I695720

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I695720 B**

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：104130548　(22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 09 月 16 日

(51)Int. Cl.：　*A61K39/395 (2006.01)*　*C07K16/28 (2006.01)*

C07K16/46 (2006.01)　*A61P31/18 (2006.01)*

(30)優先權：2014/09/16　美國　62/051,200

2014/11/11　世界智慧財產權組織　PCT/US14/65048

(71)申請人：美國聯合生物醫學公司 (美國) UNITED BIOMEDICAL, INC., UBI　(US)

美國

(72)發明人：王　長怡 WANG, CHANG-YI (US)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

EP　1034790A2　US　2009/0053320A1

US　2009/0060914A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：24 項　圖式數：28　共 239 頁

(54)名稱

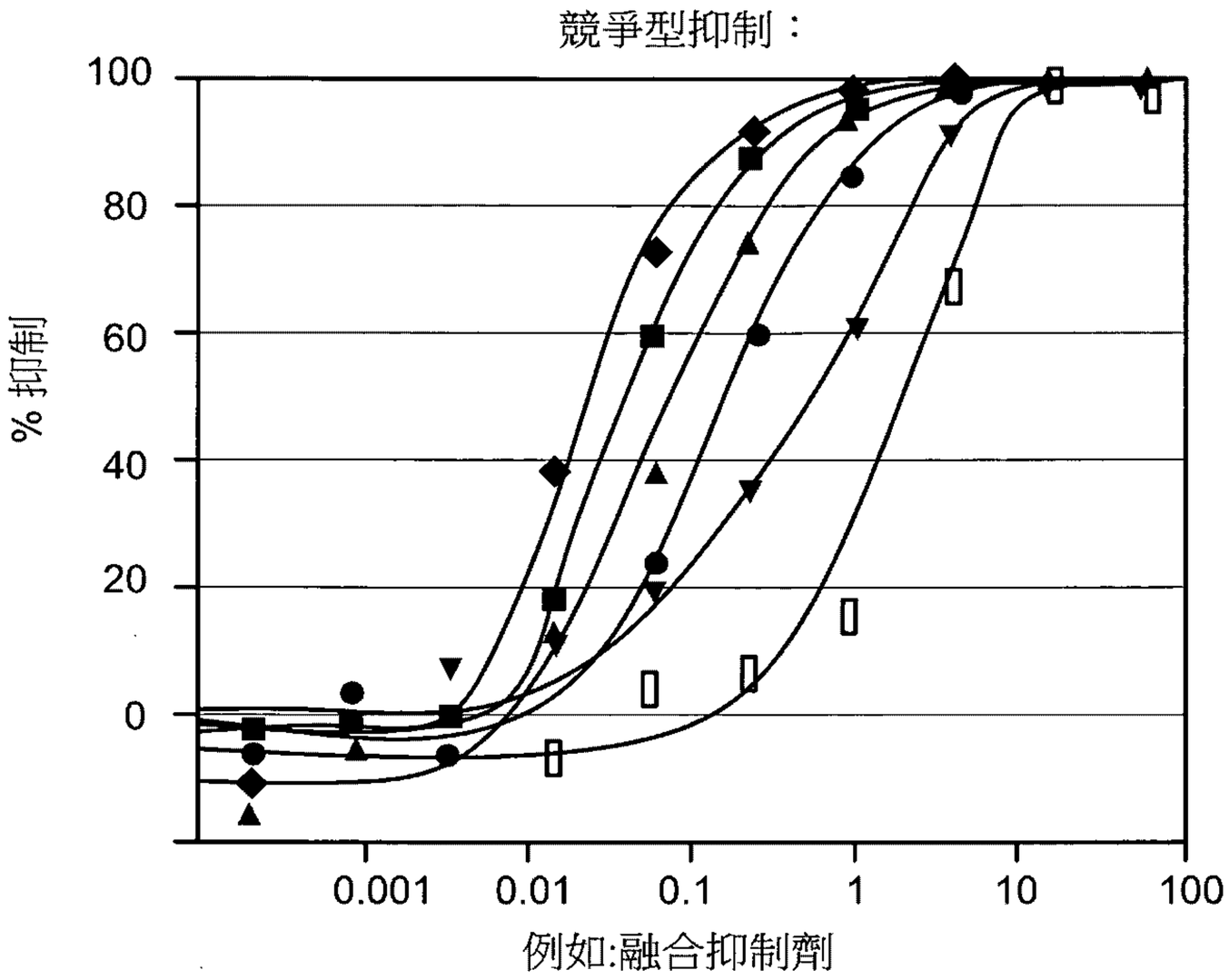
藉由針對ＣＤ４之單株抗體調停競爭型ＨＩＶ進入抑制之ＨＩＶ感染的治療和功能性治癒

(57)摘要

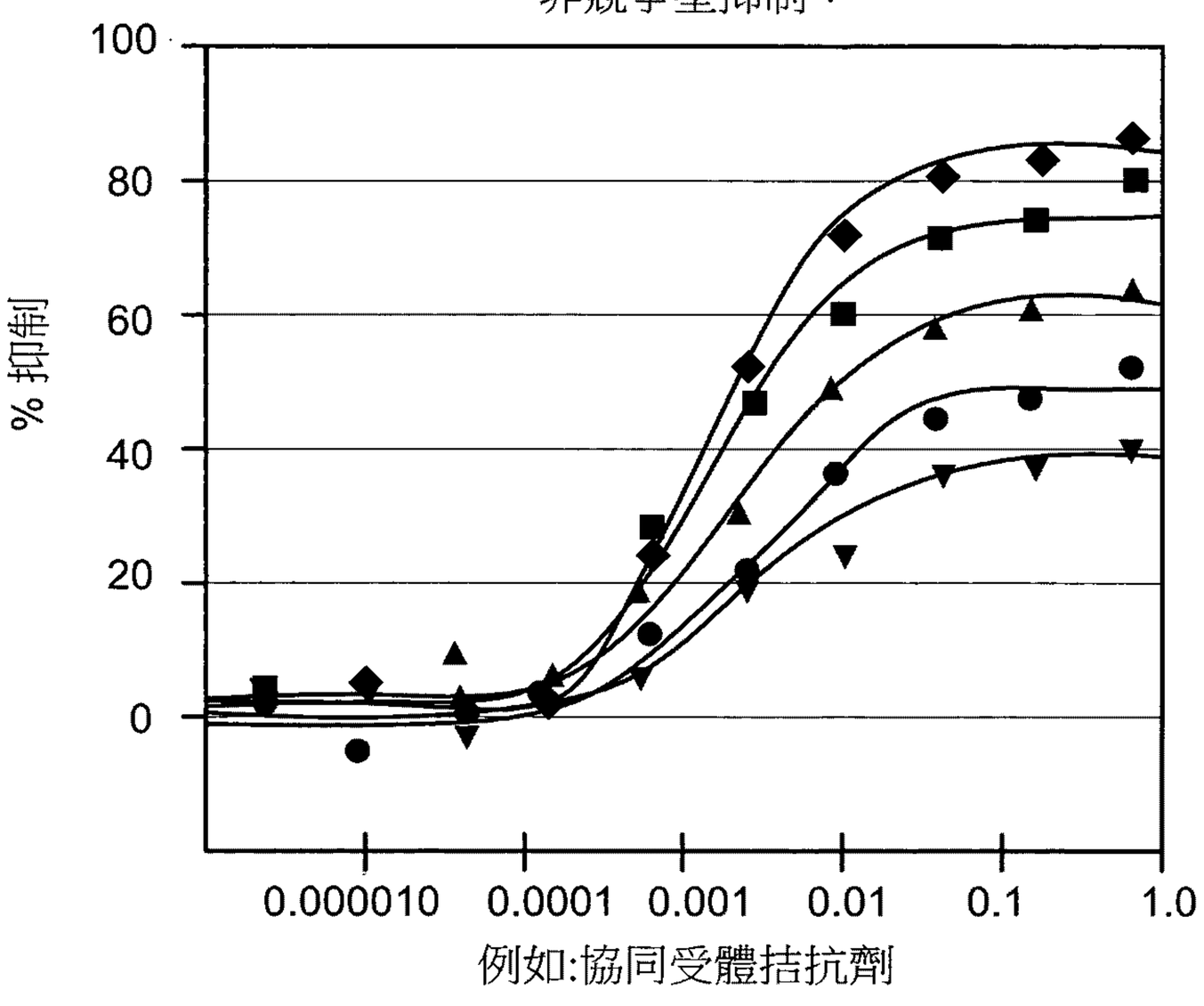
本發明有關於用以預防、治療，及/或功能性治癒 HIV 感染的組成物和方法。本發明之一範疇是關於針對 CD4 之單株抗體、其組成物，以及使用此組成物以預防、治療，和功能性治癒 HIV 感染的方法。

The present disclosure is directed to compositions and methods for the prevention, treatment, and/or functional cure of HIV infection. One aspect of the present disclosure relates to monoclonal antibodies directed against CD4, compositions thereof, and methods employing such compositions for the prevention, treatment, and functional cure of HIV infection.

指定代表圖：


競爭型抑制：
100
80
60
40
20
0
% 抑制
0.001
0.01
0.1
1
10
100
例如:融合抑制劑

第 1A 圖


非競爭型抑制：
100
80
60
40
20
0
% 抑制
0.000010
0.0001
0.001
0.01
0.1
1.0
例如:協同受體拮抗劑

第 1B 圖

公告本

I695720

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：　　※IPC 分類：

【發明名稱】 藉由針對CD4之單株抗體調停競爭型HIV進入抑制之HIV感染的治療和功能性治癒

TREATMENT AND FUNCTIONAL CURE OF HIV INFECTION BY MONOCLONAL ANTIBODIES TO CD4 MEDIATING COMPETITIVE HIV ENTRY INHIBITION

【中文】

本發明有關於用以預防、治療，及/或功能性治癒HIV感染的組成物和方法。本發明之一範疇是關於針對CD4之單株抗體、其組成物，以及使用此組成物以預防、治療，和功能性治癒HIV感染的方法。

【英文】

The present disclosure is directed to compositions and methods for the prevention, treatment, and/or functional cure of HIV infection. One aspect of the present disclosure relates to monoclonal antibodies directed against CD4, compositions thereof, and methods employing such compositions for the prevention, treatment, and functional cure of HIV infection.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（　　1　　）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無 。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無 。

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】藉由針對CD4之單株抗體調停競爭型HIV進入抑制之HIV感染的治療和功能性治癒

TREATMENT AND FUNCTIONAL CURE OF HIV INFECTION BY MONOCLONAL ANTIBODIES TO CD4 MEDIATING COMPETITIVE HIV ENTRY INHIBITION

【技術領域】

【0001】 本發明是關於針對 CD4 之單株抗體調停競爭型 HIV 進入抑制、其組成物，以及使用此組成物治療和功能性治癒 HIV 感染的方法。

【先前技術】

【0002】 後天免疫缺乏症候群(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)是一種由人類免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)所引起之人類免疫系統的疾病(http://en.wikipedia.org/wiki/HIV/AIDS)。基因研究指出 HIV 於十九世紀晚期或二十世紀早期起源於非洲中西部。AIDS 最早是於 1981 年由美國疾病控制與預防中心所辨識，且其原因，HIV，在 1980 年代初被鑑別。由於疫情的開始，已有超過 70 萬人感染 HIV，且已有 35 萬人死於 AIDS。在全球，截至 2011 年底已有 34.0 萬人感染 HIV (http://www.who.int/gho/hiv/en/)。

【0003】 HIV 感染逐漸地降低免疫系統的效力，且使個體容易受到伺機性感染和產生腫瘤。HIV 可透過黏膜或是

具有含有 HIV 之體液(例如血液、精液、陰道液、射精前液體和母乳)的血液直接接觸而傳播。這種傳播可涉及肛門、陰道或口交、輸血、受污染的注射針頭、母親與嬰兒於懷孕、分娩或母乳餵養期間之交流，或是於上述之一體液中其他方式的暴露。

【0004】 30 年來，科學家們認爲 AIDS 是由“製造病毒”的 CD4 T 細胞所引起，而非靜默 T 細胞。但是這些“製造病毒”的受感染的細胞並不足以去解釋於發展 AIDS 之患者體中 T 細胞的大量耗竭。Greene 和其同僚指出 95%的靜默淋巴 CD4 T 細胞是死於細胞焦亡(pyroptosis)，而其是由失敗的病毒感染所引發(Doitsh, G. et al. 2014)。此些細胞具有細胞質病毒 DNA，但不像變成病毒-複製單位的 T 細胞，這些“HIV 感染的”靜默 T 細胞被涉及前發炎性細胞激素釋放之計畫性細胞死亡(細胞焦亡)的高度炎症形式所自毀。此細胞蛋白，γ 干擾素誘導蛋白 16 (interferon-gamma-inducible protein 16, IFI16)，可辨認病毒 DNA 並於 T 細胞引發一連串反應(包含調停細胞焦亡之 caspase-1 酵素活化，且造成細胞腫脹、細胞膜通透性和細胞質內容物洩漏)。靜默 T 細胞的自毀無益於殺死病毒。此過程最終導致 HIV 致病機轉以推進病程至 AIDS。

【0005】 現行用以延遲 AIDS 發生之 HIV 感染的治療是由高效抗反轉錄病毒療法或 HAART (highly active antiretroviral therapy)組成，以防止病毒複製。現行優選的 HAART 包含聯合療法(或“雞尾酒”)，其由屬於至少兩種

類抗反轉錄病毒藥物中的至少三個藥物所組成(聯合抗反轉錄病毒治療(Combination antiretroviral therapy, cART))。典型治療方案包含兩個核苷類似物反轉錄酶抑制劑(NARTIs 或 NRTIs)加上一個蛋白酶抑制劑或非核苷類反轉錄酶抑制劑(NNRTI)。

【0006】 在已開發國家，當決定要何時推薦開始HAART治療時，醫生會評估病毒量、CD4 T細胞數量、CD4陽性細胞減少速度和患者準備就緒。一般來說，會建議對CD4 T細胞數量下降至每毫升血液200-250細胞之無症狀的患者進行治療。然而，越早開始治療(於CD4水平爲350 cells/microliter下)可顯著地減少AIDS的風險和死亡。

【0007】 在沒有治療的狀況下，評估感染HIV後之淨存活期中位數爲9至11年，此取決於HIV亞型；且AIDS診斷後之平均存活率範圍介於6至19個月。在廣泛使用HAART治療的地區，此疾病的死亡率減少了80%，其轉而增加新確診HIV感染患者的預期壽命至約20年。

【0008】 HAART的標準目標包括患者生活品質的改善、併發症的減少，以及將HIV病毒血症減少至低於檢測極限。

【0009】 然而，HAART治療存在多種問題。首先，其無法治癒HIV感染的患者，一旦停止治療也無法避免大多數“HAART抗藥性”的HIV回復至高血液水平。第二，HAART具有包含倦怠、無力、腹瀉、頭痛、噁心和嘔吐之討人厭的副作用。從長期來看，HIV感染的患者可能經歷

神經認知障礙症、骨質疏鬆症、神經病變、癌症、腎病和心血管疾病。儘管較新的抗反轉錄病毒藥物比較舊的藥物具有較少的副作用，終生使用仍然會造成不良的結果。無法規則服藥意謂 HIV 反彈、抗藥性和疾病進程。第三，就達到超過 50%以上患者而言，HAART 之表現遠較理想結果差，此乃因爲藥物不耐症、過去無效的抗病毒治療，以及 HIV 之抗藥性病毒株的感染。

【0010】 越來越多研究人員研究如何治癒 HIV 感染，或至少達成無抗反轉錄病毒藥物治療下之長期或永久緩解。

【0011】 兩種治療策略，消除性(即根除)和功能性治癒爲針對 HIV 感染之現行研究(如表 1 所示)。消除性治癒方法目的是消除所有 HIV 感染的細胞，由體內完全地清除 HIV，且定義爲其可減少病毒量至每毫升血液低於 1 copy。功能性治癒目的是 HIV 的緩解狀態與長期控制，包含於無抗反轉錄病毒療法下的低病毒量，其於永久或延長的期間內可減少病毒量至每毫升血液低於 50 copies。

【0012】 “消除性治癒”現行唯一的例子是來自一名感染 HIV 男子的案例研究，此人被暱稱爲“柏林患者”，其罹患急性骨髓性白血病，且接受來自具有 CCR5 基因之突變或不同形式的捐贈者的骨髓移植。於停止治療 45 個月後，醫生已無法於其體內偵測到 HIV。然而，採用具有 CCR5 突變之捐贈者的骨髓移植策略並非可行的 HIV 治癒方法，此策略帶來毒性和治療的複雜性。可於精英的控制者發現“功能性治癒”之自然案例。精英的控制者是指感染 HIV

的個體，其免疫系統可自然地控制病毒而無須使用抗反轉錄病毒藥物。此個體成功地維持穩定的 CD4 (白血球)細胞數量、低或低於檢測極限的病毒量，以及於其細胞中顯著較低量之“潛伏的 HIV”。

【0013】 事實上，治癒的主要障礙是“潛伏 HIV 病毒庫”之存在，其潛伏在免疫系統的細胞(例如記憶細胞)內，於抗反轉錄病毒藥物治療期間具有長的壽命，而此種治療可藉由阻斷複製作用而作用於活躍的病毒感染而非潛伏的 HIV。然而，若停用此種抗反轉錄病毒藥物治療，潛伏的 HIV 可能會被活化，以更新 HIV 感染的過程。

【0014】 針對此些“有問題的”潛伏 HIV 病毒庫的現行策略包含致力於 HAART 治療下透過病毒表現之活化以耗竭潛伏病毒庫，以滅絕感染的細胞，只留下未受感染的細胞。有一群活化劑爲組蛋白脫乙醯酶(Histone deacetylase, HDAC)抑制劑(請參見表 2)。目前，以 HDAC 抑制劑作爲情緒穩定劑、抗癲癇藥物和抗癌治療之使用。HDAC 抑制劑之長期影響在於提高惡性腫瘤及/或致癌基因再活化的風險，此仍爲主要問題。如果以聯合抗反轉錄病毒治療(cART)可完全地抑制活躍的病毒複製，則此策略可行。到目前爲止，這些努力尚未能達成長期的病毒抑制或功能性治癒。

【0015】 於 HIV 感染之人體用以限制或減少潛伏 HIV 病毒庫大小的兩個計劃涉及(1)加強治療(藉由對患者治療方案加入新的 ART 藥物)，以及(2)早期治療(藉由感染後立即地開始 ART)。多個試驗結果顯示，當於 HIV 感染的早期

急性期而非慢性晚期開始 cART，HIV 感染細胞的數量可顯著地下降。

【0016】 總之，對用於 HIV 治療之有效和安全的藥物具有高度需求(不論是提供作爲單獨使用或是作爲對 cART 的輔助使用)，此些藥物(1)於無細胞(cell-free)和細胞間(cell-to-cell)傳播模式中均可阻斷 HIV 進入，顯著地減少活化或靜默 CD4 T 細胞(包含那些長壽的記憶 T 細胞)之 HIV 感染；(2)特異性地再活化 HIV 感染的靜默 CD4 T 細胞以釋出 HIV，導致潛伏感染細胞的細胞凋亡；及/或(3)當抗原/細胞激素刺激時抑制 HIV 感染的靜默 CD4 T 細胞活化/發炎，此種活化發生之時可引起細胞焦亡和正常 CD4 陽性 T 細胞的大量耗竭，因而導致 AIDS。對 HIV 感染之功能性或消除性治癒之一致努力以導致後續無 cART 下之長期或永久緩解，此爲全球公共衛生的重要議題，並正於世界各地積極地探究中，且如果可行，此將在 HIV 感染治療方面實現突破性重大變革。

【0017】 參考文獻

Briant, L., Reynes, J., Coudronniere, N., et al. “HIV Reactivation in resting peripheral blood mononuclear cells of infected Adults upon in vitro CD4 cross-linking by ligands of the CDR2-loop in extracellular domain 1.” J. AIDS. 1999. 21:9-19.

Briant, L., Coudronniere, N., Robert-Hebmann, V., et al. “Binding of HIV virions or gp120-anti-gp120 immune

complexes to HIV-1 infected quiescent peripheral blood mononuclear cells reveals latent infection." J. Immunol., 1996. 156:3994-4004.

Burkly, L.C., Olson, D., Shapiro, R., et al. "Inhibition of HIV infection by a novel CD4 domain 2-specific monoclonal antibody. Dissecting the basis for its inhibitory effect on HIV-induced cell fusion." J. Immunol. 1992; 149: 1779–87.

Carr, F.J., Carter, G., Hamilton, A.A. & Adair, F.S. "Reducing immunogenicity of proteins - by modifying the amino acid sequence of the protein to eliminate potential epitopes for T-cells of a given species." PCT Publication WO 1998-052976.

Chiba, Y., "Leu3A Binding Peptides." US Patent 5,171,838 (1992).

Doitsh, G. Galloway, K., Geng, X., et al. "Cell Death by pyroptosis derives CD4 T-cell depletion in HIV infection." Nature. 2014. 505:509-514.

Global Health Observatory (GHO) HIV/AIDS. http://www.who.int/gho/hiv/en/

HIV-Wikepedia, The free encyclopedia. http://en.wikipedia.org/wiki/HIV/AIDS

Jacobson, J.M. Kuritzkes, D.R., Godofsky, E., et al. "Safety, Pharmacokinetics, and Antiretroviral Activity of Multiple Doses of Ibalizumab (formerly TNX-355), an

§

Anti-CD4 Monoclonal Antibody, in Human Immunodeficiency Virus Type-1-Infected Adults." Antimicrob. Agents Chemother. 2009. 53:450457.

Jameson, B.D., Rao, P.E., Kong, L.L. et al. Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. Science. 1988, 240, 1335-1339.

Jones, T.D., et al. "Deimmunization of Monoclonal Antibodies." Methods Mol. Bio. 2009. 525:405-423.

Kuritzkes, D.R., Jacobson, J.L., Powderly, W.G., et al. "Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type I." J. Infect. Dis. 2004. 189:286-291.

Lynn, S. and Wang, C.Y. "Designed deimmunized monoclonal antibodies for protection against HIV exposure and treatment of HIV infection." US Patent No. 7,501,494 (Issued March 10, 2009).

Pace, C.S., Fordyce, M.W., Franco, D. ,et al. "Anti-CD4 Monoclonal Antibody ibalizumab Exhibits Breadth and Potency Against HIV-1, with Natural Resistance Medicated by the loss of a V5 Glycan in Envelope." J.AIDS. 2013. 62:1-9.

Pace G, Fordyce M, Franco D. "Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits exceptional breadth and potency against HIV, which adopts a unique pathway to

resistance." Abstract 585, 18th CROI 2011, Boston.

Sawyer, L.S.W., Wrin, M.T., Crawford-Miksza, L., et al. "Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 is determined in part by the cell in which the virus is propagated." J. Virol. 1994, 68(3), 1342-1349.

Sigal, A., Kim, J.T., Balazs, A.B., et al. "Cell-to-Cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy." Nature. 2011. 477:95-98.

Than, S., Oyaizu, N., Tetali, S., et al. "Upregulation of human immunodeficiency virus (HIV) replication by CD4 cross-linking on peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected adults." J. Virol. 1997: 71(8):6230-6232.

Toma, T., Weinheimer, S.P., Stawiski, E., et al. "Loss of Asparagine-linked glycosylation sites in variable region 5 of human immunodeficiency virus type 1 envelope is associated with resistance to CD4 antibody ibalizumab." J. Virol. 2011. 85:3872-3880

Wang, C.Y. "Antibodies against a host cell antigen complex for pre and post exposure protection from infection by HIV." US Patent No. 5,912,176, 1999.

Wang, C.Y., Sawyer, L.S.W., Murthy, K.K., et al. "Postexposure immunoprophylaxis of primary isolates by an antibody to HIV receptor complex." Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1999, 96, 10367-10372.

5

【發明內容】

【0018】 本發明是針對用以預防、治療，及/或功能性治癒 HIV 感染的組成物和方法。本發明之一範疇是關於針對 CD4 之單株抗體、其組成物，以及使用此組成物以預防、治療，和功能性治癒 HIV 感染的方法。

【0019】 本發明之一範疇是關於針對 CD4 之抗體、其組成物，以及使用此組成物以預防、治療，及/或功能性治癒 HIV 感染的方法。在某些實施例中，此抗體可特異性地結合位於 CD4 功能區塊 1 的 CDR2 區域。於無細胞和細胞間的系統中，本發明抗體透過其結合至 CD4 的功能區塊 1 而展現有效的競爭型 HIV 進入抑制。本發明之抗體也可抑制抗原引起的 T 細胞增生和 CD4 陽性 T 細胞的細胞激素製造(IL2 和 IFN-gamma)，其涉及細胞焦亡的致病循環。本發明抗體也具有再活化靜默 CD4 陽性 T 細胞的能力。此特性對靜默 T 細胞中潛伏 HIV 病毒庫的再活化特別有用，可使這些細胞對抗反轉錄病毒藥物治療敏感。爲了釋放 HIV，此種對 CD4 高親和力之抗體可活化靜默的 HIV 感染細胞。HIV 感染靜默 CD4+ T 細胞的再活化允許於 HIV 感染患者使用合併本發明抗體與 HAART 的合併治療，以達成功能性治癒。

【0020】 本發明是針對用以治療、預防，和功能性治癒 HIV 感染的方法。在某些實施例中，此劑型包含針對 CD4 之抗體。本發明也包含可用於治療、預防，和功能性治癒 HIV 感染之方法的抗病毒藥物。

【0021】 在某些實施例中，本發明是關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合，抗-CD4 抗體的醫藥組成物，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予作爲單一藥物治療時，此種治療可使接受治療之受試者的病毒量減少至低於檢測極限，且只要血清抗體水平高於 10 μg/mL 即無病毒量反彈。

【0022】 在其他實施例中，本發明是關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其可作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予未使用治療藥物之 HIV 患者，將達成患者的功能性治癒。

【圖式簡單說明】

【0023】

第 1 圖係競爭型與非競爭型 HIV 進入抑制機制。第 1A 圖係顯示於競爭型 HIV 進入抑制模型中所提供理論結果的曲線圖，在此，HIV 外套膜蛋白 gp120 和抑制劑(例如抗體藥物)競爭結合於一個共同目標表面分子上的相同位置(即 CD4 功能區塊 1 的 CDR2)。在此模型中，當此抑制劑濃度達到某個閥值時可達成 HIV 結合/進入的 100%抑制。相較之下，第 1B 圖係顯示於非競爭型 HIV 進入抑制模型中所提供理論結果的曲線圖，在此，HIV 和抑制劑結合至位於相同目標分子上的不同位置(例如 CD4 的功能區塊 2 對於 TMB-355)。在此非競爭型抑制模型中，抑制劑可減少 HIV 結合/進入，但不論抑制劑之濃度爲何都無法達成完全抑

制。不論藥物濃度爲何，作爲於%抑制之“高原”反映了HIV對抗體藥物的抗藥性。

第2圖係來自利用TMB-355對一組涵蓋11個進化支的118種不同HIV-1 Env假型病毒株的HIV進入抑制的結果(Pace, G., et al., 2011)。對每一種病毒而言，黑線是指當以濃度達到10 μg/mL之TMB-355處理時的最大抑制百分比(MPI)(請參見左邊的Y軸)；且灰線是指相對應的IC_{50}(請參見右邊的Y軸)。TMB-355以≥50%抑制中和了92%的病毒株，且以≥95%抑制只中和了31%的病毒株。

第3圖係來自利用mAb B4對在10年間所收集的一組超過850種Env假型HIV病毒株的HIV進入抑制的結果。MAb B4於HIV進入抑制提供了廣泛性與效力，其於所有850種Env假型病毒株具有接近100%最大抑制百分比(MPI)，且具有兩個IC_{50}濃度(一個是介於0.01至1 μg/mL，且第二個是約10 μg/mL)。

第4圖係mAb dB4C7抗體Fv區域之重鏈的完整胺基酸序列(SEQ ID NO: 7)，其於UB-421中使用。代表衍生自其親本鼠源B4抗體之相對應CDR1、2和3區域的序列在下方劃有底線(表4，SEQ ID NOs: 1至3)。變異區和恆定區分別以淺灰色和深灰色陰影表示(分別爲SEQ ID NOs: 11和12)。以重鏈上位於第101個胺基酸殘基Asn (N)作爲N-醣化點，此對於其Fv區域位置具有獨特性，對B4抗體結合具有重要性。爲了取代的人類IgG_1之Fc區域序列，位於第298個胺基酸殘基Asn (N)的N-醣化點乃利用胺基酸

His (H)取代而加以移除(即 N298H)。發現此突變可於抗體 B4 存在下消除 IgG 調停的補體依賴型細胞毒殺作用(complement dependent cytotoxicity, CdC)和 CD4 陽性 T 細胞的耗竭。

第 5 圖係 dB4C7 抗體 Fv 區域之輕鏈的完整胺基酸序列(SEQ ID NO: 8)，其於 UB-421 中使用。代表衍生自其親本鼠源 B4 抗體之相對應 CDR1、2 和 3 區域的序列在下方劃有底線(表 4，SEQ ID NOs: 4 至 6)。變異區和恆定區分別以淺灰色和深灰色陰影表示(分別爲 SEQ ID NOs: 13 和 14)。

第 6 圖係經進一步改進之擬人化抗體之重鏈的完整胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)，因爲對位於重鏈位置第 253、255 和 257 個胺基酸的 Fc 區域分別地將 Met (M)取代爲 Tyr (Y)(即 M253Y)、將 Ser (S)取代爲 Thr (T)(即 S255T)、以及將 Thr (T)取代爲 Glu (E)(即 T257E)，以使此抗體具有更長的半衰期。

第 7 圖係擬人化抗體 mAb dB4 之重鏈的完整胺基酸序列(SEQ ID NO: 10)，其包含於第 4 和 6 圖中所討論的變異胺基酸。

第 8 圖係顯示在對細胞經過三次抗體繼代後 mAb B4 對位於 HPB-ALL 細胞之表面 CD4 的結合親和力(抗體濃度)和結合容量(游離和結合的抗體)的曲線圖。

第 9 圖係 mAb B4 (---)和 mAb dB4 (—)對塗覆於 ELISA 微量盤上之可溶性 CD4 (sCD4)和 p2704a 胜肽捕獲混合物

之結合親和力的曲線圖比較。分別地利用 mAb B4 和 mAb dB4 去競爭地抑制 B4-biotin 和 dB4C7-Alexa 結合至捕獲混合物而加以測定結合親和力。

第 10 圖係 mAb B4 (---)和 mAb dB4 (—)對位於 HPB-ALL 細胞上 CD4 之結合親和力的曲線圖比較。結合親和力是以 FACS 加以測定，分別地利用 mAb B4 和 mAb dB4 去競爭地抑制 B4-biotin 和 dB4C7-Alexa 結合至位於 HPB-ALL 細胞上的表面 CD4。

第 11 圖係 mAb dB4 (---)和 gp120MN (—)對位於 HPB-ALL 細胞上 CD4 之結合親和力的曲線圖比較。結合親和力是以 FACS 加以測定，利用 mAb dB4 和 gp120MN 去競爭地抑制 dB4C7-Alexa 結合至位於 HPB-ALL 細胞上的表面 CD4。

第 12 圖係顯示 mAb dB4C7 對 PBMC CD4+ T 細胞之溫度倚賴性結合(MFI)的曲線圖。

第 13 圖係顯示來自 6 位未受感染個體血液樣品之未被佔據的 CD4 受體(—)和以 mAb dB4 佔據/結合之 CD4 受體(---)的平均百分比(±標準差)，並作爲 mAb dB4 濃度之函數的曲線圖。利用 dB4C7-Alexa 結合至位於血液 CD4+ T 細胞表面之未被佔據的結合位以偵測未被佔據的受體。然而 mAb dB4 佔據之受體是利用山羊抗-huIgG-FITC 加以偵測。

第 14 圖係顯示現行抗反轉錄病毒治療(cART)藥物 Tenofovir 於 HIV 無細胞和細胞間傳播上之效果的長條圖 (Sigal, A., et al., 2011)。Y 軸代表來自於存在或缺乏

tenofovir 狀況下由不同感染源所分離之周邊血液單核球細胞(PBMCs)的傳播指數(Sigal, A. et al., 2011)。

第 15 圖係顯示藉由以下刺激所引發於靜默 PBMCs 之病毒再活化的長條圖(其乃利用 HIV-1 p24 gag 製造加以測量)，刺激種類包含未受刺激(第 1 長條)、植物凝集素(PHA)(第 2 長條)、不活化的 HIV (iHIV)溶胞產物(第 3 長條)、針對 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域的單株抗體(第 4 長條)、針對 CD4 功能區塊 1 之 CDR3 區域的單株抗體(第 5 長條)、針對 CD4 功能區塊 1/2 的單株抗體(第 6 長條)、可溶性 CD4 存在下之 iHIV (第 7 長條)、可溶性 CD4 存在下針對 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域的單株抗體(第 8 長條)、可溶性 CD4 存在下針對 CD4 功能區塊 1 之 CDR3 區域的單株抗體(第 9 長條)，以及可溶性 CD4 存在下針對 CD4 功能區塊 1/2 的單株抗體(第 10 長條)，如附圖說明所示(改編自 Briant L., et al., 1999)。

第 16 圖係顯示利用抗-HIV RC 多株抗體對生物素化-B4 結合至 rsCD4 之競爭型抑制的圖式，其藉由 ELISA 加以測量。

第 17 圖係顯示 mAb dB4 和抗-HIV RC 多株抗體對位在 PBMCs 上之表面 CD4 的抗體效價測定圖式。抗體效價測定爲% CD4 結合對抗體濃度(μg/mL)。

第 18A 圖至第 18G 圖係顯示於未使用治療藥物之 HIV 陽性和 HIV 陰性受試者以 mAb dB4 和抗-HIV RC 多株抗體對由超抗原 SEB 所引起增生 CD4+和 CD8+ T 細胞之細胞激

素 IL2 和 IFN-γ 製造抑制的分析。對 HIV 陰性(第 18A 圖)和 HIV 陽性(第 18B 圖)受試者，mAb dB4 和抗-HIV RC 多株抗體對由超抗原所引起增生 CD4+ T細胞之 IL2製造的抑制如圖所示。對 HIV 陰性受試者和年齡一致的 HIV 陽性受試者(第 18C 圖)，mAb dB4 和抗-HIV RC 多株抗體對由超抗原所引起增生 CD8+ T 細胞之 IL2 製造的抑制也如圖所示。對 HIV 陰性(第 18D 圖)和 HIV 陽性(第 18E 圖)受試者，mAb dB4 和抗-HIV RC 多株抗體對由超抗原所引起增生 CD4+ T 細胞之 IFN-γ 製造的抑制如圖所示。對 HIV 陰性(第 18F 圖)和 HIV 陽性(第 18G 圖)受試者，mAb dB4 和抗-HIV RC 多株抗體對由超抗原所引起增生 CD8+ T 細胞之 IFN-γ 製造的抑制如圖所示。

第 19A 圖至第 19C 圖係顯示藉由對於 HIV-1 原代分離株 DH12 ($HIV\text{-}1_{DH12}$)暴露前(第 19A 圖)和暴露後(第 19B 圖)投予 mAb B4 以保護黑猩猩免於 HIV 感染的圖式，其藉由於感染後一段時間測定在 PBMCs 中的 HIV-1 RNA copies/mL 而加以評估。暴露於 $HIV\text{-}1_{DH12}$ 而未投予抗體之控制組動物的結果圖式(第 19C 圖)如圖所示。向下箭頭標記試驗開始，此時 mAb B4 是於 $HIV\text{-}1_{DH12}$ 攻毒前或後一小時投予。

第 20A 圖和第 20B 圖係顯示未接受治療和以 mAb B4 治療之 HIV-1 感染黑猩猩的 HIV 病毒量的圖式，其藉由隨時間測定的 HIV-1 RNA copies/mL 而加以評估。第 20A 圖係比較於黑猩猩 X356 (接受三次 mAb B4 輸注(實心圓))與未接受治療的控制組黑猩猩 X084 (在之前試驗中先前接受

mAb B4 的單一劑量(空心圓))之血漿病毒血症的持續時間。

第 20B 圖係比較於黑猩猩 X356 (接受三次 mAb B4 輸注(實心圓))與未接受治療的控制組黑猩猩 X259 (未接受 mAb B4 之先前用藥劑量(空心圓))之血漿病毒血症的持續時間。

第 21 圖係 mAb dB4 對人類(---)和狒狒(—) CD4 陽性 T 細胞之結合親和力的曲線圖比較。

第 22A 圖和第 22B 圖係顯示對在藥物增量(1、5、10 和 25 mg/kg)之第 I 期臨床試驗中接受抗體藥物 UB-421 (mAb dB4C7)單次投予的患者於 HIV-1 RNA 的平均 Log_{10} 變化對試驗天數的圖式。第 22A 圖係顯示在本試驗期間每一劑量所展現之病毒減少的圖式。第 22B 圖係顯示對每一劑量之平均和最大個別最低點的圖式。

第 23A 圖至第 23C 圖係顯示 UB-421 (mAb dB4C7)之療效和先前報導之 TMB-355 (TMB-355 先前稱爲 TNX-355; Kuritzkes, D.R., et al., 2004，第 1 圖)療效數據的理論比較圖式。第 23A 圖係顯示以 5 mg/kg 之 UB-421 和 3 mg/kg 之 TMB-355 單次投予後所觀察之病毒量下降的圖式比較。第 23B 圖係顯示以 10 mg/kg 之 UB-421 或 TMB-355 單次投予後所觀察之病毒量下降的圖式比較。第 23C 圖係顯示以 25 mg/kg 之 UB-421 或 TMB-355 單次投予後所觀察之病毒量下降的圖式比較。

第 24A 圖和第 24B 圖係顯示於爲期 8 週治療期期間在接受每週 10 mg/kg (第 24A 圖)或每兩週 25 mg/kg (第 24B 圖) UB-421 (mAb dB4C7)投予之受試者的平均 PBMC CD4 T 細

胞數量/mm^3的圖式。可藉由針對 CD4 功能區塊 2 之生物素化抗體測得於 UB-421 治療的患者中穩定的 CD4 T 細胞數量。

第 25A 圖至第 25D 圖係顯示在第 IIa 期臨床試驗期間 UB-421 治療之臨床療效的圖式，如利用病毒量減少(上圖)和 UB-421 的藥物動力學(如以 μg/mL 血清濃度加以測定(下圖))所測定。提供了用於以下代表性患者的相關數據：接受每週 10 mg/kg UB-421 投予的患者 1-1-01 (第 25A 圖)；接受每週 10 mg/kg UB-421 投予的患者 1-1-02 (第 25B 圖)；接受每兩週 25 mg/kg UB-421 投予的患者 1-2-03 (第 25C 圖)；以及接受每兩週 25 mg/kg UB-421 投予的患者 1-2-06 (第 25D 圖)。以整個塗滿灰色陰影之區間代表 UB-421 結合於 PBMC CD4+細胞上的持續期間。

第 26A 圖和第 26B 圖係顯示於使用 UB-421 之第 IIa 期臨床試驗所觀察之病毒量減少對照於由他人所作之 TMB-355 (ibalizumab，先前稱爲 TNX-355)類似試驗 (Jacobson, J.L., et al., 2009; Toma, J., et al., 2011; and Pace, C.S., et al., 2013)所觀察之病毒量減少的理論比較圖式。第 26A 圖概述於以 10 mg/kg 和 25 mg/kg UB-421 治療之受試者所觀察的病毒量變化，而第 26B 圖概述於以相同劑量水平 TMB-355 治療之受試者所觀察的病毒量變化。

第 27 圖係顯示於 HIV 患者群體的治療形式示意圖，此 HIV 患者群體是於未使用治療藥物之 HIV 患者和 HAART 治療穩定之 HIV 患者使用 UB-421 單一藥物治療以替代

HAART 治療。

第 28 圖係顯示於 HIV 患者群體的治療形式示意圖，其利用 UB-421 合併使用 HAART 治療以於未使用治療藥物之 HIV 患者、HAART 治療穩定之 HIV 患者，和 HAART 治療失敗之 HIV 患者達成 HIV 感染的功能性治癒。

【實施方式】

【0024】 本發明有關於用以預防、治療，及/或功能性治癒 HIV 感染的組成物和方法。本發明之一範疇是關於針對 CD4 之抗體、其配方，以及使用此配方以預防、治療，及/或功能性治癒 HIV 感染的方法。

【0025】 在此使用之章節標題僅作爲組織的目的，且並非被解釋作爲限制所述之專利標的。爲了任何目的，此申請案引用之所有參考文獻或參考文獻之部分透過引用在此明確地被併入本文整體。

CD4

【0026】 CD4 (cluster of differentiation 4)是一種醣蛋白(UniProtKB/Swiss-Prot: P01730.1)，其位於免疫細胞(例如助手 T 細胞、單核球、巨噬細胞和樹突細胞)(http://en.wikipedia.org/wiki/CD4)。CD4 是免疫球蛋白超家族的成員，且具有暴露於細胞外表面的四個免疫球蛋白功能區塊(D1 至 D4)。CD4 功能區塊 D1 和 D3 類似免疫球蛋白變異(IgV)區；而 D2 和 D4 類似免疫球蛋白恆定(IgC)區。CD4 使用其 D1 功能區塊與第二型主要組織相容性複

合體(MHC II)分子的 β2-功能區塊交互作用。因此，於其表面表現 CD4 分子的 T 細胞對 MHC II 所呈現之抗原具有特異性。包含特殊胺基酸序列的 CD4 短細胞質/細胞內尾端使其可與 lck 分子交互作用。

【0027】 CD4 的第一個細胞外功能區塊與免疫球蛋白共有同源性，其三個互補決定區(CDRs)與免疫球蛋白鏈相似。發現 CD4 分子細胞外區域的功能區塊 1 和功能區塊 2 均對 MHC II 分子之結合位具有貢獻；然而，發現單獨功能區塊 1 涉及 HIV 結合與合胞形成(syncytia formation)。特別地，發現 HIV 外套膜醣蛋白 gp120 之結合位位於功能區塊 1 的類 CDR－2 環(CDR2-like loop)。

【0028】 HIV-1 藉由 CD4 進入宿主 T 細胞，此乃透過其病毒外套膜蛋白(稱爲 gp120)達成。結合 CD4 引起 gp120 構型變化以允許 HIV-1 結合至表現於宿主細胞上的化學激素受體 CCR5 或 CXCR4。接著另一個病毒蛋白(gp41)結構改變，HIV 將融合胜肽插入宿主細胞，以允許病毒的外膜與細胞膜融合。HIV 感染造成表現 CD4 之 T 細胞數量逐漸減少。

抗體

【0029】 本發明之一範疇是關於針對 CD4 之抗體、其組成物，以及使用此組成物以預防、治療，及/或功能性治癒 HIV 感染的方法。

【0030】 本發明抗體廣泛地包含完整的抗體分子，其包

含完整的多株、單株、單特異性、多特異性、嵌合、去免疫化、擬人化、人類、靈長類、單鏈、單功能區塊(single-domain)、合成和重組抗體，以及具有所欲活性或功能之抗體片段。

【0031】 本發明抗體可辨認 CD4 的功能區塊 1。在某些實施例中，抗體可特異性地結合位於 CD4 功能區塊 1 的 CDR2 區域。

【0032】 本發明抗體可以任何標準方法製造。在一些實施例中，本發明抗體可藉由以重組 CD4 蛋白、重組 CD4 蛋白的片段、或是表面表現 CD4 的細胞免疫動物(例如：小鼠、狗、天竺鼠、豬、山羊、馬等)加以製造。或者，可化學合成抗體。

【0033】 在某些實施例中，可藉由以含有 CD4 功能區塊 1 之胺基酸序列的胜肽免疫動物以製造抗體。例如，可藉由以含有 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域胺基酸序列的胜肽或其結合免疫動物以製造多株抗體。在某些實施例中，含有 CD4 之第 39-66 個胺基酸的胜肽(稱爲 HIV 受體複合體(“HIV RC”))，如同 HIV 結合至 CD4 之此部分。在某些實施例中，HIV RC 胜肽可藉由雙硫鍵以創造環狀結構。

【0034】 在某些實施例中，可利用環狀 HIV RC 胜肽免疫動物以製造多株抗體。本發明所述“抗-HIV RC 多株抗體”是指抗含有 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域第 39-66 個胺基酸的環狀胜肽的免疫血清。

【0035】 在其他實施例中，利用 CD4 陽性細胞免疫動

物以製造抗體。例如，在某些實施例中，以完整、未感染的 CD4+人類 HPB-ALL 細胞、T 細胞急性淋巴細胞性白血病細胞株(T-acute lymphoblastic leukemia cell line)免疫 BALB/c 小鼠製造抗體。於 Wang 的專利(美國 5,912,176 號和 6,090,388 號專利)以及 Wang 等人於 1999 年發表的期刊論文對此抗體有更詳細的討論，其均透過引用以併入本文整體。

【0036】 在其他實施例中，抗體包含如序列表所列之重鏈和輕鏈的胺基酸序列。本發明包含含有序列表所列胺基酸序列之抗體的同源物和功能類似物。

【0037】 本發明抗體的功能類似物包含序列變異和同源物，其保持如原抗體實質上相同之功能特徵(結合辨認、結合親和力等)。例如，作爲功能類似物或同源物之抗體變異於胺基酸位置具有保留性取代；靜電荷改變；共價結合至其他官能基；或小的加入、插入、刪除或保留性取代及/或其任意結合。因此，此抗體的變異抗體功能類似物和同源物將可辨識並結合 CD4，且用於受試者以治療 HIV。

【0038】 在一實施例中，抗體功能類似物或同源物通常與含有揭露於序列表之胺基酸序列的抗體具有至少約 50%序列相似度。在其他實施例中，抗體功能類似物或同源物與含有揭露於序列表之胺基酸序列的抗體具有至少約 50%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、或約 99%相似度。

【0039】 保留性取代是指一個胺基酸殘基以另一個具

有相似化學特性之胺基酸殘基取代。例如，非極性(疏水性)胺基酸包含丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸和甲硫胺酸；極性中性胺基酸包含甘胺酸、絲胺酸、酥胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、天門冬醯胺酸和麩醯胺酸；正電(鹼性)胺基酸包含精胺酸、離胺酸和組胺酸；以及負電(酸性)胺基酸包含天門冬胺酸和麩胺酸。

【0040】 在其他實施例中，抗體的功能類似物可藉由對氮基端、羧基端加入或刪除胺基酸，及/或藉由插入序列中間而加以修飾。在本發明之不同實施例中，是對胜肽的氮基端或羧基端加入或刪除。可爲 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 個胺基酸殘基的加入或刪除。此種加入或刪除可能構成胺基酸序列，而此胺基酸序列未呈現於序列表所列之序列中，但並不改變此抗體的一般功能特徵。

【0041】 在某些實施例中，以化學物質標記或標幟本發明抗體。例如，抗體可以生物素、延伸臂、探針(例如：螢光異硫氰酸鹽(FITC)、藻紅素(PE)、四甲基異硫氰酸羅丹明(TRITC)、DyLight Fluors、Alexa、綠色螢光蛋白(GFP)、R-藻紅素(R-Phycoerythrin)、量子點(quantum dots)等)、酶結合物，及其結合加以標幟。在具體實施例中，抗體是以生物素或螢光探針標幟。

【0042】 在具體實施例中，抗體透過已知的去免疫化過程加以修飾。本發明所述“去免疫化”一般是指用以修飾抗體之部分的過程，藉此使其投予動物時不引起動物體內

之免疫反應。具體來說，此抗體於投予至特定動物時具有免疫原性(例如，T 細胞抗原表位)，去免疫化涉及定位與移除抗體部分胺基酸序列的過程。此過程可藉由結合使用免疫學與分子生物學技術達成。此過程先前已揭露(例如 Jones, T.D., et al. 2009)。在抗體去免疫化的狀況下，可普遍地引入突變以移除 T 細胞抗原表位而未顯著地減少抗體的結合親和力。

【0043】 本發明所述“擬人化”是指修飾(去免疫化)非人類物種抗體的蛋白質序列，藉此移除當此抗體投予人類時的免疫原性。在某些實施例中，本發明抗體是利用以人類恆定區取代其恆定區及/或利用表現於哺乳類細胞編碼此些抗體的基因以去免疫化供人類使用。

【0044】 在某些實施例中，本發明抗體具有如表 4 所示之重鏈和輕鏈胺基酸序列。

【0045】 本發明所述“mAb B4”或“B4”或“鼠源 B4”分別地是指具有 SEQ ID NOs: 1–6 之重鏈和輕鏈的 CDR1、2、3 區域胺基酸序列的鼠源單株抗體(如表 4 所示)。鼠源單株抗體可辨識 CD4 並抑制 HIV 進入。此抗體之結構與功能特徵於實施例與下文中有更詳細之討論。

【0046】 本發明所述“mAb dB4”或“dB4”是指衍生自 mAb B4 之人類去免疫化抗體。人類去免疫化 mAb dB4 分別地具有 SEQ ID NOs: 1–6 之重鏈和輕鏈的 CDR1、2、3 區域之胺基酸序列(如表 4 所示)。在一些實施例中，mAb dB4 之輕鏈具有 SEQ ID NO: 8 之胺基酸序列(如第 5 圖所

示)。在一些實施例中，mAb dB4 之重鏈具有 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列(如第 4 圖所示)。在不同實施例中，mAb dB4 之重鏈具有 SEQ ID NO: 9 之胺基酸序列(如第 6 圖所示)。MAb B4 可藉由於本領域所知悉的任何適當方法加以去免疫化。在一實施例中，mAb B4 是利用依據美國 7,501,494 號和 7,872,110 號專利所述之方法去免疫化以供人類使用，其透過引用在此併入本文整體。在特殊實施例中，人類去免疫化 mAb dB4 是藉由移除 mAb B4 之鼠源抗體恆定區(C_H和 Cκ)，並以人類 IgG1 的恆定區取代，而製造。MAb dB4 包含以任何適當之細胞選殖株製造的 dB4。在具體實施例中，mAb dB4 是由 7 號選殖株所製造。

【0047】 本發明所述“mAb dB4C7”或“dB4C7”，是指由包含重組基因 B4DIVHv1/VK1CHO#7 的 7 號選殖株所表現的 mAb dB4，其先前於美國 7,501,494 號和 7,872,110 號專利揭露，這些專利透過引用在此併入本文整體。顯示 C7 選殖株可製造高品質的 mAb dB4 抗體。特別的是，mAb B4C7 爲人類去免疫化抗體，其具有包含 SEQ ID NO: 8 胺基酸序列之輕鏈(如第 5 圖所示)和包含 SEQ ID NO: 7 胺基酸序列之重鏈(如第 4 圖所示)。此外，將位於 mAb dB4C7 位置 298 之 Asn (N)殘基以 His (H)取代，以移除 N-醣化點，因此於抗體 B4 存在下消除 IgG 調停的補體依賴型細胞毒殺作用(CdC)以防止 CD4 陽性 T 細胞的耗竭。

【0048】 本發明所述“UB-421”是指使用於投予人類受試者之合適形式的 mAb dB4C7。

【0049】 本發明抗體也可藉由其有趣與獨特的功能特徵而加以描述。

【0050】 例如，本發明之抗體可透過其結合至 CD4 之功能區塊 1 而發揮有效的競爭型 HIV 進入抑制。特別是，本發明之抗體於測試的所有 Env 假型病毒具有接近 100% 的最大抑制百分比(MPI)，具有兩個 IC_{50} 濃度；一個是介於 0.01 至 1 μg/mL，且第二個是約 10 μg/mL。本發明抗體的結合活性較 HIV gp120 外套膜蛋白所展現之 CD4 結合親和力高了約兩個對數(即 100 倍更緊密的結合)。此外，本發明抗體的平均解離常數(Kd)測得爲 5.6×10^{-11} M (範圍：3.1×10^{-11} 至 8.1×10^{-11} M)，且最大結合容量(Bmax)測得爲每細胞 1.2×10^{6} Ab (範圍：0.93 至 1.4×10^{6})。

【0051】 於無細胞和細胞間的系統中均顯示本發明抗體的競爭型抑制特性。本發明抗體以較 HIV 外套膜蛋白 gp120 MN 高至少 50 倍之親和力結合至 CD4 受體。並且，本發明抗體以相較於其他市售抗體(例如 Leu3a)更高的親和力與特異性結合至 CD4。

【0052】 本發明抗體也可抑制由抗原引起的 T 細胞增生和 CD4 陽性 T 細胞的細胞激素製造(IL2 和 IFN-gamma)，其涉及細胞焦亡的致病循環。此種對 CD4 具高親和力之單株抗體可抑制抗原(例如超抗原 SEB (金黃色葡萄球菌 B 型腸毒素(staphylococcal enterotoxin B, SEB))引起的 CD4 陽性 T 細胞活化和細胞激素(例如 IL2 和 IFN-γ)製造。此種抗原引起的活化導致 HIV 感染失敗的靜默 CD4+ T 細胞產生

細胞激素，造成這些靜默 CD4+ T 細胞和附近正常靜默 CD4 陽性細胞的細胞焦亡，其導致之後 CD4+ T 細胞的大量耗竭，因而導致 AIDS。

【0053】 本發明抗體也具有再活化靜默 CD4 陽性 T 細胞的能力。此特性對再活化靜默 T 細胞中的潛伏 HIV 病毒庫特別有用，可使這些細胞對抗反轉錄病毒藥物治療敏感。爲了釋放 HIV，此種對 CD4 高親和力之抗體可活化靜默的 HIV 感染細胞。HIV 感染的靜默 CD4+ T 細胞再活化允許 HIV 感染患者使用合併本發明抗體與 HAART 之合併治療，以達成功能性治癒。

【0054】 於以下實施例提供本發明抗體額外的結構與功能特徵。

劑型

【0055】 本發明也針對用以預防、治療，及/或功能性治癒 HIV 感染的藥劑劑型。在某些實施例中，劑型包含針對 CD4 之抗體。在特定實施例中，本發明關於包含對 CD4 高親和力之單株抗體的醫藥組成物(此抗體可針對位於 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域內或附近的位置)。此種抗體的結合活性(EC_{50})較 HIV gp120 外套膜蛋白所展現之 CD4 結合親和力(對 gp120 之 EC_{50}=97nM)高了約兩個對數(即 100 倍更緊密的結合)。

【0056】 抗體蛋白質的藥劑劑型可藉由混合抗體蛋白質與任選的藥物學上可接受的載體而加以製備。藥物學上

可接受的載體包含溶劑、分散介質、等滲劑等。載體可爲液體、半固體(例如膏狀物)或固體載體。載體的例子包含水、鹽溶液或其他緩衝液(例如磷酸鹽、檸檬酸鹽緩衝液)、油類、醇類、蛋白質(例如血清白蛋白、明膠)、碳水化合物 (例如單醣、雙醣，以及其他碳水化合物(包含葡萄糖、蔗糖、海藻醣、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇或糊精)、凝膠、脂質、微脂體、樹脂、多孔基體、黏合劑、充填劑、塗層、安定劑、防腐劑、抗氧化劑(包含抗壞血酸以及甲硫胺酸)、螯合劑(例如 EDTA)；成鹽的抗衡離子(salt forming counter-ions)(例如鈉)；非離子界面活性劑(例如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇(PEG)，或其結合)。

【0057】 此劑型可包含至少一種的活性物質。例如，劑型可含有用於預防和治療 HIV 感染之一或多個抗體及/或一或多個具有額外優點的化合物。活性物質可以任何方便使用的方式(例如：混合、溶液、懸浮液、乳化作用、膠囊化、吸附等)與載體結合，且可製成適用於注射、攝取、輸注等的劑型(例如：錠劑、膠囊、粉末(包含冷凍乾燥粉末)、糖漿劑、懸浮液)。亦可製備成緩釋製劑。

【0058】 在某些實施例中，藥劑劑型包含供人類使用之 mAb dB4C7。包含 mAb dB4C7 之藥劑劑型可配製於適當緩衝液中，包含，但不限於，檸檬酸鹽、磷酸鹽、三羥甲基氨基甲烷(Tris)、1,3-二[三(羥甲基)甲基氨基]丙烷(BIS-Tris)等，於介於 6.0 至 7.0 之 pH 值，且可包含賦形劑(例如醣類(50 mM 至 500 mM 的蔗糖、海藻糖、甘露醇，或其混合))、

界面活性劑(例如：0.025% - 0.5%的 Tween 20 或 Tween 80)，及/或其他試劑。在具體實施例中，劑型包含 mAb dB4C7 於含有 20 mM 甘胺酸，以及 0.05% (v/v) Tween (polysorbate 20)之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)(pH 6.5)中。在其他具體實施例中，也可製備 mAb dB4 之高濃度劑型以供包含皮下注射之應用，其包含 10 mM 組胺酸。

【0059】 可製備含有不同量抗體的劑型。一般來說，用於投予受試者的劑型包含介於約 0.1 mg/mL 至約 200 mg/mL 的抗體。在某些實施例中，劑型可包含介於約 0.5 mg/mL 至約 50 mg/mL；介於約 1.0 mg/mL 至約 50 mg/mL；介於約 1 mg/mL 至約 25 mg/mL；或介於約 10 mg/mL 至約 25 mg/mL 的抗體。在具體實施例中，劑型包含約 1.0 mg/mL，約 5.0 mg/mL，約 10.0 mg/mL，或約 25.0 mg/mL 的抗體。

【0060】 在具體實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之針對 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域之人類、擬人化或嵌合、單株抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其展現競爭型 HIV 進入抑制與 CD4+ T 細胞活化，作為 HIV 患者的免疫療法。

【0061】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合，抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其作為單一藥物治療使接受治療之受試者血清抗體水平高於 10 μg/mL，可將病毒量降低至檢測極限以下。

【0062】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合，抗-CD4 抗體的醫藥組

成物，其作為單一藥物治療可於為期 12 週治療期間使接受治療之受試者血清抗體水平高於 10 μg/mL，且維持穩定的 CD4 T 細胞數量，將病毒量降低至檢測極限以下。

【0063】 在某些實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合，抗-CD4 抗體的醫藥組成物，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予作為單一藥物治療時，此種治療可於為期 12 週治療期間使接受治療之受試者的病毒量降低至檢測極限以下。

【0064】 在另一較佳實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其可作為偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予未使用治療藥物之 HIV 患者，將達成患者的功能性治癒。

【0065】 在另一較佳實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其可作為偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予於 HAART 下具有穩定病毒量的患者，將達成患者的功能性治癒。

抗病毒藥物

【0066】 本發明之治療、預防，和功能性治癒 HIV 感染的方法更包括抗病毒藥物。

【0067】 抗病毒藥物包含可於哺乳類動物有效抑制

HIV 之形成及/或複製的任何藥物(化合物或生物的)。抗病毒藥物的例子包含，但不限於，進入/融合抑制劑(例如：maraviroc、enfuvirtide)；核苷類反轉錄酶抑制劑(NRTI)和核苷酸類反轉錄酶抑制劑(NtRTI)(例如：zidovudine、abacavir、lamivudine、emtricitabine 和 tenofovir)；非核苷類反轉錄酶抑制劑(NNRTI)(例如：nevirapine、efavirenz、etravirine 和 rilpivirine)；整合酶抑制劑(也稱爲整合酶鏈轉移抑制劑或 INSTIs (例如：raltegravir、dolutegravir)；蛋白酶抑制劑(例如：saquinavir、saquinavir mesylate、fosamprenavir、tipranavir、lopinavir、indinavir、nelfinavir、amprenavir、ritonavir、darunavir、atazanavir、bevirimat、vivecon)；病毒成熟抑制劑；針對 HIV 基因表現的藥物；針對涉及 HIV 複製之重要宿主細胞基因和基因產物的藥物；以及其他抗-HIV 藥物；iRNA 藥物；反義 RNA (antisense RNA)；表現 iRNA 藥物或反義 RNA 之載體；肽核酸(PNA)以及抗病毒抗體；及其結合。

【0068】 抗病毒藥物可以單獨或合併方式使用。以合併方式使用抗病毒藥物稱爲抗反轉錄病毒治療(ART)，聯合抗反轉錄病毒治療(cART)或高效抗反轉錄病毒療法(HAART)。抗反轉錄病毒(ARV)藥物藉由藥物抑制反轉錄病毒生命週期的階段而廣泛地被分類。典型的合併使用包含以兩種 NRTIs 作爲“骨架”，以及以一種 NNRTI、PI 或 INSTI 作爲“基底”。在某些實施例中，合併使用抗病毒藥物的方式，例如：Combivir、Trizivir、Kaletra、Epzicom、

Truvada、Atripla、Complera、Stribild、Triumeq。

治療、預防和功能性治癒的方法

【0069】 本發明也包括用以治療、預防，和功能性治癒HIV感染的方法。在某些實施例中，劑型包含針對CD4之抗體。

【0070】 另一方面，本發明之抗體、任選的藥物學上可接受的載體可於受試者用以預防、治療，及/或功能性治癒HIV感染，以及預防HIV傳播。

【0071】 本發明所述HIV感染的“治療”是指對HIV感染的有效抑制，藉此延遲發生、延緩病程、減少病毒量，及/或改善由HIV感染所引起之症狀。治療包含對HIV暴露前和暴露後。

【0072】 本發明所述HIV感染的“預防”是指延遲HIV感染之發生，及/或減少或消除HIV感染的發生率或可能性。本發明所述HIV傳播的“預防”是指減少或消除HIV由一個體傳染至另一個體(例如於懷孕、分娩或生產，或母乳餵養期間由HIV陽性之女性傳至小孩)的發生率或可能性。

【0073】 本發明所述“受試者”是指任何靈長類受試者，包含人類、恒河猴、狒狒和黑猩猩受試者。

【0074】 爲治療及/或預防HIV感染，對有需求的受試者投予本發明抗體的治療劑量。

【0075】 本發明所述“治療上有效劑量”是指抑制

HIV 感染效果所需劑量，藉此治療及/或預防 HIV 感染。抗體的劑量取決於疾病狀態和其他臨床因素，例如受試者重量和狀況、受試者對此療法的反應、劑型的種類和給藥途徑。作爲治療上有效且非有害的精確劑量可由本領域之技術人員所決定。

【0076】 一般來說，投予成年人類之抗體的適當劑量範圍介於約 3 至 50 mg/kg 受試者體重，具有範圍介於約 5 至 25 mg/kg 受試者體重的典型初步範圍可供使用。適當劑量也包含約 5.0 mg/kg、約 10.0 mg/kg、或約 25.0 mg/kg 受試者體重。

【0077】 包含本發明人類單株抗體的治療性組成物可便於靜脈投予(例如藉由單位劑量注射)。單位劑量一般是指本發明之治療性組成物，其進一步是指對受試者適合作爲單位劑量之物理上分開的單位，每一單位包含計算用以產生所欲治療反應之活性物質的預定量和所需稀釋劑(即載體或賦形劑)。

【0078】 以適當劑型之方式與治療上有效劑量投予組成物。給藥量取決於所欲治療的受試者、受試者身體利用活性物質的能力，以及所欲治療效果之程度。需要投予之活性成分的精確劑量取決於醫生之判斷與個體的差異性。然而，所揭露供系統性應用之適當劑量範圍取決於給藥途徑。用於投予的適當治療方案也不盡相同， 而是以於初次投予後投予重複劑量作爲代表(於一或多個小時之間隔藉由之後的注射或其他投予方式)。另外，考慮在生物治療中

持續靜脈輸注以維持血液中的濃度於指定範圍。

【0079】 於受試者用以治療、預防，及/或功能性治癒 HIV 感染的方法包含投予受試者有效劑量之含有抗體的劑型。在某些實施例中，以單次投予的方式提供劑型給受試者。在某些實施例中，以多次投予的方式提供劑型給受試者。當以多次投予的方式提供劑型時，劑型可以每天一次、每週一次、每兩週一次(每隔一週)，或每月一次投予。在具體實施例中，當治療時程表是以每週一次時，劑型是以約 5.0 mg/kg 受試者體重之劑量投予受試者。在另一實施例中，當治療時程表是以每兩週一次時，劑型是以約 25.0 mg/kg 受試者體重之劑量投予受試者。

【0080】 在某些實施例中，當以總共 8 週，以 5 mg/kg 或 25 mg/kg 劑量以每週爲基礎重複投予受試者時，含有單株抗體之劑型顯現高安全係數且耐受性良好。在特定實施例中，單株抗體可以 5 mg/kg 劑量在 HIV 感染數小時內投予受試者，以提供 HIV 感染的消除性治癒。在其他實施例中，單株抗體可以 5 mg/kg 劑量於 HIV 感染後在數天內投予受試者，以提供 HIV 感染的功能性治癒。

【0081】 在某些實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合，抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其透過靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予 HIV 患者作爲免疫療法以減少病毒量。在特定實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之針對 CD4 功能區塊 1 CDR2 區域之人類、擬人化或嵌合單株抗-CD4 抗體的醫藥

組成物，其展現競爭型 HIV 進入抑制與 CD4+ T 細胞活化，以作爲 HIV 感染之患者的免疫療法。

【0082】 在某些實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量透過靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予 HIV 患者作爲免疫療法以減少病毒量。

【0083】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其作爲單一藥物治療可使接受治療之受試者血清抗體水平高於 10 μg/mL，將病毒量降低至檢測極限以下。

【0084】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其作爲單一藥物治療可於爲期 12 週治療期間使接受治療之受試者血清抗體水平高於 10 μg/mL，且維持穩定的 CD4 T 細胞數量，將病毒量降低至檢測極限以下。

【0085】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合抗-CD4 抗體的醫藥組成物，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予作爲單一藥物治療時，此種治療可於爲期 12 週治療期間使接受治療之受試者的病毒量降低至檢測極限以下。

【0086】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合抗-CD4 抗體的醫藥組成物，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑

量投予作爲單一藥物治療時，此種治療可使接受治療之受試者的病毒量降低至檢測極限以下，且只要血清抗體水平高於 10 μg/mL 即無病毒量反彈。

【0087】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其可作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予未使用治療藥物之 HIV 患者，可達成患者的功能性治癒。

【0088】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其可作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予於 HAART 下具有穩定病毒量的患者，可達成患者的功能性治癒。

【0089】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量透過靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予對 HAART 之輔助治療中 HAART 治療失敗之患者，可使病毒進一步減少。

【0090】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予作爲於 HAART 替代療法的關鍵成份，藉此進行治療循環，每治療循環以抗-CD4 抗體治療 2 至 4 個月作爲開始，其如同對於 HARRT 之下經歷穩定低於檢測極限病毒量之患者的治療假日(treatment

holiday)，之後接續 HAART 治療，進行 1 至 4 個或更多循環的期間，可達成功能性治癒。

【0091】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予作爲於 HAART 替代療法的關鍵成份，藉此進行治療循環，對於未使用治療藥物之 HIV 患者每治療循環以抗-CD4 抗體治療 2 至 4 個月作爲開始，之後接續 2 至 4 個月的 HAART 治療，進行 1 至 4 個或更多循環的期間，可達成功能性治癒。

【0092】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予作爲於 HAART 替代療法的關鍵成份，藉此進行治療循環，每治療循環以抗-CD4 抗體治療 2 至 4 個月作爲開始，其如同對於 HARRT 之下經歷穩定低於檢測極限病毒量之患者的治療假日，之後接續 HAART 治療，進行 1 至 4 個或更多循環的期間，以每週或每兩週之時程表以約 5 mg/kg 或更高之劑量，可達成功能性治癒。

【0093】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予作爲於 HAART 替代療法的關鍵成份，藉此進行治療循環，對於未使用治療藥物之 HIV 患者每治療循環以抗-CD4 抗體治療 2 至 4 個月作爲開始，之後接續 2 至 4 個月的 HAART 治療，進行 1 至 4

個或更多循環的期間，以每週或每兩週之時程表以約 5 mg/kg 或更高之劑量，可達成功能性治癒。

【0094】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其可作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予未使用治療藥物之 HIV 患者，將達成患者的功能性治癒。

【0095】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，其可作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，當以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量投予於 HAART 下具有穩定病毒量的患者，將達成患者的功能性治癒。

【0096】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以每週或每兩週之時程表以約 10 mg/kg 或更高之劑量透過靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予對 HAART 之輔助治療中 HAART 治療失敗之患者，使病毒進一步減少。

【0097】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4 抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，於間歇模式中，對於未使用治療藥物之 HIV 患者，每循環以 2 至 4 個月之治療期作爲開始，以及 1 至 2 個月之治療假日，進行 1 至 4 個或更多循環的期間，如同於密集 HAART 治療模式的輔助治療，可達成患者

的功能性治癒。

【0098】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，於間歇模式中，對於未使用治療藥物之 HIV 患者，每循環以 2 至 4 個月之治療期作爲開始，以及 1 至 2 個月之治療假日，進行 1 至 4 個或更多循環的期間，以每週或每兩週之時程表以約 5 mg/kg 或更高之劑量，如同於密集 HAART 治療模式的輔助治療，可達成患者的功能性治癒。

【0099】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株擬人化抗-CD4抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予作爲偕同 HAART 之輔助治療的關鍵成份，於間歇模式中，對 HARRT 之下經歷穩定低於檢測極限病毒量之患者，每循環以 2 至 4 個月之治療期作爲開始，以及 1 至 2 個月之治療假日，進行 1 至 4 個或更多循環的期間，以每週或每兩週之時程表以約 5 mg/kg 或更高之劑量，如同於密集 HAART 治療模式的輔助治療，可達成患者的功能性治癒。

【0100】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結合特徵之單株人類、擬人化或嵌合抗-CD4抗體的醫藥組成物，可將其以靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予 HIV 患者作爲免疫療法以減少病毒量。

【0101】 在其他實施例中，本發明關於包含具有上述結

合特徵之單株人類、擬人化或嵌合抗-CD4抗體的醫藥組成物，可將其以每週或每兩週之時程表以約 5 mg/kg 或更高之劑量透過靜脈注射或皮下注射給藥途徑投予 HIV 患者作爲免疫療法以減少病毒量。

具體實施例

【0102】 本發明包含以下具體實施例：

(1) 一種用以治療暴露於HIV感染之受試者的方法，包含：a) 投予針對CD4之單株抗體的藥理學上有效劑量包含：SEQ ID NO: 1之鼠源抗體B4之重鏈的CDR1、SEQ ID NO: 2之鼠源抗體B4之重鏈的CDR2、SEQ ID NO: 3之鼠源抗體B4之重鏈的CDR3、SEQ ID NO: 4之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR1、SEQ ID NO: 5之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR2，以及SEQ ID NO: 6之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR3；b)在步驟(a)後評估受試者血液之每毫升的HIV RNA水平。

(2) 依據(1)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 7。

(3) 依據(1)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 9。

(4) 依據(1)的方法，其中抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(5) 依據(1)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 7，且抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(6) 依據(1)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID

NO: 9，且抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(7) 依據(1)的方法，其中投予步驟(a)是於暴露於HIV感染24小時內進行。

(8) 依據(1)的方法，其中投予步驟(a)是於暴露於HIV感染48小時內進行。

(9) 依據(1)的方法，其中單株抗體的藥理學上有效劑量是以於12週之期間內以每週或每兩週之時程表以約爲10 μg/ml或更高之血清水平被投予。

(10) 依據(1)的方法，其中低於1 copy/ml之每毫升的HIV RNA水平數值被視爲病毒的根除。

(11) 依據(1)的方法，其中介於1至低於50 copy/ml之每毫升的HIV RNA水平數值被視爲病毒的功能性治癒。

(12) 一種用以治療HIV患者的方法，包含：a) 投予組成物之藥理學上有效劑量，此組成物包含針對CD4之單株抗體，此針對CD4之單株抗體包含：SEQ ID NO: 1之鼠源抗體B4之重鏈的CDR1、SEQ ID NO: 2之鼠源抗體B4之重鏈的CDR2、SEQ ID NO: 3之鼠源抗體B4之重鏈的CDR3、SEQ ID NO: 4之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR1、SEQ ID NO: 5之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR2，以及SEQ ID NO: 6之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR3；以及高效抗反轉錄病毒療法(HAART)；以及b)在步驟(a)後評估受試者血液中每毫升的HIV RNA水平。

(13) 依據(12)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 7。

(14) 依據(12)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 9。

(15) 依據(12)的方法，其中抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(16) 依據(12)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 7，且抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(17) 依據(12)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 9，且抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(18) 依據(12)的方法，其中抗體的藥理學上有效劑量是以每週或每兩週之基礎以10 mg/kg或更高之劑量被投予。

(19) 依據(12)的方法，其中抗體是以間歇模式被投予以作爲於HAART治療模式中的輔助治療。

(20) 依據(19)的方法，其中每循環是於約2至4個月之期間投予抗體作爲HAART治療模式中的輔助治療，之後爲HAART治療模式中1至2個月的抗體治療假日。

(21) 依據(20)的方法，其中間歇方式持續一至四循環的期間。

(22) 一種用以治療HIV患者的方法，包含：a)藉由活化患者體內之潛伏感染細胞的HIV病毒表現和細胞凋亡，以減少於HIV患者體內的潛伏HIV病毒庫；以及b) 對患者投予HAART的藥理學上有效劑量。

(23) 依據(22)的方法，其中活化患者體內潛伏感染細胞的HIV病毒表現和細胞凋亡是藉由對患者投予針對CD4

之單株抗體的藥理學上有效劑量而加以執行，包含：SEQ ID NO: 1之鼠源抗體B4之重鏈的CDR1、SEQ ID NO: 2之鼠源抗體B4之重鏈的CDR2、SEQ ID NO: 3之鼠源抗體B4之重鏈的CDR3、SEQ ID NO: 4之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR1、SEQ ID NO: 5之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR2，以及SEQ ID NO: 6之鼠源抗體B4之輕鏈的CDR3。

(24) 依據(22)的方法，其中活化患者體內潛伏感染細胞的HIV病毒表現和細胞凋亡是藉由對患者投予組蛋白脫乙醯酶(HDAC)抑制劑而加以執行。

(25) 一種用以治療暴露於HIV感染之受試者的方法，包含：a)投予對CD4類CDR2功能區塊區域(CDR2-like domain region)具有高度親和力之單株抗體的藥理學上有效劑量；以及b)在步驟(a)後評估受試者血液之每毫升的HIV RNA水平。

(26) 依據(25)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 7。

(27) 依據(25)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 9。

(28) 依據(25)的方法，其中抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(29) 依據(25)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 7，且抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(30) 依據(25)的方法，其中抗體的重鏈序列包含SEQ ID NO: 9，且抗體的輕鏈序列包含SEQ ID NO: 8。

(31) 依據(25)的方法，其中投予步驟(a)是於暴露於HIV感染24小時內進行。

(32) 依據(25)的方法，其中投予步驟(a)是於暴露於HIV感染48小時內進行。

(33) 依據(25)的方法，其中單株抗體的藥理學上有效劑量是於12週之期間內以每週或每兩週之時程表以約10 μg/ml或更高之血清水平被投予。

(34) 依據(25)的方法，其中低於1 copy/ml之每毫升的HIV RNA水平數值被視爲病毒的根除。

(35) 依據(25)的方法，其中介於1至低於50 copy/ml之每毫升的HIV RNA水平數值被視爲病毒的功能性治癒。

額外的具體實施例

【0103】

(1) 一種用以治療暴露於HIV之受試者的方法，包含投予受試者針對CD4功能區塊1之抗體的藥理學上有效劑量。

(2) 依據(1)的方法，其中抗體特異性地結合位於CD4功能區塊1的CDR2區域。

(3) 依據(2)的方法，其中抗體爲單株抗體、多株抗體，或其結合。

(4) 依據(2)的方法，其中抗體爲擬人化單株抗體。

(5) 依據(4)的方法，其中擬人化單株抗體包含：重鏈胺基酸序列包含：SEQ ID NO: 1的CDR1、SEQ ID NO: 2的CDR2，以及SEQ ID NO: 3的CDR3；以及輕鏈胺基酸序列

包含：SEQ ID NO: 4的CDR1、SEQ ID NO: 5的CDR2，以及SEQ ID NO: 6的CDR3。

(6) 依據(4)的方法，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的重鏈；以及包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。

(7) 依據(4)的方法，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的重鏈；以及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的輕鏈。

(8) 依據(7)的方法，其中重鏈包含SEQ ID NO: 7的胺基酸序列。

(9) 依據(8)的方法，其中擬人化抗體是於暴露於HIV前投予受試者。

(10) 依據(8)的方法，其中擬人化抗體是於暴露於HIV後投予受試者。

(11) 依據(10)的方法，其中擬人化抗體是於暴露於HIV後48小時內投予。

(12) 依據(8)的方法，其中擬人化抗體是以至少約5 mg/kg體重之劑量投予受試者。

(13) 依據(12)的方法，其中擬人化抗體是以多次投予受試者。

(14) 依據(13)的方法，其中擬人化抗體是以每週或每兩週之間隔投予受試者。

(15) 依據(13)的方法，更包含投予受試者抗病毒藥物之步驟。

(16) 依據(15)的方法，其中抗病毒藥物為高效抗反轉錄病毒療法(HAART)。

(17) 依據(16)的方法，其中HAART包含核苷類似物反轉錄酶抑制劑合併使用蛋白酶抑制劑或非核苷類反轉錄酶

抑制劑。

(18) 依據(16)的方法，其中擬人化抗體是與HAART同時投予。

(19) 依據(16)的方法，其中在一循環的期間內投予受試者擬人化抗體和HAART，其中此循環包含：(i)以每週或每兩週之間隔於4個月之期間對受試者投予擬人化抗體，之後為兩個月的治療假日；以及(ii)於(i)內之六個月期間持續地對此受試者投予HAART。

(20) 依據(19)的方法，其中受試者是以二循環的期間治療。

(21) 一種用以治療HIV感染之受試者的方法，包含投予此受試者治療方案包含：(a)針對CD4功能區塊1之抗體的藥理學上有效劑量；以及(b)高效抗反轉錄病毒療法(HAART)。

(22) 依據(21)的方法，其中抗體特異性地結合位於CD4功能區塊1的CDR2區域。

(23) 依據(22)的方法，其中抗體為單株抗體、多株抗體，或其結合。

(24) 依據(22)的方法，其中抗體為擬人化單株抗體。

(25) 依據(24)的方法，其中擬人化單株抗體包含：重鏈胺基酸序列包含：SEQ ID NO: 1的CDR1、SEQ ID NO: 2的CDR2，以及SEQ ID NO: 3的CDR3；以及輕鏈胺基酸序列包含：SEQ ID NO: 4的CDR1、SEQ ID NO: 5的CDR2，以及SEQ ID NO: 6的CDR3。

(26) 依據(24)的方法，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的重鏈；以及包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。

(27) 依據(24)的方法，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的重鏈；以及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的輕鏈。

(28) 依據(27)的方法，其中擬人化抗體是以至少約5 mg/kg體重之劑量投予受試者。

(29) 依據(21)的方法，其中在一循環的期間內投予受試者治療方案，其中此循環包含：(i)以每週或每兩週之間隔於4個月之期間對受試者投予擬人化抗體，之後為兩個月的治療假日；以及(ii)於(i)內之六個月期間持續地對此受試者投予HAART。

(30) 依據(29)的方法，其中此受試者是以二循環治療。

更具體實施例

【0104】

(1) 一種用以治療暴露於HIV之受試者的組成物包含：針對CD4功能區塊1之抗體的藥理學上有效劑量。

(2) 依據(1)的組成物，其中抗體特異性地結合位於CD4功能區塊1的CDR2區域。

(3) 依據(2)的組成物，其中抗體為單株抗體、多株抗體，或其結合。

(4) 依據(2)的組成物，其中抗體為擬人化單株抗體。

(5) 依據(4)的組成物，其中擬人化單株抗體包含：重

鏈胺基酸序列包含：SEQ ID NO: 1的CDR1、SEQ ID NO: 2的CDR2，以及SEQ ID NO: 3的CDR3；以及輕鏈胺基酸序列包含：SEQ ID NO: 4的CDR1、SEQ ID NO: 5的CDR2，以及SEQ ID NO: 6的CDR3。

(6) 依據(4)的組成物，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的重鏈，以及包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。

(7) 依據(4)的組成物，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的重鏈；以及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的輕鏈。

(8) 依據(7)的組成物，其中重鏈包含SEQ ID NO: 7的胺基酸序列。

(9) 依據(8)的組成物，其中擬人化抗體是於暴露於HIV前投予受試者。

(10) 依據(8)的組成物，其中擬人化抗體是於暴露於HIV後投予受試者。

(11) 依據(10)的組成物，其中擬人化抗體是於暴露於HIV後48小時內投予。

(12) 依據(8)的組成物，其中擬人化抗體是以至少約5

mg/kg體重之劑量投予受試者。

(13) 依據(12)的組成物，其中擬人化抗體是以多次投予受試者。

(14) 依據(13)的組成物，其中擬人化抗體是以每週或每兩週之間隔投予受試者。

(15) 依據(13)的組成物，其中是以抗病毒藥物治療(或投予)受試者。

(16) 依據(15)的組成物，其中抗病毒藥物爲高效抗反轉錄病毒療法(HAART)。

(17) 依據(16)的組成物，其中HAART包含核苷類似物反轉錄酶抑制劑合併使用蛋白酶抑制劑或非核苷類反轉錄酶抑制劑。

(18) 依據(16)的組成物，其中擬人化抗體是與HAART同時投予。

(19) 依據(16)的組成物，其中在一循環的期間內投予受試者擬人化抗體和HAART，其中此循環包含：(i)以每週或每兩週之間隔於4個月之期間對受試者投予擬人化抗體，之後爲兩個月的治療假日；以及(ii)於(i)內之六個月期間持續地對此受試者投予HAART。

(20) 依據(18)的組成物，其中受試者是以二循環的期間治療。

(21) 一種用以治療HIV感染之受試者的組成物包含：(a)針對CD4功能區塊1之抗體的藥理學上有效劑量；以及(b)高效抗反轉錄病毒療法(HAART)。

(22) 依據(21)的組成物，其中抗體特異性地結合位於CD4功能區塊1的CDR2區域。

(23) 依據(22)的組成物，其中抗體爲單株抗體、多株抗體，或其結合。

(24) 依據(22)的組成物，其中抗體爲擬人化單株抗體。

(25) 依據(24)的組成物，其中擬人化單株抗體包含：重鏈胺基酸序列包含：SEQ ID NO: 1的CDR1、SEQ ID NO: 2的CDR2，以及SEQ ID NO: 3的CDR3；以及輕鏈胺基酸序列包含：SEQ ID NO: 4的CDR1、SEQ ID NO: 5的CDR2，以及SEQ ID NO: 6的CDR3。

(26) 依據(24)的組成物，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的重鏈；以及包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。

(27) 依據(24)的組成物，其中擬人化單株抗體包含：包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的重鏈，以及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的輕鏈。

(28) 依據(27)的組成物，其中擬人化抗體是以至少約5 mg/kg體重之劑量投予受試者。

(29) 依據(21)的組成物，其中在一循環的期間內投予受試者治療方案，其中此循環包含：(i)以每週或每兩週之間隔於4個月之期間對受試者投予擬人化抗體，之後爲兩個月的治療假日；以及(ii)於(i)內之六個月期間持續地對此受試者投予HAART。

(30) 依據(18)的組成物，其中此受試者是以二循環治

療。

【0105】 除非特別說明，在此使用的所有技術和科學用語如本發明所屬技術領域中具有通常知識者的通常理解具有相同意義。除非上下文清楚地指出，否則單詞“一(a)”、“一(an)”和“該(the)”包含複數形式。類似地，單詞“或(or)”是意指包括“和(and)”，除非上下文另有明確說明。因此，“包含 A 或 B”是指包括 A，或 B，或 A 和 B。更應被理解的是，用於給定多胜肽之所有的胺基酸大小和所有分子量或分子質量值是近似的，並且被提供作爲描述之用。然而類似或等同於在此描述者的方法和材料可被用於以下所述之揭露的方法、合適的方法和材料的實踐或測試中。所有出版物、專利申請、專利和在此提及的其它參考文獻透過引用在此併入本文整體。在衝突的情況下，以本說明書(包括術語的解釋)爲準。此外，材料、方法和實施例僅是說明性的而非意指加以限制。

【0106】 所提供圖式和相關實施例的以下說明性解釋是用以便於理解在此頻繁使用的某些術語，特別是在實施例中。解釋是爲便利性而被提供而非用以限制本發明。

【實施例】

實施例1. MAb B4的免疫和功能特性

【0107】 單株抗體 B4 (mAb B4)爲可辨識位於 T 細胞表面之複合 HIV 受體位點(CD4)的單株抗體。MAb B4 可影響和妨礙 CD4 和 HIV 協同受體的交互作用。MAb B4 優先地

中和原代 HIV-1 分離株。

【0108】 以下資訊總結了鼠源 mAb B4 之發現與初步的特性研究，其包含引用自兩篇專利(由 Wang 所發明的美國 5,912,176 號和 6,090,388 號專利)和 Wang 等人於 1999 年發表期刊論文的資料，其均透過引用以併入本文整體。

1. 衍生自HPB-ALL免疫之鼠源單株抗體

【0109】 以完整、未感染的 CD4+人類 HPB-ALL 細胞、T 細胞急性淋巴細胞性白血病細胞株免疫 BALB/c 小鼠以提供 mAb B4。

【0110】 所提供之新種類的抗-CD4 抗體(以 mAb B4 表示)對位於細胞表面之 CD4 具有特異性，且對 HIV-1 的原代分離株具有廣泛的中和活性。

2. MAb B4辨識位置的特徵

【0111】 相較於重組可溶性 CD4 (rsCD4)，發現 mAb B4 優先地辨識位於細胞表面上與膜結合的 CD4 (membrane-bound CD4)。

【0112】 於暴露於 HIV 前之 mAb B4 結合至與膜結合的 CD4 顯示可阻斷後續 gp120 和整個病毒附著至 CD4。然而，於暴露於抗體前就已結合至 gp120 的與膜結合的 CD4 仍然可結合 mAb B4。因此，mAb B4 能影響 gp120 結合至與膜結合的 CD4，但是 gp120 並不影響 mAb B4 結合至 CD4。

【0113】 MAb B4 的辨識位置有別於其他已充分研究之抗-CD4 單株抗體的辨識位置，包含可辨識 CD4 功能區塊 1 之單株抗體 Leu3a 和 OKT4A (Chiba, Y. 1992; Jameson, B.D.,

et al., 1988)，以及可辨識 CD4 功能區塊 2 之單株抗體 5A8 (Burkly, et al., 1992)。

3. MAb B4的體外中和活性

【0114】 透過一般的定義，鼠源 mAb B4 並非中和性抗體。反而，mAb B4 是藉由覆蓋宿主細胞受體，而非藉由附著至病毒，以抑制病毒進入。可藉由於此領域所使用之病毒中和試驗而容易地觀察到 mAb B4 對 HIV 感染的效果(例如 MT-2 微斑中和試驗(MT-2 Microplaque Neutralization Assay) (Sawyer et al., 1994))。鼠源 mAb B4 的中和活性是由我們的合作者 Carl Hanson 博士(加州健康服務部)所評估，也於 John Mascola 博士(亨利傑克遜基金會，WRAIR)、David Montefiori 博士(杜克大學)和 Malcolm Martin 博士(NIAID)的實驗室中獨立地評估。以下 HIV 中和特性，於 1995 年至 2010 年間被廣泛地描繪，其與 mAb B4 相關：

(1) PBMC生長的原代分離株(PBMC-grown primary isolates)較 T 細胞株適應的分離株 HIV-1_{IIIB} 和 HIV-1_{MN}對藉由mAb B4的中和作用更加敏感。

(2) MAb B4可中和透過使用CCR5/CXCR4 (雙性)和CCR5協同受體之原代分離株的感染。

(3) MAb B4對使用CXCR4協同受體之T細胞株適應的HIV-1分離株具有低活性。

(4) MAb B4可中和代表HIV-1亞型A-G之不同合胞誘導型 (Syncytial Inducing (SI)) 和非合胞誘導型 (Non-Syncytial Inducing (NSI))的原代分離株，達到

90%終點指標(endpoints)與高達3個對數的感染性。

(5) MAb B4可中和具有雙性協同受體HIV-1外套膜的HIV-2、猿猴免疫不全病毒(SIV)和人猴嵌合免疫缺陷病毒(SHIV)。

(6) 於扁桃體組織系統，mAb B4減少了兩個對數之HIV-1原代分離株VL135 ($HIV\text{-}1_{VL135}$)的感染性。在活化的人類補體存在下，在此狀況下許多抗-病毒抗體展現抗體依賴性增強作用，少至12.5 μg/mL的mAb B4可完全地中和>100 TID_{50} (50%扁桃體感染劑量)的monocytotropic分離株JR-CSF。

(7) 當感染後加入mAb B4達48小時，mAb B4於$HIV\text{-}1_{VL135}$展現中和活性；當加入mAb B4達72小時後，則具有顯著的抗-病毒效果。

a. 不論是否與細胞或病毒預培養，其均同樣有效。

b. 它的作用是藉由阻斷感染的病灶傳播至新的細胞，而非藉由進入後的機制。

c. 在這些試驗中，mAb B4 並不有助於細胞毒性。

實施例2. HIV-1中和和抗藥性試驗

【0115】 以下於 1998 年至 2011 年期間針對不同進化支之多個 HIV 分離株的病毒中和和抗藥性試驗是在 Carl Hanson 博士和 Monogram 生物科學公司的實驗室中執行。此試驗的詳細說明如以下所述。

1. HIV-1中和試驗

【0116】 如每一試驗所指明收集血液或抗體樣品。使用MT-2 微斑試驗或有絲分裂促進劑(PHA)-刺激的 PBMC 試驗，於一組含有多個進化支(multi-clade panel)的 HIV-1 分離株評估血清或抗體樣品。

1.1. MT-2微斑試驗

【0117】 MT-2 微斑試驗限於 HIV 的合胞誘導型分離株。本試驗於 96 孔盤上進行，於其藉由在微斑上合胞的螢光染色可計數到高達每孔洞 25 個微小空斑。在此試驗中，受感染的 MT-2 細胞藉由透過熔化的瓊脂糖離心形成單層，此熔化的瓊脂糖於離心期間膠化。此試驗被認爲具有敏感性並具有遍佈多個數量級數的動態範圍。此試驗也被視爲是處理大量樣品時唯一具有效率的方法。利用電腦化統計分析大量複製的孔洞，以提供使用其他方式所難以達成之品質控制與標準化的程度。

1.2. PBMC試驗

【0118】 PBMC 試驗是一種標準的抗原-減少試驗，於此試驗中，在受感染的細胞於 96 孔微量盤生長後，以抗原-捕獲 ELISA 定量於 PBMCs 的 p24 抗原表現。此試驗的優點在於其適用於所有的 HIV 病毒株與分離株。

1.3. 病毒原液

【0119】 用於體外與體內中和試驗的 HIV 原液列於表 3、表 5 和表 6，以及第 1A、1B、3、22 和 23 圖。來自亞型 A 至 G 和 H 之原代 HIV-1 病毒爲：(a)分離自參加病毒和立克次體疾病實驗室(VRDL)加州健康服務部之舊金山

男性健康研究的男性同性戀者；(b)由 HIV 分離和鑑定之世界衛生組織網絡取得，(c)由美國軍方 HIV 研究計劃提供，以及(d)由國家過敏和傳染病研究所 AIDS 研究和參考試劑計劃所饋贈。DH-12 (由患者分離，於黑猩猩周邊血液單核球細胞(PBMC)繼代)也是由國家過敏和傳染病研究所 AIDS 研究和參考試劑計劃所提供。

1.4. B4或dB4中和活性

【0120】 B4 或 dB4 中和活性定義爲相對於不含抗體之控制組可提供指定百分比(50–95%)之病毒減少的抗體濃度。藉由於抗體稀釋物之間的內插法推導出在 50%和 90%終點指標之抗體濃度。

2. PhenoSense HIV進入試驗

【0121】 用以測定抗藥性之 PhenoSense HIV 進入試驗是於 Monogram 生物科學公司執行(南舊金山，加州)。

【0122】 利用從載體庫產生的重組病毒於不同濃度之藥物或抗體(例如 B4 或 dB4)存在下感染細胞。依據 50% (IC_{50})或 90% (IC_{90})測定用以抑制試驗載體之病毒複製所需的藥物量。

2.1. 使用於PhenoSense HIV試驗之重組病毒的產生

【0123】 PhenoSense HIV 試驗使用之重組病毒來自於患者的樣本，此些患者是於 HIV 感染之縱貫性研究中所篩選出，並確定爲 HIV 血清反應陽性者。對於發生 HIV 感染者，收集臨床和血漿樣品以供實驗室評估(包括 HIV 病毒量和 CD4 細胞數量)。對於起初是血清反應陰性但於後續約一

年變成血清反應陽性的個體，利用兩個酵素免疫分析法和西方墨點法之確証加以確認 HIV 感染。

【0124】 收集來自於血清轉化期間具有亞型 A、BF、C、D、E、EA、F、G 或 J 之受試者的樣品(基於先前的 HIV 亞型分析，其乃利用多個雜交分析而達成)，用以建構重組病毒(如表 3 所示)。由試驗樣品放大 HIV env、*pol* 區域，並選殖放大的 DNAs 進入試驗載體。於 GeneSeq HIV，定序載體庫以確定 HIV 基因型。於 PhenoSense HIV 試驗，於不同藥物濃度存在下利用從載體庫產生的重組病毒感染細胞。

實施例3. MAb B4對所有進化支之HIV分離株的中和活性(利用Monogram生物科學的PhenoSense試驗)

【0125】 已證實 mAb B4 可中和 B 進化支的所有 HIV 病毒。於本試驗中共計 73 個具代表性的非 B 進化支 HIV 分離株，將來自進化支 A (n=8)、BF (n=1)、C (n=18)、D (n=18)、E (n=4)、EA (n=10)、F (n=8)、G (n=4)、J (n=2)，加上三個控制組病毒 92HT594、JRCSF、JRFL，製成重組病毒，並於 PhenoSense HIV 試驗中測試，以分析其對 mAb B4 的敏感性(請參見表 3)。顯示所有重組病毒對 mAb B4 具有高度敏感性，其具有無先例的低 IC_{50} 和 IC_{90} 濃度，具有平均 IC_{50}=0.018 μg/mL 和 IC_{90}=0.062 μg/mL。值得注意的是，發現這些 HIV 病毒分離株中的多個衍生自具多重抗藥性患者，此清楚地表明 mAb B4 或其人類對應物在已經

對 HIV 藥物產生抗藥性之患者的治療中具有高效率。

實施例4. 單株抗體B4的競爭型HIV進入抑制：預防治療後之HIV抗藥性突變種的不可預期效果

【0126】 競爭型抑制試驗可評估抑制劑（例如，進入抑制劑抗體）與 HIV 外套膜蛋白競爭位在 CD4 上相同受體結合位點從而抑制 HIV 進入細胞的能力和療效。理論試驗中，mAb B4 和 HIV 外套膜蛋白(gp120)競爭結合 CD4。第 1A 圖顯示此試驗的預測結果，在此每一條線代表不同的病毒分離株。具體地，從此理論試驗的預期結果證明，雖然不同的病毒分離株對 mAb B4 具有不同敏感性(IC_{50})，但只要 mAb B4 存在足夠濃度下可抑制所有病毒分離株的進入，幅度達 100%。

【0127】 透過比較，非競爭型抑制試驗可評估抑制劑(例如，協同受體拮抗劑或結合於 CD4 之不同部分的抗體)抑制或降低 HIV 外套膜蛋白結合至 CD4 從而抑制 HIV 進入細胞的能力和療效。在理論試驗中，分析非競爭型抑制劑(例如，TMB-355)抑制 HIV 外套膜蛋白(gp120)結合 CD4 的能力。第 1B 圖顯示此試驗的預測結果，在此每一條線代表不同的病毒分離株。具體地，從此理論試驗的預期結果證明，不同的病毒分離株對 TMB-355 具有不同敏感性(IC_{50})，且不論 TMB-355 呈現量爲何，至少一些部份的病毒分離株可進入細胞。基於此理論試驗，如同於最大抑制百分比的“高原”，可預期不論 IC_{50} 爲何均可觀察到 HIV

抗藥性。

【0128】 TMB-355 (原 TNX-355，也稱爲 Ibalizumab)爲擬人化 IgG4 單株抗體，設計其結合恆河猴和人類 CD4 之細胞外功能區塊 2 以避免 HIV 結合後進入 CD4+細胞(例如，Burkly, LC, et al., 1992; and Kurizkes, DR, et al., 2004)。位於 CD4 之 TMB-355 抗體結合位點有別於 HIV 外套膜蛋白 gp120 結合所需之位點，且有別於與主要組織相容性複合體蛋白質交互作用所需之位點。據此，TMB-355 調停非競爭型 HIV 進入抑制。

【0129】 已顯示 TMB-355 對一些 HIV-1 病毒具有強烈的中和活性，但是當以一組廣泛的 HIV-1 病毒株評估時，其抑制活性與中和活性並不一致。第 2 圖顯示 TMB-355 的最大抑制百分比(MPI)介於 100%至 15%(左邊的 Y 軸)，伴隨由 0.01 μg/mL 至 10 μg/mL 之增加的 IC_{50} (右邊的 Y 軸)，對一組 118 種 Env 假型 HIV 病毒，以每一長條代表一種病毒分離株(Song, R., et al., 2013)。於分析的所有進化支中，進化支 A 和 E 病毒較非進化支 A 和 E 病毒對 TMB-355 顯著地具有敏感性。此外，發現來自接受 TMB-355 治療以減少病毒量之患者的病毒抗藥性突變種於 gp120 的 V5 區域具有突變(Toma, J., et al., 2011; Pace, C.S., et al., 2013)。以 TMB-355 (Ibalizumab)所證明之非競爭型抑制效應顯示在抗體治療期間有發展抗藥性 HIV 突變種的高度可能性，因爲具有低於 100%抑制的分離株會發生病毒複製。

【0130】 相反地，來自一組超過 850 種 Env 假型 HIV

病毒於 10 年期間收集的結果顯示，mAb B4 於 HIV 進入抑制提供了非預期之廣泛性與效力(第 3 圖)。從這些收集的數據可見 mAb B4 具有接近 100%最大抑制百分比(MPI)，具有兩個 IC_{50} 濃度，一個是介於 0.01 至 1 μg/mL，且另一個是約 10 μg/mL。MAb B4 之 HIV 進入抑制曲線具有競爭型抑制機制的典型特性，無論 IC_{50} 爲何，其對每一 HIV 病毒具有爲~100%之 MPI。鑑於 mAb B4 之顯著強烈的競爭型 HIV 進入抑制特性，故在 mAb B4 治療期間不大可能會發展出病毒抗藥性突變種。這種嚴密的競爭型抑制，如透過 mAb B4 所展現者，迄今從未以任何其它測試的 HIV 抑制劑觀察到。

【0131】 來自此實施例之 MPI 和 IC_{50}，與顯示衍生自多重抗藥性患者之多個 HIV 分離株對 mAb B4 具有高度敏感性的數據(實施例 3)相結合，顯示 mAb B4 或其人類對應物於 HAART 治療失敗之抗藥性 HIV 患者治療上具有高效率。由 mAb B4 所調停之中和模式提供獨特 HIV 藥物，其可於接受 mAb B4 或其人類對應相似物(具有相似 Fv 區域)治療的 HIV 患者中預防抗藥性病毒突變種的產生。

實施例5. 單株抗體B4的擬人化

【0132】 因爲鼠源抗體，mAb B4 於人類具有免疫原性。可透過已知的去免疫化技術(Jones, T.D., et al. 2009)之過程達到鼠源抗體的擬人化。MAb B4 的去免疫化於 Lynn., S.和 Wang, C.Y.之美國 7,501,494 號專利中已詳細描

述(其均透過引用以併入本文整體)，如同以下內容所概述。

【0133】 首先，完全地移除鼠源抗體 B4 的恆定區(C_H和 Cκ)，並以人類 IgG_1的恆定區(分別爲 SEQ ID NOs: 12 和 14)取代，然而保留 Fv 部分，從而製造嵌合 B4 抗體。接下來，爲供人類使用而將鼠源 mAb B4 之 Fv 片段去免疫化，此是藉由辨識與除去潛在具有免疫原性之鼠源 T 和 B-細胞抗原表位而達成。在從 mAb B4 的變異區中辨別此種抗原表位之後移除 T 細胞抗原表位。爲了呈現第二型主要組織相容性複合體結合域(MHC class II-binding motifs)而利用三維“肽鏈線化”方法以分析變異區的胺基酸序列。藉由表面殘基的“鑲飾”達成由變異區移除 B 細胞抗原表位而不妨礙抗體辨識。此去免疫化擬人化形式的 mAb B4 稱爲 mAb dB4。

【0134】 Lynn., S.和 Wang, C.Y.之美國 7,501,494 號專利討論到 IgG_1於 CH2 區域中含有雙觸角複合 N 端結合碳水化合物，其對於效能作用(effector functions)具有重要性，例如補體結合和抗原依賴細胞毒殺作用(antigen-dependent-cellular-cytotoxicity, ADCC)，可造成目標抗原的消除。因爲 mAb B4 作用於 CD4 受體複合體，其可透過負責結合補體之 IgG_1的效能作用造成 CD4+細胞的破壞和 CD4+細胞功能的免疫抑制。因此，移除位於 IgG_1之 Fc 區域的 N-醣化點可破壞 IgG_1結合至人類 FcR1 的能力，以活化補體，或結合 C1 q，從而消除 IgG 調停的補體依賴型細胞毒殺作用(CdC)。藉由以 His (H)取代胺基酸殘

基 Asn (N) (即 N298H)達成移除位於 IgG_1 之 Fc 區域的 N-醣化點。

【0135】 在本說明書中所討論的胺基酸編號/位置是基於包含在序列表中的序列，此序列表爲本說明書的一部分。應該注意的是，以上所討論之位在第 298 個胺基酸之醣化點對應於天然 IgG_1 分子中位於第 297 個胺基酸之醣化點，它是根據用於 IgG_1 的歐洲編號系統所編號的。因此，本申請案之第 298 個胺基酸對應於美國 7,501,494 號專利中位於第 297 個胺基酸之醣化點。

【0136】 Fv功能區塊之去免疫化 mAb dB4 重鏈(第 4 圖)和輕鏈(第 5 圖)的 CDR1、2 和 3 區域分別包含 SEQ ID NOs: 1 至 6 的胺基酸序列(表 4)。MAb dB4 重鏈和輕鏈的完整胺基酸序列分別地如第 4 和 5 圖所示，如 SEQ ID NOs: 7 和 8。

【0137】 發現當突變位於抗體重鏈的某些胺基酸時可改進(延長) mAb dB4 的半衰期。具體來說，當位於第 253 (Met)、255 (Ser)和 257 (Thr)個重鏈 Fc 胺基酸分別以 Tyr、Thr 和 Glu 取代時可改進擬人化抗體之半衰期。擬人化 mAb dB4 抗體經改進之重鏈的全長序列如第 6 圖所示，如 SEQ ID NO: 9。據此，經改進之擬人化抗體 mAb dB4 包含具有 SEQ ID NO: 8 胺基酸序列之輕鏈，以及具有 SEQ ID NO: 9 胺基酸序列之重鏈。

【0138】 鼠源 mAb B4 和擬人化 mAb dB4 之序列和結構的獨特特性爲存在位於第 101 個胺基酸位置(Asn101)的醣類結合殘基 Asn，於 Fv 的重鏈中。此醣類結合位點對其 Fv

區域位置是獨特的，其意外地隱藏於 Fv 功能區塊內，且只可藉由整個抗體分子的變性而曝露出來供酵素裂解。起初於 Fv 區域呈現此醣類使抗體特性複雜化。然而，對醣鏈或結合位點進行修飾會破壞抗體對 CD4 的結合親和力。因此，此位於 Fv 區域之獨特的 N-醣化點對抗體結合至 CD4 是具關鍵性的。

【0139】 第 7 圖說明 mAb dB4 之完整長度的重鏈胺基酸序列，其強調第 4 和 6 圖於上述所討論的醣化、取代和突變位置。

實施例 6. 利用 MT-2 微斑、PBMC 中和試驗和 PhenoSense進入試驗證明mAb dB4和其親本mab B4間的生物相等性

【0140】 進行廣泛的比較研究，以評估去免疫化/擬人化，Fc-無醣基化的 mAb dB4 和親本鼠源 mAb B4 的生物相等性，以確保擬人化形式可在靈長類動物和人類供進一步毒性/安全性和療效研究。來自這些比較研究的結果概述於下文。

(1) 高靈敏性的HIV-1中和試驗，分別以來自進化支A、B、C、D和E，以及來自進化支C和E之具代表性的HIV分離株，於MT-2微斑和有絲分裂促進劑(mitogen)刺激的PBMC試驗中進行。利用去免疫化技術將鼠源mAb B4擬人化形成mAb dB4抗體後並未造成HIV中和活性的喪失。比較結果如MT-2微斑(表5)

和基於PBMC之試驗(表6)所示。

(2) 因爲測得對來自所有進化支之所有HIV分離株的IC_{50}s和IC_{90}s彼此間落於兩倍以內，因此證明鼠源mAb B4和mAb dB4間的生物相等性。

(3) 在表現雙重受體(CXCR4和CCR5或X4/R5)的細胞株U87和具有各種向性之經挑選HIV分離株(包含JRCSF (R5)、HXB2 (X4)、92TH594 (R5/X4)、原代分離株#5 (R5)、原代分離株#6 (R5)和原代分離株#7 (R5))上進行，以評估藉由mAb B4、mAb dB4和其他兩個已知針對HIV-env之單株中和性抗體(2F5和2G12HIV)的HIV進入抑制。在此試驗中，HIV進入抑制是由Monogram生物科學利用假型病毒(假型病毒攜帶來自數百個HIV病毒株之任一者的外套膜醣蛋白和螢光酵素(luciferase))而加以評估。定量於U87-CD4+/CCR5+/CXCR4+細胞產生之生物螢光以測定抗體的中和作用，此細胞是利用生物工程於HIV tat控制下表現螢光酵素。此試驗的結果如表7所示，其證明：

a. 當與兩個最具效力之抗-HIV Env抗體2F5 (第1列)和2G12 (第2列)相比較時，鼠源mAb B4 (MuB4；第4列)於HIV進入抑制上較二者更具效力。對不同HIV分離株之相對應的IC_{50}s分別爲0.04 vs 4和0.8；0.4 vs 0.07和0.5；0.05 vs 3和1.3；0.05 vs 50和20；0.05 vs 2和3；0.03 vs >100和2；以及

b. 當以各種向性之相同具代表性的HIV分離株測試時，鼠源mAb B4 (MuB4；第4列)和mAb dB4 (第3列)於其IC_{50}s出人意料地相等。

【0141】 因此充分證明鼠源 mAb B4 和去免疫化的 mAb dB4 (二者在重鏈和輕鏈具有相同 CDRs)爲生物等效性的，且兩種抗體的功能特性在不同的體外和體內試驗中可爲代表彼此的。

實施例7. (A)對HPB-ALL細胞之dB4和mAb B4結合活性；(B)對PBMC CD4陽性細胞之dB4結合活性；(C)對重組CD4之dB4結合活性，以及(D)對HPB-ALL細胞之dB4 和gp120結合活性的特性

1. 背景

【0142】 儘管抗原結合和功能特性的定性方面是已知的，如同藉由中和試驗所證明，對 mAb dB4 及其親本鼠源 mAb B4 而言如先前實施例所示，但先前尚未研究過於 CD4+ T 淋巴細胞之 mAb B4 和 mAb dB4 定量的細胞結合曲線。

【0143】 測試鼠源 mAb B4 和其擬人化，Fc-無醣基化的 IgG_1 單株抗體 mAb dB4 在正常人類血液 CD4+ T 淋巴細胞和在 CD4+ T-白血病 HPB-ALL 細胞之細胞結合曲線。使用 HPB-ALL 細胞是因爲如實施例 1 所討論是透過以 HPB-ALL 細胞免疫接種小鼠而選出 mAb B4。一般的細胞結合是利用流式細胞儀(FACS)分析方法評估，且結果是基於平均螢光

強度(MFI)記述爲 EC_{50} 或 IC_{50} 數值。除了評估抗體一般的細胞結合，也研究天然 dB4 IgG_1 分子對 HPB-ALL 細胞之絕對結合親和力(Kd)和最大結合容量(Bmax)。

2. 材料

2.1. 培養液和試劑

【0144】 培養 HPB-ALL 細胞之 RPMI-1640 培養液和胎牛血清是來自 Gibco (貨號分別爲 11875-093 和 10091-148)。牛血清白蛋白(BSA)是來自 ApplicChem (貨號 A-0850)。細胞與測試抗體之培養是在 NUNC 的 V 型底 96 孔盤(貨號 249662)上進行。供樣品製備的微量稀釋管(1.2 mL)是來自 Bertec (貨號 1710-00)。以 2%甲醛固定細胞；樣品以含有 0.05% BSA 和 0.05%疊氮化鈉之 PBS (pH 7.4) 稀釋；且清洗液爲含有 0.05%疊氮化鈉之 PBS (pH 7.4)。

【0145】 分別利用山羊抗-鼠 IgG-FITC (Sigma，貨號 F8264)和山羊 $F(ab')_2$ 抗-人 IgG Fcγ-FITC (Jackson ImmunoResearch，貨號 109-096-098)追蹤鼠源 mAb B4 和擬人化 mAb dB4 之結合。dB4-Alexa 488 結合物(整篇文章以縮寫的“dB4-Alexa”表示)爲於聯合生物醫學公司(UBI)內部製造(UBI批號 0102143)。B4-biotin結合物來自 UBI (批號 051807)。綿羊抗-hIgG-HRP 來自 The Binding Site (貨號 AP004)；Extravidin-HRP 來自 Sigma Aldrich (貨號 E2886)；以及可溶性 rCD4 來自 R & D System (貨號 514-CD-050)。胜肽 p2704a HIV 外套膜來自 UBI，重組 gp120 MN 來自 ImmunoDiagnostics (貨號 1021-2)。利用抗-CD4(D2)-FITC

抗體(Ancell，貨號 148-020)選取血液 $CD4^+$ T 細胞供結合之追蹤使用。利用來自 LinearFlow™ Green Flow Cytometry Intensity Calibration Kits (Molecular Probe)的螢光珠作爲參考標準，以定量標幟細胞的相對螢光。使用的其他螢光偵測器爲：FITC-ChromPure 山羊 IgG、$F(ab')_2$ 片段(Jackson ImmunoResearch，貨號 005-090-006)；CD3 PE (ASR) (BD Biosciences，貨號 340662)；CD45 PerCP (ASR) (BD Biosciences，貨號 340665)。

2.2. HPB-ALL細胞和周邊血液$CD4^+$ T細胞

【0146】 由 DSMZ ACC提供 HPB-ALL 細胞株(人類胸腺衍生急性淋巴細胞性白血病細胞株)。PBMC $CD4^+$ T 細胞(由健康的供血者新鮮地採血至 EDTA-真空採血管內)衍生自以含有氯化銨之低滲溶液(8.3 g/L 氯化銨、0.84 g/L 碳酸氫鈉以及 29.4 mg/L EDTA 於 pH 7.4 之混合液)分解紅血球後的周邊血液白血球(PBL)。

2.3. 鼠源mAb B4和擬人化dB4 mAb

【0147】 透過以 HPB-ALL 細胞作爲免疫原之融合瘤操作提供鼠源單株 B4 IgG_1 (UBI 批號 120197)。藉由 N298H 使 B4-衍生的擬人化 dB4 IgG_1 成爲 Fc-無醣基化(實施例 5)。

2.4. ELISA和FACS偵測

【0148】 96 孔盤來自 Nalge NUNC International，平底(Cat. 442404)的供光學測定，V 型底的供細胞培養(Cat. 249570)。光學密度是於 VersaMax 微量盤分析儀上讀取(Molecular Devices)。以 BD FACSCalibur scanner (DB

Biosciences)偵測螢光染劑；並透過相關的 Cell Quest 軟體獲得結果的數據。將來自 ELISA 和 FACS 的結合數據導入到 SigmaPlot 11 軟體進行定量分析。

3. 方法

3.1. dB4對HPB-ALL細胞的結合

3.1.1. 平衡時間試驗

【0149】 於 V 型底的微量盤上，添加每孔洞 0.1 mL 內含 2×10^5 個細胞的溶液，離心，並丟棄液體。於長達 180 分鐘之各種持續時間，將細胞在冰上以 100 μL 高達 100 ng/mL 之各種濃度的 dB4 溶液加以培養。於培養時間收集上清液以測定游離、未結合的抗體藥物。利用添加之總藥物濃度扣除游離的部份而計算出結合的部份。

【0150】 利用 ELISA 定量於結合溶液中的游離 dB4 濃度。簡而言之，此試驗涉及塗覆於 NUNC Maxisorp 微量盤之綿羊抗-hIgL (0.5 μg/mL)混合液的使用，並以綿羊抗-huIgG-HRP (1/1000 稀釋)作爲檢測蛋白質。基於 0.14-18.5 ng/mL 範圍內之校正標準測定於未知樣品中的游離 dB4 濃度。

3.1.2. 與dB4直接結合試驗

【0151】 於 V 型底的微量盤上，添加每孔洞 0.1 mL 內含 2×10^5 個細胞的溶液，離心，並丟棄液體。將細胞在冰上以 100 μL 高達 2000 ng/mL 之各種濃度的 dB4 溶液培養 1 小時。培養之後，移除 dB4，並加入與起始培養所使用相同濃度之 dB4 的新鮮溶液至細胞中，並在冰上再培養細胞

1 小時。重複此步驟一次。研究來自三次培養(繼代)的細胞。在第三次培養後，洗滌細胞一次，以 300 g 離心 5 分鐘，以 100 μL 之山羊 $F(ab)_2$ 抗-huIgG Fc-FITC (250 ng/mL)於冰上染色 30 分鐘。洗滌細胞一次並於離心後丟棄液體。對每一孔洞加入 200 μL 的結合溶液，並將其移至微量稀釋管供流式細胞檢測分析。基於每一樣品 5,000 個細胞的進樣，於 FACS 上測定結合強度(平均螢光強度，MFI)。

3.1.3. dB4的結合親和力試驗

【0152】 在離心管內，加入濃度爲 3.1-2000 ng/mL (0.5 mL)之 dB4 抗體至數量爲 4 x 10^5 個細胞的 HPB-ALL 細胞(0.5 mL)中，並於和緩的搖動下於冰上培養 1 小時。測定於飽和結合時之絕對結合親和力，在此以 ELISA 定量溶液中的游離 dB4 濃度([F])，且如以上平衡試驗所述計算結合部分([B])。以基於等式[B] = Bmax • {[F]/([F] + Kd)}的曲線擬合於 SigmaPlot 上分析所得之飽和的游離-vs-結合濃度曲線，在此個別的[B]和[F]代表結合和游離的濃度。

3.1.4. dB4和B4與B4-biotin的競爭

【0153】 於塗覆 sCD4 (0.5 μg/mL)和 p2704a 胜肽(2.0 μg/mL)混合液之平底微量盤上，於 B4-biotin (10 μg/mL)存在下加入 0.1 mL 之 dB4 或 B4 溶液(濃度爲 0.78-100 μg/mL)，並於室溫下培養 1 小時。以下對捕獲混合物之競爭型結合，是以 Extravidin-HRP 偵測結合的 B4-biotin 並以 ELISA 分析儀測定。

3.1.5. dB4和B4與dB4-Alexa的競爭

【0154】 於 V 型底微量盤上，添加每孔洞 0.1 mL 內含 2×10^5 個細胞的溶液，離心，並丟棄液體。細胞於 dB4-Alexa (250 ng/mL)存在下與 100 μL 之 dB4 或 B4 溶液(濃度高達 2000 ng/mL)在冰上培養 1 小時。洗滌細胞一次並於離心後丟棄液體。對每一孔洞加入 200 μL 的結合溶液，並將其移至微量稀釋管供流式細胞檢測分析。基於每一樣品 5,000 個細胞的進樣，於 FACS 上測定結合強度(平均螢光強度，MFI)。

3.1.6. dB4C7和gp120 MN與dB4C7-Alexa的競爭

【0155】 於 V 型底微量盤上，添加每孔洞 0.1 mL 內含 2×10^5 個細胞的溶液，離心，並丟棄液體。細胞於 dB4-Alexa (250 ng/mL)存在下與 100 μL 之 dB4C7 或 gp120 MN 溶液(濃度高達 200 nM，~30 μg/mL)在冰上培養 1 小時。洗滌細胞一次並於離心後丟棄液體。對每一孔洞加入 200 μL 的結合溶液，並將其移至微量稀釋管供流式細胞檢測分析。基於每一樣品 5,000 個細胞的進樣，於 FACS 上測定結合強度(平均螢光強度，MFI)。

3.2. dB4對血液CD4+T淋巴細胞的結合

3.2.1. dB4 的溫度倚賴性結合試驗

【0156】 爲了模擬生理環境，在此於靜脈注射後 dB4 (UB-421)結合(覆蓋或佔據)位於 $CD4^+$T 細胞上之 CD4 受體，將由實驗室人員新鮮採取的 EDTA-血液溶液與等量之 dB4 於稀釋緩衝液中在 37°C 下進行培養(dB4 濃度高達 100 μg/mL)。爲了作比較，其他樣品組同時於冰上進行培養。

在培養 1 小時後，樣品以 20 倍體積之紅血球裂解緩衝液於室溫下裂解 10 分鐘以產生周邊血液白血球(PBL)部分。

【0157】 離心 PBL 部份，洗滌，並接著以等量之含有 1.0% BSA 和疊氮化鈉的 PBS 緩衝液再製(例如，0.1 mL 血液和 0.1 mL 稀釋緩衝液)。以 0.1 mL 之山羊 $F(ab)_2$ 抗-hIgG Fc-FITC、抗-CD3-PE 和抗-CD45 perCP 混合液於冰上染色 PBL 樣品 30 分鐘。洗滌之後，以 2%甲醛固定樣品，並基於 10,000 個細胞的進樣對樣品進行 FACS 分析。利用抗-CD3-PE 選取 T 淋巴細胞群。

3.2.2. 直接結合

【0158】 於三個男性和女性受試者中分析 dB4 對血液 CD4+ T 細胞的直接結合，在此將新鮮抽取之 EDTA-血液與 dB4 於 37°C 下培養 1 小時。MAb dB4 結合至 CD4+ T 細胞，且發現達到濃度範圍爲 0.2-200 ng/mL 之表觀飽和度(apparent saturation)。利用抗-CD3-PE 選取 T 淋巴細胞群。此實驗步驟與上述之溫度倚賴性結合試驗的步驟相同，在此利用山羊 $F(ab)_2$ 抗-hIgG Fcγ-FITC 染細胞以追蹤 dB4 之結合。

3.2.3. 未被佔據的結合位

【0159】 類似於上述之直接結合試驗，在對三個男性和三個女性之每一個體於相同場合下研究 dB4 結合後所留下未被佔據之結合位的程度(在完全受體佔據之前)。此實驗步驟與上述之直接結合試驗的步驟相同，除了其使用固定量之 dB4-Alexa (濃度 250 ng/mL)以顯現未被佔據的、空閒

結合位的程度。

3.2.4. 校正微珠

【0160】 爲了同時調查直接結合和未被佔據的結合位，利用兩種 Molecular Probes 的 LinearFlow™ Kits (貨號 L14821 和 L14823)之組合在六個不同場合中的每一個產生 log(MFI)-vs-log(bead%)標準曲線。此套件組合於流式細胞儀實驗中提供高和低強度標準之寬廣的校正範圍。作爲參考標準，利用這些螢光珠定量位於藉由山羊 $F(ab)_2$ 抗-hIgG FcR-FITC 或 dB4-Alexa 標幟之細胞上的相對螢光。

4. 結果和討論

4.1. dB4的結合曲線和其於CD4-陽性HPB-ALL細胞之絕對結合親和力(Kd)的測定

4.1.1. 對HPB-ALL細胞之結合活性的平衡

【0161】 在完全描述配體-受體結合反應特徵之前，定義對不同濃度配體達到平衡的時間長度，即高原狀態，在此結合速率等於解離速率。通常已知的狀況爲較低的濃度需要越長時間達到平衡。

【0162】 在於冰上培養 CD4-陽性 HPB-ALL 細胞之 dB4-CD4 交互作用的例子中，對 2.0 ng/mL 濃度要花約 60 分鐘，且對 50 ng/mL 濃度要花約 15 分鐘，以達到%結合數值中的高原。對 dB4 濃度爲 100 ng/mL (0.1 μg/mL)和更高的水平可觀察到幾乎瞬間達到高原狀態。

【0163】 這些結果指出對寬的濃度範圍(例如，濃度≥ 2.0 ng/mL)而言，dB4 結合反應可於 1 小時達成。結合試驗

可在冷的及/或在 0.05%疊氮化合物存在下進行，以避免配體-受體複合體之可能的內噬作用。於室溫或於 37°C 下培養可較快達到反應的高原狀態。在上述進展的狀況下，HPB-ALL 細胞，以三個不同細胞繼代，於冰上與 dB4 培養 1 小時。收集上清液以供游離藥物濃度的 ELISA 測定，且藉由從總數扣除提供結合的部分。利用如第 8 圖所示之結合曲線計算絕對結合親和力和結合容量。

4.1.2. 對HPB-ALL細胞的直接結合

【0164】 在三個不同場合(細胞繼代)，2 x 10^5 個 HPB-ALL 細胞於冰上與 dB4 (高達~2000 ng/mL)培養 1 小時，抗體展現 4-參數羅吉函數(logit function)的飽和結合曲線，在此結合的程度是利用山羊 $F(ab)_2$ 抗-huIgG Fc-FITC 測得並以平均螢光強度(MFI)表示。於濃度爲 200 ng/mL (0.2 μg/mL)和以上者之結合接近飽和。平均結合 EC_{50} 測得爲 42.2 ng/mL (表 8)，具有小的繼代代數間的差異(between-passage variation) (n=3)。也標準化絕對 MFI 數值爲% MFI 以供繼代代數間的比較。因此使標準差減到最小，且 EC_{50} 數值基本上保持不變；對兩個平均曲線之總平均結合 EC_{50} 數值測得爲 42.9 ng/mL (表 8)。

4.1.3. 於HPB-ALL細胞之結合親和力(Kd)和結合容量(Bmax)

【0165】 收集培養之後的上清液(冰上培養 1 小時)供利用 ELISA 測定游離(未結合) dB4 濃度[F]，且因此透過由加入(總)濃度扣除測得結合濃度[B]。利用如表 9 所示之游離

藥物-vs-結合藥物數據圖表評估對 dB4 的絕對結合親和力。平均解離常數(Kd)測得爲 5.6 x 10^{-11} M (範圍：3.1 至 8.1 x 10^{-11} M)，且最大結合容量(Bmax)測得爲每細胞 1.2 x 10^6 Ab (範圍：0.93 至 1.4 x 10^6)。這些結果指出 dB4 以特別高的親合力結合至位於 HPB-ALL 細胞上的 CD4 受體，且 HPB-ALL 細胞具有高密度，最高每個細胞對 dB4 具有超過一百萬個結合位(表 9)。位於 HPB-ALL 細胞上之 CD4 受體密度較位於血液 CD4+ T 淋巴細胞者高至少 20 倍，其爲每細胞約 3.2 - 6.1 x 10^4 個結合位。

4.2. dB4和B4於結合至HPB-ALL細胞的比較

【0166】 面臨的難題在於利用使鼠源 B4 抗體成爲 dB4 之去免疫化方法以擬人化是否改變了結合親和力，故於使用競爭設計的兩個技術報告上徹底研究此難題。

【0167】 首先，於以可溶性 CD4 (sCD4)和 p2704a 胜肽之捕獲混合物塗覆的 ELISA 微量盤上調查 mAb B4 和 mAb dB4 的結合親和力。p2704a 胜肽模擬 CD4-CCR5 受體複合體，因爲其包含位在 CCR5 上的抗原表位序列，而 HIV-1 繫住 CCR5 以進入 CD4 細胞。當以 ELISA 分析時可見，於各種濃度之 mAb B4 或 mAb dB4 存在下，B4-biotin 對塗覆之 sCD4/p2704a 混合物的結合受到抑制。當 mAb B4 或 mAb dB4 抗體共存且與 B4-biotin 競爭對捕獲蛋白質混合物之結合時，B4-biotin 之結合受到抑制，B4 和 dB4 之 IC_{50} 數值分別爲 5539 ng/mL 和 8191 ng/mL (第 9 圖)。B4 對 dB4 之 IC_{50} 比率爲 0.68，顯示擬人化 dB4 具有相當於鼠源 B4 抗

體的結合親和力。

【0168】 再者，也利用 CD4-陽性 HPB-ALL 細胞研究相對結合親和力，在此 B4 或 dB4 抗體共存且與 dB4-Alexa 競爭對細胞 CD4 受體之結合。利用 FACS 分析，dB4-Alexa 結合受到抑制，B4 和 dB4 之 IC_{50} 數值分別爲 135 和 197 ng/mL (第 10 圖)。B4 對 dB4 之 IC_{50} 比率爲 0.69，如利用 ELISA 範例所證明爲實質上相同，再次顯示擬人化 dB4 利用相當於鼠源 B4 抗體的親和力結合 CD4 受體。

【0169】 比較性的競爭型結合抑制試驗，利用親本抗體 B4 和其擬人化抗體 dB4C7 (UB-421)，提供對 CD4 陽性 T 細胞(HPB-ALL)的抗體結合曲線，其如同以平均螢光強度(MFI)對一系列抗體濃度(由 100 至 104 ng/mL)所測得。此試驗進一步驗證表 5 和表 6 所呈現的數據，此兩個抗體的個別中和活性於 MT2 和 PBMC 試驗系統中具有相當的中和抗體活性。

【0170】 當與其親本鼠源抗體 B4 比較時，這些比較性試驗所提供之結果指出利用去免疫化技術以擬人化並未顯著地減少 dB4C7 (UB-421)對 CD4 受體的結合親和力。

4.3. MAb dB4對CD4的結合特徵

【0171】 評估 mAb dB4 對 CD4 的結合特徵。

4.3.1. MAb dB4對可溶性CD4和對細胞結合之CD4的結合

【0172】 如以上討論，如利用 ELISA 所評估，dB4 抑制 B4-biotin 對 sCD4/p2704a 之結合，其 IC_{50} 爲 8191 ng/mL (第

9圖)，且如利用FACS測試，dB4抑制dB4-Alexa對HPB-ALL細胞之結合，其IC_{50}爲197 ng/mL(第10圖)。這些數據有趣地證明，相較於可溶性CD4 (sCD4)，dB4對CD4-陽性T細胞具有更高的結合親和力。具體來說，這兩項試驗之IC_{50}數值的比較顯示dB4對CD4陽性T細胞的結合親和力較可溶性CD4高超過40倍。

4.3.2. dB4和gp120 MN於HPB-ALL細胞結合之比較

【0173】 執行競爭試驗以比較dB4和HIV gp120 MN對結合於CD4-陽性T細胞之CD4的結合親和力。具體來說，比較dB4和gp120 MN抑制dB4-Alexa結合至位於HPB-ALL細胞上之CD4的能力(第11圖)。在第一個試驗中，dB4抑制dB4-Alexa結合至位於HPB-ALL細胞上之CD4，其IC_{50}爲1.8 nM。在比較試驗中，gp120 MN抑制dB4-Alexa結合至位於HPB-ALL細胞上之CD4，其IC_{50}爲97.2 nM。依照此結果，發現dB4較gp120 MN對位於HPB-ALL T細胞上之CD4具有實質上更高的結合親和力。具體來說，這兩項試驗之IC_{50}數值的比較顯示dB4對CD4的結合親和力較gp120 MN高至少50倍。

4.3.3. dB4和gp120 MN對CD4之結合親和力的比較

【0174】 如以上討論，mAb dB4結合至CD4具有約5.6 x 10^{-11} M的結合親和力(表9)。他人先前已發現，透過結晶學研究，HIV-1 gp120結合於CD4分子功能區塊1附近，具有約5 x 10^{-9} M的高結合親和力(Kd) (Myszka, D.G., et al., “Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction”

Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 1, 2000; 97(16): 9026–9031)。因此，比較 dB4 和 gp120 之 Kd 數值顯示，dB4 對 CD4 之結合親和力較 gp120 的結合親和力高約 100 倍。此結果與上述發現(基於 IC_{50} 數值的比較，dB4 結合 HPB-ALL 細胞較 gp120 MN 強至少 50 倍)一致。

【0175】 體外結果整體顯示，上述討論證明藉由避免或關閉 HIV 病毒進入，使 dB4 足以阻斷或減少 HIV-1 感染。

4.4. dB4 (UB-421)對血液CD4+ T細胞的溫度倚賴性結合

【0176】 研究於正常體溫(37°C)下 dB4 對人類血液中之 CD4+ T 細胞的結合，以測定是否可有效地投予 dB4 作爲治療藥物給人類受試者。爲了模擬人體的生理環境，dB4C7 (UB-421)與新鮮抽取的血液於 37°C 下培養 1 小時，且利用紅血球裂解步驟提供周邊血液白血球(PBL)樣品。同時執行於冰上(4°C)的培養。之後以山羊 $F(ab)_2$ 抗-huIgG-FITC 染色 PBL 部分，以顯現 dB4 對位於 CD4-選取 T 細胞上之 CD4 受體的直接結合。

【0177】 與於 4°C 下培養比較(數據未示)，指出以 dB4 於 37°C 下細胞培養 1 小時並不會造成配體-受體的內噬作用，如同觀察到於鼠抗-CD4(D2)-FITC 之 MFI 無變化。鼠抗-CD4(D2)-FITC (供 CD4+ T 細胞選取，濃度爲 50-1000 ng/mL)和 dB4 (目標爲 CD4 受體之 D1 功能區塊，濃度高達 200 ng/mL)並不會競爭結合。

【0178】 如同來自一女性個體之血液樣品所示(第 12

圖)，於兩種不同溫度(37°C 或 4°C)下將周邊血液單核球細胞(PBMC)與 dB4 培養 1 小時。染色選取的 CD4+ T 細胞供於 FACS 上觀察 dB4 結合。第 12 圖顯示 dB4 於 37°C 下較於 4°C 下以 5 倍高之親合力結合至 CD4 受體，此乃基於分別爲 4.8 ng/mL 和 23.0 ng/mL 的 IC_{50} 數值。如同預期，dB4 於兩種溫度狀況下均可達到相同之最大結合 MFI。MFI 數值反映受體佔據的程度，特別是當標準化這些數值並以% MFI 表示時。

4.4.1. dB4對血液CD4+ T細胞的直接結合

【0179】 研究於正常體溫(37°C)下 dB4 對人類血液中之 CD4+ T 細胞的結合曲線。利用從六個成人(三個男性和三個女性)新鮮抽取的血液於六個不同場合下評估 dB4 對血液 CD4+細胞的直接結合活性(表 10)。在 1 小時培養後，分離周邊血液白血球，以山羊 $F(ab)_2$ 抗-huIgG Fc-FITC 染色，並以 FACS 分析 dB4-結合之 CD4-選取的 T 細胞。以參考珠校正樣品以供螢光讀取。發現結合(EC_{50})數值介於 2.6 ng/mL 至 5.7 ng/mL，其平均 EC_{50} 爲 4.1 ng/mL。同樣地，最大% MFI 數值介於 68%至 93%，其平均值爲 77.8% (表 10)。這些結果分別地反映於結合親和力和受體密度上具微小意義的受試者間差異。

4.4.2. 在以mAb dB4佔據受體後之未被佔據的CD4結合位

【0180】 連同於 4°C 下 dB4 對血液 CD4+細胞的直接結合(如同以山羊抗-hIgG 偵測)，利用 dB4-Alexa 評估位於

CD4+細胞上之未被佔據，空閒的 CD4 結合位。

【0181】 在沒有 dB4 的狀況下，單獨 dB4-Alexa 結合物於濃度爲約 250 ng/mL時可接近其最大結合的~100% (第 13 圖)。濃度高於 500 ng/mL 時，dB4-Alexa 結合物可逐出約 10%或更多的結合的 dB4 (數據未示)。具體來說，當以 250 ng/mL 之接近飽和程度的 dB4 佔據受體時，dB4-Alexa (於 250 ng/mL)對 CD4 受體之結合被完全地阻斷。

【0182】 與 dB4-Alexa結合上升的同時可觀察到受體佔據隨著 dB4 存在之下降而下降。受體佔據程度與未被佔據之結合位的程度以對稱方式同步化，且二曲線於濃度約 4.0 ng/mL 處交錯(第 13 圖)，此與其結合 EC_{50}數值一致(表 10)。

【0183】 因此整體結果指出於體外使用 250 ng/mL 的 dB4-Alexa 和 MFI 以及%MFI 可作爲適當之範例，用以研究對人類受試者投予 dB4C7 (UB-421)後之體內的受體佔據。

5. 結論

【0184】

(1) MAb dB4與位於HPB-ALL細胞上之CD4受體交互作用，其具有獨特地高活性，在濃度高於50 ng/mL時於冰上達到立即的平衡。絕對結合親和力(Kd)測定爲5.6 x 10^{-11} M，且最高時1.2 x 10^{6}個dB4分子(Bmax)可結合至單一個HPB-ALL細胞，其較於正常血液CD4+ T細胞者具有至少高於20倍的受體密度。

(2) 擬人化鼠源B4成爲dB4 mAb並未顯著地改變對CD4受體之dB4結合親和力。藉由結合抑制的設計，

利用基於分子的ELISA (塗覆sCD4和含有CCR5抗原表位之胜肽p2704a)和與HPB-ALL細胞之基於細胞的FACS，兩種抗體同等地阻斷示跡劑(示跡劑爲B4-biotin或dB4-Alexa)的結合，於此二實驗中觀察到B4-vs-dB4之IC_{50}比率約爲0.7。

(3) dB4抗體以高於HIV-1外套膜蛋白gp120 MN至少50倍之親和力結合CD4受體。具體來說，利用HPB-ALL細胞之結合抑制試驗證明dB4和gp120 MN分別以1.8和97.2 nM之IC_{50}數值抑制示跡劑dB4-Alexa之結合。此結果也與dB4的高結合親和力(Kd) (其於先前報導較重組gp120高約100倍)一致。

(4) MAb dB4以與對HPB-ALL細胞相似之結合親和力結合血液CD4+ T細胞。在低溫環境(4°C)下，dB4之EC_{50}爲約23.0 ng/mL。且在正常體溫(37°C)下，dB4以約5倍高之親和力結合血液CD4+ T細胞，結合EC_{50}爲4.8 ng/mL。

(5) 由來自六個人類受試者之血液樣品的試驗證明dB4濃度和CD4受體佔據間具有直接(成反比的)相關性。如第13圖所示之相反的曲線，交叉於約4.0 ng/mL，其與對CD4之dB4的平均EC_{50}結合數值一致。這些整體結果指出於體外使用dB4-Alexa (濃度250 ng/mL)和以螢光珠校正之%MFI之測定可作爲適當之範例，用以研究對人類受試者投予dB4C7 (UB-421)後之體內的受體佔據。

實施例8. 抗體B4有效地抑制HIV之無細胞和細胞間傳播

【0185】 HIV 顆粒典型地藉由無細胞傳播散佈全身，在此病毒擴散於血流和局部環境中以感染細胞。病毒也藉由需要親密細胞間接觸的機制以具有直接地由受感染細胞轉移至未受感染細胞的能力。此種傳播發生於當受感染的細胞與未受感染的細胞形成穩定的接觸點時，並直接地將 HIV 顆粒傳播給未受感染的細胞。相較於無細胞傳播，細胞間傳播具有較高效率，速度較快，且不需要擴散至血流。

【0186】 Sigal, A.,等人於 2011 年報導，於抗病毒藥物 tenofovir 存在下，起源於無細胞病毒的感染激烈地下降，於共培養試驗中涉及細胞間傳播之感染卻顯著地對藥物較不具敏感性(第 14 圖)。敏感性的降低在藥物的存在下足以阻止多輪感染的終止。作者使用隨機感染模型在臨床藥物濃度的存在下研究來自細胞間傳播的複製，並發現複製是間歇性的，無突變的實質積累。如果細胞間傳播在體內具有相同的特性，它可能具有對免疫系統的不良後果，具有危險因子以導致個體的治療失敗，並可能有助於病毒的持久性，因此，其爲治療 HIV 感染的障礙。

【0187】 因此，爲了評估其於治療上的潛在影響，重要的是評估用以抑制 HIV 細胞間傳播之 mAb B4 和 mAb dB4 相關抗體的能力及效力。

1. 用以測定HIV細胞間傳播之抗體調停抑制的試驗

1.1. 材料和方法

1.1.1. 細胞和病毒

【0188】 選擇 Jurkat-inGLuc 選殖株(來自美國國立衛生研究所 AIDS 研究和參考試劑計劃)，其具有利用基因工程置入於 HIV-1 基因體中的報導基因(*luciferase*)，選擇其作爲供體細胞(原因在於在利用目標原代 CD4+ T 細胞之共培養試驗中，表面 CD4 之低度表現可使供體-vs-供體感染減到最少)。報導基因 *luciferase* 可以在受感染的細胞中表現並作爲病毒感染之標誌。可測定於受感染細胞中的這些病毒表現報導者以定量 HIV-1 感染。以原代 $CD4^+$ T 細胞作爲目標細胞。於此試驗中使用進化支 D 的病毒 UG266 和 UG046。

1.1.2. 病毒細胞間傳播試驗

【0189】 在本試驗，在與指明的 HIV-1 病毒株混合之前，將供體與連續稀釋之抗體 B4 預培養，並於幾天後使用(當~10–75%的細胞爲 Gag^+時)。之後以於 200 µl 中爲 1.5×10^6 細胞/ml 之最終濃度在 96 孔盤上以 1:2 比率混合供體和 CD4 陽性 PBMC 目標細胞。於 48 小時後，針對細胞內 Gag 進行細胞染色並以流式細胞儀分析。利用 BioLux Gaussia Luciferase Assay 套組(New England Biolabs)和 Berthold Technologies 冷光測定儀偵測累積於培養上清液中的 GLuc。

1.1.3. IC_{50}和IC_{90}的校正

【0190】 透過擬合數據至 S 形的劑量-反應曲線(多變的

S

斜率)繪製劑量-反應抑制曲線。抑制的百分比定義爲(未處理之目標細胞的訊號百分比-抗體處理之細胞的訊號百分比)/(未處理之目標細胞的訊號百分比) × 100。依此計算 IC_{50} 和 IC_{90}。

2. 結果和討論

【0191】 表 11 顯示，當透過嚴格的 90%進入抑制標準測定時，抗體 B4 可等效地抑制 HIV (進化支 C 的病毒株 UG266 和 UG046)之細胞間和無細胞傳播。具體來說，分別地發現對 UG266 和 UG046 病毒株於細胞間傳播試驗中的融合抑制效價爲 1:140 和 1:245，其相當於在無細胞傳播中和試驗中爲 1:136 和 1:234 之中和效價。當以 50%進入抑制標準測定時，相較於相對應之無細胞傳播，在對細胞間傳播觀察到對此兩種病毒株較高的融合抑制效價。

【0192】 這些結果證明，當與迄今所測定之所有其他針對 HIV Env 蛋白質的中和單株抗體或其他 ART-藥物相比較時，抗體 B4 於其在抑制 HIV 之細胞間和無細胞傳播的能力方面均具有獨特的特性。這些結果顯示，只有 mAb B4 和 mAb dB4 相關抗體具有資格可在個體中預防 HIV 病毒的無細胞和細胞間傳播。

實施例9. 抗體UB-421 (dB4C7或dB4)調停在HIV感染個體中用於增強病毒複製之靜默PBMCs的再活化

1. 背景

【0193】 HIV-1 感染靜默的周邊血液單核球細胞

(PBMCs)卻保持不活化直到後續的細胞活化。利用體外模型(此體外模型是利用細胞培養條件和允許靜默 T 細胞非增值性感染之方法，模擬藏匿於靜默 PBMCs 中的靜默 HIV-1)，以研究熱滅活的 HIV-1 (iHIV-1)或 gp120-抗-gp120 免疫複合物對這些靜默 PBMCs 的刺激效應(Briant, L., et al., 1996)。

【0194】 此證明偕同熱滅活 HIV-1 (iHIV-1)或 gp120-抗-gp120 免疫複合物之外套膜醣蛋白的 CD4 接合(CD4 engagement)足以透過交聯以刺激控制 NF-κB (即核轉位)和 AP-1 活化的訊息傳遞路徑，其依次涉及 CD4 的細胞外功能區塊 1 (D1)和細胞質內功能區塊與幾種激酶(Lck、Raf-1、MEK 和 ERK)，以誘導細胞週期進程、促進活化標誌 CD25 的細胞表面表現，以及刺激原病毒整合和使細胞產生病毒。

【0195】 由 Than 等人(Than, et al., 1997)之獨立的科學發現進一步證實，利用抗-CD4 單株抗體於 gp120 結合位之 CD4 分子的交聯可誘導來自 HIV 感染患者之潛伏受感染的 PBMCs 以促進病毒複製。此試驗中使用的抗-CD4 mAb 爲 Leu3a，其可結合 CD4 之 D1 的 CDR2-環。具體來說，Leu3 是針對線性抗原表位，而此線性抗原表位代表具有 CD4 功能區塊 1 內之第 47-64 個胺基酸的胜肽(Chiba, Y. 1992)。

【0196】 此外，發現藉由針對 CD4 功能區塊 1 (D1)之 CDR2-環的單株抗體可特異性地誘導於靜默 PBMCs 之病毒的再活化，且此並非藉由針對其他抗原表位(例如位於 D1 之 CDR3 或接近 D1/D2 接合點區域(Briant, L., et al., 1999))

的抗體(參見第 15 圖，比較第 4 長條與第 5 和 6 長條)。可利用可溶性 CD4 (sCD4)事先吸附 CDR2-環配體以預防此種病毒再活化(參見第 15 圖，比較第 4 長條和第 8 長條)。

【0197】 因此，重要的是要評估抗體 dB4C7 (UB-421)(其對 CD4 功能區塊 1 附近區域具有高結合親合力)是否可調停在 HIV 感染個體中用於增強病毒複製之靜默 PBMCs 的再活化。

2. 位於CD4之D1附近之B4/dB4構型結合位的結構精算

2.1. 藉由mAb B4對黑猩猩CD4陽性PBMCs之Leu3a結合的競爭型順序結合抑制

【0198】 於此試驗中使用分離自二受試者(X282 和 X301)的黑猩猩 PBMC 細胞、mAb B4 (利用 FITC 標幟)和 Leu3a (以 PE 標幟)。以個別的抗體順序地染色 PBMCs 並進行細胞螢光顯影(cytofluorography)的分析。由此實驗所提供之數據如表 12 所描述，並於下文中討論。

【0199】 於單一標幟的控制組樣品，只利用以 Leu3a 染色的細胞測試呈現 Leu3a-PE 結合陽性者；只利用以 mAb B4 染色的細胞測試呈現 B4-FITC 結合陽性者。具體來說，於未受感染之黑猩猩樣品(X282 和 X301)的 CD4+細胞(如利用 Leu3a 所偵測)分別爲 25.5%和 44.0%，其與那些以 mAb B4 偵測者(26.1%和 45.5%)相似。

【0200】 事先結合 Leu3a 之後暴露於 mAb B4 導致雙重染色的(Leu3a+/B4+) PBMC 細胞數量與單獨只利用 Leu3a

或 B4 染色之單一標幟的控制組細胞相似(即對 X282 和 X301 分別爲 24.5%和 46.7%)。

【0201】 相反地，事先結合 mAb B4 之後暴露於 Leu3a 導致在單一或雙重染色過程中只有無 Leu3a 陽性染色之 mAb B4 染色的 PBMCs。

【0202】 整體來說，這些結果證明藉由針對 Leu3a-PE 之抗體 B4-FITC 的單向抑制。也就是說，藉由事先 Leu3a 結合未能阻斷 B4 結合；然而，事先 B4 結合可阻斷 Leu3a 結合。結論爲 mAb B4 辨識涵蓋 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域的構型抗原表位(抗體 Leu3a 可辨識此區域)，且 mAb B4 以相較於抗體 Leu3a 之較高的親和力結合 CD4 的此區域。而這些數據支持此結論。

2.2. 利用針對HIV RC胜肽(第39-66個胺基酸)之免疫血清對B4結合至rsCD4進行競爭型抑制(ELISA方法)

【0203】 透過利用針對 CD4 功能區塊 1 CDR2 區域之免疫血清的競爭型抑制試驗，評估 mAb B4 對完整重組可溶性 CD4 (rsCD4)的結合親合力。

2.2.1. 抗-HIV RC多株抗體

【0204】 利用包含 CD4 第 39-66 個胺基酸的環狀胜肽免疫天竺鼠以製備針對 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域的多株抗體。此環狀胜肽於本試驗中稱爲 HIV 受體複合體胜肽(HIV RC 胜肽)，且如同先前於 Wang 等人在 2002 年所描述之胜肽 p2240c。

【0205】 具體來說，第 0 週是配製於完全弗氏佐劑者，

且第 3 和 6 週是配製於不完全弗氏佐劑者，接著在此之後以配製於不完全弗氏佐劑者每月加強，以每劑量 0.5 ml 中內含 100 μg 者肌肉注射免疫接種 4–6 週齡的 Duncan Hartley 天竺鼠後，於特定時間點收集針對 HIV RC 胜肽之天竺鼠血清。

【0206】 提供的多株抗體稱爲“抗-HIV RC 多株抗體”。

2.2.2. 藉由抗-HIV RC多株抗體對B4結合rsCD4進行競爭型抑制

【0207】 利用每孔洞以體積 0.1 mL 濃度 0.08 μg/mL 之完整 rsCD4 塗覆的 96 孔微量盤進行競爭型抑制實驗。在利用生物素化 B4-抗體結合前，將天竺鼠血清(在利用針對 HIV RC 胜肽(CD4 的第 39-66 個胺基酸)之免疫原免疫接種後第 0、3、6、9、12、14、16 和 19 週收集天竺鼠血清)以 1:30 的比例稀釋與孔洞培養，之後利用與卵白素(avidin)-HRP 之結合作爲示跡劑。也對從整個試驗同期所收集來自未免疫接種之天竺鼠的陰性控制血清(RC 同型)進行測試。

【0208】 第 16 圖顯示藉由於初次免疫後第 6 週所提供之抗-HIV RC 多株抗體可顯著地抑制生物素化-B4 結合至 rsCD4，藉由於初次免疫後第 9 週所提供之抗-HIV RC 多株抗體可達到近乎完全的抑制。

【0209】 此競爭型結合抑制試驗進一步證明 mAb B4 的結合位是位於 CD4 功能區塊 1 的 CDR2 環附近，雖然藉由

mAb B4 直接結合至此胜肽並非顯著地是因爲 mAb B4 對與膜結合的 CD4 之構型結構的偏好性結合。

2.3. 於mAb dB4交聯時在HIV感染個體中用於增強病毒製造之靜默CD4陽性T細胞的再活化

【0210】 藉由利用 mAb dB4 處理細胞與觀測 TNF-α 產量、病毒量和細胞增生，以評估 mAb dB4 活化靜默 CD4+細胞的能力。

【0211】 在此試驗中，藉由將培養盤與 200 μL 山羊抗-人 IgG (Jackson ImmunoResearch)在 37°C 下培養 1 小時，以將人類 IgG 塗覆於 8 孔培養盤。將塗覆的培養盤保存於 4°C 冰箱中直到本試驗進一步使用。

【0212】 依照標準作法將來自 HIV 患者之 PBMC 解凍 1.5 小時。如下所述，利用 mAb dB4 (實驗組)、PMA+PHA (陽性控制組)或只有培養液(陰性控制組)處理 PBMC，以評估靜默 CD4+細胞的活化。

2.3.1. MAb dB4處理

【0213】 以 mAb dB4 (濃度爲 3 μg/10^6 細胞/mL)於 4°C 下處理細胞 1 小時以引發細胞上 CD4 的交聯。細胞以 mAb dB4 處理，之後洗滌，並以 RPMI 培養液和 10%胎牛血清於塗覆的 48 孔培養盤上培養 7 天。以未塗覆之孔洞作爲陰性控制組。於第 0 天、第 2 天和第 7 天冷凍培養上清液供之後的評估。於 4°C 處理 30 分鐘後由細胞移除上清液，以提供作爲 mAb dB4 樣品之時間點第 0 天。

2.3.2. PMA+PHA處理

【0214】 以 0.1 μM 植物凝集素(phytohaemagglutinin，PHA)加上 15 μg/mL 豆蔻酸-佛波醇-乙酸酯(phorbol myristate acetate， PMA) (Sigma) (PMA+PHA)於塗覆的 48 孔培養盤上和 RPMI 培養液與 10%胎牛血清處理細胞 7 天，作爲再活化之靜默 CD4+細胞的陽性控制組。利用未塗覆之孔洞作爲陰性控制組。於第 0 天、第 2 天和第 7 天冷凍培養上清液供之後的評估。於 4°C 處理 30 分鐘後由細胞移除上清液，以提供作爲 PMA+PHA 樣品之時間點第 0 天。

2.3.3. 只有培養液

【0215】 如同陰性控制組，於塗覆的 48 孔培養盤上以 RPMI 培養液和 10%胎牛血清培養細胞 7 天(只有培養液)。利用未塗覆之孔洞作爲額外的陰性控制組。於第 0 天、第 2 天和第 7 天冷凍培養上清液供之後的評估。於 4°C 下在培養液中培養 30 分鐘後由細胞移除上清液，以提供作爲只有培養液樣品之時間點第 0 天。

2.3.4. CD4+再活化的分析

【0216】 藉由評估 TNF-α 產量、病毒量和細胞增生以測定 CD4+細胞的再活化。於表 13 概述來自本試驗之結果。

【0217】 使用標準方法分析來自所有樣品之溶液，項目包含：(1)利用定量的 ELISA 分析 TNF-α 濃度；(2)利用 RT PCR 分析 HIV 病毒量；(3)細胞數量；以及(4)利用錐蟲藍(trypan blue)分析存活率。

【0218】 具體來說，數據顯示，相較於只有培養液的陰性控制組(低於檢測極限)和以 PMA+PHA 刺激的細胞(較

mAb dB4 覆蓋之細胞高約 3 至 5 倍)，mAb dB4 交聯所覆蓋之來自 HIV 患者的 PBMC 細胞可引起 TNF-α 的中度生成。

【0219】 同樣地，mAb dB4 樣品以與只有培養液之陰性控制組相似的速率增生；然而，PMA+PHA 刺激的細胞具有相較於以 mAb dB4 交聯之細胞更大程度的增生(在第 7 天時，於 PMA+PHA 培養組別之細胞數量爲 mAb dB4 培養組的 5 倍高)。

【0220】 然而，相較於培養液控制組和 PMA+PHA 刺激的細胞，於以 mAb dB4 交聯之細胞的 HIV 病毒量顯著地增加。具體來說，當於第 2 和 7 天與只有培養液之陰性控制組相比較時，以 mAb dB4 交聯之細胞於病毒量分別地具有 151%和 220%的增加；然而，PMA+PHA 培養具有次佳的病毒量產生(於第 2 和 7 天分別爲 55%和 78%)，儘管其細胞增生有 5 倍量的增加。

3. 結論

【0221】

(1) 發現鼠源mAb B4可辨識位於CD4上的構型位置，且此構型位置接近抗體Leu3a所辨識的位置(位於CDR2區域第47-64個胺基酸)。基於在實施例7所描述之比較性試驗，預期mAb dB4具有如同在此所述之對於mAb B4而言相同的辨識特性。

(2) 利用多株抗體(此多株抗體是針對含有CD4功能區塊1之CDR2區域第39-66個胺基酸的環狀胜肽(HIV RC胜肽))可抑制鼠源mAb B4對完整rsCD4之結合。

這些結果顯示mAb B4辨識CD4第39-66個胺基酸，其對應至CD4之D1的CDR2環。基於在實施例7所描述之比較性試驗，預期mAb dB4具有如同在此所述之對於mAb B4而言相同的辨識特性。

(3) 發現CD4與mAb dB4交聯於HIV感染的PBMC CD4+ T細胞可活化病毒製造。具體來說，mAb dB4誘導TNF-α產生，並增強HIV製造，而未誘導細胞增生(如表13所示)。

(4) 基於此實施例所提供之結果，mAb dB4 (包含UB-421)能調停在HIV感染個體中用於增強病毒製造之靜默PBMCs的再活化。

實施例10. MAb dB4C7和抗-HIV RC多株抗體抑制抗原所引發的T細胞增生和CD4陽性T細胞的細胞激素(IL2和IFN-γ)製造，因此破壞細胞焦亡的HIV致病循環

1. 背景

【0222】 最近的報告顯示，當 HIV 病毒感染允許(permissive)、活化的 CD4+ T 細胞時，細胞死亡透過 caspase-3 依賴性的細胞凋亡默默地發生(Doitsh, G., et al., 2014)。相反地，當 R5 或 X4-向性 HIV 失敗地感染來自淋巴組織之非允許(non-permissive)、靜默的 CD4+ T 細胞時，這些細胞透過 caspase-1 依賴性的細胞焦亡而死亡，其爲程序性細胞死亡之強烈的炎症形式。被視爲宿主 DNA 感測器的干擾素誘導因子 16 (IFI16)可識別不完整的 HIV 反轉錄

產物，進而引發 caspase-1 的活化(Monroe, K.M., et al., 2013)。在大多數的人類淋巴組織(包含扁桃體、淋巴結和脾臟)中，活化和允許的細胞次群體代表了 CD4 T 細胞總數中的 5%或更少數量，而非允許靜默細胞則代表了遭遇 HIV 之目標中的 95%或更多數量。因此，Caspase-1 調停的細胞焦亡似乎主要地負責在這些淋巴組織感染 HIV 後驅使 CD4 T 細胞死亡，而非 caspase-3 調停的細胞凋亡。分析來自以 R5-向性 HIV 感染之受試者的新鮮淋巴結進一步支持這些發現，其中在富含靜默 CD4 T 細胞的皮質區可偵測到 caspase-1 和 IL-1β，而發現在解剖學上不同的生發中心(在此發現生產性感染細胞)可偵測到 caspase-3 活性。

【0223】 細胞焦亡極可能透過前發炎性細胞激素的釋放和內生性危險訊號，藉由移除細胞內複製的小生境(niches)和增強宿主的防禦反應，促進各種細菌性感染的快速清除。然而，在致病的慢性炎症，例如 HIV 感染，細胞焦亡不是保護性反應且並不會導致原發性感染的清除。事實上，細胞焦亡似乎製造了惡性的致病循環，在此瀕死 CD4 T 細胞釋放炎症信號以吸引更多細胞進入受感染的淋巴組織，進而死亡並產生更多的炎症。這些事件建立了炎症的慢性狀態，其刺激病程和組織損傷。慢性炎症也可能促進潛伏 HIV 病毒庫的維持，而潛伏 HIV 病毒庫可刺激記憶 CD4 T 細胞的恒定性增生。

【0224】 CD4 T 細胞的耗竭和慢性炎症的發展是推動疾病進展之 HIV 致病機制中的特徵過程，且細胞焦亡提供

了這兩種疾病-促進過程之間意外的連結。

【0225】 以上資料顯示，透過抑制由 CD4+細胞之抗原刺激所引發的 CD4+細胞增生及/或發炎性細胞激素製造的機制可能可以減輕或減少發生於 HIV 感染期間在淋巴組織的細胞焦亡。

2. 實驗

【0226】 進行研究以確定是否 mAb dB4 可藉由於 HIV 感染個體抑制慢性炎症發展以破壞由細胞焦亡所引起的致病循環。抑制由抗原刺激所引發之細胞激素製造有助於緩解許多靜默 T 細胞(靜默 T 細胞已經有失敗的 HIV 感染)之細胞焦亡的負擔，從而破壞起因於細胞激素所造成 CD4 陽性 T 細胞耗竭的 HIV 病理。

【0227】 利用金黃色葡萄球菌 B 型腸毒素(SEB)之體外模型評估 mAb dB4C7 (UB-421)在正常和 HIV 感染個體中抑制 PBMC T 細胞增生的能力。SEB 是一種超抗原，其具有刺激帶有特定 T 細胞抗原受體(TCR)之所有 T 細胞的能力，並可誘導大量的細胞激素製造。

【0228】 透過與 Huyen Cao 和 Mohamed Elrefaei 博士的合作，進行了正常人類供體(n=3)和 HIV 感染供體(n=6，未使用 ART 治療的患者，CD4+數量>200，病毒量>10,000)的功能分析，以評估 mAb dB4C7 (UB-421)或針對 CD4 之 D1 的 CDR2 區域的抗-HIV RC 多株抗體(實施例 9)是否可以抑制細胞增生和細胞激素(IL2 和 IFN-γ)的產生。

2.1. 研究對象和樣品

【0229】 從 REACH cohort (舊金山)招募 HIV-陽性未使用 ART 治療的志願者(n=6)。也將三個年齡一致的 HIV-血清反應陰性控制組的志願者納入此試驗中。將 PBMC 分離並冷凍保存在液態氮中直到試驗的時間。

2.2. 使用mAb dB4C7或純化的抗-HIV RC多株抗體的飽和濃度

【0230】 首先在間接免疫螢光試驗中分別以 mAb dB4C7 IgG 或抗-HIV RC 多株抗體 IgG 染色 CD4 + T 淋巴細胞，之後再用 Alexa-山羊抗-HuIgG 或 Alexa-山羊抗-天竺鼠 IgG 進行染色。爲了偵測陽性細胞百分比，透過流式細胞儀分析所得之染色的細胞。MAb dB4C7 和抗-HIV RC 多株抗體於 2 倍稀釋所測得之效價介於 50 μg/mL 和 0.0025 μg/mL。MAb dB4 和抗-HIV RC 抗體的抗體效價測定爲% CD4 結合對抗體濃度(μg/mL)。在於 HIV 感染和正常個體進行 T 細胞功能測試使用之前評估這些抗體效價。

【0231】 第 17 圖顯示於功能試驗中所使用各試劑的飽和濃度，mAb dB4 (dB4C7)爲 1 μg/mL 和抗-HIV RC 多株抗體爲 25 μg/mL。

2.3. CD4+或CD8+ T細胞的增生

【0232】 利用羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(carboxy-fluorescein succinimidyl ester，CFSE)螢光試驗分析細胞增生，其在細胞分裂時產生羧基螢光素二乙酸鹽琥珀醯亞胺酯(carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester，CFDA-SE)染色的減少。利用 CFSE 作爲 ^{3}H -胸腺嘧

啶(增生)測試的代用品。

【0233】 以 mAb dB4C7 或純化的抗-HIV RC 多株抗體之飽和濃度與 PBMCs 培養，以覆蓋位於細胞表面上的 CD4 受體。細胞也分別與抗-HIV RC 同型(濃度爲 25 μg/mL)和 PHA (10 μg/ml；Sigma-Aldrich)培養作爲陰性和陽性控制組。

【0234】 於 PBS 中以 CFDA-SE (Molecular Probes，Eugene，OR)標幟 PBMCs，之後以 100% FCS (Sigma-Aldrich, St.Louis，MO)進行螢光淬熄。在以 PBS 洗滌後，將細胞再懸浮於具有 10% FCS 的 RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)中。

【0235】 之後在 SEB 抗原(1 μg/mL)存在下，將細胞於 37°C 含 5% CO_2 之條件下培養 5 天，並分析表面標誌的表現。

【0236】 利用流式細胞儀圈選 CD3+ (Amcyan)細胞群中 CD4+ (PE，D2)及 CD8+ (PercpCY5.5)細胞群進行分析，並針對% CFSE 陽性細胞(作爲%增生細胞)進一步測定此細胞群。利用 LSR II (BD Biosciences，Mountain View，CA)獲得每個樣品四萬(40,000)個淋巴細胞，並利用 FLOWJO 軟體(TreeStar, San Carlos, CA)分析。結果測定爲分裂的 CD4 (或 CD8) T 細胞的百分比。所有試驗參與者證明於 PHA 刺激後之顯著的細胞增生。CD4 T 細胞在無 SEB 抗原刺激下之細胞增生爲<0.5% (陰性控制組)。

2.4. 用以測定細胞激素(IL2和IFN-γ 製造)的細胞內染色試驗

【0237】 PBMC (0.5 x 10^6 個細胞)與 SEB 抗原(1 μg/mL)於 37°C 含 5% CO_2 之條件下培養 2 小時。以含有 0.1% FCS 之 PBS (洗滌緩衝液)洗滌細胞，將細胞再懸浮於裂解緩衝液(BD Biosciences)中於室溫下反應 10 分鐘進行固定。細胞以洗滌緩衝液洗滌一次，之後將細胞再懸浮於 0.5 mL 的膜通透劑 2 (BD Biosciences)中並於室溫下培養 10 分鐘進行透化處理。接著以洗滌緩衝液洗滌細胞，並以抗-IL-2 APC、抗-IFN-γ (PE CY7)以及抗-CD3 (Amcyan)、抗-CD4 (PE，D2)或抗-CD8 (Percp CY5.5) (BD Pharmingen)染色。利用 LSR II (BD Biosciences)獲得每個樣品四萬(40,000)個淋巴細胞，並利用 FLOWJO 軟體(TreeStar)分析。在無抗原刺激下之細胞激素-製造 CD4 或 CD8 T 細胞的百分比爲 <0.05% (陰性控制組)。結果表示爲表現 IFN-γ 或 IL2 之 CD4+ (或 CD8+) T 細胞的百分比。

2.5. 統計分析

【0238】 利用配對 t 檢定進行統計分析和比較。

3. 結果

【0239】 此 SEB 抗原引發之 T 細胞增生試驗所提供的結果顯示，在未使用 HIV ART 治療的患者和年齡一致的正常個體中，mAb dB4C7 (1 μg/mL)和抗-HIV RC 多株抗體(25 μg/mL)在飽和狀態下均可減少 CD4+ T 細胞增生，而非 CD8+ T 細胞增生(數據未示)。

【0240】 MAb dB4 (1 μg/mL)和純化的抗-HIV RC 多株抗體(25 μg/mL)於其個別的飽和 PBMC 表面 CD4 結合濃度

下，於 HIV 陰性(第 18A 圖)和 HIV 陽性(第 18B 圖)個體均可抑制由超抗原 SEB 所引發增生 CD4+ T 細胞的 IL2 生成。於來自相同 HIV 陽性和陰性個體的 CD8+ T 細胞中則未發現此種抑制(第 18C 圖)。

【0241】 MAb dB4 (1 μg/mL)和純化的抗-HIV RC 抗體(25 μg/mL)在其個別的飽和濃度下，於 HIV 陰性(第 18D 圖)和 HIV 陽性(第 18E 圖)個體也均可抑制由超抗原 SEB 所引發增生 CD4+ T 細胞的 IFN-gamma 生成。於來自相同 HIV 陰性(第 18F 圖)和陽性(第 18G 圖)個體的 CD8+ T 細胞中則未發現此種抑制。

4. 結論

【0242】 抗體 mAb dB4C7 (UB-421)和抗-HIV RC 多株抗體，二者針對 CD4 功能區塊 1 的 CDR2 區域，發現可抑制超抗原 SEB 所引發藉由 CD4 陽性 T 細胞的 T 細胞增生和細胞激素(IL2 和 IFN-γ)生成，而非藉由 CD8 陽性 T 細胞的 T 細胞增生和細胞激素(IL2 和 IFN-γ)生成。發現 dB4C7 和抗-HIV RC 多株抗體可抑制 CD4+ T 細胞增生和相關細胞激素(IL2 和 IFN-γ)生成，顯示此抗體可能對其他 CD4 陽性細胞相關的細胞激素生成展現相似的抑制效果，具有破壞細胞焦亡之 HIV 致病循環的潛力。

【0243】 在此與先前實施例所觀察到，其對 CD4 陽性 T 細胞增生和相關細胞激素(IL2 和 IFN-γ)生成的抑制效果爲高度顯著，其中在此所述之針對 CDR2 區域的抗體對 CD4 細胞可能展現同時發生的相反效果，包括：(1)靜默 HIV 感

染之 CD4 陽性 T 細胞的再活化，以引發由其潛伏狀態釋出 HIV (實施例 9)；(2)藉由靜默 CD4+ T 細胞的再活化，競爭型抑制和預防 HIV 從新釋出的病毒進入未受感染的 CD4 陽性 T 細胞(實施例 4 和 6)；以及(3)當(超)抗原刺激時藉由 CD4 陽性 T 細胞抑制 T 細胞增生和細胞激素生成(此實施例)。

【0244】 針對 HIV 結合之特定位置(即 CD4 功能區塊 1 的 CDR2 區域)的 mAb dB4 和抗-HIV RC 多株抗體的獨特生物特徵和免疫反應的引發可提供功能性治癒 HIV 感染所需的特性，即能夠(1)透過進入抑制阻止 HIV 感染；(2)於靜默 T 細胞再活化病毒製造；以及(3)直接地改變細胞激素生成。

實施例11. 於以進化支B之HIV原代分離株HIV-1_{DH12}攻毒的黑猩猩利用mAb B4對HIV感染的暴露前和暴露後預防和治療

【0245】 已證明針對 CD4 功能區塊 1 之 CDR2 區域的 B4 相關高親和力抗體具有許多獨特的體外特性，重要的是要在最像人類的動物模型中測試 B4 抗體於預防及/或治療 HIV 感染的療效。已使用黑猩猩作爲人類病毒、細菌和寄生蟲感染的模型超過 100 年了。於黑猩猩所精心制定的攻毒模型中，使用進化支 B 之 HIV 原代分離株 HIV-1_{DH12}展開攻毒試驗，以評估 mAb B4 於暴露前和暴露後模式中對 HIV-1 感染提供被動性免疫的潛力。具體來說，評估 mAb B4

所能提供的能力，包含(1)針對感染用以保護受暴露之受試者的消除性免疫，和(2)於證實感染後幾天投予抗體時對受暴露的受試者進行治療。

1. 於黑猩猩利用mAb B4對HIV感染的暴露前和暴露後預防

【0246】 評估 mAb B4 於攻毒前和攻毒後(暴露於 HIV-1)模式對 HIV-1 感染提供被動性免疫的潛力。

1.1. 方法

1.1.1 試驗使用之動物

【0247】 本試驗總共使用 4 隻黑猩猩。使用一隻黑猩猩作爲暴露前治療動物(X084)，使用二隻黑猩猩作爲暴露後治療動物(X356 和 X357)，以及使用一隻黑猩猩作爲控制組(X259)。

1.1.2 動物對以HIV-1_{DH12}病毒原液感染的敏感性

【0248】 在治療和感染前利用其 PBMC 之體外感染測定動物對以 HIV-1_{DH12} 病毒原液感染的敏感性。在暴露於病毒 3 天內可感染所有培養物。

1.1.3 MAb B4抗體

【0249】 製備供輸注使用之 mAb B4 作爲高度純化的抗體製劑(濃度爲 5 mg/mL)。

1.1.4 攻毒前預防/治療

【0250】 於 HIV-1_{DH12}攻毒前 1 小時利用 5 mg/kg的 mAb B4 對黑猩猩 X084 進行靜脈輸注。

1.1.5 攻毒後預防/治療

【0251】 於 HIV-1_{DH12}攻毒後 1 小時利用 5 mg/kg的 mAb B4 對黑猩猩 X356 和 X357 進行靜脈輸注。

1.1.6 控制組動物

【0252】 以 HIV-1_{DH12}攻毒黑猩猩 X259 而未以 mAb B4 抗體進行輸注。

1.1.7 以HIV-1_{DH12}攻毒

【0253】 以 HIV-1_{DH12}的 100 $TCID_{50}$ (其取自預先製備的病毒原液，並已於西南生物醫學研究基金會在黑猩猩 PBMC 中測定效價)靜脈攻毒四隻黑猩猩。

1.1.8 HIV-1_{DH12}病毒的偵測

【0254】 利用 gag 序列的 DNA PCR 放大、共培養、p24 捕獲 ELISA 和免疫墨點法，藉由血漿病毒血症、細胞相關病毒量和對 HIV 之免疫反應的偵測，以監測於黑猩猩的感染確立。利用來自所有黑猩猩於 50 週研究期期間內所收集之所有血液樣品的 HIV-1 RNA copies/mL，以測定 HIV 感染的血清病毒血症指標。利用病毒分離和 DNA PCR 試驗(DNA PCR 試驗是用以偵測對應 gag 的原病毒 DNA)於黑猩猩 PBMC 中偵測 HIV-1_{DH12}病毒。利用 p24 抗原捕獲 ELISA (Coulter)評估病毒製造。製備黑猩猩 PBMC 和淋巴結細胞之 1×10^6至 1×10^2個細胞的連續稀釋，於 IL-2 培養液中與來自 3 日齡之 PHA 刺激的母細胞(數量爲 2×10^6個細胞)進行共培養。選取導致 p24 製造之最高稀釋度的孔洞作爲終點指標。

1.1.9 動物飼養

【0255】 經機構 IACUC 的批准並依照國家研究委員會的指導方針，將黑猩猩飼養在西南生物醫學研究基金會。

1.2. 結果

【0256】 利用 mAb B4 對接受 HIV-1_{DH12} 攻毒之黑猩猩提供消除性免疫。在 HIV-1 攻毒前以 mAb B4 抗體輸注的動物中(X084)(第 19A 圖)，或在於 HIV-1 攻毒後 1 小時以 mAb B4 抗體輸注的兩隻動物中(X356 和 X357)(第 19B 圖)，在攻毒後後續的 32 週期間內未偵測到感染的標誌。

【0257】 相反地，在攻毒後第 1 週開始由控制組動物(X259)從 PBMC(第 19C 圖)和在攻毒後第 2 週時由血漿可輕易地分離出病毒。也可於第 4 和 20 週由 X259 活組織切片的淋巴結細胞分離出病毒。於包含細胞數量範圍介於 1×10^4 至 1×10^6 的稀釋物中，可偵測到於 PBMC 和淋巴結隔間之受感染的細胞。在第 4 週於動物 X259 發生血清轉化。

【0258】 在利用抗體治療的黑猩猩 X084、X356 和 X357 發現在血液循環中所呈現的游離、未結合之 mAb B4 迅速下降。來自接受治療之黑猩猩的 CD4+和 CD8+次群體在攻毒後 20 週期間的監測下無 CD4+耗竭的證據。到第 32 週期間，黑猩猩 PBMC 對有絲分裂促進劑(PHA、商陸果實分裂素(Pokeweed mitogen)和刀豆素(Concanavalin A))的增生反應無抑制作用。

【0259】 此試驗結果指出 mAb B4 對 HIV 感染可以提供預防或消除性治癒，透過從攻毒日起甚至一年之血清病毒血症和其他參數的廣泛隨訪可證明此試驗結果。

1.3. 結論

【0260】 在黑猩猩試驗中，可藉由暴露之前或暴露之後於短暫時間間隔之內的 mAb B4 投予以中止藉由致病性原代分離株的 HIV 感染。過繼免疫(transferred immunity)被消除，且無暫時、減少或延遲的病毒血症證據。透過 mAb B4 被捕捉在位於周邊血液和淋巴組織的 CD4+細胞上，儘管 mAb B4 抗體從血漿中快速清除，但完整的保護是明顯的。

【0261】 精心執行的試驗進一步指出，使用 5 mg/kg 之 mAb B4 或相關抗體的治療計畫書可供(i)遭受 HIV 患者於數小時內，或(ii)由血清反應陽性母親所生下之嬰兒於生產時，以達到消除性治癒。

1.4. 藉由mAb B4對暴露後預防的應用

【0262】 美國公共衛生服務指南對意外地暴露於 HIV 後之醫護人員推薦使用抗反轉錄病毒藥物的暴露後預防。然而，美國公共衛生服務指南對暴露後預防目前可用藥物的毒性持保留態度。

【0263】 在此試驗所獲得的結果證明使用 mAb B4 作爲暴露後預防性治療以代替或合併使用現行暴露後治療方法的潛力。MAb B4 的低毒性和療效證明此抗體較抗反轉錄病毒藥物更爲廣泛有效的潛力。

【0264】 這些結果進一步指出 mAb B4 可用於從母親到孩子之 HIV 垂直傳播的預防。HIV 的母嬰傳播(Mother-to-child transmission (MTCT))也稱爲週產期或垂直傳播，發生於懷孕、分娩，及/或生產或母乳餵養期間，

將 HIV 從 HIV+的婦女傳播給其嬰兒。對未接受針對病毒之治療的 HIV+婦女在懷孕、分娩和生產期間的 MTCT 機率約爲 25%。在以母乳餵養其嬰兒之未經治療的 HIV+婦女，MTCT 有額外 12%的機會。在全世界，在 2001 年，1.8 萬名婦女感染 HIV，且大約 80 萬名兒童也成爲 HIV 感染者，其中多數是經由 MTCT。在全世界被新診斷爲 HIV 之大部分的人是介於 15-24 歲之間。MTCT 預防的一個非常重要的構成要素是必須針對年輕人進行 HIV 預防，尤其是女孩和年輕婦女在其變得性生活頻繁之前，並對那些已感染者進行治療。關於 MTCT 的額外訊息可以在 http://caps.ucsf.edu/archives/factsheets/mother-to-child-transmission-mtct#sthash.DTRyms46.dpuf 找到。利用 mAb B4 所得到的結果指出，可藉由對 HIV+婦女之新生兒提供 5 mg/kg 或更多之 mAb dB4 的單次投予，以在分娩和生產階段期間預防 MTCT。

2. 於黑猩猩利用mAb B4治療HIV感染

2.1. 方法

2.1.1 試驗中使用的動物

【0265】 黑猩猩 X084、X356 和 X357 在先前預防試驗中使用且接受 5 mg/kg 之 mAb B4 的單次投予，以保護其免於 HIV-1_{DH12}的感染，其以治療模式於此攻毒試驗中再次使用。

2.1.2 動物對以HIV-1_{DH12}病毒原液感染的敏感性

【0266】 在抗體治療和 HIV 攻毒之前，從動物製備

PBMCs 以測定其對以 HIV-1_{DH12} 感染的敏感性。利用病毒於預防接種的 3 天內感染所有的體外培養物。

2.1.3 MAb B4抗體

【0267】 製備供輸注使用之 mAb B4 作爲高度純化的抗體製劑(濃度爲 5 mg/mL)。

2.1.4 以HIV-1_{DH12}攻毒

【0268】 以 HIV-1_{DH12}的 100 $TCID_{50}$ (其取自預先製備的病毒原液，並已於西南生物醫學研究基金會在黑猩猩 PBMC 中測定效價)靜脈攻毒所有動物(X084、X356 和 X357)。

2.1.5 攻毒後治療

【0269】 黑猩猩 X084 沒有任何攻毒後治療。在攻毒後第 14 天以 5 mg/kg 的 mAb B4 輸注黑猩猩 X357，此時於供 HIV 感染治療之受攻毒的動物中的 HIV 病毒血症爲最高。在攻毒後第 14、18 和 22 天以 5 mg/kg 的 mAb B4 輸注黑猩猩 X356。

2.2. 結果的概述

【0270】 利用輸注 5 mg/kg 鼠源 mAb B4 進行被動性免疫治療試驗，以於具有急性期 HIV 感染之黑猩猩測定 mAb B4 的療效。以 HIV-1_{DH12} 靜脈注射(i.v.)預防接種三隻黑猩猩(X084、X356 和 X357)，並基於病毒檢測(未示出)和定量 RT-PCR 證實感染確立。

【0271】 於所有黑猩猩(X084、X356 和 X357)在暴露後 7 天利用 RT-PCR 檢測來自 HIV-1_{DH12}的 RNA(基線以上)。

利用病毒分離和利用 HIV-1_{DH12}整合偵測的 DNA-PCR，於 14 天內在來自所有三隻動物之 PBMCs 和淋巴結細胞中檢測細胞相關病毒。

【0272】 在感染後第 14 天，利用 mAb B4 (5 mg/kg，靜脈注射)輸注受感染黑猩猩中的 2 隻(X356 和 X357)。在感染後第 18 和 22 天，一隻動物(X356)接受額外兩劑的抗體(5 mg/kg，靜脈注射)。對前 12 週以每週間隔和之後直到感染後 40 週每月地利用 RT-PCR 試驗監測病毒量。在感染後第 14 天時，以 mAb B4 輸注黑猩猩 X356 和 X357，病毒 RNA 已經處於一個快速上升的階段。相較於未接受治療的黑猩猩(X084) (第 20A 圖，空心圓)，接受抗體的兩隻黑猩猩之後在第 20 天時經歷於其病毒量快速且顯著的下降(下降幅度爲 1-2 個對數)，以及於初期病毒血症期持續時間的顯著降低(初期病毒血症期持續時間由 4 週降至 1 週)(第 20A 圖，實心圓)。

【0273】 第 20A 圖和第 20B 圖比較於未接受治療的控制組黑猩猩 X084 (來自本試驗，其先前接受 mAb B4 的單次暴露前投藥)與未接受治療的控制組 X259 (來自先前試驗，其未接受 mAb B4 的投藥)和接受 mAb B4 三次輸注之黑猩猩 X356 的血漿病毒血症持續時間。於病毒攻毒後，如血清 HIV-1 RNA copies 所檢測，在無任何干預下利用 HIV-1_{DH12}攻毒黑猩猩 X084 (第 20A 圖，空心圓)和 X259 (第 20B 圖，空心圓)，並顯示早在第 3 天開始病毒血症。血清 HIV-1 病毒血症的持續時間約 42 天，爲 HIV-1_{DH12}感染的

特徵。黑猩猩 X356 (第 20A 和 20B 圖，實心圓)接受 mAb B4 的三次投予，且 HIV-1 病毒血症急劇下降，之後在或約在第 21 天達到低於檢測極限。比較 X356 和 X084 與 X259 之間的病毒量數據顯示，從 HIV-1_{DH12} 感染之特有的病毒血症持續時間減少了 21 天。

【0274】 如上所述，來自本試驗之未接受治療的控制組黑猩猩 X084 於先前試驗中接受了 mAb B4 的單次暴露前投予；而來自先前試驗之未接受治療的控制組黑猩猩 X259 則未接受任何 mAb B4 投予。有趣的是，比較 X084 (第 20A 圖，空心圓)與 X259 (第 20B 圖，空心圓)所提供之數據顯示，相較於 X259，在試驗期間 X084 具有整體較低的病毒量。因此，雖然在此試驗中未接受治療的動物(X084)的病毒量顯著高於 mAb B4 治療的動物(X356)，於 X084 對 mAb B4 之先前暴露似乎顯著地減少整體病毒量，特別是在 HIV 感染的急性期期間(比較 X084 與 X259)。整體來說，這些結果指出於 HIV 暴露前之 mAb B4 的任何投予可減少在感染急性期期間之病毒量程度，其可能進一步降低感染後從個體至個體的病毒傳播。

【0275】 另外，進行細胞表面染色發現，在第 14 天時於投予 mAb B4 單一劑量的動物(X357)中，mAb B4 結合至 CD4+細胞維持了至少七天。且於投予此抗體之多劑量的動物(X356)中，mAb B4 結合至 CD4+細胞持續了至少 14 天。相反地，只在輸注後三天之動物中於血液循環內偵測到游離 mAb B4，如利用針對 HIV-1_{DH12} 分離株之中和活性所測

得。如同在黑猩猩的預防試驗中，這符合藉由結合至 CD4+細胞而已經將 mAb B4 由血液循環中移除。

【0276】 利用對於 CD4/B4 抗原表位的體外免疫染色，FACS分析在40週期間可於所有樣品中偵測到CD4+細胞而無顯著的耗竭。在前 21 天的期間於 PBMC 之上完成輸注 mAb B4 的免疫染色。PBMC 樣品之有絲分裂促進劑所誘導的增生反應(利用刀豆素、PWM 或 PHA)在抗體治療前和後是不同的，且似乎不受 mAb B4 輸注所影響。這些觀察指出 mAb B4 能夠破壞病毒感染，且減少病毒量及病毒血症期，而無不適當的免疫毒性。

實施例12. UB-421製劑，於狒狒之臨床前藥理學/毒性試驗和在人體組織的交叉反應性

簡介

【0277】 於前述實施例所討論之細胞培養和黑猩猩試驗中所獲得的數據證實，有足夠的科學價值證明進一步發展供人類使用之含有 mAb dB4 的藥物製劑是有理的。製備含 mAb dB4C7 (UB-421)的藥物製劑，並爲臨床使用而於大量生產上進行一般的安全性測試。

【0278】 另外，進行一組臨床前安全性試驗以提供針對候選藥物 UB-421 的藥效學、藥物動力學、毒性和安全性資訊。

【0279】 在狒狒(Papio species)進行單次與多次投予以及劑量依賴性(低和高劑量)試驗，以協助第一期臨床試驗

的設計，用以評估在無症狀 HIV-1 感染的人類受試者中 UB-421 之劑量依賴性的安全性、耐受性和免疫毒性。於臨床前藥理/毒性試驗使用狒狒作爲動物模型，原因爲狒狒的 CD4+ T 細胞具有與人類相似的對 mAb dB4C7 結合親合力，如第 21 圖所示(即對人類和狒狒分別爲 EC_{50}=0.33 μg/mL 和 0.29 μg/mL)。與 Krishna Murthy 博士(西南生物醫學研究基金會，病毒學暨免疫學部門，聖安東尼奧，德州)合作以開始與執行在狒狒的非人類靈長類動物藥理和毒性試驗。

【0280】 此外，執行交叉反應性試驗，以評估 UB-421 是否具有任何非預期性的反應性，和對有別於預定目標之人類組織之細胞毒性的可能位置。

【0281】 如以下進一步詳細討論者，從這些臨床前試驗所得到的數據顯示具有足夠的科學價值證明進一步發展 UB-421 作爲在人體臨床試驗之試驗性新藥是有理的。

1. 藥劑劑型

【0282】 爲了供人類使用而製備含有 mAb dB4C7 的藥劑劑型。一般來說，包含 mAb dB4C7 之藥劑劑型可配置於適當的緩衝液中包含，但不限於，檸檬酸鹽、磷酸鹽、三羥甲基氨基甲烷(Tris)、1,3-二[三(羥甲基)甲基氨基]丙烷(BIS-Tris)等，於介於 6.0 至 7.0 之 pH 值，且可包含賦形劑(例如醣類(50 mM 至 500 mM 的蔗糖、海藻糖、甘露醇，或其混合))、界面活性劑(例如：0.025% - 0.5%的 Tween 20 或 Tween 80)，及/或其他試劑。

【0283】 UB-421 是指定爲於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS) (pH 6.5)中包含 10 mg/mL mAb dB4C7、20 mM 甘胺酸，以及 0.05% (v/v) Tween (polysorbate 20)的醫藥組成物。

【0284】 MAb dB4 之高濃度劑型也可供包含皮下注射的應用而加以製備，其包含 10 mM 組胺酸。

【0285】 製造之後，執行一般的安全性和毒性試驗以確保製造的藥物產品對投予人類和動物受試者是安全的。

2. 一般的安全性試驗

2.1. UB-421生產批次和安全標準

【0286】 以兩個大規模生產(P/N Z807，批號 225711 和 225758）製備 UB-421 藥物產品供臨床試驗使用，並評估一般的安全性。

【0287】 若在 7 天的測試期間符合下列條件（1）整個測試期間所有的動物存活;（2）未觀察到毒性的明顯徵象；以及（3）於投予醫藥組成物之時間直到試驗期結束的期間內沒有動物具有明顯的體重減少，則將 UB-421 的大規模批次製造視作對臨床使用上爲安全且可接受的。

2.2. 實驗動物

【0288】 小鼠：(白化，BALB/cByJNarl 品系(家鼷鼠(Mus musculus))，無特殊病原，雄性(國研院動物中心(NLAC)，台灣)。(實驗編號 BIO-003.90)。

【0289】 天竺鼠：(白化，Hartley 品系(天竺鼠(Cavia porcellus))，無特殊病原，雄性(台大醫院(NTUH)，動物中心，台灣)。(實驗編號 BIO-003.91)。

2.3. 方法

【0290】 透過腹腔投予方式對兩隻小鼠和兩隻天竺鼠注射各批次的 UB-421。控制組的小鼠和天竺鼠則是透過腹腔投予方式注射等滲氯化鈉溶液(“S.T.”，批號 1OC0206)。每隻小鼠接受 0.5 毫升的總體積，而每隻天竺鼠接受 5.0 毫升的總體積。在給藥前(第 0 天)和結束前(第 7 天)記錄動物體重。針對一般健康情況和毒性的臨床徵象每天觀察每隻動物。

2.4. 分析和結論

【0291】 來自一般的安全性試驗結果針對分析標準產生了以下令人滿意的結果：

(1) 用於一般安全性試驗的所有動物在測試期間內存活。

(2) 在UB-421治療的動物中未觀察到明顯徵象的毒性。

(3) 試驗期間內無動物體重減少。

【0292】 鑑於上述情況，將此些批次視爲無未預期，不可接受的外來雜質。

【0293】 這些發現證實了 UB-421 的大規模製造批次(批號 225711 和 225758)無未預期或不可接受的外來雜質。據此，視這兩個批次於人類臨床試驗使用上爲安全和可接受的。

3. 試驗A：於狒狒之UB-421的單次投予毒性試驗

3.1. 方法

【0294】 試驗 A 評估爲期 42 天 UB-421 之低劑量(5 mg/kg 體重)或高劑量(25 mg/kg 體重)單次投予的藥效學、藥物動力學和安全性，如表 14A 所示。在這項試驗中，於 30 分鐘期間內以 5 mg/kg 或 25 mg/kg 體重透過靜脈輸注投予 UB-421。在 0、0.5、1、2、4、8、12、24 小時，以及在 2、3、5、7、10、14、21、28、35、42 天，收集用於藥物動力學(PK)分析的血液樣品。

【0295】 利用流式細胞儀分析法分析血液樣品，利用以下標誌監測 CD4+ T 淋巴細胞的存在，標誌包含：CD4 功能區塊 1 (抗-CD4+D1)和 CD4 功能區塊 2 (抗-CD4+D2)。利用 Alexa-dB4 作爲標誌和用於競爭型 CD4 結合的示跡劑(競爭型 CD4 結合是利用單株抗體 UB421，且單株抗體 UB421 和 Alexa-dB4 均針對 CD4 功能區塊 1 和 2)。利用 Alexa-山羊抗-huIgG 作爲針對 CD4 功能區塊 1 和 2 之單株抗體的示跡劑。此外，利用針對 CD3 和 CD14 的抗體監測於 PBMC 製備中的總 T 細胞(CD3)和單核球(CD14)數量。

3.2. 結果簡述

【0296】 未於藥效學、藥物動力學和安全性試驗中發現 UB-421 不應該於人類進行第一期臨床試驗之負面看法。對於評估的所有參數而言，在控制組和實驗組動物均觀察到發現每一資料點顯著地高於或低於平均值(“超出正常範圍”)。

【0297】 對來自以低劑量(5 mg/kg)和高劑量(25 mg/kg) UB-421 單次投予治療之狒狒所提供的血液樣品評估

UB-421 之初始藥物動力學(PK)性質。

【0298】 此試驗結果顯示，以 UB-421 治療導致來自周邊血液單核球細胞(PBMC)或由淋巴結活檢樣品細胞懸浮液所分離的 CD3+CD4+ T 淋巴細胞和 CD14+CD4+單核球之偵測顯著減少。因此懷疑這些細胞的減少是由於以 UB-421 “覆蓋” CD4+細胞，而不是因爲動物體之 CD4+細胞耗竭。發現當利用針對抗-CD4+ D2 標誌的抗體時，所偵測之 CD4+ T 淋巴細胞的百分比沒有變化，其證實了此項懷疑。此種在輸注後於 CD4+細胞上以 UB-421 “覆蓋” 的持續時間於接受低劑量之動物中爲至少 3 天，而於接受高劑量之動物中則爲至少 7 天。當於動物的血漿中不再偵測得到 UB-421 時，CD4+細胞上的 “覆蓋” 減少，且 CD4+細胞(如利用抗-CD4+D1 偵測)回復到與利用抗-CD4+D2 偵測者相同的百分比。

【0299】 綜上所述，本研究發現 UB-421 是安全的，且當以低劑量 UB-421 投予時，UB-421 可完全覆蓋 CD4 陽性細胞達至少 3 天，當以高劑量 UB-421 投予時則達至少 7 天。基於先前實施例所討論的結果，當完全覆蓋 CD4+細胞時，預期可完全地排除 HIV 進入細胞，此將產生病毒量減少的結果。

4. 試驗B：於狒狒之多次投予毒性試驗

4.1. 方法

【0300】 試驗 B 評估爲期 56 天(8 週)之 UB-421 的低劑量(5 mg/kg 體重)或高劑量(25 mg/kg 體重)重複投予的藥效

學、藥物動力學和毒性，如表 14B 所示。在此試驗中，一個治療期包含以每週的間隔(每週投予一次)投予 UB-421 共 8 次。在 8 週治療期結束時，對半數之接受治療的動物進行屍體剖檢與評估(表 14B，第 1 部分)。其餘的動物隨後經過一個 12 週的恢復期，期間維持動物供觀察和收集血液與淋巴結樣品(表 14B，第 2 部分)之用。在治療期期間的 0*、1、3、7*、14、21、28、35*、42、49、56*天，以及在恢復期期間的 63*、70、77、91、105*、133 天，由動物收集血液樣品(和淋巴結活檢*)供分析之用。此試驗系統使用成年雄性(M)和雌性(F)的狒狒(n=20；年齡：7 至 18 歲)。

4.2. 結果簡述

【0301】 來自一組大規模臨床前試驗所提供對 UB-421 之低劑量(5 mg/kg)和高劑量(25 mg/kg)多次投予的藥物動力學、藥效學、毒性和安全性資訊。

【0302】 整體來說，由試驗 B 第 1 部分和第 2 部分所提供之數據指出 UB-421 候選藥物具有供進一步發展的科學價值以作爲試驗性新藥。未於藥效學、藥物動力學和安全性研究中發現 UB-421 不應該於人類進行第一期臨床試驗之負面看法。對於評估的所有參數而言，在控制組和實驗組動物均觀察發現到每一資料點顯著地高於或低於平均值(“超出正常範圍”)。

4.2.1 血液和活檢分析

【0303】 從利用低劑量和高劑量 UB-421 多次投予治療之動物中所得到樣品進行一組大規模的試驗。這些試驗的

結果總結在表 15 和 17，並於以下內容進一步討論。

【0304】 利用 UBI ELISA 試驗(實施例 7)和 MT-2 試驗(實施例 2)發現，於接受低劑量(5 mg/kg) UB-421 之動物中可於其血漿偵測到 UB-421 達至少 3 天，而於接受高劑量(25 mg/kg) UB-421 之動物中則達至少 7 天。在最後一次輸注後，於某些接受高劑量之動物的血漿中檢測到過量 UB-421 達至少 14 天。

【0305】 在接受 UB-421 的 16 個動物中的任一個內均未發現針對 UB-421 的狒狒抗體，證實本候選藥物於接受治療之動物中不具有免疫原性。

【0306】 所有狒狒在第 0 和 28 天免疫接種 B 型肝炎病毒(HBV)疫苗(Merck)。在 4 隻控制組(1B)動物中的 4 隻、接受低劑量(2B) UB-421 的 8 隻狒狒中的 6 隻，以及接受高劑量(3B) UB-421 的 8 隻狒狒中的 3 隻，在第 56 天可觀察到可檢測水平的狒狒抗-HBsAg 抗體。這些結果指出 CD4+ 細胞之 UB-421 “覆蓋” 可能造成某些動物對抗原預防接種的低反應性。然而，發現此種低反應性的效應爲可逆的，因爲在 UB-421 治療中斷和以 HBV 疫苗額外免疫接種後，這些動物都能夠發展出抗-HBsAg 抗體。

4.2.2 觀察和屍體剖檢的結果

【0307】 將本試驗中接受治療之狒狒的肉眼和顯微鏡分析總結在表 16 和 17。

【0308】 在一般情況下，於此試驗中評估取自所有狒狒的組織(第 1 和 2 部份)，未顯示可能歸因於以低或高劑量

水平投予 UB-421 之任何獨特或一致的病理變化。

【0309】 對所有第 3B 組(高劑量)動物(n=8)於輸注前之收案時進行眼睛觀察，並於最後輸注後一週，於治療期結束時再次眼睛觀察。從這些動物的眼科報告指出，對在治療期結束時執行的所有測試而言，兩眼均保持在正常範圍內。

【0310】 取得來自所有動物(n=20)在完成投予每一劑量之前、期間和之後的心電圖觀察記錄。從所有試驗動物的心電圖報告推斷所發現的心電圖變化是在正常的逐日差異的範圍內。

4.2.3 IND-Enabling毒理試驗結果

【0311】 除了對 HBV 疫苗接種的免疫反應下降之外，UB-421 處理組(2B 和 3B)和控制組(1B)之間於免疫毒性結果並無顯著差異。臨床檢查結果、眼科報告、心電圖記錄和組織病理學結果支持結論，結論爲於成年狒狒在接受劑量水平高達 25 mg/kg 之 8 週輸注後，UB-421 是安全且耐受性良好的，治療法可有效地覆蓋目標細胞而不造成細胞耗竭。

5. 於人體組織的交叉反應性

【0312】 如先前實施例所討論的，mAb dB4 抗體，包含 mAb dB4C7 (UB-421 候選藥物的主要成分)，證明其對 CD4 具有高結合親合力，特別是位於 T 細胞上之與膜結合的 CD4。以下的臨床前試驗利用來自 30 個人體器官組織的一種晶片評估是否 mAb dB4C7 可結合其他細胞種類。本試驗

的目的是評估是否 mAb dB4C7 具有任何意料之外的反應性，以及其對有別於預期目標人體組織之細胞毒性的可能位置。

5.1. 方法

【0313】 使用含有 30 個器官之共 90 個組織核心的 FDA 標準的冷凍組織晶片進行免疫組織化學試驗，其每一組織取自 3 個正常人類個體捐贈者(美國 BioMax 組織微陣列(TMA)切片，洛克維爾，MD)。個別人類樣本之額外的冷凍切片也納入人體組織調查對象中，如表 18 所述。利用生物素化 mAb dB4C7 和控制組試劑(生物素化山羊抗-兔 IgG)篩選人體組織調查對象供免疫反應之用，用以評估特異性和非所欲之自體反應性。

5.2. 結果

【0314】 藉由於 PhenoPath 實驗室(西雅圖，華盛頓)經認證的臨床病理學家複審在成人正常組織切片所觀察到的染色模式，並針對反應性進行評分。在胸腺和位於扁桃體(和淋巴結)之 T 細胞依賴區觀察到強陽性的表面細胞膜染色，於脾臟則注意到弱陽性反應。偶發的單核細胞與淋巴細胞或巨噬細胞一致，以一個預期模式在多種組織中染色陽性。也注意到於肝臟之局部微弱的庫氏細胞(Kupffer cell)染色。除了在某些組織中內源性生物素的微弱染色，測試的所有其他人體組織均呈現陰性。扁桃體部分與未標幟的 mAb dB4C7 抗體預培養可阻斷特定染色模式。未觀察到預期外的交叉反應性。

【0315】 這些結果證實 mAb dB4C7 (UB-421 的主要成分)不具有可能會對有別於預定目標之人類組織導致細胞毒性的任何意料外的交叉反應性。

實施例13. 第I期，開放性，單次投予，劑量依賴性試驗，以評估UB-421於無症狀HIV-1感染之成年人的安全性和藥物動力學

1. 目標

【0316】 主要目標是要評估於無症狀之人類免疫缺陷病毒-1 (HIV-1)感染的受試者以 UB-421 遞增劑量單次靜脈輸注的安全性和耐受性，次要目標爲確定於無症狀之 HIV-1 感染的受試者以 UB-421 遞增劑量單次靜脈輸注的藥物動力學。(臨床試驗識別碼：NCT01140126)。

2. 方法

【0317】 開放性，單次投予，劑量依賴性(劑量遞增)，二中心，非比較性。

3. 受試者人數

【0318】 總共收案 20 個受試者(於每個劑量組有 5 位受試者)。

4. 診斷和納入的主要標準

【0319】 爲了參與這項試驗，受試者必須滿足以下所有標準。

(1) HIV-1血清反應陽性；

(2) 年齡20 歲(含)以上；

(3) 對於計畫書版本Mar-09-2010：無症狀，如同試驗主持人於篩選訪視(visit 1，V1)根據疾病史、生理學檢查、心電圖(ECG)，以及凝血試驗和臨床化學和血液學試驗結果所判定，此些項目結果必須一直維持在正常範圍±10%內；

(4) 對於計畫書版本Jul-01-2010：無症狀，定義爲患者在篩選訪視(visit 1，V1)前24週內無急性或有症狀的病毒性肝炎，且無AIDS-界定疾病的病史，其是由試驗主持人根據疾病史、生理學檢查、ECG，以及實驗室值所判定；

(5) 對於計畫書版本Mar-09-2010：在篩選訪視(visit 1，V1)所獲得CD4+ T細胞數量> 350個細胞/mm^3和HIV-1病毒量> 5,000 copies/mL；

(6) 對於計畫書版本Jul-01-2010：在篩選訪視前4週內或於篩選訪視(visit 1，V1)所獲得CD4+ T細胞數量> 350個細胞/mm^3和HIV-1病毒量> 5,000 copies/mL；

(7) 未使用治療藥物者(treatment-naïve)，即事前和目前未接受抗反轉錄病毒治療的受試者；

(8) 非哺乳中婦女；

(9) 受試者於對具生育能力婦女之篩選訪視時必需具有陰性的血清妊娠試驗結果；

(10) 受試者必須同意在試驗期間使用屏障避孕法(女性或男性保險套)；以及

(11) 受試者在接受任何研究程序前應簽署知情同意書。

5. 試驗用藥品和干預方法

【0320】 以濃度爲 10 mg/mL (100 mg 於 10 mL 藥瓶)提供 UB-421 (dB4C7 mAb)。

【0321】 把受試者分成 4 個劑量組，每一劑量組包含 5 名受試者，此基於其所接受 UB-421 的劑量。每個納入的受試者在第 0 天(Visit 2，V2)以以下的劑量水平之一接受 UB-421 的單次靜脈輸注：1 mg/kg 體重(第 1 劑量組)、5 mg/kg 體重(第 2 劑量組)、10 mg/kg 體重(第 3 劑量組)或 25 mg/kg 體重(第 4 劑量組)。基於特定劑量和受試者體重計算 UB-421 的適當體積。使用無菌生理食鹽水調整每個個別劑量的體積，藉此以藥物之等量輸注體積輸注一個劑量組內的每個個別受試者。之後使用輸注幫浦輸送 UB-421 的劑量。

6. 療程：

【0322】 從篩選、治療和隨訪的時間範圍：62 至 90 天。從輸注到試驗結束的時間範圍：60 天。

7. 評估標準：

7.1. 主要安全性終點：

【0323】

(1) 生理學檢查(PE)

(2) 生命徵象

(3) 臨床化學和血液學試驗

(4) 不良事件(AE)/嚴重不良事件(SAE)的發生率

(5) 心電圖(ECG)

7.2. 次要安全性終點：

【0324】

(1) 在給藥後第0天(輸注前)、第14天、第28天和第60天所展現之抗-UB-421抗體的血清濃度(UB-421的免疫原性)。

(2) 初始CD4+ T細胞數量是在篩選訪視(V1)時評估，或是基於篩選訪視前4週內所提供的預篩選數據。

(3) 在給藥後第60天評估隨訪的CD4+ T細胞數量。

8. 療效終點

【0325】 以於 HIV-1 病毒量從基線之改變評定療效終點。將基線的 HIV-1 病毒量定義爲在篩選訪視 V1 時所評估的病毒量。

9. 藥物動力學(PK)

【0326】 針對 UB-421 評估以下藥物動力學(PK)參數：

(1) C_{max}：給藥後所觀察到的最高血清藥物濃度。

(2) T_{max}：達到C_{max}的時間。

(3) λ_z：排除(末端)速度常數。

(4) $t_{1/2}$：排除(末端)半衰期。

(5) $AUC_{(0\rightarrow last)}$：從時間零至最終樣品評估時間之血清藥物濃度-時間曲線下的面積。

(6) $AUC_{(0\rightarrow \infty)}$：從時間零至無限大之血清藥物濃度-時間曲線下的面積。

(7) CL：從身體之藥物的血清清除率。

(8) V_β：於消除相之分佈的體積。

(9) V_{ss}：於穩定狀態(steady-state)之分佈的體積。

(10) $MRT_{(0\rightarrow\infty)}$：外推到無限大的平均滯留時間($MRT_{(0\rightarrow t)}$)。

10. 統計方法

10.1. 主要安全性終點

【0327】

(1) 生理學檢查：利用藉由中心、天數、劑量組或整體之敘述統計概述生理學異常。也呈現從基線至最終訪視的轉變表。

(2) 生命徵象：藉由每一訪視利用敘述統計概述生命徵象。也藉由中心、天數、劑量組或整體呈現相對於基線值的轉變。

(3) 臨床化學和血液學試驗：利用敘述統計於適用的訪視概述臨床化學和血液學試驗的結果。根據試驗主持人的專業判斷和在每個研究地點的正常範圍標準，將測試結果分為四個類別：正常、異常且無臨床意義(NCS)、異常且有臨床意義(CS)，以及異常且有典型的臨床意義(CST)。在轉變表中也呈現從基線至最終訪視之實驗室檢測結果異常的改變。

(4) 不良事件(AE)的發生率：將治療前不良事件、治療相關緊急不良事件(TEAE)、以及藥物相關不良事件概述於頻率分佈。每個報導的不良事件與一個國際通用醫學術語辭典(MedDRA)編碼和一器官系統分類相關。可將國家過敏症與傳染病研究所愛滋病分部

(DAIDS)的不良事件分級表第1.0版用於嚴重度分級。

(5) 心電圖(ECG)：利用敘述統計概述於適用之訪視所提供的心電圖紀錄數據。

10.2. 次要安全性終點

【0328】

(1) 抗-UB-421抗體的血清濃度：利用適用的訪視概述抗體濃度。

(2) CD4+ T細胞數量：利用分佈統計對適用的訪視概述細胞數量和細胞百分比。也概述了於CD4+ T細胞數量和百分比之相對於基線至最終訪視的改變。

10.3. 療效終點

【0329】

(1) HIV-1病毒量：於每一訪視利用敘述統計概述HIV-1病毒量。也利用中心、天數、治療劑量組和整體呈現相對於基線數值之改變=(於治療後訪視的數值–於基線訪視的數值)。

10.4. 藥物動力學評估

【0330】 於每一訪視利用敘述統計概述藥物動力學參數。

【0331】 根據計劃書和統計分析計畫書(SAP)，安全性終點是在意圖治療(intent-to-treat，ITT)群體進行分析，然而療效分析會在 ITT 和療效群體二者中進行。至於藥物動力學評估，因爲只有在台北榮民總醫院(TVGH)的受試者有樣品可收集作爲 PK 數據分析之用，故定義這些受試者爲

PK 群體。PK 評估只在 TVGH 的受試者進行。

11. 結論的摘要

11.1. 療效、藥物動力學和安全性結果

11.1.1 療效結果

【0332】 如第 22A 圖所示，利用測量在整個試驗中於不同時間點之 HIV-1 病毒量的變化以評估 UB-421 的療效。療效分析顯示在 UB-421 輸注後於來自第 2 劑量組(5 mg/kg)、第 3 劑量組(10 mg/kg)和第 4 劑量組(25 mg/kg)的受試者，而非於第 1 劑量組(1 mg/kg)的受試者，可發現於平均 HIV-1 病毒量之顯著的淨變化。

【0333】 藉由在單次投予後病毒量下降至 2.25 log_{10} (來自 10 mg/kg 組別)可證明抗體藥物 UB-421 (mAb dB4C7)的療效(第 22B 圖)。將對每一劑量組之 HIV-1 病毒量的最大平均下降概述如下，並在第 22B 圖顯示：

第 1 劑量組(1 mg/kg)：於第 6 天(V5)爲 0.29 log_{10} copies/mL。

第 2 劑量組(5 mg/kg)：於第 6 天(V5)爲 0.97 log_{10} copies/mL。

第 3 劑量組(10 mg/kg)：於第 10 天(V6)爲 1.58 log_{10} copies/mL。

第 4 劑量組(25 mg/kg)：於第 14 天(V7)爲 1.63 log_{10} copies/mL。

【0334】 HIV-1 抑制的持續時間與劑量水平相關，其中相較於較低劑量之劑量組的受試者，在較高劑量之劑量組

的受試者顯示 HIV-1 病毒量下降的持續時間較長(第 22A 圖)。對以最高劑量 UB-421 (第 4 劑量組，25 mg/kg)輸注受試者之 HIV-1 病毒量抑制的持續時間維持最長，約 28 天。

【0335】 總之，發現 UB-421 抗體在 5、10 和 25 mg/kg 的劑量水平以劑量-依賴關係具有強的抗病毒效應。也就是說，在可比較的投藥下，相對於 TMB-355，利用 UB-421 治療時有更高百分比的患者於血清 HIV-1 RNA 水平達到>1 Log_{10} 的減少。

【0336】 針對 TMB-355 (TMB-355 先前稱爲 TNX-355；Kuritzkes, D.R., et al., 2004, 第 1 圖)先前報導的療效數據評估來自本試驗使用 UB-421 之療效數據的理論比較，如第 23A 圖至第 23C 圖所示。基於此比較，於評估的 100%的受試者中，接受 10 mg/kg 或 25 mg/kg 單次投予時，UB-421 可達到於病毒量的 10 倍減少；然而 TMB-355 只可於使用相同劑量之 83%的受試者中達到於病毒量的 10 倍減少。

11.1.2 藥物動力學結果

【0337】 針對此試驗中所使用 UB-421 的每個劑量(1、5、10 和 25 mg/kg)評估以上列出的藥物動力學(PK)參數。表 19 概述了在每一劑量組來自 3 個受試者所評估的多個 PK 參數(C_{max}、$AUC_{(0\rightarrow\infty)}$、$T_{1/2}$ 和 MRT)的結果。結果顯示每個 PK 參數和投予 UB-421 劑量的數據值之間具有相關性。也就是說，UB-421 的劑量由 1 mg/kg 增加至 25 mg/kg 可對應至所評估之 PK 參數的增加。具體來說，C_{max} 由 28.6 μg/mL 增加至 462.5 μg/mL；$AUC_{(0\rightarrow\infty)}$由 201 μg-小時/mL

增加至 51367 μg-小時/mL；$T_{1/2}$由 14.4 小時增加至 85.4 小時；且 $MRT_{(0\rightarrow\infty)}$由 21.6 小時增加至 97.4 小時。

11.1.3 安全性結果

【0338】 透過生理學檢查、生命徵象、臨床化學和血液學試驗、AE/ SAE 的發生率和心電圖評估 UB-421 的安全性特徵。也測定 CD4+ T 細胞數量和抗-UB-421 抗體濃度以提供進一步的安全性評估。

【0339】 針對總共 30 個事件，將 TEAEs 的淨發生率以嚴重度分級爲 65.0% （20 個受試者中的 13 個）。報導的三個受試者具有六件治療相關的不良事件與嚴重度分級：於受試者 B-001-001 (投予 1 mg/kg 劑量的 UB-421)爲第 1 級(輕度)“搔癢”和“癤瘡”；於受試者 A-015-009 (投予 10 mg/kg 劑量的 UB-421)爲第 1 級(輕度)“淋巴細胞數量增加”、“嗜中性球數量減少”和“血小板數量下降”；且於受試者 B-015-008 (投予 25 mg/kg 劑量的 UB-421)爲第 2 級(中度)“麻疹樣疹”。於受試者 B-015-008 之麻疹樣疹的發生爲未預期之嚴重藥品不良反應(Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction，SUSAR)；此受試者在 5 天護理之後從醫院出院。報導的一位受試者具有另外的 SAE，其與 UB-421 無關，於受試者 A-012-005 (投予 5 mg/kg 劑量的 UB-421)爲肛門廔管和痔瘡；在生命徵象或心電圖的結果則未發現與治療相關的異常。於治療僅有一個劑量；因此，尚未發生治療中斷或劑量變化。

【0340】 在三個受試者(分別來自第 2、3 和 4 劑量組的

一位受試者)中在第 14 天(V7)檢測到抗-UB-421 抗體，其水平略高於 0.4 μg/mL 的實驗檢測極限。在經過第 60 天(試驗結束)的任何後續的訪視中未檢測出抗-UB-421 抗體。沒有相關的不良事件或其他生理學異常與抗-UB-421 抗體的出現有關。

【0341】 此外，CD4+ T 細胞數量和細胞百分比在 60 天的治療期和無治療隨訪期期間爲相對穩定的。

【0342】 總而言之，當以介於 1 和 25 mg/kg 的劑量範圍透過靜脈內(IV)輸注投予單劑量時，UB-421 對 HIV-1 感染的成人是安全且耐受性良好的。

12. 結論

【0343】 此第 I 期試驗，以劑量範圍從 1 至 25 mg/kg 的 UB-421 單次靜脈輸注，證明 UB-421 對 HIV-1 感染的成人是安全且耐受性良好的。大部分的不良事件爲輕度或與試驗藥物無關的。麻疹樣疹之 SUSAR 的唯一發生是發生在第 4 劑量組(25 mg/kg 劑量)，但目前還不清楚這起事件是否與試驗藥物有關。在三個受試者中只於第 14 天(V7)檢測到對 UB-421 的暫時性免疫反應，其抗體水平僅略高於 0.4 μg/mL 的實驗檢測極限，證明此抗體的出現爲輕微的臨床意義。關於此試驗藥物的藥物動力學概況，主要參數的趨勢與劑量水平相關。此外，HIV-1 病毒量抑制的程度和持續時間與 5、10 和 25 mg/kg 之 UB-421 劑量水平顯著地正相關，但在 1 mg/kg 劑量組並非如此明顯。

【0344】 考慮到從此試驗所獲得的安全性和療效結

果，在治療無症狀 HIV-1 感染的成年人中許可至少爲 5 mg/kg 劑量水平 UB-421 的進一步發展。

實施例14. 第IIa期，開放性，多次投予，劑量依賴性試驗以研究UB-421於無症狀HIV-1感染之成年人的安全性和療效

1. 試驗目的

【0345】

(1) 評估於無症狀HIV-1感染受試者之UB-421二劑量治療方案之多次投予的安全性和耐受性。

(2) 獲得於這些受試者之UB-421二劑量治療方案之多次投予的抗病毒活性證據。

(3) 評估抗病毒活性和安全性概況以確定最佳UB-421給藥和劑量治療方案。

(臨床試驗識別碼：NCT01668043)。

2. 試驗設計

【0346】 這是利用 UB-421 之重複靜脈內給藥的開放性試驗。爲了可受試性(eligibility)而篩選對 HIV-1 血清反應陽性且無症狀之受試者。二十九位納入的受試者接受兩個劑量水平(每週 10 mg/kg (第 1 劑量組)或每兩週 25 mg/kg (第 2 劑量組))之一的試驗藥物(UB-421)之多次靜脈輸注，共爲期 8 週的治療期。基於收案順序透過地點且輪流地將受試者分配到兩個試驗劑量組之一。在 8 週的治療期之後隨訪受試者額外的八週。此試驗在第 16 週結束。

3. 納入的標準

【0347】 受試者必須滿足以下標準才有資格參與第 IIa 期試驗：

(1) 無症狀，未接受抗反轉錄病毒治療的患者(antiretroviral therapy (ART)-naïve)，HIV-1血清反應陽性

(2) CD4+ T細胞數量> 350 cells/mm^3

(3) HIV-1病毒量> 5,000 copies/mL

(4) 無需要立即治療的感染症(HIV-1除外)

(5) 無使用免疫調節藥物或全身化療

(6) 無需高效抗反轉錄病毒療法(HAART)。

【0348】 當依據對 HIV/AIDS 診斷與治療的現行指導方針由試驗總主持人視作必需時，在這項試驗完成後，受試者於門診遵循例行的監測時程表(無抗反轉錄病毒藥物)或接受標準治療之抗反轉錄病毒療法(例如 HAART)。允許於使用 UB-421 之第 I 期試驗所納入的個體和符合第 IIa 期試驗之進入標準的個體參與此次試驗。

4. 試驗用藥品

【0349】 以濃度爲 10 mg/mL (100 mg 於 10 mL 藥瓶)提供 UB-421 (dB4C7 mAb)。

【0350】 每個納入的受試者接受利用以下劑量水平之一的 UB-421 的多次靜脈輸注：每週 10 mg/kg (第 1 劑量組)或每兩週 25 mg/kg (第 2 劑量組)，爲期 8 週。UB-421 的適當體積是基於特定劑量和受試者體重。使用無菌生理食鹽水調整每個個別劑量的體積，藉此利用藥物之等量輸注體

積輸注一個劑量組內的每個個別受試者。對 10 mg/kg 劑量組的輸注總體積爲約 100 mL，而對 25 mg/kg 劑量組的輸注總體積爲約 200 mL。每次給藥的輸注時間爲約一到兩小時。

5. 評估標準：

5.1. 主要安全性和療效終點：

【0351】 直到第 16 週(試驗結束)評估 UB-421 的以下安全性和耐受性參數：

(1) 生理學檢查(PE)

(2) 生命徵象

(3) 臨床化學和血液學試驗

(4) 不良事件(AE)/嚴重不良事件(SAE)的發生率

【0352】 在試驗期(從 V2 至 V12)期間對每一個劑量組評估 UB-421 的以下療效參數：

(1) 個別最大病毒量下降

(2) 平均最大病毒量下降

5.2. 次要病毒學終點

【0353】 在試驗期(從 V2 至 V12)期間評估以下病毒學反應：

(1) 在每一試驗劑量組內和之間根據次群組的個別最大病毒量下降和平均最大病毒量下降。

(2) 具有病毒量< 50 copies/mL之受試者的比例；

(3) 具有病毒量< 200 copies/mL之受試者的比例；

(4) 具有病毒量下降> 0.5 $\log_{10}$ copies/mL之受試者的

比例；

(5) 具有病毒量下降> 1 log_{10} copies/mL之受試者的比例；

(6) 分別地對第1劑量組和第2劑量組在最終完成試驗藥物投予後直到7天和14天具有病毒反彈(於病毒量從最低點有超過0.5 log_{10}的增加)之受試者的比例；

(7) 抗-UB-421抗體的血清濃度(UB-421的免疫原性)；

(8) CD4+和CD8+ T細胞數量的變化；

(9) UB-421的藥物動力學參數(C_{max}、$AUC_{(0\rightarrow\infty)}$和$AUC_{(0\rightarrow last)}$)。

6. 分析群體

【0354】 意圖治療(ITT)群體：29 個受試者，其接受試驗藥物的至少一次給藥。第 1 劑量組和第 2 劑量組的 ITT 群體分別爲 14 個受試者和 15 個受試者。

【0355】 依計劃書執行臨床試驗的群體(Per-protocol (PP) population)：18 個受試者，其接受試驗藥物的所有給藥，具有有效的基線和至少一個有效的治療後療效測定(HIV-1 病毒量試驗)，且無重大違反計畫書規定。第 1 劑量組和第 2 劑量組的 PP 群體分別爲 7 個受試者和 11 個受試者。

【0356】 安全性和免疫原性群體：將 29 個受試者納入意圖治療(ITT)群體。

【0357】 藥物動力學群體：是基於安全性和免疫原性群體中的次群體。

【0358】 於安全性和免疫原性群體分析基線數據和安全性終點，然而療效分析是在 ITT 和 PP 群體二者中進行。在藥物動力學群體進行藥物動力學分析。

7. 試驗期的持續時間

【0359】 篩選期：< 4 週

【0360】 治療期：8 週

【0361】 隨訪期：治療期結束後接著的 8 週

【0362】 Visit 0 代表初始篩選，而試驗期間的每一次訪視代表 1 週期間。隨訪期通常以每週間隔執行。

8. 結果的概述

8.1. 試驗群體

【0363】 在台灣的兩個試驗地點篩選總共 33 個無症狀之 HIV 感染的成年人。其中 29 個受試者通過了篩選標準並被選擇進行試驗。所有符合資格的 29 個受試者均爲男性。

8.2. 安全性和耐受性結果

【0364】 所有 29 名受試者在試驗期間經歷至少 1 件不良事件，共計 128 件不良事件。其中，114 例(在所有 29 個受試者中有 89.06%)爲治療相關緊急不良事件(TEAEs)和 14 例(在 5 個受試者中有 10.94%)爲治療前不良事件。於 29 個受試者中未觀察到嚴重不良事件(SAEs)。所有治療前不良事件均與 UB-421 無關，且這些事件中無事件被視爲 SAEs。報導 TEAEs 中的大多數(78.95%)爲輕度，17.54%爲中度，且 3.51% (於一個受試者)是重度的。

【0365】 最常見的(>10%) TEAE 是皮疹和蕁麻疹。除了不良事件，在 22 個受試者中觀察到於血液學(於 22 個受試者中的 154 個事件)和生物化學(於 6 個受試者中的 32 個事件)之實驗室異常檢測結果。然而，大多數的變化是輕微且不具有臨床意義的。生理學檢查結果和生命徵象在試驗期期間大多爲正常或無臨床意義。

【0366】 如臨床試驗計劃書所說明，UB-421 在試驗期期間爲耐受性良好的，其於 8 週治療期的整體治療耐受性爲 73.84%。

8.3. 藥效學

8.3.1 $CD4^+$ T和$CD8^+$ T細胞數量

【0367】 在 8 週治療期和 8 週隨訪期之後，平均 $CD4^+$ T 細胞數量從基線略微減少了 55.10 ± 117.97 cells/mm^3，而平均 $CD8^+$ T 細胞數量從基線增加了 193.31 ± 459.34 cells/mm^3。第 1 劑量組受試者之代表的 $CD4^+$ T 細胞數量和平均 CD4 T 細胞數量如表 22A 和第 24A 圖所示。第 2 劑量組受試者之代表的 $CD4^+$ T 細胞數量和平均 CD4 T 細胞數量如表 22B 和第 24B 圖所示。

8.3.2 以UB-421覆蓋CD4 受體

【0368】 利用螢光結合的 UB-421 透過流式細胞儀偵測 CD4 受體覆蓋的程度。從四個代表受試者所提供之結果，兩個來自第 1 劑量組和兩個來自第 2 劑量組，分別如第 25A 至 25B 圖和第 25C 至 25D 圖所示。此試驗的靈敏度爲 0.15 μg/mL。以每週 10 mg/kg 或每兩週 25 mg/kg 重複給藥時，

UB-421 的臨床療效顯示，當作爲單一藥物治療時，於>10 μg/mL 之 UB-421 血清水平存在下可使病毒減少至低於檢測極限。只要 PBMC CD4+細胞被完全覆蓋(即 dB4C7-Alexa 結合百分比接近 0)就沒有病毒反彈。

【0369】 在以兩個劑量水平投予 UB-421 二至三次後可達成以 UB-421 完全覆蓋位於 PBMC 上之 CD4 受體。此外，於整個治療期期間可保持以 UB-421 完全覆蓋 CD4+ T 細胞(第 25A–25D 圖，上圖)。在大多數受試者中，如同利用螢光 dB4C7 mAb (dB4C7-Alexa)之結合所測定，在最終 UB-421 輸注的三週內，結合至 CD4 受體的 UB-421 減少並回復至基線數值。

【0370】 評估試驗期間於受試者血清中所呈現之 UB-421 的濃度，以決定足以達成完全 CD4 覆蓋和 HIV-1 病毒抑制之 UB-421 的血清濃度。基於所獲得的數據，只要 UB-421 血清濃度維持在高於 10 μg/mL，則可利用 UB-421 達成持續的 CD4+ T 細胞的完全覆蓋和 HIV-1 病毒抑制(第 25A–25D 圖，下圖)。

8.4. 藥物動力學

【0371】 在第 1 劑量組中觀察到平均 AUC 從 17300 ± 10000 μg x 小時/mL (Visit 1-2)增加至 23900 ± 10700 μg x 小時/mL (Visit 8-9)，然後在 Visit 11-12 回復至基線。在第 1 劑量組中所觀察到的平均 $AUC_{(0\rightarrow last)}$是 171000 ± 70300 μg x 小時/mL。

【0372】 在第 2 劑量組中觀察到平均 AUC 從 56500 ±

19500 μg x 小時/mL (Visit 1-3)增加至 61100 ± 20700 μg x 小時/mL (Visit 7-9)，然後在 Visit 11-12 回復至基線。在第 2 劑量組中所觀察到的平均 $AUC_{(0\rightarrow last)}$是 239000 ± 73900 μg x 小時/mL。

【0373】 這些數據證明，如同利用 $AUC_{(0\rightarrow last)}$所測定，相較於接受每週 10 mg/kg UB-421 輸注者(第 1 劑量組，171000 ± 70300 μg x 小時/mL)，平均血清藥物濃度以在投予每兩週 25 mg/kg UB-421 輸注的受試者中較高(第 2 劑量組，239000 ± 73900 μg x 小時/mL)。

8.5. 療效結果

【0374】 此試驗招募 29 個 HIV-1 感染的受試者，其接受至少一劑的 UB-421 (ITT 群體)。招募的 29 個受試者中，共計 18 個受試者完成了 8 週的治療期，其接受試驗藥物的所有給藥(PP 群體)。於試驗期間透過評定所納入無症狀 HIV-1 感染受試者的個別和平均最大病毒量下降，以評估 UB-421 多次投予的療效，且將第 1 和 2 劑量組之 ITT 和 PP 群體的結果概述於表 20。

【0375】 發現平均最大病毒量下降在 ITT 或 PP 群體的兩個劑量水平之間並無顯著差異。具體來說，在第 1 劑量組於 ITT 群體之病毒量減少了 2.27 ± 0.60 log_{10} copies/mL，而在第 2 劑量組於 ITT 群體之病毒量減少了 2.45 ± 0.46 log_{10} copies/mL。於 PP 群體，在第 1 劑量組病毒量減少了 2.73 ± 0.34 log_{10} copies/mL，而在第 2 劑量組病毒量減少了 2.47 ± 0.45 log_{10} copies/mL。

【0376】 在治療期期間，於所有(n=29，100.00%)試驗受試者觀察到≥ 0.5 log_{10} copies/mL 的病毒量下降；且於所有(n=29，100.00%)試驗受試者觀察到≥ 1 log_{10} copies/mL 的病毒量下降。

【0377】 於以下內容揭露在治療期期間所獲得之數據的進一步評估：

【0378】 在第 1 劑量組，於 ITT 之 8/14 (57.14%)的受試者和於 PP 之 5/7 (71.43%)的受試者具有≤ 200 copies/mL 的病毒量；此外，於 ITT 之 3/14 (21.43%)的受試者和於 PP 之 3/7 (42.86%)的受試者具有< 50 copies/mL 的病毒量。

【0379】 在第 2 劑量組，於 ITT 之 10/15 (66.67%)的受試者和於 PP 之 7/11 (63.64%)的受試者具有≤ 200 copies/mL 的病毒量；且於 ITT 之 3/15 (20.00%)的受試者和於 PP 之 2/11 (18.18%)的受試者具有< 50 copies/mL 的病毒量。

【0380】 來自第 1 和 2 劑量組受試者之代表的病毒量下降數據如表 21A 至 21C 和第 25A 至 25D 圖(上圖)所示。在每一劑量組之內、每一劑量組之間，或在每一劑量組內的次群體之間，於具有病毒量下降之受試者的比例並無統計上顯著的差異。此外，在 8 週治療期期間，在第 1 和 2 劑量組分別有 43%和 18%受試者的病毒量減少至低於目前實驗檢測極限(20 copies/mL)的水平。在所有受試者中，當以 UB-421 完全覆蓋 CD4+ T 細胞時可使病毒量持續下降。在隨訪期結束時，於兩個劑量組的病毒量回復至基線水平。此外，在治療期期間於任何的試驗受試者中未觀察到病毒

反彈。來自兩個劑量組之患者於整個治療期中未偵測到可計量的抗-UB421 抗體(表 21A 至 21C)。

8.6. UB-421和TMB-355的比較

【0381】 針對由他人(Jacobson, J.L., et al., 2009; Toma, J., et al., 2011; and Pace, C.S., et al., 2013)所執行 TMB-355 (ibalizumab，先前稱爲 TNX-355)的相似試驗所提供的結果，以評估 UB-421 於此試驗所提供之結果。第 26A 圖顯示在具有 CD4+細胞完全覆蓋的 UB-421 存在下，有高達>3 Log_{10}之優異的病毒量下降而無病毒量反彈。相反地，甚至在 CD4+細胞完全覆蓋存在下，從治療起只有一週之後，接受 TMB-355 治療的患者便遭遇到病毒反彈，此爲抗藥性病毒突變種發展的象徵(第 26B 圖)。

【0382】 這兩種治療方案的比較，如圖所示，證明了利用 UB-421 治療 HIV 感染的受試者具有較 TMB-355 治療明顯的優勢。具體來說，UB-421 在整個治療期中提供了於 HIV 病毒量的持續性下降，且甚至在進入到隨訪期的一或兩週仍具有>3 log_{10}的最大病毒量下降。相反地，TMB-355 藉由第一次投予只提供了暫時性的病毒量下降，以及接近 1 log_{10}之最大病毒量下降。

【0383】 此外，使用 TMB-355 之先前試驗發現，儘管血清 TMB-355之呈現和 CD4陽性 T細胞之完全覆蓋， HIV 病毒反彈仍在進入治療的一週後發生(Jacobson, J.L., et al., 2009)。這結果與於上述實施例 4 之先前預測一致，非競爭型進入抑制機制，如 TMB-355 (ibalizumab)所調停者，在

抗體治療期期間可提供抗藥性 HIV 突變種發展的高度可能性。實際上，發現來自接受 TMB-355 治療以減少病毒量之患者的病毒抗藥性突變種於 gp120 的 V5 區域上辨別出突變 (Toma, J., et al., 2011; Pace, C.S., et al., 2013)。

9. 結論

【0384】 發現於無症狀 HIV-1 感染的受試者以 UB-421 進行 8 週治療具有良好的耐受性。此外，分別來自第 1 和 2 劑量組對個別受試者之代表的 CD4+ T 細胞數量(表 22A 和 22B)和平均 CD4 T 細胞數量(第 24A 和 24B 圖)在整個爲期兩個月的監測中保持穩定。

【0385】 更重要的是，以 UB-421 治療導致在所有受試者中顯著的病毒量下降(100%接受治療的受試者以≥ 1 log_{10} copies/mL 之最大下降作出反應)。兩種治療方案，每週 10 mg/kg (第 1 劑量組)和每兩週 25 mg/kg (第 2 劑量組)輸注，顯示於病毒量下降之類似療效。在第 1 劑量組於 ITT 群體之平均最大病毒量下降達到 2.27 ± 0.60 log_{10} copies/mL，而在第 2 劑量組於 ITT 群體之平均最大病毒量下降達到 2.45 ± 0.46 log_{10} copies/mL。利用 UB-421 所觀察到的病毒減少療效比迄今所測試的任何其他的小分子抗 HIV 藥物優越。

【0386】 從此周密進行之 UB-421 的多劑量第 IIa 期所得到的臨床試驗結果證明在治療期期間不具有病毒反彈之作爲單一藥物治療的高耐受性、安全性，和於病毒量下降之空前的療效。在這試驗中所獲得的結果是意想不到的，

且與此領域中長期抱持之懷疑(結合 CD4 功能區塊 1 的抗-CD4 單株抗體是免疫抑制的，因爲其對於第二型主要組織相容性複合體所調停之免疫功能的干擾，且此種療法對於 HIV 疾病之治療並不合適(Jacobson, J.L., et al., 2009))相矛盾。此結果進一步指出利用 UB-421 合併使用正交的(orthogonal) HAART 及/或其他 HIV 病毒庫激活劑(例如 HDACi)之 HIV 療法的額外形式可達到 HIV 感染的功能性治癒。

實施例15. 利用UB-421單一藥物治療的治療形式作爲於HIV-1感染成年人之抗反轉錄病毒療法的替代品

【0387】 第 27 圖說明利用 UB-421 單一藥物治療對各種 HIV 患者群體的治療形式以作爲抗反轉錄病毒療法的替代品。詳細的目的和計畫書於以下內容所述。

1. 適用的患者群體

【0388】 藉由穩定的高效抗反轉錄病毒療法(HAART)而具有病毒抑制之對 HIV-1 爲血清反應陽性的受試者有資格進行此種治療。

【0389】 符合資格的患者在 4 個月的初期透過 IV 或 SC 途徑接受 UB-421 投予，之後是 HAART 治療的另一個循環。“HAART-UB-421”交替治療循環可重複多次，直到停用 UB-421 和 HAART 治療時不再觀察到病毒反彈爲止，從而達成對 HIV 感染的功能性治癒。

【0390】 更具體地，這些受試者分別地於爲期 8 週和

16 週的治療期，以兩個劑量水平(每週 10 mg/kg 或每兩週 25 mg/kg)之一，接受試驗藥物(UB-421)的多次靜脈輸注。在第一次 UB-421 輸注的前一天停用 HAART 治療。在 UB-421 投予之前，依照試驗總主持人所判斷，給予受試者預防用藥(治療前給藥)，包含類固醇和抗組織胺藥物，以預防輸注反應。在完成最後一次排程的 UB-421 給藥後，所有受試者在同一天重啓其原先或其他適當之病毒敏感的抗反轉錄病毒療法。HAART 治療方案之使用是由試驗總主持人所判斷。在治療期期間和在治療期結束後 6 個月監測來自所有患者的病毒量和 CD4 細胞數量。

2. 納入標準

【0391】 若受試者滿足以下所有標準則可納入此治療形式：

(1) HIV血清反應陽性；

(2) 年齡20 歲(含)以上；

(3) 已接受HAART治療，定義爲至少2個核苷類/核苷酸類反轉錄酶抑制劑(NRTIs)加上1個非核苷類反轉錄酶抑制劑(NNRTI)、整合酶抑制劑，或蛋白酶抑制劑，達至少2年；此治療在進入本試驗之前一年內是不間斷的且無藥物更換。

(4) 在篩選訪視前1年內具有CD4+ T細胞數量≧ 500 cells/mm^3或CD4百分比≧ 28%的兩個測量值；

(5) 在篩選訪視前4週內或於篩選訪視時所提供具有CD4+ T細胞數量≧ 500 cells/mm^3；

(6) 篩選訪視前至少1年之HIV-1血漿RNA保持在低於檢測極限，每年具有至少2個病毒量測定。病毒量在篩選訪視前4週內或於篩選訪視時也是低於檢測極限；在篩選訪視前4週以前的可檢測HIV血漿RNA的單次事件將不排除參與。

3. 排除標準

【0392】 爲了以下任何的理由可將受試者排除在此治療形式之外：

(1) 需要立即治療的任何感染症(HIV除外)；

(2) 根據美國疾病控制與預防中心(CDC)對HIV感染分類系統按照第B類和第C類條件之任何先前確診或現行的AIDS-界定疾病；

(3) 體重> 80 kg；

(4) 在篩選前12週內任何紀錄的CD4+ T細胞數量< 250 cells/mm^3或CD4+ T細胞百分比≦14%；

(5) 先前納入於UB-421的第I期或第IIa期試驗，或呈現抗-UB-421抗體的任何病史；

(6) 在試驗藥物UB-421第一次給藥前12週內對單株抗體的任何先前暴露；

(7) 任何顯著疾病(除了HIV-1感染)或臨床上顯著的發現，包括精神和行爲問題，根據篩選、病史及/或生理學檢查決定，由試驗主持人判定，將受試者排除參加此項試驗；

(8) 在試驗藥物第一次給藥前8週內的任何疫苗接種；

(9) 在試驗藥物第一次給藥前12週內的任何免疫調節治療(包含干擾素)、全身化療；

(10) 少於12個月的預期餘命；

(11) 在試驗藥物第一次給藥前12週內的任何非法靜脈注射吸毒；

(12) 由於病毒學失敗和先前的非何杰金氏淋巴瘤或卡波西氏肉瘤之不只一次的HAART治療方案改變；

(13) 任何當前之酒精或非法毒品的使用，由試驗主持人判定，會妨礙受試者去遵從投藥和訪視時程表以及計畫書評估的能力。

4. 藥品成品

【0393】 以濃度爲 10 mg/mL (100 mg 於 10 mL 藥瓶)提供藥品成品 UB-421 (dB4C7 mAb)。受試者利用靜脈輸注接受 10 mg/kg UB-421 的 8 次每週劑量或 25 mg/kg UB-421 的 8 次每兩週劑量。

【0394】 UB-421 的適當體積是基於特定劑量和受試者體重。使用無菌生理食鹽水調整每個個別劑量的體積，藉此利用藥物之等量輸注體積輸注一個劑量組內的每個個別受試者。對 10 mg/kg 劑量組的輸注總體積爲約 100 mL，而對 25 mg/kg 劑量組的輸注總體積爲約 200 mL。每次給藥的輸注時間爲約一到兩小時。

實施例16. 利用UB-421合併使用HAART的治療形式供HIV-1感染的功能性治癒

【0395】 第 28 圖說明利用抗體 UB-421 合併使用 HAART對各種HIV患者群體的治療形式可供HIV-1感染的功能性治癒。適用的患者群體：(1)未使用治療藥物之 HIV 患者；(2) HAART 治療穩定的 HIV 患者；以及(3) HAART 治療失敗之 HIV 患者。

【0396】 更具體地，於受感染之受試者供 HIV 功能性治癒的臨床計畫書之達成是藉由在初期(爲期 4 個月)透過 IV 或 SC 途徑投予 UB-421，初期(爲期 4 個月)之後是治療假日(爲期 2 個月)，其作爲在兩個完整循環(爲期一年)中的一個治療循環(爲期 6 個月)。這些相同的受試者也在 UB-421 治療之兩個完整循環的期間開始和持續 HAART 治療。在兩個完整循環結束時，停用 HAART 和 UB-421 (A 組(Arm A))以評估發生病毒反彈所需的時間，如果有病毒反彈的話。控制組中，包含在 HAART 治療停用之前透過相同的 12 個月期間單獨以 HAART 治療的受試者，其也被評估以評定發生病毒反彈的時間，如果有病毒反彈的話(B 組(Arm B))。

【0397】 在同時發生 UB-421 和 HAART 治療的二個循環期間和治療期後 6 個月，共計 18 個月，監測來自所有患者的病毒量及 CD4 細胞數量。

【0398】 A 組：以 HAART 治療合併使用每週 10 mg/kg 或每兩週 25 mg/kg 的 UB-421 投予。B 組：單獨以 HAART 治療。

1. 於功能性治癒之UB-421治療的設計(表23)

【0399】 UB-421 勝過 HAART 藥物的潛在優勢：

(1) UB-421可阻斷HIV-1病毒的細胞間傳播

(2) UB-421交聯CD4的類CDR－2環並活化細胞，且因此從潛伏誘導和釋放HIV-1

2. 目標

【0400】

(1) 利用UB-421合併使用HAART，藉由阻斷HIV之無細胞和細胞間傳播，以提供HIV感染的受試者有效的治療和保護。

(2) 於HIV感染的受試者提供對HIV的功能性治癒。

3. 適用的患者群體

【0401】 (1) HAART 治療穩定的 HIV 患者；(2) 未使用 HAART 治療之 HIV 患者；以及(3) HAART 治療失敗之 HIV 患者。

4. 藥品成品UB-421

【0402】 以濃度爲 10 mg/mL (100 mg 於 10 mL 藥瓶)提供藥品成品 UB-421 (dB4C7 mAb)。受試者利用靜脈輸注接受 10 mg/kg UB-421 的 8 次每週劑量或 25 mg/kg UB-421 的 8 次每兩週劑量。

【0403】 UB-421 的適當體積是基於特定劑量和受試者體重。使用無菌生理食鹽水調整每個個別劑量的體積，藉此利用藥物之等量輸注體積輸注一個劑量組內的每個個別受試者。對 10 mg/kg 劑量組的輸注總體積爲約 100 mL，而對 25 mg/kg 劑量組的輸注總體積爲約 200 mL。每次給藥的輸注時間爲約一到兩小時。

5. 分配干預

【0404】 分配以下的干預措施：

5.1. A組-UB-421和HAART治療的合併使用

【0405】 受試者以適當的 HAART 療法持續地治療，並也以持續一年之兩個完整循環的 UB-421 治療。UB-421 治療的每個循環包括在 4 個月的期間以每週 10 mg/kg UB-421 投予或以每兩週 25 mg/kg UB-421 投予，之後接續無 UB-421 治療的兩個月。

【0406】 在 1 年的治療期結束後，停用 HAART 和 UB-421 治療。進行額外的觀察試驗(藉由於缺乏 HAART 和 UB-421 狀況下未見任何病毒反彈)以確保 HIV 感染的功能性治癒。

5.2. B組-單獨以HAART治療

【0407】 作爲控制組，於同樣期間內利用適當的 HAART 療法而未以 UB-421 治療用以持續地治療一組個別的受試者。

【0408】 在 1 年的治療期結束後，停用 HAART 治療並針對病毒反彈對受試者進行監測。

【0409】 所有說明書中所揭示之發明技術特點可以任意方式組合。說明書中揭示之每一技術特點可以提供相同、等同或相似目的之其他方式替換。因此，除非另有特別說明，文中所有揭示之特點均只是等同或相似特點之一般系列之實例。

【0410】 由上述可知，熟習此技藝者能輕易地了解本發

明之必要特徵，在不脫離其精神與範圍之下能就本發明做許多改變與調整以應用於不同用途與條件。

【0411】 表 1. 在 HIV 治療上未滿足的醫療需求：功能性治癒和根除

消除性治癒(根除)	**功能性治癒**
所有 HIV 感染細胞的消除	在缺乏 HAART 下的長期病毒抑制
HIV RNA < 1 copy/ml	HIV RNA < 50 copies/ml (或低於實驗檢測極限)
治癒	緩解

【0412】 表 2. 目前發展中供 HIV 感染靜默 T 細胞之再活化的 HDAC 抑制劑的列表

藥物名稱	**資訊**
Vorinostat (SAHA)	Vorinostat (辛二醯基苯胺羥胺酸，SAHA，Zolinza)是一種 HDAC 抑制劑，IC_{50} 爲~10 nM。
Entinostat (MS-275, SNDX-275)	MS-275 是一種 HDAC 抑制劑，對 HDAC1 和 HDAC3 之 IC_{50} 分別爲 0.51 μM 和 1.7 μM。
Panobinostat (LBH589)	LBH589 (Panobinostat)是一種新的廣譜 HDAC 抑制劑，對 MOLT-4 和 Reh 細胞之 IC_{50} 分別爲 5 和 20 nM。
Trichostatin A (TSA)	Trichostatin A (TSA)是一種 HDAC 抑制劑，IC_{50} 爲~1.8 nM。
Belinostat (PDX101)	Belinostat (PXD101)是一種新的 HDAC 抑制劑，於 HeLa 細胞萃取物之 IC_{50} 爲 27 nM。
Mocetinostat (MGCD0103)	MGCD0103 (Mocetinostat)是一種有效的第一型 HDAC 抑制劑，對 HDAC 1、HDAC 2 和 HDAC 3 之 IC_{50} 分別爲 0.15 μM、0.29 μM 和 1.66 μM。
MC1568	MC1568 是一種第 II (IIa)型選擇性 HDAC 抑制劑，IC_{50} 爲 220 nM。
Romidepsin (FK228, depsipeptide)	Romidepsin (FK228，酯肽(depsipeptide)) 是一種有效的 HDAC1 和 HDAC2 的抑制劑，IC_{50} 分別爲 36 nM 和 47 nM。
M344	M344 是一種有效的 HDAC 抑制劑，IC_{50} 爲 100 nM。
PCI-34051	PCI-34051 是一種有效且具特異性的 HDAC8 抑制劑，IC_{50} 爲 10 nM。
Tubastatin A HCl	Tubastatin A 是一種有效的 HDAC6 抑制劑，IC_{50} 爲 15 nM。
AR-42 (HDAC-42)	AR-42 是一種新的 HDAC 抑制劑，對急性淋巴性白血病(697)細胞株之 IC_{50} 爲 0.61 μM。
ITF2357 (Givinostat)	ITF2357 (Givinostat)是一種口服、有活性，有效的 HDACs 抑制劑，IC_{50} 爲 7.5-16 nM。
SB939 (Pracinostat)	SB939 是一種有效的小分子；作爲 HDAC 抑制劑，對第一型、第二型和第四型 HDAC 同功酶的 IC_{50} 數值介於 40 nM 至 140 nM。
Droxinostat	Droxinostat (CMH，5809354)是一種 HDAC3、HDAC6 和 HDAC8 的選擇性抑制劑， IC_{50} 爲 1.46 μM 至 16.9 μM。
CUDC-01	CUDC-101 是一種有效的多重標靶的 HDAC、EGFR 和 HER2 抑制劑，IC_{50} 分別爲 4.4、2.4 以及 15.7 nM。
丙戊酸鈉鹽(Valproic acid sodium salt (丙戊酸鈉 (Sodium valproate))	Valproic acid sodium salt (Sodium valproate)是一種 HDAC 抑制劑，IC_{50} 爲 0.4 mM，且展現抗癌、抗發炎和神經保護的效果。
JNJ-26481585	JNJ-26481585 (Quisinostat)是一種口服、生物可利用，二代的，基於羥胺酸的 HDAC 抑制劑，對 HDAC1 之 IC_{50} 爲 0.11 nM。
LAQ824	LAQ824 (NVP-LAQ824)是一種新的 HDAC 抑制劑，IC_{50} 爲 32

(NVP-LAQ824, Dacinostat)	nM。
PCI-24781	HDAC 抑制劑，Ki 爲 7 μM。

【0413】 表 3. 單株抗體 B4 的 HIV 進入抑制活性 (Monogram 生物科學 PhenoSense™ 試驗)

B4 MAb: 非B進化支病毒			
進化支	分離株名稱	B4 Mab (μg/mL)	
		IC_{50}	IC_{90}
A	92/RW/008	0.026	0.082
A	92/RW/024	0.055	0.105
A	93/RW/029	0.019	0.063
A	93/UG/077	0.012	0.109
A	94/UG/103	0.021	0.082
A	CA1	0.011	0.062
A	CA2	0.018	0.055
A	CA3	0.019	0.052
BF	93/BR/019	0.013	0.046
C	10362	0.020	0.065
C	21068	0.011	0.053
C	10215-6	0.018	0.063
C	11657-3	0.025	0.067
C	20635-4	0.020	0.090
C	93/IN/101	0.016	0.047
C	CC1	0.016	0.052
C	CC10	0.015	0.053
C	CC2	0.021	0.065
C	CC3	0.012	0.049
C	CC4	0.013	0.044
C	CC5	0.019	0.062
C	CC6	0.018	0.061
C	CC7	0.013	0.050
C	CC8	0.019	0.053
C	CC9	0.020	0.071
C	MW/93/959	0.019	0.050
C	MW/93/960	0.010	0.056
D	92/UG/001	0.018	0.056
D	92/UG/005	0.019	0.073
D	92/UG/021	0.017	0.054
D	92/UG/024	0.040	0.085
D	92/UG/035	0.011	0.025
D	92/UG/038	0.014	0.039
D	92/UG/046	0.015	0.042
D	93/UG/053	0.020	0.049
D	93/UG/065	0.015	0.044
D	93/UG/067	0.016	0.080
D	93/UG/070	0.011	0.053

B4 MAb: 非B進化支病毒			
進化支	分離株名稱	B4 Mab (μg/mL)	
		IC_{50}	IC_{90}
D	93/UG/082	0.016	0.059
D	93/UG/086	0.015	0.052
D	94/UG/105	0.021	0.073
D	94/UG/114	0.015	0.054
D	94/UG/117	0.017	0.063
D	94/UG/118	0.020	0.066
D	CD1	0.016	0.047
E	93/TH/057	0.023	0.079
E	93/TH/305	0.021	0.069
E	CMU06	0.026	0.088
E?	QZ4589	0.036	0.170
EA	92/TH/005	0.012	0.054
EA	92/TH/006	0.022	0.073
EA	92/TH/007	0.013	0.061
EA	92/TH/009	0.021	0.052
EA	92/TH/019	0.022	0.063
EA	92/TH/020	0.015	0.051
EA	92/TH/021	0.017	0.052
EA	92/TH/022	0.012	0.035
EA	92/TH/024	0.010	0.048
EA	CMU02	0.011	0.041
F	93/BR/020	0.024	0.069
F	CF2	0.016	0.053
F	CF3	0.024	0.081
F	CF4	0.019	0.055
F	CF5	0.018	0.060
F	CF6	0.018	0.064
F	CF7	0.019	0.064
F	CF8	0.017	0.079
G	CG1	0.018	0.071
G	CG2	0.027	0.081
G	CG3	0.016	0.045
G	CG4	0.013	0.037
J	CJ1	0.018	0.056
J	CJ2	0.019	0.063
控制組	92HT594	0.021	0.062
控制組	JRCSF	0.034	0.077
控制組	JRFL	0.074	0.152
平均: IC_{50} = 0.018 μg/mL IC_{90} =0.062 μg/mL			

【0414】 表 4. 來自鼠源抗體 B4 重鏈和輕鏈序列的相對應 CDR 1、2、3 序列

描述	Seq ID No.	序列
鼠源抗體 B4 之重鏈的 CDR 1	1	DYVIH
鼠源抗體 B4 之重鏈的 CDR 2	2	EIYPGSGSAYSNAKFKD
鼠源抗體 B4 之重鏈的 CDR 3	3	RGNGTGFAY
鼠源抗體 B4 之輕鏈的 CDR 1	4	KAGQSVDYDGDSYMN
鼠源抗體 B4 之輕鏈的 CDR 2	5	VASNLES
鼠源抗體 B4 之輕鏈的 CDR 3	6	QQSYKDPLT

【0415】 表 5. 相較於親本 B4 之去免疫化 B4 (dB4C7) 的中和活性(MT-2 微斑試驗)

HIV-1 分離株	進化支	B4 抗體*	達到 50%抑制時的抗體濃度(μg/mL)	達到 90%抑制時的抗體濃度(μg/mL)
VL 135	B	mAb dB4C7	0.06	0.19
		鼠源 mAb B4	0.12	0.29
UG 029	A	mAb dB4C7	0.5	1.88
		鼠源 mAb B4	0.31	0.94
UG 046	D	mAb dB4C7	0.44	11
		鼠源 mAb B4	0.43	5.7
TH 036	E	mAb dB4C7	0.19	0.56
		鼠源 mAb B4	0.25	0.74
USNG/98/31	C	mAb dB4C7	0.08	0.22
		鼠源 mAb B4	0.19	0.36

【0416】 表 6. 相較於親本 B4 之去免疫化 B4 (dB4C7) 的中和活性(PBMC 試驗)

HIV-1 分離株	進化支	B4 抗體*	達到 50%抑制時的抗體濃度(μg/mL)	達到 90%抑制時的抗體濃度(μg/mL)
ZA/98/009	C	mAb dB4C7	0.04	0.08
		鼠源 mAb B4	0.03	0.13
CM 235	E	mAb dB4C7	0.04	0.07
		鼠源 mAb B4	0.02	0.1

【0417】

表7. 利用於病毒複製之中和作用的IC_{50} (μg/mL)測定藉由單株抗體B4或dB4於無細胞系統抑制HIV分離株進入CD4陽性PBMC細胞。納入針對HIV gp120之廣泛地中和性單株抗體2F5和2G12作為比較。

	IC_{50} (μg/mL)					
抗體	JRCSF (R5)	HXB2 (X4)	92TH594 (R5/X4)	原始分離株#5 (R5)	原始分離株#6 (R5)	原始分離株#7 (R5)
2F5	4	0.07	3	50	2	> 100
2G12	0.8	0.5	1.3	20	3	2
mAb dB4C7	0.04	0.4	0.05	0.05	0.05	0.03
mAb B4	0.04	0.4	0.05	0.05	0.05	0.03

【0418】 表 8. dB4C7 對 HPB-ALL 細胞之結合親和力 (EC_{50})

實驗組別 (編號)	以 MFI 表示之 EC_{50} (ng/mL)	以%MFI 表示之 EC_{50} (ng/mL)
第 1 組	42.1	42.4
第 2 組	43.7	45.7
第 3 組	40.7	40.7
平均值	42.2	42.9
標準差	1.5	2.5
%變異係數	3.6	5.9

【0419】 表 9. dB4C7 對 HPB-ALL 細胞之絕對結合親和力(Kd)和最大結合容量(Bmax)

實驗組別 (編號)	Kd (ng/mL)	Kd (10^{-11} M)	Bmax (ng/mL)	Bmax (10^{-11} M)	Bmax (10^{6} Ab/cell)
第 1 組	8.6	5.7	65.4	43.6	1.3
第 2 組	12.1	8.1	70.4	47.0	1.4
第 3 組	4.7	3.1	46.4	31.1	0.93
平均值	8.5	5.6	60.7	40.6	1.2
標準差	3.7	2.5	12.7	8.4	0.25
%變異係數	43.7	44.4	20.9	20.6	20.5

【0420】 表 10. 利用(1)山羊抗-huIgG-FITC 和(2) dB4C7-Alexa 結合至血液 CD4+ T 細胞所測得之 dB4C7 的結合活性(EC_{50})

受試者 (性別)	山羊抗-huIgG		dB4C7-Alexa	
	EC_{50} (ng/mL)	最大值(%)	EC_{50} (ng/mL)	最大值 (%)
M1	3.7	93.0	4.8	67.3
M2	4.2	68.9	4.6	62.6
M3	2.6	67.6	3.3	63.7
F1	4.7	91.3	4.3	65.6
F2	5.7	71.5	6.6	68.3
F3	3.7	74.6	4.3	61.0
平均值	4.1	77.8	4.7	64.7
標準差	1.1	11.4	1.1	2.8
%變異係數	25.5	14.6	23.4	4.3

【0421】 表 11. 單株抗體 B4 阻斷 HIV 的無細胞和細胞間傳播

病毒株	融合抑制效價(細胞間)		中和效價(無細胞)	
	50%	90%	50%	90%
UG266	1:1060	1:140	1:280	1:136
UG046	1:1479	1:245	1:628	1:234

【0422】 表 12. 利用 FACS 分析的順序性染色–陽性 PBMC 百分比

	單一標幟控制組		1st - Leu3a 結合 2nd - B4 暴露			1st - B4 結合 2nd - Leu3a 暴露		
	Leu3a+	B4+	Leu3a+ B4-	Leu3a- B4+	Leu3a+ B4+	Leu3a+ B4-	Leu3a- B4+	Leu3a+ B4+
X282	**25.5**	**26.1**	0.1	0.8	**24.5**	0.0	**21.9**	1.2
X301	**44.0**	**45.5**	0.3	0.6	**46.7**	0.0	**42.7**	3.0

【0423】 表 13. 於 PBMC 培養物的 TNF-α 水平和 HIV-1 病毒量

刺激物	TNF-α 濃度(pg/ml)			病毒量(copies/ml)			病毒量%變化 (以培養液標準化)			細胞數量(x10^6) /存活率 (%)		
	D0	D2	D7	D0	D2	D7	D0	D2	D7	D0	D2	D7
只有培養液 (控制組)	ND	ND	ND	82	37731	24905	100	100	100	11.86 / 92.4	2.13 / 94.4	0.84 / 98.4
mAb dB4	ND	546.7	349.5	99	57162	54797	121	151	220	11.98 / 89.2	2.00 / 91.7	1.02 / 77.1
PMA+PHA	ND	2593.1	1030	344	20738	19465	420	55	78	11.71 / 93.4	1.32 / 85.2	5.20 / 92.0

ND: 低於檢測極限

【0424】 表 14A. 試驗 A：於狒狒的單次投予臨床前試驗

組別	劑量 (100 mL)	給藥間隔	動物數量	
			雄性	雌性
1A (控制組)	無(生理食鹽水)	單一劑量	1	1
2A (低劑量)	5 mg/kg BW	單一劑量	1	1
3A (高劑量)	25 mg/kg BW	單一劑量	1	1

【0425】 表 14B. 試驗 B：於狒狒的多次投予臨床前試驗

	組別		劑量 [1, 2] (100 mL)	動物數量	
				雄性	雌性
第 1 部份 只有治療期	1B	控制組	生理食鹽水	1	1
	2B	UB-421 –低劑量	5 mg/kg	2	2
	3B	UB-421 –高劑量	25 mg/kg	2	2
第 2 部份 治療期和恢復期	1B	控制組	生理食鹽水	1	1
	2B	UB-421 –低劑量	5 mg/kg	2	2
	3B	UB-421 –高劑量	25 mg/kg	2	2

[1] 爲期 8 週每週投予

[2] 劑量：mg (UB-421) / kg (體重)

【0426】 表 15. 於狒狒的血液和活檢結果

項目	結果
臨床血液學	正常
臨床化學	正常
凝血試驗	正常
UB-421 分析：血清和 CD4+細胞	劑量依賴性動力學
對 UB-421 的狒狒抗體反應	抗 UB-421 抗體低於檢測極限
具有結合至 CD4+細胞之 UB-421 的樣品於血清可測得 UB-421 的最小濃度	~ 10 μg/mL
淋巴細胞和單核球亞型	無 CD4+細胞耗竭被注意到
UB-421 對 HBV 免疫的影響	於以低劑量 UB-421 治療之 8 隻動物中的 6 隻，以及以高劑量 UB-421 治療之 8 隻動物中的 3 隻，可觀察到對 HBV 的低反應性
細胞激素分析(IL-2、IL-6、IFN-γ、TNF-α)	於有絲分裂促進劑刺激的 PBMC 培養物可觀察到於細胞激素生成上沒有變化
淋巴結(T 細胞和單核球)的流式細胞儀分析	劑量依賴性動力學

【0427】 表 16. 於狒狒的觀察和屍體剖檢結果

項目	結果
眼睛觀察	正常-高劑量 UB-421(第 3 組)以 8 次每週投予後無改變被注意到
每次輸注期間的心電圖觀察	心電圖紀錄之改變被視爲正常逐日的差異且與 UB-421 無關
年齡範圍	7 至 18 歲
體重	雌性：17 至 23 kgs 雄性：24 至 35 kgs
器官重量	在正常範圍內
肉眼和顯微鏡檢查	有些動物具有與 UB-421 治療無關之與年齡有關的，異常的特徵(骨關節炎、澱粉樣變性及/或內分泌囊腫)
組織病理學(H&E 染色) 骨髓樣品	沒有明顯的病變–每隻動物檢查超過 50 個器官和組織樣品

【0428】 表 17. UB-421 的臨床前概述：於狒狒的 IND-Enabling 毒理試驗

■ 在以低劑量(5 mg/kg)或高劑量(25 mg/kg) UB-421 經 8 次每週輸注後，於體重或體溫、食物消耗、血液學、臨床化學、心電圖、眼睛觀察、器官重量或組織病理學未觀察到異常。
■ 在 UB-421 輸注後於 CD4+和 CD8+ T 細胞的相對數量沒有顯著變化；於來自控制組和接受 UB-421 治療動物的幾個血液樣品中注意到暫時的(輕微地上升的)單核球增多症。
■ 狒狒 CD4+ T 細胞之 UB-421 "覆蓋"的持續時間(利用流式細胞儀)： - 5 mg/kg 體重(低劑量)～ 介於 3 至 7+天。 - 25 mg/kg 體重(高劑量)～ 大於 7 至 21+天。
■ 在多次輸注後無狒狒產生抗 UB-421 的抗體(BAHA)。
■ 細胞激素(IL2、IL6、IFN-γ、TNF-α)的表現未受到 UB-421 治療的影響且無升高或顯著地抑制。
■ 相較於控制組動物對相同有絲分裂促進劑之反應，於以低或高劑量 UB-421 治療的動物中未觀察到對有絲分裂促進劑(Con-A、PHA 或 PWM)之淋巴細胞增生反應的抑制。
■ 雖然以 UB-421 完全地覆蓋 8 週，以高劑量 UB-421 治療的一些狒狒(第 3B 組)在以 Merck 的 B 型肝炎疫苗(Recombivax HB®)免疫接種二次後產生抗-HBsAg 抗體。
■ 發現在所有檢測的狒狒中(n =16)，以低和高劑量 UB-421 多次輸注爲安全和耐受性良好的。

【0429】 表 18. 利用生物素化的 mAb dB4C7 評估組織的交叉反應性

測試成年人類組織；除了眼睛(n=1)以外，其餘評估三個或更多個捐贈者	腎上腺、骨髓、乳房(乳腺)、腦(大腦、小腦)、子宮頸、食道、眼、心臟(心肌)、腸(小腸、大腸、結腸)、腎、**肝**[5]、肺(間皮)、**單核細胞(組織中的淋巴細胞和巨噬細胞)**[4]、卵巢、胰臟、周邊神經、腦下垂體、胎盤、前列腺、唾腺、皮膚、脊髓、**脾臟**[3]、胃、骨骼肌、睾丸、**胸腺**[1]、甲狀腺、**扁桃體(和淋巴節)**[1,2]、膀胱(輸尿管)、子宮(子宮內膜和子宮肌層)、血管內皮。

[1] 觀察到強陽性表面膜染色

[2] 與未標幟的 mAb dB4C7 預培養可阻斷染色

[3] 觀察到弱陽性

[4] 觀察到偶而陽性的染色

[5] 局部微弱的庫氏細胞染色

【0430】 表 19. 關於在第 I 期試驗單一劑量 UB-421 的 PK 參數

參數	UB-421 (單一劑量，靜脈注射)[1]	
給藥後所觀察到的最高血清藥物濃度 (C_{MAX}) (μg/ml)	1 mg/Kg	28.6
	5 mg/Kg	81.7
	10 mg/Kg	164.5
	25 mg/Kg	462.5
從時間零至無限大之血清藥物濃度-時間曲線下的面積 ($AUC_{0-\infty}$) (μg·小時/ml)	1 mg/Kg	201
	5 mg/Kg	4739
	10 mg/Kg	12785
	25 mg/Kg	51367
排除(末端)半衰期($T_{1/2}$) (小時)	1 mg/Kg	14.4
	5 mg/Kg	25.2
	10 mg/Kg	37.0
	25 mg/Kg	85.4
平均滯留時間 (MRT) (小時)	1 mg/Kg	21.6
	5 mg/Kg	45.3
	10 mg/Kg	62.6
	25 mg/Kg	97.4

[1] 結果爲來自 3 個受試者的平均值

【0431】 表 20. 在第 IIa 期試驗於多次投予 UB-421 後的病毒量下降

終點指標	第 1 劑量組 (每週 10 mg/kg)		第 2 劑量組 (每兩週 25 mg/kg)	
	ITT N=14	PP N=7	ITT N=15	PP N=11
平均(標準差)最大病毒量下降 Log_{10} copies/ml	-2.27 (0.60)	-2.73 (0.34)	2.45 (0.46)	-2.47 (0.45)
最大個別病毒量下降 Log_{10} copies/ml		-3.23		-3.28
n (%) > 1 Log_{10} 病毒量下降	14 (100%)	7 (100%)	15 (100%)	11 (100%)
n (%) < 200 copies/ml	8 (57.1%)	5 (71.4%)	10 (66.7%)	7 (63.6%)
n (%) < 50 copies/ml	3 (21.4%)	3 (42.9%)	3 (20.0%)	2 (18.2%)
n (%) < 20 copies/ml		3 (42.9%)		2 (18.2%)

ITT: 意圖治療群體(Intent-to-Treat Population)
PP:依計劃書執行臨床試驗的群體(Per-Protocol Population)
VL: 病毒量(Viral Load)

【0432】 表 21A. 第 IIa 期臨床療效數據顯示病毒量減少至低於檢測極限：患者 1-1-01 (第 1 劑量組：每週 10 mg/kg)

訪視	病毒量 (copies/mL)	抗-UB-421 (μg/mL)
1	9,570	NQ
2	392	
3	185	NQ
4	27	
5	**<20**	NQ
6	**<20**	
7	**<20**	NQ
8	**<20**	
9	**<20**	
10	**<20**	NQ
11	1,730	NQ

NQ:無法定量
斜線:未評估

【0433】 表 21B. 第 IIa 期臨床療效數據顯示病毒量減少至低於檢測極限：患者 1-1-02 (第 1 劑量組：每週 10 mg/kg)

訪視	病毒量 (copies/mL)	抗-UB-421 (μg/mL)
1	34,200	NQ
2	817	
3	143	NQ
4	187	
5	76	NQ
6	63	
7	27	NQ
8	69	
9	**<20**	
10	30	NQ
11	98,800	NQ

NQ:無法定量
斜線:未評估

【0434】 表 21C. 第 IIa 期臨床療效數據顯示病毒量減少至低於檢測極限：患者 1-2-03 (第 2 劑量組：每兩週 25 mg/kg)

訪視	病毒量 (copies/mL)	抗-UB-421 (μg/mL)
1	2,990	NQ
2	393	
3	31	NQ
4	71	
5	60	NQ
6	20	
7	**<20**	NQ
8	**<20**	
9	**<20**	
10	**<20**	NQ
11	4,010	NQ

NQ:無法定量
斜線:未評估

【0435】 表 22A. 第 1 劑量組 UB-421 治療之患者的平均 CD4 T 細胞數量(每週 10 mg/kg)

訪視	T 1-1-01 (PP)	T 1-1-02 (PP)	K 2-1-03 (PP)	K 2-1-04 (PP)	K 2-1-05 (PP)	平均 CD4 細胞數量
1	509	867	526	512	466	**561**
2	1101	655	646	811	455	**703**
3	890	429	619	566	552	**594**
4	890	534	585	735	649	**668**
5	754	304	658	531	592	**543**
6	821	734	617	606	512	**649**
7	877	559	653	600	563	**641**
8	804	650	765	741	685	**727**
9	756	810	657	632	539	**672**
10	918	511	402	377	659	**542**
11	461	622	725	667	381	**555**
12	507	637	606	589	480	**561**

【0436】 表 22B. 第 2 劑量組 UB-421 治療之患者的平均 CD4 T 細胞數量(每兩週 25mg/kg)

訪視	T 1-2-01 (PP)	T 1-2-02 (PP)	T 1-2-03 (PP)	T 1-2-04 (PP)	K 2-2-01 (PP)	K 2-2-02 (PP)	T 1-2-06 (PP)	平均 CD4 細胞數量
1	310	466	756	430	806	618	425	518
2	458	548	766	600	811	672	558	620
3	533	581	569	610	701	662	445	580
4	459	591	699	409	902	648	629	602
5	392	608	670	506	665	776	539	581
6	396	462	640	532	999	646	128	471
7	365	388	552	598	756	653	548	536
8	397	606	451	557	666	697	662	566
9	415	466	481	653	690	619	483	535
10	287	470	584	281	784	550	493	465
11	379	404	521	375	771	470	548	481
12	345	367	729	393	705	534	511	492

【0437】 表 23. 於功能治癒之 UB-421 治療的設計

UB-421 勝過 HAART 藥物的潛在優勢：

- UB-421 阻斷 HIV-1 病毒的細胞間傳播
- UB-421 交聯 CD4 的類 CDR－2 環並活化細胞，且因此從潛伏誘導和釋放 HIV-1

目標：

- 藉由阻斷無細胞和細胞間傳播，包含 HAART，以提供有效的保護
- 開發功能性治癒策略供 HIV 感染的患者，此患者爲先前未接受治療或目前處在穩定的抗逆轉錄病毒療法之下。

目的：

- 用以評估於減少潛伏病毒庫的大小和治癒 HIV-1 感染患者方面之協同連續性 HEART 的 UB-421 循環治療的效力

試驗種類：

干預性

試驗設計：

單一組別評估；開放性

分配干預：

- 在 4 個月的期間於第 1、15、29、43、57、71、85 和 99 天利用靜脈輸注每兩週投予 25 mg/kg UB-421 之 8 個劑量的二個循環，之後爲 2 個月之單獨背景 HAART，以提供給 HIV-1 感染的患者。
- 在一年的試驗期結束後，利用以下條件決定並進行額外的觀察試驗：
  - 在一年的試驗中完成 UB-421 合併使用 HAART 的 2 個循環
  - 病毒庫的顯著減少
  - CD4+ T 細胞數量> 500/mm^3
- 在額外的觀察試驗中，中斷背景 HAART 以評估：
  - 病毒血症(> 1,000 copies/ml)的時間
  - 符合標準以重啓 HAART 的時間

【序列表】

<110> 美國聯合生物醫學公司(United Biomedical, Inc.)

王長怡

<120> 藉由針對 CD4 之單株抗體調停競爭型 HIV 進入抑制之 HIV 感染的治療和功能性治癒

<130> 1004263.213WO (2034WO)

<150> US 62/051,200

<151> 2014-09-16

<150> PCT/US2014/065048

<151> 2014-11-11

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 鼠源抗體

<220>

<221> 功能區塊

<222> (1)..(5)

<223> 鼠源抗體 B4 之重鏈的 CDR1

<400> 1

Asp Tyr Val Ile His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 鼠源抗體

<220>
<221> 功能區塊
<222> (1)..(17)
<223> 鼠源抗體 B4 之重鏈的 CDR2

<400> 2

Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 3
<211> 9
<212> PRT

<213> 鼠源抗體

<220>

<221> 功能區塊

<222> (1)..(9)

<223> 鼠源抗體 B4 之重鏈的 CDR3

<400> 3

Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 鼠源抗體

<220>

<221> 功能區塊

<222> (1)..(15)

<223> 鼠源抗體 B4 之輕鏈的 CDR1

<400> 4

Lys Ala Gly Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 鼠源抗體

<220>

<221> 功能區塊

<222> (1)..(7)

<223> 鼠源抗體 B4 之輕鏈的 CDR2

<400> 5

Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 鼠源抗體

<220>

<221> 功能區塊

<222> (1)..(9)

<223> 鼠源抗體 B4 之輕鏈的 CDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 448
<212> PRT
<213> 鼠源抗體

<220>
<221> 功能區塊
<222> (1)..(448)
<223> 具有與衍生自來自親本鼠源 B4 抗體重鏈序列相對應之 CDRs1、2、3 的相似 CDRs1、2、3 的去免疫化人類抗體 B4 [UB421]的重鏈

<400> 7

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

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

Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 8

<211> 218

<212> PRT

<213> 鼠源抗體

<220>

<221> 功能區塊

<222> (1)..(218)

<223> 具有與衍生自來自親本鼠源 B4 抗體輕鏈序列相對應之 CDRs1、2、3 的相似 CDRs1、2、3 的去免疫化人類抗體 B4 [UB421]的輕鏈

<400> 8

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
85 90 95

Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 9
<211> 448
<212> PRT
<213> 鼠源抗體

<220>
<221> 功能區塊
<222> (1)..(448)

<223> 具有 M253Y/S255T/T257E 取代之去免疫化人類抗體 B4 [UB421]的重鏈

<400> 9

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

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

Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg
245 250 255

Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 10
<211> 448
<212> PRT

<213> 擬人化抗體

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (253)..(253)

<223> M 或 Y

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (255)..(255)

<223> S 或 T

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (257)..(257)

<223> T 或 E

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (298)..(298)

<223> N 或 H

<400> 10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg
245 250 255

Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Xaa Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> 鼠源抗體

<400> 11

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

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

Val Ile His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Ala Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 330

<212> PRT

<213> 人類抗體

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (135)..(135)

<223> M 或 Y

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (137)..(137)

<223> S 或 T

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (139)..(139)

<223> T 或 E

<220>

<221> 尚未歸類的特徵

<222> (180)..(180)

<223> N 或 H

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 111
<212> PRT
<213> 鼠源抗體

<400> 13

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asn Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
85 90 95

Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 人類抗體

<400> 14

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

第104130548號申請專利範圍修正本 修正日期：106年5月17日

申請專利範圍

1. 一種擬人化單株抗體，包含：

包含選自由SEQ ID NO: 7、9以及10所組成之群組之一胺基酸序列的一重鏈；以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

2. 如申請專利範圍第1項所述之擬人化單株抗體，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO: 9之一胺基酸序列的一重鏈；以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

3. 如申請專利範圍第1項所述之擬人化單株抗體，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO: 10之一胺基酸序列的一重鏈；以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

4. 如申請專利範圍第1項所述之擬人化單株抗體，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO: 7之一胺基酸序列的一重鏈，以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

5. 一種組成物之用途，其係用於製備功能性治癒HIV患者的藥物，包含(a)一藥理學上有效劑量之如申請專利範圍第1項所述之擬人化單株抗體；以及(b)一高效抗反轉錄病毒療法(HAART)的抗病毒藥物。

6. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該擬人化單株抗體特異性地結合至CD4。

7. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該擬人化單株抗體特異性地結合至位於CD4的功能區塊1。

8. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該擬人化單株抗體的Fv區域包含一N-醣化點。

9. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該擬人化單株抗體重鏈變異區的CDR包含一醣類結合殘基Asn。

10. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO: 7之一胺基酸序列的一重鏈；以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

11. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO: 10之一胺基酸序列的一重鏈；以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

12. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO: 9之一胺基酸序列的一重鏈，以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

13. 一種醫藥組成物，包含如申請專利範圍第1項所述的擬人化單株抗體以及一藥學上可接受的載體。

14. 一種包含如申請專利範圍第1項所述之擬人化單株抗體的醫藥組成物，其中該擬人化單株抗體溶於含有20mM甘氨酸及0.05%(v/v)聚山梨酯20的磷酸鹽緩衝液中。

15. 如申請專利範圍第14項所述之醫藥組成物，其中該磷

酸鹽緩衝液可進一步包含10mM組氨酸。

16. 如申請專利範圍第14項所述之醫藥組成物，其中該擬人化單株抗體濃度介於1.0 mg/mL至200.0 mg/mL。

17. 一種使用如申請專利範圍第 1 項所述之擬人化單株抗體於製造活化靜默 $CD4^+$T 細胞之藥物的用途。

18. 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中該擬人化單株抗體特異性地結合至CD4。

19. 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中該擬人化單株抗體特異性地結合至位於CD4的功能區塊1。

20. 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中該擬人化單株抗體的Fv區域包含一N-醣化點。

21. 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中該擬人化單株抗體重鏈變異區的CDR包括一醣類結合殘基Asn。

22. 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO:10之一胺基酸序列的一重鏈，以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

23. 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中該擬人化單株抗體包含：

包含SEQ ID NO: 7之一胺基酸序列的一重鏈，以及

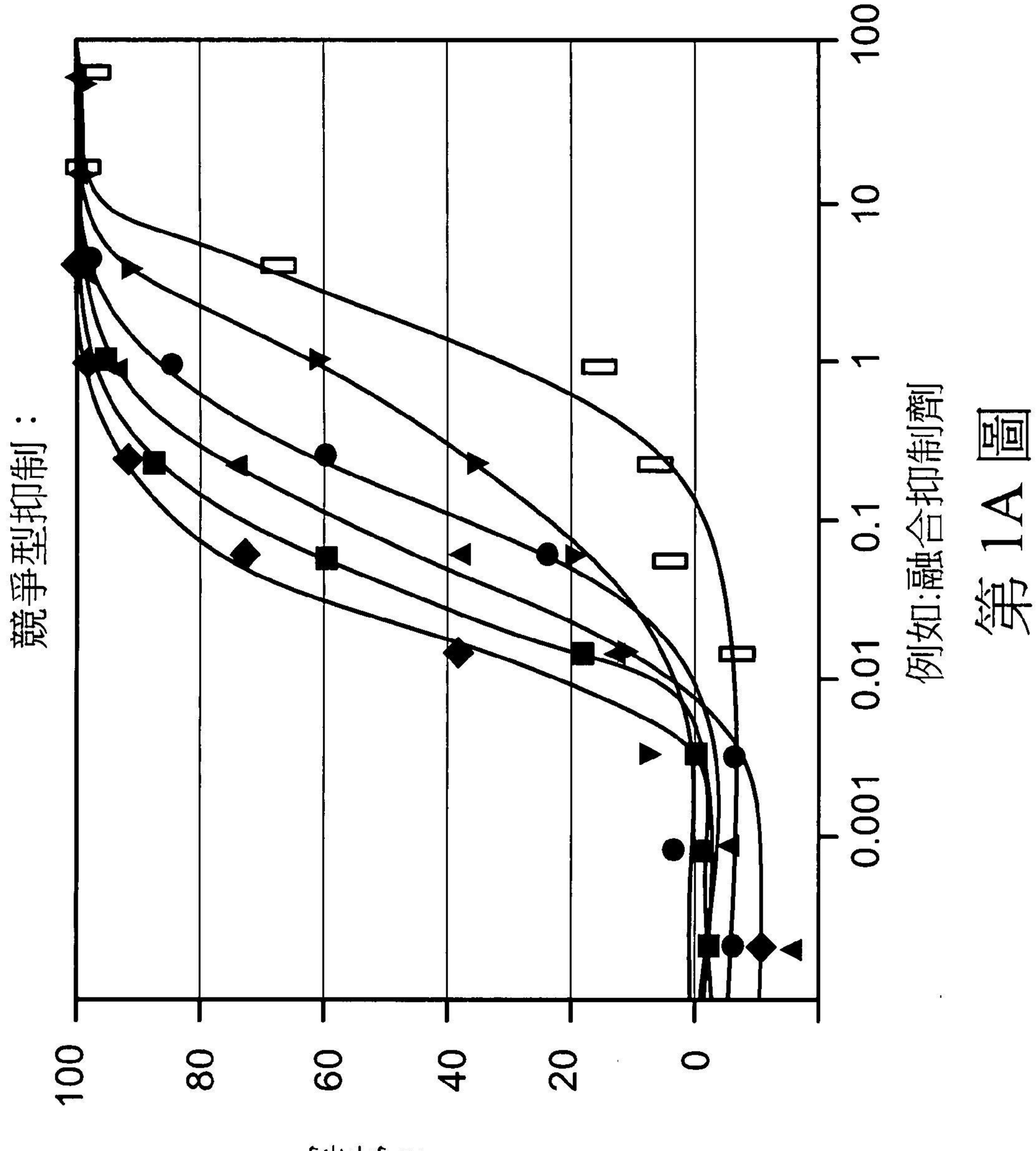
包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

24. 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中該擬人化單株抗體包含：

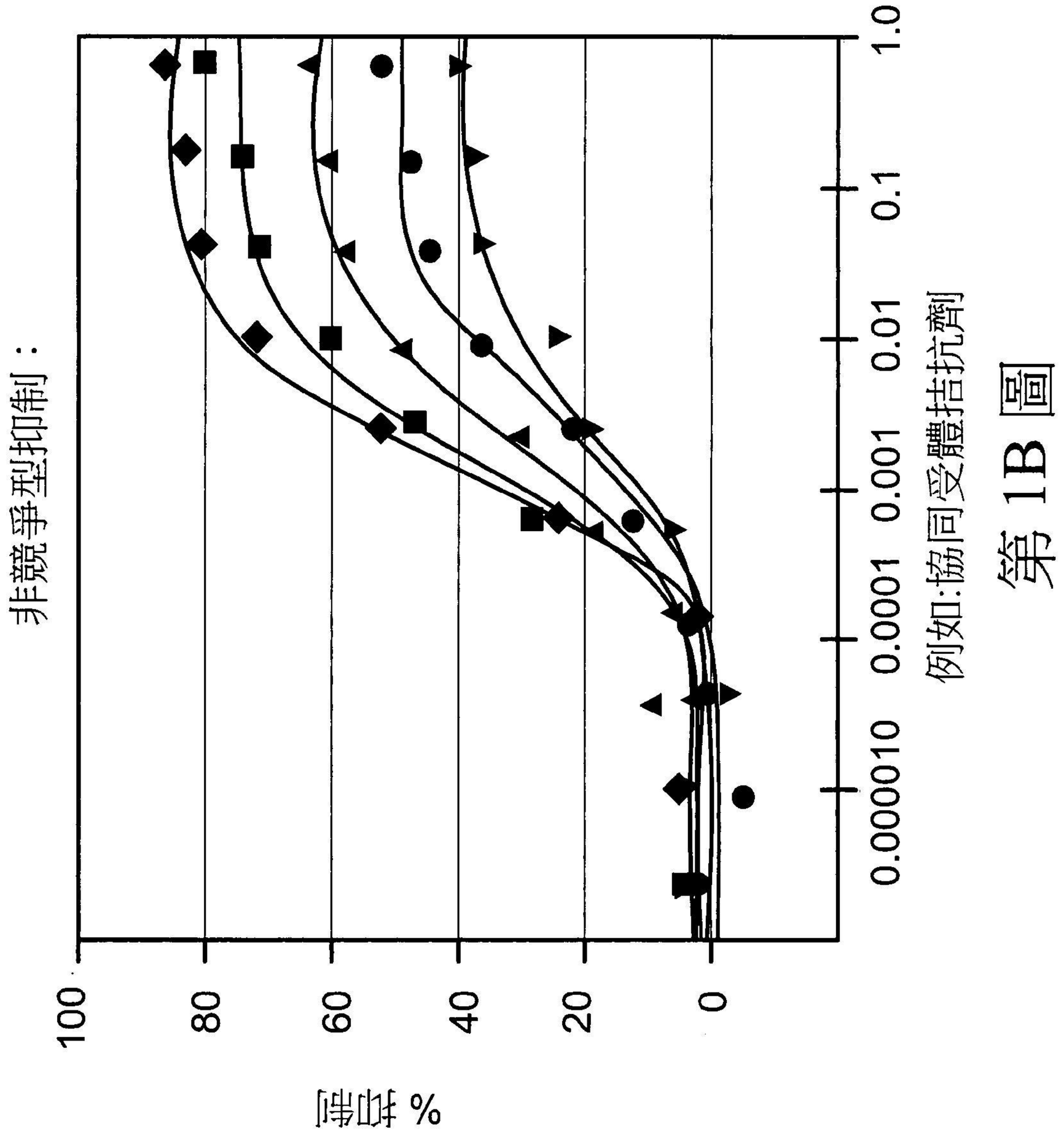
包含SEQ ID NO: 9之一胺基酸序列的一重鏈，以及

包含SEQ ID NO: 8之一胺基酸序列的一輕鏈。

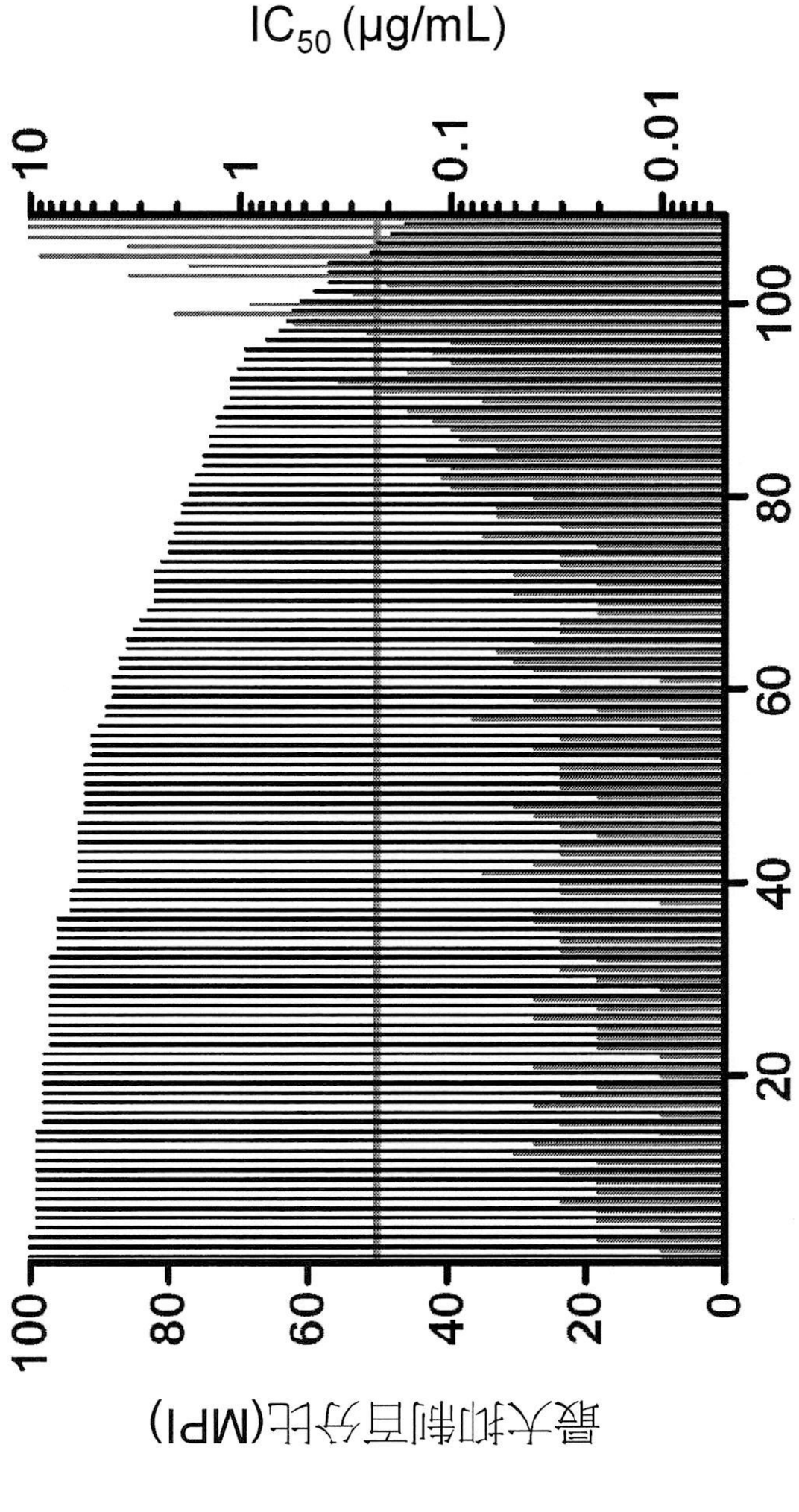
圖式



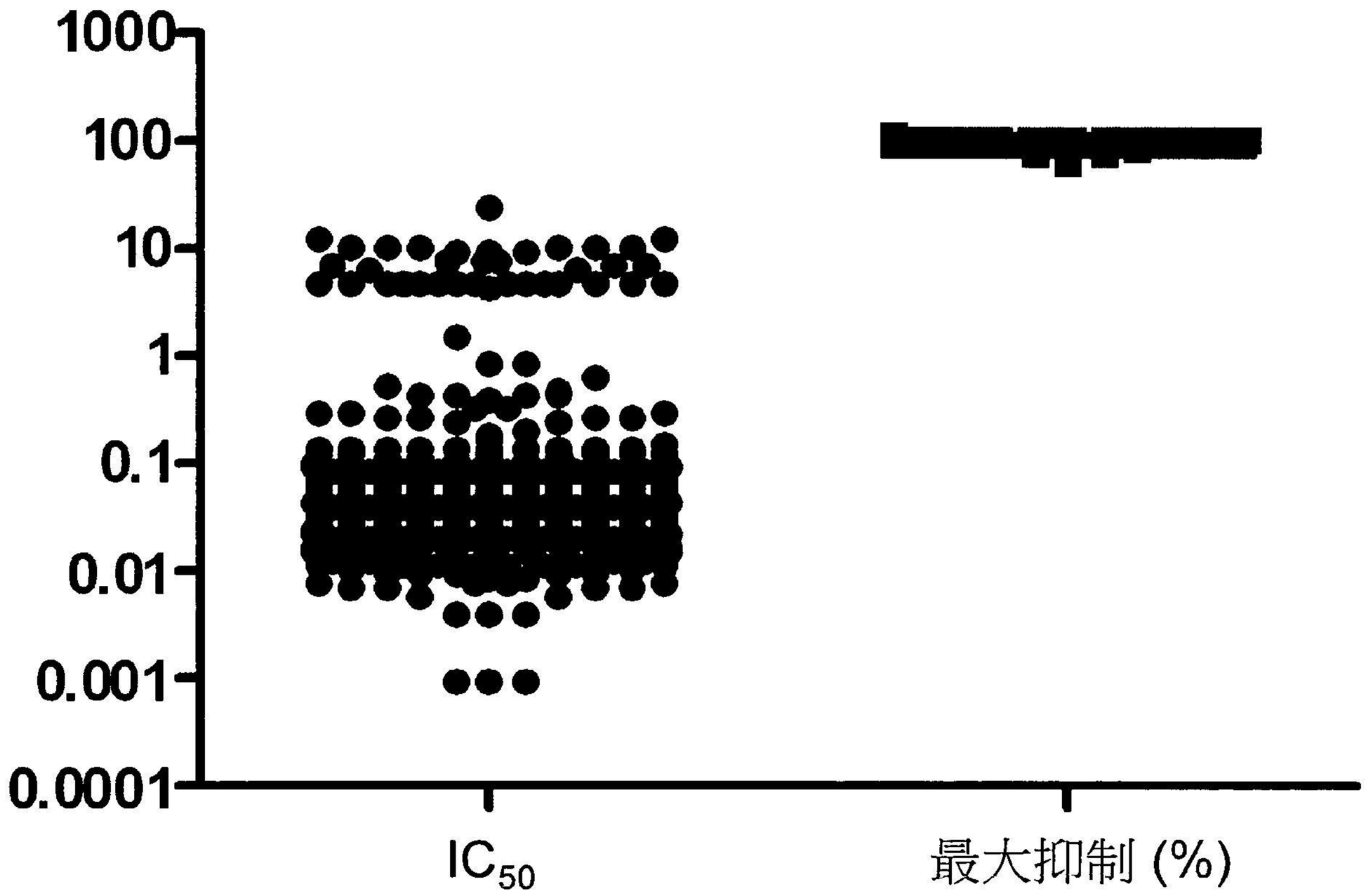
第 1A 圖


非競爭型抑制：
100
80
60
40
20
0
% 抑制
0.000010
0.0001
0.001
0.01
0.1
1.0
例如:協同受體拮抗劑

第 1B 圖



第 2 圖



第 3 圖

MAb dB4C7/UB-421的完整重鏈Fv 區域(SEQ ID NO: 7)：



第 4 圖

MAb dB4C7/UB-421的完整輕鏈Fv 區域(SEQ ID NO: 8)：

DIVLTQSPASLAVSLGQRATITCKAGQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYVASNLESGIPARFSGSGS

CDR1　　CDR2

GTDFTLNIHPVEENDAATYYCQQSYKDPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

CDR3

FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSF

NRCEC

變異區(SEQ ID NO: 13)

恆定區(SEQ ID NO: 14)

第 5 圖

經改進擬人化抗體之完整重鏈Fv 區域(SEQ ID NO: 9)：



: 變異區(SEQ ID NO: 11)

: 恆定區(SEQ ID NO: 12)

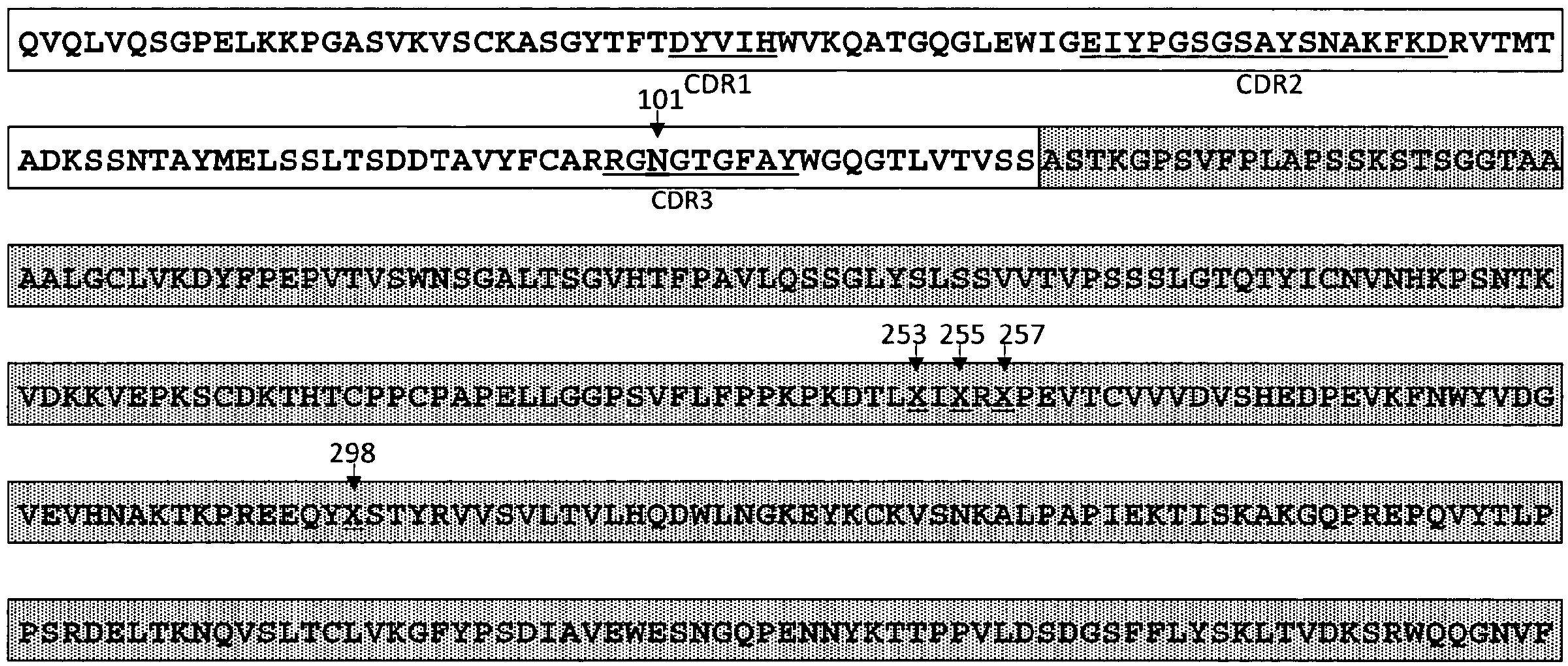
N101：N-醣化點

M253Y/S255T/T257E：基於SEQ ID NO:7 的突變

N298H：避免ADCC或CDC

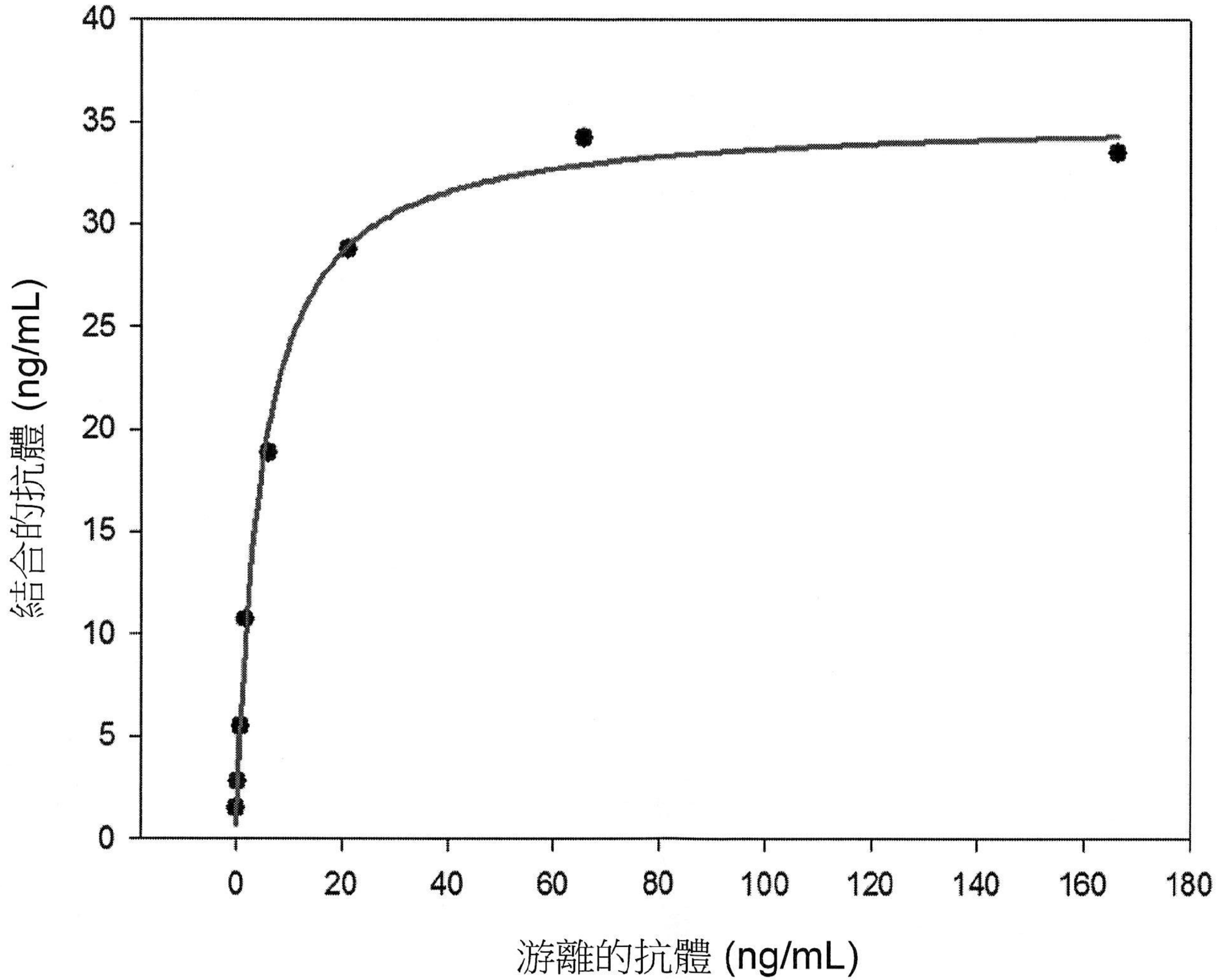
第 6 圖

Mab dB4之完整重鏈Fv 區域(SEQ ID NO: 10)：

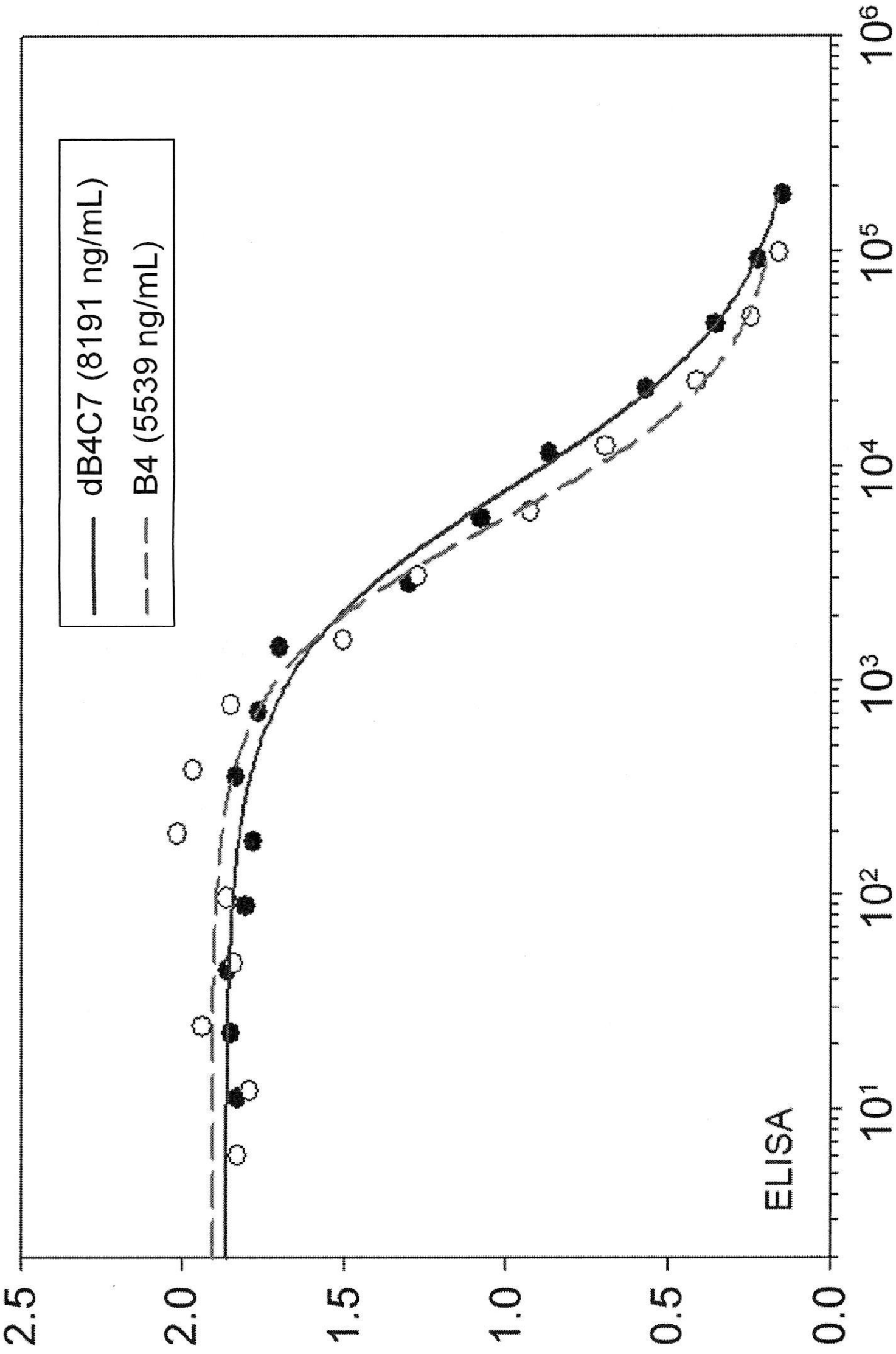


	：變異區(SEQ ID NO: 11)
	：恆定區(SEQ ID NO: 12)
N101：N-醣化點	
X253：M (SEQ ID NO:7)或Y (SEQ ID NO:9)	
X255：S (SEQ ID NO:7)或T (SEQ ID NO:9)	
X257：T (SEQ ID NO:7)或E (SEQ ID NO:9)	
X298：N (天然IgG_1)或H (SEQ ID NOs:7和9)	
N298H：避免ADCC或CDC	

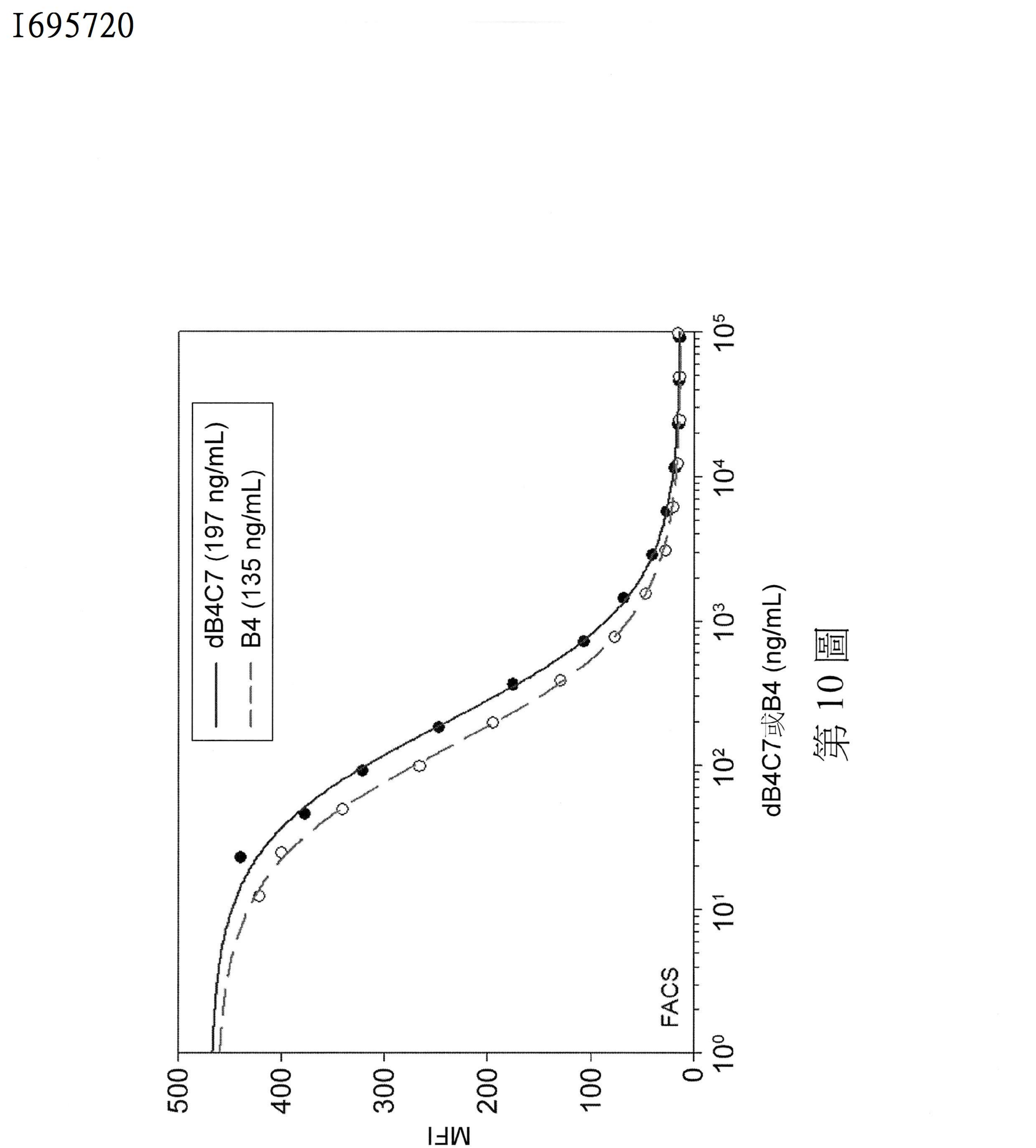
第 7 圖


40
35
30
25
20
15
10
5
0
結合的抗體 (ng/mL)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
游離的抗體 (ng/mL)

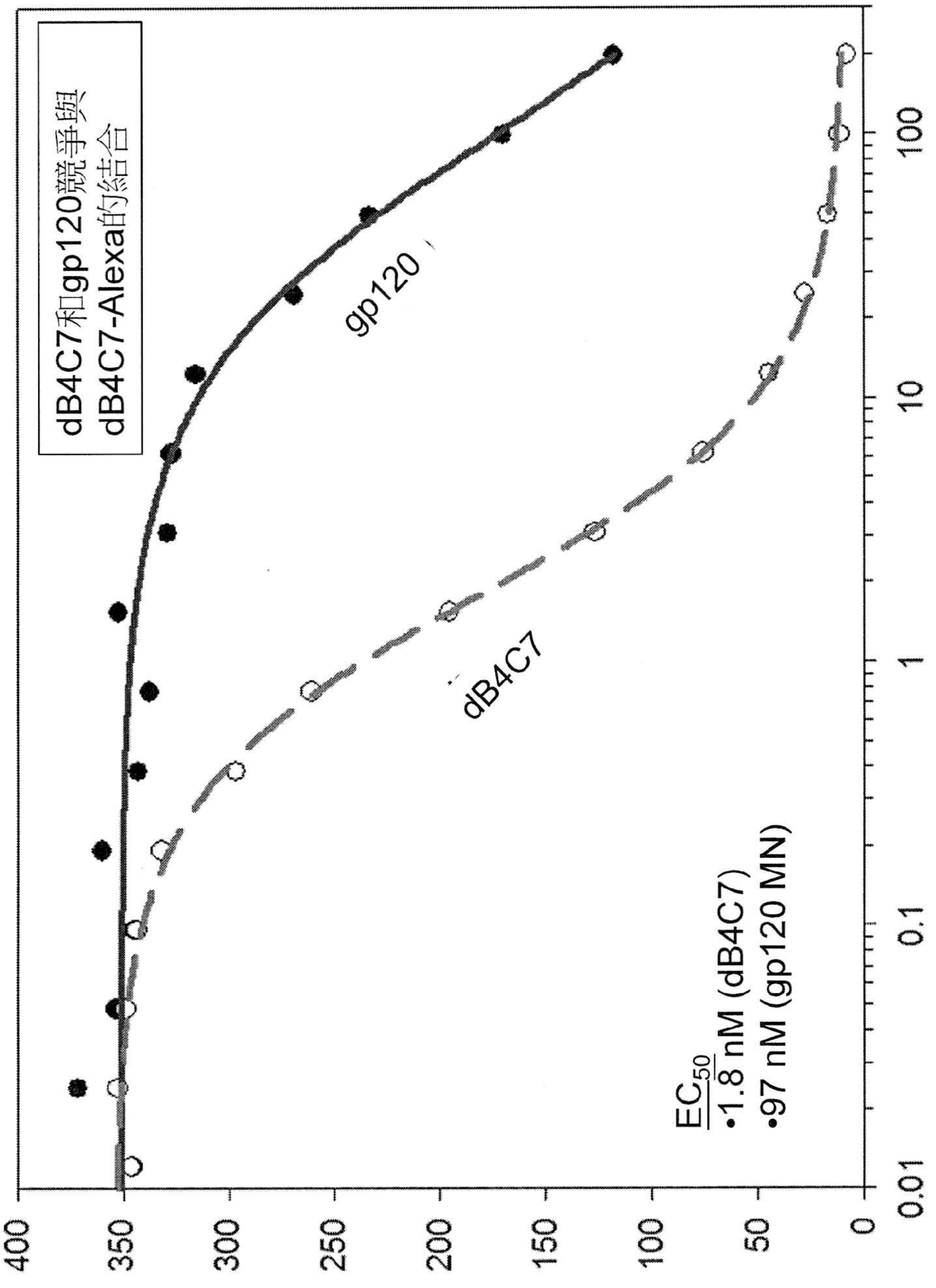
第 8 圖


dB4C7 (8191 ng/mL)
B4 (5539 ng/mL)
ELISA
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
10⁶
dB4C7或B4 (ng/mL)

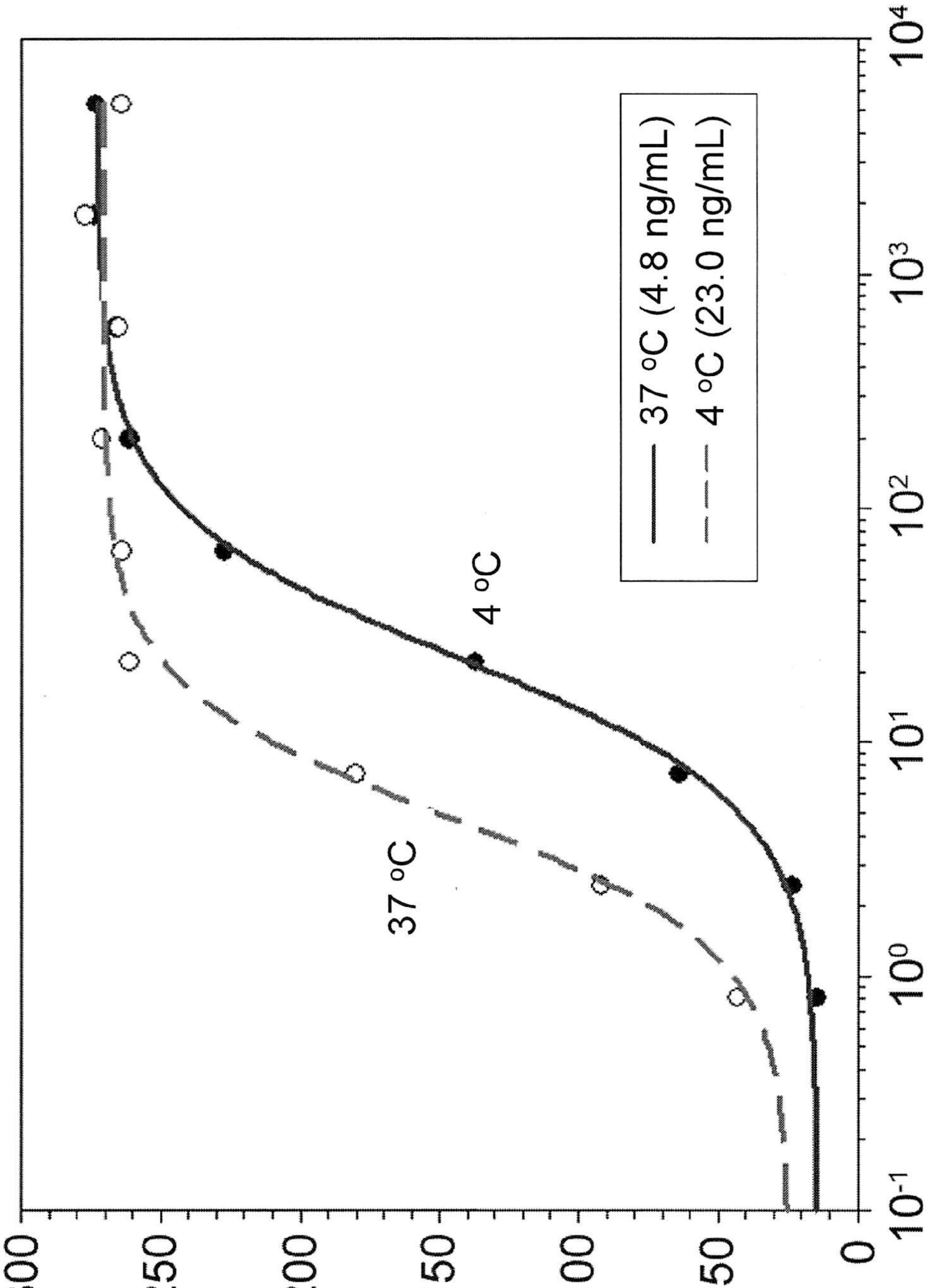
第 9 圖


dB4C7 (197 ng/mL)
B4 (135 ng/mL)
FACS
MFI
0
100
200
300
400
500
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
dB4C7或B4 (ng/mL)

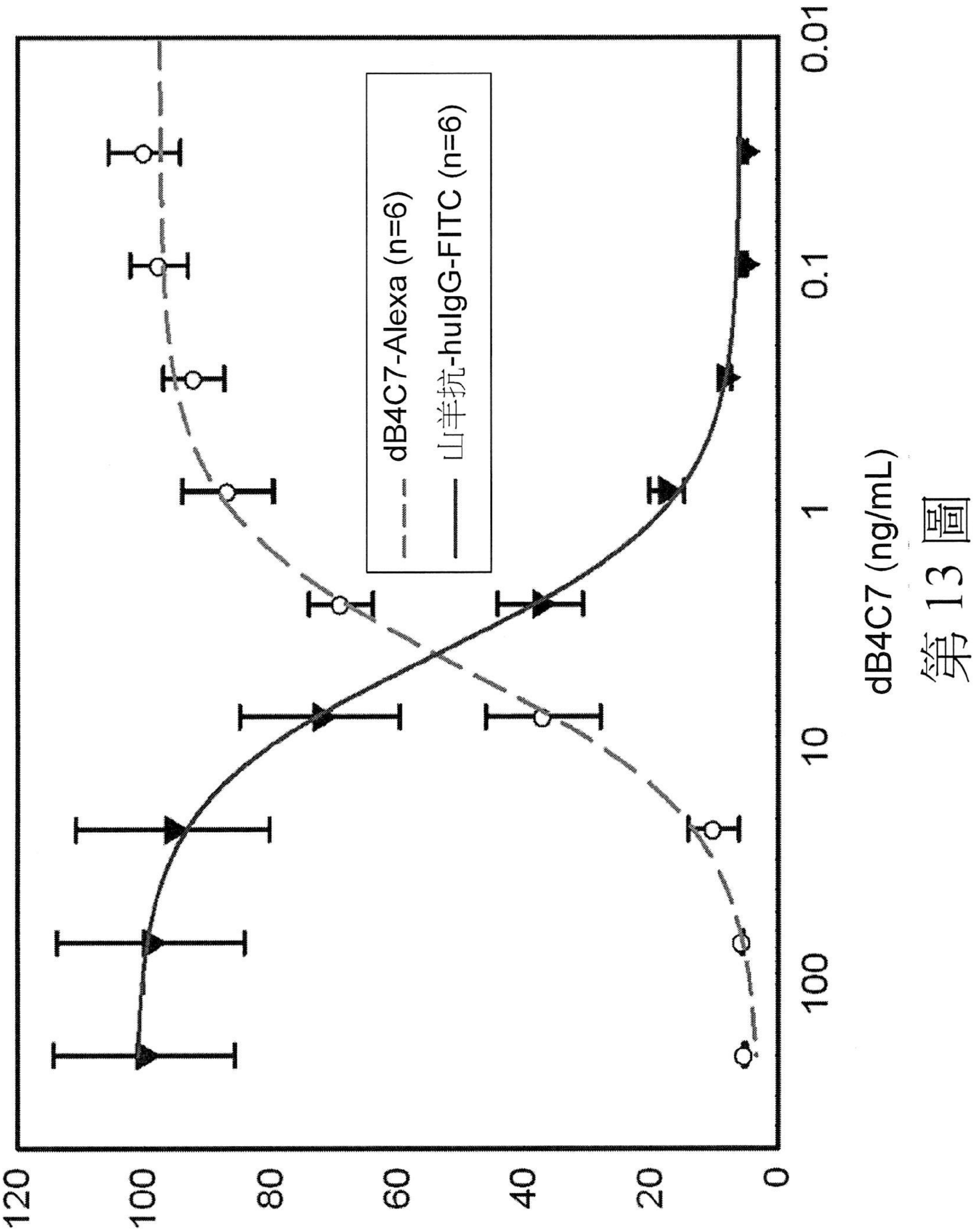
第 10 圖


dB4C7和gp120競爭與
dB4C7-Alexa的結合
gp120
dB4C7
EC50
•1.8 nM (dB4C7)
•97 nM (gp120 MN)
MFI
濃度(nM)
0
0,01
0,1
1
10
100
400
350
300
250
200
150
100
50
0

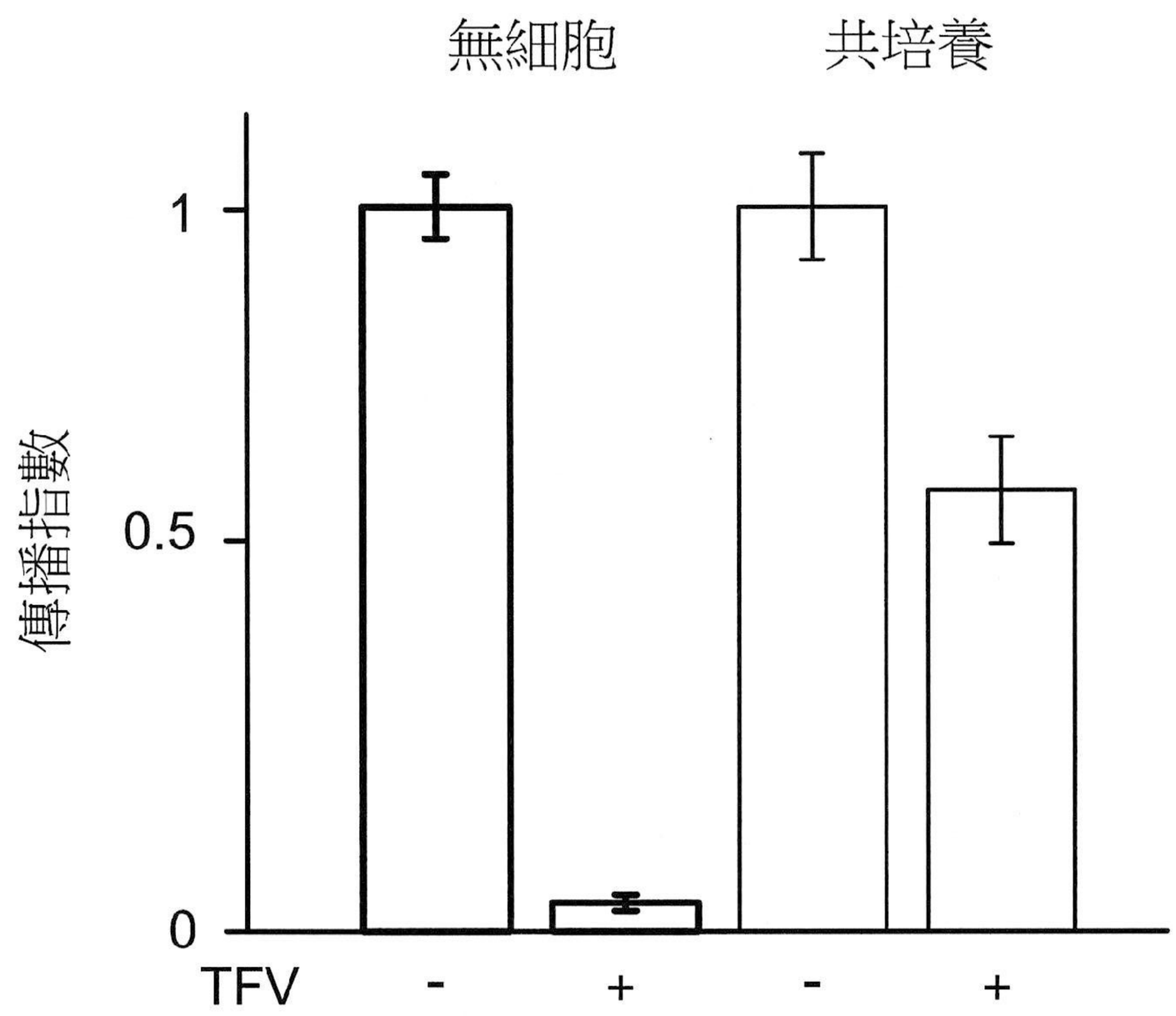
第 11 圖


MFI
300
250
200
150
100
50
0
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
10^{4}
dB4C7 (ng/mL)
37 °C
4 °C
37 °C (4.8 ng/mL)
4 °C (23.0 ng/mL)

第 12 圖

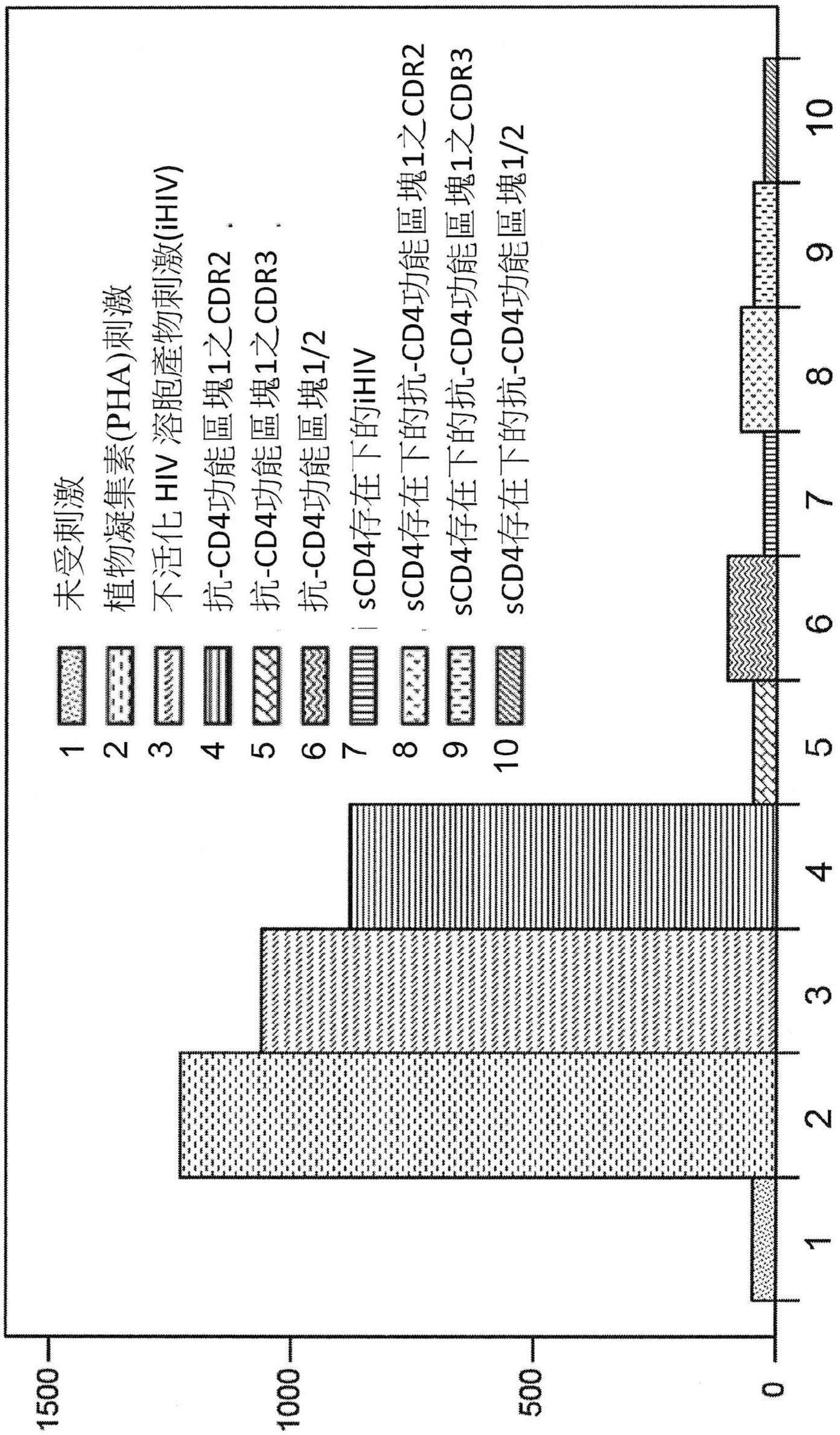

dB4C7-Alexa (n=6)
山羊抗-hulgG-FITC (n=6)
%MFI (標準化)
120
100
80
60
40
20
0
dB4C7 (ng/mL)
0.01
0.1
1
10
100

第 13 圖

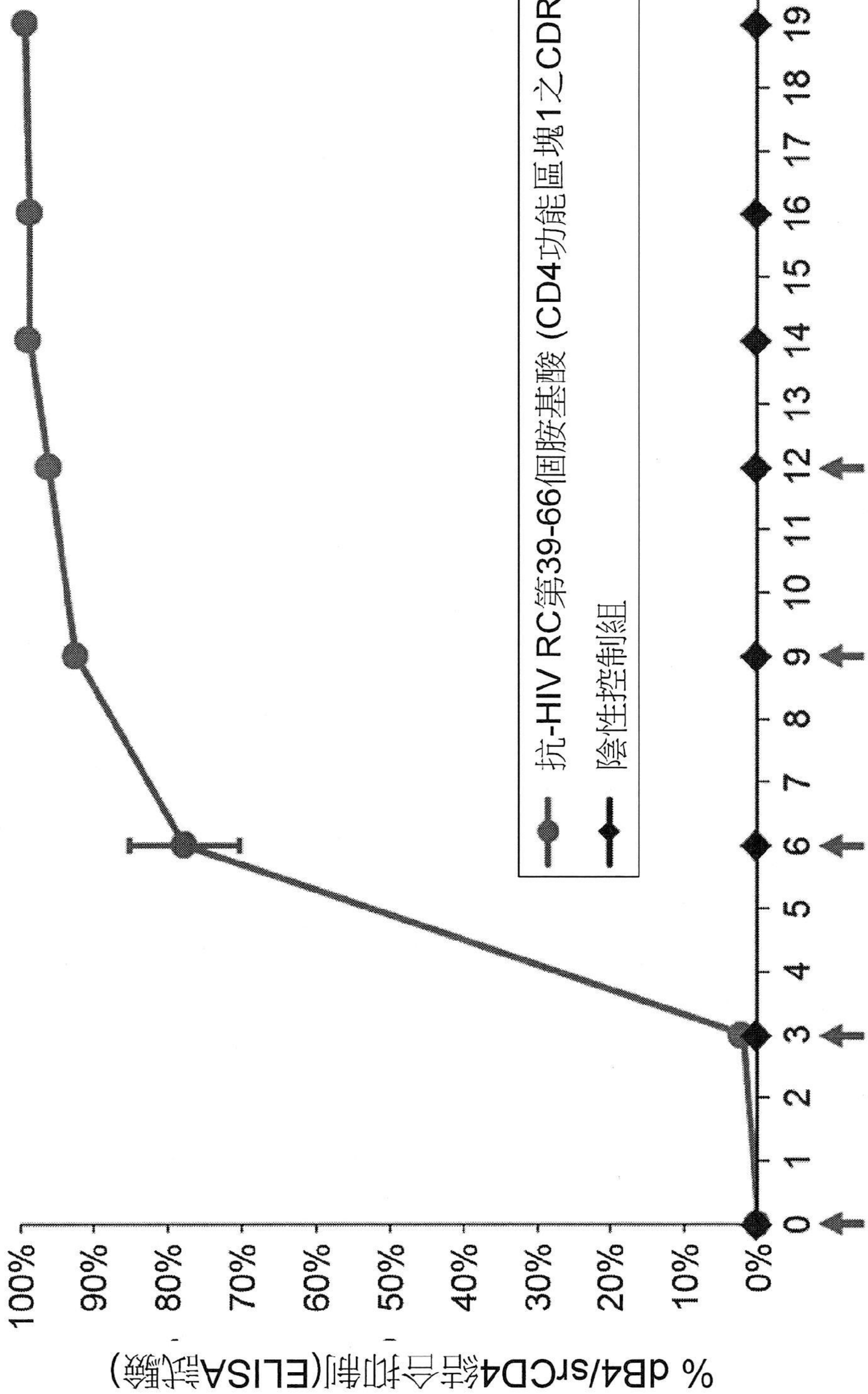


來自不同感染源的PBMC
於存在(+)或缺乏(-)Tenofovir的狀況下

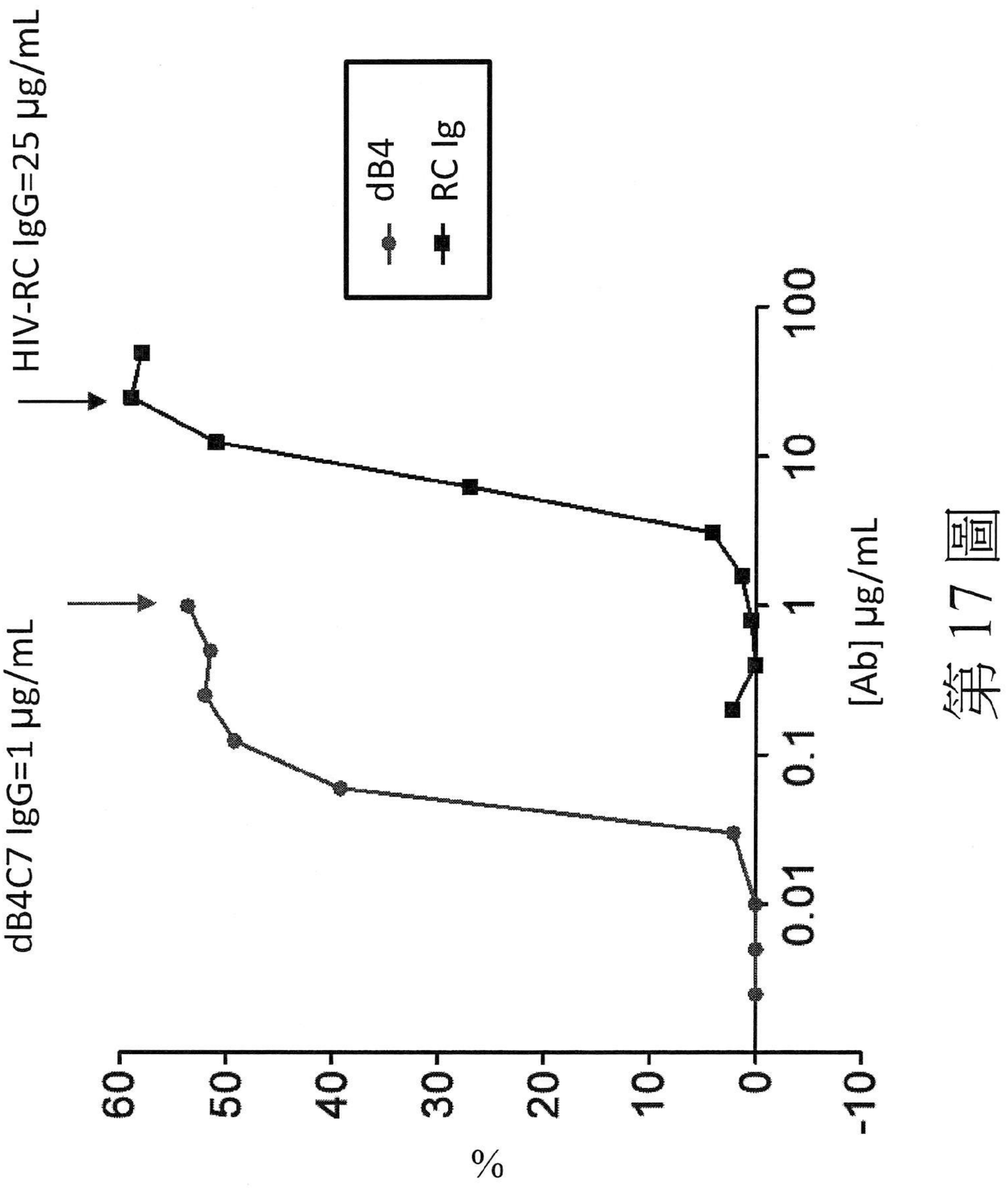
第 14 圖


1 未受刺激
2 植物凝集素(PHA)刺激
3 不活化 HIV 溶胞產物刺激(iHIV)
4 抗-CD4功能區塊1之CDR2
5 抗-CD4功能區塊1之CDR3
6 抗-CD4功能區塊1/2
7 sCD4存在下的iHIV
8 sCD4存在下的抗-CD4功能區塊1之CDR2
9 sCD4存在下的抗-CD4功能區塊1之CDR3
10 sCD4存在下的抗-CD4功能區塊1/2
刺激後第5天
P24 gag 抗原(pg/mL)
0
500
1000
1500
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

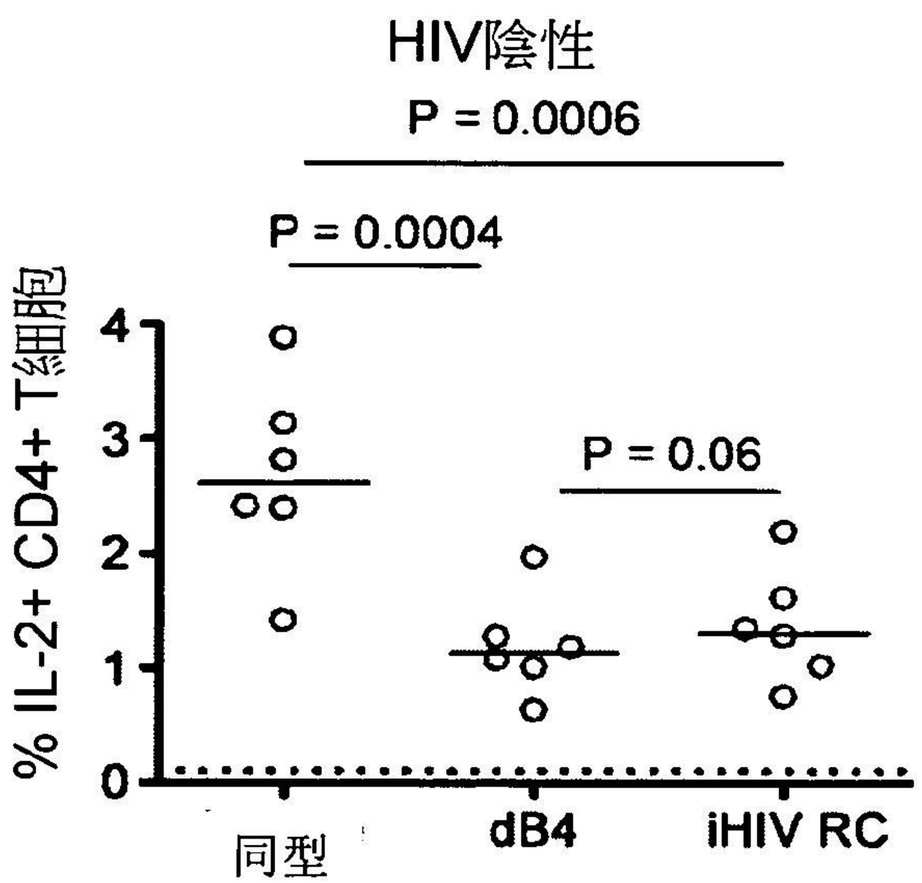
第 15 圖


% dB4/srCD4結合抑制(ELISA試驗)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
初次免疫後週數
抗-HIV RC第39-66個胺基酸 (CD4功能區塊1之CDR2區域)
陰性控制組

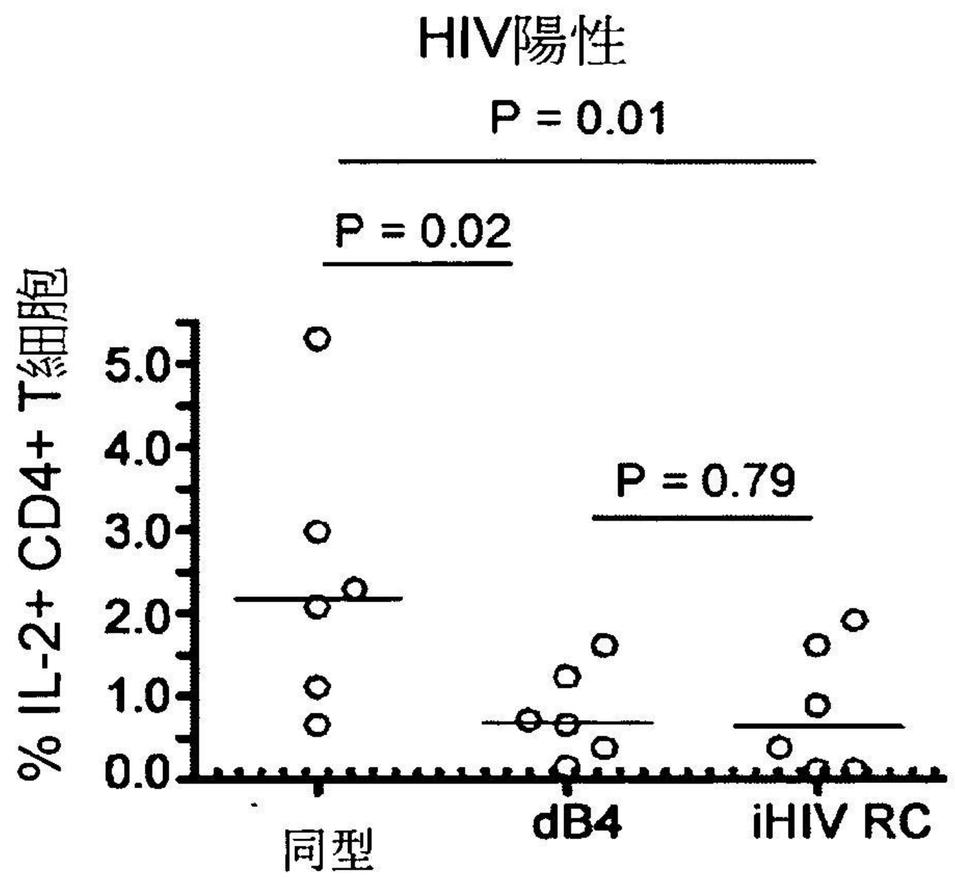
第 16 圖


HIV-RC IgG=25 µg/mL
dB4
RC Ig
100
10
1
0.1
0.01
[Ab] µg/mL
dB4C7 IgG=1 µg/mL
60
50
40
30
20
10
0
10
%

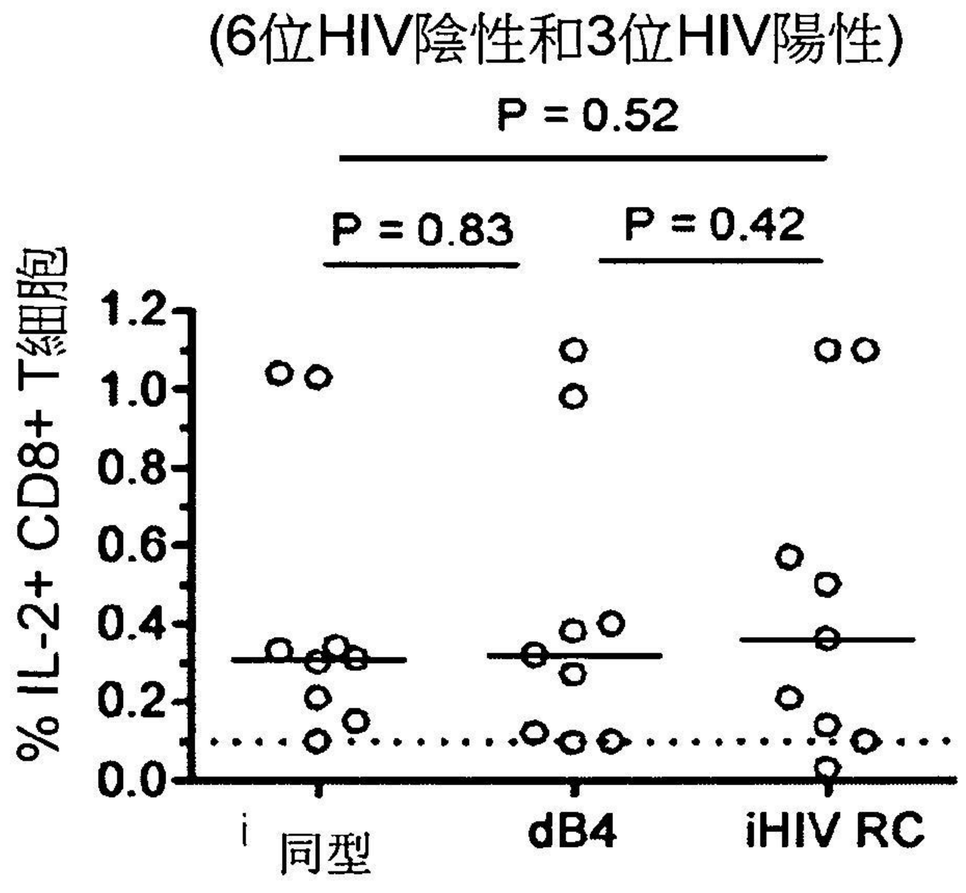
第 17 圖



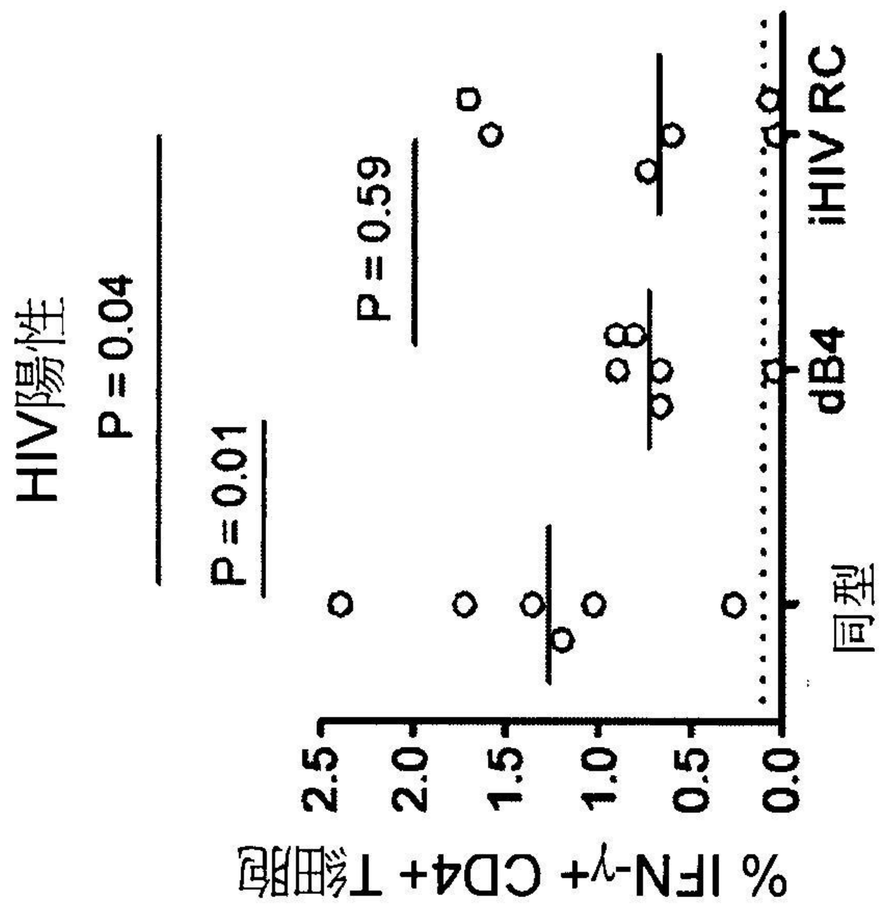
第 18A 圖



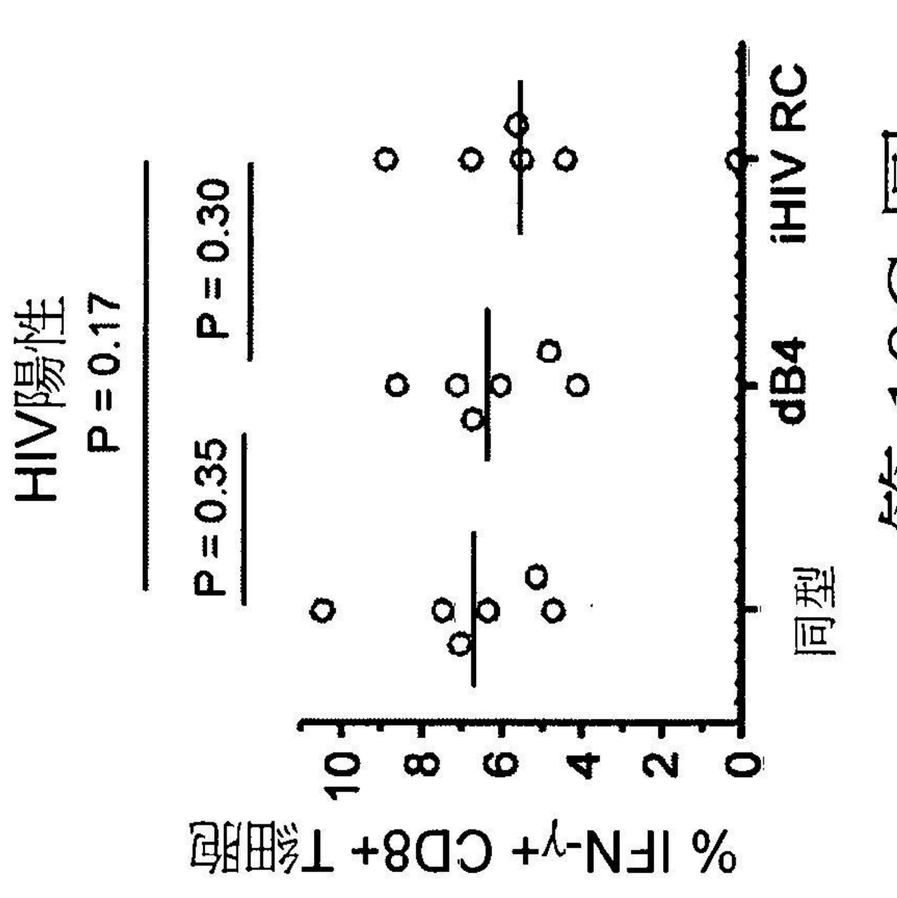
第 18B 圖



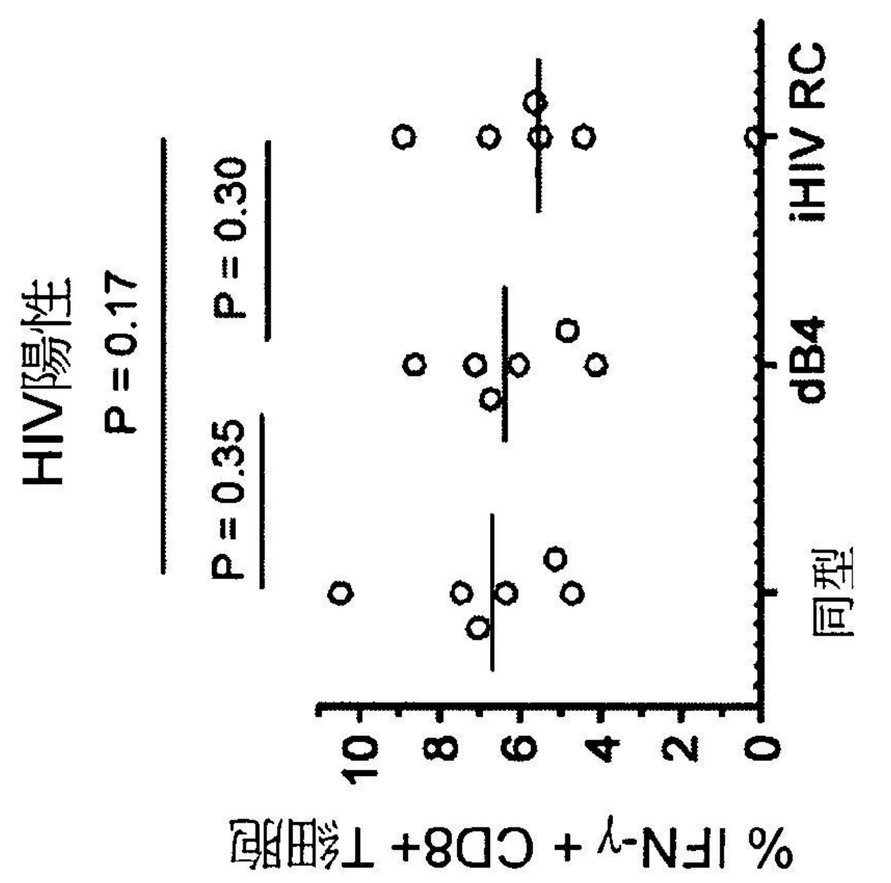
第 18C 圖



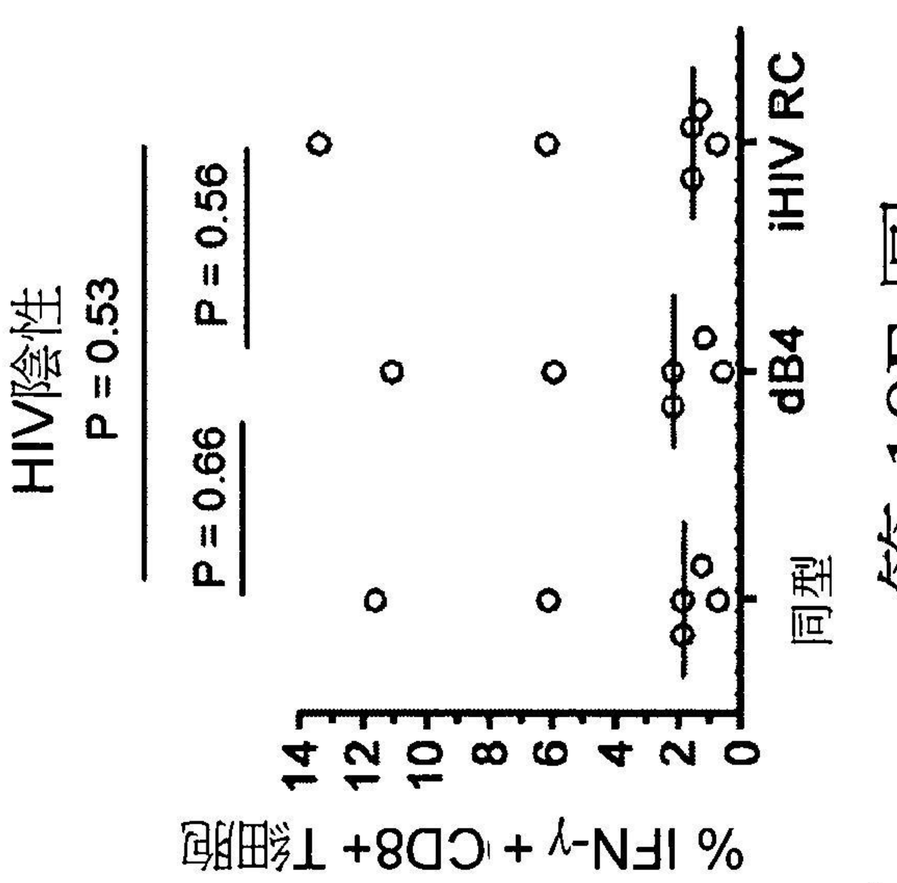
第 18E 圖



第 18G 圖

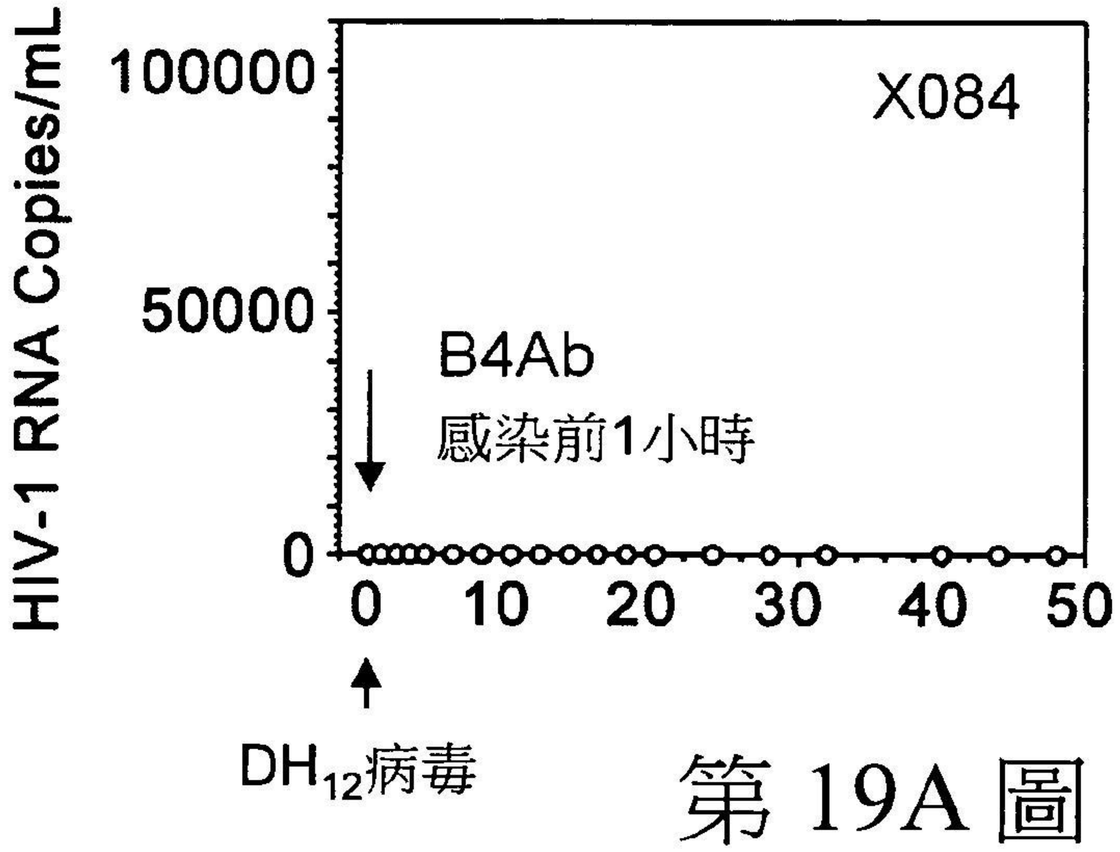


第 18D 圖

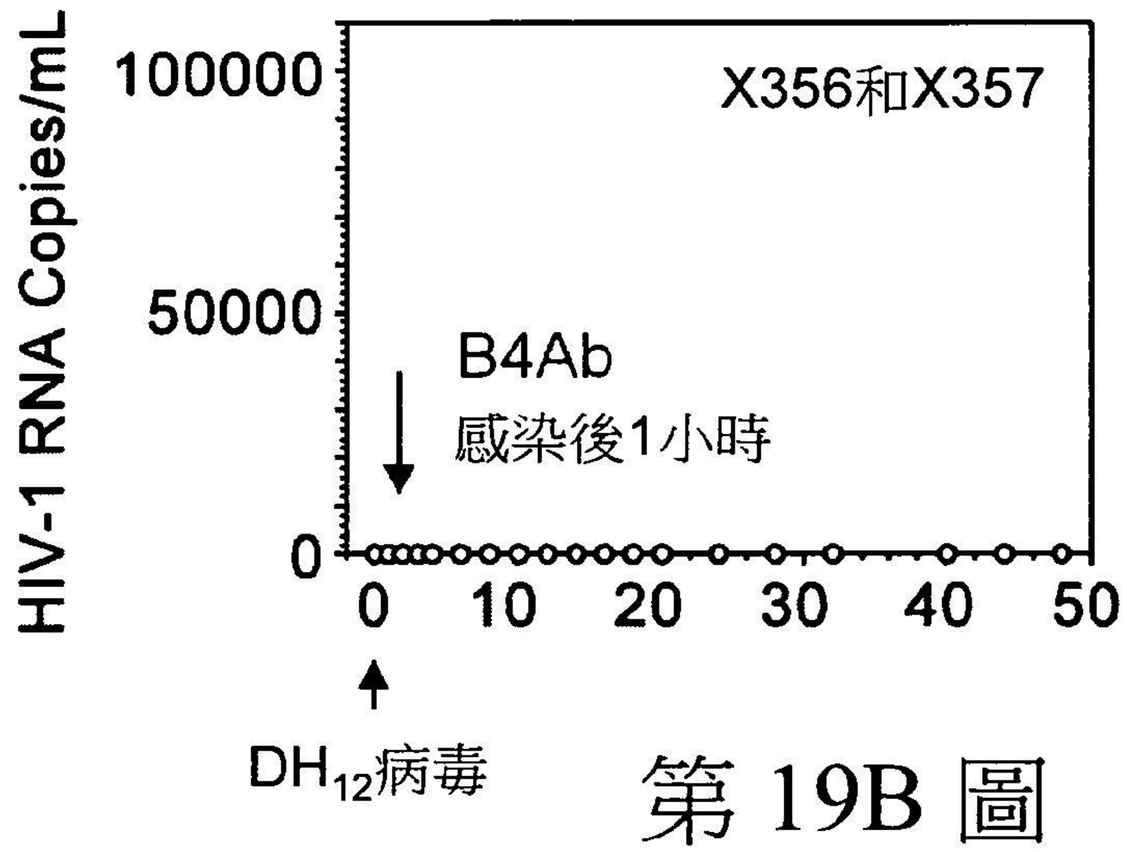


第 18F 圖

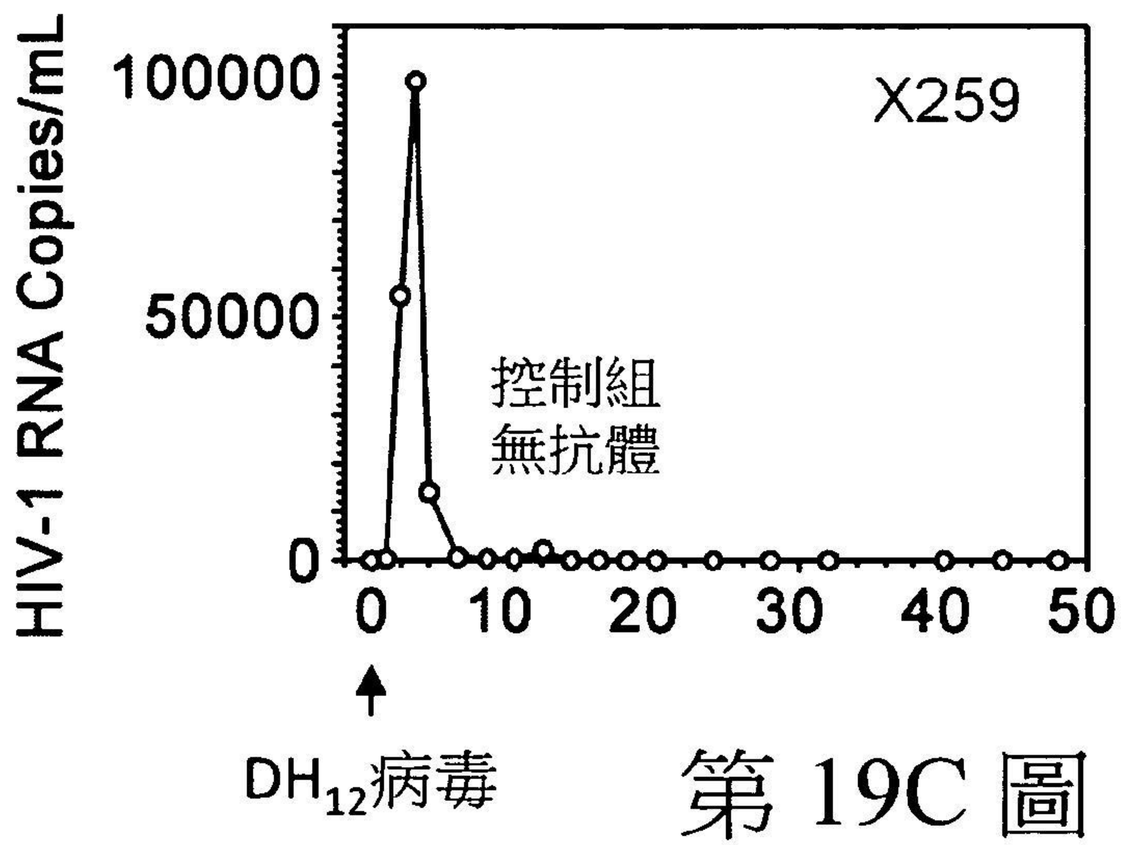
S



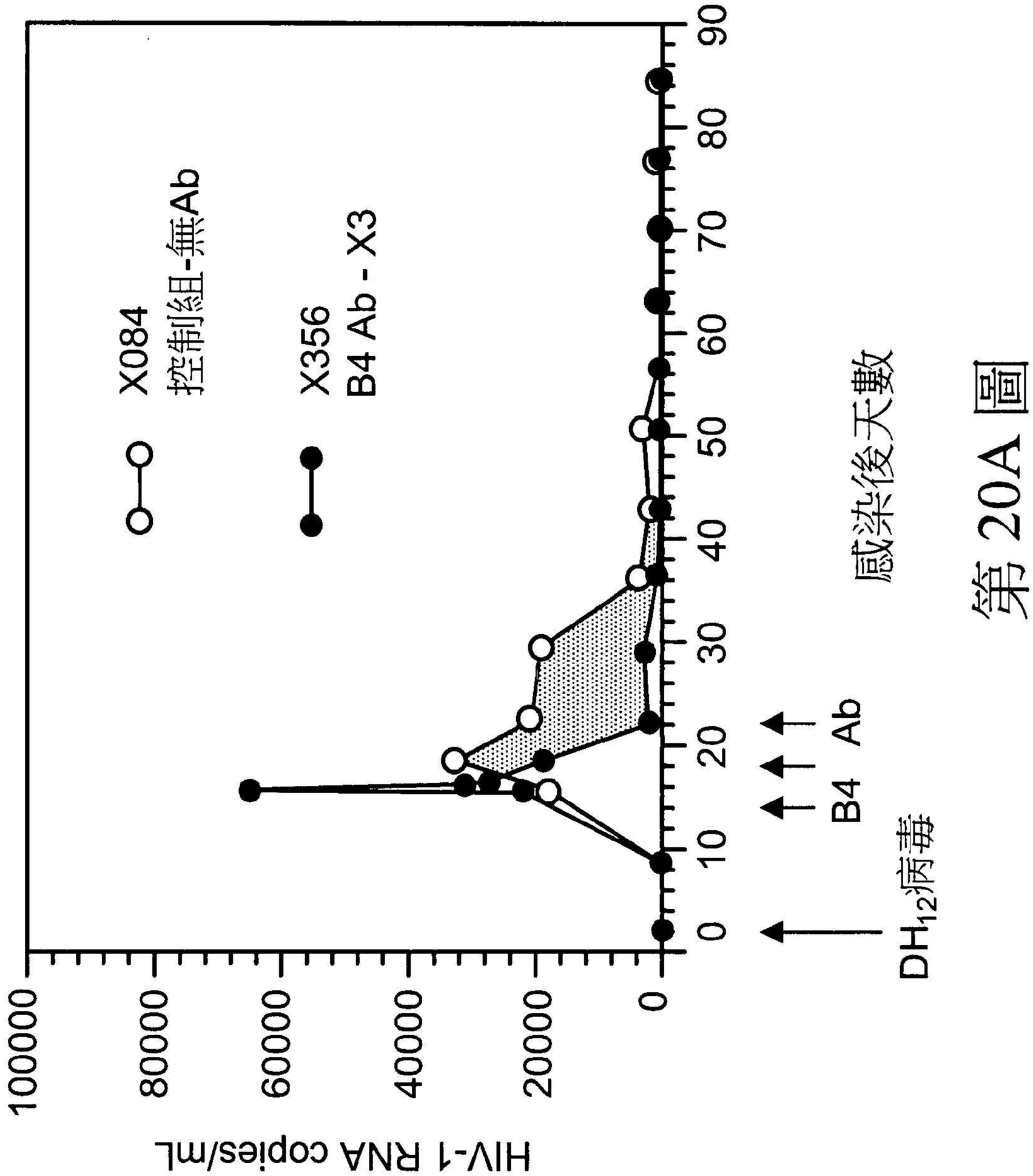
第 19A 圖



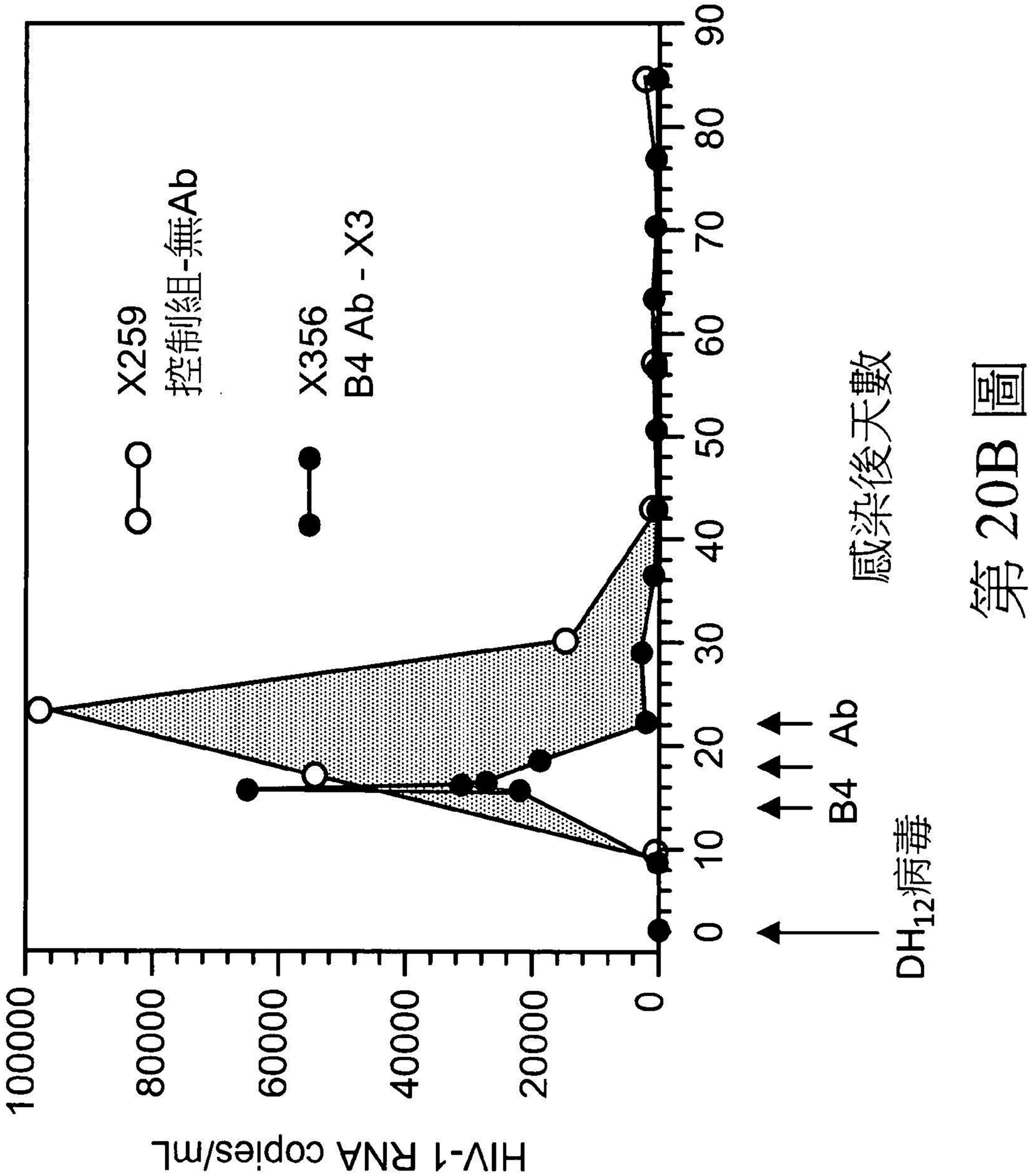
第 19B 圖



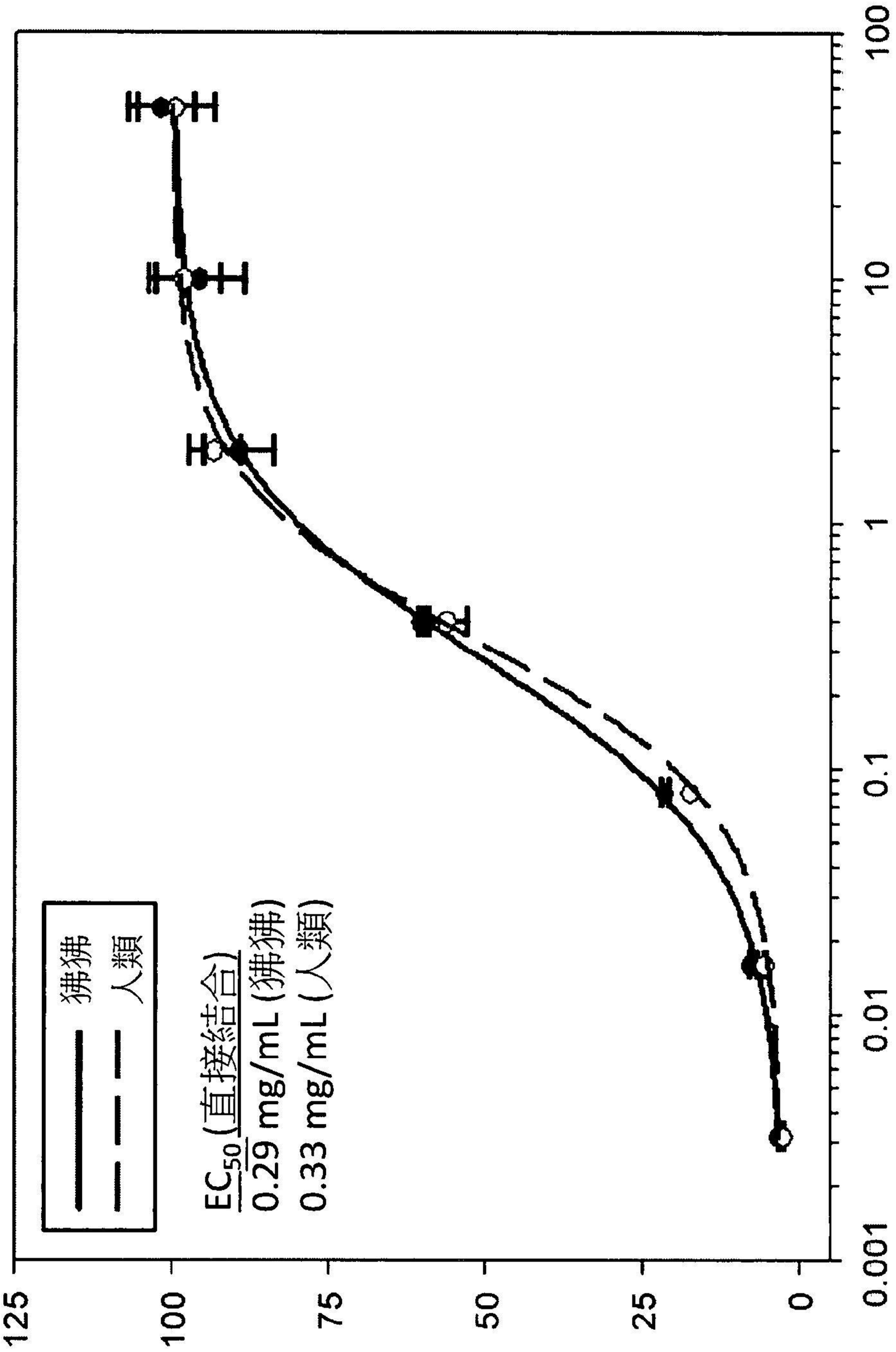
第 19C 圖


X084
控制組-無Ab
X356
B4 Ab - X3
HIV-1 RNA copies/mL
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
感染後天數
DH12病毒
B4 Ab

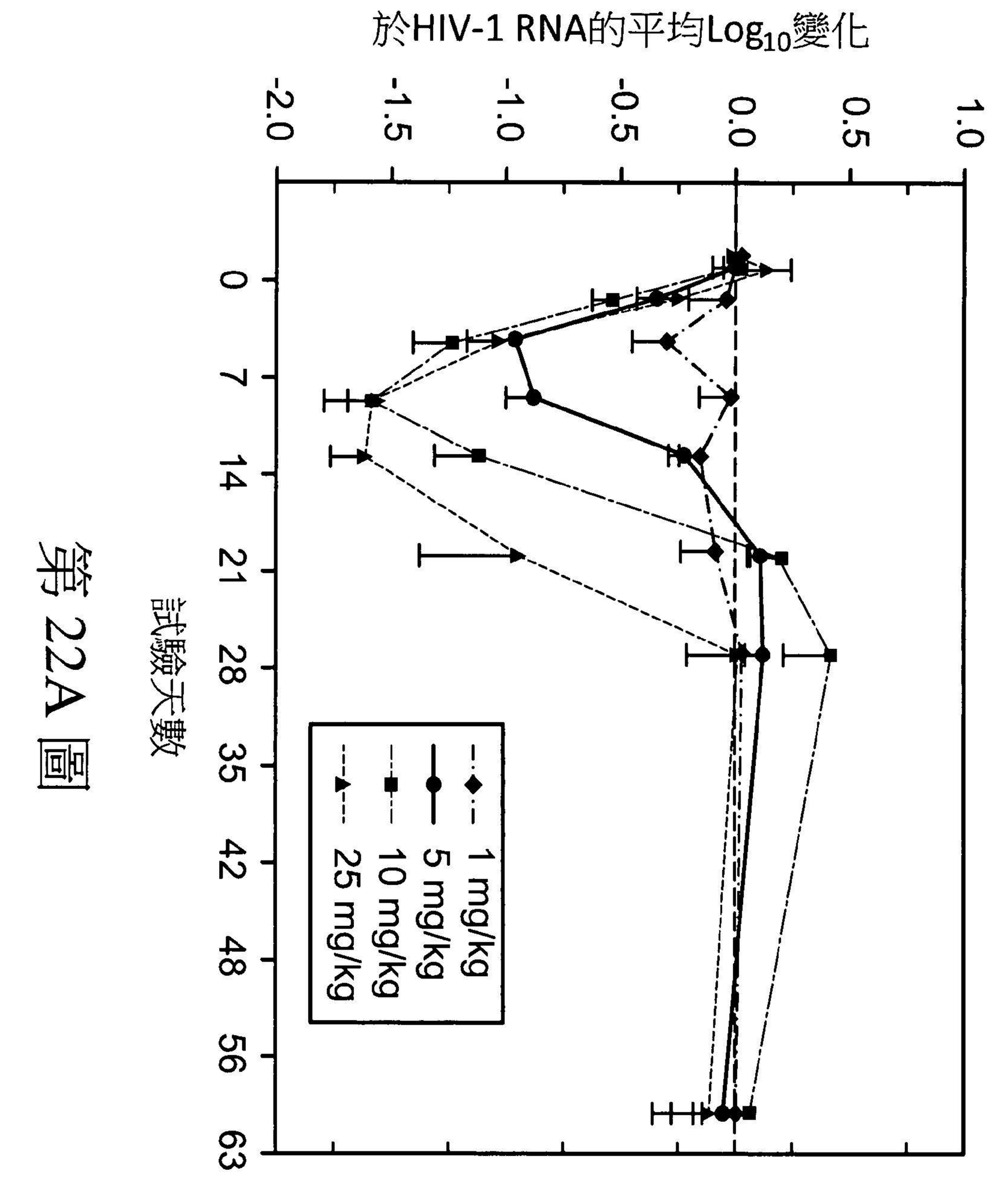
第 20A 圖


X259
控制組-無Ab
X356
B4 Ab - X3
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
感染後天數
DH12病毒
B4 Ab
HIV-1 RNA copies/mL
100000
80000
60000
40000
20000
0

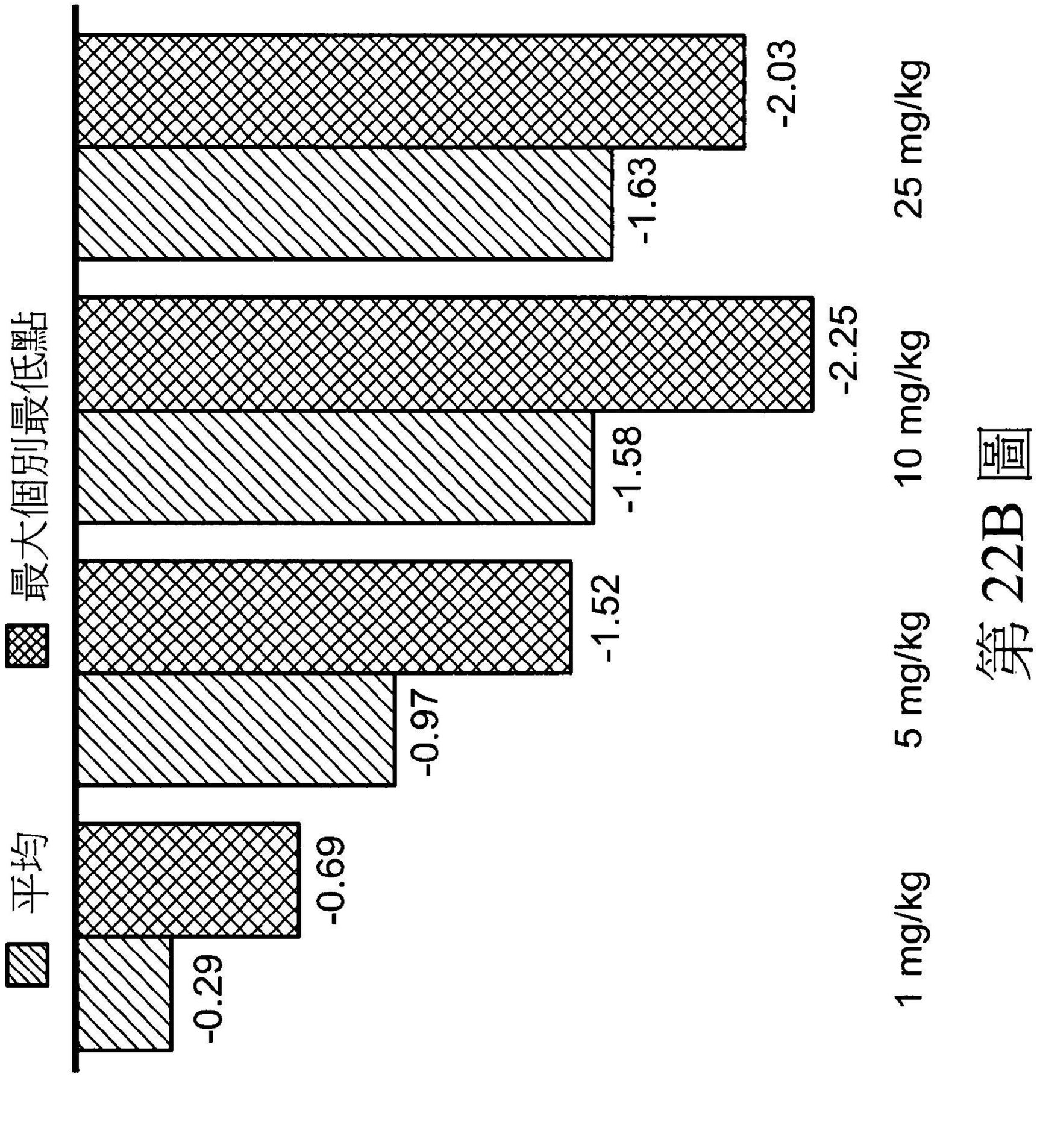
第 20B 圖


猞猁
人類
EC50 (直接結合)
0.29 mg/mL (猞猁)
0.33 mg/mL (人類)
%MFI
125
100
75
50
25
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
dB4C7-Alexa (μg/mL)

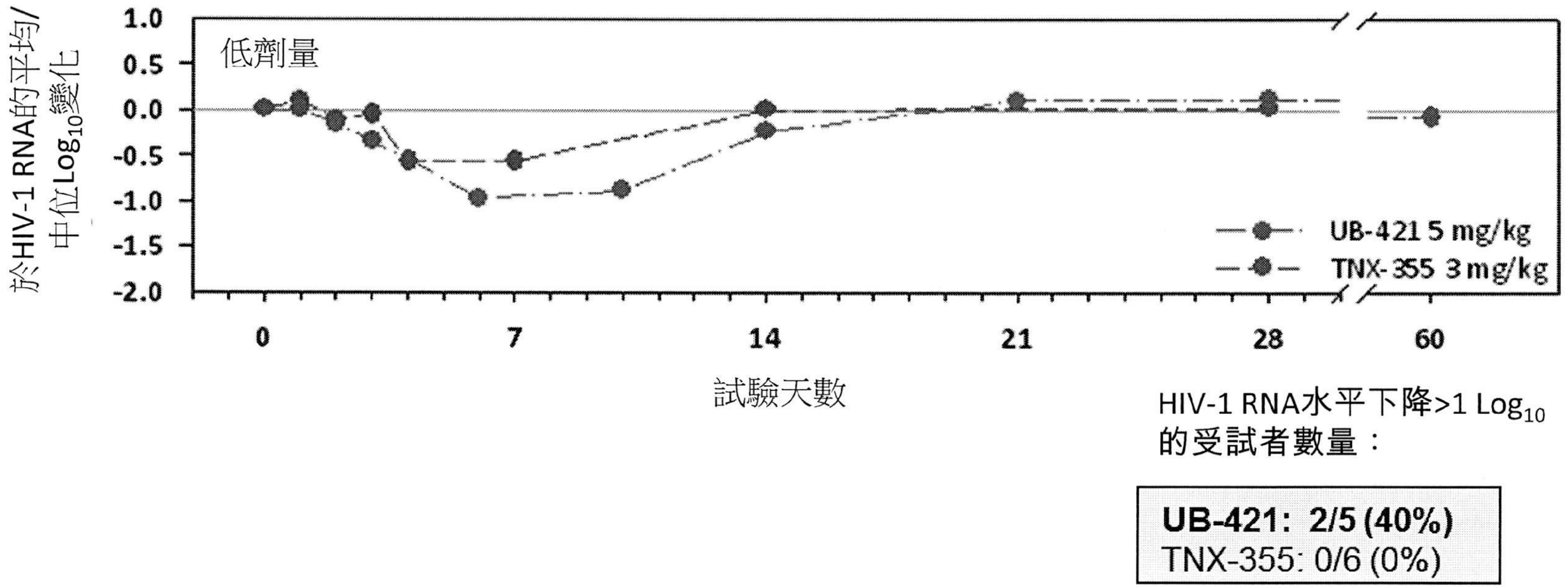
第 21 圖


於HIV-1 RNA的平均Log10變化
-2.0
-1.5
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0
0
7
14
21
28
35
42
48
56
63
試驗天數
1 mg/kg
5 mg/kg
10 mg/kg
25 mg/kg

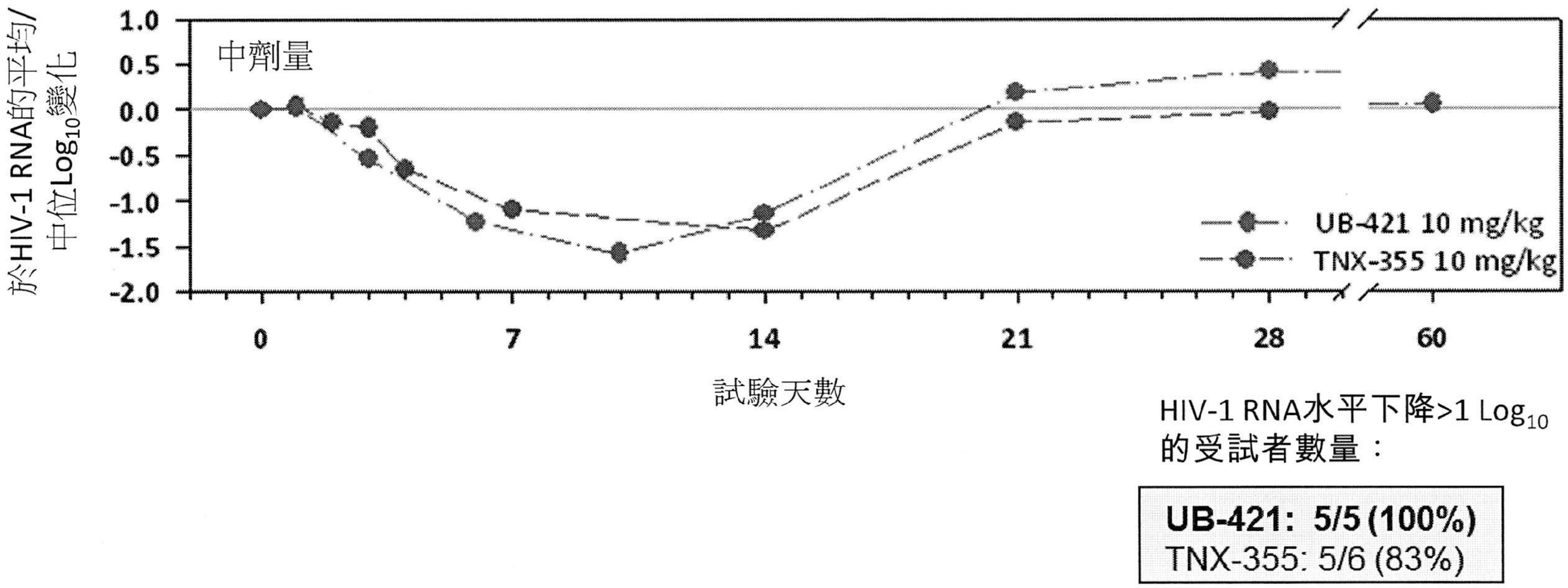
第 22A 圖


大個別最低點
最大
平均
-2.03
-1.63
-2.25
-1.58
-1.52
-0.97
-0.69
-0.29
25 mg/kg
10 mg/kg
5 mg/kg
1 mg/kg

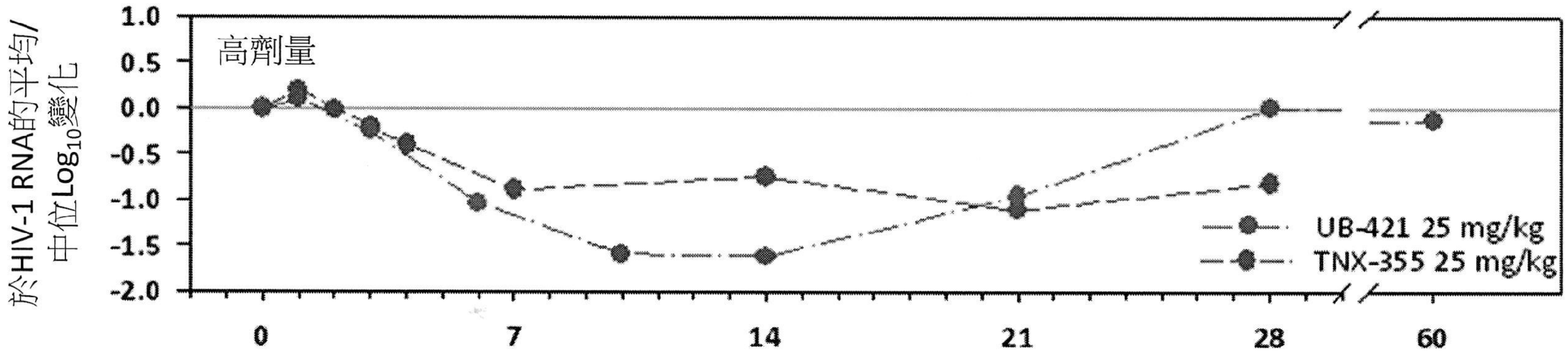
第 22B 圖


於HIV-1 RNA的平均/中位Log10變化
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
低劑量
UB-421 5 mg/kg
TNX-355 3 mg/kg
0
7
14
21
28
60
試驗天數
HIV-1 RNA水平下降>1 Log10的受試者數量：
UB-421: 2/5 (40%)
TNX-355: 0/6 (0%)

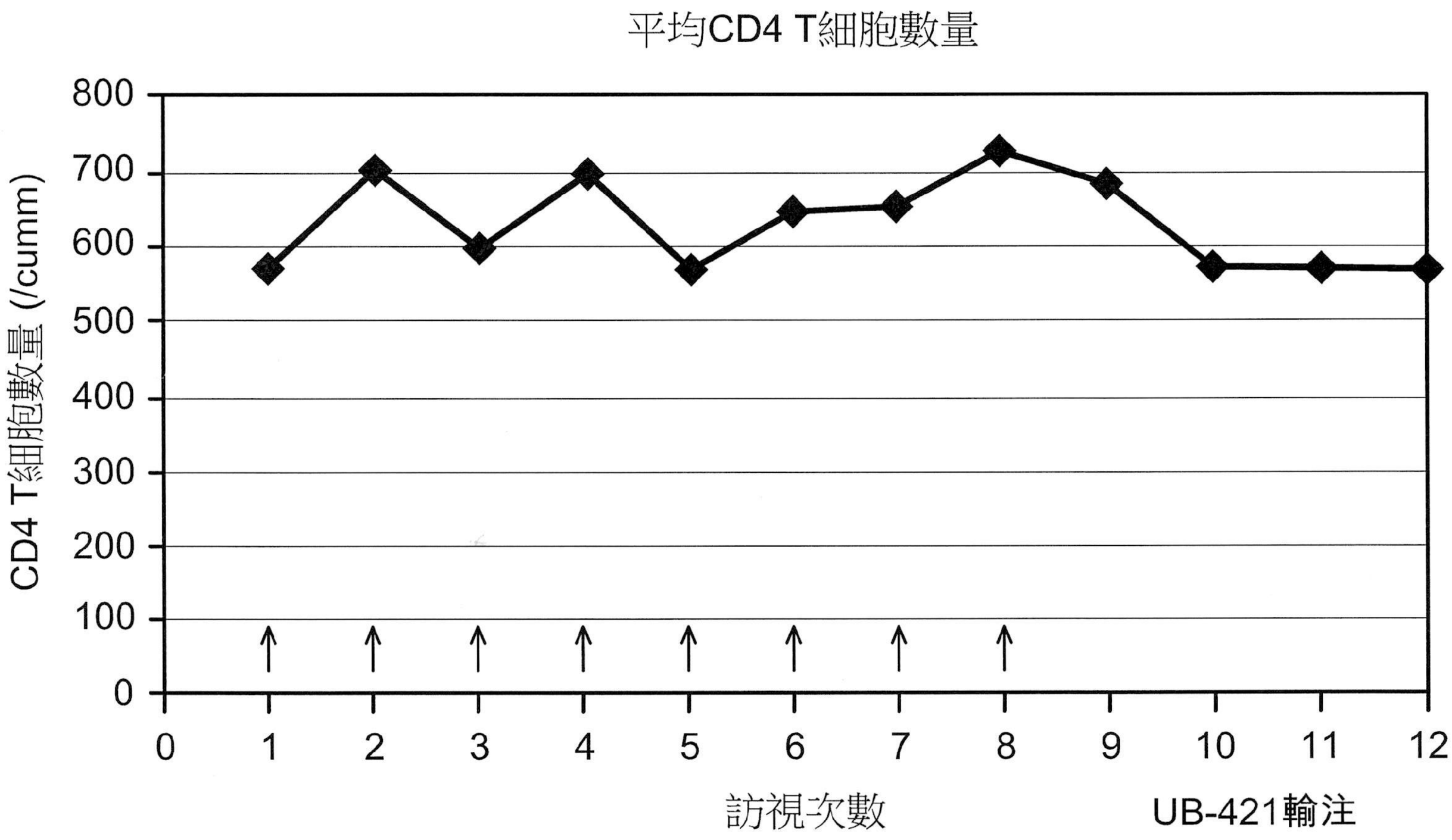
第 23A 圖


於HIV-1 RNA的平均/中位Log10變化
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
中劑量
UB-421 10 mg/kg
TNX-355 10 mg/kg
0
7
14
21
28
60
試驗天數
HIV-1 RNA水平下降>1 Log10的受試者數量：
UB-421: 5/5 (100%)
TNX-355: 5/6 (83%)

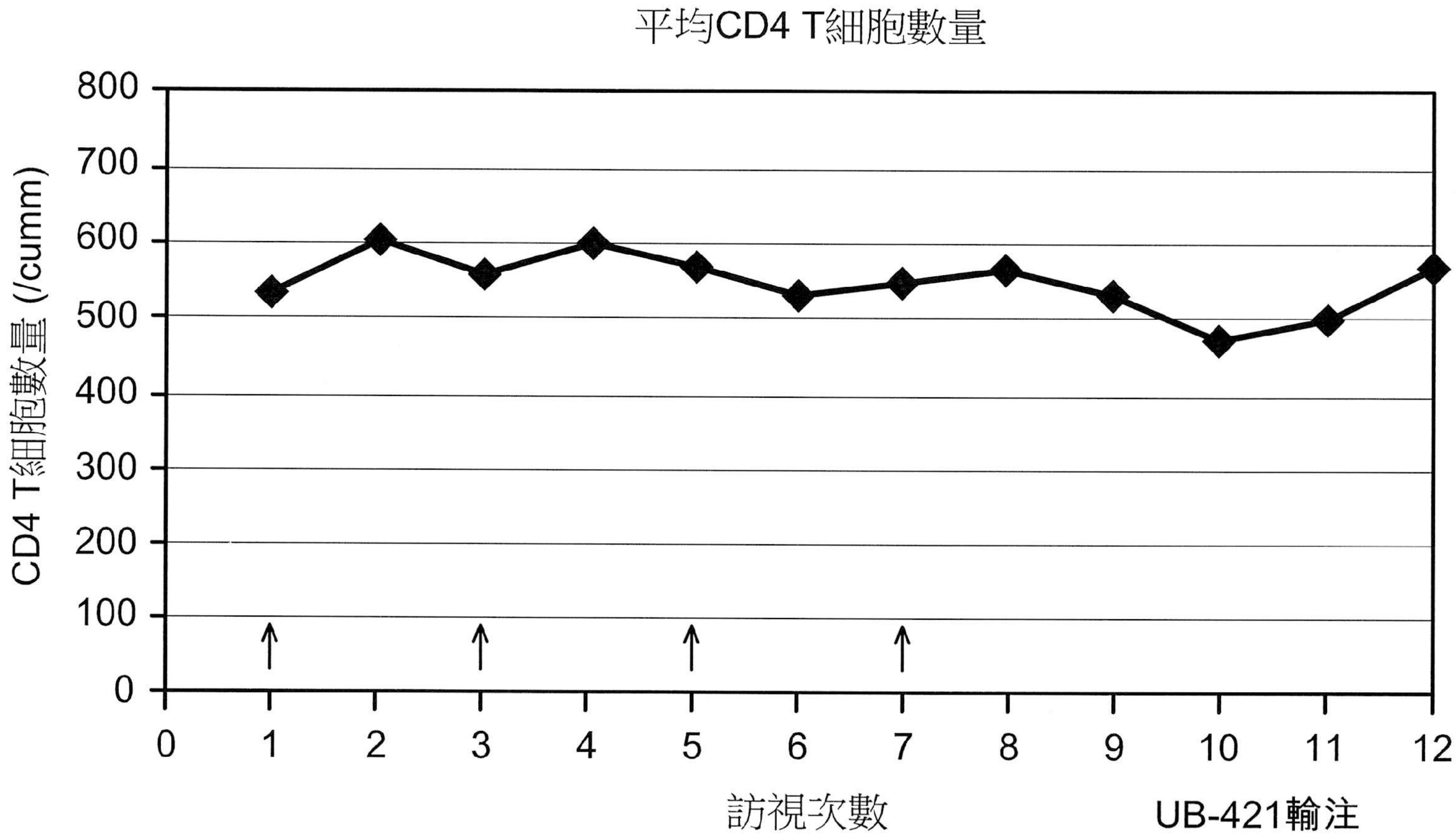
第 23B 圖


高劑量
於HIV-1 RNA的平均/中位Log10變化
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
0
7
14
21
28
60
試驗天數
UB-421 25 mg/kg
TNX-355 25 mg/kg
HIV-1 RNA水平下降>1 Log10的受試者數量：
UB-421: 5/5 (100%)
TNX-355: 5/6 (83%)

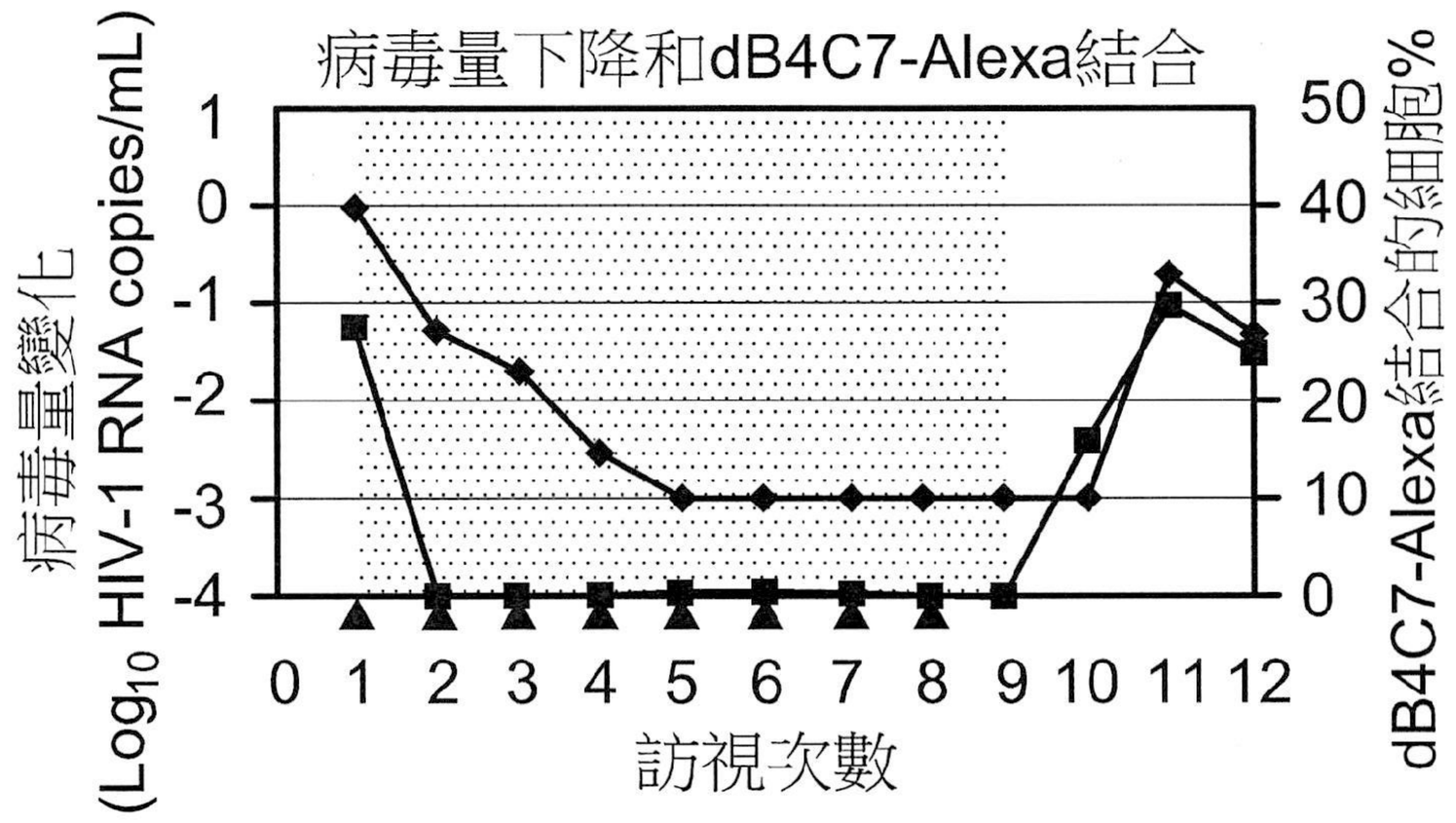
第 23C 圖

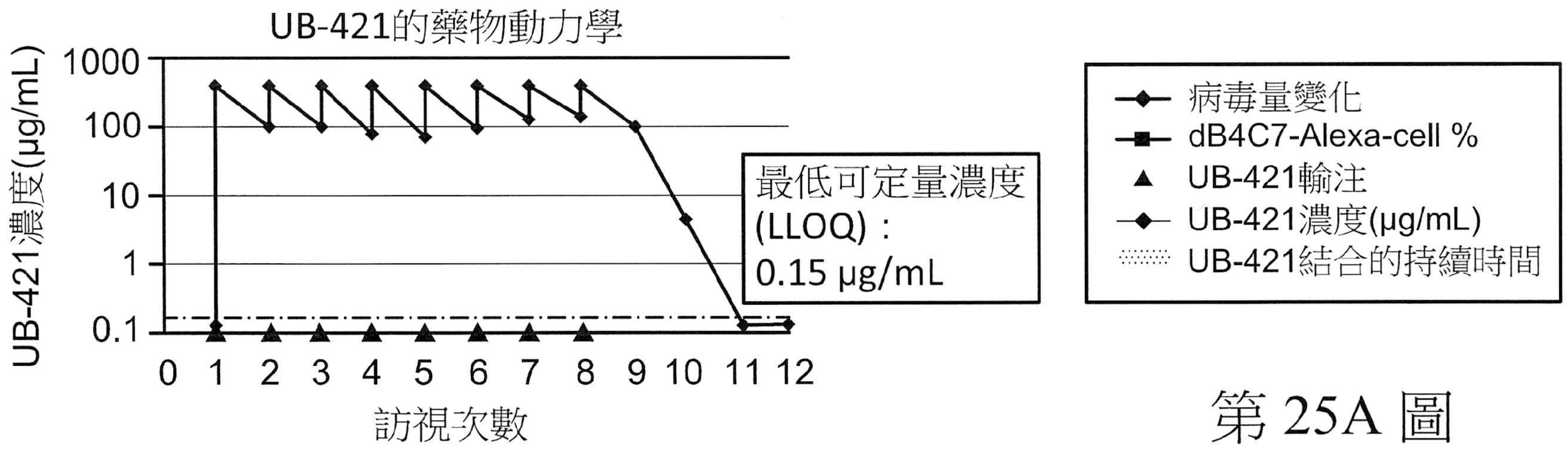

平均CD4 T細胞數量
CD4 T細胞數量 (/cumm)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
訪視次數
UB-421輸注

第 24A 圖

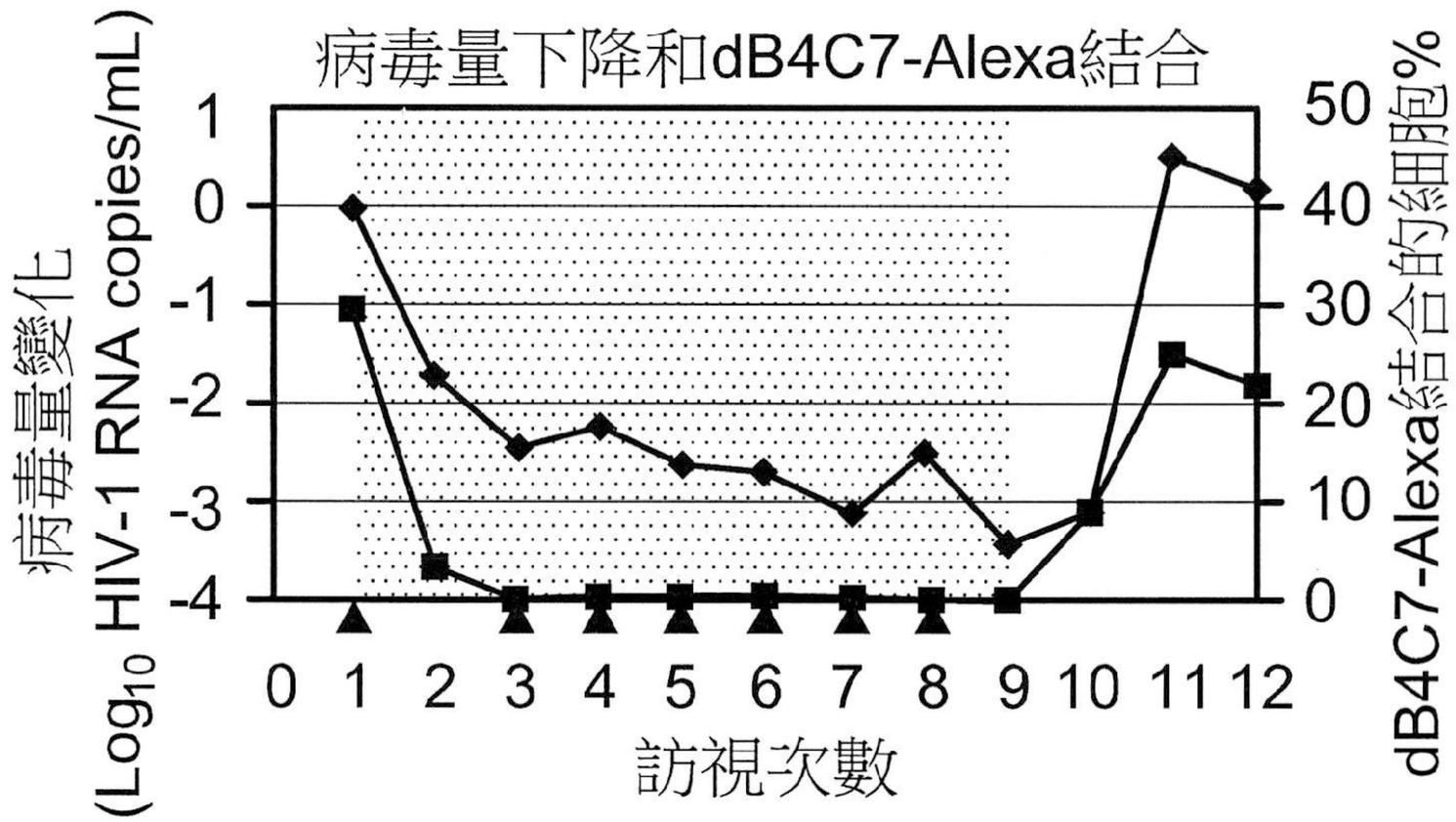

平均CD4 T細胞數量
CD4 T細胞數量 (/cumm)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
訪視次數
UB-421輸注

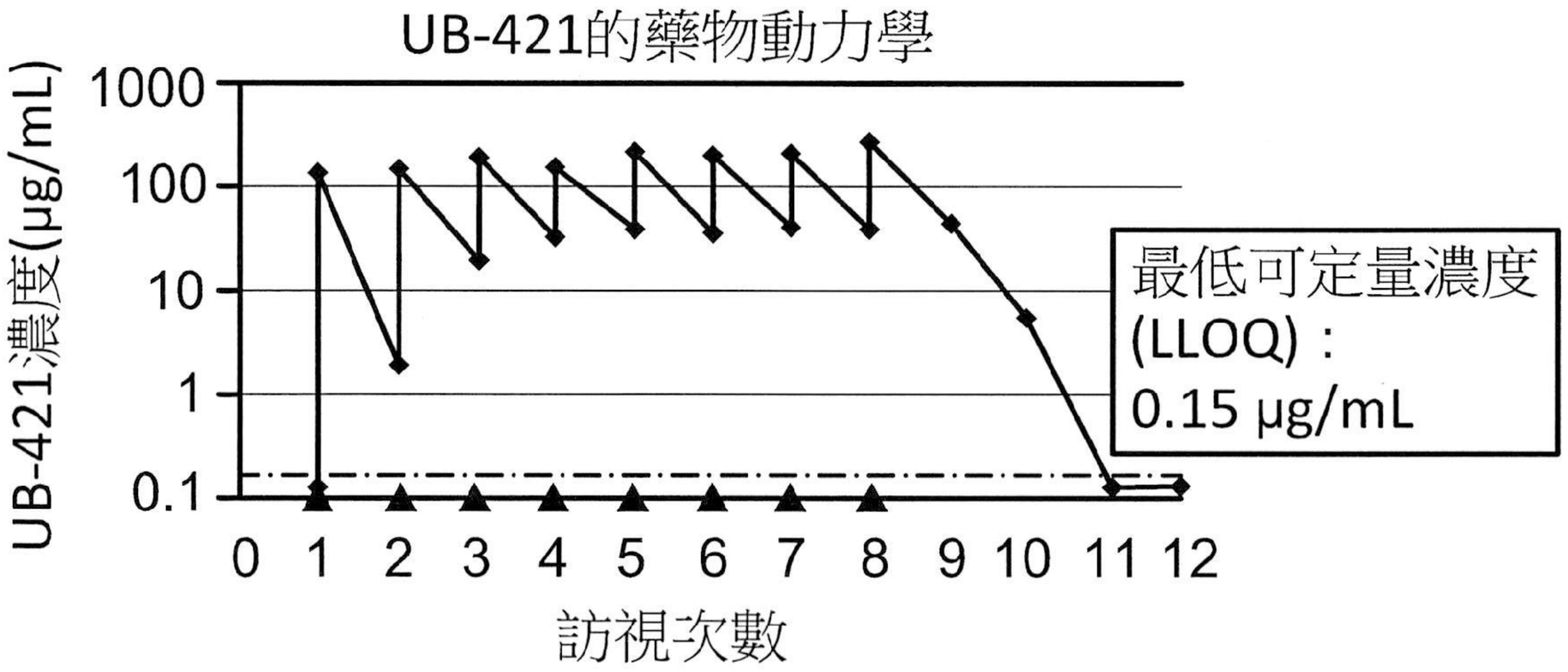
第 24B 圖

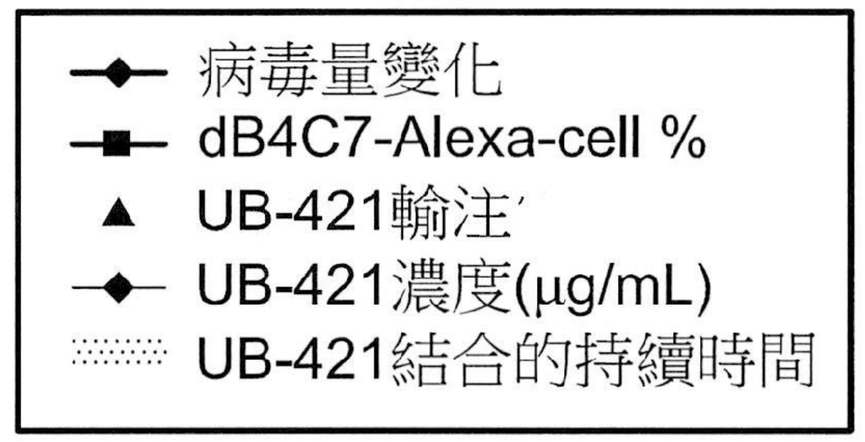

病毒量下降和dB4C7-Alexa結合
病毒量變化
(Log10 HIV-1 RNA copies/mL)
1
0
-1
-2
-3
-4
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
訪視次數
dB4C7-Alexa結合的細胞%
50
40
30
20
10
0


UB-421的藥物動力學
UB-421濃度(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
訪視次數
最低可定量濃度
(LLOQ)：
0.15 μg/mL
病毒量變化
dB4C7-Alexa-cell %
UB-421輸注
UB-421濃度(μg/mL)
UB-421結合的持續時間

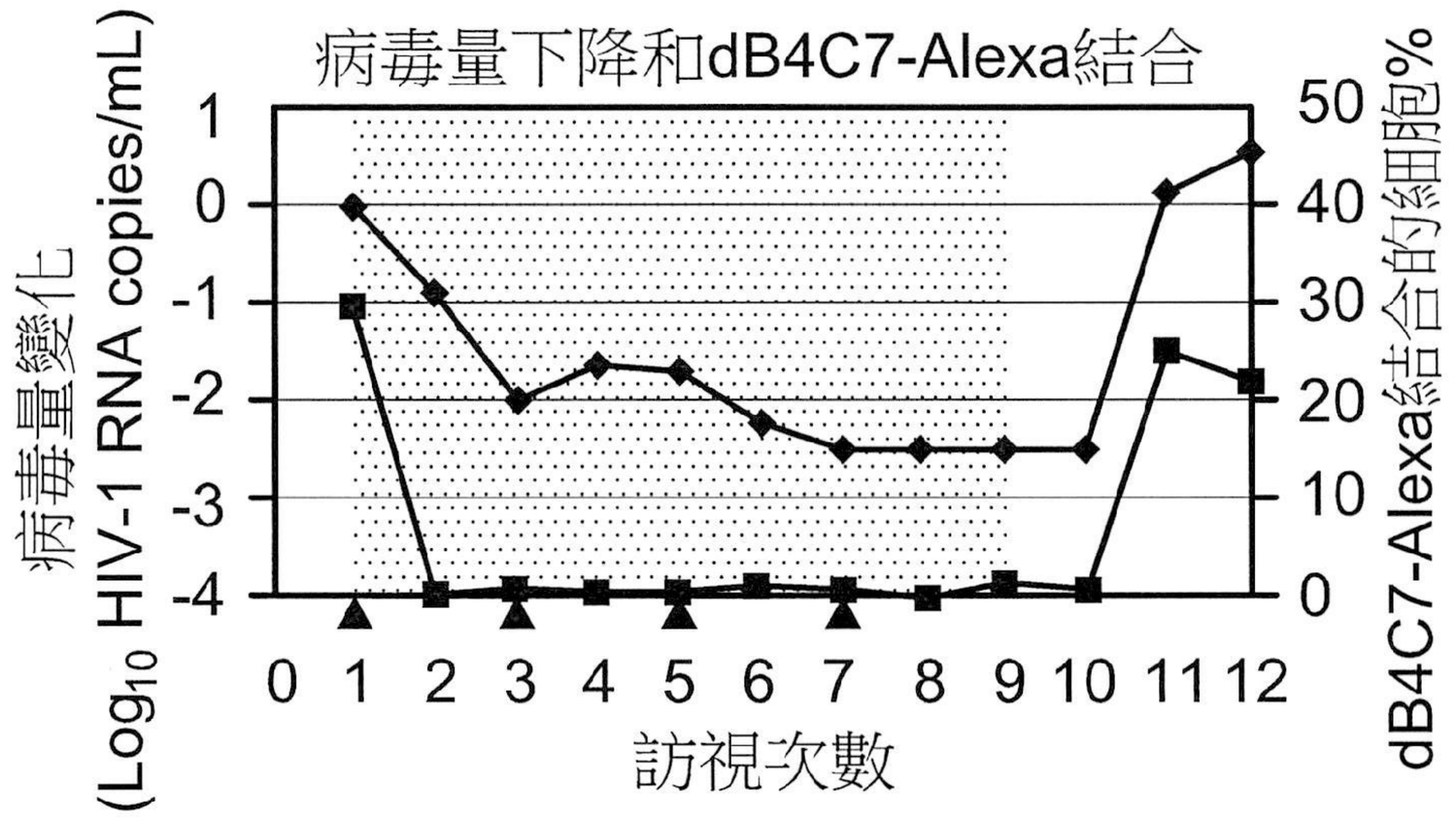
第 25A 圖

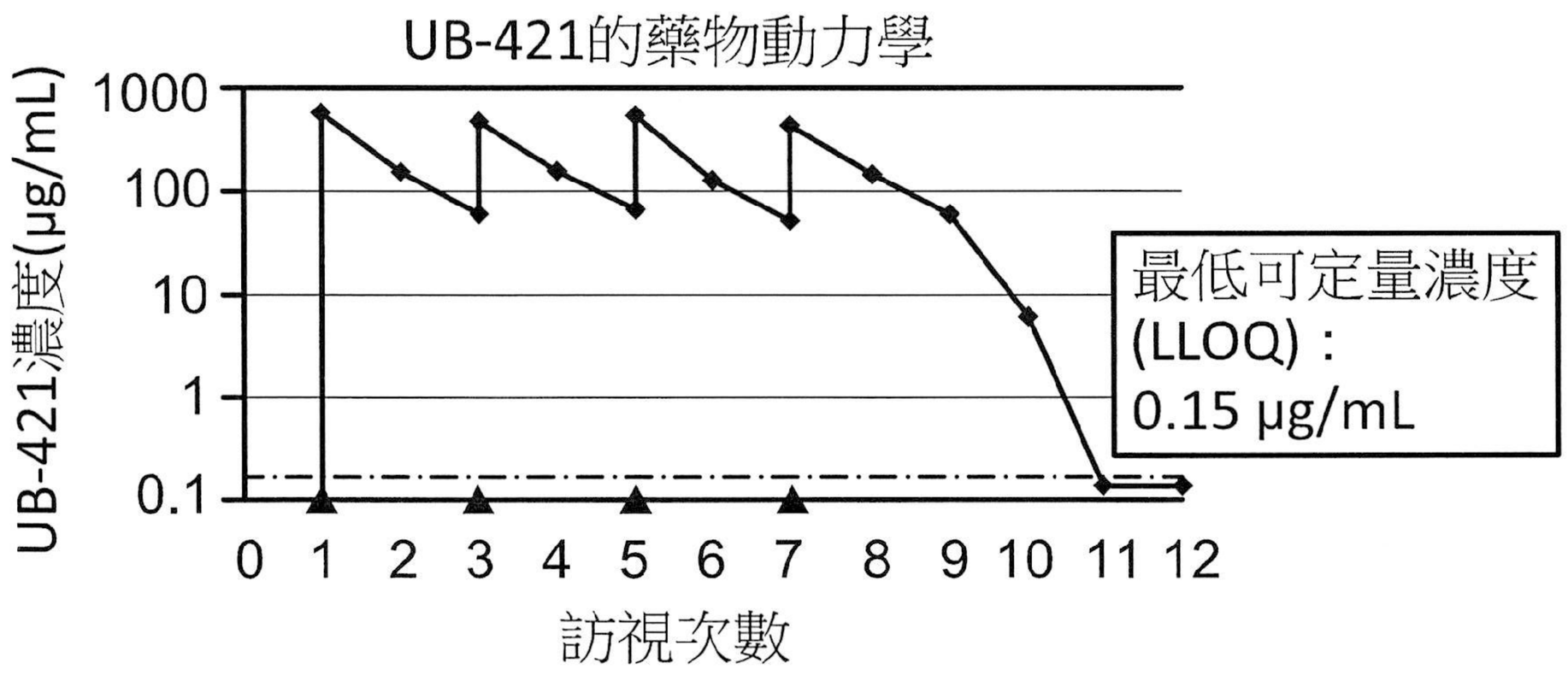

病毒量下降和dB4C7-Alexa結合
病毒量變化
(Log10 HIV-1 RNA copies/mL)
1
0
-1
-2
-3
-4
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
訪視次數
dB4C7-Alexa結合的細胞%
50
40
30
20
10
0


UB-421的藥物動力學
UB-421濃度(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
訪視次數
最低可定量濃度
(LLOQ)：
0.15 μg/mL

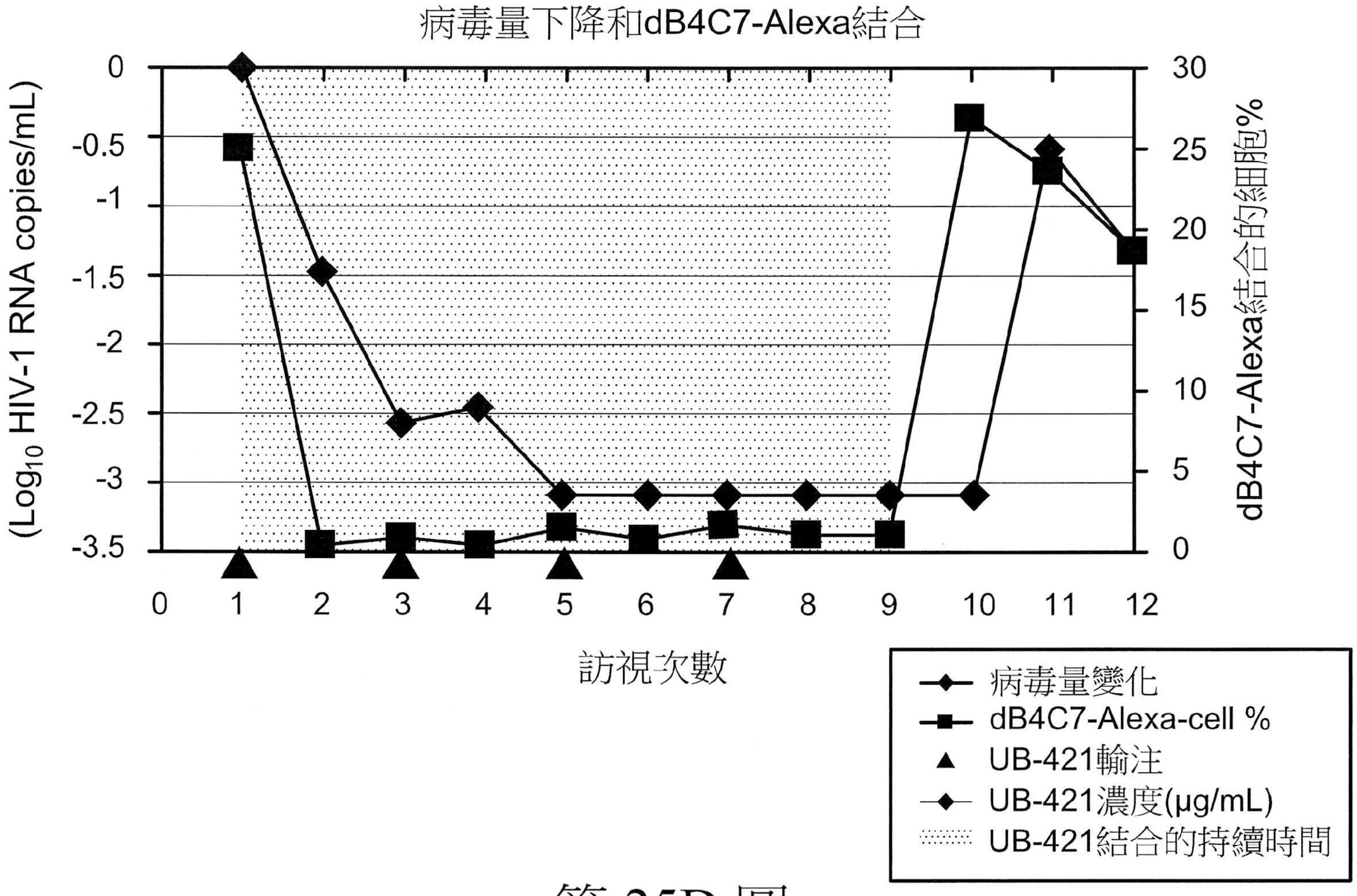

病毒量變化
dB4C7-Alexa-cell %
UB-421輸注
UB-421濃度(μg/mL)
UB-421結合的持續時間

第 25B 圖

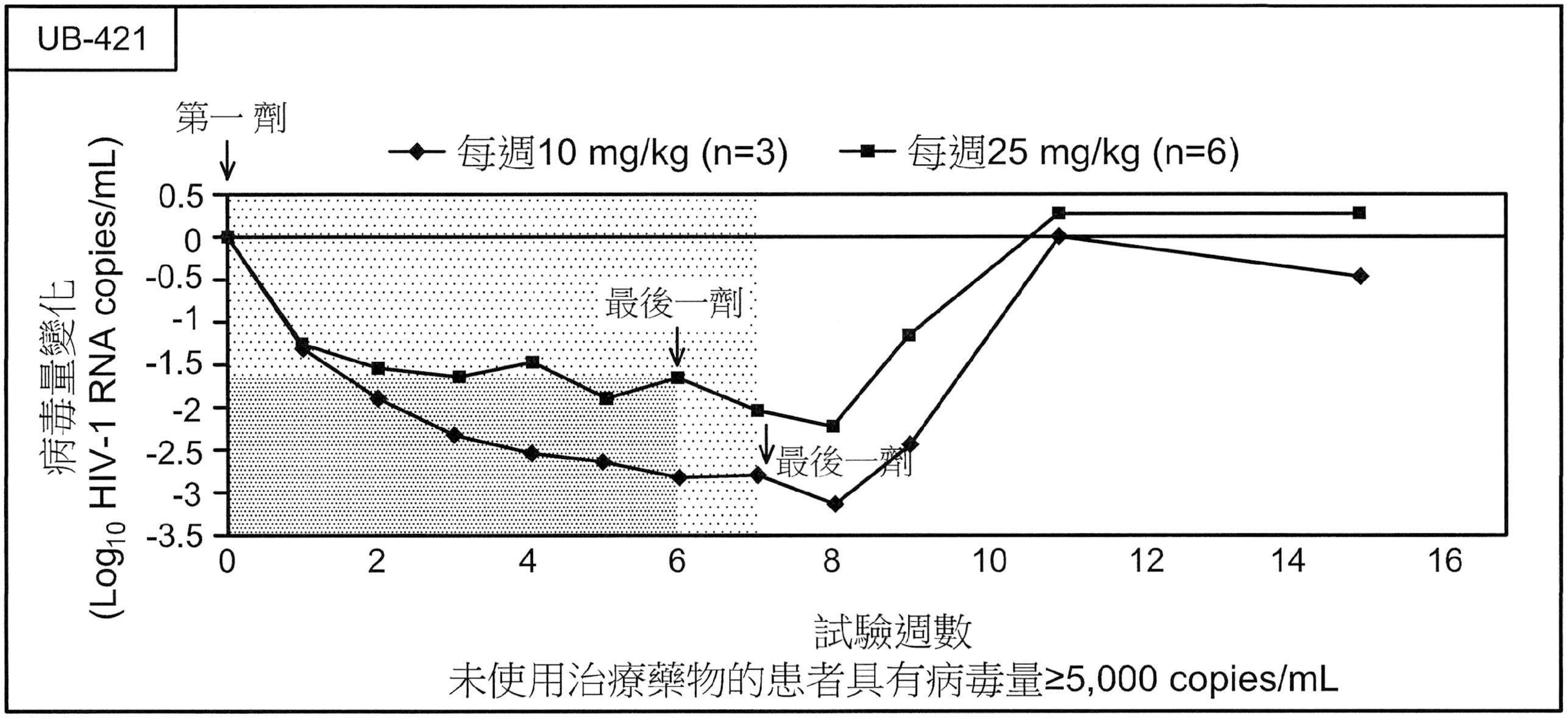

病毒量下降和dB4C7-Alexa結合
病毒量變化
(Log10 HIV-1 RNA copies/mL)
1
0
-1
-2
-3
-4
50
40
30
20
10
0
dB4C7-Alexa結合的細胞%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
訪視次數


UB-421的藥物動力學
UB-421濃度(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
最低可定量濃度
(LLOQ)：
0.15 μg/mL
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
訪視次數
病毒量變化
dB4C7-Alexa-cell %
UB-421輸注
UB-421濃度(μg/mL)
UB-421結合的持續時間

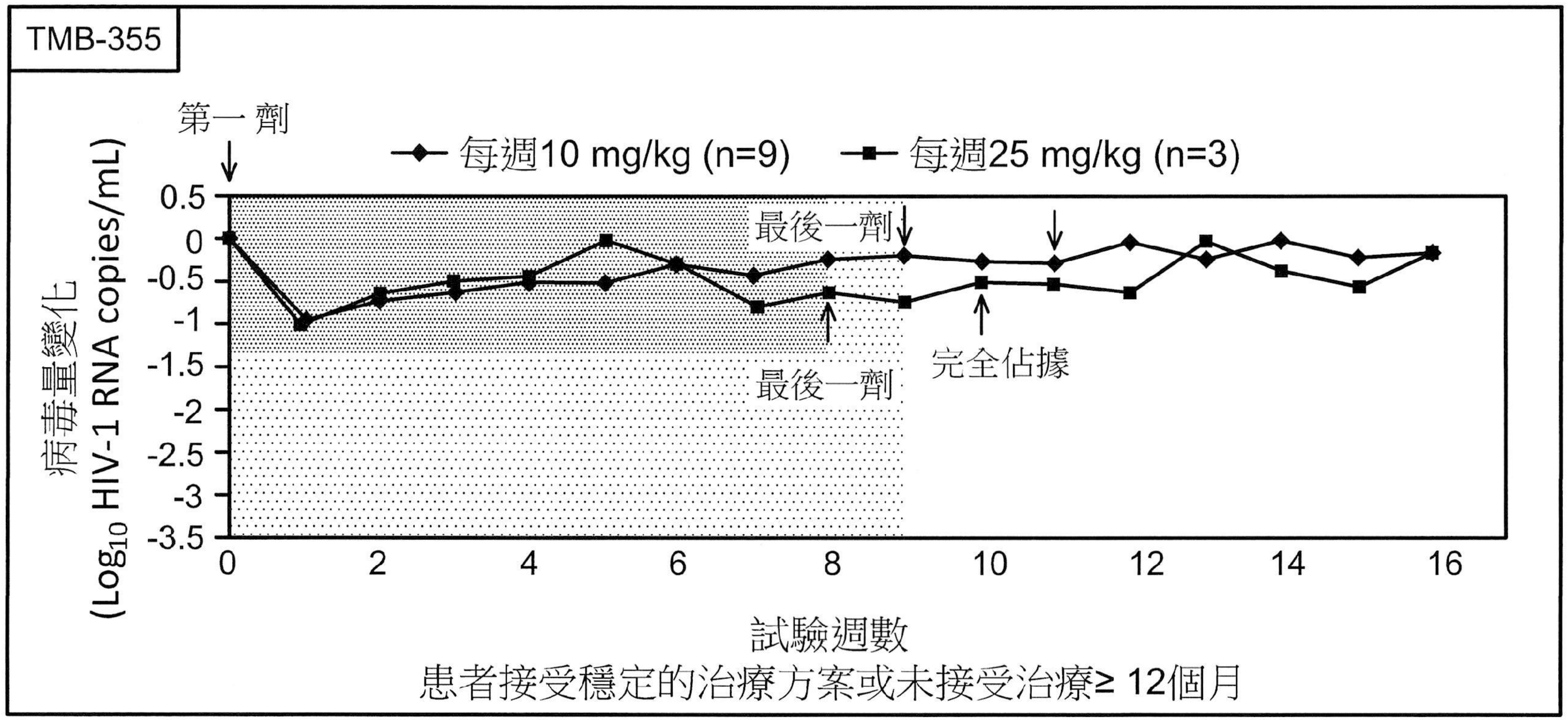
第 25C 圖


病毒量下降和dB4C7-Alexa結合
病毒量變化
(Log10 HIV-1 RNA copies/mL)
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
-3.5
dB4C7-Alexa結合的細胞%
30
25
20
15
10
5
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
訪視次數
病毒量變化
dB4C7-Alexa-cell %
UB-421輸注
UB-421濃度(μg/mL)
UB-421結合的持續時間

第 25D 圖


UB-421
第一劑
每週10 mg/kg (n=3)
每週25 mg/kg (n=6)
最後一劑
最後一劑
病毒量變化
(Log10 HIV-1 RNA copies/mL)
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
-3.5
0
2
4
6
8
10
12
14
16
試驗週數
未使用治療藥物的患者具有病毒量≥5,000 copies/mL

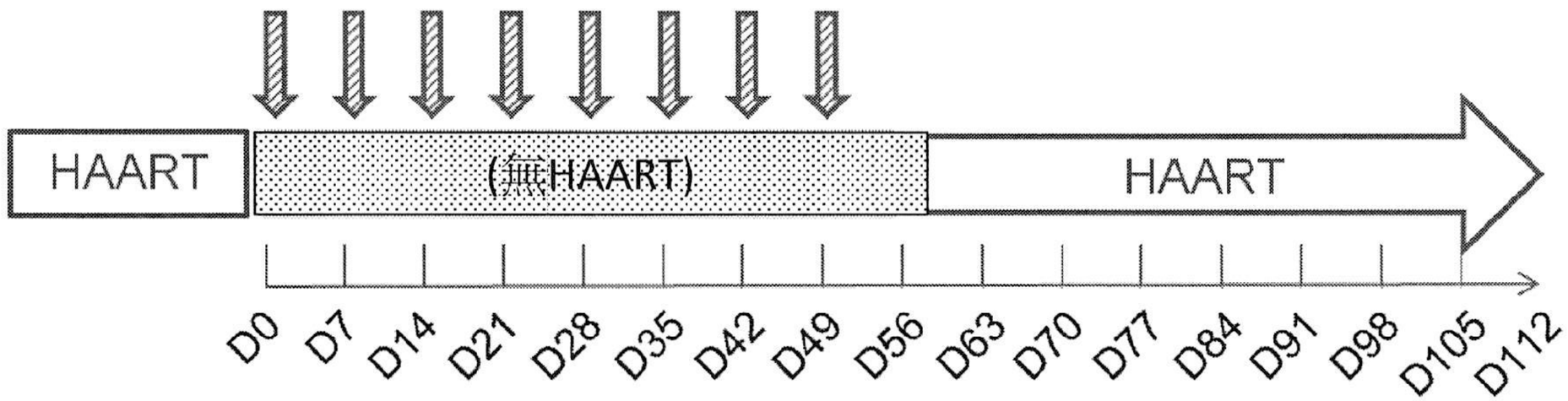
第 26A 圖


TMB-355
第一劑
每週10 mg/kg (n=9)
每週25 mg/kg (n=3)
最後一劑
最後一劑
完全佔據
病毒量變化
(Log10 HIV-1 RNA copies/mL)
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
-3.5
0
2
4
6
8
10
12
14
16
試驗週數
患者接受穩定的治療方案或未接受治療≥ 12個月

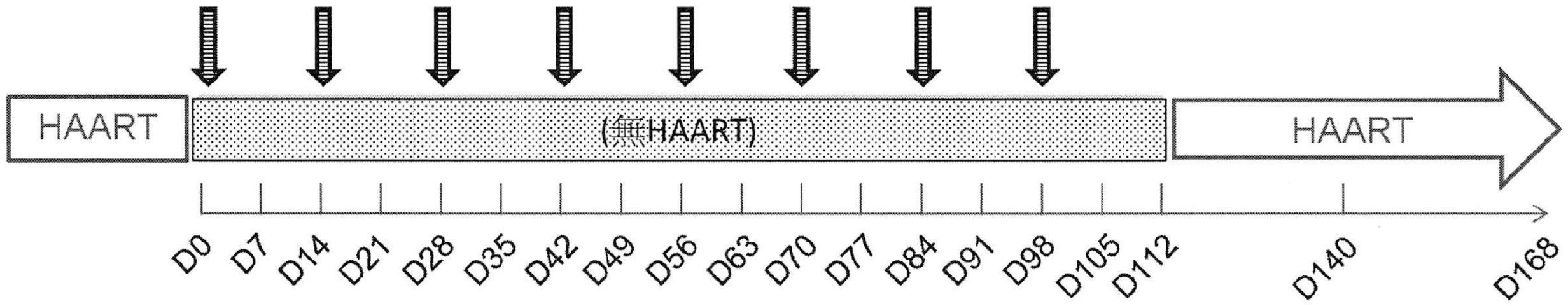
第 26B 圖

UB-421 單一藥物治療作為HAART替代療法

治療方案1 (為期8週，每週10 mg/kg UB-421，約10個受試者)

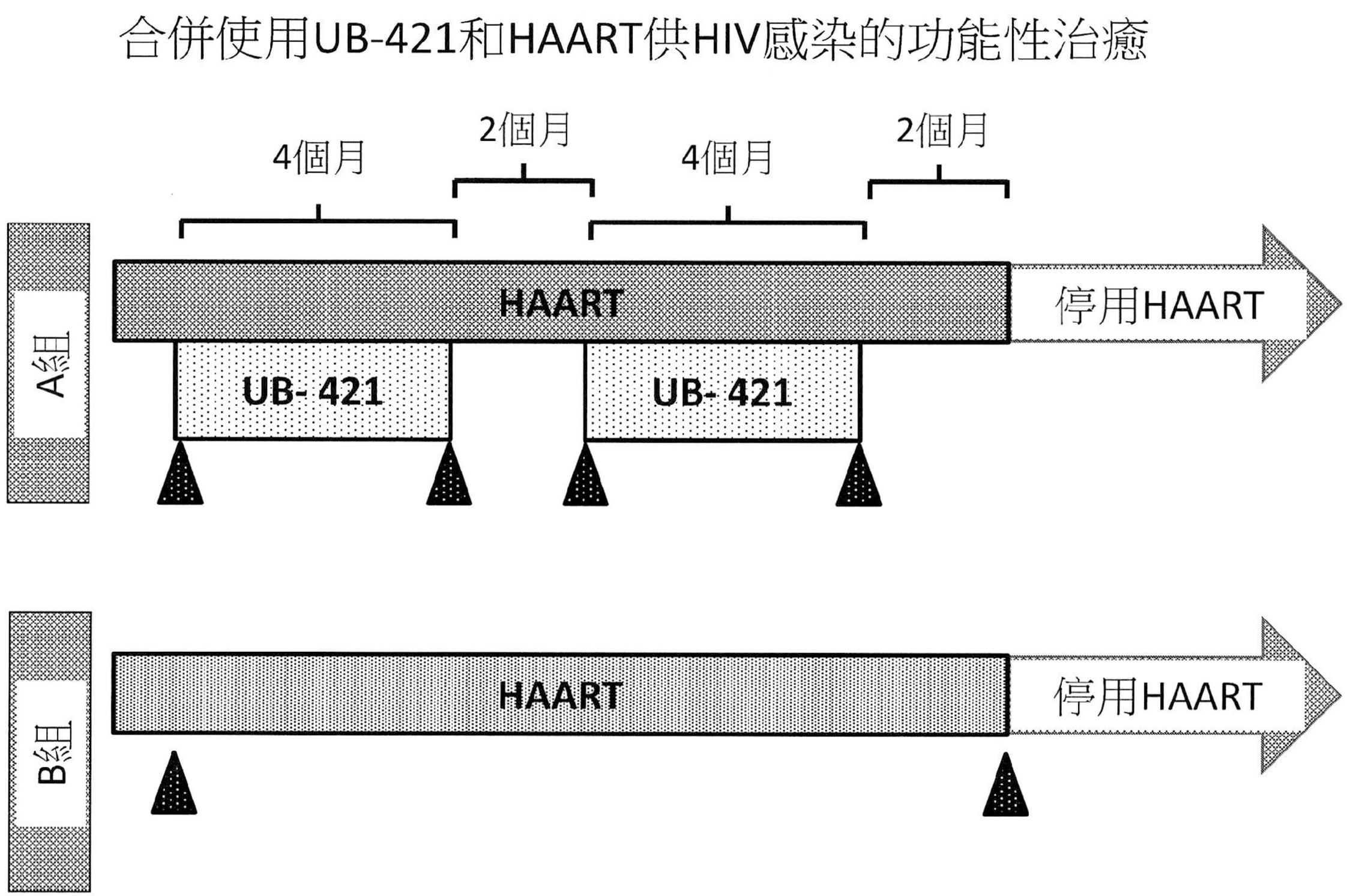


治療方案2 (為期16週，每兩週25 mg/kg UB-421，約10個受試者)



10 mg/kg UB-421輸注(+治療前給藥)　　25 mg/kg UB-421輸注(+治療前給藥)

第 27 圖


合併使用UB-421和HAART供HIV感染的功能性治癒
4個月
2個月
4個月
2個月
A組
HAART
停用HAART
UB- 421
UB- 421
B組
HAART
停用HAART

第 28 圖