[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780035346.3

[43] 公开日 2009 年 8 月 26 日

[11] 公开号 CN 101516914A

[22] 申请日 2007.9.25
[21] 申请号 200780035346.3
[30] 优先权
[32] 2006. 9.29 [33] EP [31] 06020646.3
[86] 国际申请 PCT/EP2007/008312 2007.9.25
[87] 国际公布 WO2008/037419 英 2008.4.3
[85] 进入国家阶段日期 2009.3.24
[71] 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 约翰内斯·奥尔 莫妮卡·贝纳
迈克尔·布朗特
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 柳春琦
权利要求书 3 页 说明书 27 页 序列表 9 页

[54] 发明名称

针对 CCR5 的抗体及其应用

[57] 摘要

结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述重链可变结构域包括 SEQ ID NO：1 的氨基酸序列，并且具有治疗免疫抑制疾病的有利性质。

1 结合 CCR5 的抗体，其特征在于重链可变结构域包括 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列：

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

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

2.根据权利要求 1 的结合 CCR5 的抗体，其特征在于轻链可变结构域包括 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列：

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

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

3.根据前述权利要求任一项的结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述抗体包括重链可变结构域，所述重链可变结构域选自 SEQ ID NO: 6, 7 或 8，或其 CCR5-结合片段。

4. 根据前述权利要求任一项的结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述抗体包括轻链可变结构域，所述轻链可变结构域选自 SEQ ID NO: 9 或 10，或其 CCR5-结合片段。

5. 根据权利要求 3 或 4 任一项的结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述抗体包括重链可变结构域，所述重链可变结构域选自 SEQ ID NO: 6, 7 或 8，或其 CCR5 结合片段，并且特征在于包括轻链可变结构域，所述轻链可变结构域选自 SEQ ID NO: 9 或 10，或其 CCR5-结合片段，其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域彼此独立地选择。

6. 根据前述权利要求任一项的结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述抗体包括人源的恒定区。

7. 根据权利要求 6 的结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述重链恒定区是在 C_H1 和 C_H2 之间的氨基酸位置 216-240 的铰链区修饰的人 IgG4 同种型或人 IgG1 同种型的重链恒定区和/或在 C_H2 和 C_H3 之间的在氨基酸位置 327-331 的第二结构域间区域修饰的人 IgG4 同种型或人 IgG1 同种型的重链恒定区。

8. 根据权利要求 6 的结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述抗体包括 SEQ ID NO: 3 或 4 的重链恒定区并包括 SEQ ID NO: 5 的轻链恒定区。

9. 根据权利要求 6-8 任一项的结合 CCR5 的抗体，其特征在于所述抗体是人 IgG1 同种型的抗体，并包括突变 L234A 和 L235A，或所述抗体是包括突变 S228P 的人 IgG 4 同种型的抗体。

10. 药物组合物，其包括药物有效量的根据权利要求 1 或 2 的任一项的抗体。

11.制备药物组合物的方法，所述药物组合物包括药物有效量的根据权利要求 1 或 2 的任一项的抗体。

12.权利要求 1 或 2 的任一项的抗体用于制备药物组合物的应用。

13.根据权利要求 1 或 2 任一项的抗体，用作药物。

14.根据权利要求 1 或 2 任一项的抗体，用于治疗免疫抑制疾病。

15. 权利要求 1 或 2 的任一项的抗体用于制备治疗免疫抑制疾病的药物的应用。

16.治疗患有免疫抑制疾病的患者的方法，其特征在于向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求 1 或 2 的任一项的抗体。

17.编码能够与第二多肽一起组装的多肽的核酸，其中所述第二多肽包括选自 SEQ ID NO: 2, 5 的多肽的组的多肽，其中所述多肽包括 SEQ ID NO: 1, 6, 7 或 8 的氨基酸序列。

18. 编码结合 CCR5 的抗体的链的核酸，其特征在于所述编码的链能够与各个其它抗体链一起组装以形成根据权利要求 1 或 2 的任一项的结合 CCR5 的抗体分子。

19. 编码根据权利要求 1 或 2 任一项的结合 CCR5 的抗体的核酸。

20. 真核细胞，其包括根据权利要求 19 的核酸。

21.生产根据权利要求 1 或 2 任一项的重组人或人源化抗体的方法，其特征在于根据权利要求 19 的核酸在原核或真核宿主细胞中表达并且所述重组抗体从所述细胞或细胞培养上清液中回收。

针对 CCR5 的抗体及其应用

本发明涉及针对 CCR5 的抗体，生产它们的方法，包含所述抗体的药物组合物，及其应用。

在过去数年间，已经出现了关于 HIV-1 利用特异性机制进入靶细胞的越来越多的理解。这推动了开发攻击该过程中的离散步骤的药物的尝试。最近已经批准了靶向进入的首个药物用于临床应用(enfuvirtide, T20; Lazzarin, A., 等, N. Engl. J. Med（新英格兰药物杂志）. 348 (2003) 2186-2195)。Enfuvirtide 是在趋化因子受体结合后的阶段阻断融合的肽药物。

HIV-1 感染由在病毒包膜糖蛋白(Env)和包括 CD4 加趋化因子受体的细胞受体复合物之间的相互作用所启动(Pierson, T.C.和 Doms, R.W., Immuno. Lett（免疫通讯）. 85 (2003) 113-118; Kilby, J.M.和 Eron, J.J., N. Engl. J. Med（新英格兰药物杂志）. 348 (2003) 2228-2238)。Env 具有两个亚基：表面糖蛋白 gp 120，其与细胞 CD4 受体相互作用并且其与病毒跨膜亚基 gp 41 非共价的缔合。Gp 41 将 gp 120 锚定到病毒膜上并且还为融合负责。gp 120 与细胞上的 CD4 的结合引发构象变化，所述构象变化暴露或产生这样的结合位点，其使 gp 120 能够与细胞表面趋化因子受体，即“辅助受体”相互作用。趋化因子受体是 7 个跨膜 G-蛋白偶联受体(7 TM GPCRs)，其在正常情况下响应于趋化因子，炎症和其它功能传递信号，所述趋化因子是具有趋化性的小的细胞因子。

临床应用中的大部分的药物针对其它的 7 TM GPCRs，并且这样靶向这些分子以阻断病毒进入是过去的药物开发程序的最成功类型的延伸。HIV-1 分离株需要 CD4 和辅助受体进入并且感染细胞。人 CC 趋化因子受体 CCR5 是巨噬细胞-向性(R5)株的辅助受体并且在 HIV-1 的性传递中具有关键作用(Berger, E.A., AIDS 11 (Suppl. A) (1997) 3-16; Bieniasz, P.D. 和 Cullen, B.R., Frontiers in Bioscience (生物科学的前沿) 3 (1998) d44-d58;

Littman, D.R., Cell（细胞） 93 (1998) 677-680)。

人 CCR5(也称为“CCR5”)由大部分 HIV-1 原代分离物使用并且对于建立和维持感染是关键的。此外，CCR5 功能对于人类健康不是必要的。突变型 CCR5 等位基因，“CCR5 △ 32”编码截短的无功能的蛋白 (Samson, M., 等, Nature （自然）382 (1996) 722-725; Dean, M., 等, Science（科学）273 (1996) 1856-1862)。对于突变纯合的个体缺乏 CCR5 表达并且被强保护免于 HIV-1 感染。它们显示没有明显的表型结果并且对 M 向性 HIV 感染具有高度抗性，而杂合子个体表现延迟的疾病进展(Schwarz, M.K.和 Wells, T.N., Nat. Rev. Drug Discov.（自然药物发现综述） 1 (2002) 347-358)。CCR5 的缺乏不会带来明显的不利后果，这可能是因为 CCR5 是作为α趋化因子 MIP-1α, MIP-1ß, 和 RANTES 的受体的高丰度趋化因子网络的部分，α-趋化因子 MIP-1α、MIP-1ß、和 RANTES 共享很多重叠的功能，并且其大部分具有备选的受体(Rossi, D.和 Zlotnik, A., Annu. Rev. Immunol.（免疫学每年综述） 18 (2000) 217-242)。将 CCR5 鉴定为 HIV-1 共同受体是基于其配体 MIP-1α，MIP-1ß 和 RANTES 阻断 R5 而不是 R5X4 或 X4 分离物的感染的能力 (Cocchi, F., 等, Science（科学） 270 (1995) 1811-1815)。

CCR5 还是“成簇”趋化因子的受体，所述“成簇”趋化因子主要在炎性反应过程中产生，并且控制嗜中性粒细胞、巨噬细胞和 T 细胞亚型（T 辅助 Th1 和 Th2 细胞）的募集。例如，Th1 反应典型地是包括有效抗病毒和肿瘤的细胞介导的免疫的那些，而 Th2 反应被认为是过敏症中的关键因素。因此，这些趋化因子受体的抑制剂可以有效用作免疫调节剂。对于 Th1 反应，例如，在包括类风湿性关节炎的自体免疫中，消除过分活跃的反应，或者，对于 Th2 反应，减少哮喘发作或过敏反应，包括遗传性过敏性皮炎(参见，例如，Schols, D., Curr. Top. Med. Chem. 4 (2004) 883-893; Mueller, A., 和 Strange, P.G., 国际生物化学和细胞生物学杂志（Int. J. Biochem. Cell Biol.）36 (2004) 35-38; Kazmierski, W.M., 等, 现代药物靶点感染病症（Curr. Drug Targets Infect. Disord.）2 (2002) 265-278; Lehner, T., 免疫学趋势（Trends Immunol.）23 (2002) 347-351)。

针对 CCR5 的抗体是，例如，PRO 140 (Olson, W.C., 等, J. Virol.（病

毒学杂志） 73 (1999) 4145-4155), 和 2D7 (Samson, M., 等, 生物化学杂志（J. Biol. Chem.）272 (1997) 24934-24941)。其它的抗体在下列各项中提到：WO 2006/103100, US 2004/0043033, US 6,610,834, US 2003/0228306, US 2003/0195348, US 2003/0166870, US 2003/0166024, US 2003/0165988, US 2003/0152913, US 2003/0100058, US 2003/0099645, US 2003/0049251, US 2003/0044411, US 2003/0003440, US 6,528,625, US 2002/0147147, US 2002/0146415, US 2002/0106374, US 2002/0061834, US 2002/0048786, US 2001/0000241, EP 1 322 332, EP 1 263 791, EP 1 207 202, EP 1 161 456, EP 1 144 006, WO 2003/072766, WO 2003/066830, WO 2003/033666, WO 2002/083172, WO 02/22077, WO 01/58916, WO 01/58915, WO 01/43779, WO 01/42308。

本发明的目的是提供针对 CCR5 的新的抗体，其主要用作针对 AIDS 的治疗剂。

发明概述

本发明包括与 CCR5 结合的抗体，其特征在于重链可变结构域包括下式的氨基酸序列：

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

其中

X01 是 Lys 或 Gln,

X02 是 Gln 或 Glu,

X03 是 Arg 或 Lys,

X04 是 Leu 或 Pro,

X05 是 Met 或 Lys,

X06 是 Ile 或 Thr,

X07 是 Ser 或 Thr,

X08 是 Ile 或 Thr

(SEQ ID NO:1)。

优选地，所述抗体特征在于所述抗体的轻链可变结构域包括下式的氨基酸序列：

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

其中

X10 是 Ile 或 Ala,

X11 是 Phe 或 Tyr,

X12 是 Gln 或 Pro,

X13 是 Ser 或 Ala,

X14 是 Gln 或 Lys,

X15 是 Val 或 Ile,

X16 是 Gln 或 Asp,

X17 是 Ser 或 Thr,

X18 是 Leu 或 Ala,

X19 是 Lys 或 Thr,

X20 是 Asn 或 Ser,

X21 是 Leu 或 Ala,

X22 是 Gly 或 Ala,

X23 是 Asn 或 Thr,

X24 是 Leu 或 Val

(SEQ ID NO: 2)。

优选地，所述抗体的特征在于是人 IgG4 同种型的抗体或人 IgG1 同种型的抗体，所述 IgG1 同种型任选地在 C_H1 和 C_H2 之间的氨基酸位置 216-240 的铰链区修饰和/或在 C_H2 和 C_H3 之间的氨基酸位置 327-331 的第二结构域间区域进行修饰。

本发明优选的实施方案是包括根据本发明的抗体的药物组合物。

本发明优选的实施方案是根据本发明的抗体用于制备药物组合物的应用。

本发明优选的实施方案是制备包括根据本发明的抗体的药物组合物的方法。

本发明优选的实施方案是编码能够与第二多肽组装在一起的多肽的核酸，其中所述第二多肽包括选自 SEQ ID NO: 2, 5 的多肽的组的多肽，并且其中所述多肽包括 SEQ ID NO: 1, 6, 7 或 8 的氨基酸序列。

本发明优选的实施方案是治疗患有免疫抑制疾病的患者的方法，其特征在于向所述患者施用治疗有效量的根据本发明的抗体。

根据本发明的抗体优选地特征在于所述抗体结合 CCR5 并且包括可变重链或轻链结构域，其选自可变结构域，所述结构域包括 SEQ ID NO: 6, 7, 8 的重链可变结构域，SEQ ID NO: 9, 10 的轻链可变结构域，或其 CCR5 结合片段。

根据本发明的抗体优选地特征在于包含作为重链可变结构域的重链可变结构域，其选自 SEQ ID NO: 6, 7 或 8 的重链可变结构域，或其 CCR5 结合片段，和特征在于包含作为轻链可变结构域的轻链可变结构域，其选自 SEQ ID NO: 9 或 10 的轻链可变结构域，或其 CCR5 结合片段，其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域彼此独立地选择。

根据本发明的抗体优选地特征在于所述重链可变结构域包括选自由 SEQ ID NO: 6, 7, 8 的重链可变结构域氨基酸序列组成的组的氨基酸序列，更精确地所述抗体包括选自 SEQ ID NO: 6, 7 或 8 的重链可变结构域，或其 CCR5 结合片段。

根据本发明的抗体优选地特征在于轻链可变结构域包括选自由 SEQ ID NO: 9, 10 的轻链可变结构域氨基酸序列组成的组的氨基酸序列，更精

确地所述抗体包括选自 SEQ ID NO: 9,或 10 的轻链可变结构域或其 CCR5 结合片段的氨基酸序列。

根据本发明的抗体优选地特征在于恒定区(轻链和重链)是人起源的。这样的恒定区(链)是现有技术中公知的并例如由 Kabat 所描述(见，例如. Johnson, G.和 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. (核酸研究) 28 (2000) 214-218)。例如，有效的人重链恒定区包括独立选自由 SEQ ID NO: 3, 4 组成的组的氨基酸序列。例如，有效的人轻链恒定区包括 SEQ ID NO: 5 的 κ 轻链恒定区的氨基酸序列。进一步优选的是所述抗体是小鼠起源的并且包括根据 Kabat 的小鼠抗体的抗体可变序列构架(见例如，Johnson, G.和 Wu, T.T., Nucleic Acids Res.（核酸研究） 28 (2000) 214-218)。

所述抗体抑制人 CCR5 的一种或多种功能，如结合 CCR5 的配体，信号传导活性(例如，活化哺乳动物 G 蛋白，诱导快速和瞬时的细胞质游离 Ca^{2+}浓度增加，和/或刺激细胞反应(例如刺激趋化性，胞吐作用或白细胞的炎性介质释放，整联蛋白激活))。所述抗体抑制 RANTES, MIP-1 α，MIP-1 β和/或 HIV 与人 CCR5 的结合并且抑制由人 CCR5 介导的功能，如白细胞运输，HIV 进入细胞，T 细胞激活，炎性介质释放和/或白细胞脱粒。

根据本发明的抗体特异性结合人 CCR5 并且在测定中以 4.0 μg/ml 或更低的 IC_{50} 值抑制 HIV 与靶细胞的融合，所述测定包括使所述靶细胞在存在病毒的情况下与抗体接触，所述抗体浓度有效抑制病毒和所述细胞之间的膜融合。

根据本发明的抗体特异性结合 CCR5，并且以 1.5 μg/ml 或更低，优选地 0.3 μg/ml 或更低的 IC_{50} 值抑制第一共表达 CCR5 和 CD4 多肽的细胞和第二表达 HIV env 蛋白的细胞之间的膜融合。

根据本发明的抗体特异性结合 CCR5，并且在测定中以 1.5 μg/ml 或更低的 IC_{50} 值抑制靶细胞的细胞反应的刺激，优选地抑制迁移，所述测定包括使所述靶细胞与抗体在存在 RANTES, MIP-1 α，和/或 MIP-1 β 的情况下接触。

根据本发明的抗体优选地在多达 100 μg/ml 的抗体浓度在结合测定中

不抑制趋化因子与 CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR6, 和 CXCR4 的结合。

根据本发明的抗体优选地在多达 50 μg/ml 的抗体浓度不刺激在表达 CCR5 和 Gα16 的 CHO 细胞中检测的细胞内 Ca^{2+}增加。

根据本发明的抗体优选地是人同种型 IgG1, IgG2, IgG3,或 IgG4，其中优选 IgG1 或 IgG4。

根据本发明的抗体优选地是 IgG4 同种型。根据本发明的抗体优选地是 IgG1 同种型。根据本发明的抗体优选地是具有突变 S228P 的 IgG4 同种型。根据本发明的抗体，即，重链和轻链恒定区是在 C_H1 和 C_H2 之间约氨基酸位置 216-240 的铰链区修饰的，优选地在 C_H1 和 C_H2 之间约氨基酸位置 220-240 的铰链区修饰的 IgG1 或 IgG4 同种型的重链和轻链恒定区(Angal, S., 等, Mol. Immunol.(分子免疫学) 30 (1993) 105-108)，和/或在 C_H2 和 C_H3 之间的约氨基酸位置 327-331 的第二结构域间区域修饰的 IgG1 或 IgG4 同种型的重链和轻链恒定区(根据 Kabat 编号，见例如 Johnson, G.和 Wu, T.T., Nucleic Acids Res.(核酸研究) 28 (2000) 214-218)。所述修饰减少或避免效应子功能(ADCC 和/或 CDC)。IgG 类别的转换可以通过所述抗体的重链恒定区和轻链恒定结构域与来自需要类别的抗体如 IgG1 突变体或 IgG4 的那些进行交换而进行。所述方法在现有技术中是公知的。

根据本发明的抗体优选地特征在于人亚类 IgG1，在 L234 中包含至少一个突变（在氨基酸位置 234 的亮氨酸），L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 和/或 P329 (根据 EU 索引编号)。优选地，所述抗体是包括突变 L234A（丙氨酸取代在氨基酸位置 234 处的亮氨酸）和 L235A 的人 IgG1 同种型的抗体。根据本发明的抗体优选地特征在于是在位置 S228 包含突变的人 IgG4 同种型的抗体。

因此，本发明在一方面涉及抗体，特征在于所述抗体结合 CCR5，包含来自人起源的 Fc 部分，并且不结合人补体因子 C1q 和/或激活补体因子 C3。优选地，所述抗体显示与人 Fcγ受体的减少的结合或不与其结合。

本发明还包括根据本发明的编码抗体链，可变结构域或其 CDR 的核酸分子。编码的多肽能够与各个其它的抗体链组装在一起以得到根据本发明的针对 CCR5 的抗体分子。

本发明还提供包含根据本发明的所述核酸并能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸的表达载体，以及包含所述载体用于重组生产所述抗体的宿主细胞。

本发明还包括包含根据本发明的载体的原核或真核宿主细胞。

本发明还包括生产根据本发明的重组人或人源化抗体的方法，其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达根据本发明的核酸并且从所述细胞或细胞培养物上清中回收所述抗体。本发明还包括可由所述重组方法获得的抗体。

根据本发明的抗体显示对于需要 CCR5 靶向治疗的患者的益处。根据本发明的抗体具有新的和创造性的性质，其导致对于患有所述疾病的患者的益处，尤其是对于患有免疫抑制的患者，尤其是对于患有 HIV 感染的患者的益处。

本发明还提供治疗患有免疫抑制的患者，尤其是患有 HIV 感染的患者的方法，所述方法包括向诊断患有所述疾病（并且因此需要所述治疗）的患者施用有效量的根据本发明的与 CCR5 结合的抗体。所述抗体优选地在药物组合物中施用。

本发明还包括根据本发明的抗体作为药物用于治疗免疫抑制疾病，优选地用于治疗 HIV 感染，用于治疗患有免疫抑制的患者，以及用于制备根据本发明的药物组合物的应用。此外，本发明包括制备根据本发明的药物组合物的方法。

本发明还包括药物组合物，其包含药物有效量的根据本发明的抗体，以及任选地用于配制药用目的的抗体的缓冲液和/或佐剂。

本发明还提供在药用载体中包含所述抗体的药物组合物。在一个实施方案中，所述药物组合物可以包含在生产的制品或试剂盒中。

因此，本发明的一个方面是根据本发明的抗体用作药物。本发明的另一个方面是根据本发明的抗体用于治疗免疫抑制疾病。另外一方面是根据本发明的抗体用于制备治疗免疫抑制疾病的药物的应用。

发明详述

术语“抗体”包括各种形式的抗体结构，其包括但不限于完整的抗体，和抗体片段。根据本发明的抗体优选地是人源化的抗体，嵌合抗体，或另外遗传改造的抗体，只要保留了根据本发明的特征性性质。

“抗体片段”包括全长抗体的一部分，优选的是抗体的可变结构域，或至少是它的抗原结合位点。抗体片段的实例包括双抗（diabodies），单链抗体分子，免疫毒素和形成自抗体片段的多特异性抗体。scFv 抗体例如描述在 Huston, J.S., Methods in Enzymol(酶学方法). 203 (1991) 46-88 中。此外，抗体片段包括具有 V_H 结构域特征的单链多肽，即能够与 V_L 结构域在一起组装成功能性抗原结合位点，或具有结合于 CCR5 的 V_L 结构域的特征，即能够与 V_H 结构域一起组装成功能性抗原结合位点，由此提供抑制与靶细胞的膜融合或 HIV 融合的性质。

术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”用于本文时指单氨基酸组成的抗体分子的制备物。术语“嵌合抗体”指包括来自小鼠的可变结构域，即结合区和来自不同的来源或物种的恒定区的至少一部分的单克隆抗体，其通常由重组 DNA 技术制备。包括小鼠可变结构域和人恒定区的嵌合抗体是特别优选的。所述小鼠/人嵌合抗体是表达的免疫球蛋白基因的产物，其包括编码小鼠免疫球蛋白可变结构域的 DNA 片段和编码人免疫球蛋白恒定区的 DNA 片段。本发明涵盖的其他形式的“嵌合抗体”是其中类别或亚类已经被从原始抗体的类别或亚类修饰或转变的那些。所述“嵌合”抗体也称为“类别转换抗体”。生产嵌合抗体的方法包括本领域公知的常规重组 DNA 和基因转染技术。见例如 Morrison, S.L., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 81 (1984) 6851-6855; 美国专利号. 5,202,238 和 5,204,244。

术语“人源化抗体”指与母体免疫球蛋白相比，其中构架和/或“互补决定区(CDR)”已经被修饰以包括不同物种的免疫球蛋白的 CDR 的抗体。在优选的实施方案中，小鼠 CDR 被移植到人抗体的构架区以制备“人源化抗体”。见例如 Riechmann, L., 等, Nature（自然）332 (1988) 323-327; 和

Neuberger, M.S., 等, 自然 314 (1985) 268-270。特别优选的 CDRs 对应于那些代表性序列，其识别上述关于嵌合和双功能性抗体的抗原。

术语“与 CCR5 结合”用于本文时，意味着在基于细胞的体外 ELISA 测定中抗体与 CCR5 的结合 (CCR5 表达细胞, 例如转化的 CHO 细胞，L1.2 细胞)。如果在 100 ng/ml 的抗体浓度，抗体导致 5 或更多的 S/N (信号/噪声)，优选地 10 或更多的 S/N (信号/噪声)比率则发现结合。

术语“七跨膜趋化因子分子结构”用于本文时指当其位于细胞膜双层时，CCR5 显示的天然结构(见，例如, Oppermann, M., Cell. Sig.(细胞信号) 16 (2004)1201-1210)。如其它 G 蛋白偶联受体(例如，G 蛋白-偶联受体 1b)，CCR5 由细胞外 N 端结构域，跨膜结构域和细胞质 C 端结构域组成。跨膜结构域由通过三个细胞质和三个细胞外片段连接的七个疏水跨膜片段组成。根据本发明的抗体在其七跨膜趋化因子分子结构中与 CCR5 结合。

术语“表位”意指能够特异性结合抗体的蛋白决定子。表位通常由分子的化学活性表面基团组成，诸如氨基酸或糖侧链，并且通常表位具有特异性的三维结构特征，以及特异性的电荷特征。构象和非构象的表位的区分在于存在变性溶剂的条件下，失去与前者的结合而不是与后者的结合。优选地，本发明所述的抗体特异性结合天然的而不是变性的 CCR5。

术语“膜融合” 指在共表达 CCR5 和 CD4 多肽的第一细胞与表达 HIV env 蛋白的第二细胞之间的融合。膜融合通过萤光素酶报告基因测定来确定。

术语“抑制 HIV 与靶细胞的融合”指在测定中测量的抑制 HIV 与靶细胞的融合，所述测定包括使靶细胞在存在所述病毒的情况下与抗体接触，所述抗体的浓度有效抑制病毒和所述细胞之间的膜融合，和测量萤光素酶报道基因活性。

“可变结构域”（(轻链) (V_L)的可变结构域，重链(V_H)的可变结构域）用于本文时指直接涉及抗体与抗原结合的轻链和重链结构域对的每一个。可变轻链结构域和可变重链结构域具有相同的一般结构并且每个结构域包括四个构架区(FR)，其序列是广泛保守的，通过三个“高变区”（或互补决定区，CDRs）连接。所述构架区采取β-折叠构象并且 CDRs 可以形成

连接β-折叠结构的环。每条链中的 CDRs 通过构架区保持它们的三维结构并且与来自其它的链 CDRs 形成抗原结合位点。所述抗体的重链和轻链 CDR3 区在根据本发明的抗体的结合特异性/亲和性中具有特别重要的作用并且因此提供本发明的另外的目的。

根据本发明的抗体优选地特征在于所述抗体包括重链可变结构域和轻链可变结构域，其选自由下列各项组成的组合的组中：

a) 由 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列定义的重链可变结构域和由 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列定义的轻链可变结构域；

b) 由 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列定义的重链可变结构域以及由 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列定义的轻链可变结构域；

c) 由 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列定义的重链可变结构域和由 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列定义的轻链可变结构域；

d) 由 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列定义的重链可变结构域和由 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列定义的轻链可变结构域;

e) 由 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列定义的重链可变结构域和由 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列定义的轻链可变结构域;

f) 由 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列定义的重链可变结构域和由 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列定义的轻链可变结构域。

术语“抗体的抗原结合部分”当用于本文时指对抗原结合负责的抗体的氨基酸残基。抗体的抗原结合部分包括来自“互补决定区”或“CDRs”的氨基酸残基。“构架”或“FR”区是除了本文定义的高变区残基的那些可变结构域区。因此，抗体的轻链和重链可变结构域从 N 端到 C 端包括结构域 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 和 FR4。特别地，重链的 CDR3 是对抗原结合贡献最大的区域并且限定抗体的性质。CDR 和 FR 区按照 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest（免疫目的蛋白质的序列）, 第 5 版, 公共健康服务（Public Health Service）, 美国全国卫生研究所（National Institutes of Health）, Bethesda, MD，公开号 91-3242 (1991)的标准定义和/ 或来自“高变环”的那些残基确定。

术语“核酸”或“核酸分子”用于本文时，倾向于包括 DNA 分子和

RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，但是优选地是双链 DNA。

当在本申请中应用时，术语“氨基酸”表示天然存在的羧基α-氨基酸，其包括丙氨酸 (三字母密码: ala, 单字母密码: A), 精氨酸 (arg, R), 天冬酰胺 (asn, N), 天冬氨酸(asp, D), 半胱氨酸 (cys, C), 谷氨酰胺 (gln, Q), 谷氨酸(glu, E), 甘氨酸(gly, G), 组氨酸(his, H), 异亮氨酸(ile, I), 亮氨酸(leu, L), 赖氨酸 (lys, K), 甲硫氨酸(met, M), 苯丙氨酸(phe, F), 脯氨酸(pro, P), 丝氨酸 (ser, S), 苏氨酸(thr, T), 色氨酸(trp, W), 酪氨酸(tyr, Y), 和缬氨酸(val, V)。

当将核酸置于与另一个核酸的功能关系中时，所述核酸是“可操作性地连接”。例如，前序列或分泌前导序列的 DNA 与多肽的 DNA 可操作性地连接，如果其作为参与多肽分泌的前蛋白表达的话；启动子或增强子与编码序列可操作性地连接如果其影响所述序列的转录的话；或核糖体结合位点与编码序列可操作性地连接如果其定位有利于翻译的话。一般而言，“可操作性地连接”指连接的 DNA 序列是共线性的，并且在分泌前导序列的情况中，是连续的并且在阅读框中。然而，增强子不必是连续的。连接通过在适合的限制性位点的连接反应实现。如果所述位点不存在，根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

用于本文时，表述“细胞”，“细胞系”和“细胞培养物”交替使用并且所有这样的定义包括子代。因此，短语“转化子”和“转化细胞”包括原代目标细胞和来自其不管经过多少次转移的培养物。还要理解所有的子代不可能在 DNA 内容物上精确地相等，这是因为故意或无意的突变。包括筛选的与原始转化的细胞具有相同的功能或生物活性的变体子代。

抗体的“Fc 部分”不直接涉及抗体与抗原的结合，但是显示不同的效应子功能。根据它们重链的恒定区的氨基酸序列，抗体或免疫球蛋白被分成数类：IgA, IgD, IgE, IgG, 和 IgM, 并且这些中的一些可以被进一步分成亚类(同种型)，例如 IgG 分成 IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4，IgA 分成 IgA1 和 IgA2。根据重链恒定区，免疫球蛋白的不同种类分别被称为 α δ ε γ 和 μ 。根据本发明的抗体优选地是 IgG 类型的。

用于本文时，术语“衍生自人起源的 Fc 部分”指亚类 IgG4 的人抗体

的 Fc 部分或亚类 IgG1, IgG2,或 IgG3 的人抗体的 Fc 部分，包括其突变形式。优选地，亚类 IgG1, IgG2,或 IgG3 的人抗体的 Fc 部分以这样的方式修饰，其使如下面定义的减少或无 Fcγ受体(FcγR, 即 FcγRIIIa)结合和/或减少或无 C1q 结合可以关于无修饰的 Fc 部分检测。“抗体的 Fc 部分”是熟练的技术人员公知的术语，并且是依据抗体的木瓜蛋白酶分解而定义的。本发明所述的抗体包含来源于人源的 Fc 部分作为 Fc 部分和优选地人恒定区的所有其他部分。优选地，Fc 部分是人 Fc 部分并且尤其优选来自人 IgG4 亚类或来自人 IgG1 亚类的 Fc 部分，或来自人 IgG1 亚类的突变的 Fc 部分。最优选的是在 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4，具有突变 L234A 和 L235A 的 SEQ ID NO: 3，具有突变 S228P 的 SEQ ID NO: 4 中显示的 Fc 部分和重链恒定区。

尽管 IgG4 表现出减少的 Fcγ受体(FcγRIIIa)结合，但是其他 IgG 亚类的抗体表现出强结合。然而，Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (无 Fc 碳水化合物), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, 和 His435 是这样的残基，即，如果改变，其也提供减少的 Fc 受体结合(Shields, R.L., 等, J. Biol. Chem.（生物化学杂志）276 (2001) 6591-6604; Lund, J., 等, FASEB J.（FASEB 杂志）9 (1995) 115-119; Morgan, A., 等, Immunology（免疫学）86 (1995) 319-324; EP 0 307 434)。优选地，本发明所述的抗体是关于 IgG4 亚类或 IgG1 或 IgG2 亚类的 Fcγ受体结合，具有 S228，L234, L235, 和/或 D265 的突变, 和/或含有 PVA236 突变。优选的是突变 S228P, L234A, L235A, L235E, 和/或 PVA236(PVA236 意指 IgG1 氨基酸位置 233-236 的氨基酸序列 ELLG (以单字母氨基酸密码表示或者 IgG4 的 EFLG 由 PVA 替代)。特别优选的是 IgG4 的突变 S228P，和 IgG1 的 L234A，L235A。

抗体的 Fc 部分直接参与 ADCC (抗体-依赖性细胞介导的细胞毒性)和 CDC (补体-依赖性细胞毒性)。补体激活(CDC)通过补体因子 C1q 与大部分 IgG 抗体亚类的 Fc 部分结合而起始。C1q 与抗体的结合由在所谓的结合位点的定义的蛋白-蛋白相互作用而引起。这样的 Fc 部分结合位点是本领域现有技术中已知的，并且例如由 Lukas, T.J., 等, J. Immunol.（免疫

学杂志）127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., 和 Cebra, J.J., Mol. Immunol. (分子免疫学) 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., 等, Nature（自然）288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., 等, Mol. Immunol.（分子免疫学）37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., 等, J. Immunol.（免疫学杂志）164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., 等, J. Virol.（病毒学杂志）75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., 等, Immunology（免疫学）86 (1995) 319-324;和 EP 0 307 434。这样的 Fc 部分结合位点特征在于，例如，氨基酸 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 和 P329 (按照 Kabat 的 EU 索引编号)。亚类 IgG1, IgG2, 和 IgG3 的抗体通常表现出补体活化，包括 C1q 和 C3 结合，而 IgG4 不激活补体系统，并且不结合 C1q 和 C3。

即，在其中需要 ADCC 和/或 CDC 的情况中，优选 IgG1 亚类的 Fc 部分，在其中需要减少的或无 ADCC 和/或 CDC 的情况中，优选 IgG4 亚类或修饰的/突变的 IgG1 亚类的 Fc 部分。在一个方面，本发明涉及结合 CCR5 并且显示减少的与 Fcγ受体和/或补体因子 C1q 的结合或不与其结合的抗体。不结合 Fc 受体和/或补体因子 C1q 的抗-CCR5 抗体不引发抗体-依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)，而显示减少的与 Fc 受体和/或补体因子 C1q 的结合的抗-CCR5 抗体显示减少的 ADCC 和/或 CDC。优选地，这种抗体特征在于，它结合 CCR5，包含来源于人源的 Fc 部分，并且不结合 Fc 受体和/或补体因子 C1q 或显示减少的与其的结合。更优选地，这种抗体是人的、或人源的抗体、或 T-细胞抗原消耗(depleted)的抗体。C1q 结合可以按照 Idusogie, E.E., 等, 免疫学杂志（J. Immunol.）164 (2000) 4178-4184 进行测量。如果在这样的测定中，在 492-405 nm 处关于测试抗体的光学密度(OD)低于以 8 μg/ml 抗体浓度的未修饰的野生型抗体 Fc 部分的人 C1q 结合的值的 15%，则发现不了“C1q 结合”。在相同的条件下，减少的“C1q 结合”是未修饰的野生型抗体 Fc 部分的人 C1q 结合的值的 15%-30%范围内。ADCC 可以作为在人 NK 细胞上所述抗体对于人 FcγRIIIa 的结合而进行测量。结合在 20 μg/ml 抗体浓度处确定。“没有 Fcγ受体结合”或“没有 ADCC”意指与人 IgG1 相同的抗体(SEQ ID NO:3)的结合相比，在 20 μg/ml 的抗体浓度处的在人 NK 细

胞上达到与人 FcγRIIIa 的结合的多达 30%。“减少的 Fcγ受体结合”或“减少的 ADCC”意指与人 IgG1 相同的抗体(SEQ ID NO:3)的结合相比，在人 NK 细胞上达到与人 FcγRIIIa 的 30%-多达 60%的结合。

本发明的另一个方面是结合 CCR5 并且还结合 Fc γ 受体和/或补体因子 C1q 的抗体。结合 Fc 受体和/或补体因子 C1q 的抗-CCR5 抗体激发抗体依赖性的细胞的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒性(CDC)。优选地，该抗体特征在于其结合 CCR5，包含来自人源的 Fc 部分，并且还结合 Fc 受体和/或补体因子 C1q。更优选地，该抗体是人或人源化的抗体，或 T 细胞抗原消耗的抗体。C1q 结合可以根据 Idusogie, E.E., 等, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184 测量。ADCC 可以作为抗体与人 NK 细胞上的人 FcγRIIIa 结合进行测量。结合在 20 μg/ml 的抗体浓度进行确定。

另外，根据本发明的抗体包括这样的抗体，其具有不影响或不改变本发明所述的抗体的上述特征的“保守序列修饰”，核苷酸和氨基酸序列修饰（变体抗体）。修饰可以通过本领域已知的标准技术引入，诸如通过定向诱变和 PCR 介导的诱变引入。保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的那些。具有相似侧链的氨基酸残基家族已经在本领域内得到了定义。这些家族包括具有下述氨基酸：具有碱性侧链的氨基酸（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸），具有酸性侧链的氨基酸（例如，天冬氨酸、谷氨酸），具有不带电荷极性侧链的氨基酸（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸），具有非极性侧链的氨基酸（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸），具有 β-分支的侧链的氨基酸（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸），和具有芳香侧链的氨基酸（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，在人抗-CCR5 抗体中预测的非必需氨基酸残基可以优选地由来自同一侧链家族的另一种氨基酸残基替代。因此，“变体”抗-CCR5 抗体，在本发明中是指这样的分子，其在氨基酸序列上与“母体”抗-CCR5 抗体的氨基酸序列不同在于在所述母体抗体的一个或多个可变区中达到 10 个、优选约 2-约 5 个添加、删除、和/或取代。氨基酸取代可以通过基于分子建模的突变进行，如 Riechmann, L.,

等, Nature（自然）332 (1988) 323-327 和 Queen, C., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA（美国国家科学院学报） 86 (1989) 10029-10033 所述。

本发明另一个实施方案是生产不结合 Fcγ 受体和/或 C1q 或显示减少的与 Fcγ 受体和/或 C1q 结合的针对 CCR5 的抗体的方法，其特征在于对编码与 CCR5 结合的人 IgG1 类型抗体的重链的核酸的序列以这样的方式进行修饰，其使所述修饰的抗体不结合或显示减少的与 C1q 和/或 Fcγ 受体的结合，将所述修饰的核酸和编码所述抗体的轻链的核酸插入表达载体，将所述载体插入真核宿主细胞，表达编码的蛋白并且从宿主细胞或上清液中回收。优选地，所述抗体通过“类别转换”，即 Fc 部分的改变或突变(例如从 IgG1 到 IgG4, 和/或 IgG1/IgG4 突变) 修饰，优选地定义为 IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331), IgG1v2 (L234A; L235A), IgG1v3 (S228P; L235E), IgG1x (S228P), IgG4v1 (PVA-236)。GLPSS331 意为突变 E233P, L234V, L235A, δG236, A327G, A330S, P331S。

关于序列的同一性或同源性在本文定义为在比对序列并在需要的情况下引入间隙以获得最大百分比序列同一性后，候选序列与母体序列相同的氨基酸残基的百分比。N 端，C 端或在抗体序列中的内部延伸，缺失或插入不会被理解为影响序列同一性或同源性。变体保留结合人 CCR5 的能力并且优选地具有优越于母体抗体的性质。例如，变体在治疗过程中可以具有减少的副作用。

本文的“母体”抗体是由用于制备变体的氨基酸序列编码的抗体。优选地，母体抗体具有人构架区并且如果存在具有人抗体恒定区或人抗体恒定结构域。例如，母体抗体可以是人源化的或人抗体。

根据本发明的抗体优选地通过重组方式进行生产。所述方法是现有技术中广泛公知的并且包括在原核和真核细胞中的蛋白质表达以及随后分离抗体多肽并且通常纯化到药用纯度。对于蛋白质表达，将编码轻链和重链或其片段的核酸通过标准方法插入表达载体。表达在适合的原核或真核宿主细胞中进行，所述细胞如 CHO 细胞, BHK 细胞, PER.C6®细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, HEK293 细胞, COS 细胞, 酵母,或大肠杆菌（E. coli）细胞, 并且将所述抗体从所述细胞中进行回收(从上清液或在细胞裂解后回

收)。

重组生产抗体是现有技术中公知的并且例如描述在 Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., 等, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol（生物技术）. 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., Arzneimittelforschung-Drug Res. 48 (1998) 870-880 的综述文章中。

抗体可以存在于完整的细胞，在细胞裂解物中或以部分纯化或完全纯化的形式存在。通过标准技术进行纯化以去除其它的细胞成分或其它的污染物，例如其它的细胞核酸或蛋白质，所述技术包括碱/SDS 处理，CsCl 显带法，柱层析，琼脂糖凝胶电泳，和其它本领域中已知的技术。见，Ausubel, F., 等, (ed.) Current Protocols in Molecular Biology（目前在分子生物学中的方法）, Greene Publishing and Wiley Interscience, 纽约 (1987)。

在 NS0 细胞中的表达由例如 Barnes, L.M., 等, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., 等, Biotech. Bioeng.(生物技术生物工程) 73 (2001) 261-270 描述。瞬时表达由例如 Durocher, Y., 等, Nucl. Acids. Res.（核酸研究）30 (2002) E9 描述。克隆可变结构域由 Orlandi, R., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报) 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., 等, J. Immunol.Methods(酶学方法杂志) 204(1997) 77-87 描述。优选的瞬时表达系统(HEK 293)由 Schlaeger, E.-J. 和 Christensen, K., 在 Cytotechnology 30 (1999) 71-83 中，和 Schlaeger, E.-J.,在 J. Immunol. Methods (酶学方法杂志) 194 (1996) 191-199 中进行描述。

单克隆抗体适合地通过常规免疫球蛋白纯化方法如例如蛋白质 A-琼脂糖，羟基磷灰石层析，凝胶电泳，透析，或亲和层析从培养基中分离。使用常规方法，容易地分离并测序编码单克隆抗体的 DNA 和 RNA。杂交瘤细胞可以作为这样的 DNA 和 RNA 的来源。一旦分离，可以将 DNA 插入表达载体中，其接着被转染到用别的方式不产生免疫球蛋白的宿主细胞中如 HEK 293 细胞，CHO 细胞,或骨髓瘤细胞中以在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

人CCR5抗体的氨基酸序列变体通过将适合的核苷酸变化引入到编码抗体的 DNA 或通过肽合成进行制备。然而，所述修饰可以仅在非常有限的范围内例如如上述的范围内进行。例如，所述修饰不改变上述抗体的特征如 IgG 同种型和表位结合，但是可以提高重组生产的产率，蛋白质稳定性或有利于纯化。

还可以通常用丝氨酸取代不涉及维持抗-CCR5 抗体的适合构象的任何半胱氨酸残基从而提高分子的氧化稳定性并防止异常的交联。相反地，可以将半胱氨酸键加入抗体中以提高其稳定性(特别是当所述抗体是抗体片段如 Fv 片段时)。

另一种类型的抗体的氨基酸变体改变抗体的原始糖基化模式。“改变”意味着去除抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分和/或加入在抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。抗体的糖基化典型地是 N 连接的。术语“N-连接的”指将碳水化合物部分连接到天冬酰胺残基的侧链上。其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸的三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是将碳水化合物部分酶连接到天冬酰胺侧链的识别序列。因此，这些三肽序列的任一在多肽中的存在产生潜在的糖基化位点。通过改变氨基酸序列方便地将糖基化位点加入抗体中从而使其包含一个或多个上述三肽序列（对于 N-连接的糖基化位点）。

编码抗-CCR5 抗体的氨基酸序列变体的核酸分子通过多种本领域已知的方法进行制备。这些方法包括，但不限于，从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况下)或通过人源化的 CCR5 抗体的早期制备的变体或非变体形式的寡核苷酸介导（或位点定向）诱变，PCR 诱变，和盒式诱变进行制备。

另一种类型的共价修饰包括化学或酶促地将糖苷偶联到抗体上。这些方法有利之处在于它们不需要在宿主细胞中生产能够 N 或 O-连接的糖基化的抗体。根据所用的偶联方法，所述糖可以连接于(a) 精氨酸和/或组氨酸, (b)游离羧基, (c)游离巯基如半胱氨酸的那些，(d)游离羟基如丝氨酸，苏氨酸或羟脯氨酸的那些，(e)芳香族残基如苯丙氨酸，酪氨酸，或色氨酸的那些，或(f) 谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法描述在 WO 87/05330 中，

和描述在 Aplin, J.D 和 Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. 10 (1981) 259-306 中。

去除在抗体上存在的任何碳水化合物部分可以化学或酶促地进行。化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等价的化合物。这种处理导致大多数或除了连接的糖（N-乙酰葡糖胺或 N-乙酰半乳糖胺）的所有的糖的裂解而保留了抗体的完整。化学去糖基化由 Sojar, H.T.和 Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys（生物化学生物物理进展）. 259 (1987) 52-57; Edge, A.S., 等 Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137 描述。在抗体上的碳水化合物部分的酶促裂解可以通过使用多种内切糖苷酶和糖苷外切酶完成，如 Thotakura, N.R.和 Bahl, O.P., Meth. Enzymol(酶学方法). 138 (1987) 350-359 所述。

抗体的另一种类型的共价修饰包括将抗体连接于多种非蛋白质聚合物，例如聚乙二醇，聚丙二醇或聚氧化烯(polyoxyalkylenes)中的一种，连接方法见美国专利号 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; 4,179,337。

根据本发明的重链和轻链可变结构域与启动子序列，翻译起始序列，恒定区序列，3'未翻译区序列，多腺苷酸化序列，和转录终止序列组合以形成表达载体构建体。所述重链和轻链表达构建体可以组合在单一载体中，共转染，系列转染或单独转染到宿主细胞中，接着将其融合以形成表达两链的单一宿主细胞。

本发明还包括根据本发明的抗体用于体外诊断 AIDS 敏感性的应用，其优选地通过免疫测定确定在人血浆样品的可溶性 CCR5(Tsimanis, T., Immunology Letters（免疫通讯）96 (2005) 55-61)和根据本发明的抗体之间的结合进行。CCR5 的表达与疾病进展相关并且可以用于鉴定 AIDS 敏感性的低或高风险个体。对于诊断目的，可以标记或不标记抗体或抗原结合片段。典型地，诊断测定需要检测由抗体或抗体片段与 CCR5 的结合导致的复合物的形成。

在另一个方面，本发明提供组合物，例如药物组合物，其包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分的一个或组合，以及与其一起配制的药用

载体。

当用于本文时，“药用载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收/再吸收延迟剂等，它们是生理相容的。优选地，载体适于注射或输注。

本发明的组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。如本领域技术人员所理解，施用的路径和/或方式将取决于需要的结果而变化。

药用载体包括无菌水性溶液或分散液以及用于制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。将这样的介质和试剂用于药物活性物质是本领域已知的。除了水之外，载体可以是，例如，等渗缓冲的盐溶液。

不管所选择的施用途径，通过本领域技术人员已知的常规方法，将可以以适当的水合形式使用的和/或用在本发明的药物组合物中的本发明的化合物配制成药用剂型。

在本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以不同，以获得这样的活性成分的量，所述量对具体的患者、组合物和施用模式有效地实现需要的治疗反应，而对患者无毒性（有效量）。选择的剂量水平将取决于许多药物代谢动力学因素，包括所用的本发明的具体组合物，或其酯，盐或酰胺的活性，施用的途径，施用的时间，所用的具体化合物的排泄率，与所用的具体组合物组合的其他药物、化合物和/或物质，被治疗的患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康和先前的医疗史以及医学领域公知的类似因素。

本发明包括根据本发明的抗体用于治疗患有免疫抑制的患者的应用，所述免疫抑制如在患有免疫缺陷综合症如 AIDS 的患者中的免疫抑制，在经历放射治疗、化疗、对于自体免疫疾病的治疗或其它导致免疫抑制的药物治疗(例如皮质类固醇治疗)的患者中的免疫抑制，或本发明包括根据本发明的抗体用于治疗患有 GvHD 或 HvGD (例如移植后)的患者的应用。本发明还包括治疗患有所述免疫抑制的患者的方法。

本发明还提供制备药物组合物的方法，所述药物组合物包含有效量的根据本发明的抗体以及药用载体，以及根据本发明的抗体用于这样方法的应用。本发明还提供根据本发明的抗体用作药物。此外，还提供根据本发

明的抗体用于治疗免疫抑制疾病。

本发明还提供有效量的根据本发明的抗体优选地与药用载体在一起用于制备药剂的应用，所述药剂用于治疗患有免疫抑制的患者。

本发明还提供有效量的根据本发明的抗体优选地与药用载体一起用于制备药剂的应用，所述药剂用于治疗患有由 CCR5 介导的炎性介质释放的患者。

提供下述实施例和序列表以帮助理解本发明，其真正的范围在后附的权利要求中设定。应该理解，在不背离本发明的精神的条件下，可以在描述的方法中进行修改。

序列描述

SEQ ID NO: 1 式 I, 重链, 可变结构域
SEQ ID NO: 2 式 II, 轻链, 可变结构域
SEQ ID NO: 3 γ1 重链恒定区
SEQ ID NO: 4 γ4 重链恒定区
SEQ ID NO: 5 κ 轻链恒定区
SEQ ID NO: 6 重链可变结构域
SEQ ID NO: 7 重链可变结构域
SEQ ID NO: 8 重链可变结构域
SEQ ID NO: 9 轻链可变结构域
SEQ ID NO: 10 轻链可变结构域

实施例 1

重组生产抗体

用于表达根据本发明的抗体的载体已经如下构建。通过将重链可变结构域与人 IgG1 (SEQ ID NO: 3) 恒定区连接在表达载体 pSVgpt 中构建重链表达载体。通过将轻链可变结构域与人 κ 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 5)连接在表达载体 pSVhyg 中构建轻链表达载体。将包括前导信号肽、前导内含子和鼠免疫球蛋白启动子的 5'侧翼序列，和包括剪接位点和内含子序列的

3' 侧翼序列使用载体 VH-PCR1 和 VK-PCR1 作为模板来引入。将重链和轻链表达载体共转染到NS0细胞(ECACC 号 85110503, 无免疫球蛋白产生的小鼠骨髓瘤)中。通过关于人 IgG 进行 ELISA 筛选产生人抗体的转染的细胞克隆。

实施例 2

构建突变体（变体）抗-CCR5 抗体的表达质粒

使用 QuickChange™ 位点定向诱变试剂盒(Stratagene)并如表 1 所述，通过表达质粒的位点定向诱变产生编码突变体抗-CCR5 抗体重链和轻链的表达质粒。根据 EU 编号(Edelman, G.M., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA（美国国家科学院学报） 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest（免疫目的蛋白质序列）, 第 5 版, National Institutes of Health（美国全国卫生研究所）, Bethesda, MD,公开号 91-3242 (1991))进行氨基酸编号。

表 1 显示恒定链(Fc)的突变体

表 1:

同种型	缩写	突变	描述
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	人γ1 -重链的氨基酸序列 $Leu_{234}Leu_{235}$ 被氨基酸序列 $Ala_{234}Ala_{235}$ 取代

突变的解释：L234A 意味着在 Kabat 氨基酸位置 234 的亮氨酸被改变为丙氨酸。

实施例 3

细胞-细胞融合测定

在第 1 天，将表达 gp160 的 HeLa 细胞(2×10^4 细胞/ 50μl /孔)接种在白色的 96 孔微量滴定平板中的补充了 10% （v/v）FCS 和 2μg/ml 多西环素的 DMEM 培养基中。在第 2 天，将 100μl 上清液样品或抗体对照/孔加入到透明的 96 孔微量滴定平板中。然后，加入 100μl 含有 $8x10^4$

CEM-NKr-Luc 悬浮细胞的培养基，并且在 37°C 温育 30 分钟。将 HeLa 细胞培养基从 96 孔板吸出，加入来自 200µl 抗体/CEM-NKr-Luc 混合物的 100µl，并且在 37°C 温育过夜。在第 3 天，加入 100µl/孔 Bright-Glo™ 萤光素酶测定底物 (1,4-二硫苏糖醇和连二亚硫酸钠(sodium dithionite); 普洛麦格公司（Promega Corp.），美国)，并且在 RT 温育最少 15 分钟后测量发光。

材料:

将 HeLa-R5-16 细胞(在多西环素诱导时表达 HIV gp160 的细胞系)培养在 DMEM 培养基中，该培养基包含营养成分和 10% (v/v)FCS，具有 400µg/ml G418 和 200µg/ml 潮霉素 B。

CEM.NKR-CCR5-Luc (目录号: 5198)是一种 T-细胞系，可获自 NIH AIDS 研究及参考试剂系统 McKesson 生物服务公司（Research & Reference Reagent Program McKesson BioServices corporation）日尔曼敦, MD 20874, 美国)。细胞类型: 转染(电穿孔)CEM.NKR-CCR5 (Cat. #4376) 以在 HIV-2 LTR 的转录控制下表达萤光素酶基因，并且在含有 10% 胎牛血清, 4 mM 谷氨酰胺, 青霉素/链霉素和 0.8 mg/ml geneticin sulfate (G418) 的 RPMI 1640 中增殖。生长特征：圆的淋巴样细胞，形态不是非常多变的。细胞以单个细胞悬浮生长，其可以形成小的簇。每周 1：10 分裂两次。特别的特征：在 HIV-2 LTR 反式激活后表达萤光素酶活性。适于用原代 HIV 分离物感染，用于中和和药物-敏感性测定(Spenlehauer, C., 等, Virology（病毒学）280 (2001) 292-300; Trkola, A., 等, J. Virol. (病毒学杂志)73 (1999) 8966–8974)。该细胞系通过 NIH AIDS 研究和参考试剂系统（Research and Reference Reagent Program），NIAID, NIH 获自于 John Moore 和 Catherine Spenlehauer 博士。

Bright-Glo™ 萤光素酶缓冲液 (普洛麦格公司(Promega Corp.)美国, 部分号 E2264B)

Bright-Glo™, 萤光素酶测定底物 (普洛麦格公司. 美国, 部分号 EE26B)。

结果:

将结果显示在表 2 中。IC_{50} 值介于 46 和 399 ng/ml 之间。抗体的恒定区是突变的 IgG1 (IgG1v2)。

表 2:

重链可变结构域	轻链可变结构域	IC_{50} [ng/ml]
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 9	108
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	399
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	46
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	152
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	132
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10	76

Example 4

用活病毒进行抗病毒测定

使用 Lymphoprep™ (Nycomed Pharma AG, Oslo, 挪威) 从通过密度梯度离心分离的暗黄覆盖层制备 PBMCs。混合来自四个不同供体的细胞，用 PHA 刺激 1 天并随后在包含 1 % (w/v) 青霉素/链霉素, 1 % GlutaMAX™ (Invitrogen 公司, 美国, 目录号 35050-038), 1 %丙酮酸钠, 1 % (w/v)非必需氨基酸和 10 % FBS 的 RPMI 培养基中，在存在 5 U/ml IL-2 (白介素-2) 的情况下培养 2 天。

将在 50 µl 中的 100,000 PBMC (外周血单核细胞)加入 100 µl 的抗体溶液（在补充的 RPMI 培养基中，系列稀释范围在 0.006-17.5 µg/ml 之间）并用 50 µl 体积的 250 TCID50(中位值组织培养感染剂量)的 NLBal（具有 BaL (gp120)的 env 的 NL4.3 株系(Adachi, A., 等, J. Virol.(病毒学杂志) 59 (1986) 284-291))或备选地 JRCSF (O'Brien, W.A., 等, Nature（自然） 348 (1990) 69-73)感染。将混合物在 CO2 培养箱中在 37℃温育 6 天。收集上清液，随后用 5U/ml IL-2 补充的 RPMI 培养基稀释 1：50 。

通过 HIV-1 p24 ELISA (铂尔金-爱尔默, 美国)进行 p24 的测量。接着，

将样品中和并转移到微量培养板的孔中，所述孔用针对 HIV-1 p24 的高特异性的小鼠单克隆抗体包被。固定的单克隆抗体捕获 HIV-1 p24。细胞培养样品不需要破裂并且直接加入单克隆抗体包被的微量培养板的孔中。将捕获的抗原与生物素化的针对 HIV-1 p24 的多克隆抗体复合，随后与链霉抗生物素蛋白-HRP (辣根过氧化物酶)缀合物复合。通过与邻苯二胺-HCl (OPD)一起温育来检测得到的复合物，所述邻苯二胺-HCl (OPD)产生直接与捕获的 HIV-1 p24 的量成比例的黄色。使用微量培养板阅读器读取每个微量培养板孔的吸光度，并且针对 HIV-1 p24 抗原标准或标准曲线的吸光度进行校正。

结果:

对于抑制 HIV 在人 PBMC 中的生长，确定包括重链(SEQ ID NO:6, 7, 8)和轻链(SEQ ID NO:9, 10)可变结构域的不同组合并且是 IgG1 同种型的抗-CCR5 抗体的 IC50 值在 2.27 ng/ml 到 14.21 ng/ml 的范围内。对于这些组合，IC90 值在 9.77 ng/ml 到 74.06 ng/ml 之间的范围内。

对于包括突变的 IgG1 恒定区 (IgG1v2)的抗-CCR5 抗体，确定重链和轻链可变结构域的不同组合的 IC50 值在 8.22 ng/ml 到 43.11 ng/ml 的范围内，而确定 IC90 值在 51.95 ng/ml 到 311.38 ng/ml 的范围内。

实施例 5

CCR5 细胞 ELISA

将重组表达 CCR5 的 20,000 个 CHO 细胞接种在每个 96 孔板中，并且在 37°C 温育过夜。随后吸出培养基并且加入 40 μl 的新鲜培养基。加入 10μl 的在培养基中稀释的第一抗体并且在 4 °C 温育两小时。吸出培养基，加入 100 μl 的戊二醛(c = 0.05 % 在磷酸盐缓冲液(PBS)中)并在室温温育 10 分钟。用 200 μl PBS 洗涤 3 次后，加入 50 μl 的检测抗体(在 ELISA 封闭缓冲液中稀释 1:1,000 到 1:2,000)并在室温温育 2 小时。加入 50 μl 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)并在 7 分钟后终止反应。在 450 nm (相对于 620 nm)测量光密度。

第一抗体: 待检测的抗体

第二(检测)抗体: 绵羊抗人 IgG-γ 特异性过氧化物酶缀合的抗体(结合位点 Cat. # AP004) 1:2,000 (6 µl/12 ml)稀释在 PBS 10 %封闭缓冲液中。

培养基: 具有 GlutaMAX™, 10 % FCS, 200 µg/ml 潮霉素(罗氏诊断（Roche Diagnostics）GmbH,德国)的 HAM´s F-12 或 GIBCO

ELISA-封闭: 罗氏诊断（Roche Diagnostics） GmbH, 德国, #1112589, 10 % (v/v)在水中的溶液，1:10 稀释在 PBS 中

TMB: 罗氏诊断（Roche Diagnostics）GmbH, 德国, #1432559, 使用溶液

结果:

CCR5 细胞 ELISA 的结果显示人 CCR5 与 1000 ng/ml 浓度的抗-CCR5 抗体的结合在 2.71-3.13 (OD 450/620)的范围内，所述抗-CCR5 抗体包括重链(SEQ ID NO:6, 7, 8)和轻链(SEQ ID NO:9, 10)可变结构域的不同组合。

实施例 6

CCR5 MAbs 与 NK 细胞上 FcγRIIIa 结合的潜能

为了确定本发明的抗体与天然杀伤(NK)细胞上的 FcγRIIIa (CD16)的结合，分离外周血单核细胞(PBMCs)并将其与 20 µg/ml 的抗体和对照抗体在存在或不存在 20 µg/ml 的针对 FcγRIIIa 的封闭小鼠抗体(抗 CD16, 克隆 3G8, RDI, Flanders, NJ)的情况下温育以证实通过 FcγRIIIa 的结合。作为阴性对照，使用人 IgG2 和 IgG4 （结合位点（The Binding Site)），其不结合 FcγRIIIa。包括人 IgG1 和 IgG3 (结合位点(The Binding Site))作为 FcγRIIIa 结合的阳性对照。使用 PE-标记的小鼠抗-人 CD56 (NK-细胞表面标记) 抗体(BD Biosciences Pharmingen, 圣地亚哥, USA)以及 FITC-标记的山羊 $F(ab)_2$ 抗-人 IgG (Fc)抗体(Protos 免疫研究（Protos Immunoresearch），伯林格姆, USA)通过 FACS 分析检测在 NK 细胞上的结合的抗体。在 20 µg/ml 的抗体浓度确定最大结合(B_{max})。对照抗体(人 IgG4)显示与人 IgG1 的 100 % B_{max} 相比多达 30 % B_{max}。因此，“无 FcγRIIIa 结合或无 ADCC”意为在 20

μg/ml 的抗体浓度，与人 IgG1 相比多达 30 %的 B_{max} 值。

实施例 7

CCR5 趋化性测定

将 L1.2hCCR5 细胞培养在包含 10 % 胎牛血清, 1 x 青霉素/链霉素, 1 x 谷氨酰胺, 1 x 丙酮酸钠, 1 x β-巯基乙醇, 和 250 μg/ml G418 (都来自 Invitrogen 公司, 美国)的 RPMI 1640 中。正好在开始趋化性测定之前，将细胞离心沉淀并重新悬浮在趋化性缓冲液（包含 0.1 % BSA 和 10 mM HEPES 的 Hank's 平衡盐溶液 HBSS (Invitrogen))中。将细胞以最终浓度 5 x 10^6 细胞/ml 用于趋化性测定中。将 CCR5 配体人 MIP1α, 人 MIP1β 或人 RANTES (R&D 系统，美国)稀释在趋化性缓冲液中并以 20 nM 的最终浓度使用。将测试抗体或适合的同种型对照抗体稀释在 HBSS 中。将趋化性测定设定在 0.5 μm 孔径 96-孔 ChemoTx®系统(Neuroprobe 公司，美国)中。将每种抗体与 CCR5 配体之一混合并将 30 μl 的该混合物置于 ChemoTx®系统的底部孔中。将滤网置于底部孔的顶部。每种抗体与 L1.2hCCR5 细胞混合并将 20 μl 的该混合物置于滤器上。接着，将板置于湿润的箱中并在 37 °C 和 5 % CO_2 温育 3 小时。温育后，将细胞从滤器刮去并且将板在台式离心机中以 2,000 rpm 离心 10 分钟。然后移去滤器并使用 CyQUANT®细胞增殖测定试剂盒(Invitrogen)和 Spectra MAX GeminiXS 板阅读器(分子装置（Molecular Devices）, Wokingham, UK)，根据生产商的推荐检测移到底部孔的细胞的密度。使用 Prism 4 (GraphPad Inc., USA) 计算 IC_{50} 值。

对于重链可变结构域和轻链可变结构域与 IgG1 同种型恒定区的不同组合的人 MIP-1α, 人 MIP-1β, 和人 RANTES 的 IC_{50} 值分别在 0.80 nM 到 0.91 nM 的范围内，0.72 nM 到 1.08 nM 的范围内，和 0.85 nM 到 2.69 nM 的范围内。

在突变的 IgG1 同种型 (IgG1v2)的情况中，对于人 MIP-1α, 人 MIP-1β, 人 RANTES 的 IC_{50} 值分别在 2.21 nM 到 6.28 nM, 2.16 nM 到 6.87 nM, 和 3.59 nM 到 5.03 nM 的范围内。

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司

<120> 针对CCR5的抗体及其应用

<130> 23961 WO

<150> EP 06020646.3
<151> 2006-09-29

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 117
<212> PRT
<213> 鼠

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 1

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Val Xaa Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> Xaa 是 X10 是 Ile 或 Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> Xaa 是 X11 是 Phe 或 Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> Xaa 是 X12 是 Gln 或 Pro

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> Xaa 是 X13 是 Ser 或 Ala

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

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

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

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

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

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

<220>

<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa 是 X20 是 Asn 或 Ser

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

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

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

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300
```

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

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 Val 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

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链可变区

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链可变区

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链可变区

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链可变区

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链可变区

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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