



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108699148 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680080258.4

(22)申请日 2016.12.15

(30)优先权数据

15200281.2 2015.12.15 EP

16306537.8 2016.11.22 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/081286 2016.12.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/103003 EN 2017.06.22

(71)申请人 欧斯易免疫疗法

地址 法国南特

(72)发明人 伯纳德·范霍夫

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

权利要求书2页 说明书30页

序列表5页 附图10页

(54)发明名称

配制用于向人施用的抗CD28人源化抗体

(57)摘要

本发明涉及被称为“FR104”的人源化聚乙二醇单价抗CD28 Fab'抗体片段的新的且有利的给药方案。该给药方案包括按照下述给药方案施用0.05至1.5mg/kg体重FR104:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次,每5周一次或每6周一次,每7周一次,每8周一次或者每8周以上一次。

1. 抗CD28 Fab' 抗体片段, 其由 (i) C-端被聚乙二醇化的SEQ ID NO:1所示的第一蛋白和 (ii) SEQ ID NO:2所示的第二蛋白的异二聚体组成, 其用于治疗能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的任何病况, 其中向有需要的人对象施用治疗有效量的所述抗CD28 Fab' 抗体片段, 并且其中所述治疗有效量的抗CD28 Fab' 抗体片段为按照下述给药方案施用0.05至1.5mg/kg体重: 每周一次, 每2周一次, 每3周一次, 每4周一次, 每5周一次或每6周一次, 每7周一次, 每8周一次或者每8周以上一次。

2. 用于权利要求1所述用途的如权利要求1所述的抗CD28 Fab' 抗体片段, 其中所述治疗有效量为按照下述给药时间方案施用0.05至少于0.5mg/kg体重: 每周一次, 每2周一次, 每3周一次, 每4周一次, 每5周一次或者每6周一次。

3. 用于权利要求1或2所述用途的如权利要求1所述的抗CD28 Fab' 抗体片段, 其中所述治疗有效量为按照下述给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重: 每周一次, 每2周一次, 每3周一次, 每4周一次或者每五5周一次。

4. 用于权利要求1所述用途的如权利要求1所述的抗CD28 Fab' 抗体片段, 其中所述治疗有效量为按照下述给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重: 至少每4周一次, 0.5mg/kg; 至少每8周一次, 1mg/kg; 以及每8周以上一次, 1mg/kg。

5. 用于权利要求1至4中任一项所述用途的如权利要求1所述的抗CD28 Fab' 抗体片段, 其中在两次施用所述抗CD28 Fab' 抗体片段之间的时间段, 所述治疗有效量的抗CD28 Fab' 抗体片段诱导至少80%的CD28受体占用率。

6. 用于权利要求1至5中任一项所述用途的如权利要求1所述的抗CD28 Fab' 抗体片段, 其中所述能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的病况是所述对象中的移植的器官、组织或细胞功能异常, T淋巴细胞介导的自身免疫性疾病, 动脉粥样硬化或炎性疾病。

7. 用于权利要求1至6中任一项所述用途的如权利要求1所述的抗CD28 Fab' 抗体片段, 其中所述能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的病况是: 肾移植排斥、慢性同种异体移植植物血管病变、移植植物抗宿主病、自身免疫性脑脊髓炎、牛皮癣、类风湿性关节炎、多发性硬化、克罗恩病、溃疡性结肠炎、动脉粥样硬化、1型糖尿病、或IV型超敏反应。

8. 用于权利要求1至7中任一项所述用途的如权利要求1所述的抗CD28 Fab' 抗体片段, 其中向所述对象静脉内、皮下、肌肉内、局部、经鞘内注射施用所述抗CD28 Fab' 抗体片段。

9. 用于抑制有需要的人对象中的T细胞免疫应答的药物组合物, 其含量为3至120mg的抗CD28 Fab' 抗体片段以及一种或多种药学可接受的赋形剂, 所述抗CD28 Fab' 抗体片段是 (i) 其C-端被聚乙二醇化的SEQ ID NO:1所示的第一蛋白和 (ii) SEQ ID NO:2所示的第二蛋白的异二聚体。

10. 如权利要求9所述的药物组合物, 其包含少于35mg, 优选3至14mg所述抗CD28 Fab' 抗体片段。

11. 如权利要求9或10所述的药物组合物, 其适用于静脉内、皮下、肌肉内、局部或鞘内施用。

12. 如权利要求9至11中任一项所述的药物组合物, 其包含重组人透明质酸酶。

13. 如权利要求9、11或12中任一项所述的药物组合物, 其包含35mg至120mg所述抗CD28 Fab' 抗体片段。

14. 包含月剂量的抗CD28 Fab' 抗体片段的试剂盒, 其中各剂量含量为3至120mg的抗

CD28 Fab' 抗体片段,所述抗CD28 Fab' 抗体片段是(i) C-端被聚乙二醇化的SEQ ID NO:1所示的第一蛋白和(ii) SEQ ID NO:2所示的第二蛋白的异二聚体。

15. 包含权利要求9至13中任一项所述的药物组合物的注射器。

配制用于向人施用的抗CD28人源化抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及免疫疗法领域。更具体地,本发明提供先前描述为“FR104”的人源化聚乙二醇化的抗CD28 Fab' 抗体片段(Poirier等,2012)的新的且有利的给药方案。

[0002] 发明背景和现有技术

[0003] CD28是主要的T细胞阳性共刺激分子。FR104是在重链的C-末端聚乙二醇化的人源化单价抗CD28 Fab' 抗体片段(WO2011/101791,US8,785,604B2)。FR104来源于被称为CD28.3的鼠抗体的人源化。该抗体的选择基于其针对结合Fab' 形式的CD28的CD80的有效拮抗活性(Vanhove等,2003),以及其固有的不能诱导抗原非依赖性T细胞活化(被称为超激动作用的过程)的能力,因为其靶标表位(显示对于超激动作用是强制性的)位于CD28的C'D抗原环之外(Poirier等人,2012a)。

[0004] FR104结合人和非人灵长类动物CD28(但不结合小鼠、大鼠、兔和狗CD28),并且拮抗CD28与其共受体CD80/CD86的结合。因此,CD80/CD86共受体仍然自由地与主要阴性共刺激分子细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡1配体1 (PDL-1) 相互作用,这抑制效应T细胞并且对调节性T细胞的阻抑功能是强制性的。因此,FR104的作用机制是双重的:1) 以直接方式阻断T细胞中CD28介导的信号,2) 以间接方式促进CTLA-4和PDL-1介导的信号。这种作用机制不同于旨在阻断T细胞共刺激的现有疗法,如阿巴西普(Orencia®)或贝拉西普(Nulojix®),它们结合CD80和CD86并阻断阳性和阴性共刺激分子的功能(通过阻断接近CD28、CTLA-4和PDL-1)。

[0005] 由于其单价性质,不存在Fc结构域并且靶标表位位于超激动剂抗体(如TGN1412)之外,FR104是拮抗剂抗体,即使在抗药抗体的存在下其也不能刺激人T细胞(Poirier等,2012)。可获得的临床前数据表明,人源化小鼠体外和转移体内(trans-vivo)以及狒狒体内的人T细胞不存在激动剂和超激动剂特性,狒狒是与人类类似的物种,其T细胞在与超激动剂抗CD28抗体相互作用之后释放细胞因子(Poirier等人,2014)。

[0006] 在所有这些情况下,FR104仍是拮抗剂。即使FR104被包被、与第二抗体交联或在抗CD3抗体的存在下,也未观察到增殖或细胞因子分泌(Poirier等人,2012)。相反,当通过抗CD3抗体刺激人PBMC时,FR104剂量依赖性地抑制T细胞增殖。在这些分析中,阳性对照超激动剂抗CD28抗体始终诱导人T细胞增殖和/或细胞因子释放。

[0007] 由于其针对效应T细胞的选择性免疫抑制活性,FR104首先被研究用于类风湿性关节炎和移植(肾移植接受者和干细胞移植后的移植物抗宿主病[GVHD])中。由于对免疫调节机制的保护,FR104对具有自我失调或同种异体免疫应答的患者具有直接的预期益处,包括T细胞免疫抑制的效力提高和病理性T细胞和B细胞应答的长期控制。对于肾移植患者,这可以减少早期排斥事件并改善长期结果。对于在同种异体造血干细胞移植后罹患中度至重度GVHD的患者,这可以钝化效应T细胞的同种异体反应性。对于罹患类风湿性关节炎的患者,这可以转化为临床症状的快速改善和复发较少。可获得的临床前评估包括表明在下述中的效力:灵长类动物的肾移植(Poirier等,2015),以及人源化小鼠(Poirier等,2012)和灵长类动物(Kean等,2014)的GVHD、自身免疫性脑脊髓炎的实验模型(Haanstra等,JI 2015)、人

牛皮癣的灵长类动物模型中的皮肤炎症(Poirier等,JI 2015)(Poirier等人, Experimental Dermatol.2015)以及灵长类动物中胶原诱导的关节炎(类风湿性关节炎模型)(Vierboom等,2015)。

[0008] 从机理上讲,已经证明FR104以CTLA-4依赖的方式阻断同种异体反应性,这证实理论上的作用机制在体内确实起作用(Poirier等,2012)。

[0009] FR104通过经典重组技术在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生。它是人源化聚乙二醇化的Fab'抗体片段,由(i)C-端被聚乙二醇化的SEQ ID NO:1所示第一蛋白和(ii)SEQ ID NO:2所示第二蛋白组成。纯化之后,它与聚乙二醇部分(PEG)化学结合,以增加其血浆半衰期。将CH1结构域的C-端改造以容纳单聚乙二醇化。PEG残基为双分支的2x 20kDa,通过马来酰亚胺环与C-端半胱氨酸连接。所有生产、纯化和装瓶过程均在GMP条件下进行。

[0010] Poirier等人(2012)通过等离子体共振分析显示FR104与CD28的解离常数约为4.6nM。FR104首次人体(FIH)临床试验的最低预期生物效应水平(MABEL)的计算和剂量选择基于Poirier等人(2012年)公开的数据。

[0011] 发明概述

[0012] 如以下实验部分所述,通过临床试验第一实验所获得的数据非常令人惊讶,并且使得发明人得出实际K_d值比体外测量值4.6nM低至少10倍的结论。

[0013] 继续他们的研究,发明人总结了药代动力学/靶标参与(PK/TE)模型,以采集已获得的PK和受体占用率(R₀)数据。基于此修订了模型:

[0014] -0.05mg/kg给药可在2-3周内达到平均R₀%>80%;和

[0015] -0.2mg/kg给药可在4-5周内达到平均R₀%>80%。

[0016] 因此,本发明涉及通过向有需要的人对象施用治疗有效量的FR104,FR104在治疗能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的任何病况中的用途,其中治疗有效量的FR104为按下述方案施用0.05至1.5mg/kg体重FR104:每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次或者每六周一次。这些施用可以长期(数月至数年)进行,或者在一次或几次给药后停止。它们也可以在一段时间内(几个月或几年)中断,并且如果患者的病况证实了新的治疗是正当的则恢复施用。

[0017] 本发明提供抗CD28 Fab'抗体片段,其由(i)C-端被聚乙二醇化的SEQ ID NO:1所示第一蛋白和(ii)SEQ ID NO:2所示第二蛋白组成,其用于治疗能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的任何病况,其中向有需要的对象施用治疗有效量的所述抗CD28 Fab'抗体片段,并且其中治疗有效量的抗CD28 Fab'抗体片段为按下述给药方案施用0.05至1.5mg/kg体重:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次,每5周一次或每6周一次,每7周一次,每8周一次或者每8周以上一次。在一些实施方案中,治疗有效量为按下述给药方案施用0.05至0.5mg/kg以下体重:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次,每5周一次或每6周一次。在一些实施方案中,治疗有效量为按下述给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次或每5周一次。在一些实施方案中,治疗有效量为按照下述给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重:至少每4周一次,0.5mg/kg;至少每8周一次,1mg/kg;以及至少每8周以上一次,1mg/kg以上。在一些实施方案中,治疗有效量的抗CD28 Fab'抗体片段在两次施用所述抗CD28 Fab'抗体片段之间的时间段内诱导至少80%的CD28受体占用率。在一些实施方案中,能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的病况是所述对象中

移植的器官、组织或细胞功能障碍, T淋巴细胞介导的自身免疫性疾病, 动脉粥样硬化或炎性疾病。在一些实施方案中, 能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的病况是肾移植排斥、慢性同种异体移植物血管病变、移植物抗宿主病、自身免疫性脑脊髓炎、牛皮癣、类风湿性关节炎、多发性硬化、克罗恩病、溃疡性结肠炎、动脉粥样硬化、1型糖尿病或IV型超敏反应。在一些实施方案中, 向所述对象静脉内、皮下、肌肉内或经鞘内局部注射施用抗CD28 Fab' 抗体片段。本发明另一方面是用于在有需要的人对象中抑制T细胞免疫应答的药物组合物, 其含量为3至120mg, 优选小于35mg/剂的FR104以及一种或多种药学可接受的赋形剂。在一些实施方案中, 药物组合物包含3至14mg所述抗CD28 Fab' 抗体片段。在一些实施方案中, 药物组合物适合于静脉内、皮下、肌肉内、局部或鞘内施用。在一些实施方案中, 药物组合物包含重组人透明质酸酶。

[0018] 包含上述药物组合物的注射器也是本发明的一部分。所述注射器可适用于皮下使用。

[0019] 本发明还涉及包含每月剂量的FR104的试剂盒, 其中各个剂量含量为3至120mg的FR104。

附图说明

[0020] 图1: FR104药代动力学研究和CD28受体占用率。A. 接受以下不同浓度FR104的志愿者血清中FR104浓度的时间过程: 组1 (黑色圆圈) 接受0.005mg/kg, 组2 (黑色方块) 接受0.05mg/kg, 组3 (黑色正三角) 接受0.2mg/kg以及组4 (黑色倒三角) 接受0.5mg/kg。B. 接受FR104的各组各志愿者中受体占用率的时间过程 (如上所述)。

[0021] 图2: 预测的CD28受体占用率对比观察的CD28受体占用率。A. 先前预测的用体外计算的Kd确定的各浓度FR104在20周时间进程的RO百分比。B. 与观察的RO百分比相比, 基于重新计算的Kd所修改的预测RO百分比的时间进程。

[0022] 图3: FR104输注后的受体表达。在接受FR104的各组中, 通过流式细胞仪分析一段时间内志愿者血清中的CD28表达。组1 (黑色圆圈) 接受0.005mg/kg, 组2 (黑色方块) 接受0.05mg/kg, 组3 (正三角) 接受0.2mg/kg, 组4 (倒三角) 接受0.5mg/kg。

[0023] 图4: 抗KLH (IgG) 抗体测量。第一次输注后15天接受: 安慰剂, 0.02mg/kg、0.2mg/kg、0.5mg/kg或1.5mg/kg FR104的五个不同组的志愿者血清中存在的抗KLH抗体百分比。该百分比代表第1天 (第一次输注) 与第15天血清中抗体浓度之间的比率。

[0024] 图5: 药代动力学和药效学数据。A. 从给药前至研究结束的平均血清FR104浓度 $\pm$ SEM (半对数标度)。显示的治疗组为: 单次递增剂量 (黑色符号), 单次递增剂量+KLH免疫 (空符号), 多次递增剂量 (MAD, 阴影符号)。LLOQ: 量化下限。每个治疗组N=3-5名对象。B. A中所示从给药前至研究结束的FR104治疗组的平均CD28受体占用率 $\pm$ SEM。每个治疗组N=3-5名对象。评估给予安慰剂的对象中受体占用率产生范围为0至5%的背景信号。

[0025] 图6: 稳定的全血样品中CD28表达水平、T淋巴细胞亚群频率和活化的T细胞频率的流式细胞仪分析。利用下述门控策略定义CD45+CD3+细胞中的T细胞亚群: 自然Treg (nTreg): CD25+CD127低CD4+; 活化的: CD69+或CD25+; 记忆T细胞: CD45RO+; 初始的: CD45RO-CCR7+; 中央记忆型 (CM): CD45RO+CCR7+; 效应记忆型 (EM): CD45RO+CCR7-; TEMRA: CD45RO-CCR7-。符号参考图1A中限定的组, 加上*代表合并的安慰剂对象 (n=12)。数据为平均值 $\pm$

SEM。

[0026] 图7:给药前至研究结束FR104和安慰剂接受者中血清IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10细胞因子。虚线条:量化下限。数据为平均值 $\pm$ SEM。SAD:单次递增剂量。SAD+KLH,用KLH免疫的单次递增给药对象。MAD:多次递增剂量。符号参考图1A中限定的组,加上*指SAD (n=6)、SAD+KLH (n=8) 和MAD (n=4) 组中的安慰剂对象。发现评估的所有样品中其他细胞因子(IL-12p70、IL-1 β 、IL-2、IL-4)均为阴性(未显示)。

[0027] 图8:在全血培养物(TruCulture®)中用SEB+LPS离体刺激血细胞。A.基准处的血液样品未受刺激或者用SEB+LPS进行刺激,并持续培养24小时。然后通过ELISA评估血浆中的细胞因子。点代表各对象。B.在接受指定剂量水平FR104的单次递增剂量组(进行或不进行KLH刺激)中,在指定时间点抽取SEB+LPS刺激的血液样品测量IL-2的分泌。仅对在该研究中测试显示对在基线(>100pg/ml)处的刺激足够应答的供血者的培养物进行分析:安慰剂(n=9)、0.02mg/kg (n=5)、0.20mg/kg (n=9)、0.50mg/kg (n=9) 和1.50mg/kg (n=3)。数据是标准化为T0时间点的平均IL-2浓度 $\pm$ SEM。*:p<0.05;****:p<0.0001。

[0028] 图9:治疗组随时间的抗KLH IgG (ng/mL) 水平。血清样品在指定时间点抽取并通过抗KLH ELISA进行评估。数据为平均值 $\pm$ SEM。虚线:量化下限。

[0029] 图10:从给药前至研究结束EBV状态的随访。通过PCR对指定的时间点血液中的EBV病毒负载进行评估。还对血清中针对EBV衣壳抗原(VCA)的IgM抗体进行评估,以测量抗EBV免疫重激活。数据为平均值 $\pm$ SEM。LLOQ:量化下限。

[0030] 优选实施方案的详细描述

[0031] 贯穿本文使用下述定义:

[0032] FR104

[0033] “FR104”表示抗CD28 Fab' 抗体片段,其由(i) C-端被聚乙二醇化的SEQ ID NO:1所示第一蛋白和(ii) SEQ ID NO:2所示第二蛋白的异二聚体组成。根据具体实施方案,FR104是抗CD28 Fab' 抗体片段,其由(i) C-端被聚乙二醇化的SEQ ID NO:3所示第一蛋白和(ii) SEQ ID NO:4所示第二蛋白的异二聚体组成。例如,可以通过马来酰亚胺环将双分支的2x20kDa PEG与CH1结构域的C-端半胱氨酸相连。

[0034] 治疗

[0035] 本文使用的术语“治疗(treat/treatment/treating)”指疾病的进展、严重程度和/或持续时间的任何降低或改善。例如,在诸如类风湿性关节炎的病理学中,其一种或多种症状的减轻被认为是治疗。

[0036] 必要时下面将详细说明其他定义。

[0037] 本发明第一方面是FR104在治疗能通过抑制T细胞免疫应答来改善或预防的任何病况中的用途,其中向有需要的人对象施用治疗有效量的所述抗CD28 Fab' 抗体片段,并且其中治疗有效量的抗CD28 Fab' 抗体片段为按照下述给药方案施用0.05-1.5mg/kg:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次,每5周一次,每6周一次,每7周一次,每8周一次,每9周一次或者每9周以上一次。

[0038] 在有需要的人对象中抑制T细胞免疫应答的方法也是本发明的一部分。根据该方法,向对象施用治疗有效量的FR104,其中所述治疗有效量为按照下述给药方案施用0.05-1.5mg/kg体重:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次,每5周一次,每6周一次,每7周

一次,每8周一次,每9周一次或者每9周以上一次。

[0039] 如上所述,根据患者的病况,本发明所述的治疗可以长期(数月至数年)施用或在一次或几次施用后停止。治疗也可以在一段时间(几个月或几年)内中断,并且如果患者的病况证实了FR104的额外施用是正当的,则需要恢复治疗。根据本发明的具体实施方案,治疗有效量为按照下述给药方案施用0.05至小于0.5mg/kg体重:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次,每5周一次或每6周一次。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每周一次的给药方案施用0.05至0.5mg/kg体重,如0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg(任选±10%)、0.4mg/kg(任选±10%)、0.3mg/kg(任选±10%)或0.25mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每2周一次的给药方案施用0.05至0.5mg/kg体重,如0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg(任选±10%)、0.4mg/kg(任选±10%)、0.3mg/kg(任选±10%)或0.25mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每3周一次的给药方案施用0.05至0.5mg/kg体重,如0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg(任选±10%)、0.4mg/kg(任选±10%)、0.3mg/kg(任选±10%)或0.25mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每4周一次的给药方案施用0.05至0.5mg/kg体重,如0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg(任选±10%)、0.4mg/kg(任选±10%)、0.3mg/kg(任选±10%)或0.25mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每5周一次的给药方案施用0.05至0.5mg/kg体重,如0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg(任选±10%)、0.4mg/kg(任选±10%)、0.3mg/kg(任选±10%)或0.25mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每6周一次的给药方案施用0.05至0.5mg/kg体重,如0.1-0.45mg/kg、0.15-0.4mg/kg、0.2-0.35mg/kg、0.25-0.3mg/kg、0.05-0.4mg/kg、0.05-0.3mg/kg、0.1-0.4mg/kg、0.1-0.3mg/kg、0.5mg/kg(任选±10%)、0.4mg/kg(任选±10%)、0.3mg/kg(任选±10%)或0.25mg/kg(任选±10%)。

[0040] 根据本发明的另一具体实施方案,治疗有效量为按照下述给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重:每周一次,每2周一次,每3周一次,每4周一次或每5周一次。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每周一次的给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重,如0.05-0.15mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.1-0.15mg/kg、0.05mg/kg(任选±10%)、0.1mg/kg(任选±10%)、0.15mg/kg(任选±10%)或0.2mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每2周一次的给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重,如0.05-0.15mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.1-0.15mg/kg、0.05mg/kg(任选±10%)、0.1mg/kg(任选±10%)、0.15mg/kg(任选±10%)或0.2mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每3周一次的给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重,如0.05-0.15mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.1-0.15mg/kg、0.05mg/kg(任选±10%)、0.1mg/kg(任选±10%)、0.15mg/kg(任选±10%)或0.2mg/kg(任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每4周一次的给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重,如0.05-

0.15mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.1-0.15mg/kg、0.05mg/kg (任选±10%)、0.1mg/kg (任选±10%)、0.15mg/kg (任选±10%)或0.2mg/kg (任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每5周一一次的给药方案施用0.05至0.2mg/kg体重,如0.05-0.15mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.1-0.15mg/kg、0.05mg/kg (任选±10%)、0.1mg/kg (任选±10%)、0.15mg/kg (任选±10%)或0.2mg/kg (任选±10%)。

[0041] 当施用0.5至1.5mg/kg体重的量时,优选减少药物摄取的频率。使用这样的剂量,有利地处方是每月施用一次剂量甚至频率更低。根据本发明的另一具体实施方案,治疗有效量为按照下述给药方案施用0.5-1.5mg/kg体重:每3周一次,每4周一次,每5周一次,每6周一次,每7周一次,每8周一次,每9周一次或者每9周以上一次。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每4周一一次的给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重,如0.6-1.4mg/kg、0.7-1.3mg/kg、0.8-1.2mg/kg、0.9-1.1mg/kg、0.5-1.4mg/kg、0.5-1.3mg/kg、0.5-1.2mg/kg、0.5-1.1mg/kg、0.5-1.0mg/kg、0.5-0.9mg/kg、0.5-0.8mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.5-0.6mg/kg、0.5mg/kg (任选±10%)、0.6mg/kg (任选±10%)、0.7mg/kg (任选±10%)、0.8mg/kg (任选±10%)、0.9mg/kg (任选±10%)、1.0mg/kg (任选±10%)、1.1mg/kg (任选±10%)、1.2mg/kg (任选±10%)、1.3mg/kg (任选±10%)、1.4mg/kg (任选±10%)或1.5mg/kg (任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每5周一一次的给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重,如0.6-1.4mg/kg、0.7-1.3mg/kg、0.8-1.2mg/kg、0.9-1.1mg/kg、0.5-1.4mg/kg、0.5-1.3mg/kg、0.5-1.2mg/kg、0.5-1.1mg/kg、0.5-1.0mg/kg、0.5-0.9mg/kg、0.5-0.8mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.5-0.6mg/kg、0.5mg/kg (任选±10%)、0.6mg/kg (任选±10%)、0.7mg/kg (任选±10%)、0.8mg/kg (任选±10%)、0.9mg/kg (任选±10%)、1.0mg/kg (任选±10%)、1.1mg/kg (任选±10%)、1.2mg/kg (任选±10%)、1.3mg/kg (任选±10%)、1.4mg/kg (任选±10%)或1.5mg/kg (任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每6周一一次的给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重,如0.6-1.4mg/kg、0.7-1.3mg/kg、0.8-1.2mg/kg、0.9-1.1mg/kg、0.5-1.4mg/kg、0.5-1.3mg/kg、0.5-1.2mg/kg、0.5-1.1mg/kg、0.5-1.0mg/kg、0.5-0.9mg/kg、0.5-0.8mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.5-0.6mg/kg、0.5mg/kg (任选±10%)、0.6mg/kg (任选±10%)、0.7mg/kg (任选±10%)、0.8mg/kg (任选±10%)、0.9mg/kg (任选±10%)、1.0mg/kg (任选±10%)、1.1mg/kg (任选±10%)、1.2mg/kg (任选±10%)、1.3mg/kg (任选±10%)、1.4mg/kg (任选±10%)或1.5mg/kg (任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每7周一一次的给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重,如0.6-1.4mg/kg、0.7-1.3mg/kg、0.8-1.2mg/kg、0.9-1.1mg/kg、0.5-1.4mg/kg、0.5-1.3mg/kg、0.5-1.2mg/kg、0.5-1.1mg/kg、0.5-1.0mg/kg、0.5-0.9mg/kg、0.5-0.8mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.5-0.6mg/kg、0.5mg/kg (任选±10%)、0.6mg/kg (任选±10%)、0.7mg/kg (任选±10%)、0.8mg/kg (任选±10%)、0.9mg/kg (任选±10%)、1.0mg/kg (任选±10%)、1.1mg/kg (任选±10%)、1.2mg/kg (任选±10%)、1.3mg/kg (任选±10%)、1.4mg/kg (任选±10%)或1.5mg/kg (任选±10%)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每8周一一次的给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重,如0.6-1.4mg/kg、0.7-1.3mg/kg、0.8-1.2mg/kg、0.9-1.1mg/kg、0.5-1.4mg/kg、0.5-1.3mg/kg、0.5-1.2mg/kg、0.5-1.1mg/kg、0.5-1.0mg/kg、0.5-0.9mg/kg、0.5-0.8mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.5-0.6mg/kg、0.5mg/kg (任选±10%)、0.6mg/kg (任选±10%)、0.7mg/kg (任选±10%)、0.8mg/kg (任选±10%)、0.9mg/kg (任选±10%)、1.0mg/kg (任选±10%)、

1.1mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.2mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.3mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.4mg/kg (任选 $\pm 10\%$)或1.5mg/kg (任选 $\pm 10\%$)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每9周一次的给药方案施用0.5至1.5mg/kg体重,如0.6-1.4mg/kg、0.7-1.3mg/kg、0.8-1.2mg/kg、0.9-1.1mg/kg、0.5-1.4mg/kg、0.5-1.3mg/kg、0.5-1.2mg/kg、0.5-1.1mg/kg、0.5-1.0mg/kg、0.5-0.9mg/kg、0.5-0.8mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.5-0.6mg/kg、0.5mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.6mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.7mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.8mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.9mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.0mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.1mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.2mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.3mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.4mg/kg (任选 $\pm 10\%$)或1.5mg/kg (任选 $\pm 10\%$)。在一些实施方案中,治疗有效量为按照每9周以上一次的给药方案施用0.5-1.5mg/kg体重,如0.6-1.4mg/kg、0.7-1.3mg/kg、0.8-1.2mg/kg、0.9-1.1mg/kg、0.5-1.4mg/kg、0.5-1.3mg/kg、0.5-1.2mg/kg、0.5-1.1mg/kg、0.5-1.0mg/kg、0.5-0.9mg/kg、0.5-0.8mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.5-0.6mg/kg、0.5mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.6mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.7mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.8mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、0.9mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.0mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.1mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.2mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.3mg/kg (任选 $\pm 10\%$)、1.4mg/kg (任选 $\pm 10\%$)或1.5mg/kg (任选 $\pm 10\%$)。

[0042] 需要注意的是,由体外数据预想的治疗剂量为0.5mg/kg至8mg/kg。如以下实验部分所公开的,获自首次人体I期研究第一实验的数据与基于该首次人体研究开始之前可获得的数据而计算的药代动力学/靶标参与(PK/TE)模型不一致。体内数据显示,使用低至0.05mg/kg的剂量观察到完全出乎意料的效果。这使得发明人修改药代动力学/靶标参与(PK/TE)模型并重新考虑FR104对人CD28的亲和力,其中 K_D 值为约0.3nM而非4.6nM。因此,现在预想的最大剂量是1.5mg/kg,并且认为低至0.05mg/kg的剂量是治疗有效的。

[0043] 在一些实施方案中,FR104的剂量在人体中的半衰期为120至240小时,如130至230小时、140至220小时或150至210小时。

[0044] 在一些实施方案中,向人对象施用FR104后的血清IFN γ 、TNF α 和IL-8的水平低于5000pg/ml,如低于4000pg/ml,低于3000pg/ml,低于2000pg/ml,低于1000pg/ml,低于800pg/ml,低于600pg/ml,低于400pg/ml或者低于200pg/ml。

[0045] 因此,本发明所述的剂量方案与以下公开的首次人体研究之前可获得的数据所预期的彻底不同。剂量方案的这种改变具有几个优点,如降低治疗成本、减少不良副作用、降低施用频率、以及配制包含FR104作为活性成分的药物组合物的困难减少。实际上,向患者施用大量治疗溶液(>2ml)并非总是可行或方便的,特别是通过皮下途径。

[0046] 目前认为,至少80%的受体占用率对用FR104获得治疗上有效的治疗是必需的。根据本发明的优选实施方案,向对象施用FR104的量在两次施用所述抗CD28 Fab' 抗体片段之间的时间段内诱导至少80%的CD28受体占用率。可以由以下公开的I期研究开始之前可获得的体外数据预想根据本发明施用的较高剂量(即每次施用0.5至1.5mg/kg)。但是,为了获得80%的CD28受体占用率,技术人员将以每2周一的频率施用0.5mg/kg(参见下表2),而根据本发明,可以以每4周一次甚至更低频率施用相同的剂量。仍然参考以下表2,使用1mg/kg的剂量似乎需要每月施用,而在本发明的框架中,每8周1mg/kg的剂量就足够了。这同样适用于1.5mg/kg的剂量,其中最低频率从每5周一次变为每两个月或更久一次。当然,技术人员将使施用频率适应施用的剂量,以在不施用过高剂量的情况下在两次施用之间的时间

段内获得至少80%的CD28受体占用率。施用的单位剂量越高,施用频率越低。例如,0.5至1mg/kg的剂量将以例如每月一次至每两个月一次的频率施用。

[0047] 根据本发明通过用FR104治疗来抑制T细胞免疫应答而能改善或预防的病况的实例是移植器官、组织或细胞功能障碍(包括移植组织排斥,特别是肾移植排斥、慢性同种异体移植血管病变和移植抗宿主病),T淋巴细胞介导的自身免疫性疾病,动脉粥样硬化,炎性疾病(包括诸如溃疡性结肠炎和克罗恩氏病的炎症性肠病),以及IV型超敏反应。在可以根据本发明进行治疗的自身免疫性疾病中,可以具体引用自身免疫性脑脊髓炎、类风湿性关节炎、牛皮癣、1型糖尿病和多发性硬化。另一病况是牛皮癣性关节炎。可以根据本发明有利地治疗其他自身免疫性疾病:例如大疱性类天疱疮、急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征(APS)、自身免疫性卵巢炎、乳糜泻、妊娠性类天疱疮、古德帕斯彻氏综合征、格雷夫斯病、格林-巴利综合征(GBS,也被称为急性炎性脱髓鞘性多发性神经病、急性特发性多神经根神经炎、急性特发性多神经炎和兰德里氏上行性麻痹)、桥本氏病、特发性血小板减少性紫癜、川崎病、红斑狼疮、重症肌无力、眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)、视神经炎、奥德氏甲状腺炎(Ord's thyroiditis)、天疱疮、莱特尔氏综合征、干燥综合征、高安动脉炎、颞动脉炎(也称为“巨细胞动脉炎”)、以及韦格纳氏肉芽肿。自身免疫性葡萄膜炎和斑秃也是可以进行治疗的自身免疫性疾病。

[0048] 如已经提到的,本发明所述的新剂量方案对于促进治疗施用特别有利。单克隆抗体通常在长达数年的长期治疗时间静脉内施用。皮下给药是一些慢性疾病(如糖尿病)早已使用的治疗选择,并且其是类风湿性关节炎的新兴给药途径(Weinblatt等人,2013)(Melichar等人,2014)。施用单克隆抗体的皮下方法的主要障碍是施用体积的限制。可以无痛注射的体积上限仅为约2ml。较高的注射体积可能引起患者疼痛和不适。为了限制注射给患者的溶液体积,可以制备高浓度的单克隆抗体溶液。但是,这就对药物配制强加了特定要求(Bowen等人,2012)。

[0049] 皮下注射的治疗剂量基于体外数据预先开处方是不可能的。本发明所述的FR104的治疗剂量可以包含于足够小(约2ml)的体积中,以考虑这样的给药途径例如,用于治疗诸如牛皮癣或类风湿性关节炎的病况。

[0050] 根据本发明的具体实施方案,治疗有效量的FR104向有需要的对象经静脉内、皮下、肌肉内,局部或者经鞘内注射施用。

[0051] 抗体自注射部位的扩散可能是一个问题,特别是经皮下注射施用抗体时。主要进展与透明质酸酶的引入相关。透明质酸分子代表防止体积扩散到细胞外基质中的功能性屏障的重要组分。由于透明质酸不断再生,短暂的破坏不会造成严重的功能问题。重组人透明质酸酶避免了免疫原性问题(Shpilberg和Jackisch,2013)。重组人透明质酸酶(rHuPH20; Hylenex®)已被FDA批准作为佐剂,以促进其他药剂的皮下施用。根据本发明的具体实施方案,向有需要的人对象施用的组合物除FR104外还包含重组人透明质酸酶。

[0052] 本发明还涉及用于在有需要的人对象中抑制T细胞免疫应答的药物组合物,其包含FR104以及一种或多种药学可接受的赋形剂,FR104的量为3至120mg,例如3至100mg,3至80mg,3至60mg或3至40mg,优选小于35mg,如小于30mg,小于25mg,小于20mg,例如3-14mg。本发明所述的药物组合物将以单一剂量使用,其可以以医师确定的频率施用于有需要的对象,但不高于每周一次。例如,本发明所述的药物组合物是月单次剂量。根据精确剂量和临

床背景(患者的体重和一般状况、疾病的性质等),本发明所述的药物组合物可以每周施用一次或者每2、3、4、5或6周施用一次。当本发明所述的药物组合物包含35mg或更多FR104,即35mg至120mg FR104,如35至60mg、35至80mg、35至100mg、40至120mg、60至120mg、80mg至120mg或者100至120mg时,优选每3、4、5或6周施用一次。

[0053] 可以配制本发明所述的药物组合物,以使其适用于静脉内、皮下、肌肉内、局部或鞘内施用。如上所述,本发明所述的药物组合物可以包含重组人透明质酸酶,特别是其配制用于皮下施用。

[0054] 本发明的另一个目的是包含若干剂量的FR104的试剂盒,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、15个或更多剂量,其中各剂量包含3至120mg量的FR104,例如3至100mg、3至80mg、3至60mg或3至40mg、优选小于35mg,例如小于30mg、小于25mg、小于20mg,以及例如3至14mg。在试剂盒中,这些剂量可以描述为每周剂量,或者每2、3、4、5或6周服用的剂量。根据具体实施方案,它们是每月剂量。

[0055] 根据上述药物组合物和试剂盒的具体实施方案,药物组合物或试剂盒中存在的各剂量包含于注射器或者能够通过静脉内、皮下、肌肉内或鞘内施用的任何其它设备中。

[0056] 本发明的其他特征在随后的生物分析和首次人体研究的描述过程中也将变得显而易见,所述生物测定和首次人体研究在本发明的框架中实施并且为其提供所需的实验支持,但未限制其范围。

实施例

[0057] 实施例1:FR104在人体中的药代动力学、药效学以及产物代谢

[0058] 在本研究开始之前,没有可利用的关于FR104在人体中的药代动力学、药效学以及产物代谢的数据。

[0059] 但是,为了确定最低预期生物效应水平(MABEL),将食蟹猴和狒狒研究的PK和PD数据合并在一起,通过群体PK/PD进行分析并针对人进行异速生长缩放。狒狒和食蟹猴的PK和RO数据是一致的,因此一起模拟。

[0060] MABEL和临床剂量水平估计

[0061] 选择最低预期生物效应水平(MABEL)作为FR104首次人体试验的第一剂量水平(EMA 2007:使用研究性药品鉴定和规避首次人体临床试验风险策略指南(Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-humans clinical trials with investigational medicinal products),EMA/CHMP/SWP/28367/07;FDA 2005:成人健康志愿者治疗初步临床试验中的最大安全起始剂量工业估算指南(Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers))。

[0062] 通常将最低预期生物效应水平(MABEL)估计为产生大约10至20%的最高药理学活性的剂量。通常基于体外数据进行估计。考虑到狒狒中观察到的非常明显的体内剂量应答,将体内数据用于FR104。

[0063] 模型开发

[0064] 为了模拟给予不同剂量FR104的人中CD28受体占用率百分比随时间的变化,利用群体方法,对迄今为止在食蟹猴和狒狒研究中获得的所有PK和PD数据(狒狒:0.1、1、10和

20mg/kg单剂量IV;食蟹猴:1、2、7mg/kg单剂量IV;食蟹猴:20、50、100mg/kg多剂量IV) 进行分析。

[0065] 考虑以下方面:

[0066] 将理论的药代动力学/靶标参与 (PK/TE) 模型用于预测人中有有效的给药方案:

[0067] o低剂量水平和低药物浓度下的PK和RO数据不足,无法可靠地估计导致体内10% RO的药物浓度

[0068] o较高药物浓度的PK和RO数据充足,允许以更高置信度建模和模拟。

[0069] 使用基于mAb-靶标相互作用的Kd计算最高受体占用率的公式来估计MABEL (Duff, 2006)。使用以下公式计算最高受体占用率,使用基于mAb-靶标相互作用的Kd计算最高受体占用率来估计MABEL (Duff, 2006)。

$$[0070] \quad RO (\%) = \frac{[\text{剂量}/V1]}{K_D + [\text{剂量}/V1]} \times 100$$

[0071] 下表显示了不同剂量水平下计算的RO:

剂量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	初始 RO (%)
1.3	7
3	15
5	23
10	37
15	47
20	54
30	64
50	75
500	97

[0074] 表1:估计的初始CD 28RO%

[0075] 使用体外保守Kd值 (4.6nM) 和人血浆体积 (V1, 0.04L/kg)。但是,体内Kd可能低于体外Kd。靶标介导的药物处置 (TMDD) 模型估计FR104的V1=0.045L/kg (见下文)。

[0076] 将下述主要的模型假设用于该PK/TE TMDD分析:

[0077] • 准平衡近似适用于描述FR104和CD28之间的相互作用

[0078] • FR104处理不会改变CD28的合成和降解速率,不会导致表达CD28的细胞耗尽,并且FR104的结合不会改变CD28的内化率 (kdeg=kint)

[0079] o输注FR104之后,最大流式细胞仪信号没有变化

[0080] o给予FR104之后,外周淋巴细胞或CD4+T细胞没有减少

[0081] • 基于提供的信息计算CD28受体水平,并随后在模型拟合中固定 (RO)

[0082] • 假定CD28仅在CD3+CD4+T细胞中表达,而其他细胞类型中的表达不考虑

[0083] • 假定狒狒和食蟹猴之间的靶标相关参数 (Kd、Kdeg、RO) 相同。

[0084] • 将动物的个体体重处理为缩放PK相关参数的协变量,其中指数为0.75 (对于CL和Q) 和1 (对于V1和V2)。

[0085] 当标准化为血量时,猴子中CD28受体浓度的理论计算基于下述数据:

- [0086] • 在研究报告中,CD3+CD4+细胞上每个细胞的受体数目范围为20000至60000。
- [0087] • 在模型拟合中,受体浓度固定在0.4nM
- [0088] • 其他受体浓度(例如,0.2nM)是固定的,并且其逆向影响Kdeg估计,但是在一定范围内对模型拟合的影响较小
- [0089] 使用以下公式并获得受体占用率的正确拟合(图2A):
- [0090] 抗原浓度(nM) = (每个细胞的受体数目*血细胞密度*10⁹) / (6.023*10²³)
- [0091] 在人中预测FR104R0
- [0092] 利用异速生长标度(allometric scaling)将PK相关参数从猴子缩放到人(参见下文)。假定分布容量的指数等于1。假定系统CL和分布CL(Q)的指数等于0.75。基于单剂量和多剂量研究中的猴子平均体重,使用70kg的人平均体重和2.9kg的食蟹猴平均体重。
- [0093] • 假定CD28的Kdeg和Kd(受Kon和Koff影响)在人和动物物种之间是相同的。
- [0094] • 猴子和人之间的CD3+CD4+T细胞数目(体重标准化之后)相当
- [0095] • 假定CD28受体密度比食蟹猴/狒狒更高1.65倍。
- [0096] 更详细的单剂量模拟显示了以下在人中针对不同剂量FR104预测的最高受体占用率特征:
- [0097]

时间 (周)	0.005 mg/kg	0.05 mg/kg	0.2 mg/kg	0.5 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	8 mg/kg
0	13	61	86	94	97	98	99	100
1	3	28	70	87	93	97	98	99
2	1	12	54	81	90	95	98	99
3	0	5	34	71	86	93	97	98
4	0	2	17	56	80	91	96	98
6	0	0	3	19	54	80	91	96
8	0	0	0	3	17	55	81	92
10	0	0	0	0	3	18	57	82
12	0	0	0	0	0	3	20	61

[0098] 表2:不同单次i.v.剂量(0.005至8mg/kg)的FR104之后,模拟人中不同观察时间(周)的CD28占用率%

[0099] 结论

[0100] 如图2A所示,利用PK/TE建模方法,确定所选0.005mg/kg剂量的MABEL剂量可以导致人中13%的CD-28受体占用率,如图2A所示。

[0101] 实施例2:研究设计

[0102] 2.1.原理

[0103] 如实施例1中所述,选择作为MABEL的剂量为5μg/kg,对应约13%的CD28受体占用率。

[0104] 决定用单次施用进行研究的剂量递增部分。施用FR104之后循环血液T淋巴细胞中CD28受体占用的持续时间是剂量依赖的。在食蟹猴的毒理学研究中,循环血液T淋巴细胞中100%CD28受体占用率主要发生在感染/淋巴瘤中,分别持续至少8/11周。

[0105] 为了降低风险,申请人决定基于异速生长适用于人的非临床数据的PK/PD群体模型,首先测试诱导血液T淋巴细胞中少于4周的100%CD28受体占用率(R0)以及8周时最高约50%R0的极低剂量(参见表2)。

[0106] 作为安全措施,在转移至更高剂量以及重复剂量之前,选择0.5mg/kg的剂量保持研究并进行PK/PD和安全性分析。

[0107] 根据该模拟,接下来调整为1和2mg/kg的剂量,以符合给药后8周约50%R0的规律。可能已经测试了可选的额外剂量。它也符合给药后8周约50%R0的规律。

[0108] 2.2材料和方法

[0109] 测试产物、剂量、施用方式

[0110] 在林格氏乳酸盐溶液中稀释至正确浓度之后,通过在至少30分钟内输注100mL,在静脉内施用所有剂量水平的FR104。

[0111] 安排6个剂量组用于第1部分,群组A(6个单次递增剂量,最终仅实施其中4个),其中下述增加比例基于最低预期生物效应水平(MABEL方法):0.005;0.050;0.200;0.500;1.0;2.0mg/kg(在分析获自组1-4的PK/PD结果之后,取消最后两个)。

[0112] 第1部分,群组B最初安排两个剂量组:0.5和1.0mg/kg,并更改为0.5和0.2mg/kg,解释如下。

[0113] 研究药物的物理描述

[0114] GMP FR104置于5mL可提取容量瓶中来提供给测试场所,所述瓶包含溶于4%甘露醇+0.02%吐温80的100mg FR104(20mg/mL)。现场在林格氏乳酸盐溶液中制备适当稀释液。

[0115] 所有研究产品均按照现行GCP的要求根据良好生产规范(GMP)制备。

[0116] 研究中施用的其他药物

[0117] 匹配的安慰剂注射液含有载体(林格氏乳酸盐溶液)。对于安慰剂给药,施用100mL载体。

[0118] 药代动力学计算

[0119] 使用Phoenix WinNonlin 6.2或更高版本(Pharsight Corporation,Palo Alto, CA,USA)进行药代动力学计算。

[0120] 在适当的情况下,使用非间隔方法由血清中的各浓度-时间特征确定FR104的下述各PK参数:

[0121] C_{max} :观察到的最大血清浓度

[0122] t_{max} :出现 C_{max} 的时间

[0123] AUC_{inf} 血清浓度vs时间(从零时到无穷大)曲线下面积,根据 $AUC_{0-t} + (C_t/\lambda_z)$ 计算,其中 C_t 是最后观察到的可量化浓度,并且 λ_z 是一级终末速率常数 AUC_{0-28d} 通过线性-对数梯形法则计算的给药间隔(即28天)内血清药物浓度-时间曲线下面积

[0124] $t_{1/2}$ 终末半衰期,由 $(\ln 2)/\lambda_z$ 计算

[0125] R_{ac} 累积比率,由第29天 AUC_{0-28d} /第1天 AUC_{0-28d} 计算仅第2部分)

[0126] CL系统清除率,由剂量i.v./ AUC_{inf} 计算

[0127] V_z 分布容量,由 CL/λ_z 计算

[0128] 评估剂量标准化参数($C_{max}/\text{剂量}$ 、 $C_{avg}/\text{剂量}$ 、 $AUC_{0-28d}/\text{剂量}$)。

[0129] 如果合适,计算其他PK参数。

- [0130] 药效学
- [0131] CD28受体占用率
- [0132] 主要的PD变量是随时间变化的分化群 (CD) 28RO, 使用适合目的的经验证的方法通过研究期间在各时间点收集血液样品中的FR104将其作为RO进行评估。计算合适的PD参数。
- [0133] 钥孔戚血蓝蛋白激发
- [0134] 对于第1部分, 仅采用群组B.
- [0135] 利用酶联免疫吸附分析 (ELISA) 方法检测血清中的人抗KLH Ab。
- [0136] 通过静脉穿刺或者经前臂中的留置插管在标准血清管中收集1.5mL血液样品。
- [0137] 通过ELISA进行抗KLH抗体测量
- [0138] 通过使用Alpha Diagnostic International生产的商业试剂盒“人抗-KLH IgG” (目录编号700-140-KLG) 进行血清研究样品的分析。确定量化下限和上限为7.20和86.00U/ml。该Elisa试剂盒基于样品中的人抗KLH抗体与固定在微孔上的KLH抗原结合, 并且通过与HRP酶结合的抗人IgG特异性抗体来检测抗KLH IgG抗体。在洗涤步骤之后, 加入显色底物 (TMB) 以终止反应, 然后利用ELISA微孔读数仪测量450nm处的吸光度。
- [0139] 血液/血清测试
- [0140] 从不同供血者获得全血样品, 并在K2-EDTA或K3-EDTA血液收集真空采血管中收集。用于测定FR104PK和CD28受体占用率的样品获自下述时间点收集的血液:
- [0141] 第1天, 给药前以及输注开始后0.5、0.75、1、2、4和8小时
- [0142] 第2天, 输注开始后24小时
- [0143] 第3天, 输注开始后48小时
- [0144] 第5天, 输注开始后96小时
- [0145] 第8天, 输注开始后1周
- [0146] 第15天, 输注开始后2周
- [0147] 第29天, 输注开始后3周
- [0148] 第43天, 输注开始后6周, 仅对0.5mg/kg而言 (群组A组4)
- [0149] 第57天, 输注开始后8周, 如果剂量<0.2mg/kg则不进行
- [0150] 第85天, 输注开始后12周, 如果剂量<0.2mg/kg则不进行
- [0151] 第113天, 输注开始后16周 (对剂量 ≥ 1 .mg/kg的组进行随访)
- [0152] 通过ELISA进行FR104-PEG浓度测量
- [0153] 将FR104 (抗CD28.3Fab) 分子在CD28Fc包被的板中孵育。然后用针对PEG (甲氧基) 的兔单克隆抗体检测结合的FR104, 其通过用过氧化物酶标记的抗兔多克隆抗体来显示。
- [0154] 试剂和缓冲液
- [0155] -CD28-Ig (CD28/Fc嵌合体, R&D Systems#342-CD-200, 以200 μ g/mL在PBS中复原),
- [0156] -包被缓冲液: NaHCO₃ 0.05M pH 9.2 (80mL Na₂CO₃ 0.05M+920ml NaHCO₃ 0.05M, pH9.2)
- [0157] -BSA (Sigma#A-7906)
- [0158] -吐温20 (Sigma#P7949)
- [0159] -样品
- [0160] -标准品: FR104#CAA-1 (0.5mg/ml)

[0161] -单克隆抗体兔抗PEG (甲氧基) (Epitomics#2061-1, 0.97mg/ml)

[0162] -多克隆山羊抗兔标记的过氧化物酶 (Jackson ImmunoResearch#111-035-144, 0.8mg/ml)

[0163] -底物: TMB (Sigma#T8665)

[0164] -H₂SO₄ (VWR 20704.292)

[0165] 用溶于0.05M碳酸盐缓冲液 (pH 9.2) 的1μg/ml CD28-Ig包被板 (50μL/孔), 并于37℃孵育2小时或于4℃孵育过夜。将孔清空并用200μL PBS-0.05%吐温连续洗涤3次。添加100μL PBS吐温0.1%BSA 1%, 并将板于37℃孵育1小时。

[0166] -标准品: 对于第一点, 将FR104#L27221/G1/2 (10.01mg/ml) 稀释为100μg/ml, 并且对于接下来的7个点连续稀释5倍, 一式两份。将血清 (50μl) 在PBS-0.1%吐温中至少1/10稀释, 并于37℃孵育1小时。将孔清空并用200μL PBS-0.05%吐温连续洗涤3次并稀释。然后添加50μl/孔以1/500溶于PBS-0.1%Tween的单克隆抗体兔抗PEG, 随后在4℃孵育1小时。将孔清空并用200μL PBS-0.05%吐温连续洗涤3次。添加以1/2000溶于PBS-0.1%吐温 (50μL/puits) 的山羊抗兔过氧化物酶 (抗-Rb PO), 并于4℃孵育1小时。(洗涤步骤) 添加TMB (50μL/孔), 并于室温避光下孵育10分钟。添加终止缓冲液 (50μL/孔H₂SO₄ 0.5M)。然后采用微量滴定板 (Nunc Immunoplate, Nunc, #442404) 读取450nm处吸光度的测量值 (ref 630nm)。采用SoftMaxPro程序用于分析并确定样品中的FR104浓度。通过流式细胞仪测量受体表达

[0167] 受体占有率测定:

[0168] 将各血液样品一分为二并与FR104抗体混合或不予混合。在红细胞裂解后, 相继利用抗PEG兔单克隆抗体和Alexa fluor 405结合的抗兔二抗, 通过流式细胞仪对用FITC结合的抗CD3抗体染色的淋巴细胞上FR104与CD28的结合进行研究。因此, 在含有另一半部分血量的两个孔中测定PEG染色的平均荧光强度 (MFI), 所述血液来自补充有过量FR104抗体的同一供血者。然后通过比较两个孔 (FR104未过量/FR104过量) 的MFI之间的比率来计算各供血者FR104促进的CD28饱和度。

[0169] 工作溶液和缓冲液

[0170]

试剂	供应商	参照	储存条件
NH ₄ Cl	Sigma	A9334	RT
KHCO ₃	Sigma	60339	RT
Na ₂ -EDTA	Sigma	E1644	RT
叠氮化钠	Sigma	S2002	RT
HCl	Merck	1.09063.1000	RT
PBS(w/o Mg ²⁺ 、Ca ²⁺)1X	Gibco	14190-094	打开前 RT, 以及打开 后 RF
BSA-7.5%	Sigma	A8412	RF
Alexa Fluor 405 山羊抗兔 IgG	Molecular probes	A31556	RF
FITC 小鼠抗人 CD3 IgG	BD Biosciences	556611	RF
兔抗 PEG 单克隆 IgG	Abcam	51257	FZ
BD C&ST 珠	BD Biosciences	650621	RF
FACS 洗涤液	BD Biosciences	340346	RT

[0171]

FACS 清洁液	BD Biosciences	340345	RT
FACS 鞘流液	BD Biosciences	342003	RT

[0172] RF:冰箱(+5℃±5℃),RT:室温;FZ:(-24℃±6℃)

[0173] 表3

[0174] 试剂和溶液的制备

[0175]

溶液和缓冲液	成分	制备	储存条件
1X 红细胞裂解液	NH ₄ Cl, KHCO ₃ , Na ₂ -EDTA 以及 dd-H ₂ O	1.658 g NH ₄ Cl, 0.2 g KHCO ₃ , 0.00744 g Na ₂ EDTA, 200 mL dd-H ₂ O. 调节 pH 为 7.2 至 7.4	长达 4 周, +5°C±5°C
FACS 缓冲液	DPBS (w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺) 1X, 牛血清白蛋白, 叠氮化钠	40 mL 7.5% BSA 溶液, 0.3 g 叠氮化钠, s.q.f 300 mL DPBS 1X	长达 4 周, +5°C±5°C

[0176] 表4

[0177] 稀释的抗体溶液的制备

[0178]

抗体稀释溶液	成分	制备	储存条件
兔抗 PEG IgG 稀释溶液	兔抗 PEG IgG 储液, FACS 缓冲液	5 μL 兔抗 PEG IgG, 254 μL FACS 缓冲液	不储存, 新鲜制备

[0179] 抗体工作溶液的制备

[0180]

抗体工作溶液	成分	制备	储存条件
FITC 小鼠抗人 CD3 IgG/兔抗 PEG IgG 工作溶液	兔抗 PEG IgG 稀释溶液, 小鼠抗人 CD3 FITC 标记的 IgG 储液, FACS 缓冲液	90 μL 兔抗 PEG IgG, 240 μL 小鼠抗人 CD3 FITC 标记的 IgG, 270 μL FACS 缓冲液	不储存, 新鲜制备
兔抗 PEG IgG 工作溶液	兔抗 PEG IgG 稀释溶液, FACS 缓冲液	90 μL 兔抗 PEG IgG, 510 μL FACS 缓冲液	不储存, 新鲜制备
Alexa Fluor 405	Alexafluor 405	3 μL 山羊抗兔 IgG 储液, 597 μL FACS 缓冲液	不储存, 新鲜制备

[0181]

山羊抗兔 IgG 工作溶液	山羊抗兔 IgG 储液, FACS 缓冲液	液, 597 μL FACS 缓冲液	新鲜制备
---------------	-----------------------	--------------------	------

[0182] FR104稀释表

[0183]

管	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	来自	开始浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	μL	DPBS 体 积 (μL)	终体积 (μL)	分析中的终浓 度, 包 含细胞 ($\mu\text{g/mL}$)
S2	500	S1	21000	3	123	126	-
CO1	50	S2	500	20	180	200	5

[0184] 本表给出的FR104储液 (S1) 为21mg/mL, 可以根据FR104批次储液浓度进行调整

[0185] CO: 浓度

[0186] 表5-7

[0187] 对于用或未用FR104饱和剂量 ($5\mu\text{g/mL}$) 处理的测试样品进行三次重复。将样品分配至96孔板上。

[0188] 取合适体积的 $50\mu\text{g/mL}$ FR104溶液, 并在EDT处理的输血导管中轻轻均化。将各 $50\mu\text{L}$ 的人全血样品装入96V-底孔板的6个孔中。在第一组三个孔中添加 $5.5\mu\text{L}$ FR104 (溶于D-PBS, $50\mu\text{g/mL}$), 并在第二组三个孔中添加 $5.5\mu\text{L}$ D-PBS。轻轻均化之后, 将板在室温 (RT) 下孵育15分钟。添加 $150\mu\text{L}$ /孔红细胞裂解液, 然后以1200g离心1分钟。弃去上清液, 并添加 $150\mu\text{L}$ /孔红细胞裂解液。室温下放置5分钟之后, 以1200g离心1分钟 (重复3次)。然后添加 $150\mu\text{L}$ FACS缓冲液并离心。添加 $30\mu\text{L}$ /孔FITC小鼠抗人CD3IgG/兔抗PEG IgG工作溶液的混合溶液, 并 4°C 下避光孵育15分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤并离心, 重复步骤两次。添加 $30\mu\text{L}$ /孔Alexa Fluor 405山羊抗兔IgG工作溶液, 并 4°C 避光孵育15分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次。然后将细胞重悬于 $300\mu\text{L}$ FACS缓冲液中用于FACS分析。

[0189] 2.3研究设计

[0190] 该FR104I期研究设计很谨慎, 并且符合欧洲首次人体临床试验研究用医药产品指南 (EMA/CHMP/SWP/28367/07)。

[0191] 该研究是首次在人体进行的I期随机双盲的, 有安慰剂对照的单中心研究, 以对健康对象中单次和多次递增静脉内剂量的FR104进行评估。

[0192] 根据入选和排除标准选择了多达71名的健康男性和女性对象, 即第1部分57对象 (SAD: 3个群组, 分别为[群组A] 36名对象, [群组B] 14名对象以及[任选群组C] 7名对象)。该研究预期共持续9个月 (36周)。

[0193] 所有的FR104剂量在至少30分钟内通过缓慢静脉输注。在所有剂量水平中均观察到交错 (staggered) 方法。在所有剂量水平之间观察到至少14天的间隔 (从第一次至最后一次输注)。在给药当天各对象至少间隔60分钟给药。

[0194] 剂量选择

[0195] 计划的第一次人体研究的第一剂量基于MABEL选择, 其通过异速生长地适用于人类的非临床数据的PK/PD群体模型确定 (详见上文实施例1)。选择的剂量为 $5\mu\text{g/kg}$, 对应于约估13%的CD28受体占有率 (R0)。

[0196] 本研究的剂量递增部分是通过单次施用进行的。为了降低风险, 在剂量水平为 1mg/kg 之后, 应保持约12周时间, 即在在4周或更久的时间 (根据群体PK-PD建模) 内可诱导

100%CD28RO的剂量水平之前。该4周的时期被认为足够短,以至于其不太可能在男性中因病毒重新激活而产生任何病理。保持12周的时间使得在转移至初始安排的1、2mg/kg较高剂量之前能够进行PK/PD和安全性评估。

[0197] 根据模拟结果,1和2mg/kg应当分别在第4周和18周诱导84%和92%的RO,以及在8周诱导大约50%的RO。作为安全措施,选择0.5mg/kg的剂量用于后续研究以及在转移至较高剂量之前进行PK/PD和安全性分析。

[0198] 第1部分单次递增剂量 (SAD) 部分

[0199] 实验对象由首席研究员(或指定的合作研究员)根据他们的病史和健康状况来判断和招募。在各治疗期间,对象从给药前一天(第1天)直至第5天均在研究中心居住。居住期间的膳食是标准化的。对于组1-4(0.005、0.05、0.2和0.5mg/kg),计划在第8天、第15天、第29天和第57天进行走访。对于组4(0.5mg/kg),计划在第85天进行另外的走访。最后一次走访之后在第85天(第12周)进行随访。组5和组6组应分别给予1和最多2mg/kg的FR104,但较低剂量的结果使研究员取消了使用这些剂量。

[0200] 群组A

[0201] 群组A中4个剂量水平组之一中登记了22名对象。顺序(剂量水平)组的健康对象接受IV施用的增加剂量的FR104。

[0202] 在前2个剂量水平组(组1至组2)中,将4名对象以3:1的比率各自随机施用FR104或安慰剂,以使3名对象接受FR104,以及1名对象接受安慰剂。

[0203] 采用交错剂量法,即在一对象给药后48小时向第二名对象给药,并且在第二名对象给药后48小时向剂量水平组剩余的两名对象给药(共5天):

[0204] 第1天:n=1

[0205] 第3天:n=1

[0206] 第5天:n=2

[0207] 在第3组和第4组中,将7名对象以5:2的比率随机施用FR104或安慰剂,以使5名对象接受FR104,以及2名对象接受安慰剂。随机施用确保在第二组的2名对象中1名接受FR104,并且1名接受安慰剂。

[0208] 采用交错剂量法,即在2名对象给药48h后向2名对象给药,并且在第四名对象给药后48小时向剂量水平组剩余的3名对象给药(共5天):

[0209] 第1天:n=2

[0210] 第3天:n=2

[0211] 第5天:n=3。

[0212] 对第5组和第6组安排了相同的方案(各7名对象,其中剂量水平为1mg/kg和2mg/kg),但在分析前4组的数据之后将其取消了。

[0213]

群组 A	剂量(mg/kg)	FR104 对象数目	安慰剂对象数目
组 1	0.005	3	1
组 2	0.050	3	1

[0214]

组 3	0.200	5	2
组 4	0.500	5	2
对于 PK、PD 和安全性评估, 保持大约 12 周			

[0215] 表8: 单次递增剂量

[0216] 群组B

[0217] 群组B的2个剂量水平组之一中登记了十四名对象(每组7名)。

[0218] 将对象以5:2的比率随机施用FR104或安慰剂, 以使5名对象接受FR104, 以及2名对象接受安慰剂。随机化确保第一组的2名对象中, 1名接受FR104, 1名接受安慰剂。

[0219] 除常规评估外, 该群组中的对象在注射FR104的当天接受了钥孔戚血蓝蛋白 (KLH) 激发。

[0220] 采用交错剂量法, 即在2名对象给药48h后向2名对象给药, 并且在第四名对象给药后48小时向剂量水平组剩余的3名对象给药(共5天):

[0221] 第1天: n=2

[0222] 第3天: n=2

[0223] 第5天: n=3

[0224] 初始设计如下:

[0225] KLH激发, 单剂量。

[0226]

第 1 部分		单次递增剂量	
群组 B	剂量 (mg/kg)	FR104 对象数目	安慰剂对象数目
组 7*	0.500	5	2
组 8*	1.000	5	2
* KLH 初始健康对象将接受 KLH 激发			

[0227] 表9: 包括KLH激发的初始SAD设计

[0228] 对该设计进行修改以考虑组1-4中获得的结果:

[0229] KLH激发, 单剂量。

[0230]

群组 B	剂量 (mg/kg)	FR104 对象数目	安慰剂对象数目
组 7*	0.500	5	2
组 8*	0.200	5	2
组 9*	1.5	5	2
组 9 (重复)*	0.02	5	2

[0231]

KLH 初始健康对象接受 KLH 激发

[0232] 表10: 包括KLH激发的修改的SAD设计

[0233] 入选标准

[0234] 符合下述所有标准的对象有资格参与本研究：

[0235] 1. 男女不限，年龄18至60岁，包括极端情况；

[0236] 2. 根据病史、生命体征、临床实验室测试和筛查时进行的一般体检确定健康状况良好[医学稳定]；

[0237] 注意：如果超出可以确定对象资格的临床实验室测试数值范围，则进行重新测试。重新测试应当优选在未安排的访问中进行。对于对象的资格，将考虑重新测试的结果。如果重新测试超出正常参考范围，则仅当研究员判断异常情况不具有临床显著性时才可以将对象包括在内。

[0238] 3. 由研究员所判断，心电图 (ECG) 在正常范围内，或者未显示临床相关差异；

[0239] 注意：如果超出可以确定对象资格的ECG数值范围，则可以进行重新测试。

[0240] 4. 体重至少50kg且不超过100kg，并且身体质量指数 (BMI) 在正常范围内： $18.0 \leq \text{BMI} < 30.0 \text{ kg/m}^2$ ；

[0241] 5. 筛查时对所选药物滥用的尿液测试结果为阴性；

[0242] 6. 筛查时酒精呼气测试为阴性；

[0243] 7. 女性对象是绝经后或经手术不育的 (进行了子宫切除术、双侧卵巢切除术或输卵管结扎术)；

[0244] 8. 筛查时女性对象的妊娠测试为阴性；

[0245] 9. 具有可生育潜力女性伴侣的非输精管切除的男性对象，必须同意在使用有效的避孕方法，直至最后一次施用研究药物后90天；

[0246] 10. 男性对象必须同意不捐献精子，直至最后一次施用研究药物后90天；

[0247] 11. 愿意遵守本协议中规定的禁令和限制；

[0248] 12. 在进行任何与研究相关的程序之前，自愿签署知情同意书 (ICF)，表明对象理解研究所需的程序和程序，并愿意参与本研究；

[0249] 13. 根据PCR，对象应为EBV阳性；

[0250] 14. 非吸烟者或轻度吸烟者，即每天最多吸5支香烟 (或3支雪茄或3烟斗)，以及具有在临床研究中心禁闭和走访期间控制吸烟的能力和意愿。

[0251] 仅对于第1部分，群组B：

[0252] 15. 对象未进行过KLH激发。

[0253] 实施例3：单次递增剂量 (SAD) 部分研究的初始结果

[0254] 在单次递增给药后第0、1、2、5、8、15和29天，通过ELISA测量患者血液中FR104的浓度，并通过流式细胞仪测量受体占用水平。药代动力学结果以血浆中ng/ml的FR104在图1中显示，并且药效学结果作为靶标CD3+T细胞上的CD28受体占用率百分比显示。图1A显示了0.005、0.05、0.2和0.5mg/kg单次i.v. FR104注射之后的FR104浓度，其在30分钟内施用，在注射后2小时测量的峰值血浆浓度分别达到 117 ± 11 、 1012 ± 48 、 4922 ± 853 和 $11620 \pm 1076 \text{ ng/ml}$ 。根据第一个月内测量的血浆浓度，显示半衰期是剂量依赖的，其中0.05mg/kg剂量的数值为3.4天，0.2mg/kg剂量为5.7天，0.5mg/kg剂量为7.9天。图1.B出人意料地显示，单次i.v.注射0.005mg/kg FR104后，受体占用率达到80%，以及单次i.v.注射0.05或0.2mg/kg FR104后达到100%，而非如预期的0.005mg/kg FR104达到约13%RO。在i.v.注射0.005mg/kg后15天以及在i.v.注射0.05、0.2和0.5mg/kg后28、56和84天，CD28受体变为完

全不饱和。

[0255] 图2显示了用体外结果预先确定的不同FR104浓度下的不同R0百分比(图2A),并与临床试验后观察到的R0百分比进行比较。图2B对在分析临床研究第一群组A之后采用修正FR104Kd来确定的预测R0%与如材料和方法中所述的通过流式细胞仪计算的观测R0%进行了比较。该图显示两种情况之间很好地相关联,证实了在Poirier等(2012)的工作中通过体外测量的Kd在人类使用中低估了,并且FR104的解离常数约为0.3nM而非4.6nM(低10倍)。这些结果是不可预测的,因为在非人灵长类动物模型中确定的R0%非常符合预测。2012年用于临床前研究的计算的FR104治疗剂量显示出良好效力并被充分公开(Haanstra等,JI 2015)(Poirier等,JI 2015)(Poirier等,Experimental Dermatol.2015)(Vierboom等,Clinical and experimental immunol 2015))。

[0256] 然后通过流式细胞仪在FR104输注后1个月内分析T细胞表面CD28的表达。图3显示了聚乙二醇化的FR104的荧光平均值,其反映细胞表面CD28受体的存在。结果显示,在接受FR104的4组不同的志愿者中,即使在FR104结合后,CD28仍然存在于T细胞表面,这表明FR104不会诱导受体内化或下调。

[0257] 在FR104单剂量输注(0.02、0.2、0.5和1.5mg/kg的修正浓度)时进行KLH激发,以测试人体对KLH抗原的免疫应答。采用商业试剂盒通过ELISA分析抗KLH抗体浓度。图4表示抗KLH抗体应答。该结果表明与接受安慰剂的志愿者相比,FR104具有剂量依赖的抗KLH应答抑制作用。从0.2mg/kg治疗剂量开始,应答下调。对于接受0.5mg/kg FR104的志愿者,观察到100%的抑制。从0.02mg/kg开始,新的治疗性FR104剂量可有效抑制免疫系统。

[0258] 实施例4:首次人体试验报告

[0259] 方法

[0260] 研究设计

[0261] 该研究是首次人体I期随机双盲安慰剂对照单中心研究,对健康对象单次和多次递增静脉内的FR104剂量进行评估。该研究被Ziekenhuisnetwerk Antwerpen独立伦理委员会批准(协议号FR104-CT01;EudraCT号2015-000302-19;Clinical-Trials.gov标识:NCT02800811)。该研究在比利时安特卫普-安特卫普临床药理学部SGS生命科学服务中心进行,其遵守良好临床实践指南和赫尔辛基宣言的原则。

[0262] 参与者

[0263] 合格的男性和女性对象签署了书面知情同意书并且身体健康。主要入选标准是整体身体健康,年龄18-60岁,≥50kg且不超过100kg,其中BMI为18-30kg/m²。排除标准是任何重要的既往病史或实验室测试异常。

[0264] 干预

[0265] 测试药物是FR104(由OSE Immunotherapeutics SA.,Nantes,France提供),而比较药物(匹配的安慰剂)是林格氏乳酸盐溶液。FR104以含有100mg FR104(20mg/mL)的5mL溶液提供,并在2-8℃(36-46°F)下避光保存。由SGS药房制备含有合适稀释液或安慰剂的注射器并由以双盲方式提供给研究员。

[0266] 剂量最初是基于非人灵长类动物数据的群体PK-PD模拟(采用异速生长改编)来选择的,并在中期分析之后包含了人的数据。初始剂量(MABEL,0.005mg/kg)对应C_{max}大约为20%的模拟CD28R0。

[0267] 对于剂量水平 $\leq 0.05\text{mg/kg}$,在林格氏乳酸盐溶液中稀释至正确浓度后,在至少30分钟内通过IV输注施用10mL FR104。对于其他剂量水平,在林格氏乳酸盐溶液中稀释至正确浓度后,在至少30分钟内通过IV输注施用100mL FR104。

[0268] 治疗方案

[0269] 第1部分选择50名对象(SAD:2个群组,22名对象[群组A]和28名对象[群组B]),并且第2部分选择14名对象(MAD)。在各治疗期间,对象从给药前一天(第-1天)直至第5天居住在研究中心。采用交错剂量法,即向1或2名对象给药(第1天),最后在48h后向1或2名对象给药(第3天),并在第四名对象之后48小时向剂量水平组的剩余对象给药。本研究共持续36周,包括最后一次重复给药后第11周的随访。所有剂量水平之间有至少14天的间隔(后一次至首次施用)。在给药当天各对象至少间隔60分钟给药。

[0270] 第1部分:单次递增剂量部分(SAD)-将22名对象登记在群组A的4个剂量水平组之一中:组1,0.005mg/kg;组2,0.050mg/kg;组3,0.200mg/kg;以及组4,0.500mg/kg。在组1和组2中,将4名对象以3:1的比率各自随机施用为FR104或安慰剂,以使3名对象接受FR104且1名对象接受安慰剂。在组3至组4中,将7名对象以5:2的比率各自随机施用FR104或安慰剂,以使5名对象接受FR104且2名对象接受安慰剂。随机化确保第一组的2名对象中,1名接受FR104且1名接受安慰剂。在组4给药后进行约12周的预定保持时间,用于中期评估PK、PD和安全性,以此来确定接下来的剂量水平。将28名对象登记在群组B的4个剂量水平组之一(每组7名):组7,0.500mg/kg;组8,0.200mg/kg;组9,1.5mg/kg;组9(重复),0.020mg/kg。将对象以5:2的比率随机施用FR104或安慰剂。除了常规评估之外,该群组中的对象在FR104注射当天接受KLH激发。

[0271] 第2部分:多次递增剂量部分(MAD)-将14名对象登记在第2部分的2个剂量水平组之一(每组7名)中:组10,0.2mg/kg以及组11,0.5mg/kg。每名对象间隔28天分别接受2次FR104或安慰剂施用。

[0272] 细胞因子评估

[0273] 在第1小时、2小时、4小时、8小时、24小时(第2天)采集给药前和给药后的血液样品。还在第15、43、57、85、113天收集样品。采用商业分析试剂盒Pro Inflammatory Panel I V-plex(#K15049G,来自Meso Scale Discovery,Rockville,MA),使用经验证的ECLIA方法向血清中给予细胞因子IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL12p70和TNF- α 。用捕获抗体预先包被MULTI-SPOT®板。将样品和含有缀合电-化学发光标记的检测抗体的溶液(MSD SULFO-TAG™)加样到孔内。样品中的分析物与固定在工作电极表面的捕获抗体结合;通过结合的分析物引入的检测抗体完成三明治结构的组合。在添加MSD读数缓冲液之后,向平板电极施加电压,并且如果大量SULFO-TAG™标记的抗体结合到平板上,则发光。该仪器测量发射光的强度,以提供样品中分析物的定量测量。

[0274] PK分析

[0275] 在相对于输注开始时间的下述时间点采集用于PK评估的系列血液样品:给药前和给药后,第0.5、0.75、1、2、4、8、24小时(第2天),第48小时(第3天),第5、8、15、29、43、57、85、113天(仅 $>0.5\text{mg/kg}$ 剂量组)。在MSD Sector Imager 6000(MSD,Gaithersburg,MD,USA)上采用关于定量电化学发光免疫吸附分析(ECLIA)的经验证的方法来测定血清中FR104的浓度。采用Phoenix WinNonlin 6.2或更高版本(Pharsight Corporation,Palo Alto,CA,

USA),通过SGS-LSS进行药代动力学计算。分析的量化下限和上限(LLOQ和ULOQ)分别为100和2000ng/mL。质量控制和标准的整体精度和准确度分别为 $\leq 20\%$ 和 $\pm 20\%$ 内。建立标准曲线,使得能够通过拟合曲线的插值来估计样品浓度。

[0276] PD分析

[0277] 利用涉及细胞荧光测定术的部分经验证的方法,在与用于CD28受体占用率(R0)的PK分析的相同时间点收集血液样品。将各待测血液样品一分为二,并将其中一个样品与过量的FR104混合。在红细胞裂解之后,相继使用抗PEG兔单克隆抗体和Alexa fluor 405-缀合的抗兔二抗,通过流式细胞仪研究用FITC缀合的抗CD3抗体染色的淋巴细胞上FR104与CD28的结合。因此,通过含有未过量FR104的孔的MFI与含有过量FR104的孔之间的比率来计算R0。该方法的灵敏度为0.25 μ g/mLFR104。供体内重复精确度的范围为1%至9%(CV)之间,并且供体间精确度的范围为16%至22%(CV)之间。通过过量条件下FR104的MFI来测量CD28的表达水平。

[0278] 利用TransFix/EDTA真空血液采集管(Cytomark,Buckingham,UK),通过流式细胞仪在稳定的全血中评估外周T淋巴细胞亚群和激活状态。测量CD45、CD3、CD28、CD45RO、CD4、CD8、CD25、CD127、CD69和CCR7标记物,以在CD4+和CD8+部分中定义下述亚群:初始T细胞、激活的T细胞、记忆T细胞、中央记忆型T细胞、效应记忆型T细胞以及TEMRA。还记录了nTreg。

[0279] 利用标准程序,通过研究中心的临床生物学实验室进行所有其他实验室测试,包括EBV PCR和EBV IgG以及IgM抗体。

[0280] 离体研究血细胞的免疫应答性。通过静脉穿刺或经前臂中的留置插管将血液样品收集到含有SEB+LPS刺激物的TruCulture®血液收集管(Myriad RBM,Austin,Tx)和对照管中,用于每次抽血。在机械提取血浆之前将收集管在37℃保持24小时,然后冷冻直至用于IL-2、IFN γ 和IL-8细胞因子分析。采用与用于评估血清中细胞因子相同的ELISA方法来分析细胞因子。

[0281] 免疫评估

[0282] 在筛选时以及第1天(给药前),第15、29、57、85和/或113天收集用于抗FR104抗体检测的血液样品。利用经验证的电化学发光、桥接免疫原性分析方法进行血清中抗FR104抗体的滴定。该方法采用血清样品的酸性处理,以便在必要时允许FR104/FR104-ADA的解离,随后进行单步分析桥接形式,由此通过生物素化和磺基TAG标记形式的FR104的组合捕获溶液中的抗FR104抗体(ADA)。随后通过MSD平台的ECL检测形成的复合物。该分析的灵敏度为3.46ng/mL(其中CV为31%),并且平均药物耐受性为179 μ g/mL(其中CV为26%)。

[0283] KLH免疫

[0284] 在筛选时以及第15、29、57、85和/或113天收集用于抗KLH抗体检测的血液样品。利用商业试剂盒“人抗KLH IgG”(700-140-KLG,来自Alpha Diagnostic International, San Antonio, Tx),通过合格的ELISA向血清中注入抗KLH抗体。

[0285] 统计方法

[0286] 基于设计类似的其他I期研究的先例并在咨询医药和卫生保健管理机构(英国)、保罗埃尔利希研究所(德国)、联邦药品和保健品管理局(比利时)以及欧洲药品管理局(EMA)之后确定本研究的样本大小。认为64名健康志愿者的样本大小足以满足本方案的目的。采用SAS(版本9.2)软件的统计计算和绘图功能进行所有统计计算。

[0287] 结果

[0288] 参与者流程

[0289] 本研究于2015年3月27日至2016年2月19日在1号临床中心进行。将总共65名对象分为2个研究部分。在第1部分中,向37名对象施用单次IV剂量的FR104 (范围为0.005至1.5mg/kg),以及向14名对象施用单次IV剂量的安慰剂。在第2部分中,向10名对象施用两剂FR104 (范围为0.200至0.500mg/kg),以及向4名对象施用两次IV剂量的安慰剂,间隔28天。除1名对象外(第1部分,群组A组,组2)均按计划接受研究药物(参见上文)。所有对象进行随机化和治疗。所有对象均完成研究,并被纳入安全性分析。一名对象(第1部分,群组A,组2)由于输注泵功能障碍导致与实验方案偏离,因而未纳入PK和PD分析。由于这种错误的给药,组2纳入另一名对象。第2部分中的一名对象由于在与AE无关的治疗之后接受了禁用的伴随药物,因而未接受第二剂FR104 0.500mg/kg。该对象按照协议完成所有访问。该对象未被排除在PK和PD群体之外,但是第29天之后取得的数据被排除在分析之外。对象的盲法编号均未被研究员或赞助商破坏。

[0290] 基准数据

[0291] 表11显示了对象的人口统计资料。在所有治疗组中,白人占对象的大多数。所有对象的年龄、体重和BMI均在协议中限定的入选标准内。

表 11: 基准处对象的人口统计资料

	安慰剂	FR104 总数
安全性群体	18	47
性别, n (%)		
男性	12 (67)	26 (55)
女性	6	21
年龄(岁)		
平均值(SD)	52.7 (9.28)	52.1 (7.88)
中值	56.7	55.5
[0292] 范围	20; 60	22; 60
种族, n (%)		
白人	17 (94)	46 (98)
亚洲人	1 (6)	0
黑人/非洲人美洲人	0	1 (2)
BMI (kg/m ²)		
平均值(SD)	25.04 (2.25)	25.64 (2.196)
中值	24.88	25.78
范围	20.2; 28.8	19.9; 29.7

[0293] 药代动力学

[0294] 0.005、0.020和0.050mg/kg较低剂量的FR104导致浓度不足以测量以进行可靠的PK参数估计。图5A阐明了其余剂量组的FR104浓度-时间数据。在群组A(组1-4,无KLH免疫,

FR104 0.005至0.500mg/kg剂量)中,FR104的药代动力学自0.200mg/kg剂量开始为近似线性关系,群组 $t_{1/2}$ 范围为146 (0.200mg/kg)至182小时 (0.500mg/kg)。在群组B(组7-9(2), KLH免疫)中,如在群组A中,FR104的药代动力学自0.200mg/kg剂量开始为近似线性关系,其中 $t_{1/2}$ 的范围为150 (0.200mg/kg)至210小时 (1.500mg/kg)。给予0.004-1.5mg/kg之后,平均FR104C_{max}的范围为117至37700ng/ml,给予0.2-1.5mg/kg之后,AUC_{inf}的范围为0.705至7.010mg/ml。

[0295] 还在间隔28天的两次输注FR104 (0.200和0.500mg/kg)之后,对FR104的PK进行评估(第2部分)。药代动力学为近似线性关系,其中 $t_{1/2}$ 的范围为169至203小时。在第1天和第29天输注FR104 0.200mg/kg之后的PK参数类似。在输注FR104 0.500mg/kg之后观察到血清浓度的累积,其中剂量标准化的AUC_{0-28d}和AUC_{inf}增加约20%。

[0296] 药效学

[0297] 输注FR104之后,观察到外周血中T细胞上剂量依赖的CD28R0(图5B)。输注0.020mg/kg以及更高剂量的FR104之后,CD28受体在第一个取样时间点(0.5小时)饱和。在第29天,在输注0.500mg/kg和1.500mg/kg剂量的FR104之后,R0仍然在50%以上。到第15天(0.020mg/kg)至第85天(1.500mg/kg),CD28R0以剂量依赖的方式恢复至50%。当FR104的血清浓度刚好高于量化下限(<100ng/mL)时,CD28R0仍然在50%以上,并且当FR104的血清浓度高于200ng/mL时,CD28R0在80%以上。这提示FR104在体内对其受体具有高亲和力,并且即使低浓度的FR104也可能具有药理学活性。在输注第二剂0.200mg/kg之后,受体再次变为饱和,这导致50%以上的饱和持续超过60天。间隔28天给予两剂0.500mg/kg可使100%的受体饱和持续超过60天。

[0298] 由任何剂量的FR104和任何给药方案引起的总淋巴细胞计数和淋巴细胞亚型(包括初始T细胞、记忆T细胞和Treg细胞)没有显著变化,并且在本研究期间,这些亚型的水平在任何组中未显著改变。通过测量MFI评估的淋巴细胞亚型的CD28表达水平也未受影响(图6)。

[0299] 由于先前在人体中施用超激动剂或二价拮抗剂抗CD28mAb后发生细胞因子释放,潜在的细胞因子释放已进行密切追踪。在任何志愿者的血清中均未观察到细胞因子升高。仅记录到背景水平,这被认为是非临床相关的(图7e,图8A)。由于这种可变性,分析试剂盒仅检测在2小时和96小时时间点(而未在其它时间点)施用0.100mg/kg以上剂量FR104之后的诱导型IL-2合成的显著抑制(图8B)。在任一组中,SEB+LPS诱导的INF γ 和IL-8(非T细胞也分泌的细胞因子)的合成不会受到FR104治疗的调节。

[0300] 抗KLH抗体的控制

[0301] 通过测量抗KLH抗体评估FR104对KLH激发应答的影响。随着FR104剂量的增加,抗KLH抗体的形成显著延迟并且程度较低。单次给予0.020mg/kg之后,在KLH免疫后第15天已经可以看到抗KLH抗体产生的减少,其在第29天达到安慰剂组的平均50%。抗KLH应答维持在与安慰剂组相当的水平,直至观察的最后一天(第85天)。与安慰剂组的应答相比,单次给予0.200mg/kg之后,抗KLH抗体产生的平均减少量在第15天和第29天为大约85%,在第57天和第85天分别为70%和60%。在单次给予0.500mg/kg之后,抗-KLH抗体产生的平均减少量在第15天和第29天为>90%,并且在第57天和第85天分别为大约80%和75%。在最高剂量水平(FR104 1.500mg/kg),抗KLH抗体的形成基本被抑制直至第57天。但是,在第85天和第113

天记录到了一些应答(减少大约75%) (图9)。。

[0302] 免疫原性

[0303] 第1部分群组A(无KLH免疫)中,在输注0.005mg/kg、0.050mg/kg、0.200mg/kg和0.500mg/kg FR104之后,分别有0名(0%)、2名(50%)、3名(60.0%)和1名(20.0%)对象在最后一次样品(第85天)中被报告为抗FR104抗体(ADA)阳性。第I部分群组B(KLH免疫)中,在输注FR104 0.020mg/kg、0.200mg/kg、0.500mg/kg(第85天)和1.500mg/kg(第113天)之后,分别有1名(20%)、3名(60.0%)、4名(80.0%)和2名(40.0%)对象在最后一次样品中含有针对FR104的抗体。在第2部分(重复给药)中,在输注FR104 0.200mg/kg和0.500mg/kg之后,有3名对象(60.0%)在最后一次样品(第113天)中含有针对FR104的抗体。最早的抗FR104抗体在第1部分从第29天开始检测到(群组A和B)以及第2部分从第57天开始检测到。大约一半的ADA+对象(10/22)具有相对低的滴度(<30)。他们不诱导AE,也不改变细胞因子的释放。由于存在抗FR104抗体时其仅在除一人之外的所有对象的血液中FR104消失后才出现,因而不能得出它们对PK的潜在影响的结论。

[0304] 安全性

[0305] 在研究期间没有发生死亡或SAE,除了一名对象被报告患有SAE肾结石,其被研究员认为在输注FR104 0.500mg/kg和KLH激发之后与研究药物无关。没有对象由于治疗出现的不良事件(TEAE)而中断研究药物或研究。由于接受了针对AE肌痛的禁用药物(布洛芬、扑热息痛和曲马朵),第2部分中的一名对象在第29天未接受第二剂FR104 0.500mg/kg。该对象未退出研究并按照协议完成所有研究访问。所有报告的TEAE的严重程度均为轻度或中度(表12)。研究员认为的至少可能与研究药物相关的TEAE在输注FR104的10名对象中有5名被报告,而在输注安慰剂的对象中没有被报告。以常用的术语来讲,FR104输注后最常被报告的TEAE为背痛,头痛和呕吐。FR104输注后可能的治疗相关事件为头痛、呕吐、口疮性口炎(aphtous stomatitis)、口腔疱疹、口干、恶心、鼻咽炎、疲劳、牙龈炎、味觉障碍、腹泻、视力模糊以及流感样疾病。

[0306] 施用研究药物之后,在任何志愿者中均未观察到实验室、病毒学、生命体征、氧饱和度和ECG参数中值的临床相关的或一致的变化。

[0307] 基准后的EBV病毒载量结果为阴性或弱阳性(1名对象除外),并且基准后的EBV衣壳IgM抗体结果对于研究中的所有对象均是阴性或可疑的(图10)。EBV衣壳和核抗原IgG抗体在所有对象中均为阳性(因为它属于入选标准),并且在整个研究中维持在其基准水平(数据未显示)。接受2次IV剂量安慰剂的一名对象在第15天发生阳性EBV病毒载量结果,其中病毒载量为 $\log 3.83 \text{ IU/mL}$,该数值被认为足够高以在例如移植环境中受到临床关注。在第29天的下一时间点,测试为阴性。后期评估在第43天为阴性,第57天为阳性,其中病毒载量为 $2.7 \log \text{ IU/mL}$,第85天为阴性,以及第113天为阳性,其中病毒载量 $<2.5 \log \text{ IU/mL}$ 。

[0308] 在研究期间,在安慰剂输注和KLH激发之后,群组B中的1名对象被报告QTcF间隔 $>450 \text{ ms}$,并且QTcF对于基准的改变 $>30 \text{ ms}$ 。在第2部分,在输注FR104 0.200mg/kg之后,1名对象被报告QTcF间隔 $>450 \text{ ms}$,在输注FR104 0.200mg/kg之后,1名对象的QTcF对于基准的改变 $>60 \text{ ms}$,在输注FR104 0.200mg/kg和FR104 0.500mg/kg之后,分别有1名和3名对象被报告QTcF对于基准的改变 $>30 \text{ ms}$ 。在第1部分(群组A和B)以及第2部分中未观察到临床上显著的生命体征、脉搏血氧测定或ECG异常。

[0309] 除了群组A的2名对象和第2部分的3名对象之外,在研究期间未报告体检异常。对于这些对象,异常被认为是临床上显著的并且该观察结果报告为TEAE:对于群组A中的对象为鼻咽炎和结膜炎;以及对于第2部分中的对象为上呼吸道感染、肌痛和痛风。

[0310] 表12:第1部分(群组A和群组B)以及第2部分中每次治疗的TEAE总结

[0311]

第1部分, 群组 A

	安慰剂	FR104 0.005 mg/kg	FR104 0.050 mg/kg	FR104 0.200 mg/kg	FR104 0.500 mg/kg	FR104 所有对象
患有至少一种的对象数目:						
TEAE	2 (33.3)	1 (33.3)	3 (75.0)	4 (80.0)	2 (40.0)	10 (58.8)
SAE	0	0	0	0	0	0
致死性 TEAE	0	0	0	0	0	0
轻度 TEAE (最高严重程度)	1 (16.7)	0	3 (75.0)	1 (20.0)	0	4 (23.5)
中度 TEAE (最高严重程度)	1 (16.7)	1 (33.3)	0	3 (60.0)	2 (40.0)	6 (35.3)
重度 TEAE (最高严重程度)	0	0	0	0	0	0
研究药物被中断的 TEAE	0	0	0	0	0	0
至少可能的治疗相关的 TEAE	0	0	1 (25.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	5 (29.4)

[0312]

第 1 部分，群组 B

	安慰剂	FR104 0.020 mg/kg	FR104 0.200 mg/kg	FR104 0.500 mg/kg	FR104 1.500 mg/kg	FR104 所有对象
患有至少一种的对象的数目：						
TEAE	7 (87.5)	3 (60.0)	3 (60.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	10 (50.0)
SAE	0	0	0	1 (20.0)	0	1 (5.0)
致死性 TEAE	0	0	0	0	0	0
轻度 TEAE(最高严重程度)	6 (75.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	6 (30.0)
中度 TEAE (最高严重程度)	1 (12.5)	1 (20.0)	1 (20.0)	2 (40.0)	0	4 (20.0)
重度 TEAE(最高严重程度)	0	0	0	0	0	0
研究药物被中断的 TEAE	0	0	0	0	0	0
至少可能的治疗相关的 TEAE	2 (25.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0	3 (15.0)

第 2 部分

	安慰剂	FR104 0.200 mg/kg	FR104 0.500 mg/kg	FR104 所有对象
患有至少一种的对象的数目：				
TEAE	3 (75.0)	5 (100.0)	4 (80.0)	9 (90.0)
SAE	0	0	0	0
致死性 TEAE	0	0	0	0
轻度 TEAE (最高严重程度)	2 (50.0)	2 (40.0)	3 (60.0)	5 (50.0)
中度 TEAE (最高严重程度)	1 (25.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	4 (40.0)
重度 TEAE (最高严重程度)	0	0	0	0
研究药物被中断的 TEAE	0	0	0	0
至少可能的治疗相关的 TEAE	1 (25.0)	2 (40.0)	3 (60.0)	5 (50.0)

[0313] 讨论

[0314] 该试验代表在人体中首次施用CD28的人源化聚乙二醇化的Fab' 抗体片段拮抗剂FR104。FR104在所有剂量下均耐受良好,其中最常见的治疗出现的AE是头痛。FR104的施用与细胞因子释放综合征或T细胞激活无关。在先前利用抗CD28单克隆抗体(TGN1412, (Suntharalingam等),FK734(Shiao等))靶向CD28的尝试中,临床研究中并发诱导的细胞因子的释放。由于FR104与此类并发症无关,因此用单价拮抗剂抗体靶向CD28仍然是共刺激阻断的有吸引力的治疗策略。

[0315] 人血清中的细胞因子评估证明,即使在重复给药之后,FR104在任何剂量下都不会存在激动剂或超激动剂活性。在基准处或FR104施用之后记录的一些对象的背景或接近背景水平的IFN γ 、TNF α 和IL-8(图7)远低于施用TGN1412之后测量的那些,对于这两种细胞因子,其峰值为5000pg/ml (Suntharalingam等)。当抗药抗体(ADA)存在时其也是在大多数对象中仅在从血浆中消除FR104之后变得明显。因此,难以估计ADA对PK和PD参数,特别是对细胞因子的影响。但是,在一名对象中(第2部分,给予0.2mg/kg MAD),ADA变得明显,而CD28R0仍然可测量。在该对象中,也没有细胞因子释放,证实了下述临床前观察结果,即在ADA的存在下,FR104不以其IgG形式重现抗CD28抗体的激动特性。值得注意的是,FR104相对较高的免疫原性发生率与报告的已批准的生物Cimzia® (Certolizumab Pegol) (一种聚乙二醇化的Fab' 抗体片段)和一些其他生物制剂如类克和修美乐的范围相似;CIMZIA临床药理学BLA125160/0)。FR104未改变总淋巴细胞计数或淋巴细胞亚型。T细胞表型也未修改。鉴于CD28还可以调节致敏T细胞(primed T cell)向靶组织的迁移,这些数据连同细胞因子释放的缺失和靶标T细胞活化的缺失增强了FR104的纯拮抗剂活性。

[0316] 当剂量 ≥ 0.200 mg/kg时,FR104的PK可被认为近似线性。对于相同剂量,组间(SAD和MAD)仅观察到t_{1/2}和AUC_{inf}以及相关参数的轻微变化。

[0317] 参考文献

[0318] Bowen,M.,Armstrong,N.,and Maa,Y.-F.(2012).Investigating high-concentration monoclonal antibody powder suspension in nonaqueous suspension vehicles for subcutaneous injection.J.Pharm.Sci.101,4433-4443.

[0319] Findlay L,Eastwood D,Stebbing R,Sharp G,Mistry Y,Ball C,et al.Improved in vitro methods to predict the in vivo toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412.J Immunol Methods.2010; 352:1-12.

[0320] Haanstra KG.,Dijkman K.,Bashir N.,et al.Selective Blockade of CD28-Mediated T Cell Costimulation Protects Rhesus Monkeys against Acute Fatal Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.J Immunol.2015 Jan 14.pii:1402563.[Epub ahead of print].

[0321] Haley PJ.Small molecule immunomodulatory drugs:challenges and approaches for balancing efficacy with toxicity.Toxicol Pathol.2012;40(2): 261-266.

[0322] Jackisch,C.,Müller,V.,Maintz,C.,Hell,S.,and Ataseven,B.(2014).Subcutaneous Administration of Monoclonal Antibodies in Oncology.Geburtshilfe Frauenheilkd.74,343-349.

- [0323] Kean L.et al,T cell Costimulation Blockade in Transplantation.Oral communication at the Nantes Actualités Transplantation Meeting,June 5-6,2014,Nantes,France
- [0324] Melichar,B.,Študentová,H.,Kalábová,H.,and Vitásková,D. (2014) .Role of subcutaneous formulation of trastuzumab in the treatment of patients with HER2-positive breast cancer.Immunotherapy 6,811-819.
- [0325] Ohresser M,Olive D,Vanhove B,Watier H.Risk in drug trials.Lancet.2006 368 (9554) :2205-6.
- [0326] Poirier,N.,Dilek,N.,Mary,C.,et al.FR104,an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab'Antibody,Prevents Alloimmunization and Allows Calcineurin Inhibitor Minimization in Nonhuman Primate Renal Allograft.Am J Transplant.2015(1) :88-100.
- [0327] Poirier,N.,Mary,C.,Dilek,N.et al.Preclinical efficacy and immunological safety of FR104,an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody.Am J Transplant.2012(10) :2630-40.
- [0328] Poirier,N.,Mary,C.,Le Bas-Bernadet,S.,N.et al.Advantages of Papio anubis for preclinical testing of immunotoxicity of candidate therapeutic antagonist antibodies targeting CD28.MAbs.2014(3) :697-707.
- [0329] Shiao SL,McNiff JM,Masunaga T,Tamura K,Kubo K,and Pober JS.Immunomodulatory properties of FK734,a humanized anti-CD28 monoclonal antibody with agonistic and antagonistic activities.Transplantation.2007;83 (3) :304-13.
- [0330] Shpilberg,O.,and Jackisch,C. (2013) .Subcutaneous administration of rituximab (MabThera) and trastuzumab (Herceptin) using hyaluronidase.Br.J.Cancer 109,1556-1561.
- [0331] Stebbings R,Findlay L,Edwards C,Eastwood D,Bird C,North D,et al. 'Cytokine storm' in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412:better understanding the causes to improve pre-clinical testing of immunotherapeutics.J Immunol.2007;179:3325-3331.
- [0332] Suntharalingam G,Perry MR,Ward S,Brett SJ,Castello-Cortes A,Brunner MD,and Panoskaltsis N.Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.N Engl J Med.2006;355(10) :1018-28.
- [0333] Vierboom et al.,Clinical efficacy of a new CD28-targeting antagonist of T cell co-stimulation in a non-human primate model of collagen-induced arthritis.Clin Exp Immunol.2015.
- [0334] Weinblatt,M.E.,Schiff,M.,Valente,R.,van der Heijde,D.,Citera,G.,Zhao,C., Maldonado,M.,and Fleischmann,R. (2013) .Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis:findings of a phase IIIb,multinational,prospective,randomized study.Arthritis Rheum.65,28-38.

序列表

<110> 欧斯易免疫疗法
 <120> 配制用于向人施用的抗CD28人源化抗体
 <130>
 <150> EP 15200281.2
 <151> 2015-12-15
 <150> EP 16306537.8
 <151> 2016-11-22
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> ()..()
 <223> VH-hCH1
 <220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa= Gln或无
 <400> 1

Xaa	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Ile	Ile	His	Trp	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40					45				
Gly	Trp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Gln	Tyr	Asn	Ala	Gln	Phe
	50					55				60					
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr
65				70					75					80	
Met	Glu	Leu	Thr	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Arg	Asp	Asp	Phe	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Pro	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser

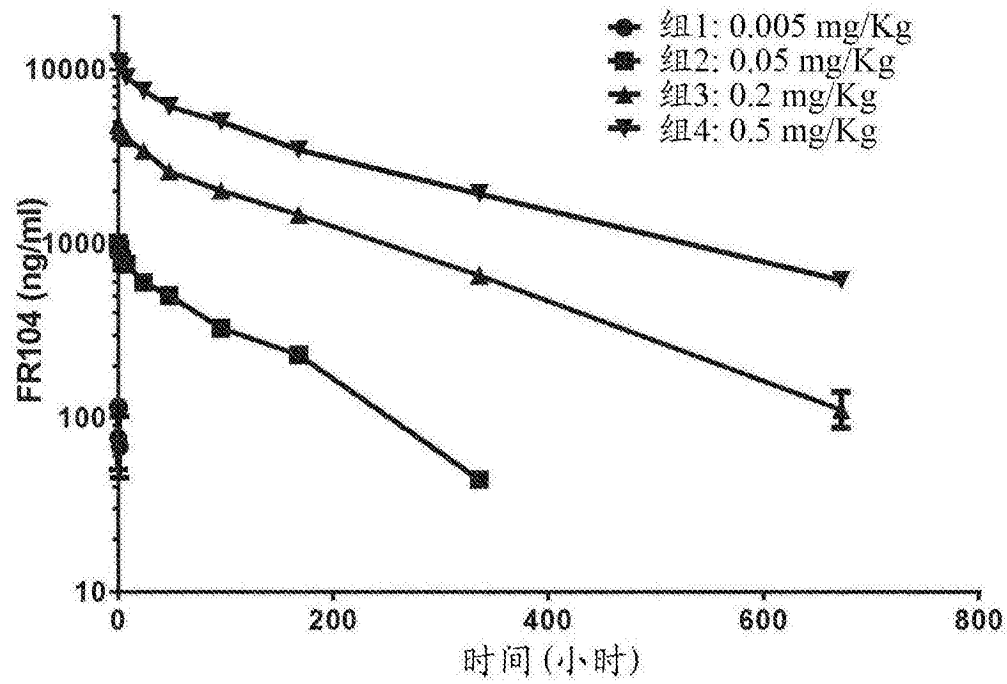
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala		
225	230	
<210>	2	
<211>	214	
<212>	PRT	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<221>	PEPTIDE	
<222>	()..()	
<223>	VL-hCkappa	
<220>		
<221>	SITE	
<222>	(96)..(96)	
<223>	Xaa = Cys或Ala或Asn	
<400>	2	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Xaa		

	85		90		95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala					
100		105		110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly					
115		120		125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala					
130		135		140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln					
145		150		155	
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser					
165		170		175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr					
180		185		190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
195		200		205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
210					
<210> 3					
<211> 232					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<221> PEPTIDE					
<222> ()..()					
<223> VH-hCH1					
<400> 3					
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala					
1	5	10		15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr					
20		25		30	
Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
35		40		45	
Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Gln Phe					
50		55		60	
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr					
65		70		75	
Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys					
85		90		95	
Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly					

100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala		
225	230	
<210>	4	
<211>	214	
<212>	PRT	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<221>	PEPTIDE	
<222>	()..()	
<223>	VL-hCkappa	
<400>	4	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

A.



B.

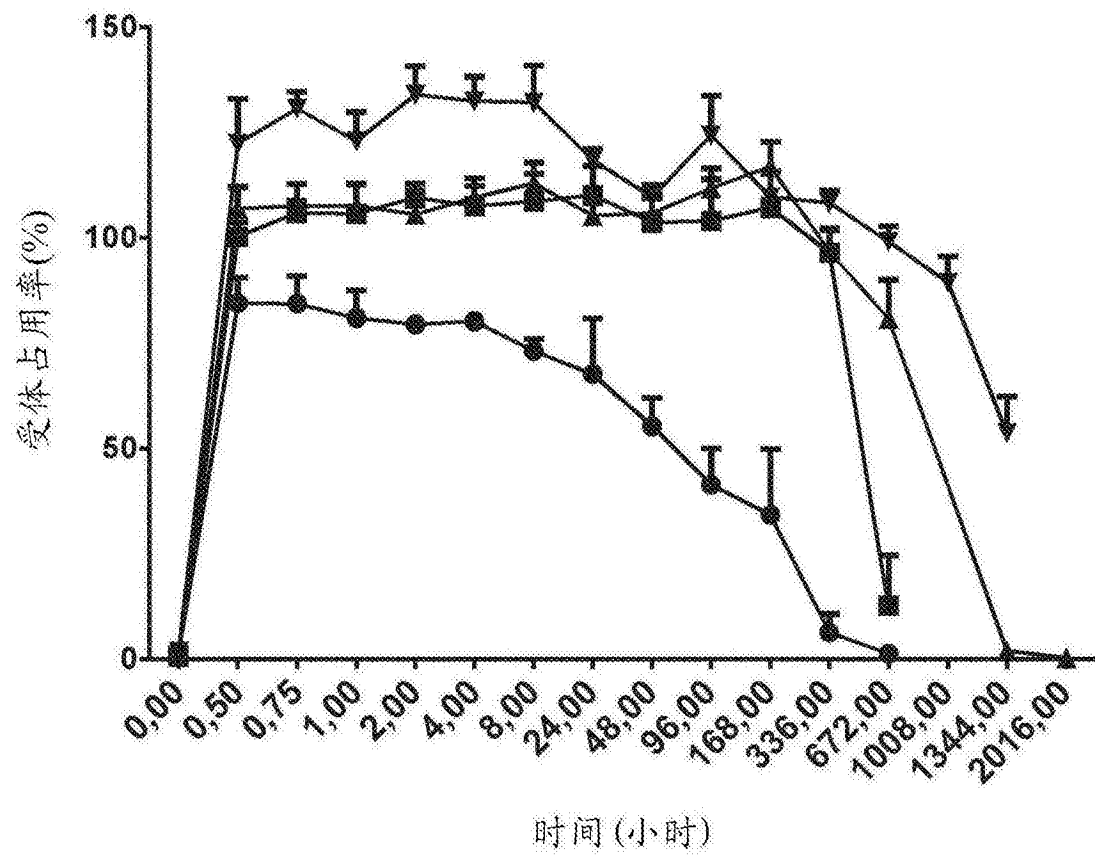


图1

A. 模拟的平均受体占用率(RO%)曲线

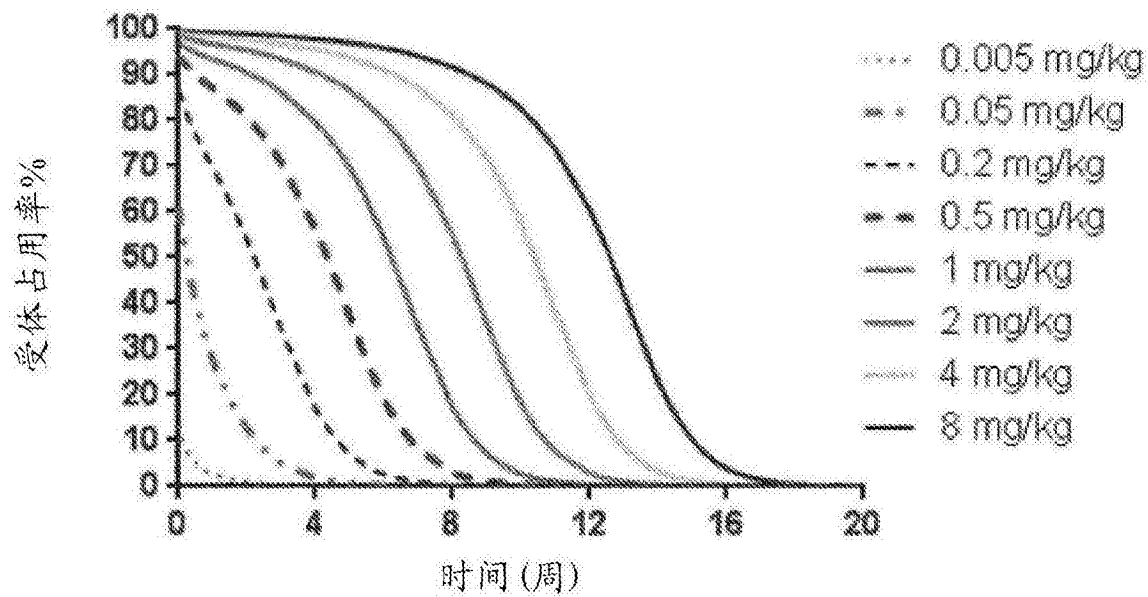
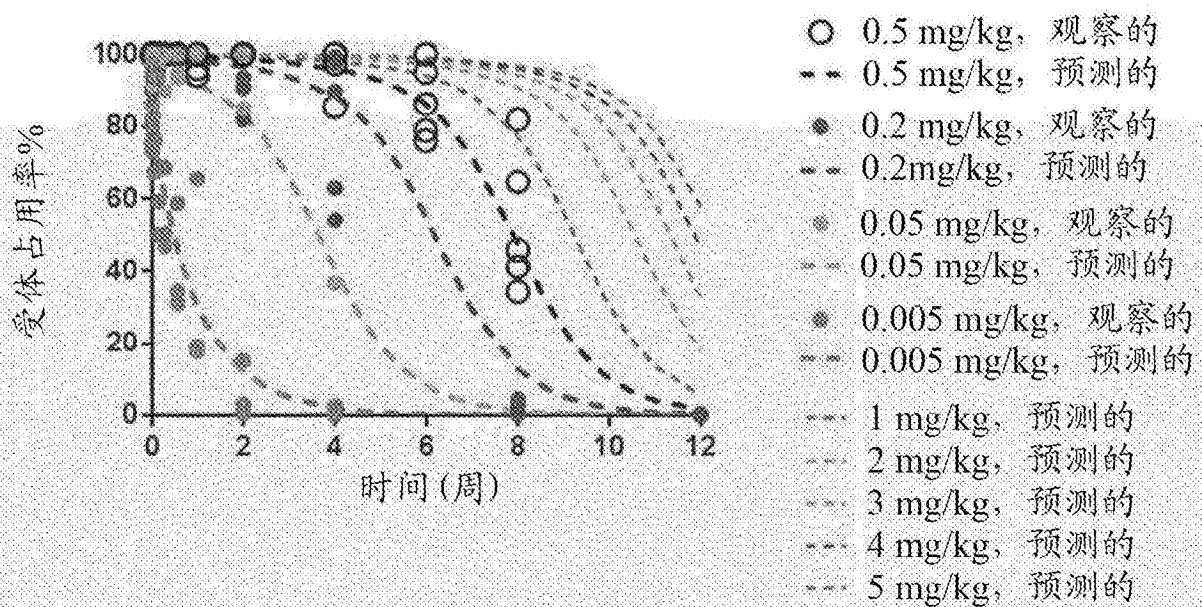
B. 人中受体占用率
预测的vs.观察的

图2

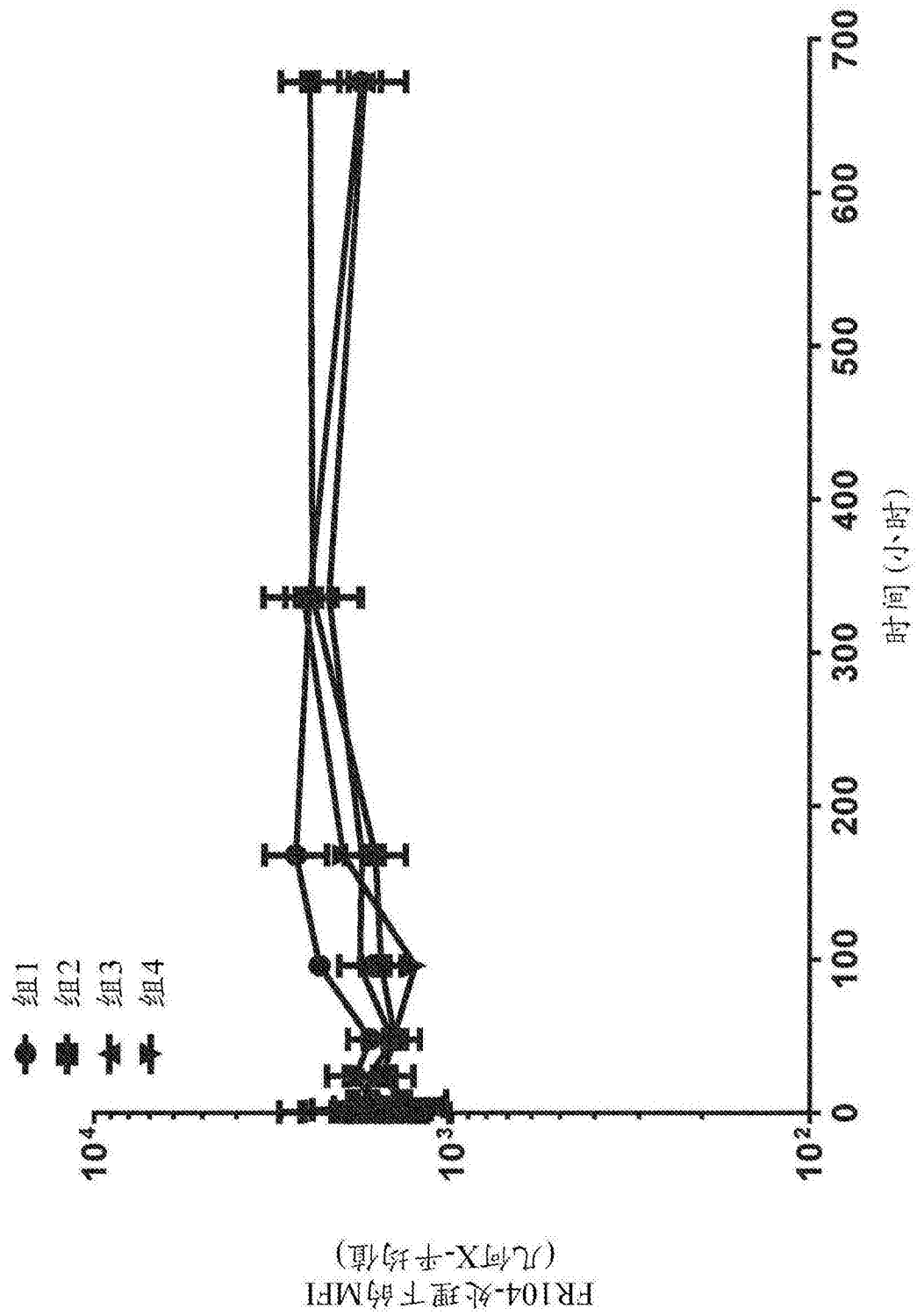
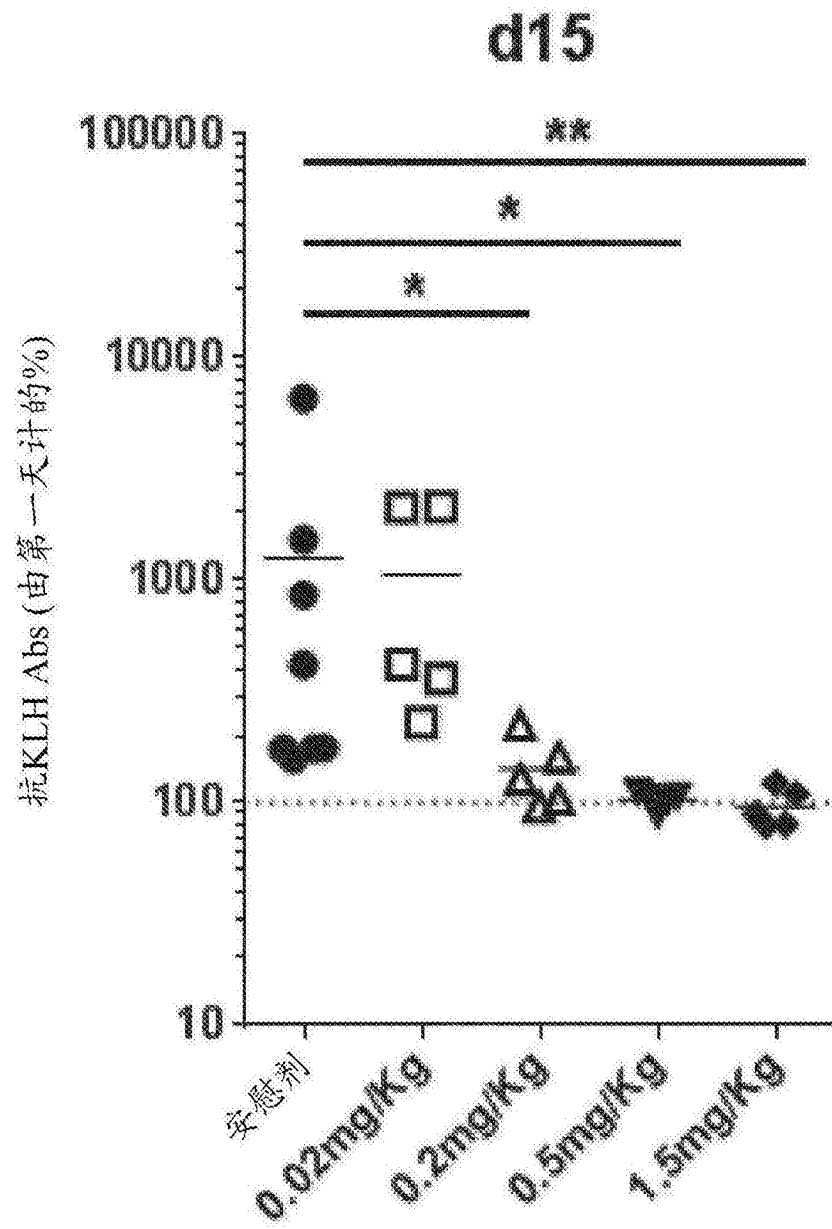


图3



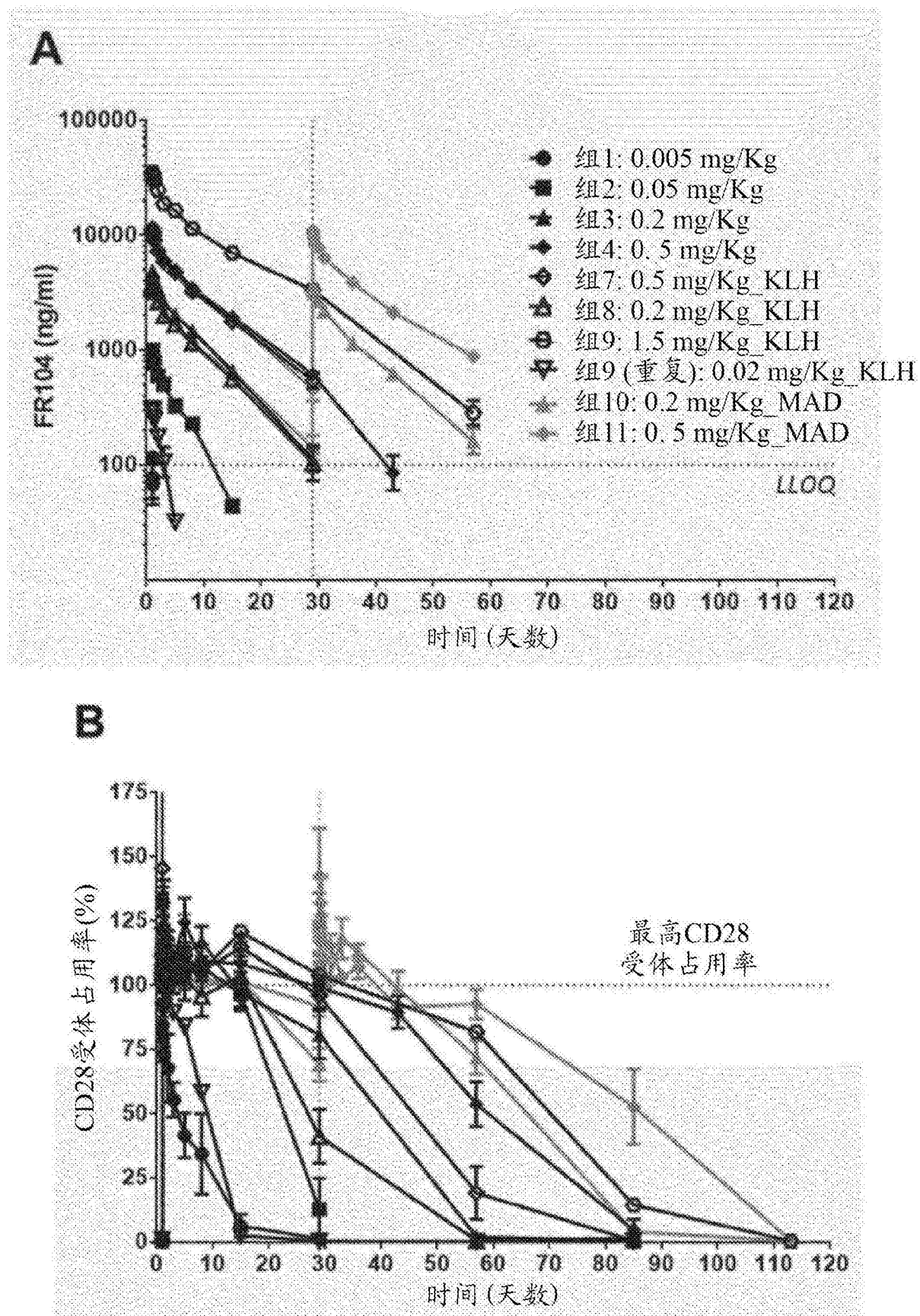


图5

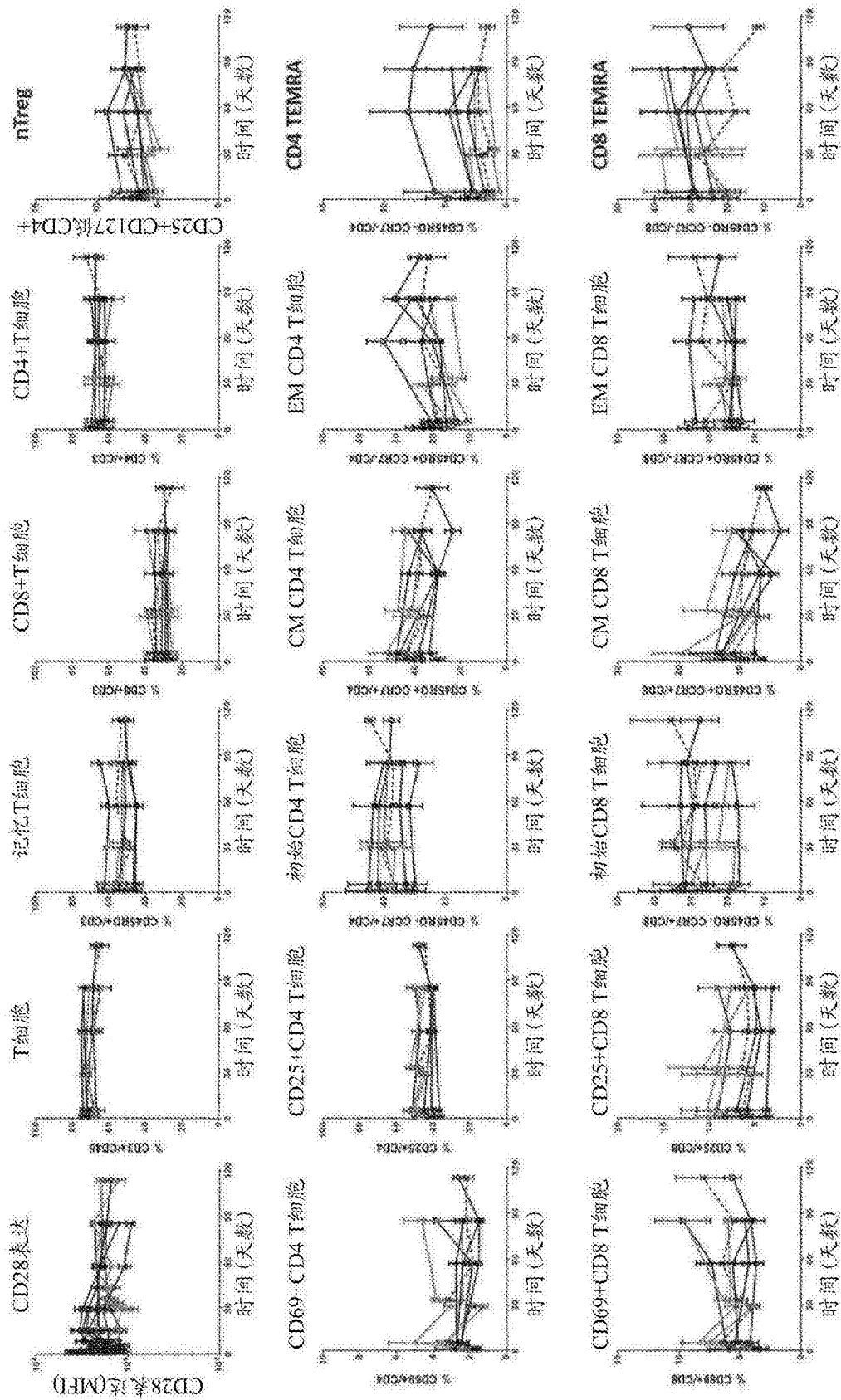


图6

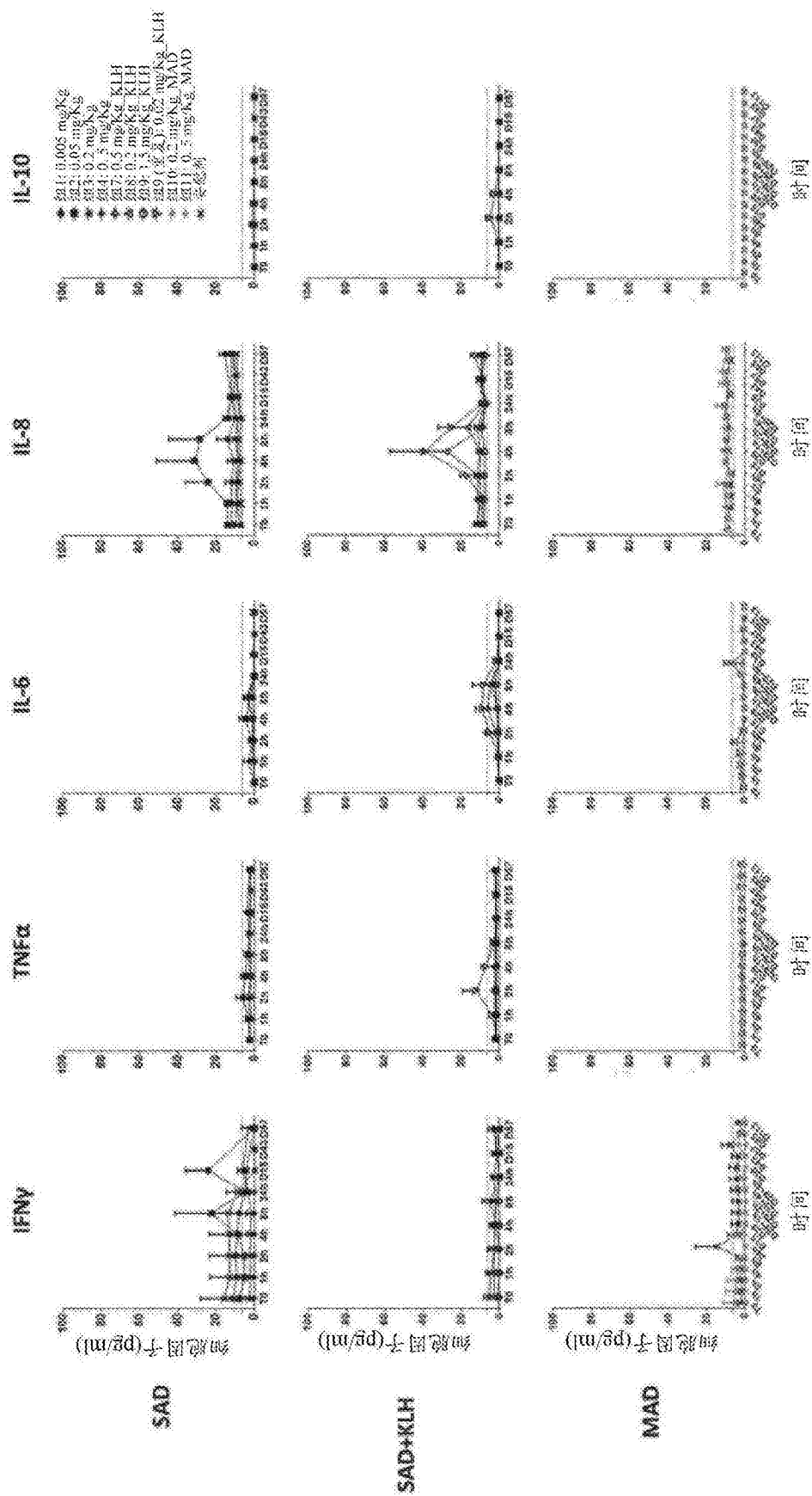


图7

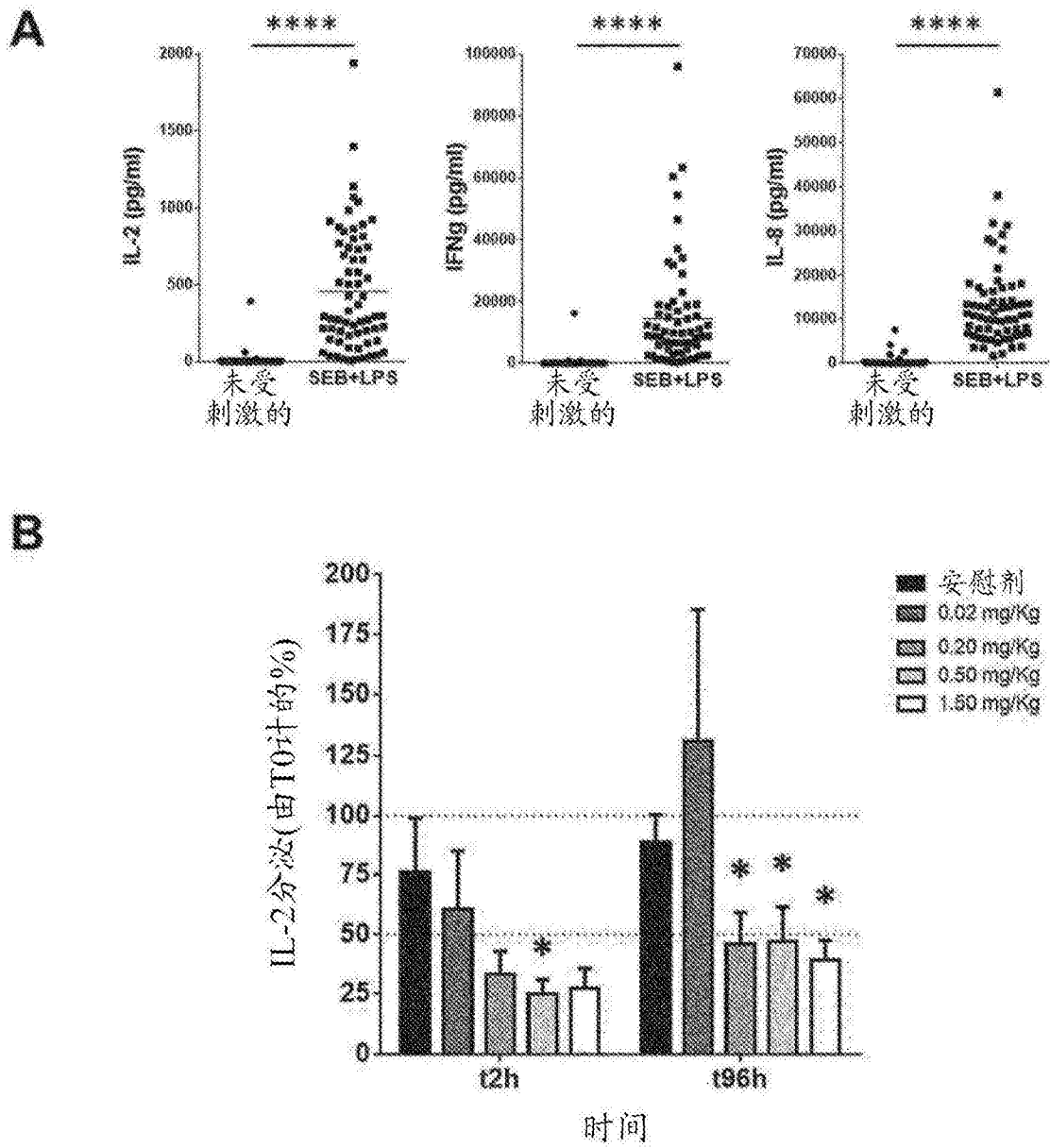


图8

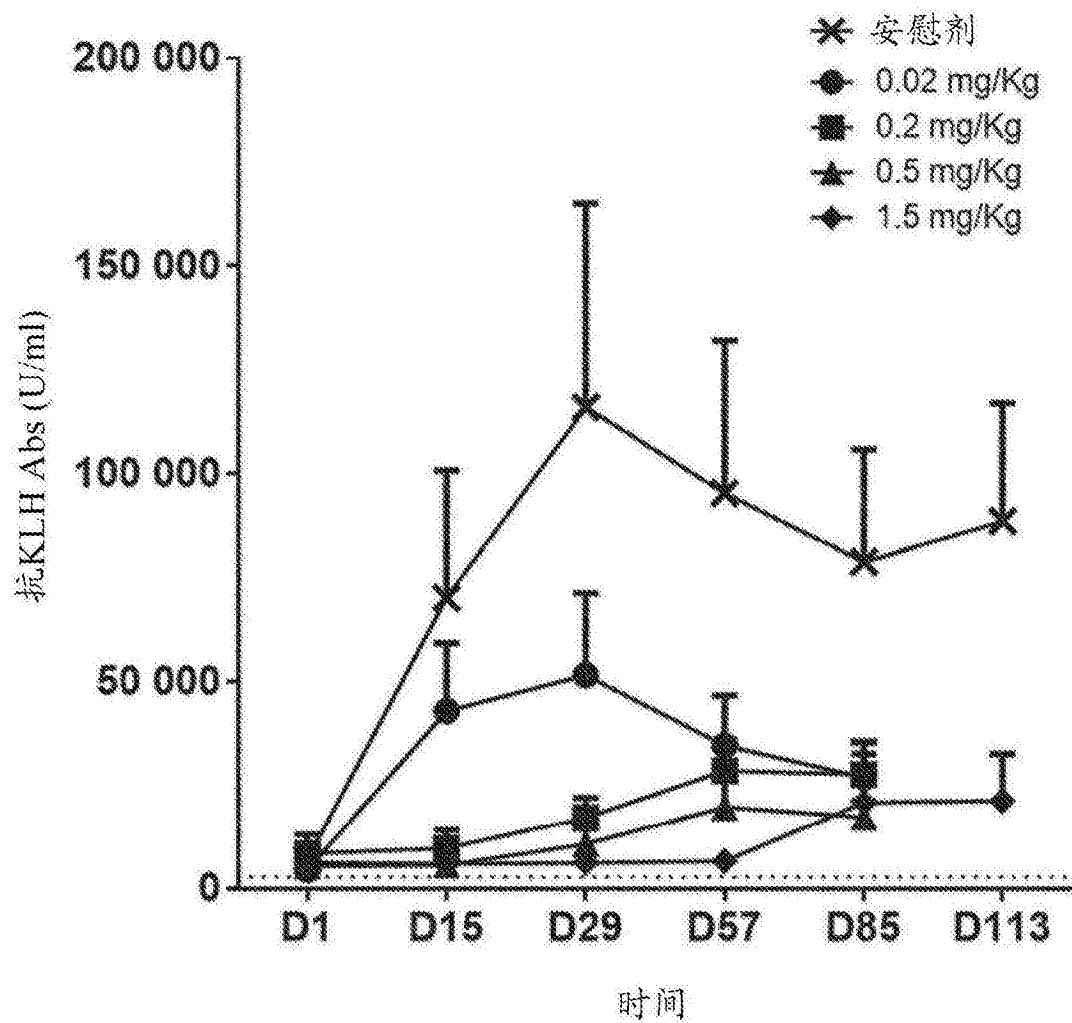


图9

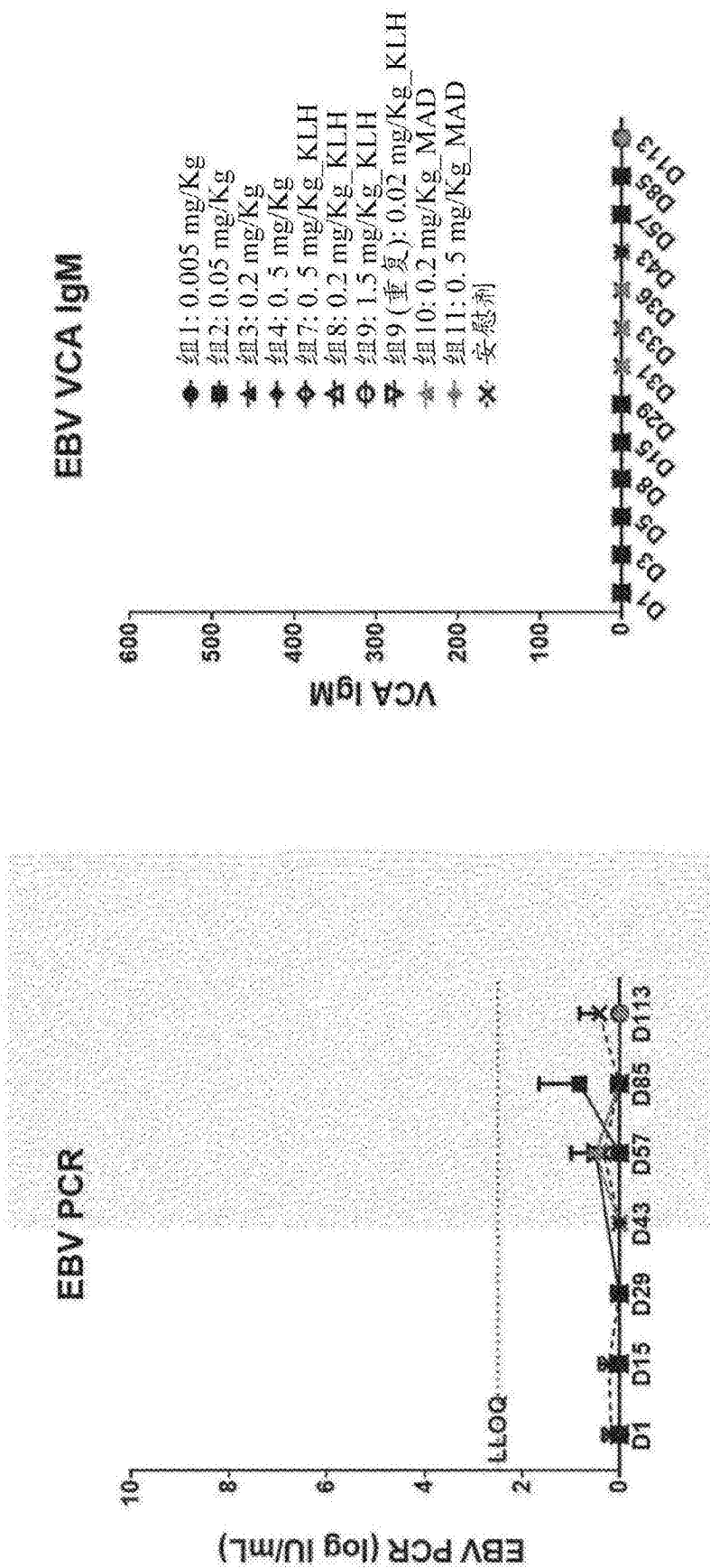


图10