

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 31/685

//(A61K31/685,31:66)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96197739.6

[43]公开日 1998年11月25日

[11] 公开号 CN 120036A

[22]申请日 96.9.13

[30]优先权

[32]95.9.14 [33]US[31]08/003,789

[86]国际申请 PCT/US96/14752 96.9.13

[87]国际公布 WO97/09989 英 97.3.20

[85]进入国家阶段日期 98.4.20

[71]申请人 LXR生物技术有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 I·C·巴特斯特 M·W·弗尔

J·G·古达德

L·D·托美尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

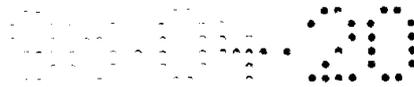
代理人 李华英

权利要求书 5 页 说明书 21 页 附图页数 15 页

[54]发明名称 含有磷脂混合物并具有抗细胞程序死亡活性的组合物

[57]摘要

本发明涉及了一种具有抗细胞程序死亡活性的组合物，该组合物包括磷脂酸、磷脂酰肌醇、溶血性磷脂酸、溶血性磷脂酰肌醇和溶血性磷脂酰胆碱。



权利要求书

1.一种具有抗细胞程序死亡活性的组合物，该组合物包括：

- (a) 磷脂酸 (PA) ；
- (b) 磷脂酰肌醇 (PI) ；
- (c) 溶血性磷脂酸 (LPA)
- (d) 溶血性磷脂酰肌醇 (LPI) ；和
- (e) 溶血性磷脂酰胆碱 (LPC) ；

其中各磷脂基本上是纯的磷脂。

2.根据权利要求 1 所述的组合物，其中，各磷脂的含量比例是在约分别 0:5:2:0:0 - 20:20:16:4:8 的范围内。

3.根据权利要求 1 所述的组合物，其中各磷脂的含量比例是在约 2:8:6:2:2 - 15:15:10:4:8 的范围内。

4.根据权利要求 1 所述的组合物，其中各磷脂含量比例是在大约 4:16:12:4:4 - 7.5:7.5:5:2:4 的范围内。

5.根据权利要求 1 所述的组合物，其中各磷脂含量比例约是分别 10:10:8:2:4 。

6.根据权利要求 1 所述的组合物，其中的磷脂是来源于植物、动物或经合成得到，但其中 LPA 是非动物性来源的。

7.根据权利要求 6 所述的组合物，其中，动物来源的磷脂是从肝脏中提取的。

8.根据权利要求 1 所述的组合物，其中组合物已经声处理。



9.根据权利要求 8 所述的组合物, 其中, 进行的声处理直至使组合物呈透明状。

10.根据权利要求 8 所述的组合物, 其中, 声处理所持续的时间大约是 3 - 90 分钟。

11.根据权利要求 8 所述的组合物, 其中声处理过程是将声处理过程和平衡过程交替进行, 各过程分别持续 5 分钟。

12.根据权利要求 8 所述的组合物, 其中, 声处理时使组合物温度不得高于 60 ℃。

13.根据权利要求 1 所述的组合物, 还包括可生理用缓冲液。

14.根据权利要求 13 所述的组合物, 其中的缓冲液 pH 值约在 5.5 - 8.0 之间。

15.根据权利要求 14 所述的组合物, 其中的缓冲液的 pH 值是约 8.0。

16.根据权利要求 1 的组合物, 其中所含磷脂的总浓度大约为 10mg/ml。

17.一种制备具有抗细胞程序死亡活性组合物的方法, 该方法包括的步骤是:

(a) 将一定量的下列物质, 以能够产生抗细胞程序死亡活性的比例混合, 并且溶于可生理用的缓冲液中, 这些物质是:

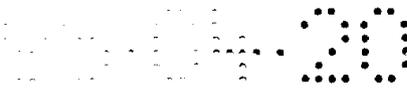
(i) 磷脂酸 (PA);

(ii) 磷脂酰肌醇 (PI);

(iii) 溶血性磷脂酸 (LPA)

(iv) 溶血性磷脂酰肌醇 (LPI); 和

(v) 溶血性磷脂酰胆碱 (LPC) 。



(b) 将磷脂/缓冲液混合物进行声处理。

18.根据权利要求 17 的方法，其中磷脂可以是来自植物、动物或合成来源的，但其中 LPA 是非动物来源的。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中动物来源的磷脂是从肝脏提取的。

20. 根据权利要求 18 的方法，其中所含磷脂的总浓度大约为 10mg/ml。

21. 根据权利要求 17 所述的方法，其中，持续进行声处理直至磷脂组合物呈透明状。

22. 根据权利要求 17 所述的方法，其中声处理所持续的时间大约是 3 - 90 分钟。

23.根据权利要求 17 所述的方法，其中的声处理是将声处理过程和平衡过程交替进行，各过程分别持续 5 分钟。

24.根据权利要求 17 所述的方法，其中声处理时组合物温度不得高于 60 ℃。

25.根据权利要求 17 所述的方法，其中缓冲液的 pH 值是约 8.0。

26.根据权利要求 25 所述的方法，其中，缓冲液是选自含碳酸氢盐的一系列溶液。

27.根据权利要求 1、 7、 19 或 21 所述方法制得的组合物。

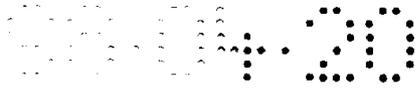
28.一种细胞程序死亡的治疗方法，包括给予需要这种治疗的患者以有效治疗量的可药用组合物，该可药用组合物含有权利要求 27 所述的组合物。



- 29.根据权利要求 28 所述的方法，其中患者患有胃肠性紊乱。
- 30.根据权利要求 29 的方法，其中，胃肠性紊乱是由刺激因素引起，这些刺激是选自人体免疫缺陷病毒、化疗剂和辐射和那些有关的传染性疾病。
- 31.根据权利要求 29 所述的方法，其中，胃肠性紊乱是由于炎性肠疾病。
- 32.根据权利要求 30 所述的方法，其中的传染性疾病选自由致腹泻性生物引发的一系列疾病。
- 33.根据权利要求 31 所述的方法，其中该治疗能够减轻与免疫抑制病毒、化疗剂、或辐射和免疫抑制药物有关的病症。
- 34.根据权利要求 33 所述的方法，其中的病毒是人体免疫缺陷病毒。
- 35.根据权利要求 28 所述的方法，其中患者患有与局部缺血和/或在局部缺血后再灌注有关的细胞程序死亡疾病。
- 36.根据权利要求 35 所述的方法，其中的再灌注与冠状动脉梗阻；脑梗塞；脊柱/头部创伤和严重的并发性麻痹和冻伤有关。
- 37.一种组合物，该组合物含有组织培养介质和有效量的、如权利要求 27 所述的组合物。
- 38.一种预防培养细胞中发生细胞程序死亡的方法，该方法包括用权利要求 27 所述的组合物处理细胞。
- 39.根据权利要求 38 所述的方法，其中的细胞是哺乳动物细胞。
- 40.根据权利要求 39 所述的方法，其中细胞是人体细胞。



- 41.根据权利要求 38 所述的方法，其中的细胞是昆虫细胞。
- 42.根据权利要求 39 所述的方法，其中的细胞来源于组织或器官的某部分。
- 43.一种器官保藏的方法，该方法包括在储存器官的溶液内加入有效量的、如权利要求 27 所述的组合物。
- 44.一种器官保藏的方法，该方法包括：给予受体动物至少一个静脉内型药物团，该静脉内药物含有有效量的如权利要求 27 所述组合物。
- 45.一种治疗皮肤病的方法，该皮肤病与细胞程序死亡有关，该治疗方法包括：采用局部给予方式，给予需要这种治疗的患者以有效治疗量的可药用组合物，该组合物包括了权利要求 27 所述的组合物。
- 46.根据权利要求 45 所述的方法，其中的皮肤病是指皮肤的皱缩、松弛、鳞皮病、秃发或脱发。
- 47.根据权利要求 46 所述的方法，其中权利要求 27 所述组合物是膏霜剂或软膏剂或凝胶剂。
- 48.一种治疗创伤的方法，该方法包括给予有效量的含有权利要求 27 所述的组合物。



说明书

含有磷脂混合物并具有抗细胞程序死亡活性的组合物

发明领域

本发明涉及了对细胞程序死亡具有抑制作用的物质的组合物。更具体地说,本发明涉及了具有抗细胞程序死亡活性的磷脂(PA、PI、LPA、LPI 和 LPC)混合物的组合物。

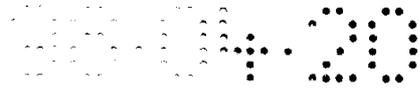
发明背景

细胞程序死亡是一种导致个体细胞死亡的正常生理过程。这种细胞程序死亡的过程涉及到多种正常的或病原性的生物作用,并且该过程可以由许多不相关的刺激所引发。在衰老过程中也会出现细胞程序死亡的生物调节的变化,并且会引起许多与衰老有关的病症和疾病。

细胞程序死亡的最新研究揭示出,诱发细胞程序死亡的正常代谢途径能够被很多种信号启动,这些信号包括激素,血清生长因子的缺失,化学治疗剂,电离辐射,和因人体免疫缺损病毒(HIV)造成的感染。Wyllie (1980) Nature 284:555-556; Kanter 等人 (1984) Biochem.Biophys.Res.Commun 118:392-399; Duke 和 Cohen (1986) Lymphokine Res.5:289-299; Tomei 等人 (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun.155:324-331; Kruman 等人 (1991) J.Cell.Physiol.148:267-173; Ameisen 和 Capron (1991) Immunol.Today 12:102-105; 及 Sheppard 和 Ascher (1992) J.AIDS 5:143-147。那些影响细胞程序死亡的生物控制的试剂对大量临床病症都具有治疗功效。

编程性细胞死亡的特点表现为细胞收缩、染色质凝聚、细胞质水泡状生长、膜通透性增大和核小体间 DNA 裂解。Gerschenson 等人 (1992) FASEB J. 6:2450-2455; 及 Cohen 和 Duke (1992) Ann.Rev.Immunol. 10:267-293.

含有部分的、经一定程度加工的植物提取物的多种食品补充剂已被用



于改善化疗、辐射和艾滋病（ AIDS ）中伴随的肠胃紊乱。这些补充剂通常含有碳水化合物、脂肪和植物性蛋白水解物。例如，可以参见 Tomei 和 Coe 等人的 *in Apoptosis The Molecular Basis of Cell Death*（ 1991 ） Cold Spring Harbor Laboratory Press 。

一些由植物提取物中得到的一些蛋白酶抑制剂具有抗癌活性。 Troll 等人（ 1987 ） *Adv.Cancer Res.* 49:265-283 。 Bowman-Birk 抑制剂是这些抑制剂中最好的。 Birk （ 1985 ） *Int. J. Pep.pro.Res.*25:113-131 。 Bowman-Birk 抑制剂被描述成一类能抑制细胞转化且分子量约是 8KD 的二硫化物键合蛋白。 Chou 等人（ 1974 ） *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 71:1748-1752; Yavelow 等人(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 82:5395-5399; 及 Yavelow 等人(1983) *Cancer Res. (Suppl.)* 43:2454s-2459s 。对含有 Bowman-Birk 抑制剂的大豆粗提物进行了具体的描述。 Kennedy 等人的美国专利 4,793,3996; PCT 公开号 WO94/20121; 和 Kennedy,A.R. （ 1994 ） *Cancer Res. (Suppl)* 54:1999s-2005s 。还有关于 Bowman-Birk 抑制剂免疫性的描述。 WO90/03574 ； 和美国专利 4,959,310 ； 和 5,053,327 。 Bowman-Birk 抑制剂还被发现有巨噬细胞脱粒的活性。日本特许公报 63051335 。

磷脂是一类亲水亲油性的含磷脂类，它们是生物膜的重要组成。不同的磷脂制品可以应用于烹饪、药物转运（脂质体）、缓释传递体系、疏水性药物的载体介质、基因转移和基因替代治疗、防晒剂、乳剂、消泡剂、缺损肺表面活性剂的替代、去污剂和膜稳定剂。

在许多植物和动物产品中都发现含有磷脂酸（ PA ）、磷脂酰肌醇（ PI ）、溶血性磷脂酸（ LPA ）、溶血性磷脂酰肌醇（ LPI ）、和溶血性磷脂酰胆碱（ LPC ）。很多植物和动物产品中含有 LPA ，据报导它具有许多包括致有丝分裂、生长因子作用在内的生理活性，并且可以作为一种抗皱剂。美国专利 4,263,286;4,746,652;5,326,690;和 5,340,568 。下列文献对 LPA 有详细的评述， Moolenaar （ 1994 ） *TICB* 4:213-219;和 Eichholtz 等人（ 1990 ） *Biochem.J.*291:677-680;和 Moolenaar （ 1995 ） *J. Biol. Chem.* 270:12949-12952 。

PCT 专利公开号 WO95/15173 描述了植物来源的脱脂（ delipidated ）



提取物可以产生抗细胞程序死亡的作用。现在认为，这些提取物中含有重量比是 2:1:2:20:20 的 LPA、LPC、LPI、PA 和 PI，提取物还含有许多蛋白质和碳水化合物组分在内。

在本发明中引用的所有参考文献都作为参考文献以其全部内容并入本发明。

发明概述

本发明涉及抑制细胞程序死亡的组合物和制备这些组合物的方法。本发明还涉及这些组合物制备和应用的方法。

因此，本发明一方面涉及了含有磷脂的组合物，这些磷脂是磷脂酸（PA）、磷脂酰肌醇（PI）、溶血性磷脂酸（LPA）、溶血性磷脂酰肌醇（LPI）、和溶血性磷脂酰胆碱（LPC），它们之间的配比是能产生抗细胞程序死亡作用的比例。

另一方面，本发明提供了制备这些组合物的方法。这些方法包括将有效量的上述磷脂以它们各自相应的比例进行结合，并且将这些磷脂进行声处理直至所得溶液具有光学透明度。

又一方面，本发明提供了这些组合物的应用方法。这些方法包括将这些组合物用于治疗细胞程序死亡，治疗是通过给予需要这类治疗的患者以有效治疗量的含有上述组合物的可药用治疗剂来实现的。该方法包括用组合物来治疗与细胞程序死亡有关的病症。使用这些组合物的其他方法包括：防止培养的细胞发生细胞程序死亡，改善连续性器官移植中的器官保藏和分流术中的器官原位保藏，例如，心脏、肝脏、肺、脑等，以及治疗牵涉有细胞程序死亡的皮肤病病症的方法。

对附图的简单描述

附图 1（A）和 1（B）是 ElirexTM（以前称为“ROM”）在不同温度条件下储存一周后的稳定性棒图。棒的阴影部分代表了活的粘附性细胞（ADH）。棒的空白部分代表了程序死亡的无血清的释放性细胞（SDR）。稳定性是以细胞密度（附图 1（A））和百分率（附图 1（B））来表示的。在附图 1（A）中，空心环代表粘附性细胞的具有统计学意义

的显著性增加；实心环代表了程序死亡细胞的具有统计意义的显著性减少。附图 1 (B)，空心方块代表了具有统计学意义的存活细胞的百分率；实心方块代表了程序死亡细胞的具有统计学意义的百分率。

附图 2 (A) 和 2 (B) 是 NM 和 RNM 在 10T 1/2 细胞中的抗细胞程序死亡活性的对比棒图。棒的阴影部分代表了活细胞 (ADH)。棒的空白部分代表了程序死亡的无血清释放细胞。NM 是一种具有抗细胞程序死亡活性的大豆来源的提取物。RNM 是具有 10:10:2:2:1 (PA:PI:LPA:LPI:LPC) 比例的重组脂混合物。加有牛血清白蛋白 (BSA) 并且最终浓度为 0.01% 的 RNM 被表示为 RNM⁺。抗细胞程序死亡活性是以细胞密度 (附图 2 (A)) 和百分率 (附图 2 (B)) 来表示。附图 2 (A) 中，空心环代表了活细胞的具有统计意义的显著性增加；实心环代表了程序死亡细胞的具有统计意义的显著性减少。附图 2 (B)，空心方块代表了存活细胞的统计学意义的百分率；实心方块代表了程序死亡细胞的统计学意义的百分率。

附图 3 (A) 和 3 (B) 是含有植物来源磷脂的 RNM 和含有动物来源磷脂的 RNM 分别所具有的抗细胞程序死亡活性的对比棒图。剂量浓度是 100 μ g/ml。溶液不论含有或不含 BSA 其最终浓度都是 0.01 %。棒图的阴影部分表示细胞 (ADH)。棒图的空白部分代表程序死亡细胞 (SDR)。抗细胞程序死亡活性是以细胞密度 (附图 3 (A)) 和百分率 (附图 3 (B)) 来表示。在各附图中，第二和第三个棒代表大豆来源的磷脂；第四和第五棒代表了动物来源的磷脂。附图 3 (A) 中，空心环代表了活细胞 (ADH) 的具有统计意义的显著性增加；实心环代表了程序死亡细胞 (SDR) 的具有统计意义的显著性减少。附图 3 (B)，空心方块代表了存活细胞的有统计意义的百分率；实心方块代表了程序死亡细胞的有统计意义的百分率。

附图 4 (A) 是以 PI 为具体实例 (采用 Avanti Polar Lipids1994 的目录)，将含有大豆来源磷脂的脂肪酸 [A] 和含有牛肝脏来源磷脂的脂肪酸 [B] 进行比较。空白部分的棒表示饱和脂肪酸；阴影部分的棒表示不饱和脂肪酸。各脂肪酸的种类是以 X: Y 来划分，其中 X 代表了链的长度，Y 代表了双键的数目。“S/U”是指饱和脂肪酸相对于不饱和脂肪酸的比例。



附图 5 (A) 至 (E) 是一系列图示, 用来表示 RNM 中的 PA (附图 5 (A))、PI (附图 5 (B))、LPA (附图 5 (C))、LPI (附图 5 (D))、和 LPC (附图 5 (E)) 在不同浓度下的抗细胞程序死亡活性。所含磷脂的比例分别保持在常数 10:10:2:2:1 (PA:PI:LPA:LPI:LPC), 但所研究磷脂的浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 是不同的。箭头代表磷脂在 100 $\mu\text{g/ml}$ 的剂量下当比例为 10:10:2:2:1 时的起始浓度。

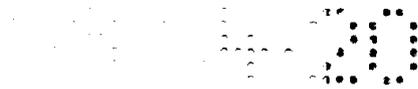
附图 6 是附图 5 所述各磷脂在不同浓度下的抗细胞程序死亡活性试验的总图示。所含磷脂的比例保持在常数 10:10:2:2:1 (PA:PI:LPA:LPI:LPC), 但这些磷脂在 100 $\mu\text{g/ml}$ 当量剂量下的浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 是不同的。附图中的磷脂表示如下: LPA (由实线连接的方块)、LPI (由实线连接的环)、LPA (由实线连接的三角)、PA (由虚线连接的方块)、PI (由虚线连接的环)。

附图 7 是重组 RNM 和 ElirexTM 在不同剂量时的抗细胞程序死亡活性对比图示。ElirexTM 是由实线连接的空心方块表示, 并且 ElirexTM 的磷脂比例是由附图 5 和 6 中优选出的。抗细胞程序死亡是以存活细胞的百分率表示。

附图 8 表示在不同 pH 条件下用 Eigel 基础培养基稀释 (BME) 得到的 ElirexTM 的抗细胞程序死亡活性。由虚线连接的实心三角代表了 BME 中的 ElirexTM 在不同浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 下的抗细胞程序死亡活性。实心方块代表 ElirexTM 在 pH 为 8 (碳酸氢铵缓冲液) 时的活性。实心三角代表 ElirexTM 在 pH 为 5.0 (醋酸钠缓冲液) 时的活性。实心环代表 ElirexTM 在 pH 为 6.5 (磷酸钠缓冲液) 时的活性。在用细胞培养介质稀释前, 都必须先在含有 100 - 200mMNaCl 的测试缓冲液中进行声处理, 使之重新混悬。

本发明实施方法

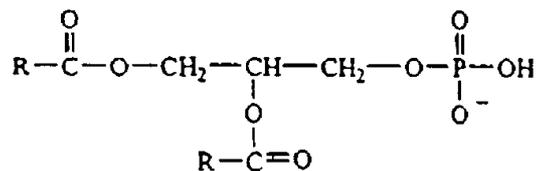
现已发现, 含有特定比例五种磷脂的组合物比含天然比例的这些磷脂具有更高的抗细胞程序死亡活性, 其中的五种磷脂可以来源于植物、动物或合成。这些组合物很容易从各种渠道得到, 包括来源于植物和动物。组合物还可以采用脂合成领域的已知方法来合成。组合物将因为来源和植物生长条件的不同而使化学组成略有差异。组合物在此被称为 ElirexTM。



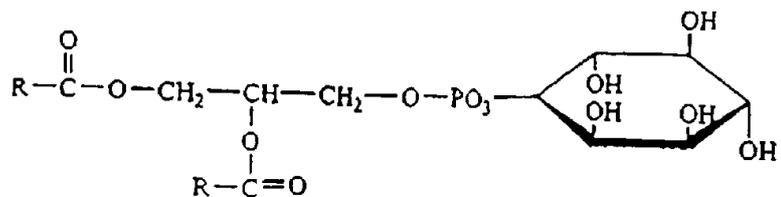
我们以前对植物来源的、可产生抗细胞程序死亡作用的提取物进行过描述，提取物活性测定采用体外细胞试验来完成，该体外细胞试验是能够对细胞程序死亡信号产生应答的试验。如 PCT WO 95/15173 所述。现在，我们发现活性组分是磷脂磷脂酸 (PA)、磷脂酰肌醇 (PI)、溶血性磷脂酸 (LPA)、溶血性磷脂酰肌醇 (LPI)、和溶血性磷脂酰胆碱 (LPC)。天然提取物分别含有这些磷脂并且它们的比例是约 20:20:2:1:2。在此它被称为“天然混合物”(NM)。这些磷脂可以这种比例重新进行结合，以得到重组天然混合物 (RNM)，该 RNM 中不含有天然混合物所含的杂质。RNM 是 Elirex™ 的一个具体实例。虽然这个比例是最常见的标准含量比例，但是它可以因各种原因而在很小的范围内变化，改变的原因包括：季节、生长条件、生长区域、收获条件、储存、种子(育种)类型和种子的基因技术，但是不仅仅局限于此。本发明中，这些磷脂的比例不同于发现的天然来源比例，但却更有效。

本发明所述组合物含有活性成分磷脂 PA、PI、LPA、LPI、和 LPC。所含各磷脂的比例范围分别是 0-20:5-20:2-16:0-4:0-8。优选各磷脂的比例范围大约分别是 2-15:8-15:6-10:2-4:2-8。更优选这些磷脂的比例分别是近 10:10:8:2:4 的比例。虽然这些磷脂的结构是确定的，但由于脂链长度和饱和程度的不同而使它们各不相同。通常，这些磷脂具有下列结构式，也包括本领域已知的其他结构的磷脂，但这些磷脂必须能够在任一标准细胞程序死亡试验中产生抗细胞程序死亡应答。

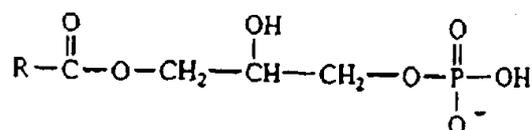
PA 的结构式是：



PI 的结构式是：



LPA 结构式是：

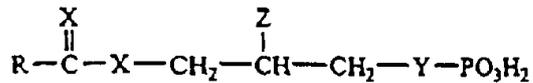


其中 R 是一个非取代或取代的、饱和或不饱和的、直链或支链的、含



有 11 - 23 个碳原子的烷基。

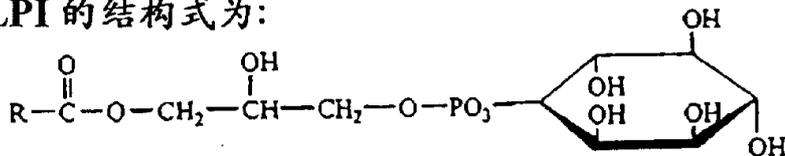
并且，在此所采用的 LPA 含有多种不同的分子，包括结构式如下的 2 - 脱氧 - 或 2 - 脱氧 - 2 - 卤素 - 溶血性磷脂酸化合物，但是不仅仅局限于此：



或 LPA 的可药用盐，其中 R 是一个非取代或取代的、饱和或不饱和的、直链或支链的、含有 11 - 23 个碳原子的烷基；X 分别是 O 或 S；Y 是 O 或 $(\text{CH})_n$ ，其中 $n = 0 - 2$ ；并且 Z 是 H、卤素、 NH_2 、 SH 、 OH 、或 OPO_3H_2 。

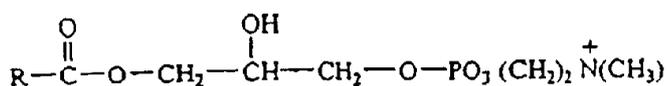
还包括 $\text{RC}(\text{O})\text{O}$ 基，例如，它可以是月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基、棕榈油酰基、油酰基、亚油酰基；优选油酰基、棕榈油酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、或月桂酰基。最优选 16 碳链的棕榈酰基和棕榈油酰基，和 18 碳链的硬脂酰基、油酰基和亚油酰基，但是不排除其他碳链长度的脂肪酸，包括 C12、C14、C20 和 C22，但不局限于此。适当磷脂的具体例子可以参见任何磷脂商品目录，如 (1994) Avanti catalog，具体是其中的第 14 和 21 页。

LPI 的结构式为：



其中 R 是非取代或取代的、饱和或不饱和的、直链或支链的、带有大约 11 - 23 个碳原子的烷基。

LPC 的结构式为：



其中 R 是非取代或取代的、饱和或不饱和的、直链或支链的、带有大约 11 - 23 个碳原子的烷基。

磷脂的可药用盐包括游离酸形式、碱金属盐，例如钠和钾；碱土金属盐，例如钙和镁；无毒重金属盐；铵盐；三烷基铵盐，如三甲基铵和三乙基铵；以及三烷基氧基铵盐，例如三乙醇铵、三(2-羟乙基)铵、和

Tromethamine (三(羟甲基)氨基甲烷), 但是不仅限于此。尤其优选钠盐和铵盐。

组合物中的磷脂可以由市场上买到, 或从多种植物(包括植物的某些部分)和动物中分离到。优选的植物是豆类, 但是磷脂也可以从其他植物中分离得到, 其他植物可包括豆科植物(扁豆和豌豆等), 但不仅限于此。磷脂还可以由纯化的植物提取物中分离出来, 纯植物提取物包括了大豆糖浆、卵磷脂、部分提纯的蛋白浓缩物、部分提纯的蛋白水解物、和其他可从中提取脂的大豆成分, 但不仅局限于此。本领域所属技术人员能够按照在此描述的方法来判断, 是否可以从特定种类的植物、植物提取物和植物的某些部分中分离出本发明所述磷脂。美国专利 3,365,440 中描述了可从豆类中提取到磷脂。

任何可以产生组合物磷脂的植物提取物或其某些部分都适用于本发明。可以利用的植物器官包括了茎、叶、根、花、根状茎、和尤其是植物的储存器官, 如种子、块茎和球茎, 但不仅限于此。所用植物组成部分优选的是储存器官。最优选使用的是干燥的大豆种子。虽然在此使用了术语“种子”和“种子类”, 但应该理解成任何可以产生至少一种本发明所述磷脂的植物组成部分。

可以采用所属技术领域任何已知的方法从植物中获得磷脂, 只要这些方法能够纯化得到至少一种本发明所述磷脂。所属技术领域, 有许多已知的方法是用于纯化和分析植物来源磷脂的。例如, 参见 Bligh 和 Dyer (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917; Patton 等人 (1982) *J. Lipid Res.* 23:190-196; Jungalwala (1985) *Recent Developments in Techniques for Phospholipid Analysis, in Phospholipids in Nervous Tissues* (编辑 Eichberg) John Wiley and Sons, 第 1 - 44 页; Hamilton 等人 (1992) 的系列文献, *A Practical Approach* (Rickwood 等人编辑) IRL Press at Oxford University Press; 和 Kates (1986) *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Burdon 等人编辑) Elsevier.

磷脂还可以来自于动物。优选的动物是哺乳动物, 最优选的是来源于

肝脏细胞的磷脂。这种磷脂可以从市场上买到或采用所属领域的已知方法从动物组织中纯化得到。例如从动物和蛋的卵磷脂，或从 WO 95/15173 所述的组合物中得到。

本发明所述的磷脂还可以采用所属技术领域的已知方法来合成。适宜的半合成磷脂及它们的合成在 Kates 的 *Techniques of Lipidology* (1972) 中进行了描述。

可以使用不同纯度的磷脂。纯度可以采用任何已知的技术方法来进行分析，例如二维的 TLC 和 HPLC，同时也对全脂、磷脂或磷酸酯进行分析。Kates 概括了许多适当的方法。尤其是，磷脂必须达到足够的纯度，当它们被混合且总浓度大约是 10mg/ml 时，混合物可以经下述方法的声处理得到相对透明的溶液。理想的情况是，磷脂至少达到 90 % 的纯度，更优选至少达到 95 % 纯度，最优选至少达到 99 % 纯度。

在应用中，磷脂可以结合也可不结合蛋白质。在此，“结合蛋白”是指任何能够保护 LPA 使之保持其活性的蛋白。结合蛋白的实例包括白蛋白，如牛血清白蛋白 (BSA) 和豌豆白蛋白，但是不局限于此。

能够影响 ElirexTM 组合物活性的其他因素是磷脂的链长、不饱和度、是否含有胆固醇、是否存在微团、脂质体、洗涤剂 and 乳化剂、及 LPA 中链的位置，即链是位于甘油的第一还是第二个碳原子上。毋庸置疑，声处理可以导致脂质体和/或微团或其他多层脂质体的形成，引起 ElirexTM 活性的提高。短链 LPA 不如 C16 和 C18 链的 LPA 更有效。

不容怀疑的是，PA、PI、LPI、和 LPC 的存在被推断为能够保护 LPA，使其不发生降解，并且可以提高 LPA 的生理作用。

本发明进一步涉及了制备 ElirexTM 组合物的方法。各磷脂的比例范围分别是 (PA:PI:LPA:LPI:LPC) 0-20:5-20:2-16:0-4:0-8。优选各磷脂的比例分别是 2-15:8-15:6-10:2-4:2-8。优选的组合物是其所含磷脂以大约 10:10:8:2:4 的重量比例混合。比例值的“大约”是指磷脂比例可以在接近多至 15 % 的范围内变化，但优选其变化不超过 5 % 的范围，更优选比例在 ±0.5% 之间变化。

磷脂可以在任何缓冲溶液中混悬，优选 pH 值为 5 - 8 的含游离二价阳离子的溶液。例如 D - PBS (磷酸盐缓冲盐水，游离的钙和镁盐，

GibcoBRL) 或浓度是 50mM 的含有等渗氯化钠的碳酸氢铵溶液。在用于治疗的组合物中, 优选那些可生理用缓冲溶液。很宽范围的 pH 值都是有效的。优选 pH 介于 5.5-8, 即使任何使 ElirexTM 活性减小的 pH 值也可以被采用。我们发现混合物在 pH 为 8 时具有最高活性。优选的是, 磷脂在浓度为 50mM 且用 0.154M 氯化钠溶液配制的碳酸氢铵溶液中混悬, 溶液 pH 值为 7.7-8.0。

特别是, 为了获得最大活性可以将磷脂混合物破裂。可以采用任何不引起变性或不产生磷脂化学修饰的破裂方法, 其包括了微流化、挤压、和声处理, 但不限于此。通常将混合物进行声处理直至产生光学透明度, 只要不使混合物过热声处理就可以持续进行。本文具体例举了优选的声处理参数。此处的“光学透明度”是指混合物由不透明变成透明。该变化可以很容易地通过肉眼观察到, 而不需要更多地测定。然而, “透明”可以规定为混合物在 600O.D. (光密度) 的条件下吸收度小于 0.2AU。

混合物浓度可以制成近 50mg/ml。优选采用的浓度是 10mg/ml。通常, 间隔 5 分钟进行一次声处理循环, 即 5 分钟的声处理, 随后 5 分钟平衡化作用。然而, 该过程可以根据所处理混合物的体积和声处理产生热量的多少而改变。

需要进行声处理的混合物的浓度和体积、以及声处理器的输出功率决定了声处理所需的总时间。声处理必须持续直至混合物变为透明。通常, 混合物需要 3 - 90 分钟长的声处理。优选的是, 声处理分成数个持续 5 分钟的阶段, 共进行 6 - 12 次这样的阶段, 每个阶段间间隔 1 - 5 分钟, 以使混合物达到平衡及散热。水浴温度不超过约 60 °C; 然而, 混合物能够经高压热处理但不损失活性。优选水浴的温度不超过 37 °C。还优选经声处理过的混合物在使用前应该进行无菌过滤。

ElirexTM 的活性可以通过已知的多种抗细胞程序死亡试验来测定。这些方法包括: 除去血清的 C3H/10T1/2 细胞试验, 该试验通常可参见 PCT 公开号 WO 94/25621 中的详细描述, 此试验是优选的试验方法, 优选方法还包括该参考专利文献实施例 3 中所述方法, 但不仅仅局限于此。另外, 体内细胞程序死亡抑制作用可以通过任何已知的方法进行测定。

本发明还涉及了含有已基本纯化 ElirexTM 的治疗用组合物。组合物所

需的纯度可以通过实验来测定，所属技术领域的技术人员是已知的。组合物适用于如下所述的多种疾病，并且同时适于人用和兽用。

通常，Elirex™ 组合物是可药用的，这是因为它们在治疗剂量范围内具备了低毒性、稳定性、及能够和很多种载体进行混合以满足多种途径给药的性能。Elirex™ 可以单独或与其他有效药用试剂结合使用，其中有效药用剂包括抗生素、创伤愈合剂、抗氧化剂和其他治疗剂，但不仅仅局限于此。适宜的抗生素包括，氨苄青霉素、四环素、氯霉素和青霉素，但不只是这些。适宜的创伤愈合剂包括转移生长因子（TGF-βs）、表皮生长因子（EGFs）、成纤维细胞生长因子（FGFs）和血小板来源生长因子（PDGFs），但不局限于此。适宜的抗氧化剂包括维生素 C 和 E，但不局限于此。

组合物含有至少有效治疗量的一种 Elirex™，并且可以含有至少一种生理用载体。所用的可生理用载体应该是使用后不会对身体产生副作用，而且能够使 Elirex™ 充分溶解以运送有效治疗量的化合物。Elirex™ 的有效治疗量要部分地根据进药的方式、需治疗的病症、和本领域普通技术人员所熟知的其他依据来判断。通常，有效治疗量是指足够缓解所治疗病症中的细胞程序死亡、以及显示出症状改善迹象的用量。尽管由于病症的不同导致有效量范围较宽，并且该有效量可以根据实验来测定，但治疗有效量通常是不低于 0.0001% 重量或 1μg/ml。特殊病症的给药途径将在下面进行讨论，对于本领域技术人员而言是易于理解的。

给药途径包括：局部、透皮、肠胃外、经肠胃的、经支气管和经肺泡的。局部给药是通过局部涂敷含有有效治疗量 Elirex™ 的膏霜、凝胶、漂洗剂等来完成的。局部给药是通过局部施用膏霜、凝胶、漂洗剂等含有有效治疗量的 Elirex™ 的物质完成的。透皮给药是通过涂敷膏霜、漂洗剂、凝胶等物质，以使 Elirex™ 能够透过皮肤进入血流。肠胃外途径的给药包括直接注射，如静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下注射，但不只局限于此。肠胃内途径给药包括食入和直肠给药，但不局限于此。经支气管和经肺泡途径给药包括：经口腔或经鼻腔的吸入，及直接注射到气道中，如通过气管造口术，但是不局限于这些。

当 Elirex™ 单独局部涂敷时，可以根据需要将它们与可局部药用或化

妆品用载体共同制成混合物来给药。此处的“局部可药用载体”是指任何基本无毒的、局部给药的常规用载体，载体中的 Elirex™ 能够在直接应用于皮肤或粘膜表面时保持其稳定性和生物作用。例如，Elirex™ 可以以常规方式溶解在液体中，或在介质中分散或乳化以形成液体制剂，或与半固体（凝胶）或固体载体混合以形成糊剂、粉剂、软膏剂、膏霜、洗剂等等，但不局限于此。

适宜的可局部药用载体包括水、石油膏（凡士林）、矿脂、矿物油、植物油、动物油、有机和无机蜡，例如微晶、石蜡和地蜡，天然聚合物，例如黄原胶、明胶、纤维素、胶原蛋白、淀粉、或阿拉伯树胶，合成聚合物，例如在下面将讨论的物质、醇、多羟基化合物等等。载体可以是水溶性载体组合物，它基本溶于水。这些水溶性的、可局部药用的载体组合物不仅可以包括一种或多种上述适当的组分，还可以包括持续或缓慢释药用载体，载体包括含水性、水分散性或水溶性组合物，例如脂质体、微绵体、微球或微囊、含水基质软膏、油包水或水包油乳化剂、凝胶或类似物。

本发明的一个具体方案中，可局部药用载体包括了长释或缓释用载体。载体是任何能够长释或缓释 Elirex™ 以达到更有效给药效果的物质，应用它们可以达到减少一次或数次 Elirex™ 的给药次数和/或减少 Elirex™ 给药剂量、易于使用、及延长或延缓对皮肤病症作用的效果。载体在任何油性、脂肪、蜡、或潮湿环境条件中，都能够通过扩散或释放作用将 Elirex™ 释放于需治疗的患处，这就要根据载体对 Elirex™ 的负载水平来决定，以便达到 Elirex™ 被释放的效果。这类载体的非局限实例包括：天然或合成的脂质体、微绵体、微球、或微囊等等。适于在潮湿环境中持续或缓慢释放的载体实例包括：明胶、阿拉伯胶、黄原烷聚合物；有 Elirex™ 负载水平的物质有木质素聚合物及其类似物；油性、脂肪或蜡质环境包括了热塑性树脂或软质热固性树脂或高弹体，其中的热塑性树脂，例如聚卤乙烯、聚乙烯酯、聚偏卤乙烯和卤代聚烯烃，高弹体例如是 brasiliensis、聚二烯、和卤代天然或合成橡胶；及软质热固性树脂，例如聚氨基甲酸乙酯、环氧树脂及其类似物。长释或缓释载体优选脂质体、微绵体、微球或凝胶。

本发明的皮肤病病症治疗方法中，将所用的组合物直接涂敷在需治疗



的患处。若无特殊需要，局部用组合物将在所需部位维持大约 24 - 48 小时以释放 ElirexTM。

如果需要，可以将一种或多种的、在局部药用或化妆品组合物的常规用附加成分与载体结合，例如增湿剂、湿润剂、矫味剂、缓冲剂、颜料、防腐剂、维生素如 A、C 和 E、乳化剂、分散剂、浸润剂、气味调节剂、胶凝剂、稳定剂、推进剂、抗微生物剂、防晒剂、酶等等。局部药物制剂领域的技术人员能很容易地选择出适当的特定附加成分和它们的用量。适当的附加成分的非限定性实例包括：超氧化歧化酶、十八烷醇、肉豆蔻酸异丙酯、山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、丙二醇、水、十二烷基硫酸碱金属或碱土金属盐、羟苯甲酸甲酯、辛基二甲基 - 对 - 氨基苯甲酸 (Padimate O)、尿酸、网硬蛋白、粘多糖、羟乙基淀粉 (例如， DuPont Pentafraction)、透明质酸、芦荟、卵磷脂、聚氧乙烯山梨醇单油酸酯。聚乙二醇、维生素 A 或 C、生育酚 (维生素 E)、 α - 羟基或 α 酮基的酸如丙酮酸、乳酸或乙醇酸，或任何在美国专利 4,340,586，4,695,590，4,959,353，或 5,130,298 和 5,140,043 中公开的局部用成分。

由于需治疗的皮肤病病症是肉眼可见的，局部用载体还可以是局部化妆品用载体。此处的“局部化妆品用载体”表示任何基本无毒的、局部用化妆品的常规用载体，这些载体中的 ElirexTM 在直接涂敷在皮肤表面时仍然保持其稳定性和生物有效性。适当的化妆用载体是所属领域技术人员熟知的，可以包括化妆用的液体、膏霜、油、洗剂、软膏剂、凝胶、或固体，例如化妆晚霜、粉底霜、晒黑洗剂、防晒剂、手部洗剂、化妆品和化妆品基质、面膜等等，但是不局限于此。因此，局部化妆品用载体基本与可药用载体相似，但常不相同；事实上，对于可药用载体的早期探讨也适于化妆品用载体。组合物可以含有其他化妆品常规组分，包括香料、雌激素、维生素 A、C 或 E、 α - 羟基或 α - 酮基酸，例如丙酮酸、乳酸或乙醇酸，羊毛脂、凡士林、芦荟、羟苯甲酸甲酯或丙酯、颜料及其类似物。

组合物中，治疗皮肤病病症或疾病所需的 ElirexTM 有效量可以根据下列因素而改变，即皮肤症状、皮肤老化程度、磷脂的特定比例或所用磷脂的纯度、制剂和所用载体的类型、给药频率、被治疗个体的整体健康状况，及类似因素。所属领域技术人员可以根据这些因素和本文内容来决定任何

特定患者所需的准确用量。优选组合物在 1 天内至少给药两次但不超过六次，或者，当使用长释或缓释剂型时减少给药次数。

局部、口服和肠胃外给药的组合物通常含有占组合物总重量约 0.001%-10%重量的 Elirex™，优选含有约占组合物 0.01%-2%重量的 Elirex™，特别优选 Elirex™ 约占组合物总重量的 0.1%-1.5%。

局部用组合物的给药是将其在需治疗皮肤或粘膜的患处涂敷成覆盖层或膜层。为了简便，只将涂敷用物质擦抹在患处。涂敷是不需要将药抹入皮肤内，形成的膜层或覆盖层可在皮肤上保持过夜。

本发明所述组合物适用于透皮给药，包括但不限于：可药用洗剂、混悬剂、油、膏霜、软膏剂、漂洗剂、凝胶、以及脂质体载体，该脂质体载体是混悬于适当赋形剂中的，其中含有有效治疗量 Elirex™。这些组合物直接涂敷在皮肤上，或与保护性载体混合，例如透皮制剂（称为“贴剂”）。适当的膏霜、软膏剂等实例，例如可以在 Physician's Desk Reference 中查到。适合的透皮制剂有具体的描述，如美国专利 4,818,540（Chien 等人）。

本发明涉及了适于肠胃外给药的 Elirex™ 组合物，不只包括可药用的无菌等渗溶液。这些溶液包括 Elirex™ 在静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下注射时所需的生理盐水和磷酸盐缓冲盐水。

本发明涉及了适于经胃肠给药的 Elirex™ 组合物，包括可药用的、口服给药的粉剂、丸或液体，及直肠给药的栓剂，但不局限于此。

本发明涉及了适于经支气管和经肺泡给药的 Elirex™ 组合物，包括各种可药用的、吸入用的气雾剂，但是不仅是这些。以气雾剂剂型给药的具体药物是五肽，该药物是通过吸入给予 AIDS 病患者以预防由卡氏肺囊虫诱发的肺炎。

本发明进一步涉及了适于经支气管和经肺泡给予 Elirex™ 的装置。该装置包括但不限于雾化器和汽化器。本发明还涉及了电子注射和直接注射的装置。电子注射，或称离子电渗疗法，是一种采用很小的电流使带电荷的元素、化合物和药物透过皮肤以使治疗药物转运到局部组织或全身的方法，该方法不对皮肤造成破坏。

本发明涉及了适于移植前器官储存的溶液。Chien 等人（1993）在“Hibernation Induction Trigger for Organ Preservation” in Medical



Intelligence Unit, R.g. Landes Co. Ausin, TX. 对适用的溶液进行了描述。ElirexTM 可以用来, 例如, 代替和改进通常使用的极其不纯的大豆制品。

上述组合物是为了说明适于本发明 ElirexTM 给药的组合物, 但不局限于此。生产不同种类组合物的方法是所属领域技术人员所能够了解的, 在此不详细描述。

生产适当注射用、局部涂敷用装置, 如雾化器和汽化器, 的方法也是所属领域技术人员所能够了解的, 在此不详细描述。

本发明还提供了与细胞程序死亡相关的病症的治疗方法, 该方法包括给予一定量 ElirexTM 以有效地抑制细胞程序死亡。在这些方法中需给予有效治疗量的、包括上述组合物在内的可药用组合物。“有效治疗量”是指能够达到有效作用或所需临床效果的量。有效治疗量可以一次或多次给予。许多与细胞程序死亡相关的但能够治疗的疾病包括: 皮肤老化作用、局部缺血后的再灌注作用、免疫抑制、胃肠紊乱症、心血管紊乱、组织移植排异、创伤愈合、和阿尔茨海默氏病症, 但不局限于此。

与免疫抑制有关的病症是由于多种刺激引起的, 这些刺激包括: 病毒, 包括但不限于 HIV 病毒, 化疗剂、和辐射。这些刺激引发了许多病症中的细胞程序死亡, 不仅仅包括消化道组织和相关胃肠性的紊乱。

胃肠紊乱包括但不限于肠内膜损伤、严重的慢性溃疡、结肠炎、辐射诱发的损伤、化疗引发性损伤、寄生虫导致的胃肠道紊乱症、和由任何其他原因造成的腹泻。许多病毒性和细菌性感染会导致胃肠紊乱; ElirexTM 还适合治疗这些感染伴随的副作用。ElirexTM 特别适于用来改善化疗引发的胃肠紊乱症。现已知道, 用氨甲蝶呤和磷脂处理的大鼠与空白对照动物相比, 遭受较小的喂食困扰且没有腹泻。如下所示, 优选的 ElirexTM 实施方案比天然来源的、不纯的磷脂混合物, 有超过 200 % 的抗细胞程序死亡活性。因此, ElirexTM 不仅适用于预防化疗诱发的腹泻还可以预防恶心。

ElirexTM 尤其适于治疗动物的各种胃肠疾病, 特别是家畜。这些病症, 尤其是腹泻, 造成许多幼仔损失。胃肠疾病的治疗优选以胃肠方式给药。对于家畜, 有效量的 ElirexTM 通常是与饲料混合在一起。对于人, 可以通过任何所属领域所熟知的胃肠给药方法来给予。优选口服。

另外, 可以将 ElirexTM 给予免疫缺损患者, 尤其是 HIV - 阳性患者,

以达到预防或至少是缓解那些与疾病有关的 T 细胞的程序死亡，该细胞程序死亡会导致免疫缺损症恶化，正如所看到的那样，病人体内会患上恶性膨胀的 AIDS。优选通过肠胃外方式给予这类患者以 Elirex™，但也可以是透皮或经胃肠给药。

Elirex™ 还可以用来治疗与再灌注损伤相关的细胞程序死亡，该再灌注损伤涉及多种疾病，包括但不限于冠状动脉梗阻、大脑梗塞、脊柱/头部创伤和伴随性的严重麻痹、其他损害造成的再灌注损伤，例如冻伤，以及任何以往认为可以用超氧化物歧化酶（SOD）治疗的病症。氧自由基在心脏疾病中的作用的综述可以参见 Singal（1988）“Oxygen Radicals in the Pathophysiology of Heart Disease” Kluwer Academic Publishers, MA, USA.

心肌梗塞和脑梗塞通常是由突发性动脉或静脉血供应不足造成的，这种供血不足是由气栓、血栓、或压力引起并造成微小区域的坏死；心脏、脑、脾、肾、肠、肺和睾丸都容易受到影响。血液再灌注造成梗塞，而细胞程序死亡则出现在梗塞区域的周围组织中；因此，须在刚形成梗塞在再灌注过程中或梗塞形成后很短时间内就给予 Elirex™，这样才能达到治疗效果。

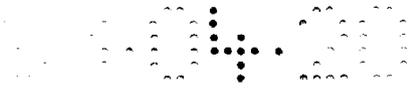
因此，本发明涉及与再灌注相关的细胞程序死亡的治疗方法，该方法包括给予需要这种治疗的患者以有效治疗量 Elirex™。

本发明进一步涉及减轻与心肌和大脑梗塞有关的细胞程序死亡和再灌注损伤的方法，患者在梗塞时会有心脏病发作和心脏搏动的危险，该方法是给予需要这种治疗的患者以有效治疗量的 Elirex™。

优选肠胃外给予本发明所述组合物来治疗再灌注损伤。任何其他适合的方法也可使用，例如心肌梗塞时直心脏注射。这种注射的装置是所属领域技术人员熟知的，例如，Aboject 心肌注射器。

本发明还涉及了在哺乳动物器官、组织、和细胞培养与保藏过程中抑制和预防细胞发生程序死亡的方法。该方法是将有效量的 Elirex™ 加入到任何种的介质或溶液中，该介质和溶液是所属领域中常用于培养或保藏哺乳动物器官、组织、和细胞的。

本发明又涉及了技术人员所熟知的、用于培养和保藏哺乳动物器官、



组织和细胞的介质和溶液，该介质和溶液中含有一定量的 ElirexTM，以有效地抑制或预防培养细胞发生的程序死亡。

本发明上述方面涉及了哺乳动物细胞培养用介质，该介质包括至少一种有效量的 ElirexTM，及应用该介质来抑制或预防哺乳动物细胞培养中的细胞程序死亡。有效量是指能够降低细胞程序死亡速率的量。现在发现，ElirexTM 能够抑制或预防细胞在受到轻度损伤情况下发生的细胞程序死亡，这种损伤通常会诱发细胞程序死亡。这种损伤包括但不限于低度辐射、冷冻细胞贮存物的解冻、温度、pH、渗透性、或培养介质离子浓度的快速改变、长期在不适温度、pH、渗透性、或培养介质离子浓度下暴露、与细胞毒素接触、原始细胞培养制备中细胞从完整组织解离下来、无血清生长（或无血清介质中的生长）。

本发明涉及了含有组织培养介质和有效量 ElirexTM 的组合物。将 ElirexTM 作为抗细胞程序死亡介质添加剂加入到无血清介质中，无血清介质包括但不限于：AIM V® 介质、Neuman 和 Tytell's 无血清介质、Trowell's T8 介质、Waymouth's MB 752/1 和 705/1 介质、和 Williams' 介质 E。除了无血清介质以外，还有其他适当的哺乳动物细胞培养介质，该培养介质也能够与作为抗细胞程序死亡介质添加剂的 ElirexTM 混合，包括 Eigel 基础培养基、Fisher's 介质、McCoy's 介质、介质 199、RPMI 介质 1630 和 1640、以 F-10&F-12 营养混合物为基础的介质、Leibovitz's L-15 介质、Glasgow 极限必需介质、和 Dulbecco 改进的 Eagle 介质，但是不仅限于此。可含有 ElirexTM 的哺乳动物细胞培养介质还可以进一步是任何所属领域技术人员已知的介质添加剂，包括蔗糖、维生素、激素、金属蛋白质、抗生素、抗真菌素、生长因子、脂蛋白和血清，但不限于此。

本发明还涉及哺乳动物移植前用的器官保藏溶液，以及这种溶液应用于抑制或预防哺乳动物器官在移植前的手术摘除和外科处理中的细胞程序死亡，其中该溶液包括有效量的 ElirexTM。就所有情况而言，抑制和预防细胞程序死亡所需的 ElirexTM 浓度可以通过所属领域技术人员按照例如本发明下列实施例所描述的方法，以及本领域其他已知的方法进行实验性测定。

ElirexTM 被认为可以局部涂敷在皮肤上以治疗多种皮肤病病症。这些

病症包括但不限于：衰老造成的皱缩或松弛和/或失去光泽或鳞皮病。从而本发明涉及了皮肤病治疗方法。另外，秃发是由毛囊细胞程序死亡造成的。因此，适合采用 Elirex™ 的皮肤局部治疗方式来防止连续脱发。Stenn 等人 (1994) J.Invest.Dermatol.103:107-111。

如上所述，优选采用含有效量 Elirex™ 的组合物的局部涂敷方式来治疗这些病症。有效量的 Elirex™ 是指可以改善或减轻皮肤病症状的用量。尤其是，能够达到消除皮肤病病症或恢复正常皮肤功能的治疗效果；然而，本发明也包括所有对疾病症状的改善或缓解。

下来的实施例是用来说明本发明，但不局限于此。

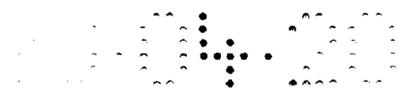
实施例 1：最佳重组混合物的合成

将从市场购买到的纯化大豆磷脂 PA、PI、LPA、LPI、LPC (例如，得自 Avanti® Polar Lipids, Inc.) 悬浮在 pH 为 8.0 且含有 154mM NaCl 的 50mM 碳酸氢铵溶液中，或含有游离二价阳离子的 pH 在 5 - 8 范围内的缓冲水溶液中。可以使用总浓度大于 10mg/ml 的磷脂溶液，但需经声处理后达到透明。所用磷脂的最高总浓度大约是 50mg/ml。

通常，磷脂混合物混悬在缓冲液中，混合物放置在一次性的硼硅酸盐玻璃杯中，优选使用 2 - 3ml 的 16 × 100mm 的试管或 1.2ml 的 13 × 100mm 试管，或 1ml 的 12 × 75mm 试管。然后将混合的磷脂进行声处理。优选采用小型浴式声处理器，例如带有大小为 9 × 19cm 椭圆型浴槽的 Branson 200 型声处理器，声处理频率是 40kHz 并且耗电率是 24W。水浴温度在 21 - 40 °C 范围内。优选在 25 - 37 °C 之间。水位高度调至接近于试管内磷脂混合物的高度。另外，还可以采用探针式声处理器 (Fisher Scientific Sonic Dismembrator model 550) 进行处理，但是要防止混合物过热。

混合物进行声处理的时间是在 3 - 90 分钟内，该声处理过程中，先进行 5 分钟声处理，随后放置 5 分钟以使混合物达到平衡，将声处理过程和平衡过程交替进行直至混合物变成透明溶液，并且该混合物能很容易地通过过滤器而被吸入到孔径是 0.22μm 的 5ml 注射器内。

Elirex™ 在不同温度下的稳定性如附图 1 所示。Elirex™ 是在 4 °C、室温、和 65 °C 下储存一周。所得结果表明，Elirex™ 在 65 °C 条件下储存



会造成活性损失，但在 4℃ 或室温下没有发生显著的活性损失。

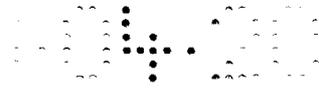
各磷脂组分的最佳比例可以通过将各纯化磷脂以不同比例混合、并且每次改变一种磷脂组分的方法来测定。实施例 2 中对各种混合物抗细胞程序死亡活性进行了分析。当确定最佳相对配比后，可以通过改变最有效磷脂组分的比例来发现最佳绝对活性。下表表示最终测试的配比。

PA:	PI:	LPA:	LPI:LPC
10:	10:	2:	2:1(RNM)
10:	10:	2:	2:2
10:	10:	2:	2:4
10:	10:	4:	2:4
10:	10:	4:	2:1
10:	10:	4:	2:2
10:	10:	8:	2:4(Elirex™)

所得结果如附图 5 - 6 所示。LPA 的浓度随链长度进行改变，以测定这些参数对活性的作用。Elirex™ 在不同温度下的稳定性如附图 1 所示。

实施例 2 采用 C3H/10T1/2 细胞进行的细胞程序死亡分析试验

为了测定 Elirex™ 的抗细胞程序死亡活性，采用下面所述试验。PCT 公开号 WO94/25621 和 WO95/15173 中描述了细胞分析试验。简单地说，将 C3H/10T1/2 克隆 8 细胞在 50 - 58 % 融合的条件下和呈指数生长期下进行分析试验，该细胞指数生长期是随机分布的细胞周期位置，没有处于 G₀ 期和静止状态的细胞。在试验开始前，将 2000 个细胞/ml (5ml, 在 60mm 培养平板中) 育种 5 天，以使细胞呈指数生长状态。当 T = 0 时，将作为细胞程序死亡刺激因素的培养物转移到无血清介质中，将种子提取物加入其中。空白对照物含有 10⁻⁷ 和 5 × 10⁻¹M 的 12 - O - 十四烷酰佛波醇 - 13 - 乙酸酯 (TPA)，以保证细胞培养的反应性。将 Elirex™ 样品加入无血清介质中，并且当加入到培养基之前将其无菌过滤。分析试验以一式三份或四份的平行试验进行。细胞应答试验是在含有或不含有 Elirex™ 的无血清物中在 18 - 28 小时进行。在各自含有不同细胞数量的细胞培



养平板中进行两种分析试验。

1. 将所有非粘附性或松散粘附细胞从培养皿中转移出来并采用适当的技术来计数，通常是使用电子颗粒计数器。这些是程序死亡性细胞，即无血清释放细胞（SDR），是在无血清介质培养的作用中释放出来的。通过紫外结构分析和 DNA 片段分析法看出，这些释放细胞中的近 95 % 是程序死亡细胞。

2. 将保留的粘附性细胞与缓冲液接触，常采用的缓冲液是平衡盐溶液，例如 pH 为 7.3、不含有钙和镁盐的、含有 0.05% 胰蛋白酶和 0.53mM 乙二胺四乙酸（EDTA）的 Hanks 平衡盐溶液。在室温或 37 °C 条件下将各培养物温育，该温育是在振摇平台上进行，这样可以保证胰蛋白酶试剂能均匀分布在培养物表面。当达到标准时间阶段后，通常是 10 分钟，将释放细胞从各培养皿中转移出来，并且按照上述的方法测定，通常采用电子颗粒计数法。该 ADH 细胞计数包括了胰蛋白酶耐受性细胞和胰蛋白酶敏感细胞，如 PCT WO94/25621 所述。

抗细胞程序死亡活性是以计算出来的材料浓度（ $\mu\text{g/ml}$ 的介质）来表示，该浓度是指能够使 50 % 经无血清处理释放的细胞存活的浓度。

由程序死亡细胞试验中得到的结果如附图 7 - 8 所示。在附图中，发生程序死亡的细胞（SDR）和粘附性细胞（ADH）的百分率是分别表示的。附图所示数据证明，ElirexTM 组合物有效地减少了融合细胞的程序死亡，该结果是相比于 Eagle 基础培养基（BME）的无血清空白对照而言的。

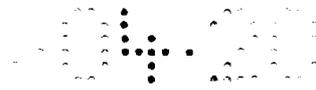
实施例 3

pH 和盐浓度对 ElirexTM 的抗细胞程序死亡活性的影响

在不同的 pH 和盐浓度条件下测定 ElirexTM 组合物的抗细胞程序死亡活性。

ElirexTM 活性测定是按照实施例 1 中所述，将磷脂重新混悬在 pH 为 8.0 的碳酸氢铵、或 pH 为 6.5 的磷酸钠、或 pH 为 6.5 的 HEPES、或 pH 为 5.0 的醋酸钠溶液中，上述溶液的浓度都是 50mM 并且含有 154mM（等渗）氯化钠。附图 1 表示所得的结果，其中 pH 为 8 时活性最高。

为了测定溶液所含盐浓度对活性的影响，将 pH 为 8 的溶液在氯化钠浓



度分别为 0、100、500 和 1000mM 的条件下进行测定。为了处理细胞，所有样品都先制备成浓溶液，然后用 BME 稀释。最佳盐浓度是在 100 - 200mM 之间，但结果并没用图表示。

还做了不同温度下的贮藏稳定性试验。所有溶液在 4、37 和 69 °C 下储存一周然后测定它们的活性。所得结果在附图 1 中表示。

最佳的溶液是含有 105mM 氯化钠的 50mM 溶液碳酸氢氨溶液，该溶液 pH 值为 8，并且储存在 4 °C 条件下。

虽然本发明通过一些具体的说明和实施例来使本发明发明目的易于理解，但很显然地是，所属领域的技术人员一定能够在实际工作中作出进一步的改进和修饰。因此，本发明的说明和实施例不能作为本发明保护范围的限定，本发明将在权利要求书中另有规定。

说明书附图

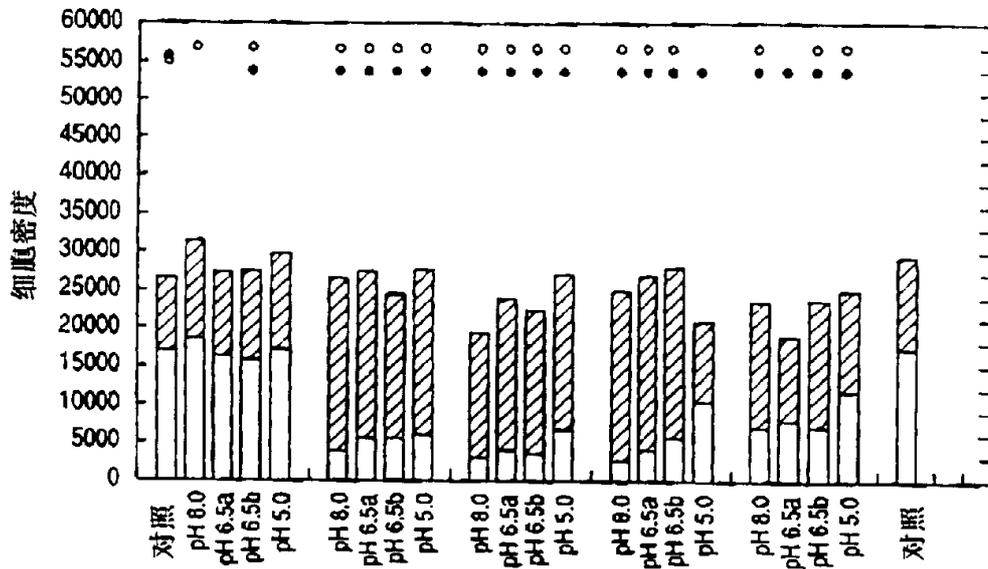


图 1A

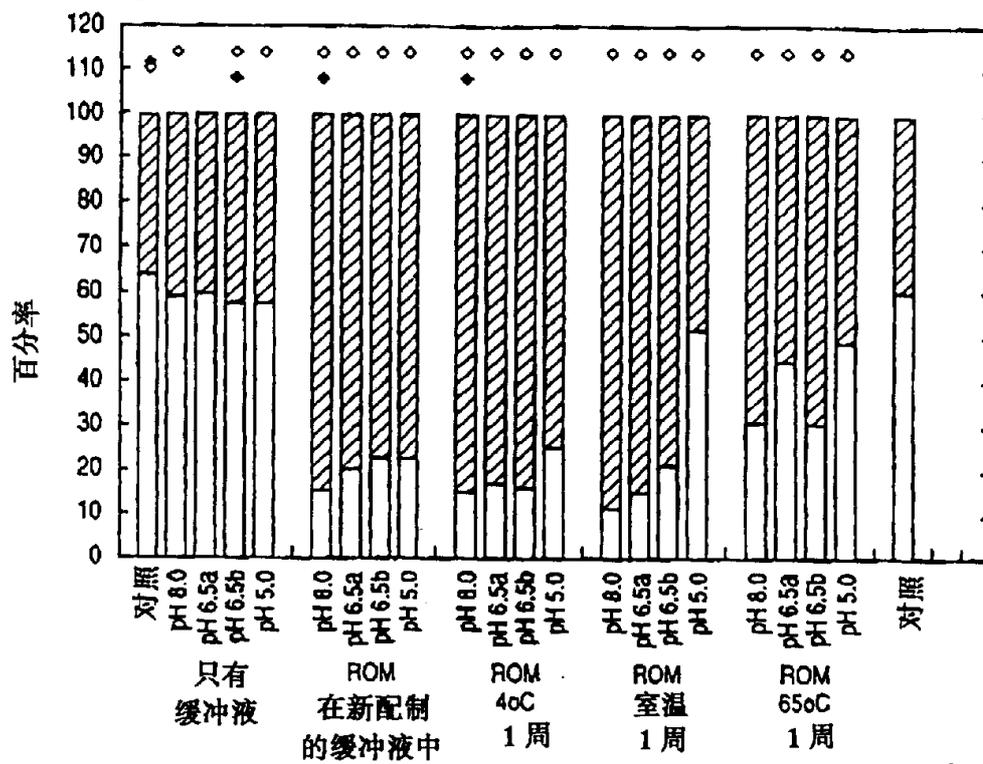


图 1B

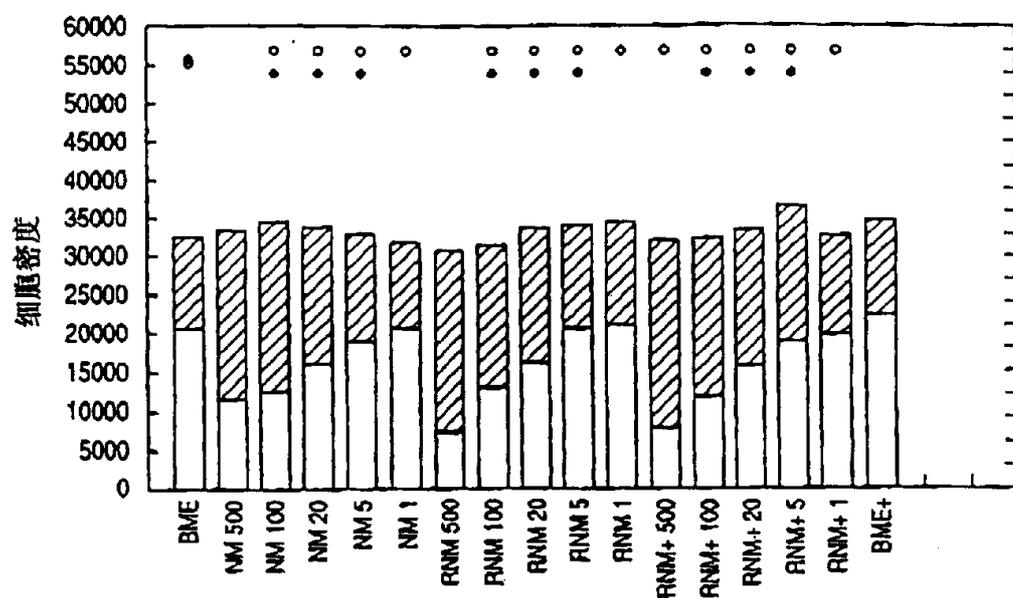
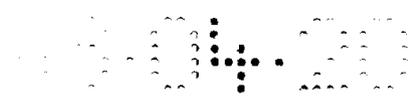


图 2A

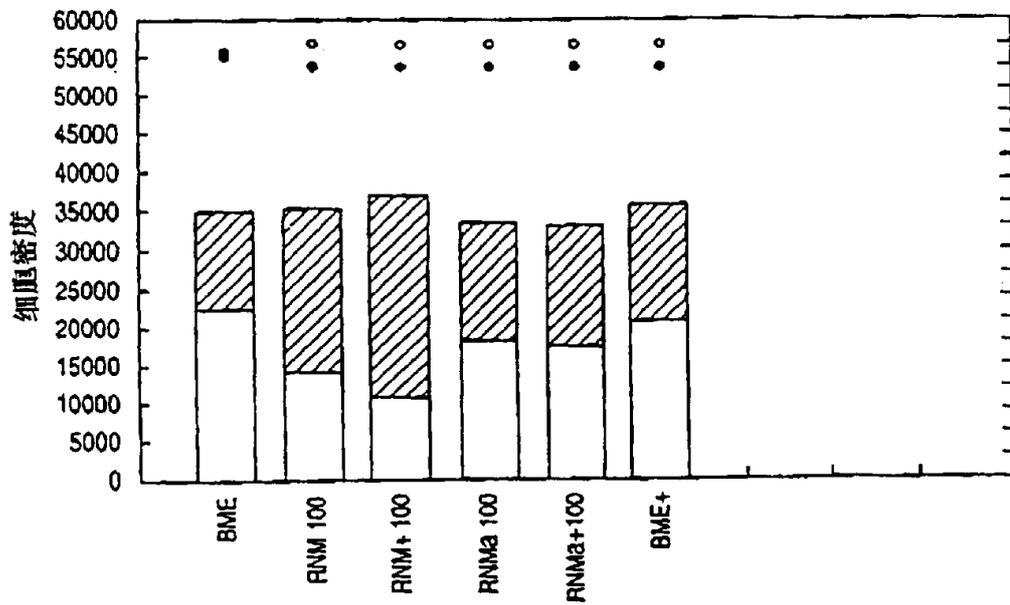
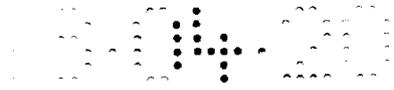


图 3A

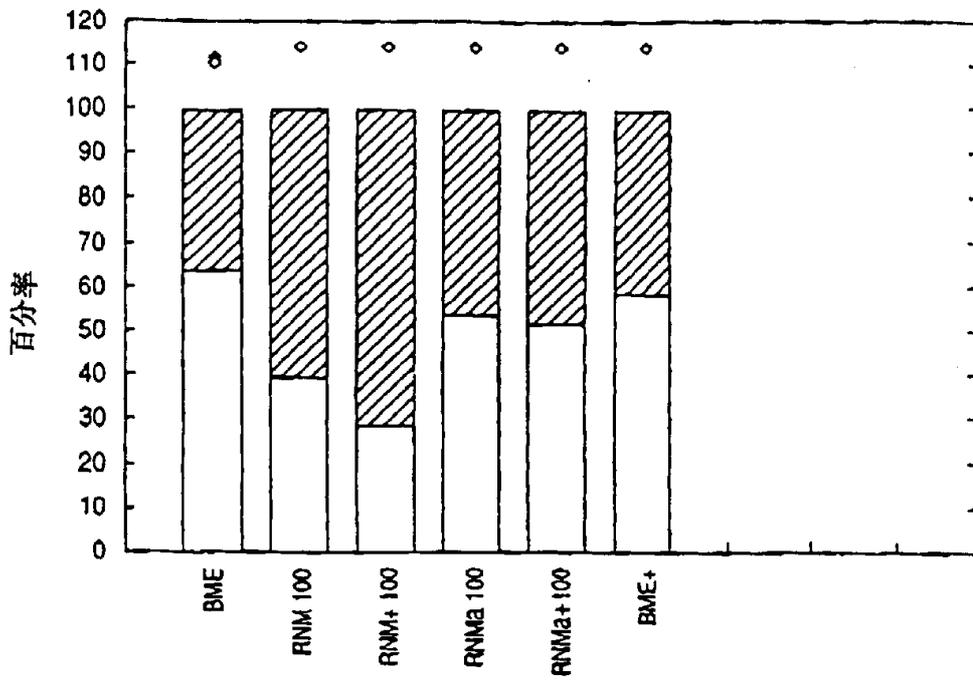
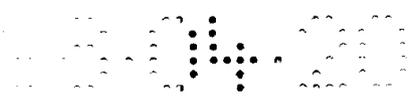


图 3B

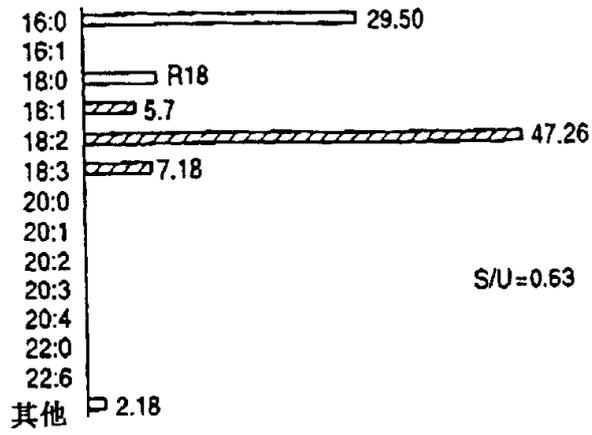
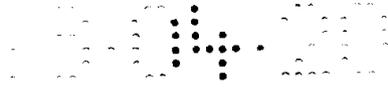


图 4A

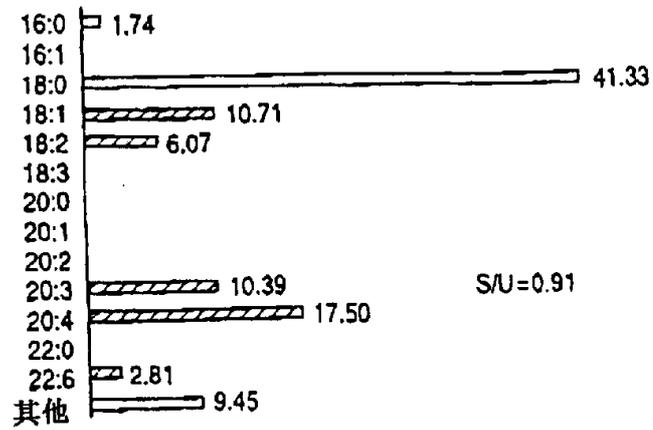


图 4B

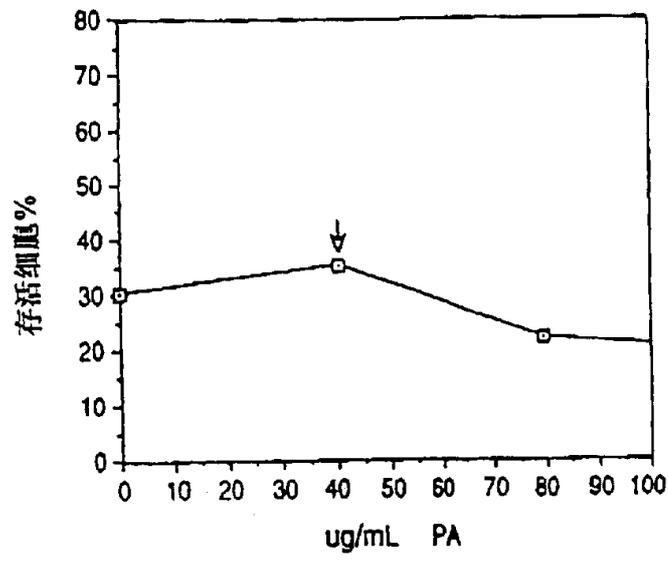


图 5A

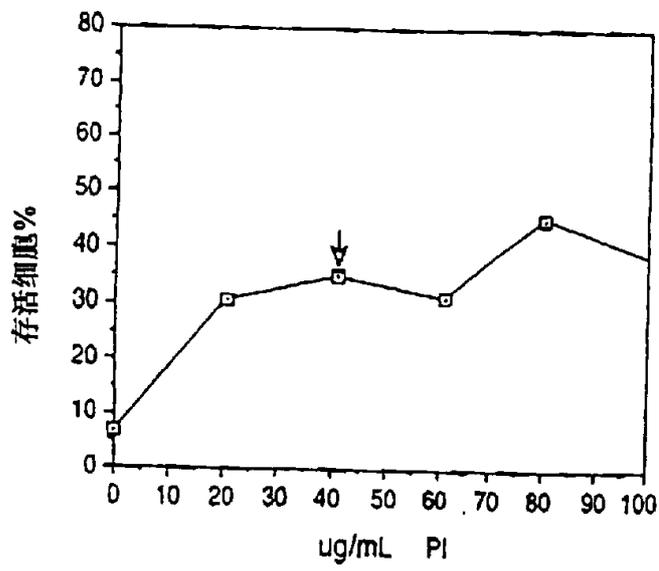


图 5B

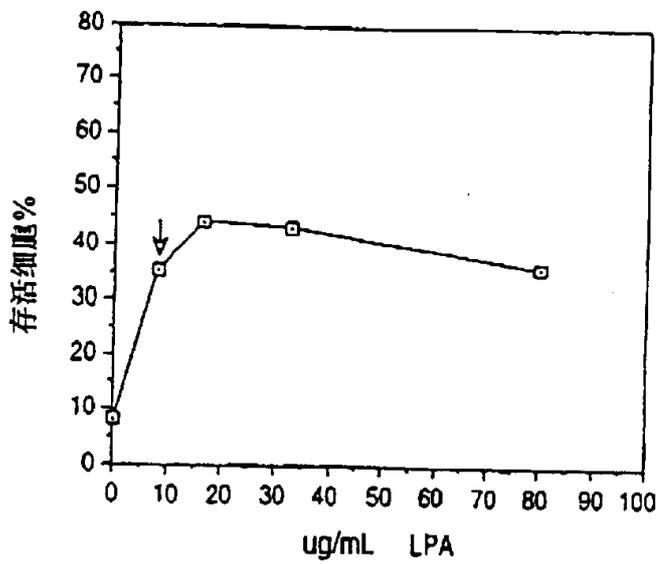


图 5C

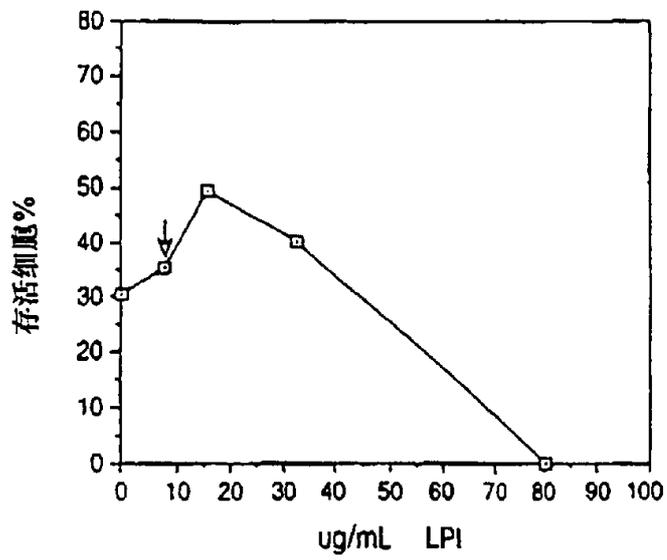


图 5D

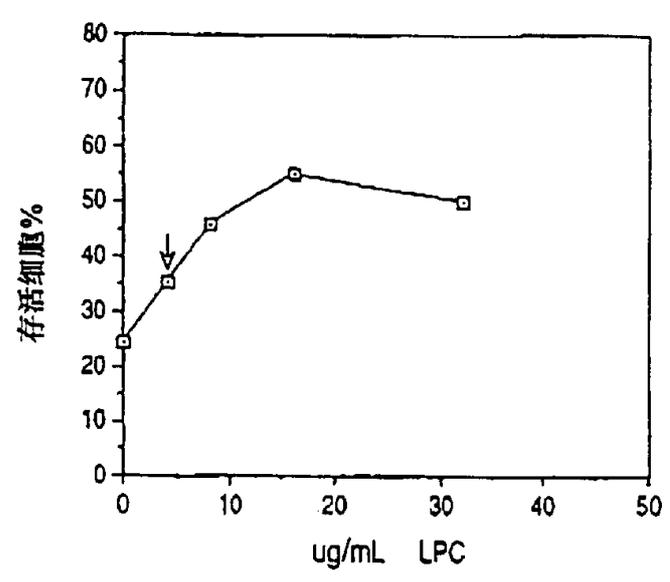


图 5E

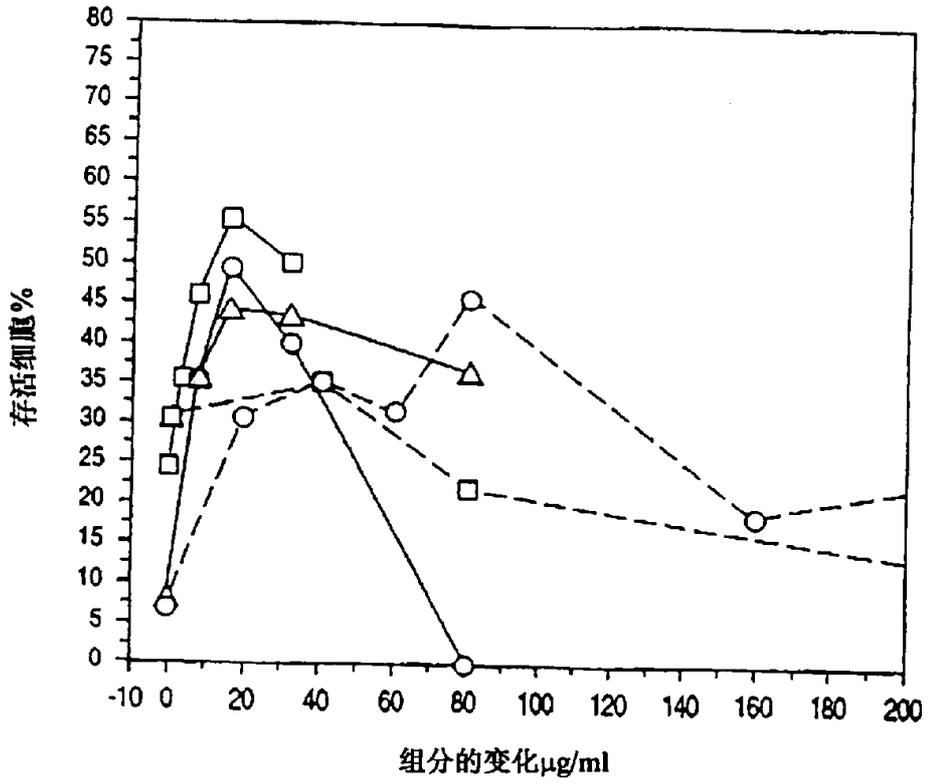


图 6

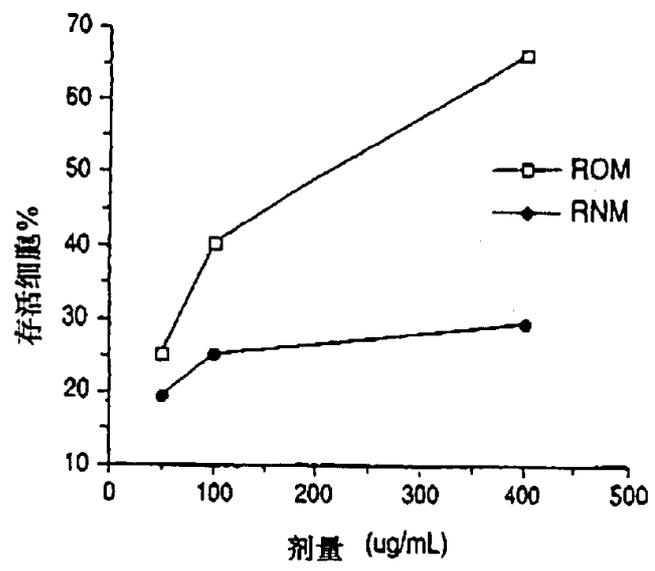
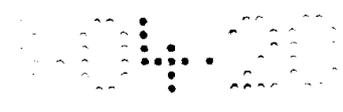


图 7

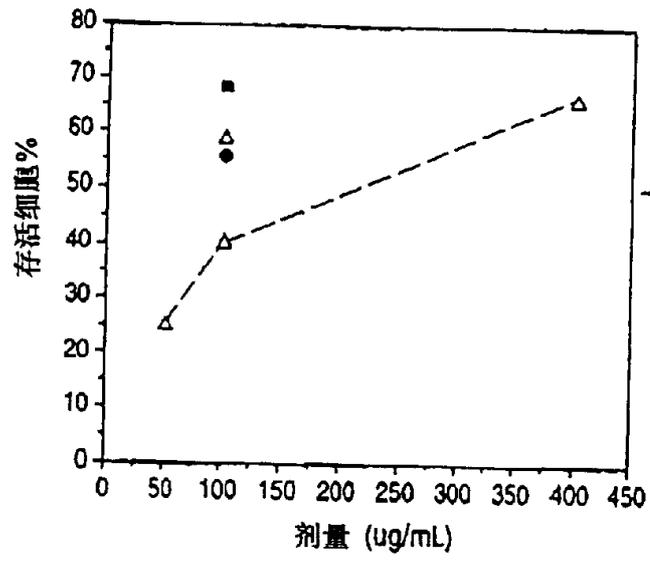


图 8