



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I573590 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：101134166

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 18 日

(51)Int. Cl. : A61K31/438 (2006.01)

A61K31/498 (2006.01)

A61K31/7048 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/09/20 美國

61/536,824

2011/09/21 美國

61/537,229

(71)申請人：雷希爾生藥有限公司 (以色列) REDHILL BIOPHARMA LTD (IL)

以色列

(72)發明人：法堤 雷薩 FATHI, REZA (US)；麥克林 派屈克 拉夫林 MCLEAN, PATRICK

LAUGHLIN (US)；雷登 哈利 傑佛森 LEIGHTON, HARRY JEFFERSON (US)

(74)代理人：李貞儀

(56)參考文獻：

US 2011/0059136

審查人員：傅玉妃

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：12 共 44 頁

(54)名稱

治療自體免疫疾病之組成物及方法

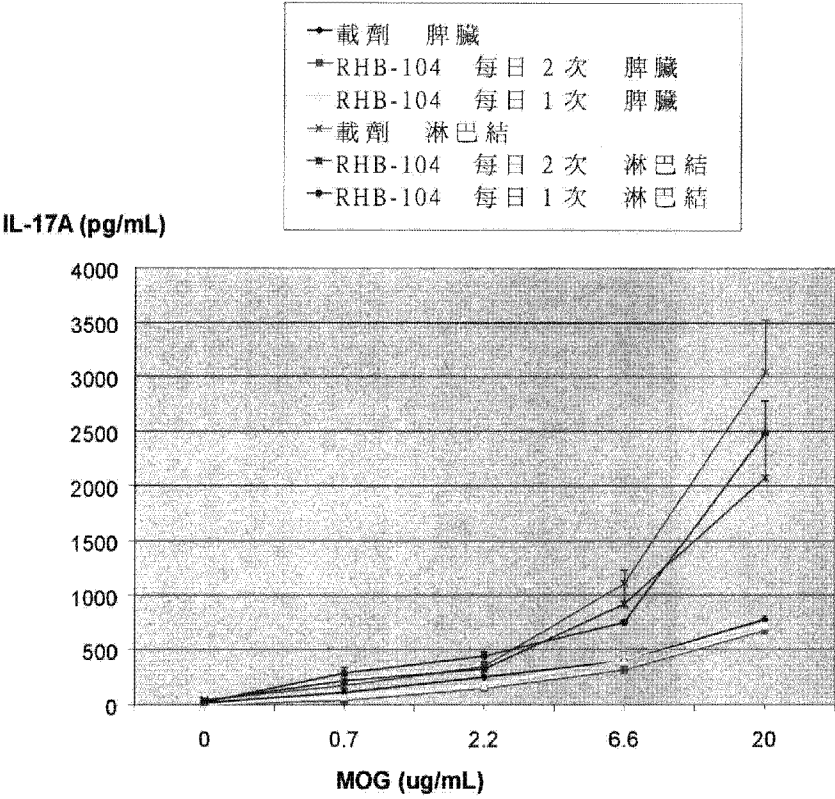
A COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING AN AUTOIMMUNE DISEASE

(57)摘要

一種抗生素組合及治療自體免疫疾病的方法。該等抗生素包括利福布汀(rifabutin)、克拉黴素(clarithromycin)以及氯法齊明(clofazimine)。該自體免疫疾病包括多發性硬化症。

A combination of antibiotics and method for the treatment an autoimmune disease. The antibiotics include rifabutin, clarithromycin and clofazimine. The automimmune disease includes multiple sclerosis.

指定代表圖：



第 1 圖

發明摘要

※ 申請案號： 101134166

A61K31/438 (2003.01)

※ 申請日： 101.9.18

※IPC 分類：

A61K31/498 (2003.01)

A61K31/2048 (2003.01)

【發明名稱】 治療自體免疫疾病之組成物及方法

A61P37/00 (2003.01)

A composition and method for treating an autoimmune disease

【中文】

一種抗生素組合及治療自體免疫疾病的方法。該等抗生素包括利福布汀 (rifabutin)、克拉黴素 (clarithromycin) 以及氯法齊明 (clofazimine)。該自體免疫疾病包括多發性硬化症。

【英文】

A combination of antibiotics and method for the treatment an autoimmune disease. The antibiotics include rifabutin, clarithromycin and clofazimine. The automimmune disease includes multiple sclerosis.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

【發明名稱】 治療自體免疫疾病之組成物及方法

A composition and method for treating an autoimmune disease

【與相關申請案的相互參照】

【0001】 本申請案主張 2011 年 9 月 20 日列案之美國專利申請案號 61/536,824 以及 2011 年 9 月 21 日列案之美國專利申請案號 61/537,229 的優先權，以上兩案皆以其整體納入本案作為參考。

【技術領域】

【0002】 本發明是關於一組成物用於治療一自體免疫疾病的用法。更明確地說，該組成物包含一抗生素組合，其可用於治療包括多發性硬化症在內的自體免疫疾病。

【先前技術】

【0003】 多發性硬化症（MS）是一種慢性自體免疫及脫髓鞘疾病，主要影響中樞神經系統。MS 的特徵在於具髓鞘專一性的 CD4+ T 細胞浸潤，攻擊軸索髓鞘以及中樞神經系統（CNS）的其他成分，破壞髓鞘與基底軸突。

【0004】 本案的發明人發現，組合多種先前用於治療發炎性腸失調症的多種抗生素，對於自體免疫疾病患者的炎性反應具有效用，包括 MS 以及其他自體免疫疾病。

【0005】 本說明書當中所討論到的任何文件、行為、材料、裝置、器物或其類似物，並不應被視為承認任一或全部的這些物件構成先前技藝基礎的一部分或因其在本申請案之每一申請專利範圍的優先權日之前即存在而承認其係本發明相關領域中的通常一般知識。

【發明內容】

【0006】 本發明提出一種利福布汀 (rifabutin)、克拉黴素 (clarithromycin) 及氯法齊明 (clofazimine) 之組合用於治療一自體免疫疾病。

【0007】 一觀點中，本發明提出一種包括利福布汀、克拉黴素及氯法齊明的組成物用於治療一自體免疫疾病。

【0008】 本發明也提出一種包括利福布汀、克拉黴素與氯法齊明的組成物用於治療多發性硬化症。

【0009】 進一步觀點中，提出一種包含利福布汀、克拉黴素與氯法齊明的組成物用於治療一自體免疫疾病。

【0010】 進一步觀點中，提出一種包含利福布汀、克拉黴素與氯法齊明的組成物用來治療多發性硬化症 (MS)。

【0011】 進一步的觀點中，提供包含多種抗生素藥劑之組合的一種組成物用於治療多發性硬化症，所稱組成物包含利福布汀、克拉黴素與氯法齊明。

【0012】 進一步的觀點中，提供包含兩樣或更多抗生素藥劑之組合的一種組成物，所稱兩樣或更多抗生素藥劑係選自利福布汀、氯法齊明以及至少一大環內酯。

【0013】 進一步的觀點中，提供包含兩樣或更多抗生素藥劑之組合的一種組成物，所稱兩樣或更多抗生素藥劑係選自利福布汀、氯法齊明以及克拉黴素。

【0014】 進一步的觀點中，提供包含兩樣或更多抗生素藥劑之組合的一種組成物用於治療一自體免疫疾病，所稱兩樣或更多抗生素藥劑係選自氯法齊明、克拉黴素以及至少一具有殺菌活性的抗生素。

【0015】 另一觀點中，本發明提供一種治療患者之自體免疫疾病的方法，包含將包括利福布汀、克拉黴素與氯法齊明的一組成物投藥予該患者。

【0016】 進一步的觀點中，提出一種方法用來治療一自體免疫疾病並（或疑似）被一分枝桿菌感染的患者，該方法包含將包括利福布汀、克拉黴素及氯法齊明的一組成物投藥予該患者。

【0017】 另一觀點中，提出一種治療多發性硬化症患者的方法，該患者亦測得分枝桿菌感染為陽性，該方法包含將包括利福布汀、克拉黴素及氯法齊明的一組成物投藥予該患者。

【0018】 另一觀點中，本發明提供一種治療病患之自體免疫疾病的方法，該方法包含將一組成物投藥給該病患，該組成物包含選自利福布汀、克拉黴素與氯法齊明的一抗生素組合。

【0019】 另一觀點中，本發明提供一種治療病患之多發性硬化症的方法，該方法包含將一組成物投藥給該病患，該組成物包含選自利福布汀、克拉黴素與氯法齊明的一抗生素組合。

【0020】 本說明書中，「包含」一詞應理解其意旨為包括了所提出的元件、整體或步驟，或一組的元件、整體或步驟，但並不排除任何其他元件、整體或步驟或一組的元件、整體或步驟。

【圖式簡單說明】

【0021】

第1圖為一折線圖，顯示本發明之RHB-104投藥對於細胞素IL-17A濃度的影響；

第2圖為一折線圖，顯示本發明之RHB-104投藥對於TNF-alpha濃度的影響；

第3圖爲一折線圖，顯示本發明之RHB-104投藥對於IFN-gamma濃度的影響；

第4圖爲一折線圖，顯示本發明之RHB-104投藥對於細胞素IL-6濃度的影響；

第5圖爲一折線圖，顯示本發明之RHB-104投藥對於細胞素IL-2濃度的影響；

第6圖爲一折線圖，顯示出EAE嚴重性（平均臨床計分）對時間的關係圖；

第7圖爲一折線圖，顯示出體重變化對時間的關係圖；

第8圖爲一長條圖，顯示出H&E切片中測得發炎點數目的平均值；

第9圖爲一長條圖，顯示出Luxol快速藍染切片所得脫髓鞘計分的平均值；

第10圖爲一長條圖，顯示出H&E切片所得脫髓鞘計分的平均值；

第11圖爲一長條圖，顯示出H&E切片中所測得凋亡細胞數的平均值；

第12圖爲一折線圖，顯示的是平均臨床計分對時間的關係圖。

【實施方式】

【0022】 本發明的組成物可進一步包含至少一對革蘭氏陽性細菌具活性的抗生素「革蘭氏陽性抗生素」。革蘭氏陽性抗生素可選自下列群組的一或多個，該群組包含：達托黴素（daptomycin）、氯林絲菌素（clindamycin）、立復黴素（rifampicin）、紅黴素、歐利安黴素（oleandomycin）、羅紅黴素（roxithromycin）、阿奇黴素（azithromycin）、康黴素（kanamycin）、健他黴素（gentamycin）、泰百黴素（tombramycin）、鏈黴素（streptomycin）、新黴素（neomycin）、巴龍黴素（paromomycin）、乙胺丁醇（ethambutol）、異菸鹼醯肼（isoniazid）、美諾四環素（minocyclin）、四環素（tetracycline）。

【0023】 「一或多個」抗生素藥劑一詞包括但不限於一、二、三、四、五、六等等的抗生素藥劑。可想而知，依據本說明書所提供的實施例以及業內知識，熟悉本技術的人士應能實際判定所需使用的抗生素藥劑之特定數目。

【0024】 本發明之組成物可用來治療自體免疫疾病的患者，其中該患者也測知為烏分枝桿菌副結核亞種 (*Mycobacterium avium paratuberculosis*, MAP) 陽性的感染者。

【0025】 該自體免疫疾病可為多發性硬化症。

【0026】 更進一步，該自體免疫疾病可為橋本氏甲狀腺炎、梅爾柯森－羅森索症候群、類肉瘤病，或其他類似疾病。

【0027】 另一實施例中，自體免疫疾病一詞包括一大群疾病的任何一項，其特徵為免疫系統功能異常而導致抗體攻擊自身組織。

【0028】 本說明書所揭示的該等抗生素或組成物可口服投藥。或者，該等抗生素可靜脈注射投藥。

【0029】 可想見的其他投藥途徑包括但不限於：肌肉內注射以及骨內注射途徑。

【0030】 各抗生素可分開投藥。或者，兩種或更多抗生素可一起投藥。

【0031】 一具體實施例中，本發明所提出的組成物包含至少兩抗生素藥劑可合併調配成為單一劑型。另一具體實施例中，本發明所提出的組成物包含至少三抗生素藥劑合併調配成為單一劑型。

【0032】 一具體實施例中，利福布汀、克拉黴素及氯法齊明 (clarithromycin) 係合併調配成為單一劑型。

【0033】 或者，各抗生素藥劑可調配成與其他抗生素藥劑分開的劑

型。此具體實施例中，可想見分開的劑型可共同包裝在一套組中，以確保各藥劑大致是在同一時間由患者服用。另一具體實施例中，兩抗生素藥劑可調配成單獨的第一劑型且其餘抗生素藥劑可分開來調配成要與第一劑型配合服用的第二劑型。

【0034】 一具體實施例中，本發明的抗生素及組成物可以是片劑形式，包含粉末形式之利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明至少其中之一。某些例子當中，利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明的兩項或全部係粉末形式。或者，本發明之組成物可以是片劑膠囊的形式，包含微囊封裝形式之利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明至少其中之一。一具體實施例中，利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明的兩項或全部係微囊封裝形式。

【0035】 進一步的實施例中，本發明之組成物可以是片劑膠囊的形式，包含粉末形式之利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明至少其中之一，且其餘藥劑係以一微囊封裝形式呈現。進一步的可能，本發明之組成物可以是片劑膠囊的形式，包含一或多個以微囊封裝形式呈現之利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明。另外的具體實施例中，本發明之組成物可以是包含利福布汀、克拉黴素與氯法齊明其中之一或一個以上的一片劑形式且氯法齊明在一膠囊內，包含利福布汀、克拉黴素與氯法齊明其中之一或一個以上的一膠囊且氯法齊明在一片劑內，包含利福布汀、克拉黴素與氯法齊明其中之一或一個以上的一膠囊且氯法齊明在含有其他藥劑的外膠囊內，或上述的任一組合。

【0036】 進一步的具體實施例中，本發明的組成物包含內有利福布汀的內膠囊，置於包含克拉黴素及氯法齊明的外膠囊當中，其中克拉黴素和氯法齊明可呈現為粉末、微囊封裝，或微顆粒形式。更進一步，本發明的組成物可包含脂質體囊封、非囊封或聚合物包覆脂質體囊封形式。

【0037】 本發明的方法可藉由投藥如前所述包含利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明的一或多個片劑／膠囊，或透過分別投藥個別藥劑實施。較佳具體實施例中，利福布汀、克拉黴素以及氯法齊明係以一劑同時投藥。

【0038】 本發明的組成物可藉由業界所熟知製備醫藥組成物的方式製備，包括摻合、研磨、均質化、懸浮、溶解、乳化、分散於液中，以及，若有所需，將利福布汀、克拉黴素和氯法齊明與所選用的賦形劑、稀釋劑、載劑和佐劑混在一起。

【0039】 為口服投藥，本發明的組成物可以是片劑、錠劑、丸劑、口含錠、膠囊、酏劑、粉末（包括冷凍乾燥粉末）、溶液、顆粒、懸浮液、乳劑、糖漿和酏劑的形式。本發明的組成物可包含緩釋或延遲釋出的形式，舉例來說像是包覆粒子、多層片劑或微顆粒的形式。

【0040】 用於口服投藥之固體形式的本發明組成物可包括藥學上可接受的黏劑、甜味劑、崩散劑、稀釋劑、調味劑、披覆劑、防腐劑、潤滑劑以及／或延時劑。合適的黏劑包括阿拉伯膠、明膠、玉米澱粉、黃蓍樹膠、藻酸鈉、羧甲基纖維素，或聚乙二醇（PEG）。合適的甜味劑包括蔗糖、乳糖、葡萄糖、阿斯巴甜或糖精。合適的崩散劑包括玉米澱粉、甲基纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、三仙膠、膨土、藻酸或瓊脂。合適的稀釋劑包括乳糖、山梨醇、甘露醇、右旋糖、高嶺土、纖維素、碳酸鈣、矽酸鈣或磷酸二鈣。合適的調味劑包括薄荷油、冬青油，櫻桃、橘子或覆盆子調味料。合適的披覆劑包括丙烯酸及（或）甲基丙烯酸及（或）其酯類的聚合物或共聚物、蠟類、脂肪醇類、玉米醇溶蛋白、蟲膠或麩質。合適的防腐劑包括苯甲酸鈉、維生素 E、 α 生育酚、維生素 C、對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸丙酯，或亞硫酸氫鈉。合適的潤滑劑包括硬脂酸鎂、硬脂酸、油酸鈉、氯化鈉或滑石。合適的延時劑包括單硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

【0041】 除了上述多種添加劑，用於口服投藥之液體形式的本發明組成物可包括一液體載劑。合適的液體載劑包括水，油類例如橄欖油、花生油、芝麻油、葵花油、紅花油、大豆油、椰子油、液態石蠟、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、乙醇、丙醇、異丙醇、甘油、脂肪醇類、三酸甘油酯類，或上述的混合。

【0042】 用於口服投藥之本發明組成物的懸浮液可進一步包括分散劑類及（或）懸浮劑類。合適的懸浮劑包括羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙甲基纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、藻酸鈉或蠟醇。合適的分散劑包括卵磷脂，脂肪酸例如硬脂酸的聚氧乙烯酯類、聚氧乙烯山梨醇單油酯或雙油酯、聚氧乙烯山梨醇硬脂酸酯或月桂酸酯、聚氧乙烯去水山梨醇單油酯或雙油酯、聚氧乙烯去水山梨醇硬脂酸酯或月桂酸酯，以及類似品。

【0043】 用於口服投藥之本發明組成物的乳劑可進一步包含一或多個乳化劑。合適的乳化劑包括前文所舉例的分散劑，或天然膠例如阿拉伯膠或黃蓍樹膠。

【0044】 各抗生素可每日投藥。或者，各抗生素可一日投藥兩次。另一具體實施例中，各抗生素可一日投藥三次。進一步的具體實施例中，各抗生素可依下述：每 3 小時、每 4 小時、每 5 小時、每 6 小時、每 7 小時、每 8 小時、每 9 小時、每 10 小時、每 11 小時或每 12 小時投藥。

【0045】 克拉黴素的劑量可由每日 250 mg 至 1.5 g，更通常約為每日 950 mg。上述 950 mg 可採 95 mg 的膠囊投藥，每日需 10 膠囊。利福布汀的典型劑量係由每日 150mg 至 750mg，更通常約為每日 450mg。氯法齊明的典型劑量係由每日 50 至 500mg。通常氯法齊明的劑量係約每日 100mg。上述 100mg 可用 10mg 的膠囊投藥，每日 10 次。氯法齊明的劑量可進一步以體量計算，並可以是由約 1mg/kg 至約 6mg/kg，更典型是約 2 mg/kg。

若用於孩童，可採用如下表所列劑量（mg/每日）：

孩童體重(kg)	15~30	30~45
克拉黴素	225-550	450-675
氯法齊明	50	75
利福布汀	258	180

【0046】 進一步的具體實施例中，孩童可遵循漸近式用劑法。

舉例來說：

抗生素	膠囊數									
克拉黴素	95	190	285	380	475	570	665	760	855	950
氯法齊明	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
利福布汀	45	90	135	180	225	270	315	360	405	450

體重為15~29.9kg的孩童：

1、2及3週 = 每日1膠囊

4&5週 = 每日兩次1膠囊（每日2次）

6&7週 = 每日3膠囊

8週之後 = 每日兩次2膠囊（每日2次）

體重為30~45 kg的孩童：

1週 = 每日1膠囊

2&3週 = 每日兩次1膠囊（每日2次）

4&5週 = 每日3膠囊

6&7週 = 每日兩次2膠囊（每日2次）

8週之後 = 每日5膠囊

體重大於45 kg的孩童：

1週 = 每日兩次1膠囊（每日2次）

2&3週 = 每日兩次2膠囊（每日2次）

4&5週 = 每日兩次3膠囊（每日2次）

6&7週 = 每日兩次4膠囊（每日2次）

8週之後每日兩次5膠囊（每日2次）

【0047】 至少一抗生素可與能促進該抗生素之生物利用率的吸收促進劑共同製劑。吸收促進劑的數量可以是相對於抗生素數量的 300 至 700% w/w。特定具體實施例中，吸收促進劑係聚乙二醇。一範例中，聚乙二醇具 200~20000 之間的平均分子量（例如 1000~15000、5000~12000、7000~9000 或 7500~8500 之間）。

【0048】 進一步的具體實施例中，本發明之組成物的製劑方法包括至少將該氯法齊明分散於 PEG 以形成一 PEG/氯法齊明分散液，然後將該 PEG/氯法齊明分散液與至少一項所說的其他抗生素藥劑混合。在一具體實施例中，該 PEG/氯法齊明分散液係與克拉黴素以及利福布汀兩者混合。同樣地，克拉黴素或利福布汀可先分散在 PEG 中並接著與其餘抗生素混合。

【0049】 本發明之組成物可進一步包含一維生素。一特定具體實施例中，本發明的組成物包含維生素 D。

【0050】 本發明之組成物可進一步包含一抗炎劑。該抗炎劑可包括 5-胺柳酸。或者該抗發炎劑可包含硫唑嘌呤。另一抗發炎劑可包含胺甲基葉酸。

【0051】 本發明之組成物可進一步包含週期素依賴激酶抑制劑。一範例包含 R 核抑制劑（R-roscovitine）。進一步的範例包括弗拉平度（Flavopiridol）。

【0052】 進一步，本發明之組成物可包含一活化 T 細胞轉錄抑制劑。

一範例包含 Tacrolimus。

【0053】 MS 患者已知會表現出免疫及細胞素上升，這與慢性感染的狀況一致。本發明係關於使用抗生素的免疫調節特性作為一治療取徑，用來弱化患者的炎性反應，尤其是自體免疫反應的病例，目的在於治療自體免疫疾病。

【0054】 溶菌性抗生素，例如 β -內醯胺，係藉由抑制細菌胞壁合成而發揮功用，從而溶解病原體，並因而導致促發炎的細菌性成分釋出，這就提高了死亡率及後遺症。反之，殺菌性抗生素，例如利福布汀，避免了一開始的炎性猛爆。體外研究數據指出，以非溶菌性抗生素治療，發炎反應較少，並改善了嚴重感染的後果。

【0055】 大環內酯抗生素擁有優良免疫調節作用。克拉黴素減低了細菌存活率，這與細菌之蛋白質合成衰減相關，可在許多細菌感染中已證實的依時性胞內堆積現象裡看出。體外研究中，大環內酯如克拉黴素抑制反應性氧物種的合成以及（或）促發炎細胞素的分泌，而對於抗發炎細胞素的釋出施加多種不同作用。

【0056】 發炎細胞素在人類發炎性疾病所扮演的角色已有所研究，而且抗生素調劑對於細胞素蛋白質濃度的作用已有所計量。

【0057】 如前述，多發性硬化症係一種自體免疫疾病，其和腦部及脊髓內包圍神經元之髓鞘的破壞有關。這疾病會影響動作、感官以及身體機能，其特徵在於中樞神經系統內的發炎細胞浸潤。其病因包括遺傳及環境因素的綜效。雖然此症的致病機制需要進一步研究，病毒及（或）微生物感染似乎會導致發作。此症好發於年輕的成人、女性以及祖輩來自北歐的高加索人。

【0058】 多發性硬化症，表現在抗原呈現細胞表面的主要組織相容

複合體 (MHC) 第二型蛋白質讓細胞耦合至髓磷質蛋白或髓磷質相關蛋白結合，造成 Th0 細胞活化與分化。接著 Th1 細胞跨越血腦障壁進入中樞神經系統，與抗原-MHC 複合體接合，並製造促發炎細胞素。

【0059】 實驗性的自體免疫腦脊髓炎 (EAE) 是最常用的人類多發性硬化症 (MS) 之小鼠模型。由於它和 MS 有許多相似處，EAE 被用來研究自體免疫、中樞神經系統發炎、脫髓鞘現象、細胞移動以及耐受性誘發的致病機制。

【0060】 近來有關 EAE 動物模型的研究指出，中樞神經系統內的 Th17 細胞、IL-6 與 TGF- β 之促發炎連鎖反應在 EAE 以及 MS 兩者的致病機制當中有其作用。EAE 顯示出和 MS 在臨床上及病理上的相似之處。EAE 模型是決定治療性處置的主要考量 (目標的效度、備選可用藥物的評估、快速的研究模式、組織病理學的分析)。

【0061】 實驗一：細胞素實驗

小鼠模型—免疫接種 MOG₃₅₋₅₅/CFA

此研究目的是要判定：包含利福布汀、克拉黴素及氯法齊明之組成物 (後文即以 RHB 104 製劑稱之) 對於經過 MOG₃₅₋₅₅/CFA 免疫接種後之淋巴結及脾臟抽取液的 T 淋巴球之細胞素生成有何作用。

RHB-104 膠囊包含 10mg 氯法齊明、95 mg 克拉黴素以及 45 mg 利福布汀，還有各種賦形劑。

實驗設計

共 3 個實驗組，每組 4 隻小鼠

第 0 日，以髓磷質寡突細胞糖蛋白中的胜肽 33-55 (MOG₃₃₋₅₅) 乳化溶於傅氏完全佐劑 (CFA) 予以免疫接種而致病，並且在同一天開始治療。免疫接種十一天後，將小鼠安樂死，取出脾臟及淋巴結並製備細胞懸浮液。細

胞懸浮液在多種 MOG₃₃₋₅₅ 濃度之下培養三天。三天培養期終了，收集這些培養的上清液。使用 Becton Dickinson 的 Th1/Th2/Th17 細胞素珠法檢測(CBA) 試劑組，判定上清液中的七種細胞素濃度 (IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF-alpha 及 IFN- γ)。

小鼠及免疫接種

本研究使用共計 12 隻 C57BL/6 雌鼠 (Taconic Farms，14 週齡)。

第 0 日，在小鼠背部兩處皮下注射 MOG₃₃₋₅₅/CFA。

分組與治療

第 0 日 (免疫接種當日) 開始治療，並持續到第 11 日小鼠犧牲。

第一組：載劑，10 mL/kg，口服，每日2次 (陰性對照組)

第二組：RHB-104，36 mg/kg，口服，每日2次，10 mL/kg

第三組：RHB-104，36 mg/kg，口服，每日1次，10 mL/kg

晨間給藥：RHB-104，36 mg/kg，口服，每日1次，10 mL/kg

夜間給藥：載劑，每日1次，10 mL/kg (服藥壓力控制組)

給藥均在每日同一時間進行 (前後一小時)。晨間與夜間給藥至少間隔 10 小時，而且夜間與晨間給藥間隔不超過 14 小時。

所有小鼠均在第 11 日的晨間給藥後 1 到 4 小時被犧牲。

脾臟及淋巴結細胞培養

取得所有小鼠的脾臟，各組合併，製備其細胞懸浮液。

取得所有小鼠的鼠蹊淋巴結，各組合併，製備其細胞懸浮液。

取各細胞懸浮液，用五種設好 MOG₃₃₋₅₅ 濃度的 96 孔培養盤：0、0.7、2.2、6.7 以及 20.0 μ g/mL，全都做三份來培養。

培養 72 小時後，取其上清液。

用 CBA Th1/Th2/Th17 試劑組 (Mouse Th1/Th2/Th17 BD™ Cytometric Bead

Array (CBA)試劑組，Becton Dickinson) 測量各培養中的細胞素濃度。此試劑組可同步測量七種不同細胞素的濃度 (IL-10、IL-4、IL-2、IL-17A、IFN- γ 、TNF-alpha、IL-6)。

實驗結果

1) 細胞素IL-10

IL-10低於標準值範圍，因此並沒能發現任何變化。

2) 細胞素IL-17A

RHB-104每日2次投藥呈現出淋巴結中的細胞素濃度減少，且脾臟中的含量較少：參見第1圖。

3) 細胞素TNF-alpha

RHB-104 每日2次以及每日1次投藥減少脾臟內的TNF-alpha。此外，每日2次投藥減少淋巴結中的TNF-alpha。每日2次投藥減少脾臟中的TNF-alpha將近50%。參見第2圖。

4) 細胞素IFN-gamma

每日2次投藥時RHB-104減少脾臟中的IFN：(參見第3圖)

5) 細胞素IL-6

RHB 104 每日2次投藥顯示出脾臟中的IL-6幾乎減少約50%：見第4圖。

6) 細胞素IL-4

IL-4低於檢測標準。

7) 細胞素IL-2

RHB-104每日1次投藥，在脾臟與淋巴結兩者當中IL-2皆減少。參見第5圖。

【0062】 上述小鼠模型中，包含利福布汀、克拉黴素及氯法齊明之

RHB 104 調劑對細胞素濃度的作用支持繼續進行如本文下述的小鼠 EAE 試驗。

【0063】 實驗二：評估 EAE 之小鼠模型中 RHB 104 給藥的功效

EAE模型的背景及概述

EAE誘發

C57BL/6小鼠以MOG₃₅₋₅₅/CFA或MOG₁₋₁₂₅/CFA乳劑免疫接

種後再接著注射百日咳毒素而得到慢性EAE。此模型是用來測試可能的化合物避免或減緩EAE疾病的可能性。它可和免疫接種（預防性處置）那時投藥的化合物一道，或藉由在EAE發作那時將該化合物投藥以反轉疾病進程並促進復原（治療性處置）。

該模型使用雌性C57BL/6小鼠，研究開始時為10至14週齡。通常，EAE會在免疫接種後8至18天出現。通常是在免疫接種之後4週（28天）出現EAE。

壓力減少小鼠對EAE的感病性。除任何化合物的作用之外，在疾病誘發期間（免疫接種後約0至10天）施予治療延遲疾病發作並減低疾病嚴重性。這是由於化合物投藥的壓力以及載劑對小鼠的作用。投藥越頻率且對載劑越難耐受，對於疾病發展的衝擊越大。

待EAE的臨床症狀已出現，治療壓力及施用載劑對於疾病發展的作用要小得多。

預防性處置

預防性研究中，疾病發作前係開始治療，即免疫接種並指派分組時。小鼠被依平衡方式分成多個治療組，以得到多個擁有類似體重分布的分組。

預防性研究檢測在出現初次EAE的臨床症狀之前以及之後治療是否會影響疾病進程。

為補償預防性處置研究中的治療壓力並達成目標疾病嚴重度，EAE係

以比治療性研究中所用更高劑量的百口咳毒素誘發。百日咳毒素的劑量係根據預期的用劑所造成壓力（途徑、頻率以及載劑的配方）決定。

預防性研究中，疾病發作時間的中位數通常就是化合物功效的最敏感度量。

免疫反應的小變化可導致疾病發作延遲：T細胞活化及增生的抑制、出現抗原、分化成為Th1及/或Th17細胞，全都會導致EAE發作延遲。

EAE發作的延遲伴隨比較低度的最大嚴重性，指出相較於陰性對照組的總體治療功效。

治療性處置

治療性處置研究中，治療是在EAE發作時開始。小鼠出現EAE時被以平衡方式分成不同治療組（隨到隨分組），以達成各組具有類似EAE發作時間以及類似發作計分。

治療性研究檢測治療是否會反轉疾病進程或改善EAE恢復情況。

此模型中最重要的讀出係最終臨床EAE計分的平均。這是該實驗的臨床結果；相較於陰性對照組的計分減少指出其治療功效。

未治療小鼠的EAE病程

個別小鼠會有不同的病程。大多數小鼠在免疫接種後第9至14日之間顯現出EAE的初期徵兆。一旦EAE開始，疾病高峰幾乎總是會在3至4日之後發生。最高計分持續數日，然後小鼠部分恢復。某些小鼠身上，疾病會停留在最嚴重的狀況直到研究結束。更少見的情形，小鼠會到最嚴重的高峰，僅停留一日然後開始恢復。

恢復的程度大半依據該小鼠所達的最大嚴重程度而定。

大多數未治療或施以載劑的小鼠並不會完全恢復，但他們的最終計分通常會比自己的最大計分少個0.5至1.5分。約25%未治療或施以載劑的小鼠在免

疫接種後24至28日之間顯示出EAE惡化，像是復發。在EAE惡化時這些小鼠的脊髓有很大數量的發炎點（每節多於7個），類似EAE發作及高峰期的組織學發現，指出這些是真正的復發而在脊髓中有新一波發炎現象。

若追蹤小鼠一段更長期間，疾病的嚴重性緩緩增加，像是人類MS患者身上所觀察到的慢性漸進病程。

EAE病程期間，體重變化反映疾病嚴重程度。小鼠往往在免疫接種隔天減去少量體重。這似乎是由於施加佐劑以及百日咳毒素的作用。然後小鼠穩定增加體重直到疾病發作。EAE發作那天，小鼠總是會失去1~2 g的體重（5~10%體重）。體重減輕隨著EAE嚴重性的進展而持續，疾病高峰時體重減輕達到發作前體重約20%。體重減輕更像是由於癱瘓與食物攝取減少，同時還有在急性發炎期間促發炎細胞素像是TNF的大量生成。達到疾病最高峰後，小鼠緩慢重拾體重，即使其臨床計分並未改善。如此的體重增加可能是由於發炎作用的往下調節，這就造成血液中的促發炎細胞素濃度較低。未治療或施以載劑的小鼠通常會在免疫接種28日後約為其免疫接種前體重的90%。

組織形態學

EAE的發炎反應一般是在脊髓的腰椎區開始，疾病高峰前擴散到整條脊髓。

疾病發作時發炎點的數目與疾病嚴重程度高度相關。發炎點增加直到疾病高峰，這時通常可在脊髓各處發現每節6-15個發炎點。EAE的慢性階段（疾病高峰之後數日開始），許多發炎點消去，通常會在免疫接種後約28日造成脊髓每節3~4個發炎點。

因為最大數目的發炎點是在病程早期出現，若在研究最後進行組織形態學分析，EAE晚發的小鼠往往會在牠們的脊髓內具有較其臨床計分所預想

更多的發炎點。舉例來說，28日的研究中免疫接種後27日發作EAE而最終臨床計分爲2的小鼠很可能會比免疫接種後9日發作EAE而最終臨床計分爲3.5的小鼠有更多發炎點。同理，研究即將終了前復發的小鼠（復發定義爲臨床計分增加1分或更多）通常會在研究結束時比帶有穩定慢性疾病的小鼠具有更多發炎點，即使這兩小鼠在研究結束時有相同的臨床計分。

脫髓鞘現象通常並不會在疾病發作後的前兩日發現，但會在疾病高峰（EAE發作後4~5日）出現並在EAE的慢性期持續看到。疾病高峰與免疫接種後28日之間，脫髓鞘現象評分並不改變太多並且平均值通常是1.2至2.5之間。

脫髓鞘現象是採Luxol快速藍染切片（LFB）以及H&E切片兩者來評分。

LFB切片中，脊髓白質染上深藍色且脫髓鞘區域係較淺的藍色，並伴有大的空泡。

H&E染色切片中，正常組織結構被大空泡破壞即指出脫髓鞘現象。

凋亡細胞可在H&E切片中看出，而且通常在疾病發展的最初兩日並不會發現。它們是在EAE的高峰期以及慢性階段期間發生。凋亡細胞的平均數通常是每一切片2至4個之間。

實驗設計

小鼠在研究開始前先稱重，然後以平衡方式指派至不同分組。化合物處置是在免疫接種當日開始（研究的第0日）。

第0日，以髓磷質寡突細胞糖蛋白中的肽35-55（MOG₃₃₋₅₅）乳化溶於傅氏完全佐劑（CFA）免疫接種而誘發疾病，接著兩次注射百日咳毒素（第0日及第1日）。

爲檢測疾病發展，小鼠始自免疫接種時每週稱重三次（週一、週三及週五），並從第7日開始每日評分其EAE臨床病徵。

材料及方法

小鼠

本研究使用共計24隻C57BL/6雌鼠（Taconic Farms，10週齡）。

分組與治療

小鼠依平衡的方式指派至不同分組，讓研究開始那天的體重約略相同。

以下表格一顯示各組是實施何種治療。

表格一：免疫接種及治療規畫

組別	化合物	劑量	頻率	目的
1	載劑	-	每日 2 次	陰性對照組
2	RHB-104	36 mg/kg	每日 2 次	測試化合物

各組包括12隻小鼠。

所有分組的治療均為口服，每日2次，量為10 mL/kg。

治療在免疫接種當日（第0日）開始，並持續到免疫接種後第27日。給藥均在每日同一時間進行（前後一小時）。夜間與晨間給藥間隔不超過14小時，且晨間與夜間給藥間隔不超過10小時。

誘發EAE

在24隻C57BL/6雌鼠（10週齡）身上誘發EAE，如下述：

第0日，第0小時：以MOG₃₅₋₅₅/CFA免疫接種

第0日，第2小時：注射百口咳毒素

第1日，第0小時：第二次注射百口咳毒素（初次免疫接種之後24小時）

小鼠係在背部兩個部位皮下注射經修飾的該試劑組之乳劑成分（包含MOG₃₅₋₅₅）。一注射位置是在上頸部，約領圍尾側1公分處。第二位置是在

下背部，約尾巴根部的頭側2公分處。每一位置的注射量為0.1 mL。

乳劑注射2小時之內，然後是乳劑注射後24小時再一次，腹膜內投入該試劑組的百口咳毒素成分。各注射的量為0.1 mL。

評分及讀出

讀出為研究終了時的EAE評分以及體重。

從第7日開始，小鼠每日評分直到研究終了，且自第-1日開始每週測量三次體重（週一、週三及週五）。

最後一個評分日是免疫接種後第28日。

評分是以盲測實施，由不知各小鼠治療及先前評分的人進行。

EAE評分

EAE是以0分至5分的量表評分：

0分

與未經免疫接種的小鼠比較，並無明顯動作功能變化

若拉尾巴提起，尾巴具張力且挺直。後肢通常跨開。

小鼠行走時，並無步伐或頭部傾斜。

1分

尾巴拖行。

若拉尾巴提起，尾巴並不挺直，整條尾巴癱在手指上。

2分

尾巴拖行而且後肢無力。

若拉尾巴提起，四肢並不跨開而是縮得更緊。觀察小鼠行走，明顯可見搖晃步態。

3分

尾巴拖行而且後肢完全癱瘓（最爲常見）；或

尾巴拖行且有一前肢或後肢癱瘓；或

以下現象全出現：

嚴重頭部歪斜，

只靠著籠邊行走；

扶著籠子內壁，

若拉尾巴提起會打轉。

4分

尾巴拖行，後肢完全癱瘓且前肢部分癱瘓。

小鼠極少在籠內移動，但看來機警且有進食。

通常，小鼠評分爲第4級二日以上就會建議安樂死。若小鼠因嚴重癱瘓而被安樂死，實驗的後續就將這隻小鼠填爲5分。

5分

完全後肢癱瘓而且完全前肢癱瘓，不在籠內移動；或

小鼠一直在籠內打轉；或

小鼠由於癱瘓而死亡。

若臨床病徵落在前文所定義的兩分數之間，就指派一中間值分數。

脊髓的組織形態分析

第28日（研究終了）所有小鼠均被犧牲以供組織形態分析。

小鼠被用PBS灌流，並取出脊椎置入10%福馬林。

各小鼠，由腰、胸及頸部的脊髓各取3個Luxol快速藍染切片以及3個

H&E切片，製備並加以分析。

組織形態分析是由不知實驗分組以及所有臨床讀出的病理學專家實施。

發炎點計數

各個H&E染色切片計得約20細胞的發炎點。若發炎浸潤包含超過20個細胞，則估計出現了多少個20細胞發炎點。

脫髓鞘面積估計

脫髓鞘評分表示各切片之脫髓鞘區域的估計，方法如下：

0：無脫髓鞘現象（少於 5% 脫髓鞘區域）

1：5至20%的脫髓鞘區域

2：20至40%的脫髓鞘區域

3：40至60%的脫髓鞘區域

4：60至80%的脫髓鞘區域

5：80至100%的脫髓鞘區域

為做Luxol快速藍染切片，脫髓鞘區域的尺寸係依據藍染較不深色的髓磷質估計。

對於H&E染色切片，脫髓鞘區域係藉由尋找正常構造中斷處加以估計：與水腫及脫髓鞘和腫大軸突一致的泛白或空泡。

凋亡細胞計數

判定三H&E切片各自的凋亡細胞數目。凋亡細胞是神經細胞，且其數目與疾病的階段相關。凋亡細胞在疾病發作後很快出現，因此EAE發作時

就會有許多發炎點，但很少凋亡細胞。然後，凋亡細胞數目增加，一直到疾病高峰，然後維持為較高數值。

統計分析

統計分析實施如下：

發病率以卡方檢定做比較

EAE發作日的中位數以魏氏存活檢定做比較

EAE發作日的平均數以雙尾t檢定做比較

平均最大計分（MMS）是以魏氏等級和檢定做比較

最終計分是以魏氏等級和檢定做比較

體重改變是以雙尾t檢定做比較

脫髓鞘計分（LFB）是以魏氏無母數檢定做比較

脫髓鞘計分（H&E）是以魏氏無母數檢定做比較

凋亡細胞數是以雙尾t檢定做比較

實驗結果及資料解讀

EAE發展是藉由比較以下各項加以評估：

EAE發病率，

EAE發病日（MME）的中位數與平均數，

平均最大計分（MMS），

研究終了時的平均EAE計分，以及

研究終了時的平均體重相對於初始體重

載劑組（陰性對照組）與RHB-104組之間的比較

實驗結果總結：臨床發現

表格二：

(105 年 9 月 2 日專利修正無劃線版)

處置	EAE 發 病率(%)	p 值	MME	p 值	MMS +/- 標 準差	p 值	最終計 分 +/-標準 差	p 值	最終體 重% +/-標準 差	p 值
載劑	100.0%		15.0		3.08 +/- 0.87		2.54 +/- 1.05		90.7 +/- 7.5	
RHB-104	100.0%	1.0000	15.0	0.7617	2.33 +/- 0.65	0.0031	0.92 +/- 0.67	0.0011	105.2 +/- 3.8	0.0000

第1組： 載劑組，口服，每日2次（陰性對照組）

本組中的大部分小鼠發展出嚴重EAE（表格一與第6圖）

本組中的大部分小鼠在此研究期間減輕體重，正如預期（表格一與第7圖）

本組並無小鼠死亡。

第2組：RHB-104，36 mg/kg，口服，每日2次

本組中大部分小鼠發展出要比載劑組所見較為緩和的疾病

相較於載劑組，本組在大多數EAE臨床讀出中有明顯進步（表格一及第6圖與第7圖）

本組並無小鼠死亡。

以上觀察到的結果顯示，相較於控制組，以RHB 104治療時對於與疾病嚴重性相關之前述指標有顯著作用。

實驗結果總結：組織形態發現

表格三：

(105 年 9 月 2 日專利修正無劃線版)

處置	發炎點 +/- 標準差	p 值	脫髓鞘(LFB) +/- 標準差	p 值	脫髓鞘化 (H&E) +/- 標準差	p 值	凋亡細胞數 +/- 標準差	p 值
載劑	3.2 +/- 2.2		1.7 +/- 0.7		1.4 +/- 0.6		3.1 +/- 1.2	
RHB-104	1.8 +/- 1.6	0.0867	0.6 +/- 0.6	0.0018	0.8 +/- 0.5	0.0198	1.4 +/- 1.7	0.0093

載劑處置小鼠：

載劑處置小鼠的組織形態發現為此EAE階段及嚴重程度的典型。低倍率放大影像顯示，取自載劑處置小鼠的胸部及腰部的脊髓切片顯現出在軟腦膜與白質當中有發炎現象。本組並無小鼠死亡。

RHB 104處置小鼠：

與臨床發現一致，這些小鼠的組織形態讀出大多指出要比載劑處置小鼠的疾病明顯較不嚴重。取自RHB-104處置小鼠之代表性胸部和腰部脊髓切片的低倍率影像顯示，這些切片當中要比載劑處置小鼠的切片較少發炎點。此外，RHB-104處置小鼠的發炎點要小於載劑處置小鼠的發炎點。

RHB-104處置小鼠的脫髓鞘區域顯著小於載劑處置小鼠的脫髓鞘區域。本組並無小鼠死亡。

與臨床發現一致，這些小鼠的組織形態讀出指出要比載劑處置小鼠的疾病明顯較不嚴重。RHB-104處置小鼠要比取自載劑處置小鼠之切片找到較少發炎點。此外，RHB-104處置小鼠的發炎點要小於載劑處置小鼠的發炎點。

RHB-104處置小鼠的脫髓鞘區域顯著小於載劑處置小鼠的脫髓鞘區域。所有這些發現證實臨床觀察結果，即研究終了時RHB-104處置小鼠要比載劑處置小鼠所患EAE顯著較不嚴重。

【0064】 實驗三：EAE 復發研究。

此模型最像一再復發型的MS（最爲常見的MS類型）。

本模型的前提如下，已知在一EAE模型中免疫接種後第11～14日小鼠出現第一次癱瘓發作期，與大部分的MS患者類似，其會從第一波的癱瘓當中完全復原或幾乎完全復原。1～2星期的無病期過後，50至100%的小鼠出現第二波癱瘓（復發）。

此模型是用來檢測化合物對於出現EAE復發現象的功效（治療性處置）。處置可在EAE之臨床病徵初發時開始，或在由第一波EAE復原時開始。此模型通常需時5到7週，但有時會觀察小鼠久些。

實驗設計

疾病是藉由在第0日以乳化於佛氏不完全佐劑當中的PLP₁₃₉₋₁₅₁胜肽免疫接種而誘發。

爲檢測疾病發展，小鼠始自免疫接種時每週稱重三次（週一、週三及週五），並從第9日開始每日評分其EAE臨床病徵。

各小鼠出現臨床病徵第二日將其分派至不同小組。小鼠出現EAE病徵即被指派至不同處置分組（隨到隨分組）。

組別指派及治療

所有小鼠一開始被視爲一整組。免疫接種後第9日開始每日計分。

各小鼠出現EAE臨床病徵第二日即將其分派至不同小組。小鼠出現EAE病徵即被指派至不同處置分組（隨到隨分組）。

45隻小鼠被指派成3組各15隻，並在分組當天開始治療。分組指派加以平衡以達成各組間在分派時的計分相同。

最晚出現疾病或有不尋常症狀的7隻小鼠，並不分派至各組且不用於研究。

組別

第一組：載劑（PBS），口服，每日2次，5 mL/kg（陰性對照組）

第二組：以FTY-720治療（Fingolimod, Gilenya）；3 mg/kg口服，每日1次（一種用來治療MS的藥物，當作陽性對照組）

第三組：以RHB-104治療，口服，每日2次，5 mL/kg

處置

分派組別當日開始治療，繼續直到第39日。

給藥均在每日同一時間進行（前後一小時）。晨間與夜間給藥至少間隔10小時，而且夜間與晨間給藥間隔不超過14小時。

所有小鼠的投藥最後一日是第39日。

評分及讀出

從第9日至第40日小鼠每日計分，且免疫接種前（-1日）開始每週測量三次體重（週一、週三及週五）。

計分是以盲測實施，由不知各小鼠治療及先前分數的人進行。

讀出是以0到5增量0.5的量表為EAE計分，還有體重變化。

EAE計分

EAE是以0分至5分的量表計分，如上述：

統計分析

統計分析如下實施：

EAE發作日的中位數以魏氏存活檢定做比較

EAE發作日的平均數以雙尾t檢定做比較

第一波發作的平均最大計分（MMS）是以魏氏等級和檢定做比較

復發率以卡方檢定做比較

復發的平均最大計分（MMS）是以魏氏等級和檢定做比較

最終計分是以魏氏等級和檢定做比較

體重改變是以雙尾t檢定做比較

實驗結果

第一組的8隻小鼠出現復發現象，這在其臨床評分可看出，其中第二與第三組各自僅2隻小鼠呈現復發。

進一步，第三組之疾病復發的嚴重性要比第一組的嚴重性要顯著小得多，如第12圖所示。

結論

除了減少EAE初次發作時的症狀，本發明RHB-104組成物已顯示出其保護小鼠對抗疾病復發，而且在出現復發的病例中，疾病的嚴重程度相較於一陰性對照組顯著減少。總的來說，這些結果指出RHB-104在本研究在減低疾病方面係相當有效。

【0065】 熟悉本技藝的人士應可理解，上述具體實施例可有許多變化及（或）修飾，而不會偏離本發明寬廣的一般性範疇。因此，本說明書的具體實施例應被視為示範性而非限制性。

申請專利範圍

1. 一種包含利福布汀、克拉黴素與氯法齊明的組成物供製造用於治療一個體之多發性硬化症之一藥劑的用途。
2. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該組成物係為口服投藥而調劑。
3. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中氯法齊明分散在一吸收促進劑。
4. 如申請專利範圍第3項所述之用途，其中該吸收促進劑包含聚乙二醇。
5. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該組成物進一步包含維生素D。
6. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該組成物進一步包含一抗炎劑。
7. 如申請專利範圍第6項所述之用途，其中該抗炎劑包含5-胺柳酸、硫唑嘌呤或胺甲基葉酸的其中一項或一組合。
8. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該組成物進一步包含一週期素依賴激酶抑制劑。
9. 如申請專利範圍第8項所述之用法，其中該週期素依賴激酶抑制劑包含R核抑制劑（R-roscovitine）或弗拉平度（Flavopiridol）。
10. 如申請專利範圍第1項所述之用途用於治療一再復發之多發性硬化症。
11. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該組成物進一步包含一活化T細胞轉錄抑制劑。

12. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，基於投藥該組成物予多發性硬化症之一個體，一脫髓鞘的縮減被觀察到。

13. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，基於投藥該組成物予多發性硬化症之一個體，關於多發性硬化症的一或多個症狀的至少一改善是可觀察到的。