



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104244966 B

(45)授权公告日 2019.01.11

(21)申请号 201280066993.1

(22)申请日 2012.11.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104244966 A

(43)申请公布日 2014.12.24

(30)优先权数据
61/559,816 2011.11.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.07.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/065291 2012.11.15

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/074798 EN 2013.05.23

(73)专利权人 昆西生物科学有限公司
地址 美国威斯康星州

(72)发明人 M·Y·安德伍德 J·R·莫耶

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限
公司 31100
代理人 陶启长

(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

(56)对比文件
US 20110130336 A1,2011.06.02,说明书第
8-11、26段,附图1.
CN 101437845 A,2009.05.20,全文.

审查员 蔡放

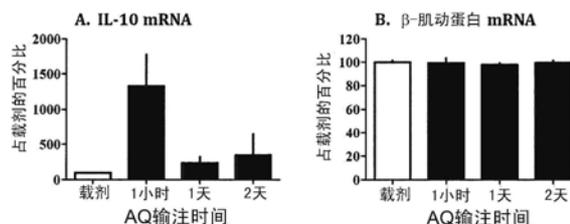
权利要求书1页 说明书13页 附图9页

(54)发明名称

水母发光蛋白用于减少缺血导致的神经损伤

(57)摘要

本发明提供了基于水母发光蛋白的组合物和用于预处理对象的神经元以减少脑缺血导致的神经元损伤的方法。方法包括向对象的神经元给予水母发光蛋白的步骤,其中相比未给予所述水母发光蛋白的神经元,所述水母发光蛋白能够引发细胞因子表达水平的改变,减少脑缺血所导致的神经元损伤。本文描述了多种制剂,包括可注射剂。



1. 水母发光蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于通过在脑缺血发生前48小时预处理神经元以增加IL-10表达水平。
2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述药物制备成通过注射给予所述水母发光蛋白。
3. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述注射是海马区内注射。
4. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述药物向对象中的神经元给予水母发光蛋白,所述对象是人。
5. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述用途减少对象中脑缺血所导致的神经元损伤,所述神经元损伤减少的效果从给予所述水母发光蛋白的时间点开始持续至少24小时。
6. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述用途减少对象中脑缺血所导致的神经元损伤,所述神经元损伤减少的效果从给予水母发光蛋白的时间点开始持续至少48小时。

水母发光蛋白用于减少缺血导致的神经损伤

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2011年11月15日提交的美国专利号61/559,816,其通过引用全文纳入本文以用于所有目的。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于减少缺血导致的神经损伤的组合物和方法。具体而言,本发明涉及水母发光蛋白及其在减少对象中脑缺血导致的神经损伤过程中的用途。

背景技术

[0004] 根据美国心脏病协会,美国境内每40秒就有一人罹患中风。目前,食品与药物管理局仅批准了一项针对中风的治疗药物,重组组织纤溶酶原激活剂(rTPA)。虽然rTPA帮助了許多人,但其仍存在有害的副作用,如出血。

[0005] 缺血期间,神经元的细胞内钙离子过量。虽然细胞内钙离子对于正常神经元功能是必需的,但过多的钙离子会引发一系列事件,包括最严重时可导致细胞死亡。存在数种机制,能够使神经元限制或控制胞质钙离子水平,其中包括钙结合蛋白(CaBP)。有报道指出,使用CaBP钙结合素D-28k进行治疗能够降低缺血的有害影响。不幸的是,目前缺乏避免缺血导致的神经元死亡的替代疗法,而且相应地,仍需要可用于治疗缺血对神经元的有害影响的全新疗法。

发明内容

[0006] 本文中,发明人证明水母发光蛋白在向神经元提供缺血性保护中的用途。相应地,本发明在第一方面中包括一种预处理对象(优选人类)中神经元以减少脑缺血所导致的神经元损伤的方法。该方法包括向对象的神经元给予水母发光蛋白的步骤,其中所述水母发光蛋白能够启动神经元中细胞因子表达水平的改变,减少脑缺血所导致的神经元损伤。

[0007] 优选的给药途径是向对象注射,优选海马区内注射。

[0008] 在某些实施方式中,所述神经元损伤减少的效果从给予水母发光蛋白的时间点开始持续至少24小时。在其他实施方式中,所述神经元损伤减少的效果从给予水母发光蛋白的时间点开始持续至少48小时。

[0009] 在其他方面,本发明涉及水母发光蛋白在制造药物中的用途,该药物用于预处理对象的神经元以减少脑缺血导致的神经元损伤。

[0010] 本发明还包括用于预处理对象的神经元以减少脑缺血导致的神经元损伤的组合物。此类组合物包括:(a) 治疗有效剂量的水母发光蛋白,用于预处理对象的神经元以减少脑缺血导致的神经元损伤;以及(b) 药学上可接受的运载体。优选的组合物配制为可注射剂。

[0011] 在另一方面,本发明涉及一种用于预处理对象的神经元以减少脑缺血导致的神经元损伤的试剂盒。该试剂盒包括:(a) 治疗有效剂量的水母发光蛋白,用于预处理对象的神

神经元以减少脑缺血导致的神经元损伤;以及(b)递送装置,设计用于向对象给予特定含量的水母发光蛋白。

[0012] 本发明的其他目的、特征和优点将在阅读说明、权利要求和附图后显而易见。

[0013] 附图简要说明

[0014] 图1以相对载剂对照百分比的形式描述输注水母发光蛋白后IL-10mRNA水平(A)的时间依赖性增加。未观察到 β -肌动蛋白mRNA(B)的变化。(水母发光蛋白缩写为“AQ”)。

[0015] 图2显示了(A)AQ对细胞拯救的剂量依赖作用;(B)缺血前2天给予4% AQ有神经保护作用(注意给予AQ后台盼蓝标记的神经元的减少);(C)AQ所提供的神经元保护窗;(D)注射入海马区后AQ的可用性。

[0016] 图3描述了给予AQ后(A)IL-10mRNA的表达;(B) β -肌动蛋白mRNA的表达;以及(C)显示多种细胞因子和趋化因子变化的PCR阵列。

[0017] 图4描述了AQ注射后细胞因子如何发生显著变化的示意图。

[0018] 图5描述了发明人检测的免疫反应基因的相互作用示意图。

[0019] 图6显示了(A)AQ注射后急性炎症反应基因的变化;(B)AQ注射后T/B细胞激活因子的变化;(C)AQ注射后血管生成/细胞增殖基因的变化;(D)AQ注射后巨噬细胞吸引基因表达模式的变化;(E)AQ注射后钙调节基因的变化;以及(F)AQ注射后基因(按功能分组)的变化。

具体实施方式

[0020] I. 概述

[0021] 描述本发明材料和方法之前,应理解,本发明不限于所述具体方法、方案、材料和试剂,这些可发生变化。还应理解,本文所用术语的目的仅是描述具体实施方式,不应用来限制本发明的范围,所述范围仅受任何随后提交的非临时申请的限制。

[0022] 必须注意到,本文和所附权利要求书所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数含义,除非文中另有明确说明。同样,术语“一个”(或“一种”)、“一种或多种”和“至少一种”在本文中可以互换使用。还应当注意,术语“包括”、“包含”和“具有”可以互换使用。

[0023] 除非另有说明,否则本文所用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。虽然与本文所述类似或等同的任何方法和材料也能用于实施或测试本发明,但在此描述优选的方法和材料。本文具体提及的所有出版物和专利都通过引用全文纳入本文用于所有目的,包括描述和公开可与本发明关联使用的所述出版物报道的化学物质、设备、统计分析和方法。本说明书引用的所有参考文献都应看作对本领域技术水平的指示。本文中所有内容均不应解释为承认本发明不能凭借在先发明而先于这些公开内容。

[0024] II. 本发明

[0025] 本文所用“对象”指的是哺乳动物和非哺乳动物。“哺乳动物”指的是任意的哺乳动物纲成员,包括但不限于人类、非人灵长类,例如大猩猩和其他猿类和猴类;农场动物,例如牛、马、绵羊、山羊和猪;家养动物,例如兔、狗和猫;实验室动物,包含啮齿动物,例如大鼠、小鼠和豚鼠;等等。非哺乳动物的示例包括但不限于鸟类等。术语“对象”不表示特定年龄或性别。

[0026] 本文所用“给予”或“给药”包括任何用于将水母发光蛋白引入体内的方法,优选引入对象脑部,更优选引入对象的海马区。给药示例包括但不限于口服、经鼻、经耳、经眼、口

颊、舌下、肺部、透皮、经粘膜,以及皮下、腹膜内、静脉内、硬外膜外和肌肉内注射。

[0027] “治疗有效量”指给予对象用于治疗紊乱、病征或疾病时,对所述紊乱、病征或疾病的此类治疗足以起效的水母发光蛋白的用量。“治疗有效量”会根据接受治疗的紊乱或病征或疾病状态,接受治疗的紊乱或病征或疾病的严重程度,所述对象的年龄和相对健康状态,给药路径和方式,主治医师或兽医从业者的判断,和其他因素而变化。

[0028] 就本发明目的而言,“治疗”或“处理”描述了管理和护理患者以用于对抗疾病、病症、或紊乱的目的。该术语包括预防性治疗(即预防)和缓解性治疗。治疗包括给予水母发光蛋白以防止所述症状或并发症的发作,缓解所述症状或并发症,或消除所述疾病、病症、或紊乱。

[0029] 术语“水母发光蛋白”指钙结合蛋白水母素的脱辅基蛋白部分。水母素由两个不同的单元组成,分别是脱辅基蛋白(水母发光蛋白,分子量约22kDa)和辅基腔肠素(一种荧光素)。水母素是一种从发光水母(例如多管水母属,如维多利亚多管水母(*Aequorea victoria*))和多种其他海洋生物中分离得到的发光蛋白质。其最初由下村修(Osamu Shimomura)从腔肠动物中分离得到。本发明中使用的水母发光蛋白可从其天然来源得到,可通过先前已知的分离和纯化方案,或者公知的采用表达系统的重组方法,表达系统利用如用于水母发光蛋白异源表达的重组DNA构建和遗传修饰的宿主细胞。

[0030] 本文所用术语“细胞因子”表示由神经系统的胶质细胞和免疫系统的多种细胞分泌的小细胞信号蛋白质分子,属于细胞间通信中广泛使用的一类信号分子。细胞因子可分为蛋白质、肽段或糖蛋白;相应地,术语“细胞因子”包括由多种胚胎来源细胞在全身各处生成的、种类繁多且各异的调节因子。术语“细胞因子”包括免疫调节因子(如白介素和干扰素)。

[0031] 本文所用术语“预调节”表示一种用于产生对供血不足的抵抗、并向体内组织提供氧气的技术。在本发明中,预调节表示在神经元中产生对供血不足的抵抗,其测量方法为例如测定水母发光蛋白给药后相比于对照组被拯救的细胞百分比或数量。

[0032] 发明人已经显示,直接注射入背侧海马区(dhpc)后,来源于腔肠动物维多利亚多管水母(*Aequorea victoria*)的22kD CaBP水母发光蛋白(AQ)显著减少了体外缺血型损伤所导致的细胞死亡(Detert等,2009;2011)。这种细胞死亡的减少发生在AQ注射后24和48小时,而非注射后1小时。有趣的是,AQ蛋白质在注射后1小时存在,在注射后24小时显著减少,而在注射后48小时几乎不存在。AQ的作用和其存在之间的相反模式使发明人产生疑问,即这一改变是否源于神经免疫调节反应。在更大的和全局性损伤发生前,一些形式的缺血预处理(如小缺血损伤)能减少梗死(Ara等,2010;Jones和Bergeron,2001)。缺血预处理的保护效果与免疫系统激活相关(Rehni和Singh,2012;Wei等,2012)。虽然本发明中未采纳任何一种作用机制,但如果AQ是激活细胞因子,则由某种缺血预处理(其中水母发光蛋白注射引起神经保护反应)减少细胞死亡可能部分是源于神经免疫调节反应。

[0033] 以治疗有效量向患者给予水母发光蛋白。可单独给予水母发光蛋白,或者作为药理学上可接受组合物的一部分给予。另外,水母发光蛋白或组合物能立即全部给药(例如通过推注),多次给药(例如通过一系列片剂),或一段时间内基本均匀递送(例如使用透皮递送)。再者,活性药物的剂量可随着时间而改变。可使用速释制剂、控释制剂或其组合给予水母发光蛋白。术语“控释”包含缓释、延迟释放和其组合。

[0034] 本发明的组合物的制备、包装或出售可批量完成、或作为单个单位剂量、或作为多种单个单位剂量。如本文所用，“单位剂量”是离散量的组合物，所述组合物包含预定量的活性成分。活性成分的量通常等于将给予患者的活性成分的剂量，或者是该剂量的适当的一部分（例如该剂量的一半或三分之一）。

[0035] 本发明组合物中活性成分、药学上可接受的运载体和任意其他成分的相对量会根据所治疗患者的本身、体型和病情而变化，并且也根据所述组合物的给药途径而变化。

[0036] 本发明另一方面涉及包含本发明组合物和说明材料的试剂盒。说明材料包含公开文献、记录、图表、或任何其他表达媒介，用于沟通本发明组合物为了本文所述目的之一用于人的实用性。说明材料也能描述例如本发明药物组合物的合适的剂量。例如，本发明试剂盒的说明材料可贴在含有本发明药物组合物的容器上，或可与含有所述药物组合物的容器一起运送。或者，所述说明材料能与本发明的容器分开运送，从而所述说明材料和所述药物组合物能由接收者配合使用。

[0037] 本发明也包含含有本发明组合物的试剂盒和将所述组合物递送给人的递送装置。作为示例，所述递送装置可以是注射器、针头或剂量测量容器。所述试剂盒还可以包含本文所述的说明材料。所述试剂盒也包含容器用于分开的组合物，例如分装瓶（divided bottle）或分装箔片包装。容器的其他示例包含注射器、盒、袋等。通常，试剂盒包含分开组分的给药的说明。当分开的组分优选以不同剂型（如口服和胃肠外）给药、以不同的剂量间隔给药，或者当处方医生需要对组合的个体成分进行滴定时，所述试剂盒形式特别有优势。

[0038] 药物组合物的胃肠道外给药包括以对人组织进行物理切开并通过组织切口给予药物组合物为特征的任意给药途径。因此胃肠道外给药包含下列方式给予药物组合物：注射所述组合物、通过外科切口应用所述组合物、通过组织穿透性非手术伤口应用所述组合物等。具体而言，胃肠道外给药包含皮下、腹膜内、静脉内、动脉内、肌内或胸骨内注射，和静脉内、动脉内或肾脏透析输注技术。例如，本发明组合物能通过脑（通过vPAG）注射、鞘内注射、腹膜内注射或血液注射的方式向对象给药。

[0039] 适合胃肠道外注射的组合物包含活性成分联同药学上可接受的运载体（例如生理学上可接受的水性或非水性无菌溶液剂、分散剂、悬浮液或乳液），或可以包含重溶成无菌可注射溶液或分散系所用的无菌粉末。合适的水性或非水性运载体、稀释剂、溶剂或载剂的示例包括水、等渗盐水、乙醇、多元醇（丙二醇、聚乙二醇、甘油等），其合适混合物，甘油三酯，包含植物油如橄榄油，或可注射的有机酯如油酸乙酯。可维持合适的流动性，例如通过使用涂层（如卵磷脂），在分散系的情况中通过保持所需粒度，和/或通过使用表面活性剂。可以适于推注给药或连续给药的形式制备、组装或出售这类制剂。可以单位剂型制备、组装或出售可注射制剂，例如在安瓿中、在包含防腐剂的剂量容器中或者在用于自动注射或通过医师注射的一次使用的装置中。

[0040] 胃肠道外给药的制剂包含悬浮液、溶液、油性或水性载剂中的乳液、糊料和可植入的缓释制剂或可生物降解的制剂。这类制剂还能包含一种或多种其他成分，包含悬浮剂、稳定剂或分散剂。在胃肠道外给药制剂的一个实施方式中，所述活性成分以干燥（如粉末或颗粒）形式提供，用于以适当的载剂（如无菌无热原水）重溶后胃肠道外给予重溶组合物。

[0041] 可以无菌可注射水性或油性（乳液）悬浮液或溶液的形式制备、组装或出售所述组合物。这种悬浮液或溶液能按照现有技术制备，并且可以包含除了活性成分以外的其他成

分,例如本文所述分散剂、润湿剂或悬浮剂。可使用胃肠道外可接受的无毒稀释剂或溶剂(例如水或1,3-丁二醇)制备这类无菌可注射制剂。其他可接受的稀释剂和溶剂包含林格氏(Ringer)溶液、等渗氯化钠溶液、和不挥发油(合成的甘油单酯或甘油二酯)。其他可用的胃肠道外给药制剂包含微晶形式、脂质体制品、或作为生物可降解聚合物体系组分的活性成分。用于缓释或植入的组合物可包含药学上可接受的聚合材料或疏水性材料,例如乳液、离子交换树脂、难溶性聚合物、或者难溶性盐。

[0042] 本发明中的组合物也可以含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂、和/或分散剂,包含例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等。也可能需要包含等渗剂,如糖、氯化钠等。可通过使用能延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和/或明胶来延长可注射药物组合物的吸收。特别地,脂质体、胶粒(mysomes)和乳化剂能用于增加本化合物的可溶性,便于递送。

[0043] 剂型可以包含固体或可注射的植入物(implant)或存储物(depot)。在优选实施方式中,所述植入物包含有效量的活性剂和生物可降解聚合物。在优选实施方式中,合适的生物可降解聚合物选自聚天冬氨酸酯、聚谷氨酸盐/酯、聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚(ϵ -己内酯)、聚酞、聚(β -羟基丁酸酯)、聚(原酸酯)和聚磷腈。在其他实施方式中,所述植入物包含有效量的活性剂和硅橡胶聚合物。所述植入物提供有效量的释放。

[0044] 水性或油性溶剂中活性成分的液体溶液能以与液体悬浮液基本相同的方式制备,主要区别是活性成分是溶解的,而不是悬浮在溶剂中。本发明组合物的液体溶液能包含液体悬浮液中所述的各成分,应理解悬浮剂并不必然促进所述活性成分在溶剂中溶解。水性溶剂包含例如水和等渗盐。油性溶剂包含例如杏仁油、油性酯(oily ester)、乙醇、植物油(如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油、分馏植物油)和矿物油如液体石蜡。

[0045] 本发明的组合物可进一步包含环糊精组分以例如改善活性药物组分的水溶性、延长药物释放和提升压片特性。一般而言,葡萄糖的环状结构寡聚体(“环糊精”)获自特定细菌的淀粉消化。丰度最高的环糊精是 α 、 β 和 γ 环糊精,分别含有6、7和8个葡萄糖单元。环糊精的内部空腔是疏水的,而该分子暴露在外的表面是亲水的。已知环糊精可增强活性药物成分的稳定性、水溶性并降低挥发性。以下为市售环糊精或其衍生物的一些示例: α -环糊精(CAS#:10016-20-3);(2-羟丙基)- α -环糊精(CAS#:128446-33-3); β -环糊精(CAS#:7585-39-9);6-O- α -D-葡糖基- β -环糊精(CAS#:92517-02-7); γ -环糊精(CAS#:17465-86-0);以及(2-羟丙基)- γ -环糊精(CAS#:128446-34-4)。特别有用于配制成递送载剂用于给予本发明所述活性剂的环糊精包括:磺基丁基醚 β -环糊精(SBE-beta-CD,可购自塞得制药公司(CyDex Pharmaceuticals, Inc.),商标名为CAPTISOL);以及环糊精和羟丙基 β 环糊精(可购自火箭制药(Roquette Pharma),商标名为KLEPTOSE)。

[0046] 对于非人类动物中的胃肠道外给药,可以糊料或者颗粒形式制备水母发光蛋白并以植入物的形式给药。可通过在药学上可接受的油(例如花生油、芝麻油、玉米油等)中分散水母发光蛋白来制备糊料制剂。可通过与稀释剂(如碳蜡、巴西棕榈蜡等)混合来制备含有治疗有效量的颗粒,并且能加入润滑剂(如硬脂酸镁或硬脂酸钙)以改善生成颗粒的工艺。当然,应认识到可以给予动物一个以上颗粒以达到所需的剂量水平。另外,已经发现也可以在动物治疗期间内周期性给予这种植入物,从而在动物体内维持合适的活性剂水平。

[0047] 可以每天约0.01至约100mg/kg范围的剂量水平向患者给予本发明的组合物。对于

一名正常成年人,约0.01至约100mg/kg范围内的剂量通常是足够的,优选剂量为每天0.1至10mg/kg。但是,常见剂量范围可以根据所治疗对象的年龄和体重、计划给药途径、所给药的特定化合物等因素产生一些变化。受益于本发明的公开,本领域普通技术人员能够确定特定患者的剂量范围和最优剂量。还应注意,本发明化合物能用于缓释制剂、控释制剂和延迟释放制剂,这些也是本领域普通技术人员所熟知的。

[0048] 能否将本发明组合物直接给予到细胞、到包含该细胞的组织、与该细胞接触的体液、或所述化合物能扩散或被转运至该细胞的身体位点,并不是关键。所述组合物以一定量并通过一定途径给药就足够了,一定量的所述组合物可凭借所述途径动用细胞中的脂质而直接或间接到达细胞。最小量随着组合物的性质而变化。

[0049] 能使用的特定剂量和剂量范围可取决于众多因素变化,包括患者需求、待治疗的病症严重程度以及所给药的活性成分的药理学活性。阅读本公开,本领域普通技术人员能够确定特定患者的剂量范围和最优剂量。应当理解,普通熟练的医生、牙医或兽医可以容易地确定组合物的有效量并开处方,来带给对象所需的治疗。在这种过程中,医生或兽医可以例如首先开出相对较低剂量的处方,然后增加剂量,直到获得适当的反应。然而,还应当理解,针对任何特定人的具体剂量水平取决于各种因素,包括所采用的具体组合物的活性、年龄、体重、一般健康情况、性别、和人的饮食、给药时间、给药途径、排泄速度、任意药物组合、以及待治疗疾病的严重程度。

[0050] 在某些实施方式中,以药学上可注射剂型配制水母发光蛋白,包括水母发光蛋白联同可注射载体系统。本文中使用的可注射和输注剂量剂型(即胃肠道外剂型)包括但不限于含有磷脂来包封活性药物成分的脂质体注射剂或脂质双层囊泡。注射包括胃肠道外使用的无菌制备物。

[0051] 根据USP的定义有五种不同类型的注射剂:乳液、脂质、粉末、溶液和悬浮液。乳液注射剂包括一种包含用于胃肠道外给药的无菌无热源制备物的乳液。用于溶液注射剂的脂质复合物和粉末为用于重溶以形成胃肠道外使用的溶液的无菌制备物。用于悬浮液注射剂的粉末为用于重溶以形成胃肠道外使用的悬浮液的无菌制备物。用于脂质体悬浮液注射剂的冻干粉末为供重溶用于胃肠道外使用的无菌冷冻干燥制备物,其制备的方式允许结合脂质体,如具有磷脂来用于将活性药物物质包封于脂质双层或水性空间内的脂质双层囊泡,从而可在重溶时形成制剂。用于溶液注射剂的冻干粉末为通过冻干(“冷冻干燥”)制备的用于溶液的剂型,过程涉及在极低压下从冷冻状态的产物中去除水分,随后加入液体产生在所有方面均符合注射要求的溶液。用于悬浮液注射剂的冻干粉末为用于胃肠道外使用的液体制备物,包含悬浮于合适液态介质中的固体,其在所有方面均符合无菌悬浮液的要求,通过冻干制备用于悬浮液的药用试剂。溶液注射剂涉及液体制备物,其含有溶解于适合注射的合适溶剂或可相互混溶的溶剂混合物中的一种或多种药物物质。溶液浓缩注射剂涉及用于胃肠道外使用的无菌制备物,在加入合适的溶剂后产生在所有方面均符合注射要求的溶液。悬浮液注射剂涉及(适合注射的)液体制备物,含有分散于液相中的固体粒子,所述粒子是不溶性的,油相分散于水相中或反之。悬浮液脂质体注射剂为(适合注射的)液体制备物,具有以一定方式分散于水相中的油相,使脂质体(脂质双层囊泡,通常含有磷脂来用于在脂质双层或水性空间内包封活性药物物质)形成。悬浮液超声注射剂为(适合注射的)液体制备物,含有分散于液相中的固体粒子,从而所述粒子是不溶性的。此外,以气体从悬浮液中

鼓泡来对该产物进行超声处理,使得由固体粒子形成微球。

[0052] 胃肠道外运载体系统包括一种或多种药学上合适的赋形剂,如溶剂和助溶剂、增溶剂、湿润剂、悬浮剂、增稠剂、乳化剂、螯合剂、缓冲液、pH调节剂、抗氧化剂、还原剂、抗微生物防腐剂、膨胀剂、保护剂、张力调节剂和特殊添加剂。

[0053] 按照本发明的组合物和方法的各种示例性实施方式在下面实施例中描述。提供以下实施例仅用于说明目的,并非旨在以任何方式限制本发明的范围。实际上,本发明所示和描述以外的各种变化通过以上描述以及以下的实施例对本领域技术人员显而易见,所述变化也包括在所附权利要求书的范围之内。

[0054] III. 实施例

[0055] 实施例1:水母发光蛋白改变IL-10表达水平的时程和有效性。

[0056] 本实施例中,发明人证明了水母发光蛋白在增强抗炎细胞因子IL-10的mRNA表达中的有效性。预调节是一种通过短暂的非致命缺血事件减弱随后发生的更严重缺血损伤所导致的伤害的现象。与从大脑损伤时产生的反应中看到的相比,预调节降低了炎症调节基因(如IL-1 β 和IL-6)的表达。IL-10是一种抗炎细胞因子并且显示出在给予Ca²⁺通道阻断剂后增加。预调节增加了IL-10的生成,而IL-10与神经保护相关。其具有神经保护性的一个方式是通过减少TNF- α 的生成间接降低IL-6。

[0057] 材料和方法

[0058] 动物。使用了50只雄性F344成年大鼠(平均年龄=3.4 \pm 0.2月)。大鼠生存于14/10小时的昼/夜循环中,自由进食和饮水。

[0059] 外科操作。将大鼠麻醉并固定在立体固定装置上。在无菌条件下,切开头皮并将其收至侧面,并使头部位于前凶和人字缝间之间。使用相对于前凶的立体定位坐标(3.5mm后部, \pm 2.6mm横向,3.0mm垂直),对每个大鼠均使用对准背侧海马区(dhpc)的双侧不锈钢插管。使用不锈钢螺杆和环氧树脂将插管固定在头骨上。未对大鼠进行注射时在原位保留不锈钢螺帽以防止导管堵塞。

[0060] 药物。在零Ca²⁺-aCSF(人工脑脊液)中制备水母发光蛋白(AQ,0、0.4、1和4%,昆西生物科学(Quincy Bioscience)),加入6%DMSO以促进神经元吸收。在去头前1小时、1天、2天、3天或5天对大鼠的一个大脑半球输注AQ,另一个大脑半球输注载体。给予60秒的双侧输注(每侧0.5 μ l)并使注射插管在原位额外保留2分钟以确保扩散。切割输注插管,使其超出导管0.5mm。

[0061] 氧气-葡萄糖耗竭。使用标准方法制备冠状切片(400 μ m)。在aCSF中进行1小时切片复苏后,通过将切片转移至果糖-CSF(使用果糖代替葡萄糖并使用95%N₂-5%CO₂代替95%O₂-5%CO₂起泡)中放置5分钟以诱导体外缺血。随后将切片放回含0.2%台盼蓝的含氧aCSF中,进行30分钟再灌注。台盼蓝能够很好地穿透死细胞并将其染成蓝色,同时活细胞保持未染色状态。使用含氧室温aCSF清洗切片两次,随后使用10%中性缓冲福尔马林在冰箱中固定过夜。随后对切片进行冷冻保护,在低位恒温器上切片(40 μ m)并装片在加胶层(subbed)载玻片上。

[0062] 细胞计数。使用奥林巴斯显微镜(配备数码照相机)10倍放大检查切片并拍照。由不知晓实验条件的实验员对CA1(约800 μ m部分)中经台盼蓝染色的神经元进行计数。使用Statview(5.0版;美国北卡罗来纳州卡雷的SAS研究院有限公司)进行统计分析。使用ANOVA

评价药效。星号表示 $p < .05$ 。

[0063] Western印迹。对大鼠双侧注射4%的AQ,并在以下时间点移除大脑:1小时、1天、2天或3天。速冻大脑并将其储存于 -80°C 。单独分离出并匀浆dhpc和腹侧海马区(vhpc)。对样品进行离心并移除上清,使用Bradford蛋白测定试剂盒(伯乐公司(Bio-Rad))进行测量。标准化蛋白样品并将其加载至SDS-PAGE(10%)。使用半干转装置(伯乐公司)将蛋白转移至PVDF膜上。随后将膜与以下试剂孵育:封闭缓冲液(2小时)、一抗(4°C 过夜;1:5000小鼠抗水母素[开米康公司(Chemicon)]或1:1000兔抗 β -肌动蛋白[细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology)])和二抗(90分钟;1:5000羊抗小鼠[圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)]或1:5000羊抗兔[密理博公司(Millipore)])。随后清洗膜,将其置于化学发光溶液(圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology))中并暴露于自射线胶片(Hyperfilm MP)。照相并使用NIH Image J软件进行密度分析。当条带的光密度值(减去每个泳道的背景)比vhpc条带的平均值高2个标准差时,认为该条带是阳性的。

[0064] PCR。对于RT-PCR,对大鼠的一个大脑半球输注4%AQ,另一个大脑半球输注载体。输注后1小时、1天或2天时,取出海马区并立即将其置于Trizol中。使用25号针头和注射器来匀浆组织,冷冻样品并将其储存于 -80°C 直至提取RNA。使用凯杰公司(Qiagen)RNeasy小试剂盒方案来提取RNA。将分离的RNA溶解于 $50\mu\text{l}$ 无RNA酶的水中。根据260与280nm处吸光度的比值计算RNA纯度,吸光度读数在1.8至2.1之间的样品被认为是纯RNA。使用凯杰公司(Qiagen)RT2HT First Stand试剂盒进行反转录以生成cDNA。IL-10和 β -肌动蛋白的引物购自凯杰公司(Qiagen)并按照凯杰RT2qPCR引物测定来使用。通过SYBR绿(非特异性DNA染色)的荧光测量cDNA的扩增情况。使用StepOne实时PCR系统和软件在96孔板中对样品进行三次重复实验。使用管家蛋白 β -肌动蛋白的基因表达作为细胞因子表达的定量基线。使用Pfaffl法分析基因表达的变化。根据两个随机选择样品的 β -肌动蛋白和IL-10的数值计算引物效率。

[0065] 小结

[0066] 如图1所示,输注水母发光蛋白后抗炎细胞因子水平升高。具体而言,IL-10mRNA早在输注后1小时就有升高。各组间未检测到 β -肌动蛋白表达的变化。鉴于公知的抗炎细胞因子水平升高和炎症减少间的关系,可以得出,在医学相关的动物模型系统中,水母发光蛋白是一种用于减少炎症的有效试剂,该系统与人体相关并可立即应用。

[0067] 实施例2:水母发光蛋白保护大鼠海马区的神经元免遭缺血损伤并改变其中细胞因子mRNA的水平。

[0068] 参见图2A,发明人证明,在海马区内注射水母发光蛋白(AQ,水母素的CaBP组分)明显能够保护海马区神经元免遭缺血性细胞死亡。最初在24小时时可观察到AQ的神经保护作用,且持续至48小时(图2B和2C)。有趣的是,western印记分析表明AQ蛋白水平在这一时期显著下降(图2D)。虽然AQ的神经保护作用在48小时时最强,该时间点上相对低的AQ蛋白量表明其他因子可能在AQ保护神经元免遭缺血性细胞死亡的能力中起作用。

[0069] 一种可能性是给予AQ导致抗炎细胞因子水平的变化。先前已有报道,抗炎细胞因子白介素10(IL-10)能够在体外保护神经元免遭缺氧。为检验细胞因子表达在AQ的神经保护中起作用的假说,在单次海马区内给予AQ后的不同时间点测量了细胞因子的mRNA水平。在12只雄性F344大鼠的背侧海马区两侧插入导管。复苏后,单侧注射4%AQ(另一侧注射载

剂,平衡)并在1、24或48小时后取出大脑并切开海马区,置于干冰上并匀浆。使用凯杰公司的RNeasy小试剂盒分离RNA。使用凯杰公司的RT2HT First Strand试剂盒-96实施反转录并使用qPCR对IL-10和 β -肌动蛋白进行定量。如图3A所示,经AQ处理的大脑半球内的IL-10水平在注射后1小时显著升高($t(14) = 5.30, p < .05$),而24或48小时后则不然($p > .05$)。AQ处理不影响 β -肌动蛋白mRNA的水平(图3B)。

[0070] 使用凯杰公司的RT2Profiler Array进行了细胞因子和趋化因子的进一步PCR阵列分析,以评价在这些时间点时其他细胞因子和趋化因子是否被激活(图3C)。图4描述了说明性结果并提示给予AQ后多种抗炎细胞因子和趋化因子的mRNA水平均以时间依赖的方式变化。

[0071] 图5描述了发明人检测的免疫反应基因的相互作用示意图。相应地,发明人按功能分析了所测定的基因,图6显示(A) AQ注射后急性炎症反应基因的变化;(B) AQ注射后T/B细胞激活因子的变化;(C) AQ注射后血管生成/细胞增殖基因的变化;(D) AQ注射后巨噬细胞吸引基因表达模式的变化;(E) AQ注射后钙调节基因的变化;以及(F) AQ注射后按功能分组基因的变化。表1以表格的形式显示了该数据。总之,这些结果表明AQ具有神经保护性且该神经保护作用涉及神经免疫调节机制。

[0072] 小结

[0073] 该实施例中的数据证明水母发光蛋白的神经保护作用是时间依赖的。缺血损伤发生前24和48小时而非1小时,在背侧海马区的CA1区域内注射AQ能够显著减少细胞死亡。有趣的是,AQ的可用性和效果之间呈现负相关。

[0074] 本数据进一步证明水母发光蛋白的神经保护作用可能涉及神经免疫调节机制。注射后IL-10的激活表明免疫系统在其保护作用中起到作用。其他细胞因子和趋化因子的时间依赖性激活支持这一假说。

[0075] 表1

[0076]

基因号	基因全名	1 小时的 %变化	24 小时的 %变化	48 小时的 %变化	基因功能
C3	补体成分 3	206.56	393.22	1011.11	参与先天免疫；C3 的激活是补体系统激活所必需的
Ccl3	趋化因子 (C-C 基序) 配体 3	2006.69	885.31	115.28	参与急性炎症反应；招募多形核白细胞
Ccl4	趋化因子 (C-C 基序) 配体 4	3388.75	619.76	168.29	NK 细胞和单核细胞的化学吸引物
Cxcl1	趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 1	1936.23	177.36	55.18	嗜中性细胞吸引剂；参与血管生成、炎症、伤口愈合；可能的神经保护剂
Cxcl10	趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 10	959.44	627.21	845.14	响应 IFNG 而分泌；化学吸引单核细胞/巨噬细胞、T 细胞粘附、NK 细胞、树突细胞、血管生成、抗肿瘤活性

[0077]

Cxcl11	趋化因子 (C-X-C 基序)配体 11	446.86	1521.84	384.18	作为 T 细胞的化学吸引物与 CXCL3 和 CXCL9 相互作用
Cxcl9	趋化因子 (C-X-C 基序)配体 9	126.58	2645.95	1346.84	T 细胞化学吸引物
Cxcr3	趋化因子 (C-X-C 基序)受体 3	117.13	3551.38	1165.82	调控白细胞运输; 激活整合素、细胞骨架变化、趋化迁移; CXCL9、10 和 11 与 CXCR3 的结合刺激细胞内钙离子水平升高
Ifng	干扰素 γ	232.35	372.74	386.50	T 和 B 细胞、巨噬细胞和 NK 细胞的激活、生长和分化; 上调 MHC 表达, Th1 分化
Il1a	白介素 1 α	3662.58	123.42	124.76	发热、败血症和炎症的发生
Il1b	白介素 1 β	3245.62	893.77	142.61	细胞增殖、分化和凋亡的发生
Il1f5	白介素 1 家族, 成员 5(δ)	137.88	310.11	425.69	特异性抑制 NF- κ B; 在 2 号染色体上形成“细胞因子基因簇”
Il2rb	白介素 2 受体, β	173.50	1191.53	670.27	刺激 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞的生长和分化
Tnf	肿瘤坏死因子	2315.29	463.93	77.50	炎症和免疫反应的调节基因; 调控细胞的生长和分化; 促进血管生成; 抑制脂肪生成代谢
Cd4401g	CD40 配体	161.81	1791.23	714.76	在 T 细胞上表达; TNF 超家族成员; 激活抗原递呈细胞
Xcr1	趋化因子 (C 基序)受体 1	48.96	319.40	881.35	提高细胞内钙离子水平

[0078] 通过考虑本文所述的发明的说明书和实践, 本发明的其他实施方式和用法对于本领域的技术人员是显而易见的。本文引用的用于任何目的的所有文献(包括所有期刊引用和美国/外国专利和专利申请)均通过引用具体地且以全文形式纳入本文。应理解, 本发明不限于本文说明和描述的特定试剂、制剂、反应条件等, 而是在所附权利要求书的范围之内

包括其修改形式。

[0079] 参考文献

[0080] 1.Ara,J.,Fekete,S.,Frank,M.,Golden,J.A.,Pleasure,D.,Valencia,I.(2011).Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain.(新生小猪脑中缺氧预处理诱导针对缺氧缺血的神经保护)Neurobiology of Disease,43,473-485.

[0081] 2.Baimbridge,K.G.,Celio,M.R.,和Rogers,J.H.(1992).Calcium-binding proteins in the nervous system.(神经系统中的钙结合蛋白)Trends in Neuroscience,15(8),303-308

[0082] 3.Bano,D.,Young,K.W.,Guerin,C.J.,Lefevre,R.,Rothwell,N.J.,Naldini,L.,等(2005).Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺exchanger in excitotoxicity.(兴奋毒性中质膜Na⁺/Ca²⁺交换因子的切割)Cell,120(2),275-285.

[0083] 4.Chard,P.S.,Bleakman,D.,Christakos,S.,Fullmer,C.S.,和Miller,R.J.(1993).Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones.(大鼠感觉神经元中钙结合素D28k和小清蛋白的钙缓冲特性)Journal of Physiology,472,341-357.

[0084] 5.Choi,D.W.(1992).Excitotoxic cell death.(兴奋毒性细胞死亡)Journal of Neurobiology,23(9),1261-1276.

[0085] 6.Detert,J.A.,Hochstetter,E.L.,Lescher,J.L.,Van Langendon,T.M.,和Moyer,J.R.,Jr.(2011)Time course and effectiveness of aequorin as a neuroprotectant in the brain,(作为脑中神经保护剂的水母发光蛋白的时程和功效)Society for Neuroscience Abstracts,Program No.781.04.

[0086] 7.Detert,J.A.,Heisler,J.D.,Hochstetter,E.L.,Van Langendon,T.M.,和Moyer,J.R.,Jr.(2009).Neuroprotection of hippocampal CA1neurons from ischemic cell death using the calcium binding protein aequorin,(使用钙结合蛋白水母素使海马区CA1神经元免遭缺血性细胞死亡的神经保护)Society for Neuroscience Abstracts,35,Program No.52.24.

[0087] 8.Fan,Y.,Shi,L.,Gu,Y.,Zhao,Y.,Xie,J.,Qiao,J.,等(2007).Pretreatment with PTD-calbindin D28k alleviates rat brain injury induced by ischemia and reperfusion.(使用PTD钙结合素D28k预处理能够减少由缺血和重灌注导致的大鼠脑损伤)Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism,27(4),719-728.

[0088] 9.Gary,D.S.,Sooy,K.,Chan,S.L.,Christakos,S.,和Mattson,M.P.(2000).Concentration-and cell type-specific effects of calbindin D28k on vulnerability of hippocampal neurons to seizure-induced injury.(钙结合素D28k对于海马区神经元易受发作诱导损伤的浓度和细胞类型特异性作用)Brain Research.Molecular Brain Research,75(1),89-95.

[0089] 10.Hochstetter,E.L.,Detert,J.A.,Lescher,J.D.,and Moyer,J.R.,Jr.(2012).Apoaequorin protects neurons from ischemia and alters cytokine mRNA levels in rat hippocampus.(水母发光蛋白保护大鼠海马区中的神经元免遭缺血并改变

细胞因子mRNA水平) Society for Neuroscience Abstracts, 38, Program No. 860.03.

[0090] 11. Jones, N.M., 和 Bergeron, M. (2001). Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. (缺氧预处理诱导新生大鼠脑中HIF-1目标基因发生变化) *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21 (9), 1105-1114.

[0091] 12. Kristian, T., & Siesjö, B.K. (1998). Calcium in ischemic cell death. (缺血性细胞死亡中的钙离子) *Stroke*, 29 (3), 705-718.

[0092] 13. Lee, J.M., Zipfel, G.J., 和 Choi, D.W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. (缺血性脑损伤机制不断变化的全景) *Nature*, 399 (6738 Suppl), A7-14.

[0093] 14. Rehni, A.K., 和 Singh, T.G. (2012). Involvement of CCR-2 chemokine receptor activation in ischemic preconditioning and postconditioning of brain in mice. (CCR-2趋化因子受体激活参与小鼠脑的缺血预处理和后处理) *Cytokine*, 60, 83-89.

[0094] 15. Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., ... Turner, M.B. (2012). Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association. (心脏病和中风统计-2012更新: 来自美国心脏病协会的报告) *Circulation*, 125: e2-e220. doi: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046.

[0095] 16. Wei, D., Ren, C., Chen, X., Zhao, H. (2012). The chronic protective effects of limb remote preconditioning and the underlying mechanisms involved in inflammatory factors in rat stroke. (参与大鼠中风中炎症因子的肢体远程预调节的慢性保护作用及其潜在机制) *PLoS ONE*, 7 (2): e30892. doi: 10.1371/journal.pone.003892.

[0096] 17. Yenari, M.A., Minami, M., Sun, G.H., Meier, T.J., Kunis, D.M., McLaughlin, J.R., 等 (2001). Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. (钙结合素d28k过表达保护纹状体神经元免遭瞬时局灶性脑缺血) *Stroke*, 32 (4), 1028-1035.

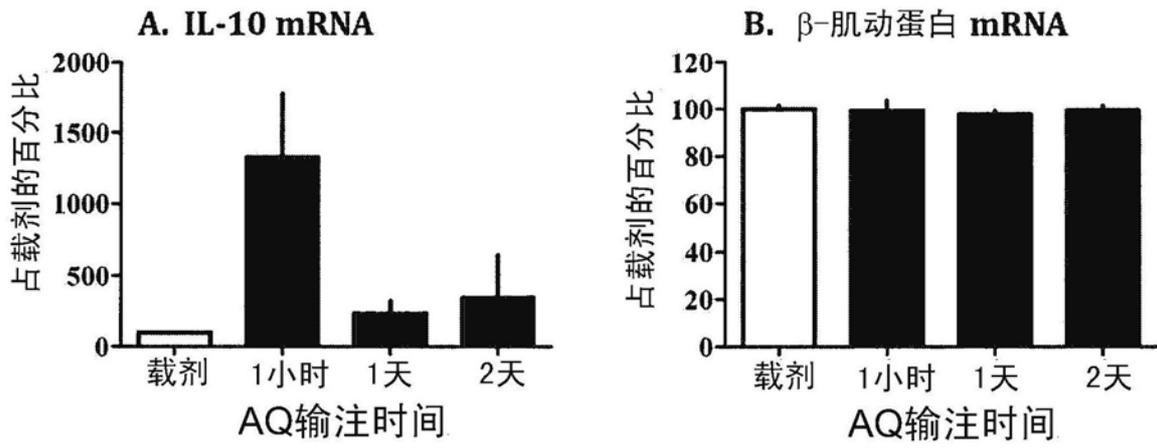
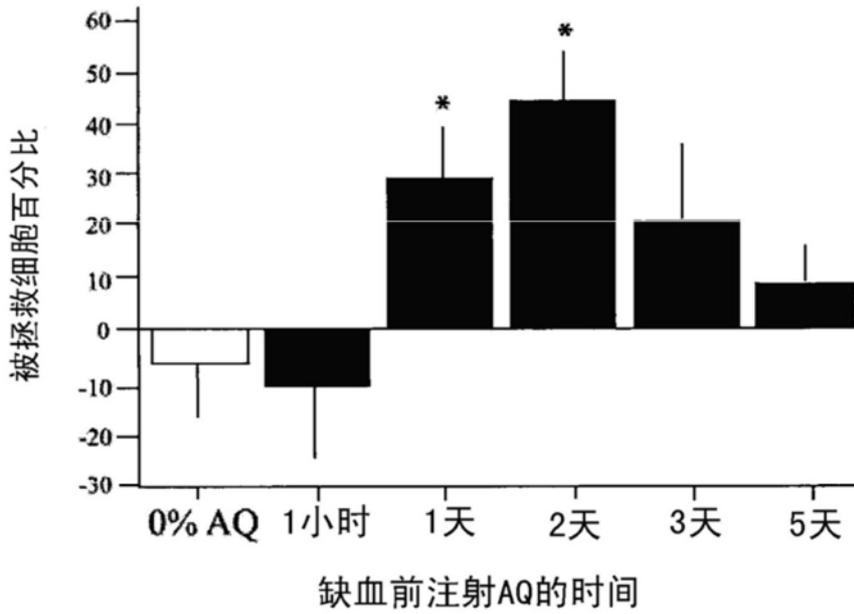


图1

C. 神经保护窗



D. 注射后的AQ可用性

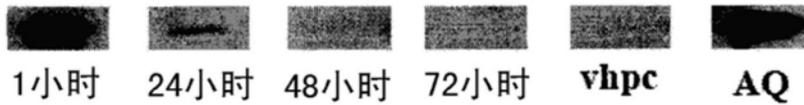
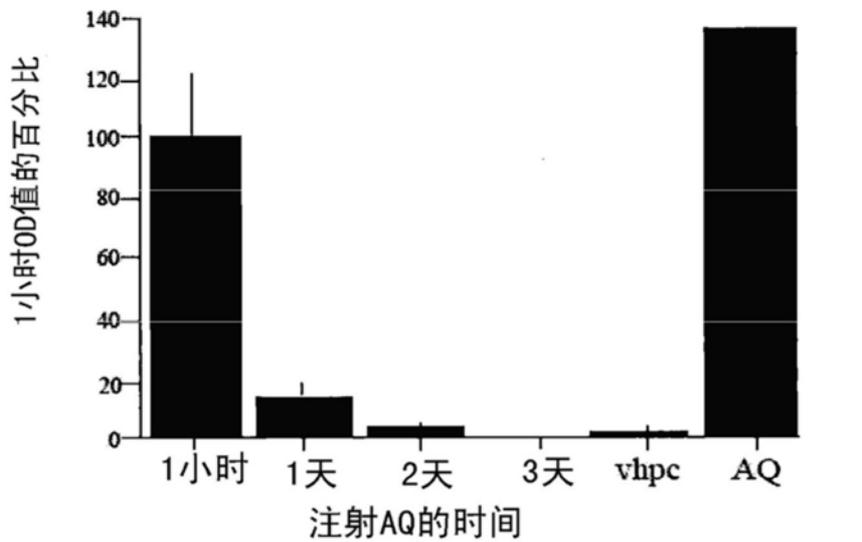
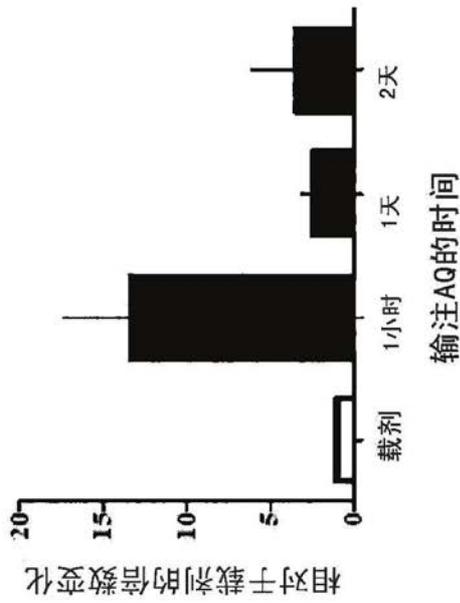
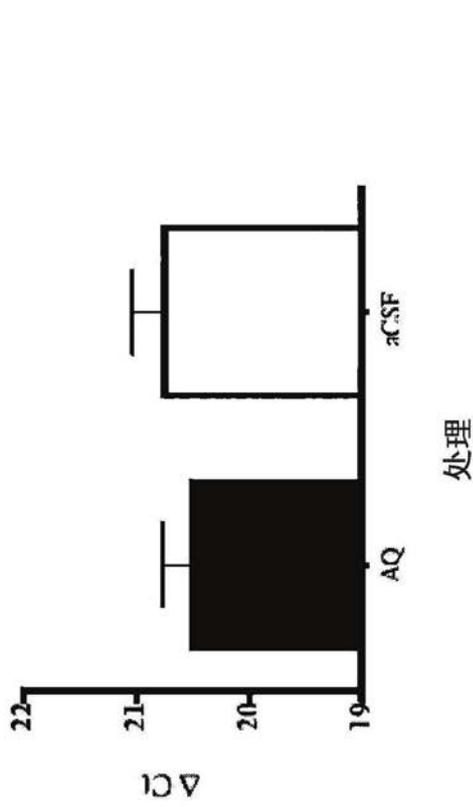


图2(续)

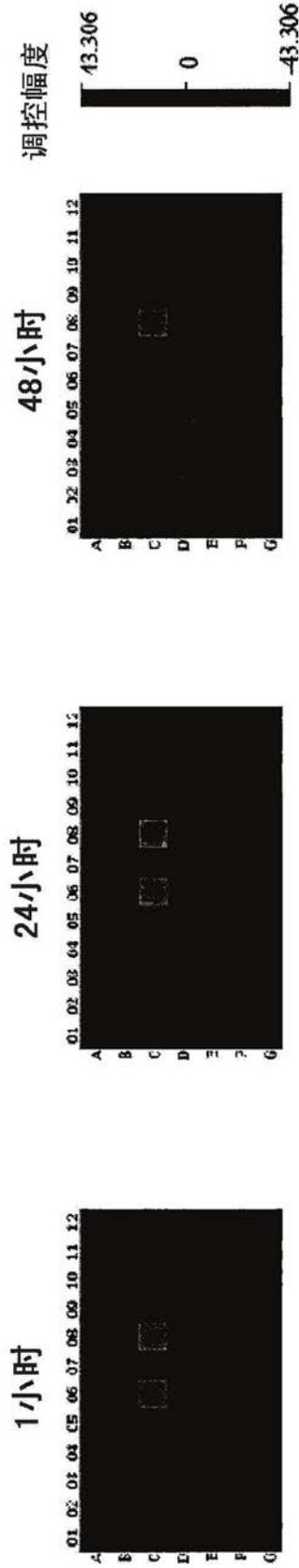
A. IL-10 mRNA 表达



B. β -肌动蛋白 mRNA表达



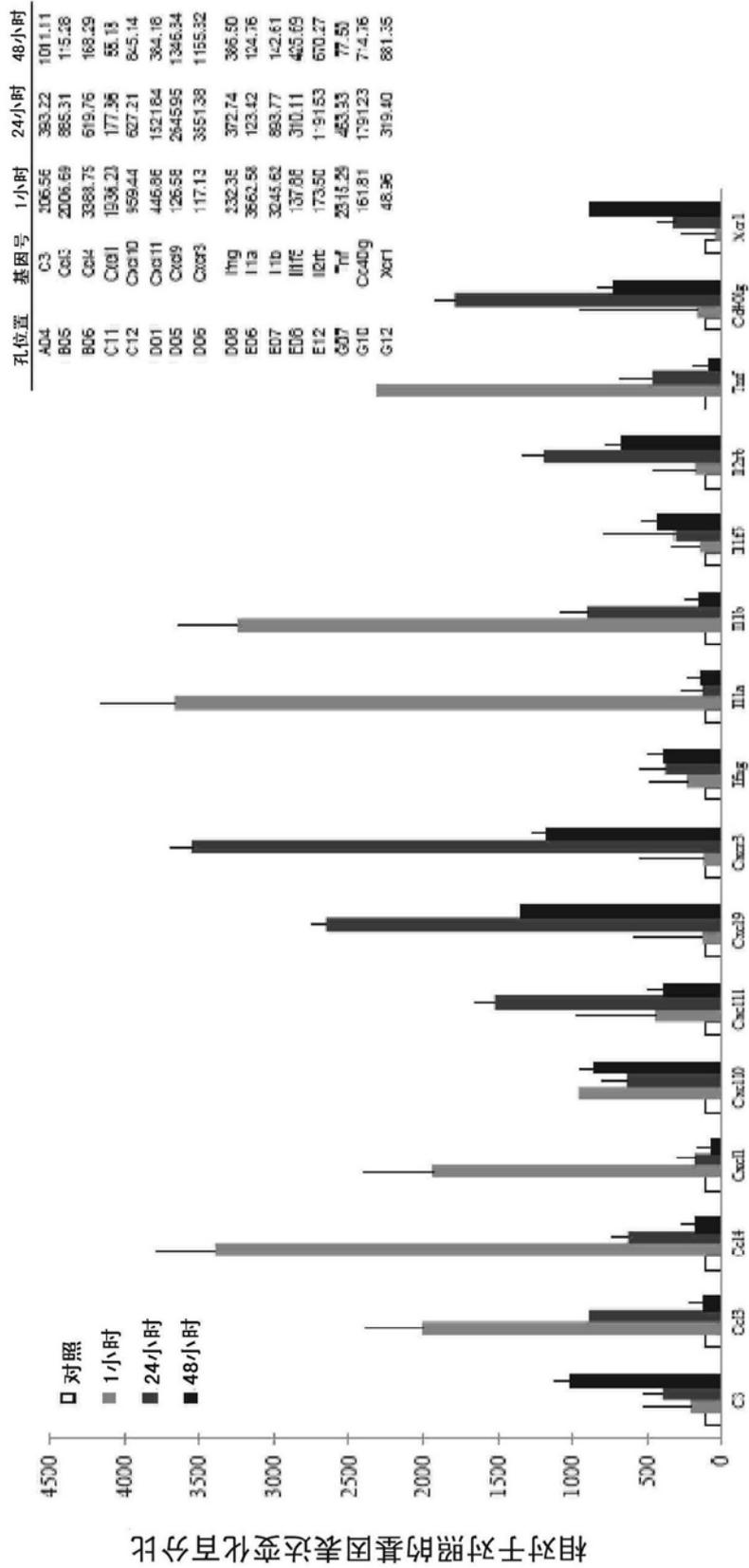
C. PCR阵列显示多种细胞因子和趋化因子的变化



96孔PCR阵列板的代表性热图以及基因如何响应AQ注射发生变化 (每个正方形代表一个不同的基因)

图3

A. AQ注射后细胞因子发生显著变化



本图只包括各组间有显著变化的基因 (p <= 0.5)
所有基因都以 2^{-Ct} (- Ct) 的形式表示。

图4

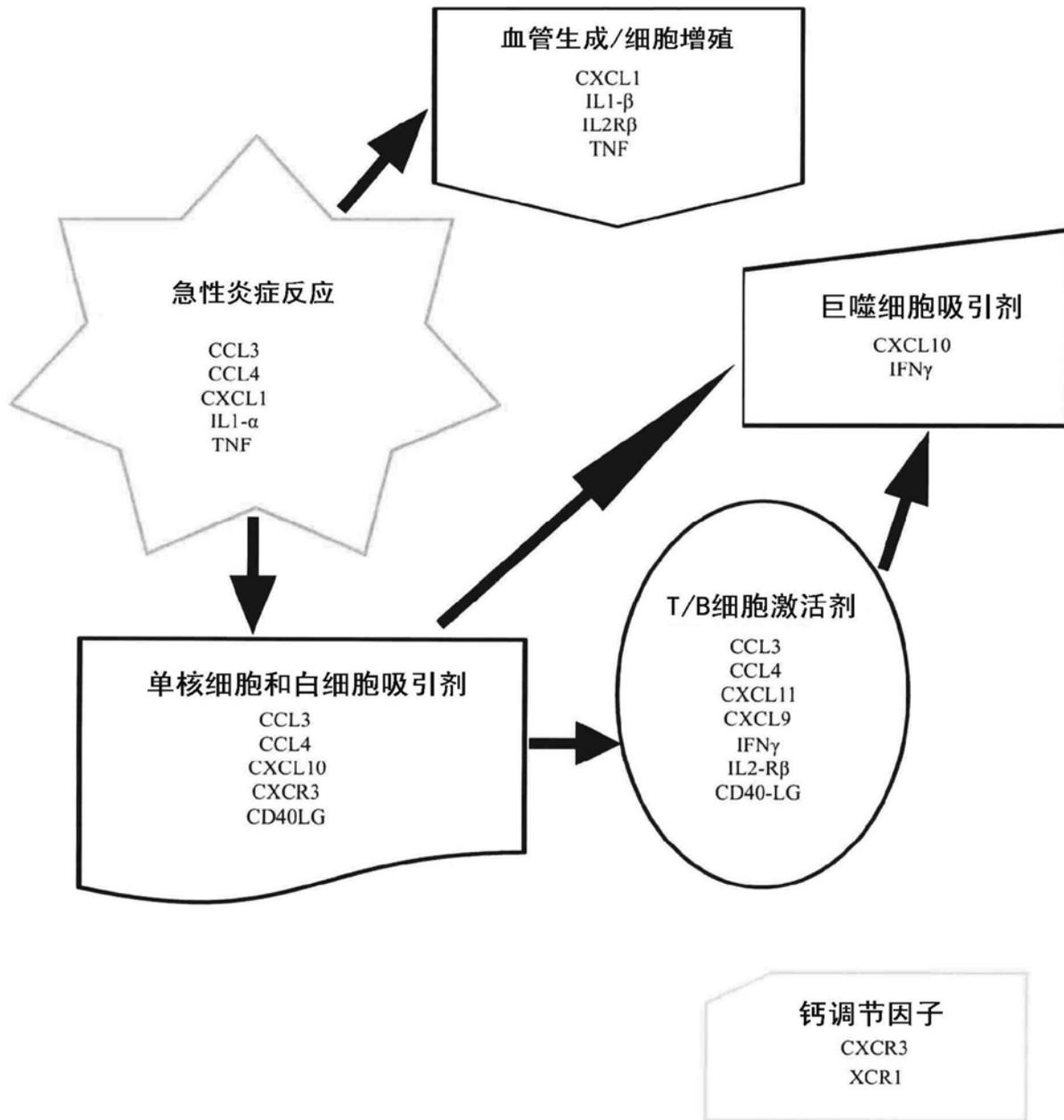


图5

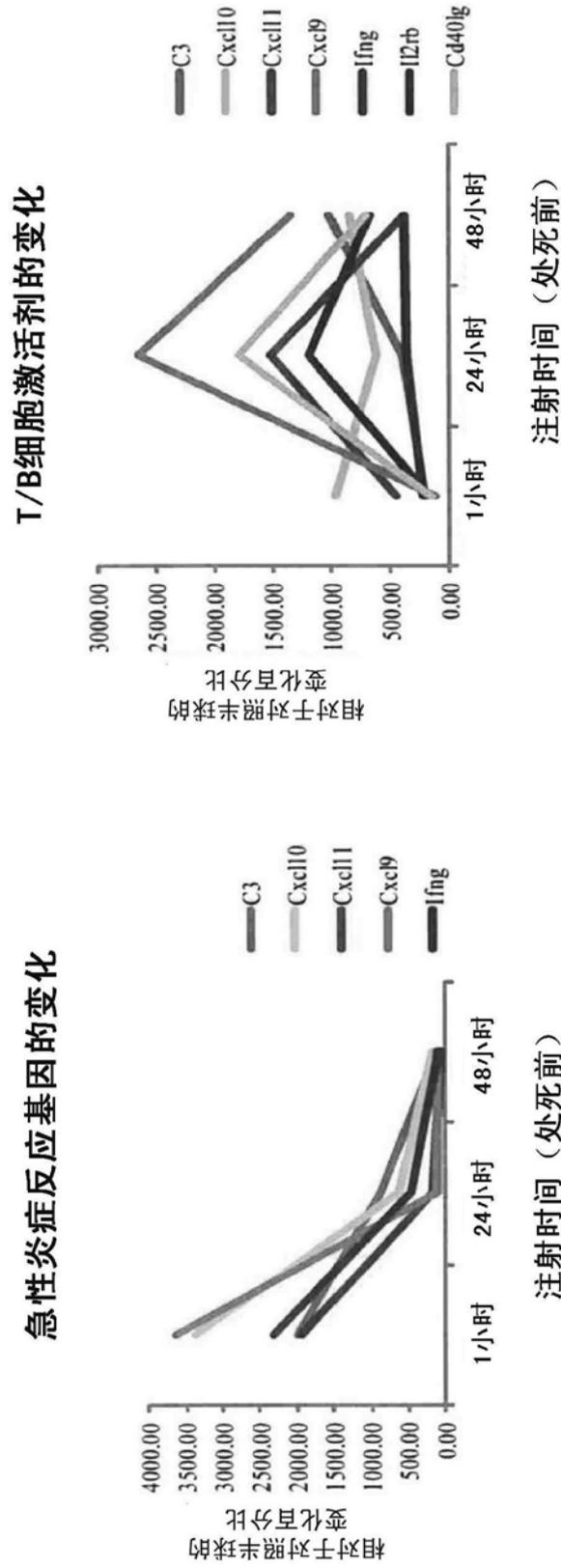
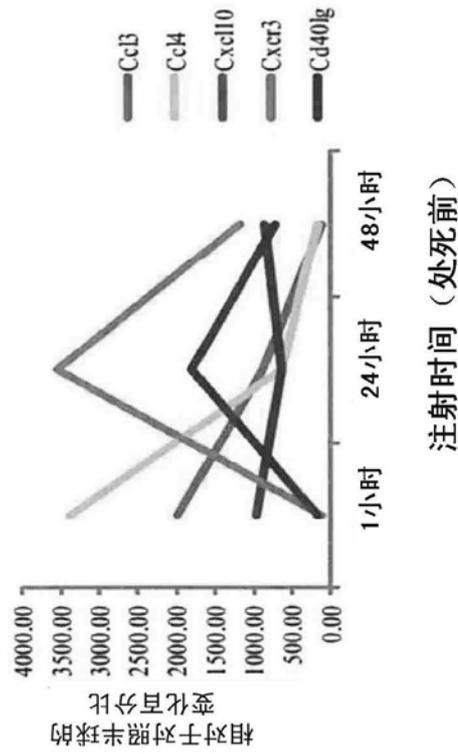


图6

巨噬细胞吸引基因变化模式



血管生成/细胞增殖基因的变化

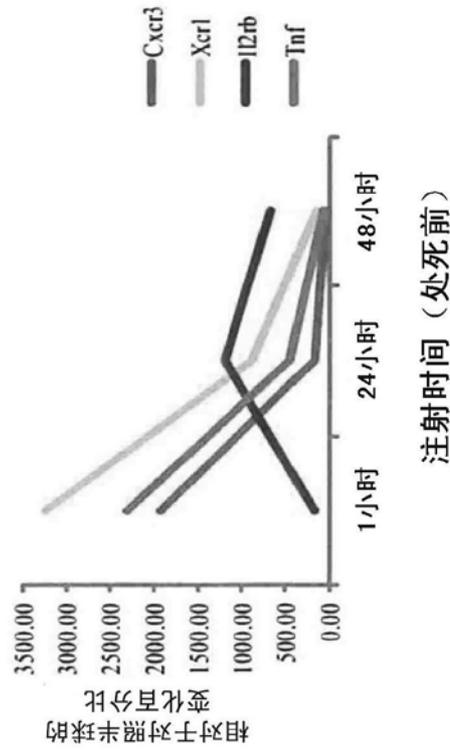


图6续

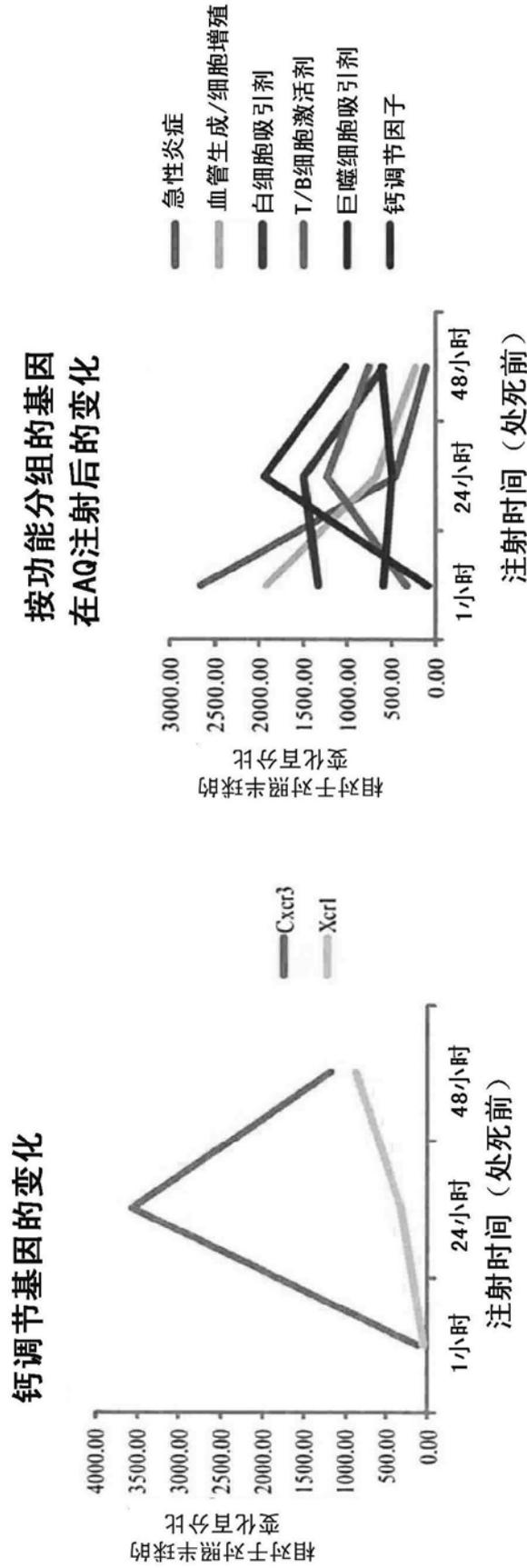


图6续