



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85537 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 39/395
A61P 1/00
A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ТРИВАЛОГО ОСЛАБЛЕННЯ РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ АБО ХВОРОБИ КРОНА ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АНТИТІЛА, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ІНТЕГРИНОМ АЛЬФА-4

1

(21) 20040907793
(22) 25.02.2003
(24) 10.02.2009
(86) PCT/US03/05421, 25.02.2003
(31) 60/360,134
(32) 25.02.2002
(33) US
(31) 60/374,501
(32) 23.04.2002
(33) US
(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.
(72) ТЕЙЛОР ДЖУЛІ, ЙЕДНОК ТЕД А.
(73) ЕЛАН ФАРМАСЬОТИКАЛЗ, ІНК.
(56) US 5932214 A, 03.08.1999
US 5840299 A, 24.11.1998
N. Tubridy et al.: "The effect of anti- 4 integrin antibody on brain lesion activity in MS." Neurology. 11.08.1999; vol. 53, no. 3, pages 466-472
Fiona H. Gordon et al.: "A randomized placebo-controlled trial of a humanized monodonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease." Gastroenterology. 2001 Aug; vol. 121, no. 2, pages 268-274
Tilley et al., VLA-4 Antagonists. Drugs of the Future 2001, Vol. 26, No. 10, pages 985-998
(57) 1. Спосіб тривалого ослаблення патологічного запалення, яке є розсіяним склерозом або хворобою Крона, у потребуючого цього пацієнта, що включає в себе тривале введення пацієнту в терапевтично ефективній кількості засобу, який інгібує інтегрин альфа-4 або інгібує димер, який містить інтегрин альфа-4, що являє собою антитіло або його імунологічно активний фрагмент, які зв'язуються з інтегрином альфа-4, де тривале введення проводять раз на місяць протягом періоду щонайменше 6 місяців.
2. Спосіб за п.1, де тривале введення проводять протягом періоду щонайменше 12 місяців.
3. Спосіб за п.1, де засіб вводять повторно таким чином, щоб зв'язувати інтегрин альфа-4 або димер, який містить інтегрин альфа-4, і де введення підтримує насичення інтегринового рецептора альфа-4 на рівні, достатньому для тривалого пригнічення у пацієнта патологічного запалення.

2

4. Спосіб за п.3, де засіб вводять пацієнту повторно, так, щоб насичення інтегринового рецептора альфа-4 у пацієнта складало щонайменше приблизно від 65% до приблизно 100%.
5. Спосіб за п.4, де насичення становить щонайменше 75%.
6. Спосіб з
а п.4, де насичення становить щонайменше 80%.
7. Спосіб за будь-яким з пп.1 або 3, де засіб зв'язується з димерами інтегрину альфа-4.
8. Спосіб за п.1, де моноклональне антитіло являє собою наталізумаб.
9. Спосіб за п.1, де інтегриновий димер альфа-4 являє собою альфа-4 бета-1.
10. Спосіб за п.3, де засіб вводять у кількості, достатній для насичення щонайменше одного інтегринового димерного рецептора альфа-4, таким чином пригнічуючи патологічне запалення.
11. Спосіб за п.10, де димерні рецептори являють собою альфа-4 бета-1 або альфа-4 бета-7, а патологічне запалення є розсіяним склерозом.
12. Спосіб за п.10, де димерні рецептори являють собою альфа-4 бета-1 або альфа-4 бета-7, а патологічне запалення є хворобою Крона.
13. Спосіб за будь-яким з пп.1-9, де патологічне запалення є розсіяним склерозом.
14. Спосіб за п.1, де патологічне запалення являє собою хворобу Крона, який включає в себе тривале введення терапевтично ефективної дози наталізумабу або його імунологічно активного фрагмента потребуючому цього пацієнту, достатньої для лікування або поліпшення хвороби Крона у пацієнта.
15. Спосіб за п.14, де наталізумаб вводять за допомогою інфузії кожні чотири тижні щонайменше протягом 6 місяців в кількості приблизно від 1мг/кг маси пацієнта до приблизно 20мг/кг маси пацієнта.
16. Спосіб за п.15, де інфузії проводять протягом щонайменше 12 місяців.
17. Спосіб за п.1, де патологічне запалення являє собою розсіяний склероз і включає в себе тривале введення терапевтично ефективної дози наталізумабу або його імунологічно активного фрагмента потребуючому цього пацієнту, достатньої для ослаблення симптомів розсіяного склерозу.

(13) C2

(11) 85537

(19) UA

18. Спосіб за п.17, де наталізумаб вводять за допомогою інфузії кожні чотири тижні щонайменше протягом 6 місяців в кількості приблизно від 1мг/кг маси пацієнта до приблизно 20мг/кг маси пацієнта.
19. Спосіб за п.18, де інфузії проводять протягом щонайменше 12 місяців.
20. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4, який являє собою антитіло або його імунологічно активний фрагмент, які зв'язуються з інтегрином альфа-4, для отримання лікарського засобу для тривалого лікування патологічного запалення, яке є розсіяним склерозом або хворобою Крона, у потребуючого цього пацієнта, де тривале введення проводять раз на місяць протягом періоду щонайменше 6 місяців.
21. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.20, де патологічний стан є розсіяним склерозом.
22. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.20, де патологічний стан є хворобою Крона.
23. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.22, де інгібітор інтегрину альфа-4 являє собою наталізумаб, а запальне захворювання являє собою хворобу Крона.
24. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.20, де лікарський засіб складають так, щоб інтегринові рецептори альфа-4 були насиченими на рівні, достатньому для пригнічення патологічного запалення, коли лікарський засіб вводять пацієнту.
25. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.24, де лікарський засіб, коли його вводять пацієнту,

- нту, забезпечує насичення інтегринового рецептора альфа-4 на рівні щонайменше приблизно від 65% до приблизно 100%.
26. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.25, де насичення становить щонайменше 75%.
27. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.25, де насичення становить щонайменше 80%.
28. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за будь-яким з пп.20-25, де інгібітор зв'язується з інтегриновими димерами альфа-4.
29. Застосування за п.20, де моноклональне антитіло являє собою наталізумаб або його імунологічно активний фрагмент.
30. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.29, де інгібітор зв'язується з альфа-4 бета-1.
31. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.20, де засіб вводять в кількості, достатній для насичення одного або декількох димерних рецепторів, тим самим пригнічуючи патологічне запалення.
32. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за будь-яким з пп.20-31, де інгібітор являє собою наталізумаб і складений у кількості приблизно від 1мг/кг маси пацієнта до приблизно 20мг/кг маси пацієнта для внутрішньовенної інфузії потребуючому цього пацієнту кожні 4 тижні протягом щонайменше 6 місяців.
33. Застосування інгібітора інтегрину альфа-4 за п.32, де інгібітор складають для внутрішньовенної інфузії пацієнту протягом щонайменше 12 місяців.

Даний винахід в основному відноситься до засобів, що специфічно зв'язуються з утримуючим субодиницю альфа-4 ($\alpha 4$) інтегриновим рецептором і інгібуючим його і до терапевтичних застосувань даних засобів.

Запалення являє собою відповідь тканин, що постачаються кров'ю, на інфекцію або пошкодження і реалізовується адгезією лейкоцитів до ендотеліальних клітин кровоносних судин і їх інфільтрацією в оточуючі тканини. Як правило, при запаленні, інфільтруючі лейкоцити вивільняють токсичні медіатори для знищення організмів, що проникли, фагоцитують дебрис і мертві клітини і грають роль у відновленні тканин і в імунній відповіді. Однак при патологічному запаленні відповідь інфільтруючих лейкоцитів надмірна і може викликати серйозне або смертельне ушкодження. [Див., наприклад, Hickey, *Psychoneuroimmunology II* (Academic Press 1990)].

Інтегрини являють собою сімейство глікопротеїнів клітинної поверхні, залучених в адгезію клітин, міграцію і активацію імунних клітин. Інтегрини альфа-4 експресуються всіма циркулюючими лейкоцитами, за винятком нейтрофілів і формують гетеродимерні рецептори в поєднанні з субодиницями інтегринів або бета1 або бета2; а димери альфа-4 бета-1 ($\alpha 4\beta 1$) і димери альфа-4 бета-7 ($\alpha 4\beta 7$) грають роль в міграції лейкоцитів через ендотелій судин [Springer et al., 1994 *Cell* 76: 301-14 і Butcher et al., 1996 *Science* 272: 60-6] і роблять

внесок в активацію і виживання клітин в паренхімі [Damle et al., 1993 *J. Immunol.* 151: 2368-79; Koopman et al., 1994 *J. Immunol.* 152: 3760-7 і Leussink et al., 2002 *Acta Neuropathol.* 103: 131-136].

Конкретно, альфа-4 бета-1 (також відомий як дуже пізній антиген-4 [VLA-4]) зв'язується з молекулою клітинної адгезії судин 1 (VCAM-1) [Lobb et al., 1994 *J. Clin. Invest.* 94: 1722-8], яка експресується судинним ендотелієм в багатьох ділянках хронічного запалення [Bevilacqua et al., 1993 *Annu. Rev. Immunol.* 11: 767-804 і Postigo et al., 1993 *Res. Immunol.* 144: 723-3-5]. Димер альфа-4 бета-7 взаємодіє з молекулою клітинної адгезії адресину слизової (MAdCAM-1) і опосередковує хомінг лімфоцитів в травний тракт [Farstad et al., 1997 *Am. J. Pathol.* 150: 187-99 і Issekutz et al., 1991 *J. Immunol.* 147: 4178-84]. Експресія MAdCAM-1 на судинному ендотелії також посилена в ділянках запалення в кишковому тракті пацієнтів із запальним захворюванням кишечника (IBD) [Briskin et al., 1997 *Am. J. Pathol.* 151: 97-110].

Молекули адгезії, такі як інтегрини альфа-4 являють собою потенційні мішені для терапевтичних засобів. Наприклад, рецептор VLA-4, в якому альфа-4 є субодиницею, являє собою важливу мету, оскільки його взаємодія з лігандом відбувається на ендотеліальних клітинах головного мозку. Захворювання і стани, що приводять до запалення головного мозку, мають тяжкі наслідки. В іншому

прикладі, інтегриновий димер альфа-4 бета-7 являє собою важливу мету, внаслідок того, що він залучений в хомінг лімфоцитів і патологічне запалення в шлунково-кишковому тракті.

Інтегрин альфа-4 бета-1 експресований на позаклітинній поверхні активованих лімфоцитів і моноцитів, залучених в патогенез гострого запального ураження головного мозку і в порушення гематоенцефалічного бар'єра (BBB), асоційованих з розсіяним склерозом (РС) [Coles et al., 1999 Ann. Neurol. 46 (3): 296-304]. На тваринних моделях і *in vitro* і *in vivo* тестували засоби проти інтегрину альфа-4 на наявність у них протизапального потенціалу. [Див. Yednock et al., 1992 Nature 356: 63-66; патент США №5840299, виданий Bendig et al. 24 листопада 1998 року, і патент США №6001809, виданий Thorsett et al. 14 грудня 1999 року]. Експерименти *in vitro* показують, що антитіла до інтегрину альфа-4 перешкоджають прикріпленню лімфоцитів до ендотеліальних клітин головного мозку. Експерименти, що тестують дію антитіл проти інтегрину альфа-4 на тваринах з штучно викликаним станом, що імітує розсіяний склероз, експериментальним аутоімунним енцефаломієлітом (ЕАЕ), продемонстрували, що введення антитіл проти інтегрину альфа-4 запобігає запаленню головного мозку і подальшому паралічу у тварин. Разом дані експерименти ідентифікували антитіла проти інтегрину альфа-4 як потенційно застосовні терапевтичні засоби для лікування розсіяного склерозу і інших запальних захворювань і порушень.

Іншим конкретним прикладом патологічного запалення, що залучає інтегрини альфа-4, є хвороба Крона (CD), що являє собою хронічне, невиліковне, ремітуюче, трансмуральне запалення кишкового тракту. Захворювання характеризується невідповідною міграцією і активацією імунних клітин в слизовій кишечнику, включаючи в себе Т-клітини, макрофаги і нейтрофіли [Schreiber et al., 1991 Gastroenterology 101: 1020-30]. Способи першочергової медичної терапії для хвороби Крона включають в себе 5-аміносаліцилати (5-ASA), що володіють низькою ефективністю, і кортикостероїди, що володіють різними короткостроковими і тривалими побічними ефектами [Munkholm et al., 1994 Gut 35: 360-2]. Стейких до терапії першої лінії пацієнтів лікують імуносупресорними засобами, такими як азатіоприн, 6-меркаптопурин і метотрексат, але дані засоби володіють повільним початком дії і потенційно серйозними побічними ефектами [Stein et al., 2001 Surg. Clin. North Am. 81: 71-101, viii]. Зовсім недавно для застосування в лікуванні хвороби Крона впровадили біологічні засоби з більш швидким початком дії, але застосування таких засобів схожим чином пов'язане з такими проблемами як тривалість ефективної дії і побічні ефекти.

Даний винахід відноситься до способів тривалого ослаблення патологічного запалення у пацієнта, за допомогою тривалого введення засобу, що селективно зв'язується з інтегрином альфа-4. Режим тривалого дозування засобу проти альфа-4 розрахований так, щоб (1) засіб специфічно зв'язувався з інтегрином альфа-4 або утримуючим

інтегрин альфа-4 інтегриновим димером і (2) засіб вводили повторно для підтримки насичення інтегринового рецептора альфа-4 на рівні, достатньому для придушення патологічного запалення. Засіб згідно з даним винаходом може бути придатним для придушення запалення за допомогою зв'язування і інгібування всіх інтегринових димерів, що містять субодиницю альфа-4, або його можна розробити так, щоб зв'язувати конкретний димер, наприклад, альфа-4 бета-1.

В одному здійсненні ефективність режиму тривалого дозування можна визначити вимірюванням насичення конкретного інтегринового димера. У конкретному прикладі вважають, що інтегриновий димер альфа-4 бета-1 залучений до розсіяного склерозу і, таким чином, рівень насичення, необхідний для ефективного тривалого введення, можна виміряти за допомогою вимірювання насичення димерного рецептора альфа-4 бета-1.

В іншому здійсненні, де передбачають, що інтегринові димери залучені до патологічного запалення, для визначення ефективності режиму тривалого введення можна вимірювати насичення поєднання димерних рецепторів. У конкретному прикладі вважають, що і димери альфа-4 бета-1 і димери альфа-4 бета-7 залучені до патологічного запалення, асоційованого із запальним захворюванням кишкового тракту. Таким чином, вимірювання рівнів насичення і альфа-4 бета-1 і альфа-4 бета-7 може бути придатним для визначення ефективності конкретного режиму тривалого введення.

В одному здійсненні успіх режиму тривалого дозування можна визначати оцінкою фізіологічного маркера патологічного запалення. Наприклад, при режимі тривалого дозування, що застосовується для РС, успіх режиму дозування можна підтвердити за допомогою визначення рівнів осередків ураження головного мозку із застосуванням способу візуалізації, наприклад, магнітно-резонансної томографії (МРТ). В іншому прикладі, при режимі тривалого дозування, що застосовується для CD, успіх режиму дозування можна підтвердити за допомогою визначення рівнів сироваткового С-реактивного білка у пацієнта. У ще одному прикладі успіх режиму дозування можна визначити із застосуванням встановленої групи критеріїв, асоційованих з поліпшенням, наприклад, зменшення CDAI у пацієнта CD.

Інше здійснення даного винаходу відноситься до лікування запального захворювання шлунково-кишкового тракту (наприклад, хвороба Крона, виразковий коліт і запальне захворювання кишечнику) у суб'єкта, що включає в себе введення терапевтично ефективної кількості утримуючої наталізумаб композиції, достатньої для лікування або ослаблення вказаного запального захворювання шлунково-кишкового тракту у вказаного пацієнта.

У конкретному здійсненні даний винахід відноситься до режиму дозування, де передбачене повторне введення засобу для забезпечення у пацієнта рівня насичення інтегринового рецептора альфа-4 в розмірі 65-100%, таким чином забезпечуючи тривале придушення патологічного запалення.

лення у пацієнта. В іншому конкретному здійсненні засіб вводять повторно для забезпечення у пацієнта рівнів, щонайменше, приблизно 75-100%. У ще одному конкретному здійсненні засіб вводять повторно для забезпечення у пацієнта рівнів, щонайменше, приблизно 80-100%.

Особливістю винаходу є те, що у пацієнта можна тривало придушувати небажані ефекти патологічного запалення, наприклад, протягом періоду тривалістю шість місяців, один рік, два роки і більше.

Аспектом способу згідно з даним винаходом є те, що протягом тривалих періодів підтримуються рівні засоби проти інтегрину альфа-4, достатні для придушення патологічного запалення протягом даних періодів.

Особливістю винаходу є те, що форма дозування забезпечує менші рівні патологічного запалення протягом більш тривалих періодів в порівнянні з однократною дозою.

Перевагою даного винаходу є те, що засоби, що застосовуються в способах згідно з даним винаходом добре переносяться і володіють низькою токсичністю.

Дані і інші об'єкти, переваги і особливості даного винаходу стануть зрозумілі фахівцям в даній галузі після детального ознайомлення зі способами і композиціями, досить повно описаними нижче.

Фіг.1 являє собою лінійний графік, що ілюструє загальну середню кількість нових осередків з накопиченням ОСГ у пацієнтів з РС після дозування наталізумаба.

На Фіг.2 представлені проценти активних сканувань в кожній часовій точці протягом вивчення застосування наталізумаба при РС. Активні сканування являють собою сканування, що містять один або декілька нових осередків з накопиченням Gd.

На Фіг.3A-C і 4A-C представлені сироваткові концентрації наталізумаба після конкретних часових точок режиму дозування в дослідженні РС. На Фіг.3A-C представлені рівні при дослідженні дози 3мг/кг; на Фіг.4A-C представлені рівні при дослідженні дози 6мг/кг;

На Фіг.5A-F представлені рівні насичення рецептора, що підтримуються при дослідженні РС. Рівні представлені як процентні значення.

На Фіг.6 і 7 представлений процент пацієнтів, що досягли передбачуваних критеріїв клінічної відповіді (Фіг.6) або ремісії (Фіг.7) після дозування при дослідженні CD.

На Фіг.8 представлені середні зміни сироваткового С-реактивного білка у підгрупи пацієнтів із збільшеним в порівнянні з базовим в даному дослідженні рівнем С-реактивного білка. Базові значення склали (в мг/л): плацебо - 38,44 (N=26); група 3+0мг/кг - 32,35 (N=38); група 3+3мг/кг - 41,16 (N=33) і група 6+6мг/кг-333 (N=26).

На Фіг.9A-B, відповідно, представлені ефекти наталізумаба на циркулюючі еозинофіли у пацієнтів з активною хворобою Крона (CD) і виразковим колітом (UC). Фіг.9A демонструє, що наталізумаб значно збільшує число циркулюючих еозинофілів у пацієнтів з хворобою Крона (n=18) і виразковим колітом (n=12) після інфузії 3мг/кг наталізумаба. Фіг.9B демонструє, що введення наталізумаба

значно збільшує число моноцитів у пацієнтів з активною хворобою Крона і виразковим колітом після інфузії 3мг/кг наталізумаба.

На Фіг.10A-D представлений вплив введення наталізумаба на клітини TCRαβ⁺, які експресують активаційний антиген. У частині A представлена дія наталізумаба у пацієнтів з активною хворобою Крона, тобто значне збільшення клітин TCRαβ⁺, які експресують CD26, HLA-DR, CD8CR і CD8CD28, щонайменше, до чотирьох тижнів після інфузії 3мг/кг наталізумаба. У частині B представлена дія наталізумаба на експресуючі активаційний антиген клітини TCRαβ⁺ у пацієнтів з активним виразковим колітом, так як значне збільшення клітин TCRαβ⁺, які експресують CD26, HLA-DR, CD8DR і CD8CD28, щонайменше, до чотирьох тижнів після інфузії 3мг/кг наталізумаба. У частині C представлена дія введення наталізумаба на клітини TCRαβ⁺, які експресують активаційний антиген і маркери пам'яті і маркери «наївних» клітин, у пацієнтів з активною хворобою Крона, тобто значне збільшення клітин пам'яті (CD45RO) і «наївних» клітин (CD45RA) TCRαβ⁺, щонайменше, до чотирьох тижнів після інфузії наталізумаба. У частині D представлені ефекти наталізумаба на клітини TCRαβ⁺, які експресують активаційний антиген, маркери пам'яті і маркери «наївних» клітин, у пацієнтів з активним виразковим колітом, тобто значне збільшення клітин пам'яті (CD45RO) TCRαβ⁺, «наївних» клітин (CD45RA) TCRαβ⁺, клітин TCRαβ⁺ з CD69 і CD38, протягом одного тижня після введення наталізумаба.

На Фіг.11A-B представлені ефекти наталізумаба на циркулюючі клітини TGRαβ⁺ і клітини NK-типу у пацієнтів з активною хворобою Крона і з виразковим колітом, відповідно.

Перед описом даних способів і терапевтичних засобів необхідно зрозуміти, що даний винахід не обмежується конкретними способами, що описуються, і терапевтичними засобами, які по суті, безсумнівно, можуть змінюватися. Також необхідно зрозуміти, що термінологія, що застосовується тут, призначена тільки для мети опису конкретних здійснень і не призначена для обмеження.

Коли представлені великі діапазони значень, необхідно розуміти, що кожне проміжне значення аж до однієї десятої одиниці нижньої межі, якщо тільки в контексті явно не вказано інакше, між верхньою і нижньою межею даного діапазону і будь-яке інше вказане або проміжне значення у вказаному діапазоні, включені в даний винахід. Верхню і нижню межі даних менших діапазонів можна незалежно включати в менший діапазон за умови того, що будь-яка межа конкретно виключається з вказаного інтервалу. Коли вказаний діапазон включає в себе одну або обидві межі, діапазони, що виключають обидві з даних включених меж, також включені в даний винахід.

Якщо не визначено інакше, всі технічні і наукові терміни, що застосовуються тут, володіють тими ж значеннями, які звичайно розуміє фахівець в галузі, якій належить даний винахід. Хоча на практиці або при тестуванні згідно з даним винаходом можна застосовувати будь-які подібні або еквівалентні тим, що описані тут способи і речовини, тут

описані переважні способи і речовини. Всі вказані тут публікації включені сюди як посилання для розкриття і опису способів і/або речовин, в зв'язку з тими, публікації про яких цитуються.

Необхідно зазначити, що, як застосовують тут, форми однини включають множину посилань, як-що в контексті явно не вказано іншого. Таким чином, посилання на "антитіло" включає в себе множину таких антитіл, а посилання на "дозування" включає в себе посилання на одне або декілька дозувань і їх еквівалентів, відомим фахівцям в даній галузі, і т.д.

Публікації, що обговорюються тут, надані виключно для їх опису до дати подачі даної заявки. Нічого тут не треба тлумачити як визнання того, що даний винахід дає право «обійти» такі публікації внаслідок більш раннього терміну створення, винаходу. Крім того, надані дати публікацій можуть відрізнятися від фактичних дат публікацій, які можуть потребувати незалежного підтвердження.

Як застосовують тут, термін "засіб проти альфа-4" відноситься до будь-якого засобу, що специфічно зв'язується з інтегрином, який містить субодиницю альфа-4, і інгібує активність інтегрину. Він включає в себе засоби, що специфічно зв'язуються з інтегрином альфа-4, а також засоби, що зв'язуються з інтегриновим димером, що містить інтегрин альфа-4, наприклад, альфа-4 бета-1 ($\alpha 4\beta 1$) або альфа-4 бета-7 ($\alpha 4\beta 7$). Термін "засоби" призначений для включення в себе синтетичних і рекомбінантних молекул (наприклад, антитіл, низькомолекулярних сполук, пептидів або інших отриманих синтетичним шляхом молекул або сполук, а також рекомбінантно отриманих генних продуктів), а також сполук, що зустрічаються в природі (наприклад, поліпептидів, антитіл і т.п.).

Як застосовують тут в контексті режиму постійного дозування, термін "ефективність" відноситься до ефективності конкретного режиму лікування. Ефективність можна виміряти на основі зміни протікання захворювання у відповідь на засіб згідно з даним винаходом. Наприклад, при лікуванні РС, ефективність можна виміряти за допомогою частоти рецидивів при ремітуючому РС і за допомогою присутності або відсутності нових осередків ураження в центральній нервовій системі, як визначають із застосуванням таких способів, як МРТ.

Як застосовують тут в контексті режимів тривалого лікування, термін "сприятливий" відноситься до ефективності конкретного режиму лікування. Він включає в себе баланс ефективності, токсичності (наприклад, побічні ефекти і переносимість пацієнтом композиції або одиниці дозування), дотримання пацієнтом режиму і схеми лікування і т.п. Щоб розглядати режим тривалого введення як "успішний", необхідний баланс різних аспектів догляду за пацієнтом і ефективності для отримання найбільш сприятливого для пацієнта результату.

Як застосовують тут, терміни "специфічно зв'язується" або "зв'язується специфічно" відносяться до ситуації, в якій один представник пари, що специфічно зв'язується, не показує ніякого значного зв'язування з молекулами, відмінними від

його специфічного партнера по зв'язуванню (наприклад, афінність для його партнера по зв'язуванню приблизно 1000х або більше. В даному винаході засіб проти інтегрину альфа-4 не демонструє специфічного зв'язування з жодним поліпептидом, відмінним від інтегрину альфа-4 або рецептора, що містить інтегрин альфа-4. Наприклад, показано, що антитіла, що застосовуються в способах згідно з даним винаходом, які зв'язуються з інтегрином альфа-4 з афінністю зв'язування в розмірі 10 моль/літр або більше, переважно 10 моль/літр або більше, специфічно зв'язуються з інтегрином альфа-4.

Як застосовують тут, термін "значною мірою гомологічний" означає будь-який поліпептид з такою зміною в послідовності, що в поліпептиді одну або декілька амінокислот замінює функціонально еквівалентна амінокислота, з отриманням, таким чином, зміни, яка не надає або впливає невеликий чином на властивості зв'язування поліпептидів. Наприклад, один або декілька амінокислотних залишків в послідовності можна замінити на іншу амінокислоту тієї ж полярності.

Як застосовують тут, терміни "викликає імунну відповідь" і "викликає імунну відповідь хазяїна" відносяться до отримання імунної відповіді до рецептору, що містить інтегрин альфа-4, у суб'єкта, після введення суб'єкту засобу згідно з даним винаходом. Імунну відповідь у суб'єкта можна охарактеризувати реактивністю сироватки до інтегринового рецептору альфа-4, яка, щонайменше, вдвічі більше, ніж у суб'єкта, що не зазнавав лікування, більш переважно - в три рази, ніж реактивність у суб'єкта, що не зазнавав лікування, і навіть більш переважно - щонайменше, в чотири рази, ніж реактивність у суб'єкта, що не зазнавав лікування, з імунореактивністю сироватки, вимірною із застосуванням розведення приблизно 1:100.

Термін "наповнювач" означає будь-яку сполуку, створюючи частину препарату, призначену діяти тільки як носій, тобто не призначену для надання біологічної дії самостійно.

Як застосовують тут, термін "ад'ювант" відноситься до домішки в композицію, яка посилює імунну відповідь на засіб згідно з винаходом, але яка самостійно не викликає імунну відповідь. Ад'юванти можуть посилювати імунну відповідь, використовуючи множину біологічних механізмів, що включають в себе як необмежувальні приклади рекрутування лімфоцитів, стимуляцію Т-клітин, стимуляцію В-клітин і стимуляцію макрофагів.

Терміни "вплив" і "лікування" і т.п. застосовують тут, як правило, щоб позначити отримання бажаного фармакологічного і фізіологічного ефекту. Ефект може бути профілактичним в термінах профілактики або часткової профілактики захворювання, симптому або їх стану і/або може бути терапевтичним в термінах часткового або повного лікування захворювання, стану, симптому або несприятливої дії, властивої захворюванню. Як застосовують тут, термін "лікування" відноситься до будь-якого лікування захворювання тварини, особливо людини, і включає в себе (а) профілактику від виникнення захворювання у суб'єкта, схильного до даного захворювання, але у якого ще не дія-

гносували наявність даного захворювання; (b) придушення захворювання, тобто затримку його розвитку; або (c) полегшення захворювання і/або його симптомів або станів. Винахід призначений для лікування пацієнтів, що страждають захворюванням, яке відноситься до патологічного запалення. Даний винахід включає в себе профілактику, придушення або полегшення несприятливих ефектів, властивих патологічному запаленню, протягом тривалих періодів часу і/або, що викликаються фізіологічними відповідями на невідповідне запалення, присутнє в біологічній системі протягом тривалих періодів часу.

Як застосовують тут, термін "патологічне запалення" відноситься до невідповідного і хронічного запалення, асоційованого з порушеннями, що включають в себе як необмежувальні приклади астму, атеросклероз, деменцію при СНІДі, діабет, запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит, відторгнення трансплантату, захворювання трансплантат проти хазяїна, розсіяний склероз (особливо для придушення демієлінізації), пухлинне метастазування, нефрит, атопічний дерматит, псоріаз, ішемію міокарда, хронічний простатит, ускладнення серпасто-клітинної анемії, червоний вовчак і гостре, опосередковане лейкоцитами ушкодження легенів. Таке запалення характеризується підвищеною відповіддю клітин запалення, що включає в себе інфільтрацію лейкоцитами. З плином часу таке патологічне запалення приводить до ушкодження тканини в ділянці невідповідного запалення.

Мають на увазі, що "Антегрєн®" включає в себе антитіло, також відоме як AN 100226 (номер коду антитіла) або наталізумаб (назва US AN). Антегрєн® являє собою рекомбінантне, гуманізоване антитіло проти інтегрину альфа-4. Переважно захворювання або стан, що підлягає лікуванню у ссавця, являє собою захворювання або стан, який регулюється при введенні терапевтично ефективної дози Antegren®.

Даний винахід оснований на тому несподіваному результаті, що тривалого введення виявленого класу нових сполук, відомих як селективні інгібітори молекул адгезії (SAMI), досить для забезпечення підтримки тривалого придушення запалення при порушеннях, що залучають інтегрінові димери. Після скасування режиму повторного дозування, придушення запалення припиняється (див., наприклад, Фіг.2). Попередні способи лікування інгібіторами запалення застосовували абсолютно відмінні режими дозування, в уявленні, що введення інгібітору запалення може викликати реакцію власної системи відповіді організму, що в свою чергу приведе до розпізнавання запалення як патологічного і як наслідок до тривалого ослаблення патологічного запалення. Автори винаходу показали тут те, що режим тривалого дозування не тільки більш ефективний, ніж короточасний режим дозування, але, фактично, він необхідний для підтримки придушення патологічного запалення. Таким чином, для реалізації деяких з більшості важливих переваг винаходу рівні засобу проти інтегрину альфа-4 необхідно підтримувати протягом ряду місяців або навіть років.

Даний винахід оснований на результатах великого, рандомізованого випробування з контролем плацебо антитіла проти інтегрину альфа-4, наталізумаба, у пацієнтів з ремітуючим РС або страждаючих від помірної до дуже активної CD. Наталізумаб являє собою рекомбінантне, гуманізоване, моноклональне антитіло проти інтегрину альфа-4. Результати даних двох випробувань показали, що лікування за допомогою наталізумаба поліпшує ознаки і симптоми у пацієнтів з РС і CD. Винахід також допускає включення інших химерних антитіл, включаючи приматизовані™ антитіла.

У загальному значенні спосіб згідно з винаходом не включає в себе ніякого конкретного способу введення, оскільки спосіб введення залежить від форми активного засобу і препарату, розробленого для введення активних засобів(у). Однак, описані тут конкретні приклади отримані із застосуванням парентерального введення наталізумаба. Хоча в даному винаході описано застосування антитіла, що специфічно зв'язується з інтегрином альфа-4, воно також призначене, щоб включати в себе тривале введення, наприклад, бівалентних або полівалентних антитіл, що розпізнають обох партнерів інтегринового димера, за умови, що димер містить інтегрин альфа-4.

Основна концепція винаходу відноситься до введення відносно постійних кількостей активних засобів в кровоносну систему пацієнта протягом декількох місяців або років. Дане тривале введення засобу, що селективно зв'язується з інтегрином альфа-4 або димером, що містить інтегрин альфа-4, приводить до придушення патологічного запалення, що підтримується на постійному рівні протягом періоду часу. За допомогою підтримки терапевтичних рівнів активного засобу протягом періоду часу, у пацієнта можна тривало придушувати патологічне запалення.

У дуже конкретному значенні, винахід включає в себе отримання і підтримку у людини рівня насичення димерного рецептора, що містить інтегрин альфа-4 в діапазоні приблизно від 65% до приблизно 100%, більш переважно - приблизно від 75% до приблизно 100%, і навіть більш переважно - приблизно від 80% до приблизно 100%. Такі рівні насичення рецепторів підтримують протягом тривалого періоду (наприклад, протягом 6 місяців або близько того) для забезпечення тривалого придушення патологічного запалення.

Засоби, що селективно зв'язуються з інтегринами альфа-4

При практичному втіленні даного винаходу можна застосовувати різні типи засобів зі здатністю зв'язуватися з інтегринами альфа-4 і придушувати їх активність. Багато які такі засоби ідентифіковані і охарактеризовані, а конкретні засоби описані нижче. Керуючись наданими тут вказівками, фахівець в даній галузі без великих зусиль ідентифікує інші засоби, здатні інгібувати інтегрінові димери, що містять альфа-4, способом, який біологічно імітує або схожий зі способами конкретно описаних засобів, а даний винахід має на увазі включення в себе тривалого введення таких засобів і поєднань таких засобів.

Антитіла

В одному конкретному здійсненні засоби згідно з винаходом являють собою антитіла або їх імунологічно активні фрагменти, що специфічно зв'язуються з інтегрином альфа-4 або димером, що містить альфа-4, такий як альфа-4 бета-1 або альфа-4 бета-7.

Коли засіб згідно з винаходом являє собою антитіло, переважним є моноклональне антитіло. У протилежність препаратам поліклональних антитіл, які, як правило, включають в себе різні антитіла, направлені проти різних епітопів, кожне моноклональне антитіло направлене проти одного епітопу на антигені. Друга перевага моноклональних антитіл полягає в тому, що їх синтезують такими способами, що вони не забруднені іншими імуноглобулінами, наприклад, за допомогою фагового дисплея або виділення з гібридоми. Хоча в даний винахід як засоби згідно з винаходом мають на увазі включеними і поліклональні і моноклональні антитіла, моноклональні антитіла переважні, оскільки вони високоспецифічні, і, таким чином, винахід обговорюють головним чином в термінах моноклональних антитіл.

Крім того, можна ідентифікувати інші антитіла із застосуванням доступних в даній галузі способів. Наприклад, моноклональні антитіла згідно з даним винаходом можна отримувати із застосуванням технології фагового дисплея. Потім виділяють фрагменти антитіл, що специфічно зв'язуються з інтегрином альфа-4 або утримуючим інтегрин альфа-4 димером. Ілюстративні переважні способи для отримання таких антитіл за допомогою фагового дисплея описані в [патентах США №№6225447, 6180336, 6172197, 6140471, 5969108, 5885793, 5872215, 5871907, 5858657, 5837242, 5733743 і 5565332].

Моноклональні антитіла також можна отримувати із застосуванням традиційних гібридомних способів. Дані способи широко застосовують для отримання гібридних клітинних ліній, що секретують високі рівні моноклональних антитіл проти конкретних антигенів, і їх також можна застосовувати для отримання моноклональних антитіл згідно з даним винаходом. Наприклад, мишей (наприклад, мишей Balb/c) можна імунізувати антигенним епітопом інтегрину альфа-4 за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції. Після того, як пройде достатній для розвитку імунної відповіді час, мишей умертвляють, і отримують клітини селезінки, і зливають з клітинами мієломи із застосуванням добре відомих в даній галузі способів. Отримані в результаті злиті клітини, гібридами, потім ростять в селективному середовищі, а виживаючі клітини ростять в такому середовищі із застосуванням умов лімітуючого розведення. Після клонування і повторного клонування гібридами можна виділяти для того, щоб секретувати антитіла (наприклад, клас IgG або IgM, або підклас IgG1), що селективно зв'язуються з мішенню, інтегрином альфа-4 або димером, що містить інтегрин альфа-4. Для отримання засобів, конкретно для застосування для людини, виділені антитіла потім можна застосовувати для отримання химерних і гуманізованих антитіл.

Антитіла згідно з винаходом включають в себе як необмежувальні приклади поліклональні, моноклональні, мультиспецифічні, людські, гуманізовані або химерні антитіла, однокланцеві антитіла (наприклад, scFv), Fab-фрагменти, P(ab')-фрагменти, фрагменти, отримані за допомогою експресійної бібліотеки Fab, антиідіотипічні (анти-Id) антитіла (наприклад, включаючи в себе анти-Id антитіла до антитіл згідно з винаходом) і фрагменти будь-якого з вказаних вище, що зв'язуються з епітопами. Найбільш переважно антитіла являють собою фрагменти людських антитіл, що зв'язуються з антигенами згідно з даним винаходом, і включають в себе як необмежувальні приклади Fab, Fab' і F(ab')₂, Fd, однокланцеві Fv (scFv), однокланцеві антитіла, пов'язані дисульфідними зв'язками Fv (sdFv) і фрагменти, що містять або домен VL або домен VH. Фрагменти антитіл, що зв'язуються з антигенами, які включають в себе однокланцеві антитіла, можуть містити варіабельну ділянку(и) одну або в поєднанні з цілим або частиною наступного нижче: шарнірна ділянка, домени CH1, CH2 і CH3. Також даний винахід включає в себе фрагменти, що зв'язуються з антигенами, які можуть містити будь-яке поєднання варіабельної ділянки(ок) з шарнірною ділянкою і доменами CH1, CH2 і CH3. Антитіла згідно з винаходом можуть походити з будь-якого тваринного джерела, що включає в себе птахів і ссавців. Переважно антитіла є людськими, мишачими і щурячими, осячними, овечими, мавпячими, кролячими, козячими антитілами, антитілами морських свинок, свиними, верблюжими, кіньськими або курячими (або інших птахів) антитілами. Як застосовують тут, "людські" антитіла включають в себе антитіла з амінокислотною послідовністю людського імуноглобуліну і включають в себе антитіла, виділені з бібліотек людських імуноглобулінів або з тварин, трансгенних по одному або декількох людських імуноглобулінів і не експресуючих ендегенні імуноглобуліни, як описано нижче і, наприклад, в [патенті США №593.4598, виданому Kucherlapati et al].

Химерні і гуманізовані антитіла можна отримувати з антитіл, що не належать людині, і вони можуть володіти такою ж або подібною афінністю зв'язування, як і антитіло з якого вони отримані. Способи отримання химерних антитіл [Morrison et al., 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851; Neuberger et al., 1984 Nature 312: 604; Takeda et al., 1985 Nature 314: 452] включають в себе злиття генів, що кодують, наприклад, мишачу молекулу антитіла відповідної антигенної специфічності з генами, що кодують людську молекулу антитіла з відповідною біологічною активністю; такі антитіла знаходяться в об'ємі даного винаходу. Наприклад, кодуючу варіабельну (V) ділянку мишачого моноклонального антитіла нуклеїнову кислоту можна зв'язати з тією, що кодує людську константну (C) ділянку, наприклад, IgG1 або IgG4 нуклеїновою кислотою. Таким чином, отримане в результаті антитіло являє собою видовий гібрид, як правило, зі зв'язуючим антиген доменом з антитіла, що не належить людині, і C або ефекторним доменом з людського антитіла або антитіла приматів.

Гуманізовані антитіла являють собою антитіла з варіабельними ділянками, що початково походять з людського антитіла (тобто акцепторного антитіла), але з ділянками, що визначають комплементарність, значною мірою з антитіла, що не належить людині (донорне антитіло). [Див., наприклад, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 10029-10033 (1989); WO 90/07861, патенти США №№6054297, 5693761, 5585089, 5530101 і 5224539]. Константна ділянка або ділянки даних антитіл, як правило, також походять з людського антитіла. Людські варіабельні ділянки, як правило, вибирають з людських антитіл з послідовностями, що демонструють високу гомологію з бажаними доменами варіабельних регіонів, що зв'язуються, які не належать людині. Варіабельні залишки тяжких і легких ланцюгів можна отримати з того ж антитіла або іншого людського антитіла. Крім того, послідовності можна вибрати як консенсус декількох людських антитіл, як описано в [WO 92/22653].

"Приматизоване™ антитіло" являє собою рекомбінантне антитіло, що містить варіабельні послідовності або зв'язуючі антиген частини приматів і послідовності людських константних доменів. Див. Newman, Biotechnology, 1992, 10: 1455-60. Приматизація антитіл приводить до "отримання антитіл, що містять мавпячі варіабельні домени і людські константні послідовності. Більш детально [див. патент США №6113898]. Даний спосіб модифікує антитіла так, що вони не відторгаються після введення людям, внаслідок того, що вони є антигенними. Даний спосіб оснований на імунізації макак-крабодів людськими антигенами або рецепторами. Даний спосіб розроблений для створення моноклональних антитіл з високою афінністю, направлених до людських антигенів клітинної поверхні.

Конкретні амінокислоти в людській варіабельній ділянці вибирають для заміни, основуючись на передбаченій конформації і властивостях зв'язування антигена. Їх можна визначити із застосуванням таких способів, як комп'ютерне моделювання, прогноз поведінки і властивостей зв'язування амінокислот в певних положеннях у варіабельній ділянці і спостереження ефектів заміни. Наприклад, коли людська варіабельна ділянка і варіабельна ділянка, що не належить людині, відрізняється по амінокислоті, людську варіабельну ділянку можна змінити так, щоб вона відображала амінокислотний склад варіабельної ділянки, що не належить людині.

У конкретному здійсненні антитіла, що застосовуються при тривалому режимі дозування згідно з даним винаходом являють собою гуманізовані антитіла, як описано в [патенті США №5840299], включеному сюди як посилання.

В іншому здійсненні несучих гени людських антитіл мишей можна імунізувати антигенною структурою інтегрину альфа-4 і можна застосовувати гібридомну технологію, для отримання людських антитіл, що селективно зв'язуються з інтегрином альфа-4.

Химерні, людські і/або гуманізовані антитіла можна отримувати із застосуванням рекомбінантної експресії, наприклад, експресії в людських гі-

ридомах [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985)], в клітинах мієломи або в клітинах яєчника китайського хом'ячка (CHO). Альтернативно, кодуючі антитіла послідовності можна впровадити в трансгени для введення в геном трансгенної тварини і подальшої експресії в молоці трансгенної тварини. [Див., наприклад, патенти США №№6197946, 5849992, 5565362, 5336894 і 5304489.] Відповідні трансгени включають в себе трансгени з промотором і/або енансером з специфічного для молочної залози гена, наприклад, казеїну або β-лактоглобуліну.

Низькомолекулярні сполуки

Низькомолекулярні сполуки для застосування згідно з даним винаходом включають в себе множини хімічних класів, хоча, як правило, вони являють собою органічні молекули, переважно невеликі органічні сполуки з молекулярною масою більше ніж 50 і менше ніж приблизно 4000 Дальтон. Засоби-кандидати містять функціональні групи, необхідні для структурної взаємодії з білками, зокрема водневими зв'язками і, як правило, включають в себе амінну, карбонільну, гідроксильну або карбоксильну групу, переважно, щонайменше, дві з функціональних хімічних груп. Засоби-кандидати часто містять циклічні вуглецеві або гетероциклічні структури і/або ароматичні або поліароматичні структури, заміщені однією або декількома з вказаних вище функціональних груп. Засоби-кандидати також знаходять серед біологічних молекул, що включають в себе як необмежувальні приклади пептиди, сахариди, жирні кислоти, стероїди, пурини, піримідини, їх похідні, структурні аналоги або поєднання.

Низькомолекулярні сполуки можна отримати з широкої множини джерел, що включають в себе бібліотеки синтетичних або природних сполук. Наприклад, для випадкового і направленого синтезу широкої множини органічних сполук і біологічних молекул, включаючи експресію випадкових олігонуклеотидів і олігопептидів, доступна множина способів. Альтернативно, доступно або легко отримати бібліотеки природних сполук в формі бактерійних, грибних, рослинних і тваринних екстрактів. Додатково, природні або синтетично отримані бібліотеки і сполуки легко модифікувати традиційними хімічними, фізичними і біохімічними засобами і їх можна застосовувати для отримання комбінаторних бібліотек. Відомі фармакологічні засоби для отримання структурних аналогів можна піддати направленим або випадковим хімічним модифікаціям, таким як ацилювання, алкілювання, етерифікація, амідування і т.п.

Пептиди проти інтегрину альфа-4

Способи згідно з винаходом можна провести з будь-якими пептидами, здатними зв'язуватися з інтегрином альфа-4 або з димером, що містить субодиницю альфа-4. Включеними в способи згідно з винаходом є пептиди, істотно гомологічні ділянці позаклітинного матрикса або натуральному ліганду специфічного рецептора інтегрину альфа-4 або цільовим рецепторам. Наприклад, для тривалого інгібування рецептора альфа-4 бета-1 можна застосовувати пептиди, що містять, щонайменше, частину фібронектинового регіону IIICS

(наприклад, пептиди, що містять, щонайменше, частину пептидної послідовності CS-1 і послідовності, істотно гомологічної послідовності CS-1), і їх можна застосовувати для зв'язування з рецептором і інгібування активності інтегрину, що містить альфа-4. [Див., наприклад, USSN 08/452098], повністю включений сюди як посилання.

Засоби, що викликають імунну відповідь

У конкретному здійсненні засоби згідно з винаходом являють собою пептиди або пептидомімети, що містять імуногенний фрагмент інтегрину альфа-4. Імуногенний фрагмент являє собою будь-який фрагмент, що містить епітоп альфа-4, як правило, складається, щонайменше, з 3, 5, 7, 10, 15, 17 або 20 послідовних амінокислот з природного білка альфа-4 тварин. Пептидна послідовність людського і мишачого альфа-4 доступна в GenBank (інвентарні №№ AA59613 і NP-034706). Фахівець в даній галузі легко отримає пептидний засіб згідно з винаходом на основі амінокислотної послідовності альфа-4 або застосовуючи нуклеотиди дикого типу, що кодують його (наприклад, інвентарні №№ в GenBank L12002 і NM-01056, відповідно). Коли отримані відповідні пептиди, спочатку їх можна піддати скринінгу антитілами, для яких відомо, що вони володіють бажаною імуногенною активністю, наприклад, антитілами, що селективно зв'язуються зі структурою альфа-4 і, що характеризуються здатністю інгібувати активність інтегрину, що містить альфа-4.

Імуногенний фрагмент також можна сконструювати так, щоб він містив амінокислотні аналоги або інші структурні елементи, що посилюють імунну відповідь. Зокрема, пептидні фрагменти можуть нести змінені C- або N-кінці, що посилюють загальну імуногенність молекул, не перешкоджаючи їх здатності викликати імунну відповідь. Приклади таких аналогів включають в себе як необмежувальні приклади альфа-, альфа-двозаміщені амінокислоти, N-алкіл-амінокислоти, молочну кислоту, 4-гідроксипролін, гамма-карбоксиглутамат, гамма-N,N,N-триметиллізин, гамма-N-ацетиллізин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметіонін, 3-метилгістидин і 5-гідроксилізин. Інші придатні аналоги можна знайти в Sigma, Biochemicals and Reagents, Sigma-Aldrich (2001). Фрагмент також можна помітити детектованою міткою, для забезпечення стеження за молекулою в організмі суб'єкта після введення суб'єкту.

Пептиди, аналогічні структури, пептидомімети і т.п. можна виділити з природних джерел, а потім необов'язково перетворити (наприклад, за допомогою розщеплення пептидів) або альтернативним чином - синтезувати традиційними відомими в даній галузі способами, такими як твердофазний синтез або рекомбінантна експресія. [Див., наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, New York, 2nd edition 1989)]. Застосовуючи комерційно доступні пристрої від таких виробників як Applied Biosystems (Foster City, California), можна провести автоматичний пептидний синтез, а способи такого виробництва добре розроблені. Рекомбінантне отримання білків можна провести в прокаріотичних системах, таких як фаг або бакте-

рійні клітини або в еукаріотичних системах, таких як клітини дріжджів, комах або ссавців. Альтернативно білки можна отримувати із застосуванням безклітинних систем *in vitro*, відомих в даній галузі.

В іншому прикладі, для експресії великого числа поліпептидів, які можна піддати скринінгу *in vitro* для ідентифікації пептидів, що специфічно зв'язуються з альфа-4 або димером, що містить інтегрин альфа-4, можна застосовувати пептидні бібліотеки фагового дисплея. Технологія фагового дисплея надає способи експресії різних сукупностей випадкових або селективно рандомізованих пептидів. У даній галузі відомі різні способи фагового дисплея і способи отримання різних сукупностей пептидів. [Наприклад, Ladner et al. (патент США №5223409)] описують способи отримання різних сукупностей зв'язуючих доменів на поверхні фага. Ladner et al. описують фагові вектори, придатні для отримання бібліотеки фагового дисплея, а також способи вибору потенційних зв'язуючих доменів і отримання випадково або селективно мутованих зв'язуючих доменів. Скринінг бібліотеки фагового дисплея, як правило, включає в себе пенінг бібліотеки *in vitro* із застосуванням очищеної молекули-мішені. Фаг, що зв'язується з молекулою-мішенню, можна відновити; окремих фаг можна клонувати і можна визначити пептид, який експресується клонованим фагом.

Подібним чином, Smith iilcott [Meth. Enzymol. 217: 228-257 (1993) і Science 249: 386-390 (1990)] описують способи отримання пептидних бібліотек фагового дисплея, що включають вектори і способи модифікації сукупності пептидів, що експресуються [див. також Huse, WO 91/07141 і WO 91/07149]. Технологія фагового дисплея може бути особливо потужною, коли її застосовують, наприклад, разом з способом оснований на кодонах мутагенезу, який можна застосовувати для отримання випадкових пептидів або бажаних зміщених пептидів [див., наприклад, патент США №5264563]. Дані і інші добре відомі способи можна застосовувати для отримання бібліотеки фагового дисплея, яку можна піддавати способу пенінга *in vivo* згідно з винаходом для ідентифікації пептиду, направленого до одного або декількох вибраних органів.

Молекули пептидної бібліотеки фагового дисплея також можуть існувати як кон'югати, які можуть полегшувати відновлення або ідентифікацію цікавлячого пептиду. Як застосовують тут, термін "кон'югат" означає пептид або пептидоміметик бібліотеки, пов'язаний з фізичною, хімічною або біологічною групою, що включає в себе як необмежувальні приклади твердий субстрат, пластикову мікрогранулу, олігонуклеотид або бактеріофаг і т.п. Така група може забезпечити засіб для ідентифікації або отримання агента.

Деякі агенти, що застосовуються для того, щоб викликати імунну відповідь, імітують відповідний епітоп для індукції імунної відповіді проти інтегрину альфа-4, але є дуже маленькими, щоб бути імуногенними самостійно. У даній ситуації пептидний засіб можна зв'язати з відповідним носієм для сприяння імунній відповіді. Відповідні носії включають в себе сироваткові альбуміни, гемоціанін

морського блюдця (KLH), імуноглобулінові молекули, тиреоглобулін, овальбумін, правцевий анатоксин або анатоксин інших патогенних бактерій, таких як збудники дифтерії, *E. coli*, збудники холери або *H. pylori* або атенуйовані похідні токсинів. Інші носії включають в себе епітопи Т-клітин, що

зв'язуються з алелями МНС, наприклад, щонайменше, з 75% всіх алелів людського МНС. Такі носії іноді називають в даній галузі "універсальними Т-клітинними епітопами". Приклади універсальних Т-клітинних епітопів включають в себе:

Гемаглютинин грипу: HA ₃₀₇₋₃₁₉	PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 2)
PADRE	AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 3), де X переважно являє собою циклогексилаланін, тирозин або фенілаланін
CS малярії: епітоп T3	EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 4)
Поверхневий антиген гепатиту В: HBsAg ₁₉₋₂₈	FLLTRILTI (SEQ ID NO: 5)
Білок теплового шоку 65: hsp65 ₁₅₃₋₁₇₁	DQSIGDLIAEAMDKVGN (SEQ ID NO: 6)
Бацила Кальмета-Жерена	QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO: 7)
Правцевий анатоксин: TT ₈₃₀₋₈₄₄	QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 8)
Правцевий анатоксин: TT ₉₄₇₋₉₆₇	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 9)
T1 gp120 HIV	KQIINMWQEVGKAMYA. (SEQ ID NO: 10)

Інші носії для стимуляції або посилення імунної відповіді включають в себе цитокіни, такі як IL-1, пептиди IL-1 α і β , IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF і хемокини, такі як запальний білок макрофагів (MIP)1 α і β і RANTES (тобто регуляція при активації експресії і секреції нормальними Т-клітинами). Імуногенні засоби також можна зв'язувати з пептидами, що посилюють транспорт через тканини, як описано в [WO 97/17613 і WO 97/17614].

Імуногенні засоби можна зв'язувати з носіями за допомогою хімічного перехресного зв'язування. Способи зв'язування засобу з носієм включають в себе як необмежувальні приклади формування дисульфідних зв'язків із застосуванням N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)пропіонату (SPDP) і сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (SMCC) (якщо у пептида відсутня сульфгідрильна група, це можна забезпечити доданням цистеїнового залишку). Дані реагенти створюють дисульфідний зв'язок між собою і пептидним цистеїном, присутнім на одному білку і амідний зв'язок за допомогою ϵ -аміногрупи на лізині або іншій вільній аміногрупі в інших амінокислотах. У [Immun. Rev. 62: 185 (1982)] описана множина таких формуючих дисульфід/амід засобів. Інші біфункціональні зв'язуючі засоби формують тіоефір, а не дисульфідний зв'язок. Множина даних формуючих тіоефіри засобів доступні комерційно і включають в себе хімічно активний складний ефір 6-малеїмідокпропаної кислоти, 2-бромощової кислоти, 2-йодоцтової кислоти і 4-(N-

малеїмідометил)циклогексан-1-карбонової кислоти. Карбоксильні групи можна активувати зв'язуванням їх з сукцинімідом або натрієвою сіллю 1-гідроксил-2-нітро-4-сульфонової кислоти.

Пептидні засоби також можна експресувати як гібридні білки з носіями (тобто гетерологічними пептидами). Пептидний засіб на його N-кінці, C-кінці або на обох кінцях можна зв'язати з носієм. Необов'язково, в гібридному білку можуть бути присутнім множинні повтори імуногенного пептиду. Необов'язково, імуногенний пептид можна зв'язати з декількома копіями гетерологічних пептидів, наприклад, і на N- і на C-кінцях пептиду. Деякі пептиди-носії служать для індукції відповіді хелперних Т-клітин проти пептиду-носія. Індукована відповідь хелперних Т-клітин в свою чергу індуктує В-клітинну відповідь проти імуногенного пептиду, пов'язаного з пептидом-носієм.

Чи є засіб антитілом, поліпептидом, пептидом, низькомолекулярною сполукою або іншою фармацевтично придатною сполукою згідно з даним винаходом, призначеним для введення індивіду, введення здійснюють за допомогою тривалого режиму дозування. Фактична кількість, що вводиться, і швидкість, і період застосування введення залежать від природи і тяжкості того, що необхідно лікувати. Призначення лікування, наприклад, рішення про дозу і т.п., знаходиться в сфері відповідальності терапевтів і інших лікарів, і, як правило, враховує порушення, яке необхідно лікувати, стан конкретного пацієнта, ділянку доставки, спо-

сіб введення і інші відомі практикам чинники. Приклади вказаних вище способів і протоколів можна знайти в [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Osol, A. (ed.), 1990.].

Фармацевтичні препарати

Даний винахід також відноситься до фармацевтичних препаратів для ослаблення хронічного патологічного запалення у суб'єкта, сприйнятливо-го до нього і/або страждаючого від порушення, асоційованого з патологічним запаленням.

Фармацевтичні препарати згідно з даним винаходом переважно містять засіб в концентрації приблизно від 0,1 до приблизно 10% препарату. Їх також можна застосовувати у відповідній асоціації з іншими фармацевтично активними сполуками. Приведені нижче способи і наповнювачі є тільки ілюстративними і жодним чином не мають на увазі обмеження.

Для оральних препаратів засоби можна застосовувати окремо або в поєднанні з відповідними домішками для отримання таблеток, порошків, гранул або капсул, наприклад, з традиційними домішками, такими як лактоза, маніт, кукурудзяний крохмаль або картопляний крохмаль; зі зв'язувальними засобами, такими як кристалічна целюлоза, похідні целюлози, гуміарабік, кукурудзяний крохмаль або желатин; із засобами для дезінтеграції, такими як кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль або карбоксиметилцелюлоза натрію; з мастильними речовинами, такими як тальк або стеарат магнію і, якщо необхідно, з розріджувачами, буферними засобами, зволожувачами, консервантами і смаковими домішками.

Коли засіб являє собою антитіло, препарат переважно вводять в парентеральній формі дозування. Переважна форма залежить від режиму введення, що планується, і терапевтичного застосування. Композиції, в залежності від бажаного препарату, також можуть включати в себе фармацевтично прийнятні, нетоксичні носії або розріджувачі, які визначають як носії, як правило, що застосовуються для отримання фармацевтичних композицій для введення тваринам або людям. Розріджувач вибирають так, щоб не впливати на біологічну активність поєднання. Приклади таких розріджувачів являють собою дистильовану воду, фізіологічний фосфатно-сольовий буфер, розчини Рінгера, розчин декстрози і розчин Хенка. Крім того, фармацевтична композиція або препарат також можуть включати в себе інші носії, ад'юванти або нетоксичні, нелікарські, неімунотенні стабілізатори і т.п. Також можна включати такі молекули-носії як протеоглікани. Конкретні приклади таких молекул-носіїв включають в себе як необхідні приклади глікозаміноглікани, такі як гепаринсульфат, гіалуронову кислоту, кератансульфат, хондроїтин 4-сульфат, хондроїтин 6-сульфат, гепарансульфат і дерматинсульфат, перлекан і пентополісульфат.

Антитіла згідно з винаходом можна вводити як ін'єктовані дози розчину або суспензії речовини в фізіологічно прийнятному розріджувачі з фармацевтичним носієм, який може являти собою стерильну рідину, таку як вода або олії з доданням поверхнево-активної речовини або без неї. Інші

фармацевтичні препарати являють собою препарати мінерального, тваринного, рослинного або синтетичного походження, наприклад, арахісова олія, соєва олія і мінеральне масло. Як правило, переважними рідкими носіями, особливо для ін'єктованих розчинів є гліколи, такі як пропіленгліколь або поліетиленгліколь. Засоби згідно з винаходом можна вводити в формі препарату з уповільненим вивільненням, наприклад, ін'єкції речовин уповільненого всмоктування, імплантованого препарату або осмотичного насоса, які можна отримувати таким чином, щоб забезпечити уповільнене вивільнення активного інгредієнта.

Крім того, засоби згідно з винаходом, що являють собою антитіла, можна доставляти суб'єкту введенням полінуклеотиду, який кодує ціле антитіло або його частину (наприклад, один ланцюг Fv). Полінуклеотид вводять суб'єкту у відповідному носії, щоб дозволити експресію антитіла у суб'єкта в терапевтично ефективній кількості.

Засоби згідно з винаходом можна складати в препарати для ін'єкцій за допомогою розчинення, суспендування або емульгування їх у водному або неводному розчиннику, такому як рослинні або інші подібні олії, синтетичні гліцериди аліфатичних кислот, складні ефіри вищих аліфатичних кислот або пропіленгліколь. Препарати також можуть містити традиційні домішки, такі як солюбілізатори, засоби для створення ізотонічності, суспендуєчі засоби, емульгатори, стабілізатори і консерванти.

Засоби можна застосовувати в аерозольному препараті для введення за допомогою інгаляції або доставки через легені. Засоби згідно з даним винаходом можна вміщувати в прийнятні газивитискувачі під високим тиском, такі як дихлордифторметан, пропан, азот і т.п.

Крім того, засоби можна отримувати в супозиторіях за допомогою змішування з різноманітними основами, такими як емульгуючі основи або водорозчинні основи. Засоби згідно з даним винаходом можна вводити ректально за допомогою супозиторіїв. Супозиторій може включати в себе носії, такі як кокосова олія, карбоваксі і поліетиленгліколи, що розплавляються при температурі тіла, але є твердими при кімнатній температурі.

Введення засобу згідно з винаходом можна здійснювати будь-якими традиційними способами, що включають в себе парентеральну ін'єкцію, а також введення можна здійснювати локально або системно. Засоби згідно з даним винаходом можна включати у множину препаратів для терапевтичного введення. Більш детально, засоби згідно з даним винаходом можна вміщувати в фармацевтичні композиції за допомогою об'єднання з відповідними фармацевтично прийнятними носіями або розріджувачами і можна вміщувати в препарати в твердих, напівтвердих, рідких або газоподібних формах, таких як таблетки, капсули, порошки, гранули, мазі, розчини, супозиторії, препарати для ін'єкцій, засоби для інгаляцій, гелі, мікросфери і аерозолі. По суті, введення засобів можна проводити різними шляхами, що включають оральний, букальний, ректальний, парентеральний, інтраперитонеальний, інтрадермальний, трансдермальний, інтратрахеальний, інтраназальний, шлунко-

вий, внутрішньом'язовий, інтракраніальний, підшкірний і т.д. шлях введення. Активний засіб після введення може діяти системно або його можна локалізувати за допомогою застосування регіонального введення, інтрамурального введення або застосування імплантату, діючого в напрямі утримання активної дози в ділянці імплантації.

Можна отримати стандартні лікарські форми для орального або ректального введення, такі як сиропи, еліксири і суспензії, де кожна одиниця дозування, наприклад, чайна ложка, столова ложка, таблетка або супозиторій, містить визначену кількість композиції, яка містить один або декілька засобів згідно з даним винаходом. Подібним чином, стандартні лікарські форми для ін'єкції або внутрішньовенного введення можуть містити засіб згідно з даним винаходом в такій композиції як розчин в стерильній воді, фізіологічному розчині або іншому фармацевтично прийнятному носії.

Імпланти для препаратів із затриманим вивільненням добре відомі в даній галузі. Імпланти складають у вигляді мікросфер, пластинок і т.п. полімерами, що не розсмоктовуються або розсмоктовуються. Наприклад, полімери молочної кислоти і/або гліколевої кислоти формують полімер, що руйнується, добре переносимий хазяїном. Імплантат вміщують в безпосередній близькості до ділянки накопичення білків (наприклад, ділянка формування накопичень амілоїду, асоційованих з нейродегенеративними захворюваннями), так щоб локальна концентрація активного засобу збільшувалася в даній ділянці відносно іншого організму.

Типові одиниці дозування для введення суб'єкту включають в себе як необмежувальні приклади розчини, придатні для внутрішньовенного введення; таблетки, що приймаються від двох до Шести разів на добу, або одну капсулу з уповільненим вивільненням або таблетку, що приймається один раз на добу і, що містять пропорційно більшу кількість активного інгредієнта і т.п. Ефект уповільненого вивільнення можна отримати за допомогою речовин капсули, що розчиняються при різних значеннях рН, за допомогою капсул, що вивільняють вміст повільніше під дією осмотичного тиску або за допомогою будь-яких інших способів контрольованого вивільнення.

Визначені засоби згідно з винаходом, включаючи в себе антитіла і пептиди, іноді вводять в поєднанні з ад'ювантом. У поєднанні із засобом проти інтегрину альфа-4 для виклику імунної відповіді можна застосовувати множину ад'ювантів. Переважні ад'юванти посилюють властиву відповідь на засіб, не викликаючи конформаційних змін в засобі, які впливають на якісну форму відповіді. Переважні ад'юванти включають в себе гідроксид алюмінію і фосфат алюмінію, 3 де-О-ацильований монофосфорилліпід А (MPL™) [див. GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, now part of Corixa)]. Stimulon™ QS-21 являє собою тритерпеновий глікозид або сапонін, виділений з кори кіляїї *Saponaria Molina*, дерева, виявленого в Південній Америці [див. Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент США №5057540 (Aquila

BioPharmaceuticals, Framingham, MA)]. Інші ад'юванти являють собою емульсії олія-в-воді (такі як сквален або арахісова олія), необов'язково в поєднанні з імуностимуляторами, такими як монофосфорилліпід А [див. Stoute et al., 1997 N. Engl. J. Med. 336: 86-91]. Іншим ад'ювантом є CpG [WO 98/40100]. Альтернативно засіб можна зв'язати з ад'ювантом. Однак таке зв'язування не повинне істотно змінювати конформацію бажаного епітопа альфа-4, так щоб впливати на природу імунної відповіді хазяїна. Ад'юванти можна вводити як компонент терапевтичної композиції з активним засобом або можна вводити окремо перед, спільно або після введення терапевтичного засобу.

Переважний клас ад'ювантів являє собою солі алюмінію (галун), такі як гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію і сульфат алюмінію. Такі ад'юванти можна застосовувати з іншими специфічними імуностимулюючими засобами, такими як MPL або 3-DMP, QS-21, полімерні або мономерні амінокислоти, такі як поліглутамінова кислота або полілізин, або без них. Інший клас ад'ювантів являє собою препарати емульсій олія-в-воді. Такі ад'юванти можна застосовувати з іншими специфічними імуностимулюючими засобами, такими як мурамілпептиди (наприклад, N-ацетилмураміл-L-треоніл-D-ізоглутамін (thr-MDP), N-ацетилнормураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін (nor-MDP), N-ацетилмураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін-L-2-(1'-2'-дипальмітоїл-sn-глицеро-3-гідроксифосфорилокси) етиламін (MTP-PE), N-ацетилглюкозамініл-N-ацетилмураміл-L-A1-D (DTP-DPP) терамід™ або іншими компонентами клітинної стінки бактерій або без них. Емульсії олія-в-воді включають в себе (а) MF59 [WO 90/14837], що містить 5% сквален, 0,5% Tween 80 і 0,5% Span 85 (необов'язково утримуючі різні кількості MTP-PE), сформовані в субмікронні частки із застосуванням мікрофлюїдизатора, такого як мікрофлюїдизатор моделі HOY (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, що містить 10% сквален, 0,4% Tween 80, 5% блокований пліоронієм полімер L121 і thr-MDP, або мікрофлюїдизований в субмікронну емульсію або перемішаний на центрифугі типу "уортекс" для утворення емульсії з частками більшого розміру і (c) ад'ювантна система Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), що містить 2% сквален, 0,2% Tween 80 і один або декілька компонентів бактерійної клітинної стінки з групи, що складається з монофосфорилліпиду А, диміколату трегалози (TDM) і скелета клітинної стінки (CWS), переважно MPL+CWS (Detox™). Інший клас переважних ад'ювантів являє собою ад'юванти сапоніни, такі як Stimulon™ (QS-21; Aquila, Framingham, MA) або частки, отримані з нього, такі як ISCOM (імуностимулюючі комплекси) і ISCOMATRIX. Інші ад'юванти включають в себе повний або неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), цитокіни, такі як інтерлейкіни (IL-1, IL-2 і IL-12), колонієстимулюючий фактор для макрофагів (M-CSF) і фактор некрозу пухлини (TNF). Такі ад'юванти, як правило, доступні з комерційних джерел.

Ад'ювант можна вводити із засобом у вигляді однієї композиції або можна вводити перед, спільно або після введення засобу. Засіб і ад'ювант можна вміщувати і постачати в одній і тій же ампу-

лі або вмішувати в окремі ампули і змішувати перед застосуванням. Засіб і ад'ювант, як правило, упаковують разом з етикеткою, вказуючою призначене терапевтичне застосування. Якщо засіб і ад'ювант вміщують роздільно, упаковка, як правило, включає в себе інструкції по змішуванню перед застосуванням. Вибір ад'юванта і/або носія залежить від таких чинників як "стабільність препарату, що містить ад'ювант, маршрут введення, протокол дозування і ефективність ад'юванту для виду, що зазнає вакцинації. У людей переважним фармацевтично прийнятним ад'ювантом є ад'ювант, схвалений для введення людям відповідними регулюючими органами. Приклади таких переважних ад'ювантів для людей включають в себе галун, MPL і QS-21. Необов'язково одночасно можна застосовувати два і більше різних ад'ювантів. Переважні поєднання включають в себе галун з MPL, галун з QS-21, MPL з QS-21 і галун, QS-21 і MPL разом. Також можна застосовувати неповний ад'ювант Фрейнда [Chang et al., 1998 *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 173-186], необов'язково в поєднанні з будь-яким з наступного: галун, QS-21 і MPL і всіма їх поєднаннями.

Режими дозування тривалого застосування

Режими тривалого лікування згідно з даним винаходом забезпечують рівень засобу проти інтегрину альфа-4, який підтримує насичення рецептору, достатнє для придушення патологічного запалення у потребуючого цього пацієнта. Способи згідно з винаходом пропонують введення один раз кожні два тижні або від одного разу на місяць до одного разу кожні два місяці, з повторним дозуванням через період часу тривалістю, щонайменше, шість місяців, а більш переважно - через рік або більше. Способи згідно з винаходом включають в себе отримання і підтримку рівня насичення рецептору у людського пацієнта димера, що містить інтегрин альфа-4 (наприклад, VLA-4) в діапазоні приблизно від 65% до 100%, більш переважно - від 75% до 100%, і навіть більш переважно - від 80% до 100%. Дані рівні насичення рецептору підтримуються на даних рівнях тривало (наприклад, протягом періоду 6 місяців або приблизно близько цього) для забезпечення тривалого придушення патологічного запалення.

У конкретному здійсненні засіб проти альфа-4 являє собою антитіло, переважно гуманізоване або людське антитіло (наприклад, наталізумаб), а дозування проводиться щомісяця. Для визначення ефективності режиму дозування можна стежити за рівнями насичення рецептору, а для підтвердження успіху режиму дозування можна вимірювати фізіологічні маркери. Як підтвердження для встановлення кліренса антитіла і для визначення можливого ефекту періоду напіввиведення на ефективність лікування можна стежити за сироватковими рівнями антитіла.

Кількість введеного в одиниці дозування засобу може залежати від того, чи вводять також ад'ювант, як правило, з більш високими дозами, необхідними в присутності ад'юванта. Для імунізації засобом згідно з винаходом дози знаходяться в діапазоні приблизно від 0,0001 до приблизно 100мг/кг, а більш звичайно - приблизно від 0,01 до

5мг/кг маси тіла хазяїна. Наприклад, дози можуть становити приблизно 1мг/кг маси тіла або приблизно 10мг/кг маси тіла. Дозування і частоту можна змінювати в залежності від часу напіввиведення засобу у пацієнта. Дозування і частоту введення можна змінювати в залежності від того чи є лікування профілактичним або терапевтичним. Для введення антитіла кожна доза для ін'єкції, як правило, складає приблизно від 2,0 до приблизно 8,0мг/кг. Відповідно до наданого тут керівництва за ефективним дозуванням можна стежити за допомогою отримання у пацієнта зразків рідин, як правило, зразок сироватки крові або цереброспінальної рідини, і визначення насичення інтегрінового рецептору із застосуванням добре відомих в даній галузі способів. В ідеалі зразок беруть до початку дозування, подальші зразки беруть і вимірюють до і/або після кожної імунізації. Особливо переважною кількістю наталізумаба або еквівалентного йому імунологічно активного фрагмента є 3 мг на кг масу пацієнта на місяць.

Коли вводять ад'ювант, рівень дозування збільшують у відповідності до конкретного ад'юванту і рівня імуногенності засобу проти інтегрину альфа-4. Дози окремих засобів, вибраних згідно з даним винаходом, визначають за способами стандартного дозування, прийнятих в зв'язку з наданим керівництвом.

Як альтернатива тривалому введенню, що включає в себе повторні окремі дозування, засіб проти альфа-4 можна ввести як препарат з уповільненим вивільненням, що забезпечує таку дозу, що рівні насичення рецептору залишаються достатніми для придушення запалення. Наприклад, для тривалого введення засобу проти альфа-4, який входить в об'єм даного винаходу, можна застосовувати системи з контрольованим вивільненням. Обговорення відповідних форм дозування з контрольованим вивільненням можна знайти в [Lesczek Krowczynski, *Extended-Release Dosage Forms*, 1987 (CRC Press, Inc.)].

Різні способи контрольованого вивільнення охоплюють дуже широкий спектр лікарських форм дозування. Способи контрольованого вивільнення включають в себе як необмежувальні приклади фізичні системи і хімічні системи. Фізичні системи включають в себе як необмежувальні приклади резервуари з мембранами, контролюючими швидкість, такі як системи з мікроінкапсуляцією, з макроінкапсуляцією і мембранні системи; резервуари без контролюючих швидкостей мембран, такі як порожнисті волокна, ультрамікропористий триацетат целюлози і пористі полімерні субстрати і плівки; монолітні системи, що включають в себе такі системи, фізично розчинені в непористих, полімерних або еластомерних матриксах (наприклад, таких, що не руйнуються, що руйнуються, що розмиваються агентами з навколишнього середовища, деградовані), і речовини, фізично розчинені в непористих, полімерних або еластомерних матриксах (наприклад, таких, що не руйнуються, що руйнуються, що розмиваються агентом з навколишнього середовища, деградовані); ламіновані структури, що включають в себе резервуарні шари, хімічно схожі або не схожі із зовнішніми

контрольними шарами і інші фізичні способи, такі як осмотичні насоси або адсорбція на іонообмінних смолах.

Хімічні системи включають в себе як необмежувальні приклади хімічну ерозію полімерних матриксів (наприклад, гетерогенну або гомогенну ерозію), або біологічну ерозію полімерних матриксів (наприклад, гетерогенну або гомогенну). Додаткове обговорення класів систем для контролюваного вивільнення можна знайти в [Agis F. Kydonieus, *Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications*, 1980 (CRC Press, Inc.)].

Способи згідно з винаходом можна застосовувати для лікування пацієнта, ураженого порушенням, що залучає до себе патологічне запалення або виникаючим внаслідок нього, або для профілактичного лікування пацієнта з ризиком конкретного порушення. У порівнянні з терапевтичним лікуванням, режими дозування, необхідні для профілактичного лікування, можуть змінюватися, і їх необхідно розробити для конкретного застосування і захворювання, що піддається лікуванню.

У деяких способах одночасно вводять два або більше засобів (наприклад, моноклональні антитіла з різною специфічністю зв'язування), і в цьому випадку доза кожного засобу, що вводиться, знаходиться у вказаних діапазонах. Інтервали також можуть бути нерегулярними, в залежності від свідчень при вимірюванні рівнів насичення рецепторів або в залежності від інших показників протікання захворювання.

Фахівці швидко зрозуміють, що рівні доз можуть змінюватися як функція конкретного засобу, тяжкості симптомів і чутливості суб'єкта до побічних ефектів. Деякі з конкретних засобів є більш ефективними, ніж інші. Фахівці в даній галузі легко визначають переважне дозування для даного засобу множиною способів. Переважні способи являють собою вимірювання фізіологічної ефективності даного засобу.

Терапевтичні свідчення

Препарати з контрольованим вивільненням згідно з даним винаходом можна застосовувати для отримання широкого діапазону бажаних ефектів. Особливо препарати згідно з винаходом придатні для лікування по суті будь-якого хворобливого стану або симптому, вибіркового довгостроковим введенням протизапальних засобів, направлених проти патологічного запалення.

Винахід також відноситься до способів лікування, що використовують здатність засобів проти інтегрину альфа-4 блокувати залежні від альфа-4 взаємодії. Залежна від альфа-4 взаємодія з лігандом VCAM-1 на ендотеліальних клітинах являє собою ранню подію при багатьох запальних реакціях, що включають запальні реакції центральної нервової системи. Небажані захворювання і стани, які виникають через запалення і проходять з гострими і/або хронічними клінічними загостреннями, включають в себе розсіяний склероз [Yednock et al., 1992 *Nature* 356: 63; Baron et al., 1993 *J. Exp. Med.* 177: 57], менінгіт, енцефаліт, інсульт і інші травми головного мозку, запальне захворювання кишечника (IBD), що включає в себе виразковий коліт і хворобу Крона (CD) [Hamann et al., 1994 *J.*

Immunol. 152: 3238; Podolsky et al., 1993 *J. Clin. Invest.* 92: 372], ревматоїдний артрит [van Dinther-Janssen et al., 1991 *J. Immunol.* 147: 4207; van Dinther-Janssen et al., 1993 *Annals Rheumatic Diseases* 52: 672; Elices et al., 1994 *J. Clin. Invest.* 93: 405; Postigo et al., 1992 *J. Clin. Invest.* 89: 1445], астму [Mulligan et al., 1993 *J. Immunol.* 150: 2407] і гострий ювенільний діабет (типу 1) [Yang et al., 1993 *PNAS* 90: 10494; Burkly et al., 1994 *Diabetes* 43: 529; Baron et al., 1994 *J. Clin. Invest.* 93: 1700], деменцію при CHIDi [Sasseville et al., 1994 *Am. J. Path.* 144: 27]; атеросклероз [Cybulsky et al., 1991 *Science* 251: 788-91, Li et al., 1993 *Arterioscler. Thromb.* 13: 197], нефрит [Rabb et al., 1995 *Springer Semin. Immunopathol.* 16: 417-25], ретиніт, атопічний дерматит, псоріаз, ішемію міокарда, хронічний простатит, ускладнення серпасто-клітинної анемії, червоний вовчак і гострі опосередковані лейкоцитами ураження легенів, такі, які відбуваються при респіраторному дистрес-синдромі дорослих.

Запальне захворювання кишечника являє собою збірний термін для двох схожих захворювань, що позначаються як хвороба Крона (CD) і виразковий коліт. CD являє собою ідіопатичне, хронічне виразково-констриктивне запальне захворювання, що характеризується різко обмеженим і, як правило, трансмуральним залученням всіх шарів кишкової стінки за допомогою гранулематозної запальної реакції. Може залучатися будь-який сегмент шлунково-кишкового тракту, від ротової порожнини до анусу, хоч захворювання найчастіше уражає кінцевий відділ клубової кишки і/або товсту кишку. Виразковий коліт являє собою запальну реакцію, як правило, обмежену слизовою і підслизовою товстої кишки. Лімфоцити і макрофаги при запальному захворюванні кишечника у множині знаходяться в осередках ураження і можуть робити внесок в запальне ураження.

Астма являє собою захворювання, що характеризується збільшеною реактивністю трахеобронхіального дерева на різні стимули, які потенціюють пароксизмальну констрикцію бронхів. Стимули спричиняють вивільнення різних медіаторів запалення з покритих IgE тучних клітин, що включають в себе гістамін, фактори хемотаксису для еозинофілів і нейтрофілів, лейкотрієни, простагландини і фактор активації тромбоцитів. Вивільнення даних факторів рекрутує базофіли, еозинофіли і нейтрофіли, що викликають запальне ураження.

Атеросклероз являє собою захворювання артерій (наприклад, коронарної, сонної, аорти або клубової). Основний осередок ураження, атерома, складається з підведеної фокальної бляшки в інтимі, з ядром з ліпідів і покриваючої фіброзної верхівки. Атероми перешкоджають артеріальному кровотоку і ослаблюють уражені артерії. Основними результатами даного захворювання є інфаркти міокарда і головного мозку. Атероми рекрутують макрофаги і лейкоцити, які вносять внесок в запальне ураження.

Ревматоїдний артрит являє собою хронічне рецидивуюче захворювання, що первинно викликає ураження і руйнування суглобів. Ревматоїдний артрит, як правило, вражає невеликі суглоби кистей і підшви, але потім може залучати зап'ястки,

лікті, кісточки і коліна. Артрит викликається взаємодією синовіальних клітин з лейкоцитами, що інфільтрують з циркуляції в синовіальну вистилку судин. Наприклад, [див. Paul, Immunology (3rd ed., Raven Press, 1993)].

Інше свідчення для тривалого дозування засобів проти альфа-4 являє собою лікування відторгнення органів або трансплантату. Протягом останніх років досягнуте значне поліпшення ефективності хірургічних способів трансплантації таких тканин і органів як шкіра, нирки, печінка, серце, легені, підшлункова залоза і кістковий мозок. Мабуть, принципово невирішеною проблемою є відсутність задовільних засобів для індукції імунотолерантності до трансплантованих алотрансплантатів або органів у реципієнта. Коли алогенні клітини або органи трансплантують хазяїну (тобто донор і реципієнт являють собою різні індивіди одного виду), ймовірно, що імунна система хазяїна розвине імунну відповідь до чужорідних антигенів трансплантату (захворювання "хазяїн проти трансплантату"), яка веде до руйнування трансплантованої тканини. Клітини CD8⁺, клітини CD4⁺ і моноцити усі залучені до відторгнення тканин трансплантату. Антитіла, направлені до інтегрину альфа-4, придатні, в числі іншого, для блокування індукованих алоантигенами імунних відповідей у реципієнта, таким чином запобігаючи участі таких клітин в руйнуванні трансплантованої тканини або органу. [Див., наприклад, Paul et al., 1996 Transplant International 9: 420-425; Georczynski et al., 1996 Immunol. 87: 573-580; Georczynski et al., 1995 Transplant. Immunol. 3: 55-61; Yang et al., 1995 Transplantation 60: 71-76; Anderson et al., 1994 APMIS 102: 23-27].

Пов'язане застосування для засобів проти альфа-4 являє собою модуляцію імунної відповіді, залученої до захворювання "трансплантат проти хазяїна" (GVHD). [Див., наприклад, Schlegel et al., J. Immunol. 155, 3856-3865 (1995)]. GVHD являє собою потенційно смертельне захворювання, виникає, коли алогенному реципієнту переносять імунотолерантні клітини. У даній ситуації імунотолерантні клітини донора можуть атакувати тканини реципієнта. Тканини шкіри, епітелії кишки і печінки являють собою часті мішені і можуть руйнуватися протягом GVHD. Дане захворювання являє собою особливо серйозну проблему, коли трансплантують імунну тканину, наприклад, проводять трансплантацію кісткового мозку; але також повідомляли про менш важку GVHD в інших випадках, що включають пересадки серця і печінки. Терапевтичні засоби згідно з даним винаходом в числі іншого застосовують для блокування активності Т-клітин донора, перешкоджаючи таким чином їх здатності лізувати клітини-мішені у хазяїна.

Додаткове застосування засобів проти альфа-4 згідно з даним винаходом являє собою придушення пухлинного метастазування. Повідомлялося, що окремі пухлинні клітини експресують інтегрин альфа-4 і антитіла до інтегрину альфа-4 блокують адгезію таких клітин до ендотеліальних клітин [Steinback et al., 1995 Urol. Res. 23: 175-83; Orosz et al., 1995 Int. J. Cancer 60: 867-71;

Freedman et al., 1994 Leuk. Lymphoma 13: 47-52; Okahara et al., 1994 Cancer Res. 54: 3233-6].

Додаткове застосування засобів проти альфа-4 являє собою лікування розсіяного склерозу. Розсіяний склероз (РС) являє собою прогресуюче неврологічне аутоімунне захворювання, що за розрахунками уражає в Сполучених Штатах від 250000 до 350000 осіб. Вважають, що розсіяний склероз являє собою результат специфічної аутоімунної реакції, в якій деякі лейкоцити атакують і запускають руйнування мієліну, ізолюючи оболонку, що покриває нервові волокна. У моделі розсіяного склерозу на тваринах показано, що мишачі моноклональні антитіла, направлені проти інтегрину альфа-4 бета-1, блокують адгезію лейкоцитів до ендотелію, і, таким чином, запобігають у тварин запаленню центральної нервової системи і подальшому паралічу.

Початок РС може бути помітним або таким слабким, що не примушує пацієнта звертатися за медичною допомогою. Найбільш часті симптоми включають в себе слабкість (в одній або декількох кінцівках), зорове розмивання зображення через оптичний неврит, сенсорні порушення, диплопію і атаксію. Протікання захворювання можна розділити на три головних категорії: (1) рецидивуючий РС, (2) РС, що хронічно прогресує і (3) неактивний РС. Рецидивуючий РС характеризується загостреннями неврологічної дисфункції, що періодично повторюються. Загострення РС, як правило, розвиваються протягом від декількох днів до декількох тижнів з подальшим повним відновленням, частковим відновленням або відсутністю відновлення. Відновлення після загострень, як правило, відбувається протягом періоду від декількох тижнів до декількох місяців від максимуму симптомів, хоч іноді відновлення може продовжуватися протягом 2 або більше років.

РС, що хронічно прогресує приводить до поступово прогресуючого погіршення, без періодів стабілізації або ремісії. Дані форма розвивається у пацієнтів з рецидивуючим РС в попередній історії хвороби, хоча у 20% пацієнтів не можна пригадати жодного рецидиву. Також протягом прогресивної течії можуть відбуватися гострі рецидиви.

Третя форма являє собою неактивний РС. Неактивний РС характеризується постійною неврологічною недостатністю різної величини. У більшості пацієнтів з неактивним РС раніше в історії хвороби спостерігали рецидивуючий РС.

Протікання РС також залежить від віку пацієнта. Наприклад, сприятливі прогностичні чинники включають в себе ранній початок (виключаючи дитячий вік), рецидивуюче протікання і невелику інвалідизацію через 5 років після початку. Навпаки, поганий прогноз асоційований з пізнім віком початку (тобто 40 років або старше) і прогресуючим протіканням. Дані змінні взаємозалежні, оскільки хронічно прогресуючий РС має тенденцію починатися в більш пізньому віці, ніж рецидивуючий РС. Інвалідизація внаслідок прогресуючого РС, як правило, відбувається внаслідок прогресуючої параплеї або квадриплеї у пацієнтів. Згідно з одним з аспектів винаходу, пацієнтів переважно

лікують в стані ремісії, а не в стадії рецидиву захворювання.

Короткострокове застосування або адренкортикотропного гормону (АСТН) або оральних кортикостероїдів (наприклад, оральний преднізон або внутрішньовенний метилпреднізолон) являє собою єдиний специфічний терапевтичний засіб для лікування пацієнтів із загостренням РС.

Нові курси лікування РС включають в себе лікування пацієнта інтерфероном бета-1b, інтерфероном бета-1a і копаксоном® (раніше відомим як співполімер 1). Показано, що дані три лікарських засоби значно зменшують міру рецидивів захворювання. Дані лікарські засоби, як правило, вводять самостійно внутрішньом'язово або підшкірно.

Жоден з курсів лікування, що застосовуються в цей час, не придушує демієлінізацію або РС. Один з аспектів даного винаходу передбачає лікування РС описаними тут засобами або окремо або в поєднанні з іншими стандартними засобами лікування. Стандартні засоби лікування включають в себе як необмежувальні приклади приведені нижче. Додаткові засоби лікування, що не обговорюються тут для застосування при лікуванні РС, в поєднанні з описаними тут способами і композиціями в залежності від стану захворювання у пацієнта повинні бути очевидними фахівцям-практикам. Такі додаткові засоби для відмінного від РС патологічного запалення повинні включати інші імунomodulators або імунodepresants.

Засоби, що обговорюються вище, і фармацевтичні композиції можна тривало вводити для профілактичних і/або терапевтичних способів лікування перерахованих вище запальних порушень, що включають в себе розсіяний склероз, запальне захворювання кишечника, астму, атеросклероз, ревматоїдний артрит, відторгнення органів або трансплантату і захворювання "трансплантат проти хазяїна". При терапевтичних застосуваннях композиції вводять пацієнту з підозрою на таке захворювання або вже страждаючому ним в кількості, достатній для лікування або, щонайменше, часткової затримки, симптомів захворювання і їх ускладнень. Адекватну для виконання цього кількості визначають як терапевтично або фармацевтично ефективну дозу.

При профілактичних застосуваннях фармацевтичну композицію тривало вводять пацієнту, сприйнятливому до конкретного захворювання, або інакше з ризиком конкретного захворювання, в кількості, достатній для усунення або зниження ризику або для затримки початку захворювання. Таку кількість визначають як профілактично ефективну дозу. У пацієнтів з розсіяним склерозом ризик можна оцінити за допомогою способу візуалізації ЯМР або, в деяких випадках, за допомогою передсимптомних ознак, що спостерігаються пацієнтом.

Ефективні режими дозування композицій згідно з даним винаходом для лікування описаних вище станів змінюються в залежності від множини різних чинників, що включають в себе засоби введення, цільову ділянку, фізіологічний стан пацієнта і інші лікарські засоби, що вводяться. Таким чином, дози для лікування необхідно титрувати для опти-

мізації безпеки і ефективності. Як правило, кожне введення в режимі дозування знаходиться в діапазоні приблизно від 0,0001 до 100мг/кг, а більш звичайно від 0,01 до 5мг/кг маси тіла хазяїна. Один з переважних режимів дозування являє собою 300мг, що вводяться один раз на місяць протягом періоду, щонайменше, 6 місяців, більш переважно - 12 місяців і можливо протягом декількох років. Інший переважний режим дозування являє собою 3мг на кілограм маси пацієнта на місяць. Такий режим може бути переважним для потребуючих лікування пацієнтів-дітей або пацієнтів-підлітків.

Поєднання лікарських засобів

Засоби згідно з винаходом проти альфа-4 можна застосовувати з ефективними кількостями інших терапевтичних засобів проти гострого і хронічного запалення. Такі засоби включають в себе інші антагоністи молекул адгезії (наприклад, інших інтегринів, селективів і представників імунoglobulinового (Ig) суперсемеїства [див. Springer, 1990 Nature 346: 425-433; Osborn, 1990 Cell 62: 3; Hynes, 1992 Cell 9: 11]. Інтегрини являють собою гетеродимерні трансмембранні глікопротеїни, що складаються з ланцюга α (120-180кДа) і ланцюга β (90-110кДа), як правило, що володіють короткими цитоплазматичними доменами. Наприклад, три важливих інтегрини (тобто LFA-1, Mac-1 і P150,95) володіють різними субодинами альфа, позначеними CD11a, CD11b і CD11c, і спільною субодинацею бета, позначеною CD 18. LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$) експресований на лімфоцитах, гранулоцитах і моноцитах і переважно зв'язується з контррецептором представників Ig-семеїства, позначеного ICAM-1 і родинними лігандами. ICAM-1 експресований на багатьох клітинах, що включають в себе лейкоцити і ендотеліальні клітини, і його експресія на судинному ендотелії підвищується під дією таких цитокінів як TNF і IL-1. Mac-1 ($\alpha_m\beta_2$) розташований на нейтрофілах і моноцитах і також зв'язується з ICAM-1. Третій інтегрин $\alpha_x\beta_2$ P150,95 ($\alpha_x\beta_2$) також розташований на нейтрофілах і моноцитах. Селективні складаються з L-селектину, E-селектину і P-селектину.

Інші протизапальні засоби, які можна застосовувати в поєднанні із засобами проти альфа-4 включають в себе антитіла і інші антагоністи цитокінів, такі як інтерлейкіни від IL-1 до IL-13, фактори некрозу пухлин α і β , інтерферони α , β і γ , фактор росту пухлини бета (TGF- β), колонієстимулюючий фактор (CSF) і колонієстимулюючий фактор для гранулоцитів і моноцитів (GM-CSF). Інші протизапальні засоби включають в себе антитіла і інші антагоністи хемокинів, такі як MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, екзотаксин і IL-8. Інші протизапальні засоби включають в себе NSAID, стероїди і інші низькомолекулярні інгібітори запалення. Препарати, шляхи введення і ефективні концентрації засобів для поєднань лікарських засобів є такими, як описано вище для гуманізованих антитіл проти інтегрину альфа-4.

Додаткові засоби для застосування в поєднанні із засобами, зв'язуючими інтегрин альфа-4 або утримуючими інтегрин альфа-4 димери і лікування запального захворювання кишечника (IBD), хвороби Крона (CD) і виразкового коліту (UC),

включають в себе як необмежувальні приклади 5-аміносаліцилати, глюкокортикоїди, похідні тіогуаніну, метотрексат (MTX), циклоспорин, антибіотики і інфліксимаб.

5-аміносаліцилати включають в себе сульфасалазин (також відомий як азульфідин), що являє собою кон'югат мезаламіну, пов'язаний з сульфопіридином діазозв'язком і, як правило, що вводиться в кількості від 500мг/доба до приблизно 6г/доба. 5-аміносаліцилати також можна спільно вводити з глюкокортикоїдом. 5-аміносаліцилат переважно застосовують для поєднального лікування з одним з інших засобів, що обговорюються тут, для лікування виразкового коліту, однак його також можна застосовувати для лікування хвороби Крона. Не утримуючі сульфонамідів препарати мезаламіну включають в себе як необмежувальні приклади АСАКОЛ®, КЛАВЕРЗУ, САЛОФАЛЬК, ПЕНТАСУ®, ДІПЕНТУМ®, КОЛАЗИД і РОВАЗУ®.

Глюкокортикоїди були оплотом лікування для гострих тяжких загострень IBD з 1955 року, коли уперше було показано, що вони ефективні при UC. Оральний преднізон можна вводити в поєднанні з будь-яким із засобів, що обговорюються тут. Як правило, вводять від 20 до 40мг орального преднізону на добу. Глюкокортикоїди також можна вводити внутрішньовенно або за допомогою клізм в поєднанні або одночасно із засобом проти інтегрину альфа-4 або в межах короткого проміжку часу до/після нього. Наприклад, гідрокортизон доступний як втримуюча клізма (100мг/60мл) і звичайна доза складає одну клізму об'ємом 60мл на ніч протягом від 2 до 3 тижнів. Це можна змінити при застосуванні в поєднанні зі способами лікування і засобами, що обговорюються тут, як можуть зрозуміти фахівці в даній галузі. Інші стероїди, які можна застосовувати, включають в себе як необмежувальні приклади преднізолону метасульфобензоат, тиксокортолу півалат, флутиказону пропіонат, беклометазону дипропіонат і будезонід.

Похідні тіогуаніну також застосовні при лікуванні IBD, CD і UC. Вони включають в себе як необмежувальні приклади 6-меркаптопурин (6-MP) і азатіоприн (ІМУРАН). Дані два лікарських засоби можна застосовувати, замінюючи один одного в поєднанні з будь-яким із альфа-4 засобів, що модулюють інтегрин, які обговорюються тут.

Також для застосування із засобами регулюючими інтегрин альфа-4, що обговорюються тут, розглядають метотрексат (MTX). Переважно, MTX вводять суб'єкту за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції (в/м) в поєднанні зі засобом проти інтегрину альфа-4. MTX ефективний при стероїдозалежній CD, але не так застосовний при UC. MTX можна вводити в кількостях приблизно від 15 до приблизно 25мг на тиждень одному суб'єкту або, якщо необхідно, як визначено фахівцем в даній галузі.

Циклоспорини (наприклад, САНДІМУН®, НЕОРАЛ®) також можна застосовувати в поєднанні із засобами модулюючими інтегрин альфа-4, що обговорюються тут, для лікування патологічного запалення кишечника. Їх можна застосовувати для лікування гострого, тяжкого UC, що не відповідає на глюкокортикоїди.

Також для лікування CD в поєднанні із засобами модулюючими інтегрин альфа-4, що обговорюються тут, можна застосовувати інфліксимаб (тобто РЕМІКЕЙД®). Інфліксимаб являє собою імунoglobulin, що зв'язується з TNF і таким чином нейтралізує його активність. Також в поєднанні із засобами модулюючими інтегрин альфа-4, що обговорюються тут, можна застосовувати інші антитіла проти TNF, наприклад, CDP571.

Також для застосування в поєднанні з вказаними тут модулюючими інтегрин альфа-4 засобами для модулювання UC, IBD і CD розглядають антибіотики. Наприклад, пацієнтів можна лікувати метронідазолом або ципрофлоксацином (або їх фармакологічними еквівалентами) в поєднанні або в формі суміші з модулюючим інтегрин альфа-4 засобом.

Також для IBD, CD і UC в поєднанні зі зв'язуючими інтегрин альфа-4 або утримуючими інтегрин альфа-4 димерами і лікуючими запальне захворювання кишечника, хворобу Крона і виразковий коліт засобами розглядають застосування способів підтримуючого лікування. Способи підтримуючого лікування включають в себе як необмежувальні приклади анальгетики, антихолінергічні і протидіарейні засоби. Поєднання таких способів підтримуючої терапії може бути придатним на початку режиму лікування для зменшення симптомів у пацієнтів і поліпшення якості їх життя. Способи підтримуючої терапії включають в себе оральне введення заліза, фолату і вітаміну B12. Протидіарейні засоби включають в себе як необмежувальні приклади дифеноксилат, кодеїн, лоперамід і антихолінергічні засоби (або їх фармакологічні еквіваленти), які можна вводити пацієнтам з помірним захворюванням для зменшення частоти випорожнення і для здатності переносити позиви до випорожнення кишечника. Холестирамін можна застосовувати у пацієнтів для профілактики індукованої солями жовчних кислот секреції в ободовій кишці у пацієнтів, яких вже піддали обмеженому видаленню клубової і ободової кишок, до описаного тут лікування тривалими режимами. Антихолінергічні засоби включають в себе як необмежувальні приклади клідинію бромід, дицикломін гідрохлорид, настойку беладони і т.п. і придатні для зменшення спастичних болів в шлунку, болів і позивів до випорожнення кишечника.

Для лікування РС засоби проти інтегрину альфа-4 (наприклад, антитіла проти інтегрину альфа-4, низькомолекулярні антагоністи інтегрину альфа-4 і т.п.) можна об'єднувати з іншими сполуками або композиціями, що застосовуються для лікування, поліпшення або зменшення асоційованих з РС симптомів.

Інші засоби, що застосовуються для лікування, поліпшення або зменшення асоційованих з РС симптомів включають в себе як необмежувальні приклади м'язові релаксанти (наприклад, діазепам, циклобензаприн, клоназепам, клонідин, примідон і т.п.), антихолінергічні засоби (наприклад, пропантелін, дицикломін і т.п.), стимулятори центральної нервової системи (наприклад, пемолін), нестероїдні протизапальні засоби (NS, такі як ібупрофен, напроксен або кетопрофен), інтерфе-

рони, імуноглобулін, глатирамер (Копаксон®), мітоксантрон (Новатрон®), мізопростол, інгібітори фактора некрозу пухлини альфа (наприклад, пірфенідон, інфліксимаб і т.п.) і кортикостероїди (наприклад, глюкокортикоїди і мінералкортикоїди).

Звичайні засоби для лікування розсіяного склерозу включають в себе інтерферон бета-1b (Бетасерон®), інтерферон бета-1a (Авонекс®), інтерферон бета-1a з високою дозою (Ребіф), глатирамер (Копаксон®), імуноглобулін, мітоксантрон (Новатрон®), кортикостероїди (наприклад, преднізон, метилпреднізон, дексаметазон і т.п.). Також можна застосовувати інші кортикостероїди, що включають в себе як необмежувальні приклади кортизол, кортизон, фторгидрокортизон, преднізон, ба-метилпреднізон, триамцинолон і бета-метазон.

Форми дозування і засоби для застосування з описаними тут сполуками і композиціями змінюються в залежності від суб'єкта і поєднання лікарських засобів, що застосовується. Наприклад, інтерферони, як правило, вводять як викладено нижче: інтерферон бета-1a (Авонекс®) вводять в кількості 30мкг один раз на тиждень; інтерферон бета-1a вводять в кількості приблизно 22мкг або 44мкг три рази на тиждень і інтерферон бета-1b (Бетасерон®) вводять в кількості 250мкг через день [Durelli et al, Lancet 359: 1453-60, 2002]. Як правило, інтерферони вводять для рецидивуючого або ремітуючого розсіяного склерозу. Таким чином, в поєднанні з описаними тут засобами проти інтегрину альфа-4, переважні діапазони інтерферонів можуть складати приблизно від 0,1мкг до приблизно 250мкг, а більш переважно приблизно від 0,5мкг до приблизно 50мкг в залежності від способу, яким засіб вводять в поєднанні з іншими описаними тут сполуками і композиціями проти інтегрину альфа-4.

NS або NSAID, що розглядаються для застосування згідно з даним винаходом, включають в себе як необмежувальні приклади неселективні інгібітори COX і селективні інгібітори COX-2. Неселективні інгібітори COX включають в себе як необмежувальні приклади похідні саліцилової кислоти (наприклад, аспірин, саліцилати натрію, холін трисаліцилат магнію, салсалат, дифлунізал, сульфасалазин і олсалазин), похідні параамінофенолу (наприклад, ацетамінофен), індол- і інденоцтові кислоти (наприклад, толметин, диклофенак і кеторолак), гетероарилоцтові кислоти (наприклад, ібупрофен, напроксен, флурбіпрофен, кетотифен, фенпрофен і оксапрозин), антранілові кислоти або фенамати (наприклад, мефенамова кислота і мелоксикамова кислота), енолові кислоти (наприклад, оксиками, такі як піроксикам і мелоксикам) і алканони (наприклад, набуметон). Селективні інгібітори COX-2 включають в себе діарилзаміщені фуранони (наприклад, рофекоксиб), діарилзаміщені піразоли (наприклад, целекоксиб), індоцтові кислоти (наприклад, етодолак) і сульфонаніліди (наприклад, німесулід). NS часто вводять в поєднанні з інтерфероном для ослаблення гриппоподібних симптомів, виникаючих у пацієнтів, що приймають, наприклад Авонекс®. Звичайні NS-засоби включають в себе напроксен, ібупрофен і

кетопрофен. Також пацієнтам часто вводять парацетамол. [Див., Reess et al., 2002 Mult. Scler. 8: 15-8].

Глатирамеру ацетат (GA, Копаксон®) являє собою синтетичну молекулу, яка інгібує активацію реактивних відносно основного білка мієліну Т-клітин і індукуює репертуар Т-клітин, що характеризується протизапальними ефектами. Більше того, Глатирамер може проникати в центральну нервову систему (CNS), тоді як інтерферон бета - ні [Dhib-Jalbut, 2002 Neurology 58: S3-9; Weinstock-Guttman et al., 2000 Drugs 59: 401-10].

Мітоксантрон являє собою синтетичний антрацендіоновий засіб, для якого показано, що він ефективний при лікуванні повторно-прогресуючого розсіяного склерозу (SP-MS). Однак, застосування даного лікарського засобу знов обмежене внаслідок його нагромадженої кардіотоксичності [Weinstock-Guttman et al., 2000].

Фактор некрозу пухлини альфа (TNF-α) може бути ключовим цитокіном при демієлінізації [Walker et al., 2001 Mult. Scler. 7: 305-12]. Таким чином, застосування засобів, протидіючих дії TNF-α або придушуючих його синтез, може годитися в поєднанні з засобами і сполуками, що розкриваються тут. Засоби проти TNF-α можуть включати в себе антитіла проти TNF-α (наприклад, інфліксимаб), а також такі засоби як пірфенідон. Пірфенідон являє собою непептидний лікарський засіб, для якого показано, що він зменшує синтез TNF-α і блокує рецептори для TNF-α [Id].

Довгий час основою при більшості демієлінізуючих станів і захворювань залишалося застосування АСТН, глюкокортикоїдів і кортикостероїдів. Дані засоби застосовують внаслідок їх протинабрякових і протизапальних ефектів. АСТН, як правило, вводять суб'єкту в кількості 80Од., вводячи суб'єкту внутрішньовенно 500мл 5% декстрози і води протягом 6-8 годин протягом 3 діб. Його також можна вводити в кількості 40Од./мл внутрішньом'язово при дозі 40Од. кожні 12 годин протягом 7 діб, потім зменшуючи дозу кожні 3 доби. [Див. S. Hauser, "Multiple sclerosis and other demyelinating diseases" в Harrison's Principles of Internal Medicine 2287-95 (13th ed., Isselbacher et al., ed. 1994). Метилпреднізон, як правило, повільно вводять в 500мл D5W протягом 6 годин, переважно вранці. Звичайні дози складаються з 1000 мг щодня протягом 3 діб, 500мг щодня протягом 3 діб і 250мг щодня протягом 3 діб. Id. Також часто вводять поєднання метилпреднізон-преднізон. Як правило, вводять приблизно 1000мг метилпреднізону внутрішньовенно протягом трьох діб з подальшим оральним введенням преднізону в кількості 1мг/кг щодня протягом 14 діб. Таким чином, для застосування в поєднанні із сполуками і композиціями, що розкриваються тут, стероїди можна вводити в кількостях, що знаходяться в діапазоні приблизно від 1 до приблизно 1000мг/кг протягом приблизно від 1 до 14 діб, у міру необхідності.

Побічним ефектом демієлінізуючих станів, таких як РС, є стомлюваність і знижена когнітивна функція. Для лікування асоційованої з РС стомлюваності часто застосовували такі засоби як аман-

тадин гідрохлорид [Geisler et al., 1996 Arch. Neurol. 53: 185-8].

Перевагою таких способів поєднального лікування є те, що воно може зменшити специфічні для даного класу і специфічні для даного засобу побічні ефекти, виникаючі в цей час при застосуванні деяких лікарських засобів. Специфічні для класу побічні ефекти інтерферона-бета включають в себе лихоманку, озноб, міалгії, артралгії і інші грипоподібні симптоми, що починаються через 2-6 годин після ін'єкції і, як правило, проходять через 24 години після ін'єкції. Іноді інтерферон-бета також індукує скороминуще погіршення симптомів РС, що раніше існували. Специфічні для засобу побічні ефекти включають в себе реакції з інтерфероном бета-1b в місці ін'єкції. Управління даними ефектами можна виконувати, підбираючи дози і часи введення, призначаючи відповідні поєднання ацетамінофену, нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NS або NSAID) і стероїдів. [Див. Munschauer et al., 1997 Clin. Ther. 19: 883-93].

Таким чином, поєднання лікарських засобів, які можуть зменшувати кількість конкретного лікарського засобу, що вводиться, можуть зменшити несприятливі побічні ефекти, виникаючі у пацієнта.

При введенні в поєднанні низькомолекулярні антагоністи інтегрину альфа-4 можна вводити в тому ж препараті, що і інші сполуки і композиції або в окремому препараті. При введенні в поєднанні антитіла проти альфа-4, як правило, вводять в окремому від інших сполук і композицій препараті. При введенні в поєднанні засобу проти альфа-4 можна вводити до, після або одночасно з іншими сполуками і композиціями, що застосовуються для лікування, поліпшення або зменшення симптомів.

Приклади

Наведені нижче приклади приведені для надання фахівцям в даній галузі повного розкриття і опису характерних прикладів того, як проводити і застосовувати здійснення даного винаходу, і не призначені ні для обмеження сфери того, що автори розглядають як їх винахід, причому приведені нижче експерименти не є обмежувачими даний винахід експериментами, ні єдино проведеними експериментами. Для гарантії точності відносно чисел, що застосовуються (наприклад, кількостей, температури і т.п.), зроблені певні зусилля, але необхідно врахувати деякі помилки експерименту і відхилення. Якщо не вказано інакше, частини являють собою частини по масі, молекулярна маса являє собою середню молекулярну масу, температура приведена в градусах по Цельсію, а тиск є атмосферним або близьким до нього.

Приклад 1

Контрольоване випробування наталізумаба при рецидивуючому розсіяному склерозі

Група пацієнтів

Двадцять шість клінічних центрів в Сполучених Штатах, Канаді і Великобританії з вересня 1999 року по травень 2000 року зареєстрували 213 пацієнтів. Спостережна рада інституту або центральний і місцевий етичний комітет схвалили протокол. Всі пацієнти дали письмову, основу на отриманій інформації згоду. Дослідження контро-

лювалося незалежним комітетом з нагляду за безпекою.

Відповідні суб'єкти повинні були знаходитися у віці від 18 до 65 років, з визначеним за критеріями Позера клінічно або лабораторно підтвердженим достовірним РС, або ремітуючого або повторно прогресуючого протікання [Poser et al., 1983 Ann. Neurol. 13: 227-31; Lublin et al., 1996 Neurology 46: 907-11], щонайменше, з двома рецидивами в попередні два роки в історії хвороби, початковим значенням по розширеній шкалі непрацездатності Куртцке (EDSS) [Kurtzke, 1983 Neurology 33: 1444-52] від 2 до 6,5 і мінімум трьома осередками ураження на T2-зваженій MPT головного мозку. Пацієнтів виключали, якщо вони проходили імуносупресуюче або імунomodуюче лікування в межах останніх 3 місяців або вони знаходилися в стані рецидиву або системно отримували кортикостероїди протягом останніх 30 днів.

План дослідження і рандомізація

Пацієнтів випадковим чином розподілили в одну з трьох груп лікування: 3мг/кг наталізумаба, 6мг/кг наталізумаба або плацебо по комп'ютерно генерованому графіку блокової рандомізації. Пацієнти отримували шість внутрішньовенних інфузій через інтервали тривалістю 28 днів, а потім їх шість місяців спостерігали на предмет безпеки віддалених результатів. Дослідника, весь персонал для дослідження і пацієнтів вибирали для лікування наосліп.

Процедури і кінцеві точки

Протягом фази скринінга (1 місяць), відразу після кожного лікування (0-5 місяць) і через один місяць після останнього лікування (6 місяць) отримували T2-зважені і T1-зважені сканування з накопиченням Gd MPT без посиленої протонної щільності. Подальші сканування MPT отримували на 9 і 12 місяцях. Отримували сорок шість суміжних аксіальних зрізів головного мозку товщиною 3мм. Аналіз MPT проводили в одному центрі без відомостей про лікування пацієнта і історії хвороби. Осередки ураження ідентифікували на друкованих копіях сканування два досвідчених клініцисти, що працюють до досягнення консенсусу.

Передбачуваною мірою первинного результату була кількість нових осередків ураження з накопиченням Gd протягом 6-місячного періоду лікування, визначеного як період від моменту після першої інфузії до одного місяця після останньої інфузії. Інші параметри MPT, що оцінюються, включали в себе кількість постійних осередків ураження з накопиченням Gd (осередки з накопиченням являли собою осередки, в яких накопичення спостерігали також при скануванні в попередньому місяці); розмір осередків ураження з накопиченням Gd (що вимірюється за допомогою напівавтоматичного способу порівняння з місцевим пороговим рівнем [Grimaud et al., 1996 Magn. Reson. Imaging 14: 495-505]); кількість нових активних осередків ураження (тобто нових осередків ураження з накопиченням Gd і нові або осередки ураження T2, що збільшуються без накопичення) і кількість активних сканувань (тобто, що містять один або більше осередків ураження з накопиченням Gd).

Клінічні кінцеві точки включали в себе частоту рецидивів і зміни по EDSS, і загальну оцінку із застосуванням візуальної аналогової шкали (VAS) за принципом самозвіту. Записували всі несприятливі події. Пацієнтів через заплановані тримісячні інтервали і при незапланованих візитах при підозрі на рецидив оглядали лікуючий і оцінюючий неврологи, при цьому обидва не знали про призначене пацієнту лікування. Лікуючий невролог вів історію хвороби і проводив огляд, і записував несприятливі події. Оцінюючий невролог визначав неврологічний статус і встановлював значення EDSS без інформації про історію хвороби пацієнта або попередні значення EDSS.

Реальний рецидив визначали як виникнення гострого епізоду нових або погіршення існуючих симптомів РС, що тривають, щонайменше, 48 годин з подальшим стабільним періодом, щонайменше, 30 діб. Це також супроводжується збільшенням, щонайменше, на один пункт по шкалі EDSS, збільшенням, щонайменше, на один пункт по двох шкалах функціональних систем (FSS) або збільшенням, щонайменше, на два пункти по одній FSS в порівнянні з базовим рівнем, як визначено оцінюючим неврологом. Неврологічні симптоми, не відповідні вказаним вище критеріям рецидиву, але що оцінюються лікуючим неврологом як такі, що складають рецидив, також записували (загальні рецидиви).

На візуальній аналоговій шкалі (VAS) пацієнти відмічали на 10см лінії розташування, що відображало їх оцінку свого загального самопочуття на початковому рівні і після 3 і 6 місяців лікування з найвищими результатами, що відображають краще самопочуття.

Пацієнтів спостерігали в клініці до 12-го місяця. Пацієнтів, що перервали лікування, але що не досягали кінцевої точки, стимулювали до повернення для подальших оцінок.

Статистичний аналіз

Оцінки розміру вибірки ґрунтувалися на кількості нових осередків ураження з накопиченням Gd

перших 12 тижнів, що спостерігаються протягом після першої інфузії в попередньому клінічному випробуванні наталізумаба [Tubridy et al., 1999 Neurology 53: 466-72]. Основуючись на результатах даного попереднього випробування і застосовуючи методологію визначення розміру вибірки, відповідну двосторонньому порівнянню двох груп на 5-процентному рівні значущості на основі статистики Вілкоксона-Мана-Уїтні [Noether, 1987 J. Amer. Stat. Assoc. 82: 645-7], підраховували, що для потужності в розмірі 80% необхідно, щоб кожна група складалася приблизно з 73 пацієнтів.

Первинне порівняння кількості осередків ураження з накопиченням Gd, а також розміру накопичення Gd, між групами 6мг/кг наталізумаба і плацебо проводили із застосуванням критерію суми рангів Вілкоксона-Мана-Уїтні. Відсутні наслідок того, що одне або декілька сканувань МРТ не проводили, значення замінювали середньою кількістю осередків пошкоджень на доступних для даного пацієнта скануваннях. Сканування МРТ, отримані у пацієнтів, що системно отримували кортикостероїди в межах попередніх 30 діб, відкидали і обробляли як відсутні значення. Для тестування залежності доза-відповідь із застосуванням даних всіх трьох груп застосовували кореляційну статистику Кохрана-Мантеля-Гензеля із застосуванням рівних інтервалів для груп і шкал рангів для основної змінної результату.

Для порівняння частки пацієнтів з рецидивами застосовували критерій хі-квадрат Пірсона. Зміни по EDSS і VAS від початкового рівня аналізували із застосуванням двостороннього ANOVA, з контрольною і підданою лікуванню групами в дослідженні як незалежні змінні.

Всі аналізи включали всіх вибраних випадковим чином пацієнтів і дотримувалися принципу "намір лікувати". Всі приведені значення P є двосторонніми. На початковому рівні істотних відмінностей в демографічних характеристиках, історії хвороби РС, початкових EDSS і параметрах МРТ в даних трьох групах не існувало (таблиця 1).

ТАБЛИЦЯ 1

**ДЕМОГРАФІЧНІ І ПОЧАТКОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИБРАНИХ
ВИПАДКОВИМ СПОСОБОМ ПАЦІЄНТІВ**

Характеристика		Наталізумаб		
		Плацебо (N=71)	3 мг/кг (N=68)	6 мг/кг (N=74)
Вік, роки	Середнє	42,9	42,8	44,9
	Діапазон	22-66	22-65	30-63
Стать N (%)	Чоловіки	25(35,2)	21(30,9)	15(20,3)
	Жінки	46(64,8)	47(69,1)	59(79,7)
Категорія РС N (%)	R-R	45(63,4)	47(69,1)	52(70,3)
EDSS	S-P	26(36,6)	21(30,9)	22(29,7)
	Середнє	4,40	4,21	4,32
Тривалість захворювання, роки	Діапазон	2,0-6,5	1,0-6,5	0,0-6,5
	Середнє	10,2	11,6	13,1
	Діапазон	1-32	0-40	2-39

Кількість рецидивів за останні 2 роки	Середнє	3	2,9	3,1
	Діапазон	2-12	2-10	2-8
Час з останнього загострення, місяці	Середнє	6,5	7,2	6
	Діапазон	2-17	2-24	2-22
<u>Скринінг T₁-зважених МРТ (Місяць 1)</u>				
Кількість (%) сканувань з одним або декількома осередками ураження з накопиченням Gd		28(40)	29(43)	29(40)
Кількість осередків ураження з накопиченням Gd в головному мозку	Середнє	1,6	1,5	1,7
	Діапазон	0-42	0-18	0-23
<u>Початкові T₁-зважені МРТ (Місяць 0)</u>				
Кількість (%) сканувань з одним або декількома осередками ураження з накопиченням Gd		22(31)	29(43)	32(43)
Кількість осередків ураження з накопиченням Gd в головному мозку	Середнє	1,3	1,3	1,4
	Діапазон	0-28	0-32	0-12

Первинний результат

У пацієнтів в групі плацебо в середньому виявили 9,6 нових осередків ураження з накопиченням Gd протягом шестимісячного періоду лікування. Відповідні значення в групах, що отримували наталізумаб, становили 0,7 для групи 3кг/кг (P<0,0001) і 1,1 для групи 6мг/кг (P<0,0001) (див.

таблицю 2). Дані відмінності становили 93% і 88% зменшення утворення нових осередків ураження з накопиченням Gd в групах 3мг/кг і 6мг/кг, відповідно. Відмінності між групами, підданих лікуванню, в порівнянні з плацебо виявляли після першої інфузії (Фіг.1).

ТАБЛИЦЯ 2

ПІДСУМКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ СПОСТЕРЕЖЕНЬ НА МРТ ПРОТЯГОМ ЛІКУВАННЯ (1-6 МІСЯЦІ) І ПРИ ПОДАЛЬШОМУ СПОСТЕРЕЖЕННІ (9 І 12 МІСЯЦІ)

	Плацебо	3 мг/кг	6 мг/кг	Значення P*
<u>Нові осередки ураження в 1-6 міс.</u>				
Середнє	9,6	0,7	1,1	(i)<0,0001
Медіана	2,0	0	0	(ii)<0,0001
SD	27,4	2,1	2,7	
<u>Постійні осередки ураження в 1-6 міс.</u>				
Середнє	3,6	0,8	1,3	<0,0001
Медіана	1	0	0	
SD	6,5	1,9	2,6	
<u>Нові активні осередки ураження в 1-6 міс.</u>				
Середнє	9,7	0,8	1,1	<0,0001
Медіана	2,0	0	0	
SD	27,4	2,2	3	
Активних сканувань в 1-6 міс. (%)	39%	9%	11%	(i)<0,0001 (ii)<0,0001

<u>Об'єм осередків ураження з накопиченням в 1-6 міс. (мм³)</u>				
Середнє	1169,0	156	279,0	(i)<0,005
Медіана	266	0	0	(ii)<0,01
SD	2666	359,0	632,0	
<u>Нові осередки ураження на 9 і 12 міс.</u>				
Середнє	2,5	2,6	2,1	(i)<0,90
Медіана	1,0	0,5	0	(ii)<0,59
SD	4,37	4,58	4,96	
<u>Постійні осередки ураження на 9 і 12 міс.</u>				
Середнє	0,2	0,1	0,1	0,029
Медіана	0	0	0	
SD	0,64	0,32	0,3	
<u>Нові активні осередки ураження на 9 і 12 міс.</u>				
Середнє	2,7	2,8	2,3	0,424
Медіана	1,0	0,5	1,0	
SD	4,49	5,69	5,11	
Активних сканувань на 9 і 12 міс. (%)	42%	40%	35%	
<u>Об'єм осередків ураження з накопиченням на 9 і 12 мес. (мм³)</u>				
Середнє	427,0	323	233	0,260
Медіана	88,0	31,0	0	
SD	797,0	591,0	686	

* (i) порівняння плацебо з групою 3 мг/кг наталізумаба; (ii) порівняння плацебо з групою 6 мг/кг наталізумаба.

Вторинні результати МРТ

Спостерігали значне і помітне зменшення сукупної кількості постійних осередків ураження з накопиченням, нових активних осередків ураження, загального розміру осередків ураження з накопиченням і процента активних сканувань в 1-6 місяці (таблиця 2; Фіг.2).

Результати клінічної ефективності

Протягом шестимісячного періоду лікування загалом виявили 35 рецидивів у 26 з 71 пацієнта, що отримували плацебо; 18 рецидивів виявили у 13 з 68 пацієнтів, що отримували 3мг/кг наталізумаба, і 15 рецидивів виявили у 14 з 74 пацієнтів, що отримували 6мг/кг (P=0,05, плацебо в порівнянні з усіма пацієнтами, що отримували наталізумаб). Із застосуванням більш суворих об'єктивних критеріїв рецидиву ефект виявлявся таким же сильним: 18 рецидивів у 15 пацієнтів, що отримували плацебо; 3 рецидиви у 3 пацієнтів, що отримували 3мг/кг наталізумаба; 8 рецидивів у 8 пацієнтів, що отримували 6мг/кг наталізумаба (P=0,05). У групі, що отримувала плацебо, спостерігали більшу кількість рецидивів, які потребують лікування стероїдами, ніж в підданих лікуванню групах (22 у тих, що отримували плацебо, 5 в групі, що отримувала 3мг/кг наталізумаба, і 7 у групі, що отримувала 6мг/кг наталізумаба, P=0,05, плацебо у порівнянні з усіма пацієнтами, що отримували наталізумаб).

На VAS пацієнти в групі, що отримувала плацебо, не повідомляли про зміну, тоді як пацієнти в групах, що отримували наталізумаб, повідомляли про покращення в самопочутті протягом 6 місяців, коли відмінності між групами ставали значущими (P=0,033, плацебо в порівнянні з усіма пацієнтами, що отримували наталізумаб). Значних змін в EDSS протягом лікування не спостерігали в жодній групі.

Концентрація антитіла і насичення рецепторів При кожному візиті у пацієнтів збирали зразки сироватки і із застосуванням твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) кількісно аналізували на наявність специфічно направлених проти наталізумаба антитіл. Також змінювали сироваткові рівні наталізумаба і зайнятість рецепторів наталізумабом в підгрупах з пацієнтів в кількості від 12 до 14 на кожну піддану лікуванню групу перед кожною інфузією і через 2 години, 24 години, 1, 2 і 3 тижні після першої і останньої інфузій.

Сироваткові концентрації антитіл визначали із застосуванням аналізу ELISA. Коротко, готували 2,0мг/мл розчин антитіла для іммобілізації, що специфічно зв'язується з наталізумабом в розчині, що

містить бікарбонат натрію при pH 8,3. 100мкл розчину антитіла додавали до кожної ямки 96-ямкового планшета для мікротитрування Costar. Планшет покривали самоклеючою стрічкою для планшетів і інкубували при температурі навколишнього середовища 12-26 годин. З планшета відбирали розчин, в кожну ямку додавали 200 мкл блокуючого буферу (0,25% казеїн в PBS, pH 7,4) і інкубували додаткову годину при температурі навколишнього середовища. Потім планшети або висушували і зберігали для подальшого застосування або однократно відмивали 300мкл буферу для відмивання (TBS, pH 7,5, що містить 0,05% Tween-20). Якщо планшети висушували, їх регідрували безпосередньо перед застосуванням за допомогою додання в кожну ямку 300мкл буфера для відмивання і інкубації протягом 1-2 хвилин. З планшетів відбирали розчин і їх перевертали на серветки для абсорбції надлишку вологості.

Зразок, що тестується, розводили в казеїновому розріджувачі до ELISA (0,25% казеїн в PBS, з 0,05% Tween 20, pH 7,4). Як правило, тестували два або три розведення кожного зразка для гарантії того, що значення для наталізумаба були точними. Із застосуванням відомих кількостей наталізумаба також готували зразки контролю розведення для перевірки точності інших стадій.

У кожну ямку додавали 100мкл стандартного зразку, зразок, що тестується, або зразок контролю розведення і планшет від 60 до 75 хвилин інкубували при температурі навколишнього середовища. Планшети тричі відмивали буфером для відмивання і видаляли вологу, що залишилася. До кожної ямки додавали 100мкл щойно розведених мишачих антитіл проти людських IgG4, кон'югованих з лужною фосфатазою і планшети інкубували додаткові 60 хвилин при температурі навколишнього середовища. Після інкубації планшети чотири рази відмивали буфером для відмивання і видаляли вологу, що залишилася. Із застосуванням каліброваної багатоканальної піпетки додавали 100мкл флуоресцентного субстрату A і планшети 45-60 хвилин інкубували при температурі навколишнього середовища. Рівні в кожній ямці визначали із застосуванням $\text{fmax Fluorescence Microplate Reader}$ із застосуванням файла протоколу `conc102.ppr`. `SOFTmax Pro` версії 1.3.1.

Результати подані на Фіг.3 і 4. Як показано на даних фігурах, рівні наталізумаба меншали між дозами, а протягом 7 або 8 місяця (тобто від 2 до 3 місяців після останньої дози) у більшості пацієнтів антитіла не виявлялися.

Так само як вимірювання концентрації антитіл, протягом дослідження дозування із застосуванням аналізу FACS визначали рівні насичення рецепторів, а конкретно, рівні насичення VLA-4. Визначення насичення VLA-4 проводили за допомогою посереднього імунологічного аналізу із застосуванням проточної цитометрії.

У дві 15мл поліпропіленові пробірки додавали аліквати приблизно 1мл зразка крові від пацієнта і додавали холодний буфер для відмивання (сироватка людини [Scantibodies Laboratory, Inc. Part 3SH341], розведена до 3% в PBS) до відмітки 14мл на пробірці. Пробірки центрифугували при

2200об./хв. 5 хвилин при 10-15°C і рідку фазу відбирали і викидали. Клітинний осад ресуспендували в холодному буфері для відмивання до загального об'єму 1мл.

У буфері для відмивання готували 500мкг/мл маточного еталонного зразка наталізумаба. 20мкл розбавленого маточного еталона додавали в першу пробірку, а у другу пробірку додавали 20мкл буферу для відмивання. Обидві пробірки 30 хвилин інкубували на льоду в темряві. Після інкубації в пробірки додавали буфер для відмивання до відмітки 14мл і центрифугували на холоді 5 хвилин при 2200об./хв. Супернатант відбирали і стадію відмивання повторювали другий раз. Після другого відмивання клітини ресуспендували в буфері для відмивання, доданому до відмітки 1мл.

До кожної пробірки додавали 10мкл антитіл проти людських CDw49d, кон'югованих з R-фікоеритрином (PE) (Pharmingen, Cat. №31475X) і обережно перемішували на центрифугі типу "Уортекс". Пробірки інкубували 10-15 хвилин при 2-8°C в темряві. Після інкубації додавали 2мл їх лізуючого розчину, pH 7,4, і кожну пробірку обережно перемішували на центрифугі типу "Уортекс". Потім пробірки 10-15 хвилин інкубували на льоду при 2-8°C, 5 хвилин центрифугували на холоді і супернатант відділяли від клітинного осаду. Клітинний осад ресуспендували в 4мл холодного забарвлюючого буферу, і пробірки знов центрифугували при 2200об./хв. на холоді. Потім дуже обережно видаляли супернатант, додавали 0,5мл фіксуючого розчину (Ortho's Fixative pH 7,6), і пробірки негайно перемішували на центрифугі типу "Уортекс" для гарантії того, що клітини ресуспендовані в фіксуючому буфері. Пробірки покривали алюмінієвою фольгою до FACS-аналізу.

Потім аналізували насичення рецептору VLA-4 кожного зразка, в зразках з наталізумабом, що аналізується, і без нього із застосуванням проточного цитометра FACS Calibur і програмного забезпечення CellQuest™. Програмне забезпечення дозволяє збирати і аналізувати дані з проточного цитометра.

Рівні насичення рецептора подані на Фіг.5. Рівні насичення рецепторів протягом 1-4 місяців визначали до дозування в даному місці. Рівні насичення рецептора, отримані при одномісячних інтервалах дозування, послідовно були досить високими, і дані постійні рівні були достатніми для підтримки придушення патологічного запалення і асоційованих фізіологічних ознак захворювання. У середньому, рівні насичення підтримували протягом місяця на середньому рівні, щонайменше, 67% і медіані, щонайменше, 75%. Дані рівні були достатніми для придушення осередків ураження в головному мозку у підданих лікуванню пацієнтів (див. Фіг.1). Мінімальний рівень насичення, що визначається в дослідженні перед інфузією від 2 до 5 місяців (і через 21 тиждень після введення на 5 місяці), є особливо низьким в порівнянні із середнім значенням і медіаною через одного пацієнта, що відповідає на наталізумаб антитілами.

У міру того як знижувалися рівні насичення рецепторів у пацієнтів, те ж саме відбувалося з ефективністю лікування. Середні рівні насичення

рецепторів в розмірі 42% і медіана рівнів насичення рецепторів в розмірі 41% в підданій лікуванню групі не асоціювалися з придушенням осередків ураження в головному мозку в групі пацієнтів (див. Фіг.2 і 5), і, таким чином, постійний рівень насичення рецепторів, більший від даного, необхідний для ефективного придушення патологічного запалення із застосуванням таких засобів як інгібітори альфа-4.

Безпека і переносимість

Виявлено, що пацієнти з РС добре переносили повторне лікування із застосуванням наталізумаба при 3 або 6мг/кг на дозу протягом шестимісячного періоду лікування. Виникаючі при лікуванні несприятливі події виявили у схожій кількості пацієнтів в кожній групі. Хоча і не значуще, але певні несприятливі події виникали більш часто при застосуванні наталізумаба в порівнянні з плацебо (таблиця 3). Протягом шестимісячного періоду лікування в групах, що отримували наталізумаб, спостерігали постійний помірний лімфоцитоз.

ТАБЛИЦЯ 3

НЕСПРИЯТЛИВІ ПОДІЇ ВИЯВЛЯЛИ БІЛЬШ ЧАСТО У ПІДДАНІХ ЛІКУВАННЮ НАТАЛІЗУМАБОМ ПАЦІЄНТІВ В ПОРІВНЯННІ З ПЛАЦЕБО*

	Плацебо (71)	3 мг/кг (68)	6 мг/кг (74)
Загальна кількість пацієнтів з несприятливими подіями	68 (96%)	62 (91%)	70 (95%)
<u>Організм як ціле</u>			
Інфекція	10 (14%)	14 (21%)	14 (19%)
<u>Травна система</u>			
Метеоризм	0	4(6%)	0(0%)
<u>Нервова система</u>			
Біляртова парастезія	1 (1,0%)	5 (7%)	2 (3%)
<u>Дихальна система</u>			
Синусити	3 (4%)	7 (10%)	3 (4%)
Фарингіти	8 (11%)	10 (15%)	15 (20%)
<u>Шкіра і її придатки</u>			
Висип	4 (6%)	6 (9%)	8 (11%)
<u>Сечостатева система</u>			
Інфекція	10 (14%)	14 (21%)	11 (15%)

* Для включення в таблицю між групою плацебо і однієї з груп, що отримували наталізумаб, необхідною була різниця в частці несприятливих подій, щонайменше, в 5 процентів.

У кількості серйозних несприятливих подій (SAE), виявлених в групах плацебо і підданих лікуванню істотної різниці не виявили (тобто 7 пацієнтів, що отримували плацебо, продемонстрували 11 SAE, 5 пацієнтів, що отримували 3мг/кг наталізумаба, продемонстрували 5 SAE і 3 пацієнти, що отримували 6мг/кг наталізумаба, продемонстрували 4 SAE). З них чотири випадки розглядали як імуноопосередковані і пов'язані з лікарським засобом, що вивчається. Спостерігали одну анафілактичну реакцію з кропивницею і бронхоспазмом в групі, що отримувала 3мг/кг, яку швидко зняли із застосуванням лікування антигістамінними препаратами і стероїдами. Повідомляли про три випадки сироваткової хвороби, по одному в кожній групі, включаючи ту, що отримувала плацебо. Тільки одна подія супроводжувалася зміною рівнів комплекменту, і вони всі сталися в одній і тій же дослідницькій ділянці. Загалом, дані події ускладнювали менш ніж одну з 250 інфузій.

У кількості пацієнтів, що перервали лікування внаслідок несприятливих подій, між групами відмінностей не спостерігали (тобто 3 в групі, що отримувала плацебо, 4 в групі, що отримувала 3мг/кг, і 3 в групі, що отримувала 6мг/кг). У дослі-

дженні трапився один смертельний випадок внаслідок повторного плеврального карциноматозу, ускладненого гемотораксом у пацієнта, що отримував плацебо.

Також оцінювали швидкість утворення антитіл. Всього антитіла проти наталізумаба утворилися у 15 пацієнтів, що отримували наталізумаб (11%): 13 протягом періоду лікування і 2 протягом періоду спостереження після лікування. Клінічна значущість присутності антитіл проти наталізумаба в цей час не відома, якщо вона взагалі є.

Максимальні сироваткові концентрації наталізумаба були залежними від дози і при повторному дозуванні не спостерігали ніякого істотного накопичення. У 3 пацієнтів, що отримували 3мг/кг наталізумаба, виявили більш ніж 80% насичення рецептора VLA-4 протягом періоду лікування; у пацієнтів, що отримували 6мг/кг наталізумаба, зайнятість рецептора була більшою (приблизно 90%) і більш тривалою.

Спостереження після лікування: 6-12 місяці

Загальна кількість нових осередків ураження з накопиченням і активних сканувань (об'єднані 9 і 12 місяці) були схожими у всіх трьох групах (таблиця 2). Існувала тенденція до меншої активності

в групі, що отримувала 6мг/кг, на 9 місяць. Істотної різниці в загальній кількості клінічних рецидивів, що сталися, між трьома групами: 24 в групі, що отримувала плацебо, 24 в групі, що отримувала 3мг/кг, і 26 в групі, що отримувала 6мг/кг, або в кількості рецидивів, як визначено за допомогою заздалегідь встановлених об'єктивних критеріїв, не виявили.

Дане дослідження є першим дослідженням, що надало суворі докази у людей за допомогою MPT і клінічного обстеження, що селективне придушення опосередкованої інтегрином альфа-4 адгезії лейкоцитом і направлена міграція являють собою ефективний підхід до тривалого лікування РС. Обидва рівні дозування специфічного до інтегрину альфа-4 гуманізованого моноклонального антитіла наталізумаб продемонстрували статистично високо достовірні ефекти на придушення нових запальних осередків ураження з накопиченням Gd в головному мозку у пацієнтів з РС протягом шестимісячного періоду лікування в порівнянні з плацебо. Зменшення даних осередків ураження у пацієнтів, що отримували наталізумаб, спостерігали через місяць після першої інфузії, і воно зберігалося протягом періоду лікування. Для обох рівнів дозування зменшення становило приблизно 90 процентів, ефект, більший, ніж зменшення в розмірі від 50 до 70 процентів, описане для бета-інтерферонів [MS/MRI Analysis Group, 1995 Neurology 4: 1277-1285; Jacobs et al., 1996 Ann. Neurol. 39: 285-294 і PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, 1998 Lancet 352: 1498-1504].

Крім того, ефекти наталізумаба на результати MPT в даному випробуванні підтверджені клінічними спостереженнями. Від даного дослідження чекали більшого відносно клінічних результатів. Однак лікування наталізумабом приводило до значного зменшення в рівні рецидивів і відчуття поліпшеного самопочуття у пацієнтів. Коли розглядали всі виявлені клінічні рецидиви, обидві групи, що отримували наталізумаб, продемонстрували значно менше рецидивів, ніж група, що отримувала плацебо, протягом шести місяців лікування. Значне зменшення даних епізодів також спостерігали із застосуванням заздалегідь визначених критеріїв рецидиву; більш суворої міри, оскільки вона вимагає зміни об'єктивних ознак. Ефект наталізумаба на рецидиви перевершує ефект прийнятих в цей час для лікування РС способів лікування, що демонструють ефект в розмірі приблизно 30 процентів [MS/MRI Analysis Group, вище; Jacobs et al., вище; PRISMS Study Group, вище; Johnson et al., 1995 Neurology 45: 1268-76].

Важливо, що в групах, що отримували наталізумаб, після закінчення лікування не спостерігали ефектів віддачі на нові осередки ураження при MPT або рецидиви. Крім того, щомісячні інфузії наталізумаба протягом шести місяців добре переносилися, і вони асоційовані із мірою безпеки, подібною до плацебо і прийнятні для тривалого лікування РС.

Результати даного дослідження надають подальше підтвердження ролі інтегрину альфа-4 і

імунних клітин, які його експресують, в патогенезі гострих запальних осередків ураження в головному мозку пацієнтів з РС. Зменшення нових осередків ураження з накопиченням Gd ставало очевидним після одного місяця лікування. Дане спостереження дозволяє передбачити, що наталізумаб діє на початку розвитку осередків ураження, запобігаючи виникненню нових осередків ураження.

У результаті наталізумаб продемонстрував потужні ефекти на клінічно значущі параметри у пацієнтів з рецидивуючим РС в даному випробуванні під контролем плацебо. Лікування добре переносилося протягом шестимісячного випробування. Корисні ефекти наталізумаба на виникнення нових запальних осередків ураження в CNS, виникнення клінічних рецидивів і поліпшення самопочуття пацієнтів, що спостерігається в даному дослідженні, вказують на потенціал ефектів, що спостерігаються відносно непрацездатності в довгострокових дослідженнях, які проходять в даний момент.

Приклад 2

Контрольоване випробування наталізумаба при хворобі Крона

Методи

У подвійному сліпому випробуванні під контролем плацебо, 248 пацієнтів з хворобою Крона (CD) від середньої до важкої міри активності випадковим чином розподіляли для введення двох інфузій плацебо або інфузії 3мг/кг наталізумаба з подальшим плацебо; або двох інфузій 3мг/кг або 6мг/кг наталізумаба через 4-тижневий інтервал. Вимірювання результатів включали в себе індекс активності хвороби Крона (CDAI), пов'язану зі здоров'ям якість життя (QOL) і сироваткові рівні С-реактивного білка.

Наталізумаб збільшував рівень клінічної ремісії і клінічної відповіді, і збільшував QOL у пацієнтів з активною CD, в той же час демонструючи міру безпеки, прийнятну для лікування даного захворювання.

Група пацієнтів

Після отримання схвалення місцевого етичного комітету кожний центр перевіряв пацієнтів чоловічої і жіночої статі у віці, щонайменше, 18 років з клінічними доказами CD із мірою активності від середньої до тяжкої, визначеним як CDAI, щонайменше, 220, але менше або рівною 450. З 311 перевірених пацієнтів 248 випадковим чином відібрали в тридцяти п'яти дослідницьких центрах в Бельгії, Чеській Республіці, Данії, Німеччині, Ізраїлі, Голландії, Швеції і Великобританії з вересня 1999 року по серпень 2000 року. Всі пацієнти дали письмову, ґрунтовану на отриманій інформації згоду. Пацієнтів, що отримували метотрексат, циклоспорин і будь-який із досліджуваних засобів в межах 3 місяців, виключали; пацієнтам, що отримували азатиоприн або 6-меркаптопурин, необхідним було знаходитися на стабільній дозі, щонайменше, 4 місяці. Інші виключення включали в себе попереднє лікування антитілами; оральне застосування на момент дослідження преднізолону в дозі, більшій, ніж 25 мг/доба; застосування на момент дослідження елементарної дієти або парен-

терального живлення; інфекції або неопластичні захворювання кишечника; хірургічні операції на кишечнику в межах 3 місяців; наявність колонотомії, ілеостомії або колоректостомії з ілеоректальним анастомозом; симптоми переважно внаслідок присутності фіброзних структур і клінічне спостереження того, що пацієнту, ймовірно, в найближчий термін необхідна абдомінальна хірургія.

План дослідження і рандомізація

Відповідних пацієнтів випадковим чином розподіляли в один з чотирьох режимів лікування по генерованому за допомогою комп'ютера графіку блокової рандомізації. Кожна група отримувала дві внутрішньовенних інфузії, розділених 4-тижневим інтервалом. Чотири режими лікування являли собою дві інфузії плацебо; одну інфузію 3мг/кг наталізумаба з подальшою інфузією плацебо і по дві інфузії 3 або 6мг/кг наталізумаба. Дослідника, весь персонал для дослідження і пацієнтів вибирали для лікування наосліп.

Процедури і кінцеві точки

Первинна кінцева точка ефективності являла собою частку пацієнтів в ремісії (CDAI150) на 6 тижні. CDAI включає в себе вісім пов'язаних змінних: кількість рідини або дуже рідкого випорожнення на добу, важкість з болями в животі або судомами, загальне самопочуття, наявність позакишкових виявів захворювання, наявність шлункової маси, застосування протидіарейних лікарських засобів, гематокрит і масу тіла [Best et al., 1976 *Gastroenterology* 70: 439-441 і Summers et al., 1979 *Gastroenterology* 77: 847-69]. Значення менше ніж 150 означали ремісію; значення від 150 до 219 означали слабко активне захворювання, від 220 до 450 означали помірно активне захворювання і значення більше 450 означали тяжку міру активності. Додаткові проспективні кінцеві точки являли собою частку пацієнтів, що демонструють клінічний результат (тобто щонайменше, зменшення CDAI на 70 пунктів), пов'язану зі здоров'ям якості життя, як вимірюють за допомогою призначеного для запальних захворювань кишечника опитувача, IBDQ [Irvine et al, 1994 *Gastroenterology* 106: 287-96], і сироваткові рівні С-реактивного білка.

Протягом дослідження проводили оцінки безпеки, що включали в себе запис несприятливих подій і моніторинг результатів лабораторних аналізів. Незалежний контрольний комітет за показниками безпеки забезпечував додатковий рівень моніторингу. При кожному візиті збирали зразки сироваток і аналізували на наявність антитіл проти наталізумаба із застосуванням твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA).

Статистичний аналіз

Всі аналізи ефективності проводили на групі пацієнтів, (ITT), тих, що висловили під час остан-

нього огляду намір подальшого лікування (LOCF), що містить всіх випадковим чином розподілених пацієнтів (n=248). Пацієнтів, що застосовують лікарські засоби невідкладної допомоги, класифікували як невдачі лікування. Група (n=244), що залишилася, містила випадковим чином розподілених і отримуючих дози пацієнтів. Чотирьом пацієнтам дози не вводили внаслідок невідповідності вимогам.

Всі статистичні тести були двосторонніми і їх рівень статистичної значущості становив 5 процентів. Проводили три парних тести кожного даного лікування в порівнянні з плацебо. Рівні ремісії і відповіді аналізували критерієм χ^2 -квадрат Кохрана-Мантеля-Гензеля (загальна асоціація) [Landis et al., 1978 *Intl. Stat. Rev.* 46: 237-54], застосовуючи країни як критерій розділення. Вплив пов'язаних випадкових величин на ремісію і відповідь (так чи ні) аналізували на 6 тижні із застосуванням логістичної регресії.

Розраховували, що для виявлення відмінностей в рівнях відповідей, передбачаючи 40% рівень відповіді в одержуючих наталізумаб групах і 15% рівень відповіді в одержуючій плацебо групі, розмір вибірок величиною 60 суб'єктів на групу забезпечує потужність в розмірі 80 процентів при 5-процентному рівні значущості.

Для порівняння середніх зменшень CDAI від початкового рівня для груп з країн і групи, підданої лікуванню, застосовували моделі двофакторного дисперсійного аналізу з фіксованими впливами. Тестували відмінності кожної з даних груп, підданих лікуванню, з групою, що отримувала плацебо.

С-реактивний білок і дані IBDQ аналізували із застосуванням тесту Вілкоксона-Мана-Уїтні для порівняння зміни від початкового рівня кожної з трьох даних груп, підданих активному лікуванню, і групи, що отримувала плацебо. У планованих проспективно аналізах для пацієнтів зі значеннями вище верхньої межі нормального діапазону на початковому рівні (0 тижень) в розмірі 8 мг/л порівнювали рівні С-реактивного білка.

Результати

На початковому рівні в групах порівнювали демографічні характеристики, значення CDAI, ділянку захворювання і лікарські засоби (таблиця 4). На момент оцінки на 0 тижні більшість пацієнтів отримували інші лікарські засоби від CD, що включають в себе сполуку 5-ASA (від 48 до 64 процентів), оральні стероїди (від 46 до 63 процентів) або азатіоприн/6-меркаптопурин (від 18 до 37 процентів) з іншими засобами або без них. Двадцять сім пацієнтів вибули з дослідження до завершення 12 тижнів: 10 в групі, що отримувала плацебо, і 6, 5 і 6 в групах, що отримували 3+0, 3+3 і 6+6мг/кг наталізумаба, відповідно.

ТАБЛИЦЯ 4

**ДЕМОГРАФІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ І ЛІКАРСЬКІ ПРЕПАРАТИ
НА ПОЧАТКОВОМУ РІВНІ**

Характеристика	Плацебо	3+0 мг/кг	3+3 мг/кг	6+6 мг/кг
Розподілених випадковим чином пацієнтів	63	68	66	51
Середній вік і діапазон (років)	34 (18-68)	36 (18-66)	36 (19-64)	35 (19-62)
Середня тривалість захворювання і діапазон (років)	8,9 (0,3-64,3)	8,4 (0,5-27,5)	8,1 (0,5-22)	7,8 (0,6-29)
Середній початковий рівень CDAI і діапазон*	300 (186-447)	288 (211-427)	298 (219-442)	296 (210-429)
<u>Ділянка захворювання:</u>				
Клубова	15 (24%)	9 (13%)	17 (26%)	12 (24%)
ободова	11 (17%)	16 (24%)	16 (24%)	16 (31%)
клубово-ободова	37 (59%)	43 (63%)	33 (50%)	23 (45%)
Стать: жіноча	33 (52%)	41 (60%)	36 (55%)	26 (51%)
Середня маса і діапазон (кг)	68 (42-100)	66 (41-95)	64 (44-97)	69 (44-98)
<u>Супутні лікарські засоби</u>				
Відсутність супутніх лікарських засобів [†] для хвороби				
Крона	12 (19%)	11 (16%)	9 (14%)	5 (10%)
Сполуки 5-ASA	30 (48%)	40 (59%)	42 (64%)	30 (59%)
Оральні стероїди	31 (49%)	31 (46%)	37 (56%)	32 (63%)
Азатиоприн або 6-MP (± стероїди)	2 (35%)	25 (37%)	17 (26%)	9 (18%)

* Вісім з 248 пацієнтів володіли на початковому рівні значенням CDAI220. П'ять з даних 8 пацієнтів були відповідними (CDAI 220) на основі скринінгу їх гематокриту, що володів значенням, яке дає можливість для випадкового розподілу, але що мав значення <220, коли згодом перерахували із застосуванням гематокриту на початковому рівні. Значення CDAI в інших 3 пацієнтів до часу випадкового розподілу підраховували неточно.

[†] 5-ASA, стероїди або імунодепресанти.

Клінічні результати, ремісії і середні значення CDAI

Частка пацієнтів, що досягли клінічного результату (тобто щонайменше зменшення CDAI на 70 пунктів), була статистично значуще більшою ніж в групі, що отримувала плацебо, у всіх трьох групах, що отримували наталізумаб, на 4, 6 і 8 тижнях (таблиця 5 і Фіг.6), і даний ефект утримувався до 12 тижня в 2 групах, що отримували 2

інфузії наталізумаба. Тенденції в поліпшенні рівнів клінічних відповідей спостерігали вже на 2 тижні після першого лікування, а група, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба в даній тимчасовій точці демонструвала статистично значущу відмінність від групи, що отримувала плацебо. Результати зменшення середнього значення CDAI від початкового рівня (таблиця 6) узгоджуються з даними аналізу рівня відповіді.

ТАБЛИЦЯ 5

РІВНІ РЕМІСІЇ І КЛІНІЧНОЇ ВІДПОВІДІ В ГРУПІ ІТТ

Часова точка	Плацебо (N=63)	3+0 мг/кг наталізумаба (N=68)	3+3 мг/кг наталізумаба (N=66)	6+6 мг/кг наталізумаба (N=51)
Ремісія (CDAI <150) Кількість пацієнтів (%)				
Тиждень 2 Значення P	6 (10)	10 (15) 0,328	13 (20) 0,127	6 (12) 0,745
Тиждень 4 Значення P	9 (14)	21 (31) 0,02	19 (29) 0,027	15 (29) 0,028
Тиждень 6 (первинна кінцева точка) Значення P	17 (27)	20 (29) 0,757	29 (44) 0,030	16 (31) 0,533
Тиждень 8 Значення P	10 (16)	19 (28) 0,107	27 (41) <0,001	22 (43) <0,001
Тиждень 12 Значення P	17 (27)	19 (28) 0,992	28 (42) 0,042	21 (41) 0,091
Відповідь (зменшення ≥ 70 пунктів) Кількість пацієнтів (%)				
Тиждень 2 Значення P	19 (30)	31 (46) 0,081	36 (55) 0,004	22 (43) 0,136
Тиждень 4 Значення P	18 (29)	32 (47) 0,029	41 (62) <0,001	27 (53) 0,006
Тиждень 6 Значення P	24 (38)	40 (59) 0,022	47 (71) <0,001	29 (57) 0,039
Тиждень 8 Значення P	22 (35)	38 (56) 0,018	44 (67) <0,001	28 (55) 0,028
Тиждень 12 Значення P	27 (43)	34 (50) 0,503	40 (61) 0,033	33 (65) 0,018

Жирним шрифтом позначені статистично значущі при порівнянні з плацебо результати.

ТАБЛИЦЯ 6

ЗМЕНШЕННЯ СЕРЕДНЬОГО ЗНАЧЕННЯ CDAI ВІД ПОЧАТКОВОГО РІВНЯ

Часова точка	Плацебо (N=63)	3+0 мг/кг наталізумаба (N=68)	3+3 мг/кг наталізумаба (N=66)	6+6 мг/кг наталізумаба (N=51)
Середнє зменшення CDAI від початкового рівня (SD)				
Тиждень 2 Значення P в порівнянні з плацебо	39,3 (73,5)	63,5 (74,8) 0,061	80,0 (68,9) 0,001	60,5 (68,3) 0,103
Тиждень 4 Значення P в порівнянні з плацебо	37,3 (88,8)	79,9 (89,5) 0,004	100,7 (76,4) <0,001	84,2 (90,5) 0,003
Тиждень 6 Значення P в порівнянні з плацебо	49,3 (97,8)	81,5 (86,1) 0,042	119,4 (79,1) <0,001	97,2 (94) 0,004

Тиждень 8 значення Р в порівнянні з плацебо	49,7 (99,5)	82,4 (87,2)	117,8 (90,7)	106,9 (102,9)
		0,053	<0,001	0,001
Тиждень 12 значення Р в порівнянні з плацебо	63,1 (103,9)	70,1 (91,7)	119,24 (111)	112,5 (96,4)
		0,729	0,001	0,008

Відхилення від початкового рівня визначали як (0 тиждень - n-ий тиждень)

D = стандартне відхилення

Жирним шрифтом позначені статистично значущі при порівнянні з плацебо результати

Через чотири тижні після першого введення і перед тим, як пацієнти отримували друге введення, всі три групи, що отримували наталізумаб, володіли статистично значущим великим рівнем ремісії в порівнянні з групою, що отримувала плацебо (таблиця 5 і Фіг.7). Однак на 6 тижні, проспективно визначеній первинній кінцевій точці, в клінічній ремісії статистично значуще велика частка пацієнтів в порівнянні з плацебо була тільки в групі, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба. На 8 тижні обидві дві групи, що отримували інфузії наталізумаба (або 3 або 6мг/кг), демонстрували статистично значущі великі рівні ремісії в порівнянні з плацебо. На 12 тижні група, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба, продовжувала демонструвати статистично значущу перевагу над групою, що отримувала плацебо, тоді як група, отримувала 6+6мг/кг наталізумаба, демонструвала сильну тенденцію до переваги над групою, що отримувала плацебо, для даного результату.

Провісники ремісії або відповіді

Із застосуванням результатів на 6 тижні провели аналіз для встановлення основних змінних,

за допомогою яких можуть передбачити ремісію або клінічну відповідь. Змінні, що перевіряються, включали в себе ділянку захворювання, тривалість захворювання, початкові значення CDAI, супутнє застосування оральних стероїдів, супутнє застосування азатіоприну або 6-меркаптопурина і позакишечникові симптоми. Початкове значення CDAI було значущим провісником ремісії ($P<0,001$); пацієнти з більш високим початковим CDAI менш ймовірно досягали ремісії. Однак початковий CDAI не передбачає ймовірність відповіді. Всі інші змінні, що аналізуються, не були значущими провісниками ремісії або відповіді.

Якість життя

Статистично значуще поліпшення середніх значень IBDQ спостерігали у всіх групах, що отримували наталізумаб, на 6 тижні в порівнянні з групою, що отримувала плацебо. Через 12 тижнів піддані лікуванню групи, що отримували тільки дві інфузії наталізумаба, продовжували володіти значеннями IBDQ, значно більшими, ніж в групі, що отримувала плацебо (таблиця 7).

ТАБЛИЦЯ 7

СЕРЕДНІ ЗНАЧЕННЯ IBDQ

Часова точка	Плацебо (N=63)	3+0 мг/кг наталізумаба (N=68)	3+3 мг/кг наталізумаба (N=66)	6+6 мг/кг наталізумаба (N=51)
Значення IBDQ, середні значення (діапазон)				
Тиждень 0	130 (66-192)	130 (52-188)	136 (79-194)	123 (55-194)
Тиждень 6	142 (61-219)	157 (81-221)	163 (99-211)	155 (67-224)
Значення Р		0,008	<0,001	<0,001
Тиждень 12	145 (61-217)	151 (81-221)	163 (86-211)	153 (64-215)
Значення Р		0,486	0,021	0,014

Жирним шрифтом позначені поліпшення значення IBDQ при порівнянні з кожним початковим рівнем при лікуванні.

С-реактивний білок

Пацієнтам з підвищеними рівнями сироваткового С-реактивного білка на початковому рівні проводили періодичну оцінку даних рівнів протягом випробування. Пацієнти, що отримували дві

інфузії наталізумаба, демонстрували значуще середніх сироваткових рівнів зниження С-реактивного білка від початкового рівня в порівнянні з пацієнтами з групи, що отримувала плацебо.

бо (Фіг.8). У пацієнтів, що отримували 3мг/кг наталізумаба, поліпшення тривало до 12 тижня.

Безпека і переносимість

Лікування наталізумабом на всіх рівнях дозування добре переносилося протягом 12-тижневого періоду дослідження. У кожній групі з дослідження в зв'язку з несприятливими подіями вибувала приблизно однакова кількість пацієнтів (тобто 2 в групі, що отримувала плацебо, 1 в групі, що отримувала 3мг/кг наталізумаба, 2 в групі, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба, і 3 в групі, що отримувала 6+6мг/кг наталізумаба). Всього 31 пацієнт повідомив про серйозну несприятливу подію протягом основної стадії дослідження (тобто 9 в групі, що отримувала плацебо, 8 в групі, що отримувала 3мг/кг наталізумаба, 8 в групі, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба, і 6 в групі, що отримувала 6+6мг/кг наталізумаба). Жодну з серйозних несприятливих подій не оцінили як пов'язану з дослідженням лікарського засобу і жодна не була смер-

тельною; більшість являли собою госпіталізацію внаслідок ускладнень або симптомів, асоційованих з CD. Кількості пацієнтів, які відчували несприятливі події, що з'являються через лікування, були однаковими в групах з різними способами лікування: 52 (83 процента) в групі, що отримувала плацебо, 51 (78 процентів) в групі, що отримувала 3мг/кг наталізумаба, 57 (88 процентів) в групі, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба, і 41 (80 процентів) в групі, що отримувала 6+6мг/кг наталізумаба. У таблиці 8 приведені несприятливі події, не пов'язані з CD, з часткою, щонайменше, на 5% більшою в групі, що отримувала наталізумаб, в порівнянні з групою, що отримувала плацебо. Жоден з даних типів несприятливих явищ статистично значуще не відрізнявся від групи, що отримувала плацебо, і вважають, що жоден не присутній на неприйнятному рівні безпеки для застосування наталізумаба у пацієнтів з CD від помірної до тяжкої міри.

ТАБЛИЦЯ 8

НЕСПРИЯТЛИВІ ПОДІЇ, НЕ ПОВ'ЯЗАНІ З ХВОРОБОЮ КРОНА, ВИНИКНЕННЯ ЯКИХ ПЕРЕВИЩУЄ 5% В ПОРІВНЯННІ З ГРУПОЮ, ЩО ОТРИМУВАЛА ПЛАЦЕБО, І ІНШІ ПОДІЇ, ЯКІ ПРЕДСТАВЛЯЮТЬ ІНТЕРЕС

Переважаючий термін	Плацебо N=63 (%)	3+0 N=65	3+3 N=65	6+6 N=51
Біль в грудях	0 (0)	2 (3)	2 (3)	4 (8)
Кон'юнктивіт	0 (0)	2 (3)	5 (8)	0 (0)
Запаморочення	0 (0)	6 (9)	3 (5)	0 (0)
Лихоманка	1 (2)	4 (6)	3 (5)	4 (8)
Грипоподібний синдром	6 (10)	9 (14)	7 (11)	10 (20)
Головний біль	20 (32)	19 (29)	27 (42)	14 (27)
Біль	4 (6)	4 (6)	4 (6)	11 (22)
Синусит	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6)
Інші події:				
Реакція на інфузію*	0 (0)	0 (0)	1 (2)	1 (2)
Pts з антитілами проти наталізумаба	0 (0)	8 (13)	4 (6)	1 (2)

*Що приводить до паузи в інфузії або її припинення.

Антитіла проти наталізумаба на 12 тижні виявляли у 13 пацієнтів, що отримували наталізумаб (7 процентів). Загалом, імовірність виявити несприятливу подію або серйозну несприятливу подію у пацієнтів з детектованими антитілами проти наталізумаба не перевищувала імовірності у пацієнтів без детектованих антитіл проти наталізумаба.

У двох пацієнтів виявили реакції на інфузію; в обох дана подія сталася протягом другої інфузії. У пацієнта з групи, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба, виявили симптоми у вигляді невеликого зуду і еритеми, і згодом виявили у нього антитіла проти наталізумаба. У пацієнта з групи, що отримувала 6+6мг/кг наталізумаба, виявили симптоми у вигляді невеликого зуду і кашлю. Дані симптоми проходили без лікування, і у пацієнта згодом не виявили детектованих антитіл проти наталізумаба.

Хоча проспективно визначена первинна кінцева точка ефективності (клінічна ремісія визначена як CDAI <150 на 6 тижні) була статистично значу-

ще перевершуючою плацебо тільки для групи, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба, значну перевагу над плацебо спостерігали для групи, що отримувала 3+3мг/кг наталізумаба, для даного виходу в 4 різних часових точках (4, 6, 8 і 12 тижні) і двох часових точках для групи, що отримувала 6+6мг/кг наталізумаба (4 і 8 тижнів, з тенденцією до переваги на 12 тижні). Спільно з тими результатами, що частина пацієнтів з виявленою клінічною відповіддю (визначеною як зниження CDAI від початкового рівня, щонайменше, на 70 пунктів) значно перевищувала плацебо для всіх трьох груп, що отримували наталізумаб, у часових точках на 4, 6 і 8 тижнях і у часовій точці на 12 тижні для двох груп, що отримували дві інфузії наталізумаба, ці дані надають суворі докази ефективності наталізумаба для лікування CD із мірою активності від середньої до тяжкої. Крім того, сприятлива дія наталізумаба на рівні клінічної відповіді і ремісії ґрунтовані на поліпшенні в CDAI, підтверджені значним поліпшенням здоров'я, на основі QOL,

виміряній за допомогою IBDQ, і поліпшень у вмісті С-реактивного білка, реагенту гострої фази, загального запалення, що застосовується для кількісного визначення.

Рівні дозування насичення рецептора у випробуванні для CD є порівнянними з дозуванням випробування для PC, і таким чином рівні насичення рецепторів у випробуванні CD повинні бути порівнянними. Таким чином, рівні насичення рецепторів у випробуванні CD асоційовані із зменшенням запалення, підтвердженим рівнями С-реактивного білка і поліпшенням загального самопочуття пацієнтів, підтвердженим CDAI.

Серйозних чинників небезпеки для будь-якої групи, що отримувала наталізумаб, не ідентифікували. Процент пацієнтів, у яких утворилися детектовані антитіла проти наталізумаба, був низьким, і серйозних несприятливих подій, асоційованих з детектованими антитілами проти наталізумаба, не спостерігали.

Дане дослідження надає безперечні докази ефективності і переносимості протидії інтегрину альфа-4 за допомогою наталізумаба в лікуванні клінічних ознак і симптомів активної від середньої до тяжкої CD. Крім того, те що ці дані надають доказ того, що протидія інтегрину альфа-4 являє собою ефективний механізм лікування для лікування CD, збільшує імовірність того, що даний спосіб можна більш широко застосовувати для лікування хронічних аутоімунних і запальних захворювань.

Приклад 3

Ефект наталізумаба на циркулюючі активовані лейкоцити при активному запальному захворюванні кишечника

У патогенез запального захворювання кишечника (IBD) залучена направлена міграція підгруп лейкоцитів. Оскільки інтегрини альфа-4 являють собою ключові медіатори міграції лейкоцитів через ендотелій судин, вони експресовані на всіх лейкоцитах за винятком нейтрофілів, ефекти однієї інфузії 3мг/кг наталізумаба (Антегрен®) на основні підгрупи циркулюючих лейкоцитів, клітини натуральних кілерів (NK) і активовані Т-клітини у пацієнтів при активному запальному захворюванні кишечника (IBD). Також раніше показано, що одна інфузія 3мг/кг наталізумаба спричиняє тривале підвищення циркулюючих в периферичній крові лейкоцитів у тварин і здорових добровольців ["A six-month weekly intravenous toxicity study with Antegren™ in cynomolgous monkeys with a six-week recovery", Athena Report 1998, №.723-013-098]. Однак було невідомим, чи може наталізумаб впливати характеристичним чином на підгрупи лейкоцитів, враховуючи те, що всі лейкоцити, крім нейтрофілів, експресують інтегрини альфа-4.

Методи

Виділені перед інфузією на 1, 2, 4, 8 і 12 тижнів після інфузії з периферичної крові 30 хворих хворобою Крона (CD; 18 отримували наталізумаб, 12 - плацебо) і 10 хворих виразковим колітом (UC; всі отримували наталізумаб без плацебо) лейкоцити аналізували на пристрої сортування клітин, що активується флуоресценцією (FACS). Сироваткові

рівні наталізумаба і рівні активності захворювання вимірювали в кожній часовій точці.

Значущі зміни в порівнянні з початковим рівнем ($p < 0,05$) і кореляції тестували критеріями Вілкоксона і Спірмена, відповідно. У підданих лікуванню групах із застосуванням знакового рангового критерію Вілкоксона проводили аналіз змін в підгрупах лейкоцитів в порівнянні з початковим рівнем ($p < 0,05$ означає значущість). Критерії рангової кореляції Спірмена застосовували для оцінки кореляції між параметрами активності захворювання, рівнями наталізумаба і підгрупами лейкоцитів у пацієнтів, що отримували наталізумаб.

Венозну кров збирали безпосередньо до інфузії наталізумаба/плацебо і знов на першому, другому, четвертому, восьмому і дванадцятому тижнях після інфузії. Для виділення лімфоцитів периферичної крові (PBL) перед аналізом за допомогою багатоколірного пристрою для сортування клітин, що активується флуоресценцією (FACS; Becton Dickinson, Oxford, UK), в поєднанні з програмним забезпеченням Consort 30 [Amiot et al., 1996 Clin. Exp. Immunol. 105: 176-82], застосовували спосіб Lymphoprep™ (Nycomed, Denmark). Із застосуванням FACS-аналізу вимірювали процент PBL, які експресують наступні маркери: CD 19 (В-клітина), TCR $\alpha\beta$ (Т-клітина), CD3 (загальна Т-клітина), TCR $\gamma\delta$ (Т-клітина), CD4 (Т-клітина-хелпер/Th-1), CD8 (цитотоксична/супресорна Т-клітина) і CD16 (NK-клітина).

Крім підгруп «наївних» (CD45RA) Т-клітин і Т-клітин пам'яті (CD45RO) і "NK-Т-клітин" (CD57⁺/CD3⁺), вимірювали кількості клітин TCR $\alpha\beta$, які експресують активаційні антигени CD38, CD25 (ланцюг рецептора інтерлейкіна-2), CD26, CD69 і HLA-DR. Також вимірювали кількість цитотоксичних/супресорних Т-клітин (CD8⁺), які експресують активаційні антигени CD28 і HLA-DR.

Результати

Всі кількості еозинофілів, моноцитів В- і Т-клітин значущо збільшувалися за ≥ 1 тиждень після наталізумаба. Загальні кількості лімфоцитів, і В- і Т-клітин значущо збільшувалися в порівнянні з початковими рівнями. Кількості нейтрофілів і базофілів не змінювалися. Кількість Т-клітин, які експресують активаційні маркери CD25, CD26, HLA-DR, CD8DR, CD8, CD28, CD45RO і CD45RA, значущо збільшувалася в порівнянні з початковим рівнем на ≥ 4 і 1 тижні у пацієнтів з UC і CD, відповідно. Кількість Т-клітин CD38⁺ і CD69⁺ збільшувалася на ≥ 1 тижні тільки у пацієнтів з UC. Після інфузії кількість NK-клітин не змінювалася у всіх пацієнтів, а кількість Т-клітин NK-типу (CD57⁺) збільшувалася на 1 тижні тільки у пацієнтів з CD. Значущої зміни в кількості Т-клітин гамма-дельта ($\gamma\delta$) у пацієнтів CD/UC не виявили. Зміни в підгрупах Т-клітин не корелювали з активністю захворювання або сироватковими рівнями наталізумаба. Змін лейкоцитів, виявлених після наталізумаба, не виявили після плацебо.

Перед тим як на 8 тижні повернутися до значень перед лікуванням, кількості лімфоцитів залишалися підвищеними протягом 4 тижнів після інфузії і у пацієнтів з хворобою Крона ($p = 0,002$) і у

пацієнтів з виразковим колітом [Gordon et al., 2002 Aliment. Pharm. & Ther. 16: 699-706 і Gordon et al., 2001 Gastroenterology 121: 268-74].

Дія наталізумаба на циркулюючі еозинофіли і моноцити представлена на Фіг.9А і 9В. Зазначено, що кількості нейтрофілів і еозинофілів залишалися незмінними у всіх групах пацієнтів, що вивчаються. На Фіг.10 і 11 представлені ефекти введення наталізумаба на конкретні циркулюючі підгрупи Т-клітин і натуральні кілери у пацієнтів з хворобою

Крона і виразковим колітом. Відрізки погіршеностей на кожній діаграмі відмічають стандартні відхилення.

Значущих змін в основних підгрупах лейкоцитів після інфузії плацебо не виявили. Введення плацебо 11 пацієнтам представлено в таблиці 9. Деякі зміни в лімфоцитах, які експресують активуючі антигени, виявляли в окремих часових точках тільки у пацієнтів з хворобою Крона (таблиця 10).

ТАБЛИЦЯ 9
ПІДГРУПИ ЛЕЙКОЦИТІВ У ПАЦІЄНТІВ З ХВОРОБОЮ КРОНА, ЩО
ОТРИМУВАЛИ ПЛАЦЕБО

	0 тиждень		1 тиждень		2 тиждень		4 тиждень		8 тиждень	
	Сер- еднє	SD	Сер- еднє	SD	Сер- еднє	SD	Сер- еднє	SD	Сер- еднє	SD
Лімфоцити	.60	.33	.55	.36	.82	.67	.48	.29	.51	.31
Нейтрофіли	.21	.75	.18	.48	.86	.36	.61	.26	.91	.15
Еозинофіли	.19	.16	.17	.13	.15	.13	.20	.12	.14	.10
Базофіли	.19	.30	.14	.09	.09	.07	.09	.03	.08	.05
Моноцити	.60	.33	.55	.36	.82	.67	.48	.29	.51	.31

Таблиця 9. Середні величини (SD) для підгруп лейкоцитів після плацебо; значних відмінностей в будь-якій групі в порівнянні зі значеннями на початковому рівні (0 тиждень) немає.

ТАБЛИЦЯ 10
МАРКЕРИ Т-КЛІТИН І НК У ПАЦІЄНТІВ З ХВОРОБОЮ КРОНА, ЩО
ОТРИМУВАЛИ ПЛАЦЕБО

Підгрупа клітин x 10 ⁹ /мл	0 тиждень Середнє SD		1 тиждень Середнє SD		2 тиждень Середнє SD		4 тиждень Середнє SD		8 тиждень Середнє SD		12 тиждень Середнє SD	
Лімфоцити	.36	.57	.12	.57	.83	.08	.34	.98	.28	.74	.62	.84
TCRαβ+	.99	.53	.81	.56	.28	.88	.98	.84	.95	.79	.17	.81
CD25+	.18	.11	.12	.07	.27	.22	.17	.17	.18	.15	.22	.17
CD26+	.49	.32	.38	.27	.80	.61	.54	.49	.54	.55	.58	.43
CD45RA+	.74	.41	.57	.39	.95	.69	.68	.59	.68	.57	.84	.56
CD45RO+	.42	.20	.31	.18	.50	.27	.39	.24	.42	.35	.50	.33
CD38+	.42	.29	.31	.23	.46	.38	.35	.27	.33	.25	.40	.25
CD69+	.14	.20	.67	.71	.13	.12	.05	.04	.12	.22	.10	.08
HLA-DR+	.19	.10	.15	.08	.25	.20	.16	.11	.17	.10	.22	.16
CD8+	.11	.09	.09	.06	.16	.15	.09	.07	.08	.05	.12	.11
CD8+CD28+	.21	.11	.16	.11	.30	.20	.22	.21	.20	.18	.23	.14
CD8+DR+	.11	.09	.09	.06	.16	.15	.09	.07	.08	.05	.12	.11
CD57+CD3+	.08	.06	.06	.05	.10	.10	.07	.04	.07	.05	.10	.15
CD16+CD3-	.11	.09	.12	.09	.16	.18	.09	.04	.12	.12	.17	.19
TCRγδ+	.11	.16	.08	.09	.18	.28	.10	.13	.09	.09	.11	.10
Mab Kappa+	.02	.02	.03	.05	.05	.08	.07	.09	.03	.04	.10	.01

Таблиця 10. У колонках представлені середні кількості (SD) підгруп Т-клітин і клітин типу NK у пацієнтів з хворобою Крона, що отримували плацебо, в порівнянні з початковими значеннями (знаковий ранговий критерій Вілкоксона; $p < 0,05$). Значущі відмінності в порівнянні з початковим рівнем представлені жирним шрифтом. Стандартні відхилення для кожного середнього представлені курсивом.

Значущою кореляцією між загальною кількістю лімфоцитів і рівнем активності захворювання і у

пацієнтів з хворобою Крона і у пацієнтів з виразковим колітом (таблиці 11 і 12) не виявили, а також не виявили ніяких значущих кореляцій між окремими підгрупами лімфоцитів і активності захворювання. На першому, другому або четвертому тижнях після інфузії значущої кореляції між сироватковими рівнями наталізумаба і змінами в підгрупах лейкоцитів не виявили. На восьмому тижні наталізумаба не виявляли майже у всіх пацієнтів. Таким чином для даної тимчасової точки кореляцій не підраховували.

ТАБЛИЦЯ 11

ЗНАЧЕННЯ R ПО СПІРМЕНУ, ЩО ПОРІВНЮЮТЬ ПІДГРУПИ ЛІМФОЦИТІВ І АКТИВНІСТЬ ЗАХВОРЮВАННЯ

Підгрупи	Хвороба Крона			Виразковий коліт		
	1 тиждень	2 тиждень	4 тиждень	1 тиждень	2 тиждень	4 тиждень
Лімфоцити	0.16	-0.37	-0.01	-0.63	-0.19	0.03
TCR $\alpha\beta$	0.26	-0.29	0.05	-0.59	-0.39	0
CD25	0.44	0.07	0.13	-0.39	-0.46	0.17
CD26	0.31	-0.22	-0.11	-0.39	-0.29	0.10
CD45RA	0.29	-0.25	0.19	-0.54	-0.39	0.51
CD45RO	0.32	-0.27	0.34	0.18	-0.17	-0.05
CD38	0.31	-0.08	0.01	-0.57	0.03	-0.05
CD69	-0.32	0.12	0.12	-0.15	0.28	0.12
HLA-DR	0.19	-0.05	-0.01	0.12	-0.13	0.15
CD8CD28	0.01	-0.17	-0.13	-0.18	-0.04	-0.17
CD8DR	0.11	-0.19	-0.18	-0.1	0.07	0.24
CD57	0.19	-0.08	-0.04	0.21	-0.15	0.15
CD16	-0.08	-0.3	-0.15	-0.19	0.1	-0.32
TCR $\gamma\delta$	0.34	0.14	-0.31	-0.63	-0.47	-0.66
Mab Каппа	-0.11	-0.02	-0.2	0.05	-0.27	0.19

Таблиця 11. Значущою кореляцією між кількістю лімфоцитів в підгрупі і CDAI (пацієнти з хворобою Крона) або шкалою Пауела-Така (виразковий коліт) немає.

ТАБЛИЦЯ 12

ЗНАЧЕННЯ R ПО СПІРМЕНУ, ЩО ПОРІВНЮЮТЬ ПІДГРУПИ ЛІМФОЦИТІВ З СІРОВАТКОВИМ НАТАЛІЗУМАБОМ

Підгрупи	Хвороба Крона			Виразковий коліт		
	1 тиждень	2 тиждень	4 тиждень	1 тиждень	2 тиждень	4 тиждень
Лімфоцити	0.03	0.49	0.64	0.1	-0.02	0.18
TCR $\alpha\beta$	-0.11	0.35	0.51	-0.04	0.28	-0.11
CD25	-0.09	0.03	0.26	0.25	-0.07	-0.25
CD26	-0.07	0.28	0.61	0.20	0.22	-0.14
CD45RA	0.19	0.29	0.62	-0.12	-0.25	-0.32
CD45RO	-0.16	0.32	0.34	0.37	0.08	0.39
CD38	0.06	0.18	-0.34	-0.01	-0.45	-0.43
CD69	0.02	0.26	0.57	0.2	-0.22	0.14
HLA-DR	0.05	0.13	-0.25	0.08	0.27	-0.07
CD8CD28	-0.18	0.16	0.41	0.25	0.07	0.32
CD8DR	0.4	0.16	0.004	0.08	0.3	-0.18
CD57	0.1	-0.06	-0.31	-0.08	0.03	0
CD16	0.22	0.19	-0.5	0.13	0.37	0.25
TCR $\gamma\delta$	0.002	-0.16	-0.2	0.21	0.61	0.6
Mab Каппа	-0.07	-0.27	0.29	0.41	0.45	-0.41

Таблиця 12. Значущої кореляції між активністю захворювання і підгрупами лімфоцитів немає, за винятком загальної кількості лімфоцитів на 4 тижні ($p=0,04$).

Основою на приведених вище даних, одна інфузія 3мг/кг наталізумаба індукувала підвищені циркулюючі рівні більшості, але не всіх, підгруп лейкоцитів у пацієнтів з активної IBD. У більшості пацієнтів кількості циркулюючих еозинофілів, моноцитів і лімфоцитів значуще збільшувалися в порівнянні з початковими значеннями, щонайменше, за чотири тижні після інфузії. Широкий діапазон наборів циркулюючих Т-клітин значуще збільшувався в порівнянні зі значеннями перед лікуванням, особливо тих з них, які експресують активаційні антигени. Однак наталізумаб не змінював кількість NK-клітин ($CD16^+/CD3^+$), а Т-клітини $CD57^+$ наталізумаб змінював в значно меншій мірі, ніж інші підгрупи Т-клітин. Також наталізумаб не змінював кількість лімфоцитів, які експресують Т-клітинний рецептор $\gamma\delta$, що свідчить про те, що дані клітини або не експресують інтегрини альфа-4 або експресують його на значно меншому рівні.

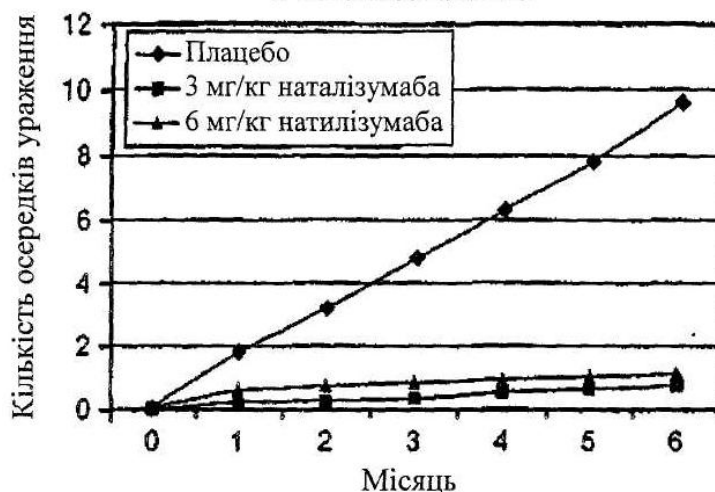
Таким чином, у пацієнтів з активною IBD наталізумаб може обмежувати направлену міграцію і

підтримувати в циркуляції множину лейкоцитів і підгрупи активованих лімфоцитів. Представляється, що NK-клітини, $\gamma\delta$ -клітини, нейтрофіли і базофіли не зачіпаються при введенні наталізумаба, що дозволяє передбачити, що вони є менш важливими медіаторами в направленій міграції даних типів клітин.

Хоча даний винахід описаний з посиланням на його конкретні здійснення, фахівцям в даній галузі необхідно розуміти, що можна здійснювати різні зміни і можна замінити еквівалентами, без відхилення від суті і об'єму винаходу. Крім того, можна проводити безліч модифікацій для адаптації конкретної ситуації, речовини, композиції речовин, процесу, стадії або стадій процесу, до мети, суті і галузі даного винаходу. Всі такі модифікації мають на увазі що знаходяться в об'ємі винаходу.

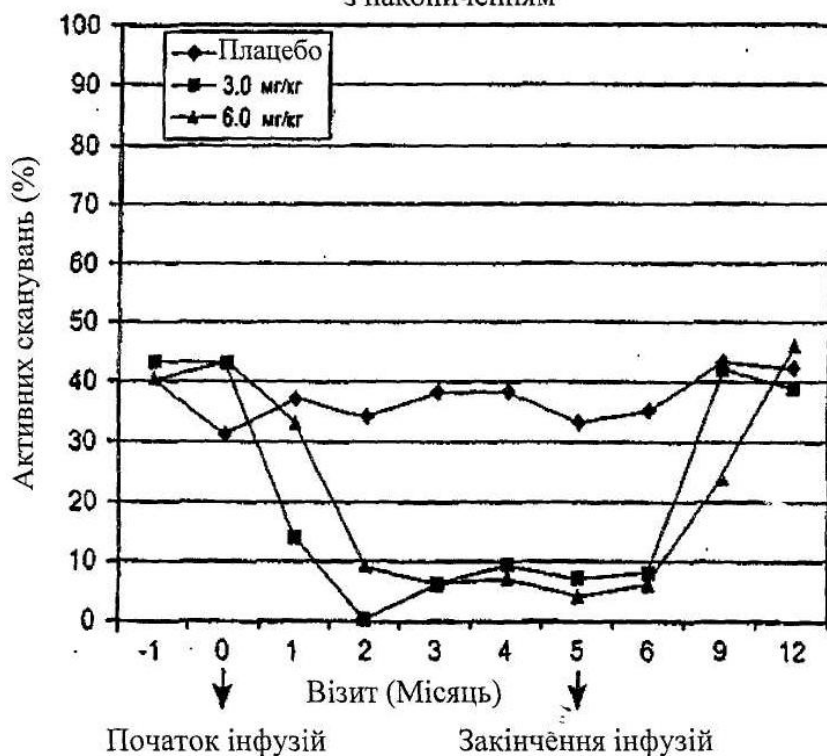
Попередні [заявки США №№60/360134 і 60/374501, подані, відповідно, 25 лютого 2002 року і 23 квітня 2002 року], у всій їх повноті включені в даний опис як посилання. Всі посилання, що цитуються тут в повному об'ємі включені в даний опис як посилання.

Інтегральна середня кількість нових осередків ураження з накопиченням Gd



Фіг. 1

Частка сканування МРТ з новими осередками ураження
з накопиченням



Фіг. 2

Сумарні сироваткові концентрації наталізумаба для 3,0 мг/кг наталізумаба

Пацієнт	0 місяць						
	Перед інфузією	60 хв.	2 години	24 години	1 тиждень	2 тиждень	3 тижде
01	<0.13	65.0	74.7 мкг/мл	43.4 мкг/мл	11.6 мкг/мл	4.6 мкг/мл	4.9 мкг/мл
02	<0.13	56.1	72.2	39.2	17.7	11.2	н./д.
03	<0.13	58.5	60.0	34.4	10.6	5.8	3.6
04	<0.13	77.9	97.3	54.1	16.2	7.2	2.3
05	<0.13	75.6	67.5	42.0	17.3	10.7	8.0
06	<0.13	72.0	73.7	н./д.	10.7	4.0	1.5
07	<0.13	16.9	30.7	23.7	13.0	н./д.	н./д.
08	<0.13	54.3	58.4	49.0	15.7	9.9	6.7
09	<0.13	82.7	74.2	62.6	18.6	н./д.	3.5
10	<0.13	84.3	84.1	64.2	22.7	10.7	7.3
11	<0.25	62.5	72.6	42.0	14.3	6.8	4.1
12	<0.25	102.7	80.6	82.1	25.5	13.7	5.8
13	<0.13	76.0	67.8	44.3	13.7	8.6	5.3
14	<0.13	66.4	70.2	36.5	11.0	6.3	3.9

	0 місяць						
	Перед інфузією	60 хв.	2 години	24 години	1 тиждень	2 тиждень	3 тижде
N	14	14	14	13	14	12	12
Середнє	0.0	67.9	70.3	47.5	15.6	8.3	4.7
SD	0.00	19.60	14.96	15.18	4.50	2.98	1.97

Фіг. 3А

Сумарні сироваткові концентрації наталізумаба для 3,0 мг/кг наталізумаба

Пацієнт	2 місяць	3 місяць	4 місяць	Перед інфузією	5 місяць		
					60 хв.	2 години	24 години
01	2.4 мкг/мл	1.4 мкг/мл	1.9 мкг/мл	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
02	7.1	8.0	11.1	7.8	65.1	82.3	50.5
03	2.3	2.9	2.7	1.2	53.9	54.7	40.6
04	<0.13	<0.13	<0.13	<0.13	24.6	21.4	2.5
05	8.1	11.4	1.8	0.2	н./д.	н./д.	н./д.
06	1.4	1.8	1.9	2.0	81.9	90.3	51.9
07	1.7	2.5	2.2	2.6	36.0	62.7	22.2
08	4.5	5.7	2.0	4.7	76.0	65.0	н./д.
09	3.4	3.9	3.3	3.3	59.7	64.8	48.5
10	2.9	3.3	6.1	4.5	82.0	79.6	59.9
11	2.7	4.6	5.5	3.0	82.6	79.3	55.6
12	2.0	1.9	1.9	3.6	68.8	н./д.	65.2
13	4.3	4.3	3.6	5.0	74.9	55.4	47.0
14	2.1	1.6	1.9	3.0	70.3	63.0	35.5
SRN	2 місяць	3 місяць	4 місяць	Перед інфузією	5 місяць		
N	14	14	14	13	12	11	11
Середнє	3.2	3.8	3.3	3.1	64.7	65.3	43.6
SD	2.19	2.98	2.74	2.11	18.51	18.61	18.03

Фіг. 3В

Сумарні сироваткові концентрації наталізумаба для 3,0 мг/кг наталізумаба

Пацієнт	21 тиждень	22 тиждень	23 тиждень	6 місяць	7 місяць	8 місяць	9 місяць	10 місяць	12 місяць
01	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
02	33.8	21.4	10.3	8.1	0.4	0.13	<0.13	н./д.	н./д.
03	21.3	9.4	4.7	5.1	<0.25	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.
04	<0.13	<0.13	<0.13	<0.13	<0.25	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.
05	н./д.	н./д.	н./д.	0.2	<0.25	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.
06	21.5	7.6	3.9	2.4	<0.13	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.
07	н./д.	11.0	6.2	3.7	0.3	<0.13	н./д.	н./д.	н./д.
08	19.1	13.2	9.6	5.3	0.4	<0.13	<0.13	<0.13	н./д.
09	33.7	13.1	6.1	3.8	<0.13	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
10	29.9	16.8	н./д.	7.4	0.5	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
11	н./д.	18.4	10.5	6.6	0.7	<0.13	н./д.	н./д.	н./д.
12	н./д.	9.9	6.3	3.5	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.	н./д.
13	22.1	13.3	9.1	4.6	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.	н./д.
14	14.1	8.2	9.4	4.7	<0.13	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
SRN	21 тиждень	22 тиждень	23 тиждень	6 місяць	7 місяць	8 місяць	9 місяць	10 місяць	12 місяць
N	9	12	11	13	13	10	6	1	0
Середнє	21.7	11.9	6.9	4.3	0.2	0.0	0.0	0.0	
SD	10.57	5.61	3.25	2.44	0.25	0.00	0.00		

Фіг. 3С

Сумарні сироваткові концентрації наталізумаба для 6,0 мг/кг наталізумаба

Пациєнт	0 місяць							
	Перед інфузією	60 хв.	2 години	24 години	1 тиждень	2 тиждень	3 тиждень	1 місяць
01	<0.25	104.8	155.3 мкг/мл	110.0 мкг/мл	36.3 мкг/мл	16.8 мкг/мл	11.4 мкг/мл	11.0 мкг/мл
02	<0.13	102.8	135.0	81.8	37.5	18.7	11.0	3.9
03	<0.13	121.1	96.3	68.4	22.9	19.9	11.4	6.6
04	<0.13	136.0	141.2	86.6	26.0	20.9	13.7	9.8
05	<0.13	163.8	138.6	84.4	29.4	17.5	14.0	9.6
06	<0.13	145.7	173.7	94.8	29.3	16.5	14.0	9.7
07	<0.25	173.5	164.0	110.0	33.9	н./д.	н./д.	н./д.
08	<0.13	135.8	143.0	105.8	20.9	17.6	15.0	10.9
09	<0.13	97.3	127.9	66.8	27.0	8.3	7.8	4.8
10	<0.13	149.2	111.2	103.2	37.0	21.4	11.9	4.8
11	<0.25	111.6	142.5	88.9	20.8	20.7	9.7	8.6
12	<0.13	147.6	135.0	95.5	43.9	28.0	19.4	9.9
13	<0.25	183.9	168.6	113.2	52.0	31.7	20.9	12.1
14	<0.13	140.2	129.2	109.9	36.9	21.0	12.2	7.9
0 місяць								
	Перед інфузією	60 хв.	2 години	24 години	1 тиждень	2 тиждень	3 тиждень	1 місяць
N	14	14	14	14	14	13	13	13
Середнє	0.0	136.7	140.1	94.2	32.4	19.9	13.3	8.4
SD	0.00	26.72	21.18	15.38	8.97	5.61	3.63	2.64

Фіг. 4А

Сумарні сироваткові концентрації наталізумаба для 6,0 мг/кг наталізумаба

Пациєнт	5 місяць						
	2 місяць	3 місяць	4 місяць	Перед інфузією	60 хв.	2 години	24 години
01	10.7 мкг/мл	н./д.	3 мкг/мл	2.4 мкг/мл	н./д.	н./д.	н./д.
02	6.8	8.2	9.6	10.3	н./д.	н./д.	н./д.
03	8.6	9.9	10.5	7.8	92.6	97.5	85.9
04	11.8	16.4	17.1	15.8	200.1	161.1	135.6
05	9.3	11.6	16.9	19.5	190.4	168.3	104.4
06	11.7	14.5	16.8	18.2	171.3	153.0	112.7
07	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
08	14.6	12.9	14.2	18.4	145.2	172.5	99.2
09	8.5	8.4	12.0	ND	103.0	107.5	44.9
10	9.0	16.3	18.1	10.9	114.3	141.4	103.0
11	11.8	14.2	13.3	14.5	135.7	109.4	93.8
12	11.7	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
13	1.6	<0.13	1.9	7.5	187.0	141.8	124.6
14	11.2	12.6	12.8	11.8	152.4	124.0	114.6
5 місяць							
SRN	2 місяць	3 місяць	4 місяць	Перед інфузією	60 хв.	2 години	24 години
N	13	11	12	10	10	10	10
Середнє	9.8	11.4	12.1	13.5	149.2	137.7	101.9
SD	4.71	4.71	5.39	4.43	37.96	26.82	24.75

Фіг. 4В

Сумарні сироваткові концентрації наталізумаба для 6,0 мг/кг наталізумаба

Пацієнт	21 тиждень	22 тиждень	23 тиждень	6 місяць	7 місяць	8 місяць	9 місяць	10 місяць	12 місяць
01	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
02	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
03	43.2	17.2	15.5	10.1	1.3	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.
04	59.1	38.6	25.1	19.3	3.4	0.2	<0.13	н./д.	н./д.
05	46.0	29.3	21.3	24.8	6.5	0.3	0.2	н./д.	н./д.
06	78.9	42.9	25.1	17.4	2.9	<0.13	<0.13	н./д.	н./д.
07	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
08	50.1	26.0	24.7	21.2	н./д.	0.7	<0.13	<0.13	н./д.
09	32.2	30.2	16.6	9.3	1.1	<0.13	0.13	н./д.	н./д.
10	50.7	34.3	17.0	13.1	2.1	<0.13	<0.13	<0.13	н./д.
11	34.0	30.0	23.7	22.5	4.6	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
12	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
13	48.1	31.9	19.3	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
14	44.8	32.3	15.5	13.6	2.6	н./д.	н./д.	н./д.	н./д.
SRN	21 тиждень	22 тиждень	23 тиждень	6 місяць	7 місяць	8 місяць	9 місяць	10 місяць	12 місяць
N	10	10	10	9	8	7	7	2	0
Середнє	48.7	31.3	20.4	16.8	3.1	0.2	0.0	0.0	
SD	13.20	6.93	4.08	5.56	1.79	0.26	0.08	0.00	

Фіг. 4С

Рівні насичення рецепторів, що підтримуються при дослідженні PC

Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
0 місяць	Перед інфузією	N	14	13	14
		Середнє	9.82	8.06	7.56
		SD	5.331	2.192	3.135
		Медіана	8.3	7.7	6.7
		Мінімум	4.7	5.9	3.1
0 місяць	2 години після інфузії	Максимум N	24.914	14.4 14	13.3 14
		Середнє	8.21	99.11	100.97
		SD	3.567	10.557	4.884
		Медіана	7.5	102.4	102.1
		Мінімум	5.2	74.9	93.2
		Максимум	18.6	110.8	110.7
Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
0 місяць	24 години після інфузії	N Середнє	12 9.30	12 99.09	13 98.93
		SD	7.328	9.052	12.079
		Медіана	6.7	99.9	97.4
		Мінімум	5.6	81.5	81.2
		Максимум	31.9	109.4	117.5
1 тиждень		N	14	14	14
		Середнє	7.92	93.41	99.61
		SD	2.579	5.656	12.011
		Медіана	8.3	94.3	94.9
		Мінімум	3.5	82.8	83.5
		Максимум	13.3	100.9	120.8

Фіг. 5А

Рівні насичення рецепторів, що підтримуються при дослідженні PC

Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
2 тиждень		N	12	14	13
		Середнє	8.98	88.28	97.37
		Медіана	8.4	88.0	97.9
		Мінімум	4.1	75.9	78.3
		Максимум	13.4	101.4	131.7
3 тиждень		N	13	13	12
		Середнє	8.17	80.99	92.79
		SD	2.242	19.150	9.767
		Медіана	8.8	85.5	92.3
		Мінімум	4.9	24.5	74.7
		Максимум	12.0	99.3	110.9
Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
1 місяць		N	14	13	13
		Середнє	8.87	82.48	85.58
		SD	3.808	11.272	8.491
		Медіана	8.4	84.1	84.6
		Мінімум	3.1	56.1	68.6
		Максимум	17.3	100.2	96.1
2 місяць		N	12	14	13
		Середнє	9.41	79.15	93.21
		SD	3.846	22.779	9.194
		Медіана	9.4	87.1	94.0
		Мінімум	4.7	7.3	75.8
		Максимум	19.5	96.6	104.2

Фіг. 5B

Рівні насичення рецепторів, що підтримуються при дослідженні PC

Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
3 місяць		N	12	14	12
		Середнє	6.97	79.47	83.32
		SD	2.720	23.459	18.333
		Медіана	6.5	81.6	88.9
		Мінімум	3.3	8.9	29.2
		Максимум	11.4	104.5	96.3
4 місяць		N	10	14	11
		Середнє	8.38	77.81	95.51
		SD	3.400	25.375	15.794
		Медіана	7.1	76.0	93.6
		Мінімум	4.9	7.9	78.3
		Максимум	16.9	117.4	139.0
Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
5 місяць	Перед інфузією	N	9	13	11
		Середнє	9.48	70.88	91.94
		SD	2.606	26.535	10.720
		Медіана	9.1	75.1	94.8
		Мінімум	6.1	9.0	75.4
		Максимум	15.6	115.0	106.9
5 місяць	2 години після інфузії	N	9	11	10
		Середнє	11.03	92.09	99.19
		SD	6.203	8.267	10.200
		Медіана	7.6	95.0	97.4
		Мінімум	4.9	79.7	82.5
		Максимум	21.7	103.4	114.6

Фіг. 5C

Рівні насичення рецепторів, що підтримуються при дослідженні PC

Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
5 місяць	24 години після інфузії	N	8	12	10
		Середнє	7.50	92.04	89.08
		SD	2.660	15.256	32.364
		Медіана	6.4	94.6	95.9
		Мінімум	4.7	49.5	4.8
		Максимум	12.8	106.4	123.2
21 тиждень		N	8	12	11
		Середнє	8.06	80.25	92.27
		SD	2.217	24.078	11.557
		Медіана	8.2	86.2	88.9
		Мінімум	4.3	5.1	77.3
		Максимум	11.7	94.6	112.9
Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
22 тиждень		N	7	12	10
		Середнє	8.67	84.98	90.44
		SD	2.471	25.744	18.174
		Медіана	8.7	90.5	81.6
		Мінімум	5.1	6.2	73.5
		Максимум	12.0	101.7	127.8
23 тиждень		N	7	10	10
		Середнє	9.16	82.89	97.24
		SD	2.950	27.649	23.374
		Медіана	8.7	90.2	90.9
		Мінімум	4.6	6.1	78.8
		Максимум	14.0	100.5	154.8

Fig. 5D

Рівні насичення рецепторів, що підтримуються при дослідженні PC

Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
6 місяць		N	10	13	9
		Середнє	8.65	67.32	80.59
		SD	3.574	29.838	27.738
		Медіана	8.2	80.2	85.4
		Мінімум	4.4	6.4	10.0
		Максимум	16.7	102.5	106.2
7 місяць		N	10	12	8
		Середнє	7.69	42.10	80.46
		SD	1.281	24.011	27.664
		Медіана	7.7	41.1	67.2
		Мінімум	5.1	4.7	62.5
		Максимум	10.4	88.0	145.2
Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
8 місяць		N	10	13	8
		Середнє	7.60	14.09	34.16
		SD	1.726	10.214	21.619
		Медіана	6.9	12.1	29.6
		Мінімум	6.0	6.2	11.8
		Максимум	10.7	45.0	59.6
9 місяць		N	5	7	7
		Середнє	9.52	5.88	9.45
		SD	2.701	2.246	4.644
		Медіана	9.0	5.6	7.7
		Мінімум	6.3	3.7	5.5
		Максимум	13.5	10.4	18.0

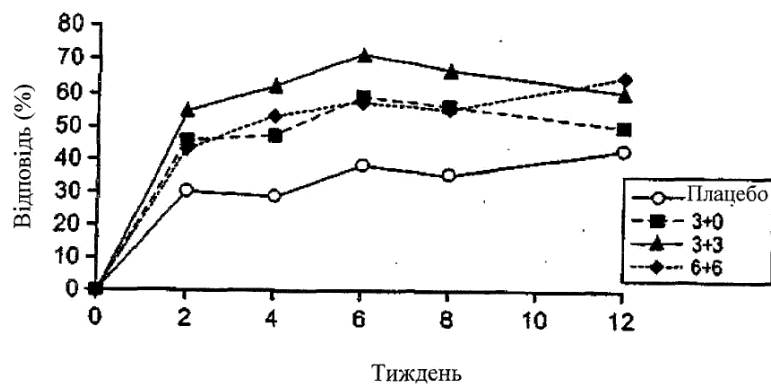
Fig. 5E

Рівні насичення рецепторів, що підтримуються при дослідженні PC

Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
10 місяць		N	2	3	4
		Середнє	7.78	8.65	9.17
		SD	2.029	0.635	1.655
		Медіана	7.8	8.6	9.3
		Мінімум	6.3	8.0	7.1
		Максимум	9.2	9.3	11.0
12 місяць		N	1	1	1
		Середнє	8.80	6.04	6.61
		SD			
		Медіана	8.8	6.0	6.6
		Мінімум	8.8	6.0	6.6
		Максимум	8.8	6.0	6.6
Візит	Час взяття проби	Статистика	Плацебо (n=71)	3,0 мг/кг Антегрена (n=68)	6,0 мг/кг Антегрена (n=74)
		N		1	1
		Середнє		94.51	32.29
		SD			
		Медіана		94.5	32.3
		Мінімум		94.5	32.3
		Максимум		94.5	32.3

Фіг. 5F

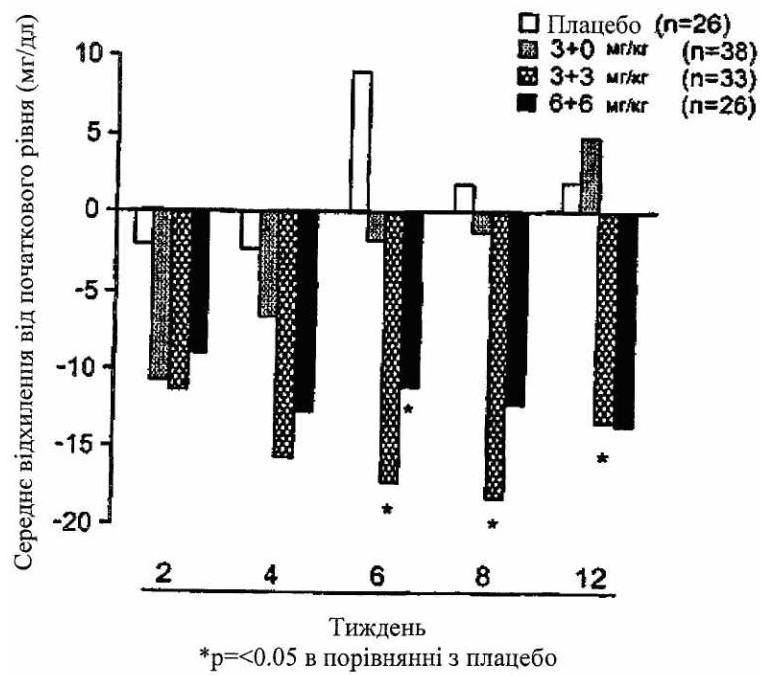
Клінічна відповідь при дослідженні CD



Фіг. 6

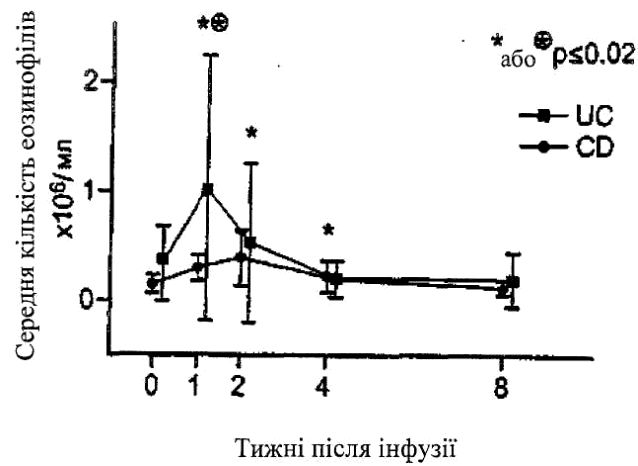


Середні значення змін сироваткового
С-реактивного білка



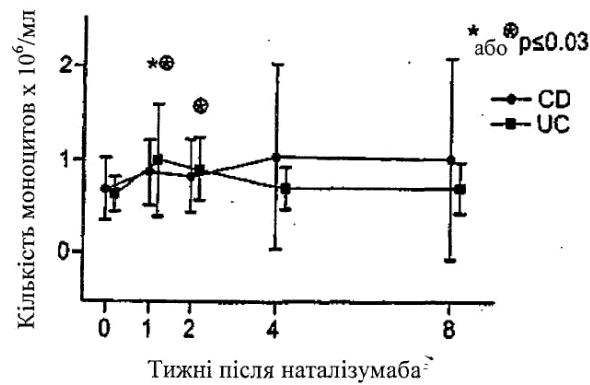
Фіг. 8

Ефект наталізумаба на циркулюючі еозинофіли у пацієнтів з активними
хворобою Крона і виразковим колітом



Фіг. 9А

Ефект наталізумаба на циркулюючі моноцити у пацієнтів з активними хворобою Крона і виразковим колітом



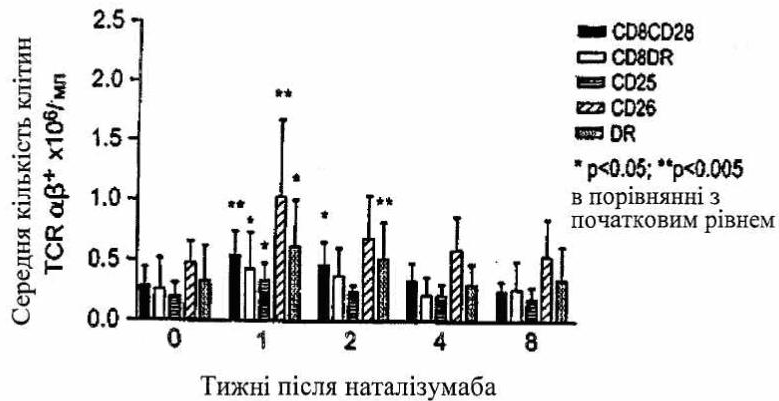
Фіг. 9В

Ефекти наталізумаба на клітини $\text{TCR}\alpha\beta^+$, що експресують активаційні антигени у пацієнтів з активною хворобою Крона



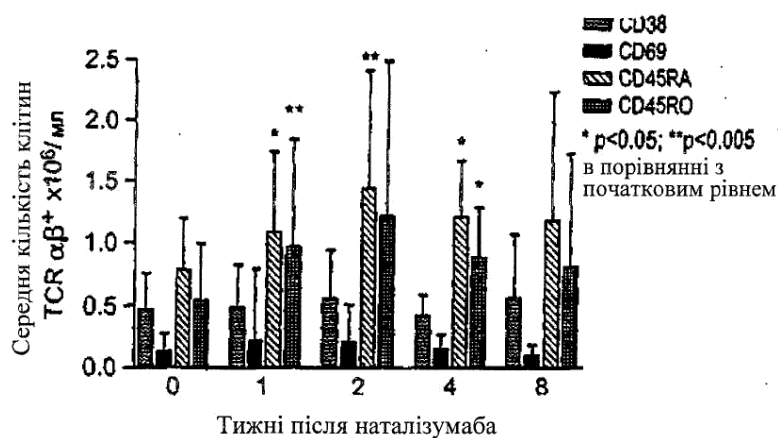
Фіг. 10А

Ефекти наталізумаба на клітини $\text{TCR}\alpha\beta^+$, що експресують активаційні антигени у пацієнтів з активним виразковим колітом



Фіг. 10В

Ефекти наталізумаба на клітини $\text{TCR}\alpha\beta^+$, що експресують активаційні антигени, маркери пам'яті і маркери наївних клітин у пацієнтів з активною хворобою Крона



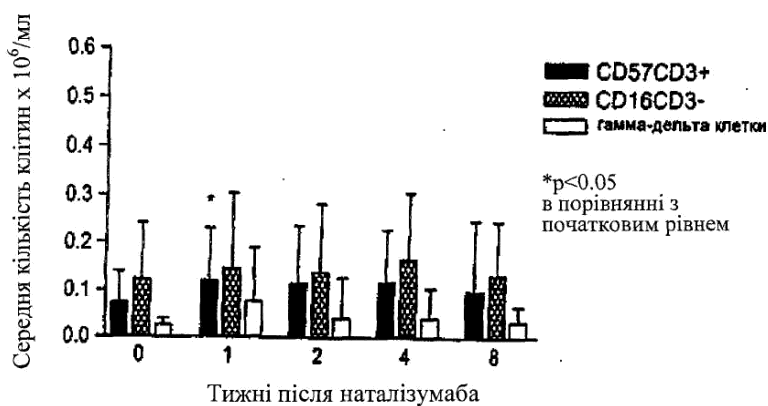
Фіг. 10С

Ефекти наталізумаба на клітини $\text{TCR}\alpha\beta^+$, що експресують активаційні антигени, маркери пам'яті і маркери наївних клітин у пацієнтів з активним виразковим колітом



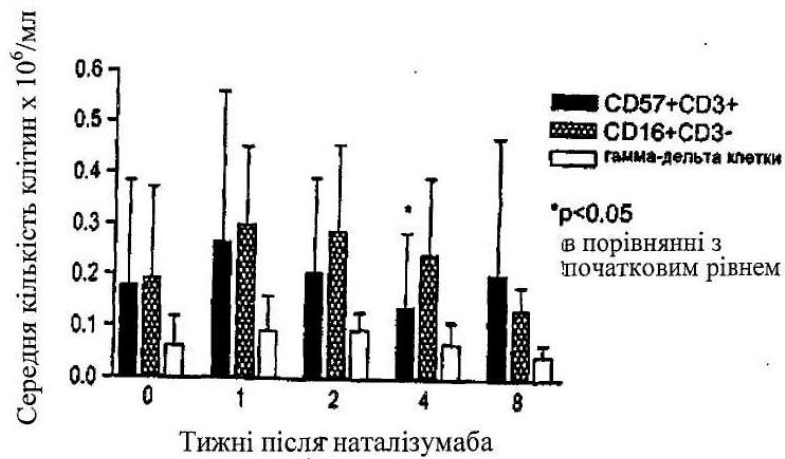
Фіг. 10D

Ефекти наталізумаба на циркулюючі клітини $\text{TCR}\gamma\delta^+$ і клітини NK-типу у пацієнтів з активною хворобою Крона



Фіг. 11А

Ефекти наталізумаба на циркулюючі клітини TCR75 $\gamma\delta^+$ і клітини NK-типу у пацієнтів з активною хворобою Крона



Фіг. 11В