



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101909444 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 18

(21) 申请号 200880124262. 1

(56) 对比文件

(22) 申请日 2008. 11. 05

US 2007/0092890 A1, 2007. 04. 26, 说明书第 41、70、82 段 .

(30) 优先权数据

WO 2005/067963 A1, 2005. 07. 28, 全文 .

60/996, 175 2007. 11. 05 US

61/100, 454 2008. 09. 26 US

审查员 宫方斌

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/082481 2008. 11. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/061818 EN 2009. 05. 14

(73) 专利权人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 A·科伊尔

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖 张静

(51) Int. Cl.

A01N 43/54 (2006. 01)

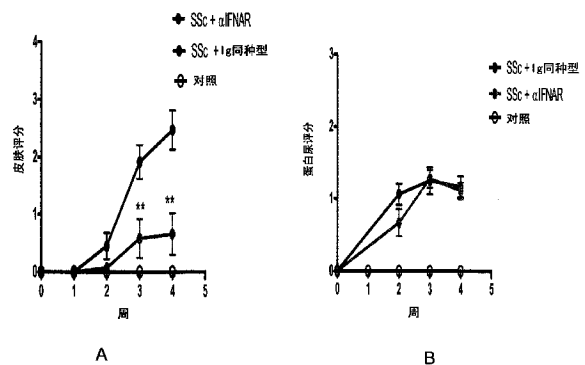
权利要求书1页 说明书22页 附图20页

(54) 发明名称

硬皮病治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及治疗 / 改善硬皮病和相关症状的方法。



1. I 型干扰素的拮抗剂用于制造药物的用途,所述药物治疗需要这种治疗的患者的硬皮病。

2. I 型干扰素的拮抗剂用于制造药物的用途,所述药物减轻需要这种治疗的患者的硬皮病相关一种或多种症状,所述症状选自:皮肤病损、脱发、炎症、皮肤增厚、胶原沉积、蛋白尿、以及补体沉积。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其特征在于,所述拮抗剂是抗体。

4. 如权利要求 3 所述的用途,其特征在于,所述抗体是抗-IFN α R 抗体。

5. 如权利要求 3 所述的用途,其特征在于,所述抗体是抗-IFN α 抗体。

硬皮病治疗方法

[0001] 本发明要求各自通过引用全文纳入本文的美国专利申请号 60/996,175 和 61/100,545 的优先权。

发明领域

[0002] 本发明提供治疗 / 改善硬皮病和相关症状的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 硬皮病或全身性硬化症 (SSC) 是一种进行性、衰弱性自身免疫病,其特征在于皮肤成纤维细胞将过量蛋白沉积于胞外基质中,也称作皮肤纤维化。弥散性皮肤病患者常存在独特的标记,如皮肤中 I 型干扰素 (IFN)- 诱导基因的上调,以及拓扑异构酶 I 特异性血清抗核自身抗体。最近有报道说接受 IFN 治疗的慢性病毒感染患者产生硬皮病支持了 IFN 在皮肤纤维化中起作用的观点。全身性硬化症的综述参见 Varga 和 Abraham, 2007, J. Clin. Invest., 117 :557-567。

[0005] I 型 IFN α 、 β 、 θ 、 κ 和 ω 是 13 种功能性 IFN- α 基因,一种 IFN- β 基因,一种 IFN- θ 基因,一种 IFN- κ 基因和一种 IFN- ω 基因所表达的细胞因子。(Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH, Type I Interferons (α/β) in immunity and autoimmunity (免疫和自身免疫中的 I 型干扰素 (α/β)). Immunol Rev. 2005 四月, 204 : 9-26)。至少存在 28 种潜在的 IFN- α 亚型,下面列举的是一部分: $\alpha 1$, $\alpha 2a$ 、 $\alpha 2b$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 10$ 、 $\alpha 16$ 、 $\alpha 17$ 和 $\alpha 21$ 。在一些例子中,干扰素 α 亚型 $\alpha 2$ 包括 $\alpha 2a$ 和 $\alpha 2b$ 。

[0006] 所有人 I 型干扰素结合于由两种跨膜蛋白 IFNAR-1 和 IFNAR-2 组成的细胞表面受体 (IFN α 受体, IFNAR) (Uze 等 (1990) Cell 60 :225 ;Novick 等 (1994) Cell 77 :391)。与这些受体的结合引起胞内信号转导通路激活 (Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. Annu Rev Biochem 1998 ;67 :227-64), 开始于 Jak 激酶, Jak1 和 Tyk2 的激活。这些激酶接着磷酸化信号转导物和激活物 (STAT) 蛋白 STAT 1 和 2。磷酸化 STAT 蛋白形成转录因子复合物 IFN- 刺激基因因子 3 (ISGF3), 其与 p48 一起转位到核中。这些复合物激活诱导 IFN- 诱导型基因表达的 IFN- 刺激效应元件 (ISRE)。

[0007] 除了特定的抗病毒功能, I 型 IFN 在调节免疫系统中具有重要作用。(Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH, Type I Interferons (α/β) in immunity and autoimmunity (免疫和自身免疫中的 I 型干扰素 (α/β)). Immunol Rev. 2005 四月, 204 :9-26, 以及 Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response : implications for its clinical use (I 型干扰素在 T 细胞应答中被忽视的作用 : 其涉及临床应用). Immunol Today 1996 ;17 :369-72)。多种类型的细胞, 包括单核细胞、巨噬细胞、DC 和淋巴细胞, 以及其它血液细胞对促炎细胞因子以及其它多种病原体组分起反应而产生 I 型 IFN。这些细胞也对 I 型 IFN 起反应, 增强免疫学重要分子, 例如 MHC I 类、CD38、白介素 (IL-1、IL-6、IL-10 和 IL-15) 以及趋化因子 (IL-8、MCP-1、MCP-2、MIG、MIP1a、MIP1b 和 IP10) 的表达。而且, I 型 IFN

在免疫系统关键组分,包括树突细胞、T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞中诱导多种生物学功能。例如,I型IFN促进DC成熟,记忆CD8+T细胞增殖,抑制CD4+T细胞凋亡,NK细胞活化和B细胞分化。(Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation (经由细胞因子诱导树突细胞活化的自身免疫力). *Immunity*, 20卷, 539-550, 5月, 2004, 以及 Taki S. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13(2002) 379-391, 以及 Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P. *J Immunol*. 2003 9月1日; 171(5): 2366-73)。

[0008] 尽管几乎所有细胞都能对病毒和细菌组分刺激起反应而产生I型IFN,但是类浆树突细胞(pDCs)或“天然IFN产生细胞”产生的I型IFN是其它细胞类型的1000倍。用单链RNA(ssRNA),细菌DNA中的弱甲基化CpG或自身抗原抗体免疫复合物刺激内涵体Toll样受体(TLR)如TLR7和TLR19,可诱导I型IFN产生。

[0009] 需要更好地理解I型干扰素在硬皮病发病机理中的作用,以及鉴定这种疾病及其临床表现的新疗法。

[0010] 本文所述参考文献的引用或讨论不应理解为承认这些参考文献是本发明的现有技术。

发明内容

[0011] 本发明提供了通过给予需要治疗的患者治疗有效量的I型IFN的拮抗剂从而治疗硬皮病及其相关症状的组合物和方法。本发明还提供抑制硬皮病相关的I型IFN诱导型基因表达的方法。

[0012] 附图简述

[0013] 出于阐述本发明的目的,附图中描述了本发明的某些实施方式。然而,本发明不仅限于附图所述实施方式的精确配置和手段。

[0014] 图1图示了在小鼠中产生全身性硬化症(SSc)模型,即疾病诱导,其中将微小组织相容性(miHag)错配总脾细胞移植至RAG2^{-/-}小鼠,SSc症状如皮肤胶原沉积和自身抗体随着时间延长而产生。

[0015] 图2A和B显示了对未进行疾病诱导小鼠(对照)、在抗-干扰素 α 受体(IFNAR)抗体存在下进行疾病诱导的小鼠(SSc+ α IFNAR)、或在Ig同种型对照抗体存在下进行疾病诱导的小鼠(SSc+Ig同种型;图2A)或(SSc+同种型Ig;图2B)随时间进行测量的硬皮病临床表现。Y轴显示皮肤评分(图2A)和蛋白尿评分(图2B)。图2C显示了抗-干扰素 α 受体抗体(α IFNAR;上图)存在下或Ig同种型对照抗体(Ig对照;上图)存在下进行疾病诱导后小鼠的照片。

[0016] 图3A是柱状图,显示了未疾病诱导的RAG2^{-/-}小鼠(没有移植)(对照),抗-干扰素 α 受体抗体存在下疾病诱导的小鼠(SSc+ α IFNAR)或Ig同种型对照抗体存在下疾病诱导的小鼠(SSc+Ig同种型)的SSc皮肤的组织病理学分析。Y轴显示炎症的加和评分(0=正常;1=稀疏细胞浸润;2=中度浸润;3=普遍皮肤浸润)和胶原沉积加和评分(0=正常,1=轻度;2=中度;3=严重)。图3B显示了对未疾病诱导的小鼠(对照),抗-干扰素 α 受体抗体存在下疾病诱导的小鼠(SSc+ α IFNAR)或Ig同种型对照抗体存在下疾病

诱导的小鼠 (SSc+Ig 同种型) 皮肤的代表性 HE (左图) 和马森三色 (右图) 染色的免疫组织化学分析。

[0017] 图 4A-4F 显示了使用山羊抗小鼠 Ig-FITC (绿色) 或大鼠抗小鼠 C1q-PE 多克隆抗体 (红色) 染色, 并在 DAPI 中封片 (蓝色) 的皮肤切片的免疫组织化学分析。皮肤切片来自同系移植对照小鼠 (图 4A 和 4D), Ig 同种型对照存在下 SSc 诱导的小鼠 (图 4B 和 4E), 以及抗 IFNAR 抗体存在下 SSc 诱导的小鼠 (图 4C 和 4F)。

[0018] 图 5A 是柱状图, 显示了利用 ELISA 检测未疾病诱导的小鼠 (对照), 抗-干扰素 α 受体抗体存在下疾病诱导的小鼠 (SSc+ α IFNAR) 或 Ig 同种型对照抗体存在下疾病诱导的小鼠 (SSc+Ig 同种型) 的血清的血清抗 Sc1-70 和抗 SSA 自身抗体 (IgG、IgA、IgM)。图 5B 是 3 幅柱状图, 显示了未疾病诱导的小鼠 (没有 GVH), 抗-干扰素 α 受体抗体存在下疾病诱导的小鼠 (10mpkA53) 或 Ig 同种型对照抗体存在下疾病诱导的小鼠 (10mpk 1A7) 的血清中抗 Sc1-70IgG1 (上)、抗 Sc1-70IgG2 (中) 和抗 SSA IgG1 (下) 的量。图 5C 显示了用 CD45R/B220 (棕色) 和花生凝集素 (红色) 染色的同系移植对照小鼠 (a 和 d), Ig 同种型对照存在下 SSc 诱导小鼠 (b 和 e) 以及抗 IFNAR 抗体存在下 SSc 诱导小鼠 (c 和 f) 的脾切片的免疫组织化学分析, 以鉴定生发中心 (GC)。

[0019] 图 6A 是柱状图, 显示通过流式细胞分选 (FACS) 定量分析移植 2 周后错配移植接受体 (SSc) 或未移植 RAG2^{-/-} 对照 (对照) 中的脾类浆树突细胞 (pDC) (B220⁺/Gr-110⁺/CD11c⁺/CD11b⁻) 数目。图 6B 显示移植总 miHag 错配脾细胞 (总脾细胞) 或 Gr-1⁻ 消除 (即 pDC⁻ 消除) miHag 错配脾细胞 (Gr-1⁻ 脾细胞) 的 RAG^{-/-} 小鼠的皮肤评分 (左) 和蛋白尿 (右) 的时效图。

[0020] 图 7 显示了未 SSc 疾病诱导的小鼠 (对照), Ig 同种型对照抗体存在下 SSc 疾病诱导的小鼠 (Ig 对照) 或抗-干扰素 α 受体抗体存在下 SSc 疾病诱导的小鼠 (α -IFNAR) 皮肤中抑制或诱导的基因的全基因组阵列 (WGA) 数据分析的“热图”。在各 WGA 分析样品柱的下方显示了如图 3A 所述测定的临床皮肤评分。

[0021] 图 8A-8D 总结了 GVH-SSc 皮肤中 I 型 IFN 的瞬时表达分析的一系列实验。图 8A 总结了 IFN α 2、 α 5、 α 9 和 β mRNA 诱导的 qPCR 分析。图 8B 和 8C 分别总结了 IFN γ 和 IFN λ -2 的 qPCR 分析 (为两次实验的代表性数据, $n = 4$ / 时间点)。图 8D 显示了 GVH-SSc (下图) 和非 SSc (上图) 皮肤上皮细胞中 IFN λ -3 的免疫组织化学染色 (放大 400x)。

[0022] 图 9A-9C 总结了 GVH- 诱导 SSc 动物模型的数据。每周用 10mg/kg 体重的抗-IFNAR1 鼠抗体 5A3 (阴影柱) 或对照 Ig (实心柱) 治疗小鼠两次, 对小鼠的皮肤样品进行富鲁达 (Fluidigm) (qPCR) 分析, 并与非 SSc 皮肤 (空心柱) 进行比较。图 9A 总结了四种 IFN 诱导型基因 (IFI44、MX1、OASL、OAS2) 在两个时间点的表达结果, 数据表明早期表达是非 IFNAR1- 依赖的, 长期表达是 IFNAR1- 依赖的。图 9B 总结的结果表明抗-IFNAR1 抗体治疗降低了皮肤中炎性基因表达 (MPO、TNF α 、IL-6、iNOS)。图 9C 总结的结果表明抗-IFNAR1 抗体治疗降低了组织重塑相关基因表达 (KLF10, TIMP, EPGN, MMP9)。

[0023] 发明详述

[0024] 硬皮病治疗

[0025] 本发明提供通过给予 I 型 IFN 拮抗剂从而治疗硬皮病或全身性硬化症的方法, 以及治疗硬皮病或全身性硬化症的症状的方法。

[0026] “治疗有效量”或“治疗有效剂量”的本发明抗 I 型 IFN 或抗干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体优选降低疾病症状的严重程度,提高无症状期的频率和持续时间,或预防疾患引起的障碍或残疾。例如以硬皮病为例,治疗有效量或剂量优选预防硬皮病或全身性硬化症相关的生理症状的进一步恶化,例如皮肤纤维化,皮肤病损,脱发,炎症,皮肤增厚,胶原沉积,蛋白尿,自身抗体产生和补体沉积。治疗有效量或剂量还优选预防或延迟硬皮病或全身性硬化症的发病,如在疾病早期或初步迹象出现时可能需要。同样,还包括延缓硬皮病或全身性硬化症相关的慢性进展。诊断硬皮病或全身性硬化症所用的实验室检测包括化学、血液学、组织病理学、血清学和放射学。因此,监测任何上述内容的任何临床或生物化学实验可应用确定特定治疗是否是治疗硬皮病或全身性硬化症的治疗有效剂量。本领域普通技术人员能够基于如对象大小、对象症状严重性和特定组合物或所选给药途径等因素来确定此类用量。

[0027] 本文所用术语“治疗”指减轻、改善和 / 或降低硬皮病或全身性硬化症及相关症状的严重程度。

[0028] 在一些实施方式中,提供治疗包括皮肤纤维化、皮肤病损、脱发、炎症、皮肤增厚、胶原沉积、蛋白尿、自身抗体产生和补体沉积在内的一种或多种硬皮病症状的方法。

[0029] 硬皮病症状的严重程度、进展、对治疗的反应以及其它临床检测通常包括用改良的罗德南皮肤评分(modified Rodnan skin score)、雷诺德症状评分(Raynaud' s Condition Score)、作为肺功能测试一部分的最大肺活量测定、右心导管插入血流动力学(right heart catheterization haemodynamics)、检测血清肌酸酐、血压和全血计数,以及检测血清肌酸酐磷酸激酶水平来评估患者(参见例如, Furst, 2008, Rheumatology, 47 : v29-v30 和 Furst 等, 2007, J. of Rheumatology, 34 :5, 1194-1200)。

[0030] 改良的罗德南皮肤评分是使用确立的触诊评估病人皮肤厚度的硬皮病临床评分方法,对病人的 17 个皮肤位点进行测量,并对每一位点进行分级:0 = 正常皮肤,1 = 皮肤增厚,2 = 皮肤增厚并无法掐捏,3 = 皮肤增厚且无法移动,总共 51 个点(参见 Czirjak 等, 2007, Ann Rheum Dis. ;66(7) :966-9. Epub2007 年 1 月 18 日,以及 Brennan 等, 1992, Br J Rheumatol. ;31(7) :457-60)。

[0031] 因此,某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了改良的罗德南皮肤评分测定的症状(即改良的皮肤评分总值降低)。

[0032] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述患者的治疗前改良罗德南皮肤评分为 1-51,治疗后改良罗德南皮肤评分为 (1-51)-x,其中 x = 1-51,并且治疗后改良罗德南皮肤评分不低于 0。

[0033] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述患者的治疗前改良罗德南皮肤评分为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 或 51,而治疗后改良罗德南皮肤评分是 50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、

2、1 或 0。

[0034] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致改良罗德南皮肤评分值至少减少 1。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致改良罗德南皮肤评分值至少减少 5。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致改良罗德南皮肤评分值至少减少 10。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致改良罗德南皮肤评分值至少减少 25。

[0035] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致改良罗德南皮肤评分值减少至少 1、至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22、至少 23、至少 24、至少 25、至少 26、至少 27、至少 28、至少 29、至少 30、至少 31、至少 32、至少 33、至少 34、至少 35、至少 36、至少 37、至少 38、至少 39、至少 40、至少 41、至少 42、至少 43、至少 44、至少 45、至少 46、至少 47、至少 48、至少 49、至少 50 或 51。

[0036] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了雷诺德症状评分 (RCS) 测定的症状。RCS 使用 1-10 的标准对雷诺德现象活性进行日常自检,随着数字的增加表明硬皮病相关症状恶化(参见例如, Merkel 等, 2002, Arthritis & Rheumatism, 46 :9, 2410-2420)。

[0037] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述患者的治疗前 RCS 评分为 1-10,治疗后 RCS 评分为 $(1-10)-x$, 其中 $x = 1-10$, 并且治疗后 RCS 评分不低于 0。

[0038] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述患者的治疗前 RCS 评分为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10, 而治疗后的改良罗德南皮肤评分为 9、8、7、6、5、4、3、2、1 或 0。

[0039] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 1。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 2。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 3。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 5。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 6。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 7。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 8。在一个实施方式中,本发

明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 9。在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值至少减少 10。

[0040] 在一个实施方式中,本发明提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗导致 RCS 评分值减少至少 1、至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9 或 10。

[0041] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了临床血清肌酸酐测定的症状。

[0042] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了血清肌酸酐磷酸激酶测定的症状。

[0043] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了作为肺功能测试一部分的最大肺活量临床检测测定的症状。

[0044] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了通过右心导管插入血流动力学检测的症状。

[0045] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了血压和全血计数测定的症状。

[0046] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了通过患者皮肤样品的组织病理学分析测定的症状。在一个实施方式中,所述改善衡量为炎症减少,所述炎症表现为组织样品中炎症细胞浸润、胶原沉积或真皮整体增厚。在一个实施方式中,用 I 型干扰素拮抗剂治疗使炎症减少 2 倍。在另一实施方式中,用 I 型干扰素拮抗剂治疗使炎症减少 3 倍。在另一实施方式中,用 I 型干扰素拮抗剂治疗使炎症减少 5 倍。

[0047] 某些实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗改善了对患者皮肤样品进行 qPCR 分析测定的症状。参见例如,国际专利申请公布 WO/08070137A2, 题目为《干扰素 α 诱导的药效学标记物》(InterferonAlpha-Induced Pharmacodynamic Markers)。

[0048] 一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗减少了炎性基因表达,包括但不限于 MPO、TNF α 、IL-6 和 INOS。一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述患者在治疗前表现出炎性基因表达升高,包括但不限于 :MPO、TNF α 、IL-6 和 INOS,而所述患者在治疗后表现出炎性基因表达降低,包括但不限于 :MPO、TNF α 、IL-6 和 INOS。一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中通过 qPCR 检测到所述治疗使炎性基因表达降低至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍或至少 10 倍。另一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中通过 qPCR 检测到所述治疗使炎性基因表达降低至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 7%、至少 8%、至少 10%、至少 15%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、

至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%或至少 90%。

[0049] 另一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述治疗降低组织重塑相关基因表达,包括但不限于 KLF10、TIMP、EPGN 和 MMP9。一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中所述病人在治疗前表现出组织重塑相关基因表达升高,包括但不限于:KLF10、TIMP、EPGN 和 MMP9,而所述病人在治疗后表现出组织重塑基因表达降低,包括但不限于:KLF10、TIMP、EPGN 和 MMP9。一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中通过 qPCR 检测到所述治疗使重组重塑相关基因表达降低至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍或至少 10 倍。另一个实施方式提供治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素拮抗剂,其中通过 qPCR 检测到所述治疗使组织重塑相关基因表达降低至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 7%、至少 8%、至少 10%、至少 15%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%或至少 90%。

[0050] 药效学 (PD) 标记物可用于以下方法:利用结合并拮抗 I 型 IFN 活性,更具体说是 IFN α 活性或 IFN α R 活性的治疗剂治疗患者的方法;将患者鉴定为结合并拮抗 I 型 IFN 活性,更具体说 IFN α 活性或 IFN α R 活性的治疗剂的候选治疗对象的方法;将患者诊断为 I 型 IFN,更具体说是 IFN α 水平或 IFN α R 活性升高相关病症的方法;监测接受结合并拮抗 I 型 IFN 活性,更具体说是 IFN α 活性或 IFN α R 活性的治疗剂治疗的患者疾病进展的方法;和鉴定 I 型 IFN,更具体说是 IFN α -介导或 IFNAR-介导的病症的候选疗法的方法。

[0051] 本发明的一个方面提供治疗患有 I 型 IFN 介导疾病或病症的患者的方法,包括给予 I 型 IFN 活性拮抗剂;其中所述患者包含 I 型 IFN-诱导型 PD 标记物表达特征;并且其中所述拮抗剂中和对象中 I 型 IFN-诱导型 PD 标记物表达特征。在一个具体实施方式中,所述疾病或病症是硬皮病或全身性硬化症。

[0052] 本发明包括鉴定、诊断、治疗和监测患者的疾病进展的方法。患者包括患有 I 型 IFN 或 IFN α 诱导型疾病、失调或病症的任何动物。患者可能因为实验性研究而患上所述疾病、失调或病症,例如,它可能是为所述疾病、失调或病症开发的实验模型。或者,患者可能在没有实验性操作的情况下患上所述疾病、失调或病症。患者包括人、小鼠、大鼠、马、猪、猫、犬和用于研究的任何动物。

[0053] 题为“干扰素 α 诱导的药效学标记物”(Interferon Alpha-induced Pharmacodynamic Markers)的国际专利申请公布号 WO/08070137A2 公开了使用 I 型 IFN 诱导型或 IFN α 诱导型 PD 标记物表达特征和/或使用中和患者的 I 型 IFN 诱导型或 IFN α 诱导型 PD 标记物表达特征的拮抗剂来鉴定、诊断、治疗和监测患者疾病进展的方法,将其通过引用纳入本文。

[0054] 结合并封闭 I 型 IFN 或 IFN α 或 IFN α R 活性的拮抗剂可中和 I 型 IFN 或 IFN α 诱导型特征。中和 I 型 IFN 或 IFN α -诱导型特征表示减少至少 1、至少 2、至少 3、至少 5、至少 7、至少 8、至少 10、至少 12、至少 15、至少 20、至少 25、至少 30、至少 35、至少 40、至少 45 或至少 50 种 I 型 IFN 或 IFN α 诱导的基因。I 型 IFN 或 IFN α 诱导的基因 T 可以是题为“干扰素 α 诱导的药效学标记物”(Interferon Alpha-induced Pharmacodynamic Markers)的

国际专利申请公布号 WO/08070137A2 中公开的基因的任何组。中和 I 型 IFN 或 IFN α 诱导型特征表示任何 I 型 IFN 或 IFN α 诱导型特征中的至少一种、至少两种、至少三种、至少五种、至少七种、至少八种、至少十种、至少十二种、至少十五种、至少二十种、至少二十五种、至少三十种、至少三十五种、至少四十种、至少四十五种或至少五十种基因下调至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 7%、至少 8%、至少 10%、至少 15%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80% 或至少 90%。或者,中和 I 型 IFN 或 IFN α 诱导型特征表示 I 型 IFN 或 IFN α 诱导型基因表达的降低,这种降低是对照样品中 I 型 IFN 或 IFN α 诱导型基因表达水平的至多 50%、至多 45%、至多 40%、至多 35%、至多 30%、至多 25%、至多 20%、至多 15%、至多 10%、至多 5%、至多 4%、至多 3%、至多 2% 或至多 1%。如果结合和调节,更具体地说是拮抗 I 型 IFN 或 IFN α 活性的药剂是生物试剂,如抗体,则该试剂在以下剂量时可中和 I 型 IFN 或 IFN α 特征:0.3-30mg/kg、0.3-10mg/kg、0.3-3mg/kg、0.3-1mg/kg、1-30mg/kg、3-30mg/kg、5-30mg/kg、10-30mg/kg、1-10mg/kg、3-10mg/kg 或 1-5mg/kg。

[0055] 此外或或者,结合和调节,更具体地说拮抗 I 型 IFN 或 IFN α 活性的药剂可中和一种或多种 I 型 IFN 或 IFN α 亚型的表达。IFN α 或 I 型 IFN 亚型可包括任何的多于一种、多于二种、多于三种、多于四种、多于五种、多于六种、多于七种、多于八种、多于九种或多于十种的 IFN α 或 I 型 IFN 亚型。这些亚型可包括 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 4、IFN α 5、IFN α 6、IFN α 7、IFN α 8、IFN α 10、IFN α 14、IFN α 17、IFN α 21、IFN β 或 IFN ω 。这些亚型可包含 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 8 和 IFN α 14 的所有。或者,这些亚型可包含 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 4、IFN α 5、IFN α 8、IFN α 10 和 IFN α 21。中和 IFN α 或 I 型 IFN 亚型可以是任何至少 1、至少 2、至少 3、至少 5、至少 7、至少 8 或至少 10 种亚型减少至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 7%、至少 8%、至少 10%、至少 15%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80% 或至少 90%。IFN α 或 I 型 IFN 亚型的中和可以是 IFN α 或 I 型 IFN 亚型基因表达的降低,这种降低是对照样品中那些 IFN α 或 I 型 IFN 亚型的表达水平的至多 50%、至多 45%、至多 40%、至多 35%、至多 30%、至多 25%、至多 20%、至多 15%、至多 10%、至多 5%、至多 4%、至多 3%、至多 2% 或至多 1%。如果结合和调节,更具体说是拮抗 IFN α 活性或 I 型 IFN 活性的药剂是生物试剂,如抗体,则该试剂在以下剂量时可中和 IFN α 或 I 型 IFN 亚型:0.3-30mg/kg、0.3-10mg/kg、0.3-3mg/kg、0.3-1mg/kg、1-30mg/kg、3-30mg/kg、5-30mg/kg、10-30mg/kg、1-10mg/kg、3-10mg/kg 或 1-5mg/kg。

[0056] 此外或或者,结合和调节,更具体说是拮抗 I 型 IFN 或 IFN α 活性的药剂可中和 IFN α 受体,即 IFNAR1、IFNAR2 或二者,或者 TNF α 、IFN γ 或 IFN γ 受体 (IFNGR1、IFNGR2 或 IFNGR1 和 IFNGR2) 的表达。IFN α 受体,即 IFNAR1、IFNAR2 或二者,或者 TNF α 、IFN γ 或 IFN γ 受体 (IFNGR1、IFNGR2 或 IFNGR1 和 IFNGR2) 表达的中和可以是这些基因中任何至少一种、至少两种、至少三种、至少五种或至少六种的表达降低至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 7%、至少 8%、至少 10%、至少 15%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80% 或至少 90%。IFN α 受体,即 IFNAR1 或 IFNAR2,或者 TNF α 、IFN γ 或 IFN γ 受体 (IFNGR1、IFNGR2 或 IFNGR1 和 IFNGR2) 的表达中和是表达的降低,这种降低是这些基因在对照样品中的表达水平的至

多 50%、至多 45%、至多 40%、至多 35%、至多 30%、至多 25%、至多 20%、至多 15%、至多 10%、至多 5%、至多 4%、至多 3%、至多 2% 或至多 1%。如果结合和调节,更具体说是拮抗 I 型 IFN 或 IFN α 活性的药剂是生物试剂,如抗体,则该试剂在以下剂量时可中和 IFN α 受体,即 IFNAR1 或 IFNAR2,或者 TNF α 、IFN γ 或 IFN γ 受体,即 IFNGR1 或 IFNGR2 的表达: 0.3-30mg/kg、0.3-10mg/kg、0.3-3mg/kg、0.3-1mg/kg、1-30mg/kg、3-30mg/kg、5-30mg/kg、10-30mg/kg、1-10mg/kg、3-10mg/kg 或 1-5mg/kg。

[0057] 申请人提供了一组非限制性实施方式以描述本发明的一些方面。

[0058] 1. 一种治疗需要这种治疗的患者的硬皮病的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素 (IFN) 的拮抗剂。

[0059] 2. 一种减轻需要这种治疗的患者的硬皮病相关一种或多种症状的方法,包括给予治疗有效量的 I 型干扰素 (IFN) 的拮抗剂。

[0060] 3. 如实施方式 1 或 2 所述的方法,其中所述拮抗剂是抗体。

[0061] 4. 如实施方式 3 所述的方法,其中所述抗体是抗-IFN α R 抗体。

[0062] 5. 如实施方式 3 所述的方法,其中所述抗体是抗-IFN α 抗体。

[0063] 6. 如实施方式 1 或 2 所述的方法,其中所述症状选自:皮肤纤维化、皮肤病损、脱发、炎症、皮肤增厚、胶原沉积、蛋白尿、以及补体沉积。

[0064] 7. 如实施方式 1 或 2 所述的方法,其中以约 0.03mg/kg-30mg/kg 的剂量给予所述抗体。

[0065] 8. 如实施方式 1 或 2 所述的方法,其中通过改良罗德南皮肤评分测定到所述治疗使症状改善。

[0066] 9. 如实施方式 1 或 2 所述的方法,其中通过改良雷诺德症状评分 (RCS) 测定到所述治疗使症状改善。

[0067] 10. 如实施方式 1 或 2 所述的方法,其中通过对患者皮肤样品进行 qPCR 分析测定到所述治疗使症状改善。

[0068] 11. 如实施方式 10 所述的方法,其中所述治疗降低选自 MPO、TNF α 、IL-6 或 INOS 的炎性基因的表达。

[0069] 12. 如实施方式 10 所述的方法,其中所述治疗降低选自 KLF10、TIMP、EPGN 或 MMP9 的组织重塑相关基因表达。

[0070] 剂量和给药

[0071] 使用标准研究技术可确定能有效治疗、预防或控制硬皮病 / 全身性硬化症及疾病症状的本发明组合物的量。基于本领域普通技术人员熟知的多个因素的考虑,技术人员可确定优选有效剂量的选择(如,通过临床试验)。此类因素包括涉及的症状,患者体重、患者免疫状态和技术人员所知的其它因素,从而反映所给予药物组合物的准确性。

[0072] 制剂中所用准确剂量还取决于给药途径以及硬皮病症状所显示的严重程度,应根据实践者的判断和各患者的状况决定。可由体外或动物模型实验系统获得的剂量反应曲线外推获得有效剂量。

[0073] 对于抗体、融合蛋白或突变蛋白,给予患者的剂量通常为 0.1-100mg/kg 患者体重。在一个实施方式中,给予患者的剂量为 0.1-20mg/kg 患者体重。在另一实施方式中,给予患者的剂量为 1-10mg/kg 患者体重。在另一实施方式中,给予患者的剂量为 0.3-30mg/

kg 患者体重。在另一个实施方式中,给予患者的剂量为 0.3-3.0mg/kg。在另一个实施方式中,给予患者的剂量为 0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、3.0mg/kg、4.0mg/kg、5.0mg/kg、6.0mg/kg、7.0mg/kg、8.0mg/kg、9.0mg/kg、10.0mg/kg、11.0mg/kg、12.0mg/kg、13.0mg/kg、14.0mg/kg、15.0mg/kg、16.0mg/kg、17.0mg/kg、18.0mg/kg、19.0mg/kg、20.0mg/kg 或 25mg/kg。在一具体实施方式中,给予患者的剂量选自 0.1mg/kg、0.3mg/kg、1.0mg/kg、3.0mg/kg、10mg/kg 或 30mg/kg 患者体重。

[0074] 在具体实施方式中,抗体(任选用药学上可接受的载体配制成药物组合物的一部分)剂量为至少约 0.0005、0.001、0.05、0.075、0.1、0.25、0.375、0.5、1、2.5、5、10、20、37.5 或 50mg/m² 和 / 或小于约 500、475、450、425、400、375、350、325、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75、60、50、37.5、20、15、10、5、2.5、1、0.5、0.375、0.1、0.075 或 0.01mg/m²。在某些实施方式中,剂量为约 0.0005-200mg/m²,约 0.001-150mg/m²,约 0.075-125mg/m²,约 0.375-100mg/m²,约 2.5-75mg/m²,约 10-75mg/m²,约 20-50mg/m²。在相关实施方式中,所用的抗-IFN α 或 IFN α R 的剂量为至少约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5mg/kg 患者体重。

[0075] 在特定实施方式中,所用抗-IFN α 或抗-IFN α R 抗体的剂量为至少约 1-10、约 5-15、约 10-20 或约 15-25mg/kg 患者体重。在特定实施方式中,所用抗-IFN α 或抗-IFN α R 抗体的剂量为至少约 1-20、约 3-15 或约 5-10mg/kg 患者体重。在另一实施方式中,所用抗-IFN α 或抗-IFN α R 抗体的剂量为至少约 5、约 6、约 7、约 8、约 9 或约 10mg/kg 患者体重。在某些实施方式中,单一剂量单位的抗体(任选用药学上可接受的载体配制成药物组合物的一部分)可以是至少约 0.5、约 1、约 2、约 4、约 6、约 8、约 10、约 12、约 14、约 16、约 18、约 20、约 22、约 24、约 26、约 28、约 30、约 32、约 34、约 36、约 38、约 40、约 42、约 44、约 46、约 48、约 50、约 52、约 54、约 56、约 58、约 60、约 62、约 64、约 66、约 68、约 70、约 72、约 74、约 76、约 78、约 80、约 82、约 84、约 86、约 88、约 90、约 92、约 94、约 96、约 98、约 100、约 102、约 104、约 106、约 108、约 110、约 112、约 114、约 116、约 118、约 120、约 122、约 124、约 126、约 128、约 130、约 132、约 134、约 136、约 138、约 140、约 142、约 144、约 146、约 148、约 150、约 152、约 154、约 156、约 158、约 160、约 162、约 164、约 166、约 168、约 170、约 172、约 174、约 176、约 178、约 180、约 182、约 184、约 186、约 188、约 190、约 192、约 194、约 196、约 198、约 200、约 204、约 206、约 208、约 210、约 212、约 214、约 216、约 218、约 220、约 222、约 224、约 226、约 228、约 230、约 232、约 234、约 236、约 238、约 240、约 242、约 244、约 246、约 248 或约 250 微克 /m²。在其它实施方式中,剂量为至多 1 克 / 单个剂量单位。

[0076] 可通过任何途径将本发明组合物给予人患者,这些途径包括但不限于:静脉内、皮内、透皮、皮下、肌肉内、吸入(如通过气雾剂)、口腔含化(如舌下)、局部(即皮肤和粘膜表面,包括气道表面)、鞘内、关节内、胸膜内、大脑内、动脉内、腹膜内、口服、淋巴内、鼻内、直肠或阴道给药,通过局部导管灌注或病损内直接注射。在一个实施方式中,通过在给定时间(0.5-2 小时)内静脉内推注或静脉内输注给予本发明组合物。可通过蠕动泵,或以长效制剂形式递送本发明组合物,但如本领域所了解的那样,在任何给定情况下最合适的途径取决于以下因素,例如对象的种类、年龄、性别和总体健康状况,所治疗疾病的特性和严重程度和 / 或所给予的特定组合物的特性(即剂量、制剂)。在具体实施方式中,给药途径是

在一段时间,每周一次或每周两次推注或连续输注。在其它特定实施方式中,给药途径是皮下注射,任选每周一次或两次。在一个实施方式中,对门诊患者给予本发明的组合物和/或方法。在另一实施方式中,使用预填充注射器给予本发明的组合物和/或方法。

[0077] 在某些实施方式中,包含抗 IFN α 或 IFN α R 抗体的组合物的剂量以 mg/kg 患者体重为单位计量。在另外的实施方式中,包含抗 IFN α 或 IFN α 抗体的组合物的剂量以 mg/kg 患者去脂体重(即体重减去体脂含量)为单位计量。在另外的实施方式中,包含抗 IFN α 或 IFN α R 抗体的组合物的剂量以 mg/m² 患者体表面积为单位计量。在另外的实施方式中,包含抗 IFN α 或 IFN α R 抗体的组合物的剂量以每次给予患者剂量的 mg 为单位计量。任何剂量衡量方法均可与本发明组合物和方法联用,可通过本领域标准方式转换剂量单位。

[0078] 本领域技术人员理解可基于多种因素选择剂量,包括年龄、性别、物种和对象健康状况(如硬皮病分级),所需细胞消耗程度,所治疗的疾病和/或所用具体抗体或抗原结合片段,并可由本领域技术人员确定。例如,可从体外测试系统或动物模型(如棉鼠或猴)测试系统得到的剂量反应曲线外推得到本发明组合物的有效量。本领域了解评估抗体作用的模型和方法(Wooldridge 等, Blood, 89(8):29942998(1997)),通过引用全文纳入本文)。

[0079] 可用于本发明方法的给药方案的例子包括但不限于:每天、每周三次(间歇性)、每周或每 14 天。在某些实施方式中,给药方案包括但不限于:限定时间内每月给药或每 6-8 周给药,或每周给药。在一个实施方式中,给药可每周进行,给予 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 周。

[0080] 本领域技术人员应理解,与维持方案相比,初始治疗的剂量通常较高和/或给药频率较高。上述所有剂量均为示例性,可与本发明组合物和方法联用,然而当抗-IFN α 或 IFN α R 抗体与消炎剂联用时,使用上述较低剂量。

[0081] 在某些实施方式中,可根据患者对本发明组合物和方法的免疫应答来调节递送剂量和速率,和/或降低输注速率。根据本发明方法的另一方面,可利用本发明组合物和方法预防治疗患者,以检测、最大程度降低免疫应答,或最大程度减少本发明组合物和方法的不良作用。

[0082] I 型干扰素拮抗剂

[0083] 如本文所用术语“I 型 IFN 拮抗剂”指阻断、抑制、阻止、中和、降低或干扰、废除经由干扰素 α 受体(IFNAR)信号转导和/或激活的任何试剂。I 型 IFN 的拮抗剂可通过干扰任何 I 型 IFN 和 IFNAR 之间的相互作用来发挥作用。因此 I 型 IFN 的拮抗剂可通过结合并拮抗 I 型 IFN 或结合并拮抗 IFNAR 来发挥作用。I 型 IFN 的拮抗剂可与 IFNAR 的 IFNAR 1 链或 IFNAR 的 IFNAR 2 链结合,或者与两条链组合产生的表位结合。在具体实施方式中, I 型 IFN 的拮抗剂是与 IFNAR 的 IFNAR 1 链结合的抗体,如通过引用全文纳入本文的美国专利申请公布号 2006/0029601, 2006/0020118, 和美国专利号 6, 713, 609 所公开的。

[0084] 本发明的某些实施方式提供了干扰 I 型 IFN 配体结合例如可溶性受体链(如可溶性 IFNAR1 或 IFNAR2)或其片段的拮抗剂。其它相关实施方式提供了选择性与一种或多种 I 型干扰素结合或与 IFNAR 结合的抗体或其抗原结合片段,从而以例如竞争、非竞争或无竞争性抑制的方式干扰配体结合。另外的实施方式提供了通过 IFNAR 干扰信号转导的拮抗剂。另外的实施方式提供了拮抗 I 型干扰素下游效应的拮抗剂。

[0085] 可将 I 型干扰素拮抗剂给予患者,或者可将患者鉴定为给予试剂或治疗剂的候选

人。在一些实施方式中，I 型干扰素拮抗剂是结合并阻断 I 型 IFN、IFN α 、或 IFNAR 活性的任何分子。拮抗剂可为小分子或生物试剂。如果治疗剂是小分子，那么它可以是合成的，或从天然来源鉴定和分离。

[0086] I 型干扰素拮抗剂抗体

[0087] 在本发明的某些实施方式中，I 型干扰素拮抗剂包括结合于 I 型干扰素受体并阻断其配体的结合（即干扰素 α 、干扰素 β 或干扰素 ω ）的抗-IFNAR 抗体和 / 或其片段。此外，I 型干扰素拮抗剂可以是结合 I 型干扰素（即干扰素 α 、干扰素 β 或干扰素 ω ）并阻断与其受体（即 IFN α R）的结合的抗-I 型干扰素抗体和 / 或其片段。抗体介导的配体结合抑制可以竞争性、非竞争性或无竞争性抑制的方式发生。此外，基于抗体的拮抗剂可以阻碍经过 I 型干扰素受体的胞内信号转导的方式发挥作用。

[0088] 因此，本发明的范围包括嵌合的、灵长化、镶面的，人源化、去免疫的和人抗-IFNAR 和抗 I 型干扰素抗体和 / 或其抗原结合片段。可用于本发明治疗方法的合适抗体拮抗剂包括单克隆抗体，如非人的、嵌合的、灵长化的、人源化的、去免疫的和 / 或完全人抗体或其抗原结合片段。抗体拮抗剂还包括一种或多种化学修饰以增加抗体或其抗原结合片段循环半衰期，例如，与聚乙二醇交联（即 PEG 化）。

[0089] 在一个实施方式中，抗体可对任何 I 型 IFN 或 IFN α 的亚型具有特异性。例如，抗体可以对 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 4、IFN α 5、IFN α 6、IFN α 7、IFN α 8、IFN α 10、IFN α 14、IFN α 17、IFN α 21、IFN β 或 IFN ω 中任一具有特异性。或者，抗体可以对 IFN α 亚型中任何两种、任何三种、任何四种、任何五种、任何六种、任何七种、任何八种、任何九种、任何十种、任何十一种、任何十二种 I 型 IFN 具有特异性。如果抗体对多于一种 I 型 IFN 亚型具有特异性，那么抗体可对 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 4、IFN α 5、IFN α 8、IFN α 10 和 IFN α 21 具有特异性；或者可对 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 4、IFN α 5、IFN α 8 和 IFN α 10 具有特异性；或者可对 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 4、IFN α 5、IFN α 8 和 IFN α 21 具有特异性；或者可对 IFN α 1、IFN α 2、IFN α 4、IFN α 5、IFN α 10 和 IFN α 21 具有特异性；或对这些亚型的任何组合具有特异性。I 型 IFN 或 IFN α 的特异性抗体包括 MEDI-545，除 MEDI-545 外的任何生物试剂或抗体，2004 年 12 月 10 日提交的美国专利申请号 11/009,410 和 2005 年 6 月 20 日提交的 11/157,494 所述抗体，9F3（及其人源化变体）和美国专利号 7,087,726 所述其它抗体，NK-2 和 YOK5/19（WO 84/03105），LO-22（美国专利号 4,902,618），144BS（美国专利号 4,885,166）以及 EBI-1、EBI-2 和 EBI-3（EP 119476）。

[0090] 在一个实施方式中，抗体拮抗剂是 MEDI-545。MEDI-545 是结合多种干扰素 α （IFN α ）亚型的、完全人的、147,000 道尔顿 IgG1k 单克隆抗体（Mab）。MEDI-545 生产自 100% 人蛋白序列，因此是完全人单克隆抗体。完全人单克隆抗体相对其它形式的单克隆抗体如嵌合和人源化抗体具有优势，它们具有更好的安全性特征，从人体中清除较慢，因此可能减少给药频率。MEDI-545 源自 IgG4k 抗体，13H5，基于功能实验进行选择，具有作为潜在治疗剂的最理想的特性。接着将 13H5 转换为 IgG1 抗体同种型，在 CHO 细胞中产生，并选择以便进一步表征和临床前开发，最开始命名为 MDX-1103，现在称为 MEDI-545。参见美国专利申请公开号 2007/0014724，名为《脱氨基特征减弱的抗体》（Antibodies with Decreased Deamidation Profiles）的美国临时申请号 60/909,232，名为《抗体制剂》（Antibody Formulation）的美国临时申请号 60/909,117，名为《干扰素 α 诱导药效学标

记物》(Interferon Alpha-induced Pharmacodynamic Markers) 的国际专利申请公开号 WO/08070137A2, 以及名为《治疗系统性红斑狼疮的方法》(Methods of Treating Systemic Lupus Erythematosus) 的国际专利申请号 WO/08070135A2, 各自通过引用纳入本文。在一个具体实施方式中, 抗体拮抗剂不是 MEDI-545。

[0091] 本发明的抗体包括但不限于: 合成抗体, 单克隆抗体, 多克隆抗体, 重组产生的抗体, 细胞内抗体, 多特异性抗体(包括双特异性抗体), 人抗体, 人源化抗体, 嵌合抗体, 合成抗体, 单链 Fvs(scFv)(包括双特异性 scFvs), BiTE 分子, 单链抗体 Fab 片段, F(ab') 片段, 二硫键连接 Fvs(sdFv), 抗-独特型(抗-Id) 抗体以及上述任一的表位结合片段。具体说, 本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分。而且, 本发明的抗体可以是任何同种型。在一个实施方式中, 本发明的抗体是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。本发明的抗体可以是包含可变区和恒定区的全长抗体, 或其抗原结合片段, 如单链抗体或 Fab 或 Fab' 2 片段。

[0092] 本发明还提供包含本发明抗体或其抗原结合片段并与治疗剂如细胞毒素或放射性同位素连接的免疫偶联物。本发明还提供双特异性分子, 所述分子包含与第二功能部分相连的本发明抗体或其抗原结合片段, 所述第二功能部分具有不同于除所述抗体或其抗原结合部分的结合特异性。

[0093] 还提供了包含本发明抗体、或其抗原结合部分或免疫偶联物或双特异性分子以及药学上可接受的载体的组合物。

[0094] 本领域已知结合 IFN α R 的抗体。这些抗体的非限制性的例子参见例如, 通过引用全文纳入本文的美国专利申请公开号 2006/0029601。本领域已知结合 I 型干扰素的抗体。这些抗体的非限制性例子参见 2008 年 3 月 7 日提交的美国临时专利申请号 61/006, 962, 以及 2008 年 5 月 2 日提交的 61/049, 970, 题目均为《Fc 配体亲和性降低的抗-IFNAR1 抗体》("Anti-IFNAR1 Antibodies with Reduced Fc Ligand Affinity")。本领域已知结合多种干扰素 α 亚型的抗体。这些抗体的非限制性例子参见例如, 通过引用全文纳入本文的美国专利申请号 7, 087, 726 以及美国专利申请公布号 2007/0014724。

[0095] 如上文所述, 在某些实施方式中, 需要改变干扰素 α 特定亚型或亚型组合的活性。

[0096] 在某些实施方式中, 需要改变抗-I 型干扰素、抗-干扰素 α 抗体或抗-IFNAR 抗体的半衰期。在一个实施方式中, 需要降低抗体的体内半衰期。在另一实施方式中, 需要增加抗体的体内半衰期。参见例如, 通过引用全文纳入本文的美国专利号申请公布号 2006/0198840 A1。

[0097] 可通过本领域熟知的多种用于产生、合成和生产抗体方法中的任何方法产生抗体或其片段, 具体说, 通过化学合成或通过重组表达技术。参见例如, Brinkman 等, 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames 等, 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough 等, 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic 等, 1997, Gene 187:9-18; Burton 等, 1994, Advances in Immunology 57:191-280; 国际申请号 PCT/GB91/01134; 国际公布号 W090/02809、W0 91/10737、W0 92/01047、W0 92/18619、W0 93/11236、W0 95/15982、W0 95/20401、W097/13844; 美国专利号 5, 698, 426、5, 223, 409、5, 403, 484、5, 580, 717、5, 427, 908、5, 750, 753、5, 821, 047、5, 571, 698、5, 427, 908、5, 516, 637、

5, 780, 225、5, 658, 727、5, 733, 743、5, 969, 108, 国际公布开号 W092/22324 ;Mullinax 等, 1992, BioTechniques 12(6) :864-869 ;Sawai 等, 1995, AJRI 34 :26-34 ;Better 等, 1988, Science 240 :1041-1043 ;美国专利号 4, 444, 887、4, 716, 111 ;国际公布号 W0 98/46645、W0 98/50433、W098/24893、W098/16654、W0 96/34096、W0 96/33735、W0 91/1074 ;国际公开号 W0 98/24893、W0 96/34096、W0 96/33735 ;美国专利号 5, 413, 923、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 569, 825、5, 661, 016、5, 545, 806、5, 814, 318、5, 939, 598 ;Morrison, 1985, Science 229 :1202 ;O'i 等., 1986, BioTechniques 4 :214 ;Gillies 等, 1989, J. Immunol. Methods 125 :191-202 ;美国专利号 5, 807, 715、4, 816, 567、4, 816, 397、6, 311, 415 ;欧洲专利号 EP 239, 400 ;国际公开号 W091/09967 ;美国专利号 5, 225, 539、5, 530, 101、5, 585, 089 ;欧洲专利号 EP592, 106、EP 519, 596 ;Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5) :489-498 ;Studnicka 等, 1994, Protein Engineering 7(6) :805-814 ;Roguska 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :969-973) ;美国专利号 5, 565, 332 ;美国专利号 6, 407, 213、5, 766, 886 ;W0 9317105 ;Tan 等, J. Immunol. 169 :1119-25(2002) ;Caldas 等, Protein Eng. 13(5) :353-60(2000), Morea 等, Methods 20(3) :267-79(2000) ;Baca 等, J. Biol. Chem. 272(16) :10678-84(1997) ;Roguska 等, ProteinEng. 9(10) :895-904(1996) ;Couto 等, Cancer Res. 55(23Supp) :5973s-5977s(1995) ;Couto 等, Cancer Res. 55(8) :1717-22(1995) ;Sandhu J S, Gene150(2) :409-10(1994) ;以及 Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3) :959-73(1994), Queen 等, 美国专利号 5, 585, 089 ;Riechmann 等, 1988, Nature 332 :323 ;Kutmejer 等., 1994, BioTechniques 17 :242) ;国际公布号 W0 86/05807, 国际公布号 W0 89/01036 ;以及美国专利号 5, 122, 464 ;以及美国专利号 5, 807, 715 ;各自通过引用全文纳入本文。

[0098] 拮抗性多肽和小分子

[0099] 在一些实施方式中, I 型 IFN 拮抗剂是多肽。在具体实施方式中, 拮抗剂是作为 I 型 IFN 的片段或 IFNAR 一条链的片段的短多肽或肽。例如, 可使用 IFNAR 1 链的肽片段, 特别是 IFNAR 1 链胞外部分的肽片段作为 I 型 IFN 拮抗剂。此类 IFNAR 片段肽参见通过引用全文纳入本文的美国专利申请公布号 2004/0067888。在具体实施方式中, 肽拮抗剂是 IFNAR1 链的 9-12 个氨基酸残基片段。可用源自 IFNAR 链的肽类似物, 但其具有一个或多个氨基酸取代 (如一个或多个保守性取代) 和 / 或缺失和 / 或加入, 而仍保留了肽作为 I 型 IFN 拮抗剂的能力。

[0100] 本发明的肽可通过编码该肽的相应核酸的体内表达而给予。因此, 在另一方面, 本发明提供了能在对象 / 患者合适细胞中表达用作 I 型 IFN 拮抗剂的肽或多肽的核酸。此类核酸可以是病毒载体或非病毒载体, 包括包装成将本发明核酸递送至人细胞的形式载体。因此, 本发明的核酸包括其形式适于病毒载体治疗的病毒载体, 例如, 重组逆转录病毒, 腺病毒或减毒流感病毒。或者, 本发明的核酸可以是非病毒载体, 例如包装成脂质体或含表面活性剂的载体递送颗粒。

[0101] 可采用常规技术通过合成或在宿主细胞中表达核酸来制备本发明的肽或多肽。通过将较长序列片段化产生, 如具有切割合适蛋白酶切割位点的融合多肽获得所需的本发明肽或多肽。

[0102] 在一个实施方式中, 调节物是蛋白质, 常常为天然产生的蛋白质或天然产生的蛋

白质的片段。在某些实施方式中,这些蛋白可以是干扰素拮抗性突变蛋白,例如拮抗 INF α R 的干扰素 α 突变蛋白。因此,可使用如包含蛋白质的细胞提取物,或蛋白质性细胞提取物的随机或直接消化产物。以此方式可产生用于本发明方法筛选的蛋白质库。具体的实施方式是细菌、真菌、病毒和哺乳动物蛋白质文库,优选后者,尤其优选人蛋白质。尤其有用的受试化合物是靶点属于如酶、配体和受体的底物的蛋白类型。

[0103] 在一些实施方式中,调节物是约 5-30 个氨基酸的肽,更具体说是约 5-20 个氨基酸,更具体说是约 7-15 个氨基酸。肽可以是如上文所述的天然产生蛋白质的消化物,随机肽或“偏好性”随机肽。本文中通过“随机化的”或语法等同物分别指基本上由核苷酸和氨基酸随机序列组成的核酸或肽。由于这些随机肽(或下文中讨论的核酸)常是化学合成的,它们可在任何位置掺入任何核苷酸或氨基酸。可设计合成工艺产生随机化蛋白质或核酸,以形成序列长度上所有或大多数的可能组合,由此形成随机化候选生物活性蛋白质试剂的文库。

[0104] 在一个实施方式中,所述文库完全随机化,任何位置都不具有序列偏好或恒定不变。在优选实施方式中,所述文库是偏好性文库。即序列内部的一些位置或恒定或选自有限数目的可能性。在优选实施方式中,在指定类型中对核苷酸或氨基酸残基进行随机化,如疏水性氨基酸,亲水性残基,空间位阻偏好(小或大)残基,倾向于产生核酸结合域,产生用于交联的半胱氨酸,用于 SH-3 结构域的脯氨酸,用于磷酸化位点的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或组氨酸。

[0105] 除了基于抗体的 I 型干扰素拮抗剂,本发明还涵盖 I 型干扰素拮抗剂及其包含一种或多种小分子,例如干扰 I 型干扰素与其受体(即 IFNAR)结合的那些小分子的组合物。

[0106] 在某些实施方式中,可筛选潜在小分子拮抗剂的组合文库结合 I 型干扰素或 I 型干扰素受体的能力。通常,通过鉴定具有某些所需特性或活性,如抑制活性的化合物(称为“先导化合物”),产生先导化合物的变体,并评估这些化合物变体的特性和活性,从而产生具有有用特性的新化学实体。这种分析中常常采用高通量筛选(HTS)方法。

[0107] 在一个优选的实施方式中,高通量筛选方法涉及提供包含大量潜在治疗性化合物(候选化合物)的文库。然后在一种或多种实验中对此类“组合化学文库”进行筛选,从而鉴定出具有需要特征活性的文库成员(具体的化学类别或亚类)。由此鉴定的化合物可用作常规“先导化合物”,或者本身可用作潜在或实际的 IBD 治疗剂。

[0108] 组合化学文库是通过化学合成或生物合成,通过组合多种化学“构建模块”,例如试剂产生的多样性化合物集合。例如,对于给定化合物长度(即多肽化合物中的氨基酸数量),通过以各种可能的方式组合称为氨基酸的化学构建模块形成线性组合化学文库,如多肽(突变蛋白)文库。可通过化学构建模块的这种组合混合来合成上百万种化合物。Gallop 等, J. Med. Chem. 37(9):1233-1251(1994)。

[0109] 本领域技术人员熟知组合化学文库的制备和筛选。此类组合化学文库包括但不限于肽文库(参见如美国专利号 5,010,175, Furka, Pept. Prot. Res. 37:487-493(1991), Houghton 等, Nature, 354:84-88(1991)), 类肽(PCT 公布号 WO 91/19735), 编码的肽(PCT 公布号 WO 93/20242), 随机生物寡聚物(PCT 公布号 WO 92/00091), 苯并二氮杂萘(美国专利号 5,288,514), 多样物(diversomer)如海因、苯并二氮杂萘和二肽(Hobbs 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6909-6913(1993)), 插烯多肽(Hagihara 等, J. Amer. Chem.

Soc. 114 :6568(1992)), 具有 β -D- 葡萄糖的非肽性肽类似物 (Hirschmann 等, J. Amer. Chem. Soc. 114 :9217-9218(1992)), 小分子文库的类似物有机合成 (Chen 等, J. Amer. Chem. Soc. 116 :2661(1994)), 低聚氨基甲酸酯 (Cho 等, Science 261 :1303(1993)), 和 / 或肽酰磷酸酯 (Campbell 等, J. Org. Chem. 59 :658(1994))。参见 Gordon 等, J. Med. Chem. 37 :1385(1994), 核酸文库 (参见如思塔基公司 (Stratagene, Corp.)), 肽核酸文库 (参见如美国专利号 5, 539, 083), 抗体文库 (参见例如 Vaughn 等, Nature Biotechnology 14(3) :309-314(1996), 以及 PCT/US96/10287), 碳水化合物文库 (参见如 Liang 等, Science 274 :1520-1522(1996), 以及美国专利号 5, 593, 853), 和小有有机分子文库 (参见如苯并二氮杂**草**, Baum, C&EN, 1 月 18 日, 33 页 (1993); 异戊二烯, 美国专利号 5, 569, 588; 噻唑啉和间胺苯硫**草**酮 (metathiazanones), 美国专利号 5, 549, 974; 吡咯烷, 美国专利号 5, 525, 735 和 5, 519, 134; 吗啉化合物, 美国专利号 5, 506, 337; 苯并二氮杂**草**, 美国专利号 5, 288, 514 等)。

[0110] 用于制备组合文库的设备市售可购 (参见例如, 357MPS, 390MPS, 高级化学技术公司 (Advanced Chem Tech), 肯塔基州路易斯维尔, Symphony, 瑞宁公司 (Rainin), 马萨诸塞州沃本, 433A 应用生物系统公司 (Applied Biosystems), 加州福斯特城, 9050Plus, 密立博公司 (Millipore), 马萨诸塞州贝德福德)。

[0111] 已开发出多种熟知的机器人系统用于液相化学。这些系统包括自动工作站如武田化学工业有限公司 (Takeda Chemical Industries, LTD) (日本大阪) 自动合成装置, 以及使用机械臂的机器人系统 (Zymate II, 泽马克集团 (Zymark Corporation), 马萨诸塞州霍普金顿; Orca, 惠普公司 (Hewlett-Packard), 加利福尼亚州帕洛阿尔托), 这些机器模仿化学家进行的人工合成操作。上述设备加以恰当改良, 适于本发明用途。此外, 多种组合文库本身是市售可购的 (参见例如, 卡姆基克斯 (ComGenex), 新泽西州普林斯顿, 阿喜克斯公司 (Asinex) 俄罗斯莫斯科, 泰普斯公司 (Tripos, Inc.) 密苏里州圣路易斯, 俄罗斯莫斯科的凯姆思塔公司 (ChemStar), 3D 制药公司 (3D Pharmaceuticals), 宾夕发尼亚埃克思顿, 马泰克生物科学公司 (MartekBiosciences), 马里兰州哥伦比亚)。

[0112] 检测 IFN 介导信号转导的实验可用于检测干扰素 - 受体相互作用, 如培养的人肿瘤细胞系中 IFN- 介导的细胞增殖抑制。此外, 可使用报道基因实验, 例如, 使用自 IFN 敏感基因启动子表达的报道基因。Lallemand 等, J. Leukocyte Biol. 60 :137-146(1996)。合适的报道基因包括编码荧光素酶和绿色荧光蛋白的基因。在该实验中, 报道基因的表达取决于 IFN 活性, 并且 IFN 拮抗剂选择性抑制 IFN- 刺激的基因表达。

[0113] 本领域熟练技术人员熟知用于评价具体多肽的存在与否、定量和其它特性的高通量实验。同样也熟知结合实验和报道基因实验。因此, 如美国专利号 5, 559, 410 公开的蛋白高通量筛选方法, 美国专利号 5, 585, 639 公开的核酸结合高通量筛选方法 (即在阵列中), 而美国专利号 5, 576, 220 和 5, 541, 061 公开了配体 / 抗体结合的高通量筛选方法。

[0114] 此外, 高通量筛选系统是市售可购的 (参见例如, 泽马克集团 (ZymarkCorp), 马萨诸塞州霍普金顿; 爱而技术工业公司 (Air Technical Industries), 俄亥俄州孟德尔; 贝克曼仪器公司 (Beckman Instruments, Inc.), 加利福尼亚州福勒顿; 普乐塞信系统公司 (Precision Systems, Inc.), 马萨诸塞州那提克等)。这些系统一般能实现全部步骤的自动化, 包括所有样品和试剂的吸移、液体分配、定时培育和最后在适合该测定的检测器上进

行微量滴定板读数。这些可配置系统提供了高通量和快速启动,以及高度灵活性和用户定制化。这些系统的制造商提供各种高通量系统的详细方案。因此,例如,泽马克公司提供有关检测调节基因转录、配体结合等的筛选系统的技术信息。

[0115] 联合治疗

[0116] 在一些实施方式中,可给予患者除了结合拮抗 I 型 IFN 活性,更具体说是 IFN α 的所述试剂外的第二种试剂。第二种药剂包括但不限于非-类固醇抗炎药,如布洛芬、萘普生、舒林酸、双氯芬酸、吡罗昔康、酮洛芬、二氟尼柳、萘丁美酮、依托度酸和奥沙普秦、吲哚美辛;抗疟药如羟基氯喹;皮质类固醇激素,如氯泼尼松、氢化可的松、甲泼尼龙和地塞米松;甲氨蝶呤;免疫抑制剂,如硫唑嘌呤和环磷酰胺;和靶向(例如)T 细胞的生物制剂,如阿法赛特(阿法赛特(alefacept))和依法利珠单抗(依法利珠单抗(efalizumab)),或靶向 TNF α 的生物制剂,如依坦西普,英利昔单抗(Remicade)和依米拉(Humira)。

[0117] 在其它实施方式中,用于抵消硬皮病血管疾病负面影响的第二种试剂可与本发明拮抗剂联用。例如,已报道钙通道阻断剂有助于血流至皮肤和心脏;血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂可逆转硬皮病肾血管痉挛的危机;并且波生坦(bosentan)(一种新的内皮收缩血管肽-1 受体抑制剂)或依前列醇(前列腺素)能改善肺部血流。此外,逆转血管痉挛的药物(如钙通道阻断剂,波生坦,前列腺素或氧化氮)均具有改善病程的潜力。未进行治疗的硬皮病的血管疾病的最终结果是由血栓形成或晚期内膜纤维化引起的血管闭塞。因此,低剂量阿司匹林形式的抗-血小板疗法可与本发明拮抗剂联用。抗纤维化试剂包括但不限于:秋水仙素,对氨基苯甲酸(PABA),二甲亚砷,D-青霉胺可与本发明拮抗剂联用。

[0118] 可设想的是本发明组合物包含一种或多种 I 型干扰素拮抗剂,如抗-I 型 IFN 抗体或其片段,抗-IFNAR 抗体或其片段,蛋白质包括肽,以及小化学分子。

[0119] 药物组合物

[0120] 用于本发明的包含抗-干扰素 α 抗体的药物组合物的非限制性例子参见名为《抗体制剂》(Antibody Formulation)的美国专利申请号 60/909,117,将其通过引用全文纳入本文。包含抗 I 型干扰素抗体的药物组合物的例子参见通过引用全文纳入本文的专利申请公布号 2006/0029601。

[0121] 在一个实施方式中,本发明制剂用于胃肠外给药。在一个实施方式中,本发明制剂是注射用制剂。在一个实施方式中,本发明制剂用于静脉内、皮下或肌肉内给药。在一个具体实施方式中,本发明制剂包含抗-I 型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体,其中所述制剂用于皮下注射。在一具体实施方式中,将抗-I 型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体配制为用于皮下给药的预填充注射器。

[0122] 在一个实施方式中,本发明的制剂用于静脉内给药,其中所述制剂包含约 20-40mg/ml 抗-I 型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体或其片段。在一具体实施方式中,本发明的制剂用于静脉内给药,其中所述制剂包含约 20-40mg/ml 抗-I 型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体。

[0123] 在一个实施方式中,本发明的制剂用于皮下给药,其中所述制剂包含约 70-250mg/ml 抗-I 型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体或其片段。在一具体实施方式中,本发明的制剂用于皮下给药,其中所述制剂包含约 70-250mg/ml 抗-I 型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体。

[0124] 在一个实施方式中,本发明制剂用于气雾剂给药。

[0125] 本发明还提供适用于人胃肠外给药的药物单位剂型,其中在合适容器中包含抗-I型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体制剂。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包含抗-I型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体。在一个实施方式中,本发明的药物单位剂量包含静脉内、皮下或肌肉内递送的抗-I型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体制剂。在另一实施方式中,本发明的药物单位剂量包含气溶胶递送的抗-I型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体制剂。在一具体的实施方式中,本发明的药物单位剂量包含皮下递送的抗-I型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体制剂。在另一实施方式中,本发明的药物单位剂量包含气溶胶递送的抗-I型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体制剂。在另一实施方式中,本发明的药物单位剂量包含鼻内递送的抗-I型 IFN 或抗-干扰素 α 或抗-IFN α R 抗体制剂。

[0126] 在一个实施方式中,在密封容器中提供本发明制剂。

[0127] 本发明还提供包含本发明 I 型干扰素拮抗剂制剂的试剂盒。

[0128] 可使用药学上可接受的载体配制抗-IFN α 或 IFN α R 抗体组合物。术语“药学上可接受的”指不干扰活性成分生物学活性的有效性的一种或多种无毒物质。这类制剂通常可含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体和任选的其它治疗剂。这类药学上可接受的制剂通常也可包含适合给予人的相容性固体或液体填料、稀释剂或包封材料。用于医药时,盐应该是药学上可接受的盐,但可方便地使用非药学上可接受的盐来制备药学上可接受的盐,不能将它们排除在本发明范围以外。这类药理学和药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、硼酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。药学上可接受的盐也可制备成碱金属盐或碱土金属盐,如钠盐、钾盐或钙盐。术语“载体”指有机或无机的天然或合成成分,其与活性成分混合以便应用。药物组合物的各组分也能与本发明抗体混合或互相混合,该混合方式不会有实质性削弱所需药学功效的相互作用。

[0129] 按照本发明的某些方面,可将具有所需纯度的抗体或免疫偶联物与任选的生理学可接受载体、赋形剂或稳定剂(《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第16版,Osol, A. 编(1999))混合,以制备储存冻干制剂或水溶液形式的抗-IFN α 或 IFN α R 抗体组合物。在所用剂量和浓度下,可接受的载体、赋形剂或稳定剂对接受者无毒,包括:缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸缓冲剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁基或苄基醇;对羟基苯甲酸烷酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它糖,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的抗衡离子,如钠;金属络合物(如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如吐温、普罗流尼克(PLURONICS)[™]或聚乙二醇(PEG)。

[0130] 任选地,抗IFN α 或 IFN α R 抗体组合物也含有合适防腐剂,如苯扎氯铵;氯丁醇;对羟基苯甲酸酯类和硫柳汞。

[0131] 抗 IFN α 或 IFN α R 抗体组合物可以是方便的单位剂型,可通过药学领域熟知的任何方法制造。所有方法均包括使活性成分与一种或多种构成附加成分的载体相结合的步骤。通常,使活性化合物与液体载体、细分固体载体或二者均匀且紧密地结合,然后在需要时使该产品成型,从而制备抗 IFN α 或 IFN α R 抗体组合物。

[0132] 在一个实施方式中,所述组合物基本上无热原。

[0133] 适合胃肠外给药的组合物通常包括水性或非水性的抗 IFN α 或 IFN α R 抗体无菌制剂,优选其与接受者血液等渗。可利用合适的分散剂或湿润剂和助悬剂,按照已知方法配制该制剂。该无菌注射剂也可以是胃肠外可接受的无毒稀释剂或溶剂配制的无菌注射溶液或混悬液,例如,1,3-丁二醇配制的溶液。可以使用的可接受运载体和溶剂是水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。此外,通常采用无菌非挥发油作为溶剂或悬浮介质。出于此种目的,可采用任何刺激性小的非挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,注射剂中也可使用脂肪酸如油酸。适合口服、皮下、静脉内、肌内等给药途径的载体制剂可参见《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Co., Easton, PA)。在某些实施方式中,适合各种给药途径的载体制剂可能与利妥昔[™]所述相同或相似。参见《医师案头参考》(新泽西州蒙特威尔的医学经济学公司(Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ), 2005),第 958,960-960 页和第 13541357 页,通过引用全文纳入本文。在本发明的某些实施方式中,将抗 IFN α 或 IFN α R 抗体组合物与氯化钠、二水合枸橼酸钠、聚山梨酯 80 和无菌水配制在一起,用于静脉内给药,其中将所述组合物的 pH 调节为约 6.5。本领域技术人员了解,静脉内注射是一种使抗体快速分布在整个循环系统中的有用给药方式。然而,静脉内给药受到包括血管内皮细胞和皮下基质的血管屏障的限制。在某些实施方式中,本发明组合物和方法中的抗 IFN α 或 IFN α R 抗体是皮下自给予的。在这类实施方式中,将该组合物配制成冻干药物或配制在液体缓冲液(如 PBS 和 / 或柠檬酸盐缓冲液)中,浓度约为 50mg/mL。

[0134] 根据所治疗特定适应症的需要,本文制剂也可含有多于一种的活性化合物,优选彼此不产生不良影响的具有补充活性的化合物。例如,可能还需要提供另外的免疫抑制剂。这种分子适合以所需目的有效的用量组合存在。

[0135] 活性成分也可包入通过(例如)凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊中,例子分别是羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,或包入胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米胶囊)或大乳液(macroemulsion)中。这类技术可参见《雷明顿药物科学》第 16 版,Osol, A. 编(1980)。

[0136] 用于体内给药的制剂一般是无菌的。这不难通过无菌滤膜过滤来实现。在一个实施方式中,无菌指基本上没有热原。

[0137] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗 IFN α 或 IFN α R 抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该基质是成型制品形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)),聚丙交酯(美国专利号 3,773,919),L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物,不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON DEPOT[™](由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够在超过 100 天中释放分子,但某些水凝胶能在较短时间内释放蛋白质。

包封的抗体长期留存于体内时,它们可能因接触 37°C 和水分而变性或聚集,导致生物学活性丧失和可能的免疫原性改变。可依据所涉及的机理设计合理方案以实现稳定化。例如,如果发现聚集机制是分子间通过巯基-二硫键互换形成 S-S 键,则可通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制水分含量、使用合适添加剂和开发特定聚合物基质组成来实现稳定化。在某些实施方式中,用于本发明组合物的药学上可接受的载体不影响人 ADCC 或 CDC。

[0138] 本文公开的抗-IFN α 或 IFN α R 抗体组合物也可配制为免疫脂质体。“脂质体”是由不同类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡,它可用于向人递送药物(如本文所述的抗-IFN α 或 IFN α R 抗体)。脂质体的组分通常排列成双层形式,类似于生物膜的脂质排列。可通过本领域已知方法制备含有本发明抗体的脂质体,这些方法参见例如 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688 (1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4030 (1980); 和美国专利 4,485,045 和 4,544,545。循环时间延长的脂质体参见美国专利号 5,013,556。可通过反相蒸发方法,利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的液体组合物产生特别有用的脂质体。使脂质体通过孔径确定的滤器挤出,以得到具有所需直径的脂质体。可以如 Martin 等, J. Biol. Chem., 257 :286-288 (1982) 所述,通过二硫键互换反应将本发明抗体偶联于脂质体。脂质体中也可含有治疗剂。参见 Gabizon 等, J. National 癌症 Inst., (19)1484 (1989)。

[0139] 实施例

[0140] 下面开始参照以下实施例描述本发明。提供这些实施例的目的只是说明,不应认为本发明仅限于这些实施例,而应认为本发明包括通过本文所述内容可明显看出的任何和所有变化形式。

[0141] 实施例 1. 诱导移植物抗宿主 (GVH) 全身性硬化症 (SSc) 小鼠模型。

[0142] 为了更好的了解 I 型干扰素 (IFNs) 在皮肤纤维化中的作用,我们在上述全身性硬化症鼠模型中使用抗 IFNAR-1 的单克隆抗体阻断 I 型 IFN 信号转导。我们研究抗-IFNAR 对皮肤和肾脏的临床、组织学、血清学以及分子疾病终点的影响,以鉴定 IFN 信号转导促进皮肤纤维化的潜在机制。

[0143] 在小鼠中,通过将不共享微小组织相容性抗原 (miHag) 的同族小鼠的脾细胞转移入成熟 B 和 T 细胞缺陷小鼠可诱导 SSc。从 6-10 周龄雌性 B10. D2-Hc1H2dH2-T18c/nSnJ (B10. D2) 小鼠中分离脾细胞的单细胞悬液,用 0.8% 氯化铵溶液孵育 4 分钟裂解红血细胞。200xg 离心使白细胞沉淀,用磷酸缓冲盐水 (PBS) 充分冲洗,将 30×10^6 个细胞从侧尾静脉注射入接受宿主 129S6 (B6)-Rag2tm1FwaN12 (RAG2 $^{-/-}$) 小鼠。在 IFN 信号阻断研究中,将 0.1ml PBS 载体中的 10mg/kg 抗-IFNAR mAb 或同种型对照 IgG1 每周 2 次经腹膜内途径给予,从移植前 1 天开始,在 2 和 4 周收集组织进行分析。

[0144] 实施例 2. 阻断 SSc 中的 I 型 IFN 信号转导。

[0145] 硬皮病临床评分和介绍。

[0146] 用 10mpk 抗-IFNAR mAb 每周两次进行预防性治疗显著减少 SSc 小鼠的皮肤病损 (**p < .001)。如下所述每周对皮肤进行评分:0 = 正常;1 = 损伤 < 1cm²;2 = 损伤 1-2cm²;3 = 损伤 > 2cm²。四肢(耳,尾,爪)出现鳞片给予 0.3 分,每只动物总分最高为 3.9。图 2A 是 3 次重复实验的代表性结果。

[0147] SSc 诱导的蛋白尿:在抗-IFNAR 和 Ig 对照治疗组中观察到轻度蛋白尿,但在同系

移植受体中未见（参见图 2B）。

[0148] SSc 临床表现：图 2C 是抗-IFNAR 和对照 Ig 治疗组在移植 4 周后的代表性小鼠。所有对照 Ig 治疗动物中出现普遍和严重的病损以及脱毛，但抗-IFNAR 治疗动物中仅 1/5 出现严重病损。

[0149] 实施例 3：SSc 皮肤的组织病理学分析。

[0150] 在移植 4 周后从 SSc 和对照小鼠的背部相同位置收集皮肤，并与未移植的 RAG2^{-/-} 皮肤样品比较。对 5 μm H&E 和马森三色染色切片进行炎症评分（0 = 正常；1 = 稀疏细胞浸润；2 = 中度浸润；3 = 普遍皮肤浸润）和胶原沉积加和评分（0 = 正常，1 = 轻度；2 = 中度；3 = 严重）。将炎症和胶原沉积评分加和产生组织病理学评分，最大评分为 6。抗-IFNAR 治疗减少皮肤病变 75%（ $p < 0.001$ ）。图 3A 中数据来自三次重复实验的组合（ $n = 20$ SSc+ 抗-IFNAR； $n = 18$ SSc+Ig 对照）。如图 3B 所示，抗-IFNAR 抗体减少 SSc 皮肤中的炎症和增厚，该图显示抗-IFNAR 和对照 Ig 治疗 SSc 皮肤的代表性 H&E（左）和马森三色（右）染色。

[0151] 实施例 4：SSc 皮肤中的 Ig 和补体沉积。

[0152] 将 5 μM 冰冻皮肤切片在丙酮中固定 10 分钟，并与山羊抗-小鼠 Ig-FITC（绿色）或大鼠抗-小鼠 C1q-PE 多克隆抗体（红色）温育 30 分钟，然后在 DAPI（蓝色）中封片。结果如图 4A-4F 所示。在同系移植物对照中未检测到 Ig 和 C1q（分别为 A 和 D），但在 Ig 对照（B）和抗-IFNAR（C）皮肤成纤维细胞中强烈检测到 Ig。在 Ig 对照治疗动物中观察到成纤维细胞（箭头）、表皮和其它皮肤结构中有 C1q 沉积（E），但在抗-IFNAR 治疗皮肤中未检测到（F）。

[0153] 实施例 5. SSc 动物中自身抗体产生和类转换。

[0154] ELISA 在 SSc 动物中检测到血清抗-Sc1-70 和抗-SSA 自身抗体（IgG、IgA、IgM），但在对照动物中没有；在抗-IFNAR 治疗血清中未观察到总 Ig 的显著性差异。结果如图 5A 所示。我们发现 Ig 类转换在抗-IFNAR 治疗小鼠中是完整的。图 5B 中结果显示 IgG1 是抗-Sc1-70 和抗-SSA 自身抗体的主要类型，并且在 IFN 阻断后未观察到类转换有缺陷。移植后 4 周，我们还检测了 SSc 动物的脾结构。结果如图 5C 所示。用 CD45R/B220（棕色）对 5 μ 冰冻脾切片进行染色，使用花生凝集素（红色）对生发中心（GC）进行染色。GC 在 SSc 中比对照脾脏中的频率高，但是抗-IFNAR 和 Ig 对照组见未见 GC 频率或大小具有显著性差异。

[0155] 实施例 6. GVH-SSc 中供体 pDC 是 I 型 IFN 的主要来源。

[0156] 通过对错配移植物接受体在移植后 2 周的脾脏 pDC（B220⁺/Gr-1^{lo}/CD11c⁺/CD11b⁻）数目进行 FACS 定量分析，我们检测了 SSc 诱导的类浆树突细胞扩增。结果如图 6A 所示。同系移植物接受体中的脾脏 pDC 数目与未移植的 RAG2^{-/-} 对照相似（数据未显示）。通过产生 pDC- 消耗的供体脾细胞的移植物，显示 GVH-SSc 模型中供体 pDC 是 I 型 IFN 中的主要来源。结果如图 6B 所示。根据生产商指导，通过用大鼠抗小鼠抗-Gr1 抗体（克隆 RB68C5）标记细胞 30 分钟，然后与绵羊抗大鼠 IgG 偶联的磁珠温育 30 分钟以去除 Gr-1⁺ 脾细胞。FACS 确认去除 Gr-1⁺ 细胞后，将剩余的脾细胞移植入 RAG2^{-/-} 接受体中（ 30×10^6 个细胞 / 小鼠）。4 周内总脾细胞和 Gr-1⁻ 移植宿主产生了轻度蛋白尿，但仅有总脾细胞移植物在宿主小鼠中诱导皮肤病损（** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ）。

[0157] 实施例 7. 抗-IFNAR mAb 治疗抑制皮肤中过表达基因的热图表示。

[0158] 全基因组阵列 (WGA) 数据分析发现皮肤中, Ig 同种型对照 Ab- 治疗组的 308 个探针集合的表达上调至少 2- 倍 ($p < 0.05$), 而抗-IFNAR mAb 治疗至少中和了 50%。结果如图 7 所示。细胞粘附, 经由 MAPK 或 Jak/Stat 的抑瘤素 M 信号转导和 CCR3 是皮肤中最显著激活并被 IFNAE Ab 中和的通路。肾脏中, Ig 同种型 Ab 治疗组的 10 个探针集合上调至少 2 倍, $p < 0.05$, 而 IFNAR Ab 中和至少 50%。被抗 IFNAR mAb 抑制的 I 型 IFN 诱导型基因包括 RSAD2、Ube2l6、Ube2S、Nfil3、Lysmd2。之前用 I 型 IFN 家族成员刺激健康人供体全血确定 I 型 I IFN- 诱导型基因。抗-IFNAR mAb 治疗抑制的通路是涉及细胞粘附、炎症、细胞骨架重塑和凋亡的那些。相反, 在 SSc 肾中观察到, 与对照 Ig 治疗相比, 抗-IFNAR mAb 治疗的效果有限 (数据未显示)。用昂飞 (Affymetrix) 小鼠基因组 430v2.0 阵列对所有样品进行测试。用 SpotFire (<http://www.spotfire.com/>) 和 Pathway 进行分层聚类分析, 用基因狗公司 (GeneGo, Inc.) (密歇根州圣约瑟夫) 的 MetaCore™ 整合软件包进行基因表达数据的网络分析。

[0159] 实施例 8. IFNAR1 阻断后 SSc 基因表达的实时 PCR 定量。

[0160] 使用如实施例 1 所述 GVH 诱导的 SSc 小鼠模型确定炎症和组织重塑相关的不同基因的表达。图 9A-9C 总结了这些实验的结果。将背部皮肤样品速冻, 并用纯化的 mRNA 逆转录得到 cDNA。将 IFN- 诱导型基因 IFI44, MX1, OASL 和 OAS2, 炎性基因 MPO, TNFa, IL-6 和 iNOS, 重塑基因 KLF10, TIMP, EPGN 和 MMP 的特异性探针铺陈于 Biomark 48.48 动态阵列芯片上 (富鲁达公司) (Fluidigm Corp.), 检测 cDNA 的基因表达。在 4 周时间点时, IFNAR1 阻断 mAb 5A3 显著抑制了所有 4 种 IFN 诱导型基因的诱导 (IFI44 减少了 93%, $P < 0.006$; MX1 减少了 85%, $P < 0.0001$; OASL 减少了 57%, $P < 0.02$; OAS2 减少了 81% $P < 0.0001$), 但在 2 周时没有显著性影响。促炎基因的诱导显示相似结果, 其中 5A3 在 4 周时完全中和 MPO、TNFa、IL-6 和 iNOS 表达, 尽管在 2 周时观察到抑制趋势, 但没有达到统计学显著性。最后, 5A3 治疗降低了 KLF10 的诱导, KLF10 是 TGF- β 响应基因, 在 2 周降低了 47% ($P < 0.06$), 4 周时降低了 91% ($P < 0.0001$), 表明主要纤维化通路的强烈抑制。EPGN, 上皮细胞有丝分裂原, 在两个时间点也被中和了 $> 95\%$ ($P < 0.03$), 而基质稳态相关基因 TIMP 和 MMP9 在 4 周时被 5A3 显著抑制 (分别抑制了 100%, $P < 0.05$ 和 92%, $P < 0.03$)。综上所述, 这些数据表明, 在 GVH-SSc 中, IFNAR1 阻断除了抑制皮肤炎症, 还明显影响上皮和成纤维细胞重塑。

[0161] 概述

[0162] 我们的研究表明 I 型 IFN 信号通路在全身性硬化症小鼠模型的皮肤纤维化中起重要作用。尽管蛋白质尿和硬皮病相关自身抗体与疾病对照观察到的相同, 但是通过 IFN α R 拮抗 IFN 信号转导显著降低了皮肤炎症和皮肤重塑的发生和严重程度。我们抗体的支持性数据是, 观察到事先从供体脾细胞中清除 pDC 包含性 Gr-1 (+) 群体无法在宿主小鼠中诱导皮肤病损, 但不显著影响蛋白尿。

[0163] 然而, 上文描述的本发明具体实施方式是出于描述目的, 本领域技术人员应理解, 可对细节作出许多改变而不背离所附权利要求书所述的本发明。

[0164] 本说明书中提及的所有发表物、专利和专利申请通过引用纳入本文, 如同各篇发表物、专利或专利申请专门和单独表明通过引用纳入本文的程度一样。

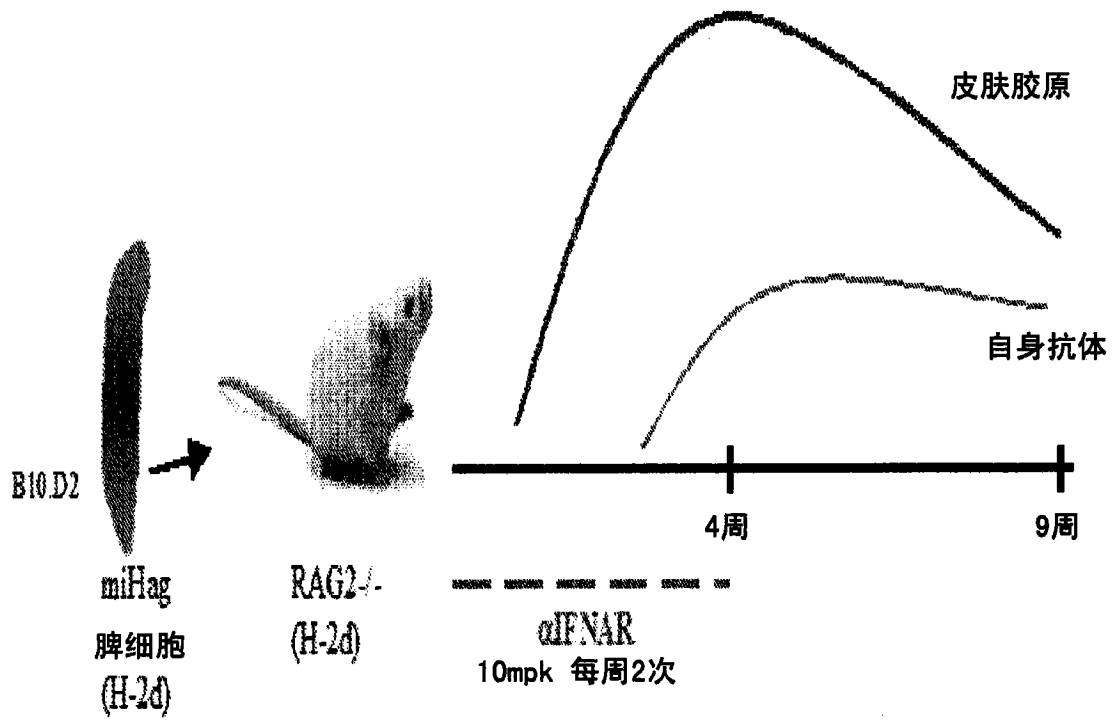


图 1

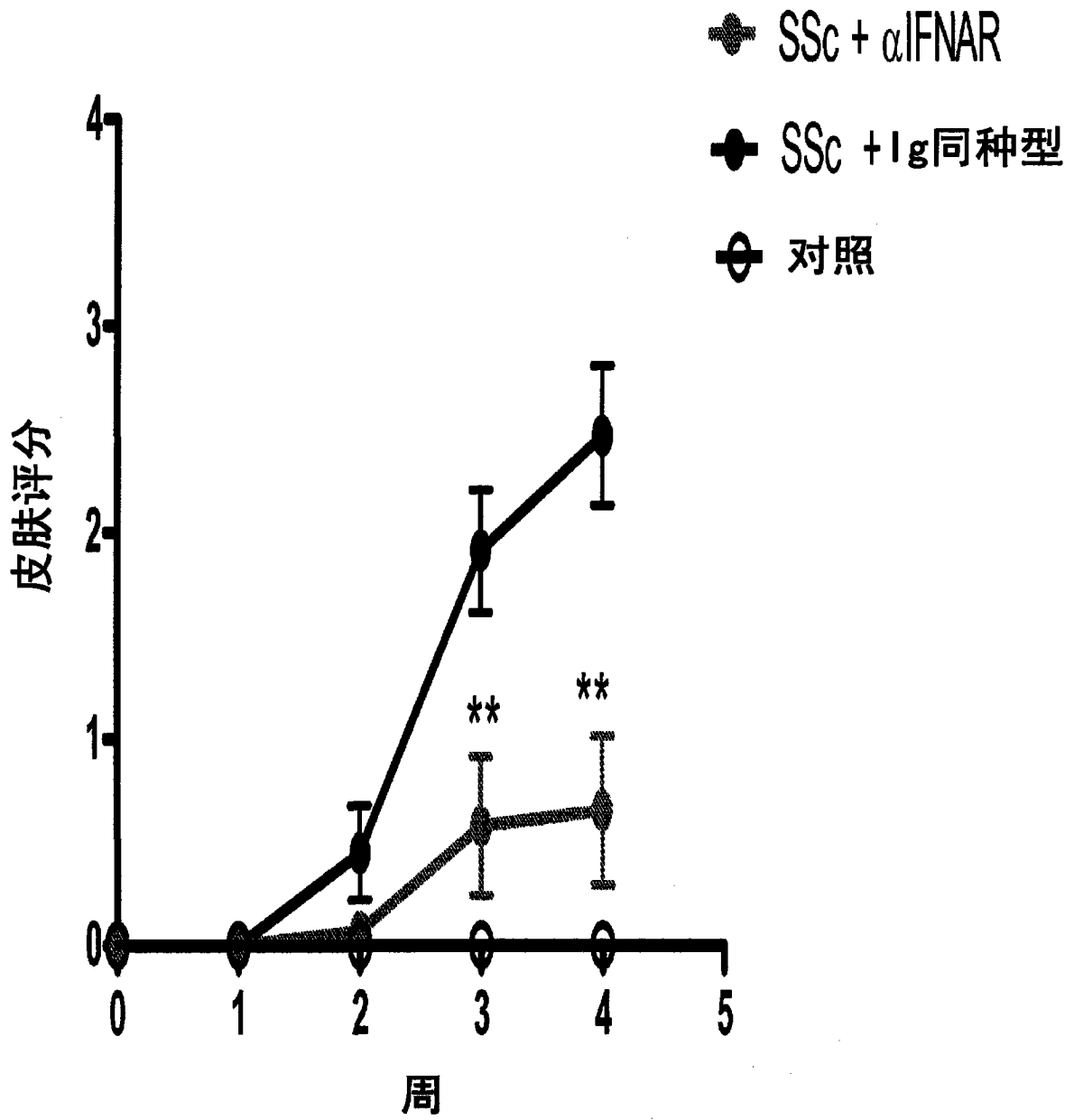


图 2A

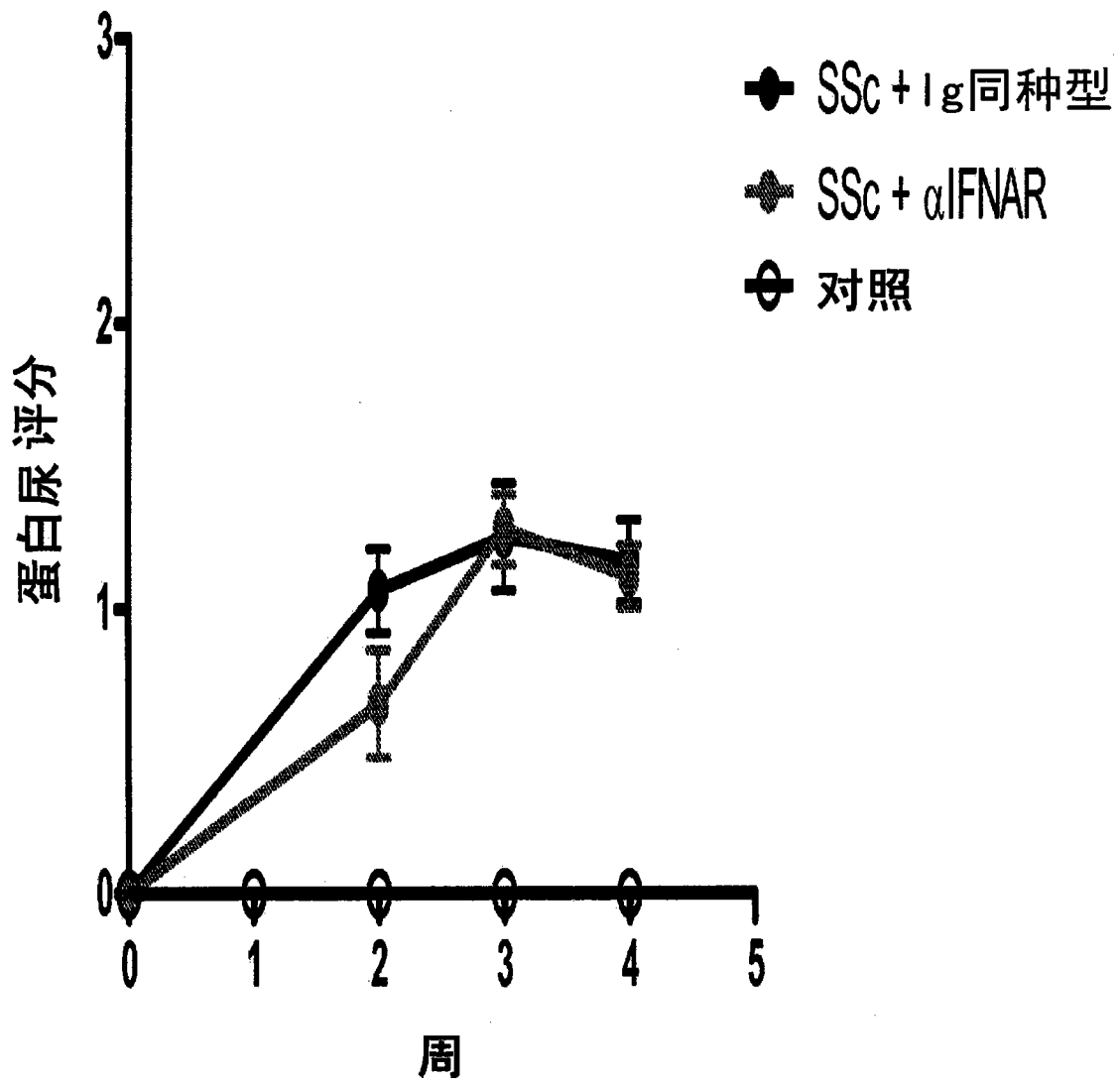


图 2B

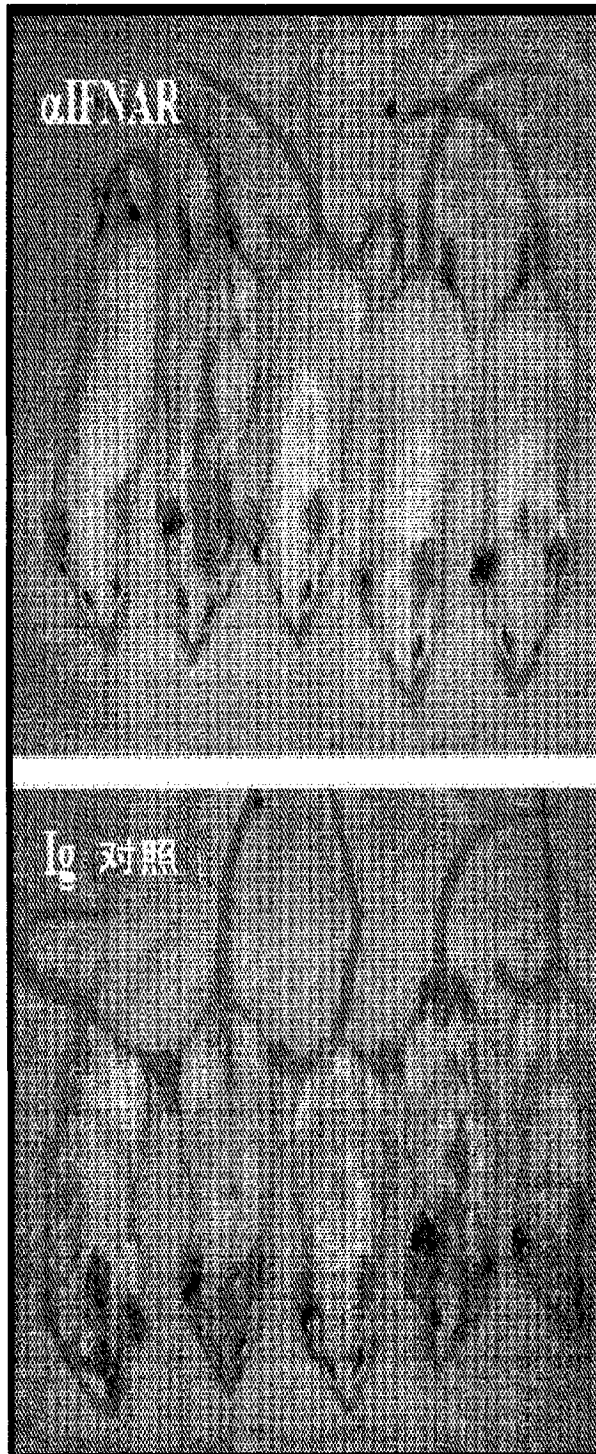


图 2C

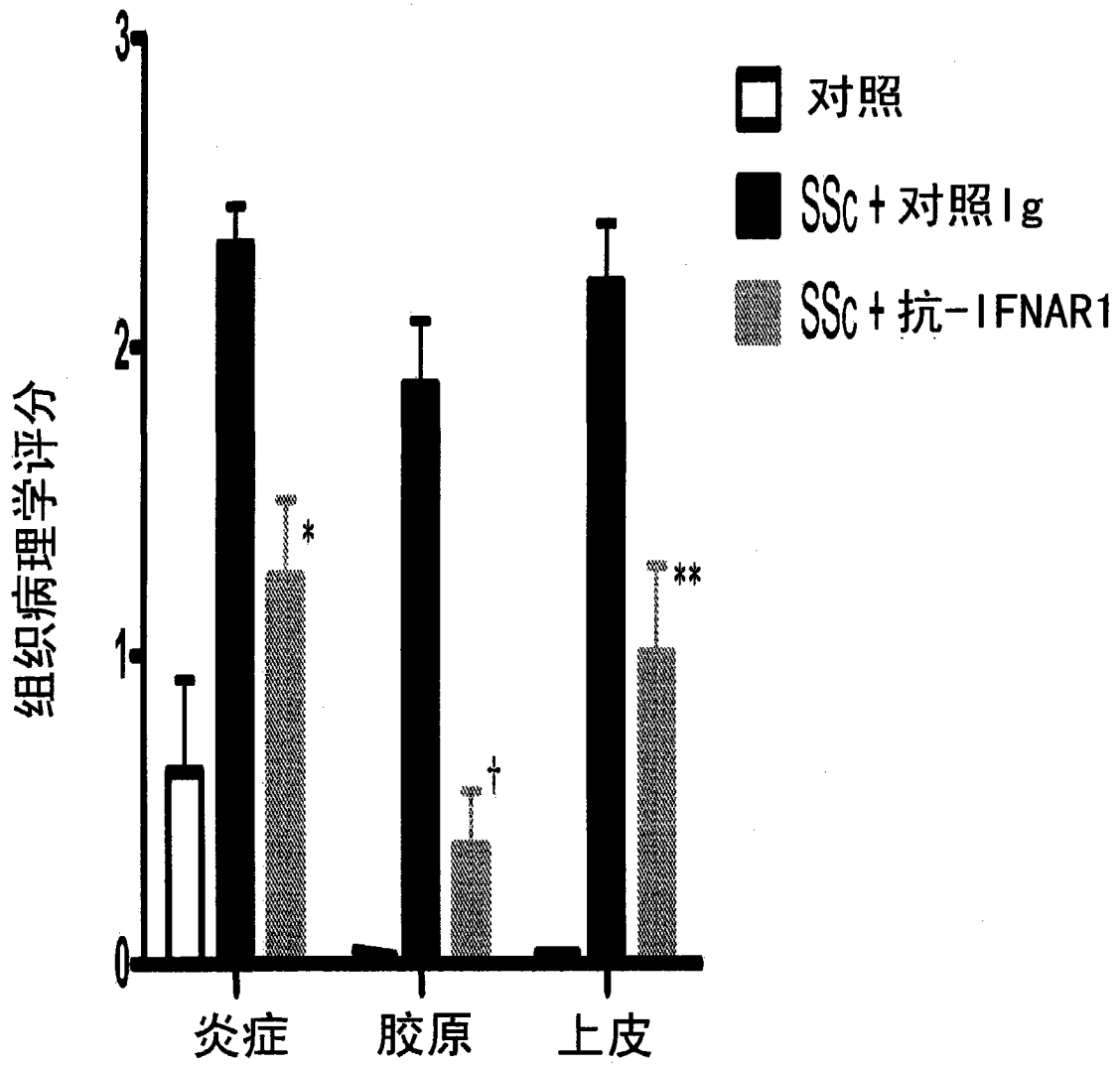


图 3A

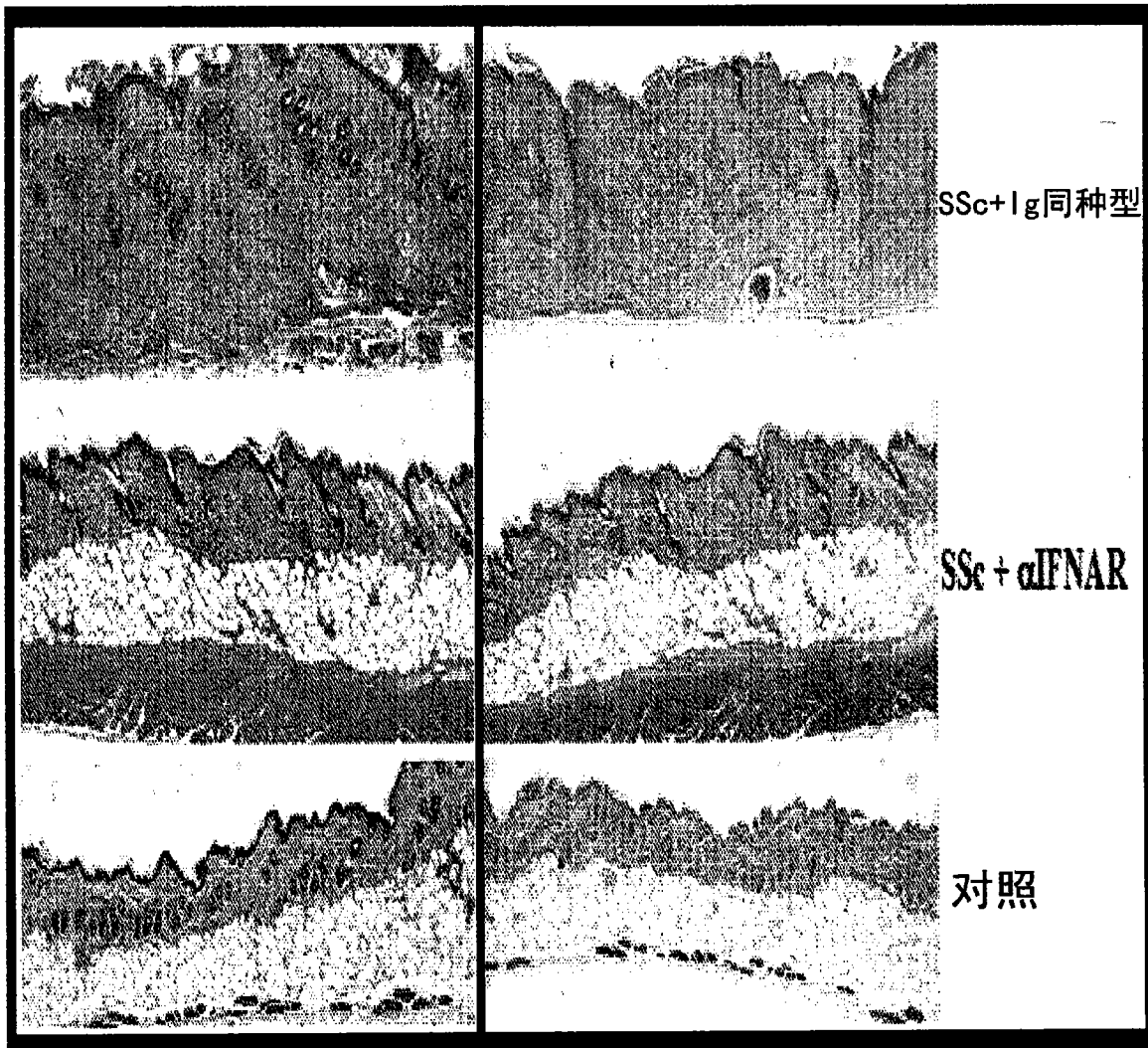


图 3B

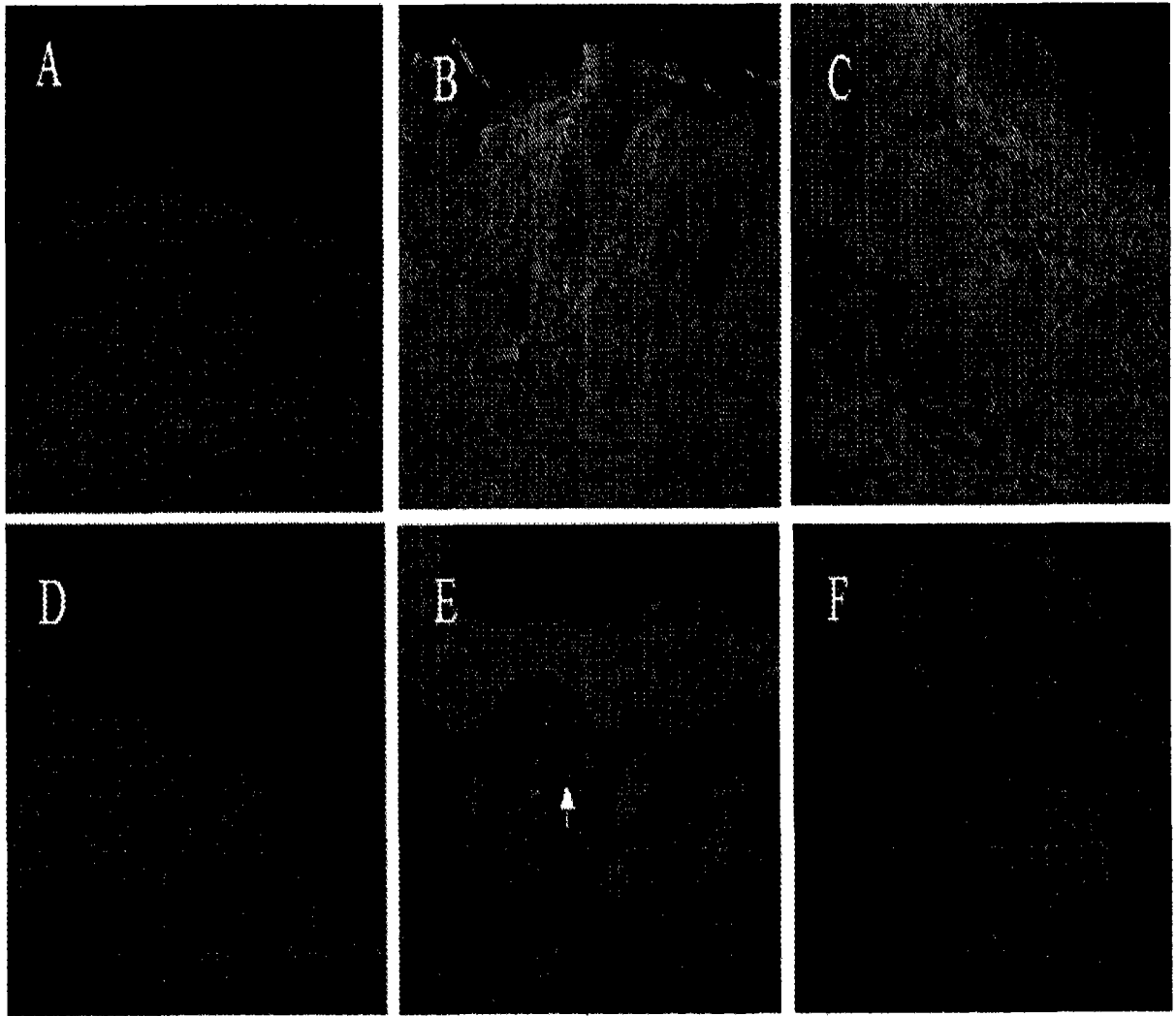


图 4

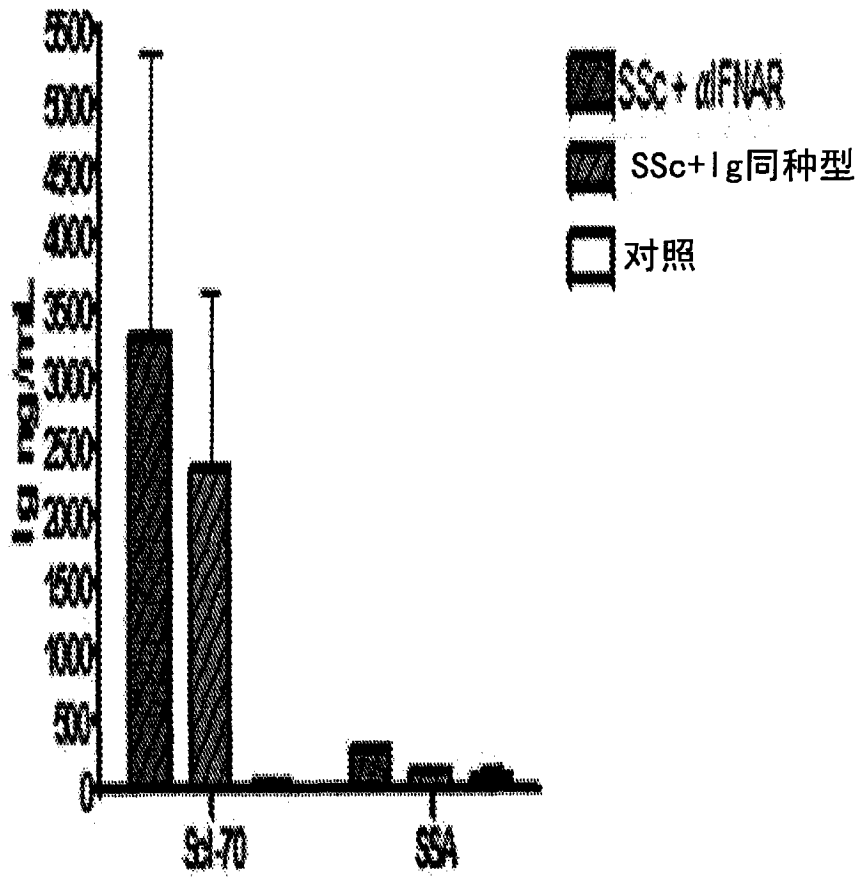


图 5A

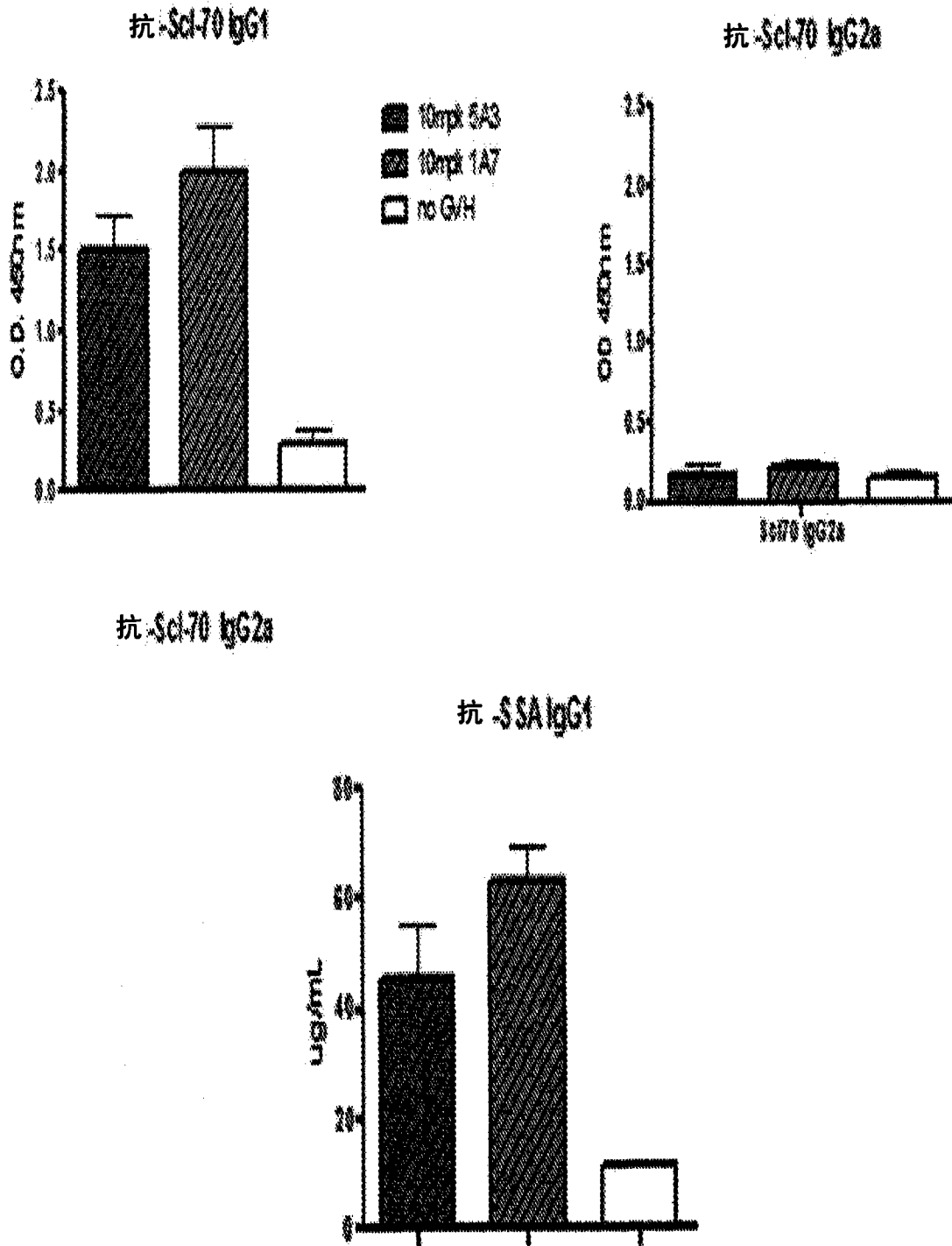


图 5B

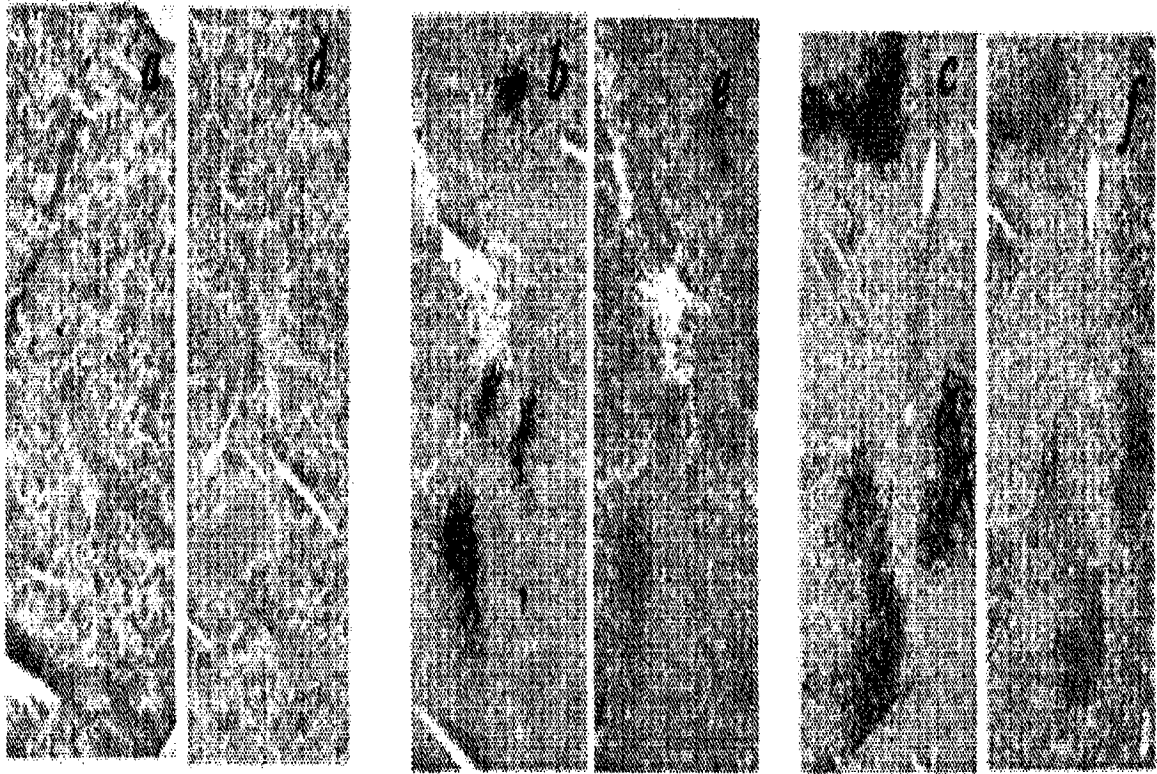


图 5C

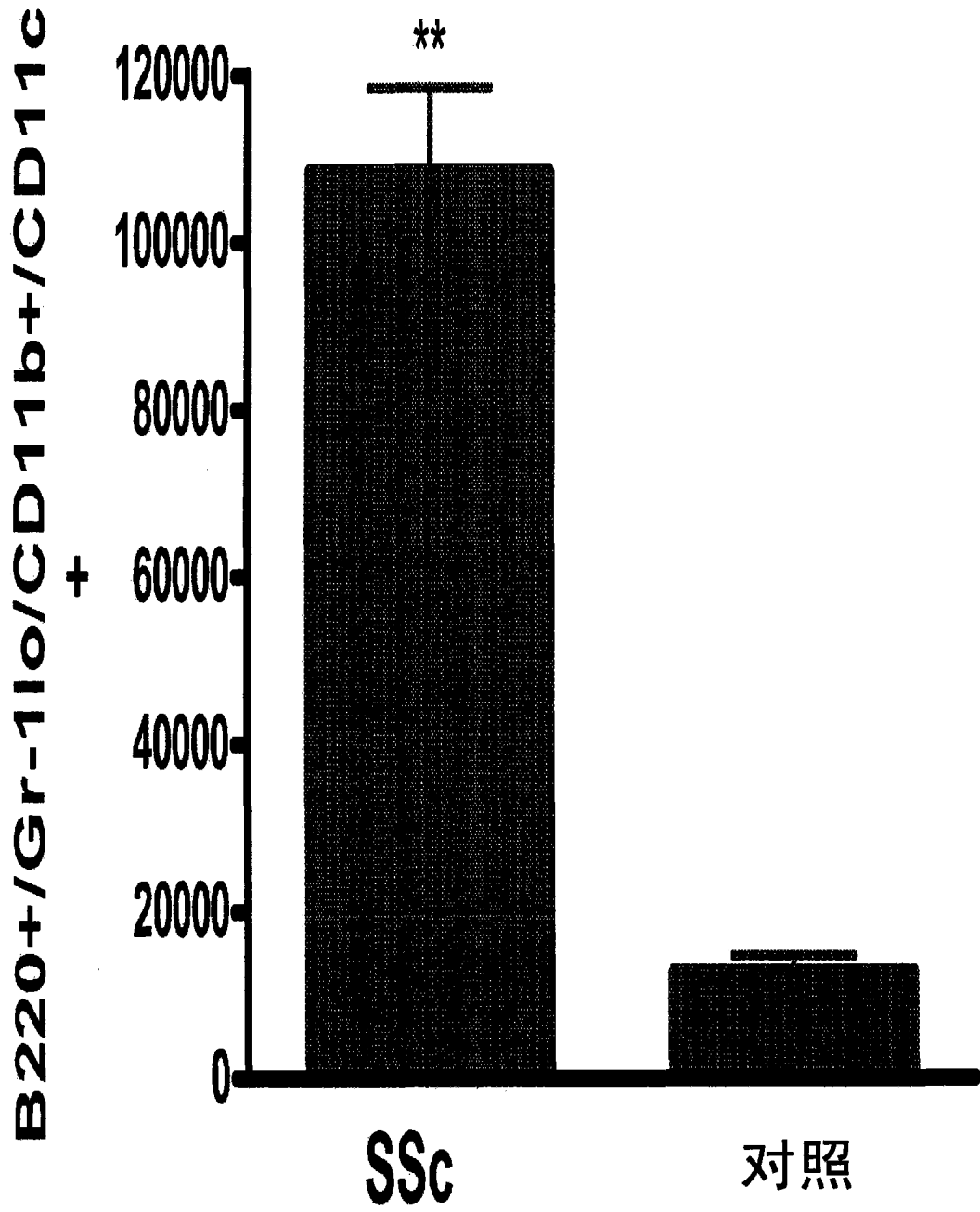


图 6A

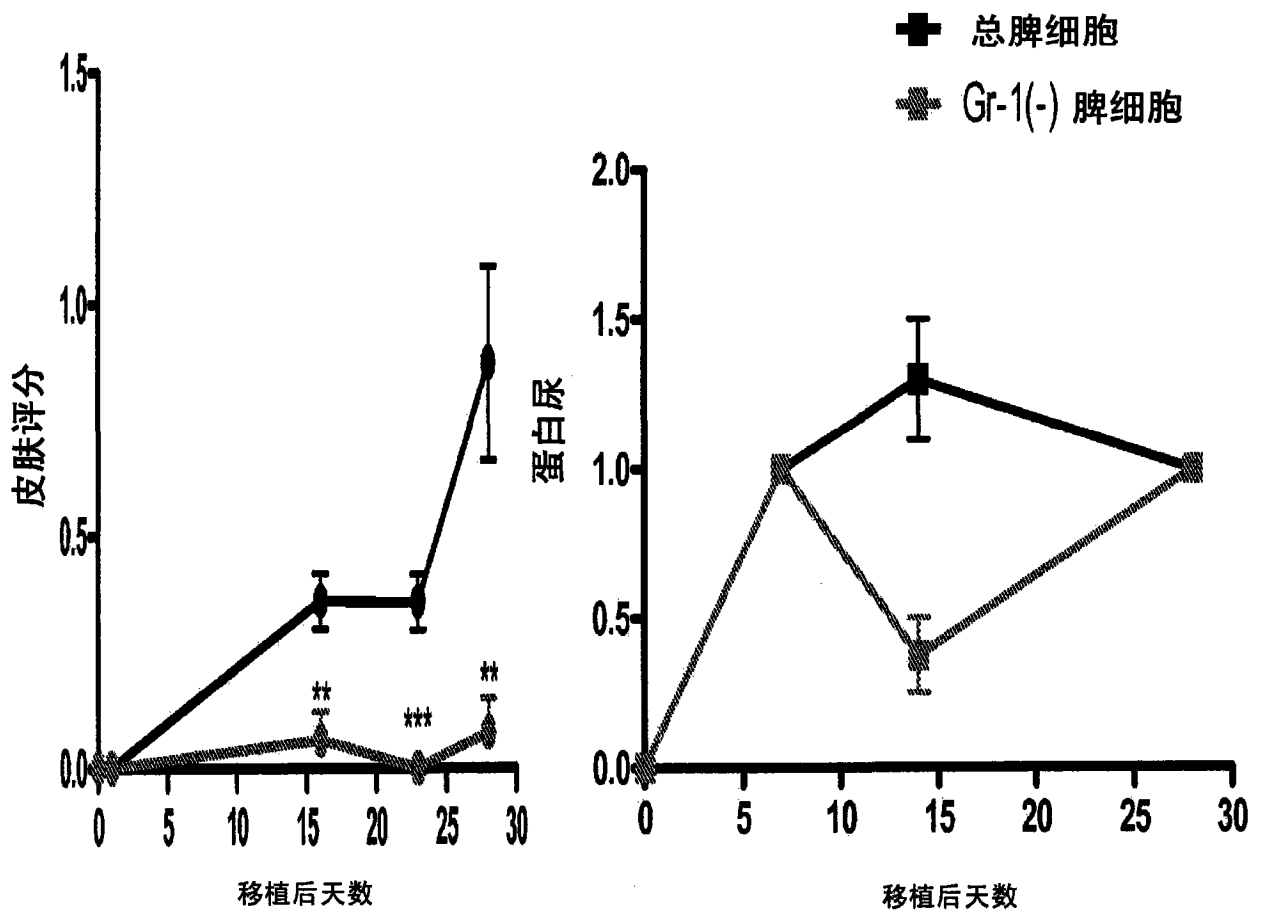


图 6B

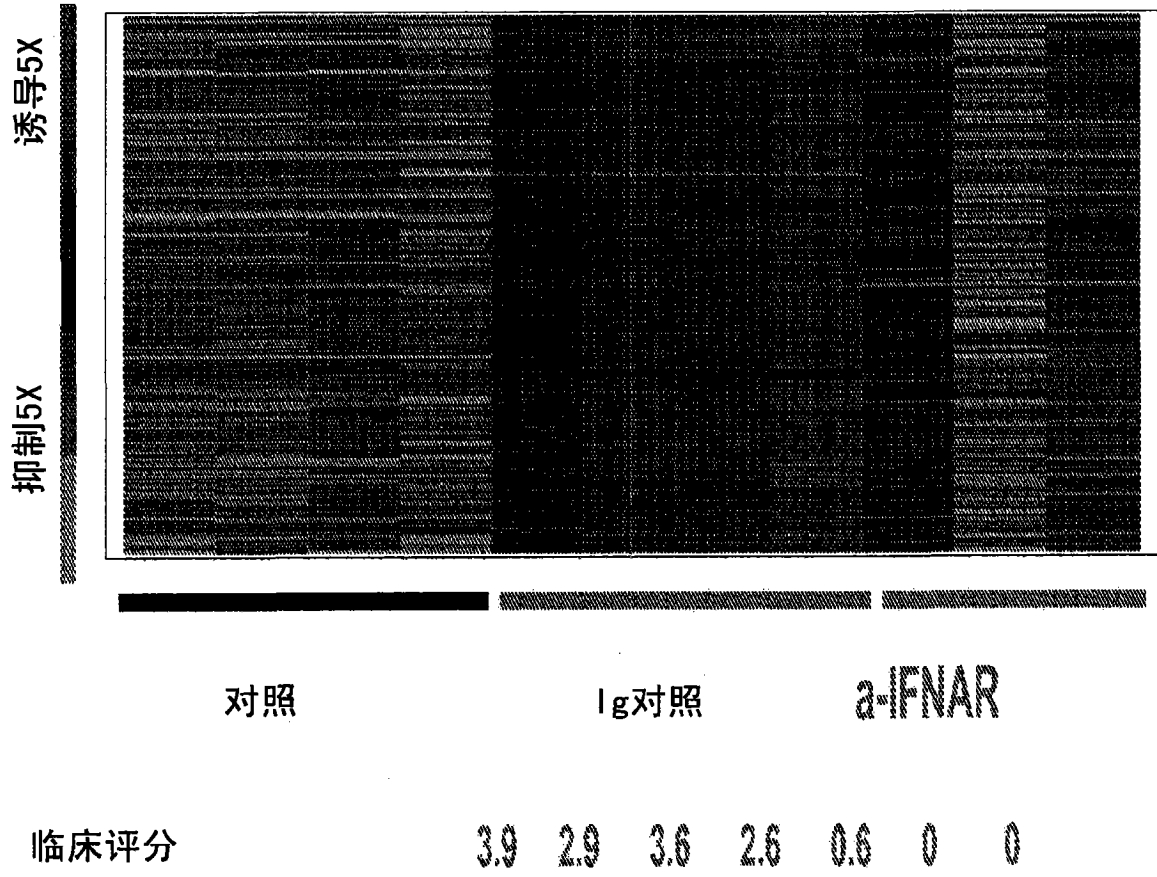


图 7

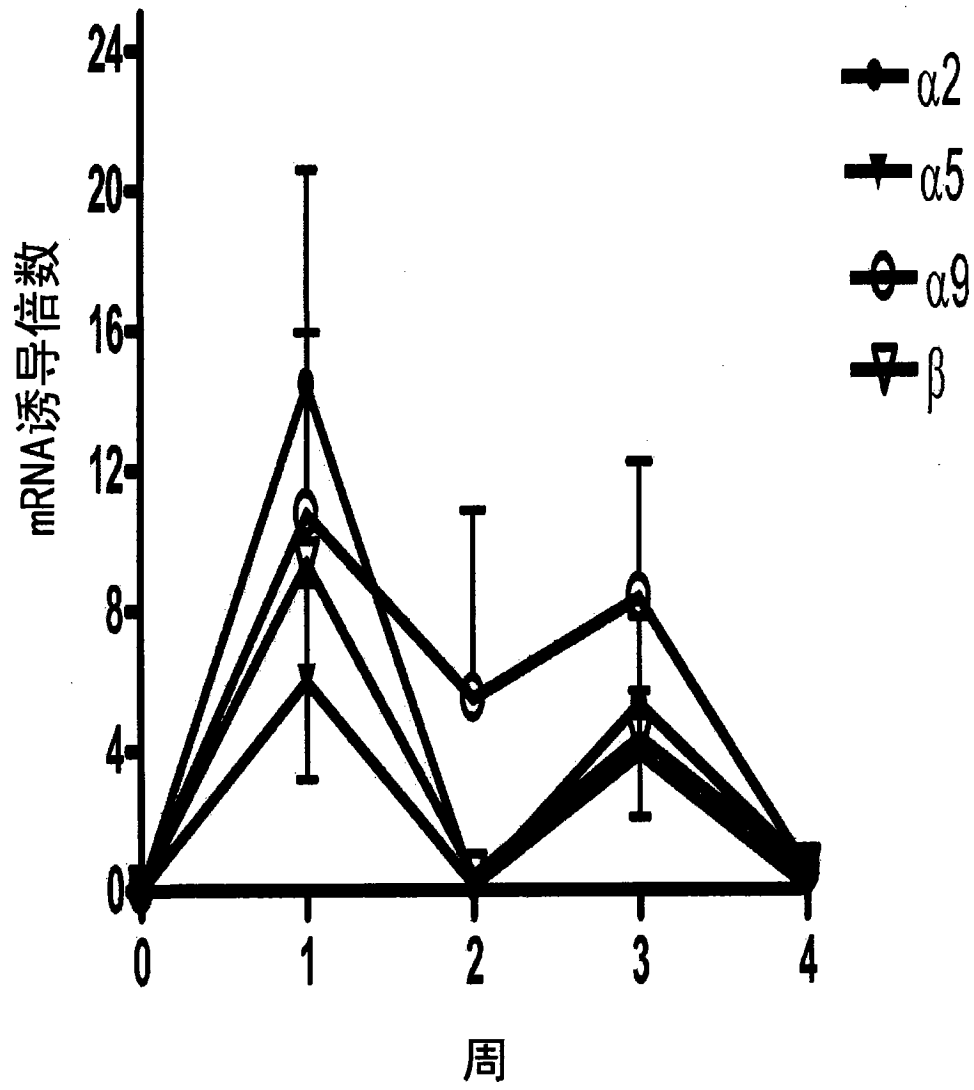


图 8A

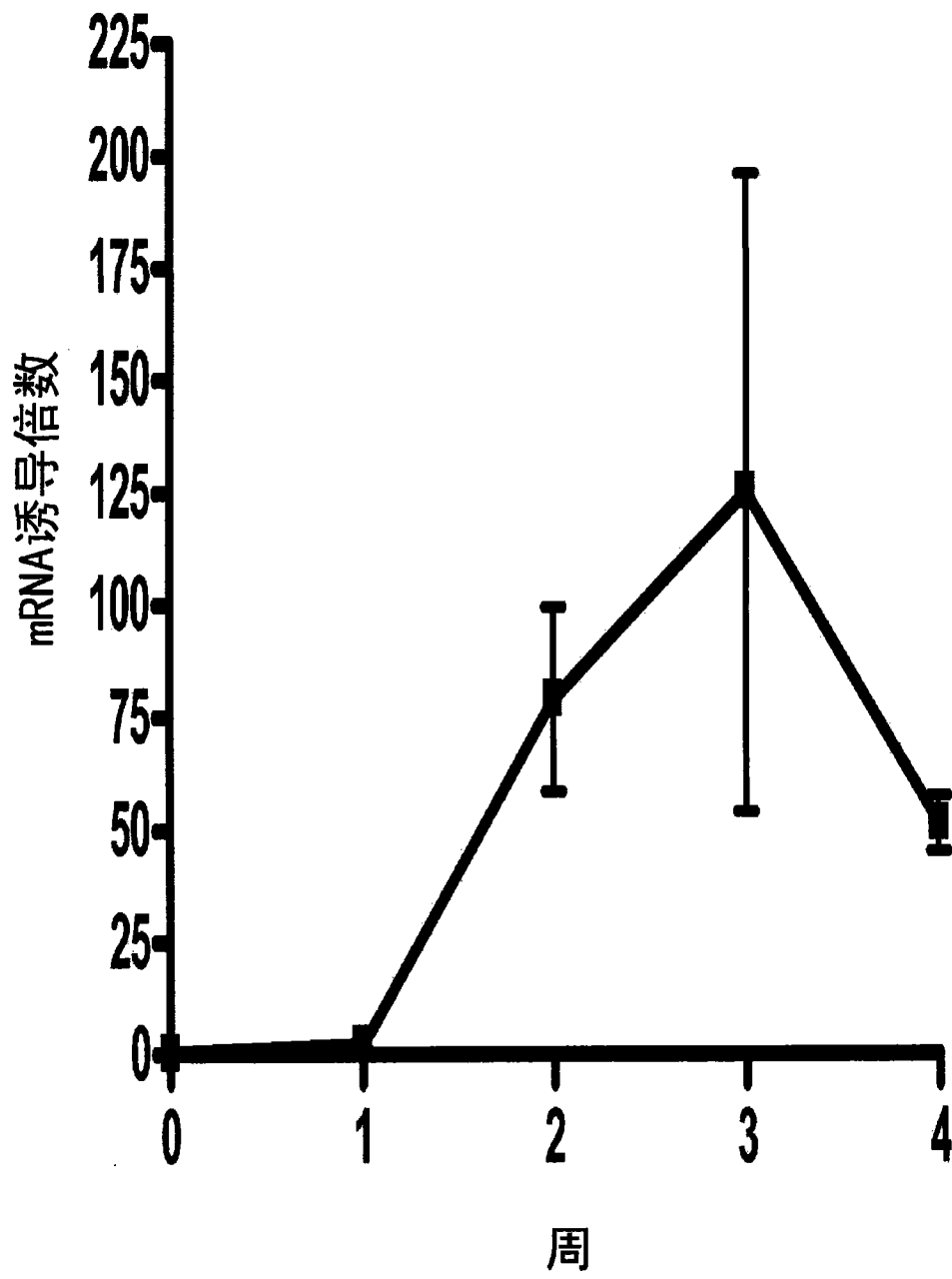


图 8B

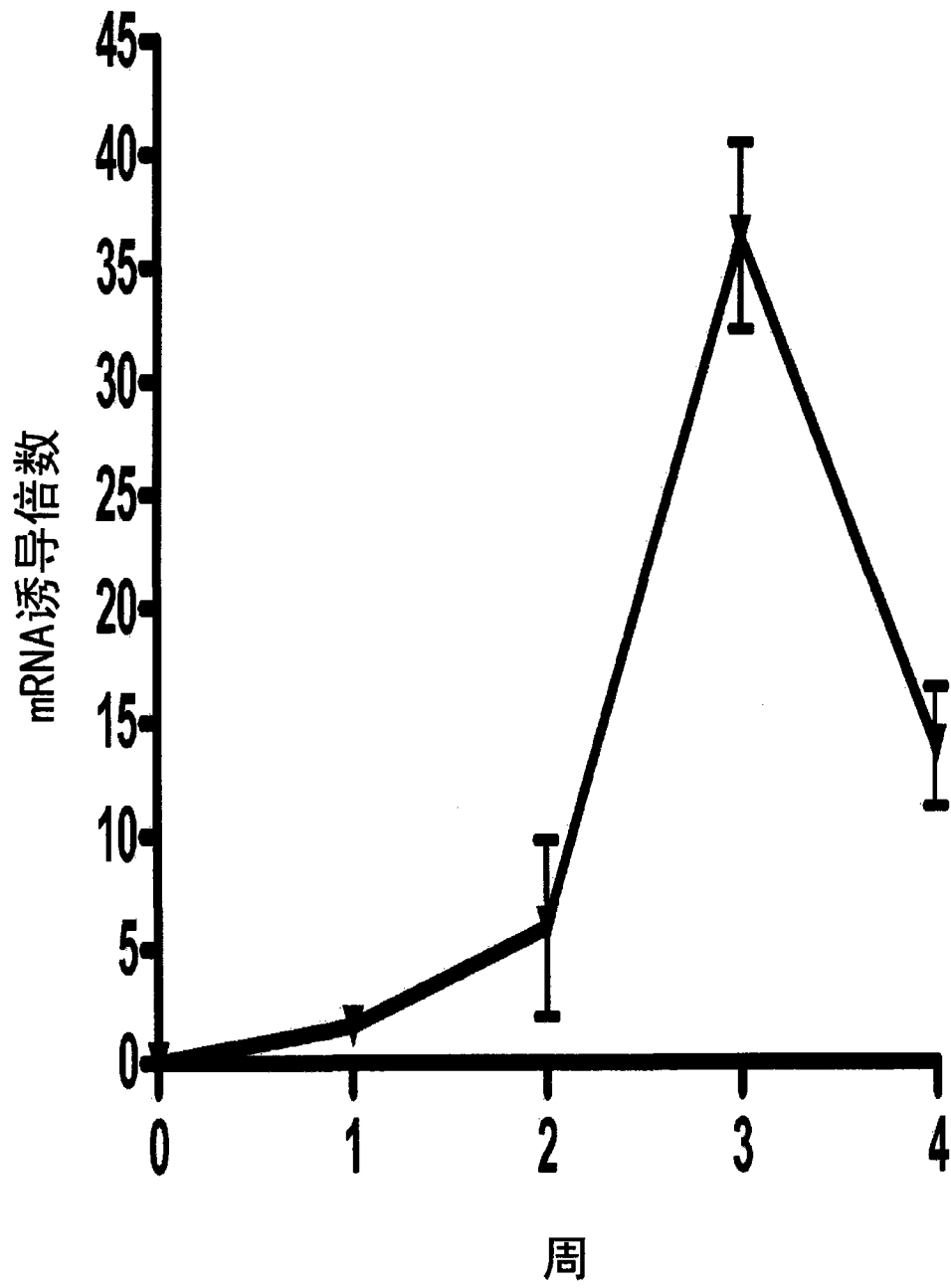


图 8C

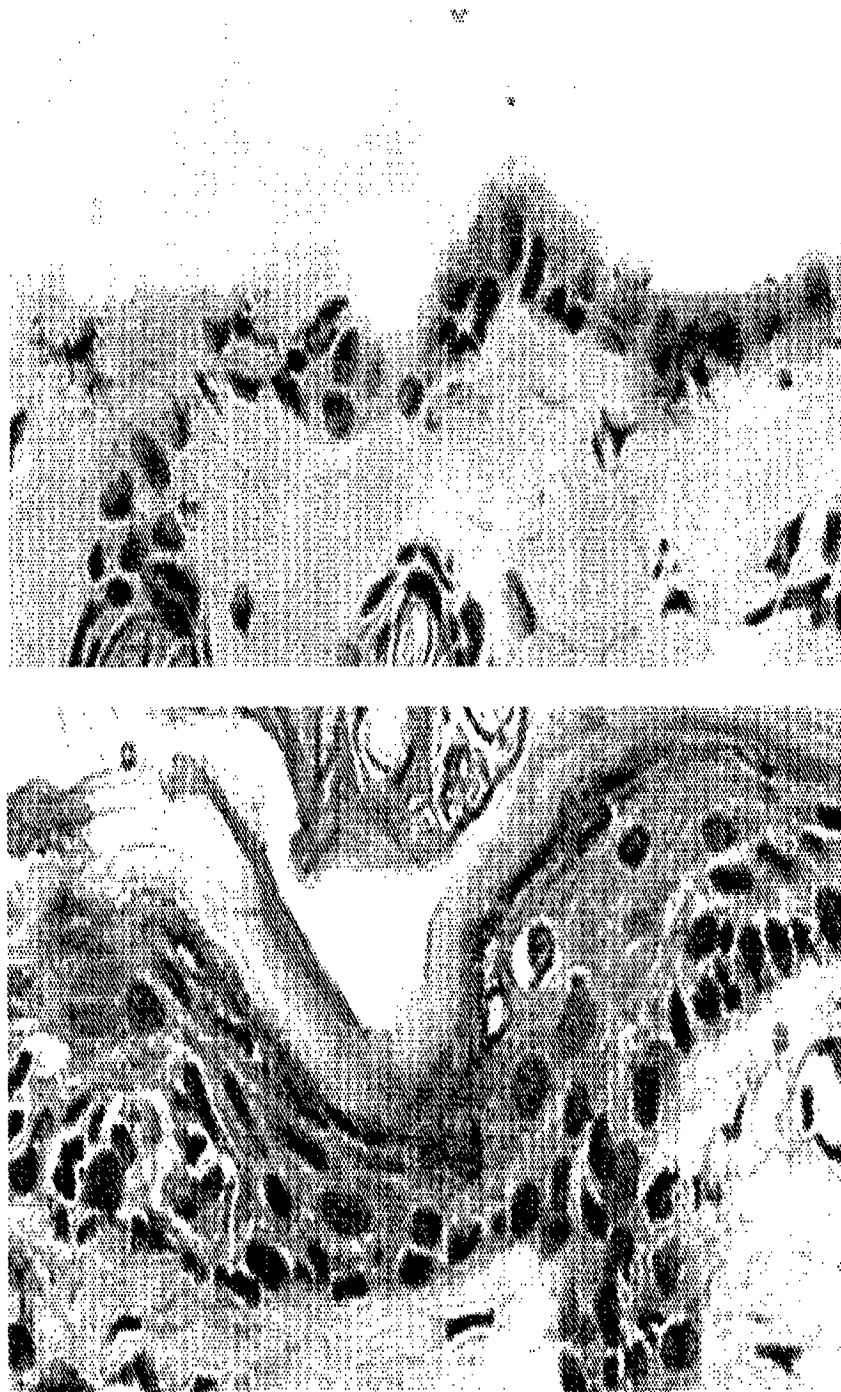


图 8D

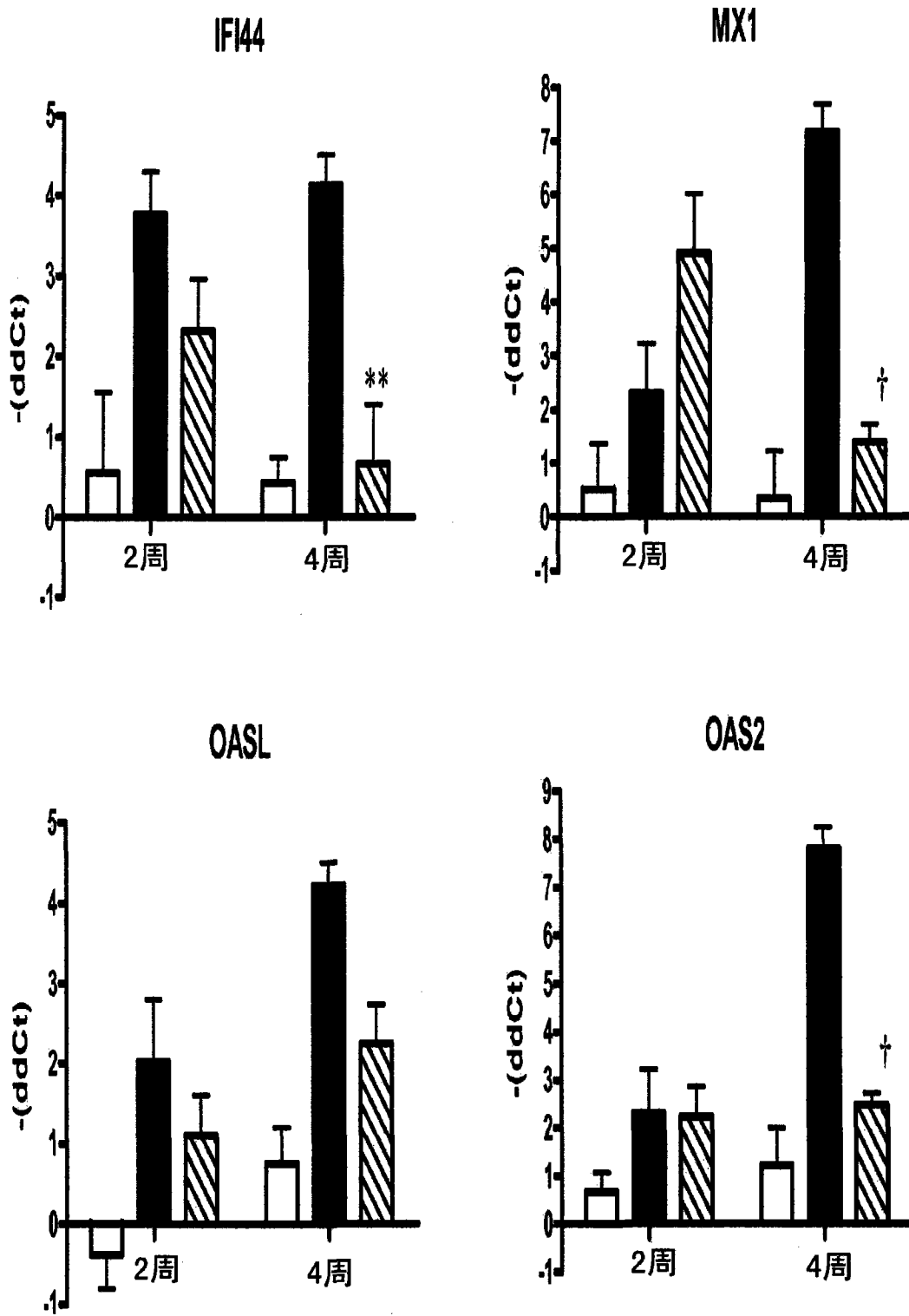


图 9A

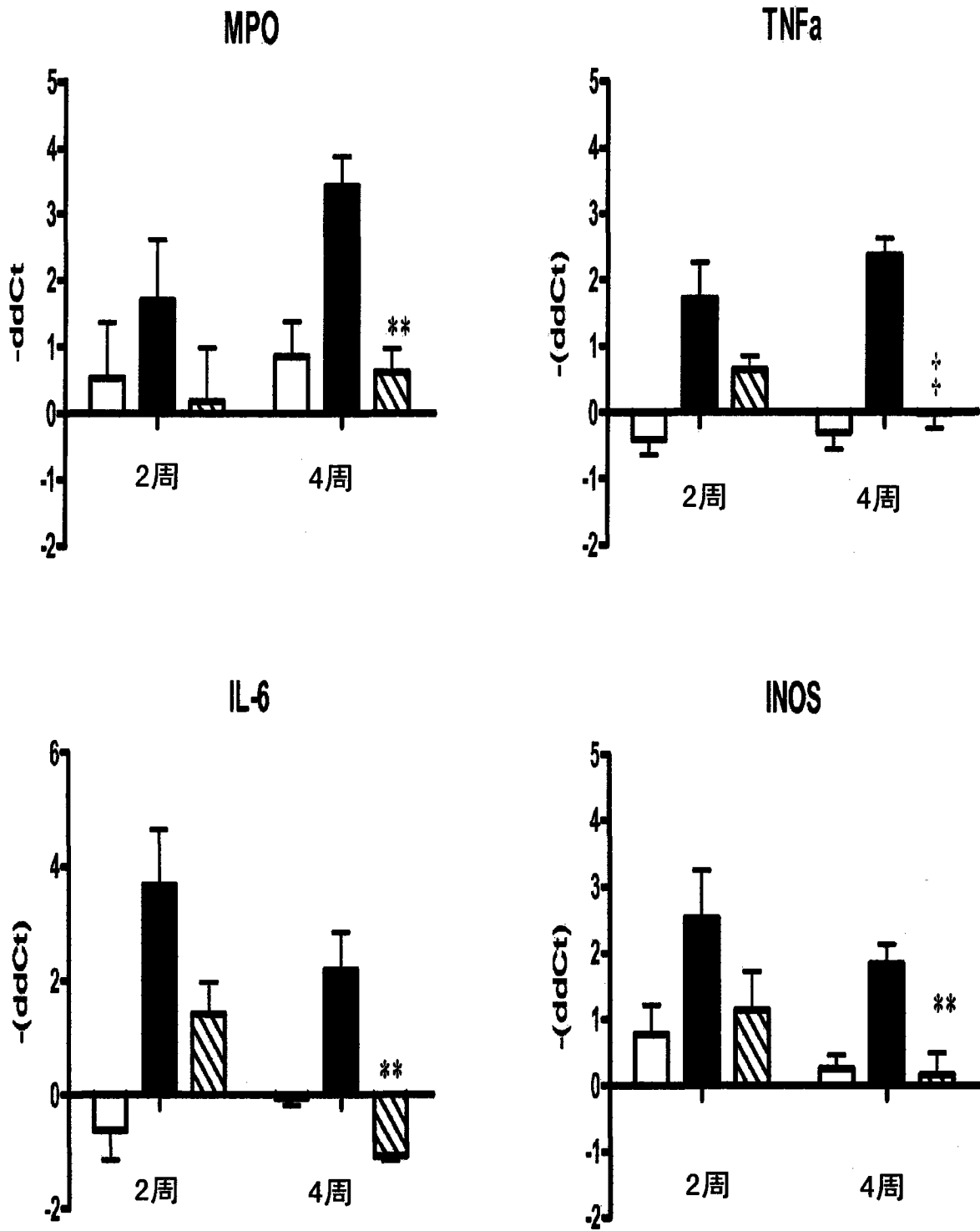


图 9B

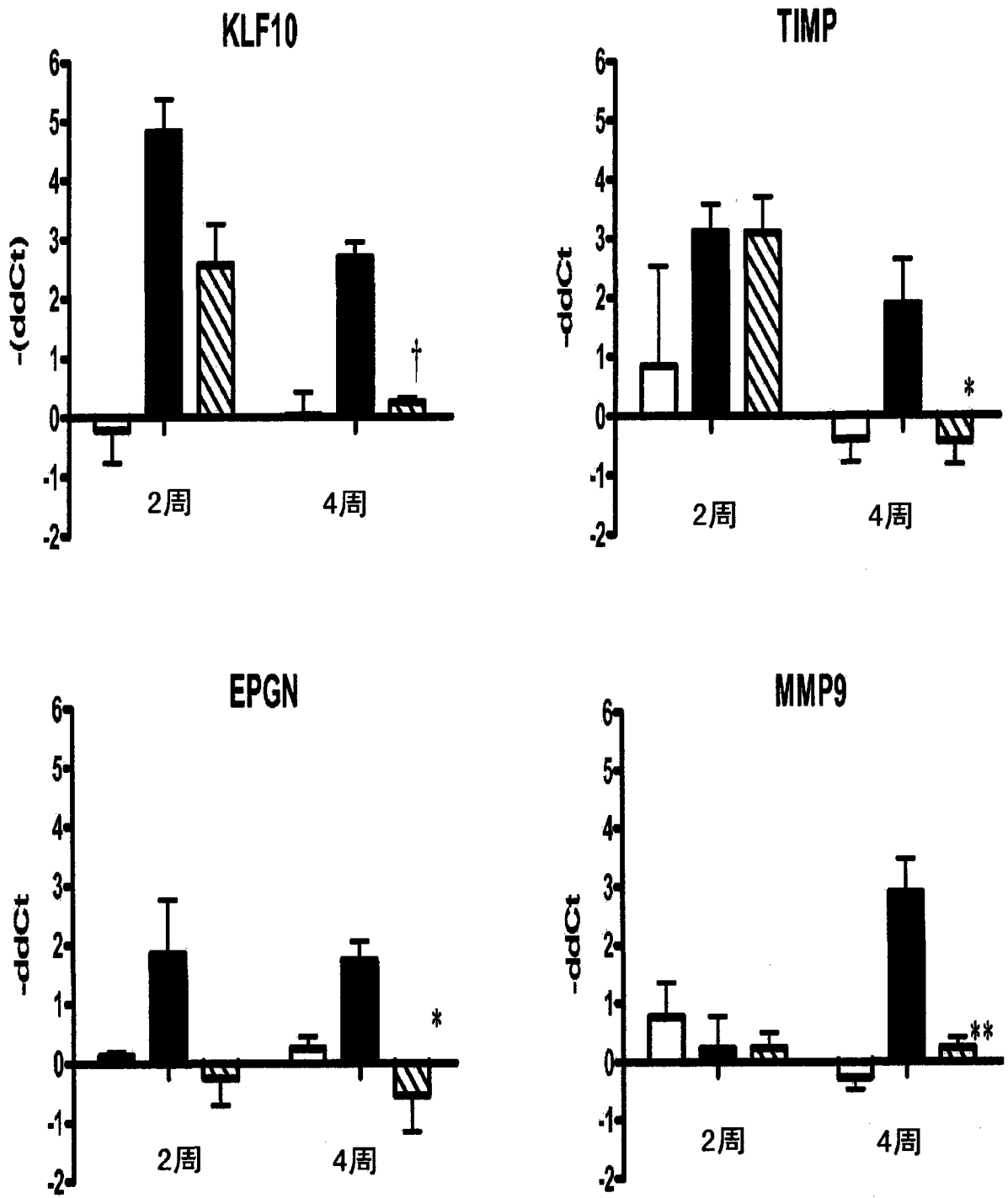


图 9C