

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 8 月 30 日 (30.08.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/113348 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/06 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
C12N 15/06 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/071596

(22) 国际申请日: 2012 年 2 月 24 日 (24.02.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201110045952.1 2011 年 2 月 25 日 (25.02.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 **厦门万泰沧海生物技术有限公司 (XIAMEN INNOV-AX BIOTECH CO. LTD.)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市海沧区新园路 130 号, Fujian 361022 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **顾颖 (GU, Ying)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, Fujian 361005 (CN)。 **侯汪衡 (HOU, Wangheng)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, Fujian 361005 (CN)。 **方楚 (FANG, Chu)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, Fujian 361005 (CN)。 **高双全 (GAO, Shuangquan)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, Fujian 361005 (CN)。 **曹芳 (CAO, Fang)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, Fujian 361005 (CN)。 **王海虹 (WANG, Haihong)** [CN/CN]; 中国福建省厦

门市思明区思明南路 422 号厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, Fujian 361005 (CN)。 **张军 (ZHANG, Jun)** [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, Fujian 361005 (CN)。

(74) 代理人: **中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE)**; 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏の説明 (细则 13 之二.4(d)(i) 和 48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: ANTI-CD4 PROTEIN MONOCLONAL ANTIBODY, ACTIVE FRAGMENTS AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 抗 CD4 蛋白的单克隆抗体及其活性片段及用途

(57) Abstract: Provided are an anti-CD4 protein monoclonal antibody, active fragments and uses thereof. The antibody of the present invention can block the binding of the human immunodeficiency virus and human CD4 protein for invasion into cells. The antibody of the present invention can be used for detecting, diagnosing, preventing and treating diseases of which target cells are CD4 cells, especially AIDS caused by the human immunodeficiency virus (HIV). Further provided are corresponding hybridoma cell lines, isolated nucleic acids molecule and oligopeptides, as well as pharmaceutical compositions and kits comprising the monoclonal antibody.

(57) 摘要: 本发明提供了抗 CD4 蛋白的单克隆抗体及其活性片段及用途, 本发明的抗体可阻断人免疫缺陷病毒通过与人 CD4 蛋白结合侵入细胞。本发明的抗体可用于探测、诊断、预防和治疗以 CD4 细胞为目标细胞的疾病, 特别是人免疫缺陷病毒 (HIV) 病毒引起的艾滋病。本发明还提供了相关的杂交瘤细胞株, 分离的核酸分子和短肽, 以及包含该单克隆抗体的药物组合物和试剂盒。



WO 2012/113348 A1

抗 CD4 蛋白的单克隆抗体及其活性片段及用途

发明领域

本发明涉及可特异性结合人表面抗原分化簇 4 (Cluster of Differentiation 4, CD4) 蛋白的单克隆抗体, 及其保守性变体或活性片段, 其多肽或多肽类似物的相关编码序列, 产生所述单克隆抗体的细胞株, 及应用该抗体或片段用于预防、免疫治疗和诊断的方法和用途; 预防或治疗灵长类, 包括人类在内的, 感染源以 CD4⁺ 细胞的主要目标细胞引起的疾病: 这些疾病包括获得性免疫缺陷综合症 (艾滋病, AIDS), 艾滋病相关的疾病, 人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染。

背景技术

上世纪发现 HIV 以来, 许多研究者致力于 HIV 的病毒分子生物学、免疫、疫苗等方面的研究, 但对于 HIV 疫苗及其免疫疗法的发展仍存在许多的困难, 包括 HIV-1 的变异性, 病毒的多种传播途径/方式, 以及有关预防 HIV 感染所必需的免疫反应仍有分歧等。

HIV-1 病毒是约 100 纳米的包膜病毒。其 RNA 基因组及一些活性蛋白包裹在由衣壳蛋白组成的锥形核心中, 病毒膜的内部为衣壳蛋白, 包膜位于病毒颗粒的最外层, 其主体为磷脂双分子层, 嵌有由 env 基因编码的 gp120 和 gp41 组成的刺突状 (spike) 结构。HIV 包膜刺突状结构与细胞第一受体 CD4 蛋白接触后发生构象变化, 然后与第二受体趋化因子受体蛋白 (chemokine receptors, 包括 CCR5、CXCR4 等) 作用, 最终实现膜融合, 释放病毒的基因侵入细胞。

HIV 病毒包膜糖蛋白是以 gp160 的前体形式在细胞中表达出来的, 成熟的包膜糖蛋白被剪切为约 481 个氨基酸的 gp120 糖蛋白和

约 345 个氨基酸的 gp41 糖蛋白 (Ratner, L. 等人, *Nature*, 1985,313:277-284)。gp120 和 gp41 在 HIV 包膜上以三聚体的功能单位形式存在, 参与病毒与细胞受体的结合及病毒与细胞融合的感染过程 (Kwong, P.D. 等人, *Nature*, 2002,420:678-682; Diskin, R. 等人, *Nat Struct Mol Biol*, 2010,17:608-613; Buzon, V. 等人, *PLoS Pathog*, 2010, 6(5):e1000880.)。

HIV-1 包膜糖蛋白 gp120 通过与细胞受体 CD4 蛋白 (Maddon, P.j. 等人, *Cell*, 1986,47:333-348) 以及与共受体 (co-receptor, 主要为 CCR5 或 CXCR4 蛋白) 的相互作用感染宿主细胞 (Alkhatib, G. 等人, *Science*, 1996,272:1955-1958; Deng, H. 等人, *Nature*, 1996,381:661-666; Dragic, T. 等人, *Nature*, 1996,381: 667-673; Feng, Y. 等人, *Science*, 1996,272:872 - 877)。与细胞受体的结合引起病毒包膜糖蛋白 gp120 构象改变, 进而诱导与包膜糖蛋白的跨膜单位 gp41 结构重排 (rearrangements) 使病毒与细胞融合 (Wyatt, R. 等人, *Science*, 1998,280:1884 - 1888; Pierson, T.C. 等人, *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003,281:1 - 27)。

CD4 全称表面抗原分化簇 4 (Cluster of Differentiation 4), 是表达在包括辅助 T 细胞、调节 T 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞等细胞表面的糖蛋白, 是辅助 T 细胞的表面标记 (surface markers) 之一, 是其行使其功能的重要受体, 参与调节 T 免疫细胞的增殖、淋巴因子的释放以及参与免疫细胞的相互作用, 调节抗体的产生。同时是许多病原体 (包括人免疫缺陷病毒等) 感染 CD4⁺ 细胞的受体糖蛋白 (Isobe, M. 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986;83(12):4399-402; Ansari-Lari, M.A. 等人, *Genome Res*, 1996;6(4):314-26; Bofill, M. 等人, *Clin Exp Immunol*, 1992;88(2):243-52)。

与很多其他细胞表面受体/标记分子相似，CD4 蛋白也属于免疫球蛋白超家族（Immunoglobulin superfamily）的成员。完整的 CD4 是由 CD4 基因编码的 433 个氨基酸膜糖蛋白，其分子量约为 55kDa-62kDa，包括由 1-375 位氨基酸组成的 4 个细胞膜外部结构域（domain），376-395 位氨基酸构成的跨膜区和 396-433 位氨基酸构成的细胞质内尾部（cytoplasmic tail）（Maddon P. J.等人, *Cell*, 1985, 42: 93-104; Littman, D.R.等人, *Cell*, 55: 541）。其中细胞外的 4 个结构域分别为第一结构域（domain 1，简称 D1，包括第 1-100 位氨基酸），第二结构域（domain 2，简称 D2，包括第 101-180 位氨基酸），第三结构域（domain 3，简称 D3，包括第 181-290 位氨基酸）和第四结构域（domain 4，简称 D4，包括第 291-375 位氨基酸）（Maddon, P.J.等人, *Cell*, 1985;42:93-104; Maddon, P.J.等人, *Cell*, 1986;47:333-348; Maddon, P.J.等人, *Cell*, 1988;54:865-874; Wang, J.H.等人, *Nature*, 1990, 348: 411-418）；其中 D1 和 D3 在结构上类似于免疫球蛋白可变区结构域（immunoglobulin variable domain, IgV domain），D2 和 D4 在结构上类似于免疫球蛋白恒定区结构域（immunoglobulin constant domains, IgC domain）。

作为 HIV 感染细胞的受体蛋白，CD4 蛋白在艾滋病毒的复制周期中发挥重要的作用（Dalglish, A. G.等人, *Nature*, 1984;312:763 - 767; Klatzmann, D.等人, *Science*, 1984; 225:59 - 63; Klatzmann, D.等人, *Nature*, 1984, 312: 767 - 768）。CD4 的第一个结构域（D1）中的 CDR3 样区（CDR3-like region）和 HIV-1 包膜糖蛋白 gp120 的第二免疫球蛋白样互补决定区（CDR2-like region）直接参与了相互作用（Arthos, J.等人, *Cell*, 1989,57:469 - 481; Clayton, L. K.等人, *Nature*, 1989, 339:548 - 551; Mizukami, T.等人, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988,85:9273-9277; Batinić, D.等人, *J Biol Chem*. 1992,

267:6664-6671; Camerini, D. 等人, *Cell*. 1990,60:747-754; Kalyanaraman, V. S.等人, *J Immunol*. 1990,145:4072-4078; Lifson, J. D.等人, *Science*. 1988,241:712-716; Truneh, A.等人, *J Biol Chem*. 1991,266:5942-5948; Diskin, R. 等人, *Nat Struct Mol Biol*. 2010,17:608-613), 两个蛋白分子的相互作用引起 CD4-gp120 复合物发生构象变化, 使 gp120 蛋白可以进一步与细胞第二受体, 即趋化因子受体 5 (chemokine receptor-5, CCR5) 或 CX 趋化因子受体 4 (CX chemokine receptor-4, CXCR4) 结合。与细胞第二受体的结合引发糖蛋白三聚体构象改变, 使 HIV 表面的 gp41 蛋白插入细胞膜, 最终导致病毒包膜和细胞膜的融合 (Kuritzkes, D.R., *Curr Opin HIV AIDS*. 2009,4:82-87; Briz, V.等人, *J Antimicrob Chemother*. 2006,57:619-627; Castagna, A.等人, *Drugs*. 2005,65:879-904)。

CD4⁺细胞被 HIV 感染后, 细胞功能和细胞的数量都受到明显的影响, 其中 T 细胞数量的减少一方面是由于病毒的裂解型感染, 同时也与 HIV 感染后的 CD4⁺细胞发生与其他感染的或未感染的 CD4⁺细胞的融合现象有关 (Sodroski, J.等人, *Nature*, 1986, 322: 470-474)。CD4⁺细胞耗尽, 会导致患者机体表现为免疫抑制, 从而越来越容易受到机会性感染和发生恶性肿瘤。这种免疫抑制现象在后天免疫缺损综合症 (艾滋病, AIDS) 患者中广泛存在。通常艾滋病临床表现为与艾滋病毒相关的复合症状特点, 如持续性全身淋巴结肿大, 发烧和体重下降等的综合征。在某些情况下, 由于艾滋病毒感染 CD4⁺脑细胞使艾滋病伴随有中枢神经系统紊乱 (Popovic, M. 等人, *Science*, 1984, 224: 497-500)。人类免疫缺陷病毒的攻击对象是 CD4⁺细胞, 在病毒引起艾滋病的过程中, 患者体内 CD4⁺细胞的数量与病情的发展有着密切的关系, 所以 CD4⁺细胞数量的检测对艾滋病治疗效果的判断和对患者免疫功能的判断有重要作用。

由于抗 CD4 抗体具有通过干扰 HIV 与 CD4 分子和/或第二受体相互作用进而影响 HIV 侵入受体细胞，发挥预防和/或治疗 HIV 感染的作用，一些研究者正在研究抗 CD4 抗体阻断艾滋病毒与细胞相互作用的关系和应用。目前报道的在阻断艾滋病毒感染 CD4⁺受体细胞中作用明显，同时具有应用于 HIV 感染引发的艾滋病方面具有良好前景的抗 CD4 抗体如 5A8 和 DB-81，其识别的表位均位于 CD4 蛋白的 D2 结构域（Song, R.等人, *J Virol.* 2010, 84:6935-6942; Burastero, S.E.等人, *J Transl Med.* 2009 Nov 28;7:101）。

已经报道了关于抗 CD4 其他表位或结构域的单克隆抗体的研究，如可用于外周血 CD4 抗原检测的单克隆抗体等特定领域的单克隆抗体，但相关报告中也报道了这些抗体在艾滋病治疗上的不足之处。

例如，与 CD4 分子 D1 结构域结合的抗体 Leu3A 和 OKT4A 具有阻断感染艾滋病毒引起的细胞合胞体形成现象的作用（Sattentau Q.J.等人, *Science*, 1986,234:1120-1123; Jameson B.A.等人, *Science*. 1988,240:1335-1339; Peterson A.等人, *Cell*. 1988,54:65-72）。但是由于这些抗体的识别表位与 HIV 包膜糖蛋白 gp120 识别的表位重叠，这些抗体无法与结合了包膜糖蛋白 gp120 的 CD4 蛋白分子反应，因此这些抗体作为艾滋病毒感染的治疗药物使用方面存在严重缺陷（Bates P.A.等人, *Protein Eng.* 1989,3:13-21; McDougal J.S.等人, *J Immunol.* 1986,137:2937-2944; Landau N.R. 等人, *Nature*. 1988,334:159-162; Dalgleish A.G.等人, *Lancet*. 1987,2:1047-1050），同时在机体内也会由于机体的免疫抑制而存在应用缺陷（Samuele E.B.等人, *J Transl Med.* 2009,7:101）。

据报道，识别 CD4 分子 D2 结构域的单克隆抗体 OKT4B（T. Kieber-Emmons T.等人, *Biochim Biophys Acta*. 1989, 989:281-300）

对于 HIV 包膜糖蛋白 gp120 与 CD4 蛋白的结合具有明显的干扰作用 (McDougal J.S.等人, *J. Immunol.*, *J Immunol.* 1986, 137:2937-2944; Lundin K.等人, *J Immunol Methods.* 1987,97:93-100; Lamarre D.等人, *EMBO J.*, 1989,8:3271-3277), 但是其阻止 HIV 感染的细胞形成合胞体现象的作用明显比 OKT4A 弱, 在治疗中的弱点更加突出 (Sattentau Q.J.等人, *Science.* 1986,234:1120-1123; Moore J.P.等人, *Science.* 1990,250:1139-42)。

其他表位的抗 CD4 抗体还包括 MT151, VIT4, 和 MT321 等 (Sattentau Q.J.等人, *Science.* 1986, 234:1120-1123), 这些抗体识别的表位与 HIV 包膜糖蛋白 gp120 结合的表位在构象上有一定的重叠 (Sattentau Q.J.等人, *J Exp Med*, 1989, 170:1319-1334; Bates P.A. 等人, *Protein Eng.* 1989,3:13-21; Landau N.R. 等人, *Nature.* 1988,334:159-162; Merkenschlager M. 等人, *J Immunol.* 1990,145:2839-2845; Benkirane M. 等人, *J Virol.* 1995,69: 6898-6903)。

本发明的抗体识别 CD4 蛋白 D1 (D1-2) 结构域上的表位, 当有 HIV 存在/CD4 蛋白与 HIV 包膜糖蛋白 gp120 结合后, 该表位可与本发明之单克隆抗体表现出更好的反应活性, 显著阻断 HIV 侵入细胞, 使病毒不能在细胞中复制, 阻断由于 HIV 感染引起的细胞病变, 从而阻止病毒在细胞间的传播。这样的抗体在阻断 HIV 感染及艾滋病等相关疾病治疗新方式方面具有应用价值。

发明内容

本发明提供了可特异性结合人表面抗原分化簇 4 (Cluster of Differentiation 4, CD4) 蛋白的单克隆抗体, 即可阻断人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 侵入 CD4⁺细胞,

抑制 HIV 感染、阻断 HIV 在 CD4⁺ 间传播，治疗艾滋病活性的单克隆抗体。

本发明的单克隆抗体可与人表面抗原分化簇 4 蛋白的第一结构域（D1，第 1-113 位氨基酸）上的表位结合，也可与包含此结构域的第 1-2 结构域（D1-2，第 1-180 位氨基酸）结合，以及与包含第一结构域的其他形式的截短的人表面抗原分化簇 4 蛋白、重组表达的 CD4、细胞表面的 CD4 蛋白结合。同时本发明之抗体对人类免疫缺陷病毒 gp120 与 CD4 蛋白的相互作用无明显阻断作用，本发明之单克隆抗体可阻断 HIV 病毒感染细胞，阻断 HIV 病毒在受体细胞中的复制。

另外，本发明提供了抗 CD4 抗体的多种同源形式：单克隆抗体、免疫球蛋白的片段（如至少是免疫球蛋白分子的一个免疫活性区段），如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、单链抗体分子或由含有一个或多个 CDR 区的免疫球蛋白分子的任意片段形成的多特异性抗体。另外，本发明还提供了重组抗体、重组嵌合抗体、重组人源化抗体等由人免疫球蛋白中的一个或多个 CDR 区结合一个或多个不同的人免疫球蛋白的构架区形成的抗体。以及本发明抗体的 CDR 功能区域的模拟物质。

本发明提供了杂交瘤细胞株，分离的核酸分子和短肽，以及包含本发明的单克隆抗体的药物组合物和医药诊断设备和试剂盒。本发明也提供了利用本发明的单克隆抗体探测、诊断、预防和治疗哺乳动物，包括人类在内的，感染源以 CD4⁺ 细胞为主要目标细胞的疾病：这些疾病包括获得性免疫缺陷综合症（艾滋病，AIDS），艾滋病相关的疾病，人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV）感染的疾病。

在一个方面，本发明提供了一种单克隆抗体或其抗原结合部分，

其具有至少一项选自以下的特征:

- (i) 特异性结合人表面抗原分化簇 4 蛋白;
- (ii) 与含有人表面抗原分化簇 4 蛋白 D1 结构域的截短形式的人表面抗原分化簇 4 多肽特异性反应;
- (iii) 对人免疫缺陷病毒包膜糖蛋白 gp120 与人表面抗原分化簇 4 蛋白的反应无明显影响; 和
- (iv) 阻断人免疫缺陷病毒感染 CD4⁺细胞及再感染, 和/或阻断由此引起的疾病, 例如艾滋病。

在一个实施方式中, 本发明提供了单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体的重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 和其中所述抗体的轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤产生的抗体 15A7 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在一个实施方式中, 本发明提供了单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体的重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 和其中所述抗体的轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别是杂交瘤产生的抗体 14G7 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在一个实施方式中, 本发明提供了单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体的重链可变区和轻链可变区分别是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤产生的抗体 15A7 的重链可变区和轻链可变区。

在一个实施方式中, 本发明提供了单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体的重链可变区和轻链可变区分别是杂交瘤产生的抗体 14G7 的重链可变区和轻链可变区。

在一个实施方式中, 本发明提供了特异性结合人表面抗原分化簇 CD4 蛋白的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示或由 SEQ ID NO:1 的核苷酸

序列编码；其中所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示或由 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列编码。

在一个实施方式中，本发明提供了特异性结合人表面抗原分化簇 CD4 蛋白的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示或由 SEQ ID NO:17 的核苷酸序列编码；其中所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示或由 SEQ ID NO:19 的核苷酸序列编码。

在一个实施方式中，本发明的抗体包含一个或多个选自 SEQ ID NOs: 5-7 的重链 CDR；和/或包含一个或多个选自 SEQ ID NOs: 8-10 的轻链 CDR；

在一个实施方式中，本发明所述抗体的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:5-7 或由 SEQ ID NO:11-13 的核苷酸序列中一个或多个编码；

在一个实施方式中，本发明所述抗体的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:8-10 或由 SEQ ID NO:14-16 的核苷酸序列中一个或多个编码；

在一个实施方式中，本发明所述的单克隆抗体或其抗原结合部分为 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或单链抗体。

在一个实施方式中，本发明的抗体包含一个或多个选自 SEQ ID NOs: 21-23 的重链 CDR；以及包含一个或多个选自 SEQ ID NOs: 24-26 的轻链 CDR；

在一个实施方式中，本发明所述抗体的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:21-23 或由 SEQ ID NO:27-29 的核苷酸序列中一个或多个编码；

在一个实施方式中，本发明所述抗体的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:24-26 或由 SEQ ID

NO:30-32 的核苷酸序列中一个或多个编码;

在一个实施方式中,本发明所述的单克隆抗体或其抗原结合部分为 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或单链抗体。

在一个实施方式中,本发明所述的单克隆抗体或其抗原结合部分结合人表面抗原分化簇 4 蛋白的 K_D 值小于 1×10^{-5} M。

在一个实施方式中,本发明所述的单克隆抗体包括非 CDR 区,该非 CDR 区是来自不是鼠类的物种。

在另一个方面,本发明提供了特异性结合人表面抗原分化簇 4 蛋白的单克隆抗体,其是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤产生的抗体 15A7,其相应的杂交瘤细胞株是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤。

在另一个方面,本发明提供了分离的核酸分子,其编码本发明所述的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区。在一个实施方式中,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2。在另一个实施方式中,所述的核酸分子序列为 SEQ ID NO:1。

在另一个方面,本发明提供了分离的核酸分子,其编码本发明所述的单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区。在一个实施方式中,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4。在另一个实施方式中,所述的核酸分子序列为 SEQ ID NO:3。

在另一个方面,本发明提供了分离的核酸分子,其编码本发明所述的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区。在一个实施方式中,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:18。在另一个实施方式中,所述的核酸分子序列为 SEQ ID NO:17。

在另一个方面,本发明提供了分离的核酸分子,其编码本发明所述的单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区。在一个实施方式中,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:20。在另一

个实施方式中，所述的核酸分子序列为 SEQ ID NO:19。

在另一个方面，本发明提供了包含本发明的核酸分子的表达载体。在另一个方面，本发明提供了包含本发明的表达载体的宿主细胞。

在另一个方面，本发明提供了检测样品中人表面抗原分化簇 4 蛋白的方法，其包括如下步骤：

- a) 将所述的样品与本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分接触；
- b) 检测所述的单克隆抗体与所述样品中的蛋白的反应；
- c) 检测所述的单克隆抗体与所述样品中的蛋白及人免疫缺陷病毒包膜蛋白的反应。

在一个实施方式中，所述的单克隆抗体附着在固相载体上。在另一个实施方式中，所述的固相载体选自：微滴定板、磁颗粒、胶乳颗粒和硝化纤维素膜。在优选的实施方式中，所述的单克隆抗体是按如此方向附着在所述固相上，该方向能够增加所述单克隆抗体与所述样品的结合效率。在另一个实施方式中，所述的单克隆抗体是通过其恒定区域而附着在所述固相上的。在一个具体实施方式中，所述的反应是通过酶显色进行测定的。在另一个具体的实施方式中，所述的反应是通过荧光进行测定的。在又一个具体的实施方式中，所述的反应是通过化学发光进行测定的。在一个优选的实施方式中，上述方法中所述的单克隆抗体为 Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv。在另一个优选的实施方式中，所述的样品来自于鸟类或人类。

在另一个方面，本发明提供了药物组合物，其包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分，以及药学上可接受的载体。在一个实施方式中，本发明的药物组合物进一步包括其它抗病毒成分。在另一个实施方式中，本发明的药物组合物中的抗体为 Fab、Fab'、F(ab')₂

或 Fv。

在另一个方面，本发明提供了治疗受试者中由人免疫缺陷病毒感染引发的疾病的方法，其包括向所述的受试者施用治疗上有效量的本发明的药物组合物。

在另一个方面，本发明提供了本发明的单克隆抗体用于制备治疗或预防以 CD4⁺细胞为目标细胞的疾病（如艾滋病）的药物的用途。

在另一个方面，本发明提供了本发明的单克隆抗体用于制备阻断 HIV 感染 CD4⁺细胞及再感染的药物的用途。

在另一个方面，本发明提供了本发明的单克隆抗体用于人表面抗原分化簇 4 蛋白模拟表位肽筛选的用途。

在另一个方面，本发明提供了上述模拟表位肽用于制备预防以 CD4⁺为目标细胞的疾病（如艾滋病）的疫苗的用途。

在另一个方面，本发明提供了上述模拟表位肽用于制备治疗或诊断以 CD4⁺为目标细胞的疾病（如艾滋病）试剂盒的用途。

附图说明

图 1 是人 CD4 胞外区氨基酸序列，图中标注 D1 结构域，D2 结构域，D3 结构域，D4 结构域四个结构域的起止位置。

图 2 是重组人 CD4 蛋白表达纯化的 SDS-PAGE 结果，各图依次为 A: CD4(d1); B: CD4(d2); C: CD4(d3); D: CD4(d4); E: CD4(d1-2); F: sCD4 (即 D1-D4 结构域)；各小图各道样品从左至右依次为：1: 蛋白分子量 marker；2: 诱导后表达菌体；3: 2M 尿素上清；4: 4M 尿素上清；5: 8M 尿素上清；6: 纯化后样品；7: BL21 空载菌体。

图 3 是各稀释度的单克隆抗体 15A7 阻断不同亚型 HIV 实验株病毒感染 Tzm-bl 细胞的曲线图，实验株病毒包括 HIV_{NL4-3}(B 亚型)，HIV_{89.6}(B 亚型)，HIV_{94UG114}(D 亚型)，HIV_{MJ4}(C 亚型)，HIV_{WCML249}

(D/C 亚型)。

图 4 是各稀释度的单克隆抗体 14G7 阻断不同亚型 HIV 实验株病毒感染 Tzm-bl 细胞的曲线图,实验株病毒包括 HIV_{NL4-3}(B 亚型), HIV_{89.6}(B 亚型), HIV_{94UG114}(D 亚型), HIV_{MJ4}(C 亚型), HIV_{WCML249}(D/C 亚型)。

图 5 是单克隆抗体 15A7 与 Tzm-bl 细胞, U87.CD4.CXCR4 细胞和 U87.CD4.CCR5 细胞结合的免疫荧光的激光共聚焦显微镜检测结果,其中使用的对照为 anti-p24 的单克隆抗体 H5F4。

图 6 是单克隆抗体 14G7 与 Tzm-bl 细胞, U87.CD4.CXCR4 细胞和 U87.CD4.CCR5 细胞结合的免疫荧光的激光共聚焦显微镜检测结果,其中使用的对照为 anti-p24 的单克隆抗体 H5F4。

图 7 是重组蛋白 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2)和 sCD4 阻断 15A7 抗体与细胞反应的流式细胞仪检测结果。

图 8 是重组蛋白 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2)和 sCD4 阻断 14G7 抗体与细胞反应的流式细胞仪检测结果。

图 9 是单克隆抗体 15A7 和 14G7 的单链抗体表达质粒图。

图 10 是单抗纯化 SDS-PAGE 结果,各道样品从左至右依次为: 1: 蛋白分子量 Marker; 2: 单克隆抗体 15A7 还原处理样品; 3: 15A7 抗体 Fab 片段还原处理样品; 4: 15A7 抗体 F(ab')₂ 片段还原; 5: 单克隆抗体 15A7 非还原处理样品; 6: 15A7 抗体 Fab 非还原处理样品; 7: 15A7 抗体 F(ab')₂ 非还原处理样品。

图 11 是单克隆抗体 15A7 及其 F(ab')₂、Fab 抗体片段和 HIV_{NL4-3} 病毒反应,阻断其进入 Tzm-bl 细胞的结果,对照为缓冲液。

图 12 是 Tzm-bl 细胞表面不同受体的流式细胞仪检测结果,其

中 A 小图是用单克隆抗体 15A7 为一抗, FITC 标记的兔抗鼠抗体 (RAM-FITC, Cat.No. F9006 Sigma) 为二抗标记待测细胞; B 小图是用 FITC 标记的 anti-CD4 (Cat.No. 555346, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CD4 受体蛋白; C 小图是用 PE 标记的 anti-CXCR4 (Cat.No. 555974, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CXCR4 受体蛋白; D 小图是用 PE-Cy5 标记的 anti-CCR5 (Cat.No. 556889, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CCR5 受体蛋白; E 小图为无标记的细胞对照。

图 13 是 MT4 细胞表面不同受体的流式细胞仪检测结果, 其中 A 小图是用单克隆抗体 15A7 为一抗, FITC 标记的兔抗鼠抗体 (RAM-FITC, Cat.No. F9006 Sigma) 为二抗标记待测细胞; B 小图是用 FITC 标记的 anti-CD4 单抗 (Cat.No. 555346, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CD4 受体蛋白; C 小图是用 PE 标记的 anti-CXCR4 单抗 (Cat.No. 555974, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CXCR4 受体蛋白; D 小图是用 PE-Cy5 标记的 anti-CCR5 单抗 (Cat.No. 556889, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CCR5 受体蛋白; E 小图为无标记的细胞对照。

图 14 是 H9 细胞表面不同受体的流式细胞仪检测结果, 其中 A 小图是用单克隆抗体 15A7 为一抗, FITC 标记的兔抗鼠抗体 (RAM-FITC, Cat.No. F9006 Sigma) 为二抗标记待测细胞; B 小图是用 FITC 标记的 anti-CD4 单抗 (Cat.No. 555346, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CD4 受体蛋白; C 小图是用 PE 标记的 anti-CXCR4 单抗 (Cat.No. 555974, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CXCR4 受体蛋白; D 小图是用 PE-Cy5 标记的 anti-CCR5 单抗 (Cat.No. 556889, BD Biosciences) 标记待测细胞的 CCR5 受体蛋白; E 小图为无标记的细胞对照。

图 15 是 U87.CD4.CXCR4 细胞表面不同受体的流式细胞仪检测结果, 其中 A 小图是用单克隆抗体 15A7 为一抗, FITC 标记的兔抗鼠抗体 (RAM-FITC, Cat.No. F9006 Sigma) 为二抗标记待测细胞; B 小图是用 FITC 标记的 anti-CD4 单抗 (Cat.No. 555346, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CD4 受体蛋白; C 小图是用 PE 标记的 anti-CXCR4 单抗 (Cat.No. 555974, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CXCR4 受体蛋白; D 小图是用 PE-Cy5 标记的 anti-CCR5 单抗 (Cat.No. 556889, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CCR5 受体蛋白; E 小图是无标记的细胞对照。

图 16 是 U87.CD4.CCR5 细胞表面不同受体的流式细胞仪检测结果, 其中 A 小图是用单克隆抗体 15A7 为一抗, FITC 标记的兔抗鼠抗体 (RAM-FITC, Cat.No. F9006 Sigma) 为二抗标记待测细胞; B 小图是用 FITC 标记的 anti-CD4 单抗 (Cat.No. 555346, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CD4 受体蛋白; C 小图是用 PE 标记的 anti-CXCR4 单抗 (Cat.No. 555974, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CXCR4 受体蛋白; D 小图是用 PE-Cy5 标记的 anti-CCR5 单抗 (Cat.No. 556889, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CCR5 受体蛋白; E 小图是无标记的细胞对照。

图 17 是人外周血单个核细胞 (PBMC) 细胞表面不同受体的流式细胞仪检测结果, 其中 A 小图是用单克隆抗体 15A7 为一抗, FITC 标记的兔抗鼠抗体 (RAM-FITC, Cat.No. F9006 Sigma) 为二抗标记待测细胞; B 小图是用 FITC 标记的 anti-CD4 单抗 (Cat.No. 555346, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CD4 受体蛋白; C 小图是用 PE 标记的 anti-CXCR4 单抗 (Cat.No. 555974, BD Biosciences) 标记待测细胞表面的 CXCR4 受体蛋白; D 小图是用 PE-Cy5 标记的 anti-CCR5 单抗 (Cat.No. 556889, BD Biosciences)

标记待测细胞表面的 CCR5 受体蛋白；E 小图是无标记的细胞对照。

图 18 是流式细胞仪检测的单克隆抗体 15A7 标记表达了 HIV 的 293FT 细胞的情况，其中使用的对照细胞为空白的 293FT 细胞，对照抗体为 anti-p24 的单克隆抗体 H5F4。

图 19 是单克隆抗体 15A7 与表达了 HIV 的 293FT 细胞的免疫荧光的激光共聚焦显微镜检测结果，其中使用的对照细胞为空白的 293FT 细胞，对照抗体为 anti-p24 的单克隆抗体 H5F4。

图 20 是各种截短的 CD4 蛋白，包括重组蛋白 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2)和 sCD4 阻断 HIV_{NL4-3} 感染 Tzm-bl 细胞的效果。

图 21 是纯化的截短 CD4 蛋白与单克隆抗体 15A7 的免疫印迹反应结果。其中 A1 小图是截短 CD4 蛋白还原 SDS-PAGE 图，A2 小图是截短 CD4 蛋白还原胶免疫印迹反应图；B1 小图是截短 CD4 蛋白非还原胶图，B2 小图是截短 CD4 蛋白非还原胶免疫印迹反应。各小图各道样品依次为 1:蛋白分子量 marker；2:CD4(d1)；3:CD4(d2)；4:CD4(d3)；5:CD4(d4)；6:CD4(d1-2)；7:sCD4；8:对照蛋白；9:BL21 空载菌体。

图 22 是用 15A7 标记 Tzm-bl 细胞的流式细胞仪检测结果，其中包括加入 HIV_{NL4-3} 和不加 HIV_{NL4-3} 两种情况。

图 23 是重组蛋白 CD4(d1)、CD4(d1-2)和重组 sCD4 阻断 15A7 中和 HIV_{NL4-3} 感染 Tzm-bl 细胞的中和实验检测结果。

图 24 是用 CD4(d1)、CD4(d1-2)和重组 sCD4 与转染了 pNL4-3 的 293FT 细胞反应，用单克隆抗体 15A7 作为二抗，再用 FITC 标记的兔抗鼠抗体标记后进行流式细胞仪检测的结果，其中 A 小图为单克隆抗体 15A7 的反应结果；B 小图为用 anti-CD4 单抗（克隆号 Q4120，Cat.No. C1805 Sigma）作为对照标记待测细胞表面 CD4 受

体蛋白的反应结果。

图 25 是单克隆抗体 15A7 与点突变 CD4(d1-2)蛋白的免疫印迹反应结果。其中 A1 小图是各点突变 CD4(d1-2)蛋白还原 SDS-PAGE 图；A2 小图是各点突变 CD4(d1-2)蛋白非还原样 SDS-PAGE 图；B1 小图是各点突变 CD4(d1-2)蛋白还原样免疫印迹反应杂交图；B2 小图是各点突变 CD4(d1-2)蛋白非还原样免疫印迹反应杂交图。各小图各道样品顺序依次为 1: 蛋白分子量 marker；2: CD4(d1-2)-N73A；3: CD4(d1-2)-R59A；4: CD4(d1-2)-K46A；5: CD4(d1-2)-F43A；6: 对照蛋白 CD4(d1-2)。

具体实施方式

本发明申请中涉及的有关术语的定义如下：

本发明中的“表面抗原分化簇 4”一词指任何由表面抗原分化簇 4 基因编码的表面抗原分化簇 4 蛋白。

本发明中的“CD4⁺细胞”一词指细胞表面具有 CD4 糖蛋白的细胞，其中包括 CD4⁺T 淋巴细胞和 CD4⁺细胞系，如 T2M-bl、H9 和 C8166 等。

本发明中的“CD4 第一结构域 (D1)”一词指第 1 至第 98 位的截短的表面抗原分化簇 4 多肽。

本发明中的“CD4 第二结构域 (D2)”一词指第 99 至第 183 位的截短的表面抗原分化簇 4 多肽。

本发明中的“CD4 第三结构域 (D3)”一词指第 184 至第 291 位的截短的表面抗原分化簇 4 多肽。

本发明中的“CD4 第四结构域 (D4)”一词指第 292 至第 365 位的截短的表面抗原分化簇 4 多肽。

本发明中的“CD4 第一/二结构域 (D1-2)”一词指第 1 至第 183

位的截短的表面抗原分化簇 4 多肽。

本发明中的“重组可溶性 CD4 (sCD4, rsCD4, D1-4)”一词指第 1 至第 365 位的截短的表面抗原分化簇 4 多肽。

本发明中的“抗 CD4 抗体”一词是指识别位于表面抗原分化簇 4 蛋白分子上的表位的抗体,即与表面抗原分化簇 4 蛋白上的表位结合的抗体。

本发明中的“包膜糖蛋白”一词指人类免疫缺陷病毒的包膜糖蛋白。包膜糖蛋白介导人类免疫缺陷病毒针对宿主细胞的吸附和进入过程。其前体形式为 gp160, 经过加工后为 gp120 和 gp41, 在人类免疫缺陷病毒包膜上以聚合体的功能单位形式存在。

本发明中的“抗体”一词指任意一种免疫球蛋白, 包括能结合特异性抗原的单抗、多抗、双特异性或多特异性抗体。一个完整的抗体包含两条重链和两条轻链。每条重链含有一个可变区和第一、第二、第三等三个恒定区; 每条轻链包含一个可变区和一个恒定区。抗体呈“Y”型, “Y”型结构的颈部含有两条重链的第二和第三恒定区, 其通过二硫键结合形成。“Y”型结构的每条臂含有其中一条重链的第一恒定区和可变区, 和一条轻链的可变区和恒定区。轻链和重链的可变区决定抗原的结合; 每条链的可变区均含有三个高变区, 称为互补决定区 (CDR) (轻链(L)的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3。其由 Kabat 等人命名, 见 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), 第 1-3 卷, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD)。其中, 三个 CDR 由构架区 (FR) 间隔开。构架区比 CDR 区更保守并形成一个架子状结构支撑超变区。重链和轻链的恒定区与抗原结合无关, 但具有多种效应功能。抗体依据重链恒定区的氨基酸序列可以分成几类, 主要是: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,

其中有些类还进一步分成亚类，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 或 IgA2 等。

本发明中的“抗体”一词，除特指完整的免疫球蛋白外，也指免疫球蛋白的片段（如至少是免疫球蛋白分子的一个免疫活性区段），如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、单链抗体分子或由含有一个或多个 CDR 区的免疫球蛋白分子的任意片段形成的多特异性抗体。另外，本发明涉及的抗体也可以是由一个特定的人免疫球蛋白中的一个或多个 CDR 区结合一个或多个不同的人免疫球蛋白的构架区形成的抗体。在片段蛋白分子中仅包含重链 CDR 中的 1 个 CDR，2 个 CDR，3 个 CDR 可实现相同表位的识别作用。在片段蛋白分子中仅包含轻链 CDR 中的 1 个 CDR，2 个 CDR 至 3 个 CDR 区段同样可实现实现相同表位的识别作用。只保留鼠单抗的 1 个或 2 个 CDR 区，其余都是全新的氨基酸序列，获得的新抗体仍具有亲本鼠单抗的活性。1998 年，Rader 等将鼠单抗 LM609 可变区上的 HCDR3 和 LCDR3 移植到人源抗体序列中，成功获得仅保留鼠 HCDR3 和 LCDR3 的人源化抗体(Rader C, Cheresch DA, Barbas CF 3rd. A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95(15):8910-5)。2000 年，Klimka 等获得只保留鼠 HCDR3 的抗 CD-30 的人源化抗体(Klimka A, Matthey B, Roovers RC, et al, Human anti-CD30 recombinant antibodies by guided phage antibody selection using cell panning. Br J Cancer. 2000, 83(2):252-60)。

抗体相关的“Fab”片段是指含有一条轻链的可变区和恒定区和一条重链的可变区和恒定区经二硫键结合起来的抗体分子的一部分。

“Fab'” 片段是指包含了部分铰链区的 Fab 片段。

F(ab')₂ 指的是 Fab' 的二聚体。

抗体的 “Fc” 指的是第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合成的抗体的一部分。抗体的 Fc 段有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。

抗体的 “Fv” 段指的是能结合完整的抗原结合位点的抗体的最小片段。一个 Fv 片段包括一条轻链的可变区结合到一条重链的可变区。

本发明中的 “单链抗体” 或 “scFv” 指的是由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个肽链连接而成的工程抗体 (Houston 1988)

本发明中的 “单链抗体 Fv-Fc” 或 “scFv-Fc” 也包括 scFv 连接抗体的 Fc 段形成的工程抗体。

本发明中的 “抗原决定簇” (或称表位) 指的是抗原分子中与抗体结合的那部分氨基酸或原子基团。

本发明中的 “单抗” 一词指的是来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即除仅在少数情况下可能出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。单抗与多抗不同，多抗是包含了识别抗原上的不同表位的抗体分子。虽然传统的单抗是由杂交瘤细胞分泌的，但本发明涉及的单抗并不仅限于此制备方法。本发明涉及的单抗可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (Köhler G. 等人, Nature, 1975, 256: 495-497)，也可采用重组 DNA 技术获得 (如参见 U.S.P 4,816,567)。

本发明中的 “嵌合抗体” 一词指的是抗体轻链或/和重链的一部分是源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类的序列相同或

同源的抗体，而抗体轻链或/和重链的另一部分是源自另一物种或属于另一抗体类或亚类的序列相同或同源的抗体。不管怎样，这种抗体片段仍保留了对目标抗原的结合活性（U.S.P 4,816,567; Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。

本发明中，“人源化抗体”一词指的是人源免疫球蛋白（受体抗体）的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体（供体抗体）的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是有预期特异性、亲和性和反应性的小鼠、大鼠或兔抗体。另外，人源免疫球蛋白的构架区（FR）的氨基酸序列也可被相应的非人源抗体的氨基酸序列所替换。而且，人源化抗体的氨基酸残基也可以既非来源于受体抗体，也非来源于供体抗体的 CDR 区或构架区序列。这些人工修饰的目的是进一步完善或优化抗体性能。总之，人源化抗体是指含有至少一个、通常是两个几乎完整的可变区，其中对应的所有或几乎所有的 CDR 区是来自非人源抗体，其中的全部或几乎全部的 FR 区是来自人源抗体。理想的人源化抗体至少含有免疫球蛋白的 Fc 区的一部分，通常是人源免疫球蛋白的 Fc 区。更多详细内容请参阅：Jones P.T.等人, Nature, 1986,321:522-525 ; Reichmann L.等人, Nature. 1988,332:323-327; Presta, Curr Opin Struct Biol, 1992,2:593-596 and Clark M. Immunol Today 2000,21: 397-402.

本发明涉及的“被分离”一词，指的是天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“被分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。比如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为被分离。这里的“被分离”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其

它不纯物质。

本发明中“载体”一词指的是，可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内得以表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

本发明中“宿主细胞”一词指的是导入载体的细胞，包括如下许多细胞类型，如大肠杆菌或枯草菌等原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞的动物细胞。

“中和抗体”一词指的是能清除或显著降低目标病毒抗原结合毒力的抗体或抗体片段。

“序列相同百分比”一词指的是候选序列中的核酸或氨基酸分别与对应的核酸或多肽序列中核酸或氨基酸相同性的百分比。这里涉及到的与核酸序列或者多肽序列有关的术语“序列相似百分比”定义为候选核酸序列或氨基酸残基序列分别与目的核酸序列或氨基酸序列的相似百分比。对于某一个序列，将它和目的序列进行比对，

必要时可跳过突变缺口，以达到最大的基因相似百分比，而不去考虑相似序列的任意保守性突变。本领域的多种比对方法可用于确定核酸或氨基酸序列的相似性，如可用的计算机软件包括 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 等。熟悉本领域技术的工作人员懂得为比对设定合适的测量参数，包括为使用最大可比性的一些运算法则达到全长序列的比较。

“特异性结合”一词指的是，两分子间的非随机结合反应，如抗体和产生该抗体的抗原间的反应。此处，结合第一种抗原的抗体对第二种抗原的结合亲和力是检测不到的或很弱。在某些实施方式中，某抗原特异性抗体是指以亲和力 (KD) $\leq 10^{-5}$ M (如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M 等) 结合该抗原，其中 KD 指解离率与结合率的比值 ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$)，其可以采用本领域技术人员熟悉的方法进行测定。

抗体

本发明所述单抗能够特异性结合表面抗原分化簇 4 受体。本发明的一个方面涉及能特异性结合表面抗原分化簇 4 受体的单抗及其相应的抗原结合片段。

在一个实施方式中，本发明所述单抗是由小鼠杂交瘤细胞株 15A7 所分泌的。这些单抗的名称以其相应的杂交瘤细胞株进行命名。也就是，这些单抗 15A7 由杂交瘤细胞株 15A7 产生，并命名为 15A7。单抗 15A7 能特异性结合表面抗原分化簇 4 蛋白。小鼠杂交瘤细胞株 15A7 已在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC, Wuhan University, Wuhan, China) 进行保藏，保藏号是 CCTCC - C201098 (杂交瘤细胞株 15A7，保藏时间 2010 年 10 月 22 日)。

本发明的单抗还包括能阻断单抗 15A7 结合表面抗原分化簇 4 蛋白的单抗。这些单抗结合的表面抗原分化簇 4 蛋白的表位可以与单

抗 15A7 所识别的表位相同。这些单抗所识别的表位也可以和单抗 15A7 所识别的表位在空间上有重叠。这样的单抗可以降低单抗 15A7 与表面抗原分化簇 4 受体蛋白的结合力至少 30%，或至少 40%，或优选至少 50%，或更优选至少 60%，或更优选至少 70%，或更优选至少 80%，或更优选至少 90%，或更优选 95%，或最优选 99%。

本发明的单抗不能显著抑制 HIV 包膜糖蛋白 gp120 与人表面抗原分化簇 4 蛋白结合。这些抗体影响 HIV 包膜糖蛋白 gp120 与人表面抗原分化簇 4 蛋白(或重组人表面抗原分化簇 4 蛋白 sCD4 及截短的人表面抗原分化簇 4 蛋白)至多 30%，或更优选 20%，或最优选 0%。

本发明的单抗与人表面抗原分化簇 4 蛋白结合(含细胞表面、重组表达和截短的人表面抗原分化簇 4 蛋白)的结合在 HIV 包膜糖蛋白 gp120 存在的情况下不受影响，这样的单抗在 HIV 包膜糖蛋白 gp120 与表面抗原分化簇 4 受体蛋白的复合物的结合力影响为 30%，或优选为 20%，或更优选为 5%。

可以采用常规方法如 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)中描述的方法，测定某一未知单抗降低某一已知单抗结合表面抗原分化簇 4 蛋白的能力。例如，先把抗原预包被在微孔板上，然后把系列稀释的未标记的待测抗体和特定浓度的标记后的已知单抗共同加入上述预包被后的微孔板中孵育，洗涤后测定不同稀释度的待测抗体已知抗体结合到板上的数量。待测抗体竞争已知抗体结合抗原的能力越强，已知抗体结合抗原的能力就越弱。通常，抗原是预包被在 96 孔微孔板上，并利用放射标记法或酶标记法测定未标记单抗阻断已标记单抗的能力。

可以采用 Kohler 等在 *Nature* 256: 495 (1975)中报道的杂交瘤

制备方法制备单抗。首先将免疫原（必要时添加佐剂）免疫注射小鼠或其它合适的宿主动物。免疫原或佐剂的注射方式通常为皮下多点注射或腹腔注射。免疫原预先偶联到某些已知蛋白，如血清白蛋白或大豆胰酶抑制剂上，可能会有助于增强抗原在宿主内的免疫原性。佐剂可以利用福氏佐剂或 MPL-TDM 等。动物受免疫后，体内会有分泌特异性结合免疫原的抗体的淋巴细胞产生。另外，淋巴细胞也可以利用体外免疫获得。收集目的淋巴细胞与骨髓瘤细胞并用合适的融合剂，如 PEG，进行融合以获得杂交瘤细胞（Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, Academic Press, 1996）。

上述制备的杂交瘤细胞可以接种到合适的培养液中生长，培养液中最好含有一种或多种能够抑制未融合的、母体骨髓瘤细胞生长的物质。例如，对缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸转移酶（HGPRT 或 HPRT）的母体骨髓瘤细胞，在培养液中添加次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶（HAT 培养基）等物质将可以抑制 HGPRT-缺陷细胞的生长。

优选的骨髓瘤细胞应该具有融合率高，抗体分泌能力稳定，对 HAT 培养液敏感等能力。其中，骨髓瘤细胞首选鼠源骨髓瘤，如 MOP-21 和 MC-11 小鼠肿瘤衍生株（THE Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA），和 SP-2/0 或 X63-Ag8-653 细胞株（American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA）。另外也有研究报道利用人骨髓瘤和人鼠异源骨髓瘤细胞株制备人单抗（Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur 等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987）。

杂交瘤细胞生长的培养液用于检测针对特异抗原的单抗的产

生。测定杂交瘤细胞产生的单抗的结合特异性的方法有免疫沉淀或体外结合试验,如放射免疫试验(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、流式细胞术(FACS)。例如, Munson 等在 Anal. Biochem. 107: 220 (1980)描述的 Scatchard 分析法可用来测定单抗的亲合力。

当杂交瘤产生的抗体的特异性、亲和力和反应性确定之后,目的细胞株可以通过(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1996)所描述的标准有限稀释法进行亚克隆化。合适的培养液可以是 DMEM 或 RPMI-1640 等。另外,杂交瘤细胞还可以腹水瘤的形式在动物体内生长。

利用传统的免疫球蛋白纯化方法,如蛋白 A 琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析等,可以将亚克隆细胞分泌的单抗从细胞培养液、腹水或血清中分离出来。

本发明的单抗还可以通过基因工程重组技术获得。利用特异性结合单抗重链和轻链基因的核酸引物进行 PCR 扩增,可以从杂交瘤细胞中分离得到编码单抗重链和轻链基因的 DNA 分子。所得 DNA 分子插入表达载体内,然后转染宿主细胞,如 *E.coli* 细胞、猿猴 COS、CHO 细胞、或其它不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。转染后的宿主细胞在特定条件下培养并表达目标抗体。

本发明的抗体对人表面抗原分化簇 4 蛋白结合具有高特异性和高亲和力。这些抗体对其它灵长类表面抗原分化簇 4 受体蛋白有交叉反应性。

本发明的单抗可以是包含两条重链和两条轻链的传统的“Y”型结构状的抗体。另外,所述抗体也可以保持了表面抗原分化簇 4 受体蛋白亲和力的传统的“Y”型结构状的抗体上的 Fab 片段、Fab'、F(ab')₂、Fv、或其它类型的部分片段,其结合血凝素蛋白的亲合力可以高于或低于传统的“Y”型结构状的抗体。

本发明的抗体片段可以利用水解完整的抗体分子获得（参见 Morimoto 等人, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan 等人, Science 229:81 (1985)）。另外，这些抗体片段也可以直接由重组宿主细胞产生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little 等人, Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab'片段可以直接从 E. coli 细胞中获得或化学偶联形成 F(ab')₂ 片段（Carter 等人, Bio/Technology, 10:163-167 (1992)）。再如，F(ab')₂ 片段可以用亮氨酸拉链 GCN4 连接获得。另外，Fv、Fab、Fab'或 F(ab')₂ 片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备抗体片段的其它技术。

抗体核酸序列

本发明涉及特异性结合人表面抗原分化簇 4 蛋白（含细胞表面的、重组表达的和重组表达的截短的人表面抗原分化簇 4 蛋白）的抗体或抗体片段的编码核酸分子。编码抗体的核酸分子可以从杂交瘤细胞中分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓利用常规技术可以测定这些分子的核酸序列。本发明涉及的抗体核酸分子也可以利用传统的基因工程重组技术或化学合成方法获得。一方面，本发明涉及的抗体核酸分子的序列包含了抗人表面抗原分化簇 4 蛋白抗体的重链可变区或抗体分子的部分核酸序列。另一方面，本发明涉及的抗体核酸分子的序列也包括抗人表面抗原分化簇 4 蛋白抗体的轻链可变区或抗体分子的部分核酸序列。另一方面，本发明涉及的抗体核酸分子的序列还包括重链或轻链可变区的 CDR 序列。互补决定区（complementary determinant region, CDR）是与抗原表位结合的部位，本研究中的 CDR 序列通过 IMGT/V-QUEST（<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>）进行确定。但是不同的划分方

法得到的 CDR 序列稍有不同。

本发明的一方面涉及编码单抗 15A7 重链和轻链可变区序列的核酸分子。单抗 15A7 重链可变区序列的核酸分子对应于 SEQ ID NO: 1。单抗 15A7 轻链可变区序列的核酸分子对应于 SEQ ID NO: 3。本发明还涉及包含了单抗 15A7 重链和轻链可变区序列的核酸分子变体或类似体。

另一方面，本发明还涉及各种分离的核酸分子的变体。具体地，核酸变体的序列与核酸序列 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3 的同一性至少达 70%、优选至少达 75%、更优选至少达 80%、更优选至少达 85%、更优选至少达 90%、最优选至少达 95%。

本发明还提供能特异性结合人表面抗原分化簇 4 蛋白的抗体片段的编码序列的核酸分子。

本发明更进一步涉及编码氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 的抗体重链可变区的分离的核酸分子。本发明还涉及编码氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 的抗体轻链可变区的核酸分子。

本发明涉及含有所述核酸分子的重组表达载体，也涉及转化了这些分子的宿主细胞。而且，本发明还涉及利用包含所述核酸分子的宿主细胞在特定条件下培养并分离得到发明所述抗体的方法。

抗体多肽序列

单抗 15A7 重链和轻链可变区氨基酸序列可以从对应的核酸序列中推导得到。单抗 15A7 重链可变区氨基酸序列是 SEQ ID NO: 2。单抗 15A7 轻链可变区氨基酸序列是 SEQ ID NO: 4。

另一方面，本发明提供了重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 的序列相似性至少达 70%，优选是至少 75%，优选是至少 80%，优选是 85%，再优选是至少 90%，最优选是至少 95% 的抗体。

另一方面，本发明提供了轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID

NO:4的序列相似性至少达70%，优选是至少75%，优选是至少80%，优选是85%，再优选是至少90%，最优选是至少95%的抗体。

单抗15A7的重链和轻链可变区的CDR的氨基酸序列分别是：

单抗15A7重链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NOs:5-7。单抗15A7轻链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NOs:8-10。

另一方面，本发明提供了抗CD4单抗重链或片段，其含有选自SEQ ID NOs: 5-7的一个或多个CDR。

另一方面，抗CD4单抗的重链或片段的CDR含有的氨基酸序列可以在SEQ ID NOs: 5-7上出现一个或多个氨基酸的突变或增添或缺失。优选的是，突变或添加或缺失的氨基酸不超过3个氨基酸。更优选的是，突变或添加或缺失的氨基酸不超过2个氨基酸。最优选的是，突变或添加或缺失的氨基酸不超过1个氨基酸。

另一方面，本发明提供了抗CD4单抗轻链或片段含有选自SEQ ID NOs: 8-10的一个或多个CDR。

另一方面，抗人CD4单抗的轻链或片段的CDR含有的氨基酸序列可以在SEQ ID NOs: 8-10上出现一个或多个氨基酸的突变、增添或缺失。优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过3个氨基酸。更优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过2个氨基酸。最优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过1个氨基酸。

上述抗体或CDR的可变区的氨基酸发生突变、添加或缺失之后的变体仍然保留特异性结合CD4的能力。本发明也包含这样的抗原结合片段的变体。

本发明的单抗变体可以通过传统的基因工程方法获得。本领域的技术人员完全知晓利用核酸突变改造DNA分子的方法。另外，编码重链和轻链变体的核酸分子也可以通过化学合成获得。

嵌合抗体、人源化抗体和融合蛋白

另一方面，本发明也提供了嵌合抗体，它是由鼠源单抗 15A7 或其变体的重链和/或轻链完整的或部分的可变区结合人源单抗恒定区组成的。而且，本发明也包括人源化抗体，它们是由鼠源单抗 15A7 或其变体的一个或多个 CDR 嫁接到人源抗体的框架上组成的。

另一方面，本发明还提供了偶联了某种分子的完全或部分的含有本发明所述单抗的融合蛋白。

嵌合抗体、人源化抗体和融合蛋白都可以利用传统的基因工程技术获得。如，编码单抗的 DNA 可以通过突变的方法把人源抗体的重链和轻链的恒定区的序列替换成同源性的鼠源序列而改造成 (Morrison, 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984))，或通过把整个或部分免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白编码序列进行共价偶联而获得嵌合或人源化抗体或融合蛋白。

中和抗体

另一方面，本发明提供了能够中和人免疫缺陷病毒的抗 CD4 抗体。在一个实施方式中，这种中和抗体能够中和人免疫缺陷病毒感染 CD4⁺细胞的活性的至少 60%，或至少 70%，或优选至少 75%，或优选至少 80%，或优选至少 85%，或优选至少 90%，更优选至少 95%，最优选至少 99.99%。在体外中和 HIV 病毒实验中，IC₅₀ 中和活性浓度优选在 0.0001-10 μ g/mL 之间，或优选为 50 μ g/mL。

本领域普通技术人员完全知晓利用传统的技术方法可以测定抗体中和人免疫缺陷病毒的感染细胞活性。如本发明的实施例中所描述的中和试验的方法即可用于测定本发明中的某一个特定 CD4 单抗的中和活性。

检测方法

本发明还提供了一种利用本发明所述单克隆抗体检测标本中的

CD4 抗原或其模拟物和/或抗体的方法。

一方面，本发明提供了 CD4 和 CD4 相关治疗的检测方法，包括以下步骤：(i)将本发明的单克隆抗体或其片段与上述样品中的抗原结合而行成抗体-抗原或抗体片段-抗原复合物；(ii)检测该样品复合物以确定样品中是否有 CD4 抗原或其模拟物。

检测方法可以使用酶联免疫吸附 (ELISA)、酶免疫检测、化学发光免疫检测、放射免疫检测、荧光免疫检测、免疫色谱法、竞争法及类似检测方法。利用竞争法或夹心法方式，上述检测方法可以用于检测目标抗原或抗体。

竞争法比较样品中抗原和一种已知量的标记抗原竞争结合本发明所述单克隆抗体的数量关系。开展基于竞争法的免疫学检测是将含有未知数量的目标抗原的样品加入到事先用已知的物理或化学方法把本发明所述单抗包被到固相支持物上而进行的。同时加入预先定量的标记后的目标抗原进行反应。孵育后，冲洗固相支持物，检测结合到该支持物上的标记物的活性。

在夹心法中，样品中的目标抗原被夹在包被单抗和标记单抗之间，然后再加入标记物比如酶的底物，通过底物颜色的变化检测并判定抗原的存在。开展基于夹心法的免疫学检测，例如，先把含有一种未知数量目标抗原的样品加入到用物理或化学方法预先包被了本发明中所述单克隆抗体的固相支持物上进行反应。然后，加入本发明所述的标记单抗进行反应。孵育后，冲洗该支持物，再对结合到该支持物上的标记物的活性进行检测。标记物可以是放射性同位素如 ¹²⁵ 碘、酶、酶的底物、发光物质如异鲁米诺和吖啶酯、荧光物质如荧光素和罗丹明、生物素和有色物质如乳胶颗粒和胶体金等。标记用的酶可以是过氧化物酶 (如辣根过氧化物酶 HRP)、碱性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶。对于这些反应中合适的底物

有 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-6 磺酸)、鲁米诺-过氧化氢、邻苯二胺-过氧化氢(针对过氧化物酶)、对硝基苯磷酸盐、4-甲基磷酸伞型酮、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酰基)苯基-1,2-二乙氧基烷(针对碱性磷酸酶)、对硝基苯- β -D-半乳糖和甲基伞形酮- β -D-半乳糖(针对 β 半乳糖苷酶)。其它的标记包括量子点标记、生色团标记、酶标记、亲和配体标记、电磁自旋标记、重原子标记、标记有纳米微粒光散射标记或其它纳米微粒的探针、异硫氰酸荧光素(FITC)、TRITC、罗丹明、四甲基罗丹明、R-藻红蛋白、Cy-3、Cy-5、Cy-7、得克萨斯红、Phar-Red、异藻红蛋白(APC)、表位标记如 FLAG 或 HA 表位、以及酶标记如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 I^2 -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶和半抗原偶联物如洋地黄毒苷或二硝基苯酚、或能够形成配合物的结合配对如链霉抗生物素蛋白/生物素、抗生物素蛋白/生物素或抗原/抗体配合物如包括兔 IgG 和抗-兔 IgG; 荧光基团如伞形三糖(umbelliferone)、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、绿荧光蛋白、藻红、香豆素、甲基香豆素、芘、孔雀绿、二苯乙烯、荧光黄、Cascade 蓝、二氯三嗪基荧光素、丹磺酰氯、藻红蛋白、荧光镧系络合物如包括铕和铽、Cy3、Cy5、分子信标(molecular beacons)和其荧光衍生物、发光材料如鲁米诺; 光散射或细胞质基因组共振材料如金或银颗粒或量子斑(quantum dot): 或放射性材料如 ^{14}C 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、Tc99m、 ^{35}S 或 ^3H ; 或球珠(spherical shell), 以及标记有本领域已知的任何其它信号产生标记物的探针。例如, 可检测的分子包括但不限于荧光基团以及前面所述其它已知的, 如在 Joseph R. Lakowicz (Editor) 所编的 Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Pub Corp, 第二版(July 1999) 和 Richard P. Hoagland 的第六版的 Molecular Probes

Handbook 所描述的。在某些实施方式中，标记物包括半导体纳米微晶如量子斑(即 Qdots)，参见 U.S.P 6,207,392。Qdots 可从 Quantum Dot Corporation 购得。用于本发明的半导体纳米微晶包括 Group II-V 半导体的纳米微晶如 MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe 和其混合物以及 Group III-V 半导体的纳米微晶如 GaAs、InGaAs、InP、InAs 和其混合物。Group IV 半导体如锗或硅的使用，或有机半导体的使用，在某些条件下可能是方便可行的。半导体纳米微晶也可以包括合金，其含有两种或多种选自于 Group III-V 化合物、Group II-VI 化合物、Group IV 元素和其组合物的半导体。

在某些实施方式中，荧光能量受体连接到检测探针作为标记物。在一实施方式中，荧光能量受体可以通过化合物与单线态氧反应形成荧光化合物而形成，或通过化合物与一辅助化合物反应并将其转化为荧光化合物而形成。这类化合物可以包括于本发明装置中的缓冲液中。在其它的实施方式中，荧光能量受体可以是包括化学发光剂或基团的化合物的一部分，例如，荧光能量受体可以包括稀土金属如铕、钐、铽等金属络合物。这些材料因其具有尖锐的发光谱带而特别具有吸引力；而且，镧系标记物如铕(III)可以提供有效的长时间的信号发射，同时不易光漂白，因而可以使得含有处理/反应样品的测试装置在需要的情况下可以放置较长一段时间。在各种异源和同源免疫测定法中，已经使用长寿命的荧光铕(III)络合物纳米微粒作为标记物，例如可以参见 Huhtinen 等人 Clin. Chem. 2004 Oct; 50(10): 1935-6。但这些内部标记的纳米微粒与时间分辨荧光检测一起使用时，测定性能可以改善。在异源测定中，低浓度下测定的动态范围可以扩展；而且，通过使用检测抗体涂敷的高特异活性纳米

微粒标记物，而不是使用常规标记的检测抗体，测定的动力学特性也可以改善。在同源测定中，对于荧光共振能量转移来说，铈(III)纳米微粒是很有效的供体，从而可以进行简单、快速和高效的筛选。在一实施方式中，标记物如此处披露的荧光标记物，包括与生物分子偶联的纳米微粒标记物。换句话说，纳米微粒可以用作检测或捕捉探针。例如，本发明中，可以利用连接到单抗或链霉抗生物素蛋白(SA)的铈(III)-标记的纳米微粒来检测样品中特定的分析物，如纳米微粒基的免疫测定。纳米微粒可以作为附着特定结合剂的底物，这些特定结合剂是针对分析物和检测(如标记物)或捕捉成分的。有关标记物的实例可以参见 U.S.P 4,695,554; 4,863,875; 4,373,932; 和 4,366,241。U.S.P 4,313,734 和 4,373,932 中则披露了胶体金属和染色颗粒。而 U.S.P 4,954,452 中则披露了如何制备和使用非金属的胶体；U.S.P 4,252,459 中披露了用作标记物的有机聚合物乳胶颗粒。

把标记物结合到抗原或抗体上的方法，可以通过顺丁烯二酰亚胺法(J. Biochem. (1976), 79, 233)、生物素活化法(J. Am. Chem. Soc. (1978), 100, 3585)、疏水结合法、酯活化法或异氰酸酯法(Igaku Shoin, "Enzyme immune assay techniques", 1987)。

如果上述标记物为放射性同位素，则需使用好的防辐射的工作台面或液体防护设备。如果上述标记物为酶，需加入底物，酶的活性通过比色法或荧光计测定。如果上述标记物为荧光物质、发光物质或有色物质，测定方法可以相应的使用本领域熟知的方法进行测定。

治疗方法和药物组合物

本发明的抗体及其活性片段及其同源物提供了一种预防和/或治疗 CD4⁺细胞相关的病毒感染及相关疾病患者的方法，尤其是人免疫缺陷病毒(HIV)感染及其相关的疾病包括艾滋病，包括对患者施

用一定量的包含本发明所述单抗的有药物活性的药物成分。本发明还提供了一种含有本发明所述的单抗的药物成分或在此基础上得到的盐类药物。

本发明的药物组合物可进一步包含其它用于预防和/或治疗 HIV 感染的药剂，可以和这些抗病毒试剂同时、分开或连续给药。例如，本发明的抗体及其活性片段及其同源物可以和能抑制反转录酶的抗反转录药剂，如 AZT 一同使用，或与能抑制 HIV 蛋白酶的药剂一同使用；此外，本发明的药物组合物进一步包含抗病毒药剂例如干扰素，免疫抑制剂如环孢菌素，但不仅限于这些。

此外，一种或多种抗体同源物也可与一种或多种前述治疗剂一同使用。此种组合疗法的优点是可使用较低剂量的治疗药剂，因此可避免当使用单一药剂时可能会有的毒性或副作用。

本发明的药物组合物包含依据本发明的一种或多种免疫治疗有效量的抗体同源物，或其衍生物，且优选的为药学可接受的载体。

“免疫治疗有效量”指足够能防止因 HIV 感染或艾滋病，或由原靶为表达 CD4 的细胞的感染因子所引起的其他疾病所造成的免疫应答作用的量。“药学可接受的载体”指不会在所施用的病人身上引发过敏反应或其他不适影响的载体。

合适的药学可接受的载体包括，例如，一种或多种水、生理盐水、磷酸缓冲液、左旋糖、甘油、乙醇和其他类似物，以及上述物质的组合。药学可接受的载体可进一步包括能提高抗体或其活性片段或其同源物的保存期限或效用的微量辅助物质，例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液。

本发明所述药物成分的施用方式可以是传统的施用途径，包括静脉滴注、肌肉注射、阴道、口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部（如，

粉剂、药膏或滴剂)，或鼻腔途径，但不仅局限于此。优选的是注射及输液形式。

本发明的组成可以有多种形式。这些包括，例如，固体、半固体和液体的剂型，例如片剂、丸剂、粉末、溶液、分散液、悬浮液、脂质体、栓剂、注射用及输液用溶液。优选的形式视施用方式及其预防或治疗应用而定。优选的组合是注射用及输液用的溶液的形式。

适合肠胃外途径注射的药物成分可能含有符合药物制备要求的无菌水或非水溶液、气雾剂、悬浮液或乳剂，可在临用时重悬成可注射的溶液或气雾剂的无菌粉剂。如适合的水性和非水性载体，工具和各种稀释液如水、乙醇、多羟基化合物（如丙烯乙二醇、聚乙烯二醇、丙三醇及其类似物），合适的混合物，菜油（如橄榄油），和可用于注射的有机脂，如乙烷油酸，如使用卵磷脂衣壳维持药物的合适流动性，如使用气雾剂、表面活性剂以维持合适的颗粒尺寸。

本发明所述的药物组合物还可含有一些起保护性、保湿、乳化和气雾化的佐剂，也可以含有预防微生物污染的速溶成分，如各种抗菌试剂、抗真菌试剂，如 parabens, chlorobutanol, 苯酚，山梨酸及类似物。也可以包括维持渗透压的试剂，如糖、NaCl 及其类似物。可使用延长吸附的试剂来延长注射用药物成分吸附时间，如单硬脂酸盐和凝胶等。

口服固相剂型包括胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂等。这些固相剂型中的活性成分至少混有一种传统的惰性药物赋形剂（或载体）如柠檬酸钠、磷酸钙，或(a)填充剂或添加剂如淀粉、乳糖、蔗糖、甘露糖和硅酸；(b)粘合剂，如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶；(c)湿润剂，如甘油；(d)碎裂剂，如琼脂，碳酸钙，马铃薯粉或木薯粉；(e)缓凝剂，如石蜡；(f)促吸收

剂，如四氨基混合物；(g)保湿剂，如十六烷基醇和单硬脂酸甘油酯；(h)吸附剂，如高岭土和斑脱土；(i)润滑剂，如滑石，硬脂酸钙，硬脂酸镁，固体聚乙二醇，硫酸十二烷基醇钠，或其上述物质的混合物。在片剂和胶囊剂型中，可能还含有缓冲剂。

固相剂型可以通过做成改良释放或脉冲释放剂型，是在上述提到的各种直接释放赋形剂中添加一些能改变药物释放速率的赋形剂而形成，可以包含在剂型中也可以做成外衣的形式。速率释放改造剂包括羧丙基甲基纤维素，甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，纤维素乙烷，醋酸纤维素，聚乙烯氧化物，黄原胶糖，异丙烯酸氨共聚物，氢化调味油，巴西棕榈蜡，石蜡，邻苯二甲酸醋酸纤维素，邻苯二甲酸羧丙基甲基纤维素，甲基丙烯酸共聚物或上述物质的混合物。改良释放和脉冲释放剂型可能含有一种或一组具有改良释放速率的赋形剂。

本发明所述药物成分还可由快速的雾化剂或消溶剂（FDDFs）组成，包含如下成分：天冬氨酸苄丙氨酸甲酯，磺胺钾，柠檬酸，croscarmellose sodium, crospovidone, 抗坏血酸，乙烷基丙烯酸盐，乙烷基纤维素，明胶，羟丙基甲基纤维素，硬脂酸镁，甘露醇，甲基乙丁烯酸盐，调味薄荷，聚乙二醇，气化硅胶，二氧化硅，乙醇酸淀粉钠，硬脂酸延胡索酸钠，山梨醇，木糖醇。这里用于描述FDDFs的“雾化和消溶”一词，依赖于所用药物的溶解性，如药物是不可溶的，可制成快速的雾化剂型，如药物是可溶的，则可制成快速的溶剂型。

类似形式的固相成分也使用诸如乳糖或牛奶糖或其它高分子量的聚乙二醇及类似的赋形剂制成软明胶或硬明胶的填充剂型。

诸如片剂、糖衣剂、胶囊剂和颗粒剂等之类的固体剂型可以通过诸如肠衣或其它本领域普通人员均知晓的外包衣壳的方式制成。

也可以是含有乳浊剂、也可以是含有能起缓慢、延迟、控制活性药物释放的类似的成分。也可以使用多聚物和石蜡等成分进行包埋。如果合适，也可用上述一种或多种赋形剂把活性成分制成微囊的形式剂型。

用于口服的液体剂型，包括符合药物要求的乳状剂、溶液、悬浮液、糖浆和西也剂等。除了活性成分，液体剂型也可含有本领域常用的一些惰性溶液，如水或其它溶剂，可溶性试剂和乳化剂，如乙烷基醇，异丙基醇，乙烷基碳酸盐，苯基安息香酸盐，丙稀乙二醇，1,3-丁烯乙二醇，油，特别是，棉籽油，落花生油，玉米油，橄榄油，调味油和芝麻油，甘油，氢糠基醇，聚乙二醇和脂肪酸山梨醇酯，以及上述物质的混合物或类似的物质。

除了这些惰性稀释液，药物成分也可包括保湿剂、乳化剂、悬浮剂、糖化剂、调味剂和香味剂等佐剂。另外，药物成分还可包括乙氧基化均聚乙醇，聚氧乙烯烷基山梨醇和山梨聚糖脂，微晶纤维素，间氢氧化铝，膨润土，琼脂聚合物和黄芪胶，或这些物质的混合物之类的悬浮剂。

本发明所述药物成分也可制成适合兽用治疗的混合物，或符合兽用的盐类，或符合兽用的溶剂或初成药，并根据普通兽医和兽医从业者的要求制成最适合某种特定动物的给药剂量和途径药物的合适剂型。

本发明优选的药物组合物与那些用于人被动免疫的其他抗体的组合物类似，例如肿瘤治疗抗体。优选的施用方式是非肠道施用。

本发明所述一个或多个单抗可以结合其它抗病毒试剂用于预防和或治疗 $CD4^+$ 细胞相关的疾病，包括但不限于人类免疫缺陷感染及其相关疾病。单抗可以和这些抗病毒试剂同时、分开或连续给药。其它抗病毒试剂包括利巴韦林，金刚烷，羧基脲，IL-2, IL-12 和五羧

链胞酸，但不仅限于这些。

此领域技术人员应不难了解，本发明抗体同源物或其活性片段的免疫治疗有效量将视施用程序、所施用的抗体同源物的单位剂量、抗体同源物是否与其他药剂一同使用、病人的免疫及健康情况、所施用的特定抗体同源物的抗病毒活性而定。

实施例

下面结合具体实施例与附图，对本发明进一步加以描述，但这些描述并不构成对本发明的限制。

实施例 1. 可抑制 HIV 感染 CD4⁺细胞的抗 CD4 单克隆抗体的制备

小鼠: 6 周龄雌性 BALB/c 鼠为厦门大学生命科学院实验动物中心提供。

杂交瘤的制备: 我们使用标准的体内免疫方式和 PEG 融合方法获得单克隆抗体, 详细方法参见 Ed Harlow 等人, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 1988. 简要过程如下:

小鼠免疫: 将溶于 PBS 的重组 sCD4 抗原溶液与弗氏完全佐剂 (CFA) 等体积混合乳化, 经四肢肌肉多点注射, 每只每次注射实施例 2 中制备的纯化重组 sCD4 抗原 5 μ g (总体积 50 μ L)。首次免疫后 15 天和 29 天, 分别用同样剂量的重组抗原溶液加弗氏不完全佐剂 (IFA) 进行加强免疫。融合前 72 小时, 尾静脉加强注射 5 μ g 不加佐剂的抗原 1 次进行加强免疫。

融合: 取血清中和效价最高的小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞相融合, 先把脾脏研磨得到脾细胞悬液, 细胞计数。按 1/6 于脾细胞

的数量取培养的 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞，混合后离心，经 50% 聚乙二醇（PEG2000）作用 1 分钟，使脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合。加入 50mL 含有 20%FBS 的 RPMI1640 培养基重悬融合细胞，将细胞悬液与等体积的饲养细胞混合后，分置于 96 孔细胞培养板中（200 μ L/孔）于 5% 二氧化碳培养箱（ESPEC BNA-311）37℃ 培养。3 天后，用含有 20%FBS 的 HT 培养基（1.361mg 黄嘌呤(hypoxanthn, H)、0.388mg 胸腺嘧啶核苷(thymidine, T)，加 RPMI 1640(GIBCO 公司)培养基至 100mL。45~50℃ 条件下溶解后，过滤除菌。半保留换液。

杂交瘤的筛选：融合后细胞在 96 孔细胞板上培养 10 天后，吸取细胞上清利用下述 HIV 感染 TZM-bl 细胞中和检测方法 96 孔细胞培养板中所得杂交瘤细胞上清培养液。对于中和效果为阳性的细胞克隆，利用有限稀释法进行克隆化，经 3 次克隆化后，得到所分泌的抗体能够稳定抑制 HIV 感染 TZM-bl 细胞的单克隆抗体细胞株（见实施例 3）。

筛选结果：获得两株单克隆抗体，分别为：15A7 和 14G7。

抗体的类型及亚类鉴定：以实施例 2 中制备的纯化 sCD4 包被 ELISA 板。每孔加入单克隆抗体的细胞上清 100 μ L，37℃ 温育 30 分钟；在 TECAN 全自动洗板机上用 PBST 洗涤 5 次，每次间隔 20 秒，扣干，加入合适稀释度的 HRP-山羊抗小鼠 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 抗体（Serotec 公司）酶标二抗，于 37℃ 温育 30 分钟；在 TECAN 全自动洗板机上用 PBST 洗涤 5 次，每次间隔 20 秒，扣干，加入显色液 A（H₂O₂）和 B（TMB）各 1 滴，于 37℃ 显色 10 分钟，加入 1 滴终止液（2M H₂SO₄）；在 TECAN 酶标仪上测量 OD_{450nm}（参比波长为 620nm），阈值为 2 倍的阴性均值，OD 值大于阈值为阳性，OD 值小于阈值为阴性。结果单克隆抗体 15A7 为

IgG1 型, 14G7 为 IgG2b 型。

杂交瘤的培养: 稳定的杂交瘤单克隆抗体细胞株先在二氧化碳培养箱中扩增培养, 经 96 孔培养后转移至 24 孔, 再转移至 50mL 细胞瓶中扩增培养。取 10 周龄的健康 BALB/c 小鼠, 腹腔注射 0.5mL/只液状石蜡, 1-2 周后, 每只小鼠腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞, 7~10 天后收集腹水。3000rpm 离心 15 分钟, 吸取中间澄清部分的液体, 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤除菌, 分装后 -20℃ 保存。

单克隆抗体的纯化: 将腹水用 0.02M、pH7.4 的 PBS(81mL 0.2M Na_2HPO_4 , 19mL 0.2M NaH_2PO_4 , 加生理盐水至 1L) 对倍稀释, 搅拌下逐滴缓慢加入硫酸铵(浓度达到 50%饱和度), 4℃ 过夜。4℃, 12000rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 将沉淀溶于原腹水体积 2 倍的 PBS 中。搅拌下逐滴缓慢加入硫酸铵, 使硫酸铵浓度达到 33%饱和度, 4℃ 静置过夜。4℃, 12000rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 将沉淀溶于原腹水体积 2 倍的 PBS 中。搅拌下逐滴缓慢加入硫酸铵(浓度达到 50%饱和度), 4℃ 过夜。4℃, 12,000rpm 离心 15 分钟, 弃上清。将沉淀溶于适量的 PBS 中, 装入透析袋中, 放入 50-100 倍含 20mM NaCl, pH 7.8 的 120mM Tris-HCl 缓冲液中 4℃ 搅拌下脱盐 12 小时左右, 期间更换 3 次以上透析液。取出后分装 -20℃ 保存。

实施例 2. 用做抗原的重组人 CD4 片段多肽的制备

用做模板之人 CD4 胞外区片段的制备: 以 TZM-bl 细胞系 (Cat.No. 8129 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program) 中的人 CD4 cDNA 为模板, CD4(d1)F (5'- CGG CAT ATG AAG AAA GTG GTG CTG GGC -3') 为正向引物, CD4(d4)R (5'- GCGAATTCTTACCATGTGGGCAGAACCTT -3') 为反向引物, 在 PCR 热循环仪 (Biometra T3) 按照如下条件进行 PCR 反应: 94℃

10 分钟;随后是 94℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 1 分钟的 25 个循环, 最后为 72℃ 延伸 10 分钟。得到特异的 1.1kb 左右大小的用做制备各截短的重组人 CD4 多肽之模板 DNA 片段。将上述获得的 PCR 产物与商售的 pMD 18-T 载体(TaKaRa 公司生产)连接,经 Nde I/EcoR I 酶切鉴定,得到插入 sCD4 基因的阳性克隆。利用 M13(+)/(-)引物,测序得经过上述方法制备的 CD4 胞外区的 DNA 片段保守序列,并用做制备各截短的重组人 CD4 多肽的模板。

以如上获得的人 CD4 的 N 端胞外区的免疫球蛋白样结构域 D1-D4 序列为模板,利用表 1 中的正向引物(其 5'端引入限制性内切酶 NdeI)和反向引物(其 5'端引入限制型内切酶 EcoRI 位点)。在 PCR 热循环仪(Biometra T3)按照如下条件进行 PCR 反应: 94℃ 10 分钟;随后是 94℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 45 秒的 25 个循环,最后为 72℃ 延伸 10 分钟。其中, CD4(d1) 所用正向引物为 CD4(d1)F, 反向引物为和 CD4(d1)R; CD4(d2) 所用正向引物为 CD4(d2)F, 反向引物为和 CD4(d2)R; CD4(d3) 所用正向引物为 CD4(d3)F, 反向引物为和 CD4(d3)R; CD4(d4) 所用正向引物为 CD4(d4)F, 反向引物为和 CD4(d4)R; CD4(d1-2)所用正向引物为 CD4(d1)F, 反向引物 CD4(d2)R 得到特异的 DNA 片段,为编码本发明所述各截短的人 CD4 的多核苷酸序列,其氨基酸序列如图 1 所示。

表 1. CD4 各结构域截短的重组蛋白克隆引物序列

引物名称	引物序列
CD4(d1)F	5'- CGGCATATGAAGAAAGTGGTGCTGGGC-3'
CD4(d1)R	5'-GGAATTCTTAGAACACTAGCAATTGCACC-3'
CD4(d2)F	5'-CCGCATATGGGATTGACTGCCAACTCTGAC-3'
CD4(d2)R	5'- GGGGAATTCTTAGGAGGCCTTCTGGAAAG-3'
CD4(d3)F	5'-GCCCATATGAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGG-3'

CD4(d3)R 5'- GGGAATTCTTACACCACCAGGTTTCAC-3'

CD4(d4)F 5'- GCCCATATGATGAGAGCCACTCAGCTCC-3'

CD4(d4)R 5'- GCGAATTCTTACCATGTGGGCAGAACCTT-3'

表达载体 pTO-T7 依照文献构建（罗文新等，生物工程学报，2000，16:53-57）。用于表达本发明所述多肽的载体构建的具体步骤包括：将如上述获得的 PCR 产物与商售的 pMD 18-T 载体（TaKaRa 公司生产）连接，经 Nde I/EcoR I 酶切鉴定，得到插入各区段 CD4 基因的阳性亚克隆；Nde I/EcoR I 酶切获得各区段的 CD4 基因片段，再与经 Nde I/EcoR I 酶切的 pTO-T7 表达载体相连接，Nde I/EcoR I 酶切鉴定得到插入个区段 CD4 基因的多肽重组表达克隆 pTO-T7-CD4(d1)、pTO-T7-CD4(d2)、pTO-T7-CD4(d3)、pTO-T7-CD4(d4)、pTO-T7-CD4(d1-2)和 pTO-T7-sCD4。

各区段截短的 CD4 重组多肽的表达：1 μ L 的重组表达载体质粒（0.15mg/mL）转化 40 μ L 的氯化钙法制备的感受态大肠杆菌 BL21（购自新英格兰生物实验室公司），涂布于卡那霉素（终浓度 25mg/mL，下同）抗性的固体 LB 培养基，37 $^{\circ}$ C 静置培养 10~12 小时，至单菌落清晰可辨。挑取单菌落至含 4mL 卡那霉素抗性的液体 LB 培养基之试管，37 $^{\circ}$ C 220 转/分振荡培养 10 小时，至菌体浓度为 OD₆₀₀ $\approx$ 0.8，从中取 1mL 保存于 4 $^{\circ}$ C，剩余的 3mL 加入 3.0 μ L 0.8M IPTG（终浓度为 0.8 mM），37 $^{\circ}$ C 220 转/分振荡进一步诱导培养转化的表达菌株 4 小时。取 1.5mL 经诱导培养的表达菌株培养液，12,000 转/分离心 30 秒，弃去上清，扣干，用 100 μ L 1 $\times$ 凝胶加样缓冲液（50mM Tris·Cl（pH6.8），100mM 二硫苏糖醇（DTT），2% SDS，0.1%溴酚蓝，10%甘油）重悬；沸水浴处理 10 分钟；12,000 转/分，离心 10 分钟；取出 10 μ L 进行 15%丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析。挑选表达量较高的转化菌株进行大量表达并长期保种。

每个 1L 的三角培养瓶装 500mL 新鲜 LB 液体培养基，分别转接 200 μ L 的保存菌液，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 11 小时，至菌体浓度 OD₆₀₀ $\approx$ 1.0。然后向每培养瓶加入 500 μ L 0.8M IPTG 至终浓度为 0.8mM，37 $^{\circ}$ C 振荡诱导培养 4 小时，离心收集菌体。

CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2)和 sCD4 截短多肽在大肠杆菌中重组表达的包涵体的洗涤纯化：重组菌株经诱导表达所得培养液 4 $^{\circ}$ C 7,000rpm 离心 5 分钟后，弃上清；菌体沉淀以每 500mL 培养基加 20mL 裂解液(50mM Tris·Cl, 10mM EDTA, 300mM NaCl pH7.2) 计算，重新悬浮于裂解液中。用超声波破碎仪 (SONICS&MATERIALS 公司的 Uilbra-Cell VCX500 型) 破碎细胞，以 500mL 培养液所得菌体悬浮液 20mL 为例破碎条件为：设置 55%功率，冰浴，每次脉冲破碎时间为 2 秒，间隔 4 秒，共破碎时间为 4 分钟；12,000 转/分 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 分钟，弃上清；沉淀用 1/2 菌体悬浮液体积的缓冲液 I 溶液 (200mM Tris·Cl, pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 重悬，加入等体积含 4% Triton-X100 的缓冲液 I，其中 Triton-X100 的终浓度为 2%。37 $^{\circ}$ C 下 200rpm 振荡 30 分钟；10,000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟，弃上清；重复 2% Triton-X100/缓冲液 I 处理一次。沉淀用与菌体悬浮液等体积的缓冲液 I 重悬，37 $^{\circ}$ C 200rpm 振荡 30 分钟；4 $^{\circ}$ C 8,000rpm 离心 10 分钟，弃上清；重复缓冲液 I 处理两次。沉淀用与菌体悬浮液等体积的缓冲液 I 重悬；37 $^{\circ}$ C 200rpm 振荡 30 分钟；4 $^{\circ}$ C 10,000rpm 离心 10 分钟，弃上清；沉淀用与菌体悬浮液等体积的 2M 尿素/缓冲液 I 重悬；37 $^{\circ}$ C 200rpm 振荡 30 分钟；4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10 分钟，留上清。样品分别编号为 CD4(d1) 2M、CD4(d2) 2M、CD4(d3) 2M、CD4(d4) 2M、CD4(d1-2) 2M 和 sCD4 2M；沉淀用等体积的 4M 尿素/缓冲液 I 重悬；37 $^{\circ}$ C 200rpm 振荡 1 小时，4 $^{\circ}$ C 放置过夜 (10 小时)；4 $^{\circ}$ C 12,000rpm

离心 10 分钟, 留上清, 样品编号为 CD4(d1) 4M、CD4(d2) 4M、CD4(d3) 4M、CD4(d4) 4M、CD4(d1-2) 4M 和 sCD4 4M; 沉淀用等体积的 8M 尿素/缓冲液 I 重悬; 37℃ 200rpm 振荡 1 小时, 4℃ 放置过夜 (10 小时); 4℃ 12,000rpm 离心 10 分钟, 留上清。样品编号为 CD4(d1) 8M、CD4(d2) 8M、CD4(d3) 8M、CD4(d4) 8M、CD4(d1-2) 8M 和 sCD4 8M; 弃沉淀。分别取 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2) 和 sCD4 的 2M/4M/8M 上清各 100 μ L, 加入凝胶加样缓冲液 (50mM Tris·Cl (pH6.8), 100mM 二硫苏糖醇 (DTT), 2%SDS, 0.1%溴酚蓝, 10%甘油); 沸水浴处理 10 分钟; 12,000rpm 离心 10 分钟; 取出 10 μ L 进行 15%丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析, 以判断目的蛋白在 2M/4M/8M 尿素/缓冲液 I 中所占的比重。

各截短的 CD4 重组多肽的复性: 分别将 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2) 和 sCD4 的 4M 或 8M 样品分装到透析袋 (美国联合碳化公司生产, 36DM, 截留分子量 8,000-10,000), 按样品体积: 透析液体积=1:100 的比例于 4℃ 梯度透析至 1 $\times$ PBS (1L 中含有 Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.24g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, pH7.4) 中 (8M 尿素/缓冲液 I-4M 尿素/缓冲液 I-2M 尿素/缓冲液 I-1 $\times$ PBS)。理论上, 透析结束时, 样品的尿素含量为 4 $\times$ 10⁻⁶M; 透析样品经 4℃ 12,000rpm 离心 10 分钟; 上清液通过 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤, 可用于进一步纯化。

CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2) 和 sCD4 等截短的 CD4 重组多肽的 HPLC 凝胶过滤色谱纯化。

对复性样品采用如下 HPLC 系统和方法进一步纯化。

仪器系统: Agilent Technologies 1200 series HPLC, 层析柱: TSK GEL G5000PWXL 7.8mm $\times$ 30cm, 洗脱液: 1 $\times$ PBS pH7.4, 流速: 0.5mL/min, 检测器波长: 280nm, 样品量: 100 μ L。

收集模式：手动收集。结果表明：样品经 15% 丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析目的蛋白峰的纯度，纯度可达 70~90%。

图 2 显示了各表达质粒转化的大肠杆菌菌体经诱导后，SDS-PAGE (A 小图为 CD4(d1)、B 小图为 CD4(d2)、C 小图为 CD4(d3)、D 小图为 CD4(d4)、E 小图为 CD4(d1-2)、F 小图为 sCD4) 显示 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)和 CD4(d1-2)、sCD4 在相应位置有表达条带，表达量约为 10~40%之间(图 2.A-F 各小图的第 2 道)，主要以包涵体的形式存在。经 2M、4M 和 8M 尿素洗涤，可见 2M 尿素上清(图 2.A~F 各小图的第 3 道)，4M 尿素上清(图 2.A~F 各小图的第 4 道)，和 8M 尿素上清(图 2.A~F 各小图的第 5 道)；对 4M 或 8M 上清样品以梯度透析复性后，HPLC 中经分子筛柱层析纯化(图 2. A~F 各小图的第 6 道)。

实施例 3. 单克隆抗体阻断 HIV 感染 TZM-bl 细胞活性验证

选用 5 株分别属于 B、C、D、D/C 亚型的 HIV 全基因实验株病毒(HIV_{NL4-3}, HIV_{89.6}, HIV_{94 UG114}, HIV_{MJ4}, HIV_{WCML249})，通过细胞中和实验测定单抗 15A7, 14G7 对上述病毒感染 CD4⁺细胞的阻断/中和效果。TZM-bl 细胞按照 1.5×10^4 个细胞/孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板中，12 小时后用于检测。按照如图 3 坐标所列的稀释浓度稀释单抗 15A7 和 14G7，在 96 孔 U 底板中每孔加入 100 μ L 抗体稀释液和 50 μ L 各 HIV 病毒悬液(稀释至 100 TCID₅₀)，37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。将混合液 150 μ L 加入 96 孔细胞培养板上培养好的 TZM-bl 细胞、37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时后，显色，Elispot 计数，并计算中和效率。对照组用 PBS 代替 15A7 抗体。结果如图 3 和图 4，可见单抗 15A7, 14G7 对上述各亚型 HIV 均具有很好的阻断/中和效果，见表 2:

表 2.单抗 15A7, 14G7 对 5 株 HIV 病毒的细胞中和效果

	IC50($\mu\text{g/mL}$)	
	15A7	14G7
HIV _{NL4-3}	0.465	1.126
HIV _{89.6}	0.058	0.340
HIV _{94UG114}	0.066	0.245
HIV _{MJ4}	0.071	0.235
HIV _{WCML249}	0.293	0.429

实施例 4. 单克隆抗体 15A7, 14G7 标记细胞表达 CD4 的免疫荧光检测

表达 CD4 的细胞株: Tzm-bl(Cat.No. 8129 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program) ; U87.CD4.CXCR4 (Cat.No.4036 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program) ; U87.CD4.CCR5 (Cat.No. 4035 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program). 上述 3 株细胞是均可以稳定表达 CD4 的贴壁细胞。

准备细胞: 实验前 1 天将上述三株细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化制备成单细胞悬液, 浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 将细胞悬液按照 100 μL /孔接种入预先铺好无菌盖玻片的 24 孔板中, 然后每孔补充 400 μL DMEM 完全培养基 (添加 10%FBS, 2mM L-glutamine, 0.1mM 非必须氨基酸及 1%双抗) 5%二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 小时。

细胞固定: 将 24 孔板中的培养基吸出, 每孔加入 500 μL PBS 洗一次, 然后每孔加入 500 μL 4%多聚甲醛 (100mL PBS 含有 4g 多聚甲醛) 室温避光固定 5 分钟, 吸出 4%多聚甲醛固定液。每孔加入 1mL PBS, 室温放置 5 分钟, 然后吸出, 重复用 PBS 洗 2 次。

封闭：在 24 孔板盖上放一张封口膜，24 孔板上每个孔的位置滴加 25 μ L 山羊血清，用眼科镊小心的从 24 孔板中取出盖玻片，用吸水纸吸去盖玻片上多余的液体，然后将盖玻片置于山羊血清的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）室温孵育 1 小时。

一抗孵育：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。再取一张新的封口膜覆盖在 24 孔板盖上，按照 24 孔板上孔的位置，滴加 25 μ L 单克隆抗体 15A7，14G7 的 PBS 稀释液（1:1000 稀释）。对照滴单克隆抗体 H5F4（anti-P24）的 PBS 稀释液（1:1000 稀释），按照封闭一样的操作，将盖玻片放置于一抗的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）室温孵育 1 小时。

二抗孵育：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。然后吸出 PBS，重复用 PBS 洗两次。取一张新的封口膜覆盖在 24 孔板盖上，按照 24 孔板上孔的位置，滴加 25 μ L 二抗，二抗为 anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC（Cat.No. F9006, Sigma）用 PBS 1:200 稀释。按照封闭一样的操作，将盖玻片放置于二抗的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）室温避光孵育 30 分钟。

DAPI 染核：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。然后吸出 PBS，重复用 PBS 洗两次。取一张新的封口膜覆盖在 24 孔板盖上，按照 24 孔板上孔的位置，滴加 25 μ L 用 PBS 稀释好的 DAPI（1:2000 稀释），按照封闭一样的操作，将盖玻片放置于 DAPI 的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）

室温避光孵育 5 分钟。

封片：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。然后吸出 PBS，重复用 PBS 洗两次。标记载玻片，并在上面滴一滴封片剂。从 24 孔板中取出盖玻片，用吸水纸吸去盖玻片上多余的液体，然后细胞面朝下，将盖玻片置于封片剂液滴中。用吸水纸轻轻除去盖玻片上的封片剂，再在边缘涂上指甲油，用来封闭盖玻片边缘。避光干燥。用共激光扫描共聚焦显微镜观察并拍照。

结果如图 5 和图 6 所示，单克隆抗体 15A7，14G7 可以很好的结合在三株细胞的细胞膜上。这表明单克隆抗体可以与三株细胞表面表达的 CD4 蛋白结合。

实施例 5. 各截短的 CD4 多肽阻断/抑制单克隆抗体 15A7, 14G7 标记 CD4⁺细胞的流式细胞仪检测

Tzm-bl 按照 1.5×10^4 个细胞/孔铺于 96 孔细胞培养板中，5%二氧化碳培养箱 37℃ 孵育 12 小时后用于实验。将初步纯化的 CD4(d1)，CD4(d2)，CD4(d1-2)，CD4(d3)，CD4(d4)，sCD4 蛋白用 10%FBS 的 DMEM 培养基稀释到终浓度 10μg/mL，再分别加入按照稀释的单克隆抗体 15A7、14G7，使抗体的终浓度达到图 7 和图 8 横坐标轴中标记的浓度，然后 37℃ 孵育 1 小时。将上述混合液加入预先铺好的 Tzm-bl 细胞，37℃ 孵育 1 小时。用 0.25% 的胰酶消化细胞，转入 4mL 离心管中，2mL PBS 洗一次，1,500rpm 离心 5 分钟弃上清，用 100μL 含有 RAM-FITC (1:200 稀释) 的 PBS 重悬细胞，25℃ 孵育 30 分钟。2mL PBS/管洗一次，1,500rpm 离心 5 分钟弃上清，用 500μL PBS 重悬细胞，流式细胞仪检测抗体结合情况。具体结果如图 7 和图 8 所示。由图 7 和图 8 可知，CD4(d1-2)对单克隆抗体 15A7、14G7 与

细胞的反应有影响最显著 ($p < 0.01$) ; CD4(d1)、sCD4 对单克隆抗体 15A7, 14G7 与细胞的反应有影响 ($p < 0.05$) ; 而 CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)对单克隆抗体 15A7, 14G7 与细胞的反应影响与 PBS 差别不大 ($P > 0.05$) 。

实施例 6. 单克隆抗体轻链基因和重链基因可变区的克隆

半贴壁培养 10^7 个表达抗体 15A7, 14G7 的杂交瘤细胞, 吹管吹起贴壁细胞使悬浮, 转移到新的 4mL 离心管中, 1,500rpm 离心 3 分钟, 收集沉淀的细胞, 重悬于 100 μ L 无菌 PBS (pH7.45) 中, 转移到一新的 1.5mL 离心管中。加入 800 μ L Trizol (Roche, Germany), 轻轻颠倒混匀, 静置 10 分钟。加入 200 μ L 氯仿, 剧烈振荡 15 秒, 静置 10 分钟, 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 15 分钟, 转移上层液体至一新的 1.5mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 静置 10 分钟。4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10 分钟, 弃上清, 加入 600 μ L 75% 乙醇洗涤, 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 沉淀于 60 $^{\circ}$ C 真空抽干 5 分钟。透明的沉淀溶于 70 μ L DEPC H₂O 中, 分装成两管。每管加入 1 μ L 反转录引物, 其中一管加入的反转录引物为 MVJkR (5'-CCg TTT (T/g)AT (T/C)TC CAg CTT ggT (g/C)CC-3'), 用于扩增轻链可变区基因, 另一管加入的反转录引物为 MVDJhR (5'-C ggT gAC Cg(T/A) ggT (C/g/T)CC TTg (g/A)CC CCA-3'), 用于扩增重链可变区基因。每管再加入 1 μ L dNTP (10mM, TAKARA), 置 72 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟, 立即放到冰浴中置 5 分钟, 加入 10 μ L 5 $\times$ 反转录缓冲液, 1 μ L AMV (10unit/ μ L, Pormega), 1 μ L RNasin (40unit/ μ L, Promega), 混匀后于 42 $^{\circ}$ C 将 RNA 反转录成 cDNA。

抗体基因可变区的分离采用聚合酶链式反应 (PCR) 法, 使用根据 Novagen 公司的 Ig-Prime kits 合成的引物组以及另外设计合成

的两条下游引物 MVJkR、MVDJhR (上海博亚公司合成), MVJkR 为轻链可变区基因扩增的下游引物, MVDJhR 为重链可变区基因扩增的下游引物。模板即为以上合成的两种 cDNA。PCR 条件为: 94°C 5 分钟, 94°C 40 秒, 53°C 复性 1 分钟, 72°C 50 秒, 35 个循环, 72°C 延伸 15 分钟。回收目的片段并克隆至 pMD 18-T 载体 (TaKaRa), 并测序, 序列经 Blast 分析比对后确定抗体可变区序列, 并推测出相应的氨基酸序列。

依上述方法分别从单克隆抗体 15A7,14G7 杂交瘤细胞株中克隆出其抗体可变区基因, 并推算出相应的氨基酸序列。表 3 所示为所用的上游引物序列, 单克隆抗体 15A7 重链可变区核苷酸 SEQ ID NO:1; 重链氨基酸序列编号 SEQ ID NO:2; 轻链可变区核苷酸 SEQ ID NO:3; 轻链氨基酸序列编号 SEQ ID NO:4。单克隆抗体 14G7 重链可变区核苷酸 SEQ ID NO:17; 重链氨基酸序列编号 SEQ ID NO:18; 轻链可变区核苷酸 SEQ ID NO:19; 轻链氨基酸序列编号 SEQ ID NO:20。互补决定区 (complementary determinant region, CDR) 是通过 Kabat 方法确定的 (Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Coeller K. Sequences of proteins of immunological interest, U.S Department of Health and Human Services, PHS, NIH, Bethesda, 1991)。

表 3. 扩增 15A7,14G7 可变区基因的引物序列

单抗株 可变区基因	引物名称	引物序列
15A7 Vh	MuIgVh5'-E2	5'-GGCCCAGCCGGCCGAGGTGCAGCTG(G/T)TGGAG(A/T)C(C/T)-3'
15A7 Vk	MuIgkVl5'-D1	5'-GGTGGAGGCGGGAGTGAAACGACACTCACGCAGTCTC-3'
14G7 Vh	MuIgVh5'-E2	5'-GGCCCAGCCGGCCGAGGTGCAGCTG(G/T)TGGAG(A/T)C(C/T)-3'
14G7 Vk	MuIgkVl5'-D1	5'-GGTGGAGGCGGGAGTGAAACGACACTCACGCAGTCTC-3'

将获得的可变区重链基因序列输入 VBASE2 数据库 (<http://www.vbase2.org/>) 进行比对分析。结果表明, 所克隆的 V 片段均为 Igh-VJ558 VH1 族, Vh 基因大小分别为 351bp, 编码由 117 个氨基酸残基组成的多肽, 具有与 KABAT 结构完全对应的结构特征。重链 CDR 区如表 4 所示。

将获得的可变区轻链基因序列输入 VBASE2 数据库进行比对分析。结果表明, 所克隆的 V 片段均为 IGKV21 族, Vk 基因大小分别为 15A7 Vk: 339bp, 编码由 113 个氨基酸残基组成的多肽, 14G7 Vk: 324bp, 编码由 108 个氨基酸残基组成的多肽, 具有与 KABAT 结构完全对应的结构特征。轻链 CDR 区如表 4 所示。

表 4. 15A7, 14G7 Vh 和 Vk CDR 氨基酸序列

单链抗体株	抗体 CDR 氨基酸序列		
	CDR1	CDR2	CDR3
15A7 Vh	GYFFTDYV	IYPGSGSS	ARRGTGLGFAY
	(SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 7)
15A7 Vk	QSVDYDGDSY	VAS	QQSNEPPT
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 10)
14G7 Vh	GYTFTDYF	IYPNNGGT	ARRGYDEGFAY
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 23)
14G7 Vk	QHIGTS	YAS	QQSNTTWPFT
	(SEQ ID NO: 24)	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 26)

实施例 7. 单链抗体的表达及活性检测

将抗体基因的重链和轻链可变区通过 (GGGGS)₃ 短肽连接成单链抗体 DNA 片段。以 15A7 VHF 为正向引物, 15A7 VHR 为反向引物扩增出 15A7 重链可变区片段, 以 15A7 VKF 为正向引物, 15A7

VKR 为反向引物扩增出 15A7 轻链可变区片段。引物序列见表 5。分别回收两个抗体基因片段。再以重链可变区和轻链可变区片段互为引物及模板在新的 PCR 系统中进行重叠延伸，得到少量完整单链抗体片段。然后以完整片段为模板，以 15A7 VHF 为正向引物，15A7 VKR 为反向引物进行大量扩增重叠的 15A7 单链抗体片段。回收单链抗体片段，以 Nde I/Xho I 酶切回收得到单链抗体片段，克隆到相同酶切的 pET-30a-c(+)原核表达载体中，载体如图 9 所示。以 ER2566 大肠杆菌作为表达菌株，采用常规方法表达，结果表达的蛋白质是以不溶性的包涵体形式存在。以常规方法洗涤纯化包涵体，结果单链抗体主要溶解于 8M 尿素中。将溶解于 8M 尿素中的单链抗体蛋白逐步对 1×PBS 透析复性，12,000rpm 离心 10 分钟去除沉淀，将最终得到的初步纯化的单链抗体溶液进行活性测定。

表 5. 单链抗体克隆用引物

引物名称	引物序列
15A7VHF	5'-CATATGATGCAAGTTTTACTACAGCAGTCT-3'
15A7VHR	5'-ACTCCCGCCTCCACCGCTACCACCCCCTCCAGATCCG CCACCTCCTGCTGCAGAGACAGTGACCA-3'
15A7VKF	5'-GGAGGTGGCGGATCTGGAGGGGGTGGTAGCGGTGGA GGCGGGAGT GACATTGTGCTGACCCAATC-3'
15A7VKR	5'-AAGCTTCTCGAG CCGTTTGATTTCAGCTTGG-3'
14G7VHF	5'-CATATGATGGAGGTCCAGCTGCAACAG-3'
14G7VHR	5'-ACTCCCGCCTCCACCGCTACCACCCCCTCCAGATCCG CCACCTCCAGAGACAGTGACCAGAGTCCCTT'
14G7VKF	5'-GGAGGTGGCGGATCTGGAGGGGGTGGTAGCGGTGGA GGCGGGAGTGACATCTTGCTGACTCAGTC'
14G7VKR	5'-AAGCTTCTCGAGTTACCGTTTCATTTCCAGCTT -3'

采用竞争 ELISA 法检测初步纯化出的 15A7 单链抗体和 14G7 单链抗体的活性。在聚苯乙烯板条的孔中包被 CD4 抗原,并用 1×ED (1×PBS 溶液中加入 2%明胶、0.5%酪蛋白和 2%蔗糖)封闭,待测孔中加入 100μL 上述单链抗体溶液,阳性对照孔中则分别加入 100μL 单克隆 15A7、单克隆抗体 14G7, 阴性对照孔中加入 100μL 不相关单抗 1F2 稀释液或 100μL PBS, 三孔重复。各孔稍混匀后于 37℃反应 1 小时后,以 biotin 标记的 15A7、14G7 再反应 1 小时,再加入 SA-HRP 作为二抗反应 30 分钟后,加入 A、B 显色液于 37℃显色 15 分钟,终止反应后用酶标仪读数。结果见表 6 和表 7, 15A7 单链抗体和 14G7 单链抗体均显示明显的阻断其对应的单克隆抗体与 CD4(D1)蛋白的结合。

表 6. 15A7 单链抗体对 15A7 全抗的阻断的活性检测

包被抗原	一抗反应物			
	15A7-scfv	15A7	PBS	1F2
CD4(d1)	1.068	0.522	1.678	1.592
CD4(d1-2)	1.159	1.080	1.209	1.095
sCD4	0.395	0.338	0.236	0.237
CD4(d2)	0.082	0.077	0.058	0.069

表 7. 14G7 单链抗体对 14G7 全抗的阻断的活性检测

包被抗原	一抗反应物			
	14G7-scfv	14G7	PBS	1F2
CD4(d1)	1.002	0.513	1.718	1.488
CD4(d1-2)	1.052	0.989	1.119	1.120
sCD4	0.412	0.323	0.225	0.253
CD4(d2)	0.076	0.058	0.049	0.058

采用 ELISA 法检测初步纯化出的 15A7 单链抗体、14G7 单链抗体与 CD4 蛋白反应活性。将 15A7 单链抗体、14G7 单链抗体标记上生物素 biotin, 并用 HCV-ED 稀释。在聚苯乙烯板条的孔中包被 CD4 抗原 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d1-2)、CD4(d3)、CD4(d4)和 sCD4, 并用 1×ED 封闭, 待测孔中加入 100μL 上述标记了 biotin 的单链抗体溶液, 阳性对照孔中则加入 100μL 标记了生物素 (biotin) 的单克隆抗体 15A7、标记了生物素 (biotin) 的单克隆抗体 14G7, 阴性对照孔中加入 100μL HCV-ED 溶液, 三孔重复。各孔稍混匀后于 37℃ 反应 1 小时后, 加入 SA-HRP 作为二抗反应 30 分钟后, 加入 A、B 显色液于 37℃ 显色 15 分钟, 终止反应后用酶标仪读数。结果见表 8 和表 9, 说明初步纯化出的 15A7 单链抗体蛋白对 CD4 蛋白具有较高的活性。

表 8. 15A7 单链抗体与 CD4 蛋白反应活性的检测

包被抗原	一抗反应物		
	15A7scfv-biotin	15A7-biotin	阴性对照
CD4(d1)	0.596	3.779	0.214
CD4(d2)	0.392	0.096	0.036
CD4(d1-2)	1.376	2.134	0.026
CD4(d3)	0.159	0.068	0.023
CD4(d4)	0.227	0.197	0.045
sCD4	0.438	0.428	0.091
N444(对照)	0.145	0.109	0.021

表 9. 14G7 单链抗体与 CD4 蛋白反应活性的检测

包被抗原	一抗反应物		
	14G7scfv-biotin	14G7-biotin	阴性对照
CD4(d1)	0.615	3.256	0.198
CD4(d2)	0.422	0.076	0.043
CD4(d1-2)	1.469	2.348	0.031
CD4(d3)	0.148	0.076	0.025
CD4(d4)	0.212	0.232	0.051
sCD4	0.525	0.521	0.089
N444(对照)	0.160	0.115	0.023

实施例 8. 单克隆抗体 Fab 片段及 F(ab')₂ 的制备

单克隆抗体 Fab 片段的制备: 纯化的单克隆抗体 15A7 (2mg/mL) 用 20mM PB (pH 7.0) 缓冲液透析过夜。将木瓜酶 (购自 Sigma 公司) 以相同缓冲液配制成 1mg/mL, 内含 20mM EDTA, 20mM 半胱氨酸, 37℃ 孵育 30 分钟, 将激活的酶缓冲液加入透析后的抗体中, 酶: 抗体重量比 = 1:1000, 37℃ 孵育 15 小时。加入碘乙酰胺 (终浓度 30mM) 避光冰浴 1 小时, 终止反应。将酶切好的单克隆抗体对 20mM TB (pH8.0) 缓冲液透析过夜, 然后上 DEAE-HPLC 纯化。用 20mM TB (pH8.0) 平衡柱子, 用含有 0.05M NaCl 的 20mM TB (pH8.0) 线性洗脱 15 分钟 Fab 洗脱, 用含有 1M NaCl 的 20mM TB (pH 8.0) 洗下 Fc 及少量未切开的全抗。上样量 10-100mg 抗体, 流速 1mL/min, 检测波长 280nm。收集的 Fab SDS-PAGE 检测纯度后用 10kD 规格浓缩管浓缩, 对 20mM PBS (pH7.4) 透析后, 除菌 (0.22μm 微孔滤膜) 分装, 即得单克隆抗体 15A7 的 Fab 纯品。

单克隆抗体 F(ab')₂ 片段的制备: 纯化的单克隆抗体 15A7 (2mg/mL) 用 6mM Na₂HPO₄·12H₂O 与 7mM 柠檬酸混合缓冲液透

析过夜。将胃蛋白酶(购自 Sigma 公司)以相同缓冲液配制成 1mg/mL 加入透析后的抗体中,酶:抗体重量比 = 1:100, 37℃ 孵育 12 小时。将酶切好的单克隆抗体对 20mMTB (pH 8.0) 缓冲液透析过夜,然后上 DEAE-HPLC 纯化。用 20mM TB (pH 8.0) 平衡柱子,用含有 1M NaCl 的 20mM TB (pH 8.0) 线性洗脱 30 分钟,分别洗下 F(ab')₂ 和少量未切开的全抗。上样量 10-100mg 抗体,流速 1mL/min,检测波长 280nm。收集的 F(ab')₂ 经 SDS-PAGE 检测纯度后用 10kD 规格浓缩管浓缩,对 20mM PBS (pH7.4) 透析后,除菌 (0.22μm 微孔滤膜) 分装,即得单克隆抗体 15A7 的 F(ab')₂ 纯品。

纯化后的单克隆抗体 15A7,单克隆抗体 15A7 Fab 片段和单克隆抗体 F(ab')₂ 片段 SDS-PAGE 结果如图 10 所示:其中第 1 道是蛋白分子量 marker;第 2 道是经过还原剂 β-巯基乙醇后沸水浴 10 分钟处理的单克隆抗体 15A7;第 3 道是经过还原剂 β-巯基乙醇后沸水浴 10 分钟处理的单克隆抗体 15A7 Fab 片段;第 4 道是经过还原剂 β-巯基乙醇后沸水浴 10 分钟处理的单克隆抗体 15A7 F(ab')₂ 片段;第 5 道是单克隆抗体 15A7;第 6 道是 15A7 Fab 片段;第 7 道是单克隆抗体 15A7 F(ab')₂ 片段。

实施例 9. 抗体 15A7 及其活性片段中和活性 IC₅₀ 的测定

选用 B 亚型病毒株 HIV_{NL4-3},用细胞中和实验检测抗体 15A7 及其活性片段中和活性 IC₅₀。TZM-bl 细胞按照 1.5×10^4 个细胞/孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板中,12 小时后用于检测。按照 100μg/ml 的稀释浓度 2 倍稀释抗体 15A7 及其 Fab、F(ab')₂ 片段,稀释 20 个梯度,在 96 孔 U 底板中每孔加入 100μL 抗体稀释液和 50μL HIV 病毒悬液 (稀释至 100 TCID₅₀),37℃ 温育 1 小时。将混合液 150μL 加入 96 孔细胞培养板上培养好的 TZM-bl 细胞,37℃ 培养 48 小时

后,显色后用 Elispot 计数,按照下列公式计算中和效率,50%以上中和活性的定为阳性,低于 50%中和活性的为阴性。对照组用 PBS 代替 15A7 抗体。图 11 显示了单克隆抗体 15A7 和其 Fab 和 F(ab')₂ 片段中和 HIV_{NL4-3} 的效果,其中 F(ab')₂ 中和效果与全抗体相当。IC₅₀ 的计算方法如下:

$$\lg IC_{50} = X_m - I(P - (3 - P_m - P_n)/4)$$

其中: X_m 为 lg 最大剂量; I 为 lg(最大剂量/相临剂量); P 为阳性反应率之和; P_m 为最大阳性反应率; P_n 为最小阳性反应率。结果总结见表 10。

表 10. 单抗 15A7 及其片段对 5 株 HIV 病毒的细胞中和效果

	IC ₅₀ (μg/mL)		
	15A7	15A7-Fab	15A7-F(ab') ₂
HIV _{NL4-3}	0.465	10.297	0.687
HIV _{89.6}	0.058	NT*	NT
HIV _{94UG114}	0.066	NT	NT
HIV _{MJ4}	0.071	NT	NT
HIV _{WCML249}	0.293	NT	NT

*NT: 未检测

实施例 10. 单克隆抗体 15A7 标记 CD4⁺细胞的流式细胞仪检测

本实验所用的表达 CD4 的细胞系: Tzm-bl (Cat.No. 8129 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program); U87.CD4.CXCR4 (Cat.No.4036 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program); U87.CD4.CCR5 (Cat.No. 4035 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program); MT4(Cat.No. 120

National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program); H9 (Cat.No. 87 National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program)。上述 5 株细胞均可以稳定表达 CD4, 其中 Tzm-bl U87.CD4.CXCR4、U87.CD4.CCR5 3 株为贴壁细胞, MT4、H9 为悬浮细胞。

PBMC 抽取健康志愿者的静脉血分离, 步骤如下: 抽取静脉血 20mL 加到肝素 (5-10IU/mL) 抗凝管中, 加入 20mL PBS 悬浮细胞。将 20mL 细胞悬液小心加在 10mL Ficoll-Paque PLUS (Cat.No. 17-1440-03 GE Healthcare Bio-Sciences AB) 上, 室温水平离心 500g 20 分钟。此时离心管中形成分层, 最上面是血浆, 血浆层和淋巴细胞分离液之间是 PBMC, 吸去部分最上层的血浆, 收集血浆层和淋巴细胞分离液交界面的 PBMC 到 50mL 离心管中。加入 40mL PBS, 混匀后 200g 离心 10 分钟, 弃掉上清, 收集细胞沉淀, 加入 40mL PBS 重悬, 混匀后 500g 离心 10 分钟, 再重复 1 次。用 1% 台盼蓝染色检测细胞活力 (应 >95 %) 并计数细胞, 用 AIM-V Medium (Cat.No.12055 Invitrogen) 培养基培养。

实验所用抗体: FITC 标记的 anti-CD4 (Cat.No. 555346, BD Biosciences), PE 标记 CXCR4 (Cat.No. 555974, BD Biosciences), PE-Cy5 标记 CCR5 (Cat.No. 556889, BD Biosciences) 以上抗体全部用 PBS 1:200 稀释用。

单克隆抗体 15A7 (1:1000 稀释) 作为一抗, Anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC (Cat.No. F9006 Sigma) 用 PBS 1:200 稀释作为二抗。

准备细胞: 将 Tzm-bl、U87.CD4.CXCR4、U87.CD4.CCR5 等 3 株贴壁细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化制备成单细胞悬液, MT4、H9 和 PBMC 为悬浮细胞, 用移液管吹打成单细胞悬液, 细胞浓度

均调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ，取 4mL 细胞悬浮液等量分装 8 管，并随机分成 A、B、C、D 四组，每组两管，一管用于抗体标记，一管为阴性对照。每管细胞加入 1.5mL PBS 颠倒混匀，1500rpm 离心 5 分钟，弃掉上清，收集细胞沉淀。

标记抗体：用稀释好的抗体溶液 200 μL 重悬细胞并混匀。A、B、C 组分别加入 FITC-anti-CD4、PE-anti-CXCR4、PE-Cy5-anti-CCR5 抗体，室温避光孵育 30 分钟。加入 2mL PBS 混匀，1,500rpm 离心 5 分钟，弃掉上清，收集细胞沉淀，并用 500 μL PBS 重悬。流式细胞仪检测抗体标记情况。

D 组一抗用单克隆抗体 15A7 溶液重悬细胞，室温孵育 1 小时，加入 2mL PBS 混匀，1500rpm 离心 5 分钟，弃掉上清，重复上述操作 1 次，收集细胞。200 μL 二抗 anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC 溶液重悬细胞并混匀，室温避光孵育 30 分钟。加入 2mL PBS，1,500rpm 离心 5 分钟，弃掉上清，收集细胞沉淀，并用 500 μL PBS 重悬。流式细胞仪检测抗体标记情况：图 12 是 Tzm-bl 细胞标记后的流式细胞仪检测检测结果；图 13 是 MT4 细胞标记后的流式细胞仪检测检测结果；图 14 是 H9 细胞标记后的流式细胞仪检测检测结果；图 15 是 U87.CD4.CXCR4 细胞标记后的流式细胞仪检测检测结果；图 16 是 U87.CD4.CCR5 细胞标记后的流式细胞仪检测检测结果；图 17 是 PBMC 细胞标记后的流式细胞仪检测检测结果。各细胞标记后的阳性率结果统计于表 11，流式检测结果将阴性对照值设定在 1%，15A7 抗体与各细胞系表面受体的结合情况与 anti-CD4 抗体具有明显的相关性。

表 11. 单抗 15A7 对各细胞系表面受体流式检测结果

	CD4	CXCR4	CCR5	15A7
Tzm-bl	99.7%	97.2%	99.4%	100%
MT4	84.3%	20.3%	2.2%	99.5%
H9	80.4%	96.8%	21.0%	99.4%
U87.CD4.CXCR4	18.4%	90.2%	32.1%	41.0%
U87.CD4.CCR5	97.7%	55.0%	91.3%	99.4%
PBMC	33.8%	90.7%	19.1%	51.0%

实施例 11. 单克隆抗体 15A7 与表达 HIV 的细胞结合情况的流式细胞仪检测

293-FT 细胞按照 5×10^4 个细胞/孔的浓度接种于 24 孔细胞培养板中, 5%二氧化碳培养箱 37℃ 孵育 12 小时, 用 0.6μg pNL4-3 质粒 (HIV_{NL4-3} 感染性克隆全基因质粒) 转染细胞, 转染试剂为梭华 (Sofast, 厦门太阳马生物工程有限公司), 转染方法参见该试剂的操作指南; 用未转染的细胞作为对照。转染 48 小时后, 将 24 孔板中的培养基吸出, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化制备单细胞悬液, 将细胞转移到 4mL 离心管中, 每孔对应一管。每管细胞悬液加入 1.5mL PBS 混匀, 1,500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清, 收集细胞沉淀。用 200μL 单克隆抗体 15A7 工作液 (1:1000 稀释) 重悬细胞; 对照组用 PBS 重悬细胞, 用 1:100 稀释的 anti-p24 单抗 H5F4 作为 pNL4-3 转染效果的参照, 混匀后室温孵育 1 小时, 每管加入 2mL PBS 混匀, 1500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清, 收集细胞沉淀。用 PBS 1:200 稀释 anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC (Cat.No. F9006, Sigma) 作为二抗, 每管加入 200μL 二抗重悬细胞并混匀, 室温避光孵育 30 分钟。然后加入 2mL PBS 混匀, 1,500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清,

收集细胞沉淀，用 500 μ L PBS 重悬。用流式细胞仪检测抗体标记与蛋白孵育后的细胞的情况。结果见图 18，阳性率结果总结于表 12 中，可见：p24 表达在 293FT-HIV⁺细胞中有表达，阳性率为 13.4%，说明 pNL4-3 质粒转染细胞后在细胞内复制表达。单克隆抗体 15A7 与 293FT-HIV 结合效果效率为 1%，可知 15A7 与 HIV 不结合。

表 12. 15A7 与 293FT 和转染了 pNL4-3 的 293FT 结合情况

	15A7	H5F4	PBS
293FT-HIV	1.0%	13.4%	1.1%
293FT	1.1%	1.2%	0.8%

实施例 12. 单克隆抗体 15A7 标记表达 HIV 的细胞的免疫荧光检测

准备细胞：使用 0.25%的胰蛋白酶将 293FT 细胞消化并制备成单细胞悬液。将细胞按照 5×10^4 个细胞/孔的浓度孔接种入预先铺好无菌盖玻片的 24 孔板中，然后每孔补充 400 μ L DMEM 完全培养基（添加 10%FBS, 2mM L-glutamine, 0.1mM 非必须氨基酸及 1%双抗）5%二氧化碳培养箱 37℃培养 12 小时。用 0.6 μ g pNL4-3 质粒（HIV_{NL4-3} 感染性克隆全基因质粒）转染细胞，转染试剂为梭华（Sofast, 厦门太阳马生物工程有限公司），转染方法参见该试剂的操作指南；用未转染的细胞作为对照。转染 48 小时后进行细胞固定。

细胞固定通透：将 24 孔板中的培养基吸出，每孔加入 500 μ L PBS 洗一次，然后每孔加入 500 μ L 4%多聚甲醛（100mL PBS 含有 4g 多聚甲醛）室温避光固定 5 分钟，吸出 4%多聚甲醛固定液。每孔加入 1mL PBS，室温放置 5 分钟，然后吸出，重复用 PBS 洗 2 次。将 PBS 吸出，每孔加入 500 μ L 0.3% Triton-X100（100mL PBS 含有 300 μ L Triton-X100）室温通透 5 分钟，吸出 0.3% Triton-X100。每孔加入 1mL PBS，室温放置 5 分钟，然后吸出，重复用 PBS 洗 2 次。

封闭：在 24 孔板盖上放一张封口膜，24 孔板上每个孔的位置滴加 25 μ L 山羊血清，用眼科镊小心的从 24 孔板中取出盖玻片，用吸水纸吸去盖玻片上多余的液体，然后将盖玻片置于山羊血清的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）室温孵育 1 小时。

一抗孵育：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。再取一张新的封口膜覆盖在 24 孔板盖上，按照 24 孔板上孔的位置，滴加 25 μ L 单克隆抗体 15A7 的 PBS 稀释液（1:1000 稀释）。对照滴单克隆抗体 H5F4（anti-P24）的 PBS 稀释液（1:1000 稀释），按照封闭一样的操作，将盖玻片放置于一抗的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）室温孵育 1 小时。

二抗孵育：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。然后吸出 PBS，重复用 PBS 洗两次。取一张新的封口膜覆盖在 24 孔板盖上，按照 24 孔板上孔的位置，滴加 25 μ L 二抗，二抗为 anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC（Cat.No. F9006, Sigma）用 PBS 1:200 稀释。按照封闭一样的操作，将盖玻片放置于二抗的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）室温避光孵育 30 分钟。

DAPI 染核：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。然后吸出 PBS，重复用 PBS 洗两次。取一张新的封口膜覆盖在 24 孔板盖上，按照 24 孔板上孔的位置，滴加 25 μ L 用 PBS 稀释好的 DAPI（1:2000 稀释），按照封闭一样的操作，将盖玻片放置于 DAPI 的液滴内，确保细胞面向下。将放有盖玻片的 24 孔板盖放入湿盒（保持饱和湿度）

室温避光孵育 5 分钟。

封片：小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 24 孔板，加入 1mL PBS 室温放置 5 分钟。然后吸出 PBS，重复用 PBS 洗两次。标记载玻片，并在上面滴一滴封片剂。从 24 孔板中取出盖玻片，用吸水纸吸去盖玻片上多余的液体，然后细胞面朝下，将盖玻片置于封片剂液滴中。用吸水纸轻轻除去盖玻片上的封片剂，再在边缘涂上指甲油，用来封闭盖玻片边缘。避光干燥。用激光扫描共聚焦显微镜观察并拍照。

结果如图 19 所示，单克隆抗体 15A7 没有结合在 293FT 和转染过 pNL4-3 质粒的 293FT 细胞上。表明单克隆抗体与 HIV 不结合。

实施例 13. 截短的 CD4 多肽阻断 HIV 感染细胞的竞争中和实验

Tzm-bl 细胞按照 1.5×10^4 个细胞/孔铺与 96 孔板中，5%二氧化碳培养箱 37℃ 孵育 12 小时后用于中和实验。将初步纯化的 CD4(d1), CD4(d1-2), CD4(d2), CD4(d3), CD4(d4) 梯度稀释后按照 100μL/孔与 100 TCID₅₀ 的 HIV_{NL4-3} 混合后 37℃ 孵育 1 小时，将上述混合液加入预先铺好的 Tzm-bl 细胞，5%二氧化碳培养箱 37℃ 培养 48 小时，显色后用 Elispot 计数，并计算中和效率。结果如图 20 所示，CD4(d1)、CD4(d1-2)和 sCD4 具有很好的阻断 HIV 病毒感染细胞的活性：其中 CD4(d1)的 IC₅₀ 为 0.143μg/mL，CD4(d1-2)的 IC₅₀ 为 0.250μg/mL，sCD4 的 IC₅₀ 为 1.815μg/mL。

实施例 14. 单克隆抗体 15A7 与各截短的 CD4 多肽的反应性

间接 ELISA 法检测：将纯化的 CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-d2)和 sCD4 蛋白用 1×PBS 包被缓冲液分别稀释至终浓度 0.5μg/mL，在 96 孔聚乙烯微量滴定板的各孔表面上 37℃

吸附 2 小时，再置于 4℃ 过夜。用 PBST 洗涤液（8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g KCl 和 0.5mL 吐温 20，加去离子水至 1 升，pH 为 7.4）洗涤滴定板以除去未结合的抗原蛋白一次。然后用 200 μL /孔的封闭液（1 $\times$ PBS 溶液中加入 2% 明胶、0.5% 酪蛋白和 2% 蔗糖）37℃ 封闭 2 小时。甩净、拍干后真空封闭，4℃ 保存。

检测时，于每孔中加入每孔加入 100 μL 稀释的 15A7 抗体每次反应设置一不相关单抗的阴性对照。37℃ 温育 1 小时，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后加入 1:5000 稀释的过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白（HRP-GAM Ig，DAKO 公司），37℃ 温育 30 分钟，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后先后加入底物液 A、B 各 50 μL （底物液 A 成分为：13.42g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、4.2g 柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 和 0.3g 过氧化氢，用去离子水中调节体积为 700mL；显色液 B 成分为：0.2g 四甲基联苯胺、20mL 二甲基甲酰胺用去离子水中调节体积为 700mL），37℃ 显色 15 分钟，加入 50 μL 终止液（2M H_2SO_4 ）终止反应，并于酶标仪上检测各孔的 OD450 值。表 13 结果可知，CD4(d1)、CD4(d1-2)和 sCD4 蛋白与抗体 15A7 有反应。

表 13. CD4(d1)、CD4(d2)、CD4(d3)、CD4(d4)、CD4(d1-2)和 sCD4 蛋白 ELISA 活性检测

单抗浓度(ng/mL)	10,000	5,000	2,500	1,250	625	310	155	75	37	18	9	PBS
CD4(d1)	15A7	2.7575	2.683	2.7345	2.0185	1.6845	1.0415	0.648	0.257	0.047	0.0395	0.017
	Control	0.134	0.062	0.038	0.009	0.0045	0.003	0.002	0.0075	0.005	0.003	0.01
CD4(d2)	15A7	0.005	0.016	0.0045	0.0065	0.0055	0.002	0.0025	0.0035	-0.0005	-0.0005	0.027
	Control	0.0505	0.0305	0.0235	0.0125	0.013	0.0165	0.014	0.01	0.0115	0.0075	0.009
CD4(d3)	15A7	0.051	0.0115	0.005	0.0115	0.007	0.0115	0.013	0.0035	0.0025	0.0075	0.007
	Control	0.2695	0.0165	0.015	0.0155	0.009	0.0095	0.018	0.0045	0.004	0.0065	0.0235
CD4(d4)	15A7	0.1135	0.0275	0.0155	0.016	0.0105	0.021	0.0055	0.007	0.004	0.0025	0.0035
	Control	0.1115	0.023	0.017	0.0095	0.007	0.0055	0.0005	0.004	0.0055	0.0055	0.0065
CD4(d1-2)	15A7	1.6685	1.19	0.9905	0.934	0.505	0.369	0.292	0.1275	0.0405	0.0375	0.021
	Control	0.0385	0.0095	0.006	0.005	0.0075	0.0055	0.005	0.003	0.0055	0.0075	0.0055
sCD4	15A7	0.895	0.7406	0.6603	0.3087	0.287	0.1553	0.1216	0.066	0.038	0.016	0.017
	Control	0.01	0.011	0.013	0.007	0.018	0.0103	0.007	0.0243	0.017	0.009	0.007

Western 法检测: HPLC 纯化后的各 CD4 重组蛋白还原样及非还原样 (不含 DTT) 分别以 15% 的 SDS-PAGE 电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜上, 加入 5% 的脱脂奶于室温封闭 1.5 小时; 将用 5% 脱脂奶封闭好的膜裁剪成约 0.8cm 宽的条, 分别加入单克隆抗体, 室温反应 1 小时; TNT (8.765g NaCl、1.21g Tris Base 和 0.5mL 吐温 20, 加去离子水至 1L, 调 pH 为 8.0) 洗涤三次, 每次间隔 5 分钟; 以 5% 脱脂奶 1:5000 稀释的 AP 标记山羊抗小鼠 (AP-GAM, H+L) 酶标二抗 (Protos 公司产品), 室温反应 1 小时; TNT 洗涤三次, 每次间隔 5 分钟; 向 10mL AP 缓冲液 (100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl, 调 pH 为 9.5) 中加入 66μL NBT 溶液 (0.5g NBT 溶于 10 mL 70% 的二甲基甲酰胺中) 和 33μL BCIP 溶液 (0.5g BCIP 溶于 10mL 70% 的二甲基甲酰胺中), 室温反应 15 分钟。Western 印迹结果见图 21: 可见单克隆抗体 15A7 仅与还原组分的 CD4(d1-2) 和 sCD4 有较好的反应性; 而非还原组分的 CD4(d1-2) 和 sCD4 有较好的反应性, 与非还原组分的 CD4(d1) 有较弱的反应性。

实施例 15. 单克隆抗体 15A7 在有或无 HIV 病毒存在情况下标记 CD4⁺ 细胞的检测

准备细胞: TZM-bl 细胞按照 1×10^5 个细胞/孔的浓度接种于 24 孔细胞培养板中, 12 小时后用于实验。24 孔板中加入病毒 (稀释至 100 TCID₅₀), 对照用 DMEM 培养基代替。37℃ 孵育 2 小时后, 弃含有病毒的上清液, 并用 PBS 洗 3 次。加入单克隆抗体 15A7 的稀释液, 37℃ 孵育 1 小时。用 0.25% 的胰酶消化细胞, 转入 4mL 离心管中, 2mL PBS 洗一次, 1,500rpm 离心 5 分钟 弃上清, 用 100μL 含有 RAM-FITC (1:200 稀释) 的 PBS 重悬细胞, 25℃ 孵育 30 分钟。2mL PBS/管洗一次, 1,500rpm 离心 5 分钟 弃上清, 用 500μL PBS 重

悬细胞，流式细胞仪检测抗体结合情况。结果如图 22 所示：在 HIV 存在的情况下，单克隆抗体 15A7 仍可标记 TZM-b1，且标记的阳性率有明显增强（ $p<0.05$ ）。

实施例 16. 单克隆抗体 15A7 对细胞的毒性检测

TZM-bl 细胞按照 1.5×10^4 /孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板中，5%二氧化碳培养箱 37℃ 孵育 12 小时用于检测。将 96 孔板中的培养基吸出，加入 100μL 无酚红的 DMEM 培养基，5%二氧化碳培养箱 37℃ 孵育 2 小时，按照 Cell Counting Kit-8 试剂盒（碧云天生物技术有限公司）说明书每孔加入 10μL CCK-8，37℃、5%二氧化碳培养箱孵育，并在孵育 20、40、60 分钟后分别取样用酶标仪读板，检测其吸光值。本次实验用 PBS 代替单克隆抗体 15A7 作为对照，无酚红的 DMEM 培养基不加细胞作为背景。具体吸光值见表 14，15A7、PBS 与 DMEM 培养基的吸光值无显著差异（ $P>0.05$ ），这表明单克隆抗体 15A7 对 Tzm-bl 细胞没有毒性。

表 14. 15A7 单抗细胞毒性检测

	20 分钟	40 分钟	60 分钟
MOCK	0.031	0.021	0.028
15A7	0.558	0.769	0.783
PBS	0.451	0.635	0.655
DMEM	0.485	0.751	0.749

实施例 17. 15A7 与截短的 CD4 多肽孵育后阻断 HIV 感染 Tzm-b1 细胞的中和实验

选用 B 亚型的 HIV 全基因实验株病毒 HIV_{NL4-3} 利用细胞中和实验检测单抗 15A7 与截短的 CD4 多肽孵育后对 Tzm-b1 细胞的感染

情况。Tzm-bl 细胞按照 1.5×10^4 /孔铺与 96 孔板中, 12 小时后用于中和实验。按照 $100 \mu\text{g/mL}$ 的稀释浓度梯度稀释单克隆抗体 15A7, 倍比稀释 20 个梯度, 稀释的培养基中分别加入相应的 CD4(d1), CD4(d1-2), sCD4 多肽, 对照为 PBS, 实验按照 25pM 的浓度使用 sCD4 多肽, 稀释液体积为 $100 \mu\text{L}$ /孔。同时用 PBS 代替 15A7 抗体梯度稀释抗体, 稀释的培养基中也分别加入相应的 CD4(d1), CD4(d1-2), sCD4 多肽, 从而验证 sCD4 多肽自身阻断 HIV 感染 Tzm-b1 的情况。HIV 用量为 100 TCID₅₀/孔, 体积为 $50 \mu\text{L}$ /孔, 与上述稀释液混合后在 37°C 恒温培养箱中孵育 1 小时, 将上述混合液加入预先铺好的 Tzm-bl 细胞中, 再在 37°C 5%二氧化碳培养箱培养 48 小时后固定通透并显色。用 Elispot 计数并计算中和效率。实验结果见附图 23: 从实验结果可以看出, CD4(d1), CD4(d1-2), sCD4 多肽对单克隆抗体 15A7 阻断 HIV 感染 Tzm-bl 有明显的影响 ($p < 0.01$)。

实施例 18. CD4(d1)、CD4(d1-2)、sCD4 与转染了 HIV 感染性克隆质粒的细胞流式细胞仪检测

293-FT 细胞按照 5×10^4 个细胞/孔的浓度接种于 24 孔细胞培养板中, 5%二氧化碳培养箱 37°C 孵育 12 小时, 用 $0.6 \mu\text{g}$ pNL4-3 质粒 (HIV_{NL4-3} 感染性克隆全基因质粒) 转染细胞, 转染试剂为梭华 (Sofast, 厦门太阳马生物工程有限公司), 转染方法参见该试剂的操作指南; 用未转染的细胞作为对照。转染 48 小时后, 将 24 孔板中的培养基吸出, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化制备单细胞悬液, 将细胞转移到 4mL 离心管中, 每孔对应一管。每管细胞悬液加入 1.5mL PBS 混匀, $1,500 \text{rpm}$ 离心 5 分钟, 弃掉上清, 收集细胞沉淀。用 $200 \mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 加入终浓度为 $0.5 \mu\text{M}$ 的 CD4(d1)、CD4(d1-2)、sCD4 蛋白; 对照组用 PBS 替代蛋白溶液, 室温孵育 1 小时。每管加入 2mL

PBS 混匀, 1,500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清, 收集细胞沉淀。用 200 μ L 单克隆抗体 15A7 工作液 (1:1000 稀释) 重悬细胞; 对照组用 200 μ L 1:100 稀释的 anti-Human CD4 (Clone Q4120, Sigma, 识别表位位于 CD4 D1 结构域) 重悬细胞, 用 1:100 稀释的 anti-p24 单抗 H5F4 作为 pNL4-3 转染效果的参照, 混匀后室温孵育 1 小时, 每管加入 2mL PBS 混匀, 1500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清, 收集细胞沉淀。用 PBS 1:200 稀释 anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC (Cat.No. F9006, Sigma) 作为二抗, 每管加入 200 μ L 二抗重悬细胞并混匀, 室温避光孵育 30 分钟。然后加入 2mL PBS 混匀, 1,500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清, 收集细胞沉淀, 用 500 μ L PBS 重悬。用流式细胞仪检测抗体标记与蛋白孵育后的细胞的情况。结果见图 24: 其中 A 小图是以单克隆抗体抗体 15A7 为第一抗体标记分别与 CD4(d1)、CD4(d1-2)、sCD4 蛋白孵育的 293FT 细胞、293FT-HIV⁺细胞的结果; B 小图是 anti-Human CD4 (Clone Q4120) 为第一抗体标记分别与 CD4(d1)、CD4(d1-2)、sCD4 蛋白孵育的 293FT 细胞、293FT-HIV⁺细胞的结果。阳性率结果总结于表 15 中, 可见: p24 表达在 293FT-HIV⁺细胞中有表达, 阳性率为 7.2%, 说明 pNL4-3 质粒转染细胞后在细胞内复制表达, 但由于 p24 蛋白主要存在于细胞内部, 因此在没有通透的情况下, 检测阳性率偏低; 通过对照抗体 anti-Human CD4 (Clone Q4120) 标记细胞的阳性率结果可知 CD4(d1)、CD4(d1-2)、sCD4 均与 293FT-HIV⁺细胞有结合, 其中 sCD4 结合能力最强; 单克隆抗体 15A7 与结合了上述 CD4(d1)、CD4(d1-2)、sCD4 蛋白的 293FT-HIV⁺细胞的标记情况比阳性对照抗体 anti-Human CD4 (Clone Q4120) 与相应细胞的标记效果好。

表 15. 15A7 检测 CD4 蛋白与转染了 pNL4-3 的 293FT 结合情况

		CD4(d1)	CD4(d1-2)	sCD4	H5F4	PBS
293FT	15A7	0.6%	0.7%	6.1%	1.0%	1.0%
	anti-CD4	1.2%	0.7%	3.4%		
293FT-HIV ⁺	15A7	8.0%	13.2%	28.2%	7.2%	1.0%
	anti-CD4	7.7%	10.2%	13.6%		

实施例 19. 单克隆抗体 15A7 与 CD4(d1-2)、sCD4 亲和力的测定

将实施例 2 中纯化的 CD4(d1-2)、sCD4 蛋白标记上生物素，具体操作如下：将上述蛋白用 PBS 稀释到 4mL 终浓度为 10 μ M，加入 100 μ L 浓度为 4mM 的生物素(EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Cat.No. 21335, Thermo Scientific)，混匀后室温孵育 2 小时，然后装入透析袋中，放入 1L PBS 中 4℃搅拌下透析，3 小时更换一次透析液，重复 4 次。

将上述透标记有生物素的 CD4(d1-2)、sCD4 作为抗原，结合 Streptavidin(SA) Biosensors 探针(Cat.No. 185019, ForteBio)，按照操作手册提示，用 ForteBio Octet RED 蛋白相互作用仪分析单克隆抗体 15A7 与 CD4(d1-2)、sCD4 蛋白的亲和力：单克隆抗体 15A7 用 PBS 稀释到 400nM、100nM、50nM 三个浓度检测并计算出亲和力，阴性对照抗体为 anti-P24 单抗 H4F5。结果见表 16：单克隆抗体 15A7 与两种蛋白的亲和力接近 1.20 $\times 10^{-9}$ M。

表 16. 单克隆抗体 15A7 与截短的 CD4 蛋白的亲和力

	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)
CD4(d1-2)	1.18 $\times 10^{-9}$	4.22 $\times 10^5$	5.00 $\times 10^{-4}$
sCD4	1.20 $\times 10^{-9}$	3.37 $\times 10^5$	4.04 $\times 10^{-4}$

实施例 20. 点突变的 CD4(d1-2)多肽的表达

对区段 CD4 基因多肽重组表达克隆 pTO-T7-CD4(d1-2)进行定点突变, 将目标位点氨基酸突变为丙氨酸, 引物序列见表 17。用 PCR 热循环仪(Biometra T3)按照如下条件进行 PCR 反应: 94℃ 10min; 随后是 94℃ 2min, 56℃ 50s, 72℃ 7min 的 17 个循环, 最后为 72℃ 延伸 10min。PCR 结束后加入内切酶 Dpn I 在 37℃反应 3h 以上消化模板质粒, 以 ER2566 大肠杆菌作为表达菌株, 采用常规方法表达, 结果表达的蛋白是以不溶性的包涵体形式存在。以常规方法纯化包涵体, 目的蛋白主要溶解于 8M 尿素中。将溶解于 8M 尿素中的蛋白逐步透析到 1×PBS 中完成复性, 12,000rpm 离心 10 分钟去除沉淀, 得到初步纯化的定点突变蛋白 CD4(d1-2)-F43A、CD4(d1-2)-K46A、CD4(d1-2)-R59A、CD4(d1-2)-N73A。

表 17. CD4(d1-2)片段各定点突变克隆的引物序列

引物名称	引物序列
CD4(d1-2)-F43A-F	5'-GGAAATCAGGGCTCCGCATTAATAAGGTCCA-3'
CD4(d1-2)-F43A-R	5'-TGGACCTTTAGTTAATGCGGAGCCCTGATTTCC-3'
CD4(d1-2)-K46A-F	5'-GGCTCCTTCTTAAGTGCAGGTCCATCCAAG-3'
CD4(d1-2)-K46A-R	5'-CTTGGATGGACCTGCAGTTAAGAAGGAGCC-3'
CD4(d1-2)-R59A-F	5'-GCTGACTCAAGAGCAAGCCTTTGGGAC-3'
CD4(d1-2)-R59A-R	5'-GTCCCAAAGGCTTGCTCTTGAGTCAGC-3'
CD4(d1-2)-N73A-F	5'-CCCCTGATCATCAAGGCACTTAAGATAGAAGAC-3'
CD4(d1-2)-N73A-R	5'-GTCTTCTATCTTAAGTGCCTTGATGATCAGGGG-3'

实施例 21. 间接 ELISA 法检测单克隆抗体 15A7 与点突变 CD4(d1-2)多肽的反应性

将初步纯化的 CD4(d1-2)-F43A、CD4(d1-2)-K46A、CD4(d1-2)-R59A、CD4(d1-2)-N73A 和 CD4(d1-d2)蛋白用 1×PBS

包被缓冲液分别稀释至终浓度 $0.5\mu\text{g/mL}$ ，按照 $100\mu\text{L/孔}$ 加入 96 孔聚乙烯微量滴定板中 37°C 孵育 2 小时，再置于 4°C 过夜。用 PBST 洗涤液（ 8.0g NaCl 、 $0.2\text{g KH}_2\text{PO}_4$ 、 $2.9\text{g Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 0.2g KCl 和 0.5ml 吐温 20，加去离子水至 1 升， pH 为 7.4）洗涤滴定板一次以除去未结合的抗原蛋白。然后用 $200\mu\text{L/孔}$ 的封闭液（ $1\times\text{PBS}$ 溶液中加入 2% 明胶、0.5% 酪蛋白和 2% 蔗糖） 37°C 封闭 2 小时。甩净、拍干后真空封闭， 4°C 保存。

检测时，每孔加入 $100\mu\text{L}$ 稀释的 15A7 抗体。 37°C 孵育 1 小时，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后加入 1:5000 稀释的过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白（HRP-GAM Ig，DAKO 公司）， 37°C 孵育 30 分钟，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后先后加入底物液 A、B 各 $50\mu\text{L}$ （底物液 A 成分为： $13.42\text{g Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 4.2g 柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 和 0.3g 过氧化氢，用去离子水中调节体积为 700mL ；显色液 B 成分为： 0.2g 四甲基联苯胺、 20mL 二甲基甲酰胺用去离子水中调节体积为 700mL ）， 37°C 显色 15 分钟，加入 $50\mu\text{L}$ 终止液（ $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ ）终止反应，并于酶标仪上检测各孔的 OD450 值。结果见表 18 结果，其中 CD4(d1-2)的 F43、K46、R59、N73 突变成丙氨酸后，对 15A7 的结合能力显著下降。

表 18.CD4(d1-2)定点突变各蛋白与 15A7 的 EIA 反应活性

15A7 浓度 (ng/mL)	10000	5000	2500	1250	625	310	155	75	37	18	9	PBS
CD4(d1-2)-F43A	0.962	0.514	0.295	0.191	0.111	0.064	0.043	0.03	0.029	0.016	0.041	0.04
CD4(d1-2)-K46A	0.265	0.128	0.157	0.165	0.100	0.087	0.089	0.056	0.053	0.160	0.095	0.056
CD4(d1-2)-R59A	0.696	0.581	0.348	0.198	0.125	0.067	0.050	0.044	0.027	0.022	0.027	0.045
CD4(d1-2)-N73A	1.658	0.539	0.392	0.24	0.121	0.087	0.139	0.094	0.073	0.082	0.052	0.053
CD4(d1-2)	1.885	1.382	1.246	0.986	0.776	0.624	0.511	0.262	0.25	0.266	0.165	0.041

实施例 22. Western 印记杂交法检测单克隆抗体 15A7 与点突变 CD4(d1-2)多肽的反应性

将初步纯化的 CD4(d1-2)-F43A、CD4(d1-2)-K46A、CD4(d1-2)-R59A、CD4(d1-2)-N73A 和 CD4(d1-d2)蛋白还原样及非还原样(不含 DTT)分别以 13.5% 的 SDS-PAGE 电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜上,加入 5% 的脱脂奶于室温封闭 1.5 小时;封闭后的膜加入一抗 15A7 (以 1: 200 稀释单克隆抗体的脱脂奶)中,4℃ 反应过夜;TNT (8.765g NaCl、1.21g Tris Base 和 0.5ml Tween-20,加去离子水至 1L,调 pH 为 8.0)洗涤三次,每次间隔 5 分钟;以 5% 脱脂奶 1:5000 稀释的 AP 标记山羊抗小鼠 (GAM_{H+L} -AP) 为酶标二抗 (Protos 公司产品),室温反应 1 小时;TNT 洗涤三次,每次间隔 5 分钟;向 10 mL AP 缓冲液 (100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 100mM Tris-HCl, pH 为 9.5) 中加入 66 μ L NBT 溶液 (0.5g NBT 溶于 10 mL 70% 的二甲基甲酰胺中) 和 33 μ L BCIP 溶液 (0.5g BCIP 溶于 10 mL 70% 的二甲基甲酰胺中),室温反应 15 分钟。Western 印迹结果参见图 25: 其中 CD4(d1-2)的 F43、K46、R59、N73 突变成丙氨酸后,单克隆抗体 15A7 对蛋白的结合能力显著下降。

表 19. CD4(d1-2)定点突变各蛋白与 15A7 的 EIA 反应活性

15A7 浓度 (ng/mL)	10000	5000	2500	1250	625	310	155	75	37	18	9	PBS
CD4(d1-2)-F43A	0.962	0.514	0.295	0.191	0.111	0.064	0.043	0.03	0.029	0.016	0.041	0.04
CD4(d1-2)-K46A	0.265	0.128	0.157	0.165	0.100	0.087	0.089	0.056	0.053	0.160	0.095	0.056
CD4(d1-2)-R59A	0.696	0.581	0.348	0.198	0.125	0.067	0.050	0.044	0.027	0.022	0.027	0.045
CD4(d1-2)-N73A	1.658	0.539	0.392	0.24	0.121	0.087	0.139	0.094	0.073	0.082	0.052	0.053
CD4(d1-2)	1.885	1.382	1.246	0.986	0.776	0.624	0.511	0.262	0.25	0.266	0.165	0.041

权 利 要 求

1、一种单克隆抗体或其抗原结合部分，其具有至少一项选自以下的特征：

- (i) 特异性结合人表面抗原分化簇 4 蛋白；
- (ii) 与含有人表面抗原分化簇 4 蛋白 D1 结构域的截短形式的人表面抗原分化簇 4 多肽特异性反应；
- (iii) 对人免疫缺陷病毒包膜糖蛋白 gp120 与人表面抗原分化簇 4 蛋白的反应无明显影响；和
- (iv) 阻断人免疫缺陷病毒感染 CD4⁺细胞及再感染，和/或阻断由此引起的疾病，例如艾滋病。

2、一种单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体的重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 和所述抗体的轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤产生的抗体 15A7 或抗体 14G7 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。

3、一种单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体的重链可变区和轻链可变区分别是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤产生的抗体 15A7 或抗体 14G7 的重链可变区和轻链可变区。

4、权利要求 1-3 任一项蛋白的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列和轻链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所示；或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列和轻链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20 所示。

5、如权利要求 1-4 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NOs:5-7 或由 SEQ ID NOs:11-13 的核苷酸序列编码，所述抗体的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID

NOs:8-10 或由 SEQ ID NOs:14-16 的核苷酸序列编码；或者，所述抗体的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NOs:21-23 或由 SEQ ID NOs:27-29 的核苷酸序列编码，所述抗体的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NOs:24-26 或由 SEQ ID NOs:30-32 的核苷酸序列编码。

6、如权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分，其为 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或单链抗体。

7、如权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中，所述的单克隆抗体结合人表面抗原分化簇 4 蛋白的 K_D 值小于 1×10^{-5} M。

8、如权利要求 1-7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中，所述的单克隆抗体包括非 CDR 区，该非 CDR 区是来自非鼠类的物种。

9、一种特异性结合人表面抗原分化簇 4 蛋白的单克隆抗体，其是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤产生的抗体 15A7。

10、一种杂交瘤细胞株，其是 CCTCC 保藏号 C201098 的杂交瘤。

11、一种检测样品中人表面抗原分化簇 4 蛋白的方法，其包括如下步骤：

a) 将所述的样品与权利要求 1-9 任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分接触；

b) 检测所述的单克隆抗体与所述样品中的蛋白的反应；

c) 检测所述的单克隆抗体与所述样品中的蛋白及人免疫缺陷病毒包膜蛋白的反应；

优选地，其中所述的单克隆抗体或其抗原结合部分附着在固相载体上；优选地，其中所述的固相载体选自：微滴定板、磁颗粒、

胶乳颗粒和硝化纤维素膜；更优选地，其中所述的单克隆抗体或其抗原结合部分是按如此方向附着在所述固相上，该方向能够增加所述单克隆抗体与所述样品的结合效率；更优选地，其中所述的单克隆抗体或其抗原结合部分是通过其恒定区域而附着在所述固相上的。

12、一种治疗受试者中由人免疫缺陷病毒感染引发的疾病的方法，其包括向所述的受试者施用治疗上有效量的、权利要求 1-9 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

13、权利要求 1-9 任一项所述的单克隆抗体用于制备治疗或预防以 CD4+细胞为目标细胞的疾病（如艾滋病）的药物的用途，用于制备阻断 HIV 感染 CD4+细胞及再感染的药物的用途。

14、一种药物组合物，其包含如权利要求 1-9 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合部分以及药学上可接受的载体；优选地，其中所述的单克隆抗体或其抗原结合部分为 Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv。

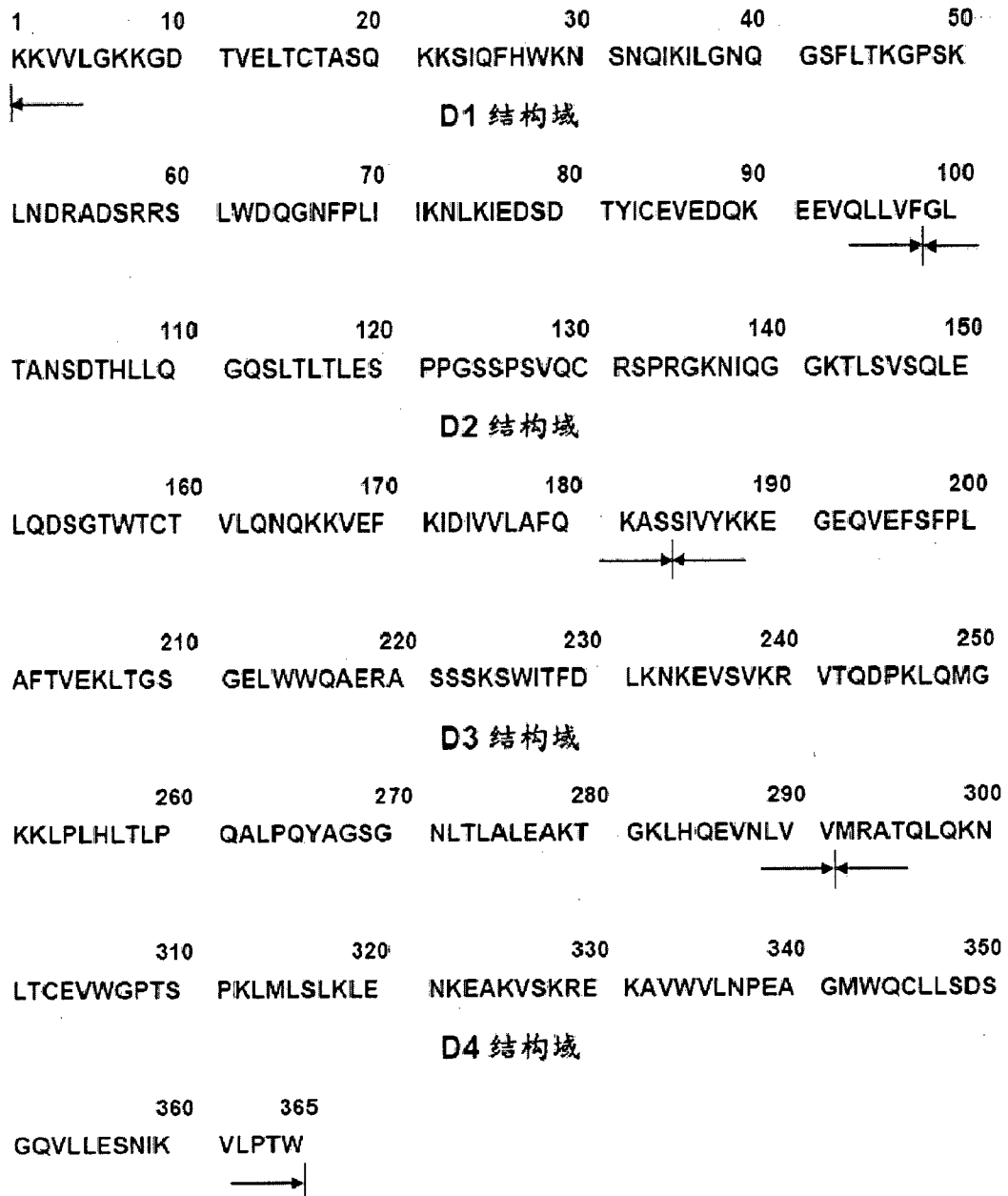


Fig. 1

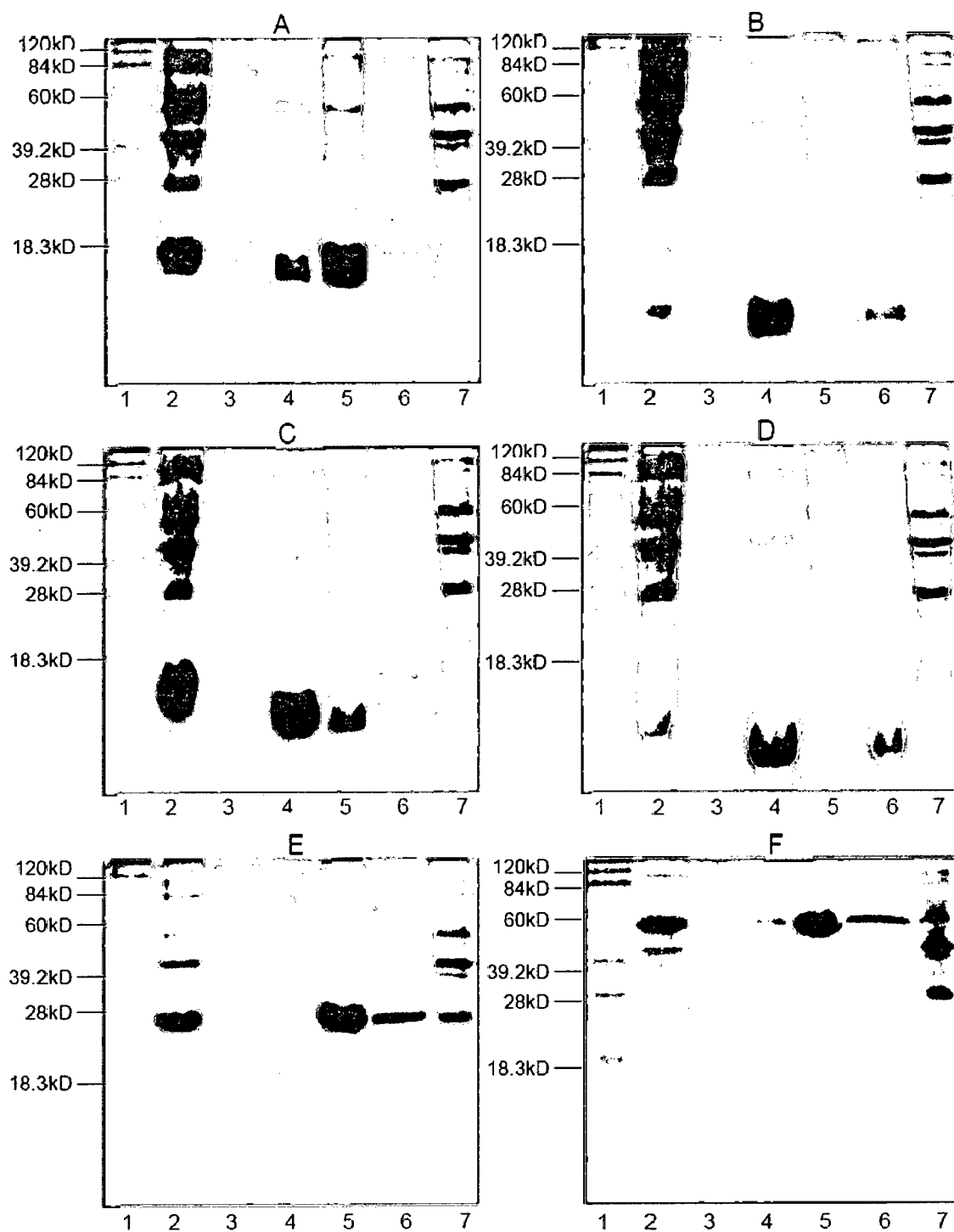


Fig. 2

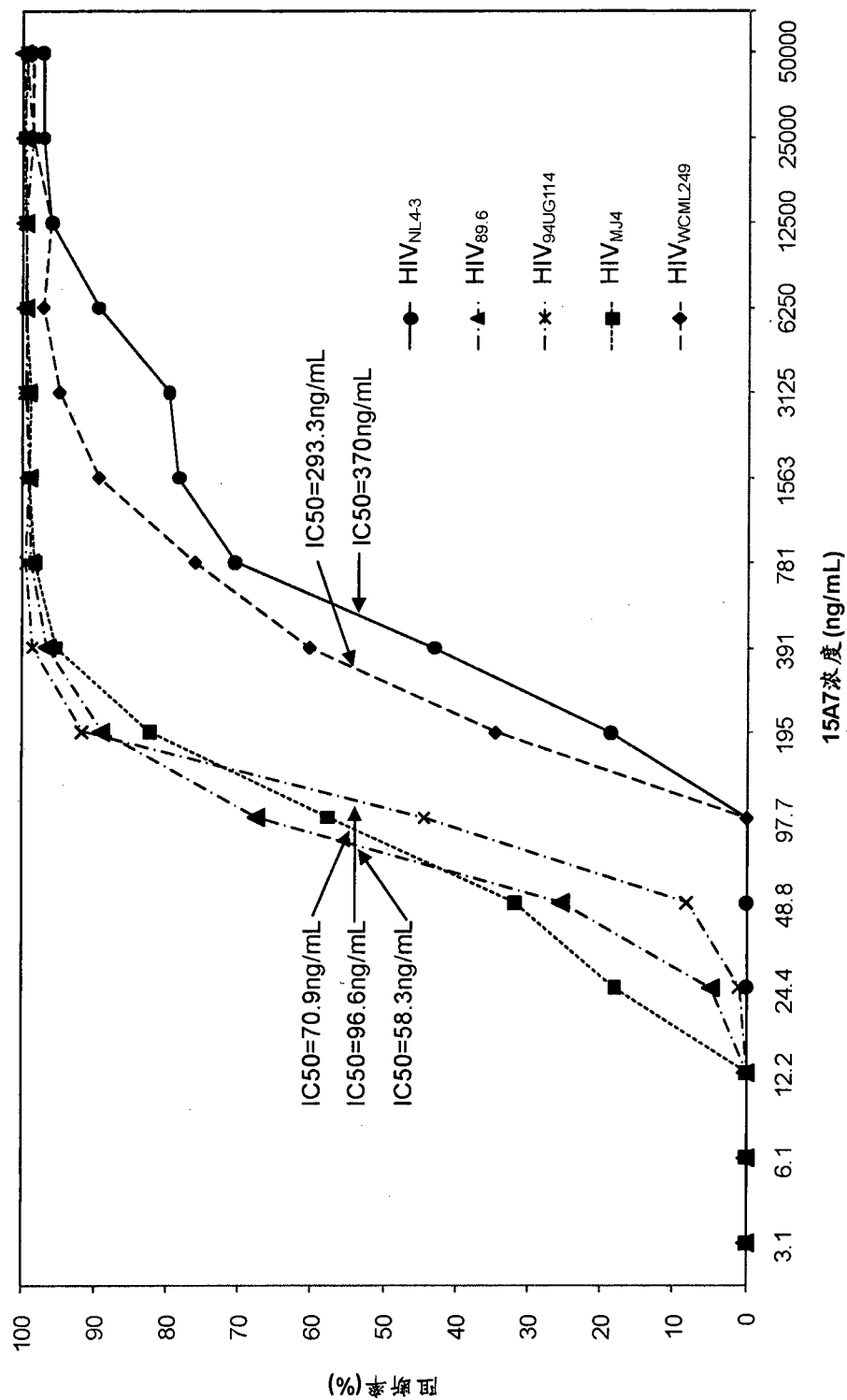


Fig. 3

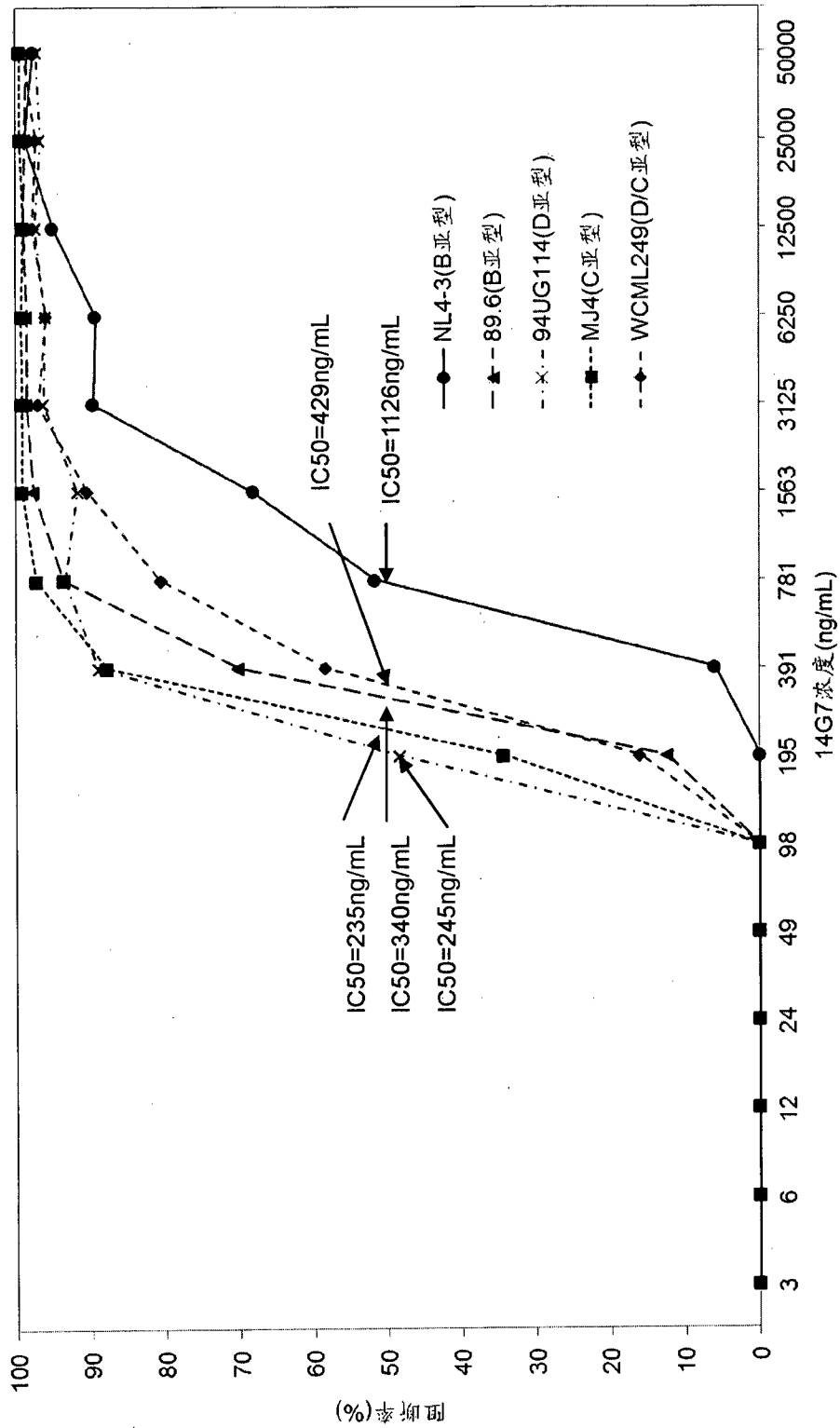
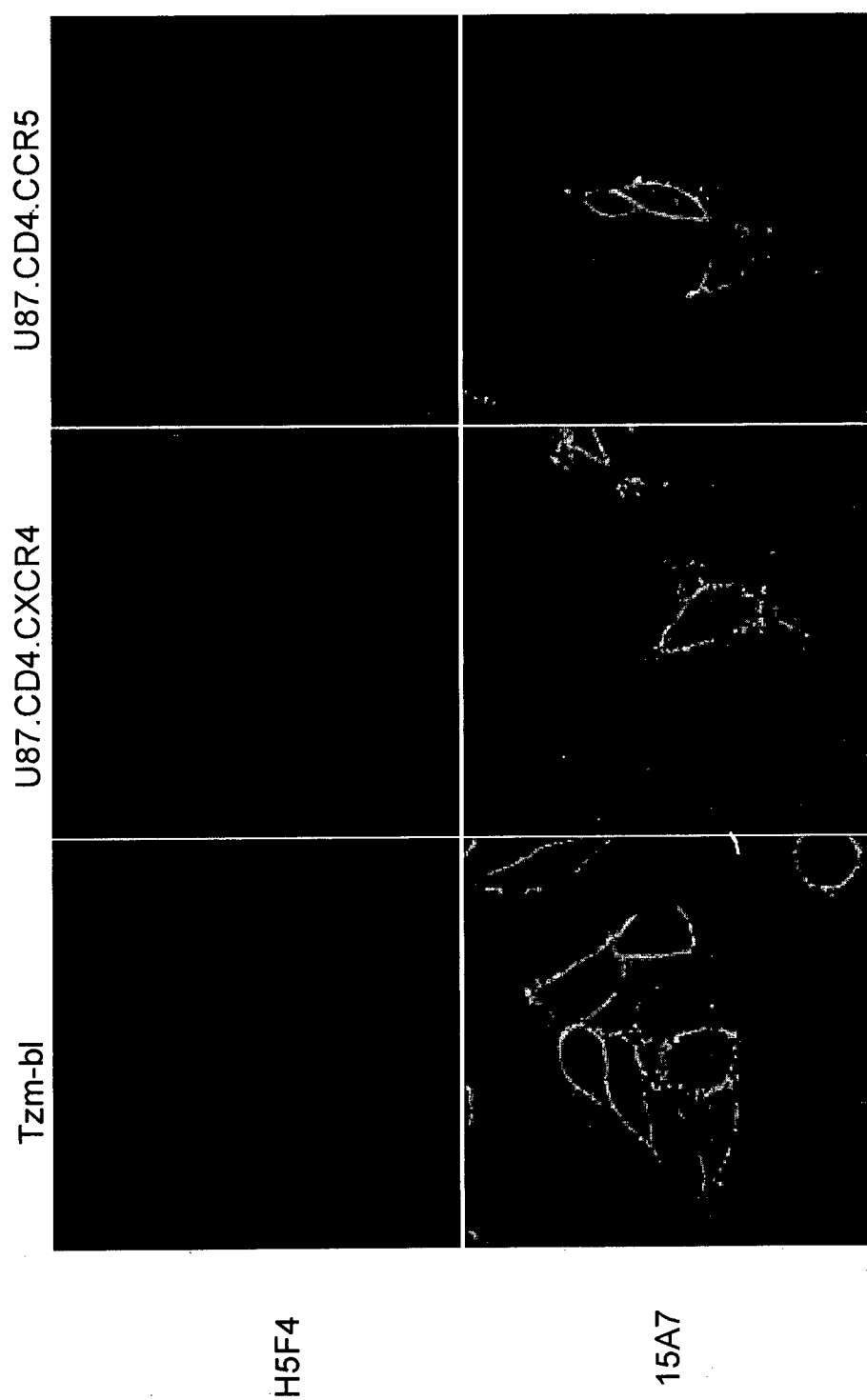


Fig. 4



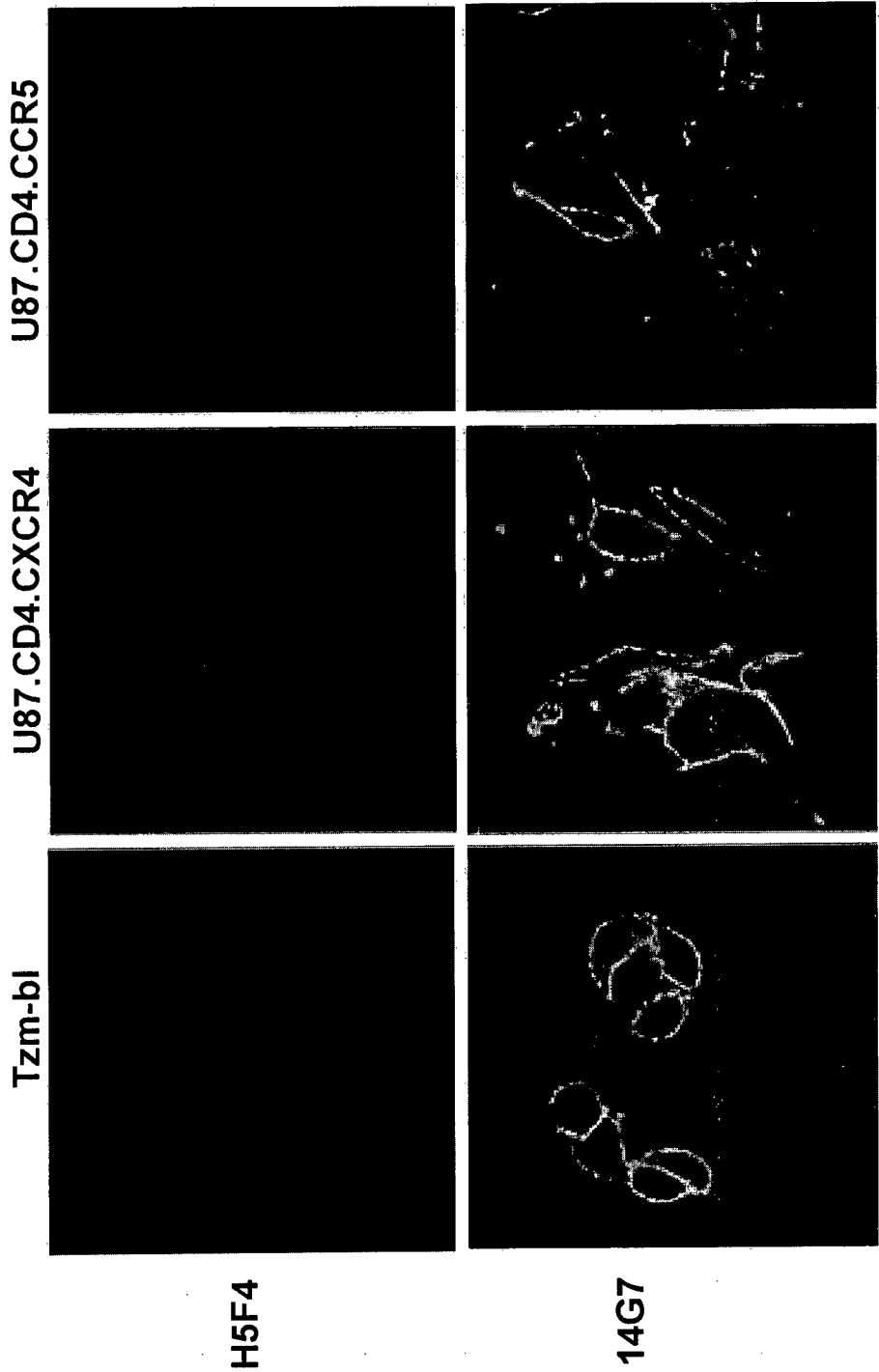


Fig. 6

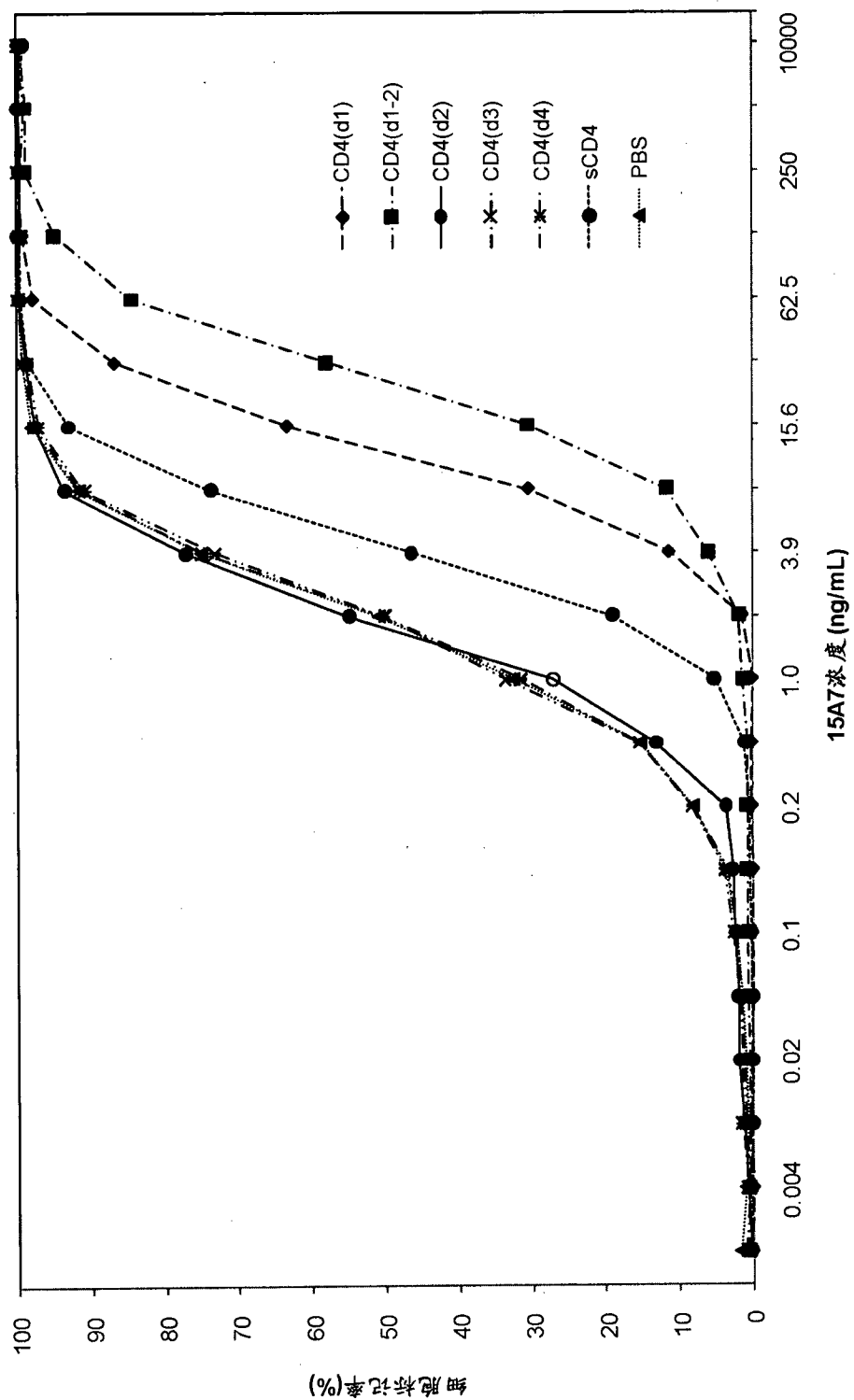


Fig. 7

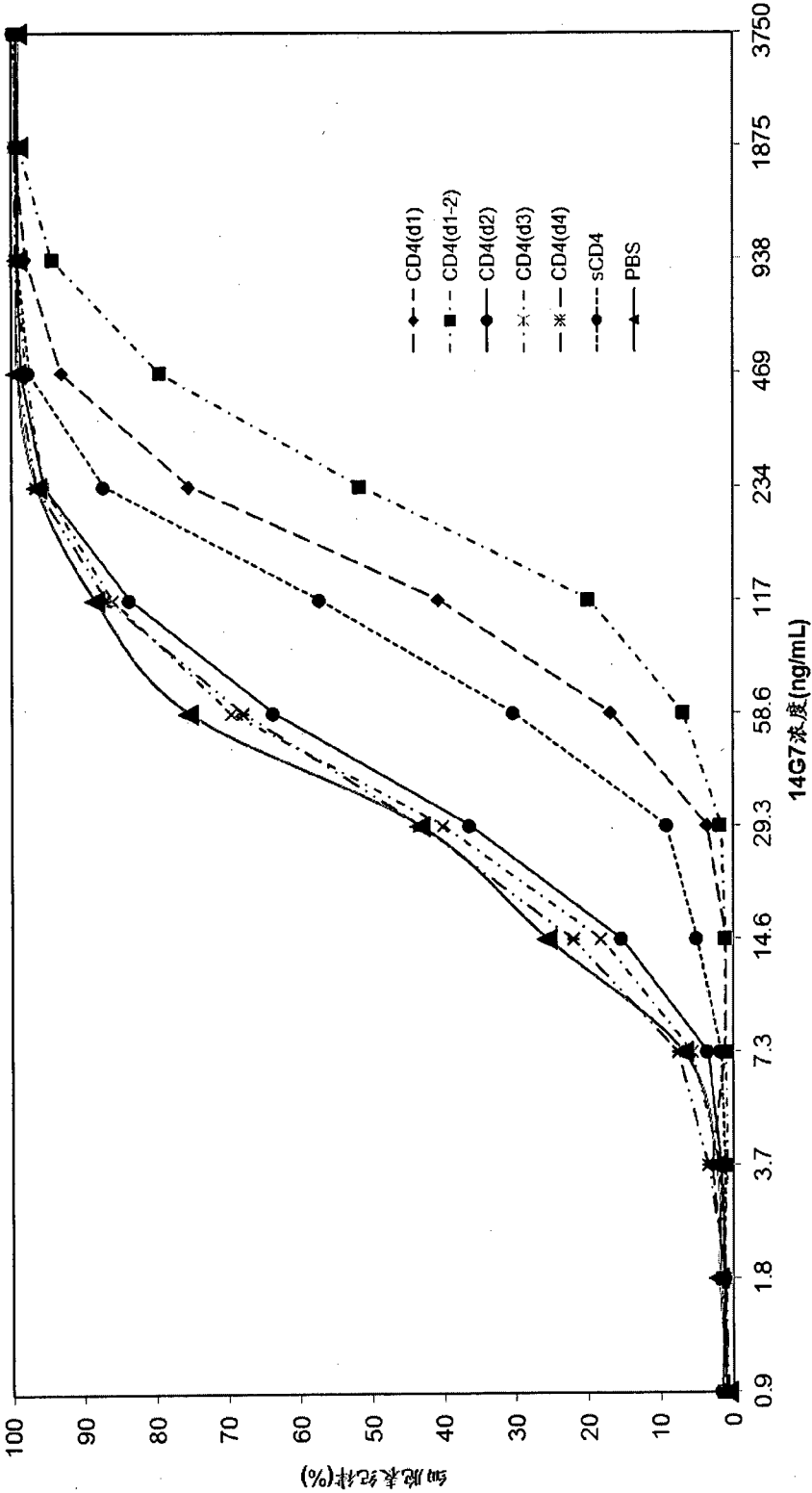


Fig. 8

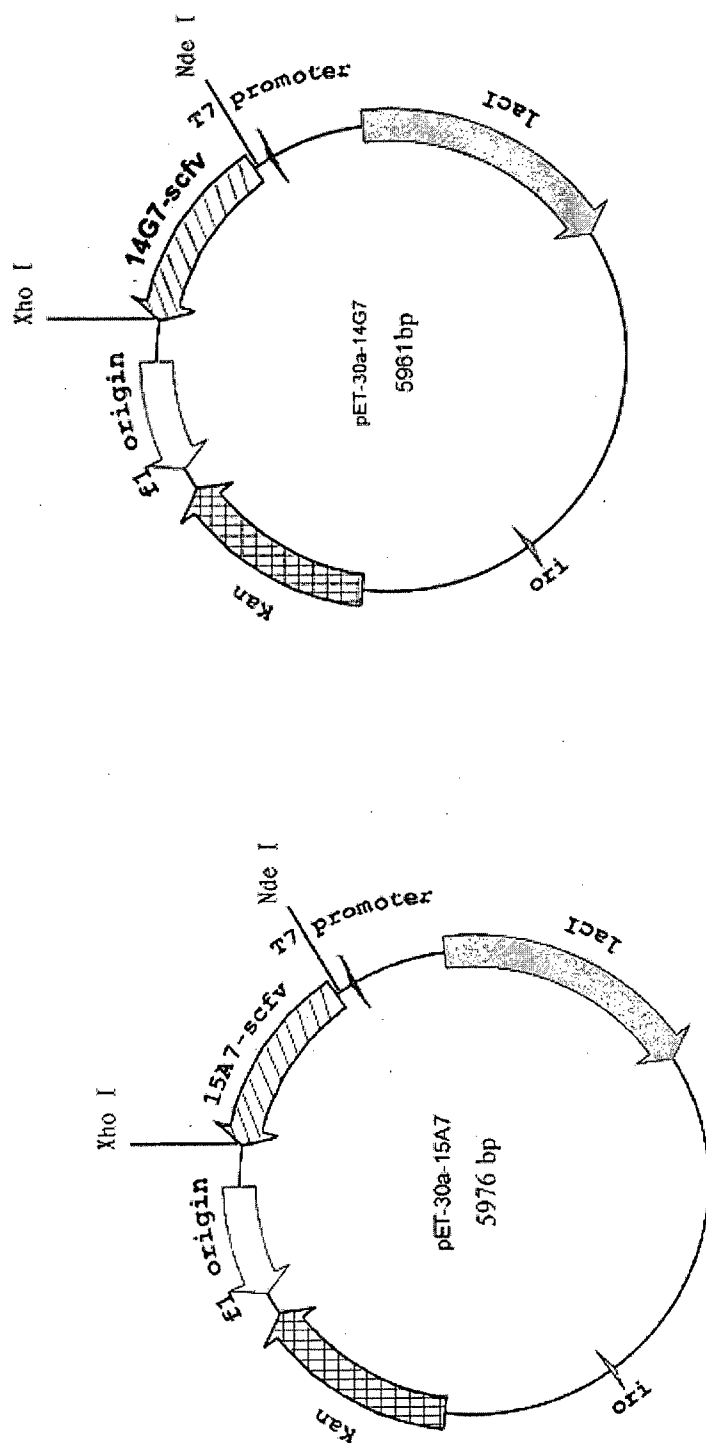
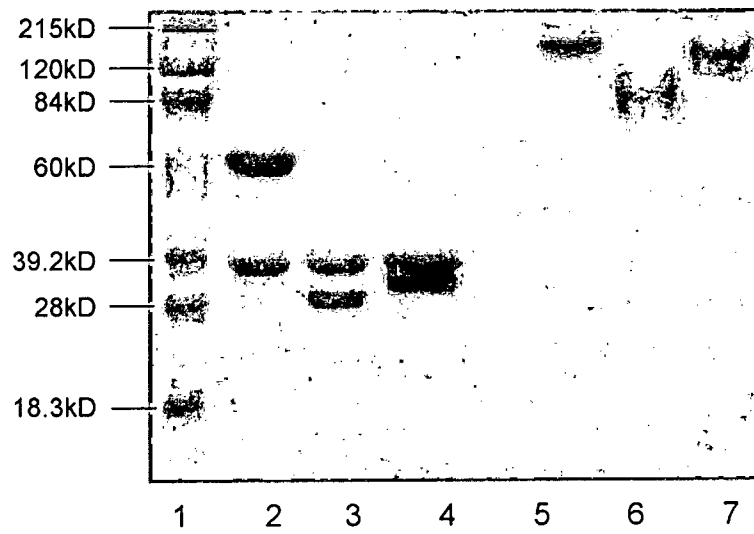


Fig. 9

**Fig. 10**

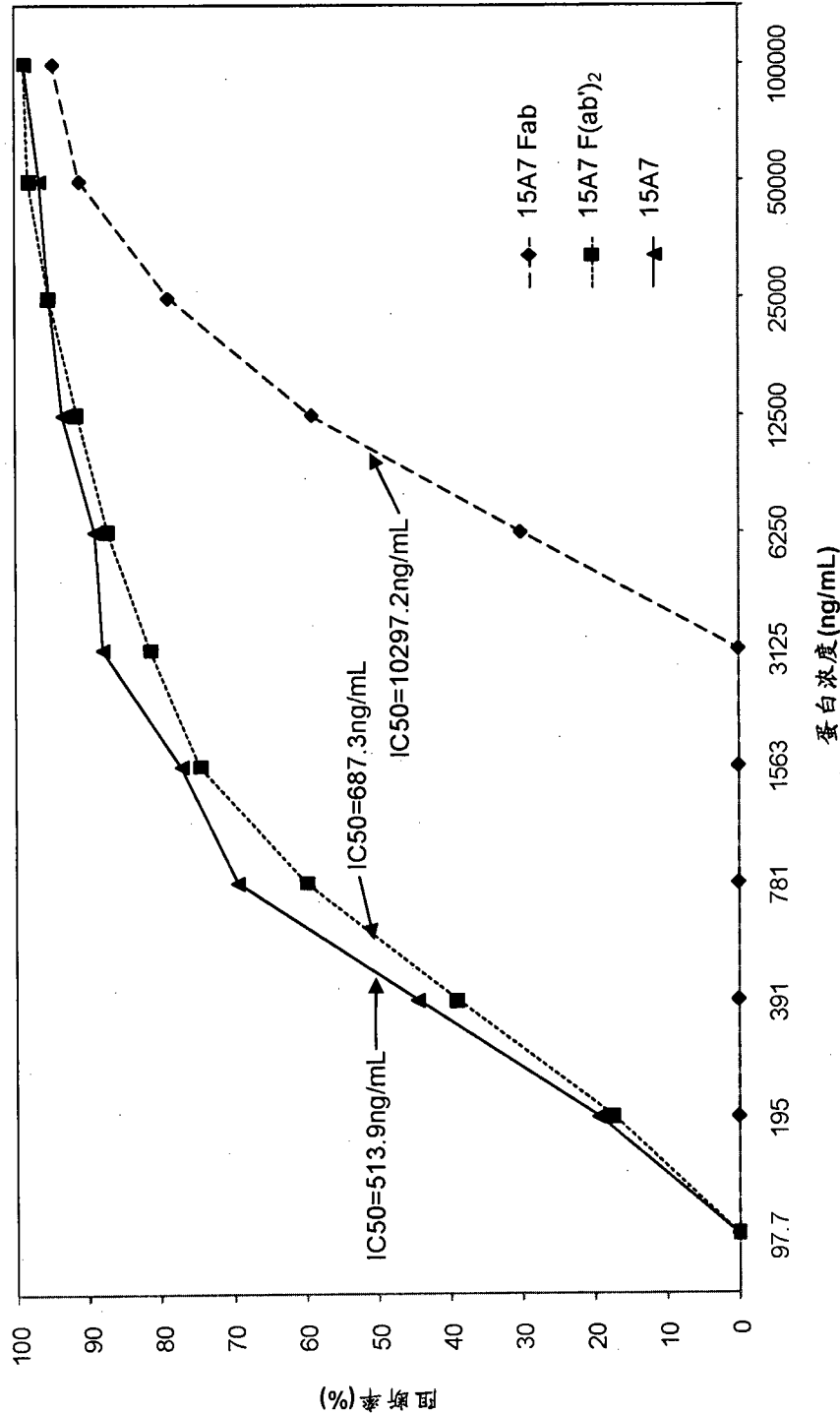


Fig. 11

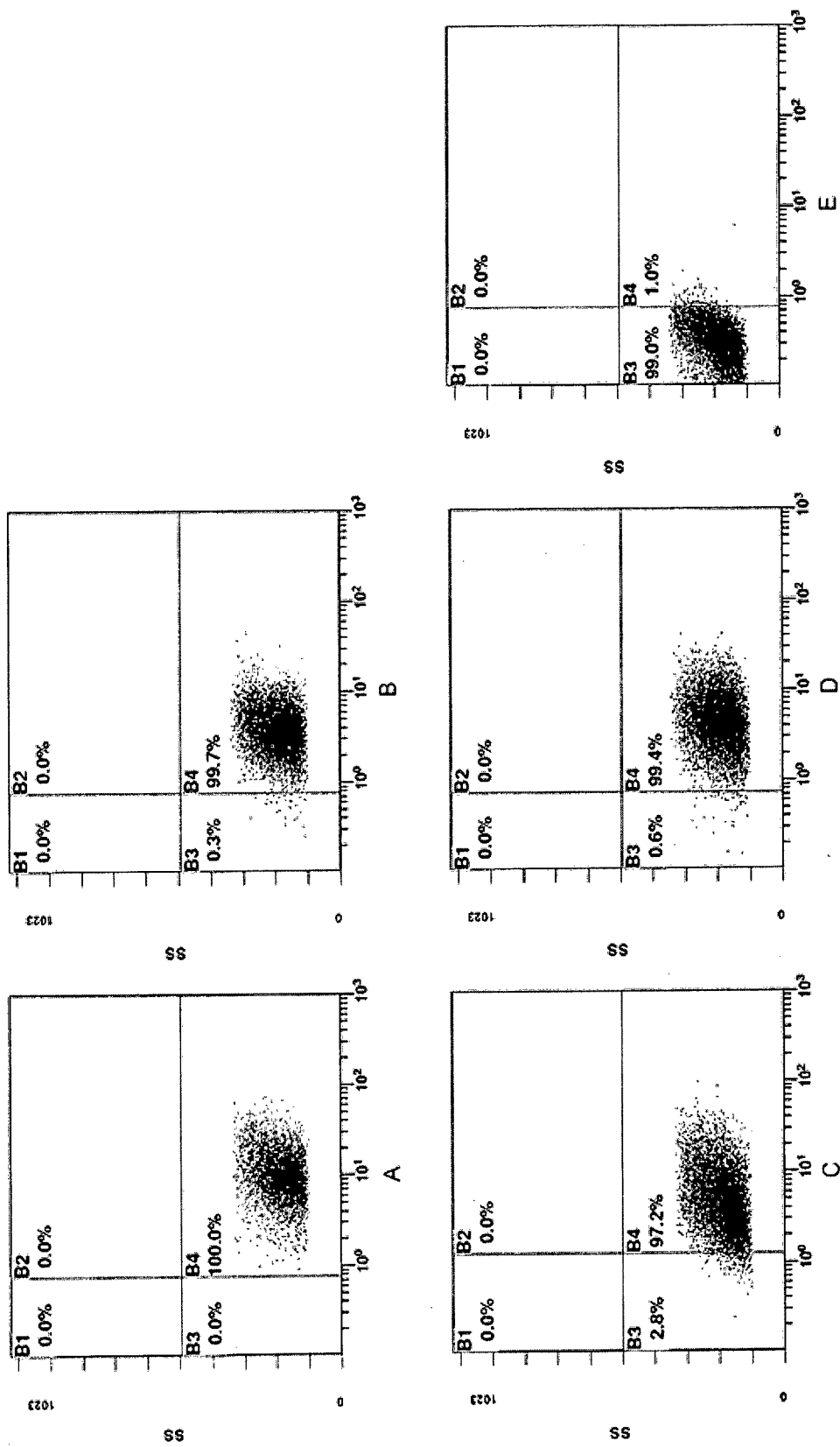


Fig. 12

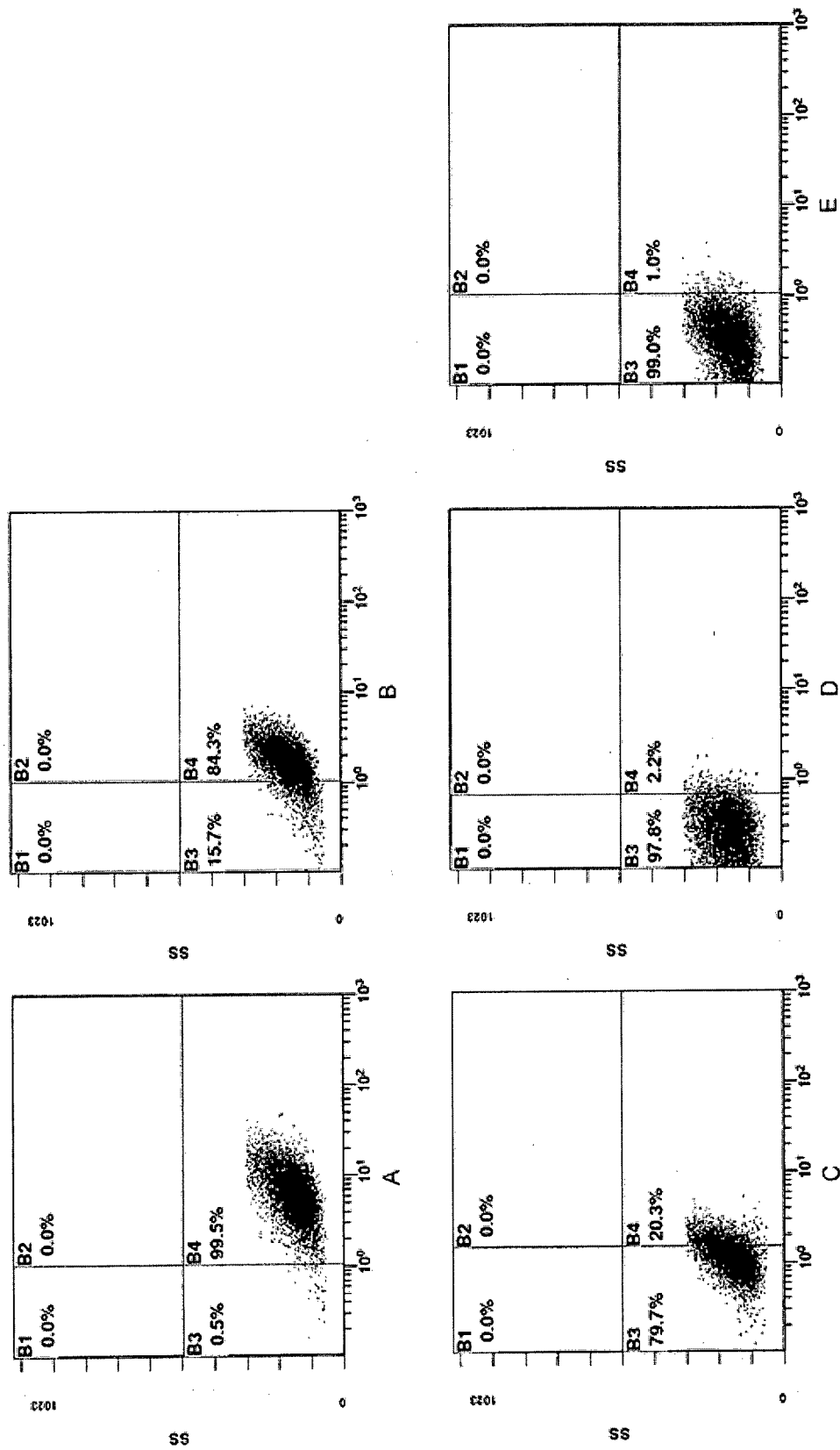


Fig. 13

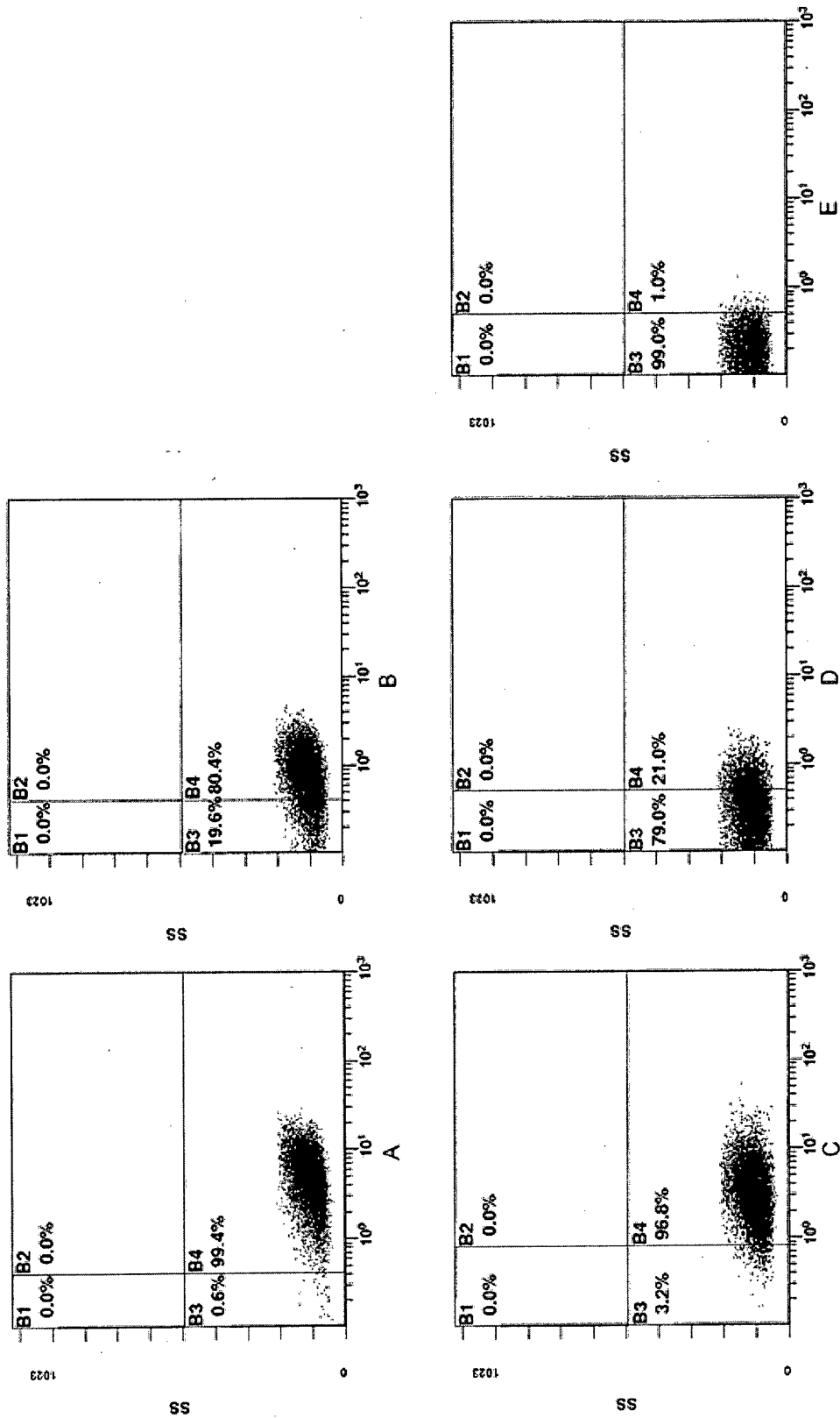


Fig. 14

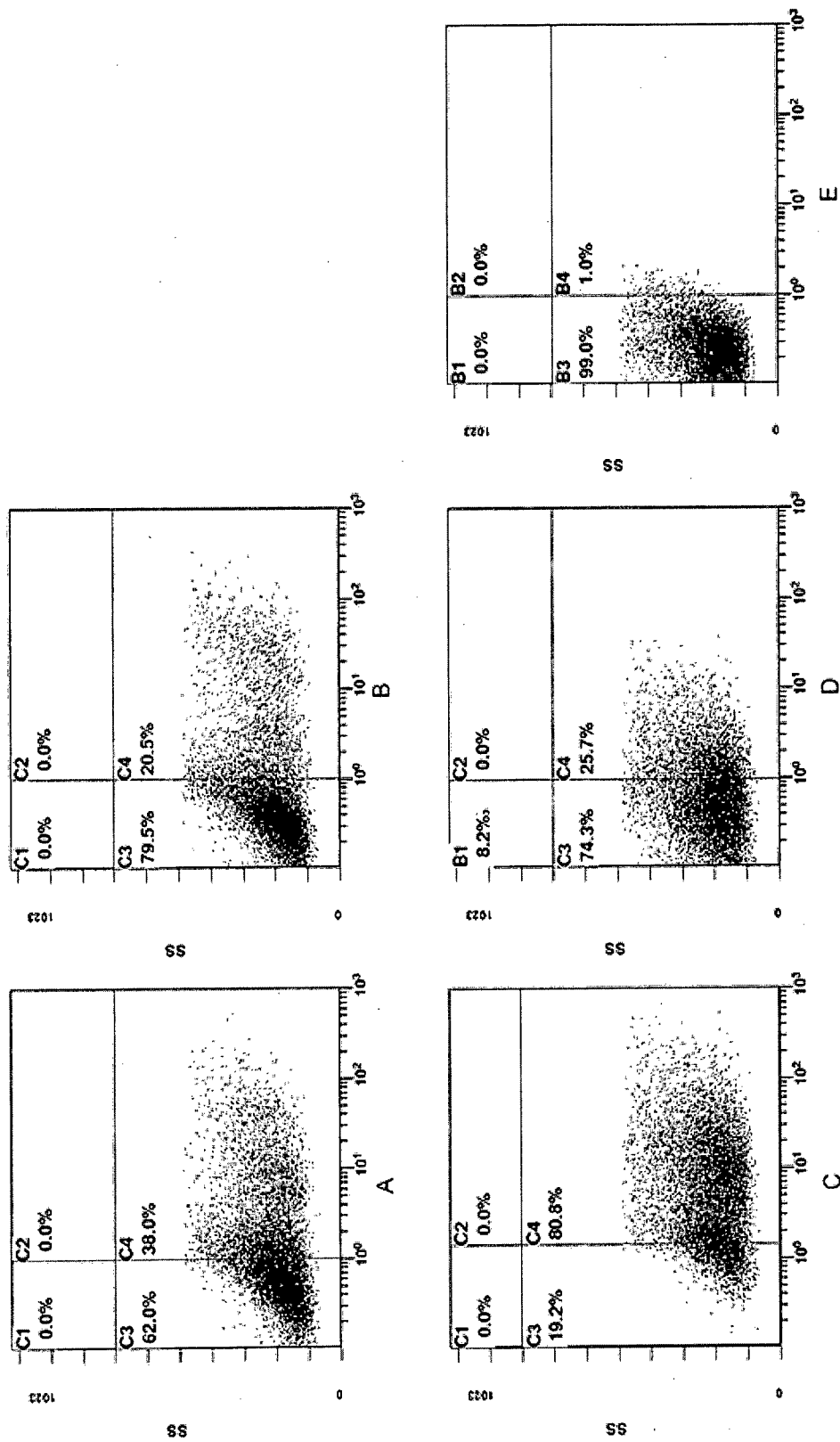


Fig. 15

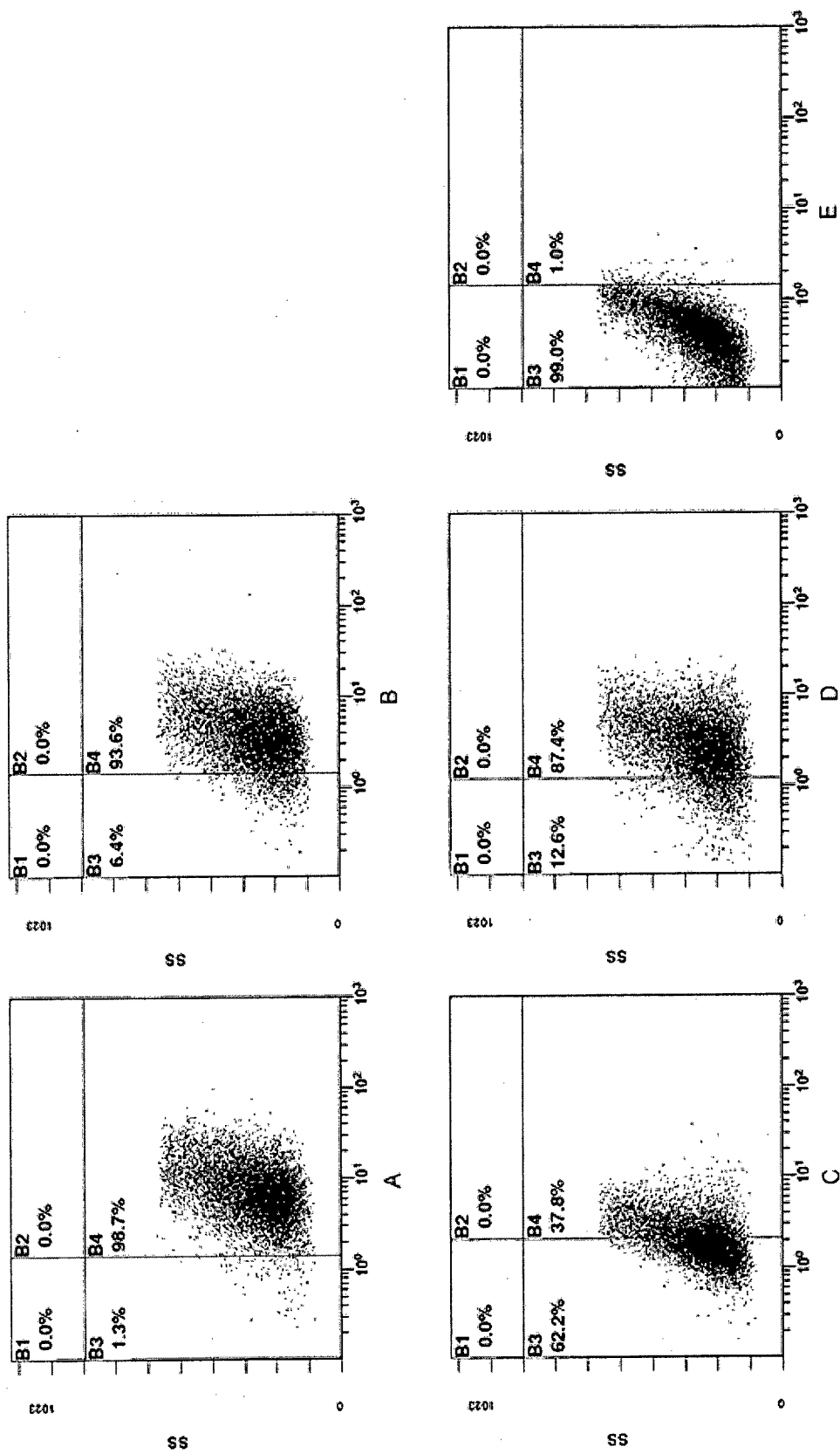


Fig. 16

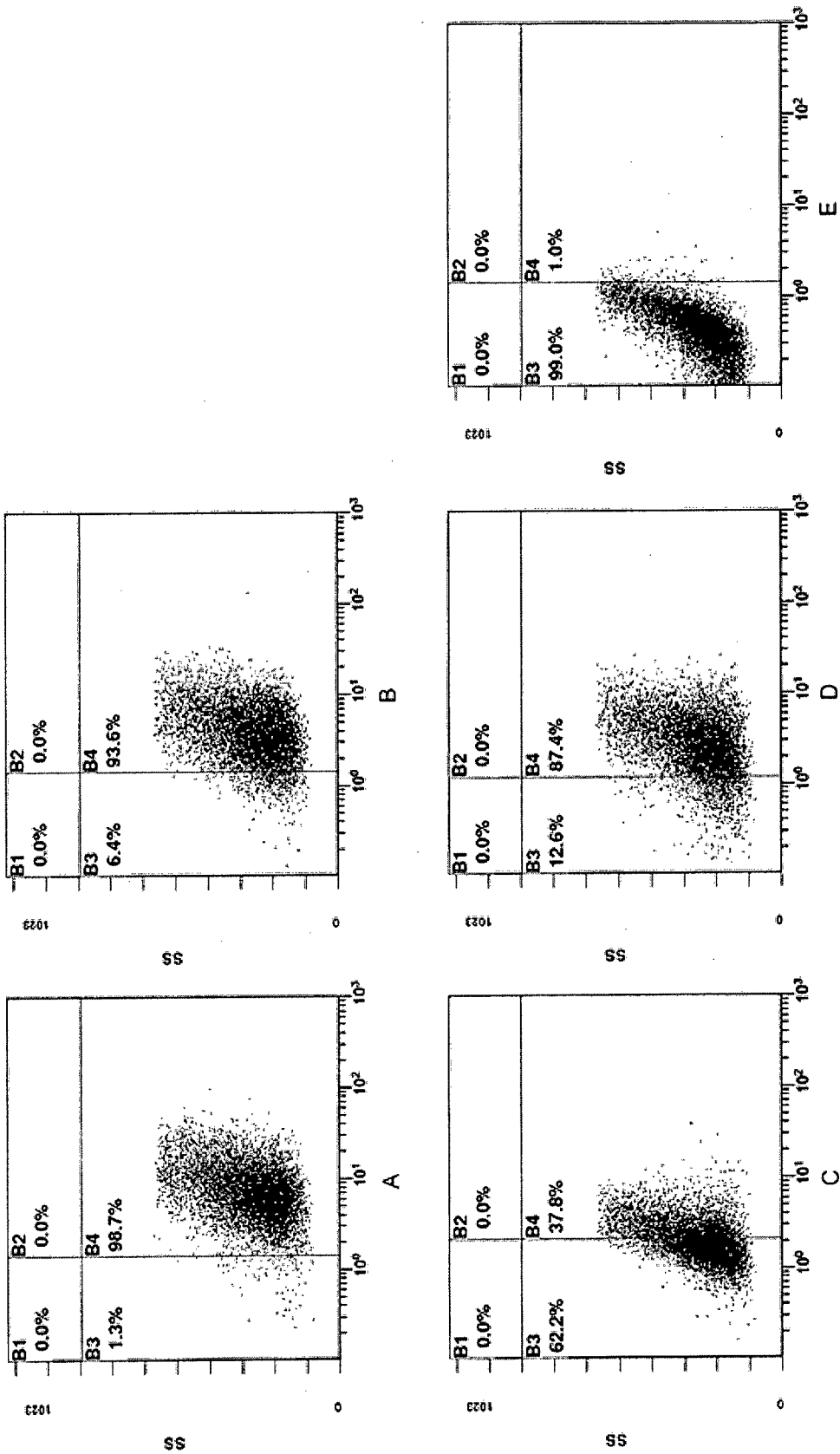


Fig. 17

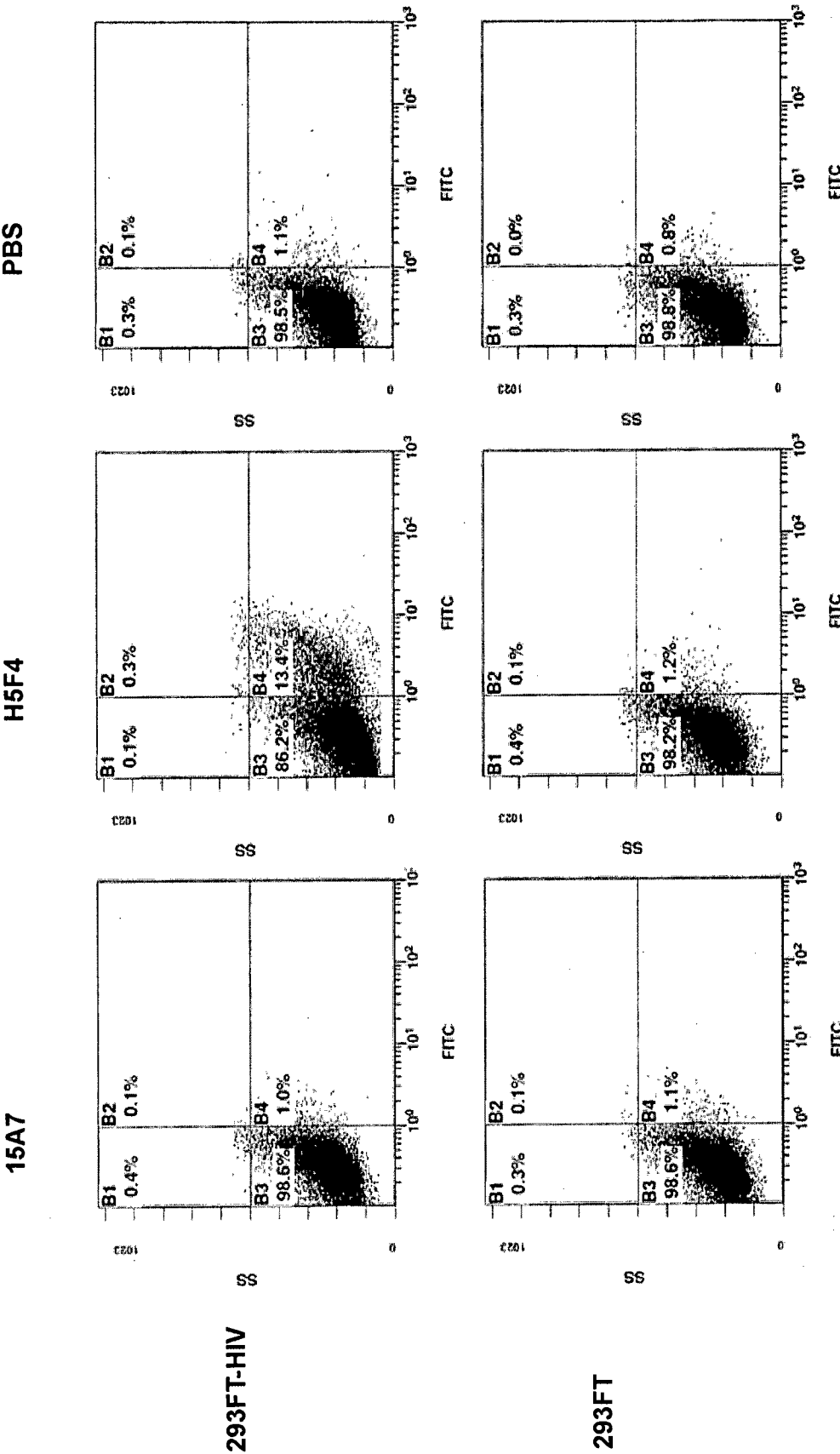


Fig. 18

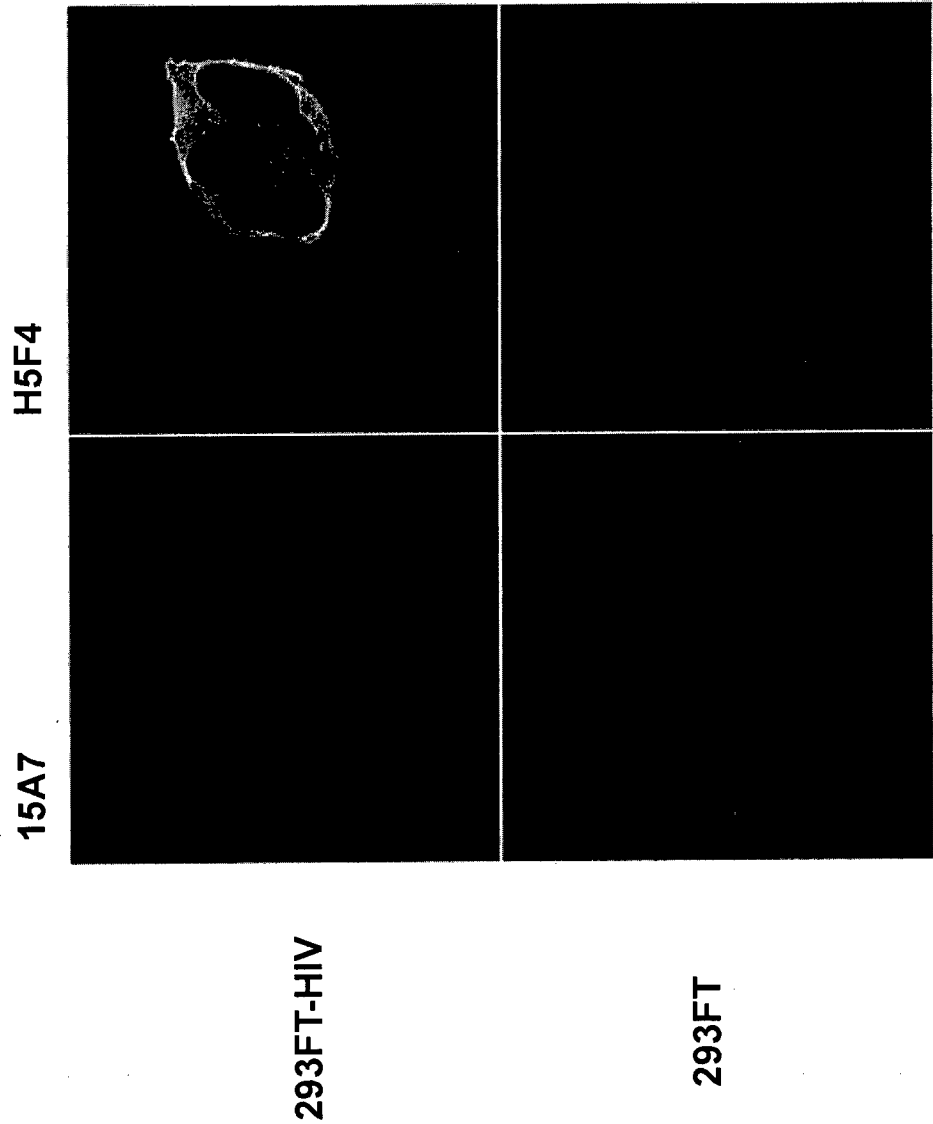


Fig. 19

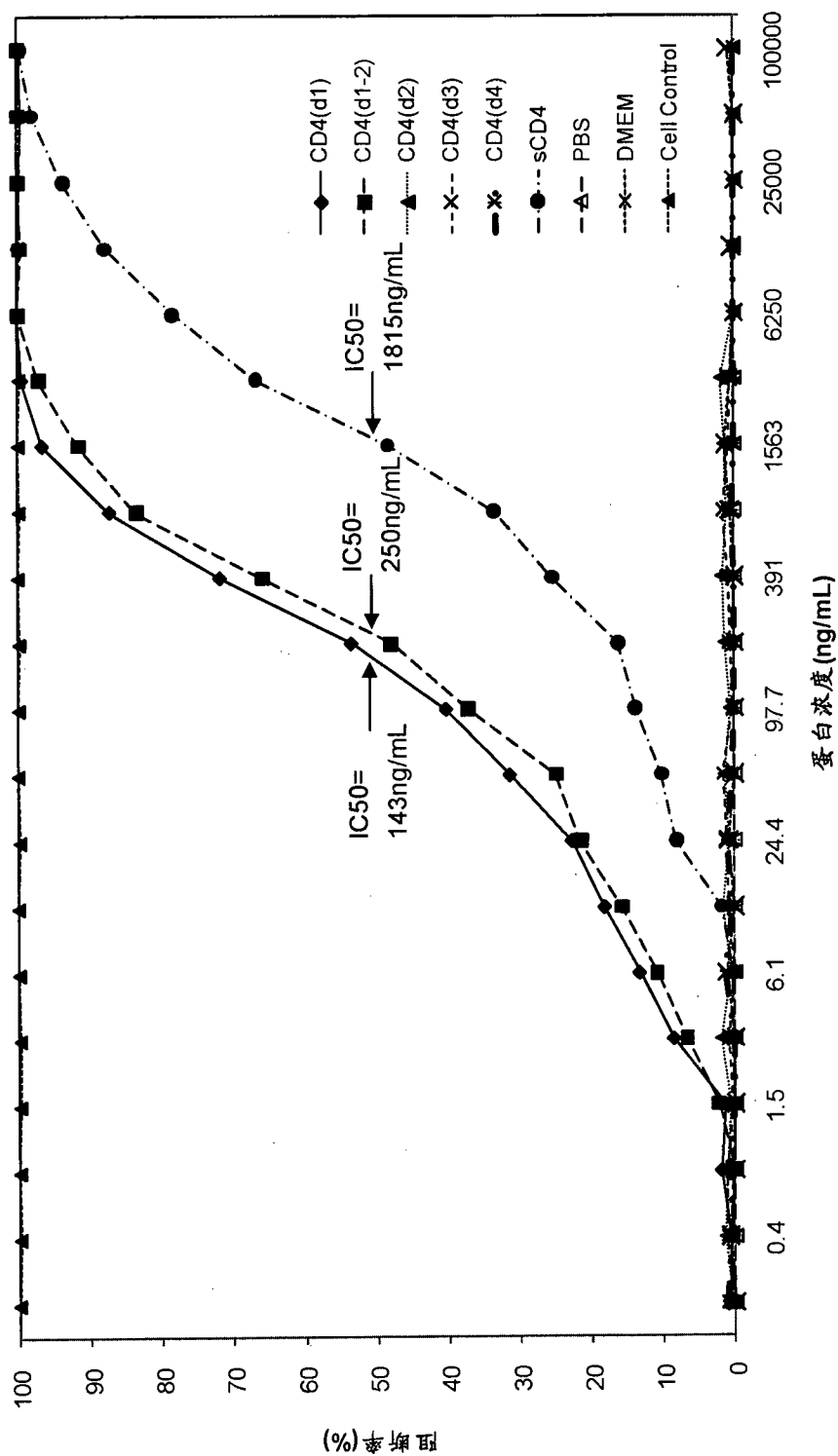


Fig. 20

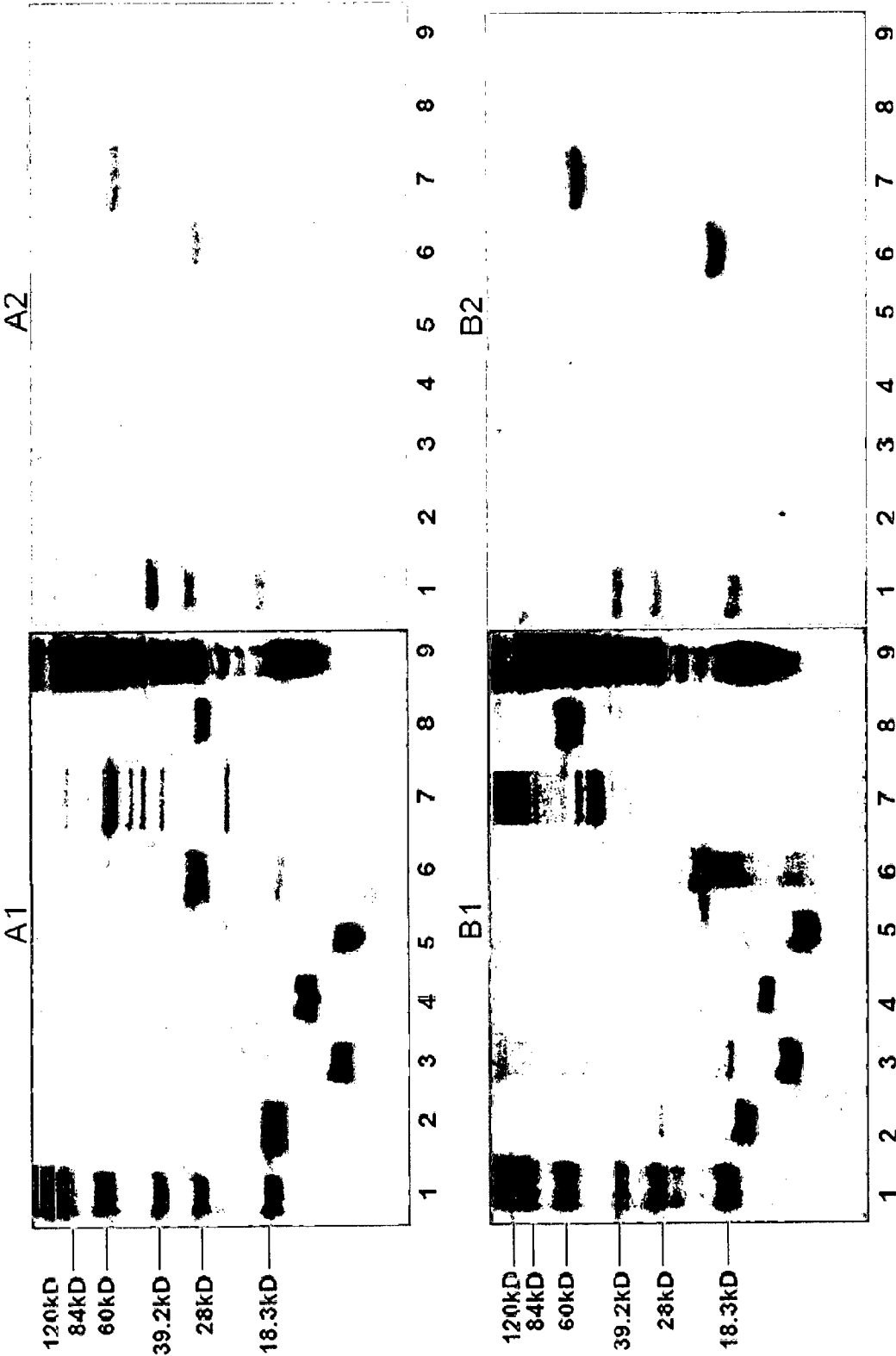


Fig. 21

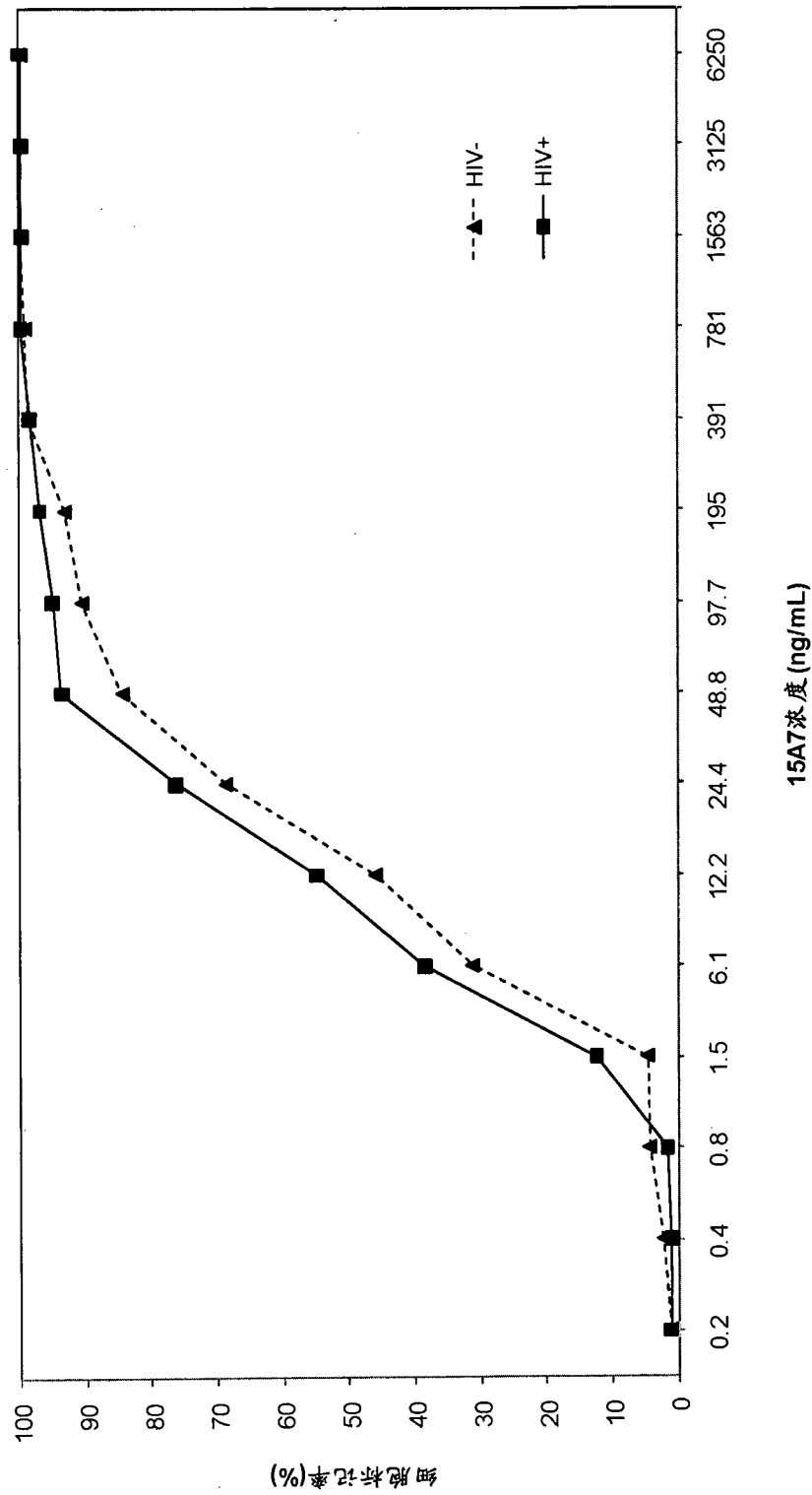


Fig. 22

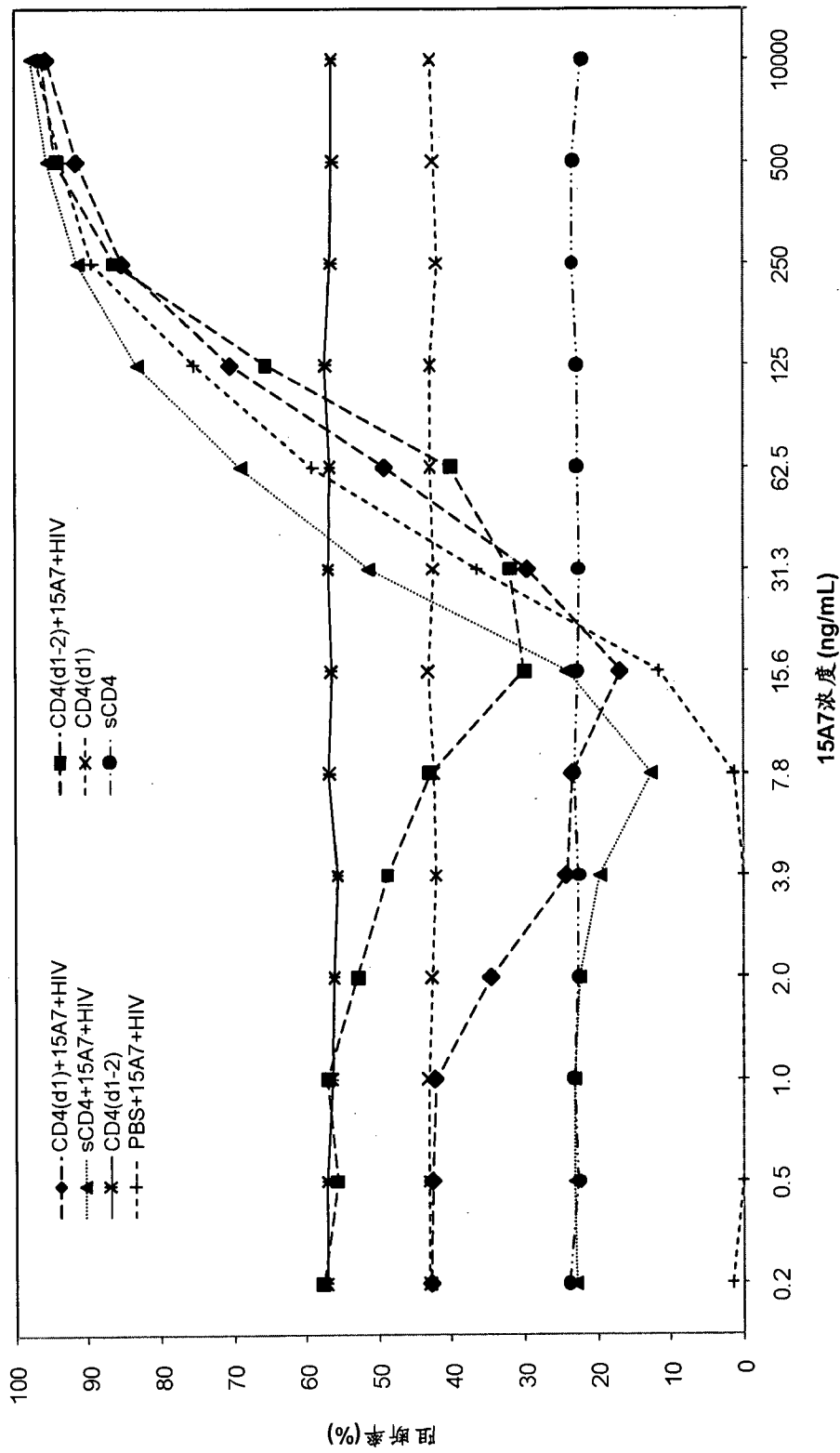
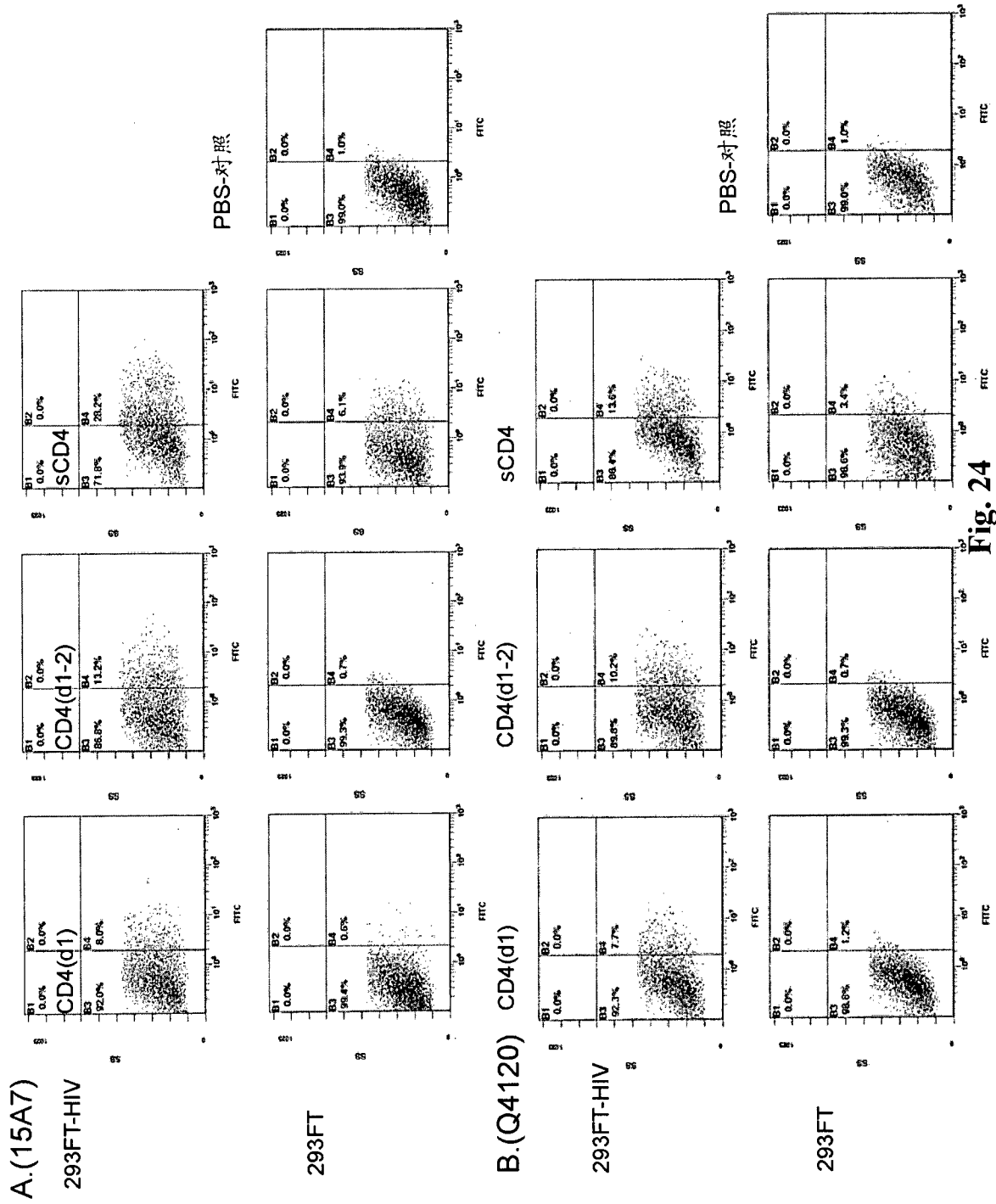


Fig. 23



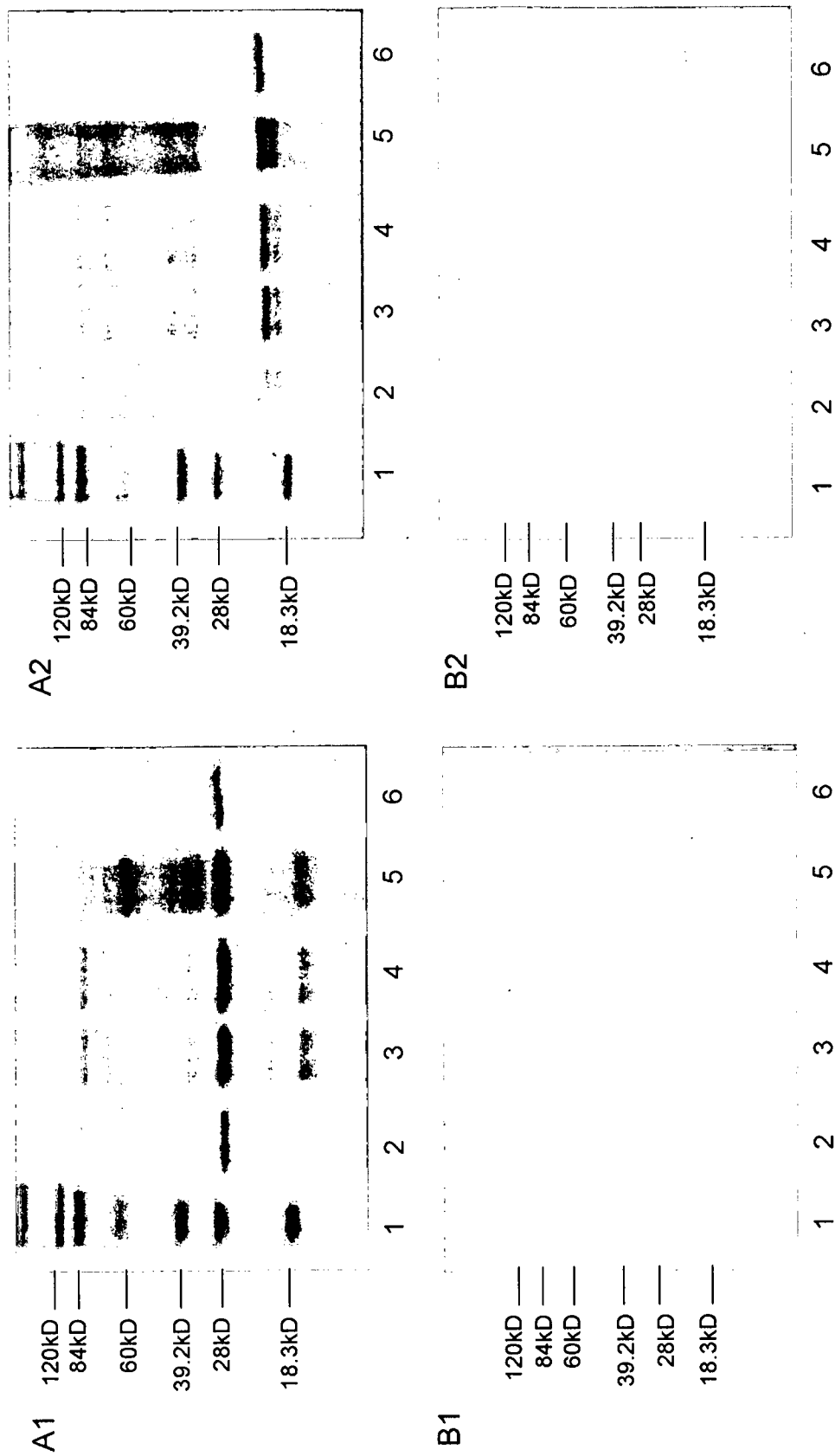


Fig. 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/071596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K; A61P; C07K; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI; CNPAT; WPI; EPODOC; CA; ELSEVIER; EMBASE and search terms: CD4, T4, antibody, immunoglobulin, HIV, AIDS, Immune Deficien+, glycoprotein, gp, etc.

GenBank; EMBL; STN; Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched sequence: SEQ ID NO: 1-32

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1227610 A (UNITED BIOMEDICAL INC), 01 Sep. 1999 (01.09.1999) abstract, claims 1, 3, 9-10, 15-18, 22-24, 38, 46, 48-55, description page 5, paragraph 1 ; page 17, paragraph 7; page 39, the last paragraph and page 41, paragraph 2	1-11, 13-14
X	CN 1121725 A (LAB UPSA), 01 May 1996 (01.05.1996) abstract, claims 9-11, description page 5, the last paragraph to page 4, paragraph 3	1-11, 13-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 Apr. 2012 (10.04.2012)

Date of mailing of the international search report
26 Apr. 2012 (26.04.2012)

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
YUE, Lixi
Telephone No. (86-10) 62411096

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/071596

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101255195 A (UNITED BIOMEDICAL INC), 03 Sep. 2008 (03.09.2008) abstract, description page 3, paragraph 2 to page 4, paragraph 2	1-11, 13-14
X	MOORE, J. P., et al., A monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4+ cells. J. Virol., Aug. 1992, Vol. 66, No. 8, pages 4784-4793 page 4784, abstract, page 4785, right column, the last paragraph, page 4792, left column, paragraph 2	1-11, 13-14
X	ZHANG, X. Q., et al., Synergistic in vitro antiretroviral activity of a humanized monoclonal anti-CD4 antibody (TNX-355) and Enfuvirtide (T-20). Antimicrob. Agents Chemother., Jun. 2006, Vol. 50, No. 6, pages 2231-2233 page 2231, left column, paragraph 1	1-11, 13-14
X	RIEBER, E. P., et al., The monoclonal CD4 antibody M-T413 inhibits cellular infection with human immunodeficiency virus after viral attachment to the cell membrane: An approach to postexposure prophylaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Nov. 1992, Vol. 89, No. 22, pages 10792-10796 page 10792, abstract, right column, paragraph 3	1-11, 13-14
X	BENKIRANE, M., et al., An antibody that binds the immunoglobulin CDR3-like region of the CD4 molecule inhibits provirus transcription in HIV-infected T cells. EMBO. J., 15 Dec.1993 (15.12.1993), Vol. 12, No. 13, pages 4909-4921 page 4909, abstract	1-11, 13-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/071596

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT—methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/071596

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1227610 A	01. 09.1999	WO9746697 A2	11. 12.1997
		AU3152997 A	05. 01.1998
		EP0910659 A2	28. 04.1999
		US5912176 A	15. 06.1999
		US5961976 A	05. 10.1999
		BR9709524 A	09. 05.2000
		JP2000511775 A	12. 09.2000
		MX9809686 A1	01. 10.1999
		MX210702 B	07. 10.2002
		EP0910659 B1	09. 08.2006
		DE69736474 E	21. 09.2006
		DE69736474 T2	18. 01.2007
		ES2270461 T3	01. 04.2007
		CA2256306 C	29. 03.2011
CN1121725 A	01. 05.1996	WO9424168 A1	27. 10.1994
		FR2704227 A1	28. 10.1994
		AU6681494 A	08. 11.1994
		FI954827 A	11. 10.1995
		EP0695312 A1	07. 02.1996
		CZ9502762 A3	12. 06.1996
		SK130395 A3	05. 06.1996
		HUT73392 A	29. 07.1996
		JPH08512287 A	24. 12.1996
CN101255195 A	03. 09.2008	US2004137000 A1	15. 07.2004
		WO2004064724 A2	05. 08.2004
		AU2003295440 A1	13. 08.2004
		EP1583558 A2	12. 10.2005
		TW200418879 A	01. 10.2004
		CN1738646 A	22. 02.2006
		INDELNP200503224E	29. 12.2006
		EP1583558 B1	09. 03.2011
		CN101293930 A	29. 10.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/071596

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CN101294159 A	29. 10.2008
		US7501494 B2	10. 03.2009
		CA2648056 A1	05. 08.2004
		CN100546652C	07. 10.2009
		TW200930728 A	16. 07.2009
		AU2003295440 B2	01. 04.2010
		CA2512040 C	01. 06.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/071596

Continuation of: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/06 (2006.01)i

C07K 16/28 (2006.01)i

C12N 15/06 (2006.01)i

C12N 15/13 (2006.01)i

A61K 39/395 (2006.01)i

A61P 31/18 (2006.01)i

C07K 16/46 (2006.01)n

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/071596

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K; A61P; C07K; C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI; CNPAT 和检索词: CD4, T4, 抗体, 免疫球蛋白, HIV, AIDS, 免疫缺陷, 艾滋, 爱滋等;

WPI; EPODOC; CA; ELSEVIER; EMBASE 和检索词: CD4, T4, HIV, AIDS, Immune Deficien+, glycoprotein, gp 等;

GENBANK; EMBL; STN; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: 序列 1-32

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 1227610 A (美国联合生物医学公司), 01.9 月 1999 (01.09.1999) 摘要, 权利要求 1、3、9、10、15-18、22-24、38、46、48-55, 说明书第 5 页第 1 段, 第 17 页第 7 段, 第 39 页倒数第 1 段, 第 41 页第 2 段	1-11, 13-14
X	CN 1121725 A (UPSA 实验室公司), 01.5 月 1996 (01.05.1996) 摘要, 权利要求 9-11, 说明书第 3 页倒数第 1 段至第 4 页第 3 段	1-11, 13-14

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

10.4 月 2012 (10.04.2012)

国际检索报告邮寄日期

26.4 月 2012 (26.04.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

岳礼溪

电话号码: (86-10) **62411096**

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101255195 A (美国联合生物医学公司), 03. 9 月 2008 (03.09.2008) 摘要, 说明书第 3 页第 2 段至第 4 页第 2 段	1-11, 13-14
X	Moore, J. P., 等. A monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4+ cells. J. Virol., 1992 年 8 月, 第 66 卷, 第 8 期, 第 4784-4793 页 第 4784 页摘要, 第 4785 页右栏倒数第 1 段, 第 4792 页左栏第 2 段	1-11, 13-14
X	Zhang, X. Q., 等. Synergistic In Vitro Antiretroviral Activity of a Humanized Monoclonal Anti-CD4 Antibody (TNX-355) and Enfuvirtide (T-20). Antimicrob. Agents Chemother., 2006 年 6 月, 第 50 卷, 第 6 期, 第 2231-2233 页 第 2231 页左栏第 1 段	1-11, 13-14
X	RIEBER, E. P., 等. The monoclonal CD4 antibody M-T413 inhibits cellular infection with human immunodeficiency virus after viral attachment to the cell membrane: An approach to postexposure prophylaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992 年 11 月, 第 89 卷, 第 22 期, 第 10792-10796 页 第 10792 页摘要、右栏第 3 段	1-11, 13-14
X	Benkirane, M., 等. An antibody that binds the immunoglobulin CDR3-like region of the CD4 molecule inhibits provirus transcription in HIV-infected T cells. EMBO. J., 15.12 月 1993 (15.12.1993), 第 12 卷, 第 13 期, 第 4909-4921 页 第 4909 页摘要	1-11, 13-14

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：12

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

PCT实施细则39.1(iv)——治疗人体或者动物体的外科手术或者疗法。

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，

具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/071596

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1227610 A	01. 09.1999	WO9746697 A2	11. 12.1997
		AU3152997 A	05. 01.1998
		EP0910659 A2	28. 04.1999
		US5912176 A	15. 06.1999
		US5961976 A	05. 10.1999
		BR9709524 A	09. 05.2000
		JP2000511775 A	12. 09.2000
		MX9809686 A1	01. 10.1999
		MX210702 B	07. 10.2002
		EP0910659 B1	09. 08.2006
		DE69736474 E	21. 09.2006
		DE69736474 T2	18. 01.2007
		ES2270461 T3	01. 04.2007
		CA2256306 C	29. 03.2011
CN1121725 A	01. 05.1996	WO9424168 A1	27. 10.1994
		FR2704227 A1	28. 10.1994
		AU6681494 A	08. 11.1994
		FI954827 A	11. 10.1995
		EP0695312 A1	07. 02.1996
		CZ9502762 A3	12. 06.1996
		SK130395 A3	05. 06.1996
		HUT73392 A	29. 07.1996
		JPH08512287 A	24. 12.1996
CN101255195 A	03. 09.2008	US2004137000 A1	15. 07.2004
		WO2004064724 A2	05. 08.2004
		AU2003295440 A1	13. 08.2004
		EP1583558 A2	12. 10.2005
		TW200418879 A	01. 10.2004
		CN1738646 A	22. 02.2006
		INDELNP200503224E	29. 12.2006
		EP1583558 B1	09. 03.2011
		CN101293930 A	29. 10.2008
		CN101294159 A	29. 10.2008
		US7501494 B2	10. 03.2009
		CA2648056 A1	05. 08.2004
		CN100546652C	07. 10.2009

关于同族专利的信息

PCT/CN2012/071596

续：A.主题的分类

C07K 16/06 (2006.01) i

C07K 16/28 (2006.01) i

C12N 15/06 (2006.01) i

C12N 15/13 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61P 31/18 (2006.01) i

C07K 16/46 (2006.01) i