

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680012540.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 9 日

[11] 公开号 CN 101160323A

[22] 申请日 2006.4.10

[21] 申请号 200680012540.5

[30] 优先权

[32] 2005.4.15 [33] US [31] 60/671,476

[86] 国际申请 PCT/IL2006/000454 2006.4.10

[87] 国际公布 WO2006/109301 英 2006.10.19

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.15

[71] 申请人 拉帕波特家族医学科学研究所

地址 以色列海法

[72] 发明人 N·卡林 G·威尔德鲍姆

Y·佐哈 L·伊扎克

U·韦因伯格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程 淼 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 46 页 序列表 9 页
附图 9 页

[54] 发明名称

用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的分子及其
使用方法

[57] 摘要

分子和包含该分子的组合物用于分离 MCP-1
和治疗 CCR2/MCP-1 相关疾病。

1. 一种包含异源氨基酸序列的分子，所述异源氨基酸序列结合到缺少 CCR2 N-末端结构域的 CCR2 氨基酸序列，所述 CCR2 氨基酸序列能够结合 MCP-1，并且其中所述分子是无免疫原性的。

2. 一种分子，其包含附着于非蛋白质部分的 CCR2 氨基酸序列，其中所述 CCR2 氨基酸序列能够结合 MCP-1，而且所述分子在受试者中是无免疫原性的。

3. 一种分子，包含至少两个各自能够结合 MCP-1 的 CCR2 氨基酸序列。

4. 一种包含标签的分子，所述标签附着于缺少 CCR2 N-末端结构域的 CCR2 氨基酸序列，所述 CCR2 氨基酸序列能够结合 MCP-1。

5. 如 SEQ ID NO: 14 或 15 所示的分子。

6. 包含权利要求 1、2 或 3 的分子以及药学上可接受的载体的药物组合物。

7. 包含一种分子和药学上可接受的载体的药物组合物，所述分子包含缺少 CCR2 N-末端结构域并能够结合 MCP-1 的 CCR2 氨基酸序列，所述药物组合物是无免疫原性的。

8. 一种在有需要的受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求 1、2、3 和/或 5 和/或 7 的分子，从而在所述受试者中治疗 MCP1/CCR2 相关疾病。

9. 权利要求 1、2、3、5 或 7 的分子的用途，用于制备被鉴定用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的药物。

10. 一种从生物样品中分离 MCP-1 的方法，所述方法包括：

(a) 使所述生物样品与权利要求 4 的分子接触，以使得 MCP-1 和权利要求 4 的分子形成复合物；以及

(b) 从所述生物样品分离所述复合物从而分离 MCP-1。

11. 权利要求 1、6、8 或 9 的任一项的分子、药物组合物、方法和用途，其中所述异源氨基酸序列包含免疫球蛋白氨基酸序列。

12. 权利要求 1、4、6、8、9 或 10 的任一项的分子、药物组合物、方法和用途，其中所述缺少 CCR2 N-末端结构域的 CCR2 氨基酸序列在 SEQ ID NO: 2 中示出。

13. 权利要求 8 或 9 的任一项的方法或用途，其中所述 MCP-1/CCR2

相关疾病选自炎症性疾病、坏死、动脉粥样硬化、癌症、多发性硬化、粉瘤、单核细胞性白血病、肾脏疾病（例如，血管球性肾炎）、hamman-rich 综合症、子宫内膜异位、类风湿性关节炎、细支气管炎、哮喘、系统性红斑狼疮、炎症性肠病（例如，结肠炎）、牙槽炎、再狭窄、脑外伤、银屑病、特发性肺纤维化和移植动脉硬化构成的组。

14. 权利要求 4 或 10 的任一项的分子或方法，其中所述标签是表位标签。

15. 权利要求 4 或 10 的任一项的分子或方法，其中权利要求 4 的分子附着于固相支持物上。

16. 权利要求 1、2、3、5 或 7 的任一项的分子，附着于非蛋白质部分。

17. 权利要求 2、6、8、9 的任一项的分子、药物组合物、方法或用途，其中所述非蛋白质部分选自聚乙二醇（PEG）、聚乙烯基吡咯烷酮（PVP）、苯乙烯马来酐共聚物（SMA）和二乙烯醚与顺丁烯二酸酐的共聚物（DIVEMA）构成的组。

18. 权利要求 6 或 7 的任一项的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体被配制为用于肠胃外施用。

19. 权利要求 6 或 7 的任一项的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体基本上是无免疫原性的。

20. 权利要求 6 或 7 的任一项的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体包括脂氨基酸。

21. 权利要求 6 或 7 的任一项的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体包括碳水化合物。

22. 权利要求 6 或 7 的任一项的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体包括微球体。

23. 权利要求 6 或 7 的任一项的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体包括脂质体。

24. 权利要求 6 或 7 的任一项的药物组合物，其中所述药学上可接受的载体包括聚合物微球体。

25. 一种在有需要的受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的分子，所述分子包含缺少 CCR2 N-末端结构域并能够结合 MCP-1 的 CCR2 氨基酸序列，从而在

所述受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病。

26. 一种分子用于制备药物的用途，所述分子包含缺少 CCR2 N-末端结构域并能够结合 MCP-1 的 CCR2 氨基酸序列，所述药物被鉴定为用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病。

27. 权利要求 25 或 26 的任一项的方法或用途，其中所述缺少 CCR2 N-末端结构域的 CCR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 中所示。

28. 权利要求 25 或 26 的任一项的方法或用途，其中所述 MCP-1/CCR2 相关疾病选自由炎症性疾病、坏死、动脉粥样硬化、癌症、多发性硬化、粉瘤、单核细胞性白血病、肾脏疾病（例如，血管球性肾炎）、hamman-rich 综合症、子宫内膜异位、类风湿性关节炎、细支气管炎、哮喘、系统性红斑狼疮、炎症性肠病（例如，结肠炎）、牙槽炎、再狭窄、脑外伤、银屑病、特发性肺纤维化和移植动脉硬化构成的组。

29. 权利要求 25 或 26 的任一项的方法或用途，其中所述分子在 SEQ ID NO: 14 或 15 中示出。

用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的分子及其使用方法

本发明的领域和背景

本发明涉及新的分子，更具体地，涉及治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病，例如炎症性疾病和癌症的方法。

在过去的几年，描述了越来越多的白细胞化学吸引剂/活化因子（趋化因子）[Oppenheim, J. J. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617-648 (1991) ; Schall and Bacon, *Curr. Opin. Immunol.*, 6:865-873 (1994) ; Baggiolini, M., *et al.*, *Adv. Immunol.*, 55:97-179 (1994)]。应答早期炎症性介导物例如 IL-1 β 或 TNF- α ，各种各样的细胞类型产生和分泌了趋化因子。

趋化因子超家族包括两个主要的分支： α -趋化因子（也称为 CXC 趋化因子）和 β -趋化因子（也称为 CC 趋化因子）。这种分类基于氨基酸序列中的前两个半胱氨酸是被单个氨基分隔（CXC）还是相邻的（CC）。 α -趋化因子分支包括蛋白质例如 IL-8、嗜中性粒细胞活化肽-2（NAP-2）、黑素瘤生长刺激活性（MGSA/gro 或 GRO α ）和 ENA-78，它们每一种都主要对嗜中性粒细胞和 T 淋巴细胞具有吸引和活化效应。 β -趋化因子分支的成员影响其他血细胞类型，例如单核细胞、淋巴细胞、嗜碱性细胞和嗜曙红细胞[Oppenheim, J. J. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617-648 (1991) ; Baggiolini, M., *et al.*, *Adv. Immunol.*, 55:97-179 (1994) ; Miller and Krangel, *Crit. Rev. Immunol.*, 12:17-46 (1992) ; Jose, P. J., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179:881-118 (1994) ; Ponath, P. D., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 97:604-612 (1996)]，包括蛋白质例如单核细胞趋化性蛋白 1-4（MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 MCP-4）、RANTES 和巨噬细胞炎症性蛋白（MIP-1 α 和 MIP-1 β ）。

趋化因子超家族的第三个较小的分支包括膜结合趋化因子。这种类型的成员被称为 CX3C 趋化因子[Bazan, J. F., *et al.*, *Nature* 385:640-644 (1997)]。

趋化因子可以介导针对白细胞的一系列前炎症性影响，例如趋化性的触发、脱粒作用、脂质介导物的合成以及整联蛋白活化[Oppenheim, J. J. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617-648 (1991) ; Baggiolini, M., *et al.*,

Adv. Immunol., 55:97-179 (1994); Miller, M. D. and Krangel, M. S., Crit. Rev. Immunol., 12:17-46 (1992)]。

趋化因子结合属于 G-蛋白偶联七跨膜结构域蛋白质家族的特定的细胞表面受体 [Murphy, P. M., Annu. Rev. Immunol., 12:593-633 (1994)]，其被称为“趋化因子受体”。在结合它们的同源配体时，趋化因子受体通过相关的三聚 G 蛋白来转导细胞内信号，引起细胞内钙浓度的快速提高、细胞形状的改变、细胞粘附分子表达的提高、脱粒作用和细胞迁移的促进，等等。

已经暗示趋化因子是过敏性、炎症性和自体免疫性失调和疾病，如哮喘、动脉粥样硬化、血管球性肾炎、胰腺炎、再狭窄、类风湿性关节炎、糖尿病性肾病、肺纤维化和移植排斥的重要的介导体。

特别地，作用于其受体 CC 趋化因子受体 2 (CCR-2) 的单核细胞化学吸引物-1 (MCP-1) 在各种症候中起作用。在与它的受体结合时，MCP-1 诱导细胞内钙浓度的快速提高，其引起细胞粘附分子表达提高，并最终引起细胞的脱粒作用并促进白细胞迁移。

通过使用遗传修饰的小鼠的实验已经提供了 MCP-1/CCR-2 相互作用的重要性的证明。MCP-1^{-/-}小鼠具有正常数量的白细胞和巨噬细胞，但是在几种不同类型的免疫激发之后不能将单核细胞征募到炎症的位点内 [Bao Lu, *et al.*, J. Exp. Med. 1998, 187, 601]。同样地，当用各种外源试剂激发时，CCR-2^{-/-}小鼠不能征募单核细胞或产生干扰素 γ ；此外，无 CCR-2 小鼠的白细胞不应答 MCP-1 而迁移 [Landin Boring, *et al.*, J. Clin. Invest. 1997, 100, 2552]，从而证实了 MCP-1/CCR-2 相互作用的特异性。两个其他的小组已经独立地报道了使用 CCR-2^{-/-}小鼠不同株系的相同结果 [William A. Kuziel, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 12053, 和 Takao Kurihara, *et al.*, J. Exp. Med. 1997, 186, 1757]。MCP-1^{-/-}和 CCR-2^{-/-}动物的生存力和一般的正常健康状态是值得注意的，因为破坏 MCP-1/CCR-2 相互作用不引起生理学的危机。结合起来，这些数据表明阻断 MCP-1 的作用的分子将在治疗一系列炎症性和自体免疫性失调中有用。

已知的是，MCP-1 在患有类风湿性关节炎的患者中被上调 [Alisa Koch, *et al.*, J. Clin. Invest. 1992, 90, 772-779]。此外，几项研究已经证实了 MCP-1/CCR2 相互作用的拮抗在治疗类风湿性关节炎中的潜在治

疗价值。编码 MCP-1 的 DNA 疫苗近来显示了在大鼠中改善慢性的多佐剂诱导的关节炎[Sawsan Youssef, *et al.*, J. Clin. Invest. 2000, 106, 361]。类似地, 通过向患有胶原诱导的关节炎[Hiroomi Ogata, *et al.*, J. Pathol. 1997, 182, 106]或链球菌细胞壁诱导的关节炎[Ralph C. Schimmer, *et al.*, J. Immunol. 1998, 160, 1466]的大鼠直接施用 MCP-1 的抗体可以控制炎症疾病症状。或许最显著地, MCP-1 的拮抗剂, MCP-1 (9-76) 在关节炎的 MRL-1pr 小鼠模型中显示了预防疾病发作和降低疾病症状(取决于施用的时间)[Jiang-Hong Gong, *et al.*, J. Exp. Med. 1997, 186, 131]。

MCP-1 也在动脉粥样硬化病变中被上调, 已经证实了 MCP-1 的循环水平在疾病发展中起作用[Abdolreza Rezaie-Majd, *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 2002, 22, 1194-1199]。如通过富含巨噬细胞的动脉壁的免疫组织化学[Yla-Herttuala *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 88:5252-5256 (1991); Nelken *et al.*, J Clin Invest 88:1121-1127 (1991)]和抗 MCP-1 抗体检测[Takeya *et al.*, Human Pathol 24:534-539 (1993)]所显示的, MCP-1 负责征募单核细胞进入动脉粥样硬化区域。与野生型 MCP-1 株系相比, LDL-受体/MCP-1 缺陷和 apoB 转基因/MCP-1 缺陷小鼠显示了在它们的整个主动脉中显著较低的脂质沉积和巨噬细胞积累[Alcami *et al.*, J Immunol 160:624-633 (1998); Gosling *et al.*, J Clin Invest 103:773-778 (1999); Gu *et al.*, Mol. Cell. 2:275-281 (1998); Boring *et al.*, Nature 394:894-897 (1998)]。

已知的是, MCP-1 在人类多发性硬化中被上调, 已经显示了使用干扰素 β -1 β 的有效治疗降低了外周血单核细胞中的 MCP-1 表达, 表明 MCP-1 在疾病发展中起作用[Carla Iarlori, *et al.*, J. Neuroimmunol. 2002, 123, 170-179]。其他研究已经表明 MCP-1/CCR-2 相互作用的拮抗在治疗多发性硬化中的潜在治疗价值; 所有这些研究已经在多发性硬化的常规动物模型实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)中被证明。向患有 EAE 的动物施用 MCP-1 的抗体显著地减小了疾病复发[K. J. Kennedy, *et al.*, J. Neuroimmunol. 1998, 92, 98]。此外, 两项更新近的报道现在已经显示了 CCR-2^{-/-}小鼠对 EAE 有抗性[Brian T. Fife, *et al.*, J. Exp. Med. 2000, 192, 899; Leonid Izikson, *et al.*, J. Exp. Med. 2000, 192, 1075]。

已知的是, MCP-1 在肺移植之后出现了闭塞性细支气管炎综合症的患者中被上调[Martine Reynaud-Gaubert, *et al.*, J. of Heart and Lung Transplant., 2002, 21, 721-730; John Belperio, *et al.*, J. Clin. Invest. 2001, 108, 547-556]。在闭塞性细支气管炎综合症的鼠模型中, 施用 MCP-1 的抗体引起气道闭塞的减弱; 类似地, CCR2^{-/-}小鼠在这个相同模型中对气道闭塞有抗性[John Belperio, *et al.*, J. Clin. Invest. 2001, 108, 547-556]。这些数据表明, MCP-1/CCR2 的拮抗可能在治疗移植后的器官排斥中是有益的。

其他研究已经表明了 MCP-1/CCR2 相互作用的拮抗在治疗哮喘中的潜在治疗价值。在卵清蛋白激发的小鼠中中和抗体对 MCP-1 的隔离引起了支气管超反应性和炎症的显著降低[Jose-Angel Gonzalo, *et al.*, J. Exp. Med. 1998, 188, 157]。证明了通过施用 MCP-1 的抗体有可能在曼氏裂头吸虫 (Schistosoma mansoni) 卵激发的小鼠中降低过敏性气道炎症[Nicholas W. Lukacs, *et al.*, J. Immunol. 1997, 158, 4398]。与此一致, MCP-1^{-/-}小鼠显示了对曼氏裂头吸虫卵攻击的减弱的应答[Bao Lu, *et al.*, J. Exp. Med. 1998, 187, 601]。

其他研究已经表明了 MCP-1/CCR2 相互作用的拮抗在治疗肾病中的潜在治疗价值。在血管球性肾炎的鼠模型中施用 MCP-1 的抗体引起了肾小球新月体形成和 I 型胶原沉积的显著降低[Clare M. Lloyd, *et al.*, J. Exp. Med. 1997, 185, 1371]。此外, 与它们的 MCP-1^{+/+}对应小鼠相比, 患有诱导的肾中毒血清肾炎的 MCP-1^{-/-}小鼠显示了显著更低的肾管损伤[Gregory H. Tesch, *et al.*, J. Clin. Invest. 1999, 103, 73]。

一项研究已经表明了 MCP-1/CCR2 相互作用的拮抗在治疗系统性红斑狼疮中的潜在治疗价值。MCP-1^{-/-}小鼠与 MRL-FAS^{sup.lpr} 小鼠杂交 (后者具有类似于人类系统性红斑狼疮的致死性自体免疫疾病) 导致比野生型 MRL-FAS^{sup.lpr} 小鼠更少的疾病和更久的存活[Gregory H. Tesch, *et al.*, J. Exp. Med. 1999, 190, 1813]。

MCP-1/CCR2 相互作用在结肠炎的病变中也是相关的, 因为 CCR-2^{-/-}小鼠免于葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎的影响[Pietro G. Andres, *et al.*, J. Immunol. 2000, 164, 6303]。

一项研究已经表明了 MCP-1/CCR2 相互作用的拮抗在治疗牙槽炎中的潜在治疗价值。当使用针对大鼠 MCP-1 (JE) 产生的抗体静脉内

地治疗患有 IgA 免疫复合物肺损伤的大鼠时，牙槽炎的症状被部分地减轻了[Michael L. Jones, *et al.*, J. Immunol. 1992, 149, 2147]。

MCP-1/CCR2 在癌症中也是相关的。当带有人类乳腺癌细胞的免疫缺陷小鼠用抗 MCP-1 抗体治疗时，观察到了肺部微转移的抑制和存活提高[Rosalba Salcedo, *et al.*, Blood 2000, 96, 34-40]。特别地，如本发明人在 PCT WO 2004/080273 中详细描述，MCP-1 被指明在前列腺癌症中。

Restinosis 是涉及 MCP-1 的又一种症候。CCR2 缺陷的小鼠显示了股动脉损伤后内膜面积和内膜/中膜比例的降低（相对于野生型同窝）[Merce Roque, *et al.* Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 2002, 22, 554-559]。

其他研究已经提供了证据，MCP-1 在以上未提及的各种疾病状态中被过量表达。这些报道提供了相关的证明，MCP-1 拮抗剂可能是这些疾病的有用的治疗剂。MCP-1 已经被证明在患有炎症性肠病的患者的肠上皮细胞和肠粘膜中过表达[H. C. Reinecker, *et al.*, Gastroenterology 1995, 108, 40; Michael C. Grimm, *et al.*, J. Leukoc. Biol. 1996, 59, 804]。两项报道描述了患有诱导的脑外伤的大鼠 MCP-1 的量表达[J. S. King, *et al.*, J. Neuroimmunol. 1994, 56, 127; Joan W. Berman, *et al.*, J. Immunol. 1996, 156, 3017]。MCP-1 还显示了在啮齿动物心脏同种异体移植中的过量表达，暗示了 MCP-1 在移植动脉硬化的发病中的作用[Mary E. Russell, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6086]。已经在患有特发性肺纤维化的患者的肺内皮细胞中注意到 MCP-1 的过表达[Harry N. Antoniades, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 5371]。类似地，在患有银屑病的患者的皮肤中注意到 MCP-1 的过量表达[M. Deleuran, *et al.*, J. Dermatol. Sci. 1996, 13, 228, and R. Gillitzer, *et al.*, J. Invest. Dermatol. 1993, 101, 127]。最后，新近的报道已经显示了，在患有 HIV-1 相关性痴呆的患者的脑和脑脊液中 MCP-1 被过量表达[Alfredo Garzino-Demo, WO 99/46991]。

迄今报道的大多数趋化因子拮抗剂不是针对特定趋化因子的中和抗体就是小分子拮抗剂[Howard *et al.*, Trend Biotechnol 14:46-51 (1996)]。

抗 MCP-1 抗体已经在如上所述的许多小鼠疾病模型中被有效地

使用。然而，与使用抗体来拮抗趋化因子功能相关的主要难题是它们在慢性人类疾病中使用之前必需被人源化。此外，多种趋化因子结合和活化单个受体的能力促使了多种抗体策略的开发或使用交叉反应性抗体以完全阻断或防止病理状况。

在科学和专利文献中已经报道了几种趋化因子受体功能的小分子拮抗剂[White, J Biol Chem 273:10095-10098(1998); Hesseigesser, J Biol Chem 273:15687-15692 (1998) ; Bright *et al.*, BioorgMed Chem Lett 8:771-774(1998); Lapierre, 26th Natl Med Chem Symposium, June 14-18, Richmond (Va.) 5 USA (1998) ; Forbes *et al.*, Bioorg Med Chem Lett 10:1803-18064 (2000) ; Kato *et al.*, WO 97/24325; Shiota *et al.*, WO 97/44329; Naya *et al.*, WO 98/04554; Takeda Industries, JP 09-55572 (1998) ; Schwender *et al.*, WO 98/02151; Hagmann *et al.*, WO 98/27815; Connor *et al.*, WO 98/06703; Wellington *et al.*, U.S. Pat. No. 6,288,103]。然而，趋化因子受体拮抗剂的特异性意味着，以多种或冗余的趋化因子表达谱为特征的炎症性失调将相对更难以通过这些试剂治疗。

因而，克服了上述局限性的用于治疗 CCR-2 相关疾病的组合物及其使用方法，是广泛公认亟需的，并且将是高度有益的。

发明概述

根据本发明的一个方面，提供了一种包含异源氨基酸序列的分子，所述异源氨基酸序列结合到缺少 CCR2 N-末端结构域的 CCR2 氨基酸序列，所述 CCR2 氨基酸序列能够结合 MCP-1，并且其中所述分子是无免疫原性的。

根据本发明的另一个方面，提供了一种分子，其包含附着于非蛋白质部分的 CCR2 氨基酸序列，其中所述 CCR2 氨基酸序列能够结合 MCP-1，而且所述分子在受试者中是无免疫原性的。

根据本发明的再一个方面，提供了一种分子，其包含至少两种 CCR2 氨基酸序列，每种都能够结合 MCP-1。

根据本发明的又一个方面，提供了一种包含标签的分子，所述标签附着于缺少 CCR2 N-末端结构域的 CCR2 氨基酸序列，所述 CCR2 氨基酸序列能够结合 MCP-1。

根据本发明的其他方面，提供了一种如 SEQ ID NO: 14 或 15 所

列的分子。

根据本发明的其他方面，提供了包含所述分子和药学上可接受的载体的药物组合物。

根据本发明的其他的方面，提供了包含特定分子和药学上可接受的载体的药物组合物，所述特定分子包含缺少 CCR2 N-末端结构域并能够结合 MCP-1 的 CCR2 氨基酸序列，所述药物组合物是无免疫原性的。

根据本发明的其它方面，提供了在有需要的受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的所述分子，从而治疗所述受试者中 MCP-1/CCR2 相关疾病。

根据本发明的其它方面，提供了所述分子在制备药物中的用途，所述药物被鉴定为治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病。

根据本发明的其它方面，提供了从生物样品分离 MCP-1 的方法，所述方法包括：（a）使所述生物样品与权利要求 4 的分子接触，从而 MCP-1 和权利要求 4 的分子形成复合物；和（b）分离所述复合物从而从所述生物样品中分离 MCP-1。

根据本发明的其它方面，提供了在有需要的受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的分子，所述分子包含缺少 CCR2 N-末端结构域并能够结合 MCP-1 的 CCR2 氨基酸序列，从而在所述受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病。

根据本发明的其它方面，提供了特定分子在制备药物中的用途，所述特定分子包含缺少 CCR2 N-末端结构域并能够结合 MCP-1 的 CCR2 氨基酸序列，所述药物被鉴定为用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病。

根据如下所述的本发明的优选实施方式中进一步的特征，所述异源氨基酸序列包含免疫球蛋白氨基酸序列。

根据所描述的优选实施方式中进一步的特征，所述缺少 CCR2 N-末端结构域的 CCR2 氨基酸序列是如 SEQ ID NO: 2 中所示的。

根据所描述的优选实施方式中再进一步的特征，所述 MCP-1/CCR2 相疾病选自炎症性疾病、坏死、动脉粥样硬化、癌症、多发性硬化、粉瘤、单核细胞性白血病、肾脏疾病（例如，血管球性肾炎）、hamman-rich 综合症、子宫内膜异位、类风湿性关节炎、细支气管炎、哮喘、系统

性红斑狼疮、炎症性肠病（例如，结肠炎）、牙槽炎、再狭窄、脑外伤、银屑病、特发性肺纤维化和移植动脉硬化构成的组。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述标签是表位标签。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述分子附着于固相支持物。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述分子附着于非蛋白质部分。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述非蛋白质部分选自自由聚乙二醇（PEG）、聚乙烯基吡咯烷酮（PVP）、苯乙烯马来酐共聚物（SMA）以及二乙烯基醚与顺丁烯二酸酐共聚物（DIVEMA）构成的组。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述药学上可接受的载体被配制为用于肠胃外施用。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述药学上可接受的载体基本上是无免疫原性的。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述药学上可接受的载体包含脂氨基酸(lipoamine acid)。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述药学上可接受的载体包括碳水化合物。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述药学上可接受的载体包括微球体。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述药学上可接受的载体包括脂质体。

根据所描述的优选实施方式中又进一步的特征，所述药学上可接受的载体包括聚合物微球体。

通过提供用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的新的分子及其使用方法，本发明成功地克服了当前已知的配置的缺点。

除非另外定义，此处使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含义。虽然类似于或等同于在此描述的那些的方法和材料可以被用于本发明的实践和测试，但以下描述了适合的方法和材料。在矛盾的情况下，以本专利说明书(包

括定义)为准。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,而无意限制。

附图的简要说明

参考附图,在此仅以举例的方式描述本发明。现在详细地具体参考附图,要强调的是,所显示的细节是通过实例的方式,目的仅是说明本发明的优选实施方式的说明性论述,为了提供被认为是最有用的和易于理解本发明的原则和概念观点的内容而存在。对此来说,不进行尝试来显示比基本理解本发明所必需的更详细的本发明结构细节,附图的说明使得本领域技术人员明白本发明的几种形式可以如何在实践中体现。

图 1a-b 是显示前列腺癌症患者选择性地发展针对 MCP-1 的高度显著的自身抗体滴度的图表。图 1a——来自 23 位前列腺癌症患者、患有良性前列腺肥大(BPH)的患者和 10 名对照受试者的人类血清,所有年龄匹配的对象(mails),被监视针对以下 13 种趋化因子的自身抗体的可能的出现: SDF-1 (CXCL12, GenBank Accession No. NM199168)、MIF (GenBank Accession No. L19686)、MIP-1 α (CCL3, GenBank Accession No. NM002983)、MIP-1 β (CCL4, GenBank Accession No. NM002984)、IL-8 (CXCL8, GenBank Accession No. M2813)、IP-10 (CXCL10, GenBank Accession No. NM001565)、MIP-3 α (CCL20, GenBank Accession No. BC020698)、MIP-3 β (CCL-19, GenBank Accession No. BC027968)、Lymphotactin (XCL1, GenBank Accession No. NM002995)、MIG (CXCL9, GenBank Accession No. NM002416)、RANTES (CCL5, GenBank Accession No. NM002985)、MCP-3 (CCL7, GenBank Accession No. NM006273)和 MCP-1 (CCL2, GenBank Accession No. NM002982)。在大多数前列腺癌症患者中观察到针对仅一种上述趋化因子, MCP-1, 的显著的抗体滴度 ($p < 0.01$)。图 1b——在上述图 1a 中描述的每个临床样品中对 MCP-1 的 Log_2Ab 滴度。约 82% 的前列腺癌症患者 (19/23) 和仅约 4.7% (1/21) 患有 BPH 的患者显示了对 MCP-1 的显著 ($p < 0.01$) 反应 (log_2Ab 滴度 > 10)。

图 2 是描绘编码本发明的 Ig-CCR2 肽 (Ig-E3) 的表达构建体的产生的示意图。

图 3 是描绘 CCR2 的 E3 结构域与 MCP-1 的特异性结合的柱形图。

图 4 是描述人类 CCR2 (E3) -IgG 抑制 MCP-1 诱导的 THP-1 细

胞 (ATCC Accession NO. TIB-202) 的迁移的能力的柱形图。进行了体外穿孔迁移分析。简言之, 将 THP-1 细胞 (10^6 个细胞/孔) 添加到转移孔平板的上室, CCL2 (重组人类 MCP-1, RHMCP-1; (20 ng/ml) 添加到下孔, 其也补充有如图所示的不同浓度的 CCR2 (E3) -IgG。在 37°C 孵育 2 小时之后, 通过 FACS 对迁移的 THP-1 细胞计数。结构显示为三个副本的平均数 $\pm$ SE。

图 5a-d 是描绘在施用 CCR2 (E3) -IgG 的细胞和对照 (施用 IgG 的或 PBS 处理的) 细胞之间所比较的原发肿瘤的发展和它的转移性散布的图表。图 5a-b 是描绘当与 PC-3 细胞的施用一同开始 (图 5a) 或在之后 18 天 (图 5b) 施用 CCR2 (E3) -IgG 时, CCR2 (E3) -IgG 随着时间降低肿瘤生长的能力的图表。在所标出的各个时间重复地测量来自施用 CCR2 (E3) -IgG (蓝色表示)、施用同种型匹配的对照 IgG (绿色表示) 或施用 PBS (褐色或黄色表示) 的小鼠的肿瘤体积 (mm^3)。图 5c 是显示在 PC3 细胞施用后 8 天注射的 CCR2 (E3) -IgG 的抗肿瘤活性的图表。在所标出的各个时间重复地测量来自施用 PC-3 细胞和 CCR2 (E3) -IgG (蓝色表示)、施用同种型匹配的对照 IgG (绿色表示) 或 PBS (粉色表示) 的小鼠的肿瘤的体积 (mm^3)。这些结果证明了图 5a-b 所示 CCR2 (E3) -IgG 的预防和治疗活性。图 5d 是描绘与对照细胞比较、通过所标明的 CCR2 (E3) -Ig 对表达荧光素酶的 PC-3 细胞的骨和肺转移的抑制作用的图表。

图 6a-f 是显示在肿瘤位点使用 CCR2 (E3) -Ig 阻断 CCL-2 完全地抑制 VEGF 产生的照片。显示了使用 CCR2 (E3) -Ig (图 6a、d)、同种型匹配的对照 IgG (图 6b、e) 或 PBS (对照细胞; 图 6c、f) 的治疗。处死动物, 取出肿瘤/组织。洗涤组织、固定并渗透化, 通过免疫染色使用共焦显微镜检测 VEGF。在 $\times 10$ (附图 6a-c) 或 $\times 40$ (附图 6d-f) 放大率下显示显微图。

图 7 是描述通过光密度测定的 CCL2 处理的 PC3 细胞的细胞迁移的柱形图。用 CCL2 (MCP-1)、CCL2 连同针对 CCL2 的抗体 (MCP-1+ 抗 MCP-1)、CCL2 连同 CCR2 (E3) -IgG (MCP-1+ CCR2 (E3) -IgG) 以及未被配体处理的对照细胞来处理 PC3 细胞。

优选实施方式的说明

本发明是用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病例如癌症的分子、包含

所述分子的组合物以及使用所述分子的方法。

参考附图和附随的说明可以更好地理解本发明的原理和操作。

在详细地解释本发明的至少一个实施方式之前，要理解的是，本发明不将它的应用限于以下说明所阐述的或通过实施例所例示的细节。本发明能有其他的实施方式或者能以各种方式实践和进行。并且，要理解的是在此采用的用语和术语是为了说明的目的而不应认为是限制性的。

单核细胞化学吸引物剂蛋白 (MCP) -1，也称为 CCL2，特异性地吸引单核细胞和记忆 T 细胞。它的表达出现于以细胞迁移为特征的多种疾病中，对于它在癌症、心血管疾病和炎症性疾病中的关键作用，存在着相当的生物学和遗传学证据。尽管有密集的筛选，至今还没有 MCP-1/CCL2 的受体 CCR2 的拮抗剂。

当还原本发明至实践时，本发明人揭示了 MCP-1 对 CCR2 的结合是由 CCR2 的第三个细胞外区域 (E3) (GenBank Accession No. NP000639.1 的氨基酸坐标 273-292) 专有地介导的。这与 Datta Mannan 和 Stone 的早先的报告 [Datta-Mannan And Stone (2004) Biochemistry 43:14602-11] 形成鲜明对比，他们表明 MCP-1 与 CCR2 的结合取决于 CCR2 的 N-末端结构域 (N-ter) 和第三个细胞外环体 (E3) 两者。这些结果表明，通过大量地隔离 MCP-1，包含 CCR2 的 E3 区域的肽可以用作抑制性试剂。

因而，本发明设想包含 CCR2 E3 结构域并优选缺少 CCR2 N-末端结构域的任何 CCR2 氨基酸序列，以及包含所述 CCR2 氨基酸序列的组合物在治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病例如癌症中的用途。重要地，本发明的组合物是无免疫原性的以实现最大的疗效。因而，本发明设想，例如，在复合物中包含 CCR2 序列，其中所述 CCR2 序列附着于蛋白质 (例如，异源氨基酸序列) 或非蛋白质 (例如，PEG) 部分，它们每一种都能够延长所述组合物在循环中的半衰期。

因而，根据本发明的一个方面，提供了包含与 CCR2 氨基酸序列结合的至少一种异源氨基酸序列的无免疫原性分子，所述 CCR2 氨基酸序列优选地缺少 CCR2 N-末端结构域 (例如，翻译的 GenBank Accession No. NM_000647/NP_000638 的氨基酸坐标 1-41，或 GenBank Accession No. NM_000648/NP_000639 的相应氨基酸坐标)，所述 CCR2

氨基酸序列能够结合 MCP-1。

如接下来的实施例部分所显示的，包含新近揭示的 MCP-1 结合结构域 (E3-IgG) 的本发明这个方面的嵌合分子，即使在肿瘤细胞施用长达 18 天之后，还抑制肿瘤发展。令人惊讶地，相同的嵌合分子甚至显著地抑制了肿瘤向骨和肺组织的转移。总而言之，当前的发现支持了本发明的分子在治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病例如癌症中的用途。

应当注意到，本发明这个方面的嵌合分子显著地不同于 WO 97/31949 中描述的那些，其教导了使用嵌合的 E3 (即，KLH-E3) 肽来产生针对 CCR2 的 E3 区域的抗体，从而抑制 CCR2 受体的配体结合。本发明的无免疫原性肽被用于靶向 CCR2 的配体，MCP-1，从而抑制所述配体的受体结合。因此，本发明的分子容许精巧的治疗控制和特异性，它们可以被容易地合成和施用，并且以高度的生物有效性为特征。

在此使用时，与 CCL2 可互换使用的 MCP-1，是指哺乳动物 (例如，人类) MCP-1 蛋白，例如在 GenBank Accession Nos. NM_002982 或 NP_002973 中列出的。

在此使用时，术语“无免疫原性的”是指一种物质，其在被施用该物质的受试者中基本上不能产生免疫应答。例如，在人体内无免疫原性是指，在使本发明这方面的嵌合分子接触人的适合组织时，在适合的潜伏期 (例如，8 到 14 天) 之后在第二次施用所述嵌合分子时，不可证明有针对所述嵌合分子的敏感性或抗性的状态。

在此使用时，“CCR2 氨基酸序列”是指具有对 MCP-1 的亲合性结合的哺乳动物 (例如，人类) 趋化因子 C-C 受体 2 蛋白质的肽部分。应当注意到，单个的 CCR2 氨基酸序列可以被包括在本发明的分子中，但是包括至少两个 CCR2 氨基酸序列、每一个都能够结合 CCR2 (优选以高亲和性，例如 SEQ ID NO: 9) 可能是优选的。由于提高的亲合力，这些多肽可以被用作 MCP-1 活性的强力抑制物，可以使用更低的剂量。

在此使用时，“亲和性结合”是指至少 10^{-6} M 的最小 KD 值。

在 GenBank Accession Nos. NM_000647 和 NP_000639.1 中提供了 CCR2 蛋白的实例。如所提及的，本发明这方面的 CCR2 优选缺少 N-

末端结构域，但是保留了 E3 结构域（即，GenBank Accession No. NM_000647 的氨基酸坐标 273-292，SEQ ID NO: 2）或其模拟物。

在此使用时，术语“模拟物”当涉及肽时是指分子结构，其在与 MCP-1 的相互作用中充当了本发明的肽的替代物[关于肽模拟物的综述，参见 Morgan *et al.* (1989) *Ann. Reports Med. Chem.* 24:243-252]。

在此使用时，肽模拟物包括合成的结构（已知的和尚未知的），其可以或可以不含有氨基酸和/或肽键，但保持了肽配体的结构和功能特征。以下进一步描述了可以利用来产生模拟物的氨基酸的种类。术语“肽模拟物”还包括类肽和寡类肽，其是 N-取代的氨基酸的肽或寡聚体[Simon *et al.* (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367-9371]。进一步作为肽模拟物包括的是肽库，其是被设计以具有给定氨基酸长度并代表与之相应的所有可想像的氨基酸序列的肽的集合。以下描述了用于肽模拟物的产生的方法。

根据本发明的这个方面的优选实施方式，所述 CCR2 氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列，并且可以由 SEQ ID NO: 1 所列的核酸序列编码。

根据本发明的这个方面的另一个优选实施方式，本发明的这个方面的分子是如 SEQ ID NO: 14 或 15 中所示的。

在此使用时，术语“肽”涵盖天然的肽（降解产物、合成性合成的肽或重组肽）以及如上文中提及的拟肽（一般地，合成性合成的肽）、以及是肽类似物的类肽和半类肽，其可能具有，例如，修饰，使得所述肽在体内更为稳定或更能透入细胞中。这种修饰包括，但不限于 N 末端修饰、C 末端修饰、肽键修饰，包括但不限于，CH₂-NH、CH₂-S、CH₂-SO、O=C-NH、CH₂-O、CH₂-CH₂、S=C-NH、CH=CH 或 CF=CH，主干修饰以及残基修饰。制备肽模拟化合物的方法是本领域公知的，例如，在 Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992) 中详细说明了，通过引用将其合并在此，如同完全在此列出一样。以下提供了关于此方面的进一步的细节。

肽中的肽键（-CO-NH-）可以被例如 N-甲基化的键（-N（CH₃）-CO-）、酯键（-C（R）H-C-O-O-C（R）-N-）、酮亚甲基键（-CO-CH₂-）、 α -氮杂键（-NH-N（R）-CO-）取代，其中 R 是任何烷基，例如甲基，carba 键（-CH₂-NH-）、羟亚乙基键（-CH（OH）-CH₂-）、硫胺键

(-CS-NH-)、烯双键(-CH=CH-)、逆酰胺键(retro amide)(-NH-CO-)、肽衍生物(-N(R)-CH₂-CO-)，其中R是天然存在于碳原子上的“正常的”侧链。

这些修饰可以出现在肽链上的任何键上，甚至同时几个(2-3个)上。

天然的芳香族氨基酸，Trp、Tyr和Phe可以被合成的非天然酸，例如苯基甘氨酸、TIC、naphthylelanine(Nol)、Phe的环甲基化的衍生物、Phe的卤化衍生物或邻甲基-Tyr。

除了上述的之外，本发明的肽还可以包括一个或多个修饰的氨基酸或一个或多个非氨基酸单体(例如，脂肪酸、复杂的碳水化合物等等)。

在说明书和以下的权利要求部分使用时，术语“氨基酸”被理解为包括20种天然产生的氨基酸；在体内常常翻译后修饰的那些氨基酸，包括，例如，羧脯氨酸、磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸；和其他稀有的氨基酸，包括但不限于2-氨基己二酸、羧基赖氨酸、异锁链赖氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸和鸟氨酸。此外，术语“氨基酸”包括D-和L-氨基酸。

以下的表1和表2列出了可以用于本发明的天然产生的氨基酸(表1)和非常规的或修饰的氨基酸(表2)。

表1

氨基酸	三字母缩写	单字母符号
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H

异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V
任何上述氨基酸	Xaa	X

表 2

非常规的氨基酸	代码	非常规的氨基酸	代码
α -氨基丁酸	Abu	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
α -氨基- α -甲基丁酸	Mgab	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
氨基环丙烷	Cpro	L-N-甲基天冬氨酸	Nmasn
羧酸酯		L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
氨基异丁酸	Aib	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
氨基降冰片基-	Norb	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgin
羧酸		L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
环己基丙氨酸	Chexa	L-N-甲基组氨酸	Nmhis
环戊基丙氨酸	Cpen	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-丙氨酸	Dal	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu

D-精氨酸	Darg	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-天冬氨酸	Dasp	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet
D-半胱氨酸	Dcys	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-谷氨酰胺	Dgln	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-谷氨酸	Dglu	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-组氨酸	Dhis	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-异亮氨酸	Dile	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-亮氨酸	Dleu	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-赖氨酸	Dlys	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-甲硫氨酸	Dmet	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-鸟氨酸	Dorn	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-苯丙氨酸	Dphe	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-脯氨酸	Dpro	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-丝氨酸	Dser	L-N-甲基- <i>t</i> -丁基甘氨酸	Nmtbug
D-苏氨酸	Dthr	L-正亮氨酸	Nle
D-色氨酸	Dtrp	L-正缬氨酸	Nva
D-酪氨酸	Dtyr	α -甲基-氨基异丁酸	Maib
D-缬氨酸	Dval	α -甲基- γ -氨基丁酸	Mgabu
D- α -甲基丙氨酸	Dmala	α -甲基环己基丙氨酸	Mchexa
D- α -甲基精氨酸	Dmarg	α -甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D- α -甲基天冬氨酸	Dmasn	α -甲基- α -naphthylalanine	Manap
D- α -甲基天冬氨酸	Dmasp	α -甲基青霉胺	Mpen

D- α -甲基半胱氨酸	Dmcys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基谷氨酰胺	Dmgln	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D- α -甲基组氨酸	Dmhis	N-(3-氨基丙基)甘氨酸	Norn
D- α -甲基异亮氨酸	Dtnile	N-氨基- α -甲基丁酸	Nmaabu
D- α -甲基亮氨酸	Dmleu	CX-naphthylalanine	Map
D- α -甲基赖氨酸	Dmlys	N-苯甲基甘氨酸	Nphe
D- α -甲基甲硫氨酸	Dmmet	N-(2-氨基甲酰基)甘氨酸	Ngln
D- α -甲基鸟氨酸	Dmorn	N-(氨基甲酰基)甘氨酸	Nasn
D- α -甲基苯丙氨酸	Dmphe	N-(2-羧乙基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基脯氨酸	Dmpro	N-(羧甲基)甘氨酸	Nasp
D- α -甲基丝氨酸	Dmser	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
D- α -甲基苏氨酸	Dmthr	N-环庚基甘氨酸	Nchep
D- α -甲基色氨酸	Dmtrp	N-环己基甘氨酸	Nchex
D- α -甲基酪氨酸	Dmty	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
D- α -甲基缬氨酸	Dmval	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
D- α -methylalnine	Dnmala	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
D- α -甲基精氨酸	Dnmarg	N-环丙基甘氨酸	Ncpro
D- α -甲基天冬氨酸	Dnmasn	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
D- α -甲基天冬氨酸	Dnmasp	N-(2,2-二苯乙基)甘氨酸	Nbhm
D- α -甲基半胱氨酸	Dnmcys	N-(3,3-二苯丙基)甘氨酸	Nbhe
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基丁酸	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchex	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmet
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpen
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯基丙氨酸	Dnmphe
N-甲基异氨基丁酸	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr

酸			
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nva
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-methyla-naphthylalanine	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ -氨基丁酸	Gabu	N-(p-羟苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-f-丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-同苯基丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬氨酸	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-t-丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mgln	L- α -甲基谷氨酸	Mglu
L- α -甲基组氨酸	Mhis	L- α -甲基同苯丙氨酸	Mhphe
L- α -甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲基硫基乙基)甘氨酸	Nmet
D-N-甲基谷氨酰胺	Dnmgln	N-(3-guanidinopropyl)甘氨酸	Narg
D-N-甲基谷氨酸	Dnmglu	N-(1-羟乙基)甘氨酸	Nthr
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	N-(羟乙基)甘氨酸	Nser
D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp

D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基丁酸	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchex	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmet
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpen
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯丙氨酸	Dnmphe
N-甲基氨基异丁酸	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr

D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-methylnaphthylalanine	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmvai	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ -氨基丁酸	Gabu	N-(p-羟苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-t-丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-同苯丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬氨酸	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-t-丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mgln	L- α -甲基谷氨酸	Mglu
L- α -甲基组氨酸	Mhis	L-CC-甲基同苯丙氨酸	Mhphe
L- α -甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲基硫乙基)甘氨酸	Nmet
L- α -甲基亮氨酸	Mleu	L- α -甲基赖氨酸	Mlys
L- α -甲基甲硫氨酸	Mmet	L- α -甲基正亮氨酸	Mnle
L- α -甲基正缬氨酸	Mnva	L- α -甲基鸟氨酸	Morn
L- α -甲基苯丙氨酸	Mphe	L- α -甲基脯氨酸	Mpro
L- α -甲基丝氨酸	mser	L- α -甲基苏氨酸	Mthr
L- α -甲基缬氨酸	Mtrp	L- α -甲基酪氨酸	Mtyr
L- α -甲基亮氨酸	Mval Nnbhm	L-N-甲基同苯丙氨酸	Nmhpe
N-(N-(2,2-二苯乙基))		N-(N-(3,3-二苯基丙基))	
氮甲酰基-甘氨酸	Nnbhm	氮甲酰基甲基(1)甘氨酸	Nnbhe
1-羧基-1-(2,2-二苯乙基氨基)环丙烷	Nmbc		

表2续

由于当前的肽优选在需要肽处于可溶形式的治疗或诊断中使用，本发明的肽优选包括一个或多个非天然的或天然的极性氨基酸，包括但不限于丝氨酸和苏氨酸，由于它们的含羟基侧链能够提高肽的溶解度。

本发明的肽优选以线性形式利用，然而要理解的是，在环化不严重地影响肽性质的情况下，也可以使用环状形式的肽。

如上文描述的，肽模拟物的产生可以使用各种方法实现，包括，例如展示技术。

因而，本发明关注包含多种展示载体（例如，噬菌体、病毒或细菌）的展示库，每一种展示了来自 CCR2 的 E3（例如，SEQ ID NO: 2）的多肽序列的至少 2 个、至少 3 个、至少 5 个、至少 7 个、至少 11 个、至少 15 个连续氨基酸。

构建这种展示库的方法是本领域公知的。在例如 Young AC, *et al.*, "The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes" *J Mol Biol* 1997 Dec 12;274 (4):622-34; Giebel LB *et al.* "Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities" *Biochemistry* 1995 Nov 28;34 (47):15430-5; Davies EL *et al.*, "Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes" *J Immunol Methods* 1995 Oct 12;186(1):125-35; Jones C RT *al.* "Current trends in molecular recognition and bioseparation" *J Chromatogr A* 1995 Jul 14;707 (1):3-22; Deng SJ *et al.* "Basis for selection of improved carbohydrate-binding single-chain antibodies from synthetic gene libraries" *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 23;92 (11):4992-6; 以及 Deng SJ *et al.* "Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display" *J Biol Chem* 1994 Apr 1;269 (13):9533-8 中描述了这些方法，通过引用将它们合并在此。

肽模拟物也可以使用计算生物学来揭示。可以利用对于显示三维结构模型有用的软件程序，例如 RIBBONS (Carson, M., 1997. *Methods in Enzymology* 277, 25), O(Jones, TA. *et al.*, 1991. *Acta Crystallogr.* A47,

110) 、 DINO (DINO:Visualizing Structural Biology (2001) <http://www.dino3d.org>) ; 和 QUANTA 、 INSIGHT 、 SYBYL 、 MACROMODE、 ICM、 MOLMOL、 RASMOL 以及 GRASP (在 Kraulis, J., 1991. Appl Crystallogr. 24, 946 中综述) 来模拟 MCP-1 和预期的肽模拟物之间的相互作用从而鉴定显示了结合特定的 MCP-1 区域的最高可能性的肽。蛋白质-肽相互作用的计算机建模已经被成功地用于合理药物设计, 对于进一步的细节, 参见 Lam *et al.*, 1994. Science 263, 380; Wlodawer *et al.*, 1993. Ann Rev Biochem. 62, 543; Appelt, 1993. Perspectives in Drug Discovery and Design 1, 23; Erickson, 1993. Perspectives in Drug Discovery and Design 1, 109 和 Mauro MJ. *et al.*, 2002. J Clin Oncol. 20, 325-34。

如所提及的, 本发明的这个方面的嵌合分子包括异源的氨基酸序列。

在此使用时, 用语“异源氨基酸序列”是指不构成 CCR2 氨基酸序列的一部分的无免疫原性氨基酸序列。这种序列优选的为本发明的这个方面的分子赋予了溶解性, 优选的提高所述嵌合分子在血清中的半衰期。

所述异源氨基酸序列一般定位于本发明的 CCR2 肽的氨基或羧基末端。

如所提及的, 至少一个异源氨基酸序列可以结合到本发明的 CCR2 氨基酸序列上。例如, 至少一个 CCR2 氨基酸序列可以插入两个异源序列之间, 如 Hoogenboom (1991) Mol. Immunol. 28:1027-1037 所描述的。所述异源氨基酸序列可以通过任何肽或非肽的键附着于所述 CCR2 氨基酸序列上。CCR2 氨基酸序列对所述异源氨基酸序列的附着可以通过直接的共价结合 (肽键或取代的肽键) 或间接的结合例如通过使用具有功能基团的接头来实现。功能基团包括但不限于, 游离羧酸 ($C(=O)OH$) 、 游离氨基 (NH_2) 、 酯基 ($C(=O)OR$, 其中 R 是烷基、环烷基或芳基) 、 酰卤基团 ($C(=O)A$, 其中 A 是氟化物、氯化物、溴化物或碘化物) 、 卤素 (氟化物、氯化物、溴化物或碘化物) 、 羟基基团 (OH) 、 硫醇基团 (SH) 、 氰基 ($C\equiv N$) 、 游离 C-氨基甲酸基团 ($NR''-C(=O)-OR'$, 其中每个 R' 和 R'' 独立地是氢、烷基、环烷基或芳基) 。

可以根据本发明的这个方面使用的异源氨基酸序列的实例是免疫球蛋白序列,例如免疫球蛋白重量结构域的铰链和 Fc 区域(参见美国专利 No. 6,777,196)。本发明的这个方面的嵌合体中的免疫球蛋白部分可以从 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型、IgA、IgE、IgD 或 IgM 获得,以下将进一步讨论。

从与适合的免疫球蛋白恒定区序列(免疫粘附素)连接的受体序列构建的嵌合体是本领域已知的。文献中报道的免疫粘附素包括 T 细胞受体[Gascoigne *et al.*, Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 84: 2936-2940 (1987)], CD4 [Capon *et al.*, Nature 337: 525-531 (1989); Traunecker *et al.*, Nature, 339: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. USA, 9: 347-353 (1990); Byrn *et al.*, Nature, 344:667-670 (1990)]; L-选择蛋白(归巢受体)[(Watson *et al.*, J. Cell. Biol., 110:2221-2229(1990); Watson *et al.*, Nature, 349: 164-167(1991)], CD44 [Aruffo *et al.*, Cell, 61: 1303-1313(1990)], CD28 和 B7 [Linsley *et al.*, J. Exp. Med., 173: 721-730 (1991)]; CTLA-4 [Lisley *et al.*, J. Exp. Med. 174: 561-569 (1991)]; CD22 [Stamenkovic *et al.*, Cell, 66:1133-1144 (1991)]; TNF 受体 [Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol., 27: 2883-2886 (1991); Peppel *et al.*, J. Exp. Med., 174:1483-1489(1991)]; NP 受体[Bennett *et al.*, J. Biol. Chem. 266:23060-23067 (1991)]和 IgE 受体 α [Ridgway *et al.*, J. Cell. Biol., 115:abstr. 1448 (1991)]的融合物。

一般地,在这种融合物中,嵌合分子将保持至少功能上活性的免疫球蛋白重链的恒定区的铰链和 CH2 和 CH3 结构域。融合物也可产生于恒定区的 Fc 部分的 C-末端,或紧接重链的 CH1 的 N-末端或轻链的相应区域。

在异源序列和 CCR2 氨基酸序列之间融合(接合)的确切位点不是关键的。特定的位点是本领域公知的,可以选择以优化本发明的这个方面的嵌合分子的生物学活性、分泌或结合特征(参见以下的实施例部分的实施例3)。

虽然有可能将完整的重链恒定区结合到本发明的 CCR2 氨基酸序列,优选的是融合较短的序列。例如,刚好在铰链区中木瓜蛋白酶切割位点上游开始的序列被用于融合物中,所述木瓜蛋白酶裂解位点化

学上划定了 IgG Fc；当重链恒定区的第一个残基为 114 时是残基 216，或其它免疫球蛋白的类似位点。在特别优选的实施方式中，CCR2 氨基酸序列被融合到 IgG1、IgG2 或 IgG3 重链的绞链区和 CH2 和 CH3，或 CH1、绞链、CH2 和 CH3 结构域（参见美国专利 NO. 6,777,196）。进行融合的确切位点不是关键的，可以通过常规的实验确定最佳位点。

如所提及的，用于构建本发明的这个方面的嵌合分子的免疫球蛋白序列可以来自 IgG 免疫球蛋白重链恒定区。使用人类 IgG1 和 IgG3 免疫球蛋白序列是优选的。使用 IgG1 的主要优点是 IgG1 可以在固定化的蛋白 A 上有效地纯化。相比之下，IgG3 的纯化需要蛋白 G，一种显然较不方便的介质。然而，当选择 Ig 融合配偶体用于特定的嵌合体构建时，应当考虑免疫球蛋白的其他结构和功能部分。例如，IgG3 绞链是更长和更柔性的，从而它可以适应更大的 CCR2 氨基酸序列，而其与 IgG1 融合时可能不折叠或不能正确地起作用。另一种考虑可能是化合价；IgG 是二价的同二聚体，而诸如 IgA 和 IgM 的 Ig 亚型可以分别产生基本的 Ig 同二聚体单位的二聚或五聚结构。在选择本发明的这个方面的嵌合分子的免疫球蛋白部分时的其他考虑在美国专利 NO. 6,77,196 中描述了。

因而，本发明的这个方面的分子可以包括异源氨基酸序列，如上所述。

作为上文提及的补充或选择，本发明的 CCR2 氨基酸序列（能够结合 MCP-1）可以附着于非蛋白质部分，选择在受试者中为无免疫原性的这种分子。这种分子是高度稳定的（可能由于非蛋白质部分赋予的位阻而对体内蛋白水解活性有抗性），并且可以使用常用的固相合成方法来生产，这是便宜的和高效的，下文中进一步说明。然而，要理解的是，仍然可以使用重组技术，从而借此重组肽产物经历体外修饰（例如，下文进一步描述的 PEG 化）。

如所提及的，CCR2 氨基酸序列附着于非蛋白质部分。如在此使用的用语“非蛋白质部分”是指附着于上述 CCR2 氨基酸序列的、不包括氨基酸（肽键）的分子。根据当前优选的实施方式，本发明的这个方面的非蛋白质部分是聚合物或共聚物（合成的或天然的）。本发明的非蛋白质部分的非限制性实例包括聚乙二醇（PEG）、聚乙烯基

吡咯烷酮 (PVP)、二乙烯醚和顺丁烯二酸酐共聚物 (DIVEMA; 参见, 例如, Kaneda Y, *et al.*, 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 160-5) 以及苯乙烯马来酐共聚物 (SMA; 参见例如, Mu Y, *et al.*, 1999, *Biochem Biophys Res Commun.* 255: 75-9)。

这种非蛋白质部分的生物结合为 CCR2 氨基酸序列赋予了稳定性 (例如, 对抗蛋白酶活性) 和/或溶解性 (例如, 在生物液体, 例如血液、胃液内), 而保持了它的生物学活性并延长了它的半衰期。在表现出短的半衰期和血液的快速清除的治疗性蛋白质的情况下, 生物结合是特别有益的。生物结合的蛋白质在血浆中提高的半衰期是来自蛋白质结合物的增加的大小 (其限制了它们的肾小球滤过作用) 以及由于聚合物位阻而降低的蛋白水解作用。一般地, 每个肽附着的聚合物链越多, 半衰期延长越大。然而, 采取方法来不降低本发明的 CCR2 氨基酸序列的特定活性 (即, MCP-1 结合)。

CCR2 氨基酸序列与 PEG 的生物结合 (即, PEG 化) 可以使用 PEG 衍生物来实现, 所述 PEG 衍生物例如 PEG 羧酸的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯、单甲氧基 PEG2-NHS、羧甲基化的 PEG 的琥珀酰亚胺基酯 (SCM-PEG)、PEG 的苯三唑碳酸酯衍生物、PEG 的缩水甘油醚、PEG 对硝基苯基碳酸酯 (PEG-NPC, 例如甲氧基 PEG-NPC)、PEG 醛、PEG-正吡啶基-二硫化物、羰基二咪唑基(carbonyldimidazol)-活化的 PEGs、PEG-硫醇、PEG-马来酐亚胺。这些 PEG 衍生物是以各种分子量商业上可获得的 [参见, 例如 *Catalog, Polyethylene Glycol and Derivatives*, 2000 (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Ala.)]。如果希望, 许多上述衍生物是可以以单功能的单甲氧基 PEG (mPEG) 形式获得的。一般地, 添加到本发明的 CCR2 氨基酸序列的 PEG 应当从分子量 (MW) 数百道尔顿到约 100 kDa (例如, 在 3-30 kDa 之间)。可以使用更大 MW 的 PEG, 但可能引起 PEG 化的肽的产量的一些损失。也应当监视较大的 PEG 分子的纯度, 因为难以获得象较低分子量 PEG 可获得的那样高纯度的较高分子量 PEG。优选的是使用至少 85% 纯度、更优选的至少 90% 纯度、95% 纯度或更高纯度的 PEG。在例如 Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press San Diego, Calif. (1996), at Chapter 15 and in Zalipsky *et al.*, "Succinimidyl Carbonates of Polyethylene Glycol," in Dunn and Ottenbrite, eds., *Polymeric Drugs and*

Drug Delivery Systems, American Chemical Society, Washington, D.C. (1991) 中进一步讨论了分子的 PEG 化。

方便地, PEG 可以通过位点特异性诱变附着于 CCR2 氨基酸序列的选定位置, 只要保持了结合物的活性(即, MCP-1 结合)。例如, 在 SEQ ID NO: 1 所列 CCR2 氨基酸序列的 5 位的半胱氨酸残基可以是 PEG 化的靶点。作为补充或选择, 其他半胱氨酸残基可以被添加到 CCR2 氨基酸序列(例如, 在 N-末端或 C-末端)以借此充当 PEG 化的靶点。可以进行计算分析来选择诱变而不损害活性的优选的位置。

可以采用活化的 PEG 的各种结合化学作用, 活化的 PEG 例如 PEG-马来酰亚胺、PEG-乙烯砜(VS)、PEG-丙烯酸酯(AC)、PEG-正吡啶基二硫化物。制备活化的 PEG 分子的方法是本领域已知的。例如, PEG-VS 可以在氩气下通过 PEG-OH 的二氯甲烷(DCM)溶液与 NaH 反应, 然后与二乙烯砜反应(摩尔比: OH 1: NaH 5:二乙烯基砜 50, 以 0.2 克 PEG/mL DCM)来制备。PEG-AC 可以在氩气下通过 PEG-OH 的 DCM 溶液与丙烯酰氯和三乙胺反应(摩尔比: OH 1:丙烯酰氯 1.5:三乙胺 2, 0.2 克 PEG/mL DCM)来制备。这些化学基团可以附着于线性化的、2 臂、4 臂或 8 臂 PEG 分子。

虽然结合到半胱氨酸残基是可以借助来 PEG 化本发明的 CCR2 氨基酸的一种便利的方法, 如果希望也可以使用其他的残基。例如, 乙酸酐可以用于与 NH_2 和 SH 基团反应, 而不是 COOH 、S-S 或 $-\text{SCH}_3$ 基团, 而过氧化氢可以用于与 $-\text{SH}$ 和 $-\text{SCH}_3$ 基团反应, 而不是 NH_2 。反应可以在适合于与所述肽中期望的残基结合的条件下采用利用了公知的反应性的化学作用来进行。

对于本发明的 CCR2 氨基酸序列与 PVP 的生物结合, 借助于 4,4'-偶氮双(4-氰戊酸)作为基团起始剂以及 3-巯基丙酸作为链转移剂, 通过在二甲基甲酰胺中的游离基聚合来从 N-乙烯基-2-吡咯烷酮合成带有末端 COOH -的 PVP。产生的具有 Mr 6,000 平均分子量的 PVP 可以通过高性能液相色谱分离和纯化, 合成的 PVP 的末端 COOH 基团通过 N-羟基琥珀酰亚胺/二环己基碳二亚胺法来活化。基本上如通过引用合并在此的 Haruhiko Kamada, *et al.*, 2000, Cancer Research 60: 6416-6420 中所描述的, CCR2 氨基酸序列与 60 倍摩尔过量的活化的 PVP 反应, 用氨基 caploic 酸(相对于活化的 PVP 5 倍摩尔过量)终

止反应。

使用例如高性能液相色谱 (HPLC) 来分离、纯化和鉴定产生的结合的 CCR2 分子 (例如, PEG 化的或 PVP 结合的 CCR2)。此外, 本发明的这个方面的纯化的结合分子可以使用例如体外分析来进一步鉴定, 其中在存在或不存在本发明的 CCR2 结合物的情况下测试 MCP-1 与其受体 (例如 CCR2) 的结合特异性, 基本上如对于其他趋化因子所描述的 [例如, MCP-1 α , 参见, 例如 Hesselgesser J, 1998 (同上), 通过引用将其完全合并在此]。

本发明的这个方面的分子可以是生物化学合成的, 例如使用标准的固相技术合成的。这些方法包括排阻固相合成、部分固相合成法、片段缩合和经典的溶液合成。当肽相对短 (即, 10 kDa) 时和/或当它不能通过重组技术产生 (即, 不由核酸序列编码, 例如下文进一步描述的“标签”) 并由此涉及不同的化学作用时, 优选的使用这些方法,

固相肽合成步骤是本领域公知的, 由 John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984) 进一步描述了。

合成的肽可以通过制备高效液相层析法 [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.] 来纯化, 其组成可以通过氨基酸测序来确认。

在期望大量本发明肽的情况下, 本发明的肽可以使用例如由 Bitter *et al.*, (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier *et al.* (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson *et al.* (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu *et al.* (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671-1680 以及 Brogli *et al.*, (1984) Science 224:838-843, Gurley *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 and Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 所描述的重组技术来产生。

简言之, 将表达构建体 (即, 表达载体) 导入宿主细胞中, 所述表达构建体包括分离的多核苷酸 (即, 从其天然产生来源分离的, 例如 SEQ ID NO: 10), 所述多核苷酸包含位于调节元件的转录控制之下的编码本发明 CCR2 (任选地与编码异源氨基酸序列的核酸序列按读码同框融合) 的核酸序列。

例如，编码本发明的 CCR2 肽的核酸序列（例如，SEQ ID NO: 1）同框连接到免疫球蛋白 cDNA 序列（例如，SEQ ID NO: 3 和 5）。要理解的是，也可以使用基因组免疫球蛋白片段的连接。在这种情况下，融合需要存在用于表达的免疫球蛋白调节序列。编码 IgG 重链恒定区的 cDNA 可以根据公开的序列从来源于脾或外周血淋巴细胞的 cDNA 库分离，通过杂交或通过聚合酶链式反应（PCR）技术。编码 CCR2 氨基酸序列和免疫球蛋白的核酸序列可以串联地连接到表达构建体（载体）中，其指导在选定的宿主细胞中的有效表达，以下进一步说明。对于在哺乳动物细胞中表达，可以使用基于 pRK5 的载体 [Schall *et al.*, *Cell*, 61:361-370 (1990)] 和基于 CDM8 的载体 [Seed, *Nature*, 329:840 (1989)]。确切的接点可以通过使用寡核苷酸指导的删除诱变 [Zoller *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 10:6487 (1982); Capon *et al.*, *Nature*, 337:525-531 (1989)] 在设计的接点密码子之间除去额外的序列来创建。可以使用合成的寡核苷酸，其中每一半与期望的接点两侧的序列互补；理想地，这些寡核苷酸是 11 到 48 mer。做为选择，PCR 技术可以用于与适合的载体同框地连接分子的两个部分。

将表达构建体导入宿主细胞的方法是本领域公知的，包括电穿孔、脂转染和化学转染（例如，磷酸钙）。还参见随后的实施例部分的实施例 2。

将“转化的”细胞在适合的条件培养，其容许由所述核酸序列编码的嵌合分子的表达。

在预定的时间之后，从所述细胞或细胞培养物回收表达的嵌合分子，根据重组多肽的最终用途进行纯化。

取决于使用的宿主/载体系统，许多适合的转录和翻译元件，包括组成型和可诱导的启动子、转录增强子元件、转录终止子等等，可以用于表达载体中 [参见，例如 Bitter *et al.*, (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544]。

除了含有用于插入的编码序列 [编码嵌合体] 的转录和翻译的必需元件之外，本发明的表达构建体也可以包括被设计来优化表达的融合蛋白的稳定性、生产、纯度、产量或毒性的序列。

可以使用各种原核或真核细胞作为宿主表达系统来表达融合蛋白编码序列。这些包括但不限于，微生物，例如用含有嵌合体编码序列

的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌；用含有嵌合体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母；用含有嵌合体编码序列的重组病毒表达载体（例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）感染的或用重组质粒表达载体例如 Ti 质粒转化的植物细胞系统。哺乳动物表达系统是优选地用于表达本发明的嵌合体。

用于分子表达的宿主细胞系的选择主要取决于表达载体。真核表达系统是优选的（例如，哺乳动物和昆虫），因为它们容许翻译后的修饰（例如，糖基化）。另一种考虑是所需要的蛋白质的量。毫克量通常可以通过瞬时转染来产生。例如，腺病毒 EIA 转化的 293 人类胚肾细胞系可以用基于 pRK5 的载体通过磷酸钙方法改良法来瞬时转染以容许有效的表达。基于 CDM8 的载体可以用于通过 DEAE-葡聚糖法来转染 COS 细胞（Aruffo *et al.*, Cell, 61:1303-1313 (1990); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. US, 9:347-353 (1990)）。如果希望更大量的蛋白质，可以在宿主细胞系的稳定转染之后表达分子（参见，例如实施例小节的实施例 2）。要理解的是，分子的 N-末端的疏水性前导序列的存在将确保转染的细胞对分子的加工和分泌。

要理解的是，可以优选的使用细菌或酵母宿主系统来降低生产成本。然而，由于细菌宿主系统缺少蛋白质糖基化机制，生产之后的糖基化可能是需要的。

在任何情况下，在有效的条件下培养转化的细胞，其容许大量的重组多肽的表达。有效的培养条件包括，但不限于，有效的培养基、生物反应器、温度、pH 值和允许蛋白质生产的氧条件。有效的培养基是指任何培养基，在其中培养细胞来产生本发明的重组嵌合分子。这种培养基一般包括具有可同化碳、氮和磷酸盐源，以及合适的盐、矿物质、金属和其他营养物例如维生素的水溶液。本发明的细胞可以在常规的发酶生物反应器、摇瓶、试管、微滴定皿和培氏皿中培养。培养可以在适合于重组细胞的温度、pH 值和氧含量下进行。这些培养条件是本领域普通技术人员的专门技能之内的。

取决于用于生产的载体和宿主系统，产生的本发明的蛋白质可以保留在重组细胞之内、分泌到发酵培养基中、分泌到两层细胞膜的间隔中，例如 E.coli 中的周质间隙中；或保留在细胞或病毒膜的外表面

上。

在培养预定时间之后，进行重组蛋白质的回收。用语“回收重组蛋白质”是指收集含有蛋白质的完整的发酵培养基，并且不必暗指其他的分离或纯化步骤。本发明的蛋白质可以使用各种标准的蛋白质纯化技术来纯化，例如但不限于，亲和层析、离子交换层析、过滤、电泳、疏水性相互作用层析、凝胶过滤层析、反相层析、伴刀豆凝集素 A 层析、层析聚焦和差异溶解。

本发明的分子优选的以“基本上纯的”形式获得。如在此使用的，“基本上纯的”是指容许所述蛋白质在以下描述的各种应用中有效使用的纯度。

包含免疫球蛋白氨基酸序列的嵌合分子可以通过亲和层析方便地纯化。蛋白 A 作为亲和配体的适用性取决于在嵌合体中使用的免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。可以使用蛋白 A 来纯化基于人类 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的嵌合分子[Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth., 62:1-13 (1983)]。蛋白 G 优选地用于所有的小鼠同种型和用于人类 $\gamma 3$ [Guss *et al.*, EMBO J., 5:1567-1575 (1986)]。亲和配体所附着的固相支持物最常见的是琼脂糖，但其他固相支持物也是可用的。与琼脂糖可以实现的相比，机械稳定的固相支持物，例如受控的孔隙玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯容许更快的流速和更短的处理时间。将嵌合分子与蛋白 A 或 G 亲和柱结合的条件完全由 Fc 结构域的特征，即它的种类和同种型来确定。一般地，当选择了适合的配体时，直接从未条件化的培养液发生有效的结合。本发明的这个方面的嵌合分子一个区别特征是，对于人类 $\gamma 1$ 分子，对蛋白 A 的结合能力相对于相同的 Fc 型的抗体有些减弱。在含有温和的离液盐的酸性 pH 值（在 3.0 或 3.0 以上）或在中性 pH 值缓冲液中，结合的本发明的这个方面的嵌合分子可以被有效地洗脱。这种亲和层析步骤可以产生 > 95% 纯度的嵌合分子制备物。医学级纯度是治疗性应用必需的。

本领域已知的其他方法可以用于替代或补充在蛋白 A 或 G 上的亲和层析来纯化包括免疫球蛋白部分的嵌合分子。这种嵌合分子在亲硫凝胶层析 [Hutchens *et al.*, Anal. Biochem., 159:217-226 (1986)] 和固定的金属螯合物层析 [Al-Mashikhi *et al.*, J. Dairy Sci., 71:1756-1763 (1988)] 中的表现类似于抗体。然而，与抗体相比，它们对离

子交换柱的表现不仅由它们的等电点决定，还由可能由由于它们的嵌合性质而存在于分子中的电荷偶极决定。

要理解的是，本发明的分子可以被用于结合任何配体，所述配体例如通过 E3 结构域来结合 CCR2。这些可以包括 CCL7、CCL8 和 CCL13[D'Ambrosio (2003) J. Immunol. Methods 273:3-13]。

本发明的这个方面的分子可以用于治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病。

因而，根据本发明的另一方面，提供了在有需要的受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的分子，从而在所述受试者中治疗 MCP-1/CCR2 相关疾病。

在此使用时，术语“受试者”是指哺乳动物，优选人类受试者。

在此使用时，术语“治疗”是指防止、治愈、逆转、减弱、减轻、最小化、抑制或停止 MCP-1/CCR2 相关疾病的有害影响。

在此使用时，用语“MCP-1/CCR2 相关疾病”是指发作或进展取决于 MCP-1 和其受体 CCR2 间的相互作用的疾病。

MCP-1/CCR2 相关疾病的实例包括但不限于炎症性疾病、坏死、动脉粥样硬化、癌症（例如，前列腺癌、乳房癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、食道癌、成神经细胞瘤）、多发性硬化、粉瘤、单核细胞性白血病、肾脏疾病（例如，血管球性肾炎）、hamman-rich 综合症、子宫内膜异位、类风湿性关节炎、细支气管炎、哮喘、系统性红斑狼疮、炎症性肠病（例如，结肠炎）、牙槽炎、再狭窄、脑外伤、银屑病、特发性肺纤维化和移植动脉硬化构成的组。

本发明的分子可以直接地或在药物组合物中施用给受试者，在所述药物组合物中它与适合的载体或赋形剂混合。

在此使用时，“药物组合物”是指一种或多种在此描述的活性成分与其他化学成分例如生理学适合的载体和赋形剂的制品。药物组合物的目的是促进化合物向有机体的施用。优选的，所述药物组合物是无免疫原性的。

在此使用时，术语“活性成分”是指本发明的分子责任产生预期的生物学效果。

下文中，可互换使用的用语“生理学上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”是指不对有机体引起的显著刺激以及不消除施用的

化合物的生物学活性和性质的载体或稀释剂。佐剂包括在这些用语中。

因而，例如，本发明的药学上可接受的载体可以包括脂氨基酸。

做为选择，本发明使用的药学上可接受的载体可以包括包埋材料，例如多元醇（即，碳水化合物）。适合于用作赋形剂的碳水化物的非限制性实例包括麦芽糊精（例如，Glucidex Roquette）、海藻糖（例如，Trehalose Merck）、纤维二糖、葡萄糖、果糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖、乳果糖、麦芽糖、龙胆二糖、乳糖、异麦芽糖、麦芽糖醇（例如，Maltisorb Roquette）、乳糖醇、赤藓醇、异麦芽酮糖醇（palatinitol）、木糖醇、甘露醇、山梨醇、半乳糖醇和核糖醇、蔗糖、棉子糖、龙胆糖、车前糖、毛蕊糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖和环己六醇。

然而做为选择，本发明使用的药学上可接受的载体是适合于口服施用的微球体。例如，微球体可以包括在胃中的 pH 值水平（例如，低于 4 的 pH 值水平）下对溶解或酸降解有抗性的有机材料的水不溶性基质，基本上如 Vaghefi 等人的美国专利 No. 6,849,271 所描述的，通过引用将其合并在此。这种有机基质材料可以是，例如，甘油三酯、氢化植物油、蜡或蜡的混合物、聚烷氧基烷基醚、聚烷氧基烷基酯和水不溶性的部分降解的蛋白质。

要理解的是，所述生物结合的聚合物（例如，本发明的 PEG 化的 CCR2 肽）可以用在药学上可接受的载体中并作为其一部分，因而充当用于递送 CCR2 氨基酸序列的载体分子，而同时充当递送载体的成分。这种双重用途的优选的实施方式是脂质体载体，例如，PEG 结合的脂质体，如例如 George 等人的美国专利申请 No. 20030186869 中所描述的，通过引用将其完全合并在此。

在此，术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中来进一步促进活性成分的施用的惰性物质。赋形剂的非限定性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖类和淀粉种类、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

配制和施用药物的技术可以最新版本的 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA 中找到，通过引用将其完全合并在此。

适合的施用途径可包括例如，口服、直肠的、穿粘膜的，特别是经鼻、肠的或胃肠外的递送，包括肌肉内的、皮下的和髓内的注射，

以及鞘内的、直接心室内的、静脉的、腹膜内的、鼻内的或眼球内注射。

作为选择，人们可以以局部而不是全身性方式来施用药物组合物，例如，直接将药物组合物注射进患者的组织区域。

本发明的药物组合物可以通过本领域公知的过程，例如通过常规的混合、溶解、粒化、制成糖衣、研磨、乳化、密封、捕集或冻干过程来制备。

因而本发明的药物组合物可以使用一种或多种生理学上可接受的载体按常规的方式来配制，所述载体包括便于将活性成分加工成可以药学上使用的制品的赋形剂和辅助剂。适当的配方取决于给药途径的选择。

对于注射，可将药物组合物的活性成分配制在水溶液中，优选的在生理学相容的缓冲液例如 Hanks'溶液、Ringer's 溶液或生理盐水缓冲液中。对于穿粘膜施用，将适合于需透过的障碍物的渗透剂用在配方中。这种渗透剂是本领域公知的。

对于口服施用，所述药物组合物可以通过使活性化合物与本领域公知的药学上可接受的载体混合来容易地配制。这些载体使得所述药物组合物能被配制为片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆液、悬浮液等等，用于由患者口服摄取。口服使用的药理学制品可以在添加所希望的辅助剂之后，使用固体赋形剂、任选的研磨所述产生的混合物、以及加工微粒的混合物以获得片剂或糖衣丸核，来制备。特别地，适合的赋形剂是填充物，例如糖类，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；纤维素制品，例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羧基丙基甲基纤维素和碳酸酞胺纤维素钠；和/或生理学上可接受的聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮（PVP）。如果希望，可以添加崩解剂，例如交联的聚乙烯基吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐，例如海藻酸钠。

锭剂核心提供有适合的包衣。为了这个目的，可以使用浓缩的糖溶液，其可以任选含有阿拉伯树胶、滑石粉、聚乙烯基吡咯烷酮、聚羧乙烯凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液和适合的有机溶剂或溶剂混合物。染料或色素可以添加到所述片剂或糖衣丸包衣中用于鉴别或表征不同的活性化合物剂量组合。

可以口服使用的药物组合物包括由明胶制成的 push-fit 胶囊，以及由明胶和成形剂，例如甘油或山梨醇制成的软的密封的胶囊。push-fit 胶囊可以含有与填料例如乳糖、粘合剂例如淀粉、润滑剂例如滑石粉或硬脂酸镁以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中，活性成分可以溶解或悬浮在适合的液体中，例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外，可以添加稳定剂。用于口服施用的所有制剂应当是适合于所选给药途径的剂量。

对于口腔施用，所述组合物可采用按常规方式配制的片剂、锭剂的形式。

对于吸入施用，使用适合的推进剂，例如，二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟甲烷或二氧化碳，以气溶胶喷雾呈现的形式从密封的包装物或喷雾器方便地递送根据本发明使用的活性成分。对于加压的气雾剂来说，剂量可以通过提供递送计量量的阀门来确定。例如，在分配器中使用的明胶的胶囊和药筒可以配制为含有化合物的粉末混合物和适当的粉末基剂，例如乳糖或淀粉。

在此描述的药物组合物可以配制为通过注射用于肠胃外施用，例如，通过弹丸注射(bolus injection)或连续的输注。用于注射的制剂可以以单位剂型存在，例如，在任选地带有添加的防腐剂的安瓿瓶或多剂量容器中。所述组合物可以是在油或水赋形剂中悬浮液、溶液或乳剂的形式，可以含有配方试剂，例如悬浮、稳定和/或分散试剂。

用于肠胃外施用的药物组合物包括水可溶形式的活性制品的水溶液。另外，活性成分的悬浮液可以制备为适合的油性或基于水的注射悬浮液。适合的亲油性溶剂或赋形剂包括脂肪油，例如芝麻油，或合成脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯，或脂质体。水性注射悬浮液可以含有提高悬浮液的粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠盐、山梨醇或葡聚糖。任选地，悬浮液也可以含有适合的稳定剂或提高活性成分的溶解性以允许制备高浓度溶液的试剂。

做为选择，活性成分可以是粉末形式，用于在使用前与适合的赋形剂，例如，无菌的无热原的基于水的溶液来构建。

通过使用诸如可可脂或其他甘油酯的常规栓剂基剂，本发明的药物组合物也可以被配制为直肠的组合物，例如栓剂或滞留灌肠剂，。

适合于在本发明的上下文中使用的药物组合物包括一些组合物，

其中以有效量包含活性成分来实现预期的目的。更具体地，“治疗有效量”是指有效防止、减轻或改善失调（例如，缺血）的症状或延长接受治疗的受试者的存活的活性成分（例如，核酸或构建体）的量。

治疗有效量的确定处于本领域技术人员的能力之内，特别是考虑在此提供的详细公开的情况下。

对于用于本发明的方法任何制品，可以最初从体外和细胞培养分析来估计剂量或治疗有效量。例如，可以在动物模型中配制剂量来实现期望的浓度或滴度。这种信息可用于更精确地测定人类中有用的剂量。

在此描述的活性成分的毒性和疗效可以通过标准的药学步骤在体外、在细胞培养物或实验动物中确定。从这些体外和细胞培养分析获得的数据可被用于配制用于人类的剂量范围。取决于采用的剂型 and 使用的给药途径，剂量可以变动。可以由独立的医师根据患者的状况选择确切的制剂、给药途径和剂量。（参见，例如 Fingl, E. *et al.* (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Ch. 1, p.1.)

可以分别地调节给药数量和施用间隔来提供足够的活性成分血浆或脑水平来诱导或抑制生物效应（即，最低有效浓度，MEC）。MEC 将随每种制品变化，但可以从体外数据来估计。实现 MEC 所必需的剂量将取决于个体特征和给药途径。可以使用检测分析来确定血浆浓度。

取决于要治疗的状况的严重度和反应性，给药可以是单次或多次施用，疗程持续从几天到几个星期，或直到实现治愈或实现疾病状态的减弱。

毫无疑问，要施用的组合物的量将取决于待治疗的受试者、痛苦的严重度、施用的方式和处方医师的判断，等等。

如果希望，本发明的组合物可以存在于包装或分配器设备中，例如 PDA 批准的试剂盒，其可以含有一种或多种含有所述活性成分的单位剂型。例如，所述包装可以包括金属或塑料薄膜，例如泡罩包装。所述包装或分配器设备可以伴有施用的说明。所述包装或分配器设备也可以伴随有由管理药物的制造备、使用或销售的政府部分机构开具规定形式的注意事项公告，所述公告反映机构批准了组合物的形式用于人类或兽医学施用。例如，这种注意事项公告可以包括由美国食品

和药品管理局对于处方药物的和批准和经批准的的产品插入物批准插页的标签。配制在药学上可接受的载体中包含本发明的制品、配制在药学上可接受的载体中的组合物也可以被制备、置于合适的容器中，并被标记上对以上进一步详述的适应症的治疗。

要理解的是，本发明的这个方面的分子（例如，嵌合的蛋白）可以通过基因治疗的方式向受试者提供。因此，以上描述的哺乳动物表达构建体可以采用上文描述的任何适合的施用方式（即，体内基因治疗）来向受试者施用。做为选择，经由合适的基因递送工具/方法（转染、转导、同源重组，等等）和所需的表达系统将核酸构建体导入适合的细胞，然后在培养中扩展修饰的细胞并返回到受试者中（即，离体基因治疗）。

当前优选的体内核酸转移技术包括使用病毒或非病毒构建体如腺病毒、慢病毒、单纯性疱疹 I 病毒或腺病毒相关病毒（AAV）和基于脂质的系统的转染。用于基因的脂质介导转移的有用的脂质是，例如，DOTMA、DOPE 和 DC-Chol[Tonkinson *et al.*, Cancer Investigation, 14 (1): 54-65 (1996)]。用于基因治疗的最优选的构建体是病毒，最优选的是腺病毒、AAV、慢病毒或逆转录病毒。病毒构建体例如逆病毒构建体包括至少一个转录启动子/增强子或基因座界定元件，或通过其他方式如可变剪接、核 RNA 输出或信使的翻译后修饰来控制基因表达的其他元件。这种载体构建体还包括包装信号、长末端重复（LTR）或其部分，以及适合于病毒使用的正链和负链引物结合位点，除非它已经存在于病毒构建体中。此外，这种构建体一般包括信号序列，用于肽从其置身其中的宿主细胞分泌。优选地，用于这个目的的信号序列是哺乳动物信号序列，例如 Igk 前导序列（例如，SEQ ID NO: 7 和 8）。任选地，构建体还可以包括指导多聚腺苷酸化的信号，以及一个或多个限制性位点和翻译终止序列。举例来说，这种构建体一般将包括 5'LTR、tRNA 结合位点、包装信号、第二链 DNA 合成起点和 3'LTR 或其部分。可以使用非病毒的其他载体，例如阳离子脂质、聚赖氨酸和树枝状聚合物(dendrimers)。

本发明的 CCR2 肽对 MCP-1 的亲合性使得其能用在 MCP-1 的纯化和检测中。

因而，根据本发明的又一个方面，提供了包含标签和本发明的

CCR2 肽的分子。

在此使用时，术语“标签”是指由结合配偶体例如抗体、螯合剂或抗生物素蛋白（生物素）分子特异性识别的部分。所述标签可以置于 CCR2 肽的 C-末端或 N-末端，只要它不影响其生物学活性（例如，MCP-1 结合）。

例如，标签多肽具有足够的残基以提供表位（即，表位标签），针对该表位可以产生抗体，而又足够短从而不干扰 CCR2 肽的生物学活性。所述表位标签优选还是十分独特的，以致针对它的抗体基本上不与其他表位交叉反应。适合的标签多肽一般地具有至少六个氨基酸残基，通常在约 8-50 个氨基酸残基之间（优选的，在约 9-30 个氨基酸残基之间）。优选的是聚组氨酸序列，其结合镍，容许通过例如所描述的 Ni-NTA 层析来分离标签的蛋白质（Lindsay *et al.* Neuron 17:571-574（1996）]。

这种 CCR2 的表位标签的形式是期望的，因为它的存在可以使用针对所述标签多肽的标记的抗体来检测。而且，提供表位标签允许本发明的 CCR2 肽容易地通过使用抗标签抗体的亲和纯化来纯化。涉及抗体的亲和纯化技术和诊断分析在此稍后说明。

标签多肽和它们相应的抗体是本领域公知的。实例包括流感 HA 标签多肽和它的抗体 12CA5（Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165（1988））；c-myc 标签和它的 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体（Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616（1985））；和单纯性疱疹病毒糖蛋白 D（gD）标签和它的抗体（Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3（6）:547-553（1990））。已经公开了其他标签多肽。实例包括 Flag 肽 [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210（1988）]；KT3 表位肽 [Martin *et al.*, Science, 255:192-194（1992）]； α -微管蛋白表位肽 [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166（1991）]；和 T7 基因 10 蛋白肽标签 [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397（1990）]。一旦选择了标签多肽，可以使用本领域公知的方法来产生它的抗体。这些抗体是商业上可获得的，例如来自 Sigma, St. Louis. USA。

本发明的这个方面的分子可以用于从生物样品分离 MCP-1 或检测其中 MCP-1 的存在。

如在此使用的，用语“生物样品”是指生物流体，例如其中存在 MCP-1 的血液、血清、血浆、淋巴、胆汁、尿、唾液、痰、滑液、精液、泪、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、腹腔积液、脓、条件培养基等等。

根据本发明的这个方面，MCP-1 的分离通过以下方式来实现：使生物样品与本发明的这个方面的分子接触，从而 MCP-1 和所述分子形成复合物（使用容许分子与 MCP-1 结合的缓冲液、温度条件，实例参见 datta-Mannan and Stone 2004，上文）；并分离所述复合物从而从所述生物样品分离 MCP-1。

为了分离所述复合物，分子优选的固定在固相支持物上。如在此使用的，用语“固相支持物”是指目的试剂（例如，本发明的这个方面的分子）可以粘附的非水基质。固相支持物的实例包括但不限于，部分或全部地由玻璃（例如，受控的孔隙玻璃）、多糖（例如，琼脂糖）、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅树脂形成的固相支持物。在某些实施方式中，取决于实际情况，固相支持物可以包括测定板的孔；在其它实施方式中，其是纯化柱（例如，亲和层析柱）。这个术语还包括离散微粒的不连续固相，例如那些在美国专利 No.4,275,149 中描述的。

做为选择，这样的分子可以用于检测生物样品中 MCP-1 的水平。对于诊断应用，分子一般地将用可检测的部分标记。可检测部分可以是能够直接或间接地产生可检测信号的任何一种。例如，所述可检测部分可以是放射性同位素、荧光或化学发光化合物，或标签（例如上文描述的，标记的抗体可以与之结合）。本发明的分子可以应用于任何已知的测定方法，例如竞争性结合测定、直接和间接夹心测定和免疫沉淀测定。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

本发明的这个方面的分子可以被包括在诊断试剂盒中，其中所述分子和任选的固相支持物和成像试剂（例如，抗体、生色底物等等）可以被包装在具有适合的缓冲液和防腐剂的适合的容器中，用于诊断。

在参阅无意用来限制的以下实施例时，本发明的其他目的、益处和新的特征对于本领域的普通技术人员将变得明显。另外，上文中描

述的各种实施方式和方面以及在以下的权利要求部分中要求权利的每一种都可以在以下实施例中找到实验支持。

实施例

现在参考以下实施例，其与以上的描述一同以非限制性的方式说明了本发明。

一般地，在此使用的术语和本发明中使用的实验方法包括分子的、生物化学的、微生物学的和重组 DNA 的技术。这些技术已经在文献中充分说明了。参见，例如，Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989) ; "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994) ; Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) ; Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988) ; Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) ; 在美国专利 Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 和 5,272,057 中阐述的方法; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994) ; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994) ; Stites *et al.* (eds) , "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition) , Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) ; Mishell and Shiigi (eds) , "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980) ; 在专利和科学文献中广泛地描述了可用的免疫测定，参见，例如，美国专利 Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 和 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984) ; "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985) ; "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984) ; "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed.(1986) ; "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986) ; "A Practical Guide to Molecular

Cloning" Perbal, B., (1984) 和 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 通过引用将所有这些合并在此, 如同在此完全地阐述了一样。在这个文件的通篇提供了其他一般的参考文件。其中的步骤被认为是本领域公知的, 为了读者的方便而提供。通过引用将其中含有的所有信息合并在此。

实施例 1

前列腺癌患者显示了对 MCP-1 的特异选择性抗体反应

使用关于针对包括 MCP-1 (CCL2) 在内各种趋化因子的抗体在前列腺癌患者中存在性的 ELISA 测试, 确定了 CCL2 与前列腺癌之间的联系。

材料和实验步骤

患者样本-与以色列 Haifa 的 CARMEL 和 RAMBAM 医疗中心的泌尿科学部合作进行了人类实验工作。所有的血清和组织样品在日期为 2003 年 11 月 11 日的 Helsinki 委员会批准 No. 1822 之下从 RAMBAM 医院的患者获得。由来自 CARMEL 医疗中心泌尿科学部的 Avi Stein 教授进行病理分析。患者的临床数据在以下的表 1 中概述。

抗体 (Ab) 滴度的确定-使用之前详细描述过的 ELISA 测试来检测针对每种测试的趋化因子的 Ab 滴度 (Wildbaum, G., M. Nahir, and N. Karin. 2003. Beneficial autoimmunity to proinflammatory mediators restrains the consequences of self-destructive immunity. *Immunity* 19:679)。重组人类趋化因子: SDF-1 (CXCL12)、MIP-1 α (CCL3)、MIP-1 β (CCL4)、IL-8 (CXCL8)、IP-10 (CXCL10)、MIP-3 α (CCL20)、MIP-3 β (CCL-19)、Lymphotactin (XCL1)、MIG (CXCL9)、RANTES (CCL5)、MCP-3 (CCL7) 和 MCP-1 (CCL2) 全部购自 PeproTech, Rocky Hill, NJ。人类 MIF 购自 R&D Systems (Minneapolis, NM)。

结果

前列腺癌患者显示了对 MCP-1 的显著的自身抗体滴度

来自 23 位前列腺癌患者, 21 位具有良性前列腺肥大 (BPH)

的个体、11 位对照受试者的血清（以下的表 3）测试了针对各种趋化因子的自身抗体的存在，特别是参与癌症的那些，包括 SDF-1（CXCL12）、MIF、MIP-1 α （CCL3）、MIP-1 β （CCL4）、IL-8（CXCL8）、IP-10（CXCL10）、MIP-3 α （MCP-10）、MIP-3 β （CCL-19）、淋巴细胞趋化因子（XCL1）、MIG（CXCL9）、RANTES（CCL5）、MCP-3（CCL7）和 MCP-1（MCP-1）。

表 3-患者统计状况和特征

征集的前列腺癌症患者的数目	23
年龄，年 [中值 (范围)]	74 (64-81)
前列腺特异性抗原 (PSA) ， ng/ml [中值 (范围)]	382 (3.7-3400)
主要的治疗	
激素治疗	1 ^a
根治性前列腺切除术	1
TURP	3
放射	2
Gleason 分值	
≤ 6	3
7	18
≥ 8	2
征集的良性前列腺肥大患者的数目	21
年龄，年 [中值 (范围)]	71 (64-79)
前列腺特异性抗原 (PSA) ， ng/ml [中值 (范围)]	6.8 (4.3-8.9)
征集的健康对照的数目	10
年龄，年 [中值 (范围)]	70 (62-75)

a 数值表示每个组中患者的数目

所有测试的趋化因子中，前列腺癌症患者具有专门针对 MCP-1 的高显著度的抗体滴度（图 1a，log₂ Ab 滴度 11.85 ± 0.8）。在健康个体和 BPH 患者中抗 MCP-1 抗体的基线滴度（log₂）是 5-6，与根据任

何其他的趋化因子观察到的没有不同。因而，前列腺癌症患者显示了针对 MCP-1 的高度特异性的和选择性的抗体反应（图 1a, $p < 0.01$ ）。统计分析揭示了，约 82% 的前列腺癌症患者（19/30），和患有非恶性的 BPH 的仅 4.7%（1/21）的患者显示了针对 MCP-1 的显著反应（ $\log_2 \text{Ab}$ 滴度 > 10 , $p < 0.01$ ）（图 1b）。

这些结果表明，MCP-1 CCR2 相互作用的抑制作用可以用来抑制由 MCP-1/CCR2 调节的癌症和其他疾病。

实施例 2

CCR2 嵌合肽 (E3-Ig) 的产生和在细胞系中的稳定表达

材料和实验步骤

CCR2 (E3) -IgG 构建体的产生

图 2 显示了 CCR2 (E3) -IgG 嵌合体表达构建体的示例。根据之前用来产生 CTLA4-Ig 的基础方案 (Van Oosterhout, A. J., C. L. Hofstra, R. Shields, B. Chan, I. Van Ark, P. M. Jardieu, and F. P. Nijkamp. 1997 Murine CTLA4-IgG treatment inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness and attenuates IgE upregulation in a murine model of allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 17:386) 来产生 IgG1 构建体，修改是：编码人类 IgG1 重链的恒定区（铰链-CH2-CH3）的 cDNA 从 LPS 和 IL-4 活化的外周血单核细胞 (PBMC) 克隆到 pSecTag2/Hygro B (Invitrogen, San Diego, CA) 上。人类 CCR2-E3 从 LPS 活化的人类 PBMC 中使用如下编码部分 CCR2 的 6 结构域 (E3, 分别为 SEQ ID NO: 1 和 2) 的引物来亚克隆：正义：cccaagcttggcctgagtaactgtgaaag (SEQ ID NO: 12)，反义：ccgctcgagagtctctgtcacctgcgtgg (SEQ ID NO: 13)。在证实序列之后，将扩增的 PCR 产物克隆到 pSec-Tag2 载体 (Invitrogen, San Diego, CA) 中。将人类 IgG Fc γ 的铰链-CH2-CH3 连接到质粒 (pSec-CCR2) 的 CCR2 (E3) 下游来产生融合蛋白 CCR2-IgG。

稳定的 pSec-CCR2 (E3) -IgG 表达细胞系的产生

将 pSec-CCR2 (E3) -IgG 质粒与 CHO DHFR 迷你基因载体根据厂家的方案使用 jet PEI (多相转染-Ilkirsch Cedex, France) 共转染入 DG44 CHO 细胞 (DHFR^{-/-}) (由 USA 哥伦比亚大学的 Dr. Lawrence Chasin 提供)。在含有潮霉素(hygromycine) (200 $\mu\text{g/ml}$) 的培养基中

筛选稳定转染的细胞。通过从 Amersham Biosciences (Uppsia, Sweden) 获得的蛋白 G-Sepharose 柱从上清液纯化 CCR2 (E3) -IgG 融合蛋白, 使用山羊抗人 IgG-HRP (Sigma, St. Louis, MO) 通过 Western 印迹分析来验证。

实施例 3

CCR2 (E3) -IgG 特异性结合 MCP-1

通过 ELISA 测定确定了 CCR2 的 E3 结构域结合 MCP-1 的能力。

材料和实验步骤

ELISA-通过如下的直接 ELISA 测定了 CCR2 (E3) -IgG 对各种商业上可获得的人类趋化因子 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) 的结合特异性: 96 孔 ELISA 平板 (Nunc, Roskilde, Denmark) 用 100 ng/mL 每种趋化因子包被, 用 1% BSA/PBS 洗涤和封闭。然后添加浓度 5 µg/ml 的 CCR2 (E3) -IgG。添加 HRP 标记的小鼠抗人 Ig (Jackson, Pennsylvania) 作为第二抗体。结果显示为 450 nm 处的 O.D. 读数。CCR2 单克隆抗体 (MAB679; R&D Systems, Minneapolis, NM) 用作阳性对照 (1 µg/ml)。

结果

通过 ELISA 测定 CCR2 (E3) -IgG 与各种细胞因子的结合。如图 3 所示, CCR2 的 E3 结构域足以结合 MCP-1, 与测试的其他因子相比, 展现了与这种趋化因子的高四倍的结合。

实施例 4

CCR2 (E3) -IgG 抑制 MCP-1 诱导的细胞迁移

材料和实验步骤

细胞系

THP-1 细胞从美国典型培养物保藏所获得 (ATCC, Rockville, MD, ATCC Accession No. TIB-202), 根据厂家的方案培养。

细胞迁移测定-测试了 CCR2 (E3) -IgG 抑制 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移的能力。使用转移孔室 (Corning Costar, Cambridge, MA) 进行了化学趋向性测定。将 THP-1 细胞与培养基 (1×10^6 细胞/孔) 添加到转移孔的上室, 在用培养基平衡下室之后, 添加补充有或不补

充可溶 CCR2 (E3)-IgG 的重组人类 MCP-1 (R&D Systems, Minneapolis, NM)。然后在含有 7.5% CO₂ 的湿润空气中在 37°C 孵育转移孔 3 小时。从下室收集迁移的单核细胞并计数。

结果

图 4 显示了可溶的 CCR2 (E3) -IgG 以剂量依赖性的方式显著地并断然地 (90%) 阻断 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移。

实施例 4

CCR2 (E3) -IgG 完全地降低 PC-3 肿瘤生长, 并降低 VEGF 表达
材料和实验步骤

用 CCR2 (E3) -IgG 治疗小鼠-六只 SCID/Bg 小鼠的三个组皮下施用 5×10^6 个 PC-3 Luc 细胞/小鼠 (El Hilali *et al.* Clin Cancer Res. 2005 Feb 1;11 (3) :1253-8.)。

第一组经历 CCR2 (E3) -IgG 的重复施用 (200 µg/小鼠, i.v., 四天的间隔)。第二组施用匹配量的 PBS, 第三组施用同种型匹配的对照 IgG。对于晚期治疗 (即, 建立的肿瘤的治疗), 在施用 PC-3 细胞 18 天后开始施用。

VEGF 的检测-参见 de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski, and S. Subramani. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. Mol Cell Biol 7:725; Rubio, N., M. M. Villacampa, and J. Blanco. 1998. Traffic to lymph nodes of PC-3 prostate tumor cells in nude mice visualized using the luciferase gene as a tumor cell marker. Lab Invest 78:1315; Rubio, N., M. Lorgans measured using prostate tumor PC-3 cells expressing the luciferase gene as a quantifiable tumor cell marker. Prostate 44:133; Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York。在第 30 天处死动物, 获取肿瘤并切片。使用来自 Santa Cruz. 的兔抗 VEGF (如果你需要, 我可以明天给你提供 cat 编号) 检测 VEGF。

荧光素酶活性-如先前描述的, 参见 El Hilali Clin Cancer Res. 2005 Feb 1;11 (3) :1253-8。简言之, 使用 CO₂ 在第 30 天处死动物。获取肺和骨并在液氮中冷冻。然后将冷冻的组织研磨成粉末, 添加裂解缓冲液 (Promega)。样品涡旋数秒, 混合物离心 20 分钟 (13000 rpm)。

然后添加荧光素酶底物。

结果

使用 CCR2 (E3) -Ig 的治疗完全地降低了 PC-3 肿瘤生长-如图 5a 所示, 与施用 PBS 或对照 IgG 的小鼠中发展的肿瘤相比, 重复施用 CCR2 (E3) -IgG 完全地抑制了 PC-3 肿瘤生长。

使用 CCR2-Ig 的晚期治疗 (第 15 天) 阻断了预先建立的原发肿瘤的发展和它形成转移的能力。图 5b 清楚地显示了, 即使当 CCR2 (E3) -IgG 在肿瘤发展之后 (细胞注射的第 18 天) 施用, CCL2 的阻断显著地降低了原发肿瘤的发展和它形成转移的能力。即使在肿瘤细胞施用的中间时间 (8 天) 之后, CCR2 (E3) -IgG 仍能够抑制肿瘤发展。

用 CCR2 (E3) -Ig 治疗降低了肿瘤转移-如图 5c 所示, 如由荧光素酶活性的降低所指明的, 用 CCR2 (E3) -IgG 治疗小鼠显著地抑制了向肺部和骨组织的肿瘤转移。与未治疗的动物相比, 在两种组织中的荧光素酶活性被降低了 4-10 倍, 并且总体达到了相同的最小水平 (即, 约 0.5)。

用 CCR2 (E3) -IgG 治疗完全地降低 VEGF 表达-如图 6a-f 所示, 与同种型匹配的对照 IgG (附图 6b、e) 和 PBS (图 6d、f) 相比, 使用 CCR2 (E3) -IgG (图 6a、d) 显著地降低了 VEGF 在肿瘤位点的表达。这表明, CCR2 途径的阻断抑制了 VEGF 的肿瘤诱导的活性。

实施例 5

CCL2 诱导的 PC-3 细胞迁移被 CCR2 (E3) -IgG 抑制

材料和实验步骤

细胞迁移测定-使用 Cell Biolabs, San Diego, CA 的 CytoSelect 试剂盒测定细胞迁移。抗 CCL2 是从 Dr. Martinez 和 Dr. Melado, 免疫学和肿瘤学部, Centro Nacional de Biotecnologia, UAM Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain 获得的。简言之, 如图 7 所示, PC-3 细胞 (10^6 /孔) 添加到转移孔平板的上室, CCL2 (重组人类 MCP-1、RHMCP-1; 20 ng/ml) 添加到下孔, 下孔也补充有抗 CCL2 (50 μ g) 和/或 CCR2 (E3) -IgG (200 μ g)。在 37°C 孵育 2 小时之后, 通过 FACS 计数迁移的 PC-3 细胞。结果显示为三个副本的平均数 $\pm$ SE。

结果

在 CCL2 对前列腺癌细胞的可能的作用机制之中的是它吸引肿瘤细胞。这可以在图 7 中看出, CCL2 与 CCR2-Ig 比抗 CCL2 mAb 更好地抑制 PC3 细胞的迁移。

实施例 6

CCR2 氨基酸序列的 PEG 化

为了稳定本发明的 CCR2 氨基酸序列以及为了使它适合于口服和/或胃肠外施用, 肽可以使用本领域已知的方法 (例如, Croyle, M.A., *et al.*, 2000, Hum. Gene Ther. 11: 1721-1730; Croyle, M.A., *et al.*, 2004, J. Virol. 78: 912-921) PEG 化, 所述肽具有以下的序列: Lys Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln Val Thr Glu Thr (SEQ ID NO: 11), 除了在它的 N-末端添加了赖氨酸残基之外其与 SEQ ID NO: 1 相同。例如, 单甲氧基聚(乙烯)乙二醇可以通过琥珀酰亚胺基琥珀酸酯 (其可以从 Sigma Chemicals, St. Louis, Mo. 获得) 活化。一旦被活化, 聚合物可以以约 10:1 (聚合物: 肽) 的肿瘤比添加至 CCR2 肽, 在 25°C 轻柔搅拌下来进一步进行 PEG 化反应。通过添加相对于添加的 PEG 数量过量 (例如, 10 倍) 的赖氨酸 (Sigma Chemicals), 可以停止反应。未反应的 PEG、过量的赖氨酸和反应副产物通过在用 100 mM 磷酸钾缓冲的盐水 (pH 7.4) 平衡的 Micro-Bio Spin P-30 层析柱 (Bio-Rad) 上进行缓冲液交换来消除。

要理解的是, 为了清楚而在独立的实施方式的上下文中描述的本发明的某些特征, 也可以组合于单个实施方式中提供。反之, 为了简便起见在单个实施方式的上下文中描述的本发明的各种特征, 也可以单独地或以任何适合的子组合来提供。

尽管已经结合其具体实施方式描述了本发明, 很明显的是, 多种替换、修改和变体对于本领域技术人员是显而易见的。因此, 旨在包括所有落在所附的权利要求的精神和广义范围内的这种替换、修改和变体。在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请和 GenBank Accession 号码通过引用将它们完全地合并到本说明书中, 达到如同每个单独的出版物、专利或专利申请或 GenBank Accession 号码被具体和分别地指明通过引用合并在此的相同程度。此外, 在本申请中所有

参考文献的引用或列明不应被看作是承认这些参考文献是本发明可获得的现有技术。

<110> Rappaport Family Institute for Research in the Medical
Sciences
Karin, Nathan
Wildbaum, Gizi
Zohar, Yaniv
Izhak, Liat
Weinberg, Uri

<120> 用于治疗MCP-1/CCR2相关疾病的分子及其使用方法

<130> 31048

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人CCR2 E3结构域编码序列

<400> 1
ggcctgagta actgtgaaag caccagtcaa ctggaccaag ccacgcaggt gacagagact 60

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人CCR2 E3结构域氨基酸序列

<400> 2
Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln
1 5 10 15

Val Thr Glu Thr
20

<210> 3
<211> 681
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
gtgccagggt attgtggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc 60
ttcatcttcc ccccaaagcc caaggatgtg ctaccatta ctctgaactcc taagggtcag 120
tgtgttggtg tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat 180
gatgtggagg tgcacacagc tcagacgcaa ccccgaggagg agcagttcaa cagcactttc 240
cgctcagtcg gtgaacttcc catcatgcac caggactgcc tcaatggcaa ggagttcaaa 300
tgcagggtca acagtgcagc tttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa 360
ggcagaccga aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag 420

```

gataaagtca gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag 480
tggcagtgga atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagcccat catggacaca 540
gatggctctt acttcgtcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga 600
aatactttca cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc 660
ctctcccaact ctctggtaa a 681

```

```

<210> 4
<211> 227
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 4

```

```

Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu
1          5          10          15

```

```

Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr
          20          25          30

```

```

Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys
          35          40          45

```

```

Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val
          50          55          60

```

```

His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
65          70          75          80

```

```

Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Cys Leu Asn Gly
          85          90          95

```

```

Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile
          100          105          110

```

```

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val
          115          120          125

```

```

Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser
          130          135          140

```

```

Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu
          145          150          155          160

```

```

Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro
          165          170          175

```

```

Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val
          180          185          190

```

```

Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu

```

```

      195              200              205

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser
 210              215              220

Pro Gly Lys
225

<210>  5
<211>  705
<212>  DNA
<213>  Homo sapiens

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (650)..(650)
<223>  n is a, c, g, or t

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (689)..(689)
<223>  n is a, c, g, or t

<400>  5
ctcgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc   60
ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc   120
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccg tgaggccaag   180
ttcgactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag   240
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg   300
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc caccgagaaa   360
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc   420
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc   480
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg   540
cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttcctetata gcaagctcac cgtggacaag   600
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggn cctgcacaac   660
cactacacgc agaagagcct ctccctgtnc ccgggtaaag ggccc               705

<210>  6
<211>  234
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  6

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1              5              10              15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      20              25              30

```

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asp Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Thr Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Pro
225 230

<210> 7
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Ig κ 前导编码序列

<400> 7
atggagacag acacactect gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gac 63

<210> 8
<211> 21

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ig κ 前导氨基酸序列

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp
20

<210> 9
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 含有两串联CCR2 E3结构域的多肽

<400> 9

Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln
1 5 10 15

Val Thr Glu Thr Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp
20 25 30

Gln Ala Thr Gln Val Thr Glu Thr
35 40

<210> 10
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 表达两串联CCR2 E3结构域的多核苷酸

<400> 10

ggcctgagta actgtgaaag caccagtcaa ctggaccaag ccacgcaggt gacagagact 60

ggcctgagta actgtgaaag caccagtcaa ctggaccaag ccacgcaggt gacagagact 120

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 含有CCR2 E3结构域的添加了用于PEG化的N' Lys残基的肽

<400> 11

Lys Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr
1 5 10 15

Gln Val Thr Glu Thr

20

<210> 12
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 12
 cccaagcttg gcctgagtaa ctgtgaaag

29

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 13
 ccgctcgaga gtctctgtca cctgcgtgg

29

<210> 14
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 由Ig κ 前导序列、CCR2 E3结构域、免疫球蛋白重链恒定区和6XHis标签组成的多肽

<400> 14

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30

Tyr Lys Leu Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln
 35 40 45

Ala Thr Gln Val Thr Glu Thr Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 50 55 60

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 65 70 75 80

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 85 90 95

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 100 105 110

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 115 120 125

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
130 135 140

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
145 150 155 160

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
165 170 175

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
180 185 190

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
195 200 205

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
210 215 220

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
225 230 235 240

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
245 250 255

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
260 265 270

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val
290 295 300

Asp His His His His His His
305 310

<210> 15

<211> 305

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 由Ig κ 前导序列、CCR2 E3结构域和免疫球蛋白重链恒定区组成的多肽

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20 25 30

Tyr Lys Leu Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln
 35 40 45

Ala Thr Gln Val Thr Glu Thr Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 50 55 60

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 65 70 75 80

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 85 90 95

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 100 105 110

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 115 120 125

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 130 135 140

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 145 150 155 160

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 165 170 175

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 180 185 190

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 195 200 205

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 210 215 220

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 225 230 235 240

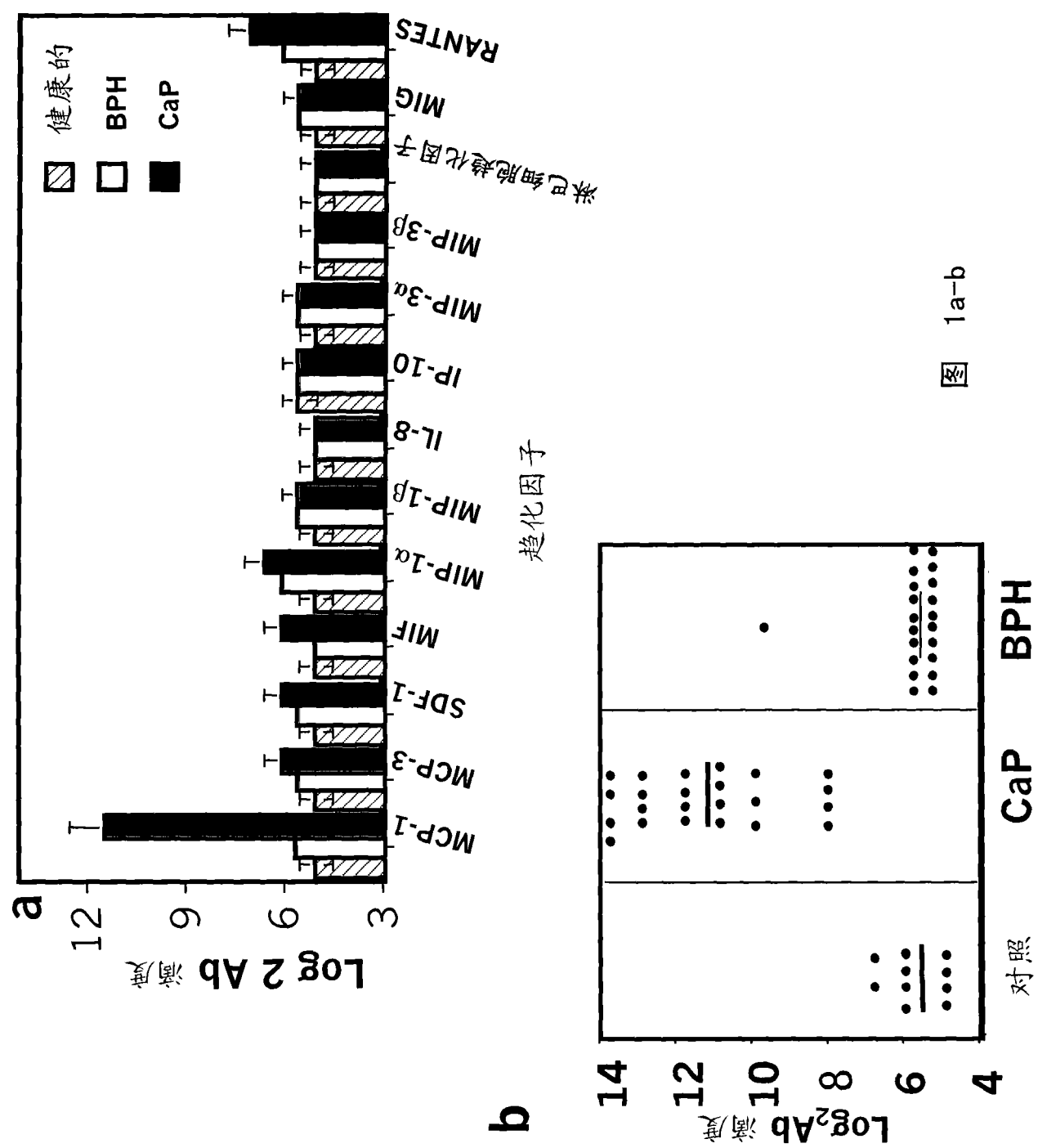
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 245 250 255

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 260 265 270

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280 285

Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val
 290 295 300

Asp
305



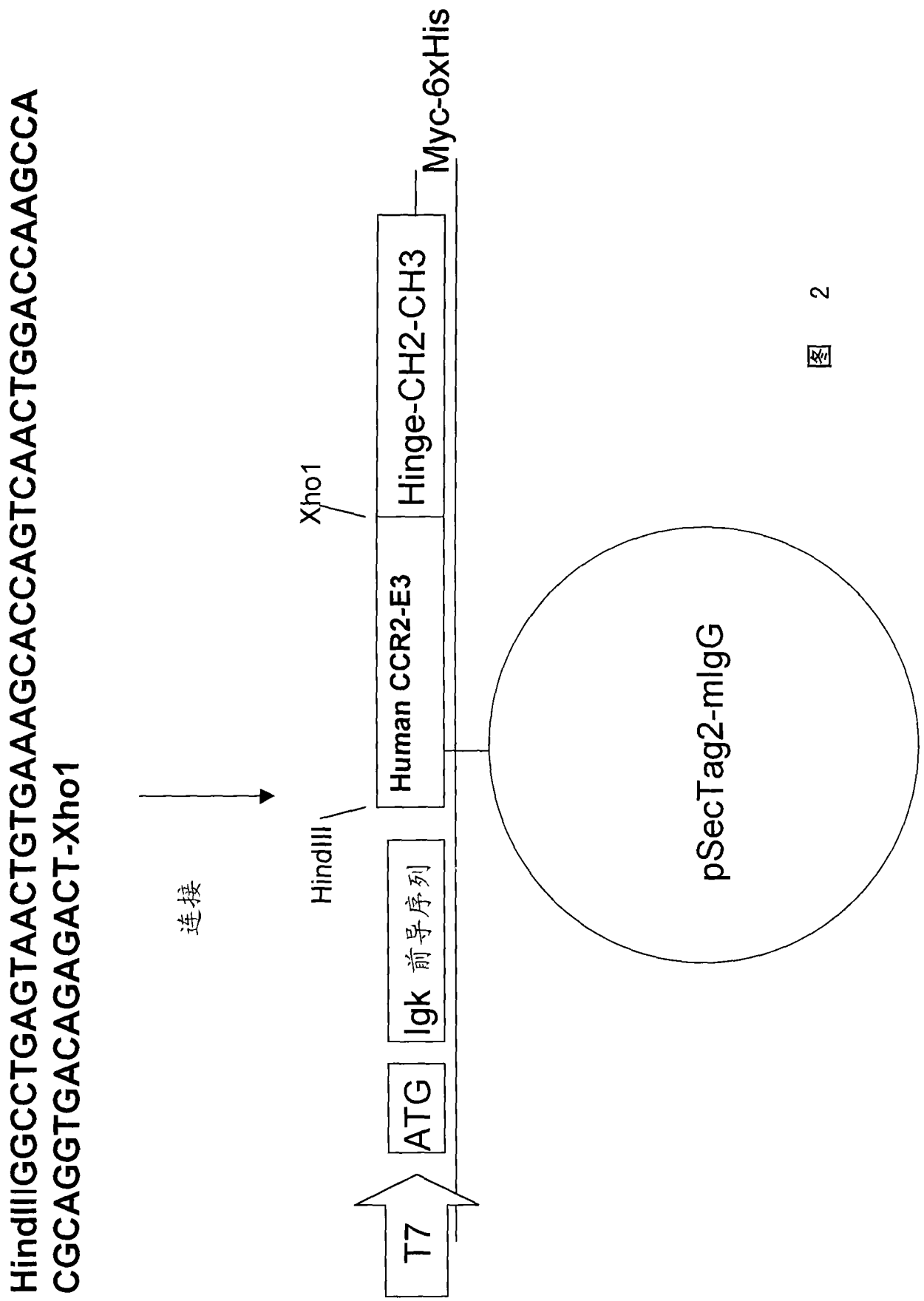


图 2

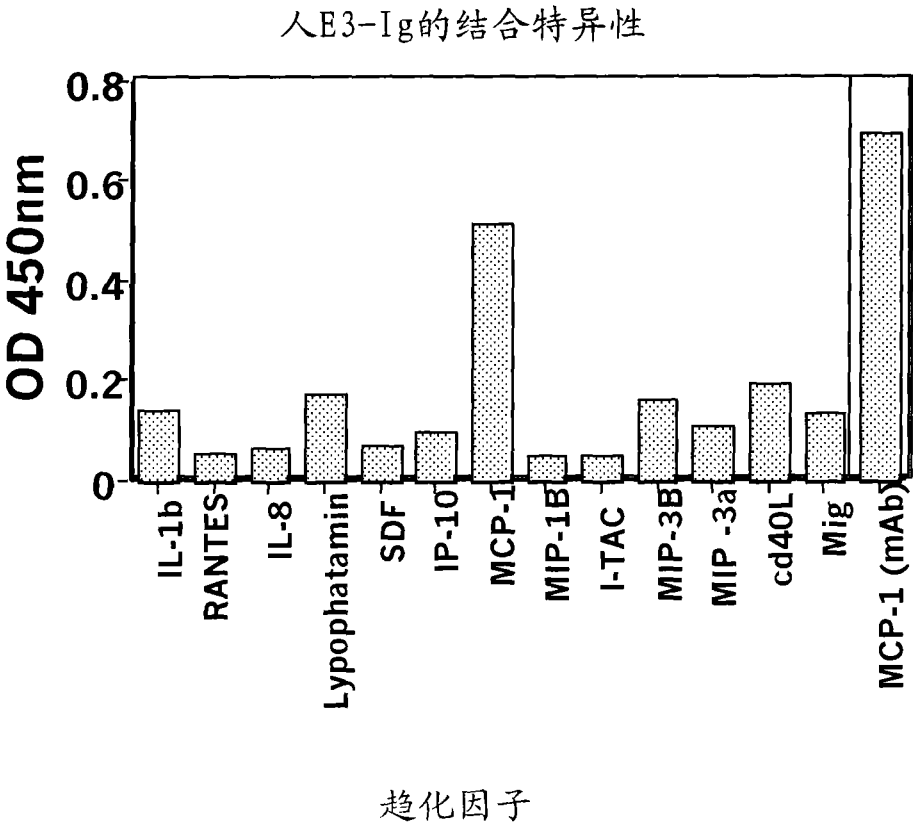


图 3

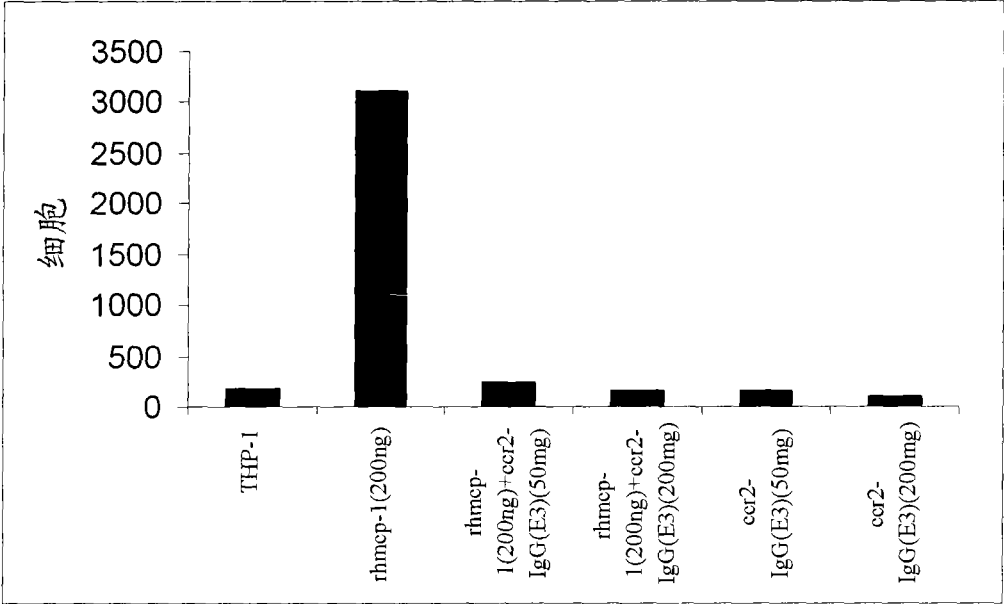


图 4

a

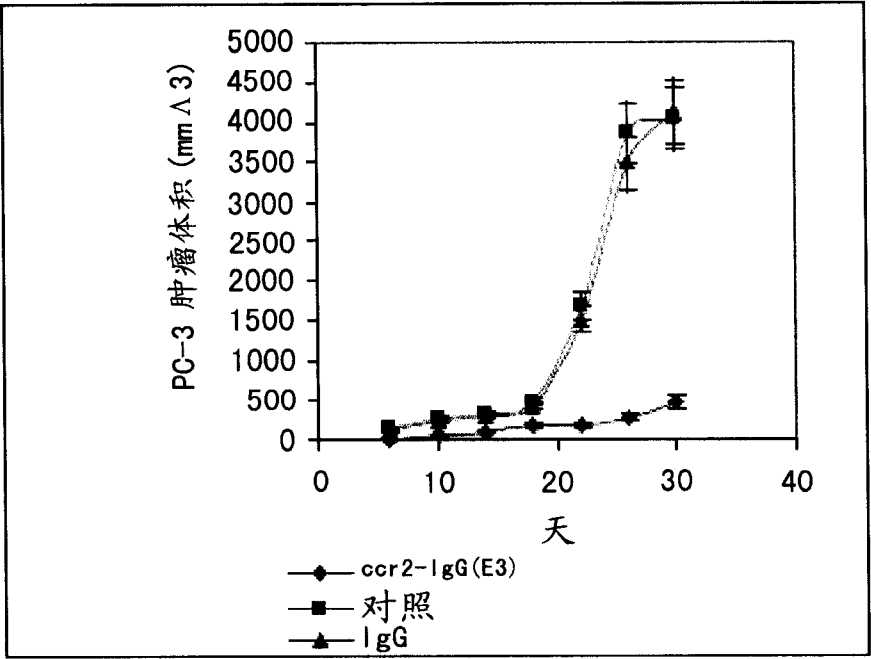


图 5a

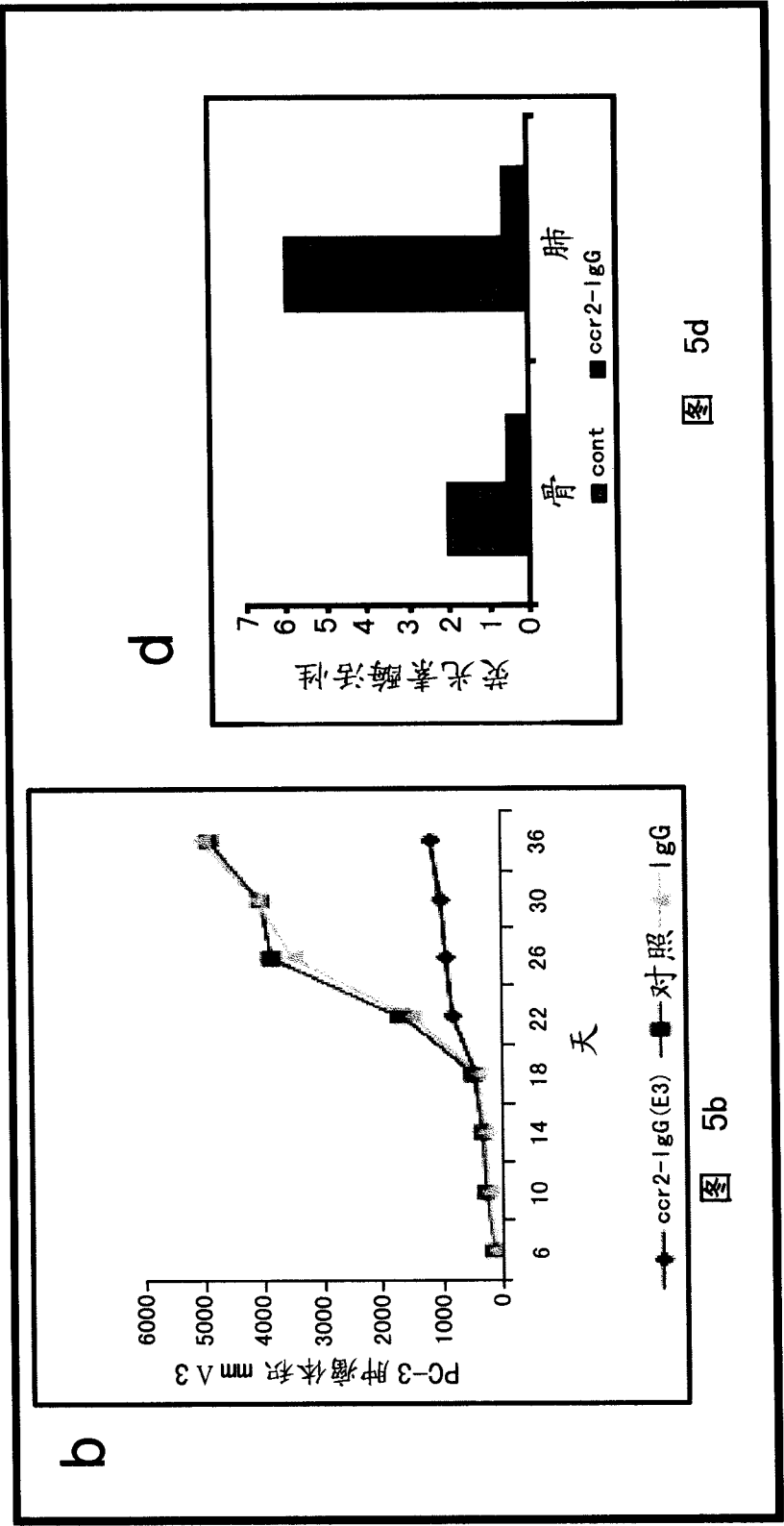


图 5d

图 5b

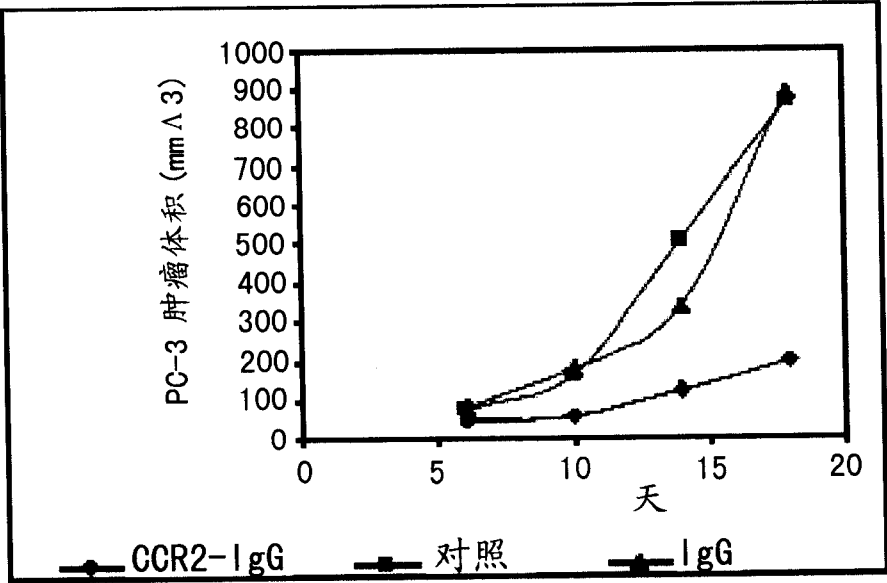
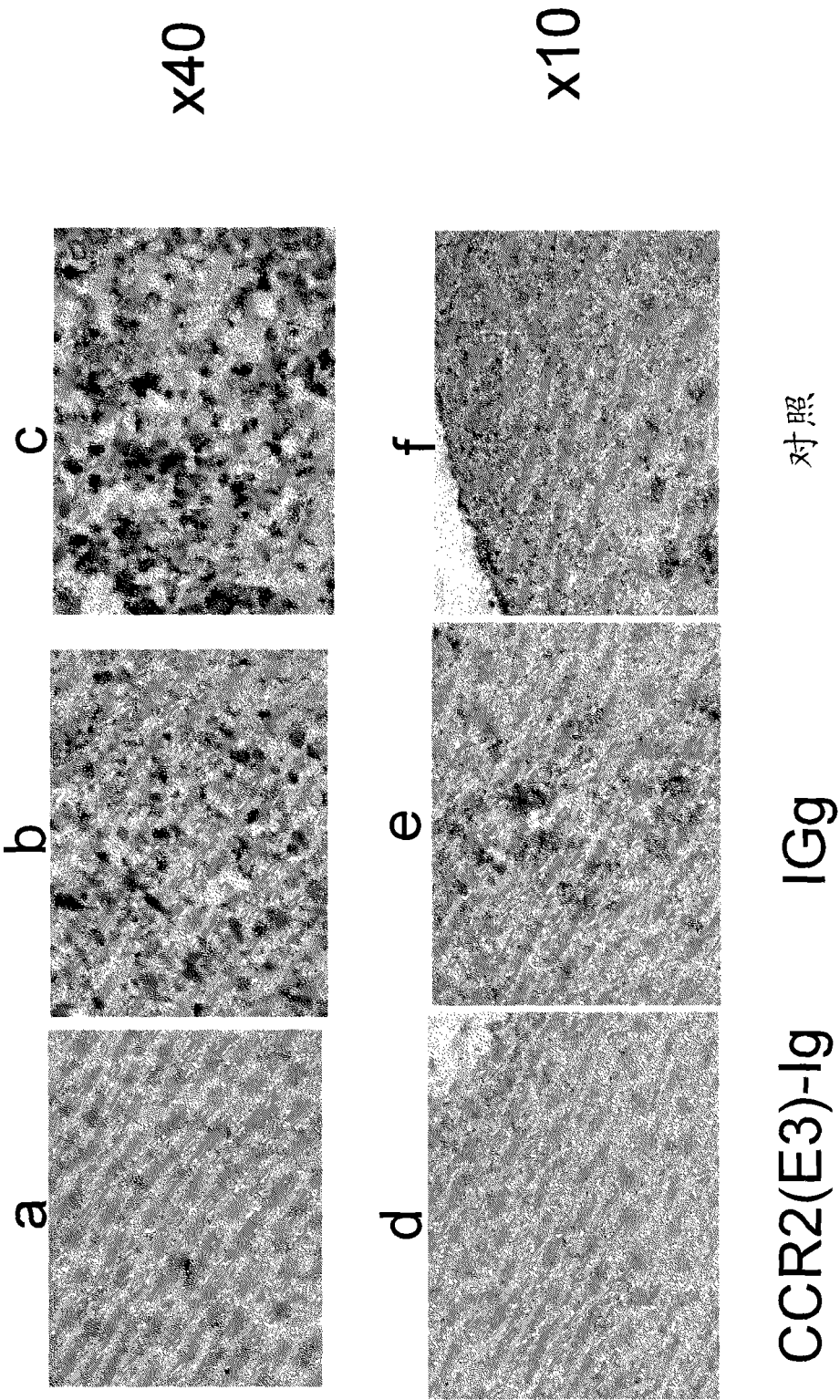


图 5c

图 6a-f



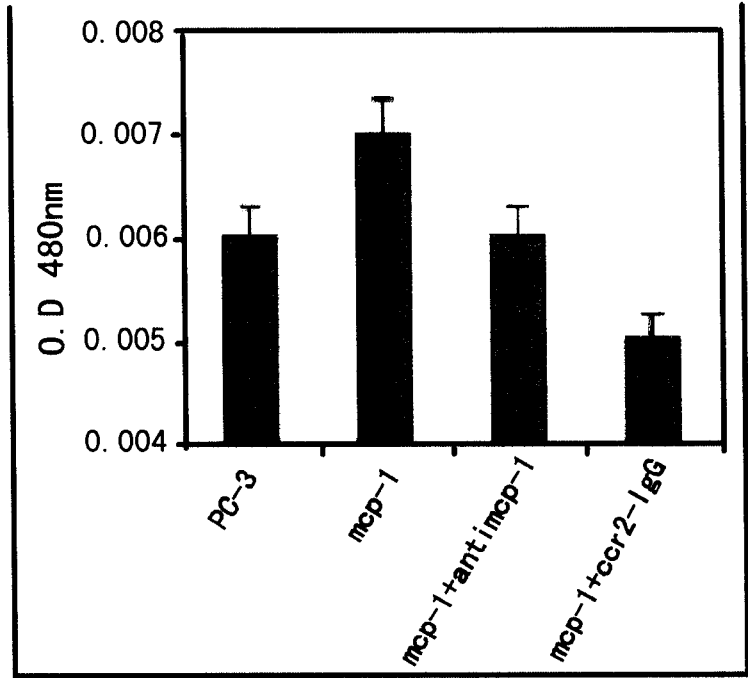


图 7