

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580046885.8

[43] 公开日 2008 年 1 月 9 日

[11] 公开号 CN 101102792A

[22] 申请日 2005.11.18

[21] 申请号 200580046885.8

[30] 优先权

[32] 2004.11.19 [33] US [31] 60/629,700

[86] 国际申请 PCT/US2005/042052 2005.11.18

[87] 国际公布 WO2006/055871 英 2006.5.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.19

[71] 申请人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 迈克尔·潘扎拉

艾尔弗雷德·桑德罗克

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 31 页

[54] 发明名称

治疗多发性硬化

[57] 摘要

本发明公开了治疗多发性硬化和其它疾病的方法。

1. 治疗患有炎性疾病并对第一种试剂反应不足的受试者的方法，所述方法包括对该受试者施用 VLA-4 结合蛋白，其施用量和施用时间致使足以治疗所述疾病，其中当所述第一种试剂在该受试者体内未达到治疗性水平时，所述 VLA-4 结合蛋白施用至少一次。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述反应不足包括低于预定反应水平。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述反应不足包括第一种试剂引起的副反应或对第一种试剂发生不能耐受的毒性反应。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述炎性疾病对所述第一种试剂在该受试者中的治疗无反应。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述第一种试剂选自：干扰素、乙酸格拉太咪尔、延胡索酸、米托蒽醌、化疗剂、皮质类固醇、免疫球蛋白、抑制素、硫唑嘌呤、以及 TNF 拮抗剂。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者被施用所述第一种试剂至少 6 个月。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述施用 VLA-4 结合蛋白在不施用所述第一种试剂的情况下持续至少 2 个月。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者在第一次施用 VLA-4 结合蛋白之前至少 3 个月未施用所述第一种试剂。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者在第一次施用 VLA-4 结合蛋白之前的 2 周内施用了所述第一种试剂。

10. 权利要求 1 的方法，还包括监控受试者的 EDSS 评分进展。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者之前因被诊断患有多发性硬化而未施用 VLA-4 结合蛋白。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述 VLA-4 结合蛋白是 VLA-4 结合抗体。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体抑制 VLA-4 与 VCAM-1 相互作用。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体至少结合 VLA-4 的 α 链。

15. 权利要求 12 的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体是那他珠单抗。

16. 权利要求 12 的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体与 HP1/2 或那他珠单抗竞争结合 VLA-4。

17. 权利要求 12 的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体是人抗体或人源化抗体。

18. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者患有慢性渐进型多发性硬化、原发-渐进型(PP)多发性硬化、继发-渐进型多发性硬化或渐进复发型多发性硬化。

19. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者被静脉施用多剂 VLA-4 结合蛋白，每剂为 200-400 mg。

20. 治疗受试者的方法，所述受试者患有 MS 且经干扰素 β 治疗至少 3 个月仍有以下一或多种症状：(a)至少一次复发、(b)出现新的 MRI 增强型损伤、和(c) 进行性残疾(EDSS)，所述方法包括对该受试者施用 VLA-4 封闭抗体或其 VLA-4 结合片段，其施用量和施用时间致使足以治疗 MS，其中当干扰素 β 在该受试者体内未达到治疗性水平时，将 VLA-4 封闭抗体施用至少一次。

治疗多发性硬化

相关申请

本申请要求 2004 年 11 月 19 日提交的美国临时申请 60/629,700 的权利, 该申请全文引入本文作为参考。

背景技术

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是最常见的中枢神经系统疾病之一。目前全世界范围内有超过 2,500,000 人患有 MS。干扰素 β 和考帕松(copaxone)是目前在售的 MS 治疗法中主要的适应性改良疗法。干扰素 β 治疗可以使 MS 患者的复发率降低 32-33%(Jacobs et al., Ann Neurol. 39:285-94, 1996; 也参见 Neurology 43:641-643, 1993)。

发明概述

本发明是基于, 至少是部分基于, 以下发现: VLA-4 阻断疗法, 如 VLA-4 结合抗体如那他珠单抗(natalizumab)疗法可以安全有效地治疗此前已治疗过多发性硬化等炎症疾病的患者。具体地, 施用那他珠单抗使一些 MS 患者的症状大大改善, 而这些患者都是此前被证实对在先的治疗、例如在先的生物学疗法、尤其是在先的干扰素 β 疗法反应不足(inadequate response)。相应地, 本发明一个方面涉及治疗受试者如人类受试者的方法, 所述受试者患有炎症疾病(inflammatory disorder), 并且对第一种治疗, 例如第一种试剂(agent), 例如本文所述试剂, 例如干扰素 β 表现为反应不足。所述炎症疾病可以是, MS、类风湿性关节炎、炎症肠疾病(inflammatory bowel disease)、或系统性红斑狼疮。所述方法包括, 对该受试者施用 VLA-4 结合蛋白(VLA-4 binding protein), 例如 VLA-4 结合抗体(VLA-4 binding antibody), 例如那他珠单抗, 其施用量和施用时间足以导致治疗所述疾病。当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处在治疗水平时, 所述 VLA-4 结合蛋白, 例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗), 可以施用至少一次, 例如至少 2, 3, 4, 5 次或更多次。(除非另外指明, VLA-4 结合抗体, 优选那他珠单抗, 是本文

所述所有实施方式中优选的 LA-4 结合蛋白。同样，除非另外指明，优选的疾病多发性硬化)。

在一个实施方案中，在不施用第一种试剂(例如干扰素 β)的情况下，将 VLA-4 结合蛋白，例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)持续施用至少 2 个月，例如至少 4, 8, 12, 24, 或 48 个月。

在一个实施方案中，在对该受试者第一次施用 VLA-4 结合蛋白，例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)之后，不施用所述第一种疗法，例如第一种试剂(例如干扰素 β)。在另一实施方案中，施用 VLA-4 结合蛋白，例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)，来代替施用第一种试剂(例如干扰素 β)。

反应不足可以是，例如反应低于本文所述预定水平。反应不足也可以是由第一种疗法，例如第一种试剂(例如干扰素 β)引起的副反应(adverse reaction)或不耐受反应或不可接受的反应。

在一个实施方案中，所述受试者事先已用第一种疗法，例如第一种试剂(例如干扰素 β)治疗了至少 3 个月，例如至少 6, 12, 18, 或 24 个月。

在一个实施方案中，所述受试者因被诊断为患有诸如 MS 等疾病，而未施用 VLA-4 结合蛋白，例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)。

在一些实施方案中，所述受试者在第一次施用 VLA-4 结合蛋白，例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)之前，有至少 1 个月，例如至少 2, 3, 4, 5, 6, 12, 或 24 个月未施用所述第一种试剂(例如干扰素 β)。

在其它实施方案中，所述受试者在第一次施用 VLA-4 结合蛋白，例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)之前的 6 周内，例如 4, 2 或 1 周内，或 6, 5, 4, 3, 2 或 1 天内，施用所述第一种试剂(例如干扰素 β)。

在一个实施方案中，所述受试者在第一次施用 VLA-4 结合蛋白，例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)的 3 个月内，例如 6, 12, 18, 24, 30 或 36 个月内，未施用米托蒽醌(mitoxantrone)、环磷酰胺、环孢菌素、硫唑嘌呤或氨甲蝶呤。

在一个实施方案中，所述受试者是成年受试者，例如年龄在 16, 18, 19, 20, 24, 或 30 岁或更大的受试者。通常，所述受试者年龄为 19-55 岁。所述受试者可以是女性或男性。

在一个实施方案中，所述受试者患有复发(relapsing)弛张型(remitting)多发性硬化。在另一实施方案中，所述受试者患有慢性渐进型多发性硬化

(chronic progressive multiple sclerosis), 例如原发-渐进型(primary-progressive, PP), 继发-渐进型(secondary progressive), 或渐进复发型(progressive relapsing)多发性硬化。

在一个实施方案中, 所述受试者患有炎症性疾病, 例如 MS, 该疾病是用第一种疗法, 例如第一种试剂(例如干扰素 β)治疗时难治的(refractory)疾病。

在一个实施方案中, 所述 VLA-4 结合蛋白是 VLA-4 结合抗体, 例如 IgG1, IgG2, IgG3, 或 IgG4 等全长抗体。所述抗体通常是有效人化(effectively human), 人化(human)或人源化(humanized)的抗体。所述 VLA-4 结合抗体可抑制 VLA-4 与其关联(cognate)配体, 例如 VCAM-1 的相互作用。所述 VLA-4 结合抗体至少结合 VLA-4 的 α 链, 例如结合 $\alpha 4$ 亚基的胞外区。例如, 所述 VLA-4 结合抗体识别 VLA-4 α 链上的表位 B (如 B1 或 B2)。所述 VLA-4 结合抗体可以与那他珠单抗、HP1/2、或本文所述另一种 VLA-4 结合抗体来竞争结合 VLA-4, 或具有与上述抗体重叠的 VLA-4 结合表位。在优选实施方案中, 所述 VLA-4 结合抗体是那他珠单抗, 或包括那他珠单抗的重链可变区和轻链可变区。

所述第一种疗法, 例如第一种试剂可以是生物学疗法(试剂), 例如具有指定序列的蛋白, 如干扰素。在一个实施方案中, 所述第一种试剂包括干扰素 β , 例如干扰素 β -1a, 例如 AVONEX® (干扰素 β -1a)或 Rebif® (干扰素 β -1a), 或 BETASERON® (干扰素 β -1b)。所述第一种试剂也可以是未限定序列(undefined sequence)的蛋白, 例如指定氨基酸的随机共聚物, 例如乙酸格拉太咪尔(glatiramer acetate)。

在一个实施方案中, 所述 VLA-4 结合蛋白, 例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)的施用剂量是, 足以实现每月一次(如每四周一次)施用约 50-600 mg (如约 200-400 mg, 例如约 300 mg, 通过静脉(IV)途径施用)所获得的生物利用度的至少 80% (优选 90%, 95%, 100%, 110%或更高)水平。例如, 所述 VLA-4 结合抗体每月一次 IV 输注约 50-600 mg (如约 200-400 mg, 例如约 300 mg)。在另一实例中, VLA-4 结合抗体皮下(SC)注射 25-300 mg (如 50-150 mg, 例如约 75 mg), 例如一周一次, 一周两次或两周一次。

在一些实施方案中, 所述 VLA-4 结合蛋白, 例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗), 可以按照有效导致以下一或多种后果的量施用: a)降低复发严重度; b)阻止 EDSS(残疾状况拓展量化表)分数升高; c)降低 EDSS 分数

(例如在至少 6 个月、一年或更长时间内降低例如 1、1.5、2、2.5、或 3 个点以上); d)减少新的 Gd+损伤的数量; e)减少新的 Gd+损伤的出现率; 和 f)减少 Gd+损伤面积的扩大。VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗), 可以施用多个剂量(multiple doses)、并且是能在至少 3、6、或 9 个月, 或在 1、2、3 年内维持不加重或不复发阶段的有效量。

在一些实施方案中, 对例如受试者接受 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗)之后的反应指标进行评价。专业人员可以采用一或多种不同的关于治疗有效性的临床指标或其它指标, 例如 EDSS 分数; MRI 扫描; 复发次数、复发率或复发严重程度; 多发性硬化综合功能(multiple sclerosis functional composite, MSFC); 多发性硬化生活质量记录(multiple sclerosis quality of life inventory, MSQLI)。所述受试者可以在实施治疗方案期间(during a regimen)的不同时间点进行监控。在一个实施方案中, 未检查所述受试者的干扰素生物利用度(例如, 在施用之前或之后)。

另一方面, 本文涉及一种治疗患有炎性疾病(例如多发性硬化)的受试者(例如人类受试者)的方法。所述方法包括, 选择对第一种试剂治疗多发性硬化反应不足(例如是第一种试剂难治的 MS)的受试者, 对所述受试者施用 VLA-4 结合蛋白, 例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗), 施用量和施用时间导致足以治疗该疾病。当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处于治疗水平时, 所述 VLA-4 结合蛋白, 例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗), 可以施用至少 1 次, 例如至少 2, 3, 4, 5 或更多次。

在一个实施方案中, 所述方法还包括确定所述受试者是否患有第一种试剂(例如干扰素 β)难治的疾病(例如多发性硬化)。在一个实施方案中, 确定疾病是否难治包括评价对第一种试剂(例如干扰素 β)治疗的反应水平, 例如评价本文所述反应, 且当所述受试者对所述治疗未达到预定的反应水平时, 再确定所述受试者是否患有第一种试剂(例如干扰素 β)难治的疾病(例如 MS)。

所述方法还可包括本文描述的任何其它实施方案。

另一方面, 本文涉及治疗患有炎性疾病(例如多发性硬化)的受试者(例如人类受试者)的方法。所述方法包括, 确定所述受试者对第一种试剂, 例

如本文所述试剂(但不是 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗))的治疗是否未达到预定的反应(例如本文所述反应)的水平,或是否表现出副反应或不能耐受的或无法接受的毒性。所述方法包括,在所述受试者对所述治疗未达到预定的反应水平、或表现出副反应或不能耐受的或无法接受的毒性时,对所述受试者施用 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗),其施用量和施用时间足以导致治疗该疾病。当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处于治疗水平时,所述 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗),可以施用至少 1 次,例如至少 2, 3, 4, 5 或更多次。

所述方法还可包括本文描述的任何其它实施方案。

另一方面,本文涉及治疗患有炎性疾病(例如多发性硬化)的受试者(例如人类受试者)的方法。所述方法包括,选择对第一种试剂,例如本文所述试剂(但不是 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗))的治疗未达到预定的反应(例如本文所述反应)的水平,或表现出副反应或不能耐受的或无法接受的毒性的受试者。所述方法包括,在所述受试者对所述治疗未达到预定的反应水平、或表现出副反应或不能耐受的或无法接受的毒性时,对所述受试者施用 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗),其施用量和施用时间足以导致治疗该疾病。当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处于治疗水平时,所述 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗),可以施用至少 1 次,例如至少 2, 3, 4, 5 或更多次。

所述方法还可包括本文描述的任何其它实施方案。

另一方面,本文涉及治疗患有炎性疾病(例如多发性硬化)的受试者(例如人类受试者)的方法。所述方法包括,对所述受试者施用 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗),其施用量和施用时间足以导致治疗该疾病。所述受试者可以是,对第一种试剂,例如本文所述试剂(但不是 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗))的治疗未达到预定的反应(例如本文所述反应)的水平,或表现出副反应或不能耐受的或无法接受的毒性的受试者。当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处于治疗水平时,所述 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗),可以施用至少 1 次,例如至少 2, 3, 4, 5 或更多次。

所述方法还可包括本文描述的任何其它实施方案。

另一方面, 本文涉及治疗患有炎性疾病(例如多发性硬化)的受试者(例如人类受试者)的方法。所述方法包括, 对所述受试者施用第一种试剂(例如干扰素 β), 并评价所述受试者对第一种试剂(例如干扰素 β)治疗的反应(例如本文所述反应)。所述方法还包括, 在所述受试者对所述治疗未达到预定的反应水平、或表现出副反应或不能耐受的或无法接受的毒性时, 对所述受试者施用 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗), 其施用量和施用时间足以导致治疗该疾病。当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处于治疗水平时, 所述 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗), 可以施用至少 1 次, 例如至少 2, 3, 4, 5 或更多次。

所述方法还可包括本文描述的任何其它实施方案。

另一方面, 本文涉及对治疗受试者(例如人类受试者)炎性疾病(例如多发性硬化)的治疗有效性进行评价的方法。所述方法包括, 选择对第一种试剂, 例如本文所述试剂(但不是 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗))的治疗未达到预定的反应(例如本文所述反应)的水平, 或表现出副反应或不能耐受的或无法接受的毒性的受试者。所述受试者是, 当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处于治疗水平时, 随后接受所述 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗)至少 1 次, 例如至少 2, 3, 4, 5 或更多次的受试者。所述方法还包括, 确定对 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗)治疗的反应(例如本文所述反应, 例如与该疾病或副反应有关的参数)的水平。

所述方法还可包括本文描述的任何其它实施方案。

另一方面, 本文涉及对患有多发性硬化的受试者进行治疗的方法, 所述受试者已用干扰素 β 治疗了一段时间, 例如至少 3 个月、6 个月、9 个月、或至少一年, 并有以下一或多种表现: (a)至少一次复发, (b)出现新的 MRI 增强型损伤, 和(c)进行性残疾(progression of disability)(EDSS)。所述方法包括, 对所述受试者施用 VLA-4 结合蛋白, 例如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗), 其施用量和施用时间足以导致治疗该疾病。当第一种试剂(例如干扰素 β)在该受试者体内未处于治疗水平时, 所述 VLA-4 结合蛋白, 例如

VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗), 可以施用至少 1 次, 例如至少 2, 3, 4, 5 或更多次。

所述方法还可包括本文描述的任何其它实施方案。

另一方面, 本发明的特征在于作出决定(例如医疗决定或财政决定(financial decision))的方法。所述方法包括:

生成或接受关于第一种试剂(例如干扰素 β)治疗受试者炎性疾病(例如多发性硬化)的反应(例如本文所述反应)的信息, (例如接受由本文所述方法生成的反应信息); 和

利用所述信息作出决定, 例如在第一行为进程(first course of action)和第二行为进程(second course of action)之间作出选择。

在优选实施方案中, 所述决定包括, 将所述信息与标准进行比较, 并根据所述信息与所述标准的关系作出决定。例如, 所述信息可以是表示反应可能性(likelihood of response)的值或其它术语(other term), 当所述值或其它术语具有事先选定的与所述标准的关联时, 例如当所述值或术语在数字上大于参考标准时, 选择第一行为进程, 当所述数字小于参考标准时, 选择第二行为进程。行为进程(course of action)可以是, 例如提供或不提供服务或治疗, 例如 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗), 或支付(paying for)或不支付服务或治疗(例如那他珠单抗)的全部或一部分。

在优选实施方案中, 所述第一行为进程是, 建议或提供第一个医学治疗疗程, 例如用 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗)进行治疗, 所述第二行为进程是建议或决定不接受所述治疗或不提供所述治疗。

在优选实施方案中, 第一行为进程包括或导致授权或转移资金来支付提供给受试者的服务或治疗, 例如用 VLA-4 结合蛋白(例如那他珠单抗)进行的治疗, 第二行为进程包括或导致拒绝支付提供给受试者的服务或治疗。例如, 支付或偿还医疗费用的实体(如医院、提供护理者(caregiver)、政府实体、或保险公司、或其它实体), 可以利用本文所述方法的结果, 来决定当事人(party), 例如除了所述受试患者以外的其他当事人, 是否为提供给所述患者的服务或治疗支付费用。例如, 第一种实体(如保险公司), 可以利用本文所述方法的结果, 来决定是否要为患者付钱或代表患者, 例如是否要向

第三方(如出售食物或服务者、医院、医师、或其它提供护理者)偿还提供给患者的服务或治疗。

定义

本文中,“反应不足(inadequate response)”是指,根据患者或有经验的临床人员的评估,表现为效力不足或有不能耐受的或无法接受的毒性的反应。效力不足可以是,不能达到用第一种试剂治疗所预定的反应水平。在 MS 的情况中,例如,效力不足可以是,在以下一或多个方面,不能表现出至少 10%、20%、30%、40%、50%或更大程度的降低:一段时间内的复发率(如,相对于标准而言,例如治疗前的一段时间的复发率);复发的严重程度;EDSS 分数;和 MRI-增强型损伤量、体积或新损伤;或本文所述其它参数。不能耐受的毒性可以是,针对第一种试剂的、导致从医疗角度必需或建议停止使用该第一种试剂的副反应。不能耐受的或无法接受的毒性的实例可以包括,肝损伤或肝功异常(hepatic injury or dysfunction)、严重变态反应(severe allergic reaction)、严重抑郁(severe depression)或有自杀想法(suicidal ideation)、过敏反应(anaphylaxis)、或注射部位坏死。本文所述方法可以减少这类毒性效应的发生和/或严重程度。

在一个实施方案中,所述受试者患有用第一种疗法难治的 MS,例如,基于临床上对该疾病特有的标准测量来评价,所述受试者接受第一种疗法后未表现出临床可接受的或显著的改善,或接受第一种疗法后最初表现改善但随后不再有改善。

例如对 MS 而言,针对第一种试剂治疗的预定反应水平可以是以下一或多种: a) 一段时间内(如 3 个月、6 个月、9 个月、1 年、2 年、3 年、4 年或更长时间),复发率降低至少 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 例如与参考值相比; b) 复发的严重程度降低至少 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%; c) 防止 EDSS 分数增加; d) 降低 EDSS 分数(在例如至少 6 个月、1 年或更长时间内,降低例如 0.5、1、1.5、2、2.5 或 3 个点以上); e) 减少新损伤(如 Gd+损伤)数,例如比新损伤参考数减少至少 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%。新损伤参考数可以是,例如所述受试者接受在先治疗后在相似时间段以内表现出的新损伤数,或者在不接受治疗或接受在先治疗的情况下,处于相似阶段或患病严重程度相似的受试者预计有的平均数; f) 新损伤(如

Gd+损伤)出现率降低,例如比新损伤出现率参考值降低至少 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%。新损伤出现率参考值可以是,例如接受在先治疗的所述受试者中的出现率,或者在不接受治疗或接受在先治疗的情况下,处于相似阶段或患病严重程度相似的受试者预计有的平均出现率;和 g) 减少损伤面积(如 Gd+损伤面积)的扩大,例如与损伤面积扩大的参考值相比。损伤面积扩大的参考值可以是,例如接受在先治疗的所述受试者中的 Gd+损伤面积的扩大,或者在不接受治疗或接受在先治疗的情况下,处于相似阶段或患病严重程度相似的受试者预计有的平均扩大。

在一个实施方案中,所述受试者是突破型患者(breakthrough patient),即,在用第一种疗法治疗具体的一段时间(如至少 3 个月、6 个月、9 个月、或至少一年)期间,有以下一或多个表现的患者:(a)至少一次复发;(b)出现新的 MRI 增强型损伤;和(c)进行性残疾(EDSS)。

在一个实施方案中,所述受试者在用第一种疗法治疗的一段时间内(例如在 6 个月、9 个月、1 年、2 年、3 年、4 年或更长时间内),复发率降低的水平不到 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%。在一些实施方案中,所述受试者在 VLA-4 结合试剂疗法(如施用 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗))开始后,在一段时间内(例如在 6 个月、9 个月、1 年、2 年、3 年、4 年或更长时间内),复发率降低至少 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%或更多。

在一个实施方案中,所述受试者用第一种疗法治疗的一段时间内(例如在 6 个月、9 个月、1 年、2 年、3 年、4 年或更长时间内),新损伤(如 Gd+或 T2 张力过强型(hypertense)损伤)或损伤体积减小的水平不到 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%。在一些实施方案中,所述受试者在 VLA-4 结合试剂疗法(如施用 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗))开始后,在一段时间内(例如在 6 个月、9 个月、1 年、2 年、3 年、4 年或更长时间内),新损伤(如 Gd+或 T2 张力过强型损伤)或损伤体积可以减小至少 50%, 60%, 65%, 70%, 80% 或更多。

术语“治疗”在本文中指进行治疗,且治疗量、治疗方式(例如用药时间表)、和/或治疗模式(如用药途径)导致可以有效改善疾病或其症状、或者防止或减缓疾病或其症状的进展。这可以表现为,例如与疾病或其症状有关的参数的改进,例如改进到具有统计学显著性的程度或改进到本领域技术人员可以检测到的程度。有效量、有效方式或有效模式可以依受试者的不

同而有多种情况,而且可以适应于受试者进行调整。防止或减缓疾病或其症状的进展是指,治疗可以在患病受试者或经确诊的受试者中防止或减缓疾病或其症状导致的变坏情况(deterioration)。

术语“生物的”是指基于蛋白的治疗试剂。在优选实施方案中,生物试剂是至少 10, 20, 30, 40, 50 或 100 个氨基酸残基长。

“VLA-4 结合试剂”是指与 VLA-4 整联蛋白以小于 10^{-6} M 的 Kd 结合的任何化合物。一例 VLA-4 结合试剂是 VLA-4 结合蛋白,例如 VLA-4 结合抗体,如那他珠单抗。

“VLA-4 拮抗剂”是指,至少部分地抑制 VLA-4 整联蛋白的活性、尤其是 VLA-4 整联蛋白的结合活性或信号传递活性(例如传递 VLA-4 介导的信号的能力)的任何化合物。例如,VLA-4 拮抗剂可抑制 VLA-4 与其关联配体(例如 VCAM-1 等细胞表面蛋白)、或与细胞外基质成分(纤连蛋白(fibronectin)或骨桥蛋白(osteopontin))的结合。典型的 VLA-4 拮抗剂可结合 VLA-4 或 VLA-4 配体(例如 VCAM-1)或纤连蛋白或骨桥蛋白等胞外基质成分。与 VLA-4 结合的 VLA-4 拮抗剂可以与 $\alpha 4$ 亚基和/或 $\beta 1$ 亚基结合。VLA-4 拮抗剂也可以与含有其它 $\alpha 4$ 亚基的整联蛋白(如 $\alpha 4 \beta 7$)或含有其它 $\beta 1$ 的整联蛋白结合。VLA-4 拮抗剂可以与 VLA-4 或与 VLA-4 配体以小于 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或 10^{-10} M 的 Kd 结合。

本文中术语“抗体”是指,包括至少一个免疫球蛋白可变区(例如提供免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白可变区序列的氨基酸序列)的蛋白。例如,抗体可包括重链(H)可变区(本文中缩写为 VH)和轻链(L)可变区(本文中缩写为 VL)。在另一例中,抗体包括两个重链(H)可变区和两个轻链(L)可变区。术语“抗体”涵盖抗体的抗原结合片段(如单链抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 片段、Fd 片段、Fv 片段、和 dAb 片段)以及完整抗体,例如完整且未接触过抗原的(intact)免疫球蛋白,为 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM 类(及其亚类)。免疫球蛋白轻链可以是 kappa (κ)或 lambda (λ)型。在一个实施方案中,抗体为糖基化抗体。抗体可以在抗体-依赖性细胞毒活性和/或补体介导型细胞毒活性中发挥作用,或者可以在上述一种或全部两种活性中无功能。

VH 和 VL 区还可以进一步细分为,具有高度变异性的区(称“互补决定区”,“CDR”),其间间隔了相对较保守的区(称“框架区”,FR)。各个 FR 和各个 CDR 的边界已经清楚界定(见 Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of*

Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; and Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917)。本文采用 Kabat 的指定。每一个 VH 和 VL 通常由三个 CDR 和四个 FR 组成，它们从氨基端到羧基端按照以下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

“免疫球蛋白区”是指，免疫球蛋白分子可变区或恒定区的区。免疫球蛋白区通常包含两个 β -折叠(它们各由约 7 个 β 链形成)和一个保守二硫键(见例如 A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405)。

本文中，“免疫球蛋白可变区序列”是指，可形成免疫球蛋白可变区结构的氨基酸序列。例如，所述序列可包括天然可变区的全部或部分氨基酸序列。例如，所述序列可省略 1 个、2 个或更多个 N-端或 C-端氨基酸、内部氨基酸，可包括一或多个插入或额外的末端氨基酸，或者可包括其它改变。在一个实施方案中，含有免疫球蛋白可变区序列的多肽可以另一免疫球蛋白可变区序列结合，形成靶结合结构(或“抗原结合位点”)，例如与 VLA-4 相互作用的结构。

抗体的 VH 或 VL 链还可以包括重链恒定区或轻链恒定区的全部或部分，以分别形成免疫球蛋白重链或轻链。在一个实施方案中，抗体是具有两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的四聚体。免疫球蛋白重链和轻链可以经二硫键相连。重链恒定区一般包括三个恒定区：CH1、CH2 和 CH3。轻链恒定区一般包括 CL 区。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合区。抗体恒定区一般介导抗体与宿主组织或因子(包括免疫系统的多种细胞(如效应细胞)和经典补体系统的第一种成分(C1q))的结合。

抗体的一或多个区可以人化、有效人化或人源化。例如，一或多个可变区可以人化或有效人化。例如，一或多个 CDR，例如 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 和 LC CDR3 可以人化。每一轻链 CDR 可以人化。HC CDR3 可以人化。一或多个框架区可以人化，例如 HC 或 LC 的 FR1, FR2, FR3, 和 FR4。在一个实施方案中，所有框架区都已经人化，例如源自人的体细胞，例如生成免疫球蛋白的造血细胞或非造血细胞。在一个实施方案中，人化序列都是种系(germline)序列，例如由种系核酸编码的序列。一或多个恒定区可以人化、有效人化或人源化。在另一实施方案中，框架区(如 FR1, FR2, 和 FR3 一起，或 FR1, FR2, FR3, 和 FR4 一起)的

至少 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 或 98%或整个抗体可以人化、有效人化或人源化。例如, FR1, FR2, 和 FR3 一起可以至少 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98, 或 99%与由人的种系节段编码的人的序列相同。

“有效人化”免疫球蛋白可变区是, 含有足够数量的人化框架氨基酸位置、因而在正常人体内不激发免疫应答的免疫球蛋白可变区。“有效人化”抗体是, 含有足够数量的人化框架氨基酸位置、因而在正常人体内激发免疫应答的抗体。

“人化”免疫球蛋白可变区是, 经过修饰导致修饰形式比非修饰形式在人体种激发较弱免疫应答的免疫球蛋白可变区, 例如其经过修饰含有足够数量的人化框架氨基酸位置、因而该免疫球蛋白可变区在正常人体内不激发免疫应答。对“人源化”免疫球蛋白的描述包括例如美国专利 6,407,213 和 5,693,762。在一些情况中, 人源化免疫球蛋白可以在一或多个框架氨基酸位置包含非人氨基酸。

抗体的全部或部分可以由免疫球蛋白基因或其节段编码。人免疫球蛋白基因例如有 kappa, lambda, alpha (IgA1 和 IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon 和 mu 恒定区基因, 以及众多的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约 25 Kd 或 214 个氨基酸)在 NH₂-末端(约 110 个氨基酸)由可变区基因编码, 在 COOH-末端由 kappa 或 lambda 恒定区基因编码。同样, 全长免疫球蛋白“重链”(约 50 Kd 或 446 个氨基酸)由可变区基因(约 116 个氨基酸)和上述其它恒定区基因之一, 例如 gamma (编码约 330 个氨基酸)编码。

术语全长抗体的“抗原结合片段”是指, 全长抗体的一或多个保留与目标靶(例如 VLA-4)特异性结合的能力的片段。由术语全长抗体的“抗原结合片段”所涵盖的结合片段的实例包括: (i) Fab 片段, 是单价片段, 由 VL, VH, CL 和 CH1 区组成; (ii) F(ab')₂ 片段, 是二价片段, 包括两个经二硫桥在铰链区相连的 Fab 片段; (iii) Fd 片段, 由 VH 和 CH1 区组成; (iv) Fv 片段, 由抗体单臂的 VL 和 VH 区组成; (v) dAb 片段 (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), 由 VH 区组成; 和(vi) 分离的保留功能的互补决定区(CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的 VL 和 VH 区分别由不同基因编码, 但可以利用重组方法将它们用合成的连接子连接, 使它们能够形成单链蛋白, 从而其中的 VL 和 VH 区配对形成已知为单链 Fv (scFv)的单价分子。参见, 例如 Bird et

al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883.

发明详述

多发性硬化(MS)是中枢神经系统疾病,特征是炎症以及损失髓磷脂鞘。此前的研究显示,用干扰素 β 治疗多发性硬化后,外周血淋巴细胞表面的 VLA-4 表达被下调,提示抗-VLA-4 抗体和干扰素 β 作用于同一途径 (Calabresi et al., *Neurology* 49:1111-1116, 1997)。现在发现,对于曾接受 MS 疗法(优选干扰素疗法)、并证实对该疗法反应不足的患者,或者是最初证实对该疗法有足够的反应但后来反应不足的患者,VLA-4 结合蛋白(如封闭抗体)可以非常有效地改进他们的状况。

在先的治疗

本文所述方法涉及事先曾接受炎性疾病(例如 MS)治疗(例如试剂)的受试者。优选在先治疗试剂是生物试剂,例如重组干扰素 β 。这类在先治疗的非限制性实例包括:

- 干扰素,例如人干扰素 β -1a (如 AVONEX®或 Rebif®)以及干扰素 β -1b (BETASERON™; 在位置 17 有取代的人干扰素 β ; Berlex/Chiron);
- 乙酸格拉太咪尔 (也称共聚物(Copolymer) 1, Cop-1; COPAXONE™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);
- 延胡索酸,例如二甲基延胡索酸 (如 Fumaderm®);
- Rituxan® (利妥昔单抗(rituximab))或另一种抗-CD20 抗体,例如竞争或结合利妥昔单抗的重叠表位的抗体;
- 米托蒽醌(mixtozantrone) (NOVANTRONE®, Lederle);
- 化疗剂,例如克拉利平(clabribine, LEUSTATIN®), 硫唑嘌呤(IMURAN®), 环磷酰胺 (CYTOXAN®), 环孢菌素-A, 氮甲蝶呤, 4-氨基吡啶, 以及替扎尼定(tizanidine);
- 皮质类固醇,例如甲基强的松龙 (MEDRONE®, Pfizer), 强的松;
- 免疫球蛋白,例如 Rituxan® (利妥昔单抗); CTLA4 Ig; alemtuzumab (阿仑单抗)(MabCAMPATH®)或 daclizumab(达利珠单抗)(结合 CD25 的抗体);

- 抑制素;
- 免疫球蛋白 G 静脉注射剂(IgGIV);
- 硫唑嘌呤;
- TNF 拮抗剂。

乙酸格拉太咪尔是由氨基酸随机链构成的蛋白 - 谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸和酪氨酸(因此称 GLATiramer)。它可以利用 N-羧基氨基酸酐, 按照大约 5 份丙氨酸、3 份赖氨酸、1.5 份谷氨酸和 1 份酪氨酸的比例, 在溶液中合成。

其它在先试剂包括其它人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂, 所述人细胞因子或生长因子例如 TNF, LT, IL- 1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL- 16, IL- 18, EMAP-11, GM- CSF, FGF, 和 PDGF。第二种试剂的其它实例包括, 抗 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 等细胞表面分子或其配体的抗体。例如, 达利珠单抗是可以改进多发性硬化状况的抗-CD25 抗体。

其它抗体实例包括, 提供本文所述试剂的活性的抗体, 例如抗(engage)干扰素受体, 例如干扰素 β 受体的抗体。

其它在先试剂实例包括: FK506, 雷帕霉素(rapamycin), 霉酚酸酯(mycophenolate mofetil), 来氟洛米(leflunomide), 非类固醇抗炎药(NSAID), 如磷酸二酯酶抑制剂, 腺苷激动剂, 抗血栓形成试剂, 补体抑制剂, 肾上腺素能(adrenergic)试剂, 干扰本文所述促炎细胞因子的信号传递的试剂, IL-1 β 转化酶抑制剂(如 Vx740), 抗-P7, PSGL, TACE 抑制剂, T-细胞信号传递抑制剂如激酶抑制剂, 金属蛋白酶(metal loproteinase)抑制剂, 柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine), azathioprine(硫唑嘌呤), 6-巯基嘌呤, 血管紧张素(angiotensin)转化酶抑制剂, 可溶性细胞因子受体及其衍生物, 如本文所述, 抗炎细胞因子(如 IL-4, IL-10, IL-13 和 TGF)。

在一些实施方案中, 在先试剂已用于治疗 MS 的一或多种症状或副作用。这类试剂包括, 例如金刚烷胺(amantadine)、巴氯芬(baclofen)、帕帕非林(papaverine)、敏可静(meclizine)、羟嗪(hydroxyzine)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)、环丙沙星(ciprofloxacin)、多库酯(docusate)、匹莫林(pemoline)、达者仑(dantrolene)、去氨加压素(desmopressin)、地塞米松(dexamethasone)、托特罗定(tolterodine)、苯妥英(phenytoin)、奥昔布宁

(oxybutynin)、比沙可定(bisacodyl)、万拉法新(venlafaxine)、阿米替林(amitriptyline)、乌洛托品(methenamine)、氯硝西泮(clonazepam)、帕司烟肼(isoniazid)、伐地那非(vardenafil)、呋喃妥因(nitrofurantoin)、欧车前亲水粘胶(psyllium hydrophilic mucilloid)、前列地尔(alprostadil)、加巴喷丁(gabapentin)、去甲普林(nortriptyline)、帕罗西汀(paroxetine)、溴丙胺太林(propanteline bromide)、莫达非尼(modafinil)、氟西汀(floxetine)、非那吡啶(phenazopyridine)、甲基强的松龙、卡马西平(carbamazepine)、丙咪嗪(imipramine)、地西泮(diazepam)、西地那非(sildenafil)、丁氨苯丙酮(bupropion)、和舍曲林(sertraline)。多种小分子在先试剂具有 150-5000 道尔顿的分子量。

TNF 拮抗剂的例子包括, 嵌合的、人源化的、人化的或体外生成的抗 TNF (如人 TNF α) 抗体(或其抗原结合片段), 诸如 D2E7 (人 TNF α 抗体, 美国专利 6,258,562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (人源化抗-TNF α 抗体; Celltech/Pharmacia), cA2 (嵌合抗-TNF α 抗体; REMICADE™, Centocor); 抗-TNF 抗体片段 (如 CPD870); TNF 受体可溶性片段, 例如 p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物, 例如 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBREL™; Immunex; 参见, 例如 Arthritis & Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Vol. 44, 235A), p55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白(LENERCEPT™)); 酶拮抗剂, 例如 TNF α 转化酶(TACE)抑制剂(如 α -磺酰羟肟酸(alpha-sulfonyl hydroxamic acid)衍生物, WO 01/55112, 以及 N-羟基甲酰胺 TACE 抑制剂 GW 3333, -005, 或 -022); 以及 TNF-bp/s-TNFR (可溶性 TNF 结合蛋白; 参见, 例如 Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, pp. 37-42)。

在对干扰素 β 疗法反应不足的患者中进行 VLA-4 阻断疗法(如施用 VLA-4 结合抗体如那他珠单抗)的安全性和有效性表现表明, VLA-4 阻断疗法在对其它疗法(如其它生物疗法)反应不足的患者中进行治疗也是有效的。

那他珠单抗及其它 VLA-4 结合抗体

那他珠单抗是 $\alpha 4$ 整联蛋白结合抗体, 它抑制白细胞从血液迁移到中枢神经系统。那他珠单抗与活化 T 细胞和其它单核白细胞表面的 VLA-4 结合。

它可以破坏 T 细胞与内皮细胞之间的粘附,从而组织单核白细胞跨过内皮、进入实质(parenchyma)。结果使促炎细胞因子水平也下降。

那他珠单抗可以减少复发弛张型多发性硬化和复发性继发-渐进型多发性硬化患者的脑损伤数和临床复发次数。本文所述结果表明,那他珠单抗可以安全地施用于已接受在先的干扰素(例如干扰素 β , 如 IFN-beta-1a)治疗的多发性硬化患者。那他珠单抗在对干扰素 β 疗法反应不足的患者中表现出意想不到的效力。

那他珠单抗及相关 VLA-4 结合抗体在例如美国专利 5,840,299 中描述。单克隆抗体 21.6 和 HP1/2 是结合 VLA-4 的鼠单克隆抗体的例子。那他珠单抗是鼠单克隆抗体 21.6 的人源化形式(参见,例如美国专利 5,840,299)。另有文献描述了 HP1/2 的人源化形式(参见,例如美国专利 6,602,503)。其它数种结合 VLA-4 的单克隆抗体,如 HP2/1、HP2/4、L25 和 P4C2,可参见例如美国专利 6,602,503; Sanchez-Madrid et al., 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349; Hemler et al., 1987 J. Biol. Chem. 2:11478-11485; Issekutz and Wykretowicz, 1991, J. Immunol., 147: 109 (TA-2 mab); Pulido et al., 1991 J. Biol. Chem., 266(16):10241-10245; 美国专利 5,888,507。

一些 VLA-4 结合抗体识别 $\alpha 4$ 亚基上参与结合关联配体(如 VCAM-1 或纤连蛋白)的表位。多个这种抗体抑制 VLA-4 与关联配体(如 VCAM-1 和纤连蛋白)的结合。

一些有用的 VLA-4 结合抗体可以与细胞(例如淋巴细胞)表面 VLA-4 发生相互作用,但不引起细胞聚集。而另一些 VLA-4 结合抗体被发现引起这类聚集。HP1/2 不引起细胞聚集。HP1/2 单克隆抗体 (Sanchez-Madrid et al., 1986)具有很高的活性,它阻断 VLA-4 与 VCAM1 和纤连蛋白两者的相互作用,并对 VLA-4 表面的表位 B 具有特异性。该抗体及其它 B 表位特异性抗体(如 B1 或 B2 表位结合抗体; Pulido et al., 1991, 出处同上)代表了一类可用于本文所述方法中的 VLA-4 结合抗体。竞争与 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)的结合的抗体也可以用于本文所述方法中。

一例 VLA-4 结合抗体具有本文所述具体抗体的一或多个 CDR,例如全部三个 HC CDR 和/或全部三个 LC CDR,或具有与这种抗体(例如那他珠单抗)总体上至少 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99%相同的 CDR。在一个实施方案中, H1 和 H2 超变环具有与本文所述抗体的超变环相同的典型结构

(canonical structure)。在一个实施方案中，L1 和 L2 超变环具有与本文所述抗体的超变环相同的典型结构。

在一个实施方案中，HC 和/或 LC 可变区的氨基酸序列至少 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99, 或 100% 与本文所述抗体(例如那他珠单抗)的 HC 和/或 LC 可变区的氨基酸序列相同。HC 和/或 LC 可变区的氨基酸序列可以有至少一个氨基酸、但最多不超过 10、8、6、5、4、3、或 2 个氨基酸不同于本文所述抗体(例如那他珠单抗)的相应序列。例如，这种差别可以主要或全部位于框架区。

HC 和 LC 可变区的氨基酸序列，可以由在严格条件下与本文所述核酸序列杂交的核酸序列编码，或者由编码本文所述可变区或氨基酸序列的核酸序列编码。在一个实施方案中，HC 和/或 LC 可变区的一或多个框架区(如 FR1, FR2, FR3 和/或 FR4)的氨基酸序列有至少 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99, 或 100% 与本文所述抗体的 HC 和 LC 可变区的相应框架区相同。在一个实施方案中，一或多个重链或轻链框架区(如 HC FR1, FR2 和 FR3)有至少 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 或 100% 与人种系抗体的相应框架区序列相同。

两个序列之间的“同源性”或“序列同一性”(这两个术语在本文中可互换使用)如下计算。对序列按照最佳比较的目的进行比对(如，为了进行最佳比对，可以在两个氨基酸序列或核酸序列之一或两者中引入空隙；为了进行比较，可以忽略非同源序列)。最佳比对用 GCG 软件包中的 GAP 程序评出的最佳分值来确定，在该 GAP 程序中，使用 Blossum 62 评分矩阵，空隙罚分为 12，空隙延伸罚分为 4，移码空隙罚分(frameshift gap penalty)为 5。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一个序列中的一个位置与第二个序列中的相应位置被相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，这两个分子在该位置是相同的(本文中，氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。两个序列之间的同一性百分比是这两个序列所共有的相同位置的数量的函数。

本文中术语“在严格条件下杂交”是指杂交和洗涤条件。杂交反应可参照 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 进行，其全文引入本文作参考。该文献中描述了水性(aqueous)和非水性(nonaqueous)的方法，它们都可以被采用。高度严格杂交条件包括，

在 6X SSC、约 45°C 杂交，然后在 0.2X SSC、0.1% SDS、65°C 洗一或多次，或者采用基本相似的条件。

抗体生成(Antibody Generation)

与 VLA-4 结合的抗体可以通过对例如动物免疫而生成，或通过噬菌体展示等体外方法生成。VLA-4 的全部或一部分可以用作免疫原。例如，可以用 $\alpha 4$ 亚基的胞外区作免疫原。在一个实施方案中，经免疫的动物含有产生免疫球蛋白的细胞，这些细胞具有天然的、人化的或部分人化的免疫球蛋白基因座。在一个实施方案中，所述非人动物具有人免疫球蛋白基因的至少一部分。例如，可以用人 Ig 基因座的大片段对抗体生成有缺陷的小鼠品系进行改造。可以用杂交瘤技术从具有所需特异性的基因生成并筛选出抗原特异性单克隆抗体。参见，例如 XenoMouse™, Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994), US 2003-0070185, 美国专利 5,789,650, 以及 WO 96/34096。

还可以产生抗 VLA-4 的非人抗体，例如啮齿类抗体。可以将这种非人抗体人源化，例如参见美国专利 6,602,503, EP 239 400, 美国专利 5,693,761, 和美国专利 6,407,213。

EP 239 400 (Winter et al.)描述了通过将一个物种的抗体的互补决定区(CDR)用另一物种的 CDR 取代，从而改变(在指定的可变区改变)抗体的方法。CDR-取代型抗体比真正的嵌合抗体较少激发人的免疫应答，因为 CDR-取代型抗体中的非人成分很少(Riechmann et al., 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239, 1534-1536)。通常利用重组核酸技术，将鼠抗体的 CDR 取代为人抗体的相应区，产生编码所需取代型抗体的序列。可以添加具有所需独特型的人恒定区基因节段(通常是 CH 的 gamma I 和 CL 的 kappa)，并使人源化的重链基因和轻链基因在哺乳动物细胞中一起表达，从而产生可溶性人源化抗体。

Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:10029-33, 1989)和 WO 90/07861 描述了一种方法，其包括，通过利用计算机分析与原始鼠抗体的 V 区框架的最佳蛋白序列同源性，来选择人 V 区框架区，并建立鼠 V 区的三级结构，从而显示出很可能与鼠 CDR 相互作用的框架氨基酸残基。然后将这些鼠氨基酸残基置于同源人框架之上。也参美国专利 5,693,762; 5,693,761;

5,585,089; 和 5,530,101。Tempest et al., 1991, Biotechnology 9:266-271 利用分别源自 NEWM 和 REI 重链和轻链的 V 区框架作为标准,在不引进鼠残基的情况下,进行 CDR-移植。用 Tempest et al.方法构建基于 NEWM 和 REI 的人源化抗体的一个好处在于, NEWM 和 REI 的可变区的三维结构已通过 X-线晶体成像技术弄清楚了,因而可以针对 CDR 和 V 区框架残基之间的特异性相互作用建立模型。

非人抗体可以经过修饰而包括插入人免疫球蛋白序列的取代,例如在具体位置的共有的人氨基酸残基,例如以下一或多个(优选至少 5, 10, 12, 或全部)位置:(在轻链可变区的 FR 中) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, 和/或(在重链可变区的 FR 中) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H, 和/或 103H (遵循 Kabat 编号)。参见,例如美国专利 6,407,213。

与 VLA-4 结合的完全的人单克隆抗体可以利用例如体外刺激(in vitro-primed)的人脾细胞来制备,参见 Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147, 86-95。它们可以通过所有组分克隆(repertoire cloning)来制备,参见 Persson et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88: 2432-2436 或 Huang and Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141, 227-236; 以及美国专利 5,798,230。大型非致敏人噬菌体展示文库也可以用于分离高亲和力抗体,将它们研发为人类治疗剂,这可以利用标准噬菌体技术(参见,例如 Vaughan et al, 1996; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2:371-8; US 2003-0232333)。

抗体制备(Antibody Production)

抗体可以在原核细胞和真核细胞中产生。在一个实施方案中,抗体(如 scFv)在毕赤酵母(*Pichia*) (参见,例如 Powers et al. (2001) J Immunol Methods. 251:123-35)、汉逊酵母(*Hansenula*)或糖酵母(*Saccharomyces*)等酵母细胞中表达。

在一个实施方案中,抗体,尤其是全长抗体,例如 IgG,在哺乳动物细胞中表达。用于重组表达的哺乳动物宿主细胞例如有,中国仓鼠卵巢(CHO 细胞)(包括 dhfr- CHO 细胞,见 Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 77:4216-4220, 使用 DHFR 选择标记, 例如见 Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621)、淋巴细胞系例如 NS0 骨髓瘤细胞和 SP2 细胞、COS 细胞、K562、以及转基因动物(例如转基因哺乳动物)的细胞。例如, 所述细胞是哺乳动物上皮细胞。

重组表达载体除了携带编码免疫球蛋白区的核酸序列, 还可以携带其它核酸序列, 如调节该载体在宿主细胞中的复制的序列(如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有利于选出引入了所述载体的宿主细胞(参见, 例如美国专利 4,399,216, 4,634,665 和 5,179,017)。选择标记基因例如有, 二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(其利用氨甲蝶呤选择/扩增 dhfr-宿主细胞)和 neo 基因(其用于 G418 筛选)。

在一例抗体(如全长抗体或其抗原结合部分)重组表达系统中, 将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体, 通过磷酸钙介导的转染, 引入 dhfr-CHO 细胞。在该重组表达载体中, 抗体的重链和轻链基因各自与增强子/启动子调节元件(如源自 SV40、CMV、腺病毒等, 诸如 CMV 增强子/AdMLP 启动子调节元件或 SV40 增强子/AdMLP 启动子调节元件)可操作相连, 以便驱动所述基因的高水平转录。所述重组表达载体还可以携带 DHFR 基因, 其允许用氨甲蝶呤选择/扩增转染了所述载体的 dhfr-宿主细胞。对选出的转化宿主细胞进行培养, 使之表达抗体重链和轻链, 并从培养基中回收完整抗体。用标准分子生物学技术制备所述重组表达载体, 来转染宿主细胞, 选出转化体, 培养宿主细胞, 并从培养基中回收抗体。例如, 一些抗体可以利用蛋白 A 或蛋白 G 通过亲和层析进行分离。

抗体还可以包含修饰, 例如改变 Fc 功能的修饰, 从而例如减弱或消除与 Fc 受体和/或与 C1q 的相互作用。例如, 人 IgG1 恒定区可以突变一或多个残基, 例如残基 234 和 237 的一或多个, 编号例如见美国专利 5,648,260。其它修饰例子可参见美国专利 5,648,260。

对于一些含 Fc 区的抗体, 可以设计抗体制备系统, 来合成含糖基化 Fc 区的抗体。例如, IgG 分子的 Fc 区在 CH2 区的天冬酰胺 297 处糖基化。该天冬酰胺是用双触角型寡糖(biantennary-type oligosaccharide)进行修饰的位置。这种糖基化参与 Fc 受体和补体 C1q 所介导的效应器功能(Burton and Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis et al. (1998) Immunol. Rev.

163:59-76)。Fc区可以在哺乳动物表达系统中产生，从而使对应于天冬酰胺297的残基适当糖基化。Fc区也可以包含其它的真核细胞翻译后修饰。

抗体也可以由转基因动物产生。例如，美国专利5,849,992描述了在哺乳动物乳腺中表达抗体的方法。构建转基因，使其含有乳特异性启动子和编码目标抗体(如本文所述抗体)的核酸序列，以及分泌所需的信号序列。由这类转基因哺乳动物中的雌性动物产出的乳汁含有分泌至其中的目标抗体，例如本文所述抗体。所述抗体可以从乳汁中纯化出来，或在一些应用中，不经纯化而直接使用。

抗体还可以用例如改进其在循环(如血液、血清、淋巴)、支气管肺泡灌洗液或其它组织中的稳定性和/或滞留时间的组分(moiety)进行修饰，所述改进例如是改进至少1.5、2、5、10、或50倍。

例如，VLA-4结合抗体可以与聚合物结合，所述聚合物例如基本上无抗原性的聚合物，如聚环氧烷烃(polyalkylene oxide)或聚环氧乙烷(polyethylene oxide)。合适的聚合物分子量可以差别很大。可以采用分子量平均约200-约35,000道尔顿(或约1,000-约15,000、以及2,000-约12,500)的聚合物。

例如，VLA-4结合抗体可以与水溶性聚合物偶联，所述聚合物例如亲水聚乙烯聚合物，如聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。这类聚合物的非限制性例子有，聚环氧烷烃均聚物如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇(polyoxyethylenated polyols)、它们的共聚物和嵌段共聚物，只要所述嵌段共聚物维持水溶性即可。其它可用的聚合物包括，聚氧化烯(polyoxyalkylenes)如聚氧化乙烯(polyoxyethylene)、聚氧化丙烯(polyoxypropylene)、以及聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的嵌段共聚物(Pluronic)；聚甲基丙烯酸酯(polymethacrylates)；丙烯酸共聚物(carbomer)；含有以下单糖的分支或非分支多糖：D-甘露糖、D-及L-半乳糖、岩藻糖(fucose)、果糖、D-木糖(xylose)、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸(glucuronic acid)、唾液酸(sialic acid)、D-半乳糖醛酸(galacturonic acid)、D-甘露糖醛酸(mannuronic acid)(如聚甘露糖醛酸或藻酸(alginic acid))、D-葡萄糖胺(glucosamine)、D-半乳糖胺(galactosamine)、D-葡萄糖和神经氨酸(neuraminic acid)包括同多糖(homopolysaccharide)和杂多糖(heteropolysaccharide)如乳糖、支链淀粉(amylopectin)、淀粉(starch)、羟乙基淀粉、直链淀粉(amylose)、硫酸葡聚糖(dextrane sulfate)、葡聚糖(dextran)、

糊精(dextrins)、糖原(glycogen)、或酸性粘多糖(acid mucopolysaccharide)的多糖亚基,如透明质酸(hyaluronic acid);糖醇聚合物如聚山梨糖醇(polysorbitol)和聚甘露糖醇(polymannitol);肝素(heparin)或 heparon。

药物组合物

VLA-4 结合试剂,如 VLA-4 结合抗体(如那他珠单抗)可以配制成药物组合物。药物组合物通常含有可药用载体。本文中“可药用载体”包括所有任何溶剂、分散介质(dispersion media)、包衣(coating)、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、以及其它生理相容性试剂。

“可药用盐”是指,保留本发明化合物的所需活性且不引起任何不良毒性的盐(参见,例如 Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这样的盐例如有,酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括,由无毒性无机酸和无毒性有机酸衍生的盐,所述无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸(sulfuric acid)、氢溴酸、氢碘酸等,所述有机酸如脂肪族一羧酸和二羧酸(aliphatic mono- and dicarboxylic acid)、苯基取代的链烷酸(phenyl-substituted alcanoic acid)、羟基链烷酸、芳香酸(aromatic acid)、脂肪族和芳香族磺酸(aliphatic and aromatic sulfonic acid)等。碱加成盐包括,由碱土金属和无毒性有机胺衍生的盐,所述碱土金属如钠、钾、镁、钙等,所述有机胺如 N,N'-二苄基乙二胺(dibenzylethylenediamine)、N-甲基还原葡萄糖胺(methylglucamine)、氯普鲁卡因(chloroprocaine)、胆碱(choline)、二乙醇胺(diethanolamine)、乙二胺(ethylenediamine),普鲁卡因(procaine)等。

那他珠单抗及本文所述其它试剂可按标准方法配制。药物配制使本领域很成熟的技术,可参见 Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); and Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X)。

在一个实施方案中,那他珠单抗或另一种试剂(如另一种抗体)可以与赋形剂物质一起配制,所述赋形剂物质如氯化钠、七水磷酸氢二钠(sodium dibasic phosphate heptahydrate)、磷酸二氢钠(sodium monobasic phosphate)、

以及 polysorbate 80。它可以是例如缓冲溶液中约 20 mg/ml 的浓度，并可以贮存在 2-8°C。那他珠单抗可以按产品标签所注进行配制。

药物组合物还可以是多种其它形式。例如，液体、半固体及固体剂型，如溶液(如注射液和灌注液)、分散体(dispersion)或悬浮液(suspension)、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。优选形式可以取决于用药模式和治疗目的。通常，本文所述试剂的组合物采用注射液或灌注液的形式。

所述组合物可以经非胃肠道途径施用(如静脉、皮下、腹腔、或肌肉注射)。术语“非胃肠道施用”在本文中是指，除了肠道使用和局部表面使用以外的施用模式，通常经注射而施用，包括但不限于经以下模式注射和输注：静脉内(intravenous)、肌肉内(intramuscular)、动脉内(intraarterial)、鞘内(intrathecal)、囊内(intracapsular)、眼眶内(intraorbital)、心内(intracardiac)、皮内(intradermal)、腹腔(intraperitoneal)、经气管(transtracheal)、皮下(subcutaneous)、表皮下(subcuticular)、关节内(intraarticular)、被膜下(subcapsular)、蛛网膜下(subarachnoid)、脊柱内(intraspinal)、硬膜外(epidural)以及胸骨内(intrasternal)。

药物组合物通常必须是无菌的，且在制备和贮存条件下保持稳定。也可以对药物组合物进行测试，以确保它符合用药规定和行业标准。

可以将组合物配制成溶液、微乳液、分散体、脂质体或其它适于药物高浓度的有序结构。将需要量的本文所述试剂，与所需的一或多种上文所列的成分一起，掺入合适的溶剂中，再过滤除菌，可以制得无菌注射液。通常，将本文所述试剂和上文所列的所需其它成分一起，掺入含有基本分散介质的无菌媒介物(vehicle)中，可制得分散体。在制备无菌注射液所用的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冻干，产生本文所述试剂的粉末外加任何来自事先经过过滤除菌的本文所述试剂的溶液的所需成分。溶液的适当流动性(proper fluidity)可以通过以下方法维持，例如，利用卵磷脂之类的包衣、在分散体的情况下维持所需的粒径(particle size)、以及利用表明活性剂。注射液通过在组合物中包含硬脂酸盐和明胶之类的延迟吸收剂，可延长吸收时间。

用药

VLA-4 结合抗体可以经多种方法对受试者(例如人类受试者)用药。在多种应用中, 用药途径是以下之一: 静脉注射或输注、皮下注射、或肌肉注射。VLA-4 结合抗体(如那他珠单抗)可以按固定剂量施用, 或者按 mg/kg 剂量施用, 但优选按固定剂量施用。所述抗体可以静脉(IV)或皮下(SC)施用。

所述抗体(例如那他珠单抗)通常按 50-1000 mg IV, 例如 100-600 mg IV, 例如约 300 mg IV 的固定单位剂量(fixed unit dose)施用。可以每 4 周施用一个单位剂量, 或采用更高或更低的频率, 例如每 2 周一次或每周一次。当皮下施用时, 所述抗体通常按 50-100 mg SC (如 75 mg)的剂量施用例如至少一周一次(如一周两次)。也可以按 1-10 mg/kg (例如约 6.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0 mg/kg)的剂量以快速输注(bolus)的形式施用。在以下情况下, 可以进行连续用药, 例如经皮下泵进行连续用药。

也可以选用减少或避免抗 VLA-4 结合抗体的抗体生成的剂量, 以实现 $\alpha 4$ 亚基的 40, 50, 70, 75, 或 80%以上饱和度, 或实现 $\alpha 4$ 亚基的 80, 70, 60, 50, 或 40%以下饱和度, 或阻止循环白细胞量增加。

在一些实施方案中, 活性试剂可以与保护该化合物免于快速释放的载体(carrier)一起配制, 如成为控释配制剂(包括植入体(implant))和微囊递送体系(microencapsulated delivery system)。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物, 如乙烯乙酸乙酯(ethylene vinyl acetate)、聚酸酐(polyanhydride)、聚乙醇酸(polyglycolic acid)、胶原(collagen)、聚原酸酯(polyorthoester)和聚乳酸(polylactic acid)。制备这类配制剂的多种方法有专利或者是众所周知的。参见, 例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

药物组合物可以利用医疗设备进行施用。例如, 药物组合物可以用无针式皮下注射设备(needleless hypodermic injection device)进行施用, 所述设备参见例如美国专利 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 或 4,596,556。众所周知的植入体和模块(module)有: 美国专利 4,487,603 公开了一种可植入的显微-输注泵, 用于以控制速率分配(dispensing)药物; 美国专利 4,486,194 公开了一种治疗设备, 用于穿过皮肤施用药物; 美国专利 4,447,233 公开了一种药物输注泵, 用于以精确的输注速率递送药物; 美国专利 4,447,224 公开了一种可变流植入型输注装置, 用于连续递送药物; 美国专利 4,439,196 公开了一种渗透型药物递送体系, 其

具有多室隔间(multi-chamber compartment); 美国专利 4,475,196 公开了一种渗透型药物递送体系。当然, 另有多种这类植入体、递送体系和模块也是本领域已知的。

本文中, 单位剂型(Dosage unit form)或“固定剂量(fixed dose)”是指物理离散单位, 是适合对受治受试者施用的单次药剂(unitary dosage); 每一单位含有预定量的活性化合物和所需的药用载体, 还可以任选含有其它试剂, 所述活性化合物的预定量是经过计算可以产生所需治疗效应的量。

药物组合物可以包含“治疗有效量”的本文所述试剂。试剂的治疗有效量也可以因个体的疾病状态、年龄、性别、体重, 以及该化合物在该个体体内激发所需反应的能力而有不同, 所述能力例如改进至少一个疾病参数, 例如多发性硬化参数, 或改进该疾病(例如多发性硬化)的至少一种症状。治疗有效量也可以是治疗有益效果超过该组合物的任何毒副作用或有害作用的量。

多发性硬化

多发性硬化(MS)是中枢神经系统疾病, 其特征是炎症以及髓磷脂鞘的损失。

MS 患者可以通过 MS 临床确诊的已有标准来鉴别, 该标准由 MS 诊断的专题研究小组(the workshop on the diagnosis of MS)制定(Poser et al., Ann. Neurol. 13:227, 1983)。简言之, 临床确诊的 MS 患者有两处发作(attack), 还有任两处损伤的临床症状或一处损伤的临床症状以及除这两处以外的另一损伤的亚临床症状。MS 还可以通过两处发作的证据以及脑脊液中 IgG 的单一克隆带(clonal band)来确诊, 或者通过将发作、两处损伤的临床证据、以及脑脊液 IgG 单一克隆带这三者综合来确诊。也可以用 McDonald 标准诊断 MS (McDonald et al., 2001, *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of multiple sclerosis*, Ann Neurol 50:121-127)。McDonald 标准包括, 在无多处临床发作的情况下, 使用用于诊断 MS 的一段时间内 CNS 损伤的 MRI 证据。多发性硬化的有效治疗可以用多种不同方法评估。可以用以下参数量化疗效。两个示例性标准包括: EDSS (残疾状况拓展量表(extended disability status scale)), 以及 MRI (磁共振成像)所示加重表现。EDSS 是对 MS 所致临床损

伤分级的一种工具(Kurtzke, Neurology 33:1444, 1983)。对 8 个功能系统进行评估,以考查神经损伤的类型和严重程度。简言之,在治疗之前,对患者以下系统的损伤进行评估:锥体(pyramidal)、小脑(cerebella)、脑干(brainstem)、感觉(sensory)、肠和膀胱(bowel and bladder)、视觉(visual)、大脑(cerebral)及其它。定期随访。评分从 0 (正常)至 10 (因 MS 致死)。降一整级(A decrease of one full step)表示有效治疗(Kurtzke, Ann. Neurol. 36:573-79, 1994)。

加重是指,出现 MS 引起的新症状,并伴有相应的新的神经异常(IFNB MS Study Group, 出处同上)。此外,加重必需持续至少 24 小时且之前稳定或改进至少 30 天。简言之,由临床医师对患者进行标准神经学检查。加重依据神经学等级评分(Neurological Rating Scale)的变化可以分为轻度(mild)、中度(moderate)、或重度(severe)(Sipe et al., Neurology 34:1368, 1984)。另外还测定年度加重率和无加重患者比例。

当治疗组和安慰剂组经过上述任一测量发现,无加重或无复发患者比例有统计学显著性差异,可认为治疗有效。另外还可以测量第一次加重的时刻、加重总时间(duration)以及严重程度。在这一方面,治疗有效是指,治疗组第一次加重的时刻、或总时间以及严重程度比对照组有统计学显著性差异。无加重或无复发的阶段超过 1 年、18 个月、或 20 个月尤其值得注意。

临床测量包括:间隔 1 年或 2 年的复发率、以及 EDSS 的改变,后者包括从持续 6 个月的 EDSS 基线水平 1.0 个单位进展的时间。在 Kaplan-Meier 曲线中,持续进行性残疾延迟表示有效。其它标准包括, MRI T2 成像的面积和体积的变化,以及由钆增强型成像(gadolinium enhanced image)所测定的损伤数和损伤体积的变化。

MRI 可以用于,利用钆-DTPA-增强型成像测量活动性损伤(active lesion)(McDonald et al., Ann. Neurol. 36:14, 1994),或利用 T₂-weighted 技术测量损伤的位置和范围(extent)。简言之,获得基线 MRI。每一轮后续研究采用同一成像平面(imaging plane)和患者部位(patient position)。可以选择定位和成像顺序(positioning and imaging sequence),从而最大程度检测损伤(maximize lesion detection)并促进对损伤的显迹(lesion tracing)。后续研究可以采用同一定位和成像顺序。MS 的存在、位置和范围可以由放射学专业人员确定。可

以划处损伤面积的轮廓，将各部分总计，获得损伤总面积。可以进行三项分析：新损伤证据、活动性损伤出现率、损伤面积的百分比变化(Paty et al., Neurology 43:665, 1993)。患者个体相对于基线水平或治疗组相对于安慰剂组有统计学显著性改进，可以确定治疗导致改进。

与多发性硬化有关、可以用本文所述方法治疗的正组例如有：视神经炎(optic neuritis)、复视(diplopia)、眼球震颤(nystagmus)、视辨距不良(ocular dysmetria)、核间性眼肌瘫痪(internuclear ophthalmoplegia)、移动和声音幻觉(movement and sound phosphenes)、相对传入性瞳孔障碍(afferent pupillary defect)、轻瘫(paresis)、单肢轻瘫(monoparesis)、下肢轻瘫(paraparesis)、轻偏瘫(hemiparesis)、quadraparesis、麻痹(plegia)、下身麻痹(paraplegia)、半身不遂(hemiplegia)、四肢麻痹(tetraplegia)、quadraplegia、强直(spasticity)、构音困难(dysarthria)、肌肉萎缩(muscle atrophy)、痉挛(spasms)、痛性痉挛(cramps)、张力过低(hypotonia)、阵挛(clonus)、肌阵挛(myoclonus)、肌纤维颤搐(myokymia)、腿多动综合症(restless leg syndrome)、足下垂(footdrop)、功能不良性反射(dysfunctional reflexes)、下身感觉缺失(paraesthesia)、麻木(anaesthesia)、神经痛(neuralgia)、神经病性痛和神经原性痛(neuropathic and neurogenic pain)、l'hermitte's、本体感受障碍(proprioceptive dysfunction)、三叉神经痛(trigeminal neuralgia)、共济失调(ataxia)、意向震颤(intention tremor)、辨距困难(dysmetria)、前庭性共济失调(vestibular ataxia)、眩晕(vertigo)、speech ataxia、张力失常(dystonia)、轮替运动障碍(dysdiadochokinesia)、尿频(frequent micturation)、膀胱痉挛(bladder spasticity)、膀胱弛缓(flaccid bladder)、逼肌括约肌协同动作障碍(detrusor-sphincter dyssynergia)、勃起障碍(erectile dysfunction)、性感缺失(anorgasmy)、性冷淡(frigidity)、便秘(constipation)、便急(fecal urgency)、大便失禁(fecal incontinence)、抑郁(depression)、认知障碍(cognitive dysfunction)、痴呆(dementia)、情绪波动(mood swings)、情绪不稳定(emotional lability)、欣快(euphoria)、两极综合症(bipolar syndrome)、焦虑(anxiety)、失语(aphasia)、言语困难(dysphasia)、疲劳(fatigue)、Uhthoff 综合症、胃食管反流(gastroesophageal reflux)、以及睡眠障碍。

每一例 MS 显示出表现及后续过程(presentation and subsequent course)的多种模式中的一种。最常见，MS 首先表现为一系列发作，随后完全或部

分消失，因为症状神秘减少，仅在一段稳定期后再出现。这称为复发-弛张型(RR)MS。原发-渐进型(PP)MS的特征是，逐渐的临床衰退，无明显消除迹象，但症状有短暂的平台期或略有缓解。继发-渐进型(SP)MS是以复发-弛张过程开始、随后是原发-渐进过程。在较少病例中，患者可能有渐进-复发(PR)过程，其疾病持续发展并不断被急性发作打断。PP、SP、和PR在有些病例中集中表现，称慢性渐进型MS。

少数患者出现恶性MS，特征是持续快速衰退(swift and relentless decline)，导致明显残疾或甚至在生病不久就死亡。施用本文所述联合疗法，可以阻止或减慢这种衰退。

除了对人的研究，或者在对人进行研究之前，可以用动物模型评价治疗效力。多发性硬化动物模型例如有，实验型自身免疫性脑炎(EAE)小鼠模型，例如参见Tuohy et al. (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel et al. (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), and Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129)。可以在诱导EAE之前，对小鼠施用本文所述试剂。然后，评价小鼠的特征性标准，以确定在该模型中施用所述试剂的效力。

其它疾病

本文所述方法也可以用于治疗已表现出对干扰素疗法反应不足的患者中的其它炎性疾病、免疫疾病、或自身免疫病。这类疾病包括，例如中枢神经系统炎症(如除了多发性硬化以外，脑炎(meningitis)、视神经脊髓炎(neuromyelitis optica)、神经肉样瘤病(neurosarcoidosis)、CNS脉管炎(vasculitis)、脑炎(encephalitis)、和横贯性脊髓炎(transverse myelitis)); 组织或器官移植物排斥或移植物抗宿主疾病; 急性CNS损伤，例如中风(stroke)或脊髓损伤(spinal cord injury); 慢性肾病(chronic renal disease); 变态反应(allergy)，例如变态反应性哮喘(allergic asthma); I型糖尿病; 炎性肠疾病，例如Crohn病、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis); 重症肌无力(myasthenia gravis); 肌纤维痛(fibromyalgia); 关节炎性疾病(arthritic disorder)，例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎(psoriatic arthritis); 炎性/免疫性皮肤病，例如银屑病(psoriasis)、白癜风(vitiligo)、皮炎(dermatitis)、扁平苔癣(lichen planus); 系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus); 干燥综合症(Sjogren's Syndrome); 血液学癌症(hematological cancers)，例如多发性骨髓瘤(multiple

myeloma)、白血病(leukemia)、淋巴瘤(lymphoma); 实体癌, 例如肉瘤(sarcomas)或腺癌(carcinoma), 如肺、乳腺、前列腺以及脑部的癌; 纤维化(fibrotic)疾病, 例如肺纤维化(pulmonary fibrosis)、肌纤维化(myelofibrosis)、肝硬化(liver cirrhosis)、肾小球膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis)、新月体性肾小球肾炎(crescentic glomerulonephritis)、糖尿病性肾病(diabetic nephropathy)、以及肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis)。

例如, 可以施用 VLA-4 结合试剂(如 VLA-4 结合抗体(例如那他珠单抗)), 来治疗这些或其它炎性疾病、免疫病、或自身免疫病, 例如对另一种或多种试剂, 如本文所述一或多种试剂反应不足的疾病。

试剂盒(kit)

可以用试剂盒形式提供 VLA-4 结合试剂(如那他珠单抗)。在一个实施方案中, 所述试剂盒包括(a)装有组合物的容器, 所述组合物含有 VLA-4 结合试剂(如那他珠单抗), 还可以含有(b)信息物质(informational material)。所述信息物质可以是描述性质(descriptive)、建议性质(instructional)、商品广告性质(marketing)或其它性质的物质, 它们与本文所述方法和/或使用所述试剂的治疗益处有关。

试剂盒中的信息物质其形式不限。在一个实施方案中, 所述信息物质包含关于该化合物的制备、该化合物的分子量、浓度、有效期、批号或生产地信息等的信息。在一个实施方案中, 所述信息物质涉及施用 VLA-4 结合试剂的方法, 例如合适的用量、施用方式(manner)、或模式(mode)(如本文所述剂量(dose)、剂型(dosage form)、或施用模式)。所述方法可以是治疗多发性硬化的方法, 例如在已接受干扰素 β 治疗的患者中治疗多发性硬化的方法。

试剂盒中的信息物质其形式不限。在多种情况中, 所述信息物质, 如说明书(instructions), 为印刷体(printed matter), 如印刷的文字(text)、图(drawing)和/或照片(photograph), 例如标签(label)或印刷的传单(printed sheet)。但所述信息物质也可以是其它形式, 如盲文(Braille)、计算机可读形式、视频、或声频形式。在另一实施方案中, 试剂盒中的信息物质是联络信息, 例如物理地址(physical address)、电子邮件地址、网址、或电话号码,

使试剂盒的用户可以从中获得关于本文所述试剂和/或本文所述该试剂的用途的实质信息。当然，所述信息物质也可以是多种形式的任意组合。

试剂盒的组合物中，除了含有 VLA-4 结合试剂，还可以含有其它成分，如溶剂或缓冲液、稳定剂、或保存剂(preservative)。所述试剂盒还可以包含其它试剂，例如第二种或第三种试剂，例如其它治疗试剂。

这些试剂可以为任何形式，例如液体、干燥形式或冻干形式。优选所述试剂是基本纯(但它们可以混合在一起或彼此分开递送)和/或无菌的。当所述试剂为溶液时，该溶液优选是含水溶液，优选无菌含水溶液。当所述试剂为干燥形式时，一般加入合适的溶剂来重建。所述溶剂，例如无菌水或缓冲液，可以选择包含在试剂盒中。

所述试剂盒可以包括一或多个容器，其中装有一或多种含所述试剂的组合物。在一些实施方案中，所述试剂盒包括相互分隔的容器、分隔体(divider)或分隔室(compartment)，用于装载组合物和信息物质。例如，可以将组合物装在大瓶(bottle)、小瓶(vial)或注射器(syringe)中，将信息物质装在塑料套或袋中。在其它实施方案中，将试剂盒的不同组件装在一个不分隔的容器中。例如，将组合物装在大瓶、小瓶或注射器中，而所述大瓶、小瓶或注射器上贴有标签形式的信息物质。在一些实施方案中，试剂盒包括一组(如一整包)容器，其中每一容器装有一或多个单位剂型(如本文所述剂型)的所述试剂。所述容器可以包括一个单位剂(unit dosage)，例如一个含有 VLA-4 结合试剂的单位。例如，所述试剂盒包括一组注射器、安瓿(ampules)、箔袋(foil packet)、带气泡的包装袋(blister pack)、或医疗装置(medical devices)，例如每一个都容纳一个单位剂。试剂盒中的这些容器可以是隔绝空气的(air tight)、防水的(waterproof) (如湿度或蒸发引起的变化都无法透过)、和/或避光的(light-tight)。

所述试剂盒还可以选择含有适于施用所述组合物的装置，例如注射器或其它合适的递送装置。所述装置可以预装 VLA-4 结合试剂，例如一个单位剂，或者也可以是空的但适于装载试剂。

本文中出现的所有文献和出版物都引入本文作参考。以下实施例无意进行任何限制。

实施例

实施例 1 – AFFIRM 和 SENTINEL 研究

AFFIRM 和 SENTINEL 研究(Rudick et al., 2003, Neurology 60 Supp.1: A479)在第 13 个月的临床终点分别见表 1 和 2。

表 1

	那他珠单抗 N=627	安慰剂(Placebo) N=315
年度复发率	0.25	0.74
相对降低	66%	
仍保持无复发的患者的百分比	76%	53%

表 2

	那他珠单抗+Avonex N=589	安慰剂+Avonex N=582
年度复发率	0.36	0.78
相对降低	54%	
仍保持无复发的患者的百分比	67%	46%

其它实施分案都落在所附权利要求的范围内。