



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113616677 A

(43)申请公布日 2021.11.09

(21)申请号 202010326530.0

(22)申请日 2020.04.23

(71)申请人 浙江楚沅生物科技有限公司

地址 310019 浙江省杭州市江干区九环路
63号2幢C座4楼

(72)发明人 钱进 孙宁

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 韦东

(51)Int.Cl.

A61K 35/57(2015.01)

A61P 31/14(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

A61K 35/50(2015.01)

权利要求书1页 说明书17页 附图12页

(54)发明名称

抑制细胞因子风暴的方法及组合物

(57)摘要

本发明涉及来自非人动物,尤其是禽类和非人哺乳动物的羊水和/或其提取物用于抑制细胞因子风暴、预防和治疗细胞因子风暴综合征。

1. 羊水和/或其提取物在制备抑制细胞因子风暴的试剂或治疗或预防细胞因子风暴综合征的药物中的应用,

其中,所述羊水来自胚龄为5-12天的鸡蛋,优选胚龄为6-11天的鸡蛋,更优选胚龄为7-9天的鸡蛋,更优选胚龄为7-8天的鸡蛋,或者来自发育时期与所述胚龄的鸡蛋所处的发育时期相对应的鸡以外的其它禽类的蛋;或来自胎龄为8-14天的啮齿类动物的胚胎,或来自发育时期与胎龄为8-14天的啮齿类动物的发育时期相对应的啮齿类动物以外的其它非人哺乳动物的胚胎。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述细胞因子风暴或细胞因子风暴综合征的诱因包括传染性、急性损伤、器官移植、风湿性和肿瘤性诱因。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述细胞因子风暴或细胞因子风暴综合征由病毒感染引起,优先由流感病毒和/或冠状病毒感染引起,或由细胞免疫治疗引起。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述冠状病毒为COVID-19、SARS、MERS、H5N1流感病毒或H7N9流感病毒引起。

5. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述细胞因子风暴或细胞因子风暴综合征是移植物抗宿主病、多发性硬化症、胰腺炎或多器官功能障碍综合症等中出现的细胞因子风暴或细胞因子风暴综合征。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的应用,其特征在于,所述提取物所含活性成分在pH5.8-8.0之间不和离子交换柱结合,且所述提取物所含成分的分子量在150-2000道尔顿范围内。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述提取物所含活性成分在pH7.0-8.0之间不和离子交换柱结合,且其所含成分的分子量在150-2000道尔顿范围。

8. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述提取物所含活性成分在pH7.0-8.0之间不和离子交换柱结合,且所述提取物所含成分的分子量在150-1200道尔顿范围内。

9. 如权利要求1-5中任一项所述的应用,其特征在于,所述提取物所含活性成分的辛醇/水分配系数Log P在0.05-1.897范围内,优选在0.3-1.5之间;优选地,所述提取物采用反相色谱分离得到。

10. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述羊水来自6-11天的鸡蛋、胚龄为8-10天的鸭蛋或怀孕8-14天的小鼠,所述细胞因子风暴或细胞因子风暴综合征由COVID-19感染引起。

抑制细胞因子风暴的方法及组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及抑制细胞因子风暴的方法及组合物。

背景技术

[0002] 细胞因子风暴综合征 (CSS) 是一种严重的危及生命的疾病,其临床特点是全身性炎症、高铁蛋白血症、血流动力学不稳定和多器官功能衰竭 (MOF)。如果不加以治疗,可能导致死亡,是H7N9、H5N1、SARS等临床表现凶险的重要因素。已有研究证明其在移植物抗宿主病、多发性硬化症、胰腺炎或多器官功能障碍综合症等中出现。

[0003] CSS的标志是一种不受控制和功能失调的免疫反应,涉及淋巴细胞和巨噬细胞的持续激活和扩增,它们分泌大量的细胞因子如TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、MCP-1和IL-8,导致细胞因子风暴。

[0004] 各种传染性和非传染性疾病与CSS有因果关系。噬血细胞淋巴组织细胞增多症 (HLH) 是一种典型的以不受控制的细胞因子风暴为特征的炎症性疾病。根据其病因和发病机制,HLH可分为原发性 (pHLH) 或继发性 (sHLH)。与自身免疫性或自身炎症性疾病相关的sHLH称为巨噬细胞活化综合征 (MAS)。机体感染微生物后也会引起体液中多种细胞因子迅速大量产生,从而引起急性呼吸窘迫综合征和多脏器衰竭。

发明内容

[0005] 本发明提供羊水和/或其提取物在制备抑制细胞因子风暴的试剂或治疗或预防细胞因子风暴综合征的药物中的应用,其中,所述羊水来自胚龄为5-12天的鸡蛋,优选胚龄为6-11天的鸡蛋,更优选胚龄为7-9天的鸡蛋,更优选胚龄为7-8天的鸡蛋,或者来自发育时期与所述胚龄的鸡蛋所处的发育时期相对应的鸡以外的其它禽类的蛋;或来自胎龄为8-14天的啮齿类动物的胚胎,或来自发育时期与胎龄为8-14天的啮齿类动物的发育时期相对应的啮齿类动物以外的其它非人哺乳动物的胚胎。

[0006] 在一个或多个实施方案中,所述试剂或药物是包含本文所述羊水和/或其提取物和任选的药学上可接受辅料的药物组合物。

[0007] 在一个或多个实施方案中,所述提取物所含活性成分在pH5.8-8.0之间不和离子交换柱结合,且所述提取物所含成分的分子量在150-2000道尔顿范围内。

[0008] 在一个或多个实施方案中,所述提取物所含活性成分在pH7.0-8.0之间不和离子交换柱结合,且其所含成分的分子量在150-2000道尔顿范围,但不限于此范围。

[0009] 在一个或多个实施方案中,所述提取物所含活性成分在pH7.0-8.0之间不和离子交换柱结合,且所述提取物所含成分的分子量在150-1200道尔顿范围内。

[0010] 在一个或多个实施方案中,所述提取物所含活性成分的辛醇/水分配系数Log P在0.05-1.897范围内,优选在0.3-1.5之间;优选地,所述提取物采用反相色谱分离得到。

[0011] 在一个或多个实施方案中,所述细胞因子风暴或细胞因子风暴综合征由流感病毒和/或冠状病毒感染引起。

[0012] 在一个或多个实施方案中,所述冠状病毒为COVID-19。

[0013] 在一个或多个实施方案中,所述细胞因子风暴或细胞因子风暴综合征由SARS、MERS、H5N1流感病毒或H7N9流感病毒等引起。

附图说明

[0014] 图1:胚龄为7天的鸡蛋的羊水的HPLC检测结果。

[0015] 图2:胚龄为11天的鸡蛋的羊水的HPLC检测结果。

[0016] 图3:胚龄为13天的鸡蛋的羊水的HPLC检测结果。

[0017] 图4:鸡胚胎成纤维细胞在不同培养条件下的生长曲线。

[0018] 图5:来自鸡蛋的羊水对对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的生长活力和迁移能力的影响。其中,横坐标表示培养基,纵坐标表示OD450值。

[0019] 图6:来自鸭蛋的羊水对鸡胚胎成纤维细胞的生长活力和迁移能力的影响。其中,横坐标表示培养基,纵坐标表示OD450值。

[0020] 图7:来自小鼠的羊水对AC16细胞的生长活力的影响。

[0021] 图8:凝胶柱GE HiLoad 16/600Superdex75 pg分离色谱图。

[0022] 图9:细胞活力检测凝胶柱GE HiLoad 16/600Superdex75 pg分离馏分。横坐标表示培养基,其中,FBS表示胎牛血清;DMEM为Dulbecco's Modified Eagle Medium;EE表示羊水;“EE”表示冻干羊水;S-200B表示B峰的馏分;Q UNBOUND表示阴离子柱未结合馏分;3-1到3-6分别表示第三步纯化中等体积的馏分1-6。

[0023] 图10:新鲜鸡蛋羊水经UniSil 10-100C18分离的色谱图。

[0024] 图11:羊水提取物组分P6、P7、P8峰的HPLC图。

[0025] 图12:细胞活力检测发现图4中的P6、P7、P8峰具有生物活性。

[0026] 图13:P8峰进一步在日立HPLC系统上经C18 AQ分离,细胞活力检测发现较高纯度的P8-2具有细胞活性。

[0027] 图14:较高纯度的P8、L-多巴 (Log P=0.05) 和维生素B12 (Log P=1.897) 的HPLC图。

[0028] 图15:心肌梗塞小鼠的射血分数。通过心脏超声可以测算出小鼠的射血分数和左心室短轴缩短率。从图中可以看出羊水 (EE) 的治疗显著地提升了心肌梗塞小鼠的射血分数,心功能明显改善。

[0029] 图16:心肌梗塞小鼠的左心室短轴缩短率。通过心脏超声可以测算出小鼠的射血分数和左心室短轴缩短率。从图中可以看出羊水 (EE) 的治疗显著地提升了心梗小鼠的左心室短轴缩短率,心功能明显改善。

[0030] 图17:心肌梗塞小鼠心脏的免疫荧光染色 (PH3, cTnT, DAPI)。

[0031] 图18:心肌梗塞小鼠心脏的免疫荧光染色 (AuroraB, cTnT, DAPI)。从图中可以看到治疗组小鼠心脏的PH3阳性和AuroraB阳性细胞显著增加,说明EE治疗显著地引发了心梗小鼠的心脏细胞再生。

[0032] 图19:心肌梗塞小鼠心脏的马松三色染色。从图中可以看到心梗小鼠有严重的纤维化,左心室壁显著变薄。而羊水 (EE) 治疗后,左心室壁变薄不明显,纤维化显著减少。

[0033] 图20:心肌梗塞小鼠心脏纤维化面积在羊水 (EE) 治疗后比未治疗组 (NS) 明显减

小。

[0034] 图21:EE提高心梗猪的心功能,并减轻左心室重构。

[0035] 图22:EE降低IR猪的心脏梗死面积,并延长活动时间。

具体实施方式

[0036] 应理解,在本发明范围内,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成优选的技术方案。

[0037] 本发明人发现,非人动物羊水和/或其提取物所含生长因子群能抑制细胞因子风暴。因此,本文涉及使用羊水和/或其提取物来抑制细胞因子风暴,或治疗或预防细胞因子风暴综合征。

[0038] 本发明中,羊水可来自禽蛋和非人哺乳动物。禽蛋指禽类的蛋。优选的禽类为家禽,如鸡、鸭和鹅。优选的是,本发明使用胚龄在5-20天、优选6-15天的禽蛋。应理解,不同禽蛋,合适的胚龄未必相同。例如,当使用鸡蛋时,优选使用胚龄为5-12天的鸡蛋,更优选使用胚龄为6-11天的鸡蛋,更优选使用胚龄为7-9天的鸡蛋、更优选使用胚龄为7-8天的鸡蛋。当使用其它禽类的蛋时,可使用其发育时期与上述胚龄的鸡蛋所处的发育时期相对应的蛋。例如,当使用鸭蛋时,胚龄为8-10天、尤其是8-9天的鸭蛋可能是最好的。

[0039] 可采用常规的方法获得禽蛋羊水。例如,可敲击相应胚龄的蛋的钝端,使蛋壳碎裂,将蛋壳剥开形成一个直径约为2厘米的口子。然后用镊子小心撕开壳膜和卵黄膜,注意不要破坏羊膜。将包裹着胚胎的羊膜和相连组织从壳中倾倒至培养皿中,用注射器刺入羊膜抽取羊水,直至羊膜紧贴胚胎,由此即可获得用于本发明的羊水。

[0040] 本文中,羊水还可来自非人哺乳动物,尤其是啮齿类动物,如来自小鼠。其它非人哺乳动物可以是常见的家畜,例如牛、羊、狗、猫、猪等。在某些实施方案中,羊水来自胎龄为8-14天的啮齿类动物的胚胎,或来自其发育时期与胎龄为8-14天的啮齿类动物所处的发育时期相对应的非人哺乳动物的胚胎。可采用常规的方法获得羊水。例如,用手术剪剪开怀孕8-14天的小鼠腹腔,小心取出并剪开子宫,用注射器刺入羊膜抽取羊水,直至羊膜紧贴胚胎,由此即可获得用于本发明的羊水。

[0041] 应理解,必要时,可对羊水进行离心,以分离出可能含有的杂质,例如卵黄等,尽可能获得纯的羊水。离心后获得的上清液即为用于本发明的羊水。应理解的是,获取羊水的所有步骤都需在无菌条件下进行;另外,本文所示的“羊水”应指“纯”的羊水,即分离自禽蛋或非人哺乳动物胚胎的不含有禽蛋内或非人哺乳动物胚胎内其它成分、且也未被外源物质污染的羊水。纯的羊水可储存于-60℃以下的冰箱中,解冻后再使用。

[0042] 在某些实施方案中,本发明使用羊水的提取物。优选地,该提取物所含的活性成分在pH5.8-8.0之间不和离子交换柱结合,更优选在pH7.0-8.0之间不和离子交换柱子结合。优选地,所述提取物所含成分的分子量在150-2000道尔顿范围内,但不限于此范围;优选在150-1200的范围内。可从羊水中分离出分子量为150-2000道尔顿、优选150-1200道尔顿的中性馏分,由此获得所述提取物。可采用本领域周知的凝胶柱和离子交换柱来实施本文的方法。例如,可使用周知的凝胶层析柱(如下文所述的各种凝胶层析柱)从羊水中分离出分子量为150-2000道尔顿的馏分,然后使用离子交换方法(如使用下文所述的离子交换柱)从该馏分中分离出中性馏分。或者,也可先用离子交换方法(如使用下文所述的离子交换柱)

从羊水中分离出中性馏分,然后再使用凝胶层析柱(如下文所述的各种凝胶层析柱)分离出该中性馏分中分子量在150-2000道尔顿范围内的馏分。

[0043] 在某些实施方案中,可先从羊水中分离得到分子量在150-2000道尔顿的中性馏分,然后再从中分离得到分子量在150-1200道尔顿范围内的馏分。具体而言,该方法可包括以下步骤:

[0044] (1) 从羊水中分离得到分子量为150-2000道尔顿的中性馏分;和

[0045] (2) 从该分子量为150-2000道尔顿的中性馏分中分离得到分子量为150-1200道尔顿的中性馏分。

[0046] 步骤(1)可通过使用凝胶层析和离子交换方法来实现。通过凝胶层析柱分离出羊水中分子量在150-2000道尔顿的成分,而通过离子交换可获得不带电荷(中性)的馏分。

[0047] 本文中,可采用各种市售的凝胶层析柱来实施凝胶层析,这类凝胶层析柱包括但不限于GE公司的Sephacryl S-100、Sephacryl S-200、Sephacryl S-300、Sephacryl S-400、Superose 12、Superose 6、Superdex 12和Superdex 6等。应理解,也可使用分离范围为100-10000道尔顿的其它任意凝胶层析填料。通常,在使用凝胶层析柱时,可先用ddH₂O平衡凝胶层析柱,流速可根据实际情况确定。例如,在某些实施方案中,流速可以是0.5-50ml/min,如1ml/min。通常,紫外吸收在200-300nm之间,如280nm。待紫外吸收曲线平稳,回归基线后,结束平衡。平衡结束后,可上样。上样流速根据实际制备情况确定。上样结束后,可用脱气ddH₂O洗脱粗品,收集分子量在150-2000道尔顿之间的馏分。需要时,可重复凝胶层析的分离数次,混合每一次分离时相同出峰时间的馏分。

[0048] 本文中,可采用本领域周知的方法将带电荷的成分与不带电荷的成分分离。例如,可使用离子交换方法实现。阴离子交换和阳离子交换都可用于本发明方法中。在某些实施方案中,本文采用阴离子交换法。可使用市售的阴离子交换柱,包括但不限于GE公司的DEAE Sepharose、ANX Sepharose、Q Sepharose、Capto DEAE、Capto Q、Mono Q和Mini Q等。应理解,也可使用其它品牌的阴离子交换填料。或者,也可使用市售的阳离子交换柱,包括但不限于CM Sepharose、SP Sepharose、Capto S、Mono S和Mini S等。

[0049] 通常,在实施离子交换时,先用缓冲液平衡离子交换柱。缓冲液可以是本领域常规的缓冲液,例如可使用磷酸盐缓冲液,尤其是磷酸钠缓冲液。缓冲液的pH可根据所使用的离子交换柱确定。例如,使用阴离子交换柱时,可使用pH为7.5~8.5、优选7.5~8.0的缓冲液平衡阴离子交换柱;使用阳离子交换柱时,可使用pH为5.8~7.0、优选5.8~6.5的缓冲液平衡阳离子交换柱。在某些实施方案中,该磷酸钠缓冲液含有Na₂HPO₄和NaH₂PO₄,pH为约5.8或8.0。本发明优选使用阴离子交换柱进行分离。流速可根据实际情况确定。例如,在某些实施方案中,流速可以是0.5-50ml/min,如1ml/min。通常,待280nm紫外吸收曲线平稳,回归基线后,结束平衡。平衡结束后,可上样,收集流出部分(即未与柱结合的部分)。上样流速根据实际制备情况确定。

[0050] 步骤(1)中,可先进行凝胶层析,分离出分子量在150-2000道尔顿的馏分,然后再进行离子交换,分离出中性馏分;或者,也可以先进行离子交换,分离出羊水中的中性馏分,然后再通过凝胶层析将中性馏分中分子量在150-2000道尔顿范围内的活性成分分离出来,获得分子量在150-2000道尔顿之间的中性馏分。

[0051] 步骤(2)中的主要目的是进一步对步骤(1)获得的中性馏分进行分离,获得分子量

大小在150-1200道尔顿范围内的活性成分。本文中,可使用市售的凝胶层析柱来分离得到分子量在150-1200道尔顿范围内的馏分。合适的凝胶层析柱包括但不限于GE公司的HiLoad Superdex 16/600Superdex75 pg、Superdex Peptide、Superdex 200和Superdex 30等。应理解,也可以使用分离范围在500-10000道尔顿的其它品牌的凝胶层析填料。

[0052] 通常,可先用ddH₂O平衡凝胶柱,流速可根据实际情况确定。例如,在某些实施方案中,流速可以是0.5-50ml/min,如1ml/min。通常,待280nm紫外吸收曲线平稳,回归基线后,结束平衡。平衡结束后,可上样。上样流速根据实际制备情况确定。上样结束后,可用脱气ddH₂O洗脱粗品,收集馏分,获得所含成分的分子量在150-1200道尔顿范围的馏分,即为本文所述的提取物。在一个或多个实施方式中,本发明羊水和/或其提取物或由其为主要原料配制成的复合敷料称为DWS。

[0053] 采用上述方法获得的提取物,将其配制成pH为5.8-8.0的溶液后过多种离子交换柱(包括DEAE Sepharose、Q Sepharose、Mono Q、CM Sepharose、SP Sepharose和Mono S),其所含活性成分均不与这些离子交换柱结合。

[0054] 类似的分离方法可参见CN 201810909193.0,本文将其全部内容以引用的方式纳入本文。

[0055] 在一些实施方案中,本发明提取物所含活性成分的辛醇/水分配系数Log P在0.05-1.897范围内,优选在0.3-1.5之间;优选地,所述提取物采用反相色谱分离得到。

[0056] 反相色谱柱的固定相通常以硅胶为载体,表面键合有非极性分子层。通常,键合的非极性基团可选自C18烷基、C8烷基、苯基和C4烷基等及其衍生物。本发明优选使用C18反相色谱柱,即键合有C18烷基的反相色谱柱。可使用本领域周知的反相色谱柱来实施本发明,如可从市售途径获得这类反相色谱柱,包括UniSil 10-100C18、LaChrom-C18、Inertsil ODS、Zorbax ODS、ACE C18、SunFire C18、Symmetry C18、Hypersil GOLD C18、Luna C18、Hypersil BDS C18、Hypersil ODS C18、SynchronisaQ C18和Synchronis C18等。反相色谱的流动相为一定比例的水和可以与水混溶的有机溶剂。有机溶剂可选自甲醇、乙腈、乙醇、四氢呋喃、异丙醇、二氧六环、丙酮等,优选使用甲醇和乙腈。使用的有机溶剂为色谱级有机溶剂,水为100%超纯水。

[0057] 在实施反相色谱前,可用流动相平衡反相色谱柱。待吸收曲线平稳、回归基线后,可停止平衡。可采用常规的方式上样,样品的流速可根据实际生产情况,如所使用的柱的材料、规格以及流动相等确定。上样结束后,可进行梯度洗脱。流动相中有机溶剂的浓度可根据有机溶剂种类的不同而稍有差异,这可由本领域技术人员容易确定。在某些实施方案中,本发明的流动相中有机溶剂的百分比梯度变化可以从5%到12%(体积百分比),水的梯度变化可以从95%到88%(体积百分比)。流动相的流速也可根据实际生产情况确定。选择洗脱体积在51-731毫升之间的馏分,优选洗脱体积在250-504毫升之间的馏分,更优选洗脱体积在278-353毫升之间和/或在354-429毫升之间和/或在430-504毫升之间的馏分,或以其它相似色谱柱以同比例所获相似馏分,即为本文所述的提取物。洗脱体积如下确定:

[0058] 反相分离柱:C18反相分离柱;

[0059] 流动相:乙腈和超纯水;

[0060] 洗脱方式:梯度洗脱,0-10CV,乙腈(A)从5%到12%,ddH₂O(B)从95%到88%;

[0061] 流动相流速:10ml/min;

[0062] 柱温:25.0℃;

[0063] 上样流速:1ml/min;

[0064] 上样量:50ml。

[0065] 当采用其它色谱柱时,洗脱体积的选择可参照上述方法进行;换言之,当采用其它色谱柱时,所选择的洗脱体积应与采用上述方法确定的洗脱体积相对应。

[0066] 在某些实施方案中,可实施两次反相色谱分离。首次反相色谱分离的分辨率可低于第二次反相色谱分离的分辨率。首次反相色谱分离进行梯度洗脱时,极性有机溶剂的百分比梯度变化可从5%-12% (体积百分比),水的百分比梯度变化可从95%-88% (体积百分比)。如上所述,实施首次反相色谱分离时,取洗脱体积在51-731毫升之间的馏分,优选洗脱体积在250-504毫升之间的馏分,更优选洗脱体积在278-353毫升之间和/或在354-429毫升之间和/或在430-504毫升之间的馏分,或以其它相似色谱柱以同比例所获相似馏分,进行第二次反相色谱分离。由于上样样品体积不同和/或反相分离柱柱体积不同,洗脱体积会相应不同。

[0067] 第二次反相色谱分离进行梯度洗脱时,有机溶剂的梯度变化可以是从0%到7% (体积百分比),水的梯度变化可以从100%到93% (体积百分比)。在某些实施方案中,第二次反相色谱分离进行梯度洗脱时,前0-3分钟,有机溶剂从0%梯度变化到5.5%,超纯水从100%梯度变化到94.5%;第3-50分钟,有机溶剂从5.5%梯度变化到7%,超纯水从94.5%梯度变化到93%。优选地,第二次反相色谱分离时,取洗脱时间在11-12.5分钟之间的洗脱液和13-14分钟之间的洗脱液。洗脱时间如下确定:

[0068] 反相分离柱:C18反相分离柱;

[0069] 流动相:乙腈和超纯水;

[0070] 洗脱方式:梯度洗脱,0-3分钟,乙腈从0%梯度变化到5.5%,超纯水从100%梯度变化到94.5%;3-50分钟,乙腈从5.5%梯度变化到7%,超纯水从94.5%梯度变化到93%;50-52分钟,乙腈从7%梯度变化到100%,超纯水从93%梯度变化到0%;

[0071] 流动相流速:0.8ml/min;

[0072] 柱温:25.0℃;

[0073] 上样量:20微升。

[0074] 应理解,两次反相色谱分离时,当使用不同的色谱分离柱时,可根据不同分离柱的组成、性能和规格选用不同的流动相、梯度变化及流速,以获得最佳的洗脱效果。此外,当采用不同的反相柱、流动相和洗脱方式时,洗脱液的选取会有所不同,可参照本文所述的确定洗脱液的方法选择合适的洗脱液,作为本发明的提取物。

[0075] 在某些实施方案中,进行首次反相色谱分离时,收集馏分,然后采用本领域常规的技术测试各馏分促进细胞(如人心肌细胞系AC16)增殖的活性。之后用对具有促进细胞增殖活性的馏分做出进一步的反相色谱分离。第二次反相色谱分离后,可测试收集到的馏分的细胞增殖活性,以获得具有细胞增殖活性的馏分。该馏分可以是一种不同成分的混合物。

[0076] 关于反相色谱分离羊水获得提取物以及该提取物的生物学活性可参见CN 201910887556.X,本文将其全部内容以引用的方式纳入本文。

[0077] 应理解,结合CN 201810911038.2、CN 201810909485.4、CN 201810909193.0以及CN 201910887556.X可知,本发明所述的各种来源的羊水及其提取物具有相同或类似的生

物学活性,用于本发明时,均可抑制细胞因子风暴,从而治疗或预防细胞因子风暴综合征。

[0078] 本文所述的羊水和/或其提取物可作为药物的活性成分,用于体内给予需要的对象。例如,可给予需要的对象有效量的本文所述的羊水和/或其提取物,或含有所述羊水和/或其提取物的药物组合物。

[0079] 本文中,动物可以是哺乳动物,尤其是人。

[0080] 本发明所述的细胞因子风暴是指机体(人体或动物体)体液中多种细胞因子如TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、MCP-1和IL-8等迅速大量产生的现象。细胞因子风暴的诱因包括传染性、急性损伤、器官移植、风湿性和肿瘤性诱因。在一些实施方案中,细胞因子风暴因微生物感染引起。在一些实施方案中,本发明所述的细胞因子风暴由病毒感染引起。病毒感染包括但不限于冠状病毒、流感病毒等。更具体而言,在一些实施方案中,本发明所述的细胞因子风暴由COVID-19、SARS、MERS、H5N1流感病毒或H7N9流感病毒引起。在一些实施方案中,采用细胞免疫疗法如使用CAR-T细胞进行治疗也会产生细胞因子风暴。此外,已有研究证明细胞因子风暴在移植物抗宿主病、多发性硬化症、胰腺炎或多器官功能障碍综合症等中出现。

[0081] 本发明所述的细胞因子风暴综合征是对象体内不受控制和功能失调的免疫反应,其淋巴细胞和巨噬细胞的持续激活和扩增,分泌大量的细胞因子如TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、MCP-1和IL-8,导致全身性炎症、高铁蛋白血症、血流动力学不稳定和多器官功能衰竭(MOF)。细胞因子风暴综合征的诱因包括传染性、急性损伤、器官移植、风湿性和肿瘤性诱因。在一些实施方案中,细胞因子风暴综合征因微生物感染引起。在一些实施方案中,本发明所述的细胞因子风暴综合征由病毒感染引起,尤其是由流感病毒和/或冠状病毒感染引起。更具体而言,在一些实施方案中,本发明所述的细胞因子风暴综合征由COVID-19、SARS、MERS、H5N1流感病毒或H7N9流感病毒引起。在一些实施方案中,采用细胞免疫疗法如使用CAR-T细胞进行治疗也会产生细胞因子风暴综合征。如本领域所周知,细胞因子风暴综合征包括HLH(噬血细胞淋巴组织细胞增多症)和MAS(巨噬细胞激活综合征)。在一些实施方案中,细胞因子风暴综合征是指移植物抗宿主病、多发性硬化症、胰腺炎或多器官功能障碍综合症中出现的细胞因子风暴综合征。

[0082] 本发明特别优选的实施方案中,使用羊水,尤其是本文所述的禽蛋羊水,更优选是鸡蛋羊水抑制细胞因子风暴、或治疗或预防细胞因子风暴综合征。

[0083] 因此,本发明提供一种抑制细胞因子风暴、或治疗或预防细胞因子风暴综合征的方法,所述方法包括给予需要的对象有效量的本发明所述羊水和/或其提取物、或含有所述羊水和/或其提取物的药物组合物的步骤。还提供的是羊水和/或其提取物在制备抑制细胞因子风暴的试剂或治疗或预防细胞因子风暴综合征的药物中的应用,以及用于抑制细胞因子风暴的试剂或治疗或预防细胞因子风暴综合征的本文所述的羊水和/或其提取物或其药物组合物。本文中,有效量是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解疾病或病症的剂量。可根据患者年龄、性别、所患病症及其严重程度、患者的其它身体状况等因素确定治疗有效量。本文中,受试者或患者通常指哺乳动物,尤其指人。本文中,治疗和预防具有本领域周知含义,“抑制”细胞因子风暴指阻止细胞因子风暴的发生或降低其严重程度。

[0084] 可直接使用本文所述的羊水和/或其提取物或用于本文所述的方法和用途,给予需要的对象。给药方式可以是肠胃外给药,例如静脉注射给药。在某些实施方案中,可将治

疗有效量的羊水和/或其提取物与适量的注射用生理盐水、注射用水或葡萄糖注射液混匀,然后通过例如静脉内输注给药。

[0085] 含有本文所述羊水和/或其提取物的药物组合物通常还含有药学上可接受的辅料。本文中,“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体、稀释剂和/或赋形剂,包括但不限于:抗生素,保湿剂,pH调节剂,表面活性剂,碳水化合物,佐剂,抗氧化剂,螯合剂,离子强度增强剂、防腐剂、载剂、助流剂、甜味剂、染料/着色剂、增味剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。在一些实施方案中,药学上可接受的辅料可以包括一种或多种非活性成分,包括但不限于:稳定剂、防腐剂、添加剂、佐剂,或其它适宜的与药效化合物合用的非活性成分。给药的剂量和频次可根据具体的病情,患者的年龄和性别等情况由医护人员确定。通常,对于特定疾病的治疗,治疗有效量是指足以改善或以某些方式减轻与疾病有关的症状的药量。这样的药量可作为单一剂量施用,或者可依据有效的治疗方案给药。给药量也许可治愈疾病,但是给药通常是为了改善疾病的症状。一般需要反复给药来实现所需的症状改善。例如,对于给予人的剂量,通常可在1-200ml/次,可每天或每周注射给予。在某些实施方案中,给药频次可以是每天多次、每天二次、每二天、每三天、每四天、每五天或每六天给药一次,或每半个月给药一次,或者每月给药一次。

[0086] 本文还提供一种药物组合物,该药物组合物含有本文所述的羊水和/或其提取物,尤其是家禽的蛋中的羊水和/或其提取物,更优选为胚龄为5-12天、更优选为6-11天、更优选6-9天、更优选7-8天的鸡蛋的羊水和/或其提取物。药物组合物可以是-60℃以下冷冻保存羊水和/或其提取物或其冻干试剂,例如冻干羊水和/或其提取物。药物组合物中还可含有其它药学上可接受的载体或赋形剂,例如注射用生理盐水、注射用水或葡萄糖注射液等。优选地,药物组合物含有5-40% (v/v) 或10%-35%的羊水和/或其提取物,优选15-30%。

[0087] 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。应理解,这些实施例仅仅是阐述性的,并不意图限制本发明的范围。实施例中所用到的方法、试剂和仪器,除非另有说明,否则为本领域常规的方法、试剂和仪器。

[0088] 实施例

[0089] 实施例1:材料和方法

[0090] 1、材料

[0091] a) 仪器和工具

[0092] 微电脑全自动孵化器(正大™ ZF880),洁净培养皿,1.0ml注射器(江西洪达™),经70%酒精消毒的镊子,不锈钢筛子,无菌离心管(Axygen®#SCT-50ML-25-S)和低速冷冻离心机(中佳KDC-2046)。

[0093] b) 试剂和生物材料

[0094] 胚龄7天的鸡蛋。

[0095] 2、实验流程

[0096] 取鸡蛋,敲击朝上放置的、较为扁平的钝端,使蛋壳碎裂,将蛋壳剥开形成一个直径约为2厘米的口子,边缘应尽量平整。用镊子小心撕开壳膜和卵黄膜,注意不要破坏羊膜。观察胚胎发育状况,只有发育良好且符合对应阶段标准的胚胎可用于抽提羊水。

[0097] 将包裹着胚胎的羊膜和相连组织从壳中倾倒入培养皿中,用注射器刺入羊膜抽取

羊水,针口斜面应背对胚胎,直至羊膜紧贴胚胎,然后将澄清、无色、无异物的羊水注入冰盒内的离心管中。

[0098] 用镊子取出羊膜中的胚胎,收集于放置在冰上的不锈钢筛子中,每隔一小时将收集的胚胎用搅拌机匀质化,封装在无菌的塑料储物罐中,倾斜放置于-80℃冰箱中。冷冻后可竖直放置。

[0099] 通过美谱达™1800紫外分光光度仪测试收集的羊水抽提液,光度仪标准操作流程参见使用手册。

[0100] 将收集羊水抽提液的离心管配平后用中佳™ KDC-2046低速冷冻离心机于5℃,3500rpm离心20分钟(离心机标准操作流程参见使用手册)。将上清液倾析转移至洁净的塑料储物罐中,储存于-80℃冰箱中。每批次预留5ml小样用于后续测试。

[0101] 所有步骤都在无菌条件下进行。

[0102] 实施例2:成分检测

[0103] 本实施例使用日立Primaide型高效液相色谱仪检测不同胚龄的鸡蛋的羊水成分。按该色谱仪的使用说明书进行检测。其中,检测开始前先用100%乙腈洗涤30分钟,流速时间为0.8ml/min,之后用水平衡30分钟,流速0.8ml/min时间。抽取25μl样品并排除气泡,点击色谱仪自带的软件的“数据采集”按钮,选择“方法2”,点击屏幕下方“单分析开始”,待系统出现“等待进样”时,开始注射样品,注射要迅速,注射完后切换阀门。该方法2如下:

[0104]

时间 (min)	水 (%)	乙腈 (%)	流量 (ml/min)
0.0	100.0	0.0	0.8
11.0	100.0	0.0	0.8
17.0	95.0	5.0	0.8
30.0	90.0	10.0	0.8
45.0	55.0	45.0	0.8
60.0	0.0	100.0	0.8
70.0	0.0	100.0	0.8

[0105] 本实施例检测了胚龄为7天、11天和13天的羊水,结果如图1-3所示。

[0106] 实施例4:对鸡胚胎成纤维细胞的影响

[0107] 本实施例测试实施例1的鸡蛋羊水(EE)对鸡胚胎成纤维细胞在不同培养条件下的生长的影响。本实施例使用的DMEM培养基的组成如下:Gibco® #Cat.11960077,加入1%L-谷氨酰胺(Solarbio® #G0200)和5%FBS(Gibco® #Cat.10099141),0.25%胰酶-EDTA(杭州科易生物™ #CY003),PBS(BI™ #02-024-1ACS),0.4%台盼蓝染剂(BBI™ #72-57-1)。

[0108] 取胚龄7天的鸡蛋的胚胎,用PBS冲洗胚胎表面,将液体用移液枪吸干净。取出胚胎内脏,将其余组织剪碎至无肉眼可见的大颗粒、团块。加1ml的0.25%胰酶-EDTA,用枪头使之与组织混匀,将悬液吸取至15ml离心管。用1ml的0.25%胰酶-EDTA冲洗培养皿,将悬液吸取至同一支15ml离心管。将离心管放入37℃水浴,消化5-7分钟后,加入8ml的DMEM培养基(含PBS)中和胰酶-EDTA。将离心管放入离心机,离心5-10秒。取出离心管,收集上清液。2000rpm离心该离心上清液2min。弃上清,加入4ml的DMEM培养基,用枪头使细胞重悬。分别取1ml细胞悬液注入10cm细胞培养皿,再加入10ml的DMEM培养基。十字方向晃动培养皿,每个方向至少20次,使细胞分布均匀。于37℃、5%CO₂条件下培养。当细胞覆盖70%-90%的培

养皿底部时,将细胞传代。

[0109] 将培养皿从培养箱取出,收集原有的培养基于离心管中。小心加入5ml的PBS清洗细胞。之后,加入500 μ l 0.25%胰酶-EDTA,将培养皿放入培养箱,消化1分钟。轻轻拍打培养皿侧边加快消化过程,待细胞团块快速分解,大部分细胞呈漂浮状态,迅速加入9.5ml回收的原有培养基中和胰酶-EDTA。用移液管吹打培养皿底部,将尽量多的细胞悬液收集至15ml离心管中,于2000rpm离心3min。弃上清,加入4ml的DMEM培养基,用枪头使细胞重悬。分别将1ml细胞悬液注入含有10ml含不同体积比的羊水的新鲜培养基的10cm细胞培养皿中。十字方向晃动培养皿,每个方向至少20次,使细胞分布均匀,于37℃、5%CO₂条件下培养。

[0110] 取生长良好的鸡胚胎成纤维细胞,收集原有的培养基于离心管中。小心加入5ml的PBS清洗细胞,注意不可造成细胞层破损,轻轻晃动后倒除PBS。加入100 μ l的0.25%胰酶-EDTA消化2-5分钟(24孔板),用100 μ l培养基中和。用枪头使之成为单细胞悬液。按照一定倍数稀释该单细胞悬液,加入等量0.4%台盼蓝染液染色,稀释倍数以稀释后细胞数在20-200之间为宜。吸取适量(15 μ l)细胞悬液,从盖玻片上下边缘加样到血球计数板上,显微镜下计活细胞数。计算活细胞总数,调整细胞浓度至 1×10^5 个细胞/ml。每24小时取样一次,每次取3个孔细胞,进行常规胰酶-EDTA消化、制备单细胞悬液、显微镜计数。以时间(天)为横轴,细胞浓度为纵轴绘制生长曲线。细胞个数=细胞总计数/ $4 \times 10^4 \times$ 稀释倍数,细胞浓度=该细胞个数/ml。

[0111] 结果如图4所示。图4显示,在共培育96小时以后,添加EE的实验组中鸡胚胎成纤维细胞的数量明显高于与未添加EE的对照的细胞数量。

[0112] 实施例5:细胞在羊水提取物中的活力和迁移能力

[0113] 采用与实施例1相同的方法获得胚龄为8天的鸭蛋的羊水。采用划痕实验测试鸡蛋羊水对鸡胚胎成纤维细胞和鸭蛋羊水对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的生长活力和迁移能力的影响。鸭蛋羊水获自胚龄8天的鸭蛋,采用实施例一的方法获得。鸡胚胎成纤维细胞采用实施例4所述的方法获得,人脐静脉内皮细胞从市售途径获得。

[0114] 本实施例使用的DMEM培养基的组成如下: Gibco® #Cat.11960077,加入1%L-谷氨酰胺(Solarbio® #G0200)和5%FBS(Gibco® #Cat.10099141),0.25%胰酶-EDTA(杭州科易生物™ #CY003),PBS(BI™ #02-024-1ACS),0.4%台盼蓝染剂(BBI™ #72-57-1)。

[0115] 实验前第一天,准备6孔板,用马克笔在6孔板背后用直尺画出5-6条分布均匀的横线,横穿过孔;再在中线位置画一条垂直的竖线以指示划痕的位置。在每个孔中加入约 5×10^5 个处于对数生长期的细胞,原则上接种过夜后融合率达到90%。

[0116] 实验当天,用枪头比着直尺,沿马克笔竖线,垂直于6孔板底面划线。尽量不要倾斜、弯曲,不同孔之间最好用同一支枪头,宽度在1000-2000 μ m为宜。每个孔用2ml PBS清洗3次,洗去划痕处的细胞。各个孔中分别加入2ml含不同含量的EE的培养基,常规培养,每48小时换液。从划痕计时为0h,每24小时定点拍照,测量划痕两侧细胞间距。观察每个孔中细胞生长状况;以时间(天)为横轴,每个孔中划痕距离为纵轴绘制图表;计算每个孔中划痕愈合的速度。

[0117] 结果如图5和6所示。图5显示来自鸡蛋的羊水对对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的生长活力和迁移能力的影响,添加5%(体积比)的羊水明显对HUVEC的愈合具有非常明显的促进作用。图6显示来自鸭蛋的羊水对鸡胚胎成纤维细胞的生长活力和迁移能力的影响,羊水

的添加对鸡胚胎成纤维细胞的愈合也显示出非常明显的促进作用。

[0118] 实施例6

[0119] 参照实施例1所述的方法获得小鼠13-14天胎龄的羊水,将收集羊水抽提液的离心管配平后用中佳™KDC-2046低速冷冻离心机于5℃,3500rpm离心21分钟(离心机标准操作流程参见使用手册)。将上清液倾析转移至洁净的塑料储物罐中,储存于-80℃冰箱中。每批次预留5ml小样用于后续测试。所有步骤都在无菌条件下进行。

[0120] 测细胞活性:将长势较好的AC16消化后,铺于96孔板中,8000个/孔,每一组五个复孔。在5%CO₂饱和湿度37℃培养箱培养2小时,细胞贴壁。用培养基DMEM饥饿培养24小时后,替换成10%FBS的DMEM、DMEM和分别添加2.5%、5%、10%和20%(体积比)小鼠EE的DMEM培养基。培养24小时后,每孔加入10μl CCK-8试剂。孵育2小时后,于酶标仪在450nm检测吸收值。

[0121] 结果如图7所示。

[0122] 实施例7:纯化羊水水中的活性化合物

[0123] 本实施例的目的在于通过分析柱凝胶柱Sephacryl S-200、阴离子交换柱HiPrep Q、脱盐柱HiPrep 26/10Desalting、HiLoad 16/600Superdex75 pg逐步纯化鸡胚羊水中具有生物活性的化合物。

[0124] 1、材料

[0125] 1.1纯化样品:新鲜的胚龄为7天的鸡蛋羊水,50ml。

[0126] 1.2主要实验设备及耗材

[0127] 1) GE AKTA purifier;

[0128] 2) 凝胶柱GE Sephacryl S-200;

[0129] 3) 阴离子交换柱GEHiPrep Q;

[0130] 4) 脱盐柱GEHiPrep 26/10Desalting;

[0131] 5) 凝胶柱GEHiLoad 16/600Superdex75pg;

[0132] 6) Superloop 10ml。

[0133] 2、方法

[0134] 2.1溶液制备

[0135] 磷酸钠缓冲液A (50mM Na₂HPO₄+NaH₂PO₄, pH 8.0) 的制备:46.6ml 1M Na₂HPO₄与3.4ml 1M NaH₂PO₄混合,加ddH₂O定容至1L。

[0136] 2.2实验方法

[0137] 2.2.2样本处理:新鲜羊水50ml,加入适量己烷,2500rpm、4℃离心20min,获得水相,0.22μm滤膜过滤。

[0138] 2.2.3样品纯化

[0139] 第一步:凝胶柱GE Sephacryl S-200

[0140] ddH₂O平衡凝胶柱:流速2ml/min,直到280nm紫外吸收曲线平稳,回归基线;

[0141] 上样:流速1ml/min,上样量10ml;

[0142] 洗脱:用脱气ddH₂O洗脱粗品,流速2ml/min,等体积收集馏分,3ml/管。2柱体积(240ml)洗脱;

[0143] 重复分离纯化5次,每一次中相同出峰时间的部分充分混合;

[0144] 第二步:阴离子交换柱GE HiPrep Q

[0145] 磷酸钠缓冲液A (50mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8.0) 平衡阴离子交换柱:流速2ml/min,直到280nm紫外吸收曲线平稳,回归基线;

[0146] 上样:取第一步纯化后具有生物活性的部分,用泵上样流速1.5ml/min,上样量250ml,同时等体积收集阴离子柱未结合部分,2ml/管;

[0147] 脱盐:将离子柱中结合和不结合的馏分分别用GE HiPrep 26/10Desalting置换到脱气ddH₂O中,收集脱盐后的部分;

[0148] 第三步:凝胶柱GE HiLoad 16/600Superdex75pg

[0149] ddH₂O平衡凝胶柱:流速1ml/min,直到280nm紫外吸收曲线平稳,回归基线;

[0150] 上样:流速1ml/min,上样量10ml;

[0151] 洗脱:用脱气ddH₂O洗脱样品,流速1ml/min,等体积收集馏分,2ml/管。洗脱1.5柱体积(240ml);

[0152] 测细胞活性:将长势较好的AC16消化后,铺于96孔板中,8000个/孔,每一组五个复孔。在5%CO₂饱和湿度37℃培养箱培养2小时,细胞贴壁。用培养基DMEM饥饿培养24小时后,替换成10%FBS的DMEM、DMEM和含20%馏分的培养基。培养24小时后,每孔加入10μl CCK-8试剂。孵育2小时后,于酶标仪在450nm检测吸收值。

[0153] 3、实验结果

[0154] 经凝胶柱GE HiLoad 16/600Superdex75 pg分离的未结合部分的色谱图如图8所示。细胞活力检测跟踪到具有生物活性的生长因子群,结果如图9所示。

[0155] 实施例8

[0156] 1、实验材料

[0157] (1) 纯化样品:新鲜的胚龄为7天的鸡蛋羊水,400ml。

[0158] (2) 主要实验设备及耗材

[0159] GE AKTA purifier;相分离柱为UniSil 10-100C18;

[0160] 日立HPLC系统;使用LaChrom-C18 AQ分离柱;

[0161] 洗脱溶剂为经脱气的色谱级乙腈和ddH₂O。

[0162] 2、实验方法

[0163] (1) 样本处理:新鲜鸡蛋羊水400ml,加入适量己烷,2500rpm、4℃离心20分钟,获得水相,0.22μm滤膜过滤。

[0164] (2) 样品纯化

[0165] 第一步:以乙腈(A)和ddH₂O(B)作为流动相,UniSil 10-100C18反相分离柱分离;

[0166] 平衡反相柱:以流动相5%乙腈(A)平衡反相柱,流速10ml/min,直到280nm紫外吸收曲线平稳,回归基线;

[0167] 上样流速:1ml/min,上样量50毫升;

[0168] 梯度洗脱:0-10CV,乙腈(A)从5%到12%,ddH₂O(B)从95%到88%。流速10毫升/分钟,等体积收集馏分,3毫升/管;

[0169] 重复分离纯化20次,合并每一次实验中相同出峰时间的馏分;

[0170] 冷冻干燥每一部分样品。

[0171] 测细胞活性:将AC16消化后,铺于96孔板中,8000个/孔,每一组五个复孔。在5%

CO₂饱和湿度37℃培养箱培养2小时,细胞贴壁。用培养基DMEM饥饿培养24小时后,替换成含10%FBS的DMEM、DMEM和20% (体积比) 不同馏分的培养基。培养24小时后,每孔加入10μl CCK-8试剂。孵育2小时后,于酶标仪在450nm检测吸收值。细胞活力(Cell viability) % = (实验组吸收值-空白孔吸收值) / (对照组吸收值-空白孔吸收值) × 100%。

[0172] 第二步:日立C18反相分离柱分离

[0173] 经AKTA分离得到的初级活性馏分第8峰,用HPLC(日立)进一步分离纯化。流动相为乙腈和超纯水。采用梯度方式洗脱,具体参数如下:0-3分钟,乙腈从0%梯度变化到5.5%,超纯水从100%梯度变化到94.5%;3-50分钟,乙腈从5.5%梯度变化到7%,超纯水从94.5%梯度变化到93%;50-52分钟,乙腈从7%梯度变化到100%,超纯水从93%梯度变化到0%。流动相流速为0.8mL/min,柱温为25.0℃,进样量为20μl。DAD检测器的检测波长为250nm,检测时间为0-20分钟。

[0174] 冷冻干燥每一部分样品;

[0175] 测细胞活性:将AC16消化后,铺于96孔板中,8000个/孔,每一组五个复孔。在5% CO₂饱和湿度37℃培养箱培养2小时,细胞贴壁。用培养基DMEM饥饿培养24小时后,替换成含10%FBS的DMEM、DMEM和含20% (体积比) 不同馏分的培养基。培养24小时后,每孔加入10μl CCK-8试剂。孵育2小时后,于酶标仪在450nm检测吸收值。细胞活力(Cell viability) % = (实验组吸收值-空白孔吸收值) / (对照组吸收值-空白孔吸收值) × 100%。

[0176] 3、实验结果

[0177] 1、新鲜羊水经UniSil 10-100C18分离的色谱图如图10所示。细胞活力检测结果如图12所示。结果显示,图10中的P6、P7、P8峰在AC16细胞中具有主要生物活性。

[0178] 2、P6、P7、P8峰HPLC结果如图11所示。和原始粗品羊水相比,结果表明UniSil 10-100C18分离具有较高的分辨率,非常适合作为制备分离的第一步。如图13所示,细胞活力检测发现P8峰中含有的P8-2在AC16细胞中具有生物活性。以上结果说明较高纯度的P8-2是P8峰中以及羊水中能促进细胞增殖及的重要化合物之一。

[0179] 3、为了确定P8峰的疏水系数,用水分别配制P8峰、L-多巴和VB12标准化合物溶液,以安捷伦SB-Aq柱洗脱,具体洗脱条件如下:

[0180] 色谱柱:安捷伦SB-Aq,4.6x 250mm,5micron;

[0181] 仪器:日立Primaide型高效液相色谱仪;

[0182] 参数:检测波长250nm,柱温25℃;

[0183] 流动相:乙腈,水;

[0184] 样品处理:各样品用水溶解;

[0185] 洗脱:

[0186]

时间(分钟)	乙腈(%)	水(%)
0	0	100
11	0	100
17	5	95
30	10	90
45	45	55
50	100	0

[0187] 结果如图14所示。图14显示,P8的疏水性介于L-多巴与VB12之间。由于L-多巴的辛醇/水分配系数Log P为0.05,VB12的辛醇/水分配系数Log P为1.897,因此,P8的辛醇/水分配系数Log P在0.05-1.897之间,更优选在0.1-1.897之间,更优选在0.5-1.897之间或在0.5-1.5之间。

[0188] 实施例9

[0189] 1、材料

[0190] 常用普通试剂如氢氧化钠、氯化钠、氯化钾、水合磷酸氢钠、磷酸二氢钾、碳酸氢钠、碳酸钠、氯化镁、丙酮、浓硫酸、浓盐酸、二甲苯、无水乙醇、石蜡和蔗糖等购自国药集团化学试剂有限公司;十二烷基硫酸钠和乙二胺四酸等购自美国Sigma公司;Triton X-100和肝素购自北京鼎国公司;Tween-20购自美国Thermo Fisher公司;水合氯醛购自北京索莱宝科技有限公司;多聚甲醛和Masson Masson三色染试剂盒购自谷歌生物科技有限公司;OCT包埋剂购自日本樱花公司;防荧光淬灭封片剂购自美国Vector公司。

[0191] 兔抗人/鼠Aurora B抗体购自美国Sigma Aldrich公司;兔抗人/鼠磷酸化组蛋白H3多抗购自德国Merck Millipore公司;兔抗人/鼠cTnT多克隆抗体购自英国Abcam公司;Alexa Fluor 594标记山羊抗兔IgG、Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG、Alexa Fluor 594标记山羊抗鼠IgG和Alexa Fluor 488标记山羊抗鼠IgG购自美国Life Technologies公司;DAPI购自美国Sigma Aldrich公司;山羊血清工作液购自武汉博士德生物工程有限公司。

[0192] Trizol购自美国Invitrogen公司;盐酸阿霉素购自上海生工生物工程股份有限公司。

[0193] 实验动物为雄性C57BL/6J小鼠,购自上海斯莱克实验动物有限公司。

[0194] Leica Dmi8荧光显微镜和Leica IM50图像采集系统购自德国Leica公司;小动物超声诊断仪购自加拿大VisualSonics公司。

[0195] 0.1mol/L磷酸盐缓冲液(1×PBS)的配制:NaCl 8.0g,KCl 0.2g,Na₂PO₄·H₂O 3.58g,KH₂PO₄ 0.24,调pH值至7.4,去离子水定容至1000ml,高压灭菌,储存于4℃。

[0196] 0.5%Triton X-100的配制:Triton X-100原液5ml,1×PBS 995ml。

[0197] 2、试验方法

[0198] (1) 免疫荧光

[0199] (a) 按实验要求处理好细胞爬片或冷冻切片,PBS洗,5min×3次。

[0200] (b) 0.5%Triton X-100室温通透15min,PBS洗,5min×3次。

[0201] (c) 山羊血清37℃封闭30min。

[0202] (d) 弃血清,将一抗按适当比例稀释,滴加覆盖组织,4℃湿盒过夜。

[0203] (e) 取出湿盒,37℃复温30min,PBS洗玻片或组织切片,5min×3次。

[0204] (f) 将二抗按适当比例稀释,滴加覆盖组织,37℃孵育30min~60min。

[0205] (g) PBS洗3次,每次5min,DAPI染核10min。

[0206] (h) PBS洗3次,每次5min,防淬灭封片剂封片后荧光显微镜下观察分析。

[0207] (2) H&E染色

[0208] (a) 4μm厚度切片,42℃捞片,60℃烤片过夜,常温保存。

[0209] (b) 石蜡切片脱蜡至水:二甲苯3次,每次20min;梯度酒精(100%,95%,95%,90%,80%)水化,分别为:2min,2min,2min,1min,1min,自来水洗5min。

- [0210] (c) PBS洗3遍,每次5min。
- [0211] (d) 苏木素染色5min。
- [0212] (e) 自来水冲洗10min。
- [0213] (f) 1%盐酸酒精分化两下,自来水冲洗5min。
- [0214] (g) 1%氨水返蓝2min,自来水冲洗5分钟。
- [0215] (h) 伊红染色1-5min。
- [0216] (i) 分别用80%,90%,95%,95%,100%的酒精脱水,时间分别为1min,2min,2min,2min,2min。
- [0217] (j) 二甲苯透明3次,每次2min。
- [0218] (k) 中性树胶封片,镜下观察。
- [0219] (3) 马松三色染色
- [0220] (a) 石蜡切片脱蜡至水。
- [0221] (b) 铬化处理(重铬酸钾过夜处理)。
- [0222] (c) 依次自来水和蒸馏水洗。
- [0223] (d) 用Harris氏苏木素染液或Weigert苏木素液染核1-2min。
- [0224] (e) 充分水洗,如过染可盐酸酒精分化2-3s。
- [0225] (f) 氨水返蓝2min。
- [0226] (g) 用Masson丽春红酸性复红液5-10min。
- [0227] (h) 1%磷钼酸水溶液分化3-5min。
- [0228] (i) 1%苯胺蓝或光绿液染5min。
- [0229] (j) 1%冰醋酸水溶液分化几秒。
- [0230] (k) 95%酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树胶封固。
- [0231] 结果:胶原纤维、粘液、软骨呈蓝色(如光绿液染色为绿色),胞浆、肌肉、纤维素、神经胶质呈红色,胞核黑蓝色。
- [0232] (4) 小鼠心肌梗塞模型的建立
- [0233] 8周C57BL/6J雄性小鼠经诱导箱中异氟烷气麻,呼吸机频率为115次/min,呼吸比1:1,潮气量为1.5ml。用20g留置针塑料管套经嘴气管插管,连接小动物呼吸机,用含有2.5%异氟烷的纯氧持续麻醉。备皮,3-4肋间开胸,暴露心脏,用7-0prolene线左前降支结扎,会看到心尖变白,缝合肋间,缝皮,消毒。关掉麻药,持续通气至小鼠苏醒。
- [0234] (5) 小鼠心力衰竭模型的建立
- [0235] 8周C57BL/6J雄性小鼠7天注射一次阿霉素(5mg/kg),一共注射四次后即会导致小鼠心力衰竭,通过心脏超声验证。
- [0236] (6) 取材、固定和切片
- [0237] (a) 手术后治疗1周和8周,小鼠腹腔注射10%的水合氯醛(200mg/kg)处死,取出心脏,1周取材还包括肝肾,OCT包埋或石蜡包埋。
- [0238] (b) 冰冻切片用于做免疫荧光=石蜡切片用于H&E和马松三色染。
- [0239] (c) 标本在做完马松三色染后,用Image J图像分析软件测量心梗大小。
- [0240] 心梗面积计算公式为:

$$[0241] \quad \text{心梗大小} = \frac{\text{心梗区域左心室内膜长度} + \text{心梗区域左心室外膜长度}}{\text{左心室内膜长度} + \text{左心室外膜长度}} \times 100\%$$

[0242] 每个标本取5个截面,计算平均值。

[0243] 3、统计分析

[0244] 所有实验结果均以Mean±SEM表示。两组之间比较用Two-tailed t检验,多组之间比较用单因素方差分析(one way ANOVA)。P<0.05为有显著性统计学差异的标准。所有实验结果利用GraphPad Prism 5(Software, Inc.)和Image J软件作图、分析。

[0245] 4、实验结果

[0246] (I) 参照前述(4)所述的方法建立小鼠心肌梗塞模型。将建立的小鼠心肌梗塞模型分为对照组(NS)与鸡胚羊水(EE)治疗组(每组6只)。EE治疗组每两天通过尾静脉注射100微升实施例一制备得到的EE,到第三周21天时,共注射10次。对照组以相同方式注射生理盐水100微升10次。

[0247] 左室射血分数(LVEF)是左心室功能的关键经典指标,左室射血分数提高表明小鼠心肌梗塞后的心脏功能得以提高。通过心脏超声测算出小鼠的射血分数,结果如图15所示。从图15可以看出,到第3周时,EE的治疗显著地提升了心梗小鼠的左室射血分数,表明EE的治疗显著提高了小鼠心肌梗塞后的心脏功能。

[0248] 通过心脏超声测算出各组小鼠的左心室短轴缩短率(LVFS),结果如图16所示。从图16可以看出,到第3周时,EE的治疗显著地提升了心梗小鼠的LVFS,也即提高了小鼠心肌梗塞后的心脏功能。

[0249] PH3染色是判断心脏内细胞再生情况的指标。处死经21天处理后的各组小鼠,制备心肌组织的冷冻切片,按照上述第(1)点所述方法进行PH3染色,结果如图17所示。从图17可明显看出,EE治疗组小鼠心脏组织中PH3染色阳性(绿色荧光点,箭头所指)细胞明显增加,表明EE的治疗促进了心脏组织内细胞的再生。AuroraB染色是判断心脏内细胞再生情况的指标。按照上述第(1)点所述方法进行AuroraB染色,结果如图18所示,从图18中可以明显看出EE治疗组小鼠心脏组织中AuroraB染色阳性(绿色荧光点,箭头所指)细胞明显增加,表明EE的治疗促进了心脏组织内细胞的再生。

[0250] 马松染色是判断心脏梗死组织与纤维组织的经典方法。处死经21天处理后的各组小鼠,制备心肌组织的石蜡切片,按前述第(3)点进行染色,结果如图19所示。图19中,蓝色的为梗死纤维化组织,红色为肌肉组织,从图中可以看到心梗小鼠有严重的纤维化,而EE治疗后纤维化显著减少;提示EE的治疗防止了小鼠心肌梗塞后的纤维化。

[0251] 仅促进心脏组织内细胞的再生无法使得成纤维细胞面积显著小于对照组。因此,除促进心脏组织内细胞的再生外,EE治疗同时也改变了炎症反应中的巨噬细胞亚型比例,选择性地激活、增加了CCR⁺及CCR2⁺CX3CR1⁺巨噬细胞,抑制了细胞因子风暴,从而抑制了心肌细胞死亡和成纤维化。

[0252] (II) 参照上述方法(5)构建小鼠心力衰竭模型。将建立的小鼠心力衰竭模型分为对照组与鸡胚成分萃取物(EE)治疗组(每组6只)。EE治疗组每两天通过尾静脉注射100微升实施例一制备得到的EE,到第三周21天时,共注射10次。对照组以相同方式注射生理盐水100微升10次。

[0253] 左室射血分数(LVEF)是左心室功能的关键经典指标,左室射血分数提高表明小鼠

心力衰竭后的心脏功能得以提高。通过心脏超声测算小鼠的射血分数,结果如图20所示。从图20可以看出,到第3周时,EE的治疗显著地提升了心衰小鼠的左室射血分数,表明EE的治疗显著地提升了心力衰竭小鼠的心脏功能。左室纤维化面积明显降低。

[0254] 实施例10

[0255] 用实验大白猪通过经皮动脉导管(PCI)至心脏冠状动脉前降支进行充气球囊堵塞50分钟后撤除,构建了大白猪的心脏缺血再灌注模型,术后立即通过静脉注射采用实施例一所述方法获得的鸡EE(1ml/kg)进行治疗。术前测定基础的心功能。结果如图21和22所示。

[0256] 图21显示,鸡EE治疗心梗大白猪能提高心梗大白猪的左室射血分数和短轴缩短率,术后对照组大白猪的心功能呈现逐渐下降的趋势,而EE治疗组的左室功能有一定回升,术后2周、4周和8周的EF和FS显著高于对照组(图21,A和C)。用与术前基础值的差值进行 Δ EF和 Δ FS统计,发现EE治疗后1周能显著降低EF和FS相较于术前的下降数值,治疗组2周、4周和8周的下降数值显著低于对照组(图21,B和D)。治疗组的每搏输出量在术后的1-8周都显著高于对照组(图21,E)。对照的左心室收缩末期的容积和直径有上升趋势,治疗组较对照组低(图21,F和I),说明EE提高了左心室收缩力。对照的左心室舒张末期的容积和直径有上升趋势,给药组呈现先上升后下降的趋势(图21,G和H),说明EE逆转了部分心肌梗塞(myocardial infarction,MI)导致的心室重构。

[0257] 大白猪缺血再灌注(IR)模型后,给药组立即给以鸡EE治疗,对照组给以5%葡萄糖。通过饲养时观察和监控视频发现,对照组大白猪活动时间少,神情倦怠。术后一周,通过统计发现,治疗组大白猪的日常活动时间显著高于对照组(图22,D)。EE治疗后8周取材,通过心脏层切后氯化三苯基四氮唑(TTC)染色发现,对照组心尖到前壁的心肌变薄,染色后呈现白色,左心室轻度扩张;治疗组心尖到左心室前壁有轻度梗死,心室壁未见明显变薄,同时会发现对照组心脏组织中脂肪组织增多(图22,A),通过统计发现治疗组TTC染色后梗死呈现白色的面积显著低于对照组(图22,B)。

[0258] 取梗死区左心室前壁组织进行马松三色染色发现,对照组呈现透壁性梗死,心室壁变薄;EE治疗组心脏纤维化穿插在心肌间隙,室壁未有明显变薄(图22,C)。

[0259] 上述结果表明,EE能显著提升缺血再灌注大白猪的左心射血分数和每搏输出量,减轻由于心梗导致的左心室重构,减轻缺血再灌注大猪的肺淤血,提升每日活动量。此外,TTC染色结果表明,EE治疗组心脏梗死面积较对照组显著降低;组织马松染色结果表明,对照组大白猪左心前壁出现透壁性梗死,纤维化面积显著高于EE治疗组;荧光染色结果表明,EE能增加大白猪梗死区血管的新生。同样地,这些结果表明,EE治疗同时也改变了炎症反应中的巨噬细胞亚型比例,选择性地激活、增加了CCR⁺及CCR2⁺CX3CR1⁺巨噬细胞,抑制了细胞因子风暴,从而抑制了成纤维化。

当前数据路径: D:\lc\DATA\7天EE
数据注释: Ch1(2D)数据
样品瓶数: 1 进样次数: 1

样品名: 7天EE

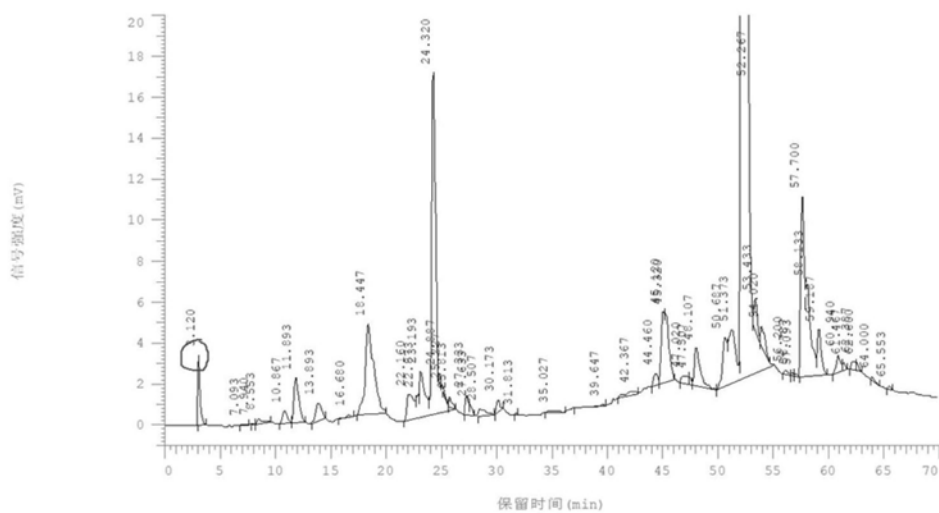


图1

当前数据路径: D:\lc\DATA\11天EE
数据注释: Ch1(2D)数据
样品瓶数: 1 进样次数: 1

样品名: 11天EE

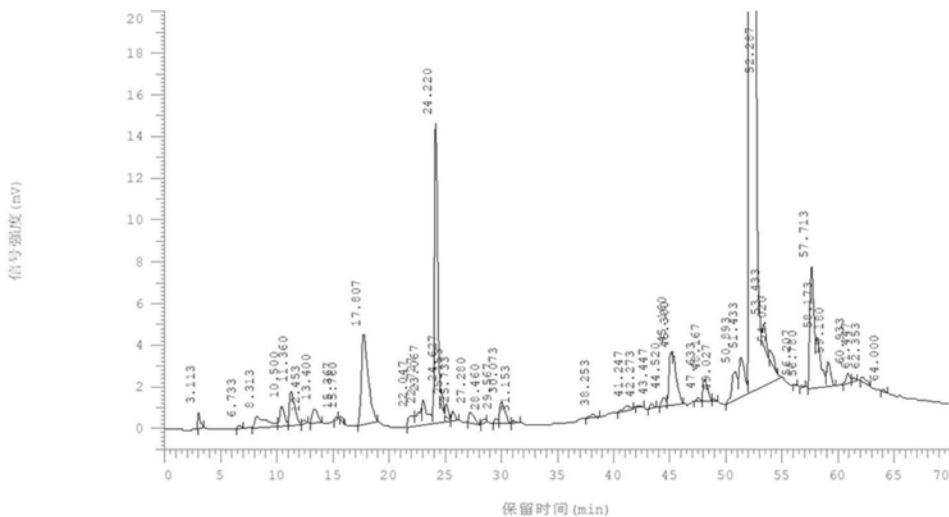


图2

当前数据路径: D:\lc\DATA\13天EE
数据注释: Ch1(2D)数据
样品瓶数: 1 进样次数: 1

样品名: 13天EE

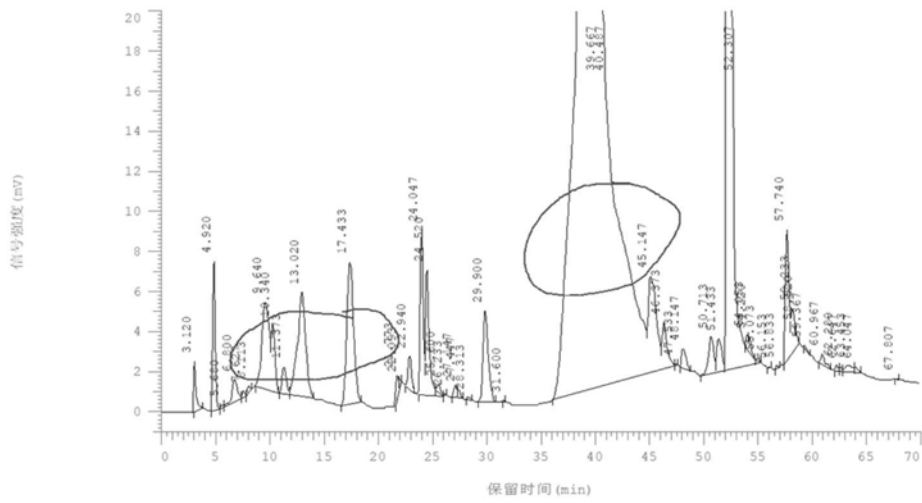


图3

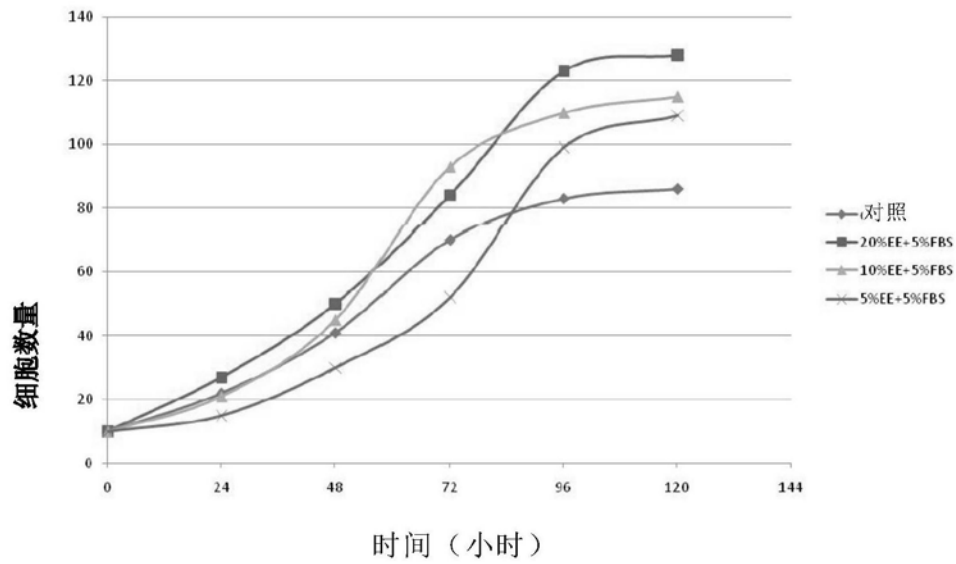


图4

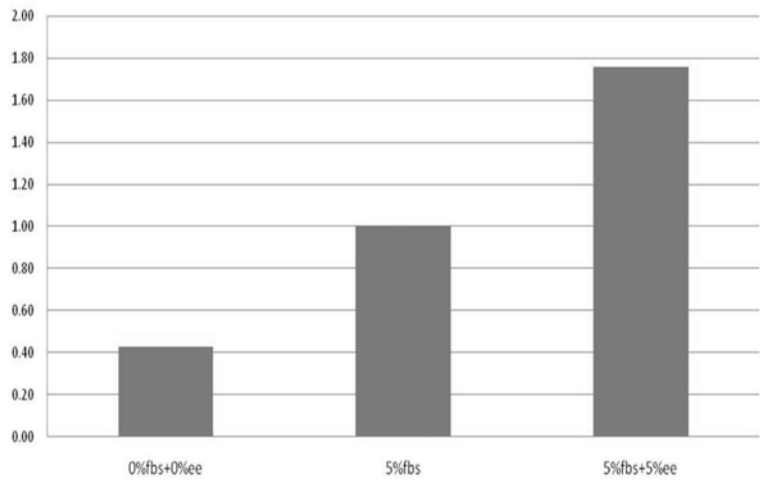


图5

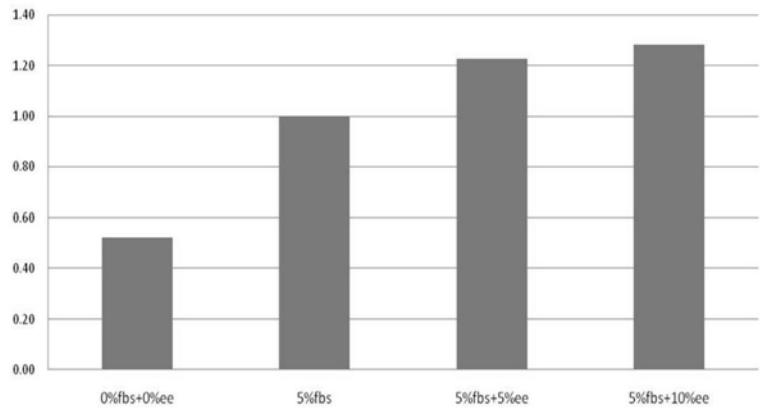


图6

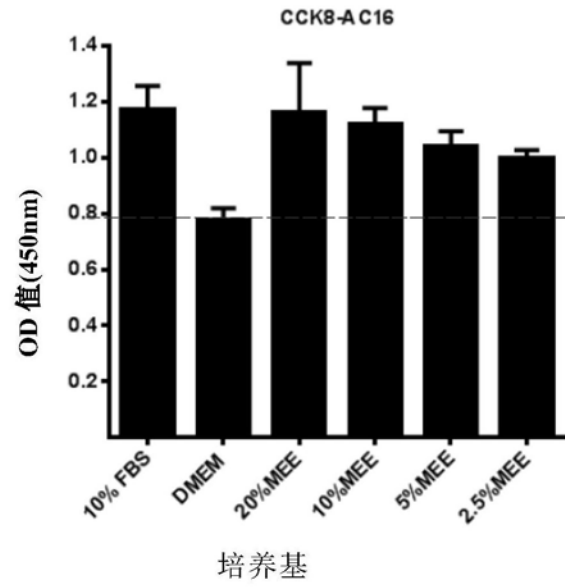


图7

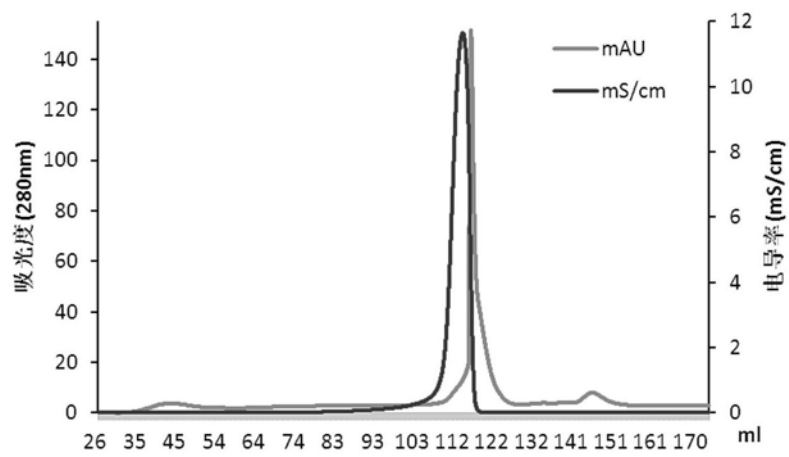


图8

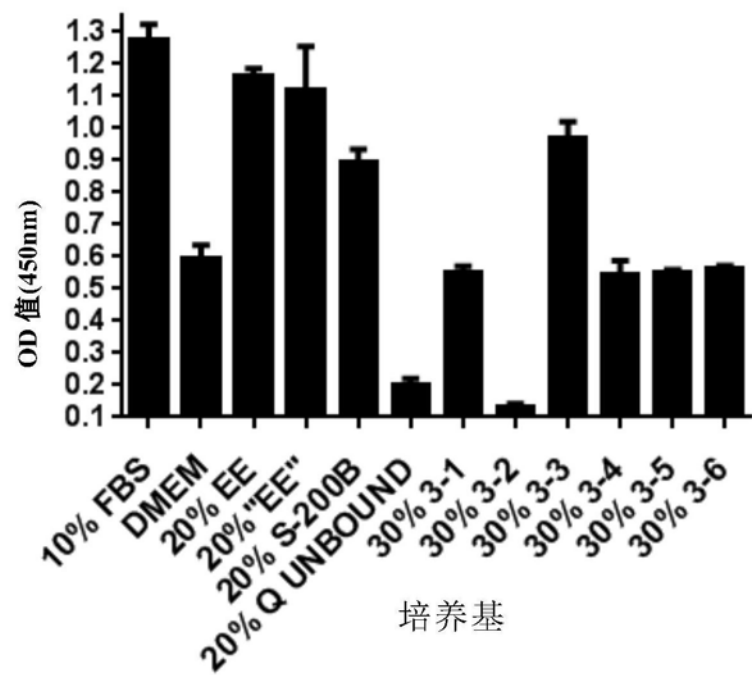


图9

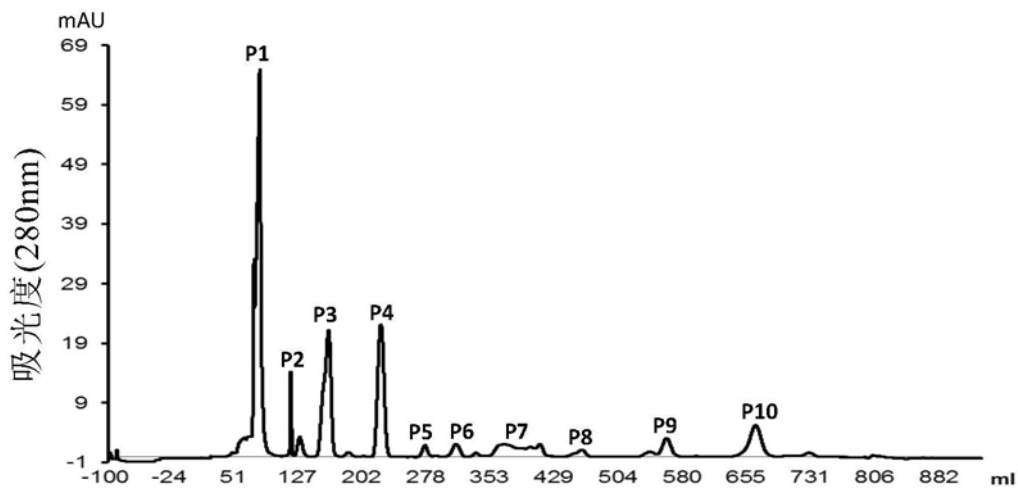


图10

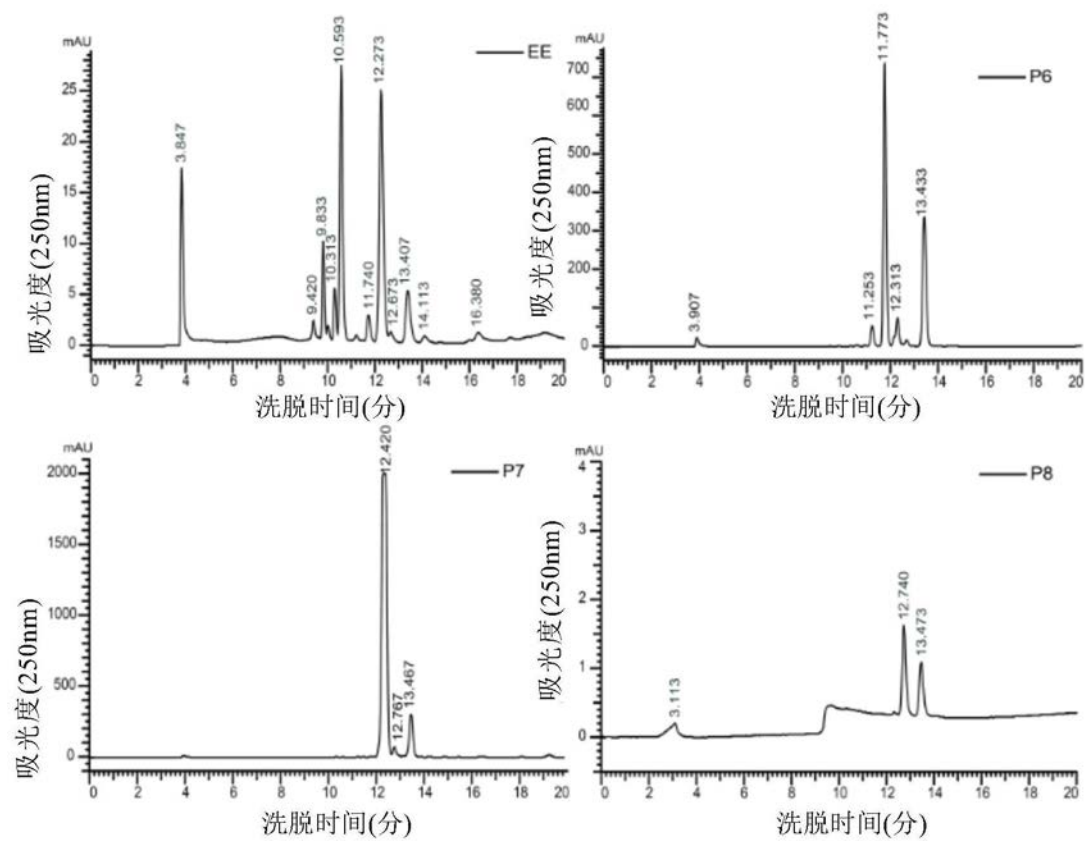


图11

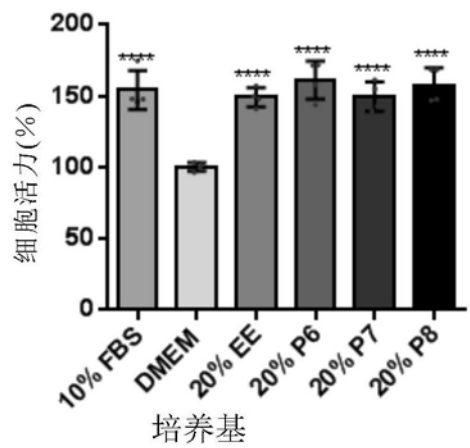


图12

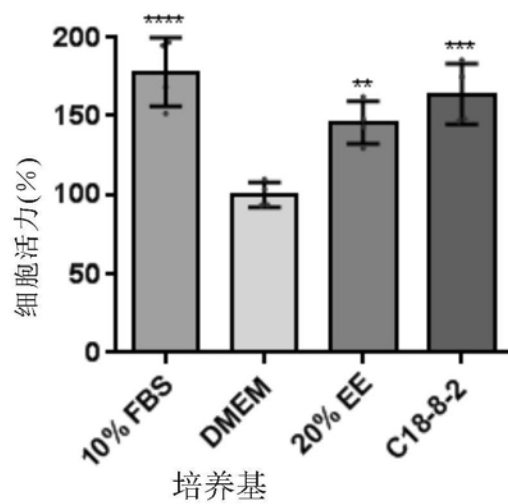


图13

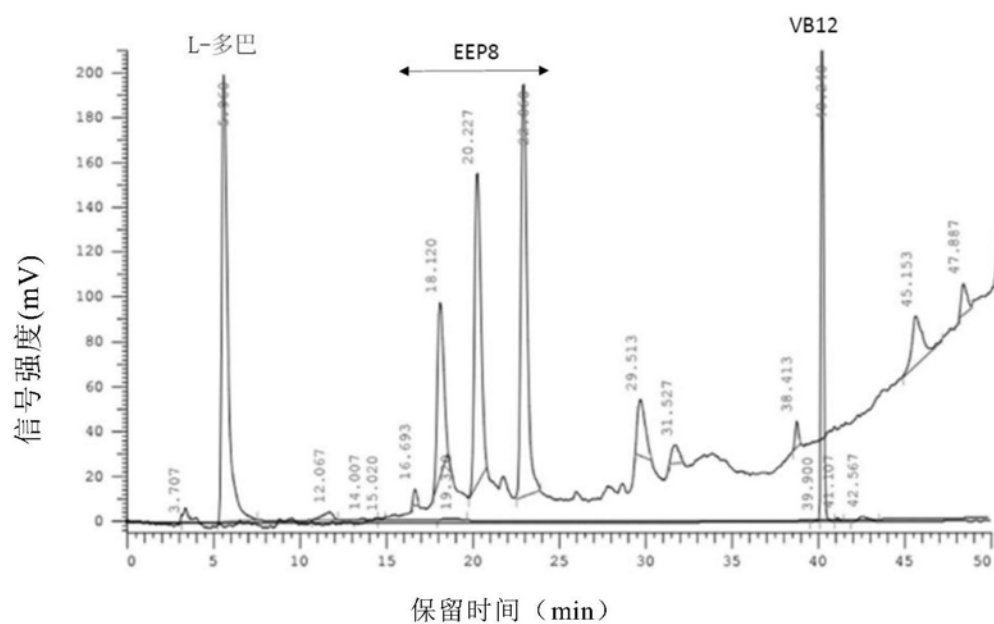


图14

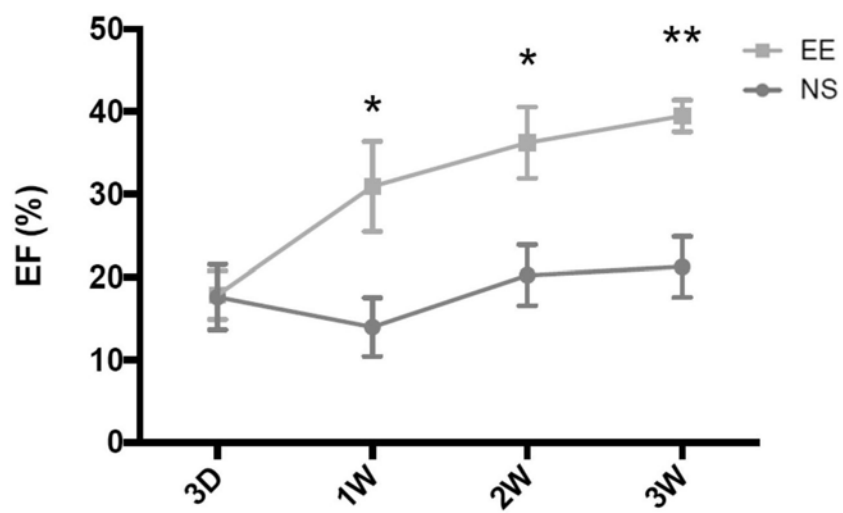


图15

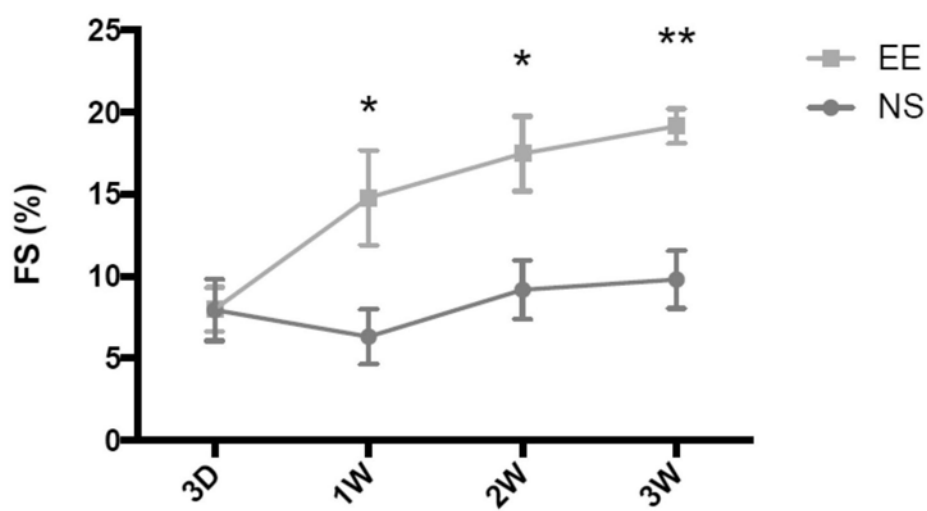


图16

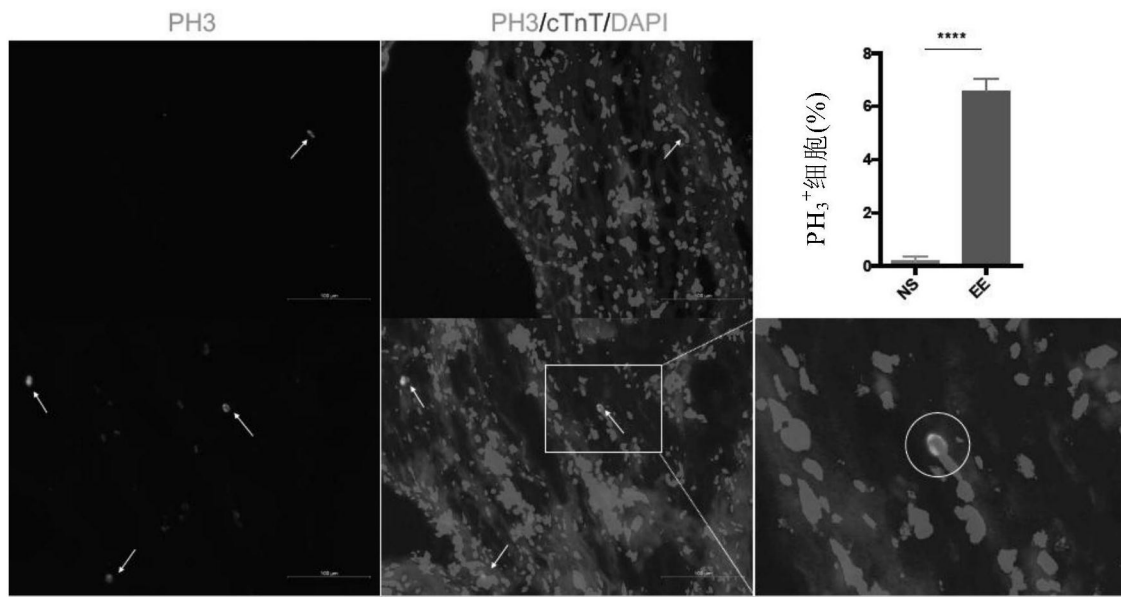


图17

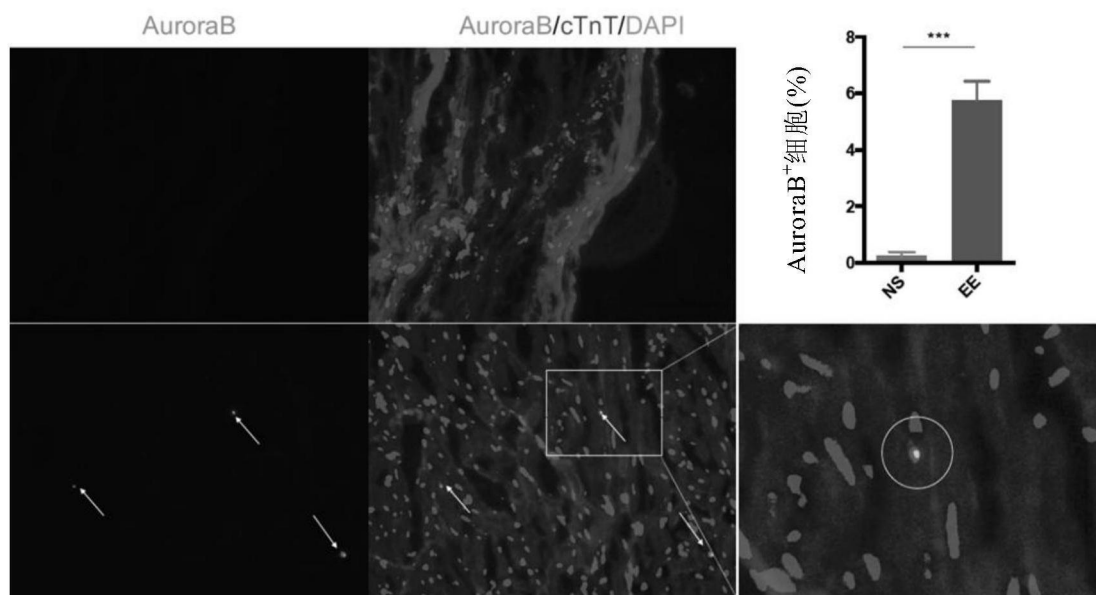


图18

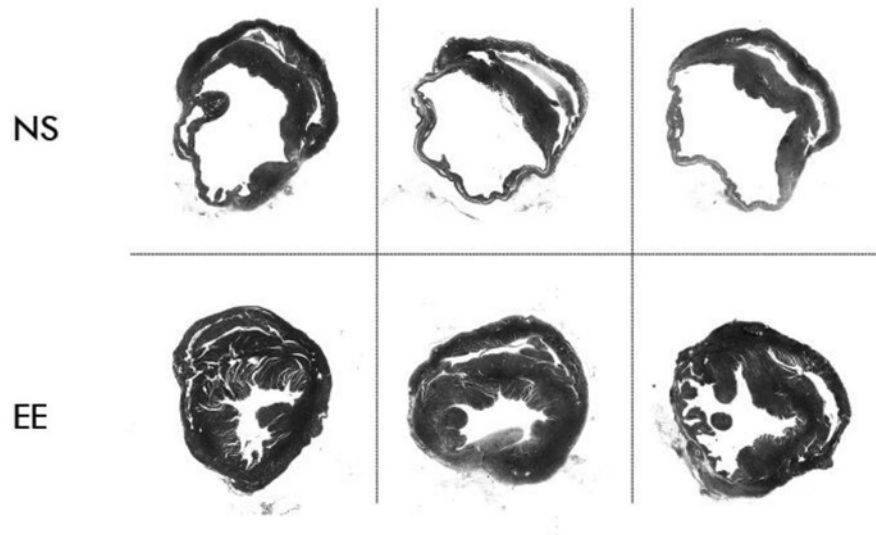


图19

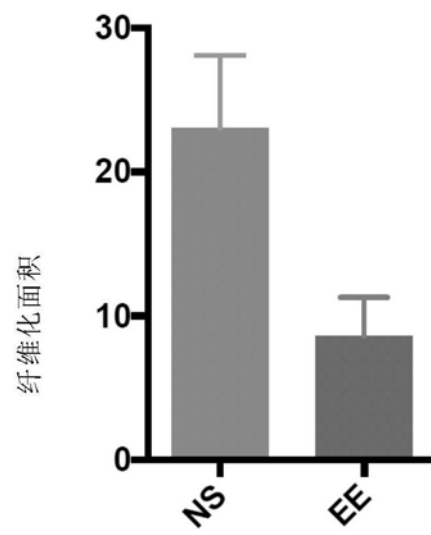


图20

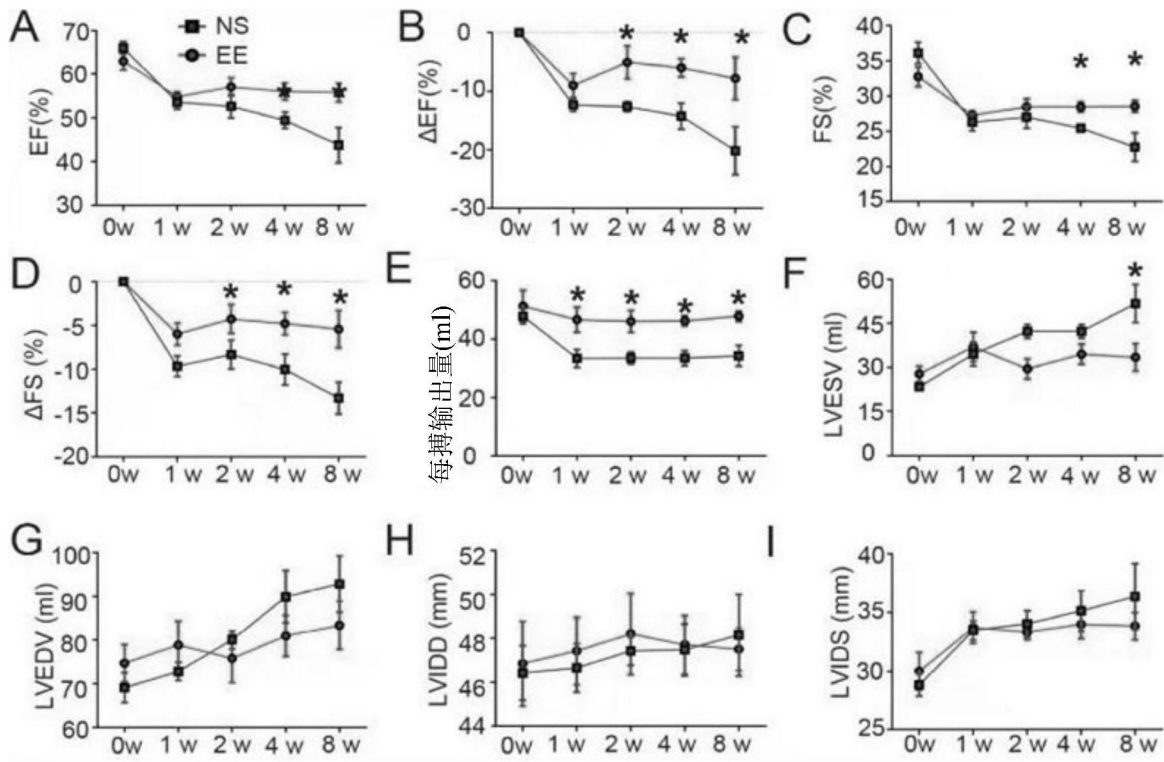


图21

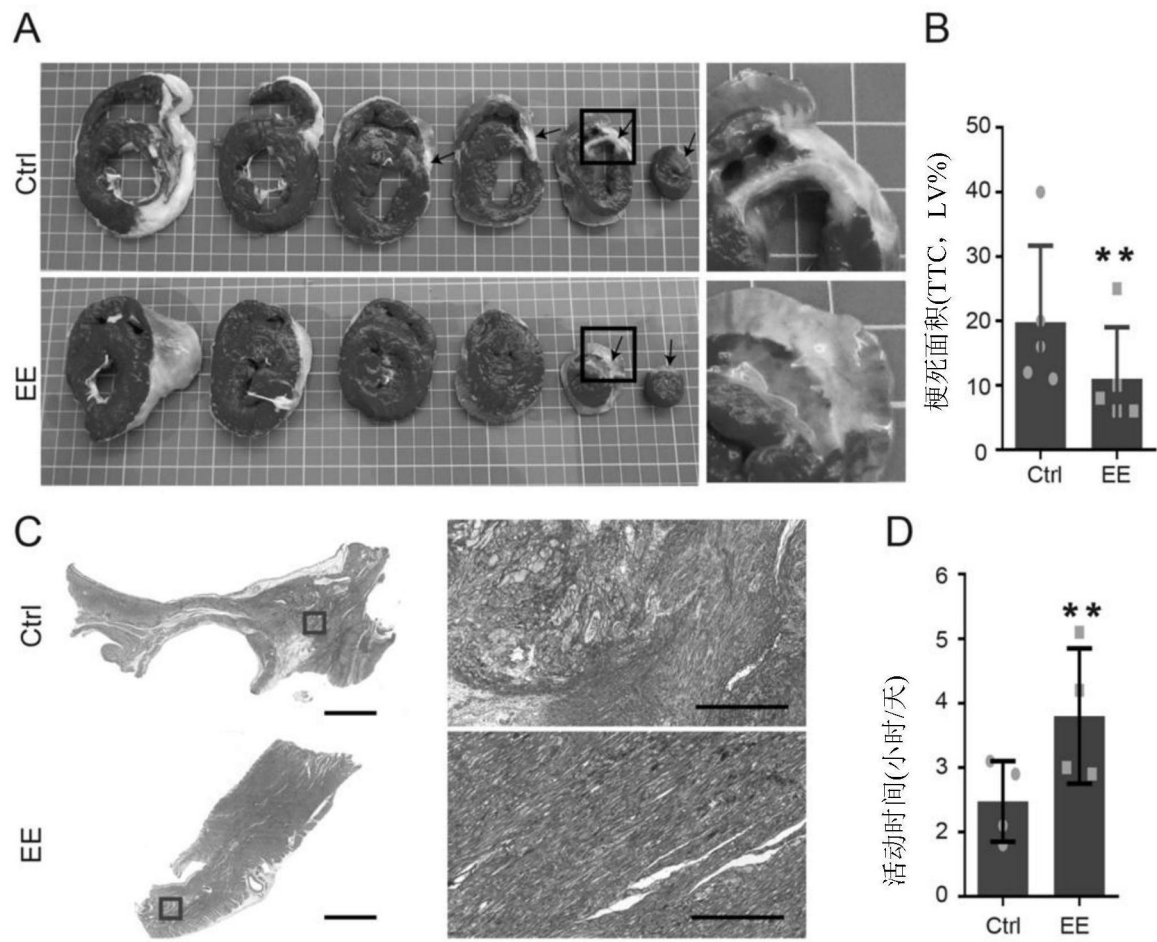


图22