



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 111225681 A

(43)申请公布日 2020.06.02

(21)申请号 201880065375.2

(72)发明人 K.马丁 L.詹森

(22)申请日 2018.08.14

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30)优先权数据

代理人 余晓文

1713037.8 2017.08.14 GB

1713035.2 2017.08.14 GB

1713036.0 2017.08.14 GB

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2018/052304 2018.08.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/034862 EN 2019.02.21

(71)申请人 艾匹托普技术(布里斯托尔)有限公

司

地址 英国格温特郡

权利要求书2页 说明书27页 附图24页

(54)发明名称

方法

(57)摘要

本发明涉及可源自髓磷脂组分的肽用于治疗或预防受试者认知受损,特别是在患有多发性硬化症(MS)、痴呆和/或脱髓鞘的受试者中,所述髓磷脂组分即是髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)或髓磷脂蛋白脂质蛋白(PLP)。所述肽可用于治疗患有认知受损的受试者或预防认知受损,特别是在患有MS的受试者中,治疗患有痴呆的受试者或预防痴呆和/或治疗受试者的脱髓鞘或预防受试者的脱髓鞘的方法。

1. 用于治疗或预防受试者的认知受损的方法,其包括向所述受试者施用源自或可源自髓磷脂组分的肽,所述髓磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白 (MBP), 髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 和髓磷脂蛋白脂质蛋白 (PLP)。
2. 根据权利要求1的方法,其中所述受试者患有脱髓鞘疾病。
3. 根据权利要求2的方法,其中所述受试者患有多发性硬化症、阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。
4. 根据权利要求1至3中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.1、2、3和4。
5. 根据权利要求1至4中任一项的方法,其中将SEQ ID No.1、2、3和4的肽施用于所述受试者。
6. 根据权利要求1至3中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.7、8、9和10。
7. 根据权利要求1至3和6中任一项的方法,其中将SEQ ID No.7、8、9和10的肽施用于所述受试者。
8. 根据权利要求1至3中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.12、16、18、23、24、25、26、27、28、29、30和31。
9. 根据权利要求1至8中任一项的方法,其中所述治疗导致所述受试者的改善的PASAT评分。
10. 如权利要求4至8中任一项所定义的肽,用于治疗或预防受试者的认知受损。
11. 如权利要求4至8中任一项所定义的肽在制备用于治疗或预防受试者中的认知受损的药物中的用途。
12. 根据权利要求10使用的肽或根据权利要求11的肽的用途,其中所述受试者患有脱髓鞘疾病。
13. 根据权利要求12使用的肽或肽的用途,其中所述受试者患有多发性硬化症、阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。
14. 根据权利要求11至13中任一项使用的肽或肽的用途,其中所述治疗导致所述受试者的改善的PASAT评分。
15. 用于治疗或预防受试者的认知受损的试剂盒,其中所述试剂盒包含如权利要求4至8中任一项所定义的肽。
16. 用于治疗或预防受试者中的痴呆的方法,其包括向所述受试者施用源自或可源自髓磷脂组分的肽,所述髓磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白 (MBP), 髓磷脂少突胶质糖蛋白 (MOG) 和髓磷脂蛋白脂质蛋白 (PLP)。
17. 根据权利要求16的方法,其中所述受试者患有阿尔茨海默氏病。
18. 根据权利要求16的方法,其中所述受试者患有帕金森氏病。
19. 根据权利要求16至18中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.1、2、3和4。
20. 根据权利要求16至19中任一项的方法,其中将SEQ ID No.1、2、3和4的肽施用于所述受试者。
21. 根据权利要求16至18中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.7、8、9和10。
22. 根据权利要求16至18和21中任一项的方法,其中将SEQ ID No.7、8、9和10的肽施用于所述受试者。
23. 根据权利要求16至18中任一项所述的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.12、16、18、

23、24、25、26、27、28、29、30和31。

24. 如权利要求19至23中任一项所定义的肽,用于治疗或预防受试者中的痴呆。

25. 如权利要求19至23中任一项所定义的肽在制备用于治疗或预防受试者中的痴呆的药物中的用途。

26. 根据权利要求24的使用的肽或根据权利要求25的肽的用途,其中所述受试者患有阿尔茨海默氏病。

27. 根据权利要求24的使用的肽或根据权利要求25的肽的用途,其中所述受试者患有帕金森氏病。

28. 用于治疗或预防受试者的痴呆的试剂盒,其中所述试剂盒包含如权利要求19至23中任一项所定义的肽。

29. 用于治疗或预防受试者的脱髓鞘的方法,其包括向所述受试者施用源自或可源自髓磷脂组分的肽,所述髓磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂蛋白脂质蛋白(PLP)。

30. 根据权利要求29的方法,其中所述受试者患有神经退行性疾病。

31. 根据权利要求29的方法,其中所述受试者患有多发性硬化症、阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。

32. 根据权利要求29至31中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.1、2、3和4。

33. 根据权利要求29至32中任一项的方法,其中将SEQ ID No.1、2、3和4的肽施用于所述受试者。

34. 根据权利要求29至31中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.7、8、9和10。

35. 根据权利要求29至31和34中任一项的方法,其中将SEQ ID No.7、8、9和10的肽施用于所述受试者。

36. 根据权利要求29至31中任一项的方法,其中所述肽选自SEQ ID No.12、16、18、23、24、25、26、27、28、29、30和31。

37. 如权利要求32至36中任一项所定义的肽,用于治疗或预防受试者的脱髓鞘。

38. 如权利要求32至36中任一项所定义的肽在制备用于治疗或预防受试者的脱髓鞘的药物中的用途。

39. 根据权利要求37的使用的肽或根据权利要求38的肽的用途,其中所述受试者患有神经退行性疾病。

40. 根据权利要求37的使用的肽或根据权利要求38的肽的用途,其中所述受试者患有多发性硬化症,阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。

41. 用于治疗或预防受试者的脱髓鞘的试剂盒,其中所述试剂盒包含如权利要求32至36中任一项所定义的肽。

方法

发明领域

[0001] 本发明涉及可源自髓磷脂 (myelin) 组分的肽用于治疗或预防受试者认知受损 (impaired cognition), 特别是在患有多发性硬化症 (MS) 的受试者中、痴呆 (dementia) 和/或脱髓鞘 (demyelination), 所述髓磷脂组分即是髓磷脂碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP), 髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG) 或髓磷脂蛋白脂质蛋白 (myelin proteolipid protein, PLP)。所述肽可用于以下方法: 治疗患有认知受损的受试者或预防认知受损, 特别是用于在患有 MS 的受试者中, 治疗患有痴呆的受试者或预防痴呆和/或治疗受试者的脱髓鞘或预防受试者的脱髓鞘。

[0002] 发明背景

[0003] 神经元 (neuron) 或神经 (neurone) 或神经细胞是通过电和化学信号处理和传输信息的细胞。神经元是中枢神经系统 (CNS) 的大脑和脊髓以及外周神经系统的自主神经节的主要组成部分。神经元具有电激发的能力。神经元可以彼此连接以形成神经网络, 并且神经元之间的信号通过突触发生。

[0004] 典型的神经元由细胞体 (胞体)、树突和轴突组成。术语神经突用于描述树突或轴突, 特别是在其未分化阶段。树突是由细胞体产生的薄结构, 通常延伸数百微米并多次分支, 从而形成复杂的“树突状树”。轴突 (髓鞘形成 (myelination) 时也称为神经纤维) 是一种特殊的细胞延伸 (过程), 其由轴丘 (axon hillock) 上的细胞体产生, 并行进一段距离, 该距离在人类中达 1 米, 或者在其他物种中更远。

[0005] 髓磷脂是一种脂肪性白色物质, 其围绕某些神经细胞的轴突, 形成被称为髓鞘的电绝缘层。这对于神经系统的正常功能至关重要。

[0006] 髓鞘的产生是由于髓鞘形成或髓鞘生成 (myelinogenesis)。在人类中, 尽管出生时大脑中几乎不存在髓磷脂, 但髓鞘形成早在妊娠晚期 (3rd trimester) 就开始。在婴儿期, 髓鞘形成迅速发生, 导致儿童快速发育, 包含在第一年爬行和行走。髓鞘形成持续到青春期。

[0007] 脱髓鞘是脱髓鞘的行为, 或使神经绝缘的髓鞘的丧失, 并且是某些神经退行性疾病的标志。当髓磷脂降解时, 沿神经的信号传导可能会受损或丧失, 并且神经最终会萎缩。这导致某些神经退行性病症, 例如多发性硬化症和慢性炎性脱髓鞘性多神经病 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)。

[0008] 脱髓鞘可能是由于对神经元的免疫攻击所致。

[0009] 多发性硬化症 (MS) 是一种影响中枢神经系统的慢性退行性疾病, 其特征是神经轴突的脱髓鞘。认知改变是 MS 的常见症状。

[0010] 脱髓鞘也可能参与痴呆和诸如阿尔茨海默氏病和帕金森氏病等的状况。

[0011] 本领域中需要用于治疗或预防认知受损 (cognitive impairment) (特别是在患有 MS 的受试者中), 痴呆和/或脱髓鞘的治疗选择。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明人已经表明, 促进髓鞘的免疫耐受的源自髓磷脂的某些肽导致抗炎细胞因

子的上调,这与调节性T细胞的上调相对应。本发明实施例表明,通过施用髓磷脂来源的肽,抗炎细胞因子增加,而在中枢神经系统中,促炎细胞因子减少。实施例还表明,髓磷脂来源的肽减少中枢神经系统炎症,并且施用该肽减少了T和B细胞浸润。此外,实施例表明,施用源自髓磷脂的某些肽导致患有多发性硬化症的受试者的认知受损显著改善。

[0014] 如图1所示,提出了激活的效应免疫细胞对髓磷脂和神经元造成损害。提出调节性T细胞的上调或激活(与抗炎细胞因子的增加相对应)以减少免疫效应细胞的应答,并从而减少对髓磷脂的损害。

[0015] Dombrowski等(Nature Neuroscience 2017,20:674-680)已报道调节性T细胞促进中枢神经系统的髓磷脂再生。作者发现调节性T细胞促进少突胶质细胞分化和髓鞘再生。缺乏Treg的小鼠表现出明显受损的髓鞘再生和少突胶质细胞分化。该发现揭示了Treg在CNS中具有新的再生功能。

[0016] Dansokho等(Brain 2016,139:1237-1251)还报道了调节性T细胞延缓了阿尔茨海默病样病理的疾病进展。作者提出调节性T细胞在阿尔茨海默氏病的病理生理中起有益作用。

[0017] 此外,Späni等(Acta Neuropathologica Communications 2015,3:71)描述了在阿尔茨海默氏病中,淀粉样β肽的积累和病理性聚集伴随着免疫反应的诱导。作者进行的实验工作揭示了在缺乏功能适应性免疫细胞的小鼠中,淀粉样蛋白β肽病理学减少并且脑淀粉样蛋白β肽水平降低。

[0018] Zhan等(J Alzheimer's Dis.2015,44:1213-1229)已证明阿尔茨海默氏病大脑中灰质的髓磷脂和轴突受到损害。有证据表明AD灰质和AD神经元中髓磷脂碱性蛋白降解,得出结论,受损的轴突可能是淀粉样β前体蛋白的来源,并且MBP和降解的MBP与髓样斑块和β淀粉样前体蛋白有关,并且这些分子可能与淀粉样斑块的形成有关。

[0019] Laurent等(Brain 2017,140:184-200)证明海马tau病理与趋化因子产生和实质性T细胞浸润有关,并提出免疫在tau触发的阿尔茨海默氏病认知缺陷中的作用。

[0020] Bryson和Lynch(Curr.Opin.Pharmacol.2016,26:67-73)也将T细胞与阿尔茨海默氏病相关联。

[0021] 此外,关于帕金森氏病,在几篇论文中描述了对髓磷脂蛋白的抗体滴度增加,证实了髓鞘的持续炎性神经退行性过程(参见,例如,Papuć E等,Ann Agric Environ Med.2016;23(2),Papuć E等,Neurosci Lett,2014年4月30日)。有人提出这种抗体增加与帕金森氏病中的痴呆有关(参见Maetzler等,J Alzheimer,26,2011)。Gagne and Power (Neurology 2010,74:995-1002)还提出了在帕金森氏病发病机制中可能的神经炎症途径。Ding等(Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.2015,19:2275-2281)综述了帕金森氏病的神经退行性变和认知。

[0022] 因此提出由如本文所述的髓磷脂来源的肽促进的增加的或活化的调节性T细胞应答将有利于治疗或预防认知受损、痴呆和/或脱髓鞘。

[0023] 因此,现在提出了源自髓磷脂的肽作为治疗或预防认知受损、痴呆和/或脱髓鞘的治疗选择。

[0024] 因此,本发明提供了一种用于治疗或预防受试者的认知受损、痴呆和/或脱髓鞘的

方法,其包括向该受试者施用源自或可源自髓磷脂组分的肽,所述髓磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂蛋白脂质蛋白(PLP)。

[0025] 本发明代表了首次提出将源自髓磷脂的此类肽用于治疗认知受损、痴呆和/或脱髓鞘,并且代表了治疗或预防认知受损、痴呆和/或脱髓鞘和促进髓鞘再生的重要治疗选择。

[0026] 另一方面,本发明提供了源自或可源自髓磷脂组分的肽用于治疗或预防受试者的认知受损、痴呆和/或脱髓鞘,所述髓磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂蛋白脂质蛋白(PLP)。

[0027] 一方面,提供了源自或可源自髓磷脂组分的肽在制备用于治疗或预防认知受损、痴呆和/或脱髓鞘的药物中的用途,所述髓磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂蛋白脂质蛋白(PLP)。

[0028] 一方面,提供了源自或可源自髓磷脂组分的肽在治疗或预防受试者认知受损、痴呆和/或脱髓鞘中的用途,所述髓磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓磷脂蛋白脂质蛋白(PLP)。

[0029] 如本文所讨论的,先前已经证明根据本发明使用的肽导致针对髓磷脂组分MBP,MOG或PLP的免疫耐受。

[0030] 认知受损、痴呆和/或脱髓鞘可能是由于对神经元的免疫攻击导致的神经变性所致。一方面,认知受损、痴呆和/或脱髓鞘可能是阿尔茨海默氏病或帕金森氏病的结果。

[0031] 一方面,受试者患有脱髓鞘疾病。脱髓鞘疾病可包括任何由于对神经元的免疫攻击而导致神经变性的疾病。

[0032] 一方面,脱髓鞘疾病可包括阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。

[0033] 在本发明的一方面,脱髓鞘疾病是多发性硬化症。

[0034] 一方面,受试者是人类受试者。

[0035] 一方面,本发明提供了一种促进神经元髓鞘再生的方法,例如通过使所述神经元与本文所述的肽接触。神经元可能已经历脱髓鞘。一方面,该方法是体外方法。

[0036] 本发明还提供了用于治疗或预防受试者的认知受损、痴呆和/或脱髓鞘的试剂盒,其中所述试剂盒包含源自或可源自髓磷脂组分的肽,所述磷脂组分选自髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的。和髓磷脂蛋白脂质蛋白(PLP)。试剂盒的肽可以用于同时、分开或顺序施用。

[0037] 根据任何方面的肽可以是组合物的形式,例如药物组合物的形式。

[0038] 一方面,该肽选自SEQ ID No.1、2、3和4。在本文所述的本发明的一方面,将SEQ ID No.1、2、3和4的肽施用于所述受试者。

[0039] 因此,一方面,该组合物包含MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154(它们的组合在本文中也称为“ATX-MS-1467”)。一方面,组合物中的肽由MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154组成或基本上由它们组成。

[0040] 一方面,除了MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154之外,组合物不包含任何其他肽。

[0041] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了一种用于治疗患有多发性硬化症的受试者的认知受损的方法,其包括向该受试者施用MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-

154肽,优选地,包含MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154肽(SEQ ID No.1、2、3和4)的组合物。

[0042] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了一种用于治疗受试者的痴呆的方法,其包括向受试者施用MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154肽,优选地,包含MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154肽(SEQ ID No.1、2、3和4)的组合物。

[0043] 在一个优选的实施方案中,本发明提供了一种用于治疗受试者的脱髓鞘的方法,其包括向受试者施用MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154肽,优选地,包含MBP30-44,MBP83-99,MBP131-145和MBP140-154肽(SEQ ID No.1、2、3和4)的组合物。

[0044] 另一方面,所述肽选自SEQ ID No.7、8、9和10。可以将SEQ ID No.7、8、9和10的肽施用于所述受试者。

[0045] 另一方面,该肽选自SEQ ID No.12、16、18、23、24、25、26、27、28、29、30和31。

[0046] 附图简述

[0047] 图1描绘了脱髓鞘发生的机理(在Oliver Neuhaus等,Trends in Pharmacological Sciences,第24卷,第3期,第131-138页(2003年3月)之后)。

[0048] 图2示出了通过PASAT值评估的认知的显著改善,这支持了使用MSFC评分测得的总体失能(disability)减少的强烈趋势。示出的认知数据是中位数+四分位距; $P=0.0101$ Wilcoxon匹配对的双尾符号秩检验。

[0049] 图3示出了以相对较低的评分开始研究的那些受试者认知的改善更大。

[0050] 图4示出了s.c.注射MBP 2h后DR2/Ob1Het/Het小鼠血清中细胞因子的剂量依赖性分泌。通过ANOVA分析数据,然后进行Dunnett的多重比较检验。*和**分别指示相对于磷酸盐缓冲盐水(PBS)治疗组的 $p<0.05$ 和 0.01 。

[0051] 图5示出了用ATX-MS-1467以 $100\mu\text{g}/\text{小鼠}$ s.c.处理后血清中细胞因子释放的时间过程。通过ANOVA分析数据,然后进行Dunnett的多重比较检验。*,**,***和****分别指示相对于PBS处理组的 $p<0.05$ 、 0.01 、 0.001 和 0.0001 。

[0052] 图6示出了用ATX-MS-1467以 $100\mu\text{g}/\text{小鼠}$ 单次或多次处理后2h的血清细胞因子水平。按照每周3次的方案,DR2/Ob1Het/Het小鼠接受ATX-MS-1467的1到10次处理。通过ANOVA分析数据,然后进行Dunnett的多重比较检验。*,**,***和****分别指示相对于PBS处理组的 $p<0.05$ 、 0.01 、 0.001 和 0.0001 。

[0053] 图7示出了在10次给药ATX-MS-1467($100\mu\text{g}/\text{小鼠}$,每周3次)的疗程后用PBS或ATX-MS-1467($100\mu\text{g}/\text{小鼠}$)攻击后2h的血清细胞因子水平,所述疗程与所述攻击是分离的并持续2、7、14或21天,在该疗程期间小鼠未接受任何处理。洗出期的长度由箭头指示。通过ANOVA分析数据,然后进行Dunnett的多重比较检验。*,**,***和****分别指示相对于PBS处理组的 $p<0.05$ 、 0.01 、 0.001 和 0.0001 。#,##,###和####分别指示相对于接受ATX-MS-1467单次处理的组的 $p<0.05$ 、 0.01 、 0.001 和 0.0001 。

[0054] 图8示出了在10次给药ATX-MS-1467($100\mu\text{g}/\text{小鼠}$,每周3次)或HLA b_2m ($25\mu\text{g}/\text{小鼠}$,每周3次)的疗程后,用PBS或MBP($300\mu\text{g}/\text{小鼠}$)攻击后2h的血清细胞因子水平,所述疗程与所述攻击是分离的并持续2、7、14或21天,在该疗程期间小鼠未接受任何处理。洗出期的长度由箭头指示。通过ANOVA分析数据,然后进行Dunnett的多重比较检验。**和****分别指示相对于PBS攻击组的 $p<0.05$ 和 0.0001 。#和##分别指示相对于非耐受组(即在没有先前处理

下用MBP攻击)的 $p < 0.05$ 和 0.01 。

[0055] 图9示出了如方法所述,来自用SCH免疫并用或是PBS或是ATX-MS-1467处理的DR2/Ob1Het/Het小鼠的脾脏中表达Lag3的CD4⁺淋巴细胞的百分比。***指示相对于PBS处理组的 $p < 0.001$ 。

[0056] 图10示出了在Lewis大鼠EAE模型中用ATX-MS-1467的预防性处理延迟疾病发作。(A)在疾病诱导(免疫)前3周开始,每周一次或三次用ATX-MS-1467处理的每日临床评分度量。(B)在疾病诱导前3周开始,每周一次或三次用ATX-MS-1467处理的疾病发生率($CS > 1$)。*使用Kruskal-Wallis以及Dunn的事后比较分析,相对于媒介物为 $p, 0.05$ 。†指示使用对数秩(Mantel-Cox)检验确定的相对于媒介物处理的显著性。CS,临床评分;EAE,实验性自身免疫性脑脊髓炎;qw,每周一次;SEM,平均值的标准误;tiw,每周3次;veh,媒介物。

[0057] 图11示出了ATX-MS-1467显著降低在双转基因“人源化”小鼠中SCH诱导的EAE中的疾病严重性。(A)从第0天(免疫)开始,每周两次用ATX-MS-1467处理的每日临床评分。(B)在麻痹的最初体征后开始每周两次用ATX-MS-1467处理。*相对于媒介物为 $p, 0.05$ 。**相对于媒介物为 $p, 0.01$ 。biw,每周两次;EAE,实验性自身免疫性脑脊髓炎;SCH,脊髓匀浆;SEM,平均值的标准误。

[0058] 图12示出了在双转基因人源化小鼠中ATX-MS-1467比MBP₈₂₋₉₈或GA处理更有效地降低疾病严重性。(A,B)从第0天起每周一次给药ATX-MS-1467($100\mu\text{g}/\text{小鼠}$),MBP₈₂₋₉₈($12\mu\text{g}$ 或 $100\mu\text{g}/\text{小鼠}$)或媒介物对照。(C,D)从第0天开始用ATX-MS-1467($100\mu\text{g}/\text{小鼠}$,每周两次)的处理与媒介物或GA(每天 $75\mu\text{g}/\text{小鼠}$)相比显著降低EAE。*相对于媒介物或GA为 $p, 0.05$ 。**相对于媒介物为 $p, 0.01$ 。biw,每周两次;EAE,实验性自身免疫性脑脊髓炎;GA,醋酸格拉替雷;HED,人等效剂量;MBP,髓磷脂碱性蛋白;qw,每周一次;SEM,平均值的标准误。

[0059] 图13示出了从第0天(免疫)开始的ATX-MS-1467处理减少在双转基因人源化小鼠中EAE诱导的中枢神经系统免疫细胞群。(A)临床评分。(B-E)在第15天从脊髓收获的细胞浸润。*相对于媒介物或GA为 $p, 0.05$ 。***相对于媒介物为 $p, 0.001$ 。EAE,实验性自身免疫性脑脊髓炎;qw,每周一次;SEM,平均值的标准误。

[0060] 图14示出了预防性给药来自dpi7的ATX-MS-1467后,DR2/Ob1het/het小鼠中SCH诱导的EAE的疾病严重性的剂量依赖性减弱。A:通过Kruskal Wallis然后Dunn检验对活性组相对于对照组进行的比较。B:通过对数秩检验对活性组相对于对照组进行的比较。组大小: $n = 10-14$ 。(*= $P < 0.05$,***= $P < 0.001$)。

[0061] 图15示出了在DR2/Ob1^{het/het}小鼠中,用ATX-MS-1467处理对SCH诱导的EAE中脊髓细胞因子浓度的作用。#,##和###=通过ANOVA,随后Bonferroni相对于用媒介物处理的小鼠分别为 $P < 0.05$ 、 0.01 和 0.001 。组大小($n = 7-13$)。C-X-C基序趋化因子(CXCL),白介素(IL),干扰素(IFN),单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)。

[0062] 图16示出了ATX-MS-1467在用预防性(从dpi7开始)或治疗性(从dpi14开始)给药方案的DR2/Ob1^{Het/Het}小鼠中由SCH诱导的EAE中的作用。*,**和***=通过Kruskal Wallis随后Dunn检验相对于对照组分别为 $P < 0.05$ 、 0.01 和 0.001 。组大小($n = 20-28$)。

[0063] 图17示出了用ATX-MS-1467预防性处理(从dpi7开始)或治疗性处理(从dpi14开始)后脊髓的病理变化。***=通过ANOVA随后Bonferroni相对于用媒介物处理的小鼠($n = 18-20$)为 $P < 0.001$ 。Luxol固蓝(LFB)。

[0064] 图18示出了DR2/Ob1^{het/het}中SCH-EAE中BBB泄漏的特征。测量临床评分(A),并在指定的时间点进行成像。在dpi7 25%的小鼠和随后时间点的100%的小鼠中检测到BBB泄漏(未示出)。小脑中Gd+泄漏的总体积在dpi10和14之间增加(B)而信号强度在所有时间点都是相当的(C)。在dpi 22信号中代表性T1加权的Gd+变化(由红色箭头指示)(D)。

[0065] 图19示出了预防性ATX-MS-1467治疗对BBB泄漏的作用。用ATX-MS-1467从dpi0的预防性处理防止DR2/Ob1^{het/het}小鼠中SCH EAE中的BBB泄漏(A-C)。就临床评分,小脑泄漏的总体积和病变内Gd+的强度而言,与PBS处理的小鼠相比,ATX-MS-1467治疗的小鼠展示出降低的疾病严重性。观察到临床评分相对于泄漏量($r^2=0.48, F=0.57$)和相对于Gd+强度($r^2=0.57, F=17.3$)之间显著相关(D)。在dpi14的代表性Gd+MRI(E)。

[0066] 图20示出了离体抗原特异性细胞因子的分泌。*,**和***通过双向ANOVA和Bonferroni的后期检验分别为 $P<0.05, 0.01$ 和 0.001 。组大小($n=5-6$)。白介素(IL),干扰素(IFN)。*,**和***通过双向ANOVA和Bonferroni的后期检验分别为 $P<0.05, 0.01$ 和 0.001 。组大小($n=5-6$)。白介素(IL),干扰素(IFN)。

[0067] 发明详述

[0068] APIOPES

[0069] 本发明人先前已经确定,在不进行进一步加工的情况下,肽与MHC分子结合并呈递给T细胞的能力与该肽在体内诱导耐受的能力之间存在联系(W002/16410)。如果肽太长而无法在不进行进一步加工(例如修剪)的情况下结合MHC分子的肽结合槽,或者以不适当的构型结合,那么它将不会在体内耐受。另一方面,如果该肽大小和构型合适于直接结合到MHC肽结合槽并呈递给T细胞,则可以推测该肽可用于耐受诱导。

[0070] Apitopes(独立于抗原加工的epiTOPES)能够与MHC分子结合并刺激T细胞的反应,而无需进一步的抗原加工。

[0071] 本发明人先前已经表明,可源自MBP,MOG或PLP的apitopes能够诱导耐受性(参见例如W02002/016410,W02003/064464,W02009/056833,W02014/111841和W02014/111840,其通过引用并入本文)。

[0072] 本发明实施例表明,当将MBP肽施用于受试者时,出乎意料地导致那些受试者的认知受损显著改善。由于已表明MOG和PLP apitopes具有与MBP相似的特性,因此可以预期,使用MOG和PLP apitopes可以实现对认知受损的相同效果。因此,本发明涉及来自MBP,MOG和PLP的肽,其用作apitopes用于如本文所述的治疗认知受损、痴呆和/或脱髓鞘的用途或方法。

[0073] MYELIN

[0074] 髓磷脂是一种介电(电绝缘)材料,通常在神经元的轴突周围形成一层髓鞘。这对于神经系统的正常运作至关重要。一些组成髓磷脂的蛋白质是髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和蛋白脂蛋白(PLP)。

[0075] 髓磷脂碱性蛋白(MBP)

[0076] 髓磷脂碱性蛋白(MBP)是一种可从人脑白质分离的18.5kDa蛋白。成熟的蛋白质具有170个氨基酸,并且该序列可从文献中广泛获得(参见例如Chou等(1986) J.Neurochem.46:47-53,图1;Kamholz等(1986),PNAS 83:4962-4966,图2;美国专利5,817,629,SEQ ID NO:1;Roth等(1987),J.Neurosci.Res.17:321-328,图4;Medeviczky等

(2006), FEBS Letters 580:545-552, 图3B)。根据本发明使用的合适的MBP肽描述于例如W02002/016410, W02003/064464和W02009/056833中, 其通过引用并入本文。

[0077] 因此, 可以根据本发明使用的肽可以如下:

[0078] MBP 30-44:

[0079] H-Pro-Arg-His-Arg-Asp-Thr-Gly-Ile-Leu-Asp-Ser-Ile-Gly-Arg-Phe-NH₂ (SEQ ID No.1)

[0080] MBP 83-99:

[0081] H-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr-Pro-NH₂ (SEQ ID No.2)

[0082] MBP 131-145:

[0083] H-Ala-Ser-Asp-Tyr-Lys-Ser-Ala-His-Lys-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-NH₂ (SEQ ID No.3)

[0084] MBP 140-154:

[0085] H-Gly-Phe-Lys-Gly-Val-Asp-Ala-Gln-Gly-Thr-Leu-Ser-Lys-Ile-Phe-NH₂ (SEQ ID No.4)

[0086] 术语“MBP 30-44”, “MBP 83-99”, “MBP 131-145”和“MBP 140-154”也可涵盖修饰的肽。例如, 只要保留未修饰的肽的MHC结合特异性及其被呈递给T细胞的能力, 就可以通过氨基酸插入、缺失或取代来使肽突变。该肽可例如具有来自未修饰序列的5、4、3、2、1或0个突变。

[0087] 备选地(或另外地)可进行修饰而不改变肽的氨基酸序列。例如, 可以包括D-氨基酸或其他非天然氨基酸, 正常的酰胺键可以被酯或烷基主链键, N-或C-烷基取代基所取代, 并且可以包括侧链修饰以及诸如二硫桥和侧链酰胺或酯链的限制。这样的改变可以导致该肽在体内的更大稳定性, 以及更长的生物学寿命。

[0088] 可以基于由K.Parker (NIH) 设计的程序“肽结合预测 (Peptide Binding Predictions)”获取的对更有效的T细胞诱导的预测来进行表位的修饰, 该程序可见于http://www-bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform (也参见Parker, K.C等1994. J. Immunol. 152:163)。

[0089] 本文所述的MBP肽可以按中性或盐形式配制成组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(由肽的游离氨基形成), 并与无机酸例如盐酸或磷酸, 或此类有机酸例如乙酸, 草酸, 酒石酸和马来酸形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱, 例如钠, 钾, 铵, 钙或铁的氢氧化物, 以及诸如异丙胺, 三甲胺, 2-乙基氨基乙醇, 组氨酸和普鲁卡因的有机碱。

[0090] 在本文描述的本发明的方法和用途中, 可以按照剂量递增方案施用肽或组合物。在“剂量递增”方案中, 以递增浓度将多个剂量给予患者。这样的方法已经用于例如磷脂酶A2肽在针对蜂毒变态反应的免疫治疗应用中 (Müller等(1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754和Akdis等(1998) J. Clin. Invest. 102:98-106)。

[0091] 一方面, 可以按剂量增加方案以以下剂量施用肽:

[0092] 第1天: 约15至约40μg的第一剂;

[0093] 第14±7天: 约35-65μg的第二剂;

[0094] 第28±7天: 约80-120μg的第三剂;

- [0095] 第42±7天:约300-500μg的第四剂;
- [0096] 第56±7天:约400-2000μg的第五剂;
- [0097] 第70±7天:约400-2000μg的第六剂;
- [0098] 第84±7天:约400-2000μg的第七剂;
- [0099] 第98±7天:约400-2000μg的第八剂;
- [0100] 第112±7天:约400-2000μg的第九剂;和
- [0101] 第126±7天:约400-2000μg的第十剂。
- [0102] 一方面,可以如下方式施用肽:
- [0103] 第1天:约25μg的第一剂;
- [0104] 第14天:约50μg的第二剂;
- [0105] 第28天:约100μg的第三剂;
- [0106] 第42天:约400μg的第四剂;
- [0107] 第56天:约800μg的第五剂;
- [0108] 第70天:约800μg的第六剂;
- [0109] 第84天:约800μg的第七剂;
- [0110] 第98天:约800μg的第八剂;
- [0111] 第112天:约800μg的第九剂;和
- [0112] 第126天:约800μg的第十剂。
- [0113] 在备选的方面,可以在第1天给予约50μg的第一剂,然后在第15天给予约200μg的第二剂,然后在第29天给予约800μg的第三剂。一方面,受试者也可以约每两周或每14天接受约800μg的剂量,此后例如持续至少16周的时间段。
- [0114] 已经发现,肽中的两种MBP 30-44和131-145是HLA-DQ6结合的,以及两种是HLA-DR2结合的(MBP 140-154和83-99)。与用单一肽的疗法相比,这些apitopes的组合使用为MS患者中见到的不同的主要组织相容性复合体(MHC)单倍型提供更广泛的覆盖范围。
- [0115] 髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)
- [0116] 髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)是拥有单个细胞外Ig可变域(Ig-V)的I型整合膜蛋白。MOG的氨基酸序列在动物物种之间高度保守(>90%),指示了重要的生物学功能。MOG在髓鞘的最外板层(outermost lamellae)以及细胞体上和少突胶质细胞的过程中在CNS中特异性表达。
- [0117] 下面给出成熟的MOG的序列(缺少29个氨基酸的信号肽)(SEQ ID No.5)。
- [0118] SEQ ID No.5
- [0119] GQFRVIGPRHPICALVGDEVELPCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRT
ELLKDAIGEGKVTLRIRNVRFSDEGGFTCFRDSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPGVLVLLAVLPVLLQITVGLVF
LCLQYRLRGKFLFLVLLFLVLLFLVLLVL
- [0120] 根据本发明使用的肽可以是可源自髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白的区域40-60。肽可以是可源自抗原的片段,该抗原的片段是通过抗原呈递细胞对抗原的自然加工而产生的。
- [0121] MOG的区域40-60具有以下顺序:
- [0122] SEQ ID No.6

- [0123] YRPPFSRVVHLYRNGKDQDGD
- [0124] 该肽可以包含来自以下肽的最小表位:MOG 41-55、43-57、44-58和45-59。
- [0125] MOG 41-55、43-57、44-58和45-59的序列为:
- [0126] MOG 41-55:RPPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID No.7)
- [0127] MOG 43-57:PFSSVVHLYRNGKDQ (SEQ ID No.8)
- [0128] MOG 44-58:FSRVVHLYRNGKDQD (SEQ ID No.9)
- [0129] MOG 45-59:SRVVHLYRNGKDQDG (SEQ ID No.10)
- [0130] 可以根据本文所述的本发明的方法和用途使用包含SEQ ID No.7、8、9和/或10的肽。一方面,一种或多种肽由SEQ ID No.7、8、9和/或10组成。
- [0131] 根据本发明使用的肽可以包含来自MOG 41-55的最小表位。该肽可以由MOG 41-55 (SEQ ID No.7) 组成。
- [0132] 髓磷脂蛋白脂质蛋白 (PLP)
- [0133] 髓磷脂蛋白脂质蛋白 (PLP) 是中枢神经系统 (CNS) 髓磷脂中最丰富的蛋白,是疏水性完整膜蛋白。
- [0134] 人PLP的序列显示在SEQ ID No.11中:
- [0135] 1 GLLECCARC LVGAPFASLV ATGLCFFGVA LFCGCGHEAL TGTEKLIETY FSKNYQDY EY
- [0136] 60 LINVIHAFQY VIYGTASFFF LYGALLAEG FYTTGAVRQI FGDKYKTTICG KGLSATVTGG
- [0137] 120 QKGRGSRGQH QAHS LERVCH CLGKWLGHDP KFGV GITYALT VVWLLVFACS AVPVYIYFNT
- [0138] 180 WTTCQSIAFP SKTSASIGSL CADARMYGVLPWNAFPGKVC GSNLLSICKT AEFQMTFHLF
- [0139] 240 IAA FVGAAAT LVSL LTFMIA ATYNFAVLKL MGRGTKF
- [0140] 根据本发明使用的肽可以是可源自PLP序列的亲水区。该肽可以是可源自抗原的片段,该抗原的片段是通过抗原呈递细胞对抗原的天然加工而产生的。
- [0141] 可源自PLP亲水区域的肽为:
- [0142] PLP 36-61:HEALTGTEKLIETYFSKNYQDY EYLI (SEQ ID No.12)
- [0143] PLP 88-119:EGFYTTGAVRQIFGDKYKTTICGKGLSATVTGG (SEQ ID No.13)
- [0144] PLP 104-135:KTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLE (SEQ ID No.14)
- [0145] PLP 119-150:GQKGRGSRGQHQAHS LERVCHCLGKWLGHDPK (SEQ ID No.15)
- [0146] PLP 179-206:TWTTQSIAFP SKTSASIGSLCADARMY (SEQ ID No.16)
- [0147] PLP 192-219:TSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVC (SEQ ID No.17)
- [0148] PLP 207-234:GVLPWNAFPGKVC GSNLLSICKTAEFQM (SEQ ID No.18)
- [0149] PLP 260-276:ATYNFAVLKLMGRGTKF (SEQ ID No.19)
- [0150] 该肽可包含以下蛋白脂蛋白 (PLP) 区域的全部或一部分:
- [0151] PLP 36-61:HEALTGTEKLIETYFSKNYQDY EYLI (SEQ ID No.12)
- [0152] PLP 179-206:TWTTQSIAFP SKTSASIGSLCADARMY (SEQ ID No.16)
- [0153] PLP 192-219:TSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVC (SEQ ID No.17)
- [0154] PLP 207-234:GVLPWNAFPGKVC GSNLLSICKTAEFQM (SEQ ID No.18)。
- [0155] 该肽可包含来自这些区域之一的最小表位。
- [0156] 该肽可包含以下区域的一部分:
- [0157] PLP 39-57:LTGTEKLIETYFSKNYQDY (SEQ ID No.20)

- [0158] PLP 180-198:WTTCQSIAPPSKTSASIGS (SEQ ID No.21)
- [0159] PLP 208-222:VLPWNAFPGKVCASN (SEQ ID No.22)
- [0160] 一方面,该肽可以选自以下PLP肽:
- [0161] PLP 39-53:LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID No.23)
- [0162] PLP 42-56:TEKLIETYFSKNYQD (SEQ ID No.24)
- [0163] PLP 43-57:EKLIETYFSKNYQDY (SEQ ID No.25)
- [0164] PLP 180-194:WTTCQSIAPPSKTS (SEQ ID No.26)
- [0165] PLP 181-195:TTCQSIAPPSKTSAS (SEQ ID No.27)
- [0166] PLP 182-196:TCQSIAPPSKTSASI (SEQ ID No.28)
- [0167] PLP183-197:CQSIAPPSKTSASIG (SEQ ID No.29)
- [0168] PLP 184-198:QSIAPPSKTSASIGS (SEQ ID No.30)
- [0169] PLP 208-222:VLPWNAFPGKVCASN (SEQ ID No.31)
- [0170] PLP 36-61:HEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLI (SEQ ID No.12)
- [0171] PLP 179-206:TWTTTCQSIAPPSKTSASIGSLCADARMY (SEQ ID No.16) 和
- [0172] PLP 207-234:GVLPWNAFPGKVCASNLLSICKTAEFQM (SEQ ID No.18)。
- [0173] 该肽可包含来自这些肽之一的最小表位。
- [0174] 特别地,该肽可包含以下之一的最小表位,由其组成或包含该最小表位:
- [0175] PLP 39-53:LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID No.23)
- [0176] PLP 181-195:TTCQSIAPPSKTSAS (SEQ ID No.27)
- [0177] PLP 179-206:TWTTTCQSIAPPSKTSASIGSLCADARMY (SEQ ID No.16)。
- [0178] 脱髓鞘疾病
- [0179] 根据本发明待治疗的疾病是脱髓鞘疾病。如上所讨论的,此类疾病可包括阿尔茨海默氏病和帕金森氏病。此类疾病还可包括白质消融疾病和多发性硬化症 (MS)。一方面,该疾病是多发性硬化症。
- [0180] 多发性硬化症
- [0181] 多发性硬化症 (MS) 是一种中枢神经系统 (CNS) 的慢性退行性疾病,其中通常负责抵抗入侵生物的免疫系统攻击人体的髓鞘,该髓鞘是包裹神经元并促进高速神经元通讯的保护性隔离。如果没有髓磷脂来协助并保护神经元,那么允许我们与环境相互作用的大脑和脊髓信号会发生故障。
- [0182] MS可能会导致许多身体和精神症状,并经常进展为身体和认知失能 (cognitive disability)。疾病发作通常在年轻人 (20-40岁) 中发生,在女性中更为常见,并影响全球超过100万人。目前认为MS是一种免疫介导的病症,其中人体自身的免疫系统攻击并破坏髓磷脂。
- [0183] MS的病程是多种多样的,并且随着时间的推移可能处于休眠或稳定进展。已基于进展模式描述了MS的几种亚型。
- [0184] 根据CNS中的损害的程度和位置,MS患者可能会经历极其多种症状。诊断时最常报道的症状是视力模糊,刺痛和/或麻木,以及失去协调能力。随着疾病进展,MS患者通常会经历疲劳,痉挛,行走困难和认知受损。在1993年之前,尚无批准的MS治疗。如今,在FDA批准的9种疾病缓解治疗中,有8种旨在减少MS临床加重的频率,而一种被批准于改善步行能力。然

而,没有一种针对在患有MS的人群中常见的认知受损。

[0185] MS有四种亚型,由疾病进展定义。复发缓解型MS (RR-MS) 是最常见的;该亚型是大约85%的所有患有MS的人群的初步诊断。在RR-MS中,患者经历一段时间的疾病症状发作,然后完全恢复或缓解。大多数被诊断为RR-MS的患者会在10到20年内发展为继发性进展型MS (SP-MS)。在SP-MS中,与RR-MS中一样,患者经历疾病症状的发作或复发,但是在两次复发之间,疾病严重性稳步增加。最初出现时诊断出的第二大最常见亚型是原发性进展型MS (PP-MS),其中患者从疾病发作时开始就经历症状严重性的稳步增加。MS的最后且最罕见的亚型,进展性复发型MS (PR-MS),涉及强调疾病稳步进展的间歇性复发。一般而言,尽管进展型亚型的MS患者更有可能经历认知受损,但仍需要对PP-MS和PR-MS患者的进一步研究。MS较早发作增加患者发展出与MS相关的认知下降的机会。

[0186] 根据本发明的待治疗的受试者可以患有MS。一方面,受试者患有复发缓解型MS。

[0187] 一方面,受试者可患有继发性进展型MS。一方面,受试者可患有原发性进展型MS。一方面,受试者可患有进展性复发型MS。

[0188] 认知受损

[0189] MS中的失能可通过多发性硬化功能复合 (Multiple Sclerosis Functional Composite, MSFC) 评分来衡量。MSFC是本领域已知的用于量化神经功能的方法,并且在Cutter等 (Brain (1999) 122, 871-882) 中描述,其通过引用并入本文。也可以从国家多发性硬化症协会 (National Multiple Sclerosis Society) 获得MSFC施用和评分手册 (2001年10月修订),该手册由Fisher J., Jak A., Kniker J., Rudick R. 和Cutter G编制。该手册也通过引用并入本文。

[0190] MSFC量化的方面之一是认知。在本发明人进行的临床试验中,首先使用MSFC评分来测量失能。发现与基线相比,治疗组的失能显著减少,并且失能改善很大程度上是由于认知受损的显著改善。

[0191] 认知受损的概念是本领域已知的,例如如Rahn等Cerebrum 2012:14所述。

[0192] “认知”是指一系列高级脑功能,包括学习和记忆信息,组织,计划和解决问题,集中、保持和转移注意力,理解和使用语言,准确地感知环境以及执行计算的能力。

[0193] 认知改变是MS的常见症状-所有患有MS的人群中超过一半会发展出认知问题。对于某些人,它甚至可能是MS的第一个症状。某些功能比其他功能更可能受到影响:

[0194] • 信息处理 (处理五种感官收集的信息)

[0195] • 内存 (获取,保留和检索新信息)

[0196] • 注意力和集中力 (尤其是注意力分散)

[0197] • 执行功能 (计划和优先化)

[0198] • 视觉空间功能 (视觉感知和构造能力)

[0199] • 语言流利性 (找词)

[0200] 认知受损可能发生在MS的所有阶段。有认知问题的受试者可能会注意到以下一种或多种症状:

[0201] • 记忆事件或对话时的问题

[0202] • 记忆名字时的问题

[0203] • 多任务时的问题

[0204] • 学习新材料时的问题

[0205] • 注意力广度的问题

[0206] • 学习指导的问题

[0207] • 做决策的问题

[0208] 认知受损可使用“PASAT”测验(同步听觉系列加法测验(Paced Auditory Serial Addition Test))进行评估。该测验是本领域已知的,并且是MSFC的组件。该测验及其如何管理(administer)是本领域技术人员已知的。本质上,PASAT是一种认知功能的量度,用于评估听觉信息处理速度和灵活性以及计算能力。它由Gronwell在1977年开发,并且后来由Rao及同事在1989年进行了改编,用于MS。使用录音磁带或光盘呈现(present)PASAT测验,以确保刺激呈现速率的标准化。每3秒呈现一次数字,并且患者必须将每个新数字添加到紧接其之前的数字。PASAT也使用了更短的刺激间隔,例如2秒或更小,但往往会增加任务的难度。已经开发了两种替代形式,以在超过一个场合重复PASAT时使对刺激项目的可能的熟悉程度最小。

[0209] 根据本发明的方法可以在用于脱髓鞘疾病如多发性硬化症的其他治疗之前或之后或与之结合使用。

[0210] 在本发明的一个优选实施方案中,本发明任何方法的受试者是哺乳动物,优选猫,狗,马,驴,绵羊,猪,山羊(goat),牛(cow),小鼠,大鼠,兔(rabbit)或豚鼠(guinea pig),但最优选地,受试者是人类。

[0211] 如本文所定义,“治疗”是指相对于治疗之前的症状,减少,减轻或消除认知受损的一种或多种症状。

[0212] “预防”(或预防性(prophylaxis))是指延迟或预防认知受损的发作。例如,预防可以是指在有认知减退的证据但存在导致认知减退的神经元丧失的风险之前的早期干预。预防可以是绝对的,或者可以仅在某些个体中或在有限的时间内有效。

[0213] 如本文所用,“治疗认知受损”旨在意指认知受损的任何方面的改善,例如不限于本文所述的认知的任何方面。作为非限制性示例,这些可包括信息处理,记忆力,注意力和集中力,执行功能,视觉空间功能和/或语言流利性。

[0214] 痴呆

[0215] “痴呆”一词描述了一组症状,其可包括记忆力丧失以及思维、问题解决或语言困难。这些变化通常开始很小,但是对于患有痴呆的人,它们已经变得严重到足以影响日常生活。痴呆者可能也会经历情绪或行为的变化。

[0216] 当大脑因诸如阿尔茨海默氏病或一系列中风等疾病而受损时,可能会导致痴呆。阿尔茨海默氏病是痴呆的常见原因,但不是唯一。患有痴呆的一些人所经历的具体症状将取决于大脑受损的部位以及导致痴呆的疾病。

[0217] 痴呆的人数正在稳步增加。

[0218] 据估计,英国有850,000名痴呆者,到2025年,这一数字将上升至100万以上。预计到2051年,这将增至200万。今年将有225,000人患上痴呆,相当于每三分钟一人。6名80岁以上的人中有1人患有痴呆。

[0219] 每个人都是独特的,并会以其自己的方式经历痴呆。不同类型的痴呆也倾向于以不同的方式影响人们,尤其是在早期阶段。

- [0220] 痴呆者可能具有认知症状(与思维或记忆力有关),并且可能存在以下某些问题:
- [0221] • 日常记忆力-例如,难以回忆起最近发生的事件
- [0222] • 集中精力,计划或组织工作-例如,难以做决策,解决问题或进行一系列任务(例如做饭)
- [0223] • 语言-例如,难以继续会话或为某事找到正确的单词
- [0224] • 视觉空间技能-例如,判断距离(例如在楼梯上)和看到三维物体的问题
- [0225] • 方向-例如,失去对日子或日期的跟踪,或变得对他们的位置感到困惑。
- [0226] 痴呆者的情绪可能也会改变。例如,他们可能变得沮丧或烦躁,冷漠或退缩,焦虑,容易沮丧或异常悲伤。患有某些类型的痴呆,该人可能会看到实际不存在的事物(视觉幻觉)或强烈相信不正确的事物(错觉)。
- [0227] 痴呆是进行性的,即随着时间的流逝,症状逐渐恶化。这种情况发生的速度因人而异。随着痴呆进展,该人可能会发展出看似异常或不相称的行为。这些行为可能包括一遍又一遍地问相同的问题,徘徊,躁动(restlessness)或激动(agitation)。
- [0228] 痴呆患者,特别是在晚期,可能会出现身体症状,例如肌肉无力或体重减轻。睡眠方式和食欲的变化也很常见。
- [0229] 如本文所定义,“治疗”是指相对于治疗前的症状,减少,减轻或消除痴呆的一种或多种症状。这样的症状包括但不限于本文描述的任何症状。
- [0230] “预防”(或预防性)是指延迟或预防痴呆的发作。例如,预防可以是指在有痴呆的证据但有导致痴呆的神经元丧失的风险之前进行早期干预。预防可以是绝对的,或者可以仅在某些个体中或在有限的时间内有效。
- [0231] 本文所用的“治疗痴呆”旨在意指痴呆任何方面的改善,例如但不限于本文所述的任何方面。
- [0232] 没有针对痴呆的单一测验。诊断可以基于以下十五的组合:
- [0233] • 进行“历史记录”-医生与该人和非常了解他们的人交谈,了解他们的问题如何产生(develop)以及它们现在如何影响他们的日常生活
- [0234] • 体格检查和测试(例如血液测试),以排除造成该人症状的其他可能原因
- [0235] • 心理能力测试(例如,记忆力,思维能力)-护士或医生将进行更简单的测试,心理学家将进行更专业的测试
- [0236] • 脑部扫描(如果需要进行治疗)。
- [0237] 痴呆有不同的形式,具有共同的潜在病理学/原因:
- [0238] 阿尔茨海默氏病-这是痴呆的最常见原因。日常记忆问题通常是首先要被注意的,但是其他症状可以包括难以找到正确的单词,解决问题,做出决定或三维度感知事物。
- [0239] 血管性痴呆-如果由于血管狭窄或阻塞而减少了对大脑的氧气供应,则某些脑细胞会受损或死亡。这是在血管性痴呆中发生的情况。在一次大中风后,症状可以突然发生。或者由于一系列小中风,它们会随着时间的流逝而发展。血管性痴呆也可以由影响大脑深部的小血管的疾病引起,称为皮下血管性痴呆。血管性痴呆的症状多种多样,并且可以与阿尔茨海默氏病重叠。许多人在解决问题或制定计划、快速思考和集中精力方面遇到困难。他们也可能在很短的时间内感到非常困惑。
- [0240] 混合性痴呆-这是某人患有一种类型以上的痴呆,并且混合了这些类型的症状的

情况。有人同时患有阿尔茨海默氏病和血管性痴呆是很常见的。

[0241] 具有路易体的痴呆-这种类型的痴呆涉及在脑细胞内部形成的微小异常结构(路易体)。它们破坏大脑的化学反应(chemistry)并导致脑细胞死亡。早期症状可以包括在一天的过程中变化的警觉性,幻觉和判断距离的困难。一个人的日常记忆通常比阿尔茨海默氏病早期受到的影响要小。路易体痴呆与帕金森氏病密切相关,并经常有一些相同的症状,包含运动困难。

[0242] 额颞痴呆(包括匹克氏病)-在额颞痴呆中,大脑的前部和侧部受到损害。异常蛋白团块在脑细胞内部形成,导致它们死亡。首先,性格和行为的改变可能是最明显的迹象。根据大脑受损的区域,该人可能会遇到流利言语的困难或忘记单词的含义。

[0243] 还有许多可以导致痴呆的其他疾病。这些很少见-它们合计仅占有所有痴呆的5%。它们趋向于在痴呆的年轻人(65岁以下)中更常见。这些罕见的原因包括皮质基底变性,进行性核上性麻痹,HIV感染,C型尼曼-皮克病和克雅氏病(CJD)。

[0244] 随着疾病的恶化,患有帕金森氏症或亨廷顿氏病的人也可能发展痴呆。患有唐氏综合症的人随着变老也处于发展阿尔茨海默氏病的特别风险。

[0245] 在本发明的一方面,受试者患有阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。

[0246] 根据本发明的方法可以在痴呆的其他治疗之前、之后或与其他治疗组合使用。

[0247] 例如,可以向患有轻度至中度阿尔茨海默氏病或者以阿尔茨海默氏症为主要病因的混合性痴呆的患者开具三种药物之一:多奈哌齐(donepezil),利斯的明(rivastigmine)或加兰他敏(galantamine)。在阿尔茨海默氏病的中度或重度阶段,可向某人提供美金刚(memantine)。

[0248] 多奈哌齐,利斯的明和加兰他敏也可能对患有路易氏体的痴呆者有用,这些痴呆者具有痛苦的幻觉或错觉,或具有挑战性行为(例如,激动或攻击性)。

[0249] 关于血管性痴呆,可以提供药物来治疗引起痴呆的潜在医学疾患。这些疾患通常包括高血压,高胆固醇,糖尿病或心脏问题。控制这些可以有助于减缓痴呆的进展。

[0250] 对于痴呆者,可在不同时间开具极其多种其他药物。这些包括用于抑郁症或焦虑的药物,安眠药或抗精神病药。

[0251] 一系列非药物治疗也是可用的,它们可以帮助某人与痴呆相处融洽,包含例如信息,建议,支持,疗法和活动。

[0252] 如本文所述的根据本发明的方法和用途可以与现有的痴呆治疗或疗法结合使用。

[0253] 在本发明的一方面,痴呆是阿尔茨海默氏病的结果;也就是说,受试者患有阿尔茨海默氏病。

[0254] 在本发明的一方面,痴呆是帕金森氏病的结果;也就是说,受试者患有帕金森氏病。

[0255] 在本发明的一个优选实施方案中,本发明任何方法的受试者是哺乳动物,优选猫,狗,马,驴,绵羊,猪,山羊,牛,小鼠,大鼠,兔或豚鼠,但最优选地,受试者是人类。

[0256] 用本发明的肽治疗的痴呆、阿尔茨海默氏病或帕金森氏病的动物模型有望表现出改善的临床评分。

[0257] 脱髓鞘

[0258] 本发明可以改善或治疗或预防受试者的脱髓鞘。

[0259] 脱髓鞘导致多样化的症状,这些症状由受影响的神经元的功能来决定。它破坏大脑与身体其他部位之间的信号;症状因患者而异,并且在临床观察和实验室研究中具有不同表现。典型症状包括:

- [0260] • 仅影响一只眼睛的中央视野模糊,可能伴随眼运动时的疼痛
- [0261] • 双重视野
- [0262] • 视力/听力丧失
- [0263] • 腿,臂,胸或脸有奇怪的感觉,例如刺痛或麻木(神经病)
- [0264] • 手臂或腿部无力
- [0265] • 认知失调(cognitive disruption),包含言语障碍和记忆丧失
- [0266] • 热敏感(在暴露于热(例如热水淋浴)时症状恶化或再次出现)
- [0267] • 失去灵活性
- [0268] • 难以协调运动或平衡紊乱
- [0269] • 难以控制肠运动或排尿
- [0270] • 疲劳
- [0271] • 耳鸣

[0272] 如本文所定义,“治疗”是指相对于治疗之前的症状,减少,减轻或消除一种或多种脱髓鞘症状。这样的症状包括但不限于本文描述的任何症状。

[0273] “预防”(或预防性)是指延迟或预防脱髓鞘的发作。预防可以是绝对的,或者可以仅在某些个体中或在有限的时间内有效。

[0274] 如本文所用,“治疗脱髓鞘”旨在意指脱髓鞘的改善,例如通过神经元的髓鞘再生。

[0275] 根据本发明的方法可以在脱髓鞘的其他治疗之前、之后或与之结合使用。

[0276] 如本文所述的根据本发明的方法和用途可以与用于脱髓鞘的现有治疗或疗法结合使用。

[0277] 脱髓鞘参与神经退行性自身免疫疾病,例如多发性硬化症,急性播散性脑脊髓炎(acute disseminated encephalomyelitis),视神经脊髓炎,横贯性脊髓炎(transverse myelitis),慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病,格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome),脑桥中央髓鞘溶解症(central pontine myelinosis),遗传性脱髓鞘性疾病,例如脑白质营养不良(leukodystrophy),腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease),恶性贫血和卡纳万病(Canavan disease)。

[0278] 脱髓鞘也可能参与痴呆和诸如阿尔茨海默氏病和帕金森氏病的病患。

[0279] 在本发明的一方面,受试者患有多发性硬化症。

[0280] 在本发明的一方面,受试者患有阿尔茨海默氏病。

[0281] 在本发明的一方面,受试者患有帕金森氏病。

[0282] 在本发明的一个优选实施方案中,本发明任何方法的受试者是哺乳动物,优选猫,狗,马,驴,绵羊,猪,山羊,牛,小鼠,大鼠,兔或豚鼠,但最优选地,受试者是人类。

[0283] 用本发明的肽治疗脱髓鞘疾病的动物模型有望促进神经元的髓鞘再生。

[0284] 肽

[0285] 术语“肽”以通常的意义使用,意指通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列残基,通常为L-氨基酸。该术语包括修饰的肽和合成的肽类似物。

[0286] 可使用化学方法 (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin) 制备肽。例如, 可以通过固相技术 (Roberge JY等 (1995) Science 269:202-204) 合成肽, 将其从树脂上切割下来, 并通过制备型高效液相色谱法 (例如, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York, NY) 纯化。可例如根据制造商提供的说明使用ABI 431A肽合成仪 (Peptide Synthesizer, Perkin Elmer) 实现自动合成。

[0287] 肽可替代地可通过重组方式或通过从更长的多肽切割而制备。例如, 可以通过从相关蛋白上切割而获得肽, 此后可修饰一个或两个末端。肽的组成可通过氨基酸分析或测序 (例如, Edman降解程序) 来确认。

[0288] 一方面, 根据本发明使用的肽可与本文描述的任何肽具有至少约60、65、70、75、80、85、90、92、93、94、95、96、97、98、99或100%的同一性。

[0289] 序列同一性可通过任何方便的方法来评估。然而, 为了确定序列之间的序列同一性程度, 进行序列的多重比对的计算机程序是有用的, 例如Clustal W (Thompson等, (1994) Nucleic Acids Res., 22:4673-4680)。比较和比对序列对的程序, 如ALIGN (Myers等, (1988) CABIOS, 4:1-17), FASTA (Pearson等, (1988) PNAS, 85:2444-2448; Pearson (1990), Methods Enzymol., 183:63-98) 和空位BLAST (Altschul等, (1997) Nucleic Acids Res., 25:3389-3402) 也可用于此目的。此外, 欧洲生物信息学研究所 (European Bioinformatics institute) 的Dali服务器提供蛋白质序列的基于结构的比对 (Holm (1993) J. Mol. Biol., 233:123-38; Holm (1995) Trends Biochem. Sci., 20:478-480; Holm (1998) Nucleic Acid Res., 26:316-9)。

[0290] 可使用标准BLAST参数 (使用所有可用生物的序列, 矩阵Blosum 62, 空位成本: 存在11, 延伸1) 确定多序列比对和同一性百分比计算。

[0291] 或者, 可使用以下程序和参数: 程序: Align Plus 4, 版本4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite)。DNA比较: 全局比较, 标准线性评分矩阵, 错配罚分=2, 空位罚分=4, 延伸空位罚分=1。氨基酸比较: 全局比较, BLOSUM 62评分矩阵。

[0292] 所述或给定序列的变体也包括在本发明的范围内, 只要该变体保留了亲本的功能活性, 即该变体是功能上等效的, 换句话说, 它们具有或表现出如本文所定义的亲本肽的活性。此类变体可包含亲本序列的氨基酸取代、添加或缺失 (包括在一端或两端的截短)。

[0293] 还包括功能上等效的衍生物, 其中一种或多种氨基酸是化学衍生的, 例如被化学基团取代。给定氨基酸序列的“变体”旨在意指可以改变例如一个或两个氨基酸残基的侧链 (例如通过用另一种天然存在的氨基酸的侧链或一些其他侧链取代它们), 以使该肽保留其所衍生的亲本肽的功能活性。

[0294] 变体可涉及用选自丙氨酸, 精氨酸, 天冬酰胺, 天冬氨酸, 半胱氨酸, 谷氨酸, 谷氨酰胺, 甘氨酸, 组氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 蛋氨酸, 苯丙氨酸, 脯氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 色氨酸, 酪氨酸和缬氨酸的残基中的一种或多种置换氨基酸残基。

[0295] 这样的变体可以产生于同源取代, 即类似的/保守的取代, 例如碱性对碱性取代, 酸性对酸性取代, 极性对极性取代等。也可以发生非同源取代, 即从一类残基到另一类残基或者涉及包括非天然氨基酸, 如鸟氨酸, 二氨基丁酸, 正亮氨酸, 吡啶基丙氨酸, 噻吩基丙氨酸, 萘基丙氨酸和苯基甘氨酸。

[0296] 取代可以是保守取代。如本文所用,“保守取代”是指在给定位置改变氨基酸同一性以用具有近似相等的大小、电荷和/或极性的氨基酸代替。氨基酸的自然保守取代的实例包括以下8种取代基(由常规的一个字母代码表示):(1)M,I,L,V;(2)F,Y,W;(3)K,R,(4)A,G;(5)S,T;(6)Q,N;(7)E,D;和(8)C,S。还包括功能等效的衍生物,其中一个或多个氨基酸是化学衍生的,例如被化学基团取代。可以通过在肽合成之前或之后使特定氨基酸反应来化学修饰功能等效的衍生物。实例是本领域已知的,例如,如R.Lundblad,Chemical Reagents for Protein Modification,第三版,CRC Press,2004(Lundblad,2004中所述。氨基酸的化学修饰包括但不限于通过酰化,酰胺化,赖氨酸的吡啶氧化,还原性烷基化,氨基用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)的三硝基苯磺酸化,羧基的酰胺修饰和半胱氨酸的过高甲酸氧化为半胱氨酸的巯基修饰,汞衍生物的形成,与其他硫醇化合物的混合二硫化物的形成,与马来酰亚胺的反应,与碘乙酸或碘乙酰胺的羧甲基化以及在碱性条件下与氰酸酯的氨基甲酰基化pH,尽管不限于此。

[0297] 本发明的肽可包含8至30个氨基酸,例如8至25个氨基酸,8至20个氨基酸,8至15个氨基酸或8至12个氨基酸。一方面,本发明的肽因此可以是长度为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。

[0298] 出于实践目的,存在该肽可显示的多种其他特征。例如,重要的是该肽在体内足够稳定而是治疗上有用的。肽在体内的半衰期可以是至少10分钟,30分钟,4小时或24小时。

[0299] 该肽还可以在体内表现出良好的生物利用度。该肽可以在体内维持构型,使其能够在细胞表面结合MHC分子而没有预期的阻碍(due hindrance)。

[0300] 在一个实施方案中,肽可以包含可改善或优化该肽的成药性的任何氨基酸,例如天然或人工氨基酸可以改善肽的溶解性。适当的修饰对于本领域技术人员将是已知的。例如参考WO 2015/019302和WO2014/072958。

[0301] 例如,该肽可以具有下式:

[0302] KKG/KKK-髓磷脂衍生肽-GKK/KKK

[0303] 肽可以是组合物形式,优选药物组合物形式。

[0304] 可以将肽以中性或盐形式配制成组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(由肽的游离氨基形成),并由无机酸例如,比如盐酸或磷酸,或此类有机酸例如乙酸,草酸,酒石酸和马来酸形成。由游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如,比如钠,钾,铵,钙或铁的氢氧化物,以及有机碱例如异丙胺,三甲胺,2-乙基氨基乙醇,组氨酸和普鲁卡因。

[0305] 或者(或另外地),如果药物组合物(或其任何部分)将以多剂量施用,则每个剂量可以分开包装。

[0306] 另外,在本发明的药物组合物中,可以将该肽或每种肽与任何合适的粘合剂,润滑剂,悬浮剂,包衣剂或增溶剂混合。

[0307] 制剂

[0308] 如本文所述的根据本发明的组合物可以或是作为液体溶液或是悬浮液的可注射形式制备;还可以制备适合于在注射之前溶解或悬浮在液体中的固体形式。制剂也可以被乳化,或将肽包封在脂质体中。肽可以可替代地被包封在载体中或结合至载体例如纳米颗粒的表面。可以将活性成分与药学上可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂是例如水,盐水(例如磷酸盐缓冲盐水),右旋糖,甘油,乙醇等,以及它们的组合。

[0309] 另外,如果需要,该组合物可以含有少量的辅助物质,例如湿润剂或乳化剂和/或pH缓冲剂。缓冲盐包括磷酸盐,柠檬酸盐,乙酸盐。盐酸和/或氢氧化钠可用于pH调节。为了稳定,可以使用二糖,例如蔗糖或海藻糖。

[0310] 在组合物中,肽的相对比例可以为约1:1。或者,例如,如果发现在特定的HLA类型中一种肽比其他肽更好地起作用,则可以改变每种肽的相对比率。

[0311] 配制后,可以将肽或组合物掺入无菌容器中,然后将其密封并在低温例如4℃下储存,或者可以将其冷冻干燥。

[0312] 方便地,将组合物制备成冻干的(冷冻干燥的)粉末。冻干允许以稳定形式长期保存。冻干程序是本领域众所周知的,参见例如<http://www.device-link.com/ivdt/archive/97/01/006.html>。通常在冷冻干燥之前使用膨胀剂,例如甘露醇,右旋糖酐或甘氨酸。

[0313] 肽或组合物可以以方便的方式施用,例如通过口服,静脉内(当水溶性时),肌内,皮下,舌下,鼻内,皮内或栓剂途径或植入(例如使用缓释分子)。

[0314] 肽或组合物可以有利地通过鼻内,皮下或皮内途径施用。在一个优选的实施方案中,施用是皮内的。

[0315] 如本文所述的肽或组合物通常以“有效量”施用,即有效地引发任何一种或多种尤其是(inter alia)治疗效果或预防效果的量。通过常规实验,本领域技术人员将能够确定有效的无毒量,以包括在药物组合物中或为了达到期望的结果而施用。通常,如本文公开的肽或组合物可以以与施用途和接受者的身体特征(包括健康状况)兼容的方式并以引发期望的作用(即治疗有效的和/或预防性的)的方式施用。例如,组合物的合适剂量可以取决于多种因素,包括但不限于受试者的身体特征(例如年龄,体重,性别),以及本领域技术人员可以认识到的其他因素。Gennaro(*The Science and Practice of Pharmacy*”,第20版, Lippincott, Williams, & Wilkins; 和 Gilman 等(编), (1990), “Goodman And Gilman’s: The Pharmacological Bases of Therapeutics”, Pergamon Press) 讨论了在确定比如组合物的适当剂量时会考虑的一般考量的其他说明性例子。

[0316] 试剂盒

[0317] 方便地,根据本发明的肽,例如SEQ ID No.1、2、3和/或4的四种MBP肽可以混合组合物或混合物的形式一起施用。但是,会存在这样的情况,其中优选以试剂盒的形式分开提供肽,以便同时、分开、顺序或联合施用。

[0318] 例如,试剂盒可以在分开的容器或两个容器中包含肽,例如SEQ ID No.1、2、3和4的四种肽,每个容器包含两种肽。容器内的内容物在施用前可以合并也可以不合并。

[0319] 试剂盒还可包含混合和/或施用手段(means)(例如用于鼻内施用的蒸发器;或用于皮下/皮内给药的注射器和针头)。试剂盒还可包含使用说明书。

[0320] 在不脱离本发明的范围和精神的情况下,所描述的发明的各种修改和变化对本领域技术人员将是显而易见的。尽管已经结合特定的优选实施例描述了本发明,但是应当理解,所要求保护的本发明不应不适当地限制于这样的特定实施方案。实际上,对于化学或生物学或相关领域的技术人员来说显而易见的是,所描述的用于实施本发明的方式的各种修改被本发明涵盖。以上说明书中提及的所有出版物均通过引用并入本文。

实施例

[0321] 实施例1-在具有复发性多发性硬化症的受试者中的ATX-MS-1467的安全性和对免疫耐受的影响

[0322] 进行了开放标签,单臂概念验证试验,以评估在具有复发性多发性硬化症的受试者中的ATX-MS-1467 (MSC2358825A) 的安全性及其对免疫耐受的影响。

[0323] 研究者/研究中心:

[0324] 这项临床研究共在8个研究中心进行;俄罗斯7个中心,拉脱维亚1个中心。协调调查员是Natalia N.Maslova,医学博士。

[0325] 研究期限(年):

[0326] 2014年2月5日(第一名受试者筛选)至2016年4月11日(最后一名受试者最后一次访视)

[0327] 发展阶段:

[0328] IIa

[0329] 目标:

[0330] 该研究的主要目标是评估与具有复发性多发性硬化症 (MS) 的受试者中基线对照期停止治疗 (Baseline Control Period off treatment) 相比,ATX-MS-1467对1.5tesla (T) 磁共振成像 (MRI) 参数的作用,所述ATX-MS-1467每2周(每两周一次)皮内施用(ID),滴定至800µg剂量,持续总共20周的总周期。

[0331] 研究的次要目标是:

[0332] • 评估ATX-MS-1467对其他MRI参数的作用,所述ATX-MS-1467是ID施用、每两周一次滴定至800µg剂量,持续总共20周

[0333] • 评估ATX-MS-1467对临床参数的作用,所述ATX-MS-1467是ID施用、每两周一次滴定至800µg剂量,持续总共20周

[0334] • 评估ATX-MS-1467的安全性,所述ATX-MS-1467是ID施用的,每两周一次滴定至800µg的剂量,持续总共20周。

[0335] 该研究的探索性目标是:

[0336] • 在停止治疗后的16周随访期内,评估ATX-MS-1467对应答者的MRI参数的任何作用的维持

[0337] • 探索随着时间的推移,治疗对外周血和CSF中疾病标志物(例如寡克隆带[OCB],免疫球蛋白G[IgG]指数,脱髓鞘)的作用

[0338] • 探索随着时间的推移,ATX-MS-1467的免疫原性(基于血清抗肽抗体水平)。

[0339] 方法:

[0340] 这是一项针对患有复发性MS的受试者的多中心、开放标签、IIa期研究。该研究由5期组成;受试者在研究中停留48周。

[0341] 筛选期(4周):在进入基线对照期之前,对受试者进行筛选以建立其初始资格。要求受试者在访视2进行他们首次MRI扫描前至少30天已完成用皮质类固醇进行的任何先前治疗。在访视1接受任何其他未经许可的MS治疗的受试者在被确认他们具有人类白细胞抗原(HLA) DRB1*15基因型后尽快停用所有此类药物,并基于他们的访视2MRI扫描而对该研究是有资格的。

[0342] 基线对照期(8周/3次访视): HLA阳性的受试者进行3次脑MRI扫描(连续两次扫描之间的最小间隔为28天),以基于MRI活动的程度确定其资格。在确认受试者关于MRI标准的资格后,受试者可以进行可选的腰椎穿刺以收集脑脊液(CSF)。在基线对照期内,受试者未接受MS治疗。

[0343] 滴定期(4周/3次访视): 在基线对照期结束后,有资格的受试者进入滴定期,在此期间,按照以下时间表,每两周一次ATX-MS-1467 ID从起始剂量(50 μ g)滴定至最大剂量(800 μ g):

[0344] • 第1天: ATX-MS-1467 50 μ g ID

[0345] • 第15天: ATX-MS-1467 200 μ g ID

[0346] • 第29天: ATX-MS-1467 800 μ g ID。

[0347] 治疗期(16周/8次访视): 在治疗期期间,受试者接受ATX-MS-1467 800 μ g ID的每两周给药,持续16周,并参加研究访视,以2周间隔进行给药和安全性评估;在治疗期期间,还进行3次其他临床评估,包括MRI扫描。

[0348] 随访期(16周/4次访视): 在完成治疗期后,受试者进入16周的随访期。在此期间,受试者保持停止研究治疗,并评估了任何治疗效果的维持。在随访期期间,进行3次MRI扫描。

[0349] 过早退出ATX-MS-1467治疗的受试者(即在滴定或治疗期期间退出的受试者)进入8周的安全随访期(两次访视)。

[0350] 受试者数量:

[0351] 计划至少有15名可评估受试者参与研究。

[0352] 总共筛选了参与研究的93名受试者,其中研究招募了37名(39.8%)受试者以开始基线对照期。有19名受试者进入并完成了滴定期并进入了治疗期。治疗的所有19名受试者均纳入意向治疗(ITT),改良ITT(mITT)和安全性分析集。

[0353] 诊断和纳入的主要标准:

[0354] 包括以下的18至65岁(含)的男性和女性门诊患者有资格参加研究:根据麦当劳诊断标准(McDonald diagnostic criteria) (2010),患有复发缓解型MS(RRMS)或继发性进展型MS(SPMS),具有最近MS活动的临床证据,在访视2时至少1次MRI造影增强病变(contrast-enhanced lesion) (CEL)以及从访视2到访视4至少存在1个新的CEL。在开始研究治疗之前,受试者必须具有0到5.5之间的扩展失能状态量表(Expanded Disability Status Scale, EDSS)评分,HLA DRB1*15阳性并且在神经学上稳定。在治疗前访视时,如果受试者有原发性进展型MS,阻止施用钆(Gd)的肾状况,淋巴细胞计数<500/ μ L或中性粒细胞计数<1500/ μ L,或者阻止参与该研究的其他潜在医学状况,则他们没有资格进行该研究。

[0355] 在研究第1天之前的8周内,以前用 β -干扰素,血浆置换或静脉丙种球蛋白治疗;进行访视2MRI扫描前30天内的类固醇或促肾上腺皮质激素;或用于治疗MS的醋酸格拉替雷,细胞毒剂,芬戈莫德(fingolimod),拉喹莫德(laquinimod),特立氟胺(teriflunomide),总淋巴样照射,干细胞或骨髓移植,单克隆抗体疗法,富马酸二甲酯,地瑞考肽(dirucotide),任何与疾病相关的T细胞疫苗或多肽耐受剂被禁止。

[0356] 测试产品:剂量和施用方式,批号:

[0357] 研究药物产品为ATX-MS-1467,并且每两周一次ID施用,持续共20周,起始剂量50 μ

g,并在4周内滴定至最终剂量800μg。

[0358] 可根据要求提供单个批号。

[0359] 治疗持续时间:

[0360] 从访视1到访视19,参加研究的最大持续时间为48周。研究治疗的持续时间为20周。

[0361] 评估标准:

[0362] 功效:

[0363] 主要终点是最近3次治疗扫描(第12、16和20周)的T1 CEL平均数量与3次基线扫描(访视2、3和4)的T1 CEL平均数量相比的变化。

[0364] 次要端点包括以下:

[0365] • MRI

[0366] • 每次计划的基线后MRI访视时T1 CEL的总数

[0367] • 每次计划的基线后MRI访视时,T1 CEL总数与基线(3次基线扫描的平均值,访视2、3和4)相比的变化

[0368] • 每次计划的基线后MRI访视时,T1 CEL的总体积与基线(3次基线扫描的平均值,访视2、3和4)相比的变化

[0369] • 每次计划的基线后MRI访视时新发或新扩大的T2病变总数

[0370] • 每次计划的基线后MRI访问时,T1 CEL总数与访视4相比的变化

[0371] • 每次计划的基线后MRI访视时,T1 CEL的总体积与访视4相比的变化。

[0372] • 临床

[0373] • 第20周的平均年度复发率(ARR)

[0374] • 第一次复发的时间

[0375] • 第20周的总EDSS评分与基线相比的变化

[0376] • 第20周的总多发性硬化症功能综合(MSFC)评分与基线相比的变化。

[0377] 还考虑了以下探索性终点:

[0378] • 在应答者亚组中,第28和36周停止治疗后,ATX-MS-1467对MRI参数的作用的维持

[0379] • 第11、20和24周的血清抗肽抗体水平

[0380] 安全性:

[0381] 安全端点包括以下:

[0382] • 治疗紧急不良事件(treatment-emergent adverse event)(TEAE)的性质、频率和严重性

[0383] • 注射部位反应的频率和严重性

[0384] • 生命体征测量,体格检查结果,临床实验室变量,心电图以及研究中提前终止的频率和时机。

[0385] 统计方法:

[0386] 本研究的样本量基于3个假设:(1)与3次基线扫描的平均CEL数量相比,CEL数量减少70%的治疗效果;(2)基线时CEL的平均数为5,标准差(SD)为6;和(3)治疗后阶段期间(第24至36周)的平均CEL值为1.5,SD为1.8。使用2侧5%水平,>80%和>90%的模拟研究分别在

12名和14名受试者的样本量下显示了统计学上显著的结果。因此,选择了15名受试者的样本量。

[0387] 主要终点和次要终点的分析基于mITT人群,但使用应答者人群进行的反应性维持评估和基于安全人群的安全性分析除外。应答者定义为在第20周时T1 Gd增强病变的数量(在第12、16和20周最后3次治疗扫描的平均值)相对于基线(访视2、3和4时3次基线扫描的平均值)降低了 $\geq 60\%$ 的那些受试者。

[0388] 使用非参数Wilcoxon符号秩检验对主要终点进行分析,以基于符号秩统计量的精确分布(其中该分布是按比例的二项式分布的卷积),对由于治疗效果而导致的位置偏移进行检验。使用具有负二项式和泊松关联函数的广义估计方程(GEE)线性回归模型,进行了支持性分析,以评估治疗期新T1 Gd增强病变相对于基线对照期的平均减少百分比。

[0389] 基于新的T1 Gd增强病变,进行了用于主要疗效终点的相同非参数程序。在mITT分析集的每次适用的访视中,显示用于次要终点的描述性统计数据。

[0390] 使用观察数,均值,SD,95%置信区间(CI),中位数,最小值和最大值描述性地总结连续变量。使用频率计数和百分比汇总分类变量。时间对事件变量表示为Kaplan Meier图,中位数和95%CI。

[0391] 总结和结论:

[0392] 受试者安置:

[0393] 共筛选了参加研究的93名受试者;招募了37名(39.8%)受试者。十九名(51.4%)受试者进入并完成滴定期,十八名(48.6%)受试者完成治疗期。一名受试者(2.7%)由于腹泻的不良事件(AE)而中止了研究药物产品(investigational medicinal product)(IMP)。第二名受试者(2.7%)在完成治疗期后撤回了同意书。所有19名有资格的受试者都包括在ITT,mITT和安全性分析集中。应答者分析集中包括7名受试者,他们在第20周时表现出T1 Gd增强病变的数量相比基线减少了 $\geq 60\%$ 。

[0394] 人口统计特征和基线特征:

[0395] 研究中受试者的平均年龄为27.1岁(范围19至38岁),大多数受试者<30岁年龄(73.7%)。大多数受试者为女性(78.9%)并且所有受试者均为白人。所有19名受试者均诊断为RRMS,大多数受试者(89.5%)报道在访视2之前的24个月内复发1至2次。基线时EDSS评分中位数为2.00(范围1.5至3.5)。根据国家多发性硬化症协会(National Multiple Sclerosis Society,NMSS)参考人群,基线MSFC评分中位数为0.470(范围-0.95至1.21)。T1 Gd增强病变的平均数量和体积分别为7.4(范围1至31)和0.838mL(范围0.05至3.65mL)。

[0396] 功效结果:

[0397] 根据使用mITT分析集进行的非参数分析,治疗时(第12、16和20周),T1 Gd增强病变的平均数与基线相比有统计学上的显著下降($p=0.0143$)。Hodges-Lehmann估计的位置偏移(95%CI)为-1.3(-6.3,0.0)。同样,新的T1 Gd增强病变的平均数有统计学上的显著下降($p=0.0106$)。Hodges-Lehmann估计的位置偏移(95%CI)为-1.3(-5.7,0.0)。新的T1 Gd增强病变的支持性分析结果与初步分析一致。

[0398] 在所有给药后评估中,注意到平均T1 Gd增强病变计数和体积均比基线有数值减少。基线处的平均病变数为7.4(范围1至31),并且病变计数从基线的平均变化范围为-4.6至-1.6。基线处的平均病变体积为0.838mL(范围0.05至3.65mL),并且病变体积从基线的平

均变化范围为-0.579至-0.225mL。相似地,注意到从第0周到每次给药后评估,平均T1 Gd增强病变和体积的数值减少。病变计数从第0周的平均变化范围为-3.5至-0.9,并且病变体积从第0周的平均变化范围为-0.473至-0.157mL。从研究的第12周(1.5)到研究结束,新的T1 Gd增强病变的中位数相似(从第28周的0.0到研究结束的2.0)。新的/扩大的T2病变的中位数从第12周的8.0(范围0至89)减少到第16周的1.0(范围0至20),并且在随后的访视中,中位计数的范围从1.0至3.0。

[0399] 在研究治疗期间,3名(15.8%)受试者发生了单次复发;其余16名受试者在治疗期间未报道复发。估计的平均ARR为2.60。对于这3名受试者,复发的发作发生在第50、59和89天,并且Kaplan-Meier估计未经历复发的概率从第4周的1.00减少到第20周的0.84。

[0400] EDSS评分从基线到治疗结束访视时的变化不是统计学显著的。相似地,当使用来自NMSS工作队数据库(NMSS Task Force Database)的值作为参照时,MSFC评分从基线到治疗结束访视时的变化虽然不是统计学显著的,但显示出强烈的改善趋势。

[0401] 安全结果:

[0402] 总体而言,在研究进行期间,78.9%的受试者报道了至少1种TEAE;57.9%的受试者的TEAE被评估为与IMP有关。最频繁报道的TEAE是注射部位红斑(26.3%),头痛(21.1%)和鼻咽炎(15.8%)。

[0403] 没有报道死亡,严重TEAE或严重强度的TEAE。一名受试者由于腹泻的TEAE中断了IMP,腹泻持续时间延长并且强度评估为中度且与IMP有关。

[0404] 从IMP开始起,大多数受试者的TEAE发作<26天。

[0405] 在研究期间,所有注射部位反应(受试者的36.8%)为轻度强度,并且最频繁报道的症状是红斑、瘙痒和硬结。

[0406] 在研究期间,三名受试者具有 $\geq 7\%$ 的体重减少;另外,临床实验室、生命体征或心电图参数没有临床相关的变化。

[0407] 结论:

[0408] 基于非参数Wilcoxon符号秩和检验,与基线对照期间相比,治疗期间T1Gd增强病变的中位数减少是统计学显著的($p=0.0143$)。Hodges-Lehmann估计的位置偏移(95%CI)为-1.3(-6.3,0.0)。

[0409] 使用负二项式和Poisson GEE模型进行的支持性分析得出了一致的发现。与基线对照期相比,治疗期间新的T1 Gd增强病变的平均减少百分比是统计学显著的(p 值=0.0109)。使用负二项式模型进行的GEE估计的平均减少百分比(95%CI)为38.4%(10.6%, 57.6%)。

[0410] 注意到在所有给药后评估中从基线和第0周起的平均T1 Gd增强病变数和体积的数值减少。

[0411] 新的/扩大的T2病变的中位数从第12周的8.0减少至第16周的1.0,在随后的访视中范围为1.0至3.0。

[0412] 在研究期间,很少有受试者(15.8%)经历复发。Kaplan-Meier估计到20周未经历复发的概率为0.84。

[0413] 注意到从基线到治疗结束访视,EDSS或MSFC评分均无统计学上的显著变化,但是MSFC有强烈改善的趋势($P=0.0542$)。

[0414] 然后,使用Wilcoxon匹配对的符号秩检验进一步分析如上所述作为第二端点获得的MSFC结果。发现认知的显著改善 ($P=0.010$) 支持使用MSFC评分测量的总体失能减少的强烈趋势。这些结果如图2所示。仅在6个月后就看到任何改善是非常不寻常的。

[0415] 每两周施用ATX-MS-1467 800 μ g ID治疗后,未识别出安全性或耐受性问题。

[0416] 实施例2-用ATX-MS-1467处理持续触发IL-10,但不触发促炎性细胞因子释放

[0417] 方法

[0418] 这些研究使用双转基因杂合小鼠,在此称为DR2/Ob1Het/Het。这些小鼠在小鼠主要组织相容性 (MCH)-II启动子下表达人白细胞抗原 (HLA) 亚型DRA*0101和DRB1*1501,并且在小鼠TCR α 和 β 启动子/增强子元件下表达MBP84-102特异性TCR (Ob.1A12)。

[0419] 通过单次或多次皮下 (sc) 注射100 μ g的ATX-MS-1467或25 μ g与EAE不相关的HLA结合蛋白 (HLA β p) 和/或30-1000 μ g髓磷脂碱性蛋白 (MBP, Sigma, M1891) 来处理 and/或攻击DR2/Ob1Het/Het小鼠。研究之间和研究组之间的处理范例有所不同 (参见每项研究的具体内容)。遵循每周3次方案,用ATX-MS-1467或用HLA β p进行慢性处理。

[0420] 使用Milliplex MAP小鼠细胞因子/趋化因子磁性试剂盒 (MCYTOMAG-70-PMX), 在不同时间点量化DR2/Ob1Het/Het小鼠血清中的细胞因子水平。为简单起见,图4中仅显示了四种代表性细胞因子。

[0421] 在MACSQuant分析仪中评估白细胞激活基因3 (Lag3) 表达,该分析仪在DR2/Ob1Het/Het小鼠的CD4 $^{+}$ 脾淋巴细胞上设门控,该小鼠已用含脊髓匀浆 (SCH) /完全弗氏佐剂 (CFA) 的乳剂免疫并在免疫后4-14天之间使用ATX-MS-1467 (100 μ g, 3x/周) 或是媒介物处理。

[0422] 结果

[0423] 发现用MBP (图4) 或ATX-MS-1467 (图5) 对DR2/Ob1Het/Het小鼠的急性处理诱导血液中促炎细胞因子和抗炎细胞因子两者的分泌。

[0424] 图5还显示细胞因子的释放是短暂的,在2h达到峰值,并在处理后4-24恢复至基线值。

[0425] 这些数据表明,在DR2/Ob1Het/Het小鼠中有一组T细胞准备与MBP以及与ATX-MS-1467中存在的至少一种肽序列反应。

[0426] 单次注射ATX-MS-1467诱导血液中IL-2, IL-17和IFN- γ 的分泌,但随后的给药 (3次/周) 使促炎性细胞因子的释放降低。相反,即使重复给药,ATX-MS-1467继续诱导抗炎细胞因子IL-10的分泌。

[0427] 如图7所示,与接受急性处理的小鼠的反应相比,在接受慢性处理的小鼠中经过长达21天的洗出期之后,经过新的ATX-MS-1467攻击后的细胞因子分泌很小。然而,在3周的洗出组点,IL-2和IFN- γ 有统计学上显著的释放,揭示出少量但显著的耐受性丧失。

[0428] 图7表明ATX-1467的延长的耐受作用。在图8中,在小鼠接受ATX-MS-1467的慢性处理后,用全长MBP对它们进行攻击,然后进行持续2至42天的洗出期。用ATX-MS-1467进行慢性处理后用全长MBP进行攻击也显示出对MBP的耐受作用,即使在长达6周的洗出期后进行了攻击。用与MBP无关的HLA结合蛋白替代ATX-MS-1467不能诱导耐受,证明了该作用的抗原特异性。

[0429] Lag3是已知与MHC-II相互作用的细胞表面分子,在T淋巴细胞中充当内在的抑制

性分子,以在IL-10分泌的诱导型Treg群体中表达,并在耐受表达中发挥作用。表达Lag3的CD4⁺脾淋巴细胞的频率增加(图9),以及先前关于从用ATX-MS-1467处理的小鼠脾细胞培养物的IL-10分泌增加的证明提示Tregs诱导是ATX-MS-1467的可能作用机理。

[0430] 结论

[0431] 数据显示,使用ATX-MS-1467进行慢性处理将血液中的细胞因子反应转变为持久的耐受状态。

[0432] 这种状态的特征是低或几乎没有促炎性细胞因子释放的模式,只是在抗原特异性攻击后有可检测的IL-10产生。

[0433] 可以合理预期,带有表位序列(由该处理耐受的)中所包含的特异性的T细胞一旦暴露于CNS中的同源抗原,表现出相似的细胞因子分泌模式,从而突出了有益的治疗意义。

[0434] 实施例3-ATX-MS-1467停止疾病进展并减少中枢神经系统炎症

[0435] 方法

[0436] 在Lewis大鼠中,在第0天使用ATX-MS-1467和完全弗氏佐剂(CFA)的乳化诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)。在第0和第2天,大鼠还接受了百日咳毒素注射。

[0437] 在双转基因(DTg;人HLA-DR15/MBP特异性T细胞受体)“人源化”小鼠中,第0天使用脊髓匀浆(SCH)和CFA的乳化诱导EAE。小鼠也在第0天和第2天接受了百日咳毒素注射。

[0438] 在整个研究过程中,使用标准的临床评分量表对神经缺损进行测量:0=无临床体征,1=尾无力,2=正位平衡受损(impaired righting reflex),3=后肢部分麻痹(paralysis),4=后肢完全麻痹,5=垂死/死亡。

[0439] 如果动物达到评分为4,将它们安乐死以达到人道终点。

[0440] 在EAE诱导前3周开始,用皮下(sc)磷酸盐缓冲盐水(PBS)媒介物或ATX-MS-1467(每个处理组n=10)预防性处理大鼠。用皮下媒介物,ATX-MS-1467,MBP82-98(地瑞考肽(dirucotide))或醋酸格拉替雷(GA[Copaxone®,Teva Neuroscience,Inc.,North Wales,PA,USA];每个处理组n=9-10)]进行预防性处理(从诱导之日开始)或治疗性(从诱导后7天开始)处理。

[0441] ATX-MS-1467与MBP82-98和GA一起进行了测试。MBP82-98是与MBP相同的17个氨基酸的合成肽,并且GA是MBP中发现的四个氨基酸的无规聚合物。对于这两种化合物,基于体表面积计算人体等效剂量(HED):MBP82-98=12μg/剂量,GA=75μg(3.75mg/kg)/剂量。

[0442] 为了研究作用机理,使用多色流式细胞术检查从第0天开始以媒介物或ATX-MS-1467(100μg/一次/周)给药的DTg EAE小鼠的样品中的细胞浸润。在疾病峰值(每个处理组n=6)期间在第15天将小鼠安乐死并收集脊髓/大脑用于分析。简而言之,在排除双态和死细胞(碘化丙锭染色)后,巨噬细胞通过高和低CD11b的表达水平分别与小胶质细胞(CD11b⁺和CD45⁺两者)区分开。使用CD19(B细胞),CD4和CD8标记(T细胞)定义淋巴细胞亚群(GR1⁻)。

[0443] 使用Kruskal-Wallis和Dunn的事后比较分析,进行随时间推移的处理的临床评分和累积临床评分(曲线下面积)显著差异的统计分析。通过Kaplan-Meier曲线分析疾病发作,并使用对数秩(Mantel-Cox)检验确定显著性。通过学生t检验对细胞的脑浸润液进行分析。统计显著性被认为是*p,0.05,*p,0.01和***p,0.001。

[0444] 结果

[0445] 从EAE诱导前3周开始,每周一次或每周三次或用媒介物或用ATX-MS-1467(100μg/

剂量,sc)处理Lewis大鼠(每组n=10)。与媒介物处理相比,每周三次用ATX-MS-1467给药显著降低疾病严重性(图10A)。另外,与媒介物相比,每周三次用ATX-MS-1467给药的大鼠的疾病发作显著延迟(图10B)。

[0446] EAE的DTg人源化小鼠模型

[0447] 在DTg人源化小鼠中用ATX-MS-1467 (100 μ g/剂量,sc)进行预处理(从免疫当天开始,第0天)或治疗性给药(从免疫后第7天开始)降低SCH诱导的EAE。与媒介物处理的对照相比,每周两次ATX-MS-1467处理显著降低疾病严重性(图11A)。

[0448] 与媒介物相比,每周两次用ATX-MS-1467的处理也显著降低疾病的严重性,即使处理是在发展第一次麻痹迹象后开始(图11B)。

[0449] 与媒介物处理相比,每周一次用ATX-MS-1467 (100 μ g/剂量,sc)显著降低疾病的严重性,但是用MBP82-98进行的相同的给药方案(12 μ g或100 μ g/剂量)在这项研究中并未显示出显著的作用(图12A,12B)。

[0450] 在一项单独研究中,与每日或用媒介物或用GA按计算的HED (75 μ g/剂;图12C,12D)处理相比,从第0天开始,每周两次用ATX-MS-1467 (100 μ g/小鼠,sc)处理显著降低疾病严重性。

[0451] 从免疫当天(第0天)开始,用ATX-MS-1467 (每周一次,100 μ g/剂量)的处理降低EAE诱导的中枢神经系统(CNS)炎性细胞浸润,这与临床评分降低相关联(图13A)。

[0452] 在第15天,将小鼠安乐死,并使用彩色流式细胞术收集脑和脊髓用于脑浸润分析。与媒介物处理的小鼠相比,用ATX-MS-1467处理的小鼠中的巨噬细胞,T细胞和B细胞的数量显著减少(图13B至13E)。

[0453] 实施例4-ATX-MS-1467减轻多发性硬化症小鼠模型中的病理变化并抑制细胞因子的产生

[0454] 方法

[0455] 疾病诱导

[0456] 通过皮下注射含有同基因(syngeneic)脊髓匀浆(SCH)的佐剂乳液,在DR2/Oblhet/het小鼠中诱导疾病。临床失能以主观0-5量表测量。

[0457] 处理

[0458] 根据研究,从免疫后0、7或14天(dpi)开始,以3、10、30或100 μ g/小鼠3次/周皮下注射ATX-MS-1467。

[0459] 组织学分析

[0460] 对于每只小鼠,通过苏木精和曙红(H&E)对10个脊髓切片进行染色用于炎症,或通过Luxol固蓝(LFB)染色分别用于髓磷脂含量评估,或用于针对CD3和CD45R的免疫反应性,T或B细胞的免疫反应性。扫描切片(Nanozoomer 2.0HT)并以盲法(blinded fashion)进行半定量分析。对于HE,CD3和CD45B染色应用相似量表,只是目的细胞或是苏木精染色的核,CD3+或CD45+细胞。H&E,CD3和CD45B量表:0=无免疫细胞浸润,1=免疫细胞内衬脑膜,2=+血管周围细胞,3=+小型多灶性白质(WM)浸润,4=+多个且广泛的WM浸润,5=灰质浸润。对于脱髓鞘,分别对背,腹,右和左侧WM评分,然后将数值相加。LFB评分:0(无脱髓鞘),0.5(脱髓鞘面积(DA) $\leq$ 10%),1(>10%DA $\leq$ 20%),2(>20%DA $\leq$ 40%),3(>40%DA $\leq$ 40%),3(>40%DA $\leq$ 40%),3(>40%DA $\leq$ 60%),4(>40%DA $\leq$ 80%),5(>80%DA $\leq$ 100%)。

[0461] 磁共振成像

[0462] 常规的T1加权钆增强 (Gd+) 和T2加权多层面MRI序列分别用来检查ATX-MS-1467对血脑屏障 (BBB) 渗漏和病变发展的作用。Gd+注射后10分钟内评估BBB渗漏;使用较晚的时间点并不表示进一步增强。

[0463] 脾细胞培养

[0464] 收集从dpi0-dpi7每周3次注射ATX-MS-1467或磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 的SCH免疫的小鼠的脾细胞,并在ATX-MS-1467存在下刺激48或72小时 (h),此时收集上清液以通过ELISA进行细胞因子定量。通过用3H-胸苷溶液部分替换上清液,后培养8h,然后定量细胞中的放射性来评估细胞增殖。

[0465] 结果

[0466] 参见图14至20。发现在DR2/Ob1het/het小鼠中,用ATX-MS-1467处理剂量依赖性地抑制SCH诱导的EAE的严重性和/或防止其发作。这些作用与中枢神经系统 (CNS) 中促炎细胞因子浓度降低相关联。

[0467] 即使在疾病高峰后启动处理,仍观察到ATX-MS-1467的治疗作用,并通过脊髓的病理学分析证实了ATX-MS-1467的治疗作用用于评估炎症,T细胞和B细胞浸润以及髓磷脂损害。

[0468] 如通过T1加权Gd+MRI测量,ATX-MS-1467的预防性处理预防MS人源化模型中的BBB渗漏。

[0469] MRI读数和数据与人类的Phase1b数据一致,表明此类临床前终点可以为临床研究提供预测信息。

[0470] 来自ATX-MS-1467处理的小鼠脾细胞的细胞增殖和细胞因子分泌数据表明,其作用机理可能涉及增加的抗炎细胞因子IL-10的合成以及IL-2和IFN- γ 合成的抑制。

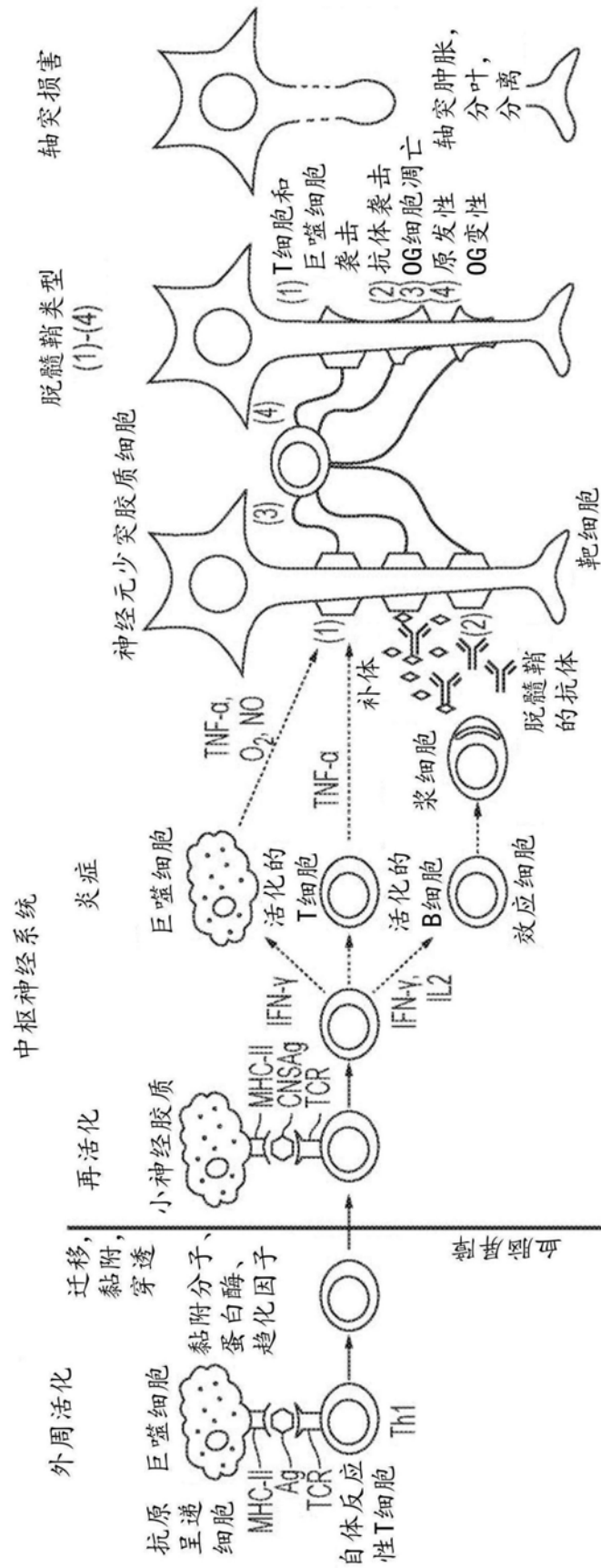


图1

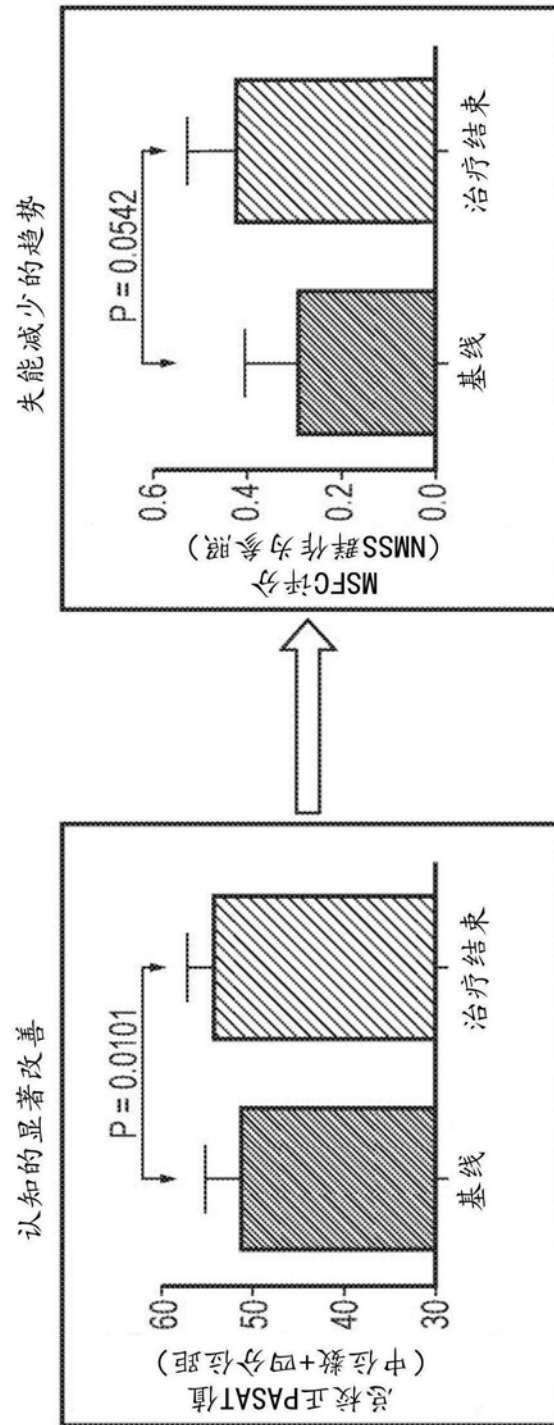


图2

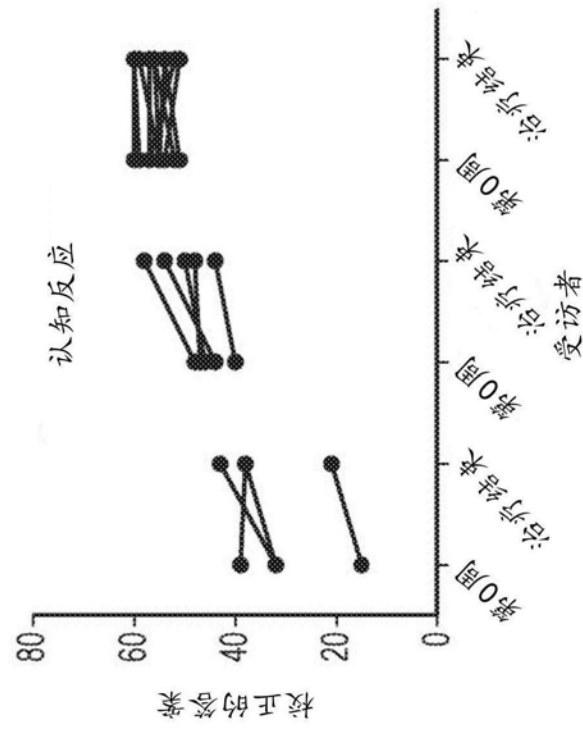


图3

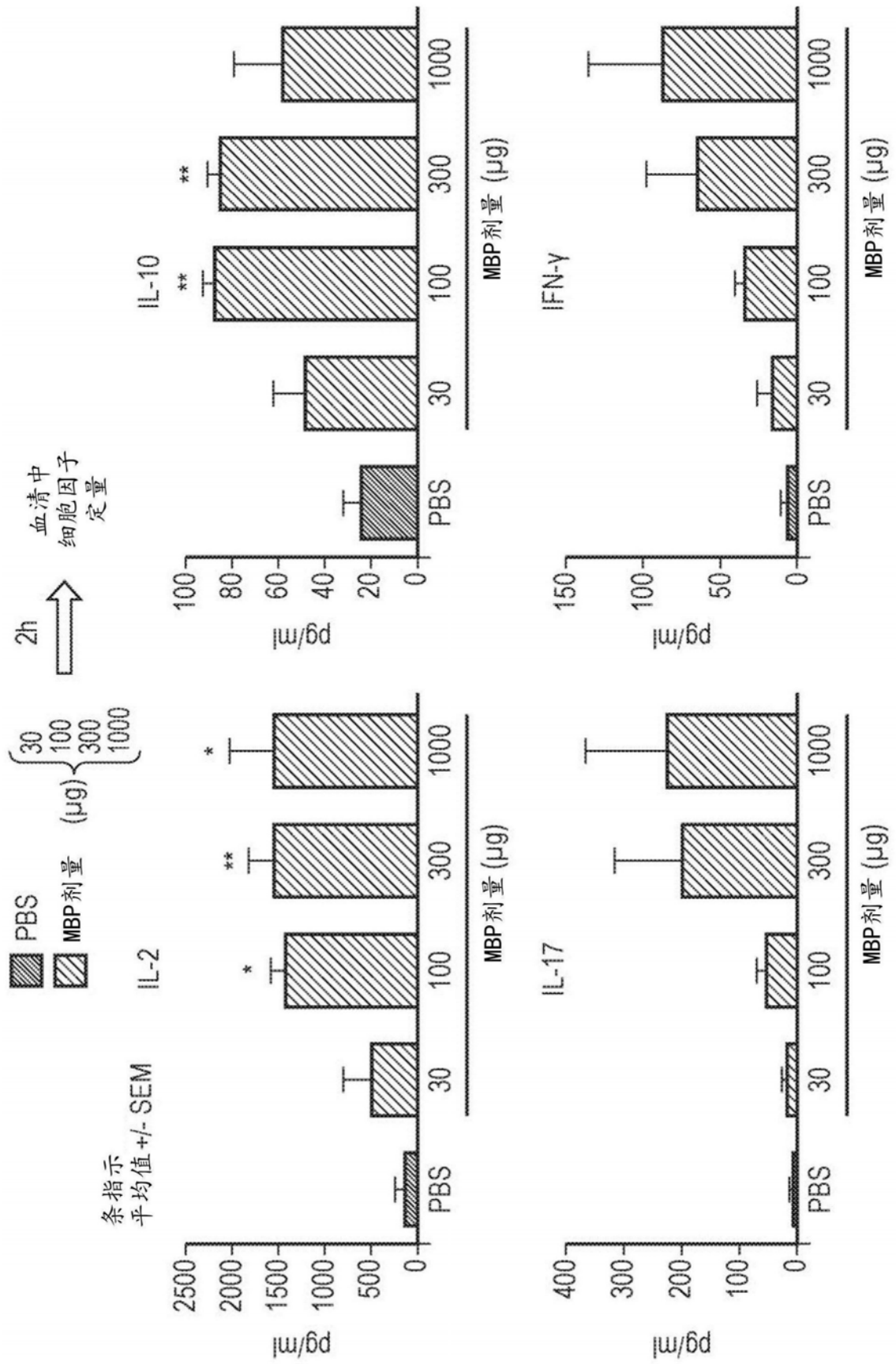


图4

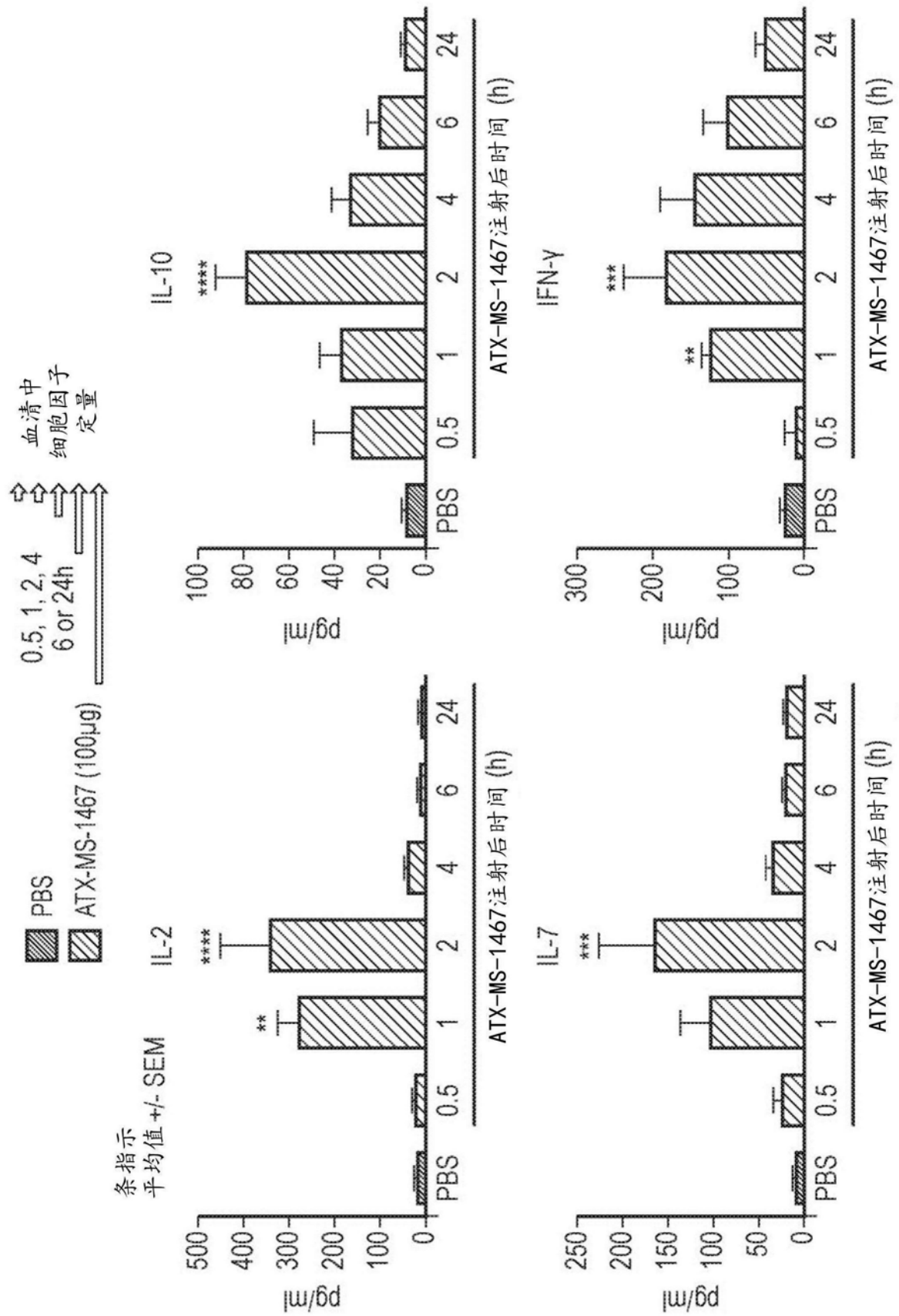


图5

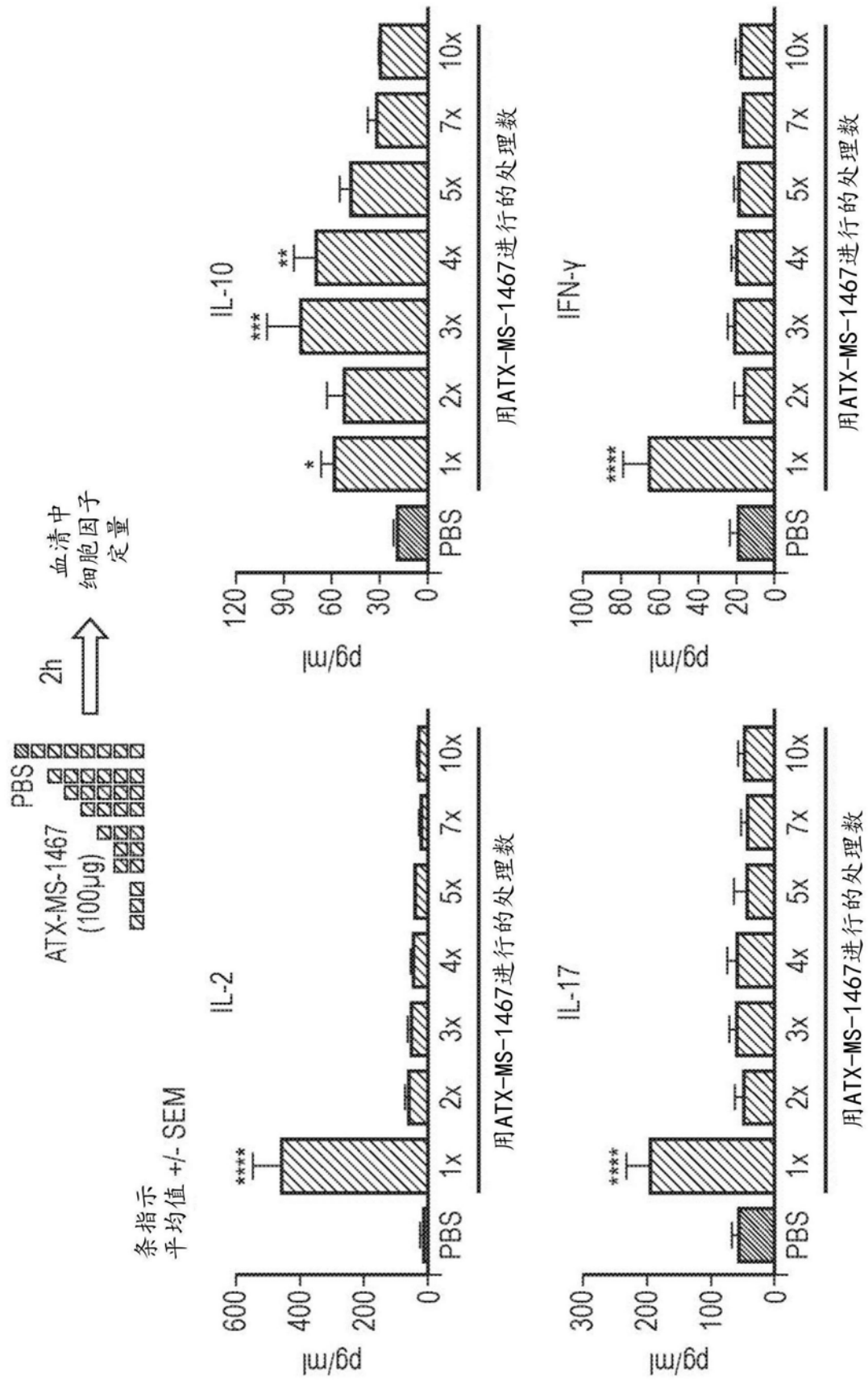


图6

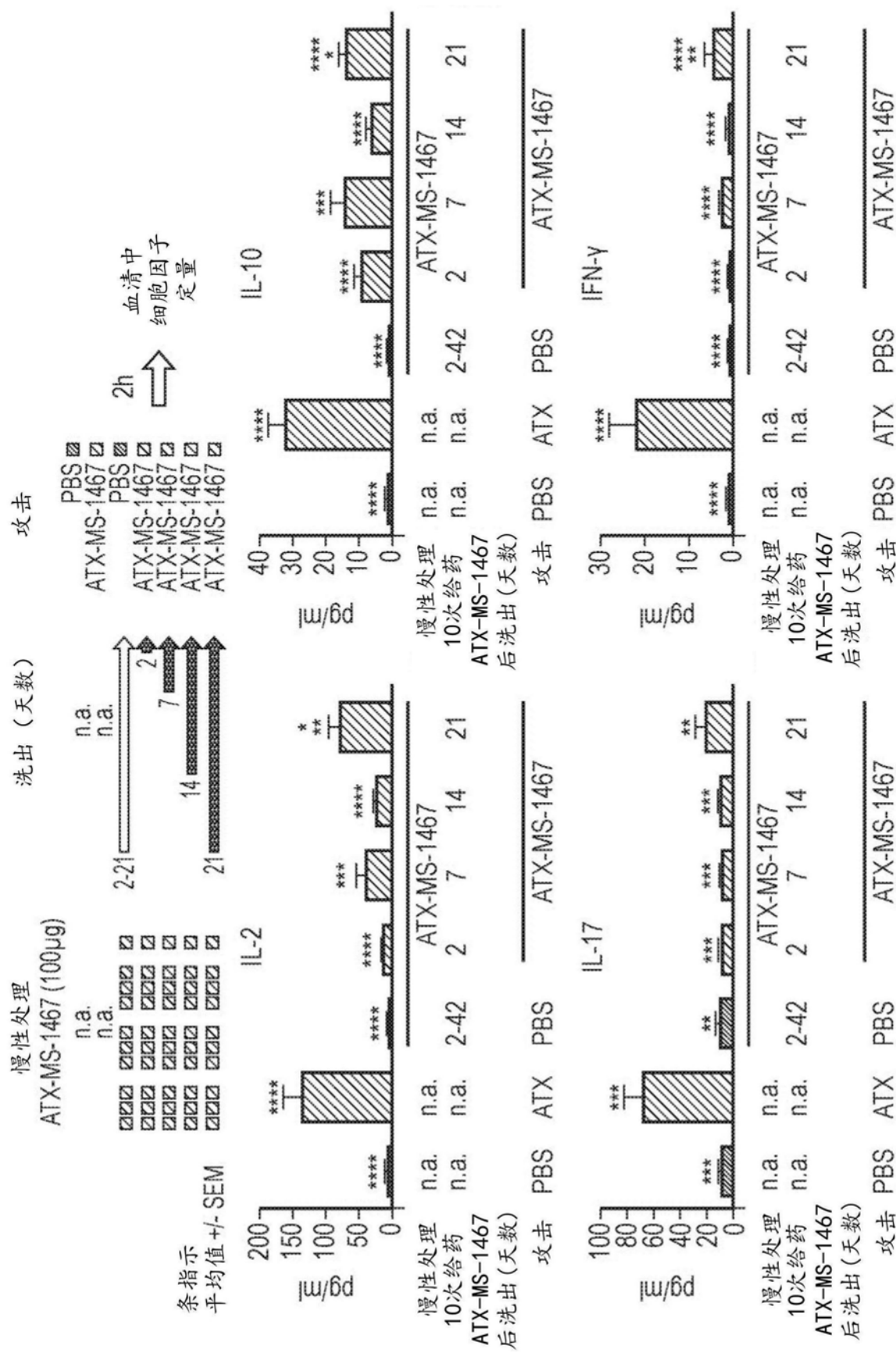


图7

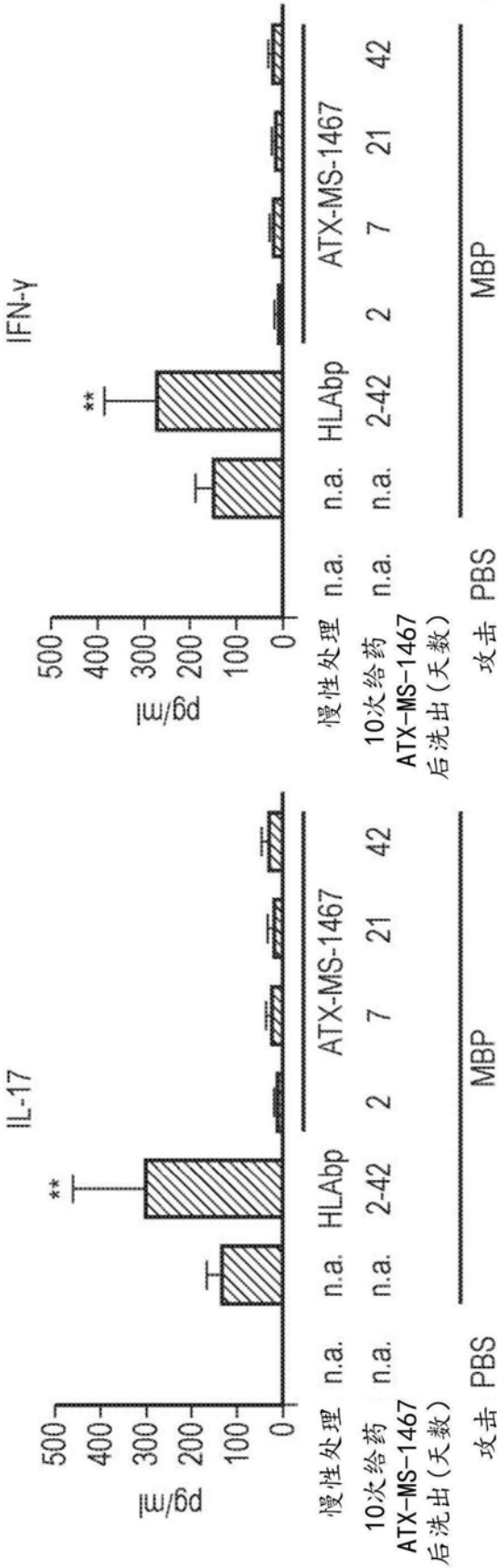


图8(续)

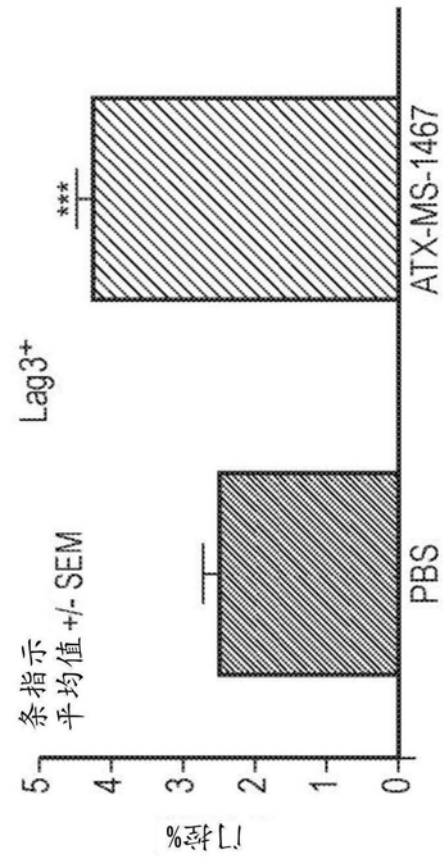


图9

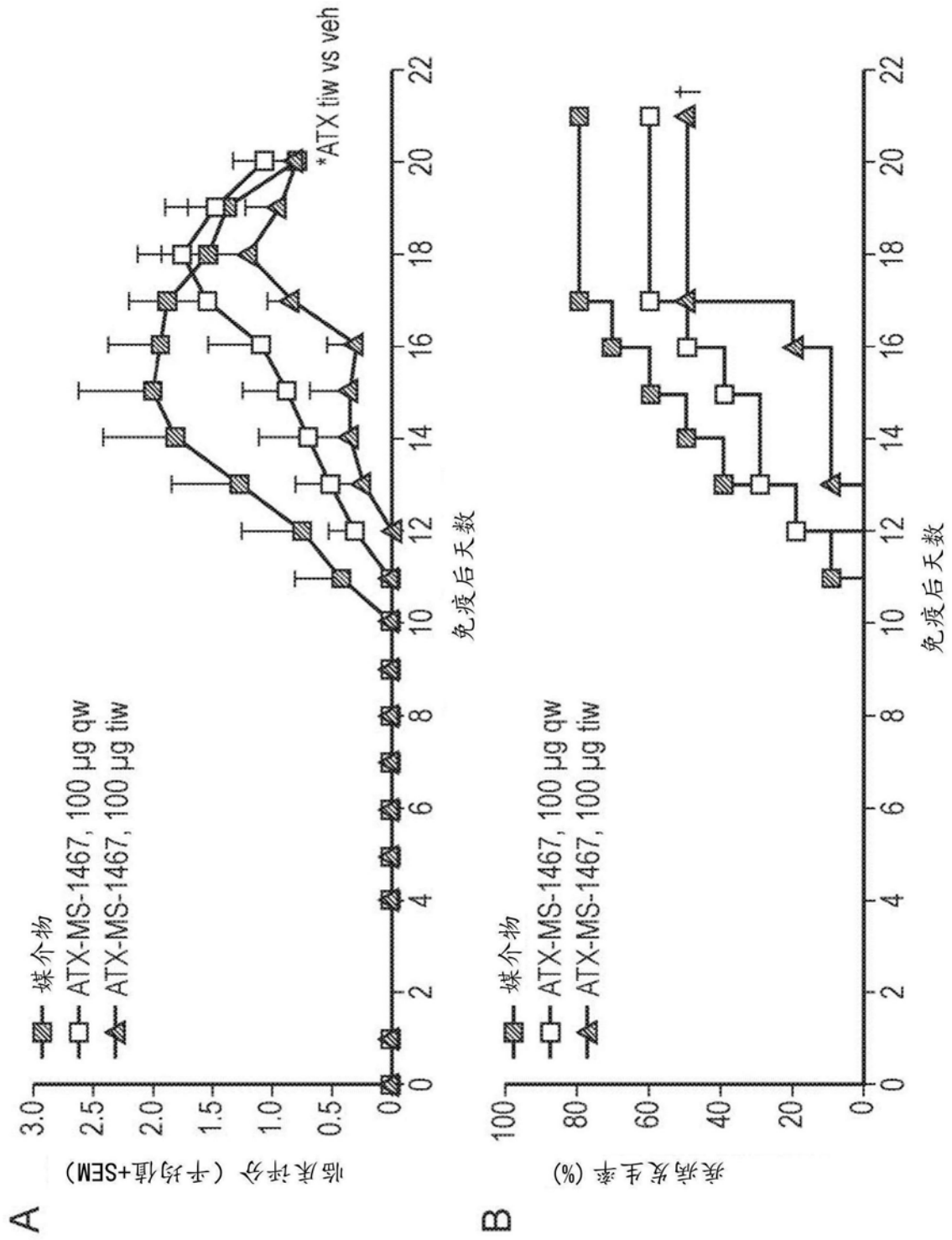


图10

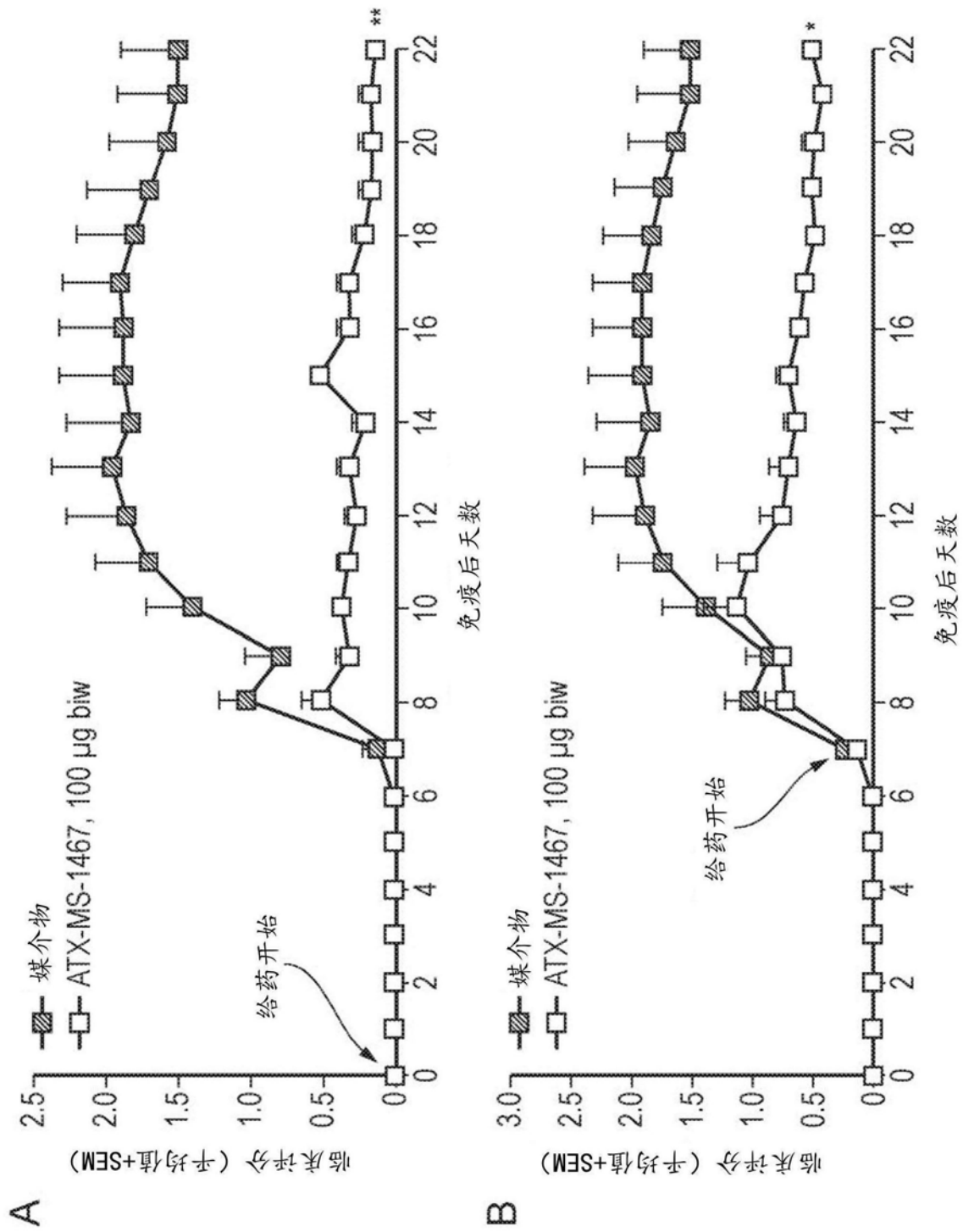


图11

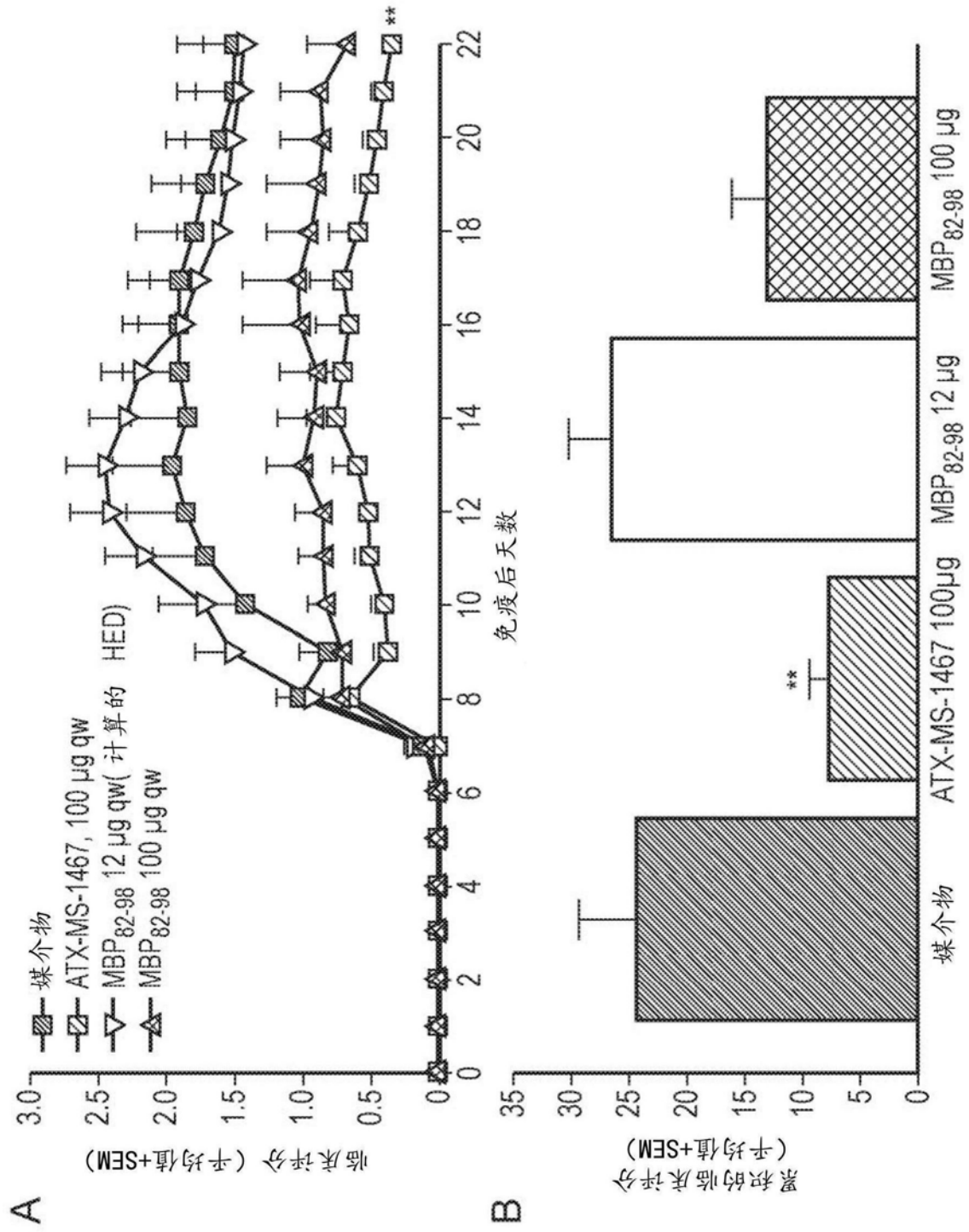


图12

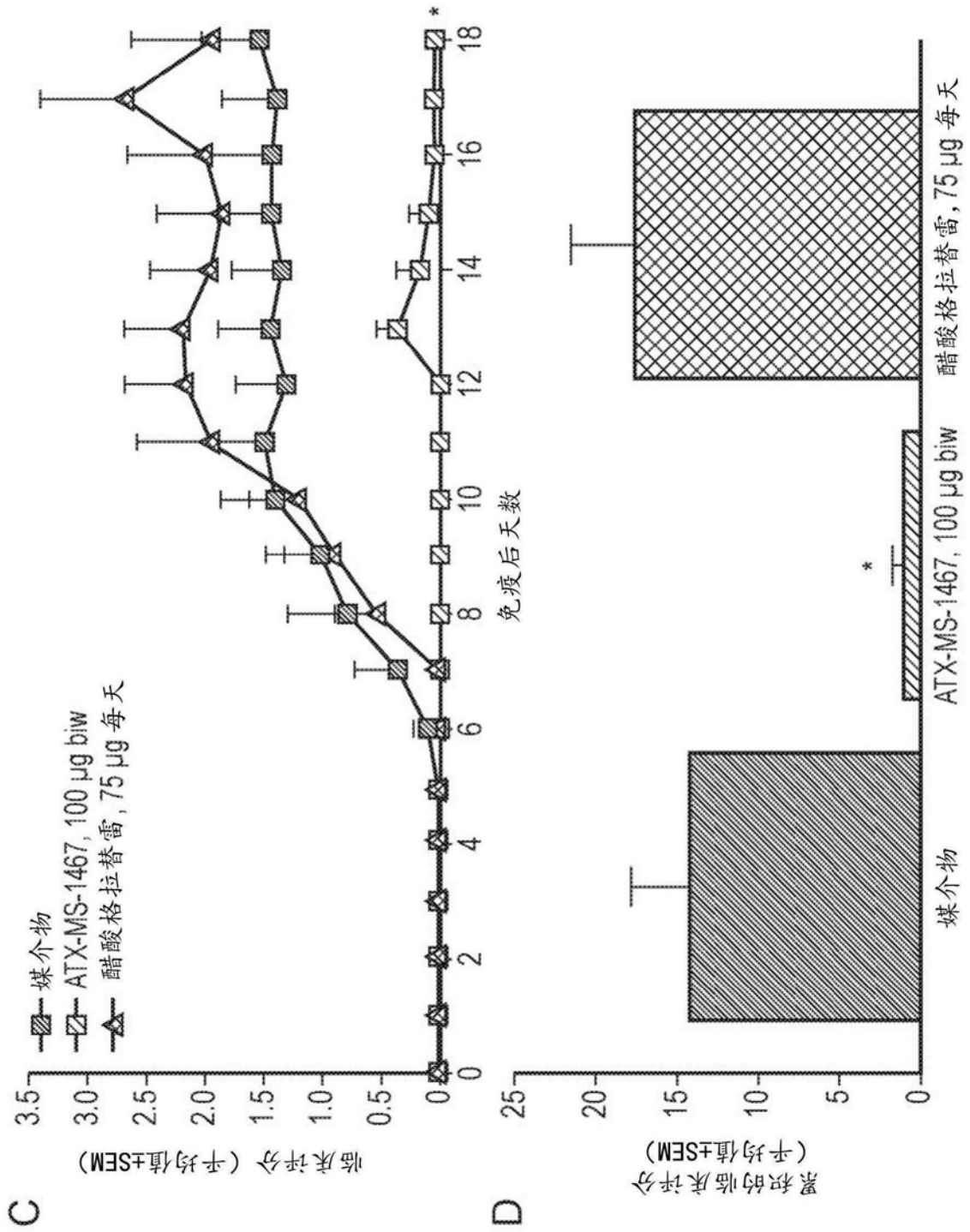


图12(续)

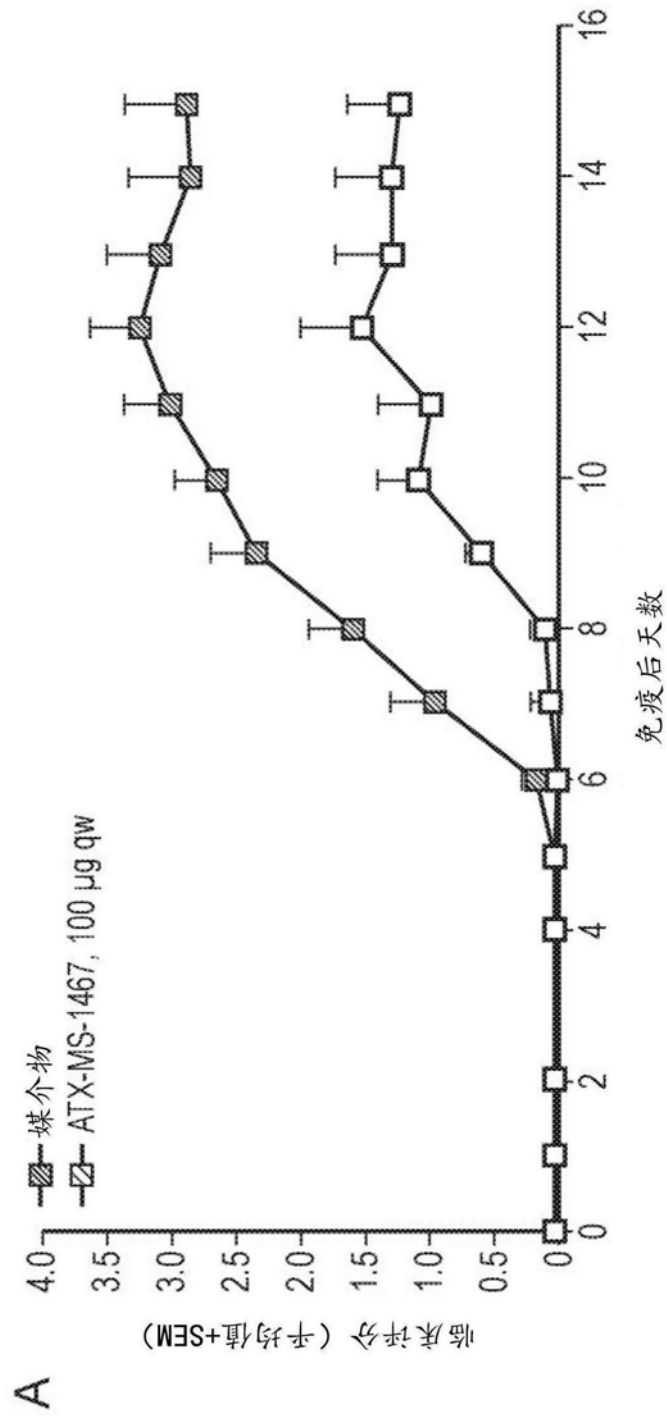


图13

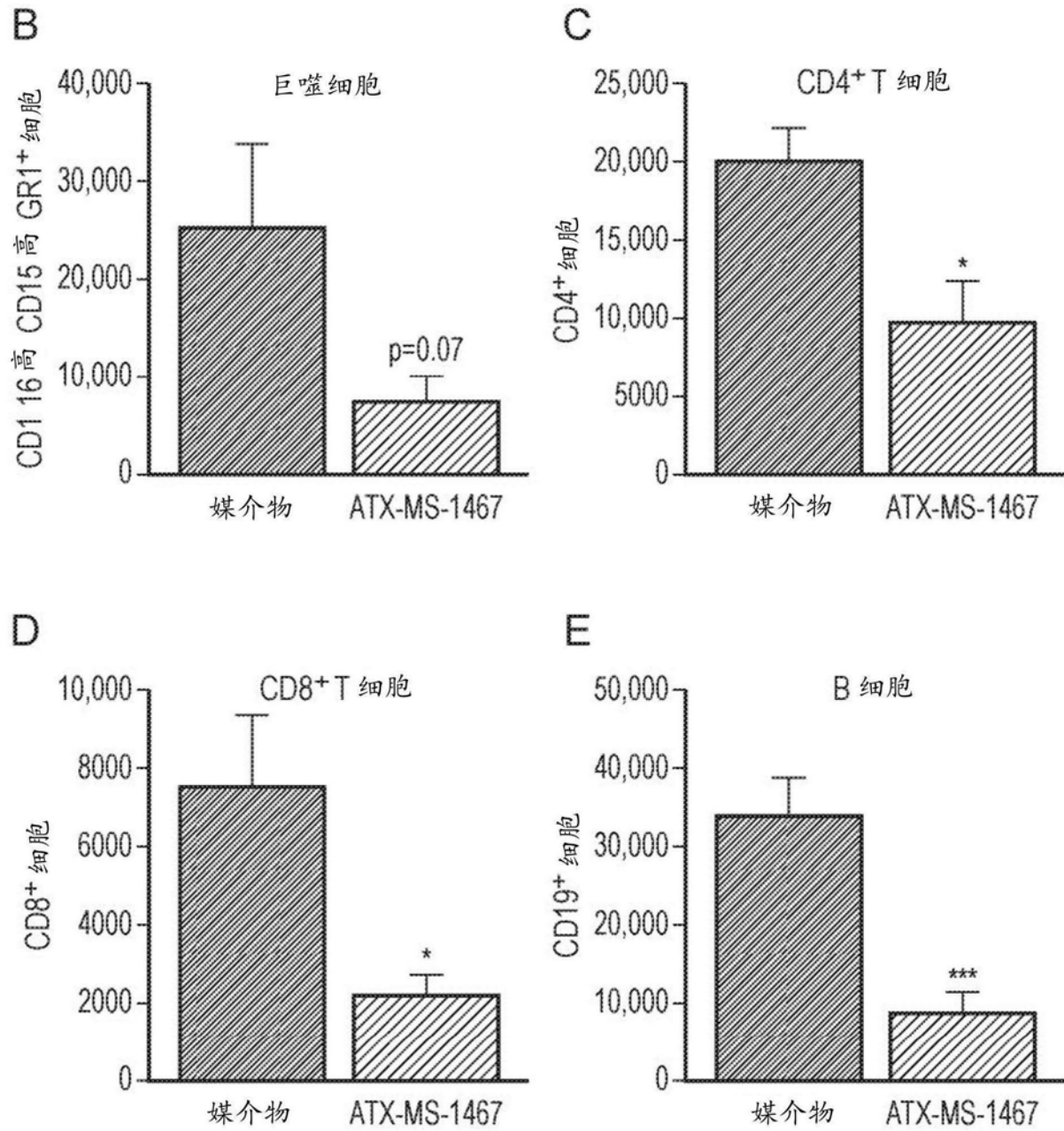


图13(续)

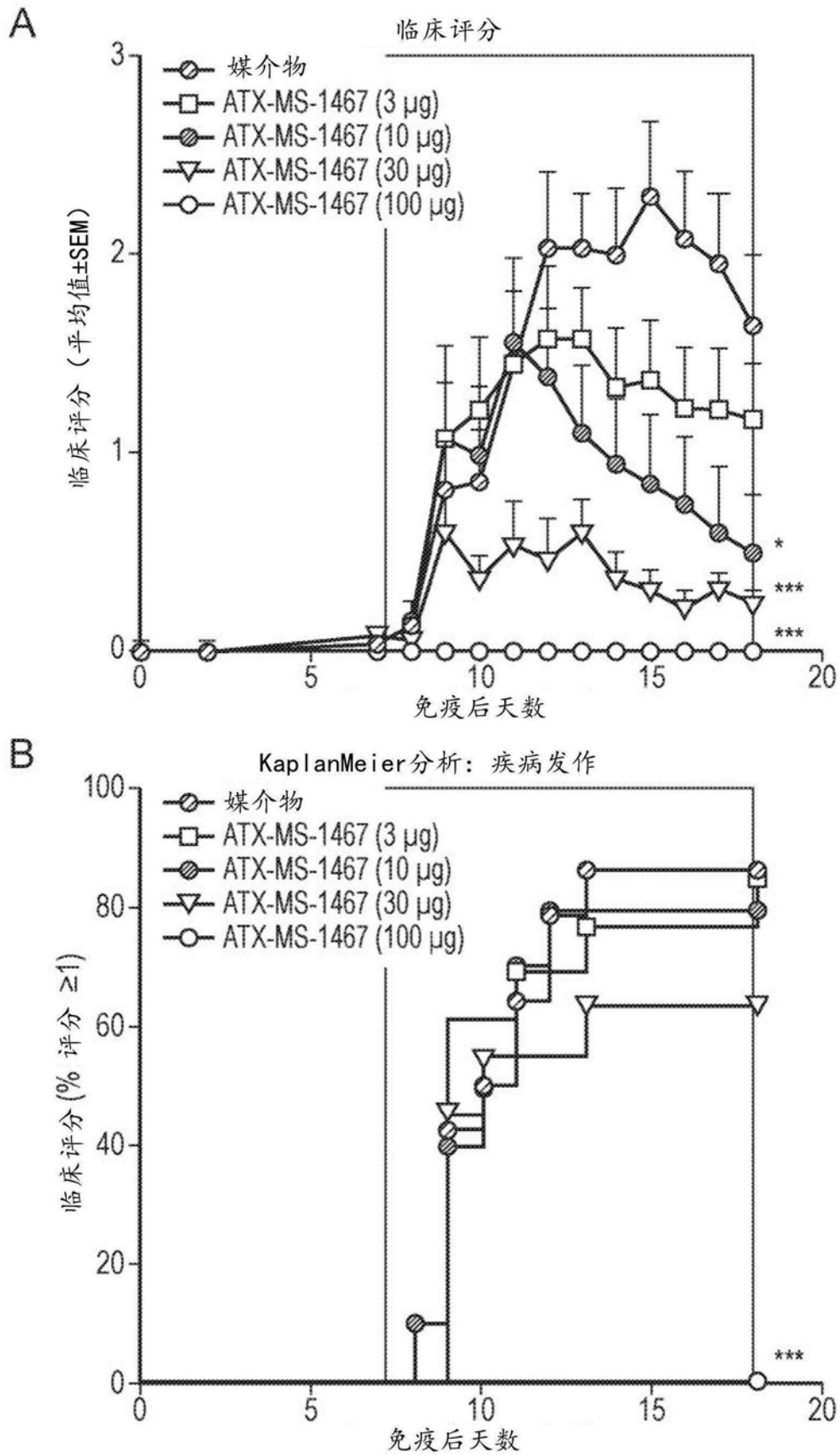


图14

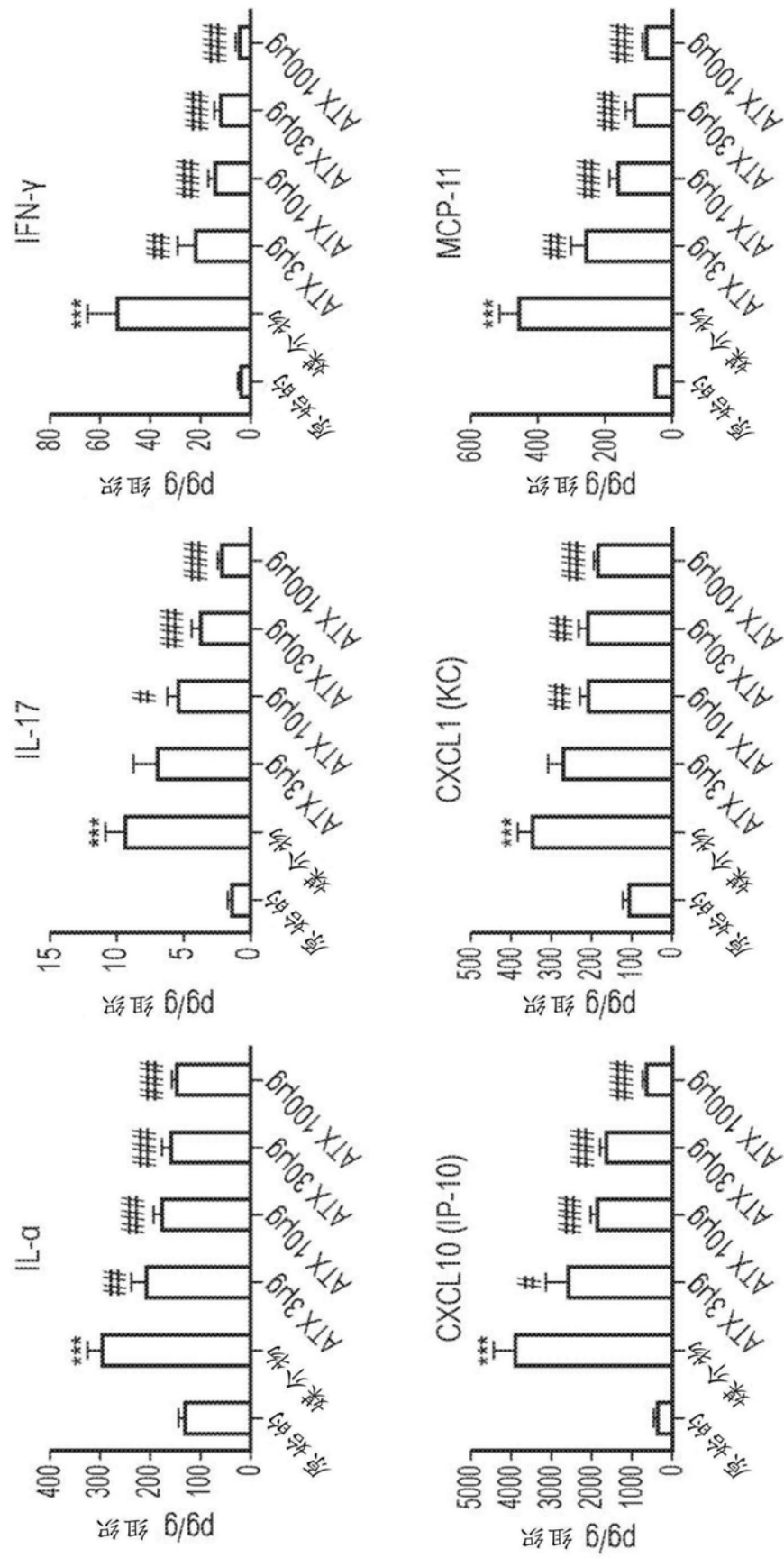


图15

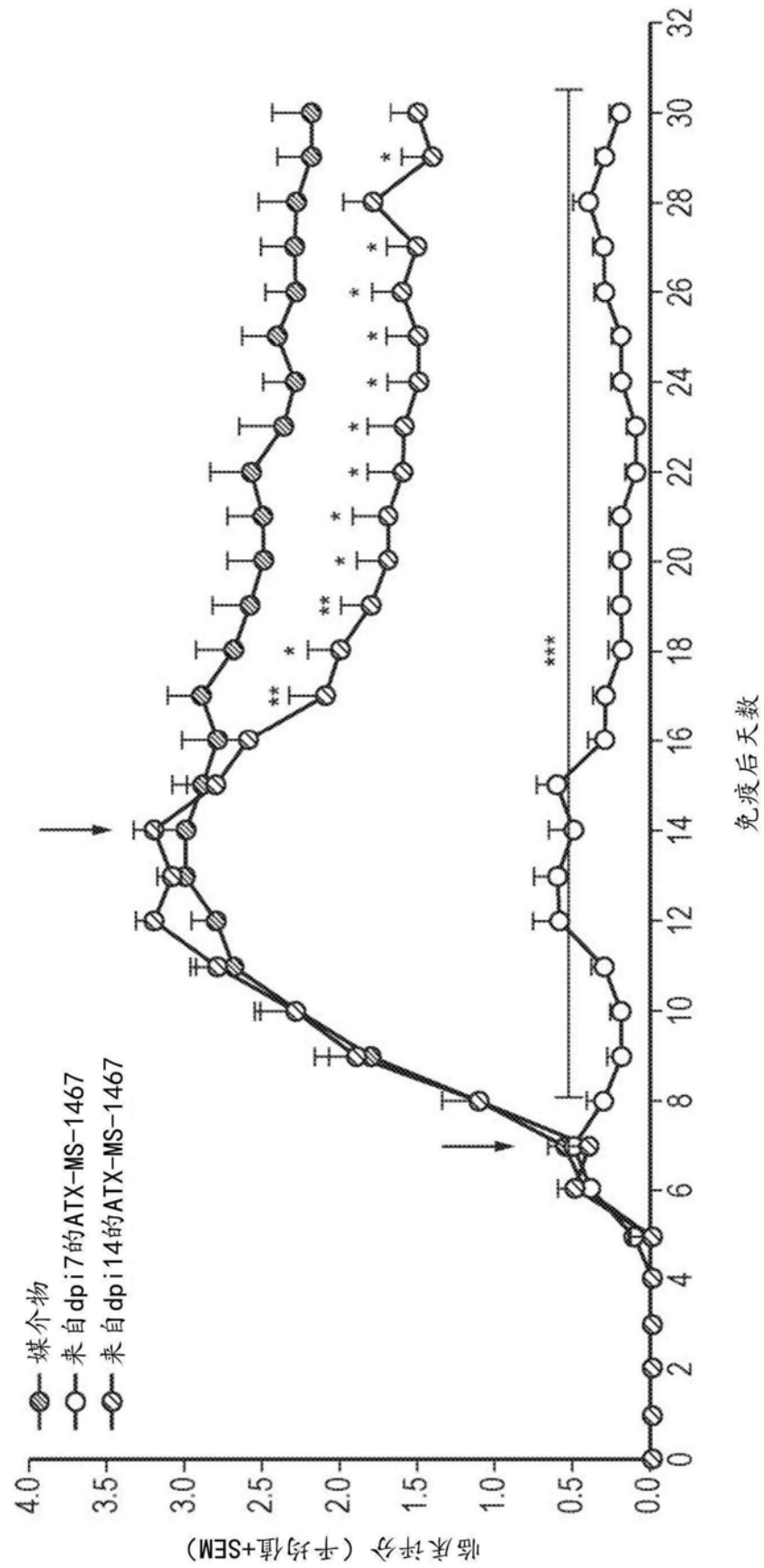


图16

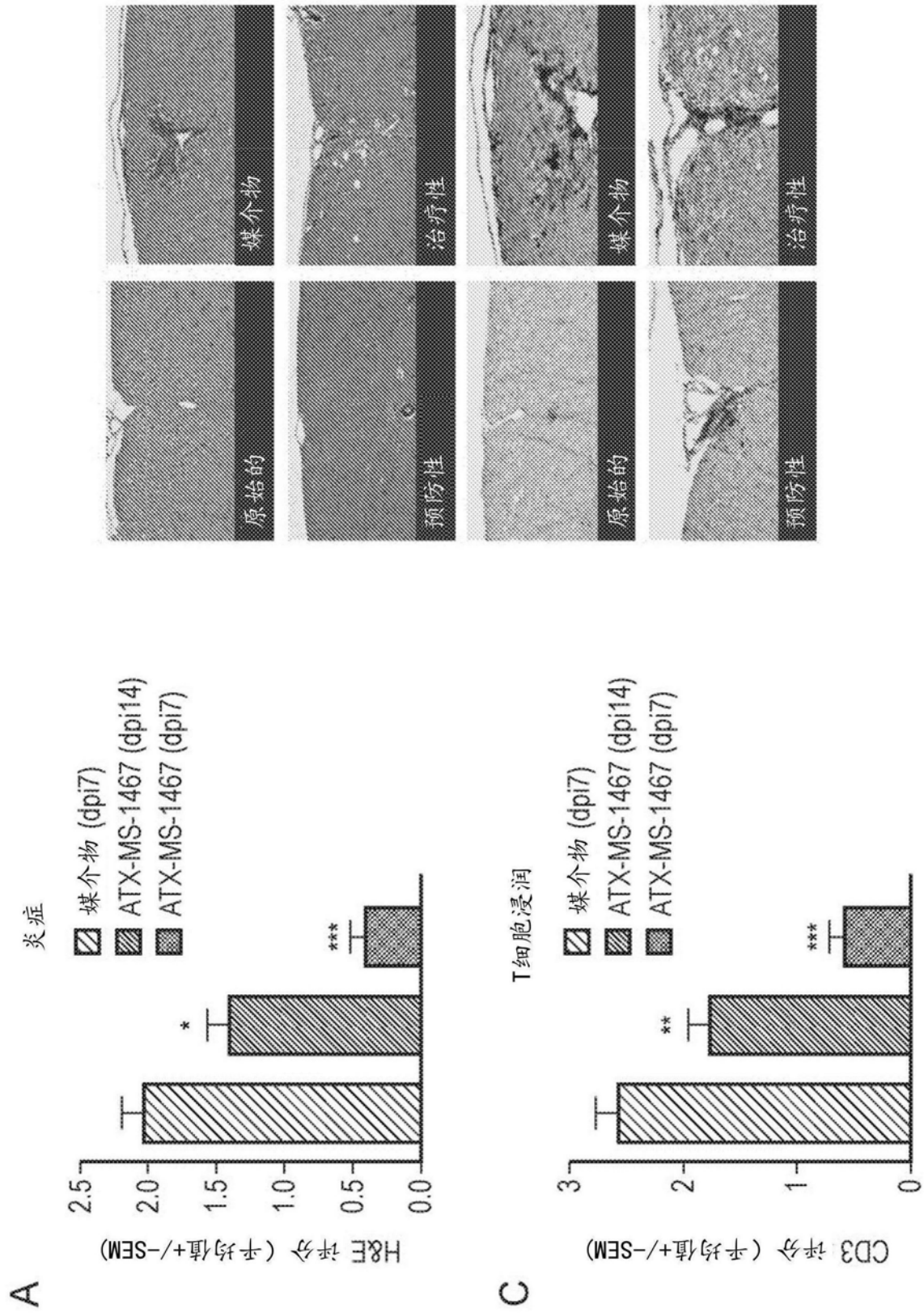


图17

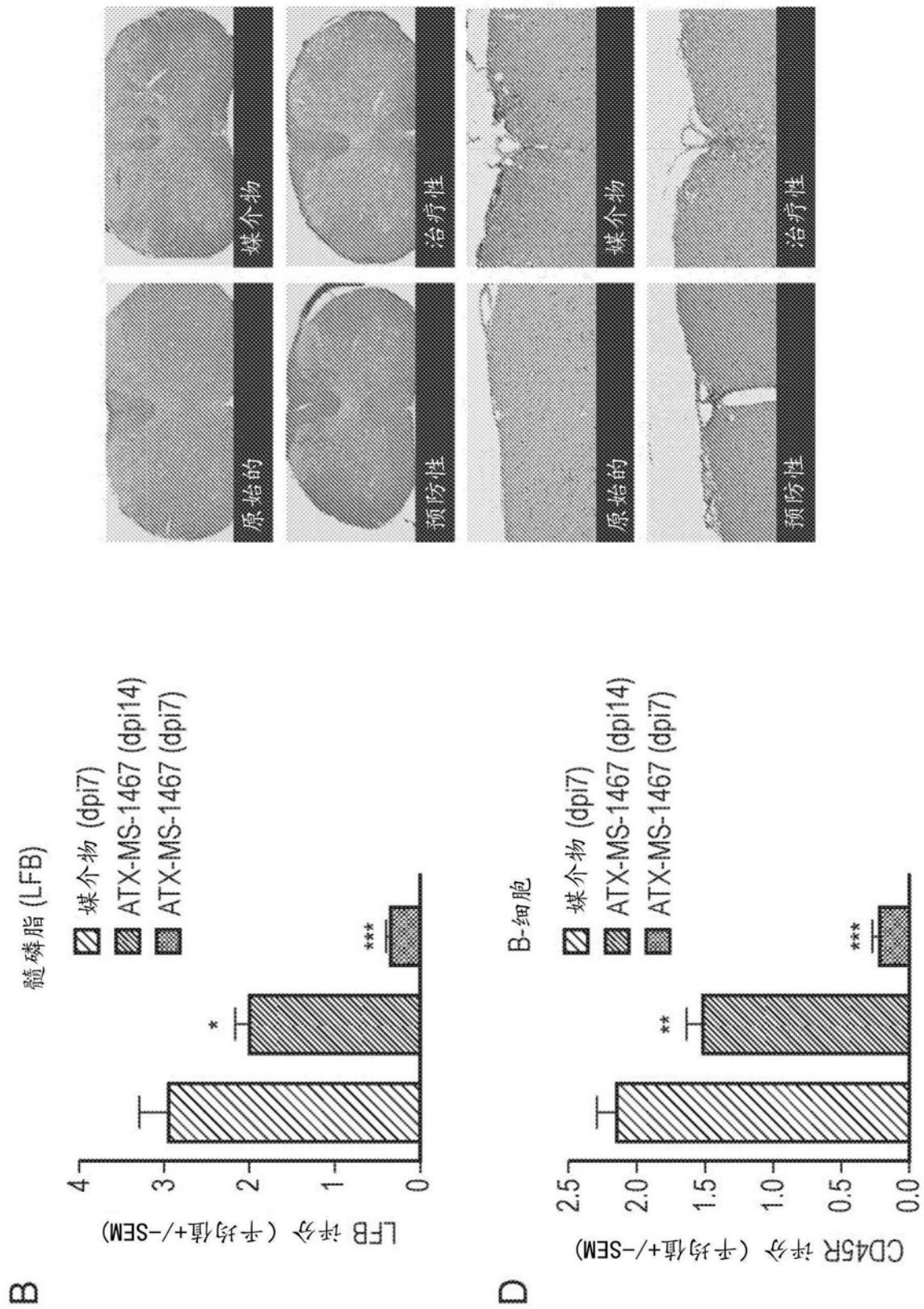


图17(续)

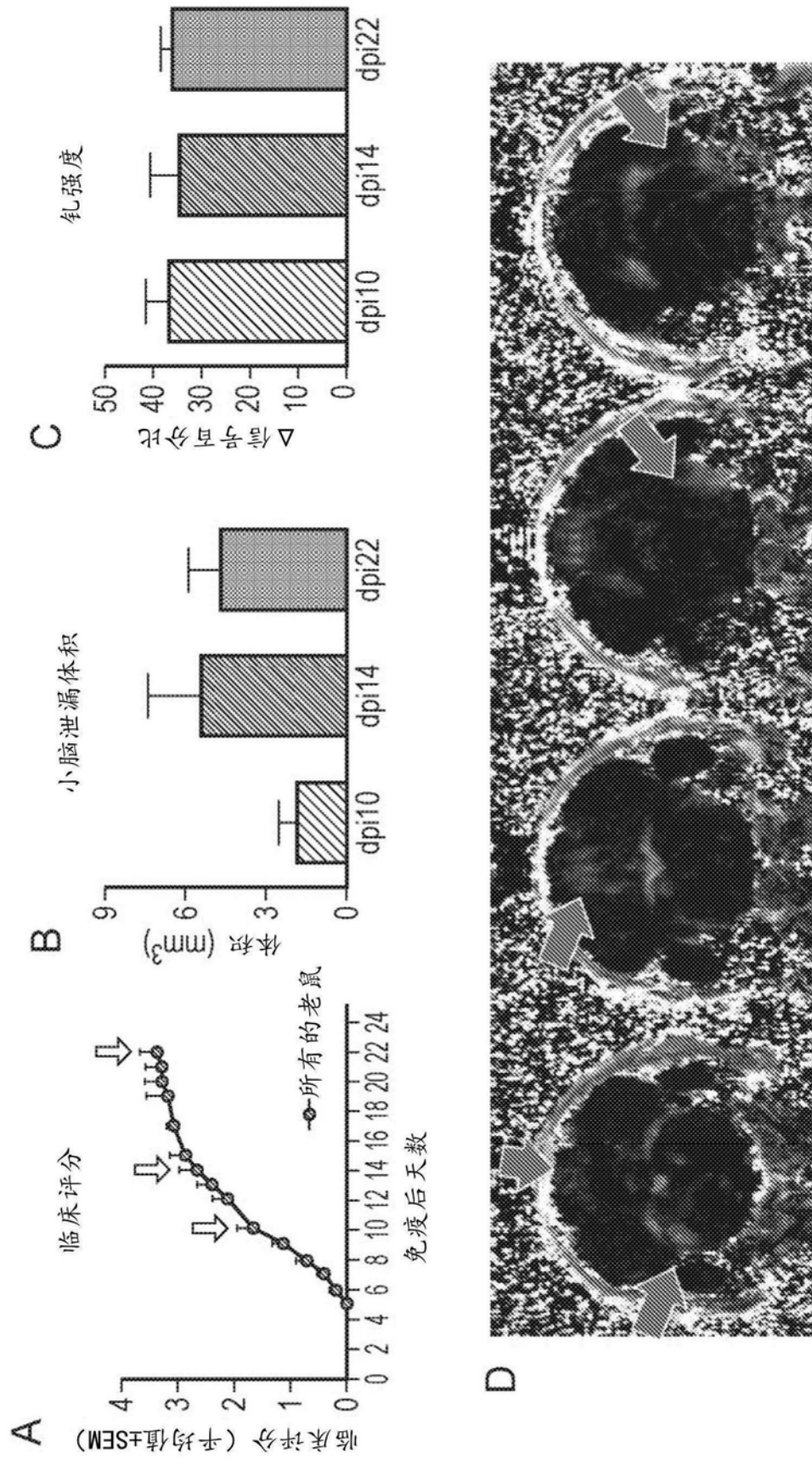


图18

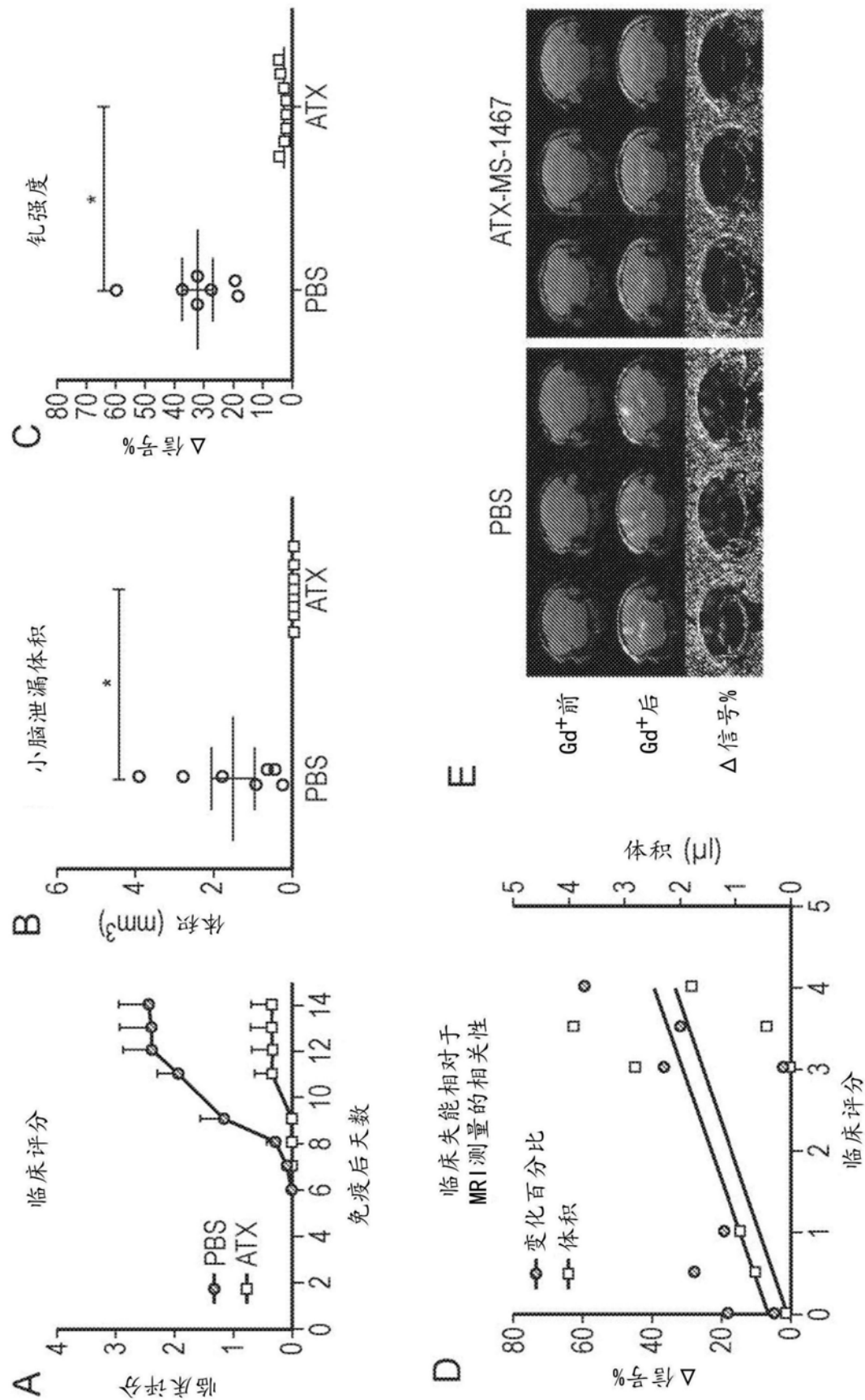


图19

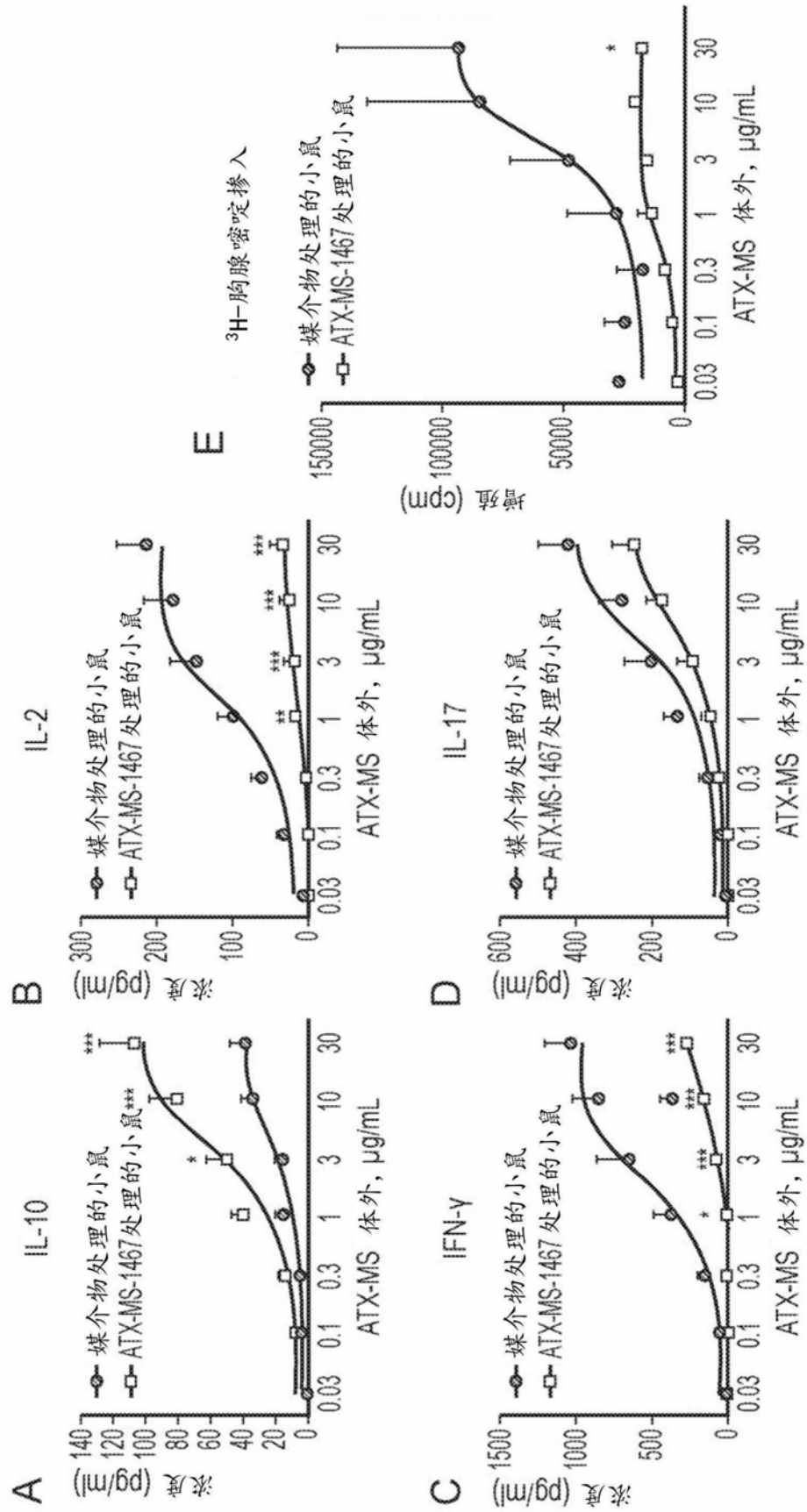


图20