



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103429265 A

(43) 申请公布日 2013.12.04

(21) 申请号 201180033779.1

地址 法国巴黎

(22) 申请日 2011.05.25

申请人 斯特拉斯堡大学

(30) 优先权数据

(72) 发明人 T·鲍默特

10305546.3 2010.05.25 EP

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(85) PCT申请进入国家阶段日

代理人 陈文平

2013.01.07

(86) PCT申请的申请数据

(51) Int. Cl.

PCT/EP2011/058538 2011.05.25

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(87) PCT申请的公布数据

W02011/147863 EN 2011.12.01

(83) 生物保藏信息

DSM ACC2938 2008.07.29

DSM ACC2935 2008.07.29

DSM ACC2934 2008.07.29

DSM ACC2933 2008.07.29

DSM ACC2931 2008.07.29

DSM ACC2937 2008.07.29

DSM ACC2932 2008.07.29

DSM ACC2936 2008.07.29

(71) 申请人 国家医疗保健研究所

权利要求书1页 说明书22页 附图4页

(54) 发明名称

用于治疗 and 预防 HCV 感染的抗包膜抗体和抗受体抗体组合物

(57) 摘要

本发明提供用于治疗或预防 HCV 感染的抗体组合。特别地,提供包含至少一种抗-HCV 包膜抗体和至少一种抗 HCV 受体抗体的组合,其中该抗 HCV-包膜抗体和抗 HCV-受体抗体以高度协同方式作用以抑制 HCV 进入易感细胞。也提供包含这种组合的药物组合物和试剂盒和使用这些组合物和试剂盒以治疗或预防 HCV 感染的方法。

1. 一种用于治疗或预防 HCV 感染的至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体的组合, 其中该抗 HCV- 包膜抗体和该抗 HCV- 受体抗体协同作用以抑制 HCV 进入易感细胞。

2. 根据权利要求 1 的组合, 其中该抗 HCV- 包膜抗体和抗 HCV- 受体抗体为单克隆抗体或其生物活性片段。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 的组合, 其中该抗 HCV- 包膜抗体为来自慢性感染 HCV 或之前感染 HCV 的个体的抗 HCV IgG。

4. 根据权利要求 1 或权利要求 2 的组合, 其中该抗 HCV- 包膜抗体为选自抗 E1 抗体、抗 E2 抗体和其生物活性片段的抗 HCV- 包膜糖蛋白抗体。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的组合, 其中该抗 HCV- 受体抗体为针对选自硫酸乙酰肝素、LDL 受体、CD81、SB-RI、密封蛋白和紧密连接蛋白-1 的 HCV 受体或针对 HCV 进入易感细胞所涉及的这种 HCV 受体的区域的抗体。

6. 权利要求 5 的组合, 其中该抗 HCV- 受体抗体为结合紧密连接蛋白 1 的胞外域的抗紧密连接蛋白 1 抗体, 并优选为选自结合紧密连接蛋白 1 胞外域的 OM-4A4-D4、OM-7C8-A8、OM-6D9-A6、OM-7D4-C1、OM-6E1-B5、OM-3E5-B6、OM-8A9-A3、OM-7D3-B3 和其任意生物活性片段的单克隆抗体。

7. 权利要求 2-6 任一项的组合, 其中该单克隆抗体为人源化、去免疫或嵌合的。

8. 权利要求 1-7 任一项的组合, 其中该抗 HCV- 包膜抗体和抗 HCV- 受体抗体的至少一种与治疗剂连接。

9. 权利要求 1-8 任一项的组合, 其中该组合的联合指数 (CI) 低于 1, 优选低于 0.75, 更优选低于 0.50, 和甚至更优选低于 0.30。

10. 权利要求 1-9 任一项的组合, 其中该组合用于治疗受试者的 HCV 感染或 HCV 相关疾病。

11. 权利要求 1-9 任一项的组合, 其中该组合用于控制受试者的慢性 HCV 感染。

12. 权利要求 1-9 任一项的组合, 其中该组合用于预防肝移植患者的 HCV 的再次感染和复发。

13. 一种药物组合物, 包含根据权利要求 1-12 任一项的组合和至少一种药学可接受载体或赋形剂。

14. 根据权利要求 13 的药物组合物, 进一步包含至少一种抗病毒剂。

15. 根据权利要求 14 的药物组合物, 其中该抗病毒剂选自干扰素、病毒唑、抗丙肝病毒单克隆抗体、抗丙肝病毒多克隆抗体、RNA 聚合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、IRES 抑制剂、解旋酶抑制剂、反义化合物、核酶、和其任意组合。

用于治疗 and 预防 HCV 感染的抗包膜抗体和抗受体抗体组合 物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2010 年 5 月 25 日提交的欧洲专利申请号 EP 10 305 546 的优先权，其通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 丙肝病毒 (HCV) 是一个主要的全球健康问题，全世界估计有 1.50-2.00 亿人感染，包括欧洲至少五百万人 (Pawlotsky, Trends Microbiol., 2004, 12 :96-102)。依照世界卫生组织，每年出现三百万到四百万例新感染。感染经常是无症状的；然而，大多数 HCV- 感染个体发展为慢性感染 (Hoofnagle, Hepatology, 2002, 36 :S21-S29 ;Lauer 等, N. Engl. J. Med. , 2001, 345 :41-52 ;Seeff, Semin. Gastrointest. , 1995, 6 :20-27)。慢性感染经常导致严重的肝病，包括纤维症和脂肪变性 (Chisari, Nature, 2005, 435 :930-932)。约 20% 的患有慢性 HCV 感染的患者发展为肝硬化，其中 5% 病例发展为肝细胞癌 (Hoofnagle, Hepatology, 2002, 36 :S21-S29)。

[0004] 慢性 HCV 感染是肝移植的最主要指征 (Seeff 等, Hepatology, 2002, 36 :1-2)。不幸的是，肝移植不是治愈丙肝；病毒复发是一个永恒的问题并且是移植失败的最主要原因 (Brown, Nature, 2005, 436 :973-978)。还没有可用的针对 HCV 提供保护的疫苗。目前的治疗包括施用病毒唑和 / 或干扰素 - α (IFN- α)，两种非特异性抗病毒剂。使用聚乙二醇化 IFN- α 和病毒唑的联合治疗，永久清除在约 50% 的感染有基因型 1 慢性丙肝基因型 1 的患者中得以实现。然而，大量患者对这种联合中的一种成分具有禁忌症、不能忍受治疗、对 IFN 治疗根本没有响应或当给药停止时经历复发。除了有限的功效和大量副作用例如嗜中性白血球减少症、溶血性贫血和严重抑郁，目前抗病毒治疗的特征还在于高成本。

[0005] 进入靶细胞的 HCV 是抗病毒预防和治疗策略的潜在靶标，因为其对感染的开始、传播、和维持是必需的 (Timpe 等, Gut, 2008, 57 :1728-1737 ;Zeisel 等, Hepatology, 2008, 48 :299-307)。事实上，HCV 通过附着于肝细胞表面上的分子或受体引发感染。目前的证据显示 HCV 的进入是涉及若干宿主因素的多步骤过程，所述因素包括硫酸乙酰肝素 (Barth 等, J. Biol. Chem. , 2003, 278 :41003-41012)、四跨膜蛋白 CD81 (Pileri 等, Science, 1998, 282 :938-941)、B 类 I 型清道夫受体 (SB-RI) (Zeisel 等, Hepatology, 2007, 46 :1722-1731 ;Bartosch 等, J. Exp. Med. , 2003, 197 :633-642 ;Grove 等, J. Virol. , 2007, 81 :3162-3169 ;Kapadia 等, J. Virol. , 2007, 81 :374-383 ;Scarselli 等, EMBO J. , 2002, 21 :5017-5025)、密封蛋白 (Ploss 等, Nature, 2009, 457 :882-886) 和紧密连接蛋白 -1 (CLDN1)、整合膜蛋白和紧密连接链成分 (Evans 等, Nature, 2007, 446 :801-805)。

[0006] 这些 HCV 受体或共受体的识别已经开启了开发用作预防和 / 或治疗 HCV 感染的药物候选物的治疗和预防剂的新途径。因此，抑制 HCV 进入的交叉中和抗体已经显示出与具有自限性急性感染的群体中 HCV 感染的控制和 HCV 再次感染的预防有关 (Osburn 等, Gastroenterology, 2009, 138 :315-324 ;Pestka 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104 :

6025-630)。例如,针对天然人 SR-BI 已经产生了单克隆抗体,其以剂量-依赖性方式抑制结合 SR-BI 的 HCV E2 并有效阻碍肝细胞瘤细胞的 HCVcc 感染 (Catanese 等, *J. Virol.*, 2007, 81 :8063-8071 ;WO2006/005465)。欧洲专利申请号 EP 1 256 348 公开了具有抑制 HCV E2 和 CD81 的结合的抗病毒作用的包括抗体的物质。国际专利申请 WO 2007/130646 描述了识别干扰 HCV 与紧密连接蛋白 -1 相互作用的试剂从而预防 HCV 感染的体内和基于细胞的试验。单克隆抗体已经产生,其通过靶向宿主进入因子紧密连接蛋白 -1 有效抑制 HCV 感染 (EP 08 305 597 和 WO 2010/034812)。

[0007] 其它研究已经显示了获自慢性感染患者的交叉中和抗 E2 抗体或纯化的异源抗 HCV IgG 能够遗传性中和多种 HCV 分离物并能够针对 HCV 准种攻击提供保护 (Meunier 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102 :4560-4565 ;Law 等, *Nat. Med.*, 2008, 14 :25-27 ;Broering 等, *J. Virol.*, 2009, 83 :12473-12482)。已经提议将施用外生交叉中和抗包膜抗体作为另一种用于预防 HCV 再次感染的免疫治疗方法。目前,在 II 期研究中评价富含抗 HCV 的多克隆免疫球蛋白制剂的能力,以评价在肝移植之后预防 HCV 感染的治疗效果 (临床试验标识符 :NCT00473824)。

[0008] 由于针对 HCV 的新治疗方法的开发仍然是一个高度优先的目标,这些研究是鼓舞人心的,因为它们表明,针对影响 HCV 进入易感细胞的受体或共受体的抗体对于目前 HCV 治疗而言可构成一种有效且安全的选项。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及用于预防和 / 或治疗 HCV 感染和 HCV 相关疾病的靶向系统和改进策略。更具体地,本申请人已经证明了交叉中和抗包膜 (抗 E2) 抗体或纯化的异源抗 HCV IgG 和抗 CLDN1 抗体以高度协同的方式起作用于高度感染性 HCV 逃脱变型 (escape variant) 的进入抑制 (参见实施例 1),表明交叉中和抗 HCV- 包膜抗体和抗 HCV- 受体抗体的组合为一种有效的抗病毒方法以预防原发性 HCV 感染 (例如在肝移植之后) 并还可能抑制慢性感染患者的病毒传播。

[0011] 因此,一方面,本发明提供了一种用于治疗或预防 HCV 感染的至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体的组合。

[0012] 在某些优选实施方案中,该抗 HCV- 包膜抗体为抗 HCV- 包膜糖蛋白抗体例如抗 E1 抗体或抗 E2 抗体。该抗 HCV- 包膜抗体也可为由之前曾感染或慢性感染 HCV 的人类个体分离并纯化的抗 HCV IgG。该抗 HCV- 包膜抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体。优选地,该抗 HCV- 包膜抗体为单克隆抗体。

[0013] 依照本发明的组合物的抗 HCV- 受体抗体可为针对本领域已知的任何 HCV 受体的抗体或直接针对 HCV 感染过程中所涉及的任何细胞表面蛋白的抗体。该抗 HCV- 受体抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体。优选地,该抗 HCV- 受体抗体为单克隆抗体。在某些实施方案中,该抗 HCV- 受体抗体为针对选自硫酸乙酰肝素、LDL 受体、四跨膜蛋白 CD81、B 类 I 型清道夫受体 (SB-RI)、密封蛋白和紧密连接蛋白 -1 (CLDN1) 的受体的抗体。在某些优选实施方案中,该抗 HCV- 受体抗体为抗 CLDN1 抗体,尤其是单克隆抗 CLDN1 抗体,例如本申请人开发并描述于 EP 08 305 597 和 WO 2010/034812 中的那些。

[0014] 依照本发明的组合的抗体可为全 (完整) 抗体、或这种抗体的生物活性片段 (即,保持抗体干扰 HCV- 宿主细胞相互作用、和 / 或特异性结合 HCV 受体或 HCV 包膜蛋白、和 /

或抑制或阻碍 HCV 进入 HCV- 易感细胞、和 / 或减少或预防易感细胞感染 HCV 的能力的这种抗体的任意片段或部分)。适合于依照本发明的组合的抗体或其片段还包括嵌合抗体、人源化抗体、去免疫抗体和包含至少一种来自抗 HCV- 受体抗体或抗 HCV- 包膜抗体的重链或轻链可变区的互补决定区 (CDR) 的抗体衍生分子, 包括分子例如 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fd 片段、Sc 抗体 (单链抗体)、双抗体、单个抗体轻单链、单个抗体重链、抗体链和其它分子间的嵌合融合、和抗体结合物 (例如结合至治疗剂的抗体), 只要这些抗体相关分子保留其所“衍生”的抗体的至少一种生物学相关性质。该生物学相关性质可为干扰 HCV- 宿主细胞相互作用、特异性结合 HCV 包膜蛋白或 HCV 受体、抑制或阻碍 HCV 进入 HCV- 易感细胞、和 / 或减少或预防易感细胞感染 HCV 的能力。

[0015] 在依照本发明的组合, 该抗 HCV- 包膜抗体和抗 HCV- 受体抗体以高度协同的方式起作用以抑制 HCV 感染。在某些实施方案中, 该抗 HCV- 包膜抗体通过抗 HCV- 受体抗体使用于抑制 HCV 感染的 IC₅₀ 降低至高达至少 10 倍或高达至少 25 倍, 优选高达至少 50 倍, 更优选高达至少 75 倍, 和甚至更优选高达 100 倍。在另一个实施方案中, 该抗 HCV- 受体抗体通过抗 HCV- 包膜抗体使用于抑制 HCV 感染的 IC₅₀ 降低至高达至少 10 倍或高达至少 25 倍, 优选高达至少 50 倍, 更优选高达至少 75 倍, 和甚至更优选高达 100 倍。至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体的联合指数 (CI) 为低于 1, 优选低于 0.75, 更优选低于 0.50, 和甚至更优选低于 0.30。

[0016] 本发明的组合可应用于多种预防性和治疗性治疗中。因此, 提供该组合用于预防细胞 (例如, 易感细胞或易感细胞群) 感染 HCV; 用于预防或治疗受试者的 HCV 感染或 HCV 相关疾病; 用于控制慢性 HCV 感染; 和用于预防肝移植患者的 HCV 复发。HCV 感染可由选自基因型 1、基因型 2、基因型 3、基因型 4、基因型 5 和基因型 6 的基因型的 HCV、或更特定的选自亚型 1a、亚型 1b、亚型 2a、亚型 2b、亚型 2c、亚型 3a、亚型 4a-f、亚型 5a、和亚型 6a 的亚型的 HCV 引起。

[0017] 在相关方面, 本发明提供一种减少易感细胞因与 HCV 接触而感染 HCV 的可能性的方法, 其包括使易感细胞与有效量的创新组合接触。还提供一种减少受试者的易感细胞因与 HCV 接触而感染 HCV 的可能性的方法, 其包括向受试者施用有效量的创新组合。本发明还提供一种治疗或预防需要其的受试者的 HCV 感染或 HCV 相关疾病 (例如, 肝疾病或病理) 的方法, 其包括向受试者施用有效量的创新组合。本发明还提供一种控制需要其的受试者的慢性 HCV 感染的方法, 其包括向受试者施用有效量的创新组合。

[0018] 还提供一种预防肝移植患者的 HCV 复发的方法, 其包括向患者施用有效量的创新组合。创新组合可通过任意合适的途径向受试者施用, 包括, 例如, 胃肠外、气雾剂、口服和局部途径。该创新组合可单独施用或与治疗剂, 例如抗病毒剂联合施用。

[0019] 该创新组合可以本身施用或作为药物组合物施用。因此, 在另一个方面, 本发明提供创新组合在制备用于治疗 and / 或预防 HCV 感染和 HCV 相关疾病的药物、药物组合物、或药物试剂盒的用途。

[0020] 在相关方面, 本发明提供一种包含有效量的创新组合 (即, 如本文所述, 至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体) 和至少一种药学可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在某些实施方案中, 该药物组合物适合与额外的治疗剂, 例如抗病毒剂联合施用。在其他实施方案中, 该药物组合物进一步包括额外的治疗剂, 例如抗病毒剂。适合于

本发明方法和药物组合物的抗病毒剂包括,但不限于,干扰素(例如,干扰素- α 、聚乙二醇化干扰素- α)、病毒唑、抗 HCV(单克隆或多克隆)抗体、RNA 聚合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、IRES 抑制剂、解旋酶抑制剂、反义化合物、核酶、进入抑制剂、和其任意组合。

[0021] 本发明的这些和其它目标、优势和特征对于已经阅读了以下优选实施方案的详细说明的本领域普通技术人员而言将是显而易见的。

[0022] 附图简要说明

[0023] 图 1 为一组三个曲线图,阐明了抗病毒和抗 CLDN1 抗体在抑制 HCVpp 感染上的协同效应。37°C 下,用抗 E1mAb IGH526(A)、抗 E2mAb IGH461(B) 或获自不相关慢性感染受试者的纯化异源抗 HCV IgG(1 或 10 μ g/ml)(C) 或同型对照 IgG 预培养菌株 P02VJ 和 P04VJ 的 HCVpp 1 小时并将其加入用抗 CLDN1 OM-7D3-B3 的连续稀释物或大鼠同型对照 mAbs 预培养的 Huh7 细胞。如实施例 1 中所述,通过荧光素酶报告基因表达的量化来分析 HVCpp 感染。

[0024] 图 2 为一组三个曲线图,阐明了抗病毒和抗 SR-BI 抗体在抑制 HCVpp 感染上的协同效应。37°C 下,用抗 E1mAb IGH526(A)、抗 E2mAb IGH461(B) 或获自不相关慢性感染受试者的纯化异源抗 HCV IgG(1 或 10 μ g/ml)(C) 或同型对照 IgG 预培养菌株 P02VJ 和 P04VJ 的 HCVpp 1 小时并将其加入用抗 SR-BI NK-8H5-E3 的连续稀释物或大鼠同型对照 mAbs 预培养的 Huh7 细胞。如实施例 1 中所述,通过荧光素酶报告基因表达的量化来分析 HVCpp 感染。

[0025] 图 3 为一组三个曲线图,阐明了抗病毒和抗 CD81 抗体在抑制 HCVpp 感染上的协同效应。37°C 下,用抗 E1mAb IGH526(A)、抗 E2mAb IGH461(B) 或获自不相关慢性感染受试者的纯化异源抗 HCV IgG(1 或 10 μ g/ml)(C) 或同型对照 IgG 预培养菌株 P02VJ 和 P04VJ 的 HCVpp 1 小时并将其加入用抗 CD81QV-6A8-F2CA 的连续稀释物或大鼠同型对照 mAbs 预培养的 Huh7 细胞。如实施例 1 中所述,通过荧光素酶报告基因表达的量化来分析 HVCpp 感染。

[0026] 图 4 为一组三个曲线图,阐明了抗病毒和抗 HCV-受体抗体在细胞培养衍生的 HCV(HCVcc) 上的协同效应。37°C 下,HCVcc(Luc-Jc1,基因型 2a) 获自不相关慢性感染受试者或同型对照 IgG 1 小时并将其加入用抗 CLDN1 OM-7D3-B3(A)、抗 SR-BI NK-8H5-E3(B)、抗 CD81QV-6A8-F2CA(C) 的连续稀释物、大鼠或小鼠同型对照 mAbs 预培养的 Huh7 细胞。如实施例 2 中所述,通过荧光素酶报告基因表达的量化来分析 HVCcc 感染。

[0027] 定义

[0028] 贯穿本说明书,使用若干术语,其在以下段落中定义。

[0029] 如本文所用,术语“受试者”指人类或另一种哺乳动物(例如,灵长类动物、狗、猫、山羊、马、猪、小鼠、大鼠、兔等),其可为丙肝病毒(HCV)的宿主,但可能感染或可能不感染病毒,和/或可能患有或可能不患有 HCV 相关疾病。非人类受试者可为转基因或者以其他方式修饰过的动物。在本发明的许多实施方案中,受试者为人类。在这种实施方案中,受试者经常称为“个体”。术语“个体”不表示特定年龄,并因此包含婴儿、儿童、青少年、和成人。

[0030] 如本文所用,术语“HCV”指任意主要的 HCV 基因型、亚型、分离物和/或准种。HCV 基因型包括,但不限于,基因型 1、2、3、4、5、和 6;HCV 亚型包括,但不限于,亚型 1a、1b、2a、2b、2c、3a、4a-f、5a 和 6a。

[0031] 术语“患有 HCV”或“感染 HCV”在本文中可互换使用。当涉及受试者使用时,它们

是指具有至少一个感染了 HCV 的细胞的受试者。术语“HCV 感染”是指例如通过靶细胞膜与 HCV 或 HCV 包膜糖蛋白 - 阳性细胞的融合将 HCV 遗传信息引入靶细胞。

[0032] 术语“HCV 相关疾病”和“HCV 关联疾病”在本文中可互换使用。它们是指已知或怀疑与 HCV 关联和 / 或直接或间接由 HCV 引起的任意疾病或紊乱。HCV- 相关 (或 HCV- 关联) 疾病包括, 但不限于, 多种多样的肝病, 例如急性肝炎的亚临床携带者状态、慢性肝炎、硬化、和肝细胞癌。该术语包括任意 HCV 感染的症状和副作用, 包括潜伏的、持久的和亚临床的感染, 无论该感染是否为临床明显的。

[0033] 术语“治疗”在本文中用以表征一种针对以下的方法或过程: (1) 延迟或预防疾病或病症 (例如, HCV 感染或 HCV 相关疾病) 的发作; (2) 减慢或停止疾病或病症症状的发展、加重、或恶化; (3) 带来疾病或病症症状的改善; 或 (4) 治愈疾病或病症。治疗可在疾病或病症的发作之前进行, 用于预防或预防性作用。选择性或另外, 治疗可在疾病或病症开始之后进行, 用于治疗作用。

[0034] “药物组合物”在本文中定义为包含有效量的至少一种本发明抗体 (或其片段)、和至少一种药学可接受的载体或赋形剂。

[0035] 如本文所用, 术语“有效量”指足以实现其预期目的, 例如, 细胞、组织、系统或受试者的所需生物学或医学响应的化合物、试剂、抗体、或组合物的任意量。例如, 在本发明的某些实施方案中, 该目的可为: 预防 HCV 感染; 预防 HCV 相关疾病的发作; 减慢、减轻或停止 HCV 相关疾病 (例如, 慢性丙肝、硬化等) 症状的发展、加重或恶化; 带来疾病症状的改善; 或治愈 HCV 相关疾病。

[0036] 术语“药学可接受的载体或赋形剂”是指不干扰活性成分生物学活性的效力并且在其施用浓度下对宿主无过度毒性的载体介质。该术语包括溶剂、分散体、介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂、和吸收延迟剂等。这种用于药学活性物质的介质和试剂的使用是本领域所熟知的 (参见例如“Remington’s Pharmaceutical Sciences”, E. W. Martin, 第 18 版, 1990, Mack Publishing Co. ; Easton, PA, 其通过引用以其整体并入本文)。

[0037] 如本文所用, 术语“抗体”是指结合特异性表位的任意免疫球蛋白 (即, 完整的免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的活性部分等)。该术语包括单克隆抗体和多克隆抗体。维持特异性结合能力的其全部衍生物和片段也包括于该术语中。该术语也包括具有与免疫球蛋白 - 结合域同源或很大程度上同源的结合域的任意蛋白。这些蛋白可衍生自天然源、或部分或完全地合成制备。

[0038] 当涉及抗体使用时, 术语“特异性结合”是指结合预定抗原的抗体。典型地, 该抗体以至少 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 的亲合力结合、并以比结合非特异性抗原 (例如, BSA、酪蛋白) 的亲合力大至少两倍的亲合力结合预定抗原。

[0039] 术语“人类紧密连接蛋白 -1 或人类 CLDN1”是指具有以 NCBI 登录号 NP_066924 所示序列的蛋白、或通常在 HCV 接受人群中发现的任意天然存在的变型。术语紧密连接蛋白 -1 的“胞外域”或“胞外结构域”是指延伸进胞外空间的紧密连接蛋白 -1 序列的区域。

[0040] 术语“易感细胞”和“HCV- 易感细胞”可互换使用。它们是指可感染 HCV 的任意细胞。易感细胞包括, 但不限于, 肝脏或肝细胞、原代细胞、肝细胞瘤细胞、CaCo2 细胞、树突细胞、胎盘细胞、子宫内膜细胞、淋巴结细胞、淋巴细胞 (B 和 T 细胞)、外周血单核细胞、和单核细胞 / 巨噬细胞。

[0041] 当涉及创新抗体或抗体相关分子使用时,术语“预防、抑制或阻碍 HCV 感染”是指与不存在抗体或抗体相关分子时的引入量相比,减少引入易感细胞或易感细胞群的 HCV 遗传信息的量。

[0042] 如本文涉及蛋白或多肽时所用,术语“分离的”是指由于其来源或处理分离自至少某些与其天然相关或当最初获得时与其相关的成分的蛋白或多肽。对于“分离的”,选择性或额外地指人工制备或合成的目标蛋白或多肽。

[0043] 术语“蛋白”、“多肽”、“和“肽”在本文中可互换使用,且是指为其中性(无电荷)形式或者为盐,并为未修饰或者通过糖基化、侧链氧化、或磷酸化而修饰的多种长度的氨基酸序列。在某些实施方案中,该氨基酸序列为全长天然蛋白。在另一个实施方案中,该氨基酸序列为全长蛋白的较小片段。仍然在其它实施方案中,该氨基酸序列通过将额外取代基连接至氨基酸侧链来修饰,所述额外取代基例如糖基单元、脂质、或无机离子例如磷酸盐、以及涉及链的化学转化例如巯基氧化的修饰。因此,术语“蛋白”(或其等同术语)意欲包括全长天然蛋白、或其片段的氨基酸序列,其经受那些不显著改变其特定性质的那些修饰。特别地,术语“蛋白”包括蛋白异形体,即,通过相同基因编码、但其 pI 或 MW 不同或两者均不同的变型。这种异形体可具有不同的氨基酸序列(例如,作为等位基因变异、选择性剪接或限制性蛋白水解的结果)、或作为替代地,可来自不同的翻译后修饰(例如,糖基化、酰化、磷酸化)。

[0044] 如本文涉及蛋白时所用,术语“类似物”是指具有与蛋白类似或相同的功能但不必需包含与该蛋白的氨基酸序列类似或相同的氨基酸序列或与该蛋白的结构类似或相同的结构的多肽。优选地,在本发明的上下文中,蛋白类似物具有与该蛋白的氨基酸序列至少 30%,更优选,至少 35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%相同的氨基酸序列。

[0045] 如本文涉及蛋白时所用,术语“片段”或术语“部分”是指包含蛋白氨基酸序列的至少 5 个连续氨基酸残基(优选地,至少约:10 个、15 个、20 个、25 个、30 个、35 个、40 个、50 个、60 个、70 个、80 个、90 个、100 个、125 个、150 个、175 个、200 个、250 个或更多个氨基酸残基)的氨基酸序列的多肽。该蛋白片段可具有或不具有该蛋白的功能活性。

[0046] 如本文表征蛋白变型、类似物或片段时所用,术语“生物学活性”是指与该蛋白共享足够的氨基酸序列同一性或同源性以具有与该蛋白类似或相同性质的分子。例如,在本发明的许多实施方案中,创新抗体的生物活性片段是保持抗体结合紧密连接蛋白-1 胞外域的能力的片段。

[0047] 如本文所用,术语“同源”(或“同源性”)与术语“同一性”同义,是指两个多肽分子间或两个核酸分子间的序列相似性。当两条相比较序列的一个位置被相同碱基或相同氨基酸残基占据时,则各自分子在该位置处同源。两条序列间的同源性百分比对应于两条序列共享的匹配或同源位置数除以相比较的位置数并乘以 100。通常,当对准两条序列以给出最大同源性时进行比较。同源氨基酸序列共享相同或类似的氨基酸序列。类似残基为参考序列中相应氨基酸残基的保守取代、或参考序列中相应氨基酸残基的“允许的点突变”。参考序列中残基的“保守取代”为与相应参考残基物理或功能类似的取代,例如具有类似尺寸、形状、电荷、化学性质,包括形成共价键或氢键的能力等的取代。特别优选的保守取代是实现为“认可的点突变”所定义的标准的那些取代,如 Dayhoff 等所描述的(“Atlas of

Protein Sequence and Structure”, 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Suppl. 3, 22 :354-352)。

[0048] 如本文涉及数值时所用,术语“大约”和“约”通常包括落入该数值任一方向 10% 范围内 (大于或小于该数值) 的数值,除非另有说明或根据上下文是明显的 (除了这种数值将超过可能值的 100% 之外)。

[0049] 某些优选实施方案的详述

[0050] 如上所述,本发明提供了用于治疗 and 预防 HCV 感染的抗体组合。

[0051] I- 组合

[0052] 依照本发明的组合包含至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少抗 HCV- 受体抗体,并预期用于治疗或预防 HCV 感染。

[0053] A. 抗 HCV- 受体抗体

[0054] 术语“抗 HCV 受体抗体”、和“抗宿主因子抗体”在本文中可互换使用。它们是指针对 HCV 受体 (或 HCV 受体区域),尤其是已知 HCV 进入易感细胞中所涉及的受体 (或受体区域) 而出现的任意抗体。它们也指直接针对 HCV 感染中所涉及的,尤其是 HCV 进入易感细胞中所涉及的细胞表面蛋白的任意抗体。这种 HCV 受体或细胞表面蛋白的实例包括硫酸乙酰肝素、LDL 受体 (Agnello 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96 :12766-12771 ;Molina 等, J. Hepatol. , 2007, 46 :411-419)、四跨膜蛋白 CD81、B 类 I 型清道夫受体 (SB-RI)、密封蛋白和紧密连接蛋白 -1 (CLDN1)。

[0055] 因此,本发明实践中适用的抗 HCV- 受体抗体包括针对选自硫酸乙酰肝素、LDL 受体、CD81、SB-RI、密封蛋白和 CLDN1 (或其特定区域) 的 HCV 受体的抗体。在某些优选实施方案中,抗 HCV- 受体抗体为针对 CD81、SB-RI 或 CLDN1 (或其特定区域) 的抗体。

[0056] 可用于本发明实践中的抗硫酸乙酰肝素抗体的实例包括,但不限于, Kurup 等, J. Biol. Chem. , 2007, 282 :21032-21042 ;Briani 等, J. Neurol. Sci. , 2005, 229-230 ;U. S. 专利申请号 2009/0136964 中描述或使用的抗体。

[0057] 可用于本发明实践中的抗 LDL 受体抗体的实例包括,但不限于, Agnello 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96 :12766-12771 ;W001/68710 ;W0 2002/048388 ;U. S. 专利申请号 US 2008/0213287 中描述或使用的抗体、和可例如从 Amersham International 商购的抗体 (例如, CloneC7)。

[0058] 可用于本发明实践中的抗密封蛋白抗体的实例包括,但不限于, Tokunaga 等, J. Histochem. Cytochem. , 2007, 55 :735-744 中描述或使用的抗体。

[0059] 可用于本发明实践中的抗 CD81 抗体的实例包括,但不限于, Meuleman 等, Hepatology, 2008, 48 :1761-1769 ;Dijkstra 等, Exp. Neurol. , 2006, 202 :57-66 ;Azorsa 等, J. Immunol. Methods, 1999, 229 :35-48 中描述或使用的抗体。

[0060] 可用于本发明实践中的抗 SB-RI 抗体的实例包括,但不限于, Haberstroh 等, Gastroenterology, 2008, 135 :1719-1728 ;Barth 等, J. Virol. , 2008, 82 :3466-3479 ;Zeisel 等, Hepatology, 2007, 46 :1722-1731 ;Catanese 等, J. Virol. , 2007, 81 :8063-8071 ;W0 2006/005465 中描述或使用的抗体。

[0061] 可用于本发明实践中的抗 CLDN1 抗体的实例具体地包括 EP 08 305 597 和 W0 2010/034812 中公开的多克隆和单克隆抗 CLDN1 抗体。如这些文献中所述的,八种单克

隆抗体已经通过基因免疫制备并证实通过靶向 CLDN1 胞外域而有效抑制 HCV 感染。使用感染性 HCV 模型系统和原代人肝细胞,这些单克隆抗 CLDN1 抗体已经被证明有效抑制个体患者中全部主要基因型以及高度可变 HCV 准种的 HCV 感染。此外,这些抗体有效阻碍对在肝移植过程中再次感染 HCV 的六位患者的中和抗体具有抗性的高度感染性 HCV 逃脱变型的进入。单克隆抗 CLDN1 抗体称为 OM-4A4-D4、OM-7C8-A8、OM-6D9-A6、OM-7D4-C1、OM-6E1-B5、OM-3E5-B6、OM-8A9-A3、和 OM-7D3-B3。其它适合的抗 CLDN1 抗体为由申请人于 2008 年 7 月 29 日以保藏号 DSM ACC2931、DSM ACC2932、DSM ACC2933、DSM ACC2934、DSM ACC2935、DSM ACC2936、DSMACC2937、和 DSM ACC2938 保藏于 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, 德国)的任何一种杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体 (EP 08 305 597 和 WO 2010/034812 中所述)。

[0062] 其它适合的抗 CLDN1 抗体包括欧洲专利号 EP 1 167 389 和 US. 专利号 6,627,439 中公开的那些。

[0063] 由杂交瘤培养物制备和分离单克隆抗体的方法是本领域所熟知的。使用标准方法、在适合的培养基,例如 D-MEM 和 RPMI-1640 培养基中生长杂交瘤细胞。可通过蛋白 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水作用色谱、亲和色谱例如蛋白 A 柱、羟磷灰石色谱、血凝素色谱、或这些方法的任意适合的组合由杂交瘤细胞培养物回收并纯化抗紧密连接蛋白 -1 单克隆抗体。也可使用高效液相色谱 (HPLC) 来进行纯化。

[0064] B. 抗 HCV- 包膜抗体

[0065] 术语“抗 HCV- 包膜抗体”、“抗 HCV 包膜蛋白抗体”、和“抗病毒抗体”在本文中可互换使用。它们是指针对 HCV 包膜蛋白 (或其特定区域),尤其是已知引起易感细胞感染 HCV 的感染中所涉及的 HCV 包膜蛋白 (或其特定区域)而出现的任意抗体。在某些优选实施方案中,HCV 包膜蛋白为包膜糖蛋白例如 E1 或 E2。术语“抗 HCV- 包膜抗体”和“抗 HCV 包膜蛋白抗体”也包括分离和纯化自之前感染了 HCV 的人受试者或慢性感染 HCV 的患者的抗 HCV IgG。

[0066] 因此,在某些实施方案中,适用于本发明实践中的抗 HCV- 包膜抗体为针对 E1、E2 或其特定区域的抗体。

[0067] 可用于本发明实践中的抗 E1 抗体的实例包括,但不限于,E1-Awady 等, World J. Gastroenterol., 2006, 12 :2530-2535 ;Keck 等, J. Virol., 2004, 78 :7257-7263 ; Meunier 等, J. Virol., 2008, 82 :966-973 ;Haberstroh 等, Gastroenterology, 2008, 135 : 1719-1728 ;EP 1 845 108 中描述或使用的抗体。

[0068] 可用于本发明实践中的抗 E2 抗体的实例包括,但不限于, Broering 等, J. Virol., 2009, 83 :12473-12482 ;Perotti 等, J. Virol., 2008, 82 :1047-1052 ;Allander 等, J. Gen. Virol., 2000, 81 :2451-2459 ;Hadlock 等, J. Virol., 2000, 74 :10407-10416 ;Haberstroh 等, Gastroenterology, 2008, 135 :1719-1728 ;EP 1 845 108 ;U. S. 专利号 6,747,136 ; U. S. 专利号 6,538,114 ;U. S. 专利号 6,951,646 ;U. S. 专利号 7,507,408 中描述或使用的抗体。

[0069] 在其他实施方案中,适用于本发明实践中的抗 HCV- 包膜抗体为纯化自之前感染

或慢性感染 HCV 的患者的抗 HCV IgG。这种抗体的实例包括,但不限于多克隆人丙肝免疫球蛋白 (Civacir®),其目前在预防肝移植后感染 HCV 的 II 期研究中进行评价。

[0070] C. 适合的抗体

[0071] 依照本发明组合的抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体。在某些优选实施方案中,创新组合的抗体为单克隆抗体。

[0072] 本发明组合的抗体可通过本领域已知的任意适合方法制备。例如,抗 HCV-受体或抗 HCV-包膜单克隆抗体可通过重组 DNA 方法制备。这些方法通常包括分离编码所需抗体的基因、将基因转移入适合载体、和在细胞培养体系中本体表达 (bulk expression)。编码所需单克隆抗体的基因或 DNA 可使用常规程序 (例如,通过使用能够特异性结合编码鼠科抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针) 而被容易地分离和测序。杂交瘤细胞系可作为这种 DNA 的优选来源。用于重组制备抗体的适合宿主细胞包括,但不限于,适当的哺乳动物宿主细胞,例如 CHO、HeLa、或 CV1。适合的表达质粒不限制地包括 pcDNA3.1Zeo、pIND(SP1)、pREP8 (全部可商购自 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 等。抗体基因可经由病毒或逆转录病毒载体,包括 MLV-基载体、牛痘病毒-基载体等表达。依照本发明组合的抗体可作为单链抗体表达。重组制备抗体的分离和纯化可通过标准方法进行。或者,本发明组合的抗体可获自商业来源。

[0073] 在某些实施方案中,抗 HCV-受体抗体或抗 HCV-包膜抗体以其天然形式使用。在其他实施方案中,其可为截短的 (例如,经由酶切割或其它适合的方法) 以提供免疫球蛋白片段或部分,特别是生物学活性片段或部分。抗 HCV-受体抗体或抗 HCV-包膜抗体的生物活性片段或部分包括保持抗体干扰 HCV-宿主细胞相互作用、和 / 或特异性结合受体或包膜、和 / 或抑制或阻碍 HCV 进入易感细胞、和 / 或减少或预防易感细胞感染 HCV 的能力的片段或部分。

[0074] 抗 HCV-受体抗体或抗 HCV-包膜抗体的生物活性片段或部分可为 Fab 片段或部分、F(ab')₂ 片段或部分、可变域、或抗体的一个或多个 CDR (互补决定区)。或者,抗 HCV-受体抗体或抗 HCV-包膜抗体的生物活性片段或部分可衍生自抗体蛋白的羧基部分或端点并可包含 Fc 片段、Fd 片段或 Fv 片段。

[0075] 本发明的抗体片段可通过本领域已知的适合方法,包括,但不限于,酶切割 (例如,完整抗体的蛋白水解消化) 或通过合成或重组技术来制备。F(ab')₂、Fab、Fv 和 ScFv (单链 Fv) 抗体片段可例如在哺乳动物宿主细胞中表达并分泌自哺乳动物宿主细胞或分泌自大肠杆菌。抗体也可使用抗体基因以多种截短形式来制备,其中一个或多个终止密码子已被引入天然终止位点的上游。抗体的多个部分可通过常规技术化学结合在一起,或可作为接壤蛋白 (contiguous protein) 使用基因工程技术制备。

[0076] 依照本发明组合的抗 HCV-受体和抗 HCV-包膜抗体 (或其片段) 可以以修饰形式,例如融合蛋白 (即,免疫球蛋白分子或连接至多肽实体的部分) 制备。优选地,该融合蛋白保持抗体的生物学性质。可选择融合至抗 HCV-受体或抗 HCV-包膜抗体、或其片段的多肽实体以将许多有利性质的任何一种赋予所得融合蛋白。例如,可选择多肽实体以提供增强的重组融合蛋白的表达。选择性或另外,该多肽实体可促进融合蛋白的纯化,例如,通过在亲和纯化中用作配体。可将蛋白水解切割位点加入到重组蛋白中以使得所需序列可在纯化后最终与多肽实体分离。当稳定性为一种目标时,也可选择多肽实体以将改进的稳定性赋

予融合蛋白。适合的多肽实体的实例包括,例如,多组氨酸标签,其允许镍螯合柱上所得融合蛋白的简单纯化。谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、麦芽糖 B 结合蛋白、或蛋白 A 为适合的多肽实体的其它实例。

[0077] 取决于预期用途,可再工程化本发明组合的抗 HCV-受体或抗包膜抗体以最优化稳定性、溶解性、体内半衰期、或结合额外靶标的的能力。实现任何一个或全部这些性质改变的基因工程方法以及化学修饰是本领域所熟知的。例如,已知抗体恒定区的增加、移除、和/或修饰在治疗性施用的抗体的生物利用度、分布、和半衰期中扮演了特别重要的角色。当存在时,通过抗体的 Fc 或恒定区(其介导效应器功能)决定的抗体类别和亚类给予了重要的额外性质。

[0078] 本发明的额外融合蛋白可通过本领域所熟知的 DNA 改组技术产生(参见,例如, U. S. 专利号 5,605,793 ;5,811,238 ;5,830,721 ;5,834,252 ;和 5,837,458)。

[0079] 依照本发明组合的抗 HCV-受体和抗 HCV-包膜抗体也可为“人源化的”:啮齿动物抗体和人序列间的序列差异可通过替代与人序列中的那些不同的残基来最小化,所述替代可通过个体残基的位点-导向突变形成或通过接枝整个区域或通过化学合成进行。也可使用重组方法制备人源化抗体。在抗体的人源化形式中,用来自人免疫球蛋白分子的氨基酸替代 CDR 区域外的某些、大部分或全部氨基酸,而不改变一个或多个 CDR 区域中的某些、大部分或全部氨基酸。可允许氨基酸的微小增加、删除、插入、取代或修饰,只要它们不显著改变所得抗体的生物学活性。适合的人类“替代”免疫球蛋白分子包括 IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgD 或 IgE 分子、和其片段。或者,可通过突变(去免疫)修饰啮齿动物抗体中存在的 T-细胞表位以产生可应用于人类治疗目的的非免疫性啮齿动物抗体(参见 www.accurobio.com)。

[0080] 依照本发明组合的抗 HCV-受体和抗 HCV-包膜抗体(或其生物学活性变型或片段)可功能上连接(例如,通过化学耦合、基因融合、非共价缔合或其它)至一个或多个其它分子实体。制备这种修饰抗体(或结合抗体)的方法是本领域已知的(参见,例如,“Affinity Techniques.Enzyme Purification ;Part B”,Methods in Enzymol.,1974, Vol. 34, Jakoby and Wilneck(Eds.),Academic Press ;New York,NY ;和 Wilchek 和 Bayer, Anal. Biochem.,1988,171 :1-32)。优选地,分子实体连接于不干扰所得结合体的结合性质的抗体分子位置处,例如不参与抗体特异性结合其靶标的位置处。

[0081] 抗体分子和分子实体可彼此共价地、直接地连接。或者,抗体分子和分子实体可通过接头基团而彼此共价连接。这可通过使用多种多样的本领域所熟知的包括同功能和异功能接头的稳定双功能试剂的任意一种来实现。

[0082] 在某些实施方案中,本发明组合的抗体(或其生物活性片段)结合至治疗成分。可适用于本发明实践中的多种多样治疗成分的任意一个包括但不限于细胞毒素(例如,抑制细胞剂或杀细胞剂)、治疗剂、和放射性金属离子(例如,连接至大环螯合剂例如 DOTA 的 α -发射器和 α -发射器)。细胞毒素或细胞毒素剂包括对细胞有害的任意试剂。实例包括,但不限于,紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、道诺霉素、二羟基蒽二酮、米托蒽醌、光神霉素、放射菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、胸苷激酶、核酸内切酶、核糖核酸酶、和嘌呤霉素和其片段、变型或同源物。治疗剂包括,但不

限于,抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺)、烷化剂(例如,二氯甲基二乙胺、噻替哌苯丁酸氮芥、美法仑、卡氯芥(BSNU)和环己亚硝脒(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C、和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(例如,道诺霉素和阿霉素)、抗生素(例如,更生霉素、博来霉素、光神霉素、和氨基霉素)、和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。所得抗体结合物可应用于与HCV感染有关的肝癌的治疗(参见下文)。

[0083] 其它治疗成分包括具有所需生物学活性的蛋白或多肽。这种蛋白包括,但不限于,毒素(例如,红豆因、蓖麻毒素A、 α 毒素、假单胞菌外毒素、白喉毒素、皂草素、木鳖子甙、白树毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、 α -八叠球菌和霍乱毒素);蛋白例如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活剂;细胞凋亡剂(例如,TNF- α 、TNF- β)或、生物应答调节剂(例如,淋巴因子、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、或其它生长因子)。

[0084] 因此,本发明的创新组合可包含全长抗体、其生物学活性变型或片段、嵌合抗体、人源化抗体、和包含至少一种来自抗HCV-受体抗体或抗HCV-包膜抗体的重链或轻链可变区的互补决定区(CDR)的抗体衍生分子,包括分子例如Fab片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fabc片段、Sc抗体(单链抗体)、双抗体、单个抗体轻单链、单个抗体重链、抗体链和其它分子间的嵌合融合、和抗体结合物,例如结合至治疗剂的抗体。

[0085] D. 组合的性质

[0086] 依照本发明的组合为(1)预期用于治疗或预防HCV感染和(2)至少一种抗HCV-包膜抗体和至少一种抗HCV-受体抗体以高度协同的方式起作用以抑制HCV感染。

[0087] 在某些实施方案中,抗HCV-包膜抗体通过抗HCV-受体抗体使用于抑制HCV感染的IC₅₀降低至高达至少10倍或高达至少25倍,优选高达至少50倍,更优选高达至少75倍,和甚至更优选高达100倍。换句话说,在抗HCV-包膜抗体的存在下,获得HCV进入的50%抑制率所必需的抗HCV-受体抗体浓度比不存在抗HCV-包膜抗体时获得相同HCV进入抑制率所必需的抗HCV-受体抗体浓度低至少10倍,至少25倍,优选至少50倍,更优选至少75倍,和甚至更优选大于100倍。

[0088] 在其他实施方案中,抗HCV-受体抗体通过抗HCV-包膜抗体使用于抑制HCV感染的IC₅₀降低至高达至少10倍或高达至少25倍,优选高达至少50倍,更优选高达至少75倍,和甚至更优选高达100倍。换句话说,在抗HCV-受体抗体的存在下,获得HCV进入的50%抑制率所必需的抗HCV-包膜抗体浓度比不存在抗HCV-受体抗体时获得相同HCV进入抑制率所必需的抗HCV-包膜抗体浓度低至少10倍,至少25倍,优选至少50倍,更优选至少75倍,和甚至更优选大于100倍。

[0089] 在某些实施方案中,本发明组合的特点在于联合指数(CI)低于1(其被定义为明显的协同作用)。本发明组合的特点优选在于CI低于0.75,更优选CI低于0.50,和甚至更优选CI低于0.30。

[0090] II- 治疗或预防HCV感染和HCV相关疾病

[0091] A. 指征

[0092] 依照本发明的抗体组合可用于治疗和预防方法以治疗和/或预防HCV感染、或治

疗和 / 或预防感染肝病或病理状态的 HCV- 易感细胞, 例如肝细胞、淋巴细胞、或单核细胞 / 巨噬细胞。

[0093] 本发明治疗方法可使用创新组合或包含创新组合的药物组合物来实现 (参见下文)。这些方法通常包括向需要其的受试者施用有效量的至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体 (如上所定义)、或其药物组合物。抗 HCV- 包膜抗体和抗 HCV- 受体抗体可同时施用 (即, 一起或分别但在约相同的时间点, 例如, 彼此 5 分钟、15 分钟或 30 分钟之内), 或者, 它们可相继施用 (即, 分别并在不同时间点, 例如, 相同日的不同时间或相同周的不同时间或相同月的不同时间等)。

[0094] 施用可使用本领域技术人员已知的任意方法来进行。特别地, 抗体或组合物可通过多种途径施用, 包括但不限于, 气雾剂、胃肠外、口服或局部途径。

[0095] 通常, 抗体组合或其组合物将以有效量施用, 即足以实现预期目的的量。待施用的抗体或药物组合物的确切量将随受试者而变化, 取决于待治疗受试者的年龄、性别、体重和总体健康状况、所需的生物学或医学响应 (例如, 预防 HCV 感染或治疗 HCV 相关肝病) 等。在许多实施方案中, 有效量为抑制或预防 HCV 进入受试者的易感细胞和 / 或感染受试者的细胞, 从而预防 HCV 感染、治疗或预防受试者的肝病或其它 HCV 相关病理的量。

[0096] 本发明的抗体和组合物可用于多种治疗或预防方法。特别地, 本发明提供一种治疗或预防受试者的肝病或病理的方法, 其包括向受试者施用有效量的至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体 (如上所定义) (或其组合物), 所述抗体抑制 HCV 进入或感染受试者的细胞, 从而治疗或预防受试者的肝病或病理。该肝病或病理可为与 HCV 感染相关的肝脏炎症、肝纤维症、硬化、和 / 或肝细胞癌 (即, 肝癌)。

[0097] 本发明也提供一种治疗或预防受试者的 HCV 相关疾病或病症 (包括肝病) 的方法, 其包括向受试者施用有效量的至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体 (如上所定义) (或其组合物), 所述抗体抑制 HCV 进入或感染受试者的细胞, 从而治疗或预防受试者的 HCV 相关疾病或病症。在本发明的某些实施方案中, 将该抗体 (或其组合物) 施用于诊断患有急性丙肝的受试者。在本发明的其它实施方案中, 将该抗体 (或其组合物) 施用于诊断患有慢性丙肝的受试者。

[0098] 依照这种方法的创新组合物的施用可导致至少一种个体所经历症状的改善, 所述症状包括, 但不限于, 急性丙肝症状例如食欲降低、疲劳、腹痛、黄疸、瘙痒、和流感样症状; 慢性丙肝症状例如疲劳、明显的体重减轻、流感样症状、肌肉疼痛、关节疼痛、间歇性低烧、瘙痒、睡眠障碍、腹痛、食欲改变、恶心、腹泻、消化不良、认知变化、抑郁、头痛、和情绪波动; 硬化症状例如腹水、瘀伤和出血倾向、骨痛、血管曲张 (尤其是胃和食道中)、脂肪泻、黄疸和肝脑病; 与 HCV 相关的肝外表现症状例如甲状腺炎、迟发性皮肤卟啉病、冷球蛋白血症、血管球性肾炎、干燥综合征、血小板减少症、扁平苔藓、糖尿病和 B 细胞淋巴增殖性疾病。

[0099] 选择性或另外, 依照这种方法的抗体或其组合物的施用可减慢、减少、停止或减轻 HCV 感染或 HCV 相关疾病的发展、或使该发展逆转为消除感染或疾病的程度。依照这种方法的抗体或其组合物的施用也可导致病毒感染数目的减少、传染性病毒颗粒数目的减少、和 / 或感染了病毒的细胞数目的减少。

[0100] 依照本发明的治疗效果可使用本领域已知的用于诊断 HCV 感染和 / 或肝病的任意试验来监控。这种试验包括, 但不限于, 血清学血液测试、测量白蛋白、丙氨酸转氨酶 (ALT)、

碱性磷酸酶 (ALP)、天门冬氨酸转氨酶 (AST)、和 γ 谷氨酰转肽酶 (GGT) 中的一种或多种的肝功能测试、和使用不同技术例如聚合酶链反应 (PCR)、转录介导扩增 (TMA)、或支链 DNA (bdNA) 的分子核酸检测。

[0101] 本发明的抗体和组合物也可用于免疫治疗。因此,本发明提供一种减少易感细胞因与 HCV 接触而感染 HCV 的可能性的方法。该方法包括使易感细胞与有效量的至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体 (如上所定义) 或其组合物接触,所述抗体抑制 HCV 进入或感染易感细胞,从而减少细胞因与 HCV 接触而感染 HCV 的可能性。本发明也提供一种减少受试者的易感细胞因与 HCV 接触而感染 HCV 的可能性的方法。在该方法中,易感细胞与抗体或组合物的接触可通过将该抗体或其组合物施用于受试者来进行。

[0102] 减少易感细胞或受试者感染 HCV 的可能性意味着减少易感细胞或受试者因与 HCV 接触而感染 HCV 的可能性。该减少可为任意显著量,例如,至少减少 2- 倍,减少大于 2- 倍,减少至少 10- 倍,减少大于 10- 倍,减少至少 100- 倍,或减少大于 100- 倍。

[0103] 在某些实施方案中,受试者在施用创新抗体或组合物之前感染 HCV。在其他实施方案中,受试者在施用创新抗体或组合物之前未感染 HCV。仍在其它实施方案中,受试者未感染、但已经暴露于 HCV。在某些实施方案中,受试者可能感染了 HIV 或 HBV。

[0104] 例如,本发明方法可用以减少受试者的易感细胞因肝移植而感染 HCV 的可能性。如之前已经提到的,当将患病肝脏从感染 HCV 的患者移除时,血清病毒水平骤降。然而,在接受健康的肝移植之后,病毒水平反弹并可在几天之内超越移植前水平 (Powers 等, *Liver Transpl.*, 2006, 12 :207-216)。肝移植患者可由施用依照本发明的抗体组合而受益。施用可在肝移植之前、肝移植期间、和 / 或肝移植之后进行。

[0105] 其它可由施用依照本发明的抗体组合而受益的受试者包括,但不限于,感染了 HCV 的母亲生育的婴儿,尤其是如果母亲也为 HIV- 阳性;已与 HCV- 污染血或血污染医疗器械接触的卫生保健工作者;通过共用用于注射或者以其他方式施用药物的设备而已暴露于 HCV 的药物使用者;和通过具有低劣感染控制程序的纹身、耳朵 / 身体穿洞和针刺疗法而已暴露于 HCV 的人。

[0106] 其它可由施用依照本发明的抗体组合而受益的受试者包括,但不限于,显示已知增加 HCV 疾病发展速度的一种或多种因素的受试者。这种因素尤其包括年龄、性别 (男性通常比女性显示更快速的疾病发展)、酒精摄入、HIV 共感染 (与显著增加的疾病发展速度相关)、和脂肪肝。

[0107] 在某些实施方案中,依照本发明的治疗方法,单独施用抗体组合或其组合物。在其他实施方案中,抗体组合或其组合物与至少一种额外的治疗剂联合施用。该组合或组合物可在施用治疗剂之前施用、与治疗剂同时施用、和 / 或在施用治疗剂之后施用。

[0108] 可与创新组合或组合物联合施用的治疗剂可选自己知在治疗或预防 HCV 感染、或 HCV 相关疾病或病症中具有有益效果的多种生物学活性化合物。这种试剂尤其包括抗病毒剂包括,但不限于,干扰素 (例如,干扰素 - α 、聚乙二醇化干扰素 - α)、病毒唑、抗 HCV (单克隆或多克隆) 抗体、RNA 聚合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、IRES 抑制剂、解旋酶抑制剂、反义化合物、核酶、和其任意组合。

[0109] B. 给药

[0110] 所需剂量的创新抗体组合 (任选在与一种或多种适当的药学可接受的载体或赋

形剂配制之后)可以任意适合的途径施用于需要其的受试者。已知多种递送系统并可用以施用本发明抗体,包括片剂、胶囊、可注射溶液、脂质体封装、微粒、微胶囊等。给药方法包括,但不限于,皮肤、皮内、肌肉、腹膜内、病灶内、静脉内、皮下、鼻内、肺部、硬脑膜外、眼睛、和口服途径。创新组合或组合物可通过任意方便的或其它适当的途径给药,例如,通过滴注或推注、通过经上皮或黏膜与皮肤内层的吸收(例如,口腔、黏膜、直肠和肠内黏膜等)。给药可为全身或局部的。胃肠外给药可优先导向患者肝脏,例如通过将导管插入肝动脉或插入胆管。如本领域普通技术人员将理解的,在创新抗体组合与额外治疗剂一起给药的实施方案中,该抗体和治疗剂可通过相同途径给药(例如,静脉内)或通过不同途径给药(例如,静脉内和口服)。

[0111] C. 剂量

[0112] 本发明创新的抗体组合(或其组合物)将以递送的量对于预期目的有效的剂量来施用。给药途径、制剂和施用剂量将取决于所需的治疗效果、待治疗的 HCV 相关病症的严重性(如果已经存在)、任何感染的存在、患者的年龄、性别、体重、和总体健康状况以及取决于所用抗体的效力、生物利用度、和体内半衰期、伴随治疗的使用(与否)、和其它临床因素。在治疗过程中,这些因素可通过主治医师而容易地确定。选择性或另外,待施用剂量可由使用动物模型(例如,黑猩猩或小鼠)的研究来确定。基于这些或其它方法调节剂量以实现最大功效是本领域所熟知的并处于受训医师的能力之内。由于研究是使用单克隆抗体创新组合进行的,关于适当剂量水平和治疗持续时间的进一步信息将显现。

[0113] 依照本发明的治疗可由单剂量或多剂量组成。因此,创新的抗体组合、或其组合物的施用可在一定时期或周期并以特定时间间隔恒定,例如,每小时、每日、每周(或以某些其它多天时间间隔)、每月、每年(例如,以延时释放形式)。或者,该递送可以在给定的时期内多次发生,例如,每周两次或多次;每月两次或多次等。该递送可连续递送一段时间,例如静脉内递送。

[0114] 通常,抗体给药量将优选为约 1ng/kg- 约 100mg/kg 受试者体重,例如,约 100ng/kg- 约 50mg/kg 受试者体重;或约 1 μ g/kg- 约 10mg/kg 受试者体重,或约 100 μ g/kg- 约 1mg/kg 受试者体重。

[0115] III- 药物组合物

[0116] 如上所述,本发明抗体组合可以本身施用或作为药物组合物施用。因此,本发明提供包含有效量如本文所述的至少一种抗 HCV- 包膜抗体和至少一种抗 HCV- 受体抗体和至少一种药学可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在某些实施方案中,该组合物进一步包含一种或多种额外的生物学活性剂。

[0117] 抗体组合和其药物组合物可以任意量并使用对实现所需预防和/或治疗效果有效的任意给药途径施用。最佳药物制剂可依据给药途径和所需剂量而变化。这种制剂可影响所施用的活性成分的物理状态、稳定性、体内释放速度、和体内清除速度。

[0118] 本发明的药物组合物可以剂量单位形式配制以便于给药和剂量均匀性。如本文所用,表达“单位剂量形式”是指用于待治疗患者的抗 HCV- 包膜抗体或抗 HCV- 受体抗体或抗 HCV- 包膜抗体和抗 HCV- 受体抗体二者的物理离散单位。然而,应当理解组合物的每日总剂量将由主治医师在其合理医学判断范围内确定。

[0119] A. 制剂

[0120] 可依照现有技术、使用适合的分散剂或润湿剂、和悬浮剂配制可注射制剂,例如,无菌可注射水性或油质悬浮液。该无菌可注射制剂也可为无毒胃肠外可接受的稀释液或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳剂,例如,作为 2,3-丁二醇中的溶液。可使用的可接受介质和溶剂为水、林格氏液、U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。另外,通常使用无菌、不挥发性油作为溶液或悬浮介质。为此目的,可使用任何温和不挥发性油,包括合成的单-或二-甘油酯。也可在可注射制剂的制备中使用脂肪酸例如油酸。无菌液体载体可用于胃肠外给药的无菌液体形式组合物中。

[0121] 可注射制剂可例如通过细菌-截留过滤器过滤、或通过使用之前引入可溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中的无菌固态组合物形式的杀菌剂而灭菌。为无菌溶液或悬浮液的液体药物组合物可通过,例如,静脉内、肌内、腹膜内或皮下注射给药。注射可经由一次性推入或通过逐步滴注。当必要或需要时,该组合物可包含局部麻醉剂以在注射位点减轻疼痛。

[0122] 为了延长活性成分(这里指抗 HCV-包膜抗体和抗 HCV-受体抗体的组合)的效果,通常理想的是减慢成分由皮下或肌内注射的吸收。胃肠外给药的活性成分的延迟吸收可通过将该成分溶解或悬浮于油类介质中来实现。可注射库形式通过形成活性成分在生物可降解聚合物例如聚交酯-聚乙二醇中的微囊化基质来制备。依靠活性成分与聚合物的比例和所用具体聚合物的性质,成分的释放速度可控。其它生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酞)。库可注射制剂也可通过将活性成分封装入与机体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备。

[0123] 用于口服给药的液体剂型包括,但不限于,药学可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆、酞剂、和加压组合物。除了抗体,该液体剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂例如,水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别地,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油、和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇、和山梨聚糖的脂肪酸酯和其混合物。除了惰性稀释剂,该口服组合物也可包括佐剂例如润湿剂、悬浮剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、和芳香剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、稳定剂或渗透调节剂。用于口服给药的适合液体载体的实例包括水(可能含有如上添加剂,例如,纤维素衍生物,例如羧甲基纤维素钠溶液)、醇(包括单羟基醇和多羟基醇例如二醇)和它们的衍生物、和油(例如,分馏的椰子油和花生油)。对于加压组合物,该液体载体可为卤代烃或其它药学可接受的推进剂。

[0124] 用于口服给药的固体剂型包括,例如,胶囊、片剂、丸剂、粉剂、和颗粒剂。在这种固体剂型中,创新抗体组合可与至少一种惰性、生理学可接受的赋形剂或载体例如柠檬酸钠或磷酸二钙和一种或多种以下物质混合:(a) 填充剂或补充剂例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、和硅酸;(b) 粘合剂例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、白明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、和阿拉伯树胶;(c) 湿润剂例如甘油;(d) 崩解剂例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐、和碳酸钠;(e) 溶液延迟剂例如石蜡;吸收促进剂例如季铵化合物;(g) 润湿剂例如,例如,十六醇和甘油单硬脂酸酯;(h) 吸收剂例如高岭土和斑脱土;和(i) 滑润剂例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、和其混合物。其它适合用于固体制剂的赋形剂包括表面修饰剂例如非离子和阴离子表面修饰剂。表面修饰剂的代表性实例包括,但不限于,泊洛沙姆 188、杀藻胺、硬脂酸钙、十八醇十六醇混合物、聚西

托醇乳化蜡、山梨聚糖酯、胶体二氧化硅、磷酸盐、十二烷基硫酸钠、硅酸铝镁、和三乙醇胺。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，该剂型也可包含缓冲剂。

[0125] 使用赋形剂如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等，类似类型的固体组合物也可用作软和硬填充的白明胶胶囊中的填充剂。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂、和颗粒剂的固体剂型可用包衣和壳例如肠包衣、控释包衣和其它药物配制领域所熟知的包衣制备。它们可任选地含有遮光剂并可为组合物以致它们仅释放活性成分，或优选地在肠道的某些部分释放活性成分，任选地以延迟方式释放活性成分。可使用的嵌入组合物的实例包括聚合物和蜡。

[0126] 在某些实施方案中，理想的是将创新组合物局部施用至需要治疗的区域（例如，肝脏）。这可例如，并不以限制的方式通过外科手术（例如，肝移植）期间的局部注入、通过注射、通过导管的方式、通过栓剂的方式、或通过皮肤贴剂或支架或其它植入物的方式局部应用来实现。

[0127] 对于局部给药，优选将组合物配制成凝胶、药膏、洗剂、或霜剂，其可包含载体例如水、甘油、醇、丙二醇、脂肪醇、三甘油酯、脂肪酸酯、或矿物油。其它局部载体包括液体石油、棕榈酸异丙酯、聚乙二醇、乙醇（95%）、聚氧乙烯单月桂酸酯的水溶液（5%）、或十二烷基硫酸钠的水溶液（5%）。如果必要，可加入其它材料例如抗氧化剂、湿润剂、粘度稳定剂、和类似试剂。

[0128] 另外，在某些情况下，期望该创新组合物可设置在置于皮肤之上、之中或之下的经皮装置中。这种装置包括贴剂、植入物、和注射剂，其通过被动或主动释放机制释放活性成分。经皮给药包括越过机体表面和机体通道内层（包括上皮和黏膜组织）的全部给药。这种给药可使用本组合物的洗剂、霜剂、泡沫、贴剂、悬浮液、溶液、和栓剂（直肠和阴道）而进行。

[0129] 经皮给药可通过使用含活性成分（即，抗 HCV- 包膜抗体和抗 HCV- 受体抗体的组合）和对皮肤无毒、并允许成分经由皮肤递送进入血流而全身吸收的载体的经皮贴剂来实现。该载体可为任意形式例如霜剂和药膏、贴剂、凝胶、和封堵装置。该霜剂和药膏可为粘性液体或水包油或油包水型半固体乳剂。由分散于石油或亲水性石油中、含活性成分的吸收性粉剂组成的贴剂可以是适合的。多种封堵装置可用以将活性成分释放入血流，例如覆盖含活性成分而含或不含载体的储库、或含活性成分的基质的半透膜。

[0130] 栓剂制剂可由常规材料制备，包括可可油（添加或不添加蜡以改变栓剂的熔点）、和甘油。也可使用水溶性栓剂基质，例如各种分子量的聚乙二醇。

[0131] 当本发明药物组合物用作“疫苗”以预防 HCV- 易感细胞感染 HCV 时，该药物组合物可进一步包含本领域已知的疫苗载体，例如，甲状腺球蛋白、白蛋白、破伤风类毒素、和聚氨基酸例如 D- 赖氨酸和 D- 谷氨酸酯的聚合物。该疫苗也可包括任意的多种已知佐剂，例如，不完全弗氏佐剂、明矾、磷酸铝、氢氧化铝、单磷酰脂质 A (MPL, GlaxoSmithKline)、皂角苷、CpG 寡核苷酸、montanide、维生素 A 和多种由生物可降解油类例如角鲨烯和 / 或生育酚制备的油包水乳剂、Quil A、Ribi Detox、CRL-1005、L-121 和其组合。

[0132] 制备各种制剂的材料和方法是本领域已知的并可调整以实施本发明。适合用于递送抗体的制剂可见于，例如，“Remington's Pharmaceutical Sciences”，E. W. Martin，第 18 版，1990，Mack Publishing Co. :Easton, PA 中。

[0133] B. 额外的生物学活性剂

[0134] 在某些实施方案中,创新抗体组合是本发明药物组合物的唯一活性成分。在其他实施方案中,该药物组合物进一步包含一种或多种生物学活性剂。适合的生物学活性剂的实例包括,但不限于,疫苗佐剂和治疗剂例如抗病毒剂(如上所述)、抗炎剂、免疫调节剂、止痛剂、抗微生物剂、抗菌剂、抗生素、抗氧化剂、防腐剂、和其组合。

[0135] 在这种药物组合物中,抗体和额外的治疗剂可结合于一种或多种制剂中以用于该抗体和治疗剂的同时、分别或相继施用。更具体地,创新组合物可以这样的方式配制:以使抗体和治疗剂可一起施用或彼此独立施用。例如,抗 HCV-包膜抗体、抗 HCV-受体抗体和治疗剂可一起配制在单一组合物中。或者,它们可分开保存(例如,在不同组合物和/或容器)和施用。

[0136] C. 试剂盒的药物包装

[0137] 在另一个方面,本发明提供了一种药物包装或试剂盒,其包含一种或多种含有一种或多种创新药物组合物成分、允许施用本发明抗体组合的容器(例如,小瓶、安瓿、试管、烧瓶或瓶)。

[0138] 药物包装或试剂盒的不同成分可以固体(例如,冻干)或液体形式供给。每种成分通常适合等分于其各自容器中或以浓缩形式提供。药物包装或试剂盒可包括用于重组冻干成分的介质。试剂盒的单个容器将优选密闭保存用于商业销售。

[0139] 在某些实施方案中,药物包装或试剂盒包括一种或多种额外的治疗剂(例如,如上所述的一种或多种抗病毒剂)。任选地,该容器中可含有由管理药物或生物学产品的制造、使用或销售的政府机构指定形式的介绍或药品说明书,该介绍反映了为施用于人而制造、使用或销售的机构许可。该药品说明书介绍可包括依照本文所公开的治疗方法使用药物组合物的说明。

[0140] 标示符,例如,条形码、无线电频率、ID 标签等可存在于该试剂盒之内或之上。可使用该标示符以,例如,为了质量控制、库存控制、工作站间跟踪移动等目的而唯一地识别该试剂盒。

实施例

[0141] 以下实施例描述了进行和实施本发明的某些优选方式。然而,应当理解该实施例仅用作说明性目的而并不意欲限制本发明的范围。此外,除非实施例中的描述以过去式呈现,正文,如说明书剩余部分不意欲表明实验是实际进行的或数据是实际获得的。

[0142] 以下报道的某些结果示于 I. Fofana 等,“Monoclonal anti-Claudin 1Antibodies Prevent Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes”中,其已公开发表于 *Gastroenterology* (2010, 139 :953-964)。

[0143] 实施例 1 :使用抗体组合抑制 HCVpp 感染

[0144] 材料和方法

[0145] 原代肝细胞和细胞系. 原代人肝细胞 (PHH) (Krieger 等, *Hepatology*, 2010, 51 : 1144-1157)、Huh7. 5. 1 (Zhong 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102 :9294-2929)、和 CHO (Krieger 等, *Hepatology*, 2010, 51 :1144-1157) 细胞(之前已描述过)的培养物用于本研究。

[0146] 抗 CLDN1mAbs 的制备. 如 EP 08 305 597 和 WO 2010/034812 所述,使用编码全长

人 CLDN1 cDNA 的真核表达载体,通过 Wistar 大鼠的基因免疫来产生抗 CLDN1mAb。免疫完成之后,通过流式细胞计对于其结合在已转染 pCMV-SPORT6/CLDN1 的非透性 HEK293T-BOSC23 细胞和 CHO 细胞的细胞表面上表达的人 CLDN1 的能力选择抗体。在本发明中,使用抗 CLDN1mAb OM-7D3-B3。

[0147] 其它单克隆抗体。抗 E1 和抗 E2mAb 购自 Innogenetics。抗 HCV IgG 由 HCV 感染患者制备。抗 SR-BI 和抗 CD81 单克隆抗体以与所描述的抗 CLDN1 类似的方式通过啮齿动物中 DNA 免疫而制备 (Fofana 等, *Gastroenterology*, 2010, 139 :953-964)。

[0148] HCVpp 制备和感染。如前所述制备 HCVpp (菌株 P02VJ 和 P04VD) (Fafi-Kremer 等, *J. Exp. Med.*, 2010)。如前所述,源自患者的 HCVpp 由 6 名经历肝移植的患者 (P01-P06)、使用由循环 HCV 产生的全长 E1E2 表达构成物制备 (Pestka 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104 :6025-6030 ;24)。37 °C 下,用抗体预培养 Huh7.5.1、Huh7 细胞和 PHH 1 小时并用 HCVpp 培养 4 小时。如所描述的分析病毒感染 (Krieger 等, *Hepatology*, 2010, 51 :1144-1157 ;Koutsoudakis 等, *J. Virol.*, 2006, 80 :5308-5320)。对于抗体 - 介导的中和,用自体同源抗 HCV 血清 (Fifa-Kremer, 修订本 2010)、抗 E2mAb (IGH461, Innogenetics) (Haberstroh 等, *Gastroenterology*, 2008, 135 :1719-1728) 和如前所述的由慢性感染患者纯化的抗 HCV IgG (Haberstroh 等, *Gastroenterology*, 2008, 135 :1719-1728 ;von Hahn 等, *Gastroenterology*, 2007, 132 :667-378) 预培养 HCVpp。

[0149] 毒性试验。如前所述,通过分析代谢 3-(4,5-二甲基噻唑 -2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物 (MTT) 的能力评估细胞毒性效应 (Mosmann 等, *J. Immunol. Methods*, 1983, 65 :55-63)。

[0150] 统计学分析。以平均值 \pm 标准偏差 (SD) 表示结果。使用司徒登氏 t 试验进行统计学分析, P 值 < 0.05 被认为是统计学显著的。

[0151] 结果和讨论

[0152] 为了研究抗 HCV-受体 mAb 与抗 HCV-包膜抗体的同时给药是否在抑制病毒感染中带来附加的效果,申请人已用单克隆抗 E2 抗体 IGH461、抗 E1 抗体 IGH526 或用获自慢性感染患者的纯化异源抗 HCV IgG 预培养源自患者的 HCVpp,并研究其在用以下抗 HCV-受体单克隆抗体的每一种预培养的细胞中抑制源自患者的 HCV 假颗粒 (pseudoparticles) 感染的能力:抗 CLDN1mAb (OM-7D3-B3)、抗 SR-BI mAb (NK-8H5-E3)、和抗 CD81mAb (QV-6A8-F2CA)。

[0153] 获自抗 CLDN1mAb 的结果示于图 1。有趣的是,用交叉中和抗 E2mAb、抗 E1mAb 或纯化异源抗 HCV IgG 预培养传染性病毒颗粒导致明显的抑制 HCV 感染的协同效应,将抗 CLDN1 的 IC_{50} 降低了高达 100 倍。

[0154] 获自抗 SR-BI mAb 和抗 CD81mAb 的结果分别示于图 2 和图 3。

[0155] 在所有情况下,通过计算由一系列平行实验测定的如前所述的联合指数 CI,协同作用被进一步证实 (Zhao 等, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10 :7994-8004)。所得结果示于下表。小于 1 的 CI 表示协同,而 CI 等于 1 表示相加和 CI 大于 1 表示对抗。

[0156] 对于包膜 - 特异性单克隆抗体和抗 CLDN1 抗体的组合,观察到非常显著的效果。对于该组合所观察到的明显协同作用可归因于包膜 - 和 CLDN1- 特异性抗体在进入期间靶向不同且互补的靶标这一事实。事实上,证实包膜 - 特异性抗体结合与 CD81 和 SR-BI 相互作用的 E2 或 E1/E2 复合物 (对于综述,参见 Zeisel 等, *J. Hepatol.*, 2011, 54 :566-576),

证实 CLDN1- 特异性抗体与导致 CD81-CLDN1 相互作用减少的 CLDN1 相互作用 (Krieger 等, Hepatology, 2010, 51 :1144-1157)。包含包膜 - 和 CLDN1- 特异性抗体的组合的最有效组合的事实也可具有重要的临床和治疗意义, 因为其表明该组合可为抗病毒策略的进一步临床前和临床开发的关键目标。

[0157] 表 1. HCVpp 感染中研究的每一组合的 IC_{50} 和 CI。

[0158]

抗 HCV-包膜抗体	抗 HCV-受体抗体	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI
同型对照	抗 CLDN1	1.5	
抗 E1 mAb	抗 CLDN1	0.3	0.20
抗 E2 mAb	抗 CLDN1	0.2	0.26
抗 HCV IgG	抗 CLDN1	0.02	0.51
同型对照	抗 SRBI	10	
抗 E1 mAb	抗 SRBI	4	0.40
抗 E2 mAb	抗 SRBI	4	0.40
抗 HCV IgG	抗 SRBI	0.07	0.50
同型对照	抗 CD81	2.5	
抗 E1 mAb	抗 CD81	2	0.80
抗 E2 mAb	抗 CD81	2	0.81
抗 HCV IgG	抗 CD81	0.3	0.62

[0159] 根据这些结果, 申请人已首次显示了交叉中和抗 HCV- 包膜抗体或纯化异源抗 HCV IgG 和抗 HCV- 受体抗体 (抗 CLDN1、抗 SR-BI 和抗 CD81mAb) 以高度协同的方式起作用于高感染性 HCV 逃脱变型的进入抑制并应用于慢性 HCV 感染的治疗。

[0160] 这些结果表明抗 HCV 受体抗体与交叉中和抗 HCV- 包膜抗体的组合是高度原创并且例如在肝移植之后有效的预防原发性 HCV 感染的抗病毒方法。该方法也可抑制慢性感染患者中的病毒传播。

[0161] 为了解决这些发现对于其它基因型的相关性, 还针对基因型 1-6 的 HCVpp 表达包膜糖蛋白的感染研究了包含抗 HCV- 包膜抗体和抗 CLDN1 抗体的组合的效果。所得结果示于表 2。

[0162] 表 2. 来自全部主要基因型的 HCVpp 感染中研究的每一组合的 IC_{50} 和 CI。

[0163]

基因型	化合物或组合	IC ₅₀ (μg/mL)	CI
1a	抗 CLDN1	6.0	
	抗 CLDN1 + 抗 E1 mAb (1μg/mL)	0.02	0.05
	抗 CLDN1 + 抗 E2 mAb (1μg/mL)	2	0.34
	抗 CLDN1 + 抗 HCV IgG (1μg/mL)	0.003	0.16
1b	抗 CLDN1	4.0	
	抗 CLDN1 + 抗 E1 mAb (1μg/mL)	0.4	0.12
	抗 CLDN1 + 抗 E2 mAb (1μg/mL)	0.03	0.06
	抗 CLDN1 + 抗 HCV IgG (1μg/mL)	0.006	0.40
2a	抗 CLDN1	3.0	
	抗 CLDN1 + 抗 E1 mAb (1μg/mL)	0.03	0.05
	抗 CLDN1 + 抗 E2 mAb (1μg/mL)	0.8	0.27
	抗 CLDN1 + 抗 HCV IgG (1μg/mL)	0.005	0.22
3a	抗 CLDN1	0.07	
	抗 CLDN1 + 抗 E1 mAb (1μg/mL)	0.04	0.57
	抗 CLDN1 + 抗 E2 mAb (1μg/mL)	0.03	0.43
	抗 CLDN1 + 抗 HCV IgG (1μg/mL)	0.001	0.41
4	抗 CLDN1	0.3	
	抗 CLDN1 + 抗 E1 mAb (1μg/mL)	0.05	0.33
	抗 CLDN1 + 抗 E2 mAb (1μg/mL)	0.1	0.35
	抗 CLDN1 + 抗 HCV IgG (1μg/mL)	0.001	0.30
5	抗 CLDN1	0.8	
	抗 CLDN1 + 抗 E1 mAb (1μg/mL)	0.02	0.31
	抗 CLDN1 + 抗 E2 mAb (1μg/mL)	0.001	0.40
	抗 CLDN1 + 抗 HCV IgG (1μg/mL)	0.001	0.35
6	抗 CLDN1	5	
	抗 CLDN1 + 抗 E1 mAb (1μg/mL)	0.4	0.08
	抗 CLDN1 + 抗 E2 mAb (1μg/mL)	2	0.40
	抗 CLDN1 + 抗 HCV IgG (1μg/mL)	0.001	0.33

[0164]

[0165] 所得结果显示了使用依照本发明的组合获得 0.05-0.57 的 CI, 表明来自全部主要 HCV 基因型的含 HCVpp 包膜糖蛋白的进入抑制的协同作用。

[0166] 这些结果首次显示交叉中和抗 HCV- 包膜抗体或纯化异源抗 HCV IgG 和抗 HCV- 受

体抗体（抗 CLDN1、抗 SR-BI、和抗 CD81mAb）以高度协同的方式起作用于全部主要基因型的 HCV 的进入抑制。

[0167] 实施例 2 :使用抗体组合抑制 HCVcc 感染

[0168] 37 °C 下,用获自不相关慢性感染受试者的纯化异源抗 HCV IgG(1 或 10 μ g/mL) 或同型对照 IgG 预培养源自细胞培养液的 HCVcc(Luc-Jc1、基因型 2a) (Krieger 等, Hepatology, 2010, 54 :1144-1157) 并将其加入用浓度增加的抗 CLDN10M-7D3-B3、抗 SR-BI NK-8H5-E3、抗 CD81QV-6A8-F2C4、大鼠或小鼠同型对照 mAb 预培养的 Huh7 细胞中。如前所述,通过荧光素酶报告基因表达分析 HCVcc 感染 (Krieger 等, Hepatology, 2010, 54 : 1144-1157 ;Fofana 等, Gastroenterology, 2010, 139 :953-964)。抗 HCV-IgG 和抗 HCV-受体抗体的组合导致协同效应,其中 CI 分别为 0.63(对于 1 μ g/mL 抗 HCV IgG 和抗 CLDN1 而言)和 0.31(对于 10 μ g/mL 抗 HCV IgG 和抗 CLDN1 而言);0.36(对于 1 μ g/mL 抗 HCV IgG 和抗 SR-BI 而言)和 0.11(对于 10 μ g/mL 抗 HCV IgG 和抗 SR-BI 而言);0.6(对于 1 μ g/mL 抗 HCV IgG 和抗 CD81 而言)和 0.21(对于 10 μ g/mL 抗 HCV IgG 和抗 CD81 而言)。

[0169] 表 3. HCVcc 感染中研究的每一组合的 IC₅₀ 和 CI。

[0170]

抗 HCV-包膜抗体	抗 HCV-受体抗体	IC ₅₀ (μ g/mL)	CI
同型对照	抗 CLDN1	0.4	
抗 HCV IgG	抗 CLDN1	0.25	0.63
同型对照	抗 SRBI	2.5	
抗 HCV IgG	抗 SRBI	0.9	0.36
同型对照	抗 CD81	0.25	
抗 HCV IgG	抗 CD81	0.15	0.60

[0171] 实施例 3 :HCV 感染体外模型的进一步表征

[0172] 使用不同 HCV 基因型和模型体系 (HCVcc、HCVpp、肝细胞瘤细胞系、原代人肝细胞) 筛选和识别 mAb 之后,将通过在包括原代人肝细胞的现有技术体外模型内中和的比较分析来进一步表征依照本发明的组合 (Krieger 等, Hepatology, 2010, 51 :1144-1157 ;Fofana 等, 2010, 139 :953-964)。为了进一步研究中和机理,使用动力学试验以确定抗体组合靶向的进入步骤。为此目的,使用允许结合与结合后事件以及细胞系过度表达进入因子之间的区别的基于 HCVpp 和 HCVcc 的动力学试验 (Haberstroh 等, Gastroenterology, 2008, 135 : 1719-1728 ;Krieger 等, Hepatology, 2010, 51 :1144-1157)。

[0173] 实施例 4 :HCV 感染体内模型的表征

[0174] 作为评价依照本发明抗体组合、和建立用于保护和治疗 HCV 感染的基本参数的第一步,在临床前研究中使用人肝-嵌合 SCID/Alb-uPA 小鼠模型。该模型是一种用于抗病毒体内评估的良好表征临床前模型。如前所述,将考察 uPA/SCID 小鼠中所选 mAb 组合的药代动力学和毒性 (Law 等, Nat. Med., 2008, 14 :25-27 ;Vanwolleghem 等, Hepatology, 2008, 47 :1846-1855)。简言之,用 HCV- 感染的人血清静脉内感染移植 SCID/Alb-uPA 小鼠并评估 mAb 组合对病毒负载的效果。如最近所述,治疗结果将被临床评价 (毒性)、病毒学评价 (病毒负载)、和形态学评价 (移植肝细胞和其它组织的组织病理学) (Vanwolleghem 等, Gastroenterology, 2007, 133 :1144-1155)。安全性特征将在非人类灵长类动物中进一步评估。

[0175] 实施例 5 :第 I/IIa 阶段临床试验

[0176] 在完成 uPA-SCID 小鼠模型研究以及非人类灵长类动物中的毒性研究之后,将使用位于斯特拉斯堡的斯特拉斯堡临床研究中心 (CIC) 的长期合作 Inserm U748-UDS,在耐药或不符合护理标准的 HCV 感染人类中开始 I/IIa 期临床试验。需要两种研究设计以评价预防和治疗 HCV 感染的安全性和功效。

[0177] 经历肝移植的受试者的 HCV 感染的预防。将通过实现移植后病毒负载自基线值减少 $\geq 2\log_{10}$ (如通过 HCV RT-PCR 量化测量) 来评估 Abs 组合以预防在肝移植之后的肝移植普遍性再次感染

[0178] 慢性感染患者受试者中 HCV 感染的治疗。将评估 Abs 组合以实现病毒负载自基线值减少 $\geq 2\log_{10}$ 。

[0179] 其它实施方案

[0180] 考虑本文所公开的本发明说明书或实践,本发明的其它实施方案对于本领域技术人员而言将是显而易见的。本说明书和实施例意欲被视为仅是示例性的,本发明的真正范围将在以下权利要求书中说明。

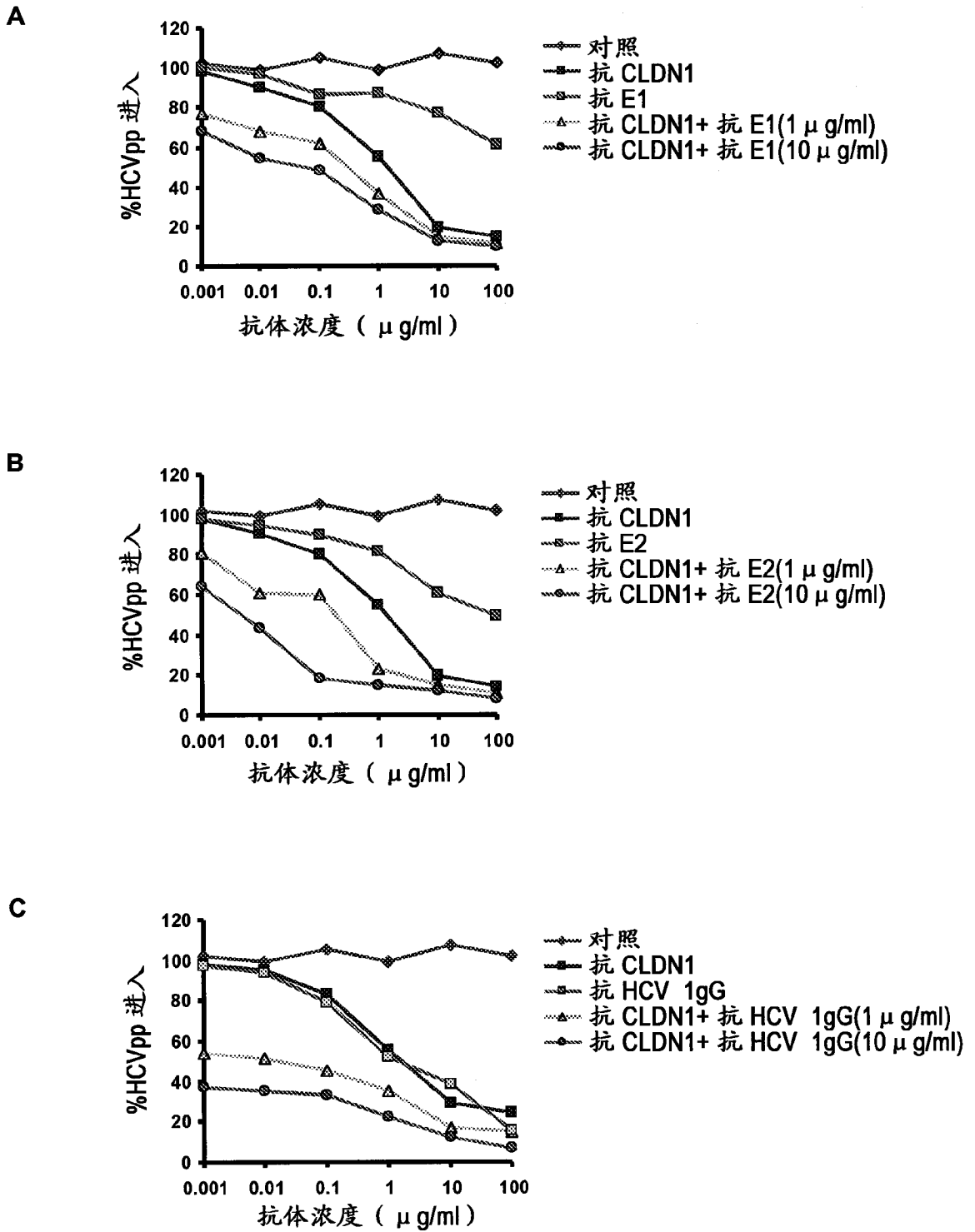


图 1

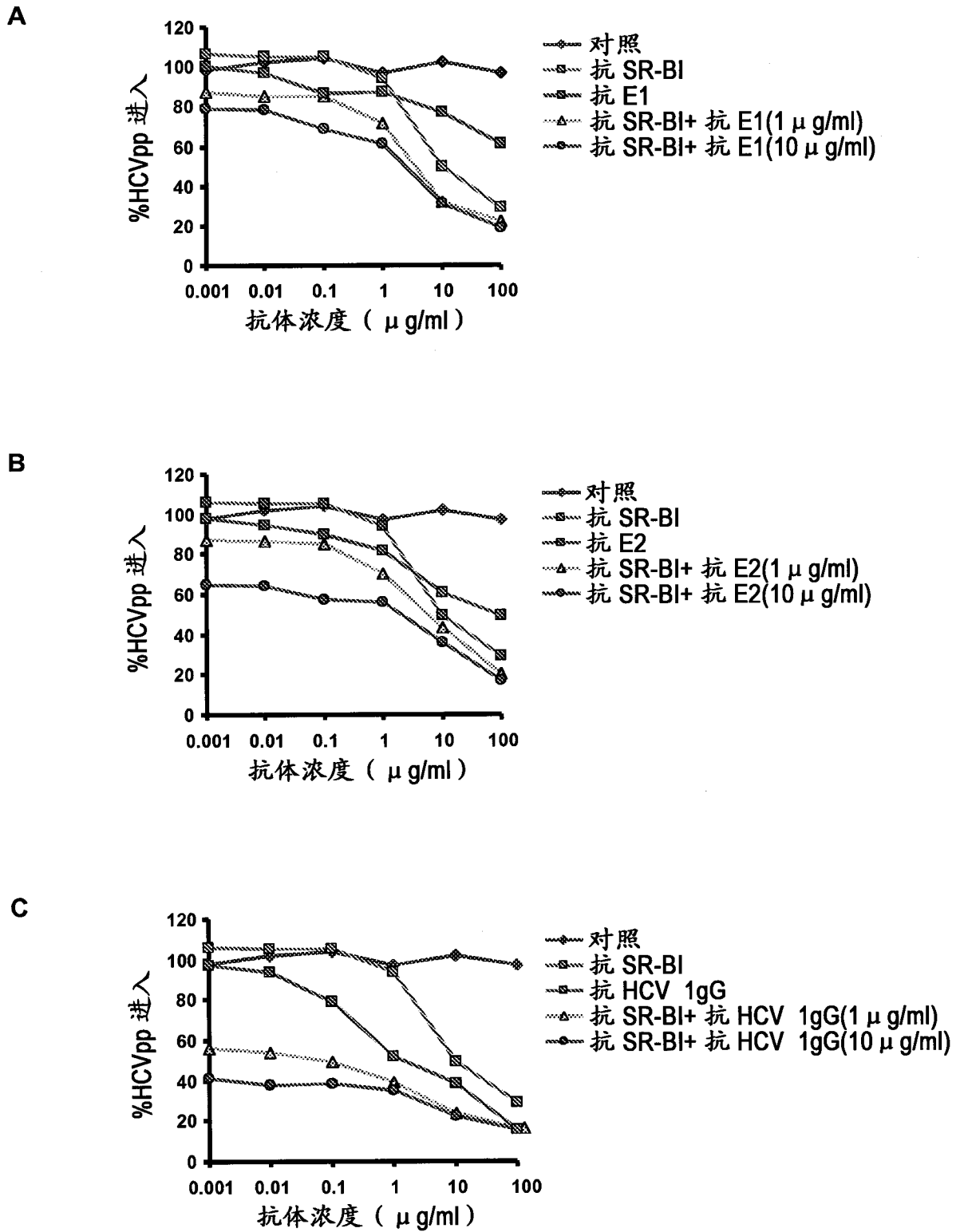


图 2

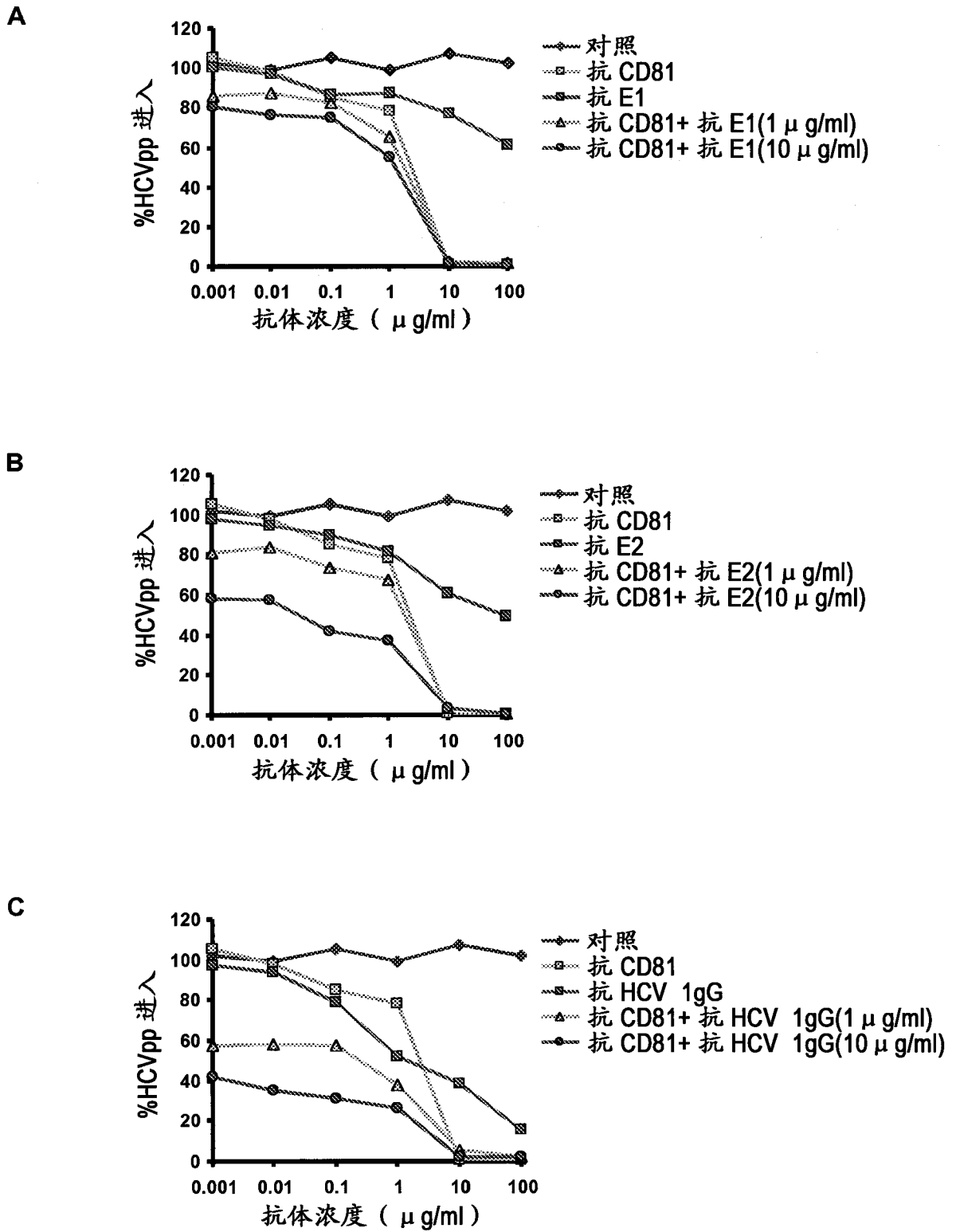


图 3

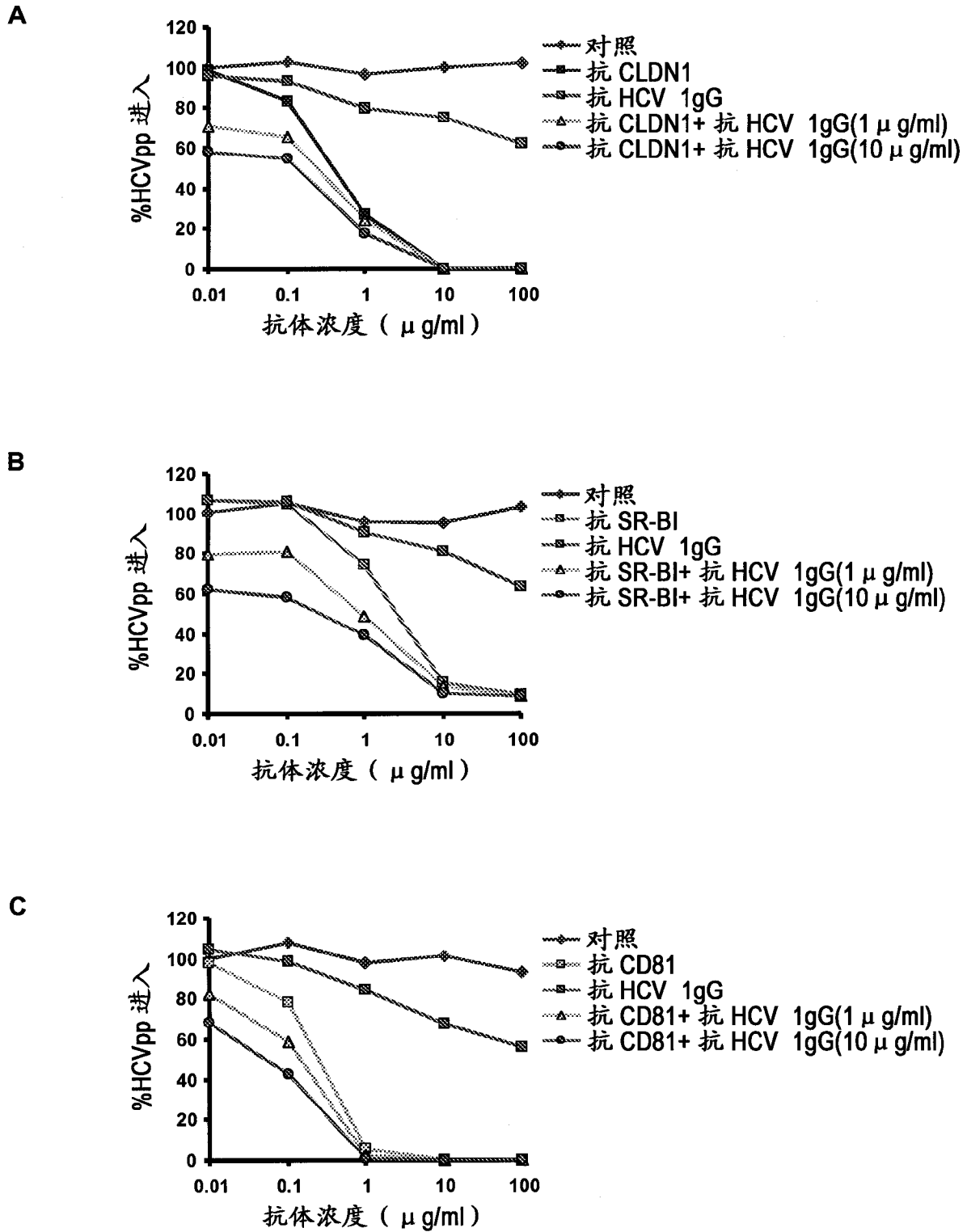


图 4