2020.04.03
(30)优先权数据
62/830,139 2019.04.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/026721 2020.04.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/206354 EN 2020.10.08
(71)申请人 德伦生物公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 P·福塔基斯 C·M·陈 史若师
A·L·萨勒斯 N·托马塞维克
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)

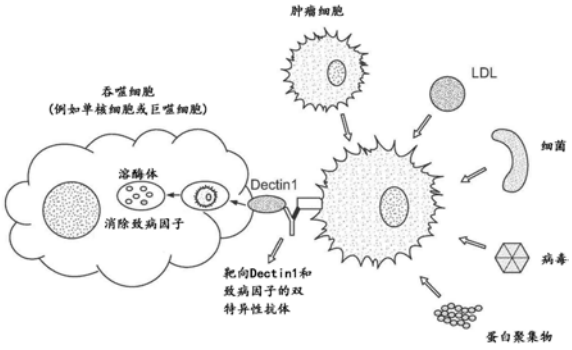
权利要求书2页 说明书22页 附图27页

(54)发明名称

通过抗体靶向吞噬作用除尽致病因子的方法

(57)摘要

本公开文本涉及一种在施用分子后在人类受试者中除尽致病因子或减少所述致病因子的数量的方法，所述致病因子包括宿主细胞或宿主细胞产物、微生物或其产物，所述分子引起靶向吞噬作用并且包含结合特定吞噬作用受体如Dectin-1的结合结构域和结合特定致病因子的结合结构域。在一个具体实施方案中，本公开文本的方法通过靶向吞噬作用除尽组织、血液或骨髓中的致病因子或减少所述致病因子的数量。



CN 114502585 A

1.一种在人类受试者中通过靶向吞噬作用去除致病因子或减少所述致病因子的数量的方法,其包括向所述受试者施用结合蛋白,所述结合蛋白包含与所述因子特异性结合的第一结合结构域、与在巨噬细胞上表达的吞噬作用受体Dectin-1结合并诱导所述巨噬细胞的吞噬作用活性的第二结合结构域以及免疫球蛋白Fc结构域。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体的施用将所述因子的数量减少至低于检测限,并且所述水平在给予所述抗体后保持低于检测至少约1周。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述致病因子的减少在施用后前24小时或48小时内发生。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述致病因子的减少是可逆的。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述致病因子的所述减少导致症状的减轻。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除疾病相关蛋白和蛋白聚集物以抑制异常蛋白质积累,并因此减轻或预防包括神经系统变性疾病、纤维化或淀粉样变性在内的疾病的进展。

7.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除癌症、肿瘤或淋巴瘤细胞或降低其水平,并因此抑制或预防所述疾病的进展。

8.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除微生物(例如,细菌、真菌、病毒)、原生动物寄生虫或降低其水平,并因此抑制或预防所述疾病的进展。

9.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除衰老细胞和所述衰老细胞的产物或降低其水平,并因此抑制或预防衰老的进展。

10.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除微生物(例如,细菌、真菌、病毒)、原生动物寄生虫或降低其水平,并因此抑制或预防所述疾病的进展。

11.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除LDL和诱导包括动脉硬化或家族性高胆固醇血症在内的心血管疾病的其他因子或降低其水平,并因此抑制或预防所述疾病的进展。

12.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除肥大细胞或降低其水平,并因此抑制或预防过敏症、纤维化、COPD、哮喘和包括免疫增生性疾病在内的其他肥大细胞相关疾病的进展。

13.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除嗜酸性粒细胞或降低其水平,并因此抑制或预防过敏症、纤维化、COPD、哮喘和包括免疫增生性疾病在内的其他嗜酸性粒细胞相关疾病的进展。

14.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除ILC2细胞或降低其水平,并因此抑制或预防过敏症、纤维化、COPD、哮喘和包括免疫增生性疾病在内的其他ILC2细胞相关疾病的进展。

15.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法用于去除肌肉、胃肠道、肺、心脏、关节、脑和其他器官中的炎性免疫细胞或降低其水平,并因此抑制或预防肌炎、IBD、RA、过敏症、纤维化、COPD、哮喘和包括免疫增生性疾病在内的其他免疫细胞相关疾病的进展。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合蛋白选自特异性抗体;共价连接的两个IgG(IgG2);IgG-scFv;胞内抗体、肽体、纳米抗体、单结构域抗体、SMTP和多特异

性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体、四抗体、串联di-scFV、串联tri-scFv、ADAPTIR);Fab、Fab'、F(ab')2、和Fv片段、Fab'-SH、F(ab')2、双抗体、线性抗体、scFv抗体、VH和从抗体片段形成的多特异性抗体。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述结合蛋白的结合结构域是非人的、嵌合的、人源化的或人的,优选地是人源化的或人的。

18.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与所述致病因子表达的靶抗原结合的第二结合结构域。

通过抗体靶向吞噬作用除尽致病因子的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2019年4月5日提交的美国临时申请号62/830,139的优先权,所述申请的公开内容通过引用以其整体特此并入。

技术领域

[0002] 本公开文本涉及通过靶向吞噬作用除尽或减少人体中的致病因子的方法。

背景技术

[0003] 专职吞噬细胞是白细胞的子集,其一般是指单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和破骨细胞,它们特异性识别并吞食异常或引起疾病的宿主或外来因子(Rabinovitch,1995,Trends in Cell Biol;Arandejelovic等人,2015,Nat Immunol;Rosales等人,2017BioMed Research International)。吞噬作用是用于去除病原体和细胞碎片的主要机制。吞噬作用定义为质膜包膜内的微粒(>0.5mm)的细胞摄取,其与通过流体相巨胞饮和受体途径对可溶配体的胞吞作用密切相关并且部分重叠(Rosales等人,2017BioMed Research International;Gordon,2016,Immunity;Tse等人,2003,J Biol Chem)。被吞食的物质随后在吞噬体中被消化。细菌、死组织细胞和小矿物颗粒是可被吞噬的对象的所有例子。几个术语已经被应用于与凋亡细胞的摄取(也称为胞葬作用)以及源于感染和炎症(坏死性凋亡和细胞焦亡)的坏死细胞的摄取相关的机制(Henson和Bratton,2009)。被吞食的物质通过内吞溶酶体途径在吞噬作用的过程中被破坏。树突细胞和巨噬细胞通过吞噬作用摄入病原体并将其分解用于抗原呈递至适应性免疫系统的细胞。

[0004] 可以将吞噬细胞质膜上介导吞噬作用的受体分为非调理素型和调理素型。非调理素受体包括凝集素型受体、Dectin受体或清道夫受体(Freeman和Grinstein,Immunological Reviews,2014)。一些吞噬途径需要来自通过附着至病原体相关分子模式(PAMPS)激活的模式识别受体(PRR)的第二信号,其导致NF-κB激活(Patin等人,2018,Semin Cell Dev Biol;Brandt等人,2013,PLoS One)。由专职吞噬细胞可变表达的非调理素受体包括凝集素样识别分子,如CD169、CD33和唾液酸化残基的相关受体。另外,吞噬细胞还表达Dectin-1(一种具有明确定义的信号传导能力的真菌β-葡聚糖的受体)、相关的C型凝集素(例如,MICL、Dectin-2、Mincle和DNGR-1)以及一组清道夫受体(Asano等人,2018,J Biochem,Lock等人,2004,Immunobiol)。SR-A、MARCO和CD36的结构域结构不同,并且具有独特但重叠的对细胞凋亡和微生物配体的识别(Freeman和Grinstein,Immunological Reviews,2014)。这些混杂受体结合聚阴离子配体,并且具有不明确定义的细胞内信号传导能力,这可能表明,多配体和受体相互作用是摄取的要求。值得注意,Toll样受体(TLR)是传感器而不是吞噬进入受体,但是它们通常与其他非调理素受体合作以促进摄取和信号传导(Gordon 2016)。

[0005] 可以将质膜受体归类为调理素型、主要针对IgG抗体的保守结构域的FcR(激活性或抑制性)以及补体受体,如针对通过补体激活的经典(IgM或IgG)或替代性凝集素途径沉

积的iC3b的CR3。CR3还可以介导在不存在调理素的情况下进行识别，可能通过沉积巨噬细胞来源的补体来介导。血浆或细胞来源的调理素包括纤连蛋白、甘露糖结合凝集素、乳脂球蛋白(MFG-E8)。最常见的吞噬受体的列表显示于表A中(Rosales 2017)。

[0006] 迄今为止，已经鉴定出四种β-葡聚糖受体作为介导抗真菌吞噬作用活性的候选物，即补体受体3(CR3;CD11b/CD18)、乳糖神经酰胺、选择的清道夫受体和dectin-1(βGR)。Dectin-1由单一C型、凝集素样碳水化合物识别结构域、短茎部和具有免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的胞质尾组成。所述受体以β-葡聚糖依赖性方式识别颗粒，如酵母多糖、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和热灭活的白念珠菌(Candida albicans)(Taylor 2002)。已经明确显示Dectin-1足以激活吞噬作用。其在髓系树突细胞、单核细胞、巨噬细胞和B细胞上表达。

[0007] 开发在不加强总体吞噬作用的情况下靶向去除和降解积累的致病因子会是有益的。本公开文本提供对所述问题的解决方案并且描述其他优点。

[0008] 本文中引用的所有参考文献，包括专利申请、专利公开案和科学文献均通过引用以其整体并入本文，如同每个单独的参考文献被具体地且单独地指示通过引用并入。

发明内容

[0009] 本公开文本涉及一种在施用分子后在人类受试者中去除和降解多种致病因子的方法，所述致病因子包括宿主细胞或宿主细胞产物、微生物或其产物，所述分子包含与所述因子特异性结合的第一结合结构域、与在巨噬细胞上表达的吞噬作用受体Dectin-1结合并诱导吞噬作用的第二结合结构域以及免疫球蛋白Fc结构域。在一个具体实施方案中，本公开文本的方法通过靶向吞噬作用除尽组织、血液和/或骨髓中的致病因子或减少所述致病因子的数量。

[0010] 在一些实施方案中，本文提供一种在受试者中通过靶向吞噬作用减少致病因子的数量的方法，其包括向所述受试者施用结合蛋白，所述结合蛋白包含与所述因子特异性结合的第一结合结构域，以及与在巨噬细胞、单核细胞和/或粒细胞上表达的吞噬作用受体结合并诱导所述巨噬细胞、单核细胞和/或粒细胞的吞噬作用活性的第二结合结构域。在一些实施方案中，所述吞噬作用受体是Dectin-1，例如，人Dectin-1。在一些实施方案中，本文提供一种减少受试者中的致病因子的数量的方法，其包括向所述受试者施用结合蛋白，所述结合蛋白包含与所述因子特异性结合的第一结合结构域和与Dectin-1结合的第二结合结构域。在一些实施方案中，所述结合蛋白还包含免疫球蛋白Fc结构域。在一些实施方案中，所述结合蛋白是抗体(例如，多特异性或双特异性抗体)。在一些实施方案中，所述受试者是人。在一些实施方案中，所述结合蛋白是双特异性抗体，其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与所述致病因子表达的靶抗原结合的第二结合结构域。在一些实施方案中，所述受试者是人。在一些实施方案中，所述结合蛋白是双特异性抗体，其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与所述致病因子表达的靶抗原结合的第二结合结构域，其中所述双特异性抗体具有参考图1A显示和/或描述的形式。

[0011] 在一些实施方案中，所述结合蛋白的施用减少所述因子的数量。在一些实施方案中，所述结合蛋白的施用将所述因子的数量减少至低于检测限。在一些实施方案中，所述结合蛋白的施用减少所述因子的数量，在给予所述结合蛋白后持续至少约1周。在一些实施方

案中,所述结合蛋白的施用在施用后12小时内、24小时内、36小时内或48小时内减少所述因子的数量。在一些实施方案中,所述致病因子的减少是可逆的,例如,在所述结合蛋白的施用停止后可逆。在一些实施方案中,所述结合蛋白的施用降低所述受试者中一种或多种症状的严重程度和/或发病率。

[0012] 在一些实施方案中,所述方法导致去除一种或多种疾病相关蛋白或蛋白聚集物和/或降低其水平。在一些实施方案中,所述方法导致抑制异常蛋白质积累。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防疾病(例如,神经系统变性疾病、纤维化或淀粉样变性)的一种或多种症状的进展。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与靶蛋白或蛋白聚集物结合的第二结合结构域。

[0013] 在一些实施方案中,所述方法导致去除癌症、肿瘤或淋巴瘤细胞和/或减少其数量。在一些实施方案中,所述方法导致减轻癌症的一种或多种症状和/或预防癌症的进展。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由癌细胞表达的靶抗原(例如,在癌细胞表面上表达的肿瘤抗原)结合的第二结合结构域。

[0014] 在一些实施方案中,所述方法导致去除一种或多种微生物(例如,细菌细胞、真菌细胞、原生动物细胞或病毒)和/或降低其水平。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防由微生物(例如,细菌细胞、真菌细胞、原生动物细胞或病毒)引起的疾病或感染的一种或多种症状的进展。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由细菌细胞表达的靶抗原(例如,在细菌细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由真菌细胞表达的靶抗原(例如,在真菌细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由原生动物细胞表达的靶抗原(例如,在原生动物细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由病毒表达的靶抗原(例如,在病毒表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。

[0015] 在一些实施方案中,所述方法导致去除衰老细胞和/或所述衰老细胞的一种或多种产物和/或降低其水平。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防衰老的进展,例如,在一种或多种年龄相关的症状或病症中。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由衰老细胞表达的靶抗原(例如,在衰老细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。

[0016] 在一些实施方案中,所述方法导致去除LDL和诱导心血管疾病(例如,动脉硬化或家族性高胆固醇血症)的其他因子和/或降低其水平。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防心血管疾病(例如,动脉硬化或家族性高胆固醇血症)的一种或多种症状的进展。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与脂蛋白颗粒(例如,LDL)结合的第二结合结构域。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法导致去除肥大细胞和/或降低其水平。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防肥大细胞相关疾病(例如,过敏症、纤维化、COPD、哮喘或其他免疫增生性肥大细胞相关疾病)的一种或多种症状的进展。在一些实施方案中,所述结合

蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由肥大细胞表达的靶抗原(例如,在肥大细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法导致去除嗜酸性粒细胞和/或降低其水平。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防嗜酸性粒细胞相关疾病(例如,过敏症、纤维化、COPD、哮喘或其他免疫增生性嗜酸性粒细胞相关疾病)的一种或多种症状的进展。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由嗜酸性粒细胞表达的靶抗原(例如,在嗜酸性粒细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。

[0019] 在一些实施方案中,所述方法导致去除ILC2细胞和/或降低其水平。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防ILC2相关疾病(例如,过敏症、纤维化、COPD、哮喘或其他免疫增生性ILC2相关疾病)的一种或多种症状的进展。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由ILC2细胞表达的靶抗原(例如,在ILC2细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。

[0020] 在一些实施方案中,所述方法导致去除炎性免疫细胞和/或降低其水平,例如,在选自肌肉、胃肠道、肺、心脏、关节和脑的一种或多种组织中。在一些实施方案中,所述方法导致减轻或预防肌炎、IBD、RA、过敏症、纤维化、COPD、哮喘或其他免疫增生性炎性免疫细胞相关疾病的一种或多种症状的进展。在一些实施方案中,所述结合蛋白是双特异性抗体,其包含与Dectin-1结合的第一结合结构域和与由炎性免疫细胞表达的靶抗原(例如,在炎性免疫细胞表面上表达的抗原)结合的第二结合结构域。

[0021] 在一些实施方案中,所述结合蛋白是抗体;共价连接的两种抗体或IgG;IgG-scFv;胞内抗体;肽体;纳米抗体;单结构域抗体;SMTP;多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体、四抗体、串联di-scFV、串联tri-scFv、ADAPTIR);Fab、Fab'、F(ab')2或Fv片段;Fab'-SH或F(ab')2双抗体;线性抗体;scFv抗体;VH抗体;或者从抗体片段形成的多特异性抗体。在一些实施方案中,所述结合蛋白的一个或多个结合结构域是非人的、嵌合的、人源化的或人的。在一些实施方案中,所述结合蛋白的一个或多个结合结构域是人源化的或人的。在一些实施方案中,所述结合蛋白的两个结合结构域是非人的、嵌合的、人源化的或人的。在一些实施方案中,所述结合蛋白的两个结合结构域是人源化的或人的。

[0022] 应当理解,可以将本文描述的各种实施方案的一个、一些或所有特性组合,以形成本公开文本的其他实施方案。本公开文本的这些和其他方面对于本领域技术人员将变得清楚。通过下文详细描述进一步描述本公开文本的这些和其他实施方案。

附图说明

[0023] 图1A提供根据一些实施方案用于靶向吞噬作用的抗体分子的示意图。与Dectin-1(d)和致病因子(a)结合的双特异性抗体显示于图1A的图A中。IgG-scFv分子的例子显示于图1A的图B和图C中。共价偶联的两个IgG分子(IgG2)显示于图1A的图D中。共价附接至含有β-1,6-连接的葡聚糖的碳水化合物(如凝结多糖)(c)的对致病因子具有特异性的IgG。

[0024] 图1B提供通过单核细胞/巨噬细胞的吞噬作用来去除和降解致病因子的作用机制的示意性概览。本公开文本描述如下分子(如双特异性抗体)的开发,所述分子在一个臂上与吞噬受体Dectin-1结合并且在另一个臂上与致病因子(例如肿瘤细胞、细菌、病毒、LDL、

蛋白聚集物等)结合。在接合后,致病因子被吞噬细胞吞食并通过内吞溶酶体途径被消除。这可以导致组织和血液中的致病因子的显著减少。

[0025] 图2显示对两个健康供体外周血单核细胞(PBMC)样品中的Dectin-1的流式细胞术分析。使用荧光团缀合的谱系和细胞类型特异性抗体对单一的活的单核细胞和淋巴细胞群进行门控,以鉴定相应的免疫细胞群。通过比较来自Dectin-1抗体(克隆15e2;如所标记)的荧光信号与荧光减一(FMO)和同种型对照(IgG2a;如所标记)来确定Dectin-1表达。如果检测,Dectin-1受体数量和Dectin-1阳性细胞的百分比(在括号中)展示于直方图中。在单核细胞中而非在淋巴细胞群中检测到Dectin-1表达。

[0026] 图3显示对三个健康供体外周血白细胞(PBL)样品中的Dectin-1的流式细胞术分析。使用前向和侧向散射对单一的活的单核细胞和粒细胞群进行门控。通过比较来自Dectin-1抗体(克隆15e2;如所标记)的荧光信号与荧光减一(FMO)和同种型对照(IgG2a;如所标记)来确定Dectin-1表达。Dectin-1受体数量和Dectin-1阳性细胞的百分比(在括号中)展示于直方图中。在与单核细胞相比时,Dectin-1在粒细胞(另一类吞噬细胞)中以较低水平表达。

[0027] 图4显示对来自健康供体的单核细胞来源的培养的巨噬细胞中的Dectin-1的流式细胞术分析。将单核细胞在MCSF(20ng/ml)中培养7天以允许其分化为巨噬细胞。然后将单一的且活的细胞用CD11b染色以确认巨噬细胞分化。通过比较来自Dectin-1抗体(克隆15e2;直方图中的右侧峰)的荧光信号与荧光减一(FMO)和同种型对照(IgG2a;直方图中的左侧峰)来确定Dectin-1表达。发现Dectin-1表达在单核细胞来源的巨噬细胞中得以维持。

[0028] 图5显示对来自健康供体的肺免疫细胞中的Dectin-1的流式细胞术分析。使用Miltenyi Biotec组织解离试剂盒来解离来自健康供体的组织肺样品。使用CD45对造血细胞进行门控。通过使用CD3+(T细胞)、CD3-CD19+(B细胞)和CD3-CD56+(NK细胞)门,基于CD45+细胞鉴定淋巴细胞群。在基于CD45+细胞排除T、B和NK细胞后,使用CD163和CD11b对巨噬细胞进行门控。通过比较来自Dectin-1抗体(克隆15e2;直方图中的右侧峰)的荧光信号与荧光减一(FMO)和同种型对照(IgG2a;直方图中的左侧峰)来确定Dectin-1表达。Dectin-1受体数量和Dectin-1阳性细胞的百分比(在括号中)展示于直方图中。在健康人肺组织中,发现Dectin-1在巨噬细胞上选择性表达,但是在淋巴细胞中或在非造血细胞中未检出。

[0029] 图6显示对对照HEK293细胞(HEK-Blue Null1细胞)、工程化以过表达人Dectin-1亚型A(HEK-Blue hDectin-1a细胞)或亚型B(HEK-Blue hDectin-1b细胞)的HEK293细胞以及用表达人Dectin-1A的构建体瞬时转染的Freestyle293细胞(293F hDectin-1a FL)中的Dectin-1表达的流式细胞术分析。用Dectin-1抗体(克隆15e2;直方图中的右侧峰)检测Dectin-1并与同种型对照(IgG2a;直方图中的左侧峰)进行比较。Dectin-1抗体(克隆15e2)识别过表达Dectin-1的HEK293细胞中的Dectin-1的A和B两种亚型。用多种Dectin-1抗体克隆(259931、GE2和BD6,其仅识别A亚型)确认Dectin-1的表达。

[0030] 图7显示通过流式细胞术在源自PBMC的食蟹猴单核细胞中对Dectin-1抗体克隆15e2和259931的结合分析。对单一的、活的且CD14+细胞进行门控以鉴定单核细胞。将所述细胞与Dectin-1一抗(克隆15e2和259931)及其相应的同种型对照IgG2a和IgG2b一起孵育,之后与荧光抗小鼠二抗一起孵育。一抗15e2和259921是以100、33.3、11.1、3.7、1.23和0.41nM的连续剂量调整来使用,并且所述同种型对照是以166、55.3、18.4和6.150nM的连续

剂量调整来使用。人ectin1抗体(克隆15e2和259931)展现与单核细胞上表达的食蟹猴Dectin-1的交叉反应性。

[0031] 图8显示对HEK-Blue hDectin-1a细胞中的Dectin-1的分泌型碱性磷酸酶(SEAP)报告物测定。HEK-Blue hDectin-1a细胞被工程化以表达Dectin-1/NF-kB/SEAP信号传导途径中的基因,并且响应于Dectin-1配体具有SEAP反应。在与Dectin-1或同种型抗体一起孵育的细胞中监测SEAP产生。通过用Dectin-1抗体而非同种型对照抗体刺激对碱性磷酸酶分泌的诱导显示于图8的上图中。通过Dectin-1抗体刺激的细胞中的活性与用酵母多糖(Dectin-1的天然配体)对HEK-Blue hDectin-1a细胞的刺激是可比较的。图8的下图显示Dectin-1抗体对碱性磷酸酶分泌的剂量依赖性作用。将细胞与Dectin-1或同种型抗体以范围为0.1-10μg/孔的量一起孵育,以生成剂量-反应曲线。

[0032] 图9A和图9B显示HEK-Blue hDectin-1a细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm)用pH敏感性荧光染料(pHrodo红)标记并与Dectin-1抗体或同种型对照缀合。然后将所述珠与培养的HEK-Blue hDectin-1a细胞(50,000个/孔)以1:3的细胞:珠比率一起孵育。将HEK-Blue hDectin-1a细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记。通过IncuCyte活细胞成像或流式细胞术监测所述珠的吞噬作用。通过IncuCyte分析软件对所述珠的吞噬作用进行定量并表示为pHrodo标记的对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。图9A的上图显示在3小时中对所述珠的吞噬作用的测量,而图9A的下图显示在吞噬作用的2.5小时时间点,pHrodo阳性细胞的代表性图像。与珠偶联的Dectin-1抗体在HEK-Blue hDectin-1a细胞中促进吞噬作用。在图9B中,显示对吞噬作用的流式细胞术测量。测试对与Dectin-1抗体克隆(克隆15e2和259931)或同种型抗体偶联的珠的吞噬作用。被吞食的珠由直方图中的右侧峰来表示。与Dectin-1抗体偶联的珠诱导的吞噬作用水平比与同种型抗体偶联的珠显著更高(2.1-4.5倍)($p<0.0001$;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。

[0033] 图10显示在HEK-Blue hDectin-1a细胞中吞噬作用对Dectin-1的特异性。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm,400,000个/孔)用pHrodo标记并与范围为20ng至400ng的增加量的Dectin-1抗体(克隆15e2)或同种型对照(IgG2a)混合。由于珠的抗体结合能力,高于20ng的量的15e2抗体导致过量的未结合15e2抗体。在不去除未结合Dectin-1抗体的情况下,将HEK-Blue hDectin-1a细胞(50,000个/孔)与Dectin-1缀合的珠混合。通过IncuCyte活细胞成像监测对所述珠的吞噬作用。通过IncuCyte分析软件对吞噬作用进行定量并表示为pHrodo阳性对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。图10显示在4小时中对珠的吞噬作用的测量(上图)。在4小时时间点,在20ng或40ng与100ng和100ng与200ng或400ng的Dectin-1抗体量之间,观察到吞噬作用的显著差异(****$p<0.0001$;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。在过量游离Dectin-1抗体的存在下,由与Dectin-1特异性抗体偶联的珠诱导的吞噬作用有所降低。图10还显示在吞噬作用的2小时时间点,pHrodo阳性细胞的代表性图像(下图)。

[0034] 图11A和图11B显示HEK-Blue hDectin-1a细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的不同大小的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(0.85、3.4和8μm)用pHrodo红标记并与Dectin-1抗体或同种型对照缀合。然后将所述珠与培养的HEK-Blue hDectin-1a细胞(50,000个/孔)以1:12的细胞:珠比率一起孵

育。通过IncuCyte活细胞成像监测对所述珠的吞噬作用。通过IncuCyte分析软件对吞噬作用进行定量并表示为pHrodo阳性对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。图11A显示在5小时的过程中对珠的吞噬作用。对于所测试的所有珠大小，与Dectin-1抗体缀合的珠的吞噬作用显著高于与同种型抗体缀合的珠(****p<0.0001;*p<0.05;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。图11B显示在5小时时间点，pHrodo阳性细胞的代表性图像。在图像中，箭头标明珠，而圆圈标明pHrodo阳性细胞。

[0035] 图12A和图12B显示HEK-Blue hDectin-1a和HEK-Blue hDectin-1b细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm)用pHrodo红标记并与Dectin-1抗体(克隆15e2或259931)或同种型对照缀合。然后将所述珠与培养的HEK-Blue hDectin-1a细胞(图12A)或HEK-Blue hDectin-1b细胞(图12B)(50,000个/孔)以1:10的细胞:珠比率一起孵育。将细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记。在3小时中通过IncuCyte活细胞成像监测对所述珠的吞噬作用，通过IncuCyte分析软件进行定量并表示为pHrodo阳性对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。在HEK-Blue hDectin-1a和HEK-Blue hDectin-1b细胞二者中，与Dectin-1抗体缀合的珠的吞噬作用显著高于与同种型抗体缀合的珠(****、^^^^p<0.0001;***、^^^p<0.001;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。在表达Dectin-1亚型A的细胞中，两种Dectin-1抗体克隆都以可比较的水平促进吞噬作用(图12A)。在表达Dectin-1亚型B的细胞中，259931抗体克隆促进的吞噬作用水平高于15e2克隆(图12B)。

[0036] 图13A-图13C显示HEK-Blue hDectin-1a细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照缀合的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将不同大小(0.85μm(图13A)、3.4μm(图13B)和8μm(图13C))的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠用pHrodo标记并与Dectin-1抗体(克隆15e2或259931)或同种型对照缀合。然后将所述珠与培养的HEK-Blue hDectin-1a细胞(50,000个/孔)以1:12的细胞:珠比率一起孵育。在5小时中通过IncuCyte活细胞成像监测对所述珠的吞噬作用，通过IncuCyte分析软件进行定量并表示为pHrodo阳性对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。两种Dectin-1抗体克隆诱导的对所有大小的珠的吞噬作用水平都显著高于同种型对照(****、^^^^p<0.0001;^^p<0.01;*、^p,0.05;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。如与15e2相比，259931克隆促进类似水平的对中间大小颗粒的吞噬作用，但是促进对极小和极大颗粒更有效的吞噬作用。

[0037] 图14A-图14C显示人单核细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm)用pHrodo红标记并与Dectin-1抗体或同种型对照缀合。然后将所述珠与培养的人单核细胞(50,000个/孔)以1:3的细胞:珠比率一起孵育。将单核细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记。通过IncuCyte活细胞成像监测对所述珠的吞噬作用。通过IncuCyte分析软件对吞噬作用进行定量并表示为pHrodo阳性对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。图14A显示在3小时中对珠的吞噬作用的测量，而图14B显示在吞噬作用的2小时，pHrodo阳性细胞的代表性图像。Dectin-1抗体(克隆15e2)诱导的单核细胞的吞噬作用水平显著高于同种型对照(****p<0.0001;***p<0.001;**p<0.01;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。Dectin-1促进人单核细胞对珠的吞噬作用。图14C显示对吞噬作用的流式细胞术评价。被吞食的珠由直方图中的右侧峰来表示。与Dectin-1抗体偶联的珠诱导的人单核细胞的吞噬作用水平显著高于

(1.6倍)与同种型抗体偶联的珠。

[0038] 图15显示在FcgR阻断抗体的存在下,人单核细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm)用pHrodo标记并与Dectin-1抗体或同种型对照缀合。然后在FcgR阻断抗体的存在下将所述珠与培养的人单核细胞(50,000个/孔)以1:3的细胞:珠比率一起孵育,以排除FcgR介导的吞噬作用。将单核细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记。在吞噬作用的3小时获取pHrodo阳性细胞的图像。FcgR阻断抗体的添加没有阻止Dectin-1抗体诱导的吞噬作用(参照右上图和右下图),表明Dectin-1诱导吞噬作用与Fcγ受体无关。

[0039] 图16显示用松胞菌素D处理的人单核细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm)用pHrodo红标记并与Dectin-1抗体或同种型对照缀合。然后在存在或不存在5μM松胞菌素D(CytoD)的情况下将所述珠与培养的人单核细胞(50,000个/孔)以1:3的细胞:珠比率一起孵育。将单核细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记。通过IncuCyte活细胞成像监测对所述珠的吞噬作用。通过IncuCyte分析软件对吞噬作用进行定量并表示为pHrodo阳性对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。图16显示在3小时中对珠的吞噬作用的测量(上图),以及在吞噬作用的3小时,pHrodo阳性细胞的代表性图像(下图)。Dectin-1抗体以显著高于同种型对照的水平诱导吞噬作用(****$p<0.0001$;***$p<0.001$;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。Dectin-1抗体依赖性吞噬作用受到CytoD添加的抑制,证实在人单核细胞中Dectin-1定向的吞噬作用需要肌动蛋白聚合。

[0040] 图17显示人巨噬细胞对与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的pHrodo标记的聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠的吞噬作用。将聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm)用pHrodo红标记并与Dectin-1抗体或同种型对照缀合。然后将所述珠与培养的单核细胞来源的巨噬细胞(50,000个/孔)以1:3的细胞:珠比率一起孵育。将巨噬细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记。通过IncuCyte活细胞成像监测珠吞噬作用。通过IncuCyte分析软件对吞噬作用进行定量并表示为pHrodo阳性对象与钙黄绿素阳性细胞的重叠。图17显示在3小时中对珠的吞噬作用的测量(上图),以及在吞噬作用的3小时,pHrodo阳性细胞的代表性图像(下图)。Dectin-1抗体以显著高于同种型对照的水平诱导巨噬细胞的吞噬作用(****$p<0.0001$;双因素anova和Holm-Sidak多重比较)。Dectin-1抗体促进培养的人巨噬细胞中对珠的定向吞噬作用。

[0041] 图18A-图18C显示由Dectin-1双特异性抗体介导的对病毒的吞食。将生物素化的Dectin-1抗体(15e2-B)或生物素化的同种型(IgG2a-B)与pHrodo标记的链霉亲和素-12CA5抗体(12CA5-SA-pHr,一种与H3N2流感病毒的血凝素蛋白结合的抗H3N2抗体)缀合。将HEK-Blue hDectin-1a细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记并接种于96孔板中(50,000个/孔)。将15e2-B或同种型对照与12CA5-SA-pHr混合,并且允许双特异性抗体的形成进行30分钟。将可溶双特异性抗体以40nM的终浓度添加至细胞。通过用IncuCyte活细胞成像评估pHrodo激活来监测对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞食。图18A显示双特异性Dectin-1/12CA5抗体与细胞的缀合。可以使用这种形式将细胞与H3N2病毒连接。图18B显示在实验的18小时,pHrodo阳性细胞的代表性图像(被吞食的12CA5 pHrodo标记的抗体在吞噬体中发亮红色荧光)。图18C显示在24小时中对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞

食。通过IncuCyte分析软件对吞食进行定量并表示为红色对象计数(pHrodo)与钙黄绿素阳性细胞的重叠。****相比于同种型,p<0.0001。双因素anova和Holm-Sidak多重比较检验。

[0042] 图19A和图19B显示人单核细胞对Dectin-1双特异性抗体的吞食。将生物素化的Dectin-1抗体(15e2-B)或生物素化的同种型(IgG2a-B)与pHrodo标记的链霉亲和素-12CA5(12CA5-SA-pHr,一种与H3N2流感病毒的血凝素蛋白结合的抗H3N2抗体)缀合。将人单核细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记并接种于96孔板中(50,000个/孔)。将15e2-B或同种型对照抗体与12CA5-SA-pHr混合,并且允许双特异性抗体的形成进行30分钟。将可溶双特异性抗体以40nM的终浓度添加至细胞。通过用IncuCyte活细胞成像评估pHrodo激活来监测对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞食。图19A显示在21小时中对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞食,将其通过IncuCyte分析软件进行定量并表示为红色对象计数(pHrodo)与钙黄绿素阳性细胞的重叠。相比于同种型,**p<0.01;****p<0.0001。双因素anova和Holm-Sidak多重比较检验。图19B显示在实验的6小时,pHrodo阳性细胞的代表性图像(被吞食的12CA5 pHrodo标记的抗体在吞噬体中发亮红色荧光)。

[0043] 图20A和图20B显示人单核细胞对与生物素化的Dectin-1抗体(15e2-B)或生物素化的同种型(IgG2a-B)缀合的链霉亲和素FITC标记的聚苯乙烯珠(40nm)的吞食。将聚苯乙烯FITC珠用生物素化的Dectin-1抗体或同种型对照饱和30分钟。然后将抗体/珠复合物与培养的人单核细胞以1:6(细胞:珠)的比率一起孵育。通过IncuCyte活细胞成像监测单核细胞的FITC染色。图20A显示在21小时中单核细胞对SA-FITC珠的吞食,将其通过IncuCyte分析软件进行定量并表示为绿色(FITC阳性)对象计数。图20B显示在实验的15小时,FITC阳性细胞的代表性图像。

具体实施方式

[0044] 下文参考实施例应用描述几个方面用于说明。应当理解,阐述了许多具体细节、关系和方法以提供对本文所述特征的全面理解。然而,相关领域的普通技术人员将容易地认识到,可以在没有一个或多个具体细节或使用其他方法的情况下实践本文所述的特征。本文所述的特征不受动作或事件的所说明顺序的限制,因为一些动作能以不同的顺序和/或与其他动作或事件同时发生。此外,并不需要所有所说明动作或事件来实施根据本文所述特征的方法。

[0045] 如本文所用,单数形式“一种/一个”(“a”)、“一种/一个”(“an”)和“所述”(“the”)意图也包括复数形式,除非上下文另有明确说明。此外,就在具体实施方式和/或权利要求书中使用术语“包括(including)”、“包括(includes)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“具有(with)”或其变体而言,此类术语意图以类似于术语“包含”的方式具有包含性。如本文所用术语“包含”与“包括”或“含有”是同义的,并且具有包含性或开放性。

[0046] 本文中对“或”的任何提及意图涵盖“和/或”,除非另有说明。如本文所用,关于数字的术语“约”是指该数字加或减该数字的10%。关于范围的术语“约”是指该范围减去其最低值的10%并且加上其最高值的10%。

[0047] 存在多种积累的以及未清除的与疾病相关的异常宿主细胞,如肿瘤细胞、淋巴瘤细胞、死亡细胞、坏死细胞、凋亡细胞、濒死细胞、感染细胞、受损细胞。另外,不同的细胞产物(如聚集的蛋白质(β-淀粉样斑或Tau聚集物)、脂蛋白颗粒)可能在积累增加后引发疾病。

致病细胞可能具有通常属于与疾病、障碍或其他不期望状况相关的异常细胞的糖蛋白、表面蛋白或糖脂。除了宿主生成的因子外，多种外来病原体，如感染性微生物(例如病毒、真菌和细菌)以及微生物生成的产物和碎片(例如病毒颗粒包膜、内毒素)，可能在患者体内没有充分清除。上文所列的异常可能引起疾病，如癌症、阿尔茨海默病、纤维化、帕金森病、亨廷顿病、HIV、甲型、乙型或丙型肝炎、脓毒症等。这些障碍或疾病中许多的特征为致病因子在人类受试者的不同器官中的积累。

[0048] 本文提供通过使用生物制品来改变和改进宿主吞噬细胞的吞食活性、选择性或表型的方法。

[0049] 本公开文本描述使用如下分子：其用一个臂与致病因子特异性结合，并且用另一个臂与吞噬作用受体Dectin-1受体特异性结合(参见例如，图1B)。为了实现靶向吞噬作用，需要生成在Dectin-1的结合后具有激动活性的单克隆抗体。本公开文本提出，所述激动抗体激活受体并诱导吞噬作用。与吞噬受体Dectin-1结合并且与致病因子(如β-淀粉样蛋白聚集物斑)结合的双特异性抗体可以诱导对所述因子的吞噬作用和所述因子的降解(图1A)。除了传统双特异性抗体以外或可替代地，可以使用共价连接的两个IgG(IgG2)，其中一个IgG与吞噬作用受体结合，另一个IgG与致病因子结合(图1A)。另一个选项是使用IgG-scFv形式，其中IgG与吞噬作用受体结合，并且scFv部分与致病因子结合(图1A)。

[0050] 为了使得能够通过吞噬作用靶向去除致病因子，本公开文本的抗原结合结构域可以选自IgG、胞内抗体、肽体、纳米抗体、单结构域抗体、SMTP和多特异性抗体(例如，双特异性抗体、双抗体、三抗体、四抗体、串联di-scFV、串联tri-scFv、ADAPTIR)。

[0051] 多特异性抗体对通常来自不同抗原的至少两种不同表位具有结合特异性。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如F(ab')2双特异性抗体)。

[0052] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域中已知的。用于制备双特异性抗体的一种完善方法是“杵入臼(knobs-into-holes)”或“突起入空腔(protuberance-into-cavity)”方法。参见例如，美国专利号5,731,168。两个免疫球蛋白多肽(例如，重链多肽)各自包含界面；一个免疫球蛋白多肽的界面与另一个免疫球蛋白多肽上的相应界面相互作用，从而允许两个免疫球蛋白多肽缔合。在一些实施方案中，界面可以被工程化，使得位于一个免疫球蛋白多肽界面中的“杵”或“突起”与位于另一个免疫球蛋白多肽界面中的“臼”或“空腔”相对应。在一些实施方案中，杵可以通过用较大氨基酸侧链替代小侧链来构建。在一些实施方案中，臼可以通过用较小氨基酸侧链替代大侧链来构建。杵或臼可以存在于初始界面中，或者可以以合成方式将它们引入。编码具有一个或多个相应的杵或臼形成突变的修饰的免疫球蛋白多肽的多核苷酸可以使用本领域中已知的标准重组技术和细胞系统来表达和纯化。参见例如，美国专利号5,731,168；5,807,706；5,821,333；7,642,228；7,695,936；8,216,805；美国公开号2013/0089553；以及Spiess等人，Nature Biotechnology 31:753-758,2013。修饰的免疫球蛋白多肽可以使用原核宿主细胞(如大肠杆菌(E.coli))或真核宿主细胞(如CHO细胞)来产生。相应的携带杵和臼的免疫球蛋白多肽可以在共培养物中在宿主细胞中表达，并且作为异多聚体一起纯化，或者它们可以在单一培养物中表达，单独纯化，并在体外装配。

[0053] 根据不同的方法，将具有所需结合特异性(抗体-抗原组合位点)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。

[0054] 双特异性抗体包括交联的或“异缀合物”抗体。用于从抗体片段生成双特异性抗体的技术也已经描述于文献中。例如,双特异性抗体可以使用化学连接来制备。

[0055] 本公开文本的结合蛋白(例如,单克隆抗体或其抗原结合部分)可以是非人的、嵌合的、人源化的或人的。抗体片段的例子包括但不限于Fab、Fab’、F(ab’)2、和Fv片段、Fab’-SH、F(ab’)2、双抗体、线性抗体、scFv抗体、VH和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0056] “Fab”(抗原结合片段)是抗体中与抗原结合的部分,并且包括经由链间二硫键与轻链连接的重链的可变区和CHI。抗体可以属于任何类别或子类,包括IgG及其子类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgE、IgA和IgD。

[0057] 抗致病因子抗体可以共价附接至吞噬作用受体配体,如β-1,6-连接的葡聚糖(例如凝结多糖和右旋糖酐),从而诱导对所述因子的吞噬作用(图1A)。

[0058] 介导通过吞噬作用靶向去除致病因子的分子的结合可以具有和不具有亲合力,即伴随和不伴随诱导吞噬作用受体(如Dectin-1)或所述因子上存在的靶抗原的二聚化。

[0059] 除了有益的通过吞噬作用去除致病因子以外,所述分子可以诱导炎性介质的产生,以改变如肿瘤、癌症和淋巴瘤中的疾病微环境。

[0060] 引起靶向吞噬作用的分子的免疫球蛋白Fc部分可以通过接合Fc受体并诱导另外的吞噬作用而在所述过程中具有重要作用。在一些实施方案中,所述分子具有修饰的Fc结构域,所述修饰的Fc结构域具有如与野生型人IgG1相比降低的ADCC活性。

[0061] 不希望受理论束缚,认为具有更高激动活性以诱导吞噬作用的抗体候选物可能对于药物开发最有吸引力。诱导低内化的抗体候选物可能由于更高的受体占有率以及细胞表面上更高的受体-抗体复合物水平而显示最显著的吞噬作用。

[0062] 为了生成针对Dectin-1的单克隆抗体(mAb),将利用重组靶标进行小鼠的免疫。将通过ELISA和流式细胞术分析所生成mAb与Dectin-1的选择性结合。将在体外测试所选mAb的Dectin-1诱导的激活(吞噬作用)和内化能力。将进一步测试mAb候选物与食蟹猴和小鼠Dectin-1的结合。阳性候选物将用于体外和体内吞噬作用。将所选mAb的活性与市售mAb进行比较。例如,抗Dectin-1 mAb将与以下抗Dectin-1 mAb一起进行测试:259931(R&D Systems;目录号:MAB1859)、15E2(Invitrogen目录号:50-9856-42;BioLegend目录号:355402)、BD6(Bio-Rad目录号:MCA4662)、GE2(Abcam目录号:Ab82888);REA515(Miltenyi Biotec目录号:130-107-725)。

[0063] 为了生成针对致病因子(如β-淀粉样蛋白聚集物)的单克隆抗体(mAb),将利用所述因子进行小鼠的免疫。如果适用,将通过ELISA或流式细胞术分析所生成mAb与适当靶标的选择性结合。如果适用,将进一步测试具有最高亲和力的mAb候选物与食蟹猴靶标的结合。将抗Dectin-1 mAb候选物的吞噬作用活性与市售抗Dectin-1 mAb进行比较。阳性候选物将用于产生双特异性抗体,所述双特异性抗体由与Dectin-1结合的臂和与致病因子(如β-淀粉样蛋白聚集物)结合的臂构成。

[0064] 可以使用重组方法来产生抗体。例如,可以分离编码抗体的核酸并将其插入可复制载体中,用于进一步克隆或用于表达。可以容易地分离编码抗体的DNA并使用常规程序(例如,通过能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)进行测序。许多载体是本领域中已知的;载体组分通常包括但不限于以下中的一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。适于克隆或表达本文

载体中的DNA的宿主细胞是原核生物、酵母或高等真核生物细胞。在使用重组技术时，抗体可以在细胞内产生，在周质间隙中产生，或者直接分泌至培养基中。如果抗体在细胞内产生，则例如通过离心或超滤去除微粒碎片(即宿主细胞或裂解的片段)。在抗体被分泌至培养基中的情况下，通常首先使用市售蛋白质浓缩过滤器浓缩来自此类表达系统的上清液。

[0065] 最终候选物将用于体外和体内吞噬作用。将所选候选物的活性与如所报道的配体诱导的吞噬作用(Herre 2004)进行比较。

[0066] 为了证实最终候选物用于除尽致病因子的体外吞噬作用活性，使用重演人体内活性的体外模型。将从正常血液供体分离的外周血淋巴细胞(PBL)与最终候选物一起孵育以研究所述除尽。将通过ELISA或流式细胞术测量因子的水平。将如先前所述用纯化的初代单核细胞测试抗体的吞噬作用活性(Ackerman 2011)。为了证实候选物对巨噬细胞的吞噬作用活性，将从初代单核细胞产生所述巨噬细胞。另外，研究Ab对由巨噬细胞和DC构成的初代组织细胞的活性，所述初代组织细胞来自单细胞组织匀浆以及骨髓或滑液。

[0067] 为了显示所选抗体候选物在体内用于除尽致病因子(如LDL或大肠杆菌)或降低其水平的活性，将使用小鼠或食蟹猴。将在单一剂量抗体治疗前一天使食蟹猴群组流血，以通过ELISA鉴定LDL的给药前水平。在用抗体治疗后，将在以下时间点使猴子流血：1小时、1天、7天、14天和30天。将通过ELISA确定致病因子(如LDL)在血液和其他生物样本(如滑液、骨髓和脾脏)中的水平。

[0068] 最终mAb候选物将是人的或人源化的，并且针对与人和食蟹猴吞噬作用受体Dectin-1以及致病因子(如LDL)的结合、吞噬作用能力以及体内活性进行表征。另外，当在2℃-8℃下孵育3个月时，最终候选物需要在高于10mg/mL的浓度下可溶，具有低水平的可溶聚集物(<5％)，如通过ELISA所测量维持其与靶标的结合(>90％效力)，如通过SDS PAGE所测量没有降解产物。

[0069] 将在比预期用于人类受试者的剂量高超过5倍的剂量下在食蟹猴中进行对最终人源化候选物的毒理学分析。

[0070] 不希望受理论束缚，认为进行靶向吞噬作用的分子可以显示对以下患者的明显益处：如阿尔茨海默病、帕金森病、癌症、感染性疾病(病毒、细菌、真菌、原生动物感染)、炎性或免疫疾病(例如，自身免疫性疾病、炎性肠病、多发性硬化)、变性疾病(例如，关节和软骨)、类风湿性关节炎、费尔蒂综合征、侵袭性NK白血病、IBM、IBD等。另外，靶向吞噬作用抗体治疗所具有的除尽组织中细胞的活性可能优于依赖于NK细胞的ADCC。相对于靶向髓系细胞并总体上改进吞噬作用的疗法，所述治疗可以具有用于去除特定致病因子的选择性活性。

[0071] 因此，本公开文本尤其提供一种在施用如下分子后在人类受试者中减少致病因子的数量或除尽所述致病因子的方法，所述分子通过与吞噬作用受体和所述因子结合来诱导靶向吞噬作用并且具有免疫球蛋白Fc区。

[0072] 呈现以下描述以使得本领域普通技术人员能够制备和使用各种实施方案。对具体装置、技术和应用的描述仅作为例子来提供。本领域普通技术人员将容易清楚对本文所述实施例的各种修改，并且在不背离各种实施方案的精神和范围的情况下，本文所限定的通用原则可以适用于其他实施例和应用。因此，各种实施方案不意图限制本文所述和显示的实施例，而是符合与权利要求书一致的范围。

实施例

实施例1:对Dectin-1表达的分析

[0073] 此实施例描述用于表征各种细胞类型的Dectin-1表达的实验的结果。

材料和方法

健康供体样品

[0074] 新鲜健康供体血沉棕黄层从斯坦福血液中心(Stanford Blood Center)获得。外周血单核细胞(PBMC)通过ficoll-paque(GE Healthcare,芝加哥,伊利诺伊州)分开来分离,并且冷藏于Bambanker细胞冷冻培养基(Bulldog-Bio,朴茨茅斯,新罕布什尔州)中。简单来说,将血沉棕黄层以1:1比率稀释于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,之后使稀释的血沉棕黄层在ficoll中分层并以760g浓缩。分离PBMC层并在PBS中洗涤,之后进行下游分析。通过红细胞裂解分离外周血白细胞(PBL)。组织样品由合作人体组织网络(Cooperative Human Tissue Network)提供,所述机构是由国家癌症研究所资助的。根据Miltenyi Biotec肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec Inc.,奥本,加利福尼亚州)的制造商说明书来进行组织解离。冷藏的食蟹猴PBMC是从Human Cells获得。

初代细胞和细胞培养

[0075] 根据全单核细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec Inc.,奥本,加利福尼亚州)的制造商说明书从健康供体PBMC分离人单核细胞。对于巨噬细胞分化,使来自PBMC的单核细胞附着于细胞培养板上持续3小时。洗去漂浮细胞并将附着的单核细胞在20ng/ml MCSF(Peprotech,罗基希尔,新泽西州)中培养7天以完全分化为巨噬细胞。将HEK-Blue Null1细胞(Invivogen,圣地亚哥,加利福尼亚州)维持在补充有Normocin和Zeocin的DMEM/10%FBS中。将HEK-Blue hDectin-1a细胞和HEK-Blue hDectin-1b细胞(Invivogen,圣地亚哥,加利福尼亚州)维持在补充有Normocin和嘌呤霉素的DMEM/10%FBS中。

[0076] 根据制造商的建议(Thermo Fisher,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)对Freestyle 293-F细胞进行瞬时转染。简单来说,确定活细胞密度和活力百分比。将细胞用Freestyle 293表达培养基稀释至1×10*6个活细胞/mL的最终密度。将Freestyle Max试剂用OptiPro SFM培养基稀释,混合并在室温下孵育5分钟。将稀释的Freestyle Max试剂添加至用OptiPro SFM培养基稀释的质粒DNA并混合。将Freestyle Max试剂/质粒DNA复合物在室温下孵育10-20分钟。将复合物缓慢转移至细胞,在添加期间缓慢地旋动培养烧瓶,然后将细胞在定轨振荡器上在具有≥80%相对湿度和8%CO2的37℃孵育器中孵育。

流式细胞术分析

[0077] 将大约$1x10^5$-$5x10^5$个细胞铺板于非组织培养处理的96孔V形底板中,并且在人FcgR阻断抗体(Biolegend,圣地亚哥,加利福尼亚州)中在室温下孵育10分钟。随后将细胞用eFluor 506活力染料(ThermoFisher,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)以1:1000稀释度在冰上染色30分钟,之后在FACS缓冲液(含有2%胎牛血清的PBS)中进行洗涤步骤。将抗体混合物(cocktail)添加至细胞,然后在冰上孵育30分钟,之后在FACS缓冲液中进行另一个洗涤步骤。使用Ultracomp珠(ThermoFisher,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)进行抗体补偿。此研究中使用的抗体提供于表1中。所有数据采集和荧光补偿都是使用CytoFlex流式细胞仪(Beckman Coulter,亚特兰大,佐治亚州)来进行。数据分析是使用FlowJo流式细胞术数据分析软件来进行。用于确定单核细胞、淋巴细胞和粒细胞中的Dectin-1表达的策略是通过针对前向和

侧向散射单独进行门控。使用前向散射面积和前向散射高度对单细胞进行门控，之后使用eFluor 506和前向散射面积进行活细胞门控。分别使用CD14、CD3+/CD4+/8+、CD3-CD19+、CD3-CD56+和CD15+标记对单核细胞、T细胞、B细胞、NK细胞和粒细胞进行门控。通过CD11b染色来鉴定培养的巨噬细胞。在肺组织中，使用CD45对造血细胞进行门控。分别使用CD3+、CD3-CD19+、CD3-CD56+策略基于CD45+细胞对T细胞、B细胞和NK细胞进行门控。在基于CD45+细胞排除T、B和NK细胞后，使用CD163和CD11b对巨噬细胞进行门控。对于结合测定，以100、33.3、11.1、3.7、1.23和0.41nM的调整使用一级Dectin-1抗体，并且以166、55.3、18.4和6.150nM的调整使用同种型对照，随后使用荧光标记的抗小鼠Fc特异性二抗。

受体定量

[0078] 通过将健康供体PBMC用APC缀合的靶抗体染色来对Dectin-1受体数量进行定量，并且如上所述基于适当免疫细胞类型进行门控。根据制造商的方案获取等效可溶荧光染料(MESF)校正标准珠(Bangs Laboratories,Inc.,费舍尔,印第安纳州)的Quantum APC分子，并同时进行分析以允许将中值荧光强度测量值转化为MESF单位。通过减去FMO(荧光减一)和同种型对照MESF值来去除背景荧光。随后将MESF值除以荧光团与蛋白质的比率(由制造商提供)以转化为抗体结合能力或受体数量。

抗体

[0079] 表1提供实施例中所述实验中使用的抗体。

表1.荧光标记的抗体。

靶标	克隆	荧光团	目录号	供应商	稀释度
Dectin-1	15e2	-	355402	Biolegend	
Dectin-1	15e2	APC	355406	Biolegend	1:67
Dectin-1	259931	-	MAB1859	R&D Systems	
Dectin-1	259931	APC	FAB17561A	R&D Systems	1:20
Dectin-1	BD6	-	MCA4662GA	Biorad	
Dectin-1	BD6	Alexa Fluor 647	MCA4662A647	Biorad	1:20
Dectin-1	GE2	-	MA5-16692	ThermoFisher	
CD11b	ICRF44	海蓝	301315	Biolegend	1:20
CD14	HCD14	FITC	325604	Biolegend	1:20
CD14	HCD14	PE-Cy7	368606	Biolegend	1:20
CD3	SK7	海蓝	344824	Biolegend	1:20
CD4	OKT4	Alexa Fluor 700	317426	Biolegend	1:40
CD8	SK1	PerCP-Cy5.5	344710	Biolegend	1:20
CD19	B4	亮紫605	302244	Biolegend	1:67
CD16	3G8	APC-Cy7	557758	BD Bioscience	1:200

CD56	B159	FITC	562794	BD Bioscience	1:67
CD45	HI30	BV650	304044	Biolegend	1:40
CD163	GHI/61	APC-Cy7	333622	Biolegend	1:40
HA	12CA5	-	RT0268	bioxcell	
mIgG1	MOPC-21	APC	400120	Biolegend	-
mIgG2a	MOPC-21	APC	981906	Biolegend	-
mIgG2b	27-35	APC	402206	Biolegend	-
mIgG2a	MOPC-173	-	400224	Biolegend	-
mIgG2b	27-35	-	402202	Biolegend	-
mIgG1	MG3-35	-	401302	Biolegend	

结果

[0080] 使用Dectin-1特异性抗体和流式细胞术分析来评价Dectin-1(也称为CLEC7A)在各种细胞类型中的表达。通过流式细胞术使用荧光团缀合的谱系和细胞类型特异性抗体来分析来自供体样品或培养的细胞样品的单一的活的单核细胞和淋巴细胞群,以鉴定相应的免疫细胞群。使用Dectin-1特异性抗体检测Dectin-1。通过与荧光减一(FMO)和同种型对照抗体进行比较来确定Dectin-1表达。在一些实验中,计算Dectin-1受体数量和Dectin-1阳性细胞的百分比。Dectin-1检测和流式细胞术中使用的所有抗体列于表1中。

[0081] 为了确定Dectin-1在免疫细胞群中的表达,收集两个健康供体外周血单核细胞(PBMC)样品并通过流式细胞术进行分析。在健康PBMC样品的单核细胞(CD14+细胞)上发现高水平的Dectin-1表达(图2)。单核细胞是专职吞噬细胞。在所测试的22个供体中的21个中,Dectin-1在单核细胞中的表达是阳性的,并且Dectin-1阳性单核细胞的百分比超过90%,且受体数量范围为32,000至59,000/细胞。在CD4+T细胞(CD3+CD4+细胞)、CD8T细胞(CD3+CD8+细胞)、B细胞(CD3-CD19+细胞)或NK细胞(CD3-CD56+细胞)上未检测到Dectin-1。因此,在健康供体PBMC样品中,Dectin-1在单核细胞上而非在T细胞、B细胞或NK细胞上选择性表达。

[0082] 因为Dectin-1在单核细胞上高度表达,也检查Dectin-1在粒细胞中的表达。粒细胞是另一类型的吞噬免疫细胞。收集三个健康供体外周血白细胞(PBL)样品并通过流式细胞术进行分析。如图3中所示,在三个健康供体PBL样品中,Dectin-1在单核细胞上高度表达并且在粒细胞中表达不多。与单核细胞相比,Dectin-1在粒细胞中以较低水平表达,且受体数量为4,000至5,000/细胞。

[0083] 单核细胞可以分化为巨噬细胞,其是组织特异性吞噬细胞。为了确定Dectin-1在巨噬细胞上的表达,将供体样品在MCSF(20ng/ml)中培养7天,以允许其分化为巨噬细胞。然后将单一的且活的细胞用CD11b染色以确认巨噬细胞分化,然后通过流式细胞术分析以确定Dectin-1表达。如图4中所示,Dectin-1在单核细胞来源的培养的巨噬细胞上表达。对培养的单核细胞来源的巨噬细胞中保留Dectin-1表达的确认用作靶向吞噬作用在组织中可能的原理验证。

[0084] 巨噬细胞是组织特异性吞噬细胞。为了测试Dectin-1在组织内的巨噬细胞中的表达,从健康供体收集肺组织样品,解离并通过流式细胞术进行分析。使用CD45对造血细胞进

行门控以将其与组织中的非造血细胞分离。分别使用CD3+、CD3-CD19+、CD3-CD56+门基于CD45+细胞鉴定T细胞、B细胞和NK细胞。在基于CD45+细胞排除T、B和NK细胞后，使用CD163和CD11b对巨噬细胞进行门控。确定所有分离的细胞群的Dectin-1表达。图5显示此实验的结果。Dectin-1在肺组织样品中的巨噬细胞中高度表达，且受体数量为19,000/细胞。在T细胞、B细胞或NK细胞中未检测到Dectin-1表达，表明Dectin-1在健康人肺组织中的巨噬细胞中选择性表达。在非造血细胞中未检测到Dectin-1。此结果证实，Dectin-1介导的靶向吞噬作用在组织中是可能的，因为适当的细胞类型和靶标二者都存在。

[0085] Dectin-1受体可以表达为两种不同亚型，即亚型A和亚型B。为了检查Dectin-1抗体是否识别A或B亚型，将HEK293细胞工程化以过表达人Dectin-1亚型A或B(分别为HEK-Blue hDectin-1a细胞和HEK-Blue hDectin-1b细胞)，并通过流式细胞术进行分析以评估Dectin-1表达。使用15e2 Dectin-1抗体克隆确认Dectin-1表达。分析对照HEK293细胞(HEK-Blue Null1细胞)和用表达人Dectin-1A的构建体瞬时转染的Freestyle293细胞(293F hDectin-1a FL)以测试Dectin-1检测的特异性。在过表达Dectin-1的HEK293细胞中，15e2Dectin-1抗体克隆识别Dectin-1的A和B两种亚型，如图6中所示。所述抗体对Dectin-1具有特异性，因为在未转化的对照细胞中未检出Dectin-1。工程化的HEK293细胞是用于对正常非吞噬细胞系中涉及Dectin-1的吞噬作用和信号传导事件进行功能评价的有用工具。

[0086] 还在过表达Dectin-1的HEK293细胞中以及在来自健康供体的单核细胞中评价多种Dectin-1抗体克隆(259931、GE2和BD6)的特异性。这些实验的结果归纳于表2中。在所测试的所有细胞中，克隆259931具有与Dectin-1的最高亲和力。259931克隆也具有对Dectin-1的亚型A和亚型B二者的高亲和力，而其他抗体不结合B亚型或者具有对B亚型减小的结合亲和力。针对不同Dectin-1抗体克隆观察到的不同亲和力可能是由于结合至不同表位，如通过其与受体亚型的不同亲和力所证实。

表2.在过表达Dectin-1的细胞系中Dectin-1抗体克隆的亲和力

Dectin-1 抗体克隆	HEK-Blue hDectin-1a细胞 EC50(nM)	HEK-BLUE hDectin-1b细胞 EC50(nM)	HEK293F hDectin-1a FL EC50(nM)	人单核细胞 EC50(nM)
15e2	1.2	9.3	1.4	0.6
259931	0.8	0.9	1.2	0.3
GE2	1.9	12	2.4	1.4
BD6	9.8	-	N/A	-

[0087] 最后，进行结合测定以检查人Dectin-1抗体克隆15e2和259931与食蟹猴Dectin-1的交叉反应性。通过流式细胞术从猴PBMC样品得到单核细胞。将分离的细胞与15e2和259931Dectin-1抗体克隆及其相应的同种型对照抗体IgG2a和IgG2b中的任一种一起孵育，之后与荧光抗小鼠二抗一起孵育。为了生成结合曲线，Dectin-1抗体是以100、33.3、11.1、3.7、1.23和0.41nM的连续剂量调整来使用，而同种型对照是以166、55.3、18.4和6.150nM的连续剂量调整来使用。如图7中所示，两种人Dectin-1抗体克隆都与单核细胞上表达的猴Dectin-1交叉反应。然而，所述克隆展现每种克隆对猴Dectin-1的不同结合特征，从而证实

不同抗体与不同表位结合。因为食蟹猴一般作为临床前模型用于毒理学研究中，并且这些Dectin-1抗体与食蟹猴单核细胞结合，因此所述Dectin-1抗体可以容易地用于毒理学研究。

[0088] 如此实施例中所示，Dectin-1在单核细胞和巨噬细胞(特化的吞噬细胞)中而非在其他免疫细胞中高度表达。Dectin-1表达对健康人肺组织内的巨噬细胞也具有特异性。此实施例中表征的Dectin-1抗体特异性识别细胞中的Dectin-1，可以识别Dectin-1的两种亚型，并且与猴Dectin-1交叉反应。此实施例中所述的抗体可以用于Dectin-1介导的靶向吞噬作用。

实施例2:Dectin-1抗体对吞噬作用和信号传导的作用

[0089] 此实施例描述用于测试Dectin-1抗体对吞噬作用和信号传导的作用的实验的结果。

材料和方法

[0090] 此实验中使用的材料和方法详述于下文中。除非另外说明，否则如实施例1中所述来制备供体样品和初代细胞。除非另外说明，否则如实施例1中所述来进行细胞培养、流式细胞术和受体定量。此时实例中使用的抗体描述于表1中。

使用通过风干固定的Dectin-1抗体在HEK细胞中进行的SEAP报告物测定

[0091] 通过涂布至未处理96孔U形底聚丙烯微量滴定板的孔表面上来固定Dectin-1单克隆抗体15e2、259931、GE2、BD6和对照同种型。为了涂布，将稀释于50μl无菌PBS中的10μg抗体添加至每孔。将板在II类层流柜中静置过夜，取下盖子以允许溶液蒸发。将涂布的板用200μl无菌PBS洗涤两次，以去除盐晶体和未结合的抗体。然后将HEK-Blue hDectin-1a细胞在所述板上培养22小时，并且根据制造商说明书使用QUANTI-Blue溶液(Invivogen，圣地亚哥，加利福尼亚州)在OD 630nm下在上清液中评估碱性磷酸酶水平。

将聚苯乙烯珠用pHrodo标记并与抗体缀合

[0092] pHrodo标记是使用涂布有山羊抗小鼠IgG(Fc)的聚苯乙烯珠(Spherotech，森林湖市，伊利诺伊州)来进行。使用Spin-X离心管过滤器(Corning，科宁市，纽约州)用磷酸盐缓冲盐水pH 7.2(PBS)(Corning，科宁市，纽约州)洗涤所述珠。通过添加碳酸氢盐缓冲液来调整pH。将pHrodo红(琥珀酰亚胺基酯，pHrodo红，SE)(ThermoFisher，沃尔瑟姆，马萨诸塞州)添加至珠并允许其在室温和振荡下孵育60分钟。然后使用Spin-X离心管过滤器用PBS洗涤所述珠以去除过量pHrodo红。在pHrodo标记后，根据制造商的建议将抗体与所述珠缀合。简单来说，基于所述珠与抗体的结合能力，在PBS中将过量抗体添加至所述珠并允许其在室温和振荡下孵育60分钟。然后使用Spin-X离心管过滤器用PBS洗涤所述珠以去除未结合抗体。

抗体依赖性细胞吞噬作用

[0093] 对于吞噬作用实验，将过表达Dectin-1的HEK细胞或单核细胞接种于96孔板中并使其附着1小时。以所需比率添加与Dectin-1抗体或同种型缀合的pHrodo珠。使用Accutase(Thermo Fisher，沃尔瑟姆，马萨诸塞州)使分化的巨噬细胞脱离并将其以所需密度再接种于96孔板中，并允许其附着2小时，之后添加所述珠。添加细胞示踪剂钙黄绿素AM(Thermo Fisher，沃尔瑟姆，马萨诸塞州)以鉴定活细胞。

[0094] 将含有细胞和pHrodo缀合的珠的板置于IncuCyte S3活体成像系统(Sartorius，德国)中。通过在所需时间点获取图像来监测吞噬作用，并使用IncuCyte S3软件进行分析。

取亮红色荧光(被吞食的珠)与钙黄绿素AM阳性细胞的重叠作为吞噬作用的量度。

[0095] 在一些实验中,将pHrodo标记的珠与Dectin-1抗体在96孔板中混合1小时。然后使珠旋转沉降,并抽吸出上清液以去除未结合的抗体。然后将细胞与所述珠以所需比率混合,短暂旋转沉降并监测吞噬作用。可替代地,收集与所述珠一起孵育30分钟或1小时的细胞,并且通过流式细胞术使用CytoFlex流式细胞仪(Beckman Coulter,亚特兰大,佐治亚州)评估吞噬作用。

[0096] 对于双特异性抗体制备,将单一抗体与生物素或链霉亲和素(Abcam,坎布里奇,马萨诸塞州)和pHrodo标记(在有指示的情况下)缀合。将抗体以2:1的比率(生物素抗体:链霉亲和素抗体)混合并允许其在室温下结合30分钟。将双特异性抗体添加至细胞以通过IncuCyte活体成像来研究吞食。在一个实验中,将生物素化的抗体与大小为40nm的链霉亲和素-FITC珠混合(Thermo Fisher,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)。

结果

[0097] 测定实施例1中所述的Dectin-1特异性抗体在各种细胞类型中激活碱性磷酸酶分泌和吞噬作用的能力。除非另有说明,否则用聚苯乙烯抗小鼠Fc IgG珠(约3.4μm)进行吞噬作用,所述珠用pH敏感性荧光染料(pHrodo红)标记并与Dectin-1抗体或同种型对照缀合。配体对Dectin-1的刺激导致细胞中产生分泌型碱性磷酸酶(SEAP)。Dectin-1特异性抗体可以用作受体的配体并刺激细胞中的SEAP信号传导途径。

[0098] 通过SEAP报告物测定使用HEK-Blue hDectin-1a细胞来测试Dectin-1抗体在刺激Dectin-1方面的能力。HEK-Blue hDectin-1a细胞已经被工程化以表达Dectin-1A亚型和Dectin-1/NF-κB/SEAP信号传导途径中涉及的基因,从而响应于Dectin-1配体的刺激来表达分泌型碱性磷酸酶(SEAP)。作为阳性对照,将细胞与酵母多糖(10ug/ml,一种DECTIN的天然配体)一起孵育。如图8中所示,15e2 Dectin-1抗体克隆可能通过接合细胞表面上的Dectin-1来促进SEAP分泌,这表明激动活性。源自Dectin-1抗体的刺激的活性与酵母多糖是可比较的。Dectin-1抗体的作用也是剂量依赖性的,如图8中所示。因此,Dectin-1特异性抗体诱导HEK-Blue hDectin-1a中的碱性磷酸酶分泌。这些细胞提供用于功能性筛选Dectin-1抗体的有用工具。

[0099] Dectin-1的刺激可以导致激活吞噬作用。为了研究Dectin-1特异性吞噬作用,将培养的HEK-Blue hDectin-1a细胞用与Dectin-1抗体或同种型对照抗体缀合的pHrodo标记的珠处理。pHrodo产生的荧光信号在酸性环境(如在吞噬体中发现的环境)中增加。如图9A和图9B中所示,Dectin-1抗体偶联的珠在HEK-Blue hDectin-1a细胞中促进吞噬作用。如图9B中所示,与259931Dectin-1抗体克隆缀合的pHrodo标记的珠相比于同种型对照促进的吞噬作用水平(比同种型对照高4.5倍)高于15e2克隆(比同种型对照高2.1倍)。对HEK-Blue hDectin-1a的处理足以诱导靶向吞噬作用。一些细胞还吞食多个珠,表明高内化效率。由于HEK细胞不表达Fcγ受体(吞噬作用中涉及的另一种受体)并且通常不具有吞噬性,这些结果表明针对Dectin-1依赖性吞噬作用的高特异性。

[0100] 通过竞争测定进一步测试在用Dectin-1抗体刺激后观察到的Dectin-1介导的吞噬作用的特异性。如果观察到的吞噬作用是由于Dectin-1抗体缀合的珠的Dectin-1受体刺激所致,那么预期添加游离Dectin-1抗体会降低所述珠的吞噬作用。在此实验中,将pHrodo标记的珠与范围为20ng至400ng的增加量的Dectin-1抗体或同种型对照(IgG2a)混合。因为

占据400,000个珠的所有结合位点需要20ng抗体(根据制造商的说明书),高于20ng的任何量都会导致过量的未结合抗体。如图10中所示,在过量游离Dectin-1抗体的存在下,Dectin-1特异性抗体诱导的吞噬作用的水平有所降低。过量游离抗体与pHrodo标记的Dectin-1抗体缀合的珠竞争,导致所述珠的吞噬作用降低。此观察支持,抗体诱导的吞噬作用对Dectin-1刺激具有特异性。

[0101] 还使用与Dectin-1抗体或同种型对照缀合的三个大小(0.85μm、3.4μm和8μm)的pHrodo标记的珠检查吞噬作用。发现所有三个大小的珠都通过Dectin-1介导的吞噬作用而被吸收(图11A和图11B)。这些数据支持以下结论:Dectin-1可以有效吞食在致病因子(如细胞(约10-20μm)、细菌(约0.2-2μm)、较大病毒(约0.5-1μm)和蛋白聚集物)的大小范围内的大小不同的颗粒。

[0102] 因为Dectin-1表达为两种不同亚型,测试Dectin-1抗体通过Dectin-1的亚型A和亚型B二者刺激吞噬作用的能力。将HEK-Blue hDectin-1a和HEK-Blue hDectin-1b细胞与缀合有Dectin-1抗体或同种型对照的pHrodo标记的珠一起孵育。在此实验中测试与珠缀合的15e2或259931Dectin-1抗体克隆。这两种克隆可以以不同亲和力与Dectin-1的A和B两种亚型结合(参见表2)。如图12A和图12B中所示,15e2和259931Dectin-1抗体克隆在过表达Dectin-1亚型A的HEK细胞中以可比较的水平促进吞噬作用。然而,在过表达Dectin-1亚型B的HEK细胞中,259931促进的吞噬作用的水平高于15e2克隆。如表2中所示,259931克隆对亚型B的亲和力高于15e2克隆。此结果表明,由Dectin-1抗体接合的特定表位对吞噬能力具有差异性作用,根据所表达的Dectin-1亚型而定。Dectin-1抗体可以在过表达两种Dectin-1亚型A和B的细胞系中促进吞噬作用,并且因此在表达任一种形式的Dectin-1的初代细胞中促进吞噬作用。

[0103] 因为259931Dectin-1抗体克隆在表达Dectin-1的A亚型或B亚型的细胞中促进吞噬作用方面的表现更好,测试该抗体克隆促进吞食不同大小的颗粒的能力。这些结果显示于图13A-图13C中。259931和15e2 Dectin-1抗体克隆二者都以可比较的效率促进对中等颗粒的吞噬作用。然而,259931克隆比15e2克隆更有效地促进对极小或极大颗粒的吞噬作用。此结果显示,两种Dectin-1抗体具有不同的摄入较小或较大颗粒的能力,表明所接合的表位与优越的功能性吞噬能力相关。

[0104] 如实施例1中所述,Dectin-1在人单核细胞(一类吞噬细胞)中高度表达。为了确定单核细胞中的吞噬作用是否可以被Dectin-1的抗体接合所促进,将来自人PBMC的纯化的单核细胞(CD14+)与缀合有Dectin-1抗体的pHrodo标记的珠一起孵育。如图14A-图14C中所示,Dectin-1抗体缀合的珠促进单核细胞的吞噬作用的水平显著高于(高1.6倍)同种型对照珠的所述水平。因此,除了在过表达Dectin-1的细胞中促进吞噬作用以外,Dectin-1特异性抗体还在人单核细胞中促进吞噬作用。

[0105] 单核细胞中的吞噬作用的激活对Dectin-1的刺激具有特异性,并且与Fcγ受体(FcγR)无关。如图15中所示,添加抗体以阻断FcγR没有影响Dectin-1抗体缀合的珠对吞噬作用的诱导。由此通过Dectin-1抗体诱导的单核细胞中的定向吞噬作用具有Dectin-1特异性,并且并非由于FcγR介导的吞噬作用所致。

[0106] 因为Dectin-1介导的吞噬作用需要肌动蛋白细胞骨架,还测试添加松胞菌素D(CytoD,一种肌动蛋白解聚药)的作用。在存在或不存在CytoD的情况下,将单核细胞与

Dectin-1抗体缀合的珠一起孵育。如图16中所示,Dectin-1介导的吞噬作用受到CytoD处理的抑制,从而证实需要肌动蛋白细胞骨架。因为吞噬作用需要活性肌动蛋白聚合并且Dectin-1介导的吞噬作用对CytoD处理敏感,Dectin-1抗体介导的靶向吞噬作用对此类细胞转运具有特异性,并且不是通过非特异性或被动机制进行。

[0107] 最后,分析Dectin-1抗体在人巨噬细胞中促进吞噬作用的能力。将纯化的单核细胞在MCSF(20ng/ml)中培养7天以分化为巨噬细胞。然后将单核细胞来源的巨噬细胞与Dectin-1抗体缀合的珠一起孵育以测试这些细胞中Dectin-1介导的吞噬作用。如图17中所示,DECTIN-1抗体在培养的人巨噬细胞中促进珠的定向吞噬作用。在与Dectin-1抗体缀合的珠一起孵育的细胞中观察到比与同种型对照珠一起孵育的细胞中观察到的更高频率的吞噬作用和更大数量的被吞食的珠。这些结果证实,在组织中通过巨噬细胞表达的Dectin-1进行的Dectin-1介导的吞噬作用是可能的。

[0108] 此实施例中呈现的结果突出显示,在不同区室(如血液、骨髓和组织)中,稳健的靶向除尽是可能的。

[0109] 接下来,在过表达Dectin-1的重组细胞系中检查对与pHrodo标记的抗H3N2病毒抗体缀合的Dectin-1抗体的吞食,从而提供证实由Dectin-1双特异性抗体介导的病毒吞食的概念验证。将生物素化的Dectin-1抗体(15e2-B)或生物素化的同种型(IgG2a-B)与pHrodo标记的链霉亲和素-12CA5抗体(12CA5-SA-pHr,一种与H3N2流感病毒的血凝素蛋白结合的抗H3N2抗体)缀合。将HEK-Blue hDectin-1a细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记并接种于96孔板中(50,000个/孔)。将15e2-B或同种型对照与12CA5-SA-pHr混合,并且允许双特异性抗体的形成进行30分钟。将可溶双特异性抗体以40nM的终浓度添加至细胞。通过用IncuCyte活细胞成像评估pHrodo激活来监测对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞食。双特异性Dectin-1/12CA5抗体与细胞的缀合图显示于图18A中。可以使用这种形式将细胞与H3N2病毒连接。

[0110] 在18小时,代表性图像显示pHrodo阳性细胞(被吞食的12CA5pHrodo标记的抗体在吞噬体中发亮红色荧光;图18B)。图18C显示在24小时中对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞食。通过IncuCyte分析软件对吞食进行定量并表示为红色对象计数(pHrodo)与钙黄绿素阳性细胞的重叠。

[0111] 这些结果证实,靶向Dectin-1和致病因子(例如,H3N2流感病毒)的双特异性抗体可以导致所述因子在过表达Dectin-1的HEK细胞中被吞食。这些数据表明,靶向Dectin-1和小生物因子(如流感病毒(约100nm))的双特异性抗体可以用于将表达Dectin-1的细胞与致病因子相连,用于通过吞噬作用进行吞食和消除。

[0112] 接下来,在初代人单核细胞中检查对与pHrodo标记的抗H3N2病毒抗体缀合的Dectin-1抗体的吞食,从而提供证实在初代人吞噬细胞中由Dectin-1双特异性抗体介导的病毒吞食的概念验证。图19A和图19B显示人单核细胞对Dectin-1双特异性抗体的吞食。将生物素化的Dectin-1抗体(15e2-B)或生物素化的同种型(IgG2a-B)与pHrodo标记的链霉亲和素-12CA5(12CA5-SA-pHr,一种与H3N2流感病毒的血凝素蛋白结合的抗H3N2抗体)缀合。将人单核细胞用细胞渗透性染料钙黄绿素AM标记并接种于96孔板中(50,000个/孔)。将15e2-B或同种型对照抗体与12CA5-SA-pHr混合,并且允许双特异性抗体的形成进行30分钟。将可溶双特异性抗体以40nM的终浓度添加至细胞。通过用IncuCyte活细胞成像评估

pHrodo激活来监测对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞食。图19A显示在21小时中对15e2-B/12CA5-SA-pHr双特异性抗体的吞食，将其通过IncuCyte分析软件进行定量并表示为红色对象计数(pHrodo)与钙黄绿素阳性细胞的重叠。相比于同种型，**p<0.01；****p<0.0001。双因素anova和Holm-Sidak多重比较检验。图19B显示在实验的6小时，pHrodo阳性细胞的代表性图像(被吞食的12CA5 pHrodo标记的抗体在吞噬体中发亮红色荧光)。

[0113] 这些结果表明，单核细胞吞食Dectin-1/H3N2流感病毒双特异性抗体。这些数据支持以下概念：Dectin-1双特异性结合蛋白可以用于促进人单核细胞对致病因子(如流感病毒)的吞食。这突出显示了通过输注可溶的Dectin-1双特异性抗体来消除这些致病因子以供治疗感染性疾病的可能性。

[0114] 还检查初代人单核细胞对40nm珠的吞食。图20A和图20B显示人单核细胞对与生物素化的Dectin-1抗体(15e2-B)或生物素化的同种型(IgG2a-B)缀合的链霉亲和素FITC标记的聚苯乙烯珠(40nm)的吞食。将聚苯乙烯FITC珠用生物素化的Dectin-1抗体或同种型对照饱和30分钟。然后将抗体/珠复合物与培养的人单核细胞以1:6(细胞:珠)的比率一起孵育。通过IncuCyte活细胞成像监测单核细胞的FITC染色。图20A显示在21小时中单核细胞对SA-FITC珠的吞食，将其通过IncuCyte分析软件进行定量并表示为绿色(FITC阳性)对象计数。图20B显示在实验的15小时，FITC阳性细胞的代表性图像。

[0115] 发现抗Dectin-1抗体促进对极小聚苯乙烯珠(40nm)的吞食。这些数据显示，可以通过靶向Dectin-1来吞食极小颗粒，并且表明促进对极小致病因子(如病毒)的吞噬作用的可能性。

[0116] 尽管出于清楚理解的目的，已经通过说明和实施例的方式详细地描述了本公开文本，但是实施方式和实施例不应被解读为限制本公开文本的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容明确地通过引用整体并入。

参考文献

Henson,P.M.,and Bratton,D.L.“Recognition and removal of apoptotic cells.In Phagocyte-pathogen interactions:macrophages and the host response to infection,D.G.Russell and S.Gordon,eds.(ASM Press)2009,pp.341-365.

Flannagan,R.S.,Jaumouille′,V.,and Grinstein,S.“The cell biology of phagocytosis”,2012,Annu.Rev.Pathol.7,61-98

Gordon S,“Phagocytosis:An Immunobiologic Process”2016Immunity 44,463-475

Taylor PR,et al.“Theβ-glucan receptor,dectin-1,is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages”.J.Immunol.2002;169:3876-3882.

Herre J,Marshall ASJ,Caron E,Edwards AD,Williams DL,Schweighoffer E,Tybulewicz V,Reis e Sousa C,Gordon S,and Brown GD,“Dectin-1uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages”Blood,2004,Vol 104,No 13,4038-45

Rosales C and Uribe-Querol E,“Phagocytosis:A Fundamental Process in Immunity”2017,BioMed Research International,Volume 2017,Article ID9042851,

18pages Ackerman ME,Moldt B,Wyatt RT,Dugast AS,McAndrew E,Tsoukas S,Jost S,Berger CT,Sciaranghella G,Liu Q,Irvine DJ,Burton DR,Alter G,"Arobust,high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples",J.Immunol.Methods,2011,366,pp.8-19.

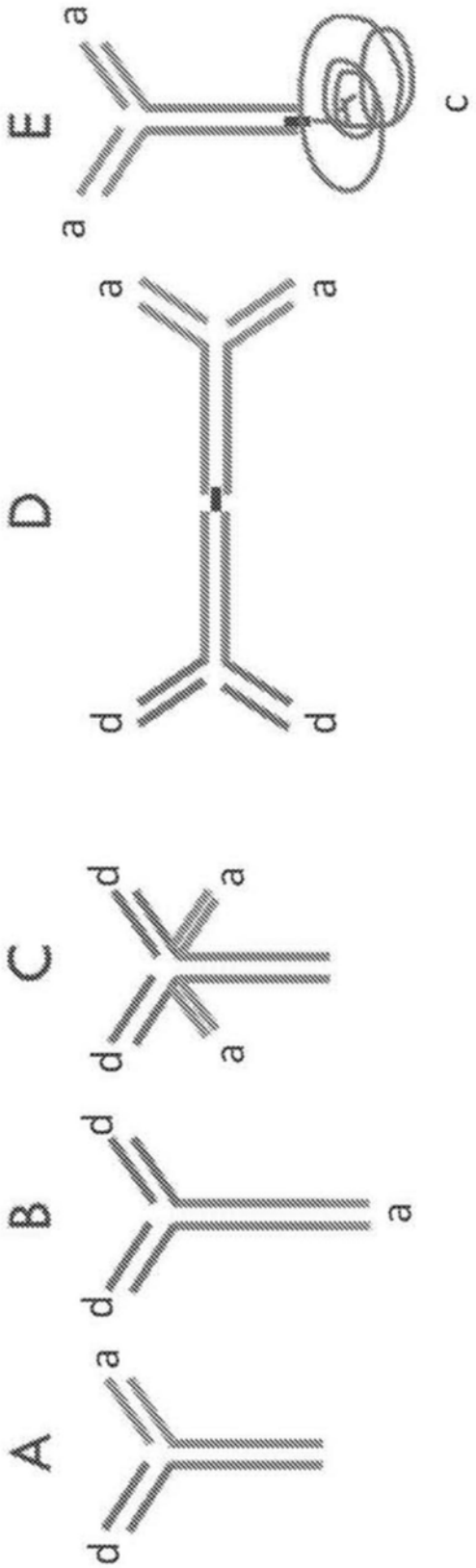


FIG.1A

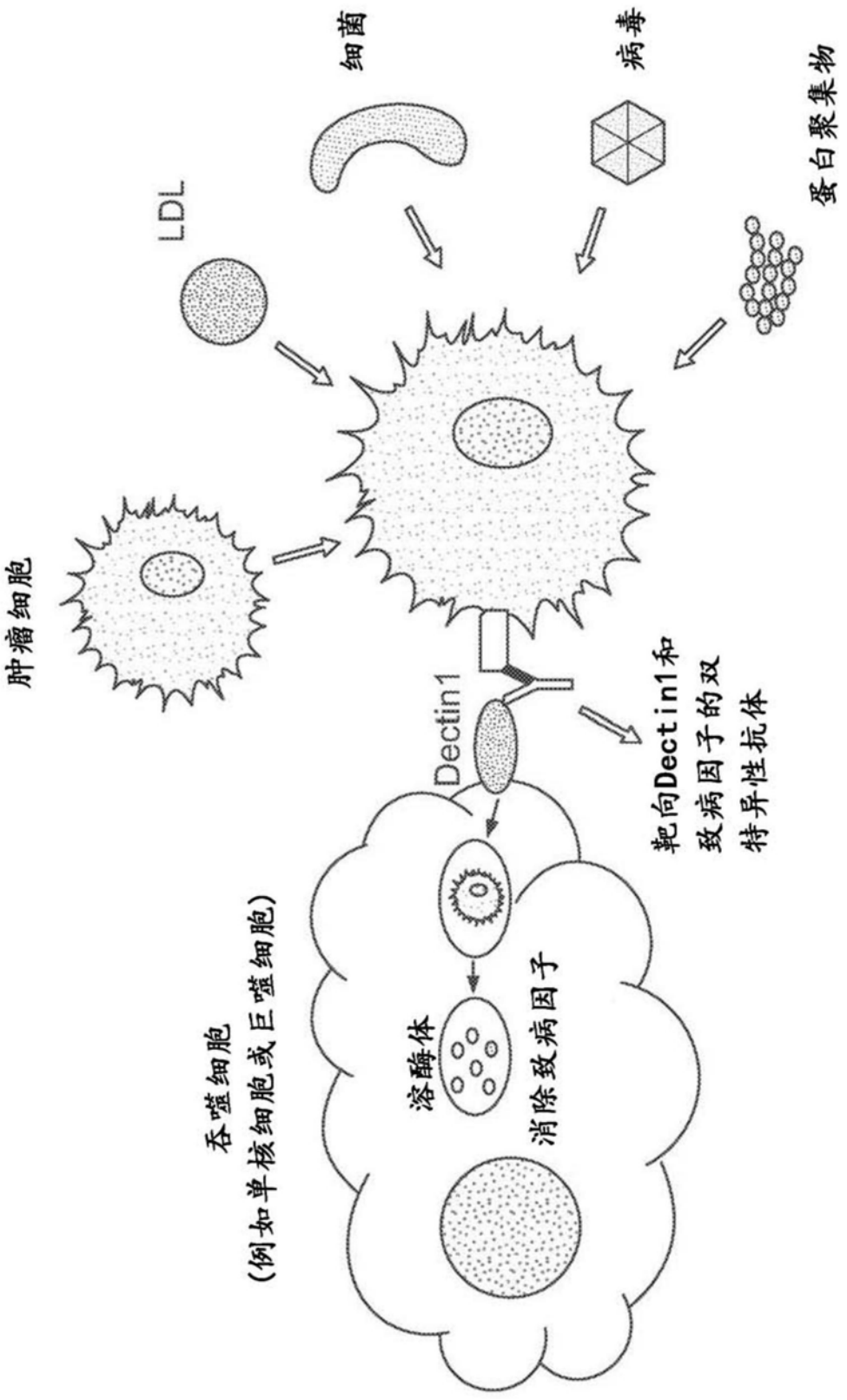

细菌
病毒
LDL
蛋白聚集物
肿瘤细胞
Dectin1
靶向Dectin1和
致病因子的双
特异性抗体
吞噬细胞
(例如单核细胞或巨噬细胞)
溶酶体
消除致病因子

FIG.1B

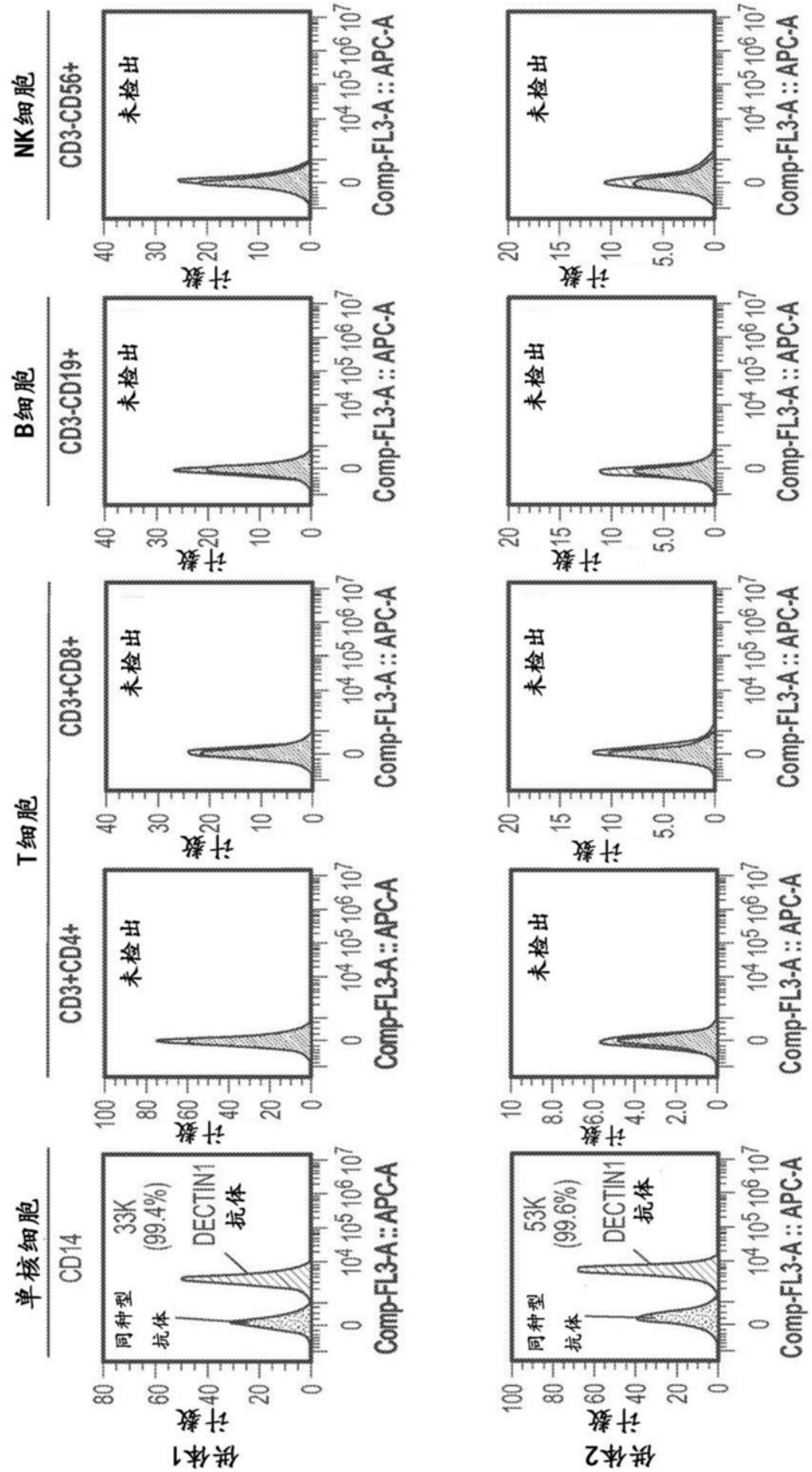

单核细胞
T细胞
B细胞
NK细胞
CD14
CD3+CD4+
CD3+CD8+
CD3-CD19+
CD3-CD56+
同种型抗体
33K (99.4%)
53K (99.6%)
DECTIN1抗体
未检出
计数
Comp-FL3-A :: APC-A
供体1
供体2

FIG.2

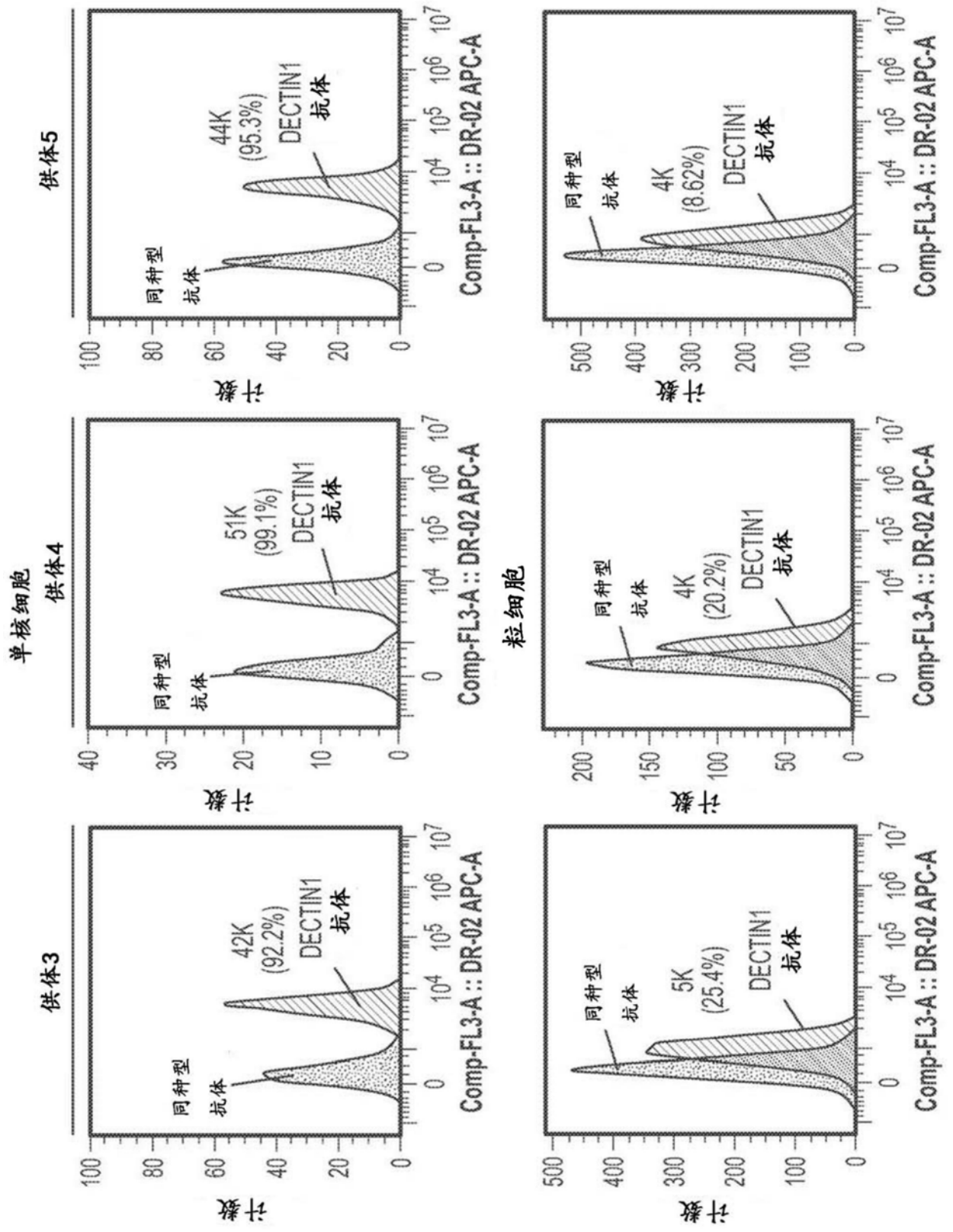

单核细胞
粒细胞
供体3
供体4
供体5
计数
同种型
抗体
42K
(92.2%)
DECTIN1
抗体
51K
(99.1%)
44K
(95.3%)
5K
(25.4%)
4K
(20.2%)
4K
(8.62%)
Comp-FL3-A :: DR-02 APC-A

FIG.3

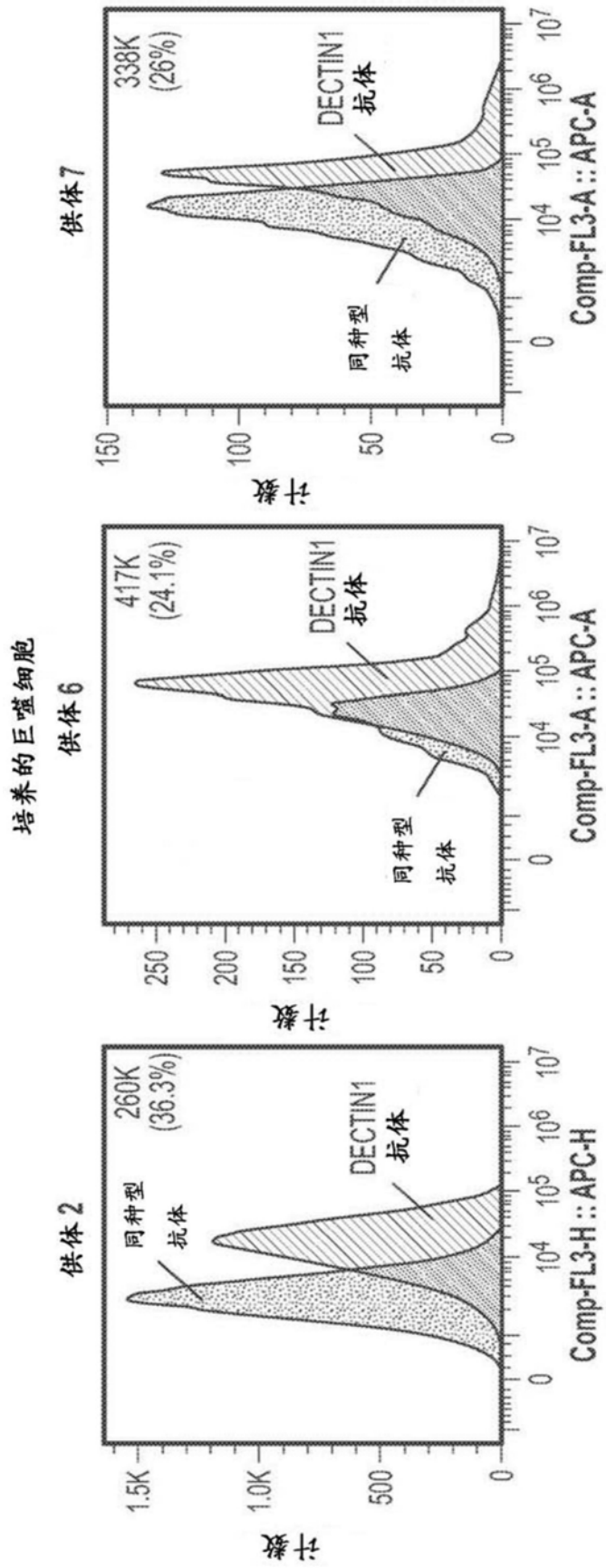

培养的巨噬细胞
供体 2
260K
(36.3%)
同种型
抗体
DECTIN1
抗体
计数
Comp-FL3-H :: APC-H
供体 6
417K
(24.1%)
DECTIN1
抗体
同种型
抗体
计数
Comp-FL3-A :: APC-A
供体 7
338K
(26%)
DECTIN1
抗体
同种型
抗体
计数
Comp-FL3-A :: APC-A

FIG.4

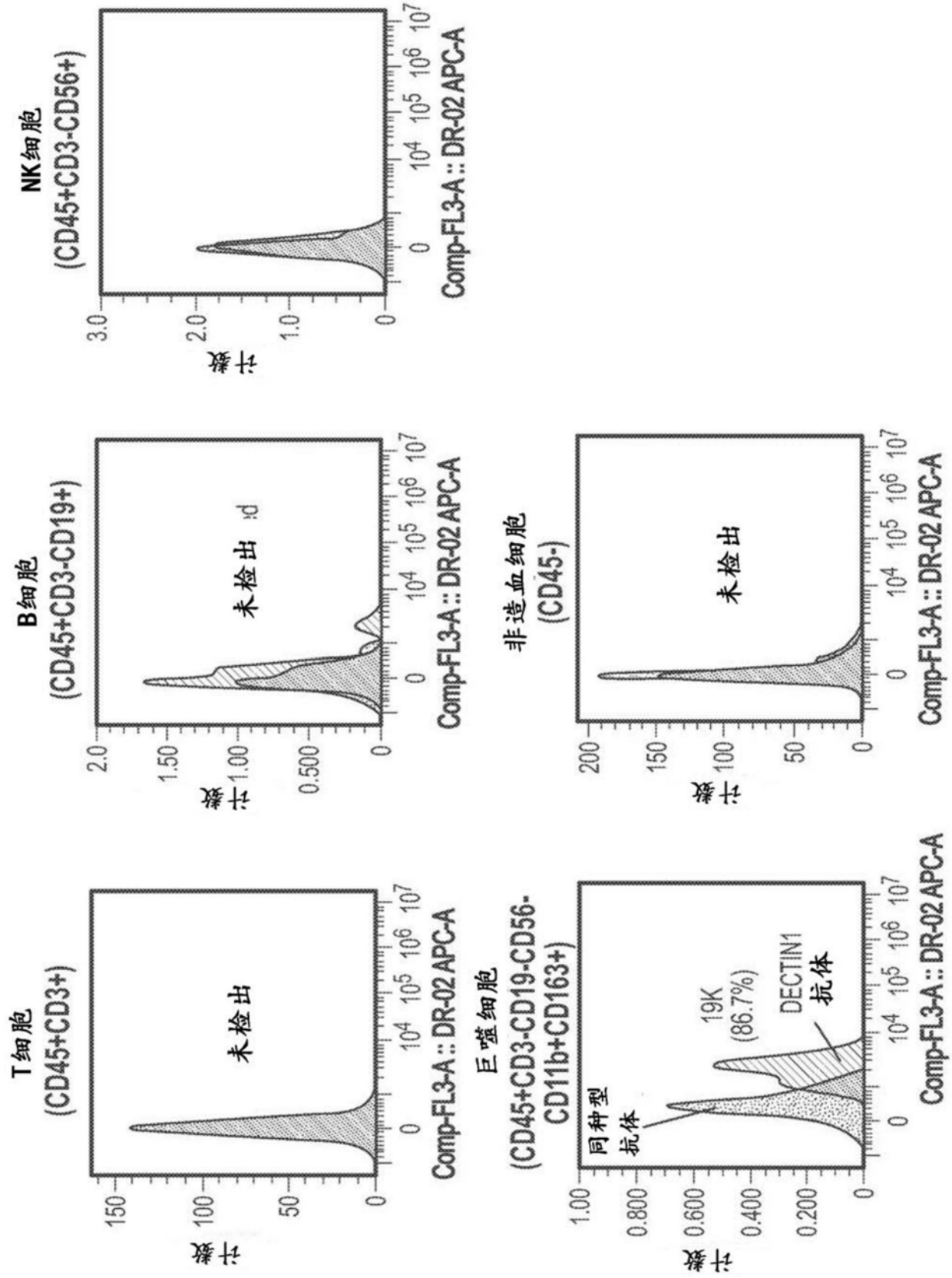

T细胞
(CD45+CD3+)
未检出
计数
Comp-FL3-A :: DR-02 APC-A
B细胞
(CD45+CD3-CD19+)
未检出
计数
Comp-FL3-A :: DR-02 APC-A
NK细胞
(CD45+CD3-CD56+)
计数
Comp-FL3-A :: DR-02 APC-A
巨噬细胞
(CD45+CD3-CD19-CD56-CD11b+CD163+)
同种型抗体
19K (86.7%)
DECTIN1抗体
计数
Comp-FL3-A :: DR-02 APC-A
非造血细胞
(CD45-)
未检出
计数
Comp-FL3-A :: DR-02 APC-A

FIG.5

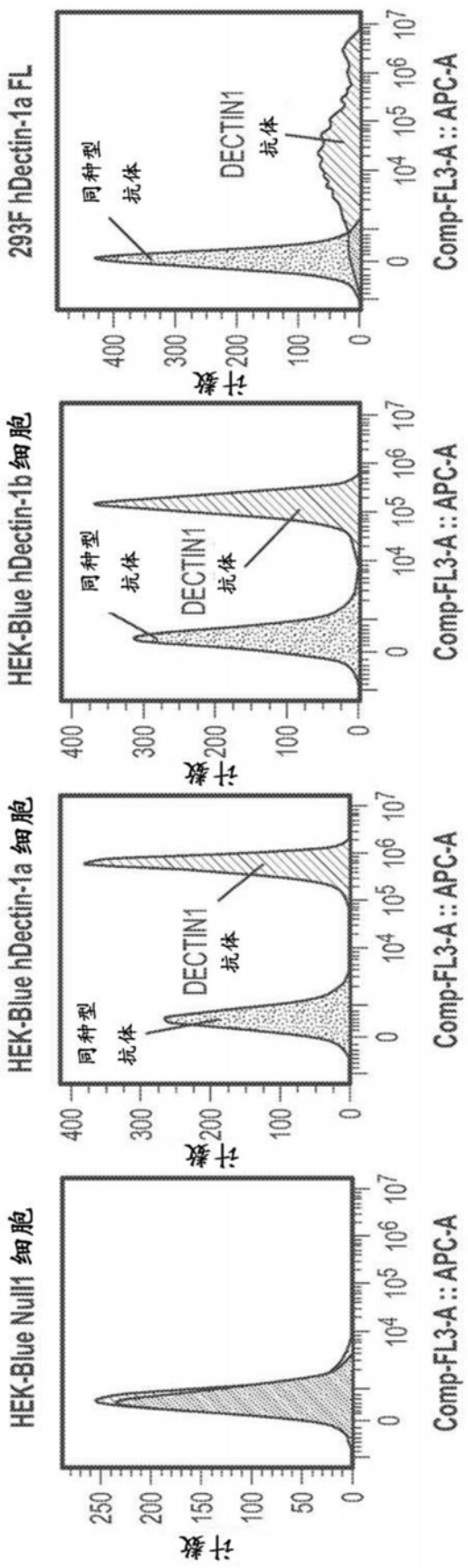

HEK-Blue Null1 细胞
HEK-Blue hDectin-1a 细胞
HEK-Blue hDectin-1b 细胞
293F hDectin-1a FL
计数
同种型
抗体
DECTIN1
抗体
Comp-FL3-A :: APC-A

FIG.6

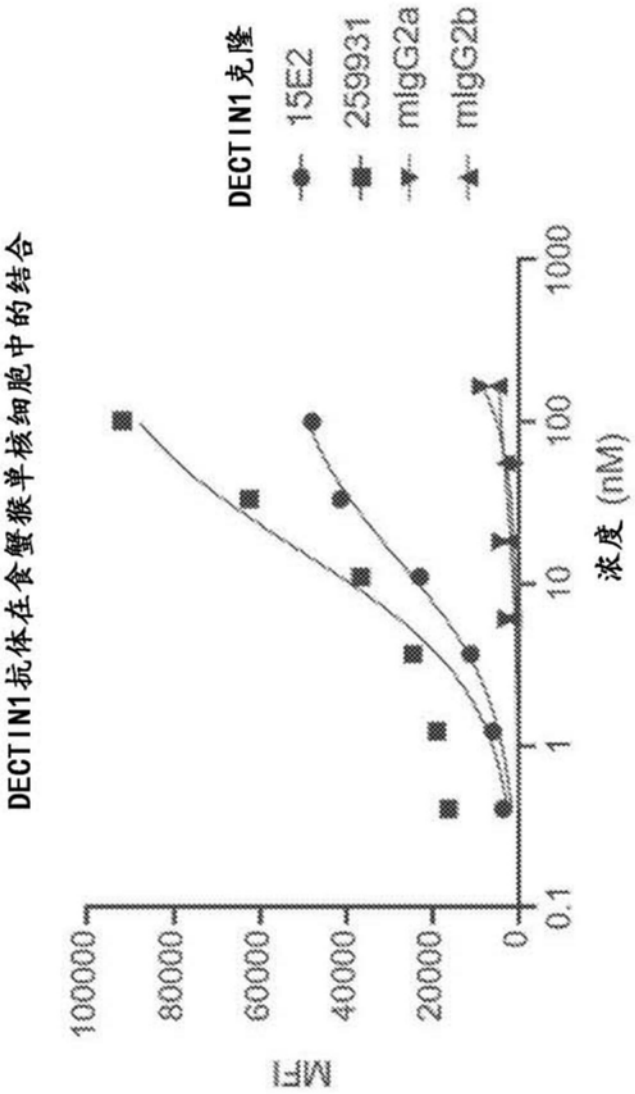

DECTIN1抗体在食蟹猴单核细胞中的结合
DECTIN1克隆
15E2
259931
mIgG2a
mIgG2b
MFI
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

FIG.7

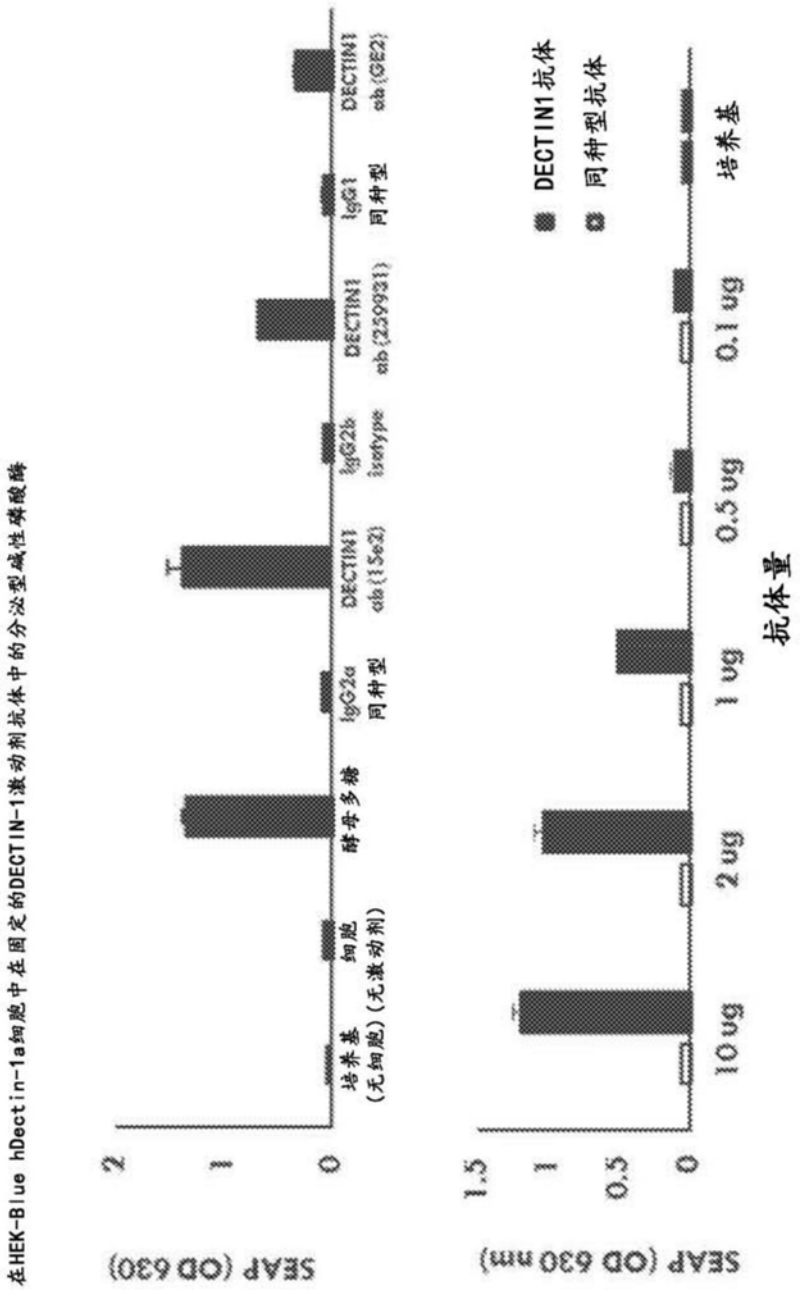

在HEK-Blue hDectin-1a细胞中在固定的DECTIN-1激动剂抗体中的分泌型碱性磷酸酶
SEAP (OD 630)
2
1
0
培养基
(无细胞)(无激动剂)
细胞
酵母多糖
IgG2a
同种型
DECTIN1
clone 15e2
IgG2b
isotype
DECTIN1
clone 259931
IgG1
同种型
DECTIN1
clone GE2
SEAP (OD 630 nm)
1.5
1
0.5
0
DECTIN1抗体
同种型抗体
10 ug
2 ug
1 ug
0.5 ug
0.1 ug
培养基
抗体量

FIG.8

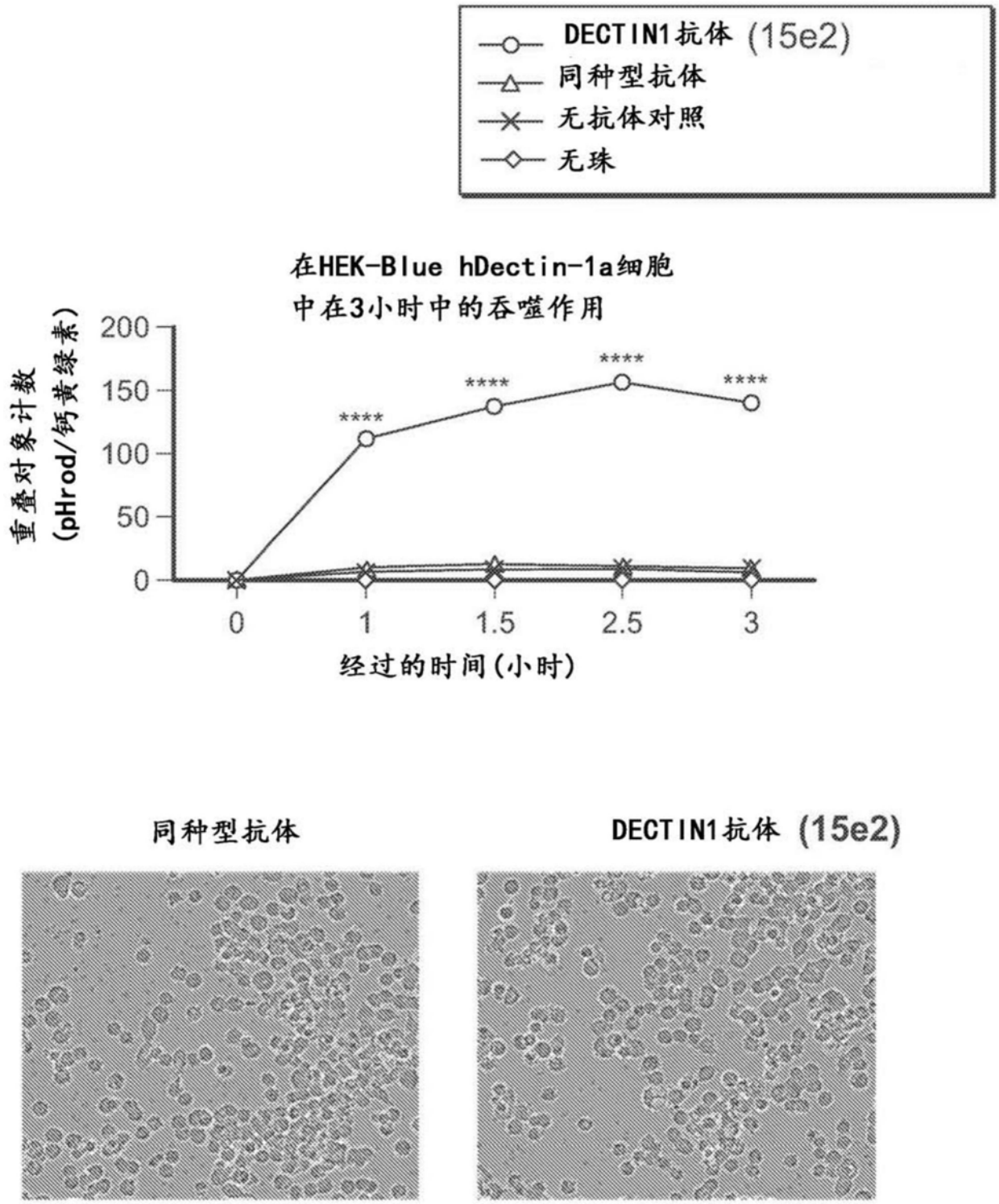

DECTIN1抗体 (15e2)
同种型抗体
无抗体对照
无珠
在HEK-Blue hDectin-1a细胞
中在3小时中的吞噬作用
重叠对象计数
(pHrod/钙黄绿素)
200
150
100
50
0
****
****
****
****
0
1
1.5
2.5
3
经过的时间(小时)
同种型抗体
DECTIN1抗体 (15e2)

FIG.9A

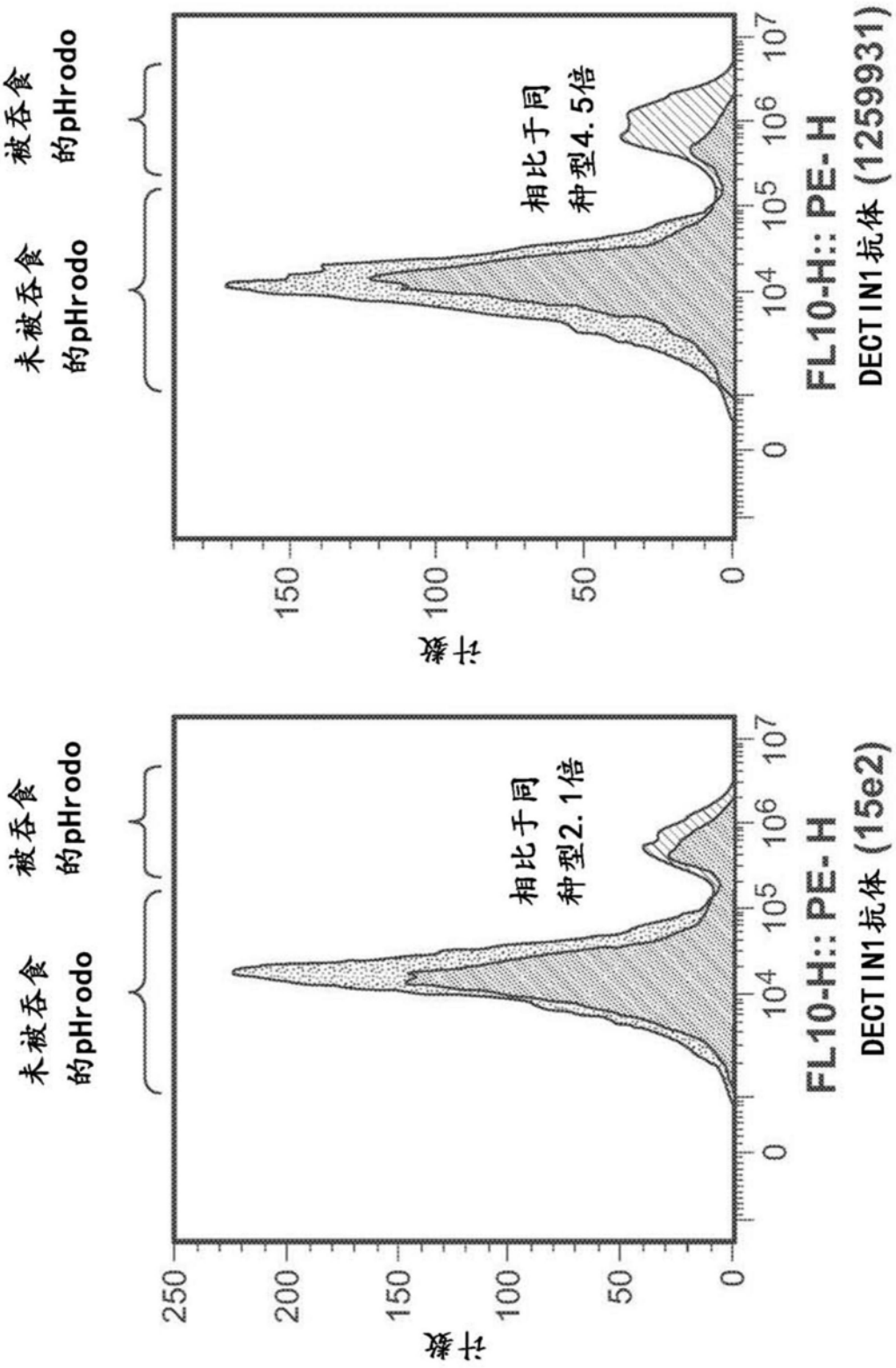

未被吞食的pHrodo
被吞食的pHrodo
相比于同种型4.5倍
FL10-H:: PE- H
DECTIN1抗体 (1259931)
计数
未被吞食的pHrodo
被吞食的pHrodo
相比于同种型2.1倍
FL10-H:: PE- H
DECTIN1抗体 (15e2)
计数

FIG.9B

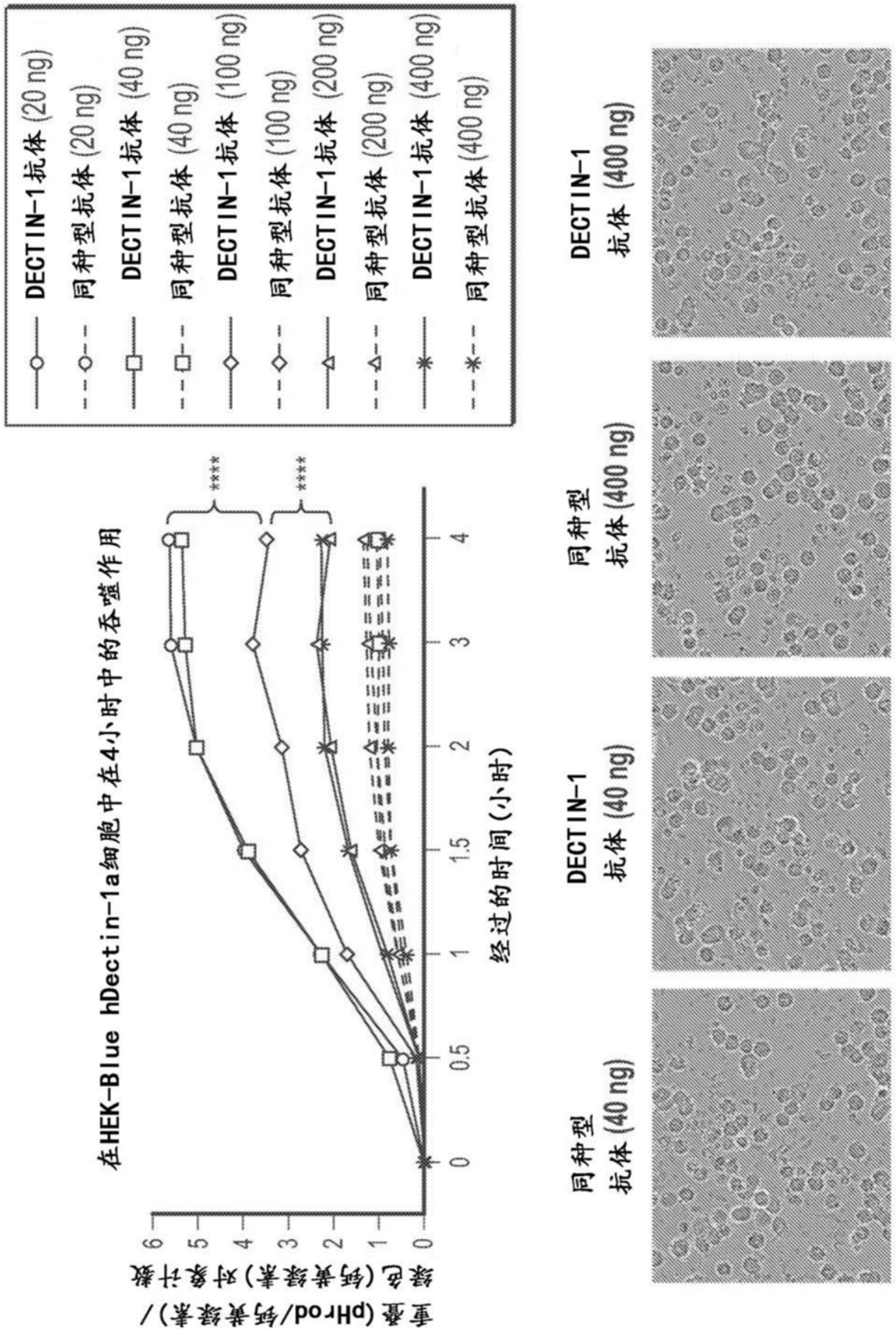

DECTIN-1抗体 (20 ng)
同种型抗体 (20 ng)
DECTIN-1抗体 (40 ng)
同种型抗体 (40 ng)
DECTIN-1抗体 (100 ng)
同种型抗体 (100 ng)
DECTIN-1抗体 (200 ng)
同种型抗体 (200 ng)
DECTIN-1抗体 (400 ng)
同种型抗体 (400 ng)
在HEK-Blue hDectin-1a细胞中在4小时中的吞噬作用
重叠(pHrod/钙黄绿素)/绿色(钙黄绿素)孔象计数
经过的时间(小时)
****
****
同种型抗体 (40 ng)
DECTIN-1抗体 (40 ng)
同种型抗体 (400 ng)
DECTIN-1抗体 (400 ng)

FIG.10

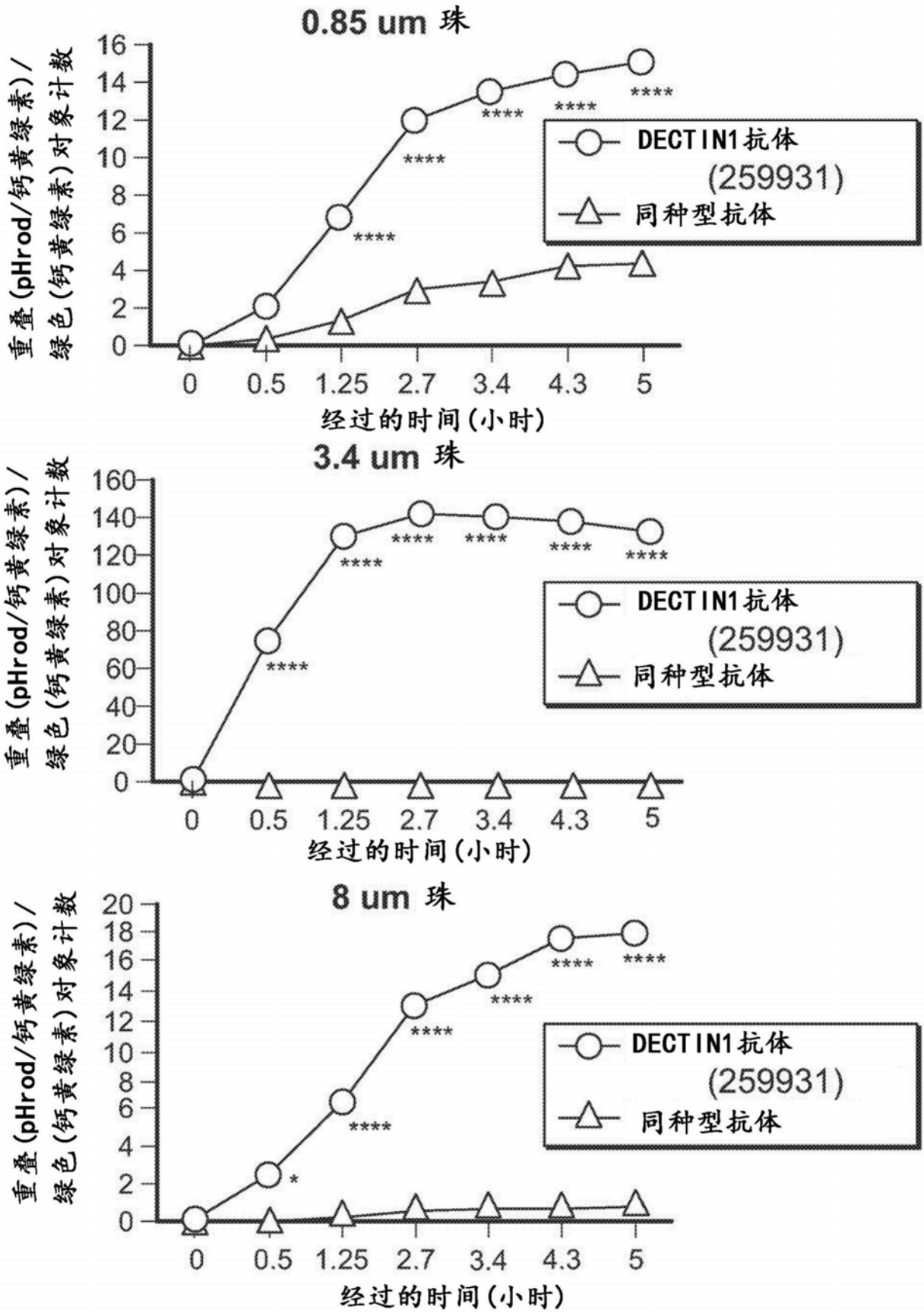

0.85 um 珠
重叠(pHrod/钙黄绿素)/绿色(钙黄绿素)对象计数
经过的时间(小时)
DECTIN1抗体 (259931)
同种型抗体
3.4 um 珠
重叠(pHrod/钙黄绿素)/绿色(钙黄绿素)对象计数
经过的时间(小时)
DECTIN1抗体 (259931)
同种型抗体
8 um 珠
重叠(pHrod/钙黄绿素)/绿色(钙黄绿素)对象计数
经过的时间(小时)
DECTIN1抗体 (259931)
同种型抗体

FIG.11A

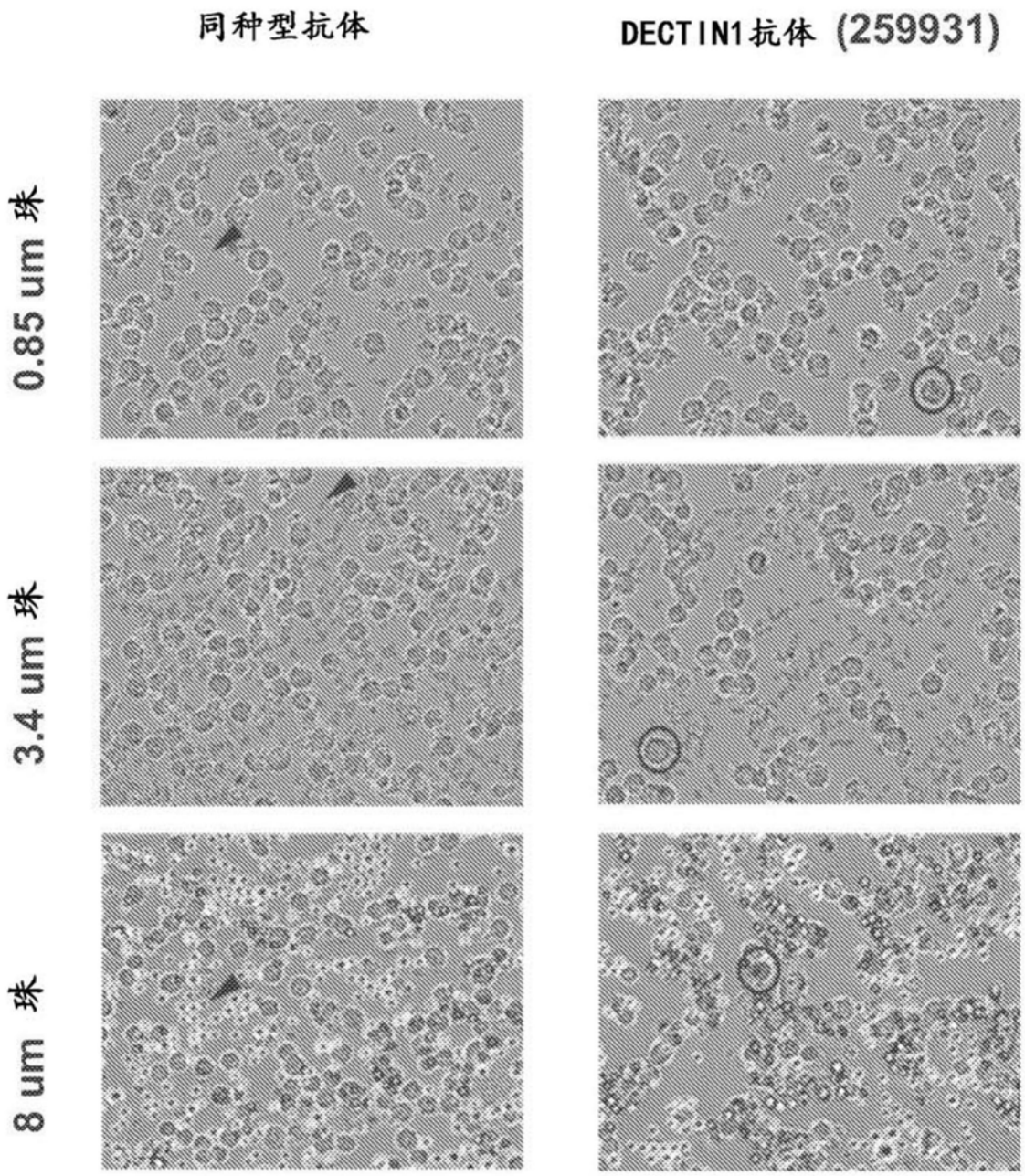


FIG.11B

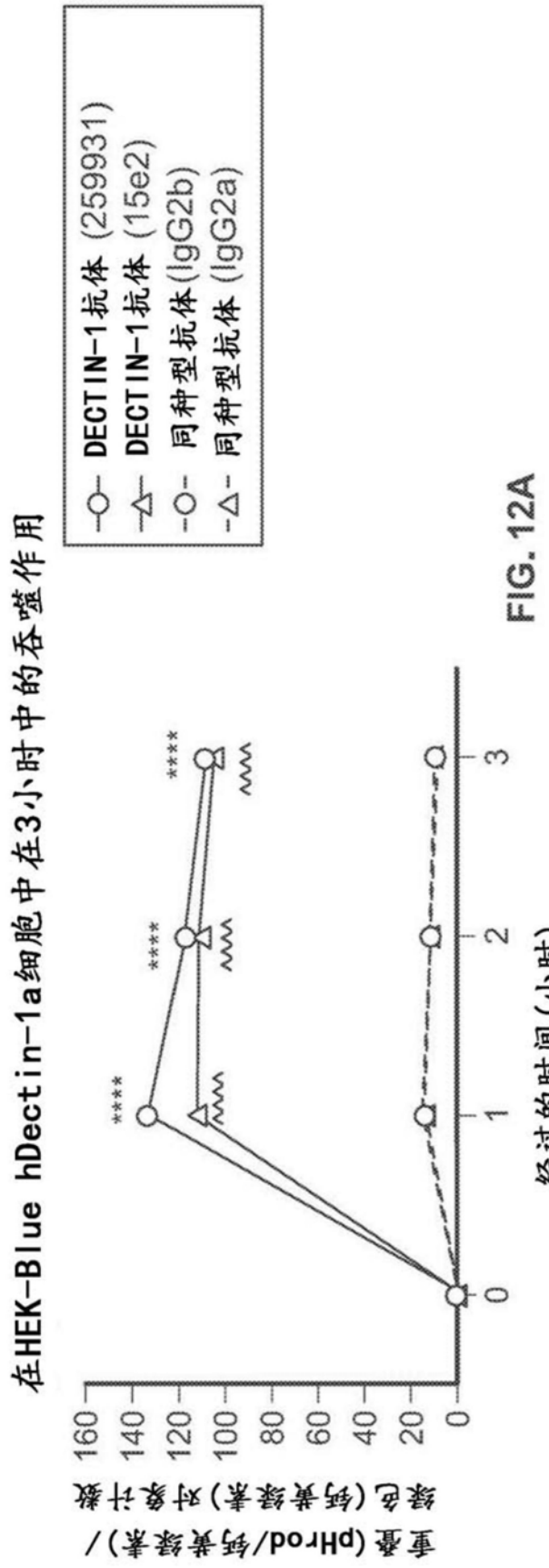


FIG. 12A

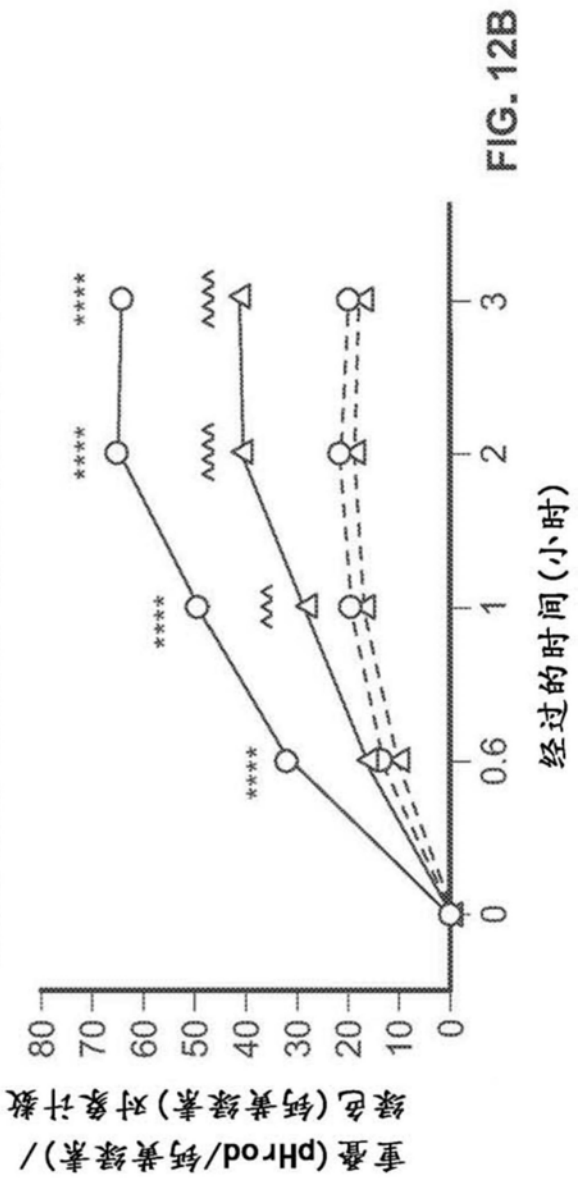


FIG. 12B

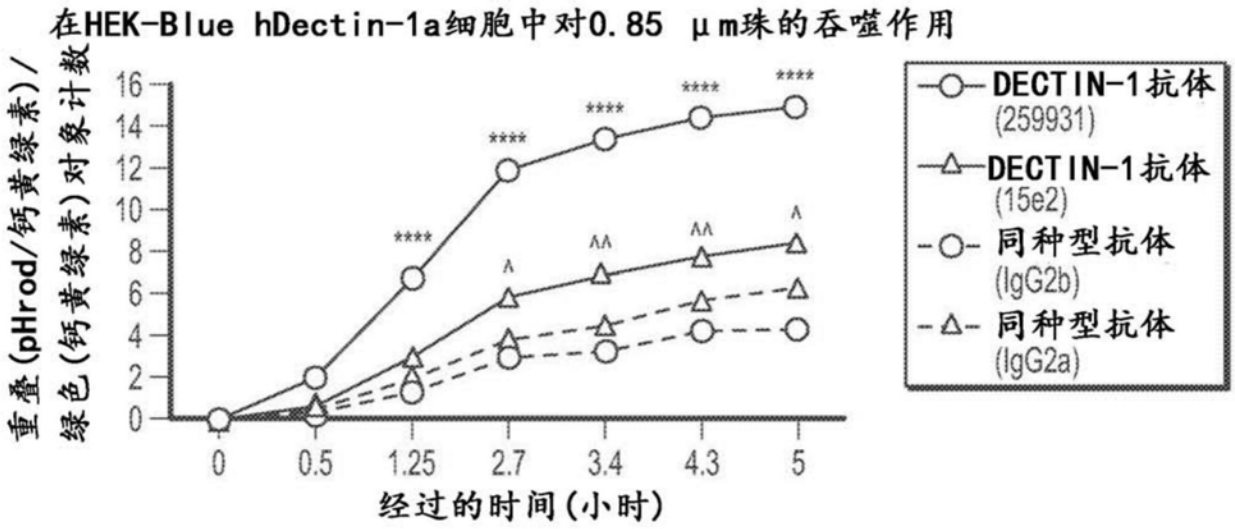


FIG.13A

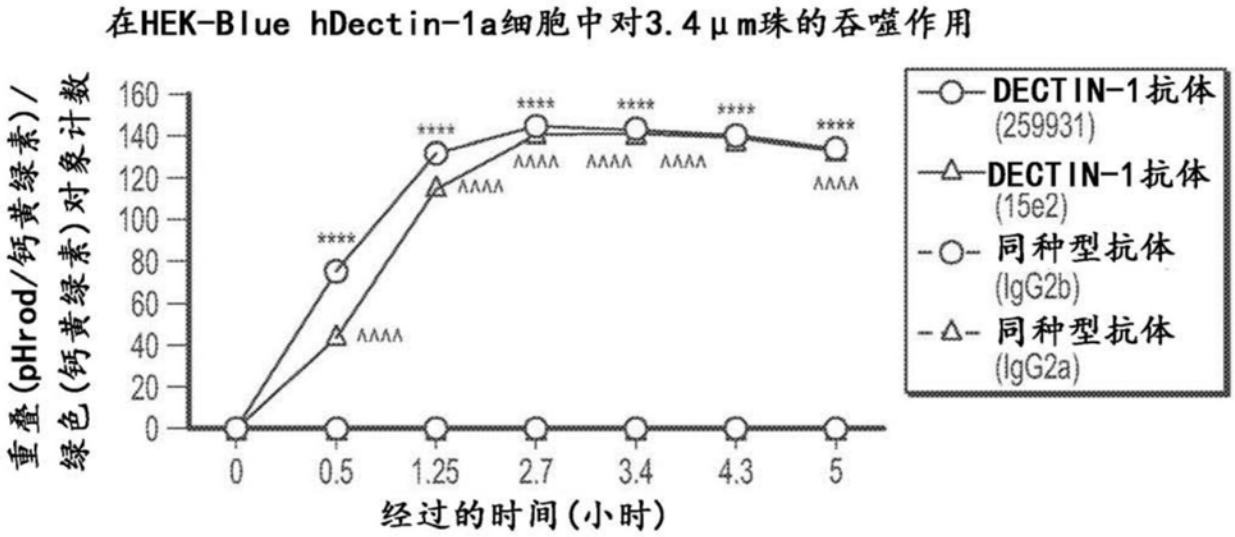


FIG.13B

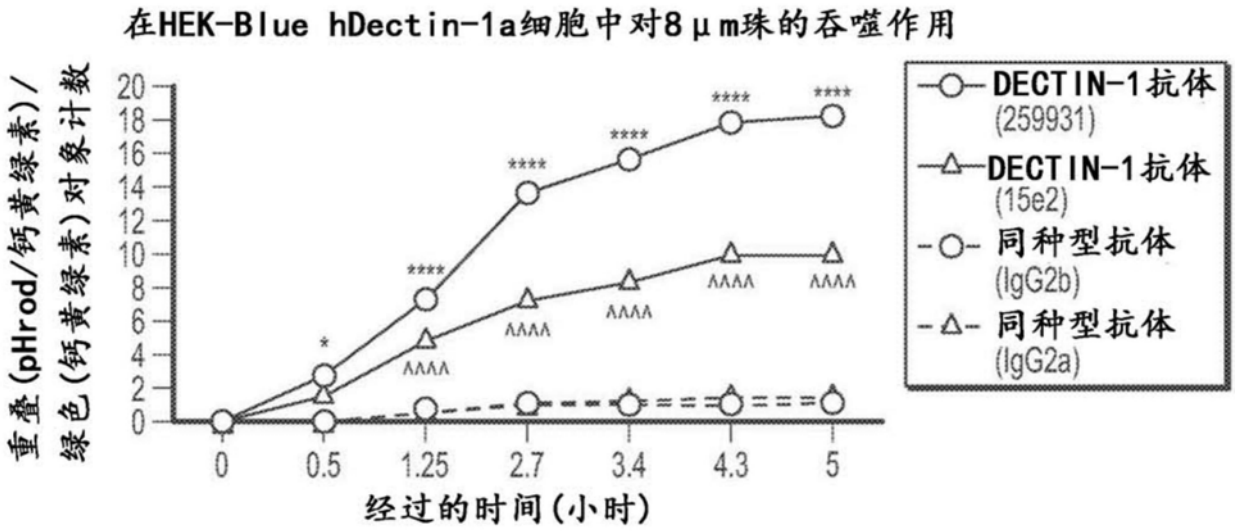

在HEK-Blue hDectin-1a细胞中对8μm珠的吞噬作用
重叠(pHrod/钙黄绿素)/绿色(钙黄绿素)对象计数
经过的时间(小时)
0
0.5
1.25
2.7
3.4
4.3
5
DECTIN-1抗体 (259931)
DECTIN-1抗体 (15e2)
同种型抗体 (IgG2b)
同种型抗体 (IgG2a)

FIG.13C

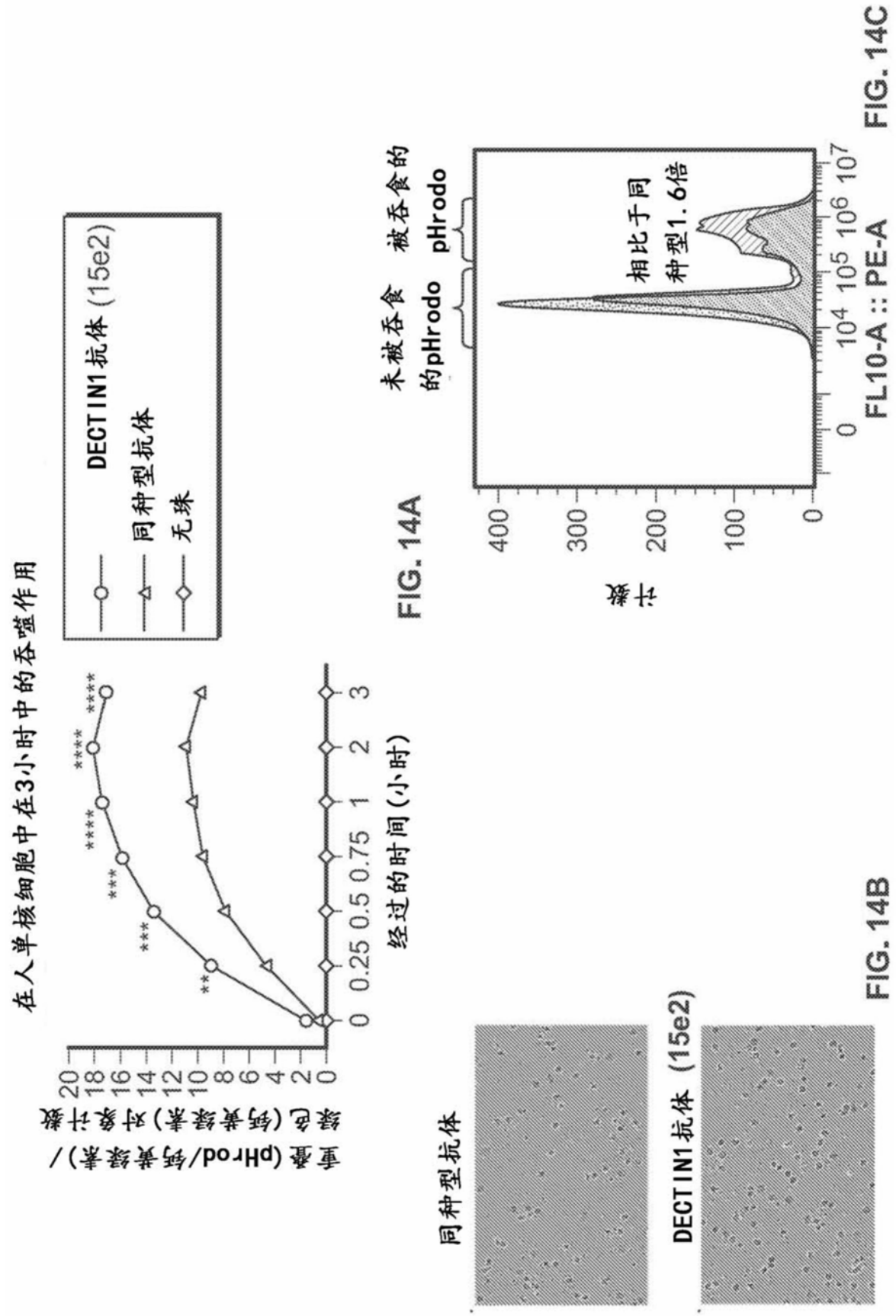


FIG. 14B

FIG. 14A

FIG. 14C

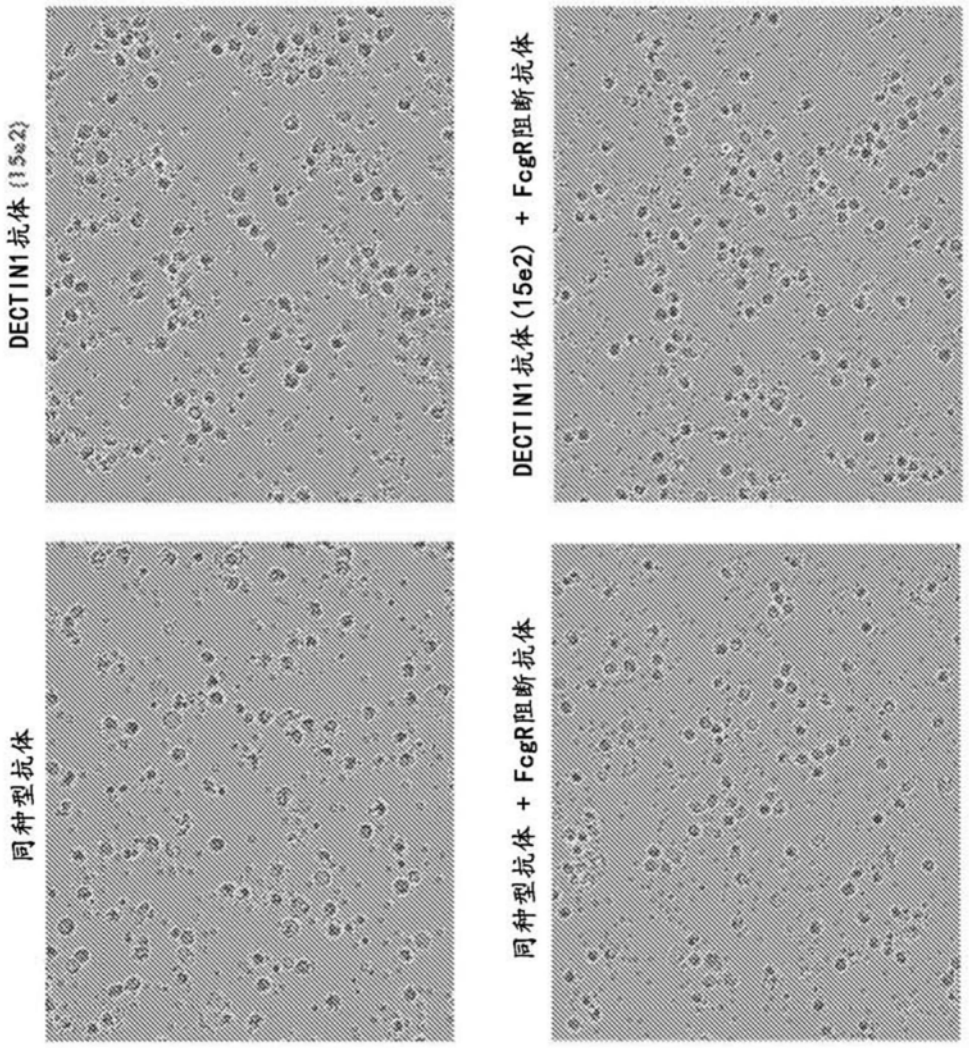

DECTIN1抗体(15e2)
DECTIN1抗体(15e2) + FcgR阻断抗体
同种型抗体
同种型抗体 + FcgR阻断抗体

FIG.15

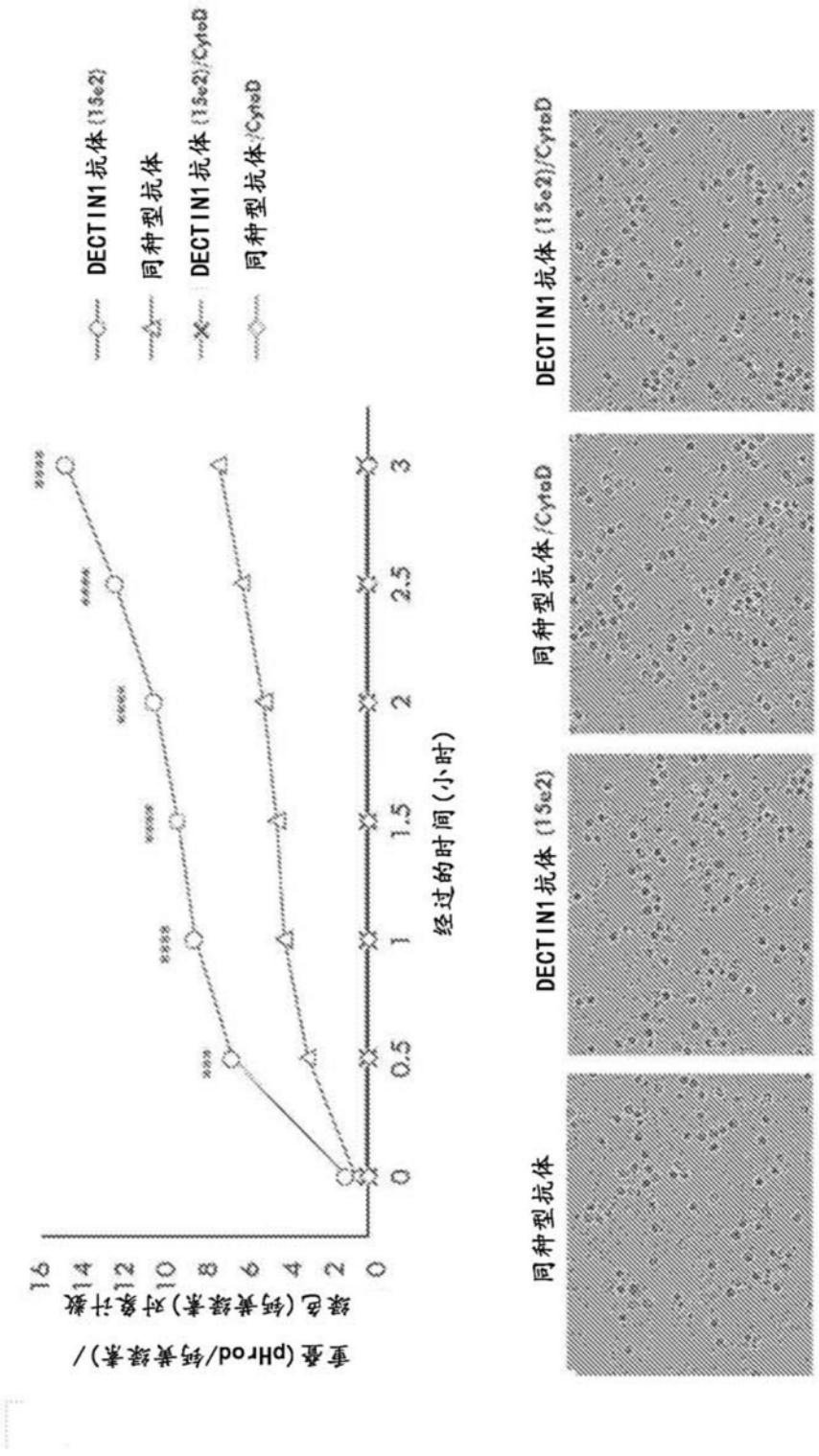

DECTIN1抗体(15e2)
同种型抗体
DECTIN1抗体(15e2)/CytoD
同种型抗体/CytoD
重叠(pHrod/钙黄绿素)/绿色(钙黄绿素)对象计数
经过的时间(小时)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
同种型抗体
DECTIN1抗体(15e2)
同种型抗体/CytoD
DECTIN1抗体(15e2)/CytoD

FIG.16

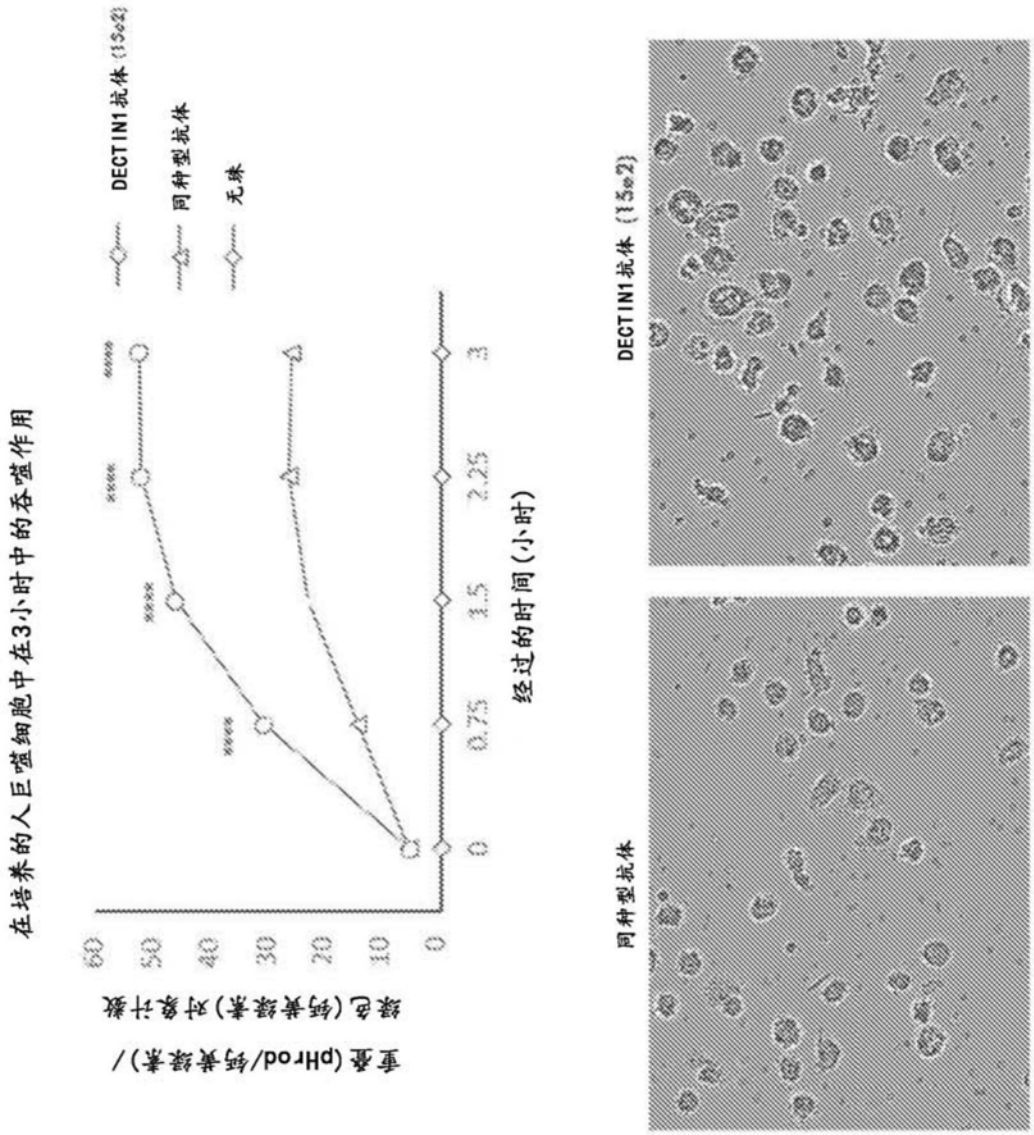

在培养的人巨噬细胞中在3小时中的吞噬作用
重叠(pHrod/钙黄绿素)/绿色(钙黄绿素)对象计数
经过的时间(小时)
DECTIN1抗体(15e2)
同种型抗体
无抗
同种型抗体
DECTIN1抗体(15e2)

FIG.17

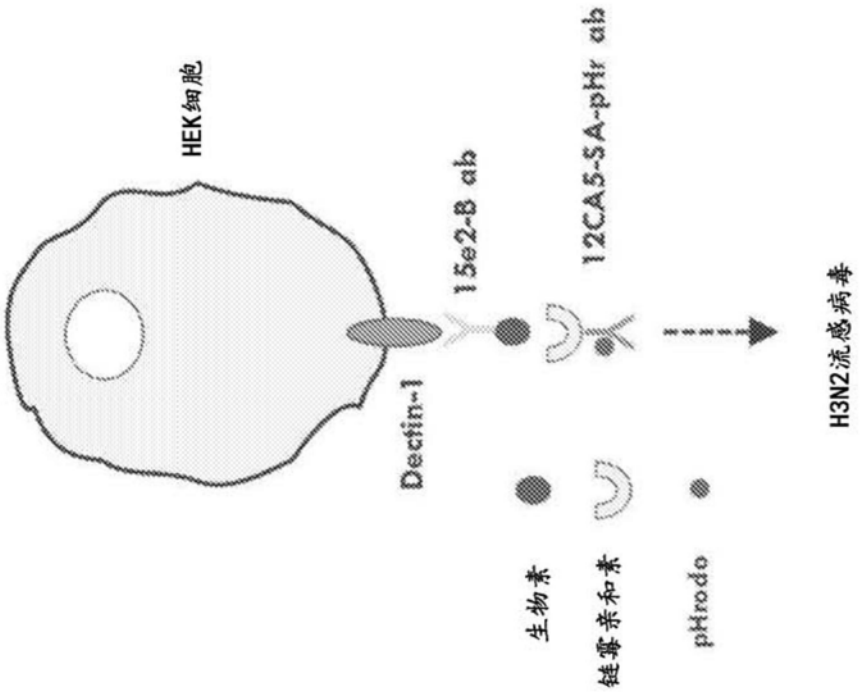


FIG.18A

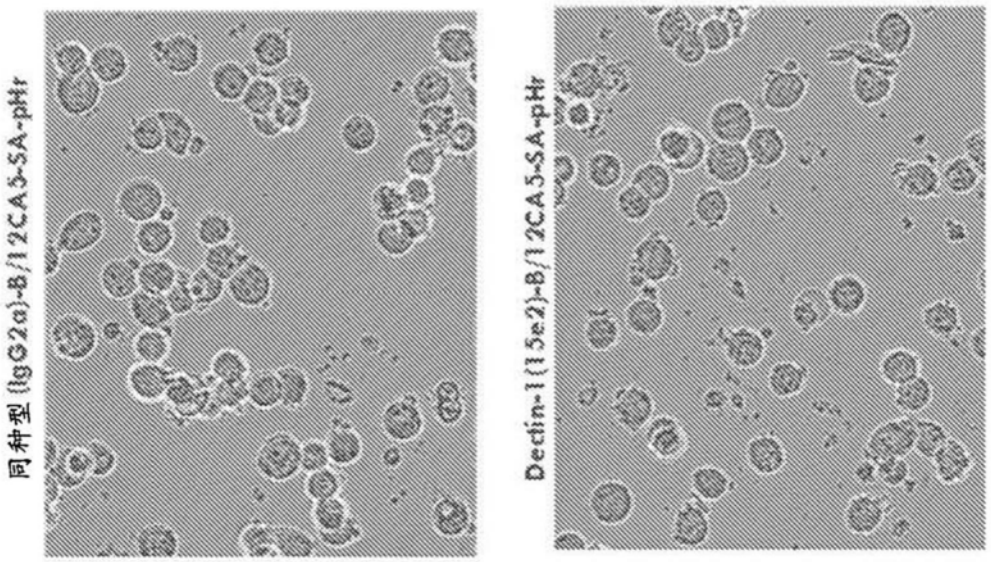


FIG.18B

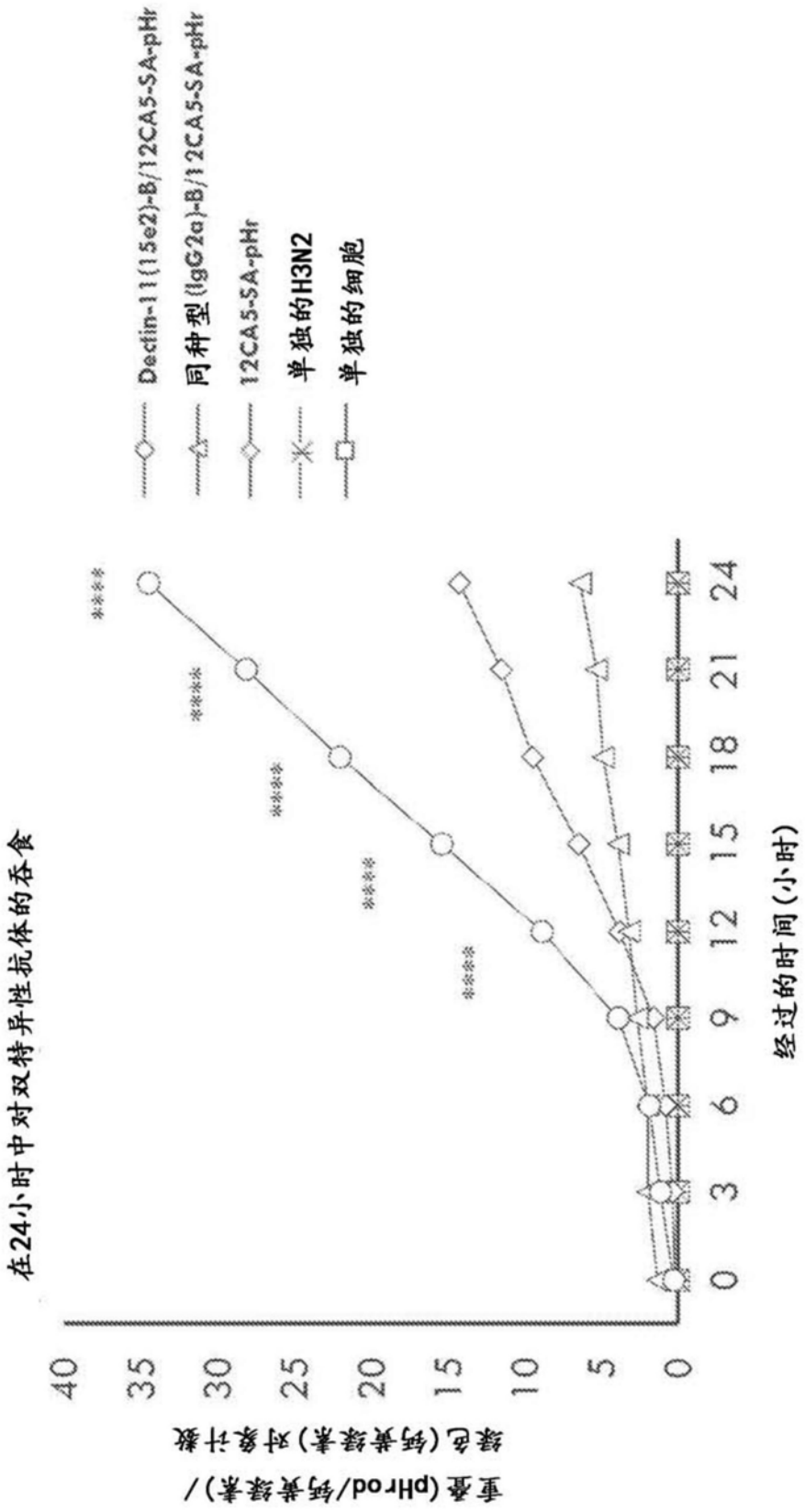

在24小时中对双特异性抗体的吞食
重叠(pHrod/钙黄绿素)/
绿色(钙黄绿素)对象计数
经过的时间(小时)
Dectin-1{15e2}-B/12CA5-SA-pHr
同种型{IgG2a}-B/12CA5-SA-pHr
12CA5-SA-pHr
单独的H3N2
单独的细胞
****
****
****
****
****
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
3
6
9
12
15
18
21
24

FIG.18C

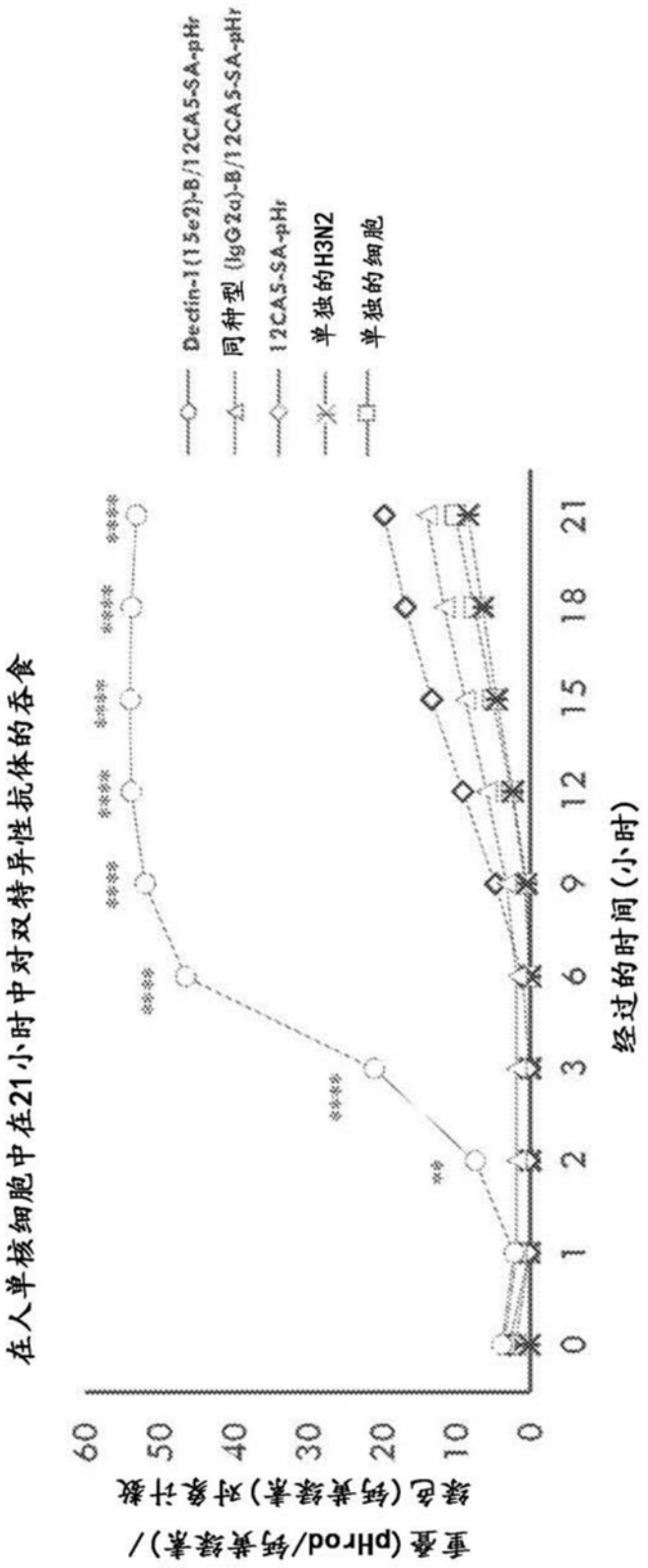

在人单核细胞中在21小时中对双特异性抗体的吞食
重叠(pHrod/钙黄绿素)/
绿色(钙黄绿素)对象计数
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
6
9
12
15
18
21
经过的时间(小时)
Dectin-1(15e2)-B/12CA5-SA-pHr
同种型(IgG2a)-B/12CA5-SA-pHr
12CA5-SA-pHr
单独的H3N2
单独的细胞

FIG.19A

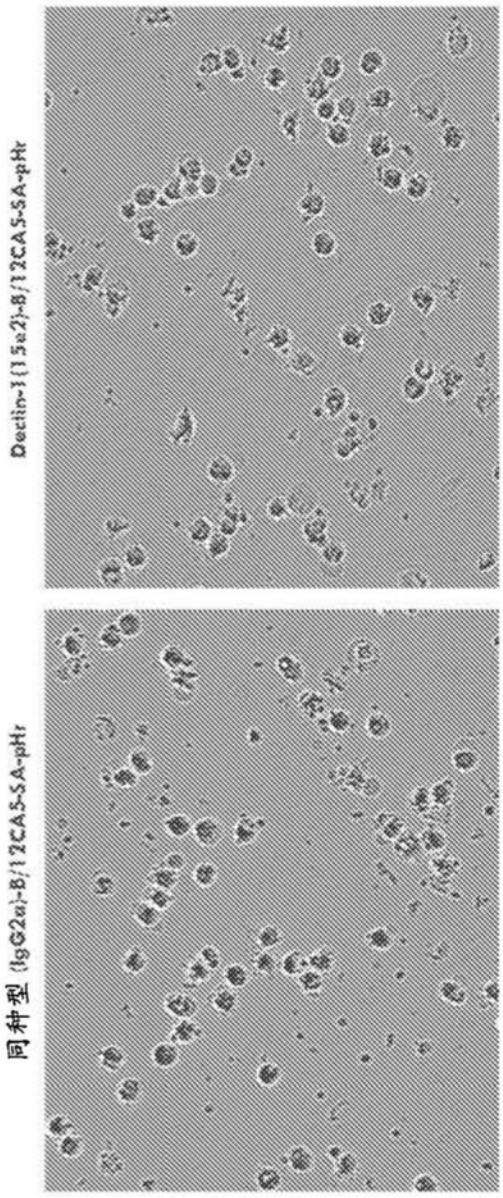


FIG.19B

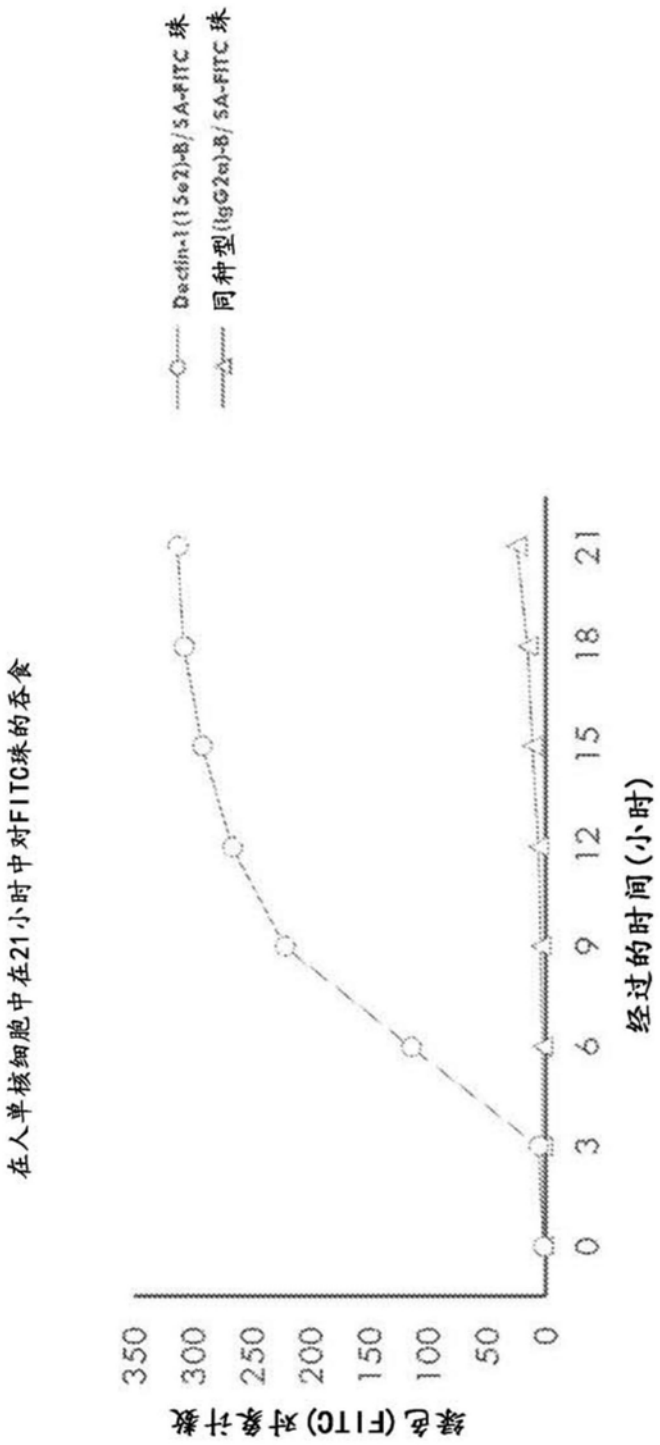

在人单核细胞中在21小时中对FITC珠的吞食
绿色(FITC)对象计数
经过的时间(小时)
Dectin-1(15e2)-B/SA-FITC 珠
同种型(IgG2a)-B/SA-FITC 珠
0
50
100
150
200
250
300
350
0
3
6
9
12
15
18
21

FIG.20A

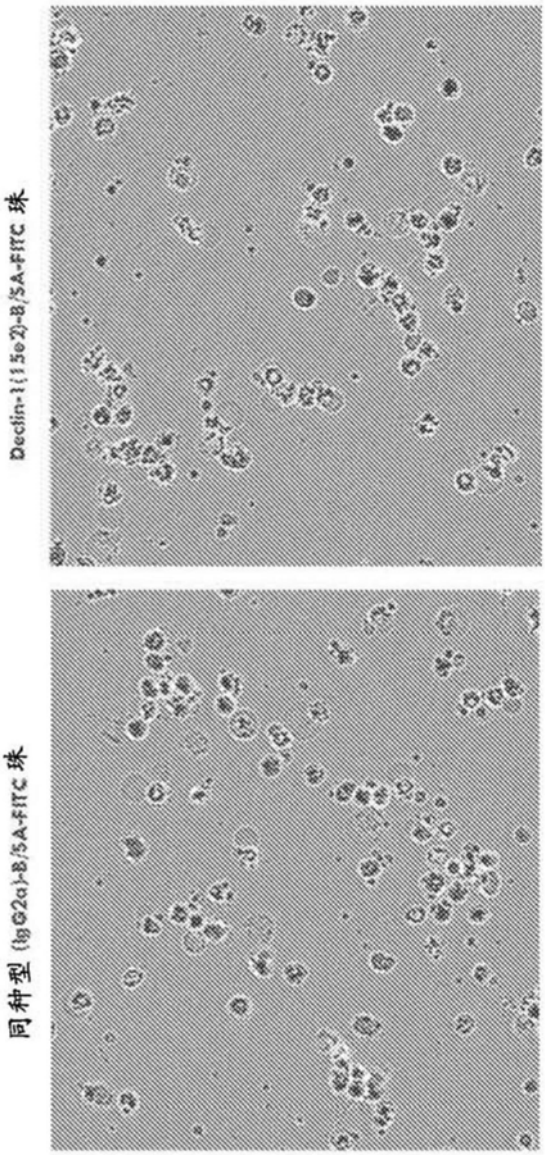


FIG.20B