(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101360999 B
(45)授权公告日 2013.07.17

(21)申请号 200680051597.6
(22)申请日 2006.11.22
(30)优先权数据
60/739,570 2005.11.22 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2008.07.22
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2006/045169 2006.11.22
(87)PCT申请的公布数据
WO2007/062101 EN 2007.05.31
(73)专利权人 麦吉尔大学
地址 加拿大魁北克
(72)发明人 H·U·萨拉戈维
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平
(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

(56)对比文件
WO 2004069258 A2,2004.08.19, 全文.
WO 2005060542 A2,2005.07.07, 全文.
CN 2237430 Y,1996.10.16, 全文.
Marcelo Rudzinski et al..Changes in Retinal Expression of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors Induced by Ocular Hypertension.《Journal of Neurobioligy》.2004, 第58卷(第3期), 第350页左栏最后一段.

审查员 刘涛

权利要求书1页 说明书22页 附图5页

(54)发明名称

眼内压调节早期基因及其用途

(57)摘要

本发明涉及通过调节由高眼内压介导的基因表达的改变来治疗青光眼和青光眼相关疾病的方法。用药物组合物治疗青光眼、视网膜神经节细胞(RGC)死亡和慢性高眼压,该药物组合物含有抑制被高眼内压上调的眼内压调节早期基因(IPREG)或其基因产物的表达或活性和/或提高被高眼内压下调的IPREG或其基因产物的表达或活性的物质。本发明还涉及鉴定IPREG的方法和通过测定IPREG蛋白质的表达水平检测个体中的慢性眼退化和RGC应激发生的方法。

CN 101360999 B

1. 抗 α 2 巨球蛋白抗体在制备用于治疗哺乳动物的青光眼的药物中的用途。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述药物被配制成用于通过至少一种选自眼内注射、局部结膜应用、局部角膜应用和机械递送装置的方法施用。

3. 权利要求 2 的用途，其中所述抗 α 2 巨球蛋白抗体进一步被配制为与一种或多种眼内压正常化药物进行施用。

4. 权利要求 3 的用途，其中所述一种或多种眼内压正常化药物选自非选择性肾上腺素受体阻断剂、选择性肾上腺素受体阻断剂、前列腺素、碳酸酐酶抑制剂、肾上腺素能激动剂和缩瞳药。

5. 权利要求 4 的用途，其中所述眼内压正常化药物是倍他洛尔。

6. 抗 α 2 巨球蛋白抗体在制备用于预防由高眼内压 (IOP) 介导的视网膜神经节细胞 (RGC) 死亡的药物中的用途。

7. 权利要求 6 的用途，其中所述抗 α 2 巨球蛋白抗体进一步被配制为与一种或多种眼内压正常化药物进行施用。

8. 抗 α 2 巨球蛋白抗体在制备用于预防哺乳动物的与上调的 α 2 巨球蛋白表达相关的慢性眼退化的药物中的用途。

9. 权利要求 8 的用途，其中所述抗 α 2 巨球蛋白抗体进一步被配制为与一种或多种眼内压正常化药物进行施用。

10. 抗 α 2 巨球蛋白抗体在制备用于检测患者的与上调的 α 2 巨球蛋白表达相关的慢性眼退化的试剂中的用途，其中所述检测包括 ：

a) 测定患者房水中的 α 2 巨球蛋白的表达水平 ；和

b) 将所述表达水平与具有正常眼功能的个体中相同的 α 2 巨球蛋白的表达水平进行比较，

其中与具有正常眼功能的个体中 α 2 巨球蛋白的表达相比，α 2 巨球蛋白的较高的表达水平和 / 或 α 2 巨球蛋白的较低的表达水平表示该患者具有慢性眼退化。

11. 抗 α 2 巨球蛋白抗体在制备用于检测患者中的与高眼内压相关的 RGC 应激的发生的试剂中的用途，其中所述检测包括 ：

a) 在最初时间点测定患者房水中 α 2 巨球蛋白的表达水平 ；

b) 在以后的时间点测定患者房水中 α 2 巨球蛋白的表达水平 ；和

c) 将在最初时间点测定的 α 2 巨球蛋白的表达水平与在以后时间点测定的表达水平进行比较，

其中患者中较高的 α 2 巨球蛋白的表达水平和 / 或较低的 α 2 巨球蛋白的表达水平表示该患者中 RGC 应激的发生。

12. 一种药物组合物，其含有有效量的抗 α 2 巨球蛋白抗体和适当的药物载体，其中施用该组合物以治疗青光眼。

13. 权利要求 12 的药物组合物，其中施用该组合物治疗选自与上调的 α 2 巨球蛋白表达相关的慢性眼退化和 RGC 死亡的至少一种。

眼内压调节早期基因及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2005年11月22日申请的美国临时申请No.60/739,570的优先权。上述申请的完整内容在此引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 青光眼在世界上损害了上百万人的视力，是导致失明的主要原因之一。在访问北美眼科诊所的大量患者中，美国每年诊断出数十万例新的青光眼病例，其中许多病例影响老年人群。实际上，仅美国每年用在青光眼上的费用就达到数十亿美元。

[0005] 在最常见的青光眼形式—开角型青光眼中，视野损失是由视网膜神经元死亡导致的进行性视神经纤维退化引起的。那些被称为视网膜神经节细胞(RGC)的视网膜神经元组成视神经的视网膜细胞内层。伴随进行性RGC死亡的是眼内压(IOP)的升高。在大多数青光眼患者中，在疾病的某些时间点检测到这种高眼压。

[0006] 据认为暴露于高IOP以恒定的每周速度诱导了RGC的慢性和进行性凋亡。因此，青光眼是一种缓慢的、慢性的、进行性的RGC的神经变性疾病。青光眼患者的IOP平均比无青光眼者的IOP高1.4至1.7倍的水平。然而，青光眼难以治疗，因为高IOP的准确发生是不可预测的，并且通常是不明显的，直到发生周边视觉损失，此时通常进展为不可逆的RGC损失。因此，青光眼主要是无痛的，周边视觉损失通常仅在大多数视神经轴突损失时才成为临床上明显的。

[0007] 青光眼的主流治疗是用药物将高IOP降回接近正常IOP水平。然而，尽管IOP正常化，但是持续的RGC死亡和向青光眼的临床进展通常继续，这提示高IOP可能不是RGC凋亡的直接原因。因此，确切地高眼压是如何触发导致RGC凋亡的生物化学事件的还不清楚。

[0008] 当前提出的青光眼中RGC凋亡的机理包括：(i)兴奋性毒性损伤(高活性NMDA受体、升高的谷氨酸盐、Ca^{++}通量和一氧化氮水平)，(ii)缺血性或机械性视网膜损伤，导致小胶质细胞和巨噬细胞激活，引起相邻视网膜细胞的旁观者损害，和(iii)视神经头的机械压缩，这阻止了RGC存活所需的轴突运输(也被称为“成套(cuffing)”或“生理性轴突切开(axotomy)”)。然而，这些机理单独不能解释为什么只有RGC对凋亡敏感，而不是暴露于改变的谷氨酸盐/一氧化氮/Ca^{++}的潜在有害作用和机械应力的视网膜内层的所有细胞。这些假说也不能解释为什么IOP的正常化不导致当轴突运输恢复时RGC死亡完全停止。

[0009] 因此，尽管高IOP显然与青光眼中的RGC死亡有关，但是实际上高IOP和RGC凋亡之间在分子水平上没有联系。由于当前的降低IOP的青光眼治疗通常不能阻止RGC细胞的继续损失和视神经的退化，需要针对青光眼进展的分子原因进行治疗的疗法。

发明内容

[0010] 本发明涉及一种治疗哺乳动物的青光眼的方法。鉴定了几种具有由高IOP诱导的显著改变的表达并且在功能上与细胞信号发生和细胞死亡有关的基因。这些基因有些表达增强，有些表达降低，被称为眼内压调节早期基因或IPREG，包括：α2巨球蛋白、PSD-95/SAP90相关蛋白-4、Reggiel-1、RBCK、Gzα、蛋白质磷酸酶1γ、核糖体蛋白L23-相关产物、

胶质细胞原纤维酸性蛋白、环核苷酸门控阳离子通道、SPARC、B-2 芳基胺 N- 乙酰转移酶、淀粉状蛋白前体样蛋白 2、双载蛋白 1、Crybb2、Ras- 相关 p23、解旋酶 Rap30、蛋白体 rPA28 亚单位 β、ATPase α -1 亚单位、βA3/A1 晶体蛋白、βA4 晶体蛋白、S- 腺苷甲硫氨酸合酶、天冬酰胺合酶和几种 cDNA 克隆和表达序列标签 (EST)。

[0011] 在一个实施方案中，本发明涉及一种治疗哺乳动物的青光眼的方法，包括给哺乳动物施用有效量的抑制一种或多种上调的 IPREG 的表达或活性的组合物。在一个实施方案中，所述上调的 IPREG 选自 α 2 巨球蛋白、PSD-95/SAP90 相关蛋白 -4、Reggiel-1、RBCK、Gz α、蛋白质磷酸酶 1 γ、核糖体蛋白 L23- 相关产物、胶质细胞原纤维酸性蛋白、环核苷酸门控阳离子通道、SPARC、和 B-2 芳基胺 N- 乙酰转移酶。在另一个实施方案中，所述抑制性组合物含有一种或多种选自下组的物质：小干扰 RNA(siRNA)、反义寡核苷酸、中和抗体、小分子、重组基因表达载体、重组基因病毒载体、合成肽、重组多肽、拟肽和 IPREG 调节区抑制剂。在另外一个实施方案中，通过眼内注射、局部结膜应用、局部角膜应用或利用机械递送装置施用所述组合物。在另一个实施方案中，该方法进一步包括施用眼内压正常化药物，该药物选自非选择性肾上腺素受体阻断剂、选择性肾上腺素受体阻断剂、前列腺素、碳酸酐酶抑制剂、肾上腺素能激动剂和缩瞳药。

[0012] 本发明还涉及一种治疗哺乳动物的青光眼的方法，包括给哺乳动物施用有效量的提高一种或多种下调的 IPREG 的表达或活性的组合物。在一个实施方案中，提高其表达的下调的 IPREG 是选自下组的一种或多种物质：淀粉状蛋白前体样蛋白 2、双载蛋白 1、Crybb2、Ras- 相关 p23、解旋酶 Rap30、蛋白体 rPA28 亚单位 β、ATPase α -1 亚单位、βA3/A1 晶体蛋白、βA4 晶体蛋白、S- 腺苷甲硫氨酸合酶和天冬酰胺合酶。该组合物包含一种或多种提高下调的 IPREG 的表达或活性的物质，并且可以通过上述途径给药，并且可以进一步与眼内压正常化药物联合给药。

[0013] 本发明还涉及通过施用有效量的既抑制至少一种上调的 IPREG 的表达或活性又提高至少一种下调的 IPREG 的表达或活性的组合物来治疗哺乳动物的青光眼。该组合物使用抑制 IPREG 的表达或活性 (对于上调的 IPREG) 和 / 或提高 IPREG 的表达或活性 (对于下调的 IPREG) 的物质调节所鉴定的 IPREG。

[0014] 本发明进一步涉及一种预防由高 IOP 介导的 RGC 死亡的方法，包括给个体施用有效量的 IPREG 调节组合物，使得该组合物抑制一种或多种上调的 IPREG 的表达或活性和 / 或提高一种或多种下调的 IPREG 的表达或活性。另外，本发明还涉及一种预防哺乳动物的慢性眼退化 (chronic ocular degeneration) 的方法，包括给哺乳动物施用有效量的 IPREG 调节组合物，使得该组合物抑制一种或多种上调的 IPREG 的表达或活性和 / 或提高一种或多种下调的 IPREG 的表达或活性。

[0015] 本发明还涉及一种检测患者的慢性眼退化的方法，包括测定患者房水中的一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平，并且将测定的表达水平与具有正常眼功能的个体中相同的一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平进行比较。与具有正常眼功能的个体中相同的 IPREG 蛋白的表达水平相比，一种或多种上调的 IPREG 蛋白的较高的表达水平和 / 或一种或多种下调的 IPREG 蛋白的较低的表达水平表示该患者具有慢性眼退化。

[0016] 本发明进一步涉及一种检测患者中的 RGC 应激的方法，包括在最初时间点测定患者房水中一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平，在以后的时间点测定患者房水中相同的一种

或多种 IPREG 蛋白的表达水平，并且将在最初时间点测定的一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平与在以后时间点测定的表达水平进行比较，因此患者中较高的一种或多种上调的 IPREG 蛋白的表达水平和 / 或较低的一种或多种下调的 IPREG 蛋白的表达水平表示患者中发生了 RGC 应激。

[0017] 还提供了一种鉴定眼内压调节早期基因 (IRPEG) 的方法，该方法包括确定一种基因的表达是否被高眼压所改变，其中该基因的表达不被视网膜神经节细胞 (RGC) 的损伤所改变。该方法进一步包括确定该基因的表达是否在高眼压发生后早期改变，确定改变的该基因的表达在高眼压或青光眼发生后是否持续，以及确定在高眼压降低后该基因的表达是否仍然改变。在一个具体实施方案中，证实了所鉴定的基因在 RGC 死亡和 / 或青光眼中的作用。本发明进一步涉及用上述方法鉴定的 IPREG。

[0018] 本发明还涉及用来治疗青光眼、慢性眼退化或 RGC 死亡的药物组合物。因此，本发明涉及一种含有有效量的至少一种抑制上调的 IPREG 的表达或活性的物质和药物可接受的载体的药物组合物，其中施用该组合物以治疗青光眼。在另一个实施方案中，施用该药物组合物以治疗慢性眼退化或 RGC 死亡。另外，本发明还涉及一种药物组合物，其含有有效量的至少一种提高下调的 IPREG 的表达或活性的物质和药物可接受的载体，其中施用该组合物以治疗青光眼，或者，在另外的实施方案中，用于治疗慢性眼退化或 RGC 死亡。本发明进一步涉及一种药物组合物，其含有有效量的至少一种抑制上调的 IPREG 的表达或活性的物质和至少一种提高下调的 IPREG 的表达或活性的物质和可接受的药物载体，其中施用该组合物以治疗青光眼、治疗慢性眼退化或 RGC 死亡。

附图说明

[0019] 专利或申请文件包括至少一张彩色附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公开文本将由专利局在收到请求和必要的费用后提供。

[0020] 基于以下对本发明实施例实施方案的具体描述，以上所述将是显而易见的。附图不一定是衡量、强调，而是说明本发明的实施方案。

[0021] 表 1 说明已经诱导高眼内压 (IOP) 然后用药物降低 IOP 的大鼠视网膜的眼内压水平。

[0022] 表 2 列出了在基因阵列芯片分析中鉴定的基因，这些基因具有由于高 IOP 而引起的显著改变的表达，其基因表达相比正常 IOP 视网膜具有相对改变。

[0023] 表 3 列出了满足多种 IPREG 定义标准的基因的亚组，并且说明了这些基因在诱导高 IOP 后的 RNA 表达水平的改变。

[0024] 图 1 中的图 A 说明用倍他洛尔治疗小鼠高眼压模型的眼内压的改变。

[0025] 图 1 中的图 B 说明进行及不进行倍他洛尔治疗的小鼠高眼压模型的视网膜神经节细胞损失。

[0026] 图 2 是说明为差示基因阵列回收视网膜 mRNA 样品的实验程序的流程图。

[0027] 图 3 是说明青光眼大鼠视网膜中 α 2 巨球蛋白转录物上调的 Northern 印迹。

[0028] 图 4 是说明正常、青光眼和视神经轴突切开大鼠视网膜中 α 2 巨球蛋白、双载蛋白 1 和 Gz α 的蛋白质表达水平的免疫印迹。

[0029] 图 5A-5B 是一系列共聚焦显微照片，说明通过免疫组化研究所见的正常和高 IOP

大鼠视网膜中 α 2 巨球蛋白和 LRP-1 受体的表达。

[0030] 图 5C-5D 是一系列共聚焦显微照片，说明通过免疫组化研究所见的正常和高 IOP 大鼠视网膜中 α 2 巨球蛋白和 LRP-1 受体的定位。

[0031] 图 6 是免疫印迹，说明患有青光眼 (G) 和白内障 (C) 的人眼的房水中 α 2 巨球蛋白的表达。

[0032] 图 7 是说明青光眼中上调的 IPREG 如何共同作用导致 RGC 死亡的模型的示意图。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明总的涉及通过调节可能与 RGC 凋亡有关的由高眼压触发的基因异常表达和 / 或功能 / 活性来治疗和诊断哺乳动物的青光眼的方法。本文使用的术语″眼内压调节早期基因″或″ IPREG″描述了满足一个或多个将基因与眼退化相关联的标准的基因。一个标准是候选基因和 / 或基因产物的任何分子改变被高 IOP 诱导，而不是作为 RGC 损伤的结果产生。另一个标准是这些分子改变在高 IOP 发生后的相对早期触发。另外，优选地，由高 IOP 触发的基因和 / 或基因产物的任何分子改变持续或长期存在，甚至在 IOP 已经正常化之后仍然存在。在一个特别优选的方面，基因和 / 或基因产物的分子改变将致敏或引发 RGC 死亡，换句话说，该基因将在死亡信号转导（例如上调的基因产物）或神经保护（例如下调的基因产物）中具有直接或间接的作用。

[0035] 基因鉴定

[0036] 在高 IOP 条件下差异表达的基因可以通过几种本领域公知的方法鉴定，这些方法包括差异展示、基因阵列芯片、蛋白质组学和基因组学方法，在一个具体实施方案中使用基因阵列芯片。使用基因阵列系统的方法在本领域中公知，简要地说，mRNA 可以从目标组织（例如视网膜）中分离，以及从正常组织来源（即对照来源）和目标组织来源（例如异常或病变组织）制备。由分离的 mRNA 制备 cDNA，并由纯化的 cDNA 制备标记的 cRNA 探针，然后将该探针与基因阵列 DNA 芯片在杂交条件下孵育。芯片上已经与探针特异性结合的基因可以通过检测何种标记物与 cRNA 探针结合来鉴定，并且进行分析来检测与来自正常组织的 cRNA 探针杂交的基因阵列芯片和与来自目标组织的 cRNA 杂交的基因阵列芯片之间基因表达变化的倍数。通常进行统计学分析来确定在芯片之间发现的基因表达的变化是否具有显著性，然后在组织本身中验证被认为具有显著性的基因表达的变化（例如通过 RT-PCR、northern 印迹法、免疫印迹法或免疫荧光法）。

[0037] 对于本发明而言，视网膜 mRNA 的来源可以来自任何能够经历和 / 或复制在青光眼中所见的改变（即高 IOP、RGC 死亡和高 IOP 正常化后持续的 RGC 死亡）的系统；因此 mRNA 来源可以来自人组织、实验动物模型或细胞 / 组织培养系统。对于本发明而言，使用巩膜外静脉烧灼大鼠高眼压模型，并且从正常大鼠、改变为高 IOP 的大鼠和改变为高 IOP 接着用药物正常化的大鼠切下的视网膜中分离 mRNA。鉴定了 33 种在诱导高 IOP 后具有显著改变的表达的基因和表达序列标签 (EST)。所有这些基因都是用于理解 RGC 损伤原因的有意义的候选物，在大鼠模型中用药物使高 IOP 正常化后 21 天，鉴定的 9 种基因保持显著改变的表达。

[0038] 眼内压调节早期基因

[0039] 鉴定了几种在诱导高 IOP 后在视网膜中的表达改变的基因。在分析中发现具有上调的表达的基因是：α 2 巨球蛋白、PSD-95/SAP90 相关蛋白 -4、Reggiel-1、RBCK、Gz α 、

蛋白质磷酸酶 1γ、核糖体蛋白 L23- 相关产物、胶质细胞原纤维酸性蛋白、环核苷酸门控阳离子通道、SPARC、和 B-2 芳基胺 N- 乙酰转移酶，而显示下调的表达的基因包括淀粉状蛋白前体样蛋白 2、双载蛋白 1、Crybb2、Ras- 相关 p23、解旋酶 Rap30、蛋白体 rPA28 亚单位 β、ATPase α -1 亚单位、β A3/A1 晶体蛋白、β A4 晶体蛋白、S- 腺苷甲硫氨酸合酶、和天冬酰胺合酶。多种基因所见的改变的表达与推测的青光眼中 RGC 死亡的机制相符合，这些机制包括谷氨酸能应激、旁观者效应、生长因子剥夺和轴突生长减少。

[0040] 例如，一种鉴定为具有上调的表达的 IPREG，α 2 巨球蛋白，与其受体 LRP-1 结合，通过 NMDA 受体的激活导致细胞内 Ca^{2+} 增多。有意思的是，已经将 NMDA 受体活性与神经凋亡相关联。另外，α 2 巨球蛋白结合并中和视网膜神经营养蛋白，特别是神经生长因子 (NGF)，NGF 是一种重要的 RGC 的存活因子。因此 α 2 巨球蛋白的过量表达可能通过将其对 NMDA 受体的兴奋活性的作用加重到凋亡水平和 / 或降低存活因子 NGF 的生物利用度而引起 RGC 死亡 (见图 7)。

[0041] IPREG PSD95/SAP90 也与 NMDA 受体结合，结合该受体的 C- 末端，并且通过 src- 家族激酶诱导该受体的磷酸化和激活。已经发现 src- 家族激酶 Fyn、PSD95 和 NMDA 受体之间复合体的形成增强了脑缺血中的细胞死亡，而 PSD95 的抑制减少了缺血后神经元细胞死亡。此外，激活 NMDA 受体的 src 家族激酶本身被蛋白质酪氨酸磷酸酶和一种 src 家族磷酸酶特别是蛋白质磷酸酶 1γ (PP1) 激活，PP1 也是在基因阵列分析中发现被上调的 IPREG。PP1 与 RGC 应激相关联，因为发现它抑制损伤的成人中枢神经系统 (CNS) 中的轴突再生长 (见图 7)。

[0042] 另外，另一种上调的 IPREG，Gzα，是 NMDA 受体的直接作用物和通过第二信使的 NMDA 受体信号的介质。实际上，已经报道 Gzα 在功能上以加剧神经元细胞死亡的方式使 α 2 巨球蛋白 /LRP-1 受体能够与 GTPases 相互作用。因此，IPREG α 2 巨球蛋白、PSD95、PP1 和 Gzα 的上调说明了通过增强 NMDA 受体激活引起 RGC 凋亡的信号协调。

[0043] 鉴定 IPREG 的方法

[0044] 以前的研究已经鉴定了在高眼内压条件下表达改变的基因 (Ahmed F 等人，Invest Ophtalmol Vis Sci 45 :1247-1258，2004 ;EssonDW 等人，Invest Ophtalmol Vis Sci 45 : 4450-4462，2004 ;Pang IH 等人，Invest Ophtalmol Vis Sci 46 :1313-1321，2005)。但是，这些基因表达的改变无法解释甚至在患者眼内压正常化后观察到的持续的 RGC 死亡以及之后的视力损失。因此，设置标准来鉴定最可能与高眼压和 / 或导致青光眼状况继续恶化的 RGC 死亡保持有关的基因。也就是说，视网膜基因表达的改变由高眼压触发，并且在高 IOP 正常化后保持，引起 RGC 死亡。

[0045] 相应地，提供了一种鉴定眼内压调节基因 (IPREG) 的方法，包括确定一种或多种候选基因是否满足某些、优选地所有特定的标准。将要用该方法评价的候选基因可以用多种方法发现 / 测定。例如，本领域技术人员可以简单地选择一种或多种感兴趣的基因。通常，这些候选基因的选择将基于该基因在眼睛 (例如视网膜细胞) 中已知的表达，以及该基因与例如细胞活性 / 信号 (例如生长、分化、存活、粘附) 的调节、高眼压和 / 或细胞死亡的相关性。另外，也可以根据该方法所述的某些条件引起的基因表达的改变选择候选基因，例如，通常在高眼内压、眼内压正常化、视力损失、视网膜细胞死亡、视网膜细胞存活和 / 或青光眼条件下一种或多种基因的表达的改变。通过 (例如) 利用差异展示或基因微阵列将基

因在所选条件下的表达与适当的对照（例如正常和/或非病变条件）进行比较可以确定这些基因表达的改变。

[0046] 在该方法中确定高眼压是否改变候选基因的表达。然而，优选基因的表达对高眼压和青光眼是特异性的，也就是说，其表达不是可能由于IOP升高而发生的普通RGC损伤的结果。为了确定基因表达的改变是否只是由于RGC损伤而改变，可以在普通的、优选急性的RGC损伤条件下利用其它合适的实验模型（例如视神经轴突切开大鼠模型）来确定基因的表达。该方法中还确定在高眼压发生后基因的表达是否早期改变。因此，进一步确定一种或多种基因的改变的表达是否不同于以后的青光眼相关事件，是由高眼压特异性地引起的。高眼压发生后足够早期的时间范围取决于许多因素，对于人类患者包括：患者群体、实验动物模型（例如小鼠、大鼠、兔）或者其它模型系统（例如细胞培养），并且最好由熟练技术人员根据对特定组、实验动物模型和/或其他模型系统的了解来确定。例如，在此处使用的高眼压/青光眼模型-大鼠巩膜外静脉烧灼模型（见实施例1）中，高眼压发生后基因的早期表达在诱导高IOP后大约1天到7天或者大约3天到7天发生。

[0047] 该方法进一步包括确定一种或多种候选基因的表达是否在高眼压或青光眼发生后持续/长期存在。也就是，确定基因的表达是否在发生高IOP后早期改变，基因表达是否长期改变。这一标准使得鉴定的基因更可能与青光眼中所见的高眼压保持和RGC死亡有关。测定满足这一标准的基因表达的时间范围也取决于患者群体或使用的实验模型。通常，将发生高IOP后早期测定的基因表达与发生高IOP后足够长时间测定的相同基因在某一时间点的表达进行比较。在大鼠巩膜外静脉烧灼模型中，测定表达改变的基因持续表达的时间点为大鼠眼睛烧灼后28天（见实施例1，第2组）。

[0048] IPREG的鉴定进一步包括确定在例如使用眼内压调节药物使高眼压下降和/或正常化后基因的表达是否仍然改变。这一标准较好地再现了在人类患者中常见的情况，即，尽管高眼压正常化，仍然继续发生视野损失，因此这一标准有助于确保鉴定引起青光眼中眼退化的基因。为了评价在高眼压下降后具有持续改变的表达的基因，可以在高IOP发生后较快速地使眼内压下降/正常化。例如，在大鼠巩膜外静脉烧灼模型中，在烧灼（例如诱导高IOP）后第3天用眼内压正常化药物治疗大鼠，到烧灼后第7天观察到眼内压正常化，并且在烧灼后第28天，即高IOP正常化后21天，测定基因表达（参见实施例1，第3组）。为了确定基因表达是否长期发生，可将IOP降低/正常化后稍后的时间点测定的基因表达与发生高IOP后早期测定的基因表达和/或正常基因表达（例如发生/诱导高眼压之前的或在正常个体/动物中所见的基因表达）进行比较。

[0049] 基因的表达可以通过其它测定基因表达的方法（例如，northern印迹法、逆转录酶PCR(传统的和实时的)、PCR)证实，通常是不用于在基因鉴定中说明改变的表达的方法。另外，也可以测定伴随的基因产物或蛋白质表达的改变，来证实在转录水平上发现的表达改变也在蛋白质水平上发现。对于特定蛋白质/酶确定鉴定的基因和/或蛋白质的表达改变是否导致蛋白质活性（例如激酶活性、结合活性、酶切活性、蛋白质激活或抑制活性）的改变也可能是有利的。对蛋白质/酶活性的评价可以用许多本领域公知的方法进行（例如，分光光度分析、荧光分析、量热法、化学发光法、放射性测量、色谱分析），并且依赖于具体的蛋白质/酶。

[0050] 在利用上述方法将一种基因鉴定为IPREG后，该方法可以包括其他方面，以更好

地理解该基因及其与 RGC 死亡的调节和 / 或原因和青光眼进展的潜在相关性。对于利用基因微阵列鉴定的候选基因，例如，确定所鉴定的基因在视网膜和其它细胞 / 系统中的功能和 / 或作用可以提供关于说明该基因在青光眼和 RGC 死亡中的推定作用的信息。该信息可被本领域技术人员从大量来源获得，包括国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information，NCBI)（例如 PubMed（科学文章）、Entrez（基因组、基因、蛋白质）、GenBank)、其它联机检索、教科书、论文、图书馆、科学演示文稿等。特别有意义的是被认为和 / 或已知在避免细胞凋亡或在诱导细胞凋亡中具有作用的鉴定的基因。因此，该方法可以进一步包括确定基因是否与细胞死亡或细胞存活有关。通常这可以通过在上述一种或多种资源中检索该基因来进行。具体而言，鉴定的与细胞死亡有关的基因的上调和鉴定的与细胞存活有关的基因的下调符合它们与 RGC 死亡的相关性。

[0051] 该方法还可以进一步包括验证所鉴定的基因在青光眼中的体内作用。确定所鉴定的基因是否在体内影响青光眼、慢性眼退化和 / 或 RGC 死亡可以帮助确认该基因为青光眼治疗的有效靶标。相应地，可以在体内降低上调的基因或基因产物的表达或活性，或者可以在体内提高下调的基因或基因产物的表达或活性，并且例如测定对 RGC 死亡的作用（例如预防）。确定基因或蛋白质在青光眼中的作用所必需的所鉴定的基因或基因产物的表达或活性的改变水平可以是在防止 RGC 死亡和 / 或青光眼进展中证明完全有效的水平，并且本领域技术人员可以测定该水平。在一个实施方案中，将基因或基因产物的表达或活性升高或降低至正常水平（例如在没有高眼压、RGC 死亡和 / 或青光眼的动物中发现的水平）。在体内降低（例如抑制）或提高基因或基因产物的表达或活性可以用如以下“治疗方法”部分所述的多种方法（例如诱变、小干扰 RNA(siRNA)、反义核苷酸、甲基化 / 脱甲基化、中和抗体、显性阴性多肽、拟肽）来实现。操作所鉴定的基因或蛋白质（例如回到正常水平）的效果可以用一种或多种动物模型（例如小鼠、大鼠、兔、狗、猴）来确定，如果成功，则最终在人类患者中进行确定。

[0052] 本发明还涉及通过上述方法鉴定的 IPREG。因此，鉴定的 IPREG 满足该方法确定的标准。此外，也可以确定所鉴定的 IPREG 是否与细胞死亡或细胞存活有关。在一个具体实施方案中，通常通过确定将鉴定的 IPREG 的表达或活性增强或减弱（降低）至一定水平（例如正常水平）是否防止 RGC 死亡和 / 或青光眼进展，来验证 IPREG 在 RGC 死亡和 / 或青光眼中的作用。

[0053] 治疗方法

[0054] 相应地，本发明涉及调节异常上调的和 / 或下调的与青光眼有关的基因的方法。该方法涉及使用上述实验模型（即巩膜外静脉烧灼大鼠高眼压模型）鉴定的那些具有已知功能（例如 α 2 巨球蛋白或双载蛋白 1）和未知功能（例如克隆 rx05013 或 EST196604）的基因。本发明的方法用来治疗哺乳动物，特别是人类。上述动物模型良好地显示了在人类中见到的青光眼的特征，并且是一种用于在人体内评价青光眼治疗效果的良好模型。

[0055] 因此，本发明涉及一种通过施用有效量的组合物治疗患青光眼的哺乳动物的方法，该组合物抑制一种或多种上调的 IPREG 的表达或活性。特别是，该方法包括抑制一种或多种在基因阵列分析中鉴定的上调的基因。在一个实施方案中，这些基因包括：α 2 巨球蛋白、PSD-95/SAP90 相关蛋白 -4、Reggiel-1、RBCK、Gz α 、蛋白质磷酸酶 1 γ 、核糖体蛋白 L23- 相关产物、胶质细胞原纤维酸性蛋白、环核苷酸门控阳离子通道、SPARC、和 B-2 芳基胺

N- 乙酰转移酶。

[0056] 本文使用的抑制上调的 IPREG 的表达或活性的组合物或物质是指由减少上调的 IPREG 的基因或表达基因产物（例如 DNA、RNA 或蛋白质）和 / 或抑制上调的 IPREG 的功能活性的任何物质组成的组合物。降低 IPREG 基因或基因产物的表达水平可以用本领域技术人员公知的许多方法来实现，包括，例如，IPREG 的沉默化（例如通过抑制特异性脱甲基酶）；定向破坏 IPREG 的正转录调节区（例如通过同源重组或诱变）；抑制 IPREG 的正转录或翻译调节物的基因或基因产物（例如使用反义寡核苷酸、小干扰 RNA、中和抗体、显性阴性基因 / 多肽、拟肽）；提高 IPREG 的负转录或翻译调节物的活性或表达（例如使用重组基因表达载体、重组病毒载体、合成肽、重组多肽、超等位基因 / 多肽）；或者抑制 IPREG 本身（例如使用反义寡核苷酸、小干扰 RNA、中和抗体、显性阴性基因 / 多肽、拟肽）。上调的 IPREG 的功能活性可以用数种方法阻断，包括：直接抑制 IPREG 蛋白的活性（例如通过使用中和抗体、小分子或拟肽、显性阴性多肽）；抑制激活 IPREG 的基因和 / 或蛋白质（例如通过阻断基因和 / 或蛋白质的表达或活性）；激活抑制 IPREG 的基因和 / 或蛋白质（例如通过提高基因和 / 或蛋白质的表达或活性）；抑制作为 IPREG 功能下游介质的基因和 / 或蛋白质（例如通过阻断介质基因和 / 或蛋白质的表达和 / 或活性）；引入负调节 IPREG 的基因和 / 或蛋白质（例如通过使用重组基因表达载体、重组病毒载体、或重组多肽）；或者基因置换，例如，置换为 IPREG 的亚效等位突变体（例如通过同源重组、利用重组基因表达或病毒载体的过量表达，或者诱变）。

[0057] 因此，在一个实施方案中，抑制性组合物可以针对作为 IPREG 的细胞受体或结合配偶体的蛋白质。例如，在一个实施方案中，所抑制的 IPREG 是 α 2 巨球蛋白，例如使用针对该蛋白质的中和抗体。在另一个实施方案中，通过拮抗其受体（例如 LRP-1）或拮抗 α 2 巨球蛋白功能的下游介质（例如 IPREG Gz α 和 / 或 NMDA 受体）抑制 α 2 巨球蛋白，例如使用抑制性肽或拟肽。或者，可以抑制 α 2 巨球蛋白的结合配偶体（例如 NGF），由此阻断 α 2 巨球蛋白的功能。类似地，抑制性组合物可以针对上调的 IPREG，例如 PSD-95，或者与 PSD-95 形成复合物以共激活受体（例如 NMDA 受体）从而介导细胞死亡的基因和 / 或蛋白质（例如 Fyn）。在另一个实施方案中，抑制性组合物可以针对其它 α 2 巨球蛋白、Gz α 和 / 或 PSD-95 功能的下游介质，例如，该组合物可以抑制上调的 IPREG PP1。

[0058] 在该方法的一个实施方案中，为抑制一种或多种上调的 IPREG 而施用的组合物可以含有小干扰 RNA、反义寡核苷酸、中和抗体、小分子、重组基因表达载体、重组基因病毒载体、合成肽、重组多肽、拟肽或 IPREG 调节区抑制剂。如前所述，该组合物的物质可以直接或间接抑制 IPREG 的表达、蛋白质表达或功能活性。该组合物可以在适当的药物载体中通过数种途径之一施用，包括眼内注射、局部结膜应用、局部角膜应用（例如滴眼剂、眼用凝胶）或者使用机械递送装置或眼部插入物。

[0059] 本发明还涉及一种治疗哺乳动物的青光眼的方法，包括给哺乳动物施用有效量的提高一种或多种下调的 IPREG 的表达或活性的组合物。该方法还包括提高在基因阵列分析中鉴定的那些具有已知和未知功能的基因的表达，在该方法的一个实施方案中，下调的基因选自：淀粉状蛋白前体样蛋白 2、双载蛋白 1、Crybb2、Ras- 相关 p23、解旋酶 Rap30、蛋白体 rPA28 亚单位 β、ATPase α -1 亚单位、β A3/A1 晶体蛋白、β A4 晶体蛋白、S- 腺苷甲硫氨酸合酶、和天冬酰胺合酶。在一个具体实施方案中，提高其表达或活性的 IPREG 是双载蛋白

1。

[0060] 如本文使用的提高下调的 IPREG 的表达或活性的组合物或物质是指由增加下调的 IPREG 的基因或表达基因产物或提高下调的 IPREG 的活性库 (active pool) 和 / 或活性的任何物质组成的组合物。因此，该组合物可以包含防止 IPREG 沉默化（例如通过激活特异性脱甲基化酶）、破坏 IPREG 的负转录调节区（例如通过同源重组或诱变）、抑制 IPREG 的负转录或翻译调节物或 IPREG 功能的负调节物（例如使用反义寡核苷酸、小干扰 RNA 或中和抗体）、或者提高 IPREG 的正转录和 / 或翻译调节物、IPREG 功能的正调节物、IPREG 本身或其下游介质的表达（例如使用重组基因表达载体、重组病毒载体、合成肽或重组多肽）的任何物质。

[0061] 相应地，提高下调的 IPREG 的表达或活性的组合物可以包含一种或多种选自小干扰 RNA、反义寡核苷酸、中和抗体、小分子、重组基因表达载体、重组基因病毒载体、合成肽、重组多肽、显性阴性基因或多肽、拟肽和 IPREG 调节区激活剂的物质。因此，该组合物可以直接或间接提高下调的 IPREG 的表达或功能活性。

[0062] 本发明还涉及通过给哺乳动物施用既调节上调的 IPREG 又调节下调的 IPREG 的组合物治疗青光眼或青光眼相关问题的方法。例如，本发明涉及一种治疗哺乳动物的青光眼的方法，包括给哺乳动物施用有效量的既抑制至少一种上调的 IPREG 的表达或活性又提高至少一种下调的 IPREG 的表达或活性的组合物。本发明还涉及一种通过给个体施用有效量的调节一种或多种 IPREG 的组合物预防由高 IOP 介导的 RGC 死亡的方法，该组合物抑制上调的 IPREG 的表达或活性或者提高下调的 IPREG 的表达或活性。类似地，本发明进一步涉及一种通过给哺乳动物施用有效量的调节一种或多种 IPREG 的组合物预防哺乳动物的眼退化的方法，该组合物抑制一种或多种在慢性眼退化中上调的 IPREG 的表达或活性或者提高一种或多种在眼退化中下调的 IPREG 的表达或活性。

[0063] 在该方法的一个进一步的实施方案中，该组合物抑制的上调的 IPREG 包括选自下组的物质：α 2 巨球蛋白、PSD-95/SAP90 相关蛋白 -4、Reggie1-1、RBCK、Gz α 、蛋白质磷酸酶 1 γ 、核糖体蛋白 L23- 相关产物、胶质细胞原纤维酸性蛋白、环核苷酸门控阳离子通道、SPARC、和 B-2 芳基胺 N- 乙酰转移酶，该组合物提高其表达的下调的 IPREG 包括选自下组的物质：淀粉状蛋白前体样蛋白 2、双载蛋白 1、Crybb2、Ras- 相关 p23、解旋酶 Rap30、蛋白体 rPA28 亚单位 β 、ATPase α -1 亚单位、β A3/A1 晶体蛋白、β A4 晶体蛋白、S- 腺苷甲硫氨酸合酶、和天冬酰胺合酶。

[0064] 在该方法中调节一种或多种 IPREG 的组合物可以包含任何直接或间接提高下调的 IPREG 的表达或功能和 / 或抑制上调的 IPREG 的表达或功能的物质。因此，在一个进一步的实施方案中，该组合物包含小干扰 RNA、反义寡核苷酸、中和抗体、小分子、重组基因表达载体、重组基因病毒载体和重组多肽、拟肽、IPREG 调节区抑制剂和 IPREG 调节区激活剂。上述组合物优选地也在适当的药物载体中通过数种途径之一施用，包括眼内注射、局部结膜应用、局部角膜应用和使用机械递送装置。

[0065] 为了治疗青光眼而抑制 α 2 巨球蛋白（上调的 IPREG）的有效性的实验检测表明，同时使用降眼内压药物增强了通过抑制 α 2 巨球蛋白见到的 RGC 存活（见表 1 和表 2）。因此，所有治疗方法都可以进一步包括与施用 IPREG 调节组合物（例如抑制上调的 IPREG 的表达或活性和 / 或提高下调的 IPREG 的表达或活性）联合，或者除此之外，施用几种眼内压

正常化药物之一。眼内压正常化药物可以在IPREG调节组合物治疗的任意时间给药；因此，眼内压正常化药物可以在组合物治疗的整个过程中连续给药，也可以在有效量的组合物之前、之后或者同时给药。由于人类患者更可能已经接受降眼内压药物治疗，因此除任意降眼内压药物以外，可以以本领域技术人员认为对于有效治疗患者合适的间隔施用IPREG调节组合物。有多种药物可以在这些方法中用来降低眼内压，包括：非选择性β1肾上腺素受体阻断剂、选择性β1肾上腺素受体阻断剂、前列腺素、前列腺素类似物、碳酸酐酶抑制剂、docosanoid、肾上腺素能激动剂、胆碱能药物和缩瞳药。在一个具体实施方案中，降眼内压药物使用选择性β1肾上腺素受体阻断剂倍他洛尔。

[0066] 剂量和合适的载体

[0067] 根据本发明的方法，有效量的调节IPREG（即抑制其表达或活性和/或提高其表达或活性）的组合物可以在可接受的药物载体中通过适当的途径（例如眼内注射、局部结膜应用、局部角膜应用或使用机械递送装置）单独地或与其他药物联合给哺乳动物施用。药物组合物的有效量是在给药条件下足以达到所需治疗或预防效果的量，例如，减轻和/或阻止RGC凋亡及青光眼进展的组合物给药量。组合物可以作为单剂量或多剂量给药，以确保患者在治疗期间保持组合物的治疗显著水平。剂量可以根据本领域公知的方法确定，并且取决于为组合物选择的具体药物、对象年龄、体重、对药物的敏感性和耐受性和总体健康状况。

[0068] 组合物的制剂根据选择的给药途径而不同（例如溶液或乳剂）。合适的药物载体可以含有不与组合物中的调节性物质相互作用的惰性成分。可以使用标准药物配制技术，如Remington′ sPharmaceutical Sciences，Mack Publishing Company，Easton，PA中所述的技术。用于肠胃外给药的合适的药物载体包括，例如，无菌水、生理盐水、抑菌盐水（含有大约0.9％ mg/ml的苯甲醇的盐水）、磷酸盐缓冲液、汉克斯液、林格乳酸盐等。

[0069] 诊断方法和试剂盒

[0070] 本发明还涉及允许医生诊断青光眼或青光眼相关问题的方法。高IOP的发生难以预测，通常，患者的结果是长期暴露于高IOP，时间长度足以发生显著的眼退化，即在医生发现和/或证明高水平的IOP之前。存在几种鉴定的IPREG，其蛋白质产物显示伴随的表达水平增加（上调的IPREG）或降低（下调的IPREG)（例如α2巨球蛋白、双载蛋白1和Gzα）。此外，许多IPREG蛋白是可溶性的，在眼睛的房水中可检测到（例如α2巨球蛋白）。眼睛的房水可以通过本领域技术人员公知的标准外科操作从患者采集。然后可以利用本领域公知的任何方法检测房水中的可溶性蛋白质，包括免疫沉淀法、免疫印迹法、免疫荧光法、色谱法（HPLC、离子交换或凝胶过滤）或比活性法（例如可检测标记的底物的酶切和/或结合），并对检测到的蛋白质的表达水平进行定量。例如，图5显示了在青光眼病人眼睛的房水中，α2巨球蛋白的表达可被检测到，并且显著上调。

[0071] 因此，本发明涉及一种检测患者的慢性眼退化的方法，包括测定患者房水中的一种或多种IPREG蛋白的表达水平，并将测定的一种或多种IPREG蛋白的表达水平与具有正常眼功能的个体中相同的一种或多种IPREG蛋白的表达水平进行比较，在慢性眼退化个体中上调的IPREG蛋白的较高的表达水平或在慢性眼退化个体中下调的IPREG蛋白的较低的表达水平表示该患者具有慢性眼退化。一种或多种IPREG蛋白的表达水平可以用本领域技术人员选择的上述任何方法来测定，并且可以与使用相同方法在具有正常眼功能的个体中

（例如）或者在具有在特征上（例如在分子上）不同于青光眼的眼部病症的个体中测定的相同的一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平进行比较。一种或多种 IPREG 蛋白的对照和/或正常表达水平可以在测定患者的同时在来自正常个体的样品中测定，或者用于比较的表达水平可以是以前为使用的具体方法建立的已知的、定量的标准。

[0072] 在该方法中可以测定通过基因阵列分析鉴定的一种或多种或者甚至全部 IPREG 的表达水平，在一个具体实施方案中，测定其表达水平的 IPREG 蛋白是 α 2 巨球蛋白和双载蛋白 1。对患者中 RGC 应激状态的了解对于医生确定和/或说明青光眼的严重程度和进展是重要的。因此，本发明还涉及一种检测患者中的 RGC 应激发生的方法，包括在最初时间点测定患者房水中一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平；在以后的时间点测定患者房水中相同的一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平；并且将在最初时间点测定的一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平与在以后时间点测定的表达水平进行比较，一种或多种上调的 IPREG 蛋白的较高的表达水平和/或一种或多种下调的 IPREG 蛋白的较低的表达水平表示患者中发生了 RGC 应激。一种或多种 IPREG 蛋白的表达水平可以如前所述在患者的房水中测定和定量（例如使用免疫化学法、色谱法或比活性法）。

[0073] 进一步地，众所周知由于许多环境和遗传因素，个体对具体疗法可能有不同的反应。因此，本发明还涉及利用与疗效相关联的 IPREG 改变来预测具体青光眼治疗为有效的可能性的方法，特别是，预测针对个体中的一种或多种具体 IPREG 对于青光眼治疗将有用和/或成功的可能性。因此，在一方面，该方法涉及利用本领域技术人员公知的任何核苷酸分析方法（例如 SNP、荧光原位杂交 (FISH)、测序、PCR 或错配检测分析）检测生物样品（例如血液、细胞或唾液）中已确定/已知是青光眼疗效标记物的 IPREG 的遗传改变（例如基因复制、缺失、重组、转座或序列突变）。另一方面，该方法涉及利用上述方法（例如免疫化学方法、色谱法或底物相互作用）或本领域技术人员公知的其他方法测定生物样品（例如房水或细胞）中已确定其表达/活性与特定青光眼治疗成功有关的 IPREG 蛋白的表达水平和/或活性。

[0074] 也可以制备用于检测生物样品（例如房水）中 IPREG 蛋白的表达水平的试剂盒。这样的试剂盒可以包括可与一种或多种 IPREG 蛋白结合的抗体或功能片段，以及适合检测抗体（或抗体片段）与一种或多种 IPREG 蛋白之间的复合体的存在的辅助试剂。抗体组合物可以作为冻干形式提供，其单独提供或者与对所检测的一种或多种 IPREG 蛋白的其它表位具有特异性的其它抗体组合。试剂盒中可以包括抗体（可以标记或者不标记）以及辅助成分（例如缓冲液、稳定剂、赋形剂、杀生物剂和/或惰性蛋白质，例如牛血清白蛋白）。例如，抗体可以作为与辅助成分混合的冻干混合物提供，或者辅助成分可以单独提供，由使用者组合使用。通常，基于活性抗体的含量，这些辅助物质的含量低于大约 5％重量，通常基于抗体的浓度，总量至少为大约 0.001％重量。当使用一种或多种能够与一种或多种 IPREG 蛋白反应性抗体结合的第二抗体（例如二级抗体）时，这些抗体可以在试剂盒中提供，例如，在第二个小瓶或容器中提供。如果存在，则第二抗体一般被标记，并且可以通过与上述抗体制剂类似的方法进行配制。试剂盒的成分（例如抗 α 2 巨球蛋白抗体或抗体片段和辅助试剂）可以单独包装或者一起包装在合适的容器（例如瓶、盒、封套或管）中。

[0075] 药物组合物

[0076] 本发明还涉及在本发明方法中用于治疗哺乳动物或患者的药物组合物。因此，本

发明涉及一种药物组合物，其含有有效量的至少一种抑制一种或多种上调的 IPREG 的表达或活性的物质（例如分子、化合物、多肽）和药物可接受的载体，其中施用该组合物以治疗青光眼。在进一步的实施方案中，药物组合物还用来治疗慢性眼退化或 RGC 死亡。该药物组合物可以包含小干扰 RNA、反义寡核苷酸、中和抗体、小分子、重组基因表达载体、重组基因病毒载体、合成肽、重组多肽、拟肽和 IPREG 调节区抑制剂。被药物组合物抑制的上调的 IPREG 可以是在基因阵列分析中鉴定的具有已知或未知功能的那些 IPREG 之一（见表 2）。

[0077] 本发明还涉及一种药物组合物，其含有有效量的至少一种提高一种或多种下调的 IPREG 的表达或活性的物质和药物可接受的载体，其中施用该组合物以治疗青光眼。在一个实施方案中，该药物组合物包含提高在基因阵列分析中发现下调的 IPREG 的表达或活性的物质（例如分子、化合物、多肽），该组合物可以包含小干扰 RNA、反义寡核苷酸、中和抗体、小分子、重组基因表达载体、重组基因病毒载体、重组多肽、拟肽和 IPREG 调节区激活剂。

[0078] 本发明进一步涉及一种药物组合物，其含有有效量的至少一种抑制一种或多种上调的 IPREG 的表达或活性的物质和至少一种提高一种或多种下调的 IPREG 的表达或活性的物质和药物可接受的载体，其中施用该组合物以治疗青光眼，在进一步的实施方案中，治疗慢性眼退化或 RGC 死亡。该药物组合物针对的 IPREG 可以是在使用任何有效和适当改变 IPREG 表达的物质的基因阵列分析中确定具有显著改变的表达的任何 IPREG。如前所述，药物组合物可以通过几种途径之一给药，包括眼内注射、局部结膜应用、局部角膜应用或使用机械递送装置。

[0079] 实施例

[0080] 实施例 1. 眼内压调节基因

[0081] 眼内压的诱导

[0082] 高 IOP. 在麻醉下进行大鼠眼睛巩膜外层烧灼。结膜切开后，分离眼外肌，根据定位、相对固定性、较大管径和分支模式确定角膜缘主引流静脉。用 30″ 烧灼头对右眼三根巩膜外血管进行烧灼。每只动物的左眼在假手术（结膜切开而不进行烧灼）后用作正常 IOP 对照。

[0083] IOP 测量 . IOP 用 Tonopen XL 眼压计在光麻醉（肌内注射 4mgkg 氯胺酮、0.32mg/kg 赛拉嗪和 0.4mg/kg 乙酰丙嗪）下进行测量。与其它仪器相比 Tonopen 读数的精度（甚至在麻醉下）已经得到确定。大鼠在麻醉下的平均正常 IOP 为 12mm Hg（范围为 10-14mmHg），在烧灼的眼中升高至稳定的平均值 21mm Hg（范围为 18-24mm Hg）超过 4 个月。这些数值与以前发表的数据相符。

[0084] 无论烧灼左眼还是右眼，其 IOP 没有差异（数据未显示）；因此，为了便于记录和管理而选择右侧。利用平面检眼镜检查证实 IOP 升高的视网膜为正常灌注。烧灼使 IOP 升高大约 1.7 倍。证明这种升高与人开角型青光眼的相关性高于其他模型，其他模型使压力升高＞ 2 倍，并且通常导致局部缺血。

[0085] 高 IOP 的药物降低 . 每日作为滴眼剂应用选择性 β - 阻断剂 (0.5％倍他洛尔，Alcon)。如示（例如在烧灼 3 天后）开始局部应用倍他洛尔，在 3 天后导致 IOP 完全正常化。之后在应用倍他洛尔的情况下 IOP 继续保持正常化。例如，当从烧灼后第 3 天开始应用倍他洛尔时，眼睛从第 1 天至第 6 天具有高 IOP，从第 7 天开始具有正常化的 IOP。倍他洛尔对于正常眼睛的 IOP 没有显著性影响。

[0086] 通过烧灼一只眼的三根巩膜外血管以减少房水流出，在大鼠眼睛中诱导高 IOP，并且对侧眼进行假手术，用作对照（图 1A）。在静脉烧灼后 3、7、14、21 和 28 天，烧灼眼的 IOP 显著高于对照眼（$p \leq 0.01$）。青光眼眼睛的平均 IOP 大约为 21mm Hg，相比而言，正常眼睛的平均 IOP 大约为 12.6mm Hg。每天用倍他洛尔局部治疗减少了房水的产生，并且降低了烧灼诱导的高 IOP，但是对于对侧眼的正常 IOP 没有显著影响（见图 1A）。从烧灼后第 3 天开始的倍他洛尔给药使高 IOP 从第 7 天开始完全正常化。用倍他洛尔治疗的烧灼的眼睛与应用或不应用倍他洛尔的对照眼睛的 IOP 没有显著性差异（图 1A）。

[0087] 高 IOP 诱导的 RGC 死亡

[0088] 静脉烧灼导致的慢性高 IOP 以恒定速度引起积累性 RGC 损失（Rudinski M 等人，J Neurobiol 58 :341-354,2004）。使用标记视网膜内 RGC 体的逆行示踪剂（retrograde tracer），我们证实在烧灼后 3、4、5 周，平均 RGC 损失为大约 15％、20％和 27％。在烧灼后 6 周，平均 RGC 损失为大约 35％（未显示）。用倍他洛尔使 IOP 正常化降低了 RGC 损失的平均速度，但没有阻止 RGC 损失（图 1B）。在所示的实验中，每日倍他洛尔给药使 IOP 从第 7 天开始正常化。因此，短期（大约 1 周）暴露于高 IOP 触发了较低的但是显著的 RGC 损失速度，但是这种死亡不依赖于持续的高 IOP。这些动物数据复制了报道的用药物降低 IOP 的患者的视野损失，所述视野损失在 3 年时影响了 25％的患者，在 10 年时影响了超过 70％的患者（Kass MA 等人，Arch Ophthalmol 107 :1590-1598,1989 ;O′ Brien C 等人，Am JOphthalmol 111 :491-500,1991）。

[0089] 视神经轴突切开术诱导的 RGC 死亡

[0090] 为了与青光眼（为慢性眼内损伤）进行对比，研究了视神经轴突切开术，这是一种急性眼外损伤。对于视神经轴突切开术，在 4 天后见到最低的但是可检测到的 RGC 死亡，在损伤后 10 天发现大约 40％的 RGC（Berkelaar M 等人，J Neurosci 14 :4368-4374,1994 ; DiPolo A 等人，Proc Natl Acad Sci 95 :3978-3983,1998）。由于青光眼和轴突切开体内模型导致相当的 RGC 损失，在进一步的实验中，将诱导高 IOP 后的第 28 天与视神经轴突切开术后的第 4 天进行比较，将诱导高 IOP 后的第 42 天与视神经轴突切开术后的第 10 天进行比较。

[0091] 眼内压调节早期基因（IPREG）

[0092] RNA 的制备．使用TRIZOL®（Life Technologies）从视网膜组织分离总 RNA。汇集属于相同实验组的三个视网膜进行基因微阵列实验。然后用RNAEASY®（QIAGEN®）进一步纯化 RNA。RNA 样品的完整性通过使用 2100 生物分析仪（Agilent）在 RNA 6000 NanoLabChip（Agilent）上运行试样份进行评价。

[0093] 微芯片杂交．探针合成、杂交和扫描按照 Affymetrix 的方案在 McGill University 和 Genome Quebec Innovation Centre 进行。对于所示的实验，使用大鼠 U34 基因组阵列（8,700 种基因，Affymetrix）。简而言之，首先将 RNA 样品转化为双链 cDNA（T7-（dT）24 引物（Genset））。然后纯化 cDNA，并用来产生生物素化的 cRNA 探针（Bioarray High Yield RNA 转录物标记试剂盒（Enzo diagnostics））。将一份纯化的 cRNA 在 RNA 6000 Nano LabChip（Agilent）上分析，以证实完整性和大小分布。杂交后立即将芯片置于 Affymetrix GeneChipFluidics Station 400（Affymetrix）上。总共进行 10 次低严格条件的洗涤（63 SSPE，0.01％ Tween-20，0.005％消泡剂）和 4 次高严格条件的洗

涤 (100mM MES,0.1M NaCl,0.01% Tween-20,50C)(所有试剂均来自 Sigma)。然后将阵列与SAPE®(链霉抗生物素 / 藻红蛋白染料,Molecular Probes) 一起孵育,然后进行 10 次低严格条件的洗涤。将阵列与生物素化的抗链霉抗生物素抗体 (Vector Laboratories) 一起孵育,并再进行 15 次低严格条件的洗涤。将阵列置于 AgilentGeneArray 扫描仪 2500(Affymetrix) 中检测特异性结合的探针。用 Microarray Analysis Suite 5.0 版 (Affymetrix) 分析扫描的图像。借助于 Kensington Discovery Edition 1.8 版 (Inforsense) 进行统计学分析。

[0094] 小心切下视网膜,以确保只制备视网膜 mRNA 进行基因微阵列研究。从假手术的眼睛(正常 IOP 对照,第 1 组)、高 IOP 第 28 天的眼睛(检测,第 2 组)和烧灼并从第 3 天起每日倍他洛尔治疗的第 28 天的眼睛(第 3 组)获得样品。在第 3 组中,到第 7 天高 IOP 回归正常水平。来自每一组(每组 n = 4) 的样品用基因微阵列进行研究(见图 2 的流程图)。利用 2.5 倍的截断值来得到显著性 ($p < 0.05$)。

[0095] 最初的分析集中于具有高 IOP 的视网膜(第 2 组)和正常 IOP 的视网膜(第 1 组)之间的差异表达。在第 2 组中,在高 IOP 的第 28 天时,32 种基因的表达显著改变,一些降低,而另外一些升高。这些基因是推断的眼内压调节早期基因 (IPREG)(表 1)。

[0096] 表 1. 基因阵列结果。cDNA- 阵列数据比较了高 IOP 第 28 天 (A 列) 和烧灼 28 天但是只经历 7 天高 IOP(从第 4 天至第 28 天施用倍他洛尔) 的正常 IOP(B 列) 眼睛相对于正常 IOP 的改变。两种情况都显示相对于未烧灼的眼睛具有改变。

[0097]

名称	Genebank 号	推断的功能	相对于未烧灼的眼睛的相对改变 烧灼的高 IOP A	烧灼+倍他洛尔 B
信号途径				
1 α2 巨球蛋白	M23566	多功能	16.3	5.6
2 cDNA 克隆 rx00382	AI639155	甲基转移酶	7.6	7.2
3 PSD-95/SAP90 相关蛋白-4	U67140	受体衔接蛋白	5.8	-1.0
4 Reggie1-1	AF023302	RGC 再生	3.9	1.8
5 RBCK	AB011369	PKC1-相关	3.2	1.3
6 Gzα	U77483	信号转导	2.8	1.1
7 蛋白质磷酸酶 1γ	S78217	信号转导	2.6	2.5
8 淀粉状蛋白前体样蛋白 2	X77934	多功能	-2.6	1.1
9 双载蛋白 1	Y13381	胞吞作用	-2.8	-1.1
10 Crybb2	X83671	转录因子	-3.3	-1.0
11 Ras-相关 p23	X12535	存活/凋亡	-4.0	1.1
结构蛋白				
12 cDNA 克隆 rx01295	AI639375	富含 WD 的蛋白质	6.9	4.8
13 核糖体蛋白 L23-相关产物	U62635	核糖体蛋白质	6.5	3.8
14 克隆 RKIAS43	AA892520	囊泡蛋白质	5.1	2.9
15 胶质细胞原纤维酸性蛋白	AF028784	胶质细胞标记	4.0	1.4
16 环核苷酸门控阳离子通道	AJ000515	感觉通道	4.0	3.4
17 SPARC	U75928		2.6	1.9
18 解旋酶 RAP 30	L01267	DNA 修复	-2.8	1.2
19 蛋白体 rPA28 亚单位β	AA892801	蛋白质降解	-2.9	
20 ATPase α-1 亚单位	M74494	ATPase	-3.3	1.5
21 β A3/A1 晶体蛋白	X15143	伴侣蛋白	-3.6	-1.1
22 β A4 晶体蛋白	AF013247	伴侣蛋白	-5.7	
代谢途径				
23 B-2 芳基胺 N-乙酰转移酶	U01347	褪黑激素合成	4.4	.1.5
24 cDNA 克隆 rx05013	AI639441	起始因子	3.8	2.8
25 S-腺苷甲硫氨酸合酶	J05571	甲基供体	-2.7	1.1
26 天冬酰胺合酶	U07201	Asn 合成	-2.8	-1.1
EST				
27 克隆 rx05013	AI639441		3.8	
28 克隆 rX03980	AI639207		2.6	
29 EST189275	AA799778		2.5	
30 克隆 rx01612	AI639465		-2.6	
31 EST213677	AI104388		-2.6	
32 EST196604	AA892801		-3.0	
33 克隆 rx01394	AI639406		-5.1	

[0098] 对正常 IOP(第 1 组)和 7 天具有高 IOP、另外 21 天具有正常 IOP 的烧灼的眼睛(第 3 组)进行了进一步的比较,证明大多数候选 IPREG 具有完全正常的表达。它们的表达与正常 IOP 视网膜没有不同。这些基因表达的正常化的发生可能是由于 i)RGC 应激/死亡

被阻止，ii）改变的表达需要高眼压持续 28 天，或者 iii）改变的表达短期存在。

[0099] 然而重要的是，尽管 IOP 完全正常化，但是相对于正常 IOP 视网膜，8 种候选 IPREG 仍保持显著改变的表达（表 2）。双载蛋白、AMPLP-2、β A4 晶体蛋白和 ras- 相关 p23 的表达下调，α 2 巨球蛋白、Gz α 、PTP-1 γ 、reggiel-1 和 PSD95/SAP90 相关蛋白 4 的表达上调。从第 7 天到第 28 天的 IOP 正常化没有逆转 3 种基因（克隆 rX00382、蛋白质磷酸酶 -1 γ 和环核苷酸门控阳离子通道）的表达的改变；只是部分逆转了 5 种基因（α 2 巨球蛋白、Reggie 1.1、克隆 rX01295 和 rX05013、核糖体蛋白 L23 相关产物和囊泡蛋白克隆 RKIAS43）的表达的改变；但是完全逆转了 Gz α 的上调（表 2）。

[0100] 表 2. 满足 IPREG 标准的选择的基因

[0101] 从表 1 中列出了满足所有 IPREG 标准的基因。也选择了其他部分满足标准的基因。* 表示神经元特异性蛋白质，而其它蛋白质在其它细胞型中表达。半定量 RT-PCR 所示的数据代表 3 个独立的研究。确定具有等量的 mRNA 和相等的凝胶加样量（数据未显示）。

[0102]

		通过定量 RT-PCR 证实	
名称	推断的功能	正常 IOP	IOP 第 28 天
完全标准			
α2 巨球蛋白	多功能		
cDNA 克隆 rx00382	甲基转移酶蛋白		
Reggie1-1	RGC 再生		
蛋白质磷酸酶 1 γ *	信号转导		
cDNA 克隆 rx01295 *	富含 WD 的蛋白质		
核糖体蛋白 L23-相关产物	核糖体蛋白质		
克隆 RKIAS43	囊泡蛋白质		
环核苷酸门控阳离子通道	感觉通道		
cDNA 克隆 rx05013	起始因子		
部分标准			
PSD-95/SAP90 相关蛋白 -4*	受体活性的衔接蛋白		
Gzα	信号转导		
淀粉状蛋白前体样蛋白 2 *	多功能		
双载蛋白 1 *	胞吞作用		
解旋酶 RAP 30	DNA 修复		

[0103] 重要的是注意到其表达在倍他洛尔治疗后 21 天完全正常化的基因（例如 Gz α）仍然可以是令人感兴趣的候选者。这些基因也可能长期存在，尽管时间短于在我们的实验例中研究的 IOP 正常化后 21 天（例子见表 3）。

[0104] 表 3. 用中和抗体针对 α 2 巨球蛋白的青光眼治疗。每个数据点表示至少 6 只眼睛的平均值（±sd）。通过染料从 SC 逆行进行 RGC 标记。〃 -〃表示“未治疗”。眼压不被眼内注射影响。

[0105]

行	第 1 天的 IOP	治疗		IOP 史	RGC 损失（第 42 天相对于正常的百分比）
		每日倍他洛尔（第 14-42 天）	第 14 和 21 天抗体注射		
1	正常	-	-	正常	0 ± 0
2	正常	-	对照血清	正常	5 ± 4
3	高	-	-	高 42 天	33 ± 6
4	高	-	-	高 28 天	19 ± 5
5	高	-	-	高 14 天	8 ± 5
6	高	-	对照血清	高 42 天	30 ± 6
7	高	-	抗-α2 血清	高 42 天	21 ± 3
8	高	第 14 至 42 天	-	14 天高，28 天正常	19 ± 1
9	高	第 14 至 42 天	对照血清	14 天高，28 天正常	21 ± 5
10	高	第 14 至 42 天	抗-α2 血清	14 天高，28 天正常	11 ± 4

[0106] 这些数据表明 8 种基因的视网膜表达的改变需要 7 天或者更短时间的视网膜对高 IOP 的暴露。此外，在没有高眼压的随后的 21 天，表达持续改变，表明这种改变是长期的。视网膜基因表达的改变被认为先于 RGC 损失，因为在该例中 RGC 死亡最少。因此，这些发现强烈提示这些基因可能与 RGC 死亡有关，特别是与 IOP 正常化后继续的 RGC 死亡有关。

[0107] 基因微阵列的确认

[0108] 动力学分析．所有研究（基因阵列、RT-PCR、Northern 印迹法、Western 印迹法、逆行标记的 RGC 的计数）都是对在术后指定天数从对照（假手术的）或烧灼的眼睛中新鲜分离的视网膜进行的。

[0109] RT-PCR. 在指定的天数切下对照、高 IOP 或轴突切开的动物的视网膜。提取总视网膜 RNA(Trizol，GIBCO)，消化 DNA(Dnase，扩增级，GIBCO)，在第二次 Trizol 提取后再次纯化样品。对于 RT-PCR 分析，使用单视网膜（n = 3-5）。利用 1 μ g 总视网膜 RNA 和特异性引物（SIGMA）产生互补 cDNA。cDNA 的 PCR 扩增用每种基因的特异性引物进行。对于 PCR，使用半定量 PCR 分析的严格条件。在总共 30 个循环后获得候选基因的线性扩增，而 β - 肌动蛋白（用作内部控制）在 18 个循环后在线性范围内。在三个独立的使用三种独立制备的

RNA 样品的 RT-PCR 实验中，用 STORM 840 成像系统扫描用来分析 PCR 产物的琼脂糖凝胶，并且用 imagequant 分析软件进行定量分析。读数为平均值 ±SEM，每组（正常的 IOP 和高 IOP）中每一基因产物的数据对于作为内部控制的 β-肌动蛋白（100%）进行标准化。视网膜 β-肌动蛋白 mRNA 的表达水平不随着高 IOP 的提高而改变（数据未显示）。

[0110] 为了证实基因微阵列分析的结果，用某些候选 IPREG 的特异性引物对进行定量 RT-PCR。用独立分离的视网膜 mRNA 样品进行的几项 RT-PCR 实验定量地证实了双载蛋白、AMPLP-2、βA4 晶体蛋白和 ras 相关 p23 的下调，以及 α2 巨球蛋白、Gzα、PTP-1γ、reggiel-1 和 PSD95/SAP90 相关蛋白 4 的上调（见表 3，有些数据未显示）。

[0111] 选择 α2 巨球蛋白进行进一步的研究。对视网膜 α2 巨球蛋白 mRNA 的 Northern 印迹分析显示高 IOP 第 28 天比正常 IOP 高大约 3 倍（$p < 0.001$）。这种增加被倍他洛尔治疗略微减弱，但是相对于正常 IOP 仍然显著增加。相反，接受或未接受倍他洛尔治疗的正常 IOP 的对照视网膜具有正常的和相当的 α2 巨球蛋白 mRNA（图 3）。

[0112] 高眼压对 IPREG 的特异性调节

[0113] 视神经轴突切开术．用赛拉嗪、乙酰丙嗪和乙酰丙嗪的混合物麻醉 250-300 克的雌性 Wistar 大鼠。通过切开背侧眼窝并部分去除泪腺和眼眶脂肪接近眼球。通过分离上直肌然后切开眼牵缩肌显现视神经（ON）。在 ON 的眼球出口后 5mm 处形成纵向脑膜切口，避开血管，以使视网膜循环不受影响。在眼球出口后 5mm 进行 ON 切开术，以使视神经头不受影响。所有动物操作都由 McGill 动物福利委员会（McGill Animal Welfare Committee）批准。

[0114] Western 印迹分析．将一个视网膜匀浆化并且裂解（150mM NaCl，50mM Tris pH 8.0，2% NP-40，PMSF，亮抑酶肽和抑肽酶）45 分钟。离心除去核和碎片后，使用试剂盒（BIORAD）测定可溶性蛋白质的浓度。每泳道 15g 视网膜蛋白质在 12% SDS-PAGE 上分级分离，并转移到硝酸纤维素膜上。用山羊抗大鼠 α2 巨球蛋白的多克隆抗体（Sigma 和 Calbiochem）检测 α2 巨球蛋白。使用纯大鼠 α2 巨球蛋白（Sigma）作为对照。用辣根过氧化物酶（HRP）-偶联的抗体作为第二试剂。免疫反应性带用增强的化学发光法（NEN）显示。

[0115] 为了确定高眼压，而不是 RGC 死亡，是基因表达的特异性调节物，将青光眼模型与视神经轴突切开模型进行比较。视网膜蛋白质的定量 western 印迹分析用来自正常 IOP、高 IOP 第 28 天和 ON 轴突切开术第 4 天的样品进行。对于每种模型选择这些时间点研究显著 RGC 死亡之前的分子改变。

[0116] 在高 IOP 中，视网膜 α2 巨球蛋白表达显著上调 2.3 倍，但是在视神经轴突切开中没有改变（图 4）。相反，在青光眼和视神经轴突切开模型中，Gzα 蛋白（分别增加 64%和 43%）和双载蛋白（在两种模型中减少大约 30%）的视网膜水平具有相当的改变。因此，Gzα 和双载蛋白的改变不被高 IOP 特异性调节；实际上，它们可能是 RGC 损伤的标记物，而 α2 巨球蛋白被高眼压特异性诱导。

[0117] 实施例 2. α2 巨球蛋白在青光眼中的作用的验证

[0118] α2 巨球蛋白及其受体在视网膜中的定位

[0119] 逆行 RGC 标记．用 3% DII（1,1-双十八烷基 -3,3,3,3-四甲基吲哚碳菁高氯酸盐）或 3%荧光金标记 RGC。简要地说，麻醉 Wistar 大鼠，并将它们的头固定在立体定向仪

上。暴露两个上丘 (SC)，将染料注入到每个半球的 SC 处的两个相邻部位（前囟后 5.8mm，侧向 1.0mm，第一次染料溶液释放深 4.5mm，第二次释放深 3.5mm）。

[0120] 平铺固定的视网膜和 RGC 计数．染料注入后 7 天，灌注固定大鼠的脉管系统（经心脏灌注磷酸盐缓冲液 (PB)，然后是 4％的 PB 中的 PFA)，并摘出眼睛。后固定 1 小时后穿过巩膜形成切口，形成马尔他十字图案，并且从视神经头处的视神经乳头凹陷 (eyecup) 上剥离视网膜。将视网膜平铺固定在载玻片上（玻璃体侧向上)，风干，并且覆盖以固定基质 (Molecular Probes)。在荧光显微镜 (Zeiss) 下观察视网膜。对于每个视网膜，每四分之一区域以 20 倍拍摄四张数码图片（上、下、鼻侧和颞侧)。根据逆向运输的染料的存在和形态学识别平铺固定的视网膜中的 RGC。将所有四个四分之一区域中的 RGC（每个视网膜 16 张图片）进行平均，并表示为 RGC/mm^2 计数面积。

[0121] 免疫组化和共聚焦显微镜检查．如上所述心内灌注大鼠，摘出它们的眼睛，除去前部和晶状体。将剩余的视神经乳头凹陷浸没在 4％ PFA 中 2 小时，然后转移到 30％蔗糖中于 4℃数小时，包埋在 OCT（组织 -Tek，Miles Laboratories，IN) 中，并在液氮中在甲基丁烷中冷冻。将径向冷冻切片 (10-14m) 置于明胶覆盖的玻片上。用含 1％ Triton 的 PBS 中的 3％ BSA 在室温下封闭切片 30 分钟，并暴露于第一抗体 - 抗 α 2 巨球蛋白抗体（兔，1 ： 200(Calbiochem) 或山羊，1 ： 100(Sigma)) 和 / 或抗 LRP1 受体 (1 ： 200 Santa Cruz)2 小时。用抗胶质标记物胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 的抗体（小鼠，1 ： 400 Chemicon) 或抗神经元标记物微管蛋白 III(Tubulin III) 的抗体（小鼠，1 ： 2000，Chemicon) 进行双染色。第二抗体是 FITC 偶联的抗小鼠、Cy3- 偶联的抗兔或 Alexa Fluor 488 抗山羊抗体（以 1 ： 250、1 ： 1000 或 1 ： 500 稀释度使用)，在室温下孵育 1 小时。用 Zeiss 共聚焦显微镜 (LSM510) 记录共聚焦图像。

[0122] 因为 α 2 巨球蛋白是一种可溶性蛋白质，因此研究了它的定位及其细胞受体 (LRP-1) 的定位（见图 5A-5D)。在正常视网膜中，在大多数 RGC 中发现了 α 2 巨球蛋白，其中它与逆行示踪剂荧光金标记和微管蛋白 β III（一种 RGC- 特异性标记物）共定位（数据未显示)，但是也定位于米勒细胞和视网膜星形胶质细胞中。LRP-1 受体的阳性免疫染色也与荧光金阳性神经元共定位。在正常视网膜中，几乎仅在 RGC 中检测到 LRP-1 免疫染色，而在青光眼（烧灼第 28 天，具有高 IOP) 中，RGC 中的 LRP-1 表达仍然较高，但是也在 fiver 层中检测到，在推测的星形胶质细胞和米勒细胞过程中，LRP-1 与 GFAP 在该层中共定位。在使用由高渗盐水青光眼模型诱导的高眼压大鼠制备的视网膜切片进行的研究中获得类似的 α 2 巨球蛋白上调和 LRP 共定位的数据（数据未显示)，提示该结果对于一种青光眼动物模型不是特异的。

[0123] 对大鼠房水的半定量 western 印迹分析证明在高 IOP 眼中比正常对侧眼中激活的 α 2 巨球蛋白显著增多（数据未显示)。与这些发现相符，使用在手术期间收集的人房水进行的半定量研究证明激活的 α 2 巨球蛋白在青光眼房水中平均显著增多，而在白内障患者中没有显著增多（图 6)。

[0124] 总之，数据表明在 2 个大鼠动物模型和人类中，α 2 巨球蛋白在高眼压中上调，α 2 巨球蛋白与其受体 LRP-1 在 RGC 和其它视网膜层中共定位，并且也存在于房水中。

[0125] 在体内确认 α 2 巨球蛋白为青光眼治疗靶标

[0126] 眼内注射．在眼睛颞上侧四分之一进行结膜切开。用 30G 针在眼壁上形成穿孔，以

允许套管进入眼眶中。用直立微电极拉伸器 (Narishige) 制备的玻璃套管 (10μm 厚) 通过塑料管与 Hamilton 注射器连接,以分配抗 α2 巨球蛋白兔抗体 (Calbiochem)、对照 PBS 或对照兔抗体 (Sigma) 的溶液。在术后第 14 天和第 21 天进行注射 (在具有正常 IOP 的假手术的对照眼中,以及具有高 IOP 的烧灼的眼中)。眼内注射 2μl 的体积,其中含有总共大约 2μg 抗体。选择该量是因为在完整大鼠视网膜的定量 western 印迹分析中估计在青光眼眼睛中总共有大约 1μg α2 巨球蛋白 (数据未显示)。眼压不受眼内注射的影响,高 IOP 眼保持高 IOP,正常 IOP 眼保持正常 IOP(数据未显示)。

[0127] 已经证实 α2 巨球蛋白与 LRP-1 的相互作用对神经元有害 (Lopes MB 等人, FEBS Lett 338 :301-305,1994 ;Yepes M 等人,J ClinInvest 112 :1533-1540,2003),包括对 RGC 有害 (Birkenmeier G 等人, Neuroreport 8 :149-151,1996 ;Birkenmeier G 等人, FEBS Lett 416 :193-196,1997 ;Herz J,J Clin Invest 12 :1483-1485,2003)。

[0128] 为了评价 α2 巨球蛋白在 RGC 死亡中的可能的作用,向正常眼睛中显微注射 α2 巨球蛋白,以确定是否接着发生青光眼样 RGC 死亡。在这一例子中,通过单一眼内注射向正常眼睛中递送总共 1-2μg 的 α2 巨球蛋白,在注射后第 14 天或第 28 天通过逆行标记对存活的 RGC 进行计数。选择 1-2μg 的量以最好地模拟从大鼠高眼压模型的青光眼眼睛的房水中定量的 α2 巨球蛋白的总量 (数据未显示)。

[0129] 与注射 PBS 载体的对侧眼组相比,快速眼内 α2 巨球蛋白注射导致 RGC 进行性损失。在三个独立的实验中 (每组 n = 3、2、6 只眼),在 α2 巨球蛋白注射后 2 周和 4 周与载体 PBS 相比分别有 11±3% ($p \leqslant 0.01$) 和 28±11% ($p \leqslant 0.001$) 的 RGC 损失。

[0130] 这些数据提示 α2 巨球蛋白诱导进行性 RGC 死亡,其动力学与高眼压诱导的动力学相当。与以前的显示 α2 巨球蛋白 mRNA 和蛋白质不依赖于高 IOP 持续过量表达的结果结合起来,这些结果有助于解释高 IOP 正常化后的进行性 RGC 死亡。

[0131] 利用第二个实验例证实 α2 巨球蛋白在 RGC 死亡中的作用。向具有高 IOP 的青光眼眼内注射抗 α2 巨球蛋白的中和抗体,以确定是否可以阻止 RGC 死亡。该实验模型是在开始 α2 巨球蛋白中和治疗之前诱导高 IOP 14 天,以触发 α2 巨球蛋白的过量表达和 RGC 损伤。应用中和作为单一治疗,或者与每日倍他洛尔治疗联合,以更好地反映用降压药同时治疗青光眼患者的临床情况。中和抗体在烧灼后第 14 天和 21 天给药,在术后第 42 天计数通过逆行标记鉴定的活的 RGC。在这个方案中,在第 21 天和第 42 天之间不给予抗体。对照大鼠用对照抗体、盐水处理,或者不注射 (见表 3)。

[0132] 高 IOP 42 天后,与正常 IOP 相比有 33±6% RGC 的损失 (表 4,第 3 行对比第 1 行)。高 IOP 中的 RGC 损失是依赖于时间的。在高 IOP 第 28 天有 19±5% RGC 的损失,高 IOP 第 14 天有 8±5% RGC 的损失 (表 4,第 4 行和第 5 行)。每日应用倍他洛尔 (从第 14 天到第 42 天) 将 IOP 正常化使 RGC 损失显著减少到 19±1% (表 4,第 8 行对比第 3 行)。在青光眼第 14 天和第 21 天两次单独眼内注射抗 α2 巨球蛋白抗体使 RGC 损失减少到 21±3% (表 4,第 7 行对比第 6 行和第 3 行)。用抗 α2 巨球蛋白抗体联合倍他洛尔治疗具有明显的神经保护作用,使 RGC 损失显著降低至 11±4% (表 4,第 10 行对比第 9 行)。这种联合治疗明显优于单独的任一种治疗 (表 4,第 10 行对比第 7 行和第 8 行)。联合治疗中的 RGC 计数与眼内注射对照抗体的正常 IOP 眼中的 RGC 计数在统计学上没有不同 (表 4,第 10 行对比第 2 行),并且与经受 14 天高 IOP 的眼睛在统计学上没有不同 (表 4,第 10 行对比第

5 行）。

[0133] 对照抗体或盐水的对照眼内注射不改变正常视网膜中的 RGC 计数（数据未显示）或者青光眼第 42 天的 RGC 计数（表 4，第 6 行对比第 3 行），并且不改变应用倍他洛尔使 IOP 正常化的保护作用（表 4，第 8 行对比第 9 行）。

[0134] 讨论

[0135] α 2 巨球蛋白基因上调

[0136] α 2 巨球蛋白基因和蛋白质仅在高 IOP 大约 7 天后就上调，不依赖于高眼压，其表达持续超过 20 天。α 2 巨球蛋白 mRNA 的诱导对于高 IOP 是特异性的，并且在视神经轴突切开术后不提高。因此，短期高眼压足以引起视网膜中高眼压特异性的、长期的提高。这些数据确定 α 2 巨球蛋白在烧灼大鼠青光眼模型以及高渗盐水大鼠青光眼模型中作为一种 IPREG（数据未显示），也证明了在青光眼人眼中的表达高于白内障眼睛。

[0137] α 2 巨球蛋白损伤的机理

[0138] 在青光眼中，α 2 巨球蛋白及其 LRP-1 受体富含于 RGC 中，LRP-1-α 2 巨球蛋白相互作用对于各种类型的神经元有害 (Lopes MB 等人，FEBS Lett 338 :301-305，1994 ；Yepes M 等人，J Clin Invest112 :1533-1540，2003)，包括对 RGC 有害 (Birkenmeier G 等人，Neuroreport 8 :149-151，1996 ；Birkenmeier G 等人，FEBS Lett 416 :193-196，1997 ；Herz J，J Clin Invest 112 :1483-1485，2003)。

[0139] 与 α 2 巨球蛋白的神经毒性作用相符，这种蛋白质在正常眼睛中的眼内运输导致青光眼样 RGC 损失 ；而该蛋白质的中和显著减少或延迟了青光眼中的 RGC 死亡，特别是在与眼压正常化药物联用时。

[0140] 神经毒性机理包括通过激活 NMDA 受体 (NMDAR) 提高 iCa^{++}，以及调节海马神经元中的谷氨酸盐神经传递 (Bacskai BJ 等人，ProcNatl Acad Sci 97 :11551-11556，2000 ；Qui Z 等人，J Biol Chem277 :14458-14466，2002 ；Qui Z 等人，Neuroscience 122 :291-303，2003 ；Qui Z 等人，J Biol Chem 279 :34948-34956，2004)。因此，眼中 α 2 巨球蛋白的上调可以使 NMDAR 具有正常的兴奋性活性，导致 RGC 死亡。α 2 巨球蛋白也结合并且中和视网膜神经营养蛋白，特别是神经生长因子 (NGF)(Chiabrando GA 等人，J Neurosci Res 70 :57-64，2002 ；Skornicka EL 等人，J Neurosci Res 67 :346-353，2002)，NGF 是重要的 RGC 的存活或保持因子。因此，α 2 巨球蛋白的过量表达将导致生长因子的生物利用度降低（参见图 7 中的模型），并且可能是关于为什么外来 NGF 的运输不能保护青光眼中的 RGC 的一种解释。

[0141] 其它上调的基因和 RGC 损伤的关系

[0142] 在高眼压中上调的其它 IPREG 可能与 RGC 死亡有关。特别感兴趣的是一些这样的 IPREG 可以与 α 2 巨球蛋白协同作用。

[0143] 上调的 PSD95/SAP90- 相关蛋白 -4(PSD95/SAP90) 和 GTPase Gz α 与 NMDAR 活性有关。PSD95/SAP90 在不同于血影蛋白 (spectrin) 的部位结合 NMDAR 的 C- 末端 (Wechsler A 和 Teichberg VI，EMBO J17 :3931-3939，1998)，并且通过 src- 家族激酶诱导 NMDAR 磷酸化和激活 (Hou XY 等人，Brain Res 955 :123-132，2002)。Fyn-PSD95-NR 复合物制剂增强了脑缺血中的细胞死亡，而沉默化的 PSD95 减少了缺血后神经元细胞死亡 (Hou XY 等人，Neurosci Lett 385 :230-233，2005)。

[0144] 激活 NMDAR 的 src- 家族激酶 (Hou XY 等人，Brain Res 955 :123-132，2002) 本

身被蛋白质酪氨酸磷酸酶 (Lei G 等人，EMBO J 21 :2977-2989,2002 ;van Zundert B 等人，Trends Neurosci 27 :428-437,2004)(PTP) 激活，因此上调的 PTP-γ (PP1) 可能与青光眼和 RGC 应激相关。而且，蛋白质酪氨酸磷酸酶活性改变了 NMDAR 复合物中的亚单位装配 (Ferrani-Kile K 和 Leslie SW，Pharmacol Exp Ther 314 :86-93,2005)，并且在 PTP-γ (PP1) 和 NMDAR 之间存在正反馈回路 (SzatmariE 等人，J Biol Chem 280(45) : 37526-35,2005)。

[0145] 上调的 Gzα 是 NMDAR 信号的直接相互作用物和介质。实际上已经报道了 α2 巨球蛋白 /LRP-1 受体和 GTPase 之间的功能增强加剧了神经元死亡 (Hashimoto Y 等人，J Neurosci 20 :8401-8409,2000)。视网膜 Gzα 也可与几种 Gi- 偶联的受体的活性有关，所述受体包括 5- 羟色胺 (serotonin) 和阿片样受体 (Connor 和 Christie,1999)。Gzα 在神经元中高度表达 (Kelleher KL 等人，Brain Res Dev Brain Res 107 :247-253,1998)，并且被逆向转运到末端，在这里它可以通过减弱 RAP-1 活性 (Johanson SO 等人，Neurochem Res 21 :779-785,1996) 抑制神经营养蛋白信号发生和分化 (Meng J 和 Casey PJ，J Biol Chem 277 :43417-43424,2002)(参见图 7)。

[0146] 基因下调和 RGC 损伤

[0147] 视网膜双载蛋白 (一种在胞吞作用和囊泡内化和转运中起关键作用的蛋白质) 的下调 (Di Paolo G 等人，Neuron 33 :789-804,2002 ;Tomizawa K 等人，J Cell Biol 163 : 813-824,2003) 可以解释青光眼中受损的轴突运输。双载蛋白由 RGC 表达 (Hosoya O 和 Tsutsui K，Neurosci 19 :2179-2187,2004)。同样，下调的 RKIAS43 是一种与突触小泡膜蛋白 VAT-1(一种胆碱能突触小泡膜蛋白) 具有 98.9％同源性、与囊泡胺转运蛋白 1 具有 80％同源性的 EST ;提示在胞吞作用和囊泡功能中起作用。

[0148] 减少的轴突运输在传统上被解释为由高压引起的压缩导致的视神经头的机械″生理轴突切开术″。上述数据证明高眼压通过引起囊泡运输蛋白表达的长期降低，引起逆向缺乏并且可以导致 RGC 死亡，可以在功能上模拟生理轴突切开术。

[0149] 下调的解旋酶与 DNA 修复有关，并且较低的 DNA 修复可以加剧细胞死亡。与 RGC 死亡特别有关，解旋酶在功能上与拓扑异构酶相关 (Howard MT 等人，Proc Natl Acad Sci 91 :12031-12035,1994)，拓扑异构酶活性是双载蛋白的转录诱导绝对需要的 (Tsutsui K 等人，JBiol Chem 216 :5769-511％,2001)。因此，图 7 模型中所示的双载蛋白的下调与解旋酶的下调相一致。最后，下调的淀粉状蛋白前体样蛋白 2 与铜的内稳态有关，并且可能参与神经保护 (White AR 等人，JNeurosci 22 :365-376,2002)。它们的缺乏可以使 RGC 对应激敏感。

[0150] 结论

[0151] 体内证据表明在大鼠青光眼模型中，高眼压调节一组关键的视网膜基因产物。一组基因的表达由短期高眼压选择性调节，并且长期持续改变，甚至在用药物使高眼压正常化后。与 RGC 死亡有关的基因产物上调，而与 RGC 保持或存活有关的基因产物下调。可溶性蛋白质 α2 巨球蛋白，一种明显上调的视网膜基因产物，被确认为防止青光眼中 RGC 死亡的治疗靶标。

[0152] 本发明已经参照其优选实施方案进行了具体说明和描述，本领域技术人员应当理解，在不背离权利要求书包括的本发明范围的条件下，可以在形式和细节上对其进行各种变化。

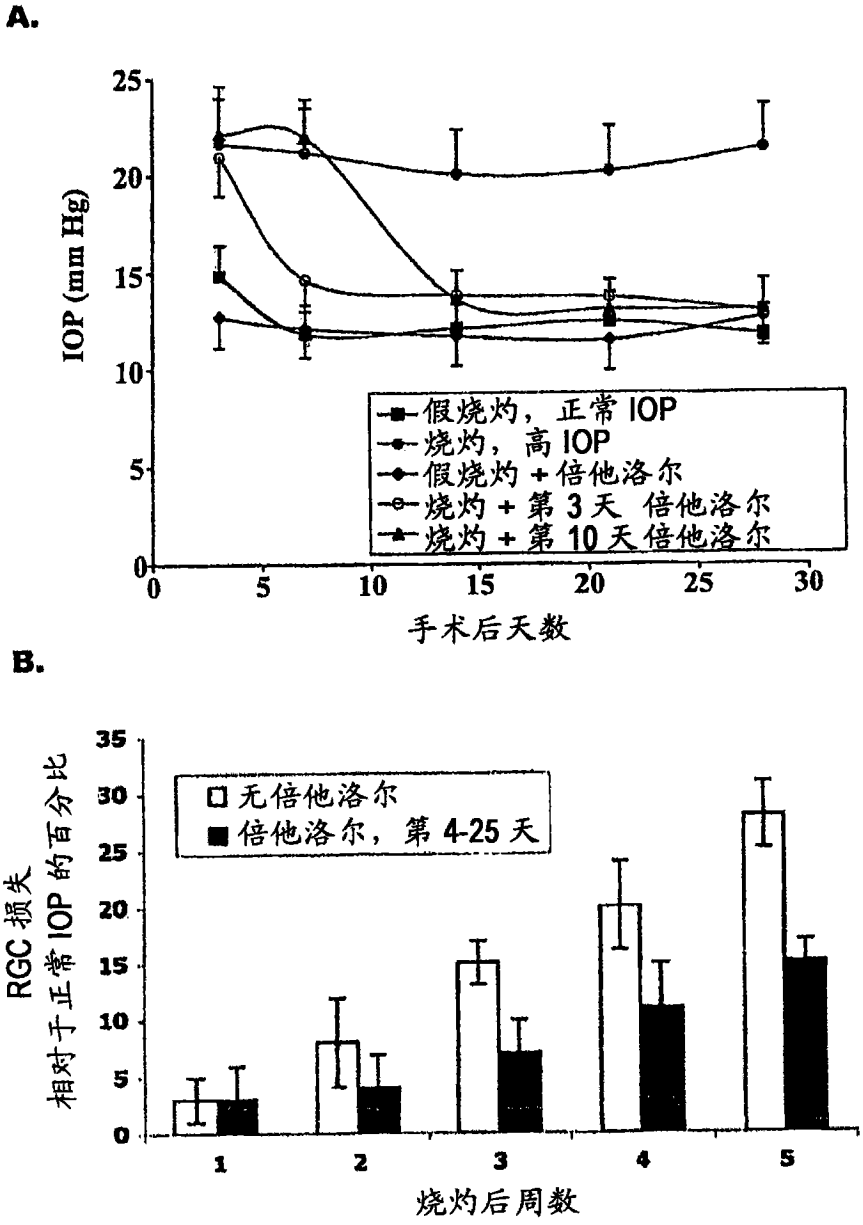

A.
IOP (mm Hg)
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
手术后天数
假烧灼，正常 IOP
烧灼，高 IOP
假烧灼 + 倍他洛尔
烧灼 + 第 3 天 倍他洛尔
烧灼 + 第 10 天倍他洛尔
B.
RGC 损失
相对于正常 IOP 的百分比
35
30
25
20
15
10
5
0
无倍他洛尔
倍他洛尔，第 4-25 天
1
2
3
4
5
烧灼后周数

图 1

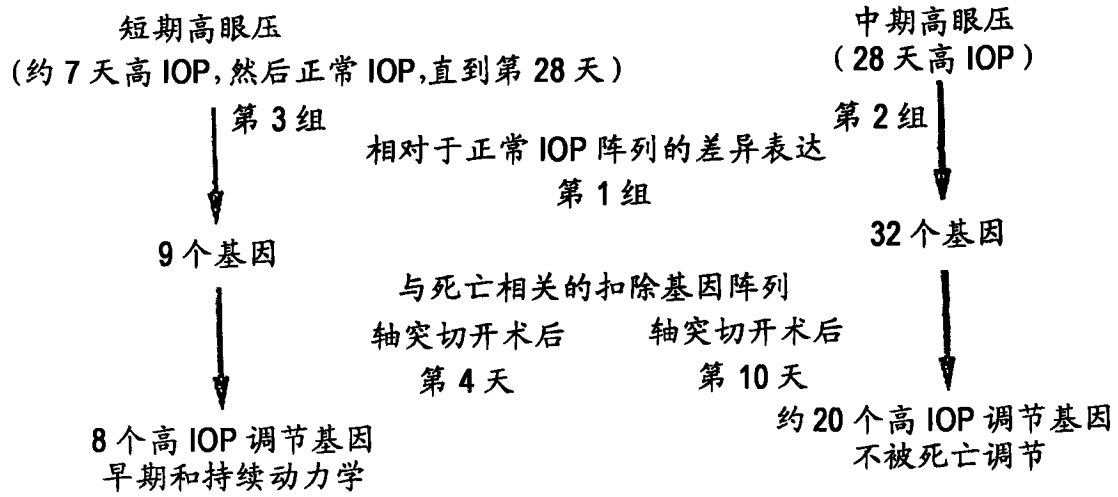

具有视网膜 mRNA 的基因阵列
短期高眼压
(约 7 天高 IOP,然后正常 IOP,直到第 28 天)
第 3 组
9 个基因
8 个高 IOP 调节基因
早期和持续动力学
相对于正常 IOP 阵列的差异表达
第 1 组
与死亡相关的扣除基因阵列
轴突切开术后
第 4 天
轴突切开术后
第 10 天
中期高眼压
(28 天高 IOP)
第 2 组
32 个基因
约 20 个高 IOP 调节基因
不被死亡调节

图 2

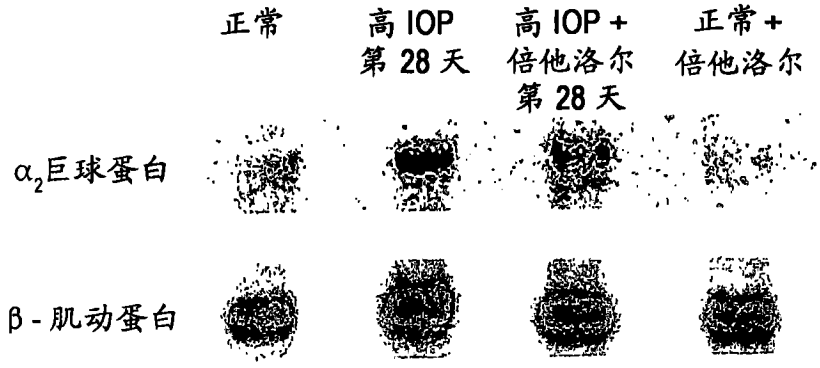

正常
高 IOP
第 28 天
高 IOP +
倍他洛尔
第 28 天
正常 +
倍他洛尔
α2巨球蛋白
β - 肌动蛋白

图 3

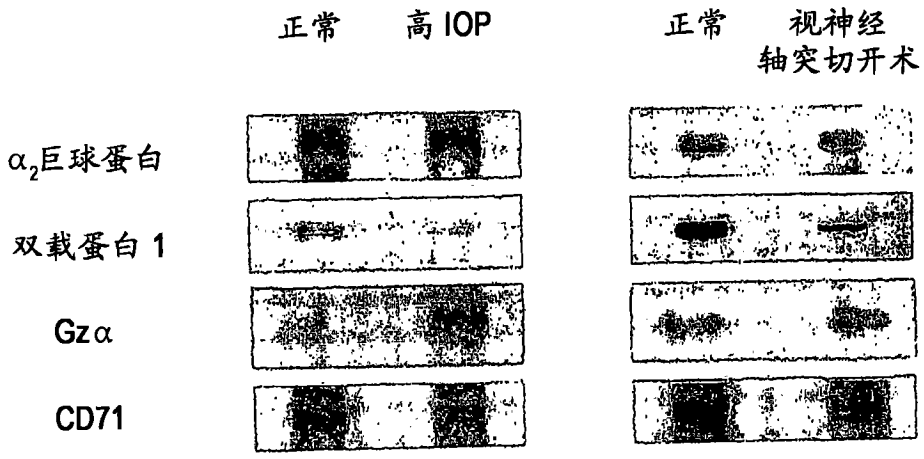

正常
高 IOP
正常
视神经
轴突切开术
α2巨球蛋白
双载蛋白 1
Gzα
CD71

图 4

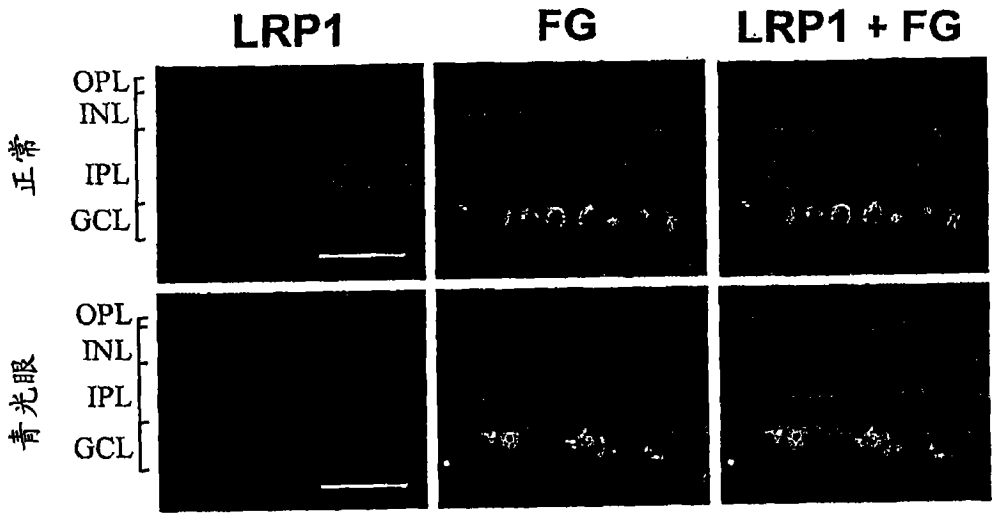

LRP1
FG
LRP1 + FG
正常
青光眼
OPL
INL
IPL
GCL

图 5A

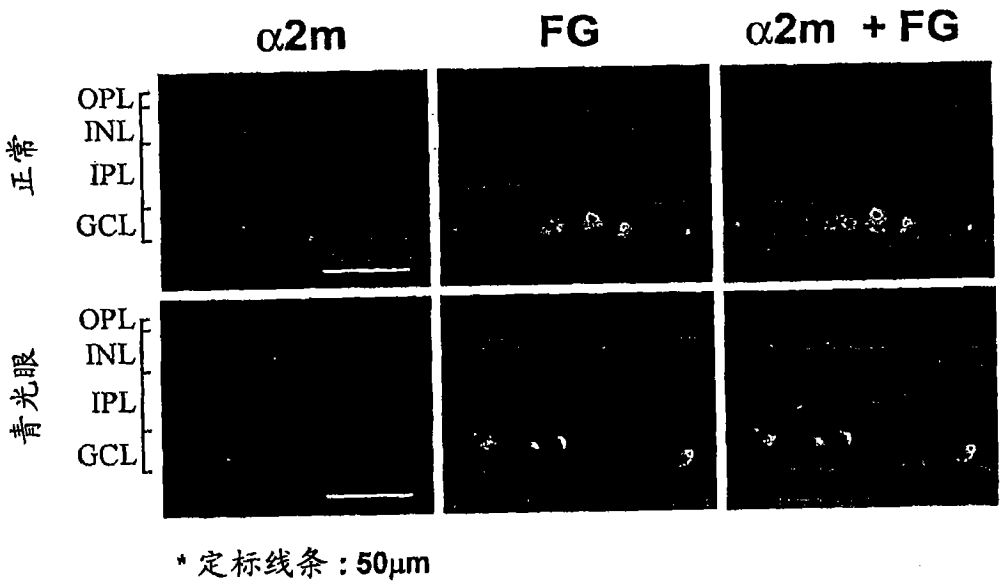

α2m
FG
α2m + FG
正常
OPL
INL
IPL
GCL
青光眼
OPL
INL
IPL
GCL
* 定标线条：50μm

图 5B

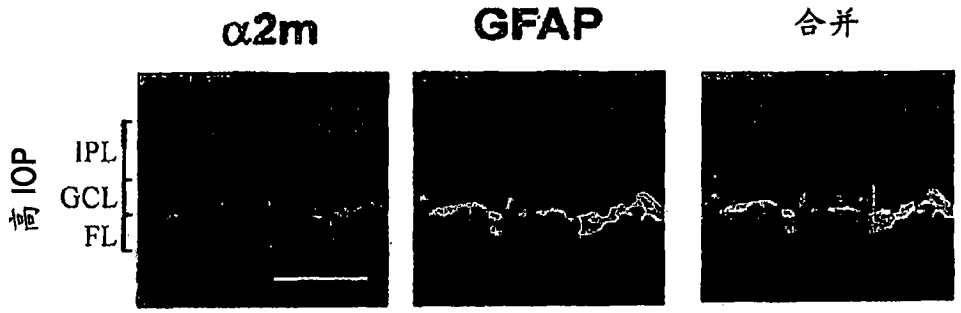

α2m
GFAP
合并
高 IOP
IPL
GCL
FL

图 5C

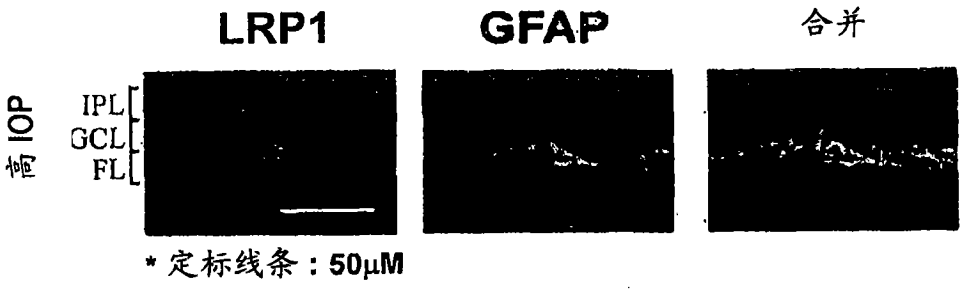

LRP1
GFAP
合并
高 IOP
IPL
GCL
FL
* 定标线条：50μM

图 5D


G G G C G C C C C

图 6

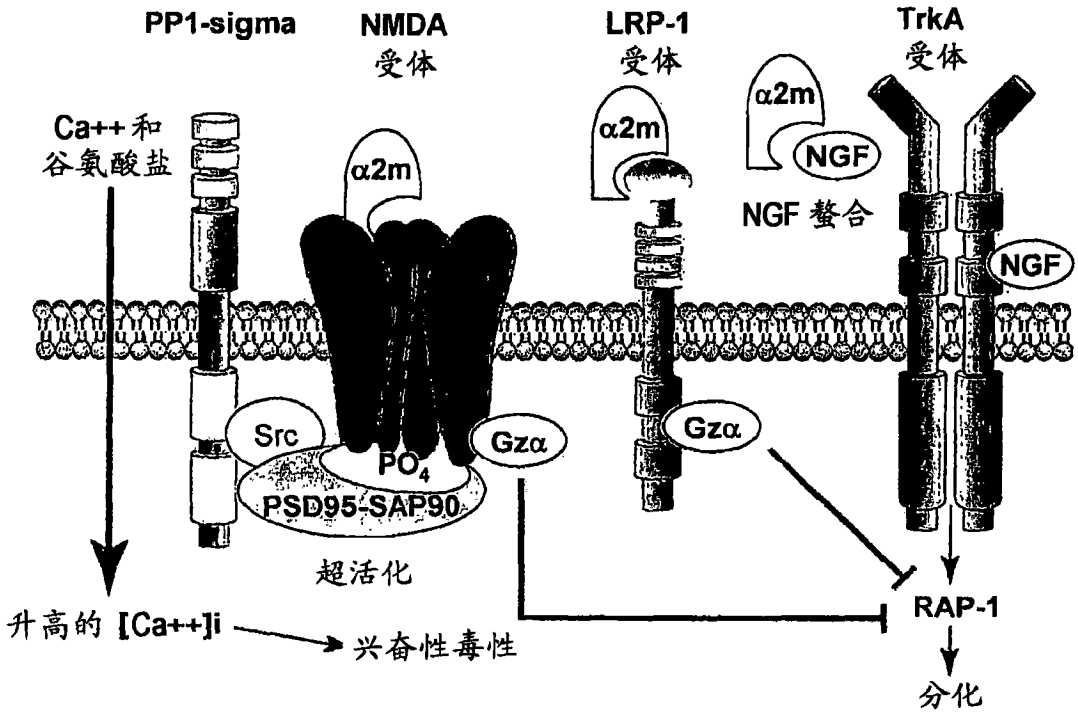

PP1-sigma
NMDA
受体
LRP-1
受体
TrkA
受体
Ca++和
谷氨酸盐
α2m
α2m
α2m
NGF
NGF 螯合
NGF
Src
PO4
PSD95-SAP90
Gzα
Gzα
超活化
升高的 [Ca++]i
兴奋性毒性
RAP-1
分化

图 7