



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103119060 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201180045464. 9

A61K 41/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 07. 15

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

2010130353 2010. 07. 21 RU

2011127058 2011. 07. 01 RU

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 03. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2011/002434 2011. 07. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02012/010978 EN 2012. 01. 26

(71) 申请人 奥列格·伊里奇·爱泼斯坦

地址 俄罗斯莫斯科

(72) 发明人 奥列格·伊里奇·爱泼斯坦

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 杨国强 张淑珍

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 16/40 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书26页

序列表11页

(54) 发明名称

治疗阿尔兹海默病的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过给予活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体和活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体,对阿尔兹海默病进行治疗的方法。

1. 一种对阿尔兹海默病进行治疗的方法,所述方法包括给予复合药物组合物,所述复合药物组合物包含 a) 活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体、以及 b) 活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体针对的是整个牛脑特异性 S-100 蛋白。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体针对的是具有序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 的脑特异性 S-100 蛋白。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体针对的是整个牛 NO 合酶。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体针对的是整个人 NO 合酶。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体处于浸渍至固态载体上的 C12、C30 及 C50 顺势疗法稀释液的混合物形式,并且所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体处于浸渍至所述固态载体上的 C12、C30 及 C50 顺势疗法稀释液的混合物形式。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体处于浸渍至固态载体上的 C12、C30 及 C200 顺势疗法稀释液的混合物形式,并且所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体处于浸渍至所述固态载体上的 C12、C30 及 C200 顺势疗法稀释液的混合物形式。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体处于浸渍至固态载体上的 C12、C30 及 C50 顺势疗法稀释液的混合物形式,并且所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体处于浸渍至所述固态载体上的 C12、C30 及 C50 顺势疗法稀释液的混合物形式。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体处于浸渍至固态载体上的 C12、C30 及 C200 顺势疗法稀释液的混合物形式,并且所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体处于浸渍至所述固态载体上的 C12、C30 及 C200 顺势疗法稀释液的混合物形式。

10. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或天然抗体。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体为多克隆抗体。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体通过连续的百倍稀释、且每次稀释时均伴以振荡而制备。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或天然抗体。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体为多克隆抗体。

15. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体通过连续

的百倍稀释、且以每次稀释时均伴以振荡而制备。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述复合药物组合物以 1-2 单位剂型进行给予,各剂型每日给予 1-6 次。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其中,所述复合药物组合物以 1-2 单位剂型进行给予,各剂型每日给予 2 次。

18. 一种改善认知功能的方法,所述改善通过 MMSE 得分增加得以表现,所述方法通过给予权利要求 1 所述的复合药物组合物进行。

19. 一种用于对患有阿尔兹海默病的患者进行治疗的药物组合物,所述组合物通过如下步骤获得:提供 a) 活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体以及 b) 活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体,各抗体根据顺势疗法技术通过对每次获得的溶液进行重复稀释和多次振荡而制备;随后通过混合将强化后的溶液进行复合,或者用所述复合后的溶液或用各强化后的溶液单独浸渍固态载体。

治疗阿尔兹海默病的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,可用于阿尔兹海默病的治疗。

背景技术

[0002] 阿尔兹海默病(AD)是以认知功能减退、记忆丧失、精神错乱、情绪控制退化和痴呆(记忆持续下降、不能想起过去知晓的信息或不能了解新的信息)为特征的神经退行性疾病。认为AD发展的主要原因是 β 淀粉样蛋白(beta amyloid)的累积导致在脑组织中形成 β 淀粉样蛋白斑块和神经原纤维结球(neurofibrillar balls)。AD还伴随有胆碱能系统缺陷。可通过莨菪碱(scopolamine)在化学上诱发实验动物中的学习和记忆减退,莨菪碱是已知干扰乙酰胆碱传递的胆碱能拮抗剂。已将莨菪碱诱发的痴呆实验动物模型广泛用于筛选对于痴呆具有潜在治疗价值的化合物。

[0003] 本领域已知基于抗脑特异性S-100蛋白抗血清的亲神经性药物(RU2156621C1, A61K39/395, 27. 09. 2000)。

[0004] 本专利申请的发明人Dr. Oleg I. Epshtein已发现了经顺势疗法技术强化的极度稀释形式(或极低形式)抗体(活性强化形式)的治疗效果。美国专利号7, 582, 294公开了通过给予抗前列腺特异性抗原(PSA)的、顺势疗法活性形式的抗体来治疗良性前列腺增生症(Benign Prostatic Hyperplasia)或前列腺炎(prostatitis)的药剂。美国专利号7, 700, 096公开了顺势疗法强化形式的抗内皮NO合酶抗体。

[0005] S-100蛋白是主要在脑灰质中(主要在神经胶质细胞和施旺细胞中)发现的细胞质酸性钙结合蛋白。所述蛋白质以由两种免疫学上不同的亚基(α 和 β)组成的多种均二聚体或异二聚体异构体存在。已经提出将S-100蛋白用作诊断的辅助,并用于对脑病变和由于脑损伤(如中风)而造成的神经伤害进行评价。Yardan等, Usefulness of S100B Protein in Neurological Disorders, J Pak Med Assoc Vol. 61, No. 3, 2011年3月,以引用的方式将其内容并入本文。

[0006] 已证明极低剂量的抗S-100蛋白抗体具有抗焦虑(anxiolytic)、抗衰弱(anti-asthenic)、抗攻击(anti-aggressive)、应激保护(stress-protective)、抗缺氧(anti-hypoxic)、抗局部缺血(anti-ischemic)、神经保护(neuroprotective)和促智(nootropic)活性。参见Castagne V. 等, Antibodies to S100proteins have anxiolytic-like activity at ultra-low doses in the adult rat, J Pharm Pharmacol., 2008, 60(3):309-16; Epstein O. I., Antibodies to calcium-binding S100B protein block the conditioning of long-term sensitization in the terrestrial snail, Pharmacol Biochem Behav., 2009, 94(1):37-42; Voronina T. A. 等, 第8章, Antibodies to S-100protein in anxiety-depressive disorders in experimental and clinical conditions, In "Animal models in biological psychiatry", Kalueff A. V. N-Y 著, "Nova Science Publishers, Inc.", 2006, 第137-152页,以引用的方式将上述文献内容全部并入本文。

[0007] 一氧化氮(NO)是已显示出在不同生物学过程的信号转导中发挥作用的气态分子。内皮衍生的NO是调节血管张力(vascular tone)的关键分子,其与血管病的联系早已被认识到。NO对许多已知参与动脉粥样硬化斑块(atherosclerotic plaque)形成的过程起抑制作用,所述过程包括单核细胞粘着、血小板凝聚以及血管平滑肌细胞增殖。内皮NO的另一重要作用是保护血管壁免受由其自身代谢产物及脂类和脂蛋白的氧化产物诱导的氧化应激(oxidative stress)。内皮功能障碍在动脉粥样硬化的很早阶段发生。因此,局部NO利用度不足可能是促进人类动脉粥样硬化形成的最终共路(final common pathway)。除了在血管内皮中的作用以外,NO利用度还显示出了对脂蛋白代谢的调节作用。NO代谢产物的血浆浓度与血浆总胆固醇水平和低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平的负相关性已有报道,而高密度脂蛋白(HDL)在高胆固醇血症患者中改善血管功能。NO缺失对疾病发展具有相当重要的影响。糖尿病与主要由动脉粥样硬化疾病发展加快导致的发病率和死亡率上升有关。并且,报告显示糖尿病患者的肺功能削弱。有人提出胰岛素抵抗可导致气道炎症。Habib等, Nitric Oxide Measurement From Blood To Lungs, Is There A Link? Pak J Physiol 2007; 3 (1)。

[0008] 一氧化氮由内皮通过一氧化氮合酶(NO合酶)从L-精氨酸合成的。NO合酶以不同亚型出现,包括组成型(cNOS)和诱导型(iNOS)。组成型NO合酶存在于正常内皮细胞、神经元和其它某些组织中。

[0009] 对在神经退行性疾病、例如阿尔兹海默病治疗中具有期望治疗效力的新药产品存在持续需求。

发明内容

[0010] 本发明提供了一种对于阿尔兹海默病治疗更有效的方法。

[0011] 本发明提供了一种对阿尔兹海默病进行治疗的方法,所述方法包括给予药物组合物,所述药物组合物包含活性强化形式的抗脑特异性S-100蛋白抗体,以及作为附加强化组分(additional strengthening)的活性强化形式的抗内皮NO合酶抗体。

[0012] 在一个变型中,本发明提供了复合药物组合物,所述复合药物组合物包含活性强化形式的抗脑特异性S-100蛋白抗体、以及活性强化形式的抗内皮NO合酶抗体,其中,所述抗体针对的是整个S-100蛋白或其片段。

[0013] 在一个变型中,本发明提供了复合药物组合物,所述复合药物组合物包含活性强化形式的抗脑特异性S-100蛋白抗体、以及活性强化形式的抗内皮NO合酶抗体,其中所述抗体针对的是整个内皮NO合酶或其片段。

[0014] 在一个变型中,本发明这一方面的复合药物组合物包含活性强化形式的抗S-100蛋白抗体,其中,所述活性强化形式的抗S-100蛋白抗体处于浸渍至固态载体上的(C12、C30及C50)或(C12、C30及C200)顺势疗法稀释液的混合物形式。活性强化形式的抗NO合酶抗体处于可随后浸渍至固态载体上的(C12、C30及C50)或(C12、C30及C200)顺势疗法稀释液的混合物形式。

[0015] 在一个变型中,本发明这一方面的复合药物组合物包含活性强化形式的抗内皮NO合酶抗体,其中,所述活性强化形式的抗内皮NO合酶抗体处于浸渍至固态载体上的(C12、C30及C50)或(C12、C30及C200)顺势疗法稀释液的混合物形式。活性强化形式的抗S-100

蛋白抗体处于可随后浸渍至固态载体上的(C12、C30 及 C50)或(C12、C30 及 C200)顺势疗法稀释液的混合物形式。

[0016] 优选地,活性强化形式的抗 S-100 蛋白抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或天然抗体,更优选为多克隆抗体。在本发明这一方面的一个变型中,活性强化形式的抗 S-100 蛋白抗体通过连续的百倍稀释(successive centesimal dilutions)、且每次稀释时均伴以振荡而制备。特别在考虑之列的是竖直振荡(vertical shaking)。

[0017] 优选地,活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或天然抗体,更优选为多克隆抗体。在本发明这一方面的一个变型中,活性强化形式的抗 NO 合酶抗体通过连续的百倍稀释、且每次稀释时均伴以振荡而制备。特别在考虑之列的是竖直振荡。

[0018] 在本发明的一个变型中,提供了如下方案:给予 1-2 单位剂型的活性强化形式的抗 S-100 蛋白抗体以及 1-2 单位剂型的活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体;各剂型以每日 1-6 次进行给予。优选所述 1-2 单位剂型的各活性强化形式抗体以每日 2 次进行给予。

具体实施方式

[0019] 参考所附的权利要求书对本发明进行限定。考虑到权利要求书,下述术语汇编提供了有关定义。

[0020] 本文所使用的术语“抗体”意味着特异性地结合至另一分子的特定空间和极性结构、并因此被定义为与另一分子的特定空间和极性结构互补的免疫球蛋白。权利要求书中所列举的抗体可包括完整的免疫球蛋白或其片段,可为天然抗体、多克隆抗体或单克隆抗体,并可包括多个类及同种型,例如 IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3、IgM 等。免疫球蛋白的片段可包括 Fab、Fv 和 F(ab')₂ 以及 Fab' 等。单数“抗体(antibody)”包括复数“抗体(antibodies)”。

[0021] 相对于本文所列举的抗体,术语“活性强化形式”或“强化形式”分别用于表示任意的抗体初始溶液的顺势疗法强化产物。“顺势疗法强化”表示利用顺势疗法的方法对有关物质的初始溶液赋予顺势疗法效力(potency)。尽管不限于此,但是“顺势疗法强化”可包括例如结合外部处理、尤其是竖直(机械)振荡的重复的连续稀释。换句话说,根据顺势疗法技术,对抗体的初始溶液进行连续的重复稀释并对每次获得的溶液进行多次竖直振荡。抗体处于溶剂(优选水或水-乙醇混合物)中的初始溶液的优选浓度范围为约 0.5mg/ml 至约 5.0mg/ml。制备各组分(即抗体溶液)的优选过程为:使用抗体初级基质溶液(primary matrix solution)(原始酊剂, mother tincture)分别被稀释 100¹²、100³⁰ 和 100²⁰⁰ 倍的 3 种水稀释液或水-醇稀释液的混合物,相当于百倍顺势疗法稀释液(C12、C30 和 C200);或者使用抗体初级基质溶液分别被稀释 100¹²、100³⁰ 和 100⁵⁰ 倍的 3 种水稀释液或水-醇稀释液的混合物,相当于百倍顺势疗法稀释液(C12、C30 和 C50)。在美国专利号 7,572,441 和 7,582,294 中描述了顺势疗法强化的实例,以引用的方式将其内容整体并入本文并用于所述目的。同时,术语“活性强化形式”用在权利要求书中,术语“极低剂量”用在实施例。术语“极低剂量”在通过研究和使用的顺势疗法稀释和强化形式的物质而产生的领域中成为行业术语。术语“极低剂量”意味着完全支持并与权利要求书所使用的术语“活性强化”形式基本上同义。

[0022] 换句话说,当存在三个因素时,抗体处于“活性强化”或“强化”形式。首先,“活性

强化”形式的抗体为顺势疗法领域广泛接受的制备方法的产品。其次,“活性强化”形式的抗体必须具备通过现代药理学广泛接受的方法确定的生物活性。第三,“活性强化”形式的抗体所表现出的生物活性不能由顺势疗法方法终产物中的分子形式抗体的存在加以解释。

[0023] 例如,活性强化形式的抗体可通过使处于分子形式的初始独立抗体经受伴以外部作用(如机械振荡)的连续多重稀释而制备。浓度降低过程中的外部处理还可通过例如暴露至超声、电磁或其它物理因素来完成。V. Schwabe, “Homeopathic medicines”, M., 1967, 美国专利号 7, 229, 648 和 4, 311, 897 (以引用的方式将其内容整体并入本文并用于所述目的) 描述了顺势疗法领域中广泛接受的顺势疗法强化方法。这一过程使得初始分子形式抗体的分子浓度均匀降低。重复这一过程直至获得期望的顺势疗法效力。对于单独的抗体, 可通过将中间稀释液在期望的药理学模型中进行生物测试来确定所需的顺势疗法效力。尽管不限于此, 但是“顺势疗法强化”可包括例如与外部处理、尤其是(机械) 振荡相结合的重复的连续稀释。换句话说, 根据顺势疗法技术, 对抗体的初始溶液(initial solution) 进行连续的重复稀释并对每次获得的溶液进行多次竖直振荡。抗体处于溶剂(优选水或水-乙醇混合物) 中的初始溶液的优选浓度范围为约 0.5mg/ml 至约 5.0mg/ml。制备各组分(即抗体溶液) 的优选过程为: 使用抗体初级基质溶液(原始酞剂) 分别被稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍的 3 种水稀释液或水-醇稀释液的混合物, 相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200; 或者使用抗体初级基质溶液(原始酞剂) 分别被稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{50} 倍的 3 种水稀释液或水-醇稀释液的混合物, 相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C50。例如在美国专利号 7, 229, 648 和 4, 311, 897 中, 也提供了如何获得期望效力的实例, 以引用方式将其并入本文用于所述目的。在下文将更加详细地描述适用于本文所述的“活性强化”形式抗体的过程。

[0024] 关于用顺势疗法对人类受试者进行治疗已有许多争议。虽然本发明依靠已接受的顺势疗法方法来获得“活性强化”形式的抗体, 但是其并不仅仅依赖于在人类受试者中进行顺势疗法来证明其活性。本申请的发明人出乎预料地发现、并在已接受的药理学模型中充分证明, 由起始分子形式的抗体进行连续多次稀释而最终得到的溶液具有明确的活性, 且与痕量分子形式抗体在目标稀释液中的存在无关。将本文所提供的“活性强化”形式的抗体在广泛接受的药理学活性模型中(在适当的体外实验中或于合适的动物模型中在体内) 测试其生物活性。下文进一步提供的实验提供了在此类模型中的生物活性的证据。人类临床研究也提供了如下证据: 在动物模型中观察到的活性被很好地转换至人类治疗。人类研究还提供了如下证据: 本文所述的“活性强化”形式可用于对在医学科学中作为病理症状而广泛接受的具体人类疾病或紊乱进行治疗。

[0025] 同样, 所要求保护的“活性强化”形式的抗体仅涵盖溶液或固体制剂, 所述溶液或固体制剂的生物活性不能由初始、起始溶液(starting solution) 中余留的分子形式抗体的存在进行解释。换句话说, 虽然“活性强化”形式的抗体可包含痕量的初始分子形式抗体也在考虑之列, 但是由于连续稀释后余留的分子形式抗体的浓度极低, 因此本领域技术人员不能以任何程度的合理性将在已接受的药理学模型中观察到的生物活性归因于余留的分子形式抗体。虽然本发明并不受任何具体理论的限制, 但是本发明的“活性强化”形式抗体的生物活性并不归因于初始分子形式抗体。优选所述“活性强化”形式抗体处于液体形式或固体形式, 其中, 初始分子形式抗体的浓度低于所接受的分析技术(如毛细管电泳和高效液相色谱) 的检测限。特别优选“活性强化”形式的抗体处于液体形式或固体形式, 其中, 初

始分子形式抗体的浓度低于阿伏伽德罗常数。在分子形式治疗物质的药物学中,通常制作剂量-响应曲线,在该曲线中,以药理学响应水平对给予受试者或在体外进行测试的活性药物的浓度作图。产生任何可检测响应的药物最低水平被称为阈剂量(threshold dose)。特别在考虑之列并优选的是,“活性强化”形式的抗体以低于所给定生物学模型中的分子形式抗体的阈剂量的浓度包含分子抗体(如果有的话)。

[0026] 在一个方面,本发明提供了复合药物组合物,所述复合药物组合物包含 a) 活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体和 b) 活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体。如上文所述,所述复合物的各单独组分由于其各自的医学用途而为大家所熟知。然而,本申请的发明人惊奇地发现,给予所述复合物明显可用来对阿尔兹海默病进行治疗。

[0027] 在另一方面,本发明提供了对阿尔兹海默病进行治疗的方法,所述方法通过向生物体中同时置入极低剂量的经亲和纯化的活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白和活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体进行。

[0028] 优选地,为了治疗目的,将所述复合药物组合物每日给予 1-4 次,每次给予包含 1-2 单位剂型的复合物。

[0029] 用于治疗阿尔兹海默病目的的本申请药物组合物包含主要以 1:1 的体积比计的活性组分。

[0030] 出于对阿尔兹海默病进行治疗的目的,所述药物组合物的组分可单独给予。然而,优选同时给予 1 种溶液和 / 或固体剂型(片剂)形式的复合组分,所述剂型形式包含活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体,以及相应的活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体。

[0031] 此外,在对阿尔兹海默病进行治疗期间,单独应用与同时应用(摄入至生物体内)所声明的药物组合物都是可能的,所述药物组合物处于两种单独制备的药物的形式,所述两种单独制备的药物均处于溶液和固体剂型(片剂)形式、各自包含活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体或活性强化形式的抗 S-100 蛋白抗体。

[0032] 所述医药产品主要按如下所述进行制备。

[0033] 根据本发明的复合药物组合物可处于液态或固态形式。药物组合物中所含的各活性强化形式抗体由初始分子形式的抗体通过顺势疗法领域所接受的方法制备。起始抗体可为根据已知方法制备的单克隆抗体或多克隆抗体,所述已知方法例如 Immunotechniques, G.Frimel, M., “Medityna”, 1987, 第 9-33 页; “Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after”, Laffly E., Sodoyer R. 著, 2005, Vol. 14., N1-2., 第 33-55 页中所述,以引用的方式将其内容并入本文。

[0034] 单克隆抗体可通过如杂交瘤技术获得。所述方法的初始步骤包括基于已在多克隆抗血清制备过程中开发出的原则进行免疫。工作的进一步步骤包括制备出产生具有相同特异性的抗体克隆的杂交细胞。其各自的分离使用与多克隆抗血清制备情况中相同的方法进行。

[0035] 多克隆抗体可通过动物的主动免疫获得。为了这一目的,例如使合适的动物(如兔)接受适当抗原(脑特异性 S-100 蛋白和内皮 NO 合酶)的一系列注射。动物的免疫系统产生相应的抗体,以已知方法从动物中进行收集。这一过程使得能够制备富含单特异性抗体的血清。

[0036] 如果需要的话,包含抗体的血清例如可通过使用亲和色谱、盐沉淀分级分离或离

子交换色谱进行纯化。可将所得到的经纯化的、富含抗体的血清用作制备活性强化形式抗体的起始材料。所得到的处于溶剂(优选水或水-乙醇混合物)中的初始抗体溶液的优选浓度范围为约 0.5mg/ml 至约 5.0mg/ml。

[0037] 制备各组分的优选过程为：使用抗体初级基质溶液分别被稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍的 3 种水-醇稀释液的混合物，相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200。为制备固体剂型，将固态载体通过顺势疗法方法所获得的期望稀释液进行处理。为获得本发明复合物的固体单位剂型，用各稀释液对载体物质进行浸渍。为制备期望的复合剂型，两种浸渍顺序都是适合的。

[0038] 在优选的实施方式中，用于制备包含本发明所述复合物的活性强化形式的起始材料是抗脑特异性 S-100 蛋白多克隆抗体和抗内皮 NO 合酶多克隆抗体，将浓度为 0.5mg/ml 至 5.0mg/ml 的初始(基质)溶液用于进行后续的活性强化形式的制备。

[0039] 为制备所述药物组合物，优选使用抗脑特异性 S-100 蛋白多克隆抗体和抗内皮 NO 合酶多克隆抗体。

[0040] 将佐剂和具有以下序列的牛内皮 NO 合酶的整个分子用作免疫原(抗原)来对兔进行免疫而获得抗内皮 NO 合酶多克隆抗体：

[0041] SEQ. ID. NO. 1

[0042] Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Gly Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys

[0043] 1 5 10 15

[0044] Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly

[0045] 16 20 25 30

[0046] Pro Ala Ser Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Pro Ala

[0047] 31 35 40 45

[0048] Thr Pro His Ala Pro Asp His Ser Pro Ala Pro Asn Ser Pro Thr

[0049] 46 50 55 60

[0050] Leu Thr Arg Pro Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn

[0051] 61 65 70 75

[0052] Trp Glu Leu GLys er Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Cys Ala Gln Ser

[0053] 76 80 85 90

[0054] Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro Arg Cys Cys Leu GLys er Leu

[0055] 91 95 100 105

[0056] Val Leu Pro Arg Lys Leu Gln Thr Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro

[0057] 106 110 115 120

[0058] Pro Ala Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln

[0059] 121 125 130 135

[0060] Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser GLys er Gln Ala His Glu Glu

[0061] 136 140 145 150

[0062] Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ser Thr Gly Thr Tyr

[0063] 151 155 160 165

[0064] His Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln Ala Trp

[0065]	166	170	175	180
[0066]	Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys Leu			
[0067]	181	185	190	195
[0068]	Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Ser Ser Ala Gln Glu Met phe			
[0069]	196	200	205	210
[0070]	Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn			
[0071]	211	215	220	225
[0072]	Leu Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ala Pro Gly Arg			
[0073]	226	230	235	340
[0074]	Gly Asp Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly			
[0075]	241	245	250	255
[0076]	Tyr Arg Gln Gln Asp GLys er Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val			
[0077]	256	260	265	270
[0078]	Glu Ile Thg Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn			
[0079]	271	275	280	285
[0080]	Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu			
[0081]	286	290	295	300
[0082]	Ala Pro Glu Leu Phe Val Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val			
[0083]	301	305	310	315
[0084]	Pro Leu Glu His Pro Thr Leu Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu			
[0085]	316	320	325	330
[0086]	Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile			
[0087]	331	335	340	345
[0088]	Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met			
[0089]	346	350	355	360
[0090]	Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr			
[0091]	361	365	370	375
[0092]	Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp Leu Asp Thr Arg			
[0093]	376	380	385	390
[0094]	Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val Glu Ile Asn			
[0095]	391	395	400	405
[0096]	Leu Ala Val Leu His Ser Phe Gln Leu Ala Lys Val Thr Ile Val			
[0097]	406	410	415	420
[0098]	Asp His His Ala Ala Thr Val Ser Phe Met Lys His Leu Asp Asn			
[0099]	421	425	430	435
[0100]	Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile			
[0101]	436	440	445	450
[0102]	Val Pro Pro Ile Ser GLys er Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu			
[0103]	451	455	460	465

[0104]	Met Val Asn Tyr Ile Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp
[0105]	466 470 475 480
[0106]	Pro Trp Lys Gly Ser Ala Thr Lys Gly Ala Gly Ile Thr Arg Lys
[0107]	481 485 490 495
[0108]	Lys Thr Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser
[0109]	496 500 505 510
[0110]	Leu Met Gly Thr Leu Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu
[0111]	511 515 510 525
[0112]	Tyr Ala Ser Glu Thr Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu
[0113]	526 530 535 540
[0114]	Gly Arg Leu Phe Arg Lys Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met
[0115]	541 545 550 555
[0116]	Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser Leu Glu His Gln Ala Leu Val Leu
[0117]	556 560 565 570
[0118]	Val val Thr Ser Thr Phe Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly
[0119]	571 575 580 585
[0120]	Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu Met Ser Gly Pro Tyr Asn
[0121]	586 590 595 600
[0122]	Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser Tyr Lys Ile Arg Phe
[0123]	601 605 610 615
[0124]	Asn Ser Val Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser Ser Trp Arg Arg
[0125]	616 620 625 630
[0126]	Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly Ala Leu Gly
[0127]	631 635 640 645
[0128]	Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala Tyr Pro
[0129]	646 650 655 660
[0130]	His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu Glu
[0131]	661 665 670 675
[0132]	Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu
[0133]	676 680 685 690
[0134]	Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Lys Ala Ala Phe
[0135]	691 695 700 705
[0136]	Gln Ala Ser Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Glu Ala Lys Ala
[0137]	706 710 715 720
[0138]	Ala Ala Gln Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln
[0139]	721 725 730 735
[0140]	Arg Tyr Arg Leu Ser Thr Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro
[0141]	736 740 745 750
[0142]	Gly Leu Ile His Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Val

[0143]	751	755	760	765
[0144]	Leu Ser Val Glu Asn Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr			
[0145]	766	770	775	780
[0146]	Ile Leu Val Arg Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr			
[0147]	781	785	790	795
[0148]	Gln Pro Gly Asp His Ile Gly Ile Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly			
[0149]	796	800	805	810
[0150]	Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg Val Glu Asp Pro Pro Pro Pro			
[0151]	811	815	820	825
[0152]	Thr Glu Ser Val Ala Val Glu Gln Leu Glu Lys Gly Ser Pro Gly			
[0153]	826	830	835	840
[0154]	Gly Pro Pro Pro Ser Trp Val Arg Asp Pro Arg Leu Pro Pro Cys			
[0155]	841	845	850	855
[0156]	Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp Ile Thr Ser Pro			
[0157]	856	860	865	870
[0158]	Pro Ser Pro Arg Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu Ala Glu Glu			
[0159]	871	875	880	885
[0160]	Pro Ser Glu Gln Gln Glu Leu Glu Thr Leu Ser Gln Asp Pro Arg			
[0161]	886	890	895	900
[0162]	Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu Glu			
[0163]	901	905	910	915
[0164]	Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu			
[0165]	916	920	925	930
[0166]	Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser			
[0167]	931	935	940	945
[0168]	Ser Ala Pro Asn Ala His Pro Gly Glu Val His Leu Thr Val Ala			
[0169]	946	950	955	960
[0170]	Val Leu Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr			
[0171]	961	965	970	975
[0172]	Gly Val Cys Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Thr Gly Asp Pro			
[0173]	976	980	985	990
[0174]	Val Pro Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro			
[0175]	991	995	1000	1005
[0176]	Asp Pro Tyr Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile			
[0177]	1006	1010	1015	1020
[0178]	Ala Pro Phe Arg Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu			
[0179]	1021	1025	1030	1035
[0180]	Ser Lys Gly Leu Gln Pro Ala Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys			
[0181]	1036	1140	1145	1050

[0182]	Arg Cys Ser Gln Leu Asp His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asp	
[0183]	1051 1155 1160 1065	
[0184]	Ala Gln Glu Arg Gly Val Phe Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser	
[0185]	1066 1170 1175 1080	
[0186]	Arg Glu Pro Asp Ser Pro Lys Thr Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg	
[0187]	1081 1185 1190 1095	
[0188]	Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg Val Leu Cys Leu Glu Arg	
[0189]	1096 1100 1105 1110	
[0190]	Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Ser Val	
[0191]	1111 1115 1120 1125	
[0192]	Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu	
[0193]	1126 1130 1135 1140	
[0194]	Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln	
[0195]	1141 1145 1150 1155	
[0196]	Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu	
[0197]	1156 1160 1165 1170	
[0198]	Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg	
[0199]	1171 1175 1180 1185	
[0200]	His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro	
[0201]	1186 1190 1195 1200	
[0202]	Asp Thr Pro Gly Pro	
[0203]	1201 1205	
[0204]	抗内皮 NO 合酶多克隆抗体可使用以下序列的人内皮 NO 合酶的整个分子获得：	
[0205]	SEQ ID NO :2	
[0206]	Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys	
[0207]	1 5 10 15	
[0208]	Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly	
[0209]	16 20 25 30	
[0210]	Pro Ala Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu	
[0211]	31 35 40 45	
[0212]	Leu Pro Pro Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr	
[0213]	46 50 55 60	
[0214]	Gln Pro Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu	
[0215]	61 65 70 75	
[0216]	Val GLys er Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln	
[0217]	76 80 85 90	
[0218]	Asp Gly Pro Cya Thr Pro Arg Arg Cys Leu GLys er Leu Val Phe	
[0219]	91 95 100 105	
[0220]	Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro	

[0221]	106	110	115	120
[0222]	Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr			
[0223]	121	125	130	135
[0224]	Ser Ser Ile Lys Arg Ser GLys er Gln Ala His Glu Gln Arg Leu			
[0225]	136	140	145	150
[0226]	Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Gln Leu			
[0227]	151	155	160	165
[0228]	Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln Ala Trp Arg Asn			
[0229]	166	170	175	180
[0230]	Ala pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys Leu Gln Val			
[0231]	181	185	190	195
[0232]	Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe Thr Tyr			
[0233]	196	200	205	210
[0234]	Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu Arg			
[0235]	211	215	220	225
[0236]	Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp			
[0237]	226	230	235	240
[0238]	Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg			
[0239]	241	245	250	255
[0240]	Gln Gln Asp GLy Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile			
[0241]	256	260	265	270
[0242]	Thr Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg			
[0243]	271	275	280	285
[0244]	Phe Asp Val Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Pro Pro			
[0245]	286	290	295	300
[0246]	Glu Leu Phe Leu Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu			
[0247]	301	305	310	315
[0248]	Glu His Pro Thr Leu Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp			
[0249]	316	320	325	330
[0250]	Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly			
[0251]	331	335	340	345
[0252]	Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr			
[0253]	346	350	355	360
[0254]	Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile			
[0255]	361	365	370	375
[0256]	Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp Leu Asp Thr Arg Thr Thr			
[0257]	376	380	385	390
[0258]	Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val Glu Ile Asn Val Ala			
[0259]	391	395	400	405

[0260]	Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr Ile Val Asp His
[0261]	406 410 415 420
[0262]	His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu Asn Glu Gln
[0263]	421 425 430 435
[0264]	Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile Val Pro
[0265]	436 440 445 450
[0266]	Pro Ile Ser GLys er Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Val
[0267]	451 455 460 465
[0268]	Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp
[0269]	466 470 475 480
[0270]	Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr
[0271]	481 485 490 495
[0272]	Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met
[0273]	496 500 505 510
[0274]	Gly Thr Val Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly
[0275]	511 515 510 525
[0276]	Ser Glu Thr Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg
[0277]	526 530 535 540
[0278]	Leu Phe Arg Lys Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu
[0279]	541 545 550 555
[0280]	Tyr Asp Val Val Ser Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val
[0281]	556 560 565 570
[0282]	Thr Ser Thr Phe Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser
[0283]	571 575 580 585
[0284]	Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser
[0285]	586 590 595 600
[0286]	Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser
[0287]	601 605 610 615
[0288]	Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser Ser Trp Arg Arg Lys Arg
[0289]	616 620 625 630
[0290]	Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly Ala Leu Gly Thr Leu
[0291]	631 635 640 645
[0292]	Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu GLys er Arg Ala Tyr Pro His Phe
[0293]	646 650 655 660
[0294]	Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu Glu Leu Gly
[0295]	661 665 670 675
[0296]	Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu Cys Gly
[0297]	676 680 685 690
[0298]	Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln Ala

[0299]	691	695	700	705
[0300]	Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala			
[0301]	706	710	715	720
[0302]	Arg Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr			
[0303]	721	725	730	735
[0304]	Arg Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu			
[0305]	736	740	745	750
[0306]	Ile His Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser			
[0307]	751	755	760	765
[0308]	Val Glu Asn Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu			
[0309]	766	770	775	780
[0310]	Val Arg Leu Asp Thr Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro			
[0311]	781	785	790	795
[0312]	Gly Asp His Ile Gly Val Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val			
[0313]	796	800	805	810
[0314]	Glu Ala Leu Leu Ser Arg Val Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu			
[0315]	811	815	820	825
[0316]	Pro Val Ala Val Glu Gln Leu Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro			
[0317]	826	830	835	840
[0318]	Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro Arg Leu Pro Pro Cys Thr Leu			
[0319]	841	845	850	855
[0320]	Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp Ile Thr Ser Pro Pro Ser			
[0321]	856	860	865	870
[0322]	Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu Ala Glu Glu Pro Arg			
[0323]	871	875	880	885
[0324]	Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp Pro Arg Arg Tyr			
[0325]	886	890	895	900
[0326]	Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu Glu Val Leu			
[0327]	901	905	910	915
[0328]	Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu Leu Thr			
[0329]	916	920	925	930
[0330]	Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Seg Val Ser Ser Ala			
[0331]	931	935	940	945
[0332]	Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu			
[0333]	946	950	955	960
[0334]	Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val			
[0335]	961	965	970	975
[0336]	Cys Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro			
[0337]	976	980	985	990

[0338] Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro
 [0339] 991 995 1000 1005
 [0340] Ser Leu Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro
 [0341] 1006 1010 1015 1020
 [0342] Phe Arg Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys
 [0343] 1021 1025 1030 1035
 [0344] Gly Leu Gln Pro Thr Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys
 [0345] 1036 1040 1045 1050
 [0346] Ser Gln Leu Asp His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln
 [0347] 1051 1055 1060 1065
 [0348] Gln Arg Gly Val Phe Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu
 [0349] 1066 1070 1075 1080
 [0350] Pro Asp Asn Pro Lys Thr Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu
 [0351] 1081 1085 1090 1095
 [0352] Leu Ala Ala Glu Val His Arg Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His
 [0353] 1096 1100 1105 1110
 [0354] Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Asn Val Leu Gln
 [0355] 1111 1115 1120 1125
 [0356] Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu Leu Asp
 [0357] 1126 1130 1135 1140
 [0358] Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln Arg Tyr
 [0359] 1141 1145 1150 1155
 [0360] His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu Val Thr
 [0361] 1156 1160 1165 1170
 [0362] Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln Leu
 [0363] 1171 1175 1180 1185
 [0364] Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr
 [0365] 1186 1190 1195 1200

[0366] Asn Ser Pro

[0367] 1201 1203

[0368] 为获得抗 NO 合酶多克隆抗体,还可使用例如选自以下序列的内皮 NO 合酶的片段:

[0369] SEQ ID NO :3

[0370] Pro Trp Ala Phe

[0371] 1192 1195

[0372] SEQ ID NO :4

[0373] Gly Ala Val Pro

[0374] 1189 1192

[0375] SEQ ID NO :5

[0376]			Arg	
[0377]			1185	
[0378]	His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro			
[0379]	1186	1190	1195	1200
[0380]	Asp Thr Pro Gly Pro			
[0381]	1201	1205		
[0382]	SEQ ID NO :6			
[0383]		Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro		
[0384]		11941195		1200
[0385]	Asp Thr Pro Gly Pro			
[0386]	1201	1205		
[0387]	SEQ ID NO :7			
[0388]	His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp			
[0389]	1186	1190	11951196	
[0390]	SEQ ID NO :8			
[0391]	His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro			
[0392]	1186	1190	1195	1200
[0393]	Asp Thr Pro Gly Pro			
[0394]	1201	1205		

[0395] 制备起始抗 NO 合酶多克隆抗体的示例性过程可描述如下。在采血前 7-9 天,将期望抗原经 1-3 次静脉注射至兔,以增高兔血流中的多克隆抗体水平。一旦免疫后,采集血样以测试抗体水平。通常,可溶性抗原免疫反应在第一次注射后 40-60 天内达到最高水平。第一个免疫周期结束后,兔具有 30 天的康复期,之后经另外的 1-3 次静脉注射进行再免疫。

[0396] 为获得包含期望抗体的抗血清,从兔中收集免疫后的兔血液并置于 50ml 离心管中。用木质药匙(spatula)将管壁上所形成的产物凝块移除,将棒置于管中心的凝块中。然后将血液放置于冷却器中于 4℃ 的温度下过夜。第二天,将药匙上的凝块移除,将剩余液体在 13000 转 / 分下离心 10min。上清液体为目标抗血清。所获得的抗血清通常为黄色。向抗血清加入 20wt% 的 NaN_3 至最终浓度为 0.02% 并在 -20℃ 的温度下于冷冻状态贮存至使用,或者不加入 NaN_3 而在 -70℃ 的温度下贮存至使用。为了从抗血清中分离目标抗内皮 NO 合酶抗体,下述固相吸附顺序很适合:

[0397] (a) 将 10ml 兔抗血清用 0.15M 的 NaCl 稀释 2 倍,之后加入 6.26g Na_2SO_4 ,混合并在 4℃ 下孵育 12-16 小时。

[0398] (b) 将沉淀物经离心移除,在 10ml 磷酸盐缓冲液中稀释并使用相同的缓冲液在环境温度下透析过夜。

[0399] (c) 移除沉淀物后,将溶液加样至用磷酸盐缓冲液平衡后的 DEAE- 纤维素柱。

[0400] (d) 通过在 280nm 处对洗脱液的光密度进行测量来确定抗体馏分。

[0401] 使用亲和色谱法,通过将所获得的抗内皮 NO 合酶抗体附至色谱介质的不溶性基质上、并随后用浓的盐溶液洗脱,对所分离出的粗抗体进行纯化。

[0402] 将所得到的缓冲溶液用作顺势疗法稀释方法的起始溶液,所述顺势疗法稀释方法

用来制备活性强化形式的抗体。抗原纯化的抗内皮 NO 合酶多克隆兔抗体的初始基质溶液的优选浓度为 0.5–5.0mg/ml, 优选 2.0–3.0mg/ml。

[0403] 由神经元细胞与神经胶质细胞(星形细胞和少突胶质细胞)表达的脑特异性 S-100 蛋白,直接或通过与其它蛋白相互作用在 CNS 中执行许多针对维持正常脑部机能的功能,包括影响学习和记忆过程、神经元的生长和生存力、神经元组织中代谢过程的调节及其它。为获得抗脑特异性 S-100 蛋白多克隆抗体,使用了脑特异性 S-100 蛋白,在如下列文章和书籍中对所述脑特异性 S-100 蛋白的理化性质进行了描述:M. V. Starostin, S. M. Sviridov, Neurospecific Protein S-100, Progress of Modern Biology, 1977, 第 5 卷, 第 170–178 页;M. B. Shtark, Brain-Specific Protein Antigens and Functions of Neuron, “Medicine”, 1985, 第 12–14 页。通过以下技术从牛的脑组织中分离出脑特异性 S-100 蛋白:

- [0404] – 使用专门的研磨装置将液氮冷冻的牛脑组织磨成粉末;
- [0405] – 以 1:3 (重量 / 体积) 的比例使用提取缓冲液经匀化作用提取蛋白;
- [0406] – 将匀浆在 60℃ 下加热 10min, 然后在冰浴中冷却至 4℃;
- [0407] – 通过离心移除热不稳定蛋白;
- [0408] – 分阶段进行硫酸铵分级分离, 然后移除沉淀的蛋白;
- [0409] – 使用通过将 pH 降至 4.0 实现的 100% 饱和硫酸铵对含 S-100 蛋白的馏分进行沉淀;通过离心收集期望的馏分;
- [0410] – 将沉淀物溶于含 EDTA 和巯基乙醇的最小体积缓冲液中, 将沉淀物用去离子水进行透析, 然后冻干;
- [0411] – 随后通过离子交换介质色谱、DEAE- 纤维 DE-52 色谱以及 DEAE-sephadex A-50 色谱对酸性蛋白分级分离;
- [0412] – 将经收集并透析的馏分(含 S-100 蛋白)根据分子量在 sephadex G-100 上通过凝胶过滤进行分离;
- [0413] – 将纯化的 S-100 蛋白进行透析和冻干。
- [0414] 纯化的脑特异性 S-100 蛋白的分子量为 21000D。
- [0415] 由于天冬氨酸和谷氨酸的高含量, 脑特异性 S-100 蛋白高度酸性化, 并且在聚丙烯酰胺凝胶的不连续缓冲体系中的电内渗过程中占据了阳极末端位置, 这有利于其鉴定。
- [0416] 还可通过类似于所述用于内皮 NO 合酶抗体的方法学, 使用佐剂来获得抗 S-100 蛋白多克隆抗体。可将 S-100 蛋白的整个分子用作兔免疫的免疫原(抗原):

[0417] 牛 S-100B (SEQ. ID. NO. 9)

[0418] Met Ser Glu Leu Glu Lys Ala Val Val Ala Leu Ile Asp Val Phe

[0419] 1 5 10 15

[0420] His Gln Tyr Ser Gly Arg Glu Gly Asp Lys His Lys Leu Lys Lys

[0421] 16 20 25 30

[0422] Ser Glu Leu Lys Glu Leu Ile Asn Asn Glu Leu Ser His Phe Leu

[0423] 31 35 40 45

[0424] Glu Glu Ile Lys Glu Gln Glu Val Val Asp Lys Val Met Glu Thr

[0425] 46 50 55 60

[0426] Leu Asp Ser Asp Gly Asp Gly Glu Cys Asp Phe Gln Glu Phe Met
 [0427] 61 65 70 75
 [0428] Ala Phe Val Ala Met Ile Thr Thr Ala Cys His Glu Phe Phe Glu
 [0429] 76 80 85 90
 [0430] His Glu
 [0431] 91 92
 [0432]
 [0433] 人 S-100B (SEQ. ID. NO. 10)
 [0434] Met Ser Glu Leu Glu Lys Ala Met Val Ala Leu Ile Asp Val Phe
 [0435] 1 5 10 15
 [0436] His Gln Tyr Ser Gly Arg Glu Gly Asp Lys His Lys Leu Lys Lys
 [0437] 16 20 25 30
 [0438] Ser Glu Leu Lys Glu Leu Ile Asn Asn Glu Leu Ser His Phe Leu
 [0439] 31 35 40 45
 [0440] Glu Glu Ile Lys Glu Gln Glu Val Val Asp Lys Val Met Glu Thr
 [0441] 46 50 55 60
 [0442] Leu Asp Asn Asp Gly Asp Gly Glu Cys Asp Phe Gln Glu Phe Met
 [0443] 61 65 70 75
 [0444] Ala Phe Val Ala Met Val Thr Thr Ala Cys His Glu Phe Phe Glu
 [0445] 76 80 85 90
 [0446] His Glu
 [0447] 91 92
 [0448] 人 S-100A1 (SEQ. ID. NO. 11)
 [0449] Met Gly Ser Glu Leu Glu Thr Ala Met Glu Thr Leu Ile Asn Val
 [0450] 1 5 10 15
 [0451] Phe His Ala His Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Tyr Lys Leu Ser
 [0452] 16 20 25 30
 [0453] Lys Lys Glu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Thr Glu Leu Ser Gly Phe
 [0454] 31 35 40 45
 [0455] Leu Asp Ala Gln Lys Asp Val Asp Ala Val Asp Lys Val Met Lys
 [0456] 46 50 55 60
 [0457] Glu Leu Asp Glu Asn Gly Asp Gly Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr
 [0458] 61 65 70 75
 [0459] Val Val Leu Val Ala Ala Leu Thr Val Ala Cys Asn Asn Phe Phe
 [0460] 76 80 85 90
 [0461] Trp Glu Asn Ser
 [0462] 91 94
 [0463] 牛 S-100A1 (SEQ. ID. NO. 12)
 [0464] Met Gly Ser Glu Leu Glu Thr Ala Met Glu Thr Leu Ile Asn Val

[0465]	1	5	10	15
[0466]	Phe His Ala His Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Tyr Lys Leu Ser			
[0467]	16	20	25	30
[0468]	Lys Lys Glu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Thr Glu Leu Ser Gly Phe			
[0469]	31	35	40	45
[0470]	Leu Asp Ala Gln Lys Asp Ala Asp Ala Val Asp Lys Val Met Lys			
[0471]	46	50	55	60
[0472]	Glu Leu Asp Glu Asn Gly Asp Gly Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr			
[0473]	61	65	70	75
[0474]	Val Val Leu Val Ala Ala Leu Thr Val Ala Cys Asn Asn Phe Phe			
[0475]	76	80	85	90
[0476]	Trp Glu Asn Ser			
[0477]	91	94		

[0478] 为获得抗血清,可将脑特异性 S-100 蛋白或 S-100 蛋白的混合物(抗原)制备成以甲基化牛血清白蛋白作为载剂与完全弗氏佐剂复合,并将其加入至指定的脑特异性 S-100 蛋白,将其以 1-2ml 的量经皮下注射入实验动物(兔)的背部区域。在第 8 天、第 15 天进行重复免疫。在第 26 天和第 28 天例如从耳静脉取血样。

[0479] 所获得的抗血清效价为 1:500-1:1000,所述抗血清与神经组织提取物形成单一沉淀带(single precipitin band),而不与异源体(heterologicalbodies)的提取物进行反应,并且与纯的 S-100 蛋白和神经组织提取物均形成单一沉淀峰,这表明所获得的抗血清为单特异性。

[0480] 活性强化形式的复合物各组分可由初始溶液经顺势疗法强化来制备,优选使用通过连续稀释来成比例降低浓度的如下方法:将 1 份的各在先溶液(preceding solution)(由初始溶液开始)连续稀释于 9 份(十倍稀释)、或连续稀释于 99 份(百倍稀释)、或连续稀释于 999 份(千倍稀释,M 衰减)的中性溶剂中,用浓度范围为约 0.5mg/ml 至约 5.0mg/ml 的处于溶剂(优选水或水-乙醇混合物)中的初始抗体溶液伴以外部作用来起始。所述外部作用优选包括每次稀释时的多次竖直振荡(稀释增效法, dynamization)。优选将单独的容器用于后续各次稀释,直至所需效力水平或稀释系数。这一方法在顺势疗法领域中被广泛接受。参见例如 V. Schwabe, "Homeopathic medicines", M., 1967, 第 14-29 页,以引用的方式将其并入本文用于所述目的。

[0481] 例如,为了制备第 12 百倍稀释液(表示为 C12),将 1 份浓度为 2.5mg/ml 的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体(或抗内皮 NO 合酶抗体)的初始基质溶液稀释于 99 份中性水溶剂或水-醇溶剂(优选 15% 乙醇)中,并随后进行多次(10 次以上)竖直振荡以制成第 1 百倍稀释液(表示为 C1)。第 2 百倍稀释液(C2)由第 1 百倍稀释液 C1 制备。将这一过程重复 11 次,从而制得第 12 百倍稀释液 C12。因此,第 12 百倍稀释液 C12 表示通过将 1 份浓度为 2.5mg/ml 的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体的初始基质溶液在处于不同容器内的 99 份中性溶剂中连续稀释 12 次所获得的溶液,相当于百倍顺势疗法稀释液 C12。以相应的稀释系数进行类似过程,获得 C30、C50 和 C200 稀释液。可将中间稀释液在期望的生物模型中进行测试以检测活性。用于本发明复合物中的优选的两种活性强化形式抗体为 C12、C30 和 C200 稀释液混

合物或 C12、C30 和 C50 稀释液混合物。当将活性物质的多种顺势疗法稀释液(主要为百倍稀释液)的混合物用作生物活性液体组分时,组合物的各组分(如, C12、C30、C50、C200)分别根据上述过程制备,直至获得倒数第二份稀释液(例如,分别直至 C11、C29、C49 和 C199),然后根据混合物组成将 1 份的各组分加入一个容器中,并与所需量的溶剂(如,用 97 份以进行百倍稀释)进行混合。

[0482] 因此,通过相应地以 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍(相当于基于顺势疗法技术制备的百倍稀释液 C12、C30 和 C200)或者以 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{50} 倍(相当于基于顺势疗法技术制备的百倍稀释液 C12、C30 和 C50)对基质溶液进行额外稀释,获得极低剂量的活性强化形式的抗脑特异性 S-100 蛋白抗体。

[0483] 可使用基于顺势疗法技术的、处于其它多种溶液的混合物形式、例如十倍稀释和/或百倍稀释的活性物质(C12、C30 和 C100 ;C12、C30 和 C50 ;D20、C30 和 C100 或 D10、C30 和 M100 等)。以实验的方式说明效力。

[0484] 在强化和浓度降低的过程中,可通过超声、电磁、或顺势疗法领域中接受的任何其它物理影响进行外部作用过程。

[0485] 本发明的药物组合物优选可处于液体或固体单位剂型的形式。药物组合物优选的液体形式为混合物,优选活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体和活性强化形式的抗 S-100 蛋白抗体处于 1:1 比例的混合物。优选的液态载体为水或水-乙醇混合物。

[0486] 可通过使用活性强化形式的活性组分水溶液或水-醇溶液的混合物对药学上可接受的固态载体进行浸渍,来制备本发明药物组合物的固体单位剂型,所述活性组分水溶液或水-醇溶液主要以 1:1 的比例进行混合并以液态剂型加以使用。或者,可用各所需稀释液对载体进行连续浸渍。两种浸渍顺序均可接受。

[0487] 优选处于固体单位剂型的药物组合物由药学上可接受的载体的颗粒制备,所述颗粒预先用活性强化形式抗体的水稀释液或水-醇稀释液饱和。固体剂型可为药学领域中已知的任何剂型,包括片剂、胶囊、锭剂及其它。作为非活性药物成分,可使用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、异麦芽糖、异麦芽酮糖醇及制药中使用的其它单糖、寡糖和多糖,还可使用上述非活性药物成分与其它药学上可接受的赋形剂的工艺混合物,所述赋形剂如异麦芽酮糖醇、交联聚维酮、甜蜜素(sodium cyclamate)、糖精钠、无水柠檬酸等,包括润滑剂、崩解剂、粘结剂和着色剂。优选的载体为乳糖和异麦芽酮糖醇。药物剂型可进一步包含标准药物赋形剂,例如微晶纤维素、硬脂酸镁和柠檬酸。

[0488] 制备固体单位剂型的实例如下所述。为制备固体口服剂型,将乳糖的 100-300 μm 颗粒用活性强化形式的抗内皮 NO 合酶抗体及抗 S-100 蛋白抗体的水溶液或水-醇溶液、以 1kg 抗体溶液对 5kg 或 10kg 乳糖(1:5 至 1:10)的比例进行浸渍。为有效浸渍,使乳糖颗粒在沸腾床设备(如, Hüttlin GmbH 的“Hüttlin Pilotlab”)中的流化床中接受饱和灌注(saturation irrigation),随后经由加热的空气流在低于 40°C 的温度下进行干燥。将用活性强化形式抗体饱和的估计量的干燥颗粒(10-34 重量份)置于混合器内,并与 25-45 重量份的“非饱和”纯乳糖(用于在不降低治疗功效的情况下,降低成本、简化和加速工艺方法的目的)、以及 0.1-1 重量份的硬脂酸镁和 3-10 重量份的微晶纤维素一起进行混合。将所获得的片状物质进行均匀混合,并通过直接干压成型(如,在 Korsch-XL400 压片机中)进行压片,从而形成 150-500mg、优选 300mg 的圆丸。压片后,获得 300mg 的丸剂,所述丸剂用活性

强化形式抗体的复合物的水-醇溶液饱和(3.0-6.0mg/丸)。用于浸渍载体的复合物各组分均处于百倍顺势疗法稀释液、优选 C12、C30 和 C200 的混合物的形式。

[0489] 优选将 1-2 片所请求保护的药物组合物每天给予 2-4 次。

[0490] 此外,所声明的药物拓宽了设计用于治疗阿尔兹海默病的药物种类。

[0491] 另外,可将本发明的复合药物组合物用于治疗阿尔兹海默病。为治疗所述紊乱,所述复合药物组合物可按 1:1 的体积比含有活性组分,由此可将各组分用作分别被稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍的三种抗体基质溶液(原始酞剂)的混合物,相当于百倍顺势疗法稀释液(C12、C30 和 C200)或用作分别被稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{50} 倍的三种抗体基质溶液(原始酞剂)的混合物,相当于百倍顺势疗法稀释液(C12、C30 和 C50)。建议将所请求保护的药物组合物优选以每天 2-6 次(优选 2-4 次)、每次 1-2 片进行服用。

[0492] 所请求保护的药物组合物及其组分不具有镇静和肌肉松弛作用,不会造成上瘾和成瘾。

[0493] 实施例

[0494] 实施例 1

[0495] 在体外,通过对标准配体 [^3H] 喷他佐辛与重组人 $\sigma 1$ 受体的结合,对以下物质的效力进行了研究,并通过放射性配体法对所述效力进行了评价:复方制剂,包含极低剂量(ULD)的活性强化形式的经亲和纯化的抗脑特异性蛋白 S-100 多克隆兔抗体(抗 S-100)和抗内皮 NO 合酶多克隆兔抗体(抗 eNOS),所述抗体通过对初始基质溶液(浓度:2.5mg/ml)进行超级稀释(super-dilution) (100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍)获得,相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200 的混合物(比例为 1:1)(ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS);所述复方制剂的组分,极低剂量的活性强化形式的针对抗原亲和纯化的抗脑特异性 S-100 蛋白多克隆兔抗体,所述抗体通过对初始基质溶液进行超级稀释 (100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍) 获得,相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200 的混合物(ULD 抗 S-100),以及极低剂量的活性强化形式的经亲和纯化的抗内皮 NO 合酶多克隆兔抗体,所述通过对初始基质溶液进行超级稀释 (100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍) 获得,相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200 的混合物(ULD 抗 eNOS)。将强化的蒸馏水(顺势疗法稀释液 C12+C30+C200 的混合物)用作测试制剂的对照。

[0496] Sigma-1 ($\sigma 1$) 受体为胞内受体,位于中枢神经系统细胞、大部分外周组织的细胞与免疫活性细胞中。这些受体显示出被认为由许多精神药物引发转位的独特能力。 $\sigma 1$ 受体的动力学与作用至 $\sigma 1$ 受体的制剂所产生的各种影响直接相关。这些影响包括对活性通道、胞吐(ecocytosis)、信号传导、质膜重塑(脂筏(raft)的形成)以及脂类转运/代谢作用的调节。这些全都能够促进脑中神经元的可塑性。存在证据表明 $\sigma 1$ 受体对全部主要的神经介质系统都具有调节作用:去甲肾上腺素系统、血清素系统、多巴胺系统、胆碱能系统以及 NMDA 可调节的谷氨酸效应。 $\sigma 1$ 受体在神经退行性疾病(例如阿尔茨海默病和帕金森病)、精神和情感障碍(psychiatric and affective disorders)以及中风的病理生理学中起重要作用; $\sigma 1$ 受体还参与学习和记忆过程。就此而言,药物影响配体与 $\sigma 1$ 受体相互作用效力的能力表明了在其药理学活性范围中的神经保护、抗缺血、抗焦虑、抗抑郁和抗虚弱组分的存在,所述能力允许将这些药物作为尤其是用于治疗脑血管疾病的有效制剂纳入考虑。

[0497] 在测试(以测定总结合)期间,将 $20\mu\text{l}$ 的复方制剂(ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS)、或

10 μ l 的 ULD 抗 S-100 抗体、或 10 μ l 的 ULD 抗 NOS 抗体加入至孵育介质中。因此,测试复方制剂时,转移至测试盘(test basin)中的 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 的量与作为单一制剂测试的 ULD 抗 S-100 抗体和 ULD 抗 NOS 抗体的量相同,这也允许将制剂的效力与其各单独的组分相比较。将 20 μ l 与 10 μ l 的强化水转移至孵育介质中。

[0498] 此外,还转移了 160 μ l (大约 200 μ g 蛋白质)的 Jurkat 细胞系的细胞膜匀浆(人白血病 T 淋巴细胞系);以及最终转移了 20 μ l 氚标记的放射性配体 [3 H] 喷他佐辛(15nm)。

[0499] 为了测量非特异性结合,将 20 μ l 未标记的配体氟哌啶醇(10 μ M)转移至孵育介质中,代替制剂或强化水。

[0500] 在 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4)中于 22℃下孵育 120 分钟、并使用玻璃纤维过滤器(GF/B, Packard)过滤之后,使用闪烁计数器(Topcount, Packard)和闪烁混合物(Microscint0, Packard)测量放射性。特异性结合(测试或对照中)由总结合(测试或对照中)与非特异性结合的差异计算得出。

[0501] 结果以对照(使用蒸馏水作为对照)中特异性结合抑制的百分比表示(表 1)。

[0502] 表 1

测试组	每测试盘 的量	对照中放射性配体特异性结合的%			对照中放 射性配体 特异性结 合抑制的%
		第一次测试	第二次测试	平均	
ULD 抗 S-100+ eNOS	20 μ l	48,4	35,5	42,0	58,0
[0503] ULD 抗 S-100	10 μ l	67,3	63,1	65,2	34,8
ULD 抗 eNOS	10 μ l	147,5	161,1	154,3	-54,3
强化水	20 μ l	98,1	75,8	86,9	13,1
强化水	10 μ l	140,1	106,2	123,2	-23,2

[0504] 制剂和强化水对标准配体 [3 H] 喷他佐辛与人重组 σ 1 受体的结合的影响

[0505] 注:对照中特异性结合的%=(测试组中的特异性结合/对照组中的特异性结合)*100%;

[0506] 对照中特异性结合抑制的%=100%-(测试组中的特异性结合/对照组中的特异性结合)*100%。

[0507] 反映出高于 50% 抑制的结果表示测试化合物的显著性影响;25%-50% 抑制表示轻度-中度影响;低于 25% 的抑制被认为测试化合物的非显著性影响,并属于本底水平的范畴。

[0508] 因此,这一测试模型的情况显示 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 复方制剂相比其各单独的组分(ULD 抗 S-100 和 ULD 抗 eNOS)在抑制标准放射性配体 [3 H] 喷他佐辛与人重组 σ 1 受体

的结合方面更为有效;转移至测试盘的 $10\ \mu\text{L}$ 的 ULD 抗 S-100 抑制了标准放射性配体 [^3H] 喷他佐辛与人重组 $\sigma\ 1$ 受体的结合,但影响强度次于 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 复方制剂;转移至测试盘的 $10\ \mu\text{L}$ 的 ULD 抗 eNOS 对标准放射性配体 [^3H] 喷他佐辛与人重组 $\sigma\ 1$ 受体的结合没有影响;转移至测试盘的 $10\ \mu\text{L}$ 或 $20\ \mu\text{L}$ 的强化水对标准放射性配体 [^3H] 喷他佐辛与人重组 $\sigma\ 1$ 受体的结合没有影响。

[0509] 实施例 2

[0510] 为了对本申请的复合药物组合物用于治疗阿尔茨海默病的性能进行研究,使用重 300mg 的片剂。所述片剂以包含水-醇溶液的药物组合物浸渍(6mg/片),所述水-醇溶液为极低剂量(ULD)的活性强化形式的亲和纯化的抗脑特异性 S-100 蛋白多克隆兔抗体(抗 S-100)和抗内皮 NO 合酶多克隆兔抗体(抗 eNOS)的水-醇溶液,所述抗体通过将初始溶液(浓度为 2.5mg/ml)超级稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍获得,相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200 的混合物(比例为 1:1) (“ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS”)。

[0511] 对照组患者接受 300mg 以包含水-醇溶液的药物组合物浸渍的片剂(3mg/片),所述水-醇溶液为极低剂量(ULD)的活性强化形式的亲和纯化的抗脑特异性 S-100 蛋白多克隆兔抗体(抗 S-100)的水-醇溶液,所述抗体通过将初始溶液(浓度为 2.5mg/ml)超级稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍获得,相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200 的混合物。

[0512] 该研究囊括了被诊断患有阿尔茨海默病的患者。阿尔茨海默病的特征在于痴呆(获得性痴呆、认知活跃性的稳定损害伴以先前获得的知识 and 实际技能一定程度的损失、难以或不能获取新知识)。

[0513] 研究为开放标签随机比较临床试验,在 2 个平行组(ULD 抗 S-100 制剂和 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 制剂)中疗法对患有轻度至中度阿尔茨海默病的患者进行治疗中的效力和安全性。

[0514] 研究囊括了 6 名诊断患有轻度至中度阿尔茨海默病的、年龄为 55-64 岁的患者(平均年龄 59.0 ± 3.58 岁)。

[0515] 遵循下列纳入和排除标准对患者依从性进行了核查:

[0516] 纳入标准如下:

[0517] 1. 由病史、神经学检查和医疗记录确认的患有轻度至中度阿尔茨海默病的患者。

[0518] 2. 在随访 1 前至少一个月内伴随治疗无变化的患者。

[0519] 3. 在整个观察期内伴随治疗无需变化。

[0520] 4. 在接下来的 6 个月内不需要免疫调节药物处方。

[0521] 5. 具有足以与研究者和研究协调者充分交流的教育水平的患者。

[0522] 6. 由研究者评价为可靠并做好准备执行在方案中规定的所有临床随访、测试和程序的患者。

[0523] 7. 拥有有效家庭地址的患者。

[0524] 排除标准如下:

[0525] 1. 在病史中有任何脑外科手术。

[0526] 2. 急性心肌梗死。

[0527] 3. 出血性中风。

[0528] 4. 在病史中诊断患有精神病、双相障碍或分裂情感性障碍。

- [0529] 5. 根据简明国际神经精神访谈(MINI)的抑郁症模块中的标准的重度抑郁障碍。
- [0530] 6. 在研究者看来可能影响研究中的患者的测试结果的医学因素 / 状况或其它特征。
- [0531] 7. 在 Beck 抑郁问卷中第“I”节答案为“2A”、“2B”、“2C”或“3”(具备某种实施意向而不具备具体计划的活跃的自杀观念,或者具备具体计划和意向的活跃的自杀观念)。
- [0532] 8. 病史中有自身免疫性疾病。
- [0533] 9. 肝急性损伤或严重肝硬化(依 Child-Pugh 为 C 类)。
- [0534] 10. 未校正的甲状腺机能障碍。
- [0535] 11. 病史中有失代偿性动脉高血压。
- [0536] 12. 严重的或失代偿性的心血管疾病、肝病、肾病、新陈代谢疾病、呼吸疾病或血液疾病、有症状的外周血管疾病或其它在研究者看来可能影响患者参与研究或可能导致研究期间住院延长或重新入院的医学或精神病学状况。
- [0537] 13. 在研究人员看来可能阻止患者参与研究的疾病或状况。
- [0538] 14. 在参与研究之前已经摄入包含 ULD 抗 eNOS 的药物或包含 ULD 抗 S-100 的药物。
- [0539] 15. 摄入任何类型的抗抑郁药(包括植物性和顺势疗法制剂)。
- [0540] 16. 摄入任何类型的抗焦虑药(包括植物性和顺势疗法制剂)。
- [0541] 17. 摄入免疫调节剂(包括植物性和顺势疗法制剂)。
- [0542] 18. 随访 0 前 1 个月内接受过全身类固醇治疗。
- [0543] 19. 在参与包含 ULD 抗 eNOS 的药物或包含 ULD 抗 S-100 的药物的研究中,若患者摄入至少一剂量制剂。
- [0544] 20. 在加入这一研究之前 1 个月内参与过其它临床研究。
- [0545] 21. 在研究期间及最后一次摄入研究药物后 1 个月内妊娠、哺乳、不能充分避孕。
- [0546] 22. 对任何药物组分存在过敏 / 不耐性,包括乳糖不耐。
- [0547] 23. 患者摄入麻醉药和安定药、患有乙醇依赖或精神疾病。
- [0548] 24. 患者为直接涉及所进行的研究的中心的职员、和 / 或患者为与所进行的研究直接相关的研究中心职员的家庭成员。所述“家庭成员”为丈夫(妻子)、父母、子女和兄弟(姐妹)。
- [0549] 25. 在研究者看来参与试验或可能收取赔偿或者参与司法程序。
- [0550] 在对符合上述纳入和排除标准的患者进行确定之后,将所述患者随机分入两个研究组:接受 ULD 抗 S-100 的患者组(3 名患者,女性为 100%,男性为 0%,平均年龄为 59.0 ± 3.6 岁)以及接受 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 的患者组(3 名患者,女性为 66.66%,男性为 33.33%,平均年龄为 59.0 ± 4.36 岁)。
- [0551] 在这一研究过程中进行了 5 次随访,治疗阶段从随访 1 持续至随访 4,平均耗时 84 ± 5 天。随访 4(第 84 ± 5 天)为研究的第一终点,之后还有跟进观察。跟进阶段从随访 4 持续至随访 5(平均 168 ± 5 天)。
- [0552] 在安全性分析中,囊括了所有参与研究的患者($n=6$)的数据。在研究过程中记录了药物良好的耐受性。没有记录到副作用。所有研究组的患者都完成了根据方案的治疗;无人中途退出。

[0553] 评价了 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 制剂对如下方面的效果：阿尔茨海默病的主要临床征象和症状(NPI 神经精神调查表,强度部分)、护理患者的人员伴随的痛苦的程度(NPI 神经精神调查表,痛苦部分)以及患者认知功能(简易精神状态检查表,MMSE)。在随访 4 时,在阿尔茨海默病的关键症状中发现了改善,例如 NPI 神经精神调查表的强度部分存在统计学上显著的降低(由 24.33 ± 4.73 降至 12.0 ± 3.46 , $p < 0.05$) (表 2)。

[0554] 还发现了护理患者的人员痛苦降低的趋势,以及在治疗结束时患者日常生活的活跃性降低的趋势(然而并无任何统计显著性差异,可能是由于参与研究的患者数量少)。

[0555] 此外,发现了认知功能改善的趋势,这可以从 MMSE 分数由 23.66 ± 3.21 提高至 26.66 ± 1.53 分证实,然而,所述差异在治疗结束时同样未能达到统计显著性的值,可能也与样本量小有关。

[0556] 在接受 ULD 抗 S-100 的患者组中,在相同终点并未显示出改善倾向,仅有统计学上非显著性的 MMSE 分数的改善:由 22.66 ± 0.58 提高至 23.33 ± 0.58 分。

[0557] 而且,治疗结束时,患者组之间在 MMSE 总分数上的差异在统计学上显著, $p < 0.05$ 。

[0558] 表 2

	NPI (强度)	NPI (痛苦)	ADCS-ADL	MMSE
ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 治疗前	24.33 ± 4.73	9.66 ± 1.53	71.0 ± 6.56	23.66 ± 3.21
[0559] ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 治疗后	$12.0 \pm 3.46^*$	5.0 ± 3.61	74.33 ± 2.51	$26.66 \pm 1.53^\#$
ULD 抗 S-100 治疗前	35.66 ± 5.50	22.33 ± 5.50	61.66 ± 5.13	22.66 ± 0.58
ULD 抗 S-100 治疗后	38.33 ± 8.5	23.0 ± 5.0	61.33 ± 5.86	23.33 ± 0.58

[0560] *——与基线比较 $p < 0.05$; #——与对照比较 $p < 0.05$

[0561] 因此,在进行的临床研究中观测到 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 复合药物组合物对阿尔茨海默病的主要临床征象和症状具有积极作用,并倾向于影响阿尔茨海默病的认知功能。另外还证实了具有好的药物耐受性。并未记录到与药物相关的副作用。

[0562] 实施例 3

[0563] 制剂在患有莨菪碱的大鼠(阿尔兹海默病模型)中的效力。

[0564] 阿尔茨海默病(AD)是以认知功能丧失、记忆退化、意识混淆和易情绪化为特征的神经退行性疾病。目前认为,这一疾病的主要原因是 β 淀粉样蛋白(beta amyloid)的累积导致在脑组织中形成 β 淀粉样蛋白斑块和神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles); AD 同样伴随有胆碱能系统缺陷。这是在胆碱能系统拮抗剂莨菪碱(scopolamine)的帮助下在动物中建立 AD 模型这一最通常方式的基础。向实验动物(通常为啮齿动物,大鼠或小鼠)中注射莨菪碱能阻断学习能力,并导致记忆退化。

[0565] 使用了各种方法以评价大鼠和小鼠的认知功能,包括 Morris 水迷宫。这一测试的

本质为将动物从不同点释放入具有浑水(cloudy water)的容器,所述动物被迫寻找隐藏的固定平台。这一方法的优点在于其允许研究者监控动物训练的过程(关于平台空间定位概念的形成,不论动物在何处被放于水中),以便于评定记忆强度(为此,在移去平台时进行测试)。

[0566] 在下述实施例 3 中,研究了处于组合物形式的所请求保护的药物制剂在患有莨菪碱健忘症(Scopolamine amnesia)的大鼠中的影响,所述组合物包含极低剂量(ULD)的活性强化形式的经抗原亲和纯化的抗脑特异性 S-100 蛋白多克隆兔抗体(抗 S-100)以及抗内皮 NO 合酶多克隆兔抗体(抗 eNOS),所述抗体通过对贮存储备液(浓度为 2.5mg/ml)超级稀释 100^{12} 、 100^{30} 和 100^{200} 倍得到,相当于百倍顺势疗法稀释液 C12、C30 和 C200 (ULD 抗 S-100+抗 eNOS)。

[0567] 在 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 药物对患有莨菪碱健忘症的大鼠(阿尔茨海默病的模型)的效力的研究中,使用了 48 只 Rj:Wistar(Han)系雄性大鼠(重 180-280g)。在 4 天内,向所述大鼠皮下注射生理盐水(n=12,原封未动(intact))或剂量为 0.5mg/kg 的莨菪碱(n=36)(莨菪碱诱导的健忘症)。患有莨菪碱诱导的健忘症的大鼠被分入三组,并分别经胃给予蒸馏水(7.5ml/kg, n=12,对照组 1)、ULD 抗 S-100 (7.5ml/kg, n=12,组 2)、和 ULD 抗 S-100+抗 eNOS (7.5ml/kg, n=12,组 3) 9 天(注射莨菪碱前 4 天,莨菪碱背景下 4 天以及最后一次莨菪碱注射后 1 天)。

[0568] Morris 水迷宫中的训练在注射莨菪碱的 4 天内,在测试药物给药 60 分钟后,以及莨菪碱给药 30 分钟后进行(4 次序贯测试(sequential tests),相隔 60 秒)。Morris 迷宫为圆形容器(直径 150cm,高 45cm),以水填充至 30cm 处(26-28℃)。在距容器边缘 18cm 处有隐藏平台(直径 15cm),埋于水位以下 1.5cm 处。通过加入非毒性染料(例如,奶粉)制成的浑水使得平台不可见。对于每一测试,将动物于初始点之一处放入迷宫,所述初始点与隐藏平台距离相等,并且允许动物找到平台。如果动物在 120 秒内无法找到平台,则将动物置于平台上,放置 60 秒,并重启测试。在四次随机顺序的测试期间,动物从各起点开始通过迷宫两次。测试记录于录像带上并随后分析各实验中用于寻找平台的距离以及寻找平台的潜伏期。在第 5 天进行如下测试:从迷宫中移去平台,并给予大鼠 60 秒的自由浮动。记录花费在平台曾在之处的时间。

[0569] 给予莨菪碱显著恶化了动物的学习能力。在对照组 1 中,动物花费在寻找平台上的时间和动物寻找平台游泳的距离显著增加(表 3 及表 4)。所述测试显示对照组 1 中动物的记忆恶化:与原封未动大鼠相比,这一组中动物在平台曾经位于的地方花费时间更少(表 5)。在组 2 中给予 ULD 抗 S-100 并不导致研究参数的改善(表 3、表 4、表 5)。在组 3 中给予 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 导致学习中的一定改善,从而导致 4 天的训练内平台寻找时间的潜伏期(表 3)和覆盖距离(表 4)缩短,并导致反映为在平台曾处于的地方花费时间增加的改善(表 5)。

[0570] 表 3:寻找平台的潜伏期,秒

组	训练			
	第1天	第2天	第3天	第4天
原封未动, n=12	54.7±6.2	30.8±2.8	26.9±5.1	20.5±3.6
对照, n=12	100.1±6.8***	92.4±9.3***	81.4±10.7***	77.7±9.4***
ULD 抗 S-100, n=12	106.8±7.0	99.3±7.8	95.6±9.0	80.4±11.1
ULD 抗 S-100+抗 eNOS, n=12	94.4±7.2	90.7±8.2	78.3±8.6	60.1±10.2

[0572] ***——与原封未动组的差异具有显著性, $p < 0.05$

[0573] 表 4: 寻找平台需要的距离, cm

组	训练			
	第1天	第2天	第3天	第4天
原封未动, n=12	1055.7±94.6	659.5±62.2	564.8±119.3	406.1±61.2
对照, n=12	2587.1±217.2***	2559.6±250.5***	2397.9±312.6	2366.1±293.8***
ULD 抗 S-100, n=12	2797.2±208.9	2865.2±255.1	2857.0±300.8	2457.4±344.4
ULD 抗 S-100+抗 eNOS, n=12	2434.3±222.8	2529.9±282.7	2344.2±283.0	1905.1±343.7

[0575] ***——与原封未动组的差异具有显著性, $p < 0.05$

[0576] 表 5: 花费在平台曾在处的时间, 秒

组	测试		
	0-30秒	30-60秒	0-60秒
原封未动, n=12	40.8±4.1	36.8±3.6	38.5±2.6
对照, n=12	18.4±2.8***	18.8±1.9***	18.8±1.7***
ULD 抗 S-100, n=12	13.3±2.1	21.5±2.6	17.6±1.3
ULD 抗 S-100+抗 eNOS, n=12	19.1±4.8	23.8±2.2	21.2±2.5

[0578] ***——与原封未动组的差异具有显著性, $p < 0.05$

[0579] 因此, 在阿尔兹海默病的模型中, 使用复方药物组合物 ULD 抗 S-100+ 抗 eNOS 与使用单独的 ULD 抗 S-100 相比更有效。

[0001]

序列表

841-038-PCT_SEQUENCE LISTING. txt

<110> Epshtein, Oleg Ilich

<120> 治疗阿尔兹海默病的方法

<130> 841-038-PCT

<140> PCT/IB2011/002434

<141> 2011-07-15

<150> RU2010130353

<151> 2010-07-21

<150> RU2011127058

<151> 2011-07-01

<160> 12

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1205

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..1205

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 1

```

Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Gly Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly
1          5          10          15
Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala
20          25          30
Ser Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro His
35          40          45
Ala Pro Asp His Ser Pro Ala Pro Asn Ser Pro Thr Leu Thr Arg Pro
50          55          60
Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Leu Gly Ser
65          70          75          80
Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gln Gln Asp Gly Pro Cys
85          90          95
Thr Pro Arg Cys Cys Leu Gly Ser Leu Val Leu Pro Arg Lys Leu Gln
100         105         110
Thr Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Leu Ser Gln
115         120         125
Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly

```

[0002]

130	135	140			
Ser Gln Ala His Glu Glu Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala					
145	150	155	160		
Ser Thr Gly Thr Tyr His Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala					
	165	170	175		
Lys Gln Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp					
	180	185	190		
Gly Lys Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Ser Ser Ala Gln Glu					
	195	200	205		
Met Phe Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly					
	210	215	220		
Asn Leu Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ala Pro Gly Arg					
225	230	235	240		
Gly Asp Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr					
	245	250	255		
Arg Gln Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile					
	260	265	270		
Thr Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe					
	275	280	285		
Asp Val Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Ala Pro Glu Leu					
	290	295	300		
Phe Val Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro					
305	310	315	320		
Thr Leu Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro					
	325	330	335		
Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala					
	340	345	350		
Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn					
	355	360	365		
Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys					
	370	375	380		
Met Asp Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala					
385	390	395	400		
Ala Val Glu Ile Asn Leu Ala Val Leu His Ser Phe Gln Leu Ala Lys					
	405	410	415		
Val Thr Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Val Ser Phe Met Lys His					
	420	425	430		
Leu Asp Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala					
	435	440	445		
Trp Ile Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln					
	450	455	460		
Glu Met Val Asn Tyr Ile Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp					
465	470	475	480		
Pro Trp Lys Gly Ser Ala Thr Lys Gly Ala Gly Ile Thr Arg Lys Lys					
	485	490	495		
Thr Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met					
	500	505	510		
Gly Thr Leu Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Ala Ser					
	515	520	525		
Glu Thr Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe					
	530	535	540		
Arg Lys Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val					

[0003]

545					550					555					560
Val	Ser	Leu	Glu	His	Glu	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Val	Thr	Ser	Thr	Phe
				565						570					575
Gly	Asn	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Gly	Glu	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu
			580						585					590	
Met	Glu	Met	Ser	Gly	Pro	Tyr	Asn	Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Glu	Gln	His
		595					600					605			
Lys	Ser	Tyr	Lys	Ile	Arg	Phe	Asn	Ser	Val	Ser	Cys	Ser	Asp	Pro	Leu
	610					615					620				
Val	Ser	Ser	Trp	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Glu	Ser	Ser	Asn	Thr	Asp	Ser
625					630					635					640
Ala	Gly	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Phe	Cys	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Ser
				645					650					655	
Arg	Ala	Tyr	Pro	His	Phe	Cys	Ala	Phe	Ala	Arg	Ala	Val	Asp	Thr	Arg
			660					665					670		
Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Asp
		675					680					685			
Glu	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Glu	Ala	Phe	Arg	Gly	Trp	Ala	Lys	Ala	Ala
	690					695					700				
Phe	Gln	Ala	Ser	Cys	Glu	Thr	Phe	Cys	Val	Gly	Glu	Glu	Ala	Lys	Ala
705					710					715					720
Ala	Ala	Gln	Asp	Ile	Phe	Ser	Pro	Lys	Arg	Ser	Trp	Lys	Arg	Gln	Arg
			725						730					735	
Tyr	Arg	Leu	Ser	Thr	Gln	Ala	Glu	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Gly	Leu
			740					745					750		
Ile	His	Val	His	Arg	Arg	Lys	Met	Phe	Gln	Ala	Thr	Val	Leu	Ser	Val
		755					760					765			
Glu	Asn	Leu	Gln	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Arg
	770					775					780				
Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Gly	Leu	Gln	Tyr	Gln	Pro	Gly	Asp	His
785				790					795						800
Ile	Gly	Ile	Cys	Pro	Pro	Asn	Arg	Pro	Gly	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Leu
			805						810					815	
Ser	Arg	Val	Glu	Asp	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Glu	Ser	Val	Ala	Val	Glu
			820					825					830		
Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Trp	Val	Arg
	835						840					845			
Asp	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Cys	Thr	Leu	Arg	Gln	Ala	Leu	Thr	Phe	Phe
	850					855					860				
Leu	Asp	Ile	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser
865					870				875						880
Thr	Leu	Ala	Glu	Glu	Pro	Ser	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser
			885					890						895	
Gln	Asp	Pro	Arg	Tyr	Glu	Glu	Trp	Lys	Trp	Phe	Arg	Cys	Pro	Thr	
		900					905					910			
Leu	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Pro	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
	915					920						925			
Leu	Leu	Leu	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Gln	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Val
	930				935					940					
Ser	Ser	Ala	Pro	Asn	Ala	His	Pro	Gly	Glu	Val	His	Leu	Thr	Val	Ala
945				950					955						960
Val	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Gln	Asp	Gly	Leu	Gly	Pro	Leu	His	Tyr	Gly

[0004]


```

          965          970          975
Val Cys Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Thr Gly Asp Pro Val Pro
          980          985          990
Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Tyr
          995          1000          1005
Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg
          1010          1015          1020
Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln
          1025          1030          1035          1040
Pro Ala Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp
          1045          1050          1055
His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asp Ala Gln Glu Arg Gly Val Phe
          1060          1065          1070
Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Ser Pro Lys Thr
          1075          1080          1085
Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg
          1090          1095          1100
Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr
          1105          1110          1115          1120
Met Ala Thr Ser Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu
          1125          1130          1135
Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg
          1140          1145          1150
Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr
          1155          1160          1165
Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu
          1170          1175          1180
Arg His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro
          1185          1190          1195          1200
Asp Thr Pro Gly Pro
          1205

```

<210> 2

<211> 1203

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 来源

<222> 1..1203

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="智人"

<400> 2

```

Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly
1          5          10          15
Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala
          20          25          30
Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro
          35          40          45
Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu

```

[0005]

50	55	60			
Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Val Gly Ser Ile Thr					
65	70	75		80	
Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro					
	85	90		95	
Arg Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Phe Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg					
	100	105		110	
Pro Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg					
	115	120		125	
Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly Ser Gln					
	130	135		140	
Ala His Glu Gln Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr					
	145	150		155	160
Gly Thr Tyr Gln Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln					
	165	170		175	
Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys					
	180	185		190	
Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe					
	195	200		205	
Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu					
	210	215		220	
Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp					
	225	230		235	240
Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln					
	245	250		255	
Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu					
	260	265		270	
Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val					
	275	280		285	
Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Pro Pro Glu Leu Phe Leu					
	290	295		300	
Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu					
	305	310		315	320
Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val					
	325	330		335	
Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro					
	340	345		350	
Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys					
	355	360		365	
Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp					
	370	375		380	
Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val					
	385	390		395	400
Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr					
	405	410		415	
Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu					
	420	425		430	
Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile					
	435	440		445	
Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met					
	450	455		460	
Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp					

[0006]

465		470		475		480
Lys Gly Ser Ala	Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe					
	485		490		495	
Lys Glu Val Ala	Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr					
	500		505		510	
Val Met Ala Lys	Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly Ser Glu Thr					
	515		520		525	
Gly Arg Ala Gln	Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys					
	530		535		540	
Ala Phe Asp Pro	Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser					
545		550		555		560
Leu Glu His Glu	Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn					
	565		570		575	
Gly Asp Pro Pro	Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu					
	580		585		590	
Met Ser Gly Pro	Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser					
	595		600		605	
Tyr Lys Ile Arg	Phe Asn Ser Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser					
	610		615		620	
Ser Trp Arg Arg	Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly					
625		630		635		640
Ala Leu Gly Thr	Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala					
	645		650		655	
Tyr Pro His Phe	Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu					
	660		665		670	
Glu Leu Gly Gly	Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu					
	675		680		685	
Cys Gly Gln Glu	Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln					
	690		695		700	
Ala Ala Cys Glu	Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala					
705		710		715		720
Arg Asp Ile Phe	Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr Arg					
	725		730		735	
Leu Ser Ala Gln	Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu Ile His					
	740		745		750	
Val His Arg Arg	Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser Val Glu Asn					
	755		760		765	
Leu Gln Ser Ser	Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg Leu Asp					
	770		775		780	
Thr Gly Gly Gln	Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Ile Gly					
785		790		795		800
Val Cys Pro Pro	Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg					
	805		810		815	
Val Glu Asp Pro	Pro Ala Pro Thr Glu Pro Val Ala Val Glu Gln Leu					
	820		825		830	
Glu Lys Gly Ser	Pro Gly Gly Pro Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro					
	835		840		845	
Arg Leu Pro Pro	Cys Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp					
	850		855		860	
Ile Thr Ser Pro	Pro Ser Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu					
865		870		875		880
Ala Glu Glu Pro	Arg Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp					

[0007]

```

      885      890      895
Pro Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu
      900      905      910
Glu Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu
      915      920      925
Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser Ser
      930      935      940
Ala Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu
945      950      955      960
Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val Cys
      965      970      975
Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro Cys Phe
      980      985      990
Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Ser Leu Pro
      995      1000      1005
Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Gly Phe
      1010      1015      1020
Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln Pro Thr
      1025      1030      1035      1040
Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp His Leu
      1045      1050      1055
Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln Gln Arg Gly Val Phe Gly Arg
      1060      1065      1070
Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Asn Pro Lys Thr Tyr Val
      1075      1080      1085
Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg Val Leu
      1090      1095      1100
Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr Met Ala
      1105      1110      1115      1120
Thr Asn Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp
      1125      1130      1135
Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln
      1140      1145      1150
Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu
      1155      1160      1165
Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln
      1170      1175      1180
Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr
      1185      1190      1195      1200
Asn Ser Pro

```

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..4

<223> /mol_type="蛋白"

/生物="牛"

[0008]

<400> 3

Pro Trp Ala Phe
1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..4

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 4

Gly Ala Val Pro
1

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..21

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 5

Arg His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro
1 5 10 15
Asp Thr Pro Gly Pro
20

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..12

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 6

[0009]

Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro Asp Thr Pro Gly Pro
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 牛

<220>
<221> 来源
<222> 1..11
<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 7

His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp
1 5 10

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 牛

<220>
<221> 来源
<222> 1..20
<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 8

His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro Asp
1 5 10 15
Thr Pro Gly Pro
20

<210> 9
<211> 92
<212> PRT
<213> 牛

<220>
<221> 来源
<222> 1..92
<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 9

Met Ser Glu Leu Glu Lys Ala Val Val Ala Leu Ile Asp Val Phe His

[0010]

```

1           5           10           15
Gln Tyr Ser Gly Arg Glu Gly Asp Lys His Lys Leu Lys Lys Ser Glu
                20                25                30
Leu Lys Glu Leu Ile Asn Asn Glu Leu Ser His Phe Leu Glu Glu Ile
                35                40                45
Lys Glu Gln Glu Val Val Asp Lys Val Met Glu Thr Leu Asp Ser Asp
                50                55                60
Gly Asp Gly Glu Cys Asp Phe Gln Glu Phe Met Ala Phe Val Ala Met
65                70                75                80
Ile Thr Thr Ala Cys His Glu Phe Phe Glu His Glu
                85                90

```

<210> 10

<211> 92

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 来源

<222> 1..92

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="智人"

<400> 10

```

Met Ser Glu Leu Glu Lys Ala Met Val Ala Leu Ile Asp Val Phe His
1           5           10           15
Gln Tyr Ser Gly Arg Glu Gly Asp Lys His Lys Leu Lys Lys Ser Glu
                20                25                30
Leu Lys Glu Leu Ile Asn Asn Glu Leu Ser His Phe Leu Glu Glu Ile
                35                40                45
Lys Glu Gln Glu Val Val Asp Lys Val Met Glu Thr Leu Asp Asn Asp
                50                55                60
Gly Asp Gly Glu Cys Asp Phe Gln Glu Phe Met Ala Phe Val Ala Met
65                70                75                80
Val Thr Thr Ala Cys His Glu Phe Phe Glu His Glu
                85                90

```

<210> 11

<211> 94

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..94

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 11

```

Met Gly Ser Glu Leu Glu Thr Ala Met Glu Thr Leu Ile Asn Val Phe

```

[0011]

```

1           5           10           15
His Ala His Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Tyr Lys Leu Ser Lys Lys
          20          25          30
Glu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Thr Glu Leu Ser Gly Phe Leu Asp Ala
          35          40          45
Gln Lys Asp Val Asp Ala Val Asp Lys Val Met Lys Glu Leu Asp Glu
          50          55          60
Asn Gly Asp Gly Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr Val Val Leu Val Ala
65          70          75          80
Ala Leu Thr Val Ala Cys Asn Asn Phe Phe Trp Glu Asn Ser
          85          90

```

<210> 12

<211> 94

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> 来源

<222> 1..94

<223> /mol_type="蛋白"
/生物="牛"

<400> 12

```

Met Gly Ser Glu Leu Glu Thr Ala Met Glu Thr Leu Ile Asn Val Phe
1           5           10           15
His Ala His Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Tyr Lys Leu Ser Lys Lys
          20          25          30
Glu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Thr Glu Leu Ser Gly Phe Leu Asp Ala
          35          40          45
Gln Lys Asp Ala Asp Ala Val Asp Lys Val Met Lys Glu Leu Asp Glu
          50          55          60
Asn Gly Asp Gly Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr Val Val Leu Val Ala
65          70          75          80
Ala Leu Thr Val Ala Cys Asn Asn Phe Phe Trp Glu Asn Ser
          85          90

```