



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1780907 B

(45) 授权公告日 2011.06.15

(21) 申请号 03809060.0

A61P 31/18(2006.01)

(22) 申请日 2003.02.21

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

WO 0158916 A, 2001.08.16, 全文.

10/081,128 2002.02.22 US

WO 0035409 A, 2000.06.22, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

TRKOLA 等人.Potent, broad-spectrum

2004.10.22

inhibition of human immunodeficiencyvirus
type 1 by the CCR5 monoclonal antibody

(86) PCT申请的申请数据

PRO 140. JOURNAL OF VIROLOGY75

PCT/US2003/005500 2003.02.21

2. 2001, 75(2), 579 - 588.

(87) PCT申请的公布数据

STEINBERGER P 等.Generation and

W02003/072766 EN 2003.09.04

characterization of a recombinant
humanCCR5-specific antibody.

(73) 专利权人 原基因药物有限公司

A phage display approach for

地址 美国纽约州

rabbitantibody humanization..THE

专利权人 PDL 生物制药公司

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 275

(72) 发明人 W·C·奥尔森 P·J·马东

46. 2000, 275(46), 36073-36078.

N·楚鲁西塔 P·R·欣顿

审查员 王启扬

M·瓦斯克

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 程金山

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 5/07(2010.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 33 页

序列表 6 页 附图 21 页

(54) 发明名称

抗 CCR5 抗体

(57) 摘要

本发明涉及抗 CCR5 抗体或其结合人
类细胞表面上 CCR5 的片段, 所述抗体包
含 (1) 两条轻链, 每条轻链包含质粒 pVK:
HuPR0140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 的表达
产物, 和 (2) 两条重链, 每条重链包含质粒 pVg4:
HuPR0140HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质
粒 pVg4:HuPR0140(mutB+D+I)-VH(ATCC 保藏编号
PTA-4099) 的表达产物。

1. 抗 CCR5 抗体或其结合人类细胞表面上 CCR5 的抗体片段,所述抗体由以下组成:
(i) 两条轻链,其中每条轻链由质粒 pVK:HuPR0140-VK 表达的可变区和恒定区组成,质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097,和 (ii) 两条重链,其中每条重链由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH 表达的可变区和恒定区组成,质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098,质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099,其中所述抗体片段是 Fab 片段或 $F(ab')_2$ 片段。

2. 权利要求 1 的抗 CCR5 抗体。

3. 权利要求 2 的抗 CCR5 抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

4. 权利要求 1 的抗 CCR5 抗体片段,其中所述片段是 Fab 片段。

5. 权利要求 1 的抗 CCR5 抗体片段,其中所述片段是 $F(ab')_2$ 片段。

6. 权利要求 2 的抗 CCR5 抗体,其中所述重链是由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 表达或编码的,质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098。

7. 权利要求 2 的抗 CCR5 抗体,其中所述重链是由质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH 表达或编码的,质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099。

8. 由两条轻链和两条重链组成的抗 CCR5 抗体,其中每条轻链的连续氨基酸序列在 SEQ ID NO:6 中列出,且每条重链的连续氨基酸序列在 SEQ ID NO:9 中列出。

9. 由两条轻链和两条重链组成的抗 CCR5 抗体,其中每条轻链的连续氨基酸序列在 SEQ ID NO:6 中列出,且每条重链的连续氨基酸序列在 SEQ ID NO:12 中列出。

10. 编码包含连续氨基酸的多肽的分离核酸,SEQ ID NO:6 列出了其氨基酸序列。

11. 权利要求 10 的核酸,其中所述连续氨基酸是由质粒 pVK:HuPR0140-VK 表达的氨基酸,质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097。

12. 一种分离的核酸,其序列如 SEQ ID NO:5 所列出。

13. 权利要求 10-12 中任何一项的核酸,其中所述核酸是 RNA、DNA 或 cDNA。

14. 包含权利要求 1-9 中任何一项的抗 CCR5 抗体或其 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段中的至少一种以及载体的组合物。

15. 一种包含权利要求 1-9 中任何一项的抗 -CCR5 抗体或其 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段的组合物,所述抗 -CCR5 抗体或其 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段附着于选自下组的材料:放射性同位素、毒素、聚乙二醇、细胞毒性试剂和可检测标记物。

16. 一种组合物,包含权利要求 1-9 中任何一项的抗 CCR5 抗体或其 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段中的至少一种和至少一种另外的抗 HIV-1 试剂。

17. 权利要求 16 的组合物,其中所述抗 HIV-1 试剂是非核苷逆转录酶抑制剂、核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、病毒侵入抑制剂、或其任何组合。

18. 体外抑制 CD4⁺ 细胞的 HIV-1 感染的方法,包括使 CD4⁺ 细胞接触抗 CCR5 抗体或其结合人细胞表面上 CCR5 的片段,其中所述抗体片段是 Fab 片段或 $F(ab')_2$ 片段,所述抗体由以下组成:(i) 两条轻链,其中每条轻链由质粒 pVK:HuPR0140-VK 表达的可变区和恒定区组成,质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097,和 (ii) 两条重链,其中每条重链由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140 (mutB+D+I)-VH 表达的可变区和恒定区组成,接触的数量和条件使得 HIV-1 或 HIV-1 感染细胞与 CD4⁺ 细胞的融合得到抑制,从而抑制 CD4⁺ 细胞的 HIV-1 感染,其中质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为

PTA-4098, 质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099。

19. 抗 CCR5 抗体或该抗体的片段在制备抗 HIV 药物组合物中的应用, 所述抗体由以下组成: (i) 两条轻链, 其中每条轻链由质粒 pVK:HuPR0140-VK 表达的可变区和恒定区组成, 质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097, 和 (ii) 两条重链, 其中每条重链由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140 (mutB+D+I)-VH 表达的可变区和恒定区组成, 其中质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098, 质粒 pVg4:HuPR0140 (mutB+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099, 所述抗体的片段与人细胞的表面上的 CCR5 结合, 所述抗体片段是 Fab 片段或 $F(ab')_2$ 片段。

20. 包含偶联至少一种聚合物的抗 CCR5 抗体或其结合人类细胞表面上 CCR5 的片段的抗 CCR5 抗体偶联物, 所述抗体由以下组成: (i) 两条轻链, 每条轻链由质粒 pVK:HuPR0140-VK 表达的可变区和恒定区组成, 质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097, 和 (ii) 两条重链, 每条重链由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH 表达的可变区和恒定区组成, 其中质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098, 质粒 pVg4:HuPR0140 (mutB+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099, 所述抗体片段是 Fab 片段或 $F(ab')_2$ 片段, 所述聚合物选自下组: 亲水性聚乙烯聚合物、聚烷撑醚、聚氧化烯、聚甲基丙烯酸酯、卡波姆、支链多糖、无支链多糖、糖醇聚合物、肝素和类肝素。

21. 权利要求 20 的抗 CCR5 抗体偶联物, 其中所述聚烷撑醚是聚乙二醇 (PEG)。

22. 权利要求 21 的抗 CCR5 抗体偶联物, 其中所述 PEG 具有至少 20kD 的平均分子量。

23. 权利要求 20 至 22 中任何一项的抗 CCR5 抗体偶联物, 其中所述偶联物的表观大小是至少大约 500kD。

24. 权利要求 20 至 22 中任何一项的抗 CCR5 抗体偶联物, 其中所述偶联物与未偶联抗 CCR5 抗体或其片段相比具有以下各项中的至少一项: 血清半衰期增加、平均循环停滞时间增加以及血清清除率减小。

25. 抗 CCR5 抗体偶联物在制备抗 HIV 药物组合物中的应用, 所述抗 CCR5 抗体偶联物包含偶联至少一种聚合物的抗 CCR5 抗体或其结合人类细胞表面上 CCR5 的片段, 所述抗体由以下组成: (i) 两条轻链, 其中每条轻链由质粒 pVK:HuPR0140-VK 表达的可变区和恒定区组成, 质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097, 和 (ii) 两条重链, 其中每条重链由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH 表达的可变区和恒定区组成, 其中质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098, 质粒 pVg4:HuPR0140 (mutB+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099, 所述抗体片段是 Fab 片段或 $F(ab')_2$ 片段, 所述聚合物选自下组: 亲水性聚乙烯聚合物、聚烷撑醚、聚氧化烯、聚甲基丙烯酸酯、卡波姆、支链多糖、无支链多糖、糖醇聚合物、肝素和类肝素。

26. 用至少两种载体转化的宿主细胞, 其中至少一种载体含有编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列, 且至少一种载体含有编码抗 CCR5 抗体轻链的核酸序列, 其中所述抗 CCR5 抗体由氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所列出的两条重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所列出的两条轻链组成。

27. 用至少两种载体转化的宿主细胞, 其中至少一种载体含有编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列, 且至少一种载体含有编码抗 CCR5 抗体轻链的核酸序列, 其中所述抗 CCR5 抗体由

氨基酸序列如 SEQ ID NO :12 所列出的两条重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO :6 所列出的两条轻链组成。

28. 权利要求 26 或 27 的转化宿主细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

29. 权利要求 28 的转化宿主细胞,其中所述细胞是 COS 细胞、CHO 细胞或骨髓瘤细胞。

30. 权利要求 26 或 27 的转化宿主细胞,其中所述细胞分泌抗 CCR5 抗体。

31. 权利要求 26 的转化宿主细胞,其中所述编码所述重链的载体是 pVg4:HuPR0140HG2-VH, pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098。

32. 权利要求 27 的转化宿主细胞,其中所述编码所述重链的载体是 pVg4:HuPR0140(mut B+D+I)-VH, pVg4:HuPR0140(mut B+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099。

33. 权利要求 26 或 27 的转化宿主细胞,其中所述编码所述轻链的载体是 pVK:HuPR0140-VK, pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097。

34. 权利要求 26 的转化宿主细胞,其中所述编码所述重链的载体是 pVg4:HuPR0140HG2-VH 且所述包含所述轻链的载体是 pVK:HuPR0140-VK, 其中 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098, pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097。

35. 权利要求 27 的转化宿主细胞,其中所述编码重链的载体是 pVg4:HuPR0140(mut B+D+I)-VH 且编码所述轻链的载体是 pVK:HuPR0140-VK, 其中 pVg4:HuPR0140(mut B+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099, pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097。

36. 权利要求 26 的转化宿主细胞,其中所述编码所述重链的核酸序列如 SEQ ID NO :8 所列出。

37. 权利要求 27 的转化宿主细胞,其中所述编码所述重链的核酸序列如 SEQ ID NO :11 所列出。

38. 权利要求 26 或 27 的转化宿主细胞,其中所述编码所述轻链的核酸序列如 SEQ ID NO :5 所列出。

39. 含有编码抗 CCR5 抗体轻链的氨基酸序列的载体,其中所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO :6 所列出。

40. 权利要求 39 的载体,其中所述载体是 pVK:HuPR0140-VK, pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097。

41. 用于生产抗 CCR5 抗体的方法,包括在容许生产抗体的条件下培养宿主细胞从而生产抗 CCR5 抗体,所述宿主细胞包含 (i) 质粒 pVK:HuPR0140-VK, 和 (ii) 质粒 pVg1:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg1:HuPR0140(mut B+D+I)-VH, 所述抗体由以下组成:由质粒 pVK:HuPR0140-VK 编码的两条轻链和由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140(mut B+D+I)-VH 编码的两条重链,其中质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097, 质粒 pVg1:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098, 质粒 pVg1:HuPR0140(mutB+D+I)-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099。

42. 用于生产抗 CCR5 抗体的方法,包括:

a) 用 (i) 质粒 pVK:HuPR0140-VK 和 (ii) 质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140(mutB+D+I)-VH 转化宿主细胞;和

b) 在容许生产抗体的条件下培养转化宿主细胞从而生产抗 CCR5 抗体,所述抗体由以下组成:由质粒 pVK:HuPR0140-VK 编码的两条轻链和由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 或质粒 pVg4:HuPR0140 (mutB+D+I) -VH 编码的两条重链,

其中质粒 pVK:HuPR0140-VK 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4097,质粒 pVg1:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098,质粒 pVg 1:HuPR0140 (mut B+D+I) -VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099。

43. 权利要求 41 或 42 的方法,其还包括以分离形式回收如此生产的抗 CCR5 抗体。

44. 权利要求 41 或 42 的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述哺乳动物宿主细胞是 COS 细胞、CHO 细胞或骨髓瘤细胞。

46. 权利要求 41 或 42 的方法,其中所述抗 CCR5 抗体的重链是由质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 编码的,质粒 pVg4:HuPR0140HG2-VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4098。

47. 权利要求 41 或 42 的方法,其中所述抗 CCR5 抗体的重链是由质粒 pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I) -VH 编码的,质粒 pVg4:HuPR0140 (mutB+D+I) -VH 的 ATCC 保藏编号为 PTA-4099。

48. 由权利要求 10-13 中任何一项的核酸编码的多肽。

49. 用于生产抗 CCR5 抗体的方法中的试剂盒,包含:

a) 含有编码抗 CCR5 抗体轻链的核酸序列的载体,其中所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO :6 所列出;和

b) 含有编码抗 CCR5 抗体重链的氨基酸序列的载体,其中所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO :9 所列出,或者包含编码抗 CCR5 抗体重链的氨基酸序列的载体,其中所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO :12 所列出。

抗 CCR5 抗体

[0001] 本申请是 2002 年 2 月 22 日提交的美国申请序列号 10/081,128 的部分继续申请并要求其优先权,在此将其内容结合于本申请作为参考。

[0002] 贯穿本申请,以阿拉伯数字提及了多份出版物。在紧邻权利要求之前的说明书末尾可以找到这些出版物的完整引述。在此将这些出版物的公开内容结合于本申请作为参考,从而更加完整的描述本发明所属领域。

[0003] 发明背景

[0004] 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 诱导病毒-细胞膜融合,从而能够进入靶细胞 (8, 15, 66)。病毒粒体与细胞表面之间的第一步高亲和力相互作用是病毒表面糖蛋白 gp120 结合 CD4 抗原 (13, 30, 41, 42),继而诱导 gp120 的构象变化,使之能够与几种趋化因子受体之一相互作用 (4, 5, 21, 36)。CC 趋化因子受体 CCR5 是巨噬细胞向性 (R5) 毒株的主要辅助受体 (co-receptor),并且在 HIV-1 的有性传播中发挥关键作用 (4, 5, 21, 36)。T 细胞系向性 (X4) 病毒利用 CXCR4 进入靶细胞,并且常常而非总是在疾病进展中较晚显现或者作为组织培养中病毒繁殖的结果 (4, 5, 21, 36)。有些原代 HIV-1 分离株具有双重向性 (R5X4),因为它们能够利用这两种辅助受体,尽管效率并非总是相同 (11, 57)。偶联 gp120 核晶体结构解析的诱变研究证明 gp120 上的辅助受体结合位点包含几个保守残基 (32, 53, 65)。

[0005] 已经证明 CCR5 氨基末端结构域 (Nt) 的酪氨酸和带负电残基是 gp120 结合辅助受体以及 HIV-1 融合和侵入所必需的 (6, 18, 20, 22, 28, 31, 52, 54)。CCR5 胞外环 (ECL) 1-3 中的残基不是辅助受体功能所必需的,然而,为了实现最佳病毒融合和侵入,必需维持 CCR5 结构域间构型 (24)。从而得出结论:gp120 与 ECL 的扩散表面形成相互作用,或者通过与 ECL 中残基的键合来维持 Nt 的功能构象。嵌合辅助受体与抗 CCR5 单克隆抗体的研究也显示了胞外环对病毒侵入的重要性 (5, 54, 64)。

[0006] 特异结合 CCR5 和 CXCR4 并阻断与其配体相互作用的分子是进一步探查辅助受体结构/功能相互关系的有效工具。鉴定这些化合物也有助于设计靶向由辅助受体介导的病毒侵入步骤的有效治疗剂。至今鉴定的 CCR5 或 CXCR4 辅助受体功能抑制剂在本质上是多样的,包括小分子、肽、趋化因子及其衍生物、和单克隆抗体 (mAb)。通过干预 CXCR4 辅助受体功能而阻断侵入的小分子的作用机制尚未深入理解 (17, 49, 55, 68)。这样的一种抑制剂即阴离子小分子 AMD3100 依赖 CXCR4 的 ECL2 和第四个跨膜 (TM) 结构域中的残基来抑制病毒侵入,但是尚不清楚它是通过破坏 gp120 结合 CXCR4 还是通过导致膜融合的结合后步骤来实现的 (16, 34, 55)。至今尚无报道特异阻断由 CCR5 介导的 HIV-1 侵入的小分子。趋化因子抑制 HIV-1 侵入是由至少两种不同机制介导的:gp120/辅助受体相互作用的阻断和趋化因子/受体复合物的内在化 (3, 26, 59, 63)。变体 AOP-RANTES 也抑制 CCR5 循环至细胞表面 (40, 56)。变体诸如 RANTES9-68 和 Met-RANTES 只防止 gp120/CCR5 相互作用,而并不下调 CCR5 (67)。SDF-1 变体大概通过相似机制作用而阻断由 CXCR4 介导的病毒侵入 (12, 27, 39)。只有一种抗 CXCR4 单抗即 12G5 已经鉴定了其抗病毒特性。已经报道了 12G5 抑制病毒侵入的效率既依赖细胞又依赖分离株 (43, 58)。这种单抗结合 CXCR4 的 ECL2,但是尚不知道它抑制侵入的机制 (7)。至今鉴定的少数抗 CCR5 单抗有效预防 HIV-1 侵入 (28, 64)。

有趣的是,表位位于 CCR5Nt 结构域(包含 gp120 结合位点)中的单抗抑制病毒融合和侵入的效率不如表位位于 ECL2 中的单抗 2D7。2D7 还拮抗 CC 趋化因子活性(64)。

[0007] 已经分离和鉴定了一组六种鼠单抗,命名为 PA8、PA9、PA10、PA11、PA12 和 PA14。所有六种单抗都特异结合 CCR5⁺ 细胞,但是效率不同且依赖细胞类型。表位作图研究确定了对单抗结合重要的残基,还揭示了关于折叠和 CCR5 胞外结构域相互作用的信息。所有单抗都抑制 HIV-1 融合和侵入,但是在单抗抑制融合和侵入的能力与其抑制 gp120/sCD4 结合 CCR5⁺ 细胞的能力之间没有关联。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了抗 CCR5 抗体或其结合人类细胞表面上 CCR5 的片段,所述抗体包含 (i) 两条轻链,每条轻链包含质粒 pVK :HuPRO140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 的表达产物,和 (ii) 两条重链,每条重链包含质粒 pVg4 :HuPRO140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPRO140 (mutB+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 的表达产物。

[0010] 本发明还提供了包含两条轻链和两条重链的抗 CCR5 抗体,其中每条轻链包含连续氨基酸,其氨基酸序列在 SEQ ID NO :6 中列出,每条重链包含连续氨基酸,其氨基酸序列在 SEQ ID NO :9 中列出。

[0011] 本发明还提供了包含两条轻链和两条重链的抗 CCR5 抗体,其中每条轻链包含连续氨基酸,其氨基酸序列在 SEQ ID NO :6 中列出,每条重链包含连续氨基酸,其氨基酸序列在 SEQ ID NO :12 中列出。

[0012] 本发明还提供了编码包含连续氨基酸的多肽的分离核酸,SEQ IDNO :6 列出了其氨基酸序列。在本实施方案中,核酸包含 SEQ ID NO :5 所列出的序列。

[0013] 本发明还提供了编码包含连续氨基酸的多肽的分离核酸,SEQ IDNO :9 列出了其氨基酸序列。在本实施方案中,核酸包含 SEQ ID NO :8 所列出的序列。

[0014] 本发明还提供了编码包含连续氨基酸的多肽的分离核酸,SEQ IDNO :12 列出了其氨基酸序列。在本实施方案中,核酸包含 SEQ ID NO :11 所列出的序列。

[0015] 本发明还提供了包含至少一种上文所述的抗 CCR5 抗体或其片段以及载体的组合物。

[0016] 本发明还提供了包含抗 CCR5 抗体或其片段且其附着于诸如放射性同位素、毒素、聚乙二醇、细胞毒性试剂和 / 或可检测标记物等材料的组合物。

[0017] 本发明还提供了抑制 CD4⁺ 细胞的 HIV-1 感染的方法,包括使 CD4⁺ 细胞接触抗 CCR5 抗体或其结合 CD4⁺ 细胞表面上 CCR5 的片段,这些抗体包含 (i) 两条轻链,每条轻链包含质粒 pVK :HuPRO 140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 的表达产物,和 (ii) 两条重链,每条重链包含质粒 pVg4 :HuPRO140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPRO 140 (mut B+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 的表达产物,接触的数量和条件使得 HIV-1 或 HIV-1 感染细胞与 CD4⁺ 细胞的融合得到抑制,从而抑制 CD4⁺ 细胞的 HIV-1 感染。

[0018] 本发明还提供了治疗受 HIV-1 之苦的受试者的方法,包括对受试者施用有效 HIV-1 治疗剂量的抗 CCR5 抗体或其结合人类细胞表面上 CCR5 的片段,这些抗体包含 (i) 两条轻链,每条轻链包含质粒 pVK :HuPRO140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 的表达产物,和 (ii) 两条重链,每条重链包含质粒 pVg4 :HuPRO140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPRO140 (mutB+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 的表达产物,施用的条件使得

有效治疗 HIV-1 感染受试者。

[0019] 本发明还提供了预防受试者免于感染 HIV-1 感染的方法,包括对受试者施用有效 HIV-1 感染预防剂量的抗 CCR5 抗体或其结合人类细胞表面上 CCR5 的片段,这些抗体包含 (i) 两条轻链,每条轻链包含质粒 pVK :HuPR0140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 的表达产物,和 (2) 两条重链,每条重链包含质粒 pVg4 :HuPR0140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPR0140 (mut B+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 的表达产物,施用的条件使得在受试者中有效预防 HIV-1 感染。

[0020] 本发明还提供了包含抗 CCR5 抗体或其结合人类细胞表面上 CCR5 的片段且其偶联至少一种聚合物的抗 CCR5 抗体偶联物,所述抗体包含 (i) 两条轻链,每条轻链包含质粒 pVK :HuPR0140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 的表达产物,和 (ii) 两条重链,每条重链包含质粒 pVg4 :HuPR0140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPR0140 (mutB+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 的表达产物。

[0021] 本发明还提供了抑制 HIV-1 感染 CCR5+ 细胞的方法,包括对有 HIV-1 感染风险的受试者施用上文所述偶联物,施用的数量和条件有效抑制 HIV-1 感染受试者的 CCR5+ 细胞。

[0022] 本发明还提供了治疗受试者中的 HIV-1 感染的方法,包括对 HIV-1 感染受试者施用上文所述偶联物,施用的数量和条件有效治疗受试者的 HIV-1 感染。

[0023] 本发明还提供了包含至少两种载体的转化宿主细胞,其中至少一种载体包含编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列,且至少一种载体包含编码抗 CCR5 抗体轻链的核酸序列,其中抗 CCR5 抗体包含具有 SEQ ID NO :9 所列出的氨基酸序列的两条重链和具有 SEQ ID NO :6 所列出的氨基酸序列的两条轻链。

[0024] 本发明还提供了包含至少两种载体的转化宿主细胞,其中至少一种载体包含编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列,且至少一种载体包含编码抗 CCR5 抗体轻链的核酸序列,其中抗 CCR5 抗体包含具有 SEQ ID NO :12 所列出的氨基酸序列的两条重链和具有 SEQ ID NO :6 所列出的氨基酸序列的两条轻链。

[0025] 本发明还提供了包含编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列的载体,其中重链包含 SEQ ID NO :9 所列出的氨基酸序列。

[0026] 本发明还提供了包含编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列的载体,其中重链包含 SEQ ID NO :12 所列出的氨基酸序列。

[0027] 本发明还提供了用于生产抗 CCR5 抗体的方法,包括在容许生产抗体的条件下培养宿主细胞从而生产抗 CCR5 抗体,所述宿主细胞包含 (i) 质粒 pVK :HuPR0140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097),和 (ii) 质粒 pVg4 :HuPR0140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPR0140 (mut B+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099),所述抗体包含由质粒 pVK :HuPR0140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 编码的两条轻链和由质粒 pVg4 :HuPR0140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPR0140 (mut B+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 编码的两条重链。

[0028] 本发明还提供了用于生产抗 CCR5 抗体的方法,包括:a) 用 (i) 质粒 pVK :HuPR0140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 和 (ii) 质粒 pVg4 :HuPR0140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPR0140 (mutB+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 转化宿主细胞;并 b) 在容许生产抗体的条件下培养转化宿主细胞从而生产抗 CCR5 抗体,所述抗体

包含由质粒 pVK :HuPRO140-VK(ATCC 保藏编号 PTA-4097) 编码的两条轻链和由质粒 pVg4 :HuPRO140 HG2-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4098) 或质粒 pVg4 :HuPRO140(mut B+D+I)-VH(ATCC 保藏编号 PTA-4099) 编码的两条重链。

[0029] 本发明还提供了用于生产抗 CCR5 抗体的方法中的试剂盒,包含:a) 包含编码抗 CCR5 抗体轻链的核酸序列的载体,其中轻链包含 SEQ ID NO:6 所列出的氨基酸序列;和 b) 包含编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列的载体,其中重链包含 SEQ ID NO:9 所列出的氨基酸序列,或者包含编码抗 CCR5 抗体重链的核酸序列的载体,其中重链包含 SEQ ID NO:12 所列出的氨基酸序列。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1:抗 CCR5 单克隆抗体与 CCR5⁺ 细胞的结合

[0032] 使用流式细胞计量术来检测 L1.2-CCR5⁺ 细胞和新鲜分离的 PHA/IL-2 刺激 PBMC 表面的 CCR5 蛋白质表达。将细胞与饱和浓度的每种 mAb 一起温育,并用 PE 标记的抗小鼠 IgG 报道抗体进行检测。显示了来自代表性实验的结果。每种 mAb 的结果表述成平均荧光强度(m. f. i.)和选通细胞%两种形式。由于 PA8-PA12 及 PA14 都属于 IgG1 亚类,因此可以直接比较它们的 m. f. i.。2D7 属于 IgG2a。

[0033] 图 2:不同 mAb 与病毒抑制剂组合的 CI 值

[0034] 对病毒侵入抑制剂的不同组合进行像图 7 图例中所描述的实验。测试抗 CCR5 mAb 彼此、与 CC 趋化因子、和 CD4-IgG2(抑制 HIV-1 附着于靶细胞)的组合。PA11 和 PA12 浓度范围为 0-250 μ g/ml;2D7 和 PA14 浓度范围为 0-25 μ g/ml;RANTES 浓度范围为 0-250ng/ml;CD4-IgG2 浓度范围为 0-25 μ g/ml。在数量上比较产生 50%和 90%融合或侵入抑制所需要的单一试剂或其混合物的浓度即称为联合指数(Combination Index, CI)的术语。

[0035] 图 3:抗 CCR5mAb 抑制细胞-细胞融合、病毒侵入和 gp120/sCD4 结合的 IC₅₀ 值

[0036] 出于比较目的,我们总结了在测试抗 CCR5 mAb 的不同测定中获得的 IC₅₀ 值。只对能够抑制>90%融合、侵入或结合的 mAb 计算 IC₅₀ 值。

[0037] 图 4:抗 CCR5 mAb 的表位制图

[0038] 将双色染色方案用于评估 mAb 与 C 末端以 HA 肽标记的突变体 CCR5 蛋白质的结合。将表达 CCR5 点突变体的 HeLa 细胞与饱和浓度的每种 mAb 一起温育,随后检测经 PE 标记的抗小鼠 IgG。通过用 FITC 标记抗 HA mAb 双重染色细胞来测量细胞表面的辅助受体表达。四个栅格对应于 CCR5 的四个胞外结构域。每个栅格的第一行指示相应 CCR5 胞外结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:1-4)。抗 CCR5 mAb 与每个残基的丙氨酸突变体的结合表述成与野生型 CCR5 结合的百分比,正如测量和方法中所述。

[0039] 图 5:抗 CCR5 mAb 对进入 CCR5⁺ 细胞的钙转移的抑制

[0040] 将 L1.2-CCR5⁺ 细胞加载吡啶-1AM 继而用抗 CCR5 mAb 或 PBS 进行刺激,随后是 RANTES(a)。使用分光荧光计测量荧光变化,追踪(tracing)来自代表性实验。对 PA14 和 2D7 测试广泛 mAb 浓度的钙流抑制(b)。将结果绘图钙流抑制%=[1-(存在 mAb 时的相对荧光÷不含 mAb 时的相对荧光)]x100%,并由三次独立试验取平均值。

[0041] 图 6:CCR5 mAb 对 CCR5 辅助受体功能的抑制

[0042] 在 RET 测定法中测试抗 CCR5 mAb 对细胞-细胞融合的抑制(a)。将 0-250 μ g/ml PA8-PA12 或 0-25 μ g/ml PA14 或 2D7 加到分别经 F18 和 R18 标记的 HeLa-EnV_{JR-FL}⁺ 细胞与 PM1

细胞混合物中。温育 4 小时后测量荧光 RET。结果是来自三次独立试验的平均值,并表述成融合抑制% = $[1 - (\text{存在 mAb 时的 \% RET} \div \text{不含 mAb 时的 \% RET})] \times 100\%$ 。在单轮基于复制荧光素酶的侵入测定法中测试抗 CCR5 mAb 对 HIV-1 侵入的抑制 (b)。在存在 0-250 $\mu\text{g/ml}$ PA8-PA12 或 0-25 $\mu\text{g/ml}$ PA14 或 2D7 时用携带 JR-FL 包膜的 NLluc⁺env⁻ 报道病毒感染 U87-CD4⁺CCR5⁺ 细胞。感染后 72 小时测量细胞裂解物中的荧光素酶活性 (相对光单位, r. l. u.)。结果来自代表性试验,并表述成侵入抑制% = $[1 - (\text{存在 mAb 时的 r. l. u.} \div \text{不含 mAb 时的 r. l. u.})] \times 100\%$ 。生物素化 [b]gp120、sCD4 和 b-gp120-CD4 复合物与 L1.2-CCR5⁺ 细胞的结合 (c)。当衍生自 R5 病毒 HIV-1_{JR-FL} 的 gp120 与等摩尔量的 sCD4 复合时观察到强结合。在不含 sCD4 或衍生自 X4 病毒 HIV-1_{LAI} 的 gp120 时没有观察到结合。由所有曲线扣除 CCR5-L.1.2 细胞的背景结合。测试存在不同浓度每种抗体时对 gp120/sCD4 结合 L1.2-CCR5⁺ 细胞的抑制 (d)。在 96 孔板中将细胞与抗 CCR5 mAb 一起预温育,随后与饱和浓度的生物素化 gp120/sCD4 一起温育。最后,使用荧光读板器测量 PE 标记链霉亲和素与细胞的结合。结果来自代表性试验,并表述成 gp120/sCD4 结合抑制百分比 = $[1 - (\text{存在 mAb 时的 m. f. i.} \div \text{不含 mAb 时的 m. f. i.})] \times 100\%$ 。

[0043] 图 7:PA12 和 2D7 对细胞-细胞融合的协同抑制

[0044] 获得了 mAb 单独和联合使用时的剂量应答曲线。将 0-50 $\mu\text{g/ml}$ PA12、0-25 $\mu\text{g/ml}$ 2D7、或这两种抗体的 2 : 1 比例联合加到分别经 R18 和 F18 标记的 HeLa-Env_{JR-FL}⁺ 细胞与 PM1 细胞混合物中。温育 4 小时后测量荧光 RET。结果表述成融合抑制百分比,而且是三次独立试验的平均值。使用中值效应 (median effect) 原理分析数据,所述原理可以表述成:

$$[0045] \quad f = 1/[1+(K/c)^m] \quad (1)$$

[0046] 其中 f 是受到影响/抑制的分数, c 是浓度, K 是产生中值效应所需要的试剂浓度,而 m 是描述剂量应答曲线形状的经验系数。方程 (1) 是描述 Michaelis-Menton 酶促动力学、Langmuir 吸收等温线、和 Henderson-Hasselbalch 电离平衡的方程的广义形式,其中 m = 1。在目前的情况中, K 等于 IC₅₀ 值。通过拟合曲线的剂量应答曲线测定 K 和 m, 并重排方程 (1) 以计算指定 f 的 c。K 和 c 的最佳拟合参数是 8.8 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.54 (对于 PA12 而言)、0.36 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.68 (对于 2D7 而言)、以及 0.11 $\mu\text{g/ml}$ 和 1.1 (对于它们的联合而言)。将这些曲线绘图,并指示实验与理论之间的合理吻合度。

[0047] 图 8:

[0048] 依照本发明,此图显示了人源化形式小鼠抗 CCR5 抗体 PA14 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6) 以及编码其的核酸序列 (SEQ ID NO:5)。SEQ ID NO:7 鉴定了 SEQ ID NO:5 中编码 SEQ ID NO:6 所列出的氨基酸序列的区域。此轻链可变区存在于本文称为 PRO 140#1 和 #2 的抗体中。互补决定区 (“CDR”) 标有下划线。

[0049] 图 9:

[0050] 依照本发明,此图显示了人源化形式小鼠抗 CCR5 抗体 PA14 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9) 以及编码其的核酸序列 (SEQ ID NO:8)。SEQ ID NO:10 鉴定了 SEQ ID NO:8 中编码 SEQ ID NO:9 所列出的氨基酸序列的区域。此轻链可变区存在于本文称为 PRO 140#2 的抗体中。CDR 标有下划线。

[0051] 图 10:

[0052] 依照本发明,此图显示了人源化形式小鼠抗 CCR5 抗体 PA14 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12) 以及编码其的核酸序列 (SEQ ID NO:11)。SEQ ID NO:13 鉴定了 SEQ ID NO:11 中编码 SEQ ID NO:12 所列出的氨基酸序列的区域。此轻链可变区存在于本文称为 PRO 140#1 的抗体中。CDR 标有下划线。

[0053] 图 11:有效减少体内病毒负荷的单剂量人源化 CCR5 抗体

[0054] 用正常人 PBMC 重建 SCID 小鼠,并感染 HIV-1_{JR-CSF}。在达到病毒稳定状态时,用单剂 1 毫克 i. p. 剂量的人源化 CCR5 抗体 (PRO 140) 或同种型对照抗体处理动物,并监测血浆 HIV RNA (Roche Amplicor Assay)。

[0055] 图 12:病毒负荷的持续减少

[0056] 用正常人 PBMC 重建 SCID 小鼠,并感染 HIV-1_{JR-CSF}。在达到病毒稳定状态时,每三天用 0.1mg 剂量的人源化 CCR5 抗体 (PRO 140) i. p. 处理动物,并监测血浆 HIV RNA (Roche Amplicor Assay)。

[0057] 图 13:

[0058] 在使用依照本发明制备的 CCR5 抗体 (PRO 140) 时展示没有淋巴细胞损耗。

[0059] 图 14:有效阻断由 CCR5 介导的 HIV-1 细胞-细胞融合的人源化 CCR5 抗体 (PRO 140)

[0060] 使用互补决定区 (CDR) 移植和框架替代方法人源化鼠 CCR5 抗体。在 Sp2/0 细胞中表达人源化 CCR5 抗体 (PRO 140#1 和 PRO 140#2),通过蛋白 A 层析进行纯化,并如 Litwin 等, J. Virol., 70:6437, 1996 中所述测试阻断由 HIV-1_{JR-FL} env 介导的膜融合复制的能力。

[0061] 图 15:人源化 CCR5 抗体 (PRO 140) 介导有效的、不依赖亚型的 HIV-1 抑制

[0062] 如 Trkola 等, J. Virol., 72:396, 1998 中所述对依照本发明的 CCR5 抗体 (PRO 140#1 和 #2) 测试阻断野生型 HIV-1 在外周血单核细胞 (PBMC) 中复制的能力。通过测定 7 天 PBMC 培养物上清液中的 p24 抗原含量来测量病毒复制程度。

[0063] 原含量来测量病毒复制程度。

[0064] 图 16:

[0065] 此图提供了编码图 8 中所示轻链可变区以及 Co 等, J. Immunol., 148:1149, 1992 中所述人 κ 恒定区的质粒 pVK-HuPRO140 的图谱。

[0066] 图 17:

[0067] 此图提供了编码图 9 中所示重链可变区以及如 He 等, J. Immunol. 160:1029 (1998) 所述,人 IgG4 的人重链恒定区、CH1、铰链、CH2、和 CH3 的质粒 pVg4-HuPRO140HG2 的图谱。

[0068] 图 18:

[0069] 此图提供了编码图 10 中所示重链可变区以及如 He 等, J. Immunol. 160:1029 (1998) 所述,人 IgG4 的人重链恒定区、CH1、铰链、CH2、和 CH3 的质粒 pVg4-HuPRO140 (mutB+D+I) 的图谱。

[0070] 图 19:HuPRO140 阻断 HIV-1 而非 RANTES 信号

[0071] 对依照本发明的 PRO140 抗体测试在 L1. 2-CCR5 细胞中阻断由 RANTES 诱导的钙转移的能力 (Olson 等人, J. Virol., 72:396, 1998)。此图显示了人源化 CCR5 抗体 (huPRO140) 阻断 HIV-1 而非 RANTES 信号。

[0072] 发明详述

[0073] 分别命名为 HuPRO140-VK、HuPRO140 (mut+B+D+I)-VH 和 HuPRO140 HG2-VH 且在图 16、18 和 17 中称为 pVK-HuPRO140、pVg4-HuPRO140 (mut B+D+I)-VH 和 pVg4-HuPRO140 HG2 的质粒于 2002 年 2 月 22 日保藏于美国弗吉尼亚州马纳萨斯 (20108) 的美国典型培养物收藏中心 (American Type Culture Collection), ATCC 编号分别为 PTA4097、PTA4099 和 PTA4098。这些保藏物遵循布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 关于出于专利程序目的的微生物保藏物的国际公认的条款。

[0074] 本发明提供了用于抑制 HIV-1 感染的组合物, 所述组合物包含对于抑制 HIV-1 感染而言协同有效量的至少两种化合物, 其中至少一种化合物预防 HIV-1 与 HIV-1 融合辅助受体之间的生产性相互作用。

[0075] 在用于本文时, “组合物” 指混合物。组合物包括但不限于那些适合于口服、直肠、阴道内、局部、鼻腔、视网膜、或肠胃外施用于受试者的组合物。在用于本文时, “肠胃外” 包括但不限于皮下、静脉内、肌内、或膜内注射或输注技术。

[0076] 在用于本文时, “HIV-1” 指 1 型人类免疫缺陷病毒。HIV-1 包括但不限于胞外病毒颗粒和在 HIV-1 感染细胞中找到的 HIV-1 形式。

[0077] 在用于本文时, “HIV-1 感染” 指将 HIV-1 遗传信息导入靶细胞, 诸如通过靶细胞膜与 HIV-1 或 HIV-1 包膜糖蛋白⁺细胞的融合。靶细胞可以是受试者的体细胞。在优选实施方案中, 靶细胞是来自人类受试者的体细胞。

[0078] 在用于本文时, “抑制 HIV-1 感染” 指与不使用所述组合物时导入的量相比导入靶细胞群的 HIV-1 遗传信息的量得到减少。

[0079] 在用于本文时, “化合物” 指分子实体, 包括但不限于肽、多肽、和其它有机或无机分子及其组合。

[0080] 在用于本文时, “协同有效” 指化合物联合使用时的联合效应大于它们分别使用时的效果的总和。

[0081] 在用于本文时, “生产性相互作用” 指 HIV-1 与 HIV-1 辅助受体的相互作用将导致所述 HIV-1 或 HIV-1 包膜糖蛋白⁺细胞与含有辅助受体的膜的融合。

[0082] 在用于本文时, “预防生产性相互作用” 指与不使用化合物时存在的量相比相互作用的量得到了降低。可以通过掩饰或改变辅助受体或 HIV-1 上的相互作用区域或者通过改变辅助受体的表达、聚集、构象、或联合状态来预防相互作用。

[0083] 在用于本文时, “HIV-1 融合辅助受体” 指介导表达受体的靶细胞与 HIV-1 或 HIV-1 包膜糖蛋白⁺细胞之间融合的细胞受体。HIV-1 融合辅助受体包括但不限于 CCR5、CXCR4 和其它趋化因子受体。

[0084] 本发明还提供了抑制 HIV-1 或 HIV-1 包膜糖蛋白⁺细胞与靶细胞融合的组合物, 所述组合物包含对于抑制 HIV-1 或 HIV-1 包膜糖蛋白⁺细胞与靶细胞融合而言协同有效量的至少两种化合物, 其中至少一种化合物预防 HIV-1 与 HIV-1 融合辅助受体之间的生产性相互作用。

[0085] 在用于本文时, “融合” 指在哺乳动物细胞或诸如 HIV-1 的病毒上发现的脂双层膜的连接或联合。该过程不同于 HIV-1 附着于靶细胞。附着是由 HIV-1 外部糖蛋白结合人 CD4 受体 (并非融合辅助受体) 介导的。

[0086] 在用于本文时, “抑制” 指与不使用组合物时存在的量相比量得到了降低。

[0087] 在用于本文时,“靶细胞”指能够被 HIV-1 或 HIV-1 感染细胞感染或融合的细胞。

[0088] 在用于本文时,“趋化因子”指能够刺激白细胞运动的细胞因子。根据两个氨基末端半胱氨酸残基是直接毗邻或是由一个氨基酸分开,它们可以表征为 cys-cys 或 cys-X-cys。它包括但不限于 RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、SDF-1 或阻断 HIV-1 感染的另一种趋化因子。

[0089] 在上述组合物的一个实施方案中,辅助受体是趋化因子受体。在上述组合物的优选实施方案中,趋化因子受体是 CCR5 或 CXCR4。已知发挥 HIV 辅助受体功能的其它几种趋化因子和相关受体包括但不限于 CCR2、CCR3、CCR8、STRL33、GPR-15、CX3CR1 和 APJ (69)。

[0090] 在用于本文时,“趋化因子受体”指结合趋化因子的七个跨膜细胞表面蛋白同源家族的成员。

[0091] 在用于本文时,“CCR5”指结合趋化因子 C-C 组的成员且其氨基酸序列包含 Genbank 编号 1705896 所提供的氨基酸序列的趋化因子受体及其相关多态性变体。

[0092] 在用于本文时,“CXCR4”指结合趋化因子 C-X-C 组的成员且其氨基酸序列包含 Genbank 编号 400654 所提供的氨基酸序列的趋化因子受体及其相关多态性变体。

[0093] 在上述组合物的一个实施方案中,至少一种化合物是非肽分子。在一个实施方案中,非肽分子是双磺酸钠 (bicyclam) 化合物 AMD3100 (16)。

[0094] 在用于本文时,“非肽分子”指不是完全由通过肽键相连的氨基酸线性序列构成的分子。然而,非肽分子可以包含一个或多个肽键。

[0095] 在上述组合物的一个实施方案中,至少一种化合物是抗体。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体。在另一个实施方案中,抗体是抗趋化因子受体抗体。在一个实施方案中,抗体是抗 CXCR4 抗体。在另一个实施方案中,抗 CXCR4 抗体是 12G5 (43)。在一个优选实施方案中,抗体是抗 CCR5 抗体。抗 CCR5 抗体包括但不限于 PA8、PA9、PA10、PA11、PA12、PA14 和 2D7。在此组合物中,化合物处于适当比例中。比例范围是 1 : 1 至 1000 : 1。

[0096] 单克隆抗体 PA8、PA9、PA10、PA11、PA12 和 PA14 于 1998 年 12 月 2 日保藏于美国弗吉尼亚州马纳萨斯大学大道 10801 号 (20110-2209) 的美国典型培养物收藏中心 (American Type Culture Collection), ATCC 编号分别为: ATCC 编号 HB-12605 (PA8)、ATCC 编号 HB-12606 (PA9)、ATCC 编号 HB-12607 (PA10)、ATCC 编号 HB-12608 (PA11)、ATCC 编号 HB-12609 (PA12) 和 ATCC 编号 HB-12610 (PA14), 保藏遵循且满足布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 关于出于专利程序目的的微生物保藏物的国际公认的要求。

[0097] 在上述组合物的另一个实施方案中,两种或多种化合物是抗体。在本发明的一个实施方案中,抗体包括但不限于 PA8、PA9、PA10、PA11、PA12、PA14 和 2D7。在此组合物中,抗体处于适当比例中。比例范围是 1 : 1 至 50 : 1。

[0098] 在用于本文时,“抗体”指包含两条重链和两条轻链并识别抗原的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白分子可以衍生自任何普遍知道的类型,包括但不限于 IgA、分泌性 IgA、IgG 和 IgM。IgG 亚类同样是本领域众所周知的,包括但不限于人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。作为例示,它包括天然发生的和非天然发生的两类抗体。具体而言,“抗体”包括多克隆和单克隆抗体及其单价和双价片段。另外,“抗体”包括嵌合抗体、完全合成的抗体、单链抗体及其片段。任选的是,可以用可检测标记物标记抗体。例如,可检测标记物包括放射性或荧光标记物。抗体可以是人的或非人的抗体。可以通过重组法将非人抗体人源化以降低其在人体

内的免疫原性。本领域技术人员知道用于人源化抗体的方法。

[0099] 在用于本文时,“单克隆抗体”也称为 mAb,用于描述一级序列基本上相同且展示相同抗原特异性的抗体分子。可以通过杂交瘤、重组、转基因或本领域技术人员知道的其它技术来生产单克隆抗体。

[0100] 在用于本文时,“抗趋化因子受体抗体”指识别并结合趋化因子受体上的表位的抗体。在用于本文时,“抗 CCR5 抗体”指识别并结合 CCR5 趋化因子受体上的表位的单克隆抗体。

[0101] 在用于本文时,“适当比例”指协同有效的化合物的质量或摩尔比例。

[0102] 在上述组合物的一个实施方案中,至少一种化合物是趋化因子或趋化因子衍生物。趋化因子包括但不限于 RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、SDF-1 或其组合。在此组合物中,化合物处于适当比例中。趋化因子衍生物包括但不限于 Met-RANTES、AOP-RANTES、RANTES 9-68 或其组合。

[0103] 在用于本文时,“趋化因子衍生物”指经过化学修饰的趋化因子。化学修饰包括但不限于氨基酸替代、添加或删除、非肽添加或氧化。本领域技术人员将能够生产这些衍生物。

[0104] 在上述组合物的另一个实施方案中,至少一种化合物是抗体且至少一种化合物是趋化因子或趋化因子衍生物。在此组合物中,化合物处于适当比例中。比例范围是 100 : 1 至 1000 : 1。

[0105] 在上述组合物的另一个实施方案中,至少一种化合物结合 HIV-1 包膜糖蛋白的 gp41 亚基。在一个实施方案中,至少一种化合物是 HIV-1 侵入的 T-20 肽抑制剂 (70)。

[0106] 在上述组合物的另一个实施方案中,至少一种化合物抑制 HIV-1 附着于靶细胞。在一个实施方案中,至少一种化合物结合 CD4。在一个实施方案中,至少一种化合物是 HIV-1 包膜糖蛋白。在一个实施方案中,至少一种化合物是抗 CD4 抗体。在一个实施方案中,至少一种化合物结合 HIV-1 包膜糖蛋白。在一个实施方案中,至少一种化合物是针对 HIV-1 包膜糖蛋白的抗体。在一个实施方案中,至少一种化合物是基于 CD4 的蛋白质。在一个实施方案中,至少一种化合物是 CD4-IgG2。

[0107] 在上述组合物的另一个实施方案中,至少一种化合物是抗体且至少一种化合物结合 HIV-1 包膜糖蛋白。在一个实施方案中,化合物是基于 CD4 的蛋白质。在一个实施方案中,化合物是 CD4-IgG2。在此组合物中,化合物处于适当比例中。比例范围是 1 : 1 至 10 : 1。

[0108] 在用于本文时,“附着”指由 HIV-1 包膜糖蛋白结合人 CD4 受体 (并非融合辅助受体) 介导的过程。

[0109] 在用于本文时,“CD4”指包含一个胞质结构域、一个疏水跨膜结构域和一个结合 HIV-1 gp120 包膜糖蛋白的胞外结构域的成熟、天然、膜结合的 CD4 蛋白质。

[0110] 在用于本文时,“HIV-1 包膜糖蛋白”指包含 gp120 表面蛋白、gp41 跨膜蛋白及其寡聚物和前体的 HIV-1 编码蛋白质。

[0111] 在用于本文时,“基于 CD4 的蛋白质”指包含对应于 CD4 中 CD4 与 HIV-1 gp120 包膜糖蛋白形成复合物所必需的那部分的至少一段氨基酸残基序列的任何蛋白质。

[0112] 在用于本文时,“CD4-IgG2”指由以 ATCC 编号 75193 和 75194 保藏的表达载体编

码的 CD4 与人 IgG2 融合蛋白异四聚物。

[0113] 在上述组物的一个实施方案中,至少一种化合物包含结合 CCR5 表位的多肽。在一个实施方案中,表位位于 N 末端、三个胞外环区域之一或其组合。在一个实施方案中,表位位于 N 末端。表位可以包含 N 末端的 N13 和 Y15。表位可以包含 N 末端的 Q4。在另一个实施方案中,表位包含 N 末端和第二个胞外环中的残基。表位可以包含 N 末端的 D2、Y3、Q4、S7、P8 和 N13 以及第二个胞外环的 Y176 和 T177。表位可以包含 N 末端的 D2、Y3、Q4、P8 和 N13 以及第二个胞外环的 Y176 和 T177。表位可以包含 N 末端的 D2 以及第二个胞外环的 R168 和 Y176。在一个实施方案中,表位位于第二个胞外环。表位可以包含第二个胞外环的 Q170 和 K171。表位可以包含第二个胞外环的 Q170 和 E172。

[0114] 在用于本文时,贯穿说明书全文使用下列标准缩写来指示特定氨基酸:

[0115] A = ala = 丙氨酸 R = arg = 精氨酸

[0116] N = asn = 天冬酰胺 D = asp = 天冬氨酸

[0117] C = cys = 半胱氨酸 Q = gln = 谷氨酰胺

[0118] E = glu = 谷氨酸 G = gly = 甘氨酸

[0119] H = his = 组氨酸 I = ile = 异亮氨酸

[0120] L = leu = 亮氨酸 K = lys = 赖氨酸

[0121] M = met = 甲硫氨酸 F = phe = 苯丙氨酸

[0122] P = pro = 脯氨酸 S = ser = 丝氨酸

[0123] T = thr = 苏氨酸 W = trp = 色氨酸

[0124] Y = tyr = 酪氨酸 V = val = 缬氨酸

[0125] 在用于本文时,“多肽”指通过肽键相连的两个或多个氨基酸。

[0126] 在用于本文时,“表位”指分子中形成结合抗体或其它化合物的表面的那部分。表位可以包含连续或不连续的氨基酸、碳水化合物或其它非肽部分或寡聚物特异表面。

[0127] 在用于本文时,“N 末端”指横跨起始甲硫氨酸和第一个跨膜区的氨基酸序列。

[0128] 在用于本文时,“第二个胞外环”指横跨第四个和第五个跨膜区且位于表面的氨基酸序列。

[0129] 在上述组物的一个实施方案中,至少一种化合物包含抗体的轻链。在上述组物的另一个实施方案中,至少一种化合物包含抗体的重链。在上述组物的另一个实施方案中,至少一种化合物包含抗体的 Fab 片段。在上述组物的另一个实施方案中,至少一种化合物包含抗体的可变结构域。在另一个实施方案中,抗体是作为单一多肽或“单链”抗体生产的,它包含经间隔氨基酸序列遗传连锁的重链和轻链可变结构域。在上述组物的另一个实施方案中,至少一种化合物包含抗体的一个或多个 CDR 片段。

[0130] 在用于本文时,“重链”指抗体分子中由一个可变结构域 (VH) 和三个或四个恒定结构域 (CH1、CH2、CH3、和 CH4) 构成的较大多肽或其片段。

[0131] 在用于本文时,“轻链”指抗体分子中由一个可变结构域 (VL) 和一个恒定结构域 (CL) 构成的较小多肽或其片段。

[0132] 在用于本文时,“Fab”指免疫球蛋白中由一条轻链和一条重链的一部分构成的单价抗原结合片段。它可以通过简单的木瓜蛋白酶消化或者通过重组法来获得。

[0133] 在用于本文时,“F(ab')₂”指免疫球蛋白中由两条轻链和两条重链的一部分构成

的二价抗原结合片段。它可以通过简单的胃蛋白酶消化或重组法来获得。

[0134] 在用于本文时,“CDR”或“互补决定区”指抗体可变结构域中高度可变的氨基酸序列。

[0135] 本发明提供了上述组合物和药用载体。药用载体对于本领域技术人员而言是众所周知的。这些药用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。非水性溶剂的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如 橄榄油、和可注射有机酯诸如油酸乙酯。水性载体包括水、乙醇 / 水性溶液、乳状液或悬浮液、盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、Ringer 氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化 Ringer 氏或不挥发性油。静脉内载体包括流体和营养补充物、电解质补充物诸如基于 Ringer 氏右旋糖的补充物、诸如此类。还可以存在防腐剂和/或其它添加剂,诸如例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体、诸如此类。

[0136] 本发明提供了治疗受 HIV-1 之苦的受试者的方法,包括对受试者施用有效剂量的上述组合物。

[0137] 在用于本文时,“受试者”指能够遭受 HIV-1 感染的任何动物或经过人工修饰的动物。经过人工修饰的动物包括但不限于具有人类免疫系统的 SCID 小鼠。动物包括但不限于小鼠、大鼠、狗、豚鼠、雪貂、兔、和灵长类动物。在优选实施方案中,受试者是人。

[0138] 在用于本文时,“治疗”指减缓、终止或逆转 HIV-1 病症的进展。在优选实施方案中,“治疗”指将进展逆转至消除病症的点。在用于本文时,“治疗”也指减少病毒感染的数目、减少感染性病毒颗粒的数目、减少病毒感染细胞的数目、或改善与 HIV-1 有关的症状。

[0139] 在用于本文时,“受 HIV-1 之苦”指受试者具有至少一个已经受到 HIV-1 感染的细胞。

[0140] 在用于本文时,“施用”可以使用本领域技术人员知道的任何方法来实现和进行。所述方法可以包括静脉内、肌肉内或皮下途径。

[0141] 本发明组合物的剂量将根据受试者和所用具体施用途径而变化。剂量范围可以是 0.1-100,000 μ g/kg。可以根据组合物连续传递剂量,诸如通过连续泵,或者以定期间隔传递剂量。例如,在一个或多个分开的情形传递剂量。本领域技术人员无需过度试验就可以确定多剂量特定组合物的期望时间间隔。

[0142] 在用于本文时,“有效剂量”指足以治疗受试者或预防受试者免于 HIV-1 感染的数量。本领域普通技术人员能够进行简单的滴定实验来确定治疗受试者所需要的数量。

[0143] 本发明提供了预防受试者免于感染 HIV-1 的方法,包括对受试者施用有效剂量的上述组合物。

[0144] 在用于本文时,“感染 HIV-1”指受到 HIV-1 感染,其遗传信息在宿主细胞中复制和/或掺入。

[0145] 本发明提供了抗 CCR5 单克隆抗体。所述抗体包括但不限于:PA8(ATCC 登记号 HB-12605)、PA9(ATCC 登记号 HB-12606)、PA10(ATCC 登记号 HB-12607)、PA11(ATCC 登记号 HB-12608)、PA12(ATCC 登记号 HB-12609) 和 PA14(ATCC 登记号 HB-12610)。

[0146] 本发明提供了上述抗体的人源化形式。

[0147] 在用于本文时,“人源化”描述了其中 CDR 区域外的一些、大多数或所有氨基酸被衍生自人免疫球蛋白分子的对应氨基酸替代的抗体。在人源化形式抗体的一个实施方案中,CDR 区域外的一些、大多数或所有氨基酸已经被来自人免疫球蛋白分子的氨基酸替代,但是

一个或多个 CDR 区域内的一些、大多数或所有氨基酸未曾改变。小型氨基酸添加、删除、插入、替代或修饰是允许的,只要它们不会消除抗体结合指定抗原的能力。合适的人免疫球蛋白分子将包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgM 分子。“人源化”抗体将保留与原始抗体相似的抗原特异性,即本发明中的结合 CCR5 的能力。

[0148] 本领域技术人员将知道如何生产本发明的人源化抗体。多种出版物(由此将其中一些结合于本申请作为参考)也描述了如何生产人源化抗体。例如,美国专利号 4,816,567(71)中描述的方法包括生产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。

[0149] 美国专利号 5,225,539(72)描述了用于生产人源化抗体的另一种方法。此专利描述了重组 DNA 技术用于生产人源化抗体的用法,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另一种免疫球蛋白的 CDR 替代,使得人源化抗体将识别期望靶而不会以显著地方式被人类受试者的免疫系统所识别。具体而言,将定点诱变用于将 CDR 移植到框架上。

[0150] 用于人源化抗体的其它方法描述于美国专利号 5,585,089(73)和 5,693,761(74)以及 WO 90/07861,它们描述了用于生产人源化免疫球蛋白的方法。这些人源化抗体具有来自供体免疫球蛋白的一个或多个 CDR 和可能的额外氨基酸以及来自受体人免疫球蛋白的框架区。这些专利描述了用于提高抗体对期望抗原的亲合力的方法。框架中的有些氨基酸选择与供体中而非受体中那些位置的氨基酸相同。具体而言,这些专利描述了通过联合小鼠单克隆抗体的 CDR 与人免疫球蛋白框架和恒定区来制备结合受体的人源化抗体。可以选择人框架区使与小鼠序列的同源性最大化。可以使用计算机模型来鉴定框架区中有可能与 CDR 或特异抗原相互作用的氨基酸,然后可以在这些位置使用小鼠氨基酸以生产人源化抗体。

[0151] 上述专利 5,585,089 和 5,693,761 以及 WO 90/07861(75)还提出了可用于设计人源化抗体的四条可能标准。第一条建议是对于受体而言,使用来自与待人源化的供体免疫球蛋白异常同源的特定人免疫球蛋白的框架,或者使用来自许多人抗体的保守框架。第二条建议是如果人免疫球蛋白框架中的氨基酸是异常的且该位置的供体氨基酸对人序列而言是典型的,那么可以选择供体氨基酸而非受体。第三条建议是在紧挨着人源化免疫球蛋白链中 3 个 CDR 的位置可以选择供体氨基酸而非受体氨基酸。第四条建议是在预测抗体三维模型中氨基酸有侧链原子位于 CDR 的 3A 以内且预测能够与 CDR 相互作用的框架位置使用供体氨基酸残基。上述方法仅仅是本领域技术人员能够用来生产人源化抗体的一些方法的例示。可以使用 Wu 等, *J. Mol. Biol.*, 284:151, 1999 和美国专利号 6,165,793、6,365,408 和 6,413,774 中描述的定向进化来提高人源化抗体的结合亲合力和/或特异性。

[0152] 在本发明的一个实施方案中,人源化形式抗体包含 SEQ ID NO:6 所列出的轻链可变氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体包含 SEQ ID NO:9 所列出的重链可变氨基酸序列。在又一个实施方案中,抗体可以包含 SEQ ID NO:12 所列出的重链可变氨基酸序列。

[0153] 在另一个实施方案中,人源化抗体包含 SEQ ID NO:6 所列出的轻链可变氨基酸序列和 SEQ ID NO:9 所列出的重链可变氨基酸序列。备选地,抗体可以包含 SEQ ID NO:6 所列出的轻链可变氨基酸序列和 SEQ ID NO:12 所列出的重链可变氨基酸序列。

[0154] 人源化抗体的可变区可以连接人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区的至少一部分。

在一个实施方案中,人源化抗体包含轻链和重链恒定区二者。重链恒定区通常包含 CH1、铰链、CH2、CH3 和有时的 CH4 区。在一个实施方案中,人源化抗体的恒定区属于人 IgG4 同种型。

[0155] 本发明提供了编码这些抗 CCR5 单克隆抗体或其人源化形式的分离的核酸分子。核酸分子可以是 RNA、DNA 或 cDNA。在一个实施方案中,核酸分子编码轻链。在一个实施方案中,核酸分子编码重链。在一个实施方案中,核酸编码重链和轻链二者。在一个实施方案中,一个或多个核酸分子编码 Fab 片段。在一个实施方案中,一个或多个核酸分子编码 CDR 片段。在一个实施方案中,核酸分子编码可变结构域。在另一个实施方案中,核酸分子编码一个可变结构域和一个或多个恒定结构域。

[0156] 优选的是,例示人源化抗 CCR5 抗体类似物因保守氨基酸替代而不同于例示人源化抗 CCR5 抗体。为了将氨基酸替代分类成保守的或非保守的,可以将氨基酸如下分组:第一组(疏水性侧链):met、ala、val、leu、ile;第二组(中性亲水性侧链):cys、ser、thr;第三组(酸性侧链):asp、glu;第四组(碱性侧链):asn、gln、his、lys、arg;第五组(影响链取向的残基):gly、pro;和第六组(芳香组侧链):trp、tyr、phe。保守替代涉及相同类型氨基酸之间的替代。非保守替代构成这些类型之一的成员与另一类的成员之间的交换。

[0157] 人源化抗 CCR5 抗体类似物显示与本文例示的人源化 PRO 140#1 或人源化 PRO 140#2 的基本的氨基酸序列同一性。编码类似物重链和轻链可变区的核酸序列能够与编码人源化 PRO 140#1 或人源化 PRO 140#2 重链和轻链可变区的核酸或其简并形式在严谨条件下杂交。

[0158] 由于遗传密码的简并性,多种核酸序列编码本发明的人源化抗 CCR5 抗体。在某些实施方案中,抗体是由与前述核酸分子高度同源的核酸分子编码的。优选的是,同源核酸分子包含与本文提供的核苷酸序列至少大约 90% 同一的核苷酸序列。更优选的是,核苷酸序列与本文提供的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,或者至少大约 99% 同一。可以使用本领域普通技术人员众所周知的多种公用软件工具来计算同源性。例示性工具包括可以由位于(美国)全国卫生研究所(National Institute of Health)的(美国)国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的网站获得的 BLAST 系统。

[0159] 鉴定高度同源核苷酸序列的一种方法经由核酸杂交。因此,本发明还包括由在高严谨度条件下与前述核酸分子杂交的核酸分子编码的、具有 CCR5 结合特性和本文所述其它功能特性的人源化 CCR5 抗体。还可以使用聚合酶链式反应(PCR)和适用于克隆相关核酸序列的其它扩增技术来实现相关序列的鉴定。优选的是,选择 PCR 引物来扩增目的核酸序列的片段,诸如 CDR。

[0160] 术语“高严谨度条件”在用于本文时指本领域所熟悉的参数。可以在编辑这些方法的参考文献中找到核酸杂交参数,如 J. Sambrook 等编辑的《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即分子克隆:实验室指南,第 2 版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1989,或者 F. M. Ausubel 等编辑的《Current Protocols in Molecular Biology》即分子生物学现行方案,John Wiley 父子公司,纽约。高严谨度条件的一个实例是于 65°C 在杂交缓冲液(3.5XSSC、0.02% Ficoll、0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、0.02% 牛血清清蛋白、2.5mM NaH₂PO₄ pH7、0.5% SDS、2mM EDTA)中杂交。SSC 即 0.15M 氯化钠/0.015M 柠檬酸钠 pH7;

SDS 即十二烷基磺酸钠 ;而 EDTA 即乙二胺四乙酸。杂交后,例如于室温用 2XSSC,然后在高达 68℃ 的温度用 0.1-0.5XSSC/0.1XSDS,清洗核酸转移其上的膜。

[0161] 将核酸序列可操作连接表达控制序列(即为了确保后者发挥功能而安置前者)后,在宿主中表达序列。这些表达载体通常能够在宿主生物体中复制,或是作为游离体或是作为宿主染色体 DNA 的整合部分。通常,表达载体将包含选择标记,如四环素或新霉素,从而容许检测经期望 DNA 序列转化的那些细胞(参阅如美国专利号 4,704,362,收入本文作为参考)。

[0162] 大肠杆菌 (*E. coli*) 是对于克隆本发明 DNA 序列而言特别有用的一种原核宿主。适于使用的其它微生物宿主包括杆菌 (*bacilli*),诸如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),以及其它肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*),诸如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、和多种假单胞菌 (*Pseudomonas*) 物种。在这些原核宿主中,也可以构建表达载体,它通常包含与宿主细胞相容的表达控制序列(如复制起点)。另外,可以存在任何数目的多种众所周知的启动子,诸如乳糖启动子系统、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统、或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常将控制表达,任选与操纵子序列一起,而且具有核糖体结合位点序列诸如此类,用于启动和完成转录和翻译。

[0163] 其它微生物,诸如酵母,也可用于表达。酵母属是优选的宿主,且合适载体具有表达控制序列,诸如启动子,包括 3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶以及复制起点、终止序列诸如此类。

[0164] 除了微生物以外,哺乳动物组织细胞培养物也可用于表达和生产本发明的多肽(参阅 Winnacker 著的《From Genes to Clones》即由基因到克隆, VCH 出版社,纽约州,纽约市,1987)。真核细胞实际上是优选的,因为本领域已经开发了能够分泌完整免疫球蛋白的许多合适宿主细胞系,包括 CHO 细胞系、多种 COS 细胞系、HeLa 细胞、优选的骨髓瘤细胞系等,以及转化的 B 细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列,诸如复制起点、启动子、增强子 (Queen 等, *Immunol. Rev.*, 89 :49-68, 1986, 收入本文作为参考)、以及必需的加工信息位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是衍生自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、细胞肥大病毒、牛乳头瘤病毒、诸如此类的启动子。

[0165] 根据细胞宿主的类型,可以通过众所周知的方法将包含目的 DNA 区段(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。例如,氯化钙转染常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其它细胞宿主(一般参阅 Maniatis 等,《Molecular Cloning :A Laboratory Manual》及分子克隆 :实验室指南,冷泉港出版社,1982,收入本文作为参考)。

[0166] 一旦表达,可以依照本领域标准方法来纯化本发明的完整抗体、其二聚体、单个轻链和重链、或其它免疫球蛋白形式,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳、诸如此类(一般参阅 R. Scopes,《Protein Purification》即蛋白质纯化, Springer-Verlag, 纽约, 1982)。制药学用途优选至少大约 90-95% 同质、最优选 98-99% 或更高均质的基本纯的免疫球蛋白。一旦根据需要部分纯化或纯化至均质,可以将多肽用于治疗(包括体外的),或者用于开发和执行测定流程、免疫荧光染色、诸如此类(一般参阅 Lefkovits 和 Pernis 编辑的《Immunological Methods》即免疫学方法,第 1 和 2 卷, Academic 出版社,纽约州,纽约市,1979 和 1981)。

[0167] 出于诊断或检测目的,抗体可以是经标记的或是未标记的。未标记抗体在使用时可以联合能够与人源化抗体反应的其它经标记抗体(二抗),诸如对人免疫球蛋白恒定区特异的抗体。备选地,可以直接标记抗体。可以采用广泛的标记物,诸如放射性核素、荧光染料、酶、酶底物、酶辅助因子、酶抑制剂、配体(特别半抗原)、等。本领域技术人员众所周知且可以利用多种免疫测定法来检测CCR5表达细胞或检测能够表达CCR5的细胞上的CCR5调控。

[0168] 本发明还提供了具有有效大小或分子量且相对于未衍生化抗体片段而言赋予血清半衰期延长、平均循环滞留时间(MRT)延长和/或血清清除率减小的抗体片段-聚合物偶联物。

[0169] 可以通过用惰性聚合物衍生期望抗体片段来生产本发明的抗体片段-聚合物偶联物。应当理解为偶联物提供期望表观大小或具有所选真实分子量的任何惰性聚合物都适用于构建本发明的抗体片段-聚合物偶联物。

[0170] 许多惰性聚合物都适用于药品。参阅如Davis等,《Biomedical Polymers: Polymeric Materials and Pharmaceuticals for Biomedical Use》即生物医学聚合物:用于生物医学用途的聚合材料和药品,第441-451页,1980。在本发明的所有实施方案中,使用了非蛋白质聚合物。非蛋白质聚合物通常是亲水性合成聚合物,即在其它情况中在自然界不会找到的聚合物。然而,天然存在且可通过重组或体外方法生产的聚合物也是有用的,正如由天然来源分离的聚合物。亲水性聚乙烯聚合物属于本发明的范围内,如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。特别有用的是聚烷撑醚诸如聚乙二醇(PEG);聚氧化烯诸如聚氧乙烯、聚氧丙烯以及聚氧乙烯和聚氧丙烯的嵌段共聚物(Pluronic即聚丙二醇与环氧乙烷的共聚物);聚甲基丙烯酸酯;卡波姆;包含糖单体D-甘露糖、D-和L-半乳糖、海藻糖、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(如聚甘露糖醛酸或褐藻酸)、D-葡萄糖胺、D-半乳糖胺、D-葡萄糖和神经氨酸的支链或无支链多糖,包括同多糖和杂多糖,诸如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、硫酸右旋糖酐、右旋糖酐、糊精、糖原、或酸性粘多糖的多糖亚基,如透明质酸,糖醇聚合物诸如聚山梨糖醇和聚甘露糖醇、肝素或类肝素(heparin)。聚合物在交联前不必但优选是水溶性的,但是最终的偶联物必须是水溶性的。优选的是,偶联物展示至少大约0.01mg/ml的水溶解度,更优选至少大约0.1mg/ml,仍更优选至少大约1mg/ml。另外,聚合物在偶联物形式中不应当是高度免疫原性的,而且它不应具有与静脉内输注或注射不相容的粘度,如果偶联物意欲通过这些途径施用的话。

[0171] 在一个实施方案中,聚合物只包含一个反应性基团。这有助于避免蛋白质分子的交联。然而,优化反应条件以减少交联或者通过凝胶过滤或离子交换层析来纯化反应产物以回收基本同质的衍生物属于本发明的范围之内。在另一个实施方案中,为了将多个抗体片段连接到聚合物主链上,聚合物包含两个或多个反应性基团。此外,凝胶过滤或离子交换层析可用于回收基本同质形式的期望衍生物。

[0172] 聚合物分子量的范围可以高达大约500,000D,且优选至少大约20,000D,或至少大约30,000D,或至少大约40,000D。选择的分子量可能取决于待达到的偶联物有效大小、聚合物的本质(如结构诸如线性或分支)和衍生度即每个抗体片段的聚合物分子数目以及抗体片段上的聚合物附着位点。

[0173] 可以通过能够与待连接的聚合物和抗体片段的一个或多个氨基酸残基反应的多功能交联剂将聚合物共价连接抗体片段。然而,通过衍生聚合物与抗体片段反应而直接交联也属于本发明的范围之内,反之亦然。

[0174] 抗体片段上的共价交联位点包括 N 末端氨基和赖氨酸残基的 ϵ -氨基,以及其它氨基、亚氨基、羧基、巯基、羟基或其它亲水性基团。聚合物可以直接与抗体片段共价结合而无需使用多功能(通常是双功能)交联剂,正如美国专利号 6,458,355 中所述。

[0175] 这种聚合物的替代程度将随着抗体片段上反应位点数目、分子量、亲水性和聚合物的其它特征、以及所选择的具体抗体片段衍生位点而变化。一般而言,偶联物包含 1- 大约 10 个聚合物分子,但是也设想了将更多数目的聚合物分子附着到本发明的抗体片段上。通过使用实验矩阵轻松实现了期望的衍生数量,其中改变时间、温度和其它反应条件以改变替代程度,其后通过大小排阻层析或本领域知道的其它手段测定了偶联物的聚合物替代水平。

[0176] 可以由 Shearwater 聚合物公司(亨茨维尔,阿拉巴马州)获得用于修饰本发明抗体片段的功能化 PEG 聚合物。这些商品化 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 琥珀酰亚胺琥珀酸酯、PEG 琥珀酰亚胺丙酸酯、羧甲基化 PEG 的琥珀酰亚胺酯、PEG 的琥珀酰亚胺碳酸酯、氨基酸 PEG 的琥珀酰亚胺酯、PEG- 氧羰基咪唑、PEG- 硝基苯基碳酸酯、PEG tresylate、PEG- 缩水甘油基醚、PEG- 醛、PEG- 乙烯砜、PEG- 马来酰亚胺、PEG- 正吡啶基-二硫化物、杂功能 PEG、PEG 乙烯基衍生物、PEG 硅烷和 PEG phospholide。用于偶联这些 PEG 衍生物的反应条件将随着蛋白质、期望的 PEG 化程度和所使用的 PEG 衍生物而变化。涉及 PEG 衍生物选择的一些因素包括:衍生物的期望附着点(诸如赖氨酸或半胱氨酸 R- 基团)、水解稳定性和反应性,接头的稳定性、毒性和抗原性,分析的适用性,等等。可以由制造商获得使用任何具体衍生物的具体指示。通过凝胶过滤或离子交换 HPLC 将本发明的偶联物与未反应的起始材料分开。

[0177] 抗 CCR5 抗体或其片段可以在使用时联合选自下组的一种或多种额外抗病毒试剂:非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI)、核苷逆转录酶抑制剂、HIV-1 蛋白酶抑制剂、病毒侵入抑制剂及其组合。

[0178] 可用于本发明组合物的已知 NNRTI 化合物包括但不限于依法韦仑、UC-781、HBY097、奈韦拉平(11- 环丙基-5,11- 二氢-4- 甲基-6H- 二吡啶[3,2-b:2'3'-][1,4] 二氮杂草-6- 酮)、地拉韦啉((RescriptorTM;PharmaciaUpjohn)(哌嗪,1-[3-[(1- 甲基- 乙基)氨基]-2- 吡啶基]-4-[5-[(甲磺酰)氨基]-1H- 吡啶-2- 基]羰基]-单甲基磺酸酯)、SJ-3366(1-(3- 环戊烯-1- 基)甲基-6-(3,5- 二甲基苯甲酰基)-5- 乙基-2,4- 嘧啶二酮)、MKC-442(6- 苯甲基-1-(乙氧基甲基)-5- 异丙基尿嘧啶)、GW420867x(S-3- 乙基-6- 氟-4- 异丙氧基羰基-3,4- 二氢- 喹啉-2(1H)- 酮;Glaxo)、HI-443(N'-[2-(2- 噻吩)乙基]-N'-[2-(5- 溴吡啶基)]- 硫脲)、诸如此类。

[0179] 可用于本发明组合物并联合至少一种本发明抗 CCR5 抗体或其片段的核苷逆转录酶抑制剂包括但不限于阿巴卡韦(ZiagenTM, GlaxoSmithKline)((1S, 顺)-4-[2- 氨基-6-(环丙基氨基)-9H- 嘌呤-9- 基]-2- 环戊烯-1- 甲醇硫酸(盐))、拉米夫定(EpivirTM, GlaxoSmithKline)((2S, 顺)-4- 氨基-1-(2- 羟甲基-1,3- 氧硫

烷-5-基)-(1H)-嘧啶-2-酮)、齐多夫定(RetrovirTM;GlaxoSmithKline)(3'-叠氮-3'-脱氧胸腺嘧啶核苷)、司他夫定(Zerit; Bristol-Myers-Squibb)(2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸腺嘧啶核苷)、zalcitabine(HividTM;Roche Laboratories)(4-氨基-1-β-D2',3'-双脱氧核糖呋喃糖基-2-(1H)-嘧啶酮)、去羟肌苷、诸如此类。

[0180] 可以在组合物中联合本发明抗CCR5抗体或其片段使用的HIV-1蛋白酶抑制剂包括但不限于洛匹那韦(1S-[1R*,(R*),3R*,4R*]-N-4-[[[(2,6-二甲苯氧基)乙酰基]氨基]-3-羟基-5-苯基-1-(苯甲基)戊基])四氢-α-(1-甲基乙基)-2-氧桥(2H)-嘧啶乙酰胺)、沙奎那韦(N-叔丁基-十氢-2-[2(R)-羟基-4-苯基-3(S)-[[N-(2-喹啉基羰基)-L-天冬酰胺酰]氨基]丁基]-(4aS,8aS)-异喹啉-(3S)-羧酰胺)、奈非那韦甲磺酸盐([3S-[2(2S*,3S*),3α,4β,8αβ]]-N-(1,1-二甲基乙基)十氢-2[2-羟基-3-[(3-羟基-3-甲基苯甲酰基)氨基]-4-(苯基硫)丁基]-3-异喹啉氨甲酰单甲磺酸酯)、硫酸茚地那韦([1(1S,2R),5(S)]-2,3,5-三脱氧-N-(2,3-二氢-2-羟基-1H-茚-1-基)-5-[2-[[[(1,1-二甲基乙基)氨基]羰基]-4-(3-嘧啶基甲基)-1-哌嗪基]-2-(苯甲基)-D-赤型缬烯酰胺硫酸(1:1)盐)、氨普奈韦((3S)-四氢-3-呋喃基N-[1(1S,2R)-3-(4-氨基-N-异丁基苯亚磺酰氨基)-1-苯甲基-2-羟丙基]氨基甲酸酯)、利托那韦((10-羟基-2-甲基-5-(1-甲基乙基)-1-[2-(1-甲基乙基)-4-噻唑基]-3,6-二氧-8,11-双(苯基甲基)-2,4,7,12-四氮十三烷-13-酸,5-噻唑基甲酯,[5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)]))、诸如此类。

[0181] 可以联合本发明抗CCR5抗体或其片段使用的HIV-1融合或病毒侵入抑制剂包括PRO 542(Progenics药品公司,塔利顿,纽约州)、T-20(Trimeris公司,达勒姆,北卡罗来纳州)(美国专利号5,464,933;6,133,418;6,020,459)、T-1249(美国专利号6,345,568;6,258,782)、诸如此类。

[0182] 对于联合疗法,可以给受试者在一种或多种常规抗病毒试剂之前、随后、或同时提供本发明的抗CCR5抗体或其片段。

[0183] 借助随后的试验详述将更好的理解本发明。然而,本领域技术人员将易于认识到所讨论的特定方法和结果仅仅是本发明的例示,本发明在其后权利要求书中更完整地描述。

[0184] 试验详述

[0185] 实施例1

[0186] A. 材料和方法

[0187] 1) 试剂

[0188] MAb 2D7购自Pharmingen(圣迭哥,加利福尼亚州),而CC-和CXC-趋化因子得自R&D Systems(明尼阿波利斯,明尼苏达州)。CD4-IgG2(1)、可溶性(s)CD4(2)和重组HIV-1_{JR-FL}gp120是由Progenics Pharmaceuticals公司生产的(59)。

[0189] 2) 抗CCR5mAb的分离和纯化

[0190] 将L1.2-CCR5⁺细胞(63)在存在5mM丁酸钠时温育16小时,它激活来自控制CCR5表达的细胞肥大病毒(CMV)启动子的表达,导致细胞表面辅助受体密度增长了10倍。将雌性Balb/c小鼠腹膜内免疫10⁷个L1.2-CCR5⁺细胞,以3周为间隔,并在脾切除前三天施行10⁷个L1.2-CCR5⁺细胞的静脉内加强。将脾细胞与Sp2/0细胞系融合。在初步筛选中,测

试来自 10^4 份杂交瘤培养物的上清液；这其中的 120 份在共振能转移 (RET) 测定法中抑制天然表达 CCR5 和 CD4 的 PM1 细胞与 HeLa-Env_{JR-FL}⁺ 细胞之间由 HIV-1 包膜介导的融合 (10)，正如先前所述 (19, 38)。通过有限稀释亚克隆生产最有效抑制性上清液和还将 CCR5⁺ 细胞染色的杂交瘤。通过 Harlan Bioproducts for Science 公司 (印第安纳波利斯, 印第安纳州) 给 Balb/c 小鼠注射生产抗 CCR5mAb PA8、PA9、PA10、PA11、PA12 和 PA14 的杂交瘤来制备腹水。通过硫酸铵沉淀及随后的蛋白 A 层析将 mAb 个别纯化至 > 95% 同质。将所有 mAb 重悬于磷酸盐缓冲盐水 (PBS)，终浓度 5mg/ml。

[0191] 3) 抗 CCR5mAb 的荧光激活细胞分类 (FACS) 分析和表位作图

[0192] 将流式细胞计量术用于检测 mAb PA8-PA12 和 PA14 对 CCR5 的细胞表面反应性。将经丁酸钠处理的 L1. 2-CCR5⁺ 细胞 (10^6 个) 与 0.25 μ g 抗体一起在溶于 50 μ l Dulbecco 氏 PBS (DPBS) 的 0.1% 叠氮钠 (NaN_3) 中于 4°C 温育 20 分钟。将 CCR5mAb 2D7 用作阳性对照，将非特异性鼠 IgG1 用作阴性对照。将细胞离心沉降下来，清洗，并与 1 : 100 稀释的经藻红蛋白 (PE) 标记的山羊抗小鼠 IgG (Caltag, 伯林格姆, 加利福尼亚州) 一起在与第一次抗体温育相同的条件下温育。最后，通过流式细胞计量术分析细胞。分离 PBMC，如先前所述 (60) 进行刺激，并使用相似方法进行染色。

[0193] 将相似流程用于抗 CCR5mAb 的表位作图。已经描述了一组 70 种 CCR5 点突变体 (20, 24, 52)。将这些蛋白质的编码序列亚克隆到 pcDNA3.1 载体 (Stratagene) 中，其中可以由 5' T7- 聚合酶启动子驱动转录。CCR5 突变体在 C 端携带 9 个残基的血球凝集素 (HA) 标签以便于检测细胞裂解物中的蛋白质，或者通过流式细胞计量术进行检测。将 HeLa 细胞 (2×10^6 个) 与 20 μ g/ml lipofectin 和等量的野生型或突变型 CCR5 表达质粒一起在 OPTI-MEM (Life Technologies, 盖瑟斯堡, 马里兰州) 中温育 5 小时。然后用 2×10^7 p. f. u. vTF7 (23) 感染细胞 12 小时以加强 CCR5 表达，用溶于 PBS 的 2mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) 分离，并用结合缓冲液 (溶于 DPBS 的 1% BSA、0.05% NaN_3) 清洗一次。如前面段落中所述用 mAb 表面标记细胞 (1×10^6 个)，用温育缓冲液清洗一次，并重悬于溶于水的 1ml 1xFACSlyse (Becton Dickinson)，于室温温育 30 分钟以渗透细胞膜。然后将细胞离心沉降下来，用温育缓冲液进行清洗，并与 4 μ g/ml 经荧光素异硫氰酸盐 (FITC) 标记的小鼠抗-HA mAb (BabCo, 里士满, 加利福尼亚州) 一起于 37°C 温育 1 小时以进行胞内标记。最后，将细胞用结合缓冲液清洗一次，用 DPBS 清洗一次，重悬于溶于 PBS 的 1% 甲醛，并通过流式细胞计量术进行分析。通过下面的方程来确定 mAb 结合突变型 CCR5 的程度：(突变型 CCR5PE m. f. i. / 野生型 CCR5PE m. f. i.) / (突变型 CCR5 FITCm. f. i. / 野生型 CCR5FITC m. f. i.) $\times$ 100%。这将突变型辅助受体表达水平的 mAb 结合标准化。

[0194] 4) gp120/sCD4 结合测定法

[0195] 使用 NHS- 生物素 (Pierce, 罗克福德, 伊利诺斯州) 依照制造商的指示生物素化 gp120，并通过渗滤除去未偶联的生物素。将经丁酸钠处理的 L1. 2-CCR5⁺ 细胞与不同稀释度的 sCD4 与生物素化 gp120 的等摩尔混合物或 1.25 μ g/ml sCD4 和 2.5 μ g/ml 生物素化 gp120 一起在存在不同浓度的抗 CCR5mAb PA8-PA12、PA14、2D7 或非特异性鼠 IgG1 时在溶于 DPBS 的 0.1% NaN_3 中于室温温育 1 小时。用温育缓冲液清洗细胞，并与 1 : 50 稀释的链霉亲和素-PE (Becton Dickinson) 一起于室温温育 1 小时。最后，用结合缓冲液清洗细胞，并使用荧光读板器进行分析 (Perspective Biosystems, 弗雷明汉, 马萨诸塞州)。

[0196] 5) 抗 CCR5mAb 对由包膜介导的细胞-细胞融合和 HIV-1 侵入的抑制

[0197] 使用 RET 测定法检测 HeLa-Env_{JR-FL}⁺ 与 PM1 细胞之间由 HIV-1 包膜介导的融合。将相同数目 (2×10^4 个) 的经荧光素十八烷醇酯 (F18) 标记的包膜表达细胞与经十八烷基若丹明 (R18) 标记的 PM1 细胞分布到 96 孔板中溶于 DPBS 中的 15% 胎牛血清中, 并在存在不同浓度的抗 CCR5mAb 即 PA8-PA12、PA14、2D7 或非特异性鼠 IgG1 时于 37°C 温育 4 小时。使用 Cytofluor 读板器 (PerSeptive Biosystems) 测量荧光 RET, 并如先前所述 (38) 确定 RET 百分比。

[0198] 如先前所述 (20), 通过来自 JR-FL 或 Gun-1 的包膜糖蛋白生产反式补充的 NLuc⁺env⁻ 病毒。在存在不同浓度的单个 mAb 时, 用包含 50-100ng/ml p24 的嵌合型报道病毒感染 U87MG-CD4⁺CCR5⁺ 细胞 (14)。于 37°C 温育 2 小时后, 用新鲜的含 mAb 的培养基替代含病毒的培养基。12 小时后再次加入不含抗体的新鲜培养基。总共 72 小时后, 向细胞中加入 100 μ l 裂解缓冲液 (Promega), 并如 (20) 所述测量萤光素酶活性 (r. l. u.)。HIV-1 感染抑制百分比定义为 $[1 - (\text{存在抗体时的 r. l. u.} / \text{不含抗体时的 r. l. u.})] \times 100\%$ 。

[0199] 6) 钙信号测定法

[0200] 向经丁酸钠处理的 L1.2-CCR5⁺ 细胞中加入荧光染料 1AM (Molecular Probes, 尤金, 俄勒冈州) 至终浓度 5 μ M。于 37°C 温育 30 分钟后, 将细胞清洗一次, 并重悬于 Hank 氏缓冲盐水。用抗 CCR5mAb 或 PBS 刺激细胞 (10^6 个), 60 秒后继以 RANTES。MAb PA8-PA12 和 PA14 的使用浓度是 100 μ g/ml, 2D7 是 20 μ g/ml, 而 RANTES 是 250ng/ml。还对 PA14 和 2D7 测试广泛 mAb 浓度的钙流抑制, 范围为 0-100 μ g/ml。使用 Perkin-Elmer LS-50S 荧光分光光度计通过测量 358nm 激发后 402nm (所结合的染料) 和 486nm (游离的染料) 的荧光发射比例来监测胞内钙水平。

[0201] B. 结果和讨论

[0202] 1) 分离抗 CCR5 单克隆抗体 PA8、PA9、PA10、PA11、PA12 和 PA14

[0203] 发现对应于 CCR5 胞外结构域的肽不足以引发针对天然细胞表面受体的特异性、高滴度抗体应答 (50)。因此, 用 L1.2-CCR5⁺ 细胞免疫 Balb/c 小鼠, 并在 RET 测定法中对杂交瘤培养物上清液测试它们抑制与 CD4⁺CCR5⁺PM1 细胞进行由 JR-FL 包膜介导的膜融合的能力 (19, 38)。尽管超过 100 个孔的上清液将细胞-细胞融合抑制了 > 50%, 然而只有 6 份 - 命名为 PA8、PA9、PA10、PA11、PA12 和 PA14 - 特异且强烈染色 L1.2-CCR5⁺ 细胞而非亲本 L1.2 细胞, 正如流式细胞计量术所证明的 (未展示数据)。根据先前的经验, 假设能够抑制细胞-细胞融合的其他 mAb 有可能针对细胞表面粘附分子诸如 LFA-1 (37)。通过同种型 ELISA (Cappel, 达勒姆, 北卡罗来纳州) 确定了杂交瘤 PA8-PA12 和 PA14 分泌 IgG1mAb。由注射了六种杂交瘤的 Balb/c 小鼠制备腹水, 并纯化 IgG1 级分。PA8、PA9、PA11、PA12 和 PA14 展示不同的等电聚焦特性, 而 PA10 具有与 PA9 非常相似的特性, 因此可能是相同 mAb 的第二个分离株 (未显示数据)。

[0204] 2) 结合 CCR5⁺ 细胞的 mAb

[0205] 所有纯化的抗 CCR5mAb 都不能将亲本 L1.2 细胞系染色 (未显示数据)。然而, 根据流式细胞计量术的测定, mAb PA9-PA12 和 PA14 将 L1.2-CCR5⁺ 细胞染色 > 90%, 而 PA8 将细胞染色约 70%, 显示它们识别 CCR5 (图 1)。在我们的实验中作为阳性对照的抗 CCR5mAb 2D7 也将 L1.2-CCR5⁺ 细胞染色 > 90%。PA8-PA12 和 PA14 都是 IgG1, 而且与山羊抗小鼠

IgG 的反应同样良好,而 2D7 是 IgG2a,而且与报道抗体的反应可能不同。因此,只有用 mAb PA8-PA12 和 PA14 测量的平均荧光强度 (m. f. i.) 直接可比。平均荧光强度 (m. f. i.) 的排列顺序是 PA12 ~ PA11 > (2D7 =) PA14 ~ PA10 ~ PA9 > PA8。PA12m. f. i. 与 PA8m. f. i. 之间的差异是 3 倍。PA8 与其它 mAb 之间在染色强度中的差异在广泛浓度上保持恒定 (未显示数据),而且有可能不符合 mAb 对 CCR5 亲和力的差异。这暗示 PA8 只与 L1. 2-CCR5⁺ 细胞表面上存在的 CCR5 分子的一个子集相互作用。

[0206] 与 L1. 2-CCR5⁺ 细胞相比,经促细胞分裂原刺激的 PBMC 对 CCR5mAb 展示不同的染色模式。2D7 和 PA14 将 PBMC 染色 > 20%, PA11 和 PA12 染色约 10%, PA8、PA9 和 PA10 染色 < 5% (图 1)。染色 PBMC 的平均荧光强度比每种 mAb 对 L1. 2-CCR5⁺ 细胞的染色低大约 10 倍;它们的排列顺序是 (2D7 >) PA14 > PA12 ~ PA11 ~ PA10 ~ PA9 ~ PA8。此外,这在一定程度上不同于在 CCR5 转染子上观察到的反应性。PA9m. f. i. 与 PA14m. f. i. 之间的差异是 7 倍。其它小组在抗 CCR5 抗体将稳定的 CCR5⁺ 细胞系与 PBMC 染色的能力中观察到相似差异 (28)。这可能归于 CCR5 构象、翻译后修饰或寡聚化的细胞特异性差异。备选地,与其它细胞表面分子的关联在细胞之间可能是不同的。由于这种分子的一个明显选择是 L1. 2-CCR5⁺ 细胞上不存在的而 PBMC 上存在的 CD4 细胞表面抗原,因此我们还测试了 PA8-PA12、PA14 和 2D7 将瞬时表达 CCR5 (单独或与 CD4 一起) 的 HeLa 细胞染色的能力。在存在 CD4 时在任何 mAb 将细胞表面 CCR5 染色的能力中都没有观察到差异 (未显示数据)。如果这两种蛋白质之间存在关联,那么它不包括我们能够得到的抗 CCR5mAb 识别的表位。或者,CCR5 与 CD4 之间的关联可能只发生在原代淋巴细胞上。

[0207] 3) 使用 CCR5 丙氨酸突变体的 mAb 表位作图

[0208] 所有抗体都不能通过 Western 印迹来检测还原和变性 CCR5 蛋白质,指示它们识别构象敏感性表位 (未显示数据)。使用 CCR5Nt 和 ECL 中残基的一组 70 种丙氨酸点突变体进行 mAb 表位作图研究。用附加了 C 末端 HA 标签的突变型或野生型 CCR5 表面序列脂转染 HeLa 细胞,并感染 vTF7 (23) 以加强辅助受体表达。然后将细胞与抗-CCR5mAb 一起温育,并通过将 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG 揭示它们的结合。使用经 FITC 标记的抗 HAmAb (BabCo) 进行第二轮胞内染色。这种内部对照容许我们将抗 CCR5mAb 对细胞表面上突变型感受态表达水平的染色直接标准化。由此,将每种突变体的 mAb 结合表述成与野生型 CCR5 的结合百分比 (图 4)。

[0209] 某些点突变将所有抗体与 CCR5 的结合降低 > 50%。一般而言,PA8-PA12 受到此类突变体的影响最大,PA14 和 2D7 受到的影响最小,这类突变体包括半胱氨酸对 C110A 和 C178A;Nt 突变体 Y10A、D11A、K25A;ECL1 突变体 D95A;ECL2 突变体 K171A/E172A、Q188A、K191A/N192A;和 ECL3 突变体 F263A 和 F264A (图 1)。一种解释是这些残基本质上不是 mAb 表位的一部分,但是将它们变成丙氨酸引起对所有 mAb 结合具有共同效果的构象扰动。我们假设,如果突变将个别 mAb 的结合降低 > 75%,但是不降低大多数其它抗体的结合,那么该残基可能是由该 mAb 识别的表位的直接贡献者。使用这些严谨方针,得出下面的结论:7 种抗 CCR5 mAb 识别交叠但不同的表位 (图 4)。MAb PA8 与 CCR5 的结合依赖 Nt 中的 N13 和 Y15。MAb PA9 和 PA10 需要 Nt 中的 D2、Y3、Q4、P8 和 N13 以及 ECL2 中的 Y176 和 T177。MAb PA9 还需要 Nt 中的 S7。MAb PA11 和 PA12 结合依赖 Nt 中的 Q4。PA14 需要 Nt 中的 D2 以及 ECL2 中的 R168 和 Y176。最后,mAb 2D7 为了结合 CCR5 需要 ECL2 中的 Q170 和 K171/

E172。

[0210] 4) 存在抗 CCR5mAb 时的趋化因子信号

[0211] 趋化因子受体结合剂可以是由受体介导的胞内信号的拮抗剂或（更罕见的）激动剂。或者，它们可能对信号没有影响。CCR5 能够结合 3 种 CC- 趋化因子即 RANTES、MIP-1 α 和 MIP-1 β ，并转导调控胞质钙水平的信号。因此，我们测试了多种浓度的 mAb PA8-PA12、PA14 和 2D7 的激动剂 / 拮抗剂活性。在加载了 1- 吡啶的 L1. 2-CCR5⁺ 细胞中测量胞内钙浓度 (Ca^{2+})_i 的变化。所有 mAb 都不能刺激 (Ca^{2+})_i 变化，指示它们不是 CCR5 的激动剂。甚至在高达 100 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度，PA8-PA12 同样不能抑制由 RANTES 诱导的 Ca^{2+} 流（图 5A 和未显示数据），显示它们也不是拮抗剂。这些浓度提供了 mAb 对 L1. 2-CCR5⁺ 细胞的饱和结合，正如流式细胞计量术和 gp120/CCR5 结合测定法所显示的（图 6D 和未显示数据）。然而，mAb PA14 和 2D7 阻断由 RANTES 诱导的钙转移，尽管效力不同（图 5A、5B）。PA14 钙流抑制的 IC_{50} 是 50 $\mu\text{g/ml}$ ，比 2D7 的 IC_{50} 高大约 8 倍（图 5B）。由 RANTES、MIP-1 α 和 MIP-1 β 诱导的钙流都被相似浓度的 PA14 所抑制（未显示数据）。所有 mAb 都不能在内源表达 CXCR4 的 L1. 2-CCR5⁺ 细胞中影响由 SDF-1 诱导的钙转移（未显示数据）。最后，mAb 或 CC 趋化因子都不能在亲本 L1. 2 细胞中影响胞质钙水平（未显示数据）。

[0212] 5) mAb 对 CCR5 辅助受体功能的抑制

[0213] 最初是根据它们抑制由 HIV-1 包膜介导的细胞 - 细胞融合的能力而选择了 mAb PA8-PA12 和 PA14。对纯化的 mAb 的这种能力进行了确认和定量。正如预料的，所有六种 mAb 以及 mAb 2D7 都在 RET 测定法中阻断 CD4⁺CCR5⁺PM1 细胞与 HeLa-Env_{JR-FL}⁺ 细胞之间的融合。效力的排列顺序是 2D7 ~ PA14 > PA12 > PA11 > PA10 ~ PA9 ~ PA8（图 6A）。PA14 和 2D7 的 IC_{50} 值分别是 1.7 $\mu\text{g/ml}$ 和 1.6 $\mu\text{g/ml}$ ，PA11 和 PA12 分别是 25.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 10.0 $\mu\text{g/ml}$ （图 3）。PA8、PA9 和 PA10 在 300 $\mu\text{g/ml}$ 将融合抑制了只有 10-15%。所有 mAb 都不能抑制 PM1 细胞与表达来自 X4 病毒的全长包膜蛋白的 HeLa-Env^{LAI}⁺ 细胞之间的融合（未显示数据）。

[0214] 还测试了不同抗 CCR5mAb 在单轮复制、基于荧光素酶的侵入测定法中抑制原型 R5 病毒、JR-FL、和 R5X4 病毒 Gun-1 的能力。在侵入测定法中的效力的排列顺序与在细胞 - 细胞融合测定法中测定得到的相似（图 6B）。使用 PA8-PA11 不能得到对 JR-FL 或 Gun-1 侵入的 > 50% 抑制。PA12 的 IC_{50} 值是 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。然而，对于这种 mAb 不能得到 > 60% 的侵入抑制。PA14 和 2D7 抑制 JR-FL 侵入的 IC_{50} 值分别测定为 0.024 和 0.026 $\mu\text{g/ml}$ （图 3），比在融合测定法中获得的低 60 倍。双重向性 Gun-1 的侵入对抗 CCR5mAb 的抑制比 JR-FL 侵入敏感 2-3 倍（未显示数据）。

[0215] 抗辅助受体 mAb 可能或是通过直接影响 gp120/CCR5 相互作用或是通过阻止涉及活性融合复合物形成的结合后步骤来抑制由包膜介导的融合。为了确定 PA8-PA12 和 PA14 抑制病毒融合和侵入的机制，还测试了不同 mAb 阻断 gp120/CCR5 相互作用的能力。为此，使用了检测复合了 sCD4 的生物素化 HIV-1_{JR-FL} gp120 结合 L1. 2-CCR5⁺ 细胞的测定法。在缺乏 sCD4 或 CCR5 时，或者在使用 HIV-1_{LAI} gp120 时，没有观察到生物素化 gp120 的结合（图 6C）。

[0216] 除了 PA8 以外，所有 mAb 都能消除 gp120/sCD4 结合 L1. 2-CCR5⁺（图 6D）。PA8 的抑制在约 40% 时饱和，这与流式细胞计量术的数据一致（图 1），说明这种 mAb 只结合 L1. 2-CCR5⁺

细胞上 CCR5 分子的一个子集。mAbPA9、PA10、PA11 和 PA12 抑制结合, IC_{50} 值分别为 0.24、0.13、0.33 和 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (图 3)。令人惊讶的是, mAb PA14 和 2D7 是 gp120/sCD4 结合的两种最低效率的抑制剂, IC_{50} 值分别为 1.58 和 1.38 $\mu\text{g/ml}$ (图 3)。因此, mAb 抑制由 gp120/CD4/CCR5 介导的融合和侵入的能力与其阻断 gp120/sCD4 结合辅助受体的能力之间没有关联。

[0217] 6) 抗 CCR5mAb 与其它病毒侵入抑制剂联合对 HIV-1 融合的协同抑制

[0218] 辅助受体特异性试剂可以在侵入过程的多个阶段发挥作用, 并在联合使用时展示非添加效应。从临床观点上说, 重要的是要测定辅助受体特异性药物候选物与可能提供某种水平针对疾病进展起保护作用的内源趋化因子的相互作用。因此, 测试 CCR5mAb 彼此、或与 RANTES、或与结合 HIV-1gp120 而抑制附着于靶细胞的 CD4-IgG2 的联合。在病毒融合和侵入测定法中获得试剂单独和联合使用时的剂量应答曲线。使用中值效应原理 (9) 分析数据。在数量上比较产生指定效应所需要的单一试剂或其混合物的浓度即称为联合指数 (CI) 的术语。CI 值超过 1 指示拮抗剂, CI 约为 1 指示添加效应, 而 CI 低于 1 指示协同效应即一种试剂的存在增强另一种试剂的效果。

[0219] PA12 和 2D7 的联合具有最强协同效力, 根据抗体比例 CI 值的范围在 0.02-0.29 之间 (图 7 和图 2)。已知协同程度随着试剂的化学计量而变化。病毒侵入和融合测定法在鉴定高度协同的 PA12 和 2D7、中度协同的 PA12 和 PA14、添加的 PA11 和 PA12、以及微弱拮抗的 PA14 和 2D7mAb 联合时是一致的。考虑到根据流式细胞计量术的测定 (未显示数据) PA14 与 2D7 交叉竞争与 CCR5⁺ 细胞的结合, 这两种 mAb 之间缺乏协同并不出人意料。PA11 与 PA12 之间添加效应的观察结果可能指示 CCR5 中略微不同的表位, 它们共享对 Nt 中残基 Q4 的依赖型。

[0220] 还测试了 mAb PA12、PA14 和 2D7 与 RANTES 协同阻断细胞-细胞融合的能力。PA12 与 RANTES 的联合展示中度协同 (图 2)。PA14 和 2D7 展示与 RANTES 没有协同, 这与这些 mAb 抑制 RANTES 结合和信号是一致的 (图 5A、5B)。最后, 我们测试了 mAb PA12、PA14、2D7 和与 gp120 相互作用的 CD4-IgG2 之间的协同。我们观察到 PA12 与 CD4-IgG2 之间的中度协同, 而 PA14 或 2D7 与 CD4-IgG2 之间没有协同 (图 2)。

[0221] C. 试验讨论

[0222] 分离并表征了六种鼠抗 CCR5IgG1mAb。尽管 PA8、PA9、PA11、PA12 和 PA14 属于不同的分子种类, 而 PA9 和 PA10 通过分析不能区分, 因而可能是相同的 mAb。分离的所有 mAb 都识别复杂的构象表位, 正如针对天然的细胞表面蛋白质所生产的 mAb 的常见情况。使用一组 CCR5 丙氨酸点突变体对所有 mAb 进行了表位作图。假设相似影响所有 mAb 结合的残基引起辅助受体的构象扰动但不构成 mAb 表位的一部分。只有两个这样的残基即 Y10 和 D11 显示影响 HIV-1 侵入 (20, 52)。PA8、PA11 和 PA12 表位完全位于 Nt 结构域内。与此结果一致, PA8 能够在 ELISA 中结合包含残基 D2 至 R31 的生物素化 Nt 肽 (未显示数据)。然而, 其结合只强烈依赖 Q4 的 PA11 和 PA12 在溶液中不结合 Nt 肽 (未显示数据)。一种可能性是 Nt 肽不采取 PA11 和 PA12 所识别的正确构象, 而 PA8 结合可能不太依赖构象。或者, PA11 和 PA12 可能与我们尚未突变的残基相互作用, 或者位于 CCR5 其它结构域中的氨基酸形成弱键, 或者结合其呈现未曾因诱变而改变的肽主链原子。抗体 PA9、PA10 和 PA14 识别包含 CCR5 Nt 和 ECL2 两个结构域中的残基的表位, 而 2D7 表位完全位于 ECL2 中。

[0223] PA14 表位包含 Nt 中的 D2 和 ECL2 中的 R168 二者,指示这两个残基在 mAb 足迹 (footprint) 图谱的内容中彼此邻近。它们甚至可能通过它们的相反电荷而彼此直接相互作用。

[0224] mAb PA8-PA12 和 PA14 以不同强度且以依赖细胞类型的方式将 CCR5⁺ 细胞染色。除了 PA8 以外,所有 mAb 将染色 > 90% 的 L1.2-CCR5⁺ 细胞,使用 PA11 和 PA12 时观察到最高平均荧光强度。然而,PA14 和 2D7 将最高百分比的 PBMC 染色,也在这些细胞上产生最高平均荧光强度。Hi11 等人 (28) 最近鉴定了将转染细胞相似染色的一组抗 CCR5 mAb,但是八种中只有两种将 PBMC 染色,而且都不能将原代单核细胞染色。对 CCR5 的低亲和力可能是这两种 mAb 与原代细胞没有反应性的原因,但是这不可能是其它四种不能反应的解释。在我们的 mAb 组中,我们观察到 mAb 2D7 和 PA14 对 PBMC 的最大强度染色,它们的表位完全或部分位于 ECL2 的前十个残基中。然而,Hi11 等人报道了对 Nt 和 ECL1 特异的 mAb 将 PBMC 染色,而针对 ECL2 和 ECL3 的 mAb 不能将 PBMC 染色,因而尚未鉴定反应性的一致模式。mAb 的细胞类型特异性染色的一种解释是激活后的 PBMC (和单核细胞) 分泌 CC-趋化因子,它们结合细胞表面 CCR5 而掩盖有些 mAb 表位。然而,希望这对 PA14 和 2D7 尤其正确,它们是由趋化因子诱导的钙转移的拮抗剂,并且大概与 CC-趋化因子竞争 CCR5 结合。至今这些 mAb 将 PBMC 染色的强度最大。或者,不同 CCR5 表位暴露可能反映了细胞类型特异性受体的寡聚化、与其它细胞表面分子的关联、或不同翻译后修饰诸如糖基化。我们已经显示了 mAb 结合的差异可能不反映 CD4/CCR5 相互作用中的细胞类型特异性差异。

[0225] mAb PA8-PA12 在 CCR5⁺ 细胞中不抑制由 CC-趋化因子诱导的钙转移,它们也不介导经由 CCR5 的信号。mAb 2D7 和 PA14 是由 CC-趋化因子诱导的钙转移的抑制剂,但是 2D7 的效力几乎比 PA14 高一个数量级。这可能是因为 PA14 表位与 CCR5 上 CC-趋化因子结合结构域的重叠程度低于 2D7 表位。所有 mAb 也都阻断 HIV-1 侵入和由包膜介导的膜融合,但是在某些情况中细胞-细胞融合抑制所需要的抗体比阻断病毒侵入的需要几乎高两个数量级。与病毒-细胞融合相比,大概在细胞-细胞融合过程中建立了更多的 gp120/CD4/CCR5 相互作用以及粘附分子之间的相互作用并且协同作用,使之更难以抑制。在使用针对 LFA-1 或 HIV-1 包膜糖蛋白的抗体时常常观察到这种现象 (45,51)。甚至在最高抗体浓度,PA8、PA9 和 PA10 也不能将细胞-细胞融合阻断 > 15%,而且不能将病毒侵入阻断 > 40%。然而,使用 PA11、PA12 和 PA14 能够获得 > 90% 的融合抑制,而且使用 PA14 能够获得 > 90% 的侵入抑制。六种 mAb 中阻断融合和侵入效力最大的是 PA14,它像 2D7 一样有效。令人惊讶的是,PA14 和 2D7 是 gp120/sCD4 结合 L1.2-CCR5⁺ 细胞的最小效力抑制剂,而 PA9-PA12 的阻断效力相似,而 PA8 不能将 gp120/sCD4 结合阻断 > 40%。这些观察结果提出了关于不同细胞上展示的 CCR5 分子的本质以及病毒融合和侵入的抑制机制的问题。可能 mAb 和 gp120 结合测定法中所使用的 L1.2 细胞上的 CCR5 与 mAb 结合测定法中所使用的 PBMC 上的 CCR5 或者与融合和侵入测定法中所使用的 PM1 和 U87MG 细胞上的 CCR5 并非处于相同构象。

[0226] 我们的一些 mAb 对 PBMC 的低染色以及对融合和侵入的部分抑制指示它们只能够结合原代淋巴细胞、PM1 和 U87MG-CD4⁺CCR5⁺ 细胞系上表达的 CCR5 分子的一个子集。然而,除了 PA8 以外,所有 mAb 都能够将 L1.2-CCR5⁺ 细胞染色 > 90%,而且能够完全阻断 gp120/sCD4 复合物与这些细胞的结合。L1.2-CCR5⁺ 细胞与我们已经使用的其它细胞之间的至少

一个差异是细胞表面辅助受体蛋白质的密度。事实上,我们估计 L1. 2-CCR5⁺ 细胞比 PM1 和 U87MG-CD4⁺CCR5⁺ 细胞多表达 10-100 倍细胞表面辅助受体。但是,在改造 HeLa 细胞瞬时表达与 L1. 2-CCR5⁺ 细胞系同样多的辅助受体后,我们仍然不能检测到与它们结合的 gp120/sCD4(未显示数据)。因此,L1. 2 上 CCR5 的过度表达以及其它细胞特异性因子可能促成显著暴露 Nt 使之更易于 mAb 和 gp120 二者接近的辅助受体构象。这种构象可能是由受体寡聚化、细胞表面蛋白质关联的减少或改变、或者受体与 G 蛋白的相互作用所诱导的 (25, 62)。细胞表面是否共存多种 CCR5 构象,而且它们是否都容许病毒侵入? mAb 的反应性模式将回答它,因为在 mAb 浓度饱和 gp120 结合 L1. 2-CCR5⁺ 细胞所需要的表位时,HIV-1 侵入和融合也能够发生,尽管水平降低。我们支持下面的假说:L1. 2-CCR5⁺ 细胞上存在的辅助受体分子具有 HIV-1 侵入受纳构象,而 PBMC、PM1 和 CCR5⁺ U87MG 上的 CCR5 分子存在展示不同 mAb 反应性的多种侵入受纳状态。虽然 PA14 和 2D7 可能识别所有构象,但是其它 mAb 可能不行。为什么 L1. 2 细胞有助于特定融合受纳构象仍然有待确定。

[0227] 最近证明了 gp120 结合结构域位于 CCR5Nt 结构域的前 20 个残基中。针对 CCR5 上 gp120 结合结构域的 mAb 有效阻断这种相互作用,但是在抑制 HIV-1 融合和侵入靶细胞方面几乎不像表位位于该区域以外的 PA14 和 2D7 那样有效。PA14 识别 Nt 尖端和 ECL2 中的残基,而 2D7 表位完全位于 ECL2 中。只能推测这些 mAb 的作用机制。可能它们与 ECL2 前几个残基的结合诱导辅助受体构象变化而防止膜融合。或者,ECL2 表位位阻可能阻碍了辅助受体寡聚化和融合受纳蛋白质复合物的形成。还有另一种可能性是 ECL2 中的残基面向融合核的内部,而且 mAb 的结合阻碍 gp41 将融合肽插入质膜。相反,mAb PA8-PA12 可能只是通过直接竞争与 gp120/CD4 复合物的结合来抑制融合和侵入。我们不知道表位暴露和 CCR5 亲和力以外的参数是否决定这些 mAb 抑制病毒侵入的功效。尚不清楚为什么 gp120/辅助受体相互作用之后的抑制步骤比直接阻断该相互作用更加有效。一种解释方式是假设与 CCR5 结合的 gp120 的解离速率比与 CCR5 结合的 mAb 的结合速率低得多。因此,每次 mAb 将自身与辅助受体分子脱离,病毒粒相关 gp120 分子就以准不可逆方式替代它,因为这种相互作用导致膜融合。

[0228] 抗-CCR5mAb 联合之间的协同可能是它们与参与 HIV-1 侵入相互依赖性连续步骤的不同表位相互作用的结果。在 PA12 与 2D7 之间观察到的协同程度(在许多情形下 CI < 0.1) 是异常的,因为对于抗 HIV-1 抗体 (33, 35, 61)、逆转录酶抑制剂 (29)、或蛋白酶抑制剂 (44) 的联合很少观察到 CI 值 < 0.2。由于其效力,在多种测定方式和浓度比例中检查 PA12 : 2D7 联合,观察到一贯高水平的协同。对于与 PA14 联合的 PA12 观察到中度协同。我们还观察到 PA12 与 CD4-IgG2 之间的中度协同。CD4/gp120 复合物是亚稳定的,而且若它不能与辅助受体相互作用则衰退成非融合原状态 (45-48)。由于 PA12 直接阻断 CCR5 上的 gp120 结合位点,因此它的存在可能将平衡转向 gp120/CD4 复合物的失活。这将解释为什么我们观察到 CD4-IgG2 与 mAb PA12 之间在抑制融合和侵入方面的协同。mAb PA14 与 CD4-IgG2 之间缺乏协同说明它们作用于病毒侵入过程中两个不连续的且独立的步骤。将需要联合进一步的研究来确定不同化合物在抑制病毒融合和侵入方面的协同的精确机制。

[0229] 上述结果与 HIV-1 侵入以三个不同步骤发生的模型一致,即受体结合、辅助受体结合和由辅助受体介导的膜融合。单克隆抗体阻断 gp120 结合以及 HIV-1 融合/侵入的能力之间缺乏联系说明辅助受体结合与融合事件是分开的。观察到的协同模式进一步说明了

融合过程中各个事件的顺序。有效抑制该过程中间步骤即 gp120 结合的试剂诸如 PA12 与其之前和之后步骤的抑制剂协同作用。

[0230] 实施例 2

[0231] 背景：

[0232] 日益增多的多药抗性 HIV-1 要求寻找新型抗逆转录病毒试剂。CCR5 是原代 HIV-1 分离株的必需融合辅助受体,而且为抗病毒疗法提供了有希望的靶。PRO140 是在体外在不影响 CCR5 趋化因子受体活性的浓度下有效抑制 HIV-1 侵入和复制的抗-CCR5 单克隆抗体。在本研究中,我们使用 HIV-1 感染的治疗性动物模型评估了 PRO 140 的体内治疗潜力。

[0233] 方法：

[0234] 用正常人 PBMC 重建 CD-17SCID 小鼠,并感染 R5 分离株 HIV-1JR-CSF。在达到病毒稳定状态时,用 PRO 140 或对照抗体腹膜内处理动物,并使用 Roche Amplicor 测定法监测病毒负荷。初步研究检验了单剂 1mg 剂量的 PRO 140。在多剂量研究中,每三天施用一次 PRO 140 达三周,剂量范围 0.1-1.0mg。在分开的试验中,使用流式细胞计量术来检验 PRO140 注射后淋巴细胞损耗的可能性。

[0235] 结果：

[0236] 单剂和多剂 PRO 140 都将所有经处理动物中的病毒负荷降低至检测不到的水平,而且病毒负荷降低的范围达到 1.8log10。单次注射 PRO 140 后观察到病毒复制的暂时控制,而多次注射导致控制延长,而且没有证据表明治疗过程中发生病毒反弹。在由 PRO 140 介导的病毒负荷降低的动力学中观察到依赖剂量的差异。流式细胞计量术分析显示 PRO 140 处理不导致淋巴细胞损耗,确认了对体内病毒复制的影响只是归于 CCR5 阻断。

[0237] 结论：

[0238] PRO 140 在控制 HIV-1 感染 hu-PBL-SCID 小鼠模型中建立的 HIV-1 感染方面高度有效。这些发现为概念即具体而言的 PRO 140 疗法和一般而言的 CCR5 抑制剂疗法提供了体内证据。

[0239] 实施例 3

[0240] 方法：

[0241] 使用本文描述的方法,对人源化 CCR5 抗体 (huPRO 140) 测试在 L1.2-CCR5 细胞中阻断由 RANTES 诱导的钙转移的能力和在人 PBMC 中阻断 HIV-1CASEC 1/85 复制的能力。

[0242] 结果：

[0243] 图 19 中所示结果显示了人源化 CCR5 抗体有效阻断 HIV-1 而非 RANTES。

[0244] 参考文献

[0245] 1. G. P. Allaway, K. L. Davis-Bruno, B. A. Beaudry, E. B. Garcia, E. L. Wong, A. M. Ryder, K. W. Hasel, M. C. Gauduin, R. A. Koup, J. S. McDougal 和 P. J. Maddon, 1995, Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates (中和原代 HIV1 型分离株的新型异四聚体的表达和鉴定), AIDS Res. Hum. Retroviruses, 11 :533-539。

[0246] 2. G. P. Allaway, A. M. Ryder, G. A. Beaudry 和 P. J. Maddon, 1993, Synergistic inhibition of HIV-1 envelope-mediated cell fusion by CD4-based molecules in combination with antibodies to gp 120 or gp41 (基于 CD4 的分子联合针对 gp120 或

gp41 的抗体对由 HIV-1 包膜介导的细胞融合的协同抑制), AIDS Res. Hum. Retroviruses, 9:581-587。

[0247] 3. A. Amara, S. L. Gall, O. Schwartz, J. Salamero, M. Montes, P. Loetscher, M. Baggiolini, J. L. Virelizier 和 F. Arenzana-Seisdedos, 1997, HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 α -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication (HIV 辅助受体下调作为抗病毒原理: 趋化因子受体 CXCR4 的 SDF-1 α 依赖性内在化有助于抑制 HIV 复制), J. Exp. Med., 186:139-146。

[0248] 4. E. A. Berger, 1997, HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection (HIV 侵入和向性: 趋化因子受体连接), AIDS, 11(增刊 A):S3-S16。

[0249] 5. P. D. Bieniasz 和 B. R. Cullen, 1998, Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection (趋化因子受体和人类免疫缺陷病毒感染), Frontiers in Bioscience, 3:d44-58。

[0250] 6. P. D. Bieniasz, R. A. Fridell, I. Aramori, S. S. G. Ferguson, M. C. Caron 和 B. R. Cullen, 1997, HIV-1-induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR5 co-receptor (由 HIV-1 诱导的细胞融合是由病毒包膜和 CCR5 辅助受体内的多个区域介导的), EMBO, 16:2599-2609。

[0251] 7. A. Brelot, N. Heveker, O. Pleskoff, N. Sol 和 M. Alizon, 1997, Role of the first and third extracellular domains of CXCR4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity (CXCR4 第一个和第三个胞外结构域在人类免疫缺陷病毒辅助受体活性中的作用), J. Virol., 71:4744-4751。

[0252] 8. D. C. Chan 和 P. S. Kim, 1998, HIV entry and its inhibition (HIV 侵入及其抑制), Cell, 93:681-684。

[0253] 9. T. C. Chou 和 D. C. Rideout, Synergism and antagonism in chemotherapy (化疗中的协同和拮抗), 纽约, Academic 出版社, 1991。

[0254] 10. F. Cocchi, A. L. DeVico, A. Garzino-Derno, S. K. Arya, R. C. Gallo 和 P. Lusso, 1995, Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8 T-cells (RANTES、MIP-1 α 和 MIP-1 β 作为由 CD8T 细胞生产的主要 HIV 遏制因子的鉴定), Science, 270:1811-1815。

[0255] 11. R. I. Connor, K. E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe 和 N. R. Landau, 1997, Change in co-receptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals (辅助受体用途的变化与 HIV-1 感染个体中的疾病进展有关), J. Exp. Med., 185:621-628。

[0256] 12. M. P. Crump, J. H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, M. Baggiolini, B. D. Sykes 和 I. Clark-Lewis, 1997, Solution structure and basis for functional activity of stromal-cell derived factor-1; disassociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1 (基质细胞衍生因子-1 的溶液结构和功能活性的基础; CXCR4 激活与 HIV-1 结合和抑制的分离), EMBO, 16:6996-7007。

- [0257] 13. A. G. Dalgleish, P. C. L. Beverly, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves 和 R. A. Weiss, 1984, The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus (CD4(T4) 抗原是 AIDS 逆转录病毒受体的实质成分), *Nature*, 312 : 763-766。
- [0258] 14. H. D. Deng, R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. DiMarizio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman 和 N. R. Landau, 1996, Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 (HIV-1 原代分离株的主要辅助受体的鉴定), *Nature*, 381 : 661-666。
- [0259] 15. D. S. Dimitrov, 1997, How do viruses enter cell? The HIV Co-receptor teach us a lesson of complexity (病毒如何进入细胞? HIV 辅助受体给我们上了一堂复杂性的课), *Cell*, 91 : 721-730。
- [0260] 16. G. A. Donzella, D. Schols, S. W. Lin, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, E. D. Clercq 和 J. P. Moore, 1998, JM3100, a small molecular that interacts with the CXCR4 co-receptor to prevent HIV-1 entry (JM3100, 与 CXCR4 辅助受体相互作用以防止 HIV-1 侵入的小分子), *Nat. Med.*, 4 : 72-77。
- [0261] 17. B. J. Doranz, K. Grovit-Ferbas, M. P. Sharron, S. H. Mao, M. B. Goetz, E. S. Daar, R. W. Doms 和 W. A. O'Brien, 1997, A small molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 co-receptor (针对趋化因子受体 CXCR4 以防止其作为 HIV-1 辅助受体的用途的小分子抑制剂), *J. Exp. Med.*, 186 : 1395-1400。
- [0262] 18. B. J. Doranz, Z. -H. Lu, J. Rucker, T. -Y. Zhang, M. Sharron, Y. -H. Cen, Z. -X. Wang, H. -H. Guo, J. -G. Du, M. A. Accavitti, R. W. Doms 和 S. C. Peiper, 1997, Two distinct CCR5 domains can mediate co-receptor usage by human immunodeficiency virus type 1 (两个不同的 CCR5 结构域能够介导 1 型人类免疫缺陷病毒对辅助受体的利用), *J. Virol.*, 71 : 6305-6314。
- [0263] 19. T. Dragic, V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huanh, K. A. Nagashima, C. Cayan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore 和 W. A. Paxton, 1996, HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 (HIV-1 侵入 CD4+ 细胞是由趋化因子受体 CC-CKR-5 介导的), *Nature*, 381 : 667-673。
- [0264] 20. T. Dragic, A. Trkola, X. W. Lin, K. A. Nagashima, F. Kajumo, L. Zhao, W. C. Olson, L. Wu, C. R. Mackay, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, J. P. Moore 和 P. J. Maddon, 1998, Amino terminal substitutions in the CCR5 co-receptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry (CCR5 辅助受体中的氨基末端替代削弱 gp120 结合和 1 型人类免疫缺陷病毒侵入), *J. Virol.*, 72 : 279-285。
- [0265] 21. T. Dragic, A. Trkola 和 J. P. Moore, 1997, HIV co-receptors : Gateways to the cell (HIV 辅助受体 : 进入细胞的通道), *Advances in Research and Therapy*, 7 : 2-13。
- [0266] 22. M. Farzan, H. Choe, L. Vaca, K. Martin, Y. Sun, E. Desjardins, N. Ruffing, L. Wu, R. Wyatt, N. Gerard, C. Gerard 和 J. Sodroski, 1998, A tyrosine-rich region in the N-terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry

and mediates an association between gp120 and CCR5 (CCR5N 末端酪氨酸富含区对 1 型人类免疫缺陷病毒侵入而言是重要的而且介导 gp120 与 CCR5 之间的结合), *J. Virol.*, 72: 1160-1164.

[0267] 23. T. R. Fuerst, E. G. Niles, F. W. Studier 和 B. Moss, 1986, Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase (合成噬菌体 T7 RNA 聚合酶的基于重组牛痘病毒的真核瞬时表达系统), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8122-8126.

[0268] 24. S. Genoud, F. Kajumo, Y. Guo, D. A. D. Thompson 和 T. Dragic, CCR5-mediated human immunodeficiency virus entry depends on an amino-terminal domain gp120-binding site and on the conformational integrity of all four extracellular domains (由 CCR5 介导的人类免疫缺陷病毒侵入依赖氨基末端结构域 gp120 结合位点和所有四个胞外结构域的构象完整性), *J. Virol.*, 已提交。

[0269] 25. U. Gether 和 B. K. Kobilka, 1998, G protein-coupled receptors (G 蛋白偶联受体), *J. Biol. Chem.*, 273: 17979-17982.

[0270] 26. C. Gordon, M. Muesing, A. E. I. Proudfoot, C. A. Power, J. P. Moore 和 A. Trkola, 1998, Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion (CC 趋化因子 RANTES 对 1 型人类免疫缺陷病毒感染的增强不依赖病毒-细胞融合机制), *J. Virol.*, 印刷中。

[0271] 27. N. Heveker, M. Montes, L. Germeroth, A. Amara, A. Trautmann, M. Alizon 和 J. Schneider-Mergener, 1998, Dissociation of the signaling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides (SDF-1 衍生小肽的信号与抗病毒特性的分离), *Current Biology*, 8: 369-376.

[0272] 28. C. M. Hill, D. Kwon, M. Jones, C. B. Davis, S. Marmon, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, M. S. Springer, D. Unutmaz 和 D. R. Littman, 1998, The amino terminus of human CCR5 is required for its function as a receptor for diverse human and simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins (人 CCR5 氨基末端是其作为不同人类和猿免疫缺陷病毒包膜糖蛋白受体发挥功能所需要的), *Virology*, 248: 357-371.

[0273] 29. V. A. Johnson, D. P. Merrill, J. A. Videler, T. C. Chou, R. E. Byington, J. J. Eron, R. T. D' Aquila 和 M. S. Hirsch, 1991, Two-drug combinations of zidovudine, didanosine and recombinant interferon-alpha A inhibit replication of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 synergistically in vitro 即 zidovudine、didanosine (重组 α -干扰素的二药组合在体外协同抑制 zidovudine 抗性 1 型人类免疫缺陷病毒的复制), *J. Infect. Dis.*, 164: 646-655.

[0274] 30. D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. M. Gruest, D. Guetard, T. Hercent, J. C. Gluckman 和 L. Montagnier, 1984, T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV (T 淋巴细胞 T4 分子表现为人类逆转录病毒 LAV 受体), *Nature*, 312: 382-385.

[0275] 31. K. E. Kuhmann, E. J. Platt, S. L. Kozak 和 D. Kabat, 1997, Polymorphism in the

CCR5 genes of African green monkeys and mice implicate specific amino acids in infections by simian and human immunodeficiency viruses (非洲青猴和小鼠 CCR5 基因多态性指示猿和人类免疫缺陷病毒感染中的特异氨基酸), *J. virol.*, 71 :8642-8656。

[0276] 32. P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski 和 W. A. Hendrickson, 1998, Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody (与 CD4 受体和中和性人类抗体复合的 HIV gp120 包膜糖蛋白的结构), *Nature*, 393 :648-659。

[0277] 33. S. Laal, S. Burda, M. K. Gorny, S. Karwowska, A. Buchbinder 和 S. Zolla-Pazner, 1994, Synergistic neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by combinations of human monoclonal antibodies (人类单克隆抗体组合对 1 型人类免疫缺陷病毒的协同中和), *J. Virol.*, 68 :4001-4008。

[0278] 34. B. Labrosse, A. Brelot, N. Heveker, N. Sol, D. Schols, E. D. Clercq 和 M. Alizon, 1998, Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus co-receptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100 (人类免疫缺陷病毒辅助受体 CXCR4 对双磺酸钠 AMD3100 的敏感性的决定因素), *J. Virol.*, 72 :6381-6388。

[0279] 35. A. Li, H. Katinger, M. R. Posner, L. Cavacini, S. Zolla-Pazner, M. K. Gorny, J. Sodroski, T. C. Chou, T. W. Baba 和 R. M. Ruprecht, 1998, Synergistic neutralization of simian-human immunodeficiency virus SHIV-vpu+ by triple and quadruple combinations of human monoclonal antibodies and high-titer anti-human immunodeficiency virus type 1 immunoglobulins (人类单克隆抗体和高滴度抗 1 型人类免疫缺陷病毒免疫球蛋白的三重和四重组合对猿-人类免疫缺陷病毒 SHIV-vpu+ 的协同中和), *J. Virol.*, 72 :3235-3240。

[0280] 36. D. R. Littman, 1998, Chemokine receptors : keys to AIDS pathogenesis (趋化因子受体 : AIDS 发病机理的关键), *Cell*, 93 :677-680。

[0281] 37. V. Litwin, 未发表结果。

[0282] 38. V. Litwin, K. Nagashima, A. M. Ryder, C. H. Chang, J. M. Carver, W. C. Olson, M. Alizon, K. W. Hasel, P. J. Maddon 和 G. P. Allaway, 1996, Human immunodeficiency virus type 1 membrane fusion mediated by a laboratory-adapted strain and a primary isolate analyzed by resonance energy transfer (通过共振能转移分析的由适合实验室的毒株和原代分离株介导的 1 型人类免疫缺陷病毒膜融合), *J. Virol.*, 70 :6437-6441。

[0283] 39. P. Loetscher, J. H. Gong, B. Dewald, M. Baggiolini 和 I. Clark-Lewis, 1998, N-terminal peptides of stromal cell derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities (具有 CXC 趋化因子受体 4 激动剂和拮抗剂活性的基质细胞衍生因子-1 的 N 末端肽), *J. Biol. Chem.*, 273 :22279-22283。

[0284] 40. M. Mack, B. Luckow, P. J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P. R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T. N. C. Wells, D. Schlondorff 和 A. E. I. Proudfoot, 1998, Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling : a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity (氨基氧戊烷-RANTES 诱导 CCR5 内在化但抑制循环 : HIV 感染的新抑制机制), *J. Exp. Med.*, 187 :

1215-1224。

[0285] 41. P. J. Maddon, A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss 和 R. Axel, 1986, The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain (T4 基因编码 AIDS 病毒受体并且在免疫系统和大脑中表达), *Cell*, 47 :333-348。

[0286] 42. J. S. McDougal, M. S. Kennedy, J. M. Sligh, S. P. Cort, A. Mawle 和 J. K. A. Nicholson, 1986, Binding of HTLVIII/LAV to T4+T cells by a complex of the 110K virus protein and the T4 molecule (通过 110K 病毒蛋白与 T4 分子的复合物 HTLVIII/LAV 结合 T4+T 细胞), *Science*, 231 :382-385。

[0287] 43. A. McKnight, D. Wilkinson, G. Simmons, S. Talbot, L. Picard, M. Ahuja, M. Marsh, J. A. Hoxie 和 P. R. Clapham, 1997, Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a co-receptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent (针对辅助受体 (CXCR4) 的单克隆抗体对人类免疫缺陷病毒融合的抑制即依赖细胞类型又依赖病毒毒株), *J. Virol.*, 71 :1692-1696。

[0288] 44. D. P. Merrill, D. J. Manion, T. C. Chou 和 M. S. Hirsch, 1997, Antagonism between human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors indinavir and saquinavir in vitro (1 型人类免疫缺陷病毒蛋白酶抑制剂 indinavir 与 saquinavir 之间的体外拮抗), *J. Infect. Dis.*, 176 :265-268。

[0289] 45. J. P. Moore, Y. Cao, L. Qing, Q. J. Sattentau, J. Pyati, R. Koduri, J. Robinson, C. F. Barbas, D. R. Burton 和 D. D. Ho, 1995, Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120 and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120 (1 型人类免疫缺陷病毒的原代分离株相对抵抗针对 gp120 的单克隆抗体的中和作用而且对单体 gp120 的研究没有预报它们的中和作用), *J. Virol.*, 69 :101-109。

[0290] 46. J. P. Moore, B. A. Jameson, R. A. Weiss 和 Q. J. Sattentau, The HIV-cell fusion reaction (HIV- 细胞融合反应), 伯克莱屯, CRC 出版公司, 1993, J. Bentz 编的《Viral Fusion Mechanisms》(病毒融合机制)。

[0291] 47. J. P. Moore, J. A. McKeating, Y. Huang, A. Ashkenazi 和 D. D. Ho, 1992, Virions of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to soluble CD4 (sCD4) neutralization differ in sCD4 binding and glycoprotein gp120 retention from sCD4-sensitive isolates (抵抗可溶性 CD4 (sCD4) 中和的 1 型人类免疫缺陷病毒原代分离株病毒粒与 sCD4 敏感性分离株在 sCD4 结合和糖蛋白 gp120 保持方面不同), *J. Virol.*, 66 :235-243。

[0292] 48. J. P. Moore 和 R. W. Sweet, 1993, The HIV gp120-CD4 interaction: a target for pharmacological and immunological intervention (HIV gp120-CD4 相互作用: 制药学和免疫学干涉的靶), *Prospect in Drug Discovery and Design*, 1 :235-250。

[0293] 49. T. Murakami, T. Nakajima, Y. Koyanagi, K. Tachibana, N. Fujii, H. Tamamura, N. Yoshida, M. Waki, A. Matsumoto, O. Yoshie, T. Kishimoto, N. Yamamoto 和 T. Nagasawa, 1997, A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1

infection(阻断 T 细胞系向性 HIV-1 感染的小分子 CXCR4 抑制剂), J. Exp. Med., 186 : 1389-1393。

[0294] 50. W. C. Olson, 未发表结果。

[0295] 51. G. Pantaleo, G. Poli, L. Butini, C. Fox, A. I. Dayton 和 A. S. Fauci, 1991, Dissociation between syncytia formation and HIV spreading. Suppression of syncytia does not necessarily reflect inhibition of HIV infection(合胞体形成和 HIV 扩散之间的分离。合胞体遏制并非必然反映对 HIV 感染的抑制), Eur. J. Immunol., 21 : 1771-1774。

[0296] 52. G. E. E. Rabut, J. A. Konner, F. Kajumo, J. P. Moore 和 T. Dragic, 1998, Alanine substitutions of polar and non-polar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dual-tropic isolates of the human immunodeficiency virus type 1 (CCR5 氨基末端结构域中极性和非极性残基的丙氨酸替代不同程度削弱 1 型人类免疫缺陷病毒巨噬细胞和双重向性分离株的侵入), J. virol., 72 : 3464-3468。

[0297] 53. C. Rizzuto, R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. Kwong, W. Hendrickson 和 J. Sodroski, 1998, Identification of a conserved human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein structure important for chemokine receptor binding(对趋化因子受体结合重要的人类免疫缺陷病毒 gp120 糖蛋白保守结构的鉴定), Science, 280 : 1949-1953。

[0298] 54. J. Rucker, M. Samson, B. J. Doranz, F. Libert, J. F. Berson, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, C. C. Broder, G. Vassart, R. W. Doms 和 M. Parmentier, 1996, Regions in the β -chemokine receptors CCR-5 and CCR-2b that determine HIV-1 cofactor specificity(β -趋化因子受体 CCR-5 和 CCR-2b 中决定 HIV-1 辅助因子特异性的区域), Cell, 87 : 437-446。

[0299] 55. D. Schols, S. Struyf, J. V. Damme, J. A. Este, G. Henson 和 E. D. Clercq, 1997, Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4(趋化因子受体 CXCR4 选择性拮抗对 T 向性 HIV 毒株的抑制), J. Exp. Med., 186 : 1383-1388。

[0300] 56. G. Simmons, P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. C. Wells 和 A. E. I. Proudfoot, 1997, Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist(巨噬细胞和淋巴细胞中新型 CCR5 拮抗剂对 HIV-1 传染性的有效抑制), Science, 276 : 276-279。

[0301] 57. G. Simmons, D. Wilkinson, J. D. Reeves, M. T. Dittmar, S. Beddows, J. Weber, G. Carnegie, U. Desselberger, P. W. Gray, R. A. Weiss 和 P. R. Clapham, 1996, Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type-1 isolates are dual-tropic and most can use either LESTR or CCR5 as co-receptor for virus entry(原代、合胞体诱导的 1 型人类免疫缺陷病毒分离株具有双重向性且大多能够使用 LESTR 或 CCR5 作为病毒侵入的辅助受体), J. Virol., 70 : 8355-8360。

[0302] 58. J. M. Strizki, J. Davis-Turner, R. G. Collman, J. Hoxie 和

F. Gonzalez-Scarano, 1997, A monoclonal antibody (12G5) directed against CXCR4 inhibits infection with the dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate HIV-189.6 but not the T-tropic isolate HIV-1 HxB (针对 CXCR4 的单克隆抗体 (12G5) 抑制双重向性 1 型人类免疫缺陷病毒分离株 HIV-189.6 而非 T 向性分离株 HIV-1 HxB 的感染), J. Virol., 71 : 5678-5683。

[0303] 59. A. Trkola, T. Dragic, J. Arthos, J. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon 和 J. P. Moore, 1996, CD4-dependent, antibody sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5 (HIV-1 与其辅助受体 CCR-5 之间的 CD4 依赖性、抗体敏感性相互作用), Nature, 384 : 184-187。

[0304] 60. A. Trkola, W. A. Paxton, S. P. Monard, J. A. Hoxie, M. A. Siani, D. A. Thompson, L. Wu, C. R. Mackay, R. Horuk 和 J. P. Moore, 1997, Genetic subtype-independent inhibition of human immunodeficiency virus type-1 replication by CC- and CX- chemokines (CC 和 CX 趋化因子对 1 型人类免疫缺陷病毒复制的非遗传亚型依赖性抑制), J. Virol., 72 : 396-404。

[0305] 61. S. Vihj-Warrier, A. Pinter, W. J. Honnen 和 S. A. Tilley, 1996, Synergistic neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by a chimpanzee monoclonal antibody against the V2 domain of gp120 in combination with monoclonal antibodies against the V3 loop and the CD4-binding site (针对 gp120 V2 结构域的黑猩猩单克隆抗体联合针对 V3 环和 CD4 结合位点的单克隆抗体对 1 型人类免疫缺陷病毒的协同中和), J. Virol., 70 : 4466-4473。

[0306] 62. S. G. Ward, K. Bacon 和 J. Westwick, 1998, Chemokines and lymphocytes : more than an attraction (趋化因子和淋巴细胞 : 不只是吸引), Immunity, 9 : 1-11。

[0307] 63. L. Wu, N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard 和 J. Sodroski, 1996, CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5 (原代 HIV-1 gp120 糖蛋白与趋化因子受体 CCR-5 之间由 CD4 诱导的相互作用), Nature, 384 : 179-183。

[0308] 64. L. Wu, G. LaRosa, N. Kassam, C. J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblas, M. Samson, M. Parmentier, J. P. Moore 和 C. R. Mackay, 1997, Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands : multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding (趋化因子受体 CCR5 与其配体之间的相互作用 : 用于 HIV-1 gp120 结合的多个结构域和用于趋化因子结合的单个结构域), J. Exp. Med., 186 : 1373-1381。

[0309] 65. R. Wyatt, P. D. Kwong, E. Desjardins, R. Sweet, J. Robinson, W. Hendrickson 和 J. Sodroski, 1998, The antigenic structure of the human immunodeficiency virus gp120 envelope glycoprotein (人类免疫缺陷病毒 gp120 包膜糖蛋白的抗原性结构), Nature, 393 : 705-711。

[0310] 66. R. Wyatt 和 J. Sodroski, 1998, The HIV-1 envelope glycoproteins : fusogens, antigens and immunogens (HIV-1 包膜糖蛋白 : 融合原、抗原和免疫原),

Science, 280 :1884-1888。

[0311] 67. L. Ylisastigui, J. J. Vizzavona, E. Drakopoulou, P. Paindavoine, C. F. Calvo, M. Parmentier, J. C. Gluckman, C. Vita 和 A. Benjouad, 1998, Synthetic full length and truncated RANTES inhibit HIV-1 infection of primary macrophages (合成全长和截短 RANTES 抑制 HIV-1 感染原代巨噬细胞), AIDS, 12 :977-984。

[0312] 68. J. L. Zhang, H. Choe, B. J. Dezube, M. Farzan, P. L. Sharma, X. C. Zhou, L. B. Chen, M. Ono, S. Gillies, Y. Wu, J. G. Sodroski 和 C. S. Fumppacker, 1998, The bis-azo compound FP-21399 inhibits HIV-1 replication by preventing viral entry (二氮化合物 FP-21399 通过防止病毒侵入来抑制 HIV-1 复制), Virology, 244 :530-541。

[0313] 69. J. S. Cairns 和 M. P. D' Souza, 1998, Chemokines and HIV-1 second receptors : the therapeutic connection (趋化因子和 HIV-1 第二受体 : 治疗联系), Nature Medicine, 1998, Vol. 4, No. 5 :563。

[0314] 70. J. Michael Kilby 等人, 1998, Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry (由 gp41 介导的病毒侵入的肽抑制剂 T-20 在人类中对 HIV-1 复制的有效遏制), Nature Medicine, Vol. 3, No. 11 :1302。

[0315] 71. 1989 年 3 月 28 日颁发给 Cabilly 等人的美国专利号 4,816,567。

[0316] 72. 1993 年 7 月 6 日颁发给 Gregory Winter 的美国专利号 5,225,539。

[0317] 73. 1996 年 12 月 17 日颁发给 Queen 等人的美国专利号 5,585,089。

[0318] 74. 1997 年 12 月 2 日颁发给 Queen 等人的美国专利号的 5,693,761。

[0319] 75. 1989 年 12 月 28 日提交的 PCT 国际申请号 PCT/US89/05857, 1990 年 7 月 26 日发表的 WO 90/07861。

[0001]

序列表

<110> 原基因药物有限公司等

<120> 抗CCR5抗体

<130> 2048/57906-D-PCT

<140> PCT/US03/05500

<141> 21.02.2003

<150> 10/081,128

<151> 22.02.2002

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

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	Lys	Gln	Ile	Ala	Ala	Ala	Arg
			20					25					30	

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

His	Tyr	Ala	Ala	Ala	Gln	Trp	Asp	Phe	Gly	Asn	Thr	Met	Cys	Gln
1				5					10					15

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Arg	Ser	Gln	Lys	Glu	Gly	Leu	His	Tyr	Thr	Cys	Ser	Ser	His	Phe	Pro
1				5					10					15	

Tyr	Ser	Gln	Tyr	Gln	Phe	Trp	Lys	Asn	Phe	Gln
				20				25		

[0002]

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser Asn Arg Leu Asp
 1 5 10 15

Gln

<210> 5
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 5

tctagaccac catgaagttg cctgtaggc tgttggtgct gatgttctgg attcctgctt 60
 ccagcagtga tattgtgatg acccaatctc cactctccct gcctgtcact cctggagagc 120
 cagcctccat ctcttgacaga tctagtcagc gccttctgag cagttatgga catacctatt 180
 tacattggta cctacagaag ccaggccagt ctccacagct cctgatctac gaagtttcca 240
 accgattttc tgggggtccca gacaggttca gtggcagtgg gtcagggaca gatttcacac 300
 ttaagatcag tagagtggag gctgaggatg tgggagttaa ttactgctct caaagtacac 360
 atgttcctct cacgttcgga caggggacca aggtggaaat aaaacgtaag tagtcttctc 420
 aactctaga 429

<210> 6
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

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

[0003]

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> 7
<211> 393
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
atgaagtgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgtcttc cagcagtgat 60
attgtgatga cccaatctcc actctccctg cctgtcactc ctggagagcc agcctccatc 120
tcttgcagat ctagtcagcg ccttctgagc agttatggac atacctattt acattgggtac 180
ctacagaagc caggccagtc tccacagctc ctgatctacg aagtttccaa ccgattttct 240
gggggtcccag acaggttcag tggcagtggtg tcagggacag atttcacact taagatcagt 300
agagtggagg ctgaggatgt gggagtttat tactgctctc aaagtacaca tgttcctctc 360
acgttcggac aggggaccaa ggtggaaata aaa 393

<210> 8
<211> 457
<212> DNA
<213> 智人

<400> 8
acgcgtccac catggaatgg agcggagtct ttatctttct cctgtcagta actgcaggtg 60
tccactccga ggtgcagctg gtggagtctg gtggaggctt ggtaaagcct ggaggttccc 120

[0004]

```

ttagactctc ctgtgcagcc tctgggttaca ctttcagtaa ctattggatc ggatgggtcc 180
gccaggctcc aggcaaaggg ctggagtgga ttggcgatat ctaccctgga gggaactaca 240
tcaggaacaa tgagaagttc aaggacaaga ccaccctgtc agcagatact tccaagaaca 300
cagcctatct gcaaataaac agcctgaaaa ccgaggacac agccgtgtat tactgtggaa 360
gcagcttcgg tagtaactac gtgttcgcct ggtttactta ctggggccaa gggactctgg 420
tcacagtctc ctcaggtgag tccttaaaac ctctaga 457

```

<210> 9
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9

```

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

```

```

Glu Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
85          90          95

```

```

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr 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> 10

[0005]

<211> 423
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 10
 atggaatgga ggggagtctt tatctttctc ctgtcagtaa.ctgcaggtgt ccactccgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg tggaggcttg gtaaagcctg gaggttcct tagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggttacac tttcagtaac tattggatcg gatgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaagggc tggagtggat tggcgatata taccctggag ggaactacat caggacaat 240
 gagaagttca aggacaagac caccctgtca gcagatactt ccaagaacac agcctatctg 300
 caaatgaaca gcctgaaaac cgaggacaca gccgtgtatt actgtggaag cagcttcggg 360
 agtaactacg tgttcgctg gtttacttac tggggccaag ggactctggg cacagtctcc 420
 tca 423

<210> 11
 <211> 457
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 11
 tctagaccac catggaatgg agcgggggtct ttatctttct cctgtcagta actgcaggtg 60
 tccactccca ggtccaactg gtgcagctctg gacctgatgt gaaaaagcct gggacttcaa 120
 tgaagatgtc ctgcaagacg tctggatata cttcagtaa 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 gtgttcgctt ggtttactta ctggggccaa gggactctgg 420
 tcacagtctc ctgaggtgag tccttaaaac ctctaga 457

<210> 12
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 12

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Lys Lys

[0006]

20	25	30
Pro Gly Thr Ser Met Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe 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 80		
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> 13
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 13
 atggaatgga gcggggtctt tatctttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactcccag 60
 gtccaactgg tgcagtctgg acctgatgtg aaaaagcctg ggacttcaat gaagatgtcc 120
 tgcaagacgt ctggatacac cttcagtaac tattggatcg gatggggttag gcaggcgcoct 180
 ggacaaggcc ttgagtggat tggagatatt taccctggag ggaactatat caggaàcaat 240
 gagaagttca aggacaagac cacttgacg gcagacacat cgaccagcac ggcctacatg 300
 caacttggca gcoctgagatc tgaagacact gccgtctatt actgtggaag cagcttcggt 360
 agtaactacg tgttcgctg gtttacttac tggggccaag ggactctggt cacagtctcc 420
 tca 423

mAb	平均荧光强度		% 选通	
	L1.2-CCR5	PBMC	L1.2-CCR5	PBMC
小鼠 IgG1	10	4	1	1
2D7	75	29	92	36
PA8	48	9	73	3
PA9	79	5	96	3
PA10	80	8	96	5
PA11	107	8	96	10
PA12	115	8	96	8
PA14	81	14	96	22

图 1

抑制剂联合	浓度比例	测定	联合指数	
			90% 抑制	50% 抑制
PA12:2D7	10:1	侵入	0.043	0.291
	2:1	融合	0.017	0.019
	10:1	融合	0.087	0.067
	50:1	融合	0.158	0.046
PA12:PA14	10:1	侵入	0.437	0.535
	10:1	融合	0.22	0.263
PA14:2D7	1:1	侵入	2.85	1.85
	1:1	融合	1.34	1.74
PA12:PA11	1:1	侵入	0.707	0.641
PA12:RANTES	1000:1	融合	0.331	0.156
PA14:RANTES	100:1	融合	1.6	1.37
2D7:RANTES	100:1	融合	0.972	0.962
PA12:CD4-IgG2	10:1	融合	0.3	0.31
PA14:CD4-IgG2	1:1	融合	0.957	0.566
2D7:CD4-IgG2	1:1	融合	1.127	0.302

图 2

	表位	IC ₅₀ 值 (μg/ml)			
		细胞-细胞 融合抑制	病毒侵 入抑制	gp120 结合抑制	钙流抑制
PA8	Nt	-	-	-	-
PA9	Nt/ECL2	-	-	0.24	-
PA10	Nt/ECL2	-	-	0.13	-
PA11	Nt	25.5	-	0.33	-
PA12	Nt	10.0	-	0.24	-
PA14	Nt/ECL2	1.7	.024	1.58	6.4
2D7	ECL2	1.6	.026	1.38	45

图 3

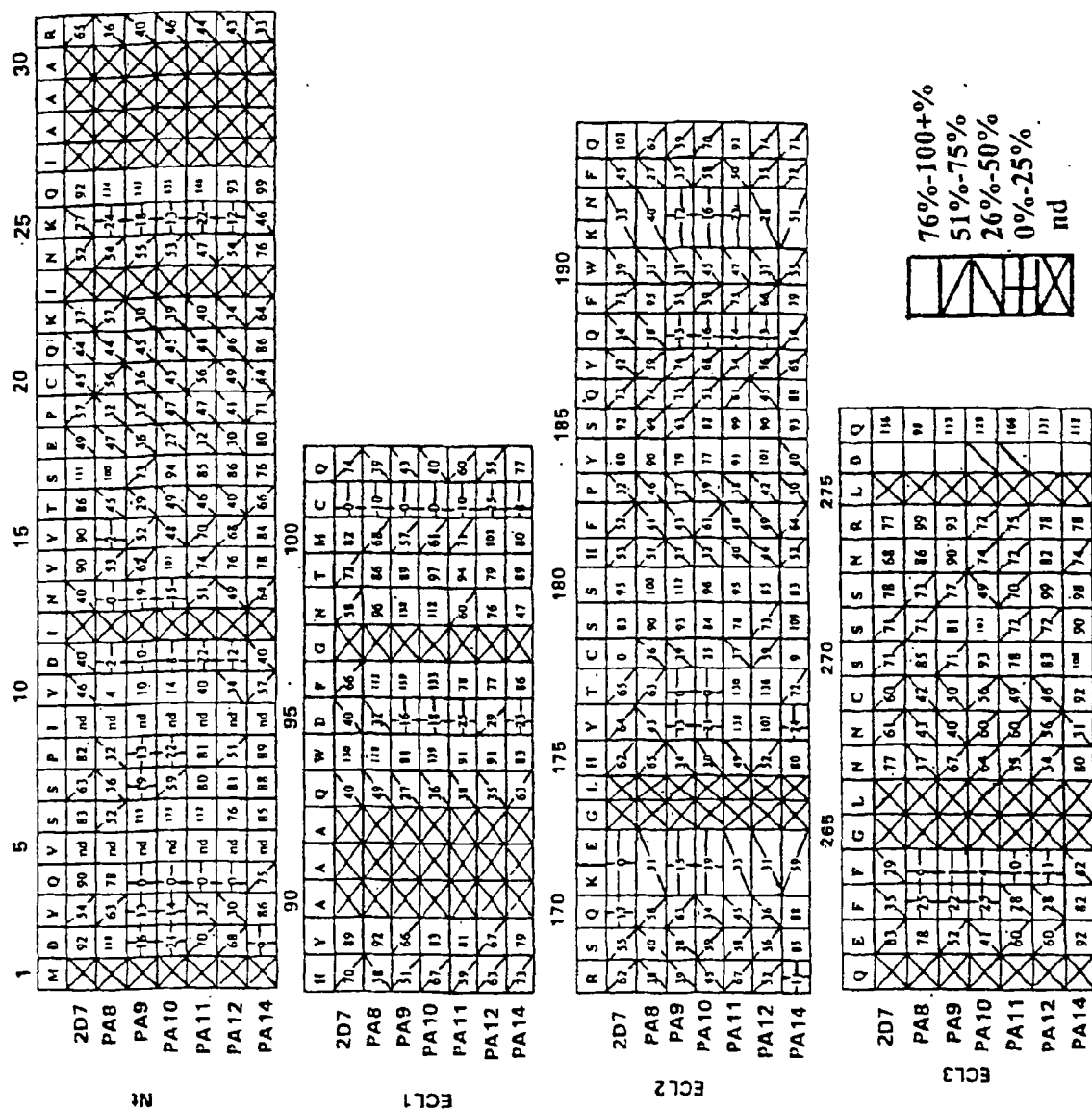


图 4

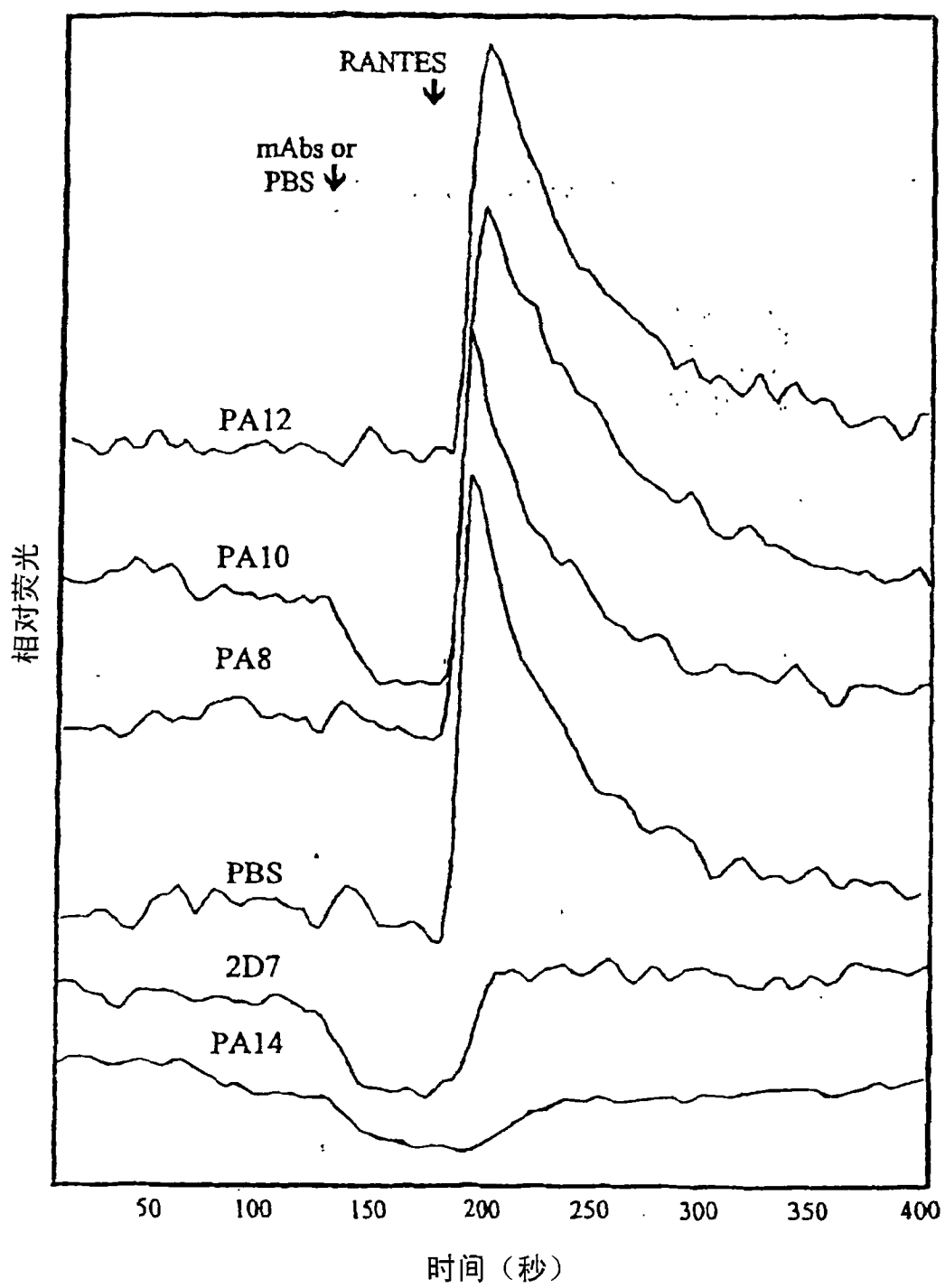


图 5A

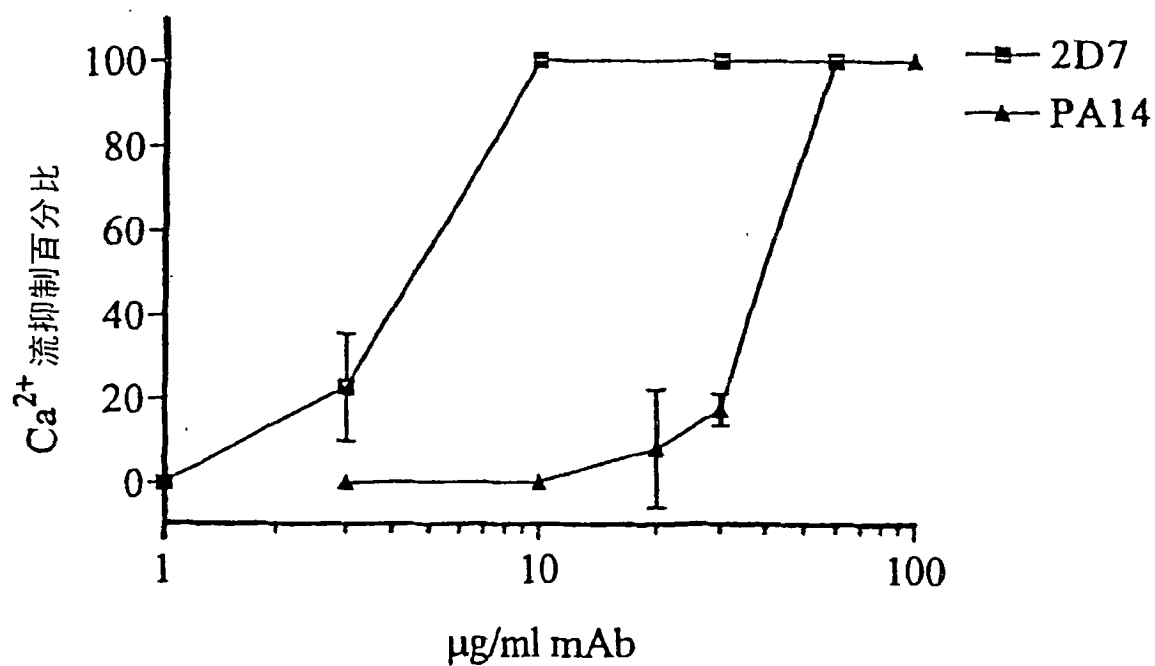


图 5B

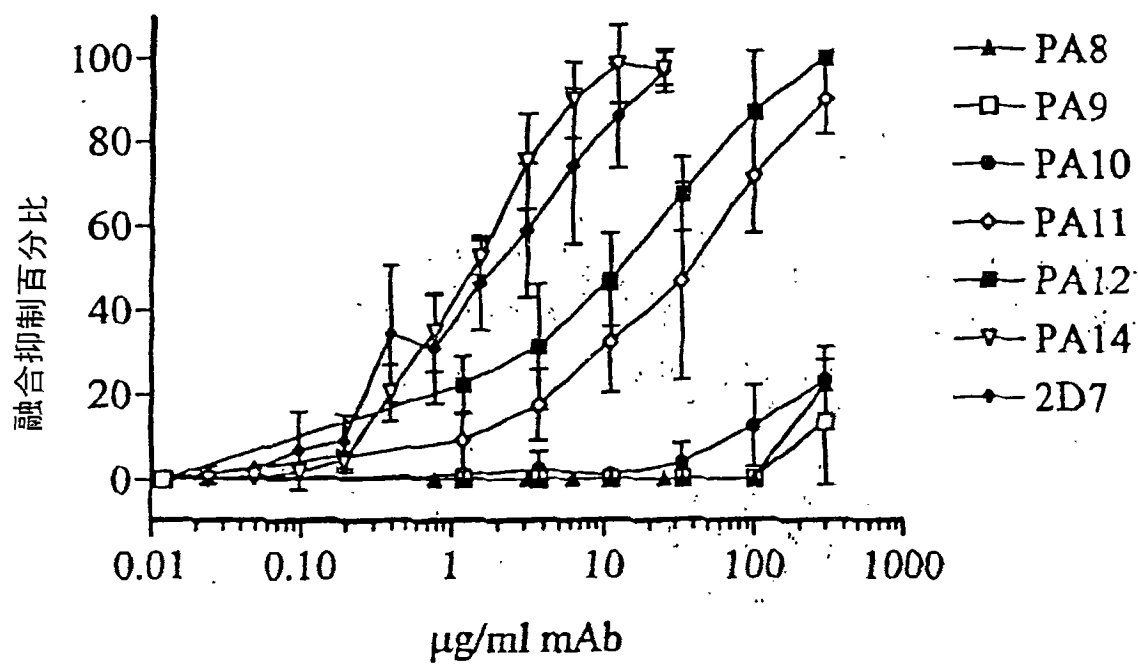


图 6A

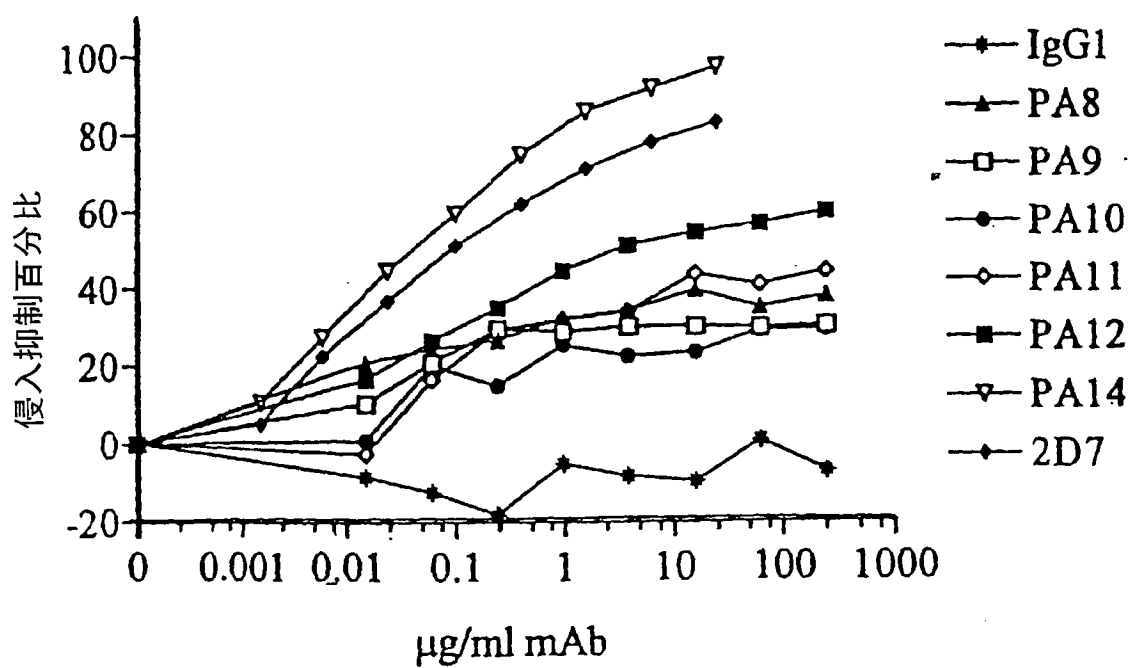


图 6B

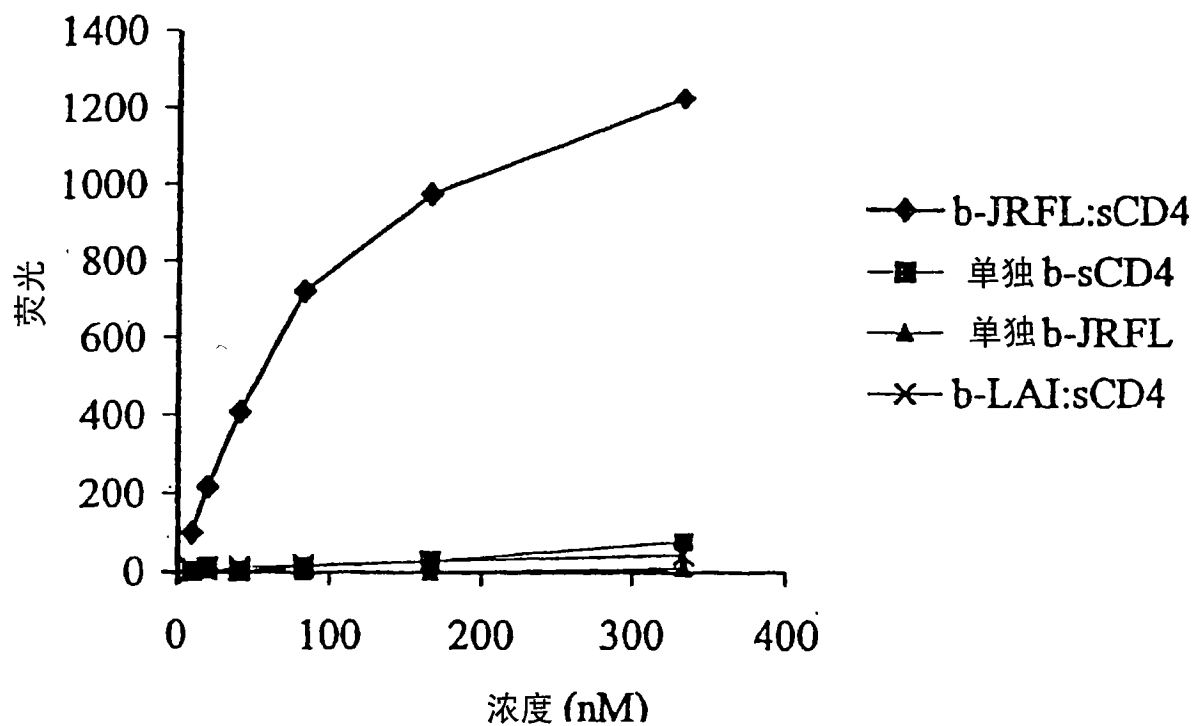


图 6C

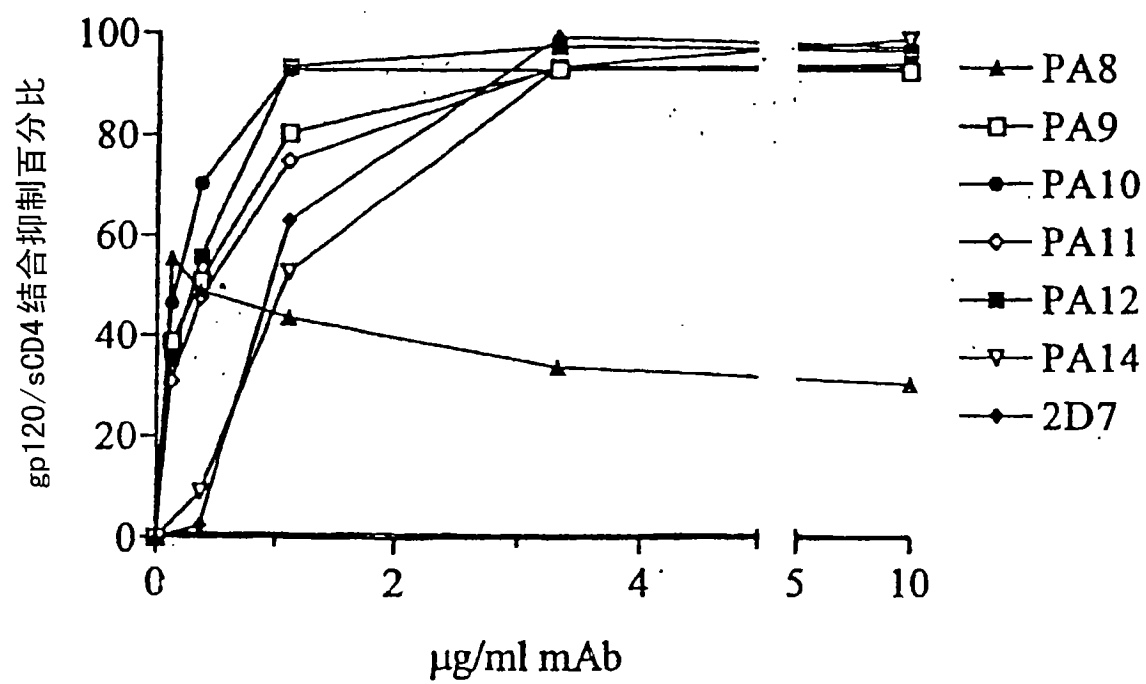


图 6D

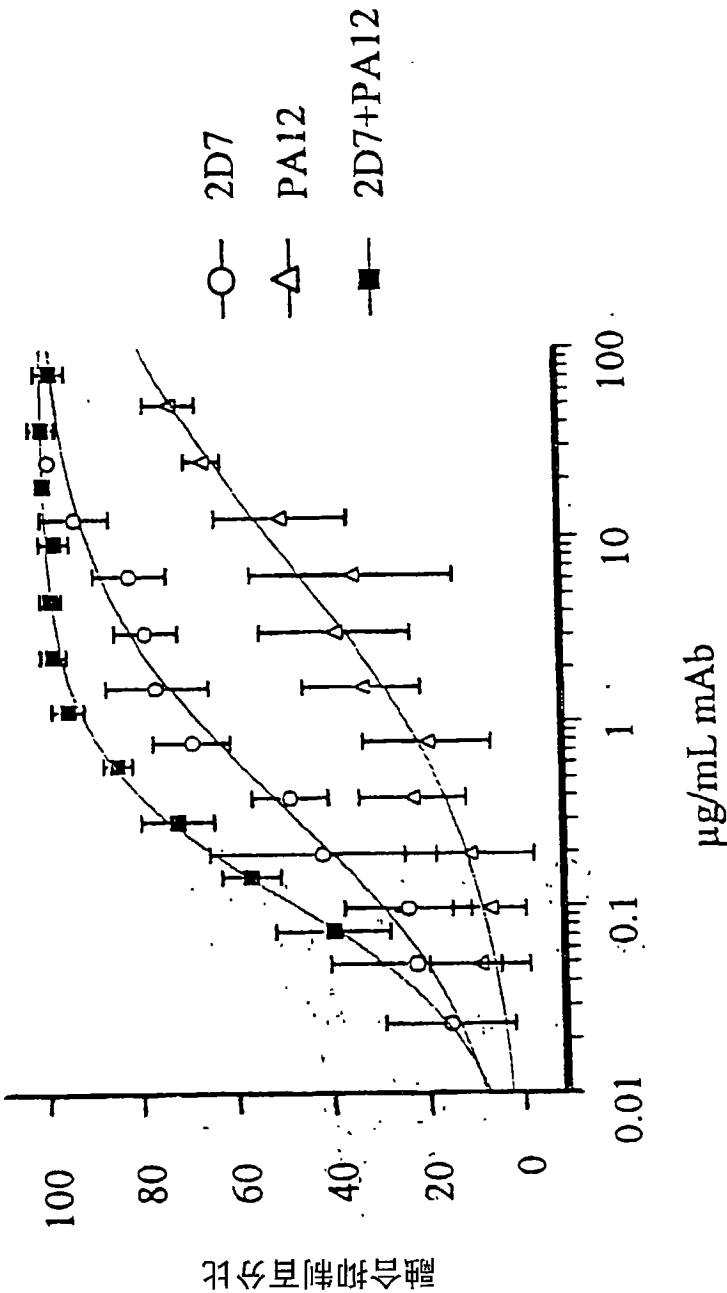


图 7

```

        30          60
TCTAGACCACCATGAAGTGCCTGTTAGGCTGTGGCTGCTGATGTTCTCGATTCCCTCTT
      M K L P V R L L L V L M F W I P A

        90          120
CCAGCAGTGATATTGTGATGACCCCAATCTCCCACTCTCCCTGCCCTGTCACCTCCTGGAGAGC
S S D I V M T Q S P L S L P V T P G E

        150          180
CAGCCTCCATCTCTTGCAATCTAGTCAAGCGGCTTCTGAGCAGTTATGGACATACCTATT
P A S I S C R S S Q R L L S S Y G H T Y

        210          240
TACA TTGGTACCTACAGAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACGAAGTTTCCA
L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y E V E

        270          300
ACCGATTTTCTGGGTCCCAAGACAGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCAAGGACAGATTTCACAC
N R F S G V P D R P S G S G S G T D F T

        330          360
TTAAGATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTTATTACTGCTCTCAAGTACAC
L K I S R V E A E D V G V Y Y C S Q S T

        390          420
ATGTTCTCTCAGTTCGGACAGGGGACCAAGGTGGAAATAAACCCTAAGTAGTCTCTCTC
H V P L T F G Q G T K V E I K

```

429
AACTCTAGA

图 8

30 59
ACGCGTCCACCATGGAATGGAGCGGAGTCTTTATCTTTCTCCTGTCAGTAACTGCAGGT
M E W S G V F I F L L S V T A G

89 118
GTCCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGAGGTTTC
V H S E V Q L V E S G G G L V K P G G S

148 177
CCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGTTACACTTTCAGTAACTATTGGATCGGATGGG
L R L S C A A S G Y T F S N Y W I G W

207 236
TCGCCCAGGCTCCAGGCAAAGGGCTGGAGTGGATTGGCGATATCTACCCTGGAGGGAAC
V R Q A P G K G L E W I G D I Y P G G N

266 295
TACATCAGGAACAATGAGAAGTTCAAGGACAAGACCACCCTGTCAGCAGATACTTCCAA
Y I R N N E K F K D K T T L S A D T S K

325 354
GAACACAGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACT
N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y

384 413
GTGGAAGCAGCTTCGGTAGTAACTACGTGTTTCGCCTGGTTTACTTACTGGGGCCAAGGG
C G S S F G S N Y V F A W F T Y W G Q G

443 457
ACTCTGGTCACAGTCTCCTCAGGTGAGTCCTTAAACCTCTAGA
T L V T V S S

图 9

30 60
TCTAGACCACCATGGAATGGAGCGGGGTCTTTATCTTTCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTG
M E W S G V F I F L L S V T A G

90 120
TCCACTCCCAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGACCTGATGTGAAAAAGCCTGGGACTTCAA
V H S Q V Q L V Q S G P D V K K P G T S

150 180
TGAAGATGTCCTGCAAGACGTCTGGATACACCTTCAGTAACTATTGGATCGGATGGGTGA
M K M S C K T S G Y T F S N Y W I G W V

210 240
GGCAGGCGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTACCCTGGAGGGAACTATA
R Q A P G Q G L E W I G D I Y P G G N Y

270 300
TCAGGAACAATGAGAAGTTCAAGGACAAGACCACACTGACGGCAGACACATCGACCAGCA
I R N N E K F K D K T T L T A D T S T S

330 360
CGGCCTACATGCAACTTGGCAGCCTGAGATCTGAAGACACTGCCGTCTATTACTGTGGAA
T A Y M Q L G S L R S E D T A V Y Y C G

390 420
GCAGCTTCGGTAGTAACTACGTGTTTCGCCTGGTTTACTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG
S S F G S N Y V F A W F T Y W G Q G T L

450 457
TCACAGTCTCCTCAGGTGAGTCCTTAAACCTCTAGA
V T V S S

图 10

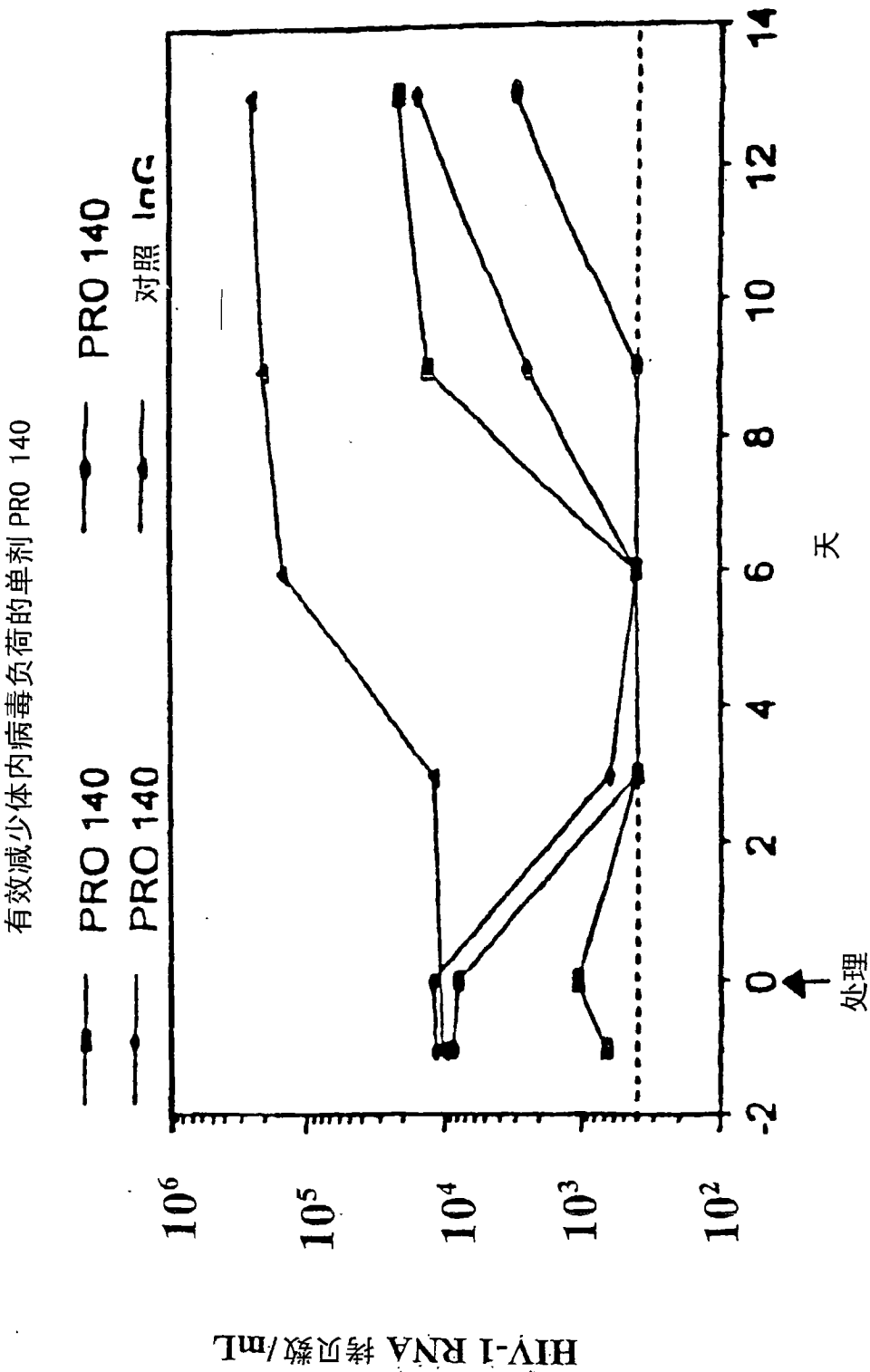


图 11

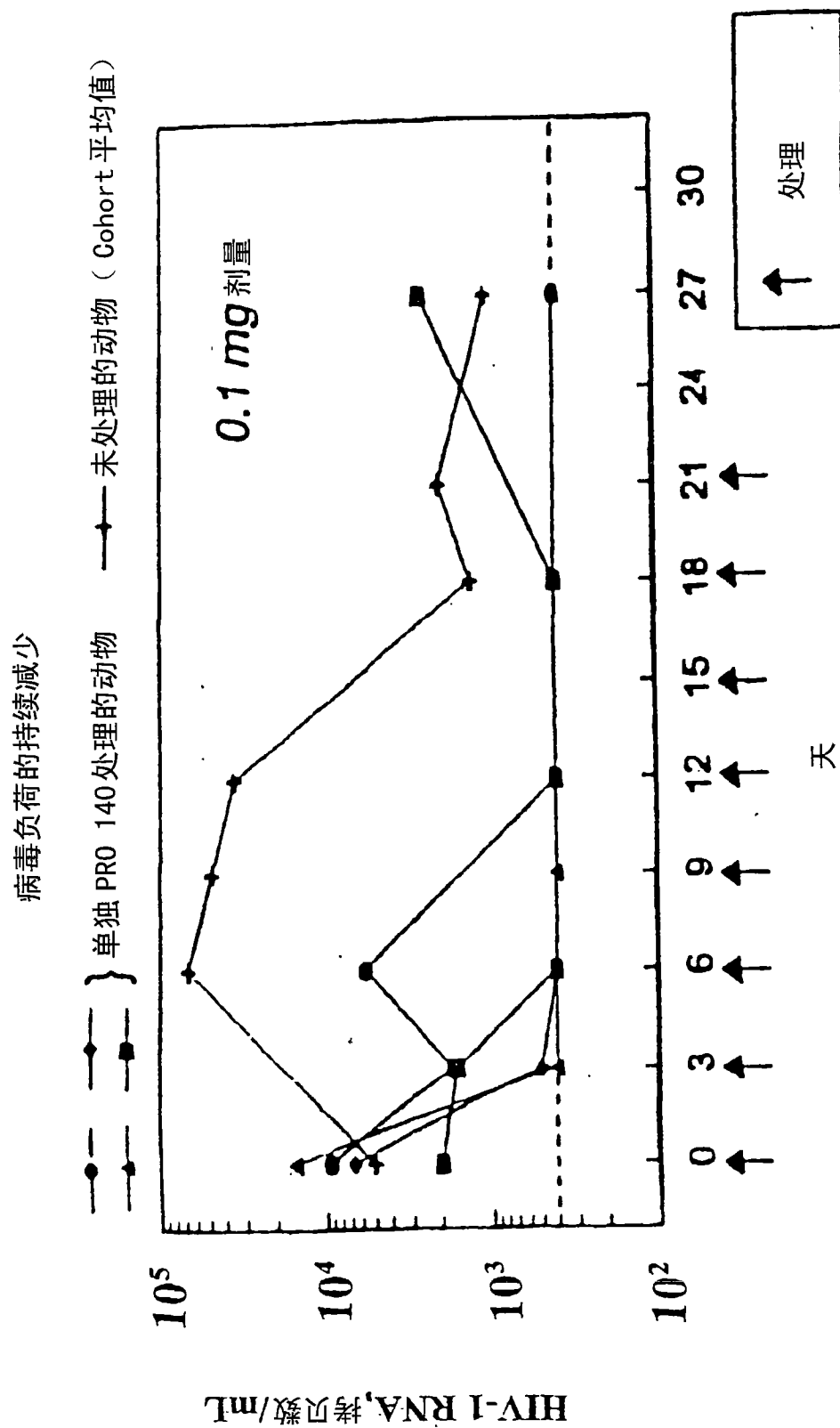


图 12

无淋巴细胞损害

循环淋巴细胞百分比 *

	CD4+ 细胞	CD8+ 细胞	人类细胞
PR0140 处理的动物	8.9	8.3	34
未处理的动物	0.7	4.8	19

*第 30 天（处理后 9 天）测量的 Cobort 平均值

图 13

有效阻断由 CCR5 介导的 HIV-1 细胞-细胞融合的人源化 PRO 140				
PRO 140 抗体	测定次数	平均抑制	浓度 $\mu\text{g/ml}$	
鼠	6	1C50	1C90	
		0.99	5.90	
		2.55	14.01	
人源化 PRO 140 # 1	6			
人源化 PRO 140 # 2	6	2.24	8.55	

图 14

人源化 PRO140 介导有效的、不依赖亚型的 HIV-1 抑制

		每种病毒的复制测定次数		平均 IC_{90} $\mu g/mL$ 病毒 (遗传亚型)	
		JR-FL Case C (B)	DJ258 (A)	DUI51 (C)	全部
鼠 PRO 140 抗体	≥ 9	2.1	3.7	9.7	1.6
					2.9
人源化 PRO 140 # 1	≥ 9	2.9	7.4	15	14
					11
人源化 PRO 140 # 2	8	2.4	3.9	3.2	4.7
					3.6

图 15

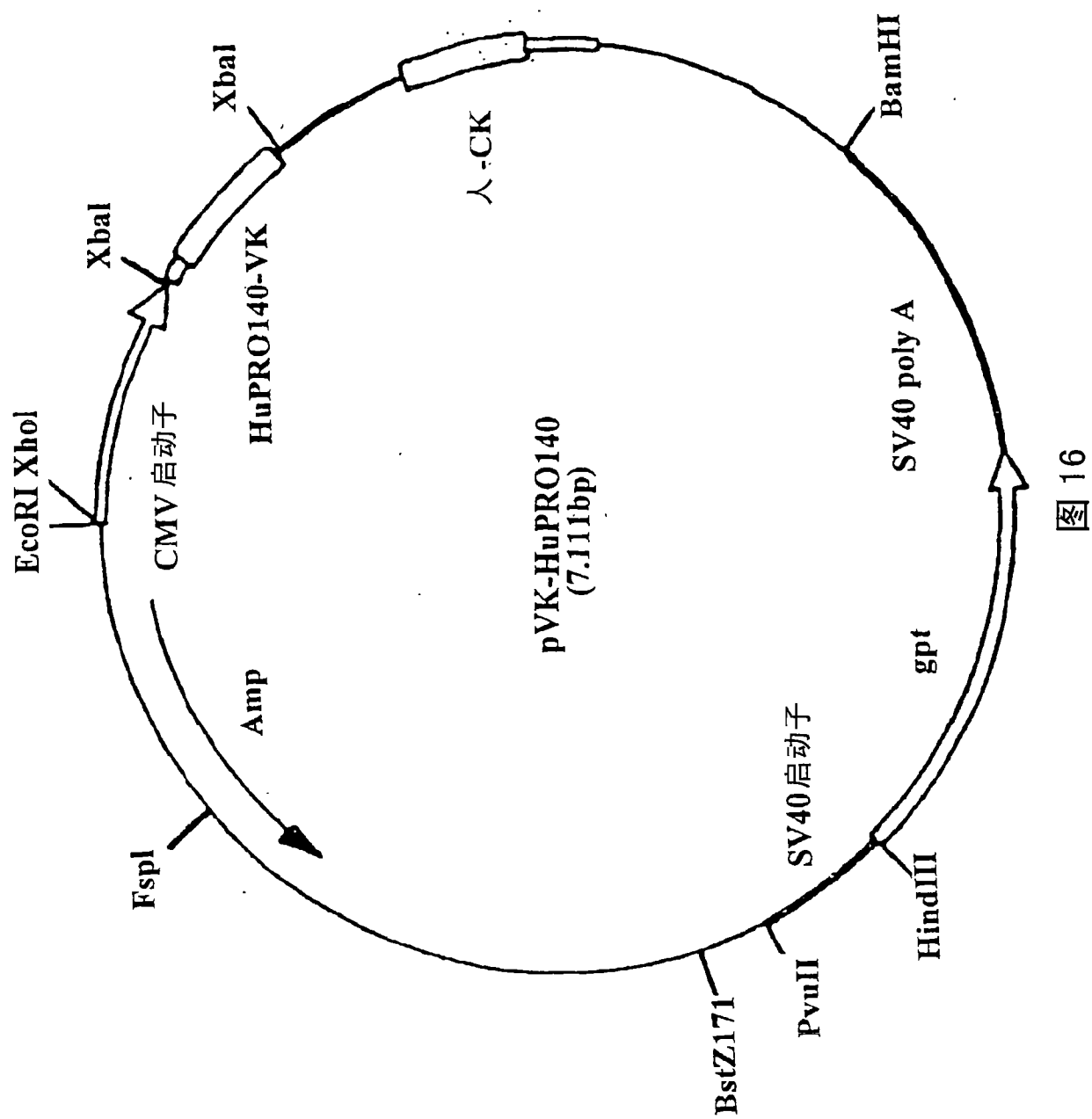


图 16

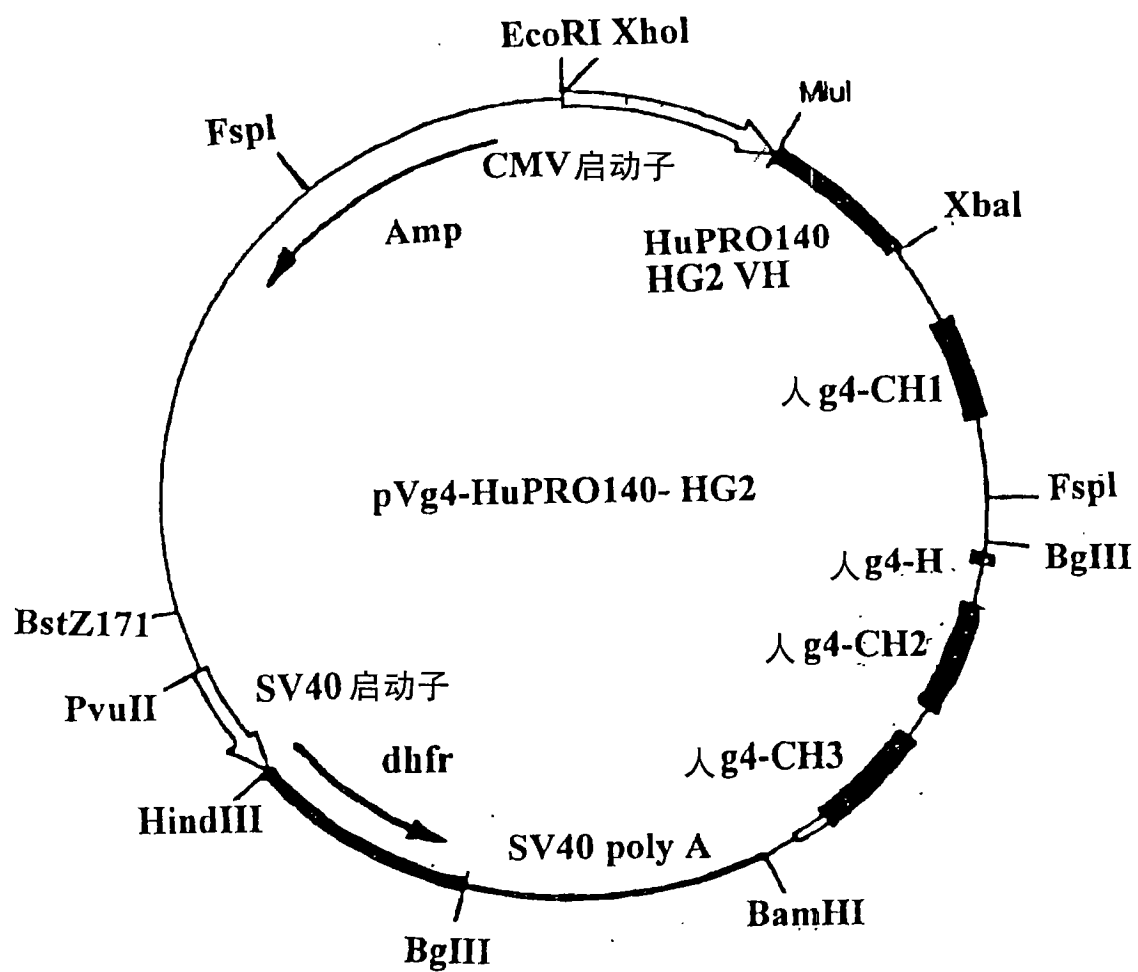


图 17

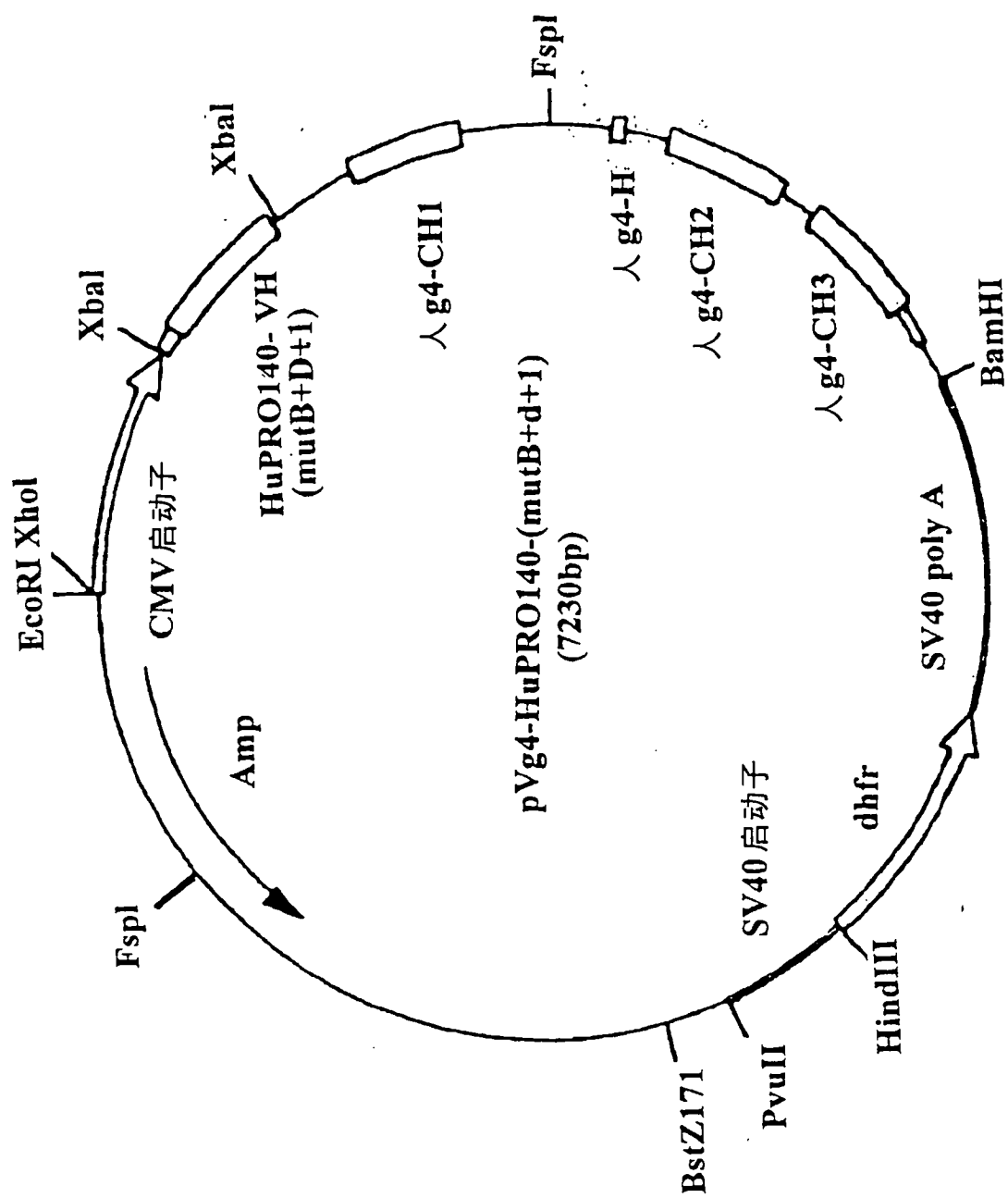


图 18

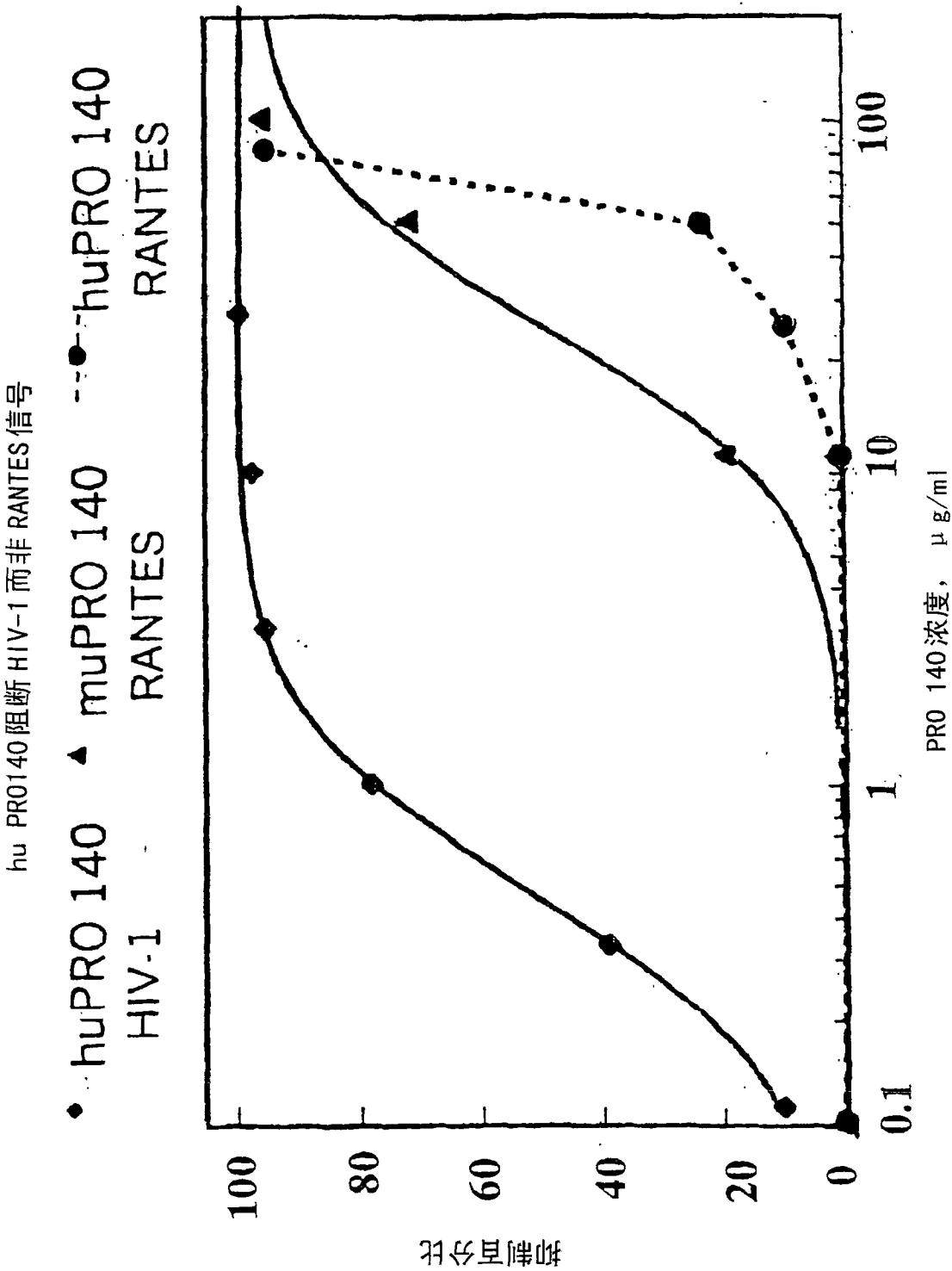


图 19