



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105051065 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201380043633. 4

代理人 黎艳 刘培培

(22) 申请日 2013. 06. 21

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/28(2006. 01)

61/663, 496 2012. 06. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/047192 2013. 06. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/192596 EN 2013. 12. 27

(71) 申请人 索伦托治疗有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 黄定秋 芭芭拉·A·斯旺森

周贺钺 陆国弟

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

权利要求书6页 说明书52页 附图14页

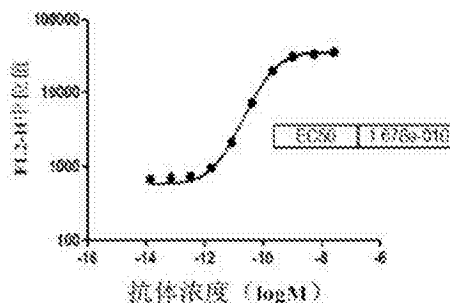
(54) 发明名称

与 CCR2 结合的抗原结合蛋白

(57) 摘要

本公开提供了涉及或源自抗 CCR2 抗体的组合物及方法。更具体地来说,本公开提供了与 CCR2 结合的人抗体、能够结合 CCR2 的所述抗体片段及衍生物、包含所述片段的 CCR2 结合性多肽。进一步而言,本公开提供了编码所述抗体、抗体片段和衍生物及多肽的核酸,包含所述多肽的细胞,用于制备所述抗体、抗体片段和衍生物及多肽的方法,以及使用所述抗体、所述抗体片段及其衍生物和多肽的方法,包括治疗或诊断患有 CCR2 相关疾病或症状的对象的方法。

抗huCCR2 IgG (D1) 与CHO-CCR2细胞结合



1. 一种与 CCR2 表位结合且结合亲和性至少为 10^{-6} M 的 IgG 类全人抗体, 该抗体的重链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合; 所述抗体的轻链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合。

2. 根据权利要求 1 所述的全人抗体, 其特征在于, 所述抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列: SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1)、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2(本文称为 1A2)、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2(本文称为 1B11)、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2(本文称为 1G11)、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2(本文称为 1H5)、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2(本文称为 1B2)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-1)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-2)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-3)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-4)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-5)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-6)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-7)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-8)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-1A)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-2A)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-3A)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-4A)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-5A)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-6A)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-7A)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-8A)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-1B)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-2B)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-3B)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-4B)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-5B)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-6B)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-7A)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-8B)、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18(本文称为 42A0)、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20(本文称为 42D4)、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22(本文称为 42E8)、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24(本文称为 42F1)、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26(本文称为 42G7)、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28(本文称为 43G12)、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30(本文称为 43F12)、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32(本文称为 45H8)、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34(本文称为 44A4)、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36(本文称为 45D7)、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38(本文称为 54A9)、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40(本文称为 54C1)、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42(本文称为 4255E40)、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44(本文称为 55F5), 及其组合。

3. 一种 Fab 全人抗体片段, 其具有来自重链的重链可变域和来自轻链的轻链可变域, 其中, 重链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、

SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 41, SEQ ID NO. 43, 及其组合 ; 且其轻链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44, 及其组合。

4. 根据权利要求 3 所述的 Fab 全人抗体片段, 其特征在于, 所述抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列 : SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

5. 一种单链人抗体, 其具有来自重链的重链可变域、来自轻链的轻链可变域、连接重链和轻链可变域的连接肽, 其中, 所述重链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 41, SEQ ID NO. 43, 及其组合 ; 所述轻链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44, 及其组合。

6. 根据权利要求 5 所述的单链人抗体, 其特征在于, 所述单链人抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列 : SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 8/SEQ ID

NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

7. 根据权利要求 5 所述的单链人抗体, 其特征在于, 所述单链人抗体具有重链可变区和轻链可变域, 且所述单链人抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列: SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

8. 一种用于治疗 CCR2 介导的疾病的方法, 包括以抗 CCR2 多肽的有效剂量给药, 其中所述抗 CCR2 多肽选自: 与 CCR2 表位结合且结合亲和力为至少 10^6 M 的 IgG 类全人抗体、具有重链可变域和轻链可变域的 Fab 全人抗体片段、具有重链可变域、轻链可变域以及连接所述轻链和重链可变域的连接肽的单链人抗体, 及其组合;

其中, 所述全人抗体的重链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合; 且所述全人抗体的轻链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID

NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 4, 及其组合 ;

其中,所述 Fab 全人抗体片段的重链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同 :SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合 ;且所述 Fab 全人抗体片段的轻链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同 :SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合 ;以及

其中,所述单链人抗体的重链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同 :SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, , 及其组合 ;且所述单链人抗体的轻链可变域序列与选自下组的氨基酸序列至少 95% 相同 :SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合。

9. 根据权利要求 8 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法,其特征在于,所述全人抗体的重链 / 轻链可变域序列选自以下序列 :SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

10. 根据权利要求 8 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法,其特征在于,所述 Fab 全人抗体片段具有重链可变域和轻链可变域,其中所述抗体的重链 / 轻链可变域序列选自以下序列:SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

11. 根据权利要求 8 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法,其特征在于,所述单链人抗体具有重链可变域和轻链可变域,其中所述抗体的重链 / 轻链可变域序列选自以下序列:SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

12. 根据权利要求 8 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法,其特征在于,所述 CCR2 介导疾病选自:炎性、免疫性疾病;心血管疾病;增值性疾病;移植物排斥;纤维化疾病;病毒感染;神经性疾病;以及,代谢性疾病。

13. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法,其特征在于,所述炎性、免疫性疾病选自:哮喘、过敏性鼻炎、过敏性肺疾病、过敏性肺炎中选择的炎症或免疫病症;

过敏反应或超敏反应；药物过敏、昆虫蜇过敏；过敏性接触性皮炎；脉管炎、组胺和 IgE 介导的过敏反应性肺炎、间质性肺病 (ILD)、特发性肺间质纤维化、类风湿性关节炎相关的 ILD、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、系统性硬化症、干燥综合征、多发性肌炎、皮炎、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎；脊柱关节病；硬皮病；牛皮癣和炎性皮肤病、皮炎、湿疹、特应性皮炎、荨麻疹；血管炎，坏死性、皮肤性及过敏性血管炎；炎性肾小球病、关节炎、类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、多发性硬化症；系统性红斑狼疮；重症肌无力；青少年发病型糖尿病；肾炎、肾小球肾炎；自身免疫性甲状腺炎；获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 和白塞氏病。

14. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法，其特征在于，所述心血管疾病选自：动脉粥样硬化形成；动脉粥样硬化；冠状动脉疾病；心肌梗塞；中风；急性冠状动脉综合征；血栓形成；动脉粥样硬化性的外周血管疾病；高血压；以及，血脂异常。

15. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法，其特征在于，所述增殖性疾病选自：液体瘤或实体瘤类型、骨髓瘤、白血病、慢性淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌、肝癌、癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、汗腺癌、皮脂腺癌、腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、未分化癌、支气管癌、黑色素瘤、肾细胞癌、肝癌、肝细胞癌、胆管癌、胆管癌、乳头状癌、移行细胞癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、乳房癌、胃肠癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、颈部和头部区域的鳞状细胞癌；肉瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤和间皮肉瘤；血液肿瘤、骨髓瘤、白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、粒细胞性白血病、单核细胞白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、恶性淋巴瘤、浆细胞、网状细胞肉瘤、霍奇金症、神经系统瘤、神经胶质瘤、脑膜瘤、神经管细胞瘤、神经鞘瘤，以及室管膜瘤。

16. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法，其特征在于，所述移植物排斥为同种异体移植排斥或移植物抗宿主疾病。

17. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法，其特征在于，所述纤维化疾病为硬皮症。

18. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法，其特征在于，所述神经性疾病选自：AIDS 相关痴呆症和疼痛、神经病理性疼痛。

19. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法，其特征在于，所述代谢性疾病为糖尿病。

20. 根据权利要求 12 所述的治疗 CCR2 介导的疾病的方法，其特征在于，所述其他疾病选自：再灌注损伤；某些恶性血液病；细胞因子诱导毒性、感染性休克、内毒素休克、多肌炎；皮炎；以及类肉状瘤病。

与 CCR2 结合的抗原结合蛋白

技术领域

[0001] 本公开提供了涉及或源自抗 CCR2 抗体的组合物及方法。更具体地来说,本公开提供了与 CCR2 结合的人抗体、能够结合 CCR2 的所述抗体片段及衍生物、包含所述片段的 CCR2 结合性多肽。进一步而言,本公开提供了编码所属抗体、抗体片段和衍生物及多肽的核酸,包含所述多肽的细胞,用于制备所述抗体、抗体片段和衍生物及多肽的方法,以及使用所述抗体、所述抗体片段及其衍生物和多肽的方法,包括治疗或诊断患有 CCR2 相关疾病或症状的对象的方法,包括 CCR2 介导的疾病,选自自体免疫疾病、心血管疾病、炎性疾病、免疫疾病、增生疾病、纤维变性病、病毒感染、神经性疾病和新陈代谢紊乱。

背景技术

[0002] CC-趋化因子受体 2 (CCR2) 在数种白血球子类的表面上表达,例如单核细胞、树突细胞和记忆 T 细胞,且由于编码羧基端区域的 mRNA 的可变剪接而表达为两种略微不同的形式 (CCR2 和 CCR2) (Charo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2752-2756 (1994))。CCR2 是趋化因子配体 CCL2 的主要受体 (单核细胞趋化蛋白 1 (MCP1)) 且还可与 CCL8 (MCP-2)、CCL7 (MCP-3)、CCL13 (MCP-4)、CCL12 (MCP-5) 和 HIV 相结合。动物模型和人的研究中有大量证据表明,CCR2 参与了动脉粥样硬化的发病原理和其他 CCR2 介导的病症。CCL2 在人类动脉中的粥样硬化病变处表达,且与巨噬细胞丰富的区域相关 (Nelken et al. (1991) J. Clin. Invest. 88 (4):1121-7; Yla-Hertuala et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 (12):5252-6; 和 Seino et al. (1995) Cytokine 7 (6):575-9)。在动物中,通过基因剔除模型中的基因操作,消除 CCR-2 表达,可在载脂蛋白 E (ApoE) 缺失的动脉粥样硬化小鼠模型中降低粥样硬化形成 (Boring et al. (1998) Nature 394 (6696):894-7; and Dawson et al. (1999) Atherosclerosis 143 (1):205-11)。类似地,编码 CCL2 的基因受到基因中断、CCL2 截断或显性失活 CCL2 的表达,在多种小鼠动脉粥样硬化模型中均降低了动脉粥样硬化的形成 (Ni et al. (2001) Circulation 103 (16):2096-2101; Gu L. et al. (1998) Mol. Cell 2 (2):275-81; Gosling et al. (1999) J. Clin. Invest. 103 (6):773-778; 和 Inoue et al. (2002) Circulation 106 (21):2700-6)。此外,CCL2 的过度表达,无论是在颈动脉局部 (Namiki et al. (2002) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22 (1):115-20) 还是在从同源小鼠移植的转基因过度表达骨髓产生的血单核细胞 (Aiello et al. (1999) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19 (6):1518-25) 中表达,均使得易感动物模型中的动脉粥样化形成增加。

[0003] 因此,CCR2 拮抗剂、CCL2 拮抗剂或感染 CCR2 与其天然配体结合的试剂,构成了一类重要的治疗剂。

[0004] 除了哺乳类趋化因子受体外,哺乳类巨细胞病毒、疱疹病毒和痘病毒也被发现在受感染细胞中表达具有与趋化因子受体结核性质的蛋白 (Wells et al., Curr. Opin. Biotech. 1997, 8, 741-748)。人趋化因子受体,例如 CXCR4、CCR2、CCR3、CCR5 和 CCR8,能够在哺乳类细胞的细菌感染中作为共同受体,例如与人免疫缺陷病毒 (HIV) 一起。

[0005] 趋化因子和它们的同源受体可能是炎症、感染和免疫调控紊乱和疾病（包括哮喘和过敏疾病），自体免疫病理（例如风湿性关节炎和多发性硬化症）和新陈代谢疾病（例如动脉粥样硬化和糖尿病）的重要介质（参见综述：Charo et al., *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621；Gao et al., *Chem. Rev.* 2003, 103, 3733；Carter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6, 510；Trivedi et al., *Ann. Reports Med. Chem.* 2000, 35, 191；Saunders et al., *Drug Disc. Today* 1999, 4, 80；Premack et al., *Nature Medicine* 1996, 2, 1174）。例如，趋化因子单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 及其受体 CC 趋化因子受体 2 (CCR2) 在将白血球吸引到发炎部位并由此激活所述细胞中起到了关键作用。当趋化因子 MCP-1 与 CCR2 结合时，在其诱导下，胞内钙浓度迅速提高，细胞粘附分子表达提高，且促进了白血球迁移。以基因修饰小鼠进行的实验，表明了 MCP-1/CCR-2 相互作用的重要性。

[0006] 数种不同类型的免疫激发表明，MCP-1^{-/-} 小鼠无法招募单核细胞至发炎部位 (Lu et al., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601)。类似地，CCR2^{-/-} 小鼠在受到各种外源物质激发时，也不能招募单核细胞或产生干扰素- γ ；此外，CCR2 无效小鼠的白血球不对 MCP-1 应答而迁移 (Boring et al., *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2552)，这因此表明了 MCP-1/CCR-2 相互作用的特异性。据研究，两种其他族类也各对不同种系的 CCR-2^{-/-} 小鼠有等同结果 (Kuziel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12053, 和 Kurihara et al., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1757)。MCP-1^{-/-} 和 CCR-2^{-/-} 动物具有显著的活力和大致正常的健康状况，MCP-1/CCR-2 相互作用的终端并未诱导生理危机。综上所述，这些数据可以推论，阻断 MCP-1/CCR-2 作用的分子可能可用于治疗多种炎性和自体免疫疾病 (Feria et al., *Exp. Opin. Ther. Patents* 2006, 16, 49；和 Dawson et al., *Exp. Opin. Ther. Targets* 2003, 7, 35)。该假设如今在许多不同动物疾病模型中得到了验证，如下所述。

[0007] 已知 MIP-1 在风湿性关节炎患者的滑液和血液中提高 (Koch et al., *J. Clin. Invest.* 1994, 93, 921-928)。此外，数项研究表明了 MIP-1/CCR1 相互拮抗作用在治疗风湿性关节炎中的潜在治疗价值 (Pease et al., *Expert Opin. Invest. Drugs* 2005, 14, 785-796)。据发现，MIP-1 的异种抗体能够改善小鼠中的实验性自体免疫性脑脊髓炎 (EAE, 一种多发性硬化症模型) (Karpus et al., *J. Immun.* 1995, 5003-5010)。类似地，炎症症状也可以通过抗 MIP-1 抗体对胶原诱导性关节炎小鼠的直接给药来控制 (Lukacs et al., 1995, 95, 2868-2876)。

[0008] 在肺移植后发展了闭塞性细支气管炎综合征的患者中，MCP-1 上调 (Reynaud-Gaubert et al., *J. Heart Lung Transplant.*, 2002, 21, 721-730；Belperio et al., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556)。在闭塞性细支气管炎综合征的鼠科模型中，抗 MCP-1 抗体的给药弱化了气道闭塞；类似地，同一模型中的 CCR2^{-/-} 小鼠抵抗了气道闭塞 (Belperio et al., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556)。这些数据暗示着，MCP-1/CCR2 的拮抗可能治疗移植后的器官排斥又一。此外，研究表明，MCP-1/CCR2 轴心的终端，能够延长胰岛移植的存活期 (Lee et al., *J. Immunol.* 2003, 171, 6929；Abdi et al., *J. Immunol.* 2004, 172, 767)。在大鼠移植模型中，发展了移植体血管病变的移植体中，发现了 CCR2 和 MCP-1 上调 (Horiguchi et al., *J. Heart Lung Transplant.* 2002, 21, 1090)。在另一项研究中，抗 MCP-1 基因治疗减弱了移植体血管病变 (Saiura et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24, 1886)。一项研究描述了阻断 MCP-1 对实验性静脉移植植物新生

内膜形成的抑制 (Tatewaki et al., J. Vasc. Surg. 2007, 45, 1236)。

[0009] 其他研究表明了 MCP-1/CCR2 相互拮抗作用在治疗哮喘中的潜在医疗价值。在卵清蛋白激发小鼠中以中和抗体阻隔 MCP-1, 使得支气管炎高反应性和炎症的显著降低 (Gonzalo et al., J. Exp. Med. 1998, 188, 157)。这证明可能通过抗 MCP-1 抗体给药, 降低曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 卵激发小鼠中的过敏气道炎症 (Lukacs et al., J. Immunol. 1997, 158, 4398)。相应地, MCP-1^{-/-} 小鼠对曼氏血吸虫卵激发表现出的应答降低 (Lu et al., J. Exp. Med. 1998, 187, 601)。

[0010] 其他研究表明, MCP-1/CCR2 相互拮抗作用具有治疗肾病的潜在医疗价值。对肾小球肾炎鼠科模型的 MCP-1 抗体给药, 使得肾小球半月体形成和 I 类胶原沉淀显著下降 (Lloyd et al., J. Exp. Med. 1997, 185, 1371)。此外, 诱导肾毒性血清肾炎的 MCP-1^{-/-} 小鼠比起 MCP-1^{+/+} 对应小鼠, 所受到的肾小管损伤显著较低 (Tesch, G. H. et al., J. Clin. Invest. 1999, 103, 73)。

[0011] 数项研究表明了 MCP-1/CCR2 相互拮抗作用具有治疗系统性红斑狼疮的潜在医疗价值。在系统性红斑狼疮的鼠科模型中, CCR2^{-/-} 小鼠相对于其 WT 对应小鼠, 存活期延长且肾病减少 (Perez de Lema et al. J. Am. Soc. Neph. 2005, 16, 3592)。这些数据与近期在狼疮啮齿类模型中的 MCP-1 基因缺失研究中发现的疾病修饰活性 (Shimizu, S. et al. Rheumatology (Oxford) 2004, 43, 1121 ;Tesch et al., J. Exp. Med. 1999, 190, 1813) 或 CCR2 拮抗剂多肽的给药 (Hasegawa et al. Arthritis&Rheumatism 2003, 48, 2555) 相一致。

[0012] 在克罗恩病患者的小肠中, 观察到相对于未患病回肠的 CCR2⁺ 淋巴细胞固有层显著 30 倍增加 (Connor et al., Gut 2004, 53, 1287)。而且, 活跃克罗恩病的患者中的循环 CCR2⁺/CD14⁺/CD56⁺ 单核细胞子类相对于对照产生显著扩大。数项啮齿类研究表明了 MCP-1/CCR2 相互拮抗作用在治疗克罗恩病 / 结肠炎中的医疗价值。CCR2^{-/-} 小鼠免遭右旋糖酐硫酸钠 - 诱导的结肠炎 (Andres et al., J. Immunol. 2000, 164, 6303)。CCR2、CCR5 和 CXCR3 小分子拮抗剂 (鼠科结合亲和性分别 = 24、236 和 369nM) 的给药也使其免遭右旋糖酐硫酸钠 - 诱导的结肠炎 (Tokuyama et al., Int. Immunol. 2005, 17, 1023)。最后, 在半抗原诱导的结肠炎模型中, MCP-1^{-/-} 小鼠表现出显著降低的结肠损伤 (肉眼可见的和组织性的) (Khan et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2006, 291, G803)。

[0013] 两篇文献描述了炎症性肠病患者中的肠粘膜上皮细胞和肠粘液中的 MCP-1 过度表达 (Reinecker et al., Gastroenterology 1995, 108, 40, 和 Grimm et al., J. Leukoc. Biol. 1996, 59, 804)。在组织纤维化相关模型中, 抑制 CCR2/MCP-1 轴心降低了皮肤纤维化 (Yamamoto et al., J. Invest. Dermatol. 2003, 121, 510 ;Ferreira et al., J. Invest. Dermatol. 2006, 126, 1900)、肺纤维化 (Okuma et al., J. Pathol. 2004, 204, 594 ; Gharaee-Kermani et al., Cytokine 2003, 24, 266)、肾纤维化 (Kitagawa et al., Am. J. Pathol. 2004, 165, 237 ;Wada et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2004, 15, 940), heart (Hayashidani et al., Circulation 2003, 108, 2134) 和肝纤维化 (Tsuruta et al., Int. J. Mol. Med. 2004, 14, 837)。

[0014] 一项研究表明了 MCP-1/CCR2 相互拮抗作用具有治疗牙槽炎的潜在医疗价值。当以抗大鼠 MCP-1 抗体 (JE) 对具有 IgA 免疫复合物肺损伤的大鼠静脉注射治疗时, 牙槽炎症状部分改善 (Jones et al., J. Immunol. 1992, 149, 2147)。数项研究表明了 MCP-1/CCR2 相

互拮抗作用具有治疗癌症的潜在医疗价值 (参见综述 :Craig et al., *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25, 611 ;Conti, *Seminars in Cancer Biology* 2004, 14, 149 ;Giles, *Curr. Cancer Drug Targets* 2006, 6, 659)。当携带人乳腺癌细胞的免疫缺陷小鼠与抗 MCP-1 抗体治疗时, 观察到了对肺微小转移的抑制和存活期的增加 (Salcedo et al., *Blood* 2000, 96, 34-40)。使用人临床肿瘤样本, 发现了 CCR2 表达与前列腺癌进展之间的关联 (Salcedo et al., *Blood* 2000, 96, 34-40)。体外的 MCP-1 表达被发现会介导前列腺癌细胞生长和入侵 (Lu et al., *Prostate* 2006, 66, 1311) ;此外, 前列腺癌细胞表达的 MCP-1 诱导了人骨髓祖细胞的骨吸收 (Lu et al., *Cancer Res.* 2007, 67, 3646)。

[0015] 多项研究描述了 MCP-1/CCR2 相互拮抗作用具有治疗再狭窄的潜在医疗价值。对人而言, MCP-1 水平与再狭窄风险直接相关。(Cipollone et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 327)。动脉损伤后, 缺少 CCR2 或 MCP-1 的小鼠表现出内膜面积减少和内膜 / 中层比例降低 (相对于野生型同窝出生幼崽) (Roque et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 554 ;Schober et al., *Circ. Res.* 2004, 95, 1125 ;Kim et al., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2003, 310, 936)。对小鼠而言, MCP-1 显性失活抑制剂在骨骼肌中的转染 (Egashira et al., *Circ. Res.* 2002, 90, 1167) 亦在动脉损伤后降低了内膜增生。使用中和抗体阻断 CCR2 降低了灵长类支架术后的新生内膜增生 (Horvath et al., *Circ. Res.* 2002, 90, 488)。

[0016] 两项研究描述了诱导脑损伤的 MCP-1 过度表达大鼠 (King et al., *J. Neuroimmunol.* 1994, 56, 127, and Berman et al., *J. Immunol.* 1996, 156, 3017)。此外, 研究表明, CCR2^{-/-} 小鼠 (Dimitrijevic et al., *Stroke* 2007, 38, 1345) 和 MCP-1^{-/-} 小鼠 (Hughes et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 308) 均部分免患局部缺血 / 再灌注损伤。

[0017] 单核细胞 / 巨噬细胞在神经病理性疼痛的发展中起到了重要作用 (Liu et al., *Pain* 2000, 86, 25)。与此相应地, 近期还报告了 CCR2 在治疗炎性疼痛和神经病理性疼痛中的潜在作用。CCR2^{-/-} 小鼠, 相对于其 WT 对应小鼠, 对炎症性疼痛的应答改变, 包括足跖福尔马林注射后疼痛行为的减少和足跖 CFA 注射后轻微降低的机械性触摸痛 (Abbadie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2003, 100, 7947)。此外, CCR2^{-/-} 小鼠在坐骨神经损伤后未表现出显著机械性触摸痛。相似地, 小分子 CCR2 拮抗剂口服给药后, 也将机械性触摸痛降低到了 80% 损伤前水平 (WO 2004/110376)。

[0018] 一项研究描述了 MCP-1 在缺血性心肌病中的关键作用 (Frangogiannis et al., *Circulation* 2007, 115, 584)。另一项研究描述了 MCP-1 抑制后实验性心力衰竭的减轻 (Hayashidani et al., *Circulation* 2003, 108, 2134)。其他研究提供的证据表明, 在上述未提到的多种疾病中, MCP-1 过度表达。这些文献提供了 MCP-1 拮抗剂可用于所述疾病的治疗剂的相关行政局。另一项研究表明, 啮齿类异位心脏移植中 MCP-1 过度表达, 暗示着 MCP-1 在移植物动脉粥样硬化中的病理性作用 (Russell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 6086)。所述 MCP-1 过度表达还在特发性肺间质纤维化患者的肺部上皮细胞中发现 (Antoniades et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5371)。相似地, 牛皮癣患者的皮肤中也发现了 MCP-1 过度表达 (Deleuran et al., *J. Dermatol. Sci.* 1996, 13, 228, and Gillitzer et al., *J. Invest. Dermatol.* 1993, 101, 127) ;还发现了 CCR2⁺ 细胞优势性的相

关证据 (Vestergaard et al., Acta Derm. Venerol. 2004, 84, 353)。最后, 一项最近的研究表明, HIV-1 相关痴呆症患者的大脑和脑脊液中, MCP-1 过度表达 (WO 99/46991)。

[0019] 此外, 发现 CCR2 多态性至少在一种患者亚类中与肉状瘤病相关 (Spagnolo et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003, 168, 1162)。

[0020] 应当指出, CCR2 被认为可能是某些 HIV 株系的共同受体 (Doranz et al., Cell 1996, 85, 1149)。经测定, 将 CCR2 用作 HIV 的共同受体, 可能与疾病进展有关 (Connor et al., J. Exp. Med. 1997, 185, 621)。该发现与一项近期发现一致, 即 CCR2 变体 CCR2-64I 的存在与 HIV 在人类种群中的延迟发作正相关 (Smith et al., Science 1997, 277, 959)。虽然这些进程中未暗示 MCP-1, 但 MCP-1 拮抗剂通过结合 CCR2 起作用可能对延迟 HIV 感染患者的病症向 AIDS 发展的进程具有有益治疗效果。

发明内容

[0021] 本公开提供一种与 CCR2 表位结合且结合亲和性至少为 10^6 M 的 IgG 类全人抗体, 其重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合; 其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合。优选地, 该全人抗体具有重链和轻链, 其中该抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列: SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1)、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2 (本文称为 1A2)、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2 (本文称为 1B11)、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2 (本文称为 1G11)、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2 (本文称为 1H5)、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2 (本文称为 1B2)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-1)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-2)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-3)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-4)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-5)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-6)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-7)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2 (本文称为 D1-8)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-1A)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-2A)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-3A)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-4A)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-5A)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-6A)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-7A)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16 (本文称为 D1-8A)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-1B)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-2B)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-3B)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-4B)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-5B)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-6B)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-7A)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32 (本文称为 D1-8B)、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18 (本文称为 42A0)、SEQ

ID NO. 19/SEQ ID NO. 20(本文称为 42D4), SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22(本文称为 42E8)、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24(本文称为 42F1)、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26(本文称为 42G7)、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28(本文称为 43G12)、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30(本文称为 43F12)、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32(本文称为 45H8)、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34(本文称为 44A4)、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36(本文称为 45D7)、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38(本文称为 54A9)、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40(本文称为 54C1)、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42(本文称为 4255E40)、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44(本文称为 55F5), 及其组合。

[0022] 本公开提供一个 Fab 全人抗体片段, 其具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域, 其中, 重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列及至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合; 且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合; 优选地, 该全人抗体 Fab 片段具有重链可变域和轻链可变域, 其中该抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列及其组合: SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

[0023] 本公开提供一个单链人抗体, 其具有来自重链的可变域、来自轻链的可变域、连接重链和轻链可变域的连接肽, 其中, 重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ

ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合 ; 其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合。优选地, 该全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域, 其中该抗单链全人抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列 : SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

[0024] 本公开进一步提供一种治疗广谱哺乳动物癌症或广谱炎性疾病和自体免疫疾病的方法, 包括以抗 CCR2 多肽的有效剂量给药, 其中所述抗 CCR2 多肽选自 : 一种与 CCR2 表位结合且结合亲和力为至少 10^6 M 的 IgG 类全人抗体、具有重链可变域和轻链可变域的 Fab 全人抗体片段、具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域以及连接所述轻链和重链可变域的连接肽的单链人抗体, 及其组合 ;

[0025] 其中, 所述全人抗体的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合 ; 且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合 ;

[0026] 其中, 所述全人抗体 Fab 片段的轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID

NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43,及其组合 ;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95%相同 :SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44,及其组合 ;以及

[0027] 其中,所述单链人抗体的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95%相同 :SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43,及其组合 ;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95%相同 :SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44,及其组合。

[0028] 优选地,所述全人抗体具有重链和轻链,其中所述抗体的重链 / 轻链可变域序列选自以下序列 :SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44,及其组合 ;优选地,所述全人抗体 Fab 片段具有重链可变域和轻链可变域,其中所述抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列 :SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/

SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44，及其组合；优选地，所述全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域，其中所述单链全人抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列：SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44，及其组合。

[0029] 优选地，待治疗的广谱哺乳动物癌症选自骨肉瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、任何儿科癌、肾癌、白血病、肾移行细胞癌、沃纳-莫里森 (Werner-Morrison) 综合征、肢端肥大症、膀胱癌、肾母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、良性前列腺增生、乳腺癌、前列腺癌、骨癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、子宫颈癌、滑膜肉瘤、转移性类癌相关性腹泻、血管活性肠肽分泌肿瘤、巨人症、牛皮癣、动脉粥样硬化、血管和微血管不适当的增殖的平滑肌再狭窄、头颈部癌、鳞状细胞癌、多发性骨髓瘤、孤立性浆细胞瘤、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、生殖细胞肿瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、黑素瘤、肾横纹肌样瘤、尤因肉瘤 (Ewing Sarcoma)、软骨肉瘤、血液恶性肿瘤、慢性成淋巴细胞白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、急性粒细胞白血病、慢性成髓细胞性白血病、霍奇金 (Hodgkin) 氏病、非霍奇金 (Hodgkin) 氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病、肥大细胞白血病、肥大细胞瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特 (Burkitt) 淋巴瘤、蕈样真菌

病、西扎里 (Seary) 综合征、皮肤 T 细胞淋巴瘤、慢性骨髓增殖性疾病、中枢神经系统肿瘤、脑癌、成胶质细胞瘤、非成胶质细胞瘤脑癌、脑膜瘤、垂体腺瘤、前庭神经鞘瘤、原始神经外胚层瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤和脉络丛乳头状瘤、骨髓增生性障碍、真性红细胞增多症、血小板增多症、特发性骨髓纤维化、软组织肉瘤、甲状腺癌、子宫内膜癌、类癌肿瘤、生殖细胞肿瘤、肝癌、巨人症、牛皮癣、动脉粥样硬化、平滑肌血管再狭窄、不恰当的微血管增生、肢端肥大症、巨人症、牛皮癣、动脉粥样硬化、血管或微血管不适当增殖、格雷夫斯 (Grave) 氏病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、桥本 (Hashimoto) 氏甲状腺炎、重症肌无力、自身免疫甲状腺炎和白塞 (Behcet) 氏病。

[0030] 优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症选自:炎症、免疫疾病;心血管疾病;增生性疾病;移植物排斥反应;纤维化疾病;病毒感染;神经系统疾病;代谢紊乱。更优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症是选自:哮喘、过敏性鼻炎、过敏性肺疾病、过敏性肺炎中选择的炎症或免疫病症;过敏反应或超敏反应;药物过敏、昆虫蜇过敏;过敏性接触性皮炎;脉管炎、组胺和 IgE 介导的过敏反应性肺炎、间质性肺病 (ILD)、特发性肺间质纤维化、类风湿性关节炎相关的 ILD、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、系统性硬化症、干燥综合征 (Sjogren's syndrome)、多发性肌炎、皮炎、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎;脊柱关节病;硬皮病;牛皮癣和炎性皮肤病、皮炎、湿疹、特应性皮炎、荨麻疹;血管炎,坏死性、皮肤性及过敏性血管炎;炎性肾小球病、关节炎、类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、多发性硬化症;系统性红斑狼疮;重症肌无力;青少年发病型糖尿病;肾炎、肾小球肾炎;自身免疫性甲状腺炎;获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 和白塞 (Behcet) 氏病。

[0031] 更优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症是选自以下各项的心血管病症:动脉粥样硬化形成;动脉粥样硬化;冠状动脉疾病;心肌梗塞;中风;急性冠状动脉综合征;血栓形成;动脉粥样硬化性的外周血管疾病;高血压;以及,血脂异常。

[0032] 更优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症是选自以下各项的增殖性病症:液体瘤或实体瘤类型、骨髓瘤、白血病、慢性淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌、肝癌、癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、汗腺癌、皮脂腺癌、腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、未分化癌、支气管癌、黑色素瘤、肾细胞癌、肝癌、肝细胞癌、胆管癌、胆管癌、乳头状癌、移行细胞癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、乳房癌、胃肠癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、颈部和头部区域的鳞状细胞癌;肉瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤和间皮肉瘤;血液肿瘤、骨髓瘤、白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、粒细胞性白血病、单核细胞白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、恶性淋巴瘤、浆细胞、网状细胞肉瘤、霍奇金症、神经系统瘤、神经胶质瘤、脑膜瘤、神经管细胞瘤、神经鞘瘤,以及室管膜瘤。

[0033] 优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症为:移植排斥,例如同种异体移植排斥或移植物抗宿主疾病;或纤维化疾病,例如硬皮症。优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症为神经性疼痛,选自 AIDS 相关痴呆症和疼痛,以及神经病理性疼痛。优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症是代谢性疾病,例如糖尿病。优选地,用该方法治疗的 CCR2 介导病症是选自以下各项的另一种疾病:再灌注损伤;某些恶性血液病;细胞因子诱导毒性、感染性休克、内毒素休克、多肌炎;皮炎;以及类肉状瘤病。

附图说明

[0034] 图 1 展示了抗 CCR2D1 抗体的细胞结合。抗 CCR2D1 抗体的细胞结合 EC_{50} 测定为 168pM, 如图 1 所示。

[0035] 图 2 展示了 D1 对 CCR2 表达细胞的细胞结合 EC_{50} 。D1 是唯一与鼠 CCR2 结合的抗 CCR2D1 抗体; 所有其他抗体均未显示细胞染色。D1 对鼠 CCR2 表达细胞的细胞结合 EC_{50} 为约 17nM(图 2)。

[0036] 图 3 展示了 THP-1 细胞的钙实验。(A) MCP-1 的 EC_{50} 测定: 在 37°C 5% CO_2 下, 以 25 μ l 含有丙磺舒的钙 4 实验试剂盒 (Calcium 4 Assay kit), 在多聚右旋赖氨酸 384 孔板上培养 THP-1 细胞 (含 0.3×10^5 细胞的 25 μ l 实验缓冲液) 1 小时, 然后室温培养 15 分钟, 最后离心。添加 5 倍剂量应答 MCP-1 (12.5 μ l) 以达到最终指定浓度。图 3A 表示为平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm S. D., $n = 3$)。(B) 测定 D1 的 IC_{50} : 室温下, 将 THP-1 细胞 (含 0.3×10^5 细胞的 25 μ l 实验缓冲液) 与系列稀释剂量的 D1 室温预培养 20 分钟。向 25 μ l 含有丙磺舒的钙 4 实验试剂中加入 25 μ l 预培养的细胞以达到最终指定 D1 浓度。在 37°C 5% CO_2 下、多聚右旋赖氨酸 384 孔板上培养 1 小时, 然后室温培养 15 分钟, 最后离心。添加 10nM (在 384 孔板中的终浓度) MCP-1, 作为 FlexStation3 检测期间的激发激动剂。图 3B 表示为两次实验结果相似的独立实验之一的平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm S. D., $n = 3$)。

[0037] 图 4 展示了原代人单核细胞的钙实验。(A) MCP-1 的 EC_{50} 测定: 在 37°C 5% CO_2 下, 以 25 μ l 含有丙磺舒的钙 4 实验试剂盒 (Calcium 4 Assay kit), 在多聚右旋赖氨酸 384 孔板上培养原代人单核细胞 (含 0.3×10^5 细胞的 25 μ l 实验缓冲液) 1 小时, 然后室温培养 15 分钟, 最后离心。添加 5 倍剂量应答 MCP-1 (12.5 μ l) 以达到最终指定浓度。图 4A 表示为两次实验结果相似的独立实验之一的平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm S. D., $n = 3$)。(B) 测定 D1 的 IC_{50} : 室温下, 将 THP-1 细胞 (含 8000 细胞的 25 μ l 实验缓冲液) 与系列稀释剂量的 D1 室温预培养 20 分钟。向 25 μ l 含有丙磺舒的钙 4 实验试剂中加入 25 μ l 预培养的细胞以达到最终指定 D1 浓度。在 37°C 5% CO_2 下、多聚右旋赖氨酸 384 孔板上培养 1 小时, 然后室温培养 15 分钟, 最后离心。添加 10nM (在 384 孔板中的终浓度) MCP-1, 作为 FlexStation3 检测期间的激发激动剂。图 4B 表示为两次实验结果相似的独立实验之一的平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm S. D., $n = 3$)。

[0038] 图 5 展示了 THP-1 细胞的趋化性实验。图 5A 中为 MCP-1 的 EC_{50} 测定: 将含系列稀释浓度的 MCP-1 (如图 5A 所示) 的 29 μ l HBSS+0.1% BSA 装入下层室的板孔中, 其中 THP-1 细胞 (含 0.3×10^5 细胞的 25 μ l HBSS+0.1% BSA) 装在 5 μ m 孔膜顶部的每个位点上。在 37°C 5% CO_2 下培养 2 小时, 然后印迹膜顶部的未迁移细胞, 并移除膜。以 Cedex 对板孔中迁移的细胞进行计数, 并以 Prism5 计算 MCP-1 的 EC_{50} 。图 5A 表示为两次实验结果相似的独立实验之一的平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm S. D., $n = 3$)。图 5B 中, 测定 D1 的 IC_{50} : 室温下, 将 THP-1 细胞 (25 μ l, 含 0.1×10^6 细胞) 与系列稀释剂量的 D1 室温预培养 20 分钟。在下层室板孔中加入 3nM MCP-1, 将与 D1 一起预培养的细胞装入膜顶部。在 37°C 5% CO_2 下培养 2 小时后, 收集迁移细胞、技术并计算, 如图 5A 中的步骤所述。图 5B 表示为两次实验结果相似的独立实验之一的平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm S. D., $n = 3$)。

[0039] 图 6 展示了原代人单核细胞的趋化性实验。图 6A 中为 MCP-1 的 EC_{50} 测定: 将含不

同浓度的 MCP-1 (如图所示) 的 $29 \mu\text{l}$ HBSS+0.1% BSA 装入下层室的板孔中,其中原代人单核细胞 (含 0.1×10^5 细胞的 $25 \mu\text{l}$ HBSS+0.1% BSA) 装在 $5 \mu\text{m}$ 孔膜顶部的每个位点上。在 37°C 5% CO_2 下培养 1 小时 45 分钟后,然后印迹膜顶部的未迁移细胞,并移除膜。以 Cedex 对板孔中迁移的细胞进行计数,并以 Prism5 计算 MCP-1 的 EC_{50} 。图 6B 中,测定 D1 的 IC_{50} :室温下,将原代人单核细胞 (每位点 $25 \mu\text{l}$, 含 0.1×10^6 细胞) 与不同浓度的 D1 (0.03–6.7nM) 室温预培养 20 分钟。在下层室板孔中加入 1nM MCP-1,将与 D1 一起预培养的细胞装入膜顶部。在 37°C 5% CO_2 下培养 1 小时 45 分钟后,收集迁移细胞、技术并计算,如图 6A 中的步骤所述。图 6B 和 6C 表示为使用从不同供体分离而来的原代人单核细胞的两次独立实验之一的平均值 \pm 标准偏差 (Mean \pm S. D., $n = 3$)。

[0040] 图 7 展示了 WEHI 274.1 细胞的趋化性实验。图 7A 中为 MCP-1 的 EC_{50} 测定。简而言之,将含不同浓度的 m MCP-1 (0.02–60nM) 的 $29 \mu\text{l}$ HBSS+0.1% BSA 装入下层室的板孔中,其中 WEHI 274.1 细胞 (含 0.1×10^6 细胞的 $25 \mu\text{l}$ HBSS+0.1% BSA) 装在 $8 \mu\text{m}$ 孔膜顶部的每个位点上。在 37°C 5% CO_2 下培养 2 小时,然后印迹膜顶部的未迁移细胞,并用 PBS 洗涤膜顶部。从板上取下膜,并以荧光平板分析仪,以 485nm 和 530nm 分别为激发波长和发射波长,从膜底部测定荧光 (FlexStation3, Molecular Device)。以 Prism5 计算 MCP-1 的 EC_{50} 。图 7B 中,测定 D1 的 IC_{50} :室温下,将 WEHI 274.1 细胞 (每位点 $25 \mu\text{l}$, 含 0.1×10^6 细胞) 与不同浓度的 D1 (4.0–534nM) 室温预培养 20 分钟。在下层室板孔中加入 2.5nM m MCP-1,将与 D1 一起预培养的细胞装入膜顶部。在 37°C 5% CO_2 下培养 2 小时后,收集迁移细胞、技术并计算,如图 7A 中的步骤所述。

[0041] 图 8 展示了抗体 D1 和 MLN1202 的趋化性比较。图 8A 中,测定并比较 D1 和 MLN1202 对 MCP-1 诱导的 THP 细胞迁移的 IC_{50} 。图 8B 中,测定并比较 D1 和 MLN1202 对 MCP-2 诱导的 THP 细胞迁移的 IC_{50} 。图 8C 中,测定并比较 D1 和 MLN1202 对 MCP-3 诱导的 THP 细胞迁移的 IC_{50} 。图 8D 中,测定并比较 D1 和 MLN1202 对 MCP-4 诱导的 THP 细胞迁移的 IC_{50} 。图 8E 中,测定并比较 D1 和 MLN1202 对 MCP-5 诱导的 THP 细胞迁移的 IC_{50} 。

[0042] 图 9 展示了抗 CCR2 抗体 D1 对鼠科 EAE 模型的多发性硬化症的体内有益效果。

[0043] 图 10–12 展示了各种抗体 1G11、1B2 和 1H5 的 IC_{50} 结果。特别地,1G11 抗 MCP-1 (3nM) 的 IC_{50} 为 79pM (Figure 10A), 抗 MCP-5 (6ng/ml) 的 IC_{50} 为 261pM (图 10B)。1B2 抗 MCP-1 (3nM) 的 IC_{50} 为 87pM (图 11A), 抗 MCP-5 (3nM) 的 IC_{50} 为 197pM (图 11B)。这些 IC_{50} 值表明 1G11 和 1B2 在 MCP-1 和 MCP-5 诱导的 THP 细胞迁移中的 IC_{50} 比 D1 更有力。但是 1G11 和 1B2 对 MCP-2、3 和 4 诱导的 THP-1 迁移不具有抑制活性 (数据未显示)。1H5 抗 MCP-1 (3nM) 的 IC_{50} 为 109pM (图 12A), 抗 MCP-5 (6ng/ml) 的 IC_{50} 为 349pM (图 12B)。这些 IC_{50} 值与 D1 相仿。1H5 还表现出抗 MCP-2 (30ng/ml) 的 1.9nM IC_{50} 值 (图 12C)、抗 MCP-3 (6ng/ml) 的 2.6nM IC_{50} 值 (图 12D) 和抗 MCP-2 (200ng/ml) 的 1.4nM IC_{50} 值 (图 12E)。

[0044] 图 13 展示了各种 CCR2 IgG1 克隆从 CHO-huCCR2 细胞的解离率。

具体实施方式

[0045] 本公开提供一个与 EGFR 表位结合且结合亲和性为 10^6M 或以下的 IgG 类全人抗体,其重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、

SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合 ; 其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列及其组合至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合 ; 优选地, 该全人抗体具有重链和轻链, 其中该抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列及其组合 : SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1)、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2(本文称为 1A2)、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2(本文称为 1B11)、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2(本文称为 1G11)、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2(本文称为 1H5)、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2(本文称为 1B2)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-1)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-2)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-3)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-4)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-5)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-6)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-7)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2(本文称为 D1-8)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-1A)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-2A)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-3A)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-4A)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-5A)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-6A)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-7A)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16(本文称为 D1-8A)、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-1B)、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-2B)、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-3B)、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-4B)、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-5B)、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-6B)、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-7A)、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32(本文称为 D1-8B)、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18(本文称为 42A0)、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20(本文称为 42D4)、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22(本文称为 42E8)、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24(本文称为 42F1)、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26(本文称为 42G7)、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28(本文称为 43G12)、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30(本文称为 43F12)、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32(本文称为 45H8)、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34(本文称为 44A4)、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36(本文称为 45D7)、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38(本文称为 54A9)、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40(本文称为 54C1)、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42(本文称为 4255E40)、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44(本文称为 55F5), 及其组合。

[0046] 本公开提供一个 Fab 全人抗体片段, 其具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域, 其中, 重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同 : SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合 ; 且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至

少95%相同;SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44,及其组合;优选地,该全人抗体 Fab 片段具有重链可变域和轻链可变域,其中该抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44,及其组合。

[0047] 本公开提供一个单链人抗体,其具有来自重链的可变域、来自轻链的可变域、连接重链和轻链可变域的连接肽,其中,重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43,及其组合;其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44,及其组合;优选地,该全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域,其中该抗单链全人抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID

NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

[0048] 本公开进一步提供一种治疗广谱哺乳动物癌症或炎性疾病或自体免疫疾病的方法, 包括以抗 CCR2 多肽的有效剂量给药, 其中所述抗 CCR2 多肽选自: 一种与 CCR2 表位结合且结合亲和力为至少 10^6 M 的 IgG 类全人抗体; 具有重链可变域和轻链可变域的全人抗体 Fab 片段; 具有来自重链的可变域、来自轻链的可变域、连接所述轻链和重链可变域的连接肽的单链人抗体; 及其组合;

[0049] 其中, 所述全人抗体的重链可变域序列与选自所述组中的氨基酸序列及其组合至少 95% 相同; 且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4, 及其组合;

[0050] 其中, 所述全人抗体 Fab 片段的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合; 且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合; 以及

[0051] 其中, 所述单链人抗体的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15、SEQ ID NO. 17、SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 43, 及其组合; 且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少 95% 相同: SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44, 及其组合;

[0052] 优选地, 所述全人抗体具有重链和轻链, 其中所述抗体的重链 / 轻链可变域序列选自以下序列: SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2, SEQ

ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合 ; 优选地, 所述全人抗体 Fab 片段具有重链可变域和轻链可变域, 其中所述抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列 : SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 19/SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合 ; 优选地, 所述全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域, 其中所述单链全人抗体的重链 / 轻链可变域序列选自下列序列 : SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 5/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 6/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 8/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 9/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 10/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 12/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 13/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 14/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 15/SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 17/SEQ ID NO. 18、SEQ ID

NO. 19/SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21/SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23/SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 25/SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 27/SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 29/SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32, SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 35/SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 39/SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 44, 及其组合。

[0053] 优选地,所述以此治疗的广谱哺乳动物癌症选自:卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、骨髓瘤、原始神经母细胞性的 CNS 瘤、单核细胞性白血病、B 细胞性白血病、T 细胞性白血病、B 细胞性淋巴瘤、T 细胞性淋巴瘤、肥大细胞性肿瘤及其组合。优选地,所述自体免疫疾病或炎性疾病选自:肠粘膜炎、结肠炎相关性消耗病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、病毒感染、类风湿关节炎、骨关节炎、牛皮癣、克罗恩病和炎症性肠疾病。

[0054] “抗原结合蛋白”是包括以下部分的蛋白:与抗原结合的部分;以及可选地,允许抗原结合部分采取促进抗原结合蛋白与蛋白的结合的构型的支架或骨架部分。抗原结合蛋白的例子包括抗体、抗体片段(例如,抗体的抗原结合部分)、抗体衍生物和抗体类似物。该抗原结合蛋白可以包括,例如,具有接枝的 CDRs 或 CDRs 衍生物的替代蛋白支架或人工支架。所述支架包括但不限于,包含引入了突变(例如用于稳定该抗原结合蛋白的三维结构的突变)的抗体衍生支架,以及包括例如生物可相容聚合物的全合成支架。例如参见:Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129;Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654。此外,可以使用多肽抗体模拟物(“PAMs”),以及基于以纤维蛋白连接素成分为支架的抗体模拟物的支架。

[0055] 抗原结合蛋白可以具有,例如,天然存在的免疫球蛋白的结构。“免疫球蛋白”是四聚物分子。在天然存在的球蛋白中,每个四聚物由 2 对相同的多肽链组成,每对中有一条“轻”(约 25kDa)链和一条“重”链(约 50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约 100-110 或以上氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分具有恒定区,主要负责效应子功能。人轻链归类为 κ (kappa) 或 λ (lambda) 轻链;重链归类为 μ (mu)、 Δ (delta)、 γ (gamma)、 α (alpha) 或 ϵ (epsilon),分别令抗体的种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链中,可变域和恒定域由约 12 个或以上氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括一个再含约 10 个或以上氨基酸的“D”区。一般请参见 *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)) (在此为任何目的以引用的方式全文并入)。每对轻/重链的可变域组成了抗体结合位点,因此一个完整的免疫球蛋白具有 2 个结合位点。

[0056] 天然存在的免疫球蛋白链具有的相同通用结构为相对保守骨架区 (FR) 连接 3 个高变区(也称为互补决定区或 CDRs)。从 N-端到 C-端,轻链和重链均包含以下域:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。每个域中的氨基酸分配与 Kabat et al. 在 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991 中所述一致。其他的免疫球蛋白链氨基酸编号系统包括 IMGT. RTM. (国际免疫遗传学信息系统 (International Immunogenetics information system; Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 29:185-203; 2005) 和 AHo (Honegger and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 309 (3):657-670; 2001)。

[0057] 抗体可以从含多样化抗原特异性免疫球蛋白的血清或血浆等来源制得。如果此类

抗体进行亲和纯化,则能够针对特定抗原特异性进行富集强化。所述抗体富集制剂通常由低于约 10%的针对特定抗原具有特定结合活性的抗体组成。将这些制剂经过几轮亲和纯化,能够增加针对抗原具有特定结合活性的抗体的比例。以此方式制备的抗体通常称为“单特异性”。单特异性抗体制剂可以由约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或 99.9%的针对特定抗原具有特定结合活性的抗体组成。“抗体”指的是完整免疫球蛋白或其能与完整抗体为特异结合而竞争的抗原结合部分,除非另有说明。抗原结合部分可以由重组 DNA 技术或完整抗体的酶切或化学裂解法制备。抗原结合部分包括但不限于:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、域抗体(dAbs),以及互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、二聚体、三聚体、四聚体和至少包含足以令特定抗原与多肽结合的免疫球蛋白部分的多肽。

[0058] Fab 片段是具有 V_L、V_H、C_L和 C_{H1}域的单价片段;F(ab')₂片段是具有 2 个 Fab 片段的二价片段,其 Fab 片段在铰链区处由二硫键连接;Fd 片段具有 V_H和 C_{H1}域;Fv 片段具有抗体单臂的 V_L和 V_H域;dAb 片段具有 V_H域、V_L域或具有 V_H域或 V_L域的抗原结合片段(美国专利 6846634、6696245;美国专利申请公开 20/0202512;2004/0202995;2004/0038291;2004/0009507;2003/0039958,以及 Ward et al., Nature341:544-546, 1989)。

[0059] 单链抗体(scFv)是一种抗体,其中 V_L和 V_H域由连接子(例如,氨基酸残基合成序列)连接以形成连续蛋白链,且该连接子的长度足以允许该蛋白链自身折叠并形成单价抗原结合位点(Bird et al., 1988, Science242:423-26and Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83)。二聚体是含有两条多肽链的二价抗体,其中每条多肽链包括由连接子连接的 V_L和 V_H域,且该连接子长度短,不允许同一条链上的两个域之间配对,由此每个域能够与另一条多肽链上的互补域配对(Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-48, and Poljak et al., 1994, Structure 2:1121-23)。若二聚体的 2 条多肽链相同,则其配对所得的二聚体将具有 2 个相同的抗原决定位点。具有不同序列的多肽链可用于形成具有 2 个不同抗原结合位点的二聚体。类似地,三聚体和四聚体分别是含有 3 个或 4 个多肽链并分别形成 3 个或 4 个抗原结合位点(可以相同或不同)的抗体。

[0060] 可以使用 Kabat et al. supra;Lefranc et al., supra and/or Honegger and Pluckthun, supra. 等所述的体系识别特定抗体的互补决定区(CDRs)和骨架区(FR)一个分子中可以共价或非共价地包含一个或多个 CDRs,来使其成为抗原结合蛋白。抗原结合蛋白可以并入作为较大多肽链的一部分的 CDR(s),可以将该 CDR(s)共价连接另一个多肽链,或可以非共价地连接该 CDR(s)。所述 CDRs 允许该抗原结合蛋白与所需的特定抗原进行特异结合。

[0061] 抗原结合蛋白可以具有一个或多个结合位点。若有超过一个结合位点,这些结合位点可以相同或不同。例如,天然存在的人免疫球蛋白典型地具有 2 个相同结合位点,而“双特异”或“双官能团”抗体则具有 2 个不同结合位点。

[0062] 术语“人抗体”包括具有源于人免疫球蛋白序列的一个或多个可变域和恒定域的所有抗体。在一个实施例中,所有的可变域和恒定域均源自人免疫球蛋白序列(全人抗体)。这些抗体可以从多种途径制备,下文对此进行了举例,包括通过与小鼠的目标抗原的免疫反应,其中小鼠经过基因改造以表达源自人重链和/或轻链编码基因的抗体。

[0063] 人源化抗体的序列不同于源自非人物种的抗体序列,其差别在于一个或多个氨基

酸的取代、删除和 / 或添加,由此令该人源化抗体在对人类对象给药时,引起免疫反应的可能性低于非人物种抗体,和 / 或引起的免疫反应严重性降低。在一个实施例中,非人物种抗体的重链和 / 或轻链的骨架和恒定区中的某些氨基酸突变,以产生人源化抗体。在又一个实施例中,人抗体的恒定区融合至非人物种的可变域。在又一个实施例中,非人抗体的一个或多个 CDR 序列中的一个或多个氨基酸残基改变,以降低该非人抗体向人类对象给药时的可能的免疫原性,其中改变的氨基酸残基要么对于该抗体与其抗原的免疫特异结合来说并不重要,或该氨基酸序列的改变是保守变化,由此该人源化抗体与抗原的结合并不显著差于该非人抗体与抗原的结合。如何制备人源化抗体的示例可以参见美国专利 6054297 ; 5886152 和 5877293。

[0064] 术语“嵌合抗体”指的是含有来自一个抗体的一个或多个区和来自一个或多个其他抗体的一个或多个区的抗体。在一个实施例中,一个或多个 CDRs 源自人抗 CCR2 抗体。在另一个实施例中,所有 CDRs 都源自人抗 CCR2 抗体。在另一个实施例中,源自多个人抗 CCR2 抗体的 CDRs 混合搭配在嵌合抗体中。例如,嵌合抗体可以包括来自第一个人抗 PAR-2 抗体的轻链的 CDR1、来自第二个人抗 CCR2 抗体的轻链的 CDR2 和 CDR3,以及来自第三个抗 CCR2 抗体的重链的 CDRs。其他组合也是可能的。

[0065] 此外,骨架区可以来自相同的抗 CCR2 抗体之一,一个或多个不同抗体(例如人抗体),或来自人源化抗体。在一个嵌合抗体的实施例中,其重链和 / 或轻链的局部等同于、同源或来源于:特定物种的抗体,或类属于特定抗体类型或亚类的抗体;且所述链的剩余部分等同于、同源或来源于:另一个特定物种的抗体,或类属于另一个特定抗体类型或亚类的抗体。还包括所述抗体具有所需生物活性的片段(即,能够特异性结合 CCR2 的能力)。

[0066] “中和抗体”或“抑制抗体”是当过量抗 CCR2 抗体令蛋白水解激活量降低至少约 20% (使用如本文实施例中所述的化验)时,对 CCR2 的蛋白水解激活进行抑制的抗体。在各实施例中,抗原结合蛋白将 CCR2 的蛋白水解激活量降低至少 30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99% 和 99.9%。本领域技术人员根据本说明书的教导并使用本领域熟知的技术,能够容易地制备抗体片段或类似物。片段或类似物的氨基末端和羧基末端优选为靠近功能域的边界。可以通过将核苷酸和 / 或氨基酸序列数据与公共或私人序列数据库,来识别结构域和功能域。可以使用计算机化的比较方法来识别存在于已知结构和 / 或功能的其他蛋白中的序列基序或预期蛋白构造域。用于识别折叠为已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的,参见 Bowie et al., 1991, Science 253:164。

[0067] “CDR 接枝抗体”是含有来自特定物种或种型抗体的一个或多个 CDRs 和来自相同或不同物种或种型的另一抗体的骨架的抗体。

[0068] “多特异抗体”是识别一种或多种抗原上的多个表位的抗体。此类型抗体的一个子类为“双特异抗体”,其识别相同或不同抗体上的两个不同表位。

[0069] 若抗原结合蛋白在结合抗原(例如人 CCR2)时的解离常数为 1 毫微摩尔或以下,则称其与抗原“特异结合”。

[0070] “抗原结合域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”是指抗原结合蛋白上含有与抗原相互作用的氨基酸残基(或其他化学部分)并有利于该抗原结合蛋白对该抗原的特异性和亲和性的部分。对于与其抗原特异结合的抗体而言,这包括其至少一个 CDR 域的至少一部分。

[0071] “表位”是分子上连接抗原结合蛋白（例如，抗体）的部分。表位可以包括该分子的非邻近部分（例如，在多肽中，在多肽一级序列中并不相邻但在该多肽的三级和四级结构中相互足够靠近以被抗原结合蛋白结合的氨基酸残基）。

[0072] 两个多核苷酸或两个多肽序列的“相同百分比”是用GAP电脑程序(GCG Wisconsin Package, version 10.3(Accelrys, San Diego, Calif.))中的一部分)以其默认参数来比较序列而确定的。

[0073] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”在全文中可交换地使用,其包括DNA分子(例如cDNA或基因组DNA)、RNA基因组(例如mRNA)、以核苷酸类似物生成的DNA或RNA类似物(例如,肽核酸和非天然存在核苷酸类似物)及其杂合体。核酸分子可以是单链或双链的。在一个实施例中,本发明的核酸分子包括编码抗体或其片段、衍生物、突变蛋白或变体的连续开放阅读框。

[0074] 若两条单链多核苷酸的序列能够反向平行对齐,使得一条多核苷酸中的每个核苷酸都与另一条多核苷酸上的互补核苷酸相对,而不存在间隙,且各序列的5'端或3'端也没有不配对的核苷酸,则称这两条多核苷酸互为“互补链”。若两条多核苷酸可在中等严格条件下相互杂交,则称其“互补”。因此,一条多核苷酸可以在并非对方互补链的情况下与另一条多核苷酸互补。

[0075] “载体”是一种可用于将另一条与之连接的核酸引入细胞的核酸。一种载体类型是“质粒”,即可供额外核酸片段连接的线形或环形双链DNA分子。另一种载体类型是病毒载体(例如复制缺陷反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其中额外DNA片段可引入病毒基因组中。某些载体被引入宿主细胞后能够进行自主复制(例如,含有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳类载体)。其他载体(例如,非附加体哺乳类载体)当引入宿主细胞时,整合入宿主细胞的基因组,由此随着宿主基因组进行复制。“表达载体”是一种能够进行指定多核苷酸表达的载体类型。

[0076] 当核苷酸序列所连接的调控序列影响该核苷酸序列的表达(例如表达水平、时机或位点)时,则称该核苷酸序列“可操作地”连接到该调控序列。“调控序列”是能够影响与之可操作地连接的核酸的表达(例如表达水平、时机或位点)的核酸。例如,调控序列可以直接对其所调控的核酸起作用,或通过一个或多个其他分子(例如与该调控序列和/或核酸结合的多肽)来起作用。调控序列的例子包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。调控序列的其他例子记载在例如Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 和Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06中。

[0077] “宿主细胞”是可用于表达核酸,例如本发明核酸的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,例如E. coli;或真核细胞,例如真核单细胞(如酵母菌或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(如人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、小鼠细胞、大鼠细胞或昆虫细胞)或杂种细胞。宿主细胞的例子包括猴肾细胞COS-7系(ATCC CRL 1651)(参见Gluzman et al., 1981, Cell 23:175)、L细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物|(例如Veggie CHO)和在无血清培养基上生长的相关细胞系(参见Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31),或CHO的DX-B11品系(缺少DHFR)(参见Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20)、HeLa细胞、

BHK (ATCC CRL 10) 细胞系、源于非洲绿猴肾细胞系 CV1 的 CV1/EBNA 细胞系 (ATCC CCL 70) (参见 McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821)、人胚肾细胞 (例如 293、293EBNA 或 MSR 293)、人表皮 A431 细胞、人 Colo205 细胞、其他转化灵长类细胞系、正常二倍体细胞、源于初生组织和初生外植体的体外培养所得的细胞系、HL-60、U937、HaK 或 Jurkat 细胞。典型地, 宿主细胞是能够以编码多肽且能够在该宿主细胞中表达的核酸转化或转染得到的培养细胞。术语“重组宿主细胞”可用于表示已经用需表达的核酸来转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是指包含该核酸, 但在调控序列被引入该宿主细胞并与该核酸可操作连接以前, 并不以所需表达水平来表达该核酸的细胞。应当理解, 术语“宿主细胞”并不单指特定的对象细胞, 而是也指所述细胞的后代或潜在后代。因为由于例如突变或环境影响的存在, 后代中可能发生某些修饰, 使得这些后代事实上与其亲代细胞并不等同, 但其仍应属于本文中的“宿主细胞”术语所涵盖的范围。

[0078] 优选地, 待治疗的广谱哺乳动物癌症选自骨肉瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、任何儿科癌、肾癌、白血病、肾移行细胞癌、沃纳-莫里森 (Werner-Morrison) 综合征、肢端肥大症、膀胱癌、肾母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、良性前列腺增生、乳腺癌、前列腺癌、骨癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、子宫颈癌、滑膜肉瘤、转移性类癌相关性腹泻、血管活性肠肽分泌肿瘤、巨人症、牛皮癣、动脉粥样硬化、血管和微血管不适当的增殖的平滑肌再狭窄、头颈部癌、鳞状细胞癌、多发性骨髓瘤、孤立性浆细胞瘤、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、生殖细胞肿瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、黑素瘤、肾横纹肌样瘤、尤因肉瘤 (Ewing Sarcoma)、软骨肉瘤、血液恶性肿瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、急性粒细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、霍奇金 (Hodgkin) 氏病、非霍奇金 (Hodgkin) 氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病、肥大细胞白血病、肥大细胞瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特 (Burkitt) 淋巴瘤、蕈样真菌病、西扎里 (Seary) 综合征、皮肤 T 细胞淋巴瘤、慢性骨髓增殖性疾病、中枢神经系统肿瘤、脑癌、成胶质细胞瘤、非成胶质细胞瘤脑癌、脑膜瘤、垂体腺瘤、前庭神经鞘瘤、原始神经外胚层瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤和脉络丛乳头状瘤、骨髓增生性障碍、真性红细胞增多症、血小板增多症、特发性骨髓纤维化、软组织肉瘤、甲状腺癌、子宫内膜癌、类癌肿瘤、生殖细胞肿瘤、肝癌、巨人症、牛皮癣、动脉粥样硬化、平滑肌血管再狭窄、不恰当的微血管增生、肢端肥大症、巨人症、牛皮癣、动脉粥样硬化、血管或微血管不适当增殖、格雷夫斯 (Grave) 氏病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、桥本 (Hashimoto) 氏甲状腺炎、重症肌无力、自身免疫甲状腺炎和白塞 (Bechet) 氏病。

[0079] 本文所称的“CCR2 介导疾病”指的是涉及以下各项的疾病: 从一个部位到另一部位的移动 (例如招募)、从一个部位到另一部位的渗透、增殖、分化和 / 或表达 CCR2 的细胞的功能。表达 CCR2 的细胞包括, 例如, 单核细胞、树突细胞、巨噬细胞、T 细胞、淋巴细胞、嗜碱粒细胞、肥大细胞、内皮细胞和成纤维细胞。CCR2 介导的疾病例子包括但不限于: i) 炎性或免疫性疾病; ii) 心血管疾病; iii) 增殖性疾病; iv) 移植物排斥; v) 纤维化疾病; vi) 病毒感染; vii) 神经性疾病; 和 viii) 代谢疾病。

[0080] 炎性疾病和症状可以是慢性或急性的。炎性或免疫性疾病的例子包括但不限于: 呼吸性疾病, 例如哮喘、鼻炎、过敏性肺疾病、过敏性肺炎、间质性肺病 (ILD) (例如特发性

肺间质纤维化或类风湿性关节炎相关的ILD)、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、系统性硬化症、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、多发性肌炎或皮炎;炎性肠病,例如克罗恩病和溃疡性结肠炎;脊柱关节病;硬皮病;牛皮癣和炎性皮肤病,例如皮炎、湿疹、特应性皮炎、荨麻疹;血管炎(例如坏死性、皮肤性及过敏性血管炎);以及炎性肾小球病。

[0081] 炎性或免疫性疾病的其他例子包括自体免疫疾病,例如关节炎(例如类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎);多发性硬化症;系统性红斑狼疮;重症肌无力;青少年发病型糖尿病;肾炎,例如肾小球肾炎;自身免疫性甲状腺炎;获得性免疫缺陷综合症(AIDS)和白塞(Behcet)氏病。

[0082] 还有一些炎性或免疫性疾病的其他例子,包括过敏性疾病和症状,例如呼吸性过敏疾病,如哮喘、过敏性鼻炎、过敏性肺疾病和过敏性肺炎;过敏反应或超敏反应;药物过敏(例如对盘尼西林和头孢菌素过敏);昆虫蜇过敏;过敏性接触性皮炎;脉管炎(例如超敏性脉管炎);以及组胺和IgE介导的过敏反应。

[0083] 心血管疾病包括但不限于,动脉粥样硬化形成;动脉粥样硬化;冠状动脉疾病;心肌梗塞;中风;急性冠状动脉综合征;血栓形成;动脉粥样硬化性的外周血管疾病;高血压;以及,血脂异常。

[0084] 增殖性病征包括但不限于癌症或肿瘤。“癌症”或“肿瘤”意在包括患者的任何肿瘤生长,包括初始肿瘤和任何转移瘤。所述癌症可以是白细胞浸润皮肤或器官的癌症,可以是液体瘤或固体瘤种类。液体瘤包括血液来源的肿瘤,包括例如骨髓瘤(多发性骨髓瘤)、白血病(例如瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom's)综合征、慢性淋巴细胞性白血病、其他白血病等)和淋巴瘤(例如B细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤)。实体瘤可以是器官起源,并且包括例如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌和肝癌。如本文所称,癌症细胞,包括肿瘤细胞,是指异常(增加的)速率分裂的细胞。癌细胞包括但不限于:癌,如鳞状细胞癌、基底细胞癌、汗腺癌、皮脂腺癌、腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、未分化癌、支气管癌、黑色素瘤、肾细胞癌、肝癌、肝细胞癌、胆管癌、乳头状癌、移行细胞癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎癌、乳房癌、胃肠癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌和颈部和头部区域鳞状细胞癌;肉瘤,如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤和间皮肉瘤;血液肿瘤,例如骨髓瘤、白血病(例如急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、粒细胞性白血病、单核细胞白血病、淋巴细胞性白血病),以及淋巴瘤(例如滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、恶性淋巴瘤、浆细胞、网状细胞肉瘤或霍奇金症);以及神经系统瘤,包括神经胶质瘤、脑膜瘤、神经管细胞瘤、神经鞘瘤或室管膜瘤。

[0085] 移植物排斥(例如在移植中),包括但不限于,同种异体移植排斥或移植物抗宿主疾病。

[0086] 纤维化疾病,包括但不限于,硬皮症。

[0087] 神经性疾病,包括但不限于,选自AIDS相关痴呆症和疼痛(例如神经病理性疼痛)。

[0088] 代谢性疾病,包括但不限于,糖尿病。

[0089] 期望抑制不良炎性应答的其他疾病或症状(包括CCR2-介导疾病或症状),包括但不限于,再灌注损伤;某些恶性血液病;细胞因子诱导毒性(例如感染性休克、内毒素休

克)、多肌炎;皮炎;以及类肉状瘤病。

[0090] 本公开的多肽可使用本领域所知的任何标准方法制得。在一个实施例中,所述多肽是以 DNA 重组的方法,通过将编码该多肽的核酸序列(例如, cDNA)插入重组表达载体,并在促进表达的条件下表达该 DNA 序列来制得的。

[0091] 编码本文公开的各种多肽的核酸可以化学合成制得。可以选择密码子使用来提高细胞中的表达。所述密码子使用取决于所选择的的细胞类型。E. coli 和其他细菌,以及哺乳类细胞、植物细胞、酵母菌细胞和昆虫细胞,都已经发展了专门的密码子使用模式。例如,参见:Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003100(2):438-42; Sinclair et al. Protein Expr. Purif. 2002(1):96-105; Connell N D. Curr. Opin. Biotechnol. 200112(5):446-9; Makrides et al. Microbiol. Rev. 199660(3):512-38; 和 Sharp et al. Yeast. 19917(7):657-78)。

[0092] 用于核酸操作的常见技术描述例如可参见:Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ed., 1989; 或 F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987) 及其定期更新,在此以引用方式并入本文。编码该多肽的 DNA 可操作地连接在源于哺乳类、病毒或昆虫基因的适当转录或翻译调节因子上。所述调节因子包括转录启动子、可选的用于控制转录的操纵子序列、编码适当 mRNA 核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译终止的序列。此外,还添加了在宿主中复制的能力,这一般是由复制起点和用于促进对转化体识别的选择基因来达成的。

[0093] 重组 DNA 还可以包括可能对纯化蛋白有用的任何蛋白标记序列种类。蛋白标记的例子包括但不限于组氨酸标记、FLAG 标记、myc 标记、HA 标记或 GST 标记。适用于细菌、真菌、酵母菌和哺乳类细胞宿主的克隆和表达载体可以参见:Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, N. Y., 1985)。

[0094] 采取适用于宿主细胞的方法将该表达结构引入宿主细胞。本领域已知有各种用于将核酸引入宿主细胞的方法,包括但不限于:电穿孔;以氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖(DEAE-dextran)或其他物质进行的转染;微弹轰击法(microprojectile bombardment);脂质转染;以及,感染(其中载体充当感染原)。适当的宿主细胞包括原核细胞、酵母菌、哺乳类细胞或细菌细胞。

[0095] 适当的细菌包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如, E. coli 或 Bacillus spp. 酵母菌,优选为 Saccharomyces 菌种(例如 S. cerevisiae),也可以用于多肽制备。各种哺乳类或昆虫细胞培养体系也可用于表达重组蛋白。用于在昆虫细胞中制备外源蛋白的 Baculovirus 体系可参见综述:Luckow and Summers, (Bio/Technology, 6:47, 1988)。适当的哺乳类宿主细胞系的例子包括内皮细胞、COS-7 猴肾细胞、CV-1、L 细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、人胚肾细胞、HeLa、293、293T 和 BHK 细胞系。通过培养适当的宿主/载体体系来表达重组蛋白,以制备纯化多肽。在许多应用中,本文公开的众多多肽的小尺寸使得在 E. coli 中表达成为优选表达方法。然后,从培养基或细胞提取物中纯化该蛋白。

[0096] 本文所公开的蛋白还可以使用细胞翻译体系来制备。为此,必须对编码该多肽的核酸进行修饰,以允许体外转录以产生 mRNA 并允许该 mRNA 在所用的特定无细胞体系(真

核（例如哺乳类或酵母菌）无细胞翻译体系或原核（例如细菌）无细胞翻译体系）中进行无细胞翻译。

[0097] CCR2 结合性多肽还可以通过化学合成来制备（例如，通过如 Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. 中所述的方法）。还可以通过化学合成来产生对蛋白的修饰。

[0098] 本公开中的所述多肽可以通过蛋白化学领域众所周知的蛋白分离 / 纯化方法进行纯化。非限制性的例子包括：提取、重结晶、盐析（例如，硫酸铵或硫酸钠）、离心、渗析、超滤、吸附层析、离子交换层析、疏水层析、正相层析、反相层析、凝胶过滤、凝胶渗透层析、亲和层析、电泳、逆流分布或其任意组合。纯化后，多肽可以交换入不同缓冲液，和 / 或以本领域所知各种方法中的任一种（包括但不限于过滤和渗析）浓缩。

[0099] 纯化多肽优选为具有至少 85% 纯度，更优选的纯度为至少 95%，最优选纯度为至少 98%。无论该纯度的确切数值是多少，该多肽的纯度足以用作医药产品。

[0100] 多肽的翻译后修饰

[0101] 在一些实施例中，本发明的结合性多肽还可以包括翻译后修饰。示范性翻译后蛋白修饰包括磷酸化、乙酰化、甲基化、在一些实施例中，本发明的结合性多肽还可以包括翻译后修饰。示范性翻译后蛋白修饰包括磷酸化、乙酰化、甲基化、ADP-核糖基化、泛素化、糖基化、羰基化、类泛素化、生物素酰化或添加多肽侧链或疏水基。由此一来，修饰后的可溶性多肽可能含有非氨基酸成分，例如脂类、多糖或单糖、磷酸。糖基化的一种优选形式为唾液酸化，其将一个或多个唾液酸部分链接至所属多肽。唾液酸部分提高蛋白的可溶性及血清半排出期，同时还降低其可能的免疫原性。参见 Raju et al. *Biochemistry*. 200131; 40(30):8868-76。可以测试所述非氨基酸成分对多肽功能性的影响以了解其对 CCR2 功能的拮抗作用。

[0102] 在一个特定实施例中，所述可溶性多肽的修饰形式包括将所述可溶性多肽链接至非蛋白质高分子。在一个特定实施例中，所述高分子为聚乙二醇 (PEG)、聚丙醇或聚氧化烯烃，如美国专利 4640835 ; 4496689 ; 4301144 ; 4670417 ; 4791192 或 4179337 所述。修饰多肽的例子包括聚乙二醇化的 VK-B8。

[0103] PEG 是可溶于水的聚合物，其市面有售，或可以根据本领域所熟知的方法 (Sandler and Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161) 通过乙二醇的开环聚合反应制备而成。术语“PEG”用于广泛涵盖任何聚乙二醇分子，无论其大小或 PEG 末端的修饰为何，且可以用以下公式代表： $X-O(CH_2CH_2O)_n-1CH_2CH_2OH(1)$ ，其中 $n = 20-2300$ 且 X 为 H 或末端修饰（例如 C_4 烷基）。在一个实施例中，本发明的 PEG 的一个末端以羟基或甲氧基结尾，即 X 为 H 或 CH_3 （“甲氧基 PEG”）。PEG 还可以进一步包括：结合反应所必需的化学基团；源于该分子的化学合成的化学基团；或作为该分子的部分的最佳距离的间隔子的化学基团。此外，所述 PEG 可以由一个或多个连接在一起的 PEG 侧链组成。具有多个 PEG 链的 PEGs 称为多臂或分支 PEGs。分支 PEGs 可以通过例如向各种多元醇（包括甘油、季戊四醇、山梨醇）添加聚氧化乙烯来制备。例如，可以从季戊四醇和环氧乙烷制备 4 臂分支 PEG。分支 PEG 参见例如 EP-A0473084 和美国专利 5932462 所述。PEGs 的一种形式包括两个通过赖氨酸的主要氨基链接的 PEG 侧链 (PEG2) (Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6(1995)62-69)。

[0104] 虽然本领域已熟知 PEG, 但据我们所知, 这是对聚乙二醇化^{10F}n3 多肽能够聚乙二醇化同时保持配体结合活性的首次展示。在一个优选实施例中, 所述聚乙二醇化^{10F}n3 多肽是通过定点聚乙二醇化制备的, 尤其是通过将 PEG 的 N 端或 C 端连接到半胱氨酸部分。相应地, 本公开提供了一种具有改良的药代动力学性质的靶向结合性^{10F}n3 多肽, 所述多肽包括: 具有约 80 至 150 个氨基酸的^{10F}n3 域, 其中所述^{10F}n3 域的环中至少一个参与靶向结合; 以及, 共价结合的 PEG 部分, 其中所述^{10F}n3 多肽与目标结合的 K_D 低于 100nM 并在哺乳动物中具有低于 30mL/hr/kg 的排出率。所述 PEG 部分可以通过顶点抉意抽华连接在所述^{10F}n3 多肽上, 例如通过连接到 Cys 残基(该 Cys 残基可以定位在^{10F}n3 多肽的 N 端, 或在 N 端和最 N 端 β -或 β 类链上, 或^{10F}n3 多肽的 C 端, 或在 C 端和最 C 端 β -或 β 类链上)上。Cys 残基还可以定位在其他位点上, 尤其是任何不参与靶向结合的环上。PEG 部分还可以通过其他化学途径连接, 包括与胺类连接。

[0105] PEG 与多肽或蛋白的连接, 一般涉及 PEG 的激活和激活后 PEG 中间体与靶蛋白/多肽的直接偶联, 或与连接体偶联, 从而将其激活并与靶蛋白/多肽偶联(参见 Abuchowski et al., J. Biol. Chem., 252, 3571(1977) 和 J. Biol. Chem., 252, 3582(1977), Zalipsky, et al., and Harris et. al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap. 21 and 22)。注意, 含有 PEG 分子的结合性多肽也称为缀合蛋白质, 而缺乏 PEG 分子连接的蛋白则可称为未缀合。

[0106] 可以选择各种分子量形式的 PEG(例如, 约 1000 道尔顿(Da)-100000Da($n = 20 \sim 2300$)) 来连接至 EGFR 结合性多肽。PEG 中得重复单元数“n”是根据以道尔顿为单位的分子量的近似值。优选地, 一个激活的连接子上的 PEG 的总分子量适合于医药用途。因此, 在一个实施例中, 所述 PEG 分子的分子量不超过 100000Da。例如, 若 3 个 PEG 分子连接在链接子上, 而每个 PEG 分子具有相同的分子量(12000Da, 每个 n 约为 270), 那么连接子上的 PEG 总分子量为约 36000Da(总 n 为约 820)。连接在连接子上的 PEG 分子量也可以不同, 例如, 在连接子上的 3 个 PEG 分子中, 其中可以有 2 个各 5000Da(每个 n 为约 110) 和 1 个 12000Da(n 为约 270) 的 PEG 分子。

[0107] 本公开的一个具体实施例中, CCR2 结合性多肽共价连接在通式 $--CO--(CH_2)_x--(OCH_2CH_2)_m--OR$ 的一个聚(乙二醇)基团上, 其中所述聚(乙二醇)基团的 $--CO$ (即羰基)与所述结合性多肽的一个氨基形成酰胺键; R 为低烷基; x 为 2 或 3; m 为约 450-约 950; 且 n 和 m 的选择使得所述结合物减去结合性多肽的分子量为约 10-40kDa。在一个实施例中, 结合性多肽的赖氨酸的 6-氨基为可用(自由)氨基。

[0108] 上述结合物可以更具体地由通式 (II) 表示: $P--NHC(=O)--(CH_2)_x--(OCH_2CH_2)_m--OR$ (II), 其中 P 为如本文所述的结合性多肽的基团(即无与通式 (II) 所示羰基形成酰胺的一个或多个氨基); 且其中 R 为低级烷基; x 为 2 或 3; m 为约 450 至约 950, 且其选择在于使得缀合物分子量减去结合性多肽分子量的差值为约 10-40Da。本文中所称的“m”的指定范围具有定向含义。在任何情况下, “m”的确切范围由 PEG 基团的分子量决定。

[0109] 本领域技术人员可以选择适当分子量的 PEG, 例如, 根据聚乙二醇化结合性多肽的医疗用途、所需剂量、循环时间、抗蛋白水解性、免疫原性和其他考量来选择。参见 Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10:91-114(1993) 中对 PEG 及其增进蛋白质性质的

用途的讨论。

[0110] 在一个实施例中,可以激活 PEG 分子并与结合性多肽上的氨基反应,例如赖氨酸 (Benham et al., *Anal. Biochem.*, 131, 25 (1983); Veronese et al., *Appl. Biochem.*, 11, 141 (1985).; Zalipsky et al., *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky et al., *Europ. Polym. J.*, 19, 1177-1183 (1983); Delgado et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12, 119-128 (1990))。

[0111] 在一个特定实施例中,使用 PEG 的碳酸酯来形成该聚乙二醇化结合性多肽缀合物。可以用 N, N' - 二琥珀酰亚胺碳酸酯 (N, N' -disuccinimidylcarbonate, DSC) 与 PEG 反应以形成活性混合 PEG- 琥珀酰亚胺碳酸酯,随后可用该产物与连接肽的亲核基团或结合多肽的氨基反应 (参见美国专利 5281698 和 5932462)。在一种相似反应类型中,可以用 1, 1' - (二苯并三唑) 碳酸酯 (1, 1' - (dibenzotriazolyl) carbonate) 和二 - (2-吡啶) 碳酸酯 (di - (2-pyridyl) carbonate) 分别与 PEG 反应以形成 PEG- 苯并三唑和 PEG- 吡啶混合碳酸酯 (美国专利 5382657)。

[0112] 可以根据本领域中的现有方法来进行^{10F}n₃多肽的聚乙二醇化,例如通过令结合性多肽与亲电子活性 PEGs (供应商 Shearwater Corp., USA, www.shearwatercorp.com) 反应。本发明的优选 PEG 试剂为例如 N- 羟基琥珀酰亚胺丙酸酯 (PEG-SPA)、丁酸酯 (PEG-SBA)、PEG- 琥珀酰亚胺丙酸酯或带支链的 N- 羟基琥珀酰亚胺 (例如 mPEG2-NHS) (Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69)。此类方法可用于在结合性多肽赖氨酸的 ϵ - 氨基处或结合性多肽的 N 端氨基处进行聚乙二醇化。

[0113] 在又一个实施例中,PEG 分子可以连接在结合性多肽的巯基上 (Sartore et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45 (1991); Morpurgo et al., *Biocon. Chem.*, 7, 363-368 (1996); Goodson et al., *Bio/Technology* (1990) 8, 343; 美国专利 5766897)。美国专利 6610281 和 5766897 描述了可连接至巯基的示例反应 PEG 种类。

[0114] 在一些实施例中,PEG 分子缀合在结合性多肽的半胱氨酸残基上,这些半胱氨酸残基是该结合性多肽上的原生残基;而在其他一些实施例中,一个或多个半胱氨酸残基被设计引入该结合性多肽。可以向结合性多肽编码序列引入突变,来产生半胱氨酸残基。这可以通过例如令一个或多个氨基酸残基突变成为半胱氨酸残基来达成。用于突变为半胱氨酸残基的优选氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸和其他亲水残基。优选地,用于突变为半胱氨酸的残基是暴露在表面的残基。用于根据基本序列或蛋白来预测残基的表面可接触性的算法在本领域中是众所周知的。可选地,若已经解出了结合性多肽的设计和演化的基础骨架的晶体结构,则可以对比结合性多肽的氨基酸残基来预测表面残基 (Himanen et al., *Nature*. (2001) 20-27; 414 (6866): 933-8), 由此识别表面暴露的残基。在一个实施例中,半胱氨酸残基被引入结合性多肽的 N 端和 / 或 C 端或其附近,或引入环区中。

[0115] 在一些实施例中,该聚乙二醇化结合性多肽包括共价连接在 N 端氨基酸的 α - 氨基上的 PEG 分子。位点特异性的 N 端还原胺化反应如 Pepinsky et al., (2001) JPET, 297, 1059 和美国专利 5824784 所述。PEG- 醛在采用其他可用亲核氨基的蛋白的还原胺化反应中的用途,如美国专利 4002531、Wieder et al., (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12579 和 Chamow et al., (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 133 所述。

[0116] 在另一个实施例中,聚乙二醇化的结合性多肽包括一个或多个 PEG 分子,所述 PEG 分子与连接子共价连接,而连接子则与该结合性多肽 N 端氨基酸残基的 α 氨基相连接。所述途径公布于美国专利公开 2002/0044921 和 W0094/01451 中。

[0117] 在一个实施例中,结合性多肽的 C 端聚乙二醇化。在一个特定实施例中,通过引入 C 端叠氮蛋氨酸,随后通过斯陶丁格 (Staudinger) 反应连接甲基-PEG-三芳基磷化合物,来在蛋白质 C 端实现聚乙二醇化。Cazalis et al., *Bioconjug. Chem.* 2004 ;15(5):1005-1009 中叙述了该 C 端链接方法。

[0118] 结合性多肽的单聚乙二醇化,还可以根据 W0 94/01451 中所述的一般方法来产生。W0 94/01451 中描述了一种用于以修饰末端氨基酸 α -碳反应基团来制备重组多肽的方法。该方法的步骤涉及,形成重组多肽,并以一种或多种生物性加成于 N 端 α -胺和 C 端 α -羰基上的保护性基团来对其进行保护。所述多肽随后可以与化学保护剂反应,以选择性地保护反应侧链基团,从而防止侧链基团被修饰。该多肽随后可以用对该生物性保护基团具有特异性的剪切剂进行剪切,以形成无保护的末端氨基酸 α -碳反应基团。用化学试剂来修饰该无保护的末端氨基酸 α -碳反应基团。所述末端修饰保护侧链的单拷贝多肽,随后对侧链基团解保护,以形成末端修饰的重组单拷贝多肽。该方法的步骤的数目和顺序可以调整,以达成多肽的 N 端和 / 或 C 端氨基酸的选择性修饰。

[0119] 缀合反应中,结合性多肽与激活 PEG 的比值可以约为 1:0.5 至 1:50,约 1:1 至 1:30,或约 1:5 至 1:15。本发明中,可使用各种水性缓冲液来催化 PEG 至结合性多肽的共价加成。在一个实施例中,所用缓冲液的 pH 为约 7.0 至 9.0。在又一个实施例中,pH 在略微碱性的范围内,例如从约 7.5 至 8.5。可以使用 pKa 接近中性 pH 的缓冲液,例如磷酸缓冲液。

[0120] 可以使用本领域的常规分离和纯化技术来纯化聚乙二醇化结合性多肽,例如尺寸排阻(例如凝胶过滤)和离子交换层析法。也可以使用 SDS-PAGE 来分离产物。可以被分离出来的产物包括单体、二聚、三聚、多聚和未聚乙二醇化结合性多肽,以及自由 PEG。单 PEG 缀合物的百分比控制,可以通过在洗脱峰附近汇聚更广馏分来增加该组合物中的单 PEG 百分比。单 PEG 缀合物百分比在约 90%,代表着产量和活性的良好平衡。可能期望的组合物中例如至少 93%或至少 96%的缀合物为单 PEG 种类。在本发明的另一个实施例中,该单 PEG 缀合物百分比为 90%-96%。

[0121] 在一个实施例中,本发明的该聚乙二醇化结合性多肽包括 1 个、2 个或更多的 PEG 部分。在一个实施例中,该 PEG 部分连接在该蛋白表面的氨基酸残基上和 / 或远离该蛋白接触目标配体的表面。在一个实施例中,该聚乙二醇化结合性多肽中的 PEG 合并或总分子量为约 3000-60000Da,可选为约 10000-36000Da。在一个实施例中,聚乙二醇化结合性多肽中的 PEG 基本为线形直链 PEG。

[0122] 本发明的一个实施例中,该聚乙二醇化结合性多肽并非使用羟胺法(例如 450mM 羟胺 (pH 6.5) 在室温下反应 8-16 小时)从聚乙二醇化氨基酸残基水解而来,因此是稳定的。在一个实施例中,该组合物中超过 80%为稳定的单 PEG 结合性多肽,更优选为至少 90%,且最优选为至少 95%。

[0123] 在又一个实施例中,本发明中的该聚乙二醇化结合性多肽优选为,相对于未修饰蛋白保持至少 25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或 100%的生物活性。在一个

实施例中,生物活性指的是其与 CCR2 结合的能力,以 KD 、 k_{on} 或 k_{off} 来评估。在一个特定实施例中,该聚乙二醇化结合性多肽蛋白相对于未聚乙二醇化的结合性多肽,表现出增强的 CCR2 结合能力。

[0124] 相对于未修饰结合性多肽的清除率,PEG 修饰的多肽的血清清除率可以降低约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或甚至 90%。该 PEG 修饰的多肽的半排出期 ($t_{1/2}$) 也可能相对于未修饰蛋白得到改善。相对于未修饰结合性多肽的半排出期,该 PEG 修饰的多肽的半排出期可以被改善至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400% 或 500%, 或甚至 1000%。在一些实施例中,该蛋白半排出期是体外测定的,例如在盐水缓冲溶液或血清中。在其他实施例中,该蛋白半排出期是体内半排出期,例如该蛋白在血清或其他动物体液中的半排出期。

[0125] 治疗剂型和给药模式

[0126] 本公开中的特点之一在于,提供了用于治疗对抑制 CCR2 生物活性有应答的病症或预防其前置症状。优选的实施例中,所述病症的特征在于炎症或细胞异常增殖。给药的剂量取决于特定多肽类型及治疗中的特定症状,但能够被本领域技术人员容易地确定。一般来说,监管机构要求用作药物的蛋白试剂的制型能够使得致热源达到可接受的低水平。由此一来,药物制型通常会与其他制型非常不同,因为其几乎没有致热源,或至少仅含有由适当监管机构(例如, FDA) 所确定的可接受致热源水平。

[0127] 本公开的治疗组合物可以与药学可接受稀释剂、载体或赋形剂以单位剂型一同给药。给药的限定性示例可以是非肠道的(例如静脉注射,皮下注射)、口服或外用的。此外,可以使用任何基因治疗技术(使用编码本发明多肽的核酸),例如裸 DNA 递送、重组基因和载体、基于细胞的递送,包括间接体内操作患者细胞等。

[0128] 该组合物可以用丸剂、片剂、胶囊、液体或持续释放片剂的形式用于口服给药;或以液体形式用于静脉注射、皮下注射或非肠道给药;以凝胶剂、洗剂、软膏剂、乳膏剂或聚合物形式进行外用给药。

[0129] 本领域中熟知的制型方法可以参见例如“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”(20th ed., ed. A. R. Gennaro A R., 2000, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, Pa.)。外用给药的制型可以例如包括赋形剂、无菌水、盐水、聚亚烷基二醇如聚乙二醇、植物原料油或氢化萘。可以使用可生物相容、可生物降解的丙交酯聚合物,丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物来控制化合物的释放。可以使用纳米颗粒剂型(如可生物降解的纳米粒子、固体脂质纳米粒、脂质体)来控制化合物的体内分布。其他潜在的有用非肠道递送体系包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物颗粒、渗透泵、可植入输注系统和脂质体。该化合物的制型浓度根据若干因素而改变,包括药物给药剂量和给药途径。

[0130] 可选地,所述多肽可以作为药学可接受的盐的形式给药,例如药物产业中常用的无毒酸加成盐或金属络合物。酸加成盐的例子包括有机酸,例如乙酸、乳酸、双羟萘酸、马来酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、苯甲酸、棕榈酸、辛二酸、水杨酸、酒石酸、甲磺酸、甲苯磺酸或三氟乙酸等;聚合酸如单宁酸、羧甲基纤维素等;以及,无机酸,如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸等。金属络合物包括锌、铁等等。在一个实例中,所述多肽在乙酸钠的存在下配制,以增加热稳定性。

[0131] 用于口服的制剂包括含有活性成分和无毒的药学可接受赋形剂的混合物的片剂。

所述赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂或填料(例如蔗糖和山梨醇)、润滑剂、助流剂和抗粘附剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、二氧化硅、氢化植物油或滑石粉)。

[0132] 用于口服的制剂还可以提供为咀嚼式片剂,或活性成分与惰性固体稀释剂混合的硬明胶胶囊,或活性成分与水或油介质混合的软明胶胶囊。

[0133] 治疗有效剂量指的是对给药对象产生疗效的剂量。确切剂量取决于需治疗的病症,且可以由本领域技术人员使用已知技术来确定查明。一般来说,该多肽的给药为每天约 0.01g/kg 至约 50mg/kg,优选为每日 0.01mg/kg 至约 30mg/kg,最优选为每日 0.1mg/kg 至约 20mg/kg。该多肽可以每天给药(例如每日一次、两次、三次或四次)或优选为较低频率给药(例如,每周、每两周、每三周、每月或每季度)。此外,本领域已知,可能需要根据年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药时间、药物相互作用和疾病严重程度来调节,这可以由本领域技术人员以常规实验来确定。

[0134] 示例用法

[0135] 此述的 CCR2 结合性蛋白及其相关变体可用于多种治疗和诊断应用中,包括通过竞争或阻断与 CCR2 的结合来抑制 CCR2 的生物活性,以及向细胞递送细胞毒性或成像部分,优选为表达 CCR2 的细胞。所述分子的小尺寸和稳定结构,对于药物的生产,在某些要求迅速清除的应用中从身体迅速清除,以及制备适当的或以所具有所述性质的分子进行改进的新型递送体系,尤其具有价值。

[0136] 本公开的多肽,基于其作为 CCR2 生物活性的抑制剂效力,能够有效对抗数种癌症以及癌症并发症,例如胸膜积液和腹水。优选地,本公开的 CCR2 结合性多肽可用于治疗或预防过度增生性疾病或癌症以及癌转移扩散。本公开的抗 CCR2 抗体的优选适应症包括结肠直肠癌、头颈癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)和胰腺癌。癌症的非限制性例子包括膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、软骨癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、淋巴结癌、神经组织癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、骨骼肌癌、皮肤癌、脊髓癌、脾癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、气管癌、泌尿生殖道癌、输尿管癌、尿道癌、子宫癌或阴道癌。此外,还可以用本公开的抗 PD-L1 结合性多肽来治疗多种炎症病症。所述炎症病症包括例如与结肠炎相关的肠粘膜炎症消耗病、多发性硬化、全身性红斑狼疮、病毒性感染、风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣和克罗恩病(Crohn's disease)。

[0137] CCR2 结合多肽可单独给药或与一种或多种附加疗法共同给予,例如化疗、放疗、免疫疗法、手术治疗或其任意组合。如上所述,在其他治疗策略中,也可以使用长期疗法或辅助疗法。

[0138] 所述方法的某些实施例中,可以共同(同时)或不同时期(前后相继)地用一种或多种多肽治疗剂给药。此外,多肽治疗剂可以与另一种类治疗癌症或抑制血管生成的化合物共同给药。

[0139] 在某些实施例中,本发明所述抗 CCR2 抗体剂可单独使用。可选地,所述药剂可以与针对增殖性紊乱(如肿瘤)的治疗或预防的其他常规抗癌治疗途径组合使用。例如,所述方法可用于癌症预防药,癌症术后复发和转移预防,以及作为其他常规癌症疗法的佐药。本公开认为,常规癌症疗法(例如化疗、放疗、光疗、免疫疗法和手术)的效力可以通过使用所述多肽治疗剂来增强。

[0140] 据发现,多种常规化合物都具有抗肿瘤活性。这些化合物被用作化疗中的治疗剂,

以收缩实体瘤,预防转移瘤和预防进一步生长,或降低白血病或骨髓恶性肿瘤中的恶性细胞数量。虽然化疗对治疗多种恶性肿瘤有效,但许多抗肿瘤化合物会导致有害副作用。据发现,当结合两种或以上不同治疗时,治疗可能协同作用,允许降低每种治疗的剂量,由此降低每种化合物在较高剂量下产生的有害副作用。在其他实施例中,难于以一种疗法治疗的恶性肿瘤可能会响应两种或以上不同疗法的组合疗法。

[0141] 当本发明的多肽治疗剂附随或前后相继地与其他常规抗肿瘤剂组合给药时,所述治疗剂可能提高抗肿瘤剂的疗效,或克服所述抗肿瘤剂的细胞抗性。这能够减少抗肿瘤剂的剂量,由此降低有害副作用,或恢复抗肿瘤药在抵抗细胞中的效力。

[0142] 可用于组合抗肿瘤疗法的要学化合物包括但不限于:氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、天冬酰胺酶、卡介苗、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、秋水仙碱、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、柔红霉素、己二烯雌酚、己烯雌酚、多西他赛、多柔比星、表柔比星、雌二醇、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、染料木黄酮、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素、伊立替康、依立替康、来曲唑、亚叶酸、亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、诺考达唑、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、苏拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、二氯二茂钛、拓扑替康、曲妥珠单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0143] 某些化疗抗肿瘤化合物可以通过其进入例如下列基团的作用机理进行分类:代谢拮抗剂/抗癌剂,例如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖/抗有丝分裂剂,包括天然产物如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)、微管干扰物如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、新长春碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本、epidipodophyllotoxins(依托泊苷、替尼泊苷)、DNA损伤剂(放线菌素、安吡啶、蒽环类药物、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲密胺奥利沙伯、异环磷酰胺、美法仑、merchlorehtamine、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、泰素、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16));抗生素如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺酶,其系统性地代谢L-天冬酰胺并清除无法自身合成天冬酰胺的细胞);抗血小板药物;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂如氮芥类(氮芥、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(六甲密胺和噻替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(BCNU)及类似物、链佐星)、trazenes-达卡巴嗪(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂代谢拮抗剂,例如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特;激素、激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香化酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝剂(肝素、合成肝素盐和其他凝血酶抑制剂);纤维蛋白溶解剂(例如组织纤维溶酶原激活剂、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗迁移剂;抗分泌剂

(breveldin) ;免疫抑制剂 (环孢霉素、他克莫司 (FK-506)、西罗莫司 (雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯) ;抗血管生成化合物 (TNP-470、染料木黄酮) 和生长因子抑制剂 (例如、VEGF 抑制剂、成纤维细胞生长因子 (FGF) 抑制剂) ;血管紧张素受体阻断剂 ;一氧化氮供体 ;反义寡核苷酸 ;抗体 (曲妥珠单抗) ;细胞周期抑制剂和分化诱导剂 (维甲酸) ;mTOR 抑制剂、拓扑异构酶抑制剂 (多柔比星 (阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、eniposide、表柔比星、依托泊苷、伊达比星和米托蒽醌、拓扑替康、伊立替康)、皮质类固醇 (可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松、和泼尼松龙) ;生长因子信号转导激酶抑制剂 ;线粒体功能障碍诱导物和半胱天冬酶活化剂 ;和染色质干扰物。

[0144] 根据组合疗法的性质,可以在施加其他疗法的同时和 / 或之后以该多肽治疗剂给药。该多肽治疗剂的给药可以是单剂或多剂。在一些实施例中,该多肽治疗剂的给药开始于常规疗法之前的至少数天 ;而在其他实施例中,给药开始于紧接着该传统疗法之前或在施予传统疗法的同时。

[0145] 在一个诊断应用的实施例中,从疑患以异常血管生成为特征的疾病的病人取得生物样本,例如血清或组织活体切片,与本公开的可检测标记多肽接触,以检测 CCR2 水平。然后,将该 CCR2 水平与正常样本与该标记多肽接触而测得的 CCR2 水平比较。CCR2 水平的增量为至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%,可看作是诊断指标。

[0146] 在一些实施例中,CCR2 结合多肽进一步附着了能够被检测的标记 (例如,该标记可以是放射同位素、荧光化合物、酶或辅酶因子)。活性部分可以是放射性试剂,例如放射性重金属如铁螯合物,钷或锰的放射性螯合物,氧、氮、铁、碳或钷的正电子发射体,⁴³K、⁵²Fe、⁵⁷Co、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³²I 或 ⁹⁹Tc。可以使用连接有该部分的结合剂来作为成像剂,并以哺乳类 (例如人类) 诊断目的的有效剂量来给药,然后检测该成像剂的定位和累积。可以用放射性闪烁摄影术、核磁共振成像、计算机断层扫描或正电子成像术来检测该成像剂的定位和累积。可以使用指向 CCR2 的 CCR2 结合多肽的免疫闪烁成像,来检测和 / 或诊断癌症和脉管系统。例如,任何针对 CCR2 的结合性多肽,以 ⁹⁹钷、¹¹¹钷或 ¹²⁵碘标记后均可以有效地用于所述成像。对于本领域技术人员来说,显而易见,给药的放射性同位素量取决于该放射性同位素。本领域技术人员可以容易地根据用作活性部分的指定放射性核素的比活性和能量来计算成像剂的给药量。典型地,在给药中使用每剂 0.1-100 毫居成像剂,优选为 1-10 毫居,更常用的是 2-5 毫居。因此,本发明中可用作成像剂的组合物包含缀合的放射性部分和靶向部分,其含 0.1-100 毫居,在一些实施例中优选为 1-10 毫居,在一些实施例中优选为 2-5 毫居,在一些实施例中更优选为 1-5 毫居。

[0147] 该 CCR2 结合多肽还可用于想表达 CCR2 的细胞或组织递送额外的治疗试剂 (包括但不限于药物化合物、化疗化合物和放疗化合物)。在一个实施例中,该 CCR2 结合性多肽与化疗试剂融合,以将该化疗试剂靶向递送至表达 CCR2 的肿瘤细胞或组织。

[0148] 该 CCR2 结合多肽可用于各种应用中,包括研究、诊断和治疗应用。例如,其可用于分离和 / 或纯化受体或其部分,以及用于研究受体结构 (例如构象) 和功能。

[0149] 在一些方面中,可以使用所述多种结合性多肽来检测或测量 CCR2 表达,例如在内皮细胞 (例如静脉内皮细胞) 或被 CCR2 基因转染的细胞上的表达。因此,其还可以用于例如细胞分选和成像 (例如流式细胞仪和荧光激活细胞分选),以用于诊断或研究目的。

[0150] 在一些实施例中,所述结合性多肽或其片段用于诊断目的时可以标记或不标记。

典型第, 诊断性分析需要检测结合性多肽与 CCR2 之间结合而形成的复合物。所述结合性多肽或其片段可以被直接标记, 类似于抗体。可以使用各种标记, 包括但不限于, 放射性核素、荧光剂、酶、酶底物、辅酶因子、酶抑制剂和配体 (例如生物素、半抗原)。本领域技术人员熟知多种适当的免疫分析法 (例如参见美国专利 3817827、3850752、3901654、4098876)。未标记的结合性多肽可用于分析中, 例如凝集试验。未标记的结合性多肽还可以与另一种 (一种或多种) 可用于检测该结合性多肽的适当试剂 (例如能与该结合性多肽反应的已标记抗体或其他适当试剂 (如标记的蛋白 A)) 组合使用。

[0151] 在一个实施例中, 本发明的结合性多肽可用于酶免疫分析, 其中所述多肽与酶缀合。当含有 CCR2 蛋白的生物样本与所述结合性多肽 CCR2 接触时, 结合性多肽和 CCR2 蛋白之间发生结合。在一个实施例中, 含有表达 CCR2 蛋白的细胞 (例如内皮细胞) 的样本与所述抗体接触, 而在结合性多肽和载有能被该结合性多肽识别的 CCR2 蛋白的细胞之间发生结合。已结合细胞从未结合试剂中分离, 且可以测定特异结合至细胞上的结合性多肽-酶嵌合体的存在, 例如通过令该样本与能够在该酶作用下产生颜色或其他可检测变化的酶底物相接触。在又一个实施例中, 可以不标记所述结合性多肽, 而添加第二种已标记多肽 (例如一种抗体) 来识别所述结合性多肽。

[0152] 在一些方面中, 还可以制备用于检测生物样本中的 CCR2 蛋白的存在的试剂盒。所述试剂盒可包括与 CCR2 蛋白或所述受体的部分相结合的 CCR2 结合性多肽, 以及一种或多种适用于检测结合性多肽与受体蛋白或其部分之间的复合物的存在的辅助试剂。本发明的多肽组合物可提供为单独与其他表位特异性的额外抗体组合的冻干形式, 所述标记或未标记的结合性多肽和 / 或抗体可以与辅料 (例如, 缓冲液, 例如 Tris、磷酸和碳酸盐缓冲液; 稳定剂; 赋形剂; 杀菌剂和 / 或惰性蛋白例如牛血清白蛋白) 一起包含在试剂盒中。例如, 该结合性多肽和 / 或抗体可以与辅料共同提供为冻干形式, 或辅料可以单独提供, 由使用者来组合。一般来说, 所述辅料的含量低于多肽或抗体浓度的约 5% 重量, 且通常总量至少为多肽或抗体浓度的约 0.001% 重量。当使用了第二种能够与该结合性蛋白结合的抗体时, 所述抗体在该试剂盒中可以例如提供在单独的试管或容器中。该第二抗体 (若存在) 一般已标记, 且可以制型为与上述抗体制型的类似形式。

[0153] 相似地, 本公开还提供了一种用于检测和 / 或定量 CCR2 表达的方法, 其中, 一种含有细胞或其碎片 (例如, 膜碎片) 的组合物在适合结合的条件下与能结合 CCR2 的结合性多肽或其部分相接触, 并监控其结合。若检测到结合性多肽, 则表明该结合性多肽和 CCR2 或其部分之间形成了复合物, 因此表明了受体的存在。多肽与细胞的结合可以用标准方法来测定, 例如实施例中所述的方法。所述方法可用于检测个体中的 CCR2 在细胞上的表达。可选地, 可以评估内皮细胞表面上的 CCR2 的数量表达, 例如通过流体细胞仪, 且染色强度可以与疾病易感性、进程或风险相关。

[0154] 本公开还提供了一种检测哺乳动物对某些病症的易感性的方法。举例而言, 该方法可用于检测哺乳动物对于进程基于细胞呈递的 CCR2 量和 / 或哺乳动物中的 CCR2- 阳性细胞数目的疾病的易感性。

[0155] 使用标准的单字母或三字母缩写来表示多肽序列。除非另有说明, 否则每个多肽序列的氨基端在左侧, 羧基端在右侧; 每个单链核酸序列, 以及每个双链核酸序列的顶链, 其 5' 端在左侧, 3' 端在右侧。还可以通过说明特定多肽序列与参照序列的区别, 来描述该

序列。

[0156] 除非文中他处另有指明, 否则下列术语应当理解为具有如下含义:

[0157] 术语“CCR2 抑制剂”和“CCR2 拮抗剂”可交换使用, 两者均指能可检测地抑制 CCR2 的至少一种功能的分子。相反地, “CCR2 激动剂”是指能可检测地增强 CCR2 地至少一种功能的分子。由 CCR2 抑制剂引起的抑制无需是完全抑制, 只要其能被化验检测到即可。可以使用 CCR2 功能的任何化验, 本文提供了一些示例。能够被 CCR2 抑制剂所抑制或被 CCR2 激动剂所增加的 CCR2 功能的例子包括: 癌细胞生长或凋亡 (程序性细胞死亡) 等等。CCR2 抑制剂和 CCR2 激动剂类型的例子包括但不限于: CCR2 结合多肽 (例如抗原结合蛋白 (如: CCR2 抑制抗原结合蛋白))、抗体、抗体片段和抗体衍生物。

[0158] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白”均指包括 2 个或以上相互以肽键连接的氨基酸残基的分子。这些术语涵盖, 例如, 天然和人工蛋白、蛋白片段、蛋白序列的多肽类似物 (例如突变蛋白、变体蛋白或融合蛋白), 以及翻译后修饰蛋白, 或共价或非共价修饰蛋白。肽、多肽或蛋白可以是单体或聚合体。

[0159] 多肽 (例如, 抗体) 的“变体”包括: 相对于其他多肽序列而插入、删除和 / 或取代了一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。已公开的变体包括, 例如, 融合蛋白。

[0160] 多肽的“衍生物”是经过化学修饰的多肽 (例如, 抗体), 如通过连接另一个化学部分 (例如, 聚乙二醇, 或白蛋白, 如人血清白蛋白)、磷酸化和糖基化。除非另有说明, 否则术语“抗体”除了指含有两条全长的重链和两条全长的轻链的抗体之外, 还包括其衍生物、变体、片段及突变蛋白, 其示例如下所述。

[0161] “抗原结合蛋白”是包括以下部分的蛋白: 与抗原结合的部分; 以及可选地, 允许抗原结合部分采取促进抗原结合蛋白与蛋白的结合的构型的支架或骨架部分。抗原结合蛋白的例子包括抗体、抗体片段 (例如, 抗体的抗原结合部分)、抗体衍生物和抗体类似物。该抗原结合蛋白可以包括, 例如, 具有接枝的 CDRs 或 CDRs 衍生物的替代蛋白支架或人工支架。所述支架包括但不限于, 包含引入了突变 (例如用于稳定该抗原结合蛋白的三维结构的突变) 的抗体衍生支架, 以及包括例如生物可相容聚合物的全合成支架。例如参见: Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654。此外, 可以使用多肽抗体模拟物 (“PAMs”), 以及基于以纤维蛋白连接素成分为支架的抗体模拟物的支架。

[0162] 抗原结合蛋白可以具有, 例如, 天然存在的免疫球蛋白的结构。“免疫球蛋白”是四聚物分子。在天然存在的球蛋白中, 每个四聚物由 2 对相同的多肽链组成, 每对中有一条“轻” (约 25kDa) 链和一条“重”链 (约 50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约 100-110 或以上氨基酸的可变区, 主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分具有恒定区, 主要负责效应子功能。人轻链归类为 κ (kappa) 或 λ (lambda) 轻链; 重链归类为 μ (mu)、 Δ (delta)、 γ (gamma)、 α (alpha) 或 ϵ (epsilon), 分别令抗体的种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。优选地, 本申请公开的该抗 EGFR 抗体的特征在于其重链和轻链氨基酸序列中的可变域序列 (V_H 和 V_L)。优选抗体为 VK-B8 (κ IgG 抗体)。在轻链和重链中, 可变域和恒定域由约 12 个或以上氨基酸的“J”区连接, 其中重链还包括一个再含约 10 个或以上氨基酸的“D”区。一般请参见 *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989))。每对轻 / 重链的可变域组成了抗体结合位点, 因此一个完整的免疫球蛋白具有

2 个结合位点。

[0163] “多特异抗体”是识别一种或多种抗原上的多个表位的抗体。此类型抗体的一个子类为“双特异抗体”，其识别相同或不同抗体上的两个不同表位。

[0164] 若抗原结合蛋白在结合抗原（例如人 EGFR）时的解离常数为 1 毫微摩尔或以下，则称其与抗原“特异结合”。

[0165] “抗原结合域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”是指抗原结合蛋白上含有与抗原相互作用的氨基酸残基（或其他化学部分）并有利于该抗原结合蛋白对该抗原的特异性和亲和性的部分。对于与其抗原特异结合的抗体而言，这包括其至少一个 CDR 域的至少一部分。

[0166] “表位”是分子上连接抗原结合蛋白（例如，抗体）的部分。表位可以包括该分子的非邻近部分（例如，在多肽中，在多肽一级序列中并不相邻但在该多肽的三级和四级结构中相互足够靠近以被抗原结合蛋白结合的氨基酸残基）。

[0167] 两个多核苷酸或两个多肽序列的“相同百分比”是用 GAP 电脑程序 (GCG Wisconsin Package, version 10.3 (Accelrys, San Diego, Calif.)) 中的一部分）以其默认参数来比较序列而确定的。

[0168] “宿主细胞”是可用于表达核酸的细胞。宿主细胞可以是原核细胞，例如 *E. coli*；或真核细胞，例如真核单细胞（如酵母菌或其他真菌）、植物细胞（例如，烟草或番茄植物细胞）、动物细胞（如人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、小鼠细胞、大鼠细胞或昆虫细胞）或杂种细胞。宿主细胞的例子包括猴肾细胞 COS-7 系 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175)、L 细胞、C127 细胞、3T3 细胞 (ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或其衍生物（例如 Veggie CHO）和在无血清培养基上生长的相关细胞系 (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31)，或 CHO 的 DX-B11 品系（缺少 DHFR）(Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20)、HeLa 细胞、BHK (ATCC CRL 10) 细胞系、源于非洲绿猴肾细胞系 CV1 的 CV1/EBNA 细胞系 (ATCC CCL 70) (McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821)、人胚肾细胞（例如 293、293EBNA 或 MSR293）、人表皮 A431 细胞、人 Colo205 细胞、其他转化灵长类细胞系、正常二倍体细胞、源于初生组织和初生外植体的体外培养所得的细胞系、HL-60、U937、HaK 或 Jurkat 细胞。典型地，宿主细胞是能够以编码多肽且能够在该宿主细胞中表达的核酸转化或转染得到的培养细胞。术语“重组宿主细胞”可用于表示已经用需表达的核酸来转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是指包含该核酸，但在调控序列被引入该宿主细胞并与该核酸可操作连接以前，并不以所需表达水平来表达该核酸的细胞。应当理解，术语“宿主细胞”并不单指特定的对象细胞，而是也指所述细胞的后代或潜在后代。因为由于例如突变或环境影响的存在，后代中可能发生某些修饰，使得这些后代事实上与其亲代细胞并不等同，但其仍应属于本文中的“宿主细胞”术语所涵盖的范围。

[0169] 抗原结合蛋白

[0170] 抗原结合蛋白（例如抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体突变蛋白和抗体变体）是与 CCR2（优选为人 CCR2）结合的多肽。抗原结合蛋白包括抑制 CCR2 生物活性的抗原结合蛋白。

[0171] 含有一个或多个抗原结合蛋白的寡聚物可以用作 CCR2 的拮抗剂。寡聚物可以是共价连接或非共价连接的二聚体、三聚体或更高寡聚物的形式。也可以使用包括 2 个或更

多抗原结合蛋白的寡聚物,其例子之一为同源二聚体。其他寡聚物包括异源二聚体、同源三聚体、异源三聚体、同源四聚体、异源四聚体等。

[0172] 其中一个实施例指向包含多个抗原结合蛋白的寡聚体,所述抗原结合蛋白通过共价或非共价作用连接在与所述抗原结合蛋白融合的多肽部分之间。所述多肽可以是连接肽(间隔子),或具有促进寡聚化性质的多肽。亮氨酸拉链和某些源自抗体的多肽也属于能够促进与之连接的抗原结合蛋白寡聚化的多肽,下文将详细描述。

[0173] 在特定实施例中,寡聚体包括 2 至 4 个抗原结合蛋白。寡聚体的抗原结合蛋白可以是任何形式,例如上述任何形式,例如变体或片段。优选地,寡聚体包括具有 CCR2 结合活性的抗原结合蛋白。

[0174] 在一个实施例中,使用源自免疫球蛋白的多肽制备寡聚体。制备含有与各种源自抗体的多肽部分(包括 Fc 域)融合的某些异源多肽的融合蛋白,已在例如 Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; 和 Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11 中有所记载。

[0175] 一个实施例指向一种含有 2 个融合蛋白的二聚体,所述融合蛋白是通过将一种抗 CCR2 抗体的 CCR2 结合片段与一个抗体的 Fc 区域相融合来获得的。该二聚体可以例如如下所述地制备:将编码该融合蛋白的基因融合插入适当的表达载体中,在以该重组表达载体转化的宿主细胞中表达该基因融合,并允许所表达的融合蛋白大致如抗体分子般组装,由此在 Fc 部分之间形成链间二硫键,以获得该二聚体。

[0176] 术语“Fc 多肽”包括源于抗体 Fc 区域的多肽的原生和突变形式。还包括含有促进二聚化的铰链区的所述多肽的截短形式。含有 Fc 部分的融合蛋白(及由此形成的寡聚物)提供的有益效果在于,易于通过蛋白质 A 或蛋白质 G 柱来以亲和层析法进行纯化。

[0177] 另一种用于制备寡聚抗原结合蛋白的方法包括使用亮氨酸拉链。亮氨酸拉链域是促进其所在的蛋白质的寡聚化的多肽。亮氨酸拉链最初是在若干 DNA 结合蛋白中识别出来的(Landschulz et al., 1988, Science240:1759),此后在各种不同蛋白中也发现过。在已知的亮氨酸拉链中,有天然存在的多肽及其衍生物,能够二聚化或三聚化。适用于制备可溶寡聚蛋白的亮氨酸拉链域的例子如 WO 94/10308 所述,以及如 Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191 中所述的源自肺表面活化蛋白 D (SPD) 的亮氨酸拉链。Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78 描述了一种修饰亮氨酸拉链,其允许与其融合的外源蛋白稳定地三聚化。在一种途径中,在适当的宿主细胞中表达含有与亮氨酸拉链融合的抗 CCR2 抗体片段或衍生物的重组融合蛋白,并从培养基上清液中回收可溶寡聚抗 CCR2 抗体片段或衍生物。

[0178] 本发明的抗原结合蛋白的抗体结合片段可以用常规技术制备。所述片段的例子包括但不限于 Fab 和 F(ab')₂ 片段。

[0179] 本公开提供与 CCR2 结合的单克隆抗体。单克隆抗体可以使用本领域已知的任何方法来制备,例如从完成免疫接种程序的转基因动物中收获脾细胞并使其无限增殖化。所述脾细胞可以使用本领域任何技术来达成无限增殖化,例如将其与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤。用于制备融合蛋白的杂交瘤技术的骨髓瘤细胞优选为不产生抗体、融合效率高,且缺乏某些酶从而无法在某些仅支持所需融合细胞(杂交瘤)生长的选择性培养基中生长的

细胞。适用于小鼠融合的细胞系的例子包括 Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1. Ag 41、Sp210-Ag14、FO、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0Bu1；用于大鼠融合的细胞系的例子包括 R210、RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F 和 48210。可用于细胞融合的其他细胞系有 U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 UC729-6。

[0180] 针对 CCR2 的抗原结合蛋白可用于例如检测 CCR2 多肽的存在的体外或体内化验。所述抗原结合蛋白还可用在以亲和层析法对 CCR2 蛋白进行的纯化中。阻断性抗原结合蛋白可用于本申请所公开的方法中。具有 CCR2 拮抗剂功能的所述抗原结合蛋白可用于治疗任何 CCR2 引起的病症，包括但不限于各种癌症。

[0181] 抗原结合蛋白可用于体外过程或体内给药以抑制 CCR2 诱导的生物活性。由此可以治疗由 CCR2 的蛋白水解激活所导致或加重（直接或间接）的病症，所述病症的例子如本文所述。在一个实施例中，本发明提供了一种治疗方法，包括以降低 CCR2 诱导的生物活性的有效剂量，用 CCR2 阻断性抗原结合蛋白对哺乳动物进行体内给药。

[0182] 抗原结合蛋白包括抑制 CCR2 生物活性（例如血管生成）的全人单克隆抗体。

[0183] 抗原结合蛋白可以由多种常规技术中的任一种来制备。例如，可以使用任何本领域已知技术，从天然表达所述蛋白的细胞中纯化而得（例如，从产生一种抗体的杂交瘤中纯化该抗体），或在重组表达体系中制备。例如，参见：*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980)；and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1988)。

[0184] 本领域已知的任何表达体系均可用于制备本发明的重组多肽。一般来说，以含有编码一种所需多肽的 DNA 的重组表达载体来转化宿主细胞。可以使用的宿主细胞包括原核细胞、酵母菌或更高等的真核细胞。原核细胞包括革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌，例如 *E. coli* 或 *bacilli*。更高等的真核生物包括昆虫细胞扩已建立的源于哺乳类的细胞系。使用的哺乳类宿主细胞系的例子包括猴肾细胞 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), L cells, 293cells, C127 细胞、3T3 细胞 (ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、BHK (ATCC CRL 10) 细胞系、源于非洲绿猴肾细胞系 CV1 的 CV1/EBNA 细胞系 (ATCC CCL 70) (McMahan et al., 1991, *EMBO J.* 10:2821)。适用于细菌、真菌、酵母菌和哺乳类细胞宿主的克隆和表达载体如 Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N. Y., 1985) 所述。

[0185] 转化后的细胞可以在促进多肽表达的条件下培养，且以常规蛋白纯化程序来回收多肽。一种所述纯化过程包括使用亲和层析法，例如，通过能与 CCR2 的全部或部分（例如胞外域）结合的基质。本申请的思路中使用的多肽包括基本不含内源性污染杂质的基本同质的重组哺乳类抗 CCR2 抗体多肽。

[0186] 可以使用多种已知技术中的任一种来制备抗原结合蛋白并筛选所需性质。某些技术涉及分离编码有感兴趣的抗原结合蛋白（例如，抗 CCR2 抗体）的多肽链（或其部分）的核酸，并通过重组 DNA 技术操作该核酸。例如，该核酸可以融合到另一感兴趣的核酸，或通过添加、删除或取代一个或多个氨基酸残基来改变（例如，通过诱变或其他常规技术）。

[0187] 单链抗体可通过氨基酸桥接（短连接肽）来连接重链和轻链可变域 (Fv 区) 片段，以形成单一多肽链。所述单链 Fvs (scFvs) 通过在编码两个可变域多肽 (V_L 和 V_H) 的 DNAs

之间融合编码连接肽的 DNA 来制备。所得多肽可以自身折叠来形成抗原结合单体,或能够形成多聚体(例如二聚体、三聚体或四聚体),取决于两个可变域之间的柔性连接子的长度(Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108)。通过连接不同的含 V_L 和 V_H 的多肽,可以形成与不同表位结合的多价 scFvs (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40)。为制备单链抗体而开发的技术包括如美国专利 4946778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:379-87 所述的技术。

[0188] 用于从感兴趣的抗体获得不同子类或种型的抗体的方法是已知的,即子类转换(subclass switching)。因此,例如可以从 IgM 抗体得到 IgG 抗体,反之亦然。此类技术允许制备既具有特定抗体(亲代抗体)的抗原结合性质,也具有不同于亲代抗体种型或子类的抗体的相关生物性质的新抗体。可以使用重组 DNA 技术。所述过程中可以使用编码特定抗体多肽的克隆 DNA,例如编码所需种型抗体的恒定域的 DNA (Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16)。此外,若需要的是 IgG4,还可能希望在铰链区中引入点突变(CPSCP→CPPCP) (Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407),以减缓重链间形成二硫键从而可能导致 IgG4 抗体异质性的趋势。

[0189] 在一些特定实施例中,本发明的抗原结合蛋白对 CCR2 的结合亲和性 (K_a) 为至少 10^6 。在另外一些实施例中,抗原结合蛋白的 K_a 为至少 10^7 、至少 10^8 、至少 10^9 、或至少 10^{10} 。在另一个实施例中,该抗原结合蛋白的 K_a 与本申请实施例中所述的抗体实质相同。

[0190] 在又一个实施例中,本公开提供了一种与 CCR2 的解离常数低的抗原结合蛋白。在一个实施例中,该抗原结合蛋白的 K_{off} 为 1×10^{-4} 至 1 或更低。在又一个实施例中,该 K_{off} 为 5×10^{-5} 至 1 或更低。在又一个实施例中, K_{off} 与本申请中所述的抗体实质相同。在又一个实施例中,抗原结合蛋白与 CCR2 结合的 K_a 与本申请中所述的抗体实质相同。

[0191] 本公开的另一个方面中,提供抑制 CCR2 活性的抗原结合蛋白。在一个实施例中,该抗原结合蛋白的 IC_{50} 为 1000nM 或以下。在又一个实施例中,该 IC_{50} 为 100nM 或以下;在又一个实施例中,该 IC_{50} 为 10nM 或以下。在又一个实施例中,该 IC_{50} 与本申请实施例中所述的抗体实质相同。在又一个实施例中,该抗原结合蛋白抑制 CCR2 活性的 IC_{50} 与本申请实施例中所述的抗体实质相同。

[0192] 本公开的另一个方面中,提供与细胞表面表达的人 CCR2 结合的抗原结合蛋白,且当发生该结合时,抑制 CCR2 在该细胞中的信号活动,而不会显著减少细胞表面上的 CCR2 量。可以使用任何用于测定或估计细胞表面和/或细胞内部的 CCR2 量的方法。在其他实施例中,该抗原结合蛋白绑定至 CCR2 表达细胞,使得低于约 75%、50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%、1% 或 0.1% 的细胞表面 CCR2 被内吞。

[0193] 本公开的另一个方面中,提供一种抗原结合蛋白,其体外或体内(例如,对人类对象给药时)的半排出期为至少 1 天。在一个实施例中,该抗原结合蛋白的半排出期为至少 3 天。在又一个实施例中,该抗原结合蛋白的半排出期为 4 天或以上。在又一个实施例中,该抗原结合蛋白的半排出期为 8 天或以上。在又一个实施例中,该抗原结合蛋白衍生化或改性,从而使其半排出期与未衍生化或未改性的抗原结合蛋白相比更为长久。在又一个实施例中,该抗原结合蛋白包括一个或多个点突变,以增加血清半排出期,例如 W000/09560 所

述,在此以引用方式并入。

[0194] 本公开还提供了多特异性抗原结合蛋白,例如双特异抗原结合蛋白(例如通过两个不同的抗原结合位点或区域,与 CCR2 的两个不同表位结合或与 CCR2 的表位和另一分子的表位结合的抗原结合蛋白)。此外,本申请公开的双特异抗原结合蛋白可以包括:来自此述的一种抗体的 CCR2 结合位点,以及来自此述的另一种抗体的另一 CCR2 结合区,其中涵盖本文引用其他出版物所描述的抗体。可选地,一种双特异性抗原结合蛋白可以包括一个来自此述的一种抗体的抗原结合位点,以及来自本领域所知的另一种 CCR2 抗体或以已知方法或此述方法制备的抗体的又一抗原结合位点。

[0195] 本领域中已知多种制备双特异性抗体的方法。所述方法包括使用杂交-杂交瘤(hybrid-hybridomas),如 Milstein et al., 1983, Nature 305:537 所述,以及抗体片段的化学连接(Brennan et al., 1985, Science 229:81; Glennie et al., 1987, J. Immunol. 139:2367; 美国专利 6,010,902)。此外,双特异性抗体可以通过重组途径来制备,例如使用亮氨酸拉链部分(即,来自优选地形成异源二聚体的 Fos 和 Jun 蛋白; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547)或其他锁匙互动域结构,如美国专利 5582996 所述。额外的可用技术包括如美国专利 5959083 和 5807706 中所述的技术。

[0196] 在又一个方面中,抗原结合蛋白包括抗体的衍生物。该衍生化抗体可以包括能够赋予该抗体所需性质的任何分子或物质,例如在一种特定用途中增加其半排出期。所述衍生化抗体可以包括例如可检测的(或标签)部分(例如:放射性、比色的、抗原性或酶活性分子)、可检测珠(例如磁性或电子致密性的(如金珠))、结合另一分子(例如生物素或链霉亲和素)的分子、治疗性或诊断性部分(例如,放射性、细胞毒性或药理学活性部分)或能够增加该抗体对一种特定用途(例如向对象如人类对象给药,或其他体内或体外用途)的适用度的分子。可用于衍生抗体的分子的例子包括白蛋白(例如人血清白蛋白)和聚乙二醇(PEG)。连接白蛋白且聚乙二醇化的抗体衍生物可以使用本领域所熟知的技术来制备。在一个实施例中,该抗体与甲状腺素运载蛋白(TTR)或 TTR 变体缀合或以其他方式结合。该 TTR 或 TTR 变体可以用选自以下种类的化学物质进行化学改性:葡聚糖、聚(N-乙烯基吡咯烷)、聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯多元醇及聚乙烯醇。

[0197] 下列术语,除非另有说明,否则应当按照下文定义进行理解:

[0198] 适应症

[0199] 本发明的一个方面中,提供了用于治疗对象的方法。该方法可以,例如,对对象产生一般而言有益健康的效果,例如,可以提高对象的期望寿命。可选地,该方法可以,例如,治疗、预防、治愈、缓解或改善(“治疗”)疾病、失调、病症或病状(“症状”)。可治疗的病症中,包括特征为 CCR2 不适当表达或不适当活性的病症。在一些所述病症中,表达或活性水平过高,则治疗中包括 CCR2 拮抗剂给药,如此所述。所述失调或病症是癌症相关的。特别是,所述癌症包括但不限于,肺癌、卵巢癌和结肠癌及各种骨髓瘤。本发明的抗原结合蛋白可治疗或可预防的特定病症和疾病包括各种癌症。

[0200] 抗原结合蛋白的治疗方法和给药

[0201] 本文所提供的一些方法包括用 CCR2 结合性抗原结合蛋白向对象给药,从而降低 CCR2 引起的参与特定病症的生物反应。在特定实施例中,本发明的方法涉及令内源性 CCR2

与 CCR2 结合性抗原结合蛋白相接触,例如,通过向对象给药或通过间接体内 (ex vivo) 疗法。

[0202] 术语“治疗”涵盖缓解或预防失调的至少一种症状或其他方面,或减轻疾病严重程度等。抗原结合蛋白并非必须产生完全治愈或根除疾病的每一症状或表现,才能构成可行的治疗剂。如本领域所知,用作治疗剂的药物可以减轻指定疾病状态的严重程度,而并非必须根除疾病的每一症状,即可被看作有用的治疗剂。类似地,预防性的给药治疗无需非要完全有效地预防病症的发生,才能被看作是构成了可行的预防剂。只要降低疾病的影响(例如,降低症状数量或严重程度,或提高另一治疗的有效性,或产生另一有益效果),或降低对象体内疾病发生或恶化的可能性,就足够了。本发明的一个实施例指向一种方法,包括用 CCR2 拮抗剂向患者给药,其给药量和给药时间足以使得反映特定病症严重程度的指标持续得到超过基线的改善。

[0203] 根据相关领域中的认识,含有本发明的抗体及其片段的药物组合物以适用于其适应症的方式向对象给药。可以用任何适当的技术对药物组合物进行给药,包括但不限于,非肠道给药、外敷或吸入。若注射,则该药物组合物可以通过例如关节内、静脉内、肌肉内、病灶内、腹膜内或皮下途径的大剂量注射或持续输注来给药。局部给药,例如可在疾病或损伤的部位,作为经皮递送和从植入物持续释放。吸入递送,包括例如经鼻或经口吸入,使用喷雾器,吸入气雾剂形式的拮抗剂,等等。其他可选形式包括:眼药水;口服制剂,包括丸剂、糖浆剂、锭剂或口香糖;和外用制剂,如洗剂、凝胶剂、喷雾剂和软膏剂。

[0204] 本发明还涵盖了抗原结合蛋白在间接体内疗法中的用途。例如,可以令患者的血液或其他体液与 CCR2 结合性抗原结合蛋白进行体外接触。该抗原结合蛋白可以与适当的不溶性基质或固体支持材料结合。

[0205] 优选地,抗原结合蛋白的给药形式为一种包含一种或多种附加成分(例如生理学可接受的载体、赋形剂或稀释剂)的组合物。可选地,该组合物还包括一种或多种生理活性药剂,例如,第二种炎症或免疫抑制物质、抗血管生成物质、镇痛物质等等,本发明中提供了一些非限制性示例。在多种特定实施例中,该组合物中除 CCR2 结合性抗原结合蛋白外,还包括 1、2、3、4、5 或 6 种生理活性药剂。

[0206] 联合疗法

[0207] 在另一个方面中,本发明提供了一种用 CCR2 抑制性抗原结合蛋白和一种或多种其他疗法来治疗对象的方法。在一个实施例中,所述联合疗法通过例如攻击肿瘤中的多个位点或分子靶点,来获得协同效应或累加效应。可以与本发明共同使用的联合疗法的种类包括抑制或激活(酌情)单一疾病相关通路中的多个节点,靶细胞中的多个通路,或靶组织中的多个细胞类型。

[0208] 在又一个实施例中,一种联合治疗方法,包括向对象以此述的 2、3、4、5、6 或更多种 CCR2 激动剂或拮抗剂给药。在又一个实施例中,该方法包括给予对象两种或更多种共同抑制或激活(直接或间接)CCR2 接到的信号传导的疗法。所述方法的例子包括使用两种或以上 CCR2 抑制性抗原结合蛋白的组合、CCR2 抑制性抗原结合蛋白和一种或多种其他具有抗癌性质的治疗部分(例如,细胞毒素剂和/或免疫调节剂)的组合,或 CCR2 抑制性抗原结合蛋白和一种或多种其他治疗(例如,手术或辐射)的组合。此外,可以将一种或多种抗 CCR2 抗体或抗体衍生物与一种或多种分子或其他治疗联用,其中所述其他分子和/或治疗

并不直接连接或影响 CCR2, 但该组合可有效治疗或预防所治疗的病症。在一个实施例中, 一种或多种分子和 / 或疗法治疗或预防由一种或多种所述其他分子或治疗在治疗期间引起的症状, 例如恶心、疲乏、脱发、恶病质、失眠等。在每种使用分子和 / 或其他治疗的组合的情况下, 各分子和 / 或其他治疗均可以在任意时间长度上, 以任意顺序给药, 例如同时给药、相继给药或交替给药, 只要有效即可。在一个实施例中, 治疗方法包括完成以第一分子或其他疗法进行的第一疗程之后, 再开始第二疗程。治疗的第一疗程末尾和第二疗程初始之间的时长可以是允许治疗全程有效的任意时长, 例如数秒、数分钟、数小时、数天、数周、数月甚至数年。

[0209] 在又一个实施例中, 该方法包括给予此述的一种或多种 CCR2 拮抗剂和一种或多种其他治疗 (例如, 治疗处理或姑息疗法)。若一种方法中包括向对象给予超过一种治疗, 则应当理解, 给予治疗的顺序、时机、数量、浓度和体积仅受到医疗要求和疗法局限的限制, 即, 向对象给予两种治疗时, 可以是例如同时、相继、交替或根据其他模式给予治疗。

[0210] 实施例 1

[0211] 本实施例展示了测定抗 CCR2 抗体的 EC_{50} 的细胞结合实验。图 1 中的数据显示了细胞结合 EC_{50} 测定的体外数据。该实施例展示了所述抗体在达到最大细胞结合度和 50% 结合饱和度 (EC_{50}) 时浓度的结合特性。在此实施例中, 使用 PBS 基的无酶细胞解离液 (Life Technologies#13151-014) 从培养瓶中提起 CHO-CCR2 细胞, 并以 1×10^6 细胞 / ml 重悬浮在 FACS Buffer (2% 牛胎血清 PBS 溶液) 中, 取 $100 \mu l$ (1×10^5 细胞) 移入 96 孔板的孔中。涂板的细胞离心沉淀并弃去上清液。以含有指定浓度 CCR2D1IgG 的 $50 \mu l$ FACS Buffer 一式三份地重悬浮细胞 (图 1)。将平板在 $4^\circ C$ 下培养 1 小时, 然后以 FACS Buffer 洗涤一次。以 $25 \mu l$ 终体积的 FACS Buffer 重悬浮细胞, 并使用 Intellicyt 流式细胞仪进行分析。使用 FlowJo 软件测定 FL-2H 通道的荧光中位值, 并通过 GraphPad Prism 作图来确定 EC_{50} , 并使用变量斜率非线性回归进行分析。

[0212] 实验结果: 抗 CCR2 抗体的细胞结合度 EC_{50} 如表 1 所示。

[0213] 表 1

[0214]

抗体	EC ₅₀ (nM) CHO-huCCR2
D1	0.17
D1-1/LO	0.13
D1-1/45H8L1	0.15
D1-2/LO	16
D1-4/LO	1.6
D1-6/LO	3.5
D1-7/LO	0.08
1A2	2.9
1B2	0.36
1B11	2.3
1G11	0.34
1H5	1.3
42G7	15
43D12	1.8
54A9	0.53

[0215] 实施例 2

[0216] 实施例 2 展示了抗 CCR2 抗体对鼠 CCR2 的细胞结合 EC₅₀测定体外数据。该实施例展示了指向人 CCR2 的所述抗体是否可与鼠 CCR2 交叉反应,并展示所述抗体在达到最大细胞结合度和 50%结合饱和度 (EC₅₀) 时浓度的结合特性。在此实施例中,以 1x10⁶细胞/ml 将 WEHI 274.1 细胞重悬浮在 FACS Buffer (2%牛胎血清 PBS 溶液) 中,取 50 μl 细胞悬浮液 (1x10⁵细胞) 移入 96 孔板的孔中。涂板的细胞离心沉淀并弃去上清液。以含有系列稀释的抗 CCR2IgG 的 30 μl FACS Buffer 一式三份地重悬浮细胞。将平板在 4℃下培养 1 小时,然后以 FACS Buffer 洗涤 2 次。以 50 μl 羊抗人 IgG (γ-链特异性)-PE 标记二抗 (Southern Biotech#2040-09) 的 1:500FACS Buffer 稀释液重悬浮细胞,4℃下培养 30 分钟,然后以 FACS Buffer 洗涤 1 次。以 30 μl 终体积的 FACS Buffer 重悬浮细胞,并使用 Intellicyt 流式细胞仪进行分析。使用 FlowJo 软件测定 FL-2H 通道的荧光中位值,并通过 GraphPad Prism 作图来确定 EC₅₀,并使用变量斜率非线性回归进行分析。实验结果如表 2 所示。

[0217] 表 2

[0218]

抗体	EC ₅₀ (nM) 鼠 CCR2
D1	1.5
D1-1/LO	4.8
D1-1/45H8L1	2.0
D1-2/LO	81

[0219] 实施例 3

[0220] 本实施例展示了 THP-1 细胞 (人单核细胞系) 的钙流入实验。为了测定 D1 对 MCP-1

诱导的 THP-1 钙流动的 IC_{50} ，我们首先建立了 MCP-1 诱导的 THP-1 钙流入实验，以测定 MCP-1 的 EC_{50} 。在如方法（钙流入实验）所述的用于测定 MCP-1 的 EC_{50} 的实验条件下，获得了 MCP-1 诱导的 THP-1 钙流量的 EC_{50} 值 3.3nM。我们随后使用 10nM 人 MCP-1 (PROSPEC#CHM-271)（约为 EC_{80} ）来进行钙流量实验，以测定 D1 对 MCP-1 诱导的 THP-1 钙流量的 IC_{50} 。

[0221] 实验结果：在如方法（钙流入实验）所述的用于测定 MCP-1 的 IC_{50} 的实验条件下，以 2 次独立实验测得了 D1 对 MCP-1 诱导的 THP-1 钙流量的 IC_{50} 值为 4.7nM。三联实验的平均值 ± 标准误差 (Mean ± S. D.) 如图 2 所示。

[0222] 实施例 4

[0223] 本实施例提供了原代人单核细胞，以测定 D1 对 MCP-1 诱导的原代人单核细胞钙流动的 IC_{50} 。我们首先建立了 MCP-1 诱导的原代人单核细胞钙流量实验，以测定 MCP-1 的 EC_{50} 。使用 FLIPR 钙 4 实验试剂盒建立钙流入实验，并以 FlexStation3 扫描荧光计 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 来测定细胞内的 Ca^{2+} 变化。为了测定趋化因子 MCP-1 的 EC_{50} ，取 THP-1 细胞或原代人单核细胞置于 25 μ L 实验缓冲液 (HBSS+20mM HEPES) 中，并与 25 μ l 含有 3mM (孔内最终工作浓度) 丙磺舒的 FLIPR4 实验试剂盒 (R8142, Molecular Devices) 装入多聚右旋赖氨酸涂层的 384 孔黑壁透明底实验平板 (Greiner) 中，然后在 37°C、5% CO_2 下培养 1 小时。培养结束后，将实验平板在 1000rpm 下离心 4 分钟，并室温培养 10 分钟。建立含有不同剂量 MCP-1 的临沂平板。然后，将两个平板都装入 FlexStation 中以向荧光标记的细胞自动添加 MCP-1。第 17 秒，向细胞添加 MCP-1 前，建立基线荧光。钙释放随时间的定量以驱动 FlexStation3 的 SoftMax Pro 软件来测定。通过将每一 MCP-1 浓度的最大 - 最小荧光值除以缓冲液的最大 - 最小荧光值，来计算折叠应答。使通过 GraphPad Prism 用折叠应答对递增的 MCP-1 浓度作图，并使用剂量 - 应答的反曲线分析来确定 MCP-1 的 EC_{50} 。

[0224] 为了测定 D1 的 IC_{50} ，在 HBSS+20mM HEPES 缓冲液中，以不同剂量的 D1 室温培养细胞 20 分钟，然后将 25 μ l 细胞与 25 μ l FLIPR4 实验试剂盒一起装入 384 孔板中。其余步骤与趋化因子 MCP-1 的上述 EC_{50} 测定相同。

[0225] 实验条件详情，例如细胞数目、D1 和 MCP-1 浓度、试验参数等等，如附图说明所述。

[0226] 在如方法（钙流入实验）所述的用于测定 MCP-1 的 EC_{50} 的实验条件下，测得了对 MCP-1 诱导的钙流量的 EC_{50} 值为 3.79nM。然后我们使用 10nM MCP-1 (约为 EC_{80}) 来进行钙流量实验，以测定 D1 对 MCP-1 诱导的人单核细胞钙流动的 IC_{50} 。

[0227] 实验结果：在如方法（钙流入实验）所述的用于测定 D1 的 IC_{50} 的实验条件下，测得了 D1 对 MCP-1 诱导的钙流量的 IC_{50} 值为 2.8nM。三联实验的平均值 ± 标准误差 (Mean ± S. D.) 如图 3 所示。

[0228] 实施例 5

[0229] 本实施例展示了使用 THP-1 (人单核细胞系) 来测定 D1 对 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移的 IC_{50} 值的趋化性实验。我们首先建立了 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移实验，以测定 MCP-1 的 EC_{50} 。在如本文（趋化性实验）所述的用于测定 MCP-1 的 EC_{50} 的实验条件下，测得了 MCP-1 诱导的趋化性的 EC_{50} 值为 0.8nM。我们随后使用 3nM MCP-1 (约为 EC_{80}) 来进行趋化性实验，以测定 D1 对 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞迁移的 IC_{50} 。

[0230] 使用具有以 5- μ m 聚碳酸酯膜隔开的 2 隔室的 96 孔趋化室 (ChemoTX; NeuroProbe, Gaithersburg, MD) 来建立趋化性实验。为了测定趋化因子 MCP-1 的 EC_{50} ，向低

层室加入含不同剂量 MCP-1 的 29 μ l 实验缓冲液（如图所示）。将膜与孔对齐并卡入适当位置。向上层室孔中加入重悬浮在 25 μ l 实验缓冲液中的 THP-1 或原代人单核细胞。盖上并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培养平板。培养结束后，以滤纸印迹仍停留在膜上侧的未迁移细胞，并从微孔板上取下膜，以 Cedex 对下层室每孔中的细胞数目进行计数。用 Prism5 计算 MCP-1 诱导的剂量依赖性曲线和 EC₅₀ 值。

[0231] 实验结果：在所用实验条件下，D1 在 MCP-1 诱导的趋化迁移中的 IC₅₀ 值为 194pM。图 4 展示了用于测定 D1 的 IC₅₀ 值的 3 次独立实验之一。3 次独立实验中的 D1 IC₅₀ 值均相似。

[0232] 实施例 6

[0233] 本实施例提供了 D1 对 MCP-1 诱导的原代人单核细胞迁移的 IC₅₀ 实验。我们首先建立了 MCP-1 诱导的原代人单核细胞迁移实验，以测定 MCP-1 的 EC₅₀。在如本文（趋化性实验）所述的用于测定 MCP-1 的 EC₅₀ 的实验条件下，测得了 MCP-1 诱导的趋化性的 EC₅₀ 值，MCP-1 诱导的趋化的 EC₅₀ 值为 0.389nM。我们随后使用 1nM MCP-1（约为 EC₈₀）来进行趋化性实验，以测定 D1 对 MCP-1 诱导的原代人单核细胞迁移的 IC₅₀。

[0234] 实验结果：在本文所述的用于测定 D1 的 IC₅₀ 值的实验条件（趋化性实验）下，从供体分离的单核细胞中（图 5），D1 在 MCP-1 诱导的趋化迁移中的 IC₅₀ 值为 1.02nM，从另一供体分离的单核细胞中，D1 在 MCP-1 诱导的趋化迁移中的 IC₅₀ 值为 3.48nM。

[0235] 实施例 7

[0236] 本实施例提供了 mMCP-1（小鼠 MCP-1）诱导的 WEHI 274.1（小鼠单核细胞系）细胞迁移实验中的 D1 IC₅₀ 值测定。我们首先建立了 mMCP-1 诱导的 WEHI 274.1 细胞迁移实验，以测定 MCP-1 的 EC₅₀。

[0237] 用荧光法来测定 WEHI 274.1 向 MCP-1 的趋化移动。细胞 (5x 10⁶/ml) 在遮光、37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下以 2 μ M 钙黄绿素 -AM 标记 30 分钟。随后，以 HBSS 洗涤细胞 25l 实验缓冲液重悬浮细胞，然后装入上层室孔中。执行上述对 THP-1 和原代人单核细胞的实验步骤。在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下培养迁移后，以滤纸印迹仍停留在膜上侧的未迁移细胞，并以 PBS 洗涤膜顶部。从板上取下膜，并用荧光平板分析仪 (FlexStation3, Molecular Device) 以 485nm 激发和 530nm 发射波长从膜底部测定个孔的荧光值。

[0238] 实验结果：在（上述）用于测定 mMCP-1 的 EC₅₀ 值的实验条件下，测得了 mMCP-1 诱导的趋化迁移的 EC₅₀ 值。然后，我们使用 0.25nM MCP-1（约为 EC₈₀）来进行趋化迁移实验，以测定 D1 对 mMCP-1 诱导的 WEHI 274.1 细胞迁移实验的 IC₅₀。

[0239] 实验结果：在如方法所述（趋化性实验）用于测定 D1 的 IC₅₀ 值的实验条件下，测得 D1 的 IC₅₀ 值为 66nM（图 7）。

[0240] 实施例 8

[0241] 本实施例提供了对 D1 和 MLN1202 的功能活性在趋化性上的比较。MLN1202 (Millennium) 是人源化单克隆抗体，对 CCR2 具有高特异性，能干扰 MCP-1 对 CCR2 的结合。在临床试验中对 MLN1202 进行评估。为了比较 D1 和 MLN1202 之间的功能活性，我们以 CCR2 趋化因子 (MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4 和 MCP-5) 对诱导的 THP-1 细胞迁移进行了趋化性实验

[0242] 该趋化性实验中采用了具有以 5- μ m 聚碳酸酯膜隔开的 2 隔室的 96 孔趋化室

(ChemoTX ;NeuroProbe, Gaithersburg, MD) 来建立趋化性实验。为了测定趋化因子 MCP-1 的 EC_{50} , 取含有不同剂量的 MCP-1 的 $29 \mu l$ 实验缓冲液 (如图所示) 加入低层隔室中。将膜与孔对齐并卡入适当位置。向上层室孔中加入重悬浮在 $25 \mu l$ 实验缓冲液中的 THP-1 或原代人单核细胞。盖上并在 $37^{\circ}C$ 、 $5\% CO_2$ 下培养平板。培养结束后, 以滤纸印迹仍停留在膜上侧的未迁移细胞, 并从微孔板上取下膜, 以 Cedex. 对下层室每孔中的细胞数目进行计数。用 Prism5 计算 MCP-1 诱导的剂量依赖性曲线和 MCP-1 的 EC_{50} 值。

[0243] 为了测定 D1 的 IC_{50} , 以不同剂量的 D1 在实验缓冲液中室温培养细胞 20 分钟, 然后将 $25 \mu l$ 含细胞的缓冲液加入到上层室孔中, 并向下层隔室中加入一种浓度的 MCP-1 (约为 EC_{80})。其余步骤与趋化因子 MCP-1 的上述 EC_{50} 测定相同。

[0244] D1 和 MLN1202 的 IC_{50} 值如图 8A、8B、8C、8D 和 8E 所示。 IC_{50} 的对比如下表 3 所示。

[0245] 实验结果 : 图 8A-8E 和表 3 中的数据显示, D1 在抑制所述 5 种 CCR2 趋化因子诱导的 THP-1 细胞迁移上, 比 MLN1202 更为强力。

[0246] 表 3 : D1 与 MLN1202 在 MCPs 诱导的 THP-1 细胞迁移中的 IC_{50} 对比 [pM]。

[0247]

	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	MCP-5
IC_{50} of D1	168	172	854	138	190
IC_{50} of MLN1202	309	459	1832	843	368

[0248] 实施例 9

[0249] 本实施例展示了 D1 抗体的体内 EAE 模型。通过 C57B1/6 小鼠中诱导实验性自体免疫性脑脊髓炎 (EAE), 测试了抗 CCR2 抗体影响疾病进展的能力。所述诱导是使用 Hooke 实验室 (Lawrence, MA) 的试剂盒达成的, 向小鼠注射脊髓少突细胞糖蛋白 (MOG) 和百日咳毒素, 以促进神经性病症。EAE 是多发性硬化 (MS) 的鼠科模型, 能再现人类疾病的许多关键病因因素。使用 D1 抗体以两种方式之一处理小鼠。在一种处理方案中, 在诱导疾病一天后 (预防), 每隔一天腹腔内给予小鼠 D1 抗体 (0.1mg)。在第二种处理方案 (治疗性) 中, 当小鼠出现疾病迹象 (尾巴不举, limp tail) 时, 每隔一天腹腔内给予抗体 (0.1mg)。试验期间, 每天检查小鼠, 并记录疾病评分。从图 9 可以明显看出, D1 处理, 无论是预防性或治疗性, 均降低了疾病严重程度。

[0250] 实施例 10

[0251] 本实施例提供了抗体 1G11、1B2 和 1H5 的细胞结合 IC_{50} 。用于所述抗体的趋化性实验方法与用于 D1 的方法相同。为了测定所述抗体对 MCPs 诱导的 THP-1 细胞迁移的 IC_{50} , 我们首先建立了 THP-1 细胞迁移实验, 以测定 MCP 配体的 EC_{50} 。在上述用于测定 MCP-1 的 EC_{50} 的实验条件 (趋化性实验) 下, 测定了 EC_{50} 值 (数据未显示)。

[0252] 然后, 我们使用每个 MCP 的 EC_{80} 浓度来进行趋化性实验, 以测定所述 CCR2 抗体 1G11、1B2 和 1H5 对 MCPs 诱导的 THP-1 细胞迁移的 IC_{50} 。

[0253] 实验结果 : 1G11 对 MCP-1 (3nM) 的 IC_{50} 为 79pM (图 10A), 对 MCP-5 (6ng/ml) 的 IC_{50} 为 261pM (图 10B)。1B2 对 MCP-1 (3nM) 的 IC_{50} 为 87pM (图 11A), 对 MCP-5 (3ng/ml) 的 IC_{50} 为

197pM(图 11B)。1H5 对 MCP-1(3nM) 的 IC_{50} 为 109pM(图 12A), 对 MCP-5(6ng/ml) 的 IC_{50} 为 349pM(图 12B)。1H5 还对 MCP-2(30ng/ml) 表现出 1.9nM IC_{50} 值(图 12C), 对 MCP-3(6ng/ml) 表现出 2.6nM IC_{50} 值(图 12D), 和对 MCP-4(200ng/ml) 表现出 1.4nM IC_{50} 值(图 12E)。

[0254] 实施例 11

[0255] 本实施例展示了人单核细胞系 THP-1(ATCC#TIB-202) 细胞的趋化性实验。该趋化性实验中采用了具有以 5- μ m 聚碳酸酯膜隔开的 2 隔室的 96 孔趋化室 (ChemoTX; NeuroProbe, Gaithersburg, MD) 来建立趋化性实验。取 THP-1 细胞 (25l 含 0.1×10^6 细胞和 0.1% BSA 的 HBSS) 与系列稀释浓度的 mAbs 在室温下预培养 20 分钟。将含配体和 0.1% BSA 的 HBSS 装入低层室的平板孔中, 以 mAbs 预培养后的细胞装入膜顶部。配体终浓度为 3nM MCP-1(PROSPEC#CHM-271)、6.7nM MCP-2(PeproTech#300-15)、1.1nM MCP-3(PeproTech#300-17)、35nM MCP-4(PeproTech#300-24) 和 0.65nM MCP-5(PeproTech#250-04)。37°C 5% CO_2 下培养 2 小时后, 以滤纸印迹仍停留在膜上侧的未迁移细胞, 并从微孔板上取下膜, 以 Cedex 细胞计数器 (Innovatis, Roche) 对下层室中平板每孔中的迁移细胞数目进行计数, 或将所述细胞转移至不透明白色 96 孔板上, 并以 CellTiter Glo 试剂 (Cat#G7571, Promega) 室温处理十分钟。用荧光平板分析仪 (FlexStation3, Molecular Device) 检测 CellTiter Glo 产生的发光信号。用 Prism5 计算表中所示的每个 mAb 的 IC_{50} 值。

[0256] 每种 mAb 对响应配体的 IC_{50} 结果如表 4 所示。每个 IC_{50} 值代表结果相似的两次或三次独立实验之一, 且表示为平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm S. D.) ($n = 2$ 或 $n = 3$)。使用对 CCR2 具有高特异性并干扰 MCP-1 与 CCR2 结合的人源化单克隆抗体 MLN1202 (Takeda) 作为对照。所公开的 mAbs (D1、1B2、1G11、D1-1 和 D1H1/45H8L1) 为人 IgG1。

[0257] 表 4: 人 THP-1 细胞的趋化性实验中的 mAbs 的 IC_{50} [pM]。

[0258]

	D1	1B2	1G11	D1-1	D1H1/45H8L1	MLN1202 (Takeda)
MCP-1	170	90	80	130	280	310
MCP-2	170	60	160			460
MCP-3	110	40	70	100		1830
MCP-4	140	50	60		80	840
MCP-5	190	200	260			370

[0259] 实施例 12

[0260] 本实施例展示了人 THP-1 细胞的钙实验。取 THP-1 细胞 (含 0.3×10^5 细胞和 20mM HEPES 的 25 μ l 实验缓冲液 HBSS) 与系列稀释剂量的 mAbs 在室温下预培养 20 分钟。取 25 μ l 预培养后的细胞, 加入装有含 5mM 丙磺舒 (Sigma#P8761-25G) 的 25 μ l 钙 4 实验试剂盒 (Molecular Device#R8142) 的多聚右旋赖氨酸的 384 孔板 (Greiner#781946) 中。37°C 5% CO_2 下培养 1 小时后, 室温培养 15 分钟, 然后平板简短离心, 向平板每孔中加入 12.5 μ l 1:5 倍浓缩配体, 作为 FlexStation3 检测期间的激发激动剂。实验配体终浓度为 2.5nM MCP-1(PROSPEC#CHM-271)、22nM MCP-3(PeproTech#300-17) 和 0.43nM MCP-5(PeproTech#250-04)。每种 mAb 的 IC_{50} 值以 Prism5 计算, 如表 5 所示。

[0261] 表 5 所示实验每种 mAb 对对应配体的 IC₅₀ 值。每个 IC₅₀ 值代表结果相似的两次独立实验之一,且表示为平均值 ± 标准误差 (Mean ± S. D.)。

[0262] 表 5 :人 THP-1 细胞的钙流量实验中的 mAbs 的 IC₅₀ [pM]。

[0263]

	D1	1B2	1G11	D1H1/45H8L1	MLN1202 (Takeda)
MCP-1	180	920	750	370	250
MCP-3	190	290	250	190	110
MCP-5	280	890	560	270	180

[0264] 实施例 13

[0265] 本实施例展示了小鼠 WEHI 细胞的趋化性实验。该趋化性实验中采用了小鼠单核细胞系 WEHI-274.1 (ATCC, CRL-1679)。使用具有以 8- μ m 聚碳酸酯膜隔开的 2 隔室的 96 孔趋化室 (ChemoTX ;NeuroProbe, Gaithersburg, MD) 来建立趋化性实验。趋化性实验缓冲液采用的是含 0.1% BSA 的 1:1 体积比例混合的 RPMI 和 HBSS。取 0.1x10⁶WEHI 细胞与系列稀释的 mAbs 在 25 μ l 实验缓冲液中室温下预培养 20 分钟。

[0266] 表 6 中的结果显示了每种对 MCP-1 的 mAb 的 IC₅₀。每个 IC₅₀ 值代表结果相似的 2 次独立实验之一,且显示为平均值 ± 标准误差 (Mean ± S. D.) (n = 2)。D1、D1-1 和 D1H1/45H8L1 显示的 IC₅₀ 值分别为 62pM、35pM 和 12pM。

[0267] 表 6 :小鼠 WEHI 细胞的趋化性实验中的 mAbs 的 EC₅₀ [pM]。

[0268]

	D1	D1-1	D1H1/45H8L1
MCP-1	62	35	12

[0269] 实施例 14

[0270] 本实施例中,使用 PBS 基的无酶细胞解离液 (Life Technologies#13151-014) 从培养瓶中提起 CHO-CCR2 细胞,并以 1x10⁶细胞/ml 重悬浮在含叠氮化钠的 FACS Buffer (2% 牛胎血清 PBS 溶液) 中,取 800 μ l (1x10⁵细胞) 移入每种抗体的试管中。以终浓度 5 μ g/ml 加入抗体,室温培养 1 小时,然后将样本置于冰上,在不同时间点上取 105 μ l 加入含 190 μ l FACS 缓冲液的 96 孔板中,并离心 3 分钟,弃去上清液,并以 105 μ l FACS 缓冲液重悬浮细胞,一式两份 (50 μ l) 地加入另一含 150 μ l FACS 缓冲液的 96 孔板中。收集所有时间点后,平板离心 3 分钟,弃去上清液,并以 50 μ l 羊抗人 IgG (γ -链特异性)-PE 标记二抗 (Southern Biotech#2040-09) 的 1:500FACS Buffer 稀释液重悬浮细胞,4 $^{\circ}$ C 下培养 30 分钟,然后以 FACS Buffer 洗涤 1 次。以 30 μ l 终体积的 FACS Buffer 重悬浮细胞,并使用 Intellicyt 流式细胞仪进行分析。各种 IgG1 克隆的解离率如图 13 所示。

[0271] 实施例 15

[0272] 本实施例中,使用 PBS 基的无酶细胞解离液 (Life Technologies#13151-014) 从培养瓶中提起 CHO-CCR2 细胞,并以 1x10⁶细胞/ml 重悬浮在 FACS Buffer (2%牛胎血清 PBS 溶液) 中,取 100 μ l (1x10⁵细胞) 移入 96 孔板的孔中。以 1 种或多种浓度加入抗体 (一般为 5、10 和 / 或 20 μ g/ml)。将平板在 4 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时,然后以 FACS Buffer 洗涤一次。以

50 μl 羊抗人 IgG (γ-链特异性)-PE 标记二抗 (Southern Biotech#2040-09) 的 1:500 FACS Buffer 稀释液重悬浮细胞, 4°C 下培养 30 分钟, 然后以 FACS Buffer 洗涤 1 次。以 30 μl 终体积的 FACS Buffer 重悬浮细胞, 并使用 Intellicyt 流式细胞仪进行分析。抗体与所述细胞的结合实验结果如表 7 所示。

[0273] 表 7

[0274]

抗体	与 CHO-huCCR2 的结合度
D1-3/LO	是
D1-5/LO	是
D1-8/LO	是
42A6	是
42D4	是
42 E8	是
42F1	是
43F12	是
55 E4	是
55F5	是

[0275] 序列表

[0276]

	重链可变域	轻链可变域
D1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYHMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSLRFD DTDVYYCATGGFGYWGEGLTVTVSS SEQ ID NO. 1	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
1A2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCATGSGGGTMDVWGQGTITVTVSSSEQ ID NO. 3	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
1B11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKAEDT AVYYCATAAAGPFDYWGQGTITVTVSSSEQ ID NO. 4	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
1G11	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTG YYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNNGVTKY AEKQGRVTMTRDTSITTAYMDLSRLRSDDT AIYYCATGGFEYWQGTITVTVSSSEQ ID NO. 5	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2

[0277]

1H5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT SYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AHKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGGHVLRFLFWLGLGEPFDYWGQ GTLVTVSSSEQ ID NO. 6	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
1B2	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMNWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT KYAQKFQGRVTMTSDTSINTAYMELSLRYD DTAVYYCATGGFQHWGQGLVTVSSSEQ ID NO. 7	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 8	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 9	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCATGSGGGTMDVWGEGTLVTVSS EQ ID NO. 10	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 11	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 12	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSSGSTKY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 13	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCATGSGGGTMDVWGEGTLVTVSS EQ ID NO. 14	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2

[0278]

D1-8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED AVYYCATGSGGGTMDVWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 15	LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGTGTK LTVL SEQ ID NO. 2
D1-1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSE DTAVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 8	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16
D1-2A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED AVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 9	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16
D1-3A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSE DTAVYYCATGSGGGTMDVWGEGTLVTVSS EQ ID NO. 10	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16
D1-4A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED AVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 11	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16
D1-5A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSE DTAVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 12	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16
D1-6A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTKY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED AVYYCATGGFGYWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 13	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16
D1-7A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSE DTAVYYCATGSGGGTMDVWGEGTLVTVSS EQ ID NO. 14	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16
D1-8A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED AVYYCATGSGGGTMDVWGEGTLVTVSSSEQ ID NO. 15	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRN HNRPSGISERFSASRSRGNTASLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAVFVFGGGT QLTVL SEQ ID NO. 16

[0279]

D1-1B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSE DTAVYYCATGGFGYWGEGLTVTVSSSEQ ID NO. 8	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
D1-2B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDT AVYYCATGGFGYWGEGLTVTVSSSEQ ID NO. 9	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
D1-3B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSE DTAVYYCATGSGGGTMDVWGEGLTVTVSS EQ ID NO. 10	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
D1-4B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDT AVYYCATGGFGYWGEGLTVTVSSSEQ ID NO. 11	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
D1-5B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNGGVT SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSE DTAVYYCATGGFGYWGEGLTVTVSSSEQ ID NO. 12	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
D1-6B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTKY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDT AVYYCATGGFGYWGEGLTVTVSSSEQ ID NO. 13	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
D1-7B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVT KYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSE DTAVYYCATGSGGGTMDVWGEGLTVTVSS EQ ID NO. 14	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
D1-8B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDT AVYYCATGSGGGTMDVWGEGLTVTVSSSEQ ID NO. 15	QAVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSN NVGNQGAAWLQQHQGQPPKLLSYRN HNRPSGVSERFSPSRSGDTSSLTITGLQ PEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGK LTVLSEQ ID NO. 32
42A0	QVQLQQSGPGLYKPSQTL SLTCVISGDSVSSG STAWN WIRQSPSRGLEWLGRTFYRSK WYND YAESVKS RITISADTSENQLSLHLNSVTAEDT AVYYCARGSRGSGYDYWGQGLTVTVSSSEQ ID NO. 17	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSS NIGSSNVN WYQQFPGKAPQLLIYTG D QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ PEDEADYYCSAWDTNLSAWVFGGGT KLTVLSEQ ID NO. 18

[0280]

54A9	QVQLVESGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFS SHYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSSGGSTIY AQKFQGRVTINADESTSTAYMELSSLGSDDT AVYYCARAAGGAVAGHGARFDYWGQGLTV TVSSSEQ ID NO. 37	LPVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIID VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYRRSSTLVFGGGT KLTVLSEQ ID NO. 38
54C1	QITLKESGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTS YYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSSGGSTSYA QKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTA MYYCAKNHPTATLDYWGQGLTVTVSSSEQ ID NO. 39	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIID VSKRPSGVSNRFSGSKSANTASLTIFG LQAEDEGDYYCSSYRSIRTVLFGGGT KLTVLSEQ ID NO. 40
55E4	EVQLVESGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT SYMHWRQAPGRGLEWMGIINPSSGSTS AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCARGQGTAIRAFDIWGQGMVTVSSS EQ ID NO. 41	DIVMTQTPLSSPVTLGQPA AISCRSSQ SLVNSDGNTYLSWLQQRPGQPPRVLI NKVSNRLSGVPDRFSGSGAGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQATEFPWTFGQ GTRLEIKSEQ ID NO. 42
55F5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT SYMHWRQAPGRGLEWMGIINPSSGSTS AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCARGQGTAIRAFDIWGQGMVTVSSS EQ ID NO. 43	DVVMTQSPLSSPVTLGQPASISCKSSQ TLVHNDGNSYLSWLHQRPGQPPRLLI YKVSNRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLRI GRVEAEDVGVYYCMQATQFPYTFGQ GTKLEIKSEQ ID NO. 44

抗huCCR2 IgG (D1) 与CHO-CCR2细胞结合

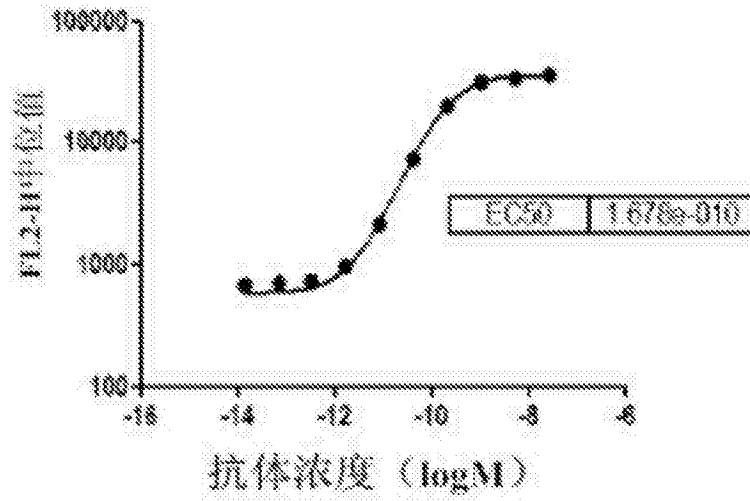


图 1

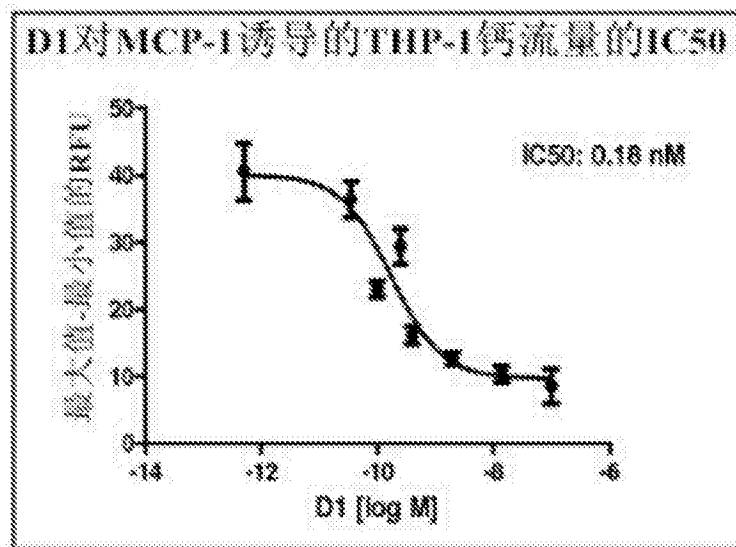


图 2

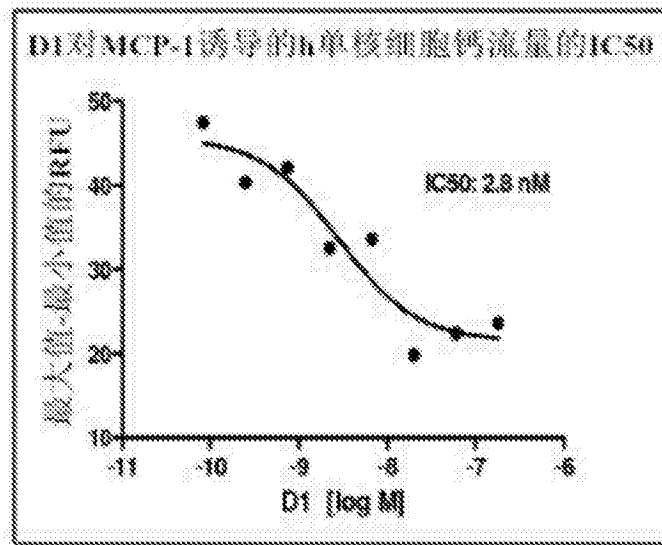


图 3

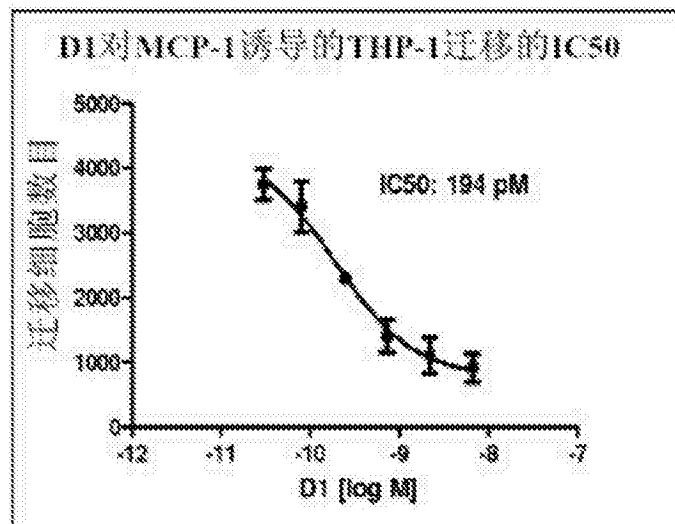


图 4

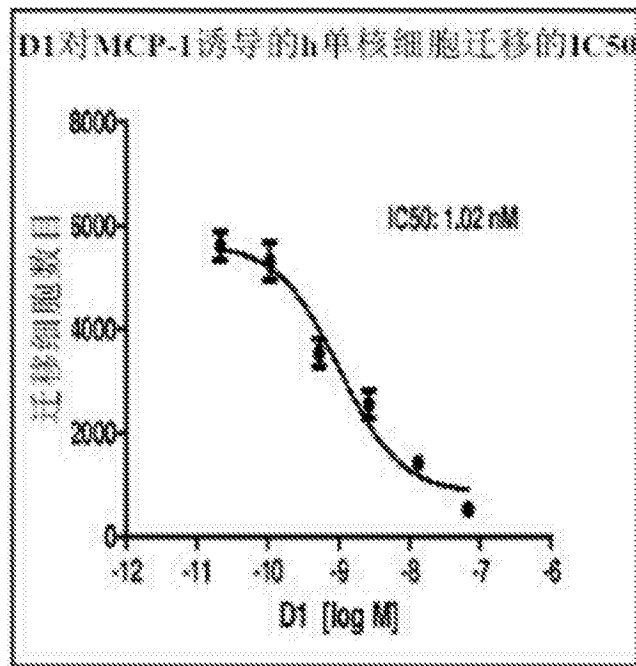


图 5

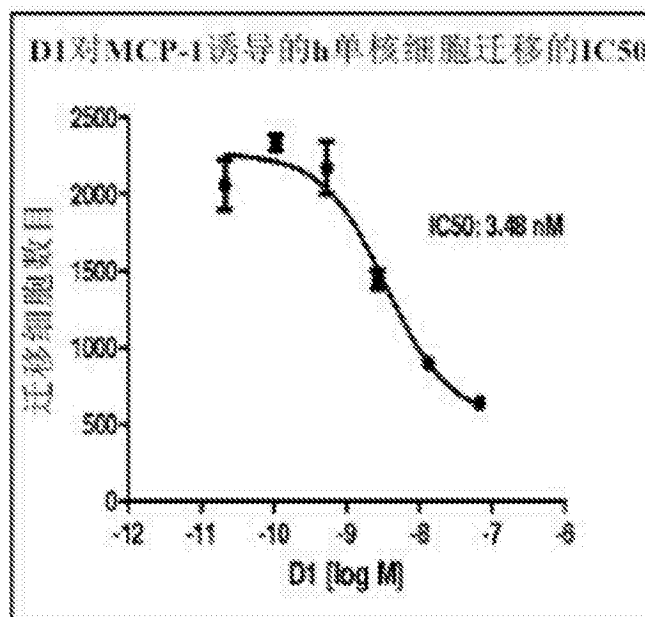


图 6

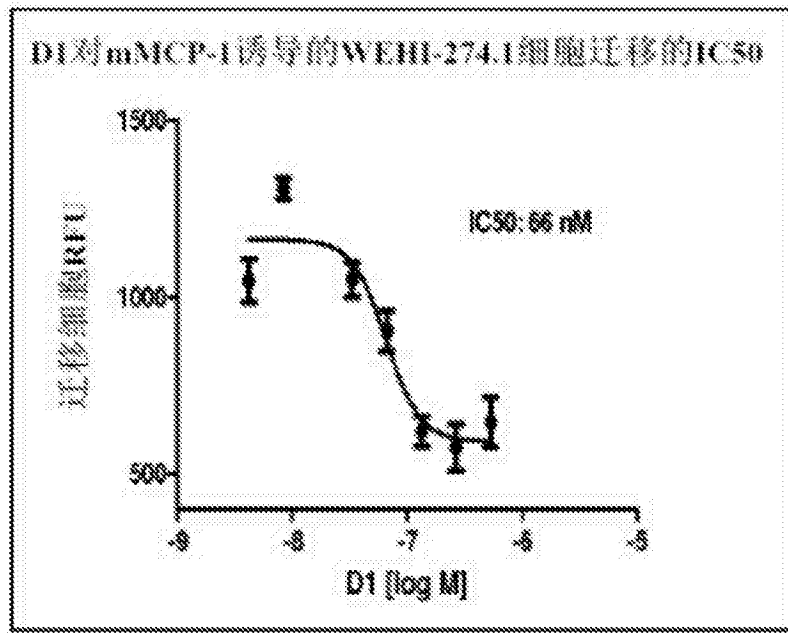


图 7

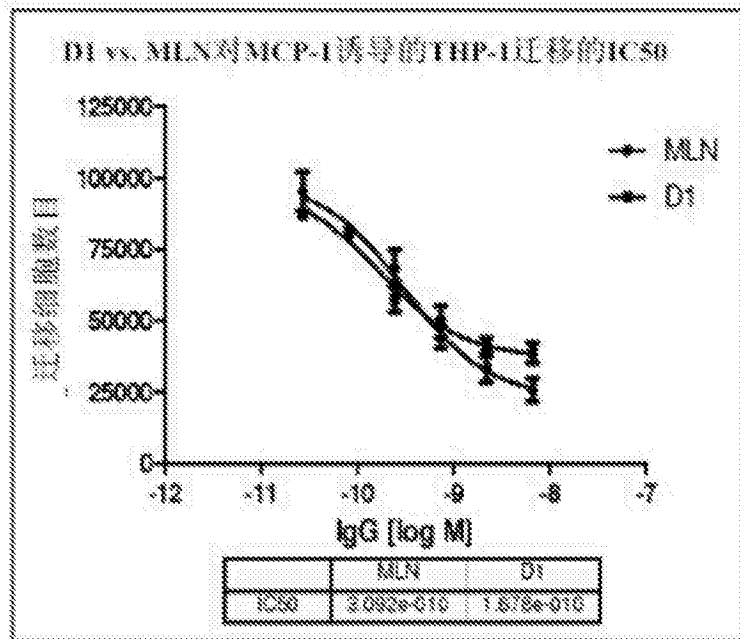


图 8A

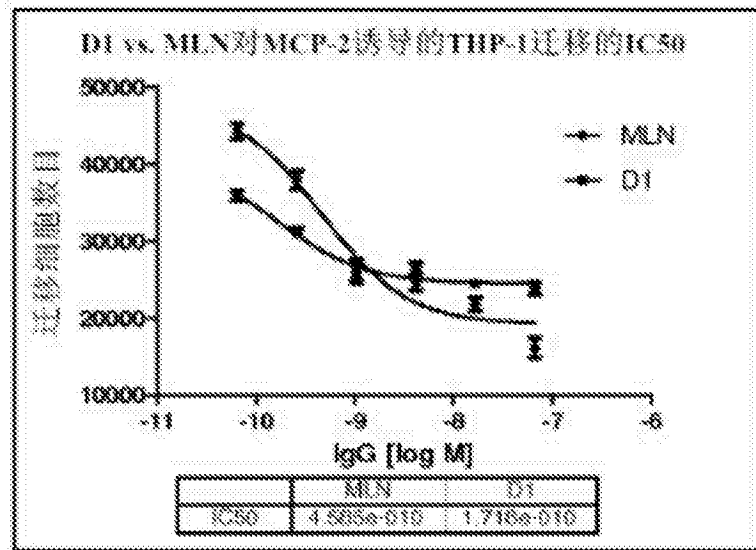


图 8B

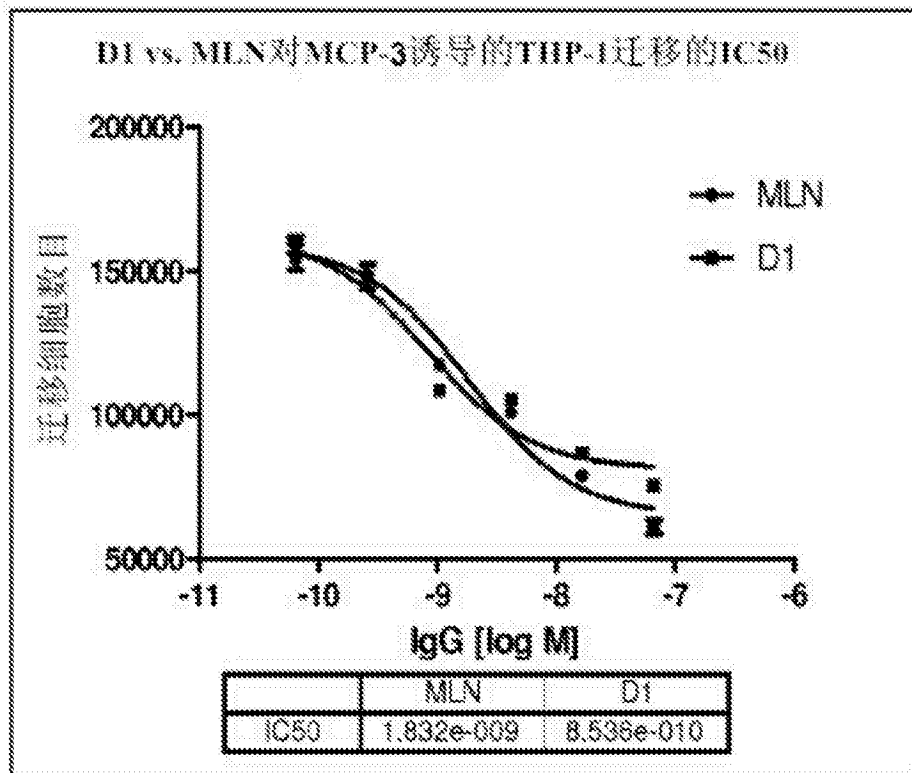


图 8C

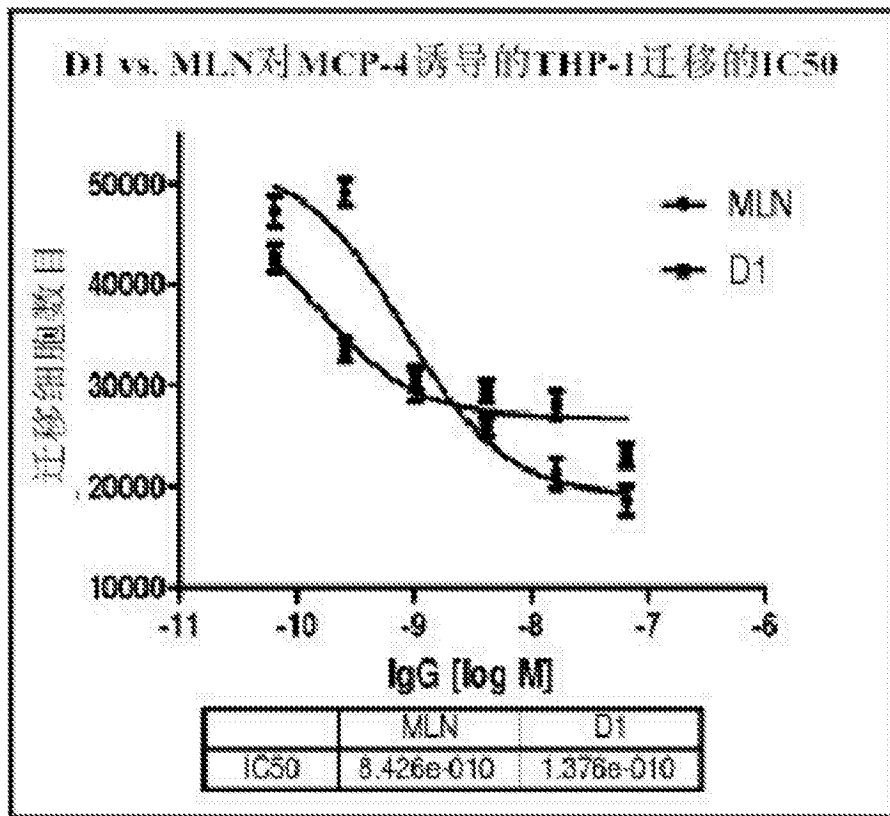


图 8D

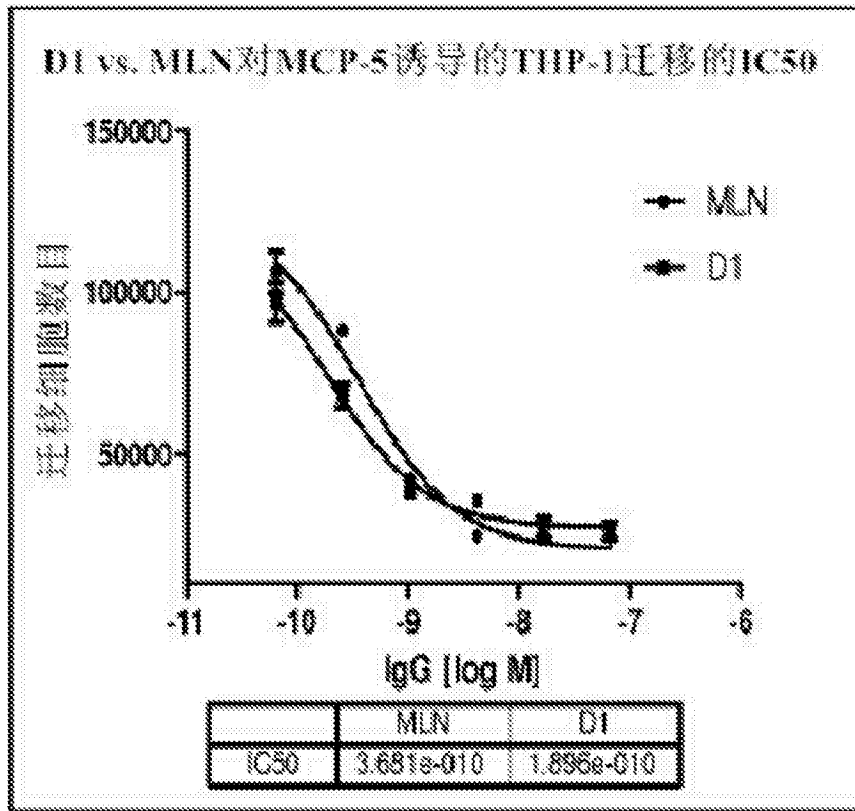


图 8E



图 9

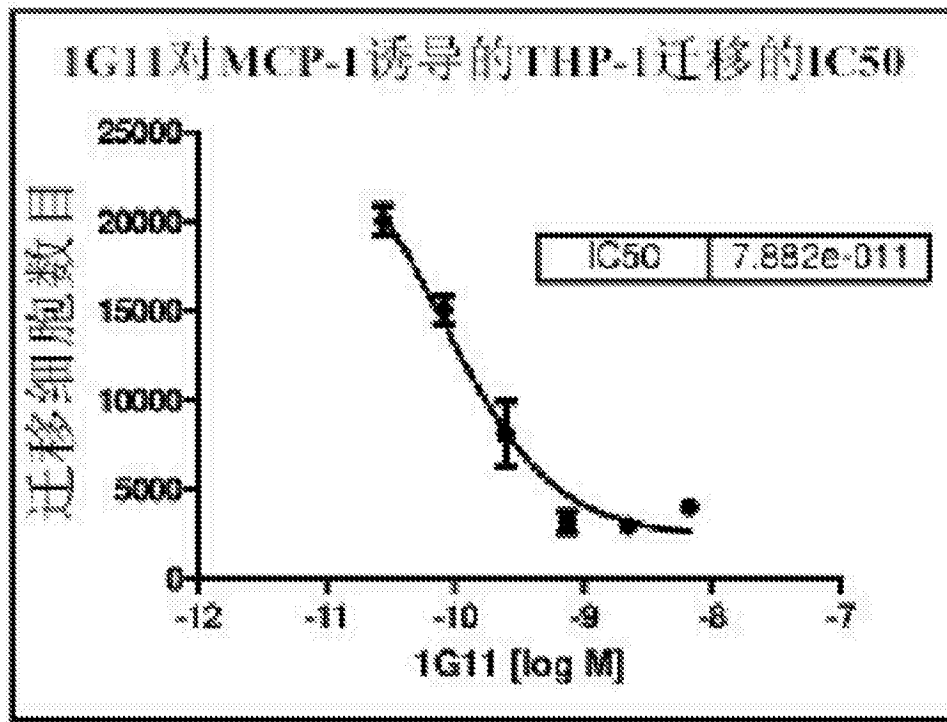


图 10A

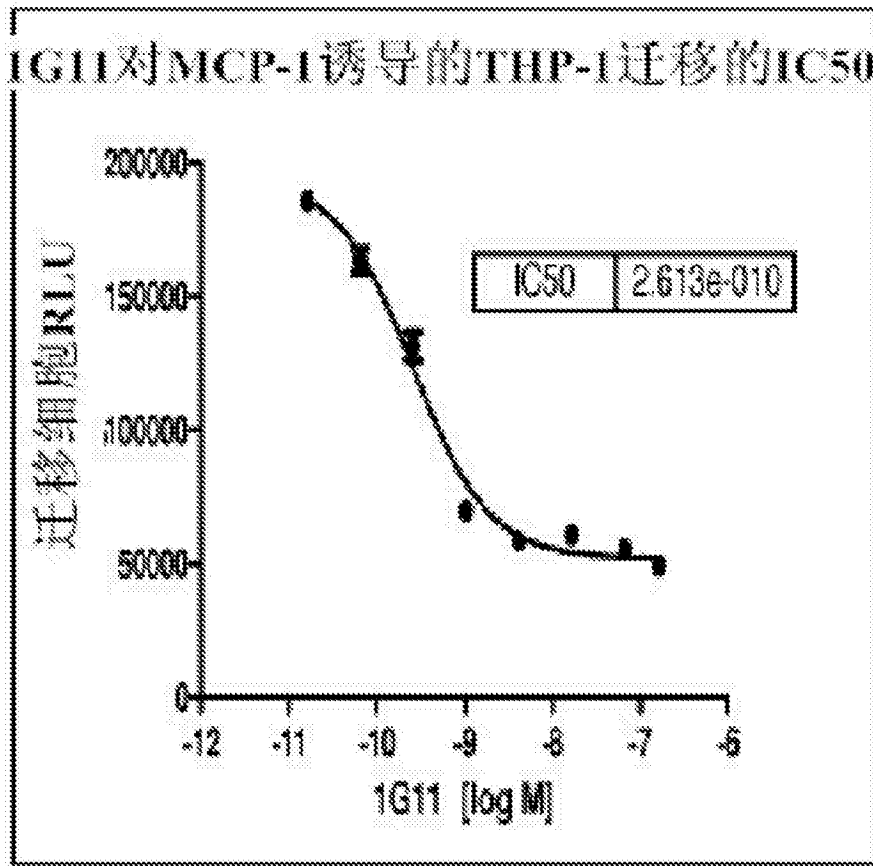


图 10B

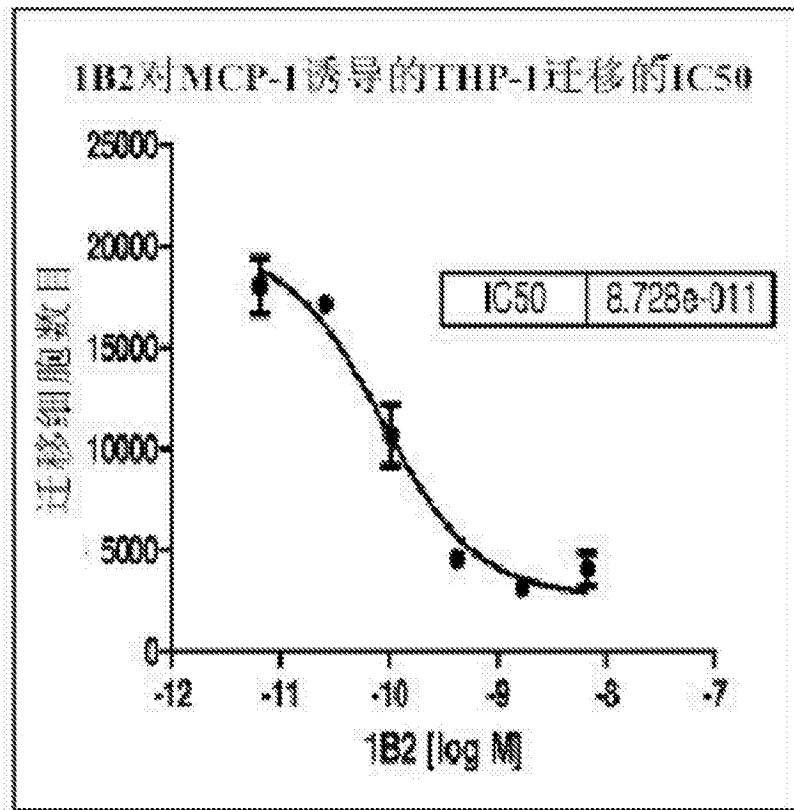


图 11A

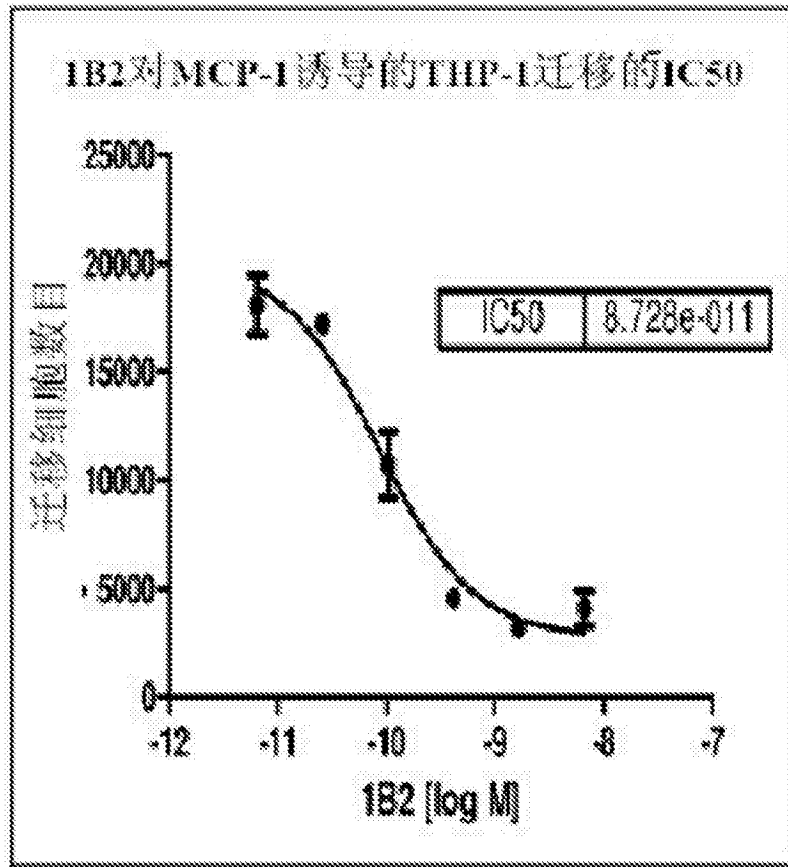


图 11B

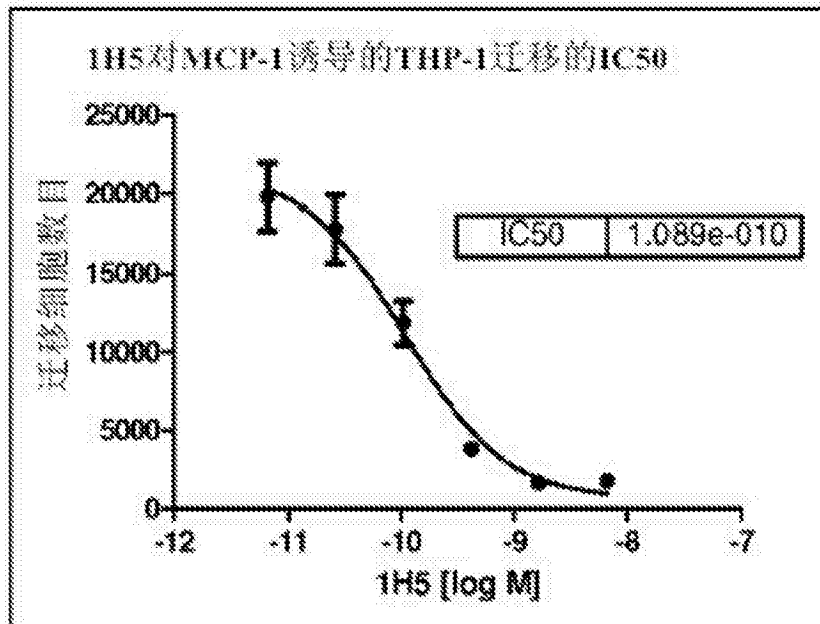


图 12A

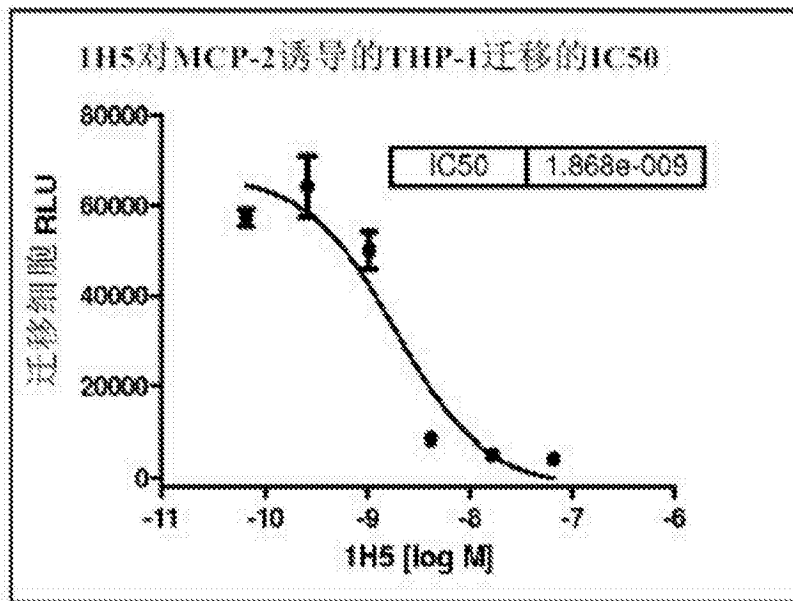


图 12B

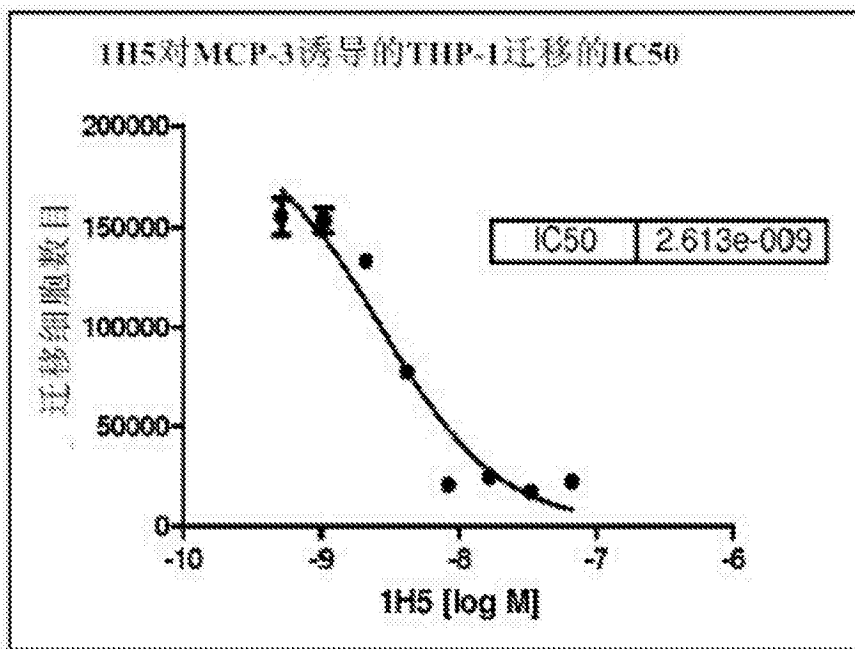


图 12C

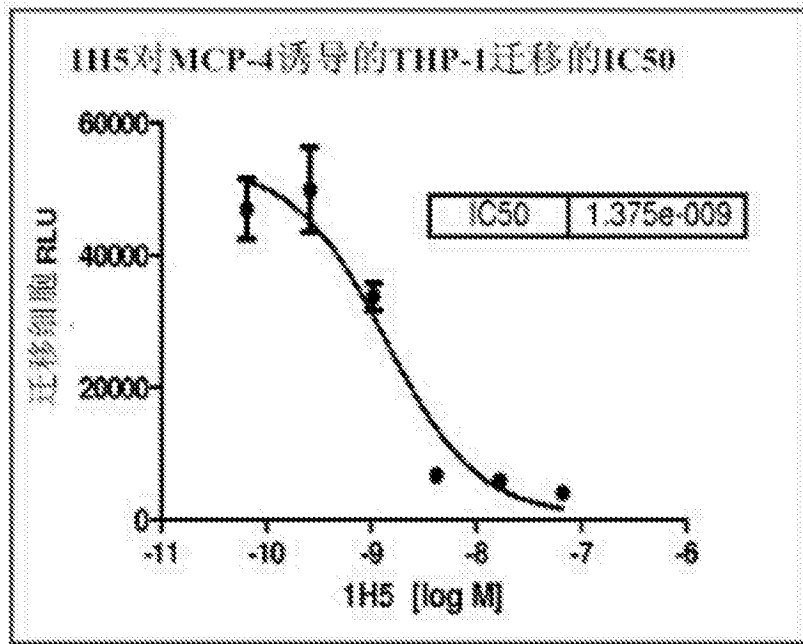


图 12D

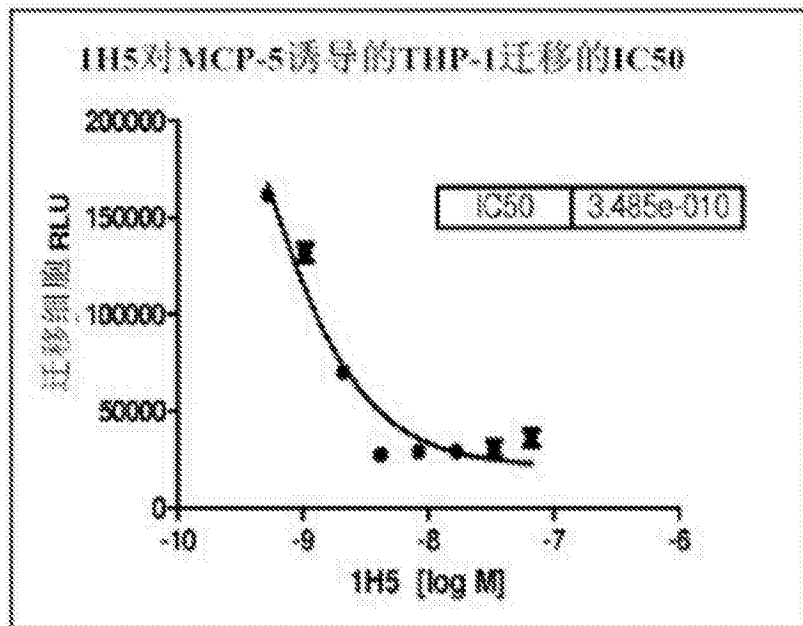


图 12E

CCR2 IgG1克隆从CHO-huCCR2细胞的解离率

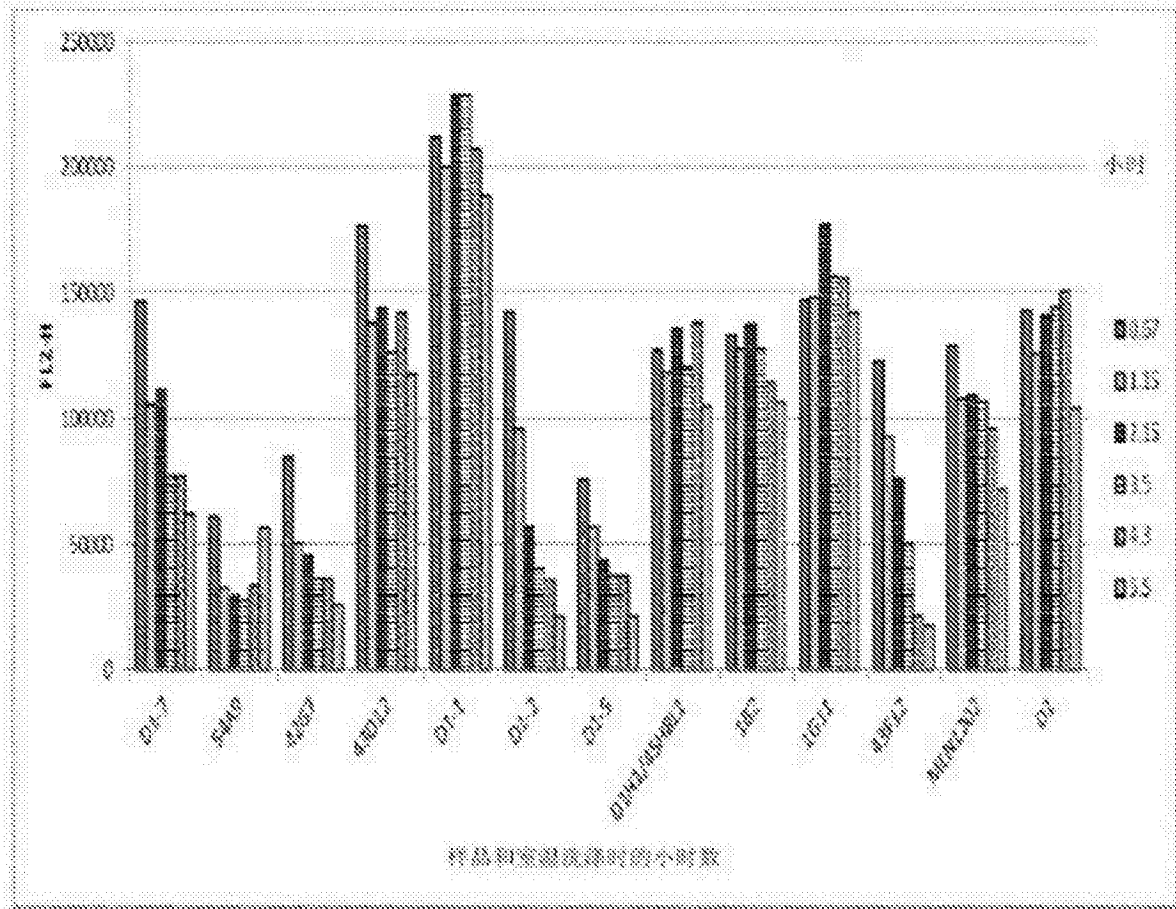


图 13