



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103221535 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201180054987. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 09. 16

C12N 5/07(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/16(2006. 01)

61/383, 628 2010. 09. 16 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/051935 2011. 09. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02012/037457 EN 2012. 03. 22

(71) 申请人 康奈尔大学

地址 美国纽约州

(72) 发明人 M·S·拜内

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有

限公司 11111

代理人 白华胜 段晓玲

权利要求书8页 说明书45页 附图29页

(54) 发明名称

腺苷受体信号转导调节血脑屏障通透性的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种增强受试者的血脑屏障(“BBB”)通透性的方法。这种方法包括向所述受试者施用激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂。还公开了一种降低受试者的 BBB 通透性的方法。这种方法包括向所述受试者施用抑制或阻断 A2A 腺苷受体信号转导的药剂。还公开了与该方法相关的组合物。

1. 一种增强受试者的血脑屏障通透性的方法,所述方法包括向所述受试者施用激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述血脑屏障通透性的增强持续长达 18 小时。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述激活 A₁ 和 A2A 腺苷受体的药剂为 A1 和 A2A 受体的激动剂。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂为广谱腺苷受体激动剂。
5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激动剂为 AMP579。
6. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激动剂为 NECA。
7. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激活对血脑屏障通透性起协同作用。
8. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激活对血脑屏障通透性起相加作用。
9. 一种增强受试者的血脑屏障通透性的方法,所述方法包括向所述受试者施用 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 受体激动剂为 A1 选择性和 A2 选择性腺苷受体激动剂。
11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中将所述 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 受体激动剂配制成单一单位剂型。
12. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 受体激动剂同时施用。
13. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 受体激动剂依次施用。
14. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述 A1 选择性腺苷受体激动剂选自 CCPA、8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤、R-苯基异丙基-腺苷、N6-环戊基腺苷、N(6)-环己基腺苷及其组合。
15. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述 A2A 选择性腺苷受体激动剂选自 Lexiscan、CGS21680、ATL-146e、YT-146(2-(1-辛炔基)腺苷)、DPMA(N6-(2-(3,5-二甲氧基苯基)-2-(2-甲基苯基)乙基)腺苷)及其组合。
16. 一种包含 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂及药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物的组合物。
17. 根据权利要求 16 所述的组合物,其中所述 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 受体激动剂为 A1 选择性和 A2 选择性腺苷受体激动剂。
18. 根据权利要求 16 所述的组合物,其进一步包含治疗剂。
19. 根据权利要求 18 所述的组合物,其中所述治疗剂适合治疗 CNS 疾病、病症或病状。
20. 根据权利要求 19 所述的组合物,其中所述治疗剂选自醋氨酚、乙酰水杨酸、酰基转移酶、阿普唑仑、金刚烷胺、阿米舒必利、阿密曲替林、安非他明-右旋安非他明、安吡啶、抗精神病药、抗病毒药、阿朴吗啡、阿莫氯醇、阿立哌唑、阿塞那平、天冬酰转移酶、托莫西汀、非典型抗精神病药、硫唑嘌呤、巴氯芬、苄氯丙酰胺、苄丝肼、苄丝肼-左旋多巴、苯二氮

卓、苯托品、贝伐单抗、博来霉素、布瓦西坦、溴隐亭、丁丙诺啡、安非他酮、卡麦角林、卡马西平、卡巴唑、卡比多巴、卡比多巴-左旋多巴、卡铂、苯丁酸氮芥、氯丙嗪、氯普噻吨、顺铂、西酞普兰、氯巴占、氯丙咪嗪、氯硝安定、氯氮平、可待因、COX-2 抑制剂、环磷酰胺、放射菌素 D、右哌甲酯、右旋安非他明、海洛因、地西洋、安定、双氯芬酸、多奈哌齐、阿霉素、氟哌利多、恩他卡朋、表柔比星、艾司西酞普兰、乙琥胺、依托泊苷、非氨酯、氟西汀、氟哌噻吨、氟奋乃静、磷苯妥英、加巴喷丁、加兰他敏、 γ -羟基丁酸酯、吉非替尼、氟哌啶醇、乙内酰脲、氢可酮、羟嗪、布洛芬、异环磷酰胺、IGF-1、伊潘立酮、伊马替尼、丙咪嗪、干扰素、伊立替康、KNS-760704、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、左旋多巴、左美丙嗪、赖氨酸安非他命、麦角乙脲、碳酸锂、解酯酶、氮芥、mGluR2 激动剂、美金刚、哌替啶、巯基嘌呤、美索达嗪、甲琥胺、甲基苯丙胺、哌醋甲酯、米诺环素、莫达非尼、吗啡、N-乙酰半胱氨酸、萘普生、奈非那韦、卡巴番定、硝基安定、NSAID、奥氮平、鸦片剂、奥司他韦、奥沙利铂、帕利哌酮、泛酸激酶 2、帕金、帕罗西汀、培高利特、哌氰嗪、奋乃静、苯乙酰胺、苯乙肼、苯巴比妥、phenturide、苯妥英、匹莫齐特、Pink1、吡贝地尔、鬼臼毒素、普拉克索、普瑞巴林、扑米酮、丙氯拉嗪、丙嗪、异丙嗪、普罗替林、嘧啶二酮、奎硫平、雷沙吉兰、立马醋胺、利鲁唑、利培酮、利托那韦、利妥昔单抗、卡巴拉汀、罗匹尼罗、罗替戈汀、卢非酰胺、选择性血清素再吸收抑制剂 (SSRI)、司立吉林、司来吉兰、舍吲啶、舍曲林、丙戊酸钠、司替戊醇、紫杉烷、替马西洋、替莫唑胺、替诺福韦、四苯喹嗪、硫胺、甲硫哒嗪、氨砒噻吨、噻加宾、托卡朋、托吡酯、拓扑替康、曲马多、反苯环丙胺、曲妥珠单抗、三环抗抑郁药、三氟啦嗪、三氟丙嗪、苯海索、奥卡西平、伐昔洛韦、戊诺酰胺、丙戊酰胺、丙戊酸、文拉法辛、水泡性口腔炎病毒、氨基烯酸、长春花生物碱、扎那米韦、齐拉西酮、唑尼沙胺、佐替平、珠氯噻醇及其组合。

21. 一种将大分子治疗剂递送至受试者脑的方法，所述方法包括向所述受试者施用：
(a) 激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂；和 (b) 所述大分子治疗剂。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂在所述大分子治疗剂之前施用。

23. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂与所述大分子治疗剂同时施用。

24. 根据权利要求 21 所述的方法，其中在施用所述大分子治疗剂前长达 5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时或 18 小时施用所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂。

25. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述大分子治疗剂为单克隆抗体。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述大分子治疗剂为选自以下的单克隆抗体：
6E10、PF-04360365、131I-chTNT-1/B MAb、131I-L19SIP、177Lu-J591、ABT-874、A IN 457、阿仑单抗、抗 PDGFR α 单克隆抗体 IMC-3G3、破 At211 单克隆抗体 81C6、巴皮纽阻单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、西妥木单抗、达利珠单抗、Hu MiK- β -1、HuMax-EGFr、碘 I131 单克隆抗体 3F8、碘 I131 单克隆抗体 81C6、碘 I131 单克隆抗体 8H9、碘 I131 单克隆抗体 TNT-1/B、LMB-7 免疫毒素、MAb-425、MGAWN1、Me1-14F(ab')₂、M-T412、那他珠单抗、Neuradiab、尼妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、雷莫芦单抗、雷珠单抗、SDZ MSL-109、苏兰珠单抗、曲妥珠单抗、优斯它单抗、扎鲁木单抗、他尼珠单抗、阿柏西普、MEDI-578、REGN475、莫罗莫那-CD3、

阿比昔单抗、利妥昔单抗、巴利昔单抗、帕利珠单抗、英夫利昔单抗、吉妥珠单抗奥唑米星、替伊莫单抗、阿达木单抗、奥玛珠单抗、托西莫单抗、托西莫单抗-I131、依法珠单抗、阿昔单抗、赛妥珠单抗、依库丽单抗、AMG-162、扎木单抗、MDX-010、抗 OMRSAmAb、培克珠单抗、美泊利单抗、依帕珠单抗、抗 RSV mAb、阿非莫单抗、卡妥索单抗、WX-G250 及其组合。

27. 根据权利要求 21 至 26 中任一项所述的方法,其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂的施用和所述大分子治疗剂的施用为全身施用。

28. 根据权利要求 21 至 26 中任一项所述的方法,其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂的施用或所述大分子治疗剂的施用为全身施用。

29. 一种治疗受试者的 CNS 疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用 (a) 至少一种激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂;和 (b) 治疗剂。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂为 A1 和 A2A 受体的激动剂。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂为广谱腺苷受体激动剂。

32. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激动剂为 AMP579。

33. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激动剂为 NECA。

34. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述治疗剂为大分子治疗剂。

35. 根据权利要求 34 所述的方法,其中所述大分子治疗剂为单克隆抗体。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中所述单克隆抗体选自 6E10、PF-04360365、131I-chTNT-1/B MAb、131I-L19SIP、177Lu-J591、ABT-874、A I N 457、阿仑单抗、抗 PDGFR α 单克隆抗体 IMC-3G3、破 At211 单克隆抗体 81C6、巴皮组阻单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、西妥木单抗、达利珠单抗、Hu MiK- β -1、HuMax-EGFr、碘 I131 单克隆抗体 3F8、碘 I131 单克隆抗体 81C6、碘 I131 单克隆抗体 8H9、碘 I131 单克隆抗体 TNT-1/B、LMB-7 免疫毒素、MAb-425、MGAWN1、Me1-14F(ab')₂、M-T412、那他珠单抗、Neuradiab、尼妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、雷莫芦单抗、雷珠单抗、SDZ MSL-109、苏兰珠单抗、曲妥珠单抗、优斯它单抗、扎鲁木单抗、他尼珠单抗、阿柏西普、MEDI-578、REGN475、莫罗莫那-CD3、阿比昔单抗、利妥昔单抗、巴利昔单抗、帕利珠单抗、英夫利昔单抗、吉妥珠单抗奥唑米星、替伊莫单抗、阿达木单抗、奥玛珠单抗、托西莫单抗、托西莫单抗-I131、依法珠单抗、阿昔单抗、赛妥珠单抗、依库丽单抗、AMG-162、扎木单抗、MDX-010、抗 OMRSA mAb、培克珠单抗、美泊利单抗、依帕珠单抗、抗 RSV mAb、阿非莫单抗、卡妥索单抗、WX-G250 及其组合。

37. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述治疗剂为小分子治疗剂。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述小分子治疗剂选自醋氨酚、乙酰水杨酸、酰基转移酶、阿普唑仑、金刚烷胺、阿米舒必利、阿密曲替林、安非他明-右旋安非他明、安吡啶、抗精神病药、抗病毒药、阿朴吗啡、阿莫氯醇、阿立哌唑、阿塞那平、天冬酰转移酶、托莫西汀、非典型抗精神病药、硫唑嘌呤、巴氯芬、苄氯丙酰胺、苄丝肼、苄丝肼-左旋多巴、苯二氮卓、苯托品、贝伐单抗、博来霉素、布瓦西坦、溴隐亭、丁丙诺啡、安非他酮、卡麦角林、卡马西平、卡巴唑、卡比多巴、卡比多巴-左旋多巴、卡铂、苯丁酸氮芥、氯丙嗪、氯普噻吨、顺铂、西酞普兰、氯巴占、氯丙咪嗪、氯硝安定、氯氮平、可待因、COX-2 抑制剂、环磷酰胺、放射菌素 D、右哌甲酯、右旋安非他明、海洛因、地西洋、安定、双氯芬酸、多奈哌齐、阿霉素、氟哌

利多、恩他卡朋、表柔比星、艾司西酞普兰、乙琥胺、依托泊苷、非氨酯、氟西汀、氟哌噻吨、氟奋乃静、磷苯妥英、加巴喷丁、加兰他敏、 γ -羟基丁酸酯、吉非替尼、氟哌啶醇、乙内酰胺、氢可酮、羟嗪、布洛芬、异环磷酰胺、IGF-1、伊潘立酮、伊马替尼、丙咪嗪、干扰素、伊立替康、KNS-760704、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、左旋多巴、左美丙嗪、赖氨酸安非他命、麦角乙胺、碳酸锂、解酯酶、氮芥、mGluR2 激动剂、美金刚、哌替啶、巯基嘌呤、美索达嗪、甲琥胺、甲基苯丙胺、哌醋甲酯、米诺环素、莫达非尼、吗啡、N-乙酰半胱氨酸、萘普生、奈非那韦、卡巴番定、硝基安定、NSAID、奥氮平、鸦片剂、奥司他韦、奥沙利铂、帕利哌酮、泛酸激酶 2、帕金、帕罗西汀、培高利特、哌氰嗪、奋乃静、苯乙酰胺、苯乙肼、苯巴比妥、phenturide、苯妥英、匹莫齐特、Pink1、吡贝地尔、鬼臼毒素、普拉克索、普瑞巴林、扑米酮、丙氯拉嗪、丙嗪、异丙嗪、普罗替林、嘧啶二酮、奎硫平、雷沙吉兰、立马醋胺、利鲁唑、利培酮、利托那韦、利妥昔单抗、卡巴拉汀、罗匹尼罗、罗替戈汀、卢非酰胺、选择性血清素再吸收抑制剂 (SSRI)、司立吉林、司来吉兰、舍吲哚、舍曲林、丙戊酸钠、司替戊醇、紫杉烷、替马西洋、替莫唑胺、替诺福韦、四苯喹嗪、硫胺、甲硫哒嗪、氨矾噻吨、噻加宾、托卡朋、托吡酯、拓扑替康、曲马多、反苯环丙胺、曲妥珠单抗、三环抗抑郁药、三氟啦嗪、三氟丙嗪、苯海索、奥卡西平、伐昔洛韦、戊诺酰胺、丙戊酰胺、丙戊酸、文拉法辛、水泡性口腔炎病毒、氨基烯酸、长春花生物碱、扎那米韦、齐拉西酮、唑尼沙胺、佐替平、珠氯噻醇及其组合。

39. 根据权利要求 29 至 38 中任一项所述的方法,其中所述 CNS 疾病、病症或病状为代谢病、行为障碍、人格障碍、痴呆、癌症、神经退行性疾病、疼痛、病毒性感染、睡眠障碍、癫痫症、酸性脂肪酶疾病、法布里病、韦尼克-柯萨可夫综合征、ADHD、焦虑性障碍、边缘型人格障碍、双相障碍、抑郁症、进食障碍、强迫性精神障碍、精神分裂症、阿耳茨海默氏病、巴特综合征和图雷特综合征、卡纳万病、哈勒沃登-施帕茨病、亨廷顿氏舞蹈病、路易体症、路格里克氏病、马查多-约瑟夫病、帕金森氏症或下肢不宁综合征。

40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述疼痛为神经性疼痛、中枢性疼痛综合征、驱体痛、内脏痛或头痛。

41. 一种用于治疗受试者 CNS 疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用 (a) A1 选择性腺苷受体激动剂; (b) A2A 选择性受体激动剂; 和 (c) 治疗剂。

42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中将所述 A1 选择性腺苷受体激动剂和 A2A 选择性受体激动剂配制成单一单位剂型。

43. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述 A1 选择性腺苷受体激动剂和 A2A 选择性受体激动剂同时施用。

44. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述 A1 选择性腺苷受体激动剂和 A2A 选择性受体激动剂依次施用。

45. 根据权利要求 41 所述的方法,所述 A1 选择性腺苷受体激动剂选自 CCPA、8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤、R-苯基异丙基-腺苷、N6-环戊基腺苷、N(6)-环己基腺苷及其组合。

46. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述 A2A 选择性受体激动剂选自 Lexiscan、CGS21680、ATL-146e、YT-146(2-(1-辛炔基)腺苷)、DPMA(N6-(2-(3,5-二甲氧基苯基)-2-(2-甲基苯基)乙基)腺苷)及其组合。

47. 根据权利要求 41 所述的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含 A1 腺苷受体激

动剂和 A2A 腺苷受体激动剂及药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物的组合物。

48. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述治疗剂为大分子治疗剂。

49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述大分子治疗剂为单克隆抗体。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,其中所述单克隆抗体选自 6E10、PF-04360365、131I-chTNT-1/B MAb、131I-L19SIP、177Lu-J591、ABT-874、A IN 457、阿仑单抗、抗 PDGFR α 单克隆抗体 IMC-3G3、砒 At211 单克隆抗体 81C6、巴皮组阻单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、西妥木单抗、达利珠单抗、Hu MiK- β -1、HuMax-EGFr、碘 I131 单克隆抗体 3F8、碘 I131 单克隆抗体 81C6、碘 I131 单克隆抗体 8H9、碘 I131 单克隆抗体 TNT-1/B、LMB-7 免疫毒素、MAb-425、MGAWN1、Me1-14F(ab')₂、M-T412、那他珠单抗、Neuradiab、尼妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、雷莫芦单抗、雷珠单抗、SDZ MSL-109、苏兰珠单抗、曲妥珠单抗、优斯它单抗、扎鲁木单抗、他尼珠单抗、阿柏西普、MEDI-578、REGN475、莫罗莫那-CD3、阿比昔单抗、利妥昔单抗、巴利昔单抗、帕利珠单抗、英夫利昔单抗、吉妥珠单抗奥唑米星、替伊莫单抗、阿达木单抗、奥玛珠单抗、托西莫单抗、托西莫单抗-I131、依法珠单抗、阿昔单抗、赛妥珠单抗、依库丽单抗、AMG-162、扎木单抗、MDX-010、抗 OMRSA mAb、培克珠单抗、美泊利单抗、依帕珠单抗、抗 RSV mAb、阿非莫单抗、卡妥索单抗、WX-G250 及其组合。

51. 根据权利要求 41 所述的方法,其中所述治疗剂为小分子治疗剂。

52. 根据权利要求 51 所述的方法,其中所述小分子治疗剂选自醋氨酚、乙酰水杨酸、酰基转移酶、阿普唑仑、金刚烷胺、阿米舒必利、阿密曲替林、安非他明-右旋安非他明、安吡啶、抗精神病药、抗病毒药、阿朴吗啡、阿莫氯醇、阿立哌唑、阿塞那平、天冬酰转移酶、托莫西汀、非典型抗精神病药、硫唑嘌呤、巴氯芬、苄氯丙酰胺、苄丝肼、苄丝肼-左旋多巴、苯二氮卓、苯托品、贝伐单抗、博来霉素、布瓦西坦、溴隐亭、丁丙诺啡、安非他酮、卡麦角林、卡马西平、卡巴唑、卡比多巴、卡比多巴-左旋多巴、卡铂、苯丁酸氮芥、氯丙嗪、氯普噻吨、顺铂、西酞普兰、氯巴占、氯丙咪嗪、氯硝安定、氯氮平、可待因、COX-2 抑制剂、环磷酰胺、放射菌素 D、右哌甲酯、右旋安非他明、海洛因、地西洋、安定、双氯芬酸、多奈哌齐、阿霉素、氟哌利多、恩他卡朋、表柔比星、艾司西酞普兰、乙琥胺、依托泊苷、非氨酯、氟西汀、氟哌噻吨、氟奋乃静、磷苯妥英、加巴喷丁、加兰他敏、 γ -羟基丁酸酯、吉非替尼、氟哌啶醇、乙内酰脲、氢可酮、羟嗪、布洛芬、异环磷酰胺、IGF-1、伊潘立酮、伊马替尼、丙咪嗪、干扰素、伊立替康、KNS-760704、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、左旋多巴、左美丙嗪、赖氨酸安非他命、麦角乙脲、碳酸锂、解酯酶、氮芥、mGluR2 激动剂、美金刚、哌替啶、巯基嘌呤、美索达嗪、甲琥胺、甲基苯丙胺、哌醋甲酯、米诺环素、莫达非尼、吗啡、N-乙酰半胱氨酸、萘普生、奈非那韦、卡巴番定、硝基安定、NSAID、奥氮平、鸦片剂、奥司他韦、奥沙利铂、泛酸激酶 2、帕金、帕罗西汀、培高利特、哌氰嗪、奋乃静、苯乙酰脲、苯乙肼、苯巴比妥、phenturide、苯妥英、匹莫齐特、Pink1、吡贝地尔、鬼臼毒素、普拉克索、普瑞巴林、扑米酮、丙氯拉嗪、丙嗪、异丙嗪、普罗替林、嘧啶二酮、奎硫平、雷沙吉兰、立马醋胺、利鲁唑、利培酮、利托那韦、利妥昔单抗、卡巴拉汀、罗匹尼罗、罗替戈汀、卢非酰胺、选择性血清素再吸收抑制剂 (SSRI)、司立吉林、司来吉兰、舍吡啶、舍曲林、丙戊酸钠、司替戊醇、紫杉烷、替马西洋、替莫唑胺、替诺福韦、四苯喹嗪、硫胺、甲硫哒嗪、氨砒噻吨、噻加宾、托卡朋、托吡酯、拓扑替康、曲马多、反苯环丙胺、曲妥珠单抗、三环抗抑郁药、三氟拉嗪、三氟丙嗪、苯海索、奥卡西平、伐昔洛韦、戊诺酰胺、丙戊酰胺、丙戊酸、文拉法辛、水泡性口腔炎病毒、氨基烯酸、长春花生物碱、扎那米

韦、齐拉西酮、唑尼沙胺、佐替平、珠氯噻醇及其组合。

53. 根据权利要求 41 至 52 中任一项所述的方法,其中所述 CNS 疾病、病症或病状为代谢病、行为障碍、人格障碍、痴呆、癌症、神经退行性疾病、疼痛、病毒性感染、睡眠障碍、癫痫症、酸性脂肪酶疾病、法布里病、韦尼克 - 柯萨可夫综合征、ADHD、焦虑性障碍、边缘型人格障碍、双相障碍、抑郁症、进食障碍、强迫性精神障碍、精神分裂症、阿耳茨海默氏病、巴特综合征和图雷特综合征、卡纳万病、哈勒沃登 - 施帕茨病、亨廷顿氏舞蹈病、路易体症、路格里克氏病、马查多 - 约瑟夫病、帕金森氏症或下肢不宁综合征。

54. 根据权利要求 53 所述的方法,其中所述疼痛为神经性疼痛、中枢性疼痛综合征、驱体痛、内脏痛或头痛。

55. 一种暂时增强受试者的血脑屏障通透性的方法,所述方法包括:

选择需要暂时增强血脑屏障通透性的受试者;

提供激活 A1 或 A2A 腺苷受体的药剂;并且

在有效暂时增强血脑屏障通透性的条件下向所选受试者施用 A1 或 A2A 腺苷受体激活剂。

56. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述 A1 或 A2A 激动剂为 A1 或 A2A 腺苷受体激动剂。

57. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述 A1 或 A2A 激动剂为 A1 选择性或 A2A 选择性腺苷受体激动剂。

58. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用治疗剂。

59. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述治疗剂适合治疗 CNS 疾病、病症或病状。

60. 根据权利要求 59 所述的方法,其中所述 CNS 疾病、病症或病状为代谢病、行为障碍、人格障碍、痴呆、癌症、神经退行性疾病、疼痛、病毒性感染、睡眠障碍、癫痫症、酸性脂肪酶疾病、法布里病、韦尼克 - 柯萨可夫综合征、ADHD、焦虑性障碍、边缘型人格障碍、双相障碍、抑郁症、进食障碍、强迫性精神障碍、精神分裂症、阿耳茨海默氏病、巴特综合征和图雷特综合征、卡纳万病、哈勒沃登 - 施帕茨病、亨廷顿氏舞蹈病、路易体症、路格里克氏病、马查多 - 约瑟夫病、帕金森氏症或下肢不宁综合征。

61. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述治疗用药选自醋氨酚、乙酰水杨酸、酰基转移酶、阿普唑仑、金刚烷胺、阿米舒必利、阿密曲替林、安非他明 - 右旋安非他明、安吡啶、抗精神病药、抗病毒药、阿朴吗啡、阿莫氯醇、阿立哌唑、阿塞那平、天冬酰转移酶、托莫西汀、非典型抗精神病药、硫唑嘌呤、巴氯芬、苄氯丙酰胺、苄丝肼、苄丝肼 - 左旋多巴、苯二氮卓、苯托品、贝伐单抗、博来霉素、布瓦西坦、溴隐亭、丁丙诺啡、安非他酮、卡麦角林、卡马西平、卡巴唑、卡比多巴、卡比多巴 - 左旋多巴、卡铂、苯丁酸氮芥、氯丙嗪、氯普噻吨、顺铂、西酞普兰、氯巴占、氯丙咪嗪、氯硝安定、氯氮平、可待因、COX-2 抑制剂、环磷酰胺、放射菌素 D、右哌甲酯、右旋安非他明、海洛因、地西洋、安定、双氯芬酸、多奈哌齐、阿霉素、氟哌利多、恩他卡朋、表柔比星、艾司西酞普兰、乙琥胺、依托泊苷、非氨酯、氟西汀、氟哌噻吨、氟奋乃静、磷苯妥英、加巴喷丁、加兰他敏、 γ -羟基丁酸酯、吉非替尼、氟哌啶醇、乙内酰脲、氢可酮、羟嗪、布洛芬、异环磷酰胺、IGF-1、伊潘立酮、伊马替尼、丙咪嗪、干扰素、伊立替康、KNS-760704、拉科酰胺、拉莫三嗪、左乙拉西坦、左旋多巴、左美丙嗪、赖氨酸安非他命、麦角

乙脒、碳酸锂、解酯酶、氮芥、mGluR2 激动剂、美金刚、哌替啶、巯基嘌呤、美索达嗪、甲琥胺、甲基苯丙胺、哌醋甲酯、米诺环素、莫达非尼、吗啡、N-乙酰半胱氨酸、萘普生、奈非那韦、卡巴番定、硝基安定、NSAID、奥氮平、鸦片剂、奥司他韦、奥沙利铂、帕利哌酮、泛酸激酶 2、帕金、帕罗西汀、培高利特、哌氰嗪、奋乃静、苯乙酰脒、苯乙肼、苯巴比妥、phenturide、苯妥英、匹莫齐特、Pink1、吡贝地尔、鬼臼毒素、普拉克索、普瑞巴林、扑米酮、丙氯拉嗪、丙嗪、异丙嗪、普罗替林、嘧啶二酮、奎硫平、雷沙吉兰、立马醋胺、利鲁唑、利培酮、利托那韦、利妥昔单抗、卡巴拉汀、罗匹尼罗、罗替戈汀、卢非酰胺、选择性血清素再吸收抑制剂 (SSRI)、司立吉林、司来吉兰、舍吡啶、舍曲林、丙戊酸钠、司替戊醇、紫杉烷、替马西洋、替莫唑胺、替诺福韦、四苯喹嗪、硫胺、甲硫哒嗪、氨磺噻吨、噻加宾、托卡朋、托吡酯、拓扑替康、曲马多、反苯环丙胺、曲妥珠单抗、三环抗抑郁药、三氟拉嗪、三氟丙嗪、苯海索、奥卡西平、伐昔洛韦、戊诺酰胺、丙戊酰胺、丙戊酸、文拉法辛、水泡性口腔炎病毒、氨己烯酸、长春花生物碱、扎那米韦、齐拉西酮、唑尼沙胺、佐替平、珠氯噻醇及其组合。

62. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述治疗用药为大分子治疗用药。

63. 根据权利要求 62 所述的方法,其中所述治疗用药为单克隆抗体。

64. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述单克隆抗体选自 6E10、PF-04360365、131I-chTNT-1/B MAb、131I-L19SIP、177Lu-J591、ABT-874、A I N 457、阿仑单抗、抗 PDGFR α 单克隆抗体 IMC-3G3、破 At211 单克隆抗体 81C6、巴皮组阻单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、西妥木单抗、达利珠单抗、Hu MiK- β -1、HuMax-EGFr、碘 I131 单克隆抗体 3F8、碘 I131 单克隆抗体 81C6、碘 I131 单克隆抗体 8H9、碘 I131 单克隆抗体 TNT-1/B、LMB-7 免疫毒素、MAb-425、MGAWN1、Me1-14F(ab')₂、M-T412、那他珠单抗、Neuradiab、尼妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、雷莫芦单抗、雷珠单抗、SDZ MSL-109、苏兰珠单抗、曲妥珠单抗、优斯它单抗、扎鲁木单抗、他尼珠单抗、阿柏西普、MEDI-578、REGN475、莫罗莫那-CD3、阿比昔单抗、利妥昔单抗、巴利昔单抗、帕利珠单抗、英夫利昔单抗、吉妥珠单抗奥唑米星、替伊莫单抗、阿达木单抗、奥玛珠单抗、托西莫单抗、托西莫单抗-I131、依法珠单抗、阿昔单抗、赛妥珠单抗、依库丽单抗、AMG-162、扎木单抗、MDX-010、抗 OMRSA mAb、培克珠单抗、美泊利单抗、依帕珠单抗、抗 RSV mAb、阿非莫单抗、卡妥索单抗、WX-G250 及其组合。

65. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述 A1 或 A2A 腺苷受体激活剂在所述治疗剂之前施用。

66. 根据权利要求 65 所述的方法,其中在施用所述治疗剂前长达 5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时或 18 小时施用所述 A1 或 A2A 腺苷受体激活剂。

67. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 腺苷受体激活剂与所述治疗剂同时施用。

68. 一种降低受试者的血脑屏障通透性的方法,所述方法包括向所述受试者施用阻断或抑制 A2A 信号转导的药剂。

69. 根据权利要求 68 所述的方法,其中所述阻断或抑制 A2A 信号转导的药剂为 A2A 选择性拮抗剂。

70. 根据权利要求 69 所述的方法,其中所述 A2A 拮抗剂为 SCH58261。

71. 一种重塑血脑屏障内皮细胞的肌动蛋白细胞骨架的方法,所述方法包括使所述内皮细胞与激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂接触。

72. 根据权利要求 71 所述的方法,其中所述肌动蛋白细胞骨架重塑使内皮细胞间的间隙增大并且使血脑屏障通透性增强。

73. 根据权利要求 71 所述的方法,其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂为 A1 和 A2A 受体的激动剂。

74. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂为广谱腺苷受体激动剂。

75. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激动剂为 AMP579。

76. 根据权利要求 74 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激动剂为 NECA。

77. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激活对血脑屏障通透性起协同作用。

78. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述 A1 和 A2A 受体的激活对血脑屏障通透性起相加作用。

腺苷受体信号转导调节血脑屏障通透性的用途

[0001] 本申请要求 2010 年 9 月 16 日提交的美国临时专利申请序列号 61/383,628 的权益,其据此通过引用整体并入。

[0002] 本发明受政府支持,基于国家卫生研究院授予的资助项目 K22A1057854 和 R01NS063011 进行。政府对本发明具有某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及血脑屏障通透性的调节。

[0004] 发明背景

[0005] 本文将进入中枢神经系统 (“CNS”) 的血液的屏障统称为血脑屏障 (“BBB”)。BBB 是覆盖脑中 400 英里毛细血管和血管的非常紧密的内皮细胞层 (Ransohoff 等, “Three or More Routes for Leukocyte Migration Into the Central Nervous System,” *Nature Rev. Immun.* 3:569-581 (2003))。血脑屏障 (BBB) 由形成脑微脉管系统的内腔的脑内皮细胞构成 (见 Abbott 等, “Structure and Function of the Blood-Brain Barrier,” *Neurobiol. Dis.* 37:13-25 (2010))。屏障功能通过内皮细胞之间调节分子和细胞渗入和渗出中枢神经系统 (CNS) 的紧密连接实现 (见 Abbott 等, “Structure and Function of the Blood-Brain Barrier,” *Neurobiol. Dis.* 37:13-25 (2010))。通过约 20 种不同类型的蛋白质交错对叉 (interdigitation) 形成 BBB 细胞之间几乎不可渗透的连接。分子必须通过膜嵌入蛋白转运子 (transporter) 或直接滑过其蜡质外膜进入 BBB。一旦进入,外源化合物必须避开高浓度的代谢酶类和多种已初敏化以除去外源物质的混杂蛋白质泵。避开这些障碍,然后外源分子必须通过 BBB 细胞的内膜以最终到达脑。这些精细的防御使 BBB 将脑与潜在危害隔离,但是 BBB 也妨碍了神经药物向脑内疾病部位的递送。学术界及生物技术和制药业的研究人员正认识到绕过 BBB 或使其让潜在药物进入脑。他们正在设计可被动扩散通过 BBB 或在营养转运子上传播以到达脑内部的小分子药物。其它是设计的附属潜力治疗用药 (attaching potential therapeutic),以致脑将无意地将其吞入。

[0006] 形成脑毛细血管的内皮细胞与在身体其它组织内存在的内皮细胞不同 (Goldstein 等, “The Blood-Brain Barrier,” *Scientific American* 255:74-83 (1986); Pardridge, “Receptor-Mediated Peptide Transport Through the Blood-Brain Barrier,” *Endocrin. Rev.* 7:314-330 (1986))。脑毛细血管内皮细胞通过细胞间紧密连接而连接在一起,形成防止分子从血液被动扩散至脑或 CNS 其它部位的连续壁。这些细胞的不同之处还在于具有较少胞饮小泡,在其它组织中所述胞饮小泡允许一定程度的非选择性转运通过毛细血管壁。在细胞之间还缺乏将允许无限制通过的连续间隙或通道。

[0007] 血脑屏障起作用以确保不断控制脑环境。血液中各种物质,例如激素、氨基酸和离子的水平经历可由例如进食和运动等活动引起的频繁小波动 (Goldstein 等, “The Blood-Brain Barrier,” *Scientific American* 255:74-83 (1986); Pardridge, “Receptor-Mediated Peptide Transport Through the Blood-Brain Barrier,” *Endocrin. Rev.* 7:314-330 (1986))。如果脑不受血脑屏障保护而免受血清组成变

化影响,结果可能是神经活动不受控制。

[0008] 脑与血流的隔离并不完全。如果事实如此,由于缺乏营养并且因为需要与身体其它部位交换化学物质,脑将不能够正确起作用。毛细血管内皮细胞中特定转运系统的存在确保了脑以受控方式接收正常生长和功能所需的所有化合物。在许多情况下,这些转运系统由选择性结合并转运某些分子穿过屏障膜的膜相关蛋白组成。这些转运蛋白称为溶质载体转运子。

[0009] 虽然 BBB 用以限制潜在有毒物质进入 CNS,但是其对治疗性药物向 CNS 的递送造成巨大障碍。据估计,超过 98% 的尺寸小于 500Da 的小分子药物未穿过 BBB (见 Pardridge, "Brain Drug Targeting: the Future of Brain Drug Development," Cambridge University Press, Cambridge, UK. (2001) 和 Pardridge, "The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development," *NeuroRx* 2:3-14 (2005))。旨在改变 BBB 以允许治疗用药进入的当前方法具极大创伤性、痛苦,可导致永久性脑损伤或导致药物失效 (见 Broadwell 等, "Morphologic Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Blood-Brain Barrier," *Science* 217:164-6 (1982); Hanig 等, "Ethanol Enhancement of Blood-Brain Barrier Permeability to Catecholamines in Chick," *Eur. J. Pharmacol.* 18:79-82 (1972); Rapoport, "Advances in Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier to Enhance CNS Chemotherapy," *Expert Opin. Investig. Drugs* 10:1809-18 (2001); Bidros 等, "Novel Drug Delivery Strategies in Neuro-Oncology," *Neurotherapeutics* 6:539-46 (2009); 和 Hynynen, "MRI-guided Focused Ultrasound Treatments," *Ultrasonics* 50:221-9 (2010))。

[0010] 目前 CNS 药物递送的方案分为三大类:化学或物理 BBB 破坏和药物修饰 (Pardridge, "The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development," *NeuroRx* 2:3-14 (2005))。化学破坏 BBB 的方法不同。高渗甘露糖醇使脑内皮细胞渗透性收缩,从而增强 BBB 通透性并促进化疗药物的 CNS 递送 (Neuwelt 等, "Osmotic Blood-brain Barrier Disruption: A New Means of Increasing Chemotherapeutic Agent Delivery," *Trans Am. Neurol. Assoc.* 104:256-260 (1979))。然而,已经证明,这种方法带有诱导癫痫发作的风险 (Neuwelt 等, "Osmotic Blood-brain Barrier Modification: Clinical Documentation by Enhanced CT Scanning and/or Radionuclide Brain Scanning," *Am. J. Roentgenol.* 141:829-835 (1983); Marchi 等, "Seizure-promoting Effect of Blood-brain Barrier Disruption," *Epilepsia* 48:732-742 (2007))。证实血管活性肽缓激肽的类似物增强了血瘤屏障的通透性 (Raymond 等, "Pharmacological Modification of Bradykinin Induced Breakdown of the Blood-brain Barrier," *Can. J. Neurol. Sci.* 13:214-220 (1986)), 并且一定程度上增强了 BBB 的通透性 (Borlongan & Emerich, "Facilitation of Drug Entry into the CNS via Transient Permeation of Blood Brain Barrier: Laboratory and Preliminary Clinical Evidence from Bradykinin Receptor Agonist," *Cereport, Brain Res. Bull.* 60:297-306 (2003)), 并且在大鼠模型中对增强亲水性,但非亲脂性药物向某些 CNS 神经胶质瘤的递送适度有效 (Bartus 等, "Permeability of the Blood Brain Barrier by the Bradykinin Agonist, RMP-7: Evidence for a Sensitive, Auto-regulated, Receptor-mediated System," *Immunopharmacology* 33:2

70-278(1996);Elliott 等, "Intravenous RMP-7 Selectively Increases Uptake of Carboplatin into Rat Brain Tumors," *Cancer Res* 56:3998-4005(1996); Matsukado 等, "Enhanced Tumor Uptake of Carboplatin and Survival in Glioma-Bearing Rats by Intracarotid Infusion of Bradykinin Analog, RMP-7," *Neurosurgery* 39:125-133, 讨论 133-124(1996); Emerich 等, "Enhanced Delivery of Carboplatin into Brain Tumours with Intravenous Cereport (RMP-7): Dramatic Differences and Insight Gained from Dosing Parameters," *Br. J. Cancer* 80:964-970(1999)。然而,可能由于大鼠模型和人患者之间的差异,血管活性肽缓激肽在临床试验中失败 (Prados 等, "A randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 2 Study of RMP-7 in Combination with Carboplatin Administered Intravenously for the Treatment of Recurrent Malignant Glioma," *Neuro. Oncol.* 5:96-103(2003))。

[0011] 物理性破坏屏障是绕过功能性 BBB 最古老且最具创伤性的方法。直接注射至脑,特别是脑室,已经用于递送治疗用药至 CNS 多年 (Cook 等, "Intracerebroventricular Administration of Drugs," *Pharmacotherapy* 29:832-845(2009))。最近,已经研发了使用压缩波强有力地推动治疗性化合物通过 BBB 的高强度聚焦超声技术 (Bradley, "MR-guided Focused Ultrasound: A Potentially Disruptive Technology," *J. Am. Coll. Radiol.* 6:510-513(2009))。尽管如此,物理性破坏 BBB 仍具有创伤性。

[0012] 有时可修饰未穿过 BBB 的药物以使其穿过。添加增强药物亲脂性的部分可增大其穿过 BBB 的可能性,但是这些添加也致使药物更能够进入所有细胞类型 (Witt 等, *Peptide Drug Modifications to Enhance Bioavailability and Blood-brain Barrier Permeability*, "Peptides" 22:2329-2343(2001))。情况也可能是这样,化学添加本身显著增大了药物的尺寸,这抵消了更高亲脂性 (Witt 等, *Peptide Drug Modifications to Enhance Bioavailability and Blood-brain Barrier Permeability*, "Peptides" 22:2329-2343(2001))。另一种方法包括所谓的“基于载体的”技术,其中药物附着于已知通过受体介导的胞吞作用进入 CNS 的化合物。例如,神经生长因子 (NGF) 与单克隆抗体和 BEC 上表达的转铁蛋白受体的结合大大增强了 NGF 向大鼠脑的递送 (Granholm 等, "NGF and Anti-transferrin Receptor Antibody Conjugate: Short and Long-term Effects on Survival of Cholinergic Neurons in Intraocular Septal Transplants," *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:448-459(1994))。基于载体的递送技术有两大缺点: 1) BBB 转运能力受受体表达限制和 2) 在 BBB 内皮中胞吞事件受限制,这是其生理学特点。

[0013] 非常需要调节 BBB 以促进治疗性药物进入 CNS。确定如何安全且有效地进行可影响各种各样的神经疾病,例如阿耳茨海默氏病 (AD)、帕金森氏症、多发性硬化、获得性免疫缺陷症 (AIDS) 的神经表现、CNS 肿瘤等。有希望的疗法可用于治疗这些病症中的一些,但是由于 BBB 造成的巨大障碍,其潜力不能完全实现。因此,本领域需要提高化合物向 CNS 中递送的方法。

[0014] 另外,患有水肿、脑外伤、中风和多发性硬化的患者表现出靠近原发性损伤部位的 BBB 破裂。破裂水平可对这些疾病的临床结果有深远影响。例如,患有多发性硬化 (MS) 的患者的 BBB 破裂程度与疾病的严重程度相关。已使用磁共振成像 (MRI) 证实,当人受 MS“攻击”时,在脑或脊髓的一个部分中血脑屏障已经破裂,使称为 T 淋巴细胞的白细胞穿过并破

坏髓磷脂。

[0015] 尽管这种屏障很重要,但是对控制 BBB 完整性和 / 或通透性的分子机制的了解很少。因此,仍然对利于此类研究的组合物和方法并且尤其对诊断和 / 或治疗性应用有相当大的需要。

[0016] 本发明旨在克服本领域的这些和其它不足。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明涉及一种增强受试者的血脑屏障通透性的方法。这种方法包括向所述受试者施用激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂。

[0019] 本发明还涉及一种增强受试者的血脑屏障通透性的方法。这种方法包括向所述受试者施用 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂。

[0020] 本发明进一步涉及一种组合物。所述组合物包括 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂及药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

[0021] 本发明还涉及一种将大分子治疗剂递送至受试者脑的方法。这种方法包括向受试者施用激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂和大分子治疗剂。

[0022] 本发明还涉及一种治疗受试者的 CNS 疾病、病症或病状的方法。这种方法包括向受试者施用至少一种激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂和治疗剂。

[0023] 本发明还涉及一种治疗受试者的 CNS 疾病、病症或病状的方法。这种方法包括向受试者施用 A1 腺苷受体激动剂、A2A 受体激动剂和治疗剂。

[0024] 本发明进一步涉及一种暂时增强受试者的血脑屏障通透性的方法。所述方法包括选择需要暂时增强血脑屏障通透性的受试者,提供激活 A1 或 A2A 腺苷受体的药剂,并且在有效暂时增强血脑屏障通透性的条件下向所选受试者施用 A1 或 A2A 腺苷受体激动剂。

[0025] 本发明还涉及一种降低受试者的血脑屏障通透性的方法。这种方法包括向所述患者施用阻断或抑制 A2A 信号转导的药剂。

[0026] 本发明还涉及一种重塑血脑屏障内皮细胞的肌动蛋白细胞骨架的方法。这种方法包括使所述内皮细胞与激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂接触。

[0027] 如以下实施例所示,经证明,通过嘌呤核苷腺苷的受体的信号转导充当血脑屏障通透性的有效内源调节因子。这些发现表明,腺苷受体 (“AR”) 信号转导代表控制 BBB 通透性的新型内源机制和现有 CNS 药物递送技术的潜在有用替代方案。增强 BBB 通透性并促进大分子 (如葡聚糖) 进入 CNS 的药物如 Lexiscan, FDA 批准的 A2A AR 激动剂,代表在人类中未来治疗性应用的可能途径。重要的是,本发现表明,这种技术可用于传统上限制其用于治疗神经病的大分子治疗用药 (如抗体) 的 CNS 递送,因为它们需要创伤性递送技术 (Thakker 等, “Intracerebroventricular Amyloid-beta Antibodies Reduce Cerebral Amyloid Angiopathy and Associated Micro-hemorrhages in Aged Tg2576Mice,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA106:4501-6 (2009), 其据此通过引用整体并入)。此处描述的结果代表现有 CNS 药物递送范例的有希望的新型替代方案。

[0028] 本发明的方法和药剂提供了对患有影响血脑屏障的病症的受试者的改进治疗。另外,本发明提供了控制血脑屏障以增强此类患者的治疗处理的改进方法。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 示出证明 cd73^{-/-} 小鼠对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (“EAE”) 有抵抗力的曲线

图。诱导 EAE, 每天监测疾病活动度, 并且计算 $cd73^{-/-}$ (空心菱形, $n=11$) 和野生型 ($cd73^{+/+}$) (实心正方形, $n=13$) 小鼠的平均 EAE 得分。所示结果代表 11 次单独实验。

[0031] 图 2A-2D 示出 $cd73^{-/-}$ T 细胞产生升高水平的 IL-1 β 和 IL-17 并且当转移至 $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠体内时介导了 EAE 易感性。图 2A 示出在来自首次接受实验的小鼠和 EAE 诱导后第 13 天的 $cd73^{-/-}$ 小鼠及野生型小鼠的脾细胞上测量的 CD4 和 FoxP3 表达。图 2B 示出通过流式细胞术分析来自首次接受实验的和 MOG 免疫后第 13 天的野生型小鼠的脾细胞的 CD4 和 CD73 细胞表面表达。图 2C 示出与 1×10^4 个经辐射脾细胞和 0 或 10μ M MOG 肽一起培养的来自免疫野生型或 $cd73^{-/-}$ 小鼠的分选细胞。在第 18 小时取上清液并进行细胞因子 Bio-plex 测定。结果表示在 0 和 10μ M MOG 肽组之间细胞因子水平的倍数变化。将来自 4 只小鼠的样本混合并且代表 3 次相似实验之一。图 2D 示出来自经 MOG 免疫的 $cd73^{-/-}$ (空心菱形, $n=5$) 或野生型 (实心正方形, $n=5$) 小鼠的脾脏和淋巴结的 CD4 $^{+}$ T 细胞, 其过继转移至 T 细胞缺陷型 $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠体内。诱导 EAE 并每天监测疾病进展。结果代表 2 次单独实验。

[0032] 图 3A-3L 示出在 EAE 诱导后显示出很少或无 CNS 淋巴细胞浸润的 $cd73^{-/-}$ 小鼠; 在 EAE 诱导后, 供体 $cd73^{-/-}$ T 细胞浸润 $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ 受体小鼠的 CNS。用 CD4 抗体标记来自 EAE 诱导后第 13 天的野生型 (图 3A-3C) 和 $cd73^{-/-}$ (图 3D-3F) 小鼠的冰冻组织切片。图 3G 为示出来自 EAE 诱导后第 13 天的野生型和 $cd73^{-/-}$ 小鼠的冰冻组织切片中脑和脊髓每个区域中量化的 CD4 $^{+}$ 浸润淋巴细胞的平均数量的条形图。在 $10 \times$ 放大倍数下, 分析每只小鼠每个解剖学上类似的 8 个区域和每条脊髓的 4 个区域 ($n=5$ 只小鼠 / 组)。误差线表示标准平均误差。图 3H-3L 示出用来自 EAE 诱导的 $tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠的 CD4 抗体标记的海马 (图 3H、3I 和 3K) 和小脑 (图 3J 和 3L) 的冰冻组织切片, 所述 EAE 诱导的 $tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠接受了来自在 EAE 诱导后第 12 天 (图 3K)、第 18 天 (图 3H 和 3L) 或第 22 天 (图 3I 和 3J) 野生型 (图 3H-J) 或 $cd73^{-/-}$ (图 3K-3L) 小鼠的 CD4 $^{+}$ 细胞。在苏木精染色的核背景 (蓝色) 下用 HRP 抗大鼠 Ig+AEC (红色) 检测免疫反应性。箭头指示淋巴细胞浸润的部位。比例尺表示 500μ m。

[0033] 图 4A-4K 示出在 EAE 诱导后显示出很少或无 CNS 淋巴细胞浸润的 $cd73^{-/-}$ 小鼠; 在转移至 $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠体内和 EAE 诱导后, $cd73^{-/-}$ T 细胞浸润 CNS。用 CD45 抗体标记来自 EAE 诱导后第 13 天的野生型 (图 4A-4C) 和 $cd73^{-/-}$ (图 4D-4F) 小鼠的冰冻组织切片。用来自 EAE 诱导的 $tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠的 CD45 抗体标记的海马 (图 4G、4H 和 4J) 和小脑 (图 4I 和 4K) 的冰冻组织切片, 所述 EAE 诱导的 $tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠接受了来自在 EAE 诱导后第 12 天 (图 4J)、第 18 天 (图 4G 和 4K) 或第 22 天 (图 4H 和 4I) 的野生型 (图 4G-4I) 或 $cd73^{-/-}$ (图 4J-4K) 小鼠的 CD4 $^{+}$ 细胞。在苏木精染色的核背景 (蓝色) 下用 HRP 抗大鼠 Ig+AEC (红色) 检测免疫反应性。箭头指示淋巴细胞浸润的部位。比例尺表示 500μ m。

[0034] 图 5A-5C 示出 EAE 诱导后髓磷脂特异性 T 细胞并未有效进入 $cd73^{-/-}$ 小鼠的脑。从经 MOG₃₅₋₅₅ 免疫的转基因 2d2 小鼠的脾脏和淋巴结分离表达对 MOG₃₅₋₅₅ 特异的 TCR 的 V β 11 $^{+}$ T 细胞并过继转移至野生型或伴有 EAE 诱导的 $cd73^{-/-}$ 小鼠体内。在转移和 EAE 诱导后第 1、3、8 和 15 天, 摘除脾脏 (图 5A)、淋巴结 (图 5B) 和脑 (图 5C) 并收获细胞。通过流式细胞术分析细胞的 CD45 和 V β 11 表达。数据表示在指定的每一天, 每个器官的 CD45 $^{+}$ 群中 V β 11 $^{+}$ 细胞百分比的相对倍数变化 (RFC)。将值归一化为在转移 /EAE 诱导后第 1 天, 每个器官中

存在的细胞百分比,基准值等于 1.0。

[0035] 图 6A-6D 示出从野生型小鼠过继转移的 CD73⁺T 细胞可赋予 cd73^{-/-} 小鼠 EAE 易感性。图 6A 示出,富集来自经 MOG 免疫的野生型小鼠的脾脏和淋巴结的 CD4⁺T 细胞并且过继转移至野生型(实心正方形, n=5) 或 cd73^{-/-}(空心菱形, n=5) 小鼠体内,接着伴有 EAE 诱导。示出了来自 2 次独立实验之一的结果。图 6B 显示,基于 CD4 和 CD73 表达分选来自先前免疫的野生型和 cd73^{-/-} 小鼠的脾脏和淋巴结的 T 细胞并过继转移至 cd73^{-/-} 小鼠体内,接着伴有 EAE 诱导 (n=5 只/组)。实心正方形表示来自野生型小鼠的表达 CD73 的供体细胞;空心正方形表示来自野生型小鼠的缺乏 CD73 表达的供体细胞;空心菱形表示来自 cd73^{-/-} 小鼠的供体细胞。图 6C-6D 示出,用 CD73(图 6C) 或 CD45(图 6D) 特异性抗体对来自首次接受实验的野生型(图 6C,左侧) 和 cd73^{-/-}(图 6C,右侧) 小鼠和 EAE 诱导后第 12 天的野生型小鼠(图 6D) 的 CNS 脉络丛的冰冻组织切片进行染色。在苏木精染色的核背景(蓝色) 下用 HRP 抗大鼠 Ig+AEC(红色) 检测免疫反应性。括号指示 CD73 染色。箭头指示 CD45 淋巴细胞染色。比例尺表示 500 μm。

[0036] 图 7A-7D 示出腺苷受体阻滞保护小鼠免于 EAE 发展。图 7A 示出了平均 EAE 得分,其中诱导 EAE,每天监测疾病活动度,并且对饲喂了单独的饮用水(封闭图形) 或补充有 0.6g/ml 广谱腺苷受体拮抗剂咖啡因的饮用水(开放图形) 的野生型(正方形) 和 cd73^{-/-}(菱形) 小鼠计算平均 EAE 得分。结果来自一次实验 (n=5 只小鼠/组)。图 7B 示出了在 Z310 鼠脉络丛细胞系中相对于 GAPDH 管家基因的腺苷受体 mRNA 表达水平。样本一式三份;误差线表示标准平均误差。图 7C 示出了在 EAE 诱导前 1 天和 EAE 诱导后的每天直至第 30 天,用 2mg/kg(1mg/kg 皮下和 1mg/kg 腹腔内) 于 45%DMSO 中的 A2A 腺苷受体拮抗剂 SCH58261(实心正方形, n=4 只小鼠/组) 或单独的 45%DMSO(空心正方形, n=5 只小鼠/组) 处理小鼠后的结果。这些结果代表 2 次实验。图 7D 示出了来自 EAE 诱导后第 15 天,经 SCH58261 和 DMSO 处理的小鼠的冰冻组织切片中脑和脊髓每个区域中量化的 CD4⁺ 浸润淋巴细胞的平均数量。在 10× 放大倍数下,分析每只小鼠每个脑解剖学上类似的 8 个区域和每条脊髓的 4 个区域 (n=4 只小鼠)。误差线表示标准平均误差。

[0037] 图 8 示出, A2A 腺苷受体拮抗剂 SCH58261 阻止在 EAE 诱导后脉络丛上的 ICAM-1 上调。在 EAE 诱导前 1 天和 EAE 诱导后的每天直至第 30 天,用 2mg/kg(1mg/kg 皮下给药和 1mg/kg 腹腔内给药) 于 DMSO 中的 A2A 腺苷受体拮抗剂 SCH58261 (n=4 只小鼠/组) 或单独的 DMSO(n=5 只小鼠/组) 处理小鼠。这些结果来自 1 次实验。检查来自 EAE 诱导后第 15 天,经 SCH58261 和 DMSO 处理的小鼠的冰冻组织切片脉络丛上的 ICAM-1 表达。用 DMSO(左侧) 或 SCH58261(右侧) 处理 WT(野生型) 并且为 ICAM-1(红色染色,白色箭头) 和 DAPI(蓝色,细胞核) 染色,40× 放大倍数。图像来自 4 只独立小鼠。

[0038] 图 9A-9B 证明,用 NECA 处理缺乏细胞外腺苷并且因此不能充分通过腺苷受体发射信号的 CD73^{-/-} 小鼠,导致与 PBS 对照相比染料迁移增强将近 5 倍(图 9A)。用 NECA 处理的野生型小鼠也显示出比对照小鼠增强(图 9B)。因为已知百日咳(pertussis) 在小鼠 EAE 模型中诱导血脑屏障渗漏,所以将百日咳作为阳性对照。

[0039] 图 10 示出在人内皮细胞系 hCMEC/D3 上的腺苷受体表达。

[0040] 图 11 示出将 hCMEC/D3 细胞接种至 transwell 膜上并使其生长到融合之后的结果;将 2×10⁶ 个 Jurkat 细胞添加到有或无 NECA(普通腺苷受体 [AR] 激动剂)、CCPA(A1AR

激动剂)、CGS21860(A2A AR 激动剂)或 DMSO 媒介物的上部腔室内;并且在 24 小时后计数迁移的细胞。

[0041] 图 12 示出 transwell 膜接种 Z310 细胞并使其生长到融合之后的结果;将 2×10^6 个 Jurkat 细胞添加到有或无 NECA(n=1, 一般 AR 激动剂)、CCPA(n=1, A1AR 激动剂)、CGS21860(n=1, A2A AR 激动剂)或 DMSO 媒介物(n=1)的上部腔室内;并且在 24h 后计数迁移的细胞。

[0042] 图 13 示出使 hCMEC/D3 细胞在 24 孔板上生长到融合之后的结果;用或不用不同浓度 NECA(一般 AR 激动剂)、CCPA(A1AR 激动剂)、CGS21860(A2A AR 激动剂)、DMSO 媒介物或 Forksolin(诱导 cAMP)处理细胞;15 分钟后添加溶解缓冲液并且将细胞冷冻于 -80°C 以终止反应;并且使用 cAMP 筛选试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA)测定 cAMP 水平。

[0043] 图 14 示出在 12-2-08 用 CFA/MOG₃₅₋₅₅+PTX 使雌性 A1 腺苷受体敲除(A1ARKO, n=5)和野生型(WT, n=5)小鼠免疫并且每天评分持续 41 天的结果。

[0044] 图 15A-15B 示出饲喂了咖啡因的野生型小鼠的脑和来自饲喂了咖啡因的 CD73^{-/-}小鼠的脑,如通过 FITC-葡聚糖外渗通过脑内皮所测量。

[0045] 图 16 以图表的形式示出 FITC-葡聚糖外渗通过用腺苷受体激动剂 NECA 处理的野生型小鼠的血脑屏障的结果,而 SCH58261,腺苷受体拮抗剂抑制 FITC-葡聚糖外渗。

[0046] 图 17 示出在用腺苷受体激动剂 NECA 处理小鼠之后,在 620nm 下用 BioTex 分光光度计测量的伊文思蓝(Evans Blue)染料外渗通过血脑屏障的结果。

[0047] 图 18 以图解形式示出结果,证明聚乙二醇化腺苷脱氨酶(“PEG-ADA”)处理抑制野生型小鼠的 EAE 发展。诱导 EAE,每天监测疾病活动度,并且为每 4 天经腹腔内给予了单独的对照 PBS 媒介物或 15 个单位/kg 体重的 PEG-ADA 的野生型小鼠计算平均 EAE 得分。实心正方形表示给予了 PBS 媒介物的野生型小鼠(n=3);空心正方形表示给予了 PEG-ADA 的野生型小鼠(n=3)。这些结果来自一次实验。这些结果证明腺苷脱氨酶处理和腺苷受体阻滞保护野生型小鼠免受 EAE 诱导。

[0048] 图 19A-19B 为示出如通过荧光分析法测量(10-15 只动物/组),静脉施用 NECA 或媒介物(DMSO/PBS)3h 后,进入野生型小鼠脑的 10,000Da(图 19A)和 70,000Da(图 19B)葡聚糖呈剂量依赖型增加的结果的条形图。图 19A 中的插图为数据点的样条散点图(splined scatter plot)。至少进行两次实验。(*)指示与媒介物的显著差异(学生 T 检验),其中 $P \leq 0.05$ 。数据为平均数 ± 标准误差。这些结果证明,静脉施用的 NECA 增强了对高分子量葡聚糖的 BBB 通透性。

[0049] 图 20A-20B 以图解形式示出了 NECA 介导的 BBB 通透性增强的实验结果。图 20A 左图显示当与 NECA 或媒介物(DMSO/PBS)联合施用,10,000Da FITC-葡聚糖外渗进入野生型小鼠脑。灰色柱 = 媒介物,黑色柱 = NECA。图 20A 右图是在 x-轴上标有时间刻度的样条散点图,其示出如通过荧光分析法所测量(10-15 只动物/组),当与 NECA(0.08mg/kg)或媒介物一起经静脉联合施用,10kDa FITC-葡聚糖外渗进入野生型小鼠脑的时间过程。图 20B 左图示出了在 NECA 或媒介物施用之后的指定时间注射时,70,000Da 德克萨斯红(Texas red)-葡聚糖外渗进入野生型小鼠脑的结果。灰色条 = 媒介物,黑色条 = NECA。图 20B 右图是在 x-轴上标有时间刻度的样条散点图,其示出了如通过荧光分析法所测量(3-5 只动物/

组),用 NECA(0.08mg/kg) 或媒介物经静脉预处理(时间=0)后,在收获时间前 90 分钟(如所示)经静脉施用的 10kDa 德克萨斯红-葡聚糖外渗进入野生型小鼠脑组织的时间过程。至少进行两次实验。(*) 指示与媒介物的显著差异(学生 T 检验),其中 $P \leq 0.05$ 。数据为平均数 \pm 标准误差。图 20A 和 20B 中的插图,左图,是在 x-轴上标有时间刻度的样条散点图;菱形=媒介物,正方形=NECA。这些结果证明,NECA 处理以时间上离散且可逆的方式增强了 BBB 通透性。

[0050] 图 21A-21J 说明示出 BBB 通透性增强取决于 A1 和 A2A 腺苷受体的选择性激动的结果。图 21A 为示出腺苷受体亚型在培养的小鼠脑内皮细胞(“BEC”)(bEnd.3) 上的相对表达的条形图。图 21B 示出免疫荧光染色的图像,并且图 21C 示出在首次接受实验的小鼠的脑皮层区附近 CD31(内皮细胞标记;绿色)与 A1(左侧柱;红色)和 A2A(右侧柱;红色)AR 的荧光原位杂交的图像(比例尺=20 μ m)。图 21D 示出在从首次接受实验的小鼠分离的原代 BEC 中,A1AR(左图)和 A2AAR(右图)表达的蛋白质印迹分析的图像。将 β -肌动蛋白表达示为上样对照。图 21E 和 21F 为条形图,示出如通过荧光分析法所测量,静脉施用 NECA 或媒介物(DMSO/PBS)3h 后,WT 和 A1AR(图 21E)和 A2AAR(图 21F)敲除小鼠体内的 10,000Da FITC-葡聚糖的水平。灰色条=媒介物,黑色条=NECA。图 21G 为条形图,示出与野生型小鼠相比,静脉施用 NECA(0.08mg/kg)或媒介物 3h 后,A1 和 A2A AR 敲除小鼠脑中的葡聚糖水平降低。在用选择性 A2A 拮抗剂 SCH58261 预处理的 A1 敲除小鼠(5-8 只动物/组)的脑中未检测到葡聚糖水平显著升高。还示出如通过荧光分析法所测定,证明经静脉联合施用特异性 A2AAR 激动剂 CGS21860(图 21H 的条形图)或特异性 A1AR 激动剂 CCPA(图 21I 的条形图)3h 后,10,000Da FITC-葡聚糖依赖剂量进入野生型脑组织的数据。图 21J 示出了条形图,说明了经静脉施用媒介物、NECA、CCPA、CGS21680 和组合 3h 后,野生型小鼠脑组织内 10,000Da FITC-葡聚糖的水平,n=3-4 只小鼠/处理组。至少重复两次实验。(*) 指示与媒介物的显著差异(学生 T 检验),其中 $P \leq 0.05$ 。数据为平均数 \pm 标准误差。

[0051] 图 22A-22F 以图解形式示出了结果,证明 A2A 激动剂 Lexiscan 增强了对 10,000Da 葡聚糖的 BBB 通透性。图 22A 以图解形式示出了结果,证明施用 Lexiscan 增强了小鼠的 BBB 通透性。轴中断前的数据条表示接受了 3 次 Lexiscan 注射的组。轴中断后的数据条表示接受了单次 Lexiscan 注射的组。对于接受了 3 次注射的组而言,在首次注射 15 分钟后进行灌注。注射 5 分钟后为接受了单次注射的组灌注(10-15 只动物/组)。注射 15 分钟后为经媒介物处理的小鼠(V)灌注。图 22B 示出 Lexiscan 增强了大鼠的 BBB 通透性。动物接受 3 次 Lexiscan 注射,间隔 5 分钟,并且在首次注射 15 分钟后灌注(3-4 只动物/组)。图 22C 以图解形式示出了大鼠对在第 5 分钟时与 1 μ g Lexiscan 同时施用的 FITC-葡聚糖的 BBB 通透性结果。作为对照参考,动物接受 1 次 NECA 注射,并且在注射 15 分钟后灌注。注射 15 分钟后为经媒介物处理的小鼠(V)灌注。通过学生 T 检验,统计表明与媒介物(*)或与 0.01 μ g Lexiscan(**)的差异显著, $P \leq 0.05$ 。数据为平均数 \pm 标准误差。图 22D 为示出了 Lexiscan 处理后小鼠体内 BBB 通透性时间过程的图表。在时间 0 时施用 Lexiscan(0.05mg/kg)(10-14 只动物/组)。图 22E 为示出了 Lexiscan 处理后大鼠体内 BBB 通透性时间过程的图表。在时间 0 时施用 Lexiscan(0.0005mg/kg)(3-4 只动物/组)。图 22F 显示,经腹腔内施用的 SCH58261 降低了小鼠对 10,000Da FITC-葡聚糖的 BBB 通透性。

所有实验重复至少 2 次。(*) 指示与媒介物的显著差异 (学生 T 检验), $P \leq 0.05$ 。数据为平均数 \pm 标准误差。

[0052] 图 23A-23H 示出在施用 NECA 后在转基因小鼠脑中, 经静脉施用的抗 β -淀粉样蛋白抗体穿过 BBB 并标记 β -淀粉样蛋白斑的结果。图 23A-23D 为靠近转基因 AD (APP/PSEN) 小鼠海马的免疫荧光显微图像。用 NECA (0.08mg/kg) (图 23A 和 23C) 或媒介物 (图 23B 和 23D) 处理小鼠并且经静脉施用抗 β -淀粉样蛋白抗体 (6E10) (上图: 图 23A 和 23B)。对于未经静脉接受 6E10 抗体的小鼠 (下图: 图 23C 和 23D), 使用 6E10 作为一抗以控制斑块的存在并且在免疫染色期间在活体外涂敷。图 23A 示出转基因 AD (APP/PSEN) 海马的免疫荧光显微图像, 如图 23A-23D 所示, 以及用或未用静脉施用的抗 β -淀粉样蛋白抗体 (Covance6E10) 和用 0.8 μ g 静脉 NECA (左图) 或媒介物 (右图) 处理的野生型小鼠海马的免疫荧光显微图像。在图 23A-23E 中, 蓝色 = DAPI, 并且红色 = 标记经 6E10 标记的 β -淀粉样蛋白斑的 Cy5 抗体 (比例尺 = 50 μ m)。图 23F 和 23G 为来自转基因 AD 小鼠脑的海马和皮质区的免疫荧光显微图像, 其示出了相对于血管的 β -淀粉样蛋白斑位置的概观 (图 23F) 和特写 (图 23G) (内皮细胞 = CD31 染色绿色; β -淀粉样蛋白斑 = 6E10 染色红色; 细胞核 = DAPI 染色蓝色; 比例尺 = 50 μ m)。图 23H 为条形图, 示出用单独 NECA 或媒介物处理的转基因 AD 小鼠的每张小鼠脑切片的 6E10 标记淀粉样蛋白斑的量化。

[0053] 图 24A-24Y 显示腺苷受体信号转导导致 BEC 上的细胞旁而非跨细胞途径变化的结果。图 24A 为示出在培养的小鼠 BEC (Bend. 3) 上腺苷受体亚型的相对基因表达的条形图。图 24B 示出了对培养的小鼠 BEC (Bend. 3) 中 A1 (左图) 和 A2A (右图) AR 表达的蛋白质印迹分析。图 24C 为示出证明 AR 激活降低了小鼠 BEC 单层中的 TEER 的结果的图表。在添加 NECA (1 μ M) 或 Lexiscan (1 μ M) 处理之后观察到跨内皮电阻降低。显示了 Lexiscan (#) 和 NECA (*) 与媒介物的显著差异 (学生 T 检验), 其中 $P \leq 0.05$ 。数据为平均数 \pm 标准误差。图 24D-24G 是与荧光标记的白蛋白和单独的培养基 (图 24D)、媒介物 (图 24E)、NECA (1 μ M) (图 24F) 或 Lexiscan (1 μ M) (图 24G) 培养 30 分钟的 Bend. 3 细胞的图像。通过荧光显微法可见白蛋白吸收 (白蛋白 = 红色; DAPI 染色的细胞核 = 蓝色)。比例尺 = 50 μ m。图 24H 为示出了白蛋白吸收结果的条形图。将白蛋白吸收显示为与单独的培养基对照 (设为 100%) 相比的相对值。数据为平均数 \pm 标准误差 ($n=5$ 个区域/组)。图 24I-24P 为示出在培养的 BEC 中肌动球蛋白应力纤维形成与 AR 激活相关的结果的图像。示出了 Bend. 3 细胞的鬼笔环肽染色并且揭示当与单独的培养基 (图 24I 和 24J) 或媒介物 (图 24K 和 24L) 相比时, 用 CCPA (1 μ M) (图 24M 和 24N) 或 Lexiscan (1 μ M) (图 24O 和 24P) 处理后, 肌动球蛋白应力纤维形成增多。左图 = 3 分钟处理; 右图 = 30 分钟处理。比例尺 = 50 μ m。图 24Q-24Y 为示出证明 AR 激活诱导培养的 BEC 中紧密连接黏附分子变化的结果的图像。示出了用 DMSO (左侧柱)、NECA (1 μ M, 中间柱) 和 Lexiscan (1 μ M, 右侧柱) 处理 1 小时后, Bend. 3 细胞的 ZO-1 (图 24Q-24S)、紧密连接蛋白 -5 (Claudin-5) (图 24T-24V) 和封闭蛋白 (Occludin) (图 24W-24Y) 染色。黏附分子 = 粉红色/红色; DAPI 染色的细胞核 = 蓝色。箭头指示表达离散变化的实例 (比例尺 = 20 μ m)。

[0054] 图 25 为示出腺苷受体信号转导和 BBB 通透性调节模型的示意图, (i) 基础条件有利于紧密屏障, (ii) A1 或 A2A AR 的激活导致 BBB 通透性增强, (iii) A1 和 A2A AR 的激活导致比在单独激活其中任一种受体后观察到的通透性更强, (iv) A2A 受体拮抗作用降低了

BBB 通透性。

[0055] 发明详述

[0056] 腺苷是在缺氧、缺血或炎症条件中产生的代谢窘迫的细胞信号。其主要任务是减少组织损伤并通过不同受体介导的机制促进修复,包括氧气供/求比增加、预处理、抗炎作用和刺激血管生成(Jacobson等,“Adenosine Receptors as Therapeutic Targets,”*Nat. Rev. Drug Discov.* 5:247-264(2006),其据此通过引用整体并入)。

[0057] 最终由特定细胞类型中四种已知腺苷受体(“AR”)亚型的不同受体分布模式和/或亲和力指示腺苷的生物效应。将哺乳动物中四种AR亚型表示为:A1、A2A、A2B和A3(Sebastiao等,“Adenosine Receptors and the Central Nervous System,”*Handb. Exp. Pharmacol.* 471-534(2009),其据此通过引用整体并入)。如今已知腺苷受体是结合细胞外腺苷的内在膜蛋白,从而经由称为G蛋白的特异性鸟嘌呤核苷酸结合蛋白引发跨膜信号以调节多种第二信使系统,包括腺苷酸环化酶、钾通道、钙通道和磷脂酶C。见Stiles,“Adenosine Receptors and Beyond:Molecular Mechanisms of Physiological Regulation,”*Clin. Res.* 38(1):10-18(1990);Stiles,“Adenosine Receptors,”*J. Biol. Chem.* 267:6451-6454(1992),其据此通过引用整体并入。

[0058] 腺苷牵涉于CNS屏障通透性的第一条线索来自证明在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)中,通过CD73(5'-外核苷酸)的催化作用由单磷酸腺苷(AMP)生成的细胞外腺苷促进白细胞进入CNS的最新发现(Mills等,“CD73is Required for Efficient Entry of Lymphocytes Into the Central Nervous System During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis,”*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:9325-30(2008),其据此通过引用整体并入)。这些研究证明,缺乏CD73的小鼠(Thompson等,“Crucial Role for Ecto-5'-nucleotidase(CD73)in Vascular Leakage During Hypoxia,”*J. Exp. Med.* 200:1395-405(2004),其据此通过引用整体并入),不能够生成细胞外腺苷,受到保护而免患EAE并且A_{2A}腺苷受体(AR)的阻滞阻碍了T细胞进入CNS(Mills等,“CD73is Required for Efficient Entry of Lymphocytes Into the Central Nervous System During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis,”*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:9325-30(2008),其据此通过引用整体并入)。此外,在预试实验中,观察到静脉内(i.v.)注射异硫氰酸荧光素(FITC)标记的10,000Da葡聚糖后,与野生型小鼠相比,CD73^{-/-}小鼠在其脑中具有更少的FITC-葡聚糖;,用广谱AR激动剂5'-N-乙酰酰胺基腺苷(NECA)处理导致与野生型小鼠(未示出)相比,这些小鼠体内FITC-葡聚糖外渗显著增多。这些观察产生这样的假设,调节BEC上的腺苷受体信号转导可调节BBB通透性以促进分子进入CNS。如以下实施例中所证明,AR信号转导代表BBB信号转导的新型内源调节因子。

[0059] 如本文令人惊讶地显示,A1和A2A腺苷受体的激活增强了受试者的BBB通透性。具体而言,通过A1或A2A受体作用的腺苷可调节BBB通透性以促进或限制分子进入CNS。BBB通透性的这些变化是剂量依赖性的并且在时间上离散。考虑到腺苷具有相对短的半衰期,约<10秒(Klabunde,“Dipyridamole Inhibition of Adenosine Metabolism in Human Blood,”*Eur. J. Pharmacol.* 93:21-6(1983),其据此通过引用整体并入),其作为生理调节因子的作用很可能限于生成腺苷的局部环境。实际上,具腺苷受体的CD39和CD73在脑内皮细胞上的表达表明这些细胞具有对细胞外ATP(得到确认的损伤信号)反应的能力(Davalos

等, "ATP Mediates Rapid Microglial Response to Local Brain Injury in vivo," *Nat. Neurosci.* 8:752-8(2005) 和 Haynes 等, "The P2Y₁₂ Receptor Regulates Microglial Activation by Extracellular Nucleotides," *Nat. Neurosci.* 9:1512-9(2006), 其据此通过引用整体并入)。BBB 内皮细胞上的腺苷受体信号转导是在使屏障通透性变化成为必需的损伤感受中的关键事件, 并且 BBB 通透性(通过 A₁ 和 A_{2A}AR 介导)起门的作用, 其中激活使门打开, 拮抗使门关闭而局部腺苷浓度是钥匙。缺乏升高水平的细胞外腺苷有利于紧密的限制性屏障。如图 25 示意性显示, A₁ 或 A_{2A} AR 的激活暂时增强了 BBB 通透性, 而两种受体的激活导致 BBB 通透性增强的相加效应。本文显示, 通过 A₁ 和 A_{2A} AR 介导的 BBB 通透性起门的作用, 其中激活使门打开而局部腺苷浓度是钥匙。

[0060] 本发明的一方面涉及一种增强受试者的血脑屏障通透性的方法。这种方法包括向受试者施用激活 A₁ 和 A_{2A} 腺苷受体的药剂。

[0061] 本领域的技术人员将理解, 血液和中枢神经系统之间的屏障由毛细血管的内皮细胞(血脑屏障("BBB"))和将中枢神经系统("CNS")的血液和脑脊髓液("CSF")分开的脉络丛("CP")的上皮细胞构成。这些结构一起发挥 CNS 屏障的作用。

[0062] 在一个实施方案中, 本发明增强 BBB 通透性的方法使 CP 的通透性增强。在另一个实施方案中, 本发明增强 BBB 通透性的方法使 CNS 屏障的通透性增强。

[0063] 在一个实施方案中, 所述方法进一步包括选择需要增强 BBB 通透性的受试者, 提供治疗用药, 并且在治疗用药有效穿过血脑屏障的条件下向所选受试者施用治疗用药和激活 A₁ 和 A_{2A} 腺苷受体的药剂。

[0064] 根据本发明需要增强 BBB 通透性的合适的受试者包括需要治疗用药穿过 BBB 以治疗或预防 CNS 疾病、病症或病状或在 CNS 中表现的疾病、病症或病状(例如, HIV 相关的神经障碍)的任何受试者。

[0065] 应理解, 施用治疗有效量的根据本发明所述的药剂。如本文所使用, 术语“有效量”和“治疗有效量”指, 当向个体施用, 有效治疗、预防、延迟或减轻患者所患病状的严重程度的化合物或组合的量。具体而言, 根据本发明所述的治疗有效量是足以治疗、预防、延迟其发作或另外改善与疾病和 / 或病症的治疗相关的至少一种副作用的量。

[0066] 根据本发明的合适的 A₁ 和 / 或 A_{2A} 腺苷受体激活剂包括对 A₁ 腺苷受体有选择性的激动剂, 对 A_{2A} 腺苷受体有选择性的激动剂, 激活 A₁ 和 A_{2A} 腺苷受体的激动剂, 广谱腺苷激活剂或激动剂及其组合。根据本发明的某些实施方案, 施用 A₁ 选择性激动剂、A_{2A} 选择性激动剂、激活 A₁ 和 A_{2A} 腺苷受体的激动剂和 / 或广谱腺苷激活剂或激动剂的组合。这些药剂可于相同或不同药物制剂中同时施用, 或依次施用。可由熟练从业者确定依次施用的定时。在某些实施方案中, 激动剂组合为单一单位剂型。

[0067] 合适的 A_{2A} 腺苷受体激活剂为本领域众所周知的 A_{2A} 激动剂 (Press 等, "Therapeutic Potential of Adenosine Receptor Antagonists and Agonists," *Expert Opin. Ther. Patents* 17(8):979-991(2007), 其据此通过引用整体并入)。A_{2A} 腺苷受体激动剂的实例包括美国专利号 6, 232, 297 和 Lindin 等的美国公开专利申请号 2003/0186926A1、Zablocki 等的美国公开专利申请号 2005/0054605A1 和 Li 等的美国公开专利申请号 2006/0040888A1、2006/0040889A1、2006/0100169A1 和 2008/0064653A1 中描述的 A_{2A} 腺苷受体激动剂。可如以下描述合成此类化合物: Olsson 等的美国专利号 5, 140, 015 和

5, 278, 150 ;Cristalli 的美国专利号 5, 593, 975 ;Miyasaka 等的美国专利号 4, 956, 345 ; Hutchinson 等, "CGS21680C, an A2 Selective Adenosine Receptor Agonist with Preferential Hypotensive Activity," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 251:47-55 (1989) ; Olsson 等, "N6-Substituted N-alkyl Adenosine-5'-uronamides: Bifunctional Ligands Having Recognition Groups for A1 and A2 Adenosine Receptors," *J. Med. Chem.*, 29:1683-1689 (1986) ; Bridges 等, "N6-[2-(3, 5-dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)ethyl]adenosine and its Uronamide Derivatives: Novel Adenosine Agonists With Both High Affinity and High Selectivity for the Adenosine A2 Receptor," *J. Med. Chem.* 31:1282 (1988) ; Hutchinson 等, *J. Med. Chem.*, 33:1919 (1990) ; Ukeeda 等, "2-Alkoxy Adenosines: Potent and Selective Agonists at the Coronary Artery A2 Adenosine Receptor," *J. Med. Chem.* 34:1334 (1991) ; Francis 等, "Highly Selective Adenosine A2 Receptor Agonists in a Series of N-alkylated 2-amino Adenosines," *J. Med. Chem.* 34:2570-2579 (1991) ; Yoneyama 等, "Vasodepressor Mechanisms of 2-(1-*o*-ctynyl)-Adenosine (YT-146), a Selective Adenosine A2 Receptor Agonist, Involve the Opening of Glibenclamide-sensitive K⁺ Channels," *Eur. J. Pharmacol.* 213(2): 199-204 (1992) ; Peet 等, "Conformationally Restrained, Chiral (phenylisopropyl) amino-substituted pyrazolo[3, 4-d]pyrimidines and Purines with Selectivity for Adenosine A1 and A2 Receptors," *J. Med. Chem.*, 35:3263-3269 (1992) ; 和 Cristalli 等, "2-Alkynyl Derivatives of Adenosine and Adenosine-5'-N-ethyluronamide as Selective Agonists at A2 Adenosine Receptors," *J. Med. Chem.* 35(13):2363-2368 (1992), 其据此通过引用整体并入。美国专利申请公布 2004/0809916 中公开了腺苷 A2A 受体激动剂另外的实例, 该专利申请公布据此通过引用整体并入。特别合适的 A2A 腺苷受体激动剂包括 4-[2-[[6-氨基-9-(N-乙基-b-D-呋喃核糖酰胺基)-9H-嘌呤-2-基]氨基]乙基]苯丙酸 ("CGS21680") 和 Lexiscan 或其组合。这些腺苷 A2A 受体激动剂旨在用于说明而非限制。

[0068] 合适的 A1 腺苷受体激活剂为 A1 腺苷受体激动剂。本领域的技术人员已知 A1 腺苷受体激动剂并且包括 (例如) Zablocki 等的美国专利申请公布号 2005/0054605 和 Press 等, "Therapeutic Potential of Adenosine Receptor Antagonists and Agonists," *Expert Opin. Ther. Patents* 17(8):979-991 (2007) 中描述的 A1 腺苷受体激动剂, 所述参考文献据此通过引用整体并入。合适的 A1 腺苷受体激动剂还包括 (例如) 2-氯-N⁶-环戊基腺苷 ("CCPA")、8-环戊基-1, 3-二丙基黄嘌呤 ("DPCPX")、R-苯基异丙基-腺苷、N6-环戊基腺苷和 N(6)-环己基腺苷或其组合。

[0069] 在一个实施方案中, 激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂为 A1 和 A2A 腺苷受体的激动剂。本领域的技术人员已知激活 A1 和 A2A 腺苷受体的合适的激动剂, 并且包括 (例如) AMP579。在另外的实施方案中, A1 和 A2A 腺苷受体的激动剂可为广谱腺苷受体激动剂。合适的广谱腺苷受体激动剂将为本领域的技术人员所知并且包括 (例如) NECA、腺苷、腺苷衍生物或其组合。

[0070] 根据本发明的一个实施方案, 与激活单独的 A1 腺苷受体或 A2A 腺苷受体时 BBB 通透性的水平相比, 激活 A1 和 A2A 腺苷受体起协同作用。关于这一点, 如果一起激活两种受

体（在指定浓度下）的作用比单独激活每种受体时（在相同浓度下）的作用之和更强，则认为 A1 和 A2A 受体的激活起协同作用。

[0071] 在又一个实施方案中，A1 和 A2A 腺苷受体的激活使 BBB 通透性增强 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 倍或本文涵盖的任何范围的倍数。在一个实施方案中，激活 A1 腺苷受体和 A2A 腺苷受体使 BBB 通透性增强 7-9 倍。

[0072] 根据本发明的某些实施方案，A1 和 A2A 受体的激活起相加作用。关于这一点，如果一起激活两种受体（在指定浓度下）的作用与单独激活每种受体时（在相同浓度下）的作用之和相等，则认为 A1 和 A2A 受体一起激活起相加作用。

[0073] 在根据本发明的一个实施方案中，BBB 通透性的增强持续长达 18 小时。在更多实施方案中，BBB 通透性的增强持续长达约 17 小时、16 小时、15 小时、14 小时、13 小时、12 小时、11 小时、10 小时、9 小时、8 小时、6 小时、4 小时、3 小时、2 小时、1 小时、30 分钟、15 分钟、10 分钟或 5 分钟。

[0074] 本发明的另一方面涉及增强受试者的血脑屏障通透性。这种方法包括向受试者施用 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂。

[0075] 在一个实施方案中，A1 腺苷受体激动剂和 / 或 A2A 腺苷受体激动剂为选择性激动剂。如本文所使用，“选择性”指对特定受体的激活优先于其它受体，这可基于证明受体活性的完整细胞、组织或生物体测定来量化。

[0076] 根据本发明的合适的 A1 选择性受体激动剂包括 2-氯-N⁶-环戊基腺苷（“CCPA”）、N⁶-环戊基腺苷、N(6)-环己基腺苷、8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤（“DPCPX”）、R-苯基异丙基-腺苷或其组合。

[0077] 根据本发明的合适的 A2A 选择性受体激动剂包括 Lexiscan（也称为热加腺苷（Regadenoson））、CGS21680、ATL-146e、YT-146（2-(1-辛炔基)腺苷）、DPMA（N⁶-(2-(3,5-二甲氧基苯基)-2-(2-甲基苯基)乙基)腺苷）或其组合。

[0078] 在一个实施方案中，A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂可同时施用。在根据本发明的另一个实施方案中，A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂可依次施用。

[0079] 在某些实施方案中，将 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂配制成单一单位剂型。以下更加详细地描述了根据本发明的剂量和制剂。

[0080] 在一个实施方案中，所述方法进一步包括施用治疗剂。治疗剂可与 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂中的一种或两种一起施用，或可在施用 A1 腺苷受体激动剂和 / 或 A2A 腺苷受体激动剂之后施用。以下更加详细地描述了合适的治疗剂。在某些实施方案中，可在治疗剂前 5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时或 18 小时施用所述激动剂。

[0081] 本发明的另一方面涉及一种组合物。所述组合物包括 A1 腺苷受体激动剂、A2A 腺苷受体激动剂和药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

[0082] 在根据本发明这个方面的一个实施方案中，A1 腺苷受体激动剂和 / 或 A2A 腺苷受体激动剂为选择性激动剂。

[0083] 本发明的化合物、组合物或药剂可局部或全身施用。具体而言，可口服、经肠胃外，例如经皮下、静脉内、肌肉内、腹腔内，通过鼻内滴注或通过涂在黏膜，例如鼻粘膜、喉粘膜

和支气管粘膜上来施用本发明的化合物、组合物或药剂。本发明的化合物、组合物或药剂可单独施用或与合适的药物载体一起施用,并且可呈固体或液体形式,例如片剂、胶囊、粉剂、溶液、混悬剂或乳剂。

[0084] 本发明的活性化合物或药剂可(例如)与惰性稀释剂或可吸收的可食用载体一起口服施用,或可封装于硬壳或软壳胶囊中,或可压成片剂,或可直接与饮食食物合并在一起。对于口服治疗施用,可将这些活性化合物与赋形剂合并在一起并且以片剂、胶囊、酞剂、混悬剂、糖浆等形式使用。此类组合物和制剂应含有至少 0.1% 的活性化合物。当然,这些组合物中化合物的百分比可改变并且可能便利地介于约 2% 与约 60% 单位重量之间。此类治疗上有用的组合物中活性化合物的量为将获得合适的剂量。便利的单位剂量制剂各含有量为 0.1mg 至 1g,例如 5mg 至 500mg 的活性成分。例如,典型单位剂量可含有约 0.5 至约 500mg,或约 1mg 至约 500mg 的根据本发明的药剂。

[0085] 片剂、胶囊等也可能含有粘合剂,例如黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸二钙;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、褐藻酸;润滑剂,例如硬脂酸镁;和甜味剂,例如蔗糖、乳糖或糖精。当剂量单位形式为胶囊时,除以上类型的物质外,其可能含有液态载体,例如脂肪油。

[0086] 各种其它物质可作为涂层存在或改变剂量单位的外形。例如,可为片剂涂上虫胶、糖或二者。除活性成分外,糖浆可含有作为甜味剂的蔗糖,作为防腐剂的尼泊金甲酯和尼泊金丙酯,染料和调味剂(例如樱桃或橘子香精)。

[0087] 也可经肠胃外施用这些活性化合物或药剂。可于和表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备这些活性化合物的溶液或混悬剂。也可在于油中的甘油、液体聚乙二醇及其混合物中制备分散体。示例性油为石油、动物油、植物油或合成来源的油,例如花生油、大豆油或矿物油。一般而言,水、盐水、含水葡萄糖和相关糖溶液和二醇,例如丙二醇或聚乙二醇,尤其对于注射溶液而言,是优选的液态载体。在一般储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0088] 适合注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉剂。在所有情况下,所述形式必须无菌并且流动性必须达到易于注射的程度。所述形式在生产和储存条件下必须稳定并且必须保藏其免受微生物,例如细菌和真菌的污染作用。载体可为含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。

[0089] 也可以气雾剂形式将本发明的化合物或药剂直接施用至气道。对于用作气雾剂,可将呈溶液或混悬剂的本发明化合物和合适的推进物,例如烃推进物(如丙烷、丁烷或异丁烷)和常规佐剂一起包装于加压气雾剂容器中。本发明的物质也可呈非加压形式施用,例如于喷雾器或雾化器中施用。

[0090] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包括治疗剂。在又一个实施方案中,所述治疗用药适合治疗中枢神经系统(“CNS”)疾病、病症或病状。此类治疗剂在本领域众所周知并且许多是相关病症的常用且典型处方试剂。此类药剂的剂量范围为本领域的普通技术人员所知并且常出现在所附处方信息小册子(常称为“标签”)中。

[0091] CNS 病症(其涵盖了精神/行为性疾病或病症)可包括但不限于获得性癫痫性失语、急性播散性脑脊髓炎、肾上腺脑白质营养不良、胼胝体发育不全、认识不能、

艾卡迪综合征 (aicardi syndrome)、亚历山大病 (Alexander disease)、阿尔珀斯病 (Alpers' disease)、交叉性偏瘫、阿耳茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、无脑、安格尔曼综合征 (Angelman syndrome)、血管瘤病、缺氧症、失语症、失用症、蛛网膜囊肿、蛛网膜炎、阿-基氏脑畸形 (Arnold-chiari malformation)、动静脉畸形、阿斯伯格综合征 (Asperger's syndrome)、共济失调毛细血管扩张、注意力缺失多动症、孤独症、听觉处理障碍、自主神经功能障碍、背痛、贝敦氏症 (Batten disease)、白塞氏病 (Behcet's disease)、贝尔氏麻痹 (Bell's palsy)、良性特发性眼睑痉挛、良性局部肌萎缩、良性颅内高压、双侧额顶多小脑回畸形、宾斯旺格病 (binswanger's disease)、睑痉挛、Bloch-sulzberger 综合征 (Bloch-sulzberger syndrome)、臂丛神经损伤、脑脓肿、脑损伤、脑外伤、脑瘤、脊髓肿瘤、脊髓侧方压迫-脊髓半断综合征 (Brown-sequard syndrome)、卡纳万病 (canavan disease)、腕管综合征 (cts)、灼痛、中枢性疼痛综合征、中心性脑桥髓鞘破坏、中央核性肌病、头部混乱 (cephalic disorder)、脑动脉瘤、动脉硬化、脑萎缩、大脑性巨人症、大脑性麻痹、腓骨肌萎缩症 (charcot-marie-tooth disease)、慢性小脑扁桃体下疝畸形 (chiari malformation)、舞蹈病、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 ("CIDP")、慢性疼痛、慢性区域性疼痛综合征、科勒二氏综合征 (Coffin lowry syndrome)、昏迷 (包括持续性植物状态)、先天性两侧面瘫、皮质基底节变性、颅动脉炎、颅缝早闭、克雅氏病 (Creutzfeldt-jakob disease)、累积性创伤疾病、库兴氏综合征 (Cushing's syndrome)、巨细胞包涵体病 ("CIBD")、巨细胞病毒感染、丹-沃二氏综合征 (dandy-walker syndrome)、道森病 (Dawson disease)、德摩西埃综合征 (de morsier's syndrome)、下臂丛麻痹 (Dejerine-klumpke palsy)、代-索二氏病 (Dejerine-sottas disease)、睡眠周期延迟综合征、痴呆、皮炎、发展性运用障碍、糖尿病性神经病、弥漫性硬化、家族性自主神经异常、计算障碍、书写困难、诵读困难、肌张力障碍、早期婴儿型癫痫性脑病、空蝶鞍综合征、脑炎、脑膨出、脑三叉神经血管瘤病、大便失禁、癫痫症、欧勃氏麻痹 (Erb's palsy)、红斑性肢痛病、特发性震颤、法布里病 (Fabry's disease)、法尔氏综合征 (Fahr's syndrome)、昏厥、家族性痉挛性麻痹、高热惊厥、fisher 综合征 (fisher syndrome)、弗里德赖希共济失调 (Friedreich's ataxia)、高歇氏病 (Gaucher's disease)、格斯特曼综合征 (Gerstmann's syndrome)、巨细胞动脉炎、巨细胞性包涵体病、球样细胞脑白质营养不良、灰质异位、格林-巴利综合征 (Guillain-barre syndrome)、htlv-1 相关脊髓病、哈勒沃登-施帕茨病 (Hallervorden-spatz disease)、头部损伤、头痛、偏侧面肌痉挛、遗传性痉挛性截瘫、多神经炎型遗传性运动失调、耳部带状疱疹、带状疱疹、Hirayama 综合征 (hirayama syndrome)、前脑无裂畸形、亨廷顿氏舞蹈病、积水性无脑畸形、脑积水、皮质醇增多症、缺氧、免疫介导的脑脊髓炎、包涵体肌炎、色素失调症、婴儿植烷酸贮积病、婴儿型雷夫叙姆病 (infantile refsum disease)、婴儿痉挛、炎症性肌病、颅内囊肿、颅内高血压、朱伯特综合征 (Joubert syndrome)、卡恩斯塞尔综合征 (Kearns-sayre syndrome)、肯尼迪病 (Kennedy disease)、金斯布林纳综合征 (kinsbourne syndrome)、颈椎融合综合征 (Klippel feil syndrome)、克拉伯病 (Krabbe disease)、库格尔贝格-韦兰德病 (Kugelberg-welander disease)、库鲁病 (kuru)、拉福拉病 (lafora disease)、朗-爱二氏肌无力综合征 (Lambert-eaton myasthenic syndrome)、获得性癫痫性失语 (Landau-kleffner syndrome)、延髓外侧 (Wallenberg) 综合征、学习无能、利氏病 (leigh's disease)、Lennox-Gastaut 综合征

(Lennox-gastaut syndrome)、莱施-尼汉综合征 (Lesch-nyhan syndrome)、脑白质营养不良、路易体痴呆 (Lewy body dementia)、无脑回、闭锁综合征 (locked-in syndrome)、路格里克氏病 (Lou Gehrig's disease)、腰椎间盘突出病、莱姆病 (Lyme disease)-神经后遗症、马查多-约瑟夫病 (Machado-Joseph disease) (脊髓共济失调 3 型)、巨脑、巨脑畸形、梅尔克松-罗森塔尔综合征 (Melkersson-rosenthal syndrome)、梅尼埃病 (Meniere's disease)、脑膜炎、门克斯病 (Menkes disease)、异染性脑白质营养不良、小头畸形、偏头痛、米勒-费雪综合征 (Miller Fisher syndrome)、小中风、线粒体肌病、默比乌斯综合征 (Möbius syndrome)、单肢肌萎缩、运动神经元病、运动技能障碍、烟雾病 (Moyamoya disease)、粘多糖贮积病、多梗死性痴呆、多灶性运动神经病、多发性硬化、多系统萎缩伴体位性低血压、肌肉萎缩症、肌痛性脑脊髓炎、重症肌无力、脱髓鞘弥漫性硬化、婴儿肌阵挛脑病、肌阵挛、肌病、肌管性肌病、先天性肌强直、发作性睡病、神经纤维瘤病、抗精神病药恶性综合征、艾滋病的神经表现、狼疮的神经系统后遗症、神经性肌强直、神经元蜡样质脂褐质沉积症、神经元移行异常、尼曼-匹克病 (Niemann-pick disease)、非 24 小时睡眠-觉醒综合征、非语言学习障碍、O'Sullivan-McLeod 综合征 (O'Sullivan-McLeod syndrome)、枕神经痛、隐性脊柱神经管闭合不全序列征、大田原综合征 (Ohtahara syndrome)、橄榄桥脑小脑萎缩、视性眼阵挛-肌阵挛综合征、视神经炎、直立性低血压、过劳综合征、重复视、感觉异常、帕金森氏症、先天性肌强直病、副肿瘤疾病、阵发性发作、帕罗综合征 (Parry-Romberg syndrome) (也称为 Romberg 综合征 (Romberg's syndrome))、佩-梅氏病 (Pelizaeus-merzbacher disease)、周期性麻痹、周围神经病变、持续性植物状态、广泛性发育障碍、旋光性喷嚏反射、植烷酸贮积病、皮克氏病 (Pick's disease)、神经受压、垂体瘤、多小脑回 (PMG)、脊髓灰质炎 (Polio)、小多脑回、多肌炎、脑穿通畸形、脊髓灰质炎后综合征、带状疱疹后神经痛 ("PHN")、感染后脑脊髓炎、体位性低血压、普-威二氏综合征 (Prader-Willi syndrome)、原发性侧索硬化、朊病毒病、进行性面部偏侧萎缩 (也称为 Romberg 综合征 (Romberg's syndrome))、进行性多灶性白质脑病、进行性硬化性灰质萎缩、进行性核上麻痹、脑假瘤、Ramsay-Hunt 综合征 (Ramsay-Hunt syndrome) (I 型和 II 型)、拉斯马森脑炎 (Rasmussen's encephalitis)、反射性交感神经营养不良综合征、雷夫叙姆病 (Refsum disease)、重复性运动障碍、重复性压力损伤、不宁腿综合征、反转录病毒相关的脊髓病、Rett 综合征 (Rett syndrome)、Reye 综合征 (Reye's syndrome)、Romberg 综合征 (Romberg's syndrome)、狂犬病、圣维特斯舞蹈病 (Saint Vitus' dance)、桑德霍夫病 (Sandhoff disease)、精神分裂症、谢耳德氏病 (Schilder's disease)、脑裂、感觉统合失调、视神经发育不良、婴儿摇晃综合征、带状疱疹、Shy-Drager 综合征 (Shy-Drager syndrome)、干燥综合征 (Sjögren's syndrome)、睡眠性呼吸暂停、昏睡病、饱食 (Satiety)、索托斯综合征 (Sotos syndrome)、强直、脊柱裂、脊髓损伤、脊髓肿瘤、脊髓性肌萎缩、椎管狭窄、斯-里-奥三氏综合 (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) (见进行性核上麻痹)、脊髓小脑性共济失调、僵人综合征 (Stiff-person syndrome)、中风、斯特奇-韦伯综合征 (Sturge-Weber syndrome)、亚急性硬化性全脑炎、皮质下动脉硬化性脑病、表面铁沉积症、西登哈姆氏舞蹈病 (Sydenham's chorea)、晕厥、联觉、脊髓空洞症、迟发性运动障碍、泰-萨二氏病 (Tay-Sachs disease)、颞动脉炎、破伤风、脊髓栓系综合征、汤姆森病 (Thomsen disease)、胸腔出口综合征、三叉神经痛、托德氏麻痹 (Todd's

paralysis)、妥瑞综合征 (Tourette syndrome)、短暂性脑缺血发作、传染性海绵状脑病、横贯性脊髓炎、外伤性脑损伤、震颤、三叉神经痛、热带痉挛性轻截瘫、锥虫病、结节性脑硬化、脉管炎 (包括颞动脉炎)、希林二氏病 (Von Hippel-lindau disease) (“VHL”)、维柳丝克脑脊髓炎 (Viliuisk encephalomyelitis) (“VE”)、延髓背外侧综合征 (Wallenberg’s syndrome)、韦德尼希-霍夫曼病 (Werdnig-hoffman disease)、韦斯特综合征 (west syndrome)、急性颈部扭伤 (whiplash)、威廉斯综合征 (Williams syndrome)、威尔逊氏病 (Wilson’s disease) 和泽韦格综合征 (Zellweger syndrome)。因此应理解,所有 CNS 相关状态和病症均可通过药物递送的 BBB 途径治疗。

[0092] 根据本发明实施方案的 CNS 疾病、病症或病状可选自代谢病、行为障碍、人格障碍、痴呆、癌症、神经退行性疾病、疼痛、病毒性感染、睡眠障碍、癫痫症、酸性脂肪酶疾病、法布里病、韦尼克-柯萨可夫综合征 (Wernicke-Korsakoff syndrome)、ADHD、焦虑性障碍、边缘型人格障碍、双相障碍、抑郁症、进食障碍、强迫性精神障碍、精神分裂症、阿耳茨海默氏病、巴特综合征和图雷特综合征 (Barth syndrome and Tourette’s syndrome)、卡纳万病、哈勒沃登-施帕茨病、亨廷顿氏舞蹈病、路易体症 (Lewy Body disease)、路格里克氏病、马查多-约瑟夫病、帕金森氏症或下肢不宁综合征 (Restless Leg syndrome)。

[0093] 在一个实施方案中,所述 CNS 疾病、病症或病状为疼痛并且选自神经性疼痛、中枢性疼痛综合征、驱体痛、内脏痛和 / 或头痛。

[0094] 根据本发明的合适的 CNS 治疗用药包括小分子治疗剂。用于治疗 CNS 疾病、病症或病状的合适的小分子治疗用药包括醋氨酚 (acetaminophen)、乙酰水杨酸、酰基转移酶、阿普唑仑 (alprazolam)、金刚烷胺 (amantadine)、阿米舒必利 (amisulpride)、阿密曲替林 (amitriptyline)、安非他明-右旋安非他明 (amphetamine-dextroamphetamine)、安吡啶 (amsacrine)、抗精神病药、抗病毒药、阿朴吗啡 (apomorphine)、阿莫氯醇 (arimoclomol)、阿立哌唑 (aripiprazole)、阿塞那平 (asenapine)、天冬酰转移酶、托莫西汀 (atomoxetine)、非典型抗精神病药、硫唑嘌呤 (azathioprine)、巴氯芬 (baclofen)、苄氯丙酰胺 (beclamide)、苄丝肼 (benserazide)、苄丝肼-左旋多巴 (benserazide-levodopa)、苯二氮卓 (benzodiazepines)、苯托品 (bentropine)、贝伐单抗 (bevacizumab)、博来霉素 (bleomycin)、布瓦西坦 (brivaracetam)、溴隐亭 (bromocriptine)、丁丙诺啡 (buprenorphine)、安非他酮 (bupropion)、卡麦角林 (cabergoline)、卡马西平 (carbamazepine)、卡巴唑 (carbatrol)、卡比多巴 (carbidopa)、卡比多巴-左旋多巴、卡铂 (carboplatin)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、氯丙嗪 (chlorpromazine)、氯普噻吨 (chlorprothixene)、顺铂 (cisplatin)、西酞普兰 (citalopram)、氯巴占 (clobazam)、氯丙咪嗪 (clomipramine)、氯硝安定 (clonazepam)、氯氮平 (clozapine)、可待因 (codeine)、COX-2 抑制剂、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、放射菌素 D (dactinomycin)、右哌甲酯 (dexamethylphenidate)、右旋安非他明 (dextroamphetamine)、海洛因 (diamorphine)、地西洋 (diastat)、安定 (diazepam)、双氯芬酸 (diclofenac)、多奈哌齐 (donepezil)、阿霉素 (doxorubicin)、氟哌利多 (droperidol)、恩他卡朋 (entacapone)、表柔比星 (epirubicin)、艾司西酞普兰 (escitalopram)、乙琥胺 (ethosuximide)、依托泊苷 (etoposide)、非氨酯 (felbamate)、氟西汀 (fluoxetine)、氟哌噻吨 (flupenthixol)、氟奋乃静 (fluphenazine)、磷苯妥英 (fosphenytoin)、加巴喷丁 (gabapentin)、加兰他敏

(galantamine)、 γ -羟基丁酸酯、吉非替尼 (gefitinib)、氟哌啶醇 (haloperidol)、乙内酰脲 (hydantoin)、氢可酮 (hydrocodone)、羟嗪 (hydroxyzine)、布洛芬 (ibuprofen)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、IGF-1、伊潘立酮 (iloperidone)、伊马替尼 (imatinib)、丙咪嗪 (imipramine)、干扰素、伊立替康 (irinotecan)、KNS-760704、拉科酰胺 (lacosamide)、拉莫三嗪 (lamotrigine)、左乙拉西坦 (levetiracetam)、左旋多巴、左美丙嗪 (levomepromazine)、赖氨酸安非他命 (lisdexamfetamine)、麦角乙脲 (lisuride)、碳酸锂、解酯酶、氮芥 (mechlorethamine)、mGluR2 激动剂、美金刚 (memantine)、哌替啶 (meperidine)、巯基嘌呤 (mercaptapurine)、美索达嗪 (mesoridazine)、甲琥胺 (mesuximide)、甲基苯丙胺 (methamphetamine)、哌醋甲酯 (methylphenidate)、米诺环素 (minocycline)、莫达非尼 (modafinil)、吗啡 (morphine)、N-乙酰半胱氨酸、萘普生 (naproxen)、奈非那韦 (nelfinavir)、卡巴番定 (neurotrin)、硝基安定 (nitrazepam)、NSAID、奥氮平 (olanzapine)、鸦片剂 (opiate)、奥司他韦 (oseltamivir)、奥沙利铂 (oxaplatin)、帕利哌酮 (paliperidone)、泛酸激酶 2、帕金 (Parkin)、帕罗西汀 (paroxetine)、培高利特 (pergolide)、哌氰嗪 (periciazine)、奋乃静 (perphenazine)、苯乙酰脲 (phenacemide)、苯乙肼 (phenelzine)、苯巴比妥 (phenobarbital)、phenturide、苯妥英 (phenytoin)、匹莫齐特 (pimozide)、Pink1、吡贝地尔 (piribedil)、鬼臼毒素 (podophyllotoxin)、普拉克索 (pramipexole)、普瑞巴林 (pregabalin)、扑米酮 (primidone)、丙氯拉嗪 (prochlorperazine)、丙嗪 (promazine)、异丙嗪 (promethazine)、普罗替林 (protriptyline)、嘧啶二酮 (pyrimidinedione)、奎硫平 (quetiapine)、雷沙吉兰 (rasagiline)、立马醋胺 (remacemide)、利鲁唑 (riluzole)、利培酮 (risperidone)、利托那韦 (ritonavir)、利妥昔单抗 (rituximab)、卡巴拉汀 (rivastigmine)、罗匹尼罗 (ropinirole)、罗替戈汀 (rotigotine)、卢非酰胺 (rufinamide)、选择性血清素再吸收抑制剂 (SSRI)、司立吉林 (selegine)、司来吉兰 (selegiline)、舍吲哚 (sertindole)、舍曲林 (sertraline)、丙戊酸钠、司替戊醇 (stiripentol)、紫杉烷 (taxane)、替马西洋 (temazepam)、替莫唑胺 (temozolomide)、替诺福韦 (tenofovir)、四苯喹嗪 (tetrabenazine)、硫胺 (thiamine)、甲硫哒嗪 (thioridazine)、氨磺噻吨 (thiothixene)、噻加宾 (tiagabine)、托卡朋 (tolcapone)、托吡酯 (topiramate)、拓扑替康 (topotecan)、曲马多 (tramadol)、反苯环丙胺 (tranylcypromine)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、三环抗抑郁药、三氟啦嗪 (trifluoperazine)、三氟丙嗪 (triflupromazine)、苯海索 (trihexyphenidyl)、奥卡西平 (trileptal)、伐昔洛韦 (valaciclovir)、戊诺酰胺 (valnoctamide)、丙戊酰胺 (valproamide)、丙戊酸、文拉法辛 (venlafaxine)、水泡性口腔炎病毒 (vesicular stomatitis virus)、氨己烯酸 (vigabatrin)、长春花生物碱 (vinca alkaloid)、扎那米韦 (zanamivir)、齐拉西酮 (ziprasidone)、唑尼沙胺 (zonisamide)、佐替平 (zotepine)、珠氯噻醇 (zuclopenthixol) 或其组合。

[0095] 在另一个实施方案中,根据本发明所述的组合物可包括适合治疗人免疫缺陷病毒 (“HIV”) 的治疗剂。所述药剂选自核苷 HIV 逆转录酶抑制剂、非核苷 HIV 逆转录酶抑制剂、HIV 蛋白酶抑制剂、HIV 整合酶抑制剂、HIV 融合抑制剂、免疫调节剂、CCR5 拮抗剂和抗感染制剂。

[0096] 病原体例如 HIV 在 CNS 中寻求庇护,在 CNS 中病原体可留在宿主体内生活。当前,

全世界超过 3 千万人感染了 HIV 并且这些数字很可能增加（见 United Nations: Report on The Global AIDS Epidemic (2008), 其据此通过引用整体并入）。没有使抗 HIV 的药物进入 CNS 以靶向所述病毒的有效方法, 似乎将不可能永远根除 HIV。

[0097] 根据本发明可施用的其它治疗剂或化合物可为任何类别的需要穿过 BBB 的药物或药剂。此类治疗用药包括但不限于抗生素、抗寄生虫剂、抗真菌剂、抗病毒剂和抗肿瘤剂。当与抗寄生虫剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗肿瘤剂、抗病毒剂等一起施用时, 可通过适于治疗所述疾病的任何施用方法和途径, 通常作为药物组合物施用根据本发明所述的化合物。

[0098] 治疗剂可作为治疗或预防用药（例如, 抑制或预防神经退行性疾病发作）来递送。治疗用药引起对所治疗的潜在病症的根除或改善。即使可能尚未进行诊断, 向有发病风险的患者或向报道了此类疾病的一种或多种生理症状的患者施用预防用药。可选地, 特别是如果症状周期性表现, 可应用预防性施用以避免潜在病症的生理症状的发作。在这后一个实施方案中, 所述疗法对相关生理症状而不是潜在指征有预防作用。对特殊应用有效的实际量将尤其取决于所治疗病状和施用途径。

[0099] 治疗用药可选自免疫抑制剂、抗炎药、抗增殖剂、抗迁移剂、抗纤维化剂、促凋亡剂、钙通道阻滞剂、抗肿瘤剂、抗体、抗血栓剂、抗血小板剂、Ilb1111a 药剂、抗病毒剂、抗癌剂、化疗剂、血栓溶解剂、血管舒张药、抗微生物药或抗生素、抗有丝分裂药、生长因子拮抗剂、自由基清除剂、生物制剂、放疗剂、造影剂、放射性标记试剂、抗凝血剂（例如, 肝素及其衍生物）、抗血管生成药物（例如, 撒利多胺 (Thalidomide)）、血管生成药物、PDGF-B 和 / 或 EGF 抑制剂、抗炎药（例如, 牛皮鲜药物）、核黄素、噻唑羧胺核苷 (tiazofurin)、zafurin、抗血小板剂（例如, 环氧合酶抑制剂（例如, 乙酰水杨酸））、ADP 抑制剂（例如氯吡格雷 (clopidogrel) 和噻氯匹定 (ticlopidine)）、牛脾磷酸二酯酶 III 抑制剂（例如西洛他唑 (cilostazol)）、糖蛋白 (lycoprotein) II/IIIa 试剂（例如阿昔单抗）、依非巴特 (eptifibatid) 和腺苷再摄取抑制剂（例如双嘧达莫 (dipyridamol)、愈合和 / 或促进剂（例如, 抗氧化剂和一氧化氮供体））、止吐药、止恶心药、雷公藤乙素 (tripdiolide)、二萜、三萜、环氧二萜 (diterpene epoxide)、环氧二萜类 (diterpenoid epoxide)、_雷公藤甲 (triepoxide) 或雷公藤多甙 F (tripterygium wifordii hook F) (TWHF)、SDZ-RAD、RAD、RAD666 或 40-0-(2- 羟基) 乙基 - 雷帕霉素 (rapamycin)、其衍生物、制药用盐和组合物。

[0100] 在某些实施方案中, 将所述治疗用药和腺苷受体激活剂（或如以下更加详细描述腺苷受体阻滞剂或抑制剂）和 / 或治疗用药配制成单一“化合物”制剂。这可通过许多已知方法中的任一种实现。例如, 可将治疗剂和激活剂组合于单种药学上可接受的赋形剂中。在另一种方法中, 可将治疗用药和腺苷受体激活剂（或腺苷受体阻滞剂或抑制剂）配制于单独赋形剂中, 装入微胶囊中, 然后组合, 或形成呈单药丸的单独薄片等。

[0101] 在一个实施方案中, 治疗用药和腺苷受体激活剂连在一起。在某些实施方案中, 治疗用药和腺苷受体激活剂（或腺苷受体阻滞剂或抑制剂）直接结合在一起或通过“绳 (tether)”或“连接子”结合在一起以形成单一化合物。不受特殊理论约束, 人们认为结合化合物提供了改善的特异性 / 选择性。

[0102] 直接或通过连接子 / 绳连接分子的许多化学结构为本领域技术人员众所周知。用于连接治疗用药和腺苷受体激活剂（或腺苷受体阻滞剂或抑制剂）以形成双官能化合物的具体化学结构取决于所需治疗用药的化学性质和“配体间”间隔。各种治疗用药和腺苷受

体激活剂通常含有多种官能团（例如，羧酸（COOH）、游离胺（-NEE）等），其可用于和连接子或反向组分（即，治疗用药或腺苷受体激活剂）上的合适官能团反应以使所述组分结合在一起。

[0103] 可选地，可使所述组分衍生化以暴露或连接另外的反应性官能团。衍生可包括连接许多连接子分子中的任何一种，例如可从Pierce Chemical Company, Rockford IL1获得的连接子分子。

[0104] 如本文所使用，“连接子”或“绳”是用于连接两个或更多个配体（例如，治疗用药或腺苷受体激活剂）以形成双官能或多官能化合物的分子。通常选择所述连接子以能够与包含双官能或多官能部分的所有组分形成共价键。合适的连接子为本领域技术人员众所周知并且包括但不限于直链或支链碳连接子、杂环碳连接子、氨基酸、核酸、树枝状分子、合成聚合物、肽连接子、肽和核酸类似物、碳水化合物、聚乙二醇等。其中一种或多种组分为多肽时，连接子可通其侧基（例如，通过与半胱氨酸的二硫键）或通过末端氨基酸的 α 碳氨基或羧基与组成型氨基酸结合。

[0105] 在某些实施方案中，具有一个可与第一治疗用药上的基团反应的官能团和另一可与腺苷受体激活剂上的官能团反应的基团的双官能连接子可用于形成双官能化合物。可选地，衍生可包括用高碘酸盐化学处理所述组分（例如，二醇裂解糖蛋白、碳水化合物或核酸等的糖部分）以生成游离醛基。可使游离醛基与连接子上的游离胺或胍基反应以使连接子与化合物结合（见，例如，Rodwell等的美国专利号4,671,958，其据此通过引用整体并入）。在多肽，例如抗体或抗体片段上生成游离巯基的方法也已知（见Nicolotti等的美国专利号4,659,839，其据此通过引用整体并入）。

[0106] 所述治疗用药和腺苷受体激活剂均为肽时，双官能化合物可化学合成或重组表达为包含相互直接连接或通过肽连接子连接的两种组分的融合蛋白。

[0107] 在某些实施方案中，基于赖氨酸、谷氨酸和聚乙二醇（PEG）的不同长度的连接子用于连接所述组分。分子与PEG接合的化学结构为本领域技术人员众所周知（见，例如，Veronese, "Peptide and Protein PEGylation: a Review of Problems and Solutions," *Biomaterials* 22:405-417 (2001); Zalipsky 等, "Attachment of Drugs to Polyethylene Glycols," *Eur. Polym. J.* 19(12):1177-1183 (1983); Olson 等, "Preparation and Characterization of Poly(ethylene glycol)ylated Human Growth Hormone Antagonist," *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications* 170-181, Harris 和 Zalipsky 编辑, ACS, Washington, DC (1997); Delgado 等, "The Uses and Properties of PEG-Linked Proteins," *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992); Pedley 等, "The Potential for Enhanced Tumour Localisation by Poly(ethylene glycol) Modification of anti-CEA Antibody," *Brit. J. Cancer* 70:1126-1130 (1994); Eyre 和 Farver, *Textbook of Clinical Oncology* 377-390 (Holleb 等编辑, 1991); Lee 等, "Prolonged Circulating Lives of Single-chain of Fv Proteins Conjugated with Polyethylene Glycol: a Comparison of Conjugation Chemistries and Compounds," *Bioconjug. Chem.* 10:973-981 (1999); Nucci 等, "The Therapeutic Value of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins," *Adv. Drug Deliv. Rev.* 6:133-151 (1991); Francis 等, "Polyethylene Glycol

Modification:Relevance of Improved Methodology to Tumour Targeting,"J. Drug Targeting3:321-340(1996),其据此通过引用整体并入)。

[0108] 在某些实施方案中,治疗用药和腺苷受体激活剂(或腺苷受体阻滞剂或抑制剂)的接合可通过使用此类连接剂实现,所述连接剂例如戊二醛、EDCI、对酞酰氯、溴化氰等,或通过还原胺化实现。在某些实施方案中,可通过 WO-A-9317713 中公开种类的羟羧酸连接子连接组分。也可利用 PEG 连接子制备各种 PEG 束缚药物(PEG tethered drug)(见,例如, Lee 等,"Reduction of Azides to Primary Amines in Substrates Bearing Labile Ester Functionality:Synthesis of a PEG-Solubilized,"Y"-Shaped Iminodiacetic Acid Reagent for Preparation of Folate-Tethered Drugs,"Organic Lett., 1:179-181(1999),其据此通过引用整体并入)。在其它实施方案中,可使腺苷受体激活剂(或腺苷受体阻滞剂或抑制剂)聚乙二醇化(例如,聚乙二醇化腺苷脱氨酶)。

[0109] 本发明的另一方面涉及一种将大分子治疗剂递送至受试者脑的方法。这种方法包括向所述受试者施用:(a) 激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂;和(b) 所述大分子治疗剂。

[0110] 在某些实施方案中,大分子治疗剂可为生物活性蛋白质或肽试剂。此类生物活性蛋白质或肽的实例包括细胞调节肽、趋化肽、抗凝血肽、抗血栓肽、抗肿瘤肽、抗感染肽、生长增强肽和抗炎肽。蛋白质的实例包括抗体、酶、类固醇、生长激素和生长激素释放激素、促性腺激素释放激素及其激动剂和拮抗剂类似物、生长激素抑制素及其类似物、促性腺激素、肽 T、降钙素、甲状旁腺激素、胰高血糖素、加压素、催产素、血管紧张素 I 和 II、缓激肽、胰激肽、促肾上腺皮质激素、促甲状腺激素、胰岛素、胰高血糖素和前述分子的许多类似物和同源物。在本发明的一些方面,通过上文的一种或多种方法调节 BBB 通透性以递送抗生素或抗感染治疗剂。此类抗感染剂降低了杀伤微生物的活性。

[0111] 除包含氨基酸残基外,肽试剂的性质不受限制。肽试剂可为合成或天然肽,包括天然肽的变体或衍生物。肽可为线性肽、环状肽、限制性肽或肽模拟物。制备环状肽的方法在本领域中众所周知。例如,可以头-尾方式实现环化,侧链与 N 或 C 端残基,以及使用连接子环化。环状肽的选择性和活性取决于控制其三维结构的环状肽整体环尺寸。因此环化提供了探查病情进展以及靶向病变蛋白质的特定自聚集状态的有力工具。

[0112] 在一些实施方案中,肽试剂特异性结合与神经病症相关的靶蛋白或结构。根据这些实施方案,本发明提供了用于选择性靶向与神经病症相关的靶蛋白或结构,用于诊断或治疗的药剂。例如,在 Wegrzyn 等的美国专利申请公布 2009/0238754 中描述了根据本发明有用的肽试剂,其据此通过引用整体并入。

[0113] 在其它实施方案中,肽试剂特异性结合与其他神经病症,例如中风、脑血管疾病、癫痫、传染性海绵状脑病(TSE)相关的靶蛋白或结构;阿耳茨海默氏病(AD)、脑淀粉样血管病(CAA)和脑血管疾病(CVD)的淀粉样蛋白斑中的 A β -肽;帕金森氏症路易体中的 α -突触核蛋白沉积物、额颞叶痴呆和皮克氏病中神经纤维缠结中的 tau;肌萎缩侧索硬化中的超氧化物歧化酶;和亨廷顿氏舞蹈病和良性和癌性脑瘤例如成胶质细胞瘤、垂体瘤或脑脊膜瘤中的亨廷顿蛋白(Huntingtin)。

[0114] 在一些实施方案中,除以上讨论的 α -螺旋向 β -折叠的转变外,肽试剂进行构象转变,例如 β -折叠向 α -螺旋的转变,非结构向 β -折叠的转变等。一旦与靶肽或与神经病症相关的结构相互作用,此类肽试剂就可进行此类构象转变。

[0115] 在其它实施方案中,肽试剂为特异性结合与精神病症相关的靶蛋白或结构,例如与淀粉蛋白疾病相关的靶蛋白或结构(例如自聚集的特定构象或状态)的抗体,例如抗淀粉样蛋白抗体 6E10 和 NG8。如同特异性结合与其它精神病症相关的蛋白质或结构的抗体,本领域已知其它抗淀粉样蛋白抗体。

[0116] 在某些实施方案中,大分子治疗剂为单克隆抗体。合适的单克隆抗体包括 6E10、PF-04360365、131I-chTNT-1/B MAb、131I-L19SIP、177Lu-J591、ABT-874、A IN 457、阿仑单抗(alemtuzumab)、抗 PDGFR α 单克隆抗体 IMC-3G3、砒 At211 单克隆抗体 81C6、巴皮组阻单抗(Bapineuzumab)、贝伐单抗、西妥昔单抗(cetuximab)、西妥木单抗(cixutumumab)、达利珠单抗(Daclizumab)、Hu MiK- β -1、HuMax-EGFr、碘 I131 单克隆抗体 3F8、碘 I131 单克隆抗体 81C6、碘 I131 单克隆抗体 8H9、碘 I131 单克隆抗体 TNT-1/B、LMB-7 免疫毒素、MAb-425、MGAWN1、Me1-14F(ab')₂、M-T412、那他珠单抗(Natalizumab)、Neuradiab、尼妥珠单抗(Nimotuzumab)、奥法木单抗(Ofatumumab)、帕尼单抗(Panitumumab)、雷莫芦单抗(Ramucirumab)、雷珠单抗(ranibizumab)、SDZ MSL-109、苏兰珠单抗(Solanezumab)、曲妥珠单抗、优斯它单抗(Ustekinumab)、扎鲁木单抗(Zalutumumab)、他尼珠单抗(Tanezumab)、阿柏西普(Aflibercept)、MEDI-578、REGN475、莫罗莫那-CD3(Muromonab-CD3)、阿比昔单抗(Abiximab)、利妥昔单抗、巴利昔单抗(Basiliximab)、帕利珠单抗(Palivizumab)、英夫利昔单抗(Infliximab)、吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab ozogamicin)、替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)、阿达木单抗(Adalimumab)、奥玛珠单抗(Omalizumab)、托西莫单抗(Tositumomab)、托西莫单抗-I131、依法珠单抗(Efalizumab)、阿昔单抗(abciximab)、赛妥珠单抗(Certolizumab pegol)、依库丽单抗(Eculizumab)、AMG-162、扎木单抗(Zanolimumab)、MDX-010、抗 OMRSA mAb、培克珠单抗(Pexelizumab)、美泊利单抗(Mepolizumab)、依帕珠单抗(Epratuzumab)、抗 RSV mAb、阿非莫单抗(Afelimomab)、卡妥索单抗(Catumaxomab)、WX-G250 或其组合。

[0117] 在某些实施方案中,大分子治疗剂为肽检测剂。例如,肽检测剂包括荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(GFP))、链霉亲和素、酶、酶底物和本领域已知的其它肽检测剂。

[0118] 在其它实施方案中,大分子治疗剂包括肽大分子和小肽。例如,在本文所述方法的情况下,神经营养蛋白用作肽试剂。神经营养蛋白包括神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3(NT-3)、神经营养因子-4(NT-4)、神经营养因子-5(NT-5)、胰岛素样生长因子(IGF-I 和 IGF-II)、胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、睫状神经营养因子(CNTF)、表皮生长因子(EGF)、神经胶质源性连接蛋白(GDN)、转化生长因子(TGF- α 和 TGF- β)、白细胞间素、血小板源性生长因子(PDGF) 和 S100 β 蛋白及其生物活性衍生物和类似物。

[0119] 神经活性肽还包括亚类的下丘脑释放激素、垂体后叶激素、垂体肽、无脊椎动物肽、胃肠肽,存在于心脏中的肽,例如心房钠尿肽和其它神经活性肽。下丘脑释放激素包括(例如)促甲状腺素释放激素、促性腺激素释放激素、生长激素抑制素、促肾上腺皮质激素释放激素和生长激素释放激素。垂体后叶激素包括(例如)加压素、催产素和后叶激素运载蛋白等化合物。垂体肽包括(例如)促肾上腺皮质激素、 β -内啡肽、 α -黑素细胞刺激激素、催乳素、黄体化激素、生长激素和促甲状腺激素。合适的无脊椎动物肽包括(例如)FMRF 酰胺、水螅头激活剂、原肠肽(proctolin)、小心脏肽、肌调蛋白(myomodulin)、

buccolin、排卵激素和袋细胞肽。胃肠肽包括（例如）舒血管肠肽、缩胆囊素、胃泌素、神经紧张素、甲硫脑啡肽、亮氨酸-脑啡肽、胰岛素和胰岛素样生长因子 I 和 II、胰高血糖素、肽组氨酸异亮氨酸酰胺、铃蟾肽 (bombesin)、胃动素和分泌素。其它神经活性肽的实例包括血管紧张素 II、缓激肽、强啡肽、鸦片样肽、睡眠肽、降钙素、CGRP（降钙素基因相关肽）、神经肽 Y、神经肽 Yy、甘丙肽 (galanin)、物质 K（神经激肽）、泡蛙肽 (physalaemin)、肛褶蛙肽 (Kassinin)、耳腺蛙肽 (uperolein)、章鱼唾腺精 (eledoisin) 和心房钠利尿肽。

[0120] 在另外的实施方案中，大分子治疗剂为与突触小泡膜相关的蛋白质，例如钙结合蛋白和其它突触小泡蛋白。钙结合蛋白亚类包括细胞骨架相关蛋白，例如钙调素结合蛋白 (caldesmon)、膜联蛋白 (annexin)、钙电蛋白 (callectrin)（哺乳动物）、钙电蛋白（电鳗）、依钙蛋白 I、依钙蛋白复合物、依钙蛋白 II、内联蛋白 I (endonexin I)、内联蛋白 II、蛋白质 II、会联蛋白 I (synexin I)；和酶调节因子，例如 p65。其它突触小泡蛋白包括活动抑制剂（例如突触蛋白 Ia, b 和突触蛋白 IIa, b）、可能的融合蛋白例如突触素 (synaptophysin)，和未知融合蛋白例如 p29、VAMP-1, 2（小突触泡蛋白 (synaptobrevin)）、VAT1、rab3A 和 rab3B。

[0121] 大分子治疗剂还包括 α -、 β - 和 γ -干扰素、依泊汀 (epoetin)、非拉司汀 (Filgrastim)、沙格莫丁 (Sargramostin)、CSF-GM、人 IL、TNF 和其它生物技术药物。

[0122] 大分子治疗剂还包括使用重组生物技术方法获得的肽、蛋白质和抗体。

[0123] 大分子治疗剂还包括直接或间接抑制蛋白质聚集和 / 或形成淀粉样蛋白斑或沉积物和 / 或促进淀粉样蛋白斑或沉积物解聚或减少的“抗淀粉样剂”或“抗淀粉样蛋白剂”。抗淀粉样剂还包括在本领域中通常称为“淀粉样克星 (amyloid buster)”或“斑块克星”的药剂。这些包括为肽模拟物并且与淀粉样纤维相互作用以使其缓慢溶解的药物。“肽模拟物”指生物分子模拟其它生物活性肽分子的活性。“淀粉样克星”或“斑块克星”还包括吸收淀粉样纤维保持稳定所必需的辅助因子的药剂。

[0124] 抗淀粉样剂包括如 PCT 申请 PCT/US2007/016738 (W02008/013859) 和美国专利申请序列号 11/828, 953 中描述的抗体和肽探针，所述专利全部内容通过引用整体并入本文。如其中所述，指定靶蛋白的肽探针与所述蛋白质特异性结合，并且可优先与特定结构形式的靶蛋白结合。虽然不愿受任何理论约束，但是据信肽探针与靶蛋白的结合将防止形成更高位的靶蛋白组装，从而预防或治疗与靶蛋白相关的疾病，和 / 或预防所述疾病进一步进展。例如，肽探针与靶蛋白单体的结合将防止靶蛋白的自聚集。类似地，肽探针与可溶性寡聚体或不溶性聚集物的结合将防止进一步聚集和初原纤维和原纤维形成，而肽探针与初原纤维或原纤维的结合将防止所述结构的进一步延伸。除阻滞进一步聚集外，这种结合还可将平衡转变回更有利于可溶性单体的状态，进一步中断疾病的进展并减轻疾病症状。

[0125] 在一个实施方案中，大分子治疗剂为上述肽试剂的变体，其具有一个或多个氨基酸取代、添加或缺失，例如一个或多个保守性氨基酸取代、添加或缺失，和 / 或进一步增强偶联物穿过 BBB 的通透性的一个或多个氨基酸取代、添加或缺失。例如，产生更具疏水性的氨基酸序列的氨基酸取代、添加或缺失可进一步增强偶联物穿过 BBB 的通透性。

[0126] 在另一个实施方案中，大分子治疗剂尺寸为约 150kDa。又一个实施方案中，治疗剂的尺寸达约 10, 000Da，尺寸达约 70, 000Da，或尺寸达约 150kDa。还有更多实施方案中，治疗剂的尺寸介于约 10, 000 与约 70, 000Da 之间，介于约 70, 000Da 与约 150kDa 之间，或介于约

10,000Da 与约 150kDa 之间。

[0127] 在一个实施方案中,激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂在治疗性大分子之前施用。在更多实施方案中,激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂可在治疗性大分子前长达 5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时或 18 小时施用。

[0128] 在另一个实施方案中,激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂与治疗性大分子同时施用。

[0129] 本发明的另一方面涉及一种治疗受试者的 CNS 疾病、病症或病状的方法。这种方法包括向受试者施用至少一种激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂和治疗剂。

[0130] 以上描述了合适的治疗剂并且可包括小分子治疗剂、大分子治疗剂或其组合。

[0131] 在一个实施方案中,激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂为 A1 和 A2A 腺苷受体的激动剂。在更多实施方案中,A1 和 A2A 腺苷受体的激动剂为广谱腺苷受体激动剂,例如 NECA、腺苷、腺苷衍生物或其组合。

[0132] 本发明的另一方面涉及一种治疗受试者的 CNS 疾病、病症或病状的方法。这种方法包括向受试者施用 (a) 腺苷受体激动剂;(b)A2A 受体激动剂;和 (c) 治疗剂。

[0133] 在根据本发明这个方面的一个实施方案中,A1 腺苷受体激动剂和 / 或 A2A 腺苷受体激动剂为选择性激动剂。

[0134] 以上指出了合适的 A1 选择性腺苷受体激动剂、A2A 选择性腺苷受体激动剂和治疗剂(连同其制备和施用)。

[0135] 又一个实施方案中,这种方法进一步包括选择需要治疗或预防 CNS 疾病、病症或病状的受试者;提供治疗剂;并且在治疗剂有效穿过血脑屏障并治疗或预防 CNS 疾病、病症或病状条件下,向所选受试者施用治疗剂、A1 腺苷受体激动剂和 A2A 受体激动剂。

[0136] 在一个实施方案中,将 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂配制成单一单位剂型。

[0137] 在另一个实施方案中,A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂同时施用。

[0138] 又一个实施方案中,A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂依次施用。

[0139] 再一个实施方案中,所述方法进一步包括施用包括 A1 腺苷受体激动剂和 A2A 腺苷受体激动剂及药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物的组合物。

[0140] 本发明的另一方面涉及一种暂时增强受试者的血脑屏障通透性的方法。这种方法包括选择需要暂时增强血脑屏障通透性的受试者,提供激活 A1 或 A2A 腺苷受体的药剂,并且在有效暂时增强血脑屏障通透性的条件下向所选受试者施用 A1 或 A2A 腺苷受体激活剂。

[0141] 在一个实施方案中,A1 或 A2A 激活剂为 A1 或 A2A 激动剂。又一个实施方案中,A1 或 A2A 腺苷受体激活剂为 A1 选择性或 A2 选择性腺苷受体激动剂。本领域的技术人员已知合适的 A1 和 A2A 腺苷受体激动剂并且以上进行了详细描述。

[0142] 在本发明这一方面的又一个实施方案中,所述方法进一步包括向受试者施用治疗剂。以上详细描述了合适的治疗剂。

[0143] 在一个实施方案中,在治疗剂之前施用激活 A1 或 A2A 腺苷受体的药剂。在更多实施方案中,激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂可在治疗剂前长达 5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时或 18 小时施用。

[0144] 在另一个实施方案中,激活 A1 或 A2A 腺苷受体的药剂和治疗剂同时施用。

[0145] 本发明的另一方面涉及一种降低受试者 BBB 通透性的方法。这种方法包括向受试者或患者施用阻断或抑制 A2A 腺苷受体信号转导的药剂。

[0146] 在降低 BBB 通透性时,所选受试者可患炎性疾病。此类炎性疾病包括其中炎症介质通过血脑屏障的炎性疾病。此类炎性疾病包括但不限于由细菌感染、病毒性感染或自身免疫性疾病引起的炎症。更特别地,此类疾病包括但不限于脑膜炎、多发性硬化、视神经脊髓炎、人免疫缺陷病毒 (“HIV”) -1 脑炎、单纯疱疹病毒 (“HSV”) 脑炎、弓形体 (*Toxoplasma gondii*) 脑炎和进行性多灶性白质脑病。

[0147] BBB 通透性降低时,所选受试者也可能还患由淋巴细胞进入脑介导的病状。可以这种方式治疗的其它病状包括脑炎、帕金森氏症、癫痫、HIV-AIDS 的神经表现、狼疮的神经系统后遗症和亨廷顿氏舞蹈病、脑膜炎、多发性硬化、视神经脊髓炎、HSV 脑炎和进行性多灶性白质脑病。

[0148] 本发明的这个方面可使用上述药物配制方法和施用方法进行。

[0149] 可通过但不限于灭活或阻断 A2A 腺苷受体实现改变受试者的腺苷受体活性以降低血脑屏障通透性。

[0150] 本领域的技术人员已知许多腺苷 A2A 受体拮抗剂并且可单独或联合用于本文所述的方法中。此类拮抗剂包括但不限于 (-)-R,S)- 甲氟喹 (mefloquine) (作为 Mefloquine™ 销售的外消旋混合物的活性对映异构体)、3,7- 二甲基 -1- 炔丙基黄嘌呤 (DMPX)、3-(3-羟丙基)-7- 甲基 -8-(间甲氧基苯乙烯基)-1- 炔丙基黄嘌呤 (MX2)、3-(3-羟丙基)-8-(3- 间甲氧基苯乙烯基)-7- 甲基 -1- 炔丙基黄嘌呤磷酸二钠盐 (MSX-3, MSX-2 的磷酸盐前药)、7- 甲基 -8- 苯乙烯基黄嘌呤衍生物、SCH58261、KW-6002、氨基咪唑基三唑 - 三 - 吡嗪基氨基乙基苯酚 (ZM241385) 和 8- 氯苯乙烯基 - 咖啡因、KF17837、VR2006、伊曲茶碱 (istradefylline)、VERNALIS 药物,例如 VER6489、VER6623、VER6947、VER7130、VER7146、VER7448、VER7835、VER8177、VER-11135、VER-6409、VER6440、VER6489、VER6623、VER6947、VER7130、VER7146、VER7448、VER7835、VER8177, 吡唑并 [4,3-e]1,2,4- 三唑并 [1,5-c] 嘧啶和 5- 氨基 - 咪唑并 -[4,3-e]-1,2,4- 三唑并 [1,5-c] 嘧啶等 (Li 等的美国专利申请公布号 2006/0128708, 其据此通过引用整体并入)、吡唑并 [4,3-e]-[1,2,4]- 三唑并 [1,5-c] 嘧啶 (见例如, Kase 等的 W001/92264, 其据此通过引用整体并入)、2,7- 二取代 -5- 氨基 -[1,2,4] 三唑并 [1,5-c] 嘧啶 (见例如, Kase 等的 W003/048163, 其据此通过引用整体并入)、2,5- 二取代 -7- 氨基 -[1,2,4] 三唑并 [1,5-a][1,3,5] 三嗪 (见例如, Vu 等, “Piperazine Derivatives of [1,2,4]Triazolo[1,5-a][1,3,5] triazine as Potent and Selective Adenosine A2A Receptor Antagonists,” *J. Med. Chem.* 47(17):4291-4299(2004), 其据此通过引用整体并入)、9- 取代 -2-(取代 - 乙炔 -1- 基)- 腺嘌呤 (见例如, Beaglehole 等的美国专利号 7,217,702, 其据此通过引用整体并入)、7- 甲基 -8- 苯乙烯基黄嘌呤衍生物、吡唑并 [4,3-e]1,2,4- 三唑并 [1,5-c] 嘧啶和 5- 氨基 - 咪唑并 -[4,3-e]-1,2,4- 三唑并 [1,5-c] 嘧啶 (见例如, Li 等的美国专利申请公布号 2006/0128708, 其据此通过引用整体并入)。这些腺苷 A2A 受体拮抗剂旨在用于说明而非限制。

[0151] 本发明的又一方面涉及一种增强 BBB 通透性,接着降低 BBB 通透性的方法。所述

方法包括施用一种或多种激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂,接着施用阻断或抑制 A2A 腺苷受体信号转导的药剂。

[0152] 在一个实施方案中,所述一种或多种激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂与治疗剂同时施用。在另一个实施方案中,所述一种或多种激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂在治疗剂之前施用。在这个实施方案中,在施用治疗剂之后施用阻断或抑制 A2A 腺苷受体信号转导的药剂。

[0153] 本发明的又一方面涉及一种重塑 BBB 内皮细胞的肌动蛋白细胞骨架的方法。这种方法包括使所述内皮细胞与一种或多种激活 A1 和 A2A 腺苷受体的药剂接触。

[0154] 肌动蛋白细胞骨架对于细胞形状的维持至关重要。内皮屏障通透性可受肌动蛋白细胞骨架的重组的影响。将肌动蛋白细胞骨架组织为三种不同结构:皮质肌动蛋白边缘、肌动球蛋白应力纤维和膜骨架的肌动蛋白交联 (Prasain 等, "The Actin Cytoskeleton in Endothelial Cell Phenotypes," *Microvasc. Res.* 77:53-63(2009), 其据此通过引用整体并入)。这些结构在控制内皮细胞形状中有独特作用。

[0155] 根据一个实施方案,肌动蛋白细胞骨架重塑使内皮细胞间的间隙增大并且使 BBB 通透性增强。

[0156] 以上公开了合适的 A1 和 A2A 腺苷受体激活剂。

[0157] 在根据本发明这个方面的一个实施方案中,A1 和 A2A 腺苷受体的激活对 BBB 通透性起协同作用。在又一个实施方案中,A1 和 A2A 腺苷受体的激活对 BBB 通透性起相加作用。

[0158] 虽然鉴定 A1 和 A2A AR 为 BBB 通透性的关键介质表示迈向分子机制的第一步,但是还需要做许多工作以阐明促进内皮细胞的细胞变化的特异性下游作用物。腺苷受体是 G 蛋白偶联受体,与异三聚体 G 蛋白相关。已经将几种 G_α 亚单位定位于紧密连接 (Denker 等, "Involvement of a Heterotrimeric G Protein Alpha Subunit in Tight Junction Biogenesis," *J. Biol. Chem.* 271:25750-3(1996), 其据此通过引用整体并入)。已知这些 G_α 亚单位会影响已经牵连于细胞骨架重塑的下游酶类(如 RhoA 和 Rac1) 的活性。实际上,其它小组所做的工作表明, RhoA 和 Rac1 小 GTP 酶对细胞外信号转导响应并介导肌动蛋白细胞骨架的变化 (Schreibelt 等, "Reactive Oxygen Species Alter Brain Endothelial Tight Junction Dynamics Via RhoA, PI3kinase, and PKB Signaling," *Faseb J.* 21:3666-76(2007); Jou 等, "Structural and Functional Regulation of Tight Junctions by RhoA and Rac1 Small GTPases," *J Cell Biol* 142, 101-15(1998); 和 Wojciak-Stothard 等, "Regulation of TNF-alpha-induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton and Cell-cell Junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in Human Endothelial Cells," *J. Cell. Physiol.* 176:150-165(1998), 其据此通过引用整体并入)。另外,有证据表明,腺苷通过 Rho GTP 酶影响肌动蛋白 (Sohail 等, "Adenosine Induces Loss of Actin Stress Fibers and Inhibits Contraction in Hepatic Stellate Cells via Rho Inhibition," *Hepatology* 49:185-94(2009), 其据此通过引用整体并入)。重要的是,由正规损伤信号,如 TNF- α 和凝血酶引起的炎症通过细胞骨架重组改变紧密连接而使 BBB 通透性增强 (Wojciak-Stothard 等, "Regulation of TNF-alpha-Induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton and Cell-Cell Junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in Human Endothelial Cells," *J. Cell. Physiol.* 176:150-65(1998)

和 Lum 等, "Mechanisms of Increased Endothelial Permeability," *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74:787-800 (1996), 其据此通过引用整体并入)。通过激活脑内皮细胞上的 A1 和 A2A AR 引发的信号转导事件导致肌动蛋白细胞骨架重塑, 其通过改变细胞形状, 使内皮细胞间的间距增大并且使分子扩散增强。已经证实腺苷以相似方式影响其它内皮细胞屏障性质 (Lu 等, "Adenosine Protected Against Pulmonary Edema Through Transporter-and Receptor A2-mediated Endothelial Barrier Enhancement," *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 298:L755-67 (2010), 其据此通过引用整体并入)。然而, 在用特异性激动剂激活 A1 或 A2A AR 后, 在这里观察到脑内皮细胞单层中肌动球蛋白应力纤维形成。相反地, 用 AR 拮抗剂阻断这些受体可以相反方式起作用并导致细胞之间的紧密度增强。在缺乏来自 AR 的活性信号转导时, 这种模型促成紧密屏障 (图 25)。这使 AR 激活与应力纤维形成息息相关。结合目前观察到 AR 激动剂也降低了 BEC 单层中的 TEER, 表明 AR 调节, 通过细胞骨架元素作用, 引起使屏障通透性增强的内皮细胞形状变化。

实施例

[0159] 提供下列实施例以说明本发明的实施方案, 但是决非旨在限制其范围。

[0160] 实施例 1- 小鼠

[0161] 先前已经描述了 $cd73^{-/-}$ 小鼠 (Thompson 等, "Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage During Hypoxia," *J. Exp. Med.* 200:1395-1405 (2004), 其据此通过引用整体并入) 并且已经与 C57BL/6 回交 14 代。 $cd73^{-/-}$ 小鼠对感染无明显易感性并且基于其淋巴器官的尺寸和细胞组成及在体内和体外测定中其 T 和 B 细胞反应看来似乎正常 (Thompson 等, "Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage During Hypoxia," *J. Exp. Med.* 200:1395-1405 (2004), 其据此通过引用整体并入)。从 Jackson Laboratories 购买 C57BL/6 和 C57BL/6 背景的 $tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠。在康奈尔大学 (Cornell University) 或土尔库大学 (University of Turku), 在特定无菌条件下繁殖和饲养小鼠。对于腺苷受体阻滞实验, 在 EAE 诱导前 1 天开始给予小鼠补充了于 DMSO (45 体积% 于 PBS 中) 中的 0.6g/L 咖啡因 (Sigma) 或 2mg/kg SCH58261 (1mg/kg 皮下和 1mg/kg 腹腔内) 或单独的 45%DMSO 的饮用水并且在整个实验中继续。对小鼠进行的所有操作均通过相关动物审查委员会批准。

[0162] 实施例 2-EAE 诱导和评分

[0163] 通过使小鼠接受如据此通过引用整体并入的 Swanborg, "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease," *Clin. Immunol. Immunopathol.* 77:4-13 (1995) 和 Bynoe 等, "Epicutaneous Immunization with Autoantigenic Peptides Induces T Suppressor Cells that Prevent Experimental Allergic Encephalomyelitis," *Immunity* 19:317-328 (2003) 中描述的髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 ("MOG") EAE 诱导方案来诱导 EAE。简单地说, 经皮下向每侧腹注射 MOG₃₅₋₅₅ 肽 (3mg/ml 于 PBS 中) (Invitrogen) 和弗氏完全佐剂 (complete Freund's adjuvant) (CFA, Sigma) 的 1:1 乳剂 (50 μ l)。在免疫时和 2 天后再次静脉注射 (200 μ l 于 PBS 中) 百日咳毒素 (PTX, 20ng) (Biological Laboratories Inc.)。基于疾病症状严重程度每天为小鼠 EAE 评分; 0= 无病, 0.5-1= 尾部虚弱 / 跛行, 2= 尾部跛行和局部后肢麻痹, 3=

全部后肢麻痹,4= 后肢和前肢麻痹,5= 死亡。使得分为 4 的小鼠安乐死。

[0164] 实施例 3-T 细胞制备和过继转移

[0165] 用于无 PTX 的 CFA 中的 MOG₃₅₋₅₅ 肽初敏化小鼠。一周后,从脾脏和淋巴结中收获淋巴细胞并且与 ACK 缓冲液 (0.15M NH₄Cl、1mMKHCO₃、0.1mM EDTA, pH7.3) 孵育以溶解红细胞。将细胞与 CD8 (TIB-105)、IA^{b, d, v, p, q, r} (212. A1)、FcR (2.4-G2)、B220 (TIB-164)、NK1.1 (HB191) 的抗体,然后与 BioMag 山羊抗小鼠 IgG、IgM 和山羊抗大鼠 IgG (Qiagen) 孵育。负磁富集后,直接使用 CD4⁺ 细胞或进一步分选为特定亚群。对于分选,用 CD4 (RM4-5) 和 CD73 (TY/23) 的抗体,并且在一些实验中用 CD25 (PC61) 的抗体为细胞染色,然后利用 FACS Aria (BD Biosciences) 分离。分选后纯度通常 >99%。对于过继转移,洗涤全部 CD4⁺ 或分选 T 细胞并再次悬浮于无菌 PBS 中。受体小鼠经静脉接受 ≤ 2.5 × 10⁶ 个于 200 μl 无菌 PBS 中的细胞。

[0166] 实施例 4- 流式细胞术

[0167] 用 CD4 (RM4-5)、CD73 (TY/23) 或 FoxP3 (FJK-16s) 的荧光染料偶联抗体为细胞悬浮液染色。根据生产商的说明 (eBioscience) 进行细胞内 FoxP3 染色。在 FACSCalibur (BD Biosciences) 上获得染色细胞。用 FlowJo 软件 (Tree Star) 分析数据。

[0168] 实施例 5-T 细胞细胞因子测定

[0169] 在受照 C57BL/6 脾细胞的存在下用 0 或 10 μM MOG 肽培养来自经 MOG 免疫的小鼠的分选 T 细胞。在 18 小时收集上清液并利用 Bio-plex 细胞因子 (Biorad) 测定分析 IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17、IL-1β 和 TNFα。

[0170] 实施例 6- 免疫组织化学 (“IHC”)

[0171] 为麻醉小鼠灌注 PBS,分离脑、脾脏和脊髓并速冻于组织 Tek-OCT 介质中。将 5 μm 切片 (矢状方向的脑) 贴在 Suprefrost/Plus 载玻片 (Fisher) 上,于丙酮中固定,并储存在 -80°C 下。对于免疫染色,解冻载玻片并且用于 PBS 中的 0.03% H₂O₂ 处理以阻滞内源过氧化物酶,用于正常山羊血清 (Zymed) 中的酪蛋白 (Vector) 阻滞,然后与抗 CD45 (YW62.3)、抗 CD4 (RM4-5) 或抗 ICAM-1 (3E2) 孵育。将载玻片与生物素化山羊抗大鼠 Ig (Jackson ImmunoResearch) 和链霉亲和素 -HRP (Zymed) 孵育并且用 AEC (红色) 底物试剂盒 (Zymed) 和苏木精复染剂显色。用 Fluoromount-G 封固盖玻片并且在光下拍照 (Zeiss)。

[0172] 实施例 7- 实时 q-PCR

[0173] 使用 Trizol (Invitrogen), 从 Z310 脉络丛细胞系中分离 RNA (Zheng 等, “Establishment and Characterization of an Immortalized Z310 Choroidal Epithelial Cell Line from Murine Choroid Plexus,” Brain Res. 958:371-380 (2002), 其据此通过引用整体并入)。使用 Reverse-iT 试剂盒 (ABGene) 合成 cDNA。使用对 AR 有特异性的引物 (根据需求提供) 测定基因表达水平并使用在 ABI7500 实时 PCR 系统上运行的 SYBR-Green 试剂盒 (ABGene) 标准化为 GAPDH 管家基因水平。进行熔解曲线分析以测量对每种 qPCR 产物的特异性。

[0174] 实施例 8- 评估 CD73 在 EAE 中的作用

[0175] 由于腺苷的免疫调节和免疫抑制特性,评估了 CD73 在 EAE 中的作用。基于 A1 腺苷受体 (AR) 缺陷型小鼠中 EAE 恶化的报道, (Tsutsui 等, “A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in

a Model of Multiple Sclerosis," *J. Neurosci.* 24:1521-1529 (2004), 其据此通过引用整体并入), 预期不能够催化细胞外腺苷生成的 $cd73^{-/-}$ 小鼠会经历严重 EAE。令人惊讶的是, $cd73^{-/-}$ 小鼠对 EAE 的诱导有高度抗性。然而, 来自 $cd73^{-/-}$ 小鼠的 $CD4^{+}T$ 细胞的确具有对 CNS 抗原产生免疫反应的能力并且当过继转移至 $cd73^{+/+}$ 细胞缺陷型小鼠体内时引起严重 EAE。来自野生型小鼠的 $CD73^{+}CD4^{+}T$ 细胞在转移至 $cd73^{-/-}$ 受体时也引起疾病, 表明 EAE 期间, 淋巴细胞进入脑需要在淋巴细胞上或 CNS 中表达 CD73。因为用广谱 AR 拮抗剂咖啡因和 A2A AR 特异性拮抗剂 SCH58261 保护 $cd73^{+/+}$ 小鼠免受 EAE 诱导, 所以该数据表明 EAE 期间 CD73 生成的细胞外腺苷, 而非 CD73 本身, 调节淋巴细胞进入 CNS。这些结果首先证明了 CD73 和腺苷在调节 EAE 发展中的作用。

[0176] 实施例 9- $cd73^{-/-}$ 小鼠抵抗 EAE 诱导

[0177] 为确定 EAE 进展期间 CD73 是否在控制炎症中起作用, 使 $cd73^{-/-}$ 和野生型 ($cd73^{+/+}$) 小鼠接受髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 ("MOG") EAE 诱导方案 (Swanborg, "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease," *Clin. Immunol. Immunopathol.* 77:4-13 (1995); Bynoe 等, "Epicutaneous Immunization with Autoantigenic Peptides Induces T Suppressor Cells that Prevent Experimental Allergic Encephalomyelitis," *Immunity* 19:317-328 (2003), 其据此通过引用整体并入)。每天监测 EAE 发展揭示, 与其野生型配对物相比, $cd73^{-/-}$ 小鼠始终表现出疾病严重程度显著降低 (图 1)。到疾病诱导 3 周后, 与野生型小鼠的 2.0 (尾部跛行和局部后肢麻痹) 相比, $cd73^{-/-}$ 小鼠的平均 EAE 得分仅为 0.5 (尾部虚弱) (图 1)。

[0178] 实施例 10-来自 $cd73^{-/-}$ 小鼠的 $CD4^{+}T$ 细胞对 MOG 免疫的反应

[0179] 然后人们提问到可用 $cd73^{-/-}$ 淋巴细胞抑制免疫反应的能力增强还是这些淋巴细胞不能对 MOG 刺激反应来解释 $cd73^{-/-}$ 小鼠对 EAE 诱导的抗性。天然 $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}T$ 细胞或 Treg 可调节活跃诱导的 EAE (Kohm 等, "Cutting Edge: $CD4^{+}CD25^{+}$ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Immunol.* 169:4712-4716 (2002), 其据此通过引用整体并入)。因为最近已经证实 Treg 表达 CD73 并且一些报道表明 Treg 功能需要 CD73 的酶活性。(Kobie 等, "T Regulatory and Primed Uncommitted $CD4^{+}T$ Cells Express CD73, Which Suppresses Effector $CD4^{+}T$ Cells by Converting $5'$ -Adenosine Monophosphate to Adenosine," *J. Immunol.* 177:6780-6786); Deaglio 等, "Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression," *J. Exp. Med.* 204:1257-1265 (2007), 其据此通过引用整体并入), 人们提问到在 $cd73^{-/-}$ 小鼠体内 Treg 的数量和抑制活性是否正常。如图 2A 所示, 在 EAE 诱导之前或之后, 在野生型和 $cd73^{-/-}$ 小鼠体内 $CD4^{+}FoxP3^{+}Treg$ 的频率无明显差异。类似地, 在 EAE 诱导之后, 在野生型小鼠体内表达 CD73 的 $CD4^{+}T$ 细胞百分比仅适度变化 (图 2B)。另外, 在野生型和 $cd73^{-/-}$ Treg 抑制 MOG 抗原特异性 $CD4^{+}$ 效应 T 细胞增殖的抑制能力方面未观察到显著差异。为确定当用 MOG 肽刺激时 $cd73^{-/-}$ T 细胞是否可反应, 评估这些细胞增殖和产生细胞因子的能力。来自经 MOG 免疫的 $cd73^{-/-}$ 和野生型小鼠的 $CD4^{+}T$ 细胞响应于不同浓度的 MOG 肽表现出相似程度的体外增殖。然而, 在体外 MOG 刺激后, 来自经 MOG 免疫的 $cd73^{-/-}$ 小鼠的 $CD4^{+}T$ 细胞分泌出比野

生型 CD73⁺CD4⁺ 或 CD73⁻CD4⁺T 细胞水平更高的 IL-17 和 IL-1 β (图 2C)。IL-17 水平升高与 MS(Matusevicius 等, "Interleukin-17mRNA Expression in Blood and CSF Mononuclear Cells is Augmented in Multiple Sclerosis," *Mult. Scler.* 5:101-104(1999), 其据此通过引用整体并入) 和 EAE 发展 (Komiya 等, "IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Immunol.* 177:566-573(2006), 其据此通过引用整体并入) 相关, 而高水平的促炎性 IL-1 β 细胞因子是 MS 的风险因素 (de Jong 等, "Production of IL-1 β and IL-1Ra as Risk Factors for Susceptibility and Progression of Relapse-Onset Multiple Sclerosis," *J. Neuroimmunol.* 126:172-179(2002), 其据此通过引用整体并入) 和 IL-17 生成的强化因子 (Sutton 等, "A Crucial Role for Interleukin(IL)-1 in the Induction of IL-17-Producing T Cells That Mediate Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Exp. Med.* 203:1685-1691(2006), 其据此通过引用整体并入)。MOG 刺激后在野生型和 cd73^{-/-}T 细胞之间未观察到 IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、INF- γ 和 TNF- α 分泌的差异 (图 2C)。总的说来, 来自这些测定的结果表明, cd73^{-/-}T 细胞可对 MOG 免疫很好地反应。

[0180] 然后确定来自 cd73^{-/-} 小鼠的 T 细胞是否具有引起 EAE 的能力。为测试这一点, 评估了来自经 MOG 免疫的 cd73^{-/-} 小鼠的脾脏和淋巴结的 CD4⁺T 细胞在转移至 tcra^{-/-} (cd73^{+/+}) 受体小鼠后诱导 EAE 的能力。tcra^{-/-} 小鼠缺乏内源 T 细胞并且不能自身发展 EAE (Elliott 等, "Mice Lacking Alpha B + T Cells are Resistant to the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Neuroimmunol.* 70:139-144(1996), 其据此通过引用整体并入)。与接受了野生型 CD4⁺T 细胞的 cd73^{+/+}tcra^{-/-} 受体小鼠相比, 接受了来自 cd73^{-/-} 供体的 CD4⁺T 细胞的 cd73^{+/+}tcra^{-/-} 受体小鼠发展明显更严重的疾病 (图 2D)。转移至 cd73^{+/+}tcra^{-/-} 受体小鼠后, 野生型和 cd73^{-/-} 供体 CD4⁺T 细胞表现出相等程度的扩增。因此, 当转移至 cd73^{+/+}tcra^{-/-} 小鼠体内时, 来自 cd73^{-/-} 小鼠的 CD4⁺T 细胞不但能够诱导 EAE, 而且引起比源自野生型小鼠的 CD4⁺T 细胞更严重的 EAE。这些结果与体外测定一致, 其中 cd73^{-/-}CD4⁺T 细胞响应于 MOG 刺激分泌升高水平的 IL-17 和 IL-1 β (已知其使 EAE 恶化) (图 2C), 并且表明由于 CD73 在非造血细胞中没有表达 (在 CNS 中最有可能没有表达), cd73^{-/-} 小鼠对 MOG 诱导的 EAE 有抗性。

[0181] 实施例 11-EAE 诱导后 Cd73^{-/-} 小鼠表现出很少 / 无淋巴细胞浸润至 CNS 中

[0182] EAE 主要是 CD4⁺T 细胞介导的疾病 (Montero 等, "Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ T Cells: Analysis Using Depleting Antibodies," *J. Autoimmun.* 23:1-7(2004), 其据此通过引用整体并入) 并且在 EAE 进展期间, 淋巴细胞必须首先进入 CNS 以便对 CNS 抗原做出其炎症反应, 导致轴突脱髓鞘和麻痹 (Brown 等, "Time Course and Distribution of Inflammatory and Neurodegenerative Events Suggest Structural Bases for the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Comp. Neurol.* 502:236-260(2007), 其据此通过引用整体并入)。为确定在 EAE 诱导后是否在 cd73^{-/-} 小鼠体内观察到 CNS 淋巴细胞浸润, 通过免疫组织化学法检查脑和脊髓切片是否存在 CD4⁺T 细胞和 CD45⁺ 细胞。在 MOG 免疫后第 13 天, 与野生型小鼠 (图 3A-C、G) 相比, cd73^{-/-} 小鼠在脑和脊髓中呈现出显著更低频率的 CD4⁺ (图 3D-G) 和 CD45⁺ (图 4[补充图 1]) 淋巴细胞。另外, 在淋巴细胞

跟踪实验中,其中将来自 2d2TCR 转基因小鼠的 MOG 特异性 T 细胞 (Bettelli 等, "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis," *J. Exp. Med.* 197:1073-1081 (2003), 其据此通过引用整体并入) 转移至伴有 EAE 诱导的野生型或 $cd73^{-/-}$ 小鼠体内,在野生型受体小鼠体内 CNS 中的 2d2 细胞百分比随时间增长几倍,但是在 $cd73^{-/-}$ 受体中根本不增长 (图 5)。总的说来,这些结果表明,在 $cd73^{-/-}$ 小鼠中观察到对 EAE 诱导的防护与 CNS 淋巴细胞浸润大大减少相关。尽管如此,当转移至相伴诱导发展 EAE 的 $cd73^{+/+} tcra^{-/-}$ 小鼠体内时,来自经 MOG 免疫的 $cd73^{-/-}$ 小鼠的 $CD4^+$ T 细胞具有进入 CNS 的能力 (图 3K 和 3L)。事实上,在接受了 $cd73^{-/-}CD4^+$ T 细胞的 $cd73^{+/+} tcra^{-/-}$ 小鼠体内 (图 3K、L) 观察到比在接受了野生型 $CD4^+$ T 细胞的 $cd73^{-/-} tcra^{-/-}$ 小鼠体内 (图 3H-J) 中更早且更广泛的 CNS $CD4^+$ 淋巴细胞浸润。因此,这些结果证明,来自 $cd73^{-/-}$ 小鼠的供体 T 细胞具有浸润 $cd73^{+/+}$ 受体小鼠的 CNS 的能力。

[0183] 实施例 12- 对于有效的 EAE 发展,CD73 必须在淋巴细胞或 CNS 中表达。

[0184] 人们接着会问, $CD4^+$ T 细胞上的 CD73 表达是否可补偿 CNS 中 CD73 表达的缺乏并且使 EAE 发展。因此,从经 MOG 免疫的野生型小鼠将 $CD4^+$ T 细胞过继转移至 $cd73^{-/-}$ 受体中,相伴诱导 EAE 并且与经相似处理的野生型受体比较疾病活动度 (图 6A)。虽然如预期的一样,在 EAE 诱导后野生型受体发展疾病,但到疾病诱导 3 周后 $cd73^{-/-}$ 受体也发展出显著的 EAE,其中平均疾病得分为 1.5。这远远高于 $cd73^{-/-}$ 小鼠在相同时间点正常显示的平均得分 0.5 (图 1)。为进一步明确 $CD4^+$ T 细胞 CD73 表达与 EAE 易感性的关联,将来自免疫野生型小鼠的分选 $CD73^+CD4^+$ 和 $CD73^-CD4^+$ T 细胞或来自免疫 $cd73^{-/-}$ 小鼠的全部 $CD4^+(CD73^-)$ T 细胞转移至伴有 EAE 诱导的 $cd73^{-/-}$ 受体中 (图 6B)。诱导 3 周后,接受了来自野生型小鼠的 $CD73^+CD4^+$ T 细胞的 $cd73^{-/-}$ 小鼠发展 EAE,其中平均得分为约 1.5。相反,接受了源自野生型的 $CD73^-CD4^+$ T 细胞的 $cd73^{-/-}$ 小鼠并未发展显著的 EAE。另外,来自 $cd73^{-/-}$ 供体小鼠的具有在表达 CD73 的 $tcra^{-/-}$ 小鼠体内引起严重 EAE 的能力 (图 2D) 的 $CD4^+$ 细胞在受体 $cd73^{-/-}$ 小鼠体内也不能够加强 EAE (图 6B)。因此,虽然 CD73 在 T 细胞上表达可部分补偿非造血细胞中 CD73 表达的缺乏,但是当 CD73 在两个隔室中表达时,最有效地诱导了 EAE。

[0185] 表达 CD73 的非造血细胞促进 EAE 发展的特性未知。因为许多类型的内皮细胞表达 CD73, 所以将 BBB 的血管内皮细胞视为可能候选物 (Yamashita 等, "CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes," *Eur. J. Immunol.* 28:2981-2990 (1998), 其据此通过引用整体并入)。然而,免疫组织化学揭示,小鼠脑内皮细胞为 CD73⁻。然而在这些实验期间,观察到 CD73 在脑中的脉络丛上高度表达 (图 6C),这是 EAE 进展期间淋巴细胞进入 CNS 的入口点 (Brown 等, "Time Course and Distribution of Inflammatory and Neurodegenerative Events Suggest Structural Bases for the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Comp. Neurol.* 502:236-260 (2007), 其据此通过引用整体并入)。图 4D 显示 EAE 诱导 12 天后与野生型小鼠脉络丛相关联的浸润淋巴细胞。在脊髓的脑膜下区域也观察到最小限度的 CD73 染色。总之,这些结果表明, T 细胞或 CNS 中 (可能在脉络丛上) 的 CD73 表达是有效 EAE 发展所必需的。

[0186] 实施例 13- 腺苷受体拮抗剂保护小鼠免受 EAE 诱导

[0187] 因为 CD73 催化 AMP 分解为腺苷并且 AR 在 CNS 中表达 (Tsutsui

等, "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," *J. Neurosci.* 24:1521-1529(2004); Rosi 等, The Influence of Brain Inflammation Upon Neuronal Adenosine A2B Receptors, " *J. Neurochem.* 86:220-227(2003), 其据此通过引用整体并入), 接着确定 EAE 进展期间 AR 信号转导是否重要。在 EAE 实验前 1 天和整个 EAE 实验持续期间, 用 0.6g/L 于其饮用水中的广谱 AR 拮抗剂咖啡因处理野生型和 $cd73^{-/-}$ 小鼠 (Dall'Igna 等, "Caffeine as a Neuroprotective Adenosine Receptor Antagonist," *Ann. Pharmacother.* 38:717-718(2004), 其据此通过引用整体并入), 这与每天每只小鼠 4.0mg 咖啡因的近似剂量相对应 (Johansson 等, "A1 and A2A Adenosine Receptors and A1mRNA in Mouse Brain: Effect of Long-Term Caffeine Treatment," *Brain Res.* 762:153-164(1997), 其据此通过引用整体并入) (图 7A)。与先前公布的结果 (Tsutsui 等, "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," *J. Neurosci.* 24:1521-1529(2004), 其据此通过引用整体并入) 相比, 显著保护了接受咖啡因的野生型小鼠免于 EAE 发展 (图 7A)。正如所预期, 接受了咖啡因的 $cd73^{-/-}$ 小鼠未发展 EAE (图 7A)。因为 CD73 在脉络丛中高度表达 (图 6C), 接着确定是否 AR 也在脉络丛上表达。利用 Z310 鼠脉络丛细胞系 (Zheng 等, "Establishment and Characterization of an Immortalized Z310 Choroidal Epithelial Cell Line from Murine Choroid Plexus," *Brain Res.* 958:371-380(2002), 其据此通过引用整体并入), 仅通过 qPCR 检测 A1 和 A2A 腺苷受体亚型的 mRNA (图 7B)。因为先前已经证实 A1AR $^{-/-}$ 小鼠在疾病诱导后发展严重 EAE (Tsutsui 等, "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," *J. Neurosci.* 24:1521-1529(2004), 其据此通过引用整体并入), 人们提问用对 A2A 亚型有特异性的 AR 拮抗剂 SCH58261 处理野生型小鼠 (Melani 等, "The Selective A2A Receptor Antagonist SCH58261 Protects From Neurological Deficit, Brain Damage and Activation of p38MAPK in Rat Focal Cerebral Ischemia," *Brain Res.* 1073-1074:470-480(2006), 其据此通过引用整体并入) 是否可防御 EAE 发展。在 EAE 诱导前 1 天和在整个实验过程的 30 天中每天经腹腔和皮下给予野生型小鼠 1mg/kg 于 DMSO 中的 SCH58261 或单独的 DMSO (总计 2mg/kg) (图 7C)。与接受单独的 DMSO 的野生型小鼠相比, 接受 SCH58261 的野生型小鼠显著防御了 EAE 发展 (图 7C)。另外, 在 EAE 诱导后第 15 天, 与 DMSO 处理的野生型小鼠相比, 给予 SCH58261 的野生型小鼠在脑和脊髓中表现出明显更低频率的 CD4⁺ 淋巴细胞 (图 7D)。因为研究已经证实脉络丛上的黏附分子 (例如 ICAM-1、VCAM-1 和 MadCAM-1) 在 EAE 发病机制中起作用 (Engelhardt 等, "Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation," *Microsc. Res. Tech.* 52:112-129(2001), 其据此通过引用整体并入), 确定 EAE 诱导之后, SCH58261 处理是否影响脉络丛上的黏附分子表达。比较来自经 DMSO 和 SCH58261 处理的野生型小鼠的脉络丛显示, A2A AR 阻滞防止通常在 EAE 进展期间出现的 ICAM-1 的上调 (图 8)。

[0188] 基于这些结果, 推断 $cd73^{-/-}$ 小鼠不能催化细胞外腺苷生成解释了在 MOG 免疫后

cd73^{-/-}小鼠不能有效发展EAE并且脉络丛上的CD73表达和A2A AR信号转导是EAE进展的要求。

[0189] 该研究的目的是评估CD73在EAE中的作用,它是MS的动物模型。因为CD73催化通常具免疫抑制力的细胞外腺苷形成(Bours等,"Adenosine 5'-Triphosphate and Adenosine as Endogenous Signaling Molecules in Immunity and Inflammation,"*Pharmacol. Ther.* 112:358-404(2006),其据此通过引用整体并入)并且A1AR^{-/-}小鼠表现出严重EAE(Tsutsui等,"A1Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis,"*J. Neurosci.* 24:1521-1529(2004),其据此通过引用整体并入),申请人预测cd73^{-/-}小鼠也会发展严重EAE。然而,cd73^{-/-}小鼠对EAE诱导有高度抗性,惊人的发现认为许多研究证明cd73^{-/-}小鼠更易患炎症。例如,cd73^{-/-}小鼠更易感博来霉素诱导的肺损伤(Volmer等,"Ecto-5'-Nucleotidase(CD73)-Mediated Adenosine Production is Tissue Protective in a Model of Bleomycin-induced Lung Injury,"*J. Immunol.* 176:4449-4458(2006),其据此通过引用整体并入)并且更易患血管炎症和内膜增生(Zernecke等,"CD73/ecto-5'-Nucleotidase Protects Against Vascular Inflammation and Neointima Formation,"*Circulation* 113:2120-2127(2006),其据此通过引用整体并入)。与这些报道一致,申请人证实,MOG刺激后cd73^{-/-}T细胞产生更高水平的EAE相关促炎性细胞因子IL-1 β 和IL-17。此外,在MOG免疫后将cd73^{-/-}T细胞过继转移至缺乏T细胞但是在其整个外周表达CD73的tcr α ^{-/-}小鼠体内,导致严重的CNS炎症,与腺苷作为抗炎介质的作用一致。有趣的是,注意到已经证实IFN- β 处理,MS最有效的疗法之一,上调了体外和体内内皮细胞上的CD73表达(Airas等,"Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis:A Special Reference to CD73 and Adenosine,"*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1110:641-648(2007),其据此通过引用整体并入)。因此,虽然未完全理解IFN- β 有益于MS患者的机制,但是伴随其已知抗炎和神经保护作用的腺苷生成增多可能是一个因素。

[0190] 与对EAE诱导的抗性一致,与野生型小鼠相比,在EAE期间cd73^{-/-}小鼠浸润CNS的细胞的频率较低。这也是出人意料的发现,因为先前已经证实生成CD73的腺苷限制嗜中性粒细胞在缺氧时迁移穿过血管内皮和限制淋巴细胞迁移穿过引流淋巴结的高内皮小静脉(Thompson等,"Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase(CD73) in Vascular Leakage During Hypoxia,"*J. Exp. Med.* 200:1395-1405(2004),其据此通过引用整体并入)。相反,申请人的数据表明,病原T细胞进入CNS的有效通道需要CD73和CD73生成的细胞外腺苷。因此,EAE期间CD73和腺苷在CNS淋巴细胞浸润中所起的作用比在神经炎症的调节中的作用更加重要。

[0191] 重要的是知道何时必须表达CD73以便T细胞迁移进入CNS。在T细胞亚类(Yamashita等,"CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes,"*Eur. J. Immunol.* 28:2981-2990(1998),其据此通过引用整体并入)以及一些上皮细胞(Strohmeier等,"Surface Expression, Polarization, and Functional Significance of CD73 in Human Intestinal Epithelia,"*J. Clin. Invest.* 99:2588-2601(1997),其据此通过引用整体并入)和内皮细胞(Yamashita等,

"CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes," *Eur. J. Immunol.* 28:2981-2990 (1998), 其据此通过引用整体并入) 上发现 CD73。此处提出的数据明确证明, 虽然 $cd73^{-/-}$ T 细胞对 MOG 免疫很好地反应, 但是除非 CD73 在非造血组织中表达 (即, 在过继转移来自 $cd73^{-/-}$ 小鼠的 $CD4^{+}$ T 细胞后发展 EAE 的 $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠), $cd73^{-/-}$ T 细胞不能进入 CNS。T 细胞上的 CD73 表达也可部分补偿非造血细胞上 CD73 的缺乏 (即, 当过继转移 $CD73^{+}$, 而非 $CD73^{-}$ 、 $CD4^{+}$ T 细胞时, $cd73^{-/-}$ 小鼠变得易感 EAE)。虽然因为 CD73 在人脑内皮细胞上表达, 所以将 BBB 内皮细胞视为 CNS 中的 CD73 相关来源, (Airas 等, "Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis: A Special Reference to CD73 and Adenosine," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1110:641-648 (2007), 其据此通过引用整体并入), 但是免疫组织化学揭示小鼠脑内皮细胞为 $CD73^{-}$ 。然而, 发现 CD73 在血液和脑脊液 (CSF) 之间形成屏障并且在调节 CNS 中的淋巴细胞免疫监视中起作用的脉络丛上皮细胞上高度表达 (Steffen 等, "CAM-1, VCAM-1, and MADCAM-1 are Expressed on Choroid Plexus Epithelium but Not Endothelium and Mediate Binding of Lymphocytes In Vitro," *Am. J. Pathol.* 148:1819-1838 (1996), 其据此通过引用整体并入)。还已表明脉络丛是引发 EAE 进展时 T 细胞的入口点 (Brown 等, "Time Course and Distribution of Inflammatory and Neurodegenerative Events Suggest Structural Bases for the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Comp. Neurol.* 502:236-260 (2007), 其据此通过引用整体并入)。虽然淋巴细胞-脑内皮细胞通过 VLA-4/VCAM-1 结合的相互作用在 EAE 和 MS 中的作用证据充分 (Rice 等, "Anti- $\alpha 4$ Integrin Therapy for Multiple Sclerosis: Mechanisms and Rationale," *Neurology* 64:1336-1342 (2005), 其据此通过引用整体并入), 但是至少在 EAE 中, 可能运输通过内皮 BBB 的淋巴细胞对疾病维持和进展比对疾病引发更重要。

[0192] 下一个问题是 CD73 如何促进 T 细胞迁移进入 CNS。早期工作证实, 淋巴细胞 CD73 可促进人淋巴细胞与内皮细胞以 LFA-1 依赖的方式结合 (Airas 等, "CD73 Engagement Promotes Lymphocyte Binding to Endothelial Cells Via a Lymphocyte Function-Associated Antigen-1-dependent Mechanism," *J. Immunol.* 165:5411-5417 (2000), 其据此通过引用整体并入)。然而, 因为在 $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ 小鼠体内 CD73 缺陷型 T 细胞可进入 CNS 并且可引起严重疾病, 所以在 EAE 中这似乎不是 CD73 的作用 (图 2D)。可选地, CD73 可起酶的作用以产生细胞外腺苷, 其是细胞表面 AR 的配体。考虑到用咖啡因或 SCH58261 阻滞 AR 可保护小鼠免患 EAE, 这后一种功能与当前工作相关。虽然广谱 AR 拮抗剂咖啡因也抑制某些磷酸二酯酶 (Choi 等, "Caffeine and Theophylline Analogues: Correlation of Behavioral Effects With Activity as Adenosine Receptor Antagonists and as Phosphodiesterase Inhibitors," *Life Sci.* 43:387-398 (1988), 其据此通过引用整体并入), 但是其对 EAE 进展的调节最有可能是通过其对 AR 信号转导的影响 (Tsutsui 等, "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," *J. Neurosci.* 24:1521-1529 (2004), 其据此通过引用整体并入)。这个观点受 SCH58261 也通过特异性抑制 A2A AR 信号转导防止 EAE 进展的事实支持。因为 CD73 和 A1 和 A2A AR 亚型在脉络丛上表达, 所以 CD73 在脉络丛上生成的细胞外腺苷可按自分泌方式发射信号。

[0193] 腺苷信号转导最有可能调节脉络丛上黏附分子的表达。研究证实,脉络丛上黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 和 MadCAM-1 的上调与 EAE 进展相关 (Engelhardt 等, *Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation*, "Microsc. Res. Tech. 52:112-129 (2001), 其据此通过引用整体并入)。因为正如在 EAE 诱导后通常出现的那样 (Engelhardt 等, "Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation," *Microsc. Res. Tech.* 52:112-129 (2001), 其据此通过引用整体并入), 用 A2A AR 拮抗剂 SCH58261 处理的小鼠并未经历脉络丛 ICAM-1 表达增多 (图 8), 所以当前结果表明 A2AAR 信号转导使 EAE 进展期间 ICAM-1 增多。

[0194] 总之, 该数据显示, CD73 在 EAE 进展中起关键作用。保护缺乏 CD73 的小鼠免受与 EAE 诱导相关的退行性症状和 CNS 炎症。这是证明 EAE 期间淋巴细胞有效进入 CNS 需要 CD73 表达和 AR 信号转导的首项研究。此处提出的数据可标志将通向 MS 和其它神经炎症疾病新疗法的历程的第一步。

[0195] 实施例 14- 可通过激活腺苷受体调节 BBB

[0196] 该实验的目的是确定是否可通过激活腺苷受体调节血脑屏障。NECA 是对 A1、A2A 和 A3 腺苷受体具有相似亲和力而对 A2b 腺苷受体的亲和力低的非选择性腺苷受体激动剂。为了确定激活腺苷受体是否会诱导伊文思蓝染料外渗通过血脑屏障 (BBB), 用以下处理小鼠: NECA, 非选择性腺苷受体激动剂 (n=5, 100 μ l, 0. 01nM); SCH58261, A2A 腺苷受体特异性拮抗剂 (n=5, 1mg/kg); 百日咳毒素, 已知诱导 BBB 渗漏并用作阳性对照的药剂 (n=7, 200 μ l); 和 PBS, 作为媒介物对照 (n=5, 100 μ l)。还用 NECA (n=4, 100 μ l, 0. 01nM) 处理缺乏生成细胞外腺苷的能力的 CD73^{-/-} 小鼠。在静脉注射 200 μ l 1% 伊文思蓝染料 1 小时之前如单次静脉注射进行处理 (总共注射染料 2 μ g)。施用伊文思蓝 4 小时后, 用克他命 (ketamine)/ 甲苯噻嗪 (xylazine) 混合物麻醉小鼠并经由左心室灌注冰冷 PBS。收获脑并按 5 μ l/mg (v:w) 匀化于 n, n- 二甲基甲酰胺 (DMF) 中。在室温下于 DMF 中服用组织 72 小时以萃取染料。萃取后, 在 500xg 下离心组织 / 溶剂混合物 30 分钟并且在 BioTex 分光光度计上在 620nm 下读取 100 μ l 的上清液。将数据表示为 μ g 伊文思蓝 /ml DMF。

[0197] 用普通腺苷受体激动剂 NECA 处理小鼠可诱导染料迁移通过血脑屏障。这表明, 可通过激活腺苷受体调节这种屏障。在图 9A 中, 用 NECA 处理缺乏细胞外腺苷并且因此不能通过腺苷受体有效发射信号的 CD73^{-/-} 小鼠, 导致与 PBS 对照相比染料迁移增强近 5 倍。因为申请人已经证实, 使用这种拮抗剂阻滞 A2A 腺苷受体可防止淋巴细胞进入脑, 所以将 SCH58261 用作阴性对照 (Mills 等, "CD73 is Required for Efficient Entry of Lymphocytes into the Central Nervous System During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (27):9325-9330 (2008), 其据此通过引用整体并入)。在图 9B 中, 经 NECA 处理的野生型小鼠也显示出比对照小鼠增强。因为已知百日咳在小鼠 EAE 模型中诱导血脑屏障渗漏, 所述将百日咳用作阳性对照。

[0198] 实施例 15-A2A 和 A2b 腺苷受体在人内皮细胞系 hCMEC/D3 上表达

[0199] 为了建立体外血脑屏障 (BBB), 获得先前已经描述具有 BBB 性质的人脑内皮细胞系 hCMEC/D3 (Weksler 等, "Blood-brain Barrier-specific Properties of a Human Adult Brain Endothelial Cell Line," *J. Neurochem.* 19 (13):1872-4 (2005); Poller 等, "The Human Brain Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood-brain Barrier Model

for Drug Transport Studies," *J. Neurochem.* 107(5):1358-1368(2008), 其据此通过引用整体并入)。这里,建立了这些细胞上的腺苷受体的表达模式。

[0200] 使 hCMEC/D3 细胞生长至融合,收获并根据生产商的说明使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提取 RNA。使用 Verso cDNA 试剂盒 (Thermo Scientific, Waltham, MA) 合成 cDNA 并且使用 Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行实时 PCR。

[0201] 如图 10 所示,发现 A2A 和 A2b 腺苷受体在人内皮细胞系 hCMEC/D3 上表达。

[0202] 实施例 16- 腺苷受体对脑内皮细胞的刺激促进淋巴细胞迁移通过 BBB

[0203] 血脑屏障 ("BBB") 由内皮细胞构成。在 EAE 后期,已知淋巴细胞穿过 BBB。为了确定腺苷受体对脑内皮细胞的刺激是否可促进淋巴细胞迁移通过 BBB,建立了体外 BBB。获得先前已经描述具有 BBB 性质的人脑内皮细胞系 hCMEC/D3 (Weksler 等, "Blood-brain Barrier-specific Properties of a Human Adult Brain Endothelial Cell Line," *J. Neurochem.* 19(13):1872-4(2005); Poller 等, "The Human Brain Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood-brain Barrier Model for Drug Transport Studies," *J. Neurochem.* 107(5):1358-1368(2008), 其据此通过引用整体并入)。

[0204] 将 hCMEC/D3 细胞接种至 Transwell 并使其生长至融合。将 2×10^6 个 Jurkat 细胞添加到有或无 NECA (普通腺苷受体 [AR] 激动剂)、CCPA (A1AR 激动剂)、CGS21860 (A2A AR 激动剂) 或 DMSO 媒介物的上部腔室内。24 小时后,对下部腔室中的迁移细胞进行计数。值为相对于迁移通过未接种 hCMECD3 的 transwell 的细胞数量。

[0205] 如图 11 所示,广谱腺苷受体激动剂 NECA 诱导一些迁移。当在较低浓度下使用时, A2A 腺苷受体激动剂 CGS 促进淋巴细胞迁移通过体外 BBB。A1 激动剂 CCPA 在高水平下诱导淋巴细胞迁移,可能是因为激活了对 CCPA 的亲和力较低并因此仅在较高 CCPA 水平下激活的 A2A 腺苷受体。

[0206] 实施例 17-A2A 腺苷受体激活促进淋巴细胞迁移通过 CP

[0207] 脉络丛 ("CP") 控制淋巴细胞迁移进入 CNS。CP 表达 A1 和 A2A 腺苷受体。当阻滞 A2A 腺苷受体活性时,为小鼠预防了 EAE。当缺失 A1 腺苷受体时 EAE 增强。假设 A2A 腺苷受体激活促进淋巴细胞迁移通过 CP。Z310 细胞为鼠脉络丛细胞系。

[0208] 为测试所述假设,为 Transwell 膜接种 Z310 细胞并使其生长至融合。将 2×10^6 个 Jurkat 细胞添加到有或无 NECA (n=1, 普通 AR 激动剂)、CCPA (n=1, A1AR 激动剂)、CGS21860 (n=1, A2A AR 激动剂) 或 DMSO 媒介物 (n=1) 的上部腔室内。24 小时后,计数下部腔室中的迁移细胞。值为相对于迁移通过未接种 Z310 的 transwell 的细胞数量,并且结果示出在图 12 中。

[0209] 如图 12 所示,广谱腺苷受体激动剂 NECA 诱导迁移。A2A 腺苷受体激动剂 CGS 促进淋巴细胞迁移通过 CP。A1 激动剂 CCPA 在高水平下诱导淋巴细胞迁移,可能是因为激活了对 CCPA 的亲和力较低并且同样仅在高水平 CCPA 下激活的 A2A 腺苷受体。

[0210] 实施例 18- 人脑内皮细胞对腺苷受体诱导的 cAMP 调节敏感

[0211] 腺苷受体激活调节细胞内的 cAMP 水平。为了测定人脑内皮细胞对腺苷受体诱导的 cAMP 调节的敏感性,将人脑内皮细胞与不同浓度的腺苷受体激动剂培养,接着进行 cAMP 水平分析,如图 13 所示。

[0212] 使 HCMECD3 细胞在 24 孔板上生长至融合。因为已知腺苷受体 (“AR”) 刺激会影响 cAMP 水平,用或不用不同浓度的 NECA(普通 AR 激动剂)、CCPA(A1AR 激动剂)、CGS21860(A2A AR 激动剂)、DMSO 媒介物或 Forksolin(诱导 cAMP) 处理细胞。15 分钟后,添加溶解缓冲液并且将细胞冷冻于 -80°C 以终止反应。每种情况使用复样。使用 cAMP 筛选试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 测定 cAMP 水平。

[0213] 如图 13 所示,广谱腺苷受体激动剂 NECA 使 cAMP 水平升高,证实这些细胞可对腺苷受体信号转导反应。高水平的 A1 腺苷受体激动剂 CCPA 使 cAMP 水平升高,也可能是因为激活了对 CCPA 的亲和力较低并且同样仅在高水平 CCPA 下激活的 A2A 腺苷受体。A2A 腺苷受体激动剂 CGS 使人脑内皮细胞系中的 cAMP 水平略微升高。

[0214] 实施例 19- 雌性 A1 腺苷受体敲除小鼠发展比野生型更严重的 EAE

[0215] A1 和 A2A 腺苷受体在脉络丛上表达。A2A 腺苷受体拮抗剂保护小鼠免患 EAE。缺乏 A1 腺苷受体的小鼠易于发展比野生型对照更严重的 EAE 吗? 为回答这个问题,比较了野生型和无 A1 腺苷受体的小鼠的疾病情况。

[0216] 在 12-2-08 用 CFA/MOG₃₅₋₅₅+PTX 使雌性 A1 腺苷受体敲除 (A1ARKO, n=5) 和野生型 (WT, n=5) 小鼠免疫并且每天一次评分持续 41 天。如图 14 中的结果说明, A1ARKO 小鼠发展比野生型更严重的 EAE, 并且发病的速率也比野生型快。

[0217] 实施例 20- 来自饲喂了腺苷受体拮抗剂的野生型小鼠的脑具有比来自饲喂了腺苷受体拮抗剂的 CD73^{-/-} 小鼠的脑更高水平的 FITC- 葡聚糖

[0218] 为了检查普通腺苷受体拮抗剂咖啡因对血脑屏障通透性的作用,对小鼠饲喂咖啡因几天,并且然后注射常用于评估内皮通透性的 FITC 葡聚糖。

[0219] 更具体地说,没有限制地对小鼠饲喂 0.6g/1 于水中的咖啡因 (Sigma, St. Louis, MO) 或普通水持续 5 天。为小鼠腹腔内注射 FITC 葡聚糖 (10,000MW, Molecular Probes, Eugene, OR) 并且在 30 分钟后经左心室为小鼠灌注冰冷 PBS。摘除脑并速冻于 OCT (Tissue Tek, Torrance, CA) 中并储存在 -80°C 下直至切片。用苏木精对组织切片 (5 μm) 染色以进行光学显微镜检查并且用 DAPI 进行荧光复染。结果示于图 15 中。

[0220] 如图 15A 所示,来自饲喂了咖啡因的 CD73^{-/-} 小鼠的脑切片的可视化显示出比野生型小鼠更浅的绿色,表明较少 FITC- 葡聚糖外渗通过血脑屏障。来自野生型小鼠的脑切片显示强烈的绿色背景 (图 15B), 这表明较多 FITC- 葡聚糖外渗通过血脑屏障。图 16 以图解形式示出了野生型小鼠的结果。

[0221] 实施例 21- 腺苷受体激动剂 NECA 使伊文思蓝染料外渗通过血脑屏障增强

[0222] 该实验的目的是确定是否可通过激活腺苷受体调节血脑屏障。NECA 是对 A1、A2A 和 A3 腺苷受体具有相似亲和力而对 A2B 腺苷受体具有低亲和力的非选择性腺苷受体激动剂。

[0223] 为了确定激活腺苷受体是否会诱导伊文思蓝染料外渗通过血脑屏障 (BBB), 在第 1 天首先用非选择性腺苷受体激动剂 NECA (n=2, 100 μl , 0.01nM) 和作为媒介物对照的 PBS (n=2, 100 μl) 处理小鼠。然后在第 2 天用 CFA-MOG₃₅₋₅₅ 和百日咳使小鼠免疫以诱导 EAE。在第 3 天、第 5 天、第 7 天和第 9 天每隔一天施用 NECA 或 PBS。在第 10 天,为小鼠静脉内注射 200 μl 11% 伊文思蓝染料 (总共注射染料 2 μg)。施用伊文思蓝 6 小时后,用克他命 / 甲苯噻嗪混合物麻醉小鼠并经由左心室灌注冰冷 PBS。收获脑并按 5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (v:w) 匀化于

n, n- 二甲基甲酰胺 (DMF) 中。在室温下于 DMF 中培养组织 72 小时以萃取染料。萃取后, 在 $500\times g$ 下离心组织 / 溶剂混合物 30 分钟并且在 BioTex 分光光度计上在 620nm 下读取 $100\ \mu\text{l}$ 的上清液。将数据表示为 pg 伊文思蓝 /ml DMF 并示于图 17 中。

[0224] 该实验证明, 用普通腺苷受体激动剂 NECA 处理小鼠诱导伊文思蓝染料迁移进入对 EAE 免疫的小鼠的 CNS 中。这表明, 可通过激活腺苷受体调节 EAE 模型中的血脑屏障。经 NECA 处理的野生型 EAE 小鼠显示 BBB 通透性增强超过 PBS 对照 EAE 小鼠。

[0225] 图 18 以图解形式显示附加实验的结果, 证明聚乙二醇化腺苷脱氨酶 (“PEG-ADA”) 处理抑制野生型小鼠的 EAE 发展。诱导 EAE, 每天监测疾病活动度, 并且为每 4 天经腹腔内给予了单独的对照 PBS 媒介物或 15 个单位 /kg 体重的 PEG-ADA 的野生型小鼠计算平均 EAE 得分。实心正方形表示给予了 PBS 媒介物的野生型小鼠 ($n=3$); 空心正方形表示给予了 PEG-ADA 的野生型小鼠 ($n=3$)。这些结果证明腺苷脱氨酶处理和腺苷受体阻滞保护野生型小鼠免受 EAE 诱导。

[0226] 实施例 22- 小鼠和大鼠模型

[0227] 使用来自 Jackson Laboratories 的 C57BL/6 小鼠作为野生型。使用的所有小鼠均为 7-9 周龄并且体重介于 20-25g 之间。所有大鼠均为雌性并且为 8 周龄并且体重介于 200-220g 之间。在特定无病原菌条件下繁殖和饲养小鼠和大鼠。所有操作均根据批准的 IACUC 方法进行。

[0228] 实施例 23- 药物和葡聚糖的施用

[0229] 将腺苷受体激动剂 NECA、CCPA、CGS21860 和 SCH58261 (Tocris, Ellisville, MO) 各自溶于 DMSO 中, 然后于 PBS 中稀释成所需浓度; 在多数情况下, 最终 DMSO 浓度 $<0.5\%$ (体积 / 体积)。将 Lexiscan (Regadenoson; TRC, Inc., Toronto) 溶于 PBS 中。对于媒介物对照, 将 DMSO 于 PBS 中稀释至相同浓度。将 FITC 或德克萨斯红 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 标记的脱水葡聚糖再次悬浮于 PBS 至 10mg/ml 。牵涉葡聚糖注射的所有实验使用 1.0mg 于 PBS 中的葡聚糖。在相伴注射药物和葡聚糖的实验中, 将 1.0mg 葡聚糖与药物混合至所需浓度, 最终体积为 $200\ \mu\text{l}$ 。在剂量 - 反应实验中, 相伴注射药物和葡聚糖。除 SCH58261 的注射外, 所有注射均用 27 规格针球后静脉注射。在 SCH58261 实验中, 在实验当天前每天腹腔注射 1mg/kg 的 SCH58261 并且以该浓度对小鼠预给药, 持续 4 天。在实验时施用附加注射。在第 5 天注射媒介物 / 药物和葡聚糖并且在媒介物 / 药物施用 3 小时后收集组织。在 Lexiscan 实验中, 经静脉施用 Lexiscan, 注射 3 次, 间隔 5 分钟并且除非另外说明, 在第 15 分钟时收集组织。

[0230] 实施例 24- 处理和组织收集

[0231] 在剂量 - 反应实验和用 A1AR 和 A2A AR 敲除小鼠的实验中, 相伴注射药物和葡聚糖。3 小时后, 用克他命 / 甲苯噻嗪麻醉小鼠并使其接受含异氟烷的头锥体 (nose cone)。经心脏的左心室为小鼠灌注 25-50ml 冰冷 PBS, 然后去头。摘除其脑, 称重并冷冻用于之后的分析。

[0232] 实施例 25- 对脑中葡聚糖的荧光分析

[0233] 将冰冷 50mM Tris-Cl (pH7.6) 添加到冷冻脑 ($100\ \mu\text{l}/100\text{mg}$ 脑) 并于冰上解冻。用杜恩斯匀浆器 (dounce homogenizer) 使其匀化并且在室温 (rt) 下于微量离心机中在 $16.1\times g$ 下离心 30 分钟。将上清液转移到新管中并且添加等体积的无水甲醇。在室温下在

16.1×g 下再离心样本 30 分钟。将上清液 (200 μl) 转移到 Corning costar96 孔黑色聚苯乙烯测定板中 (清澈见底)。另外,向每块板添加含有 0.001-10 μg/ml 于 50%Tris-Cl/50% 无水甲醇 (体积 / 体积) 中的葡聚糖的一系列标准品。由这些标准曲线得到葡聚糖的绝对浓度。在 BioTek (Winooski, VT) Synergy4 上进行荧光分析。在 488/519 (激发 / 发射) 下检测 FITC- 葡聚糖并且在 592/618 检测德克萨斯红 - 葡聚糖。

[0234] 实施例 26- 原代脑内皮细胞分离

[0235] 已经由先前描述的技术改编了这种方法。Song 和 Patcher, "Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins," *In Vitro Cell.Dev.Biol. Anim.* 39:313-320 (2003), 其据此通过引用整体并入。简单地说,使 12 周龄的 C57BL/6 小鼠安乐死并去头。使解剖的脑与小脑分开并且通过无菌厄特曼纸 (Whatman paper) 上小心滚动脑来去除大面积血管。然后于杜恩斯匀浆器中将组织匀化于补充了 L- 谷氨酰胺和 Pen/Strep 的冰冷 DMEM-F12 介质中,并且在 4°C 于 3800×g 下离心所得匀浆 5 分钟。丢弃上清液后,使沉淀再次悬浮于 18% (重量 / 体积) 于 PBS 溶液中的葡聚糖,用力混合并且在 4°C 于 10000×g 下离心 10 分钟。用葡聚糖上清液,通过轻轻抽吸小心去除泡沫状髓鞘层。使沉淀再次悬浮于预热的 (37°C) 消化培养基 (补充了 1mg/ml 胶原酶 / 分散酶、40 μg/ml DNA 酶 I 和 0.147 μg/ml 蛋白酶抑制剂对甲苯磺酰赖氨酸氯甲基酮的 DMEM) 中并且在 37°C 下偶尔搅拌下孵育 75 分钟。在 3800×g 下离心悬浮液。丢弃上清液;使沉淀再次悬浮于预热的 (37°C) PBS 中并且在 3800×g 下离心。使沉淀悬浮于完全培养基 (含有 10% 血浆来源的血清、L- 谷氨酰胺、1% 抗生素 - 抗真菌剂、100mg/ml 肝素和 100mg/ml 内皮细胞生长添加剂的 DMEM-F12 培养基) 中。将所得毛细血管片段涂在涂有鼠胶原 IV (50 μg/ml) 的组织培养皿上,密度对应 1 个脑 / 9.5cm²。在 24h 和 48h 后更换培养基。前两天向培养基中添加嘌呤霉素 (8 μg/ml)。分析之前,使原代小鼠脑内皮细胞生长直至 5-7 天后培养物在体外达到完全融合。

[0236] 实施例 27- 细胞培养和 qRT-PCR

[0237] 从 ATCC (Manassas, VA) 获得 bEnd. 3 小鼠脑内皮细胞系并使其在 ATCC 配制的补充了 10%FBS 的 DMEM 中生长。使用 Trizol (Invitrogen) 提取,从 bEnd. 3 细胞分离 RNA。使用 Multiscribe 逆转录酶 (Applied Biosystems, Carlesbad, CA) 合成 cDNA。使用对腺苷受体和 CD73 有特异性的引物 (根据需求提供) 测定基因表达水平并且使用在 BioRad CFX96 实时 qPCR 系统上运行的 KapaSybr Fast (KapaBiosystems, Woburn, MA) 标准化为 TBP 管家基因水平。进行熔解曲线分析以测量对每种 qPCR 产物的特异性。

[0238] 实施例 28- 腺苷受体蛋白质印迹和免疫荧光分析

[0239] 如上所述培育原代小鼠脑内皮细胞和 Bend. 3 细胞培养物。用 1ml 含有蛋白酶抑制剂的溶解缓冲液溶解细胞并且用 TCA 溶液浓缩至 200 μl。使样本跑 12%SDS-PAGE 并转移到消化纤维素纸上。用 1%PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 封闭膜并与抗 A1AR (AAR-006) 和 A2AAR (AAR-002) 一抗 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) 孵育过夜。洗涤膜,并且然后与山羊抗兔 HRP 孵育。彻底洗涤膜并且用 ECL 溶液显影并暴露于 X 射线胶片。对于腺苷受体免疫染色,对麻醉小鼠灌注 PBS 并且分离脑并速冻于组织 Tek-OCT 培养基中。将 5 μm 切片 (矢状方向的脑) 贴在 Suprefrost/Plus 载玻片 (Fisher) 上,于丙酮中

固定,并储存在 -80°C 下。解冻载玻片,于PBS中洗涤,用于正常山羊血清(Zymed)中的酪蛋白(Vector)封闭,并且然后与抗CD31(MEC13.3, BDBiosciences)和抗A1AR(A4104, Sigma)或抗A2A AR(AAR-002, Alomone Labs)孵育。然后将载玻片与山羊抗大鼠Igalexafuor488(Invitrogen)和山羊抗兔Ig德克萨斯红-X(Invitrogen)孵育。用具有DAPI(Vector Laboratories, Burlingame, CA)的Vectashield封固剂封固切片。在Zeiss Axio Imager M1 荧光显微镜上获得图像。

[0240] 实施例 29- 荧光原位杂交 (FISH)

[0241] 为检测脑内皮中的腺苷受体 mRNA,我们使用 FITC 标记的 Cd31 和生物素标记的 A1 或 A2A DNA 寡核苷酸探针(Integrated DNA Technologies, 根据要求可获得探针序列)进行 FISH。对麻醉小鼠灌注 PBS 并且分离脑并速冻于组织 Tek-OCT 培养基中。将 12 微米冰冻切片固定在 Superfrost/Plus 载玻片(Fisher)上。在载玻片上风干 30 分钟后,将组织固定于 4% 中性缓冲多聚甲醛(PFA)中 20 分钟并且于 $1\times\text{PBS}$ 中冲洗 30 分钟。接下来,于 0.1M 三乙醇胺中简单平衡组织并且于具有 0.25% 乙酸酐的 0.1M 三乙醇胺中乙酰基化 10 分钟。乙酰基化后立即通过递增的乙醇系列使切片脱水,并储存在室温下。使组织于 PBS 中再水合 2×15 分钟,并且于 $5\times\text{SSC}$ ($\text{NaCl} 0.75\text{M}$ 、柠檬酸钠 0.075M) 中平衡 15 分钟。然后在 42°C 下于杂交缓冲液(50% 去离子甲酰胺、 $4\times\text{SSC}$ 、鲑鱼精 DNA $40\mu\text{g/ml}$ 、20% (w/v) 硫酸葡聚糖、 $1\times\text{Denhardt}$ 溶液(Denhardt's solution))中使切片预杂交 1h。在 80°C 下使探针(300ng/ml)变性 3 分钟并添加到预热(42°C)缓冲液(杂交混合物)中。在 42°C 下在每张用石蜡膜覆盖的载玻片上用 $250\mu\text{l}$ 杂交混合物进行杂交反应 38h。在充满 $4\times\text{SSC}$ -50% 甲酰胺溶液的黑盒子中进行预杂交和杂交以避免 FITC 蒸发和光漂白。孵育后,于 $2\times\text{SSC}$ (室温)中洗涤切片 30 分钟,于 $2\times\text{SSC}$ (65°C)中洗涤 15 分钟,于 $0.2\times\text{SSC}$ 、0.1%SDS(65°C)中洗涤 15 分钟,并且于 PBS 中平衡 5 分钟。为检测生物素-探针,将切片与在含 $1\times$ 酪蛋白(Vector Laboratories)的 PBS 中的德克萨斯红 X 偶联的链霉亲和素(分子探针, S6370, $1\mu\text{g/ml}$)在室温下孵育 30 分钟。到第 15 分钟于 PBS 中去除过量链霉亲和素,接着到第 15 分钟于 $0.2\times\text{SSC}$ 、0.1%SDS(65°C)中去除过量链霉亲和素并且到第 15 分钟于 PBS 洗涤液中去除过量链霉亲和素。用具有 DAPI(Vector Laboratories)的 Vectashield 封固剂覆盖切片。使用 Zeiss Axio Imager M1 荧光显微镜获得图像。

[0242] 实施例 30- 注射和抗 β -淀粉样蛋白抗体和免疫荧光显微镜检查

[0243] 给予野生型和转基因(AD)小鼠 $0.80\mu\text{g}$ NECA(静脉)。3h 后,静脉施用 $400\mu\text{g}$ 的 β -淀粉样蛋白抗体($200\mu\text{l}$ 的 2mg/ml ;克隆 6E10, Covance, Princeton, NJ)并且使小鼠休息 90 分钟。然后如上所述对小鼠进行麻醉和灌注并将其脑置于 OTC 中并速冻用于稍后切片。于丙酮中固定矢状切片($6\mu\text{m}$)10 分钟,然后于 PBS 中洗涤。用酪蛋白封闭切片 20 分钟,然后与山羊抗小鼠 IgCy5(多克隆, 1mg/ml , Abcam, Cambridge, MA)的 1:50 稀释液培养 20 分钟,然后于 PBS 中洗涤 3 次。然后干燥切片并且用具有 DAPI(Vector Laboratories)的 Vectashield Hardset 封固剂封固。在 Zeiss Axio Imager M1 荧光显微镜上获得图像。

[0244] 实施例 31- 跨内皮细胞电阻 (TEER) 测定

[0245] 使 Bend. 3 细胞在孔径为 $8\mu\text{m}$ 的 24 孔 transwell 插入物(BD Falcon, Bedford, MA)上的 ATCC 配制的补充了 10%FBS 的 DMEM 中生长,直至单层建立。使用伏欧表(EVOMX, World Precision Instruments, Sarasota, FL)评估 TEER。从记录值中减去来自未接种 transwell

的背景电阻以确定 TEER 绝对值。将每个单独 transwell 从 T0 开始的绝对 TEER 变化表示为变化百分比并且计算每个处理组的平均值。

[0246] 实施例 32- 内皮细胞的 F- 肌动蛋白染色

[0247] 使 Bend. 3 细胞在 24 孔板中的圆形盖玻片上生长 (如上所述)。用 1 μ M CCPA、1 μ M Lexiscan、DMSO 或单独的培养基处理细胞 3 或 30 分钟。用 PBS 洗涤盖玻片, 于 4% 多聚甲醛中固定, 再于 PBS 中洗涤, 然后用 0.5% 于 PBS 中的 TritonX-100 渗透化。于 PBS/1%BSA 中洗涤后, 用 1%BSA 封闭盖玻片, 然后用 Phalloidin-Alexa568 染色。洗涤盖玻片并且在载玻片上用含 DAPI (Invitrogen) 的 ProlongGold 封固。在 Olympus BX51 荧光显微镜上获得图像。

[0248] 实施例 33- 白蛋白吸收测定

[0249] 将在涂有胶原的盖玻片上生长的 Bend. 3 细胞与白蛋白 -alexafluor594 (50mg/ml) (Invitrogen) 和单独的培养基、DMSO 媒介物、NECA (1 μ M) 或 Lexiscan (1 μ M) 孵育 30 分钟。利用 Zeiss Axio Imager M1 荧光显微镜使白蛋白吸收可视化 (白蛋白 = 红色)。使用 Zeiss Axio Vision 软件记录总白蛋白荧光, 并利用 Image-J 软件测量。

[0250] 实施例 34- 紧密连接分子染色

[0251] 将在涂有胶原的盖玻片上生长的 Bend. 3 细胞与 DMSO 媒介物、NECA (1 μ M) 或 Lexiscan (1 μ M) 孵育 1h。用 PBS 洗涤细胞, 用 4% 多聚甲醛固定, 并且用 0.5% 于 PBS 中的 Triton-X 渗透化。用 PBS/BSA/ 山羊血清封闭细胞, 并且然后用 ZO-1 (1A12)、紧密连接蛋白 -5 (34-1600) 或封闭蛋白 (3F10) 的抗体 (Invitrogen) 染色。洗涤步骤之后, 将细胞与山羊抗兔 Ig 德克萨斯红 -X 或山羊抗小鼠 IgCy5 (Invitrogen) 孵育。洗涤盖玻片并且在载玻片上用含 DAPI 的 ProlongGold 封固。在 Zeiss Axio Imager M1 荧光显微镜上获得图像。

[0252] 实施例 35- 分析确认广谱 AR 激动剂 NECA 使对大分子的 BBB 通透性增强

[0253] 示出了使用学生 T 检验评估的统计差异, 其中 $P \leq 0.05$ 。

[0254] 确定静脉施用激活所有 AR (A1、A2A、A2B、A3) 的 NECA, 导致静脉施用的荧光标记葡聚糖向小鼠 CNS 的外渗呈剂量依赖型增加 (图 19)。重要的是, 观察到改变 NECA 的剂量导致与用单独的媒介物处理相比, 10,000Da 葡聚糖 (图 19A) 和 70,000Da 葡聚糖 (图 19B) 的 CNS 进入呈剂量依赖型增加。用 0.08mg/kg NECA 观察到葡聚糖最大限度地进入 CNS。较高浓度的 NECA 无附加作用或显示出功效减小, 可能是因为受体脱敏 (Ferguson 等, "Subtype-Specific Kinetics of Inhibitory Adenosine Receptor Internalization are Determined by Sensitivity to Phosphorylation by G Protein-coupled Receptor Kinases," *Mol. Pharmacol.* 57:546-52 (2000), 其据此通过引用整体并入)。这些结果证明腺苷受体激活使 BBB 通透性增强。

[0255] 接下来确定了 NECA 施用后 BBB 通透性的持续时间和所述过程是否可逆。在时间过程实验中, 使用经剂量 - 反应实验测定的 NECA 的最低有效剂量 (0.08mg/kg), 观察到在 NECA 处理后屏障通透性增强在时间上离散 (图 20A), 处理后 4-6h 之间观察到经标记的葡聚糖最大限度地进入 CNS。这些数据表示自时间 0 (T_0) 时施用葡聚糖和 NECA 以后, 脑中 FITC- 葡聚糖随时间的积累。为测定在 NECA 处理后的离散时间段内多少葡聚糖可进入脑, 在第二个实验中, 在 NECA 施用后的指定时间施用葡聚糖 (图 20B)。这些数据表示葡聚糖注

射 90 分钟后进入脑的葡聚糖。在 NECA 处理后第 8h (收集时间 9.5h), 脑中葡聚糖的可检测水平从最大值降低并且到处理后第 18h (收集时间 19.5h) 所述水平回到基线, 因为在脑中不可检测到显著水平的在 NECA 处理 18h 后施用的葡聚糖 (图 20B)。这些结果证明, 静脉施用 NECA 导致在第 8-18h 回到基线的时间上离散的屏障通透性增强期。

[0256] 实施例 36-A1 和 A2A AR 激活使 BBB 通透性增强

[0257] 将哺乳动物中 4 种 AR 亚型表示为 :A₁、A_{2A}、A_{2B} 和 A₃ (Sebastiao 等, "Adenosine Receptors and the Central Nervous System," *Handb. Exp. Pharmacol.* 471-534 (2009), 其据此通过引用整体并入)。为确定哪些 AR 可能在屏障通透性中起作用, 检查小鼠脑内皮细胞中每种受体亚型的 mRNA 表达水平。在这种细胞系中检测到 A₁ 和 A_{2A} 受体, 而非 A_{2B} 或 A₃ 受体的表达 (图 21A)。另外, 在培养的小鼠脑内皮细胞上观察到催化来自 ATP (CD39) 的细胞外腺苷所需的两种胞外酶 CD73 和 CD39 的表达。因为 AR 激活增强了小鼠体内对葡聚糖的 BBB 通透性, 接下来确定了是否由小鼠 BEC 表达腺苷的受体。利用抗 A₁ 和 A_{2A} AR 的抗体和探针, 通过免疫荧光染色 (图 21B) 和荧光原位杂交 (图 21C) 观察到小鼠脑中经 CD31 共染色的内皮细胞上两种 AR 表达。重要的是, 通过对从小鼠脑分离的原代内皮细胞的蛋白质印迹分析检测到 A₁ 和 A_{2A} AR 蛋白质表达 (图 21D)。有趣的是, 人脑内皮细胞系 hCMEC/D3 也表达 A₁ 和 A_{2A} AR。这些数据表明, BEC 能够直接对细胞外腺苷反应。

[0258] 为研究 A₁ 和 A_{2A} 受体在 AR 介导的 BBB 通透性变化中的功能贡献, 在缺乏这些受体的小鼠中研究了这种影响。重要的是, 在野生型、A₁AR^{-/-} 和 A_{2A}AR^{-/-} 小鼠之间, 对 10,000Da 葡聚糖的 BBB 通透性的基础水平无显著差异 (图 21E、21F、21G)。静脉施用 NECA 之后, 与野生型小鼠相比, A₁^{-/-} 和 A_{2A}^{-/-} 小鼠均显示在其脑中静脉施用的葡聚糖的水平明显更低 (图 21E 和 21F)。这些数据表明, 这两种 AR 亚型至少部分介导了对屏障通透性的调节。为检查 A₁ 或 A_{2A} AR 均不可用于激活时 NECA 施用对小鼠的 BBB 通透性的影响, 在 NECA 施用之前用选择性 A_{2A} 拮抗剂 SCH58261 处理 A₁AR^{-/-} 小鼠。当在缺乏 A₁AR 的小鼠体内 A_{2A} AR 信号转导受这种拮抗剂阻滞时, 未观察到 BBB 通透性的显著差异 (图 21G)。这些数据表明, 这两种 AR 亚型至少部分介导了对屏障通透性的调节。

[0259] 为确认这些结果, 向野生型小鼠施用特异性 A₁ 激动剂 2-氯-N⁶-环戊基腺苷 (CCPA) 和特异性 A_{2A} 激动剂 4-[2-[[6-氨基-9-(N-乙基-b-D-呋喃核糖酰胺基)-9H-嘌呤-2-基]氨基]乙基]苯丙酸 (CGS21680)。CGS21680 (图 21H) 和 CCPA (图 21I) 处理均导致增加的葡聚糖进入 CNS, 并且虽然与媒介物处理相比, 这种增加是实质性的, 但是比在 NECA 施用后观察到的增加明显更低。然而, 当组合使用时, CCPA 和 CGS21680 重现了用 NECA 处理观察到的增加的葡聚糖进入 CNS 的效应 (图 21J)。这些结果确认, 对腺苷受体的调节促进分子进入 CNS。总之, 这些结果表明, 虽然激活 BEC 上的 A₁ 或 A_{2A} AR 可促进分子进入 CNS, 但是激活两种 AR 具有相加效应。

[0260] 实施例 37- 选择性 A_{2A} AR 激动剂 Lexiscan 增强了 BBB 通透性

[0261] 为探究 AR 激动对促进静脉施用的化合物进入 CNS 的可能治疗用途, 在该实验范式中试验了市场上有售的经 FDA 批准的 AR 激动剂。已经成功用于人心肌灌注成像的特异性 A_{2A} AR 激动剂 Lexiscan (Iskandrian 等, "Adenosine Versus Regadenoson Comparative Evaluation in Myocardial Perfusion Imaging: Results of the ADVANCE Phase 3 Multicenter International Trial," *J. Nucl. Cardiol.* 14:645-58 (2007), 其据此

通过引用整体并入),在小鼠体内静脉施用后的确增强了对 10,000Da 葡聚糖的 BBB 通透性(图 22A)。有趣的是,单次 Lexiscan 注射 5 分钟后在脑中可检测到 FITC-葡聚糖。另外,静脉施用 Lexiscan 也可增强大鼠的 BBB 通透性(图 22B)。Lexiscan 施用后 BBB 通透性增强的幅度比 NECA 施用后通透性增强的幅度大很多。同样,有趣的是, BBB 通透性增强的持续时间与 AR 激动剂的半衰期相关。例如,用 NECA 处理后 BBB 打开和关闭的时间过程(半衰期约 5h)比用 Lexiscan 处理后的时间过程(半衰期约 3 分钟)长很多(Astellas Pharma, "Lexiscan:U.S. Physicians Prescribing Information"(2009),其据此通过引用整体并入)。在旨在模拟连续输注药物的注射范例中,15 分钟内注射 3 次 Lexiscan 导致在大鼠脑中检测到显著高水平的标记葡聚糖(图 22B)。为检查 Lexiscan 对 BBB 通透性影响的持续时间,我们测定了小鼠和大鼠体内随时间推移的 CNS 葡聚糖进入。图 22C 以图解形式示出了大鼠体内对在 5 分钟时与 1 μ g 的 Lexiscan 同时施用的 FITC-葡聚糖的 BBB 通透性。单次静脉注射 Lexiscan 后,在 30 分钟后观察到最大限度增强的 BBB 通透性并且到处理后第 180 分钟回到基线(图 22D)。在 Lexiscan 处理后在大鼠体内观察到相似结果(图 22E)。重要的是, Lexiscan 处理后对 BBB 通透性影响的持续时间比 NECA 处理后短很多,可能是因为化合物的半衰期不同(NECA 约 5h, Lexiscan 约 3 分钟;(Astellas Pharma, "Lexiscan:U.S. Physicians Prescribing Information"(2009),其据此通过引用整体并入)。用由于多剂量的 Lexiscan 赋予 BBB 打开的协同效应来解释图 22B 中(与单次注射相比,图 22E)标记葡聚糖增加超过 20 倍。

[0262] 这些结果证明,除用于该研究的广谱 AR 激动剂 NECA,和特异性 A1 和 A2A AR 激动剂, CCPA 和 CGS21680 外, FDA 批准的 A2A 激动剂 Lexiscan 增强了对大分子的 BBB 通透性。

[0263] 实施例 38-A2A 拮抗降低 BBB 通透性

[0264] 进一步假设,如果 A1 和 A2A 受体的激动增强屏障通透性,则 AR 拮抗可能降低屏障通透性并防止分子进入 CNS。先前在野生型小鼠中观察到, A2A 腺苷受体的阻滞抑制白细胞迁移进入 CNS(Mills 等, "CD73 is Required for Efficient Entry of Lymphocytes Into the Central Nervous System During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9325-30 (2008),其据此通过引用整体并入)。用特异性 A2A AR 拮抗剂检验这个假设。腹腔内施用 A2A AR 拮抗剂 2-(2-呋喃基)-7-(2-苯基乙基)-7H-吡唑并 [4,3-e] [1,2,4] 三唑并 [1,5-c] 嘧啶-5-胺 (SCH58261) 导致 10,000Da FITC-葡聚糖向野生型小鼠脑的进入显著减少(图 22F)。这个数据支持阻断 AR 信号转导使 BBB 变紧密或关闭。

[0265] 实施例 39- 在 NECA 施用后 β -淀粉样蛋白抗体进入脑

[0266] 通过 BBB 的最具挑战性的治疗剂为大分子,例如抗体,因为其尺寸巨大(约 150kDa)。人们提问到,用 NECA 调节腺苷受体是否可促进抗体进入 CNS。为检验这一点,使用 AD 的双 [淀粉样蛋白前体蛋白 (APP)/ 早老蛋白 (presenilin) (PSEN)] 转基因小鼠模型 [菌株 B6. Cg-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J]。这些小鼠积累为 AD 标志的相似 β -淀粉样蛋白 (A β) 斑 (Jankowsky 等, "Mutant Presenilins Specifically Elevate the Levels of the 42 Residue Beta-amyloid Peptide in vivo: Evidence for Augmentation of a42-specific Gamma Secretase," *Hum. Mol. Genet.* 13:159-170 (2004); Mineur 等, "Genetic Mouse Models of Alzheimer's Disease," *Neural. Plast.* 12:299-310 (2005),其

据此通过引用整体并入)。

[0267] 已经证实当经脑室注射时单克隆抗体 6E10 (Covance) 使 AD 小鼠模型中负载的 A β 斑块明显减少 (Thakker 等, "Intracerebroventricular Amyloid-beta Antibodies Reduce Cerebral Amyloid Angiopathy and Associated Micro-hemorrhages in Aged Tg2576 Mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:4501-6 (2009), 其据此通过引用整体并入)。静脉 NECA 施用 3 小时后, 静脉施用 6E10 抗体。90 分钟后, 收集脑, 切片并用 Cy5 标记的二抗染色。在经 NECA 处理的小鼠的整个脑观察到 6E10 抗体与 A β 斑块结合, 其中 A β 斑块集中于海马区中 (图 23A 和 23E)。在用单独的媒介物处理的 AD 小鼠 (图 23A、23B 和 23E) 或用 NECA 或媒介物处理的野生型小鼠体内未观察到静脉注射的 6E10 抗体的结合。单独的 NECA 或媒介物处理均不影响 AD 小鼠形成 A β 斑块的能力 (图 23C 和 23D)。这些结果证明, 静脉施用的 A β 抗体可在 AR 激动后穿过 BBB 并且结合 CNS A β 斑块 (图 23H), 其大部分位于脑中的血管附近 (图 23F 和 23G)。这些结果证明, 在 AR 激动后, 静脉施用的 β -淀粉样蛋白抗体可穿过 BBB。

[0268] 实施例 40-AR 激活导致培养的小鼠 BEC 单层中的跨内皮电阻降低

[0269] 为确定 AR 信号转导如何介导 BBB 通透性的变化, 我们利用预先建立的小鼠脑内皮细胞-系 Bend. 3 (Montesano 等, "Increased Proteolytic Activity is Responsible for the Aberrant Morphogenetic Behavior of Endothelial Cells Expressing the Middle T Oncogene," *Cell* 62:435-445 (1990), 其据此通过引用整体并入)。虽然有 4 种在哺乳动物体内表达的已知 AR 亚型 (A1、A2A、A2B 和 A3 (Sebastiao 等, "Adenosine Receptors and the Central Nervous System," *Handb. Exp. Pharmacol.* 471-534 (2009), 其据此通过引用整体并入), 在 Bend. 3 细胞中检测到 A1 和 A2A 受体, 而非 A2B 或 A3 受体的 mRNA 表达 (图 24A)。另外, 在这些培养的小鼠 BEC 上观察到催化来自 ATP 的细胞外腺苷所需的胞外酶 CD73 的表达 (图 24A)。重要的是, 在 Bend. 3 细胞上检测到 A1 和 A2A AR 的蛋白质表达 (图 24B), 表明这些细胞能够直接对细胞外腺苷反应。

[0270] 已经证明内皮细胞单层中跨内皮细胞电阻 (TEER) 降低与内皮细胞之间的细胞旁间隙增大和屏障通透性增强相关 (Wojciak-Stothard 等, "Rho and Rac But not Cdc42 Regulate Endothelial Cell Permeability," *J. Cell. Sci.* 114:1343-1355 (2001); Dewi 等, "In vitro Assessment of Human Endothelial Cell Permeability: Effects of Inflammatory Cytokines and Dengue Virus Infection," *J. Virol. Methods* 121:171-180 (2004), 其据此通过引用整体并入)。在对培养的单层小鼠 BEC 的 transwell 测定中 (起始绝对 TEER 平均值 =182 Ω ; 中值 =187 Ω), 我们观察到与给予单独的媒介物或培养基的 BEC 相比, 添加 NECA 或 Lexiscan 后 TEER 降低 (图 24C)。虽然 AR 信号转导改变了 BEC 中的 TEER, 在 AR 刺激后我们并未观察到 BEC 中转胞吞作用速率的任何改变。例如, 与经培养基和媒介物处理的对照相比, NECA 和 Lexiscan 诱导的 AR 信号转导不影响 BEC 中荧光标记的白蛋白吸收速率 (图 24D-24H)。

[0271] 实施例 41-AR 激活与脑内皮细胞中肌动球蛋白应力纤维形成和紧密连接改变相关

[0272] 肌动蛋白细胞骨架对于维持细胞形状和内皮屏障完整性至关重要。因为肌动球蛋白应力纤维是诱导细胞形状收缩所必需的 (Hotulainen 等, "Stress Fibers are

Generated by Two Distinct Actin Assembly Mechanisms in Motile Cells,"*J. Cell. Biol.* 173:383-94(2006);Prasain 等,"The Actin Cytoskeleton in Endothelial Cell Phenotypes,"*Microvasc. Res.* 77:53-63(2009),其据此通过引用整体并入),假设腺苷受体信号转导导致肌动蛋白应力纤维诱导。

[0273] 为检验这一点,用 CCPA(激动 A1 腺苷受体)或 Lexiscan(激动 A2A 腺苷受体)处理内皮细胞("BEC")(图 24I-24P)。如图 24I-24L 所示,与用单独的媒介物处理相比,A1 和 A2A 激动剂处理后观察到标记的肌动球蛋白应力纤维的诱导。这表明,激活 AR 诱导 BEC 中的细胞骨架元素变化以增强屏障通透性。

[0274] 虽然 AR 信号转导诱导为细胞旁通透性的功能测量的 TEER 和调节细胞形状的肌动球蛋白应力纤维的变化,但重要的是确定 AR 信号转导是否改变 BEC 之间的连接相互作用。因此为确定 AR 信号转导是否改变 BEC 的紧密连接,将 Bend. 3 细胞培养为融合单层并确定在 AR 激动剂处理后是否改变了 ZO-1、紧密连接蛋白-5 或封闭蛋白的表达(图 24Q-24Y)。虽然融合 Bend. 3 细胞在培养基上生长或用媒介物处理时形成适当紧密连接(图 24Q、24T 和 24W),AR 激动剂处理诱导紧密连接蛋白表达的改变。例如,用 NECA 或 Lexiscan 处理的 Bend. 3 细胞在处理之后严重削弱了封闭蛋白表达,而 ZO-1 和紧密连接蛋白-5 有细微改变(图 24X 和 24Y)。总的来说,这些结果表明,可由 AR 信号转导通过改变紧密连接分子表达来改变 BEC 通透性。

[0275] 如图 25 示意性所示,这些结果证明 A1 或 A2A AR 的激活暂时增强了 BBB 通透性,而两种受体的激活导致对 BBB 通透性增强的相加效应。这里显示,通过 A1 和 A2A AR 介导的 BBB 通透性起门的作用,其中激活使门打开,拮抗使门关闭,而局部腺苷浓度是钥匙。

[0276] 虽然本文已经详细描绘和描述了优选的实施方案,但是对于相关领域的技术人员而言显而易见的是,在不背离本发明精神的前提下可做各种修改、添加、取代等并且因此将这些视为在以下权利要求中限定的本发明的范围内。

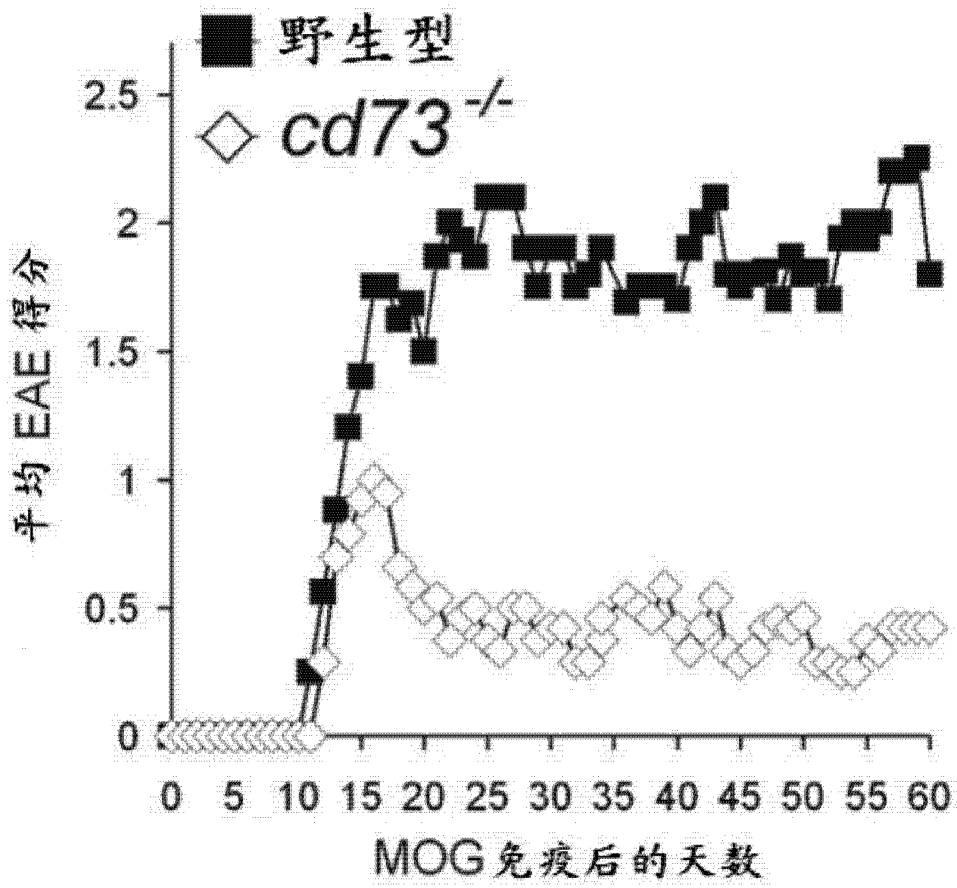


图 1

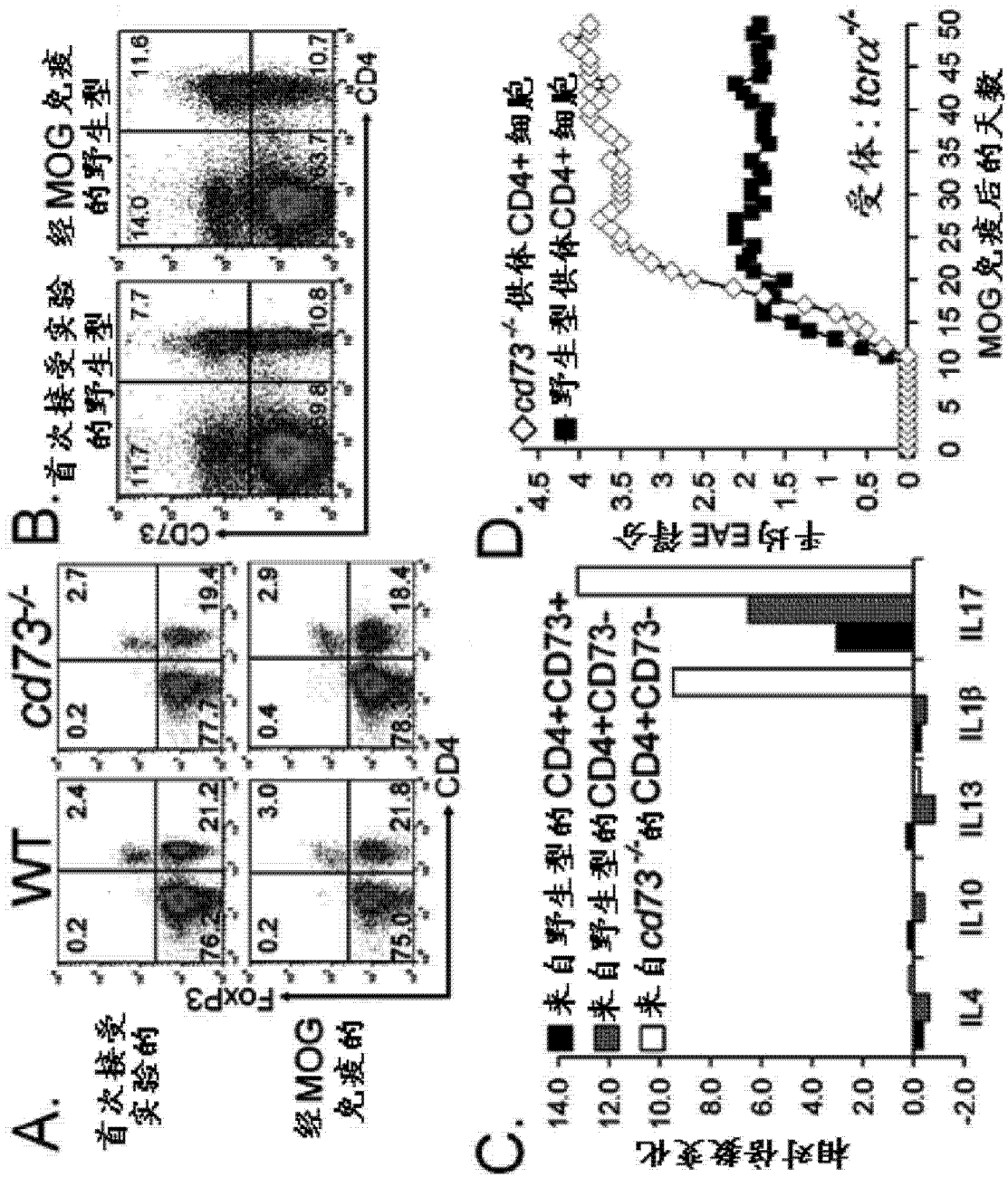


图 2A-2D

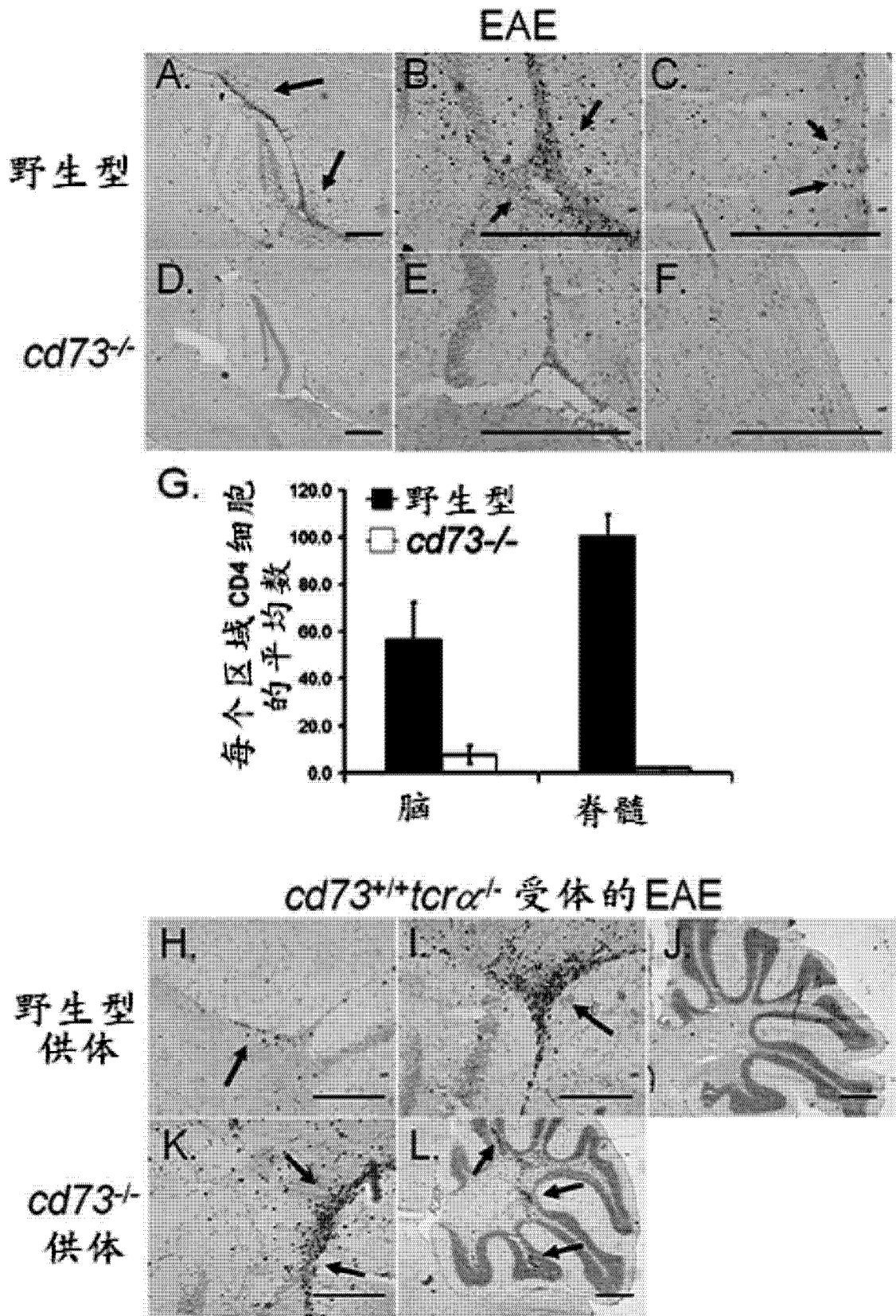


图 3A-3L

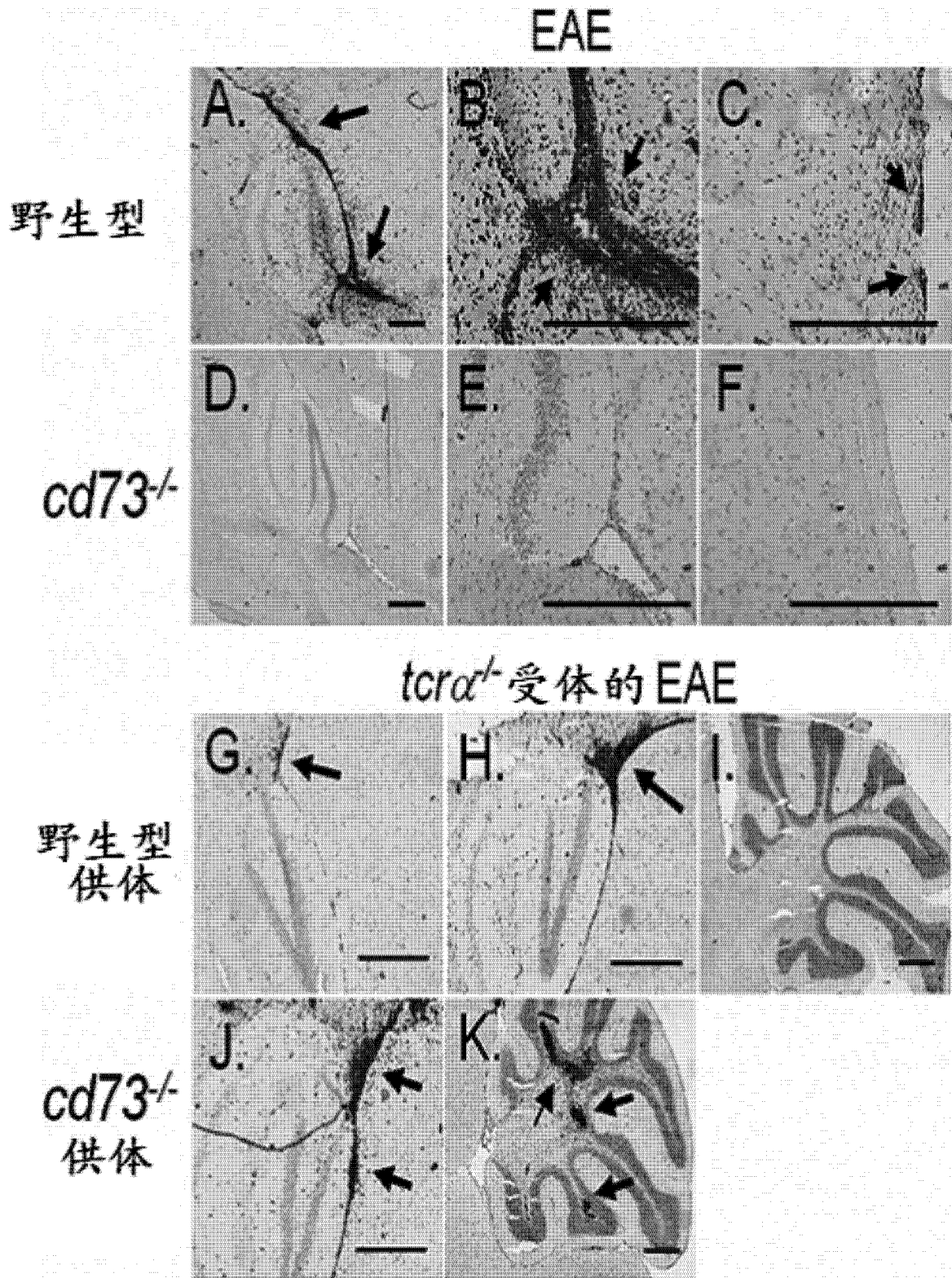


图 4A-4K

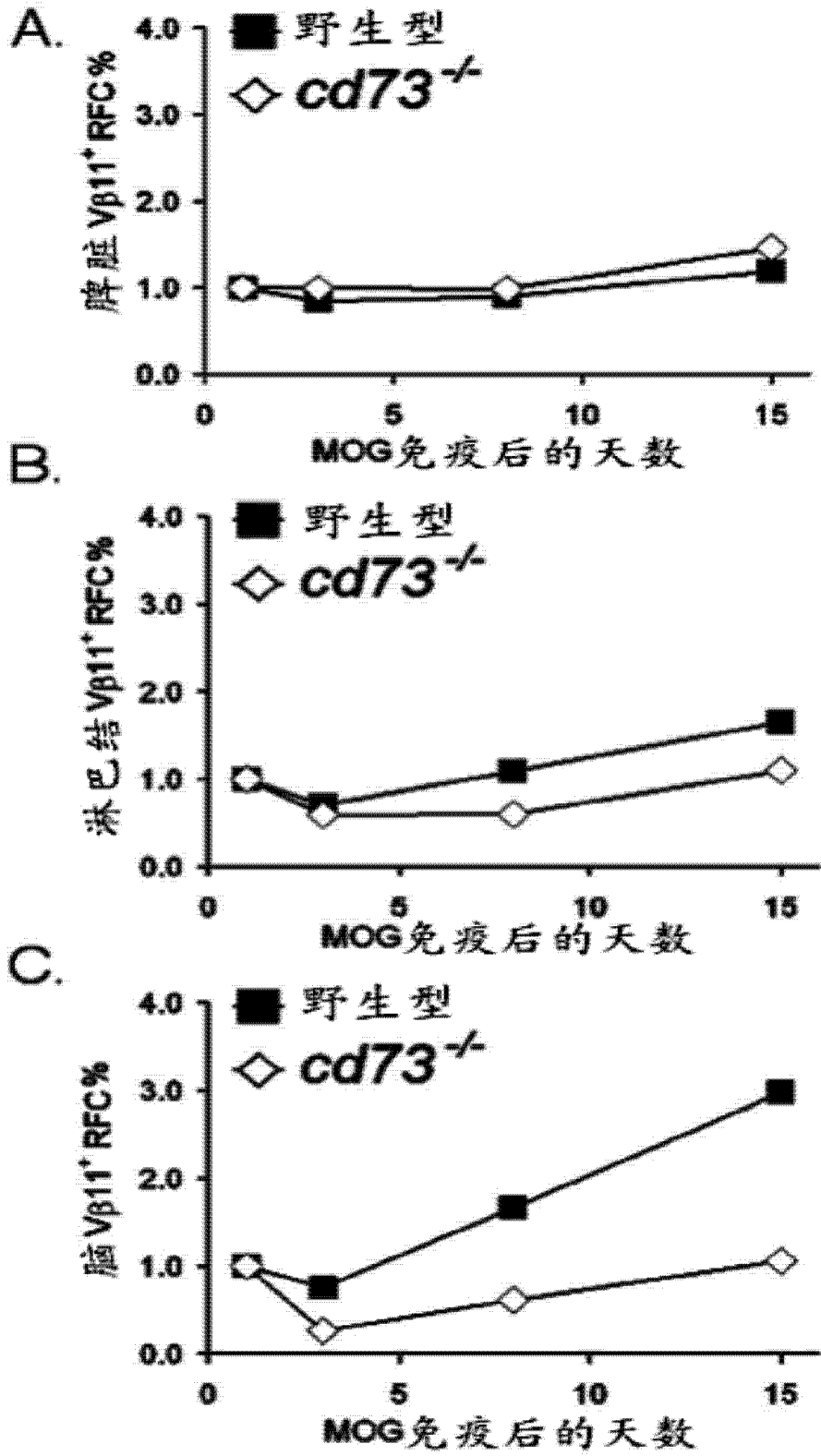


图 5A-5C

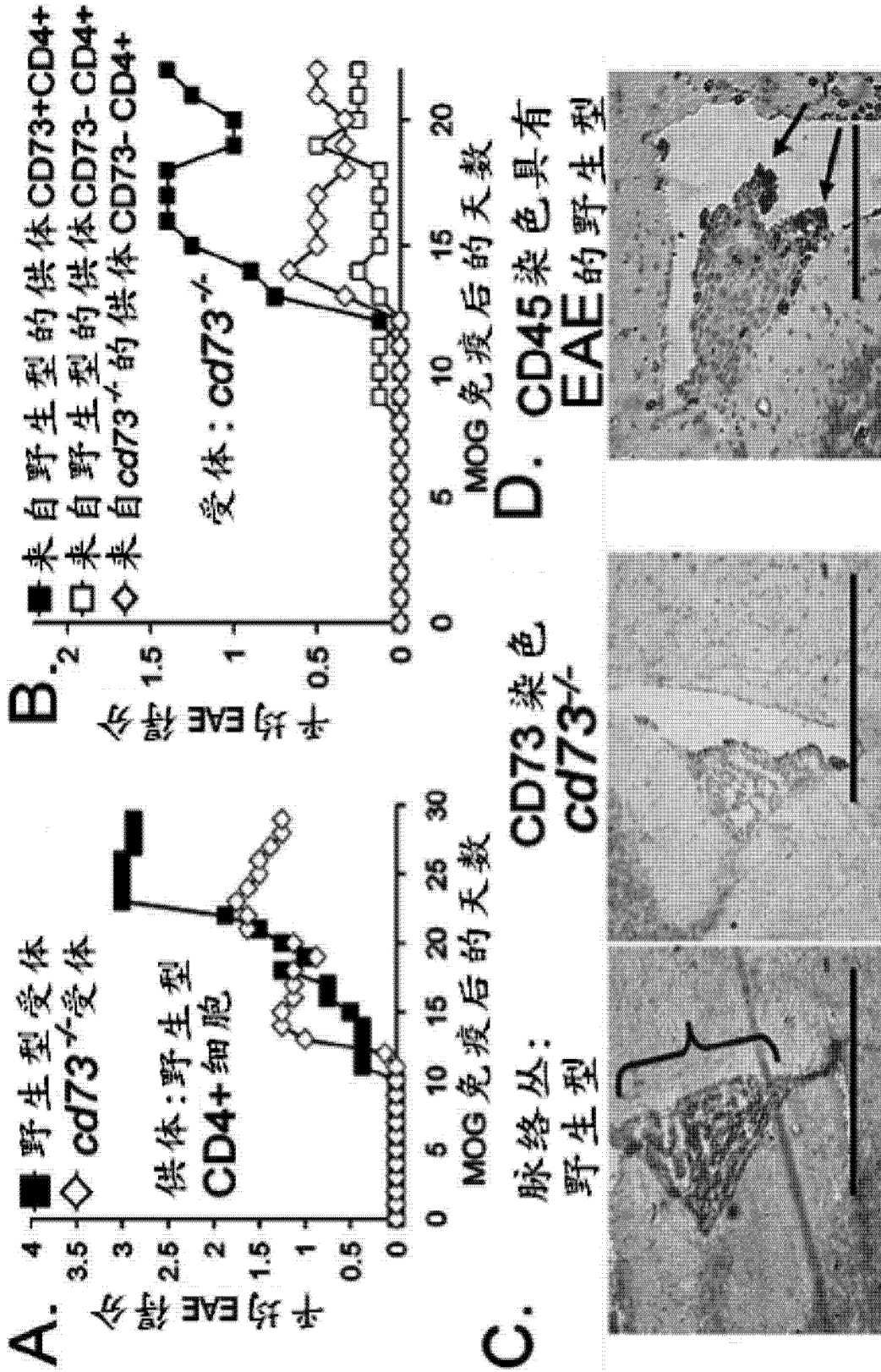


图 6A-6D

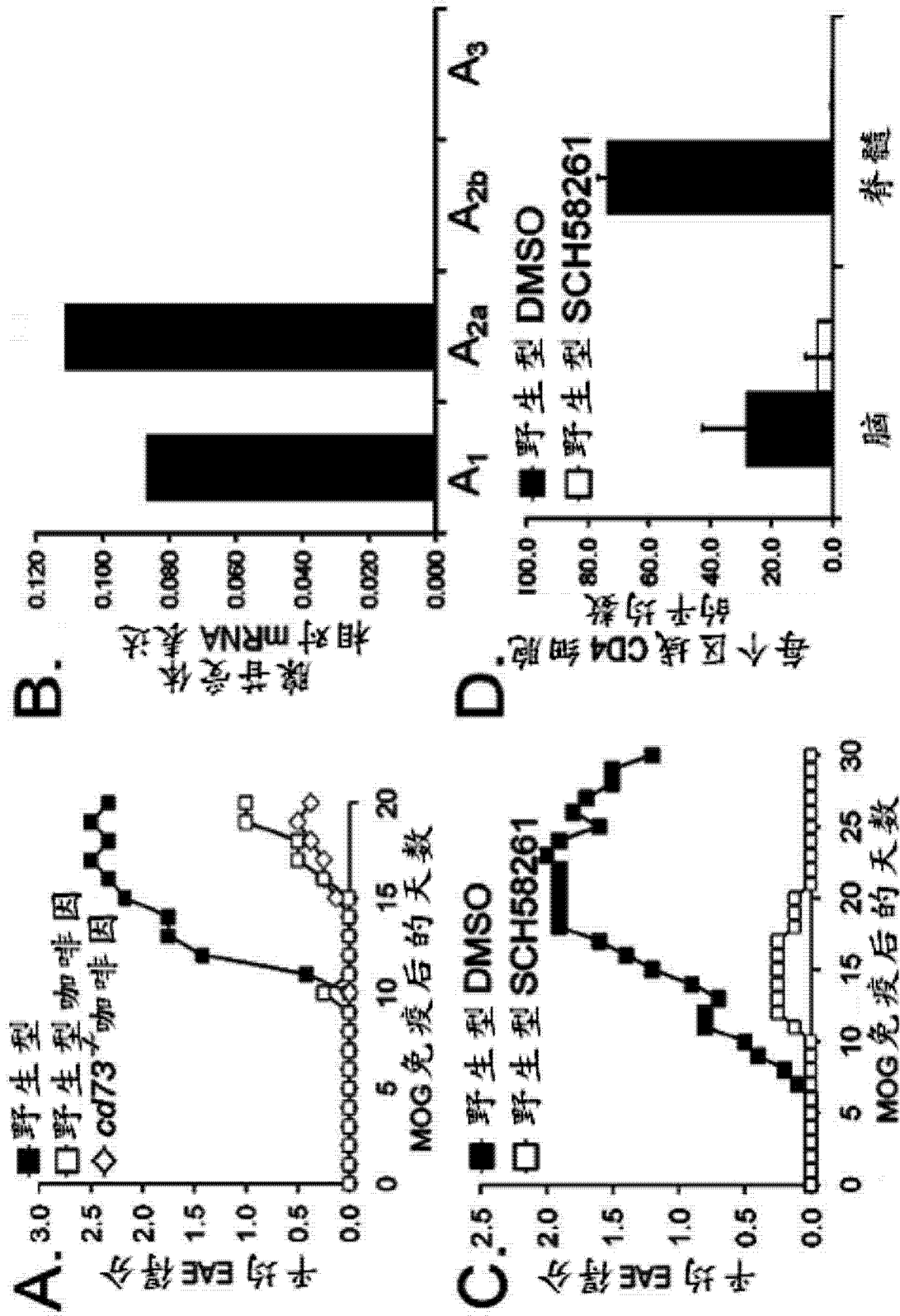


图 7A-7D

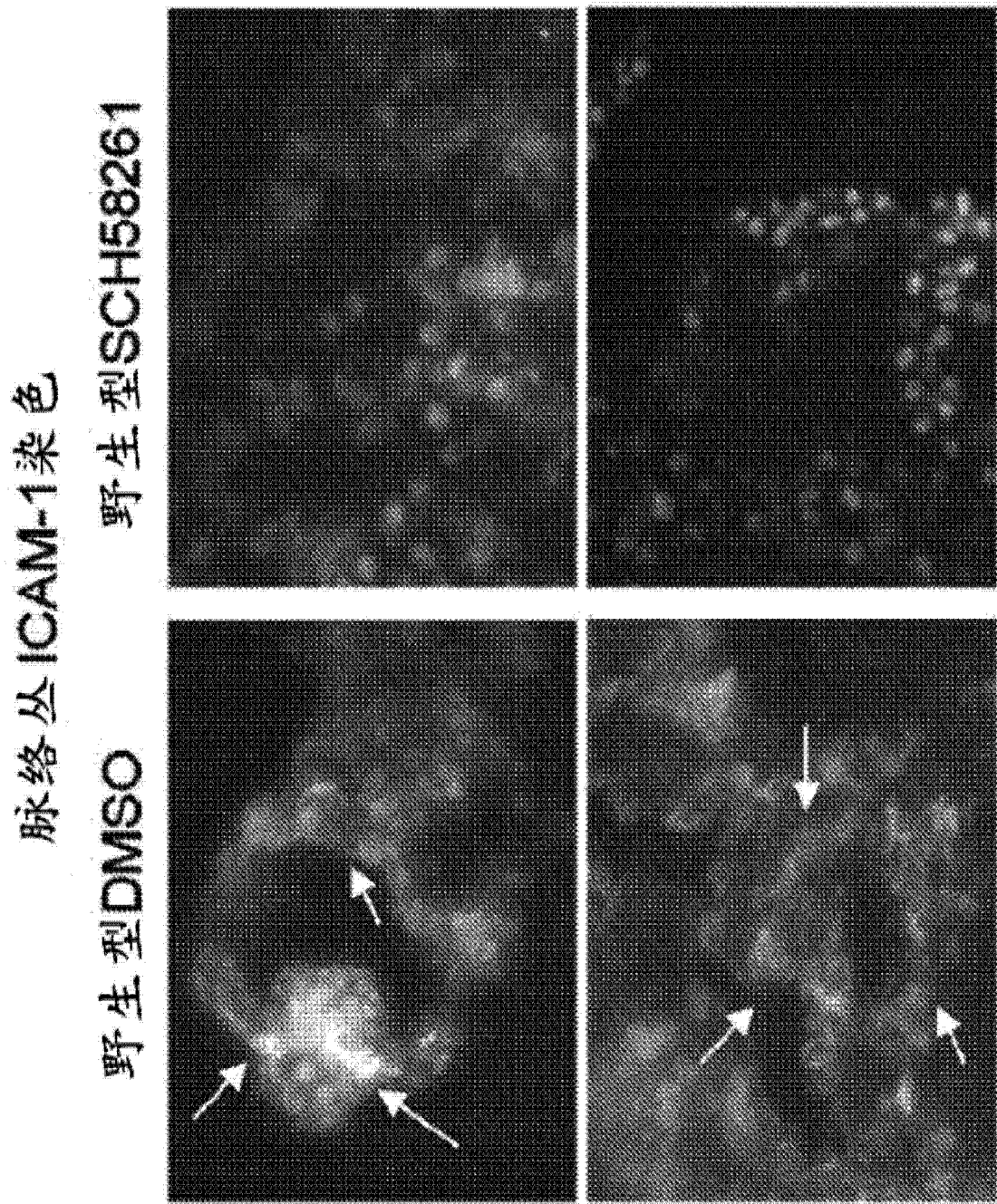


图 8

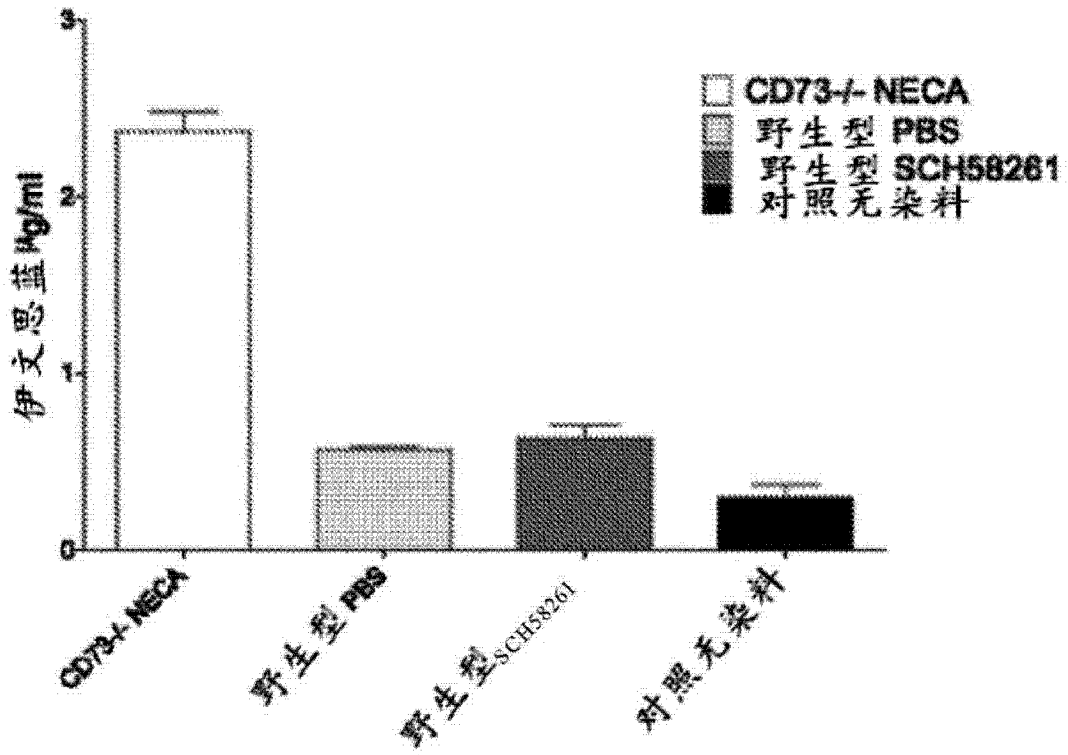


图 9A

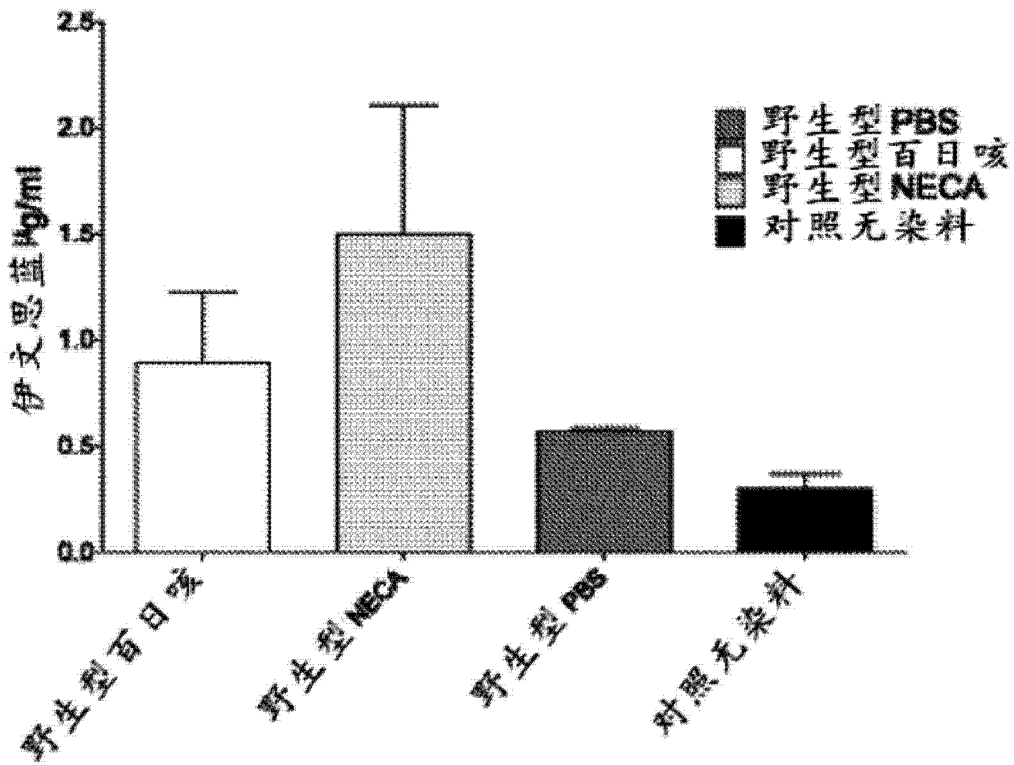


图 9B

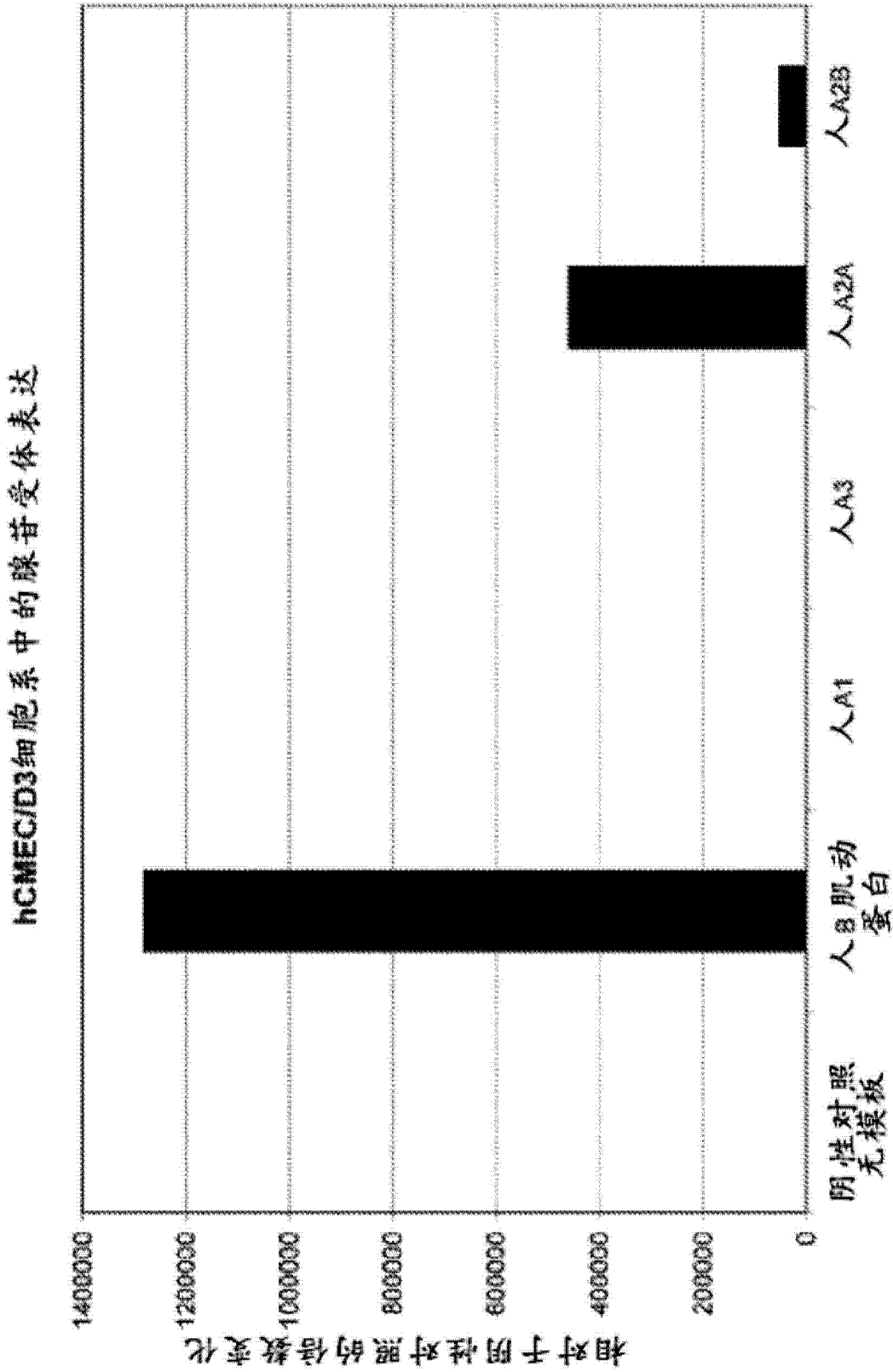
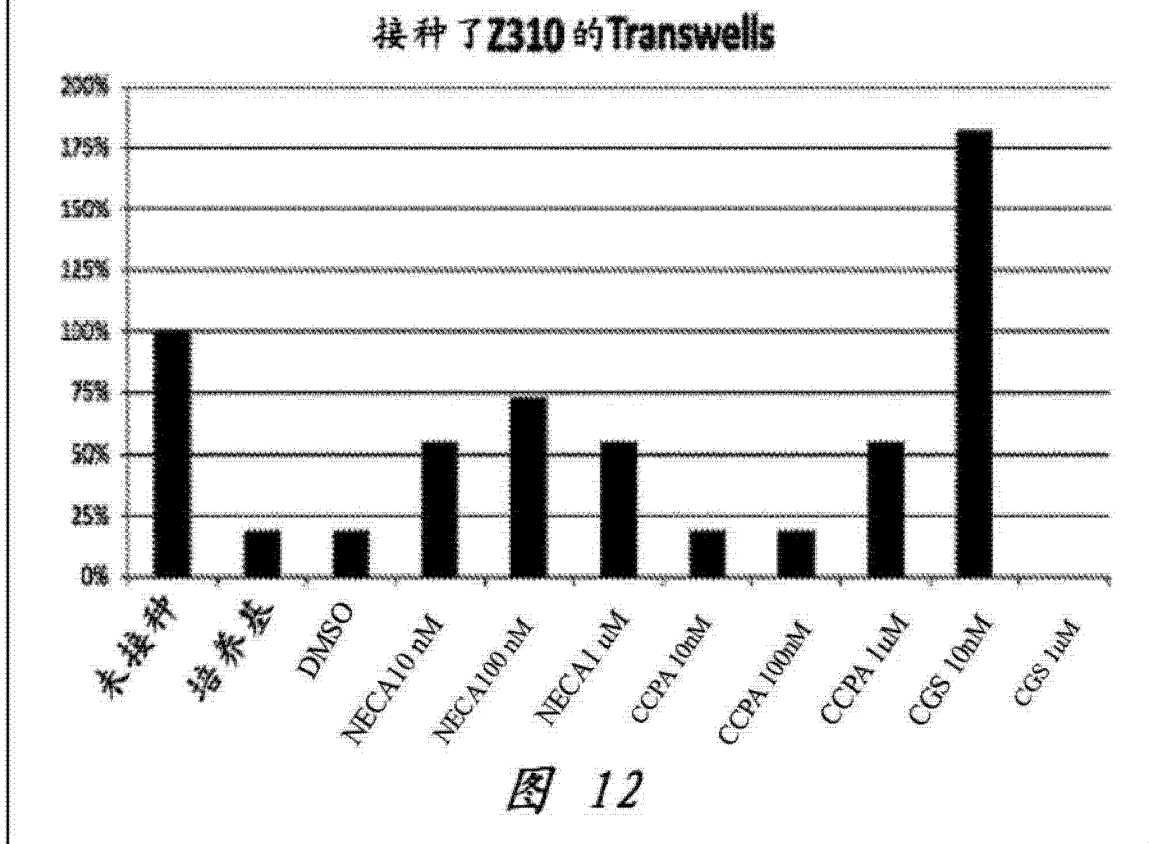
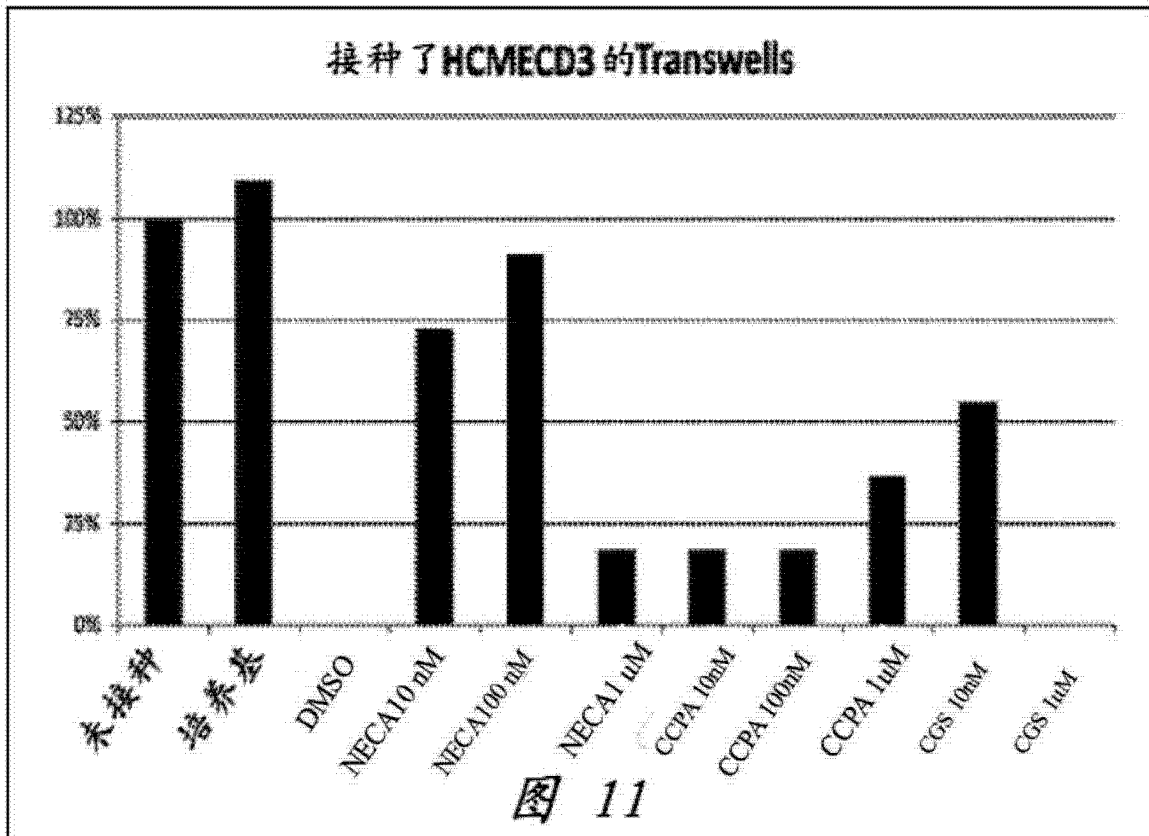


图 10



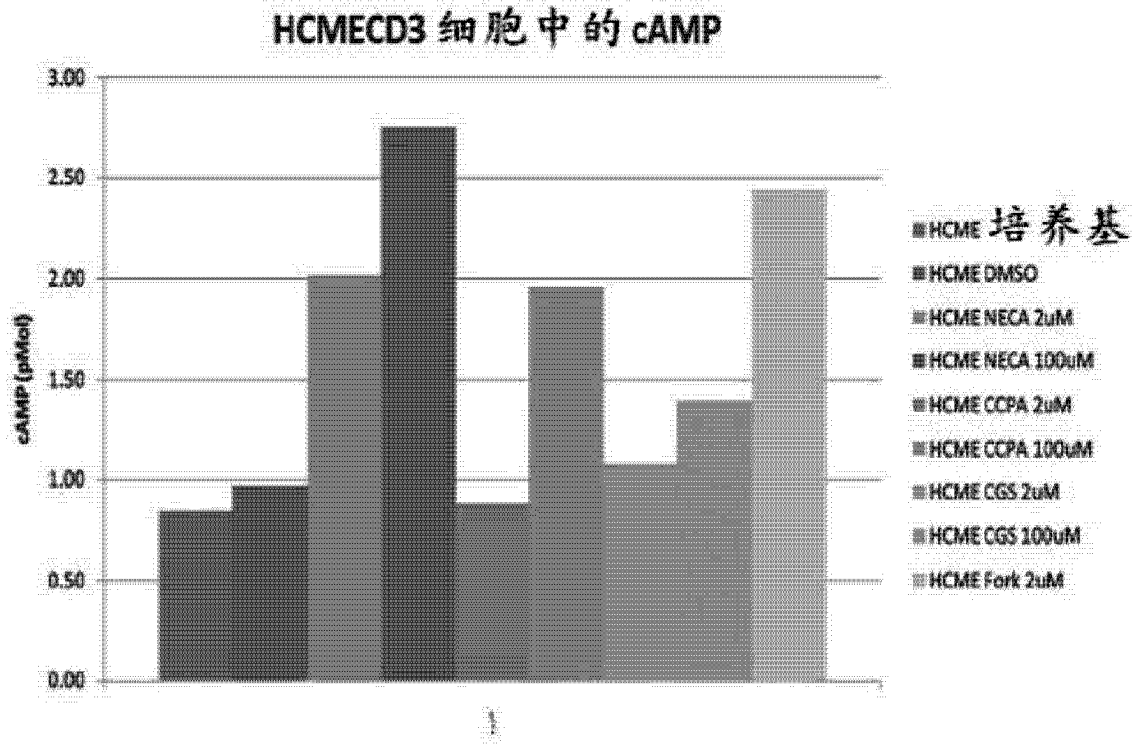


图 13

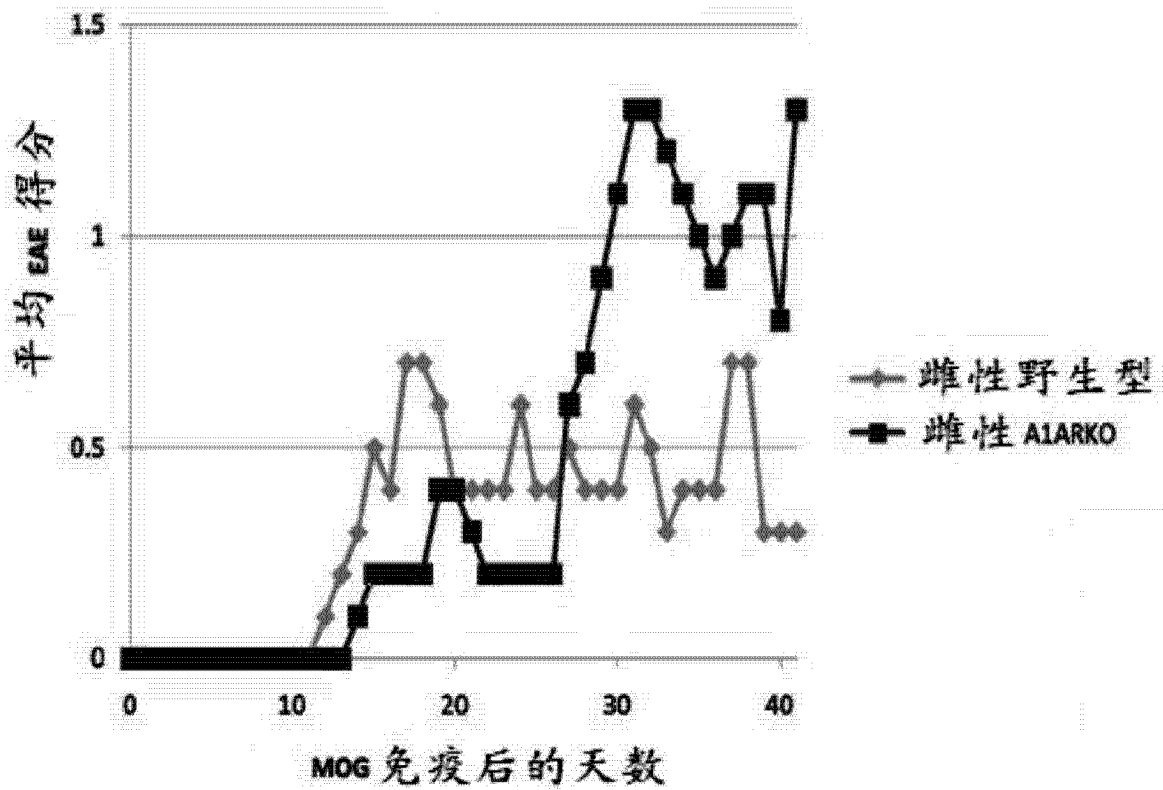


图 14

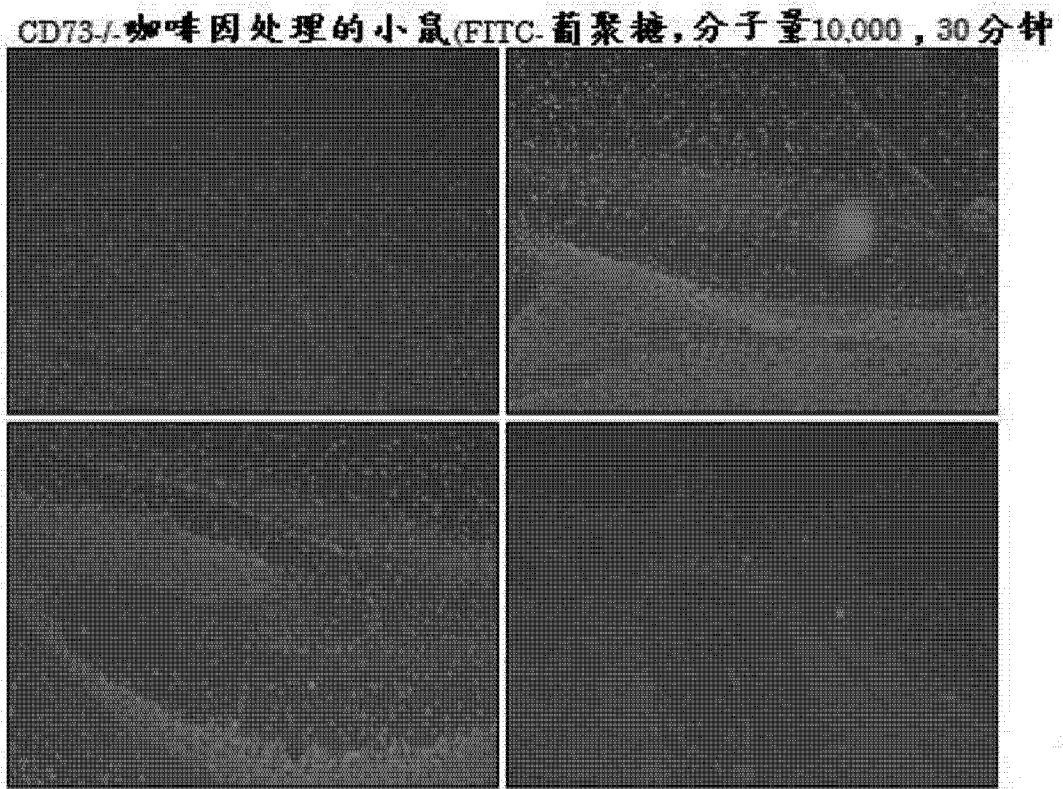


图 15A

野生型咖啡因处理的小鼠(FITC-葡聚糖,分子量10,000,30分钟)

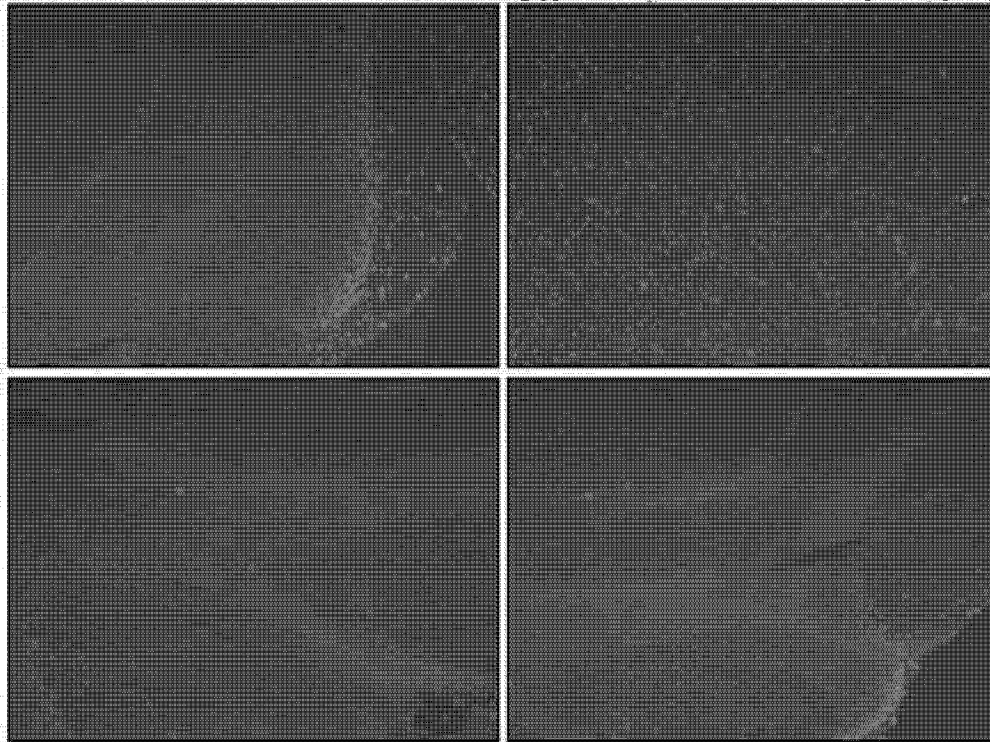


图 15B

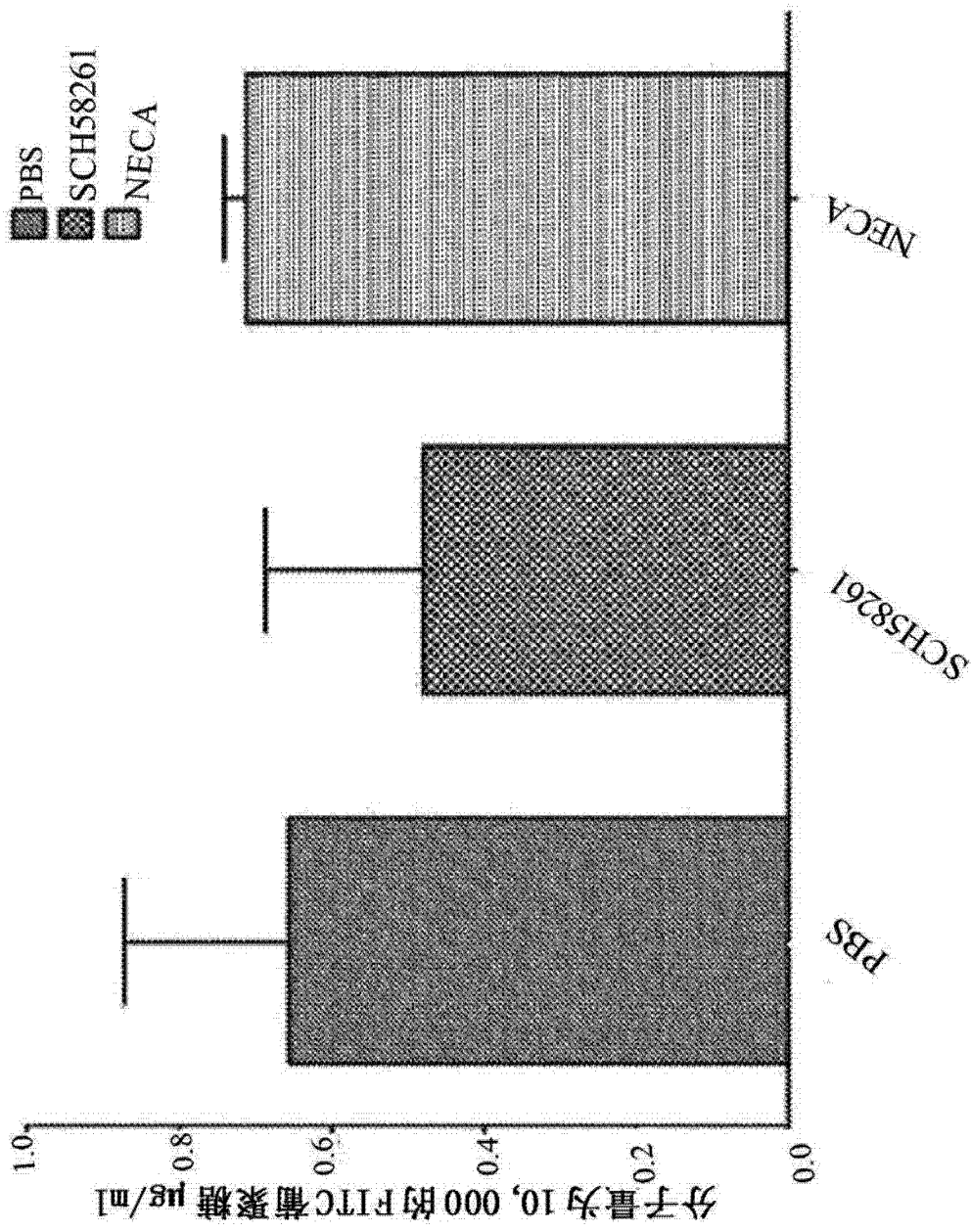


图 16

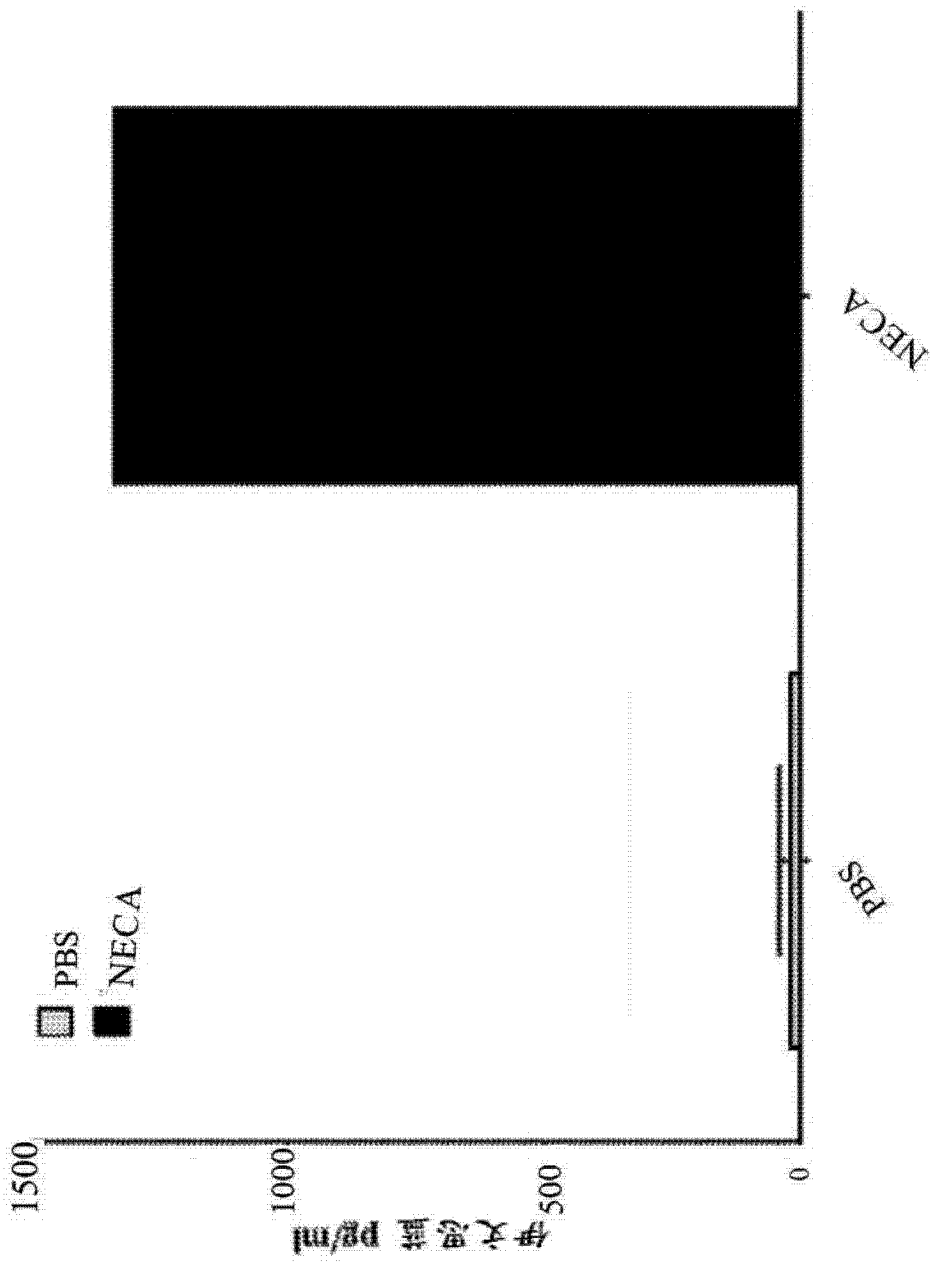


图 17

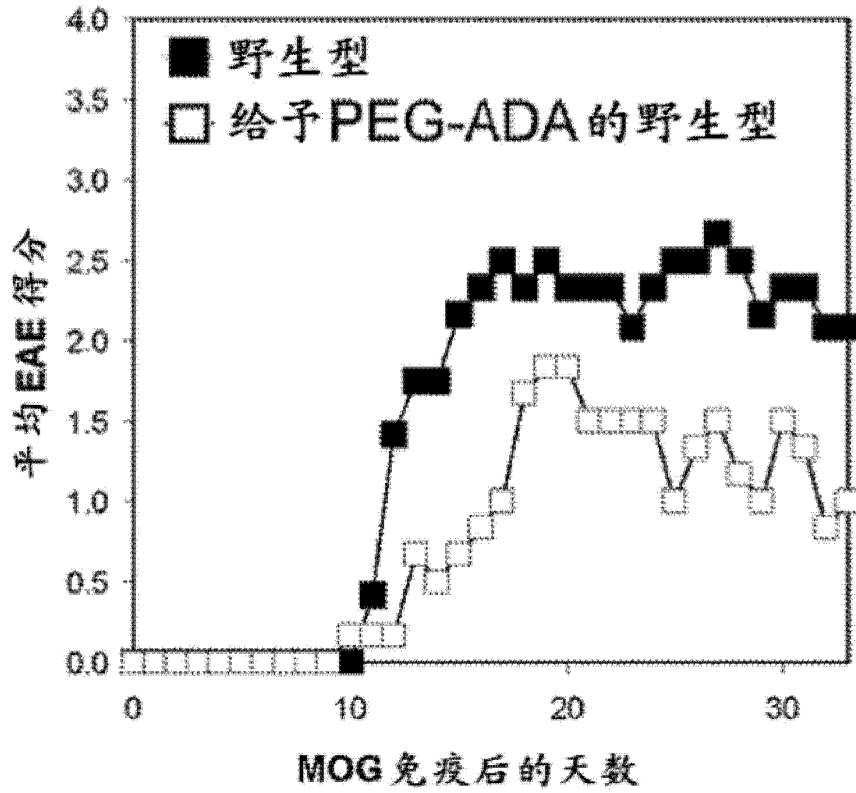


图 18

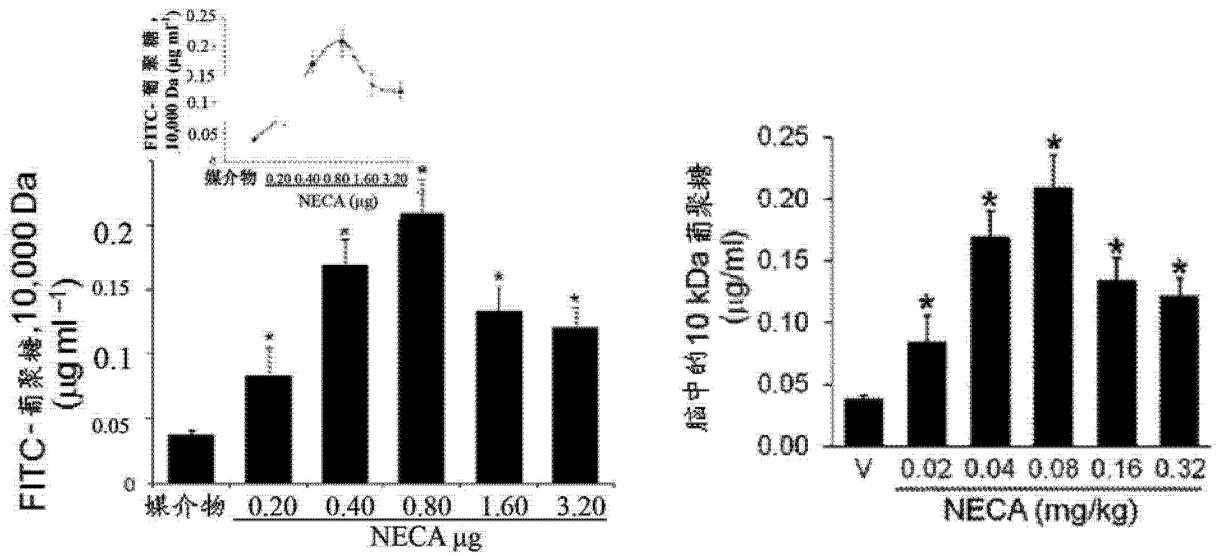


图 19A

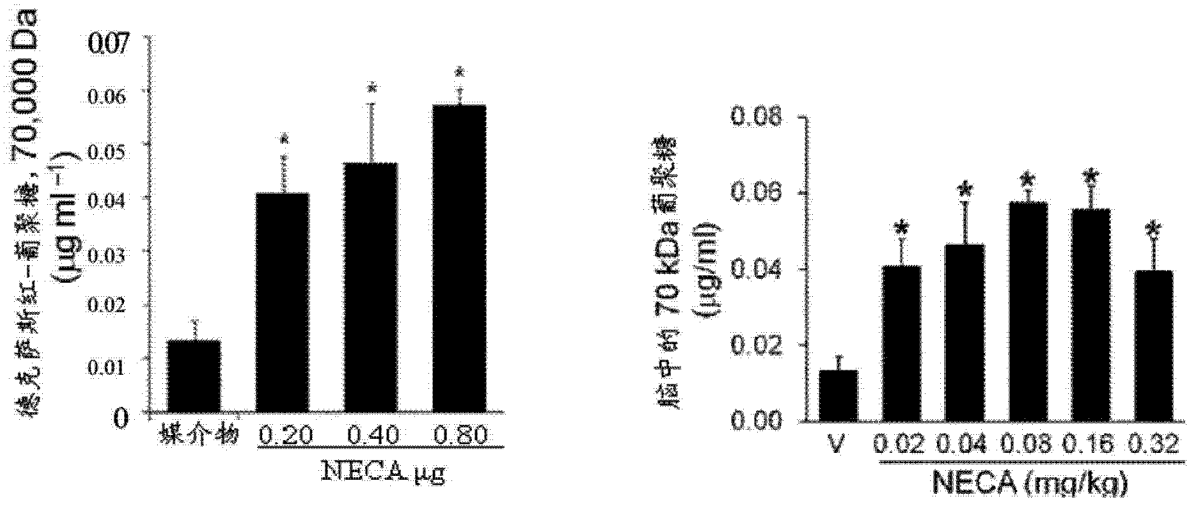


图 19B

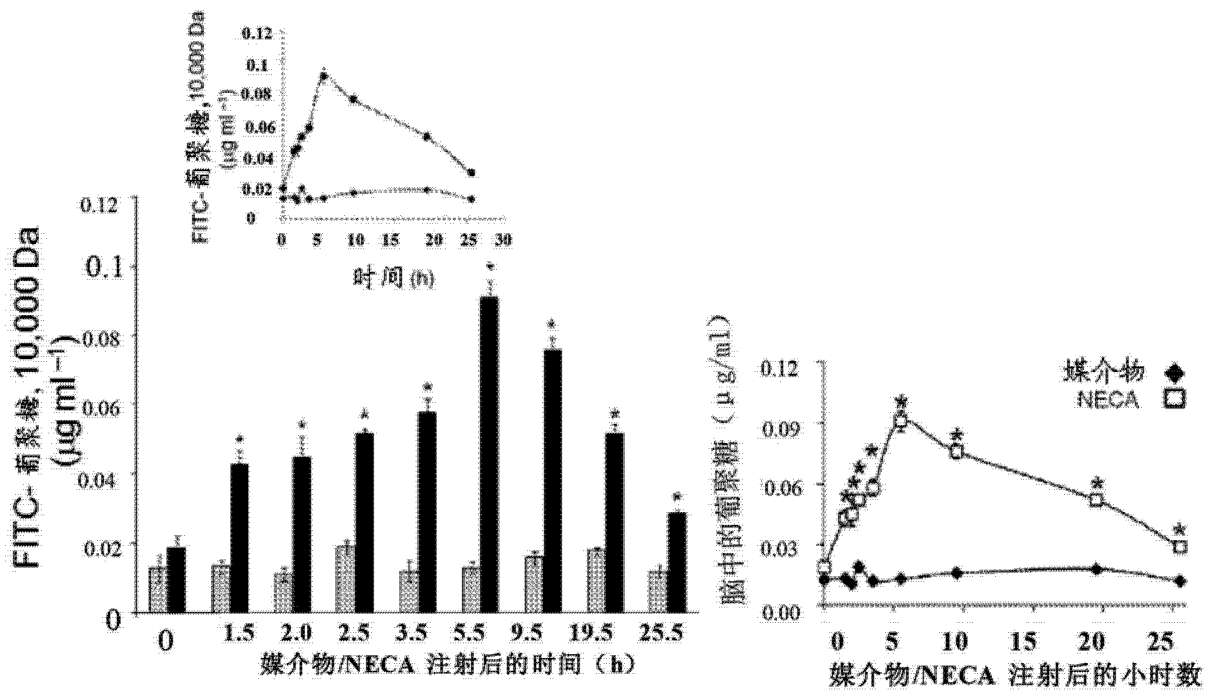


图 20A

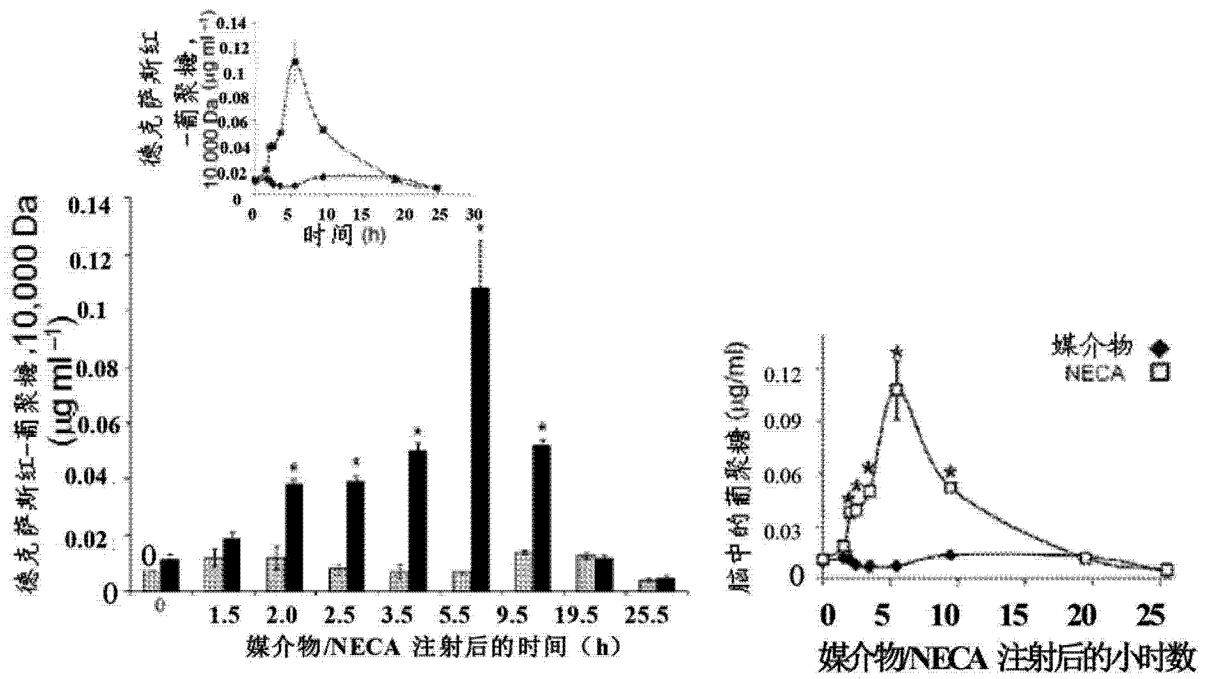


图 20B

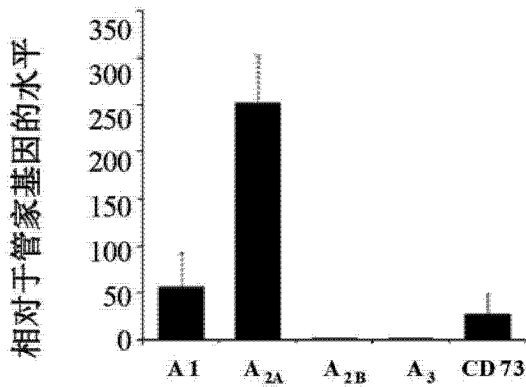


图 21A

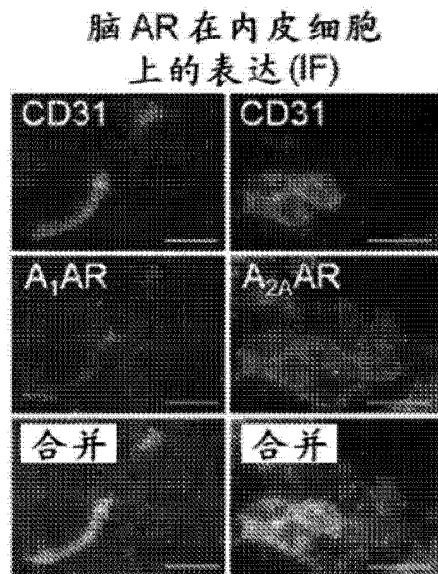


图 21B

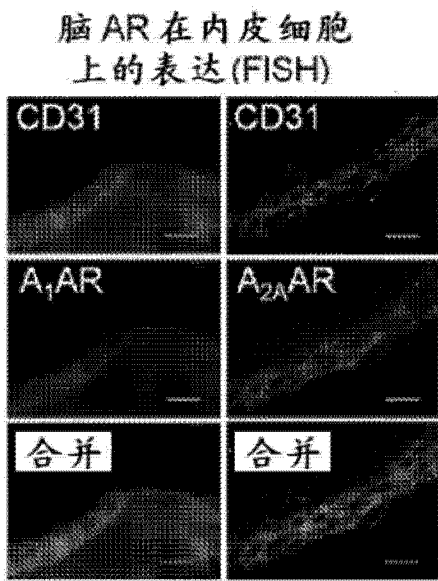


图 21C

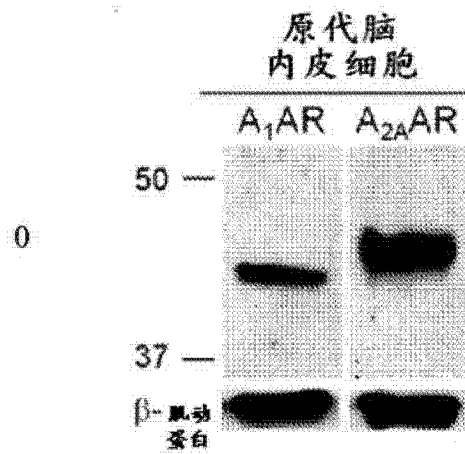


图 21D

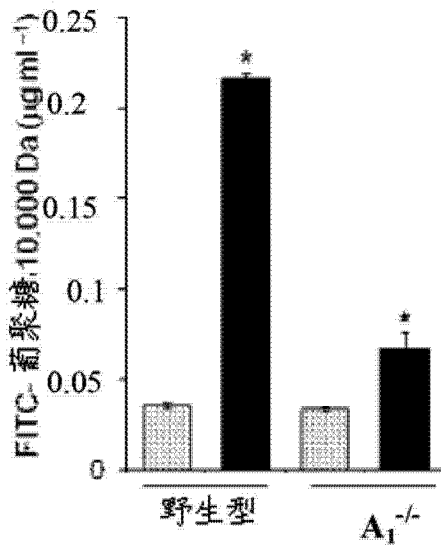


图 21E

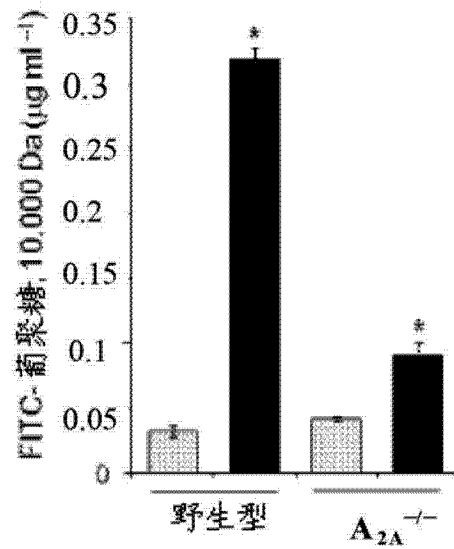


图 21F

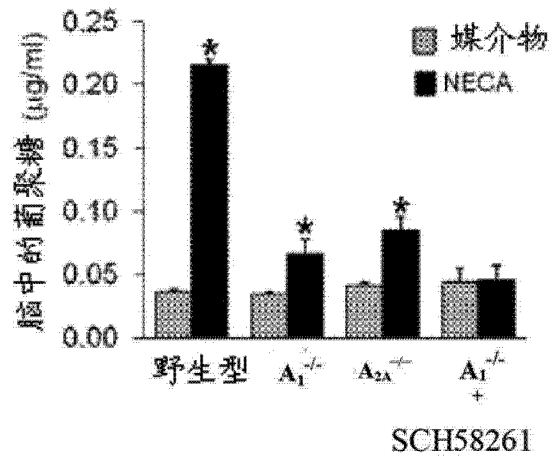


图 21G

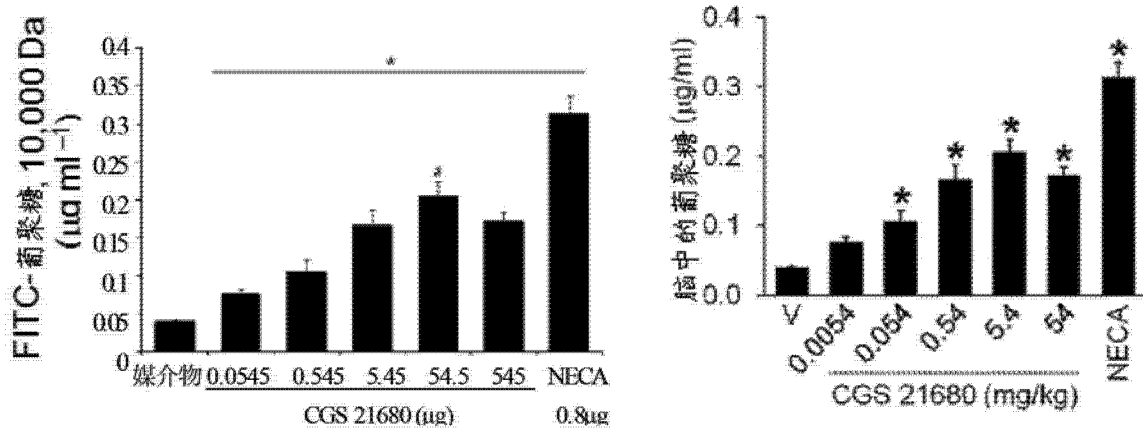


图 21H

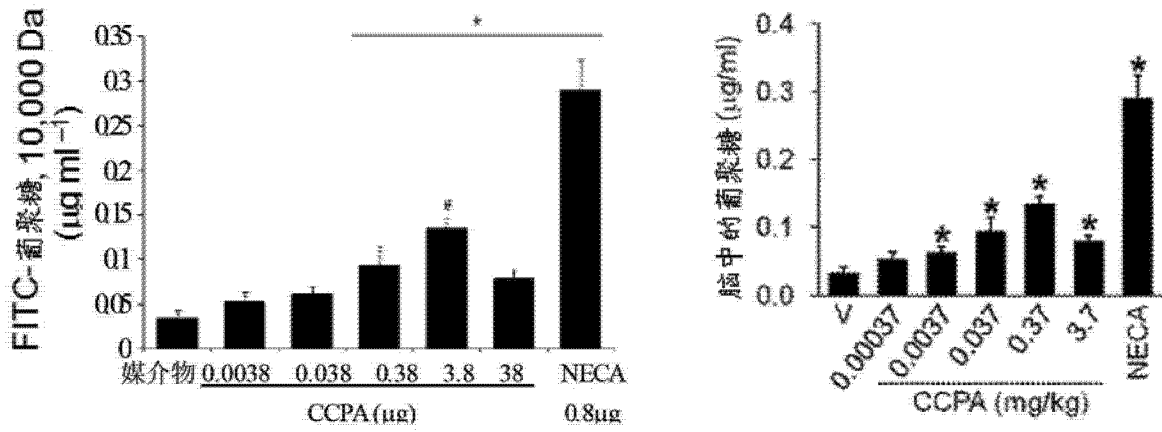


图 21I

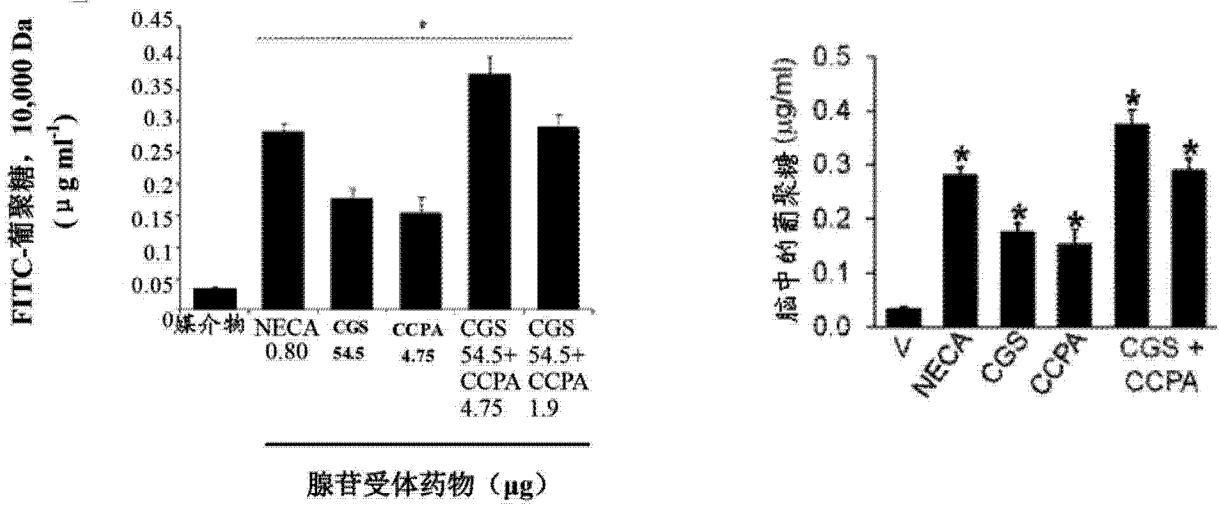


图 21J

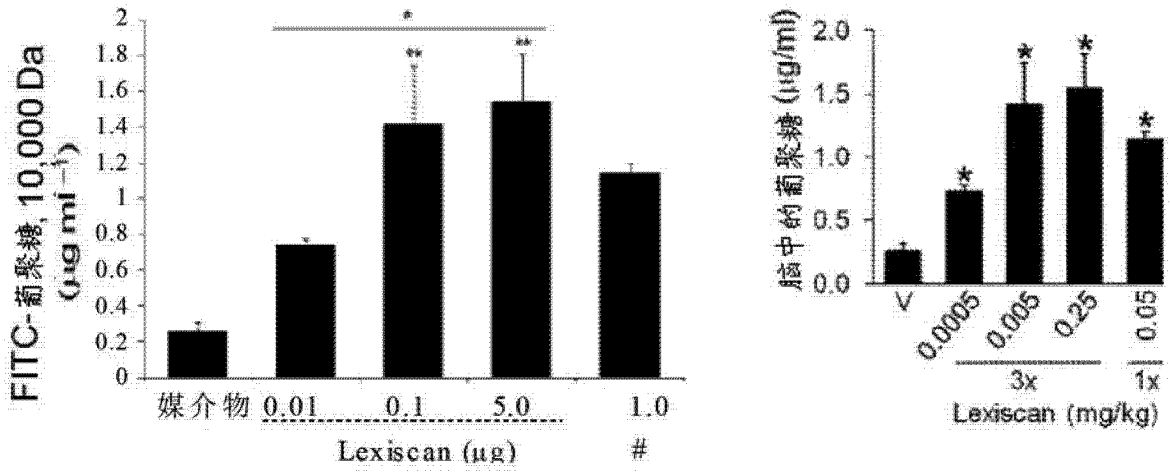


图 22A

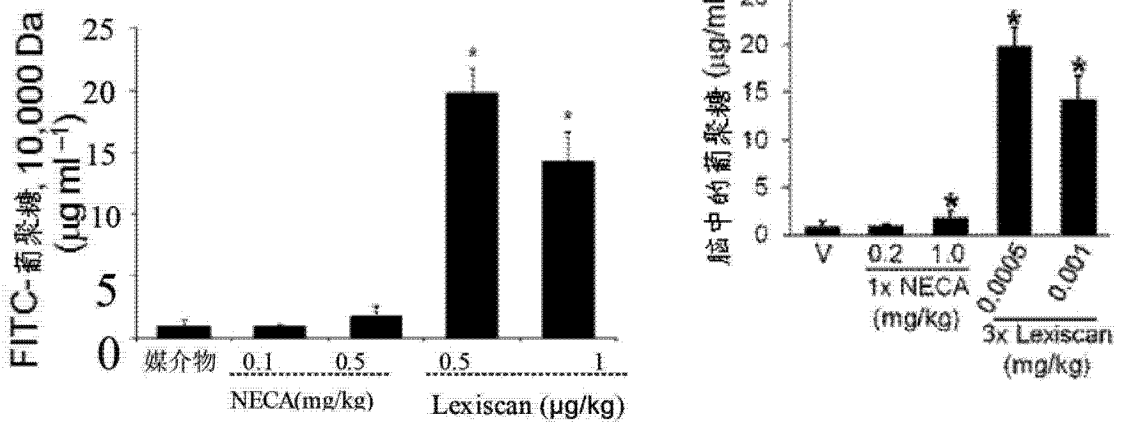


图 22B

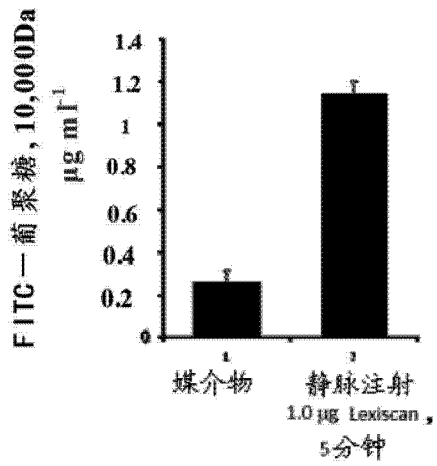


图 22C

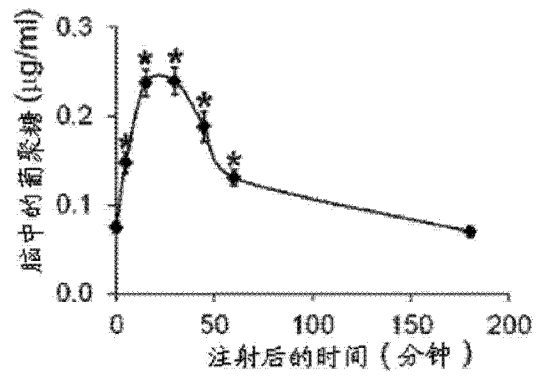


图 22D

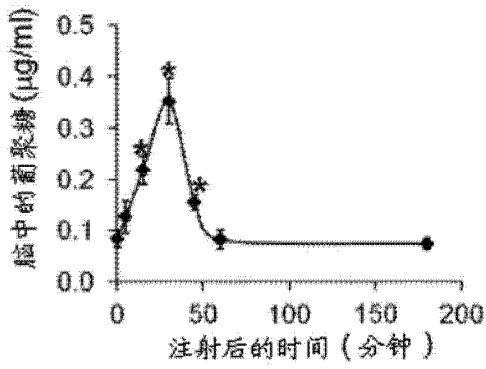


图 22E

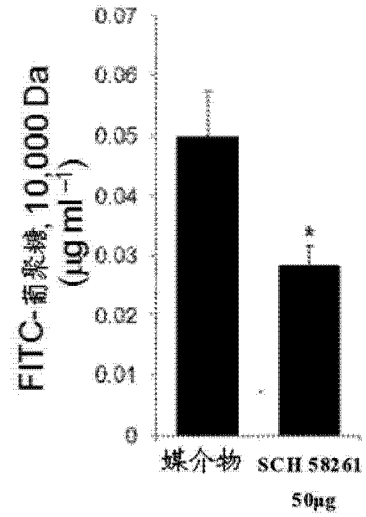


图 22F

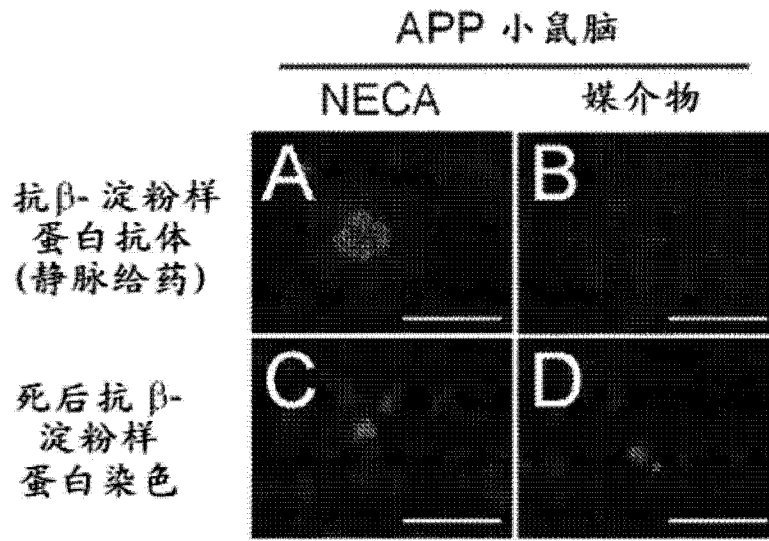


图 23A-23D

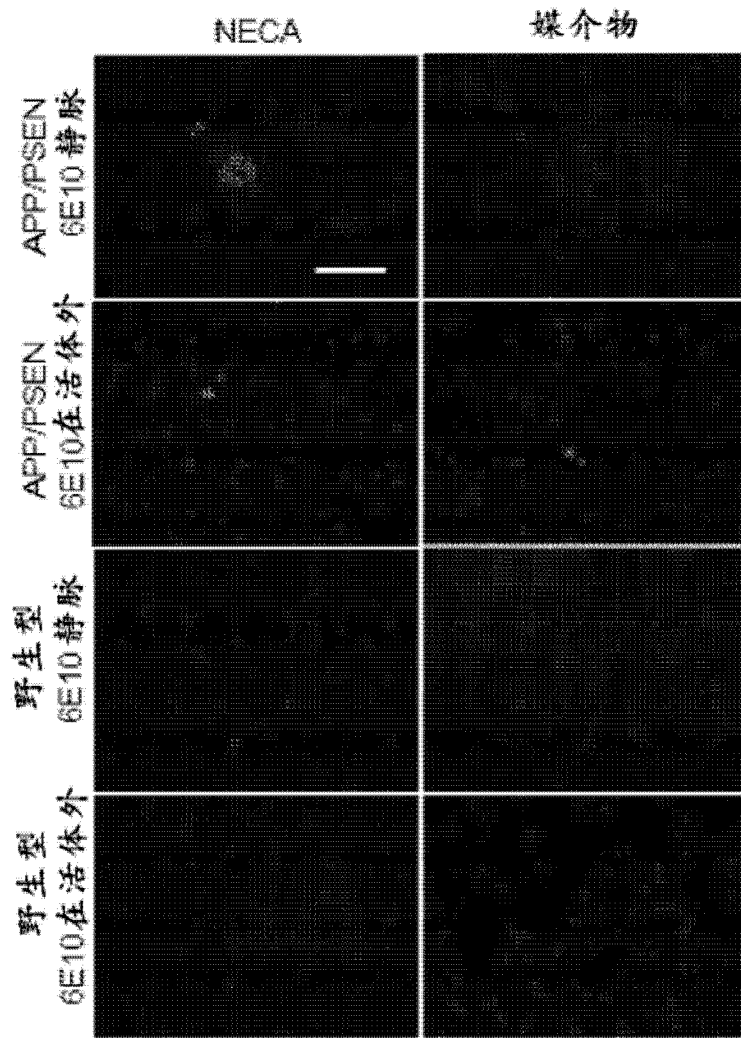


图 23E

CD31和 β -淀粉样蛋白染色的
APP小鼠脑



图 23F-23G

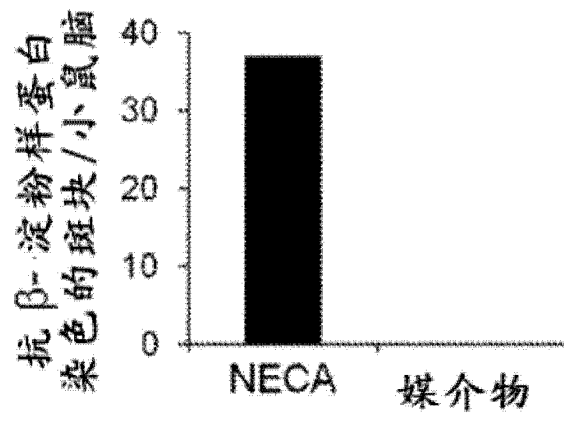


图 23H

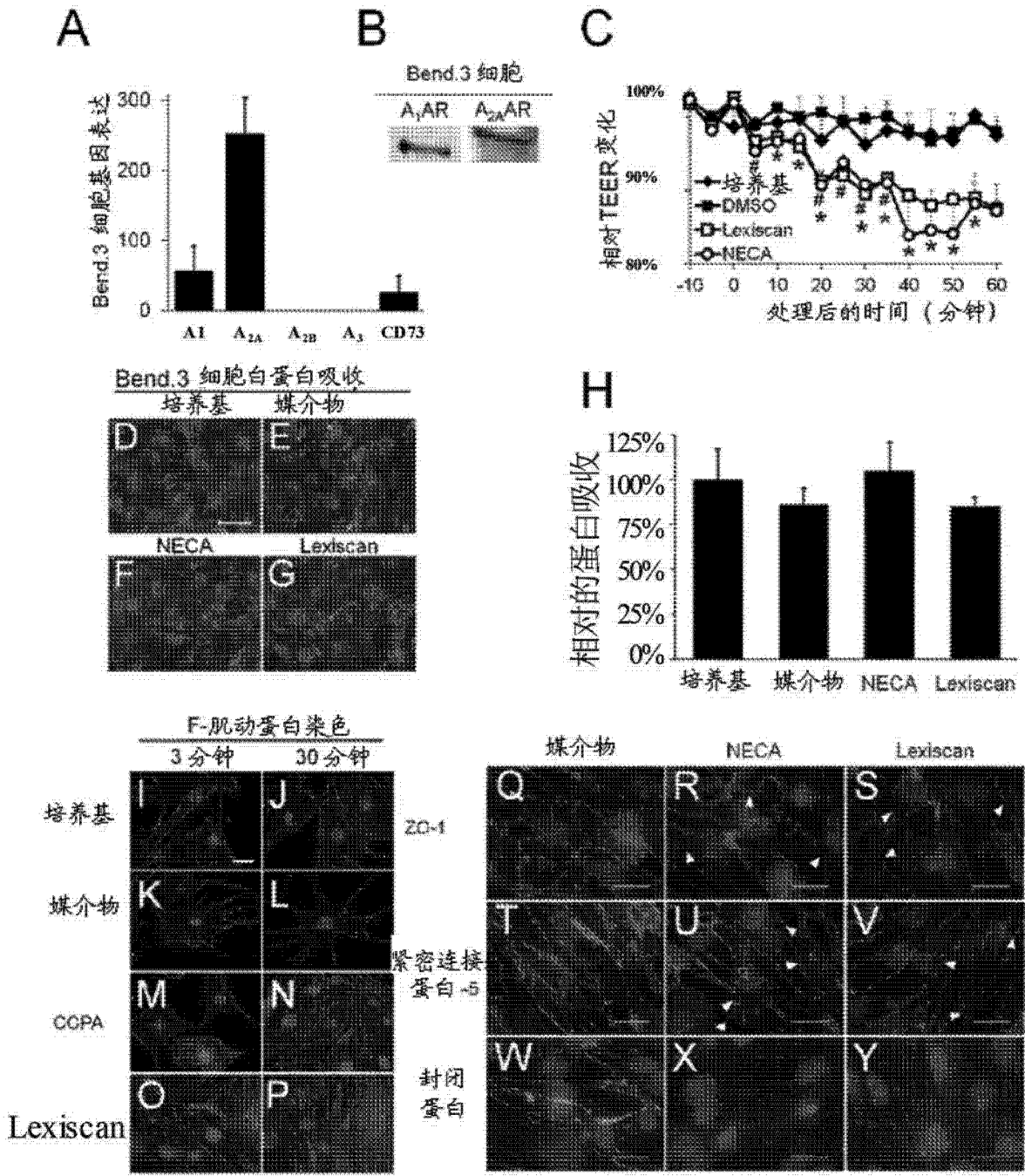


图 24A-24Y

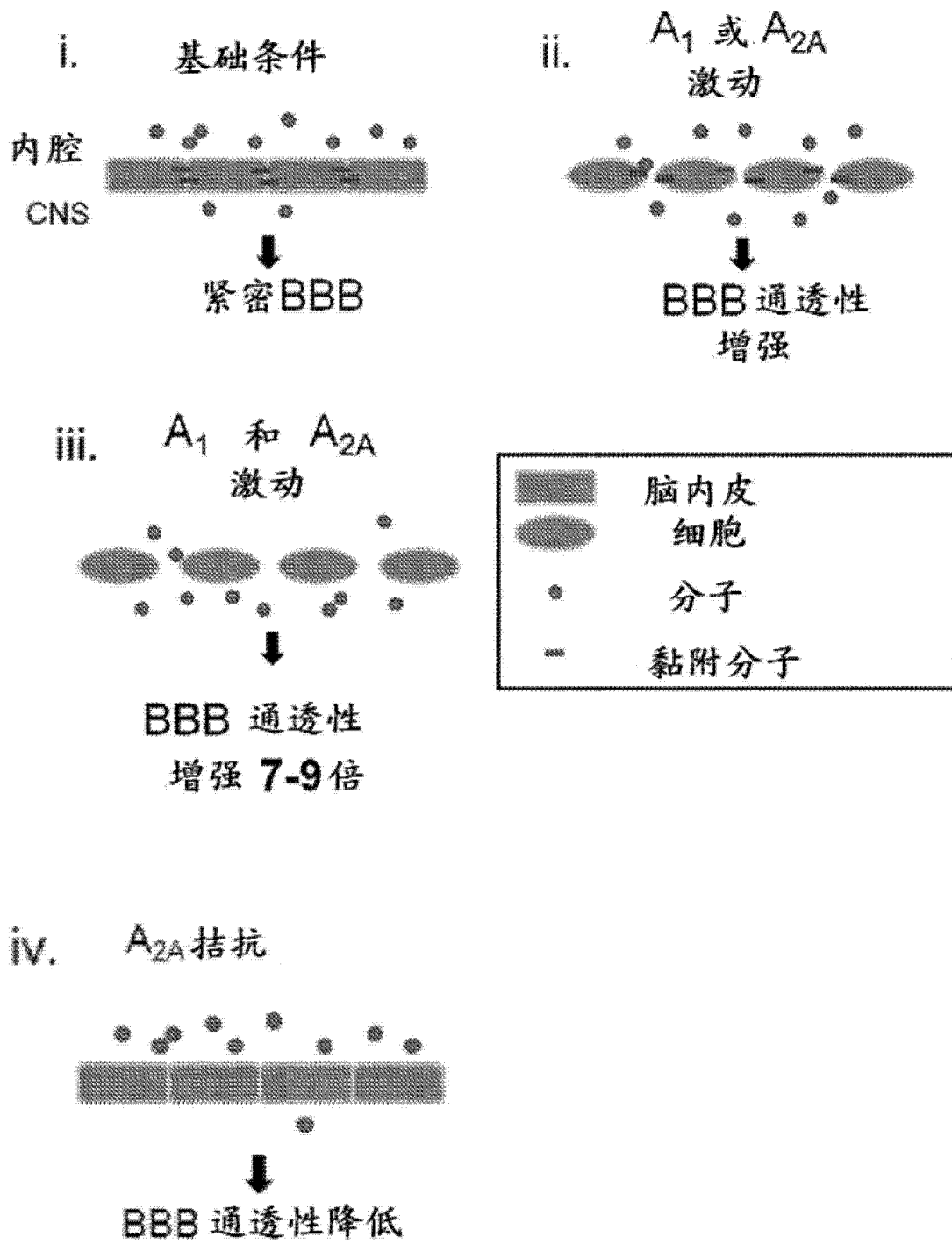


图 25