



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101102781 B

(45) 授权公告日 2012.06.20

(21) 申请号 200580003723.6

A61K 33/40 (2006.01)

(22) 申请日 2005.01.25

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/541,576 2004.02.03 US

审查员 陈卫星

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.07.31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/002469 2005.01.25

(87) PCT申请的公布数据

W02005/076819 EN 2005.08.25

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·S·麦格拉斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

司 31100

代理人 范征

(51) Int. Cl.

A61K 33/00 (2006.01)

A61K 33/14 (2006.01)

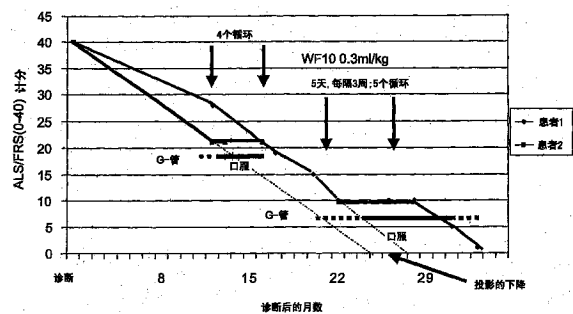
权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 8 页

(54) 发明名称

亚氯酸盐治疗神经变性疾病

(57) 摘要

本发明提供了通过给予亚氯酸盐在对象中治疗巨噬细胞-相关神经变性疾病如肌萎缩侧索硬化(ALS)、阿尔茨海默病(AD)或多发性硬化(MS)的方法,亚氯酸盐的量可有效减少血免疫细胞活化。本发明还提供了通过评价治疗前后血免疫细胞活化来监测治疗的方法。



1. 亚氯酸盐在制备用于治疗患有神经变性疾病的对象的药物组合物中的应用,其中,所述神经变性疾病是肌萎缩侧索硬化或阿尔茨海默病,所述亚氯酸盐以每升 40mM 到 80mM 的浓度以 0.1ml/ 公斤体重到 1.5ml/ 公斤体重的剂量给予,其中,所述亚氯酸盐是药学上可接受的亚氯酸盐形式。

2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述亚氯酸盐是亚氯酸钠。

3. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述神经变性疾病是肌萎缩侧索硬化。

4. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述神经变性疾病是阿尔茨海默病。

5. 亚氯酸盐在制备用于治疗患有多发性硬化的对象的药物组合物中的应用,其中,所述亚氯酸盐以每升 40mM 到 80mM 的浓度以 0.1ml/ 公斤体重到 1.5ml/ 公斤体重的剂量给予,其中,所述亚氯酸盐是药学上可接受的亚氯酸盐形式。

6. 如权利要求 5 所述的应用,其特征在于,所述亚氯酸盐是亚氯酸钠。

亚硝酸盐治疗神经变性疾病

[0001] 政府权利

[0002] 本发明在国立卫生研究院授予的联邦资助号 U01-CA66529 下由政府支持下完成。美国政府对本发明享有某些权利。

发明领域

[0003] 本发明一般涉及采用亚硝酸盐治疗神经变性疾病,尤其是特征为病理性巨噬细胞的神经变性疾病,例如肌萎缩侧索硬化(ALS)、多发性硬化(MS)、HIV-相关神经病症或阿尔茨海默病(AD)。

[0004] 发明背景

[0005] 神经变性疾病一般特征为个体脑或神经系统中神经元的变性。肌萎缩侧索硬化(ALS)、阿尔茨海默病(AD)和多发性硬化(MS)属于该类别。这些疾病使患者虚弱,它们导致的损害常常是不可逆的,在许多情况下结局是致死的。

[0006] ALS的特征为脊髓和脑中运动神经元细胞的逐渐变性,最终导致进行性肌肉衰弱和麻痹以及死亡。ALS表现为两种临床不可区分形式,称为散发型和家族型。尚未完全了解ALS的发病机制,虽然已提出了不同的假设,包括线粒体功能不良、超氧化物歧化酶基因突变以及神经元谷氨酸转运缺陷。也假设自身免疫与ALS发病机制有关(Appel等1993. J. Neurol. Sci. 118 :169-174)。此外,近来一些研究表明,免疫系统主动参与ALS的疾病过程,ALS患者脊髓中观察到活化的小胶质细胞、IgG沉积、增加的FcR表达和细胞因子表达的失调(Troost等1989. Clin. Neuropathol. 8 :289-294 ;Engelhardt等1990. Arch. Neurol. 47 :1210-1216 ;Schiffer等1996. J. Neurol. Sci. 139(增刊):27-33 ;Hayashi等2001J. Neurol. Sci. 188 :3-7. 9-12)。

[0007] 最近的临床和病理学研究表明,运动神经元系统外部参与肌萎缩侧索硬化(ALS)较为常见(Hayashi等2001,同上;Obal等2001 Neuroreport. 12 :2449-2452 ;Sola等20028. Eur. Neurol. 47 :108-112 ;Ono等2001J. Neurol. Sci. 187 :27-34 ;Alexianu等2001 Neurology. 57 :1282-1289)。小胶质细胞/巨噬细胞活化和炎症反应预示着ALS疾病进展(Appel等1993,同上;Engelhardt等1990,同上;Hayashi等2001同上;Obal等2001 Neuroreport. 12 :2449-2452 ;McGeer等2002 Muscle Nerve. 26 :459-470,28,29)。然而,迄今很少有研究表明全身免疫反应在ALS中地位。尽管进行了广泛研究,尚不知道ALS的原因或有效疗法。

[0008] 近来在患有HIV相关疾病的患者中发现逆转录病毒感染是ALS样综合征的发病机制。Moulinier等(HIV感染中的可逆ALS样病症,Neurology. 57 :995-1001)最近报道,六位伴有神经病症的HIV-1感染患者的结局类似ALS,并且用抗逆转录病毒疗法可稳定或改善所有这些患者。MacGrowen等(2001. 伴有新型HIV感染的ALS样综合征以及对抗逆转录病毒疗法的完全响应. Neurology. 57 :1094-10)也报道,在伴有新型HIV感染的ALS样综合征中对于抗逆转录病毒疗法的显著临床响应。

[0009] 大约四分之一AIDS患者可发生神经病理症状。HIV-1感染引起脑内炎症和神经

元变性 (Power 等 2001 *Adv. Virus. Res.* 56 :389-433), 导致 HIV- 相关痴呆 (HAD) 或不太严重的轻微认知和运动障碍 (Janssen 等 1991 美国神经病学协会 AIDS 特别工作组的报告 (Report of a Working Group of the American Academy of Neurology AIDS Task Force). *Neurology.* 41 :778-785 ;McArthur 等 1993 多中心 AIDS 定群研究 (Multicenter AIDS Cohort Study). *Neurology.* 43 :2245-2252 ;Dana 协会 (The Dana Consortium). 1996. 美国神经病学协会的 HIV-1 相关认知 / 运动障碍计算的临床验证 (Clinical confirmation of the American Academy of Neurology algorithm for HIV-1-associated cognitive / motor disorder). Dana 协会关于 HIV 痴呆及相关认知障碍的疗法 (The Dana Consortium on Therapy for HIV Dementia and Related Cognitive Disorders). *Neurology.* 47 : 1247-1253)。

[0010] 尚未完全了解 HIV- 相关性神经元损伤的机制。各种研究表明, 单核细胞 / 巨噬细胞活化在许多神经疾病的发病机制中起着重要作用 (Smits 等 2000 *Eur. J Clin. Invest.* 30 : 526-535. ;Fiala 等 2002 *Eur. J. Clin. Invest.* 32 :360-371 ;Minagar 等 2002 巨噬细胞 / 小胶质细胞和星形胶质细胞在三种神经病症发病机制中的作用 :HIV- 相关痴呆、阿尔茨海默病和多发性硬化。 *J Neurol. Sci.* 200 :13-23), 包括 HIV- 相关神经病症 (Pulliam 等 1997 *Lancet.* 349 :692-695 ;Diesing 等 2002 *AIDS Reader.* 12 :358-368。事实上, HIV- 相关神经病症, 尤其是 HAD 的最佳病理学关联是活化单核吞噬细胞 (血管周围和实质性血衍生巨噬细胞和小胶质细胞) 的数目, 而不是脑本身中病毒的绝对水平 (Glass 等 1995 *Ann. Neurol.* 38 :755-762 ;Adamson 等 1999 *Mol. Med.* 5 :98-109)。报道了对于猿 AIDS 相关脑病 (SIVE) 的类似发现 (Williams 等 2002 *Am. J :Pathol.* 161 :575-585)。已报道患有 ALS 疾病的患者脊髓中巨噬细胞活化 (Appel 等 1993, 同上 ;Engelhardt 等 1990, 同上 ;Obal 等 2001, 同上 ;McGeer 等 2002, 同上), 虽然目前尚未确定巨噬细胞活化在 ALS 发病机制中的作用。

[0011] 对来自 HAD 患者 (Liu 等 2000 *J Neurovirol.* 6 (增刊 1) :S70-81) 和患 SIVE 的猴 (Williams 等 2002 *Am. J :Pathol.* 161 :575-585) 的血液研究表明, 活化的血巨噬细胞的存在与中枢神经系统 (CNS) 疾病之间的关系。认为这些活化的巨噬细胞介导血脑屏障 (BBB) 破裂并直接导致 CNS 发病。

[0012] 阿尔茨海默病 (AD) 是老年人中最常见的痴呆形式。各种研究表明, 巨噬细胞活化与 AD 有关 (例如参见 WO 99/21542)。目前确切诊断 AD 的唯一方式是通过死后解剖来评价脑组织中淀粉样斑和结的存在。因此, AD 诊断通常是“可能”或“很可能”AD 的诊断。在专业中心, 医生诊断 AD 的正确率高达 90%。利用一些工具来诊断“很可能”AD, 包括医疗史、分析血尿或脊髓液以排除其它原因 (例如甲状腺缺乏、感染性疾病等)、脑扫描、以及神经心理测验来评价记忆能力、解决问题的能力、注意力、计算能力和语言能力。

[0013] 多发性硬化 (MS) 是一种慢性疾病, 其特征在于“发作”, 发作期间中枢神经系统白质区, 称为斑块, 发生炎症。斑块区的炎症继之以髓鞘质 (形成隔离脑和脊髓中神经细胞纤维的鞘或覆盖物的脂肪物质) 的破坏。髓鞘质有利于脑、脊髓和身体其它部位之间电化学信息的流畅、高速传递。髓鞘质的损伤可减缓或完全阻断这些电化学信息的传递, 导致身体功能减弱或丧失。

[0014] MS 的最常见病程表现为一系列发作, 然后是完全或部分缓解, 期间, 在稍候的时间

点症状仅减轻到恢复。这种类型的 MS 常称为“复发 - 减轻型 MS”。另一种形式的 MS 称为“原发 - 进行性 MS”，其特征在于疾病状态渐渐减弱，无明显减轻且只有暂时平稳状态或症状较少缓解。第三种形式的 MS 称为“继发 - 进行性 MS”，开始时是复发 - 减轻型病程，但后来恶化成原发 - 进行性 MS 病程。

[0015] MS 症状可以是温和的或严重的，急性或长持续时间，或以各种组合形式出现。这些症状包括视觉问题如视力模糊或复视、红绿色彩失真或甚至一只眼睛失明，四肢肌无力，协调和平衡问题，肌痉挛状态，肌疲劳，感觉异常，瞬时异常感如麻木、刺痛或“销和针”感觉，最坏的情况下部分或完全麻痹。大约一半 MS 患者还受到认知损伤，例如，差的集中力、注意力、记忆力和 / 或判断力。当负责信息处理的脑区发生损伤时，可出现这些认知症状。

[0016] 虽然本领域取得了一些进步，但仍然需要一种治疗 ALS 和 MS 的疗法，包括缓解这些疾病的症状。本发明满足了这种需要。

[0017] 参考文献

[0018] 感兴趣的是以下参考文献，以及书目和全文引用的参考文献：Akiyama 等 2000 *Neurobiol. Aging*. 21 :383-421 ;Anderson 等 2002. *J Leukoc. Biol.* 72 :101-106 ;Cremer 等 1976. *N. Engl. J Med.* 295 :107-108. (Letter) ;Fischer-Smith 等 2001. *J. Neurovirol.* 7 :528-541 ;Giese 等 *Cell Immunol.* 2004 Jun ;229(2) :149-58 ;Hansen 等 *Pharmacol Toxicol.* 2001 Aug ;89(2) :92-5 ;Hensley 等 2002. *JNeurochem.* 82 :365-374 ;Hirsch 等 2003. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 991 :214-228 ;Kemp 等 *Pharmacol Toxicol.* 2002 Jun ;90(6) :346-8 ;Kemp 等 *Transplant Proc.* 2000 Aug ;32(5) :1018-9 ;Klaustermeyer 等 1989. *Ann. Allergy.* 63 :327-330 ;Kott 等 1979. *Neurology.* 29 :1040-1044 ;Lehrich 等 1974. *J;Neurol. Sci.* 23 :537-540 ;Marshall 等 1998. *Brain Behav. Immun.* 12 :297-307 ;McGeer 等 1998. *Exp. Gerontol.* 33 :371-378 ;Morgan 等 1988. *Arch. Dis. Child.* 63 :771-773 ;Nottet 等 1996. *J Immunol.* 156 :1284-1295 ;Provinciali 等 1988. *Acta. Neurol. Scand.* 78 :449-454 ;Nguyen 等 2001 *Ann. Neurol.* 50 :630-639 ;Ostermeyer-Shoaib 等. 1993 *Acta Neurol Scand.* 87 :192-194 ;Raffanti 等 *Infection.* 1998 Jul-Aug ;26(4) :200-7 ;Schempp 等 *Arzneimittelforschung.* 2001 ;51(7) :554-62 ;Tikka 等 2001. *J Neurosci.* 21 :2580-2588 ;Veerasararn 等 *Radiother Oncol.* 2004 Nov ;73(2) :179-85 和 Van Den Bosch 等 2002. *Neuroreport.* 13 :1067-1070。

[0019] 也参见：McGrath 等 2002 *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3 :365-373 ;McGrath 等 1999 *Pathobiology.* 67 :277-81 ;McGrath 等 1998 *Transplant. Proc.* 30 :4200-4204 ;Giese 等 2004 Jun ;229(2) :149-58 ;Zhang 等. *J Neuroimmunol.* 2005 Feb ;159(1-2) :215-24. Epub 2004 Nov 26.

[0020] 也参见：美国专利 4,725,437 ;5,877,222 ;6,086,922 ;以及美国出版号 20030175832 ;20030158262 ;20030130357 ;和 20030130350。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明提供在患者中治疗巨噬细胞相关的神经变性疾病如肌萎缩侧索硬化 (ALS)、阿尔茨海默病 (AD) 或多发性硬化 (MS) 的方法，该方法通过给予一定量的亚硝酸盐以有效减少血免疫细胞活化。本发明还提供通过评价治疗前和治疗后血免疫细胞活性来监测疗法的方法。

[0023] 附图简要说明

[0024] 结合附图阅读时,从以下详细说明可最好地理解本发明。附图中包括以下的图:

[0025] 图 1 显示了在 ALS 患者中,校正的 ALS 功能评定量表 (ALSFRS-R) 与活化抗原 CD38 共表达的 CD4T⁺ 细胞的关系。基于 ALSFRS-R 标度的中点、计分 24 将 ALS 患者分成两组。与正常对照 ($P < 0.01$) 和损伤较轻的患者 (ALSFRS-R 计分 > 24 , $n = 26$) ($P < 0.05$) 相比,损伤严重的患者 (ALSFRS-R 计分 $0-24$, $n = 10$) 中,CD4 活化标记物 CD38 显著较少,但正常对照和损伤较轻患者之间无差异。

[0026] 图 2a-2b 显示了在 ALS 患者中,共表达 HLA-DR 的 CD14 限定的巨噬细胞活性的分析。图 2a 说明在 ALS 患者中,巨噬细胞活化与 ALSFRS-R 计分负相关 (Pearson $r = -0.3424$, $P = 0.0409$)。图 2b 说明 ALS CD14 细胞上的 HLA-DR 水平与疾病进展速率 (ALSFRS-R 计分变化 / 月) 正相关 (Pearson $r = 0.3696$, $P = 0.0265$)。

[0027] 图 3a-3b 显示了 ALSFRS-R 分类的正常对照与 ALS 患者组之间血清 -IgG 和 -IgM 水平的比较。图 3a 显示,与正常对照相比,损伤严重的 ALS 患者中的血清 -IgG 水平显著较低 ($P < 0.05$),但在损伤较轻患者和正常对照之间无差异。图 3b 显示,损伤较轻患者中的血清 -IgM 水平显著高于正常对照 ($P < 0.01$),但损伤严重患者和正常对照之间无差异。

[0028] 图 4 显示了在 ALS 患者中,WF10 给药对活化的血巨噬细胞的作用。

[0029] 图 5 是一组曲线,显示从 1 个循环的 WF10 治疗的多发性硬化患者取血测定血巨噬细胞活化。

[0030] 图 6 显示给予两位 ALS 患者 WF10 的结果 (WF10, 1 个循环 = 1 小时内输注 0.3ml WF10/kg, 每天输注持续 5 天,每 3 周给予 5-天方案一次; 4 个循环和 5 个循环结束时所显示的数据。箭头表示给予 WF10 循环的时间。结果表示为 ALS/FR (肌萎缩侧索硬化 / 功能) 计分。G-管表示胃管在适当位置中的时间。口服表示患者能够用口进食。

[0031] 在进一步描述本发明之前,要了解的是本发明并不限于所描述的具体实施方案,这种实施方案当然是可以变化的。还需要了解的是既然本发明的范围仅受附加的权利要求限制,文中使用的术语仅是为了描述具体的实施方案而不是用来限制本发明。

[0032] 在提供值的范围之处,应了解在该范围上下限之间的每个插入值 (除非文中另有明确规定,该插入值到下限单位的十分之一) 也特定地包括在内。所述范围中任何规定的值或插入值以及所述范围中任何其它规定值或插入值之间各较小的范围均包括在本发明内。以在规定的范围内任何具体的排它性限制为条件,这些较小范围的上下限可独立地包括在该小范围内或排除在外,并且包括或不包括上下限或包括其中之一的范围也包括于本发明。在规定的范围包括上下限之一或两者时,排除包括上下限之一或两者的范围也包括在本发明内。

[0033] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的意思相同。虽然任何类似或等同于文中所描述的方法和材料均可用于实践和测试本发明,现在将描述优选的方法和材料。文中提及的所有出版物均纳入本文作为参考来披露和描述与所引用的出版物有关的方法和 / 或材料。

[0034] 必须注意的是,除非文中另有明确规定,用在文中和附加的权利要求中的单数形式“一个”、“一”与“该”均包括复数对象。因此,例如,“一亚氯酸盐基质”指包括多个这种亚氯酸盐基质,“该组合物”指包括一种或多种本领域技术人员已知的组合物及其等价物,

等等。

[0035] 文中提供讨论的出版物仅是因为其公开早于本申请的提交日。不应认为由于在先发明而使本发明不具资格先于这种出版物。此外,所提供的出版物日期可能与实际发表日期不符,这需要独立地证实。

[0036] 发明详述

[0037] 概况

[0038] 本发明基于以下发现:给予包含活性成分亚氯酸盐(例如,四氯癸氧(TCDO)形式)的WF10可用于治疗患有肌萎缩侧索硬化(ALS)的患者和用于治疗患有多发性硬化(MS)的患者。不受理论的限制,亚氯酸盐可降低活化的血免疫细胞(例如,活化的巨噬细胞),这些活化的血免疫细胞在ALS和MS患者中升高并导致ALS和MS疾病的发病。并且,由于阿尔茨海默病(AD)与活化的血免疫细胞相关联的方式类似于ALS,AD也可通过给予WF10来治疗。因此,本发明可用于治疗与活化的血免疫细胞、尤其与增殖或不适当活化的巨噬细胞有关的神经变性疾病。

[0039] 定义

[0040] “神经变性疾病”指特征为中枢神经系统进行性、一般逐渐地丧失功能性神经组织。本发明尤其感兴趣的是治疗患者具有活化的血免疫细胞,尤其是具有增殖或不适当活化的巨噬细胞的神经变性疾病。“非患病”个体通常指诊断不患有或非疑似患有相关神经变性疾病的个体。“患病”个体通常指诊断患有,或疑似患有相关神经变性疾病的个体。示例性神经变性疾病包括肌萎缩侧索硬化、多发性硬化及病原体-介导或病原体-相关性神经疾病或症状(例如病毒感染,如HIV感染)。

[0041] 如本文所用,术语“巨噬细胞”和“单核细胞”可互换使用,应理解在本领域中术语“单核细胞”常常用于描述表达CD14细胞表面标记物的循环单核细胞,而在组织中该细胞也称为巨噬细胞。

[0042] 本文中可互换使用的“异常的巨噬细胞”或“活化的循环单核细胞”或“活化的单核细胞”指表达CD14(即CD14+),表达升高水平的HLA-DR(II型主要组织相容抗原)和/或表达CD16(即CD16+)的单核细胞。通常在外周血中发现异常的巨噬细胞,但也可在来自个体的其它生物样品中发现。通常,在ALS患者中,这些异常的巨噬细胞没有可鉴定的伴随的T细胞活化。

[0043] 如本文所用,检测“异常的巨噬细胞的存在”通常指检测异常巨噬细胞的水平。通常,异常的巨噬细胞(或活化的单核细胞)的水平由CD14+细胞群中HLA-DR的表达水平和/或CD14+细胞群中CD16+细胞的百分比和/或CD14+/CD16+细胞的数量来表示,虽然也可采用其它标记物表示单核细胞活化、分化和/或增殖。应理解,无需测定绝对或甚至相对水平;观察到可检测的异常巨噬细胞已足够。

[0044] 应理解本领域中的“增殖的巨噬细胞”或“promac”,在本文中用于指疾病相关的血巨噬细胞,相对于非疾病的血巨噬细胞,其显示增殖和/或活化标记物升高。一般,巨噬细胞是不能进一步分裂的末端分化细胞。在本发明中,“增殖的巨噬细胞”能够进一步分裂或在一部分细胞周期中不认为是末端或末期的,和/或经历了不适当的活化(例如“不适当活化”)或正在经历不适当活化。下面将讨论检测增殖的巨噬细胞的方法。

[0045] “病理性巨噬细胞”在这里指包括增殖的巨噬细胞和不适当活化的巨噬细胞(例

如,异常巨噬细胞)。因此,如上所述,病理性巨噬细胞包括增殖的巨噬细胞,以及在任何给定时间下不显示增殖标记物、但仍慢性活化,因而处于病理状态的血中巨噬细胞。

[0046] 如本文所用,检测“增殖的巨噬细胞的存在”通常指检测增殖的巨噬细胞的水平。应理解,无需测定绝对或甚至相对水平;观察到可检测的增殖巨噬细胞已足够。

[0047] “巨噬细胞-相关”疾病、病症或适应症指与病理性巨噬细胞有关的疾病、病症或适应症,与对照样品相比,巨噬细胞的增殖水平或速率升高或异常。这种病症包括但不限于,巨噬细胞-相关神经变性疾病,例如 ALS、MS、HIV-相关神经病症和 AD。术语“病症”和“疾病”在这里可互换使用。“HIV-相关”疾病更广泛地指通常与 HIV 感染相关或由 HIV 感染继发的疾病;例如,认为“HIV-介导”的疾病包括在“HIV-相关”疾病中。在具体的实施方式中,考虑用本发明治疗的病症不是癌症(例如,是除癌症以外的疾病或病症)。在其它具体的实施方式中,考虑用本发明治疗的病症不是自身免疫疾病(例如,除自身免疫病症或疾病以外的巨噬细胞相关疾病或病症)。例如,病症不是移植排斥。在其它实施方式中,治疗的疾病不是病毒感染,尤其是 HIV 或 HCV 感染(即患者不是病毒感染,例如,不是 HIV-感染或 HCV-感染)。在其它实施方式中,病症不是 HIV-相关痴呆(例如,患者没有 AIDS 痴呆)。“巨噬细胞-相关神经变性疾病”在这里特别排除了癌症、HIV 感染、HCV 感染和自身免疫疾病。

[0048] “巨噬细胞-相关神经变性疾病”是患者具有病理性巨噬细胞的神经变性疾病(例如,异常活化的巨噬细胞和/或增殖的巨噬细胞,尤其是与对照样品相比,与巨噬细胞增殖水平或速率升高或异常有关的疾病)。“巨噬细胞-相关神经变性疾病”在这里特别排除了癌症和自身免疫疾病。

[0049] 本领域所理解的术语“肌萎缩侧索硬化”或“ALS”在这里指影响上运动神经元(脑中的运动神经元)和/或下运动神经元(脊髓中的运动神经元)并导致运动神经元死亡的进行性神经变性疾病。如本文所用,术语“ALS”包括本领域已知的所有 ALS 类型,包括但不限于,经典 ALS(一般影响上下运动神经元),原发性侧索硬化(PLS,一般只影响上运动神经元)、进行性延髓麻痹(PBP 或延髓发作,一种典型地开始表现为吞咽、咀嚼和说话困难的 ALS)、进行性肌萎缩(PMA,一般只影响下运动神经元)和家族性 ALS(一种遗传型 ALS)。

[0050] 本领域所理解的术语“多发性硬化”或“MS”在这里指导致神经细胞,尤其是脑和脊髓的髓鞘质覆盖物破坏的进行性神经变性疾病。如本文所用,“MS”包括本领域已知的所有 MS 类型,包括但不限于,复发-减轻型(RRMS)(典型地特征为发作后部分或完全恢复(也称为加剧、复发或突发))、继发进行性(SPMS)(通常特征为较少复发,失能和症状增加)和原发进行性(PPMS)(通常特征为症状和失能的增进而不是减轻)。

[0051] 本领域所理解的术语“阿尔茨海默病”或“AD”在这里指随着包括记忆损伤的多重认知缺陷的发生,特征为痴呆的进行性神经变性疾病,由美国精神病学协会(在 DSM IV 中)定义。

[0052] “个体”指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选。哺乳动物包括但不限于,农畜、运动动物、啮齿动物、灵长动物和宠物。

[0053] “巨噬细胞-相关神经变性疾病个体”或“巨噬细胞-相关神经变性疾病患者”指通过显示神经疾病的临床症状诊断患有神经变性疾病或疑似患有神经变性疾病的个体,这些症状包括患者血液中的病理性巨噬细胞。“非巨噬细胞-相关神经变性疾病个体”指诊

断不患有,非疑似患有巨噬细胞-相关神经变性疾病的个体。“巨噬细胞-相关神经变性疾病”在这里特别排除了癌症和自身免疫疾病。

[0054] “ALS 个体”或“ALS 患者”指通过显示 ALS- 相关症状诊断患有 ALS 或疑似患有 ALS 的个体。“非 ALS 个体”指非诊断患有 ALS 或非疑似患有 ALS 的个体。ALS 及 ALS 的诊断方法是本领域已知的且将在这里讨论。

[0055] “AD 个体”或 AD 患者“指通过显示 AD- 相关症状诊断患有 AD 或疑似患有 AD 的个体。“非 AD 个体”指非诊断患有 AD 或非疑似患有 AD 的个体。AD 及 AD 的诊断方法是本领域已知的且将在这里讨论。

[0056] “MS 个体”或“MS 患者”指通过显示 MS- 相关症状诊断患有 MS 或疑似患有 MS 的个体。“非 MS 个体”指非诊断患有 MS 或非疑似患有 MS 的个体。MS 及 MS 的诊断方法是本领域已知的且将在这里讨论。

[0057] 疾病(例如,巨噬细胞-相关神经变性疾病如 ALS、AD 或 MS)的“发生”或“进展”在这里指病症的初期表现和/或随后的疾病进展。例如,可采用标准临床技术,例如神经和肌肉活组织检查及 CNS 扫描技术如 MRI,检测和评价 ALS 或 MS 的发生。然而,发生也指不可检测的疾病进展。在本发明中,发生或进展指疾病状态的生物过程。“发生”包括出现、复发和发作。如本文所用,“发作”或“出现”包括 ALS、AD 或 MS 的首次发作和/或复发。

[0058] 如本文所用,巨噬细胞-相关神经变性疾病如 ALS、AD 或 MS 的“延迟发生”指延迟、妨碍、减缓、延缓、稳定和/或推迟疾病的一种或多种症状的发生,包括降低患者的疾病进行速率(例如,将患者从快速进行性疾病转为较缓慢的进行性疾病)。延迟可以是各种时间长度,取决于治疗个体的病史和/或医疗特点。如本领域技术人员所明白的那样,事实上,充分或明显的延迟包括防止该个体发生可检测的疾病。“延迟”疾病发生的方法指与不使用该方法相比,在给定时间框架内可降低疾病程度。这种比较一般基于临床研究,采用统计学显著量的对象,虽然该结果也可基于无对照的证据。“延迟发生”指与不给予药剂相比,减弱疾病程度和/或不希望的临床表现,和/或减缓或延长进展时程。因此,该术语还包括但不限于,减轻症状、降低疾病程度、稳定的疾病状态(例如,不是恶化)、延迟或减缓疾病进展以及可检测或不可检测的减轻(无论是部分或是完全)。

[0059] 如本文所用,“生物样品”包括多种获得自个体的样品类型,可用于诊断或监测分析。该定义包括血液和其它生物来源的液体样品、固体组织样品如活检标本或组织培养物或由此得到的细胞、及其后代。该定义还包括获取后以任何方式处理的样品,例如通过用试剂处理、增溶作用或富含某些组分如蛋白质或多核苷酸。术语“生物样品”包括临床样品,也包括培养细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物液体和组织样品。通常,样品可来源于外周血,例如“血样”。在一些情况下,血可富含巨噬细胞组分,例如通过使用玻璃或塑料粘附。

[0060] “血样”指来自血液,优选外周(或循环)血的生物样品。例如,血样可以是全血、血浆或血清。

[0061] 如本文所用,“有效量”(例如,药物的有效量)指产生所需和/或有益结果的(药物的)量。可以一次或多次给药方式给予有效量。通常,有效量指足以降低巨噬细胞-相关神经变性疾病患者中或来源于巨噬细胞-相关神经变性疾病固体的异常巨噬细胞(病理性巨噬细胞)水平的量。在一些实施方式中,有效量指足以降低 ALS 患者中或来源于 ALS

个体的异常巨噬细胞的水平的量。在其它实施方式中,有效量指足以降低 MS 患者中或来源于 MS 个体的异常巨噬细胞的水平的量。在其它实施方式中,有效量指足以降低 AD 患者中或来源于 AD 个体的异常巨噬细胞的水平的量。“足以降低异常巨噬细胞的水平的量”优选能够降低异常巨噬细胞的水平至少约 25%,优选至少约 50%,更优选至少约 75%,甚至更优选至少约 90%。这种降低可具有所需的伴随作用,例如减轻、改善、稳定、逆转、减缓或延迟疾病的进展,延迟和 / 或甚至防止疾病的发作。

[0062] 在其它实施方式中,“足以降低 CD14+ 细胞 HLA-DR 表达水平的量”优选能够降低 HLA-DR 表达水平至少约 25%,优选至少约 50%,更优选至少约 75%,甚至更优选至少约 90%。这种降低可具有所需的伴随作用,例如减轻、改善、稳定、逆转、减缓或延迟疾病进展,延迟和 / 或甚至防止疾病的发作。

[0063] 如本文所用,降低“异常巨噬细胞的水平”通常指降低异常的巨噬细胞或活化的单核细胞群数量和 / 或降低 CD14+ 细胞群中 HLA-DR 的表达水平。在多个实施方式中,通过测定 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞的百分比和 / 或生物样品中 CD14+/CD16+ 细胞的数量,分析异常巨噬细胞的水平。应理解,无需测定绝对水平,观察到异常巨噬细胞的相对水平已足够。

[0064] “调节”巨噬细胞增殖指与不给予可改变巨噬细胞增殖的药物相比,改变增殖水平和速率。例如,通过使用含亚氯酸盐的组合物“调节”巨噬细胞增殖表示,与不给予药物相比,改变增殖巨噬细胞的水平或增殖速率。优选地,“调节”巨噬细胞增殖表示,改变增殖巨噬细胞的水平或巨噬细胞增殖速率至少 25%,优选至少 50%,更优选至少 75%,甚至更优选至少 90%。通常,在本发明中,“调节”巨噬细胞增殖表示,与不给予药物的个体中的相同参数相比,降低增殖巨噬细胞的水平或增殖速率。然而,例如,治疗过程中,希望从先前测定水平增加增殖巨噬细胞的水平或增殖速率。如下所述,通过测定巨噬细胞的增殖评价调节的程度,通常需要测定巨噬细胞群中的增殖标记物或某些物质如 BrdU 或 3H- 胸苷(提供增殖的定量测定)的摄取。并且,如果由于遗传改变(例如,转座、缺失或插入)导致巨噬细胞增殖,可采用本领域标准技术如 RFLP(限制性片段长度多态性)检测这种改变。

[0065] “治疗”或“处理”在这里指在对象中、通常哺乳动物对象、优选人对象中的任何治疗性干预,包括:(i) 防止,使不发生明显的临床症状,例如防止疾病进展至有害状态;(ii) 抑制,即阻止临床症状的发生或进一步发展,例如缓和现有临床症状;和 / 或 (iii) 缓解,即临床症状消退,例如缓解临床症状。

[0066] ALS 的示例性临床症状包括:肌无力、肌肉萎缩、肌肉痛性痉挛、肌肉颤搐、模糊不清或迟缓的语言、吞咽困难、以及缓慢和失调的活动。ALS 临床症状的其它例子包括:在从患有或疑似患有 ALS 对象获得的生物样品中可检测到的症状,例如,与正常相比 CD4 : CD8 细胞比例增加,与正常相比 CD14+ 细胞数量减少,与正常 CD14+ 细胞相比 CD14+ 细胞上 HLA-DR 表达增加,与正常相比活化的单核细胞或巨噬细胞水平增加,增殖巨噬细胞的存在,与正常相比血清 IgG 和 / 或 IgM 降低,其中,“正常”在这里指未患 ALS 的对象或来自该未患病对象的细胞。因此,“治疗”包括降低一种或多种临床症状,这种降低可具有所需的伴随作用,例如减轻、改善、稳定、逆转、减缓或延迟疾病的进展,延迟和 / 或甚至防止疾病的发作。

[0067] AD 的示例性临床症状包括:轻度健忘,包括记忆近期事件、活动、或家庭成员名字或物品的困难;解决简单数学问题的困难;记住如何完成简单任务(例如,刷牙或梳头)困难;不能清楚思考;语言、理解、阅读或写作困难;以及焦虑和攻击性,或离家游荡的倾向。

[0068] MS 的示例性临床症状包括：疲劳（也称为 MS 倦怠）、肌肉疲劳、感觉异常、步行困难和 / 或平衡问题、异常感觉如麻木、刺痛、“销和针”、疼痛、膀胱功能障碍、肠功能障碍、认知功能改变（包括记忆、注意、集中、判断和问题解决能力的问题）、头晕和眩晕、情绪问题（例如，抑郁）、性功能障碍和视觉问题。严重的情况可涉及部分或完全麻痹（例如视觉模糊或复视、红绿色彩失真、甚至是一只眼睛失明）。其它症状包括头痛、听力丧失、瘙痒、癫痫发作、痉挛状态、语言和吞咽障碍、以及震颤。MS 临床症状的其它例子包括：在从患有或疑似患有 MS 对象获得的生物样品中检测到的症状，例如，与正常相比 CD4 : CD8 细胞比例增加，与正常相比 CD14+ 细胞数量减少，与正常 CD14+ 细胞相比 CD14+ 细胞上 HLA-DR 表达增加，与正常相比活化的单核细胞或巨噬细胞水平增加，增殖巨噬细胞的存在，与正常相比血清 IgG 和 / 或 IgM 降低，其中，“正常”在这里指未患 MS 的对象或来自该未患病对象的细胞。因此，“治疗”包括降低一种或多种临床症状，这种降低可具有所需的伴随作用，例如减轻、改善、稳定、逆转、减缓或延迟疾病的进展，延迟和 / 或甚至防止疾病的发作。

[0069] 术语“对象”和“患者”指需要本文所述药物方法、组合物和治疗的任何哺乳动物或非哺乳动物。因此，对象和患者包括但不限于，灵长动物（包括人）、犬科动物、猫科动物、有蹄动物（例如，马类、牛类、猪类（例如猪）、禽类动物和其它对象。尤其感兴趣的是具有商业价值的人和除人以外动物（例如，家畜和家养动物）。

[0070] “哺乳动物”指任何哺乳动物成员，示例性地包括：犬类；猫类；马类；牛类；羊类；啮齿类等以及灵长类，尤其是人。实验性研究中可采用除人以外的动物模型，尤其是哺乳动物如灵长类、鼠类、兔等。

[0071] 术语“单位剂型”在这里指适合作为单剂量给予人和动物对象的物理离散单位，每一单位包含计算足以产生所需作用的量的预定量的本发明化合物以及药学上可接受的赋形剂（例如，药学上可接受的稀释剂、载体或运载体）。

[0072] “药学上可接受的赋形剂”指用于制备药物组合物的赋形剂，该赋形剂通常安全、无毒、既无生物活性或又无不良作用，包括适用于兽医学应用以及人类药物应用的赋形剂。说明书和权利要求书中使用的“药学上可接受的赋形剂”包括一种或一种以上的赋形剂。

[0073] 亚氯酸盐及其给药

[0074] 给予本发明亚氯酸盐的亚氯酸盐离子来源可为多种形式。例如，可以亚氯酸盐盐形式给予亚氯酸盐（例如，碱金属盐，如亚氯酸钠、亚氯酸钾等）或亚氯酸盐盐的混合物，其中，优选亚氯酸盐盐是药学上可接受的。此外或可选地，可以亚氯酸盐离子基质的形式给予亚氯酸盐，如美国专利 4, 507, 285 所述。在一个实施方式中，组合物中亚氯酸盐离子具有以下通式：

[0075] $ClO_2 \times nO_2$

[0076] 其中，“n”的值约为 0.1-0.25。拉曼光谱中该试剂的 O_2 谱带为 $1562cm^{-1}$, 0-0 间距 123pm。本领域已知该试剂的制备，例如参见美国专利 4, 507, 285。

[0077] 在一个实施方式中，治疗方法涉及给予产物称为“四氯氧阴离子配合物”，常简称为“TCDO”的水溶液。TCDO 的制备是本领域公知的，例如参见美国专利 4, 507, 285 的实施例 1。

[0078] 适当时，可以游离碱或游离酸形式（即，以游离化合物而非盐形式）给予可提供亚氯酸盐离子来源的试剂。此外，也可使用该化合物任何药学上可接受的盐。药学上可接受

的盐指那些保留游离化合物的生物活性且既无生物活性或又无不良作用的盐。适当时,本发明中也可使用所述化合物的立体异构体,包括非对映体和对映体,以及立体异构体的混合物,包括但不限于外消旋混合物。除非结构中明确指出立体化学,认为结构包括所示混合物的所有可能的立体异构体。

[0079] 制剂

[0080] 亚氯酸盐可以是任何合适的制剂形式,根据所需给药途径选择。

[0081] 美国专利 4, 725, 437 描述了一种适合静脉内给予的化学稳定亚氯酸盐基质水溶液,人和除人以外动物中的给药剂量约为 6.2×10^{-6} 摩尔 ClO_2^- 到 9.3×10^{-5} 摩尔 ClO_2^- / 公斤体重。该溶液包含的亚氯酸盐基质浓度约为 12-72 微摩尔 ClO_2^- / 毫升。其它亚氯酸盐制剂的描述参见美国专利 4, 507, 285 和 4, 725, 437。

[0082] 本发明尤其感兴趣的是 TCDO 制剂。WF10 是本发明实施过程中特别感兴趣的 TCDO 制剂。WF 10, 也称为 Oxoferin (Oxo Chemie GmbH, Fort Worth, Tex.) 可市售获得。其它 TCDO 制剂在本发明范围内。

[0083] 可配制含亚氯酸盐的组合物,例如 TCDO,用于胃肠外给药或肠内给药,通常是胃肠外给药。因此,亚氯酸盐制剂适用于胃肠外、局部或经皮给药,通常静脉内、肌内、或皮下给药,适合通过快速浓注给药,缓释(包括控释)、输注等。感兴趣的是输注给药(例如,通过皮下或静脉内输注),是栓剂的给药形式。

[0084] 其它药物和疗法。

[0085] 可单独或以各种组合形式给予亚氯酸盐。当组合给药时,可与其它药物联合给予亚氯酸盐,尤其是那些适合保护、减轻或支持性护理的对象。短语“与……联用”指在其它物质或疗法之前、同时或之后给予药物。与药物联用的药物的例子包括但不限于利鲁唑。与亚氯酸盐联用的其它药物包括用于控制巨噬细胞-相关神经变性疾病症状,例如 ALS、AD 或 MS 症状的药物。与本发明亚氯酸盐联用的其它示例性药物包括但不限于:巴氯芬、地西泮、苯海索和 / 或阿米替林。亚氯酸盐也可与非药物治疗(例如,物理和 / 或职业疗法、按摩等)联用。

[0086] 在一个实施方式中,组合物不包含一定量的其它抗增殖药物,例如多胺类似物,在巨噬细胞-相关神经变性疾病患者,如 ALS、AD 或 MS 患者中,有效降低异常巨噬细胞的水平(例如,与治疗前相比)。例如,已公开 TCDO 与抗增殖药物联合治疗,其中,给予一定量可有效促进巨噬细胞吞噬作用的 TCDO,以促进抗增殖药物递送至巨噬细胞。本发明考虑,将亚氯酸盐离子(例如,药学上可接受的盐或在稳定化基质中,例如在 TCDO 中)给予巨噬细胞-相关神经变性疾病患者,例如 ALS、AD 或 MS 患者,以使亚氯酸盐在所述对象中为活性成分,存在的量可有效促进患者的治疗,例如,通过减少增殖 / 不适当活化的巨噬细胞,而无需与亚氯酸盐联合给予(例如)多胺类似物或其它抗增殖药物。

[0087] 给药与剂量

[0088] 通常亚氯酸盐制剂的体内剂量取决于对象的体重。由于血中活性药物的不断分解,一般以有规律的间隔给予药物。本领域技术人员将容易明白,实际剂量和给药方案将随着药物、制剂、症状严重性、所述对象对治疗的敏感度和 / 或副作用等而改变。本领域技术人员通过多种方式可容易地常规确定剂量。

[0089] 含亚氯酸盐制剂的示例性剂量约为 0.1-1.5 毫升 / 公斤体重,优选约 0.5 毫升 /

公斤体重,浓度约为 40-80 毫摩尔 ClO_2^- /升,通常约为 60 毫摩尔 ClO_2^- /升。在 TCDO 的情况下,在 48 位患者中进行评价静脉内给予 WF-10 的剂量发现 I/II 期研究,建立了最大剂量约为 0.5 毫升/公斤。其它合适的剂量约为 0.25 毫升/公斤。

[0090] 给药方案(例如,给药频率与剂量的结合)通常将涉及为提供所需效果的给药量和给药频率,例如,可有效改善巨噬细胞-相关神经变性疾病患者的一种或多种症状,例如一种或多种 ALS、AD 或 MS 症状的给药量。例如,以连续 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多天给予亚氯酸盐,最后一次给药后 1、2、3 或更多周后,可再次给药。在一个示例性实施方式中,WF-10 方案包括每三周连续 5 天的治疗。

[0091] 在一个实施方式中,给予亚氯酸盐以有效调节巨噬细胞增殖,例如,与不存在给药相比,改变增殖巨噬细胞的水平或巨噬细胞增殖速率,和/或有效调节不适当的巨噬细胞活化。例如,通过比较治疗前和治疗期间 promacs 的水平(或数量)来确定亚氯酸盐的有效量,具有通常与阳性作用相一致的 promacs 数量降低趋势。在一个实施方式中,给予亚氯酸盐以有效改变增殖巨噬细胞水平或巨噬细胞增殖速率至少 25%,优选至少 50%,更优选至少 75%,甚至更优选至少 90%。如本领域所述,可通过测定巨噬细胞增殖评价调节的程度,通常需要检测巨噬细胞群中的增殖标记物或某些物质如 BrdU 或 3H-胸苷的摄取(提供增殖的定量测定)(例如,参见美国出版号 20030175832)。这种降低可具有所需的伴随作用,例如减轻、改善、稳定、逆转、减缓或延迟疾病的进展,延迟和/或甚至防止疾病的发作。

[0092] 检测增殖或不适当活化巨噬细胞及测定巨噬细胞增殖速率的方法是本领域已知的。例如,可通过分析细胞增殖标记物如 PCNA、Ki67 或溴脱氧尿苷(BrdU)或 3H-胸苷的摄取测定增殖的巨噬细胞。这些标记物与那些仅鉴定“活化”巨噬细胞(相对于增殖的巨噬细胞)的标记物,例如 CD69 和 CD25 不同。通过检测某些细胞特异性标记物,例如 CD14、CD68、CD16 或非特异性酯酶,也可鉴定显示巨噬细胞的细胞亚型。采用本领域标准方法检测这些细胞型和/或增殖标记物,例如印迹技术和 FACS 分选及分析。

[0093] 在另一个实施方式中,给予亚氯酸盐,以在巨噬细胞-相关神经变性疾病患者(例如 ALS、AD 或 MS 患者)中有效降低病理性巨噬细胞的水平(例如数量),例如,以有效降低 CD14+ 单核细胞,优选活化的 CD14+ 单核细胞的水平。在该实施方式中,给予亚氯酸盐的量足以降低个体中 CD14+ 单核细胞,优选活化的 CD14+ 单核细胞和/或 HLA-DR 表达升高的 CD14+ 单核细胞的水平(例如数量)和/或 CD14+/CD16+ 细胞的数量和/或 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞的百分比(即有效量)。例如,通过比较治疗前和治疗期间 CD14+ 单核细胞,优选活化的 CD14+ 单核细胞的数量水平来确定亚氯酸盐的有效量,具有通常与阳性作用相一致的 CD14+ 单核细胞数量降低趋势。“足以降低 CD14+ 单核细胞数量的量”优选能降低 CD14+ 单核细胞至少约 25%,优选至少约 50%,更优选至少约 75%,甚至更优选至少约 90%。评价 CD14+ 单核细胞、活化的 CD14+ 单核细胞、HLA-DR 表达升高的 CD14+ 单核细胞、CD14+/CD16+ 细胞的水平及 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞的百分比的方法是本领域已知的(例如,参见美国出版号 20030175832)。这种降低可具有所需的伴随作用,例如减轻、改善、稳定、逆转、减缓或延迟疾病的进展,延迟和/或甚至防止疾病的发作。

[0094] 将上述病理性巨噬细胞(增殖/不适当活化巨噬细胞(promacs))、巨噬细胞增殖速率、CD14+ 细胞、HLA-DR 表达等的水平与来自相同个体,不同时间和/或不同条件下(例如,治疗前、不同剂量等)测定的水平进行比较,和/或与非疾病标准(例如,适当时,非巨

噬细胞 - 相关神经变性疾病患者,例如非 ALS、非 AD 或非 MS),例如来自未患病个体(例如,非巨噬细胞 - 相关神经变性疾病个体;非 ALS 个体;非 AD 个体;或非 MS 个体)测定的平均和中位水平进行比较。

[0095] 例如,可将 HLA-DR 表达水平与来自相同个体、不同时间和 / 或不条件下(例如治疗前、不同剂量等)测定的 HLA-DR 水平进行比较。在一些实施方式中,可将 HLA-DR 表达水平与从非疾病(例如,非 ALS、非 AD 或非 MS)标准,例如从非 ALS 个体或非 MS 个体或非 AD 个体的 CD14+ 细胞群测定的 HLA-DR 表达的平均或中位水平进行比较。发现 HLA-DR 表达水平比非疾病标准状态的表达水平高约 1.4 倍,表明该个体中 HLA-DR 表达水平升高。通常,发现 HLA-DR 表达水平比非疾病标准状态的表达水平高约 1.5 倍,高约 1.6 倍,高约 1.7 倍,高约 1.8 倍,高约 1.9 倍,高约 2.0 倍,高约 5.0 倍,或高约 10 倍,表明该个体中 HLA-DR 表达水平升高。因此,本发明感兴趣的是,巨噬细胞 - 相关神经变性疾病对象(例如,ALS 对象、AD 对象或 MS 对象)中 HLA-DR 表达降低,而更接近非疾病对象(例如,非 ALS、非 AD 或非 MS 对象)中 HLA-DR 的表达水平。

[0096] 在另一个实施例中,将来自巨噬细胞 - 相关神经变性疾病对象(例如 ALS 对象、AD 对象或 MS 对象)的样品中 CD14+/CD16+ 细胞的数量或 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞的百分比与来自非疾病(例如,非 ALS、非 AD 或非 MS)标准状态,例如来自非 ALS 个体;非 AD 个体或非 MS 个体的生物样品中 CD14+/CD16+ 细胞的平均或中位水平进行比较。发现样品中 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞的百分比和 / 或 CD14+/CD16+ 细胞的数量比非疾病(非 ALS、非 AD 或非 MS)标准状态下大约 1.5 倍、大约 1.6 倍、大约 1.7 倍、大约 1.8 倍、大约 1.9 倍、大约 2.0 倍、大约 3.0 倍、大约 4.0 倍、大约 5.0 倍、或大约 10 倍,表明该个体中 CD14+/CD16+ 细胞数量增加。因此,在一个实施方式中,提供本发明疗法来降低 CD14+/CD16+ 细胞数量或 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞的百分比,以更加接近合适的非疾病对象中的水平。

[0097] 一般来说,如上所述,根据血巨噬细胞活化,通常根据 CD14/DR 水平和 CD14/16 阳性细胞百分比监测治疗。

[0098] 提供含单位剂量受试化合物的试剂盒,通常是可注射的剂量。在这种试剂盒中,除含单位剂量的容器外,还具有信息包装说明书,描述亚氯酸盐在治疗巨噬细胞 - 相关神经变性疾病对象,例如 ALS、AD 或 MS 中的使用及伴随的优点。优选的化合物和单位剂量如上所述。

[0099] 对象和监测治疗

[0100] 一般来说,适合给予本发明亚氯酸盐治疗的个体包括已被诊断具有巨噬细胞 - 相关神经变性疾病,“患有”巨噬细胞 - 相关神经变性疾病(例如,诊断具有、患有和 / 或显示一种或多种临床症状)的个体,或判断对发生该疾病具有高风险的个体。“风险”或“高风险”个体指具有发生巨噬细胞 - 相关神经变性疾病的离散和显著风险的个体。接受本文所述方法之前,“风险”或“高风险”个体患有或不患有可检测的疾病,显示或不显示可检测的疾病。“高风险”(或“风险”)指具有一种或多种所谓风险因素的个体,这些风险因素是与疾病发生有关的可测定参数。具有一种或多种风险因素的个体比没有风险因素的个体发生疾病的概率更高。这些风险因素包括但不限于,基因(即遗传)因素(包括家族史和遗传标记物)。应理解,只具有一种风险因素常常预示着高风险。作为本领域技术人员的内科医生应慎重决定是否采用药物治疗处于风险中的个体。巨噬细胞 - 相关神经变性疾病的例子

包括 ALS、AD 和 MS。

[0101] 在一个实施方式中,适合用本发明亚氯酸盐治疗的个体包括诊断具有 ALS 的个体,“患有”ALS(例如,诊断具有、患有和 / 或显示一种或多种 ALS 临床症状),或判断对发生该疾病具有高风险。“风险”或“高风险”个体指具有发生 ALS 离散和显著风险的个体。接受本文所述方法之前,“风险”或“高风险”个体患有或不患有可检测的疾病,显示或不显示可检测的疾病。“高风险”(或“风险”)表示具有一种或多种所谓风险因素的个体,这些风险因素是与疾病发生有关的可测定参数。具有一种或多种风险因素的个体比没有风险因素的个体更有可能发生疾病。这些风险因素包括但不限于,基因(即遗传)因素(包括家族史和基因标记物)。应理解,只具有一种风险因素常常预示着高风险。作为本领域技术人员的内科医生应慎重决定是否采用药物治疗处于风险中的个体。

[0102] ALS 的临床症状的例子包括:肌无力、肌肉萎缩、肌肉痛性痉挛、肌肉颤搐、模糊不清或迟缓的语言、吞咽困难、以及缓慢和失调的活动。ALS 临床症状的其它例子包括:在从患有或疑似患有 ALS 对象获得的生物样品中可检测到的症状,例如,与正常相比 CD4 : CD8 细胞比例增加,与正常相比 CD14+ 细胞数量减少,与正常 CD14+ 细胞相比 CD14+ 细胞上 HLA-DR 表达增加,与正常相比活化的单核细胞或巨噬细胞水平增加,增殖巨噬细胞的存在,与正常相比血清 IgG 和 / 或 IgM 降低,其中,“正常”在这里指未患 ALS 的对象或来自该未患病对象的细胞。

[0103] 在另一个实施方式中,适合用本发明亚氯酸盐治疗的个体包括诊断具有 MS 的个体,“患有”MS(例如,诊断具有、患有和 / 或显示一种或多种 MS 临床症状),或判断对发生该疾病具有高风险。“风险”或“高风险”个体指具有发生 MS 离散和显著风险的个体。接受本文所述方法之前,“风险”或“高风险”个体患有或不患有可检测的疾病,显示或不显示可检测的疾病。“高风险”(或“风险”)表示具有一种或多种所谓风险因素的个体,这些风险因素是与疾病发生有关的可测定参数。具有一种或多种风险因素的个体比没有风险因素的个体更有可能发生疾病。这些风险因素包括但不限于,基因(即遗传)因素(包括家族史和基因标记物)。应理解,只具有一种风险因素常常预示着高风险。作为本领域技术人员的内科医生应慎重决定是否采用药物治疗处于风险中的个体。

[0104] MS 的临床症状的例子包括从患有或疑似患有 MS 对象获得的生物样品中检测到的症状,例如,与正常相比 CD4 : CD8 细胞比例增加,与正常相比 CD14+ 细胞数量减少,与正常 CD14+ 细胞相比 CD14+ 细胞上 HLA-DR 表达增加,与正常相比活化的单核细胞或巨噬细胞水平增加,增殖巨噬细胞的存在,与正常相比血清 IgG 和 / 或 IgM 降低,其中,“正常”在这里指未患 MS 的对象或来自该未患病对象的细胞。

[0105] 在另一个实施方式中,适合用本发明亚氯酸盐治疗的个体包括诊断具有 AD 的个体,“患有”AD(例如,诊断具有、患有和 / 或显示一种或多种 AD 临床症状),或判断对发生该疾病具有高风险。“风险”或“高风险”个体指具有发生 AD 离散和显著风险的个体。接受本文所述方法之前,“风险”或“高风险”个体患有或不患有可检测的疾病,显示或不显示可检测的疾病。“高风险”(或“风险”)表示具有一种或多种所谓风险因素的个体,这些风险因素是与疾病发生有关的可测定参数。具有一种或多种风险因素的个体比没有风险因素的个体更有可能发生疾病。这些风险因素包括但不限于,基因(即遗传)因素(包括家族史和基因标记物)。应理解,只具有一种风险因素常常预示着高风险。作为本领域技术人员的内

科医生应慎重决定是否采用药物治疗处于风险中的个体。

[0106] AD 的临床症状的例子包括：轻度健忘，包括记住近期事件、活动、家庭成员名字或物品困难；解决简单数学问题困难；记住如何完成简单任务（例如，刷牙或梳头）困难；不能清楚思考；语言、理解、阅读或写作困难；以及焦虑和攻击性，或离家游荡的倾向。AD 的临床症状的其它例子包括从患有或疑似患有 AD 对象获得的生物样品中检测到的症状，例如，与正常相比 CD4 : CD8 细胞比例增加，与正常相比 CD14+ 细胞数量减少，与正常 CD14+ 细胞相比 CD14+ 细胞上 HLA-DR 表达增加，与正常相比活化的单核细胞或巨噬细胞水平增加，增殖巨噬细胞的存在，与正常相比血清 IgG 和 / 或 IgM 降低，其中，“正常”在这里指未患 MS 的对象或来自该未患病对象的细胞。

[0107] 监测疗法

[0108] 通过评价疗法对一种或多种临床症状的作用，可监测本发明基于亚氯酸盐的疗法，并由此调节剂量和给药方案。一般来说，亚氯酸盐的有效量指可改善对象中一种或多种临床症状的剂量。

[0109] 例如，由于 CD14+ 细胞上 HLA-DR 表达增加和 / 或 CD14+/CD16+ 细胞数量增加和 / 或 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞百分比增加与巨噬细胞 - 相关神经变性疾病（例如，ALS、AD、MS）有关，监测这些水平有利于评价对疗法的初始反应和 / 或效应，以及疗法的合适剂量。类似地，由于 CD14+ 细胞上 HLA-DR 表达增加和 / 或 CD14+/CD16+ 细胞数量增加和 / 或 CD14+ 细胞群中 CD16+ 百分比增加与 MS 有关，监测这些水平有利于评价对疗法的初始反应和 / 或效应，以及疗法的合适剂量。

[0110] 应理解，监测疗法指在不同时间评价症状并随时间进行比较。当评价临床症状需要分析生物样品时，通常在不同时间获得该生物样品，例如，应用疗法期间，并与其它生物样品、对照和 / 或所需的值进行比较。例如，通过评价生物样品监测 ALS 疗法的方法参见美国出版号 20030175832 所述。

[0111] 例如，通过测定外周血中 CD14+ 细胞上 HLA-DR 的表达水平，监测巨噬细胞 - 相关神经变性疾病，例如 ALS、AD 或 MS 疗法。在另一个实施方式中，监测疗法包括测定血样、优选外周血中 HLA-DR 表达升高的 CD14+ 细胞水平的步骤。在另一个实施方式中，监测疗法包括测定血样、优选外周血中，CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞百分比的步骤。在另一个实施方式中，监测疗法包括测定血样、优选外周血中 CD14+/CD16+ 细胞数量的步骤。在另一个实施方式中，通常将治疗期间和 / 或治疗完成时测定的血样中异常巨噬细胞水平（在多种实施方式中，HLA-DR 表达升高的 CD14+ 细胞水平；CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞的百分比和 / 或 CD14+/CD16+ 细胞数量）与对照样品水平和 / 或所需的值进行比较。在另一个实施方式中，监测疗法还包括测定异常巨噬细胞增殖的步骤。

[0112] 在另一个实施方式中，通过评价在特点时间从经历治疗患者抽取的样品和 / 或治疗后或治疗完成时提取的样品中异常巨噬细胞的水平，通常将该水平与治疗前从患者提取的样品和 / 或在治疗的不同时间点从患者提取的样品中的水平进行比较，监测巨噬细胞 - 相关神经变性疾病治疗，例如 ALS、AD 或 MS 治疗。例如，与治疗前或治疗较早时间点提取的样品相比，治疗期间提取的样品中异常巨噬细胞水平降低，通常与治疗的阳性作用相一致。

[0113] 在另一个实施方式中，通过测定血样、如外周血样中 CD14+ 细胞 HLA-DR 的表达水

平,评价异常巨噬细胞的水平,以监测本发明疗法。例如,通过将治疗前和治疗期间外周血中 CD14+ 细胞 HLA-DR 的表达水平进行比较来确定治疗效果,通常具有与阳性作用相一致的 HLA-DR 表达降低趋势。

[0114] 在另一个实施方式中,通过测定血样、如外周血样中 CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞百分比,评价病理性巨噬细胞的水平,以监测本发明疗法。例如,通过将治疗前和治疗期间外周血中,CD14+ 细胞群中 CD16+ 细胞百分比进行比较来确定治疗效果,通常具有与阳性作用相一致的 CD14+/CD16+ 细胞百分比降低趋势。

[0115] 在另一个实施方式中,通过测定血样、如外周血样中 CD14+/CD16+ 细胞数量,评价病理性巨噬细胞的水平,以监测本发明疗法。例如,通过将治疗前和治疗期间外周血中 CD14+/CD16+ 细胞数量进行比较来确定治疗效果,通常具有与阳性作用相一致的 CD14+/CD16+ 细胞数量降低趋势。

[0116] 试剂盒

[0117] 本发明还涉及试剂盒,其包含单位剂量的亚氯酸盐离子源,例如亚氯酸盐盐(例如碱金属盐,如亚氯酸钠、亚氯酸钾等);亚氯酸盐的混合物;亚氯酸盐离子基质,例如通式 $\text{ClO}_2 \times n\text{O}_2$ 的组合物,其中“n”的值约为 0.1-0.25;例如,TCDO。一般来说,这种单位剂量是可注射剂型,更具体地说是适合输注的剂型。在这种试剂盒中,除含单位剂量的容器以外,还具有信息包装说明书,描述亚氯酸盐在治疗巨噬细胞-相关神经变性疾病对象,例如 ALS、AD 或 MS 中的使用及伴随的优点。任选地,试剂盒包含涉及鉴定含有巨噬细胞-相关神经变性疾病患者和监测该患者的治疗的信息(例如,涉及评价病理性巨噬细胞,例如增殖巨噬细胞、活化巨噬细胞的信息)。

[0118] 实施例

[0119] 提供下面的实施例是向本领域普通技术人员完全披露和描述如何制造及使用本发明,而非限制发明人所认为的其发明的范围,也非表示以下的实验是所进行的全部或仅有的实验。已作了努力保证所用数字(例如,量、温度等)的精确性,但一些实验错误和偏差应该说明。除非另有说明,份是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏温度,压力是大气压或接近大气压。

[0120] 方法和材料

[0121] 在下述实施例中采用下面的方法和材料。

[0122] 对象

[0123] 40 位 ALS 患者(平均年龄 \pm SD, 59.5 ± 13.3 岁),在 Forbes Norris MDA/ALS 研究中心(San Francisco, California, USA)通过 El Escorial 标准(Brooks 等,诊断肌萎缩侧索硬化的 El Escorial 世界神经病学联合会标准。世界神经病学联合会神经肌肉疾病研究小组运动神经元疾病/肌萎缩侧索硬化附属委员会和 El Escorial “肌萎缩侧索硬化的临床限制”工作组 J. Neurol. Sci. 124(增刊):96-107)诊断,根据 CPMC 和 UCSF 人类研究委员会指导取血,由 UCSF AIDS 和 Cancer Specimen Resource (ACSR) 规划协调。采用校正的 ALS 功能评定量表 (ALSFRS-R),计分 0-48,评价临床试验和临床研究中总的功能状态(Cedarbaum 等 1999. ALSFRS-R:包括评价呼吸功能的校正的 ALS 功能评定量表。J Neurol. Sci. 169:13-21),用来评价每位患者的临床状态并在血试验 1 个月内更新)。

[0124] 40 位患者由 26 位男性(年龄范围 34-87 岁;平均年龄 \pm SD, 58.0 ± 14.0 岁)和 14

位女性（年龄范围 40-77 岁；平均年龄 \pm SD, 62.4 \pm 11.7 岁）构成。他们患 ALS 已有 4-93 个月，ALSFRS-R 计分为 8-43。只有两位患者为家族型 ALS (fALS)，38 位患者诊断为散发型 ALS (sALS)。研究 ALS 患者（在表中缩写为“Pt”）样本的人口统计信息如表 1 所示，其中，13 位患者用各种标准剂量的抗炎药治疗 (Celebrex, Vioxx, Naproxyn, Excedrin)，31 位患者给予利鲁唑 (50 毫克，每天两次)；10 位患者给予上述两种药物。

[0125]

Pt 编号	Pt 年龄 (岁)	Pt 性别	疾病形式	治疗		患病持续时间 (月)	ALSFRS-R 计分
				利鲁唑 ^A	NSAIDS ^B		
Pt 1	76	F	sALS	否	否	46	19
Pt 2	59	M	sALS	是	否	15	30
Pt 3	77	F	sALS	是	否	37	34
Pt 4	73	F	fALS	是	否	31	20
Pt 5	57	M	sALS	是	Celebrex	19	34
Pt 6	63	F	sALS	是	Vioxx	10	N/A
Pt 7	75	F	sALS	否	否	78	33
Pt 8	64	M	sALS	是	否	43	13
Pt 9	58	F	sALS	是	否	42	28
Pt 10	72	M	sALS	是	否	18	26
Pt 11	40	F	sALS	是	否	12	28
Pt 12	58	M	sALS	是	Celebrex	21	18
Pt 13	55	M	sALS	是	否	85	N/A
Pt 14	82	M	sALS	否	Celebrex	4	N/A
Pt 15	67	M	sALS	是	Celebrex	45	20
Pt 16	79	M	sALS	是	否	14	15
Pt 17	49	M	sALS	否	否	88	16
Pt 18	60	M	sALS	否	否	18	32
Pt 19	49	M	sALS	是	N/A	26	29
Pt 20	37	M	sALS	是	Celebrex	82	8
Pt 21	70	M	sALS	是	否	29	N/A

[0126]

Pt 编号	Pt 年龄 (岁)	Pt 性别	疾病形式	治疗		患病持续时间 (月)	ALSFRS-R 计分
				利鲁唑 ^A	NSAIDS ^B		
Pt 22	49	M	sALS	是	否	14	39
Pt 23	41	F	sALS	是	否	33	37
Pt 24	58	M	sALS	是	否	20	32
Pt 25	30	M	sALS	否	否	24	35
Pt 26	65	M	sALS	是	否	18	42
Pt 27	41	M	sALS	是	否	43	43
Pt 28	58	M	sALS	是	Celebrex	25	26
Pt 29	66	F	sALS	是	否	6	39
Pt 30	63	F	sALS	是	Excedrin	18	34
Pt 31	65	M	sALS	是	Celebrex	33	34
Pt 32	52	F	fALS	否	Celebrex	8	26
Pt 33	34	M	sALS	是	Celebrex	41	15
Pt 34	47	M	sALS	是	否	17	38
Pt 35	62	M	sALS	是	否	57	43
Pt 36	87	M	sALS	否	否	93	25
Pt 37	64	F	sALS	是	Celebrex	45	35
Pt 38	60	F	sALS	是	否	27	23
Pt 39	65	F	sALS	是	否	27	30
Pt 40	53	M	sALS	否	Naproxyn	45	37

[0127] A 50 毫克, 每天两次。B 标准剂量。

[0128] 在斯坦福大学血液中心取血得到 37 份正常对照血液 (平均年龄 \pm SD, 41.8 \pm 9.2 岁), 并以类似于 ALS 患者血液标本的方式加工处理。由 21 位男性 (年龄范围 25-61 岁; 平均年龄 \pm SD, 43.5 \pm 8.6 岁) 和 16 位女性 (年龄范围 25-59 岁; 平均年龄 \pm SD, 35.9 \pm 9.7 岁) 组成。IgG 和 IgM 研究的对照样品由来自 80 位供血者的血浆组成, 也获得自斯坦福大学血液中心。

[0129] 流式细胞仪

[0130] 从每位患者和正常对照抽取 10ml 外周血, 置于加有肝素的试管中, 室温下转移至实验室用于同一天的免疫学试验。通过定量 T 细胞亚型上 CD38 和 CD14 细胞上 HLA-DR 的水平, 评价细胞的免疫学活化。采用 CD14 细胞上表达的 CD16 (Fc γ III 受体) 作为单核细胞分化的另一种标记物, 它是与组织巨噬细胞的细胞因子表达模式相关的抗原 (Ziegler-Heitbrock 等, 1993. Eur. J. Immunol. 23 :2053-2058 ;Frankenberger 等 1996. Blood. 87 :373-377)。通过 CD14⁻ 相关“后门” (“backgating”) 的侧面光散射特征 (SSC) 测定与其分化有关的单核细胞粒度。用 CD14⁻ 异硫氰酸荧光素 (FITC)、CD 16- 藻红蛋白 (PE) (DAKO, Carpinteria, California, USA)、CD8-FITC、CD38-PE、HLA-DR-PE 和 CD4⁻ 多甲藻叶绿素蛋白 (PerCP) (Becton-Dickinson, SanJose, California, USA) 室温下染色全血 15

分钟。阴性对照由同种型 IgG-FITC、IgG-PE 和 IgG-PerCP 染色的等分试样组成；所有染色根据生产商的说明书进行。然后，用 FACS 裂解溶液 (Becton-Dickinson) 室温下裂解样品 10 分钟后，用不含 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ 的 0.1% 叠氮钠 + PBS 洗涤。然后，将染色细胞重悬在 1 毫升固定液 (1% 低聚甲醛的 PBS 溶液，含 0.1% 叠氮钠) 中。通过在配有 Cellquest 软件的 FACScan 流式细胞仪 (Becton-Dickinson) 上获取数据来完成分析，每次分析计数至少 20,000 个细胞。

[0131] 检测血清 IgG 和 IgM

[0132] 通过 Percoll 梯度离心获得来自 ALS 患者血液的血浆， -70°C 下冷冻备用。测定血清抗体的标准 ELISA 法： 37°C 下孵育至少 1 小时，将抗-人 IgG Fab 或抗-人 IgM (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 涂覆 (100mc1/孔) 到 96-孔 ELISA 板中 (Nunc, Roskilde, Denmark)。用 TBS (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.4) 洗涤板一次，然后室温下加入 150mc1 (微升)/孔 BLOTTO (TBS, 含 0.1% Tween-20, 2.5% 正常羊血清, 2.5% 脱脂干乳) 阻断 30 分钟，轻微振动。然后，用 TBS 洗涤 ELISA 板 (1 次)。将一系列稀释血清加入到涂覆的板中 (每个稀释物两复管, 100mc1/孔)，室温下反应 90 分钟。制备 IgG 和 IgM 的标准校正系列 (0-5mcg/ml) (Sigma)，加入到 ELISA 孔中，平行孵育。所有稀释孔中采用 BLOTTO。孵育 90 分钟后，吸去所有液体，然后用 TBS 洗涤所有的板 3 次。通过加入 1 : 10000 稀释在 BLOTTO 中的 100mc1/孔抗-人 IgG 碱性磷酸酶偶联物 (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA)，检测结合的 IgG 抗体。通过加入 1 : 5000 稀释在 BLOTTO 的 100mc1/孔抗-人 IgM 碱性磷酸酶偶联物 (Kirkegaard&Perry, Gaithersburg, Maryland, USA)，检测结合的 IgM 抗体。室温下孵育抗体偶联物 8 小时，轻微搅拌。吸去偶联物，用 TBS 洗涤板 4 次。每孔中加入 100mc1 PNPP 底物 (Sigma) 后，室温下孵育 20 分钟，进行颜色反应。405nm 处读各孔的光密度 (O. D.)。重复测定极低或极高值的任何血清。根据从正常血浆制备的不同方式，ALS 样品的原始 IgG 和 IgM 值应乘以转化因子。

[0133] 统计学分析

[0134] 通过与来自 37 位正常 ALS- 阴性、健康供体的值进行比较，确定 ALS 患者的细胞活化为“阳性”和“阴性”的甄别阈。结果表示为平均值 \pm SD。用 GraphPad Prism4.0 软件 (San Diego, California, USA) 进行统计学分析，包括两组间比较的双尾 t- 检验，分析多组间差异的单向 ANOVA (Newman-Keuls 检验)。用 Pearson 的秩相关系数分析相关性。所有分析中，认为 $P < 0.05$ 的值具有显著性。

[0135] 实施例 1 : 与正常对象相比，ALS 患者免疫活化的交叉试验

[0136] 对来自 40 位诊断患有 ALS 的患者和 37 位对照的血液进行免疫活化的交叉试验，进行与药物处理状态无关的初步统计学分析。ALS 血细胞显示异常的活化水平。表 2 总结了该试验的结果。

[0137] 表 2 : 比较分析 ALS 患者和正常对照血液中的血清抗体和分化抗原表达

[0138]

参数	ALS 患者 (n = 40)	正常对照 (n = 37 ^a)	P 值 (ALS 与对照)
CD4/CD8 比	2.84 \pm 1.53	2.20 \pm 0.98	0.0261

% CD4	47.42±8.03	37.99±11.96	< 0.0001
% CD4CD38	27.14±11.50	31.36±10.69	0.0799
中位 CD4CD38 ^B	12.67±14.24	18.83±17.00	0.0784
% CD8	20.45±8.01	19.85±7.05	0.6986
% CD8CD38	13.35±8.09	12.03±4.53	0.3620
中位 CD8CD38 ^B	3.30±6.32	2.68±4.18	0.6003
% CD14	2.31±0.99	3.25±1.41	0.0002
平均 CD14DR ^C	847.79±228.55	566.59±130.43	< 0.0001
CD14 SSC	465.9±155.5	388.49±162.24	0.0198
% CD14CD16	42.44±11.03	24.31±15.70	< 0.0001
血清 -IgG(mg/ml)	8.05±5.72	11.26±5.57	0.0038
血清 -IgM(mg/ml)	2.31±2.27	1.37±1.14	0.0171

[0139] ^A:对于血清 -IgG 和血清 -IgM,对照样品的 n = 80。

[0140] ^B:CD4 和 CD8T 细胞上表达的中位 CD38 荧光。

[0141] ^C:CD14 单核细胞上表达的平均 HLA-DR 荧光。

[0142] 与对照相比,ALS 患者具有显著更高比例水平的 CD4 T 淋巴细胞亚型 ($P < 0.0001$)。通过比较,患者和对照中的 CD8T 细胞水平相似。这些与对照的比例差异表明,ALS 患者中 CD4/CD8 细胞比例显著增加 ($P = 0.0261$)。ALS 患者中未发现明显超过正常的 T 细胞亚型中的淋巴细胞活化。

[0143] 与对照相比,ALS 患者中总白细胞计数内 CD14 细胞的绝对百分比显著降低 ($P = 0.0002$)。来自 ALS 患者的 CD14+ 单核细胞表达显著高于正常水平的主要组织相容性 (MHC) 抗原 II 型 (HLA-DR) ($P < 0.0001$) (表 2)。血管周围的巨噬细胞一般结构性表达 MHC II 型 (HLA-DR),响应损伤而上调 (Streit 等 1989. 亚致死和致死运动神经元损伤后,血管周围和小胶质细胞上 Ia 抗原的表达。Exp. Neurol. 105 :115-126)。血单核细胞上 HLA-DR 的调节与多种病理状态有关,血液测定显示具有临床意义 (Gascon 等 2002. 患有原发性 HIV 感染的对象亚组中,外周血单核细胞上表达的 HLA-DR 的增加与 CD4T 细胞凋亡和 CD4T 细胞耗竭的相关性。J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 30 :146-153 ;Gu 等,2003. 心脏手术后致炎和抗炎反应的时间过程:单核细胞 HLA-DR 表达。Ann. Thorac. Surg 76 :654-655 ;Melichar 等 2003. 卵巢癌患者中腹水单核细胞的表型和抗肿瘤活性 Int. J. Gynecol. Cancer. 13 :435-443)。ALS 血中几乎一半的 CD14 细胞具有组织巨噬细胞的特征,表达显著高于正常水平的 CD16 抗原 ($P < 0.0001$)。

[0144] 对 MHC 抗原 II 型 (HLA-DR) 和 CD16 标记物高反应性的异常的单核细胞表型与 ALS 患者和正常对照之间 CD14⁺ 相关 SSC (粒度和分化测定) 的显著差异有关。与对照相比, ALS 患者的单核细胞具有统计学增加的粒度 (较高的 SSC 值) ($P = 0.0198$)。

[0145] 最后,通过定量 ALS 患者和对照中血清 -IgG 和血清 -IgM 的水平 (表 2),评价总的体液免疫状态;ALS 患者中的血清 -IgG 水平显著低于对照 ($P = 0.0038$),而血清 -IgM 浓度则显著更高 ($P = 0.0171$)。

[0146] 实施例 2:晚期 ALS 疾病中 CD4⁺ 细胞活化降低

[0147] 为试验 T 淋巴细胞活化是否与疾病的持续时间或疾病的严重性有关,将 T 相比活化结果与临床 ALS 值进行比较,如表 1 所示。为了简化临床相关性分析,基于 ALSFRS-R 量表 (0-48,无疾病 = 48) 将患者分成两组。将具有严重损伤 (ALSFRS-R 计分 0-24, $n = 10$) 的患者与轻度损伤 (ALSFRS-R 计分 > 24 , $n = 26$) 的患者进行比较。

[0148] 如图 1 所示,两组之间通过检测 CD4⁺ 细胞表面上的 CD38 抗原定量的 T 细胞活化水平存在显著性差异 ($P < 0.05$)。与对照相比,ALSFRS-R 计分 24 或更小的患者中 CD4/CD38 反应性显著较低 ($P < 0.01$),而严重程度较低的 ALS 患者 (ALSFRS-R 计分 > 24) 中发现的 CD4/CD38 反应性则没有差异。在测定的任何其它 T 细胞 (CD4 或 CD8) 参数中未观察到明显的疾病相关变化。

[0149] 实施例 3:巨噬细胞活化和 ALS 疾病进展

[0150] 为评价全身单核细胞 / 巨噬细胞活化是否与疾病的持续时间和疾病的严重性有关,将表 2 的巨噬细胞活化参数与疾病严重性的临床测定数据作图,试验是否存在任何疾病特异性变化。

[0151] 轻度和严重疾病的个体之间,CD14 细胞水平 (总的白细胞计数的比例) 没有变化。单核细胞 / 巨噬细胞活化水平与 ALSFRS-R 计分确定的疾病严重性之间存在明显相关性 (Pearson $r = -0.3464$, $P = 0.0409$) (图 2a)。

[0152] 当将 ALS 疾病进展速率 (ALSFRS-R 计分变化 / 月) 与 CD14 细胞 HLA-DR 表达进行比较时,观察到直接和明显的相关性。图 2b 显示,较高的 CD14-DR 水平与较快速的 ALS 疾病进展有关 (Pearson $r = 0.3696$, $P = 0.0265$)。最后,表达 CD14 的单核细胞上升高的巨噬细胞分化抗原 CD16 共表达水平与疾病严重性无关。

[0153] 实施例 4:ALS 患者中血清 -IgG 和血清 -IgM 的变化

[0154] 表 2 显示,ALS 患者与正常对照之间的血清 IgG 和 IgM 浓度存在显著性差异。血清 -IgG 和血清 -IgM 水平还随疾病严重性变化。ALSFRS-R 计分 0-24 的 ALS 患者的血清 -IgG 水平显著低于正常对照 ($P < 0.05$),而轻度疾病和对照个体中的血清 -IgG 水平相似 (图 3a)。但是,轻度疾病患者中血清 -IgM 水平显著较高 ($P < 0.01$),正常对照和严重疾病患者之间没有显著性差异 (图 3b)。

[0155] 实施例 5:ALS 特异性免疫活化状态中治疗相关性变化

[0156] 表 1 显示了本试验评价过程中 ALS 患者摄取的药物。药物分为两类;适用于减缓 ALS 疾病进展的利鲁唑和非甾体抗炎药 (NSAIDs)。表 3 总结了 ALS 患者中药物治疗对免疫活化测定的作用。具体地说,HLA-DR 和 CD16 测定的巨噬细胞活化和分化水平不随治疗改变。

[0157] 表 3:给药或不给药,比较分析正常对照和 ALS 患者的血中血清抗体和分化抗原表

达

[0158]

参数	ALS 患者			正常对照 (n=37) ^A
	未治疗(n=6)	利鲁唑 (n=20)	利鲁唑+ NSAIDS (n=10)	
CD4/CD8	2.59±1.46	2.77±1.54	2.74±1.44	2.20±0.98
%CD4	44.62±8.09	46.10±7.45	49.02±9.20	37.99±11.96
%CD4CD38	20.52±7.92	27.88±10.76	30.81±14.87	31.36±10.69
中位 CD4CD38 ^B	5.91±5.47	12.76±12.62	19.75±20.12	18.83±17.00
%CD8	21.25±9.59	20.20±7.69	21.43±8.27	19.85±7.05
%CD8CD38	15.05±6.70	13.20±9.62	12.47±5.49	12.03±4.53
中位 CD8CD38 ^B	2.18±1.99	4.90±8.55	1.70±2.16	2.68±4.18
%CD14	2.39±1.10	2.28±1.22	2.33±0.66	3.25±1.14
平均 CD14DR ^C	779.95±336.69	839.02±220.79	829.43±181.55	566.59±130.43
CD14SSC	509.6±220.3	457.4±153.2	467.2±162.3	388.5±162.2
%CD14CD16	41.20±8.19	44.22±12.91	37.83±8.62	24.31±15.70
血清 -IgG(mg/ml)	8.82±5.77	7.90±4.58	8.59±8.35	11.26±5.57
血清 -IgM(mg/ml)	2.48±1.08	2.78±3.03	1.53±0.87	1.37±1.14

[0159] ^A:对于血清 -IgG 和血清 -IgM,对样品品的 n = 80。

[0160] ^B:CD4 和 CD8T 细胞上表达的中位 CD38 荧光。

[0161] ^C:CD14 单核细胞上表达的平均 HLA-DR 荧光。

[0162] 即使包括 NSAIDS 也与较低水平的巨噬细胞活化无关(表 3)。类似地,三个治疗组之间的 CD4/CD38 共表达和血清 -IgG 水平不存在显著性差异。但是,双重治疗(利鲁唑+NSAIDS)与血清 -IgM 水平的正常化有关,而单用利鲁唑组与未治疗患者之间没有差异。

[0163] 有关实施例 1-5 的讨论

[0164] 在本研究中,对来自 ALS 患者的血液进行免疫表型分析和体液免疫评价,以确定 ALS 中是否存在全身免疫变化。ALS 患者的血中观察到持续活化的巨噬细胞。整个 ALS 过程中持续着高水平的巨噬细胞活化和分化。此外,由 HLA-DR 共表达的 CD14 确定的巨噬细胞活化以疾病严重性相关的方式变得更高,并且与疾病进展速率直接相关。而且,利鲁唑(目前唯一批准用于治疗 ALS 的药物)和 NSAIDS 治疗的 ALS 患者中,巨噬细胞活化状态没有改善。血巨噬细胞活化程度与 ALS 疾病进展速率之间的直接关系表明,血和 CNS 中发生的病理过程之间的关联。

[0165] ALS 患者中循环的单核细胞上明显较高水平的 HLA-DR 可能起因于外周免疫系统对运动神经元的损伤反应,延伸到 ALS 患者脊髓和脑中小胶质细胞/巨噬细胞的反应。或者,由图 2a-2b 可见,在 HAD 和 SIVE 中观察到,ALS 患者血中活化的巨噬细胞可与脊髓血管周围区域连通,在疾病中起直接的病理作用。

[0166] ALS CD14 细胞上高水平 HLA-DR 与 ALS 中共表达组织巨噬细胞标记物 CD16 的 CE14

细胞的比例升高相关联。CD14+/CD16+ 单核细胞是一种细胞亚群,循环中获得与成熟组织巨噬细胞相同的特征。它们能够产生致炎细胞因子,例如 TNF α 、IL-1 α 和 IL-6,但其强效抗炎细胞因子 IL-10 的表达较低或没有。因此,CD14+/CD16+ 胞可诱导比常规单核细胞更显著的炎症水平。

[0167] CD14+/CD16+ 单核细胞可快速迁移至炎症部位,在该炎症部位容易成熟为致炎巨噬细胞。不受理论的束缚,神经疾病如阿尔茨海默病 (AD) 和 AIDS- 相关痴呆部分是由于当这些细胞迁移至 CNS 和穿过 BB 时释放神经毒性因子。ALS 中,通过类似于 AD 和 HAD 中活化的巨噬细胞的机制,表达 CD16 的单核细胞上升高的 HLA-DR 表达水平可能导致血单核细胞迁移入 CNS 和穿过 BBB。ALS 患者中 CD14 细胞绝对百分比的降低与循环的 CD14/CD16+ 细胞迁移至疾病血管周围区域有关,在疾病的血管周围区域这些细胞释放局部神经毒性因子如 IL-6,一种预示在 ALS 中可能起病理作用的因子 (Ono 等 2001. 肌萎缩侧索硬化中增加的皮肤和血清的白介素 -6. J. Neurol. Sci. 187 :27-34 ;Sekizawa 等 1998. 肌萎缩侧索硬化中的脑脊液白介素 6 :免疫参数以及与炎性和非炎性中枢神经系统疾病的比较. J. Neurol. Sci. 154 :194-199),可损害运动神经元,类似于 AIDS- 相关痴呆和其它 HIV- 相关神经病症。

[0168] 虽然在本交叉试验中,整个病理 ALS 过程的血巨噬细胞持续异常,T- 细胞测定显示与疾病严重性有关的改变。与正常对照相比,ALS 患者中表达 CD4 的 T 细胞显著增加,而发现 CD8T 细胞的百分率在正常范围内,导致 ALS 中 CD4/CD8 细胞比显著增加。本文所述的 ALS 患者外周血中 CD4+T- 细胞比例增加和 CD4/CD8 比增加表明,免疫平衡可能向无反应性或 Th2 型体液免疫反应而不是 Th1 型细胞免疫反应转变。ALS 中高水平活化的 CD14+/CD16+ 单核细胞的存在可诱导这种 Th2- 样淋巴细胞免疫反应。活化巨噬细胞上的 Fc γ R(CD16) 配体可将这些活化的巨噬细胞表型转化为优先驱动 Th2- 样反应的细胞,导致免疫系统 Th1 型适应性组分的改变。

[0169] 血清 -IgG 和血清 -IgM 抗体浓度与正常对照之间存在显著性差异,并随着疾病进展而改变。在疾病早期,ALS 患者具有正常的 IgG 浓度和较高水平的 IgM。在 ALS 患者中,随着疾病的进展,观察到较低水平的血清 -IgG 伴随着血清 -IgM 分泌的正常化。ALS 患者中血清 -IgM 的正常化与联合疗法有关。ALS 患者血液中血清抗体水平的变化与持续巨噬细胞活化有关,驱使 CD4T- 细胞功能障碍和 / 或缺陷的 Th1 型免疫。

[0170] 在 T 细胞活化标记物的研究中,随着 ALS 疾病进展,CD4T 细胞上 CD38 水平降低。然而,CD8/CD38 反应性仍然在正常范围内。这些数据表明,ALS 发病期间,(T 细胞) 免疫系统的适应性组分没有活化。对来自 ALS 患者血液的观察表明,与小胶质细胞 / 巨噬细胞不同,淋巴细胞在与免疫炎症反应相关的活化 ALS 脊髓中起次要作用。因此,ALS 中的神经炎症过程很少依赖于淋巴细胞浸润,而是由巨噬细胞活化驱动的。

[0171] 本发明首次证明,ALS 患者中血细胞活化的全身性改变。ALS 血中观察到持续的疾病 - 相关巨噬细胞活化,CD14 细胞上的 HLA-DR 水平与 ALS 疾病进展速率直接相关。本研究证实了 ALS 疾病中的全身巨噬细胞活化,提示巨噬细胞在 ALS 发病机制中的主动作用。ALS 血液中观察到异常活化的巨噬细胞,而没有伴随的 T- 细胞活化。这些观察结果表明,全身免疫失调在 ALS 的发病机制中起作用。所述数据表明,ALS 是一种全身炎性疾病,局部表现为导致运动神经元缺失。

[0172] 这些观察结果是本发明监测 ALS 疾病进展的方法的基础,该方法包括测定循环的

单核细胞的活化 - 和炎症 - 相关标记物, 如 HLA-DR 和 CD16, 以及 ALS 患者中的 T- 细胞活化状态。本发明可在监测免疫功能障碍疾病 ALS 的治疗中提供有价值的帮助。而且, 这些观察结果也是本发明涉及旨在降低 ALS 炎症的治疗干预的基础。

[0173] 实施例 6 : 用 WF10 治疗两位 ALS 患者

[0174] 两位 2001 年以后诊断患有 ALS 的患者接受 WF10 (也称为 IMMUNOKINE™) 治疗。对每位患者, 以相同剂量, 相同给药间隔, 给予每种药物。以 1 小时输注的形式, 静脉内给予剂量 0.3cc/kg, 持续 5 天 (0.5cc/kg WF10, 63mM 含亚氯酸盐的溶液, 500cc 盐水中每天输注 1 小时, 持续 5 天)。每三周重复该给药方案。这样, 1 个循环包括 1 小时输注 5 天, 然后 3 周不给药。患者 1 接受 5 个循环; 患者 2 接受 4 个循环。两位患者中均未发现副作用。

[0175] 患者 1 是一位 59 岁女性患者, 患有家族型 ALS (已知的超氧化物歧化酶基因 SOD 突变), 从诊断时 (计分 40) 直到开始 WF10 治疗 21 个月后 (计分 15), 通过标准 ALS 功能评分 (ALS/FRS), 该患者显示进行性功能丧失。在标准 ALS 患者中, 基于 ALS/FRS 计分系统的 ALS 进展速率基本上是线性的, 当下降斜率已知时, ALS 以可预测的速率进行。在该病例中, 以及第二位患者病例中, 预测的疾病进展速率表示为从 ALS/FRS 计分的实线向下延伸的投影虚线。开始治疗时, 患者 1 不再能吞咽食物或流体, 具有为了进食而插入胃中的胃肠管 (G-管)。不能进食是大脑具有退行性 ALS 过程的征兆, 而 ALS/FRS 测定则记录了脊髓退化。

[0176] 第一个 WF10 循环后, 患者症状显著改善, 包括: 吞咽和进食能力恢复, 可除去 G-管 (图中虚线表示 G-管放置时间, 除去表示为实线, 治疗中断后, 虚线表示放置新的 G-管), 面部肌束震颤和声音颤抖暂停 (神经疾病恶化的症状停止)。治疗期间和中断治疗后 2 个月, ALS/FRS 计分仍然稳定在 10, 保持 7 个月, 而不治疗的话, 预测 5 个月内将恶化至 0。治疗开始后 8 个月, 该患者能够用口进食, 不再需要放置 G-管进食。由于第 5 个循环后不能获得药物, 稳定疾病 7 个月后中断治疗, 以后的 6 个月内其 ALS 疾病以等于其治疗前的速率加剧。根据图 6 所示曲线, 7 个月疾病稳定的 ALS/FRS 计分中和 8 个月逆转不能进食的基于脑的症状 (延髓症状) 中, 患者均显示有益的作用。目前尚没有批准或已知的实验药物可逆转延髓症状, 并且没有药物可使 ALS/FRS 计分稳定。

[0177] 患者 2: 这是一位 37 岁男性患者, 2003 年诊断患有散发型 (非家族型) ALS, 诊断时 ALS/FRS 计分 40, 并且 1 年内疾病进展快速, 如图 6 所示。WF10 治疗时, 该患者刚刚进行 G-管插入, 因为他不再能够吞咽。WF10 治疗 1 周内, 其进食能力恢复并除去 G-管, 类似于患者 1 的临床反应。该患者接受 4 个循环的 WF10, 期间, 其 ALS/FRS 计分保持稳定在 21, 使他能够用助行器行走, 并与其家庭联系。治疗开始后, 他的生活质量显著改善。本专利申请时, 他仍然可以进食, 且 ALS/FRS 计分保持在 21, 上述两种明显反应均持续 5 个月。如上所述, 没有治疗具有这种效果。

[0178] 图 4 显示了用 WF10 治疗患者 1 的血巨噬细胞活化结果的变化。Y 轴表示血 CD14 细胞 (单核细胞 / 巨噬细胞) 表面上表达的 HLA-DR 的单位。第二柱 (ALS 快速) 表示具有快速下降临床过程的 ALS 患者表现的 DR 表达水平。第三柱 (ALS 慢速) 表示具有慢速进行性疾病的 ALS 患者中 DR 的表达水平。上述两柱之间的进展速率差异约为 5-10 倍 (图 2a 和 2b)。高水平 DR 患者的进展速率比低水平 DR 患者快 5-10 倍。

[0179] 图 4 中的第一组柱显示了 ALS 患者的 DR 基线水平 (高速、快速进展), 其中的第二

柱表示一个 WF10 的 5 天循环后三周表达的 DR 水平 (0.5cc/kg WF10, 含 63mM 亚氯酸盐的溶液, 每天 500cc 盐水输注 1 小时, 持续 3 天)。第一组柱中的第三柱表示 CD14 细胞 ± 1 标准偏差上正常 (38 位正常血供体组成) DR 的表达水平。

[0180] 如图 4 所示, 显示 1 个循环后, 患者 1 循环的血单核细胞 (CD14+ 细胞) 上 HLA-DR 的水平从升高水平转变至正常水平。在最近的文献中 (Zhang 等, *JNeuroImmunology* 2005159 :215-224), 单核细胞上 DR 的水平与 ALS 疾病进展速率明显相关。本图中显示的数据比较了快速进展与慢速进展速率, 表明给予 WF10 后, 患者 1 的血单核细胞从快速表型转化为慢速表型。这些数据结合图 6 所示临床数据表明, 通过血试验和临床观察可监测用基于亚氯酸盐的药物对全身巨噬细胞活化 (也如图 5 中的 MS 所示) 的调节。

[0181] 这些数据表明, 给予 WF10 与快速进展 ALS 患者的症状改善有关, 同时血巨噬细胞活化值恢复, 例如, 病理性巨噬细胞的降低伴随着患者的改善。

[0182] 实施例 7 : WF10 治疗 MS 患者

[0183] 图 5 的一组曲线显示了从接受 WF10 治疗 (如实施例 6 所述的 1 个循环的 WF10) 的多发性硬化 (MS) 患者取血测定巨噬细胞活化。Y 轴的数值表示每个测定的参数除以正常水平 (38 位正常供体平均值) 得到的观察数值之比。第 0 天代表 5 种不同的巨噬细胞活化 / 增殖标记物的基线水平。5 种标记物在第 0 天都超出正常范围 (如实线和虚线所示)。

[0184] 然后, 用 1 个循环的 WF10 治疗患者, 开始 WF10 的 3 天疗程后, 第 14 和 28 天进行两种后续的血试验。第 14 天, 巨噬细胞增殖 (CD14Ki67, CD14PCNA) 和活化 (CD14/DR, CD14SSC, CD14/16%) 都向正常范围转变, 表明在测定的 5 种巨噬细胞参数中, 都对 1 个循环的 WF10 有响应。两周后 (第 28 天), 数值基本上回到治疗前水平。这些数据与多发性硬化患者中药物诱导的对异常巨噬细胞增殖 / 活化参数的影响相一致。

[0185] 实施例 8 : 分析 ALS 和 AD 患者的巨噬细胞

[0186] 对 38 位诊断患有 sALS 的患者取血进行免疫活化的交叉试验, 与对照组比较, 进行与药物治疗状态无关的初步统计学分析。在本试验中, 选择两组对照与 sALS 患者进行比较 : 28 位年龄匹配的正常对照和 25 位 AD 患者作为神经疾病对照。类似于疾病对照 AD 患者, sALS 患者的血细胞显示异常的活化水平。表 4 总结了本试验的结果。与正常对照相比, sALS 和 AD 患者具有显著更高比例的 CD4T 淋巴细胞亚组水平 ($p < 0.05$)。通过比较, 所有三组中 CD8 T- 相比水平和 CD4/CD8 比率相似。sALS 患者和疾病对照中没有观察到 T 细胞亚组中明显高于正常的淋巴细胞活化。

[0187]

表 4: 比较分析 sALS 患者、正常对照和 AD 的血中血清抗体和分化抗原表达

参数	sALS(n=38)	正常对照(n=28)	AD(n=25)	P 值 sALS 与正常	P 值 AD 与正常	P 值 sALS 与 AD
CD4/CD8	2.87±1.56	2.33±1.59	3.43±2.72	NS	NS	NS
%CD4	47.43±8.04	39.81±11.30	47.37±11.22	<0.01	<0.05	NS
%CD4CD38	27.21±11.76	32.24±10.51	25.67±12.02	NS	NS	NS
中位 CD4CD38 ^a	13.02±14.54	19.15±16.71	14.08±16.12	NS	NS	NS
%CD8	20.38±8.22	21.19±8.53	19.93±12.43	NS	NS	NS
%CD8CD38	13.67±8.20	12.41±6.85	15.86±11.46	NS	NS	NS
中位 CD8CD38 ^a	3.43±6.46	1.93±2.40	5.85±16.19	NS	NS	NS
%CD14	2.34±1.01	2.51±0.93	2.49±1.00	NS	NS	NS
平均 CD14DR ^b	825.60±206.62	582.56±144.35	911.93±341.80	<0.001	<0.001	NS
CD14 SSC ^c	466.3±159.6	346.5±42.3	434.7±226.5	<0.01	NS	NS
%CD14CD16	42.44±11.22	23.90±10.60	41.77±18.97	<0.001	<0.001	NS
血清-IgG(mg/ml) ^d	7.80±5.76	11.26±5.57	ND ^e	<0.003	ND	ND
血清-IgM(mg/ml) ^d	2.28±2.30	1.37±1.14	ND	<0.03	ND	ND

a: CD4 和 CD8 T-细胞上表达的中位 CD 荧光。b: CD14 单核细胞上表达的平均 DR 荧光。

c: CD14-相关的侧面光散射特征。d: 对于血清-IgG 和 IgM 的对照样品, n=80。

e: ND, 没有数据。

[0188] 单核细胞/巨噬细胞标记物的分析显示,来自 sALS 和 AD 患者的 CD14+ 单核细胞表达水平显著高于主要组织相容性 (MHC) 抗原 II 型正常水平 ($p < 0.001$),但与正常对照相

比, sALS 和 AD 患者血样中均未发现总白细胞计数内 CD14 细胞绝对百分比的差异 (表 4)。sALS 和 AD 血中几乎一半的 CD14 细胞具有组织巨噬细胞的特征, 表达水平显著高于 CD16 抗原正常水平 ($p < 0.001$)。HLA-DR 和 CD16 较高表达限定的异常单核细胞表型与 sALS 患者和正常对照之间 CD14- 相关 SSC (粒度和分化测定) 的显著性差异有关。与正常对照相比, sALS 患者的单核细胞的粒度显著增加 (较高的 SSC 值) ($p < 0.01$)。最后, 通过定量 sALS 患者和正常对照中的血清 -IgG 和血清 -IgM 水平, 评价总的体液免疫状态 (表 4); sALS 患者中的血清 -IgG 水平显著低于正常对照 ($p < 0.003$), 而血清 -IgM 浓度则显著较高 ($p < 0.03$) (没有获得 AD 患者的血清进行研究)。

[0189] 整个 sALS 病程持续着高水平的巨噬细胞活化和分化。此外, 共表达 HLA-DR 的 CD14 限定的巨噬细胞活化与 sALS 疾病进展速率直接相关。利鲁唑 (目前唯一批准用于治疗 ALS 的药物) 或 NSAID 治疗的 sALS 患者中, 巨噬细胞活化状态没有改善。血巨噬细胞活化程度与 ALS 疾病进展速率的直接关系提示, 血和 CNS 中进行的病理过程之间存在联系。

[0190] 上文仅仅阐述了本发明的原理。应理解, 虽然本文没有明确描述或说明, 本领域技术人员能够设计各种安排以体现本发明原理, 且包括在本发明精神和范围内。而且, 本文所述的所有实施例和条件说明原则上是为了帮助读者理解本发明原理和发明者为深化本领域所提供的概念, 应解释为并不限于这些具体描述的实施例和条件。而且, 所有描述原理、方面和本发明实施方式及其具体实施例的陈述包括其结构和功能等价形式。此外, 这些等价形式包括目前已知的等价形式和未来开发的等价形式, 与结构无关, 即行使相同功能而开发的任何元件。因此, 本发明范围并不限于所示具体实施方式和本文所述。而是, 本发明的范围和精神由所附权利要求书所体现。

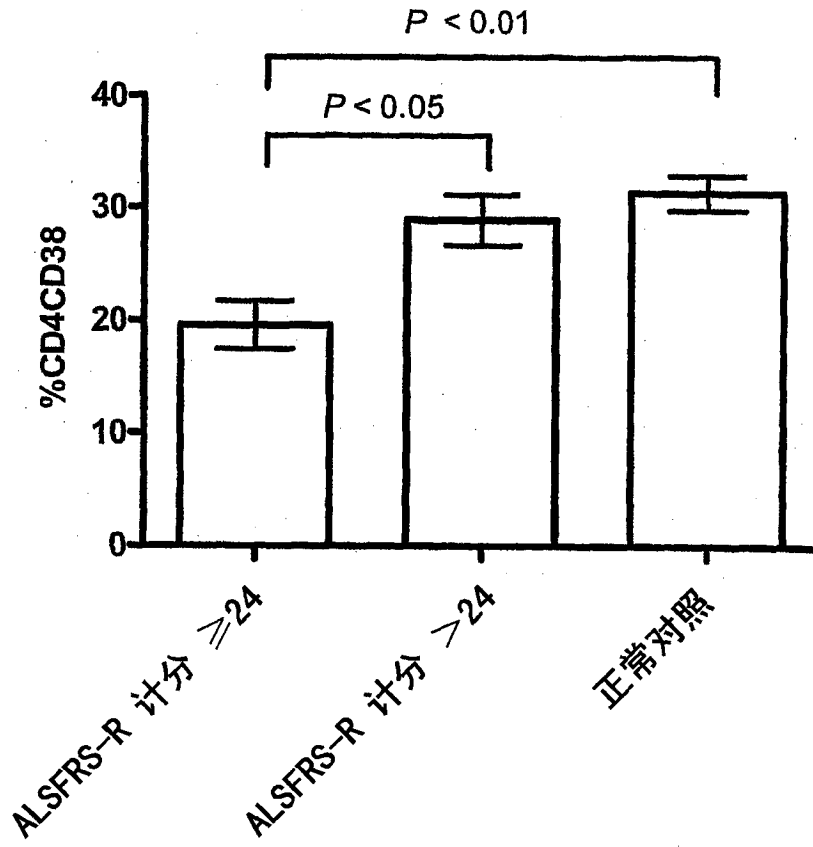


图 1

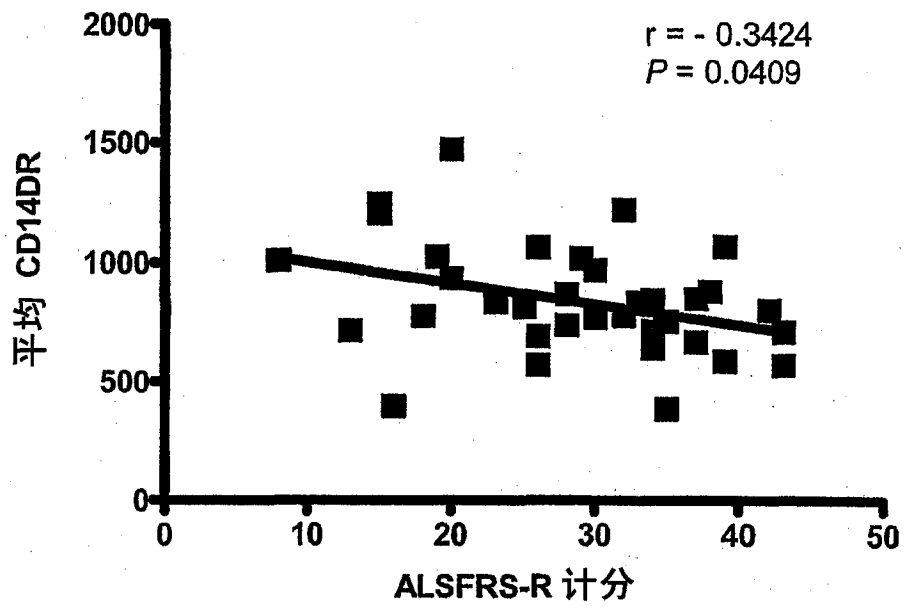


图 2A

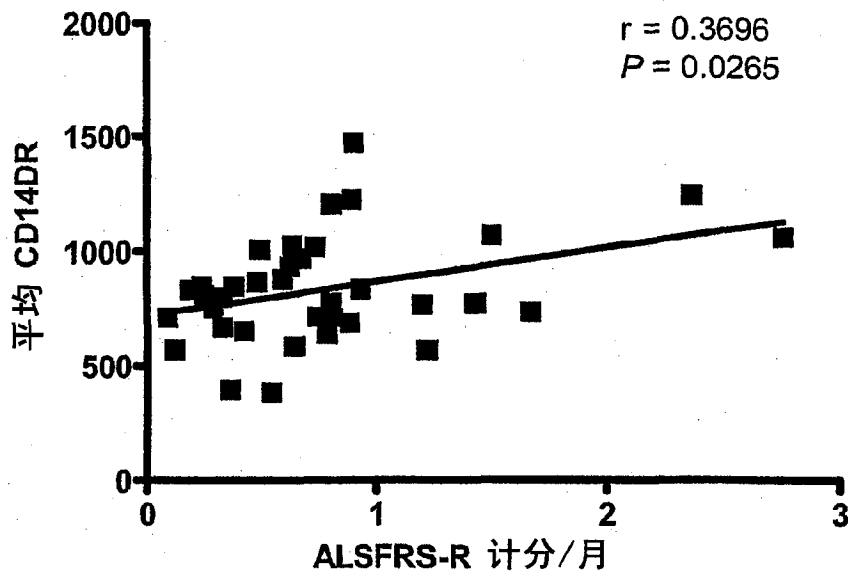


图 2B

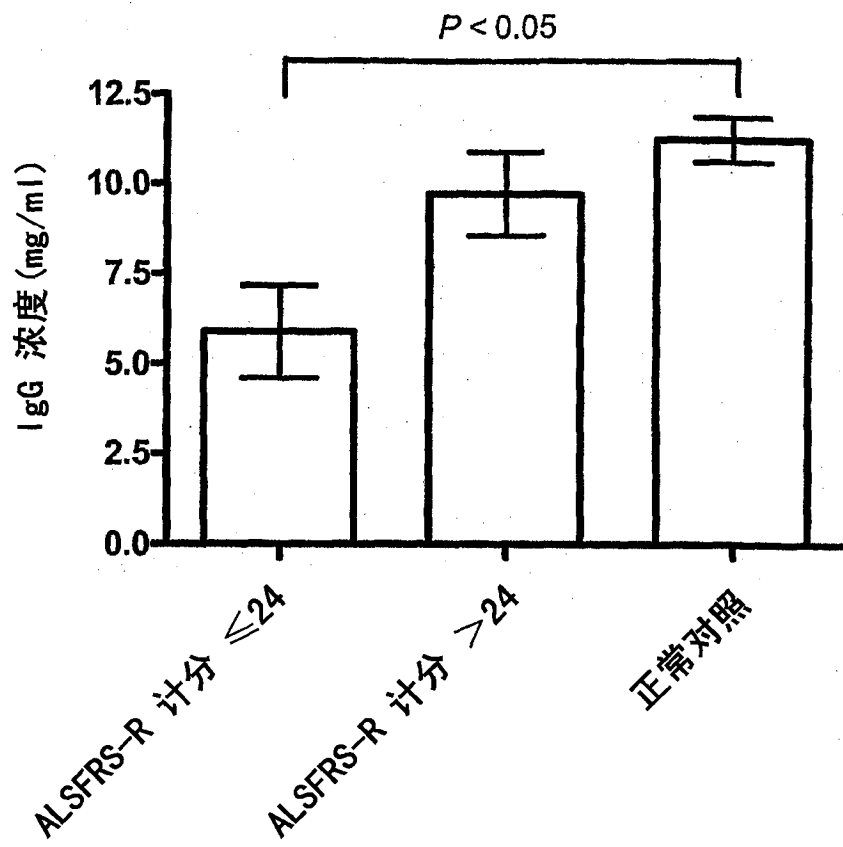


图 3A

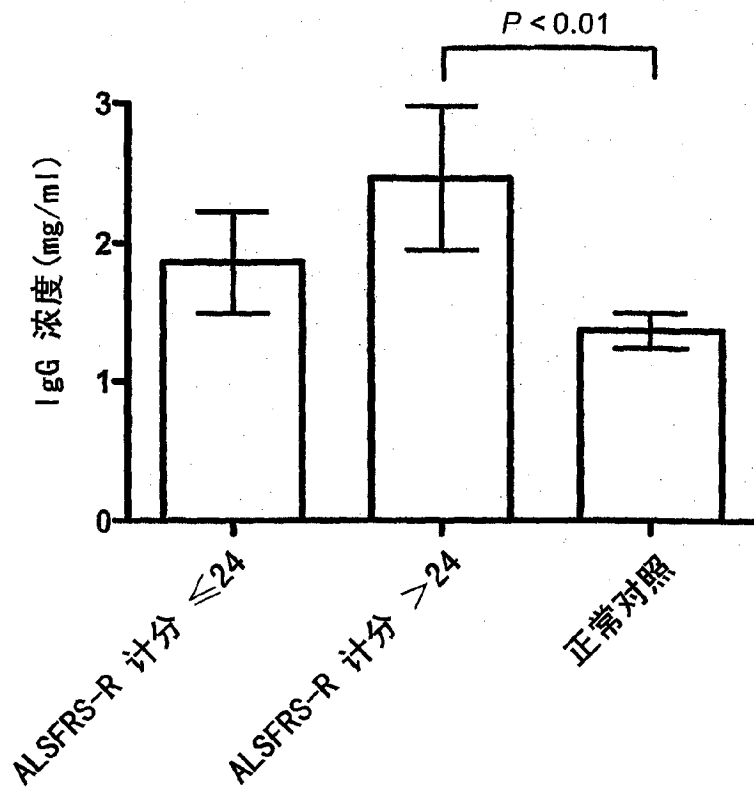


图 3B

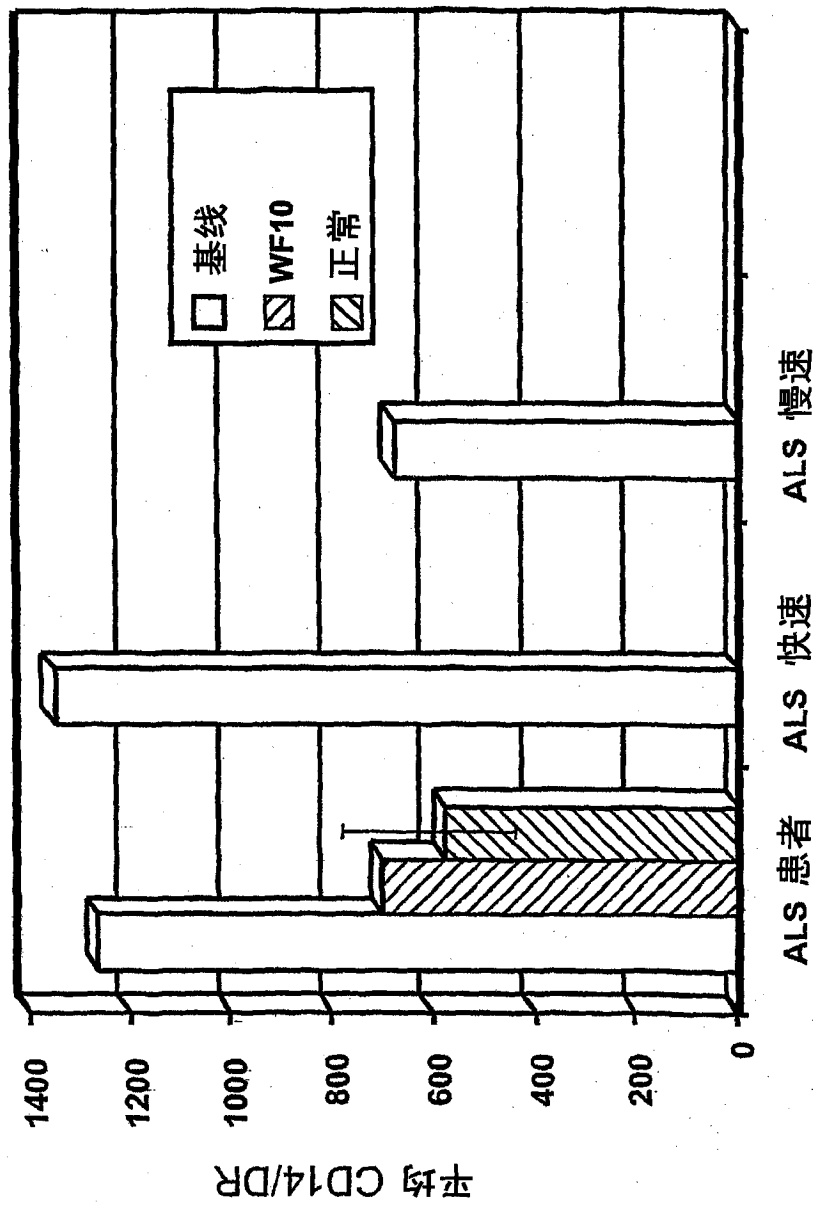


图 4

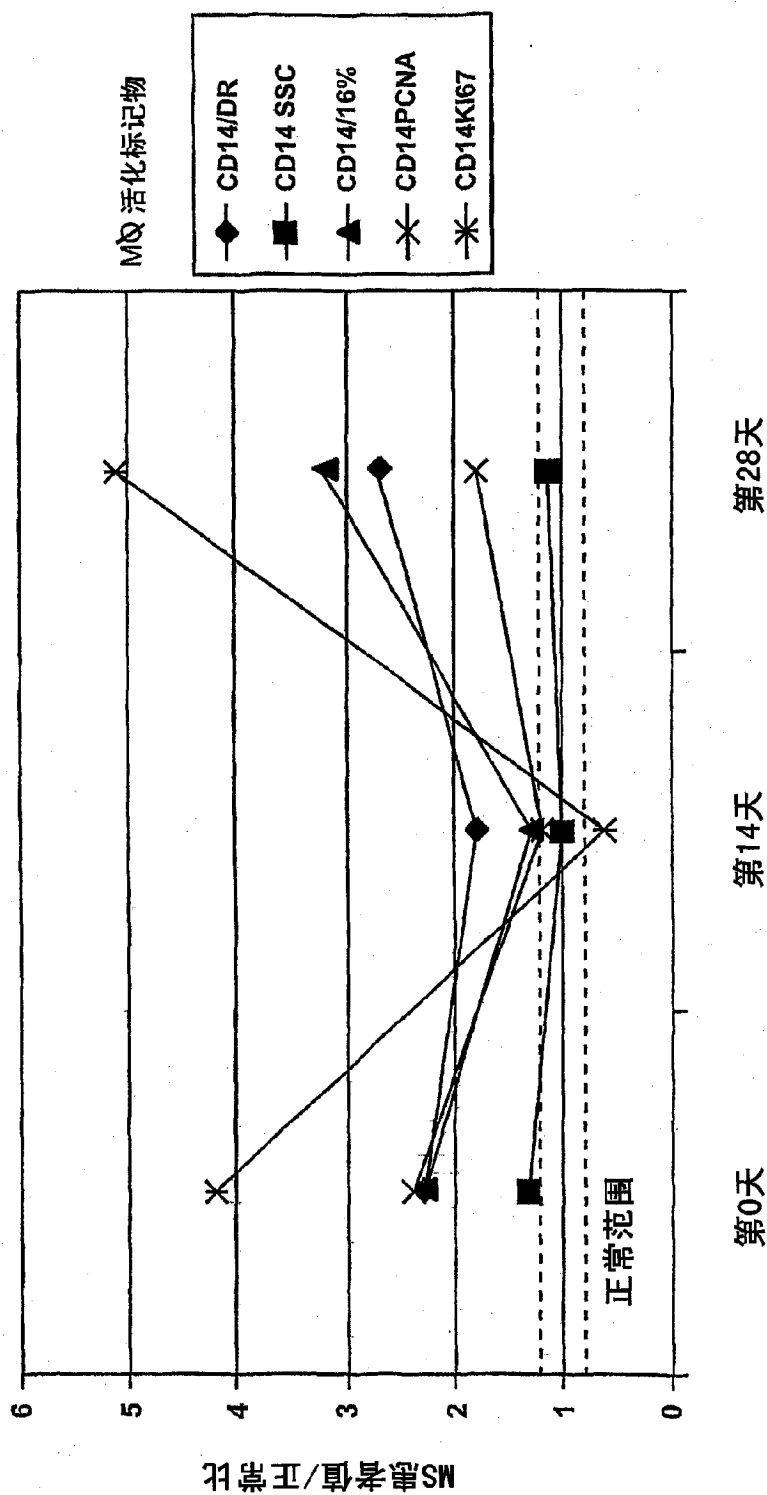
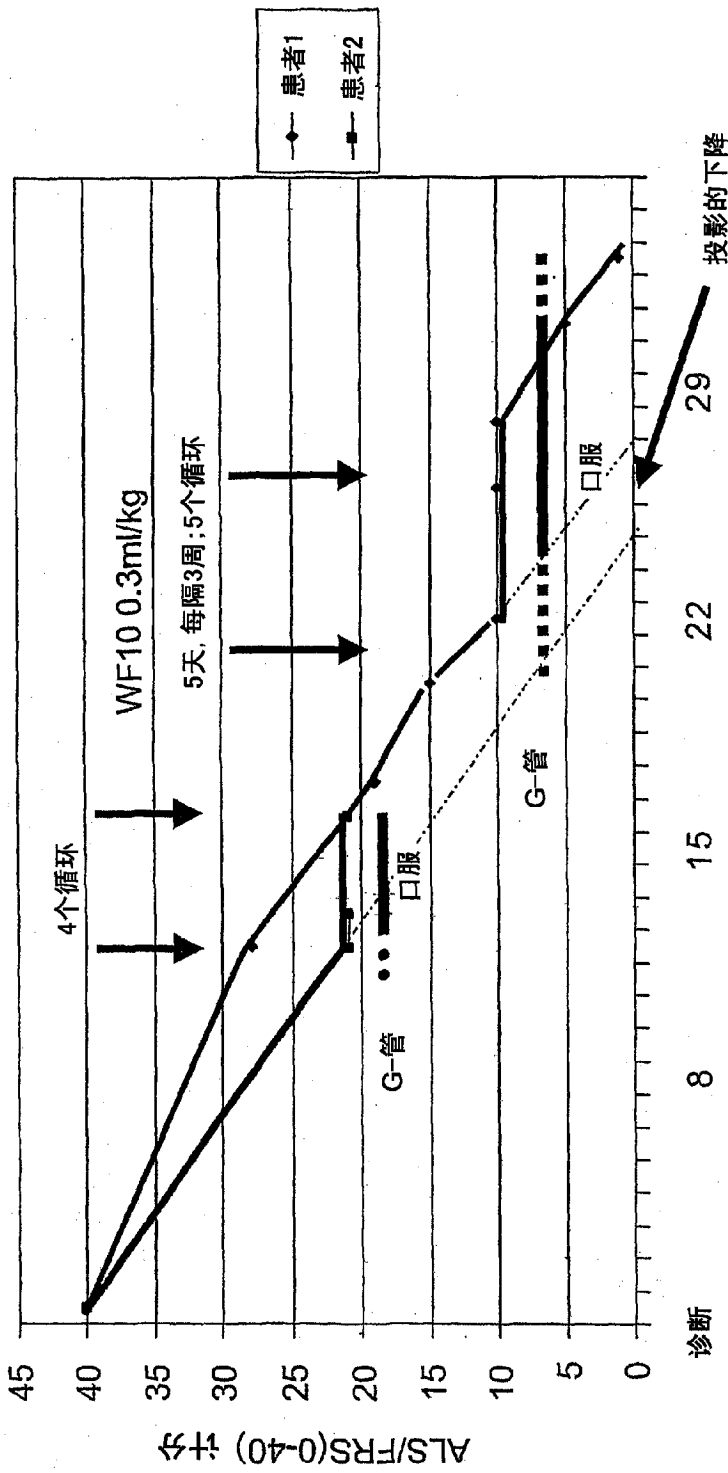


图 5



诊断后的月数

图 6