



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102552905 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201210002865. 2

(22) 申请日 2004. 12. 09

(30) 优先权数据

60/531, 639 2003. 12. 22 US

(62) 分案原申请数据

200480038541. 8 2004. 12. 09

(71) 申请人 辉瑞产品公司

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 V·贝蒂安 J·D·库斯马诺

R·P·格拉杜

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 孙式洪

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 14 页

序列表 8 页 附图 3 页

(54) 发明名称

CD40 抗体制剂和方法

(57) 摘要

本发明涉及 CD40 抗体制剂和方法。具体而言,本发明提供了治疗患者肿瘤的方法,包括根据间歇给药时间表将 CD40 激动剂抗体给药于所述患者。本发明还提供了治疗患者肿瘤的方法,包括给药 CD40 激动剂抗体和 DNA 复制抑制剂的组合。还提供了治疗中所用的制剂。

1. 激活 CD40 活性至少 40% 的 CD40 激动剂抗体或其片段用于制备治疗患者的癌症的药物的用途,其中所述药物适于根据至少两个循环的间歇给药方案给药所述抗体,每个循环包括 (a) 给药阶段,该过程中将治疗有效量的所述 CD40 激动剂抗体给药于所述患者,此后, (b) 静息阶段;其中给药的 CD40 激动剂抗体的治疗有效量是 0.03 至 3.0mg/kg/天,持续 1-5 天,连续或隔天;且静息阶段是 1-8 周。

2. 激活 CD40 活性至少 40% 的 CD40 激动剂抗体或其片段用于制备在患者中增强免疫应答的药物的用途,其中所述药物适于根据至少两个循环的间歇给药方案给药所述抗体,每个循环包括 (a) 给药阶段,该过程中将治疗有效量的所述 CD40 激动剂抗体给药于所述患者,此后, (b) 静息阶段;其中给药的 CD40 激动剂抗体的治疗有效量是 0.03 至 3.0mg/kg/天,持续 1-5 天,连续或隔天;且静息阶段是 1-8 周。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中治疗有效量产生所述抗体 0.01 μ g/ml 至 10 μ g/ml 的血浆浓度持续至少三小时,且静息阶段为至少 1 周。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中治疗有效量产生 0.03 μ g/ml 至 1.0 μ g/ml 的血浆浓度。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的用途,其中所述抗体选自具有抗体 3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1、24.2.1、3.1.1L-L4M-L83V 和 23.28.1L-C92A 的氨基酸序列的抗体。

6. 根据权利要求 1-4 任一项的用途,其中所述抗体包括选自称为 3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1、24.2.1、3.1.1L-L4M-L83V 和 23.28.1L-C92A 的抗体的抗体的 CDR 或可变区。

7. 根据权利要求 1-4 任一项的用途,其中所述抗体与选自称为 3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、3.1.1L-L4M-L83V、3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1、24.2.1 和 23.28.1L-C92A 的抗体的 CD40 抗体结合相同的表位。

8. 根据权利要求 1-4 任一项的用途,其中所述抗体与选自称为 3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1、24.2.1、3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 和 23.28.1L-C92A 的抗体的 CD40 抗体竞争。

9. 根据权利要求 1-4 任一项的用途,其中所述抗体具有选自 21.4.1、3.1.1 和 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 的抗体的氨基酸序列。

10. 适于非肠道给药的稳定液体药物制剂,包括 pH5.0-6.0 的 CD40 激动剂抗体和药学上可接受的载体,所述制剂稳定至少三个月,其中所述抗 CD40 抗体具有 21.4.1 抗体的氨基酸序列,其中所述抗体的浓度为至少约 5mg/ml,且其中所述药学上可接受的载体选自醋酸钠、氯化钠和聚山梨酸酯 80。

11. 权利要求 10 的制剂,含有醋酸钠、氯化钠和聚山梨酸酯 80。

CD40 抗体制剂和方法

[0001] 发明背景

[0002] CD40 是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族的成员。其在抗原呈递细胞 (B 细胞、树突细胞、单核细胞)、造血前体、内皮细胞、平滑肌细胞、上皮细胞以及多数人肿瘤上表达。(Grewal & Flavell, *Ann. Rev. Immunol.*, 1996, 16:111-35; Toes & Schoenberger, *Seminars in Immunology*, 1998, 10(6):443-8)。使用 CD40 激动剂的研究报道了对 CD40 受体的刺激引发了与抗肿瘤活性相关的级联效果。例如, 已经表明对抗原呈递细胞上 CD40 受体的刺激可增强它们的成熟、抗原呈递功能、共刺激潜能及其免疫调节细胞因子的释放 (Lee 等, *PNAS USA*, 1999, 96(4):1421-6; Cella 等, *J. Exp. Med.*, 1996, 184(2):747-52)。已经报道 CD40 激动剂促进了 CD40+ 肿瘤的凋亡并提高它们被树突细胞加工的能力 (von Leoprechting 等, *Cancer Res.*, 1999, 59:1287-94; Sotomayo 等, *Nature Medicine*, 1999, 5(7):780-87; Eliopoulos 等, *Mol. Cell Biol.*, 2000, 29(15):5503-15; Ziebold 等, *Arch. Immunol. Therapiae Experimentalis*, 2000, 48(4):225-33; Hoffmann 等, *J. Immunol.*, 2001, 24(2):162-71)。已经在动物模型中说明了这些免疫刺激和直接抗肿瘤效果的重要性, 其中已经表明 CD40 激动剂抗体能防止肿瘤生长并逆转肿瘤耐受性 (Diehl 等, *Nature Med.*, 1999, 5(7):774-9; Francisco 等, *Cancer Res.*, 2000, 60(12):32225-31)。以下专利公开中涉及 CD40 抗体: U. S. 5, 786, 456; U. S. 5, 674, 492; WO 02/088186; US2003059427; US20020142358; WO 01/56603; U. S. 5, 801, 227; EP806963; WO88/06891 和 WO94/04570。然而, 对于 CD40 抗体还没有描述高度有效的给药方法和制剂。适用于这样治疗中的稳定制剂也是有用的。

[0003] 发明概述

[0004] 本发明涉及治疗需要这样治疗的患者的癌症的方法, 包括将 CD40 激动剂抗体或其片段给药于所述患者, 其中根据至少两个循环的间歇给药方案来给药所述抗体, 每个循环包括 (a) 给药阶段, 该过程中将治疗有效量的所述 CD40 激动剂抗体给药于所述患者, 和此后 (b) 静息阶段。一实施方案中, 给药产生了 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 至 10 $\mu\text{g/ml}$ 的抗体血浆浓度, 维持至少三小时, 而静息阶段为至少 1 周。另一实施方案中, 给药阶段为至少一天、1-5 天或 1-3 天。另一实施方案中, 静息阶段为 1-8、1-6 周, 2-5 周, 或 3-4 周。

[0005] 特定实施方案中, CD40 激动剂抗体的治疗有效量产生所述抗体约 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 至 10 $\mu\text{g/ml}$, 约 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 至 1 $\mu\text{g/ml}$, 约 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 至 0.3 $\mu\text{g/ml}$, 或约 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆浓度, 持续 3 至 120 小时。一些实施方案中, 所指明的血浆浓度维持至少一天, 24 至 30 小时, 24 至 36 小时, 24 至 48 小时, 24 至 72 小时, 24 至 96 小时, 或 24 至 120 小时。一些实施方案中, 血浆浓度维持 3 至 96 或 12 至 72 小时。

[0006] 特定实施方案中, 在给药阶段过程中给药的 CD40 激动剂抗体的治疗有效量为约 0.03 至 3.0mg/kg/天, 0.1 至 3.0mg/kg/天, 0.1 至 1.0mg/kg/天, 或约 0.1 至 0.3mg/kg/天。一实施方案中, 给药所述剂量持续 1-5 天或 1-3 天, 连续或隔天。

[0007] 如上结合肿瘤治疗所述的, CD40 激动剂抗体的间歇给药方案, 在提高患者的免疫应答中也是有用的, 因此, 本发明还提供了这样的用途。特定实施方案中, 患者免疫应答的

提高使得患者全血中 B 细胞上 CD23 或 MHC-II 表达的提高,例如,可以在给药阶段结束时进行测量。

[0008] 一些实施方案中,将抗 CD40 抗体给药于患有原发和 / 或联合免疫缺陷的患者,包括 CD40- 依赖性高 -IgM 性免疫缺陷综合征、常见的可变型免疫缺陷、Bruton's 丙种球蛋白缺乏血症、IgG 亚类缺乏和 X- 连锁的 SCID(常见 γ 链突变)。一些实施方案中,给药抗 CD40 抗体来治疗免疫抑制患者,例如由于化疗,或具有免疫 - 衰弱疾病,包括任何获得性免疫缺陷疾病,如 HIV。一些实施方案中,给药抗 CD40 抗体来提高老年患者的免疫力。一些实施方案中,给药抗 CD40 抗体来治疗细菌、病毒、真菌或寄生虫感染的患者。一些实施方案中,可以将人激动剂抗 CD40 抗体预防性地给药于患者来预防感染或减少感染次数或减轻感染严重程度,这些患者由于年龄、疾病或总体差的健康状况而易于受到感染的影响。

[0009] 本发明还提供了治疗患者肿瘤的方法,包括给药 CD40 激动剂抗体和 DNA 复制抑制剂,优选铂衍生物,尤其是顺铂。特定实施方案中,将顺铂静脉内给药。一些实施方案中,顺铂的给药量为每 m^2 患者体表面积约 25 至 300mg,每 m^2 约 50 至 150mg,或每 m^2 约 75 至 100mg。一实施方案,以一次剂量给药顺铂(例如,单次静脉内输注)。另一实施方案中,在 2-5 天内给药。特定实施方案中,联合顺铂给药的 CD40 抗体的给药剂量为约 0.1 至 3.0mg/kg,或约 0.1 至 1.0mg/kg,或约 0.1 至 0.3mg/kg。

[0010] 另一方面中,顺铂的给药联合 CD40 抗体的间歇给药方案,在一个或多个给药阶段或静息阶段中给药顺铂。

[0011] 另一方面中,本发明涉及治疗需要这样治疗的患者的肿瘤的方法,通过以低于 1mg/kg/ 天的剂量将 CD40 激动剂抗体或其片段给药于患者,其中由给药抗体引起的患者 C_{max} 血清浓度低于 50 μ g/ml。一实施方案中,剂量为 0.1 至 0.3mg/kg,患者的抗体 C_{max} 血清浓度为 0.5 至 10 μ g/ml。

[0012] 另一方面中,本发明涉及适于非肠道给药的稳定液体药物制剂,包括 pH 为 5.0-6.0 的抗 CD40 抗体和药物学上可接受的载体,制剂稳定至少三个月。制剂优选具有至少约 5mg/ml 的 CD40 抗体浓度。一实施方案中,制剂包括抗 CD40 抗体、醋酸钠、氯化钠和聚山梨酸酯 80。优选,其含有 20mM 醋酸钠、140mM 氯化钠和 0.2mg/mL 聚山梨酸酯 80。抗 CD40 抗体优选具有选自抗体 21.4.1 或 3.1.1 的抗体的氨基酸序列。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1 显示了在免疫细胞存在下 CD40 激动剂抗体抑制了 CD40(-) 肿瘤 K562 的生长。在肿瘤攻击时动物接受单次注射 (IP) 21.4.1 或 KLH。在第 21 天以 mm^2 记录每个个体动物的肿瘤大小(每组 10 只动物)。研究是至少 5 次单独研究的代表。

[0015] 图 2 显示了 CD40 激动剂抑制了人乳房肿瘤细胞系 BT474 的生长。数值表示注射后第 53 天的各个肿瘤测量值,每组使用 6 只动物。研究是两次单独实验的代表。通过水平线表示每个处理组的平均值。

[0016] 图 3 显示 CD40 激动剂抑制了 CD40(+) 肿瘤的生长,单独或在免疫细胞存在下。在肿瘤攻击时动物接受单次注射 21.4.1。(a) 单独注射肿瘤或 (b) 与人外周血 T 细胞和 DC 一起。数据点表示每个个体动物的肿瘤大小(mm^2)。通过水平线表示每个处理组 ($N = 10$) 的平均值。研究是至少 3 次单独实验的代表。

[0017] 图 4 显示了 CD40 激动剂抗体延迟由 B 细胞淋巴瘤 (Daudi) 诱导的死亡率的效果。

数据点指的是存活动物的平均数目。每组 $N = 10$ 。

[0018] 图 5 显示了 CD40 激动剂抗体和顺铂联合治疗引起的肿瘤消退。

[0019] 优选实施方案的详述

[0020] 如在此所用的,术语“激动剂 CD40 抗体”或“激动剂抗 CD40 抗体”意思是当加入表达 CD40 的细胞、组织或生物体中时,特异性结合人 CD40 分子并提高一种或多种 CD40 活性至少约 20% 的抗体。一些实施方案中,抗体激活 CD40 活性至少 40%、50%、60%、70%、80% 或 85%。一些实施方案中,在 CD40L 存在下发生激活。一些实施方案中,使用全血表面分子上调测试来测量激活抗体的活性。另一实施方案中,使用测量 IL-12 释放的树突细胞测试来测量激活抗体的活性。另一实施方案中,使用体内肿瘤模型来测量激活抗体的活性。

[0021] 如在此所用的术语“抗体”指的是完整抗体,或其与完整抗体竞争特异性结合的结合片段。通过重组 DNA 技术,或通过对完整抗体的酶促或化学裂解来产生结合片段。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 和单链抗体。可以理解在此涉及完整(例如,整个、全长等)抗体时包括重链具有末端赖氨酸缺失的抗体,其通常在重组表达过程中发生。

[0022] 优选,激动剂 CD40 抗体是人抗体。如在此所用的,术语“人抗体”意思是其中可变和恒定结构域序列源自人序列的抗体。人 CD40 抗体详细描述于 2001 年 11 月 9 日申请的 U.S. 临时申请 no. 60/348,980 和 2002 年 11 月 8 日申请的 PCT 国际申请 No. PCT/US02/36107(现在公开为 WO 03/040170)中,整个公开内容在此引入作为参考。人抗体在本发明的治疗方法中提供了实质性的优势,因为预期它们可最小化与人患者中使用非人抗体相关的免疫原性和过敏性反应。

[0023] 用于本发明的示范性人抗 CD40 抗体包括具有指定为 3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1、24.2.1、3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 和 23.28.1L-C92A 的抗体的氨基酸序列的抗体,以及包括任何示范性抗体的 CDR 或可变区的抗体。

[0024] 识别相同或相似表位的抗体或其片段,和任一种示范性抗体一样,也可以用于本发明中。即,因为本领域技术人员基于在此所提供的公开内容,可以理解与本发明抗体(例如,3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1、24.2.1、3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 和 23.28.1L-C92A,等)竞争的抗体可以如在此别处所公开的一样有用。使用本领域公知的表征抗体的方法可以容易地鉴定与在此列举的抗体竞争的目标抗体。更具体地,评估抗体结合特征的测试以及将那些结合特征与另一种抗体相比较的测试,是本领域技术人员公知的。这样的方法包括,但不限于,基于 ELISA 的测试,使用 BIAcore 结合研究以及详细描述于 Walker 等的 US 专利申请公开 No. 2003/0157730A1 中的那些。

[0025] 如在此所用的关于抗体的术语“竞争”,意思是第一个抗体与第二个抗体竞争结合,其中与第二个抗体不存在时第一个抗体的结合相比较,在第二个抗体存在下,可检测到第一个抗体与其同源表位的结合降低。或者,可以是(但无需是)在第一个抗体存在下,可检测到第二个抗体与其表位的结合也降低了。即,第一个抗体可以抑制第二个抗体与其表位的结合而第二个抗体没有抑制第一个抗体与其表位的结合。然而,当每个抗体可检测

地抑制另一个抗体与其同源表位或配体的结合,不管程度是相同、更高或更低,认为抗体彼此相互“交叉竞争”结合它们各自的表位。例如,交叉竞争抗体可以结合本发明抗体(例如,3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1、24.2.1、3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 和 23.28.1L-C92A)结合的表位,或表位的一部分。本发明包括竞争和交叉竞争抗体两者。与产生这样的竞争或交叉竞争的机理(例如,位阻,构象改变或与共同表位或其片段结合等)无关,本领域技术人员基于在此提供的教导将认识到这样的竞争和/或交叉竞争抗体被包括在内并可用于在此所公开的方法中。

[0026] 此外,可以通过一个或多个氨基酸残基的置换、添加或缺失来进一步修饰示例抗体而不消除抗体结合抗原并发挥其激动剂功能的能力。实际上,称为“3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V”的抗体,在重链可变区中包括三个氨基酸置换,即氨基酸残基编号78的丙氨酸置换为苏氨酸,氨基酸残基编号88的缬氨酸置换为丙氨酸,和氨基酸残基编号97的缬氨酸置换为丙氨酸(SEQ ID NO:9),所有均相对于抗体3.1.1的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。此外,3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V抗体进一步包括轻链可变区中氨基酸残基编号4的亮氨酸至甲硫氨酸的氨基酸置换和氨基酸残基编号83的亮氨酸至缬氨酸的置换(SEQ ID NO:10),与抗体3.1.1的轻链可变区的氨基酸序列相比较(SEQ ID NO:3)。3.1.1和3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V抗体的重链(SEQ ID NO:2)和轻链(SEQ ID NO:4)恒定区的氨基酸序列是相同的。抗体3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V也称为“3.1.1H3L2”来反映出相对于抗体3.1.1,该抗体包括重链中的三个氨基酸置换和轻链中的两个氨基酸置换。

[0027] 因此,一些实施方案中,可以通过例如CDR或框架区中一至十个,一至五个,或一至三个氨基酸残基的置换、添加或缺失来修饰示例抗体。这些示例抗体和产生它们的方法详细描述于2001年11月9日申请的U.S.临时申请no.60/348,980和2002年11月8日申请的PCT国际申请No.PCT/US02/36107(WO 03/040170)中。然而,本发明不受限于这些或任何其他氨基酸置换。相反,本领域技术人员根据在此所提供的教导将认识到本发明包括多种氨基酸置换。

[0028] 杂交瘤3.1.1、7.1.2、10.8.3、15.1.1和21.4.1根据布达佩斯条约于2001年8月6日保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209。杂交瘤21.2.1、22.1.1、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.29.1和24.2.1于2002年7月16日保藏于ATCC。已经指定杂交瘤为以下保藏编号:

	<u>杂交瘤</u>	<u>保藏 No.</u>
	3.1.1 (LN 15848)	PTA-3600
	7.1.2 (LN 15849)	PTA-3601
	10.8.3 (LN 15850)	PTA-3602
	15.1.1 (LN 15851)	PTA-3603
[0029]	21.4.1 (LN 15853)	PTA-3605
	21.2.1 (LN 15874)	PTA-4549
	22.1.1 (LN 15875)	PTA-4550
	23.5.1 (LN 15855)	PTA-4548
	23.25.1 (LN 15876)	PTA-4551
	23.28.1 (LN 15877)	PTA-4552
	23.29.1 (LN 15878)	PTA-4553
[0030]	24.2.1 (LN 15879)	PTA-4554

[0031] 这些抗体的序列是已知的,并描述于 WO 03/040170 中。为了方便,以下显示了这些抗体中两个的重链和轻链的氨基酸序列:

[0032] 抗体 3.1.1

[0033]

3.1.1: 重链 蛋白序列	可变 (SEQ ID NO: 1): QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISKDGGNKYHADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRVEDTA VYYCVRRGHQLVLGYYYYNGLDVWGQGTTVTVSS 恒定 (SEQ ID NO: 2): ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SPGK
3.1.1: 轻链 蛋白序列	可变 (SEQ ID NO: 3): DIVLTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDVG VYY CMQALQTPRTFGQGTKVEIK 恒定 (SEQ ID NO: 4): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0034]

3.1.1H-A78T -V88A-V97A: 重链 蛋白序列	可变 (SEQ ID NO: 9): QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISKDGGNKYHADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARRGHQLVLGYYYNGLDVWGQGTTVTVSS 恒定 (SEQ ID NO: 2): ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNT KVDKTV ERKCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LQSDGSGFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
3.1.1L-L4M- L83V: 轻链 蛋白序列	可变 (SEQ ID NO: 10): DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQALQTPRTFGQGTKVEIK 恒定 (SEQ ID NO: 4): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0035] 抗体 21.4.1

[0036]

21.4.1: 重链 蛋白序列	可变 (SEQ ID NO: 5): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPGQGLE WMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTA VYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLLVTVSS 恒定 (SEQ ID NO: 6): ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVBRKCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LDDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
21.4.1: 轻链 蛋白序列	可变 (SEQ ID NO: 7): DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNL LIYTASTLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAN IFPLTFGGGTKVEIK 恒定 (SEQ ID NO: 8): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0037] 因此, 21.4.1 抗体的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:5-8 中所示的氨基酸序列, 3.1.1 抗体的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:1-4 中所示的氨基酸序列, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 抗体的氨基酸序列包括 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:4 中所示的氨基酸序列。3.1.1 和 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 之间不同的氨基酸是标有下划线的。

[0038] 基于在此所提供的公开内容, 将理解本发明的 3.1.1 抗体包括在此所示重链和 / 或轻链可变区的任意组合。即, 抗体可以包括可变区的任意组合, 包括, 但不限于, 3.1.1H(SEQ ID NO:1)/3.1.1L(SEQ ID NO:3), 3.1.1H(SEQ ID NO:1)/3.1.1L-L4M-L83V(SEQ ID NO:10), 3.1.1H-A78T-V88A-V97A(SEQ ID NO:9)/3.1.1L(SEQ ID NO:3), 更优选, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A(SEQ ID NO:9)/3.1.1H(SEQ ID NO:10)。然而,

本发明绝不受限于这些或任何其他的特定组合。

[0039] 特定实施方案中,肿瘤治疗抑制癌细胞增殖,抑制或防止肿瘤重量或体积的增加,和/或导致肿瘤重量或体积的降低。一些实施方案中,肿瘤治疗延长了患者的存活。特定实施方案中,与那些未治疗的相比较,肿瘤生长被抑制至少 50%、55%、60%、65%、70%或 75%。一些实施方案中,肿瘤是 CD40 阳性的。一些实施方案中,肿瘤是 CD40 阴性的。肿瘤可以是实体肿瘤或非实体肿瘤如淋巴瘤。一些实施方案中,将抗 CD40 抗体给药于患有癌性肿瘤的患者。

[0040] 可以用抗 CD40 抗体或抗体部分治疗的患者包括,但不限于,已经诊断为患有脑癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈部癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌 (stomach cancer)、胃癌 (gastric cancer)、结直肠癌、结肠癌、妇科肿瘤(例如,子宫肉瘤、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌和外阴癌)、食道癌、小肠癌、内分泌系统的癌症(例如,甲状腺、甲状旁腺和肾上腺的癌症)、软组织肉瘤、白血病、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、儿童期的实体肿瘤、霍奇金病、淋巴细胞性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、膀胱癌、肝癌、肾癌、肾脏或输尿管的癌症(例如,肾细胞癌、肾盂癌),或中枢神经系统肿瘤(例如,原发性 CNS 淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤或垂体腺瘤)、神经胶质瘤或纤维肉瘤的患者。

[0041] 如在此所用的,术语“患者”指的是表达交叉反应 CD40 的人或非人哺乳动物(例如,灵长类、食蟹猴或恒河猴)。优选所治疗的患者是人。

[0042] 如在此所用的,术语“间歇给药方案”意思是包括给药 CD40 激动剂抗体接着静息阶段的给药方案。

[0043] 如在此所用的,术语“静息阶段”意思是在该过程中不给予患者 CD40 激动剂抗体的时间段。例如,如果以每日基础给予抗体,如果中止每日给药例如几天或几周,就存在静息阶段。如果根据不同的时间表给予剂量,当中止给药一定时间时,将产生静息阶段。或者,当抗体浓度维持在低于治疗水平时,可产生静息阶段。

[0044] 一实施方案中,在第二个静息阶段后没有给予抗体,即,当本发明的方法包括两个循环时,第二个间歇循环后不再需要给药药物。

[0045] 优选,在静息阶段的过程中,将抗体的血浆浓度维持于低于治疗水平。

[0046] 各循环之间给药阶段和/或抗体剂量可以是相同的或不同的。

[0047] 基于合理医学判断和所治疗患者的特定因素,各患者的总治疗时间(即,治疗循环数)将不同。通常,给予治疗直至获得满意的反应。本发明的特定实施方案中,治疗期包括 2-20、2-15、2-10、2-7、2-5 个循环或 2-3 个循环。

[0048] 通过任何所需的方式给药抗体,包括,例如,静脉内、皮下、肌内、非肠道、肿瘤内和经皮给药。一实施方案中,静脉内给药 CD40 抗体。另一实施方案中,使用微针装置给药;这样的装置是公知的并包括,例如,WO03/084598 中所述的装置。

[0049] 当联合 DNA 复制抑制剂例如顺铂给药时,可以在抑制剂给药之前、之中或之后给药抗体。

[0050] 一方面中,本发明涉及用于静脉内注射的水溶液,具有约 5.0 至 6.0 的 pH,优选约 5.5 的 pH。可以用醋酸钠(三水合物)、醋酸(冰醋酸)、聚山梨酸酯 80、氯化钠和水来配制这样的溶液。优选将抗体溶液保存于 2°C 至 8°C 的冷藏温度,而不是冷冻的。

[0051] 根据本发明,还提供了治疗需要这样治疗的患者的肿瘤的方法,包括将治疗有效量的 CD40 激动剂抗体和治疗有效量的 DNA 复制抑制剂例如铂衍生物的组合给药于所述患者。特定实施方案中,CD40 激动剂抗体与铂衍生的化合物尤其是顺铂联合协同起效,使得该组合的抗肿瘤效果高于单独给药每种化合物所预测的效果。

[0052] 铂衍生物是公知的通过干扰 DNA 复制而呈现其抗肿瘤活性的化合物组。特定实施方案中,铂衍生物选自顺铂(顺-二胺二氯铂,参见 Merck Index)、卡铂和奥克赛铂。

[0053] 通过参考以下实施例来更全面地理解本发明。然而,这些实施例不应理解为对本发明范围的限制。所有引用文献引入作为参考。

实施例

[0054] 实施例 1:抗体对来自癌症患者的淋巴结细胞的效果

[0055] 研究了人抗 CD40 抗体 (21.4.1) 对用自体肿瘤细胞刺激的从癌症患者获得的淋巴结细胞的效果。

[0056] 从肾细胞癌、非小细胞肺癌、膀胱移行细胞癌、结肠癌、前列腺癌以及头颈部癌患者收集淋巴结细胞和肿瘤。在 21.4.1 (1 μ g/mL; 6.7nM) 存在或不存在下,将淋巴结细胞与照射过的经胶原酶处理的肿瘤(从相同患者收集的)一起置于培养中。96 小时后使用 ^3H -胸苷测定增殖。再刺激后,通过 ELISPOT 测定 $\text{INF } \gamma$ 产生细胞的数量。

[0057] 抗体提高了用肿瘤抗原刺激的淋巴结细胞培养物中 $\text{INF } \gamma$ + 阳性 T 细胞的数量。此外,这些淋巴结细胞响应肿瘤抗原的增殖提高了 3-4 倍。

[0058] 当用肿瘤抗原刺激时,抗体提高了从癌症患者获得的淋巴结细胞的增殖和细胞因子产生能力。

[0059] 实施例 2:抗体与 Fc 受体的结合

[0060] 研究了抗 CD40 抗体 (21.4.1) 与人和食蟹猴白细胞上 Fc 受体的结合。

[0061] 流式细胞仪研究表明 $\text{Fc } \gamma \text{ RII (CD32)}$ 和 $\text{Fc } \gamma \text{ RIII (CD16)}$ 型 FcR, 以及非常低水平的 $\text{Fc } \gamma \text{ RI (CD64)}$ 在人白细胞上表达。使用 ^{125}I -21.4.1 和人 IgG1 对照 mAb 测定 21.4.1 与人或食蟹猴外周血白细胞上的 Fc 受体 (FcR) 的结合。使用血浆凝胶从全血分离正常供体的人白细胞或食蟹猴的白细胞并彻底洗涤来使受体结合的血清免疫球蛋白解离。通过蔗糖垫层的离心用来分离细胞结合的和游离的抗体。在 4°C 在叠氮钠存在下进行研究以防止受体内化。

[0062] 测试 21.4.1 与 FcR 的特异性结合,使用过量未标记的人 IgG2 同种型匹配抗体作为竞争者。 ^{125}I -21.4.1 与人白细胞上 FcR 的特异性结合为 $-1.0 \pm 8.5\%$ ($n = 5$ 名供体), 与食蟹猴白细胞上 FcR 的特异性结合为 $15 \pm 13\%$ ($n = 4$)。500 倍过量的将阻断 ^{125}I -21.4.1 与白细胞 CD40 受体以及 FcR 任何特异性结合的未标记 21.4.1 的加入,显示出 ^{125}I -21.4.1 分别与人和食蟹猴白细胞上 CD40 受体 49% 和 67% 特异性结合(通过从总 % 特异性结合减去与 FcR 的 % 结合来计算与 CD40 的 % 特异性结合)。作为对照, ^{125}I -IgG1 一致地表现出与人和食蟹猴白细胞的特异性结合。IgG1 对照抗体与人和食蟹猴白细胞上 FcR 的特异性结合各自占总结合放射性的 56% 和 51%。

[0063] 这些研究表明了该抗体显示出与人和食蟹猴白细胞上 Fc 受体的最小特异性结合。

[0064] 实施例 3 :全血细胞因子释放测试

[0065] 测试抗 CD40 抗体 (21. 4. 1) 诱导细胞因子从未刺激的人全血释放的能力,使用与诱导人抗体介导的细胞因子释放相关的体外全血测试。测试 1、10 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 21. 4. 1, 与作为阳性对照的通过 Fc 介导途径诱导细胞因子释放的鼠抗人 CD3 IgG1 和作为第二阳性对照的通过刺激巨噬细胞诱导细胞因子的 LPS 一起。所用的供体包括响应鼠抗体和 LPS 两者的个体 (4 名供体), 以及只响应 LPS 的个体 (3 名供体)。用 21. 4. 1 培养肝素化的全血 5 小时并收集血浆和通过 ELISA (使用可购得的试剂盒) 来分析肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (INF- γ) 和白介素 -6 (IL-6)。还将培养物孵育 48 小时并分析白介素 -1 β (IL-1 β)。

[0066] 用 1 或 10 $\mu\text{g/mL}$ 21. 4. 1 培养的人血血浆中没有检测到细胞因子。只有一名用 100 $\mu\text{g/mL}$ 抗体处理的供体显示出低但是可测量水平的两种细胞因子 (34pg/mL 的 TNF- α 和 90pg/mL IL-6)。随后再次测试该供体,其显示没有可检测的 TNF- α 或 IL-6 的诱导。任何样品中都没有 INF γ 或 IL-1 β 的升高。

[0067] 这些研究表明,21. 4. 1 在人全血中不诱导炎性细胞因子。

[0068] 实施例 4 :抗体的药效学和药物动力学

[0069] 以不同的剂量 (1mg/kg, $n = 4$, 3mg/kg, $n = 4$, 5mg/kg, $n = 2$ 和 10mg/kg, $n = 2$) 将 CD40 抗体 (21. 4. 1) 静脉内给药于食蟹猴。在给药前和给药后的不同时间点从猴子采取肝素化的血液。将血液等分并染色。使用 Becton Dickinson FACSCalibur 获得数据并用 CellQuest 软件分析。将结果计算为与给药前的值相比较中值荧光强度的倍数增加。

[0070] 对于所有测试剂量,到给药后 24 小时,反映 B- 细胞激活状态和抗原呈递能力的 MHC II 类表达增加了 2.5 至 3 倍,没有观察到明显的剂量 - 响应相关性。CD23 表达, B- 细胞激活的另一标记,以 3mg/kg 在 2 个动物中评价,以 10mg/kg 在一个动物中评价。给药后 24 小时 CD23 表达提高了 ≥ 20 倍,没有观察到剂量效应。两种表面标记的上调持续 (≥ 2 倍提高) 而 21. 4. 1 水平保持高于 1 $\mu\text{g/mL}$ 。CD71 (转铁蛋白受体) 和 CD86 共刺激分子水平也显示出适度的上调,而 CD80 表达没有显著改变。

[0071] 21. 4. 1 上调了体内食蟹猴 B- 细胞中的表面标记。随着治疗 CD20+ 细胞上 MHC II 类和 CD23 的表达提高, 1mg/kg (对应于 $C_{\max} \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 和暴露 $\geq 0.1 \mu\text{g/mL} \times 4$ 天) 似乎在食蟹猴 B- 细胞中产生了饱和药效响应。在更高剂量该响应的持续时间更长。

[0072] 在静脉内 (IV) 给药单剂量 1、3、5 或 10mg/kg 后,研究食蟹猴中抗 CD40 抗体 (21. 4. 1) 的药物动力学特征。21. 4. 1 的特征在于低的全身清除 (0.0133 至 0.0635 mL/min/kg) 和稳定状态的小分布体积 (0.0459 至 0.0757 L/kg), 导致 0.75 至 2.0 天的表观平均消除半衰期 (表 1)。21. 4. 1 的药物动力学似乎在研究的剂量范围内是剂量依赖性的。清除值通常随着 1 至 10mg/kg 的剂量提高而降低,表观平均消除半衰期提高,从 1mg/kg 时的 0.75 天提高至 10mg/kg 时的 2.0 天。不同剂量的稳定状态分布体积相似 (平均 0.0575 L/kg)。

[0073] 观察到的剂量依赖性清除部分是由于 21. 4. 1 与正常组织中广泛表达的 CD40 受体的结合和随后的内化以及抗体 - 受体复合物的消除。灵长类抗人抗体 (PAHA) 响应的发生也可有助于一些猴子中的加速清除。由于测试血清中 21. 4. 1 的存在干扰对 PAHA 的测试,只在 21. 4. 1 的个体血清浓度达到定量的下限 (LLOQ, 0.03 $\mu\text{g/mL}$) 后才评价 PAHA。给药抗体后 14 至 28 天检测 3、5 和 10mg/kg 剂量组中所有猴子的抗 21. 4. 1 抗体。

[0074] 表 1

[0075] 单次 IV 给药 1、3、5 和 10mg/kg 后

[0076] 食蟹猴中 21.4.1 的平均药物动力学参数 ($\pm$ SD)

[0077]

剂量 (mg/kg)	N/ 性别	CL (mL/min/kg)	Vdss (L/kg)	$t_{1/2}$ (天)	AUC _(0-∞) (μ g·h/mL)
1	2/性别	0.0635 $\pm$ 0.0245	0.0757 $\pm$ 0.0265	0.75 $\pm$ 0.21	298 $\pm$ 126
3	2/性别	0.0213 $\pm$ 0.0055	0.0459 $\pm$ 0.0055	1.4 $\pm$ 0.3	2460 $\pm$ 600
5	2F	0.0174	0.0488	1.4	4790
10	1/性别	0.0133	0.0529	2.0	12500

[0078] 实施例 5 : 抗体的抗肿瘤活性

[0079] 在 SC 注射单独肿瘤细胞 (1×10^7) 或注射相同供体的人 DC (1×10^5) 和 T 细胞 (5×10^5) 的 SCID- 米色小鼠中测定 CD40 抗体 (21.4.1) 的肿瘤生长抑制活性。肿瘤细胞对 DC 和 T 细胞的比例为 100 : 1 : 5。除非另外指出, 以一个固定时间点的肿瘤大小 mm^2 来呈现结果, 该时间点预先测定为 (从动力学实验) 是对照动物中肿瘤生长达到 300-400 mm^2 大小并且再继续实验是不人道的时候。所有情况中, 只给予一次注射 21.4.1, 其在 SCID- 米色小鼠中的 $T_{1/2} > 30$ 天。

[0080] 实施例 5(a) : 抗体对 CD40(-) 人肿瘤的效果

[0081] 研究了 CD40 抗体 (21.4.1) 对 CD40(-) 肿瘤 (例如, 红白血病和结肠癌) 生长的效果。特别地, 选择 K562 肿瘤来测定 21.4.1 对抗 CD40(-) 低免疫原性 (I 类和 II 类阴性) 肿瘤的效果。

[0082] 对 SCID- 米色小鼠 SC 注射 CD40(-) 红白血病肿瘤 K562 (ATCC CCL-243), 单独或在人外周血 T 细胞和 DC 存在下。使用不同剂量水平在肿瘤注射时或 5 天后动物接受单次 IP 注射 21.4.1。

[0083] 当免疫细胞存在时, 单次 IP 注射 21.4.1 导致 K562 肿瘤生长的剂量依赖性抑制, 如在肿瘤攻击后 21 天所说明的 (图 1)。导致肿瘤生长 50% 抑制的 21.4.1 量为 0.005mg/kg, 对应于 $C_{\max}$ 血清浓度 0.05 μ g/mL。用 CD40(-) 结肠癌 Lovo (ATCC CCL-229) 观察到相似的结果。当相对于肿瘤攻击第 0 天或第 +5 天给药 21.4.1 时, 结果相同。在免疫细胞不存在下, 这些 CD40(-) 肿瘤的生长没有受到 21.4.1 抑制。

[0084] 当免疫细胞存在时, 21.4.1 防止了 CD40(-) 肿瘤的生长, 表明免疫介导的抗肿瘤活性的提高。这是对结肠癌和红白血病肿瘤表现出的。对于结肠癌使用抗体 3.1.1 和红白血病肿瘤中使用 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 抗体 ($IC_{50} < 0.01\text{mg/kg}$) 也证明了这种抗肿瘤活性。因此, 在此公开的数据证明了 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 抗体具有 3.1.1 抗体的体内活性。这些体内肿瘤结果进一步支持, 鉴于两种抗体比较时获得的相似体外数据, 抗体 3.1.1 和抗体 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 将在体内以相似的方式表现。因此, 在这个和其他测试中使用 3.1.1 获得的结果适用于 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V。

[0085] 实施例 5(b) : 抗体对人乳房和前列腺肿瘤生长的效果

[0086] 研究了抗 CD40 抗体 (21.4.1) 对防止乳房和前列腺肿瘤生长的效果。

[0087] 用人乳房肿瘤 BT474(ATCC HTB-20)(SC) 与人外周血 T 细胞和 DC 一起攻击 SCID- 米色小鼠。在肿瘤注射时动物接受单次剂量的 21.4.1(IP)。

[0088] 如图 2 中所示的,在免疫细胞存在下 21.4.1 的单次注射防止了 BT474 细胞的生长。导致肿瘤生长降低 50%需要的 21.4.1 量为 0.005mg/kg,对应于 0.05 μ g/mL 的 $C_{\max}$ 血清浓度。对人前列腺癌细胞系 PC-3(ATCC CRL-1435) 观察到相似的结果。使用抗体 3.1.1 也证明了这一点,并对 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 也可预期。

[0089] 21.4.1 防止了人乳房和前列腺肿瘤的生长。

[0090] 实施例 5(c):抗体对 CD40(+) 肿瘤的抗肿瘤效果

[0091] 研究了免疫细胞存在和不存在下,抗 CD40 抗体 (21.4.1) 对对抗 CD40(+) 肿瘤的抗肿瘤活性的效果和功效的改变。

[0092] 对 SCID- 米色小鼠皮下注射 CD40(+)Raji B 细胞淋巴瘤 (ATCC CCL-86)(SC),接着在肿瘤注射时给予单次剂量 21.4.1(IP)。一些动物还注射了人 T 细胞和 DC。在第 21 天测定肿瘤生长。

[0093] 如图 3 中所示的,在免疫细胞不存在下,导致肿瘤生长 50%抑制的 21.4.1 量为 0.02mg/kg,对应于 0.2 μ g/mL 的 $C_{\max}$ 血清浓度。当肿瘤细胞与免疫细胞共注射时,导致肿瘤生长 50%抑制的 21.4.1 量降低 20 倍至 0.001mg/kg($C_{\max}$ 血清浓度 = 0.01 μ g/mL)。

[0094] 这些结果说明了 21.4.1 具有对抗 CD40(+) 肿瘤的直接抗肿瘤活性。对于 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V($IC_{50} < 0.01$ mg/kg) 也得到了这种观察。当免疫细胞存在时,对于抗体 21.4.1,提高了这种抗肿瘤活性,用抗体 3.1.1 也证明了这一点,并对抗体 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 也可预期。

[0095] 实施例 5(d):抗体对 B- 细胞淋巴瘤的抗肿瘤效果

[0096] 测定了根据本发明抗 CD40 抗体 (21.4.1) 延迟使用 B 细胞淋巴瘤的 CD40(+) 全身肿瘤模型中的死亡率的能力。

[0097] 对 SCID- 米色小鼠 IV 注射 B 细胞淋巴瘤 Daudi(ATCC CCL-213)。在肿瘤注射时以单次注射 (IP) 给药 21.4.1。监测死亡率 58 天。

[0098] 如图 4 中所示的,21.4.1 的单次注射防止了全身给予肿瘤细胞系诱导的死亡率。

[0099] 21.4.1 延迟了使用 B 细胞淋巴瘤的 CD40(+) 全身肿瘤模型中的死亡率。使用 3.1.1 也证明了这一点,并对 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V 可预期相似的结果。

[0100] 实施例 6:抗体联合顺铂的治疗效果

[0101] 研究了抗 CD40 抗体 (21.4.1) 单独和在顺铂存在下防止人乳房肿瘤生长的治疗效果。

[0102] 对 SCID- 米色小鼠 SC 注射乳房肿瘤 BT474。一旦肿瘤达到 200mm² 的大小,以单次注射给药抗体 (1mg/kg, IP) 和 / 或顺铂 (2.5mg/kg, IP)。攻击后第 84 天测量肿瘤生长。

[0103] 如图 4 中所示的,21.4.1 或顺铂的单次注射防止了肿瘤生长。然而,两种治疗的组合导致 7/8 动物中完全的肿瘤消退。

[0104] 一旦肿瘤建立,当单独给药时,21.4.1 防止了肿瘤生长,当联合顺铂给药时,导致肿瘤消退。使用抗体 3.1.1 也证明了这一点,如同对于 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L

4M-L83V 也同样。

[0105] 实施例 7 :抗体的多剂量药物动力学

[0106] 多剂量研究中,在 1、3、5、7 和 9 天以 0.3、1.0 和 10mg/kg 的剂量对食蟹猴静脉内给药 21.4.1 (2/ 性别 / 剂量),总共 5 个剂量。在第 1 和 9 天给药前和给药后 0.5、6 和 24 小时以及第 5 天给药前和给药后 0.5 小时采集血液来测量血清药物浓度。对 21.4.1 的全身暴露,如通过平均 C_{max} 和平均 $AUC_{(0-24)}$ 测量的,在第 1 天和第 9 天随着从 0.3 至 10mg/kg 剂量提高而提高 (表 2)。在 0.3 和 1mg/kg 剂量组在第 1 天和第 9 天观察到相似的暴露 (平均 C_{max} 和平均 AUC)。在 10mg/kg 剂量组中,平均 C_{max} 和平均 $AUC_{(0-24)}$ 值从第 1 天至第 9 天分别提高 2.6- 和 2.8- 倍。没有观察到性别相关的暴露差异。

[0107] 表 2

[0108] 隔天 IV 给药后第 1 天和第 9 天

[0109] 食蟹猴中 21.4.1 的平均药物动力学参数 ($\pm$ SD)

[0110]

剂量 ^a (mg/kg)	天数	C_{max} (μ g/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{(0-24)}$ (μ g·h/mL)
0.3	1	4.67 $\pm$ 1.71	1.9 $\pm$ 2.8	47.7 $\pm$ 15.4
	9	7.4 $\pm$ 2.9	0.5 $\pm$ 0.0	55.6 $\pm$ 47.1
1.0	1	26.7 $\pm$ 5.1	0.5 $\pm$ 0.0	387 $\pm$ 59
	9	12.3 $\pm$ 9.1	1.9 $\pm$ 2.8	219 $\pm$ 151
10	1	226 $\pm$ 29	1.9 $\pm$ 2.8	4130 $\pm$ 600
	9	577 $\pm$ 163	3.3 $\pm$ 3.2	11400 $\pm$ 2100

[0111] ^aN = 2/ 性别 / 剂量

[0112] 实施例 8 :抗体制剂

[0113] 使用含有 30kDa 分子量截留盒的超滤装置将 CD40 抗体浓缩至约 11.0mg/mL $\pm$ 0.8mg/mL。然后将浓缩物渗滤于 20mM 醋酸钠 /140mM 氯化钠, pH5.5 的缓冲液中。将 2% 聚山梨酸酯 80 溶液加入浓缩的渗滤产物中来获得 0.02% 聚山梨酸酯 80 的终浓度。

[0001]

序列表

<110> Pfizer Product Inc.

<120> CD40 抗体制剂和方法

<130> PC32065A

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> 3.1.1: 人

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Lys Asp Gly Gly Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Arg Gly His Gln Leu Val Leu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly
100 105 110

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> 3.1.1: 人

<400> 2

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

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

[0002]

```

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
   65                               70                               75                               80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
           100                               105                               110

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

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
           180                               185                               190

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

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

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

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

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

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

```

[0003]

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> 3.1.1: 人

<400> 3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> 3.1.1: 人

<400> 4

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

[0004]

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 5
<211> 126
<212> PRT
<213> 21.4.1: 人

<400> 5

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6
<211> 326
<212> PRT
<213> 21.4.1: 人

[0005]

<400> 6

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

[0006]

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 21.4.1: 人

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 21.4.1: 人

<400> 8

[0007]

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> 人 : 3.1.1H-A78T-V88A-V97A

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Lys Asp Gly Gly Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly His Gln Leu Val Leu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly
100 105 110

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0008]

```

115              120              125

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> 人      : 3.1.1L-L4M-L83V
<400> 10

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20              25              30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85              90              95

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

```

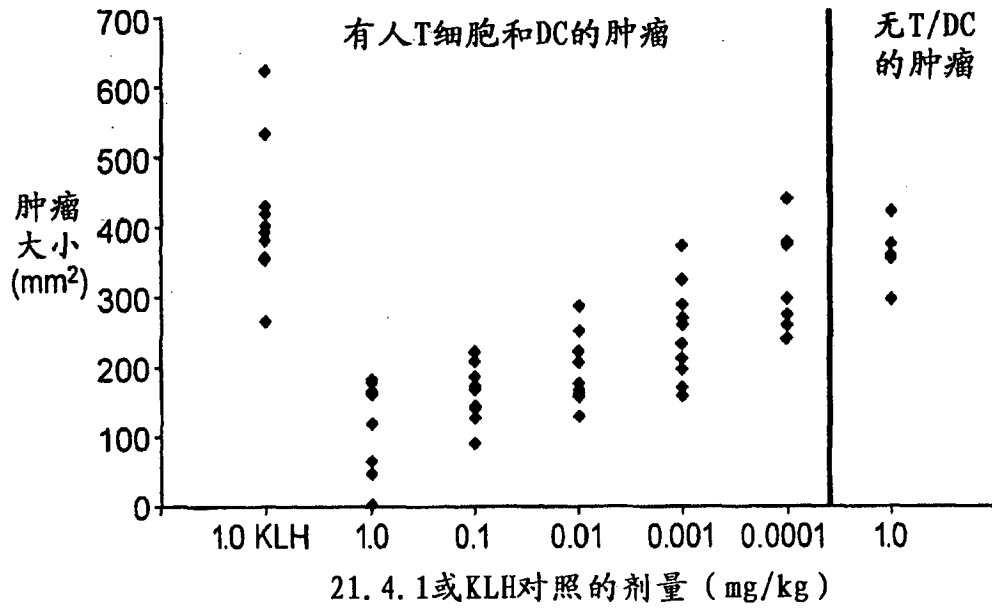


图 1

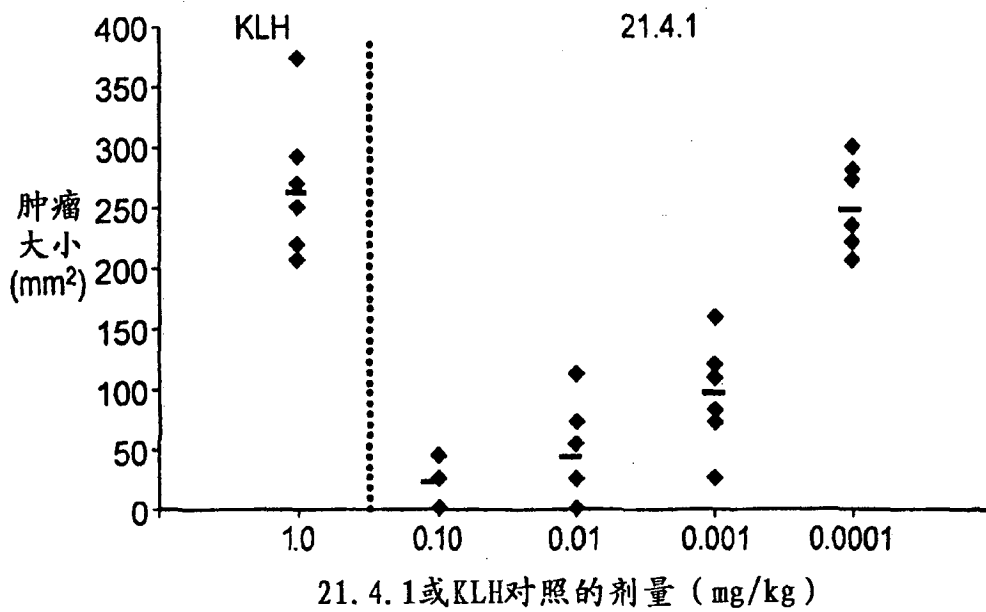


图 2

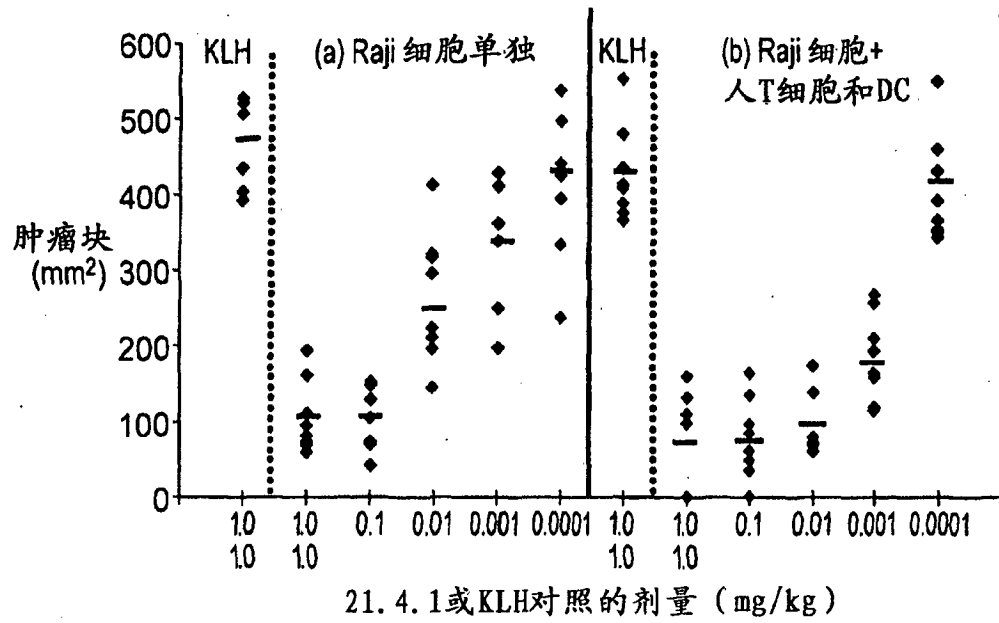


图 3

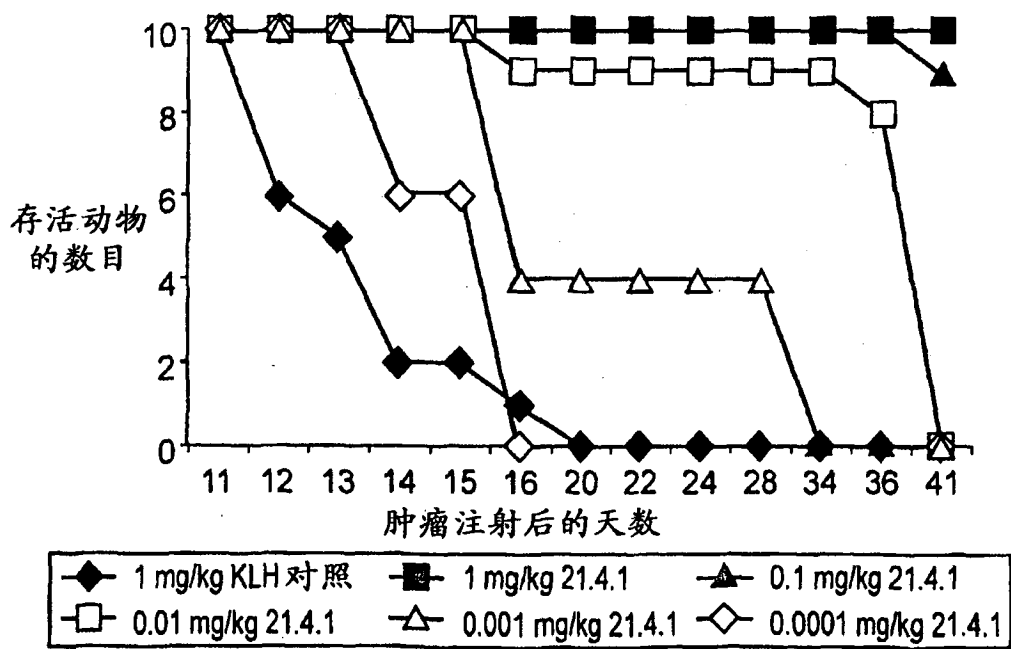


图 4

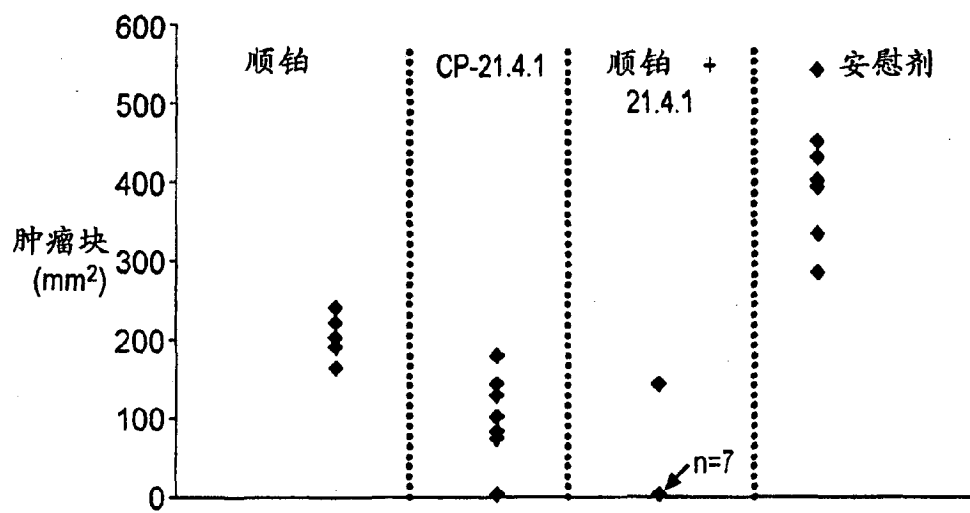


图 5