

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580047544.2

[43] 公开日 2008 年 1 月 23 日

[11] 公开号 CN 101111263A

[22] 申请日 2005.12.2

[21] 申请号 200580047544.2

[30] 优先权

[32] 2004.12.3 [33] US [31] 60/633,022

[86] 国际申请 PCT/US2005/043980 2005.12.2

[87] 国际公布 WO2006/060787 英 2006.6.8

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.31

[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 马科·里佐

[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 3 页 说明书 23 页

[54] 发明名称

推迟或阻止发生多发性硬化

[57] 摘要

本文描述了对有复发 MS 风险的人进行治疗的方法。

1. 对有复发或渐进型多发性硬化风险的受试者进行治疗的方法，包括对该受试者施用 VLA-4 结合抗体。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者经历一次灶性神经功能缺损的临床发作。
3. 权利要求 2 的方法，其中所述抗体在所述临床发作的 4 周内施用。
4. 权利要求 2 的方法，其中所述神经功能缺损表现为选自下组的一或多个症状：四肢中一或多肢虚弱、四肢中一或多肢麻痹、四肢中一或多肢震颤、失控型肌肉痉挛、感觉丧失或异常、协调性降低、平衡能力丧失、抽象思维能力丧失、归纳能力丧失、讲话困难、言语理解困难、单目或双目失明(monocular or binocular visual loss)、以及大或小便失禁(bladder or bowel discontrol)。
5. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者经颅部扫描显示脑组织炎症或髓鞘受损的身体证据。
6. 权利要求 5 的方法，其中所述颅部扫描选自：X 线照片扫描、计算机辅助体层摄影(CT)扫描，和磁共振成像(MRI)扫描。
7. 权利要求 5 的方法，其中所述受试者经 MRI 测出有 1-50 处脑损伤。
8. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者有抗髓少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂碱性蛋白(MBP)之一或两者的血清抗体。
9. 权利要求 5 的方法，其中所述受试者经历一次神经功能缺损临床发作。
10. 权利要求 5 的方法，其中所述受试者未经历神经功能缺损临床发作。
11. 权利要求 8 的方法，其中所述受试者经历一次神经功能缺损临床发作。
12. 权利要求 8 的方法，其中所述受试者未经历神经功能缺损临床发作。
13. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者未经历灶性神经功能缺损的临床发作、且具有一或多个以下特征：
 - (a) 经颅部扫描发现有多处大于或等于 3 mm 的脑损伤或疤痕，

(b) 有抗髓少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂碱性蛋白(MBP)之一或两者的血清抗体，

(c) 与阴性对照相比，CSF IgG 水平增加，和

(d) 与阴性对照相比，髓磷脂碱性蛋白(MBP)水平增加。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者经历一次灶性神经功能缺损的临床发作、且具有一或多个以下特征：

(a) 经颅部扫描发现有多处大于或等于 3 mm 的脑损伤或疤痕，

(b) 有抗髓少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂碱性蛋白(MBP)之一或两者的血清抗体，

(c) 与阴性对照相比，CSF IgG 水平增加，和

(d) 与阴性对照相比，髓磷脂碱性蛋白(MBP)水平增加。

15. 权利要求 1 的方法，还包括，在用药之前，基于以下一或多项选出有 MS 风险的受试者：(a) 颅部扫描显示髓鞘受损、(b) 有抗 MOG 和 MBP 之一或两者的血清抗体、(c) CSF IgG 水平增加、(d) MBP 水平增加、以及(e) 出现一次灶性神经功能缺损的临床发作。

16. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者有多发性硬化家族史。

17. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者有一次累及视神经、脊髓或小脑的急性孤立脱髓鞘事件。

18. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者有多个无临床症状、大于或等于 3 mm 的脑 MRI 损伤。

19. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者有横贯性脊髓炎。

20. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者有视神经炎。

21. 治疗受试者的方法，包括：

对受试者进行扫描，和

当扫描显示出无临床症状的脑组织炎症或髓鞘受损证据时，对该受试者施用 VLA-4 结合抗体。

22. 治疗受试者的单相脱髓鞘病的方法，包括：鉴别患有单相脱髓鞘病的受试者；和对该受试者施用 VLA-4 结合抗体。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述受试者有横贯性脊髓炎。

24. 权利要求 22 的方法，其中所述受试者有视神经炎。

25. 权利要求 22 的方法，其中所述受试者有急性播散性脑脊髓炎 (ADEM)。

26. 权利要求 1, 13, 14, 15, 21 和 22 之一的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体至少结合 VLA-4 的 α 链。

27. 权利要求 1, 13, 14, 15, 21 和 22 之一的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体包含那他珠单抗。

28. 权利要求 1, 13, 14, 15, 21 和 22 之一的方法，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。

29. 权利要求 1, 13, 14, 15, 21 和 22 之一的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体是人抗体或人源化抗体。

30. 权利要求 1, 13, 14, 15, 21 和 22 之一的方法，其中所述 VLA-4 结合抗体与第二种治疗剂联用。

推迟或阻止发生多发性硬化

相关申请

本申请要求 2005 年 12 月 3 日提交的美国临时申请 60/633,022 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(MS)是中枢神经系统慢性、多灶性(multifocal)、脱髓鞘(demyelinating)、自身免疫病。全世界有超过 2 百万人患有 MS，美国有 400,000。近 80% 的 MS 患者有复发形似，其中>80% 的患者在 25 年内进展为继发渐进型 MS(secondary progressive MS)。

发明概述

一方面，本发明涉及治疗有多发性硬化(MS)风险，例如有渐进型 MS (progressive MS) 或复发型 MS (relapsing MS) 风险的受试者的方法。所述方法包括，对该受试者施用 VLA-4 阻断剂(VLA-4 blocking agent)，例如 VLA-4 结合抗体(VLA-4 binding antibody) (例如全长 VLA-4 结合抗体或 VLA-4 结合抗体片段)。在一实施方案中，所述方法可以阻止(prevent) MS(例如复发弛张型 MS (relapsing remitting MS))临床表现(clinical manifestation)的发作或将其实现(delay)(例如至少 1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、10 年或更长时间)，或者可以使后续(例如继发)临床表现的严重程度最低。在一实施方案中，该受试者有不到两次的灶性(focal)神经功能缺损(neurologic deficit)临床发作(clinical episode)。

在一实施方案中，所述受试者经历一次灶性神经功能缺损的临床发作。所述神经功能缺损可以表现为例如以下一或多个症状：四肢中一或多肢(one or more extremities)虚弱、四肢中一或多肢麻痹(paralysis)、四肢中一或多肢震颤(tremor)、失控型肌肉痉挛(uncontrollable muscle spasticity)、感觉丧失或异常(sensory loss or abnormality)、协调性降低(decreased coordination)、平衡能力丧失(loss of balance)、抽象思维能力丧失(loss of ability to think

abstractly)、归纳能力丧失(loss of ability to generalize)、讲话困难(difficulty speaking)、以及言语理解困难(difficulty understanding speech)。

所述 VLA-4 阻断剂可以在临床发作的 6、4、3、2、或 1 周内施用。

在另一实施方案中，受试者经神经病学损伤(neurological damage)检查发现有多发性硬化风险。例如，受试者可以用例如颅部扫描(cranial scan)进行评估，例如通过 X 线照片扫描(radiographic scan)、计算机辅助体层摄影(computed tomography, CT)扫描、或磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)扫描进行评估。检测出脑组织炎症或髓鞘(myelin sheath)受损(damage)的身体证据(physical evidence)可以说明，接受治疗的该受试者无临床发作或有一次临床发作。在另一实例中，受试者如果通过例如 MRI 被检出有至少 2、3、5、10、15、20 或 25 个脑损伤或疤痕(例如大于或等于 1.5 或 3 mm)，可以对其进行治疗。

在另一实施方案中，受试者有生化或生理指标表明有多发性硬化风险，例如在无临床发作或有一次临床发作的情况下。例如，有抗髓少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)和髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)之一或二者的血清抗体，可以表明该受试者有风险。

也可以将本文所述多种标准联用，来判定受试者是否可以接受治疗。可以对受试者施用 VLA-4 阻断剂，例如当受试者有至少 1、2、3、4、或 5 种 MS 风险因素(risk factor)，例如本文所述风险因素时。例如，受试者经历一次神经功能缺损临床发作且可检出神经病学损伤或表明有生化或生理指标时，可以对其进行治疗。在另一实例中，受试者未经历神经功能缺损临床发作、但检出神经病学损伤或表明有生化或生理指标。例如，未经历灶性神经功能缺损的临床发作的受试者，如有以下一或多项特征，表明可以接受治疗：(a)经颅部扫描发现有多处大于或等于 3 mm 的脑损伤或疤痕，(b)有抗髓少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂碱性蛋白(MBP)之一或二者的血清抗体，(c)与对照相比，CSF IgG 水平增加，和(d)与对照相比，髓磷脂碱性蛋白(MBP)水平增加。

在另一实施方案中，受试者有多发性硬化家族史，例如父母、兄弟姊妹(sibling)、或祖父母有至少一位患有多发性硬化。在一实施方案中，所述受试者有一次急性孤立(isolated)脱髓鞘事件，如累及视神经(optic nerve)、脊

髓(spinal cord)或小脑(cerebellum)的事件。在另一实施方案中，受试者有多发性硬化的无临床症状(clinically silent)的特征。例如，受试者有至少 1、2、5、或 10 个无临床症状的、大于或等于 3 mm 的脑部 MRI 损伤。在一实施方案中，受试者有横贯性脊髓炎(transverse myelitis)或视神经炎(optic neuritis)。

在一些例子中，受试者经测评不具有除 MS 以外的其它疾病的相关病理表现。例如，受试者经测定未患有可引起神经功能缺损的代谢病、脉管病(vascular)、胶原-脉管病(collagen-vascular)、传染病、和/或瘤形成疾病(neoplastic disease)。例如，受试者经测定未患有中风(stroke)、CNS 淋巴瘤、脑干神经胶质瘤(brainstem glioma)、或溶酶体贮积症(lysosomal storage disease)。

在一实施方案中，在至少一个起始用药点，所述受试者的 EDSS 分数低于 3、2、1.5、或 1。

在一实施方案中，受试者是成年人，例如年龄大于或等于 16、18、19、20、24、或 30 岁。例如，受试者年龄为 19-40 岁。受试者可以是女性或男性。受试者可以施用 VLA-4 阻断剂超过 14 周，例如超过 6 或 9 个月，超过 1、1.5、或 2 年，例如按通常的定期间隔(regular intervals)用药。

在一实施方案中，所述方法包括，在用药之前，基于以下一或多项选出有 MS 风险的受试者：(a) 颅部扫描有髓鞘受损证据、(b) 有抗 MOG 和 MBP 之一或两者的血清抗体、(c) CSF IgG 水平增加、(d) MBP 水平增加、以及(e) 出现一次灶性神经功能缺损的临床发作。

在一实施方案中，所述 VLA-4 阻断剂包括 VLA-4 结合抗体，例如 IgG1, IgG2, IgG3, 或 IgG4 等全长抗体。所述抗体可以是有效人化(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(natalizumab)、HP1/2、或本文所述另一种 VLA-4 结合抗体来竞争结合 VLA-4。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。

早期治疗可以，例如，防止经过较长时间后发生残疾(disability)、减少随着时间推移所出现的 T2 和 Gd+损伤、防止发生继发渐进型 MS、和/或防止发生持续的脑组织损伤(例如经 MRI 检测到的损伤)。

本发明另一方面涉及一种方法，其包括：评价受试者或者获取评价受试者的相关信息；以及，在该评价表明该受试者有 MS 风险时，对该受试者施用 VLA-4 结合抗体。在一实施方案中，所述方法包括：对受试者进行扫描，以及在该扫描显示 MS (例如早期 MS) 的无临床症状的特征时，对该受试者施用 VLA-4 阻断剂。无临床症状的特征例如，脑组织炎症或髓鞘受损，例如在无神经功能缺损临床发作的情况下有 Gd+、T1 或 T2 损伤。其它评价例如，评价本文所述风险因素。可以评价所述受试者的至少 1、2、3 或 4 个风险因素。当检测到至少 1、2、3 或 4 个风险因素时，对该受试者施用 VLA-4 阻断剂。

本发明另一方面涉及一种方法，其包括：鉴别患有单相脱髓鞘病 (monophasic demyelinating disorder) 的受试者；并对该受试者施用 VLA-4 结合抗体，例如用量足以有效治疗该疾病。例如，所述受试者患有临床不能确定为多发性硬化的疾病。所述受试者可以患有例如横贯性脊髓炎、视神经炎、或急性播散性脑脊髓炎(acute disseminated encephalomyelitis, ADEM)。

定义

“神经功能缺损”是指中枢神经系统功能下降。实例包括，不能表达 (inability to speak)、感觉迟钝(decreased sensation)、平衡丧失(loss of balance)、虚弱(weakness)、认知障碍(cognitive dysfunction)、视觉变化(visual changes)、反射异常(abnormal reflexes)、和行走困难(problems walking)。“灶性神经功能缺损”既可以是累及具体部位(如左脸、右脸、左臂、右臂)，也可以是累及具体功能(例如，可影响语言表达，但不影响写的能力)。术语“临床发作”在指神经功能缺损时，表示持续数小时、数日、或数周(但此后可以部分或完全恢复)、可通过患者的身体外部指标(outward physical signs)直接观察到的神经功能缺损，它区别于仅可通过身体内部组织进行实验室测试或成像才能观察到的情况。临床神经功能缺损常常通过医疗史(medical history)和/或神经学体检(physical neurological exam)确定。

术语“治疗”是指进行治疗，且治疗量、治疗方式(manner)、和/或治疗模

式(mode)导致有效改善病情、症状、或与疾病有关的参数，或者防止或减缓疾病进展，直至统计学显著程度或直至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。

“颅部扫描”是检查并获得活体脑部成像的技术。实例有 CT 扫描和 MRI 扫描。

术语“生物学”是指基于蛋白的治疗试剂。

“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(如纤连蛋白(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 拮抗剂也可以与其它含有 $\alpha 4$ 亚基的整联蛋白(如 $\alpha 4\beta 7$)或其它含有 $\beta 1$ 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功能，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与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(Clq))的结合。

抗体的一或多个区可以人化或有效人化。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。一或多个恒定区可

以人化、或有效人化。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或有效人化。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(germline segment)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、因而不是在正常人体内激发免疫应答的抗体。

“人源化”免疫球蛋白可变区是，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。在一些情况下，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 可以根据灶性神经功能缺损的多次临床发作来诊断，或者根据与 MRI 等辅助测试所获得的神经病学损伤支持证据有时空间隔的灶性神经功能缺损临床发作来诊断(McDonald et al., *Ann. Neurol.*, 2001, 50:121-7.)。该 McDonald 标准使得可以通过 MRI 中出现的新损伤及时确定第二次发作。该 MacDonald 标准还使得可以基于 MRI 中的 9 个典型的白质损伤(white matter lesion)或 1 个增强型损伤来确立空间散布(dissemination in space)。初始临床表现可以是各种各样的，包括体感改变(somatic sensory change)、视神经炎、或虚弱。为了进行真实的临床诊断，必须观察到至少两次神经损害(neurologic impairment)，且它们必须是在不同时间的不同次解剖中发现的。此外，所述损害必须与 MS 患者中发现的损害一致，这通常意味着缺损历时数日或数周。本文所述方法可以用于，例如阻止或减缓临床确定的 MS 或复发 MS 的进展。

据估计，单次神经损害发作后，发生 MS (例如复发型 MS)的总体风险从低至 12% (Beck et al., 1993, *N. Engl. J. Med.* 329:1764-1769)到高至 58% (Rizzo et al., 1988, *Neurology* 38:185-90)。MRI 已被证明是预测 MS 进展最有效的检查。在对有临床孤立事件的患者进行的 10 年随访研究中，54 例 MRI 表现异常的患者中有 45 例(83%)出现临床 MS，27 例 MRI 表现正常的患者中只有 3 例出现 MS (O'Riordan et al., 1998, *Brain* 121(Pt 3):495-503)。

Tintoré et al 随访了 70 例有孤立的神经事件的患者，平均随访时间是 28.3 个月，还比较了用于诊断 MS 的各种 MRI 标准，所述标准是 Paty et al., Fazekas et al., 和 Barkhof et al. 界定的那些(Tintoré et al., 2000, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 21:702-706; Paty et al., 1988, *Neurology* 38:180-185; Fazekas et al., 1988, *Neurology* 38:1822-1825; Barkhof et al., 1997, *Brain* 120:2059-2069)。Paty et al. 的方法要求有 3 或 4 次损伤(其中 1 次是脑室周(periventricular)损伤)，他们报道的敏感性是 86%，但特异性只有 54%。

Fazekas et al. 的标准有同样的敏感性和特异性。这些标准要求有 3 次损伤、以及以下 3 项特征中的 2 项：幕下位置(infratentorial location)、脑室周位置、以及损伤大于 6 mm。Barkhof 的标准要求有 1 次幕下损伤，1 次近皮质损伤(juxtacortical lesion)、3 次脑室周损伤、以及 1 次钆增强型损伤或 9 次以上损伤，是在 T2 加权 MRI (T2-weighted MRI) 中。这些标准的敏感性是 73%，特异性是 73%。故，随着 MS 诊断中 MRI 标准越来越严格，特异性提高了，但代价是敏感性降低。

临床孤立综合症(CIS)和单相炎症疾病(monophasic inflammatory disorder)

单次神经学损伤事件表明患者的情况可以用 VLA-4 阻断剂改善。临床孤立综合症(CIS)是指，检测到脱髓鞘或另一种单相型 CNS 炎症疾病(例如脊髓综合症、脑干/小脑综合症、以及下述其它疾病)的单次临床发作。

Frohman et al. (2003) Neurology. 2003 Sep 9;61(5):602-11 报道称，对 CIS 受试者而言，在 T2 加权 MRI 扫描中，有三个以上白质损伤(尤其当其中一个位于脑室周区域时)，是表明此后 7-10 年内发生 CDMS 的非常敏感的预示指标(可预示>80%的病例)。在随访期间扫描(follow-up scan)中，有两个以上处于基线水平的钆(Gd)增强型损伤、以及出现新的 T2 损伤或新的 Gd 增强，也强烈预示在近期内将发生 CDMS。Dalton et al. (2004) Brain 127(Pt 5):1101-7 报道称，灰质部分容积(grey matter fractional volume, GMF，是颅内总容积的一个部分)的中值降低(mean decrease)，表明 CIS 受试者很可能发展成 MS。

本文所述 VLA-4 阻断剂可以对 CIS 受试者施用，例如其用量导致有效推迟后续发作的发生，例如推迟至少 1 年、2 年、3 年或更长时间。所述试剂可以对在 T2 加权 MRI 扫描中还有至少 1、2、或 3 处白质损伤的 CIS 受试者施用，所述损伤之一或多个可以位于脑室周区域。所述方法还可包括定期评价受试者，例如通过 MRI 扫描进行评价，以便确定可被 MRI 检测到的损伤数或灰质部分容积的改变。

本文所述 VLA-4 阻断剂也可以以治疗有效量施用给患有单相型 CNS 炎症疾病(例如横贯性脊髓炎，视神经炎、或急性播散性脑脊髓炎(ADEM))的受试者。

脊髓综合症(Spinal Cord Syndrome)

脊髓综合症受试者具有与脱髓鞘事件一致的脊髓 MRI、并有脊髓病 (myelopathy) 的症状，例如以下一或多种症状：(a) 布朗-塞卡尔综合症 (Brown-Sequard syndrome); (b) 下肢麻痹和/或上肢麻痹 (crural and/or brachial paresis or plegia) (单侧或双侧); (c) 小便失禁或尿潴留 (urinary incontinence or retention); (d) 大便失禁或大便停滞 (fecal incontinence or retention); (e) 阵发型张力失常 (paroxysmal dystonia); (f) 莱尔米特现象 (Lhermitte's phenomena)。

脑干/小脑综合症(Brainstem/Cerebellar syndrome)

对于脑干/小脑综合症受试者，经神经学检查发现的异常与经神经病学专家确定的该受试者的症状一致。症状至少包括以下 2 种：(a) 眩晕 (vertigo)、(b) 三叉神经痛 (trigeminal neuralgia)、(c) 核内眼肌麻痹 (internuclear ophthalmoparesis (plegia))、(d) 眼球震颤 (nystagmus)、(e) 振动幻视 (oscillopsia) 和复视 (diplopia)、(f) 同向或异向注视麻痹 (conjugate or dysconjugate gaze palsies (paresis))、(g) 交叉运动综合症 (crossed motor syndrome)、(h) 交叉感觉综合症 (crossed sensory syndrome)、(i) 半面肌痉挛 (hemifacial spasm)、(j) 共济失调 (ataxia)、(k) 震颤、(l) 构音困难 (dysarthria)。

横贯性脊髓炎/Partial Myelitis

横贯性脊髓炎是因横贯脊髓同一水平或节段双侧的炎症引起的神经学疾病。炎症的发作可以损害或破坏髓磷脂，中断脊髓中神经与机体其它部分的联络。横贯性脊髓炎的症状包括在数小时至数周内丧失脊髓功能。始于下背部突然疼痛、肌肉虚弱、或脚趾和脚的异常感觉的症状，可以快速发展为更严重的症状，包括麻痹、尿潴留、以及肠失控。虽然有些患者可以从横贯性脊髓炎恢复，仅留下一点点残余问题或根本没有任何残余问题，但其他患者可以遭受长期损害，影响他们完成日常生活中常规任务的能力。大多数患者仅有一次横贯性脊髓炎发作。少数患者可有复发。

横贯性脊髓炎的一种急性、快速进展形式有时表示 (signal) 多发性硬化 (MS) 的首次发作；但研究表明，大多数横贯性脊髓炎患者并不发展为 MS。

然而，仍可以在横贯性脊髓炎患者中筛查 MS，因为获得如此诊断的患者可以要求不同的治疗。Partial myelitis 可以更常用于预示 MS。

视神经炎

视神经炎是服务于眼部视网膜的视神经(颅神经 II)的一种炎症，伴有脱髓鞘。它可以有以下任一种或多种症状：视力模糊(blurring of vision)、丧失视敏度(visual acuity)、丧失部分或全部色觉(color vision)、彻底或部分的失明以及眼后疼痛。70%的病例只有单侧(一只眼)有症状。在约 20% 的 MS 患者中，视神经炎是 MS 的最初表现(首次发作)。视神经炎诊断测试包括，视觉诱导电位(visually evoked potential, VEP)测试和视觉诱导反应(visually evoked response, VER)测试，它们检测沿视神经的神经传递速度。

视神经炎患者可以通过以下一或多种(优选全部)症状的存在来鉴定：(a) 单侧(而非双侧)视神经炎；(b)曾有通常与疼痛相伴的突发失明；(c)有视神经功能紊乱迹象(例如有相对传入瞳孔效应(relative afferent pupillary effect, RAPD)以及受累眼的视野缺陷)；(d)受累眼的视盘(optic disc)正常或肿胀(但不苍白)；(e)极微量斑流出物(macular exudates)、虹膜(iritism)或玻璃体(vitreous)细胞；(f)经检查没有可以解释上述视觉症状的任何其它发现。

急性播散性脑脊髓炎 (ADEM)

ADEM 是一种 CNS 单相脱髓鞘病，一般先有病毒性综合症或免疫接种。它可以伴有髓磷脂损失，但轴突相对较少累及(sparing)。常见有小静脉周围淋巴细胞和单核细胞浸润以及脱髓鞘。

MS 风险

多发性硬化病因复杂。一或多种因素都可能导致多发性硬化风险，这样的因素包括目前已知的那些，以及本领域技术人员通过测定发现有统计学显著效应的那些。

临床孤立综合症或单相炎症疾病的表现是一种可以指示受试者有多发性硬化风险的事件。风险因素的其它例子可包括，地理位置、环境因素、和基因多态性。环境因素可包括，在先的用药和疫苗接种。例如，Hernan et al. (2004, Neurology 63:838-42)报道称，接种乙肝疫苗可以导致多发性硬化

风险。

遗传因素也可以导致多发性硬化风险。有很多文献记载了家族聚集性。当遗传性家族(genetic family)成员有多发性硬化时，多发性硬化风险也比一般群体增加约 2-40 倍。例如，同卵双胞胎的风险增加 20 倍。

MS1 是指主要组织相容性复合体。6 号染色体短臂上主要组织相容性复合体(MHC)中的 HLA-DR2 单元型(DRB1*1501 DQB1*0602)是 MS 中鉴定的最强遗传效应，在家族和病例-控制研究(case-control studies)中被一贯证实即有连锁又有关联(association)。Olerup et al (1991) *Tissue Antigens* 38:1-15。此外，已有人将 MS 与一些人类白细胞抗原(HLA)单元型关联，尤其是与 DR2, DR(1*1501), DQ(1*602), DQA102 和 DW2 单元型关联。基因组筛查显示，有证据支持在该区域的连锁，所有四种基因组筛查的后续分析(meta-analysis)将 19q13 鉴定为仅次于 MHC 的最显著区域(Barcellos et al., (1997) *JAMA* 278:1256-1271; Pericak-Vance et al., (2001) *Neurogenetics* 3:195-201)。

Bilinska 等报道称，CTLA-4 基因第一个外显子中的特定 SNP 与 MS 关联(*Acta Neurol Scand.* 2004 Jul;110(1):67-71)。其它可以调节多发性硬化风险的基因座包括编码 ApoE 的基因。见，例如 Schmidt et al., *Am. J. Hum. Genet.* (2002) 70:708-717。

地理因素和环境因素也可以导致多发性硬化风险。例如，Schiffer et al. ((2001) *Arch Environ Health*. 56(5):389-95)报道了在 Illinois 州中北部一个小区域的一组多发性硬化(MS)病例，该区域因有锌熔炉故属于重金属重污染区。Pugliatti et al. (*Neurology*. (2002) 58(2):277-82)发现，在撒丁岛(Sardinia)，多发性硬化病例呈不均分布。

检测风险因素实例

脑脊液检查可以用于检测 MS 风险。例如，一个因素可以表现为 CSF IgG 水平增加，例如与基线水平相比或与配对的健康个体相比、或表现为 CSF IgG 比 CSF 清蛋白的比例增加。见，例如 Perkin et al. (1983) *J Neurol Sci.* 60(3):325-36。例如，IgG 指标大于或等于 0.7 可指示异常比例。免疫固定电泳发现有不连续的 IgG 单一条带(oligoclonal band)，也可以指示 MS 风险。

将受试者血清与 MOG 和 MBP 的重组蛋白接触，可以检测这些蛋白的抗体。人重组 MOG Ig-区和人髓磷脂衍生的 MBP 可以按，例如 Reindl et al.

(1999) Brain 122: 2047-2056 所述制备。例如，可以将 1 mg 重组 MOG-Ig 或 2 mg MBP 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳，并转移至硝酸纤维素膜或 nytran 膜。再将这些膜用 2% 奶粉的磷酸盐缓冲液(PBS)补加 0.05% Tween-20 (PBS-T) 进行封闭。然后将这些膜与稀释的受试者血清(在 2% 奶粉的 PBS-T 溶液中, IgG 稀释为 1:1000; IgM 或 IgA 稀释为 1:200)接触。之后，洗膜，并用第二抗体室温 1 小时进行评估，所述第二抗体例如碱性磷酸酶偶联型抗-人 IgG, IgM 或 IgA (例如，全部是 1:5000; G6907, G5204 或 G5415; 全部来自 Axell, Westbury, USA)。洗膜后，用合适的碱性磷酸酶检测体系(例如氯化四唑对硝基兰(p-nitro blue tetrazolium chloride)和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(都来自 Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany))检测该第二抗体。如果该第二抗体与另外的检测试剂偶联，则可以相应调整检测方案。见，例如 Soderstrom et al., Neurology (1998) 50:708- 14。

视觉诱导电位检查也可以用于鉴定 MS 风险因素。见，例如 Cuypers et al., (1995) Doc Ophthalmol. 90(3):247-57。

VLA-4 结合抗体

那他珠单抗是 α 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，从而阻止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-渐进型多发性硬化的脑损伤数和临床复发次数。那他珠单抗可以联合干扰素 β -1a (IFN β -1a) 疗法安全地施用于多发性硬化患者。其它 VLA -4 结合抗体可以具有这些特性或类似特性。

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 mAb 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，都有文献描述(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 α 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 结合抗体与细胞(例如淋巴细胞)表面 VLA-4 相互作用, 但不引起细胞聚集。而另一些抗 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 MAb (Sanchez-Madrid et al., 1986) 具有很高的活性, 它阻断 VLA-4 与 VCAM-1 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)代表了一类有用的 VLA-4 结合抗体。

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。

可以测试抗体的功能特征，例如 VLA-4 结合特征，例如参见美国专利 6,602,503。

抗体生成(Antibody Generation)

与 VLA-4 结合的抗体可以通过免疫(例如用动物进行免疫)而生成。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 XenoMouseTM, 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-取代型抗体预计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 区的三级结构模型，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。也参见美国专利 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，在哺乳动物细胞中生成。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 et al (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 使用 DHFR 选择标记，例如见 Kaufman et al (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 CHO 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。美国专利 6,602,503 也描述了表达和纯化 VLA-4 结合抗体的方法的实例。

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 Fcγ 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 描述了在转基因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、编码目标抗体的核酸序列, 以及用于分泌的信号序列。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。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，如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。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，只要维持所述嵌段共聚物的水溶性即可。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(Pluronics); 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(dextrin)、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 阻断剂，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”包括任何及所有溶剂、分散介质(dispersion media)、包衣(coating)、抗细菌剂和抗真菌剂、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，保留母体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、亚磷酸(phosphorous acid)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。药物配制是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); Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X)。

在一个实施方案中，VLA-4 阻断剂，如 VLA-4 结合试剂(如那他珠单抗)可以与赋形剂(excipient)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(TYSABRI®)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，除了肠道施用和局部表面施用以外的施用模式，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。将需要量的活性化合物，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，将活性化合物掺入含有基本分散介质和上文所列的所需其它成分的无菌媒介物(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，产生活性成分和任何其它所需成分的粉末，所述其它所需成分来自其事先经过过滤除菌的溶液。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)、以及利用表面活性剂。注射组合物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 阻断剂，如 VLA-4 结合抗体(如那他珠单抗)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 阻断剂，如 VLA-4 结合抗体(如那他珠单抗)可以按固定剂量(fixed dose)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。

VLA-4 阻断剂，如 VLA-4 结合抗体(如那他珠单抗)可以按 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(unit dose)，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。在一些情况下，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。

此外，不具有临床确定的多发性硬化的受试者可以施用比具有临床确定的多发性硬化的受试者减量(reduced dose)的 VLA-4 阻断剂，例如 VLA-4 结合抗体，例如那他珠单抗。例如，对于有风险但未实际患有临床确定的多发性硬化的受试者，可以按 20-300 mg IV，例如 20-150 mg IV (例如每 4 周 1 次)、或者 20-70 或 20-40 mg SC (例如约 35 mg)，例如至少 1 周 1 次的固定剂量，施用 VLA-4 阻断剂，例如 VLA-4 结合抗体，例如那他珠单抗。

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，如控释制剂，包括植入体(implant)，泵，以及微囊递送体系(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来施用。例如，药物组合物可以用无针式皮下注射设备(needleless hypodermic injection device)来施用，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。

可以对剂量方案(dosage regimen)进行调整，以产生所需反应，例如治疗反应或组合治疗效应(combinatorial therapeutic effect)。本文中，单位剂量

(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等因素而有不同，所述能力例如调节风险因素，推迟神经功能缺损临床发作的发生或减轻其严重程度，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。

联合治疗(Combination Therapy)

在一些实施方案中，对受试者，例如有多发性硬化风险的受试者，例如本文所述受试者，可以将第二种试剂与 VLA-4 阻断剂，例如 VLA-4 结合抗体，例如那他珠单抗联用。可以与 VLA-4 阻断剂联用以治疗或防止多发性硬化的试剂的非限制性实例可参见未结案申请 U.S.S.N. 60/603,468，其于 2004 年 8 月 20 日提交，代理人案号(attorney docket number) 10287-087P01/P0608，标题为“Combination Therapy”。

本文中所有专利申请、专利、参考文献和出版物都引入做参考。

其它实施方案都包括在后续权利要求的范围内。