



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03809604.8

[43] 公开日 2005 年 8 月 3 日

[11] 公开号 CN 1650001A

[22] 申请日 2003.4.18 [21] 申请号 03809604.8
[30] 优先权
[32] 2002. 4. 30 [33] US [31] 60/376,606
[86] 国际申请 PCT/US2003/012521 2003.4.18
[87] 国际公布 WO2003/092584 英 2003.11.13
[85] 进入国家阶段日期 2004.10.28
[71] 申请人 爱尔康公司
地址 瑞士哈楠波格
[72] 发明人 D·L·弗利纳 A·谢泼德
N·雅各布森 彭玉豪
A·F·克拉克

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

[54] 发明名称 作为降低眼内压和治疗青光眼性视网膜病变/眼神经病的独特手段的调控、抑制或调节结缔组织生长因子 (CTGF) 的活性和 / 或表达的药物

[57] 摘要
本发明提供了通过施用治疗有效量的至少一种抑制结缔组织生长因子 (CTGF) 表达和/或信号传导的非核苷酸或非蛋白药物而在有需要的患者中降低眼内压并提供神经保护的方法。

ISSN 1008-4274

1. 在有需要的患者中降低眼内压并提供神经保护的方法，所述方法包括施用治疗有效量的包含至少一种抑制结缔组织生长因子(CTGF)表达、信号传导或生物学功能的非核苷酸或非蛋白药物和可药用载体的组合物。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述的施用是通过局部应用、眼房内或通过植入物施用。

3. 权利要求 1 的方法，其中在所述组合物中所述 CTGF 抑制剂的总浓度为 0.01%至 2%。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述的患者患有青光眼或高眼压症。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述的青光眼为正常眼压性青光眼。

6. 在有需要的患者中降低眼内压的方法，所述方法包括施用治疗有效量的包含至少一种抑制结缔组织生长因子(CTGF)表达、信号传导或生物学功能的非核苷酸或非蛋白药物和可药用载体的组合物。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述的施用是通过局部应用、眼房内或通过植入物施用。

8. 权利要求 6 的方法，其中在所述组合物中所述 CTGF 抑制剂的总浓度为 0.01%至 2%。

9. 权利要求 6 的方法，其中所述的患者患有青光眼或高眼压症。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述的青光眼为正常眼压性青光眼。

11. 预防与原发性开角型青光眼(POAG)相关的视野缺损的方法，所述方法包括向有需要的患者施用包含调节结缔组织生长因子(CTGF)表达的非核苷酸或非蛋白药物的组合物以便控制眼内压并对视网膜神经节细胞或视神经乳头提供保护。

12. 在有需要的患者中降低眼内压并提供神经保护的组合物，所述组合物包含至少一种抑制结缔组织生长因子(CTGF)表达、信号传导或生物学功能的药物和可药用载体。

13. 权利要求 12 的组合物，其中在所述组合物中所述 CTGF 抑制剂

的总浓度为 0.01%至 2%。

作为降低眼内压和治疗青光眼性视网膜病变/眼神经病的独特手段的调控、抑制或调节结缔组织生长因子(CTGF)的活性和/或表达的药物

发明背景

发明领域

本发明涉及的领域是包括神经变性和/或眼内压升高在内的眼部病症。更具体而言，本发明提供了降低眼内压并提供眼部神经保护的组合物。

相关领域描述

有许多眼部病症由视神经乳头(optic nerve head)损伤、眼组织变性和/或眼内压升高引起或恶化。例如，“青光眼”是一类衰弱性眼病，其是美国和其它发达国家中导致不可逆性失明的最主要原因。原发性开角型青光眼(“POAG”)是青光眼的最常见形式。该疾病的特征是小梁网变性，导致房水的正常功能受阻而使得眼在虹膜和角膜之间的空间(例如，“夹角”)无法闭合(Vaughan, D.等(1992))。在该疾病中，所述受阻的一个特征是眼内压(“IOP”)增加，如果治疗不当和治疗不及时会导致进行性视力损失和失明。据估计，在 40 岁以上的所有成年人中 0.4%至 3.3%的人被该疾病侵袭(Leske, M.C.等(1986); Bengtsson, B. (1989); Strong, N.P. (1992))。此外，该疾病的患病数随着年龄增长而上升，在 75 岁或以上的人中患病数超过 6%(Strong, N.P., (1992))。

青光眼侵袭眼的三个独立的组织。与 POAG 相关的 IOP 升高是由于小梁网(TM)的形态学和生化学改变所致，小梁网是位于角膜和虹膜之间的夹角处的组织。大部分营养房水通过 TM 存在于眼的前部。在青光眼眼睛的 TM 中，TM 细胞的不断损失和胞外碎片的集结导致房水外流的阻力增加，从而使 IOP 升高。IOP 升高以及其它因素如局部缺血导致视神经乳头(ONH)的变性改变，引起 ONH 的进行性“杯状陷凹形成”和视网膜神经

节细胞及轴突的损失。造成 TM、ONH 和视网膜神经节细胞的青光眼性损伤的详细分子机理尚不清楚。

20 年前,作为导致青光眼视野缺损发展的主要因素,曾激烈地讨论过高眼压症、局部缺血和视神经乳头机械变形的相互作用。此后,在变性疾病过程中还涉及到其它因素,包括兴奋毒性、氧化一氮、缺乏重要的神经营养因子、神经胶质/神经元相互作用异常以及基因组学(genomics)。在其可最终确定细胞死亡机理并提供对青光眼的各种形式的区分方面,对基因组学的考虑值得讨论。在过去 8 年中,已经对超过 15 种的不同青光眼基因进行了绘图并对 7 种青光眼基因进行了鉴定。这包括原发性开角型青光眼的 6 种已绘图的基因(*GLC1A-GLC1F*)和 2 种已鉴定的基因(*MYOC* 和 *OPTN*)、先天性青光眼的 2 种已绘图的基因(*GLC3A-GLC3B*)和 1 种已鉴定的基因(*CYP1B1*)、色素分散型(pigmentary dispersion)/色素性青光眼的 2 种已绘图的基因,以及发育性或综合征性(syndromic)青光眼的许多基因(*FOXC1*、*PITX2*、*LMX1B*、*PAX6*)。

因此,青光眼的每种形式可能具有独特的病理学,相应地,控制所述疾病可能需要不同的治疗方法。例如,作用于降解视神经乳头胞外基质的酶表达的药物不可能预防兴奋毒性或神经营养因子不足导致的 RGC 死亡。在青光眼中,一种称为凋亡(程序性细胞死亡)的过程导致 RGC 死亡。据推测可导致死亡的不同类型的损伤可通过集中于某些共同途径而导致死亡。可能拓宽药物效用和增加其在控制疾病的不同形式中具有效用的可能性的一种策略是以共同途径下游为靶标。然而,作用于多个代谢途径的药物更可能产生不需要的副作用。随着用于鉴定青光眼的具体形式的基于基因的诊断试剂盒的出现,可以试验选择性神经保护剂以期减少所测量的反应的偏差程度。

目前的青光眼治疗主要是降低 IOP,其是青光眼发展和恶化的主要危险因素。这些治疗虽然可降低 IOP,但是它们并不直接针对发病机制,并且疾病继续恶化。因此,所需要的是通过发病途径降低 IOP 和/或对视神经乳头和/或视网膜神经节细胞提供神经保护的治疗方法。

发明概述

本发明通过为有需要的患者提供一种降低眼内压并提供神经保护的方法克服了现有技术的这些及其它缺点，所述方法通过施用治疗有效量的包含至少一种抑制结缔组织生长因子(CTGF)表达和/或信号传导的非核苷酸或非蛋白药物和可药用载体的组合物来实现。另一方面，本发明提供了通过向患者施用治疗有效量的抑制 CTGF 表达和/或信号传导的药物而降低眼内压的方法。优选地，用于本发明的方法的组合物可降低由 CTGF 或 CTGF 信号传导产物表达增加引起的眼内压升高。

在一项优选的实施方案中，本发明的组合物可通过局部应用、眼房内 (intracamerally) 或通过植入物施用。典型地，本发明的组合物中 CTGF 抑制剂的总浓度为 0.01% 至 2%。通常，本发明的治疗方法对患有青光眼例如正常眼压性青光眼或高眼压症的患者最有用。

本发明还提供了预防与 POAG 相关的视野缺损的方法，所述方法通过向有需要的患者施用包含调节 CTGF 表达和/或信号传导的非核苷酸或非蛋白药物的组合物以便控制眼内压并对视网膜神经节细胞或视神经乳头提供保护来实现。

在另一项实施方案中，本发明提供了一种在有需要的患者中降低眼内压并提供神经保护的组合物。通常，本发明的组合物包含至少一种抑制结缔组织生长因子(CTGF)表达和/或信号传导的药物和可药用载体。本发明的组合物中 CTGF 的总浓度优选为 0.01% 至 2%。

附图简要说明

以下附图形成本说明书的一部分并包括在本说明书中以进一步阐明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一幅或多幅以及在此给出的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

图 1. CTGF 基因在青光眼 TM 组织中相对于在正常 TM 组织中表达升高。为了证实微阵列和 cDNA 差减的结果，通过正常相对于青光眼 TM 组织 cDNA 的 QPCR 分析测定了 CTGF mRNA 表达。每个样品下面的数字

表示分配给每个样品的 cDNA 标识号。如(Wang 等, 2001)所述的那样获得人供体组织和总 RNA。“平均”代表正常或青光眼 TM 水平的平均值。

图 2. CTGF 基因在青光眼 TM 细胞系中相对于在正常 TM 细胞系中表达升高。为了证实微阵列和 cDNA 差减的结果, 通过正常相对于青光眼 TM 细胞系 cDNA 的 QPCR 分析测定了 CTGF mRNA 表达。每个样品下面的数字表示细胞系标识号。如(Shepard 等, 2001)所述的那样获得人 TM 细胞系和总 RNA。“NTM 库”和“GTM 库”是指从合并的 NTM 或 GTM cDNA 得到的扩增水平。

图 3. GSK-3 抑制对青光眼 TM 细胞中 CTGF 基因表达的影响。为了测定 GSK-3 抑制对 CTGF 基因表达的影响, 我们使用 QPCR 分析测定了已知的 GSK-3 抑制剂 SB-216763 (Coghlan 等, 2000) 对青光眼 TM 细胞系 (SGTM2697) 中基础和 TGF β 2-刺激的 CTGF mRNA 表达的影响。

图 4. CDK2 抑制对青光眼 TM 细胞中 CTGF 基因表达的影响。为了测定 CDK 抑制对 CTGF 基因表达的影响, 我们使用 QPCR 分析测定了已知的 CDK-2 抑制剂 GW-8510 (Davis 等, 2001) 对青光眼 TM 细胞系 (SGTM2697) 中基础和 TGF β 2-刺激的 CTGF mRNA 表达的影响。

优选实施方案详述

青光眼是一类多样的具有某些共同临床特征的视神经病。青光眼的视力损失是由于神经视网膜中视网膜神经节细胞的选择性死亡所致, 该选择性死亡在临床上通过视野的特征性改变、神经纤维层缺损和 ONH 的进行性杯状陷凹形成来诊断。青光眼发展的主要危险因素之一是存在高眼压症(眼内压 IOP 升高)。在患者具有通常所认为的正常 IOP 的正常眼压性青光眼的发病机制中似乎也涉及 IOP。与青光眼相关的 IOP 升高是由于小梁网(TM)中房水外流的阻力升高所致, 小梁网是位于眼前房的虹膜-角膜夹角处的一种小的特殊组织。TM 的青光眼性改变包括 TM 细胞损失和包括斑块样物质在内的胞外碎片的沉积和积聚。另外, 青光眼的视神经乳头也发生改变。在青光眼眼睛中, ONH 神经胶质细胞有形态学和可动性改变。

在对 IOP 升高和/或短暂性局部缺血损伤的反应中, ONH 胞外基质的组成有改变并且神经胶质细胞和视网膜神经节细胞轴突的形态也有改变。

TM 的青光眼性改变与纤维变性不同, 纤维变性与伤口愈合反应有关并且通常涉及炎症以及随后的肌成纤维细胞增殖。组织损伤可被炎症系统识别, 该系统通过刺激成纤维细胞和血管生成启动伤口修复过程。死亡或将死的组织/细胞被最初由纤维蛋白组成的瘢痕组织代替, 之后被过量的胞外基质物质、尤其是胶原蛋白所代替。

CTGF 是分泌的细胞因子, 已知其主要通过增加 I 型胶原蛋白和纤连蛋白的沉积来增加胞外基质(ECM)的产生。以前认为 CTGF 的过量表达是如硬皮病、纤维增生性疾病、瘢痕形成等其中存在 ECM 成分过量积累的病症的主要成因。小梁网(TM)区域中胞外基质物质的过量积累也是许多形式的青光眼的标志; 认为这种增加导致房水外流的阻力增加, 从而导致眼内压升高。本发明人已发现: 在分离的组织和由人 TM 建立的细胞系中存在 CTGF 基因产物。因此, 认为 CTGF 在 TM 的 ECM 产生中发挥作用。下调 CTGF 基因表达、蛋白产生或 CTGF 活化的下游作用的药物代表降低 IOP 的新手段。

CTGF 表达可被多种因素诱导, 包括: TGF- β 、VEGF、凝血酶、高级糖基化终产物(AGE)、机械应激和溶血磷脂酸(LPA)等。CTGF 的具体诱导物和信号途径可因所刺激的具体细胞类型而异。有报导称在一些细胞类型中 TGF- β 对 CTGF 的诱导涉及 Smads、PLC、PKC 和酪氨酸激酶, 而在其它细胞类型中似乎涉及 RhoA、PKA 和细胞骨架。成纤维细胞的机械应激通过蛋白激酶和酪氨酸磷酸酶的参与诱导 CTGF 表达。

CTGF 的作用机理尚不十分清楚。CTGF 似乎与 PDGF 受体、整联蛋白以及 LDL 受体相关的蛋白(LRP)结合, 它们中的每一种均可以作为 CTGF 的信号细胞表面受体发挥作用。在一些细胞类型中, 通过 PDGF 受体的 CTGF 信号传导似乎涉及 MAPK 和 PI3K。软骨细胞中的 CTGF 信号传导涉及引起细胞增殖的 ERK 信号传导和引起细胞分化的 p38MAPK 信号传导。CTGF 所用的具体的细胞表面受体和信号途径似乎取决于所研

究的具体细胞类型。

美国专利 No. 5,585,270 描述了编码 CTGF 的多核苷酸。据说 CTGF 具有促有丝分裂活性，即刺激靶细胞增殖的功能。据说 CTGF 还具有趋化活性，即通过与特定分子相互作用导致化学诱导细胞运动。该蛋白被认为在人组织的正常发育、生长和修复中发挥作用。该专利还描述了通过对伤口应用有效量的含有纯化 CTGF 的组合物加速患者伤口愈合的方法。据说该多肽可用于皮肤伤口愈合不良的情况或者需要增强正常愈合机制的情况，例如烧伤。该专利没有对青光眼或眼部病症进行讨论。

美国专利 No. 6,069, 006 的说明书是上述美国专利 No. 5,585,270 的部分延续，其描述了 CTGF 调节性核酸序列。该专利还描述了治疗纤维变性疾病的方法和鉴别用于治疗纤维变性疾病的药物的方法。除了 CTGF 核酸序列或多肽外，没有描述其它具体的药物。没有描述眼组织的神经保护。

美国专利 No. 6,358,741 描述了衍生自 CTGF 的许多核酸序列，据说这些核酸序列可用于抑制细胞中的 CTGF 表达。该专利没有讨论青光眼、眼组织的神经保护或抑制 CTGF 表达的非核酸或非多肽序列。

CTGF 似乎在中枢神经系统的星形反应性星形胶质细胞的胞质中以高浓度产生。CTGF 被认为是造成与反应性星形胶质细胞增生如神经胶质增生(神经胶质过度生长)以及神经胶质瘢痕形成相关的机制、即已知阻碍神经修复和生长的过程的成因(Schwab 等, 2000; Schwab 等, 2001)。据信，所述过程还参与与青光眼相关的视网膜神经元损失和/或视神经轴突修复不能。本发明人已发现：下调 CTGF 提供了保护视网膜和视神经/神经乳头的方法。

因此，一方面，本发明提供了通过施用包含非核苷酸或非肽 CTGF 抑制剂的组合物降低 IOP 并对视网膜神经节细胞提供神经保护的方法。进一步的构思是该组合物可包含抑制上调 CTGF 的药物的化合物。例如，已证明过氧化氢(H_2O_2)是 CTGF 基因表达的诱导物。还发现 TGF- β 、地塞米松和 5-羟色胺也诱导 CTGF 表达(Park 等, 2001)。

治疗青光眼的治疗剂优选为药物样小分子，其影响 CTGF 途径的一个

或多个方面。优选的治疗剂为以下的这些：(1)CTGF 的抑制剂；(2)在 CTGF 作用的下游发挥作用的物质的抑制剂(即 CTGF 信号传导的抑制剂)和/或(3)上调 CTGF 基因或蛋白表达的物质的抑制剂。

本发明人已经用 CTGF QPCR 分析试验了数种不同化合物种类对培养的人正常或青光眼 TM 细胞中基础和 TGF β 2 诱导的 CTGF 基因表达的抑制作用。小分子抑制剂的靶标是抑制 GSK-3、CDK、NAALADase、蛋白激酶 C、MEK、p38MAPK、ROCK、VEGF、牻牛儿基牻牛儿基转移酶和 AGE。还试验了 PPAR、5-HT 和 P2X7 的小分子激动剂的活性。以胞外信号调节激酶 1 或 2(ERK1 或 ERK2)为靶标的化合物也可以在基础或 TGF β 2-诱导的 CTGF 基因表达中发挥作用。许多 GSK-3 和 CDK 抑制剂之间存在明显的交叉反应性，因此抑制其它靶标如 ERK、蛋白激酶 C 或 STAT 家族的化合物可能会被证明在抑制 TM 细胞中基础或 TGF β 2-刺激的 CTGF 表达中价值。

已发现两大类化合物可抑制人 TM 细胞中基础和 TGF β 2 诱导的 CTGF 表达：GSK-3 和 CDK 抑制剂。糖原合酶激酶(GSK-3)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，其以衍生自两种基因的两种细胞形式存在，即 GSK-3 α 和 GSK-3 β 。GSK-3 α 和 GSK-3 β 95%相同，并且不能容易地区分小分子拮抗剂对它们的差别抑制。GSK-3 是糖原合成中的限速酶，但具有许多磷酸化细胞靶标，包括糖原合酶、 β -连环蛋白、eIF2B 和 tau(在(Cohen 和 Frame 2001)和(Woodgett 2001)中有评述)。在该文献中没有给出 GSK-3 直接参与 CTGF 表达和信号传导的实例。

依赖细胞周期蛋白的激酶(CDK)具有多种细胞功能，包括调节细胞分裂周期、凋亡、转录、神经元功能和分化。已经鉴定了数种已知的 CDK 的 ATP-竞争性抑制剂(Knockaert, Greengard 等, 2002)。人们一直在致力于将 CDK 抑制用于治疗癌症、阿尔茨海默病、ALS、中风、心血管疾病等。已证明 CTGF 是成纤维细胞增殖中 TGF β 的下游介导体，其上调细胞周期蛋白 A-cdk2 (Kothapalli 和 Grotendorst, 2000)。

在 GSK-3 类化合物中，发现一种化合物即 SB-216763 (Coghlan,

Culbert 等, 2000)抑制正常和青光眼(图 3)人 TM 细胞中基础和 TGF β 2 诱导的 CTGF 水平。SB-216763 是一种马来酰亚胺衍生物, 其在 0.01mM ATP 存在下对 GSK-3 α 和 GSK-3 β 的 IC₅₀ 为 34nM, Ki 为 9nM(Coghlan, Culbert 等, 2000)。受试并发现可抑制 TM 细胞中基础和某些情况下的 TGF β 2 诱导的 CTGF 基因表达的 GSK-3 类抑制剂中的其它化合物包括帕罗酮类(paullones), 如阿司特帕罗酮(alsterpaullone)、9-氟基帕罗酮和坎帕罗酮(kenpaullone) (Zaharevitz, Gussio 等, 1999; Leost, Schultz 等, 2000; Bain, McLauchlan 等, 2003)。

在 CDK 类化合物中, 发现一种具有相对选择性的 CDK2 抑制剂即 GW-8510(Davis, Benson 等, 2001)抑制正常和青光眼(图 4)人 TM 细胞中基础和 TGF β 2-诱导的 CTGF 水平。GW-8510 是强效且具有相对选择性的 CDK2 抑制剂, 其 IC₅₀ 为 10nM。GW-8510 还抑制 CDK1 和 CDK4, 但 IC₅₀ 值较低(110 和 130nM) (Davis, Benson 等, 2001)。受试并证明具有抑制活性的其它 CDK 类抑制剂包括 purvalanol A 和 roscovitine (Hardcastle, Golding 等, 2002)。

在 CTGF QPCR 分析中受试并发现可抑制 TM 细胞中基础和一些情况下的 TGF β 2 诱导的 CTGF 基因表达的其它类化合物包括 PPAR 激动剂如曲格列酮、环格列酮(Willson, Brown 等, 2000)和 15(S)HETE。

可将本发明的药物掺入用于(例如局部、眼房内或通过植入物)递送至眼的各种类型的眼用制剂中。优选将所述药物掺入用于递送至眼的局部眼用制剂中。所述药物可以与眼科可接受的防腐剂、表面活性剂、粘度增强剂、渗透促进剂、缓冲剂、氯化钠以及水混合以形成水性、无菌的眼用混悬液或溶液。眼用溶液制剂可以通过将药物溶解在生理学可接受的等张水性缓冲液中来制备。此外, 眼用溶液还可以包含眼科可接受的表面活性剂以帮助溶解药物。另外, 眼用溶液还可以含有增加粘度的物质, 如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等, 以增强制剂在结膜囊中的保持力。也可以使用胶凝剂, 包括但不限于: 结冷胶(gellan)和黄原胶。为了制备无菌眼用软膏制剂, 将活性成分与

防腐剂在适合的赋形剂如矿物油、液体羊毛脂或白凡士林中混合。根据公开的类似眼用制剂的配方，可以通过将药物混悬于由例如卡波普-974等的组合物制备的亲水性基质中制备无菌眼用凝胶制剂；可以掺入防腐剂和张力剂。

优选将药物配制成 pH 约 4 至 8 的局部眼用混悬剂或溶液剂。为每个个体建立特定的剂量方案由临床医生决定。通常这些制剂中包含的药物量为以重量计 0.01% 至 5%，但优选为以重量计 0.05% 至 2%，最优选为以重量计 0.1 至 1.0%。剂型可以是溶液剂、混悬微乳剂。因此，对于局部给药，根据熟练临床医生的判断，可将这些制剂的 1 至 2 滴递送至眼表面，每天 1 至 4 次。

所述药物也可以与用于治疗青光眼的其它药物组合使用，所述的其它药物例如但不限于： β -阻断剂、前列腺素类似物、碳酸酐酶抑制剂、 α_2 激动剂、缩瞳药和神经保护药。

可以使用本领域技术人员公知的技术将药物直接递送至眼(例如：局部用滴眼剂或软膏剂；处于陷凹(cul-de-sac)中或邻近巩膜或在眼中的缓释装置；眼周、结膜或眼球筋膜下、眼房内或玻璃体内注射)或经胃肠外递送至眼(例如：经口；静脉内、皮下或肌内注射；经皮递送；等)。以下是本发明具体的可能的制剂实例：

(a) 局部眼用制剂	<u>重量百分比</u>
CTGF 抑制剂	0.005-5.0
四丁酚醛	0.01-0.05
HPMC	0.5
苯扎氯铵	0.01
氯化钠	0.8
乙二胺四乙酸二钠	0.01
NaOH/HCl	适量至 pH 7.4
纯化水	适量至 100 mL

进一步的构思是可将本发明的化合物配制在眼内植入装置中。

以下实施例用于阐明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解：在以下实施例中所公开的技术代表发明人所发现的在本发明的实施中可良好发挥作用的技术，因此可以认为其构成了实施本发明的优选方式。然而，根据本发明所公开的内容，本领域技术人员应当理解：在不背离本发明的精神和范围的情况下，可对所公开的具体实施方案进行很多改变并且仍能获得类似或相似的结果。

实施例 1

青光眼 TM 相对于非青光眼 TM 中的 CTGF 表达

微阵列筛选

通过 GeneFilter[®](Research Genetics)筛选鉴定青光眼 TM 细胞中相对于正常 TM 细胞中 CTGF 的 mRNA 转录物升高。

如(Shepard 等, IOVS 2001, 42:3173)所述的那样，由合并的(每种 6 个)正常或青光眼 TM 细胞系中分离出 500ng 总 RNA(TRIZOL Reagent; Invitrogen)，并于 300 单位 Superscript II 核糖核酸酶 H-反转录酶(Invitrogen)、100 μ Ci [α -³³P]dCTP (10mCi/ml, 3,000Ci/mmol; Amersham)、0.33mM dATP、dGTP、dCTP (Promega)、3.3mM DTT、1X 第一链缓冲液(Invitrogen)和 2 μ g oligo-dT 存在下、在 37℃下分别反转录 90 分钟。然后按照生产商的使用说明用 Chroma-Spin 100 柱(Clontech)纯化放射性标记的 cDNA。按照生产商的使用说明用点有 $\approx$ 4,000 种已知基因的单个 Genefilter[®] (GF211; Research Genetics)与放射性标记的探针杂交。通过在 0.5% SDS 中煮沸 5 分钟将膜首先进行预处理。膜的预杂交在 42℃下、于含有 5ml MicroHyb (Research Genetics)的转瓶中用 5 μ g poly-dA (Research Genetics)和 5 μ g 煮沸的 Cot1 DNA(Invitrogen)作为封闭试剂进行 30 分钟。将全部放射性标记的探针煮沸并在 42℃下加至预杂交混合物中达 16h。杂交后，将膜在 2X SSC/1% SDS 中洗涤 2 次达 20 分钟，然后在 0.5X SSC/1% SDS 中洗涤 1 次达 15 分钟。将膜放置于湿 Whatmann 3MM 纸上并用 SaranWrap 包裹。在 Storm 磷光显像仪 (Molecular Dynamics)上用最大分

分辨率获得图像。一旦获得图像,就将印迹立即在沸腾的 0.5% SDS 中除去探针并用相反的探针(例如正常 TM 之后是青光眼 TM)进行另一次杂交。使用 Pathways (Research Genetics)和 MS Excel (Microsoft)软件分析得自一式两份探测的图像。在 GF211 GeneFilter[®]上的 4300 种基因中, CTGF (GenBank 登录号#AA598794)是显示出 GTM:NTM 比>2 倍的 7 种基因之一。

cDNA 差减筛选

在定制的 PCR-Select[™] cDNA 差减筛选(Clontech)中独立地鉴定 CTGF, 所述的差减筛选用于筛选在青光眼 TM 细胞中相对于在正常 TM 细胞中差异表达的 mRNA 转录物。

如(Shepard 等, 2001)所述的那样, 由合并的(每种 7 个)正常或青光眼 TM 细胞系中分离出 700 μ g 总 RNA(TRIZOL Reagent; Invitrogen)。使用 Nucleotrap mRNA Midi 试剂盒(Clontech)通过在 oligo-dT 胶乳珠上的两轮 poly A+选择分离出受试者(青光眼)和驱动器(正常)poly A+ RNA。按照 Clontech 试剂盒(目录号#K1804-1)的方法进行所有随后的 PCR-Select[™] cDNA 差减步骤。

基本按照 PCR-Select[™] 差异筛选试剂盒(Clontech 目录号#K1808-1)中的使用说明进行得到的 cDNA 差减文库的差异筛选。选择的数个差异表达的 cDNA 克隆也通过 Northern 分析证实。用差减 TM 细胞 cDNA 文库探针鉴定的所有候选差异表达克隆的列表由 Clontech 产生。CTGF 的转录物 (GenBank 登录号#XM_037055.1)在该表中并且于青光眼 cDNA 文库中被富集。

实施例 2

RNA 分离和第一链 cDNA 制备

按照生产商的使用说明(Life Technologies)使用 Trizol[®]试剂由 TM 细胞中分离出总 RNA。按照生产商的使用说明(PE Biosystems, Foster City,

CA)使用随机六聚体和 TaqMan[®]反转录试剂由 1 μ g 总 RNA 产生第一链 cDNA。然后, 将 100ul 反应物稀释 20 倍以达到 0.5ng/ μ l 的有效 cDNA 浓度。

定量 PCR

基本如(Shepard 等, IOVS 2001, 42:3173)所述的那样使用 ABI Prism[®] 7700 序列检测系统(Applied Biosystems)通过定量实时 RT-PCR(QPCR)证实 CTGF 的差异表达。使用 Primer Express 软件(Applied Biosystems)设计用于 CTGF 扩增的引物, 并将该引物退火至 Genbank 登录号为 #NM_001901.1 的邻接外显子(CAGCTCTGACATTCTGATTCGAA, nts 1667-1689 和 TGCCACAAGCTGTCCAGTCT, nts 1723-1742)上, 产生 76-bp 扩增子。CTGF 的扩增使用设计用于产生 69-bp 扩增子的针对 18S rRNA 基因(GenBank 登录号#X03205 GTCCCTGCCCTTTGTACACAC, nts 1680-1700 和 CGATCCGAGGGCCTCACTA, nts 1730-1749)的引物相对于 18S 核糖体 RNA 表达进行标化。使用 SYBR[®] Green I 双链 DNA 结合染料化学(Applied Biosystems)扩增 CTGF 或 18S cDNA。CTGF 和 18S 引物对的特异性通过组合使用 DNA 测序、琼脂糖凝胶分析和使用 ABI Prism 770 SDS 解离曲线软件(Applied Biosystems)的解离曲线分析由 PCR 产物评价。CTGF 或 18S rRNA 反应物由 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、50nM 引物和 2.5ng cDNA 组成, 终体积为 50 μ l。热循环条件由 50 $^{\circ}$ C, 2 分钟、95 $^{\circ}$ C, 10 分钟, 然后 40 个 95 $^{\circ}$ C 15 秒及 60 $^{\circ}$ C 1 分钟的循环组成。使用 PE Biosystems 用户公告 #2 (<http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>)中所述的相对标准曲线法进行相对 RNA 浓度的定量。使用 SDS 软件版本 1.9.1 (Applied Biosystems)和 MS Excel 97 (Microsoft)进行数据分析。使用含有 CTGF 或 18S 的靶序列的质粒 DNA 产生标准曲线。QPCR 数据以平均值 $\pm$ SD 给出。

根据本发明所公开的内容, 在此所公开并要求保护的所有组合物和/或方法均无需进行过多实验即可进行制备和实施。虽然根据优选实施方案

对本发明的组合物和方法进行了描述，但对本领域技术人员而言，显而易见的是：在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下，可对在此所述的组合物和/或方法以及所述方法的步骤或步骤的顺序进行改变。更具体而言，显而易见的是：可以用化学和结构上相关的某些药物替换在此所述的药物以得到相似的结果。对本领域技术人员而言，显而易见的是：所有这些替换和改变均被认为落入所附权利要求所定义的本发明的精神、范围和概念之内。

参考文献

就其提供的典型性步骤细节或作为此处所述内容的补充的其它细节，在此将以下参考文献详细引入作为参考。

美国专利

6,069,006

6,358,741

书籍

其它出版物

Bain, J., H. McLauchlan,等, "蛋白激酶抑制剂的特异性: 最新报道" **BIOCHEM J** 371(Pt 1): 199-204 (2003)。

Coghlan, M. P.等, "糖原合酶激酶-3 的选择性小分子抑制剂调节糖原代谢和基因转录" **CHEM BIOL** 7(10): 793-803 (2000)。

Cohen, P.和 Frame, S., " GSK3 的复兴" **NAT REV MOL CELL BIOL** 2(10): 769-776 (2001)。

Davis, S. T.等, "用 CDK 抑制剂在大鼠中预防化学疗法诱导的脱发" **SCIENCE** 291(5501): 134-137 (2001)。

Hardcastle, I. R.等, "设计依赖细胞周期蛋白的激酶的抑制剂" **ANNU REV PHARMACOL TOXICOL** 42: 325-348 (2002)。

Knockaert, M.等, "依赖细胞周期蛋白的激酶的药理学抑制剂" **TRENDS PHARMACOL SCI** 23(9): 417-425 (2002)。

Kothapalli, D.和 Grotendorst, G. R., "CTGF 调节 cAMP-抑制的 NRK 成纤维细胞的细胞周期进展" J CELL PHYSIOL 182(1): 119-126 (2000)。

Leost, M.等, "帕罗酮类是糖原合酶激酶-3 β 和依赖细胞周期蛋白的激酶 5/p25 的强效抑制剂" EUR J BIOCHEM 267(19): 5983-5994 (2000)。

Park, S. K., Kim, J., Seomun, Y., Choi, J., Kim, D. H., Han, I. O., Lee, E. H., Chung, S. K., Joo, C. K., "过氧化氢是结缔组织生长因子的新型诱导物" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 284(4): 966-971 (2001)。

Schwab, J. M., Postler, E., Nguyen, T. D., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Schluesener, H. J., "在人脑梗死中结缔组织生长因子由反应性星形胶质细胞亚型表达" NEUROPATHOL. APPL. NEUROBIOL. 26(5): 434-440 (2000)。

Schwab, J. M., Beschorner, R., Nguyen, T. D., Meyermann, R., Schluesener, H. J., "在大鼠和人中结缔组织生长因子的差异细胞积累限定中枢神经系统损伤后的反应性星形胶质细胞亚型、侵入成纤维细胞和内皮细胞" J. NEUROTRAUMA 18(4): 377-388 (2001)。

Shepard 等, IOVS 42: 3173 (2001)。

Wang 等, Mol. Vis. 7: 89-94 (2001)。

Willson, T. M.等, "PPARs:从孤儿受体到药物发现" J MED CHEM 43(4): 527-550 (2000)。

Woodgett, J. R., "不仅仅通过其名称判断一种蛋白: GSK-3" SCI STKE 2001(100): RE12 (2001)。

Zaharevitz, D. W.等, "帕罗酮类——依赖细胞周期蛋白的激酶的一类新的小分子抑制剂——的发现和最初表征" CANCER RES 59(11): 2566-2569 (1999)。

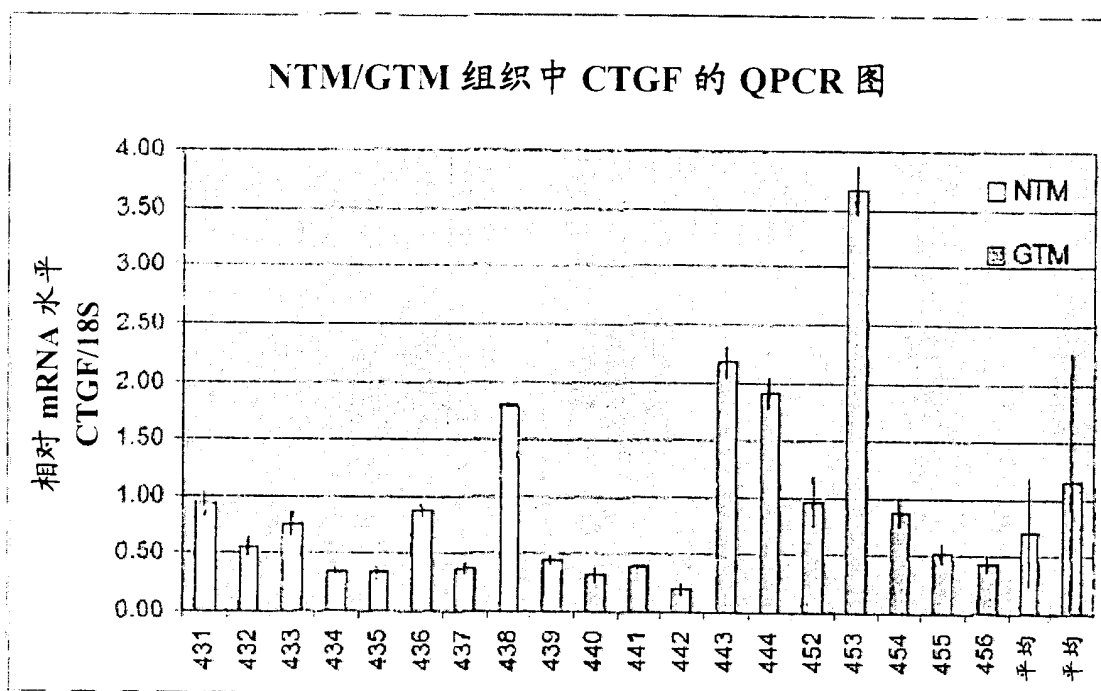


图 1

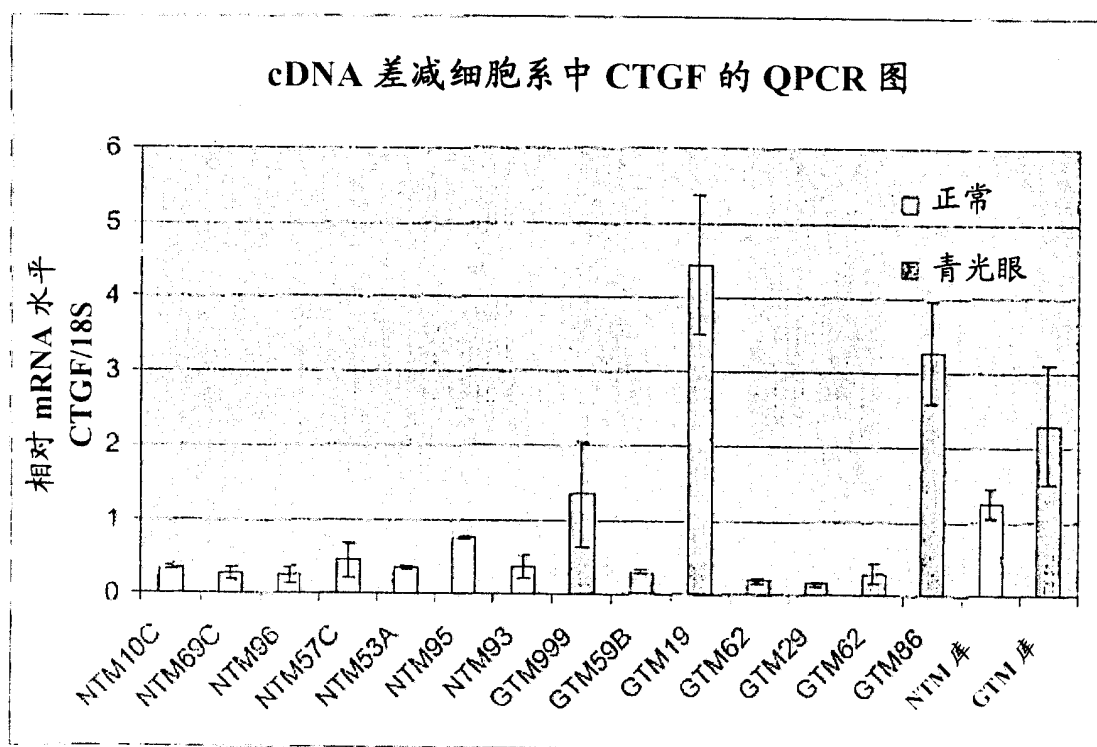


图 2

SB-216763 对 SGTm2697 细胞中基础和
TGF β 2 刺激的 CTGF 基因表达的影响

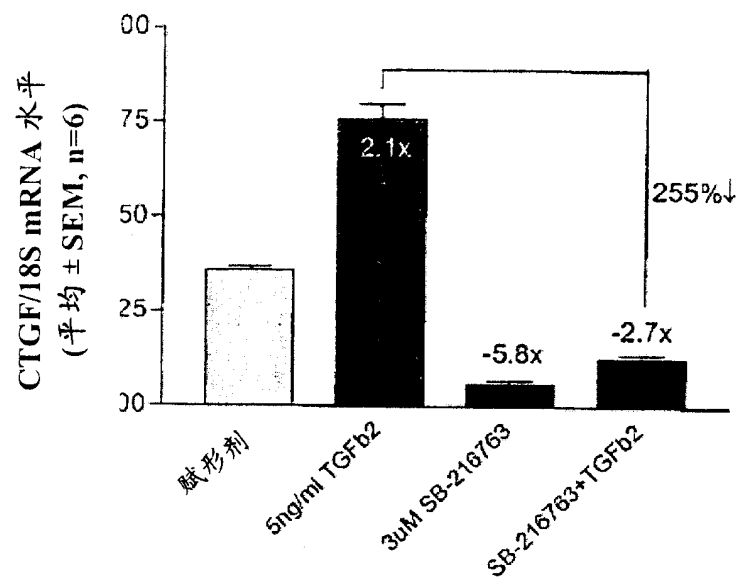


图 3

GW-8510 对 SGTM2697 细胞中基础和
TGF β 2 刺激的 CTGF 基因表达的影响

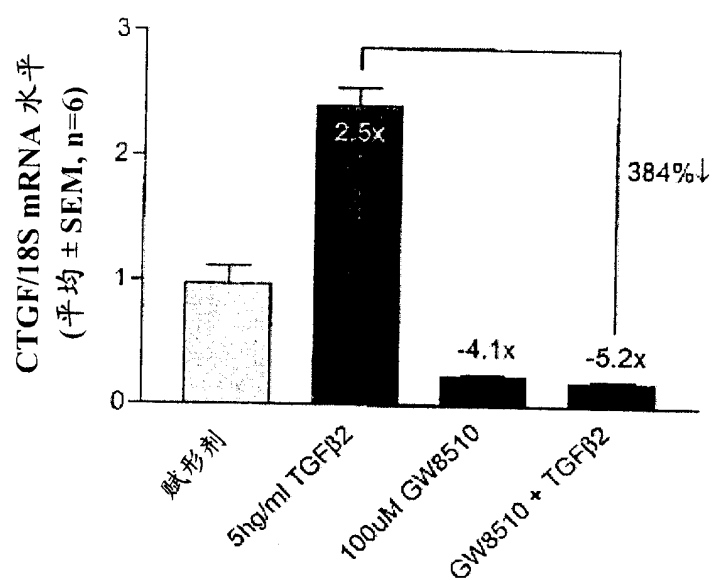


图 4