



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105037549 B

(45)授权公告日 2018.09.28

(21)申请号 201510142726.3

(22)申请日 2008.01.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105037549 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(30)优先权数据
60/879,964 2007.01.11 US
60/911,527 2007.04.13 US

(62)分案原申请数据
200880002001.2 2008.01.11

(73)专利权人 诺和诺德公司
地址 丹麦拜格斯瓦尔德

(72)发明人 彼得·安德烈亚斯·尼古拉·鲁默
特·沃特曼
伊万·斯文森 罗赞纳·斯文松
莱内·约尔特·阿利法朗尼斯
鲁内·维格·奥弗高

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240
代理人 沈敬亭 徐丽华

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

EP 1673397 A2,2006.06.28,
WO 2006003179 A2,2006.01.12,
WO 2006072626 A1,2006.07.13,
AU 2005259221 A1,2006.12.21,
S.Angal 等.《A single amino acid
substitution abolishes the heterogeneity
of chimeric mouse/human (IgG4) antibody》.
《Molecular Immunology》.1993,第30卷(第1
期),第105-108页.
J.Schuurman 等.《Normal human
immunoglobulin G4 is bispecific:it has
two different antigen-combining sites》.
《Immunology》.1999,第97卷(第4期),第693-698
页.

审查员 黄炎

权利要求书1页 说明书40页
序列表5页 附图8页

(54)发明名称

抗-KIR抗体、制剂及其应用

(57)摘要

本发明提供了抗-KIR抗体、制剂及其应用。本发明提供了一种新型IgG4同种型抗-KIR抗体、该抗体和其他IgG4抗-KIR抗体的新型制剂、以及使用这样的制剂的方法。本发明还描述了适于NK细胞激活和抗-KIR抗体治疗性应用的组合物、制剂、剂量、和给药方案,以及包括一种或多种抗-KIR抗体、连同关于在治疗癌症中的使用说明书的药剂盒。

MDWTRFLFVVAASTGVQSQVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSFYAISNVRQAPGQ
GLEWNGGFIPIFGAANYAQNFGGRVTITADESTSTAYMELSSLASDDTAVYYCARIPSGSY
YDYDMQVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDRKPKNTKVDKRVESKYGP
PCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVYTCVVVDVSNQEDPEVQFNNYVDGVEVHNAK
TKPREQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLGGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAGQPREPOVY
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK*

1. 一种分离的抗-KIR抗体,包括:
 - (a) 轻链,所述轻链包含具有对应于SEQ ID NO:2的残基24-34的氨基酸序列的轻链CDR1、具有对应于SEQ ID NO:2的残基50-56的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有对应于SEQ ID NO:2的残基89-97的氨基酸序列的轻链CDR3;
 - (b) 重链,所述重链包含具有对应于SEQ ID NO:3的残基31-35的氨基酸序列的重链CDR1、具有对应于SEQ ID NO:3的残基50-65的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有对应于SEQ ID NO:3的残基99-112的氨基酸序列的重链CDR3;以及
 - (c) 具有包含S241P突变的氨基酸序列的恒定区。
2. 根据权利要求1所述的抗体,包括:具有在SEQ ID NO:3中给出的氨基酸序列的重链可变区和具有在SEQ ID NO:2中给出的氨基酸序列的轻链可变区。
3. 根据权利要求1或2所述的抗体,所述抗体为IgG4同种型。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体,所述抗体为人或人源化抗体。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,包括:具有在SEQ ID NO:1中给出的氨基酸序列的重链和包含具有在SEQ ID NO:2中给出的氨基酸序列的轻链可变区的轻链。
6. 编码根据权利要求1至5中任一项所述的抗体的分离核酸。
7. 包括根据权利要求6所述的核酸的载体。
8. 包括根据权利要求7所述的载体的宿主细胞。
9. 一种产生抗体的方法,包括在适当的宿主细胞中表达根据权利要求6所述的核酸。
10. 一种药物组合物,包括根据权利要求1至5中任一项所述的抗-KIR抗体。
11. 根据权利要求10所述的药物组合物,所述药物组合物适合于在治疗癌症中应用。
12. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗-KIR抗体在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

抗-KIR抗体、制剂及其应用

[0001] 本申请为申请日为2008年1月11日,申请号为200880002001.2,发明名称为“抗-KIR抗体、制剂及其应用”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及针对某些杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的新型抗体;以及这些和/或其他治疗性抗-KIR抗体的制剂、剂量(剂型,dosage)和给药方案;及其生产方法和使用方法。

背景技术

[0003] KIR是存在于某些淋巴细胞亚群(包括NK细胞和某些T细胞)上的多态1型跨膜分子。KIR与MHC I类分子的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域中的免疫因子相互作用。在患有AML的患者体内,单倍体相合(haplo-identical)干细胞移植(SCT)可导致KIR-HLA I类不合(错配,mismatched)NK细胞的扩增和激活,并导致白血病复发的速率降低,无移植物抗宿主病,和存活率显著提高(Ruggeri等人,Science 2002;295:2029-31)。单倍体相合SCT的临床功效的分子基础是NK细胞介导的肿瘤杀伤由抑制性KIR受体调控。在结合到其特异性HLA-B或-C配体后,这些NK细胞受体发送抑制NK细胞介导的肿瘤杀伤的负信号。由于HLA-B和-C分子在种群中是高度多态的,且不同HLA同种抗免疫球蛋白由KIR2DL1或KIR2DL2/3识别,通常可以发现KIR和HLA不合的供体和受体,即供体的KIR不能结合受体中的HLA配体。在这样的情形中,没有抑制性信号经由不能结合HLA配体的KIR发送,促进NK细胞的激活。然而,这种SCT方案不是对所有患者都是可利用的,如大多数老年AML患者。

[0004] 为了通过药理学方法实现类似的NK介导的抗白血病活性,可以使用能够阻断抑制性KIR信号转导的人源化或完全人抗-KIR抗体。W02006003179、W02006072626、W02005003172和W02005003168中描述了抗-KIR抗体具有有利的药理学特性并可用于例如治疗癌症或传染病。然而,对于这类抗体的临床应用,需要优化的制剂和有效的给药方案。

[0005] 这里所述的本发明涉及抗-KIR抗体的制剂和给药方案,其适用于促进对于治疗癌症和其他病症或疾病有用的生理作用。

发明内容

[0006] 本发明提供抗-KIR抗体的组合物,其在给予(或给药)后,调节体内NK细胞的活性。当以特定的剂量方案应用时,这些组合物导致NK细胞上KIR受体的有效占据(占用,occupancy),且对治疗如癌症和病毒病有用。

[0007] 本发明还提供了抗-KIR抗体1-7F9(在W02006003179中已描述)的S241P变体,可与该变体和/或1-7F9使用的新型药物制剂、其制造方法、以及使用这些组合物来促进生理效应,如治疗癌症和病毒病的方法。

附图说明

[0008] 图1示出了编码抗-KIR(1-7F9)的S241P变体的突变重链的氨基酸序列(SEQ ID

NO:1), 其中突变的脯氨酸残基以黑体示出。

[0009] 图2示出了来自抗-KIR(1-7F9)的pH溶解性研究的结果,示出了在不同pH值沉淀的数量。

[0010] 图3示出了与不同赋形剂相关的沉淀分析的结果,示出了对于赋形剂沉淀的数量。

[0011] 图4示出了来自利用蛋白质A并脱盐到PBS缓冲液中而提纯抗-KIR(1-7F9) S241P突变的色谱图。来自蛋白质A的洗脱材料,标记为峰起点(保留(“R.”)体积(vol)-14mL)和峰终点(R.vol-12mL),在脱盐柱中注射前存储在环路中。脱盐后,收集流分(fraction)并且将标记为A2和A3的流分汇集并用于进一步的分析。

[0012] 图5A和图5B给出了通过分析杂种细胞中表达的抗-KIR(1-7F9)和CHO K1细胞中表达的抗-KIR(1-7F9)得到的电泳图(A)和整合表(integration table)(B)。

[0013] 图6示出了野生型B6小鼠和转基因KIR-tgII小鼠中抗-KIR(1-7F9)的群体药代动力学模型的示意图,包括可饱和和外周结合位点(peripheral binding site)。

[0014] 图7示出了与在B6小鼠中的平均观察值相比的平均预测PK分布(profile)。模型预测基于组合的B6/KIR-tgII PK模型。

[0015] 图8示出了与KIR-tgII小鼠的平均观察值相比的平均预测PK分布。模型预测基于组合的B6/KIR-tgII PK模型。

[0016] 图9示出了与在KIR-tgI小鼠中的平均观察值相比的平均预测PK分布。

[0017] 图10示出了用于人PK预测和猕猴PK估计的两室(two-compartment)药代动力学模型的示意图。

[0018] 图11示出了在37℃时,通过体外滴定结合到KIR-tgII小鼠的NK细胞和结合到人NK细胞的抗-KIR(1-7F9)所获得的平行的浓度对占据的曲线。KIR-tgII小鼠的脾细胞和人供体的PBMC或NK细胞,以及表达KIR2DL1的YTS细胞系以增加浓度的抗-KIR(1-7F9)培育,然后用流式细胞仪分析。

[0019] 图12示出了AML患者体内抗-KIR(1-7F9)血浆浓度对给药后时间的曲线图,示出了1975-1733:AML患者中的抗-KIR(1-7F9)血浆浓度。

[0020] 图13示出了给予后2小时人体内KIR占据和1-7F9血清浓度之间的关系。绘出了在1/2LOQ(2.5ng/ml)处的低于定量限(LOQ)的血浆浓度。实线不是实际数据的拟合,而是 $K_d=4\text{ng/ml}$ 的单价饱和和等温线拟合(方程10)。

[0021] 图14示出了给予后24小时到6周时间点人体内KIR占据和1-7F9血清浓度间的关系。绘出了在1/2LOQ(2.5ng/ml)处的低于LOQ的值。实线不是实际数据的拟合,而是 $K_d=20\text{ng/ml}$ 的单抗原饱和等条件拟合(方程10)。点线示出了 $K_d=9\text{ng/ml}$ (针对24小时预测的值)。

[0022] 图15示出了给予抗-KIR(1-7F9)后患者血液中NK细胞和T细胞上CD107a的水平,其中在给予后24小时NK细胞上CD107a水平增加。

具体实施方式

[0023] 如上所述,本发明提供适于NK细胞激活的组合物、制剂、剂量和给药方案,以及抗-KIR抗体的治疗应用,以及包括一种或多种抗-KIR抗体及用于治疗癌症或病毒病(过滤性病毒)的说明书的药剂盒。

[0024] 在一个方面,本发明提供抗-KIR一种抗体给药方案,其特征在于表1中描述的示例性剂量-给药方案(或给药频率)组合。

[0025] 表1-抗-KIR抗体的剂量和给药方案

[0026]

剂量 (mg/kg)	给药方案
0.003	每天1-2次
0.015	每周3-5次
0.075	每周1-2次
0.3	每月1-2次
1	每月约1次
3	每2月1-2次

[0027] 表1中所述的特定值应理解为近似值。例如,对于表1中每个剂量-给药方案,有效的NK细胞调控也可通过以同样的给药频率给予更高的剂量而实现,或通过以更高给药频率给予同样的剂量而实现。

[0028] 所提供的给药方案部分基于PK/PD模拟和针对抗-KIR抗体1-7F9的患者研究的数据的组合,如在实施例中所描述的。不受理论束缚,表1中的给药方案通过给予患者抗-KIR抗体后血液中NK细胞上实现高KIR占据水平,如至少约90%,或至少约95%,而达到有效的NK细胞调控。根据本发明,其他具有合适特性的用于获得类似高占据水平的抗-KIR抗体也可用于给药方案中,如这里所述。

[0029] 在KIR和HLA不合(或不匹配)的供体和受体之间的单倍体相合SCT的临床情况中,可以在移植后长达约3个月内在患者血液循环中检测到供体源(donor-derived)NK细胞;然而,NK细胞可以以排除(或防止)其识别的量维持显著更长的时间。应该指出,每个个体表达克隆地分布在NK细胞上的不同KIR的所有成分,并且即使在单倍体相合SCT情况下,仅一个供体源NK细胞亚群将表达不能结合受体中的HLA的特定KIR。因此,至少3个月,完全没有经由NK细胞亚群上的特定KIR亚群的信号转导,足以实现显著的临床益处。

[0030] 基于这些前提,中和性抗-KIR抗体的治疗有效剂量方案是这样的方案,其导致足够高(如全部或近似全部)的阻断KIR受体至少约3个月的时间,优选至少6个月。然而,直到现在还未知是否可在患者体内实现足够高的阻断,或者要求怎样剂量的抗-KIR抗体来实现这种阻断。如这里所述,令人惊讶的是,低剂量的抗-KIR(1-7F9)足以在患者体内(ii)可检测地激活NK细胞介导的体内肿瘤细胞的杀伤,和(i)实现近似全部受体阻断。虽然全长人抗体或人源化抗体通常在血液中具有长半衰期从而实现几个月的全部或近似全部KIR占据,但需要在某些规定的时间间隔重复给予。从PK/PD模拟和人类临床数据组合看,现在已经揭示了什么给药方案可实现持续的KIR阻断(参见表1和实施例12)。

[0031] 在另一方面,本发明提供适于1-7F9、1-7F9(S241P)、或类似IgG4抗体、特别是类似抗-KIR IgG4抗体和/或交叉反应性(cross-reactive)抗-KIR抗体的制剂。已经确定这里所述的制剂与有利的药理特性关联,这些有利的药理特性包括(a)低水平抗体分子沉淀(合适的溶解度和低水平的颗粒形成)、(b)可接受水平的抗体分子稳定性(在单体结构和二级结构元素的维持方面)、和(c)低水平的聚集体形成。

[0032] 抗-KIR抗体

[0033] 可用于本发明的抗-KIR抗体是NK细胞调控的,即有效地调控NK细胞活性,通常通过减少KIR信号转导。这可通过抗体阻断HLA配体结合到KIR分子,或通过抗体的非竞争性拮抗机理(参见W02006072626)而实现。对于减少或阻断一个或多个抑制性KIR,如KIR2DL1、KIR2DL2、和KIR2DL3的信号转导的抗-KIR抗体,这里称为“中和性(neutralizing)抗-KIR抗体”,高KIR占据导致NK细胞活性增强。合适的抗-KIR抗体也可是单特异性的,即结合到单一类型的KIR分子上,或者是多特异性的,即结合到多于一种的KIR分子上。至少结合到所有KIR2DL1、KIR2DL2、和KIR2DL3的抗-KIR抗体在这里称为“交叉反应性抗体”。可用于根据本发明用途的示例性抗体包括在W02006003179和W02006072626中描述的那些抗体。例如,中和性与交叉反应性抗-KIR抗体1-7F9(也称为“抗-KIR(1-7F9)”、“1-7F9”、和“抗-KIR”)阻断抑制性KIR2DL受体KIR2DL1、KIR2DL2、和KIR2DL3与它们的HLA-C配体相互作用,由此增强NK细胞的细胞毒素活性。如在实施例13和14中所述,迄今在对患有AML或多发性骨髓瘤患者进行的剂量递增试验(dose-escalation trial)中,即使单一、低剂量的1-7F9也能够减少大多测试的患者中的肿瘤标记物。抗-KIR(1-7F9)的可变轻和重链序列分别在SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中给出。

[0034] 然而,本发明也提供了抗-KIR IgG4抗体1-7F9的新型变体。所提供的变体包括IgG4重链,其中该IgG4重链包括1-7F9可变重链序列和残基241中丝氨酸至脯氨酸突变,相应于根据EU索引(EU-index)的位置228(Kabat等人,“Sequences of proteins of immunological interest”,第5版,NIH,Bethesda,ML,1991)。而且还提供了包括根据这里提供的SEQ ID NO:1的重链的IgG4同种型(isotype)的1-7F9变体。编码SEQ ID NO:1的核苷酸序列在SEQ ID NO:6中给出,且其互补序列在SEQ ID NO:7中给出。该变体可进一步包括轻链,其中该轻链包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区。该变体也称为1-7F9(S241P)。通常,抗体变体在CHO细胞或另一合适细胞类型中重组地表达。如实施例所示,突变不影响变体抗体通过1-7F9结合到KIR抗原的能力。同样,1-7F9(S241P)抗体通常可以以W02006003179中所述的抗体1-7F9应用的任何方式使用。

[0035] 编码1-7F9(S241P)变体的突变重链的序列在图1中示出。根据突变重链和野生型轻链的转染,变体在CHO细胞中表达。当然,这些方法仅是示例性的,因为这样的抗体分子可用任何合适方法制备(其实例在W02006003179中描述)。

[0036] 用于制备、鉴定和表征(例如,亲和力(Kd))中和性和/或交叉反应性抗-KIR抗体的不同方法,以及用于重组地表达这类抗体的方法和其他相关技术是本领域公知的,并在例如W02006003179、W02006072626、W02005003172和W02005003168中说明,所有文献的全部内容以引用方式结合于此。

[0037] 药物制剂

[0038] 在一个方面,本发明提供药学可接受的抗体制剂。当然,虽然以1-7F9IgG4抗-KIR抗体或上述1-7F9变体IgG4分子(其可称为,如“1-7F9v”、“1-7F9S241P”、或“S241P变体”等)作为示例,但是这类制剂的特性可适用于包括类似的IgG4抗体,特别是类似的抗-KIR IgG4抗体和/或交叉反应性抗-KIR抗体的制剂。例如,W02006003179中所述的任何人类抗-KIR抗体、以及鼠类抗-KIR抗体的人源化IgG4变体,如DF200、NKVSF1、EB6、或GL183,有或没有S241P变异,都可类似地用在根据本发明的制剂中。

[0039] 本发明还提供了包括变体1-7F9抗体的这样的制剂或其他组合物。这样的制剂特

征为具有少于约15%，如少于约10%（如约5%或更少、约4%或更少、约3%或更少、或甚至约1%或更少）的IgG4“半抗体（half antibody）”（包括单个重链/轻链对）。这样的IgG4“半抗体”副产物由于铰链区重链间的二硫桥（disulphide bridge）的异质性（heterogeneity）与分泌的人IgG4成比例形成（关于IgG4“半抗体”、S241P变异和相关原理的说明，参见Angal等人，*Molecular Immunology*, 30 (1):105-108, 1993）。该效果通常仅在变性、非还原条件下可检测。在1-7F9变体中，S241P突变能够减少这样的半抗体产物的形成。半抗体形成的显著减少是通过标准技术观察到的。

[0040] 在一个方面，本发明提供药学可接受的活性制剂，其包括 (a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL的IgG4抗体；(b) 约10-50mM磷酸钠；(c) 约160-250mM的蔗糖或约100mM的NaCl；和(d) 聚山梨醇酯80，pH为约7。抗体通常是中和抗-KIR抗体，并且也可以是交叉反应性抗体。在个别实施方式中，抗体包括根据SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:1的重链序列。在另一种实施方式中，抗体进一步包括根据SEQ ID NO:2的轻链序列。这样的制剂中IgG4抗体分子的浓度可以在例如约1至约10mg/mL的范围内，如约10mg/mL。在特定实施方式中，磷酸钠在约20mM至约50mM变化，蔗糖从约220mM至约250mM变化，以及聚山梨醇酯例如可以为约0.001%。在另一种特定的实施方式中，磷酸钠浓度为约20mM且蔗糖浓度为约220mM。

[0041] 在另一个示例性方面，本发明提供药学可接受的活性制剂，其包括 (a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL包括重链和轻链的IgG4抗体分子，其中该重链包括根据SEQ ID NO:3的可变区，而该轻链包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区；(b) 约50mM磷酸钠；(c) 约250mM蔗糖；和(d) 约0.001%的聚山梨醇酯80，pH为约7。在一种实施方式中，该重链包括SEQ ID NO:1的序列。

[0042] 在另一个举例说明性方面，本发明提供药学可接受的活性制剂，其包括 (a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL包括重链和轻链的IgG4抗体分子，其中该重链包括根据SEQ ID NO:3的重链可变区，而该轻链包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区；(b) 约50mM磷酸钠；(c) 约250mM的蔗糖或约100mM氯化钠；和(d) 约0.001%的聚山梨醇酯80，其中所述制剂的pH为约7。在特定方面，该抗体是具有S241P突变的1-F79。

[0043] 在一个示例性方面，本发明提供药学可接受的活性制剂，其包括 (a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL包括重链和轻链的IgG4抗体分子，其中该重链包括根据SEQ ID NO:3的重链可变区，该轻链包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区；(b) 约20mM磷酸钠；(c) 约220mM的蔗糖；和(d) 约0.001%的聚山梨醇酯80，pH值为约7。在一种实施方式中，该重链包括SEQ ID NO:1的序列。

[0044] 在另一个举例说明性方面，本发明提供药学可接受的活性制剂，其包括 (a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL包括重链和轻链的IgG4抗体分子，其中该重链包括根据SEQ ID NO:3的重链可变区，而该轻链包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区；(b) 约20mM磷酸钠；(c) 约220mM的蔗糖或约100mM氯化钠；和(d) 约0.001%的聚山梨醇酯80，其中所述制剂的pH为约7。在特定方面，该抗体是具有S241P突变的1-F79。

[0045] 在另一个示例性方面，本发明提供由以下成分的混合物制备的药学可接受的活性制剂，包括 (a) 一定量的包括重链和轻链的IgG4抗体分子，其使得该制剂中的抗体浓度为约10mg/mL，其中该重链包括根据SEQ ID NO:3的重链可变区，而该轻链包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区；(b) 约8.4mg/mL的磷酸氢二钠（七水合物）；(c) 约2.6mg/mL的磷酸二氢钠；

(d) 约85mg/mL的蔗糖;和(e) 约0.01mg/mL的聚山梨醇酯80,其中所述制剂的pH为约7。在一个方面,抗体包括根据SEQ ID NO:1的重链。在另一个方面,抗体是1-F79。

[0046] 在另一方面,本发明提供制备适于由具有上述特征的浓缩制剂注射到患者体内的制剂的方法,其包括提供在约5℃存储的浓缩制剂,利用包括制剂的组分(b)-(d)的制剂稀释该浓缩制剂,从而得到稀释的(可立即注射/输注)产品,且可选在给予前在约5℃存储该稀释产物长达24小时。

[0047] 在又一个方面,本发明提供药学可接受的活性制剂,其包括(a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL包括重链和轻链的IgG4抗体分子,其中该重链包括根据SEQ ID NO:3的重链可变区,而该轻链包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区;(b) 约5-20mM磷酸钠(如约5mM磷酸钠、约10mM磷酸钠、约15mM磷酸钠、或约20mM磷酸钠);(c) 约180至约250mM的蔗糖(如约180-240mM、如190-230mM,如约200-225mM,如约220mM);和(d) 约0.001%或约0.01-0.1%的聚山梨醇酯80(如约0.02-0.1%、0.03-0.1%、0.05-0.09%、0.05-0.08%等),其中所述制剂pH值为约7。在一个方面,制剂包括低于约35mM(如低于约25mM)的磷酸钠。较低的磷酸钠浓度可能在需要长期冷冻贮藏该制剂的情况下是特别理想的。在另一个方面,该制剂包括多于约0.005%的聚山梨醇酯80。在特定的示例性方面,包含在这样的制剂中的抗体是1-F79。在另一个特定的示例性方面,这样的制剂中的抗体具有由或基本上由SEQ ID NO:1构成的重链。在又一个方面,该抗体是另一种IgG4抗体,如另一种抗-KIR IgG4抗体,或如另一种至少与KIR2DL1和KIR2DL2/3是交叉反应性的抗-KIR抗体。在一个方面,该制剂可具有等张性特征。

[0048] 作为另一个方面,本发明提供制备适于由具有根据以上段落的制剂特征的浓缩制剂注射到患者体内的制剂的方法,其包括提供在约5℃存储的浓缩制剂,利用包括制剂的组分(b)-(d)的制剂或无菌等张盐水溶液稀释该浓缩制剂,从而得到稀释的(可立即注射/输注的)产品,且可选在给予前在约5℃存储该稀释产物长达约24小时。例如,该方法可包括在稀释液中稀释这类制剂,该稀释液是通过混合包括下列成分而制备的,即约5g/L磷酸氢二钠(二水合物)、约3g/L磷酸二氢钠(一水合物)、约85g蔗糖、约0.01g聚山梨醇酯80(Tween 80),该稀释液pH值用氢氧化物/氯化氢调节,并通过加入无菌水调整到所需体积供注射。

[0049] 在另一个方面,本发明提供包括氯化钠(典型地取代上述制剂中的蔗糖)作为张力调节剂(tonicity modifier)的制剂。典型地,氯化钠的浓度为约20mM至约300mM,且更典型地约50mM至约200mM,如约75mM至约175mM(如约90-160mM、约100-150mM)。在一个方面,这样的制剂包括浓度为约100mM的氯化钠。

[0050] 在另一种可替换的实施方式中,本发明提供一种制剂,其中Tris(碱)缓冲液包括在该制剂中,典型地取代磷酸钠。任何合适浓度的Tris(碱)都可使用。约10-100mM的浓度,如约15-80mM、20-75mM、或10-60mM,或更特别地如约25mM是典型的。

[0051] 根据本发明任一方面的制剂可具有任何合适的抗体浓度。通常,该浓度为约0.05mg/mL至约10mg/mL(如约1mg/mL至约5mg/mL)。在一个示例性方面,该制剂以相对浓缩的抗体制剂提供,其可以是在给予前稀释的(通常通过静脉给予或直接的肠胃外注射)浓度为约10mg/mL的制剂。在另一个示例性方面,该制剂以相对稀的制剂提供,如可立即输注/注射的制剂,其中制剂中抗体浓度为约0.05mg/mL或约0.1mg/mL。在另一个方面,该制剂具有约1mg/mL的抗体浓度。

[0052] 根据本发明的制剂的单位剂量容器可以以任何合适的体积提供。通常制剂以约1mL至约20mL的体积提供,如约3mL至约15mL的体积。通常,制剂体积为约5mL至约10mL(且经常是5mL或10mL)。容器可以是任何合适类型的容器。容器可具有多余体积(如容器可以是装有5mL制剂的6mL小瓶)。不是单位剂量容器的所有体积都可用在特定治疗方案中。通常所选的体积提供包括典型剂量范围的量,该剂量提供给患者不会不必要地浪费药品。

[0053] 在本发明的情况下,可接受低水平的抗体分子沉淀意味着该制剂中沉淀可发觉地(并且优选基本上地,否则显著地)少于其他基本相同制剂中获得的沉淀,其他基本相同制剂包括其他常用的药物赋形剂,如NaCl;泊洛沙姆表面活性剂(poloxamer surfactant)、EDTA、HAS、HP- β CD、聚山梨醇酯80、和/或聚山梨醇酯80与NaCl的混合物。用于评估沉淀物的方法是本领域已知的并可包括,如使用标准技术(这里例示出)的目视检查。已经确定,与其他的典型赋形剂比较,由这类IgG4抗体和约180–500mM(如约180–280mM)蔗糖形成的制剂可提供显著低水平的与抗-KIR抗体,如1-F79或1-F79v相关的沉淀物,特别是在pH值为约7或约7.0(与pH值为6.0或更小,以及与更小的范围,pH值为7.4相比)情况下。而且,蔗糖可为这类制剂提供有利的张性(tonicity)。

[0054] 在本发明内容中,抗体分子稳定性的可接受水平(依据单体结构和二级结构成分(或元件)的保持)是指组合物的pH值保持为充分接近7,从而保持抗体分子的单体结构和二级结构成分,与pH值例如3或8.5时的分子稳定性进行对比。

[0055] 可接受的低水平聚集/沉淀形成意味着制剂含一定水平的聚集/沉淀,该聚集/沉淀是通过指定量/浓度的聚山梨醇酯80和磷酸钠(除蔗糖以外)获得的。已经确定这样的制剂与优异的稳定性和低水平的聚集有关,这可在不同温度(如约–20℃至约40℃、如约5℃(如2–8℃)至约20℃)下,经长时间(如长达约1个月、约2个月、约3个月、或更长),通过如对组合物进行IEF、GP HPLC、和SDS PAGE分析而确定,同时也展示出比组氨酸和tris(三羟甲基氨基甲烷制剂)更少的沉淀。

[0056] 如上所述,根据本发明任意方面的制剂理想地包括至少一种、两种、或全部三种这些特征。

[0057] 从前述可以看出,制剂的pH是重要因素。特定pH范围内的有限量的变化是可接受的(取决于所需的稳定性特征和计划存储时间和制剂的变量)。一般地,使用至少约6和小于约8(和更一般地小于约7.7、7.6或7.5)的pH值(如在6–7.4的范围内,如6–7.2、如6–7、6.2–7、6.4–7、6.5–7、6.6–7等)。pH值在7–7.4范围内的制剂,如pH值为约7的制剂也已表明具有充分的或有时是有利的特性。

[0058] 根据本文所述任意方面的制剂的稳定性也可具有基于无高分子量杂质(如,引起制剂中抗体分子聚集(多聚体)的杂质)的特征。在一个方面,根据本发明的制剂的特征为,在约5℃下存储至少一天,如至少约1周、如至少约2周、至少约1个月、至少约2个月、或甚至约3个月高分子量(HMW)杂质含量低于约10%(如约5%或更少)。

[0059] 而且,在需要其的患者体内加强NK细胞活性的方法中,根据这里所述的任意方面的制剂可有利地以这里提供的任意给药方案应用。

[0060] 根据本发明任意方面的制剂可以以任何合适的体积注射或输注。通常(如,对于50–100kg的患者),约0.3至30mL稀释(利用如等张无菌盐水溶液或“安慰剂”制剂/稀释液(即无任何抗体或其他活性剂的制剂))或未稀释的最终制剂的溶液,在给药方案中通常用

1mL-30mL注射器(如使用注射泵)在约1小时的时间内注射。当然,该体积随所需的剂量改变,如下面的示例性给药方案表所例示的,其中在特定实施方式中,抗-KIR抗体是有或无S241P突变的抗-KIR(1-7F9):

[0061] 表2-示例性剂量体积

[0062]

剂量水平	剂量 (mg/kg)	抗-KIR 抗体的浓度 (mg/ml)	给药溶液 (DS)或未稀释的抗-KIR 抗体 (10mg/ml)	50-100 kg 患者的注射体积	每个患者所需的抗-KIR 抗体瓶或 DS 的量	待用的注射器尺寸(SP=注射器泵)
1	0.0003	0.05	给药溶液 0.05mg/ml	0.3-0.6ml	1 (DS)	1 ml
2	0.003	0.1	给药溶液 0.1 mg/ml	1.5-3ml	1 (DS)	2 或 3 ml
3	0.015	1.0	给药溶液 1.0 mg/ml	0.75-1.5ml	1 (DS)	1 或 2 ml
4	0.075	1.0	给药溶液 1.0 mg/ml	3.75-7.5ml	1 (DS)	5-10ml(SP)
5	0.3	10	未稀释	1.5-3.0ml	1	5 ml
6	1.0	10	未稀释	5.0-10ml	1	5-10ml(SP)
7	3.0	10	未稀释	15-30ml	2-3	30 ml (SP)

[0063] 剂量和给药方案

[0064] 在一个方面,本发明提供增强需要其的患者体内NK细胞活性的方法,包括对患者给予一种包括剂量为约0.0003mg(抗体)/kg(患者体重)至约3mg/kg(如约0.003mg/kg至约3mg/kg、如约0.015mg/kg至约3mg/kg、如约0.075mg/kg至约3mg/kg、约0.3mg/kg至约3mg/kg、和约1mg/kg至约3mg/kg中的任一剂量,或约0.0003mg/kg、约0.003mg/kg、约0.015mg/kg、约0.075mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg、和约3mg/kg中的任一剂量)的抗-KIR抗体的组合物。在一种实施方式中,该组合物是任意前面段落中所述的抗体制剂。在一种实施方式中,该方法包括重复给予至少一次,例如以每天3次到每2个月一次的范围内的给药频率。例如,该剂量也可至少给予3次、至少6次、或至少10次。在一种实施方式中,抗体可静脉内给予。在另一种实施方式中,抗体结合NK细胞表面上的抑制性KIR,可增强NK细胞的细胞毒活性。在又一种实施方式中,抗体是交叉反应性抗-KIR抗体。例如,抗体可包括抗体1-7F9的可变重链(SEQ ID NO:3)和可变轻链(SEQ ID NO:2)区序列。此外或可替换地,抗体可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:1的序列。通常但不是必须的,患者在第一次给药后24小时,血液中NK细胞上CD107a水平增加。

[0065] 该剂量范围是通过药代动力学和药效动力学(PK/PD)模型化模拟,用交叉反应性和中和性抗-KIR抗体1-7F9作为实例而获得的,如这里所述。人类PK是通过评估人IgG分子的典型PK预测的,评估的PK获自于猴的1-7F9研究和小鼠与猴间的异速生长尺度分析(allometric scaling)。并且选择剂量从而提供可检测的饱和(>20%),尽管并非必需地,在患者体内的饱和(<95%)(0.0003mg/kg,静脉给予)例如可被预测以导致最大达50%的瞬间饱和,并与约0.006μg/mL的最大血浆浓度(C_{max})相关。这些参数(如受体饱和度至少约20%、如至少约40%、至少约50%、至少约90%、或至少约95%,和/或C_{max}约0.005-0.01μg/

mL)也可以或可替换地可用来限定给药方案的特征。该方法通常包括估计患者的如NK细胞增强和/或抗肿瘤活性(其可利用任何合适技术执行,其中几种是本领域已知的,包括,如KIR占据水平、CD107a标记物等,如这里所述)。制剂通常是经合适的时间段,如约1小时通过静脉给药而给予的。

[0066] 在另一方面,本发明提供一种治疗患者(受治疗者)体内与KIR2DL1、-2和-3和/或2DS1和-2抑制关联的疾病、症状或病症的方法,包括根据表1中所述的任一剂量-给药方案给予患者包括抗-KIR抗体的组合物,以治疗该疾病、症状或病症。在一种实施方式中,该组合物是上述组合物或制剂中的任一种。这里术语“治疗”是指递送有效量的所述制剂,目的是防止任何症状或疾病状态发展或者目的是减轻、改善、或根除(治愈)已经发展的这类症状或疾病状态。术语“治疗”因此意味着包括预防性治疗。然而,可以理解,本发明的治疗方案和预防方案也可看作是本发明的分离和独立的方面。同样,无论本文中该术语在哪里使用,都应理解为也为这类分离的预防性和减轻/治疗性应用提供支持。

[0067] 例如,本发明提供一种治疗患者的癌症或病毒病的方法,其包括以实现血浆中NK细胞上至少约90%、优选至少约95%的KIR占据的剂量和给药频率给予抗-KIR抗体,达到至少约3个月占据。在个别实施方式中,剂量范围在约0.0003至约3mg/kg;约0.003至约3mg/kg;约0.015至约3mg/kg;约0.075至约3mg/kg;约0.075至约3mg/kg;约0.3至约3mg/kg,以及约1至约3mg/kg的范围内。示例性剂量为约0.0003、约0.003、约0.015、约0.075、约0.3、约1、和约3mg/kg。给药频率可在一天一次到两个月一次、约一周一次至约两个月一次的范围内;或约一月一次。可替换地,给药频率可选自约一天三次、约一天两次、和约一天一次;约一周五次、约一周四次、约一周三次、和约一周两次;以及约每两周、四周和六周一次。在其他个别实施方式中,约每周两次至约每月一次,给予约0.075至约0.3mg/kg剂量;约每月一次到两次给予约0.3至约1mg/kg的剂量;约每月一次到每两月一次给予约1至约3mg/kg的剂量。而且,剂量和给药频率可从表1中选择。剂量可以例如以至少3次、至少6次、或更多次给予。例如,该方法可包括以实现NK细胞上至少约95%的KIR占据的剂量和给药频率给予抗-KIR抗体达到至少约6个月占据。抗体通常是静脉内给药的,但其他合适的给药模式是已知的,并且如W02006003179所述。抗体优选是中和性和/或交叉反应性抗-KIR抗体,如抗-KIR(1-7F9)或其S241P变体。

[0068] 在一个方面,待通过上述方法治疗的患者是被诊断患有癌症的患者。在更特别的方面,患者是被诊断患有急性髓性白血病(AML)的患者。在另一个特殊方面,患者是被诊断患有慢性髓性白血病(CML)的患者。在又一个特殊方面,患者是被诊断患有多发性骨髓瘤(MMy)的患者。在又一个示例性方面,患者是被诊断患有非霍奇金淋巴瘤(NHL)的患者。在另一个说明性方面,要通过实施上述方法进行治疗的患者是被诊断患有直肠癌的患者。在又一个方面,要通过实施该方法进行治疗的患者是被诊断患有肾癌的患者。在又一个方面,患者是被诊断患有卵巢癌的患者。在另一种实施方式中,患者是被诊断患有肺癌的患者。在又一种实施方式中,患者是被诊断患有乳癌的患者。在另一种实施方式中,患者是被诊断患有恶性黑素瘤的患者。在又一种特殊实施方式中,要以上述方法治疗的患者是被诊断患有传染病,如病毒感染(如感染HIV或丙型肝炎)的患者。

[0069] 患者治疗效果可遵循评估从患者体内获取的生物样本,如血液、血浆、尿液等中的NK细胞激活标志物或肿瘤标志物的水平。例如,如实施例中所示,多数患者在第一次给药1-

7F9后24小时提取的血液样品中NK细胞上CD107a水平增加,即使给予剂量非常低。特别地,CD107a的增加可能不能在T细胞上检测到。这里所述的用于监控治疗的为临床研究选择的特殊肿瘤标志物包括,如AML患者血液中和/或骨髓中的Wilms肿瘤基因1转录本,和尿液中M蛋白质的水平。此外,基于NK细胞在对其他各种癌症的抗肿瘤活性的作用,其他肿瘤标志物水平的降低,包括直肠癌中的CEA、生殖细胞瘤中的AFP和HCG、滋养细胞肿瘤中的HCG、卵巢癌中的CA-125、CA 15-3、CA 27.29、和乳癌中的雌激素受体、前列腺癌中的PSA、慢性淋巴细胞白血病中的CD5+/CD23+细胞、以及白血病和淋巴瘤中的细胞遗传标志物预期在恶性肿瘤中易受到抗-KIR治疗的影响。此外或可替换地,抗-KIR治疗对恶性疾病的功效可由标准终点如无癌存活率(cancer-free survival)、总体存活率、和/或无事件存活率(event-free survival)评估(关于AML患者三期试验,参见,如Brune等人(Blood,2006;108:88-96))。

[0070] 虽然抗-KIR(1-7F9)或其S241P变体是优选的调控NK细胞活性和/或治疗癌症、病毒病、或其他合适疾病的抗体,但其他抗-KIR抗体也可用于根据本发明的方法和剂量-给药方案中。然而,这样的抗-KIR抗体与抗-KIR(1-7F9)具有类似的Kd值、类似的患者体内清除作用、和类似的分布体积,其中“类似”意味着在相应的抗-KIR(1-7F9)参数的约50%内、优选在约30%之内。对于高达0.015mg/kg的剂量,抗-KIR(1-7F9)具有约4ng/ml的高亲合力Kd和约20ng/ml的低亲合力Kd;约0.5ml/h/kg的清除率、约115ml/kg的分布体积(参见实施例11)。可用于本发明的一种或多种方法中的示例性抗-KIR抗体具有下面的特性:(a)减小或阻断NK细胞上抑制性KIR的信号转导;(b)约2至约6ng/ml的高亲合力Kd;(c)约10至约30ng/ml的低亲合力Kd;(d)约0.25至约0.75ml/h/kg的清除率;(e)约50ml/kg至约175ml/kg的分布体积;和(f)可选地结合多于一个KIR,如至少所有的KIR2DL1、KIR2DL2、和KIR2DL3。

[0071] 在另一个方面,任何上述方法可进一步通过使用辅助抗癌剂(secondary anti-cancer agent)进行补充,如W02006003179所述的那些(免疫调节剂、荷尔蒙剂、化疗剂、抗血管生成剂、凋亡剂,结合到抑制性KIR的第二抗体、抗感染剂、靶向剂、佐剂化合物、如抗CD20抗体)。本发明的变体抗体也可提供在制品或具有有效剂量的这类助剂的“药剂盒”中。本发明进一步提供编码该变体抗体的分离核酸,通过在适当的宿主细胞中表达这类核酸而产生抗体(并通过任何合适方法从其中回收抗体产物)的方法、包括这样的核酸的宿主细胞、以及包括这样的核酸的载体。

[0072] 实施例

[0073] 提供下面的示例性实验方法和数据以更好地呈现本发明的各个方面,但决不能认为是限制本发明的范围。

[0074] 实施例1:1-7F9稳定性研究

[0075] 对人抗体1-7F9的生物物理特性和稳定性研究如下。蛋白质的折叠和二级结构通过圆形二色性(CD)以及通过动态光散射(DLS)的低聚和聚集进行研究。为了模拟两年5℃的存储条件,使蛋白质在37℃下振荡孵育14天。

[0076] 材料和方法

[0077] 样品制备。在(a) 50mM钠-磷酸盐,0.001%聚山梨醇酯80(Sigma,P8074),pH 7.0;(b) 50mM钠-磷酸盐,0.001%聚山梨醇酯80,pH 7.0,0.5mM蔗糖;(c) 50mM柠檬酸盐,0.001%聚山梨醇酯80,pH 3.0;和d) 50mM Tris,0.001%聚山梨醇酯80,pH 8.5中制备2mg/ml 1-7F9。

[0078] 圆形二色性(CD)。在25℃下进行CD测量,装配有用于温度控制的Peltier元件的Chirascan圆形二色性分光计(Applied Photo-physics)上蛋白质浓度为2.0mg/ml。1-7F9样品在路径长度为0.1mm的圆柱形石英比色皿(quartz cell)中。记录缓冲液扫描(buffer scan)并从每个样品谱中扣除。

[0079] 动态光散射(DLS)。在25℃下用Dynapro 99温控DLS仪器(Protein Solutions公司)实施DLS,蛋白质浓度为2.0mg/ml。数据分析使用该仪器公司提供的Dynamics软件进行。

[0080] 结果

[0081] 尽管经DLS评估,14天孵育后pH为7.0的样品,分子大小不变,但在pH 3.0和pH 8.5下配制的样品在14天时间内高度聚集。

[0082] CD检测显示出所有β结构的特征并揭示在pH 7.0下配制的样品在整个加速研究过程中保持其二级结构,但仅含聚山梨醇酯80作为赋形剂的样品的信号稍微降低。这可能是由于样品的弱沉淀所导致的,因为光谱的总体形状不变。含蔗糖的样品信号随时间变化并没有表现出这种减小。对在pH 3.0和8.5下配制的样品进行的CD检测表明光谱特征随时间而强烈改变,这可能是去折叠或其他构象变化的结果,这可导致非功能性1-7F9蛋白质。这些变化可立即观察到并在pH 3.0时最显著。

[0083] 总之,在应力状态(37℃并摇动)下、pH 7.0、并以聚山梨醇酯80和蔗糖作为赋形剂时,1-7F9保持其物理特性并保持稳定。

[0084] 实施例2:溶解性筛选

[0085] 对含抗-KIR人类IgG4抗体1-7F9的制剂进行微制剂筛选(microformulation screen),其以1μl的液滴测试88种不同的条件。筛选条件涉及3-10之间的pH范围和添加几种已知的赋形剂。对所有制剂目视检查沉淀(评估产物透明度、颜色、和颗粒/纤维的存在)。对于视觉评估,外观由两个操作员在日光(通常)或通用实验室照明下在黑白背景下独立评估。pH溶解性研究的结果在图2中给出,且与不同赋形剂相关的沉淀分析的结果在图3中示出。

[0086] 该分析的结果表明在pH 7.0时出现的沉淀比pH 6.0和7.4时少,在pH 5.0、3.0和8.5时甚至沉淀更少。从图2中示出的数据可以看到0.5M蔗糖制剂导致无法检测到沉淀(甘油制剂液也与相对低水平的沉淀相关)。

[0087] 实施例3:制剂研究

[0088] 根据表3中的时间安排,在长达3个月的存储期内,在4种不同温度下,基于pH、外观、GP HPLC、SDS-PAGE、和IEF分析12种不同的1-7F9(10mg/mL)制剂。被测试制剂在表4中示出。

[0089] 表3-溶解性评估的测试方案

	温度	时间点(月数)			
		0	1	2	3
[0090]	-20℃	×	×	NT	NT
	5℃	×	×	×	×
	25℃	×	NT	×	×
	40℃	×	×	×	NT

[0091] ×=进行测试;NT=没有测试

[0092] 表4-测试的制剂

代码	制剂	pH
F1	25 Mm 醋酸钠, 125 mM 氯化钠, 0.001%吐温 80	5.5
F2	25 Mm 醋酸钠	5.5
F3	40 mM 醋酸钠, 125 mM 氯化钠, 0.001%吐温 80	5.5
F4	40 mM 柠檬酸钠	5.5
F5	50 mM 磷酸钠, 100 mM 氯化钠, 0.001%吐温 80	7.0
[0093] F6	50 mM 磷酸钠	7.0
F7	50 mM 磷酸钠, 250 mM 蔗糖, 0.01%吐温 80	7.0
F8	50 mM 磷酸钠, 250 mM 蔗糖, 0.001%吐温 80	7.0
F8	50 mM 磷酸钠, 250 mM 蔗糖, 0.001%吐温 80	7.0
F9	25 mM Tris (碱), 125 mM 氯化钠, 0.001%吐温 80	7.5
F10	25 mM 柠檬酸钠, 150 mM 氯化钠, 0.001%吐温 80	5.5
F11	25 Mm L-组氨酸, 150 mM 氯化钠, 0.001%吐温 80	6.5
F12	25 Mm L-组氨酸, 150 mM 氯化钠, 0.001%吐温 80	6.5

[0094] 所采用的具体方法简单说明如下(外观检测在上面描述了)。

[0095] 凝胶渗透HPLC是在Agilent 1100HPLC系统上用标准化的TSK SWXL G3000柱进行的。流动相是0.2M磷酸钠,pH为7.0,流速为1.0mL/min。样品注射体积是50μL。250μg的蛋白质加样使用单个确定进行分析(%单体,%片段,且每个样品都确定%片段)。所有样品初始确定聚集度在1.8%和2.3%之间。

[0096] 实施SDS PAGE以测试产物的均一性和纯度。还原和未还原样品的SDS PAGE利用Novex预制剂(pre-cast)4%和20%(w/v)的丙烯酰胺梯度凝胶而进行,并在125V限制条件下对每一凝胶进行电泳,直到染料前沿迁移到凝胶底部1厘米内。使用非还原条件下4μg的蛋白质加样和还原条件下10μg的加样。凝胶在室温下利用Coomassie Brilliant Blue R250染色剂进行染色。Novex MK12分子量标记物包括在每个凝胶中,从而覆盖6kDa到200kDa的MW范围。对于还原条件,孵育使用pH 8.0的样品缓冲液,含2-巯基乙醇。对于非还原条件,孵育使用pH 7.1的样品缓冲液,无2-巯基乙醇。还原和未还原样品分别制备并对独立凝胶进行分析从而防止污染。在每个终点进行单个测试。对于未还原和还原样品,每个样品的带分布(banding profile)通过视觉进行分析并对还原样品通过激光密度测定法进行分析以测定每个条带的相对百分比纯度。

[0097] IEF使用可商购的琼脂糖等电聚焦凝胶(pH 3至pH 10)而进行,从而判断蛋白质的等电聚焦模式和等电点范围。10μg的每种样品被加载到凝胶阴极端5μL体积中。聚焦1500伏特小时后,凝胶应用Coomassie Brilliant Blue R250染色剂进行染色,且将每种样品的聚焦模式与T=0分布进行视觉比较,从而识别蛋白质带电同种型的任何变化。恰当pI标记物包括在每种凝胶中并基于制造商提供的pH值识别。每种样品在每个时间点单独测试。

[0098] 12个制剂中平均抗体蛋白质浓度是10.61mg/mL且所有样品的蛋白质浓度在该值的3%以内。

[0099] 基于这些测试,各个制剂依据这些时间点的颗粒评分(0分最好,14分最差),并且对于作为分析(HPLC、IEF、SDS、和外观分析)的一部分而执行的其他测定,依据稳定性进行三点标度打分(0最差,1表示制剂具有可能的“先导候选物(lead candidate)”特性,2表示

制剂具有“先导候选物”性质)。该工作所获得的结果在表5和6中提供:

[0100] 表5-各种1-7F9制剂中颗粒构成的分析

[0101]

制剂	温度 (°C)			
	-20	5	25	40
F1	1	2	1	6
F2	1	1	1	4
F3	2	3	1	10
F4	3	3	0	14
F5	0	2	1	1
F6	6	2	0	1
F7	0	0	0	4
F8	0	2	0	2
F9	0	0	0	1
F10	2	2	1	3
F11	2	1	0	3
F12	0	1	1	3

[0102] 表6-1-7F9制剂的稳定性分析

[0103]

样品	GP HPLC	SDS	外观	IEF	总分
F1	0	0	0	0	0
F2	2	1	2	0	5
F3	0	0	0	0	0
F4	0	0	2	0	2
F5	2	1	2	1	6
F6	1	1	2	1	5
F7	0	1	2	1	4
F8	0	1	2	1	4
F9	2	1	2	1	6
F10	0	0	2	0	2
F11	2	2	0	2	6
F12	2	2	0	2	6

[0104] 具体的特定结果包括以下内容。GP HPLC数据表明在约25°C和约40°C,与被研究的其他制剂相比,pH值为5.5的含醋酸盐和柠檬酸盐缓冲液的制剂,单体水平随时间显著减少(表明例如聚集/多聚化)和/或片段水平随时间增加(表明例如蛋白质水解)。SDS PAGE结果也表明至少大多柠檬酸盐和醋酸盐制剂可能不适于长期存储IgG4抗-KIR抗体,特别在较高温度时,这是由于与其他制剂相比片段水平较高。较低pH值的制剂也通常与较高水平的片段化(蛋白质水解)相关。

[0105] 制剂经受冻融条件的能力也作为该实验和其他实验的一部分被评估。一般地,制剂表现出合适的冻融特性,但存储在零下温度条件,对于至少某些制剂而言被认为不是最佳的。制剂F6被认为不适于长期存储在零下温度,这是由于冻融应力所致。适当的张力修饰

剂的包含物,如蔗糖和/或氯化钠,对抗体制剂在零下条件下存储和/或冻融是重要的。一般地,推荐在5℃供应、存储、和操作液体制剂。如果要求冰冻,应使用相对低量的磷酸钠(如果并入),且张力修饰剂浓度/选择要适当调整。

[0106] 总之,从该分析得到的结果标明含聚山梨醇酯80(Tween 80)的组氨酸、tris、和磷酸盐基制剂在不同温度条件下表现出最佳特性。如表4所示,通过IEF、HPLC和SDS PAGE分析被认为含组氨酸、氯化钠、和聚山梨醇酯80是最好的。然而,这些特定制剂含沉淀,且根据颗粒形成(特别是较高温度时)被认为是不合适的。从剩余数据,可以确定pH值为7,含聚山梨醇酯80(Tween 80)和氯化钠或蔗糖作为张力修饰剂的磷酸盐制剂可提供最佳的抗-KIR IgG4制剂。

[0107] 实施例4:野生型抗-KIR1 7F9和抗-KIR1 7F9 S241P与重组KIR2DL3结合的表面等离子共振研究

[0108] 1-7F9S241P变体是通过使用Quick-Change Mutagenesis试剂盒(Stratagene)与引物P1:5'-cccccatgcccaccatgcccagcacctgag (SEQ ID NO:4),和P2:5'-ctcaggtgctgggcatggtgggcatggggg (SEQ ID NO:5)采用定点诱变而产生。突变通过测序而证实。

[0109] 在Biacore3000仪器(Biacore AB,Uppsala,Sweden)上进行表面等离子共振研究,以便验证和比较“野生型”抗-KIR1 7F9和抗-KIR1 7F9 S241P与固定化KIR2DL3的结合。

[0110] 重组KIR2DL3的固定化是在CM5传感器芯片(Biacore AB)上,按照制造商(Biacore AB)所说明的使用标准胺耦联进行的。

[0111] HBS-EP缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005%聚山梨醇酯20(v/v))用作电泳缓冲液,并用于所有稀释。传感器芯片再生是用pH值为1.8的10mM甘氨酸-HCl短脉冲(15μl,流量30μl/min)进行的。

[0112] 实验是以10μl/min的流速,在25℃下进行的。数据用Biaevaluation 4.1软件进行分析。

[0113] 对6个不同批次的CHO细胞表达的抗-KIR1 7F9 S241P,和一个批次的杂交瘤细胞表达的野生型抗-KIR1 7F9进行测试。所有样品在HBS-EP中稀释到100nM。各样品3分钟通过固定KIR2DL3,然后是10分钟的解离阶段。

[0114] 所有样品证明结合到固定的KIR2DL3上。各样品的解离率(off-rate)是用Langmuir 1:1结合模型确定的。所有样品证明有近乎相等的解离率(表7)。

[0115] 表7-1-7F9S241P的解离率

[0116]

样品	解离率
抗-KIR1 7F9 S241P CHO#1	2.07E-05
抗-KIR1 7F9 S241P CHO#2	2.24E-05
抗-KIR1 7F9 S241P CHO#3	3.23E-05
抗-KIR1 7F9 S241P CHO#4	2.87E-05
抗-KIR1 7F9 S241P CHO#5	2.72E-05
抗-KIR1 7F9 S241P CHO#6	2.32E-05
KIR1 7F9野生型杂交瘤细胞	2.83E-05

[0117] 基于相同的结合方式和解离率,这些数据表明在野生型抗-KIR1-7F9和抗-KIR1-7F9-S241P间在结合KIR2DL3方面没有差别。

[0118] 实施例5:S241P-1-F79中的还原半抗体制剂

[0119] 为了评估半抗体制剂是否是通过在1-F79的重链序列中引入S241P突变而还原的,进行了下面的实验。

[0120] 重组地表达的S241P-1-F79IgG4变体是在MabSelect™ SuRe蛋白-A柱上纯化的。在加载后,以10个柱体积的PBS缓冲液洗涤介质柱(media column),并以100mM甘氨酸、pH 3.0的100mM的NaCl缓冲液进行洗提,然后用High Trap™脱盐柱将缓冲液更换为PBS缓冲液。所有操作都由GE Healthcare Amersham Bioscience AB的Äktapress系统控制。

[0121] 抗体异质性和半抗体含量的估计是用Agilent 2100生物分析仪采用Forrer, Analytical.Biochemistry 334.1 (2004):81和Vasilyeva, Electrophoresis 25.21-22 (2004):3890中所述的方法进行分析的。样品是在非还原条件下制备的,并添加N-乙基马来酰亚胺以稳定二硫键。

[0122] 表达的抗-KIR1-7F9S241P变体是用蛋白质A纯化的并脱盐至PBS缓冲液中(图4)。在图4中,蛋白质A的洗提材料被注解为峰开始(滞留(“R”)体积(vol) 14mL)和峰终点(R.vol-12mL)并在脱盐柱注射前存储在环路(loop)中。在脱盐后,收集流分并将标注为A2和A3的流分汇集并用于进一步的分析。

[0123] 纯化后,存在于组合物中的半抗体的量用前面所述的Forrer和Vasilyeva(上文)的方法进行分析。半抗体的分析证明半抗体的形成受S241P突变抑制(参见图5和表8(下面))。图5给出从在杂交瘤细胞(左图)中表达的抗-KIR(1-7F9)和在CHO K1细胞(右图)表达的抗-KIR(1-7F9)的分析得到的电泳图和整合表。表8反应了对CHO K1细胞中表达的野生型(WT) 1-7F9和S241P抗-KIR(1-7F9)检测的半抗体形成的量:

[0124] 表7-1-7F9和1-7F9S241P中半抗体形成的比较(绝对值Abs)

[0125]

WT	S241P
8.6	0.3
9.5	0.6
5.8	0.4

[0126] 这些结果表明脯氨酸替代抗-KIR(1-7F9)重链中的Ser-241导致与显著更低“半抗体”副产物关联的抗-KIR IgG4抗体产物。

[0127] 实施例6:基于KIR-转基因小鼠的体内研究预测抗-KIR(1-7F9)的人PK/PD

[0128] 该实施例说明了基于药代动力学(PK)/药效动力学(PD)的基本原理,其用于在人剂量试验中选择抗-KIR(1-7F9)的起始剂量,预测最大饱和时人体内会导致KIR受体可检测的饱和(>20%),但非完全饱和(<95%)的剂量。

[0129] 特别地,开发PK模型从而捕获野生型和KIR转基因小鼠中抗-KIR(1-7F9)的PK特性。基于PK模型,建立关于KIR转基因小鼠中KIR占据和血浆浓度间关系的PK/PD模型。然后预测并模拟人体内抗-KIR(1-7F9)的PK分布,通过结合小鼠PK/PD模型和预测的人PK分布来设计人体内KIR占据的PK/PD模型。

[0130] 材料和方法

[0131] 数据源。KIR转基因小鼠中PK/PD模型基于研究数据,在该研究中,对静脉给予的一定范围的抗-KIR (1-7F9) 的剂量水平 (作为单剂量),进行KIR受体饱和与血浆浓度间关系的体内测定。使用0.0004mg/kg至4mg/kg的剂量范围。使用三个不同品系的小鼠。野生型B6 (C57BL/6) 小鼠不表达KIR受体并被用作参照,用来估计两个KIR转基因小鼠品系中可能的靶向介导清除的幅度。在NK细胞和T细胞亚群上表达人KIR2DL2受体的小鼠品系,类似于在人体中看到的模式 (pattern),指定为KIR转基因II (KIR-tgII)。在该模型中,KIR的表达水平稍低于正常人NK细胞上的KIR。作为关于可用于靶向介导清除的KIR受体总数目的最差模型,选择指定为KIR转基因I (KIR-tgI) 的小鼠品系。KIR-tgI小鼠严重过表达KIR受体且预期不反映在人体中看到的模式。

[0132] 在单次静脉剂量的抗-KIR (1-7F9) 后,处死小鼠群 (n=3),且收集血液和脾脏用于通过荧光活化细胞分选 (FACS) 在7天内不同时间点测定KIR受体的饱和。对于每只小鼠,抗-KIR (1-7F9) 的浓度是在死亡前的一个时间点以及在用于通过应用验证的ELISA方法确定饱和的时间进行测定。受体占据是用FACS测量,使用直接耦合的抗-KIR (1-7F9) 检测游离KIR,使用抗IgG4抗体以测量结合的抗-KIR (1-7F9)。以该方式,可以跟踪随着注射的mAb剂量增加,游离KIR消失,这与结合的抗-KIR (1-7F9) 的量平行增加。

[0133] 在模型模拟中,任何受体内化 (receptor internalisation) 被忽视且仅考虑出现在NK细胞表面的受体饱和。标记的NK细胞的平均荧光强度 (MFI) 的测量用来评估受体占据和其他特征。人PK参数的预测是基于PK-PD研究得到的小鼠PK数据,更早研究得到的猴PK数据,以及来自多种文献资源的人IgG PK参数。

[0134] 测定分析。小鼠和猴的血浆浓度是用基于验证的ELISA测定而评估的。小鼠血浆测定中量限为2.5ng/ml,猴血浆测定中定量限为0.5ng/ml。

[0135] 在KIR转基因小鼠中,抗-KIR (1-7F9) 的受体占据是通过FACS测量的,用直接耦合的抗-KIR (1-7F9) 检测游离KIR,抗IgG4抗体测量结合的抗-KIR (1-7F9)。以该方式,可以跟踪随着注射抗体剂量增加,游离KIR消失,这与结合的抗-KIR (1-7F9) 的量增加平行。

[0136] 对于KIR受体%饱和度的计算,来自两个测量的总平均荧光强度 (MFI) 如下所述进行应用。

[0137] 软件。以下软件用于最终数据文件的生成:

[0138] S-plus,版本6.1,Insightful Corporation,西雅图,华盛顿,美国。

[0139] 以下软件用于非线性混合效应模拟 (mixed effects modelling):

[0140] Compaq Visual Fortran,版本6.6a,Hewlett-Packard Company,帕洛阿尔托,加利福尼亚,美国。

[0141] NONMEM V,版本1.1,GloboMax,Hanover,马里兰,美国。

[0142] Visual-NM,版本5,RDPP,蒙彼利埃,法国。

[0143] 软件的安装/验证以如下方式执行:

[0144] NONMEM功能是用当前部门程序 (current departmental procedure) 验证的。

[0145] 其他软件按照制造商建议进行安装。

[0146] 数据文件

[0147] 格式生成程序。PK和PD数据初始是用Excel文件准备的。然后,用S-PLUS将PK和PD数据组合并准备用于NONMEM和NM-TRAN。

[0148] 最终数据文件被用于PK模型的生成。带有各PK估算的PK模型的输出在排除不相关的B6鼠数据并添加用于模拟人体内各剂量水平的群体平均值目的的模拟记录后被用于PD模型。

[0149] 遗漏值(或缺失值,missing values)和LOQ以下值的处理。在KIR-tgII鼠中,3 μ g组中两只鼠的FACS分析失败,且数据未出现在数据文件中。PK数据:BLQ值被设定为0并从建模中排除,但时间点保持在数据文件中用于应用PK模型预测血浆浓度。

[0150] 偶然性例外(occasional outliers)数据的处理。在KIR-tgII鼠的0.1 μ g组中血浆浓度被当作偶然性例外数据并在PK模型的参数估算过程中被排除。该组包括在有预测血浆浓度的PK-PD模型中。

[0151] 模型开发后,基于加权余量的数值应小于4的标准,四个例外数据被识别并被除去。

[0152] 检查程序。对于小鼠PK/PD模型,针对原始数据Excel文件,就所有个体的%结合和体重,以及三个个体的血浆浓度,检查用于NONMEM的最终数据文件。对于猴PK模型,数据文件中记录的数目是针对原始数据中记录的数目检查的。

[0153] 模型开发

[0154] NONMEM一级条件估算(FOCE)方法,如单个模型中指示的那样,有或无INTERACTION,被用于模型开发。中间模型间的评估和区分基于目标函数值和标准图形估值方法。

[0155] 关于目标函数值,该值的变化假定为 χ^2 分布的(嵌套模型),且扩展模型的标准是相应定义和使用的。

[0156] 结构模型和误差模型。对于所有动物PK模型,对个体间差异(或个体间变异性,IIV)研究指数式误差模型。对于PK模型(使用浓度作为响应),对个体内差异研究成比例的和组合的误差模型。对于PD模型(使用%结合作为响应),使用加性误差模型。

[0157] 对于模拟的人PK分布,不考虑个体内或个体间差异。

[0158] 检查程序。最终模型(即NONMEM控制流)被全面校对以确保正确。

[0159] 协变分析(covariate analysis)。对于小鼠PK模型,体重(BW)是作为所有PK参数的协变进行研究的。

[0160] 评估程序。最终模型的评估是通过标准图形估值方法而执行的。

[0161] 结果和讨论

[0162] 开发了三个小鼠品系PK模型:1) 仅野生型B6,2) B6和KIR-tgII结合,和3) KIR-tgI小鼠。

[0163] 野生型B6的分析。从野生型B6的PK数据的分析中,可以发现需要非线性来解释高低剂量组间的差别。所选模型使用特殊情形的Mager&Jusko的靶向调节的药物处置(TMDD)模型(Mager和Jusko,J Pharmacokinet Pharmacodyn 2001;28(6):507-532),其中仅分布体积是非线性的,而非清除率(参见图6中的图示)。可替换地,两室Michaelis Menten模型,即具有可饱和清除率,可说明PK分布,因此使得关于在PK数据中观察到的非线性的基础生理机理不可能得到结论。通过利用TMDD模型,可获得小鼠模型中清除率的合理估算,这对Michaelis-Menten模型是不可能的,且因此TMDD模型被用作最终模型。

[0164] B6和KIR-tgII小鼠的联合分析。对于野生型B6和KIR-tgII小鼠的联合分析,TMDD

模型被再次发现是解释所观察到的数据非线性的优选模型。为了研究是否可将两种小鼠品系中PK归结为不同,尝试以两个品系的相同参数或以两个品系的不同参数来说明数据。因为通过这两种方法的视觉模型匹配实际上是相同的,所以可以得出在两个品系的PK中没有差别的结论。然而,注意,可在目标函数值(OFV)中看到显著差异($\Delta \text{OFV}=28.4$)。

[0165] 考虑到可用数据的量,B6/KIR-tgII小鼠中最终模型的评估图表明模型质量完全可接受(图7和8)。更特别地,在个体水平上和群体平均水平上,观察的和预测的浓度间的一致性是完全可接受的。B6/KIR-tgII和KIR-tgI小鼠最终模型的参数估算分别在表1和表2中示出。

[0166] KIR-tgI转基因小鼠的分析。发现两个其他品系中KIR-tgI转基因小鼠的药代动力学显著不同。非线性程度大得多,且数据不与TMDD模型兼容,然而,用于可饱和消除(saturable elimination)的Michaelis-Menten模型是成功的。对于KIR-tgI转基因小鼠,在图9中将平均预测PK分布与平均观察值进行比较。

[0167] 表8:B6和KIR-tgII小鼠的最终组合的PK模型的参数估值

[0168]

参数	V ₁ (ml/g)	V ₂ (ml/g)	B ^{max} ($\mu\text{g mAb/g}$)	CL (ml/h)	Q ₁₂ (ml/h)	K _{on} (l/h)	K _{off} (l/h)
种群平均值	0.0689	0.0626	0.0662	0.0266	0.127	0.094	0.003
平均值的%SE	2.5	7.7	19.3	7.3	12.4	22.2	8.4
IIV(平均值的%)	-	-	19.5	37.8	-	-	-
残余 SD	22.4%						

[0169] 表9-KIR-tgI小鼠的最终PK模型的参数估值

	V ₁ (ml/g)	V ₂ (ml/g)	Q ₁₂ (ml/h)	V _{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml/h}\cdot\text{g BW}$)	K _m ($\mu\text{g/ml}$)
[0170] 群体平均值	0.072	0.0667	0.768	0.0276	0.892
平均值的%SE	6.1	10.7	44.4	2.1	9.1
最终 SD	36.7%				

[0171] 没有抗-KIR(1-7F9)的人PK数据可用,但由于抗-KIR(1-7F9)是完全人类IgG4,所以预期抗体将展示出类似于人内源IgG4的药代动力学特性。充分可接受的是,不易受靶向介导清除影响的IgG的PK分布通常可由两室模型来说明,如图10所示(参见Ghetie和Ward, Immunol Res 2002;25:97-9113)。

[0172] 为了预测抗-KIR(1-7F9)最可能的人PK参数,三种不同方法按照以下三部分所述进行比较。

[0173] (1) 人类IgG的典型PK参数

[0174] 文献中有大量关于内源性IgG和单克隆抗体的PK的信息。进行文献调研工作以鉴定定义人IgG两室模型的参数(CL、V₁、V₂和Q)的典型值。PK参数应与人体内人IgG的一般PK特征一致。初始中心体积(central volume)为约血浆体积,即3升,分布体积类似于或稍微大于中心体积,且平均终末半衰期为20-23天(Ghetie和Ward, Immunol Res 2002;25:97-9113;Morell等人,J Clin Invest1970;49:673-80;Roskos等人,Drug Dev Res 2004;61:108-20;Lobo等人,J Pharm Sci 2004;93:2645-68)。

[0175] 这些一般特征与来自不同文献资源的关于个体人和人源化抗体的文献数据结合。通常具有证明的靶向介导清除或与内源性IgG不一致的PK特性的mAb被排除。预期所引用的

清除率值反映经RES系统的一般性剂量独立的清除机制。

[0176] 如预期的那样,多数mAb具有接近血浆体积(约40ml/kg)的中心体积,而外周分布体积类似于或稍微高于该值。用于人PK后续模拟的PK参数在表10中示出。选择这些参数作为文献调研中发现的一般特征和特殊参数的反映。使用这些参数的终末半衰期是20天。

[0177] 表10-基于典型IgG值预测的人类抗-KIR(1-7F9)的PK参数

[0178]

PK参数	值
清除率(CL)	0.12ml/h/kg
V ₁ (中心体积)	40ml/kg
V ₂ (外周容积)	40ml/kg
Q(室间清除率)	1ml/h/kg

[0179] 最少数据支持的参数是室间清除率Q,对于该参数,需要使用有和没有靶向介导清除的人源化和人抗体的数据。在陈述中心体积和外周容积间转移的微恒量(micro-constant)的情况下,Q是根据 $V_1 \times k_{12}$ (室1和2间转移的速率常数)计算的。1ml/h/kg的室间清除率和40ml/kg的中心体积与1-3天的分布阶段(distribution phase)一致,这通常可在mAb中观察到。

[0180] 一种调节人体内IgG血浆半衰期的重要机理是结合到人FcRn(Brambell)受体(Lobe等人,J Pharm Sci 2004;93:2645-68),且抗-KIR(1-7F9)预期和内源IgG4抗体对FcRn受体具有类似亲合力。

[0181] 多数已知的人或人源化单克隆抗体为IgG1或IgG2亚型。抗-KIR(1-7F9)是IgG4,但预期PK参数类似于IgG1和IgG2,如通过内源IgG亚类的比较而评估的那样(Morell等人,J Clin Invest 1970;49:673-80)。因此预测抗-KIR(1-7F9)具有非常类似于如人体内CP-675206、Adalimumab、tefibazumab、pertuzumab和ABX-IL8的PK特性。

[0182] 关于猴PK参数,先前的NCA研究表明猕猴体内抗-KIR(1-7F9)的AUC在0.1-1mg/kg的研究范围内是剂量线性的。

[0183] 对于群体PK模型,发现2室模型适合描述静脉给予后的血浆浓度的双指数下降。四个参数中任一个上的个体间变化都不显著(p-level<0.01)。这可能是由于高个体内变化,这在对时间绘制实际血浆浓度时是明显的。模型中残留误差(或残差,residual error)是可接受的(29%)。

[0184] 表11-抗-KIR(1-7F9)的PK参数比较,使用NCA分析和群体PK方法,基于NCA,V₁=中心体积,V₂=外周分布体积,V_d=分布体积,CL=清除率,Q=室间清除率。

方法	V ₁ (ml/kg)	V ₂ (ml/kg)	CL(ml/h/kg)	Q(ml/h/kg)
[0185] NCA(平均值)	V _d =276		0.65	-
室群体 PK	62	181	0.64	3.8

[0186] 如表11所示,与报告的猴体内其他人抗体的清除率相比,NCA和群体PK模型一致地表明抗-KIR(1-7F9)的清除率略高(2-3倍)。然而,由于分布体积也是2-3倍高,终末半衰期(t_{1/2})为8-11天,这与给猴施用的人抗体的预期一致(Halpern等人,Toxico Sci 2006;91(2):586-599;Gobburu等人,J Pharmacol Exp Ther 1998;286(2):925-930)。观察到暴露与剂量成比例且没有观察到对清除率重要的饱和机理的指示。

[0187] 虽然某些实施例表明猴PK参数可直接转移到人,但要小心处理,因为物种差异,如FcRn亲和力可引起清除率方面的物种差异(Lobo等人,J Pharm Sci 2004;93:2645-68)。

[0188] 异速生长尺度分析。从两个物种,即小鼠和猴(体重0.025和2.5kg)的群体PK模型获得的四个结构PK参数(参见上述),被用来执行对人(70kg)的异速生长机制。所讨论的PK参数是对体重(BW)绘出的。所获得的直线确定以下方程中的A和B(Lobo等人,J Pharm Sci 2004;93:2645-68;Tabrizi等人,“Pharmacokinetics and immunogenicity profiles for fully human monoclonal antibodies against soluble and membrane bound antigens in patients with psoriasis and melanoma”,Poster on ASCPT 2004):

[0189] $\text{清除率} = A * (\text{体重})^B$

[0190] 所有四个参数(CL、V1、V2和Q)是以相似方式计算的。对于分布体积的尺度分析(scaling),仅小鼠模型的V1和V2被考虑。如与非特异性结合关联的第三可饱和室被忽略,因为mAb的人PK记录很少,且对于非常小的浓度,其被认为是线性的。

[0191] 表12-从异速生长尺度分析预测的抗-KIR(1-7F9)的人PK参数

[0192]

		异速生长尺度分析的系数	
PK 参数	人预测值	A	B
清除率 (CL)	0.46 ml/h/kg	-0.15	0.90
V1 (中心体积)	58 ml/kg	1.8	0.98
V2 (外周体积)	409 ml/kg	2.15	1.25
Q (室间清除率)	3.0 ml/h/kg	0.61	0.93

[0193] 仅存在少数关于使用异速生长机制的mAb的PK物种间外推的实施例(Tabrizi等人,上述;Richter等人,Drug Metab Dispos 1999;27:21-5,Lin等人,J Pharmacol Exp Ther 1999;288(1):371-378)。通常,使用该方法的人PK的预测看起来适用,但看起来清除率被过度预测(Tabrizi等人,上述;Lin等人,上述)。ABX-IL8就是该情形,仅两个物种用于抗-KIR(1-7F9)的异速生长机制,且形式上,连接两个点的直线统计基础差。然而,包括更多物种并不必然改善预测,因为该关系的潜在例外不能反应参数差异,而是消除机制(elimination mechanism)中的物种差异,特别是FcRn受体的亲和力。小鼠和猕猴FcRn的抗-KIR(1-7F9)的亲和力未知,因此,应谨慎应用异速生长机制(Lobo等人,J Pharm Sci 2004;93:2645-68)。

[0194] 总之,关于人PK的预测,由于抗-KIR(1-7F9)是全人IgG,所以预期抗体将具有类似于人体内源IgG的药代动力学特性。基于异速生长机制和猴清除率,人体清除率估计在0.46-0.64ml/h/kg,这高于人体内人IgG清除率的典型值(0.12ml/h/kg)。文献预测被用于开发人PK-PD模型,因为该方法估计最低清除率且因此估计人体内最高潜在暴露(potential exposure)。

[0195] KIR-tgII鼠中KIR受体饱和的PK/PD模型

[0196] PD响应数据(MFI)的定义。本方法的一个基本假定是%结合的合理值可由平均荧光强度(MFI)数据计算/定义。对于对照动物和受治疗动物,在筛选和测量时使用了几种不同的MFI测量标准。其包括:

[0197] 对照动物的MFI

- [0198] MFI_{游离,对照}:与游离受体相关的MFI (PBMC)
- [0199] MFI_{最大,结合,对照}:通过1-7F9孵育,与结合到1-7F9 (PBMC) 的受体相关的最大MFI
- [0200] MFI_{游离,背景}:评估游离受体时的背景MFI
- [0201] MFI_{结合,背景}:筛选时对受治疗动物评估结合受体时的背景MFI
- [0202] MFI_{游离,筛选}:与游离受体相关的MFI (PBMC) (仅对某些动物进行评估)
- [0203] 受治疗动物在实验时间点的MFI
- [0204] MFI_{游离}:与游离受体相关的MFI (PBMC)
- [0205] MFI_{结合}:与结合的受体相关的MFI (PBMC)
- [0206] MFI_{结合,脾脏}:与结合的受体 (脾脏细胞) 相关的MFI (仅对某些动物进行评估)
- [0207] MFI_{最大,结合,脾脏}:与结合的受体 (脾脏细胞) 相关的MFI (仅对某些动物进行评估)
- [0208] KIR受体的%饱和的计算。使用对照、背景和脾脏中最大结合,可对受治疗动物计算三个标准化的MFI值:

$$[0209] \quad \text{MFI}_{\text{游离,标准化}} = \frac{\text{MFI}_{\text{游离}} - \text{MFI}_{\text{游离,背景}}}{\text{Mean}(\text{MFI}_{\text{游离,对照}}) - \text{MFI}_{\text{游离,背景}}} \quad \text{方程1}$$

$$[0210] \quad \text{MFI}_{\text{结合,标准化}} = \frac{\text{MFI}_{\text{结合}} - \text{MFI}_{\text{结合,背景}}}{\text{Mean}(\text{MFI}_{\text{最大,结合,脾脏}}) - \text{MFI}_{\text{结合,背景}}} \quad \text{方程2}$$

$$[0211] \quad \text{MFI}_{\text{结合,标准化,自身对照}} = \frac{\text{MFI}_{\text{结合,脾脏}} - \text{MFI}_{\text{结合,背景}}}{\text{Mean}(\text{MFI}_{\text{最大,结合,脾脏}}) - \text{MFI}_{\text{结合,背景}}} \quad \text{方程3}$$

[0212] 在假定MFI随所涉及的受体数目线性增大下,这些标准化的MFI值可用来计算%结合受体和%游离受体。对于MFI_{游离,标准化}和MFI_{结合,标准化},可在各MFI值中发现高变化性。在假定该变化是由于KIR受体数目的个体间变化所致下,MFI_{游离,标准化}和MFI_{结合,标准化}与KIR受体数目成比例,因而%结合可如下计算,

$$[0213] \quad \% \text{结合} = \frac{\text{MFI}_{\text{结合,标准化}}}{\text{MFI}_{\text{结合,标准化}} + \text{MFI}_{\text{游离,标准化}}} \quad \text{方程4}$$

[0214] 这就是为PK/PD模型所选的方法。

[0215] 对于某些动物,要用额外样本评估MFI_{最大,结合,脾脏}和MFI_{结合,脾脏},使得可以使用动物自身最大水平进行标准化。对于这些动物,可以使用MFI_{结合,标准化,自身对照}来计算%结合受体。人们发现该方法可提供良好的一致性,15min的样本例外。其差别被认为可能是由于PBMC和脾脏细胞间的差异,因为抗-KIR (1-7F9) 到达脾脏要晚于其到达血液。

[0216] %结合的模型模拟。PK/PD模型是为说明KIR-tgII鼠中抗-KIR (1-7F9) 的血浆浓度和tgII受体饱和百分数间的关系而开发的。由于饱和与血浆浓度在所有时间点都不均衡,所以需要使用动态结合方程,将受体的结合速率 (on-rate) 和解离速率 (off-rate) ($k_{\text{结合}}$ 和 $k_{\text{解离}}$) 与血浆浓度 C_p 随时间的变化相联系。说明结合受体B的总数目的方程为:

$$[0217] \quad \frac{dB}{dt} = k_{\text{结合}}(B_{\text{最大}} - B)C_p - k_{\text{解离}}B \quad \text{方程5}$$

[0218] 等同替换地,我们发现描述结合百分数%B的方程:

$$[0219] \quad \frac{d\%B}{dt} = k_{\text{结合}}(100 - \%B)C_p - k_{\text{解离}}\%B \quad \text{方程6}$$

[0220] 解离常数 K_d 是由通过模型获得的 $K_{\text{结合}}$ 和 $K_{\text{解离}}$ 的值经 $K_d = k_{\text{解离}}/k_{\text{结合}}$ 计算的。

[0221] 当检查在每个时间点时结合的KIR受体百分数对血浆浓度的绘图时,可以看到在24小时之前的时间点,饱和受体需要的抗-KIR (1-7F9) 比随后的时间点要少。亲合力的明显减少的不同实验性实施显示出一致的结果。

[0222] 对于非常低的剂量 ($\leq 0.0004\text{mg/kg}$), 抗-KIR (1-7F9) 的血浆浓度与模型预测不一致, 模型预测表明血浆浓度约在定量限左右或低于定量限。为了将测量的%结合包括到模型中, PK部分从较高剂量外推。作为该外推的结果, 最高初始亲合力Kd1的精确值有一定的不确定性, 且随后最终模型使用Kd1 $\sim 0.004\mu\text{g/ml}$ 。在24-48小时后, 可以看到亲合力降低, 在后面的时间点Kd2 $\sim 0.1\mu\text{g/ml}$, 其中血浆浓度在可测量范围内。测量的和模拟的饱和之间良好的一致性可通过最终方法而获得。该最终模型可书写如下:

$$[0223] \quad K_d = e^{\frac{\log(Kd_{\text{最小}}) + (\log(Kd_{\text{最大}}) - \log(Kd_{\text{最小}})) \cdot \frac{\text{时间}}{(\text{时间} + T_{50})}}{\text{时间} + T_{50}}} \quad \text{方程7}$$

[0224] 其中参数值在表13中给出, $K_{\text{解离}}$ 保持不变, 而 $k_{\text{结合}}$ 是根据 $k_{\text{结合}} = k_{\text{解离}}/Kd$ 计算的。 T_{50} 是Kd发生50%变化的时间。

[0225] 由于抗-KIR (1-7F9) 具有两个结合位点, 所观察的亲合力降低被解释为提供双价和单价结合模式或其混合体。在几个实验条件中, 观察到抗-KIR (1-7F9) 的两种不同Kd值。体内结合模式从二价变为单价的可能解释可以是, 由于膜内受体内化或其他重排导致各受体间更大间隔因而KIR受体表面密度减小。这将减少强的二价结合, 因为抗体两个结合位点同时衔接的几率强烈取决于表面密度和膜结合的靶抗原的接近度 (Larsson等人, Molecular Immunology 26, 735-739)。

[0226] 表13-KIR-tgII小鼠中最终PK/PD模型的参数估算

[0227]

参数	$K_{\text{解离}}(\text{l/h})$	最小 Kd($\mu\text{g/ml}$)	$T_{50}(\text{h})$	最大 Kd($\mu\text{g/ml}$)
群体平均值	0.607	0.004	72	0.1
% 平均值的 SE	28.5	固定的	固定的	固定的
残差 (%结合) 加性误差模式	13.3			

[0228] 小鼠PK/PD模型向人的外推。在NONMEM中, 人PK/PD模型基本上通过在NONMEM输入文件中用表12中描述的人PK参数来替换小鼠PK参数而执行, 同时保持输入的PD结构 (表13)。剂量范围和长达13周的时间点是通过该模式进行模拟的。

[0229] 在模拟中, 仅考虑结构参数的群体平均值, 即不包括PK或PD参数的个体间或个体内变化。

[0230] KIR-tgII小鼠和人的不同细胞类型的体外结合曲线在图11中示出。这些结果证明, 血浆浓度和饱和度间的关系与人和KIR转基因小鼠的体内关系相似。因此, 虽然人体内血浆浓度的时间进程与小鼠不同, 但PK/PD模型可用于预测给药后给定时间点人体内给定时间点的针对给定血浆浓度的饱和度。

[0231] 通过比较黑猩猩和人体内抗CD11a mAb hu1124而成功进行了类似的亲和力的体外-体内比较 (Bauer等人, J Pharmacokinet Biopharm 1999; 27: 397-420)。

[0232] 最终模型的应用, 最大饱和与饱和持续时间的预测。最终预测的人体内抗-KIR (1-

7F9)的PK/PD模型被用来进行对体内不同剂量抗-KIR(1-7F9)的受体占据百分数对时间的模拟,以及推断最大KIR占据和占据持续时间(表14)。为了不低估潜在激活,选择模型估值以预测最大潜在激活,即模型基于:1)由PK模型预测的最高潜在暴露,2)PK和饱和度(低Kd)间高亲和力关系,和3)KIR占据百分数作为NK细胞最大潜在激活的度量。

[0233] 预测可引起体内可检测以及可度量但未完全饱和的抗-KIR(1-7F9)血浆浓度的剂量被鉴别为0.0003mg/kg,并被建议作为FHD试验中的起始剂量。

[0234] 表14-预测的NK细胞上的KIR饱和,饱和持续时间和预测的在不同IV剂量的抗-KIR(1-7F9)下体内的血浆浓度

[0235]

剂量(mg/kg)	%饱和的 KIR 受体*		>95% 饱和的天数	抗-KIR(1-7F9)的血浆浓度 $\mu\text{g/ml}$	
	最大结合	4 周后		C _{最大}	4 周后
0.0003	61	<20	0	0.007	0.001
0.001	85	<20	0	0.025	0.004
0.01	98	37	<1	0.25	0.04
0.1	100	85	9	2.5	0.4
0.3	100	95	25	7.4	1.3
1.0	100	98	56	25	4
1.5	100	99	63	37	6
3.0	100	99	84	74	12

[0236] *所建立的定量下限(lower limit of quantification)为占据测定中的约20%

[0237] 因此开发模拟模型以预测体内抗-KIR(1-7F9)剂量、最终血浆浓度分布和KIR受体占据之间的关系。该模型是通过组合体内IgG的典型PK模型和血浆浓度与KIR受体占据之间关系的模型而构建的。后面的模型是用KIR-tgII小鼠研究获得的数据开发的。

[0238] 在模型开发过程中使用谨慎性原则,旨在预测最大潜在占据。基于该模型,预测0.0003mg/kg的剂量可能在体内产生可检测的(>20%),但未完全的饱和(<95%)。该剂量预期在C_{最大}导致约60%的KIR占据。

[0239] 实施例7:临床AML研究

[0240] 单剂量递增试验是针对老年AML患者(>60岁)进行的,这些患者处于诱导和巩固化疗后的首次完全缓解期内,且不适于骨髓移植。使用标准3+3设计,且计划探究总共7个剂量水平:剂量范围在0.0003mg/kg至3mg/kg。给药后,监视患者安全、PK和KIR占据,直到KIR占据不再可检测。

[0241] 还进行了延伸试验(或扩展试验,extension trial)。完成剂量递增试验且还在完全缓解期内的AML患者可参与延伸试验,其中患者可每月给药达6次。患者的给药剂量与他们在前面试验中接受的剂量相同。

[0242] 患者、材料和方法

[0243] 在两类试验中,处于首次完全缓解期(CR)内,且不适于移植的老年AML患者(>60岁)适于该研究。在剂量递增试验的筛选中,时间是至少从最后一次化疗给药开始的30天且不超过120天。其他合格性标准包括(但不限于)KIR2DL1和2/3在NK细胞上表达,ECOG状态0-2,和从前面治疗的所有毒性恢复。对于延伸试验,完成可接受安全分布的剂量递增试验是额外的合格性标准。

[0244] 研究设计

[0245] 剂量递增试验是多中心、开放性(open-label)、单剂量递增安全性和耐受性试验。计划探究7个剂量水平:0.0003mg/kg、0.003mg/kg、0.015mg/kg、0.075mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg和3mg/kg。为该试验选择一般(3+3)设计。每个患者被分配一个剂量,并监视安全性、药代动力学和药效动力学,直到患者NK细胞上无可检测的KIR占据。安全性、PK和KIR占据被持续(on-going basis)分析,且在给药后前4周从每个剂量组获得的数据通常构成剂量递增决策的基础。

[0246] 延伸试验被设计为重复给药、多中心、开放性、安全性和耐受性。给每个患者的剂量与该患者在单剂量试验中接受的相同。患者可在4周间隔内接受6次给予,即,最长6个月持续时间的6个给药周期。每个给药周期由给药访问(dosing visit)和安全监视访问(safety monitoring visit)构成。在最后一次给药后,监视患者安全性直到患者NK细胞上没有可检测的KIR占据。该安全性随访期(follow-up period)的持续时间可能取决于接受的剂量,并预期最大在最后一次给药后24周。

[0247] 抗-KIR(1-7F9)给予的安全性(即,任何观察的毒性)是用美国国家癌症研究院不良事件常用术语标准(CTCAE)版本3.0评估的。药代动力学终点、KIR占据、NK细胞激活标志物和T细胞激活标志物、WT-1肿瘤标志物、无进展存活率(或无恶化存活率,progression-free survival)、和总存活率也被评估。

[0248] 结果

[0249] 基于报告的不良事件(AE)和实验室参数,迄今测试剂量(0.0003mg/kg、0.003mg/kg、0.015mg/kg)的抗-KIR(1-7F9)都具有良好的耐受性。迄今试验中报告的SAE都被视作无关的或不可能与药物试验相关。3个患者报告在给药后出现1级严重的轻度皮肤反应(背部红斑、瘙痒症和皮疹)。这些反应是作为非严重性并可能与试验药物相关的事件进行评估的,且患者大多在几天内恢复。

[0250] 实施例8:临床多发性骨髓瘤研究

[0251] 对患有复发或难治性多发性骨髓瘤(MMy)的患者进行剂量递增试验,其中患者可每月给药4次(即约4周的给药间隔)。合适患者是18岁以上的患者。

[0252] 采用标准的3+3设计,且计划探究总共7个剂量水平:给药范围0.0003mg/kg至3mg/kg(0.0003mg/kg、0.003mg/kg、0.015mg/kg、0.075mg/kg、0.3mg/kg、1.0mg/kg和3.0mg/kg)。给药后,监视患者安全、PK和KIR占据直到不能再检测到KIR占据。

[0253] 实施例9:患者体内的药代动力学

[0254] 方法

[0255] 抗-KIR(1-7F9)的血浆浓度通过下面简要说明的ELISA确定。

[0256] 用KIR2DL3包被溶液(100μl/孔)包被板并在+4℃孵育过夜。然后用自动洗板机以洗涤缓冲液(400μl/孔)洗涤板3次。加入封闭缓冲液(200μl/孔)且在室温下在板振荡器(plate shaker)上孵育板约2小时。此后,再次用洗涤缓冲液(400μl/孔)洗涤板3次。

[0257] 在室温下在板振荡器上孵育约2小时前,向板中加入标准液、定性对照(quality control)和样本(100μl/孔)。在加入小鼠抗人IgG4:过氧化物酶工作溶液(100μl/孔)前,再洗涤板3次(如上所述)。然后,再次在板振荡器上于室温下孵育板约2小时,然后再次洗涤。

[0258] 向板中加入TMB(100μl/孔),然后在板振荡器上于室温下孵育约30分钟。酶反应是

通过添加终止液 (50 μ l/孔) 而结束的。读取450nm的吸光值 (基准滤波器 (reference filter) 650nm)。

[0259] 该研究的定量下限是5.000ng/mL, 该研究的定量上限是110.0ng/mL。

[0260] 结果

[0261] 迄今, 在剂量递增试验中, 三个剂量水平0.0003、0.003和0.015mg/kg的抗-KIR mAb经静脉给予至9个AML患者, 而对4个MM_y患者给予0.0003mg/kg的抗-KIR。至此, 从AML患者获得的血浆数据, 可看出三个最低剂量间暴露的剂量线性增加 (图12)。在MM_y患者中观察的浓度与AML患者中观察的浓度恰好匹配 (align well)。在0.015mg/kg剂量后, 在给药后长达4周检测到可测量的抗-KIR血浆浓度。迄今在给药0.015mg/kg后, 记录的最高血浆暴露 (plasma exposure) 接近400ng/mL。

[0262] 实施例10: KIR占据测定

[0263] 在该测定中, 受体占据是通过四色荧光分析对人全血样本进行评估的。简单地, 游离和结合的KIR2D受体水平是在EDTA抗凝结外周血中对T和NK淋巴细胞进行评估的。游离位点测定将通过利用PE标记的1-7F9染色来评估未结合的KIR2D, PE标记的1-7F9结合到KIR2D分子。通过以识别结合到KIR2D受体的1-7F9的PE标记的小鼠抗人IgG4单克隆抗体进行染色, 结合位点测定将评估被1-7F9占据的KIR2D受体。游离和结合的测定将允许评估阳性染色百分数以及1-7F9-PE或抗hIgG4-PE的荧光强度 [MESF]。以下标记抗体的组合用在下述两种测定中:

[0264] 游离位点测定 (free site assay): CD3/1-7F9/CD45/CD56

[0265] 结合测定 (bound assay): CD3/ $\square$ hIgG4/CD45/CD56

[0266] 样本是用Becton Dickinson Cellquest软件在Becton Dickinson FACScalibur上分析的。T细胞被定义为CD45+CD3+淋巴细胞, 而NK细胞被定义为CD45+CD3-CD56+细胞。

[0267] 实施例11: PK/PD模型转移到人

[0268] 使用如实施例9和10所述而获得的药代动力学和KIR占据数据, 从三个正在进行的1-7F9的临床试验 (参见实施例7和8) 获得的数据被用来验证和更新实施例6中所述的临床前PK/PD模型。

[0269] 如实施例7和8所述, 患者静脉接受0.0003、0.003或0.015mg/kg体重的剂量。某些患者在4周间隔内接受相同剂量的重复给药, 但出于以下的计算目的, 这些剂量作为独立的单一剂量进行处理, 因为在这些低剂量的给药事件之间对占据没有持续作用或作用有限。

[0270] 占据计算

[0271] 对于KIR占据的计算, 不必使用临床前PK/PD模型所用的复杂公式, 因为每个患者可作为其自身对照。而且, 仅评估游离KIR受体数目的测定被用作指示该测定更可靠的验证。表示为NK细胞的等量可溶性荧光分子值 (MESF) 的标准化荧光被用来计算:

$$[0272] \quad \% \text{ 游离} = 100\% \times \frac{\text{MESF}}{\text{MESF}_{\text{给药前}}} \quad \text{方程8}$$

$$[0273] \quad \% \text{ 占据} = 100\% - \% \text{ 游离}$$

$$[0274] \quad \text{方程9}$$

[0275] 低于0的占据按定义设定为0。为了解释测定中的日差异, 显著KIR占据的截止值 (cut-off) 被设定为30%。

[0276] 数据分析

[0277] 对试验获得的PK和PD数据进行探索性分析,绘制KIR占据对1-7F9血浆浓度图并观察数据的任何趋势。为了说明性目的,简单单价结合等温线(isoterm)覆盖在这些绘图上。从临床前模型,可以知道假定亲和力(Kd)在某些时间范围内保持恒定是合理的,因此,每个时间范围的KIR占据应用方程10进行计算:

$$[0278] \quad \% \text{占据} = 100\% \times \frac{(1 - 7F9 \text{ 血浆浓度.})}{(Kd + 1 - 7F9 \text{ 血浆浓度.})} \quad \text{方程10}$$

[0279] 这也表明可假定这种结合与血浆浓度是瞬间均衡的。从临床前PK/PD模型可知道这是合理的假定。

[0280] 此外,将某些通过临床前PK/PD模型预测的PK和PD参数与正在进行的临床试验过程中的实际观察进行比较。

[0281] 群体PK

[0282] 可用PK数据被用于群体模拟从而生成人体内1-7F9的初步PK模型,同时PK/PD关系基于探索性分析。

[0283] 软件。下面的软件用于最终数据文件的生成:

[0284] S-plus,版本6.1,Insightful Corporation,西雅图,华盛顿,美国

[0285] 下面的软件用于非线性混合效应模拟:

[0286] NONMEM V,版本1.1,GloboMax,Hanover,马里兰,美国。

[0287] Visual-NM,版本5,RDPP,蒙彼利埃,法国。

[0288] 软件的安装/验证以如下方式执行:

[0289] NONMEM功能是用当前部门程序验证的。其他软件按照制造商建议进行安装。

[0290] 模型开发:有互动的NONMEM一级条件(FOCE)估算方法被用于模型开发。中间模型间的评估和区分基于目标函数值和标准图形估值方法。

[0291] 根据目标函数值,该值的变化被假定为 χ^2 分布的(嵌套模型),且扩展模型的标准是相应定义和使用的。

[0292] 低于LOQ的值的处理

[0293] 从模型中排除低于LOQ的值,但时间点保存在数据文件中以便获得预测值。

[0294] 结构模型和误差模型。为个体内差异研究比例误差模型和组合误差模型。

[0295] 检查程序。最终模型(即NONMEM控制流)被充分校对从而确保正确。

[0296] 协变分析。由于患者数目少所以不进行协变分析。

[0297] 评估程序。最终模型的评估是通过标准图形估值方法进行的。

[0298] 结构模型:研究标准一室和两室模型。此外,包括可饱和清除率和/或分布的模型被测试。

[0299] 结果

[0300] 临床前PK/PD模型的预测值。使用一般人IgG参数通过PK模型准确预测静脉给予后立即(10分钟)的1-7F9血浆浓度,比较表15。最大血浆浓度基本与中心体积的大小相关,中心体积的大小对人类而言是相当明确的,因此预期该参数将是预测的具有最大确定性的参数。对于随后时间点的预测,动力学过程(清除率、分布)被同时预测且因此预期预测的确定性较低,如观察的那样,以下比较。

[0301] 表15-静脉给予所列剂量后10分钟人体内1-7F9的血浆浓度。“预测的”是通过临床前PK/PD模型预测的值,“观察的”是临床试验得到的实际平均(标准偏差)值,n是数据点的数目

	剂量 mg/kg	预测的 ng/ml	观察的	
			平均 (sd)	n
[0302]	0.0003	7.5	11(7)	5*
	0.003	75	56(11)	3
	0.015	370	344 ^{\$} (66)	3

[0303] *两个LOQ值没有包括,\$使用1h时间点,10分钟没有确定

[0304] 类似地,最大占据(给药后2小时)可通过模型很好地预测(表16)。假定几乎在同一时间点血浆浓度和KIR占据都被很好地预测,则可以推断临床前PK/PD模型中包括的高初始亲合力确实适于预测给药后早时间点的人体内KIR占据。

[0305] 表16-静脉给予所列1-7F9剂量后2小时人体内KIR占据(%)。“预测的”是通过临床前PK/PD模型预测的值,“观察的”是临床试验得到的实际平均(标准偏差)值,n是数据点的数目。由于技术原因,最多95%可在测定中被检测到。

	剂 量 mg/kg	预测的 %	观察的	
			平均 (sd)	n
[0306]	0.0003	62	53(20)	10
	0.003	95	93(2)	7
	0.015	99	94(1)	3

[0307] 由于许多数据点的1-7F9血浆浓度低于LOQ,所以人体内初始KIR亲合力仅可从数据近似得出。然而,占据数据表明初始亲合力接近预测值4ng/ml,这可从图13中看出,该图描绘给药后2小时KIR占据对1-7F9的血浆浓度。临床前PK/PD模型预测亲合力随时间降低。虽然目前为止仅基于几个数据点,但对于给药后24小时到长达6周获得的占据数据,确实可观察到这样的趋势(图14)。与20ng/ml Kd的尝试性拟合叠加在绘图上。临床前模型预测24小时Kd为9ng/ml,也如图所示。

[0308] 给药后前几天,KIR受体去饱和的时间进程可由临床前PK/PD模型很好地描述。在随后时间点的适度偏离可能是由于血浆浓度比一般IgG PK预期降低更快,该IgG PK参数被用来预测人PK。然而,对于最大占据,潜在血浆浓度可由模型很好地预测。

[0309] 群体PK模型。如对单克隆抗体所预期的,血浆浓度的时间进程遵从双指数模式。因此,双室模型为数据给出比一室模型更好的拟合。

[0310] 可以看到分布相中非剂量成比例性的趋势,较低剂量比高剂量分布更快。用于更新模型的PK参数在表17中示出。

[0311] 表17-来自基于临床试验的前三个剂量水平数据的初步群体PK模型的平均群体PK参数。*Q仅为0.015mg/kg剂量水平示出

[0312]

PK参数	值
清除率(CL)	0.49ml/h/kg
V ₁ (中心体积)	47ml/kg

V ₂ (外周容积)	69ml/kg
Q (室间清除率)*	1.5ml/h/kg

[0313] 对于迄今获得的数据,清除率似乎比用在临床前PK/PD模型中0.12ml/h/kg的人IgG的一般清除率高(约4倍)。不受理论束缚,该差异可表明1-7F9经历靶向调节配置,如常从结合膜结合靶的抗体观察到的那样,并可能暗示1-7F9清除率可在较高剂量饱和,因此导致更长的终末半衰期。对于分布体积也有同样的考虑,分布体积可比预测的稍高。然而,也如上面探索性分析指示的那样,中心分布体积的大小可非常好地预测(0.047对0.041/kg)。

[0314] 结论

[0315] 总之,临床前PK/PD模型预测的特征也在迄今所获得的临床数据中观察到。最大占据和最大1-7F9血浆浓度都被很好地预测。亲合力可随时间改变,这也可通过模型预测。

[0316] 实施例12:基于更新的PK/PD模型的给药方案

[0317] 如前面实施例中所述获得的PK参数被用来确定要用在临床试验中抗-KIR(1-7F9)剂量水平的最优给药频率。

[0318] 使用1-7F9的临床治疗的给药频率取决于饱和和所需的稳态血浆浓度和清除率以及1-7F9的分布体积。

[0319] 虽然最大占据初始由高亲合力决定(初步结果表明约4ng/ml),随后维持该饱和和所需的血浆浓度更高(初步结果表明约20ng/ml)。

[0320] 获得>95%占据所需的浓度这里称作SatConc,比结合的K_d约高20倍(参考方程10)。为了确定给药间隔,假定血浆浓度在间隔内的所有时间都应高于SatConc,以便保持KIR占据>95%。

[0321] 给药间隔的计算基于方程11(Gabrielsson J&Weiner D,Pharmacokinetic and pharmacodynamics data analysis,第三版,Taylor&Francis 2000):

$$[0322] \quad D = \frac{\text{SatConc} \times V_d}{e^{-\text{tau} \times \text{Cl} / V_d}} \quad \text{方程11}$$

[0323] 其中V_d是稳态时分布体积(表17中V₁+V₂),D是剂量,C₁为清除率且tau为给药间隔。通过重新调整,tau可以表示为

$$[0324] \quad \text{tau} = \frac{-\ln(\text{SatConc} \times V_d) / D}{\text{Cl} / V_d} \quad \text{方程12}$$

[0325] 使用表17的PK参数和SatConc=400ng/ml为高于0.015mg/kg的剂量确定tau。对于较低的剂量,不能使用方程12,因为该方程基于较低的K_d在给药后24小时明显。取而代之,给药间隔是通过数据外推和交错(staggering)并假定亲合力将保持在重复给药的初始高亲合力而近似得出的,该情形可能是或可能不是重复给药。结果在表18和19中示出。

[0326] 表18-临床试验中使用的剂量的预测给药方案,旨在达到稳态时>95%KIR占据(0.0003mg/kg例外)

[0327]

剂量 (mg/kg)	观察的>95 占据的单剂量占据持续时间	预测的 95% 占据的 SS 占据持续时间 (tau) \$	给药方案
	(天)	(周)	
0.0003	<0.5		2-3x/天*
0.003	<7 天		1-2x/天*
0.015	2-7 天		3-5x/周*
0.075	-	0.7	1-2x/周
0.3	-	2.6	1x/2 周
1	-	4.3	1x/4 周
3	-	5.9	1x/6 周

[0328] *基于所观察的数据,而非基于模型预测

[0329] \$SS是用更新的PK模型预测的稳态

[0330] \$\$为了实施可行性,将tau适当地四舍五入为最近的完整天或周值。

[0331] 表19-用在临床试验中的剂量的预测给药方案,旨在达到稳态时>95%的KIR占据。给药频率是按周和月给出的。

[0332]

	C _{最小} 时精确达到 95%的给药间隔		给药频率, 完整周和月			
剂量 (mg/kg)	Tau(天)	Tau (周)	前 1 周	前 2 周	前 1 月(4.3 周)	前 2 月(8.6 周)
0.075	5	0.7	1.4	2.9	6.1	12
0.3	18	2.6	0.4	0.8	1.7	3.3
1	30	4.3	0.2	0.5	1.0	2.0
3	41	5.9	0.2	0.3	0.7	1.5

[0333] 该计算是基于剂量线性PK参数的假设。可替换地,产生KIR饱和血浆水平的剂量可取而代之地用包括任何观察的非线性(群体)PK/PD模型的模拟而发现。

[0334] 实施例13:癌症患者体内NK细胞的抗-KIR调节的激活

[0335] 根据NK细胞和T细胞调节的肿瘤细胞杀伤,位于细胞溶解颗粒膜内层的溶酶体相关膜蛋白1 (LAMP-1或CD107a) 暴露于NK细胞和T细胞表面上 (Betts等人, J Immunol Methods 2003;281:65-78)。在临床试验中,NK细胞上CD107a表达的评估被证明是可行的并且是NK细胞调节的肿瘤细胞杀伤的可靠标志物 (Koch等人, Ann Surg 2006;244:986-92)。

[0336] 在正在进行的研究对AML患者进行抗-KIR治疗的临床试验中,用流式细胞仪评估CD107a。收集血样,血红细胞被溶解,且外周血细胞被洗涤并随后针对CD3、CD45、和CD107a用抗体染色。用BD FACSDiva软件从BD FACScanto获取数据。

[0337] 结果表明NK细胞而非T细胞上CD107a的明显上调。以单剂量 (0.0003、0.003和0.015mg/kg) 抗-KIR (1-7F9) 治疗的8个患者中共有6个患者,在给药后24小时NK细胞上CD107a水平增加(图15)。

[0338] 而且,在以多个周期抗-KIR (1-7F9) 治疗(与上述剂量相同,最多重复6次给药)的AML患者中,在重复给药后观察到CD107a的水平增加。通过以肿瘤细胞体外模拟患者NK细胞,CD107a水平增加与肿瘤细胞杀伤增加一致。在患有多发性骨髓瘤的患者中,抗-KIR (1-7F9) 给药后,5个患者共有4个患者观察到CD107a上调。

[0339] 除了CD107a, MIP-1 β (巨噬细胞炎性蛋白-1 β) 也表明是NK细胞激活的可靠标志物和有效的NK细胞化学引诱物(或趋化物, chemoattractant) 和NK细胞调节的抗肿瘤效应的刺激物(Hanna等人, J Immunol 2004;173:6547-63;Luo等人, Cell Mol Immunol.2004;1:199-204)。AML和多发性骨髓瘤试验中, 在1-7F9给予后, 在12个患者中总共11个患者中观察到MIP-1 β 的血清水平增加。

[0340] 总之, 这些结果证明对癌症患者进行抗-KIR治疗使得能够快速并重复实现NK细胞激活和肿瘤细胞杀伤。

[0341] 实施例14: 抗-KIR调节的肿瘤标志物减少

[0342] 在急性髓性白血病(AML)中, 最小残余疾病的检测对于风险分级(risk stratification)和复发的早期检测具有提高的重要性。Wilms肿瘤基因1(WT-1)转录本在多于90%的髓性白血病中过表达。WT-1与肿瘤负担相关, 并被证明是用于监视对AML治疗的响应的分子的有价值的工具。而且, WT-1水平的增加发生在临床复发之前(Cillonni等人, Acta Haematol.2004;112:79-8)。

[0343] 在正在进行的研究对AML患者进行抗-KIR(1-7F9)治疗的临床试验中, WT-1水平是在骨髓和血液样本中测量的。WT-1水平是根据制造商说明, 通过Ipsogen的qRT-PCR测定(PQPP-01)评估的。在抗-KIR(1-7F9)给药后, 在6个患者中共4个患者中观察到骨髓或血液WT-1水平的降低。

[0344] 多发性骨髓瘤是恶性B细胞失调, 其特征是骨髓中恶性浆细胞的单克隆增殖(monoclonal expansion)。疾病特点是血清和/或尿液中高水平的单克隆(M)免疫球蛋白(M-protein)。在临床试验中, 作为治疗反应标志物的M蛋白的常规监测是标准的临床实践(Prince等人等人, Leuk Lymphoma.2007;48:46-55)。

[0345] 在正在进行的研究对患有多发性骨髓瘤患者进行抗-KIR(1-7F9)治疗的临床试验中, 尿液M蛋白是根据制造商说明用Helena Laboratories的凝胶电泳测定(3398)评估的。在4个可评估患者中总共2个患者中观察到抗-KIR给药后尿液M蛋白减少。

[0346] 总之, 这些结果证明对癌症患者进行抗-KIR(1-7F9)治疗能够诱导抗肿瘤反应。

[0347] 实施例15: 制剂研究

[0348] 在该实施例中, 我们在6个月稳定性条件下测试了5种不同1-7F9制剂。

[0349] 材料和方法

[0350] 5种不同1-7F9制剂(10mg/mL 1-7F9、10-50mM磷酸钠、160-240mM蔗糖、0.1-0.5mg/mL聚山梨醇酯80, pH 7.0)是基于pH、外观、GP HPLC、SDS-PAGE、和IEF, 在长达6个月的存储期内, 在3个不同温度下, 根据表20中的时间安排而进行分析的。关于制剂的细节在表21中给出。

[0351] 该分析基本按照实施例3中所说明的进行, 除了凝胶渗透GPHPLC在Waters 2695系统上执行, 且流动相为0.1M磷酸钠, pH值为7.0, 流速为1.0mL/min。圆形二色性是在Chirascan CD(Applied Photophysics)上进行的。

[0352] 表20-第二制剂研究的时间安排

[0353]

温度	时间点(月)				
	0	1	2	3	6

5℃	×	NT	×	×	×
25℃	×	×	NT	×	×
40℃	×	×	×	×	NT

[0354] ×=进行测试;NT=未测试

[0355] 表21-测试的制剂

[0356]

成分	量				
	制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4	制剂 5
抗-KIR	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml
磷酸二氢钠	1.38mg/ml (10 mM)	2.76mg/ml (20 mM)	4.14mg/ml (30 mM)	6.90mg/ml (50 mM)	2.76mg/ml (20 mM)
蔗糖	82.2mg/ml (240 mM)	75.3mg/ml (220 mM)	68.5mg/ml (200 mM)	54.8mg/ml (160 mM)	75.3mg/ml (220 mM)
吐温 80	0.1 mg/ml	0.1 mg/ml	0.1 mg/ml	0.1 mg/ml	0.5 mg/ml
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

[0357] 结果

[0358] 结果在表22A-C、23A-C、24A-C和25A-C中示出。

[0359] 表22-pH测量

[0360]

A-5℃	月		
	0	3	6
制剂 1	7.03	7.06	7.06
制剂 2	7.04	7.04	7.03
制剂 3	7.05	7.03	7.01
制剂 4	7.05	7.03	7.00
制剂 5	7.05	7.02	7.02

[0361]

B-25℃	月			
	0	1	3	6
制剂 1	7.03	7.08	7.06	7.05
制剂 2	7.04	7.07	7.05	7.03
制剂 3	7.05	7.06	7.02	7.01
制剂 4	7.05	7.05	7.03	7.00
制剂 5	7.05	7.04	7.03	7.02

[0362]

C-40℃	月		
	0	1	3
制剂 1	7.03	7.07	7.06
制剂 2	7.04	7.04	7.04
制剂 3	7.05	7.02	7.03
制剂 4	7.05	7.02	7.02
制剂 5	7.05	7.01	7.05

[0363] 表23-外观打分:0最差;1表示制剂具有可能适于药物产品的特性;且2表示制剂具有适于药物产品的高质量。

[0364]

A-5°C	月		
	0	3	6
制剂 1	2	2	2
制剂 2	2	2	2
制剂 3	2	2	2
制剂 4	2	2	2
制剂 5	2	2	2

[0365]

B-25°C	月		
	0	3	6
制剂 1	2	2	2
制剂 2	2	2	2
制剂 3	2	2	2
制剂 4	2	2	2
制剂 5	2	2	2

[0366]

C-40°C	月			
	0	1	2	3
制剂 1	2	2	2	2
制剂 2	2	2	2	2
制剂 3	2	2	2	2
制剂 4	2	2	2	2
制剂 5	2	2	2	2

[0367] 表24-GP-HPLC获得的纯度,按单体百分数测定

[0368]

A-5°C	月		
	0	3	6
制剂 1	94	94	95
制剂 2	94	95	94
制剂 3	94	95	95
制剂 4	94	95	93
制剂 5	94	94	94

[0369]

B-25°C	月			
	0	1	3	6
制剂 1	94	93	94	91
制剂 2	94	94	94	91
制剂 3	94	93	94	91
制剂 4	94	93	94	91
制剂 5	94	94	94	89

[0370]

C-40°C	月			
	0	1	2	3
制剂 1	94	89	82	74
制剂 2	94	89	82	76
制剂 3	94	88	83	76
制剂 4	94	86	79	74
制剂 5	94	91	80	74

[0371] 表25-生物活性(任意单位)

[0372]

A-5°C	月		
	0	3	6
制剂 1	8.78	8.19	8.70
制剂 2	8.88	9.99	10.10
制剂 3	9.48	9.38	9.30
制剂 4	9.57	9.45	8.00
制剂 5	9.91	9.50	8.60

[0373]

B-25°C	月			
	0	1	3	6
制剂 1	8.78	8.90	8.60	7.50
制剂 2	8.88	9.46	7.99	7.00
制剂 3	9.48	9.32	8.56	7.30
制剂 4	9.57	9.30	9.28	7.20
制剂 5	9.91	10.11	9.00	8.20

[0374]

C-40°C	月			
	0	1	2	3
制剂 1	8.78	7.29	5.80	4.47
制剂 2	8.88	7.74	5.70	4.39
制剂 3	9.48	6.53	4.96	3.71
制剂 4	9.57	6.27	5.27	3.75
制剂 5	9.91	6.14	6.15	4.42

[0375] 6个月后,5种不同制剂间观察不到显著差别,因为它们均表明具有高质量,适于药物抗体产品,并表明pH、外观、GP-HPLC、生物活性分析方面没有显著差别。圆形二色性也没有检测到差别。此外,即使在该实验中测试的聚山梨醇酯80的浓度(0.010-0.050%)比前面情形中高10至50倍,也检测不到实际聚山梨醇酯浓度对被测试参数的实质影响。包括20mM磷酸钠、220mM蔗糖、0.001%聚山梨醇酯80,pH值为7.0的制剂具有低磷酸盐含量和恰当的渗量、以及优异的稳定性的优点。

[0376] 这里引用的所有文献,包括出版物、专利申请、和专利以其全部内容以引用方式结合于本文中并且相同程度地如同每个文献单独地并特别地以引用方式结合并以其全部内容陈述于此(法律允许的最大程度),不考虑本文其他地方独立提供的特定文献的结合。

[0377] 在描述本发明的上下文中使用术语“一”和“该”以及类似指示都应解释为包括单

数和复数,除非上下文另外指出或与本文明显抵触。

[0378] 除非额外指出,这里提供的所有精确值都代表相应的近似值(如,关于特定因素或度量提供的所有精确的示例性值都可被当作也提供相应的近似度量,适当时用“约”修饰)。而且,任意组数值中使用术语“约”是为了为该组中每个值提供支持(不考虑本文中该用途中的不一致性),除非额外指出(如短语约1、2、或3应解释为对“约1”、“约2”、和“约3”提供支持)。

[0379] 这里值范围的引用仅是为了用作个别提及落在与该范围下端点相同量级和相同意义内(即,所有意义相似的数字)的范围中的每个独立值的简略表示方法,除非本文额外说明,且每个独立值包括在该说明书中,如同其在本文中个别被引用。因此,例如,这里1-100的范围支持在1-100之间(包括1-100)的每个整数(即,1、2、3、4、...、98、99和100),且范围0.1-1支持这些端点之间并包括这些端点的与0.1相同量级和相同意义的每个值(即,0.1、0.2、0.3、...、0.9、1.0)。

[0380] 本文中对本发明任何方面或实施方式的、涉及一个或多个元素而使用诸如“包括”、“具有”、“包含”、或“含有”术语的说明,旨在为由该特定元素或多个元素“构成”、“基本构成”的、或“基本上包括”该特定元素或多个元素的本发明的类似方面或实施方式提供支持,除非上下文另外指出或明显抵触(如,这里所述的包括特定成分(元件,element)的组合物应理解为也描述由该元素构成的组合物,除非上下文另外指出或明确抵触)。

[0381] 这里提供的任意和所有实施例、或示例性语言(如,“例如”)的使用,仅为了更好地说明本发明,而不限本发明的范畴,除非另外指出。本说明书中没有言语可解读为指示任何未被要求保护的元素对实施本发明是重要的。

[0382] 本发明包括权利要求中提到的主题和/或包括在此的方面的所有修改和等同物,如适用法允许的那样。

[0383] 本发明的示例性实施方式

[0384] 为了更好地阐述这里所述的本发明,这里提供本发明示例性实施方式和特征的非限制列举。这些实施方式在这里提供的本发明的说明书中更全面地得到说明,且本发明的其他实施方式、特征和优点通过这里提供的本发明的说明书也变得明了。

[0385] 以下实施方式涉及用于调节需要其的患者体内NK细胞活性的组合物:

[0386] 1.一种调节需要其的患者体内NK细胞活性的方法,包括对患者给予一种抗体,该抗体结合至少一种人类抑制性KIR抗体,剂量范围为约0.0003至约3mg/kg。

[0387] 2.根据实施方式1的方法,其中该剂量的范围为约0.075至约3mg/kg。

[0388] 3.根据实施方式2的方法,其中该剂量选自约0.0003、约0.003、约0.015、约0.075、约0.3、约1和约3mg/kg。

[0389] 4.根据实施方式1的方法,包括重复给予至少一次。

[0390] 5.根据实施方式1的方法,其中所述给予以每天3次至每两个月一次的给药频率进行重复。

[0391] 6.根据前述任一实施方式的方法,其中该剂量至少给予3次。

[0392] 7.根据实施方式4的方法,其中该剂量至少给予6次。

[0393] 8.根据前述任一实施方式的方法,其中该抗体静脉内给予。

[0394] 9.根据前述任一实施方式的方法,其中抗体结合到NK细胞表面上的抑制性KIR可

增强NK细胞的细胞毒活性。

[0395] 10. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体是交叉反应性抗-KIR抗体。

[0396] 11. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体具有以下一种或多种特性:

[0397] (a) 为约2至约6ng/ml的高亲合力Kd;

[0398] (b) 为约10至约30ng/ml的低亲合力Kd;

[0399] (c) 为约0.25至约0.75ml/h/kg的清除率; 以及

[0400] (d) 为约50ml/kg至约175ml/kg的分布体积。

[0401] 12. 根据实施方式11的方法, 其中该抗体具有特性(a)至(d)中的所有特性。

[0402] 13. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体包括抗体1-7F9的可变重链(SEQ ID NO:3)和可变轻链(SEQ ID NO:2)区序列。

[0403] 14. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体包括包含SEQ ID NO:1的序列的重链。

[0404] 15. 根据前述任一实施方式的方法, 其中在取自第一次给药后24小时的患者体内的血液样本中, 患者NK细胞上CD107a的水平增加。

[0405] 16. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该剂量没有增加血液样本中T细胞上CD107a的水平。

[0406] 17. 根据前述任一实施方式的方法, 导致NK细胞上至少约50%的KIR占据。

[0407] 18. 根据前述任一实施方式的方法, 导致NK细胞上至少约90%的KIR占据。

[0408] 以下实施方式涉及治疗患者癌症的方法, 以及相关制品:

[0409] 1. 一种治疗患者癌症的方法, 包括以实现血液中NK细胞上至少约95%的KIR占据达到至少约3个月的剂量和给药频率给予抗-KIR抗体。

[0410] 2. 根据实施方式1的方法, 其中该剂量的范围为约0.003至约3mg/kg。

[0411] 3. 根据实施方式1的方法, 其中该剂量的范围为约0.075至约3mg/kg。

[0412] 4. 根据实施方式2的方法, 其中该剂量选自约0.0003、约0.003、约0.015、约0.075、约0.3、约1、和约3mg/kg。

[0413] 5. 根据实施方式1的方法, 其中该给药频率范围为每天一次至每两个月一次。

[0414] 6. 根据实施方式5的方法, 其中该给药频率范围为约每周一次至约每两个月一次。

[0415] 7. 根据实施方式6的方法, 其中该给药频率是约每月一次。

[0416] 8. 根据实施方式5的方法, 其中该给药频率选自约每天三次、约每天两次、和约每天一次; 约每周五次、约每周四次、约每周三次、和约每周两次; 以及约每两周一次、约每四周一次、和约每六周一次。

[0417] 9. 根据实施方式1的方法, 其中约0.075至约0.3mg/kg的剂量以约每周两次至约每月一次的频率给予。

[0418] 10. 根据实施方式1的方法, 其中约0.3至约1mg/kg的剂量以约每月一次至约每月两次的频率给予。

[0419] 11. 根据实施方式1的方法, 其中约1至约3mg/kg的剂量以约每月一次至约每两个月一次的频率给予。

[0420] 12. 根据实施方式10和11中任一种的方法, 其中该给药频率为约每月一次。

[0421] 13. 根据实施方式1的方法, 其中该剂量和给药频率选自以下组合中的任一种:

[0422]

剂量 (mg/kg)	给药方案
约0.003	每天1-2次
约0.015	每周3-5次
约0.075	每周1-2次
约0.3	每月1-2次
约1	约每月1次
约3	每两个月1-2次

[0423] 14. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该剂量至少给予3次。

[0424] 15. 根据实施方式14的方法, 其中该剂量至少给予6次。

[0425] 16. 根据前述任一实施方式的方法, 包括以实现血液中NK细胞上至少约95%的KIR占据至少约6个月的剂量和给药频率给予KIR抗体。

[0426] 17. 根据前述任一实施方式的方法, 其中所述癌症是急性髓性白血病 (AML)、慢性髓性白血病 (CML)、多发性骨髓瘤 (MM_y)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、直肠癌、肾癌、卵巢癌、肺癌、乳癌、或恶性黑色素瘤。

[0427] 18. 根据前述任一实施方式的方法, 其中所述抗体是静脉内给予的。

[0428] 19. 根据前述任一实施方式的方法, 其中抗体结合到NK细胞表面上的抑制性KIR可增强NK细胞的细胞毒活性。

[0429] 20. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体是交叉反应性抗-KIR抗体。

[0430] 21. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体具有以下一种或多种特性:

[0431] (a) 为约2至约6ng/ml的高亲合力K_d;

[0432] (b) 为约10至约30ng/ml的低亲合力K_d;

[0433] (c) 为约0.25至约0.75ml/h/kg的清除率; 以及

[0434] (d) 为约50ml/kg至约175ml/kg的分布体积。

[0435] 22. 根据实施方式21的方法, 其中抗体具有特性 (a) 至 (d) 的所有特性。

[0436] 23. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体包括抗体1-7F9的可变重链 (SEQ ID NO:3) 和可变轻链 (SEQ ID NO:2) 区序列。

[0437] 24. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该抗体包括包含SEQ ID NO:1的序列的重链。

[0438] 25. 根据前述任一实施方式的方法, 其中在第一次给药后24小时获取的血液样本中该患者NK细胞上的CD107a水平增加。

[0439] 26. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该剂量没有增加血液样本中T细胞上的CD107a水平。

[0440] 27. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该患者患AML且其中血液和/或骨髓中Wilm的肿瘤基因1转录本的水平在一次或多次抗-KIR抗体给药后降低。

[0441] 28. 根据前述任一实施方式的方法, 其中该患者患MM_y且其中尿液中M蛋白的水平在一次或多次抗-KIR抗体给药后降低。

[0442] 以下实施方式描述根据本发明的示例性制品 (如药剂盒):

[0443] 1. 一种制品, 包括:

[0444] (a) 包含抗-KIR抗体的容器;以及

[0445] (b) 包装插件,具有对治疗患者癌症的说明书,其中该说明书指示以约每天一次至约两个月一次的给药频率给予患者约0.003至约3mg/kg剂量的抗-KIR抗体。

[0446] 2.根据实施方式1的制品,其中该剂量为约0.075至约0.3mg/kg且该给药频率为约每周两次至约每月一次。

[0447] 3.根据实施方式1的制品,其中该剂量为约0.3至约1mg/kg且该给药频率为约每月一次至约每月两次。

[0448] 4.根据实施方式1的制品,其中该剂量为约1mg/kg至约3mg/kg且所述给药频率为约每月一次至约两个月一次。

[0449] 5.根据实施方式30和31中任一种的制品,其中该给药频率为约一月一次。

[0450] 6.根据实施方式1的制品,其中该剂量和给药频率选自以下组合中的任一种:

[0451]

剂量 (mg/kg)	给药方案
约0.003	每天1-2次
约0.015	每周3-5次
约0.075	每周1-2次
约0.3	每月1-2次
约1	约每月1次
约3	每两个月1-2次

[0452] 7.根据实施方式1的制品,进一步包括容器,该容器包含第二药剂,其中所述包装插件进一步包括以第二药剂治疗患者的说明书。

[0453] 8.根据实施方式7的制品,其中该第二药剂是免疫调节剂、激素试剂、化疗剂、抗血管生成剂、凋亡剂、结合到抑制性KIR的第二抗体、抗感染剂、靶向剂、和抗CD20抗体。

[0454] 本发明的以下实施方式涉及抗-KIR抗体的药物制剂。

[0455] 1.一种药学可接受的活性制剂,包括(a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL的IgG4抗体; (b) 约10-50mM磷酸钠; (c) 约160-250mM的蔗糖或约100mM的NaCl; 和(d) 聚山梨醇酯80, pH值为约7。

[0456] 2.根据实施方式1的制剂,其中该抗体是中和性抗-KIR抗体。

[0457] 3.根据实施方式2的制剂,其中该抗体是交叉反应性抗-KIR抗体。

[0458] 4.根据实施方式3的制剂,其中该抗体包括根据SEQ ID NO:3的重链序列。

[0459] 5.根据实施方式4的制剂,其中该抗体包括根据SEQ ID NO:2的轻链序列。

[0460] 6.根据实施方式5的制剂,其中该重链序列包括SEQ ID NO:1。

[0461] 7.根据实施方式1-3中任一种的制剂,其中该IgG4抗体分子的浓度为约1-10mg/ml。

[0462] 8.根据实施方式7的制剂,其中IgG4抗体的浓度为10mg/ml。

[0463] 9.根据实施方式1至8中任一种的制剂,包括约20-50mM磷酸钠、约220-250mM蔗糖、以及约0.001%的聚山梨醇酯80。

[0464] 10.根据实施方式9的制剂,包括约20mM磷酸钠和约220mM蔗糖。

[0465] 11.一种药学可接受的活性制剂,包括(a) 约0.05mg/mL至约10mg/mL的IgG4抗体分

子,该抗体分子包括根据SEQ ID NO:1的重链和包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区的轻链;(b)约50mM磷酸钠;(c)约250mM蔗糖;和(d)约0.001%的聚山梨醇酯80,pH值为约7。

[0466] 12.一种药学可接受的活性制剂,包括(a)约0.05mg/mL至约10mg/mL的IgG4抗体分子,该抗体分子包括根据SEQ ID NO:3的重链可变区的重链和包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区的轻链;(b)约50mM磷酸钠;(c)约250mM蔗糖或约100mM氯化钠;和(d)约0.001%的聚山梨醇酯80,其中该制剂pH值为约7。

[0467] 13.一种药学可接受的活性制剂,包括(a)约0.05mg/mL至约10mg/mL的IgG4抗体分子,该抗体分子包括根据SEQ ID NO:1的重链和包括根据SEQ ID NO:2的轻链可变区的轻链;(b)约20mM磷酸钠;(c)约220mM蔗糖;和(d)约0.001%的聚山梨醇酯80,pH值为约7。

[0468] 14.一种药学可接受的活性制剂,包括(a)约0.05mg/mL至约10mg/mL的IgG4抗体分子,该抗体分子包括含根据SEQ ID NO:3的重链可变区的重链和含根据SEQ ID NO:2的轻链可变区的轻链;(b)约20mM磷酸钠;(c)约220mM蔗糖或约100mM氯化钠;和(d)约0.001%的聚山梨醇酯80,其中该制剂pH值为约7。

[0469] 15.根据实施方式1-14中任一种的制剂,其中该抗体是1-7F9。

[0470] 16.根据实施方式1-15中任一种的制剂,其中该制剂中抗体浓度为约10mg/mL。

[0471] 17.根据实施方式1-15中任一种的制剂,其中该制剂中抗体浓度为约0.05mg/mL。

[0472] 18.一种由多个成分的混合物制备的药学可接受的活性制剂,包括(a)一定量的IgG4抗体分子使得该制剂中抗体浓度为约10mg/mL,该抗体分子包括含根据SEQ ID NO:3的重链可变区的重链和含根据SEQ ID NO:2的轻链可变区的轻链;(b)约8.4mg/mL磷酸氢二钠(七水合物);(c)约2.6mg/mL磷酸二氢钠;(d)约85mg/mL蔗糖;和(e)约0.01mg/mL的聚山梨醇酯80,其中该制剂pH值为约7。

[0473] 19.根据实施方式18的制剂,其中该抗体包括根据SEQ ID NO:1的重链。

[0474] 20.根据实施方式19的制剂,其中该抗体是1-7F9。

[0475] 21.根据实施方式1-20中任一种的制剂,其中该制剂在约5℃存储长达约1个月具有小于约10%的杂质含量。

[0476] 22.根据实施方式21的制剂,其中该制剂在约5℃存储长达约3个月具有小于约5%的高分子量蛋白杂质含量。

[0477] 23.一种药学可接受的活性制剂,包括(a)约0.05mg/mL至约10mg/mL的IgG4抗体分子,该抗体分子包括含根据SEQ ID NO:3的重链可变区的重链和含根据SEQ ID NO:2的轻链可变区的轻链;(b)约5-20mM磷酸钠;(c)约180至约250mM蔗糖;和(d)约0.001-0.1%的聚山梨醇酯80,其中该制剂pH值为约7。

[0478] 24.根据实施方式21的制剂,其中该制剂包括约200mM蔗糖。

[0479] 25.根据实施方式23或24的制剂,其中该制剂在约5℃存储长达约1个月具有小于约10%的杂质含量。

[0480] 26.根据实施方式23-25中任一种的制剂,其中该制剂在约5℃存储长达约3个月具有小于约5%的高分子量蛋白杂质含量。

[0481] 27.根据实施方式23-26任一种的制剂,其中该制剂是等张的。

[0482] 28.根据实施方式23-27中任一种的制剂,其中该制剂中抗体的浓度为约10mg/mL。

[0483] 29.根据实施方式23-27中任一种的制剂,其中该制剂中抗体的浓度为约0.05mg/

mL。

[0484] 30. 根据实施方式23-27中任一种的制剂, 其中该制剂中抗体的浓度为约0.1mg/mL。

[0485] 31. 根据实施方式23-27中任一种的制剂, 其中该制剂中抗体的浓度为约1mg/mL。

[0486] 32. 一种制备用于通过静脉注射给予人的药学可接受制剂的方法, 包括在约5℃温度下存储根据实施方式1-20中任一种的浓缩制剂, 并在包括实施方式1的组分(b)-(d) (但没有任何抗体) 的溶液中稀释该浓缩制剂从而生产可立即给予的(稀释)产品, 并在给药前在约5℃温度下存储该可立即给予产品长达约24个小时。

[0487] 33. 根据实施方式32的方法, 其中浓缩产品的抗体浓度为约1mg/mL至约10mg/mL, 稀释产品的抗体浓度为约0.05mg/mL。

[0488] 34. 一种制备用于通过静脉注射给予人的药学可接受的制剂, 包括在约5℃温度下存储根据实施方式21-31中任一种的浓缩制剂并在无菌等渗盐溶液中稀释该浓缩制剂从而生产可立即给予的(稀释的)产品, 并在给药前在约5℃温度下存储该可立即给予的产品长达约24个小时。

[0489] 35. 根据实施方式34的方法, 其中该浓缩产品具有约1mg/mL至约10mg/mL的抗体浓度且该稀释产品具有约0.05mg/mL的抗体浓度。

[0490] 36. 一种包括存储容器的药物产品, 该存储容器包括体积为约3mL至约30mL的根据实施方式1-22中任一种的制剂。

[0491] 37. 根据实施方式36的产品, 其中该容器包括约5mL或约10mL的制剂。

[0492] 38. 一种包括存储容器的药物产品, 该存储容器包括体积约3mL至约30mL的根据实施方式23-31中任一种的制剂。

[0493] 39. 根据实施方式38的产物, 其中该容器包括约5mL或约10mL的制剂。

[0494] 40. 一种增强需要其的患者体内NK细胞活性的方法, 包括向患者给予根据实施方式1-31中任一种的制剂, 其中抗体剂量为约0.0003mg/kg (患者体重) 至约3mg/kg。

[0495] 41. 根据实施方式40的方法, 其中该剂量为约0.001mg/kg至约3mg/kg。

[0496] 42. 根据实施方式40或实施方式41的方法, 其中该患者是被诊断患有癌症的患者。

[0497] 43. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有急性髓性白血病的患者。

[0498] 44. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有慢性髓性白血病的患者。

[0499] 45. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有多发性骨髓瘤的患者。

[0500] 46. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有非霍奇金淋巴瘤的患者。

[0501] 47. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有直肠癌的患者。

[0502] 48. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有肾癌的患者。

[0503] 49. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有卵巢癌的患者。

[0504] 50. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有肺癌的患者。

[0505] 51. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有乳癌的患者。

[0506] 52. 根据实施方式42的方法, 其中该患者是被诊断患有恶性黑素瘤的患者。

[0507] 53. 根据实施方式40或41的方法, 其中该患者是被诊断患有传染病的患者。

[0508] 54. 根据实施方式40-53中任一种的方法, 其中该方法包括在前一次给予后至少约6小时给予患者约0.0003mg/kg至约3mg/kg的一个或多次额外剂量。

- [0509] 55. 根据实施方式1-31中任一种的制剂在药物制备中的应用。
- [0510] 56. 根据实施方式1-31中任一种的制剂在制备用于治疗癌症或传染病的药物中的应用。
- [0511] 57. 根据实施方式1-31中任一种的制剂以提供约0.0003mg/kg至约3mg/kg抗体的量用作治疗癌症的药物的应用。
- [0512] 58. 根据实施方式1-31中的任一种、用于治疗癌症或传染病的制剂。
- [0513] 59. 根据实施方式1-31中的任一种、用于治疗癌症的制剂。

序列表

<110> 诺和诺德公司(Novo Nordisk A/S)

<120> 抗-KIR抗体、制剂及其应用

<130> PW35267LECL

<150> US60/879964

<151> 2007-01-11

<150> US60/911527

<151> 2007-04-13

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(8)

<400> 1

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ser Thr Gly
1 5 10 15

[0001]

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
35 40 45

Ser Phe Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Phe Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp
115 120 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
				180					185					190			
	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	
			195					200					205				
	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	
		210					215					220					
	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	
	225					230					235					240	
	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	
					245				250						255		
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				260					265						270		
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
		275						280					285				
	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
		290					295					300					
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	
	305					310					315					320	
[0002]	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
				325						330					335		
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	
			340					345						350			
	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
		355					360						365				
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
		370					375					380					
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
	385					390					395					400	
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
			405						410						415		
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	
			420						425						430		
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
		435						440					445				
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
		450					455					460					
	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys												
	465																

<210> 2
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

[0003]

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 3

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0004]	<210> 4		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> 人造序列		
	<220>		
	<223> 引物		
	<400> 4		
	cccccatgcc caccatgccc agcacctgag	30	
	<210> 5		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> 人造序列		
	<220>		
	<223> 引物		
	<400> 5		
	ctcaggtgct gggcatggtg ggcattgggg	30	
[0004]	<210> 6		
	<211> 1410		
	<212> DNA		
	<213> 人造序列		
	<220>		
	<223> 突变体		
	<400> 6		
	atggactgga cctggaggtt cctctttgtg gtggcagcat ctacaggtgt ccagtcaccag	60	
	gtccagctgg tgcagtctgg ggcctgaggtg aagaagcctg ggtcctcggt gaaggtctcc	120	
	tgcaaggett ctggaggcac ctccagtttc tatctatca gctgggtgcg acaggccctt	180	
	ggacaagggc ttgagtggat gggagggttc atccctatct ttggtgcage aaactacgca	240	
	cagaagtccc agggcagagt caccattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg	300	
	gaactgagca gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aatccctagt	360	
	gggagctact actacgacta cgatatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	420	
	tcctcagcta gcaccaaggc cccatccgtc tccccctgg cgcctgtctc caggagcacc	480	
	tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	540	
	gtgtcgtgga actcagggcc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag	600	
	tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg	660	
	aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag ccagcaaca ccaagggtga caagagagtt	720	
	gagtcctaat atggtcctcc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca	780	
	tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccttgag	840	
	gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	900	
	gtggaatggc tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	960	
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	1020	
	tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcttcca tcgagaaaac catctccaaa	1080	
	gccaaagggc agccccgaga gccacagggt tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg	1140	
	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctaccccag cgacatgcc	1200	
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1260	

	gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag	1320
	gaggggaatg tcttctcatg ctccgigatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	1380
	aagagcctct cctgtctct gggtaaatga	1410
<210>	7	
<211>	1410	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	突变体	
<400>	7	
[0005]	tacctgacct ggacctccaa ggagaaacac caecgtcgta gatgtccaca ggtcagggtc	60
	caggtegacc acgtcagacc ccgactccac ttcttcggac ccaggagcca ctccagagg	120
	acgttccgaa gacctccgtg gaagtcaaag atacgatagt cgaaccacgc tgtccgggga	180
	ctgttcccg aactcaacta ccttcccaag tagggataga aaccacgtcg ttigtatgct	240
	gtcttcaagg tccgctctca gtgctaattg cgcttctta ggtgtctgtg tcggatgtac	300
	cttgactcgt cggactctag actgtctgtc cggcacataa tgacacgtc ttaggatca	360
	cctcgtatga tgatctgat gtatacctg cagaccccg ttccctggtg ccagtggcag	420
	aggagtcgat cgtggttccc gggtaggcag aagggggacc gcgggaagag gtctctgtgg	480
	aggctctcgt gtcggcggga ccgacggac cagtctctga tgaaggggt tggecactgc	540
	caacagacct tgagtcgag ggactggctg ccgcacgtgt ggaagggccg acaggatgc	600
	aggagtctgt agatgaggga gtcgtgcac cactggcacg ggaggtctgc gaacctgtgc	660
	ttctggatgt ggacgttcca tctagtcttc gggctgtgt ggttccacct gtctctcaa	720
	ctcaggttta taecaggggg tacgggtggt acgggtctgt gactcaagga cccccctggt	780
	agtcagaagg acnagggggg ttttgggttc ctgtgagagt actagaggge ctggggactc	840
	cagtgcacgc accaccacct gcactcgttc ctctggggt tccaggtaaa gttgaccatg	900
	caactaccgc acctccactg attacgttgc tgttctggcg cctctctct caagttgtgc	960
	tgcatggcac accagtgcga ggagtggcag gacgtggtcc tgaccgactt gccgttctc	1020
	atgttcactg tccagaggtt gtttcgggag ggcaggaggt agctcttttg gtagaggitt	1080
	cgttttcccg tcggggtctt cgggtgtccac atgtgggacg ggggtagggt cctcctctac	1140
	tggtttcttg tccagtgcga ctggacggac cagtttccga agatggggtc gctgtagcgg	1200
	caactcaece tctcgttacc cgtcggcctc ttgttgatgt tcigtgtcgg agggcacgac	1260
	ctgaggtctc cgaggaagaa ggagatgtc tccgattggc acctgttctc gtccaccgtc	1320
	ctccccctac agaagagtac gaggeactac gtaactccgag acgtgttgtt gatgtgtgtc	1380
	ttctcggaga gggacagaga cccatttact	1410

MDWTWRFLFVVAASTGVQSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSFYAISWVRQAPGQ
GLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSY
YDYDMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK*

图1

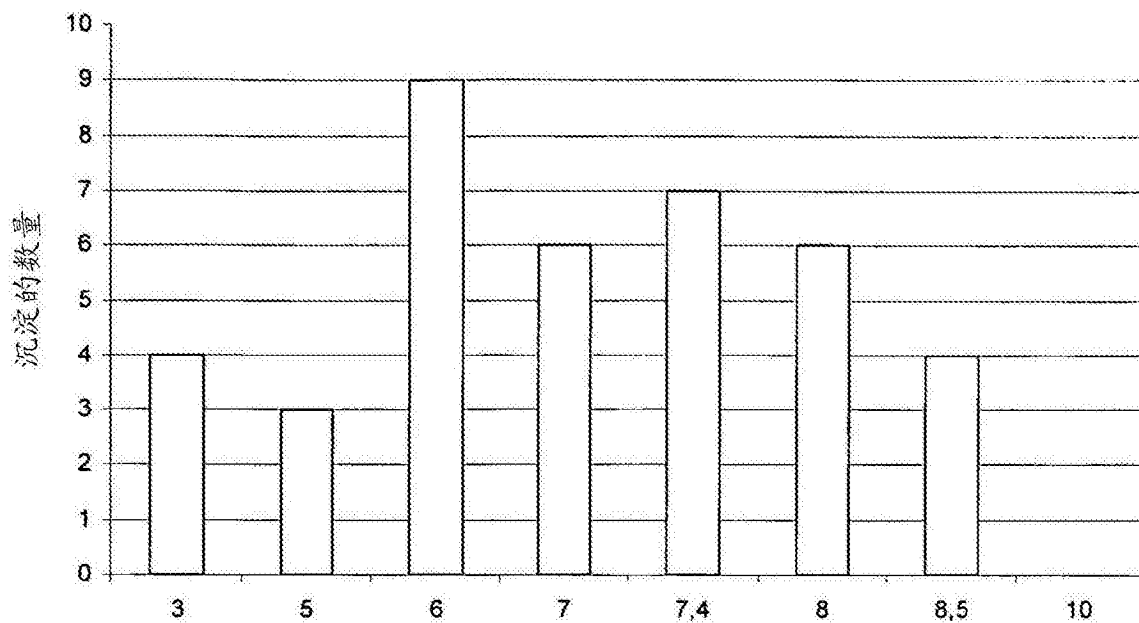


图2

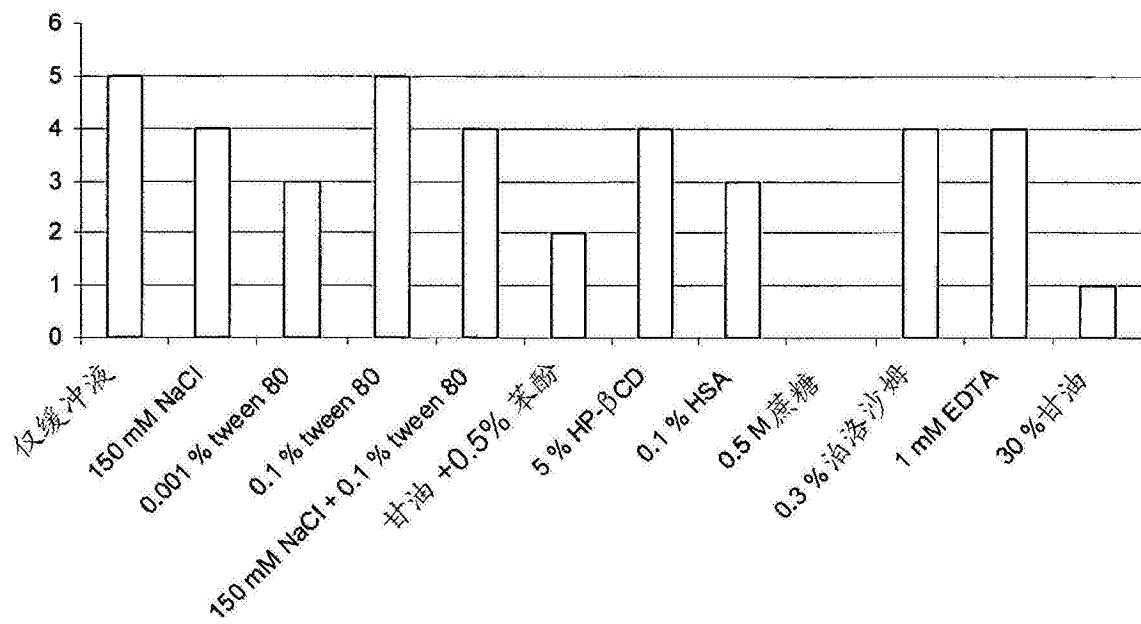


图3

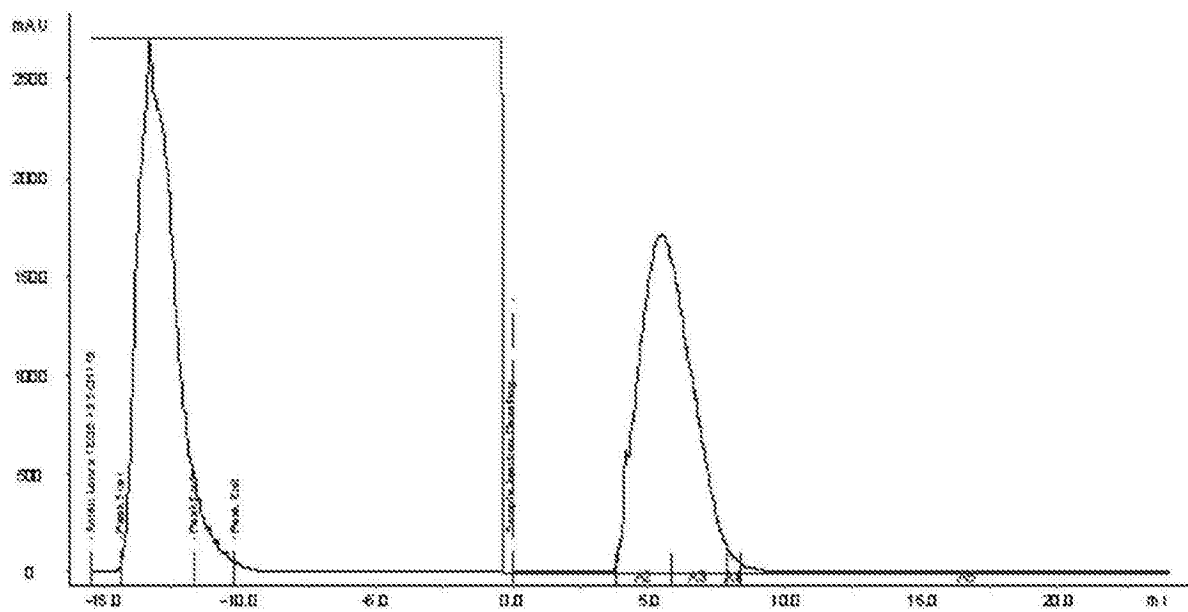
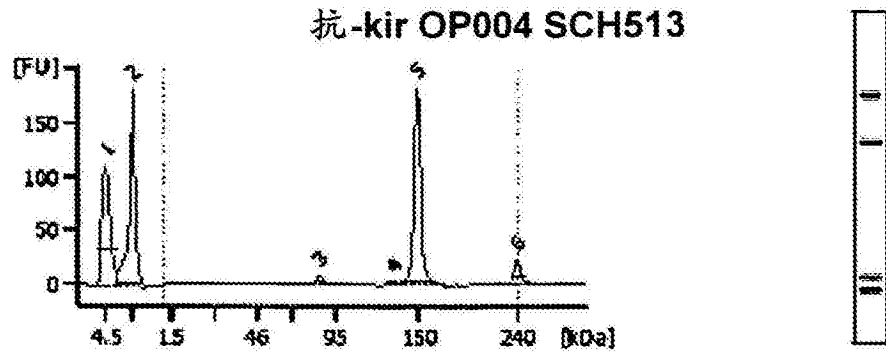


图4



样品 1 的总体结果：

抗-kir OP004 SCH513

发现的峰数量：

3

总相对浓度：

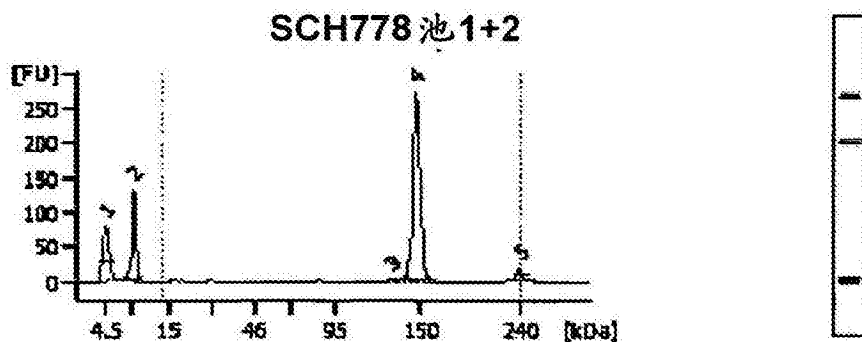
672.2 $\mu\text{g/ml}$

样品 1 的峰值表：

抗-kir OP004 SCH513

峰	大小 [kDa]	相对浓度	校准浓度	% 总数	观察结果
1	4.5	0.0	0.0	0.0	下标记物
2	7.0	0.0	0.0	0.0	系统峰值
3	82.8	29.4	0.0	4.4	
4	132.7	7.3	0.0	1.1	
5	149.8	635.4	0.0	94.5	
6	240.0	60.0	0.0	0.0	上标记物

图5A



样品 2 的总体结果:

发现的峰数量:

总相对浓度:

样品 2 的峰值表:

SCH778 池1+2

2

1,319.3 $\mu\text{g/ml}$

SCH778 池1+2

峰	大小 [kDa]	相对浓度	校准浓度	% 总数	观察结果
1	4.5	0.0	0.0	0.0	下标记物
2	7.5	0.0	0.0	0.0	系统峰值
3	131.9	8.8	0.0	0.7	
4	148.2	1,310.5	0.0	99.3	
5	240.0	60.0	0.0	0.0	上标记物

图5B

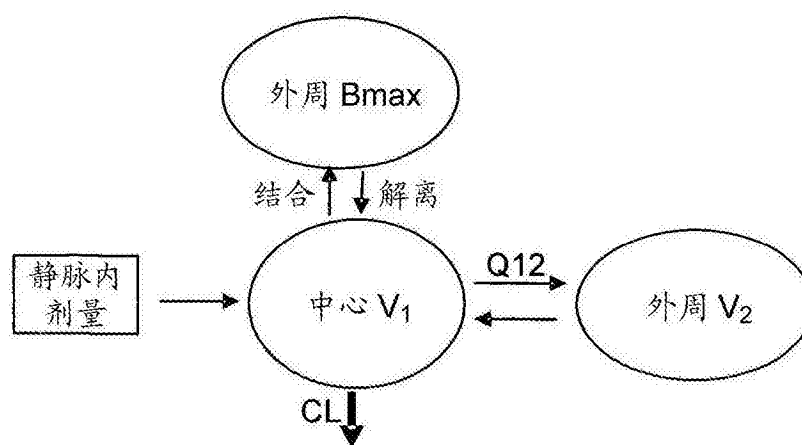


图6

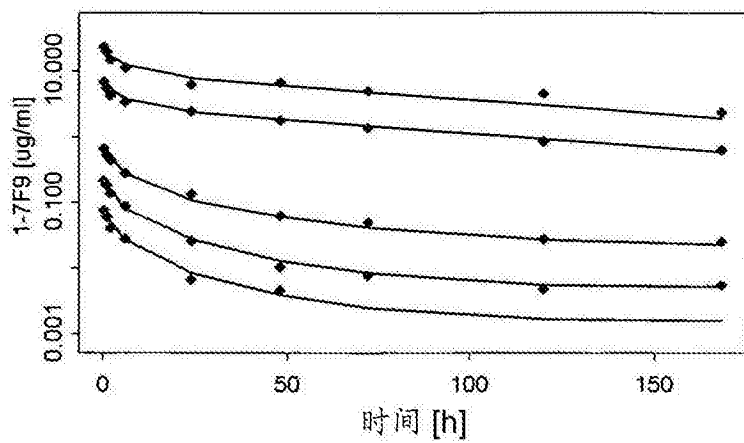


图7

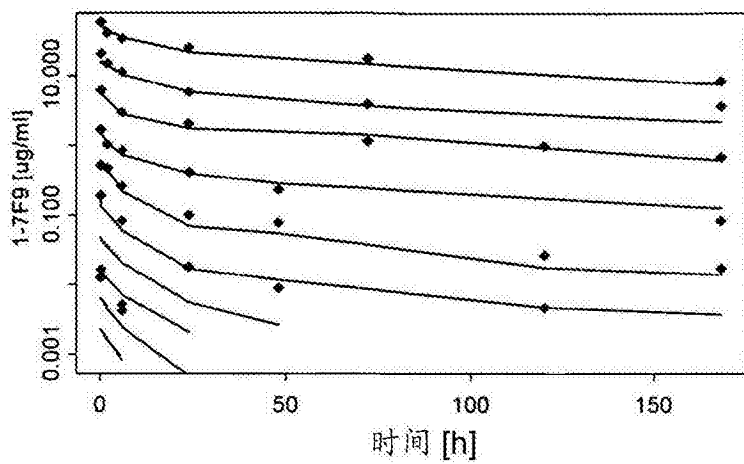


图8

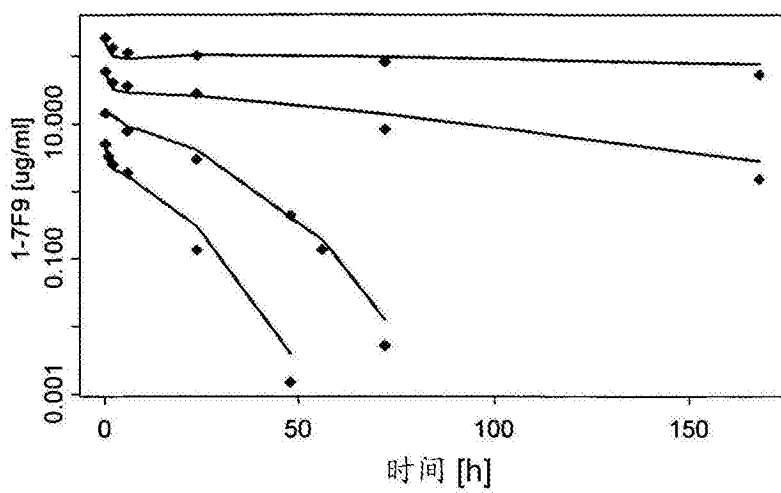


图9

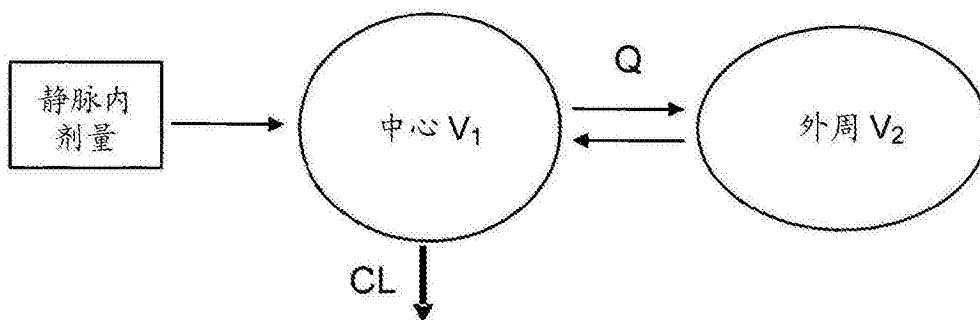


图10

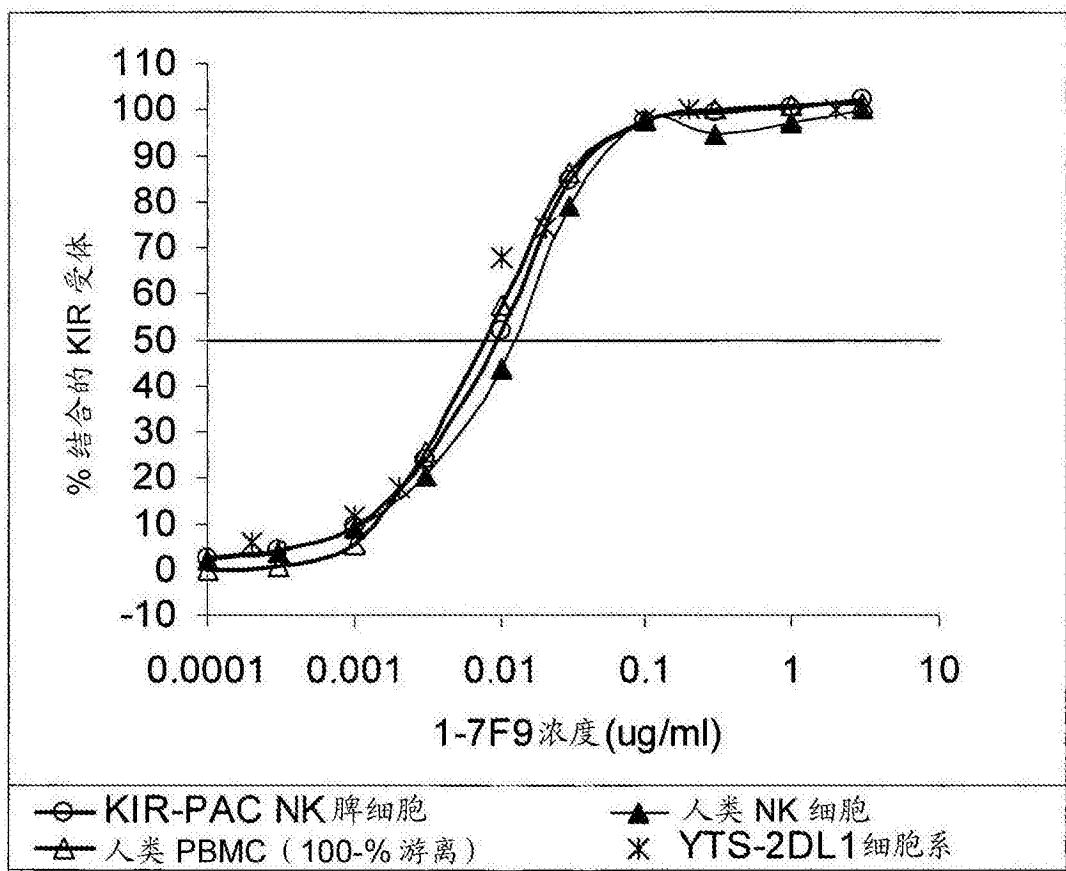


图11

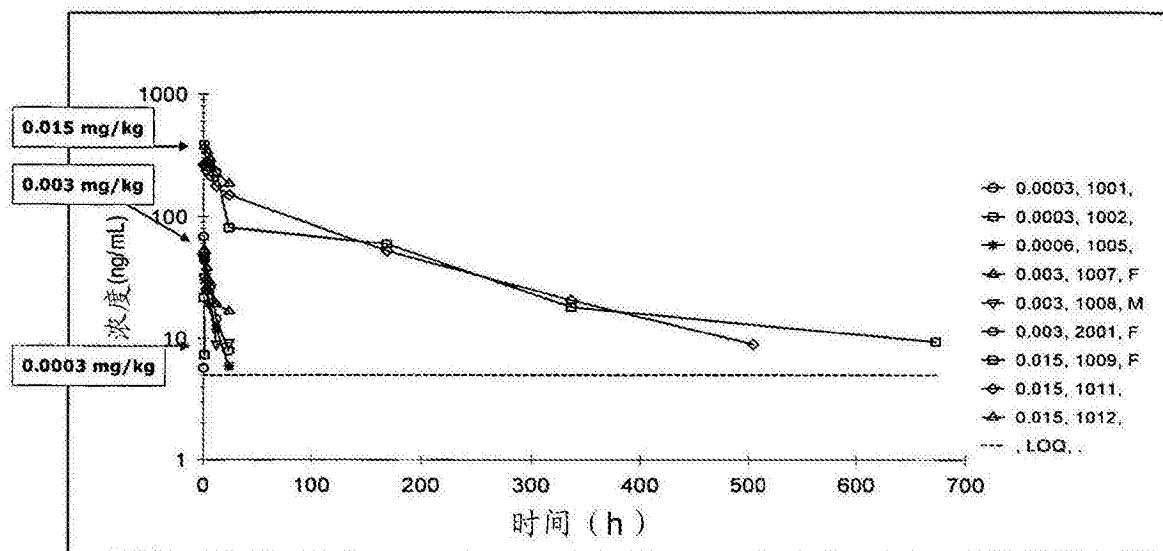


图12

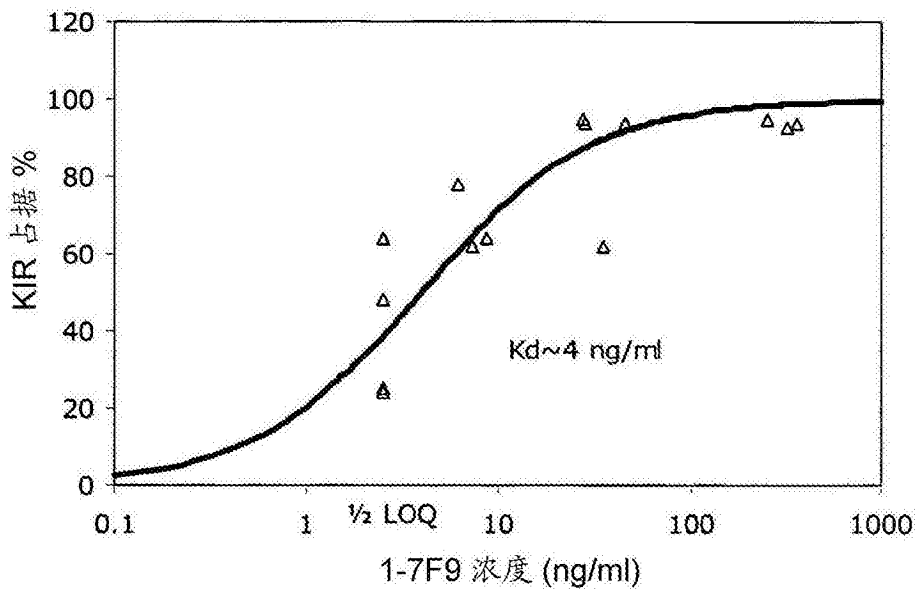


图13

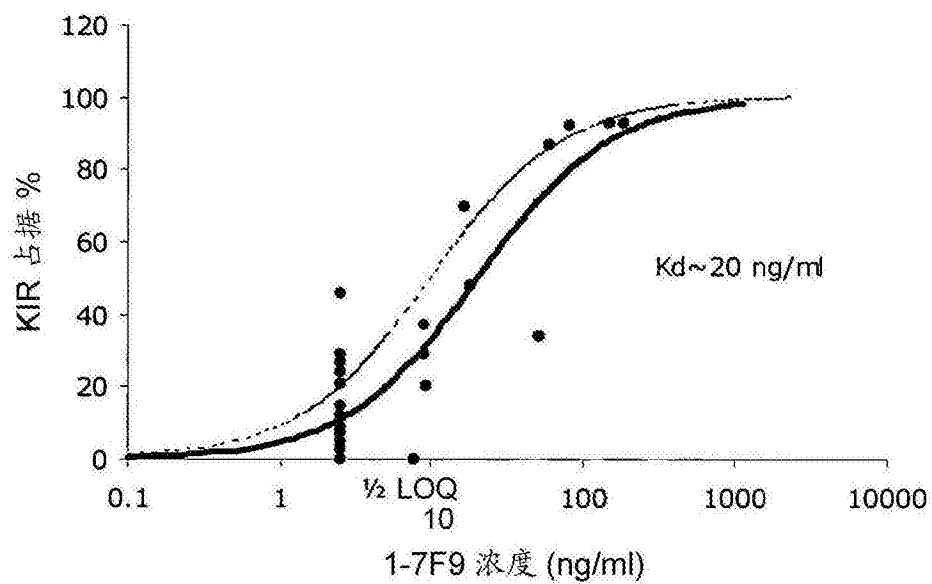


图14

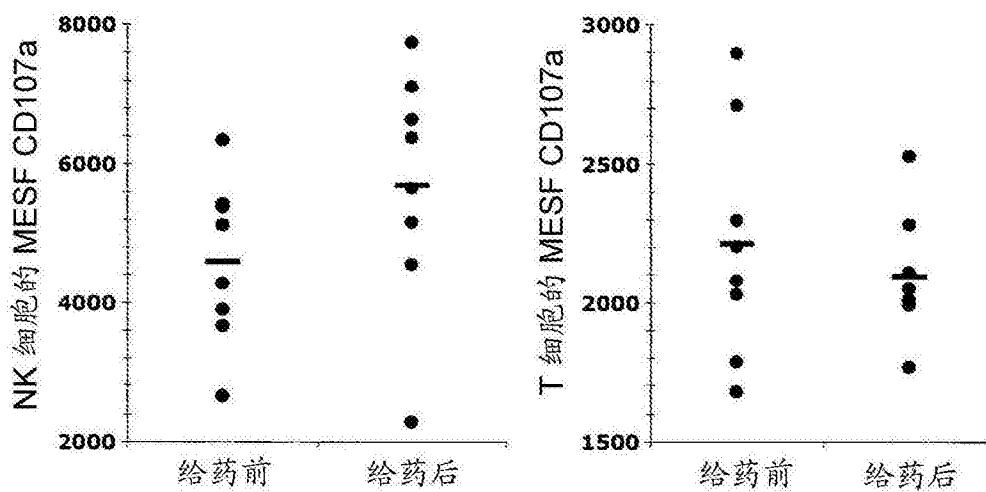


图15