



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114502594 A

(43) 申请公布日 2022. 05. 13

(21) 申请号 202080069162.4

(22) 申请日 2020.07.31

(30) 优先权数据

62/882,353 2019.08.02 US

63/047,693 2020.07.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/044616 2020.07.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/026028 EN 2021.02.11

(71) 申请人 西托戴恩股份有限公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 D·伯格 S·凯利

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 傅宇昌

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

权利要求书3页 说明书33页

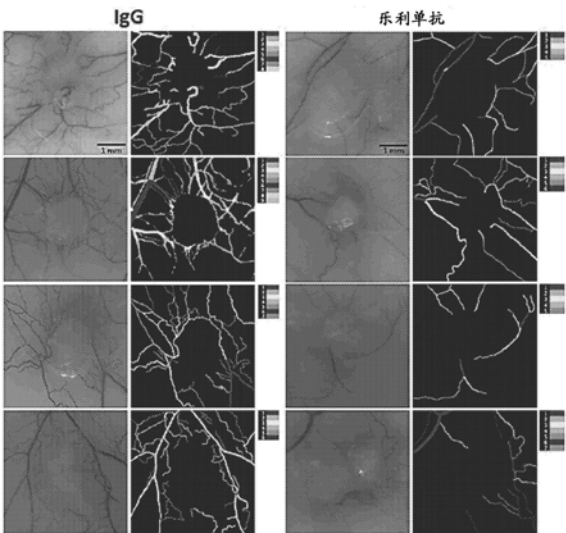
序列表9页 附图25页

(54) 发明名称

牵涉施用抗-CCR5受体试剂的用于治疗或预防癌症的方法

(57) 摘要

本公开内容涉及在治疗或预防癌症中使用CCR5受体的竞争性抑制剂,例如单克隆抗体乐利单抗(leronlimab)或其结合片段。



1. 治疗、抑制或预防结肠癌转移的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:

(a) 乐利单抗抗体或其结合片段;

(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;

(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;

(d) 宿主细胞,其包含 (i) 乐利单抗抗体或其结合片段, (ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或 (iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者

(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5细胞受体结合试剂。

2. 权利要求1的方法,其中所述施用导致减少的结肠癌向肺或肝脏中至少一个的转移。

3. 权利要求2的方法,其中向肺的转移减少超过50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,80%至90%,或者超过85%。

4. 权利要求2的方法,其中向肝脏的转移减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。

5. 权利要求1的方法,其中所述施用减少肿瘤相关的血管生成。

6. 权利要求5的方法,其中供养肿瘤的血管的总血管面积减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,或者超过60%。

7. 权利要求5的方法,其中供养肿瘤的血管的血管长度密度减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。

8. 权利要求5的方法,其中供养肿瘤的血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,或者超过70%。

9. 权利要求8的方法,其中较大血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。

10. 权利要求8的方法,其中较小血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,或者超过70%。

11. 权利要求1-10中任一项的方法,其中所述施用导致在所述受试者的外周血中增加的CD4+CD25+细胞水平或降低的CD4+CD25-细胞水平之一;或者,其中所述抗-CCR5细胞受体结合试剂不改变CD4+细胞中的酪氨酸激酶磷酸化。

12. 在具有结肠癌的受试者中减少转移负荷的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:

(a) 乐利单抗抗体或其结合片段;

(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;

(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;

(d) 宿主细胞,其包含 (i) 乐利单抗抗体或其结合片段, (ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或 (iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者

(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。

13. 权利要求12的方法,其中在肺中的转移负荷减少超过50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,80%至90%,或者超过85%。

14. 权利要求12的方法,其中在肝脏中的转移负荷减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。

15. 在具有结肠癌的受试者中减少肿瘤相关的血管生成的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:

- (a) 乐利单抗抗体或其结合片段;
- (b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;
- (c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;
- (d) 宿主细胞,其包含 (i) 乐利单抗抗体或其结合片段, (ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或 (iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者
- (e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。

16. 权利要求15的方法,其中供养肿瘤的血管的总血管面积减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,或者超过60%。

17. 权利要求15的方法,其中供养肿瘤的血管的血管长度密度减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。

18. 权利要求15的方法,其中供养肿瘤的血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,或者超过70%。

19. 权利要求18的方法,其中较大血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。

20. 权利要求18的方法,其中较小血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,或者超过70%。

21. 下列各项用于治疗、抑制或预防转移性结肠癌的用途:

- (a) 乐利单抗抗体或其结合片段;
- (b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;
- (c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;
- (d) 宿主细胞,其包含 (i) 乐利单抗抗体或其结合片段, (ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或 (iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者
- (e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。

22. 治疗、抑制或防止转移性癌症损伤生长的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用不具有CCL5激动剂活性的针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂。

23. 根据权利要求22的方法,其中所述竞争性抑制剂与所述CCR5细胞受体的ECL-2环相结合。

24. 根据权利要求22或23的方法,其中所述竞争性抑制剂与CCL5竞争与所述CCR5细胞受体的结合。

25. 根据权利要求22-24中任一项的方法,其中所述竞争性抑制剂包括单克隆抗体PA14、乐利单抗或CCR5mAb004,或者其结合片段。

26. 根据权利要求22-25中任一项的方法,其中所述竞争性抑制剂不改变CD4+细胞中的酪氨酸激酶磷酸化。

27. 根据权利要求22-26中任一项的方法,其中所述CCR5细胞受体在NK细胞上。

28. 根据权利要求22-27中任一项的方法,其中所述CCR5细胞受体在B细胞上。

29. 防止转移性癌症扩散的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:

- (a) 乐利单抗抗体或其结合片段；
 - (b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸；
 - (c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体；
 - (d) 宿主细胞，其包含 (i) 乐利单抗抗体或其结合片段，(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸，或 (iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体；或者
 - (e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。
30. 根据权利要求29的方法，其中所述抗-CCR5细胞受体结合试剂为乐利单抗或其结合片段。
31. 根据权利要求30的方法，其中所述乐利单抗或其结合片段包括scFv。
32. 根据权利要求29-31中任一项的方法，其中向所述受试者施用乐利单抗或其结合片段。
33. 根据权利要求29-31中任一项的方法，其中施用包含乐利单抗或其结合片段的宿主细胞。
34. 根据权利要求22-33中任一项的方法，其中所述癌症为乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤、胃癌或卵巢癌中的一种。
35. 根据权利要求34的方法，其中所述癌症为乳腺癌。
36. 根据权利要求34的方法，其中所述癌症为前列腺癌。
37. 根据权利要求34的方法，其中所述癌症为结肠癌。
38. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中预防所述癌症包括减慢所述癌症的生长。
39. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中预防所述癌症包括防止肿瘤的形成。
40. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中预防所述癌症包括限制或减小肿瘤的大小。
41. 根据前述权利要求中任一项的方法，其进一步包括向所述受试者施用细胞疗法、化学治疗试剂、小分子或者CCR5/CCL5信号传导的抑制剂。
42. 根据权利要求20的方法，其中所述CCR5/CCL5信号传导的抑制剂包括马拉韦罗、维立韦罗、阿拉韦罗、SCH-C、TAK-779、PA14抗体、2D7抗体、RoAb13抗体、RoAb14抗体或45523抗体。
43. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中所述CCR5细胞受体在NK细胞上。
44. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中所述CCR5细胞受体在B细胞上。
45. 使抗-CCR5结合试剂靶向在NK细胞或B细胞中任一个上的CCR5受体以预防癌症的方法。
46. 用于治疗癌症的治疗性组合物，其包含不改变CD4+T细胞中的酪氨酸激酶磷酸化的针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂。
47. 权利要求46的用于治疗癌症的治疗性组合物，其进一步包含另外的细胞疗法、化学治疗试剂、小分子或者CCR5/CCL5信号传导的抑制剂。
48. 权利要求46的用于治疗癌症的治疗性组合物，其中所述CCR5细胞受体位于NK细胞上。
49. 权利要求46的用于治疗癌症的治疗性组合物，其中所述CCR5细胞受体位于B细胞上。

牵涉施用抗-CCR5受体试剂的用于治疗或预防癌症的方法

[0001] 关于序列表的声明

[0002] 与本申请相关联的序列表以文本格式代替纸质副本提供,并且特此通过提及而合并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称为230042_429W0_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为15.1KB,创建于2020年7月30日,并且通过EFS-Web以电子方式提交。

[0003] 发明背景

技术领域

[0004] 本公开内容涉及在治疗或预防癌症中使用CCR5受体的竞争性抑制剂,例如单克隆抗体乐利单抗(leronlimab)。

[0005] 背景

[0006] 炎症可以响应于创伤、化学或物理损伤、自身免疫应答、感染性因子、癌症等而出现。炎症是先天免疫的重要组成部分,并且对于引发适应性免疫来说和对于免疫应答的效应阶段来说是必需的。可溶性介体,例如趋化因子,显示出在驱动各种炎症组分,尤其是白细胞流入中发挥了重要作用。

[0007] 趋化因子与其受体(它们在许多细胞类型,包括例如白细胞、内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞、平滑肌细胞和实质细胞上表达)相结合。趋化因子通过控制在基础和炎症情形中的细胞募集和激活而在白细胞生物学中发挥重要作用。另外,因为趋化因子受体也在其他细胞类型上表达,所以趋化因子还具有多种其他作用,包括血管生成、组织和血管重塑、病原体消除、抗原呈递、白细胞激活和存活、慢性炎症、组织修复/愈合、纤维化、胚胎发生、肿瘤发生等。

[0008] CCL5(C-C趋化因子配体5)(一种也称为“在激活后调节的并且正常T细胞表达和分泌的(regulated upon activation and normal T cell expressed and secreted; RANTES)”的炎性趋化因子)在这些免疫机制中发挥重要作用。CCL5充当T细胞迁移至炎症位点的关键调节物,其中引导T细胞迁移至受损或被感染的位点。CCL5也调节T细胞分化。趋化因子的许多生物学效应通过其与在细胞表面上的趋化因子受体的相互作用来介导。在本发明中,对于CCL5的最相关的已知受体为CCR5受体;但是,CCR1和CCR3也是已知的CCL5受体,并且CCR4和CD44是辅助受体。Tamamis等人,Elucidating a Key Anti-HIV-1 and Cancer-Associated Axis:The Structure of CCL5(Rantes) in Complex with CCR5,Scientific Reports,4:5447(2014)。

[0009] 长期以来,炎性趋化因子主要被视为免疫和炎症的必不可少的“看门人”。但是,近期的研究表明,例如,癌细胞推翻正常的趋化因子系统,并且这些分子和其受体成为肿瘤微环境的重要成分,以非常不同的方式发挥促进肿瘤的作用。虽然在一些血液学恶性肿瘤、淋巴瘤和大量的实体肿瘤中已检测到CCR5受体和CCL5配体,但是仅在有限数目的癌症中进行了关于CCL5配体/CCR5受体轴的作用的广泛研究。Aldinucci等人,The Inflammatory chemokine CCL5 and Cancer Progression,Mediators of Inflammation,第2014卷,文章ID 292376,第12页。

[0010] CCR5受体是在淋巴细胞(例如,NK细胞、B细胞)、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、一个亚群的T细胞等上表达的C-C趋化因子G-偶联蛋白受体。CCR5受体以蛇状方式横跨细胞质膜七次。细胞外部分是关于靶向CCR5的抗体的潜在靶标,并且包含氨基末端结构域(Nt)和三个细胞外环(ECL1、ECL2和ECL3)。CCR5的细胞外部分刚好包含分布在四个结构域中的90个氨基酸。这些结构域中最大的结构域在Nt和ECL2处,每个以大致30个氨基酸。Olson等人,CCR5 Monoclonal Antibodies for HIV-1 Therapy,Curr.Opin.HIV AIDS,3月,4(2):104-111(2009)。

[0011] CCL5配体和CCR5受体复合物的形成引起受体中的构象变化,这激活G蛋白的亚基,从而诱导信号传导并且导致经变化的水平的环AMP(cAMP)、肌醇三磷酸、细胞内的钙和酪氨酸激酶激活。这些信号传导事件引起细胞极化和转录因子NF- κ B的易位,这导致吞噬能力、细胞存活和促炎基因的转录的增加。一旦G-蛋白依赖性信号传导出现,CCL5/CCR5受体复合物就经由胞吞作用而被内化。

[0012] 已通过计算得出与CCR5相复合的CCL5的完整的复合结构。据报道,CCL5的1-15残基部分插入到CCR结合口袋中;CCL5的1-6N-末端结构域被埋在CCR5的跨膜区域内;并且CCL5的7-15残基部分主要被CCR5的N-末端结构域和细胞外环所包围。CCL5残基Ala16和Arg17以及24-50残基部分的另外残基与CCR5的上部N-末端结构域和细胞外环界面相互作用。据进一步报道,CCL5的氨基末端的完整性对于受体结合和细胞激活来说是至关重要的。进一步地,已报道CCL5和HIV-1主要与几乎相同的CCR5残基相互作用,并且共享相同的趋化因子受体结合口袋。参见Tamamis等人,Elucidating a Key Anti-HIV-1 and Cancer-Associated Axis:The Structure of CCL5(Rantes) in Complex with CCR5,Scientific Reports,4:5447(2014)。还分开报道了,趋化因子,例如CCL5配体,主要通过ECL2来结合CCR5受体。Olson等人,CCR5 Monoclonal Antibodies for HIV-1 Therapy,Curr.Opin., HIV AIDS,3月,4(2):104-111(2009)。

[0013] 一些研究已表明,CCR5信号传导具有抗肿瘤效应,其中充当对于T细胞激活的共刺激分子并且增加向肿瘤微环境的T细胞趋化性。参见Gao等人,CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells,Open Biol.,6:160122(2016);González-Martín等人,CCR5 in cancer immunotherapy: More than an“attractive”receptor for T cells,OncoImmunology,1:106-108(2012)。但是,证据也暗示,CCL5/CCR5轴信号传导可能在某些类型的癌症例如乳腺癌和前列腺癌中被优先激活,并且这样的信号传导推动疾病进展。例如,一些研究表明,癌细胞可以过表达CCL5、CCR5或两者,从而可能经由CCR5信号传导对于雷帕霉素的机械靶标(mTOR)的效应而对癌细胞的生长和增殖做出贡献。参见Gao等人,CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells,Open Biol.,6:160122(2016);也参见Chow和Luster,Chemokines in Cancer,Cancer Immunol.Res.,2(12):1125-1131(2014);Singh等人,Expression of CCR5 and its ligand CCL5 in pancreatic cancer(Abstract),J Immunol,196(1增刊):51.3(2016)。另外,一些免疫抑制性免疫细胞(包括调节T细胞(Treg)和骨髓来源的抑制细胞(MDSC))表达CCR5,这暗示了CCR5信号传导通过其可以对肿瘤生长做出贡献的另一条途径。Mukaida,CCR5 antagonist, an ally to fight against metastatic colorectal cancer,Translational Cancer

Research,5 (增刊2):S309-S312 (2016)。进一步地,已报道在肿瘤微环境中的癌细胞可以利用由CD4⁺和CD8⁺T细胞进行的CCL5产生,以导致增加的肿瘤生长和肿瘤细胞扩散。Halama等人,Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients,Cancer Cell,29:587-601 (2016)。

[0014] 已进行了使用抗-CCR5结合试剂来改变与一些癌症类型相联系的CCL5/CCR5信号传导的探索性努力。Sicoli等人,CCR5 Receptor Antagonists Block Metastasis to Bone of v-Src Oncogene-Transformed Metastatic Prostate Cancer Cell Lines, Cancer Res.,74 (23):7103-7114 (2014);Velasco-Velázquez等人,The CCL5/CCR5 Axis Promotes Metastasis In Basal Breast Cancer,Oncoimmunology,2 (4):e23660 (2013);Velasco-Velázquez等人,CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells,Cancer Res.,72 (15):3839-3850 (2012)。存在各种各样的抑制、打断、阻断、改变或修饰CCR5/CCL5受体/配体轴(即,CCR5受体/CCL5配体轴)的化合物。这些化合物中的许多已被开发用于治疗HIV-1,HIV-1也与CCR5受体相结合并且已知与CCL5共享一些结合共性。此类化合物包括细胞外或细胞跨膜CCR5结合试剂例如乐利单抗(细胞外)和马拉韦罗(跨膜),和其他化合物例如维立韦罗、阿拉韦罗、SCH-C和TAK-779,和抗体例如PA14、2D7、RoAb13、RoAb14、45523,等等。已发现最强有力地抗病毒的抗-CCR5单克隆抗体(包括例如乐利单抗(也称为PRO 140))结合单独的或与Nt残基相组合的在EL2中的CCR5受体氨基酸残基。也已确定,关于抗-CCR5单克隆抗体的CCR5受体结合位点不同于小分子CCR5拮抗剂的那些。即,可得的小分子CCR5拮抗剂,例如马拉韦罗,结合由跨膜螺旋形成的疏水空腔,即不是细胞外的Nt或环区域。已将在第七跨膜区域中的氨基酸残基E283特别地鉴定为对于小分子的主要位点或相互作用,并且已发现马拉韦罗和维立韦罗与相同套组的CCR5受体氨基酸相结合。Olson等人,CCR5 Monoclonal Antibodies for HIV-1 Therapy,Curr.Opin.HIV AIDS,3月,4 (2):104-111 (2009)。但是,也已报道,CCL5配体和马拉韦罗通过共享两个受体位点(Nt和ECL2)而停靠在CCR5受体上,并且合成的CCL5-衍生的肽也可以用于阻断CCR5受体。Secchi等人,Combination of the CCL5-Derived Peptide R4.0 with Different HIV-1 Blockers Reveals Wide Target Compatibility and Synergic Ccobinding to CCR5,Antimicrob Agents Chemother.,58 (10):6215-6223 (2014)。

[0015] 在一些情况下,与免疫细胞激活相关联的CCL5表达可以被在肿瘤微环境中的癌细胞利用,并且通过使用抑制剂例如马拉韦罗来阻断CCR5信号传导可以具有抗肿瘤效应。在一项人结肠直肠癌肝脏转移的研究中,在侵袭性边缘处的CD4⁺和CD8⁺T细胞表达CCL5,其与T细胞耗竭、肿瘤增殖、侵袭性肿瘤细胞行为和增加的由肿瘤相关巨噬细胞进行的基质金属蛋白酶产生相关联。Halama等人,Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients,Cancer Cell,29:587-601 (2016)。用马拉韦罗抑制CCL5导致肿瘤相关巨噬细胞的再极化和肿瘤细胞死亡。Halama等人,(2016)。

[0016] 但是,CCR5信号传导的抑制也可以具有免疫抑制效应。已进行了体外研究以调查在激活的人T细胞上通过马拉韦罗的CCR5受体阻断对于潜在的免疫机制的效应。发现通过马拉韦罗阻断CCR5不仅可以阻断由CCL5和CCL2诱导的CCR5和CCR2内化过程,而且还可以抑

制分别朝向其关联配体的T细胞趋化活性。进一步地,用高剂量的马拉韦罗阻断CCR5倾向于降低TNF- α 和IFN- γ 的产生。还注意到,马拉韦罗对于CCR5的效应是暂时的和可逆的。Yuan等人, *In Vitro Immunological Effects of Blocking CCR5 on T Cells, Inflammation*, 38(2):902-910(2015);参见Arberas等人, *In vitro effects of the CCR5 inhibitor maraviroc on human T cell function*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 68(3):577-586(2013)。

[0017] CCR5还被认为在移植物抗宿主病(GVHD)中发挥作用。趋化因子受体CCR5已显示出介导鼠类GVHD发病机理。据报道,在人急性GVHD样品的皮肤中的浸润性淋巴细胞主要是CCR5⁺T细胞。Lisa Palmer, George Sale, John Balogun, Dan Li, Dan Jones, Jeffrey Molldrem, Rainer Storb, Qing Ma, *Chemokine Receptor CCR5 Mediates Allo-Immune Responses in Graft-vs-Host Disease*, *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010年3月, 16(3):311-319, doi:10.1016/j.bbmt.2009.12.002。还已发现,CCR5⁺群体展现出激活的效应T细胞表型的特征。CCR5表达在同种异体刺激后上调,并且CCR5⁺细胞伴随着T细胞激活标志物的共表达进行增殖。进一步地,产生炎性细胞因子TNF α 、IL-2或IFN- γ 的激活的T细胞关于CCR5是阳性的。因此,应当理解的是,CCR5是关于GVHD效应细胞的标志物,并且CCR5⁺T细胞在人急性GVHD的发病机理中是积极参与者。

[0018] 鉴于在对肿瘤发展做出贡献中CCR5信号传导的众多的和有时互相矛盾的作用,对于这样的针对CCR5受体的竞争性抑制剂以及使用方法存在需要,其可以用于抑制、减缓、打断、阻断、改变或修饰CCR5/CCL5受体/配体轴以用于治疗目的而不触发不意欲的副作用,或者减少其影响。进一步地,对于这样的针对CCR5受体的竞争性抑制剂以及使用方法存在需要,其引起较少的和较不严重的副作用,是长期的,并且推动经改善的患者顺应性,这是由于降低的按剂量给药要求和经改善的患者体验(由于较少的不希望的副作用),包括由该竞争性抑制剂本身引起的副作用。使用CCL5/CCR5轴作为治疗靶标的最佳治疗样式将会需要调和两个相反的要求:需要抑制在特定恶性疾病中CCL5和CCR5的有害牵涉,而同时保护其在免疫中的潜在地有益的活性。

[0019] 简要概述

[0020] 先前已显示,当单独地添加至CD4⁺T细胞时单克隆抗体乐利单抗不影响cAMP水平,但是当与CCL5一起进行施用减少CCL5对于cAMP水平的效应。W02016/210130。类似地,虽然单独的乐利单抗不影响CHO-K1细胞的趋化性,但是当与CCL5一起进行施用乐利单抗降低CCL5-诱导的趋化性。W02016/210130。这些研究表明,乐利单抗不具有对于CCR5的激动剂活性,但是充当与CCL5的竞争性抑制剂以与CCR5相结合。

[0021] 但是,在本公开内容中,显示单独的乐利单抗在体外不影响在T细胞中CCR5受体信号传导下游的酪氨酸激酶磷酸化,并且它也不抑制通过CCL5的此类激酶的磷酸化。这些结果提供了证据证明,相对于RANTES而言,乐利单抗在调节CCR5/CCL5轴中的作用是不一致的,即它仅阻断或抑制否则将会产生自CCL5/CCR5结合的下游活性中的一些。因此,显示乐利单抗的作为CCL5竞争性结合抑制剂的活性对于CCL5参与常规地与CCR5/CCL5轴相关联的下游活性的能力具有混合型影响。进一步阐明乐利单抗的作用以及其免疫调节效应是继续调查的主题。

[0022] 另外,在本公开内容中,乐利单抗被发现在缺乏T细胞的小鼠模型中防止肿瘤生长

方面是出乎意料地有效的,这表明乐利单抗也通过NK细胞、B细胞或两者来调节免疫应答并且促进抗肿瘤效应。因此,测定了在非T细胞上,例如在NK细胞、B细胞或两者上乐利单抗调节通过结合CCR5轴而触发的活性的能力。此外,重要的是,发现乐利单抗在小鼠模型中防止肿瘤生长方面是令人惊讶地有效的,仅基于相关于非T细胞的其活性;因此,暗示了一种非T细胞治疗方法。

[0023] 本公开内容进一步显示,虽然CCR5表达与加速的肿瘤生长相关联,但是乐利单抗在人源化小鼠中既减慢xGVHD(异种移植物-GVHD)的发展,也增强抗肿瘤活性。发现乐利单抗在荷SW480瘤小鼠和非荷瘤小鼠中都延迟xGVHD的发作。另外,发现乐利单抗在人源化小鼠中有效地延迟肿瘤进展,其中该效应持续至第80天,但是在非人源化小鼠中对于肿瘤生长没有效应。对于来自用乐利单抗进行治疗的荷瘤人源化小鼠的外周血进行的分析显示出增加的循环T细胞的数目和降低的B和NK细胞的百分比。更详尽的分析显示出CD4+CD25+Treg的增加和CD4+CD25-Treg的减少,这可能涉及乐利单抗对于GVHD的抑制。

[0024] 本公开内容还证实,乐利单抗在移入有SW480人结肠癌细胞的人源化小鼠中减小了转移负荷。令人惊讶地,相比于原发性肿瘤的生长抑制而言,在转移损伤(也可以称为继发性位点损伤)中的肿瘤抑制程度是更加明显的。因为肿瘤新血管生成对于肿瘤生长和转移来说是必需的,所以评估了乐利单抗对于血管生成的效应。发现乐利单抗干扰肿瘤血管生成,这暗示了关于所观察到的转移负荷减小的机制。

[0025] 因此,在某些方面,本公开内容旨在CCR5受体的竞争性抑制剂(例如,单克隆抗体乐利单抗或其结合片段)在治疗或预防癌症和/或GVHD中的用途。

[0026] 在一些实施方案中,本公开内容提供了治疗、抑制或预防结肠癌转移的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:(a) 乐利单抗抗体或其结合片段;(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;(d) 宿主细胞,其包含(i) 乐利单抗抗体或其结合片段,(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或(iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5细胞受体结合试剂。

[0027] 在一些实施方案中,本公开内容提供了在具有结肠癌的受试者中减少转移负荷的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:(a) 乐利单抗抗体或其结合片段;

[0028] (b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;(d) 宿主细胞,其包含(i) 乐利单抗抗体或其结合片段,(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或(iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。

[0029] 在一些实施方案中,本公开内容提供了在具有结肠癌的受试者中减少肿瘤相关的血管生成的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:(a) 乐利单抗抗体或其结合片段;(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;(d) 宿主细胞,其包含(i) 乐利单抗抗体或其结合片段,(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或(iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。

[0030] 在一些实施方案中,本公开内容提供了下列各项用于治疗、抑制或预防转移性结

肠癌的用途：(a) 乐利单抗抗体或其结合片段；(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸；(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体；(d) 宿主细胞，其包含(i) 乐利单抗抗体或其结合片段，(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸，或(iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体；或者(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。

[0031] 在一些实施方案中，本公开内容提供了治疗、抑制或防止转移性癌症损伤生长的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用不具有CCL5激动剂活性的针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂。

[0032] 在一些实施方案中，本公开内容提供了防止转移性癌症扩散的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂，其包括：(a) 乐利单抗抗体或其结合片段；(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸；(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体；(d) 宿主细胞，其包含(i) 乐利单抗抗体或其结合片段，(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸，或(iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体；或者(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5结合试剂。

[0033] 在一些实施方案中，本公开内容提供了使抗-CCR5结合试剂靶向在NK细胞或B细胞中任一个上的CCR5受体以预防癌症的方法。

[0034] 在一些实施方案中，本公开内容提供了用于治疗癌症的治疗性组合物，其包含不改变CD4⁺T细胞中的酪氨酸激酶磷酸化的针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂。

[0035] 附图简述

[0036] 图1显示了响应于PMA处理的酪氨酸激酶激活。关于未染色的(例如，没有针对所示磷蛋白的抗体；“CTL”)、经染色但未处理的(“未处理的”)或者用25nM PMA进行处理的(“经PMA处理的”)的未分选的T细胞的结果。使用F1oJo软件v10来定量中值荧光强度值。

[0037] 图2显示了在经分选的对照和经RANTES处理的CD4⁺CCR5⁺T细胞中中值荧光强度直方图的位移。使用抗-磷-LCK抗体来定量响应于RANTES (0.1μM) 处理的LCK的磷酸化。结果是用于提取后续的中值荧光强度值的直方图的典型结果。

[0038] 图3显示，乐利单抗不诱导CREB、ERK、LCK、VASP或ZAP-70 (在本申请中称为ZAP-70或ZAP70) 的磷酸化。在固定和染色以定量蛋白质磷酸化之前，用乐利单抗(1μg/mL) 处理CD4⁺CCR5⁺-分选的T细胞15分钟。结果显示为相比于各自的未处理的对照而言的磷酸化倍数。使用单因素ANOVA分析来确定是否出现磷酸化的在统计学上显著的变化；未检测到显著变化。

[0039] 图4显示，乐利单抗不影响FSK-诱导的磷酸化。在固定和染色以定量蛋白质磷酸化之前，用乐利单抗(1μg/mL) 和/或弗司扣林(10μM) 处理CD4⁺CCR5⁺-分选的T细胞15分钟。结果显示为相对于各自的未处理的对照而言的磷酸化倍数。单因素ANOVA分析的结果表明，磷酸化的变化不是在统计学上显著的。

[0040] 图5显示乐利单抗不影响RANTES-诱导的磷酸化。在固定和染色以定量蛋白质磷酸化之前，用乐利单抗(1μg/mL) 和/或RANTES (0.1μM) 处理CD4⁺CCR5⁺-分选的T细胞15分钟。结果显示为相对于各自的未处理的对照而言的磷酸化倍数。使用单因素ANOVA分析来确定是否出现磷酸化的在统计学上显著的变化；未检测到显著变化。

[0041] 图6显示了在用SW480人结肠癌细胞进行接种并且然后在接种后第1天开始每周两次施用2mg乐利单抗或2mg非特异性对照抗体(IgG) 的雄性NCr nu/nu小鼠中的肿瘤体积。在接种后42天时，施用了乐利单抗的小鼠的肿瘤体积显著地低于用对照抗体进行处理的小鼠

的肿瘤体积。 $N=16$ 个肿瘤/组; $p=0.014$ 。

[0042] 图7显示了关于用SW480人结肠癌细胞进行接种并且然后在接种后第1天开始每周两次施用2mg乐利单抗或2mg非特异性对照抗体(IgG)的雄性NCr nu/nu小鼠的在研究过程中的小鼠重量。用乐利单抗进行处理的小鼠在研究中未丢失重量,而在接种后40天,接受了对照抗体的小鼠的重量显著地低于用乐利单抗进行处理的小鼠的重量。 $N=16$ 个肿瘤/组; $p=0.047$ 。

[0043] 图8显示了在用SW480人结肠癌细胞进行接种并且然后在接种后第21天开始每周两次施用2mg乐利单抗或2mg非特异性对照抗体(IgG)的雄性NCr nu/nu小鼠中的肿瘤体积。在接种后42天时,平均肿瘤体积在两个组之间没有差异。 $N=8$ 个肿瘤/组; $p=0.719$ 。

[0044] 图9显示了在用SW480人结肠癌细胞进行接种并且然后在接种后第1天开始每周两次施用0.2mg乐利单抗或0.2mg非特异性对照抗体(IgG)的雄性NCr nu/nu小鼠中的肿瘤体积。在接种后42天时,平均肿瘤体积在两个组之间没有差异。 $N=16$ 个肿瘤/组; $p=0.272$ 。

[0045] 图10显示了关于用SW480人结肠癌细胞进行接种并且然后在接种后第1天开始施用0.2mg乐利单抗或0.2mg非特异性对照抗体(IgG)的雄性NCr nu/nu小鼠的在研究过程中的小鼠重量。在接种后40天时,平均小鼠重量在两个组之间没有差异。 $N=16$ 个肿瘤/组; $p=0.708$ 。

[0046] 图11显示了在用SW480人结肠癌细胞进行接种并且然后在接种后第1天开始每周两次施用2mg乐利单抗或2mg非特异性对照抗体(IgG)的雄性NSG小鼠中的肿瘤体积。在接种后42天时,平均肿瘤体积在两个组之间没有显著差异。 $N=16$ 个肿瘤/组; $p=0.076$ 。

[0047] 图12显示了关于用SW480人结肠癌细胞进行接种并且然后在接种后第1天开始施用2mg乐利单抗或2mg非特异性对照抗体(IgG)的雄性NSG小鼠的在研究过程中的小鼠重量。在接种后40天时,平均小鼠重量在两个组之间没有显著差异。 $N=16$ 个肿瘤/组; $p=0.61$ 。

[0048] 图13A-13C描绘了表达CCR5的经FACS分选的SW480结肠癌的生长。图13A.在门控(FSC对SSC)以排除碎片后,76.70%的细胞被包括在门1中。图13B.来自门1的APC阳性细胞的直方图,在 10^1 - 10^2 APC之间的间隔门绘制出了暗淡的CCR5阳性细胞,而2.53-1.14APC的间隔门绘制出了明亮的CCR5阳性细胞。图13C.将经分选的细胞接种到未辐照的NSG小鼠的左侧(暗淡的,L0)和右侧(明亮的,HI)中(2.5×10^5 个细胞/位点)。因此,每只小鼠携带2个肿瘤并且充当其自己的对照。描绘了基础生长速率;未给予治疗。

[0049] 图14A和14B显示,乐利单抗在人源化的荷SW480瘤小鼠中延迟xGVHD发作。在第0天用正常的人BM(10^7 个经Ficoll-Hypaque纯化的单核细胞)接种以亚致死方式进行辐照的NSG小鼠。图14A显示了平均小鼠重量。图14B显示了%存活。处理组:IgG-5wk:IgG 2mg i.p. 2x/周,35天,然后停止(非荷瘤的);Ler-5wk:乐利单抗2mg ip 2x/周,35天,然后停止(非荷瘤的);IgG-tum:IgG 2mg ip 2x/周,连续地,在第35天用SW480(2.5×10^5 个细胞,s.c.)进行接种;Ler-tum:乐利单抗2mg ip 2x/周,连续地,在第35天用SW480进行接种; $n=8$ 只小鼠/组。

[0050] 图15显示了小鼠人源化对于乐利单抗抗肿瘤活性的效应。NSG小鼠要么进行人源化(正常的人BM, 10^7 个单核细胞),要么进行假注射,然后在第35天用SW480(2.5×10^5 个细胞,s.c.)进行接种。人源化小鼠接受IgG(h-IgG)或者乐利单抗(h-Ler)。非人源化小鼠接受IgG(IgG)或乐利单抗(Ler)。所有的组都接受2mg Ab i.p.,每周两次,第7天开始, $n=8$ 只小

鼠/组。

[0051] 图16显示了乐利单抗对于外周血B、T和NK细胞的效应。用正常的人BM单核细胞接种以亚致死方式进行辐照的NSG小鼠。处理组: IgG-5wk: IgG 2mg i.p. 2x/周, 35天, 然后停止 (非荷瘤的); Ler-5wk: 乐利单抗2mg ip 2x/周, 35天, 然后停止 (非荷瘤的); IgG-tum: IgG 2mg ip 2x/周, 连续地, 在第35天用SW480 (2.5×10^5 个细胞, s.c.) 进行接种; Ler-tum: 乐利单抗2mg ip 2x/周, 连续地, 在第35天用SW480进行接种; n=8只小鼠/组。在第62天分析外周血 (对hCD45+进行门控)。指出了显著的p值。

[0052] 图17显示了乐利单抗对于外周血Treg细胞的效应。用正常的人BM单核细胞接种以亚致死方式进行辐照的NSG小鼠。处理组: IgG-5wk: IgG 2mg i.p. 2x/周, 35天, 然后停止 (非荷瘤的); Ler-5wk: 乐利单抗2mg ip 2x/周, 35天, 然后停止 (非荷瘤的); IgG-tum: IgG 2mg ip 2x/周, 连续地, 在第35天用SW480 (2.5×10^5 个细胞, s.c.) 进行接种; Ler-tum: 乐利单抗2mg ip 2x/周, 连续地, 在第35天用SW480进行接种; n=8只小鼠/组。在第62天分析外周血 (对hCD45+进行门控)。CD4+CD25+细胞抑制GVHD, 而CD4+CD25-细胞促进它。指出了显著的p值。

[0053] 图18A-18C显示了乐利单抗对于体内luc-SW480结肠癌转移的效应。在人源化NSG小鼠的盲肠中同位接种SW480细胞。在第10天, 进行IVIS成像以证明在所述两个处理组中的相当的移入水平 (图18A)。小鼠接受连续抗体处理, 其中使用真皮内施用 (2x/周) 的2mg的IgG或乐利单抗。在第45天进行收获后, 将切除的肝脏和肺与荧光素底物一起离体进行温育。乐利单抗处理导致在肝脏中 (图18B) 中和在肺中 (图18C) 的降低的发光信号。

[0054] 图19A和19B显示了真皮血管生成测定法。为了让肿瘤生长大于2mm直径, 必须诱导新的宿主血管。将SW480肿瘤细胞 (2×10^6) 以在0.1ml PBS的体积中的悬浮液接种到人源化NSG小鼠的真皮中。小鼠用真皮内施用 (2x/周) 的2mg的IgG或乐利单抗进行处理。十天后, 对小鼠实施安乐死, 并且在 $12.5 \times$ 放大倍数下对接种位点进行拍照。使用VESGEN软件来分析血管数目、直径、分支、血管世代数和网络特征。通过VESGEN将血管分配至分支世代G1-G9。样本的VESGEN输出图像在此图解说明了对于动脉终点区域将血管分类为十个逐次更小的分支世代 (G1-G9)。血管分支世代通过下述方式来确定: (1) 血管直径的减小; 和 (2) 大致对称的血管分叉 (例如, 当从亲代血管分支出的子代血管的直径大致相等时)。

[0055] 图19A显示了显微照片和血管大小分析。图19B显示了关于总血管面积、血管长度密度、血管数目和肿瘤面积的定量数据。相比于经IgG处理的小鼠而言, 经乐利单抗处理的小鼠具有高于2倍的新血管形成减少, 这通过总像素计数、血管长度密度和血管总数目的降低来证明。最引人注目的是较小血管 (世代4-9) 的减少, 相比于较大血管 (世代1-3) 而言。

[0056] 发明详述

[0057] 本公开内容提供了用于治疗或预防癌症的方法, 其包括施用针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂。在一些实施方案中, 所述竞争性抑制剂包括乐利单抗或其结合片段。

[0058] 术语汇编

[0059] 在更详细地阐述本公开内容之前, 提供待在本文中使用的某些术语的定义可以有助于对于本公开内容的理解。除非另有定义, 否则本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属于领域的技术人员通常所理解的相同的含义。另外的定义在本公开内容各处进行阐述。

[0060] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应被理解为包括在所记述的范围内的任何整数和(当合适时)其分数(例如,一个整数的十分之一和百分之一)的值,除非另有说明。此外,涉及任何物理特征(例如剂量)的在本文中所记述的任何数字范围应被理解为包括在所记述的范围内的任何整数,除非另有说明。如在本文中所使用的,术语“大约”意指所示范围、值或结构的 $\pm 20\%$,除非另有说明。

[0061] 应当理解,如在本文中所使用的,术语“a”和“an”是指“一个(种)或多个(种)”所列举的组分。两者择一(例如,“或(者)”)的使用应当被理解为意指所述备选项中的一个、两者或其任何组合。

[0062] 如在本文中所使用的,术语“包括”、“具有”和“包含”是同义地进行使用的,所述术语及其变体意欲被解释为非限制性的。

[0063] 术语“基本上由...组成”将权利要求的范围限制至所指定的材料或步骤,或者不本质上地影响所要求保护的发明的基本特征的那些。例如,蛋白质结构域、区域或模块(例如,结合结构域、铰链区、连接体模块)或者蛋白质(其可以具有一个或多个结构域、区域或模块)基本上由特定的氨基酸序列组成,当结构域、区域或模块或者蛋白质的氨基酸序列包括这样的延伸、缺失、突变或其任何组合(例如,在氨基或羧基末端处或者在结构域之间的氨基酸)时,其相组合地对结构域、区域或模块或者蛋白质的长度的至多20%(例如,至多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)做出贡献并且不实质上影响(即,不将活性减少超过50%,例如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)所述结构域、区域、模块或者蛋白质的活性(例如,结合性蛋白质的靶标结合亲和力)。

[0064] 如在本文中所使用的,“趋化因子”意指推动白细胞移动的细胞因子。趋化因子可以以cys-cys或cys-X-cys为特征,取决于两个氨基末端半胱氨酸是直接相邻还是被一个氨基酸分隔开。它包括但不限于CCL5(也称为RANTES)、MIP-1 α 、MIP-1 β 或SDF-1等。趋化因子通过与细胞表面受体结合而发挥其效应。

[0065] 如在本文中所使用的,“趋化因子受体”意指结合趋化因子的七跨膜横跨性细胞表面蛋白质的同源家族的成员。

[0066] 如在本文中所使用的,“CCR5”是这样的趋化因子受体,其结合趋化因子的C-C组的成员,并且其氨基酸序列包含在Genbank登录号1705896中所提供的那种以及相关的多态性变体。

[0067] 如在本文中所使用的,“抗体”意指包含两条重链和两条轻链并且识别抗原的免疫球蛋白分子。所述免疫球蛋白分子可以源自任何通常已知的类别或同种型,包括但不限于IgA、分泌性IgA、IgG和IgM。IgG亚类也是本领域技术人员所众所周知的,并且包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。它例如包括天然出现的和非天然出现的抗体两者。特别地,“抗体”包括多克隆抗体和单克隆抗体,以及其单价和二价片段。此外,“抗体”包括嵌合抗体,完全合成的抗体、单链抗体及其片段。任选地,抗体可以用可检测标识物进行标记。可检测标识物包括例如放射性或荧光标识物。所述抗体可以是人或非人抗体。所述非人抗体可以通过重组方法来进行人源化,以降低其在人中的免疫原性。用于使抗体人源化的方法是本领域技术人员已知的。

[0068] 如在本文中所使用的,使用“单克隆抗体”(也被称呼为“mAb”)来描述其一级序列基本上同一并且展现出相同的抗原特异性的抗体分子。单克隆抗体可以通过杂交瘤技术、

重组技术、转基因技术或本领域技术人员已知的其他技术来产生。

[0069] 如在本文中所使用的,“重链”意指由一个可变结构域(VH)和三个或四个恒定结构域(CH1、CH2、CH3和CH4)组成的抗体分子的较大多肽,或者其片段。

[0070] 如在本文中所使用的,“轻链”意指由一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)组成的抗体分子的较小多肽,或者其片段。

[0071] 如在本文中所使用的,抗体的“结合片段”或“抗原结合片段或部分”是指完整抗体的片段或部分,其具有或保持与由完整抗体所识别的抗原靶分子相结合的能力,包括抗原结合片段(Fab)片段,F(ab')₂片段,Fab'片段,Fv片段,重组IgG(rIgG)片段,单链抗体片段,包括单链可变片段(scFv),和单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。该术语涵盖免疫球蛋白的经基因改造的或者经修饰的形式,例如胞内抗体,肽体(peptibody),嵌合抗体,完全人的抗体,人源化抗体,和异缀合物抗体,多特异性(例如,双特异性)抗体,双链抗体,三链抗体,四链抗体,串联的di-scFv,和串联的tri-scFv。

[0072] 如在本文中所使用的,“Fab”意指免疫球蛋白的单价抗原结合片段,其由一条轻链和重链的一部分组成。它可以通过短暂的木瓜蛋白酶消化或通过重组方法来获得。

[0073] 如在本文中所使用的,“F(ab')₂片段”意指免疫球蛋白的二价抗原结合片段,其由两条轻链和两条重链的一部分组成。它可以通过短暂的木瓜蛋白酶消化或通过重组方法来获得。

[0074] 如在本文中所使用的,“CDR”或“互补性决定区”意指在抗体的可变结构域中的高度可变的氨基酸序列。CDR和构架区的编号可以按照任何已知的方法或方案来确定,例如Kabat、Chothia、EU、IMGT和AHO编号方案(参见例如,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版;Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003;Honegger和Plückthun,J.Mol.Bio.309:657-670(2001))。可以使用抗原受体编号和受体分类(Antigen receptor Numbering And Receptor Classification;ANARCI)软件工具(2016,Bioinformatics 15:298-300)来对等价的残基位置进行注释并且比较不同的分子。因此,按照一个编号方案在本文中所提供的示例性可变结构域(VH或VL)序列的CDR的鉴定并不排除这样的抗体,其包含通过使用不同的编号方案而确定的相同可变结构域的CDR。

[0075] 如在本文中所使用的,“人源化(的)”描述了这样的抗体,其中在CDR区外面的氨基酸中的一些、大多数或所有被源自人免疫球蛋白分子的相应氨基酸替代。在抗体的人源化形式的一个实施方案中,在CDR区外面的氨基酸中的一些、大多数或所有已被来自人免疫球蛋白分子的氨基酸替代,但是在一个或多个CDR区内的一些、大多数或所有氨基酸未变化。氨基酸的小的添加、缺失、插入、置换或修饰是允许的,只要它们不会取消该抗体结合给定抗原的能力。合适的人免疫球蛋白分子将会包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgM分子。“人源化”抗体将会保持与原始抗体相似的抗原特异性,例如,在本公开内容中,结合CCR5的能力。

[0076] 本领域技术人员将会知道如何制备本发明的人源化抗体。各种出版物(其中几个通过提及而特此合并入本申请中)也描述了如何制备人源化抗体。例如,在美国专利号4,816,567中所描述的方法包括产生具有一种抗体的可变区和另一种抗体的恒定区的嵌合抗

体。美国专利号5,225,539描述了另一种用于产生人源化抗体的方法。该专利描述了使用重组DNA技术来产生人源化抗体,其中一种免疫球蛋白的可变区的CDR被来自具有不同特异性的免疫球蛋白的CDR替代,从而该人源化抗体将会识别所希望的靶标,但不会以显著的方式被人受试者的免疫系统识别。特别地,使用位点定向诱变来将CDR移植到构架上。

[0077] 其他用于使抗体人源化的方法描述在美国专利号5,585,089和5,693,761以及W0 90/07861中,其描述了用于产生人源化免疫球蛋白的方法。这些具有一个或多个CDR和可能的来自供者免疫球蛋白的额外的氨基酸和来自接纳性人免疫球蛋白的构架区。这些专利描述了用于增加抗体对于所希望的抗原的亲合力的方法。在框架中的一些氨基酸被选择为与在供者中(而不是在接纳者中)的那些位置处的氨基酸相同。特别地,这些专利描述了通过将小鼠单克隆抗体的CDR与人免疫球蛋白构架区和恒定区相组合来制备与受体相结合的人源化抗体。可以选择人构架区以最大化与小鼠序列的同源性。可以使用计算机模型来鉴定在构架区中的可能与CDR或特定抗原相互作用的氨基酸,然后可以在这些位置处使用小鼠氨基酸以创造人源化抗体。

[0078] 上面的美国专利号5,585,089和5,693,761以及W0 90/07861还提出了四个可以在设计人源化抗体中使用的可能标准。第一个建议是,对于接纳者,使用来自与待人源化的供者免疫球蛋白异乎寻常地同源的特别的人免疫球蛋白的构架,或者使用来自许多人抗体的共有构架。第二个建议是,如果在人免疫球蛋白的构架中的氨基酸是异乎寻常的并且在那个位置处的供者氨基酸对于人序列来说是典型的,那么可以选择供者氨基酸而不是接纳者氨基酸。第三个建议是,在与在人源化免疫球蛋白链中的3个CDR直接相邻的位置中,可以选择供者氨基酸而不是接纳者氨基酸。第四个建议是,在这样的构架位置处使用供者氨基酸残基,在所述构架位置处该氨基酸被预测在该抗体的三维模型中具有在CDR的3A内的侧链原子并且被预测能够与CDR相互作用。上面的方法仅仅举例说明了本领域技术人员可以采用来制备人源化抗体的方法中的一些。可以通过使用在Wu等人,J.Mol.Biol.,284:151(1999)以及美国专利号6,165,793、6,365,408和6,413,774中所描述的定向进化的方法来增加人源化抗体的结合的亲和力和/或特异性。

[0079] 可以将所述人源化抗体的可变区与人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区的至少一部分相连接。在一个实施方案中,所述人源化抗体包含轻链和重链恒定区两者。所述重链恒定区通常包括CH1区,铰链区,CH2区,CH3区,和有时,CH4区。在一个实施方案中,所述人源化抗体的恒定区是人IgG4同种型的。

[0080] 在本文中所公开的抗体或结合片段可以是经标记的或未标记的。未标记的抗体可以与其他经标记的与人源化抗体起反应的抗体(二抗)(例如,特异于人免疫球蛋白恒定区的抗体)相组合地进行使用。备选地,可以直接标记所述抗体。可以采用各种各样的标记物,例如放射性核素、荧光色素、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、配体(特别地,半抗原)等。对于检测表达CCR5的细胞或者检测在能够表达CCR5的细胞上的CCR5调节,许多类型的免疫测定法是可行的并且对于本领域技术人员来说是众所周知的。

[0081] 本公开内容还提供了这样的抗体或抗体片段-聚合物缀合物,其具有赋予相对于未衍生的抗体片段而言的血清半寿期增加、在循环中的平均滞留时间(MRT)增加和/或血清清除率降低的有效的大小或分子量。抗体片段-聚合物缀合物可以通过用惰性聚合物对所希望的抗体片段进行衍生化来制备。将会意识到的是,任何给该缀合物提供所希望的表现

大小或者具有所选择的实际分子量的惰性聚合物都适合于在构建本发明的抗体片段-聚合物缀合物中使用。

[0082] 许多惰性聚合物适合于在药制剂中使用。参见例如Davis等人, *Biomedical Polymers: Polymeric Materials and Pharmaceuticals for Biomedical Use*, 第441-451页 (1980)。对于在本文中所公开的抗体或抗体片段-聚合物缀合物, 使用非蛋白质聚合物。所述非蛋白质聚合物通常是亲水的合成聚合物, 例如未在自然界中发现的聚合物。但是, 在自然界中存在的和通过重组或体外方法产生的聚合物也是有用的, 如从天然来源分离的聚合物就是有用的。亲水的聚乙烯基聚合物落在本发明的范围之内, 例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。特别有用的是聚亚烷基醚例如聚乙二醇 (PEG); 聚氧化烯例如聚氧乙烯、聚氧丙烯以及聚氧乙烯和聚氧丙烯的嵌段共聚物 (普流罗尼克); 聚甲基丙烯酸酯; 卡波姆; 支化或非支化的多糖, 其包含糖单体D-甘露糖、D-和L-半乳糖、岩藻糖、果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、唾液酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸 (例如, 聚甘露糖醛酸或藻酸)、D-葡糖胺、D-半乳糖胺、D-葡萄糖和神经氨酸, 包括同多糖和杂多糖例如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、硫酸葡聚糖、葡聚糖、糊精、糖原或酸性粘多糖的多糖亚单位, 例如透明质酸; 糖醇的聚合物例如聚山梨糖醇和聚甘露糖醇, 肝素, 或乙酰肝素。所述聚合物在交联之前不需要但优选地是水溶性的, 但是最终的缀合物必须是水溶性的。优选地, 所述缀合物展现出至少大约0.01mg/ml, 和更优选地至少大约0.1mg/ml, 和更加优选地至少大约1mg/ml的水溶解度。在一个实施方案中, 所述聚合物不应当在缀合物形式下是高度免疫原性的, 也不应当具有与静脉内输注或注射不相容的粘度, 如果意欲通过此类途径来施用所述缀合物。

[0083] 在一个实施方案中, 所述聚合物仅包含单个具有反应性的基团。这有助于避免蛋白质分子的交联。但是, 在本发明的范围内的是: 使反应条件最大化以减少交联, 或者通过凝胶过滤或离子交换色谱法来纯化反应产物以回收实质上同质的衍生物。在另一些实施方案中, 所述聚合物包含两个或更多个反应性基团, 目的是将多个抗体片段连接至聚合物主链。

[0084] 可以使用凝胶过滤或离子交换色谱法来回收以实质上同质的形式的所希望的衍生物。

[0085] 所述聚合物的分子量可以变动直至大约500,000D, 和优选地为至少大约20,000D, 或至少大约30,000D, 或至少大约40,000D。所选择的分子量可以取决于待取得的缀合物的有效大小, 聚合物的性质 (例如, 结构例如线性的或支化的), 和衍生化程度, 即每个抗体片段的聚合物分子数目, 和在所述抗体片段上的聚合物附着位点。

[0086] 可以通过与聚合物和待连接的抗体片段的一个或多个氨基酸残基反应的多官能交联试剂来将所述聚合物与所述抗体片段共价连接。但是, 通过使经衍生的聚合物与抗体片段反应 (反之亦然) 来直接交联所述聚合物也在本发明的范围内。

[0087] 在抗体片段上的共价交联位点包括N-末端氨基基团和存在于赖氨酸残基上的 ϵ -氨基基团, 以及其他氨基、亚氨基、羧基、硫氢基、羟基或其他亲水基团。可以将所述聚合物与所述抗体片段直接共价键合, 而不使用多官能 (通常, 双官能) 交联试剂, 如在美国专利号6,458,355中所描述的。

[0088] 用此类聚合物的取代程度将会取决于在抗体片段上的反应位点的数目, 聚合物的

分子量、亲水性和其他特征,以及所选择的特定的抗体片段衍生化位点而变化。一般而言,所述缀合物包含1至大约10个聚合物分子,但是也考虑更大数目的与本发明的抗体片段相附着的聚合物分子。所希望的衍生化量通过使用实验矩阵而容易地实现,在所述实验矩阵中使时间、温度和其他反应条件变化以改变取代程度,之后通过大小排阻色谱法或本领域中已知的其他手段来测定所述缀合物的聚合物取代水平。

[0089] 用于修饰本发明的抗体片段的经官能化的PEG聚合物从Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.) 可得到。此类商购可得的PEG衍生物包括但不限于:氨基-PEG、PEG氨基酸酯、PEG-酰肼、PEG-硫醇、PEG-琥珀酸酯、羧甲基化PEG、PEG-丙酸、PEG氨基酸、PEG琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、PEG琥珀酰亚胺基丙酸酯、羧甲基化PEG的琥珀酰亚胺基酯、PEG的琥珀酰亚胺基碳酸酯、氨基酸PEG的琥珀酰亚胺基酯、PEG-氧代羰基咪唑、PEG-硝基苯基碳酸酯、PEG tresylate、PEG-缩水甘油醚、PEG-醛、PEG-乙烯砜、PEG-马来酰亚胺、PEG-邻吡啶基二硫化物、杂官能PEG、PEG乙烯基衍生物、PEG硅烷和PEG磷脂。关于偶联这些PEG衍生物的反应条件将会取决于蛋白质、所希望的PEG化程度和所采用的PEG衍生物而变化。在PEG衍生物的选择中所牵涉的一些因素包括:所希望的附着点(例如,赖氨酸或半胱氨酸R-基团),所述衍生物的水解稳定性和反应性,所述连接的稳定性、毒性和抗原性,对于分析的适合性,等等。关于使用任何特定衍生物的具体说明书从制造商可得到。其缀合物可以通过凝胶过滤或离子交换HPLC与未反应的起始材料分开。

[0090] 如在本文中所使用的,“抗趋化因子受体抗体”意指识别并且结合在趋化因子受体上的表位的抗体。如在本文中所使用的,“抗-CCR5抗体”意指识别并且结合在CCR5趋化因子受体上的表位的单克隆抗体。

[0091] 如在本文中所使用的,“表位”意指这样的分子的部分,其形成用于结合抗体或其他化合物的表面。所述表位可以包含邻接或不邻接的氨基酸、碳水化合物或者其他非肽基部分或寡聚体特异性表面。

[0092] 如在本文中所使用的,“多肽”意指通过肽键相连接的两个或更多个氨基酸。

[0093] “核酸分子”或“多核苷酸”可以以RNA或DNA的形式,其包括cDNA、基因组DNA和合成的DNA。核酸分子可以是双链的或单链的,并且如果是单链的,可以为编码链或非编码链(反义链)。编码分子可以具有与本领域中已知的编码序列相同的编码序列,或者可以具有不同的编码序列,其由于遗传密码的冗余性或简并性或者通过剪接而可以编码相同的多肽。

[0094] 抗体或结合片段的“类似物”包括由于保守氨基酸置换而不同于所述抗体或结合片段的分子。为了将氨基酸置换分类为保守的或非保守的,可以将氨基酸如下进行分组:第I组(疏水侧链):met、ala、val、leu、ile;第II组(中性亲水侧链):cys、ser、thr;第III组(酸性侧链):asp、glu;第IV组(碱性侧链):asn、gln、his、lys、arg;第V组(影响链方向的残基):gly、pro;和第VI组(芳香族侧链):trp、tyr、phe。保守置换牵涉在相同类别中的氨基酸之间的置换。非保守置换是将这些类别之一的成员交换成另一个类别的成员。

[0095] 由于遗传密码的简并性,各种各样的核酸序列编码在本文中所公开的蛋白质或多肽。例如,同源核酸分子可以包含与参考核苷酸序列至少大约90%同一的核苷酸序列。更优选地,所述核苷酸序列与参考核苷酸序列至少大约95%同一,至少大约97%同一,至少大约98%同一,或至少大约99%同一。同源性可以通过使用各种公众可得的本领域普通技术人员熟知的软件工具来计算。示例性的工具包括从美国国立卫生研究院的美国国家生物技术

信息中心(National Center for Biotechnology Information;NCBI)的网站可得的BLAST系统。

[0096] 一种鉴定高度同源的核苷酸序列的方法是通过核酸杂交。因此,同源的核酸分子在高严谨性条件下杂交。相关序列的鉴定也可以通过使用聚合酶链式反应(PCR)和适合于克隆相关核酸序列的其他扩增技术来实现。优选地,选择PCR引物以扩增目的核酸序列的部分,例如CDR。

[0097] 如在本文中所使用的,术语“高严谨性条件”是指本领域熟悉的参数。核酸杂交参数可以在编纂此类方法的参考文献中找到,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等人(编者),第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989),或者Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人(编者),John Wiley&Sons,Inc.,New York。高严谨性条件的一个例子是在65摄氏度下在杂交缓冲液($3.5\times\text{SSC}$, $0.02\%\text{Ficoll}$, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% 牛血清白蛋白, $2.5\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7), $0.5\%\text{SDS}$, 2mM EDTA)中的杂交。 SSC 是 0.15M 氯化钠/ 0.015M 柠檬酸钠,pH7;SDS是十二烷基硫酸钠;和EDTA是乙二胺四乙酸。在杂交后,洗涤在其上转移了核酸的膜,例如在 $2\times\text{SSC}$ 中在室温下,然后在 $0.1\text{--}0.5\times\text{SSC}/0.1\times\text{SDS}$ 下在直至68摄氏度的温度下。

[0098] 如在本文中所使用的,术语“载体”是指能够运送另一个核酸的核酸分子。载体可以例如质粒、粘粒、病毒或噬菌体。“表达载体”为这样的载体,其当存在于合适的环境中时能够指导由该载体所携带的一个或多个基因所编码的蛋白质的表达。

[0099] 核酸序列可以在将所述序列可操作地连接至表达控制序列(即放置以确保其功能发挥)后在宿主中进行表达。这些表达载体典型地在宿主生物中是可复制的,要么作为附加体,要么作为宿主染色体DNA的整合部分。通常,表达载体将会包含选择标记,例如四环素或新霉素,以使得能够检测用所希望的DNA序列转化的那些细胞。参见例如,美国专利号4,704,362,其通过提及而合并入本文。

[0100] 大肠杆菌(E.coli)是对于克隆本发明的DNA序列来说特别有用的一种原核宿主。适合于使用的其他微生物宿主包括杆菌,例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis),和其他肠杆菌科,例如沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)和各种假单胞菌属(Pseudomonas)物种。在这些原核宿主中,也可以制备表达载体,其将会典型地包含与所述宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)。另外,任何数目的各种各样的众所周知的启动子将会存在,例如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自 λ 噬菌体的启动子系统。所述启动子将会典型地控制表达,任选地与操纵基因序列一起,并且具有核糖体结合位点序列等,以用于起始和完成转录和翻译。

[0101] 其他微生物,例如酵母,也可以对于表达来说是有用的。糖酵母属(Saccharomyces)是优选的宿主,其具有合适的载体,所述载体具有表达控制序列,例如启动子,包括3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶,和复制起点、终止序列等,如所希望的。

[0102] 除了微生物外,哺乳动物组织细胞培养物也可以用于表达和产生本发明的多肽。参见Winnacker,From Genes to Clones,VCH Publishers,New York,N.Y.(1987)。真核细胞实际上是优选的,因为许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适的宿主细胞系已经在本领域中被开发出来,并且包括CHO细胞系,各种COS细胞系,HeLa细胞,优选地骨髓瘤细胞系等,和

经转化的B细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点,启动子,增强子(Queen等人,Immunol.Rev.,89:49-68(1986),其通过提及而合并入本文),和必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列为源自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、巨细胞病毒、牛乳头状瘤病毒等的启动子。

[0103] 可以通过众所周知的方法将包含目的DNA区段(例如,重链和轻链编码序列以及表达控制序列)的载体转移到宿主细胞中,所述方法取决于细胞宿主的类型而变化。例如,氯化钙转染常常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可以用于其他细胞宿主。一般参见Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press (1982),其通过提及而合并入本文。

[0104] 一旦经表达,就可以按照本领域的标准程序来纯化本发明的全抗体、其二聚体、单独的轻链和重链或其他免疫球蛋白形式或结合片段,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱法、凝胶电泳等。一般参见R.Scopes,Protein Purification,Springer-Verlag,New York (1982)。对于制药用途,具有至少大约90至95%均质性的实质上纯的免疫球蛋白是优选的,和具有98至99%或更高均质性的实质上纯的免疫球蛋白是最优选的。一旦经纯化(部分地或至所希望的均质性),就可以治疗性地(包括在体外地)或者在开发或施行测定法程序、免疫荧光染色等中使用所述多肽。一般参见Immunological Methods,第I和II卷,Lefkovits和Pernis(编者),Academic Press,New York,N.Y.(1979和1981)。

[0105] 如在本文中所使用的,“抑制”意指,相比于在没有组合物的情况下将会出现的量而言,在所述组合物存在下量减少了。

[0106] 如在本文中所使用的,术语“竞争性抑制剂”是指这样的分子,其与参考分子竞争与靶标的结合,并由此钝化、抑制、减缓、减小或阻断参考分子对于靶标的效应。例如,乐利单抗是CCL5与CCR5受体结合的竞争性抑制剂。

[0107] 如在本公开内容中所使用的,“激动剂活性”是指靶标被分子结合,其中所述结合激活所述靶标以产生应答。

[0108] 如在本文中所使用的,“CCL5激动剂活性”是指与通过CCL5的激活相一致的活性。

[0109] 如在本公开内容中所使用的,“拮抗剂活性”是指靶标被分子结合,其中所述结合不激活所述靶标以产生应答并且所述结合阻断一种或多种激动剂分子的作用。

[0110] 如在本文中所使用的,“受试者”意指能够具有癌症的任何动物或经人工修饰的动物。经人工修饰的动物包括但不限于具有人免疫系统的SCID小鼠。所述动物包括但不限于,小鼠、大鼠、狗、豚鼠、雪貂、兔子和灵长类。在一个优选的实施方案中,所述受试者为人。

[0111] 如在本文中所使用的,“治疗”意指抑制、减慢、终止或逆转给定疾病或病症的进展。在一个优选的实施方案中,“治疗”意指逆转所述疾病或病症的进展。在一些实施方案中,治疗包括逆转所述疾病或病症的进展至消除所述疾病或病症的点。

[0112] 如在本文中所使用的,“预防”是指防止疾病或病症出现;延迟疾病或病症的发作或进展;或者减轻疾病或病症的病理学或症状学。例如,预防癌症包括防止肿瘤的发展,减慢肿瘤的生长,和延迟肿瘤的发展。

[0113] 如在本文中所使用的,“施用”可以通过使用本领域技术人员已知的任何方法来施行或进行。所述方法可以包括静脉内、肌内或皮下手段。

[0114] 如在本文中所使用的,“有效剂量”意指处于对于治疗受试者或防止受试者发展出癌症来说足够的数量的量。本领域普通技术人员可以进行简单的滴定实验来确定需要什么量来治疗受试者。

[0115] CCR5拮抗剂

[0116] 在一个方面,本公开内容涉及靶向CCR5受体并且充当对于CCR5细胞受体的竞争性抑制剂而不提供CCR5激动剂活性的CCR5拮抗剂的用途。

[0117] 在一个实施方案中,本公开内容提供了乐利单抗抗体或其结合片段在治疗或预防癌症中的用途。乐利单抗(在本文中也称为PRO 140)是在美国专利号7,122,185和8,821,877(其通过提及而以其整体合并入本文)中所描述的人源化单克隆抗体。乐利单抗是鼠类mAb PA14(其是针对CD4⁺CCR5⁺细胞而产生的)的人源化形式。Olson等人,Differential Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion,gp 120 Binding and CC-Chemokine Activity of Monoclonal Antibodies to CCR5,J.Virol.,73:4145-4155(1999)。乐利单抗与在细胞表面上表达的CCR5相结合,并且以在体外和在HIV-1感染的hu-PBL-SCID小鼠模型中不影响CCR5趋化因子受体活性的浓度强有力地抑制HIV-1进入和复制。Olson等人,Differential Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion,gp 120 Binding and CC-Chemokine Activity of Monoclonal Antibodies to CCR5,J.Virol.,73:4145-4155.(1999);Trkola等人,Potent,Broad-Spectrum Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by the CCR5 Monoclonal Antibody PRO 140,J.Virol.,75:579-588(2001)。

[0118] 编码人源化的乐利单抗抗体的重链和轻链的核酸已被保藏于ATCC。特别地,根据布达佩斯条约并且满足布达佩斯条约的要求,将分别命名为pVK-HuPRO140、pVg4-HuPRO140 (mut B+D+I)和pVg4-HuPRO140 HG2的质粒分别以ATCC登录号PTA 4097、PTA 4099和PTA 4098于2002年2月22日保藏于ATCC,Manassas,Va.,U.S.A.20108。命名为pVK-HuPRO140和pVg4-HuPRO140 HG2的质粒分别编码乐利单抗的轻链和重链。

[0119] 乐利单抗的HCDR1-3和LCDR1-3氨基酸序列分别列在SEQ ID NO:12-14和9-11中。乐利单抗的VH和VL序列分别列在SEQ ID NO:3的氨基酸20-141和SEQ ID NO:1的氨基酸20-131中。乐利单抗的重链和轻链序列分别列在SEQ ID NO:7和8中。

[0120] 在一个实施方案中,在本文中所公开的方法包括施用命名为乐利单抗的人源化抗体或者与乐利单抗竞争与CCR5受体的结合的抗体,其中所述乐利单抗包含:(i)两条轻链,每条轻链包含命名为pVK:HuPRO140-VK的质粒(ATCC保藏号PTA-4097)的表达产物;和(ii)两条重链,每条重链包含命名为pVg4:HuPRO140 HG2-VH的质粒(ATCC保藏号PTA-4098)或命名为pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH的质粒(ATCC保藏号PTA-4099)的表达产物。在一个进一步的实施方案中,所述乐利单抗为这样的人源化或人抗体,其结合与抗体乐利单抗所与之结合的表位相同的表位。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体为命名为乐利单抗的人源化抗体。

[0121] 在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:1至少70%同一,与SEQ ID NO:1至少75%同一,与SEQ ID NO:1至少80%同一,与SEQ ID NO:1至少85%同一,与SEQ ID NO:1至少90%同一,或与SEQ ID NO:1至少95%同一的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,本公

开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:170%-100%同一,与SEQ ID NO:1 75%-100%同一,与SEQ ID NO:180%-100%同一,与SEQ ID NO:1 85%-100%同一,与SEQ ID NO:1 90%-100%同一,与SEQ ID NO:1 91%-100%同一,或与SEQ ID NO:1 95%-100%同一的轻链可变抗体区域。

[0122] 在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131至少70%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131至少75%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131至少80%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131至少85%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131至少90%同一,或与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131至少95%同一的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131 70%-100%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131 75%-100%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131 80%-100%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131 85%-100%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131 90%-100%同一,与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131 91%-100%同一,或与SEQ ID NO:1的氨基酸20-131 95%-100%同一的轻链可变抗体区域。

[0123] 在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:3至少70%同一,与SEQ ID NO:3至少75%同一,与SEQ ID NO:3至少80%同一,与SEQ ID NO:3至少85%同一,与SEQ ID NO:3至少90%同一,或与SEQ ID NO:3至少95%同一的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:3 70%-100%同一,与SEQ ID NO:3 75%-100%同一,与SEQ ID NO:3 80%-100%同一,与SEQ ID NO:3 85%-100%同一,与SEQ ID NO:3 90%-100%同一,与SEQ ID NO:3 91%-100%同一,或与SEQ ID NO:3 95%-100%同一的重链抗体可变区。

[0124] 在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141至少70%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141至少75%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141至少80%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141至少85%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141至少90%同一,或与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141至少95%同一的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141 70%-100%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141 75%-100%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141 80%-100%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141 85%-100%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141 90%-100%同一,与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141 91%-100%同一,或与SEQ ID NO:3的氨基酸20-141 95%-100%同一的重链抗体可变区。

[0125] 在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体的用途,所述抗-CCR5抗体具有与SEQ ID NO:5至少70%同一,与SEQ ID NO:5至少75%同一,与SEQ ID NO:5至少80%同一,与SEQ ID NO:5至少85%同一,与SEQ ID NO:5至少90%同一,或与SEQ ID NO:5至少95%同一的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体的用途,所述抗-CCR5抗体具有与SEQ ID NO:5 70%-100%同一,与SEQ ID NO:5 75%-100%同一,

与SEQ ID NO:5 80%-100%同一,与SEQ ID NO:5 85%-100%同一,与SEQ ID NO:5 90%-100%同一,与SEQ ID NO:5 91%-100%同一,或与SEQ ID NO:5 95%-100%同一的重链可变抗体区域。

[0126] 在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体的用途,所述抗-CCR5抗体具有与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141至少70%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141至少75%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141至少80%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141至少85%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141至少90%同一,或与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141至少95%同一的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体的用途,所述抗-CCR5抗体具有与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141 70%-100%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141 75%-100%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141 80%-100%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141 85%-100%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141 90%-100%同一,与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141 91%-100%同一,或与SEQ ID NO:5的氨基酸20-141 95%-100%同一的重链可变抗体区域。

[0127] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,其中所述VH包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链CDR1(VH-CDR1)、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链CDR2(VH-CDR2)和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链CDR3(VH-CDR3);并且所述VL包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1(VL-CDR1)、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链CDR2(VL-CDR2)和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR3(VL-CDR3)。在一些这样的实施方案中,所述VH包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列或SEQ ID NO:3的氨基酸20-141具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸20-131具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,条件是所述VH-CDR(SEQ ID NO:12-14)和VL-CDR(SEQ ID NO:9-11)的氨基酸序列未变化;或者所述VH包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列或SEQ ID NO:5的氨基酸20-141具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且所述VL包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸20-131具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,条件是所述VH-CDR(SEQ ID NO:12-14)和VL-CDR(SEQ ID NO:9-11)的氨基酸序列未变化。

[0128] 在一些实施方案中,本公开内容提供了抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗-CCR5抗体或其抗原结合片段包含:(a)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或SEQ ID NO:3的氨基酸20-141的VH,和包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸20-131的VL;或者(b)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或SEQ ID NO:5的氨基酸20-141的VH,和包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸20-131的VL。

[0129] 在一个进一步的实施方案中,本公开内容涉及命名为CCR5mAb004的人抗体或其结合片段的用途。CCR5mAb004是通过使用Abgenix Xeno **Mouse**®技术而生成的完全人的mAb,其特异性地识别CCR5并且与CCR5相结合。参见Roschke等人,Characterization of a Panel of Novel Human Monoclonal Antibodies That Specifically Antagonize CCR5

and Block HIV Entry, 44th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C., 2004年10月30日-11月2日 (2004); HGS Press Release, Human Genome Sciences Characterizes Panel of Novel Human Monoclonal Antibodies That Specifically Antagonize the CCR5 Receptor and Block HIV-1 Entry, 2004年11月2日 (2004); HGS Press Release, Human Genome Sciences Begins Dosing of Patients in a Phase I Clinical Trial of CCR5 mAb in Patients Infected With HIV-1, 2005年3月30日 (2005)。

[0130] 在一个实施方案中,本公开内容涉及由命名为PA14的杂交瘤细胞系(ATCC登录号HB-12610)产生的单克隆抗体PA14、其结合片段或者在与CCR5受体结合中与单克隆抗体PA-14竞争的抗体在治疗或预防癌症中的用途。

[0131] 在本文中所描述的方法的一个实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的轻链。在另一个实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的重链。在一个进一步的实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的Fab部分。在一个更进一步的实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的F(ab')₂部分。在一个另外的实施方案中,所述抗体或其结合片段包含抗所述体的Fd部分。在另一个实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的Fv部分。在一个进一步的实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的可变结构域。在一个更进一步的实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的一个或多个CDR结构域。在另外一个实施方案中,所述抗体或其结合片段包含所述抗体的六个CDR结构域。

[0132] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含Fc区部分的抗-CCR5抗体的用途。如在本文中所使用的,“Fc区部分”是指来自抗体的Fc片段(“可结晶片段”区域或Fc区)的重链恒定区区段,其可以包括一个或多个恒定结构域,例如CH₂、CH₃、CH₄或其任何组合。在一些实施方案中,Fc区部分包括IgG、IgA或IgD抗体的CH₂和CH₃结构域或其任何组合,或者IgM或IgE抗体的CH₃和CH₄结构域,以及其任何组合。在一些实施方案中,CH₂CH₃或CH₃CH₄结构具有来自相同抗体同种型的亚区结构域,并且是人的,例如人的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM(例如,来自人IgG1的CH₂CH₃)。作为背景,Fc区负责抗体的效应子功能,例如ADCC(依赖抗体的细胞介导的细胞毒性)、CDC(依赖补体的细胞毒性)和补体固定,与Fc受体(例如,CD16、CD32、FcRn)的结合,相对于缺乏Fc区的多肽而言更长的体内半寿期,A蛋白结合,和可能甚至胎盘转移(参见Capon等人,Nature 337:525,1989)。在一些实施方案中,在本公开内容的抗体或抗原结合片段中的Fc区部分能够介导这些效应子功能中的一种或多种。在一些实施方案中,在本公开内容的抗体或抗原结合片段中的Fc区部分具有正常的效应子功能,这意味着具有相比于野生型IgG1抗体而言小于20%、15%、10%、5%、1%的在效应子功能(例如,ADCC、CDC、半寿期或其任何组合)方面的差异。

[0133] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含Fc区部分的抗-CCR5抗体的用途,所述Fc区部分具有在这些效应子功能中的一种或多种方面的增加,通过例如本领域中已知的在所述Fc区部分中的一个或多个氨基酸置换或缺失。具有有着增加的效应子功能的突变型或变体Fc区部分的抗体或抗原结合片段意味着,所述抗体相比于具有野生型Fc区部分的抗体而言在FcR结合、ADCC、CDC或其任何组合方面展现出至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的增加。在一些实施

方案中,所述突变型或变体Fc区部分展现出增加的与FcRn、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16a)、Fc γ RIIIB (CD16b) 或其任何组合的结合。在一些实施方案中,在本公开内容的抗体或抗原结合片段中的Fc区部分为具有增加的ADCC、CDC、半寿期或其任何组合的变体Fc区部分。

[0134] 用于修饰(例如,改进、降低或除去)Fc功能性的氨基酸修饰(例如,置换)包括例如T250Q/M428L、M252Y/S254T/T256E、H433K/N434F、M428L/N434S、E233P/L234V/L235A/G236+A327G/A330S/P331S、E333A、S239D/A330L/I332E、P257I/Q311、K326W/E333S、S239D/I332E/G236A、N297Q、K322A、S228P、L235E+E318A/K320A/K322A、L234A/L235A和L234A/L235A/P329G突变,所述突变在由InvivoGen (2011) 发表的并且在www.invivogen.com/PDF/review/review-Engineered-Fc-Regions-invivogen.pdf?utm_source=review&utm_medium=pdf&utm_campaign=review&utm_content=Engineered-Fc-Regions处在线可得的“Engineered Fc Regions”中进行了总结和注释,并且通过提及而合并入本文。

[0135] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含Fc区部分的抗-CCR5抗体的用途,所述Fc区部分具有在这些效应子功能中的一种或多种方面的减小,通过例如本领域中已知的在Fc区部分中的一个或多个氨基酸置换或缺失。具有有着减小的效应子功能的突变型或变体Fc区部分的抗体或抗原结合片段意味着,所述抗体相比于具有野生型Fc区部分的抗体而言在FcR结合、ADCC、CDC或其任何组合方面展现出至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的降低。在一些实施方案中,所述突变型或变体Fc区部分展现出降低的与FcRn、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16a)、Fc γ RIIIB (CD16b) 或其任何组合的结合。在一些实施方案中,在本公开内容的抗体或抗原结合片段中的Fc区部分为具有减小的ADCC、CDC、半寿期或其任何组合的变体Fc区部分。在一些实施方案中,所述Fc区部分为包含相应于按照在Kabat中所阐述的EU进行编号的氨基酸E233P、L234V、L234A、L235A、L235E、 Δ G236、G237A、E318A、K320A、K322A、A327G、P329G、A330S、P331S或其任何组合的突变的变体IgG1 Fc区部分。例如,引入到IgG1 Fc区部分中的氨基酸置换L234A、L235E、G237A减小与Fc γ RI、Fc γ RIIa和Fc γ RIII受体的结合,并且引入到IgG1 Fc区部分中的A330S和P331S减小C1q-介导的补体固定。

[0136] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含Fc区部分的抗-CCR5抗体的用途,所述Fc区部分具有在这些效应子功能中的一种或多种方面的增加,通过例如本领域中已知的在所述Fc区部分中的一个或多个氨基酸置换或缺失。具有有着增加的效应子功能的突变型或变体Fc区部分的抗体或抗原结合片段意味着,所述抗体相比于具有野生型Fc区部分的抗体而言在FcR结合、ADCC、CDC或其任何组合方面展现出至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的增加。在一些实施方案中,所述突变型或变体Fc区部分展现出增加的与FcRn、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16a)、Fc γ RIIIB (CD16b) 或其任何组合的结合。在一些实施方案中,在本公开内容的抗体或抗原结合片段中的Fc区部分为具有增加的ADCC、CDC、半寿期或其任何组合的变体Fc区部分。

[0137] 在一些实施方案中,本公开内容提供了经糖基化的抗-CCR5抗体的用途。IgG亚型抗体在Fc区部分的CH2结构域中的氨基酸N297处包含保守的糖基化位点。在一些这样的实施方案中,在本公开内容的抗体或抗原结合片段中的Fc区部分包含按照在Kabat中所阐述

的EU进行编号的N297。在一些实施方案中,本公开内容提供了包含改变在Fc区部分中的N297处的糖基化的突变的抗-CCR5抗体,任选地其中改变糖基化的突变包括N297A、N297Q或N297G。在一些实施方案中,包含N297A、N297Q或N297G突变的抗体或其抗原结合片段展现出减小的与一种或多种低亲和力Fc γ R的Fc相互作用、减小的CDC、减小的ADCC或其任何组合。

[0138] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含重链(HC)和轻链(LC)的抗-CCR5抗体的用途,其中所述HC包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,并且所述LC包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0139] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含HC和LC的抗-CCR5抗体的用途,其中所述HC包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的氨基酸序列,并且所述LC包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0140] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含Fc区或其片段(包括CH2(或其片段),CH3(或其片段),或者CH2和CH3)的抗-CCR5抗体的用途,其中CH2、CH3或两者都可以是任何同种型的,并且可以分别相比于相应的野生型CH2或CH3而言包含氨基酸置换或其他修饰。在某些实施方案中,本公开内容的Fc区包含两个CH2-CH3多肽,其相缔合从而形成二聚体。

[0141] 如在本文中所使用的,除非另有规定,否则在例如人IgG1重链的恒定区中的氨基酸残基的位置通过假设人IgG1的可变区由128个氨基酸残基组成来进行编号(按照Kabat编号协定)。然后,将人IgG1重链的经编号的恒定区用作用于对在其他免疫球蛋白重链的恒定区中的氨基酸残基进行编号的参考。在除了人IgG1重链以外的其他免疫球蛋白重链的恒定区中的目的氨基酸残基的位置为在目的氨基酸残基所与之比对的人IgG1重链中的氨基酸残基的位置。可以通过使用本领域中已知的软件程序,例如Megalign程序(DNASTAR Inc.),使用Clustal W方法(具有默认参数),来进行人IgG1重链与其他免疫球蛋白重链的恒定区之间的比对。按照在本文中所描述的编号系统,例如,虽然人IgG2 CH2区相比于其他CH2区而言可以在接近其氨基末端处具有氨基酸缺失,但是位于在人IgG2 CH2中的296处的“N”的位置仍然被认为是位置297,因为该残基与在人IgG1 CH2中的位置297处的“N”进行比对。

[0142] 另外,本公开内容提供了包含典型地位于Fab和Fc区之间的铰链序列(但是该铰链的下面节段可以包括Fc区的氨基末端部分)的抗-CCR5抗体的用途。作为背景,免疫球蛋白铰链充当柔韧的间隔子以允许Fab部分在空间中自由移动。与恒定区相反,铰链在结构上是多样的,其中在免疫球蛋白类别之间和甚至在亚类之间在序列和长度方面都有变化。例如,人IgG1铰链区是自由地柔韧的,这允许Fab片段围绕其对称轴旋转并且在以两个重链间二硫桥中的第一个为中心的球体内移动。通过比较,人IgG2铰链是相对短的,并且包含通过四个重链间二硫桥进行稳定化的刚性的聚脯氨酸双螺旋,这限制了柔韧性。人IgG3铰链因其独特的经延伸的铰链区(长度为IgG1铰链的大约四倍)而不同于其他亚类,所述经延伸的铰链区包含62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸),形成不柔韧的聚脯氨酸双螺旋,并且提供更大的柔韧性,因为Fab片段相对远离Fc片段。人IgG4铰链比IgG1短,但是具有与IgG2相同的长度,并且其柔韧性介于IgG1和IgG2之间。免疫球蛋白结构和功能在例如Harlow等人(编者),Antibodies:A Laboratory Manual,第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,1988)中进行了综述。

[0143] 在一些实施方案中,本公开内容提供了嵌合的、人源化的或人的抗-CCR5抗体或其抗原结合片段的用途。非人(例如,鼠类)抗体的嵌合或人源化形式可以是完整的(全长的)嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其抗原结合片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他结合靶标的亚结构域),其可以包含源自非人免疫球蛋白的序列。一般而言,在人源化抗体或其抗原结合片段中,在CDR区外面(例如,构架(FR)区)的氨基酸中的大多数或所有被源自人免疫球蛋白分子的相应氨基酸替代。在抗体的人源化形式的一个实施方案中,在CDR区外面的氨基酸中的一些、大多数或所有已被来自人免疫球蛋白分子的氨基酸替代,但是在一个或多个CDR区内的一些、大多数或所有氨基酸未变化。氨基酸的小的添加、缺失、插入、置换或修饰是允许的,只要它们不会取消该抗体结合给定抗原的能力。人源化抗体也可以包含人免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。用于在使非人抗体人源化中使用的合适的人免疫球蛋白分子将会包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgM分子。“人源化”抗体将会保持与原始抗体相似的抗原特异性,例如,在本公开内容中,结合CCR5的能力。

[0144] 使用方法

[0145] 在一个方面,本公开内容提供了治疗、抑制或预防结肠癌转移的方法,其包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂。

[0146] 在一个实施方案中,本公开内容提供了治疗、抑制或预防结肠癌转移的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用抗-CCR5细胞受体结合试剂,其包括:(a) 乐利单抗抗体或其结合片段;(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;(d) 宿主细胞,其包含(i) 乐利单抗抗体或其结合片段,(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或(iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者(e) 不具有CCL5激动剂活性的抗-CCR5细胞受体结合试剂。

[0147] 在一个实施方案中,所述施用导致减少的结肠癌向肺或肝脏中至少一个的转移。在一个实施方案中,向肺的转移减少超过50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,80%至90%,或者超过85%。在一个实施方案中,向肝脏的转移减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。

[0148] 在一个实施方案中,所述施用减少肿瘤相关的血管生成。在一个实施方案中,供养肿瘤的血管的总血管面积减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,或者超过60%。在一个实施方案中,供养肿瘤的血管的血管长度密度减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。在一个实施方案中,供养肿瘤的血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,或者超过70%。在一个实施方案中,较大血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,或者超过50%。在一个实施方案中,较小血管的数目减少超过40%,40%至50%,50%至60%,60%至70%,70%至80%,或者超过70%。

[0149] 在前述实施方案的任一个之中,施用可能导致在所述受试者的外周血中增加的CD4+CD25+细胞水平或降低的CD4+CD25-细胞水平之一。在前述实施方案中的任一个之中,所述抗-CCR5细胞受体结合试剂可能不改变CD4+细胞中的酪氨酸激酶磷酸化。

[0150] 在一个进一步的方面,本公开内容提供了治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用本身不具有CCL5激动剂活性的针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂。在一个特别的实施方案中,提供了用于预防癌症的方法。

[0151] 在一个实施方案中,本公开内容提供了预防癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用本身不具有CCL5激动剂活性的针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂,其中所述竞争性抑制剂与所述CCR5细胞受体的ECL-2环相结合。在一个进一步的实施方案中,所述竞争性抑制剂与CCL5竞争与所述CCR5细胞受体的结合。在一个进一步的实施方案中,所述竞争性抑制剂包括单克隆抗体PA14、乐利单抗或CCR5mAb004,或者其结合片段。在一个进一步的实施方案中,所述竞争性抑制剂与单克隆抗体PA14、乐利单抗或CCR5mAb004或者其结合片段竞争结合。

[0152] 在一个实施方案中,本公开内容提供了预防癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用:(a) 乐利单抗抗体或其结合片段;(b) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸;(c) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体;或者(d) 宿主细胞,其包含(i) 乐利单抗抗体或其结合片段,(ii) 编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸,或(iii) 包含编码乐利单抗抗体或其结合片段的核酸的载体。在前述实施方案中,所述乐利单抗抗体或其片段可以包含例如乐利单抗单克隆抗体或scFv。

[0153] 在一个实施方案中,本公开内容提供了预防癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用乐利单抗抗体或其结合片段。

[0154] 在前述实施方案中的任一个之中,所述癌症可以为例如乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤、胃癌、卵巢癌、肺(非小细胞)癌、胰腺癌、肉瘤或血液细胞癌。在一个特别的实施方案中,所述癌症为乳腺癌。在一个特别的实施方案中,所述癌症为前列腺癌。在另一个特别的实施方案中,所述癌症为结肠癌。

[0155] 在前述实施方案中的任一个之中,预防所述癌症可以包括减慢所述癌症的生长,防止肿瘤的形成,或者限制或减小肿瘤的生长或大小。

[0156] 在一个实施方案中,与在药学上可接受的承载体一起施用所述针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂,例如乐利单抗。在药学上可接受的承载体是本领域技术人员熟知的。此类在药学上可接受的承载体可以包括但不限于水性或非水性溶液、悬浮液和乳状液。非水性溶剂的例子为丙二醇,聚乙二醇,植物油例如橄榄油,和可注射有机酯例如油酸乙酯。水性承载体包括水,含醇/水性溶液、乳状液或悬浮液,盐水,和经缓冲的介质。肠胃外载料包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖溶液、葡萄糖和氯化钠、乳酸盐林格氏液或固定油。静脉内载料包括液体和营养补充剂,电解质补充剂例如基于林格氏葡萄糖溶液的那些,等等。也可以存在防腐剂和/或其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合试剂、惰性气体等。

[0157] 本发明的组合物的剂量将会取决于受试者和所使用的特定施用途径而变化。剂量可以从0.1至100,000 μ g/kg变动。基于所述组合物,所述剂量可以连续地(例如通过连续泵)或者以定期间隔(例如在一个或多个分开的时机)来进行递送。特定组合物的多个剂量的所希望的时间间隔可以由本领域技术人员来决定,而无需过度的实验。

[0158] 在本发明方法的一个实施方案中,向所述受试者多次施用所述抗体或其结合片段,并且每次施用向所述受试者递送0.01mg/kg体重至50mg/kg体重的所述抗体或其结合片段。在另一个实施方案中,每次施用向所述受试者递送0.05mg/kg体重至25mg/kg体重的所述抗体或其结合片段。在一个进一步的实施方案中,每次施用向所述受试者递送0.1mg/kg体重至10mg/kg体重的所述抗体或其结合片段。在一个更进一步的实施方案中,每次施用向所述受试者递送0.5mg/kg体重至5mg/kg体重的所述抗体或其结合片段。在另一个实施方案

中,每次施用向所述受试者递送1mg/kg体重至3mg/kg体重的所述抗体或其结合片段。在另一个实施方案中,每次施用向所述受试者递送大约2mg/kg体重的所述抗体或其结合片段。在一个优选的实施方案中,每次施用递送175mg、350mg、525mg、700mg、875mg、1050mg、1225mg、1400mg、1575mg、1750mg、1925mg或2100mg剂量之一。在一个优选的实施方案中,所述剂量可以作为皮下注射进行施用或自我施用。在另一个优选的实施方案中,所述剂量可以以175mg/mL的浓度进行配制。

[0159] 在一个实施方案中,多次施用所述抗体或其结合片段,并且第一次施用以少于一周的间隔与随后的施用分开。在另一个实施方案中,第一次施用以至少一周的间隔与随后的施用分开。在一个进一步的实施方案中,第一次施用以一周的间隔与随后的施用分开。在另一个实施方案中,第一次施用以两至四周的间隔与随后的施用分开。在另一个实施方案中,第一次施用以两周的间隔与随后的施用分开。在一个进一步的实施方案中,第一次施用以四周的间隔与随后的施用分开。在另外一个实施方案中,多次施用所述抗体或其结合片段,并且第一次施用以至少一个月的间隔与随后的施用分开。

[0160] 在一个进一步的实施方案中,经由静脉内输注向所述受试者施用所述抗体或其结合片段。在另一个实施方案中,经由皮下注射向所述受试者施用所述抗体或其结合片段。在另一个实施方案中,经由肌内注射向所述受试者施用所述抗体或其结合片段。

[0161] 在一个实施方案中,前述方法可以进一步包括向所述受试者施用细胞疗法,例如自体或同种异体免疫疗法;小分子;化学治疗试剂;或者CCR5/CCL5信号传导的抑制剂。在一个实施方案中,施用CCR5/CCL5信号传导的抑制剂,并且所述CCR5/CCL5信号传导的抑制剂包括马拉韦罗、维立韦罗、阿拉韦罗、SCH-C、TAK-779、PA14抗体、2D7抗体、RoAb13抗体、RoAb14抗体或45523抗体。

[0162] 在一个实施方案中,单独地或者与一种或多种其他治疗性分子或处理相组合地施用所述针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂,所述其他治疗性分子或处理例如为细胞疗法,例如自体或同种异体免疫疗法;小分子;化学治疗剂;或者CCR5/CCL5信号传导的抑制剂,例如马拉韦罗、维立韦罗、阿拉韦罗、SCH-C、TAK-779、PA14抗体、2D7抗体、RoAb13抗体、RoAb14抗体或45523抗体。在一个实施方案中,在本文中所公开的方法包括与马拉韦罗、维立韦罗、阿拉韦罗、SCH-C、TAK-779、PA14抗体、2D7抗体、RoAb13抗体、RoAb14抗体或45523抗体相组合地施用乐利单抗。

[0163] 在一个实施方案中,与一种或多种化学治疗剂相组合地施用所述针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂(例如,乐利单抗),所述化学治疗剂例如为:烷基化试剂,例如塞替派和环磷酰胺;烷基磺酸酯类,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,例如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);氮杂环丙烷类和甲基三聚氰胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺、三羟甲蜜胺;氮芥类,例如苯丁酸氮芥、蔡氮芥、环磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧化氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺和尿嘧啶氮芥;亚硝基脲类,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,例如阿克拉霉素、放线菌素、authramycin、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、加利车霉素、carabycin、caminomycin、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、马塞罗霉素、丝裂霉素、

麦考酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脉菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁和佐柔比星；抗代谢药，例如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，例如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤和三甲曲沙；嘌呤类似物，例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷和5-FU；雄激素类，例如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷和睾内酯；抗肾上腺药，例如氨鲁米特、米托坦和曲洛司坦；叶酸补充剂，例如亚叶酸；醋葡萄糖内酯；醛磷酸胺糖苷；5-氨基酮戊酸；安吡啶；bestrabucil；比生群；依达曲沙；地磷酰胺；秋水仙胺；地吡醌；elformithine；依利醋铵；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖；氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌；莫派达醇；尼曲吡啶；喷司他丁；蛋氨酸芥(phenamet)；吡柔比星；鬼臼酸；2-乙基酰肼；丙卡巴肼；PSKTM；雷佐生；西佐喃；锗螺胺；细交链孢菌酮酸；三亚胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；乌拉坦；长春地辛；达卡巴嗪；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；gacytosine；阿拉伯糖苷(“Ara-C”)；环磷酰胺；塞替派；紫杉烷类，例如紫杉醇(TaxolTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西他赛(TaxotereTM, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-硫代鸟嘌呤；巯基嘌呤；氨甲蝶呤；铂类似物，例如顺铂和卡铂；长春碱；铂；依托泊苷(VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺安托；替尼泊苷；道诺霉素；氨基蝶呤；希罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；维甲酸；埃斯波霉素；和卡培他滨；以及上述中任一个的在药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0164] 如在本文中所使用的，“小分子”CCR5受体拮抗剂包括例如与CCR5受体相结合并且抑制该受体的活性的小有机分子。在一个实施方案中，所述小分子具有低于1,500道尔顿的分子量。在另一个实施方案中，所述小分子具有低于600道尔顿的分子量。

[0165] 在一个实施方案中，与一种或多种小分子相组合施用所述针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂(例如，乐利单抗)，所述小分子例如为：SCH-C(Strizki等人,PNAS,98:12718-12723(2001))；SCH-D(SCH 417670；维立韦罗)；UK-427,857(马拉韦罗)；1-[(4,6-二甲基-5-嘧啶基)羰基]-4-[4-[2-甲氧基-1(R)-4-(三氟甲基)苯基]乙基-3(S)-甲基-1-哌嗪基-4-甲基哌啶)；GW873140；TAK-652；TAK-779；AMD070；AD101；1,3,4-三取代的吡咯烷(Kim等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,15:2129-2134(2005))；经修饰的4-哌啶基-2-苯基-1-(苯磺酰氨基)-丁烷(Shah等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,15:977-982(2005))；Anibamine TFA、蛇孢菌素C或19,20-环氧细胞松弛素Q(Jayasuriya等人,J.Nat.Prod.,67:1036-1038(2004))；5-(哌啶-1-基)-3-苯基-戊基砒(Shankaran等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,14:3589-3593(2004))；4-(杂芳基哌啶-1-基-甲基)-吡咯烷-1-基-乙酸拮抗剂(Shankaran等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,14:3419-3424(2004))；包含4-(吡唑基)哌啶侧链的试剂(Shu等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,14:947-52(2004))；Shen等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,14:935-939(2004)；Shen等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,14:941-945(2004))；3-(吡咯烷-1-基)丙酸类似物(Lynch等人,Org.Lett.,5:2473-2475(2003))；[2-(R)-[N-甲基-N-(1-(R)-3-(S)-((4-(3-苄基-1-乙基-(1H)-吡唑-5-基)哌啶-1-基)甲基)-4-(S)-(3-氟苯基)环戊-1-基)氨基]-3-甲基丁酸(MRK-1)](Kumar等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,304:1161-1171(2003))；携带经4-氨基杂环取代的哌啶侧链的1,3,4-三取代的吡咯烷(Willoughby等人，

Bioorg.Med.Chem.Lett.,13:427-431 (2003);Lynch等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,12:3001-3004 (2003);Lynch等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,13:119-123 (2003);Hale等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,12:2997-3000 (2002));二环异噻唑烷(Lynch等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,12:677-679 (2002));CCR5拮抗剂的组合合成(Willoughby等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,11:3137-41 (2001));包含杂环的化合物(Kim等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,11:3103-3106 (2001));包含乙内酰脲的拮抗剂(Kim等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,11:3099-3102 (2001));1,3,4-三取代的吡咯烷(Hale等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,11:2741-2745 (2001));1-[N-(甲基)-N-(苯磺酰基)氨基]-2-(苯基)-4-(4-(N-(烷基)-N-(苄氧基羰基)氨基)哌啶-1-基)丁烷(Finke等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,11:2475-2479 (2001));来自植物Lippia alva的化合物(Hedge等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,12:5339-5342 (2004));基于哌嗪的CCR5拮抗剂(Tagat等人,J.Med.Chem.,47:2405-2408 (2004));基于脒基哌啶子基哌啶的CCR5拮抗剂(Palani等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,13:709-712 (2003));SCH 351125的旋转异构体(Palani等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,13:705-708 (2003));基于哌嗪的对称的杂芳基甲酰胺(McCombie等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,13:567-571 (2003));脒基哌啶子基哌啶酰胺(Palani等人,J.Med.Chem.,45:3143-3160 (2002));Sch-351125和Sch-350634(Este,Curr.Opin.Investig.Drugs.,3:379-383 (2002));1-[(2,4-二甲基-3-吡啶)羰基]-4-甲基-4-[3(S)-甲基-4-[1(S)-[4-(三氟甲基)苯基]乙基]-1-哌嗪基]-哌啶N1-氧化物(Sch-350634)(Tagat等人,J.Med.Chem.,44:3343-3346 (2001));4-[(Z)-(4-溴苯基)-(乙氧基亚胺基)甲基]-1'-[(2,4-二甲基-3-吡啶)羰基]-4'-甲基-1,4'-二哌啶N-氧化物(SCH 351125)(Palani等人,J.Med.Chem.,44:3339-3342 (2001));2(S)-甲基哌嗪(Tagat等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,11:2143-2146 (2001));哌啶-4-甲酰胺衍生物(Imamura等人,Bioorg.Med.Chem.,13:397-416,2005);包含亚砷部分的1-苯并氮杂^草衍生物(Seto等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,13:363-386 (2005));包含吡啶N-氧化物部分的N-酰基苯胺衍生物(Seto等人,Chem.Pharm.Bull.(Tokyo),52:818-829 (2004));1-苯并噻平1,1-二氧化物和包含叔胺部分的1-苯并氮杂^草衍生物(Seto等人,Chem.Pharm.Bull.(Tokyo),52:577-590 (2004));N-[3-(4-苄基哌啶-1-基)丙基]-N,N'-二苯基脒(Imamura等人,Bioorg.Med.Chem.,12:2295-2306 (2004));5-氧代吡咯烷-3-甲酰胺衍生物(Imamura等人,Chem.Pharm.Bull.(Tokyo),52:63-73 (2004));具有季铵部分的N-酰基苯胺衍生物(Shiraishi等人,J.Med.Chem.,43:2049-2063 (2000));AK602/ON04128/GW873140(Nakata等人,J.Virol.,79:2087-2096 (2005));螺二酮哌嗪衍生物(Maeda等人,J.Biol.Chem.,276:35194-35200 (2001);Maeda等人,J.Virol.,78:8654-8662 (2004));和选择性CCR5拮抗剂(Thoma等人,J.Med.Chem.,47:1939-1955 (2004))。

[0166] 在一个实施方案中,与SCH-C、SCH-D(SCH 417670或维立韦罗)、UK-427,857(马拉韦罗)、GW873140、TAK-652、TAK-779、AMD070或AD101中的一种或多种相组合地施用所述针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂(例如,乐利单抗)。参见美国专利号8,821,877。

[0167] 在一个实施方案中,当与一种或多种其他治疗性分子或处理(例如,细胞疗法、小分子、化学治疗剂或者CCR5/CCL5信号传导的抑制剂)相组合地进行施用时,所述针对CCR5细胞受体的竞争性抑制剂(例如,乐利单抗)展现出协同效应。两种或更多种试剂之间的“协

同作用”是指所述试剂的联合效应,其大于它们的累加效应。试剂之间的协同、累加或拮抗效应可以通过使用组合指数(Combination Index;CI)方法的剂量-反应曲线的分析来进行定量。大于1的CI值表明了拮抗作用;等于1的CI值表明了累加效应;并且小于1的CI值表明了协同效应。在一个实施方案中,协同相互作用的CI值小于0.9。在另一个实施方案中,所述CI值小于0.8。在另一个实施方案中,所述CI小于0.7。

实施例

[0168] 实施例1

[0169] 在CD4⁺T细胞中乐利单抗对于激酶激活和磷酸化的效应

[0170] CCR5是一种G蛋白偶联趋化因子受体(GPCR),其响应于趋化因子RANTES、MIP-1 α 和MIP-1 β 而介导细胞的激活和运输。CCR5在CD4⁺T辅助-1、T细胞、单核细胞衍生的巨噬细胞和外周血树突细胞中表达。Bleul等人,The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes,PNAS 94(5):1925-1930(1997);Loetscher等人,CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes,Nature,391(6665):344-345(1998);Lee等人,Quantification of CD4,CCR5,and CXCR4 levels on lymphocyte subsets,dendritic cells,and differentially conditioned monocyte-derived macrophages,PNAS 96(9):5215-5220(1999)。趋化因子与GPCR结合改变细胞内cAMP水平,磷脂酶和PI3K激活,以及酪氨酸激酶活性。Rodriguez-Frade等人,Similarities and Differences in RANTES-and(AOP)-RANTES-triggered Signals:Implications for Chemotaxis,The Journal of Cell Biology,144(4):755-765(1999);Ward等人,Chemokines and T lymphocytes:More than an attraction,Immunity,9(1):1-11(1998)。MIP-1 α 、MIP-1 β 和RANTES(CCL5)与CCR5的结合以相似的亲和力和下游效应出现。Ward等人,Chemokines and T lymphocytes:More than an attraction,Immunity,9(1):1-11(1998)。

[0171] 一种此类效应是STAT转录因子的激活。Mellado等人,Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways,The EMBO Journal,20(10):2497-2507(2001)。趋化因子与CCR5结合刺激酪氨酸激酶(TK)活性,并且促进STAT1和STAT3活性,其被牵涉于在T细胞中原癌基因c-fos的表达之中。

[0172] 先前已显示,当单独地添加至CD4⁺T细胞时单克隆抗体乐利单抗不影响cAMP水平,但是当与CCL5一起进行施用减少CCL5对于cAMP水平的效应。W02016/210130。类似地,虽然单独的乐利单抗不影响CHO-K1细胞的趋化性,但是当与CCL5一起进行施用乐利单抗降低CCL5-诱导的趋化性。W02016/210130。这些研究表明,乐利单抗不具有对于CCR5的激动剂活性,但是充当与CCL5的竞争性抑制剂以与CCR5相结合。因为CCR5牵涉各种生物化学途径,所以评价乐利单抗对于这些途径的可能调控是重要的。

[0173] 为了进一步检查乐利单抗对于已知在CCR5接合的下游被激活的备选信号传导途径具有拮抗剂还是激动剂活性,评价了乐利单抗对于特定酪氨酸激酶激活的效应。

[0174] (a) 细胞系:收集来自3名健康供者的血液并且进行离心以允许外周血单核细胞(PBMC)的分开和分离。用1 μ g/mL的白细胞凝集素PHA-L刺激PBMC(2E6个细胞/孔,在24-孔平板中)。在刺激后并且每隔一天,通过使用30U/mL IL-2来使PHA系扩增24小时,直至关于CD4

$^{+}$ CCR5 $^{+}$ T细胞的FACS(在第7-10天)。FACS分选通过使用抗人CD4-percp-Cy5.5克隆RPA-T4(小鼠IgG1 κ)和抗人CCR5-PE克隆NP-6G4(小鼠IgG1 κ)来进行,各自以25 μ g/mL,其中工作浓度为0.125 μ g/mL。将经FACS分选的CD4 $^{+}$ CCR5 $^{+}$ T细胞在具有或没有抗-CD3和抗-CD28激动性抗体的IL-2条件培养基(30U/mL)中培养过夜。

[0175] (b) 方法:就响应于乐利单抗(1 μ g/mL)的酪氨酸激酶(CREB、ERK、LCK、VASP、ZAP-70)激活来对所述细胞系进行检定。另外,还测试了乐利单抗对于弗司扣林(“FSK”;10 μ M)和RANTES(0.1 μ M)的效应。将细胞在37 $^{\circ}$ C下温育15分钟,然后通过添加16 μ L的16%PFA来进行固定,并且在RT下再温育20分钟。然后,将细胞在具有2%牛血清白蛋白和0.1%Triton-X 100的磷酸盐缓冲盐水中进行封闭/透化。如下通过使用针对经磷酸化的激酶的加有荧光标签的抗体来对细胞进行染色:CREB—Alexa Fluor 488标签,BD Cat#558435;ERK1/2—Alexa Fluor 488标签,BD Cat#612592;LCK—PE标签,BD Cat#558552;VASP—FITC标签,Enzo Cat#ALX-804-240F-C100;和ZAP-70—Alexa Fluor 488标签,BD Cat#558518。通过使用BD FACScalibur流式细胞仪来测量在FL-1或FL-2通道中的荧光强度。使用中值荧光强度方面的群体位移来定量细胞群体中的磷酸化。

[0176] 在初始的实验中,将未分选的T细胞暴露于25nM佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA),以测试TK磷酸化是否可以通过使用已建立的基于流的方法在这些细胞中进行评估。通过比较在未处理的经抗体染色的细胞(未处理的)和未染色的细胞(CTL未染色的)之间的中值荧光强度来观察基线磷酸化水平。

[0177] (c) 结果:使用PMA的初步实验确证,酪氨酸激酶活性可以通过使用流式细胞术在T细胞中进行定量。PMA处理增加了CREB和ERK的磷酸化,但未增加VASP或ZAP-70的磷酸化(图1)。经分选的CD4 $^{+}$ CCR5 $^{+}$ T细胞在中值荧光强度直方图中也展现出位移(图2,其显示了RANTES对于LCK磷酸化的效应)。

[0178] 乐利单抗不改变所测试的激酶的蛋白质磷酸化,并且不改变由腺苷酸环化酶激动剂弗司扣林或CCR5激动剂RANTES所诱导的磷酸化的变化。乐利单抗处理不产生CREB、ERK、LCK、VASP或ZAP-70的在统计学上显著的磷酸化(图3)。弗司扣林处理增加了CREB的磷酸化;用乐利单抗进行预处理未在统计学上改变该应答(图4)。同样地,RANTES处理增加了磷-CREB,但是该应答未通过乐利单抗预处理而在统计学上被改变(图5)。与先前的发现(乐利单抗不改变cAMP形成或降解)相一致,本研究表明乐利单抗也不显著地改变CREB、ERK、LCK、VASP或ZAP-70的激活,并且乐利单抗不改变弗司扣林或RANTES对于这些激酶的激活。因此,虽然乐利单抗钝化CCR5信号传导以及CCR5在经CD4 $^{+}$ CCR5 $^{+}$ 富集的T细胞中降低cAMP浓度的能力,但是它对于在此所测试的TK的活性没有明显效应。另外,乐利单抗不改变由弗司扣林(一种刺激cAMP合成的激动剂)所诱导的基础TK激活或应答。

[0179] (d) 结论:本研究的结果暗示,乐利单抗对于在CD4 $^{+}$ 细胞系中的激酶激活没有直接效应,并且也没有明显的抑制通过RANTES(一种CCR5激动剂)或弗司扣林的此类激酶的磷酸化的能力。

[0180] 实施例2

[0181] 乐利单抗在免疫受损的小鼠模型中预防癌症

[0182] 在免疫受损的小鼠中生长的SW480人结肠癌的小鼠异种移植物模型之中评估了乐利单抗这种人源化单克隆抗体的抗肿瘤活性。虽然乐利单抗不影响CCL5在体外调节T细胞

中的酪氨酸激酶活性的能力(实施例1),但是乐利单抗在缺乏T细胞的小鼠中展现出免疫调节效应,而在缺乏T细胞、NK细胞和B细胞的小鼠中不是这样。

[0183] (a) 方法:将SW480人结肠癌细胞(ATCC)在培养基(DMEM,10%FBS,抗生素,抗真菌剂)中进行扩增,并且皮下接种(2百万/位点,s.c.)到雄性NCr nu/nu小鼠(Taconic)和雄性NOD-scid-IL2Rg(NSG)小鼠(Jackson)的胁腹中。NCr nu/nu小鼠和NSG小鼠都缺乏T细胞,这防止小鼠的免疫系统排斥所移植的人结肠细胞。但是,NSG小鼠还缺乏NK细胞和B细胞。将小鼠随机化以每周两次(星期一、星期四)以腹膜内方式接受对照IgG或乐利单抗。每周3次(星期一、星期三、星期五)用测径规测量肿瘤直径,并且通过使用关于扁长球形体的公式来计算肿瘤体积。每周(星期三)测定小鼠的体重。

[0184] 乐利单抗剂量通过使用来自下述来源的“关于各种物种的代表性表面积与重量之比(km)(Representative Surface Area to Weight Ratios(km)for Various Species)”来进行计算:Freireich等人,Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man, Cancer Chemother Rep., 50:219-44(1966);和the National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program <http://dtp.nci.nih.gov>。开始于乐利单抗的人剂量=5.8mg/kg x 12(人至小鼠转换因子)=69.6mg/kg小鼠剂量;平均小鼠=0.025kg,因此剂量为69.6mg/kg x 0.025kg=1.74mg(小鼠单剂量)。将这四舍五入至2.0mg并且命名为“高剂量”。也测试了“低剂量”(0.2mg)。使用源自人血清的IgG(>95%SDS-PAGE, Sigma, I4506)作为非特异性对照抗体。

[0185] 该研究以四个部分来进行,其中使用不同的小鼠株系、药物剂量和药物规划方案,如在表1中所显示的。

[0186] 表1.用于在免疫受损的小鼠中生长的SW480人结肠癌的小鼠异种移植物模型之中评估乐利单抗这种人源化单克隆抗体的抗肿瘤活性的实验计划

	小鼠株系	n	乐利单抗剂量	按剂量给药规划方案
[0187]	第1部分 无胸腺裸鼠(NCr nu/nu)	16	高剂量(2.0 mg)	i.p., 每周两次, 第1天开始
	第2部分 无胸腺裸鼠(NCr nu/nu)	8	高剂量(2.0 mg)	i.p., 每周两次, 第21天开始
	第3部分 无胸腺裸鼠(NCr nu/nu)	16	低剂量(0.2 mg)	i.p., 每周两次, 第1天开始
	第4部分 NSG小鼠	16	高剂量(2.0 mg)	i.p., 每周两次, 第1天开始

[0188] (b) 结果:在用结肠癌细胞接种小鼠后不久开始以高剂量施用乐利单抗导致在该研究结束时显著减小的肿瘤体积,而在接种后三周开始施用乐利单抗则与在肿瘤体积方面没有显著差异相关联。

[0189] 施用乐利单抗(第1部分,2mg,i.p.,每周两次)导致到第42天SW480肿瘤体积减小62.8%($p=0.014$)(图6)。接受乐利单抗的小鼠在该研究的过程中展现出正常的体重增长,而接受非特异性IgG的小鼠在该研究的后半段期间体重减轻($p=0.047$)(图7)。

[0190] 在第21天开始用乐利单抗(第2部分,2mg,i.p.,每周两次)治疗更大的已建立的肿瘤(体积:对照- 68.5 ± 47.25 ;乐利单抗- $47.25 \pm 34.89\text{mm}^3$)未导致肿瘤生长的显著抑制($p=0.719$)(图8)。

[0191] 以减小的剂量施用乐利单抗(第3部分,0.2mg,i.p.,每周两次)诱导了到第42天SW480肿瘤体积减小18.3%,但是未达到统计学显著性($p=0.272$) (图9)。在该研究的后半段中的肿瘤进展期间,所述两个组都展现出相似的体重减轻程度($p=0.708$) (图10)。

[0192] 从裸鼠(缺乏T细胞)转换为更免疫抑制的宿主(NSG小鼠,缺乏T、B和NK细胞)导致乐利单抗抗肿瘤效力的丧失。相比于对照而言在乐利单抗组中存在32%的肿瘤体积减小,但是这未达到统计学显著性($p=0.076$) (图11)。在所述两个处理组中都存在相似的体重减轻程度($p=0.61$) (图12)。

[0193] 结论:该研究的结果暗示,在暴露于结肠癌细胞后不久施用乐利单抗倾向于减慢或抑制肿瘤生长。但是,该效应取决于剂量,在暴露于结肠癌细胞和施用乐利单抗之间的时间,和小鼠模型是缺乏T细胞还是缺乏T细胞、NK细胞和B细胞。

[0194] 实施例3

[0195] 乐利单抗在结肠癌的人源化小鼠模型中减慢xGVHD的发展并且增强抗肿瘤活性

[0196] 在人源化小鼠中生长的SW480人结肠癌的小鼠异种移植物模型之中评估了乐利单抗这种人源化单克隆抗体的抗肿瘤活性。

[0197] (a) 人源化小鼠:在使用时,通常称为NOD scid IL-2受体 γ 敲除(NSG,Jackson Laboratory,储存号005557)的雄性NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ为6-8周龄。小鼠接受经由X-射线源的225cGy全身辐射(Precision X-Rad 320,North Branford,CT)。在X-射线辐射后二十四小时,将人BM细胞移入小鼠。通过由Cleveland Clinic骨髓移植计划所使用的反冲洗式过滤组合件来获得去除了身份的人供者细胞。将新鲜的(非冷冻的)白细胞通过Ficoll-Hypaque梯度离心进行纯化,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中进行洗涤,并且就生存力进行评估(ViCell,Beckman Coulter,Brea,CA)。将人BM单核白细胞注射到侧尾静脉中(10^6 个细胞/小鼠)。

[0198] (b) 方法:

[0199] 异位接种:在第35天,当存在人白细胞移入的清楚证据时,用 2.5×10^5 个已经通过使用Lipofectamine而稳定地转染了萤光素酶-pcDNA3(Addgene质粒#18964;<http://n2t.net/addgene:18964>;RRID:Addgene_18964)的SW480人结肠癌细胞(ATCC,Manassas,VA)在肋腹中接种小鼠。每周两次就GvHD的临床症状(身体姿势、活动、毛皮和皮肤状况、体重减轻)监测小鼠。使用收集在K-EDTA试管中的隐静脉静脉穿刺(50 μ L),就移入每周监测外周血。在第81天,超过一半的小鼠展现出 $>10\%$ 体重减轻,GvHD的临床症状,并且被认为已达到实验终点。

[0200] 同位接种:在氯胺酮-赛拉嗪麻醉下,在用聚维酮碘擦洗和70%乙醇擦拭(x3)进行皮肤准备后,通过10mm切口将盲肠暴露。使用31号针将在10 μ L的体积中的 10^5 个SW480-luc细胞接种到盲肠的浆膜下层中。将盲肠送回腹膜腔,以两层缝合来闭合肌肉和皮肤,并且让小鼠恢复。

[0201] 安乐死:通过受控梯度CO₂吸入(Quietek,NextAdvance,Averill Park,NY)以及随后的颈部脱位来使小鼠经历安乐死,并且收获肿瘤和器官。

[0202] 生物发光成像:为了评价转移,通过使用IVIS光谱体内成像系统(PerkinElmer,Waltham MA)来对小鼠进行分析。萤光素剂量为3mg,i.p.,用于体内成像;和150 μ g/mL,用于切除的肺和肝脏的体外成像。

[0203] 乐利单抗处理:将小鼠按体重随机分为对照组和处理组(每组8只动物)。每周两次以2.0mg/小鼠以腹腔内方式(i.p.)施用乐利单抗。计算出2.0mg剂量以接近在关于急性GVHD的2期人临床试验中所使用的剂量。在HIV阳性患者中该剂量的单次施用已显示出将HIV载量降低超过十倍。对照小鼠接受以相同剂量比较的正常人IgG(Sigma Aldrich, St.Louis,MO)。

[0204] (c) 结果:

[0205] CCR5表达与加速的肿瘤生长相关联-表征了在人源化人结肠异种移植小鼠模型中乐利单抗的抗肿瘤和免疫调节效应。为了证明CCR5是在该异种移植模型中结肠癌进展的功能上相关的标志物,按照CCR5表达的强度对SW480人结肠癌细胞进行FACS分选(图13A)。使用包含最前和最后20%表达者的汇集物来接种(未辐照的)NSG小鼠(图13B)。从最强地表达CCR5的细胞(Hi)起始的肿瘤生成比具有最低CCR5表达的细胞(Lo)更快地生长的肿瘤, $n=4$, $p=0.019$ (图13C)。因此,在药物治疗不存在下,表达高数目的CCR5的肿瘤细胞展示出体内生长优势。

[0206] 乐利单抗减慢xGVHD的发展-检查了在人源化NSG小鼠的情景下SW480肿瘤的行为。用225cGy全身辐射来对NSG小鼠进行调适,随后在24小时后用正常人BM单核细胞进行接种。在3周内,接受IgG的小鼠开始展现出以体重减轻、身体姿势、活动、毛皮和皮肤状况为特征的异种移植抗宿主病(xGVHD)的征候(图14A和14B)。在非荷瘤小鼠中,在第5周终止乐利单抗和IgG处理,以测定由Ab所赋予的抗-GVHD活性的持续时间和持久性。在处理停止后,在IgG和乐利单抗组中全身症状都恶化。在所述两个经乐利单抗处理的组中,xGVHD的征候都延迟直至第7周。相比于非荷瘤动物而言,在所述两个荷瘤组中体重减轻都加速了。相比于IgG而言,乐利单抗在荷瘤和非荷瘤小鼠中都展示出xGVHD的发作, $p=0.001$ 。

[0207] 乐利单抗在人源化小鼠中增强抗肿瘤活性-然后评估了人源化对于抗肿瘤活性的效应。在人源化NSG小鼠中,乐利单抗相比于IgG处理而言有效地延迟了肿瘤进展,并且该效应持续至第80天(图15), $p=0.004$ 。在非人源化NSG小鼠中,乐利单抗处理对于肿瘤生长的效应与IgG处理没有不同($p=0.782$),这表明人效应细胞在介导抗-SW480活性中的重要性。与IgG处理相组合的人源化赋予了初始的抗肿瘤效应,其到第60天才最终消失。

[0208] 实施例4

[0209] 乐利单抗在结肠癌的人源化小鼠模型中降低肺和肝脏转移性损伤生长速率

[0210] 在人源化小鼠中生长的SW480人结肠癌的小鼠异种移植模型之中评估了乐利单抗这种人源化单克隆抗体的抗转移活性

[0211] (a) 方法:如上面所描述的,用SW480结肠癌细胞同位接种人源化小鼠。在将经萤光素酶标记的结肠癌细胞同位接种到盲肠的浆膜下层中后十天,使小鼠经历生物发光成像以验证相等的开始肿瘤体积。在第45天,由于大于15mm直径的在腹部测量中可触知的肿瘤和在所述两个处理组中正在恶化的小鼠的一般状况而终止了该研究。将肝脏和肺切除并且放置在包含萤光素底物的介质中。

[0212] (b) 结果:在由植入到经IgG处理和经乐利单抗处理的小鼠中的肿瘤所发射的早期发光信号(光子/秒,p/s)之间没有显著差异($p=0.074$)(图18A)。肝脏转移负荷在经乐利单抗处理的小鼠中下降59%,但是未达到相当的显著性($p=0.067$)(图18B)。相比于经IgG处理的动物而言,肺转移负荷在经乐利单抗处理的小鼠中下降87%($p=0.012$)(图18C)。因

此,相比于原发性皮下肿瘤的生长抑制而言,肿瘤抑制的程度在转移性损伤中是更明显的。

[0213] 实施例5

[0214] 乐利单抗增强某些免疫细胞的表达

[0215] 使用流式细胞术来鉴定在介导乐利单抗的抗肿瘤效应中所牵涉的免疫细胞的类型。

[0216] (a) 方法:通过流式细胞术来分析外周血(PB)样品。用氯化铵裂解红细胞,将细胞用PBS洗涤两次并且在具有下列抗体的PBS/0.5mM EDTA/0.5%BSA中在4℃下染色15分钟:抗-人-CD3-FITC(克隆UCHT1,IM1281U)、抗-人-CD45-PC7(克隆J.33,IM3548U)、抗-小鼠-CD45.1-FITC(克隆A20)(eBioscience)(Thermo Fisher)和抗-人-CD56-PE(克隆5.1H11)(BioLegend)。对于人CD45、小鼠CD45和人CD3,结果表示为总事件的百分比。对于人CD56,结果表示为总事件的百分比。关于免疫抑制性细胞的分析,按照制造商的说明书(BioLegend, San Diego,CA)使用True-Nuclear Human Treg Flow试剂盒(FoxP3 AlexaFluor 488/CD4 PE-Cy5/CD25 PE)。在Cytomics FC500流式分析仪(Beckman/Coulter)上分析样品。

[0217] (b) 结果:就免疫细胞组成的变化来分析来自人源化小鼠的外周血。在非荷瘤小鼠中,乐利单抗诱导循环NK细胞的28.9%增加($p=0.017$) (图16,左图版)。在荷瘤小鼠中,乐利单抗处理导致降低的循环B细胞(40.1%, $p=0.037$)和NK细胞(49.8%, $p=0.006$),和增加的T细胞(9.0%, $p=0.002$) (图16,左和右图版)。在乐利单抗施用后的该细胞重新分布并非继发于通过人白细胞的增强的肿瘤侵袭。SW480肿瘤的免疫组织化学是异常柔和的,其中关于B细胞、T细胞、NK细胞以及巨噬细胞(CD206和CD163)的染色不存在(数据未显示)。

[0218] 在荷瘤和非荷瘤动物的外周血中,乐利单抗都诱导免疫抑制性人CD4+CD25+细胞(分别为1.47倍增加, $p=0.016$;2.22倍增加, $p=0.0038$) (图17)。乐利单抗还引起促进GVHD的循环人CD4+CD25-细胞的1.84倍减少($p=0.033$)。没有检测到FoxP3+细胞。

[0219] 实施例6

[0220] 乐利单抗抑制肿瘤相关的血管生成

[0221] 在人源化小鼠中生长的SW480人结肠癌的小鼠异种移植物模型之中评估了乐利单抗对于肿瘤相关的血管生成的效应。

[0222] (a) 方法:使用解剖显微镜在12.5x放大倍数下对于在人源化NSG小鼠中真皮接种10天的SW480结肠癌肿瘤的外周处生长的血管进行拍照。将每个接触肿瘤结节的周缘的可见血管计为单个血管。进行两次测量以评估肿瘤面积(与皮肤共面的最大直径,和与第一直径垂直的第二直径)。将这两次测量的乘积用作肿瘤面积的指数。使用具有12.5物镜的手术显微镜(World Precision Instruments,PSMT5,Sarasota,FL)来捕获图像。每个实验组包含八只小鼠。使肿瘤照片经历使用VESGEN软件的数字分析,其中代表肿瘤块的目的区域限定了肿瘤的周界。输出是一系列的彩色世代图谱(在黑色背景上的有色的血管),其中最大直径血管被定义为G1,每个随后的更小世代表示为G2-G9。血管数目基于总血管面积、血管长度密度和血管直径来进行表示。

[0223] (b) 结果:直接供养入接种在胁腹真皮中的第10天SW480结肠癌肿瘤中的血管的定量分析揭示了相比于经IgG处理的宿主而言在来自经乐利单抗处理的人源化小鼠的肿瘤中的血管数目的显著减少(图19A),这与乐利单抗引起对于在肿瘤床中新血管生成的抑制效应相一致。VESGEN软件的使用允许在处理组之间的详细比较,并且揭示了供养肿瘤的血管

网络的多个关键特性的显著减小,包括总血管面积(像素)的62%减小($p=0.013$)、血管长度密度的53%减小($p=0.0011$)、大血管(例如,世代1-3(G1-G3))的数目的61%减少($p=0.0082$)和小血管(例如,世代4-9(G4-G9))的数目的80%减少($p=0.017$) (图19B)。因此,在用乐利单抗进行处理后,来自具有相同的初始肿瘤负荷的动物的原发性肿瘤展现出降低的血管生成。

[0224] 在本说明书中所提及的和/或在申请数据页中所列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请(包括2019年8月2日提交的美国临时专利申请号62/882,353,和2020年7月2日提交的美国临时专利申请号63/047,693)通过提及而以其整体合并入本文。如果需要采用各种专利和申请的概念以提供更进一步的实施方案,可以修改实施方案的方面。上面所描述的各种实施方案可以进行组合以提供进一步的实施方案。

[0225] 虽然已经举例说明和描述了本发明的具体的实施方案,但是将会容易地意识到,上面所描述的各种实施方案可以进行组合以提供进一步的实施方案,并且可以在其中进行各种改变而不背离本发明的精神和范围。可以按照上面详述的描述来对实施方案进行这些和其他改变。

[0226] 一般而言,在下面的权利要求书中,所使用的术语不应当被解释为将权利要求限制于在说明书和权利要求书中所公开的特定的实施方案,而应当被解释为包括所有可能的实施方案以及此类权利要求有资格享有的等价物的全部范围。因此,权利要求书不受本公开内容的限制。

序列表

<110> CytoDyn Inc.

<120> 牵涉施用抗-CCR5受体试剂的用于治疗或预防癌症的方法

<130> 230042.429W0

<140> PCT

<141> 2020-07-31

<150> US 63/047,693

<151> 2020-07-02

<150> US 62/882,353

<151> 2019-08-02

<160> 15

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体PR0140 VL

<220>

<221> sig_peptide

<222> 1...19

<223> 在氨基酸1-19处的信号肽

<400> 1

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val

20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu

35 40 45

Leu Ser Ser Tyr Gly His Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115	120	125	
Glu Ile Lys			
130			
<210> 2			
<211> 429			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人源化抗体PR0140 VL			
<400> 2			
tctagaccac catgaagttg cctgttaggc tgttggtgct gatgttcttg attcctgctt			60
ccagcagtga tattgtgatg acccaatctc cactctccct gcctgtcact cctggagagc			120
cagcctccat ctcttgca tctagtcagc gccttctgag cagttatgga catacctatt			180
tacattggta cctacagaag ccaggccagt ctccacagct cctgatctac gaagtttcca			240
accgattttc tggggtccca gacaggttca gtggcagtg gtcagggaca gatttcacac			300
ttaagatcag tagagtggag gctgaggatg tgggagtta ttactgctct caaagtacac			360
atgttcctct cacgttcgga caggggacca aggtggaaat aaaacgtaag tagtcttctc			420
aactctaga			429
<210> 3			
<211> 141			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人源化抗体PR0140 #2 VH			
<220>			
<221> sig_peptide			
<222> 1...19			
<223> 在氨基酸1-19处的信号肽			
<400> 3			
Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly			
1 5 10 15			
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys			
20 25 30			
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
35 40 45			
Ser Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50 55 60			
Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asn Tyr Ile Arg Asn Asn			
65 70 75 80			

35	40	45
Ser Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asn Tyr Ile Arg Asn Asn		
65	70	75
Glu Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser		
85	90	95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Gly Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Gly Ser Ser Phe Gly Ser Asn Tyr Val Phe Ala Trp Phe		
115	120	125
Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
130	135	140

<210> 6

<211> 457

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体PRO#1 VH

<400> 6

tctagaccac catggaatgg agcgggggtct ttatctttct cctgtcagta actgcaggtg	60
tccactccca ggtccaactg gtgcagtctg gacctgatgt gaaaaagcct gggacttcaa	120
tgaagatgtc ctgcaagacg tctggataca ctttcagtaa ctattggatc ggatgggtta	180
ggcaggcgcc tggacaaggc cttgagtgga ttggagatat ttaccctgga gggaactata	240
tcaggaacaa tgagaagttc aaggacaaga ccacactgac ggcagacaca tcgaccagca	300
cggcctacat gcaacttggc agcctgagat ctgaagacac tgccgtctat tactgtggaa	360
gcagcttcgg tagtaactac gtgttcgcct ggtttactta ctggggccaa gggactctgg	420
tcacagtctc ctcaggtgag tccttaaaac ctctaga	457

<210> 7

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体重链

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
35				40				45							
Gly	Asp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ile	Arg	Asn	Asn	Glu	Lys	Phe
50				55				60							
Lys	Asp	Lys	Thr	Thr	Leu	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Gly	Ser	Ser	Phe	Gly	Ser	Asn	Tyr	Val	Phe	Ala	Trp	Phe	Thr	Tyr	Trp
				100				105				110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
				115				120				125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
130				135				140							
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145				150				155				160			
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165				170				175			
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				180				185				190			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
195				200				205							
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr
210				215				220							
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro
225				230				235				240			
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245				250				255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp
				260				265				270			
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
275				280				285							
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
290				295				300							
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305				310				315				320			
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys
				325				330				335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr

	340					345					350				
Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
	355					360					365				
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370					375					380				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385					390					395					400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			405					410					415		
Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
	420					425					430				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly
	435					440					445				
Lys															
<210> 8															
<211> 219															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 人源化抗体轻链															
<400> 8															
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1			5					10				15			
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser
	20					25					30				
Tyr	Gly	His	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
	35					40					45				
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser
	85					90					95				
Thr	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
	100					105					110				
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
	115					120					125				
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	130					135					140				

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体LCDR1

<400> 9

Arg Ser Ser Gln Arg Leu Leu Ser Ser Tyr Gly His Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体LCDR2

<400> 10

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体LCDR3

<400> 11

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体HCDR1

<400> 12

Asn Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体HCDR2

<400> 13

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asn Tyr Ile Arg Asn Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体HCDR3

<400> 14

Ser Phe Gly Ser Asn Tyr Val Phe Ala Trp Phe Thr Tyr

1 5 10

<210> 15

<211> 352

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CCR5 NCBI参考序列: NP_000570.1

<400> 15

Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr

1 5 10 15

Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu

20 25 30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn

35 40 45

Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met		
50	55	60
Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu		
65	70	75 80
Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe		
85	90	95
Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe		
100	105	110
Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu		
115	120	125
Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe		
130	135	140
Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser		
145	150	155 160
Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr		
165	170	175
Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn		
180	185	190
Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu		
195	200	205
Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys		
210	215	220
Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile		
225	230	235 240
Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu		
245	250	255
Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser		
260	265	270
Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr		
275	280	285
His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe		
290	295	300
Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe		
305	310	315 320
Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser		
325	330	335
Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu		
340	345	350

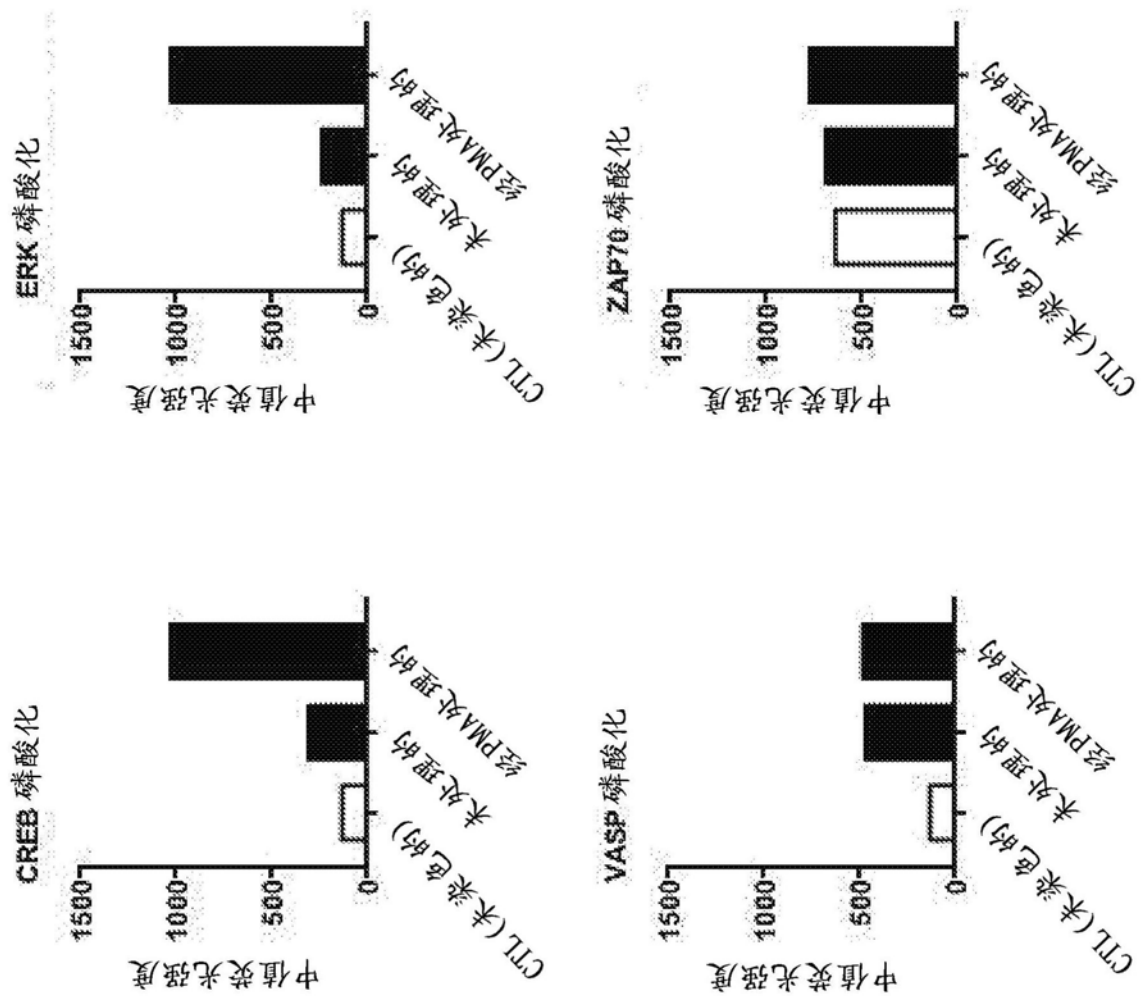


图1

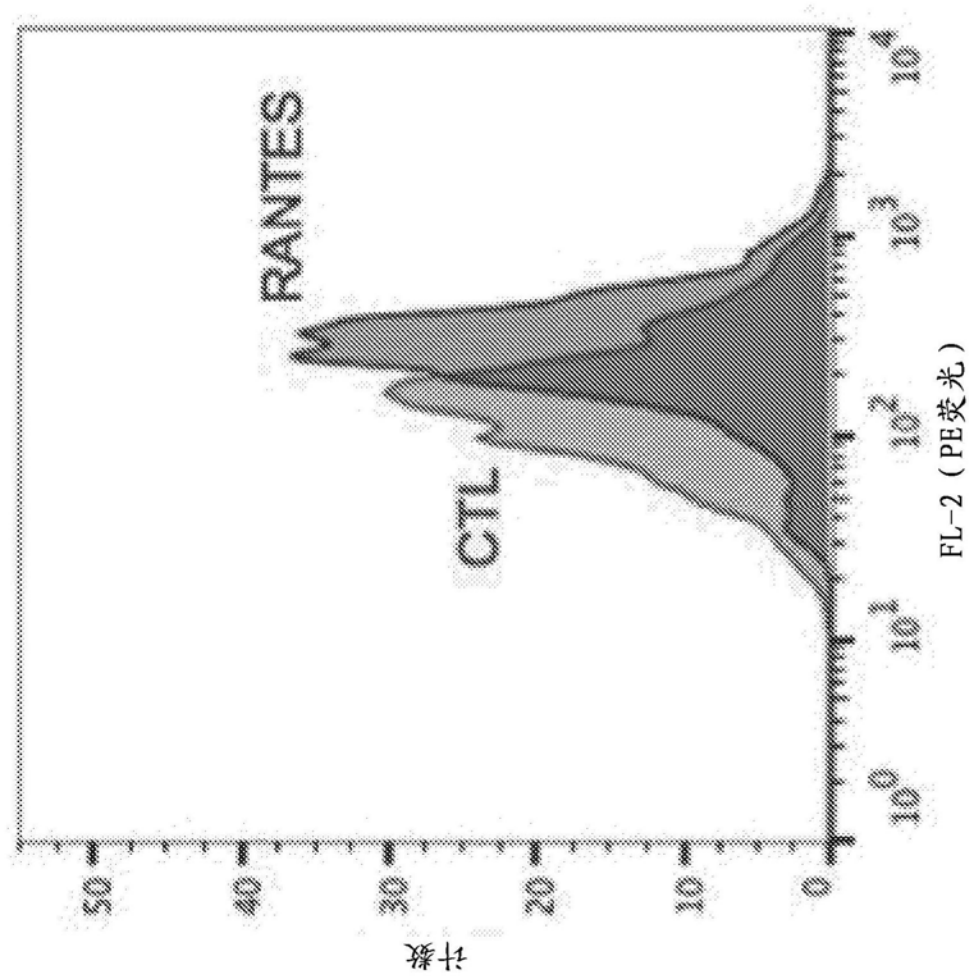


图2

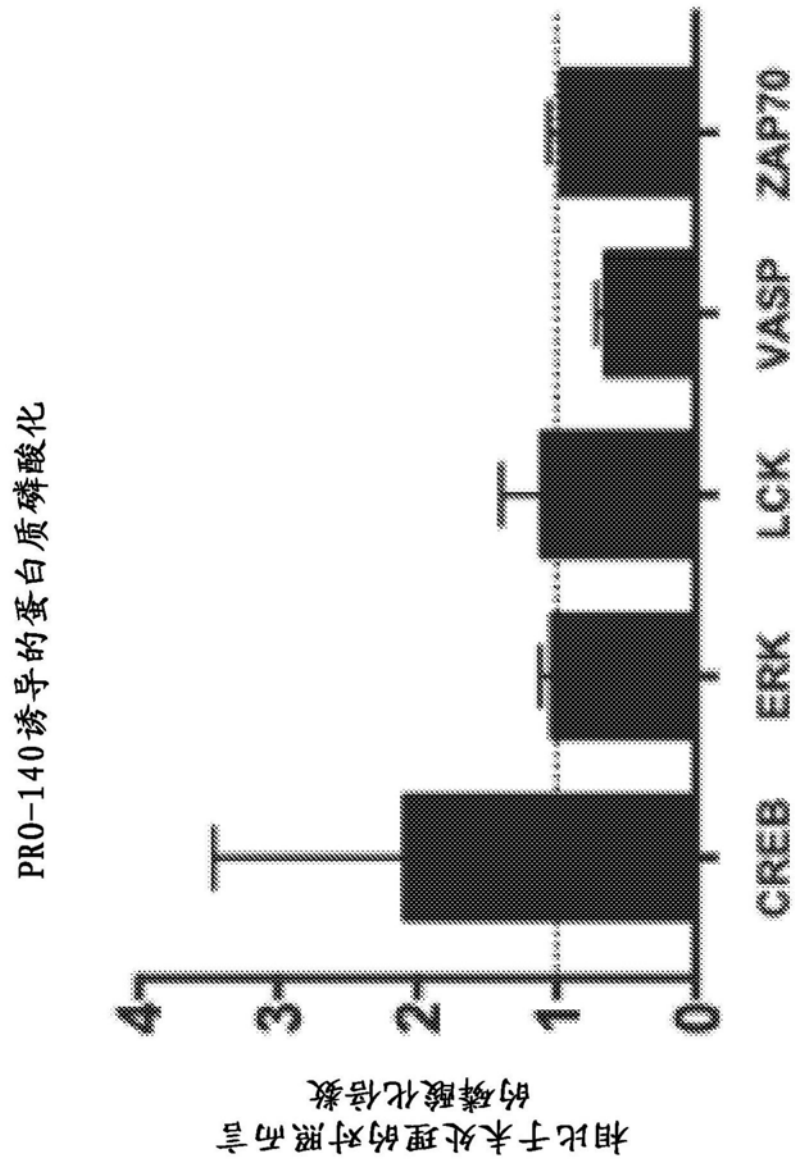


图3

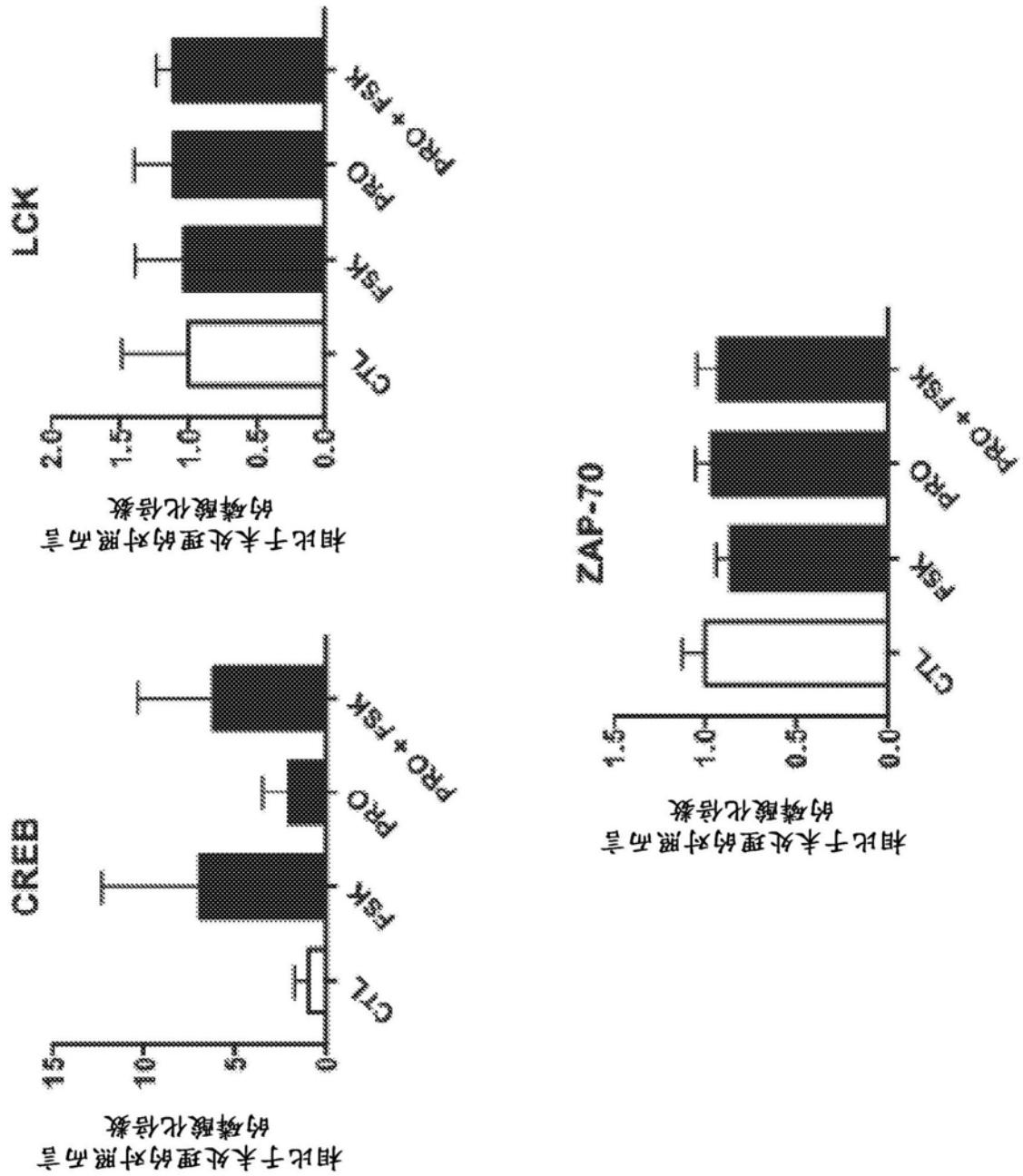


图4

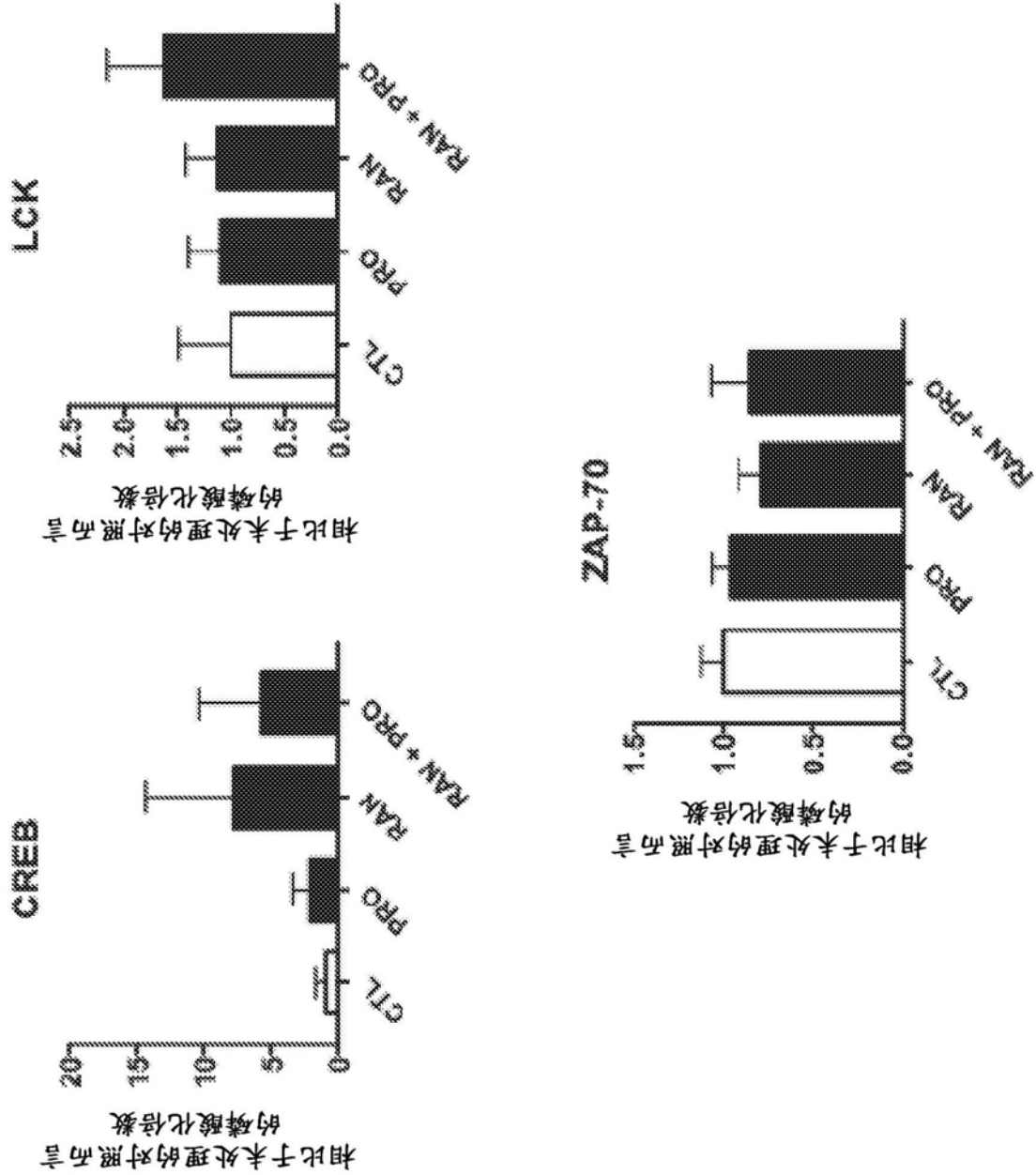


图5

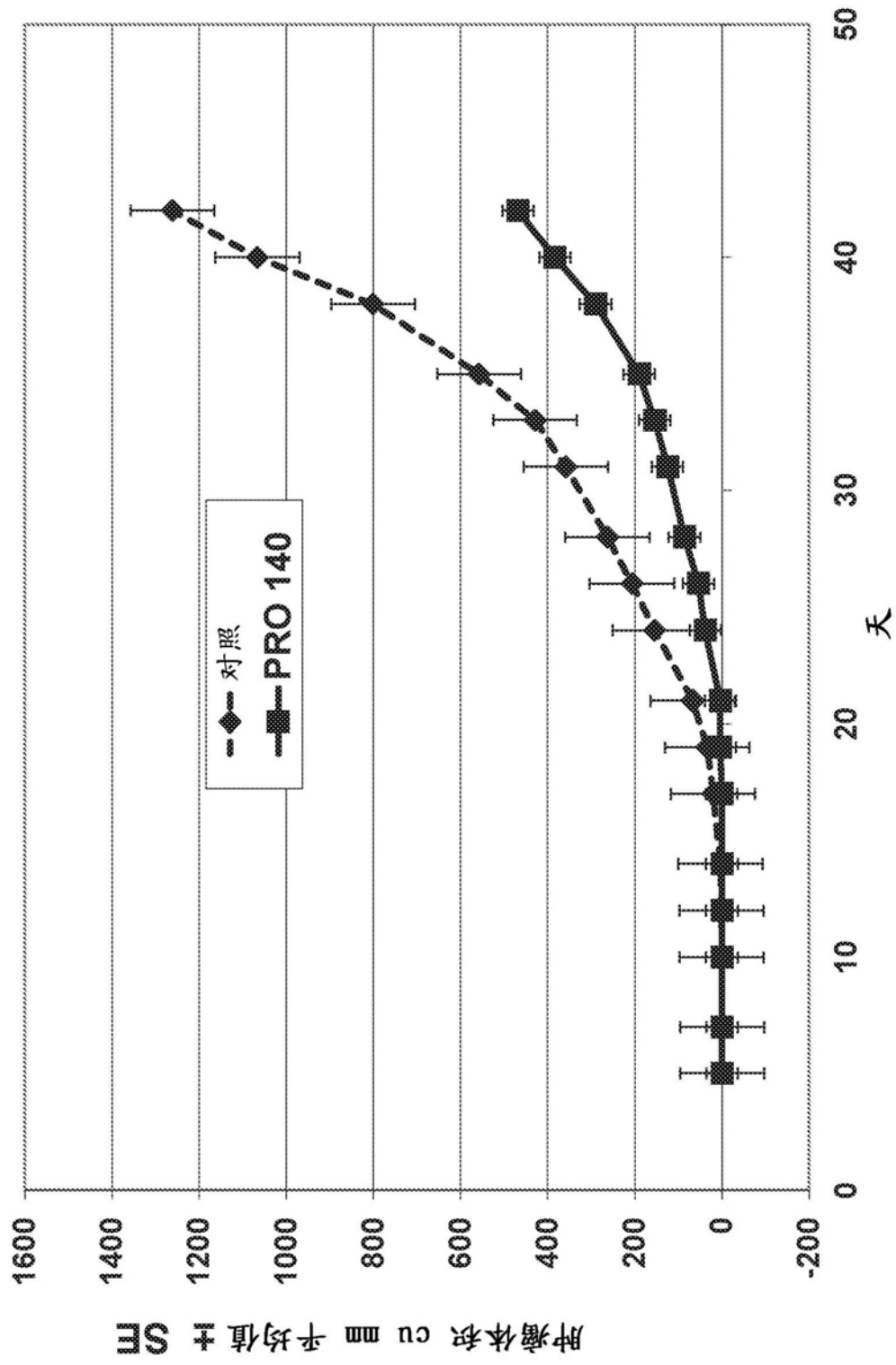


图6

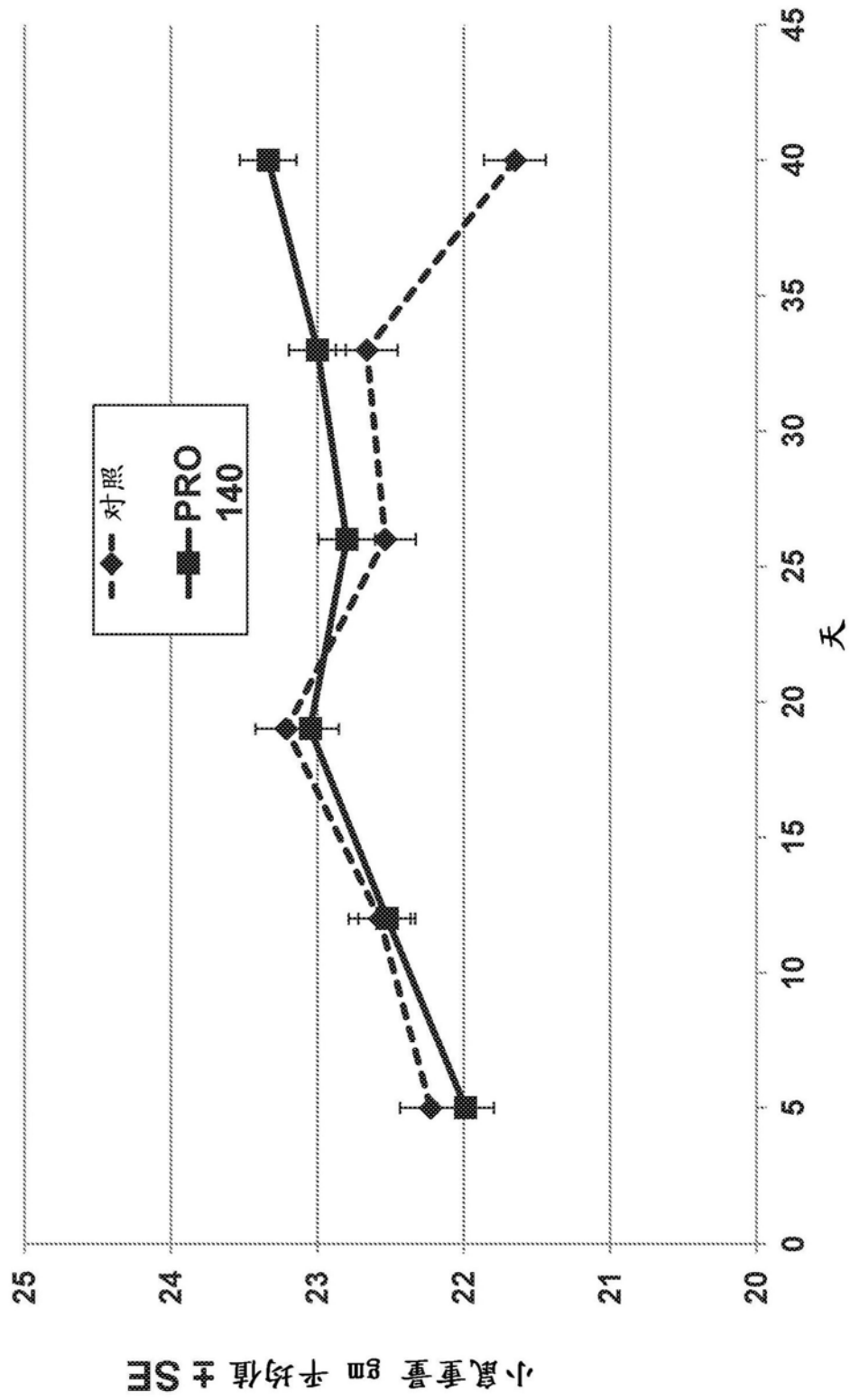


图7

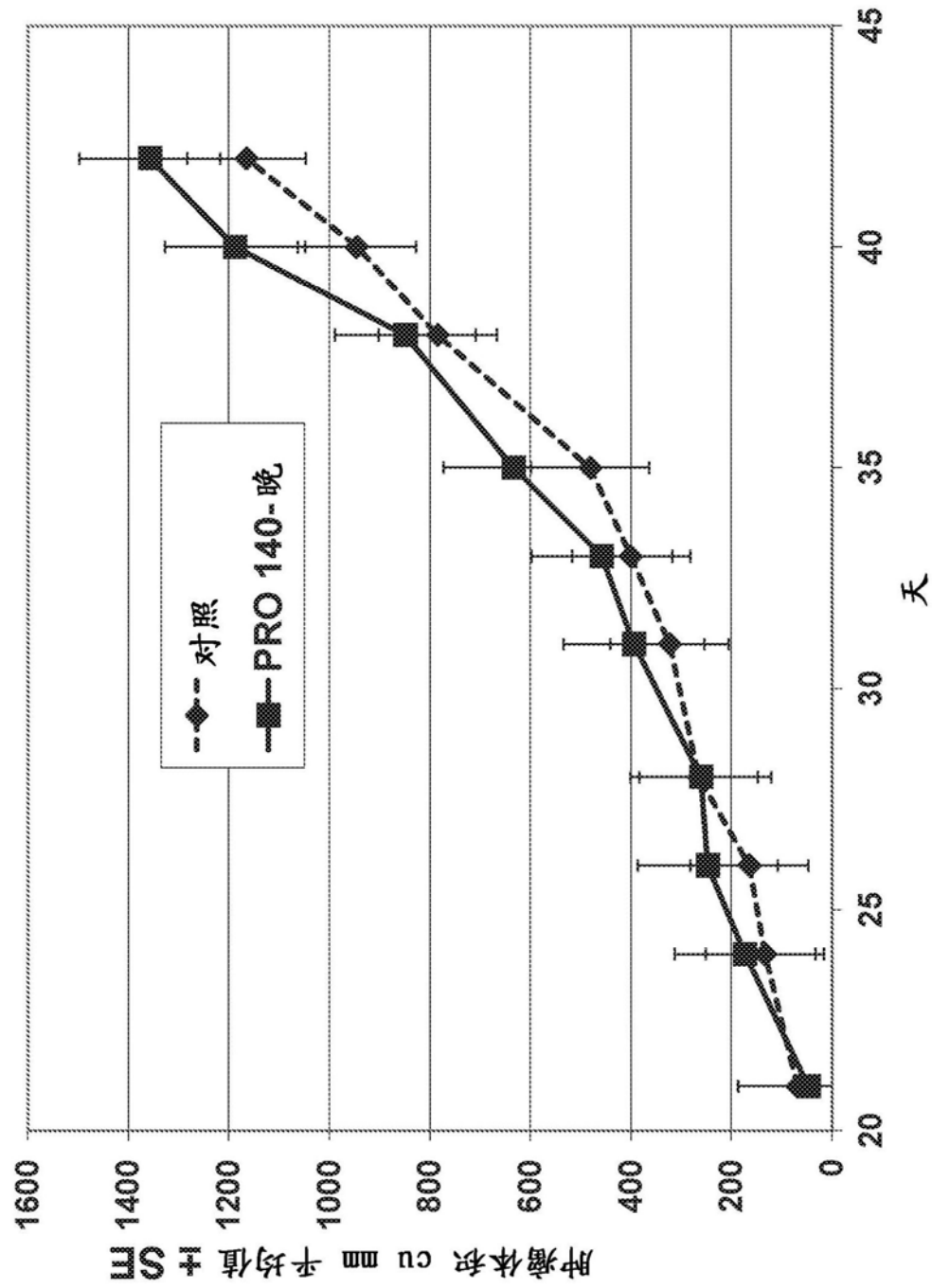


图8

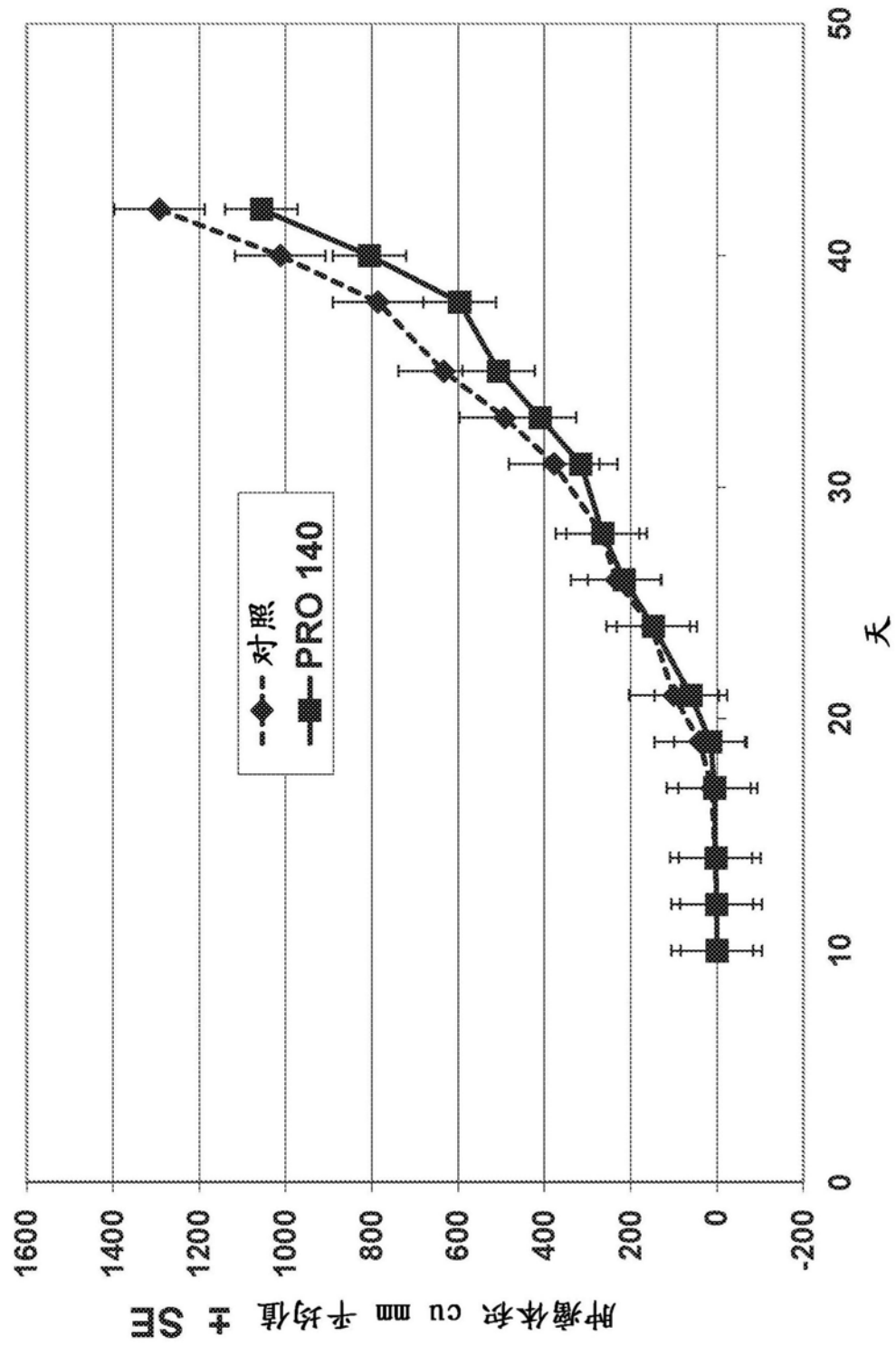


图9

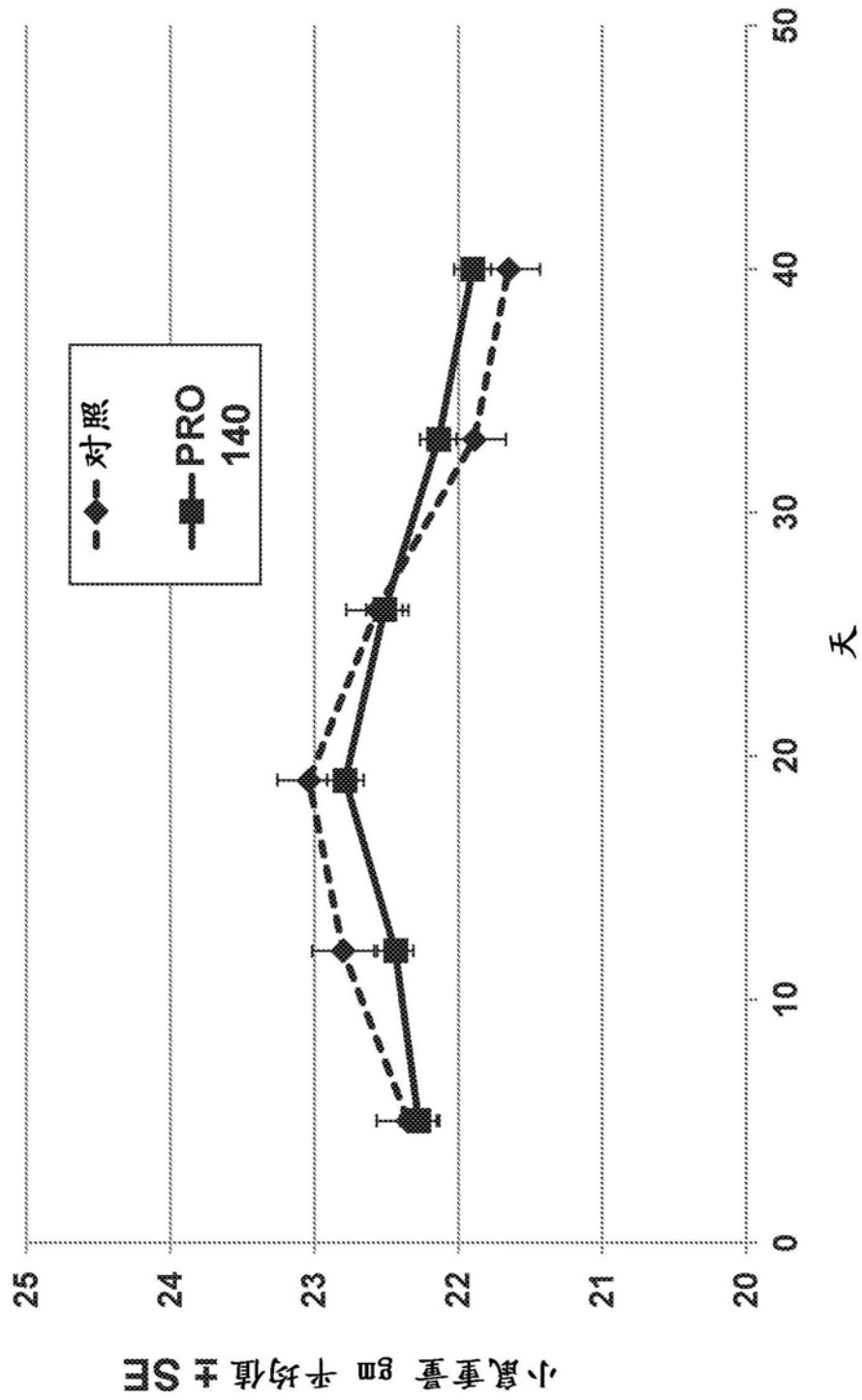


图10

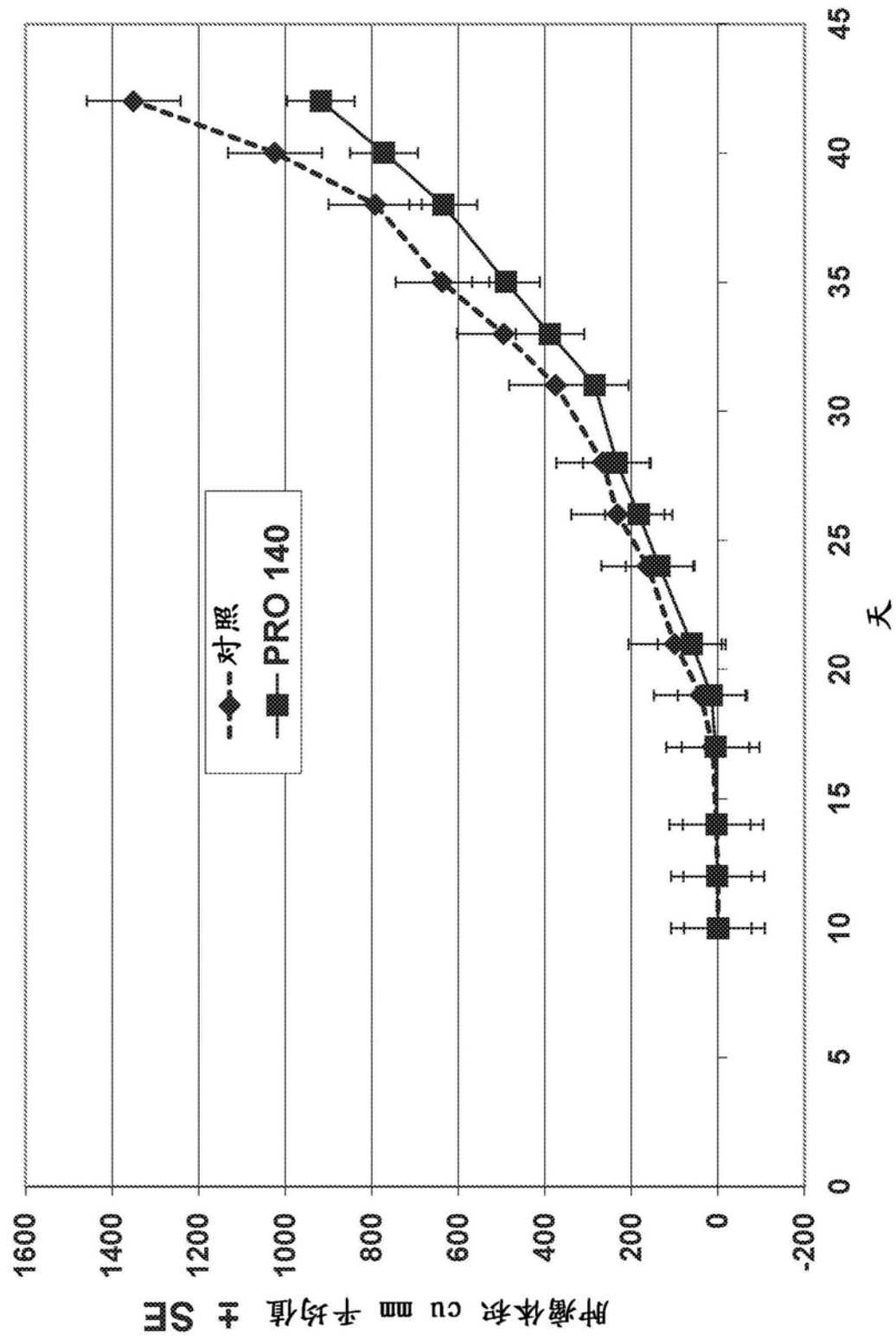


图11

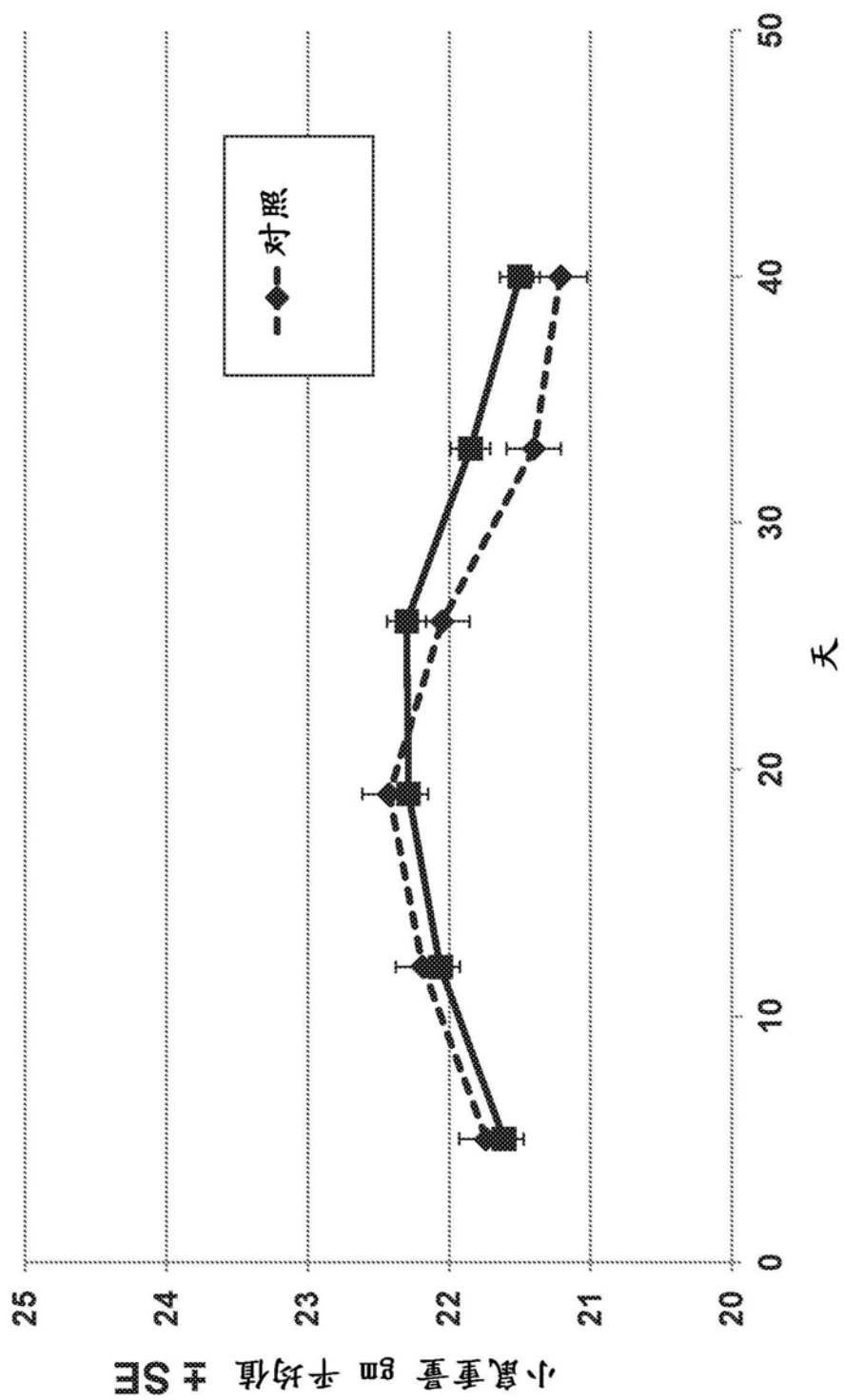


图12

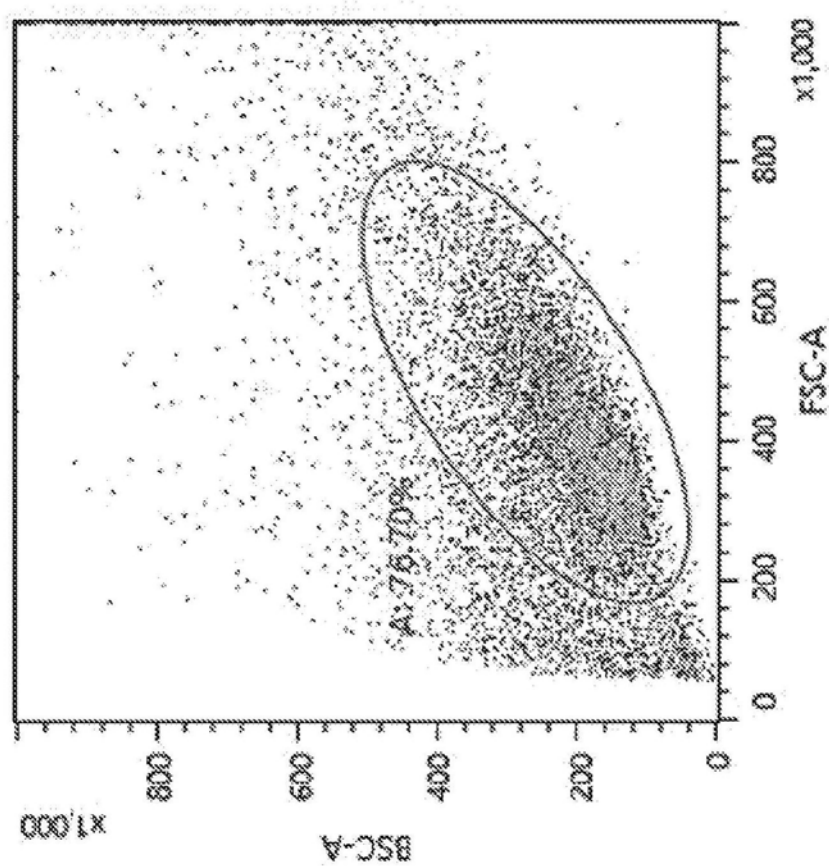


图13A

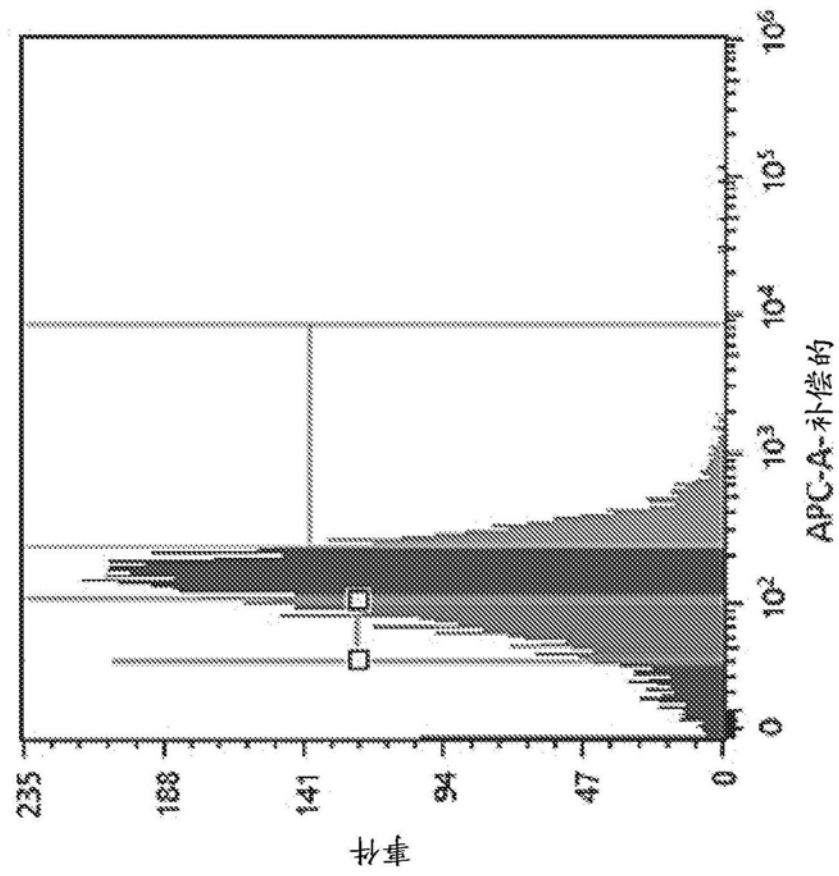


图13B

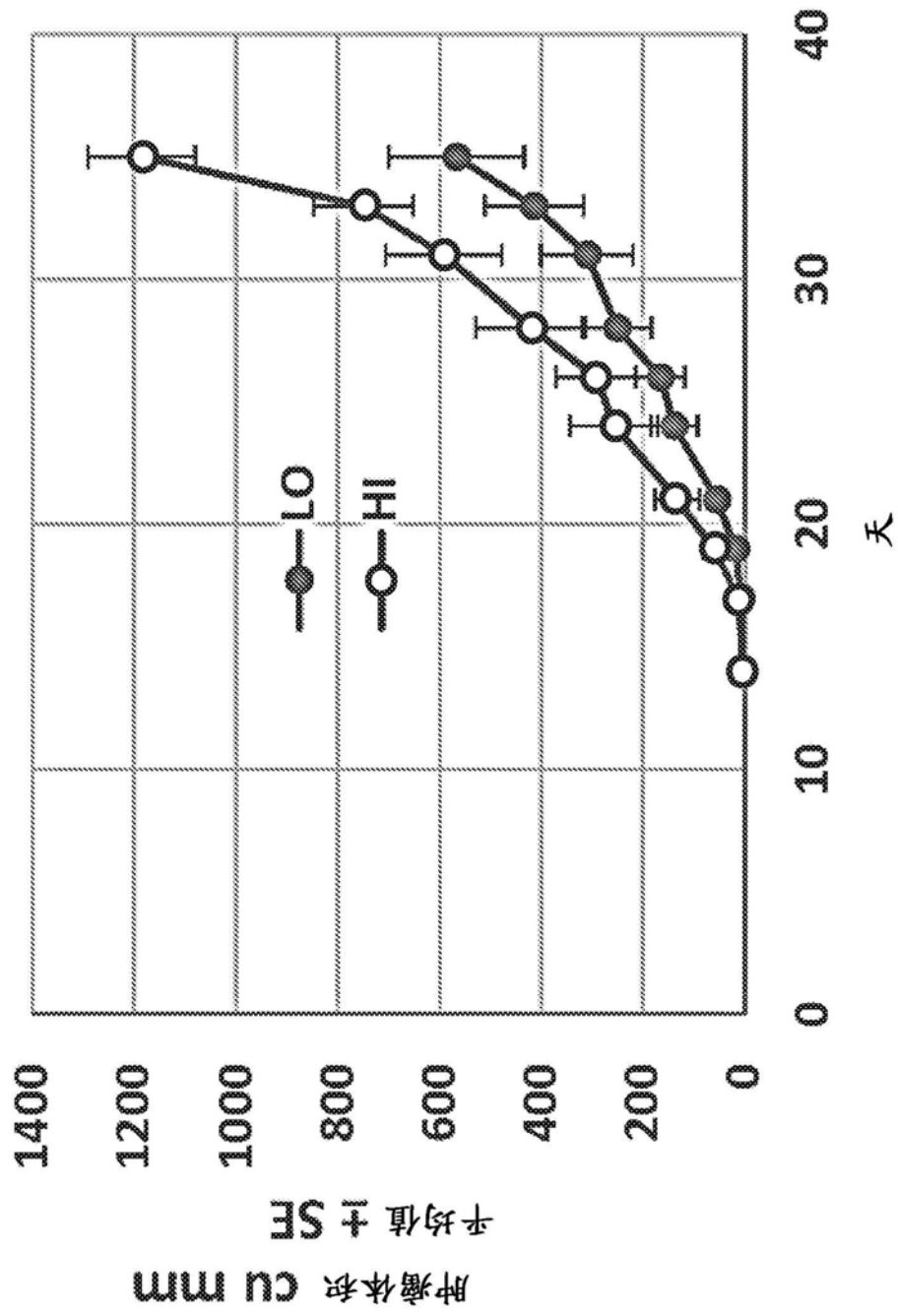


图13C

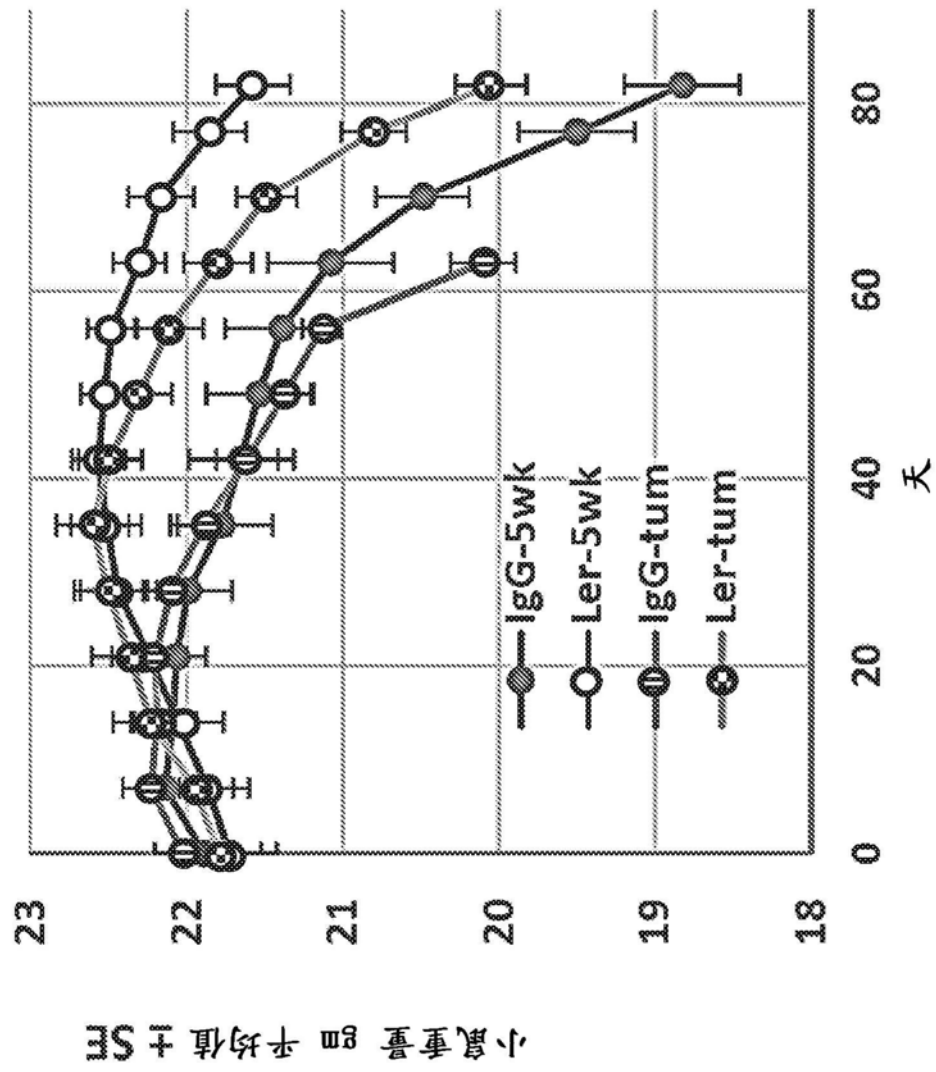


图14A

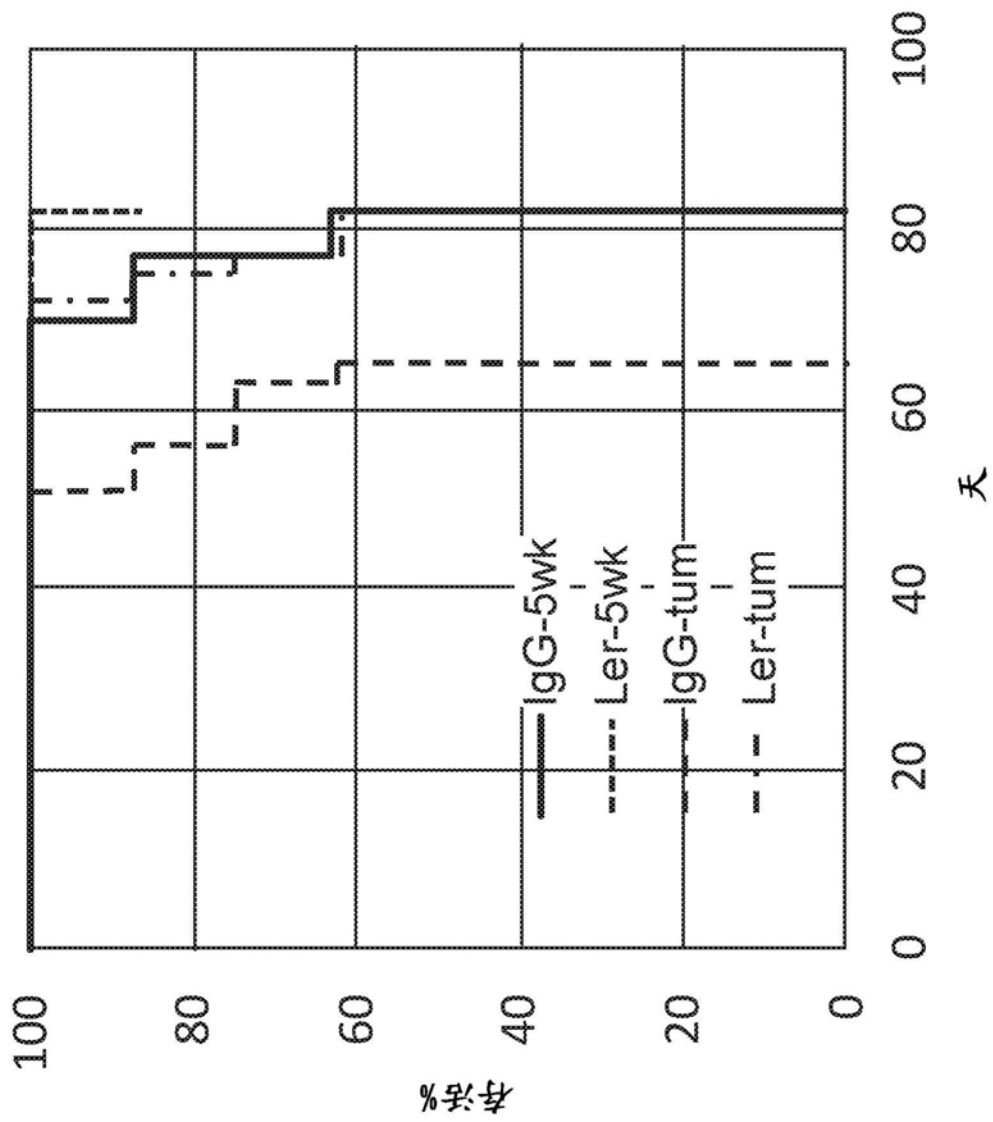


图14B

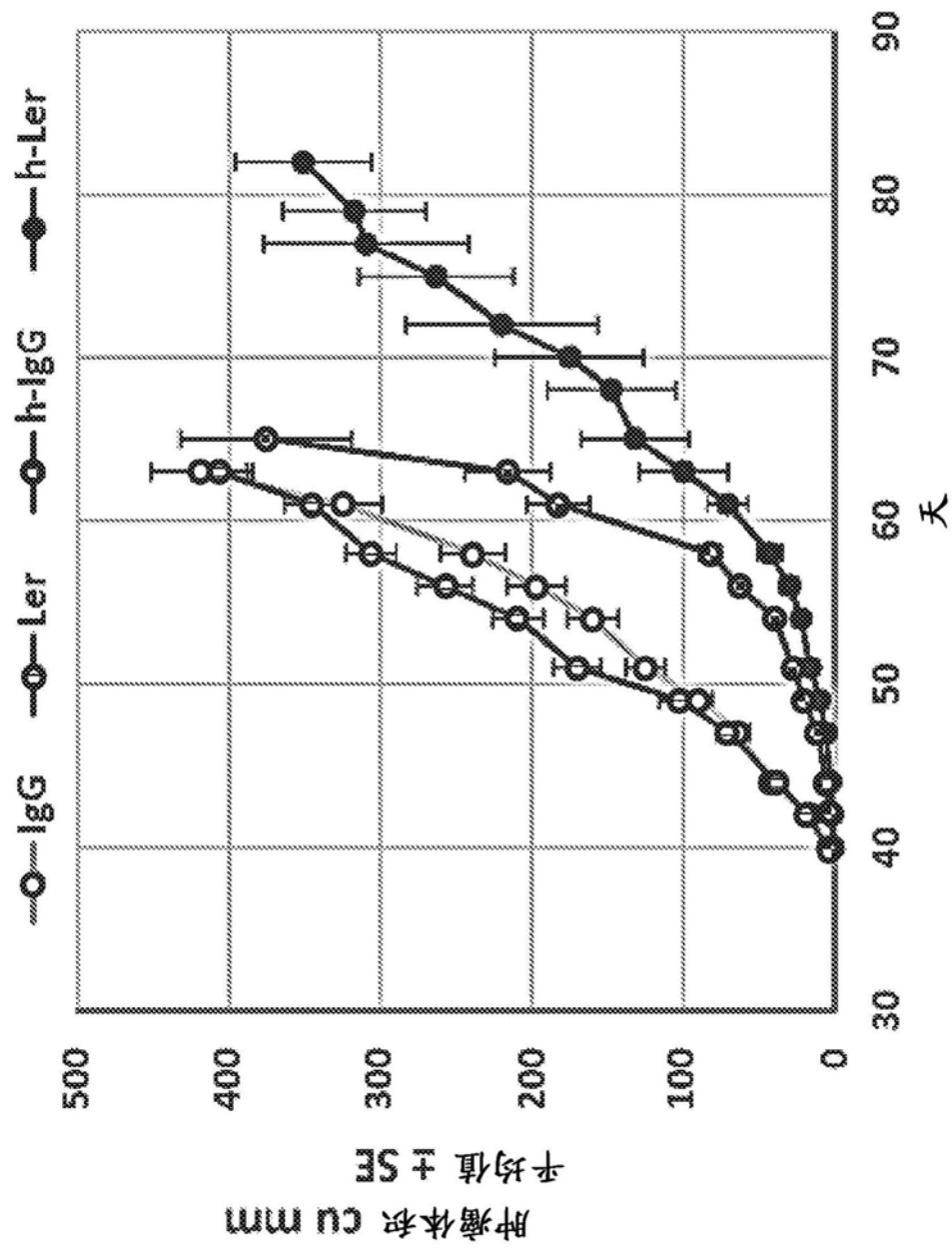


图15

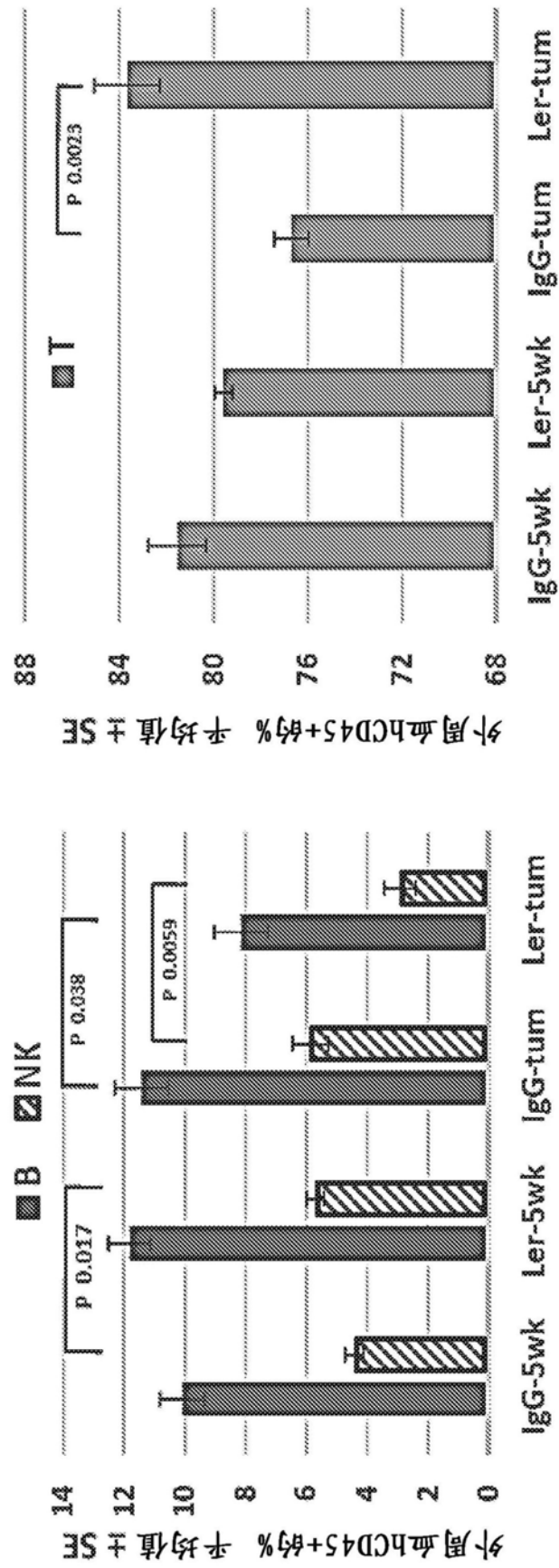


图16

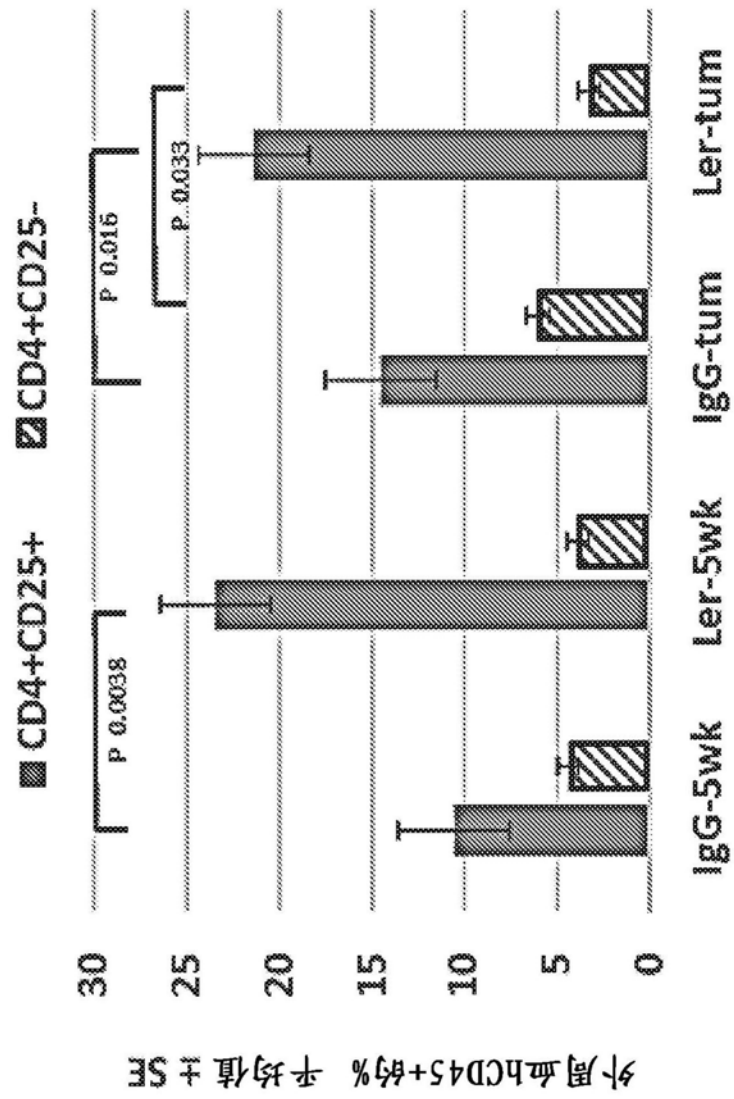


图17

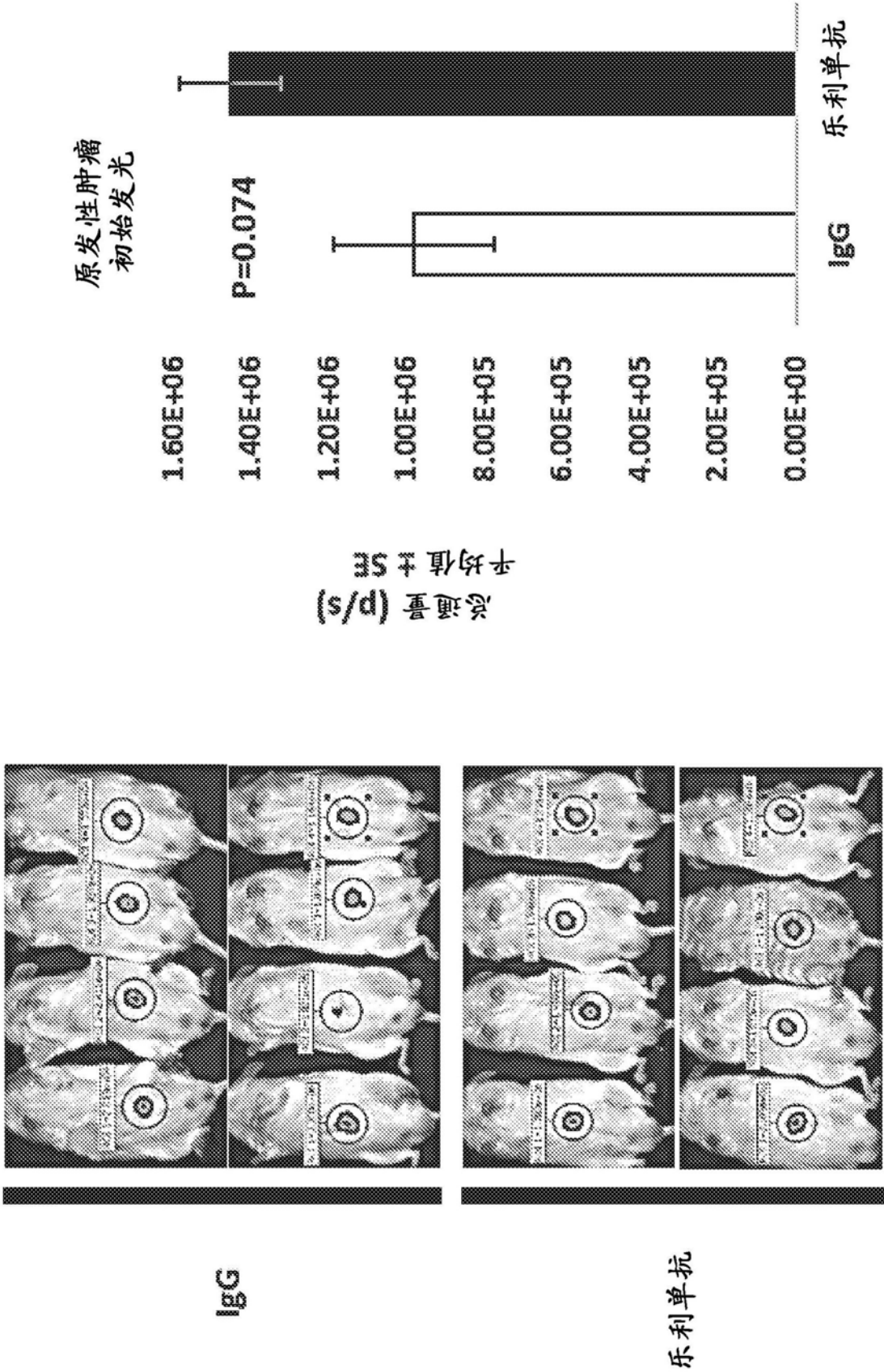


图18A

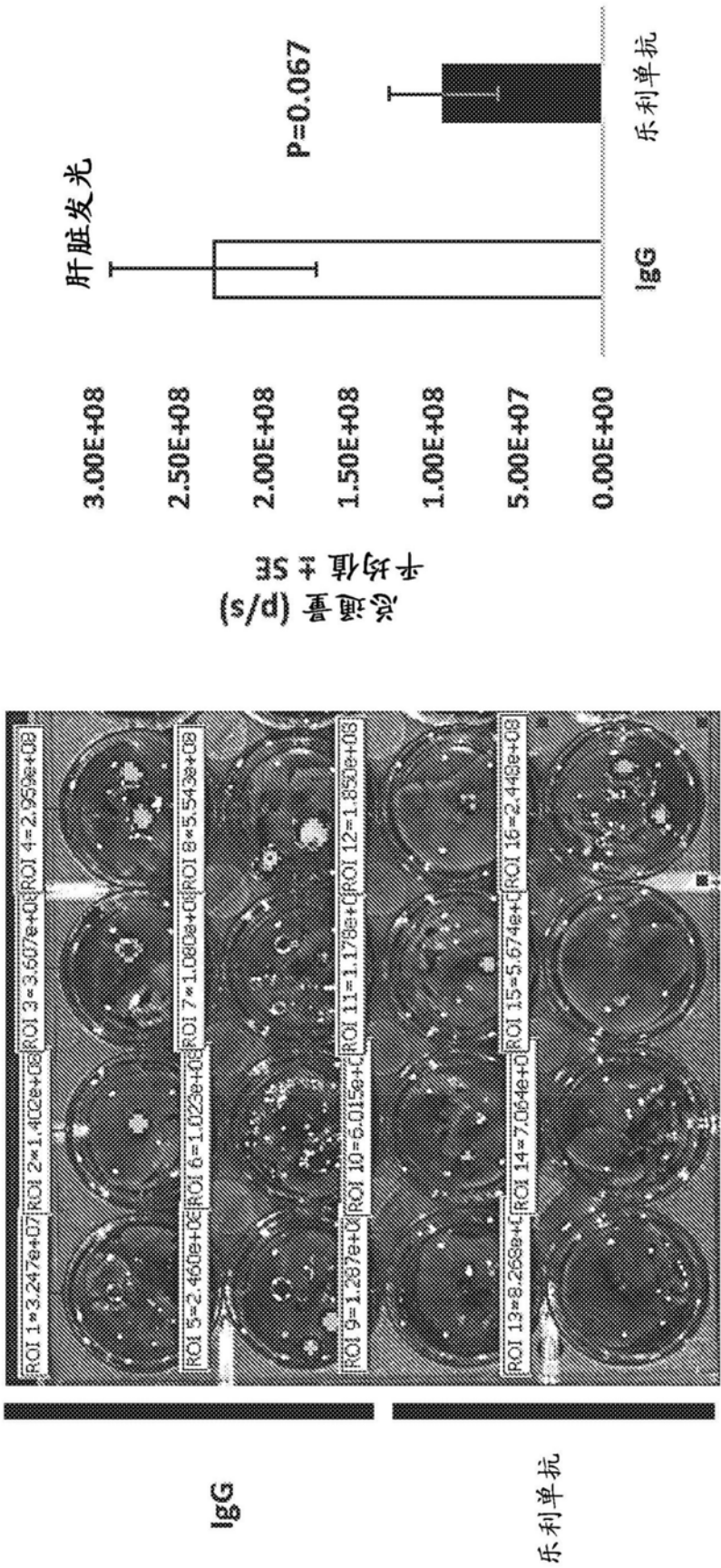


图18B

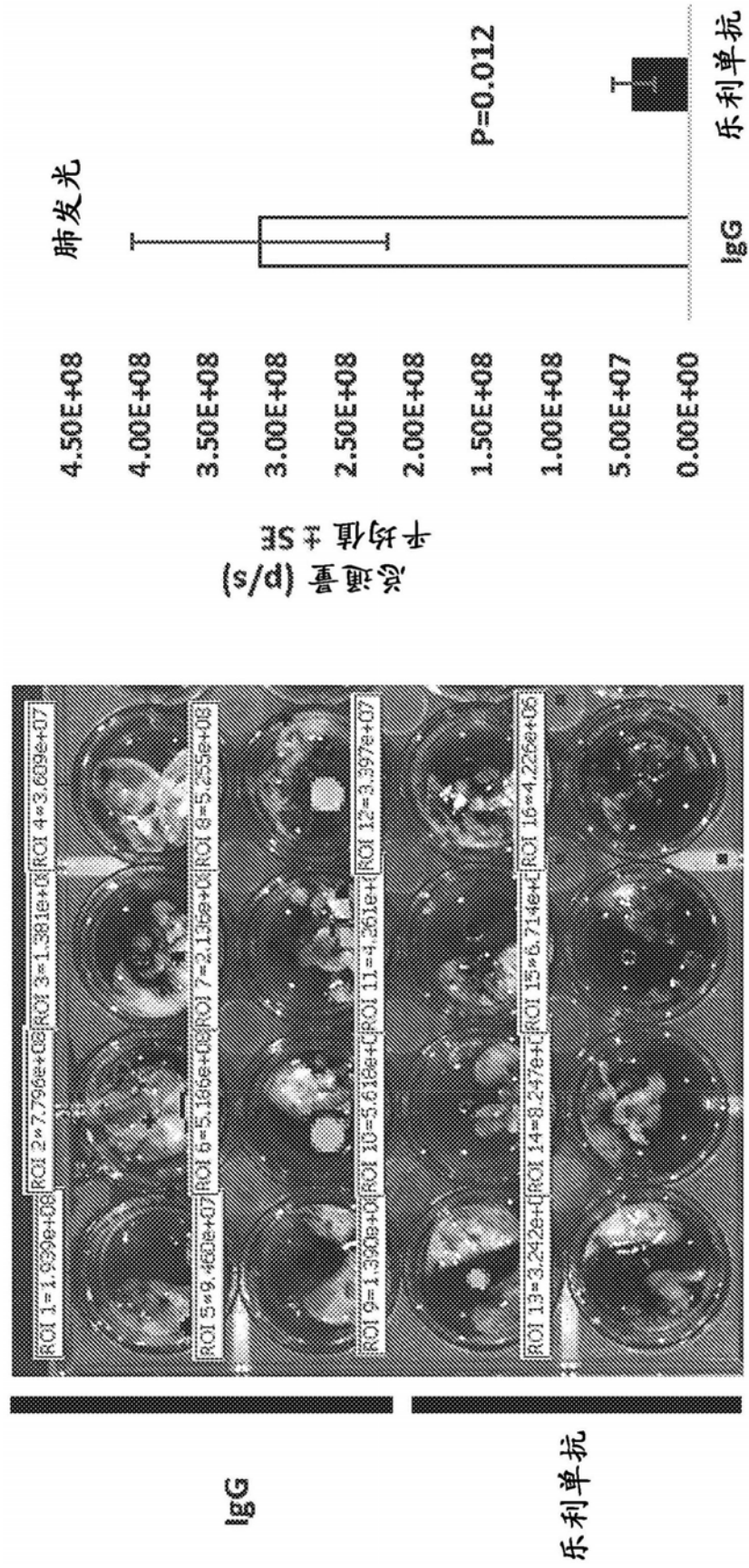


图18C

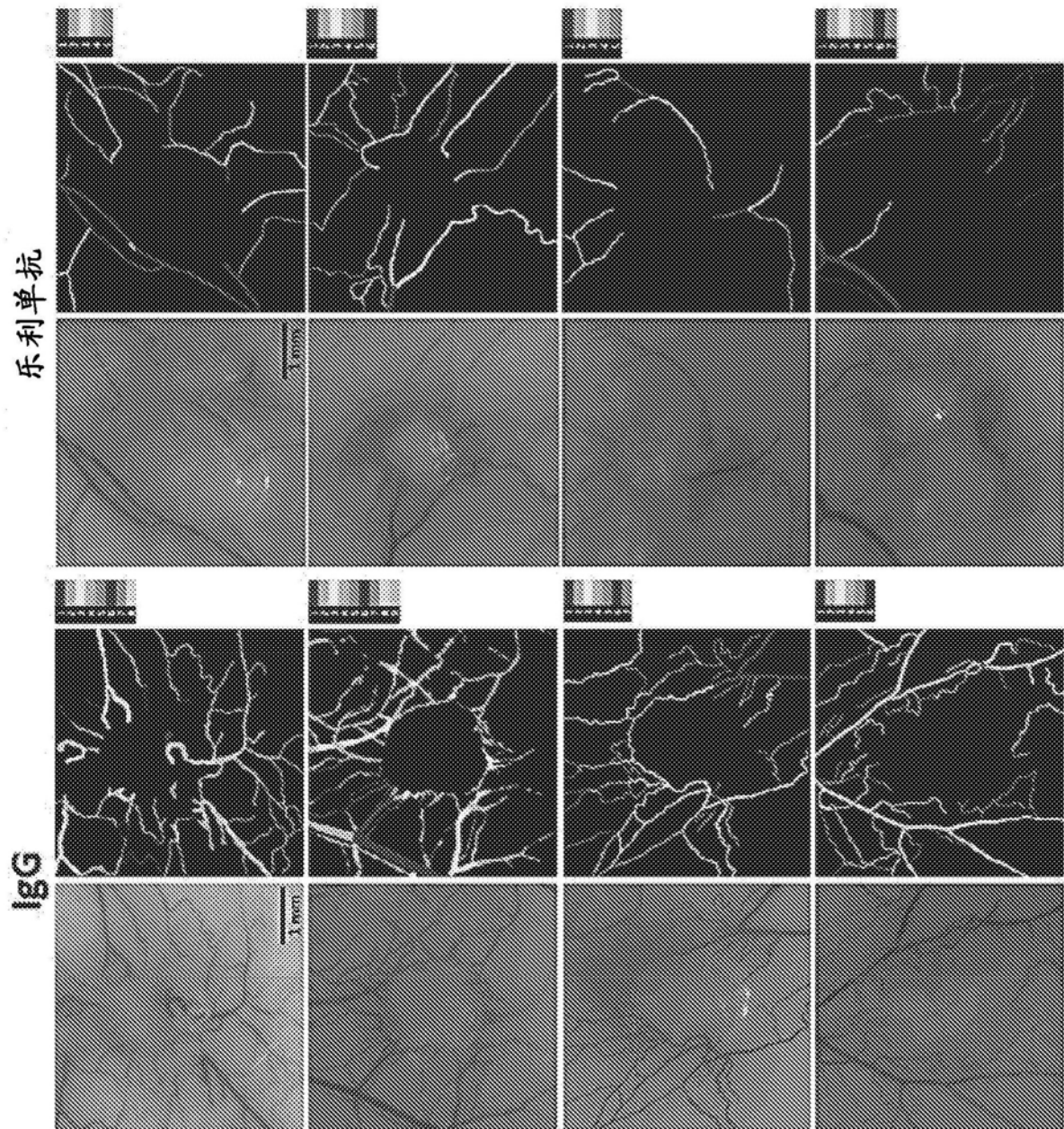


图19A

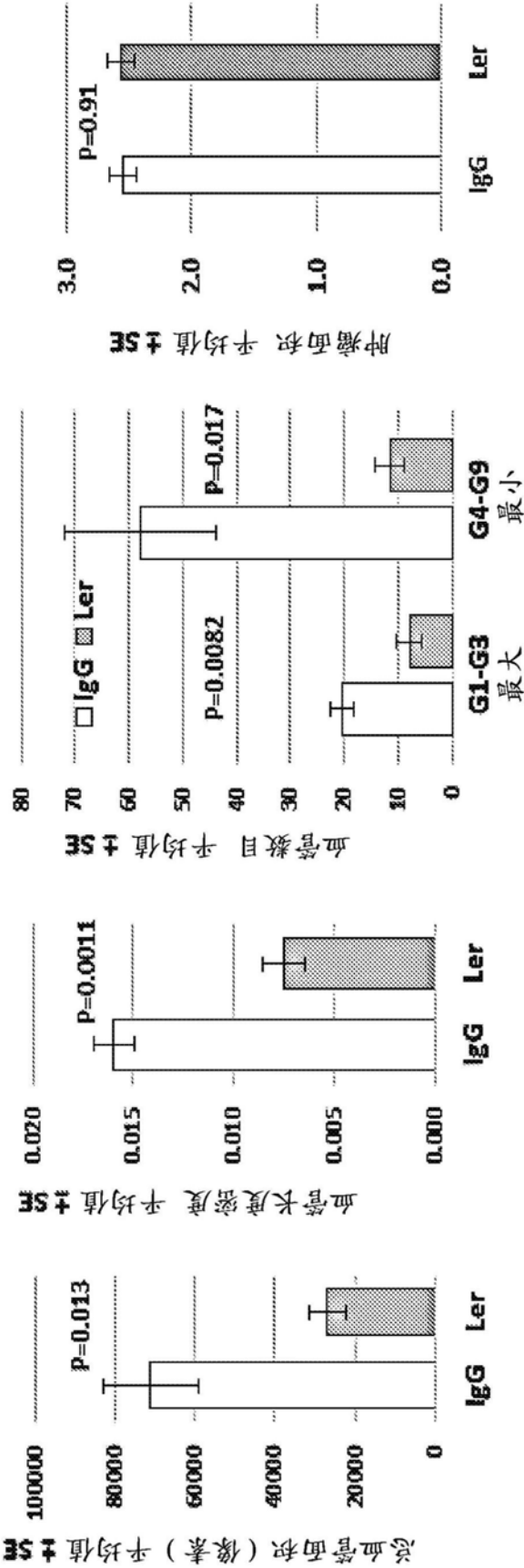


图19B