

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 38/00
A61K 38/18 A61P 25/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97194749. X

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1181885C

[22] 申请日 1997. 3. 21 [21] 申请号 97194749. X
[30] 优先权
[32] 1996. 3. 22 [33] US [31] 08/620,444
[86] 国际申请 PCT/US1997/005071 1997. 3. 21
[87] 国际公布 WO1997/034618 英 1997. 9. 25
[85] 进入国家阶段日期 1998. 11. 18
[71] 专利权人 通用医疗公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 塞思·P·芬克尔斯坦
审查员 张珍丽

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 15 页

[54] 发明名称 中枢神经系统局部缺血或损伤后多肽生长因子的给药

[57] 摘要

本发明涉及通过向脑池内或静脉内以多肽生长因子，如碱性成纤维细胞生长因子给药而治疗中枢神经系统损伤。 此方法提供的显著好处是给药可在损伤后的较长时间内进行。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 利用多肽生长因子制备治疗中枢神经系统损伤发生 12 小时以后的疾病状态的药剂的用途。
- 5 2. 权利要求 1 的用途, 其中所述的损伤包括局部缺血。
3. 权利要求 1 的用途, 其中所述的损伤为外伤。
4. 权利要求 1 的用途, 其中所述的多肽生长因子为成纤维细胞生长因子。
5. 权利要求 4 的用途, 其中所述的成纤维细胞生长因子为碱性 FGF 或其有活性的片段。
- 10 6. 权利要求 4 的用途, 其中所述的成纤维细胞生长因子为酸性 FGF 或其有活性的片段。
7. 权利要求 4 的用途, 其中所述的成纤维细胞生长因子为 hst/Kfgf 基因产物或其有活性的片段。
- 15 8. 权利要求 4 的用途, 其中所述的成纤维细胞生长因子为 FGF - 5 或其有活性的片段。
9. 权利要求 4 的用途, 其中所述的成纤维细胞生长因子为 int - 2 或其有活性的片段。
10. 权利要求 1 的用途, 其中所述药剂促进所述患者从损伤的不良后果恢复功能, 所述的功能恢复包括所述病人在以下的至少一个方面的改进(a) 运动技能, (b) 认识技能, (c) 感觉和(d) 语言。
- 20 11. 权利要求 2 的用途, 其中所述的治疗在所述局部缺血的大于 24 小时后开始。
12. 权利要求 2 的用途, 其中所述的治疗在所述局部缺血的大于 48 小时后开始。
- 25 13. 权利要求 1 的用途, 其中所述的治疗包括静脉内给药。
14. 权利要求 13 的用途, 其中所述的静脉内给药包括以 10 - 1,000 $\mu\text{g/kg}$ 的多肽生长因子给药。
15. 权利要求 1 的用途, 其中所述的治疗包括大脑内给药。
- 30 16. 权利要求 1 的用途, 其中所述的大脑内给药为脑池内给药。
17. 权利要求 16 的用途, 其中所述的脑池内给药包括 0.1 - 100 $\mu\text{g/kg/}$

注射的单一注射的给药。

18. 权利要求 17 的用途，其中所述的给药在所述的中枢神经系统损伤的 24 小时后进行。

19. 权利要求 16 的用途，其中所述的脑池内给药包括 1.5 - 3.0 $\mu\text{g/kg/}$
5 注射的一系列注射的给药。

20. 权利要求 19 的用途，其中所述的给药每周进行 2 次。

21. 权利要求 19 的用途，其中所述的给药在中枢神经系统所述损伤的
24 小时后进行。

22. 权利要求 2 的用途，其中所述的局部缺血为全面性大脑局部缺血。

10 23. 权利要求 2 的用途，其中所述的局部缺血为病灶性大脑局部缺血。

24. 权利要求 2 的用途，其中所述的局部缺血由以下因素所致，包括高血压、高血压脑血管疾病、动脉瘤破裂、栓塞、血栓、血管瘤、血液不调、心脏衰竭、系统性低血压、心动停止、心源性休克、败血性休克、脊髓索创伤、头部创伤、癫痫发作、肿瘤出血或其它血液损失。

15 25. 权利要求 1 的用途，其中所述的治疗包括髓鞘内给药。

中枢神经系统局部缺血或损伤
后多肽生长因子的给药

5

此处所述的工作得到国立卫生研究院资金(P01 NS 10828)的部分授权支持。因此政府具有本发明的特定权利。

本发明的领域为中枢神经系统局部缺血损伤的治疗。

发明背景

10 神经因子是中枢神经系统发育所必需的多肽。第一种发现的神经因子即神经生长因子(NGF)，现已知其是一大类生长因子的一部分，后者也包括脑衍生神经营养因子(BDNF)和神经营养蛋白(NT3 和 NT4/NT5)。成纤维细胞生长因子(FGFs)构成了另一大类多肽生长因子，该类生长因子在多种细胞(包括神经元)中诱导促有丝分裂、趋化性和血管生成活性(Thomas, FASEB J. 1:434 - 440, 1987; Burgess 等, 生化年评(Ann. Rev. Biochem.) 58: 575 - 606, 15 1989; Moscatelli 等, 美国专利 4,994,559)。虽然多肽生长因子在动物发育中的作用日渐明显，但其在成年动物，特别是神经系统中的作用知之甚少。

成年动物中神经元的损伤或死亡造成的运动原和/或认知的缺陷常常是永久性的。患“中风”或任何其它形式大脑缺血的病人常常部分恢复，但常留下中度到严重的衰弱。目前，除了理疗外，还没有改善患大脑局部缺血病人预后的可靠的治疗方法。

发明简述

我们发现在大脑局部缺血后，以多肽生长因子给药可提供明显的好处，甚至在缺血后相当长时间后给药也是如此。功能恢复出现而梗塞 25 (infarct)(即，局部缺血造成的坏死组织)的大小没有减小。此外，在梗塞(即局部缺血造成的坏死组织)不减小的情况下即能恢复功能。

因此，本发明涉及通过以多肽生长因子对病人给药而治疗患中枢神经系统损伤，如局部缺血或外伤损伤的病人的方法，其中给药在损伤开始大于 6 小时后进行；在更晚阶段给药是有益的，即在局部缺血发作后 12、24 小时、 30 48 小时或更长时间后给药。

用来给药的多肽生长因子可以是成纤维细胞生长因子(FGF)家族成员, 如碱性 FGF(bFGF)、酸性 FGF(aFGF、 hst/Kfgf 基因产物、 FGF - 5 或 int - 2 ; 神经营养蛋白家族的成员, 如神经生长因子(NGF)、脑衍生神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白 3(NT3)或神经营养蛋白 4/5(NT4/5); 类胰岛素生长因子(IGF), 如 IGF - 1、或 IGF - 2 ; 睫状神经营养生长因子(CNTF); 5 白血病抑制因子(LIF); 制瘤素 M ; 或白细胞介素。

本发明同样包括“功能性多肽生长因子,”它具有此处所述多肽生长因子的一种或更多种生物学功能或活性。这些功能或活性将在下面详细描述, 该功能或活性主要涉及中枢神经系统局部缺血后恢复的增强。因此, 多肽生
10 长因子其它的分子形式也在本发明的范围之内。例如, 已观察到 bFGF 具有分子量为 17.8 、 22.5 、 23.1 和 24.2kDa 的形式。较高的分子量形式为 17.8kDa bFGF 的共线性(colinear)N - 末端延伸(Florkiewicz 等, 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)86: 3978 - 3981, 1989)。

另一方面, 用于本发明中的多肽生长因子可由这些因子的活性片段所组成。这里用于指代多肽生长因子的“活性片段”意指能产生与全长多肽相同活性的多肽的任何部分。该活性片段将产生至少 40 % , 优选至少 50 % , 更为优选至少 70 % , 且最优选至少 90 % (包括达到 100 %) 全长多肽的活性。可用任一方式容易地测定任何给定片段的活性。例如, 当根据这里所述的本发明方法给药时, 在功能测试中显示与用全长 bFGF 多肽给药产生作用相当
20 的 bFGF 片段即 bFGF 的“活性片段”。熟练技术人员完全有能力测定多肽生长因子(不考虑其大小)是否维持了全长野生型多肽生长因子功能活性。

如这里所使用的, “蛋白”和“多肽”意指任意的氨基酸残基链, 不考虑其长度或翻译后加工(如糖基化或磷酸化)。用于本发明中的多肽生长因子称为“基本上纯的”组合物至少含有重量(干重)占 60 % 的目的多肽, 如 bFGF
25 多肽。优选地, 该多肽组合物为目的多肽重量的至少 75 % , 更优选至少 90 % , 且最优选至少 99 % 。纯度可通过任何适当的标准方法, 如柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或 HPLC 分析加以测定。

此外, 多肽生长因子领域的命名复杂, 主要是因为许多因子由不同的研究组独立地分离而且传统上是根据纯化该因子分析过程中所用的组织类型而
30 加以命名。碱性 FGF 在科学出版物中至少有 23 种不同的名称。这包括白血病生长因子、巨噬细胞生长因子、胚肾衍生血管生成因子 2、前列腺生长因

子、星形胶质细胞生长因子 2、内皮生长因子、肿瘤血管生成因子、肝细胞癌生长因子、软骨肉瘤生长因子、软骨衍生生长因子 1、眼衍生生长因子 1、肝素结合生长因子 II 类、成肌生长因子、人胎盘纯化因子、子宫衍生生长因子、胚胎肿瘤衍生生长因子、人垂体生长因子、垂体衍生软骨细胞生长因子、脂肪细胞生长因子、前列腺成骨细胞因子和哺乳动物肿瘤衍生生长因子。因此，前面所说的任何一种因子都被包括在本发明的范围之内。

用于本发明的多肽生长因子可以是天然产生的、合成的或由例如 bFGF 的一部分与不同多肽的第二部分的杂合或嵌合多肽所组成的重组分子。这些因子可从生物样品中纯化、化学合成或通过标准的技术重组制备(见，如，Ausubel 等，现代分子生物学方法，纽约，John Wiley 和 Sons, 1993; Pouwels 等，克隆载体：实验室手册，1985，1987 增刊)。

根据本发明的治疗方案依据给药方式、给药时间和剂量而进行从而改善病人中枢神经系统伤的不利后果中得到的功能恢复；即，由于根据本发明多肽生长因子给药而病人的运动技能(如姿势、平衡、握力或步态)、识别技能、语言和/或感官知觉(视觉、味觉、嗅觉和本体感觉)改善。

根据本发明多肽生长因子的给药可通过任何一种已知的给药途径进行，包括静脉内，口腔、或大脑内(例如脑室内、鞘内或脑池内)给药；脑池内给药可，例如用 0.1 至 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /注射并单一注射或连续注射进行给药。例如，在局部缺血 24 小时或更长时间后的治疗方案中，脑池内给药可由以下的注射方式所组成，包括例如，损伤后 24 小时的给予的单一注射、损伤后如 24 和 48 小时后施予的 2 次注射或，如果必要，给予每周 2 次(例如，每 3-4 天)的 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /注射的系列注射。该治疗方案可持续很多周。或者，在局部缺血后 24 小时或更长时间后的治疗方案中，脑池内给药可由 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /注射的系列注射、一次注射、2 次注射或，例如一周 2 次注射所组成。

或者，该多肽生长因子可由静脉内给药。一般地，静脉内给药的剂量将大于脑池内给药的剂量，如可以 10-1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 多肽生长因子给药。优选地，该多肽生长因子以 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /小时的浓度范围静脉内给药。下面详细讨论治疗方案。

本发明可用于治疗由于任何一种原因造成中枢神经系统损伤的不良后果。血栓、栓塞(embolus)、和系统性低血压是大脑局部缺血最为常见的原因。其它损伤可由以下因素所致，这些因素包括高血压、高血压脑血管

疾病(Hypertensive cerebral vascular disease)、动脉瘤破裂、血管瘤、血液不调、心脏衰竭、心动停止、心源性休克、败血性休克、头部损伤、脊索损伤、癫痫发作、肿瘤出血或其它血液损失。

如下所述，局部缺血若与中风相关，它可以是全面性的(global)也可以是病灶性的(focal)局部缺血。一般认为用根据本发明的多肽生长因子给药是有效的，甚至给药在损伤后相当长时间后进行还能有效，至少部分是因为这些肽刺激了神经元新的生长过程。此外，多肽生长因子可保护其免受退行性神经元死亡，即与梗塞区域死亡的神经元形成突触的神经元的死亡。

“局部缺血”意为导致组织供血不足的任一种情形。大脑局部缺血由于脑供血不足所致。同样作为中枢神经系统的一部分的脊髓，也对降低的血流所致的局部缺血敏感。与血栓或栓子中发生的情况一样，局部缺血可由血管的收缩或阻断所致。或者，局部缺血可由任何一种形式的损伤的心脏功能，包括上述的心动停止所致。预期本发明对治疗由于机械力量，如头部或脊髓的冲撞而造成的中枢神经系统损伤也是有用的。损伤可包括组织伤害如擦伤、切伤、扭伤、刺伤、压伤等，它们可产生于外来物与头、颈或脊柱的任何位点或附属物的损伤性接触。其它形式的损伤可产生于液体不适当的积累(例如，正常脑脊液或玻璃体肿瘤体液产生、更新或体积调节的受阻或失常，或硬膜下或颅内的血肿或水肿)而造成的中枢神经系统收缩或挤压。同样地，损伤性收缩或挤压可由于大块异常组织，如转移原发肿瘤的出现而产生。

这里用于针对中枢神经系统的“病灶性局部缺血”(focal ischemia)是指这样的情形，即由于供应大脑或脊髓血液的单一动脉受阻而导致由该动脉所供应区域中所有细胞组分的死亡(全部坏死)。

这里针对中枢神经系统使用的“全面性局部缺血”(global ischemia)是指这样的情形，即由于到达整个大脑、前脑或脊髓血流的普遍下降，从而导致所有这些组织局部脆弱区域神经元的死亡。这些情形中的每一种在病理学上是相当不同的，而其临床上相关的。病灶性局部缺血的模型可应用于病灶性脑梗塞的病人，而全面性局部缺血类似于心动停止及其它系统性低血压的成因。

本发明的方法具有几个优势。首先，多肽生长因子可在中枢神经系统损伤的数小时、数天、数周或甚至数月后给药。这是有利的，因为无法预测何时会发生损伤。所有导致上述局部缺血或损伤的事件都不可预见。其次，该

治疗方案改善了其功效而无副作用。

在此所引用的所有出版物、专利、专利申请及其它文献都被引入本文作为参考。

下面将要描述的优选方法、材料和实施例仅是为了说明而并不打算限制类似或相当于这里所述的材料和方法可用于本发明的实践或测试中。通过下面的详细描述和权利要求，本发明的特征和优势是显而易见的。

附图简述

注，在图 2A - 2B 和 3A - 3B 中，沿 Y - 轴描述的是代表以总共 8 μ g bFGF 处理的大鼠表现的得分，得分越低，代表表现越好，与 X - 轴交点最近。相反，在图 5A - 5B 和 6A - 6B 中，沿 Y - 轴描述的为代表以总共 4 μ g 的 bFGF 处理大鼠的行为得分，得分越低，代表表现越好，与 X - 轴交点最远。造成该前者表示方法向后者的转变是为了让改进表现为上升趋势，而不是下降趋势。

n.s. = 不显著。

图 1A - 1F 为以苏木精和曙红染色的一系列大脑切片的照片。显示了在相邻的中脑动脉(MCA)闭塞后产生的典型大脑梗塞。与前囟相比，冠状切面为 + 4.7(图 1A)，+ 2.7(图 1B)，+ 0.7(图 1C)，- 1.3(图 1D)，- 3.3(图 1E)和 - 5.3(图 1F)。

图 2A - 2B 为描述 bFGF 处理的动物(3 μ g/kg/注射；总 bFGF 递送量 = 8 μ g/动物；N = 9 只动物；实心方框)和载体处理的动物(N = 8，空心方框)受影响的(左边的)肢体的前肢置位(placing)(2A)和后肢置位(2B)的得分的 2 个图。数据表示为平均值 $\pm$ SD。ANOVA(前肢置位)：处理：F(1) = 17.7，p = 0.0008。ANOVA(后肢置位)：处理：F(1) = 26.0，p = 0.0001。* = 与通过双尾未配对 t 检验且以 Bonferroni 校正(P < 0.05)的以载体处理的动物的相应值不同的以 bFGF 处理后的动物的值。

图 3A - 3B 为描述 bFGF 处理的动物中(3 μ g/kg/注射；总 bFGF 递送量 = 8 μ g/动物；N = 9 只动物；实心方框)和载体处理的动物(N = 8 只动物，空心方框)中的平衡木(3A)和姿势反射(3B)得分的 2 个图。数据表示为平均值 $\pm$ SD。ANOVA(平衡木)：处理：F(1) = 7.5，p = 0.002。ANOVA(姿势反射)：处理：F(1) = 7.2，p = 0.02。* = 与通过双尾未配对 t 检验且以 Bonferroni 校正(P < 0.05)的以载体处理的动物的相应值不同的以 bFGF 处理后

的动物的值。

图4为描述bFGF处理的动物($3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{注射}$; 总bFGF递送量 = $8\mu\text{g}/\text{动物}$; $N = 9$ 只动物; 实心方框)和载体处理的动物($N = 8$ 只动物, 空心方框)体重的图。数据表示为平均值 $\pm$ SD。ANOVA: 处理: $F(1) = 2.8$, $p = \text{n.s.}$

- 5 图5A - 5B为描述以低剂量(LD)bFGF处理的动物($1.5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{注射}$; 总承载的bFGF = $4\mu\text{g}/\text{动物}$; $N = 8$ 只动物; 实心方框)和载体处理的动物($N = 6$ 只动物; 空心方框)受影响(左边的)肢体的前肢置位(5A)和后肢置位(5B)得分的图。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。ANOVA(前肢置位): 处理: $F(1) = 32.65$, $P = 0.0001$ 。ANOVA(后肢置位): 处理: $F(1) = 34.58$, $p = 0.0001$ 。

- 10 图6A - 6B为描述以低剂量bFGF - 治疗的动物($1.5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{注射}$; 总bFGF递送量 = $4\mu\text{g}/\text{动物}$; $N = 8$ 只动物; 实心方框)和载体治疗的动物($N = 6$, 空心方框)平衡木(6A)和姿势反射(6B)得分的图。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。ANOVA(平衡木): 处理: $F(1) = 15.933$, $P = 0.0018$ 。ANOVA(姿势反射): 处理: $F(1) = 1.998$, $p = \text{n.s.}$ 。

- 15 图7的图显示脑池内接受低剂量bFGF的动物(递送的总bFGF = $4\mu\text{g}/\text{动物}$; $N = 8$ 只动物; 实心方框)、脑池内接受载体的动物($N = 6$; 空心方框); 数据表示为平均值 $\pm$ SEM。ANOVA: 处理: $F(1) = 3.02$, $p = \text{n.s.}$ 、静脉内接受bFGF的动物(实心圆)和静脉内接受载体的动物(空心圆)体重之间没有差异。

- 20 图8A - 8B为以描述静脉内注射bFGF(3小时 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{小时}$; 见实心圆)处理的动物或静脉内仅接受载体处理的动物(见空心圆)受影响(留下的)的肢体前肢置位(8A)和后肢置位(8B)得分的两个图。这些数据与一周2次脑池内接受bFGF注射的动物($0.5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{注射}$; 即低剂量处理的动物)的数据放在一起从而表明恢复是可比较的。

- 25 图9A - 9E为手术诱导中风和脑池内bFGF处理后进行GAP - 43免疫反应性染色的大鼠脑(前端至前囟)组织学切片的图像分析仪照片(图9A - 9D)和素描图(图9E)。前端切片收集自假手术(sham - operated)/载体的处理的动物(图9A)、诱导中风/载体处理的动物(图9B)、假手术/bFGF - 处理的动物(图9C)和诱导中风/bFGF - 处理的动物(图9D)。较黑的区域代表GAP - 43免疫及反应活性的区域, 每张载玻片上其光密度是胼胝体的1.5倍或更高。弯箭头指向大脑梗塞区。素描中显示了各个脑区域(图9E): Cg = 带状皮层
- 30

(Cingulate cortex); FR 1, 2 = 前部皮层(frontal cortex), 1 区和 2 区; FL = 前肢区域(are); Par 1, 2 = 顶骨皮层(Parietal cortex), 1 区和 2 区; I = 脑岛皮层(insular cortex); Pir = 梨状皮层(piriform cortex); CC = 胼胝体; Sep = 中间核(Septal nucleus); CP = 尾状核(Caudoputamen).

- 5 图 10A - 10B 为手术诱导中风和脑池内 bFGF 处理后 GAP - 43 免疫反应性染色的大鼠脑(后端(posterior)至前囟)组织学切片的图像分析仪照片(图 10A - 10D)和素描图(图 10E)。后端切片收集自假手术/载体处理的动物(图 10A)、诱导中风/载体处理的动物(图 10B)、假手术/bFGF 处理的动物(图 10C)和诱导中风/bFGF 处理的动物(图 10D)。较黑的区域代表 GAP - 43 免疫反应活性的区域, 每张载玻片上其光密度是胼胝体的 1.5 倍或更高。弯箭头指向大脑梗塞区(图 10B 中所有的坏死组织都已从载玻片上排出; 在图 10D 中一些梗塞的组织保留(较低的弯箭头), 但通过对邻近切片的苏木精(hemotoxylin)和曙红染色测定其为坏死的)。各个脑的区域显示于素描图中(图 10E): Rs = 后夹肌(retrosplenial)皮层; FR 1, 2 = 前部皮层, 1 区和 2 区; HL = 后肢区域; Par 1, 2 = 顶骨皮层, 1 区和 2 区; Prh = 鼻周(perirhinal)皮层; Pir = 梨状皮层; Am = 杏仁核; CP = 尾状核; H = 海马; Hy = 下丘脑。
- 10
- 15

发明详述

- 为了开发用于治疗脑和/或脊髓损伤病人的方法, 以多肽生长因子碱性 FGF(bFGF)对中脑动脉(MCA)闭塞后的动物给药。MCA 闭塞是病灶性局部缺血普遍接受的模型并认为它模拟了中风后的人出现的情况。在 MCA 闭塞后 24 小时开始以 bFGF 处理的动物在各种功能/行为测试中比未治疗的动物好得多。
- 20

- 首先描述了以多肽生长因子对中枢神经系统局部缺血发作的病人给药的方法, 接着有特定的实施例, 其中的 bFGF 在脑池内或静脉内给药并表现出增强手术诱导的病灶性局部缺血的恢复。
- 25

多肽生长因子可按下述以治疗有效量对病人给药。治疗有效量指足以导致功能恢复的剂量, 其功能恢复高于所期望的没有以多肽给药的功能恢复。

有效剂量

- 给定的多肽生长因子的毒性和治疗效应可通过标准的药物方法, 用培养的细胞或实验动物测定 LD₅₀(50 % 群体致死的剂量)和 ED₅₀(在 50 % 的群体中治疗上有效的剂量)而加以测定。毒性和药物效应之间的剂量比为治疗指标,
- 30

并且其可表示为 $LD_{50}:ED_{50}$ 的比值。表现较大治疗指标的多肽是优选的。虽然可使用显示毒副作用的多肽生长因子，但为了最大限度地降低对未受影响细胞的潜在伤害因而降低副作用而应仔细地设计将这种化合物定向运送至受影响组织的运载系统。

5 获自细胞培养分析和动物研究，特别是下述大鼠研究的数据可用于制定用于人的剂量范围。这种多肽的剂量优选位于包括 ED_{50} 的具有很少或不具有毒性的循环浓度范围内。依据所用的剂量形式和给药的途径，该剂量可在此范围内加以改变。对于用于本发明方法的任何多肽，最初可根据下述哺乳动物脑中手术诱导的局部缺血研究而估计治疗有效量。

10 可在动物模型中制定剂量以得到由下述体内研究中所测定的包括 IC_{50} 的循环血浆浓度范围(即，达到半最大化恢复诱导测试多肽的浓度)。该信息可用于更为准确地测定用于人的剂量。血浆水平可通过放射免疫测定法(RIA)加以测定。

制剂和使用

15 用于本发明的药物组合物可用常规的方式使用一种或更多种生理上可接受的载体或赋形剂加以配制。

这样，可配制多肽生长因子通过吸入或吹入法(或经嘴或经鼻)或口服(oral)、口腔含服(buccal)、肠道外或直肠给药。

对于口服给药，该药物组合物可采取例如，常规方法制备的片剂或胶囊
20 的形式，其中具有可药用的赋形剂如结合剂(例如，预胶凝(pregelatinised)的玉米淀粉、聚乙烯基吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素)；填充剂(例如，乳糖、微晶体纤维素或磷酸氢钙)；滑润剂(例如，硬脂酸镁、滑石或硅)；分解剂(例如，土豆淀粉或淀粉甘醇酸钠(sodium starch glycolate)；或增湿剂(例如正十二烷基硫酸钠)。片剂可用本领域已知的方法包被。口服给药的液体制剂可采取
25 例如，溶液、糖浆或悬液的形式，或者它们可作为干燥产物存在，使用前与水或其它的载体组合。这种液体制剂可通过常规的方法加以制备，其中具有可药用的添加剂如悬浮剂(例如，山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化的食用脂肪)；乳化剂(例如，卵磷脂或金合欢胶(acacia))；非水性赋形剂(例如，杏仁油，油性酯，乙醇或分级的植物油)；和防腐剂(例如，甲基或丙基对羟基苯甲酸
30 酯(hydroxybenzoates)或山梨酸)。该制品也可有适当的缓冲盐、调味剂、着色剂及甜味剂。

口服给药的制剂可适当地制备以使该活性化合物有控制的释放。

对于口腔含服给药，该组合物可采取以常规方式配制的片剂或糖锭的形式。

可配制该多肽生长因子以通过注射，例如，通过集合药团注射或连续灌注的注射非经肠给药。用于注射的制剂可以单位剂量的形式保存于例如安瓿中或保存于具有附加防腐剂的多剂量容器中。该组合物可采取如悬液、溶液或油性或水性赋形剂中的乳剂形式，并可含有配剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，该活性成分可以为粉末的形式，在使用前与适当的赋形剂，例如，无菌无致热源的水组合。

10 该多肽组合物也可配制成直肠组合物如，含有常见的栓剂基质如可可油(cocoa butter)或其它甘油酯的栓剂或滞留灌肠剂(retention enemas)。

除了前述的制剂外，该化合物也可配制成贮藏剂(depot preparation)。这种长时间起作用的制剂可通过植入(例如皮下或肌肉内)或肌肉内注射给药。因此，例如，该化合物可与适当的聚合或疏水物质(例如配制成可接受油中的浮剂)或离子交换树脂一起配制或作为较不溶解的衍生物，例如略微溶解的盐。

如果必要，该多肽生长因子可存于含有活性成分的一个或更多个单位剂量形式的填充器或分配器中。该填充物可包括例如金属或塑料箔，如泡状填充物(blister pack)。填充物器或播撒器可伴以给药说明。

20 本发明的治疗性多肽生长因子也可含有载体或赋形剂，其中的许多对熟练技术人员是已知的。可使用的赋形剂包括缓冲液(例如，柠檬酸缓冲液、磷酸缓冲液、醋酸缓冲液和碳酸氢盐缓冲液)、氨基酸、尿素、醇(alcohols)、抗坏血酸、磷脂、蛋白(例如，血清蛋白)、EDTA、氯化钠、脂质体、甘露醇、山梨醇、和甘油。本发明的核酸、多肽、抗体或调节化合物可通过任何一种标准的途径给药。除了上述的途径外，本发明的多肽生长因子可经静脉内、25 动脉内、皮下、肌内、颅内、眼眶内、眼的 (ophthalmically)、心室内、小管内、脊髓内或脑池内给药。

根据相应的给药途径，该多肽生长因子可以各种方式配制。例如，液体溶液可制备用于摄入或注射；可制备凝胶或粉末用于摄入、吸入或局部应用。30 用于制备这样的制剂的方法是已知的并见于例如，“雷明顿药物科学”(“ Reminton's Pharmaceutical Sciences ”)(A. Gennaro，编，Mark 出版社，

1990)。预期优选的给药途径将是静脉内给药。已知静脉内给药的 bFGF 穿过受伤的血脑屏障以进入局部缺血大脑组织(Fisher 等, 大脑血流与代谢杂志(J. Cereb. Blood Flow Metab.)。15: 953 - 959, 1995, Huang 等, 美国生理学杂志(Amer. J. Physiol.)待发表)。

- 5 在医学领域已知任何一个病人的剂量依赖于许多因素, 包括病人基本健康、性别、体表面积和年龄以及待给药的特定化合物、给药的时间和途径和目前正在给药的其它药物。确定给药的最适剂量和途径在熟练内科医生的能力范围之内。

中脑动脉手术闭塞的实验试剂和方法

- 10 这里使用的局部缺血动物模型是病灶性局部缺血的中脑动脉(MCA)闭塞模型(Kawamata 等, 大脑血流与代谢杂志, 16:542 - 547, 1996; Gotti 等, 脑研究.522: 290 - 307, 1990)。用于该研究的动物为体重 250 - 300 克的 Sprague - Dawley 大鼠(Charles River)。用于手术方法, 将动物在 70 % NO₂/30 % O₂ 中以 2 % 的氟烷麻醉。将尾动脉插入套管从而能够监测血液毒
- 15 剂和血糖。体温以直肠探测器加以监测并用加热垫(heating pad)将其维持于 37 ± 0.5 °C。近端右中脑动脉(MCA)用改进的 Tamura 等方法(大脑血流与代谢杂志.1:53 - 60, 1981)加以永久性闭塞。简言之, 将近端 MCA 跨颅(trans cranially)暴露而不去除颞弓或横切面神经。然后将该动脉用双极性微凝集剂(microcoagulator)在紧临下脑静脉的嗅束处加以电凝集(electrocoagulated), 然
- 20 后将其横切(Bedcrson 等, 中风(Stroke)17:472 - 476, 1986)。观察大鼠直至它们恢复知觉且然后将其放回笼内。为了防止感染在中风手术的前一天和后一天将一种抗生素头孢唑啉钠(40 μg/kg, 腹腔内)给药于所有的动物。

多肽生长因子的给药

- 制备重组的人 bFGF 的浓缩贮存液(2μg/ml; Scios Nova Corp, Mountain View, CA)并贮于 - 80 °C。在准备使用过程中, 将该贮备液以 PH7.4, 含有 100μg/ml 牛血清蛋白(BSA; 宝灵曼, 目录号.# 711454)的 0.9 % 的盐稀释。以得到 20 μg/ml 的 bFGF 终浓度。对照动物接受没有 bFGF 而具有相同浓度所有其它成分的溶液。

脑池内给药

- 30 脑池内注射时将大多数动物分成 2 组: 一组动物接受 3μg/kg/注射的剂量(“高剂量 bFGF”), 且另一组动物接受 1.5μg/kg/注射的剂量(“低剂量 bFGF”)。

为了实施注射，将动物在 70 % NO₂/30 % O₂ 中以氟烷麻醉并置于趋实体架 (Stereotaxic frame) 上。含有溶液的生长因子或仅含载体的溶液的脑池内注射方法是相同的。

下面是对以“高剂量” bFGF 完成的脑池内给药的描述。用无菌技术，
5 以配有 26 号标准针头的 Hamilton 注射器通过皮肤注射(50μl/注射)将 bFGF(N = 9 只动物, 3μg/kg/注射; N = 8 只动物, 1.5μg/kg/注射)或仅将载体(N = 8 只动物, “高剂量” bFGF 研究中; N = 6 只动物, “低剂量” bFGF 研究中) 导入小脑延髓池中(Yamada 等, 大脑血流与代谢杂志.11: 472 - 478,1991)。 每次注射之前, 用 Hamilton 注射器抽出 1 - 2μl 脑脊液(CSF)以证实针头置入
10 了蛛网膜下的空间。初步研究证实以这种方式递送的一种染色剂(1 % 的 Evans 蓝)经基底池自由扩散并在注射后的 1 小时内越过大脑皮层。

从中风后 24 小时开始, 连续 4 周每周 2 次进行脑池内注射(即, 中风后 1、4、8、11、15、18、22 和 25 天)。动物随机分成 bFGF 处理组或赋形剂处理组。

15 第三组动物仅在中风后的第 1 和第 2 天接受 2 次 0.5 μg/注射的 bFGF 脑池内注射。由于大鼠的平均重量为 300 - 400 克, 每体重相当的剂量将是 1.5μg/kg/注射。这些注射按上述给药。对照动物在中风后的第一和第二天也与该治疗组匹配, 并接受没有 bFGF 而具有相同终浓度其它成分的溶液。

静脉内给药

20 按上述(即, 通过含 100μg/ml BSA 的 0.9 % 的盐溶解)制备 bFGF 从而使终浓度为 30μg/ml。然后以 50μg/kg/小时连续 3 小时将 bFGF 静脉内对鼠给药。MCA 闭塞一天后进行给药。对照动物以不含 bFGF 但含有与接受 bFGF 处理组动物灌注中相同组分的静脉内灌注进行处理。

功能/行为测试

25 为了将动物适应将对行为/功能测试必要的处理, 手术前将它们每日 10 分钟处理 3 天。手术后, 将其放入单独的笼子中。

用 4 次功能/行为测试分析闭塞后的感觉运动和反射功能。有关这些测试 详细细节另有描述(Bederson 等, 中风 17: 472 - 476, 1986; DeRyck 等, 脑研究.573: 44 - 60, 1992; Markgraf 等, 脑研究.575: 238 - 246, 1992;
30 Alexis 等, 中风 26: 2338 - 2346, 1995)

前肢置位测试

简言之, 前肢置位 (placing) 测试由 3 个子测试所组成。每只前肢获得单独的得分。对视觉置位子测试, 研究者将动物垂直放置并接近桌面。肢体正常置位于桌上得分为“0”, 延迟置位(< 2 秒)得分为“1”, 没有或非常延迟的置位(< 2 秒)得分为“2”。先将动物带向前然后沿侧向再次带到桌子时分别获得得分(每只肢体最大得分 = 4; 每种情况越高的数目代表更大的缺陷)。对于触觉置位子测试, 也这样放置动物从而使其不能够看到桌面或以其触须接触到桌面。先将动物带向前时其背前爪轻轻地接触桌面且然后将其沿侧向带至桌。每次置位得分如上(每只肢体最大得分 = 4)。对于本体感觉置位测试, 仅将动物带向前并对背前爪施加更大的压力; 置位得分如上(每只肢体最大得分 = 2)。将这些子得分加起来以得到每只前肢总的前肢置位得分(范围 = 0 - 10)。

后肢置位测试

后肢置位测试以与前肢置位测试相同的方式进行但仅包括后肢的触觉和本体子测试(最大得分分别为 4 和 2; 总得分范围 = 0 - 6)。

修改的平衡木测试

修改的平衡木测试检测动物在一长而窄的横梁上(30 × 1.3cm)平衡 60 秒时的前庭运动反射(vestibulomotor reflex)活力。在横梁上平衡能力的得分如下: 1 = 动物以所有 4 只爪平衡于横梁顶部; 2 = 动物将爪置于横梁侧面或在横梁上摇摆; 3 = 一只或两只肢体滑下横梁; 4 = 三只肢体滑下横梁; 5 = 动物试图以爪平衡于横梁上但落下来; 6 = 动物悬于横梁上, 然后落下来; 7 = 动物没有试图平衡而直接从横梁上落下来。手术前动物接受三次训练尝试; 最后一次得分计为基本分。

姿势反射测试

姿势反射测试既测量反射又测量感觉运动功能。动物首先由尾部悬挂于地板的上方。以 2 只前肢对称地到达地板的动物得分为“0”。然后将显示异常姿势(肢体弯曲(flexing), 身体旋转)的动物置于塑料支撑的纸上。能够抵抗具温和侧向压的并排运动的动物其得分为“1”, 而不能对抗这样运动的动物得分为“2”。所有的功能/行为测试在刚中风手术前和然后从中风后第 1 天至第 31 天每隔一天进行。在每次实验中, 在测试开始前 30 分钟让动物适应测试室 30 分钟。

组织学分析

在中风后第 31 天(即 MCA 闭塞后 31 天), 将动物以苯巴比妥深度麻醉并以肝素化的盐经心脏灌注然后灌以 10 % 缓冲的福尔马林。取下大脑, 切成 3 片, 并在脱水和石蜡包埋前以 10 % 缓冲的福尔马林贮存。在可动显微切片机上切出冠状切片(5 μ m), 固定至玻片上且以苏木精和曙红染色。对 7 张切片的每一张上大脑的梗塞区(+ 4.7、+ 2.7、+ 0.7、- 1.3、- 3.3、- 5.3、和 - 7.3, 与前囟相比)用计算机界面的图像处理系统(Bioquant, R & M Biometrix, Inc., Nashville, TN)进行测定。通过“间接的方法”将每张切片的总梗塞面积测定成[完整对侧半球的面积] - [完整同侧半球的面积]以矫正处理期间大脑的收缩(Swanson 等, 大脑血流与代谢杂志. 10: 290 - 293, 1990)。梗塞体积然后表示为完整对侧半球体积的百分比。皮层和纹状体的梗塞区也用这些方法分别加以测定。

在收集所有的数据前进行脑池内注射、行为测试和组织学分析的实验者对分配的处理是盲目的(blinded)。数据表示为平均值 $\pm$ SD 或平均值 $\pm$ SEM 且通过方差的反复测定分析(ANOVA)然后通过适当未配对的双 - 尾 t 检验而加以分析, 并且为了多重比较而进行了 Bonferroni 校正。

生长相关蛋白 - 43 的免疫染色

生长相关蛋白 - 43(GAP - 43)为周围和中枢神经系统中新轴突生长过程中受选择性上行调节的神经细胞膜和生长锥(growth cone)的磷蛋白成分(Skene, 神经科学得鉴(Ann. Rev. Neurosci.). 12: 127 - 156, 1989; Aigner 等, 细胞 83: 269 - 278, 1995; Woolf 等, 神经科学(Neuroscience) 34: 465 - 478, 1990; Benowitz 等., 分子脑研究(Mol. Brain Res.). 8: 17 - 23, 1990)。GAP - 43 是在大脑发育和大脑损伤或局部缺血后新轴突生长的可靠标记(Stroemer 等., 中风 26: 2135 - 2144, 1995; Benowitz 等., 见上; Vaudano 等, 神经科学杂志(J. Neurosci.). 15: 3594 - 3611, 1995)。检测接受或没有接受脑池内 bFGF 的患病灶性梗塞(由上述的 MCA 梗塞产生)的动物的 GAP - 43 免疫反应性(IR)。梗塞后 24 小时开始, 接受 bFGF 的动物给予 0.5 μ g/注射。连续 4 周每 2 次或直至杀死动物之前每周 2 次持续注射。

为了组织学分析, 在中风手术(MCA 闭塞)后第 3、7 或 14 天杀死动物, 然后以常规的盐再以 2 % 的甲醛、0.01M 的偏高碘酸钠(Sodium - m - periodate)和 0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4; PLP 溶液)中的 0.075M L - 赖氨酸单盐酸(L - lysine monohydrochloride)穿颅灌注固定。取下它们的大脑, 后固

定并用振动切片机将其切成 40 μ m 的切片。将切片冷冻保存。

将自由漂浮的切片相继孵育于 20 个常规羊血清、一个抗 GPA - 43 的小鼠单克隆抗体(1:500, 91E12 克隆, 宝灵曼, Indianapolis, IN)和吸附抗大鼠 IgG 的生物素化马抗小鼠 IgG(45 μ l/10ml; Vector, Burlingame, CA)中。然后将切片固定至玻片上, 空气干燥, 浸于梯度乙醇中并覆以盖玻片。将每个时间点的动物(即, 中风手术后 3、7 或 14 天杀死的动物)的大脑切片同时免疫染色。不用一级抗体处理的对照切片并没有显示出特异性的染色。

免疫染色后, 检查 2 张横跨大脑梗塞的标准冠状切片; + 0.2mm 处的“前端”(anterior)部分与前囟相比较且 0.28mm 处的“后端”(posterior)的部分与前囟相比较。GAP - 43 免疫反应性(IR)强度和范围的相对改变通过两种不同的方法用计算机界面图像处理系统(Bioquant, Nashville, TN)加以定量。将用苏木精和曙红通过标准方法染色的相邻大脑切片用于鉴定梗塞的范围。相对低的 GAP - 43 IR 区域(胼胝体)的光密度(O.D.)被看作是每张切片的“背景”值。

测量用两种方法进行。在第一种方法中, 显示出至少背景区 1.5 倍 O.D. 的所有大脑区域被鉴定出来并加以突出显示(图 9A - 9D 和图 10A - 10D)。测定每张切片背侧感觉运动皮层中突出显示区域的面积(mm²)并计算每组动物的平均值。在第二种方法中, 用发表的标准大鼠大脑图谱(Paxinos 和 Watson, “在趋实体性座标中(Stereotaxic Coordinates)的大鼠大脑”, 学术出版社, 圣地亚哥, CA)鉴定背侧感觉运动皮层的特异性区域。在“前端”大脑切片中, 这些包括同侧半球中的内侧周梗塞皮层(medial peri - infarct cortex)(从梗塞边缘 $\leq$ 1mm)和两半球的前面皮层 1 区和 2 区(图 1, 2)和皮层区域的前肢区(FL)(图 9A - 9E)。在“后端”的切片中, 这些包括同侧半球的内侧周梗塞区以及 FR1, 2 和两侧皮层区的后肢区(HL)(图 10A - 10E)。测定每张切片每个区域的 O.D.并用背景归一化。对于每种方法, 在假处理或赋形剂处理中的数据和假处理或 bFGF 处理的动物中的数据没有不同, 因此收集这些值用于分析。所有组的数据表示为与中风/赋形剂治疗动物相比的比值。

结果

在 bFGF 处理或赋形剂处理的动物之间总的梗塞体积没有差异

在中风手术期间, 随后接受 bFGF 或赋形剂处理的动物之间血液毒素或血糖水平没有差异。在存活的动物中, 在第 31 天杀死的在右侧大脑皮层和

MCA 区域纹状体下面显示出较大的梗塞(图 1)。由梗塞严重损伤的大脑区域包括部分的皮层、1 区和 2 区(Par1、Par2)和粒状岛区皮层(granular insular cortex)(GI)。由梗塞部分损伤的区域包括前部皮层、1 区、2 区和 3 区(FR1、FR2、FR3); 粒状岛区皮层(AI); 颞皮层(temporal cortex), 1 区和 3 区(Tel1、T3I3); 侧枕叶皮质, 2 区(Oc2L); 皮层前肢区(FL)、和尾状核(cPu; Paxinos 和 Waston, 1986)。皮层后肢区(HL)一般较少发生梗塞。

在以 $3\mu\text{g/kg}$ /注射 bFGF(“高剂量” bFGF)处理的动物与载体处理的动物之间总的梗塞体积没有差异(分别为 31.1 ± 5.9 对 $30.0 \pm 5.3\%$ 的完整对侧半球体积, $N = 9$ 对 $N = 8$, $t = 0.4$, $P = \text{n.s.}$)。同样, 在以 $1.5\mu\text{g/kg}$ /注射 bFGF(“低剂量” bFGF)处理的动物或赋形剂处理的动物之间的总梗塞体积也没有差异。此外, 当这些体积分别计算时, 生长因子处理的动物和载体处理的动物之间的皮层或纹状体梗塞体积没有差异。

检查苏木精和曙红染色的切片显示在 bFGF 治疗的动物中没有异常细胞增殖的迹象。

15 在功能中测试中以 bFGF 处理的动物表现好于以载体处理的动物

梗塞以后, 动物在所有四次行为测试中显示出感觉运动和反射功能的严重紊乱。对于肢体置位测试, 将缺陷局限于对侧(左侧)肢体。中风后第一个月中在所有四次行为测试中动物显示出部分的恢复(图 2A - 2B 和图 3A - 3B)。此外, bFGF 处理的动物较赋形剂处理的大鼠恢复得更快并且恢复程度更大。经 bFGF 处理的动物和赋形剂以处理的动物的恢复改进的对比表明在前肢和后肢置位行为中最为显著, 并且对于横梁平衡和姿势反射测试尽管仍然明显但较少显著。图 2A - 2B 和图 3A - 3B 中显示脑池内接受“高”剂量 bFGF 后在四次行为测试中动物的表现, 和图 5A - 5B 和图 6A - 6B 显示在脑池内接受“低”剂量 bFGF 后在四次行为测试中动物的行为。bFGF 处理后在肢体置位测试的所有子测试(视觉、触觉和本体)中见到增强的恢复。

以较高剂量的 bFGF(即从 $3\mu\text{g/kg}$ /注射)处理的 14 只动物中的 5 只在中风后第一个月内经历了严重渐进式的体重下降然后死去。这些动物的表现与那些在中风后 7 - 23 天死亡之前的经 bFGF 处理的动物的表现类似。以 $3\mu\text{g/kg}$ /注射的 bFGF 处理并死亡的动物的平均体重在死亡之日为 $165 \pm 11\text{g}$ 。

30 以该相同剂量处理而存活下来的动物中风后显示出较小程度的起始体重下降, 然后体重逐渐恢复(图 4)。bFGF 处理后存活的动物较赋形剂治疗的大鼠

体重恢复趋于更慢(图 4)。相反,以较低剂量即, $1.5\mu\text{g/kg}$ /注射 bFGF 处理的动物与仅以赋形剂处理的动物体重之间没有差异。接受较低剂量 bFGF 的动物没有经历接受较高剂量所致的体重下降;其体重与仅以赋形剂处理动物的体重相同(图 7)并且在前肢和后肢置位测试中表现好于以赋形剂处理的动物 (图 5A - 5B)。

仅得到 2 次 bFGF 注射的(即中风后的第 1 天和第 2 天以 $0.5\mu\text{g}$ /注射的 bFGF 注射)动物的恢复与得到 8 次 bFGF 注射(即,一周 2 次注射“高”或“低”剂量 bFGF 一个月)的动物的恢复是相近的。例如,中风后 30 天,每周 2 次得到 8 次脑池内注射(3 或 $1.5\mu\text{g/kg}$ /注射)动物的前肢置位测试平均得分约为 “2”,这与中风后仅第一天和第二天得到脑池内注射($1.5\mu\text{g/kg}$ /注射)动物的平均得分相同。相反,全部无 bFGF 处理的动物在相同的测试中平均得分约为 “5”。

当静脉内给药时 bFGF 也增强了恢复(MCA 闭塞后),如图 8A - 8B 中所示,静脉内给药 bFGF 动物的前肢置位(图 8A)和后肢置位(图 8B)(见实心圆)与脑池内给药 bFGF 的动物($0.5\mu\text{g/kg}$ /注射,4 周)相同。用作静脉内注射组对照的动物与用于脑池内注射组的对照动物恢复至相同的程度(见图 8A - 8B 中的空心圆)。此外,以 bFGF 静脉内治疗的动物体重与脑池内得到 bFGF 动物的体重没有差异。

根据这些结果,在局部缺血后至少一天开始,脑池内和静脉内给药 bFGF 在病灶性大脑梗塞后增强了行为恢复。在这里使用的大鼠局部缺血模型中观察到了改进的行为恢复,而 bFGF 处理的动物与赋形剂处理的动物的梗塞体而之间没有而化。局部缺血后一天开始给予 bFGF,超过了其间 bFGF 可降低梗塞大小的表观“治疗窗口”(therapeutic window)。目前的发现第一次证实了在中风动物模型中外源性给药的神经营养生长因子可增强行为恢复而不降低梗塞的大小。

由 bFGF 所致的恢复增强在受影响肢体的感觉运动功能测试中最为显著且在反射和姿势功能测试中较少显著。我们的梗塞没有完全损伤前肢和后肢皮层区,这与 MCA 区域的病灶性梗塞后肢体置位测试中的恢复相协调。在梗塞后的第一个月中以 bFGF 的治疗既增强了行为恢复的速度又增强了行为恢复的程度。

在 bFGF 治疗后大脑梗塞对侧的完整感觉运动皮层中 GAP - 43 的免疫

反应性选择性增加

bFGF 增强恢复的可能机制可能包括: (1) 保护退化的细胞死亡和/或(2) 加快新的神经元产生和突触的形成。在丘脑和其它部位由 bFGF 治疗中未受损的(Spared)远端神经元可建立新的功能连接因而增强恢复是可能的。虽不希望束缚到作用的特定内在机制上, 但对 GAP - 43 表达的检查表明轴突, 且可能是树突的新的生长可能在局部缺血损伤的功能恢复中起到重要作用。

在检查的所有时间点(见上)上, 在接受 bFGF 或赋形剂的假手术动物中 GAP - 43 免疫反应性的模式类似于前述完整、成熟大鼠大脑的情形(Benowitz 等, 神经科学杂志(J. Neurosci).8: 339 - 352, 1988)。特别地, GAP - 43 免疫反应性在腹外侧大脑皮层和纹状体、下丘脑、部分丘脑、扁桃体和海马结构中相对较高。GAP - 43 的免疫反应性除了在“前端”大脑部分的 FR 1、2、皮层和“后端”部分的 HL 皮层中之外, 在背外侧感觉运动皮层中相对较低。

中风后(由 MCA 闭塞所诱导), 在同侧半球的梗塞周皮层中发现有增加了的 GAP - 43 免疫反应性, 局部缺血后第三天达到高峰, 这与前面的报告一致(Stroemer, 见上)。在中风/赋形剂处理和中风/bFGF 处理的动物之间的同侧梗塞周皮层中没有发现 GAP - 43 免疫反应性的不同。中风/赋形剂处理的动物与假/赋形剂处理或假/bFGF 处理的动物相比, 其对侧半球中没有发现差异(图 9A - 9E 和图 10A - 10E)。然而, 在中风/bFGF 处理的动物中, 在对侧感觉运动皮层中发现有 GAP - 43 免疫反应性的选择性增加。特别地, 高 GAP - 43 免疫反应性的区域更大, 向腹部延伸以包括整个 FR1, 2 皮层和“前面”大脑部分的部分 FL 皮层(图 9A - 9E), 并包括“后面”大脑部分的 Par1 皮层(图 10A - 10E)。

副作用

脑池内 bFGF 剂量仅仅增高了 2 的处理也会产生副作用。当剂量从 3.0 μ g/kg/注射降至 1.5 μ g/kg/注射时, 功能/行为恢复得到增强但动物体重没有下降, 并且没有动物死亡。同样地, 静脉内接受 bFGF 的动物体重也没有下降, 并且没有动物死亡。我们在较高剂量观察到的改进的行为得分仅仅是较低体重的人为假象的可能性是不大的, 因为除了平衡木测试外, 所用的所有行为测试均以研究者支撑动物来完成的。尽管已知 bFGF 对神经胶质细胞和内皮细胞有促分裂效应, 应该注意到其它的情况是在 bFGF 处理的动物大脑

中没有异常细胞增殖的明显证据。



图 1A

图 1D



图 1B

图 1E



图 1C

图 1F

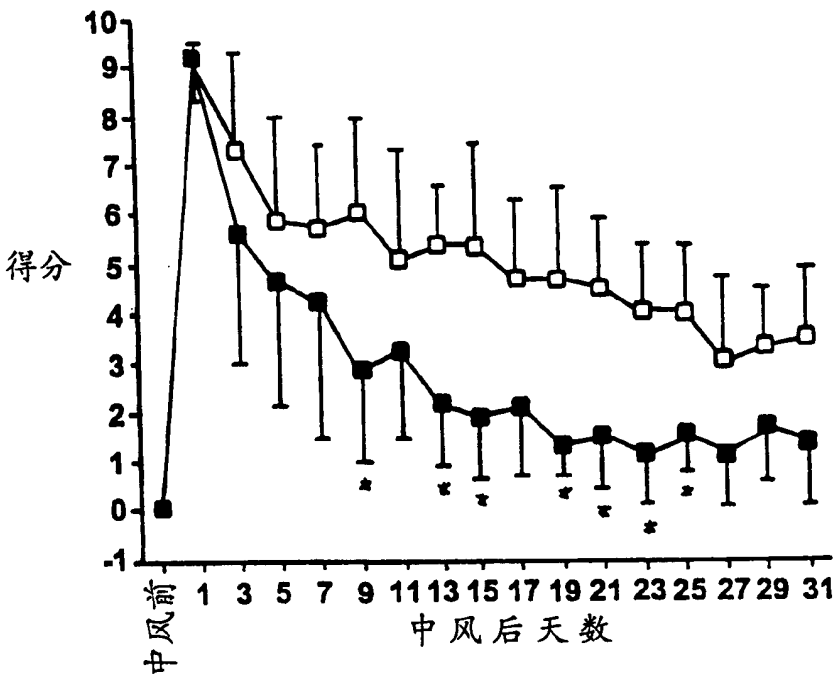


图 2A

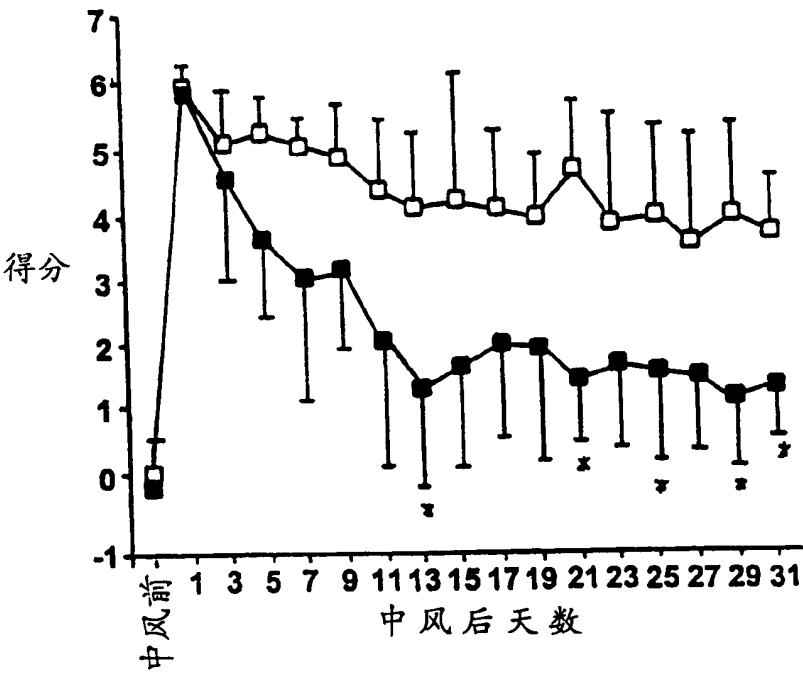


图 2B

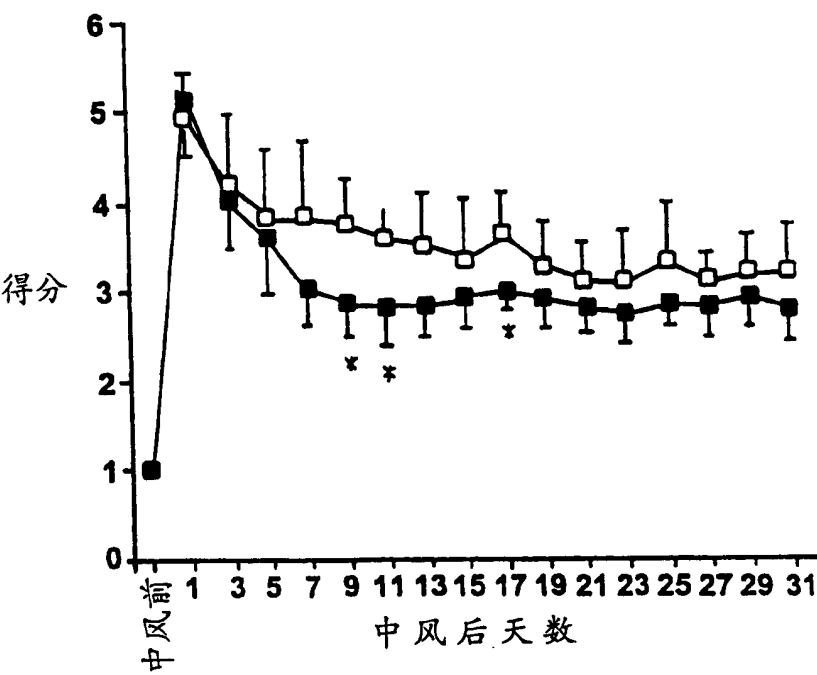


图 3A

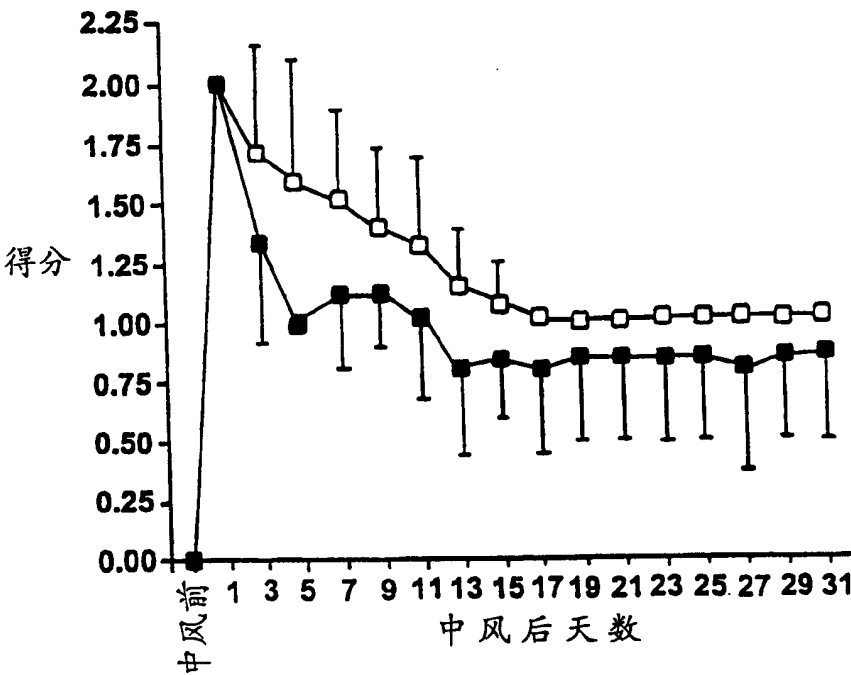


图 3B

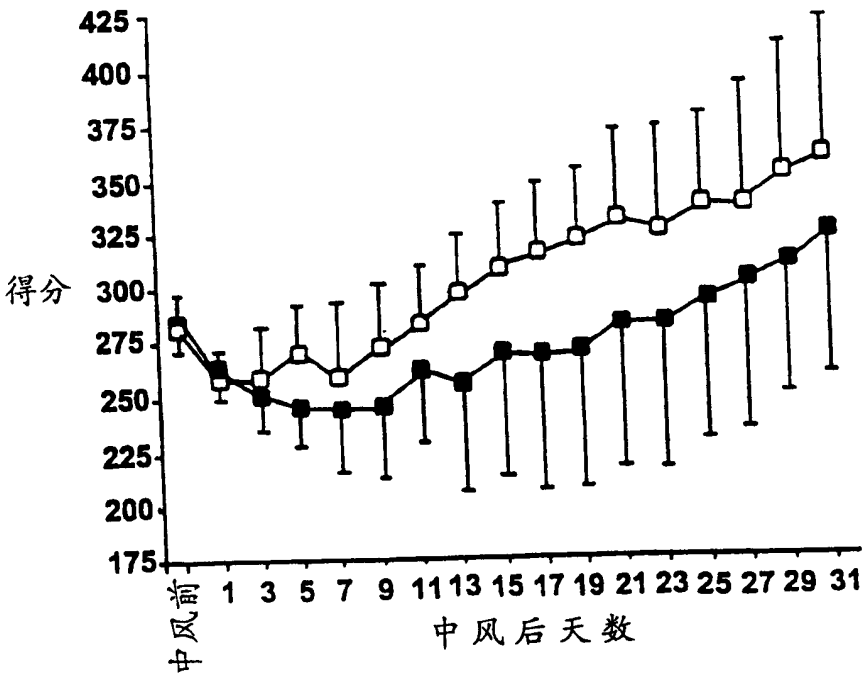


图 4

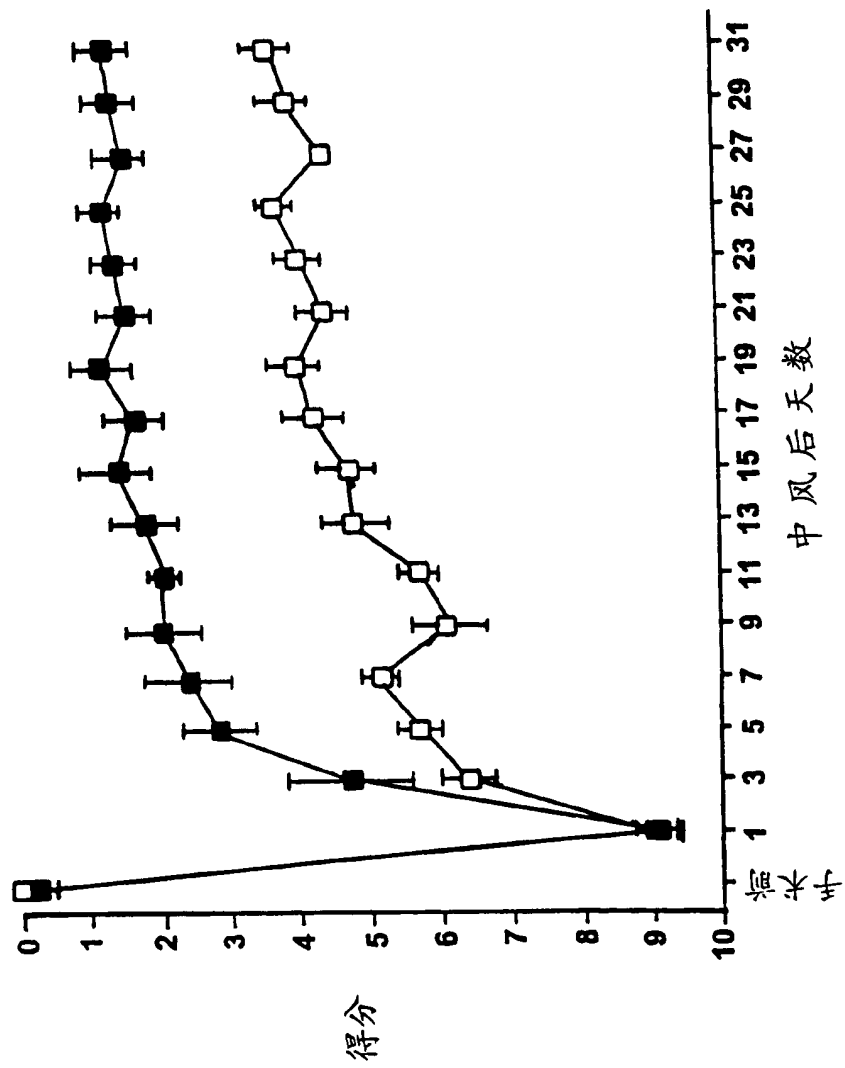


图 5A

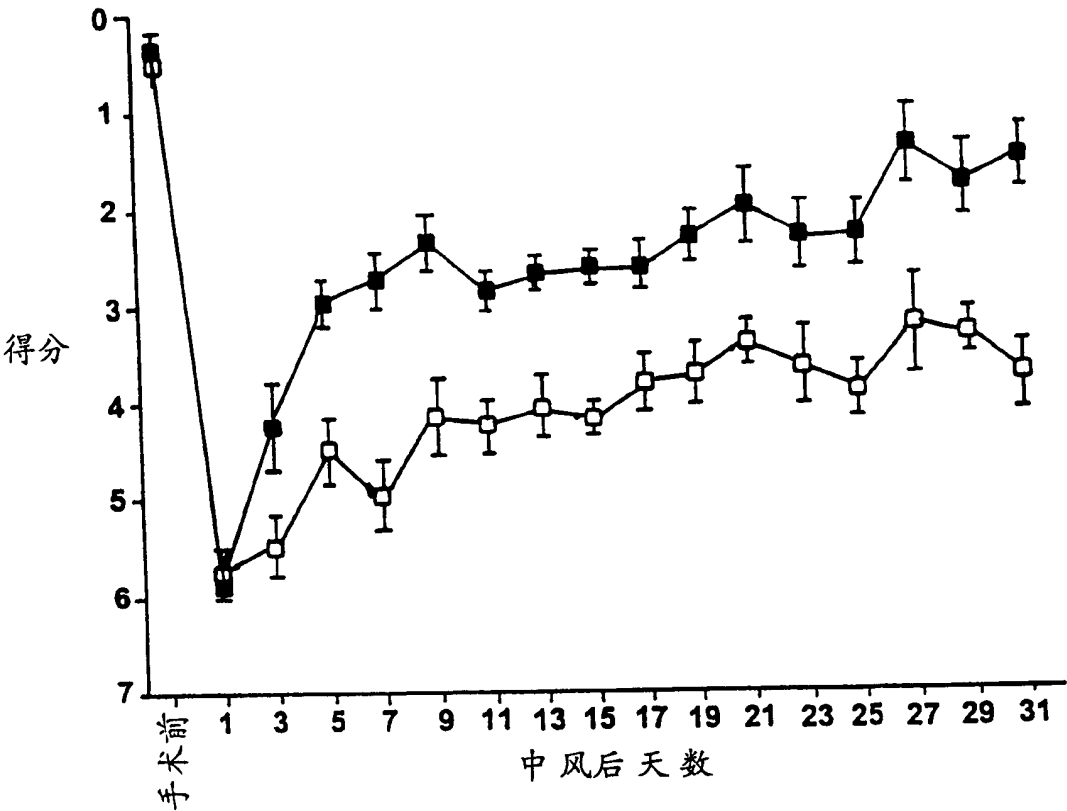


图 5B

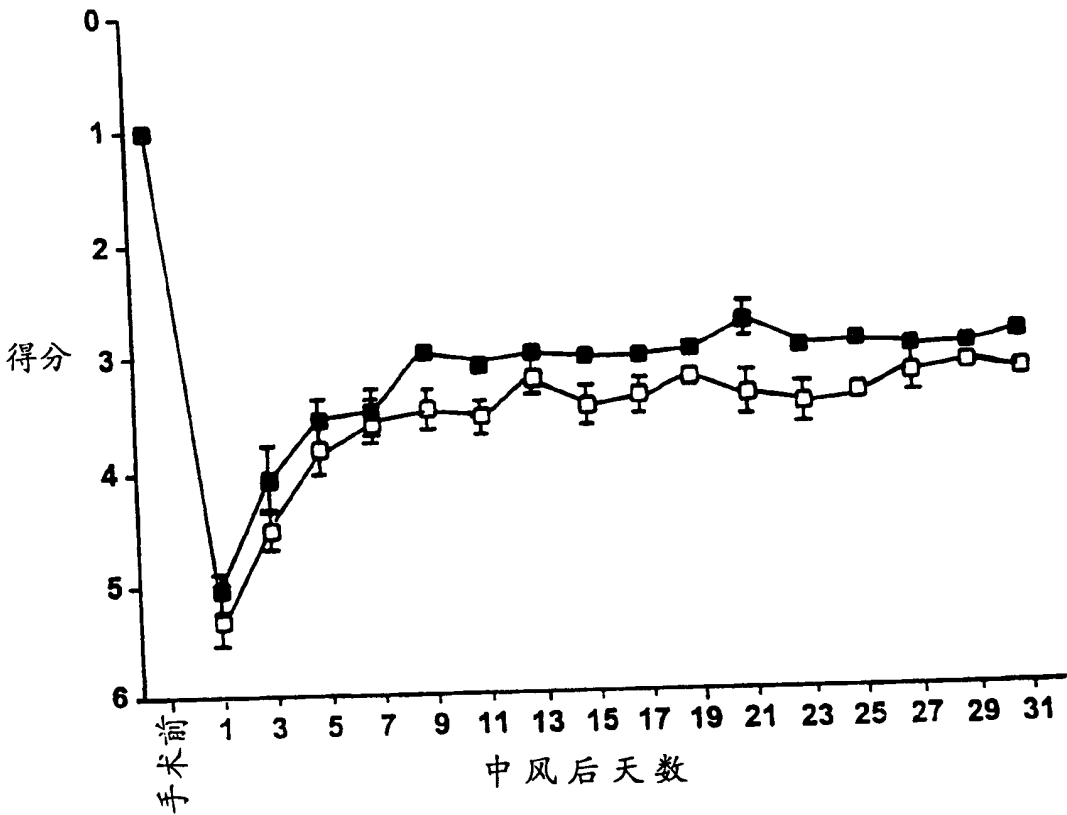


图 6A

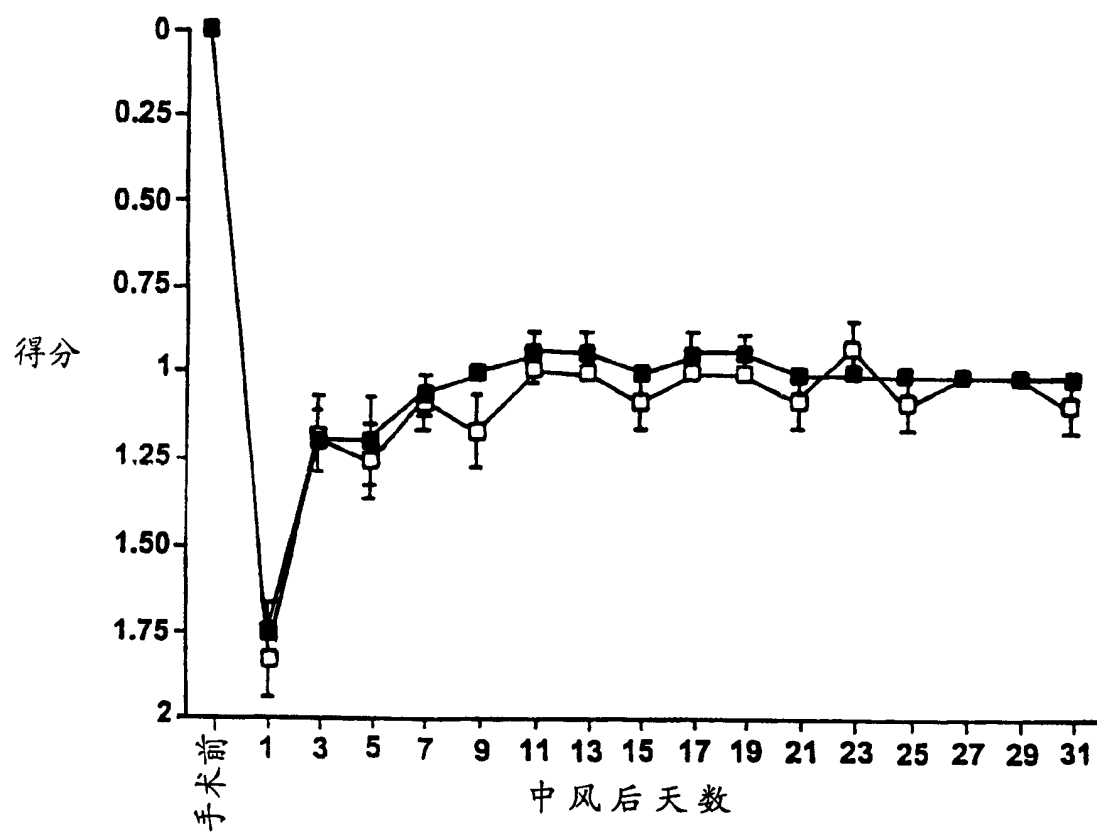


图 6B

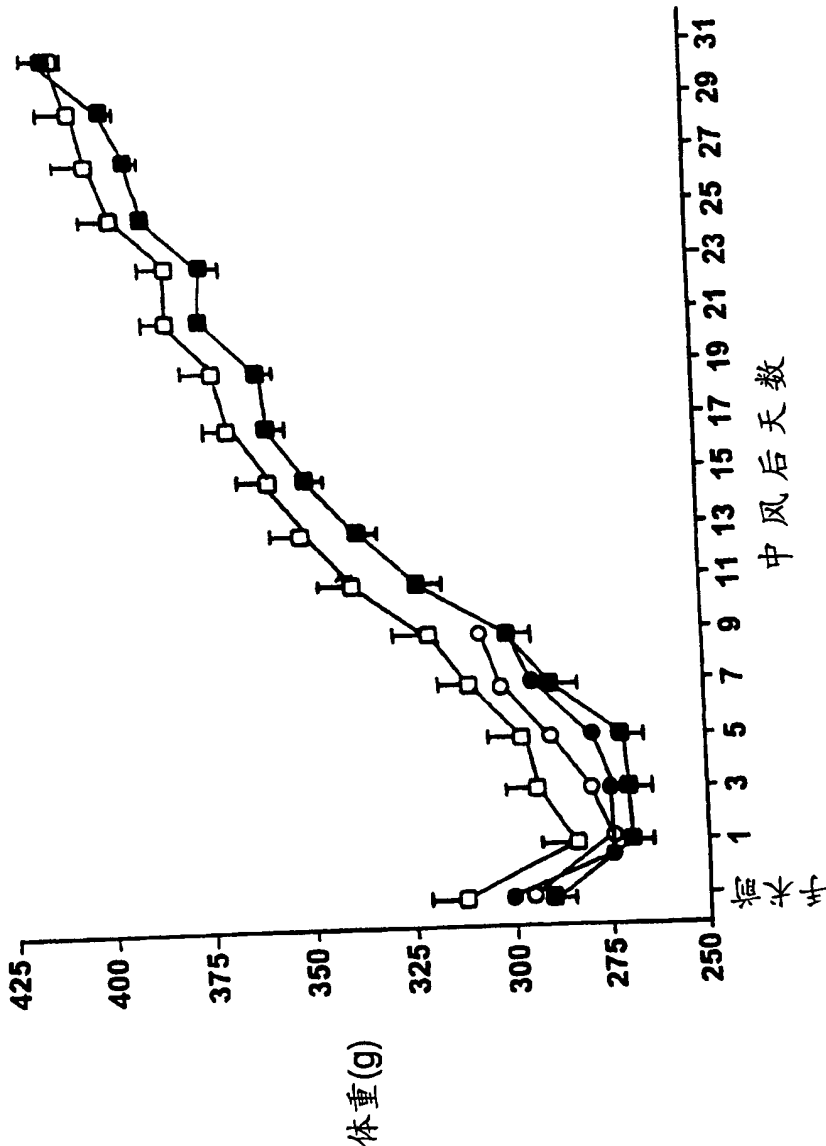


图 7

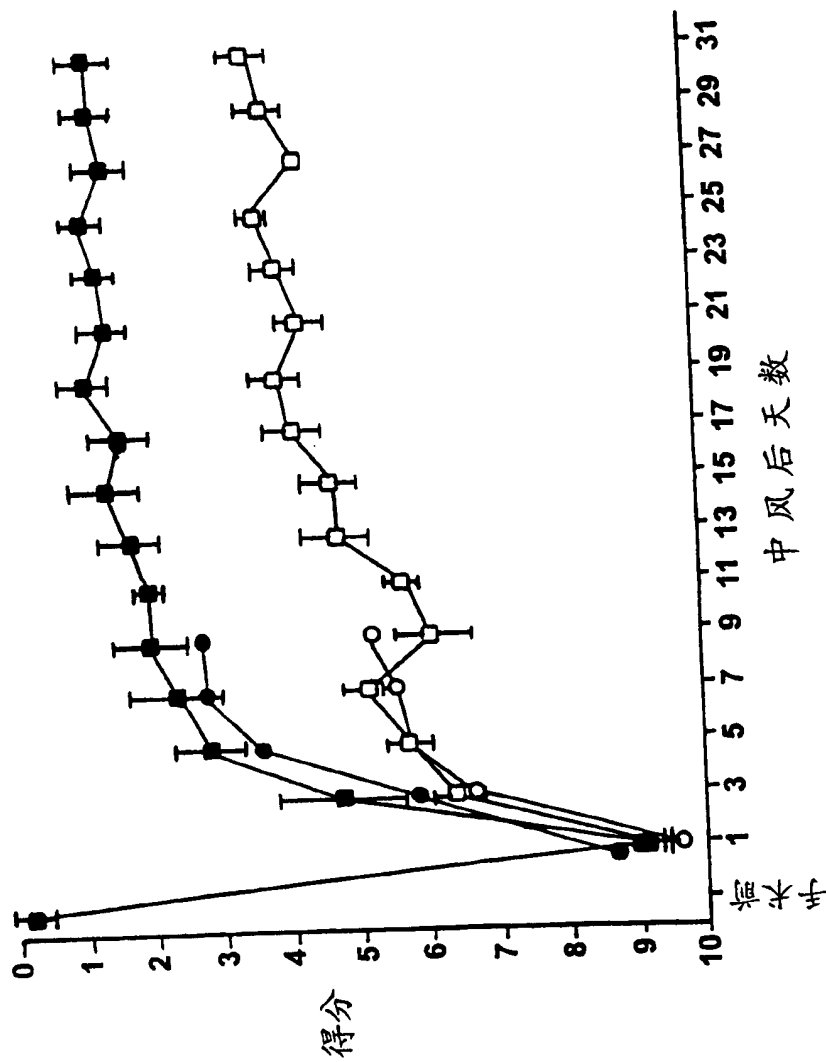


图 8A

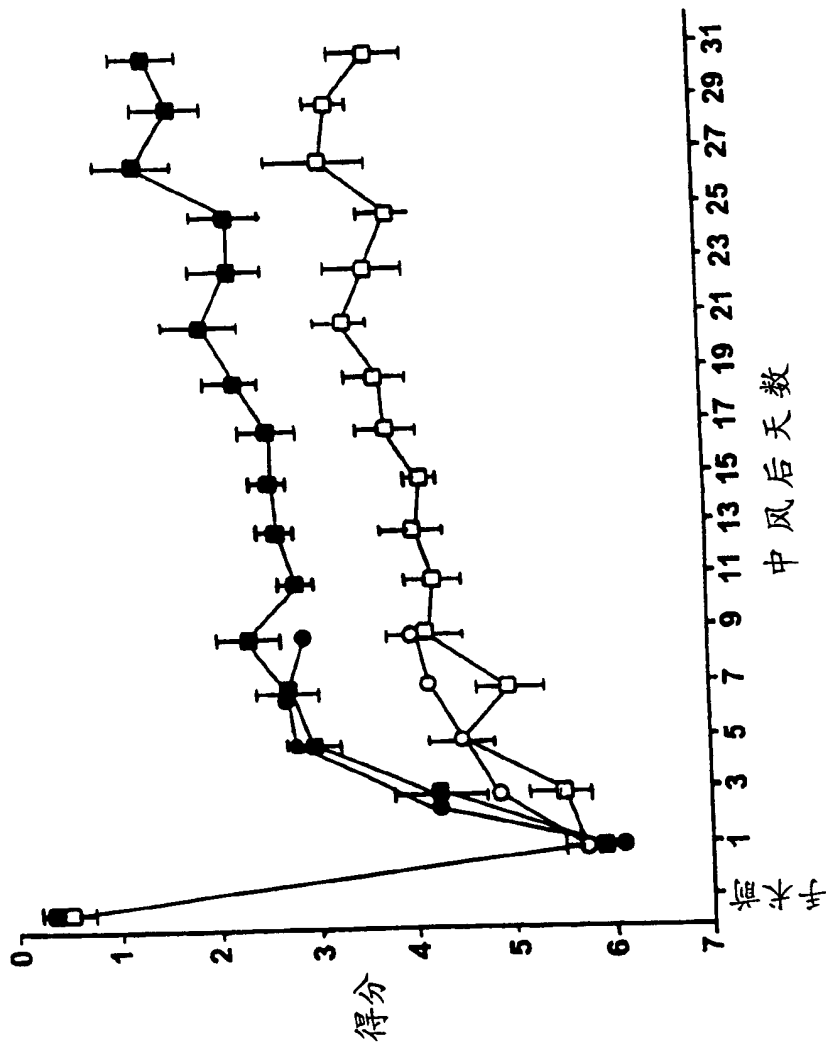


图 8B

