



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112245586 A

(43) 申请公布日 2021.01.22

(21) 申请号 202010960541.4

(22) 申请日 2014.02.26

(30) 优先权数据

61/800,102 2013.03.15 US

(62) 分案原申请数据

201480015159.9 2014.02.26

(71) 申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 斯蒂芬·威林汉 莫林·霍华德

杰·刘 莱文德拉·吗杰提

苏珊·斯威尼·普劳哈斯卡

安妮·K·沃奥科迈

詹斯·彼得·沃奥科迈

欧文·L·唔斯曼

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务
所(普通合伙) 11363

代理人 郭放 许伟群

(51) Int.Cl.

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书49页

序列表3页 附图14页

(54) 发明名称

用于实现治疗有效剂量的抗CD47剂的方法

(57) 摘要

本文提供用于通过在向受试者施用治疗有效剂量的抗CD47剂之前施用引物剂来用治疗剂量的抗CD47剂治疗所述受试者的方法。细胞的更新开始于诱导标记它们以用于除去的细胞凋亡程序或其它细胞变化,以及通过吞噬细胞(包括巨噬细胞、树突细胞等)随后识别标志物。此过程要求不想要的细胞的特异性和选择性除去。

1. 引物剂和治疗剂在制备用于治疗受试者癌症的药物中的用途，
其中所述引物剂包含亚治疗剂量的抗CD47剂，并且所述治疗剂包含治疗有效剂量的抗CD47剂；
其中所述抗CD47剂降低CD47与SIRP α 的结合，以及
其中向所述受试者施用所述引物剂对所述受试者进行引发以接受所述治疗剂的施用，显著降低由于红细胞的损失而引起的毒性。
2. 根据权利要求1所述的用途，其中所述药物还包括用于实践施用所述引物剂和所述治疗剂的说明书，并且其中在施用所述引物剂后3天至21天的范围内进行所述治疗剂的施用。
3. 根据权利要求2所述的用途，其中在施用所述引物剂后6天至8天的范围内进行所述治疗剂的施用。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途，其中所述抗CD47剂选自：抗CD47抗体，与免疫球蛋白Fc区融合的可溶性SIRP α ，以及与免疫球蛋白Fc区融合的高亲和力SIRP α 。
5. 根据权利要求4所述的用途，其中所述抗CD47剂是抗CD47抗体。
6. 根据权利要求5所述的用途，其中所述抗CD47抗体是Hu5F9-G4。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途，其中所述治疗剂的施用包括以递增浓度的两种或更多种剂量施用所述抗CD47剂，直到施用治疗有效剂量为止。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的用途，其中所述治疗剂的施用包括施用两个或更多个治疗有效剂量。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的用途，其中所述受试者是人。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途，其中所述治疗剂还包含另外的抗癌剂。
11. 一种用于治疗受试者中癌症的方法中的组合物，所述组合物包含引物剂和治疗剂，
其中所述引物剂包含亚治疗剂量的抗CD47剂，并且所述治疗剂包含治疗有效剂量的抗CD47剂；
其中所述抗CD47剂降低CD47与SIRP α 的结合，以及
其中向所述受试者施用所述引物剂对所述受试者进行引发以接受所述治疗剂的施用，显著降低由于红细胞的损失而引起的毒性。
12. 根据权利要求11所述的组合物，其还包含用于实践所述引物剂和所述治疗剂的施用的说明书，并且其中在施用所述引物剂后3天至21天的范围内进行所述治疗剂的施用。
13. 根据权利要求12所述的组合物，其中在施用所述引物剂后6天至8天的范围内进行所述治疗剂的施用。
14. 根据权利要求11-13中任一项所述的组合物，其中所述抗CD47剂选自：抗CD47抗体，与免疫球蛋白Fc区融合的可溶性SIRP α ，以及与免疫球蛋白Fc区融合的高亲和力SIRP α 。
15. 根据权利要求14所述的组合物，其中所述抗CD47剂是抗CD47抗体。
16. 根据权利要求15所述的组合物，其中所述抗CD47抗体是Hu5F9-G4。
17. 根据权利要求11-16中任一项所述的组合物，其中所述治疗剂的施用包括以递增浓度的两种或更多种剂量施用所述抗CD47剂，直到施用治疗有效剂量为止。
18. 根据权利要求11-17中任一项所述的组合物，其中所述治疗剂的施用包括施用两个或更多个治疗有效剂量。

19. 根据权利要求11-18中任一项所述的组合物,其中所述受试者是人。
20. 根据权利要求11-19中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂还包含另外的抗癌剂。

用于实现治疗有效剂量的抗CD47剂的方法

[0001] 本申请为2015年9月14日提交的名称为“用于实现治疗有效剂量的抗CD47剂的方法”的中国专利申请号201480015159.9的分案申请。

背景技术

[0002] 细胞的更新开始于诱导标记它们以用于除去的细胞凋亡程序或其它细胞变化,以及通过吞噬细胞(包括巨噬细胞、树突细胞等)随后识别标志物。此过程要求不想要的细胞的特异性和选择性除去。与健康细胞不同,不想要的/老化的/垂死细胞展示被称为“吃我(eat-me)”信号即“改变自身”的标志物或配体,其进而可由吞噬细胞上的受体识别。健康细胞可展示积极抑制吞噬作用的“别吃我”信号;这些信号在垂死细胞中下调、存在于改变的构象中或它们优先于“吃我”或促吞噬信号的上调。健康细胞上的细胞表面蛋白CD47以及其吞噬细胞受体SIRP α 的接合构成可关闭由多种形式(包括凋亡细胞清除和FcR介导的吞噬作用)介导的吞入的关键“别吃我”信号。阻断CD47介导的吞噬细胞上的SIRP α 的接合或在敲除小鼠中的CD47表达的损失可引起活细胞和非老化红细胞的除去。对于其中还存在预吞噬信号的那些细胞来说,阻断SIRP α 还允许通常不被吞噬的靶标的吞入。

[0003] CD47是广泛表达的具有单个Ig样结构域和五个跨膜区的跨膜糖蛋白,其充当SIRP α 的细胞配体,其中结合通过SIRP α 的NH2末端V样结构域介导。SIRP α 主要在骨髓细胞上表达,包括巨噬细胞、粒细胞、骨髓树突细胞(DC)、肥大细胞以及它们的前体,包括造血干细胞。SIRP α 上介导CD47结合的结构决定簇由Lee等(2007) J. Immunol. 179:7741-7750; Hatherley等(2007) J.B.C.282:14567-75讨论;并且SIRP α 顺式二聚在CD47结合中的作用由Lee等(2010) J.B.C.285:37953-63讨论。与CD47抑制正常细胞的吞噬作用的作用一致,有证据表明它在临迁移期之前和在迁移期期间在造血干细胞(HSC)和祖细胞上瞬时上调,并且这些细胞上的CD47的水平决定它们在体内被吞入的可能性。

[0004] 编程性细胞死亡(PCD)和吞噬细胞除去是生物体响应以便除去受损的、癌前或感染的细胞的常见方式。因此,在此生物体响应情况下存活的细胞(例如,癌性细胞、长期感染的细胞等)已经设计了用于逃避PCD和吞噬细胞除去的方式。CD47(“别吃我”信号)在各种各样的患病细胞、癌细胞以及受感染细胞上组成型上调,从而允许这些细胞逃避吞噬作用。阻断一种细胞(例如,癌细胞、感染的细胞等)上的CD47与另一种细胞(例如,吞噬细胞)上的SIRP α 之间的相互作用的抗CD47剂抵消CD47表达的增加并且促进癌细胞和/或受感染细胞的吞噬作用。因此,抗CD47剂可用于治疗和/或保护免受各种各样的病状/病症。

[0005] 然而,初始高剂量的抗CD47剂可引起小鼠和非人灵长类动物(NHP)模型中的红细胞(RBC)的剂量依赖性损失。这种贫血的严重性可排除实现与治疗功效相关的持续血清浓度所要求的更高剂量的使用。本发明提供减轻抗CD47剂的红细胞毒性、从而能够用治疗有效量的抗CD47剂治疗的方法。

发明内容

[0006] 提供用于通过在向个体施用治疗有效剂量的抗CD47剂之前施用引物剂来用治疗

剂量的抗CD47剂治疗所述个体的方法。在一些实施方案中,本发明的方法适用于优化针对调节CD47介导的吞噬作用的疗法。在一些此类实施方案中,正在针对癌症用一定剂量的抗CD47剂治疗个体。在其它实施方案中,正在针对细胞内病原体感染用一定剂量的抗CD47剂治疗个体。在主题方法中,在施用引物剂之后约3天至约21天施用治疗有效剂量的抗CD47剂。

[0007] 在本发明的一些实施方案中,施用两种或更多种引物剂。适合的引物剂包括红细胞生成刺激剂(ESA)和/或引发剂量的抗CD47剂。

[0008] 用于在本发明的方法中使用的抗CD47剂干扰存在于靶细胞(包括但不限于癌细胞、感染细胞内病原体的细胞、干细胞等)上的CD47与存在于吞噬细胞上的SIRP α 之间的结合。通常这两种细胞均存在于所治疗的个体中。在促吞噬信号的存在下此类方法可增加靶细胞的吞噬作用。主题方法可用于针对对CD47介导的SIRP α 信号传导的阻断敏感的任何疾病治疗受试者。适合的抗CD47剂包括可溶性SIRP α 多肽;可溶性CD47;抗CD47抗体、抗SIRP α 抗体等,其中术语抗体涵盖抗体片段及其变体,如本领域中所已知。

[0009] 治疗剂量的如上所述的抗CD47剂可导致红细胞(RBC)的损失和贫血。本发明的方法解决这一问题,并且出人意料地显示如本文所用的引物剂显著降低由于红细胞的损失所致的毒性。不受理论束缚,据信引物剂增加网织红细胞(不成熟的RBC)的产生,其可更耐CD47介导的吞噬作用并且因此在抗CD47剂的随后施用期间较不易于损失。

[0010] 本发明的某些实施方案任选地包括确定个体对施用引物剂的反应性的步骤。例如,网织红细胞计数或血红蛋白的减少可用于确定施用引物剂是否增加网织红细胞的产生。可在引物剂施用之前和之后进行网织红细胞计数,从而允许在有效于网织红细胞的增加的计数之间的一段时间。任选地,可使用用于确定增加的红细胞生成的任何适合的方法。

[0011] 在施用引物剂并且允许有效于网织红细胞产生的增加的一段时间之后,施用治疗剂量的抗CD47剂。治疗剂量可以多种不同方式施用。在一些实施方案中,在施用引物剂之后施用两个或更多个治疗有效剂量。在一些实施方案中,治疗有效剂量的抗CD47剂作为递增浓度的两个或更多个剂量施用,在其它实施方案中剂量是等效的。

附图说明

[0012] 图1A-B呈现在单次250 μ g腹膜内注射(IP injection)MIAP410(IgG1同种型)或MIAP470(IgG2a同种型)施用至野生型小鼠之后血细胞比容(HCT)的变化百分比和血红蛋白的变化百分比。

[0013] 图2呈现在单次250 μ g腹膜内注射MIAP410(IgG1同种型)或MIAP470(IgG2a同种型)施用至CD47 $^{-/-}$ 小鼠之后血红蛋白的变化百分比。

[0014] 图3A-B呈现在腹膜内注射250 μ g的对照小鼠IgG、MIAP410或MIAP740每3天施用至野生型小鼠之后血细胞比容(HCT)的变化百分比和血红蛋白的变化百分比。

[0015] 图4描绘在Ig-样细胞外结构域中人与猕猴CD47之间的序列比对。人CD47ECD(SEQ ID NO:4);食蟹猴(猕猴)CD47ECD(SEQ ID NO:5)。

[0016] 图5证明Hu5F9-G4识别人和食蟹猴CD47,但不识别小鼠CD47。通过涂覆抗小鼠Fc特异性抗体,接着添加人、小鼠和食蟹猴CD47-mFc融合蛋白来进行ELISA。不相关的小鼠Fc(mFc)融合蛋白用作阴性对照。然后添加Hu5F9-G4。使用HRP缀合的抗人 κ 抗体检测结合的抗

体。

[0017] 图6呈现针对Hu5F9-G4结合测量的结合常数的总结。使用GLM传感器芯片在BioRad ProteOn XPR36系统上进行SPR结合研究。在25℃下收集结合数据。使用1:1相互作用模型对反应数据全局拟合。括号中的数字表示最后一次报道的数字的标准误差。(A) 结合至人CD47。(B) 结合至食蟹猴CD47。

[0018] 图7呈现来自非人灵长类动物Hu5F9-G4毒理动力学研究的数据。通过所指示水平下的单剂量对食蟹猴NHP施用Hu5F9-G4。(A) 贫血以剂量依赖性方式发展,但自发消退。阴影条表示指示人中对于输血的需要的血红蛋白的范围。(B) 通过测量血清水平的药代动力学(PK)分析指示短的半衰期,其中治疗水平通过10和30mg/kg而不是其它剂量实现。

[0019] 图8呈现来自非人灵长类动物Hu5F9-G4剂量递增毒理动力学研究的数据。在剂量递增研究中所指示的剂量和时间点对未接受预处理或接受用单剂量的EP0预处理的食蟹猴NHP施用Hu5F9-G4。(A) 连续地测量血红蛋白以监测贫血。(B) 通过ELISA针对Hu5F9-G4的水平筛选血清以确定药代动力学(PK)。在图(A)中,阴影条指示在人群中倾向于触发输血的血红蛋白的范围。在图(B)中,阴影条指示与异种移植研究中的有效功效相关的血清Hu5F9-G4的范围。

[0020] 图9呈现来自非人灵长类动物Hu5F9-G4负载-维持剂量毒理动力学研究的数据。食蟹猴NHP在第1天接受1mg/kg或3mg/kg的负载剂量(LD)(即,引发剂量),并且然后在所指示的时间点接受10或30mg/kg的维持剂量(MD)。2种NHP(实线和虚线)用于每个实验组中。(A) 连续地测量血红蛋白以监测贫血。(B) 通过ELISA针对Hu5F9-G4的水平筛选血清以确定药代动力学。在图(A)中,阴影条指示在人群中可能触发输血的血红蛋白的范围。在图(B)中,阴影条指示与异种移植研究中针对原发性人AML的有效功效相关的血清Hu5F9-G4的范围(即,治疗有效的血清水平的范围)。

[0021] 图10呈现证明与不同剂量的抗CD47剂(在此情况下hu5F9-G4抗体)相关的网状细胞增多症的水平的网织红细胞计数数据。

[0022] 图11证明Hu5F9-G4抑制肿瘤生长和转移。A) Hu5F9-G4在异种移植测定中完全消除膀胱癌。B) Hu5F9-G4体内预防人前列腺癌转移。

[0023] 图12证明Hu5F9-G4消除已形成的转移。A-B) Hu5F9-G4消除肺(A)和脑(B)中的转移性乳癌细胞。C) Hu5F9-G4抑制切除的乳腺肿瘤的再生长。D) hu5F9-G4的血清浓度与治疗功效相关。因此,人源化抗体(例如hu5F9-G4)具有与疾病(例如,癌症或慢性感染)的治疗相关的相同一般特性,因为当使用人源化抗体(例如,抗CD47抗体)治疗癌症和/或治疗慢性感染时非人源化抗体和主题方法将是有效的。

[0024] 图13描绘实施例4中所述的研究设计。

[0025] 图14描绘在实施例4中所述的研究的持续时间内所有组的血红蛋白水平数据(还参见图13)。

[0026] 图15描绘在实施例4中所述的研究的所有组中Hu5F9-G4(人源化抗CD47抗体)的药代动力学曲线(还参见图13)。

具体实施方式

[0027] 本发明涉及通过首先施用引物剂用治疗剂量的抗CD47剂治疗受试者的方法。

[0028] 在描述本发明方法和组合物之前,应理解本发明不限于所描述的具体方法或组合物,因为这些当然都可以变化。还应该理解,本文所使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,并且不意图为限制性的,因为本发明的范围将仅由所附权利要求所限制。

[0029] 在提供数值范围时,应理解,还明确公开了该范围的上限与下限之间的各居中值(至下限单位的十分之一,除非上下文另外明确地规定)。在规定范围中的任何规定值或居中值与在该规定范围中的任何其它规定值或居中值之间的各个较小范围涵盖在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可被独立地包括在该范围中或排除在该范围外,并且当两个界限之一、都不或全都包括在较小范围中时各个范围也涵盖在本发明内,从属于规定范围中的任何明确排除的极限值。在规定范围包括限值之一或两者时,超出那些包括的限值的任一者或两者的范围也包括在本发明中。

[0030] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然在本发明的实践或测试中可使用与本文所述的那些类似或等效的任何方法和材料,但是现在描述一些可能和优选的方法和材料。本文提及的所有出版物以引用的方式并入本文,以便公开和描述与所引述的出版物相关的方法和/或材料。应理解的是,在有矛盾的情况下,本公开内容优先于所并入出版物的任何公开内容。

[0031] 本领域技术人员在阅读本公开之后将显而易见的是,本文所述且说明的各个单独实施方案具有分离的组分和特征,所述组分和特征可容易地与任何其它若干实施方案的特征分离或组合而不偏离本发明的范围或精神。任何所陈述方法均可以所陈述事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行。

[0032] 必须指出,除非上下文另外明确地规定,否则在本文和所附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个此类细胞并且提及“所述肽”包括提及一种或多种肽及其本领域中的技术人员已知的等效物(例如多肽)等。

[0033] 本文所讨论的出版物仅为其在本申请的提交日期之前的公开而提供。本文没有任何内容应被解释为承认本发明没有资格先于现有发明的此类出版物。此外,所提供的公布日期可与实际公布日期不同,这可能需要独立证实。

[0034] 定义

[0035] 抗CD47剂。如本文所用,术语“抗CD47剂”是指减少CD47(例如,在靶细胞上)与SIRP α (例如,在吞噬细胞上)的结合的任何剂。适合的抗CD47试剂的非限制性实例包括SIRP α 试剂,包括但不限于高亲和力SIRP α 多肽、抗SIRP α 抗体、可溶性CD47多肽以及抗CD47抗体或抗体片段。在一些实施方案中,适合的抗CD47剂(例如抗CD47抗体、SIRP α 试剂等)特异性地结合CD47以减少CD47与SIRP α 的结合。在一些实施方案中,适合的抗CD47剂(例如抗SIRP α 抗体、可溶性CD47多肽等)特异性地结合SIRP α 以减少CD47与SIRP α 的结合。结合SIRP α 的适合的抗CD47剂不会活化SIRP α (例如,在表达SIRP α 的吞噬细胞中)。适合的抗CD47剂的功效可通过测定剂来评定(下文进一步描述)。在示例性测定中,在存在或不存在候选剂的情况下孵育靶细胞。用于在本发明的方法中使用的剂将使吞噬作用相较于在不存在所述剂的情况下的吞噬作用上调至少10%(例如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少120%、至少140%、至少160%、至少180%或

至少200%)。类似地,用于SIRP α 的酪氨酸磷酸化的水平的体外测定将显示磷酸化相较于在不存在候选剂的情况下观察到的磷酸化降低至少5% (例如,至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%)。

[0036] 在一些实施方案中,抗CD47剂不会在结合之后活化CD47。当CD47被活化时,可能发生类似于细胞凋亡(即,编程性细胞死亡)的过程(Manna和Frazier,Cancer Research,64,1026-1036,2004年2月1日)。因此,在一些实施方案中,抗CD47剂不会直接诱导表达CD47的细胞的细胞死亡。

[0037] 一些病原体(例如痘病毒、粘液瘤病毒、鹿痘病毒、猪痘病毒、山羊痘病毒、绵羊痘病毒等)表达CD47类似物(即,CD47模拟物)(例如,M128L蛋白),所述CD47类似物充当毒力因子以能够感染(Cameron等,Virology.2005年6月20日;337(1):55-67),并且一些病原体诱导宿主细胞中的内源性CD47的表达。感染病原体的表达CD47类似物的细胞因此可排他性地或与内源性CD47组合表达病原体提供的CD47类似物。这种机制允许病原体在增加或不增加内源性CD47的水平的情況下增加感染的细胞中的CD47表达(通过表达CD47类似物)。在一些实施方案中,抗CD47剂(例如抗CD47抗体、SIRP α 试剂、SIRP α 抗体、可溶性CD47多肽等)可减少CD47类似物(即,CD47模拟物)与SIRP α 的结合。在一些情況下,适合的抗CD47剂(例如,SIRP α 试剂、抗CD47抗体等)可结合CD47类似物(即,CD47模拟物)以减少CD47类似物与SIRP α 的结合。在一些情況下,适合的抗CD47剂(例如,抗SIRP α 抗体、可溶性CD47多肽等)可结合SIRP α 。结合SIRP α 的适合的抗CD47剂不会活化SIRP α (例如,表达SIRP α 的吞噬细胞中)。当病原体是提供CD47类似物的病原体时,抗CD47剂可用于本文提供的任何方法中。换言之,如本文所用,术语“CD47”涵盖CD47以及CD47类似物(即,CD47模拟物)。

[0038] SIRP α 试剂。SIRP α 试剂包含SIRP α 的足以以可识别的亲合力结合CD47的部分,所述部分通常位于信号序列与跨膜结构域之间,或保留结合活性的其片段。适合的SIRP α 试剂减少(例如,阻断、防止等)天然蛋白质SIRP α 与CD47之间的相互作用。SIRP α 试剂通常将至少包含SIRP α 的d1结构域。在一些实施方案中,SIRP α 试剂是融合蛋白,例如,与第二多肽框内融合。在一些实施方案中,第二多肽能够增加融合蛋白的大小,例如以使得融合蛋白将不会从循环中快速清除。在一些实施方案中,第二多肽是免疫球蛋白Fc区的一部分或全部。Fc区通过提供“吃我”信号有助于吞噬作用,其增强由高亲合力SIRP α 试剂提供的“别吃我”信号的阻断。在其它实施方案中,第二多肽是大致上类似于Fc的任何适合的多肽,例如,提供增加的大小、多聚化结构域和/或与Ig分子的另外结合或相互作用。

[0039] 在一些实施方案中,主题抗CD47剂是“高亲合力SIRP α 试剂”,其包括SIRP α 源性的多肽及其类似物。高亲合力SIRP α 试剂描述于国际申请PCT/US13/21937中,其特此以引用的方式具体地并入。高亲合力SIRP α 试剂是天然SIRP α 蛋白的变体。在一些实施方案中,高亲合力SIRP α 试剂是可溶性的,其中多肽缺乏SIRP α 跨膜结构域并且包含相对于野生型SIRP α 序列的至少一个氨基酸变化,并且其中氨基酸变化增加结合CD47的SIRP α 多肽的亲合力,例如通过使解离速率降低至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍或更多。

[0040] 高亲合力SIRP α 试剂包含SIRP α 的足以以可识别的亲合力(例如高亲合力)结合CD47的部分,所述部分通常位于信号序列与跨膜结构域之间,或保留结合活性的其片段。高亲合力SIRP α 试剂通常将至少包含SIRP α 的d1结构域,具有修饰的氨基酸残基以增加亲合力。在一些实施方案中,本发明的SIRP α 变体是融合蛋白,例如,与第二多肽框内融合。在一

些实施方案中,第二多肽能够增加融合蛋白的大小,例如以使得融合蛋白将不会从循环中快速清除。在一些实施方案中,第二多肽是免疫球蛋白Fc区的一部分或全部。Fc区通过提供“吃我”信号有助于吞噬作用,其增强由高亲和力SIRP α 试剂提供的“别吃我”信号的阻断。在其它实施方案中,第二多肽是大致上类似于Fc的任何适合的多肽,例如,提供增加的大小、多聚化结构域和/或与Ig分子的另外结合或相互作用。提供增加的亲和力的氨基酸变化位于d1结构域中,并且因此高亲和力SIRP α 试剂包含人SIRP α 的d1结构域,具有相对于d1结构域内的野生型序列的至少一个氨基酸变化。此类高亲和力SIRP α 试剂任选地包含另外的氨基酸序列,例如抗体Fc序列;野生型人SIRP α 蛋白不同于d1结构域的部分,包括但不限于天然蛋白质的残基150至374或其片段,通常与d1结构域毗连的片段;等。高亲和力SIRP α 试剂可以单体的或多聚体的,即二聚体、三聚体、四聚体等。

[0041] 抗CD47抗体。在一些实施方案中,主题抗CD47剂是特异性地结合CD47的抗体(即,抗CD47抗体)并且减少一种细胞(例如,感染的细胞)上的CD47与另一种细胞(例如,吞噬细胞)上的SIRP α 之间的相互作用。在一些实施方案中,适合的抗CD47抗体不会在结合之后活化CD47。适合的抗体的非限制性实例包括克隆B6H12、5F9、8B6和C3(例如,如描述于国际专利公布W0 2011/143624中,以引用的方式具体地并入本文)。适合的抗CD47抗体包括此类抗体的完全人、人源化或嵌合型式。人源化抗体(例如hu5F9-G4)由于其低抗原性尤其适用于人中的体内应用。类似犬源化、猫源化等抗体分别尤其适用于狗、猫和其它物种中的应用。目标抗体包括人源化抗体,或犬源化、猫源化、马源化、牛源化、猪源化等抗体及其变体。

[0042] 抗SIRP α 抗体。在一些实施方案中,主题抗CD47剂是特异性地结合SIRP α 的抗体(即,抗SIRP α 抗体)并且减少一种细胞(例如,感染的细胞)上的CD47与另一种细胞(例如,吞噬细胞)上的SIRP α 之间的相互作用。适合的抗SIRP α 抗体可在不活化或刺激通过SIRP α 信号传导的情况下结合SIRP α ,因为SIRP α 的活化将抑制吞噬作用。相反,适合的抗SIRP α 抗体有助于遭受损伤的细胞相对于正常细胞的优先吞噬作用。相对于其它细胞(未感染的细胞)表达更高水平的CD47的那些细胞(例如,感染的细胞)将优先地被吞噬。因此,适合的抗SIRP α 抗体特异性地结合SIRP α (而不活化/刺激足够的信号传导反应来抑制吞噬作用)并且阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用。适合的抗SIRP α 抗体包括此类抗体的完全人、人源化或嵌合型式。人源化抗体由于其低抗原性尤其适用于人中的体内应用。类似犬源化、猫源化等抗体分别尤其适用于狗、猫和其它物种中的应用。目标抗体包括人源化抗体,或犬源化、猫源化、马源化、牛源化、猪源化等抗体及其变体。

[0043] 可溶性CD47多肽。在一些实施方案中,主题抗CD47剂是特异性地结合SIRP α 的可溶性CD47多肽并且减少一种细胞(例如,感染的细胞)上的CD47与另一种细胞(例如,吞噬细胞)上的SIRP α 之间的相互作用。适合的可溶性CD47多肽可在不活化或刺激通过SIRP α 信号传导的情况下结合SIRP α ,因为SIRP α 的活化将抑制吞噬作用。相反,适合的可溶性CD47多肽有助于感染的细胞相对于未感染的细胞的优先吞噬作用。相对于正常、非靶细胞(正常细胞)表达更高水平的CD47的那些细胞(例如,感染的细胞)将优先地被吞噬。因此,适合的可溶性CD47多肽特异性地结合SIRP α ,而不活化/刺激足够的信号传导反应来抑制吞噬作用。

[0044] 在一些情况下,适合的可溶性CD47多肽可以是融合蛋白(例如,如结构性地描述于美国专利公布US20100239579中,以引用的方式具体地并入本文)。然而,不会活化/刺激SIRP α 的仅融合蛋白适合用于本文所提供的方法。适合的可溶性CD47多肽还包括包含变体

或天然存在的CD47序列(例如,细胞外结构域序列或细胞外结构域变体)的任何肽或肽片段,所述肽或肽片段可特异性地结合SIRP α 并且抑制CD47与SIRP α 之间的相互作用而不会刺激足够的SIRP α 活性来抑制吞噬作用。

[0045] 在某些实施方案中,可溶性CD47多肽包含CD47的细胞外结构域,包括信号肽(SEQ ID NO:2),以使得CD47的细胞外部分通常是142个氨基酸长,并且具有在SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。本文所述的可溶性CD47多肽还包括包含至少65%-75%、75%-80%、80-85%、85%-90%或95%-99%(或未在65%至100%之间具体列举的任何同一性百分比)的氨基酸序列的CD47细胞外结构域变体,所述变体保留结合SIRP α 的能力而不刺激SIRP α 信号传导。

[0046] 在某些实施方案中,信号肽氨基酸序列可被源自另一种多肽(例如像免疫球蛋白或CTLA4)的信号肽氨基酸序列取代。例如,不同于全长CD47(其是跨越外细胞膜的细胞表面多肽),可溶性CD47多肽是分泌型;因此,编码可溶性CD47多肽的多核苷酸可包括编码与通常从细胞分泌的多肽相关的信号肽的核苷酸序列。

[0047] 在其它实施方案中,可溶性CD47多肽包含缺乏信号肽的CD47的细胞外结构域。在示例性实施方案中,缺乏信号肽的CD47细胞外结构域具有在SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列(124个氨基酸)。如本文所述,信号肽未暴露在分泌型或跨膜蛋白的细胞表面上,因为该信号肽在蛋白质的易位期间裂解或该信号肽保持锚定在外细胞膜上(此类肽还被称为信号锚)。CD47的信号肽序列据信在体内从前体CD47多肽裂解。

[0048] 在其它实施方案中,可溶性CD47多肽包含CD47细胞外结构域变体。此类可溶性CD47多肽保留结合SIRP α 的能力而不刺激SIRP α 信号传导。CD47细胞外结构域变体可具有与SEQ ID NO:1至少65%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%或95%-99%同一(包括在所描述范围的任一个之间的任何同一性百分比)的氨基酸序列。

[0049] 本文使用术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等通常是指获得所需的药理学和/或生理学作用。该作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可为防治性的和/或就部分或完全稳定或治愈疾病和/或可归因于该疾病的不利作用而言可为治疗性的。术语“治疗”涵盖哺乳动物(具体地人)中的疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防该疾病和/或症状在可能易患该疾病或症状但尚未被诊断为患有该疾病或症状的受试者中发生;(b)抑制该疾病和/或症状,即阻止其发展;或(c)减轻该疾病症状,即引起该疾病和/或症状消退。需要治疗的那些包括已经遭受损伤的那些(例如,具有癌症的那些,具有感染的那些等)以及需要预防的那些(例如,具有对癌症易感性增加的那些、具有增加的感染可能性的那些、疑似患有癌症的那些、疑似具有感染的那些等)。

[0050] 靶细胞可以是“遭受损伤的(inflicted)”细胞,其中术语“遭受损伤的”在本文用于指具有可用抗CD47剂治疗的症状、病或疾病的受试者。“遭受损伤的”受试者可患有癌症,可具有感染(例如,慢性感染)以及其它过度增生性病状,例如硬化症、纤维化以及类似病状等。“遭受损伤的细胞”可以是引起症状、病或疾病的那些细胞。作为非限制性实例,遭受损伤的患者的遭受损伤的细胞可以是癌细胞、感染的细胞等。可用抗CD47剂治疗病或疾病的一种适应症是所涉及的细胞(即,遭受损伤的细胞,例如癌性细胞、感染的细胞等)相较于相同细胞类型的正常细胞表达增加水平的CD47。

[0051] 治疗性治疗是其中受试者在施用之前遭受损伤的一种治疗并且防治性治疗是其

中受试者在施用之前未遭受损伤的一种治疗。在一些实施方案中,受试者具有增加的变得遭受损伤的可能性或在治疗之前疑似正遭受损伤。在一些实施方案中,受试者疑似具有增加的变得遭受损伤的可能性。

[0052] 可用抗CD47剂治疗的症状、病和/或疾病的实例包括但不限于癌症和感染(例如,慢性感染)。如本文所用,“癌症”包括任何形式的癌症(例如,白血病;急性骨髓性白血病(AML);急性淋巴细胞性白血病(ALL);转移;微小残留疾病;实体瘤癌症,例如,乳癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、成胶质细胞瘤、平滑肌肉瘤和头颈部鳞状细胞癌;等)。其中癌细胞表现出相较于非癌细胞的增加的CD47表达的任何癌症是待通过主题方法和组合物治疗的适合的癌症。

[0053] 如本文所用,术语“感染”是指生物体(即受试者)的至少一个细胞中的任何状态受感染剂感染(例如,受试者具有细胞内病原体感染,即慢性细胞内病原体感染)。如本文所用,术语“感染剂”是指诱导感染的生物体的至少一个细胞中的增加的CD47表达的外源生物实体(即病原体)。例如,感染剂包括但不限于细菌、病毒、原生动物以及真菌。细胞内病原体是特别感兴趣的。感染性疾病是由感染剂引起的病症。一些感染剂在某些条件下不引起可识别的症状或疾病,但在改变的条件具有引起病状或疾病的潜力。主题方法可用于治疗慢性病原体感染,例如包括但不限于病毒感染,例如,逆转录病毒、慢病毒、嗜肝DNA病毒(hepadna virus)、疱疹病毒、痘病毒、人乳头状瘤病毒等;细胞内细菌感染,例如分支杆菌属(*Mycobacterium*)、嗜衣原体属(*Chlamydophila*)、埃力克体属(*Ehrlichia*)、立克次氏体属(*Rickettsia*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、军团菌属(*Legionella*)、弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)、李斯特氏菌属(*Listeria*)、柯克斯氏体属(*Coxiella*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、耶尔森氏菌属(*Yersinia* sp.)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)等;以及细胞内原生动物病原体,例如,疟原虫属(*Plasmodium* sp.)、锥体虫属(*Trypanosoma* sp.)、贾第虫属(*Giardia* sp.)、弓形虫属(*Toxoplasma* sp.)、利什曼虫属(*Leishmania* sp.)等。

[0054] 如本文所用,“靶细胞”是在表面上表达CD47的细胞,其中掩蔽或以另外的方式改变CD47阳性表型(例如,通过施用抗CD47剂)导致增加的吞噬作用。通常靶细胞是哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0055] 术语“接受者”、“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用并且是指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者,具体地是人。用于治疗目的的“哺乳动物”是指被分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养动物和农场动物,以及动物园动物、竞技动物或宠物动物,如狗、马、猫、牛、绵羊、山羊、猪等。优选地,哺乳动物是人。

[0056] “治疗有效剂量”或“治疗剂量”是足以实现所需临床结果(即,实现治疗功效)的量。治疗有效剂量可在一次或多次施用中施用。出于本发明的目的,治疗有效剂量的抗CD47剂是通过增加靶细胞(例如靶细胞)的吞噬作用足以减轻、改善、稳定、逆转、预防、减缓或延迟疾病状态(例如,癌症或慢性感染)的进展的量。因此,治疗有效剂量的抗CD47剂以有效剂量减少靶细胞上的CD47与吞噬细胞上的SIRP α 的结合以用于增加靶细胞上的吞噬作用。

[0057] 在一些实施方案中,治疗有效剂量导致约40 μ g/ml或更多(例如,约50 μ g/ml或更多、约60 μ g/ml或更多、约75 μ g/ml或更多、约100 μ g/ml或更多、约125 μ g/ml或更多或约150 μ g/ml或更多)的抗CD47剂(例如,抗CD47抗体)的持续血清水平。在一些实施方案中,治

疗有效剂量导致约40 μ g/ml至约300 μ g/ml (例如,约40 μ g/ml至约250 μ g/ml、约40 μ g/ml至约200 μ g/ml、约40 μ g/ml至约150 μ g/ml、约40 μ g/ml至约100 μ g/ml、约50 μ g/ml至约300 μ g/ml、约50 μ g/ml至约250 μ g/ml、约50 μ g/ml至约200 μ g/ml、约50 μ g/ml至约150 μ g/ml、约75 μ g/ml至约300 μ g/ml、约75 μ g/ml至约250 μ g/ml、约75 μ g/ml至约200 μ g/ml、约75 μ g/ml至约150 μ g/ml、约100 μ g/ml至约300 μ g/ml、约100 μ g/ml至约250 μ g/ml或约100 μ g/ml至约200 μ g/ml) 范围内的抗CD47剂 (例如,抗CD47抗体) 的持续血清水平。在一些实施方案中,用于治疗实体瘤的治疗有效剂量导致约100 μ g/ml或更多的抗CD47剂 (例如,抗CD47抗体) 的持续血清水平 (例如,约100 μ g/ml至约200 μ g/ml范围内的持续血清水平)。在一些实施方案中,用于治疗非实体瘤 (例如,急性骨髓性白血病 (AML)) 的治疗有效剂量导致约50 μ g/ml或更多的抗CD47剂 (例如,抗CD47抗体) 的持续血清水平 (例如,75 μ g/ml或更多的持续血清水平;或约50 μ g/ml至约150 μ g/ml范围内的持续血清水平)。

[0058] 因此,单个治疗有效剂量或一系列治疗有效剂量将能够实现且维持抗CD47剂的血清水平。抗CD47剂的治疗有效剂量可取决于所使用的具体剂,但通常是约8mg/kg体重或更多 (例如,约8mg/kg或更多、约10mg/kg或更多、约15mg/kg或更多、约20mg/kg或更多、约25mg/kg或更多、约30mg/kg或更多、约35mg/kg或更多或约40mg/kg或更多),或约10mg/kg至约40mg/kg (例如,约10mg/kg至约35mg/kg,或约10mg/kg至约30mg/kg)。用于实现和/或维持特定血清水平所需的剂量与剂量之间的时间量成正比并且与所施用剂量的数目成反比。因此,随着给药频率增加,所需的剂量减少。给药策略的优化将由本领域的普通技术人员容易地理解和实践。

[0059] 亚治疗剂量是不足以实现所需临床结果的剂量 (即,量)。例如,亚治疗剂量的抗CD47剂是不足以减轻、改善、稳定、逆转、预防、减缓或延迟疾病状态 (例如,癌症、感染、炎症等) 的进展的量。在一些情况下,希望的是使用亚治疗剂量的抗CD47剂作为引物剂 (在下文更详细地描述)。虽然使用亚治疗剂量的抗CD47剂作为引物剂实现所需结果 (例如,受试者被“引发”以接受治疗有效剂量),但该剂量不被认为是“治疗剂量”,因为亚治疗剂量不会有效地增加靶细胞的吞噬作用并且不足以减轻、改善、稳定、逆转、预防、减缓或延迟疾病状态的进展。亚治疗剂量的抗CD47剂可取决于所使用的具体剂,但通常小于约10mg/kg。

[0060] “维持剂量”是意图为治疗有效剂量的剂量。例如,在确定治疗有效剂量的实验中,可将多个不同的维持剂量施用至不同受试者。如此,一些维持剂量可能是治疗有效剂量并且其它维持剂量可能是亚治疗剂量。

[0061] 引物剂。如本文所用,术语“引物剂”是指针对进一步施用治疗有效剂量的抗CD47剂引发受试者的剂。本发明人已经发现当在无首先施用引物剂的情况下向受试者施用治疗有效剂量的抗CD47剂时,高的需要剂量可引起红细胞 (红细胞, RBC) 的剂量依赖性损失 (例如,如以下在小鼠和非人灵长类 (NHP) 模型中所示)。本领域的普通技术人员将容易地理解如何测量RBC的损失。例如,RBC的损失可例如通过测量血细胞比容随时间推移的变化百分比和/或通过随时间推移测量血红蛋白 (例如,随时间推移的变化百分比, g/dL等) 来监测 (图1-图3和图7-图9)。由RBC的损失引起的贫血的严重性 (在一些情况下致死) 因此可排除使用治疗有效剂量的抗CD47剂。然而,通过在施用治疗有效剂量的抗CD47剂之前施用引物剂,受试者不会经历超越暂时的不利作用,在施用引物剂之后可发生的轻度贫血。因此,施用引物剂用于针对未来施用治疗有效剂量的抗CD47引发受试者。

[0062] 当治疗灵长类动物时使用引物剂的主题方法是特别相关的,因为灵长类动物是对RBC计数敏感性的并且易于发展贫血。因此,在一些实施方案中,受试者是灵长类动物(例如,人、原猴亚目、猿猴、狐猴、瘦猴(lorisoids)、眼镜猴、猴、猿、卷尾猴、吼猴、松鼠猴、狒狒、猕猴、长臂猿、类人猿等)。

[0063] 引物剂增加受试者中的RBC的数目并且因此抵消由施用治疗有效剂量的抗CD47剂引起的RBC的损失。因此,在一些实施方案中,引物剂是红细胞生成刺激剂(ESA)。ESA是本领域中已知的并且包括但不限于促红细胞生成素(EPO)、EPO衍生物和EPO刺激化合物。适合的实例包括但不限于:EPO α 、EPO β 、EPO δ 、EPO ω 、EPO ζ 、达贝泊汀 α (Aranesp)、依泊汀 α (Procrit)、Epocept(Lupin pharma)、Nanokine(Nanogen Pharmaceutical biotechnology,Vietnam)、Epofit(Intaspharma)、Epogen(Amgen)、Epogin、Eprex、(Janssen-Cilag)、NeoRecormon(Hoffmann-La Roche)、Recormon、甲氧基聚乙二醇-依泊汀 β (Mircera)(Roche)、Dynepo、Epomax、Silapo(Stada)、Retacrit(Hospira)、Epocept(Lupin Pharmaceuticals)、EPOTrust(Panacea Biotec Ltd.)、Erypro Safe(Biocon Ltd.)、Repoitin(Serum Institute of India Limited)、Vintor(Emcure Pharmaceuticals)、Epofit(Intas pharma)、Erykine(Intas Biopharmaceutica)、Wepox(Wockhardt Biotech)、Espogen(LG life sciences)、ReliPoietin(Reliance Life Sciences)、Shanpoiectin(Shantha Biotechnics Ltd.)、Zyrop Cadila(Healthcare Ltd.)、EPIA0(rHuEPO)以及(Shenyang Sunshine Pharmaceutical Co.,LTD.China)。应该施用的ESA的剂量取决于所使用的剂的性质,并且还取决于众多受试者特异性因素(例如,年龄、体重等)。确定ESA的适当剂量的方法是本领域中已知的。在一些实施方案中,以根据制造商的建议的剂量施用ESA,并且在一些情况下可低至约50单位/kg、约100单位/kg或约150单位/kg的体重或高达约17,000单位/kg的体重。

[0064] 在一些实施方案中,引物剂包含亚治疗剂量的抗CD47剂。本发明人已经发现施用亚治疗剂量的抗CD47剂作为引物剂有效地针对未来施用治疗有效剂量的抗CD47剂引发受试者,从而预防否则与治疗有效剂量相关的严重贫血。

[0065] 因此,术语“引发剂量”或如本文所用是指针对施用治疗有效剂量的抗CD47剂引发受试者以使得该治疗有效剂量不会导致RBC的严重损失(降低的血细胞比容或减少的血红蛋白)的引物剂(例如,抗CD47剂、ESA等)的剂量。抗CD47剂的具体适当的引发剂量可取决于所使用的剂的性质且取决于众多受试者特异性因素(例如,年龄、体重等)变化。抗CD47剂的适合引发剂量的实例包括但不必限于以下范围:约0.05mg/kg至约10mg/kg(例如,约0.1mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约7.5mg/kg、约0.1mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约4mg/kg、约0.1mg/kg至约3mg/kg、约0.5mg/kg至约10mg/kg、约0.5mg/kg至约7.5mg/kg、约0.5mg/kg至约5mg/kg、约0.5mg/kg至约4mg/kg、约0.5mg/kg至约3mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约7.5mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约4mg/kg、约1mg/kg至约3mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约7.5mg/kg或约10mg/kg)。在一些实施方案中,引物剂包含ESA与引发剂量的抗CD47剂的组合。

[0066] “负载剂量”是意图为引发剂量的剂量。例如,在确定有效引发剂量的实验中,可将多个不同的负载剂量施用至不同受试者。如此,一些负载剂量可能是引发剂量并且其它负载剂量可能不是引发剂量。

[0067] 术语“特异性结合”、“特异性地结合”等是指相对于溶液或反应混合物中的其它分子或部分非共价或共价优先结合分子(例如,抗体相对于其它可获得的多肽特异性地结合特定多肽或表位,或结合SIRP α 多肽)。在一些实施方案中,一个分子对它所特异性地结合的另一个分子的亲和力特征在于 10^{-5} M或更低(例如, 10^{-6} M或更低、 10^{-7} M或更低、 10^{-8} M或更低、 10^{-9} M或更低、 10^{-10} M或更低、 10^{-11} M或更低、 10^{-12} M或更低、 10^{-13} M或更低、 10^{-14} M或更低、 10^{-15} M或更低或 10^{-16} M或更低)的KD(解离常数)。“亲和力”是指结合强度,增加的结合亲和力与较低的KD相关。

[0068] 如本文所用的术语“特异性结合成员”是指特异性结合对的成员(即,两个分子,通常两个不同的分子,其中一个分子例如第一特异性结合成员通过非共价方式特异性地结合另一个分子,例如,第二特异性结合成员)。适合的特异性结合成员包括特异性地结合CD47和/或SIRP α 的剂(即,抗CD47剂),或以另外的方式阻断CD47与SIRP α 之间的相互作用的剂。

[0069] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用来指氨基酸残基的聚合物。该术语还适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,并且适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0070] 术语“吞噬细胞(phagocytic cell)”和“吞噬细胞(phagocyte)”在本文中可互换使用来指能够吞噬作用的细胞。存在三种主要类别的吞噬细胞:巨噬细胞、单核细胞(组织细胞和单核细胞);多形核白细胞(中性粒细胞)和树突细胞。

[0071] 关于患者的术语“样品”涵盖血液和生物来源的其它液体样品、实体组织样品如活检标本或组织培养物或源自或分离自其的细胞及其子代。该定义还包括已经在其获得之后以任何方式操作的样品,该方式如通过用试剂处理;洗涤;或针对某些细胞群体如癌细胞富集。该定义还包括已经针对特定类型的分子例如核酸、多肽等富集的样品。

[0072] 术语“生物样品”涵盖临床样品,并且还包括通过外科切除获得的组织、通过活检获得的组织、培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解产物、组织样品、器官、骨髓、血液、血浆、血清等。“生物样品”包括包含靶细胞或正常对照细胞或疑似包含此类细胞或源自其的生物流体(例如,癌性细胞、感染的细胞等)的样品,例如包含从此类细胞获得的多核苷酸和/或多肽的样品(例如,包含多核苷酸和/或多肽的细胞裂解产物或其它细胞提取物)。包含来自患者的遭受损伤的细胞的生物样品还可包括未遭受损伤的细胞。

[0073] 术语“抗体”以最广泛意义使用且具体地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)以及抗体片段,只要其表现出所需的生物活性。“抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。虽然抗体表现出对特异性抗原的结合特异性,但免疫球蛋白包括抗体和缺乏抗原特异性的其它抗体样分子。后一种多肽例如由淋巴系统以低水平产生且由骨髓瘤以高水平产生。

[0074] 如本文所用的“抗体片段”及其所有语法变型被定义为包含抗原结合位点的完整抗体的一部分或完整抗体的可变区,其中该部分不含完整抗体的Fc区的恒定重链结构域(即,CH2、CH3和CH4,取决于抗体同种型)。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂以及Fv片段;双抗体;为具有由连续氨基酸残基的一个不间断序列组成的一级结构的多肽的任何抗体片段(在本文被称为“单链抗体片段”或“单链多肽”),包括但不限于(1)单链Fv(scFv)分子(2)含有一个轻链可变结构域的单链多肽或其含有轻链可变结构域的三个CDR的片段,而无相关的重链部分(3)含有一个重链可变区的单链多肽或其含有重链可变

区的三个CDR的片段,而无相关的轻链部分以及(4)包含来自非人物种的单个Ig结构域或其它特异性单个结构域结合分子的纳米抗体;以及由抗体片段形成的多特异性或多价结构。在包含一个或多个重链的抗体片段中,该重链可含有在完整抗体的非Fc区中发现的任何恒定结构域序列(例如IgG同种型中的CH1),和/或可含有在完整抗体中发现的任何铰链区序列,和/或可含有融合至或位于该重链的铰链区序列或恒定结构域序列中的亮氨酸拉链序列。

[0075] 如在本发明中所用,术语“表位”意指抗体的互补位所结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。

[0076] 方法

[0077] 提供用于使用治疗剂量的抗CD47剂治疗受试者的方法。主题方法包括向受试者施用引物剂的步骤,接着向该受试者施用治疗有效剂量的抗CD47剂的步骤。在一些实施方案中,施用治疗有效剂量的步骤在开始施用引物剂之后至少约3天(例如,至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天或至少约10天)之后进行。此时间段例如足以由个体提供增强的网织红细胞产生。

[0078] 在一些实施方案中,施用治疗有效剂量的步骤在开始施用引物剂之后约3天至约21天(例如,约3天至约17天、约3天至约14天、约3天至约12天、约4天至约12天、约5天至约12天、约5天至约11天、约5天至约10天、约5天至约9天、约6天至约8天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天或约12天)的范围内进行。此时间段例如足以由个体提供增强的网织红细胞产生。

[0079] 在一些实施方案中,在施用治疗有效剂量的抗CD47剂之前施用两种或更多种引物剂。在此类情况下,引物剂可以是相同的剂或可以是不同的剂。第一引物剂可以与任何随后施用的引物剂以相同的剂量或以不同的剂量施用。在一些实施方案中,同时施用两种或更多种引物剂,和/或两种或更多种引物剂的施用在时间上重叠,其中一种引物剂的施用可在另一种引物剂之前或之后开始或结束。

[0080] 施用治疗有效剂量的抗CD47剂可以多种不同的方式实现。在一些情况下,在施用引物剂之后施用两个或更多个治疗有效剂量。治疗有效剂量的适合的施用可能需要施用单剂量,或可能需要每日、每半周、每周、每两周一次、每月一次、每年等施用剂量。在一些情况下,治疗有效剂量被施用为递增浓度的两个或更多个剂量(即,递增剂量),其中(i)所有的剂量都是治疗剂量,或其中(ii)初始给予亚治疗剂量(或两个或更多个亚治疗剂量),并且通过该递增实现治疗剂量。作为说明递增浓度(即,递增剂量)的一个非限制性实例,可以亚治疗剂量(例如,5mg/kg的剂量)开始每周施用治疗有效剂量,并且每个随后剂量可增加特定增量(例如,增加5mg/kg)或增加可变增量,直到达到治疗剂量(例如,30mg/kg),此时施用可停止或可继续(例如,持续的治疗剂量,例如30mg/kg的剂量)。作为说明递增浓度(即,递增剂量)的另一个非限制性实例,可以治疗剂量(例如,10mg/kg的剂量)开始每周施用治疗有效剂量,并且每个随后剂量可增加特定增量(例如,增加10mg/kg)或增加可变增量,直到达到治疗剂量(例如,30mg/kg、100mg/ml等),此时施用可停止或可继续(例如,持续的治疗剂量,例如30mg/kg、100mg/ml等的剂量)。在一些实施方案中,施用治疗有效剂量可以是连续输注并且剂量可随时间推移改变(例如,递增)。

[0081] 剂量和频率可取决于患者中的抗CD47剂的半衰期而不同。本领域的技术人员将理解,此类准则将例如在抗体片段的使用中、在抗体缀合物的使用中、在SIRP α 试剂的使用中、在可溶性CD47肽的使用中等针对活性剂的分子量进行调整。剂量还可针对局部施用(例如鼻内、吸入等)或针对全身性施用例如肌肉内(i.m.)、腹膜内(i.p.)、静脉内(i.v.)等而不同。

[0082] 引物剂的有效施用。在一些实施方案中,在向受试者施用治疗有效剂量的抗CD47剂的步骤之前进行确定施用引物剂是否有效的步骤。如果施用引物剂不有效,那么可能希望重新且再次开始施用引物剂。在此类情况下,可使用不同剂量和/或不同引物剂,或可使用相同剂量和相同引物剂。如果施用引物剂有效(即,网织红细胞计数指示施用有效,如以下更详细地描述),那么可递送治疗有效剂量的抗CD47剂。

[0083] 因为引发剂量的引物剂可增加受试者中的RBC的数目(其在施用ESA引物剂之后以及在施用引发剂量的抗CD47剂之后发生),所以评价最近产生的(即,年轻的)血细胞(即,网织红细胞)可充当用于确定施用引物剂是否有效的评价工具。

[0084] 评价网织红细胞的方法包括测量血液样品中的网织红细胞的绝对或相对数目(例如,可在施用引物剂之前和之后对来自受试者的血液样品进行网织红细胞计数)。用于评价和/或计数网织红细胞的方法由本领域中的普通技术人员已知并且可使用任何方便的方法。适合的方法的实例包括但不限于基于形态评价计数样品中的网织红细胞的数目。网织红细胞表现出在特定染色例如新亚甲基蓝(NMB)的情况下变得可见的网状网络。当在正常罗曼诺夫斯基(Romanowsky)染色情况下观察时,网织红细胞似乎比其它红细胞稍微更蓝。网织红细胞还稍微更大,其可在全血计数情况下被挑选为高MCV(平均红细胞体积)。

[0085] 用于评价网织红细胞的适合方法的另一个实例包括但不限于基于年轻/未成熟的RBC的标志物的表达计数网织红细胞的数目(例如,CD71表达在年轻RBC中相对于较老RBC增加并且CD71可充当鉴别网织红细胞的标志物)。

[0086] 用于评价网织红细胞的适合方法的另一个实例包括但不限于在使样品与标记核酸(RNA和DNA)并且因此是非选择性核酸染料的荧光染料(例如,噻唑橙、聚甲炔等)相接触之后基于测量由细胞表现出的荧光的量来计数样品中的网织红细胞的数目。例如,非选择性核酸染料可染色网织红细胞的残基RNA,而可与非选择性核酸染料(例如,噻唑橙)结合使用的DNA选择性染料(例如,DRAQ5)将不会染色网织红细胞,因为网织红细胞没有DNA(网织红细胞因此是DRAQ5阴性的)。相对中等水平的荧光使网织红细胞与成熟的RBC(其既不具有RNA也不具有DNA,并且因此具有非常少的荧光)且与淋巴细胞(不同于网织红细胞,其具有大量DNA)区分开来。因此,网织红细胞计数不能以自动方式(例如,使用荧光激活细胞分选(FACS))进行。

[0087] 确定施用引物剂是否有效的适合方法的另一个实例包括测量血液中的EPO的水平。虽然ESA可用于直接刺激EPO产生,但引发剂量的抗CD47剂也引起EPO水平的增加。如此,确定施用引物剂是否有效的步骤可包括测量血液中的EPO的水平(例如,在施用引物剂之前和之后)。

[0088] 确定施用引物剂是否有效的适合方法的另一个实例包括测量血红蛋白。用于测量血红蛋白的方法由本领域中的普通技术人员已知并且可使用任何方便的方法。血红蛋白通常作为来自血液样品的全血计数(CBC)的一部分进行测量。实验室血红蛋白测试方法要求

血液样品(动脉、静脉或毛细血管)以及在血液分析仪和CO-血氧定量计上的分析。另外,可使用无创血红蛋白测试方法(例如,脉冲CO-血氧定量法)。作为测量血红蛋白的一个非限制性实例,将红细胞分解以得到血红蛋白至溶液中。使游离血红蛋白暴露于含有氰化物的化学品,该化学品与血红蛋白分子紧密地结合以形成氰化高铁血红蛋白。通过使样品暴露于特定波长的光(例如,540nm),可测定血红蛋白的量。

[0089] 确定施用引物剂是否有效(例如,通过网织红细胞计数)可在开始步骤(a)之后约3天至约12天(例如,约4天至约11天、约5天至约10天、约6天至约10天、约7天至约9天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天或约12天)的范围内进行。

[0090] 在进行网织红细胞计数时,约 400×10^9 个网织红细胞/L或更多的计数指示施用引物剂是有效的。网织红细胞计数经常被表达为网织红细胞的红细胞的百分比,并且健康成人的正常计数在0.5%至2%的范围内。当以这种方式表达网织红细胞计数时,约4%或更高(例如,4.5%或更高、5%或更高、5.5%或更高或6%或更高)的值指示施用引物剂是有效的。在一些情况下,可计算网织红细胞数目的成倍增加,并且2倍或更高(例如,3倍或更高、3.5倍或更高、4倍或更高、4.5倍或更高或5倍或更高)的增加指示施用引物剂是有效的。当进行血红蛋白测量时,约2至约4g/dL的绝对减少或约12%或更高(例如约15%或更高、17.5%或更高、20%或更高、25%或更高或30%或更高)的相对减少或约12%至约30%(例如,约15%至约30%、约15%至约25%或约20%至约30%)范围内的相对减少指示施用引物剂是有效的。

[0091] 在一些实施方案中,在施用治疗有效剂量的抗CD47剂之后针对疾病(例如癌症或感染)的临床病征监测受试者。

[0092] 试剂盒

[0093] 还提供用于在方法中使用的试剂盒。主题试剂盒包括引物剂和抗CD47剂。在一些实施方案中,试剂盒包括两种或更多种引物剂。在一些实施方案中,试剂盒包括两种或更多种抗CD47剂。在一些实施方案中,引物剂以剂型(例如,引发剂型)提供。在一些实施方案中,引物剂以两种或更多种不同的剂型(例如,两种或更多种不同的引发剂型)提供。在一些实施方案中,抗CD47剂以剂型(例如,治疗有效剂型)提供。在一些实施方案中,抗CD47剂以两种或更多种不同的剂型(例如,两种或更多种不同的治疗有效剂型)提供。在试剂盒的背景下,引物剂和/或抗CD47剂可以液体或固体形式提供在任何方便的包装(例如,棒包(stick pack)、剂量包等)中。

[0094] 除以上组分以外,主题试剂盒还可包括(在某些实施方案中)用于实践主题方法的说明书。这些说明书可以多种形式存在于主题试剂盒中,该形式中的一种或多种可存在于试剂盒中。其中可存在这些说明书的一种形式是作为在适合的介质或衬底上(例如上面印刷信息的一张或多张纸)、在试剂盒的包装中、在包装插页等中的印刷信息。这些说明书的另一种形式是计算机可读介质,例如,磁盘、光盘(CD)、闪存盘等,信息已经记录在该计算机可读介质上。可存在这些说明书的又一形式是网站地址,其可经由互联网用以在移动位点处存取信息。

[0095] 效用。主题方法和试剂盒可用于治疗其中靶细胞(例如癌细胞、感染的细胞等)表现出相对于相同类型的正常细胞增加的CD47表达的任何损伤。所施用的抗CD47剂抑制SIRP α (例如,吞噬细胞上)与靶细胞上(例如,癌细胞上、感染的细胞上等)的CD47之间的相互作用。

用,从而增加靶细胞的体内吞噬作用。主题方法包括向需要治疗的受试者施用治疗有效剂量的抗CD47剂,包括但不限于该试剂与另一种药物(例如,抗癌药物、抗感染药物等)的组合。

[0096] 在一些实施方案中,损伤是慢性感染,即不能在多达1周、2周等的时期内由宿主免疫系统清除的感染。在一些情况下,慢性感染涉及将病原体遗传元件整合至宿主基因组中,例如逆转录病毒、慢病毒、乙型肝炎病毒等。在其它情况下,慢性感染例如某些细胞内细菌或原生动物病原体由驻留在宿主细胞内的病原体细胞引起。另外,在一些实施方案中,感染处于潜伏期,如在疱疹病毒或人乳头状瘤病毒的情况下。

[0097] 目标病毒病原体包括但不限于逆转录病毒和慢病毒病原体,例如HIV-1、HIV-2、HTLV、FIV、SIV等。乙型肝炎病毒等。目标微生物包括但不限于以下:耶尔森氏菌属(*Yersinia* sp.),例如鼠疫耶尔森氏菌(*Y. pestis*)、假结核耶尔森氏菌(*Y. pseudotuberculosis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Y. enterocolitica*);弗朗西斯氏菌属(*Francisella* sp.);巴斯德氏杆菌属(*Pasturella* sp.);弧菌属(*Vibrio* sp.),例如霍乱弧菌(*V. cholerae*)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*);军团菌属(*Legionella* sp.),例如嗜肺军团菌(*L. pneumophila*);李斯特氏菌属(*Listeria* sp.),例如单核细胞增生性李斯特氏菌(*L. monocytogenes*);支原体属(*Mycoplasma* sp.),例如人型支原体(*M. hominis*)、肺炎支原体(*M. pneumonia*);分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.),例如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、麻风杆菌(*M. leprae*);立克次氏体属(*Rickettsia* sp.),例如立氏立克次氏体(*R. rickettsii*)、斑疹伤寒立克次氏体(*R. typhi*);衣原体属(*Chlamydia* sp.),例如沙眼衣原体(*C. trachomatis*)、肺炎衣原体(*C. pneumonia*)、鹦鹉热衣原体(*C. psittaci*);螺杆菌属(*Helicobacter* sp.),例如幽门螺杆菌(*H. pylori*)等。还包括细胞内原生动物病原体,例如疟原虫属、锥体虫属、贾第虫属、弓形虫属、利什曼虫属等。

[0098] 用本发明的方法治疗的感染通常涉及具有至少一部分其生命周期在宿主细胞内(即细胞内阶段)的病原体。本发明的方法提供相对于在不存在治疗的情况下的吞噬作用,通过宿主生物体的吞噬细胞更有效地除去感染的细胞,并且因此涉及病原体生命周期的细胞内阶段。

[0099] 在一些实施方案中,本发明的方法涉及诊断患者为患有病原体细胞内感染;或选择之前被诊断为患有病原体细胞内感染的患者;用任选地与另外的疗法组合的抗CD47疗法的方案治疗患者;以及针对治疗的功效监测患者。监测可测量感染的临床症候(例如发热、白细胞计数等)、和/或直接监测病原体的存在。

[0100] 治疗可与其它活性剂组合。抗生素的类别包括青霉素,例如青霉素G、青霉素V、甲氧西林、苯唑西林(oxacillin)、羧苄青霉素、萘夫西林、氨苄西林等;青霉素与 β -内酰胺酶抑制剂的组合,头孢菌素类,例如头孢克洛、头孢唑林、头孢呋辛、拉氧头孢等;碳青霉烯类;单环内酰胺类;氨基糖苷类;四环素类;大环内酯类;林可霉素类;多粘菌素类;磺酰胺类;喹诺酮类;氯霉素;甲硝哒唑;壮观霉素;甲氧苄氨嘧啶;万古霉素;等。还可包括细胞因子,例如干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素12等。抗病毒剂例如阿昔洛韦、更昔洛韦(gancyclovir)等也可用于治疗中。

[0101] 在一些实施方案中,损伤是癌症。如上所述,其中癌性细胞相对于相同类型的非癌性细胞表达增加水平的CD47的任何癌症可用主题方法治疗。

[0102] 如本文所用的术语“癌症”是指由异常、不受控制的细胞生长引起的多种病状。能够引起癌症、被称为“癌细胞”的细胞具有特征特性,如不受控制的增殖、永生性、转移潜能、快速生长和增殖速率和/或某些典型的形态特征。癌症可以多种方式中的任何一种来检测,包括但不限于检测一个或多个肿瘤的存在(例如,通过临床或放射学方式),检查肿瘤内或来自另一种生物样品(例如,来自组织活检)的细胞,测量指示癌症的血液标志物,并且检测指示癌症的基因型。然而,一种或多种以上检测方法中的阴性结果不一定指示癌症的不存在,例如,已经表现出对癌症治疗的完全反应的患者可能仍具有癌症,如由随后复发所证明。

[0103] 如本文所用的术语“癌症”包括癌(例如,原位癌、浸润癌、转移癌)和癌前病状,即独立于其组织学来源的新形态变化。术语“癌症”不限于感染的组织或细胞聚集的任何阶段、分级、组织形态学特征、侵袭性、攻击性或恶性肿瘤。具体地说,包括0期癌症、I期癌症、II期癌症、III期癌症、IV期癌症、I级癌症、II级癌症、III级癌症、恶性癌症以及原发癌。

[0104] 可治疗的癌症和癌细胞包括但不限于,血液癌症,包括白血病、淋巴瘤和骨髓瘤;和实体癌症,包括例如大脑肿瘤(成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤);癌,例如肺癌、肝癌、甲状腺癌、骨癌、肾上腺癌、脾癌、肾癌、淋巴结癌、小肠癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌、乳癌、子宫内膜癌、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、皮肤癌、头颈癌和食道癌。

[0105] 在一个实施方案中,癌症是血液癌症。在一个实施方案中,血液癌症是白血病。在另一个实施方案中,血液癌症是骨髓瘤。在一个实施方案中,血液癌症是淋巴瘤。

[0106] 在一个实施方案中,白血病选自急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)以及慢性髓细胞性白血病(CML)。在一个实施方案中,白血病是AML。在一个实施方案中,白血病是ALL。在一个实施方案中,白血病是CLL。在另一实施方案中,白血病是CML。在一个实施方案中,癌细胞是白血病细胞,例如但不限于AML细胞、ALL细胞、CLL细胞或CML细胞。

[0107] 响应于使用抗CD47剂的治疗的适合癌症包括但不限于白血病;急性骨髓性白血病(AML);急性淋巴细胞性白血病(ALL);转移;微小残留疾病;实体瘤癌症,例如,乳癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、成胶质细胞瘤、平滑肌肉瘤和头颈部鳞状细胞癌;等等。例如,参见:(i) Willingham等,Proc Natl Acad Sci U S A.2012年4月24日;109(17):6662-7:“The CD47-signal regulatory protein alpha(SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors”;(ii)Edris等,Proc Natl Acad Sci U S A.2012年4月24日;109(17):6656-61:“Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma”;以及(iii)美国专利申请20110014119;所述全部文献整体并入本文。

[0108] 药物组合物。适合的抗CD47剂和/或引物剂可提供在适合用于治疗用途例如用于人治疗的药物组合物中。在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含本发明的一种或多种治疗实体或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物。在一些其它实施方案中,抗CD47剂或引物剂的使用包括与另一种治疗剂(例如,另一种抗感染剂或另一种抗癌剂)组合使用。包含本发明的一种或多种抗CD47剂和/或引物剂的治疗性制剂通过将具有所需纯度的抗CD47剂或引物剂与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's

Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980))一起混合成冻干制剂或水性溶液的形式来制备以供储存。抗CD47剂或引物剂组合物将以符合良好医学规范的方式配制、给药及施用。在此背景下的考虑因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、单个患者的临床病状、病症的病因、剂递送部位、施用方法、施用时程及医学从业者已知的其它因素。

[0109] 抗CD47剂或引物剂可通过任何适合的方式施用, 包括局部、口服、胃肠外、肺内以及鼻内。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内(弹丸或缓慢滴注)、动脉内、腹膜内、鞘内或皮下施用。

[0110] 抗CD47剂或引物剂不必但任选地与增强活性或以另外的方式增加治疗作用的一种或多种剂一起配制。这些通常以相同的剂量且以如上文中使用的施用途径或迄今为止采用的剂量的约1%至99%使用。

[0111] 抗CD47剂或引物剂经常作为包含活性治疗剂和另一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物施用。优选形式取决于预定施用模式和治疗应用。组合物还可包括(取决于所需的制剂)药学上可接受的、非毒性载体或稀释剂, 该载体或稀释剂被定义为通常用于配制用于动物或人施用的药物组合物的媒介物。选择稀释剂以便不影响组合的生物活性。此类稀释剂的实例是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、葡萄糖溶液和汉克氏溶液(Hank's solution)。此外, 药物组合物或制剂也可包括其它载体、佐剂或无毒非治疗性非免疫原性稳定剂等。

[0112] 在一些其它实施方案中, 药物组合物还可包括大型缓慢代谢的大分子, 如蛋白质、多糖(如壳聚糖)、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(如乳胶官能化Sepharose™、琼脂糖、纤维素等)、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(如油滴或脂质体)。

[0113] 载体可以多种方式承载所述剂, 包括共价键合(直接地或经由接头基团)以及非共价缔合。适合的共价键载体包括蛋白质如白蛋白、肽和多糖如氨基葡聚糖, 其各自具有用于连接部分的多个位点。载体还可通过非共价缔合如非共价键合或通过包封承载抗CD47剂或引物剂。出于本发明的目的, 载体的性质可以是可溶性的或不溶性的。本领域的技术人员将了解用于结合抗CD47剂和/或引物剂的其它适合的载体, 或将能够使用常规实验确定此类载体。

[0114] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者来说是无毒的, 且包括缓冲液, 如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和蛋氨酸; 防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六甲铵(hexamethonium chloride); 苯扎氯铵、苄索氯铵; 苯酚、丁醇或苄醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(小于约10个残基)多肽; 蛋白质, 如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水聚合物, 如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、双糖和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 如EDTA; 糖, 如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇; 成盐抗衡离子, 如钠离子; 金属络合物(例如, 锌-蛋白质络合物); 和/或非离子表面活性剂, 如TWEEN™、PLURONIC™或聚乙二醇(PEG)。有待用于体内施用的制剂必须无菌。这可通过经无菌过滤膜过滤来容易地实现。

[0115] 活性成分还可包埋在例如通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、胶体药物递送系统(例

如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子及纳米胶囊)中、或巨乳液(macroemulsions)中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0116] 对于放射性核素剂具有特异性的载体和接头包括放射性卤化的小分子和螯合化合物。放射性核素螯合物可由螯合化合物形成,该螯合化合物包括含有氮和硫原子作为供体原子以用于结合金属或金属氧化物、放射性核素的那些。

[0117] 在本发明中用作成像部分的放射照相部分包括具有相对大的原子如金、铟、镱、钡、铈、碘及其同位素的化合物和螯合物。优选的是较低毒性放射照相成像部分如碘或碘同位素用于本发明的方法中。此类部分可通过可接受的化学接头或螯合载体缀合至抗CD47剂或引物剂。用于在本发明中使用的正电子发射部分包括¹⁸F,其可通过与抗CD47剂或引物剂的氟化反应容易地缀合。

[0118] 通常,组合物被制备成呈液体溶液或悬浮液形式的可注射物;也可制备适于在注射之前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。如上所论述,制剂也可于脂质体或微颗粒(如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物)中乳化或包封以实现增强的佐剂作用。Langer, Science249:1527,1990和Hanes,Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119,1997。本发明的剂可以可允许活性成分持续或脉动释放的方式配制的储库注射剂或植入制剂形式施用。药物组合物通常被配制为无菌、大致上等渗并且完全遵循美国食品药品监督管理局的所有药品生产质量管理规范(GMP)条例。

[0119] 可通过细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序确定抗CD47剂和/或引物剂的毒性,例如,通过测定LD50(群体的50%致死剂量)或LD100(群体的100%致死剂量)。毒性作用与治疗作用之间的剂量比是治疗指数。可在进一步优化用于人使用的治疗剂量范围和/或引发剂量范围中使用从这些细胞培养测定和动物研究获得的数据。可由个体医师鉴于患者的病状来选择确切制剂、施用途径以及剂量。

[0120] 现在完全描述本发明,对于本领域的普通技术人员来说将清楚的是可在不脱离本发明的精神或范围的情况下做出各种变化和修改。

[0121] 实验

[0122] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何进行和使用本发明的完整公开和描述,并且不意图限制发明人所认为的本发明的范围,也不意图代表以下实验为所进行的所有或仅有的实验。已经努力确保关于所使用的数值(例如用量、温度等)的准确性,但也应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指示,否则份是重量份,分子量是重均分子量,温度是以摄氏度计,并且压力是大气压或接近大气压。

[0123] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请以引用的方式并入本文,如同每一项个别出版物或专利申请被明确地和独立地指示以引用的方式并入一样。

[0124] 已经按照由本发明人发现或者提出包含用于实践本发明的优选模式的具体实施方案对本发明进行了描述。本领域的技术人员将理解,鉴于本公开,可在不脱离本发明的意图范围的情况下在所举例说明的具体实施方案中做出多种修改和变化。例如,由于密码子冗余,可在不影响蛋白质序列的情况下在潜在DNA序列中做出变化。此外,由于生物功能等效性考虑,可在不在种类或量方面影响生物作用的情况下在蛋白质结构中做出变化。所有此类修改意图包括在所附权利要求书的范围内。

[0125] 实施例

[0126] 实施例1

[0127] 在野生型小鼠中单次注射抗CD47抗体

[0128] 将单次250μg腹膜内注射MIAP410 (IgG1同种型) 或MIAP470 (IgG2a同种型) 施用至野生型小鼠。此抗体剂量大约等于10mg/kg剂量。在抗体注射之后第1、3和6天从眼眶后血管丛 (retro-orbital plexus) 收集血液并且在HemaTrue血液分析仪上进行CBC分析。血细胞比容 (HCT) 的变化百分比和RBC值在图1中示出。所有抗CD47 mAb处理的小鼠发展贫血, 其最低值在注射后约3天出现。MIAP470引起更显著的贫血, 其可能是由于由IgG1和IgG2a同种型引起的差示FcR介导的作用。

[0129] 在CD47^{-/-}小鼠中单次注射抗CD47抗体

[0130] CD47^{-/-}小鼠获自杰克逊实验室 (Jackson Laboratory) 并且腹膜内注射250μg的对照小鼠IgG、MIAP410或MIAP470。在mAb注射之后72小时收集并分析血液。未在任何所注射的CD47^{-/-}小鼠中观察到贫血。在图2中示出血红蛋白的变化百分比。这证明野生型小鼠中所观察到的贫血是结合CD47的抗CD47抗体的直接结果。

[0131] 在野生型小鼠中多次注射抗CD47抗体

[0132] 每3天向WT小鼠给予腹膜内注射250μg的对照IgG、MIAP410或MIAP470 (由图3中的垂直虚线表示)。在每次注射之前通过CBC分析监测红细胞毒性。HCT的急性下降在第一次抗体注射后发生 (第0天)。第二次注射 (在第3天) 未导致血细胞比容的进一步下降。小鼠似乎变得对后续注射具有抗性并且最终返回至与对照IgG处理的小鼠的范围类似的范围。重复施用抗CD47抗体不会加剧初始贫血的发现是在非人灵长类中的随后实验的基础。

[0133] 实施例2

[0134] 在非人灵长类动物 (NHP) 中验证给药策略

[0135] Hu5F9-G4抗CD47抗体 (及其母体5F9) 结合人CD47, 但不结合小鼠CD47。为了鉴别适当的毒理学物种, 将猕猴 (食蟹猴) 非人灵长类动物 (NHP) CD47的序列与人CD47进行比对, 并且确定两个序列在细胞外结构域中仅含有3个氨基酸差异 (图4)。所有3个非保守氨基酸位于SIRP-α相互作用区的外部, 如已经通过已公开的X-射线晶体结构所确定。

[0136] 产生食蟹猴NHP CD47-Fc融合蛋白并且确定Hu5F9-G4确实事实上结合食蟹猴NHP CD47 (图5)。通过使用Biacore进一步进行表面等离子体共振 (SPR) 亲和力测量。结果显示Hu5F9-G4以可比得上人CD47的亲和力结合食蟹猴CD47 (图6)。

[0137] 此外, 流式细胞术和免疫荧光分别用于显示Hu5F9-G4抗体以类似于人白细胞和组织的分布结合食蟹猴NHP白细胞和正常组织。总之, 这些研究证明食蟹猴是用于安全性和毒理学研究的相关物种。

[0138] 抗CD47抗体在NHP中引起剂量依赖性贫血 (单剂量)

[0139] 使用由Lonza生产的纯化Hu5F9-G4抗体使用其专有谷氨酰胺合成酶 (GS) 表达系统进行多个NHP研究。以0.1、0.3、1、3、10或30mg/kg的单剂量施用Hu5F9-G4并且监测临床病理学参数, 包括全血计数和代谢功能检查 (metabolic panels)。在无肝或肾功能障碍的情况下观察到与网状细胞增多症和球形红细胞症相关的剂量依赖性贫血 (图7)。未检测到游离血浆血红蛋白, 从而指示不存在血管内溶血。通过测量血清水平监测药代动力学指示存在导致短的半衰期的较大抗原池 (antigen sink) (图7)。在单剂量的情况下, 仅10和30mg/kg能够瞬时实现与异种移植研究中的功效相关的范围内的血清水平。因此, 正确给药能够实

现且维持治疗有效的抗CD47剂水平,同时最小化贫血。

[0140] 抗CD47抗体的递增浓度不会加剧贫血

[0141] 推测预先施用促红细胞生成素 (EPO) 将通过刺激年轻RBC产生来使贫血减弱。根据这些考虑,基于以下假设在NHP中进行了单独的剂量递增研究:初始低剂量将使老化RBC的损失减弱并且刺激不太敏感的年轻RBC的产生,从而有助于耐受随后更大剂量(图8)。两只动物被招募至此研究中并且在一周间隔给药:一只用EPO预处理(3、10、30、100和300mg/kg),并且一只无预处理(1、3、10、30和100mg/kg)。在两种情况下,NHP表现出在初始给药情况下的轻微贫血,贫血在重复施用的情况下不会恶化。事实上,血红蛋白仅达到用于在人中输血的上限阈值,即使在无EPO预处理的情况下。动物良好耐受所有剂量,包括100和300mg/kg,无另外的血液或代谢异常。在研究结束时,将两只动物安乐死,并且尸体剖检和组织病理学分析揭示无异常。

[0142] 从此剂量递增研究确定Hu5F9-G4在NHP中的药代动力学。与由正常组织表达的CD47的较大抗原池的存在一致,初始低剂量的Hu5F9-G4以24小时的半衰期从血清快速清除(图9)。相比之下,更高剂量的Hu5F9-G4产生持续血清水平,从而指示抗原池的饱和。以300mg/kg给药的动物具有5mg/ml的峰值水平与持续接近2周的大于1mg/ml的持续水平。

[0143] 抗CD47抗体的单次负载剂量实现更高维持剂量

[0144] 这些研究证明Hu5F9-G4可按能够实现延长的治疗性血清水平的剂量施用至NHP而无主要毒性作用。为了模仿潜在的临床给药策略,使用负载-维持给药方法进行了另一个NHP研究。在此研究中,以能够刺激轻度贫血和网状细胞增多症而无3级毒性的负载剂量施用Hu5F9-G4。单剂量数据(参见上文)引导选择在第1天1或3mg/kg作为负载剂量。一周之后,施用10或30mg/kg的维持剂量,并且每周继续持续3个剂量。两种负载剂量均减轻贫血的严重程度,即使在30mg/kg维持剂量的情况下;并且未发展3级毒性。第一维持剂量之后的PK数据指示动物已经实现治疗水平。此研究表明负载-维持策略减轻贫血(从而防止3级毒性),同时实现潜在治疗药物水平。图10呈现证明与不同剂量的抗CD47剂(在此情况下hu5F9-G4抗体)相关的网状细胞增多症的水平的网织红细胞计数数据。

[0145] 实施例3

[0146] 异种移植测定中抗CD47抗体的治疗功效

[0147] 先前报道了临床前证据,即阻断抗CD47单克隆抗体(克隆B6H12,小鼠IgG1)可有效抑制实体肿瘤的生长和转移,该实体肿瘤包括乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、成胶质细胞瘤、平滑肌肉瘤以及头颈鳞状细胞癌(PMID:22451913、22451919)。抗CD47单克隆抗体还引起血液肿瘤生长的类似抑制(PMID:21177380、20813259、19632179、19632178)。现在证实人源化抗体(例如,用于以上研究中的人源化抗CD47抗体,hu5F9-G4)还是在抑制实体肿瘤生长和消除转移方面高度有效的(图11)。

[0148] 为了研究hu5F9-G4对实体肿瘤的功效,将人膀胱癌细胞系(639V)皮下移植至免疫缺陷小鼠。将携带肿瘤的小鼠用PBS或hu5F9-G4处理。由于肿瘤负担,在处理4周之后将所有PBS处理的小鼠安乐死。相比之下,未在hu5F9-G4处理组中观察到肿瘤生长(图11)。然后监测这些小鼠持续另外4周(无进一步hu5F9-G4处理)。未在已经用hu5F9-G4处理的小鼠中观察到肿瘤生长,从而指示肿瘤已经完全消除(图11A)。

[0149] 为了评价hu5F9-G4对肿瘤转移的形成的作用,将人转移性前列腺肿瘤标本皮下植

入至免疫缺陷小鼠中。在肿瘤植入之后,开始用PBS或hu5F9-G4处理。在处理6周之后,观察到淋巴结转移的数目和大小显著减少(图11B)。这些结果指示hu5F9-G4可抑制或消除肿瘤转移。

[0150] 为了证明hu5F9-G4消除已形成的转移的潜力,将原代人乳癌细胞植入至小鼠乳腺脂肪垫中。在确认肺中肿瘤转移的存在之后,切除原发性肿瘤并且开始用PBS或hu5F9-G4处理。在4周之后,在hu5F9-G4处理的小鼠中观察到肺转移生长的显著抑制(图12A)。此外,观察到脑中肿瘤转移的完全消除(图12B)。Hu5F9-G4还抑制切除的原发性肿瘤的再生长,从而指示hu5F9-G4在治疗微小残留疾病方面还是有效的(图12C)。

[0151] 在整个实验期间监测hu5F9-G4的血清浓度。100-200 μ g/ml之间的Hu5F9-G4浓度与治疗功效相关(图12AD)。这些数据证明人源化抗体(例如hu5F9-G4)具有与非人源化抗体相同的与疾病(例如,癌症或慢性感染)的治疗相关的一般特性,并且当使用人源化抗体治疗癌症和/或治疗慢性感染时,主题方法将是有效的。

[0152] 实施例4

[0153] 在食蟹猴中的先前毒理学实验中,当以10mg/kg或10mg/kg以上给药时单次注射人源化抗CD47单克隆抗体(Hu5F9-G4)产生不可接受水平的贫血($Hb > 7$ g/dL)。小于10mg/kg的Hu5F9-G4剂量不足以产生与临床前模型中的治疗功效相关的血清水平(100-200 μ g/ml)。此新的研究确定5mg/kg的单个“引发剂量”是否足以保护食蟹猴免于在否则将是毒性(并且可能致死)水平下的随后“维持剂量”(参见研究设计:图13)。

[0154] 尽管与施用Hu5F9-G4相关的贫血,未在任何动物中的临床病征中观察到毒性证据,并且因此引发/维持给药策略允许Hu5F9-G4是临床上良好耐受的,即使在高达300mg/kg的剂量下(图14)。相信施用Hu5F9-G4通过用CD47对老化RBC的立即阻断取代CD47的逐渐损失来加速消除老化RBC的过程。老化RBC的过早损失通过确保网状细胞增多症(其在所有研究中观察到)进行补偿,并且随时间推移,随着老化RBC被更年轻的细胞替代,初始贫血消退,并且因此,RBC池的年龄分布转变成更年轻的细胞。组2-4中的血清浓度(图13、图14、图15)远高于与治疗功效相关的最小100-200 μ g/ml水平。

[0155] 图13. 研究设计。将动物(最右列中的#雄性和雌性)分成5组,其中一个组不接受抗CD47抗体。组2-5中的所有动物接受引发剂量(5mg/kg)并且组2-5在其之后接受所列出的维持剂量。

[0156] 图14. 在研究的持续时间内所有组中的血红蛋白水平水平虚线表示此研究中的剂量限制性毒性($Hb < 7$)。此图上的每个点表示单只动物。在不同维持剂量水平下不存在Hb水平的统计差异。引发剂量(5mg/kg)提供针对随后剂量(无论多高)的保护。

[0157] 图15. 所有组中Hu5F9-G4的药代动力学曲线。组3-4实现远高于与功效相关的最小浓度的Hu5F9-G4的血清浓度(目标范围)。

[0158] 实施例5

[0159] 在猕猴和/或食蟹猴中进行研究,其两者均被认为是药理学上相关的动物物种(猕猴的CD47与食蟹猴的CD47共享100%序列同源性)。

[0160] 所有研究遵循美国食品药品监督管理局(FDA)良好实验室管理规范(GLP)条例(21CFR第58部分)进行。Hu5F9-G4的开发还遵循适用的ICH,专有委员会(Committee on Proprietary)和FDA指导文件。

[0161] Hu5F9-G4 (人源化抗CD47抗体)的体外溶血测定

[0162] 因为CD47在红细胞上表达并且在清除老化红细胞方面起作用,所以进行此研究以评价Hu5F9-G4是否引起人或猴(猕猴和食蟹猴)红细胞的直接血管内溶血,使用游离血红蛋白作为读出。Hu5F9-G4不会引起人或猴(猕猴和食蟹猴)红细胞的溶血。

[0163] 在体外用Hu5F9-G4刺激的人PBMC中的细胞因子产生

[0164] 此研究的目的是评价在人外周血单核细胞(PBMC)中由Hu5F9-G4对细胞因子释放的潜在诱导。在此体外研究中,将从三个单独的供体收集的培养的PBMC与Hu5F9-G4(20 μ g/mL板结合的)或非特异性人IgG4抗体(阴性对照)或抗CD3/抗CD28抗体(阳性对照)一起孵育。通过Luminex多重分析对五种不同的细胞因子,包括与细胞因子风暴(cytokine storm)相关的许多促炎细胞因子(例如,TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-6)进行了评价。在所评价的不同细胞因子之中,Hu5F9-G4未诱导人PBMC中的细胞因子释放。此外,未在任何猴研究中观察到细胞因子释放综合征的临床病征。相较于用非特异性IgG4抗体或CD3/CD28抗体处理的PBMC,用Hu5F9-G4处理人PBMC确实导致IL1-RA、MIP1b/CCL4、IL-8和ENA-78/CXCL5的水平降低。虽然CD47与这四种细胞因子之间的关系尚不清楚,但在猴研究中未观察到可与细胞因子水平的降低直接相关的任何处理相关作用的证据。

[0165] 通过1小时静脉内输注或皮下注射至食蟹猴施用的Hu5F9-G4和B6H12-G4的单剂量研究

[0166] 此研究的目的是评价通过1小时静脉内输注(IV infusion)至雄性食蟹猴作为单剂量施用的Hu5F9-G4的潜在毒性和毒理动力学。在此研究中,在第1天将Hu5F9-G4以10mg/kg的剂量施用至单只雄性猴。针对临床病征、食物消耗、体重和临床病理学参数(血液学、凝血、血液学、临床化学)的变化对猴进行评价。在研究的整个持续时间收集样品以用于毒理动力学分析;在第14天将动物返回至测试机构(testing facility)动物群(animal colony)。

[0167] 在血液学参数中观察到处理相关的变化,并且包括红细胞计数(RBC)、血红蛋白、血细胞比容的轻度至中度减少,网织红细胞计数和红细胞分布宽度的显著增加,以及白细胞、淋巴细胞和单核细胞计数的瞬时增加。还在临床化学参数中观察到被认为可能与Hu5F9-G4相关的变化,其包括乳酸脱氢酶、胆红素、AST和ALT的瞬时增加。到第14天血液学和临床化学参数的变化部分或完全返回至基线水平。

[0168] 总之,以10mg/kg单次施用Hu5F9-G4是良好耐受的,其中处理相关的发现限于血液学和临床化学参数的瞬时变化。

[0169] 通过静脉内输注施用至猕猴的研究

[0170] 进行此研究以评价当在进行食蟹猴中的研究的相同测试机构(Charles River Laboratories,Reno,NV)处施用至猕猴时Hu5F9-G4对血液学和临床化学参数的潜在作用。在此研究中,通过以3mg/kg 1小时静脉内输注将Hu5F9-G4以单剂量施用至雌性猕猴(N=2)。持续14天对动物进行评价,并且然后将其返回至机构动物群。

[0171] 施用Hu5F9-G4是良好耐受的,并且在临床病征、体重或食物消耗方面未注意到被认为与Hu5F9-G4直接相关的变化。在第7、8和14天在两只动物中观察到水样粪便,其可能与研究相关的程序而不是Hu5F9-G4的直接作用相关。此外,未在任何其它猴研究中报道水样粪便。在两只动物中在血液学参数中观察到处理相关的变化,包括RBC和血红蛋白水平的降

低;然而,这些降低到第14天恢复并且在9.4和9.1g/dL的最低值下不严重(表1)。未在任何时间点任一动物中检测到游离血浆血红蛋白。还在每只动物中观察到总胆红素的增加,但与血液学变化一致,显示对于可逆性的持续倾向直到研究结束。

[0172] 总之,Hu5F9-G4是在猕猴中良好耐受的,并且在此研究中观察到的处理相关变化与在Charles River Laboratories (Reno,NV) 进行的食蟹猴研究中注意到的发现一致。

[0173] 表1.猕猴中临床病理学参数的变化

[0174]

动物编号	研究天数	RBC (10 ⁶ /μl)	HGB (g/dL)	总胆红素 (mg/dL)	
700	研究前	6.12	13.8	0.18	
	1 (剂量后 8 小时)	5.14	11.7	1.30	
	1 (剂量后 24 小时)	4.9	11.3	1.69	
	2	4.36	10.0	0.98	
	3	4.18	9.8	0.56	
	5	4.04	9.4	0.34	
	7	4.11	9.9	0.49	
	10	4.25	10.8	0.43	
	14	4.62	11.4	0.32	
	701	研究前	5.47	12.7	0.12
		1 (剂量后 8 小时)	4.85	11.5	1.89
		1 (剂量后 24 小时)	4.65	10.8	0.77
		2	4.21	9.9	0.44
		3	4.02	9.8	0.34
5		4.01	9.6	0.33	
7		3.89*	9.1	0.41	
	10	4.15	10.4	0.41	
	14	4.9	12.7	0.23	

[0175] 施用至猕猴的Hu5F9-G4的药代动力学和耐受性研究

[0176] 此研究的初始目的是评价在植入鞘内储库的猕猴中作为1小时静脉内输注或通过鞘内施用来施用的Hu5F9-G4的药代动力学和潜在作用。然而,由于在通过1小时静脉内输注施用Hu5F9-G4的第一只猴中观察到的严重贫血,放弃了研究的剩余组成部分,包括鞘内施用阶段。在此研究中,在第0天将一只雄性猕猴通过1小时静脉内输注施用Hu5F9-G4作为3mg/kg引发剂量,接着在第15和22天施用1mg/kg维持剂量(初始研究设计中的维持剂量是在第8、15、22和29天施用的30mg/kg)。

[0177] 在施用3mg/kg引发剂量之后24小时内观察到RBC计数和血红蛋白的大幅减少(表2)。由于在此动物中观察到的贫血,未施用在第8天的第一计划的维持剂量。RBC计数和血红蛋白水平显示恢复的倾向,并且到第14天,RBC计数和血红蛋白水平已经分别返回至4.31M/μL和10.8g/dL。因此,在第14天重新给药;然而,维持剂量被减少至1mg/kg(而不是30mg/kg)。在第16天,RBC计数和血红蛋白再次开始减少,然而,到第17天,RBC计数和血红蛋白开始恢复。然后在第21天向动物施用第二维持剂量(然而,在第21天之后未收集到另外的临床病理学数据)。此外,虽然在施用第一维持剂量(在第14天)之后两天注意到血小板的减少,但血小板到第21天返回至研究前水平;此时不清楚在此动物中注意到的血小板的减少是否与Hu5F9-G4直接相关,因为未在任何其它猴研究(包括单剂量猕猴研究)中观察到此变化。

[0178] 表2.施用Hu5F9-G4的猕猴中血液学参数的变化

[0179]

研究天数	RBC (M/ μ L)	HGB (g/dL)	血小板(K/ μ L)
研究前	5.09	12.2	548
0 (剂量后 8 小时)	3.73	7.8	380
1	3.86	8.0	411
2	3.42	7.2	416
3	3.27	7.0	517
6	3.31	7.8	661
9	3.56	9.1	632
13	3.94	8.9	373
14 (剂量前)	4.31	10.8	374
15	3.87	8.3	146
16	3.95	8.2	130
17	4.19	8.5	197
20	4.01	8.7	494
21 (剂量前)	4.37	9.1	622

[0180] 通过1小时静脉内输注至食蟹猴施用的Hu5F9-G4的单剂量研究和重复剂量研究以及FD6-IgG2的单剂量研究

[0181] 在先前单剂量研究中观察到的贫血可能与作为结合在RBC上表达的CD47的结果的Hu5F9-G4的药理作用相关。随着RBC老化,它们逐渐损失CD47表达,损失来自糖蛋白和糖脂的唾液酸,并且以可能加速促吞噬信号的方式重组膜磷脂,从而导致其通过吞噬作用消除(Danon,1988)。假设施用Hu5F9-G4通过用CD47对老化RBC的立即阻断取代CD47的逐渐损失来加速老化RBC消除的过程。老化RBC的过早损失通过确保网状细胞增多症进行补偿,并且随着老化RBC被更年轻的RBC替代,初始贫血消退,并且RBC池的年龄分布转变成更年轻的细胞。基于这些考虑,进行此研究以评估i) Hu5F9-G4的初始低剂量是否可引起老化RBC的有限损失,该损失仍然足以诱导网状细胞增多症并且因此刺激敏感性较低的年轻RBC的产生且保护动物免受严重贫血;以及ii) 用红细胞生成素(EPO;一种刺激RBC产生的红细胞生成刺激剂)预处理是否可诱导敏感性较低的年轻RBC的产生,从而补偿在施用Hu5F9-G4之后老化RBC的清除。另一种抗体候选物(FD6-IgG2)在此研究中进行评价但将不在此IND中进行讨论。在此研究中,将雄性食蟹猴通过1小时静脉内输注作为1mg/kg的单剂量或3mg/kg每周一次持续4周(第1、8、15、22天)施用Hu5F9-G4。在第5天将施用每周一次剂量Hu5F9-G4的一只猴通过静脉内注射(17,000U/kg)用红细胞生成素(EPO)预处理以评估用EPO预处理是否将降低之前所观察到的Hu5F9-G4相关的贫血。此外,在第1、2、5、8、9、12、15、16、19、22、23和26天将施用每周一次剂量Hu5F9-G4的一只猴还通过静脉内注射(0.5mg/kg)施用地塞米松且通过肌肉内(IM)注射(5mg/kg)施用苯海拉明(地塞米松和苯海拉明在同时施用)以评价施用地塞米松和苯海拉明是否将降低Hu5F9-G4相关的贫血。研究设计在表3中呈现。

[0182] 表3. 施用至食蟹猴的Hu5F9-G4的单剂量和重复剂量

[0183]

组 ^A	Hu5F9-G4 (mg/kg)	Hu5F9-G4 剂量天数	地塞米松/苯海拉明剂量天数 ^B	EPO 剂量天数 ^C
1	1	1	-	-
2	3	1, 8, 15, 22	1, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 19, 22, 23, 26,	
3	3	1, 8, 15, 22	-	- 5
4	3	1,8, 15, 22	-	-

[0184] ^A组1在第31天被释放至动物群;组2和4在第31天终止并且组3在第29天终止

[0185] ^B地塞米松(静脉内注射;0.5mg/kg)和苯海拉明(肌肉内注射;5mg/kg)在Hu5F9-G4之前60分钟在第1、8、15、22天同时施用。

[0186] ^CEP0以17,000U/kg静脉内施用

[0187] 标准安全性参数(例如,临床观察结果、体重、临床病理学等)并入研究中,并且因为CD47在脑中表达(添加引用),所以进行兽医神经学检查。针对毒理动力学在贯穿研究的多个时间点收集血液。组2和3的动物在第31天终止,并且组4中的猴在第29天终止(组1中的猴被返回至测试机构动物群)。

[0188] 未发生计划外死亡并且未注意到临床病征、体重、食物消耗、兽医神经学检查、凝血或尿分析参数、器官重量或宏观或微观检查中的处理相关的变化。

[0189] 与Hu5F9-G4相关的变化限于血液学和临床化学参数中的变化。单剂量动物(组1)中的变化包括降低的红细胞质量(RBC计数、血红蛋白和血细胞比容水平)和平均红细胞体积(MCV),以及增加的平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)和红细胞分布宽度(RDW);到第2天观察到这些变化。此动物还具有稳健的网织红细胞反应,并且在血液涂片评价中观察到的RBC形态的变化包括最小至轻度球形红细胞、红细胞大小不均以及多染色性。每周一次施用Hu5F9-G4的猴中处理相关的变化包括RBC质量和MCV的降低以及MCHC的增加。这些变化到第3天注意到并且相较于单独或与地塞米松/苯海拉明一起施用Hu5F9-G4的其它猴在用EP0预处理的动物中较不显著。RBC质量的变化到第27天部分恢复(在第22天最后一次剂量之后5天),并且与相应的稳健网织红细胞反应相关。类似于单剂量猴,RBC形态的变化包括最小至中度球形红细胞、红细胞大小不均以及多染色性。未在单剂量或重复剂量Hu5F9-G4处理的猴中检测到游离血浆血红蛋白的有意义的上升。

[0190] 考虑与Hu5F9-G4施用有关的临床化学参数的变化包括增加的乳酸脱氢酶、天冬氨酸转氨酶(仅单剂量动物)、总胆红素(最小)以及减少的结合珠蛋白(仅单独Hu5F9-G4和地塞米松/苯海拉明重复剂量处理的猴)。临床化学参数的这些变化显示到研究结束时完全或部分恢复的证据。

[0191] 总之,以1mg/kg的单剂量或以3mg/kg的剂量每周一次剂量持续4周施用Hu5F9-G4(单独或与用EP0预处理一起或与施用地塞米松/苯海拉明组合)在雄性食蟹猴中是良好耐受的,并且处理相关的作用限于血液学(包括RBC形态)和临床化学参数的变化。到研究结束时注意到RBC质量和临床化学参数的变化的部分或完全恢复。

[0192] 通过静脉内输注至食蟹猴Xx施用的Hu5F9-G4或FD6单体的重复剂量研究以及FD6-IgG4的单剂量研究

[0193] 此研究的目的是评价当在5周时期内通过1小时静脉内输注以递增剂量施用至雌性食蟹猴时Hu5F9-G4的潜在毒性和毒理动力学(FD6-IgG2是在此研究中评价的另一种抗体候选物)。在此研究中,将一只猴在第5天施用EP0(17,000U/kg),接着在第1、8、15、24和31天每周一次施用多达300mg/kg的递增剂量的Hu5F9-G4;将另一只猴在第1、8、15、24和31天每周一次施用多达100mg/kg的递增剂量的Hu5F9-G4(未用EP0预处理)。标准安全性参数并入此研究中并且两只动物在第43天终止(在最后一次Hu5F9-G4剂量之后13天)。研究设计在表4中呈现。

[0194] 表4. 施用至食蟹猴的Hu5F9-G4的递增剂量

[0195]

组	雌性猴数目	Hu5F9-G4 剂量 (mg/kg)	剂量天数
1 (EPO 预处理) (在第 5 天施用的 17,000 U/mg)		3	1
		10	8
		30	15
		100	24
		300	31
		1	1
		3	8
		10	15
		30	24
		100	31

[0196] 两只动物均在研究的计划结束时存活,并且未注意到临床病征、体重、食物消耗、凝血和尿分析参数,指示肾、肝或心脏作用的临床化学参数、器官重量或宏观或微观检查中的处理相关的变化。处理相关的发现限于血液学和临床化学参数中的变化。与之前研究一致,血液学变化包括降低的RBC质量(RBC计数、血红蛋白、血细胞比容)以及增加的网织红细胞计数。其它变化包括MCHC和RDW的增加,并且还观察到MCV的降低。RBC计数和血红蛋白的减少到研究结束时返回至接近两只动物的研究前的值(表5)。在第3天开始在两只动物中观察到稳健的网织红细胞计数,其到第43天在两只动物中返回至接近研究前的值。

[0197] 表5. 血液学参数的变化

[0198]

组/动物编号	天数	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dL)	RETIC ($10^5/\mu\text{l}$)
1/1501 (EPO 预处理)	研究前	5.48	13.0	0.66
	3	4.39	10.7	6.8
	5	4.43	10.7	5.32
	13	4.28	10.8	3.0
	20	4.25	10.8	3.61
	30	4.64	11.6	2.32
	43	4.98	12.3	1.54
2/2501 (无 EPO)	研究前	5.3	12.1	0.53
	3	4.19	9.6	3.27
	5	4.47	10.3	5.86
	13	4.6	11.5	5.93
	20	4.76	11.4	4.43
	30	4.76	12.7	2.77
	43	5.74	13.2	0.80

[0199] RBC形态的变化与先前研究一致并且包括最小至显著小红细胞、红细胞大小不均、多染色性以及球形红细胞症。如所预期(基于EPO的药理作用),相较于动物编号1501,这些变化在动物编号2501(无EPO预处理)中更显著。RBC形态的变化显示到第37天部分或完全恢复(表6)。

[0200] 表6. 红细胞形态

组/动物编号	研究天数	RBC 形态和严重性			
		红细胞大小不均	小红细胞	多染色性	球形红细胞
[0201]	1/1501 (EPO 预处理)	3	1+	-	2+
		5	1+	-	2+
	2/2501 (无 EPO)	3	1+	-	1+
		5	1+	-	3+
		10	1+	-	2+
		13	3+	2+	4+
		17	3+	1+	2+
		20	1+	-	1+
		37	3+	2+	1+
		37	1+	-	-

[0202] 1+=最小;2+=轻度;3+=中度;4+=显著;-=不适用

[0203] 此外,在两只动物中观察到增加的淋巴细胞和小红细胞计数,其在约第20天最高并且对于淋巴细胞高于研究前的值2.58-3.7倍的范围且对于小红细胞计数高于研究前的值4.4-6.13倍的范围。临床化学变化包括在两只动物中观察到的减少的结合珠蛋白,其到研究结束时返回至研究前水平。对于动物编号2501(无EPO预处理)还在第13天观察到增加的胆红素。

[0204] 毒理动力学证实在两只动物中暴露于Hu5F9-G4,并且Hu5F9-G4的循环浓度通常随着剂量增加而增加。以多达100mg/kg的剂量施用Hu5F9-G4导致14小时的中值半衰期。

[0205] 总之,通过1小时静脉内输注以多达100mg/kg(无EPO预处理)或300mg/kg(EPO预处理)的剂量每周一次施用的Hu5F9-G4的递增剂量的施用通常由食蟹猴良好耐受。处理相关的变化限于血液学(包括RBC形态)和临床化学参数,其到研究结束时是部分或完全可逆的。

[0206] 通过1小时静脉内输注至雌性食蟹猴施用的Hu5F9-G4的单剂量或递增剂量研究

[0207] 基于先前研究,以较低剂量初始施用Hu5F9-G4能够随后施用在食蟹猴中耐受的更高剂量。此研究的目的是评价当作为低剂量水平的引发剂量、接着更高剂量水平的多个维持剂量施用时Hu5F9-G4的潜在毒性和毒理动力学。此外,此研究被设计来使用引发/维持给药方案模仿潜在临床给药方案。在此研究中,在第1天将雌性食蟹猴通过1小时静脉内输注施用磷酸盐缓冲盐水(PBS)或递增剂量的Hu5F9-G4(0.1至30mg/kg的范围)作为单次引发剂量(组A和H)。将组B-F中的动物在第1天施用PBS或Hu5F9-G4作为引发剂量,接着施用多个维持剂量的PBS或不同剂量水平的Hu5F9-G4。将组D(10501)和组F(12501)中的一只动物在第68天开始施用第二引发/维持剂量循环(3mg/kg的引发剂量),接着每周两次维持剂量(30mg/kg)持续2周(在第75、78、82和85天)。虽然对于动物编号10501在第1天的第一引发剂量是1mg/kg,但在第68天的第二引发剂量增加至3mg/kg以评价引发剂量水平的这种增加是否耐受(对于动物编号12501在第1和68天的引发剂量是3mg/kg)。不是具有引发/维持剂量方案,而是将组G中的动物在第1、8、15和22天以10mg/kg每周一次施用Hu5F9-G4(由于低RBC质量,未施用第15天剂量)。研究设计在表7中呈现。

[0208] 表7. 将Hu5F9-G4作为引发/维持剂量方案施用至食蟹猴

[0209]

动物编号	组	动物的数目	测试材料	剂量天数 ^A	剂量水平 (mg/kg)
1501	A	1	PBS	1	0
2501	A	1	Hu5F9-G4	1	0.1
3501	A	1	Hu5F9-G4	1	0.3
4501	A	1	Hu5F9-G4	1	1
5501	A	1	Hu5F9-G4	1	3
6501	A	1	Hu5F9-G4	1	10
7501	A	1	Hu5F9-G4	1	30
8501	B	1	PBS	1	0
				8	
				15	
				22	
				29	
				36	
				43	
				68	
				75	
				78	
				82	
				85	
9501 9502	C	2	Hu5F9-G4	1	1
				8	10
				15	
				22	10
				29	10
				36	10
10501 ^D 10502	D	2	Hu5F9-G4	43	10
				1	1
				8	30
				15	
				22	
				29	30
				36	30
				43	30
				68 ^B	3
				75 ^B	30
11501 11502	E	2	Hu5F9-G4	78 ^B	30
				82 ^B	30
				85 ^B	30
				1	3
				8	10
				15	
12501 ^D	F	2	Hu5F9-G4	22	10
				29	10
				36	10
				43	10
12501 ^D	F	2	Hu5F9-G4	1	3
				1	3

[0210]

动物编号	组	动物的数目	测试材料	剂量天数 ^A	剂量水平 (mg/kg)
12502				8	30
				15	
				22	
				29	30
				36	30
				43	30
				68 ^B	3
				75 ^B	30
				78 ^B	30
				82 ^B	30
				85 ^B	30
13501	G	1	Hu5F9-G4	1	10
				8	
				15 ^C	
				22	
14401	H	1	Hu5F9-G4	1	30

[0211] ^A在第1天施用引发剂量；在所有随后天数施用维持剂量。

[0212] ^B在第68天给药(引发剂量)、接着在第75、78、82和85天维持剂量适用于此组中的仅1只动物(组D中的动物10501和组F中的动物12501)。

[0213] ^C由于低RBC质量,动物在此天具有休药期(dose holiday)

[0214] ^D动物编号10501和12501在第120天终止且经受完整尸体剖检;所有其它动物在第120天返回至机构的动物群。

[0215] 针对临床病征、食物消耗、体重、临床病理学参数(血液学、凝血、临床化学、尿分析)的变化对所有动物进行评价。在整个研究期间收集血液样品用于毒理动力学和评价ADA反应。由于降低的RBC质量水平,对于组G中的动物(13501;10mg/kg的引发/维持剂量)休药期在第15天发生;此动物在第22天施用最后一个计划的剂量。将动物在第120天返回至测试机构群,除了动物编号10501(组D)和12501(组F),其第120天进行安乐死且经受完全尸体剖检检查;还进行器官重量和组织的微观检查。

[0216] 未发生计划外死亡,并且Hu5F9-G4的总体施用是临床上良好耐受的。考虑与Hu5F9-G4相关的发现限于血液学和临床化学参数中的变化。

[0217] 单剂量组(A和H):血液学参数

[0218] 在施用单剂量的Hu5F9-G4(组A和H)的动物中注意到血液学变化。在第3至14天期间在剂量组 $\geq 0.3\text{mg/kg}$ 中在组A(施用0.1至30mg/kg范围内的递增引发剂量)中的动物中观察到RBC质量的可变降低(对于0.1mg/kg未观察到变化)。RBC质量的降低对于0.3mg/kg在低于研究前水平多达0.73倍的范围,对于1和10mg/kg低于研究前0.63倍的范围,并且对于30mg/kg低于研究前0.53倍的范围(表8)。令人感兴趣地,对于组H中的动物RBC质量仅稍微降低至研究前水平以下,即使此动物施用了最高引发剂量(30mg/kg)。然而,这些降低表明针对组A和H评价的到最后时间点恢复的持续倾向。对于所有动物(包括对照)网织红细胞计数增加,从而指示反应性红细胞生成。此外,注意到MCHC($\geq 0.3\text{mg/kg}$)和RDW($\geq 0.1\text{mg/kg}$)的增加,其中对于MCHC增加至高于研究前的值1.2倍,并且对于RDW增加至高于研究前的值2倍。在剂量 $\geq 0.3\text{mg/kg}$ 下还注意到MCV的降低,其在低于研究前的值多达0.91倍的范围。未在任何动物中检测到游离血浆血红蛋白。淋巴细胞计数在剂量 $\geq 0.3\text{mg/kg}$ 下增加,其中值

在高于研究前的值1.19至1.86倍的范围;淋巴细胞的增加与白细胞计数一致,其在高于研究前多达2.5倍的范围。在第6和10天评价RBC形态的变化,并且在剂量 $\geq 0.1\text{mg/kg}$ 下注意到;这些变化在更高剂量(0.3至30mg/kg)的情况下严重性增加并且包括最小至显著巨红细胞、小红细胞、红细胞大小不均、多染色性以及球形红细胞症。

[0219] 表8.施用单个引发剂量的Hu5F9-G4(组A和H)的动物的血液学参数的变化

动物编号 (Hu5F9-G4 的剂量)	研究天数	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dL)
组 A			
1501 (对照)	研究前	5.87	13.5
	3	5.46	12.6
	6	5.20	12.0
	14	5.63	13.0
	42	5.55	13.1
2501 (0.1 mg/kg)	研究前	5.62	13.9
	3	5.07	12.5
	6	4.67	11.6
	14	5.27	13.1
	42	5.82	14.4
3501 (0.3 mg/kg)	研究前	5.58	12.8
	3	4.92	11.2
	6	4.44	10.4
	14	5.20	12.1
	42	5.88	13.5
4501 (1 mg/kg)	研究前	5.31	13.8
	3	3.75	9.7
	6	3.65	9.6
	14	4.39	11.5
	42	5.51	14.3
5501 (3 mg/kg)	研究前	5.64	13.0
	3	4.68	11.0
	6	4.05	9.9
	14	4.44	11.6
	42	5.56	13.8
6501 (10 mg/kg)	研究前	6.24	14.2
	3	5.01	11.2
	6	4.14	9.7
	14	5.24	12.1
	42	6.25	14.4
7501 (30 mg/kg)	研究前	5.22	12.5
	3	4.69	11.2
	6	3.02	7.3
	14	3.98	9.9
	42	5.37	12.8

组 H			
14501 (30 mg/kg)	研究前	5.99	13.9
	3	4.9	11.2
	6	4.76	11.3
	14	4.87	11.8
	42	5.77	14.0

[0222] 引发/维持组(B-F)和每周一次给药(组G):血液学参数

[0223] 在于第1天施用引发剂量、接着重复维持剂量的Hu5F9-G4 (组B-F) 和每周一次HuF59-G4 (组G) 的动物中观察到的血液学变化与在单剂量动物 (组A和H) 中观察到的那些一致。在施用引发剂量 $\geq 1\text{mg/kg}$ 和维持剂量 $\geq 10\text{mg/kg}$ 的组中观察到RBC质量 (RBC计数、血红蛋白、血细胞比容) 的可变降低 (表9-10)。RBC质量的这些降低倾向于在较早时间点 (第5、8、12天) 更大。此外,相较于施用引发/维持剂量方案的其它动物,对于每周一次施用 10mg/kg 的动物 (动物编号13501;组G) 来说RBC质量的降低更大。令人感兴趣的是,虽然动物编号10501 (组D) 的血红蛋白水平在第1天 1mg/kg 的第一引发剂量之后降低,但血红蛋白水平在第68天第二更高引发剂量之后或在第75、78、82和85天维持剂量的第二循环之后未下降 (表9-10)。另外,施用第二引发/维持循环的另一动物 (编号12501;组F) 的血红蛋白水平在第二循环期间保持在研究前水平。这些数据指示通过低于 10mg/kg 的引发剂量产生的贫血相较于引发剂量 $\geq 10\text{mg/kg}$ 严重性更低,并且更低引发剂量允许由食蟹猴耐受的Hu5F9-G4的持续维持给药。此外,这些数据表明引发/维持给药方案不会产生与在每周一次剂量方案 (组G) 的情况下观察到的贫血一样严重的贫血。对于所有引发/维持组,存在RBC质量的恢复的倾向直到研究结束。动物13501 (组G, 10mg/kg 每周一次) 由于低RBC质量 (在第12天血红蛋白水平是 6.5g/dL) 在第15天具有休药期。然而,血红蛋白水平在第19天开始恢复,并且因此对于此动物重新给药,在第22天向其施用最后一个剂量 (表9-10)。动物编号13501的血红蛋白水平稳定地维持在朝向恢复的倾向,并且到最后时间点 (第71天) 返回至稍微高于研究前水平。对于所有组 (B-F, 包括对照组) 网织红细胞计数增加,其指示反应性红细胞生成。MCHC和RDW在引发/维持剂量 $\geq 1/10\text{mg/kg}$ 下可变地增加,其中对于MCHC值在高于研究前多达1.21倍的范围并且对于RDW在高于研究前多达2.41倍的范围。还观察到MCV的可变降低 (高于研究前多达0.90倍)。与RBC质量的变化类似,相较于施用引发/维持剂量方案的其它动物,在MCHC、RDW和MCV中观察到的变化在每周一次施用 10mg/kg 的动物编号13501 (组G) 中更显著。MCHC、RDW和MCV的变化显示对于恢复至或接近研究前水平的持续倾向,从而指示这些变化是可逆的。重要的是,未在任何动物中观察到游离血浆血红蛋白。还观察到RBC形态的变化 (与血液学参数的变化一致), 并且包括红细胞大小不均、巨红细胞、小红细胞 (在 $3/30\text{mg/kg}$ 的引发/维持剂量下未观察到)、多染色性以及球形红细胞。总体上,这些变化的发生和严重性不是以剂量依赖性方式发生,并且基于所评价的时间点,显示到研究结束时部分或完全恢复的倾向。淋巴细胞计数也在引发/维持剂量 $\geq 1/10\text{mg/kg}$ 下增加,在高于研究前的值1.25至2.01倍的范围,并且与其它参数一致,总体上显示对于恢复的倾向。

[0224] 表9. 对于施用引发/维持给药的动物 (组B-F) 血液学参数的变化

[0225]

动物编号(引发/维持剂量)	研究天数	RBC (10 ⁶ /μl)	HGB (g/dL)	RETIC (10 ⁹ /L)
组 B				
8501 (对照)	研究前	6.01	14.1	102.2
	5	5.31	12.7	98.7
	12	5.55	13.1	169.0
	22	5.35	12.6	228.8
	43	5.54	13.0	181.5
	64	5.65	13.5	155.1
组 C				
9502 (1/10 mg/kg)	研究前	5.73	13.3	51.8
	5	4.08	9.8	337.7
	12	3.18	8.4	438.2
	22	3.88	10.5	602.9
	43	5.05	12.3	92.6
	64	5.40	13.0	54.8
组 D				
10501 (1 和 3/30 mg/kg)	研究前	5.53	13.5	42.2
	5	3.91	9.9	239.0
	12	3.18	8.8	479.1
	22	4.11	11.5	395.5
	42	4.39	11.7	317.4
	64	4.86	12.8	143.3
	68	5.03	13.2	158.9
	78	4.61	12.2	290.7
	88	4.37	12.0	362.8
	106	4.62	12.1	336.5
10502 (1/30 mg/kg)	研究前	5.95	13.6	44.1
	5	4.44	10.0	195.2
	12	4.09	9.3	246.3
	22	3.86	9.7	683.2
	42	5.12	11.9	169.8
	64	5.60	13.0	122.5
组 E				
11501 (1/10 mg/kg)	研究前	5.36	12.0	50.9
	5	3.80	8.5	171.9
	12	3.84	8.8	381.8
	22	4.69	10.8	314.5
	42	5.17	11.2	115.3
	64	5.37	11.9	56.2
11502 (1/10 mg/kg)	研究前	5.85	14.2	94.4
	5	4.42	10.8	234.0
	12	4.21	10.7	812.8
	22	4.77	11.8	497.6
	42	5.02	11.8	157.7
	64	5.84	14.2	127.3
组 F				
12501 (3 和 3/30 mg/kg)	研究前	5.54	13.0	61.9

[0226]

	5	4.46	10.7	202.6
	12	4.32	10.8	330.0
	22	4.97	11.6	212.3
	42	4.72	11.5	151.5
	64	5.33	12.8	135.0
	68	5.75	13.5	112.0
	78	5.30	12.9	134.3
	88	5.03	12.3	164.1
	106	5.40	13.1	174.1
12502 (3/30 mg/kg)	研究前	5.26	12.6	62.9
	5	4.09	10.0	181.3
	12	4.07	10.1	222.2
	22	4.53	11.1	275.7
	42	4.75	11.2	196.2
	64	5.04	12.6	115.0

[0227] 表10. 对于每周一次施用10mg/kg Hu5F9-G4的动物编号13501 (组G) 血液学参数的变化

[0228]

组/动物编号	研究天数	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	RETIC ($10^9/\text{L}$)
组 G/13501 ^A	研究前			
	5	3.70	8.6	217.6
	12	2.73	6.5	196.3
	19	3.63	9.1	312.7
	22	4.19	10.3	230.1
	40	5.48	13.1	101.3
	50	5.37	12.8	82.1
	71	6.01	13.8	75.8

[0229] ^A休药期在第15天发生

[0230] 单剂量组 (A和H) : 临床化学参数

[0231] 在单剂量动物 (组A和H) 中, 在剂量 $\geq 1\text{mg/kg}$ 下注意到总胆红素的增加, 其中增加在第6天发生并且在高于研究前的值1.56至3.29倍的范围内; 总胆红素的增加不以剂量依赖性方式发生且显示恢复的倾向。在第6天施用30mg/kg (动物14501; 组H) 的单只动物中注意到ALT和AST的增加, 但这些增加显示到最后时间点恢复的倾向。结合珠蛋白在剂量 $\geq 0.1\text{mg/kg}$ 下减少, 然而, 对于所有动物结合珠蛋白在3至4个时间点处低于检测水平, 包括在第42天两只Hu5F9-G4处理的动物和一只PBS对照动物的研究前。因此, 结合珠蛋白的减少被认为对此研究中Hu5F9-G4的单剂量施用具有不确定关系。

[0232] 引发/维持组 (B-F) 和每周一次给药 (组G) : 临床化学参数

[0233] 与单剂量组类似, 总胆红素在施用引发/维持剂量方案的所有组中增加; 然而, 总胆红素的水平在整个研究中保持低于1mg/dL (表11)。总胆红素的增加显示在研究结束时恢复的倾向。对于所有组结合珠蛋白水平降低, 其显示在研究结束时恢复的倾向 (表11)。ALT、AST和LDH中偶发的变化在研究过程期间在一些时间点在几只动物中发生; 然而, 这些变化在正常限值内 (基于测试机构的历史数据库), 在研究周期期间仅在第1或2天发生, 并且在本质上是瞬时的。

[0234] 表11. 引发/维持 (组B-F) 和每周一次给药 (组G) : 临床化学参数

[0235]

组/动物编号(剂量)	研究天数	总血红蛋白(mg/dL)	结合珠蛋白(g/L)
组 B			
8501 (对照)	研究前	0.23	0.48
	5	0.31	0.46
	12	0.23	0.92
	26	0.22	0.70
	40	0.21	0.66
	78	0.13	0.61
组 C			
9502 (1/10 mg/kg)	研究前	0.17	0.30
	5	0.28	0.15
	12	0.72	0.15
	26	0.20	0.15
	57	0.18	0.34
组 D			
10501 (1 和 3/30 mg/kg)	研究前	0.28	0.40
	5	0.25	0.15
	12	0.53	0.15
	26	0.35	0.15
	47	0.32	0.15
	68	0.21	0.15
	106	0.38	0.15
10502 (1/30 mg/kg)	研究前	0.22	0.95
	5	0.22	0.94
	12	0.34	0.15
	26	0.21	0.15
	57	0.16	0.41
	5	0.22	0.94
组 E			
11501 (1/10 mg/kg)	研究前	0.23	0.36
	5	0.28	0.34
	26	0.22	0.55
	40	0.17	0.69
	57	0.22	0.41
11502 (1/10 mg/kg)	研究前	0.12	0.61
	5	0.18	0.15
	12	0.33	0.15
	26	0.20	0.44
	40	0.13	1.81
	57	0.12	0.60
组 F			
12501 (3 和 3/30 mg/kg)	研究前	0.39	0.35
	5	0.38	0.30
	12	0.52	0.15
	26	0.27	0.15
	47	0.25	0.33

[0236]

组/动物编号(剂量)	研究天数	总血红蛋白(mg/dL)	结合珠蛋白(g/L)
	68	0.25	0.15
	106	0.34	0.15
12502 (3/30 mg/kg)	研究前	0.20	0.32
	5	0.39	0.31
	12	0.54	0.34
	26	0.37	0.15
	40	0.29	0.34
	57	0.25	0.15
组 G			
13501 (10 mg/kg 每周一次)	研究前	0.15	0.90
	5	0.56	0.15
	26	0.19	0.61
	40	0.12	0.73
	71	0.12	0.79

[0237] 将动物编号10501 (组D) 和12501 (组F) 在第120天进行安乐死且经受完全尸体剖检检查;还进行器官重量和组织的微观检查。虽然在动物编号10501的延髓内注意到特征在于伴随吞噬细胞和单核细胞浸润的轴突变性的白质变性的单个最小病灶,但由于该发现的最小本质和经受微观检查的动物的较少数目 (2), 未知此发现是偶然的还是与Hu5F9-G4相关。重要的是,未在关键的GLP 8周毒理学研究中注意到此发现,其指示此发现可能在本质上是偶然的。

[0238] 毒理动力学显示对于以 $\leq 0.3\text{mg/kg}$ 的剂量施用单剂量的Hu5F9-G4的组未获得可测量浓度的Hu5F9-G4。 C_{\max} 和 AUC_{0-1} 通常随着剂量增加而增加,并且 C_{\max} 的增加似乎大于对于剂量 $\geq 1\text{mg/kg}$ 成比例的剂量。 AUC_{0-t} 的增加也不与剂量成比例。对于10和30mg/kg剂量水平 $T_{1/2}$ 分别是10.7至46.5小时,并且表明 $T_{1/2}$ 可随剂量的增加而增加。

[0239] 对于在1或3mg/kg (在第1或68天) 的引发剂量和重复施用10或30mg/kg之后施用重复剂量的组,平均 C_{\max} 从第1天至第8天增加; C_{\max} 的这种增加大于从第1天至第8天成比例的剂量。在1 (第1天) 或3 (第68天) mg/kg的引发剂量和维持给药30mg/kg之后,平均 C_{\max} 从第1天至第8天增加; C_{\max} 的这种增加大于从第1天至第8天成比例的剂量。半衰期在10.8至173小时的范围内。一些动物具有低于预期血清浓度的Hu5F9-G4,这表明ADA的存在。

[0240] 总之,作为多达30mg/kg的单个引发剂量或作为多达3/30mg/kg的引发/维持剂量持续多达2个引发/维持剂量方案施用Hu5F9-G4在食蟹猴中是临床上良好耐受的。虽然以10mg/kg每周一次施用Hu5F9-G4是临床上良好耐受的,但由于低RBC质量,休药期是在第15天必要的;然而,血红蛋白水平显示在第19天对于恢复的倾向,并且因此对于此动物重新给药。处理相关的变化限于血液学 (包括RBC形态) 和临床化学参数中的改变。RBC质量的降低与先前研究一致,并且RBC计数和血红蛋白的减少可能与Hu5F9-G4通过结合老化RBC上的CD47且加速其清除的假定药理作用相关。据信老化RBC的这种清除导致初始贫血以及在早期时间点观察到的补偿网状细胞增多症用更年轻的RBC替代老化的RBC。血液学和临床化学参数的所有处理相关的变化显示到研究结束时对于部分或完全恢复的倾向,从而指示Hu5F9-G4的这些作用是可逆的。重要地,数据证明通过引发/维持剂量方案诱导的贫血不与用每周一次给药一样严重,并且引发剂量 $\leq 10\text{mg/kg}$ 是更好耐受的。如此,其中引发剂量 $\leq 10\text{mg/kg}$ 的引发/剂量方案用于随后研究中。

[0241] 在静脉内输注施用至食蟹猴之后Hu5F9-G4的药代动力学

[0242] 此研究的目的是评价当以未在先前研究中评价的剂量水平通过1小时静脉内输注作为引发/维持剂量方案施用Hu5F9-G4的潜在毒性和毒理动力学。在此研究中,在第1天以5mg/kg作为引发剂量将Hu5F9-G4施用至雄性食蟹猴,接着在第8、11、15、18、22和25天以150mg/kg施用每周两次维持剂量。研究设计在表12中呈现。

[0243] 表12. 食蟹猴中Hu5F9-G4的引发/维持引发和维持给药

[0244]

组	雄性猴数目	Hu5F9-G4 引发剂量 (mg/kg)	剂量天数 引发剂量	Hu5F9-G4 维持剂量 (mg/kg)	剂量天数 维持剂量
1	2	5	1	150	8, 11, 15, 18, 22, 25

[0245] 将动物针对临床病征、体重、血液学、凝血和临床化学参数(收集直到第77天)的变化进行评价;还收集血液样品以使用流式细胞术评价受体占据,然而数据未呈现在此IND中。在整个研究期间直到第149天收集样品以用于毒理动力学和评估ADA反应。在研究结束时将两只动物返回至测试机构动物群。

[0246] 两只动物均在研究的计划结束时存活,并且未注意到临床病征、食物消耗或体重的处理相关作用的证据。在两只动物中观察到处理相关的发现并且包括血液学和临床化学参数中的变化。与先前研究一致,在第5天(在5mg/kg引发剂量之后4天)在两只动物中均注意到轻度贫血。在第8天(动物1036)和第11天(动物1037)开始在两只动物中观察到RBC计数的显著减少。在第18天,在动物1036中观察到RBC返回至正常水平的倾向;然而,动物1037继续显示RBC计数的显著减少(表13)。RBC计数的减少与两只动物的网织红细胞的显著增加一致(表13)。与RBC计数类似,对于动物1036观察到网织红细胞返回至正常水平的倾向;然而,对于动物1037网织红细胞继续增加。此外,血红蛋白水平在动物1037中显著降低(开始于第15天)。动物1036的血红蛋白水也降低,然而,在此动物中观察到的降低不与动物1037一样显著,并且在研究期间保持高于10.0g/dL,除了在第11天,其中血红蛋白稍微下降至低于10.0g/dL(表13)。未在一动物中观察到游离血浆血红蛋白。由于严重贫血,对于动物1037在第15天停止给药。对于此动物未重新给药以评估贫血是否将恢复;因此,动物编号1037未在第18、22和25天给药。因为对于动物1036血红蛋白水平在研究的大部分期间保持高于10.0g/dL,所以继续按计划给药。尽管贫血,但在任一动物中未观察到指示毒性的临床病征。此外,未观察到其它临床病理学参数(包括白细胞计数、血小板或肌酸酐水平)的主要变化。在第22天由助理兽医师对两只动物进行检查,特别注意脾的触诊;脾的触诊揭示任一动物中无异常。

[0247] 表13. 血液学参数的变化

[0248]

动物编号	研究天数	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dL)	RETIC ($10^9/\text{L}$)
1036	研究前	5.87	13.8	75.4
	5	4.24	10.4	234.6
	8	3.92*	10.0	984.3
	11	3.75*	9.8	847.7
	15	3.94*	10.3	557.5
	18	4.3	10.8	542.1
	22	4.45	11.6	414.5
	25	4.51	11.5	329.4
	29	4.59	11.7	374.2
	48	5.07	12.9	236.1
	77	5.25	13.5	258.6
1037	研究前	6.47	14.3	51.4
	5	4.85	11.1	232
	8	4.13	10.0	937.1
	11	3.24*	8.0	612.9
	15	2.23*	5.5*	670.3
	18	1.86*	4.7*	749.7
	22	1.95*	5.1*	1076
	25	2.02*	5.7*	1043
	29	2.32*	6.6*	1085
	48	4.71	11.9	1106
	77	6.31	14.9	505.7

[0249] *基于测试机构的历史数据库,显著在食蟹猴中此参数的正常范围之外的值

[0250] 直至第29天在动物1037中RBC和血红蛋白水平保持显著降低并且网织红细胞保持显著升高(与研究前相比)。然而,到第48天,RBC、血红蛋白和网织红细胞开始恢复,并且到第77天,这些参数返回至研究前水平。另外,在动物1036中观察到的这些血液学参数的变化在第22天开始恢复,并且到第77天返回至研究前水平。因此,虽然动物1037似乎对于与施用Hu5F9-G4相关的贫血更敏感,但终止给药(在第15天)显示随时间推移,贫血是可逆的。还在两只动物中观察到RBC形态的变化且与先前研究一致,包括最小至显著红细胞大小不均、小红细胞、多染色性以及球形红细胞。

[0251] 毒理动力学显示血清Hu5F9-G4浓度从第1天至第15天剂量后4小时在两只动物之间类似(动物1037的休药期开始于第15天)。两只猴的 $T_{1/2}$ 在173至212小时的范围内。

[0252] 总之,此研究中的处理相关作用与先前研究一致,并且包括血液学和临床化学参数的变化。所有这些处理相关变化,包括在动物1037中观察到的严重贫血是可逆的,并且到研究结束时返回至正常范围。此外,尽管所观察到的贫血,但在任一动物中未观察到毒性的临床病征。

[0253] 食蟹猴中通过静脉内输注的Hu5F9-G4的8周毒性研究与8周恢复期

[0254] 此GLP研究的目的是当作为引发剂量、接着重复维持剂量施用至食蟹猴时评价Hu5F9-G4的潜在毒性和毒理动力学。由于在先前研究中在动物编号1037中观察到的5/150mg/kg的引发/维持剂量情况下的严重贫血,因此在此研究中使用的引发和最高维持剂量是5/100mg/kg以为临床研究中建议的剂量提供合理的安全性界限。在第1天以5mg/kg作为引发剂量通过1小时静脉内输注施用媒介物或Hu5F9-G4(5mg/kg),接着每周两次持续连续7周施用的5、10、50或100mg/kg剂量的媒介物或Hu5F9-G4的维持剂量(第8、11、15、18、22、

25、29、32、36、39、43、46、50以及53天)。对于组5的引发和维持剂量采用相同的剂量水平(5mg/kg)。恢复动物包括在媒介物和高剂量组中以评估任何处理相关作用的可逆性。研究设计在表14中呈现。

[0255] 表14. 食蟹猴中的8周毒理学研究

组	剂量 ^A (mg/kg)		雄性/雌性数目	雄性/雌性数目
	引发	维持		
1	0 (媒介物)	0 (媒介物)	3/3	2/2
2	5	10	3/3	-
3	5	50	3/3	2/2
4	5	100	3/3	2/2
5	5	5	2/2	

[0257] ^A在第1天施用引发剂量,并且每周两次在第8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、43、46、50和53天施用维持剂量。

[0258] 安全药理学参数并入此研究中并且包括呼吸功能评估(视觉呼吸速率、心血管功能(ECG)以及指示对中枢神经系统功能的作用的临床病征的变化(例如活动、行为)。在整个研究期间收集血液样品以用于毒理动力学和评估ADA反应,以及评价CD47的受体占据。在整个持续时间,基于来自先前研究的数据对临床病理学样品进行评价以评估特异性参数(例如,血红蛋白、RBC、网织红细胞)。在两只动物(动物编号3002;组3,引发/维持剂量5/50mg/kg;动物编号4504;组4,引发/维持剂量5/100mg/kg)中观察到严重贫血,并且将这些动物置于休药期以评价贫血的恢复和一旦重新给药,动物如何反应。动物编号3002对于维持剂量6-9(第25、29、32和36天)具有休药期,并且在第39天重新给药(维持剂量10)。将动物编号4504在第25天(剂量6)置于休药期,并且继续休药期直到剂量周期结束。主要研究动物在第57天终止并且恢复动物在第109天终止。研究的存活部分是完整的,并且可获得主要研究动物的所有数据,包括组织病理学。来自恢复动物的数据将在可获得时提交。

[0259] 在此研究中未发生计划外死亡,并且Hu5F9-G4的施用是临床上良好耐受的。未观察到临床病征、体重、物理和眼科检查、体温、ECG、呼吸或心率、凝血或尿分析参数、器官重量或宏观和微观检查中的处理相关作用。

[0260] 与先前先导研究一致,在所有Hu5F9-G4处理组中观察到血液学参数的处理相关变化并且包括红细胞质量(包括RBC计数、血红蛋白和血细胞比容)的轻度至中度降低,其第1天引发剂量之后最显著;血液学参数的这些变化显示到给药阶段结束时对于恢复的持续倾向(关于血红蛋白水平的变化参见表15)。虽然在所有Hu5F9-G4处理组中观察到RBC计数、血红蛋白和血细胞比容的减少,但这些变化不以明显剂量依赖性方式发生。在所有Hu5F9-G4处理组中观察到网织红细胞的增加,指示与RBC质量的降低相关的稳健红细胞生成反应。与先前研究一致,降低的红细胞质量与MCV和结合珠蛋白的减少以及MCHC、网织红细胞和RDW的增加相关。未在任何剂量组中观察到游离血浆血红蛋白。还观察到淋巴细胞的最小至轻度增加,但这些增加在本质上是瞬时且偶发的并且不以剂量依赖性方式发生。在第8天观察到血小板的最小至轻度增加(对于大多数组,其是相较于对照统计上显著的),但到第11

天在大多数组中开始返回至对照值。血小板的这种增加被认为是对加速的红细胞生成的反应性血小板生成和生理反应,其是通过网织红细胞的同时增加明显的。血液学参数的所有这些处理相关的变化到给药期结束时是部分或完全可逆的。

[0261] 表15. 血红蛋白水平的变化

动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
组 1 (媒介物对照)		
1001	研究前	13.3
	3	12.3
	8	13.8
	11	12.0
	15	12.5
	25	12.5
	39	13.2
	57	12.4
1002	研究前	13.8
	3	12.8
	8	13.6
	11	12.5
	15	12.9
	25	12.6
	39	13.1
	57	12.6
1003	研究前	13.8
	3	13.1
	8	13.5

[0262]

[0263]

动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
	11	12.7
	15	13.0
	25	13.4
	39	13.2
	57	13.0
1104	研究前	14.6
	3	14.8
	8	14.9
	11	13.7
	15	13.8
	25	14.1
	39	13.8
	57	12.4
	74	13.8
	109	14.7
1005	研究前	14.8
	3	13.0
	8	13.9
	11	11.9
	15	12.4
	25	13.0
	39	13.1
	57	12.0
	74	12.6
	109	13.6
1501	研究前	12.9
	3	11.7
	8	12.3
	11	11.4
	15	11.6
	25	11.9
	39	11.9
	57	11.5
1502	研究前	13.0
	3	11.9
	8	12.5
	11	11.7
	15	11.8
	25	12.4
	39	12.2
	57	13.4
1603	研究前	13.7
	3	12.3
	8	12.7
	11	11.2
	15	12.4
	25	12.3
	39	11.5
	57	10.6
1504	研究前	15.1
	3	13.5
	8	13.8
	11	13.0
	15	12.9
	25	12.6

[0264]

动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
	39	13.1
	57	12.7
	74	13.1
	109	13.8
1505	研究前	13.6
	3	12.5
	8	13.3
	11	13.1
	15	12.6
	25	12.8
	39	12.9
	57	9.9
	74	12.6
	109	13.1
组 2 (5/10 mg/kg)		
2001	研究前	14.1
	3	12.6
	8	12.5
	11	11.4
	15	12.4
	25	12.6
	39	12.7
2002	研究前	15.9
	3	12.1
	8	11.8
	11	10.8
	15	11.6
	25	13.5
	39	13.8
2003	研究前	14.1
	3	11.5
	8	11.2
	11	9.8
	15	10.1
	25	11.9
	39	12.7
2501	研究前	13.7
	3	11.3
	8	10.7
	11	8.8
	15	8.9
	25	11.4
	39	13.0
2502	研究前	13.0
	3	10.4
	8	10.2
	11	9.1
	15	10.1
	25	10.5
	39	11.4
	57	9.9

[0265]

动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
2503	研究前	14.3
	3	12.0
	8	12.1
	11	9.9
	15	10.0
	25	11.5
	39	13.0
	57	12.1
组 3 (5/50 mg/kg)		
3001	研究前	14.9
	3	12.8
	8	12.1
	11	11.2
	15	11.7
	25	13.2
	39	14.1
	57	13.2
3003	研究前	13.9
	3	10.8
	8	11.3
	11	10.1
	15	10.0
	25	12.4
	39	13.4
	57	12.0
3104	研究前	14.6
	3	13.0
	8	13.7
	11	12.3
	15	11.8
	25	12.7
	39	13.4
	57	12.3
	74	13.0
	109	13.8
3005	研究前	14.6
	3	12.1
	8	13.0
	11	11.9
	15	12.1
	25	13.3
	39	13.6
	57	12.5
	74	13.1
	109	12.5
3601	研究前	15.0
	3	11.4
	8	12.0
	11	10.2
	15	10.9
	25	11.6
	39	11.8
	57	10.4
	74	12.0
	109	14.1

[0266]

动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
3602	研究前	13.2
	3	10.9
	8	10.3
	11	8.7
	15	8.8
	25	11.2
	39	12.2
	50	8.1
	57	7.0
	67	8.8
	74	10.9
	109	13.4
3503	研究前	13.0
	3	10.4
	8	10.1
	11	9.0
	15	8.5
	25	10.2
	39	11.0
	57	10.1
3504	研究前	12.8
	3	10.9
	8	11.9
	11	10.5
	15	10.6
	25	10.7
	39	10.8
	57	11.0
3505	研究前	13.4
	3	11.0
	8	11.1
	11	10.2
	15	10.8
	25	11.1
	39	12.0
	57	11.4
组 4 (5/100 mg/kg)		
4001	研究前	13.5
	3	10.5
	8	9.8
	11	8.9
	15	9.3
	25	10.0
	39	12.1
	57	11.5
4102	研究前	13.5
	3	10.7
	8	9.5
	11	9.2
	15	10.0
	25	11.4
	39	11.3
	57	11.4
4103	研究前	14.8

[0267]

动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
	3	11.3
	8	10.4
	11	9.5
	15	10.2
	25	12.0
	39	13.5
	57	12.4
4004	研究前	13.8
	3	10.9
	8	10.0
	11	9.1
	15	9.8
	25	12.4
	39	12.8
	57	11.9
	74	12.4
	109	12.5
4005	研究前	14.2
	3	11.6
	8	11.4
	11	9.6
	15	8.8
	25	11.1
	39	12.4
	57	11.1
	74	12.2
	109	12.7
4501	研究前	13.0
	3	9.7
	8	10.4
	11	8.4
	15	8.4
	25	8.8
	39	10.4
	57	10.4
4502	研究前	13.5
	3	11.7
	8	11.8
	11	9.7
	15	11.0
	25	11.9
	39	12.9
	57	12.3
4503	研究前	13.6
	3	11.4
	8	12.1
	11	11.0
	15	10.6
	25	13.0
	39	13.5
	57	13.2
4505	研究前	13.3
	3	11.5
	8	11.3
	11	9.8

[0268]

动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
	15	9.1
	25	10.2
	39	11.2
	57	11.0
组 5 (5/5 mg/kg)		
5001	研究前	14.4
	3	12.2
	8	11.9
	11	11.7
	15	12.4
	25	13.1
	39	14.5
	57	13.3
5002	研究前	14.3
	3	12.4
	8	11.9
	11	11.5
	15	11.7
	25	12.2
	39	12.8
	57	12.8
5501	研究前	13.9
	3	10.7
	8	10.7
	11	9.8
	15	10.1
	25	11.7
	39	13.6
	57	12.0
5502	研究前	14.0
	3	11.4
	8	10.9
	11	10.6
	15	10.9
	25	12.4
	39	12.9
	57	12.0

[0269] 虽然在第1天施用引发剂量之后血红蛋白在所有Hu5F9-G4处理的动物中减少,但血红蛋白的减少通常在第8天施用第一维持剂量之后最显著(参见表16中的第11天血红蛋白水平)。血红蛋白减少的程度在动物之间变化,在第11天具有 ≤ 10.0 g/dL的血红蛋白水平的动物的发生率对于组2 (2/10mg/kg)、组3 (5/50mg/kg)、组4 (5/100mg/kg) 和组5 (5/5mg/kg) 分别是67%、30%、90%和50%。虽然贫血(在第11天)在组2、3或5之间不以明显剂量依赖性方式发生,但组4具有最高数目的具有 ≤ 10.0 g/dL的血红蛋白水平的动物。总体上,在动物之间观察到血红蛋白的恢复的持续倾向,在约第15至32天开始且持续直到研究结束。然而,在接近研究结束时注意到一个例外,其中动物编号3602在第46天在施用第11个维持剂量之后具有血红蛋白的另一次明显减少(在第55和57天血红蛋白降低至7.0g/dL;表16)。然而,动物编号3602的血红蛋白水平开始在第60天(在最后一个维持剂量之后7天)恢复,并且到第109天研究结束时返回至研究前水平(13.4g/dL)。由于所观察到的严重贫血,将两只动物(动物编号3002;组3,引发/维持剂量5/50mg/kg;动物编号4504;组4,引发/维持剂量5/100mg/kg)置于休药期以评价贫血的恢复和一旦重新给药,动物如何反应。动物编号3002显

示更严重的贫血(在第15和18天低至5.7g/dL)并且对于维持剂量6-9(第25、29、32和36天)具有休药期;在第39天重新给药(维持剂量10)。将动物编号4504在第25天(剂量6)置于休药期,并且继续休药期直到剂量周期结束(参见表16以观察血红蛋白水平的变化)。在动物编号3002中注意到的RBC计数、血红蛋白和网织红细胞的变化在第36天开始恢复,并且持续恢复直到在第57天研究结束。同样,动物编号4504中的血液学变化开始恢复,并且显示恢复的持续倾向直到研究结束(第109天;此动物处于恢复组中)。因此,虽然看起来较低数目的动物可能对由Hu5F9-G4产生的贫血尤其敏感,但贫血是瞬时的且血红蛋白水平随时间推移恢复。

[0270] 表16. 置于休药期的动物的血液学参数

组/动物编号	研究天数	HGB (g/dL)
3/3002 ^A	研究前	14.4
	3	10.8
	8	9.6
	11	6.9
	15	*5.7
	18	*5.7
	25	*5.9
	36	12.2
	46	10.3
	57	11.0
4/4504 ^B	研究前	13.7
	3	11.2
	8	11.7
	11	9.6
	15	7.3
	18	*6.9
	25	7.1
	36	7.2
	46	8.4
	57	11.0
	74	12.9
	109	13.0

[0272] ^A在第25天将动物编号3002置于休药期且在第39天重新给药;主要研究动物且在第57天终止

[0273] ^B在第25天将动物4504置于休药期且保持休药期直到研究结束;恢复动物且在第109天终止

[0274] *基于测试机构的历史数据库显著低于食蟹猴的正常范围

[0275] 血细胞形态的变化与先前研究一致,并且被认为与加速的红细胞破坏/清除和增加的红细胞生成相关。这些变化在本质上在从最小至显著的范围并且包括红细胞大小不均、球形红细胞(小红细胞)、多染色性,以及与红细胞损伤/清除一致的偏心性细胞(eccentrocytes)和非典型红细胞碎片。红细胞大小范围中的可变性是由于较小球形红细胞与较大多染色性细胞(网织红细胞)的混合物。还在几个Hu5F9-G4处理的动物的循环中观察到有核红细胞的数目的瞬时增加。红细胞形态的变化显示恢复的持续倾向直到研究结束。骨髓涂片评价的变化是轻度至中度并且限于红细胞谱系的形态变化(发育异常),其包

括具有异常核形状、多核、核起泡和/或核至细胞质成熟不同步(异常核至细胞质成熟)的偶然细胞。另外变化被认为同与Hu5F9-G4相关的加速的红细胞生成反应有关,其包括组3和组4(仅雌性)动物中的平均M:E比例的轻度降低连同适当的最小至轻度转移至与加速的红细胞生成相关的更不成熟的红细胞前体。

[0276] 与先前研究一致,血液学参数的治疗相关变化(即,减少的RBC和血红蛋白;增加的网织红细胞)与总胆红素的增加和结合珠蛋白的减少相关。仅在高剂量组(5/100mg/kg)中观察到临床化学参数的其它变化并且包括白蛋白的轻微减少(两只雌性动物)、球蛋白的轻微增加以及白蛋白:球蛋白比例的相应减少。临床化学参数的所有处理相关的变化在给药期结束时是部分或完全可逆的。

[0277] 第8天毒理动力学显示在第1天的5mg/kg引发剂量和在第8天的5、10、50或100mg/kg初始维持剂量之后,C_{max}的增加是10至100mg/kg成比例的剂量,但大于5至100mg/kg成比例的剂量。虽然AUC₀₋₇₂的增加倾向朝向50与100mg/kg之间成比例的剂量,但AUC₀₋₇₂的变化大于5至100或10至100mg/kg成比例的剂量。平均T_{1/2}似乎随着增加的剂量而增加并且在5mg/kg下6小时至在100mg/kg下52小时的范围。在暴露方面不存在明显的性别差异。第25天毒理动力学显示以5、10、50或100mg/kg每周两次给药持续3周之后,暴露的增加(C_{max}, AUC₀₋₇₂)大于5至100mg/kg成比例的剂量但10至100mg/kg成比例的剂量。此外,相较于雄性猴,暴露倾向于在雌性中更低。表观T_{1/2}相对于更高剂量在5mg/kg下更短。在一些动物中,T_{1/2}在第25天与第8天之间类似,并且在其它动物中,T_{1/2}似乎在第25天更长;平均T_{1/2}在6.3小时(5mg/kg)至66小时(50mg/kg)的范围内。以5、10、50或100mg/kg每周两次给药持续7周之后的第53天毒理动力学显示暴露的增加(C_{max}, AUC₀₋₇₂)大于5至100mg/kg成比例的剂量但10至100mg/kg成比例的剂量。

[0278] 相对于第25天或第8天在第53天的浓度对比时间曲线表明Hu5F9-G4的循环浓度随着重复给药持续增加。除了5mg/kg剂量(其似乎受ADA影响)之外,每个剂量组内在第53天的平均和中值暴露(C_{max}, AUC₀₋₇₂)通常高于在第25天或第8天的平均和中值暴露,从而表明在持续每周两次给药情况下的Hu5F9-G4进一步积聚。虽然ADA的发展似乎影响暴露,但此影响主要在5mg/kg维持剂量下注意到,并且总体上暴露在整个研究中维持在≥10mg/kg维持剂量的剂量下。

[0279] 总之,处理相关的发现与先前研究一致,并且包括血液学和临床化学参数以及骨髓细胞学的变化。血液参数的变化包括RBC计数和血红蛋白与网状细胞增多症组合的减少。重要的是,在整个研究中未在任何动物中检测到游离血浆血红蛋白。虽然与Hu5F9-G4相关的贫血在组2、3或5之间不以明显剂量依赖性方式发生,但具有≤10.0g/dL的血红蛋白水平的动物的数目在组5中最高,其被施用最高维持剂量(100mg/kg)。虽然血红蛋白水平通常显示在约第15-32天开始在所有动物中恢复的倾向并且持续到研究的结束,但在第46天施用第11个维持剂量之后接近研究结束时在一只动物(组3)中再次注意到血红蛋白的显著减少。然而,此动物的血红蛋白到研究结束时(第109天)返回至研究前水平。由于在每只动物中观察到的严重贫血,将两只动物(组3和4中各一只)置于休药期。重要的是,尽管在这些动物中观察到的严重贫血,但未注意到毒性的临床病征且每只动物中的血红蛋白水平显示恢复的持续倾向直到研究结束。红细胞形态的变化与加速的红细胞破坏/清除和增加的红细胞生成一致,并且包括非典型红细胞碎片、红细胞大小不均、球形红细胞(小红细胞)以及多

染色性。血液学参数的变化与增加的总胆红素和减少的结合珠蛋白相关。仅在高剂量组中注意到临床化学参数的其它处理相关变化并且包括白蛋白的轻微减少、球蛋白的轻微增加以及相应的白蛋白:球蛋白(A:G)比例。所有这些处理相关的变化到研究结束时在所有Hu5F9-G4处理组中是部分或完全可逆的。骨髓细胞学的变化限于红细胞谱系的形态变化,其包括具有异常核形状、多核、核起泡和/或核至细胞质成熟不同步的偶然细胞。

[0280] 总体上,在第1周(第1天)以5mg/kg的引发剂量通过1小时静脉内输注、接着在多达100mg/kg的剂量下每周两次维持剂量持续连续7周施用Hu5F9-G4在食蟹猴中是临床上良好耐受的。尽管处理相关的贫血,包括具有休药期的动物,但未观察到临床毒性的病征。在此研究中观察到的变化与先前研究一致,并且认为与Hu5F9-G4在通过结合RBC上表达的CD47加速老化RBC消除的过程中的药理作用相关。因此,基于数据的总体,此研究的最高非严重毒性剂量(HTNSTD)认为是5/100mg/kg的引发/维持剂量,所评价的最高剂量。

[0281] 遗传毒性

[0282] 针对小分子药物产品常规进行的遗传毒性研究的范围和类型通常不适用于生物技术来源的产品[ICH S6(R1)]。不预期单克隆抗体如Hu5F9-G4将与DNA或其它染色体物质直接相互作用。因此,认为诱变性研究是不适当的且未计划。

[0283] 致癌性

[0284] 未用Hu5F9-G4进行致癌性研究。基于Hu5F9-G4的作用机制,它不被预期是致癌性的。另外,Hu5F9-G4既不是生长因子也不是免疫抑制剂。因此,鉴于所意图的患者群体和机制关注的缺乏,未计划致癌性研究。

[0285] 生殖和发育毒性

[0286] 未用Hu5F9-G4进行生殖和发育毒性研究。虽然将不会进行正式、独立的生育力研究,但在8周毒性研究中未在雄性和雌性生殖器官的微观检查中注意到处理相关作用。因为实验室动物中Hu5F9-G4的潜在致畸作用(如果存在)是未知的,所以Hu5F9-G4将不被施用于孕妇。为了避免怀孕,将对招募进入建议的1期临床研究中的具有生育潜力的男性和女性患者采取适当的预防措施(例如,女性必须证明妊娠测试阴性,患者必须同意适当的避孕预防措施等)。

[0287] 局部耐受性

[0288] 未进行独立的局部耐受性研究;然而,与ICH S6(R1)一致,作为重复剂量毒性研究的一部分进行Hu5F9-G4的局部耐受性的评价(临床观察结果、来自注射部位的组织样品的宏观和微观检查)。

[0289] 讨论和结论

[0290] 在所提出的临床试验中进行了支持施用Hu5F9-G4的一系列全面的毒理学研究。这些研究包括体外溶血研究、在猕猴和食蟹猴中的单剂量和多剂量研究以及在一组人组织中的组织交叉反应性研究。

[0291] 在所有猴研究中的主要和一致的处理相关发现是贫血(如在减少的RBC计数和血红蛋白中所反映)。贫血通常在施用第一剂量(或在引发/维持剂量方案研究中的引发剂量)之后发展并且与指示加速的RBC清除和反应性红细胞生成的变化相关,包括网状红细胞增多症和RBC形态的改变如红细胞大小不均、多染色性和球形红细胞症。重要的是,在所有研究中未观察到游离血浆血红蛋白。与Hu5F9-G4相关的血液学参数的变化通常与结合珠蛋白

和总胆红素的变化相关;结合珠蛋白经常但并不总是减少,并且通常观察到总胆红素的增加;然而,结合珠蛋白和总胆红素的变化不以剂量依赖性方式发生。在所有研究之中,与Hu5F9-G4相关的血液学和临床化学参数的变化显示在研究期间恢复的倾向,并且到研究结束时是部分或完全可逆的。认为骨髓细胞学的变化(在GLP 8周研究中进行;PR013)与加速的红细胞生成相关并且包括红细胞谱系的形态变化、平均M:E比例的降低以及适当的转移至与加速的红细胞生成相关的更不成熟的红细胞前体。

[0292] 基于CD47在老化红细胞的正常清除中的已知作用和在猴研究中获得的合并数据,认为主要的处理相关变化(即,贫血)与结合RBC上表达的CD47的Hu5F9-G4的药理作用相关。相信施用Hu5F9-G4通过用CD47对老化RBC的立即阻断取代CD47的逐渐损失来加速消除老化RBC的过程。老化RBC的过早损失通过确保网状细胞增多症(其在所有研究中观察到)进行补偿,并且随时间推移,随着老化RBC被更年轻的细胞替代,初始贫血消退,并且因此,RBC池的年龄分布转变成更年轻的细胞。

[0293] 尽管与施用Hu5F9-G4相关的贫血,但未在任何动物中的临床病征中观察到毒性的证据,并且因此Hu5F9-G4是临床上良好耐受的,即使在高达300mg/kg的剂量下。虽然施用Hu5F9-G4导致瞬时贫血,但未注意到毒性的临床病征,并且Hu5F9-G4由猴临床上良好耐受,即使在高达300mg/kg的剂量下。然而,毒性研究确实揭示较小数量的动物对Hu5F9-G4相关的贫血特别敏感。虽然此时未知这些猴对由Hu5F9-G4产生的贫血更敏感的原因,但贫血是瞬时的并且一致地显示在终止给药之后恢复的倾向。因为某些患者可能比其它患者更敏感,所以将在所提出的临床研究中严密地监测血液学的变化,并且将针对发展低于预先指定水平的贫血的任何患者采取适当的措施。

[0294] 与Hu5F9-G4相关的贫血在所有猴研究中是部分或完全可逆的,并且对于置于休药期的动物来说消退,包括已经重新给药的那些动物。8周毒理学研究的HNSTD是5/100mg/kg的引发/维持剂量(所测试的最高剂量)。基于毒理动力学数据,用于8周毒理学研究的5mg/kg引发剂量预计提供在高于所计划的临床试验中所提出的0.1mg/kg的起始引发剂量的28至194倍范围内的安全性界限(基于AUC的)。100mg/kg的每周两次维持剂量提供在高于针对所提出的临床研究所计划的0.1mg/kg的起始维持剂量766-803倍范围内的预测安全性界限(基于AUC)。

[0295] 总之,基于来自毒理学研究的结果,非临床安全性评估程序支持针对所提出的临床试验施用Hu5F9-G4(例如,如静脉内输注)。

序列表

<110> Willingham, Stephen
 Howard, Maureen
 Liu, Jie
 Prohaska, Susie
 Volkmer, Anne K
 Volkmer, Jens Peter
 Weissman, Irving L
 <120> 用于实现治疗有效剂量的抗CD47剂的方法
 <130> STAN-1010W0
 <150> US 61/800,102
 <151> 2013-03-15
 <160> 5
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
 1 5 10 15
 Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
 20 25 30
 Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
 35 40 45
 Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
 50 55 60
 Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
 85 90 95
 Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
 100 105 110
 Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn
 115 120
 <210> 2
 <211> 18
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽序列

<400> 2

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly

1 5 10 15

Ser Ala

<210> 3

<211> 142

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly

1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe

20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala

35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp

50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp

65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala

85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr

100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu

115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn

130 135 140

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn

1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn

20 25 30

Thr	Thr	Glu	Val	Tyr	Val	Lys	Trp	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr
35				40				45							
Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Lys	Ser	Thr	Val	Pro	Thr	Asp	Phe	Ser
50				55				60							
Ser	Ala	Lys	Ile	Glu	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu
65				70				75				80			
Lys	Met	Asp	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	His	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys
				85				90				95			
Glu	Val	Thr	Glu	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys
				100				105				110			
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Trp	Phe	Ser	Pro	Asn	Glu	Asn				
115				120											

<210> 5
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 猕猴
 <400> 5

Gln	Leu	Leu	Phe	Asn	Lys	Thr	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	Thr	Phe	Cys	Asn
1		5		10		15									
Asp	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Cys	Phe	Val	Thr	Asn	Met	Glu	Ala	Gln	Asn
20				25				30							
Thr	Thr	Glu	Val	Tyr	Val	Lys	Trp	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr
35				40				45							
Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Lys	Ser	Thr	Ala	Pro	Ala	Asn	Phe	Ser
50				55				60							
Ser	Ala	Lys	Ile	Glu	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu
65				70				75				80			
Lys	Met	Asp	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	His	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys
				85				90				95			
Glu	Val	Thr	Glu	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys
				100				105				110			
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Trp	Phe	Ser	Pro	Asn	Glu	Asn				
115				120											

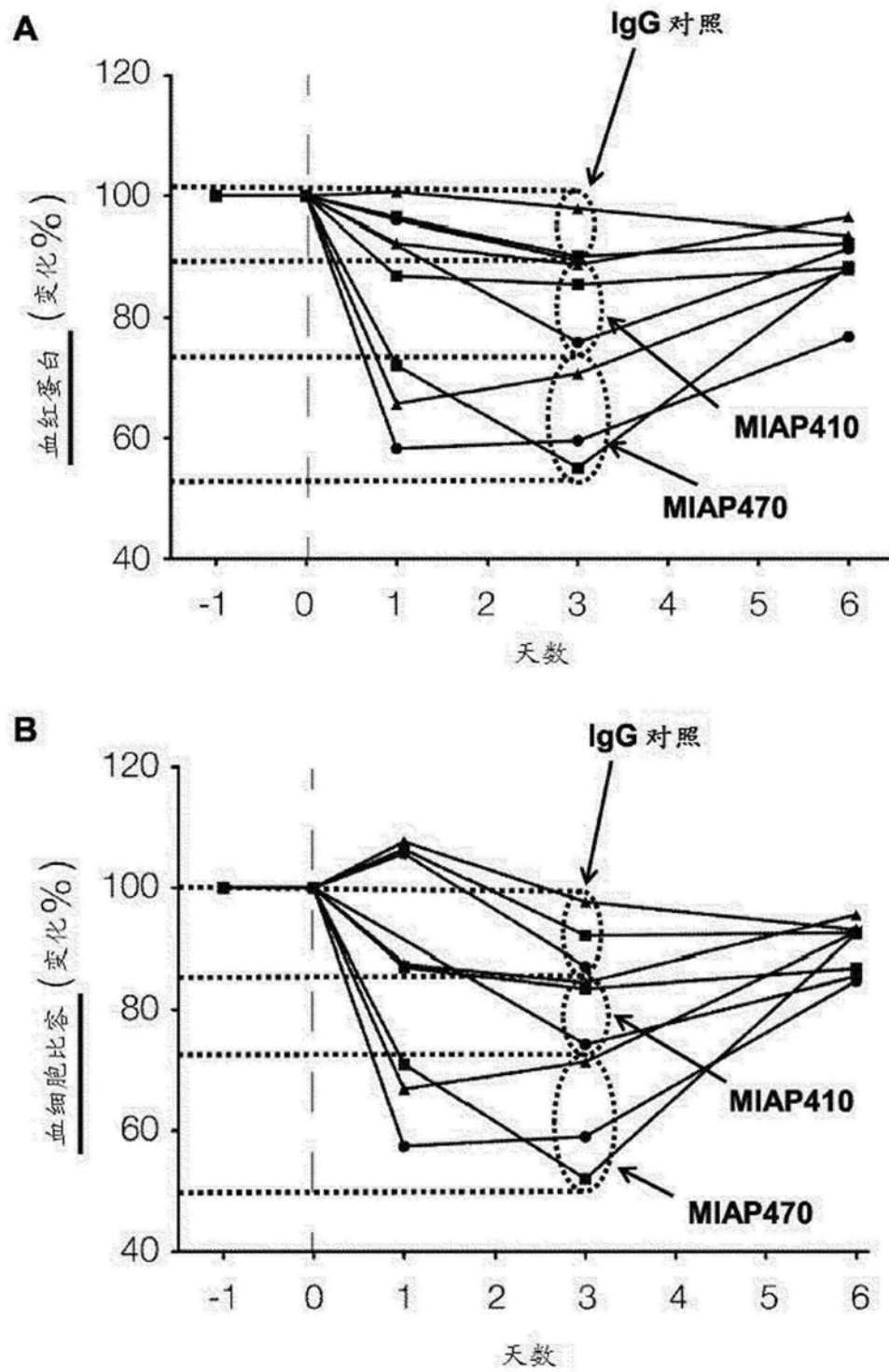


图1

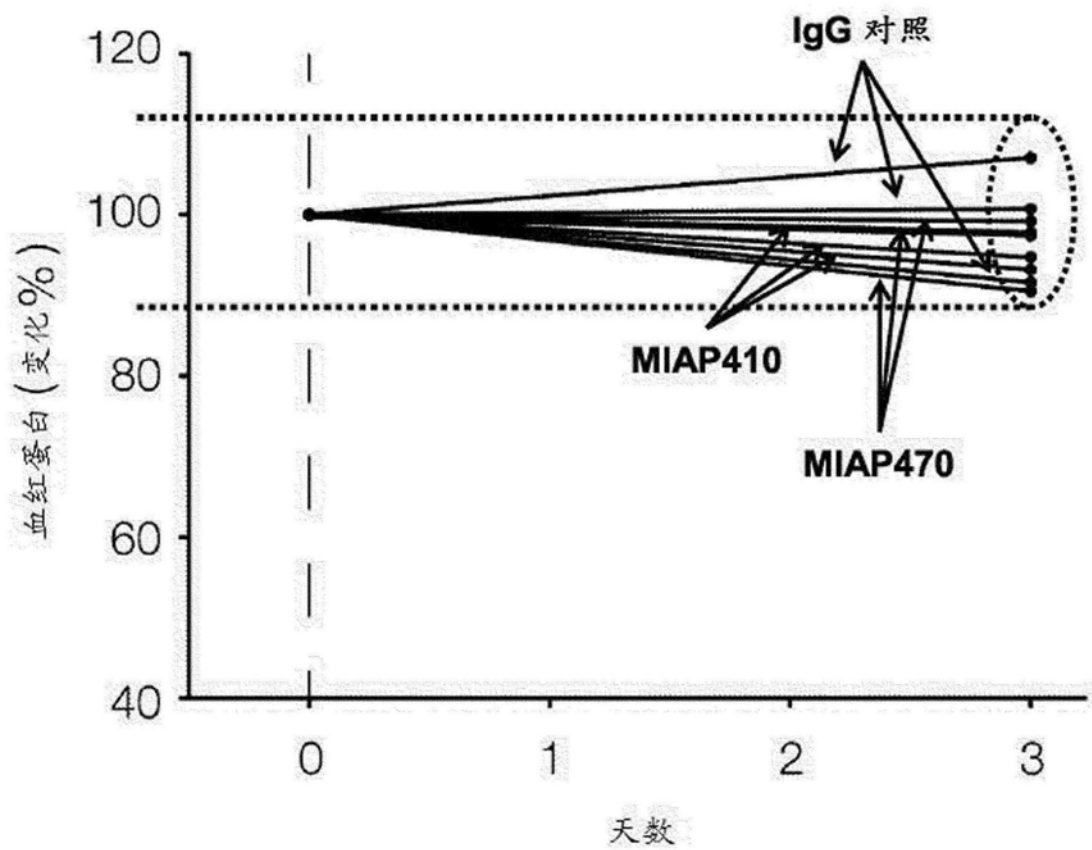


图2

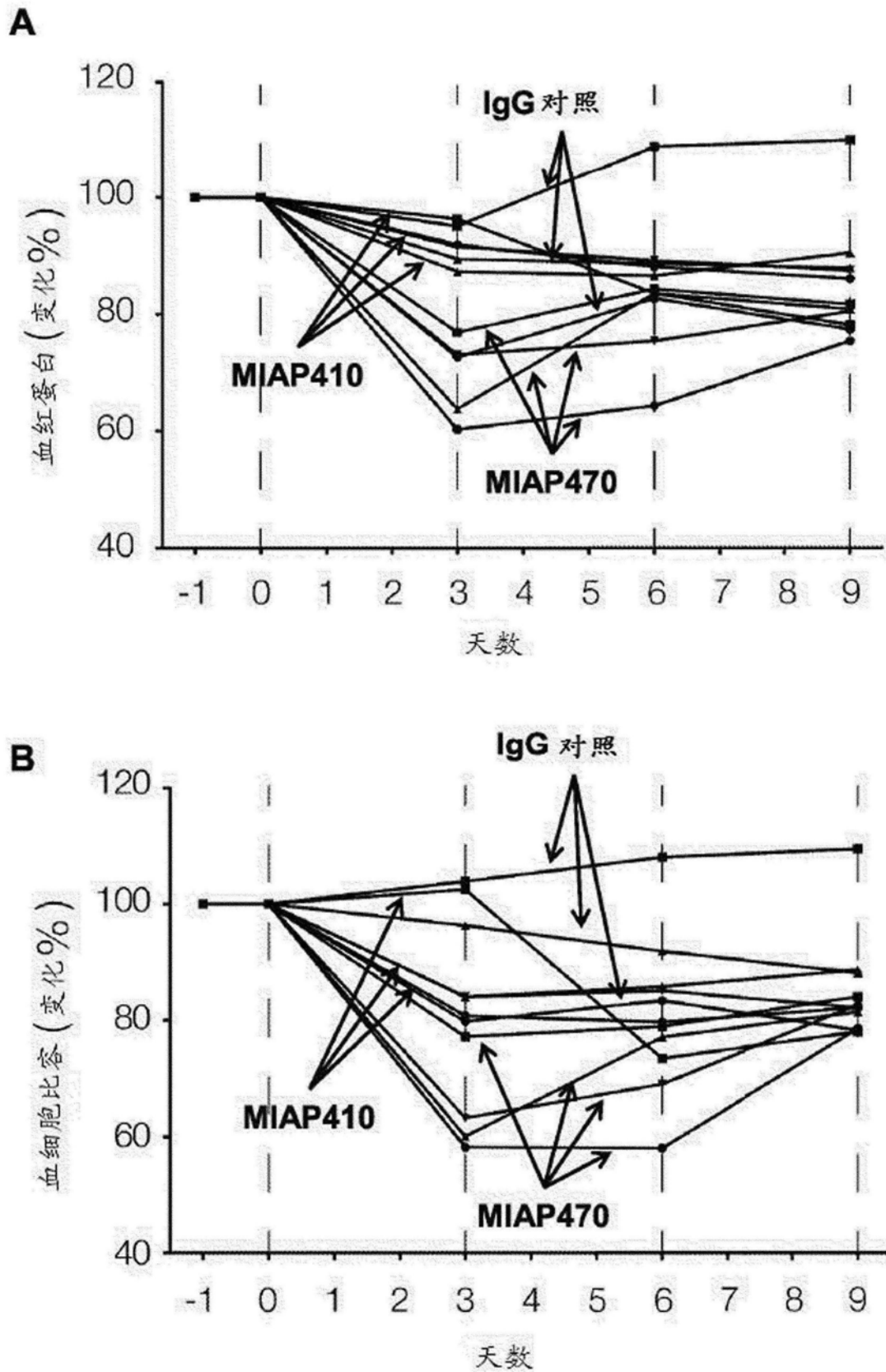


图3

人	CD47ECD	10	20	30	40	50	60
		QLLFNKTSVEFTFCNDTVVIPC	FVTNMEAQNTEVYVKWKFKGRDIYTFD	GALNKSTVP			
食蟹猴	CD47ECD	10	20	30	40	50	60
		QLLFNKTSVEFTFCNDTVVIPC	FVTNMEAQNTEVYVKWKFKGRDIYTFD	GALNKSTAP			
人	CD47ECD	70	80	90	100	110	120
		TDFSSAKIEVSQLLKGDA	SLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI	IELKYRVVSWFS			
食蟹猴	CD47ECD	70	80	90	100	110	120
		ANFSSAKIEVSQLLKGDA	SLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI	IELKYRVVSWFS			
人	CD47ECD						
		PNEN					
食蟹猴	CD47ECD						
		PNEN					

图4

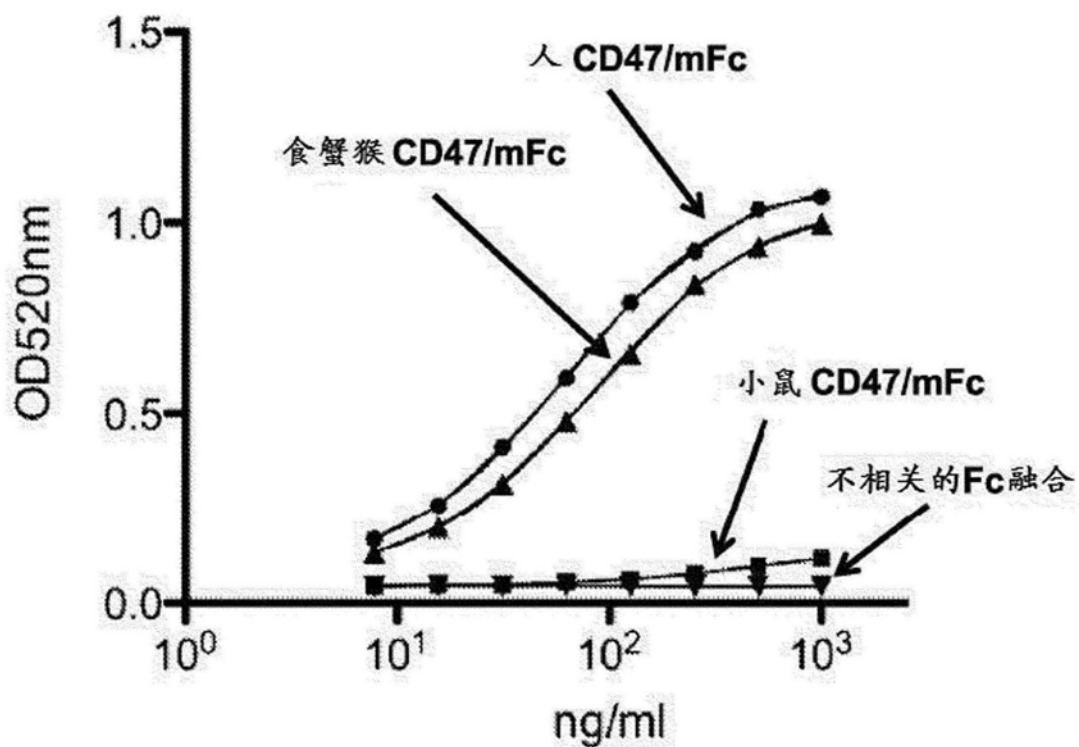


图5

A	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (pM)
测定 1	5.13E5	7.34E-6	14.3
测定 2	4.94E5	1.00E-6	2.02
平均值	5.0(1)E5	4(4)E-6	8(8)

B	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (pM)
测定 1	2.27E5	2.75E-6	12.1
测定 2	2.76E5	2.00E-6	7.239
平均值	2.5(3)E5	2.4(5)E-6	10(3)

图6

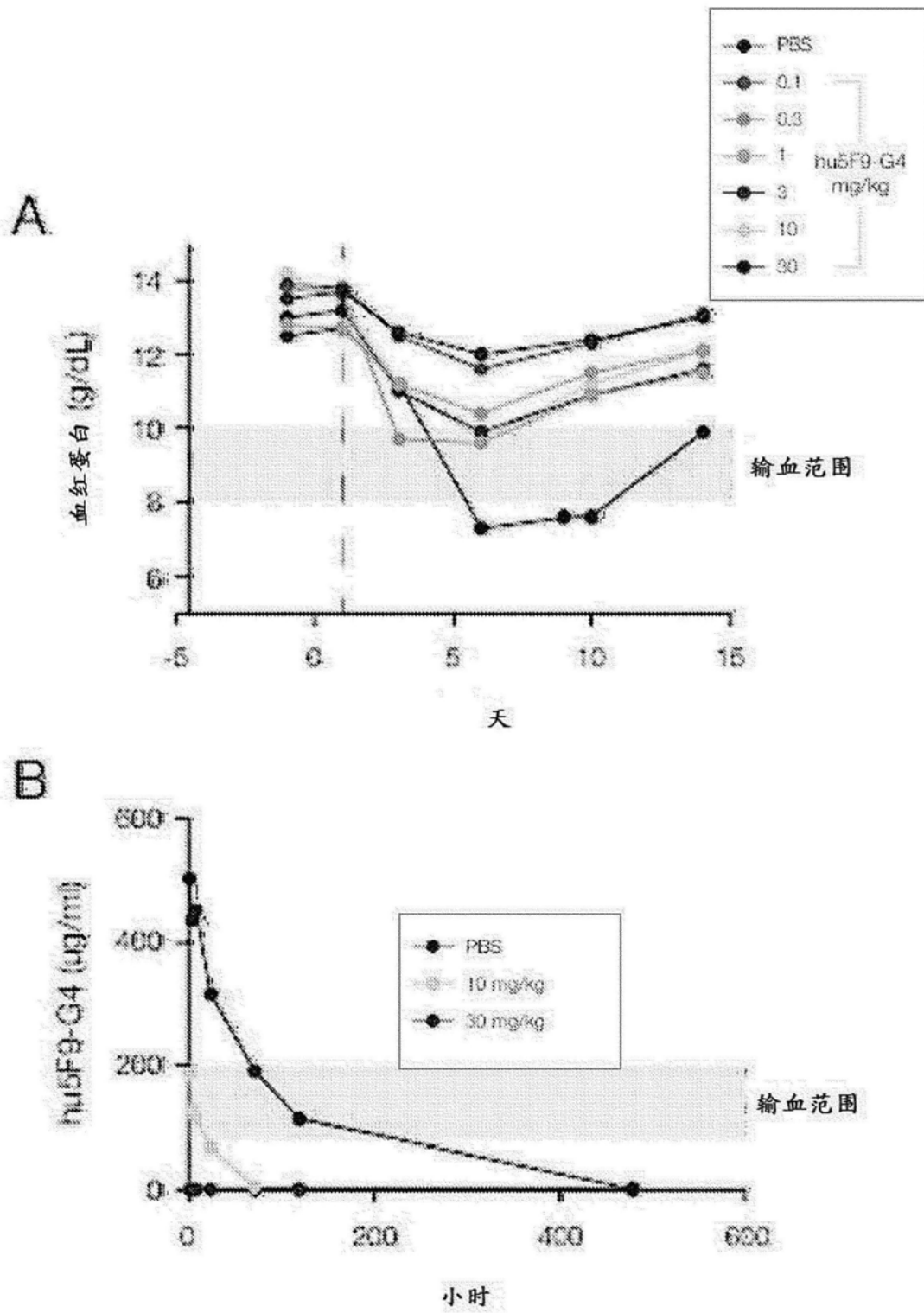


图7

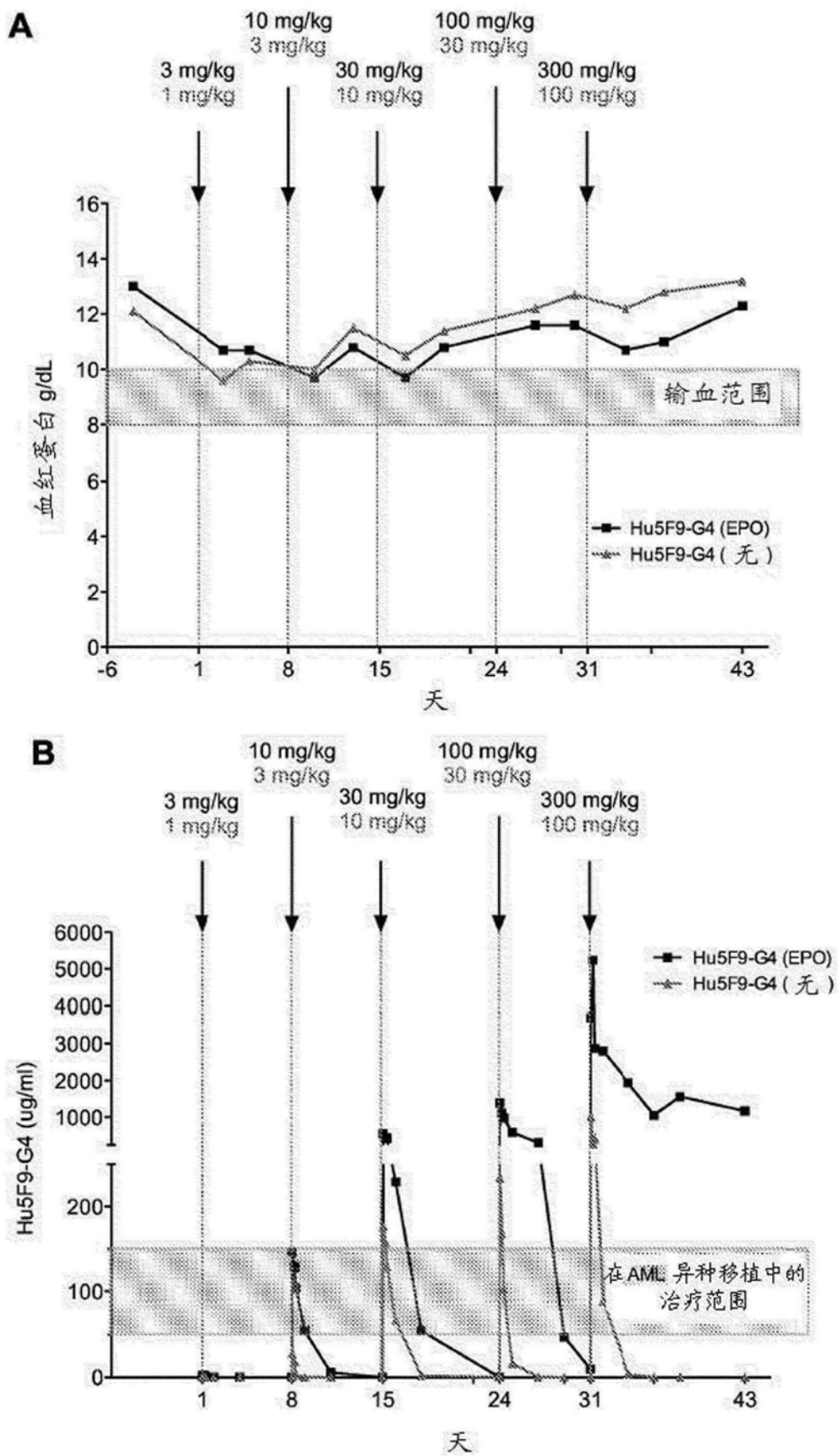


图8

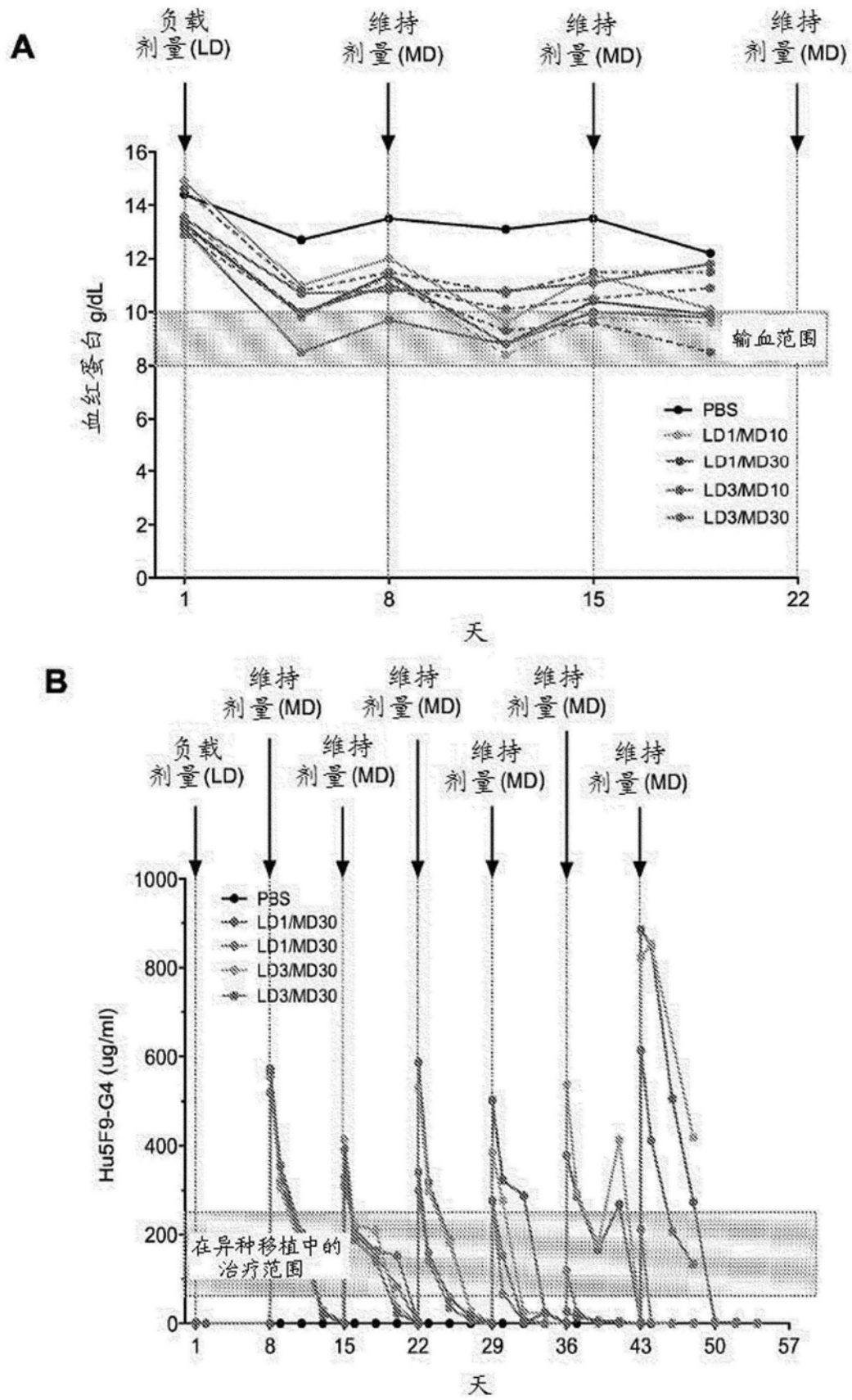


图9

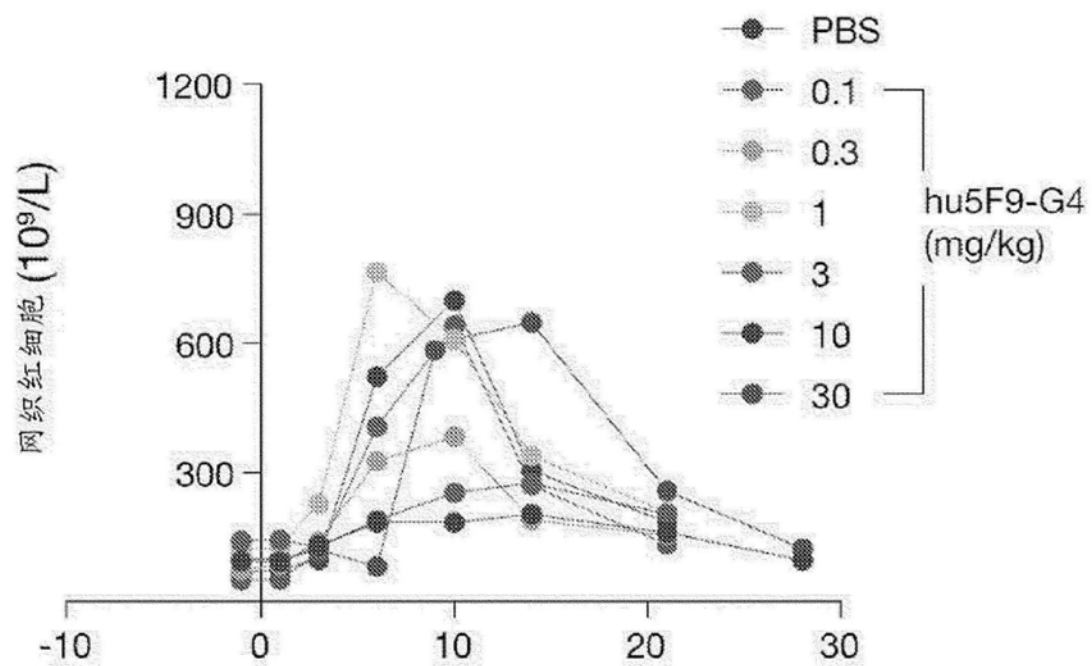


图10

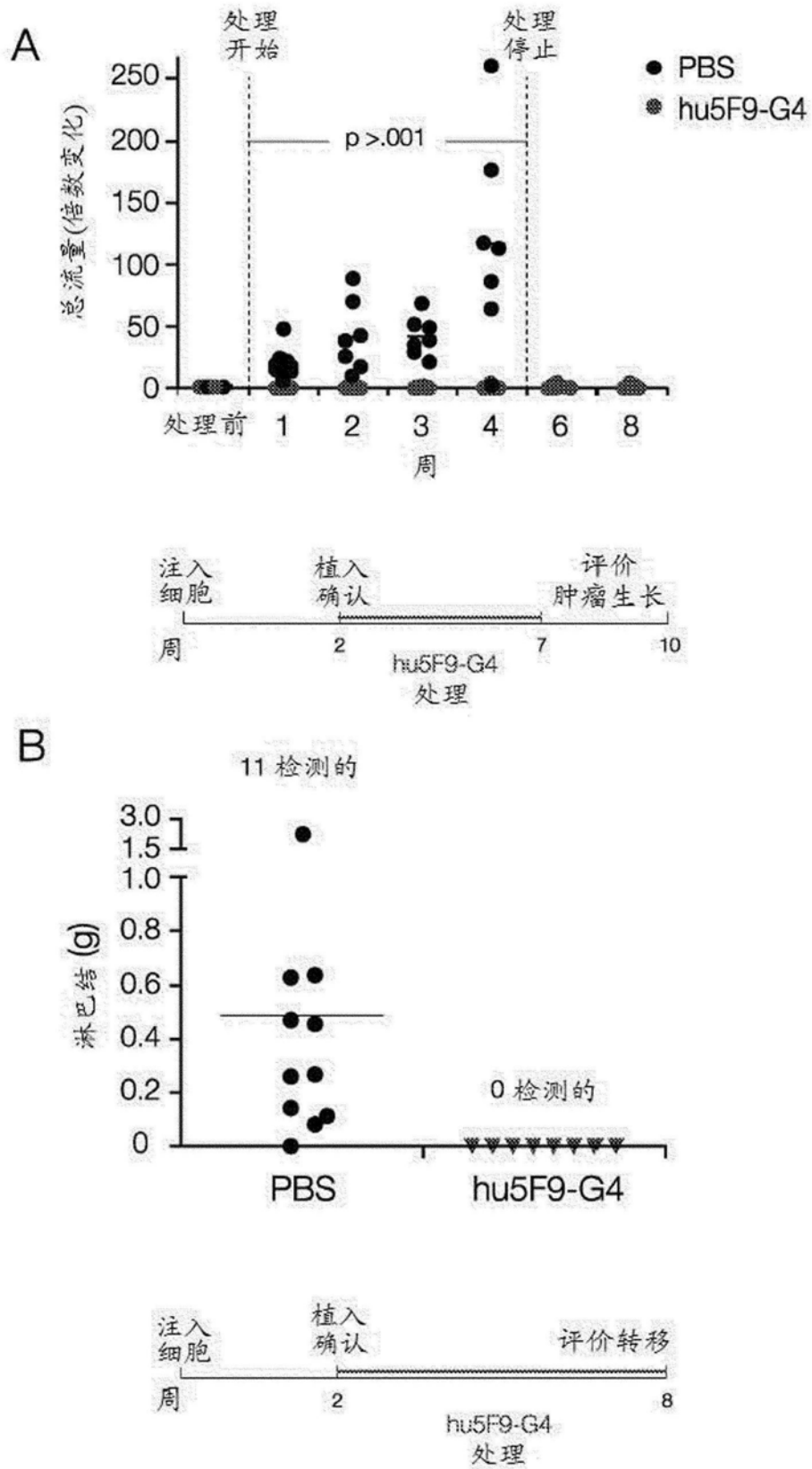
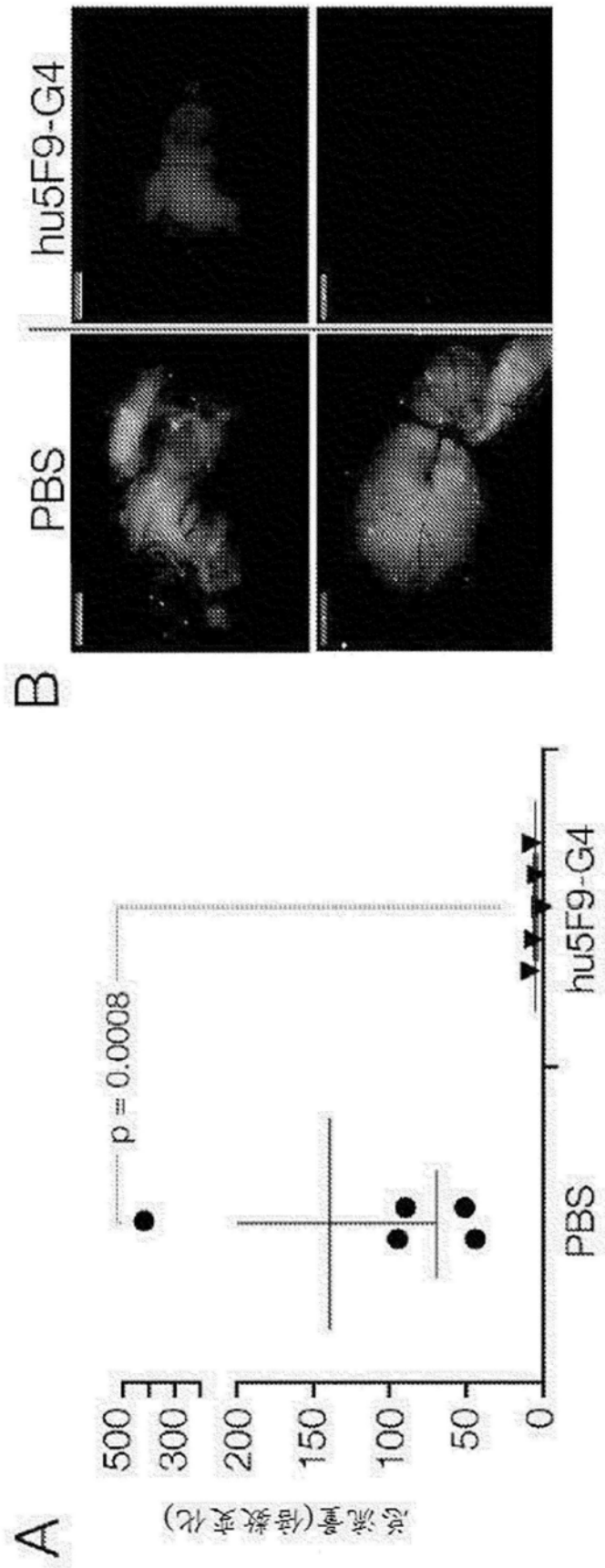


图11



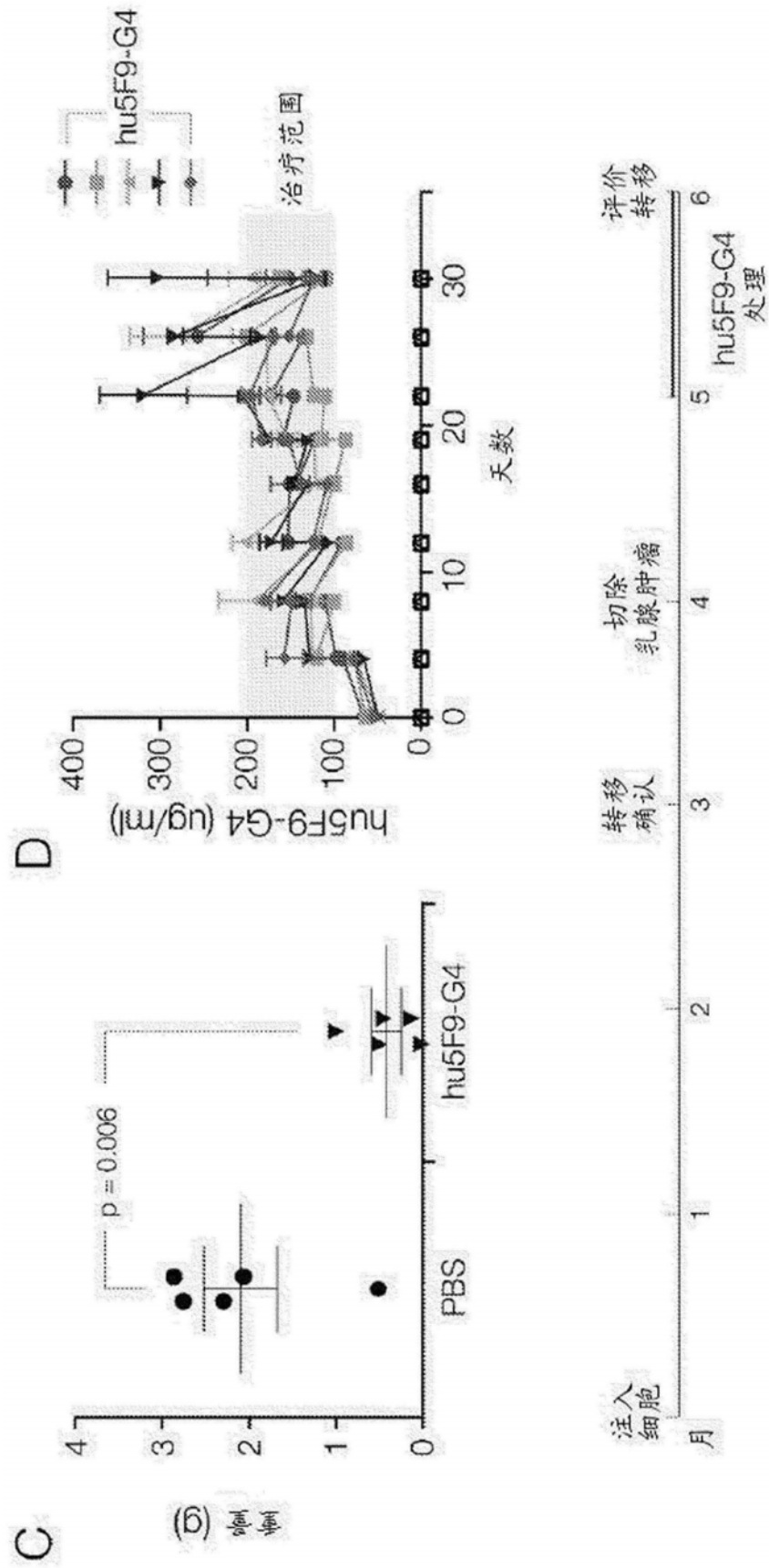


图12

研究设计

组	引发剂量	维持剂量	数量 (雄性/雌性)
1	0 (媒介物)	0 (媒介物)	5/5
2	5 mg/kg	10 mg/kg	3/3
3	5 mg/kg	50 mg/kg	5/5
4	5 mg/kg	100 mg/kg	5/5
5	5 mg/kg	5 mg/kg	2/2

^A在第1天施用引发剂量

^B在第8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、43、46、50和53天每周两次施用维持剂量。

^C在第53天施用最终维持剂量，但监测动物直到第95天

图13

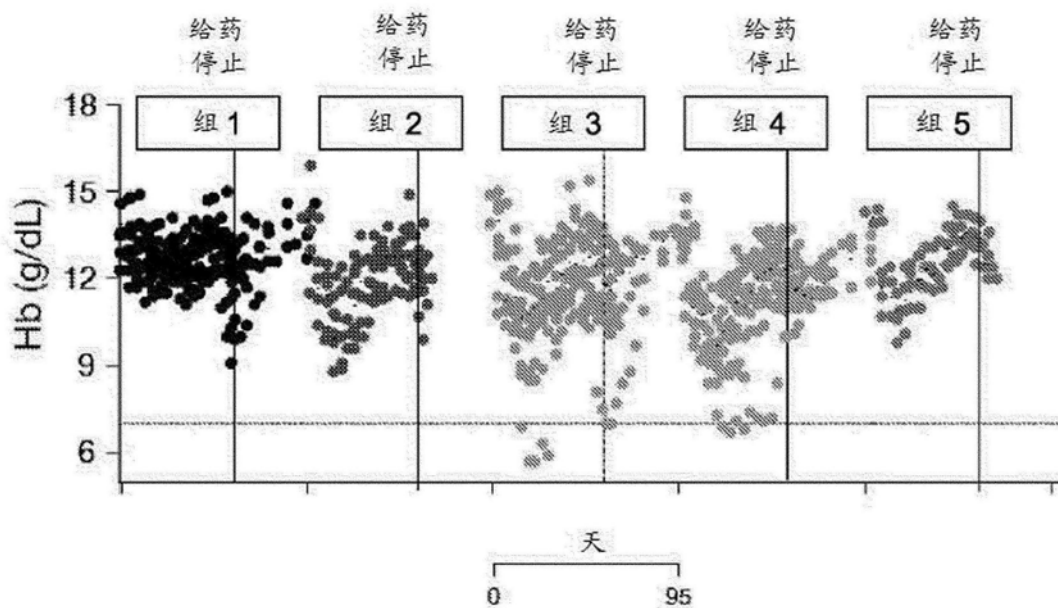


图14

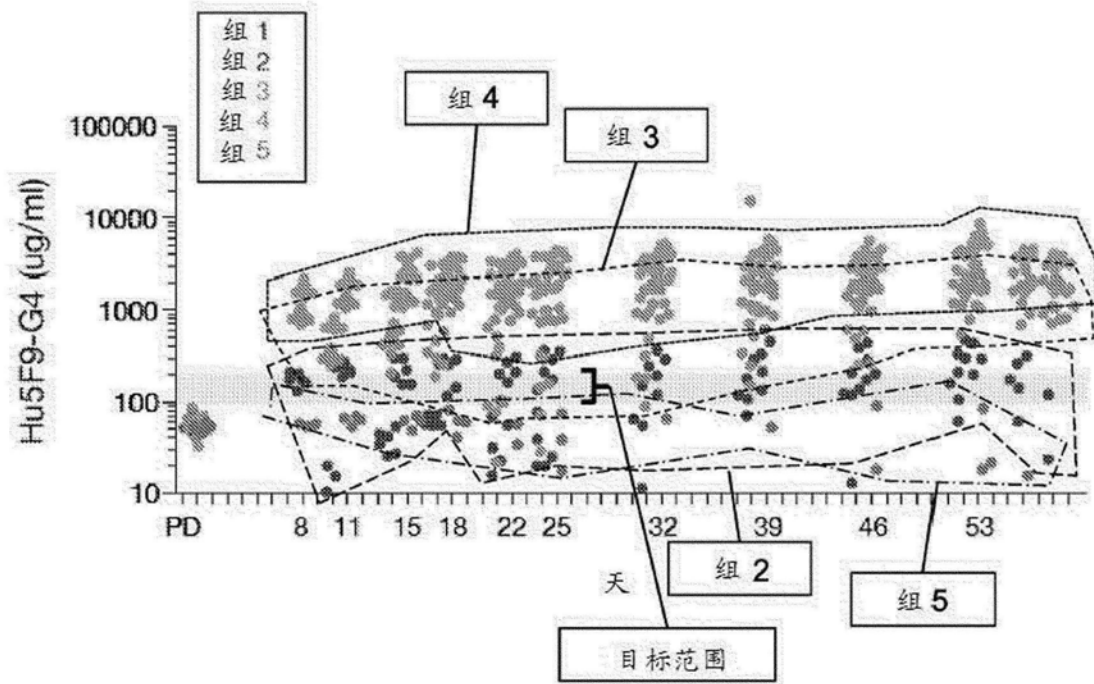


图15