

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96136004

※ 申請日期： 96.9.27

※IPC 分類：

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 39/395

A61P 37/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗 CCR5 抗體及其用途

ANTIBODIES AGAINST CCR5 AND USES THEREOF

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

1. 菲杜林 克勞士納

KLAUSNER, FRIDOLIN

2. 丹尼斯 史崔柏

STREBEL, DENISE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街124號

124 GRENZACHERSTRASSE CH-4070 BASEL SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 喬漢尼斯 奧爾
AUER, JOHANNES
2. 蒙妮卡 貝納
BAEHNER, MONIKA
3. 麥可 布蘭特
BRANDT, MICHAEL

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY
3. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2006年09月29日；06020646.3

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗CCR5抗體、其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物及其用途。

【先前技術】

在過去幾年中，對HIV-1用以進入標靶細胞之特定機制的瞭解逐漸增加。其有助於嘗試開發攻擊該過程中之不連續階段的藥物。近來批准首個靶向進入之藥物用於臨床應用(恩福韋地(enfuvirtide)，T20；Lazzarin, A.等人，N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2186-2195)。恩福韋地為阻斷在趨化因子受體結合後之階段之融合的肽藥物。

藉由病毒性包膜糖蛋白(Env)與由CD4加上趨化因子受體組成之細胞受體複合物之間的相互作用而引發HIV-1感染(Pierson, T.C.及Doms, R.W., Immuno. Lett. 85 (2003) 113-118；Kilby, J.M.及Eron, J.J., N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2228-2238)。Env具有兩個次單位：表面糖蛋白gp 120，其與細胞CD4受體相互作用且與病毒跨膜次單元gp 41非共價結合。gp 41錨定gp 120至病毒膜上且亦產生融合。gp 120與CD4結合於細胞上將觸發構型變化，該構型變化暴露或產生使gp 120能夠與細胞表面趨化因子受體("輔助受體")相互作用之結合部位。趨化因子受體為通常回應趨化因子(具有趨化性、發炎性及其他功能之較小細胞因子)而傳遞信號之7跨膜G蛋白偶聯受體(7 TM GPCR)。

臨床應用中之大部分藥物係針對其他7 TM GPCR且因此

靶向該等分子以阻斷病毒進入為一種過去藥物開發程式的最成功類型之擴展。HIV-1分離株需要CD4及輔助受體以便進入且感染細胞。人類CC趨化因子受體CCR5為巨噬細胞嗜性(R5)株系之輔助受體且在HIV-1之性傳播中起關鍵作用(Berger, E.A., AIDS 11 (增刊 A) (1997) 3-16; Bieniasz, P.D.及Cullen, B.R., Frontiers in Bioscience 3 (1998) d44-d58; Littman, D.R., Cell 93 (1998) 677-680)。

人類CCR5(另外命名為"CCR5")被大多數HIV-1主要分離株使用且為建立且維持感染的關鍵。此外，對於人類健康而言，CCR5功能係非必需的。突變體CCR5等位基因"CCR5 ρ 32"編碼被截斷之無功能蛋白(Samson, M.等人，Nature 382 (1996) 722-725; Dean, M.等人，Science 273 (1996) 1856-1862)。對於突變而言為純合的個體缺乏CCR5表現且受到強有力地保護免受HIV-1感染。其證明無明顯的表型後果且對M嗜性HIV感染高度抵抗，而雜合子個體表現出延遲疾病進展(Schwarz, M.K.及Wells, T.N., Nat. Rev. Drug Discov. 1 (2002) 347-358)。可能因為CCR5作為 α 趨化因子MIP-1 α 、MIP-1 β 及RANTES之受體屬於高度冗餘趨化因子網路之一部分，該等趨化因子享有許多重疊功能且其大多數具有替代受體，所以CCR5之缺乏無明顯不利後果(Rossi, D.及Zlotnik, A., Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 217-242)。鑑別CCR5為HIV-1輔助受體係基於其配位體MIP-1 α 、MIP-1 β 及RANTES阻斷被R5感染但不阻斷被R5X4或X4分離株感染之能力(Cocchi, F.等人，Science 270

(1995) 1811-1815)。

CCR5亦為"簇"趨化因子受體，其主要產生於發炎性反應期間且控制嗜中性白細胞、巨噬細胞及T細胞子集(T輔助Th1及Th2細胞)之募集。舉例而言，Th1反應通常為涉及有效抗病毒及腫瘤之細胞介導免疫性的反應，而咸信Th2反應為過敏症之關鍵。因此，該等趨化因子受體之抑制劑可用作免疫調節劑。對於Th1反應，抑制(例如)包括類風濕性關節炎之自體免疫中的過度活化反應或對於Th2反應，減輕哮喘發作或包括異位性皮膚炎之過敏性反應(參見例如Schols, D., Curr. Top. Med. Chem. 4 (2004) 883-893; Mueller, A.及Strange, P.G., Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 (2004) 35-38; Kazmierski, W.M.等人, Curr. Drug Targets Infect. Disord. 2 (2002) 265-278; Lehner, T., Trends Immunol. 23 (2002) 347-351)。

抗CCR5抗體為(例如)PRO 140(Olson, W.C.等人, J. Virol. 73 (1999) 4145-4155)及2D7(Samson, M.等人, J. Biol. Chem. 272 (1997) 24934-24941)。其他抗體為以下文獻中所提及：WO 2006/103100、US 2004/0043033、US 6,610,834、US 2003/0228306、US 2003/0195348、US 2003/0166870、US 2003/0166024、US 2003/0165988、US 2003/0152913、US 2003/0100058、US 2003/0099645、US 2003/0049251、US 2003/0044411、US 2003/0003440、US 6,528,625、US 2002/0147147、US 2002/0146415、US 2002/0106374、US 2002/0061834、US 2002/0048786、US

2001/0000241、EP 1 322 332、EP 1 263 791、EP 1 207 202、EP 1 161 456、EP 1 144 006、WO 2003/072766、WO 2003/066830、WO 2003/033666、WO 2002/083172、WO 02/22077、WO 01/58916、WO 01/58915、WO 01/43779、WO 01/42308。

本發明之目標為提供主要用作AIDS之治療劑的新穎抗CCR5抗體。

【發明內容】

本發明包含與CCR5結合之抗體，其特徵在於重鏈可變域包含下式之胺基酸序列：

Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu-Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser,

其中

X01為Lys或Gln，

X02為Gln或Glu，

X03為Arg或Lys，

X04為Leu或Pro，

X05為Met或Lys，

X06為Ile或Thr，

X07為Ser或Thr，

X08為Ile或Thr

(SEQ ID NO:1)。

該抗體之特徵較佳在於，該抗體之輕鏈可變域包含下式之
胺基酸序列：

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Glu-Thr-Val-
Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu-Ala-Trp-X11-Gln-
Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-
Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-X16-Phe-X17-
X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-X22-X23-Tyr-Tyr-Cys-Gln-
His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-X24-Glu-Ile-Lys，

其中

X10 為 Ile 或 Ala，

X11 為 Phe 或 Tyr，

X12 為 Gln 或 Pro，

X13 為 Ser 或 Ala，

X14 為 Gln 或 Lys，

X15 為 Val 或 Ile，

X16 為 Gln 或 Asp，

X17 為 Ser 或 Thr，

X18 為 Leu 或 Ala，

X19 為 Lys 或 Thr，

X20 為 Asn 或 Ser，

X21 為 Leu 或 Ala，

X22 為 Gly 或 Ala，

X23 為 Asn 或 Thr，

X24 為 Leu 或 Val

(SEQ ID NO: 2)。

該抗體之特徵較佳在於屬於人類 IgG4 同種型或人類 IgG1

同種型，該IgG1同種型視情況在鉸鏈區中C_H1與C_H2之間的胺基酸位置216-240處及/或在第二域間區中C_H2與C_H3之間的胺基酸位置327-331處加以修飾。

本發明之一較佳實施例為一種包含本發明之抗體的醫藥組合物。

本發明之一較佳實施例為本發明之抗體用於製造醫藥組合物的用途。

本發明之一較佳實施例為一種製造包含本發明之抗體之醫藥組合物的方法。

本發明之一較佳實施例為一種編碼能夠連同第二多肽一起裝配之多肽的核酸，藉此該第二多肽包含選自SEQ ID NO: 2、5之多肽之群的多肽且因此該多肽包含SEQ ID NO: 1、6、7或8之胺基酸序列。

本發明之一較佳實施例為一種治療患有免疫抑制性疾病之患者的方法，其特徵在於向患者投與治療有效量之本發明之抗體。

本發明之抗體之特徵較佳在於，該抗體與CCR5結合且包含選自可變域之群的可變重鏈或輕鏈域，該等可變域包含SEQ ID NO: 6、7、8之重鏈可變域、SEQ ID NO: 9、10之輕鏈可變域或其CCR5結合片段。

本發明之抗體之特徵較佳在於含有選自SEQ ID NO: 6、7或8之重鏈可變域或其CCR5結合片段之群的重鏈可變域作為重鏈可變域，且含有選自SEQ ID NO: 9或10之輕鏈可變域或其CCR5結合片段之群的輕鏈可變域作為輕鏈可變

域，其中該等重鏈及輕鏈可變域彼此獨立選取。

本發明之抗體之特徵較佳在於，該重鏈可變域包含選自由SEQ ID NO: 6、7、8之重鏈可變域胺基酸序列組成之群的胺基酸序列，更確切地說該抗體包含選自SEQ ID NO: 6、7或8之重鏈可變域或其CCR5結合片段之胺基酸序列。

本發明之抗體之特徵較佳在於，該輕鏈可變域包含選自由SEQ ID NO: 9、10之輕鏈可變域胺基酸序列組成之群的胺基酸序列，更確切地說該抗體包含選自SEQ ID NO: 9或10之輕鏈可變域或其CCR5結合片段之胺基酸序列。

本發明之抗體之特徵較佳在於該等恆定區(輕鏈及重鏈)具有人類來源。該等恆定區(鏈)為目前的先進技術所熟知且(例如)由Kabat描述(參見例如Johnson, G.及Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218)。舉例而言，適用之人類重鏈恆定區包含獨立選自由SEQ ID NO: 3、4組成之群的胺基酸序列。舉例而言，適用之人類輕鏈恆定區包含SEQ ID NO: 5之 κ 輕鏈恆定區的胺基酸序列。另外較佳為，抗體來源於小鼠且根據Kabat包含小鼠抗體之抗體可變序列框(參見例如Johnson, G.及Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218)。

該等抗體抑制人類CCR5之一或多種功能，諸如與CCR5之配位體結合性、信號轉導活性(例如哺乳動物G蛋白之活化、誘導胞內游離 Ca^{2+} 濃度快速且瞬時增加及/或刺激細胞反應(例如趨化性、胞泄作用或由白血球釋放之發炎性介體之刺激、整合素活化))。該等抗體抑制RANTES、MIP-

1 α 、MIP-1 β 及/或HIV與人類CCR5之結合性且抑制由人類CCR5所介導之功能，如白血球運輸、HIV進入細胞、T細胞活化、發炎性介體釋放及/或白血球脫粒。

在檢定中本發明之抗體與人類CCR5特異性結合且抑制與標靶細胞之HIV融合，該檢定包含使該等標靶細胞與抗體在病毒存在下以在4.0 $\mu\text{g/ml}$ 或更低之 IC_{50} 值下有效抑制病毒與該細胞之間的膜融合之抗體濃度接觸。

本發明之抗體與CCR5特異性結合且以1.5 $\mu\text{g/ml}$ 或更低、較佳0.3 $\mu\text{g/ml}$ 或更低之 IC_{50} 值抑制共表現CCR5及CD4多肽之第一細胞與表現HIV env蛋白之第二細胞之間的膜融合。

在包含使該標靶細胞與抗體在RANTES、MIP-1 α 及/或MIP-1 β 存在下以1.5 $\mu\text{g/ml}$ 或更低之 IC_{50} 值接觸的檢定中，本發明之抗體與CCR5特異性結合且抑制標靶細胞中之細胞反應的刺激(較佳抑制遷移)。

本發明之抗體較佳在以至多100 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度與CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR6及CXCR4之結合檢定中並不抑制趨化因子結合。

本發明之抗體較佳以至多50 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度並不刺激表現CCR5及Galpha16之CHO細胞內所偵測到之細胞內 Ca^{2+} 增加。

本發明之抗體較佳屬於人類同種型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，藉此較佳為IgG1或IgG4。

本發明之抗體較佳屬於IgG4同種型。本發明之抗體較佳

屬於IgG1同種型。本發明之抗體較佳屬於具有突變S228P之IgG4同種型。本發明之抗體(亦即重鏈及輕鏈恆定區)屬於在鉸鏈區中 C_{H1} 與 C_{H2} 之間的約胺基酸位置216-240處、較佳約胺基酸位置220-240處(Angal, S.等人, Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108)及/或在第二域間區中 C_{H2} 與 C_{H3} 之間的約胺基酸位置327-331處(根據Kabat編號, 參見例如Johnson, G.及Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218)經修飾的IgG1或IgG4同種型。該等修飾降低或避免效應功能(ADCC及/或CDC)。可藉由將抗體之重鏈恆定區及輕鏈恆定域交換為來自所需類之抗體(如IgG1突變體或IgG4)之重鏈恆定區及輕鏈恆定域而進行IgG類之轉換。該等方法為目前的先進技術所熟知。

本發明之抗體之特徵較佳在於屬於在L234(在胺基酸位置234處之白胺酸)、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及/或P329(根據EU索引編號)中含有至少一種突變的人類子類IgG1。該抗體較佳屬於包含突變L234A(在胺基酸位置234處丙胺酸代替白胺酸)及L235A之人類IgG1同種型。本發明之抗體之特徵較佳在於屬於在位置S228處含有突變之人類IgG4同種型。

因此在一態樣中本發明係關於抗體, 其特徵在於該等抗體結合CCR5, 含有源自於人類之Fc部分且並不結合人類補體因子C1q及/或活化補體因子C3。該等抗體較佳展示與人類Fc γ 受體之低結合性或並不與人類Fc γ 受體結合。

本發明進一步包含一種根據本發明編碼抗體鏈、可變域

或其CDR之核酸分子。經編碼之多肽能夠與個別其他抗體鏈一起裝配以產生本發明之抗CCR5抗體分子。

本發明進一步提供含有本發明之該核酸且能夠在原核或真核宿主細胞中表現該核酸的表現載體且提供含有該等載體之宿主細胞用於重組製備該抗體。

本發明進一步包含一種包含本發明之載體的原核或真核宿主細胞。

本發明進一步包含一種製造本發明之重組人類或人類化抗體的方法，其特徵在於在原核或真核宿主細胞中表現本發明之核酸且自該細胞或細胞培養物上清液中回收該抗體。本發明進一步包含可由該重組方法獲得之抗體。

本發明之抗體展示對於需要CCR5靶向治療之患者的益處。本發明之抗體具有有益於患有該疾病(尤其患有免疫抑制，尤其患有HIV感染)之患者的新穎及創造性特性。

本發明進一步提供一種治療患有免疫抑制(尤其患有HIV感染)之患者的方法，其包含向診斷為具有該疾病(且因此需要該治療)之患者投與有效量之本發明之與CCR5結合的抗體。較佳以醫藥組合物形式投與該抗體。

本發明進一步包含本發明之抗體作為藥物的用途，其用於治療免疫抑制性疾病(較佳用於治療HIV感染)、用於治療患有免疫抑制之患者且用於製造本發明之醫藥組合物。此外，本發明包含一種用於製造本發明之醫藥組合物的方法。

本發明進一步包含一種含有醫藥學上有效量之本發明之

抗體及視情況連同適用於抗體之調配物之緩衝劑及/或佐劑用於醫藥目的的醫藥組合物。

本發明進一步提供在醫藥學上可接受之載劑中包含該等抗體的醫藥組合物。在一實施例中，該醫藥組合物可包括於製品或套組中。

因此，本發明之一態樣為適用作藥物之本發明之抗體。本發明之另一態樣為適用於治療免疫抑制性疾病之本發明之抗體。一態樣亦為本發明之抗體用於製造用以治療免疫抑制性疾病之藥物的用途。

【實施方式】

術語"抗體"涵蓋各種形式之抗體結構，包括(但不限於)全抗體及抗體片段。本發明之抗體較佳為人類化抗體、嵌合抗體、或進一步遺傳工程化之抗體，只要可保持本發明之特性。

"抗體片段"包含全長抗體之一部分(較佳其可變域)或至少其抗原結合部位。抗體片段之實例包括雙功能抗體(diabodies)、單鏈抗體分子、免疫毒素、及由抗體片段形成之多特異性抗體。例如 Huston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-88中描述scFv抗體。此外，抗體片段包含具有V_H域特徵(亦即能與V_L域一起裝配)，或具有與CCR5結合之V_L域特徵(亦即能與V_H域一起裝配成一個功能性抗原結合部位)，因此提供抑制與標靶細胞之膜融合或HIV融合之特性的單鏈多肽。

如本文中所用，術語"單株抗體"或"單株抗體組合物"係

指單一胺基酸組合物之抗體分子製劑。術語"嵌合抗體"係指包含一個來自小鼠之可變域(亦即結合區域)及至少一部分之恆定區源自不同來源或物種之單株抗體，其通常由重組DNA技術製備。包含一個小鼠可變域及一個人類恆定區之嵌合抗體尤其較佳。該等小鼠/人類嵌合抗體為表現包含編碼小鼠免疫球蛋白可變域之DNA片段及編碼人免疫球蛋白恆定區之DNA片段之免疫球蛋白基因的產物。本發明所涵蓋之其他形式之"嵌合抗體"為種類或子類由最初抗體之種類或子類經修飾或改變之嵌合抗體。該等"嵌合"抗體亦稱為"種類轉換抗體"。產生嵌合抗體之方法涉及此項技術中熟知之習知重組DNA及基因轉染技術。參見例如 Morrison, S.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855；美國專利第5,202,238號及第5,204,244號。

術語"人類化抗體"係指構架及/或"互補判定區"(CDR)經修飾以包含與親本免疫球蛋白之物種相比不同的物種之免疫球蛋白之CDR的抗體。在一較佳實施例中，將小鼠CDR移植到人類抗體之構架區中以製備"人類化抗體"。參見例如 Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327；及 Neuberger, M.S.等人，Nature 314 (1985) 268-270。尤其較佳CDR相當於彼等表現識別該等上述對於嵌合及雙官能抗體之抗原之序列的CDR。

如本文中所用，術語"與CCR5結合"意謂在基於細胞之活體外ELISA檢定(CCR5表現性細胞，例如經轉型之CHO細胞，L1.2細胞)中抗體與CCR5結合。若抗體在100 ng/ml

之抗體濃度下產生5或更大、較佳10或更大之S/N(信號/雜音)比，則發現存在結合性。

如本文中所用，術語"7跨膜趨化因子分子結構"係指CCR5當定位於細胞膜雙層中時所展示之天然結構(參見例如 Oppermann, M., Cell. Sig. 16 (2004) 1201-1210)。如其他G蛋白偶聯受體(例如G蛋白偶聯受體1b)一樣，CCR5係由細胞外N末端域、跨膜域及細胞質C末端域組成。該跨膜域由7個由3個細胞質片段及3個胞外片段連接之疏水性跨膜片段組成。本發明之抗體與CCR5結合於其7跨膜趨化因子分子結構中。

術語"抗原決定基"表示能夠與抗體特異性結合之蛋白質決定子。抗原決定基通常由分子之化學活性表面分組(諸如胺基酸或糖側鏈)組成且抗原決定基通常具有特定三維結構特性以及荷質比特徵。區分構形抗原決定基與非構形抗原決定基在於在變性溶劑存在下與前者(而非後者)之結合消失。本發明之抗體較佳與天然CCR5特異性結合但不與變性CCR5特異性結合。

術語"膜融合"係指共表現CCR5及CD4多肽之第一細胞與表現HIV env蛋白之第二細胞之間的融合。由螢光素酶報導體基因檢定來測定膜融合。

術語"抑制與標靶細胞之HIV融合"係指抑制在檢定中所量測之與標靶細胞的HIV融合，該檢定包含使標靶細胞與抗體在該病毒存在下以有效抑制病毒與該細胞之間的膜融合之抗體濃度接觸且量測螢光素酶報導體基因活性。

如本文中所用，"可變域"(輕鏈可變域(V_L)、重鏈可變域(V_H))表示直接涉及抗體與抗原結合之各成對輕鏈及重鏈域。該等輕鏈及重鏈可變域具有相同通用結構且各域包含4個序列普遍保守且由3個"高變區"(或互補判定區CDR)連接之構架區(FR)。構架區採用 β 片構形且該等CDR可形成連接 β 片結構之環。各鏈中之CDR藉由構架區保持其三維結構且與來自其他鏈之CDR一起形成抗原結合部位。抗體之重鏈及輕鏈CDR3區域對本發明之抗體之結合特異性/親和力具有特別重要的作用且因此成為本發明之另一目標。

本發明之抗體之特徵較佳在於，該抗體包含選自由以下可變域組成之組合之群的重鏈可變域及輕鏈可變域：

- a) 由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列所定義之重鏈可變域及由SEQ ID NO: 9之胺基酸序列所定義之輕鏈可變域；
- b) 由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列所定義之重鏈可變域及由SEQ ID NO: 10之胺基酸序列所定義之輕鏈可變域；
- c) 由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列所定義之重鏈可變域及由SEQ ID NO: 9之胺基酸序列所定義之輕鏈可變域；
- d) 由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列所定義之重鏈可變域及由SEQ ID NO: 10之胺基酸序列所定義之輕鏈可變域；
- e) 由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列所定義之重鏈可變域及由SEQ ID NO: 9之胺基酸序列所定義之輕鏈可變域；
- f) 由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列所定義之重鏈可變域及

由 SEQ ID NO: 10 之胺基酸序列所定義之輕鏈可變域。

術語"抗體之抗原結合部分"當本文中所用時係指引起抗原結合之抗體的胺基酸殘基。抗體之抗原結合部分包含來自"互補判定區"或"CDR"之胺基酸殘基。"構架"或"FR"區域為彼等除如本文中所定義之高變區殘基以外的可變域區域。因此，抗體之輕鏈及重鏈可變域包含來自N至C末端之該等域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。重鏈之CDR3尤其為最促使抗原結合且限定抗體特性之區域。根據Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publication No. 91-3242 (1991)之標準定義及/或彼等來自"高變環"之殘基來確定CDR及FR區域。

如本文中所用，術語"核酸"或"核酸分子"意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可為單股或雙股DNA，但較佳為雙股DNA。

如本申請案中所用術語"胺基酸"表示天然存在之羧基 α 胺基酸之群，其包含丙胺酸(3字母代碼：ala，1字母代碼：A)、精胺酸(arg，R)、天冬醯胺酸(asn，N)、天冬胺酸(asp，D)、半胱胺酸(cys，C)、麩醯胺酸(gln，Q)、麩胺酸(glu，E)、甘胺酸(gly，G)、組胺酸(his，H)、異白胺酸(ile，I)、白胺酸(leu，L)、離胺酸(lys，K)、甲硫胺酸(met，M)、苯丙胺酸(phe，F)、脯胺酸(pro，P)、絲胺酸

(ser, S)、蘇胺酸(thr, T)、色胺酸(trp, W)、酪胺酸(try, Y)及纈胺酸(val, V)。

核酸當處於與另一核酸之功能關係中時為"可操作連接的"。舉例而言，若前序列或促分泌前導區之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其可與多肽之DNA可操作連接；若啟動子或增強子影響序列轉錄，則其可與編碼序列可操作連接；或若核糖體結合部位經定位使得有助於轉譯，則其可與編碼序列可操作連接。一般而言，"可操作連接"意謂所連接之DNA序列為共線的且在促分泌前導區之情況下為鄰接的且處於閱讀框架內。然而，增強子不必為鄰接的。藉由在適當限制性部位上進行接合反應來實現連接。若該等部位不存在，則根據習知實務使用合成寡核苷酸銜接子或連接子。

如本文中所用，詞句"細胞"、"細胞株"及"細胞培養物"可互換使用且所有該等名稱包括子代。因此，字詞"轉型子"及"轉型細胞"包括在不考慮轉移數目情況下之初始受檢者細胞及由此衍生之培養物。亦瞭解所有子代由於蓄意或偶然性突變而不可能在DNA含量上精確相同。包括具有與最初轉型細胞中所篩檢相同之功能或生物活性的異變體子代。

抗體之"Fc部分"不直接涉及抗體與抗原之結合，但顯示各種效應功能。視其重鏈之恆定區之胺基酸序列而將抗體或免疫球蛋白分成以下各類：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且若干該等類可進一步分成子類(同種型)，例如IgG

分成IgG1、IgG2、IgG3及IgG4，IgA分成IgA1及IgA2。根據重鏈恆定區，將不同類之免疫球蛋白分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。本發明之抗體較佳屬於IgG型。

如本文中所用，術語"源自於人類來源之Fc部分"表示屬於子類IgG4之人類抗體之Fc部分或子類IgG1、IgG2或IgG3之人類抗體之Fc部分的Fc部分，包括其突變形式。子類IgG1、IgG2或IgG3之人類抗體之Fc部分較佳以此方式經修飾使得相對於未經修飾之Fc部分可偵測到如以下所定義之Fc γ 受體(Fc γ R，亦即Fc γ R1IIa)結合性降低或無Fc γ 受體結合性及/或C1q結合性降低或無C1q結合性。"抗體之Fc部分"為熟習此項技術者所熟知之術語且基於抗體之番木瓜蛋白酶裂解而加以定義。本發明之抗體含有充當Fc部分之源自人類來源之Fc部分且較佳含有人類恆定區之所有其他部分。Fc部分較佳為人類Fc部分且尤其較佳來自人類IgG4子類或來自人類IgG1子類或來自人類IgG1子類之突變Fc部分。最佳為展示於SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、具有突變L234A及L235A之SEQ ID NO: 3、具有突變S228P之SEQ ID NO: 4中之Fc部分及重鏈恆定區。

儘管IgG4展示Fc γ 受體(Fc γ R1IIa)結合性降低，但其他IgG子類之抗體展示較強結合性。然而Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(缺失Fc糖)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及His435為(若改變)亦提供Fc受體結合性降低之殘基(Shields, R.L.等人，J. Biol. Chem. 276 (2001)

6591-6604 ; Lund, J.等人 , FASEB J. 9 (1995) 115-119 ; Morgan, A.等人 , Immunology 86 (1995) 319-324 ; EP 0 307 434)。本發明之抗體較佳與IgG4子類或IgG1或IgG2子類之Fc γ 受體結合有關，在S228、L234、L235及/或D265處具有突變且/或含有PVA236突變。較佳為該等突變S228P、L234A、L235A、L235E及/或PVA236(PVA236意謂來自IgG1之胺基酸位置233至236之胺基酸序列ELLG(以1字母胺基酸代碼給出)或IgG4之EFLG經PVA置換)。尤其較佳為該等突變IgG4之S228P及IgG1之L234A、L235A。

抗體之Fc部分與ADCC(抗體依賴性細胞介導型細胞毒性)及CDC(補體依賴性細胞毒性)直接有關。藉由使補體因子C1q與大多數IgG抗體子類之Fc部分結合來引發補體活化(CDC)。藉由限定蛋白-蛋白在所謂之結合部位處相互作用而引發C1q與抗體的結合。該等Fc部分結合部位為目前的先進技術所已知且例如藉由以下文獻進行描述：Lukas, T.J.等人，J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560；Brunhouse, R.及Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917；Burton, D.R.等人，Nature 288 (1980) 338-344；Thommesen, J.E.等人，Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004；Idusogie, E.E.等人，J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184；Hezareh, M.等人，J. Virol. 75 (2001) 12161-12168；Morgan, A.等人，Immunology 86 (1995) 319-324；及EP 0 307 434。該等Fc部分結合部位以(例如)胺基酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329(根據Kabat之EU

索引編號)為特徵。子類IgG1、IgG2及IgG3之抗體通常展示包括C1q及C3結合之補體活化，而IgG4並不活化補體系統且並不結合C1q及C3。

亦即，在需要ADCC及/或CDC之情況下，IgG1子類之Fc部分為較佳，在需要低ADCC及/或CDC或不需要ADCC及/或CDC之情況下，IgG4子類或經修飾/突變之IgG1子類之Fc部分為較佳。在一態樣中，本發明涉及一種結合CCR5且展示與Fc γ 受體及/或補體因子C1q之低結合性或並不結合Fc γ 受體及/或補體因子C1q的抗體。不結合Fc受體及/或補體因子C1q之抗CCR5抗體並不引發抗體依賴性細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)，而展示與Fc受體及/或補體因子C1q之低結合性之抗CCR5抗體展示低ADCC及/或CDC。該抗體之特徵較佳在於，其結合CCR5，含有源自人類來源之Fc部分且並不結合Fc受體及/或補體因子C1q或展示Fc受體及/或補體因子C1q之低結合性。該抗體更佳為人類或人類化抗體或T細胞抗原耗盡(depleted)之抗體。可根據Idusogie, E.E.等人，J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184量測C1q結合性。若在該檢定中在492-405 nm下測試抗體之光學密度(OD)低於未經修飾野生型抗體Fc部分在8 μ g/ml之抗體濃度下之人類C1q結合性之值的15%，則說明無"C1q結合性"。低"C1q結合性"處於未經修飾野生型抗體Fc部分在相同條件下之人類C1q結合性之值之15%至30%的範圍內。可將ADCC量測為抗體與人類Fc γ RIIIa於人類NK細胞上之結合性。在20 μ g/ml之抗體濃

度下測定結合性。"無Fc γ 受體結合性"或"無ADCC"意謂在20 μ g/ml之抗體濃度下與人類IgG1(SEQ ID NO: 3)相同之抗體之結合性相比與人類Fc γ RIIIa於人類NK細胞上至多30%的結合性。"低Fc γ 受體結合性"或"低ADCC"意謂與人類IgG1(SEQ ID NO: 3)相同之抗體之結合性相比與人類Fc γ RIIIa於人類NK細胞上30%至多60%的結合性。

本發明之另一態樣為一種結合CCR5以及結合Fc γ 受體及/或補體因子C1q之抗體。結合Fc受體及/或補體因子C1q之抗CCR5抗體引發抗體依賴性細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。該抗體之特徵較佳在於，其結合CCR5，含有源自人類來源之Fc部分且亦結合Fc受體及/或補體因子C1q。該抗體更佳為人類或人類化抗體或T細胞抗原耗盡之抗體。可根據Idusogie, E.E.等人，J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184量測C1q結合性。可將ADCC量測為抗體與人類Fc γ RIIIa於人類NK細胞上之結合性。在20 μ g/ml之抗體濃度下測定結合性。

此外，本發明之抗體包括該等具有"保守序列修飾"(變異體抗體)、核苷酸及胺基酸序列修飾之抗體，該等修飾並不影響或改變本發明之抗體的上述特徵。可藉由在此項技術中已知之標準技術(諸如定點突變及PCR介導型突變)引入修飾。保守胺基酸取代基包括胺基酸殘基經具有相似側鏈之胺基酸殘基置換的取代基。具有相似側鏈之胺基酸殘基家族已在此項技術中所定義。該等家族包括具有鹼性側鏈之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈

之胺基酸(例如天冬胺酸、麩胺酸)、無電荷極性側鏈之胺基酸(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈之胺基酸(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 β 支鏈側鏈之胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，在人類抗CCR5抗體中經預測之非必需胺基酸殘基可較佳經另一來自相同側鏈家族之胺基酸殘基置換。因此"變異體"抗CCR5抗體本文中係指一種在胺基酸序列上與"親本"抗CCR5抗體之胺基酸序列不同的分子，不同之處在於在親本抗體之一或多個可變區中至多10個、較佳約2個至約5個添加、缺失及/或取代。可藉由基於如由Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327及Queen, C.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033所描述之分子模型化之突變進行胺基酸取代。

本發明之另一實施例為一種製造不結合Fc γ 受體及/或C1q或展示與Fc γ 受體及/或C1q低結合性之抗CCR5抗體的方法，其特徵在於編碼與CCR5結合之人類IgG1型抗體之重鏈之核酸序列以此方式經修飾使得該經修飾抗體不結合C1q及/或Fc γ 受體或展示C1q及/或Fc γ 受體之低結合性，將該經修飾核酸及編碼該抗體之輕鏈之核酸插入表現載體中，將該載體插入真核宿主細胞中，使經編碼之蛋白表現且自宿主細胞或上清液中回收。該抗體較佳藉由"類轉換"

來修飾，亦即Fc部分之改變或突變(例如IgG1至IgG4及/或IgG1/IgG4突變)，較佳定義為IgG1v1 (PVA-236；GLPSS331)、IgG1v2 (L234A；L235A)、IgG1v3 (S228P；L235E)、IgG1x (S228P)、IgG4v1 (PVA-236)。GLPSS331意謂突變E233P、L234V、L235A、 Δ G236、A327G、A330S、P331S。

本文中將相對於序列之一致性或同源性定義為在比對序列且引入間隙(必要時)以實現最大百分數序列一致性之後候選序列中與親本序列一致之胺基酸殘基的百分數。抗體序列中無N末端、無C末端或內部延伸、缺失或插入將被視為影響序列一致性或同源性。該變異體保持結合人類CCR5之能力且較佳具有優於親本抗體之彼等特性的特性。舉例而言，該變異體可在治療期間具有低副作用。

本文中"親本"抗體為一種由用於製備變異體之胺基酸序列編碼的抗體。該親本抗體較佳具有人類構架區且(若存在)具有人類抗體恆定區或人類抗體恆定域。舉例而言，該親本抗體可為人類化或人類抗體。

較佳藉由重組方法產生本發明之抗體。該等方法為目前的先進技術中所普遍熟知且包含於原核及真核細胞中蛋白質表現，然後分離抗體多肽且通常純化至醫藥學上可接受之純度。對於蛋白質表現而言，將編碼輕鏈及重鏈之核酸或其片段藉由標準方法插入表現載體中。於適當原核或真核宿主細胞(諸如CHO細胞、BHK細胞、PER.C6®細胞NS0細胞、SP2/0細胞、HEK 293細胞、COS細胞、酵母或大腸

桿菌(*E. coli*)細胞)中進行表現且自該等細胞中(自上清液中或在細胞分解之後)回收抗體。

抗體之重組製備為目前的先進技術中所熟知且(例如)描述於以下綜論中：Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202；Geisse, S.等人，*Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282；Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160；Werner, R.G., *Arzneimittelforschung-Drug Res.* 48 (1998) 870-880。

該等抗體可以全細胞、細胞溶胞物或以部分純化或大體上純化形式存在。藉由標準技術(包括鹼/SDS處理、CsCl顯帶(banding)、管柱層析、瓊脂糖凝膠電泳及其他在此項技術中所熟知之技術)進行純化以便除去其他細胞組份或其他污染物(例如其他細胞核酸或蛋白質)。參見Ausubel, F.等人，(編)*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

NS0細胞中之表現由(例如)Barnes, L.M.等人，*Cytotechnology* 32 (2000) 109-123；Barnes, L.M.等人，*Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270描述。瞬時表現由(例如)Durocher, Y.等人，*Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9描述。可變域之選殖由Orlandi, R.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837；Carter, P.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289；Norderhaug, L.等人，*J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87描述。較佳瞬

時表現系統(HEK 293)由 Schlaeger, E.-J.及 Christensen, K. 於 Cytotechnology 30 (1999) 71-83 中且由 Schlaeger, E.-J. , 於 J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199 中描述。

藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白質 A-瓊脂糖法、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、滲析或親和性層析)以適當方式自培養基中分離單株抗體。編碼單株抗體之 DNA 及 RNA 易於使用習知程序分離且測序。融合瘤細胞可充當該 DNA 及 RNA 之來源。一旦分離後,可將 DNA 插入表現載體中,隨後將該等表現載體轉染於不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如 HEK 293 細胞、CHO 細胞或骨髓瘤細胞)中以於宿主細胞中實現重組單株抗體之合成。

藉由將適當核苷酸變化引入編碼抗體之 DNA 中或藉由肽合成來製備人類 CCR5 抗體之胺基酸序列變異體。然而,僅可在(例如)如上所述之極有限範圍內進行該等修飾。舉例而言,該等修飾並不改變上述抗體特徵,諸如 IgG 同種型及抗原決定基結合性,但可改良重組製備之產率、蛋白質穩定性或有助於純化。

任何不涉及維持抗 CCR5 抗體之合適構形之半胱胺酸殘基亦可通常經絲胺酸取代以提高分子之氧化穩定性且防止異常交聯。相反地,可將半胱胺酸鍵添加於抗體中以提高其穩定性(尤其當抗體為抗體片段,諸如 Fv 片段時)。

抗體之另一類型之胺基酸變異體改變抗體之原始糖基化模式。"改變"意謂移除一或多個可見於抗體中之醣部分及/或添加一或多個不存在於抗體中之糖基化部位。抗體之糖

基化通常為N-連接的。術語"N-連接"係指醣部分與天冬醯胺酸殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸之外之任何胺基酸)為醣部分與天冬醯胺酸側鏈酶促連接的識別序列。因此,在多肽中存在該等三肽序列中之任一者會產生潛在糖基化部位。藉由改變胺基酸序列便利地將糖基化部位添加至抗體中使得其含有上述三肽序列中之一或多者(對於N-連接糖基化部位而言)。

由此項技術中已知之多種方法製備編碼抗CCR5抗體之胺基酸序列變異體的核酸分子。該等方法包括(但不限於):自天然來源分離(在天然存在胺基酸序列變異體之情況下),或藉由早期所製備之變異體或非變異體形式之人類化抗CCR5抗體的寡核苷酸介導(或定點(site-directed))突變、PCR突變及盒式(cassette)突變來製備。

另一類型之共價修飾涉及醣苷經化學或經酶偶合至抗體。該等程序不需要在宿主細胞中產生能夠N或O連接糖基化之抗體因而有利。視所用偶合模式而定,該(等)糖可連接於(a)精胺酸及/或組胺酸;(b)游離羧基;(c)游離硫氫基,諸如半胱胺酸之硫氫基;(d)游離羥基,諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥脯胺酸之羥基;(e)芳族殘基,諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之殘基;或(f)麩醯胺酸之醯胺基。該等方法描述於WO 87/05330,及Aplin, J.D.及Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. 10 (1981) 259-306中。

可以化學方式或酶方式達成移除任何存在於抗體上之醣

部分。化學去糖基化需要使抗體暴露於化合物三氟甲烷磺酸或等效化合物。該處理導致除連接糖(N-乙醯葡萄糖胺或N-乙醯半乳糖胺)外之大多數或所有糖裂解，同時保留抗體完整性。化學去糖基化由Sojar, H.T.及Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57; Edge, A.S.等人, Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137描述。酶裂解抗體上之糖部分可藉由使用多種內糖苷酶及外糖苷酶達成，如Thotakura, N.R.及Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359所描述。

另一類型之抗體共價修飾包含以美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號、第4,179,337號中所闡明之方式將抗體連接至多種非蛋白質聚合物之一(例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚烷二醇(polyoxyalkylenes))。

本發明之重鏈及輕鏈可變域與啟動子、轉譯起始、恆定區、3'末轉譯區域、聚腺核苷酸化、及轉錄終止之序列組合形成表現載體構築體。該重鏈及輕鏈表現構築體可組合成單一載體，共轉染、連續轉染或分別轉染於宿主細胞中，隨後該等宿主細胞融合形成表現兩種鏈之單個宿主細胞。

本發明進一步包含本發明之抗體用於診斷活體外AIDS易感性的用途，其較佳藉由測定人類血漿試樣(Tsimanis, T., Immunology Letters 96 (2005) 55-61)之可溶性CCR5與本發明之抗體之間的結合性之免疫學檢定來診斷。CCR5

之表現與疾病進展具有相關性且可用於鑑別AIDS易感性之較低或較高風險個體。為達到診斷目的，該等抗體或抗原結合片段可經標記或不經標記。一般而言，診斷檢定需要偵測由抗體或抗體片段與CCR5結合所產生之複合物的形成。

在另一態樣中，本發明提供一種含有與醫藥學上可接受之載劑一起調配之一種本發明之單株抗體或單株抗體組合或其抗原結合部分的組合物(例如醫藥組合物)。

如本文中所用，"醫藥學上可接受之載劑"包括任何及所有生理上可相容之溶劑、分散介質、塗料、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收/再吸收延遲劑及其類似物。該載劑較佳適合於注射或灌注。

可由多種此項技術中已知之方法投與本發明之組合物。如由熟習此項技術者將瞭解，投藥之途徑及/或模式將視所需結果而不同。

醫藥學上可接受之載劑包括無菌水溶液或分散液及用於製備無菌可注射溶液或分散液之無菌散劑。該等介質及藥劑用於醫藥學活性物質之用途為在此項技術中所已知。除水之外，載劑可為(例如)等滲緩衝鹽水溶液。

在不考慮所選給藥途徑之情況下，藉由熟習此項技術者已知之習知方法將可以適當水合形式使用之本發明之化合物及/或本發明之醫藥組合物調配成醫藥學上可接受之劑型。

本發明之醫藥組合物中之活性成份的實際劑量可改變以

便在對特定患者無毒性之情況下獲得有效實現該患者、組合物及投藥方式所需之治療反應的活性成份之量(有效量)。所選劑量將視多種藥物代謝動力學因素而定，其包括本發明所用之特定組合物或其酯、鹽或鹽胺之活性、給藥途徑、投藥時間、所用特定化合物之排泄速率、其他與所用特定組合物組合使用之藥物、化合物及/或物質、欲治療患者之年齡、性別、體重、病狀、全身健康情況及前病史及醫學技術中所熟知之類似因素。

本發明包含本發明之抗體用於治療患有免疫抑制之患者，諸如治療患有免疫缺陷症候群(諸如 AIDS)之患者、經受會產生免疫抑制之放射治療、化療法、自體免疫疾病療法或其他藥物療法(例如皮質類固醇療法)之患者的免疫抑制，或用於治療患有 GvHD 或 HvGD 之患者(例如移植後)的用途。本發明亦包含一種治療患有該免疫抑制之患者的方法。

本發明進一步提供一種製造包含有效量之本發明之抗體以及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物的方法及本發明之抗體用於該方法的用途。本發明亦提供一種適用作藥物之本發明的抗體。亦提供一種用於治療免疫抑制性疾病之本發明的抗體。

本發明進一步提供有效量之本發明之抗體用於製造用以治療患有免疫抑制之患者之藥劑(較佳連同醫藥學上可接受之載劑)的用途。

本發明亦提供有效量之本發明之抗體用於製造用以治療

患有由CCR5所介導之發炎性介體釋放的患者之藥劑(較佳連同醫藥學上可接受之載劑)的用途。

提供下列實例及序列表以幫助理解本發明，其真實範疇於附加申請專利範圍中闡明。應瞭解在不悖離本發明之精神的情況下可對所闡明之程序進行修改。

序列描述

SEQ ID NO: 1	式I，重鏈，可變域
SEQ ID NO: 2	式II，輕鏈，可變域
SEQ ID NO: 3	γ 1重鏈恆定區
SEQ ID NO: 4	γ 4重鏈恆定區
SEQ ID NO: 5	κ 輕鏈恆定區
SEQ ID NO: 6	重鏈可變域
SEQ ID NO: 7	重鏈可變域
SEQ ID NO: 8	重鏈可變域
SEQ ID NO: 9	輕鏈可變域
SEQ ID NO: 10	輕鏈可變域

實例1

重組製備抗體

已如下構建用於表現本發明之抗體之載體。藉由在表現載體pSVgpt中將重鏈可變域連接至人類IgG1(SEQ ID NO: 3)恆定區來構建重鏈表現載體。藉由在表現載體pSVhyg中將輕鏈可變域連接至人類 κ 輕鏈(SEQ ID NO: 5)恆定區來構建輕鏈表現載體。使用載體VH-PCR1及VK-PCR1作為模板引入包括前導區信號肽、前導區內含子及鼠類免疫球蛋白

啟動子之5'側接序列及包括剪接位點及內含子序列之3'側接序列。將重鏈及輕鏈表現載體共轉染於NS0細胞(ECACC No 85110503，一種產生小鼠骨髓瘤之非免疫球蛋白)中。篩檢經轉染之細胞純系以便藉由ELISA製備人類IgG之人類抗體。

實例2

構建突變體(變異體)抗CCR5抗體之表現質體

編碼突變體抗CCR5抗體重鏈及輕鏈之表現質體係藉由使用QuickChange™定點突變套組(Stratagene)進行表現質體定點突變而產生且描述於表1中。根據EU編號系統對胺基酸進行編號(Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publication No. 91-3242 (1991))。

表1展示恆定鏈(Fc)之突變體。

表1：

同種型	縮寫	突變	描述
IgG1	IgG1v2	L234A ; L235A	人類 $\gamma 1$ -重鏈之胺基酸序列 Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ 經胺基酸序列 Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅ 置換

突變說明：L234A意謂Kabat胺基酸位置234處之白胺酸變成丙胺酸。

實例3

細胞-細胞融合檢定

在第1天時，將gp160表現性HeLa細胞(2×10^4 個細胞/50

微升/孔)接種於補充有10%(v/v)FCS及2 µg/ml多西環素(doxycycline)之DMEM培養基之白色96孔微量滴定盤中。在第2天時，將每孔100 µl上清液試樣或抗體對照添加於澄清96孔微量滴定盤中。隨後添加100 µl含有 8×10^4 個細胞於培養基中之CEM-NKr-Luc懸浮液且在37°C下培育30分鐘。自96孔滴定盤中吸出HeLa細胞培養基，添加來自200 µl抗體/CEM-NKr-Luc混合物之100 µl且在37°C下培育隔夜。在第3天時，添加100微升/孔Bright-Glo™螢光素酶檢定受質(1,4-二硫蘇糖醇及二硫亞磺酸鈉；Promega Corp., USA)且在RT下培育最少15分鐘後量測發光性。

物質：

將HeLa-R5-16細胞(一旦多西環素誘導後表現HIV gp160之細胞株)培養於含有營養素及10%(v/v)具有400 µg/ml G418及200 µg/ml勻黴素(Hygromycin)B之FCS的DMEM培養基中。

CEM.NKR-CCR5-Luc(產品目錄號：5198)為由NIH AIDS Research & Reference Reagent Program McKesson BioServices Corporation Germantown, MD 20874, USA獲得之T細胞株。細胞類型：將CEM.NKR-CCR5(產品目錄號4376)轉染(電穿孔)以在HIV-2 LTR之轉錄調控下表現螢光素酶基因且增殖於含有10%胎牛血清、4 mM麩醯胺酸、青黴素/鏈黴素及0.8 mg/ml遺傳黴素硫酸鹽(G418)之RPMI 1640中。生長特點：圓形淋巴樣細胞，形態不太可變。細胞以單個細胞形式生長於懸浮液中且可形成小塊。每週以

1:10分裂兩次。特點：在轉錄激活 HIV-2 LTR 之後表現螢光素酶活性。適合於以主要 HIV 分離株感染而用於中和及藥物敏感性檢定 (Spenlehauer, C. 等人, Virology 280 (2001) 292-300; Trkola, A. 等人, J. Virol. 73 (1999) 8966-8974)。經由來自 Drs. John Moore 及 Catherine Spenlehauer 之 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH 獲得細胞株。

Bright-Glo™ 螢光素酶檢定緩衝劑 (Promega Corp., USA, Part No E2264B)

Bright-Glo™ 螢光素酶檢定受質 (Promega Corp., USA, Part No EE26B)

結果：

該等結果呈現於表 2 中。IC₅₀ 值介於 46 與 399 ng/ml 之間。抗體之恆定區為經突變之 IgG1 (IgG1v2)。

表 2：

重鏈可變域	輕鏈可變域	IC ₅₀ [ng/ml]
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 9	108
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	399
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	46
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	152
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	132
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10	76

實例 4

以活病毒進行之抗病毒檢定

由藉由使用 Lymphoprep™ (Nycomed Pharma AG, Oslo, Norway) 進行密度梯度離心所分離之血塊黃層 (buffy coat) 製備 PBMC。將來自 4 種不同供體之細胞混合、以 PHA 刺激

1天且隨後在5 U/ml IL-2(介白素-2)存在下於含有1%(w/v)青黴素 / 鏈黴素、1% GlutaMAX™ (Invitrogen Corp., USA, 產品目錄號35050-038)、1%丙酮酸鈉、1%(w/v)非必需胺基酸及10% FBS之RPMI培養基中培養2天。

將50 μ l 100,000個PBMC (末梢血液單核細胞)添加至100 μ l抗體溶液中(連續稀釋於RPMI補充培養基中至範圍介於0.006-17.5 μ g/ml之間), 且以50 μ l體積之250 TCID₅₀(半數組織培養感染量)之NLBal (具有BaL(gp120)之env之NL4.3病毒株(Adachi, A.等人, J. Virol. 59 (1986) 284-291))或者JRCSF (O'Brien, W.A.等人, Nature 348 (1990) 69-73)感染。將混合物於CO₂恆溫箱中在37℃下培育6天。將上清液收集且隨後使用5 U/ml補充有IL-2之RPMI培養基以1:50稀釋。

藉由HIV-1 p24 ELISA (Perkin-Elmer, USA)量測p24。隨後將試樣中和且轉移至塗佈有對HIV-1 p24具有高度特異性之小鼠單株抗體的微板孔中。經固定之單株抗體捕捉HIV-1 p24。無需破壞細胞培養物試樣且將其直接添加至塗有單株抗體之微板孔中。使捕捉抗原與HIV-1 p24之經生物素化多株抗體、接著抗生蛋白鏈菌素-HRP(辣根過氧化物酶)結合物複合。藉由使用產生與被捕捉之HIV-1 p24之量成正比之黃顏色的鄰苯二胺-HCl (OPD)進行培育來偵測所得複合物。使用微板讀取器測定各微板孔之吸光率且相對於HIV-1 p24抗原標準物或標準曲線之吸光率進行校準。

結果：

為抑制 HIV 於人類 PBMC 中之生長，對於包含重鏈 (SEQ ID NO:6、7、8) 及輕鏈 (SEQ ID NO:9、10) 可變域與 IgG1 同種型之不同組合的抗 CCR5 抗體，已測定 IC_{50} 值介於 2.27 ng/ml 與 14.21 ng/ml 之間。對於該等組合， IC_{90} 值係在 9.77 ng/ml 至 74.06 ng/ml 之範圍內。

對於包含突變 IgG1 恆定區 (IgG1v2) 之抗 CCR5 抗體，已測定重鏈及輕鏈可變域之不同組合之 IC_{50} 值係在 8.22 ng/ml 至 43.11 ng/ml 之範圍內，而測定 IC_{90} 值為 51.95 ng/ml 至 311.38 ng/ml 之範圍內。

實例 5**CCR5 細胞 ELISA**

將 20,000 個重組表現 CCR5 之 CHO 細胞以每 96 孔滴定盤接種且在 37°C 下培育隔夜。此後吸出培養基且添加 40 μ l 新鮮培養基。添加 10 μ l 於培養基中經稀釋之第一抗體且在 4°C 下培育 2 小時。吸出培養基，添加 100 μ l 戊二醛 ($c=0.05\%$ 於磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS) 中) 且在室溫下培育 10 分鐘。在以 200 μ l PBS 洗滌 3 次後，添加 50 μ l 偵測抗體 (以 1:1,000 至 1:2,000 稀釋於 ELISA 阻斷緩衝液中) 且在室溫下培育 2 小時。添加 50 μ l 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺且在 7 分鐘後停止反應。在 450 nm (以 620 nm 對比) 下量測光學密度。

第一抗體：待檢驗之抗體

第二 (偵測) 抗體：綿羊抗人類 IgG- γ 特異性過氧化酶結合性抗體 (結合位點目錄 AP004)，以 1:2,000 (6 μ l/12 ml) 稀釋

於PBS 10 %阻斷緩衝液中

培養基：具有GlutaMAX™之HAM's F-12或GIBCO、10% FCS、200 µg/ml 勻徽素 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

ELISA- 阻斷緩衝液：Roche Diagnostics GmbH, Germany, #1112589，10% (v/v)水溶液，以1:10稀釋於PBS中

TMB：Roche Diagnostics GmbH, Germany, #1432559，備用溶液

結果：

CCR5細胞ELISA之結果展示，包含重鏈(SEQ ID NO:6、7、8)及輕鏈(SEQ ID NO:9、10)可變域之不同組合之抗CCR5抗體與人類CCR5的結合性在1000 ng/ml之濃度下係在2.71至3.13(OD 450/620)之範圍內。

實例6

CCR5 MAb與FcγRIIIa結合於NK細胞上之潛在性

為測定本發明之抗體結合FcγRIIIa (CD16)於自然殺傷(NK)細胞上之能力，將末梢血液單核細胞(PBMC)分離且以20 µg/ml抗體及對照抗體在存在或不存在20 µg/ml阻斷FcγRIIIa之小鼠抗體(抗CD16，純系3G8，RDI, Flanders, NJ)的情況下培育以檢驗經由FcγRIIIa之結合性。使用不結合FcγRIIIa之人類IgG2及IgG4 (結合位點)作為負對照。包括人類IgG1及IgG3 (結合位點)作為FcγRIIIa結合性之正對照。藉由使用與經FITC標記山羊F(ab)₂抗人類IgG(Fc)抗體

(Protos Immunoresearch, Burlingame, USA)組合之經PE標記小鼠抗人類CD56(NK細胞表面標記)抗體(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA)進行FACS分析偵測結合於NK細胞上之抗體。在20 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下測定最大結合性(B_{max})。對照抗體(人類IgG4)與人類IgG1之100% B_{max} 相比展示出至多30% B_{max} 。因此，"無Fc γ RIIIa結合性或無ADCC"意謂在20 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下與人類IgG1相比至多30%的 B_{max} 值。

實例7

CCR5趨化性檢定

將L1.2hCCR5細胞培養於含有10%胎牛血清、1 $\times$ 青黴素/鏈黴素、1 $\times$ 麩醯胺酸、1 $\times$ 丙酮酸鈉、1 $\times$ β -巰基乙醇及250 $\mu\text{g/ml}$ G418 (所有皆來自Invitrogen Inc., USA)之RPMI 1640中。僅在開始趨化性檢定之前，將該等細胞旋轉下來且再懸浮於趨化性緩衝液(含有0.1% BSA及10 mM HEPES之漢克氏平衡鹽溶液(Hank's Balanced Salt Solution)HBSS (Invitrogen))中。將該等細胞在 5×10^6 細胞/毫升之最終濃度下用於趨化性檢定。將該等CCR5配位體人類MIP1 α 、人類MIP1 β 或人類RANTES (R&D Systems, USA)稀釋於趨化性緩衝液中且在20 nM之最終濃度下使用。將測試抗體或適當同種型對照抗體稀釋於HBSS中。在0.5 μm 孔隙96孔ChemoTx®系統(Neuroprobe Inc., USA)中開始趨化性檢定。將各抗體與該等CCR5配位體中之一者混合且將30 μl 該混合物置於ChemoTx®系統之底部孔中。將過濾網置於

底部孔之頂部。將各抗體與L1.2hCCR5細胞混合且將20 μ l該混合物置於濾器上。隨後將該等板置於增濕腔室中且在37°C及5% CO₂下培育3小時。培育後，將該等細胞自濾器上刮掉且將該等板於桌上型離心機中在2,000 rpm下旋轉10分鐘。隨後將濾器移出且根據製造商之用法說明書使用CyQUANT®細胞增生檢定套組(Invitrogen)及Spectra MAX GeminiXS板讀取器(Molecular Devices, Wokingham, UK)偵測已遷移至底部孔中之細胞的密度。使用Prism 4(GraphPad Inc., USA)計算IC₅₀值。

人類MIP-1 α 、人類MIP-1 β 及人類RANTES對於重鏈可變域及輕鏈可變域與IgG1同種型恆定區之不同組合的IC₅₀值係分別介於0.80 nM至0.91 nM、0.72 nM至1.08 nM及0.85 nM至2.69 nM之範圍內。

在突變IgG1同種型(IgG1v2)之情況下，人類MIP-1 α 、人類MIP-1 β 及人類RANTES之IC₅₀值係分別介於2.21 nM至6.28 nM、2.16 nM至6.87 nM及3.59 nM至5.03 nM範圍內。

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
 <120> 抗 CCR5 抗體及其用途
 <130> 23961 FT
 <140> 096136004
 <141> 2007-09-27
 <150> EP 06020646.3
 <151> 2006-09-29
 <160> 10
 <170> PatentIn Version 3.2
 <210> 1
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 小鼠

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa為X01，為Lys或Gln

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa為X02，為Gln或Glu

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa為X03，為Arg或Lys

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa為X04，為Leu或Pro

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(64)
 <223> Xaa為X05，為Met或Lys

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (92)..(92)
 <223> Xaa為X06，為Ile或Thr

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (112)..(112)
 <223> Xaa為X07，為Ser或Thr

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa為X08，為Ile或Thr

<400> 1

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Xaa Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Xaa
 50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa
 100 105 110

Val Xaa Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> Xaa為X10，為Ile或Ala

<220>

<221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> Xaa為X11，為Phe或Tyr

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> Xaa為X12，為Gln或Pro

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> Xaa為X13，為Ser或Ala

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa為X14，為Gln或Lys

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa為X15，為Val或Ile

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (70)..(70)
 <223> Xaa為X16，為Gln或Asp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa為X17，為Ser或Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa為X18，為Leu或Ala

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa為X19，為Lys或Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (76)..(76)
 <223> Xaa為X20，為Asn或Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa為X21，為Leu或Ala

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (84)..(84)
 <223> Xaa為X22，為Gly或Ala

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (85)..(85)
 <223> Xaa為X23，為Asn或Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (104)..(104)
 <223> Xaa為X24，為Leu或Val

<400> 2

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Xaa His Gly Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Xaa Gln Gln Lys Xaa Gly Lys Xaa Pro Xaa Leu Leu Xaa
35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ser Xaa Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Xaa Xaa Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
85 90 95

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

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

0

•

<213> 人造

<220>

<223> 重鏈可變域

<400> 6

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 重鏈可變域

<400> 7

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 重鏈可變域

<400> 8

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 輕鏈可變域

<400> 9

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ala His Gly Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Ala Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 輕鏈可變域

<400> 10

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ala His Gly Tyr
 20 25 30

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

200821330

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Ala Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
85 90 95

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

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種與CCR5結合之抗體，其特徵在於重鏈可變域包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列且具有用於治療免疫抑制性疾病之有利特性。

六、英文發明摘要：

An antibody binding to CCR5 characterized in that the heavy chain variable domain comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, and has advantageous properties for the treatment of immunosuppressive diseases.

十、申請專利範圍：

1. 一種與 CCR5 結合之抗體，其特徵在於重鏈可變域包含

SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列：

Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu-Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser ,

其中 X01 為 Lys 或 Gln，X02 為 Gln 或 Glu，X03 為 Arg 或 Lys，X04 為 Leu 或 Pro，X05 為 Met 或 Lys，X06 為 Ile 或 Thr，X07 為 Ser 或 Thr，X08 為 Ile 或 Thr。

2. 如請求項 1 之與 CCR5 結合之抗體，其特徵在於輕鏈可變

域包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列：

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu-Ala-Trp-X11-Gln-Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-X16-Phe-X17-X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-X22-X23-Tyr-Tyr-Cys-Gln-His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-X24-Glu-Ile-Lys ,

其中 X10 為 Ile 或 Ala、X11 為 Phe 或 Tyr、X12 為 Gln 或 Pro、X13 為 Ser 或 Ala、X14 為 Gln 或 Lys、X15 為 Val 或 Ile、X16 為 Gln 或 Asp、X17 為 Ser 或 Thr、X18 為 Leu 或 Ala、X19 為 Lys 或 Thr、X20 為 Asn 或 Ser、X21 為 Leu 或 Ala、X22 為 Gly 或 Ala、X23 為 Asn 或 Thr、X24 為 Leu 或 Val。

3. 如請求項 1 或 2 之與 CCR5 結合之抗體，其特徵在於該抗體

包含一個重鏈可變域選自 SEQ ID NO: 6、7或8之重鏈可變域或其CCR5結合片段。

4. 如請求項1或2之與CCR5結合之抗體，其特徵在於該抗體包含一個輕鏈可變域選自 SEQ ID NO: 9或10之輕鏈可變域或其CCR5結合片段。
5. 如請求項3之與CCR5結合之抗體，其特徵在於該抗體包含選自 SEQ ID NO: 6、7或8之重鏈可變域或其CCR5結合片段及包含選自 SEQ ID NO: 9或10之輕鏈可變域或其CCR5結合片段，其中該等重鏈及輕鏈可變域彼此獨立選擇。
6. 如請求項1或2之與CCR5結合之抗體，其特徵在於該抗體包含人類來源之恆定區。
7. 如請求項6之與CCR5結合之抗體，其特徵在於該重鏈恆定區為人類IgG4同型(isotype)或人類IgG1同型在鉸鏈區中C_H1與C_H2之間的胺基酸位置216-240及/或在第二域間(inter-domain)區中C_H2與C_H3之間的胺基酸位置327- 331經修飾之重鏈恆定區。
8. 如請求項6之與CCR5結合之抗體，其特徵在於該抗體包含SEQ ID NO: 3或4之重鏈恆定區及包含SEQ ID NO: 5之輕鏈恆定區。
9. 如請求項6之與CCR5結合之抗體，其特徵在於該抗體為人類IgG1同型抗體且包含突變L234A及L235A，或該抗體為包含突變S228P之人類IgG4同型抗體。
10. 一種包含醫藥學上有效量之如請求項1或2之抗體的醫藥

組合物。

11. 一種製造包含醫藥學上有效量之如請求項1或2之抗體之醫藥組合物的方法。
12. 一種如請求項1或2之抗體用於製造醫藥組合物之用途。
13. 如請求項1或2之抗體，其用作藥物。
14. 如請求項1或2之抗體，其用於治療免疫抑制性疾病。
15. 一種如請求項1或2之抗體的用途，其用於製造用以治療免疫抑制性疾病之藥物。
16. 一種核酸，其編碼一種能夠與第二多肽一起裝配之多肽，其中該第二多肽包含選自SEQ ID NO: 2、5之多肽之群的多肽，及其中該多肽包含SEQ ID NO: 1、6、7或8之胺基酸序列。
17. 一種編碼與CCR5結合之抗體鏈的核酸，其特徵在於該編碼鏈能夠與一個其他抗體鏈一起裝配以產生如請求項1或2之與CCR5結合的抗體分子。
18. 一種編碼如請求項1或2之與CCR5結合之抗體的核酸。
19. 一種包含如請求項18之核酸的真核細胞。
20. 一種製造如請求項1或2之重組人類或人類化抗體的方法，其特徵在於使如請求項18之核酸於原核或真核宿主細胞中表現及自該細胞或細胞培養物上清液中回收該重組抗體。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)