



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101511869 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 200680026291. 5

(22) 申请日 2006. 05. 19

(30) 优先权数据

60/682, 620 2005. 05. 19 US

60/682, 654 2005. 05. 19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 01. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/019627 2006. 05. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02006/125202 EN 2006. 11. 23

(73) 专利权人 森托科尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 A·达斯 R·斯威特 P·徐

M·巴德罗夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 黄可峻

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

C07H 21/04(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12P 21/06(2006. 01)

C07K 17/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03/048083 A1, 2003. 06. 12, 全文.

WO 2004/016769 A2, 2004. 02. 26, 全文.

WO 2004/024921 A1, 2004. 03. 25, 全文.

PERI G ET AL. A new monoclonal

antibody (5D3-F7) which recognizes human

monocyte chemotactic protein-1 but not

related chemokines. Development of a

sandwich ELISA and in situ detection of

producing cells. 《JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS》. 1994, 第 174 卷 (第 1-2 期), 249-257.

KESAVAN P ET AL. Anti-CCL-2/MCP-1

(monocyte chemoattractant protein-1)

monoclonal antibodies effectively inhibit

tumor angiogenesis and growth of human

breast carcinoma. 《PROCEEDINGS OF THE

AMERICAN ASSOCIATION FOR 96TH CANCER

RESEARCH ANNUAL MEETING》. 2005, 第 46 卷 254.

YOSHIMURA T ET AL. Production and

characterization of mouse monoclonal

antibodies against human monocyte

chemoattractant protein-1. 《JOURNAL

OF IMMUNOLOGY》. 1991, 第 147 卷 (第 7 期), 2229-2233.

审查员 朱宁

权利要求书 1 页 说明书 69 页

序列表 23 页

(54) 发明名称

抗 MCP-1 抗体、组合物、方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及至少一种新型抗 MCP-1 抗体、包括编码至少一种抗 MCP-1 抗体的分离的核酸、MCP-1、载体、宿主细胞、转基因动物或植物, 以及制备和使用其的方法, 包括治疗组合物、方法和装置。

1. 分离的结合单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的抗体,其具有重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的序列如 SEQ ID NO:27 所示,轻链可变区的序列如 SEQ ID NO:28 所示。

2. 分离的结合 MCP-1 的抗体,其具有重链可变区和轻链可变区,其中重链互补决定区为 SEQ ID NO:6 的 CDR1、SEQ ID NO:7 的 CDR2 和 SEQ ID NO:9 的 CDR3;和

轻链互补决定区为 SEQ ID NO:13 的 CDR1、SEQ ID NO:14 的 CDR2 和 SEQ ID NO:16 的 CDR3。

3. 一种分离的人抗 MCP-1 抗体,其具有

SEQ ID NO:2 的重链可变区和 SEQ ID NO:4 的轻链可变区,其中

1) 重链互补决定区为 SEQ ID NO:6 的 CDR1、SEQ ID NO:7 的 CDR2、和 SEQ ID NO:9 的 CDR3 并且轻链互补决定区为 SEQ ID NO:13 的 CDR1、SEQ ID NO:14 的 CDR2、和 SEQ ID NO:15 的 CDR3;

2) 重链互补决定区为 SEQ ID NO:6 的 CDR1、SEQ ID NO:7 的 CDR2、和 SEQ ID NO:9 的 CDR3 并且轻链互补决定区为 SEQ ID NO:13 的 CDR1、SEQ ID NO:14 的 CDR2、和 SEQ ID NO:16 的 CDR3;或者

3) 重链互补决定区为 SEQ ID NO:6 的 CDR1、SEQ ID NO:8 的 CDR2、和 SEQ ID NO:9 的 CDR3 并且轻链互补决定区为 SEQ ID NO:13 的 CDR1、SEQ ID NO:14 的 CDR2、和 SEQ ID NO:17 的 CDR3;

其与构架区功能连接,所述抗体还包括选自人免疫球蛋白的 CH1 结构域、铰链结构域、CH2 结构域和 CH3 结构域的部分。

4. 一种结合 MCP-1 的药物组合物,其包含权利要求 1 的分离的 MCP-1 抗体和药学可接受的载体或稀释剂。

5. 权利要求 1 的抗体在制备用于治疗 MCP-1 介导的病症的药物中的用途,所述 MCP-1 介导的病症为胰肿瘤。

抗 MCP-1 抗体、组合物、方法和用途

[0001] 发明背景

[0002] 与相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求于 2005 年 5 月 19 日提交的美国临时专利申请系列号 60/682654 和 60/682620 的优先权,所述美国临时专利申请的内容整体引入作为参考。

发明领域

[0004] 本发明涉及对至少一种人单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) 蛋白质或其片段特异的抗体,包括特定部分或变体,以及抗独特型抗体,和编码此类抗 MCP-1 抗体的核酸,互补核酸,载体,宿主细胞,以及制备和使用其的方法,包括治疗制剂、施用和装置。

[0005] 相关领域

[0006] 包含 76 个氨基酸残基的 8.6kDa 蛋白质人单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) (也称为 CCL-2),是细胞因子的趋化因子 - β (或 C-C) 家族成员。趋化因子是低分子量 (8-10kDa)、诱导型、分泌的、促炎趋化细胞因子,其已显示在组织损伤位点处特定白细胞亚群的血管周围变移和累积中起重要作用。取决于 4 个保守半胱氨酸的定位已定义了 2 个主要家族。CXC 或 α -趋化因子主要吸引嗜中性粒细胞,而 CC 或 β -趋化因子主要吸引单核细胞和除嗜中性粒细胞以外的其他白细胞 (Leonard 和 Yoshimura 等人,1990)。单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) 家族成员形成了趋化因子 C-C 家族的主要组分,且视为单核细胞、巨噬细胞和活化的淋巴细胞募集中涉及的主要趋化因子。考虑来自不同物种的 MCP-1 的同源性,人和猴 MCP-1 只有 2 个氨基酸不同,从而揭示了 97% 的序列同一性,而包含 125 个氨基酸残基的 13.8kDa 蛋白质 - 鼠 MCP-1 在分子大小和糖基化程度方面与人 MCP-1 不同。

[0007] 趋化因子受体属于 G 蛋白偶联的、7 跨膜 (7TM) 结构域受体 (GPCRs,也称为蛇形受体) 大家族。基于于 1996 年趋化细胞因子戈登研讨会 (Gordon Research Conference) 确定的受体命名法,结合 CXC 趋化因子的趋化因子受体被命名为 CXCRs,且结合 CC 趋化因子的受体被命名为 CCRs。

[0008] MCP-1 已知结合且通过趋化因子受体 CCR2 发信号。CCR2 是在许多细胞上表达的 7 个跨膜跨越 G 蛋白偶联受体,所述细胞包括单核细胞、T 细胞、B 细胞和嗜碱性粒细胞。2 种 MCP-1 特异性受体 CCR2A 和 CCR2B 已被克隆,所述受体响应纳摩尔 (nM) 浓度的 MCP-1 发信号。CCR2A (CC-CCR2A) 和 CCR2B (CC-CCR2A) 代表编码具有可变剪接的羧基尾的 2 种 MCP-1 特异性受体的 2 种 cDNAs。MCP-1 以高亲和力结合 2 种同工型。MCP-1 在表达 CCR2B 的细胞但不在表达 CCR2A 的细胞中诱导钙流动。与表达 CCR2A 的细胞比较,5 倍小的 MCP-1 在表达 CCR2B 的细胞中诱导趋化性。

[0009] 与人 MCP-1 具有某些功能和序列同源性的其他蛋白质是已知的。与 MCP-1 (GenBank NP_002973) 尤其相似的是 MCP-2 (GenBank NP_005614) 和嗜酸性粒细胞趋化因子 (eotaxin) (GenBank P_51671);MCP-2 与 MCP-1 具有 61.8% 的序列同一性,且嗜酸性粒细胞趋化因子 -1 与 MCP-1 具有 63.2% 的序列同一性。这些蛋白质在人稳态机制和病理学中的活性和受累谱范围不如对于 MCP-1 同源物那样充分了解。例如 MCP-2 (重新命名

为 CCL8) 与 MCP-1 和 MCP-3 (重新命名为 CCL8, Genbank NP_006264) 紧密相关, 且使用 CCR1 以及 CCR2B 作为其功能受体。MCP-3 与命名为 D6 的受体结合。MCP-3 还与 CCR10 和 CCR1 结合。MCP-3 蛋白质 (97 个氨基酸) 序列显示与 MCP-174% 的同一性, 和与 MCP-2 58% 的同源性。分泌的 MCP-3 在 N 糖基化方面与 MCP-1 不同。MCP-4 (重新命名为 CCL13, Genbank NP_005399) 与 3 种已知的单核细胞趋化蛋白共有 56-61% 的序列同一性, 且与嗜酸性粒细胞趋化因子 -160% 相同。MCP-4 的功能似乎与 MCP-3 和嗜酸性粒细胞趋化因子的那些功能高度相似。如同 MCP-3, MCP-4 是对于单核细胞和 T 淋巴细胞的有效化学引诱物。它对于嗜中性粒细胞是无活性的。在单核细胞上, MCP-4 与识别 MCP-1、MCP-3、RANTES (CCL5) 和嗜酸性粒细胞趋化因子的受体 (CCR1 和 CCR3 受体) 结合, 且显示与嗜酸性粒细胞趋化因子 -1 完全交叉脱敏。MCP-5 是鼠 CC- 趋化因子且与人 MCP-1 最紧密相关 (66% 的氨基酸同一性)。关于 MCP-5 的基因符号是 SCYA12 (重新命名为 CCL12)。用趋化因子受体 CCR2 转染的细胞已显示对 MCP-5 应答。关于细胞因子和趋化因子的一般信息, 参见 <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, 且关于目前的分类系统, 参见 Zlotnik A., Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127。

[0010] 125I-MCP-1 与单核细胞结合, 且斯卡查德图分析表明单核细胞具有每个细胞 ~ 1700 个结合位点的最低限度, 其 K_d 为 ~ 2nM (Yoshimura 和 Leonard, 1990)。使用人单核细胞的随后平衡结合实验揭示每个细胞存在大约 3000 个结合位点, 其 K_d 为 ~ 0.77nM (Ernst 等人, 1994)。125I-MCP-1 还显示与表达 CCR2 受体的 dEoL-3 细胞的高亲和力结合, 其 K_d 值为 0.4nM (Sarau 等人, 1997), 从而证实 MCP-1 与其受体的亚纳摩尔亲和力。为了鉴定 MCP-1 接触其受体 CCR2 的区域, 所有表面暴露的残基用丙氨酸代替。某些残基也突变成其他氨基酸, 以鉴定特定位置处电荷、疏水性或芳香性的重要性。2 个主要碱性残基的簇 (R24、K35、K38、K49 和 Y13) 由 35 Å 疏水沟分开, 使结合水平减少 15-100 倍。数据暗示其中 MCP-1 的大表面积接触受体, 且许多弱相互作用的累积导致对于野生型 (WT) 蛋白质观察到的 35pM 亲和力的模型 (Hemmerich 等人, 1999)。文献中从 2nM 下降至 35pM 的亲和力范围可能是由于使用的测定和分别的测定限制。

[0011] 与人 MCP-1 具有某些功能和序列同源性的其他蛋白质是已知的。与 MCP-1 (GenBank NP_002973) 尤其相似的是 MCP-2 (GenBank NP_005614) 和嗜酸性粒细胞趋化因子 (GenBank P_51671); MCP-2 与 MCP-1 具有 61.8% 的序列同一性, 且嗜酸性粒细胞趋化因子 -1 与 MCP-1 具有 63.2% 的序列同一性。这些蛋白质在人稳态机制和病理学中的活性和受累谱范围不如对于 MCP-1 同源物那样充分了解。例如 MCP-2 与 MCP-1 和 MCP-3 (Genbank NP_006264) 紧密相关, 且使用 CCR1 以及 CCR2B 作为其功能受体。MCP-3 与命名为 D6 的受体结合。MCP-3 还与 CCR10 结合。MCP-3 蛋白质 (97 个氨基酸) 序列显示与 MCP-174% 的同一性, 和与 MCP-2 58% 的同源性。分泌的 MCP-3 在 N 糖基化方面与 MCP-1 不同。MCP-4 (Genbank NP_005399) 与 3 种已知的单核细胞趋化蛋白共有 56-61% 的序列同一性, 且与嗜酸性粒细胞趋化因子 -160% 相同。MCP-4 的功能似乎与 MCP-3 和嗜酸性粒细胞趋化因子的那些功能高度相似。如同 MCP-3, MCP-4 是对于单核细胞和 T 淋巴细胞的有效化学引诱物。它对于嗜中性粒细胞是无活性的。在单核细胞上, MCP-4 与识别 MCP-1、MCP-3、RANTES (CCR2) 的受体结合。在嗜酸性粒细胞上, MCP-4 具有与 MCP-3、RANTES 和嗜酸性粒细胞趋化因子相似的

功效和效力。MCP-4 与嗜酸性粒细胞趋化因子共有受体 (CCR1 和 CCR3), 且显示与嗜酸性粒细胞趋化因子 -1 完全交叉脱敏。

[0012] 能够结合 MCP-1 的其他抗体已被报道: JP9067399 公开了从分离的血细胞获得的抗体, 且 JP05276986 公开了分泌 IgM 抗人 MCP-1 的杂交瘤。最近能够结合多个 β -趋化因子包括 MCP-1 的抗体 (W003048083) 以及也结合嗜酸性粒细胞趋化因子的 MCP-1 结合抗体 (US20040047860) 被公开。

[0013] 因此, 需要提供对人 MCP-1 特异的人抗体, 其用于在治疗中使用, 以减少或消除 MCP-1 依赖性疾病的症状, 以及超过已知抗体或其片段的改善。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供了如本文描述和使得可行的, 与本领域已知的那些组合的, 分离的人、灵长类动物、啮齿类动物、哺乳动物、嵌合、人源化和 / 或 CDR 嫁接抗 MCP-1 抗体及其他免疫球蛋白衍生蛋白质、片段、切割产物和其他特定部分及其变体, 以及抗 MCP-1 抗体组合、编码或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、制剂、装置、转基因动物、转基因植物, 以及制备和使用其的方法。除了如本文描述的本发明的抗体组合物之外, 本发明的抗体由其对人 MCP-1 的亲合力、对人 MCP-1 的特异性和阻断人 MCP-1 的生物活性的能力限定。

[0016] 本发明还提供了至少一种分离的抗 MCP-1 抗体, 例如但不限于, 如本文描述的至少一种抗体、抗体融合蛋白或片段。根据本发明的抗体包括包含分子的任何蛋白质或肽, 所述分子包含免疫球蛋白分子的至少部分, 例如但不限于, 至少一个配体结合结构域, 例如但不限于, 如表 4A、B、D 和 E (SEQ ID NO :6-26 中提供的重链或轻链可变区、重链或轻链的互补性决定区 (CDR) 或其配体结合部分; 和任选地与构架区 (例如, 表 4C (SEQ ID NO :2-5) 中描述的 FR1、FR2、FR3、FR4 或其片段功能性结合, 进一步任选包含人免疫球蛋白的至少 CH1、铰链、CH2 或 CH3。至少一种抗体氨基酸序列可以进一步任选包含如本文描述 或如本领域已知的至少一种特定置换、插入或缺失。

[0017] 在实施方案中, 抗体的配体结合部分包含 SEQ ID NO :27 和 28。在一个方面, 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体, 其包含包括 SEQ ID NOS :27 或 28 的至少一个可变区。

[0018] 在另一方面, 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体, 其包含 (i) ID NOS :6、7 和 9 的所有重链互补性决定区 (CDR) 氨基酸序列; 或 (ii) SEQ ID NOS :13、14 和 16 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

[0019] 在一个方面, 本发明提供了包含编码特异性抗 MCP-1 抗体的多核苷酸、与其互补或杂交的分离的核酸分子, 其包含至少一种特定序列、结构域、部分或其变体。本发明进一步提供了包含所述抗 MCP-1 抗体核酸分子的重组载体, 包含此类核酸和 / 或重组载体的宿主细胞, 以及制备和 / 或使用此类抗体核酸、载体和 / 或宿主细胞的方法。

[0020] 本发明的至少一种抗体结合对至少一种 MCP-1 蛋白质或变体或衍生物例如 SEQ ID NO :1 中提供的那些特异的至少一种特定表位。所述至少一种表位可以包含包括所述蛋白质的至少一个部分的至少一个抗体结合区域, 所述表位优选包含其至少一个部分的至少 1-5 个氨基酸, 例如但不限于, 所述蛋白质的至少一个功能性、细胞外、可溶、亲水、外部或细胞质结构域, 或其任何部分。

[0021] 所述至少一种抗体可以任选包含如 SEQ ID NOS :6、7、9、13、14 和 16 提供的至少一

个互补性决定区 (CDR) (例如分别如 SEQ ID Nos :27 和 28 提供的重或轻链可变区的 CDR1、CDR2 或 CDR3) 的至少一个特定部分 ; 和任选进一步包含至少一个恒定或可变构架区或其任何部分, 其中所述抗体阻断、抑制或阻止至少一种活性, 例如但不限于, MCP-1 与细胞表面上的受体结合、CCR2 受体内在化、MCP-1 刺激的 Ca^{2+} 动员或任何其他合适的已知 MCP-1 测定。抗 MCP-1 抗体因此可以根据已知方法筛选相应活性, 例如但不限于, 针对 MCP-1 蛋白质的至少一种生物活性。

[0022] 本发明进一步提供了针对本发明的至少一种 MCP-1 抗体的至少一种 MCP-1 抗独特型抗体。抗独特型抗体包括包含分子的任何蛋白质或肽, 所述分子包含免疫球蛋白分子的至少部分, 例如但不限于, 至少一个配体结合部分 (LBP), 例如但不限于, 重或轻链的互补性决定区 (CDR), 或其配体结合部分, 重链或轻链可变区, 重链或轻链恒定区, 构架区, 或其任何部分, 它们可以掺入本发明的抗独特型抗体内。本发明的抗独特型抗体可以包括或来源于任何哺乳动物, 例如但不限于, 人、小鼠、兔、大鼠、啮齿类动物、灵长类动物等。

[0023] 在一个方面, 本发明提供了包含编码至少一种 MCP-1 抗独特型抗体的多核苷酸、与其互补或杂交的分离的核酸分子, 其包含至少一种特定序列、结构域、部分或其变体。本发明进一步提供了包含所述 MCP-1 抗独特型抗体编码核酸分子的重组载体, 包含此类核酸和 / 或重组载体的宿主细胞, 以及制备和 / 或使用此类抗独特型抗体核酸、载体和 / 或宿主细胞的方法。

[0024] 本发明还提供了用于在宿主细胞中表达至少一种抗 MCP-1 抗体或 MCP-1 抗独特型抗体的至少一种方法, 其包括如本文所述的在其中至少一种抗 MCP-1 抗体以可检测和 / 或可回收的量表达的条件下培养宿主细胞。

[0025] 本发明还提供了至少一种组合物, 其包含 (a) 如本文描述的分离的 MCP-1 抗独特型抗体编码核酸和 / 或抗体 ; 和 (b) 合适的载体或稀释剂。根据已知载体或稀释剂, 载体或稀释剂可以任选是药学可接受的。组合物可以任选进一步包含至少一种另外的化合物、蛋白质或组合物。

[0026] 本发明进一步提供了至少一种抗 MCP-1 抗体方法或组合物, 如本领域已知的和 / 或如本文描述的, 其用于施用治疗有效量以调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关状况和 / 或在相关状况之前、之后或期间。

[0027] 本发明还提供了递送治疗或预防有效量的根据本发明的至少一种抗 MCP-1 抗体的至少一种组合物、装置和 / 或方法。

[0028] 本发明进一步提供了至少一种抗 MCP-1 抗体方法或组合物, 如本领域已知的和 / 或如本文描述的, 其用于诊断细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关状况和 / 或在相关状况之前、之后或期间。

[0029] 本发明还提供了递送根据本发明的至少一种抗 MCP-1 抗体用于诊断的至少一种组合物、装置和 / 或方法。

[0030] 在一个方面, 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体, 其包含包括 SEQ ID NOS :27 或 28 的至少一个可变区。

[0031] 在另一方面, 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体, 其包含 (i) SEQ ID NOS :6、7 和 8 或 9 的所有重链互补性决定区 (CDR) 氨基酸序列 ; 或 (ii) SEQ ID NOS :13、14 和 15 或 16 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

[0032] 在另一方面,本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体,其包含 (i) SEQ ID NOS :6、7 和 8 或 9 的所有重链互补性决定区 (CDR) 氨基酸序列;或 (ii) SEQ ID NOS :13、14 和 15 或 16 的所有轻链 CDR 的氨基酸序列中的至少一个。

[0033] 所述至少一种抗体可以任选进一步具有下列至少一种:以选自至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-11} M 或至少 10^{-12} M 的至少一种的亲和力结合 MCP-1;基本上中和至少一种 MCP-1 蛋白质的至少一种活性。还提供的是编码至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体的分离的核酸;包含分离的核酸的分离的核酸载体,和 / 或包含分离的核酸的原核或真核宿主细胞。宿主细胞可以任选是选自 NOS、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、YB2/O、SP2/O、HeLa、骨髓瘤、或淋巴瘤细胞、或其任何衍生、无限增殖化或转化细胞中的至少一种。还提供的是生产至少一种抗 MCP-1 抗体的方法,其包括在体外、体内或原位条件下翻译抗体编码核酸,从而使得 MCP-1 抗体以可检测或可回收的量表达。

[0034] 还提供的是包含至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体和至少一种药学可接受的载体或稀释剂的组合物。

[0035] 还提供的是用于诊断或治疗细胞、组织、器官或动物中的 MCP-1 相关状况的方法,其包括 (a) 使组合物与细胞、组织、器官或动物接触,或给细胞、组织、器官或动物施用组合物,所述组合物包含有效量的本发明的至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体。

[0036] 还提供的是包含本发明的至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体的医学装置,其中所述装置适合于经由选自下列的至少一种形式接触或施用至少一种 MCP-1 抗体:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内 (intrarticular)、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内 (intracerebellar)、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、快速灌注 (bolus)、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮。

[0037] 还提供的是用于人药物或诊断用途的制品,其包含包装材料和容器,后者包含溶液、颗粒或冷冻干燥形式的本发明的至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体。

[0038] 还提供的是用于生产本发明的至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体的方法,其包括提供能够表达可回收量的抗体的宿主细胞或转基因动物或转基因植物或植物细胞。本发明中进一步提供的是通过上述方法生产的至少一种抗 MCP-1 抗体。

[0039] 本发明进一步提供了本文描述的任何发明。

[0040] 序列表简述

[0041]

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>描述</u>
1	用于选择抗 MCP-1 结合剂的人 MCP-1 (CCL2) 和变体
2	VH1A 重链可变序列: FR1、CDR1、FR2、CDR2 变体、FR3、CDR3、FR4
3	VH3 重链可变序列: FR1、CDR1、FR2、CDR2 变体、FR3、CDR3、FR4
4	κ 3 轻链可变序列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 变体、FR4
5	λ 3 轻链可变序列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 变体、FR4
6	VH1A CDR1 所有 MOR03471
7	VH1A CDR2 3781、3790、CNTO 888
8	VH1A CDR2 3899
9	VH1A CDR3 所有 MOR03471
10	VH3 CDR1 所有 MOR03548
11	VH3 CDR2 3744、3747
12	VH3 CDR3 所有 MOR03548
13	κ 3 CDR1 所有 MOR03471
14	κ 3 CDR2 所有 MOR03471
15	κ 3 CDR3 3781
16	κ 3 CDR3 3790、CNTO888

[0042] [0042]

17	κ3 CDR3 3899
18	λ3 CDR1所有 MOR03548
19	λ3 CDR2所有 MOR03548
20	λ3 CDR3 3744
21	λ3 CDR3 3747
22	VH1A CDR2 变体
23	VH3 CDR2 变体
24	LκCDR3 变体
25	LλCDR3 变体
26	HC CDR1 变体
27	CNTO888 重链可变区
28	CNTO888 轻链可变区

[0043] 发明详述

[0044] 本发明提供了至少一种纯化的、分离的、重组和 / 或合成的抗 MCP-1 人、灵长类动物、啮齿类动物、哺乳动物、嵌合、人源化、工程改造或 CDR 嫁接抗体和对于其的 MCP-1 抗独特型抗体, 以及包含至少一种多核苷酸的组合物和编码核酸分子, 所述多核苷酸编码至少一种抗 MCP-1 抗体或抗独特型抗体。本发明进一步包括但不限于, 制备和使用此类核酸和抗体和抗独特型抗体的方法, 包括诊断和治疗组合物、方法和装置。

[0045] 引用: 本文引用的所有出版物或专利都整体引入本文作为参考, 因为它们显示本发明时的技术发展水平, 和 / 或提供了本发明的描述和实现。出版物指任何科学或专利出版物, 或以任何介质形式可获得的任何其他信息, 包括所有记录的、电子的或印刷的形式。下列参考文献整体引入本文作为参考: Ausubel 等人, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2004); Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow 和 Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan 等人, eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2004); Colligan 等人, Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2004)。

[0046] 缩写

[0047] aa: 氨基酸; BSA: 牛血清清蛋白; CDR: 互补性决定区; ECL: 电化学发光; HuCAL[®]: 人组合抗体文库; HSA: 人血清清蛋白; MCP-1: 单核细胞趋化蛋白 -1; Ig: 免疫球蛋白; IPTG: 异丙基 β-D- 硫代半乳糖苷; mAb: 单克隆抗体; PBS: 磷酸缓冲盐水, pH 7.4; SET: 溶液平衡滴定; VH: 免疫球蛋白重链可变区; VL: 免疫球蛋白轻链可变区;

[0048] 定义

[0049] 如本文使用的, “抗 CCL2 抗体”、“抗 MCP-1 抗体”、“抗 MCP-1 抗体部分”、或“抗 MCP-1

抗体片段”和 / 或“抗 MCP-1 抗体变体”等包括包含分子的任何蛋白质或肽,所述分子包含免疫球蛋白分子的至少部分,例如但不限于,重链或轻链的至少一个互补性决定区 (CDR) 或其配体结合部分,重链或轻链可变区,重链或轻链恒定区,构架区,或其任何部分,或 MCP-1 受体或结合蛋白的至少一个部分,它们可以掺入本发明的抗体内。此类抗体任选进一步影响特定配体,例如但不限于其中此类抗体体外、原位和 / 或体内调节、减少、增加、拮抗、激动 (angonize)、缓和、减轻 (aleviates)、阻断、抑制、消除和 / 或干扰至少一种 MCP-1 活性或结合,或 MCP-1 受体活性或结合。作为非限制性例子,本发明的合适的抗 MCP-1 抗体、特定部分或变体可以结合至少一种 MCP-1、或其特定部分、变体或结构域。

[0050] 如本文使用的,“表位”指能够与抗体特异性结合的蛋白质片段或特征。表位通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或糖侧链组成,且通常具有特定的三维结构特征,以及比电荷特征。构象和非构象表位的区别在于与前者而不是后者的结合在变性溶剂的存在下丧失。包括由 MCP-1 分子的构象折叠产生的蛋白质表位,所述蛋白质表位在来自 MCP-1 分子线性序列的不同部分的氨基酸在 3 维空间中以紧密接近性集合时出现。

[0051] “MCP-1”意指在 NCBI 记录登记号 NP_002973 中参考的 76 个氨基酸的序列,且名称不一地称为 MCP (单核细胞趋化蛋白)、SMC-CF (平滑肌细胞趋化因子)、LDCF (淋巴细胞衍生趋化因子)、GDCF (神经胶质瘤衍生单核细胞趋化因子)、TDCF (肿瘤衍生趋化因子)、HC11 (人细胞因子 11)、MCAF (单核细胞趋化及活化因子)。基因符号是 SCYA2,在人染色体 17 上的 JE 基因,且新名称是 CCL2 (Zlotnik, Yoshie 2000. *Immunity* 12:121-127)。JE 是人 MCP-1/CCL2 的小鼠同源物。

[0052] 如本文使用的,术语“人抗体”指其中基本上蛋白质的每个部分 (例如 CDR、构架、 C_L 、 C_H 结构域 (例如 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})、铰链、(V_L 、 V_H)) 都来源于人种系免疫球蛋白基因序列的重组事件或来自成熟人抗体序列的抗体。除了从人中分离的抗体以外,此类人抗体可以通过用人免疫球蛋白种系基因免疫能够发动免疫应答的转基因小鼠来获得 (Lonberg 等人, *Int Rev Immunol* 13(1):65-93(1995) 和 Fishwald 等人, *Nat Biotechnol* 14(7):845-851(1996)), 或可以如本文所述选自人抗体谱文库。此类人基因序列的来源可以在任何合适的文库中找到,例如 VBASE, 人抗体基因 (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>) 或其翻译产物数据库,或在 <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/> 上,它给出了基于其氨基酸相似性分类成分组的人抗体。在这个定义的范围内的复合抗体或人复合抗体的功能片段,后者包括来自一种或多种人抗体序列的构架区和来自 2 种不同的人或非人来源的 CDR 区。在“人抗体”定义内的是复合抗体或人复合抗体的功能片段,后者包含来自种系和重排人抗体序列的构架区和来自 2 种不同来源抗体的 CDR 区。依照本公开内容的人复合抗体或人复合抗体的功能片段包括来自一种或多种人抗体序列的构架区,和来源于人或非人抗体序列的 CDR 区,或可以是完全合成的。因此,人抗体不同于嵌合或人源化抗体。应当指出人抗体可以由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白 (例如重链和 / 或轻链) 基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可以包含在天然人抗体中没有发现的接头肽。例如, Fv 可以包含连接重链可变区和轻链可变区的接头肽,例如 2 到约 8 个甘氨酸或其他氨基酸残基。此类接头肽视为具有人起源。

[0053] “人源化”形式的非人 (例如鼠) 抗体是具有来源于非人免疫球蛋白的基本上置换的序列部分的嵌合抗体。在很大程度上,人源化抗体是人免疫球蛋白 (受体抗体),其中受

体的 CDR(互补性决定区,其也称为高变区)残基由具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的 CDR 残基置换。在某些情况下,人免疫球蛋白的构架区(FR)残基由相应的非人残基置换。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰以进一步精制抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有至少一个,且一般是 2 个可变结构域,其中所有或基本上所有高变区对应非人免疫球蛋白的那些,且所有或基本上所有 FRs 是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人 IgG 免疫球蛋白的那种。关于更多的细节,参见 Jones 等人, *Nature* 321:522-525(1986); Reichmann 等人, *Nature* 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

[0054] 如本文使用的,抗体的 K_d 指抗体对预定抗原的解离常数 K_d , 且是抗体对特定靶的亲和力的测量。高亲和力抗体对于预定抗原具有 $10^{-8}M$ 或更少的 K_d , 更优选 $10^{-9}M$ 或更少, 且再更优选 $10^{-10}M$ 或更少。如本文使用的,术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”、或“ K_d ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。“ K_d ”是解离速率(k_2)也称为“解离率(off-rate) (k_{off})”与结合速率(k_1)或“结合率(on-rate) (k_{on})”的比率。因此, K_d 等于 k_2/k_1 或 k_{off}/k_{on} , 且表示为摩尔浓度(M)。它遵循下列原则, K_d 越小,结合越强。因此与 $10^{-9}M$ (或 1nM)比较, $10^{-6}M$ (或 1 微摩尔)的 K_d 表明弱结合。

[0055] 如本文使用的,术语“对..... 特异”和“特异性结合”和“特异地结合”指抗体以比对于其他抗原或蛋白质更大的亲和力与预定抗原结合。一般地,抗体以 $10^{-7}M$ 或更少的解离常数(K_d)结合,且与预定抗原结合的 K_d 为其与除预定抗原以外的非特异性抗原(例如 BSA、酪蛋白或任何其他特定多肽)结合的 K_d 的至少 1/2。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异性结合的抗体”或“抗原特异性抗体”例如 MCP-1 特异性抗体互换使用。

[0056] 1. 本发明的抗体的制备

[0057] 对人 MCP-1 蛋白质或其片段,例如分离的和/或 MCP-1 蛋白质或其部分(包括合成分子,例如合成肽),特异的人抗体的制备可以使用本领域已知的任何合适技术来进行。人抗体可以使用本领域已知的各种技术来产生。在一个实施方案中,人抗体选自噬菌体文库,其中那种噬菌体文库表达人抗体(Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314(1996); Sheets 等人 *PITAS(USA)* 95:6157-6162(1998)); Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等人 *J. Mol. Biol.*, 222:581(1991))。

[0058] 人抗体还可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物内来制备,例如其中内源性免疫球蛋白基因已被部分或全部灭活的小鼠。例如,包含功能性重排的人免疫球蛋白重链转基因,以及包含来自可以经历功能性重排的人免疫球蛋白轻链基因座的 DNA 的转基因的转基因小鼠,可以用人 MCP-1 或其片段免疫以引发抗体的产生。需要时,抗体产生细胞可以被分离,且杂交瘤或其他无限增殖化的抗体产生细胞可以如本文描述的和/或如本领域已知的进行制备。可替代地,抗体、特定部分或变体可以使用编码核酸或其部分在合适的宿主细胞中表达。

[0059] 用合适抗原攻击后,观察到人抗体产生,所述人抗体在所有方面都非常类似于在人中可见的那种,包括基因重排、装配和抗体谱。这种方法在例如美国专利号 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 以及下列科学

出版物中描述: Marks 等人, Bio/Technology 10:779-783(1992); Lonberg 等人, Nature 368:856-859(1994); Morrison, Nature 368:812-13(1994); Fishwild 等人, Nature Biotechnology 14:845-51(1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826(1996); Lonberg 和 Huezar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995)。可替代地, 人抗体可以经由产生针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞(此类 B 淋巴细胞可以从个体中回收或可以已在体外进行免疫)无限增殖化进行制备。参见, 例如 Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第 77 页(1985); Boerner 等人, J. Immunol., 147(1):86-95(1991); 和美国专利号 5,750,373。抗体产生细胞还可以从人或其他合适动物的外周血, 或优选脾或淋巴结获得, 所述人或其他合适动物已用目的抗原进行免疫。任何其他合适的宿主细胞还可以用于表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其他合适的已知方法进行分离, 且通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可以通过合适测定(例如 ELISA)进行选择。

[0060] 在一种方法中, 杂交瘤通过使合适的无限增殖细胞系(例如骨髓瘤细胞系, 例如但不限于, Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L. 5、> 243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MIA 144、ACT IV、MOIT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A 等, 或异种骨髓瘤(heteromylomas), 其融合产物, 或由其衍生的任何细胞或融合细胞, 或如本领域已知的任何其他合适的细胞系, 参见, 例如 www.atcc.org, www.lifetech.com, 等, 与抗体产生细胞融合来产生, 所述抗体产生细胞例如但不限于分离或克隆的脾、外周血、淋巴、扁桃体、或其他免疫或包含 B 细胞的细胞, 或任何其他细胞, 它们表达重或轻链恒定或可变或构架或 CDR 序列, 作为内源或异源核酸、作为重组或内源的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿类动物、马、绵羊、山羊、羊、灵长类动物、真核生物、基因组 DNA、cDNA、rDNA、线粒体 DNA 或 RNA、叶绿体 DNA 或 RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单、双、或三链、杂交的、等或其任意组合。参见, 例如整体引入本文作为参考的 Ausubel, 同上, 和 Colligan, Immunology, 同上, 第 2 章。

[0061] 与人 MCP-1 结合且包含限定的重或轻链可变区的人抗体可以使用合适方法例如噬菌体展示(Katsube, Y. 等人, Int J Mol. Med, 1(5):863-868(1998))进行制备。可以使用产生或分离具有所需特异性的抗体的其他合适方法, 其包括但不限于从肽或蛋白质文库中选择重组抗体的方法(例如但不限于, 噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA 等, 展示文库; 例如如可从下列获得的: Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys。参见, 例如 EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754; (Scripps); W096/13583, W097/08320(MorphoSys); W095/16027(BioInvent); W088/06630; W090/3809(Dyax); US 4,704,692(Enzon); PCT/US91/02989(Affymax); W089/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046;

PCT/US91/07149(Ixsys);或随机产生的肽或蛋白质-US 5723323,5763192,5814476,5817483,5824514,5976862,WO 86/05803,EP 590 689(Ixsys,现在的 Applied Molecular Evolution(AME),各自都完整地引入本文作为参考),或依赖转基因动物免疫接种的那种(例如 SCID 小鼠,Nguyen 等人, Microbiol. Immunol. 41:901-907(1997);Sandhu 等人, Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118(1996);Eren 等人, Immunol. 93:154-161(1998),各自整体引入本文作为参考。

具体实施方案

[0062] 申请人例示了从噬菌体展示人 Fab 文库开始选择和制备人抗体的方法,所述人抗体具有针对人 MCP-1 的所需亲和力、特异性和生物活性。总之,从所有 10 次淘选筛选 17856 个克隆,从而导致产生 1104 个初步命中和最后 26 个独特 Fabs。

[0063] 为了提供例示保持与天然存在的 MCP-1 受体结合能力的抗原的独特配体,化学合成人 MCP-1 及其类似物或“突变蛋白质”且进行修饰以用于在选择、亲和力和生物测定中特别使用。人 MCP-1 Ile⁴¹ 和人 MCP-1 Tyr⁴³ 用于初步固相淘选以及抗体选择和亲和力成熟测定的其他方面,且与 MCP-1 突变蛋白质的生物素化形式:Ile41、Lys(生物素-PEG₄)⁶⁹ 和 (Ile41, Lys(生物素-PEG₄)⁷⁵ (SEQ ID NO:1) 一样如本文描述。

[0064] 因为 26 个独特 Fabs 中无一在特定的生物测定中具有测量为 $K_D < 0.5$ nM 的亲和力或所需 IC₅₀ 值,所以成熟是必需的。用于亲和力成熟的候选物作为 Fabs 进行选择,且分别的 IgGs 与成熟过程平行进行分析。选择标准是 1) 在整个细胞受体结合测定中的活性, 2) 在钙动员测定中的活性, 3) 对人 MCP-1 的亲和力, 4) 对人 MCP-1 的特异性, 和 5) 对短尾猴 (cyno) MCP-1 的亲和力和与天然 MCP-1 的结合。

[0065] 溶液中的 MCP-1 的 Fab 捕获模式 Biacore 亲和力测量对于把成熟候选物分等良好地起作用,且亲和力在 49-406 nM 范围内。最佳的亲本 Fab 显示 50 nM 的亲和力,从而表明亲和力和必须最优化至少 100 倍以达到亲和力成功标准。此外与短尾猴和天然人 MCP-1 的结合可以在 Fab 捕获模式中检测到,这是关于成熟的另外先决条件。与短尾猴 MCP-1 的亲和力在与对于人 MCP-1 相同的范围内。由于可能的修饰,如例如糖基化,必须显示抗体不仅识别合成或重组 MCP-1,而且还识别天然 MCP-1,所述天然 MCP-1 内源性表达和从 PANC-1 人细胞上清液中纯化。

[0066] 对 MCP-1 的特异性在 Biacore 的抗体捕获模式中进行测量,其中加入 100 nM 各种趋化因子且检测结合信号。用于成熟的大多数候选 Fab 是特异的,而 2 个显示对同源物趋化因子相同的交叉反应性。

[0067] Fab 的非常重要的特征是中和活性,且设立了几种不同的测定以分析这种活性。¹²⁵I MCP-1 THP-1 细胞结合测定是最灵敏的测定法,这在最优化后是特别重要的。亲本 Fabs 显示 10-650 nM 的 IC₅₀ 值。除了放射性配体结合测定之外,计划了其他次级生物测定法以证明在 MCP-1 下游信号传导途径的不同水平上的中和活性。

[0068] 吸引单核细胞是 MCP-1 的主要功能之一,但最可能是由于缺少活性、共纯化因子或内毒素,亲本 Fabs 在趋化性测定中不起作用,且因此同意只测试分别的 IgG1,而不是在这种测定中设法使 Fab 起作用。另一个下游信号传导事件是钙释放到细胞质内。事实上在放射性配体结合测定中显示中和活性的所有 Fabs 都在 THP-1 细胞中抑制 MCP-1 诱导的钙

动员,其 IC_{50} 为 $0.1-3\mu M$ 。必须显示亲本 Fabs 的生物活性在转化成 IgG 形式后被完全保留。如预期的,所有分别的 IgG 在放射性配体结合测定、钙动员测定和甚至趋化性测定中都显示活性,从而最终证明所有 IgGs 都保留了在 Fab 形式中可见的活性且甚至抑制 MCP-1 诱导的趋化性。

[0069] 对于亲和力成熟,根据其特性选择了在放射性配体结合测定中具有 $10-400nM$ K_D 和 $10-650nM$ IC_{50} 值的 7 个不同 Fabs。随后将它们分成 3 组用于文库克隆和后续选择。L-CDR3 和 H-CDR2 最优化平行进行。产生高质量的文库。对于选择过程使用溶液淘选,且选择的严格性通过减少抗原、解离率选择和非常长的洗涤步骤来增加。对于随后的筛选过程,使用允许对最优化结合剂高通量分等的 BioVeris 筛选。筛选对改善的结合剂的鉴定非常有效地起作用。此外可以鉴定在 L-CDR3 和 H-CDR2 中最优化的 Fabs,从而使得可能对 MOR03471 和 MOR03548 衍生物交叉克隆。特别是 MOR03471 衍生物的交叉克隆非常成功,从而导致与 2 个最优化的起始 Fabs 比较再提高 100 倍的亲和力。在 17 个最优化 Fabs 中,选择 16 个用于详细表征,且最终符合所有成功标准的 4 个结合剂来源于亲本 MOR03471,2 个仅在 L-CDR3 中最优化,且 2 个来自交叉克隆。亲和力成熟的候选物分析和序列在实施例 3 和 4、表 4-6、以及 SEQ IDNos :2-28 中详述。

[0070] 成熟后,最优化结合剂的亲和力不能在 Biacore 中进行分析,这主要是因为达到了检测极限。在 MorphoSys,使用非常灵敏的 K_D 测定方法,其是与 BioVeris 技术组合的溶液平衡滴定 (SET)。单价解离常数可以通过对于 Fab 和 IgG 的合适拟合模型进行计算。除亲和力测量之外,这种方法用于交叉反应性研究。最终候选物的亲和力在 BioVeris 中测量对于人和短尾猴 MCP-1 为 $10-320pM$,且在 Centocor 通过 KinexA 证实。使用 BioVeris 的特异性测试显示所有测试的 16 个 Fabs 和 IgGs 与人 MCP-2 没有交叉反应性。几个 Fab 和 IgG 还显示与人嗜酸性粒细胞趋化因子没有明显的交叉反应性。根据成功标准,特异性标准确定为在 Biacore 抗体捕获模式中不与 $100nM$ 同源物人 MCP-2、3、4 以及 $100nM$ 人嗜酸性粒细胞趋化因子 1、2 和 3 结合。在 Biacore Fab 捕获模式中,所有选择的 Fabs 都显示与 MCP-2 和嗜酸性粒细胞趋化因子不同程度的交叉反应性。与 IgGs 比较 Fabs 推定的略微增加的不稳定性和趋化因子的一般非特异性结合能力可能已促成非特异性结合。几个选择的 IgG 显示与同源物趋化因子没有显著结合信号,且在 Biacore IgG 捕获模式中符合特异性成功标准。在溶液平衡滴定实验中,使用 BioVeris,甚至几个 Fabs 显示没有交叉反应性。为了分析在 Biacore 中检测的对 MCP-2 的 Fab 结合活性是否转变成中和活性,放射性配体全细胞结合测定在 Centocor 被开发。在这种测定中测试的 Fabs 显示没有显著抑制 ^{125}I 标记的 MCP-2 与 Thp-1 细胞上的 CCR2 受体结合 ($IC_{50} \geq 2\mu M$)。

[0071] 由于需要少量的 $1ng/ml$ MCP-1,所以放射性配体结合测定是这个计划中最灵敏的测定,测定的 IC_{50} 极限对于 Fab 为约 $100pM$,且对于 IgG 甚至为 $20pM$ 。除了亲和力之外,这个测定中的活性用于分等和选择最优化结合剂用于详细表征。在最优化过程中活性中的整体改善最高达 $1000x$ 倍,且最后 1 个 MOR03471 衍生的 Fab-MOR03878 显示 $110pM$ 的最高亲和力。所有测试的 IgG 在放射性配体结合测定中保留活性。4 个最终的 IgG 候选物 MOR03781、MOR03790、MOR03850 和 MOR03878 的 IC_{50} 值为 $20-50pM$,与 Fabs 的分别活性比较甚至略微更佳。关于改善的活性的一个原因是二价 IgG 每个分子中和 2 个 MCP-1 (系数 $2x$)。IgGs 来自纯的按比例增大的产品且因此另一个原因可能是抗体的纯度、稳定性或活性。作为次级

生物测定,成功开发了基于 FACS 的测定,其测量 MCP-1 诱导的 CCR2 受体内在化的抑制。最后该测定甚至允许 IC_{50} 测定和分等。最终的 4 个候选 Fabs MOR03790、MOR03850、MOR03781 和 MOR03878 显示 3-5nM 的 IC_{50} 值。

[0072] 需要天然 MCP-1 以证实针对合成或重组 MCP-1 分离的 MCP-1 抗体的活性。天然 MCP-1 从 PANC1 上清液中进行纯化且用于诱导钙释放。最优化的 Fabs 显示以比参考抗体 C775 更高的活性抑制天然 MCP-1 诱导的钙动员。所有 MOR03548 衍生的预先选择的 Fabs 在竞争 ELISA 中完全抑制 C775 与 MCP1 的结合。所有 MOR03471 衍生的预先选择的 Fabs 在 ELISA 中显示部分 (~60%) 竞争,从而表明表位是至少重叠的。最终 4 个抗体 MOR03781、MOR03790、MOR03850 和 MOR03878 满足所有的成功标准,包括特异性标准和天然 MCP-1 的中和。

[0073] 生产抗体的其他合适方法

[0074] 用于生产本发明抗体的其他方法如本领域已知的和 / 或如本文描述的能够生产人抗体谱。此类技术包括但不限于核糖体展示 (Hanes 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 : 4937-4942 (1997 年 5 月) ; Hanes 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 : 14130-14135 (1998 年 11 月)) ; 单细胞抗体生产技术 (例如选择的淋巴细胞抗体法 (“SLAM”)) (美国专利号 5,627,052, Wen 等人, J. Immunol. 17 : 887-892 (1987) ; Babcook 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 7843-7848 (1996)) ; ; 凝胶微滴和流式细胞术 (Powell 等人, Biotechnol. 8 : 333-337 (1990) ; One Cell Systems, Cambridge, MA ; Gray 等人, J. Imm. Meth. 182 : 155-163 (1995) ; Kenny 等人, Bio/Technol. 13 : 787-790 (1995)) ; B 细胞选择 (Steenbakkers 等人, Molec. Biol. Reports 19 : 125-134 (1994) ; Jonak 等人, Progress Biotech, 第 5 卷, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands (1988))。

[0075] 用于工程改造或人源化非人或人抗体的方法也可以使用且是本领域众所周知的。一般地,人源化或工程改造的抗体具有来自非人来源的一个或多个氨基酸残基,所述非人来源例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些人氨基酸残基通常称为“输入”残基,它们一般取自已知人序列的“输入”可变、恒定或其他结构域。已知的人 Ig 序列是本领域众所周知的且可以是任何已知序列。用于最优化人工改造的人源化抗体的结合、构象和减少的免疫原性的各种策略已得到描述,参见,例如 Presta 等人 J Immunol. 151 : 2623-2632, 1993 ; WO200302019 和 WO2005080432。

[0076] 此类输入序列可以用于减少免疫原性,或减少、增强或修饰如本领域已知的结合、亲和力、结合率、解离率、抗体亲抗原性、特异性、半衰期、或任何其他合适的特征。一般部分或全部非人或人 CDR 序列被维持,而可变和恒定区的非人序列用人或其他氨基酸置换。抗体还可以任选是人源化的,保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了达到这个目标,人源化抗体还可以任选使用亲本和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上的人源化产物的分析过程进行制备。三维免疫球蛋白模型通常是可用的且对于本领域技术人员是熟悉的。举例说明且显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可行的。这些展示的检查允许分析在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中残基的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从共有和输入序列中选择和组合 FR 残基,从而使得达到所需抗体特征,例如对靶抗原增加的亲

和力。一般而言, CDR 残基直接且基本上大多数涉及影响抗原结合。本发明抗体的人源化或工程改造可以使用任何已知方法进行, 例如但不限于下列中描述的那些: Winter (Jones 等人, Nature 321 :522 (1986) ; Riechmann 等人, Nature 332 :323 (1988) ; Verhoeyen 等人, Science 239 :1534 (1988)), Sims 等人, J. Immunol. 151 :2296 (1993) ; Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901 (1987), Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :4285 (1992) ; Presta 等人, J. Immunol. 151 :2623 (1993), 美国专利号: 5723323、5976862、5824514、5817483、5814476、5763192、5723323、5, 766886、5714352、6204023、6180370、5693762、5530101、5585089、5225539 ; 4816567、PCT/ :US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755 ; W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246, 各自整体引入本文作为参考, 包括其中引用的参考文献。

[0077] 可以生产与人抗原结合的人抗体谱的转基因小鼠可以通过已知方法产生 (例如但不限于授予 Lonberg 等人的美国专利号 5, 770, 428、5, 569, 825、5, 545, 806、5, 625, 126、5, 625, 825、5, 633, 425、5, 661, 016 和 5, 789, 650 ; Jakobovits 等人 W0 98/50433, Jakobovits 等人 W0 98/24893, Lonberg 等人 W0 98/24884, Lonberg 等人 W0 97/13852, Lonberg 等人 W0 94/25585, Kucherlapate 等人 W0 96/34096, Kucherlapate 等人 EP0463 151 B1, Kucherlapate 等人 EP 0710 719 A1, Surani 等人美国专利号 5, 545, 807, Bruggemann 等人 W0 90/04036, Bruggemann 等人 EP 0438474 B1, Lonberg 等人 EP 0814 259 A2, Lonberg 等人 GB 2 272 440 A, Lonberg 等人 Nature 368 : 856-859 (1994), Taylor 等人, Int. Immunol. 6 (4) 579-591 (1994), Green 等人, Nature Genetics 7 :13-21 (1994), Mendez 等人, Nature Genetics 15 :146-156 (1997), Taylor 等人, Nucleic Acids Research 20 (23) :6287-6295 (1992), Tuailon 等人, Proc Natl Acad Sci USA 90 (8) 3720-3724 (1993), Lonberg 等人, Int Rev Immunol 13 (1) :65-93 (1995) 和 Fishwald 等人, Nat Biotechnol 14 (7) :845-851 (1996), 所述参考文献各自整体引入本文作为参考)。一般地, 这些小鼠包含包括来自至少一种人免疫球蛋白基因座的 DNA 的至少一种转基因, 所述基因座是功能性重排的, 或可以经历功能性重排。此类小鼠中的内源免疫球蛋白基因座可以被破坏或缺失以消除动物产生由内源基因编码的抗体的能力。

[0078] 与相似蛋白质或片段特异性结合的抗体筛选可以方便地使用肽展示文库来完成。这种方法涉及在大型肽集合中筛选具有所需功能或结构的个别成员。肽展示文库的抗体筛选是本领域众所周知的。被展示的肽序列的长度可以是 3-5000 个或更多个氨基酸, 通常为 5-100 个氨基酸长, 且通常为约 8-25 个氨基酸长。除用于产生肽文库的直接化学合成方法之外, 几种重组 DNA 方法已得到描述。一种类型涉及在噬菌体或细胞表面上展示肽序列。每个噬菌体或细胞包含编码特定展示的肽序列的核苷酸序列。此类方法在 PCT 专利公开号 91/17271、91/18980、91/19818 和 93/08278 中得到描述。用于产生肽文库的其他系统具有体外化学合成和重组方法的 2 个方面。参见 PCT 专利公开号 92/05258、92/14843 和 96/19256。还参见, 美国专利号 5, 658, 754 ; 和 5, 643, 768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒从此类供应商如 Invitrogen (Carlsbad, CA) 和 Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) 商购可得。参见, 例如美国专利号 4704692、4939666、4946778、5260203、5455030、5518889、5534621、5656730、5763733、5767260、5856456, 转让给 Enzon ; 5223409、5403484、5571698、5837500, 转让给 Dyax, 5427908、5580717, 转

让给 Affymax ;5885793, 转让给 Cambridge antibody Technologies ; 5750373, 转让给 Genentech, 5618920、5595898、5576195、5698435、5693493、5698417, 转让给 Xoma, Colligan, 同上 ;Ausubel, 同上 ;或 Sambrook, 同上, 上述专利和出版物各自整体引入本文作为参考。

[0079] 2. 本发明的核酸

[0080] 使用本文提供的信息, 例如编码 SEQ ID NOS :2-5 和 27-28 中至少一个的至少 70-100% 邻接氨基酸的核苷酸序列、其特定片段、变体或共有序列, 编码至少一种抗 MCP-1 抗体的本发明的核酸分子可以使用本文描述的或如本领域已知的方法获得。本发明的分离的核酸分子可以包括包含可读框 (ORF) 的核酸分子, 任选具有一个或多个内含子, 例如但不限于, 至少一条重链 (例如 SEQ ID NOS :6-12、22 和 23) 或轻链 (例如 SEQ ID NOS :13-21 和 24-26) 的至少一个 CDR, 如 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的至少一个特定部分 ;包含抗 MCP-1 抗体或可变区 (例如 SEQ ID NOS :2-5、27 和 28) 编码序列的核酸分子 ;和包含基本上不同于上述那些的核苷酸序列, 但由于遗传密码简并性, 如本文描述的和 / 或如本领域已知的仍编码至少一种抗 MCP-1 抗体的核酸分子。当然, 遗传密码是本领域众所周知的。因此, 对于本领域技术人员而言, 产生编码本发明的特异性抗 MCP-1 抗体的此类简并核酸变体将是常规的。参见, 例如 Ausubel 等人, 同上, 且此类核酸变体包括在本发明中。

[0081] 如本文指出的, 包含编码抗 MCP-1 抗体的核酸的本发明核酸分子可以包括但不限于, 单独编码抗体片段的氨基酸序列的那些 ;关于完整抗体或其部分的编码序列 ;关于抗体、片段或部分、以及附加序列的编码序列, 例如至少一种信号前导序列或融合肽的编码序列, 具有或不具有前述的附加编码序列, 例如至少一个内含子, 连同附加的非编码序列一起, 包括但不限于, 非编码的 5' 和 3' 序列, 例如在转录、mRNA 加工, 包括剪接和多腺苷酸化信号 (例如 mRNA 的核糖体结合和稳定性) 中起作用的转录的非翻译序列 ;编码附加氨基酸例如提供附加功能性的那些的附加编码序列。因此, 编码抗体的序列可以与标记序列例如编码肽的序列融合, 所述肽促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化。

[0082] 与如本文所述的多核苷酸选择性杂交的多核苷酸 :本发明提供了在选择性杂交条件下与本文公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此, 这个实施方案的多核苷酸可以用于分离、检测和 / 或定量包含此类多核苷酸的核酸。例如, 本发明的多核苷酸可以用于在保藏的文库中鉴定、分离、或扩增部分或全长克隆。在某些实施方案中, 多核苷酸是分离的基因组或 cDNA 序列, 或以其他方式与来自人或哺乳动物核酸文库的 cDNA 互补。

[0083] 优选地, cDNA 文库包含至少 80% 的全长序列, 优选至少 85% 或 90% 的全长序列, 且更优选地至少 95% 的全长序列。cDNA 文库可以进行标准化以增加罕见序列的表现。低或中等严格杂交条件一般但不是唯一地用于相对于互补序列具有减少的序列同一性的序列。中等和高严格条件可以任选对于同一性更大的序列使用。低严格条件允许具有约 70% 的序列同一性的序列选择性杂交, 且可以用于鉴定直系同源或旁系同源序列。

[0084] 任选地, 本发明的多核苷酸将编码由本文描述的多核苷酸编码的抗体的至少部分。本发明的多核苷酸包含可以用于与编码本发明抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见, 例如 Ausubel, 同上 ;Colligan, 同上, 各自整体引入本文作为参考。

[0085] 核酸的构建 :本发明的分离的核酸可以使用如本领域众所周知的 (a) 重组方法、(b) 合成技术、(c) 纯化技术、或其组合进行制备。

[0086] 用于构建核酸的重组方法:本发明的分离的核酸组合物,例如 RNA、cDNA、基因组 DNA、或其任何组合,可以使用本领域技术人员已知的任何数目的克隆方法从生物学来源获得。在某些实施方案中,在严格条件下与本发明的多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在 cDNA 或基因组 DNA 文库中鉴定所需序列。RNA 的分离、以及 cDNA 和基因组文库的构建是本领域普通技术人员众所周知的(参见,例如 Ausubel,同上;或 Sambrook,同上)。

[0087] 核酸筛选和分离方法:cDNA 或基因组文库可以使用依据本发明多核苷酸序列例如本文公开的那些的探针进行筛选。探针可以用于与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交以分离相同或不同生物中的同源基因。本领域技术人员将理解各种程度的杂交严格性可以在测定中使用;且杂交或洗涤介质可以是严格的。随着用于杂交的条件变得更严格,在发生双链体形成的探针和靶之间必须存在更大的互补性程度。严格性的程度可以由温度、离子强度、pH 和部分变性溶剂例如甲酰胺的存在中的一种或多种加以控制。例如,杂交的严格性通过经由例如将甲酰胺浓度操纵在 0% -50% 内来改变反应物溶液的极性方便地加以改变。可检测的结合所需的互补性(序列同一性)程度将根据杂交介质和/或洗涤介质的严格性而变。互补性程度将最佳为 100%、或 70-100%、或其中的任何范围或值。然而,应当理解探针和引物中较小的序列变异可以通过减少杂交和/或洗涤介质的严格性进行补偿。

[0088] 扩增 RNA 或 DNA 的方法是本领域众所周知的,且基于本文呈现的教导和指导无需过度实验即可根据本发明使用。DNA 或 RNA 扩增的已知方法包括但不限于,聚合酶链反应(PCR)和相关扩增方法(Mullis 等人,美国专利号 4,683,202(1987);和 Innis 等人,PCR Protocols A Guideto Methods and Applications,Eds.,Academic Press Inc.,San Diego,CA(1990))。

[0089] 用于构建核酸的合成方法:本发明的分离核酸还可以通过已知方法通过直接化学合成进行制备(参见,例如 Ausubel 等人,同上)。化学合成一般产生单链寡核苷酸,它可以通过与互补序列杂交,或用 DNA 聚合酶使用单链作为模板通过聚合转变成双链 DNA。本领域技术人员将认识到尽管 DNA 的化学合成可以限制于约 100 个或更多个碱基的序列,但较长的序列可以通过连接较短序列来获得。关于编码序列的化学合成的特别优选方法在美国专利号 6521427 和 6670127 中教导。

[0090] 3. 载体和表达系统

[0091] 本发明提供了包含编码抗 MCP-1 抗体的核酸的载体,优选表达载体,或可以用于获得包含各种抗体 HC 或 LC 基因或其部分的质粒。如本文使用的,术语“载体”指能够转运与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种载体类型是“质粒”,这指另外的 DNA 片段可以连接到其内的环状双链 DNA 环。另一种载体类型是病毒载体,其中另外的 DNA 片段可以连接到病毒基因组内。本发明还涉及包括本发明的分离的核酸分子的载体、用重组载体基因工程改造的宿主细胞、以及通过如本领域众所周知的重组技术生产至少一种抗 MCP-1 抗体。参见,例如各自整体引入本文作为参考的 Sambrook 等人,同上;Ausubel 等人,同上。

[0092] 对于抗体或其抗体片段的表达,编码部分或全长轻和重链的 DNAs 可以插入表达盒或载体内,从而使得基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。编码抗体的盒可以作为构建体进行装配。构建体可以使用本领域已知的方法进行制备。构建体可以作为较大质粒的部分进行制备。此类制备允许以有效方式克隆和选择正确构造。构建体可以位于质粒或其他载体上的方便的限制位点之间,从而使得它们可以容易地与其余的质粒序列分开。

[0093] 一般地,质粒载体在沉淀物例如磷酸钙沉淀物中,或在含 DEAE- 葡聚糖的带电脂质的复合物中被引入。如果载体是病毒,那么它可以使用合适的包装细胞系在体外进行包装且随后转导到宿主细胞内。载体构建体引入宿主细胞内还可以通过电穿孔或其他已知方法来实现。此类方法在本领域中得到描述,例如 Sambrook, 同上, 1-4 和 16-18 章; Ausubel, 同上, 1、9、13、15、16 章。

[0094] 在这种背景中,术语“可操作地连接的”意指抗体基因被连接到载体内,从而使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因转录和翻译的预期功能。选择与使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。抗体轻链基因和抗体重链基因可以被插入分开的载体内,或更一般地,2 种基因被插入相同表达载体内。抗体基因通过标准方法被插入表达载体内(例如抗体基因片段和载体上的互补限制位点的连接,或如果不存在限制位点,则为平端连接)。

[0095] 通过将本文所述抗体的轻和重链可变区插入已编码所需同种型的重链恒定和轻链恒定区的表达载体内,从而使得 VH 片段与载体内的 CH 片段可操作地连接,且 VL 片段与载体内的 CL 片段可操作地连接,可以将它们用于制备任何抗体同种型的全长抗体基因。此外或可替代地,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞中分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体内,从而使得信号肽与抗体链基因的氨基端框内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0096] 尽管理论上可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体,但抗体在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中的表达是最优选的,因为此类真核细胞且特别是哺乳动物细胞比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠和免疫活性的抗体。

[0097] 一般而言,哺乳动物表达载体将包含(1)调节元件,通常是病毒启动子或增强子序列的形式,且特征在于宽的宿主和组织范围;(2)促进包含抗体编码序列的 DNA 片段插入质粒载体内的“多接头”序列;和(3)负责 mRNA 转录物的内含子剪接和多腺苷酸化的序列。这种启动子-多接头-多腺苷酸化位点的邻接区域通常称为转录单位。载体将还可能包含(4)选择标记基因(例如, β -内酰胺酶基因),通常赋予对抗生素(例如氨苄青霉素)的抗性,从而允许在大肠杆菌(*E. coli*)中选择最初的阳性转化体;和(5)促进载体在细菌和哺乳动物宿主中复制的序列。包括质粒复制起点用于在大肠杆菌中繁殖表达构建体,且为了在 Cos 细胞中瞬时表达,将 SV40 复制起点包括在表达质粒中。

[0098] 启动子可以选自 SV40 启动子(例如晚期或早期 SV40 启动子、CMV 启动子(美国专利号 5,168,062;5,385,839)、HSV tk 启动子、pgk(磷酸甘油酸激酶)启动子、EF-1 α 启动子(美国专利号 5,266,491)、至少一种人免疫球蛋白启动子。

[0099] 表达载体将优选但任选包括至少一种选择标记。此类标记包括例如但不限于,对于真核细胞培养的氨甲蝶呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR,美国专利号 4,399,216;4,634,665;4,656,134;4,956,288;5,149,636;5,179,017,氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸、或谷氨酰胺合成酶(GS,美国专利号 5,122,464;5,770,359;5,827,739)抗性,和对于在大肠杆菌和其他细菌或原核生物中培养的四环素或氨苄青霉素抗性基因(上述专利整体在此引入作为参考)。关于上述宿主细胞的合适培养基和条件是本领域已知的。合适的载体对于技术人员将是显而易见的。

[0100] 当使用真核宿主细胞时,一般向载体内整合入多腺苷酸化或转录终止序列。终

止序列的例子是来自牛生长激素基因的多腺苷酸化序列。还可以包括用于正确剪接转录物的序列。剪接序列的例子是来自 SV40 的 VP1 内含子 (Sprague 等人, J. Virol. 45: 773-781 (1983))。此外,如本领域已知的,控制宿主细胞中的复制的基因序列可以整合入载体内。同样,为了避免重链分子的高表面表达,可能必需使用消除跨膜结构域变体剪接的表达载体。

[0101] 附加元件包括增强子、Kozak 序列以及侧接用于 RNA 剪接的供体和受体位点的间插序列。高效率的转录可以使用下列来达到:来自 SV40 的早期和晚期启动子,来自逆转录病毒例如 RSV、HTLVI、HIVI 的长末端重复序列 (LTRS),和巨细胞病毒 (CMV) 的早期启动子。然而,也可以使用细胞元件(例如人肌动蛋白启动子)。用于在本发明实践中使用的合适表达载体包括例如,载体,例如 pIRESneo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN、或 pLNCX(Clontech Labs, Palo Alto, CA)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-) 或 pcDNA3.1/Hygro(+/-) (Invitrogen)、PSVL 和 PMSG (Pharmacia, Uppsala, 瑞典)、pRSVcat (ATCC 37152)、pSV2dhfr (ATCC 37146) 和 pBC12MI (ATCC 67109)。

[0102] 可替代地,编码抗体序列的核酸可以在包含整合到染色体内的基因的的稳定细胞系中表达。与选择标记例如 dhfr、gpt、新霉素或潮霉素共转染允许鉴定和分离表达大量编码的抗体的转染细胞。DHFR(二氢叶酸还原酶)标记对于开发携带几百或甚至几千拷贝的目的基因的细胞系有用。另一种有用的选择标记是谷氨酰胺合酶 (GS) (Murphy 等人, Biochem. J. 227:277-279 (1991); Bebbington 等人, Bio/Technology 10:169-175 (1992))。使用这些标记,哺乳动物细胞在选择性培养基中生长且选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系包含整合到染色体内的扩增的基因。中国仓鼠卵巢 (CHO) 和 NSO 细胞通常用于生产抗体。

[0103] 本发明抗体生产中使用的 DNA 构建体可以任选包括至少一种隔离子 (insulator) 序列。术语“隔离子”、“隔离子序列”和“隔离子元件”在本文中可互换使用。隔离子元件是隔离置于其作用范围内的基因转录但不会负面或正面干扰基因表达的控制元件。优选地,隔离子序列插入待转录的 DNA 序列的任何一侧上。例如,隔离子可以定位于距离启动子 5' 约 200bp- 约 1kb,且在目的基因 3' 末端处距离启动子至少约 1kb-5kb。隔离子序列与启动子和目的基因 3' 末端的距离可以由本领域技术人员取决于目的基因的相对大小、构建体中使用的启动子和增强子进行确定。此外,超过一个启动子序列可以定位于启动子的 5' 或转基因的 3' 末端处。例如,2 个或更多个隔离子序列可以定位于启动子的 5'。转基因 3' 末端处的一个或多个隔离子可以定位于目的基因的 3' 末端处,或 3' 调节序列例如 3' 非翻译区 (UTR) 或 3' 侧翼序列的 3' 末端处。

[0104] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的例子包括 pTrc (Amann 等人, (1988) Gene 69:301-315) 和 pET 11d (Studier 等人, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89)。来自 pTrc 载体的靶基因表达依赖于从杂交 trp-lac 融合启动子起的宿主 RNA 聚合酶转录。来自 pET 11d 载体的靶基因表达依赖于共表达的病毒 RNA 聚合酶 (T7 gn1) 介导的、从 T7 gn10-lac 融合启动子起的转录。这种病毒聚合酶由来自定居 λ 原噬菌体的宿主株 BL21 (DE3) 或 HMS174 (DE3) 供应,所述 λ 原噬菌体具有在 lacUV 5 启动子的转录控制下的 T7 gn1 基因。

[0105] 在另一实施方案中,表达载体是酵母表达载体。用于在啤酒糖酵母

(*S. cerevisiae*) 中表达的载体例子包括 pYepSec1 (Baldari 等人 (1987) *EMBO J.* 6 : 229-234)、pMFa (Kurjan 和 Herskowitz, (1982) *Cell* 30 :933-943)、pJRY88 (Schultz 等人 (1987) *Gene* 54 :113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、和 pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.)。

[0106] 可替代地,表达载体是杆状病毒表达载体。可用于在培养的昆虫细胞(例如 Sf9 细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体包括 pAc 系列 (Smith 等人 (1983) *Mol. Cell Biol.* 3 : 2156-2165) 和 pVL 系列 (Lucklow 和 Summers (1989) *Virology* 170 :31-39)。

[0107] 在再一实施方案中,本发明的核酸使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中进行表达。哺乳动物表达载体的例子包括 pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329 :840) 和 pMT2PC (Kaufman 等人 (1987) *EMBO J.* 6 :187-195)。当在哺乳动物细胞中使用时,表达载体的控制功能通常由病毒调节元件提供。例如,常用的启动子来源于多瘤、腺病毒 2、巨细胞病毒和猿猴病毒 40。关于原核和真核细胞的其他合适表达系统,参见 Sambrook 等人,同上的 16 和 17 章。

[0108] 在另一实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够指导核酸表达,优选在特定细胞类型中,例如淋巴瘤细胞(例如小鼠骨髓瘤细胞)。在特定细胞类型中,组织特异性调节元件用于表达核酸。组织特异性调节元件是本领域已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性例子包括清蛋白启动子(肝特异性;Pinkeft 等人 (1987) *Genes Dev.* 1 :268-277),淋巴样特异性启动子 (Calame 和 Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43 :235-275),特别是 T 细胞受体 (Winoto 和 Baltimore (1989) *EMBO J.* 8 :729-733) 和免疫球蛋白 (Banerji 等人 (1983) *Cell* 33 :729-740;Queen 和 Baltimore (1983) *Cell* 33 :741-748) 启动子,神经元特异性启动子(例如神经丝启动子;Byrne 和 Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :5473-5477),胰特异性启动子 (Edlund 等人 (1985) *Science* 230 :912-916),和乳腺特异性启动子(例如乳清启动子;美国专利号 4,873,316 和欧洲申请公开号 264,166)。还可以包含发育调节启动子,例如鼠 *hox* 启动子 (Kessel 和 Gruss (1990) *Science* 249 :374-379) 和甲胎蛋白启动子 (Campes 和 Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3 :537-546)。

[0109] 本发明进一步提供了包含在反义方向上克隆到表达载体内的 DNA 分子的重组表达载体。即,DNA 分子以允许 RNA 分子表达(通过 DNA 分子转录)的形式与调节序列可操作地连接,所述 RNA 分子对编码多肽的 mRNA 是反义的。可以选择与在反义方向上克隆的核酸可操作地连接的调节序列,它指导反义 RNA 分子在多种细胞类型中的连续表达。例如,可以选择病毒启动子和/或增强子、或调节序列,它指导反义 RNA 的组成型、组织特异性、或细胞类型特异性表达。反义表达载体可以是重组质粒、噬菌粒、或减弱病毒的形式,其中反义核酸在高效率调节区的控制下生产,其活性可以由载体引入其中的细胞类型来决定。关于使用反义基因的基因表达调节的讨论,参见 Weintraub 等人 (Reviews—Trends in Genetics, 第 1 卷 (1) 1986)。在骨髓瘤细胞中的克隆和表达

[0110] 称为 cM-T412(整体引入作为参考的 EP0511308)的针对人 CD4 的嵌合小鼠/人 IgG1k 单克隆抗体,被观察到在转染的小鼠骨髓瘤细胞中以高水平表达 (Looney 等人 1992. *Hum Antibodies Hybridomas* 3(4) :191-200)。在最优化培养条件方面没有大量努力,在 1990 年于 Centocor, Inc. Malvern, PA 容易地获得 > 500mg/L 的生产水平(在 Pg/细胞/天的基础上的比生产力未知)。基于这些表达载体的组分,开发了对 HC 和 LC 克隆有用的抗

体克隆载体,它包括基因启动子/转录起始核酸序列、5'非翻译序列和翻译起始核酸序列、编码信号序列的核酸序列、用于信号内含子和J-C内含子的内含子/外显子剪接供体序列,以及J-C内含子增强子核酸序列。质粒p139,pUC19质粒包含从分泌完全小鼠M-T412 Ab的C123杂交瘤细胞克隆的5.8kb EcoRI-EcoRI基因组片段;该片段包含cM-T412 HC基因的启动子和V区部分。用于LC V区载体工程改造的原材料是质粒p39,包含从C123杂交瘤细胞克隆的3kb HindIII-HindIII基因组片段的pUC质粒;这个片段包含cM-T412 LC基因的启动子和V区部分。来源于p139和p39的工程改造的载体设计成使得能够在2步过程中方便的装配适合于在哺乳动物宿主细胞中表达的HC或LC基因,所述过程需要1)克隆编码在V区载体中特别制备的限制位点之间的目的序列的DNA,由此V区编码序列紧位于载体编码的信号序列下游,以及部分或全部基因启动子下游;和2)转移在正确方向上跨越从V区载体到C区载体的插入序列的片段,由此所得到的质粒构成适合于在细胞中表达的最终表达质粒(Scallion等人1995 Cytokine 7(8):759-769)。在CHO细胞中的克隆和表达

[0111] 质粒pC4是质粒pSV2-dhfr(ATCC登记号37146)的衍生物。该质粒包含在SV40早期启动子控制下的小鼠DHFR基因。用这些质粒转染的中国仓鼠卵巢或缺乏二氢叶酸活性的其他细胞,可以通过使细胞在补加了化学治疗剂氨甲蝶呤的选择培养基(例如alpha minus MEM,LifeTechnologies,Gaithersburg,MD)中生长进行选择。在对氨甲蝶呤(MTX)抗性的细胞中扩增DHFR基因已得到充分证明(参见,例如,F.W.Alt等人,J.Biol.Chem. 253:1357-1370(1978);J.L.Hamlin和C.Ma,Biochem.et Biophys.Acta 1097:107-143(1990);以及M.J.Page和M.A.Sydenham,Biotechnology 9:64-68(1991))。在浓度渐增的MTX中生长的细胞由于DHFR基因扩增通过超量生产靶酶DHFR发展出对药物的抗性。如果第二种基因与DHFR基因连接,那么它通常被共扩增和超表达。本领域已知的是这种方法可以用于开发携带超过1,000个扩增的基因拷贝的细胞系。随后,当氨甲蝶呤被取出时,获得包含整合到宿主细胞的一个或多个染色体内的扩增的基因的细胞系。

[0112] 质粒pC4包含用于表达目的基因的劳斯肉瘤病毒的长末端重复序列(LTR)的强启动子(Cullen等人,Molec.Cell.Biol. 5:438-447(1985)),加上从人巨细胞病毒(CMV)的立即早期基因的增强子分离的片段(Boshart等人,Cell 41:521-530(1985))。启动子的下游是允许基因整合的BamHI、XbaI和Asp718限制酶切割位点。在这些克隆位点之后,该质粒包含3'内含子和大鼠前胰岛素原基因的多腺苷酸化位点。其他高效率的启动子也可以用于表达,例如人b-肌动蛋白启动子、SV40早期或晚期启动子、或来自其他逆转录病毒例如HIV和HTLVI的长末端重复序列。Clontech的Tet-Off和Tet-On基因表达系统和类似系统可以用于在哺乳动物细胞中以受调节的方式表达MCP-1抗体(M.Gossen和H.Buiard,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992))。对于mRNA的多腺苷酸化,也可以使用例如来自人生长激素或珠蛋白基因的其他信号。

[0113] 4. 用于生产抗体的宿主细胞

[0114] 如本领域众所周知的,本发明的至少一种抗MCP-1抗体可以任选通过细胞系、混合细胞系、无限增殖化细胞或无限增殖化细胞的克隆群体来生产。参见,例如,Ausubel等人,ed.,Current Protocols in MolecularBiology,John Wiley&Sons,Inc.,NY, NY(1987-2004);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold SpringHarbor,NY(1989);Harlow和Lane,antibodies,a Laboratory Manual,Cold

Spring Harbor, NY(1989) ;Colligan 等 人, eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY(1994-2004) ;Colligan 等人, Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2004), 各自整体引入本文作为参考。

[0115] 为了生产生物药物产品, 需要能够有效和可重复表达重组多肽的生产细胞系。该细胞系是稳定和可获利的 (bankable)。多种宿主细胞系可以用于这个目的。作为对细胞机器如何影响生物治疗产品的最终量和组成的复杂性的理解, 将赋予产品生产和组成所需属性的宿主细胞系的选择变得更明显。

[0116] 与由连续基因组 DNA 序列转录的大多数基因不同, 抗体基因由可以在种系中广泛分开的基因片段装配。具体地, 重链基因由编码抗体可变 (V)、多变 (D) 和连接 (J) / 恒定 (C) 区的 3 个基因组片段重组形成。功能性轻链基因通过连接 2 个基因片段形成; 一个编码 V 区且另一个编码 J/C 区。重链和 κ 轻链基因座都包含估计跨越大大超过 1000kb 的多个 V 基因片段 (估计大小为 100s-1000s)。相反, λ 基因座小得多, 且已显示在小鼠染色体 16 上跨越大约 300kb。它由 2 个可变基因片段和 4 个连接 / 恒定 (J/C) 区基因片段组成。功能性基因的形成需要 V 和 J/C 元件之间的重组。

[0117] 在其中抗体天然产生的 B 细胞中, 重排的重和 κ 轻链基因的转录控制依赖 V 区上游的组织特异性启动子和位于 J-C 内含子中的组织特异性增强子的活性。这些元件协同发挥作用。同样, 第二种 B 细胞特异性增强子已在 κ 轻链基因座中鉴定。这个另外的增强子位于 C _{κ} 下游 9kb。因此, 使抗体表达基因无限增殖化的杂交瘤方法依赖亲本 B 细胞谱系的内源启动子和增强子序列。可替代地, 本发明的核酸可以在包含编码本发明抗体的内源 DNA 的宿主细胞中通过开启 (通过操纵) 在宿主细胞中进行表达。此类方法是本领域众所周知的, 例如, 如美国专利号 5, 580, 734、5, 641, 670、5, 733, 746 和 5, 733, 761 中描述的, 所述专利整体引入本文作为参考。

[0118] 将抗体基因组 DNA 克隆到人造载体内是制备能够表达抗体的宿主细胞的另一种方法。然而, 在强启动子之后的单克隆抗体表达增加鉴定高生产细胞系和获得更高产量的单克隆抗体的机会。本发明的抗体可以使用例如如本领域众所周知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合 (例如 Morrison, S. (1985) Science 229 :1202) 在宿主细胞转染瘤中生产。

[0119] 用于在多种不同的宿主细胞中克隆和表达生物药物包括抗体的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、酵母和杆状病毒系统以及转基因植物和动物。在本领域中可用于表达异源多肽完整糖基化蛋白的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞 (BHK)、NSO 小鼠黑素瘤细胞和衍生细胞系, 例如 SP2/0、YB2/0 (ATC CRL-1662) 大鼠骨髓瘤细胞、人胚肾细胞 (HEK)、人胚视网膜细胞 PerC. 6 细胞、hep G2 细胞、BSC-1 (例如, ATCC CRL-26)、以及可从例如美国典型培养物保藏中心, Manassas, Va (www.atcc.org) 获得的许多其他细胞。常见的优选细菌宿主是大肠杆菌。

[0120] 哺乳动物细胞例如 CHO 细胞、骨髓瘤细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞 (BHK21, ATCC CRL-10)、小鼠 Ltk- 细胞、和 NIH3T3 细胞已经常用于异源基因的稳定表达。相反, 细胞系例如 Cos (COS-1 ATCC CRL1650 ;COS-7, ATCC CRL-1651) 和 HEK293 常规地用于重组蛋白质的瞬时表达。

[0121] 由于其高表达率,用于表达本发明的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括骨髓瘤细胞,例如 Sp2/0、YB2/0 (ATC CRL-1662)、NS0 和 P3X63. Ag8. 653 (例如 SP2/0-Ag14)。具体地,对于与 NS0 骨髓瘤细胞的使用,另一种优选的表达系统是 WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP338,841 中公开的 GS 基因表达系统。当编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时,抗体通过使宿主细胞培养足够的时间段来产生,所述时间段允许抗体在宿主细胞中表达,或更优选地,抗体分泌到宿主细胞在其中生长的培养基内。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基回收。

[0122] 用于生产抗体、其特定部分或变体的细胞培养物实例是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常将是细胞单层的形式,尽管哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器也可以使用。

[0123] 能够表达完整糖基化蛋白的许多合适的宿主细胞系已在本领域被开发,且包括 COS-1 (例如 ATCC CRL 1650)、COS-7 (例如 ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21 (例如 ATCC CRL-10)、CHO (例如 ATCC CRL 1610) 和 BSC-1 (例如 ATCC CRL-26) 细胞系、Cos-7 细胞、CHO 细胞、hep G2 细胞、P3X63Ag8. 653、SP2/0-Ag14、293 细胞、HeLa 细胞等,它们可从例如美国典型培养物保藏中心,Manassas, Va (www. atcc. org) 容易获得。优选的宿主细胞包括淋巴样起源的细胞,例如骨髓瘤和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞是 P3X63Ag8. 653 细胞 (ATCC 登记号 CRL-1580) 和 SP2/0-Ag14 细胞 (ATCC 登记号 CRL-1851)。

[0124] CHO-K1 和 DHFR-CHO 细胞 DG44 和 DUK-B11 (G. Urlaub, L. A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 4216-4220) 用于高水平的蛋白质生产,因为目的基因扩增通过整合入选择、可扩增标记 DHFR 使用例如药物氨甲蝶呤 (MTX) 能够进行 (R. J. Kaufman, 1990. Methods Enzymol. 185 :537-566)。DHFR CHO 细胞可以成功地用于以高水平生产重组 mAbs。DHFR CHO 可以以 $80-110\text{mg } 10^6 \text{ 细胞}^{-1} \text{ 天}^{-1}$ 或超过 $200\text{mg } 10^6 \text{ 细胞}^{-1} \text{ 天}^{-1}$ 的速率生产抗 MCP-1 抗体。多种启动子已用于在这些 CHO 细胞中获得 H- 和 L- 链的表达,例如, b- 肌动蛋白启动子、人 CMVIE 启动子、Ad 病毒主要晚期启动子 (MLP)、RSV 启动子和鼠白血病病毒 LTR。用于 mAb 表达的许多载体在文献中得到描述,其中 2 条 Ig 链由具有独立选择 / 可扩增标记的 2 种不同质粒携带。包含 1 条抗体链,例如与 DHFR 标记连接的 H- 链,和具有 Neo^r 标记的 L- 链表达盒或反之亦然载体可用于在旋转器瓶中获得最高达 180mg 的人源化 mAb 10^7 天^{-1} 。用于初始选择和后续扩增的方法可以有变化且是本领域技术人员众所周知的。一般而言,高水平的 mAb 表达可以使用下列步骤获得:候选克隆的初始选择和后续扩增,共选择 (例如在其中 H- 链和 L- 链表达载体都携带 DHFR 表达单位的情况下) 和扩增,使用不同可扩增标记的共扩增,以及在大量培养中初始选择和扩增,随后为稀释克隆法以鉴定个别高表达的克隆。因为整合位点可以影响 H- 链和 L- 链表达以及总体 mAb 表达的效率,所以已制备其中 2 个 Ig- 链表达单位串联放置的单个载体。这些载体还携带显性选择标记,例如 Neo^r 和 DHFR 表达盒。关于综述,参见 Ganguly, S. 和 A. Shatzman. Expression Systems, mammalian cells IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. 1999 by John Wiley & Sons, Inc.

[0125] Cockett 等人 (1990. Bio/Technology 8, 662-667) 开发了 GS 系统用于在 CHO 细胞中高水平表达异源基因。将包含 cDNA (在 hCMV 启动子的转录控制下) 和 GS 小基因 (在 SV40 晚期启动子的控制下) 的表达载体转染到 CHO-K1 细胞内 (随后用 20mM-500mM MSX 选择) 可以用于产生表达本发明抗体的克隆,其产量与 DHFR-CHO 系统的那种可比较。GS

系统整体或部分连同欧洲专利号 0 216 846、0 256 055 和 0323 997 以及欧洲专利申请号 89303964.4 讨论。

[0126] 作为非限制性例子,表达重组蛋白质的转基因烟草叶已成功地用于提供大量重组蛋白质,例如使用诱导型启动子。参见,例如 Cramer 等人, *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240 :95-118(1999) 和其中引用的参考文献。同样,转基因玉米已用于以商业生产水平表达哺乳动物蛋白质,其生物活性等同于在其他重组系统中生产或从天然来源纯化的那些。参见,例如 Hood 等人, *Adv. Exp. Med. Biol.* 464 :127-147(1999) 和其中引用的参考文献。也已由转基因植物种子包括烟草种子和马铃薯块茎大量生产了抗体,包括抗体片段,例如单链抗体(scFv's)。参见,例如 Conrad 等人, *Plant Mol. Biol.* 38 :101-109(1998) 和其中引用的参考文献。因此,本发明的抗体还可以使用转基因植物根据已知方法进行生产。还参见,例如 Fischer 等人, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30 :99-108(Oct., 1999), Ma 等人, *Trends Biotechnol.* 13 :522-7(1995); Ma 等人, *Plant Physiol.* 109 :341-6(1995); Whitelam 等人, *Biochem. Soc. Trans.* 22 :940-944(1994); 其中引用的参考文献。关于抗体的植物表达一般还参见但不限于美国专利号 5959177。上述参考文献各自整体引入本文作为参考。

[0127] 5. 抗体的纯化

[0128] 抗 MCP-1 抗体可以通过众所周知的方法从重组细胞培养物中进行回收和纯化,所述方法包括但不限于, A 蛋白纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析法、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相层析(“HPLC”)也可以用于纯化。参见,例如 Colligan, *Current Protocols in Immunology*, 或 *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001), 例如 1、4、6、8、9、10 章,各自整体引入本文作为参考。

[0129] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成方法的产物、和通过重组技术由真核宿主生产的产物,所述真核宿主包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。取决于在重组生产方法中使用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的,而糖基化的是优选的。此类方法在许多标准实验室手册中描述,例如 Sambrook, 同上, 17.37-17.42 节; Ausubel, 同上, 10、12、13、16、18 和 20 章, Colligan, *Protein Science*, 同上, 12-14 章, 所述参考文献全部整体引入本文作为参考。

[0130] 6. 本发明的抗体

[0131] 在本发明的方法和组合物中有用的抗 MCP-1 抗体(也称为抗 CCL-2 抗体或 MCP-1 抗体)可以任选表征为与 MCP-1 的高亲和力结合、与 MCP-1 的高特异性结合、抑制与 MCP-1 有关的一种或多种生物学活性的能力、并任选和优选具有低毒性。

[0132] 本发明的抗体可以以广泛范围的亲和力(K_D)结合人 MCP-1。在优选实施方案中,本发明的至少一种人 mAb 可以任选以高亲和力结合人 MCP-1。例如,人 mAb 可以以等于或小于约 10^{-7} M 的 K_D 结合人 MCP-1, 例如但不限于 0.1-9.9(或其中的任何范围或值) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 或其中的任何范围或值。

[0133] 抗体对于抗原的亲和力或抗体亲抗原性可以使用任何合适的方法实验上测定。(参见,例如 Berzofsky 等人,“Antibody-Antigen Interactions,” *In Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*,

W.H.Freeman and Company :New York, NY(1992) ;和本文描述的方法)。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH)下测量,那么特定抗体-抗原相互作用的测量的亲和力可以不同。因此,亲和力和其他抗原结合参数(例如 K_D 、 K_a 、 K_D)的测量优选使用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液,例如本文描述的标准溶液和缓冲液来进行。

[0134] 本发明的分离的抗体包含由任何合适的多核苷酸编码的本文公开的抗体氨基酸序列,或任何分离的或制备的抗体。优选地,人抗体或抗原结合片段结合人 MCP-1,且由此部分或基本上中和蛋白质的至少一种生物学活性。部分或优选基本上中和至少一种 MCP-1 蛋白质或片段的至少一种生物学活性的抗体或其特定部分或变体,可以结合蛋白质或片段,且由此抑制通过 MCP-1 与 MCP-1 受体结合或通过其他 MCP-1 依赖性介导的机制介导的活性。如本文使用的,术语“中和抗体”指取决于测定可以将 MCP-1 依赖性活性抑制约 20-120% 的抗体,优选至少约 10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100% 或更多。抗 MCP-1 抗体抑制 MCP-1 依赖性活性的能力优选通过如本文描述的和/或如本领域已知的至少一种合适的 MCP-1 蛋白质或受体测定进行评估。本发明的人抗体可以是任何种类(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 等)或同种型,且可以包含 κ 或 λ 轻链。在一个实施方案中,人抗体包含 IgG 重链或限定片段,例如至少一种同种型 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。这种类型的抗体可以如本文描述的和/或如本领域已知的通过使用转基因小鼠或其他转基因非人哺乳动物来制备,所述哺乳动物包含至少一种人轻链(例如 IgG、IgA 和 IgM(例如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$) 转基因。在另一实施方案中,抗人 MCP-1 人抗体包含 IgG1 重链和 IgG1 轻链。

[0135] 本发明的至少一种抗体结合对至少一种 MCP-1 蛋白质、片段、部分或其任何组合特异的至少一种特定表位。至少一种表位可以包含包括蛋白质的至少一个部分的至少一个抗体结合区域,所述表位优选包含 SEQ ID NO:1 邻接氨基酸的至少 1-3 个氨基酸至整个特定部分。

[0136] 一般地,本发明的人抗体或抗原结合片段将包含抗原结合区域,所述抗原结合区域包含至少一个人互补性决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)或至少一个重链可变区变体,以及至少一个人互补性决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)或至少一个轻链可变区变体。作为非限制性例子,抗体或抗原结合部分或变体可以包含具有 SEQ ID NO:9 或 12 的氨基酸序列的至少一个重链 CDR3,和/或具有 SEQ ID NO:15-17、20 或 21 的氨基酸序列的轻链 CDR3。在具体实施方案中,抗体或抗原结合片段可以具有抗原结合区域,所述抗原结合区域包含具有相应 CDRs 1、2 和/或 3 的氨基酸序列(例如 SEQ ID NOS:6-12 和/或 22、23 和 26)的至少一个重链 CDR(即,CDR1、CDR2 和/或 CDR3)的至少部分。在另一具体实施方案中,抗体或抗原结合部分或变体可以具有抗原结合区域,所述抗原结合区域包含具有相应 CDRs 1、2 和/或 3 的氨基酸序列(例如 SEQ ID NOS:13-21 和/或 24 和 25)的至少一个轻链 CDR(即 CDR 1、CDR 2 和/或 CDR 3)的至少部分。在优选实施方案中,抗体或抗原结合片段的 3 个重链 CDRs 和 3 个轻链 CDRs 具有来源于如本文所述的 FabMOR0336、MOR03464、MOR03468、MOR03470、MOR03471、MOR03473、MOR03548 中至少一个的相应 CDR 的氨基酸序列,且重链构架区来源于 VH3 抗体(SEQ ID NO. 2),且轻链构架区来源于 κ 型抗体(SEQ ID NO. 4)。此类抗体可以通过下列方法制备:使用常规技术将抗体的各个部分(CDRs 和构架)化学连接在一起,使用重组 DNA 技术的常规技术或通过使用任何其他合适方法制备和表达编码抗体

的核酸分子。

[0137] 抗 MCP-1 抗体可以包含具有在构架区中限定氨基酸序列的至少一个重或轻链可变区。例如,在优选实施方案中,抗 MCP-1 抗体包含任选具有 SEQ ID NO:2 或 3 的氨基酸序列的至少一个重链可变区和 / 或任选具有 SEQ ID NO:4 或 5 的氨基酸序列的至少一个轻链可变区中的至少一个。

[0138] 抗体种类或同种型 (IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM) 被给予由重链恒定区基因编码的恒定区。在人 IgG 种类中,存在 4 个亚类或亚型: IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4,按照其在血清中的天然丰度从最高到最低的顺序命名。IgA 抗体发现了 2 个亚类: IgA1 和 IgA2。如本文使用的,“同种型转换”也指 IgG 亚类或亚型之间的变化。

[0139] 本发明还涉及包含氨基酸序列的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和 CDRs,所述氨基酸序列基本上与本文描述的氨基酸序列相同。优选地,此类抗体或抗原结合片段和包含此类链或 CDRs 的抗体可以以高亲和力 (例如小于或等于约 10^{-9} M 的 K_D) 结合人 MCP-1。基本上与本文所述序列相同的氨基酸序列包括包含保守氨基酸置换、以及氨基酸缺失和 / 或插入的序列。保守氨基酸置换指用第二种氨基酸置换第一种氨基酸,所述第二种氨基酸具有的化学和 / 或物理性质 (例如电荷、结构、极性、疏水性 / 亲水性) 与第一种氨基酸的那些相似。保守置换包括一种氨基酸用下列组内的另一种置换: 赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和组氨酸 (H); 天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E); 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、酪氨酸 (Y)、K、R、H、D 和 E; 丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、脯氨酸 (P)、苯丙氨酸 (F)、色氨酸 (W)、甲硫氨酸 (M)、半胱氨酸 (C) 和甘氨酸 (G); F、W 和 Y; C、S 和 T。

[0140] 本发明的抗 MCP-1 抗体可以包括来自自然突变或人为处理的一种或多种氨基酸置换、缺失或添加,如关于来源于人种系基因序列且通过序列相似性分类成命名为 VH1A、VH1B、VH2 等的家族,且通过轻链分类为 κ 或 λ 亚群的可变区如本文详细说明的或如 Knappik 等人 US6828422 中教导的。可以在本发明中使用的这些序列和其他序列包括但不限于,表 1 中呈现的构型,如于 2004 年 6 月 21 日提交的 PCT 公开 WO 05/005604 和 US 10/872,932 的图 1-42 中进一步描述的,所述专利整体引入本文作为参考,其中参考的图 1-42 显示了重和轻链可变和恒定结构域序列、构架、亚结构域、区域和置换的例子,所述部分可以在如本文教导的本发明的 Ig 衍生蛋白质中使用。

[0141] 表 1. 人抗体构型

[0142]

		区域						
重链可变区		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
轻链可变区		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IgA1、IgA2、IgD、 IgG1、IgG2、 IgG3、IgG4	恒定区	CH1	铰链1-4	CH2	CH3			
SIgA、IgM		CH1	铰链1-4	CH2	CH3	J-链		
IgE		CH1		CH2	CH3	CH4		

[0143] 技术人员可以制备的氨基酸置换数目取决于许多因素,包括上文描述的那些。一般而言,对于任何给定的抗 MCP-1 抗体、片段或变体的氨基酸置换、插入或缺失数目将不超过 40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个,例如 1-30 个或如本文指定的其中的任何范围或值。

[0144] 在本发明的抗 MCP-1 抗体中对功能必需的氨基酸可以通过本领域已知方法进行鉴定,例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(例如, Ausubel, 同上, 8、15 章; Cunningham 和 Wells, Science 244:1081-1085(1989))。后面的方法在分子的每个残基处引入单个丙氨酸突变。随后测试所得到的突变分子的生物学活性,例如但不限于至少一种 MCP-1 中和活性。对抗体结合关键的位点也可以通过结构分析进行鉴定,例如结晶、核磁共振或光亲和标记 (Smith 等人, J. Mol. Biol. 224:899-904(1992) 和 de Vos 等人, Science 255:306-312(1992))。

[0145] 本发明的抗 MCP-1 抗体可以包括但不限于,选自 SEQ ID NOS:2-5 和 27-28 中至少一个的 5 至所有邻接氨基酸的至少一个部分、序列或组合。

[0146] 抗 MCP-1 抗体可以进一步任选包含 SEQ ID NOS:27 和 28 中至少一个的多肽。在一个实施方案中,若非不改变抗 MCP-1 抗体的结合特异性的保守置换,免疫球蛋白链的氨基酸序列或其部分与 SEQ ID NOS:27-28 中至少一个的相应链的氨基酸序列具有约 100% 的同一性。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO:4 或 5 的序列进行比较,或重链的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO:2 或 3 进行比较。优选地,氨基酸同一性使用如本领域已知的合适计算机算法进行测定。

[0147] 如技术人员应当理解的,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体具有天然(非合成)、内源或相关和已知抗体比活性的至少 20%、30%或 40%,且优选至少 50%、60%或 70%,且最优选至少 80%、90%或 95%-1000%的比活性。测定和定量测量酶促活性和底物特异性的方法是本领域技术人员众所周知的且在本文中描述。

[0148] 在另一方面,本发明涉及通过共价附着有机部分进行修饰,如本文描述的人抗体和抗原结合片段。此类修饰可以产生具有改善的药物代谢动力学特征(例如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或分支的亲水聚合基团、脂肪酸基团、或脂肪酸酯基团。在具体实施方案中,亲水聚合基团可以具有约 800-约 120,000 道尔顿的分子量,且可以是聚链烷二醇(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物

聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,且脂肪酸或脂肪酸酯基团可以包含约 8- 约 40 个碳原子。

[0149] 本发明修饰的抗体和抗原结合片段可以包含与抗体直接或间接共价结合的一个或多个有机部分。与本发明的抗体和抗原结合片段结合的每个有机部分可以独立地是亲水聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文使用的,术语“脂肪酸”包含单羧酸和二羧酸。“亲水聚合基团”如该术语在本文使用的指在水中比在辛烷中更易溶的有机聚合物。例如,聚赖氨酸在水中比在辛烷中更易溶。因此,通过共价附着聚赖氨酸修饰的抗体由本发明包含。适合于修饰本发明抗体的亲水聚合物可以是线性或分支的,且包括例如聚链烷二醇(例如 PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG 等)、碳水化合物(例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等)、亲水性氨基酸聚合物(例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等)、聚环氧链烷(例如,聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)和聚乙烯吡咯烷酮。优选地,修饰本发明抗体的亲水聚合物作为单独的分子实体具有约 800- 约 150,000 道尔顿的分子量。例如可以使用 PEG₅₀₀₀ 和 PEG_{20,000},其中下标是以道尔顿表示的聚合物的平均分子量。亲水聚合基团可以由 1- 约 6 个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。由脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物可以通过使用合适方法进行制备。例如,包含胺基的聚合物可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧基偶联,且脂肪酸或脂肪酸酯上的活化羧基(例如用 N, N- 羰基二咪唑活化的)可以与聚合物上的羟基偶联。

[0150] 适合于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可以包含一个或多个不饱和单位。适合于修饰本发明抗体的脂肪酸包括,例如正十二烷酸(C₁₂,月桂酸)、正十四烷酸(C₁₄,肉豆蔻酸)、正十八烷酸(C₁₈,硬脂酸)、正二十烷酸(C₂₀,花生酸)、正二十二烷酸(C₂₂,山嵛酸)、正三十烷酸(C₃₀)、正四十烷酸(C₄₀)、顺式- Δ 9-十八烷酸(C₁₈,油酸)、全顺式- Δ 5,8,11,14-二十烷四烯酸(eicosatetraenoate)(C₂₀,花生四烯酸)、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括包含线性或分支低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基可以包含 1- 约 12 个,优选 1- 约 6 个碳原子。

[0151] 修饰的人抗体和抗原结合片段可以使用合适方法,例如通过与一种或多种改性剂反应进行制备。“改性剂”如该术语在本文中使用的指包含活化基团的合适有机基团(例如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是化学部分或官能团,它们在合适条件下可与第二种化学基团反应,由此在改性剂和第二种化学基团之间形成共价键。例如,胺反应活化基团包括亲电基团,例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤(氯、溴、氟、碘)、N- 羟基琥珀酰亚胺基酯(NHS)等。可以与硫醇反应的活化基团包括例如马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酸(acryloyl)、吡啶基二硫化物、5- 硫醇-2- 硝基苯甲酸硫醇(TNB- 硫醇)等。醛官能团可以与含胺或酰肼的分子偶联,且叠氮基可以与三价含磷基团反应以形成氨基磷酸酯或 phosphorimide 键。将活化基团引入分子的合适方法是本领域已知的(参见例如 Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press; San Diego, CA(1996))。活化基团可以直接或通过接头部分与有机基团(例如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)结合,所述接头部分例如其中一个或多个碳原子可以由杂原子例如氧、氮或硫置换的二价 C₁-C₁₂ 基团。合适的接头部分包括例如四甘醇、-(CH₂)₃-、-NH-(CH₂)₆-NH-、-(CH₂)₂-NH- 和 -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH-。包含接头部分的改性剂可以通过下述产生:例如在 1- 乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)的存在下,使单-Boc-烷基二胺(例如单-Boc-乙

二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸反应,以在游离胺和脂肪酸羧基之间形成酰胺键。Boc保护基团可以通过用三氟乙酸(TFA)处理从产物中去除,以暴露伯胺,所述伯胺如所述地可以与另一种羧基偶联,或可以与马来酐反应,且所得到的产物环化以产生脂肪酸的活化马来酰亚胺基(maleimido)衍生物。(参见,例如Thompson等人,WO 92/16221,其完整教导引入本文作为参考。)

[0152] 本发明的修饰抗体可以通过使人抗体或抗原结合片段与改性剂反应来产生。例如,有机部分可以通过使用胺反应性改性剂例如PEG的NHS酯以非位点特异性方式与抗体结合。修饰的人抗体或抗原结合片段还可以通过使抗体或抗原结合片段的二硫键(例如链内二硫键)还原来制备。还原的抗体或抗原结合片段随后可以与硫醇反应性改性剂反应以产生本发明的修饰抗体。包含有机部分的修饰的人抗体或抗原结合片段可以使用合适方法进行制备,所述有机部分与本发明抗体的特定定位点结合,所述方法例如反向蛋白质水解(Fisch等人,Bioconjugate Chem.,3:147-153(1992);Werlen等人,Bioconjugate Chem.,5:411-417(1994);Kumaran等人,Protein Sci.6(10):2233-2241(1997);Itoh等人,Bioorg.Chem.,24(1):59-68(1996);Capellas等人,Biotechnol.Bioeng.,56(4):456-463(1997)),以及Hermanson,G.T.,Bioconjugate Techniques,Academic Press:San Diego,CA(1996)中描述的方法。

[0153] 7. 针对抗MCP-1抗体的抗独特型抗体

[0154] 除了单克隆或嵌合抗MCP-1抗体之外,本发明还涉及对本发明的此类抗体特异的抗独特型(抗Id)抗体。抗Id抗体是识别一般与另一种抗体的抗原结合区域相关的独特决定簇的抗体。抗Id可以通过用抗体或其包含CDR的区域免疫与Id抗体来源相同的物种和遗传类型(例如小鼠品系)的动物进行制备。被免疫动物将识别且对免疫抗体的独特型决定簇应答,且产生抗Id抗体。抗Id抗体还可以用作“免疫原”以在另一动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗抗Id抗体。

[0155] 8. 包含另外的治疗活性成分的抗体组合物

[0156] 组合物可以任选进一步包含有效量的至少一种化合物或蛋白质,所述化合物或蛋白质选自皮肤病学药物,消炎药,止痛剂,肾药(例如血管紧张素受体阻断剂(ARB)或拮抗剂),抗感染药,心血管(CV)系统药物,中枢神经系统(CNS)药物,自主神经系统(ANS)药物,呼吸道药物,胃肠(GI)道药物,激素药物,用于流体或电解质平衡的药物,血液学药物,抗癌药,免疫调谐药物,眼、耳或鼻药物,局部药物,营养药物等中的至少一种。此类药物是本领域众所周知的,包括关于本文提出的每一种的配制、适应症、给药和施用(参见,例如,Nursing 2001 Handbook of Drugs,第21版,Springhouse Corp.,Springhouse,PA,2001;Health Professional's Drug Guide 2001,ed.,Shannon,Wilson,Stang,Prentice-Hall,Inc,Upper Saddle River,NJ;Pharmacotherapy Handbook,Wells等人,ed.,Appleton&Lange,Stamford,CT,所述参考文献各自整体引入本文作为参考)。

[0157] 本发明的抗MCP-1抗体组合物可以进一步包括任何合适和有效量的组合物或药物组合物中的至少一种,所述组合物或药物组合物包含对于需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者的至少一种抗MCP-1抗体,任选进一步包含选自下列的至少一种:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF化学或蛋白质拮抗剂,TNF单克隆或多克隆抗体或片段,可溶性TNF受体(例如p55、p70或p85)或其片段、融合多肽,或小分子TNF拮

抗剂,例如 TNF 结合蛋白 I 或 II(TBP-1 或 TBP-II),nerelimonmab,英夫单抗,entercept, CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept 等),抗风湿药(例如氨甲蝶呤、醋硫葡金、葡糖硫金、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟洛米、柳氮磺吡啶),肌肉松弛药,麻醉药,非类固醇消炎药(NSAID),止痛剂,麻醉剂,镇静剂,局部麻醉剂,神经肌肉阻断剂,抗微生物剂(例如氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生物剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂),抗牛皮癣剂,皮质类固醇,促蛋白合成类固醇,糖尿病相关剂,矿物质,营养物,甲状腺剂,维生素,钙相关激素,止泻剂,止咳药,止吐剂,抗溃疡药,缓泻药,抗凝剂,促红细胞生成素(例如重组人类红细胞生成素 α),非格司亭(例如 G-CSF,重组人粒细胞集落刺激因子),沙格司亭(GM-CSF,白细胞素),慢性阻塞性肺病(COPD)剂,抗纤维变性剂,免疫接种,免疫球蛋白,免疫抑制剂(例如 basiliximab、环孢菌素、daclizumab),生长激素,激素替代药物,雌激素受体调节剂,散瞳剂,睫状肌麻痹药,烷化剂,抗代谢物,有丝分裂抑制剂,防辐射药物,抗抑郁药,抗躁狂剂,抗精神病药,抗焦虑药,催眠药,拟交感神经药,兴奋剂,多奈哌齐,单满吡啶氨,哮喘药, β 激动剂,吸入类固醇,白细胞三烯抑制剂,甲基黄嘌呤,色甘酸,肾上腺素或类似物,阿法脱氧核糖核酸酶(Pulmozyme),细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类细胞因子的非限制性例子包括但不限于 IL-1-IL-29 中任何一种。合适的剂量是本领域众所周知的。参见,例如, Wells 等人, eds., Pharmacotherapy Handbook, 第 2 版, Appleton and Lange, Stamford, CT(2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA(2000), 所述参考文献各自整体引入本文作为参考。

[0158] 此类抗癌药或抗感染药还可以包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共配制或共施用的毒素分子。毒素可以任选起作用以选择性杀死病理性细胞或组织。病理性细胞可以是癌或其他细胞。此类毒素可以是但不限于,纯化或重组毒素或包含毒素的至少一个功能性细胞毒性结构域的毒素片段,例如选自蓖麻毒蛋白、白喉毒素、毒液毒素、或细菌毒素中的至少一种。术语毒素还包括由任何天然存在的、突变型或重组细菌或病毒产生的内毒素和外毒素,所述细菌或病毒可以在人和其他哺乳动物中引起任何病理状况,包括毒素休克,这可以导致死亡。此类毒素可以包括但不限于,产肠毒素的大肠杆菌热不稳定肠毒素(LT),热稳定肠毒素(ST),志贺氏菌属(*Shigella*)细胞毒素,气单胞菌属(*Aeromonas*)肠毒素,中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1),葡萄球菌(*Staphylococcal*)肠毒素 A(SEA)、B(SEB)、或 C(SEC),链球菌(*Streptococcal*)肠毒素等。此类细菌包括但不限于下列物种的菌株:产肠毒素大肠杆菌(ETEC),肠出血性大肠杆菌(例如血清型 O157:H7 菌株),葡萄球菌属物种(例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))、化脓性葡萄球菌(*Staphylococcus pyogenes*)),志贺氏菌属物种(例如痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*))、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Shigella boydii*)和宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)),沙门氏菌属(*Salmonella*)物种(例如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*))、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella cholerae-suis*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)),梭菌属(*Clostridium*)物种(例如产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*))、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)),*Camphlobacter* 物种(例如 *Camphlobacter jejuni*、*Camphlobacter fetus*),*Helicobacter* 物种(例如 *Helicobacter pylori*),气单胞菌属物

种(例如温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)), *Pleisomonas shigelloides*, 小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*), 弧菌属(*Vibrios*) 物种(例如霍乱弧菌(*Vibrios cholerae*)、副溶血弧菌(*Vibrios parahaemolyticus*)), 克雷伯氏菌属(*Klebsiella*) 物种, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 和链球菌(*Streptococci*)。参见, 例如 Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 第 3 版, 第 1-13 页, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans 等人, eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 第 2 版, 第 239-254 页, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell 等人, Principles and Practice of Infectious Diseases, 第 3 版., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow 等人, eds., The Merck Manual, 第 16 版, Merck and Co., Rahway, N. J., 1992; Wood 等人, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack 等人, Science, 248: 705-711 (1990), 所述参考文献的内容整体引入本文作为参考。

[0159] 本发明的抗 MCP-1 抗体化合物、组合物或组合可以进一步包含任何合适辅助剂中的至少一种, 例如但不限于, 稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。药学可接受的辅助剂是优选的。此类无菌溶液的非限制性例子和制备方法是本领域众所周知的, 例如但不限于 Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。如本领域众所周知的或如本文描述的, 可以常规选择适合于抗 MCP-1 抗体、片段或变体组合物的施用方式、溶解性和 / 或稳定性的药学可接受的载体。

[0160] 在本组合物中有用的药学赋形剂和添加剂包括但不限于蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如糖, 包括单糖、二、三、四和寡糖; 衍生糖, 例如糖醇、糖醛酸、酯化糖等; 和多糖或糖聚合物), 它可以单独或组合存在, 单独或组合地构成 1-99.99 重量或体积%。示例性蛋白质赋形剂包括血清清蛋白, 例如人血清清蛋白(HSA)、重组人清蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。也可以在缓冲能力方面起作用的代表性氨基酸 / 抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0161] 适合于在本发明中使用的碳水化合物赋形剂包括, 例如单糖, 例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等; 二糖, 例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等; 多糖, 例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等; 和糖醇, 例如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇(maltitol)、乳糖醇(lactitol)、木糖醇山梨糖醇(葡糖醇(glucitol))、肌醇等。用于在本发明中使用的优选碳水化合物赋形剂是甘露醇、海藻糖和棉子糖。

[0162] 抗 MCP-1 抗体组合物还可以包括缓冲剂或 pH 调节剂; 一般地, 缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐, 例如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐; Tris, 盐酸三羟甲基氨基甲烷, 或磷酸盐缓冲剂。用于在本发明组合物中使用的优选缓冲剂是有机酸盐, 例如柠檬酸盐。

[0163] 此外, 本发明的抗 MCP-1 抗体组合物可以包括聚合赋形剂 / 添加剂, 例如聚乙烯吡咯烷酮、ficolls(聚合糖)、葡萄糖结合剂(例如环糊精, 例如 2-羟丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(例如聚山梨醇酯, 例如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”)、脂质(例如磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如胆固醇)、和螯

合剂（例如 EDTA）。

[0164] 适合于在根据本发明的抗 MCP-1 抗体、部分或变体组合物中使用的这些和另外已知的药学赋形剂和 / 或添加剂是本领域已知的，例如，如“Remington :The Science&Practice of Pharmacy”，第 19 版，Williams&Williams, (1995) 以及“Physician’s Desk Reference”，第 52 版，MedicalEconomics, Montvale, NJ (1998) 中列出的，所述参考文献的公开内容整体引入本文作为参考。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物（例如糖和糖醇）和缓冲剂（例如柠檬酸盐）或聚合剂。

[0165] 9. 制剂

[0166] 如上文指出的，本发明提供了适合于药学或兽医学用途的稳定制剂，其在药学可接受的制剂中包含至少一种抗 MCP-1 抗体。

[0167] 如上文指出的，本发明提供了包含包装材料和至少一个小瓶的制品，所述小瓶包含至少一种 MCP-1 抗体与指定缓冲剂和 / 或防腐剂任选溶于水性稀释剂中的溶液，其中所述包装材料包含标明此类溶液可以在 1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72 小时或更长时间段内保存的标签。本发明进一步包含制品，其包含包装材料、包含冷冻干燥的至少一种抗 MCP-1 抗体的第一个小瓶、和包含指定缓冲剂和 / 或防腐剂的水性稀释剂的第二个小瓶，其中所述包装材料包含指导患者在水性稀释剂中重构至少一种抗 MCP-1 抗体，以形成可以在 24 小时或更长时间段内保存的溶液的标签。

[0168] 如果在湿润 / 干燥系统中，那么本发明产品中的至少一种抗 MCP-1 抗体的范围包括重构后产生约 1.0 μ g/ml - 约 1000mg/ml 的浓度的量，尽管更低和更高的浓度是可行的且取决于计划的递送载体，例如溶液制剂将不同于经皮贴剂、肺、跨粘膜、或渗透或微量泵方法。

[0169] 水性稀释剂任选进一步包含药学可接受的防腐剂。优选的防腐剂包括选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯 (alkylparaben) (甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等)、苄扎氯铵、氯化苄乙氧铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞、或其混合物的防腐剂。在制剂中使用的防腐剂的浓度是足以产生抗微生物作用的浓度。此类浓度取决于所选防腐剂且由技术人员容易确定。

[0170] 其他赋形剂例如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂增强剂，可以任选且优选加入稀释剂中。等渗剂例如甘油通常以已知浓度使用。优选加入生理学耐受的缓冲剂以提供改善的 pH 控制。制剂可以覆盖宽范围的 pHs，例如约 pH4 - 约 pH10，且优选范围是约 pH5 - 约 pH9，且最优选的范围是约 6.0 - 约 8.0。优选地本发明的制剂具有约 6.8 - 约 7.8 的 pH。优选缓冲剂包括磷酸盐缓冲液，最优选磷酸钠，特别是磷酸缓冲盐水 (PBS)。

[0171] 其他添加剂例如药学可接受的增溶剂如 Tween 20 (聚氧乙烯 (20) 山梨糖醇酐单月桂酸酯)、Tween 40 (聚氧乙烯 (20) 山梨糖醇酐单棕榈酸酯)、Tween 80 (聚氧乙烯 (20) 山梨糖醇酐单油酸酯)、Pluronic F68 (聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)、和 PEG (聚乙二醇) 或非离子表面活性剂，例如聚山梨醇酯 20 或 80 或泊洛沙姆 184 或 188, Pluronic[®] polyols, 其他嵌段共聚物，以及螯合剂例如 EDTA 和 EGTA 可以任选加入制剂或组合物中以减少聚集。如果使用泵或塑料容器施用制剂，那么这些添加剂是特别有用的。药学可接受的表面活性剂的存在减轻了蛋白质聚集的倾向。

[0172] 本发明的制剂可以通过如下方法来制备，所述方法包括使至少一种抗 MCP-1 抗体

和缓冲溶液以足够提供所需浓度的蛋白质的量混合。这种方法的变化将是本领域普通技术人员可认识到的。例如,组分添加的顺序、是否使用另外的添加剂、制剂制备时的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和施用方式进行最优化的因素。

[0173] 请求保护的制剂可以作为溶液或作为双小瓶提供给患者,所述双小瓶包含一小瓶冷冻干燥的至少一种抗 -MCP-1 抗体,所述抗体用第二个小瓶重构,所述第二个小瓶包含在水性稀释剂中的水、防腐剂和 / 或赋形剂,优选磷酸盐缓冲液和 / 或盐水和所选盐。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用,且可以满足患者治疗的单个或多个循环,且因此可以提供比目前可用的更方便的治疗方案。

[0174] 本发明请求保护的制品对于在立即 -24 小时或更长时间段内的施用是有用的。因此,本发明请求保护的制品提供了对于患者的明显优点。本发明的制剂可以任选安全地贮存于约 2- 约 40°C 的温度,且使蛋白质的生物活性保持延长的时间段,从而允许包装标签标明溶液可以保持和 / 或在 6、12、18、24、36、48、72 或 96 小时或更长时间段内使用。如果使用防腐的稀释剂,那么此类标签可以包括最高达 1-12 个月、半年、一年半和 / 或 2 年的使用。

[0175] 请求保护的产品可以通过提供给药房、门诊部或其他此类机构和设施、澄清溶液或双小瓶间接提供给患者,所述双小瓶包含一小瓶冷冻干燥的至少一种抗 -MCP-1 抗体,所述抗体用包含水性稀释剂的第二个小瓶重构。在这种情况下的澄清溶液的大小可以是最高达 1 升或甚至更大,从而提供较大储库 (reservoirs),较小部分的至少一种抗体的溶液可以从其中一次或多次取出用于转移到较小的小瓶内、且通过药房或门诊部提供给它们的顾客和 / 或患者。

[0176] 包含这些单小瓶系统的公认的装置包括用于递送溶液的那些笔式注射器装置,例如 BD Pens、BD Autojector[®]、Humaject[®] NovoPen[®]、B-D[®] Pen、AutoPen[®]、和 OptiPen[®]、GenotropinPen[®]、Genoteronorm Pen[®]、Humatro Pen[®]、Reco-Pen[®]、Roferon Pen[®]、Biojector[®]、Iject[®]、J-tipNeedle-Free Injector[®]、Intraject[®]、Medi-Ject[®],例如,如 Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com)、Disetronic (Burgdorf, 瑞士, www.disetronic.com ;Bioject, 波兰, Oregon (www.bioject.com) ;National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com) 制备或开发的。包含双小瓶系统的公认的装置包括用于在药筒中重构冷冻干燥药物用于递送重构溶液的那些笔式注射器系统,例如 HumatroPen[®]。

[0177] 本发明请求保护的产品包括包装材料。包装材料除了提供管理机构要求的信息之外,还提供了产品可以在其中使用的条件。对于双小瓶、湿润 / 干燥产品,本发明的包装材料提供了患者在水稀释剂中重构至少一种抗 MCP-1 抗体以形成溶液,且在 2-24 小时或更长时间段内使用溶液的说明书。对于单小瓶溶液产品,标签标明此类溶液可以在 2-24 小时或更长时间段内使用。本发明请求保护的产品对于人药学产品使用有用。

[0178] 稳定抗 MCP-1 抗体的其他制剂或方法可以导致不同于包含所述抗体的冷冻干燥粉末的澄清溶液。在非澄清溶液中的是包含颗粒悬浮液的制剂,所述颗粒是包含可变尺寸结构的抗 MCP-1 抗体的组合物,且名称不一地称为微球体、微粒、纳米颗粒

(nanoparticle)、纳米球体 (nanosphere) 或脂质体。如 U. S. 4, 589, 330 中教导的, 包含活性剂的此类相对同质、基本上球形的颗粒制剂可以通过下列方法形成: 使包含活性物和聚合物的水相与非水相接触, 随后蒸发非水相以导致颗粒从水相凝聚。如 U. S. 4, 818, 542 中教导的, 多孔微粒可以通过下列制备: 使用包含在连续溶剂中分散的活性物和聚合物的第一个相, 和通过冷冻干燥或稀释 - 提取 - 沉淀从悬浮液中去除所述溶剂。用于此类制剂的优选聚合物是天然或合成共聚物或聚合物, 它们选自: glectin 琼脂、淀粉、阿拉伯半乳糖、清蛋白、胶原、聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯 -L(-) 丙交酯聚 (ϵ -己内酯、 ϵ -己内酯-乳酸共聚物、 ϵ -己内酯-乙醇酸共聚物、聚 (β -羟基丁酸)、聚氧化乙烷、聚乙烯、聚 (烷基-2-氰基丙烯酸酯)、聚 (甲基丙烯酸羟乙酯)、聚酰胺、聚 (氨基酸)、聚 (2-羟乙基 DL-aspartamide)、聚 (酯脲)、聚 (L-苯丙氨酸 / 乙二醇 / 1,6-二异氰酸己烷) 和聚 (甲基丙烯酸甲酯)。特别优选的聚合物是聚酯, 例如聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯 -L(-) 丙交酯聚 (ϵ -己内酯、 ϵ -己内酯-乳酸共聚物和 ϵ -己内酯-乙醇酸共聚物。对溶解聚合物和 / 或活性物有用的溶剂包括: 水、六氟异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、己烷、苯、或六氟丙酮倍半水合物。分散包含活性物的相与第二个相的方法可以包括施加压力从而迫使所述第一个相通过喷嘴中的孔口以影响小滴形成。

[0179] 干粉制剂可以由不同于冷冻干燥的方法产生, 例如通过喷雾干燥或通过蒸发提取溶剂或通过沉淀结晶组合物, 随后为去除水性或非水性溶剂的一个或多个步骤。喷雾干燥的抗体制剂的制备在 U. S. 6, 019, 968 中教导。基于抗体的干粉组合物可以通过在一定条件下喷雾干燥溶于溶剂的抗体和任选地赋形剂的溶液或浆, 以提供可呼吸的干粉来生产。溶剂可以包括可以容易干燥的极性化合物, 例如水和乙醇。抗体的稳定性可以通过在不存在氧的情况下例如在氮气层下, 或通过使用氮作为干燥气体进行喷雾干燥操作得到增强。如 WO 9916419 中教导的, 另一种相对干燥的制剂是分散在悬浮介质中的许多有孔微结构的分散体, 所述悬浮介质一般包含氢氟烷推进剂。稳定化的分散体可以使用计量的吸入器施用于患者的肺。在喷雾干燥药物的商业制备中有用的设备由 Buchi Ltd 或 Niro Corp 制造。

[0180] 本文所述的在稳定或防腐制剂或溶液中的至少一种抗 MCP-1 抗体可以依照本发明经由多种递送方法施用于患者, 所述递送方法包括如本领域众所周知的 SC 或 IM 注射; 经皮、肺、跨粘膜、植入、渗透泵、药筒、微型泵、或技术人员理解的其他方法。

[0181] 10. 治疗应用

[0182] 本发明还提供了使用本发明的至少一种 MCP-1 抗体调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关疾病的方法, 如本领域已知的或如本文描述的。本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关疾病的方法, 所述疾病包括但不限于, 恶性疾病、代谢疾病、免疫或炎症相关疾病、心血管疾病、传染病、或神经疾病中的至少一种。

[0183] 此类状况选自但不限于, 由细胞粘附和 / 或血管发生介导的疾病或状况。此类疾病或状况包括免疫病症或疾病, 心血管病症或疾病, 传染性、恶性和 / 或神经病症或疾病, 或其他已知或特定 MCP-1 相关状况。具体地, 抗体对于治疗下列疾病有用, 所述疾病涉及血管发生, 例如眼疾病和肿瘤性疾病, 组织重建例如再狭窄, 以及某些细胞类型的增殖特别是上皮和鳞状细胞癌。具体适应症包括在动脉粥样硬化、再狭窄、癌症转移、类风湿性关节炎、糖尿病性视网膜病和黄斑变性治疗中的用途。本发明的中和抗体还用于预防或治疗不需要

的骨再吸收或降解,例如如骨质疏松症中发现的或由某些肿瘤超表达 PTHrP 引起的。抗体还可能在各种纤维变性疾病的治疗中 useful,例如特发性肺纤维变性、糖尿病肾病、肝炎和肝硬化。

[0184] 因此,本发明提供了使用本发明的至少一种 MCP-1 抗体调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关疾病的方法,如本领域已知的或如本文描述的。具体适应症在下文讨论:

[0185] 肺部疾病

[0186] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法,所述恶性疾病包括但不限于,下列中的至少一种:肺炎;肺脓肿;由粉尘、气体或薄雾形式的试剂引起的职业性肺部疾病;哮喘,闭塞性纤维性细支气管炎,呼吸衰竭,肺的超敏感性疾病包括超敏感性肺炎(外源性变应性肺泡炎),变应性支气管肺曲霉病,和药物反应;成人呼吸窘迫综合征(ARDS),Goodpasture 氏综合征,慢性阻塞性气道病症(COPD),特发性间质性肺病例如特发性肺纤维变性和结节病,脱屑性间质性肺炎,急性间质性肺炎,呼吸细支气管炎相关性间质性肺病,含机化性肺炎的特发性闭塞性细支气管炎,淋巴细胞性间质性肺炎,郎格汉斯细胞肉芽肿病,特发性肺含铁血黄素沉积症;急性支气管炎,肺泡蛋白沉积症,支气管扩张,胸膜病症,肺膨胀不全,囊性纤维变性,以及肺肿瘤和肺栓塞。

[0187] 恶性疾病

[0188] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法,所述恶性疾病包括但不限于,下列中的至少一种:白血病,急性白血病,急性成淋巴细胞性白血病(ALL),B 细胞、T 细胞或 FAB ALL,急性髓细胞样白血病(AML),慢性髓细胞性白血病(CML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),毛细胞性白血病,骨髓异常增生综合征(MDS),淋巴瘤,何杰金病,恶性淋巴瘤,非何杰金淋巴瘤,Burkitt 氏淋巴瘤,多发性骨髓瘤,卡波西肉瘤,结肠直肠癌,胰腺癌,肾细胞癌,乳腺癌,鼻咽癌,恶性组织细胞增多症,恶性肿瘤的肿瘤相关综合征/高血钙综合征,实体瘤,腺癌,鳞状细胞癌,肉瘤,恶性黑素瘤,特别是转移性黑素瘤,血管瘤,转移性疾病,癌症相关的骨再吸收,癌症相关的骨痛等。

[0189] 免疫相关疾病

[0190] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法,所述免疫相关疾病包括但不限于,下列中的至少一种:类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、全身性发作的青少年类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、全身性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维变性、系统性脉管炎/韦格纳肉芽肿病、结节病、睾丸炎/输精管切除术 逆向操作(vasectomy reversal procedures)、变应性/特应性疾病、哮喘、变应性鼻炎、湿疹、变应性接触性皮炎、变应性结膜炎、超敏感性肺炎、移植、器官移植排斥、移植抗宿主病、全身性炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性脓毒症、革兰氏阴性脓毒症、培养物阴性脓毒症、真菌性脓毒症、嗜中性白细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、外伤/出血、灼伤、电离射线暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎症病理状态、结节病、Crohn 氏病理状态、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、超敏反应、变应性鼻炎、枯

草热、常年性鼻炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、荨麻疹、systemic anaphalaxis、皮炎、恶性贫血、溶血病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺植入物排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体移植排斥、抗受体超敏反应、Graves 病、Raynaud 氏病、B 型胰岛素抗性糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III 型超敏反应、全身性红斑狼疮、POEMS 综合征 (多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮病、混合型结缔组织病、特发性 Addison 氏病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬变、白癜风、脉管炎、MI 后心切术综合征、IV 型超敏反应、接触性皮炎、超敏感性肺炎、同种异体移植排斥、胞内生物导致的肉芽瘤、药物敏感性、新陈代谢 / 特发性、Wilson 氏病、血色素沉着、 α -1 抗胰蛋白酶缺乏、糖尿病性视网膜病、桥本甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬变、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶病质、囊性纤维变性、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、familial hemaphagocytic lymphohistocytosis、皮肤病状况、牛皮癣、秃头、肾病综合征、肾炎、肾小球性肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、毒性、先兆子痫、OKT3 疗法、抗 CD3 疗法、细胞因子疗法、化学疗法、放射疗法 (例如包括但不限于无力、贫血、恶病质等)、慢性水杨酸中毒等。参见, 例如 Merck Manual, 第 12-27 版, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells 等人, eds., 第 2 版, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 各自整体引入作为参考。

[0191] 心血管疾病

[0192] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种心血管疾病的方法, 所述心血管疾病包括但不限于, 下列中的至少一种: 心脏震昏综合征、心肌梗死、充血性心力衰竭、中风、缺血性中风、出血、动脉硬化症、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病性动脉硬化病、高血压、动脉高压、肾血管性高血压、昏厥、休克、心血管系统梅毒、心力衰竭、肺源性心脏病、原发性肺动脉高压、心律失常、心房异位搏动、心房扑动、心房纤颤 (持续或阵发性)、灌注后综合征、心肺分流术炎症反应、紊乱性或多源性房性心动过速、规则狭窄性 QRS 心动过速、特殊心律失常、心室纤颤、希氏束性心律失常、房室传导阻滞、束支传导阻滞、心肌缺血性病症、冠状动脉病、心绞痛 pectoris、心肌梗死、心肌病、扩张性充血性心肌病、限制性心肌病、瓣膜心脏病、心内膜炎、心包病、心脏肿瘤、主动脉和周围性动脉瘤、主动脉壁夹层形成、主动脉炎症、腹主动脉及其分支阻塞、外周血管病症、阻塞性动脉病症、外周动脉粥样硬化病、血栓闭塞性血管炎、功能性外周动脉病症、Raynaud 氏现象和疾病、手足发绀、红斑性肢痛病、静脉疾病、静脉血栓形成、曲张静脉、动静脉瘘、lymphoderma、脂肪水肿、不稳定心绞痛、再灌注损伤、泵后综合征 (post pump syndrome)、缺血 - 再灌注损伤等。此类方法可以任选包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的、包含至少一种抗 MCP-1 抗体的组合物或药物组合物。

[0193] 神经疾病

[0194] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种神经疾病的方法, 所述神经疾病包括但不限于, 下列中的至少一种: 神经变性疾病, 多发性硬化,

偏头痛, AIDS 痴呆综合征, 脱髓鞘性病, 例如多发性硬化和急性横贯性脊髓炎; 锥体束外和小脑病症, 例如脊髓皮质系统损害; 基底神经节病症或小脑病症; 运动机能亢进性运动障碍, 例如亨廷顿舞蹈病和老年性舞蹈病; 药物诱发的运动失调, 例如由阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的那些; 运动机能减退性运动失调, 例如帕金森病; 进行性核上麻痹; 小脑结构损害; 脊髓小脑变性, 例如脊髓性共济失调、弗里德赖希共济失调、小脑皮质变性、多系统变性 (Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-Drager 和 Machado-Joseph); 全身病症 (Refsum 氏病、血 β 脂蛋白缺乏症)、共济失调、毛细血管扩张、和线粒体多系统病症); 脱髓鞘核心病症, 例如多发性硬化、急性横贯性脊髓炎; 以及运动单位病症, 例如神经原性肌萎缩 (前角细胞变性, 例如肌萎缩性侧索硬化症、婴儿脊髓性肌萎缩和青少年脊髓性肌萎缩); 阿尔茨海默氏病; 中年唐氏综合征; 弥散性 Lewy 体病; Lewy 体型老年性痴呆; Wernicke-Korsakoff 综合征; 慢性酒精中毒; Creutzfeldt-Jakob 病; 亚急性硬化性全脑炎、Hallerrorden-Spatz 病; 和拳击员痴呆 (Dementiapugilistica) 等。此类方法可以任选包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的、包含至少一种 TNF 抗体或特定部分或变体的组合物或药物组合物。参见, 例如 Merck Manual, 第 16 版, Merck & Company, Rahway, NJ (1992)。

[0195] 纤维变性状况

[0196] 除了上述状况和疾病之外, 本发明还提供了用于调节或治疗各种病因的纤维变性状况的方法, 例如肝纤维变性 (包括但不限于酒精诱发的肝硬化、病毒诱发的肝硬化、自身免疫诱发的肝炎); 肺纤维变性 (包括但不限于硬皮病、特发性肺纤维变性); 肾纤维变性 (包括但不限于硬皮病、糖尿病性肾炎、肾小球肾炎、狼疮肾炎); 皮肤纤维变性 (包括但不限于硬皮病、肥大性和瘢痕疙瘩性瘢痕形成、灼伤); 骨髓纤维变性; 神经纤维瘤病; 纤维瘤; 肠纤维变性; 和由外科手术操作引起的纤维变性粘连。

[0197] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种创伤、外伤或组织损伤或由其产生或与其相关的慢性状况的方法, 包括但不限于, 下列中的任何一种: 身体损伤或与外科手术相关的外伤, 所述手术包括胸、腹、颅或口腔外科手术; 或其中所述创伤选自无菌创伤、挫伤、割伤、撕裂伤、非穿透伤、开放性创伤、穿透伤、贯通伤、刺伤、染毒创伤、梗塞形成和皮下创伤; 或其中所述创伤选自缺血性溃疡、褥疮、瘰、严重咬伤、热灼伤和供体部位创伤; 或其中所述创伤是口疮创伤、外伤性创伤或疱疹相关创伤。供体部位创伤是例如与从身体的一个部分切除硬组织至身体的另一部分有关, 例如与移植有关发生的创伤。由此类手术产生的创伤是非常疼痛的且改善的愈合因此最有价值。创伤纤维变性也顺应抗 MCP-1 抗体疗法, 因为侵袭创伤区域的第一种细胞是嗜中性粒细胞, 随后为由巨噬细胞活化的单核细胞。巨噬细胞被认为是有效的创伤愈合所必需的, 因为它们还负责病原性生物的吞噬作用且去清除组织碎片。此外, 它们释放涉及后续愈合过程事件的众多因子。巨噬细胞吸引起始胶原产生的成纤维细胞。几乎所有组织修复过程都包括早期结缔组织形成、这个以及后续过程的刺激改善组织愈合, 然而, 结缔组织和胶原的超量产生可以导致特征为非弹性和含氧量低的纤维变性组织。本发明的抗 MCP-1 抗体可以在用于调节、治疗或预防此类创伤愈合后遗症的方法中使用。

[0198] 本发明的抗体还可以在用于调节或治疗移植器官、组织或细胞例如心脏移植的慢性排斥中的至少一种症状的方法中使用。

[0199] 抗 MCP-1 抗体的其他治疗用途

[0200] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种传染病的方法,所述传染病包括但不限于,下列中的至少一种:急性或慢性细菌感染,急性和慢性寄生虫或传染性过程,包括细菌、病毒和真菌感染,HIV 感染/HIV 神经病,脑膜炎,肝炎(甲型、乙型或丙型等),脓毒性关节炎,腹膜炎,肺炎,会厌炎,大肠杆菌 0157:h7,溶血尿毒症综合征/溶解血栓性血小板减少性紫癜,疟疾,登革出血热,利什曼病,麻风病,中毒性休克综合征,链球菌性肌炎,气性坏疽,结核分枝杆菌,细胞内鸟分枝杆菌,卡氏肺囊虫性肺炎,骨盆炎症性疾病,睾丸炎/附睾炎,军团杆菌,lyme 病,a 型流行性感冒,EB 病毒,vital-associated hemaphagocytic syndrome,重要脑炎/无菌性脑膜炎等。

[0201] 本发明的任何方法都可以包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的、包含至少一种抗 MCP-1 抗体的组合物或药物组合物。此类方法可以任选进一步选自下列的至少一种:至少一种 TNF 拮抗剂(例如但不限于 TNF 抗体或片段,可溶性 TNF 受体或其片段、融合蛋白,或小分子 TNF 拮抗剂),抗风湿药(例如氨甲蝶呤、醋硫葡金、葡糖硫金、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟洛米、柳氮磺吡啶),肌肉松弛药,麻醉药,非类固醇消炎药(NSAID),止痛剂,麻醉剂,镇静剂,局部麻醉剂,神经肌肉阻断剂,抗微生物剂(例如氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂),抗牛皮癣剂,皮质类固醇(地塞米松),促蛋白合成类固醇(睾酮),糖尿病相关剂,矿物质,营养物,甲状腺剂,维生素,钙相关激素,止泻剂,止咳药,止吐剂,抗溃疡药,缓泻药,抗凝剂,促红细胞生成素(例如重组人类红细胞生成素 α),非格司亭(例如 G-CSF,重组人粒细胞集落刺激因子),沙格司亭(GM-CSF,白细胞素),免疫接种,免疫球蛋白(利妥昔单抗),免疫抑制剂(例如 basiliximab、环孢菌素、daclizumab),生长激素,激素拮抗剂,生殖激素拮抗剂(氟利坦、尼鲁米特),激素释放调节剂(亮丙瑞林,性瑞林),激素替代药物,雌激素受体调节剂(他莫西芬),类视黄醇(维甲酸),拓扑异构酶抑制剂(依托泊苷、依立替康),cytotoxin(阿霉素),散瞳剂,睫状肌麻痹药,烷化剂(卡铂),氮芥(美法仑,苯丁酸氮芥(chlorambucil)),亚硝基脲(卡莫司汀、雌莫司汀),抗代谢物(氨甲蝶呤、阿糖胞苷、氟尿嘧啶),有丝分裂抑制剂(长春新碱、紫杉醇),防辐射药物(碘 131-托西莫单抗(tositumomab)),辐射敏化剂(米索硝唑、替拉扎明),抗抑郁药,抗躁狂剂,抗精神病药,抗焦虑药,催眠药,拟交感神经药,兴奋剂,多奈哌齐,单满吡啶氨,哮喘药, β 激动剂,吸入类固醇,白细胞三烯抑制剂,甲基黄嘌呤,色甘酸,肾上腺素或类似物,阿法脱氧核糖核酸酶(Pulmozyme),细胞因子(干扰素 α -2、IL-2)或细胞因子拮抗剂(英夫单抗(infliximab))。合适的剂量是本领域众所周知的。参见,例如 Wells 等人,eds., Pharmacotherapy Handbook,第 2 版,Appleton and Lange, Stamford, CT(2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA(2000),所述参考文献各自整体引入本文作为参考。

[0202] 用于治疗肿瘤性疾病的具体组合包含通过在抗肿瘤药(antineoplastic agent)施用之前、同时和/或之后共施用或组合治疗,所述抗肿瘤药例如烷化剂、氮芥、亚硝基脲(nitrosurea)、抗生素、抗代谢物、激素激动剂或拮抗剂、免疫调节剂等。对于在转移性黑色素瘤和其他肿瘤性疾病中的使用,优选组合是抗体与氮烯米胺、干扰素 α 、白细胞介素-2、

替莫唑胺、顺铂、长春碱、甲磺酸伊马替尼 (Imatinib Mesylate)、卡莫司汀、紫杉醇等共施用。对于转移性黑素瘤,氮烯米胺是优选的。

[0203] 11. 施用剂量和方法

[0204] 本发明的方法可以包括用于治疗 MCP-1 介导的病症的方法,包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的、包含至少一种抗 MCP-1 抗体的组合物或药物组合物。此类方法可以任选进一步包括用于治疗此类疾病或病症的共施用或组合治疗,其中所述至少一种抗 MCP-1 抗体、其特定部分或变体的施用进一步包含在选自下列的至少一种施用之前、同时和 / 或之后施用:肾药、皮肤病学 (dermatological) 药物、抗血管生成药、抗感染药,心血管 (CV) 系统药物,中枢神经系统 (CNS) 药物,自主神经系统 (ANS) 药物,呼吸道药物,胃肠 (GI) 道药物,激素药物,用于流体或电解质平衡的药物,血液学药物,抗癌药,免疫调谐药物,眼、耳或鼻药物,局部药物,营养药物等,至少一种 TNF 拮抗剂 (例如但不限于 TNF 抗体或片段,可溶性 TNF 受体或其片段、融合蛋白,或小分子 TNF 拮抗剂),抗风湿药 (例如氨甲蝶呤、醋硫葡金、葡糖硫金、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟洛米、柳氮磺吡啶),肌肉松弛药,麻醉药,非类固醇消炎药 (NSAID),止痛剂,麻醉剂,镇静剂,局部麻醉剂,神经肌肉阻断剂,抗微生物剂 (例如氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生物剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺类药物、四环素、另一种抗微生物剂),抗牛皮癣剂,皮质类固醇,促蛋白合成类固醇,糖尿病相关剂,矿物质,营养物,甲状腺剂,维生素,钙相关激素,止泻剂,止咳药,止吐剂,抗溃疡药,缓泻药,抗凝剂,促红细胞生成素 (例如重组人类红细胞生成素 α),非格司亭 (例如 G-CSF, 重组人粒细胞集落刺激因子),沙格司亭 (GM-CSF, 白细胞素),免疫接种,免疫球蛋白,免疫抑制剂 (例如 basiliximab、环孢菌素、daclizumab),生长激素,激素替代药物,雌激素受体调节剂,散瞳剂,睫状肌麻痹药,烷化剂,抗代谢物,有丝分裂抑制剂,防辐射药物,抗抑郁药,抗躁狂剂,抗精神病药,抗焦虑药,催眠药,拟交感神经药,兴奋剂,多奈哌齐,甲满吡啶氨,哮喘药, β 激动剂,吸入类固醇,白细胞三烯抑制剂,甲基黄嘌呤,色甘酸,肾上腺素或类似物,阿法脱氧核糖核酸酶 (Pulmozyme),细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类药物是本领域众所周知的,包括关于本文提出的每一种的配制、适应症、给药和施用 (参见,例如 Nursing 2001 Handbook of Drugs,第 21 版, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's DrugGuide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells 等人, ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, 所述参考文献各自整体引入本文作为参考)。

[0205] 一般地,病理性状况的治疗通过施用有效量或剂量的至少一种抗 MCP-1 抗体组合物来完成,取决于组合物中包含的比活性,所述组合物总计为平均至少约 0.01-500 毫克至少一种抗 MCP-1 抗体 / 千克患者 / 剂,且优选至少约 0.1-100 毫克抗体 / 千克患者 / 单次或多次施用。可替代地,有效血清浓度可以包含 0.1-5000 μ g/ml 血清浓度 / 单次或多次施用。合适的剂量是医学从业者已知的,且当然将依赖具体疾病状态、待施用组合物的比活性、以及接受治疗的具体患者。在某些情况下,为了达到所需治疗量,可能必须提供重复施用,即特定监控或计量剂量的重复个别施用,其中所述个别施用可以重复直至达到所需日剂量或作用。

[0206] 优选剂量可以任选包括 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、

7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 和 / 或 100-500mg/kg/ 施用,或其任何范围、值或分数,或达到下列血清浓度:0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500 和 / 或 5000 μ g/ml 血清浓度 / 单次或多次施用,或其任何范围、值或分数。

[0207] 可替代地,施用的剂量可以依已知因素而变,所述因素例如具体试剂的药物动力学特征,及其施用方式和途径;受体年龄、健康和重量;症状性质和程度、目前治疗种类、治疗频率和所需作用。通常活性成分的剂量可以是约 0.1-100 毫克 / 千克体重。通常 0.1-50,且优选 0.1-10 毫克 / 千克 / 施用或缓释形式对于达到所需结果是有效的。

[0208] 作为非限制性例子,人或动物的治疗可以在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 天中的至少一天,或可替代地或另外地,在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51 或 52 周中至少一周,或可替代地或另外地,在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 年中的至少一年,或其任何组合,使用单次、输注或重复剂次,作为 0.1-100mg/kg 的一次或定期剂量的本发明至少一种抗体提供,例如 0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90 或 100mg/kg/ 天。

[0209] 适合于内部施用的剂型(组合物)一般包含约 0.001 毫克-约 500 毫克活性成分 / 单位或容器。在这些药物组合物中,活性成分一般将以基于组合物总重量的约 0.5-99.999 重量%的量存在。

[0210] 对于肠胃外施用,抗体可以配制为溶液、悬浮液、乳剂、颗粒、粉末或冷冻干燥粉末,它们与药学可接受的肠胃外载体结合或分开提供。此类载体的例子是水、盐水、林格溶液、葡萄糖溶液、和 1-10% 的人血清清蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体,例如固定化油。载体或冷冻干燥粉末可以包含维持等渗性(例如氯化钠、甘露醇)和化学稳定性(例如缓冲剂和防腐剂)的添加剂。制剂可以通过已知或合适技术进行灭菌。合适的药学载体在 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol 的最近版本中得到描述,所述参考文献是这个领域的标准参考文本。

[0211] 可替代的施用。许多已知和开发的方式可以依照本发明使用以施用药学有效量的根据本发明的至少一种抗 MCP-1 抗体。尽管在下文说明书中使用肺施用,但其他施用方式也可以根据本发明使用,产生合适的结果。本发明的 MCP-1 抗体可以使用适合于通过本文

描述的或本领域已知的吸入或其他方式施用的多种装置和方法中的任何一种,在载体中作为溶液、乳剂、胶体或悬浮液、或作为干粉进行递送。

[0212] 肠胃外制剂和施用。用于肠胃外施用的制剂可以包含作为普通赋形剂的无菌水或盐水、聚亚烷基二醇例如聚乙二醇、植物来源的油、氢化萘等。用于注射的水性或油性悬浮液可以通过使用合适的乳化剂或湿润剂和悬浮剂根据已知方法进行制备。用于注射的试剂可以是无毒的、非经口施用的稀释剂,例如溶于溶剂的水溶液或无菌注射液或悬浮液。作为可用的载体或溶剂,水、林格溶液、等渗盐水等是允许的;作为普通溶剂或悬浮溶剂,可以使用无菌不挥发性油。为了这些目的,可以使用任何种类的不挥发性油和脂肪酸,包括天然或合成或半合成脂肪油或脂肪酸;天然或合成或半合成甘油单酯、或甘油二酯、或甘油三酯。肠胃外施用是本领域已知的,且包括但不限于如本领域众所周知的常规注射方法、气压无针注射装置、或激光穿孔装置(例如但不限于美国专利号 5,851,198 和美国专利号 5,839,446 中公开的材料和方法,所述专利整体引入本文作为参考)。

[0213] 可替代的递送。本发明进一步涉及通过下列方式施用至少一种抗 MCP-1 抗体:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、快速灌注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮方式。至少一种抗 MCP-1 抗体组合物可以制备用于肠胃外(皮下、肌内或静脉内)或特别是以液体溶液或悬浮液的形式任何其他施用;用于以阴道或直肠施用特别是半固体形式使用,例如但不限于乳膏和栓剂;用于口腔或舌下施用例如但不限于片剂或胶囊的形式;或鼻内,例如但不限于粉末、鼻滴剂或气溶胶或某些试剂的形式;或经皮,例如但不限于,凝胶、软膏、洗剂、悬浮液或贴剂递送系统,其含化学增强剂例如二甲基亚砜以修饰皮肤结构或增加经皮贴剂中的药物浓度(Junginger 等人 In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., 第 59-90 页 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, 整体引入本文作为参考),或含氧化剂,其使得包含蛋白质和肽的制剂能够应用在皮肤上(WO 98/53847),或应用电场以产生瞬间转运途径,例如电穿孔,或增加带电药物通过皮肤的运动性,例如离子电渗疗法,或应用超声,例如超声波导入术(sonophoresis)(美国专利号 4,309,989 和 4,767,402)(上述出版物和专利整体引入本文作为参考)。

[0214] 肺/鼻施用。对于肺施用,优选至少一种抗 MCP-1 抗体组合物以有效用于达到肺或窦的下部气道的颗粒大小递送。根据本发明,至少一种抗 MCP-1 抗体可以通过本领域已知的用于通过吸入施用治疗剂的多种吸入或鼻装置中的任何一种递送。能够在患者的窦腔或肺泡中沉积气溶胶化制剂的这些装置包括计量剂量的吸入器、雾化器、干粉产生器、喷雾器等。适合于指引抗体的肺或鼻施用的其他装置也是本领域已知的。所有此类装置都可以使用适合于以用于以气溶胶形式分配抗体施用的制剂。此类气溶胶可以包含溶液(水性或非水性)或固体颗粒。计量剂量吸入器如 Ventolin[®] 计量剂量吸入器,一般使用推进气体且在吸气期间需要启动(参见,例如,WO 94/16970, WO 98/35888)。干粉吸入器如 Turbuhaler[™](Astra)、Rotahaler[®](Glaxo)、Diskus[®](Glaxo)、Spiros[™]吸入器(Dura)、由 Inhale Therapeutics 销售的装置,和 Spinhaler[®]粉末吸入器(Fisons),使用混合粉末的呼吸-启动(US 4668218 Astra, EP237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552

Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, 所述专利整体引入本文作为参考)。雾化器如 AERx™ Aradigm、Ultravent® 雾化器 (Mallinckrodt)、和 Acorn II® 雾化器 (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, W097/22376), 上述参考文献整体引入本文作为参考, 由溶液产生气溶胶, 而计量剂量吸入器、干粉吸入器等产生小颗粒的气溶胶。这些商购可得的吸入装置的具体例子意在代表适合于本发明实践的具体装置, 且不意在是本发明范围的限制。优选地, 包含至少一种抗 MCP-1 抗体的组合 物由干粉吸入器或喷雾器递送。对于施用本发明的至少一种抗体, 吸入装置有几个所需的特征。例如, 通过吸入装置递送有利地是可靠的、可再现的和精确的。为了良好的可呼吸性, 吸入装置可以任选递送小的干燥颗粒, 例如小于约 $10\ \mu\text{m}$, 优选约 $1\text{--}5\ \mu\text{m}$ 。

[0215] 实施例 1 : 作为非限制性例子使用噬菌体展示产生对 MCP-1 特异的 MCP-1 抗体

[0216] 申请人先前已显示鼠抗人 MCP-1 抗体的有利的治疗特征, 所述抗体命名为 C775 且在申请人共同未决的专利申请美国系列号 11/170453 (那个申请关于重和轻链可变区分别为 SEQ ID NO : 7 和 8) 和相关文件中描述。本次努力的目标是从 HuCAL GOLD® 中鉴定至少一种人抗体, 所述抗体中和人细胞因子 MCP-1 的生物学活性且显示相似属性。C775 抗体, 以及因此所需的人抗 MCP-1 抗体的属性由下文概述的成功标准限定。

[0217] 至少一种治疗抗体的成功标准:

[0218] 以固相形式与人 MCP-1 结合;

[0219] 特异性限定为在 100nM 时缺乏与同源蛋白质人 MCP-2、3、4 以及人嗜酸性粒细胞趋化因子 1、2 和 3 的结合;

[0220] 抑制人 MCP-1 与其在 Thp-1 细胞上的人受体 CCR2 的结合, 且 IC₅₀ 值小于参考 Fab C775;

[0221] 抑制人 MCP-1 介导的 THP-1 细胞的趋化性, 且 IC₅₀ 值小于参考 Fab C775;

[0222] 在次级生物测定 (例如 Ca²⁺ 动员或 CCL-2 诱导的受体内在化) 中抑制人 MCP-1 介导的活性, 作为定性的是 / 非标准, 或在定量测定中具有与参考 Fab C775 可比较的效力;

[0223] 与人 MCP-1 结合的 K_d < 0.5nM;

[0224] 与短尾猴 MCP-1 结合的 K_b < 20nM, 且优选 < 10nM;

[0225] 以可比较的效力抑制天然人 MCP-1 和化学合成的人 MCP-1 的生物活性;

[0226] 在 Fab 再工程改造成 IgG 后、且在 C775 的全长 IgG 形式作为比较物 (comparator) 的基础上保留标准 1-8。

[0227] 选择过程概述

[0228] 使用 HuCAL GOLD® 进行了 10 次不同的淘选, 且筛选了 17856 个克隆, 从而产生 1104 个初步命中。最后在 ELISA 中鉴定了结合合成的人 MCP-1 的 26 个独特 Fabs。在那些中, 根据亲和力、生物活性、特异性以及与短尾猴和天然人 MCP-1 的结合选择 7 个不同的 Fabs 用于亲和力成熟。亲本 Fabs 的亲和力为 10-400nM, 且在放射性配体结合测定中的 IC₅₀ 值为 10-600nM。

[0229] 材料和方法

[0230] DNA 限制和修饰酶以及聚合酶购自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、New England Biolabs (Beverly, MA, USA)、Roche Diagnostics (Mannheim, 德国) 和 MBI

Fermentas(Vilnius, 立陶宛)。特异性 POD 缀合的山羊抗人 IgG F(ab')₂ 片段由 Jacksons(West Grove, PN, USA) 提供, 绵羊抗人 IgG、Fd 片段特异性抗体由 The Binding Site(Birmingham, UK) 提供, 且与碱性磷酸酶缀合的链霉抗生物素蛋白 (ZyMAX_{TM} 级别) 由 Zymed Laboratories(San Francisco, CA, USA) 提供。重组人细胞因子 hMCP-1、2、3、4 以及 hEotaxin 1、2 和 3(R&D systems) 试剂、配体和抗体:mAb 279, 对 MCP-1 特异(R&D systems); 合成 hMCP-1(Bachem); mAb1 小鼠抗 hCCR2 生物素 (R&D systems); 人 γ 球蛋白 (Jackson Immuno Research); 小鼠 γ 球蛋白 (Jackson ImmunoResearch); mAb mIgG2b 同种型对照生物素 (R&D systems); 链霉抗生物素蛋白-PE (BD Pharmingen); Versene(Invitrogen); PBS(Invitrogen). FCS(PAN); V 底孔板 (Greiner); 和 U 底孔板 (Nunc)。

[0231] MCP-1 多肽和类似物的制备。如申请人的共同未决的申请美国系列号 No. 60/682620 和 Kruszynski 等人 2006, J Peptide Sci. 12:25-32 中描述的, 分步固相肽合成和亲和纯化以提供分离的、全长、成熟 (76 个氨基酸) 以及正确折叠和任选修饰的人 MCP-1 和变体, 其具有生物学活性。设计成显示天然表面拓扑学和肽主链结构的变体包括 A40S、V41I 和 F43Y。化学合成也提供了使用 K69 和 K75 处的赖氨酸的 ϵ -氨基用于人 MCP-1 位点特异性生物素化的方法, 所述赖氨酸不涉及受体结合或表面活性、在结构中是紊乱的 (美国系列号 60/682620 和 Kruszynski 等人 2006, J Peptide Sci. 12:354-360)。4 个乙烯氧基单位 (PEG4) 的亲水间隔基插入生物素和赖氨酸残基的 ϵ -氨基之间。从生物素酰胺到末端羰基的链长是 19.2 Å。选择间隔基以增加溶解性且提供足够的间隔基长度以用于结合链霉抗生物素蛋白缀合物。MCP-1 和变体的序列在 SEQ IDNO:1 中提供。测定变体保留在 THP-1 细胞中诱导 Ca²⁺ 动员的能力。生物素-Lys⁶⁹ 和生物素-Lys⁷⁵ MCP-1 在筛选、固结和亲和力测定中并排进行比较, 且没有观察到显著差异。使用 Biacore, 35 个最优化的 Fabs 对链霉抗生物素蛋白芯片上固定的 MCP-1 Ile⁴¹, Lys(生物素-PEG₄)⁶⁹ 和 MCP-1 Ile⁴¹, Lys(生物素-PEG₄)⁷⁵ 平行进行分析。一般而言对 MCP-1K69 和 K75 测量的亲和力是可比较的。

[0232] 噬菌体 Fab 文库。噬菌粒文库基于 HuCAL[®] 概念 (Knappik 等人, 2000), 且使用 CysDisplayTM 技术用于在噬菌体表面上展示 Fab (Löhning, 2001)。文库编码作为与小外壳蛋白 pIII 的融合物、在 M13 噬菌体上展示的大约 10¹⁰ 个独特的 Fabs。对于选择, 将 HuCAL GOLD[®] 抗体-噬菌体分成包含不同 VH 主基因的 3 个库。此外在 1 个库 (VH1-6) 中使用完整文库。对于每次淘选使用 2×10¹³ HuCAL GOLD[®] 输入噬菌体。应用 4 种不同的淘选策略, 包括分别对人 MCP-1 类似物 -1 (V41I, Ile⁴¹) 和类似物 -2 (F43Y, Tyr⁴³) 的 3 轮淘选, 以及按照 1-2-1 和 2-1-2 的顺序对类似物的 2 次交替淘选。

[0233] 固相淘选。在 PBS, pH7.4 中 50 μ g/ml 的 100 μ l 等分试样的人 MCP-1 类似物 -1 (V41I) 或类似物 -2 (F43Y) 直接包被在 Maxisorp[®] 孔上 (Nalgen Nunc, Rochester, NY) 于 4°C 过夜。包被的孔进行洗涤且用 5% MPBS (PBS, 5% 低脂乳粉) 封闭。每孔加入 100 μ l 封闭的 HuCALGOLD[®] 噬菌体于 RT 2 小时。几个洗涤步骤后, 结合的噬菌体通过溶于

10mM Tris/HCl, pH8.0 的 100 μ l 20mM DTT 进行洗脱,于 RT 温育 10 分钟。洗脱物用于感染中期大肠杆菌 TG1 (Stratagene, Amsterdam, 荷兰),且噬菌粒如所述的进行扩增 (Krebs 等人,2001)。

[0234] 针对人 MCP-1 类似物 -1 (V41I) 和类似物 -2 (F43Y) 的半溶液淘选产生中和 Fab 分子。半溶液淘选通过下列进行:将 2 种生物素化的人 MCP-1 衍生物 -V41I, K69-PEG-生物素或 V41I, K75-PEG-生物素 (SEQID NO:1) 与 HuCAL GOLD[®] 噬菌体在溶液中温育,随后使噬菌体抗原复合物捕获至 Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条 (PERBIO)。对于淘选,1.5ml Eppendorf 管于 4°C 用由 PBS 0/N1 : 1 稀释的 Chemiblocker (Chemicon International) 封闭。下一天 Reacti-Bind[™] NeutrAvidin[™] (Pierce, Rockford, IL, USA) 微量滴定板条 (结合能力:25 皮摩尔生物素/孔;PERBIO) 用 2 $\times$ 300 μ l PBS 漂洗,这是减少 neutravidin 结合剂的数目的 2 个预先吸附步骤所需的。每孔加入在 100 μ l 50% Chemiblocker (Chemicon),0.05% Tween 20 (Sigma) 中来自 HuCAL GOLD[®] 文库的 2 $\times$ 10¹³ 个噬菌体,且于 RT 轻微振荡封闭 1 小时。对于第 2 个预先吸附步骤,将噬菌体溶液转移至新 Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条,且于 RT 轻微振荡温育 1 小时。随后向预先封闭的 1.5ml Eppendorf 管中加入预先吸附的噬菌体和生物素化的抗原 (对于生物素化生物素与抗原的比率为 3 : 1;终浓度为 200nM),且于 RT 在旋转轮上进行 1 小时温育。平行地,进一步的 Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条用 2 $\times$ 300 μ l PBS 漂洗,用由 PBS 1 : 1 稀释的 300 μ l Chemiblocker 封闭 1 小时,且用 1 $\times$ 300 μ l PBS 洗涤。100 μ l/孔的生物素-抗原-噬菌体复合物用移液管移液到微量滴定板条内,且于 RT 轻微振荡温育 1 小时。几个洗涤步骤后,结合的噬菌体通过溶于 10mM Tris/HCl, pH8.0 的 110 μ l 20mM DTT 进行洗脱,于 RT 温育 10 分钟。洗脱物用于感染中期大肠杆菌 TG1 (Stratagene, Amsterdam, 荷兰),且噬菌粒如所述的进行扩增 (Krebs 等人,2001)。

[0235] 所选 Fab 片段的亚克隆和微量表达 (Microexpression)。为了促进可溶性 Fab 的快速表达,编码所选 HuCAL GOLD[®] 噬菌体插入片段的 Fab 经由 XbaI 和 EcoRI 亚克隆到表达载体 pMORPH[®] X9_FH 内。Fab 片段携带 C 末端 FLAG[™] 标记 (Prickett 等人,1989) 和作为第二个 C 末端标记的 6x His 标记 (Chen 等人,1994)。TG1-F⁻ 转化后,如先前所述进行包含 HuCAL[®]-Fab 片段的周质提取物的单个克隆表达和制备 (Rauchenberger 等人,2003)。

[0236] 如上所述进行对人 MCP-1 类似物 -1 (V41I) 的固相形式的结合测定法。封闭后加入周质提取物。通过与山羊抗人 IgG, F(ab')₂ 片段特异性抗体温育进行 Fab 片段的检测。

[0237] 对固定化的生物素化 hMCP-1 V41I 的筛选使用 Reacti-Bind[™] NeutrAvidin[™] 384 孔板 (Pierce, Rockford, IL, USA) 进行,所述 384 孔板用在 PBS, pH7.4 中稀释的 20 μ l 0.5 μ l/ml 生物素化的 hMCP-1 类似物 -1 (V41I) 或类似物 -2 (F43Y) 包被,于 4°C 进行 16 小时。用溶于 TBS,0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 中的 1% BSA 于 RT 封闭 1 小时后,加入周质提取物。通过与山羊抗人 IgG, F(ab')₂ 片段特异性抗体温育进行 Fab 片段的检测。

[0238] 对生物素化 hMCP-1 类似物 -1 (V41I) 的固相筛选通过下列进行:用在 PBS, pH7.4

中 1 : 1000 稀释的 20 μ l 绵羊抗人 IgG, Fd 片段特异性抗体于 4℃ 包被 Maxisorp (Nunc, Rocheoter, NY, USA) 384 孔板 16 小时。用溶于 TBS, 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 中的 3% BSA 于 RT 封闭 2 小时后, 加入周质提取物。随后允许捕获的 HuCAL[®]-Fab 片段与溶于 TBS 中的 0.2 μ g/ml 生物素化的 hMCP-1 类似物 -1 (V41I) 结合, 所述结合通过与缀合至碱性磷酸酶的链霉抗生物素蛋白温育, 随后加入 Attophos 荧光底物 (Roche Diagnostics, Mannheim, 德国) 进行检测。记录用 430nm 处的激发在 535nm 处的荧光发射。

[0239] 生物活性测定

[0240] 细胞培养。所有细胞在标准化条件下于 37℃ 和 5% CO₂ 在湿润培养箱中进行培养。表达 CCR2 的细胞在标准培养基中生长。另外, THP-1 细胞 (人急性单核细胞性白血病细胞) 在包含 2mM L-谷氨酰胺、1.5g/L 碳酸氢钠、4.5g/L 葡萄糖、10mM HEPES 和 1.0mM 丙酮酸钠, 90% ; 10% 胎牛血清 (FBS; Vitacell RPMI 20-2001, ATCC, Manassas, VA) 的 RPMI 中以 4-8 $\times 10^5$ 细胞 / mL 的密度于 37℃ 和 5% CO₂ 进行培养

[0241] 放射性配体结合测定。竞争测定在微孔过滤器板 (Millipore, Bedford, MA) 中进行。1 $\times 10^6$ THP-1 细胞 / 孔与 ¹²⁵I-MCP-1 (1ng/mL; Perkin Elmer Life Science, Boston, MA), 连同不同浓度的重组人 (rh) MCP-1 (279-MC, R&D Systems, Minneapolis, MN) 或合成蛋白质温育。所有试剂都在由 RPMI Medium 1640 (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) 和 0.1% BSA 组成的结合缓冲液中进行稀释。允许竞争于 RT 进行 1 小时, 且孔用 150 μ l / 孔洗涤缓冲液 (结合缓冲液 + 1 M NaCl) 洗涤 3 次。过滤器上的放射性使用 Wallac Wizard 1470 Automatic GammaCounter (Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, MA) 进行计数。计算可变剂量的重组或合成 MCP-1 对 ¹²⁵I-MCP-1 与 CCR2 结合的抑制百分比。随后将抑制百分比值输入 Graphpad Prism 程序中, 且使用 S 形剂量应答曲线用可变斜率以及底部 = 0 和顶端 = 100 的常数进行作图。

[0242] 钙动员测定。Ca²⁺ 动员测定以 96 孔的形式进行, 其中使用 the FLEXstation[™] Ca²⁺Plus Assay Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 根据制造商关于非贴壁细胞的规程和 FLEXstation[™] (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)。将 RFU 峰值输入 Graphpad Prism 中用于分析。

[0243] MCP-1 诱导的 CCR2 受体内在化 FACS 测定。最优化配体浓度 (合成 MCP-1 的 EC₅₀ ~ 100ng/ml) 和温育时间 (1 小时后大多数内在化已发生) 后, 通过加入不同浓度的抗体测定 IC₅₀。培养的 CCR2 表达细胞用 PBS 洗涤, 且于 37℃ 用 Versene (Invitrogen) 分离约 10 分钟。细胞的所有离心步骤为约 200Xg。细胞用 FACS 缓冲液 (PBS/3% FCS) 洗涤 2 次, 计数且检测生存力 (台盼蓝)。96V 底孔板 (Greiner) 每孔装满在 100 μ l 中的 ~ 2.5 $\times 10^5$ 细胞且置于冰上。在 96U 底孔板 (Nunc) 中, 抗体在细胞培养基 (MEME) 中进行稀释以产生一式三份样品中的约 200 μ g/ml 直到 0,001 μ g/ml。不同浓度的抗体与终浓度为 100ng/ml 的合成 MCP-1 (Bachem) 于 RT 预温育 10 分钟。细胞用预温育的 100 μ l MCP-1 / 抗体混合物重悬浮且于 37℃ 在培养箱中温育 1 小时用于受体内在化。内在化后, 细胞用 180 μ l 冷 FACS 缓冲液洗涤 1 次, 且对于所有后续步骤板必须维持在冰上以阻止进一步的内在化。生物素化的小鼠抗 hCCR2mAb (R&D Systems) 在 FACS 缓冲液中 1 : 10 稀释。作为对照, 小鼠 IgG2b 同种型生物素 (Isotype Biotin)mAb (R&D Systems) 同样在 FACS 缓冲液中 1 : 10 稀释。将终浓度为 10 μ g/ml 的人和小鼠 γ 球蛋白 (Jackson Immuno Research) 的 1 : 1 混合物加

入抗 hCCR2 和对照 mAb 以封闭 Fc 受体。细胞在 50 μ l 抗 CCR2/ γ 球蛋白混合物（或对照 IgG2b/ γ 球蛋白混合物）中重悬浮，且在冰上温育 1 小时。细胞用 180 μ l FACS 缓冲液洗涤 2 次，在 50 μ l 1 : 400 稀释的链霉抗生物素蛋白-PE (BD Pharmingen) 中重悬浮，且在黑暗中在冰上于 4℃ 温育 1 小时。细胞用 180 μ l FACS 缓冲液洗涤 2 次，在 100 μ l 2% PFA/PBS 中重悬浮，且于 4℃ 贮存过夜用于固定（可替代地无需 PFA 固定的直接测定也是可能的）。对于 FACS 测量，细胞用 200 μ l FACS 缓冲液重悬浮且各自计数至少 5000 个细胞。

[0244] 亲和力测定

[0245] 关于 K_D 测定的溶液平衡滴定 (SET) 法和使用 BioVeris 的交叉反应性研究。溶液中的亲和力测定基本上如文献 (Friguet 等人, 1985) 中所述的进行。为了改善 SET 法的灵敏性和精确性，它从经典 ELISA 转移到基于 ECL 的 BioVeris 技术 (Haenel 等人, 2005, 被接受用于在 Analytical Biochemistry 中出版)。1mg/ml 山羊抗人 (Fab)₂ 或山羊抗小鼠 IgG, Fc 片段特异性抗体 (Jackson Immuno Research) 用 BV-tagTM NHS-Ester (Bioveris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 根据制造商的说明书进行标记。实验在聚丙烯微量滴定板中进行，且含 0.5% BSA 和 0.02% Tween 20 的 PBS pH7.4 作为测定缓冲液。未标记的抗原以 4n 系列进行稀释：对于人和短尾猴 MCP-1，选择 10pM-40nM 的浓度范围，且对于交叉反应性对照（嗜酸性粒细胞趋化因子和 MCP-2）选择 40pM-160nM 的浓度范围。不含抗原的孔用于测定 S_{max} 值。加入 100pM Fab 或 IgG（在 75 μ l 终体积中的终浓度）后，混合物于 RT 温育 2 小时。随后每孔加入用 0.25 μ g/ml 生物素化的 MCP-1 (K69) 包被的 25 μ l Dynabeads (0.4 mg/ml M-280 链霉抗生物素蛋白, DYNAL, Hamburg)、和对于抗人 Fab 终稀度为 1 : 4000 或对于抗小鼠 IgG 终稀度为 1 : 2000 的 BV 标签标记的检测抗体的混合物。于 RT 在 Eppendorf 摇动器 (700rpm) 上温育 30 分钟后，使用 M-384 SERIES[®] Workstation (Bioveris Europe) 检测电化学发光信号。数据使用 Origin 5.0 (Microcal) 软件应用定制的拟合模型进行评估（对于 Fab : Haenel 等人, 2005, 被接受用于在 Analytical Biochemistry 中出版；对于 IgG : 根据 Piehler 等人, 1997）。

[0246] 对直接包被的抗原的 Biacore K_D 测定。动力学常数 k_{on} 和 k_{off} 使用与共价固定化 MCP-1 结合的系列稀释的各自 Fab、使用 BIAcore 3000 仪器 (Biacore, Uppsala, 瑞典) 进行测定。对于共价抗原固定化，使用标准 EDC-NHS 胺偶联化学。动力学测量在 PBS (136mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄ pH7.4) 中以 20 μ l/分钟的流速使用 1.5-500nM 的 Fab 浓度范围进行。关于每种浓度的注射时间是 1 分钟，随后为 3 分钟的解离相。对于再生使用 5 μ l 10mM HCl。所有传感图 (sensograms) 都使用 BIA 评估软件 3.1 (Biacore) 进行拟合。对生物素-K69 人 MCP-1 和短尾猴 MCP-1 的 Biacore K_D 测定。生物素-K69 人 MCP-1 和生物素化的短尾猴 MCP-1 包被至链霉抗生物素蛋白芯片表面，且短尾猴 MCP-1 直接包被至 CM5 芯片。Fabs 的结合使用标准方法进行测试。

[0247] 在抗体捕获模式中的 Biacore K_D 测定。Fabs 在 CM5 芯片（流速 5 μ l/分钟）上用抗 hFab (s. 3.15) 以 500nM 进行捕获，注射每种类似物 (MCP1、2、3、4 以及嗜酸性粒细胞趋化因子、嗜酸性粒细胞趋化因子-2 和 -3) 的溶液。所有细胞因子是无载体的且以 15-500nM 的浓度（对于亲本 Fabs 在最优化前）用作分析物用于亲和力测定。传感图使用 BIAevaluation 软件进行分析。在抗体捕获模式中对 MCP-1 的 Biacore 亲和力测定对于最优化的结合剂是不可能的，因为达到了 Biacore 的检测极限。

[0248] 对于 Fabs 的特异性分析,使用表面等离子体共振 (Biacore 3000, Uppsala, 瑞典),其中使用捕获测定。Fabs 被捕获且各种蛋白质 (MCP-2、-3、-4 以及嗜酸性粒细胞趋化因子-1、-2 和 -3) 用作分析物。在所有 4 个流动室上,CM5 芯片 (Biacore, 瑞典) 用 6500-8000 RU 抗-F(ab)₂ (Dianova, Affipure F(ab)₂ 片段山羊抗人 IgG, F(ab)₂ 片段特异性;10mM 乙酸盐缓冲液, pH4.5) 包被,其中使用标准 EDC-NHS 胺偶联化学。流动室 2-4 用特异性抗 MCP-1 Fabs (流速为 10 μ l/ml 的 20 μ l 1500nM Fab, 产生 300-400RU 的捕获密度) 进行捕获。Fabs 捕获后,注射浓度为 100nM 的趋化因子 (20 μ l, 流速 20 μ l/分钟, PBS pH7.4)。趋化因子以小等分试样贮存,且对于测量只使用具有最多 1 个冻融循环的新解冻的材料。为了避免由 MCP-1 的解离率、Fab 特异性相互作用和抗 Fab/Fab 相互作用引起的解离率组合,注射缓冲液以测定抗 Fab/Fab 相互作用的解离。达到的血清传感图从特异性 1 中减去。应答单位对在表面上的捕获抗体量进行标准化。

[0249] 在抗体捕获模式中与天然 MCP-1 的结合。方法如上所述使用。天然 MCP-1 从 PANC1 上清液中进行纯化且用于结合分析。在 Fab 捕获模式中与天然 MCP-1 的结合良好地在检测极限上,然而,由于提取物中的杂质混淆了天然 MCP-1 的正确浓度,所以真正的亲和力测量是不可能的。

[0250] 至 IgG 的转化

[0251] 为了表达全长 IgG,重链 (VH) 和轻链 (VL) 的可变结构域片段从 Fab 表达载体中亚克隆到合适的 pMorph_hIg 载体中用于人 IgG1、人 IgG4、嵌合人/小鼠 IgG1 和 IgG2a。限制酶 EcoRI、MfeI、BlnI 用于将 VH 结构域片段亚克隆到 pMorph_hIgG1.1、pMorph_hIgG4.1、pMorph_mIgG1.1 或 pMorph_mIgG2a.1 内,且 EcoRV、BsiWI 用于将 VL 结构域片段分别亚克隆到 pMorph_hIg κ _1、pMorph_hIg λ _1、pMorph_mIg κ _1 或 pMorph_mIg λ _1 内。所得到的 IgG 构建体在 CANTO 表达。

[0252] 结果

[0253] 固相淘选对直接包被至 Maxisorp 板的 hMCP-1 (41I) 和 hMCP-1 (43Y) 进行。应用各包含 3 轮选择的 4 种不同的淘选策略。亚克隆到表达载体 pMORPHx9_Fab_FH 内后,对直接包被的 hMCP-1 (41I) 和生物素化的 hMCP-1 进行固相筛选。在初步筛选中总共分析了 8832 个克隆,且获得了 983 个初步命中。最后鉴定了 5 个独特的 Fabs,但所有 5 个 Fabs 在细胞测定中都不中和 MCP-1,从而表明直接包被至 Maxisorp 可能损害了中和表位的构象或至少可接近性。

[0254] 如所述的进行半溶液淘选,在溶液中温育生物素化的人 MCP-1 类似物-1 (V41I) 和类似物-2 (F43Y) 与 HuCAL GOLD[®] 噬菌体,随后捕获噬菌体抗原复合物。应用 2 种不同的主要淘选策略,包括分别对生物素化的人 MCP-1 蛋白质类似物-1 (V41I) 和类似物-2 (F43Y) 的 3 轮淘选 (无交替淘选)。在初步筛选中总共分析了 9024 个克隆,且获得了 121 个初步命中,最后揭示了 18 个独特的结合剂。基于 Luminex 对来自对生物素化的人 MCP-1 蛋白质类似物-1 (V41I) 淘选的 192 个克隆的再筛选导致产生 9 个另外的初步命中和 3 个另外的独特结合剂,从而显示 Luminex 筛选是捕获筛选的合适的可替代筛选方法。从半溶液淘选中鉴定总共 21 个独特的结合剂,且这些结合剂中的 14 个显示中和活性。来自 HuCAL GOLD[®] 的所有中和 Fabs 都来源于这次淘选。

[0255] HuCAL GOLD[®] Fabs 的表征。独特 Fabs 被表达且纯化以用于进一步表征。hMCP-1 的结合亲和力通过 BIAcore 测定且 Fabs 在下列测定中进行表征：1) ¹²⁵I-CCL-2 与 Thp-1 细胞结合的抑制和 2) 在 Thp-1 细胞中 hMCP-2 诱导的 Ca²⁺ 动员的抑制。在基于细胞的测定中显示中和活性的 Fabs 进一步测试 1) 与合成短尾猴 hMCP-2 的结合；2) 与 hMCP-2 家族相关人趋化因子的结合用于结合特异性（即 MCP-2、3、4 以及嗜酸性粒细胞趋化因子 1、2、3）；和 3) 与天然人 hMCP-2 的结合，以确保使用合成 hMCP-2 肽选择的 Fabs 识别天然 hMCP-2。选择具有最佳特性的 7 个 Fabs 用于另外的亲和力成熟。选择用于亲和力成熟的 Fabs 的特性在表 2 中概括。选择用于亲和力成熟的这 7 个 Fabs 分配到 3 个组用于文库克隆和选择。L-CDR3 和 H-CDR2 最优化平行进行。轻和重可变链的平行最优化产生了经由交叉克隆组合改善的重和轻链以产生再进一步改善的抗体的可能性。

[0256] 表 2. 选择用于亲和力成熟的 Fab 候选物的概括。

[0257]

Fab 名称	组	Kd MCP-1 (nM)	放射性 配体 结合	Ca ²⁺ 动员 IC ₅₀ (nM)	特异性	Kd 短尾猴	天然 MCP-1 结合	序列组 Hc _____ Lc
			IC ₅₀ (nM)			[nM]		
MOR 03336	1	60 ± 33	114	526	MCP-1	170 ± 42	是	VH3 / VL-λ3
MOR 03464	1	75 +/- 50	105	1340	MCP-1, 2	175 ± 49	是	VH3 / VL-λ3
MOR 03468	1	ND	255	2000	MCP-1	550 ± 14	ND	VH1B / VL-λ3
MOR 03470	1	46 +/- 1	645	2100	MCP1	145 ± 92	是	VH1B / VL-λ3
MOR 03471	2	94 +/- 6	180	1256	MCP-1	465 ± 106	是	VH1A / VL-κ3
MOR 03473	2	175 +/- 20	184	2900	MCP-1	478 ± 95	是	VH1A / VL-κ3
MOR 03548	3	42	11	124	MCP-1, Eo	54 ± 8	是	VH3 / VL-λ3

[0258] 实施例 2：来自 Fabs 的高亲和力、MCP-1 特异性抗体的评估

[0259] 如指出的，用于亲和力成熟的候选物选择对游离 Fab 形式的候选物进行。选择标准是：在放射性配体结合测定中的活性，在 Ca²⁺ 动员测定中的活性，通过 BIAcore 测量的对人 MCP-1 的亲和力，对人 MCP-1 的特异性，对短尾猴 MCP-1 的亲和力以及在 BIAcore 中检测的与天然 MCP-1 的结合。关于亲本 Fabs 分组的另外标准是在 ELISA 中的 C775 竞争，且基于可变重和轻链的构架家族。成熟候选物作为 IgG 的表征，特别是在趋化性测定中，与成熟选择过程平行进行。

[0260] 选择用于成熟的 7 个 Fabs 分成 3 个不同的序列种类。在 1 类（组 1，表 2）中，Fabs 03336、03464、03468 和 03470 具有 Vλ3 轻链构架与 2 个不同重链构架中的 1 个。Fabs

03336 和 03464 具有 VH3 重链构架,且 Fabs 03468 和 03470 具有 VH1B 重链构架。第 2 类 Fabs(组 2,表 2),03471 和 03473 具有 VH1A 重链构架和 V κ 3 轻链构架。Fab 03548 具有与第 1 类中的 2 个 Fabs 相同的重和轻链构架 (VH3,V λ 3) 但单独维持 (组 3,表 2),因为它具有特别有效的生物活性和与嗜酸性粒细胞趋化因子的结合交叉反应性。关于本文使用的可变区序列分类的完整描述,参见整体引入作为参考的美国专利号 6828422。后来成熟的目标是在增加特异性的同时改善 03548 对 CCL-2 的亲合力。

[0261] 成熟前,在 Biacore Fab 捕获模式中只测定与短尾猴和天然人 MCP-1 的结合而不是亲合力。所有 7 个亲本 Fabs 都显示与短尾猴和天然 MCP-1 结合,这是用于成熟的先决条件。

[0262] 亲本 IgGs 的结合特异性。所有 7 个亲本 Fabs 转化成 IgG1 后,对 IgG 形式重复交叉反应性研究。嗜酸性粒细胞趋化因子 3 与传感器芯片上的葡聚糖表面非特异性结合,且这种非特异性结合可以通过添加羧甲基葡聚糖竞争失去。因为与其他趋化因子的葡聚糖表面的非特异性结合也是可能的,所以在所有 Biacore 特异性测定中添加羧甲基葡聚糖。与 Fabs 相反,2 个 IgGs 没有显示与人 MCP-1 的显著结合,有趣的是满足所有成功标准的所有 4 个最后结合剂都来自 1 个亲本 Fab。

[0263] MCP-1(应答单位)的结合信号通过表面上的捕获抗体的量进行标准化:摩尔结合比率=(结合抗原的 RU/抗原的 MW) $\times$ (mAb 的 MW/表面上捕获的 mAb 的 RU),且小于 0.5 的摩尔结合比率预期是不显著的。4 个 IgGs 显示与 MCP-1 的标准化结合比率 >0.5 且与所有同源趋化因子的标准化结合比率 <0.5 ,且因此在 IgG 水平上称为特异性的。1 个 IgG 也显示与 MCP-2 和嗜酸性粒细胞趋化因子的某些结合,这在 Fab 水平上已得到检测,但这种交叉反应性在 IgG 水平上减少。MOR03468 IgG 的数据未显示。

[0264] I¹²⁵ MCP-1 与 THP-1 细胞结合的抑制 (CNT0)。IgG1 形式的亲本结合剂的中和活性首先在放射性配体结合测定中进行测试。通过添加无关人 IgG1 封闭 THP-1 细胞上的 Fc 受体后,MCP-1 结合的抑制对于所有亲本 IgGs 都是可检测的。4 个 IgGs 显示抑制放射性标记的人 MCP-1 与 THP-1 细胞的抑制,其 IC₅₀ 值在参考 IgG C775 的范围内。

[0265] 钙动员的抑制 (CNT0)。所有亲本 IgGs 都抑制 THP-1 细胞中 MCP-1 诱导的钙动员。4 个 IgGs 显示与参考 IgG C775 比较在较高的抗体浓度上抑制 MCP-1 诱导的钙动员。

[0266] MCP-1 诱导的趋化性的抑制 (CNT0)。因为亲本 Fabs 在趋化性测定中无法测试,所以 MCP-1 诱导的趋化性的抑制以 IgG 形式测试。测试的所有亲本 IgGs 在趋化性测定中都是有活性的,且 4 个 IgGs 显示与参考 IgG C775 比较在较高的抗体浓度上抑制 MCP-1 诱导的趋化性。

[0267] 实施例 3:所选 Fab 通过 L-CDR3/H-CDR2 盒平行交换的亲合力成熟

[0268] 亲合力成熟过程的概括

[0269] 在第 1 轮成熟中,L-CDR3 最优化和 H-CDR2 最优化平行进行。来自每类 Fabs 的 DNA 汇集用于成熟文库构建。来源重链 CDR2 和轻链 CDR3 序列对于每个 DNA 库由随机化序列置换,从而产生 6 个新文库:3 个随机化的 H-CDR2 和 3 个随机化的 L-CDR3 文库。6 个文库各自的多样性超过 10⁸ 个独特的 Fabs。合成 CCL-2 41I-生物素-K69 肽用于溶液淘选或 neutravidin 包被的塑料孔上捕获的生物素-肽淘选。6 个文库各自在各种条件下淘选以富集具有缓慢解离率的 Fabs(即延长的洗涤、减少的抗原浓度)。进行 36 次平行淘选,包

括溶液和半溶液淘选。减少抗原浓度、选择解离率以及延长的洗涤导致产生严格淘选条件。亲和力和筛选借助于基于 BioVeris(以前的 IGEN) 电化学发光 (ELC) 的平台进行,从而允许高通量的亲和力和分等和鉴定具有改善亲和力的 Fab 分子。

[0270] 用于亲和力成熟的文库。因为 H1A 和 H1B 的重链 H-CDR2 文库分别进行克隆,所以克隆了 7 个不同的可变区文库。2 个 H1A 和 H1B 文库随后在选择之前汇集,从而产生 6 个选择文库。文库大小为 10^8 – 8×10^9 。除了 MOR03548 λ 3 L-CDR3 文库外,对于所有文库覆盖了所有理论多样性,在所述 MOR03548 λ 3 L-CDR3 文库中只覆盖了 0.625x 的理论多样性。文库的质量控制通过随机挑选的克隆的测序来进行。75 个序列中的 71 个 (95%) 是正确和多样的,而对于 75 个序列中的 4 个检测出移码。所有亲本 Fabs 的衍生物都在其各自的文库中找到。

[0271] 为了增加所选抗体片段的亲和力和生物学活性, L-CDR3 和 H-CDR2 区域通过盒诱变使用三核苷酸指导的诱变进行平行最优化 (Virnek Ö s 等人, 1994), 而构架区保持恒定。克隆用于亲和力成熟之前, 所有亲本 Fab 片段都经由 XbaI/EcoRI 从相应的表达载体 (pMORPH[®] X9_FH) 转移到 CysDisplay[™] 载体 MORPH[®] 25_LHC 内。pMORPH[®] 25_LHC 由 HuCAL GOLD[®] 展示载体 pMORPH[®] 23_LHC 通过去除干扰文库克隆进行 H-CDR2 最优化的 1 个 BssHII 位点来制备。对于亲本 Fab 片段库的 L-CDR3 最优化, 结合剂库的轻链的 L-CDR3、构架 4 和恒定区 (405 bp) 通过 BpiI/SphI 去除, 且用多样化的 L-CDR3s 谱连同构架 4 和恒定结构域置换。这种 L-CDR3 盒的设计、合成和克隆将在其他地方描述 (准备中的原稿)。5 μ g 结合剂库载体与 3 倍摩尔过量、携带多样化的 L-CDR3s 的插入片段连接。在第 2 个文库组中, H-CDR2 (XhoI/BssHII) 是多样化的, 而连接构架区保持恒定。为了监控克隆效率, 在多样化的 H-CDR2 盒克隆进去之前, 亲本 H-CDR2 用虚设物置换。7 个不同文库的连接混合物在 4ml 大肠杆菌 TOP10F 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中进行电穿孔, 从而产生 1×10^8 – 8×10^9 个独立克隆。这个文库大小确保了理论多样性的覆盖度。文库扩增如先前所述 (Rauchenberger 等人, 2003) 进行。对于质量控制, 随机挑选单个克隆并进行测序 (SequiServe, Vaterstetten, 德国)。

[0272] 针对人生物素 -K69 MCP-1 (V41I) 的半溶液淘选用于亲和力成熟。从最优化文库中拯救出的 1×10^{13} 个噬菌体在 Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条上预先吸附 2 次, 且随后用 ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA, USA) 封闭。预先吸附的噬菌体和不同浓度的生物素 -K69 MCP-1 (0.02–50nM) 在溶液中于 22°C 温育 1.5 小时, 随后使噬菌体-抗原复合物捕获至 Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条 (PERBIO)。于 22°C 的洗涤步骤延伸至最多 12 小时。通过溶于 10mM Tris/HCl, pH8.0 的 20mMDTT 的洗脱、以及每轮淘选之间的噬菌粒扩增如上所述进行。

[0273] 针对人生物素 -K69 MCP-1 (V41I) 的溶液淘选用于亲和力成熟。如上所述从亲和力和成熟文库中拯救出的 1×10^{13} 个噬菌体用 ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA, USA), 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 封闭, 且在通过不含 Tween 20 的 ChemiBLOCKER 封闭的 Dynabeads[®] M-280 Streptavidin (DynaL Biotech, Oslo, 挪威) 上预先吸附 2 次。在 3 轮淘选期间应用抗原减少, 且生物素 -K69 MCP-1 的浓度为 0.01 至最高 5nM。封闭的

Dynabeads[®] 和磁性颗粒分离器 MPC-E (Dynal Biotech, Oslo, 挪威) 用于捕获与生物素化抗原结合的噬菌体。洗涤步骤 (Rauchenberger 等人, 2003)、通过溶于 10mM Tris/HCl, pH8.0 的 20mM DTT 的洗脱、以及每轮淘选之间的噬菌粒扩增如上所述进行。此外淘选严格性通过选择解离率 (Hawkins 等人, 1992) 和通过延长的洗涤步骤 (最高达 6 小时) 进一步增加。

[0274] 筛选了 3312 个克隆, 且鉴定了来自 7 个亲本 Fabs 中的 4 个的 85 个最优化 Fabs。鉴定在 L-CDR3 和 H-CDR2 中最优化的 Fabs, 且对于 2 个不同亲本克隆的衍生物进行改良轻和重链的交叉克隆, 从而导致产生亲和力 (K_D) 最高达 100 倍的进一步改善。Kd 估计为 ~1-10nM 的最高级别的结合剂 (约 100) 进行测序, 从而导致鉴定了 41 个独特的改善 Fabs。大多数改善的结合剂来源于组 III (03548)。在组 I 和 II 中进行另外的筛选以在这些成熟组中鉴定改善更多的 Fabs。鉴定了 29 个另外的 I 和 II 类结合剂。总之, 在成熟过程中鉴定了来源于 7 个亲本 Fabs 中的 5 个的 87 个独特 Fabs。表 3 概括了成熟淘选结果。

[0275] 表 3. 选择具有与 MCP-1 的改善结合的 Fab 的概括。

[0276]

组	亲本克隆	改善的 L-CDR3	改善的 H-CDR2	
1	03336	-	14	
1	03470	-	2	
1	03464	-	1	
1	03468	-	-	
2	03471	23	1	
2	03473	-	-	
3	03548	11	35	
	总改善的 Fabs	34	63	87

[0277] 成熟 Fabs 中的氨基酸变化位于亲本克隆 03741 和 03548 的 H-CDR2 或 L-CDR3 中。随后进行 Fabs 最佳改善的重链 CDR2 与最佳轻链 CDR3 的交叉克隆, 以设法产生具有甚至更高的亲和力的 Fabs。产生了大约 36 个交叉克隆。同样筛选所有独特 Fab 序列的预测 N 连接的糖基化位点。鉴定了对于重链 CDR2 中的糖基化具有 NIS 共有序列的少数 Fabs。这些 Fabs 被从进一步表征排除。总共 84 个 Fabs 在 Morphosys 被表达和纯化, 且转移至 Centocor 用于生物学表征。

[0278] 利用最优化 Fabs 达到了关于使用 Biacore 的亲和力测量的灵敏性极限。因此亲和力和值通过基于 ECL 的溶液平衡滴定 (SET) (Haenel 等人, 2004, 被提交用于在 Analytical Biochemistry 中出版) 进行测定。亲和力成熟后, 达到约 10pM 的 K_D 且使用 KinexA 证实所述值。在放射性配体测定中的 Fab 结合达到 110pM 的 IC_{50} 。因此, 与亲本 Fabs 比较 MCP-1 亲和力和结合动力学改善最高达 1000 倍。4 个最优化 Fabs 满足所有 9 个成功标准。2 个是 L-CDR3 最优化的 Fabs, 且 2 个是由 L-CDR3 和 H-CDR2 最优化链组成的交叉克隆。所有 4 个都被转化成 IgG1, 且在所有测试测定中保留活性, 其在放射性配体结合测定中最佳 K_D 为

10pM 和最佳 IC_{50} 为 20pM。1 个另外的交叉克隆 MOR03899 作为 IgG1 满足所有成功标准,但作为 Fab 则不是。满足成功标准的所有结合剂都来源于 MOR03471 亲本 Fab (SEQ ID Nos. 2, 4)。独特的 Fab-MOR03790 选择用于 IgG 生产,按比例扩大的制备开发,和基于 MOR03471 在动物模型中的体内评估,且包含表 4D 中给出的重和轻链可变区序列以及 SEQ ID Nos. 6、7、9、13、14 和 16。

[0279] 在亲和力成熟期间的 BioVeris 筛选。亲和力改善的 Fab 克隆通过基于 ECL 的高通量亲和力筛选 BioVeris 测定进行鉴定。命中后,选择 4 个亚克隆通过相同方法进行巩固。

[0280] 关于亲和力成熟的淘选策略。总共进行了 36 次不同的淘选。18 次溶液淘选针对具有噬菌体-抗原复合物捕获至链霉抗生物素蛋白珠的生物素-K69 MCP-1 (V41I)。选择过程中的严格性通过减少抗原浓度、选择解离率和延长的洗涤来增加。此外,进行针对生物素-K69 MCP-1 的 18 次半溶液淘选,使噬菌体-抗原复合物捕获至 Neutravidin 板。在这些淘选中,严格性通过减少抗原和延长洗涤来增加。

[0281] 关于亲和力成熟的 BioVeris 筛选。抗原生物素-K69 MCP-1 41I 在成熟淘选中且同样对于基于 BioVeris 的筛选使用。筛选对鉴定改善的结合剂非常有效地发挥作用。对于 36 种淘选条件中的每一种,筛选 92 个克隆,从而导致产生 3312 个筛选的克隆。总共鉴定了 85 个不同的独特最优化结合剂。发现了来自 3 个组的最优化 Fabs。此外,可以鉴定在 L-CDR3 和 H-CDR2 中最优化的 Fabs,从而使得命名为 MOR03471 和 MOR03548 的 Fabs 衍生物能够交叉克隆。46 个最优化的 Fabs 来源于 MOR03548,与 11 个 L-CDR3 最优化的 Fabs 比较,来自 H-CDR2 最优化的 35 个 Fabs 显示了较高的亲和力和活性。而且亲本 MOR03471 在这种成熟中非常成功地最优化,具有在 L-CDR3 中最优化的 23 个 Fabs 和在 H-CDR2 中最优化的 1 个 Fabs。改善的 Fabs 来源于 7 个亲本 Fabs 中的 4 个,从而表明每个亲本结合剂都具有被最优化的不同潜力。满足所有成功标准的最后 4 个 Fabs 来源于 MOR03471,2 个只在 L-CDR3 中最优化且来自交叉克隆的 2 个在 L-CDR3 和 H-CDR2 中最优化。

[0282] 最优化 Fab 分子的交叉克隆。HuCAL[®]技术的模块结构允许简单地通过在克隆步骤中组合 2 条最优化链快速交叉克隆来源于相同亲本克隆的最优化 Fabs 的最优化轻和重链。交叉克隆是可能获得进一步改善的抗体的快速方法,无需另外的成熟循环。一方面 2 个 L-CDR3 最优化的 MOR03548 衍生物与 6 个 H-CDR2 最优化的 MOR03548 进行交叉克隆,从而导致产生 12 个交叉克隆。另一方面 22 个 L-CDR3 最优化的 MOR03471 与 1 个可用的 H-CDR2 最优化的 MOR03471 克隆进行交叉克隆。在这个计划中,交叉克隆是成功的,从而导致产生 2 个不同的 MOR03471 衍生的交叉克隆-MOR03850 和 MOR03878,它们最终符合所有成功标准。

[0283] 16 个预先选择的抗体的详细表征

[0284] 从亲和力筛选中鉴定的 85 个最优化 Fabs 和另外 34 个交叉克隆(参见上文)产生总共 119 个不同的独特最优化 Fabs,所述独特最优化 Fabs 没有全部通过所有可用测定进行表征。因此,16 个最优化 Fabs 根据其在放射性配体结合抑制中的 IC_{50} 、在钙释放测定中的活性、在 CDRs 中缺乏 N 糖基化位点(表 4A 和 B)和亲和力进行预先选择。进一步的详细表征包括特异性测试、与天然 MCP-1 的结合和中和、对人和短尾猴 MCP-1 的亲和力、在趋化性测定中的活性以及所有转化的 IgG1 的表征。

[0285] 代表最优化 Fabs 的克隆由表 4A-C 中给出的序列表示,其中克隆 MOR03471 亲本

Fab 具有 VH1A $\times$ 3 构架且 MOR03548 具有 VH3 $\times$ 3 构架。具有所需物理化学属性（在 CDRs 中没有 N 糖基化位点）以及亲和力和生物活性的最优化特性的 17 个所选 Fabs，显示在使用的构架（VH3 和 VH1A）内在 HC-CDR2 和 LC CDR3 序列中的某些交替的独特 CDR 序列和代表性共有序列，以及更一般地在所有 HC-CDR1 中的共有序列。这些共有序列显示于表 4C-4E 以及 SEQ IN Nos :2-26 中。

[0286] 表 4A :17 个所选结合剂的重链 CDR 序列

[0287]

亲本	MOR #	VH 类型	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3781	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPIFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3790	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPIFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3791	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPIFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆(3822 $\times$ 3797)	3849	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆(3822 $\times$ 3819)	3850	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆(3822 $\times$ 3794)	3878	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆(3822 $\times$ 3788)	3885	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆(3822 $\times$ 3876)	3899	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3744	VH3	GFTFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTTYADSVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3747	VH3	GFTFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTTYADSVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3753	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYTTSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3754	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATTYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3755	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3757	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSNYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3758	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3832	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSNYATSYAAGVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3836	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF

[0288] 表 4B :17 个所选结合剂的轻链 CDR 序列

[0289]

亲本	MOR #	VL 类型	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3781	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIELWSF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3790	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIQLHSF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3791	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYIDISPM
MOR03471 x 克隆 (3822x3797)	3849	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISHPQ
MOR03471 x 克隆 (3822x3819)	3850	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYITYPFF
MOR03471 x 克隆 (3822x3794)	3878	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISFPA
MOR03471 x 克隆 (3822x3788)	3885	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISQPV
MOR03471 x 克隆 (3822x3876)	3899	VL- κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIFYPN
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3744	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QTYDRFSSTA
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3747	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYDRFSSTG
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3753	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3754	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3755	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3757	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3758	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3832	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3838	VL- λ 3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS

[0290] [0290] 4C. 关于抗 MCP-1V 区的共有序列

[0291]

SEQ ID NO.	WV- <u>X</u>	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	VH1A	QVELVQ SGAE VKKPGS SVKV SCKAS	<u>GGTFSSY</u> <u>GIS</u>	WVRQAPG QGLE	<u>WMGXIXPKXG</u> <u>XXXVAKKFG</u>	RVTITADEST STAYMELSSL RSEDVAVYC AR	<u>YDGIYGELEF</u>	WGQGTILVTVSS
3	VH3	QVQLVE SGGG LVQPGG SLRL SCAAS	<u>GTFERSY</u> <u>GMS</u>	WVRQAPG KGLE	<u>WVSNIRSDGS</u> <u>YTYADSVKG</u>	RFTISRDNK NTLYLQMNLS RAEDTAVYC AR	<u>FEFTPWTFD</u> <u>F</u>	WGQGTILVTVSS
4	K 3	DIVLTQ SPAT LSLSPG ERAT LSC	<u>RASQSVS</u> <u>DAYLA</u>	WYQQKPG QAPR	<u>LLIYDASSRA</u> <u>T</u>	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEFEDFAVY YC	<u>KQYIXXX</u>	FTFGQGTKVEI K
5	λ 3	DIELTQ PPSV SVAPGQ TARI SC	<u>SGDNLGK</u> <u>KYV Y</u>	WYQQKPG QAPV	<u>LVIYDDNRP</u> <u>S</u>	GIPERFSGSN SGNTATLTIS GTQAEDEADY YC	<u>QYXXXSSXX</u>	FGGGT'KLTVL

[0292] [0292] 4D. 抗 MCP-1 独特 CDRs

[0293]

<u>V- 区</u>	<u>CDR</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Fab 名称</u>	<u>序列</u>
VH1A	CDR1	6	所有 MOR03471	GGTFSSYGIS
VH1A	CDR2	7	3781, 3790, CNT0 888	WMGGIIPIFGTANYAQKFQG
VH1A	CDR2	8	3899	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG
VH1A	CDR3	9	所有 MOR03471	YDGIYGELDF
VH3	CDR1	10	所有 MOR03548	GFTFRSYGMS
VH3	CDR2	11	3744, 3747	WVSNIRSDGS YTYADSVKG
VH3	CDR3	12	所有 MOR03548	FEFTPWTFYD F
K 3	CDR1	13	所有 MOR03471	RASQSVSDAYLA
K 3	CDR2	14	所有 MOR03471	LLIYDASSRA T
K 3	CDR3	15	3781	HQYIELWSF
K 3	CDR3	16	3790, CNT0888	HQYIQLHSF
K 3	CDR3	17	3899	HQYIFYPN
λ 3	CDR1	18	所有 MOR03548	SGDNLGKKYV Y
λ 3	CDR2	19	所有 MOR03548	LVIYDDDNRP S
λ 3	CDR3	20	3744	QTYDRFSSTA
λ 3	CDR3	21	3747	QSYDRFSSTG

[0294] [0294] 表 4E. 抗 -MCP-1 CDR 区的共有序列

[0295]

CDR	SEQ ID NO:	序列	变体
VH1A- CDR2	22	WMGXIXPKXG XXXYAQKFQG	X4 = A, G X6 = I, N X8 = I, L X9 = A, F X11 = H, T X12 = A, T X13 = H, N
VH3- CDR2	23	WVSSIEHKWX XYXTXYAAXV KG	X10 = S, T X11 = G, N X13 = A, T X15 = G, S, T X19 = G, S
Lk- CDR3	24	XQYIXXXX	X1 = H, Q X5 = D, E, F, Q, S, T X6 = Q, L, I, H, T, F X7 = W, H, S, P X8 = A, N, Q, V, P- F, P-M, S-F
LA- CDR3	25	QXYXXXSSXX	X2 = S, T X4 = D, T X5 = A, R X6 = F, Q X9 = A, T X10 = A, G, S
HC- CDR1	26	GXTFXSYGXS	X2 = F, G X5 = S, R X9 = I, M

[0296] 表 5 :所选抗体的亲和力概括

[0297]

<u>K_p</u> [nM]	<u>MOR3757</u>	<u>MOR3781</u>	<u>MOR3790</u>	<u>MOR3850</u>	<u>MOR3878</u>	<u>MOR3899</u>
<u>Fab BioVeris</u> rh MCP-1 n=2	0.008 / 0.02	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.32 ± 0.14	0.81 ± 0.18
<u>Fab BioVeris</u> cyno MCP-1 n=2	0.01 / 0.07	0.004 / 0.01	0.06 ± 0.02	0.04	0.32 ± 0.04	0.49 ± 0.04
<u>Fab KinexA</u> bt-K69 h MCP-1 (CNTO)	0.0067	0.0089	0.075	0.02	ND	ND
<u>IgG1 BioVeris</u> rh MCP-1 n=2	ND	0.02	0.07 ± 0.03 n=3	0.011 ± 0.005 n=3	0.27 ± 0.06	0.34 ± 0.05
<u>IgG1 BioVeris</u> cyno MCP-1 n=2	ND	0.016 ± 0.008	0.06 ± 0.01 n=3	0.021 ± 0.015 n=3	0.23 ± 0.02	0.36 ± 0.06

[0298] 通过 Biacore 测量的与天然 MCP-1 的结合。与天然 MCP-1 的结合在 Biacore Fab 捕获模式中进行测试,且所有选择的 Fabs 都显示与天然 MCP-1 结合。尤其是因为对于最优

化 Fabs 达到了在 Biacore 中关于 K_D 测定的检测极限,所以必须使用用于亲和力测定和特异性证实的可替代方法。

[0299] IgG 转化。选择用于详细表征的所有最优化 Fabs 都被转化成 IgG1 形式,另外将 4 个 Fabs 亚克隆成 IgG4 形式。测试的人 IgG4 的表达数据和在不同测定中的活性与各自的 IgG1 一样良好。

[0300] 使用 BioVeris 的溶液平衡滴定。作为用于灵敏 K_D 测定的可替代方法,进行使用 BioVeris 技术的溶液平衡滴定 (SET)。单价解离常数通过关于 Fab 和 IgG 的合适拟合模型进行计算。这种方法适合于亲和力测量和交叉反应性研究。所有选择的 16 个结合剂都通过使用 BioVeris 的溶液平衡滴定 (SET) 进行分析 (表 5 和表 6),且这些亲和力值被视为最终亲和力值。几个结合剂包括作为 Fab 和 IgG 的 MOR03757、MOR03781、MOR03790、MOR03850、MOR03878 以及作为 IgG 的 MOR03899,满足针对人 MCP-1 $< 0.5\text{nM}$ 和针对短尾猴 MCP-1 $< 20\text{nM}$ 的亲和力成功标准。对人 MCP-1 的最佳亲和力是在 Fab 水平上 20-40pM,和在 IgG 水平上 10-20pM (表 5)。对短尾猴 MCP-1 的最佳亲和力是在 Fab 水平上 10-40pM,和在 IgG 水平上 20pM (表 6)。

[0301] 使用 BioVeris 的特异性测试。除亲和力之外,还在使用 BioVeris 的溶液平衡滴定 (SET) 中分析特异性,尤其是与嗜酸性粒细胞趋化因子和 MCP-2 的交叉反应性。对于所选的 16 个 Fabs 和 15 个测试的 IgGs (16 个所选 IgGs 中有 1 个是不可用的) 中的任何一个没有检测到与人 MCP-2 的交叉反应性。因为人 MCP-1、人 MCP-2 主要与 CCR2 受体结合,而人嗜酸性粒细胞趋化因子占优势地与 CCR3 受体结合。对于 MOR03744、MOR03747、MOR03790 和 MOR03781 Fab 和 IgG 在 BioVeris 中没有检测到与人嗜酸性粒细胞趋化因子的交叉反应性,而 12 个所选结合剂包括 MOR03850 以 Fab 或 IgG 形式显示与嗜酸性粒细胞趋化因子的某些交叉反应性 (数据未显示)。

[0302] 最优化抗体在 Biacore 抗体结合模式 (CNT0) 中的特异性。对于所选 IgGs 进行特异性评估。在 Biacore 中,向捕获的最优化抗体中加入 100nM 人 MCP-1、人 MCP-2、3、4 以及人嗜酸性粒细胞趋化因子 1、2 和 3。MOR03790、MOR03791、MOR03747、MOR03850、MOR03744、MOR03849、MOR03878、MOR03885、MOR03899 和 MOR03781 IgG 没有显示与同源物趋化因子的明显结合信号,且满足特异性成功标准 (表 6)。

[0303] Fabs 与 MCP-2 的结合不抑制 ^{125}I MCP-2 与 Thp-1 细胞的结合 (CNT0)。为了分析在 Biacore 中检测到的 Fab 与 MCP-2 和嗜酸性粒细胞趋化因子的结合活性是否转变成中和活性,在 Centocor 开发了放射性配体全细胞结合测定。 ^{125}I MCP-2 显示与 Thp-1 细胞的良好结合,且结合被未标记的 MCP-2 的添加抑制,而不被 MCP-1 特异性的参考抗体 C775 的添加抑制。结果提供了用于测试结合 / 中和和特异性的重要功能测定。在受体结合测定中使用 1ng/ml MCP-1,而在这种测定法中需要约 100ng/ml MCP-2,因为 MCP-2 的标记可能已引起活性的丧失。MOR03754 显示没有显著抑制 ^{125}I 标记的 MCP-2 与 Thp-1 细胞上的 CCR2 受体的结合 ($\text{IC}_{50} \geq 2\text{ }\mu\text{M}$)。

[0304] 成熟的 Fabs 有效抑制 ^{125}I MCP-1 与 Thp-1 细胞的结合 (CNT0)。由于需要低量的 1ng/ml MCP-1,所以这种测定是这个计划中最灵敏的测定,测定的 IC_{50} 极限对于 Fab 为约 100pM ,且对于 IgG 甚至为 20pM (表 5)。最优化后,Fabs 必须以低于参考 Fab C775 的 IC_{50} 抑制人 MCP-1 与其在 Thp-1 细胞上的人受体 CCR2 的结合。亲本 MOR03471 Fab 显示 180nM 的

IC₅₀,且最优化的 MOR03471 Fab 衍生物 (MOR03781 为 180pM、MOR03790 为 260 pM、MOR03850 为 160 pM、MOR03878 为 110 pM 和 MOR03899 为 130 pM) 显示在最优化期间最高达 1000 倍的活性总体改善。尽管这种测定是这个计划中可用的最灵敏的测定,但即使在这种测定中最优化的结合剂似乎也已达到测定的极限。

[0305] 成熟的 IgGs 有效抑制 I¹²⁵MCP-1 与 Thp-1 细胞的结合 (CNT0)。通过添加无关的人 IgG1 封闭 Fc 受体结合位点对于放射性配体结合和钙动员测定是重要的。所有测试的 IgG1 在放射性配体结合测定中保留活性。最优化 MOR03781 的 IC₅₀ 值是 20pM,对于 MOR03790 是 30pM,对于 MOR03850 是 50pM,对于 MOR03878 是 30pM,且对于 MOR03899 是 50pM。MCP-1 诱导的 CCR2 受体内在化的抑制 FACS 测定开发。受体内在化测定使用表达 CCR-2 的细胞进行,所述表达 CCR-2 的细胞显示比 THP-1 细胞更高的 CCR2 的表达,从而导致产生更佳的信噪比。首先,合成的人 MCP-1 在该测定中进行滴定以确定 EC₅₀ 值。发现对于 MCP-1 的 EC₅₀ 值是 116ng/ml。因此,对于进一步的 FACS 测定,选择 100ng/ml (~ 11nM) MCP-1。此外,获得完全内在化的最佳温育时间于 37℃ 进行评估。大多数内在化在最初 30 分钟内发生。因此在所有后续测定中使用 1 小时的温育时间。该测定被成功开发以允许测定 IC₅₀。测量用于抑制 MCP-1 诱导的受体内在化的 0.001-200 μg/ml 的 Fab 或 IgG 的活性和分等。所选的最优化结合剂显示良好抑制 MCP-1 诱导的受体内在化 (数据未显示)。2 批不同的 Fabs 进行平行测试,显示了可再现性。

[0306] 对于使用 Fabs 的内在化测定,对于 MOR03790 检测到 5nM 的 IC₅₀,对于 MOR03850 是 4nM,对于 MOR03781 是 7nM,对于 MOR03878 是 5.3nM,且对于 MOR03899 是 3.3nM (表 6)。MOR03781 IgG1 也显示 7nM,从而表明活性在 IgG 转化后被保留。

[0307] 钙动员的抑制 (CNT0)。MCP-1 在 THP-1 细胞中诱导钙动员,这可以借助于荧光团 (fluorophore) 进行检测。最优化的抗体显示有效抑制钙动员,4 个最终候选物 MOR03781、MOR03790、MOR03850 和 MOR03878 Fab 显示 18-28nM 的 IC₅₀ 值。各自的 IgGs 再次保留活性,且由于每个 IgG 中和 2 个 MCP-1 分子的能力,显示甚至略微更佳的约 6-10nM 的 IC₅₀ 值。再次在约 10nM 时似乎达到测定的极限。

[0308] 天然 MCP-1 诱导的钙动员的抑制。天然 MCP-1 从 PANC1 上清液中进行纯化且用于诱导钙释放。与参考抗体 C775 比较,最优化 Fabs 显示以更高的活性抑制天然 MCP-1 诱导的钙动员。再次在约 10-20nM 天然 MCP-1 时似乎达到测定的极限。

[0309] 趋化性的抑制。由于潜在的非特异性作用,亲本 Fabs 无法在趋化性测定中进行测试,但成熟后所有测试的最优化 Fabs 都特异性抑制趋化性,这可能是由于活性增加。测试的所有最优化 IgGs 在趋化性测定中都是有活性的。因为测定是半定量的,所以无法测定正确的 IC₅₀ 值。

[0310] 与参考抗体 C775 的结合竞争。所有 MOR03548 衍生的预先选择的 Fabs 在竞争固相形式中完全抑制 C775 与 MCP1 的结合。所有 7 个 MOR03471 衍生的预先选择的 Fabs 在这个测定中显示部分 (~ 60%) 竞争。

[0311] 总结数据

[0312] 表 6 :满足成功标准的 Abs 的概况

[0313]

	参考		MOR3790k		MOR3850k		MOR3781k		MOR3878k		MOR3899k	
成功标准	Fab	IgG	Fab	IgG	Fab	IgG	Fab	IgG	Fab	IgG	Fab	IgG
# 1, 6 MCP-1 Kd<0.5 nM IGEN	65,	-	0.12,	0.07	0.04,	0.01	0.03,	0.02	0.32	0.27	(0.81)	0.34
# 2 MCP-1 特异性 BIAcore (IgG)	无,	无	(MCP-2 /Eo),无		(MCP-2 /Eo),无		(MCP-2 /Eo),无		(MCP-2 /Eo),无		(MCP-2 /Eo),无	
# 3 ¹²⁵ I MCP-1 抑制 IC50< C775	35.6,	25.6	0.26,	0.03	0.16,	0.05	0.18,	0.02	0.11,	0.03	0.13,	0.05
# 4 趋化性的抑制	是,	是	是,	ND	是,	ND	是,	ND	是,	ND	是,	ND
# 5 Ca ²⁺ 动员的抑制 IC50 < C775	71.5,	62.3	25.02,	4.26	28.42,	9.47	21.8,	10.9	20.24,	6.7	17.54,	5.85
# 7 短尾猴MCP-1 Kd<10 nM	ND,	ND	0.06,	0.06	0.04,	0.01	0.01,	0.02	0.32,	0.23	0.49,	0.36
# 8 天然MCP-1诱导的 Ca ²⁺ 的抑制	是,	ND	是,	ND	是,	ND	是,	ND	是,	ND	是,	ND
延伸的测量-1 C775 竞争	是,	是	部分,	ND	部分,	ND	部分,	ND	部分,	ND	部分,	ND
延伸的测量-2 CCR2 内在化的抑制	65,	ND	5,	ND	4,	ND	7,	7	5.3,	ND	3.3,	ND

[0314] [0314] 实施例 4 :治疗候选物的选择

[0315] 最终治疗候选物 CNT0888 的选择和产生。

[0316] 仅在其轻链 CDR3 序列方面不同的 2 个 mAbs-3781 和 3790 (表 4B 和 D, SEQ ID Nos : 15 和 16) 在测定中显示出几乎等等的生物学活性。进行计算机 (In silico) 免疫原性分析。以鉴定潜在的 HLA II 类结合肽且确定候选物在 HLA 结合表位方面是否显著不同。分析预

测 mAb 3790 呈现比 mAb 3781 更低的免疫原性可能性。基于这点以及表 6 中显示的其他生物化学和生物学分析,包含重链 VH1A 构架区 (SEQ ID NO. 2) 和重链 CDR 区 SEQ ID NO. 6、7 和 9;以及轻链 κ 3 构架 (SEQ ID NO:4) 和 CDR 区 SEQ ID NO:13、14 和 16 的 3790 被选择作为最终的治疗 mAb。

[0317] 由于在克隆过程中引入的氨基酸变化,mAb 3790 的 N 末端序列包含来自人种系序列的变异。此外,氨基酸密码子 (即 DNA 序列) 偏向在原核细菌细胞中的最大表达。重新合成 MAb DNA 以校正与种系序列的有缺点的 N 末端比对,且使密码子偏倚改变成在高度表达的人蛋白质中有利的那些。序列修饰的 3790 mAb 命名为 CNT0 888,其分别包含 SEQ ID NO:27 和 28 以及下文 (有下划线的是 CDRs) 的重和轻链可变区序列,其中重链的 N 末端残基是 QVQ (Gln-Val-Gln) 和或轻链的是 EIV (Glu-Ile-Val)。

[0318] CNT0888 重链可变序列 (SEQ ID NO:27)

[0319] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGT

[0320] ANYAQKFQGRVTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDGIYGELDFWGQGT

[0321] LVTVSS

[0322] CNT0888 轻链可变 (SEQ ID NO:28)

[0323] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSDAYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATG

[0324] VPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCHQYIOLHSFTFGQGTKVEIK

[0325] CNT0888 的生物化学和生物物理学表征。CNT0 888 是全长人 Ig1 κ 抗体。在该序列中没有预测的 N 连接的糖基化位点。CNT0 888 (在 HEK293 细胞中瞬时表达且通过 A 蛋白亲和和层析进行纯化) 的生物化学和生物物理学特性在 SDS-PAGE、大小排阻层析 (SEC)、质谱 (MS) 和 BIAcore 中对于结合亲和力 (Kd) 和特异性进行表征。在 SDS-PAGE 中,天然 CNT0 888 作为大约 150kDa 处的单一条带迁移。还原的 /alkalylated IgG 作为大约 60kDa 和 33kDa 处的 2 个条带迁移。CNT0 888 的大小排阻层析证明 IgG 以与对于 Remicade IgG 对照测量的那种相同的洗脱体积 (数据未显示) 作为单个峰洗脱。最后,MS 分析证明 CNT0888 具有 147,000 Da 的质量 (数据未显示)。BIAcore 分析证明 CNT0 888 与人和短尾猴 CCL-2 的结合亲和力 (Kd) 分别是 30 和 10 pM。CNT0888 在 BIAcore 中没有显示与 CCL-2 相关趋化因子,即 MCP-2、3、4 以及嗜酸性粒细胞趋化因子 1、2 和 3 的可检测结合。

[0326] CNT0888 的体外表征。CNT0 888 的生物学活性在多种基于细胞的测定中进行评估。在所有成功标准测定中评估的瞬时表达的 CNT0 888 具有与亲本 mAb 3790 不能区别的活性 (表 5)。

[0327] 实施例 5:抗 MCP-1 抗体的克隆和表达

[0328] 具有 CNT0 888 质粒 p2844 和 p2882 的等分试样的大肠杆菌分别包含抗体的重和轻链。质粒 p2844 包含在抗 CD4 重链启动子下的 CNT0888 编码区的最优化重链编码序列,且质粒 p2882 包含在抗 CD4 轻链启动子下的 CNT0888 编码区的最优化轻链。2 个构建体都包括 gpt 选择基因以给予针对 MHX (霉酚酸、次黄嘌呤和黄嘌呤) 的化学抗性。对每个质粒进行纯化、表征、定量和测序。

[0329] 来自 C463A 宿主细胞系的指数培养的细胞与线性化的 p2844 和 p2882 共电穿孔,所述 C463A 宿主细胞系是适合在化学成分确知培养基中生长的 Sp2/0 衍生物 (CD- 杂交瘤)。48 小时后,将细胞暴露于 1 x MHX (0.5mg/L 霉酚酸、2.5mg/L 次黄嘌呤和 50mg/L 黄嘌呤)。

岭)。选择后 3 天,细胞生存力已减少到小于 13%,在这时将~ 90,000 个有生活力的细胞在甲基纤维素中进行铺平板。细胞不受干扰地培养 8 到 13 天,随后使用 Halo 操作进行筛选且挑取到 24 孔板内。扩大培养且获得 24 孔过度生长滴度。

[0330] 最高的亲本细胞系 (1C4) 具有 70mg/L 的 24 孔过度生长滴度,和在摇瓶中 108.5mg/L 的滴度 (在 CD- 杂交瘤培养基中)。选择这个亲本细胞系 C1262A 用于在摇瓶中的进一步评估。将 C1262A 提交给细胞库组 (Cell Banking Group) 用于产生开发细胞库 (Development Cell Bank) (DCB)。来自 DCB、命名为 C1262A :DCB ;02SEP04 的细胞对于支原体和无菌性测试阴性。为了支持进一步的调查研究,从摇瓶 (添加大豆蛋白胨) 中的 C1262A 细胞生产 CNT0 888 达到 230mg/L 的滴度且由 2L 培养物产生 366mg 纯化 CNT0 888。平行地, C1262A 细胞的另外 9L 培养物产生~ 2g 粗 CNT0 888 材料用于早期纯化和制剂开发。

[0331] 亲本细胞系 C1262A 使用 Halo 操作进行亚克隆且产生 5 个高生产的亚克隆细胞系。最佳亚克隆细胞系 (4D5) 具有 150.5mg/L 的 24 孔过度生长滴度,和在摇瓶中 167mg/L 的滴度 (在 CD- 杂交瘤中)。这个亚克隆细胞系编码为 C1262B。

[0332] 实施例 6 :用 CNT0888 治疗人胰肿瘤

[0333] 这个研究调查肿瘤 MCP-1 (由人肿瘤衍生的细胞产生) 的封闭是否抑制鼠异种植物中的肿瘤生长。为了测量肿瘤以及宿主 MCP-1 同源物 JE 在恶性疾病的生长和进展中的作用,测试抗人 MCP-1 和抗小鼠 JE 抗体在体内抑制人胰肿瘤生长的能力。

[0334] 荷有 BxPC-3 胰肿瘤的小鼠用命名为 CNT0888 的人抗人 MCP-1 抗体进行治疗,所述抗体包含与人 IgG1 恒定区融合的可变区序列 (SEQ IDNos :27 和 28)。为了比较 CNT0888 与其中发现最有效抑制宿主作用的先前测试的鼠抗体的体内活性, CNT0888 和鼠抗人 MCP-1 (C775) 与抗 muJE (C1142) 组合施用。基于最终的肿瘤重量测量,人 (CNT0888) 和鼠 (C775) 抗人 MCP-1 Mabs 都显著抑制肿瘤生长。

[0335] 材料和方法

[0336] BxPC-3 是人胰腺癌衍生的细胞。由 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 肿瘤制备的 Matrigel™ 从 Becton Dickinson 获得 (0.2 EU/mg, Bedford, MA)。

[0337] C775 是小鼠抗人 MCP-1 Mab,且 C1142 是大鼠 / 鼠嵌合抗小鼠 JE 抗体,其具有在申请人共同未决的专利申请美国系列号 11/170453 和相关文件中描述的大鼠可变和小鼠恒定区。对照抗体 cVaM 是由大鼠可变和小鼠恒定区组成的大鼠 / 鼠嵌合 IgG_{2a}k,它充当 C1142 和 C775 的同种型对照。临床级别的人 IgG 从 Beckett Apothecary and Home Health Care, Inc, Sharon Hill, PA 获得,且充当 CNT0888 的对照。

[0338] 在本研究中使用从 Charles River (Raleigh, NC) 获得的雌性 SCID 小鼠 (6-8 周大)。小鼠在过滤器居于顶部的塑料笼中分组饲养且供应 高压灭菌的食物和水。

[0339] BxPC-3 细胞在包含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基 (完全培养基) 中进行培养。细胞在研究开始前 48 小时 1 : 3 分开。在研究当天,细胞用胰蛋白酶处理以产生单细胞悬浮液,且细胞悬浮液用 10 体积的完全培养基洗涤以中和胰蛋白酶。将细胞离心且重悬浮于无血清 RPMI 中。Matrigel™ 于 4℃ 过夜解冻。Matrigel™- 肿瘤细胞悬浮液通过将等体积的 Matrigel™ 溶液和 BxPC-3 细胞混合进行制备。癌细胞悬浮液的最终浓度是在 5mg/ml Matrigel™ 中 5×10^6 细胞 /ml。

[0340] 在第0天,80只雌性SCID小鼠皮下(s.c.)植入0.2ml BxPC-3细胞悬浮液。0.2ml细胞悬浮液包含 1×10^6 BxPC-3细胞和1.0mgMatrigel™。使用冷注射器以避免Matrigel™聚合。

[0341] 表7. 抗肿瘤研究设计。

[0342]

组编号	动物/组	治疗(腹膜内((i.p.))
1	10	PBS
2	10	cVaM + huIgG (每种抗体20 mg/kg)
3	10	C775 + C1142 (每种抗体20 mg/kg)
4	10	CNT0888 + C1142 (每种抗体2 mg/kg)
5	10	CNT0888 + C1142 (每种抗体20 mg/kg)

[0343] 所有动物在研究开始时和在研究过程中每周一次进行称重。一旦观察到肿瘤生长(3.0mm^3),就用卡尺在2个维度(长度和宽度)测量肿瘤,单位为毫米(mm)。监控小鼠的肿瘤生长,且基于式[长度×宽度×宽度]/2计算肿瘤体积(mm^3)。

[0344] 在肿瘤细胞植入后第14天,具有约 50mm^3 的平均肿瘤体积的小鼠随机分成5组($n = 10/\text{组}$)。治疗(表7)在第14天开始,且对于剩余部分的研究(第14天治疗开始后52天)每周施用2次治疗。对于剩余部分的研究每周测量一次肿瘤。在研究结束时,小鼠通过 CO_2 窒息实施安乐死。肿瘤被解剖、在数字天平上称重、且固定。肿瘤使用数码相机进行拍照。在第50天,组3中的1只小鼠具有超过在研究指导下可接受极限的肿瘤,且被处死。这个动物的体积和重量被包括在最终分析中。

[0345] 对于肿瘤重量,数据经由标准线性模型和方差分析(ANOVA)进行分析。除非另有说明,对于所有检验和比较小于0.05的P值视为显著的。使用对数尺度,因为更好地满足相等方差和正态分布型的根本假设。对于没有肿瘤的小鼠的6个零值由样条插入值(0.007240538)替换,所述样条插入值促进对数尺度中的统计学分析而不破坏数据结构。

[0346] 对于肿瘤体积,重复的测量模型对假定一阶自相关协方差结构的数据进行拟合。使用天然样条以灵活模拟时间曲线中的趋势曲率。在每个时间点上进行组内的成对比较。通过R软件环境进行计算。

[0347] 结果

[0348] PBS和cVaM/huIgG阴性对照组显示出相似的肿瘤生长,在51天后达到 $\sim 350\text{mm}^3$ 。这表明用无关抗体的抗体治疗不抑制肿瘤生长。3个测试组(C775/C1142和CNT0888/C1142)中的肿瘤生长比阴性对照组中更慢,从而表明抗CCL2/抗JE治疗对肿瘤生长有影响。如从第18天到研究结束时通过肿瘤体积测量的,与PBS对照组比较,C775/C1142

和 CNT0888/C1142(2mg/kg) 组显示出明显的肿瘤抑制。与 PBS 对照组比较, CNT0888/C1142(20mg/kg) 组显示出从第 18 天到第 39 天的显著抑制。

[0349] 在第 51 天研究结束时获得肿瘤重量(表 8)。在 PBS 组 1(1 只小鼠)、C775/C1142 组 3(3 只小鼠)和 CNT0888/C1142 组 4(2 只小鼠)中存在无肿瘤小鼠。当比较肿瘤重量时,与 PBS 对照组比较, CNT0888 测试组各自显示肿瘤重量中的显著减少(表 8)。以 2mg/kg 给药的 CNT0888/C1142 组中的抑制百分比是 80% ($P = 0.006$),而对于以 20mg/kg 给药的 CNT0888/C1142 组抑制是 68% ($P = 0.046$)。C775/C1142 组也显示肿瘤生长的显著抑制 ($P = 0.004$)。肿瘤体积对肿瘤重量结果的统计学解释中可见的差异最可能是由于与从动物中切除的肿瘤称重的精密度比较,用卡尺测量肿瘤体积中的不精确。

[0350] 表 8. 最终的肿瘤重量

[0351]

动物 #	PBS	cVaM+Hu IgG	C775+C1142	CNT0888+C1142*	CNT0888+C1142
1	0	0.142	0	0.089	0.116
2	0.34	0.349	0.075	0	0.13
3	0.368	0.302	0	0.04	0.028
4	0.239	0.667	0.032	0.123	0.13
5	0.386	0.268	0.273	0.198	0.453
6	0.222	0.178	0.018	0.065	0.059
7	0.926	0.531	0.044	0.196	0.058
8	0.484	0.485	0.307	0.128	0.029
9	0.564	0.302	0	0	0.024
10	0.459	0.28	1.328	0.031	0.356
平均数					
肿瘤重量(g)	0.399	0.350	0.208	0.087	0.138
SD	0.244	0.163	0.410	0.073	0.148

[0352] 总之,这些结果表明在确立的 BxPC-3 模型中, MCP-1 和小鼠 JE 的封闭明显抑制肿瘤生长,且 CNT0888 具有抗肿瘤活性。

[0353] 显而易见的是本发明可以以与前述说明书和实施例中先前所述不同的其他方式进行实践。

[0354] 本发明的众多修改和变化依据上述教导是可能的,且因此在附加权利要求的范围内。

[0355] 参考文献

[0356]

Abraham R., Buxbaum, S., Link, J., Smith, R., Venti, C., Darsley, M. (1996). Determination of Binding Constants of Diabodies directed against Prostate-specific Antigen using Electrochemiluminescence-based Immunoassays. *J. Mol. Recognit.*, 9(5-6):456-61.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, USA

Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP 3rd, Xue YY, Berlin A, Ross DJ, Kunkel SL, Charo IF, Strieter RM. (2001). Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest*. 108(4):547-56.

Boder, E. T., Midelfort, K. S., Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *PNAS* 97, 20, 10701-10705

[0357]

- Carnevale KA, Cathcart MK. (2003). Protein kinase C beta is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem*. 278(28):25317-22.
- Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Böhl D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. (2003). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23(6):748-55.
- Chen, B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75. 1994
- Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881
- Conti P, DiGiacchino M. (2001). MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc*. 22(3):133-7.
- Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C. (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets*. 7(1):35-48.
- Ernst CA, Zhang YJ, Hancock PR, Rutledge BJ, Corless CL, Rollins BJ. (1994). Biochemical and biologic characterization of murine monocyte chemoattractant protein-1. Identification of two functional domains. *J Immunol*. 152(7):3541-9.
- Friguet B., Chaffotto A.F., Djavadi-Ohanian L., & Goldberg M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 77, 305-319.
- Frisch, C., Brocks, B., Ostendorp, R., Hoess, A., von Ruden, T., and Kretzschmar, T. (2003). From EST to IHC: human antibody pipeline for target research. *J Immunol Methods* 275, 203-212.
- Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*. 103(6):773-8.
- Haenel C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration (accepted for publication in *Analytical Biochemistry*)
- Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grunberger D, Kristenansky J, Lee S, McCarley D, Mulkins M, Wong B, Pease J, Mizoue L, Mirzadegan T, Polsky I, Thompson K, Handel TM, Jarnagin K. (1999). Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38(40):13013-25.
- Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 22(3):308-17.

- Jarnagin K, Grunberger D, Mulkins M, Wong B, Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Diehl F, Freedman R, McCarley D, Polsky I, Ping-Tsou A, Kosaka A, Handel TM. (1999). Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry*. 38(49):16167-77.
- Jimenez-Sainz MC, Fast B, Mayor F Jr, Aragay AM. (2003). Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol*. 64(3):773-82.
- Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellenhofer G, Hoess A, Wolle J, Pluckthun A, and Virnekas B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A, Inge L, Knappik A, Margel M, Pack P, Meng X.Q, Schier R, Sohlmann P, Winter J, Wolle J, and Kretzschmar T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- Kretzschmar T and von Rüden T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13:598-602.
- Leonard EJ, Yoshimura T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1. *Immunol Today*, 11: 97-101.
- Löhning C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- Losy J, Zaremba J. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke*. 32(11):2695-6.
- Low N. M., Holliger P., Winter G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260: 359-368.
- Mahad DJ, Ransohoff RM. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*. 15(1):23-32.
- McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CP. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol*. 86(1):20-9.
- Nagy ZA, Hubner B, Löhning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. (2002). Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med*. 8(8):801-7.

[0359]

- Nakamura M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Ishida Y, Fujii C, Kondo T, Inoue M, Mukaida N. (2004). hTERT-promoter-based tumor-specific expression of MCP-1 effectively sensitizes cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther.* 11(1):1-7.
- Neumark E, Sagi-Assif O, Shalmon B, Ben-Baruch A, Witz IP. (2003). Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNF α cross-regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy factors. *Int J Cancer.* 106(6):879-86.
- Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, Zhao Q, Nishida K, Takeshita A, Egashira K. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(3):534-9.
- Nokihara H, Yanagawa H, Nishioka Y, Yano S, Mukaida N, Matsushima K, Sone S. (2000). Natural killer cell-dependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein-1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 15;60(24):7002-7.
- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 22(4):773-8.
- Piehler, J, Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., Gauglitz, G (1997). Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Méth.* 201, 189-206.
- Prickett, KS, Amberg DC, Hopp TP (1989). A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques.* 7(6):580-9.
- Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kötzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A., and Rothe, C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J. Biol. Chem.* 278(40):38194-38205.
- Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2(3):242-56.
- Rose CE Jr, Sung SS, Fu SM. (2003). Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation.* 10(3-4):273-88.
- Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* 96(1):34-40.
- Sarau HM, Rush JA, Foley JJ, Brawner ME, Schmidt DB, White IR, Barnette MS. (1997). Characterization of functional chemokine receptors (CCR1 and CCR2) on EoL-3 cells: a model system to examine the role of chemokines in cell function. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(1):411-8.

[0360]

- Sartipy P, Loskutoff DJ. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(12):7265-70.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., Mc Call, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. Weiner Marks, J. D. (1996a). Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.* 255, 28-43
- Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., Marks, J. D. (1996b). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.* 263, 551-567
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766
- Seli E, Selam B, Mor G, Kayisli UA, Pehlivan T, Arici A. (2001). Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause.* 8(4):296-301.
- Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. (2002). Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* 62(4):1160-70.
- Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, Falus A. (2001). Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 108(3):375-81.
- Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. (2003). Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278(47):46654-60.
- Tonouchi H, Miki C, Ohmori Y, Kobayashi M, Mohri Y, Tanaka K, Konishi N, Kusunoki M. (2004). Serum monocyte chemoattractant protein-1 in patients with postoperative infectious complications from gastrointestinal surgery for cancer. *World J Surg.* 28(2):130-6.
- Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 154(1):45-51.
- Voss, S. and Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982
- Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, Iwao H. (2003). Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(11):1996-2001.

Yang, W., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., Barbas III, C. F. (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254, 392-403

Yoshimura T, Leonard EJ. (1999). Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J Immunol.* 145(1):292-7

Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, Cooke JP. (2003). Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell.* 4(3):191-6.

[0001]

序列表

- <110> Centocor, Inc.
Das, Anuk
Sweet, Raymond
Tsui, Ping
Bardoff, Micheal
- <120> 抗 MCP-1 抗体、组合物、方法和用途
- <130> CEN5098NP
- <140> 11/942126
<141> 2007-11-19
- <150> US 60/682654
<151> 2005-05-19
- <150> US 60/682620
<151> 2005-05-19
- <150> PCT/US2006/019627
<151> 2006-05-19
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 76
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
- <220>
<221> VARIANT
<222> (1).. (1)
<223> Xaa 可以是 Gln、Glu 或焦谷氨酸
- <220>
<221> VARIANT
<222> (40).. (40)
<223> Xaa 可以是 Ala 或 Ser

[0002]

<220>

<221> VARIANT

<222> (41).. (41)

<223> Xaa 可以是 Val 或 Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (43).. (43)

<223> Xaa 可以是 Phe 或 Tyr

<220>

<221> SITE

<222> (69).. (69)

<220>

<221> SITE

<222> (69).. (69)

<223> 缀合位点, 例如生物素或 PEG-生物素

<220>

<221> SITE

<222> (75).. (75)

<223> 缀合位置, 例如生物素或 PEG-生物素

<400> 1

Xaa	Pro	Asp	Ala	Ile	Asn	Ala	Pro	Val	Thr	Cys	Cys	Tyr	Asn	Phe	Thr
1				5					10					15	

Asn	Arg	Lys	Ile	Ser	Val	Gln	Arg	Leu	Ala	Ser	Tyr	Arg	Arg	Ile	Thr
			20					25						30	

Ser	Ser	Lys	Cys	Pro	Lys	Glu	Xaa	Xaa	Ile	Xaa	Lys	Thr	Ile	Val	Ala
			35				40							45	

Lys	Glu	Ile	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Gln	Lys	Trp	Val	Gln	Asp	Ser	Met
			50				55							60	

Asp	His	Leu	Asp	Lys	Gln	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Thr
65					70						75

[0003]

<210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1).. (25)
<223> FR1

<220>
<221> SITE
<222> (26).. (35)
<223> CDR1

<220>
<221> DOMAIN
<222> (36).. (46)
<223> FR2

<220>
<221> SITE
<222> (47).. (66)
<223> CDR2

<220>
<221> VARIANT
<222> (50).. (50)
<223> Xaa 是 Gly 或 Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (52).. (52)
<223> Xaa 是 Ile 或 Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (54).. (54)
<223> Xaa 是 Ile 或 Leu

<220>

[0004]

<221> VARIANT
<222> (55).. (55)
<223> Xaa 是 Phe 或 Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (57).. (57)
<223> Xaa 是 Thr 或 His

<220>
<221> VARIANT
<222> (58).. (58)
<223> Xaa 是 Ala 或 Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (59).. (59)
<223> Xaa 是 Asn 或 His

<220>
<221> DOMAIN
<222> (67).. (98)
<223> FR3

<220>
<221> SITE
<222> (99).. (108)
<223> CDR3

<220>
<221> DOMAIN
<222> (109).. (119)
<223> FR4

<400> 2

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20				25					30		

[0005]

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1).. (25)
<223> FR1

<220>
<221> SITE
<222> (26).. (35)
<223> CDR1

<220>
<221> DOMAIN
<222> (36).. (46)
<223> FR2

[0006]

<220>

<221> SITE

<222> (47).. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (67).. (98)

<223> FR3

<220>

<221> SITE

<222> (99).. (110)

<223> CDR3

<220>

<221> DOMAIN

<222> (111).. (120)

<223> FR4

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0007]

85

90

95

Ala Arg Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1).. (23)
<223> FR1

<220>
<221> SITE
<222> (24).. (35)
<223> CDR1

<220>
<221> DOMAIN
<222> (36).. (46)
<223> FR2

<220>
<221> SITE
<222> (47).. (57)
<223> CDR2

<220>
<221> DOMAIN
<222> (58).. (89)
<223> FR3

<220>
<221> VARIANT

[0008]

<222> (90).. (90)

<223> X 可以是 H 或 Q

<220>

<221> SITE

<222> (90).. (97)

<223> CDR3

<220>

<221> VARIANT

<222> (94).. (94)

<223> X 可以是 Glu、Gln、Asp、Ser、Thr 或 Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (95).. (95)

<223> X 可以是 Leu、Ile、His、Tyr、Phe 或 Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (96).. (96)

<223> X 可以是 Trp、His、Ser、脯氨酸

<220>

<221> VARIANT

<222> (97).. (97)

<223> X 可以是 Ala、Val、Asn、Gln、Ser 或脯氨酸

<220>

<221> VARIANT

<222> (98).. (98)

<223> X 可以是不存在或 Phe 或 Met

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99).. (109)

<223> FR4

<400> 4

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

[0009]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1).. (22)
<223> FR1

<220>
<221> SITE
<222> (23).. (33)
<223> CDR1

<220>
<221> DOMAIN
<222> (34).. (44)
<223> FR2

[0010]

<220>
<221> SITE
<222> (45).. (55)
<223> CDR2

<220>
<221> DOMAIN
<222> (56).. (87)
<223> FR3

<220>
<221> SITE
<222> (88).. (97)
<223> CDR3

<220>
<221> VARIANT
<222> (89).. (89)
<223> Xaa 可以是 Ser 或 Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (91).. (91)
<223> Xaa 可以是 Asp 或 Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (92).. (92)
<223> Xaa 可以是 Arg 或 Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (93).. (93)
<223> Xaa 可以是 Gln 或 Phe

<220>
<221> VARIANT
<222> (96).. (96)
<223> Xaa 可以是 Thr 或 Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (97).. (97)

[0011]

<223> Xaa 可以是 Ala、Gly 或 Ser

<220>

<221> DOMAIN

<222> (98)..(107)

<223> FR4

<400> 5

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa
85 90 95

Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

[0012]

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln
1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Trp Met Gly Ala Ile Asn Pro Leu Ala Gly His Thr His Tyr Ala Gln
1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly
20

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
1 5 10

[0013]

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 11

Trp Val Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12

Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 13

[0014]

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5 10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

His Gln Tyr Ile Glu Leu Trp Ser Phe
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe
1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

[0015]

His Gln Tyr Ile Phe Tyr Pro Asn

1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 18

Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 19

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 20

Gln Thr Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

[0016]

Gln Ser Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (4).. (4)
<223> Xaa 可以是 Gly 或 Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (6).. (6)
<223> Xaa 可以是 Ile 或 Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (8).. (8)
<223> Xaa 可以是 Ile 或 Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (9).. (9)
<223> Xaa 可以是 Phe 或 Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (11).. (11)
<223> Xaa 可以是 Thr 或 His

<220>
<221> VARIANT
<222> (12).. (12)
<223> Xaa 可以是 Ala 或 Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (13).. (13)

[0017]

<223> Xaa 可以是 Asn 或 His

<400> 22

Trp	Met	Gly	Xaa	Ile	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Ala	Gln
1				5					10					15	

Lys Phe Gln Gly
20

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (10).. (10)

<223> Xaa 可以是 Ser 或 Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (11).. (11)

<223> Xaa 可以是 Gly 或 Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (13).. (13)

<223> Xaa 可以是 Ala 或 Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (15).. (15)

<223> Xaa 可以是 Gly、Ser 或 Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (19).. (19)

<223> Xaa 可以是 Ser 或 Gly

<400> 23

[0018]

Trp Val Ser Ser Ile Glu His Lys Trp Xaa Xaa Tyr Xaa Thr Xaa Tyr
1 5 10 15

Ala Ala Xaa Val Lys Gly
20

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (1).. (1)
<223> Xaa 可以是 His 或 Gln

<220>
<221> VARIANT
<222> (5).. (5)
<223> Xaa 可以是 Ser 或 Phe

<220>
<221> VARIANT
<222> (6).. (6)
<223> Xaa 可以是 Gln、His、Phe 或 Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> (8).. (8)
<223> Xaa 可以是 Ala、Asn、Gln 或 Val

<400> 24

Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Pro Xaa
1 5

<210> 25
<211> 10
<212> PRT

[0019]

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (2).. (2)

<223> Xaa 可以是 Ser 或 Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (4).. (4)

<223> Xaa 可以是 Asp 或 Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 可以是 Ala 或 Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (6).. (6)

<223> Xaa 可以是 Gln 或 Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (9).. (9)

<223> Xaa 可以是 Ala 或 Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (10).. (10)

<223> Xaa 可以是 Ala、Gly 或 Ser

<400> 25

Gln	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Ser	Xaa	Xaa
1				5					10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

[0020]

<220>
<221> VARIANT
<222> (2).. (2)
<223> Xaa 可以是 Gly 或 Phe

<220>
<221> VARIANT
<222> (5).. (5)
<223> Xaa 可以是 Ser 或 Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (9).. (9)
<223> Xaa 可以是 Ile 或 Met

<400> 26

Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr Gly Xaa Ser
1 5 10

<210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1).. (25)
<223> FR1

<220>
<221> SITE
<222> (26).. (35)
<223> CDR1

<220>
<221> DOMAIN
<222> (36).. (46)
<223> FR2

<220>

[0021]

<221> SITE
 <222> (47).. (66)
 <223> CDR2

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (67).. (98)
 <223> FR3

<220>
 <221> SITE
 <222> (99).. (108)
 <223> CDR3

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (109).. (119)
 <223> FR4

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0022]

Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 可以是 Asp 或 Glu

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(23)
<223> FR 1

<220>
<221> SITE
<222> (24)..(35)

<220>
<221> DOMAIN
<222> (36)..(46)
<223> FR2

<220>
<221> SITE
<222> (47)..(57)
<223> CDR2

<220>
<221> DOMAIN
<222> (58)..(89)
<223> FR3

[0023]

<220>

<221> SITE

<222> (90)..(98)

<223> CDR3

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99)..(109)

<223> FR4

<400> 28

Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His
85 90 95

Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105