



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104080474 B

(45) 授权公告日 2016.04.27

(21) 申请号 201280063159.7

(22) 申请日 2012.12.21

(30) 优先权数据

11195254.5 2011.12.22 EP

61/587,371 2012.01.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.20

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/076691 2012.12.21

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2013/093027 EN 2013.06.27

(73) 专利权人 德国杰特贝林生物制品有限公司
地址 德国马尔堡

(72) 发明人 C · 克莱因施尼茨 M · 诺尔特
G · 施托尔 G · 迪克奈特
S · 舒尔特 B · 尼斯万特
I · 普拉格斯特

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 崔锡强

(51) Int. Cl.

A61K 38/57(2006.01)

A61P 7/10(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101365478 A,2009.02.11,

CN 101365478 A,2009.02.11,

R. Tei et al..Protective effect of C1 esterase inhibitor on acute traumatic spinal cord injury in the rat. 《Neurological Research》.2008,第30卷第761-767页.

Claudio Storini et al..C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. 《Neurobiology of Disease》.2005,(第19期),第10-17页.

Claudio Storini et al..C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. 《Neurobiology of Disease》.2005,(第19期),第10-17页.

审查员 李恩

权利要求书2页 说明书16页 附图10页

(54) 发明名称

C1- 抑制剂在治疗中枢神经系统继发性水肿中的应用

(57) 摘要

在最一般的方面中, 本发明的主题是预防和/或治疗继发性水肿的方法。特别地, 本发明涉及 C1- 抑制剂, 其用于预防受试者中枢神经系统 (CNS) 继发性水肿形成和/或减小其大小的方法, 其中所述受试者具有或已经具有至少一种选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤和脊髓损伤的疾病。优选 CNS 的继发性水肿是继发性脑水肿。本发明的另一个主题是治疗与血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加相关的疾病的方法。且第三个主题是血浆衍生的 C1- 抑制剂, 其用于预防、减轻或治疗脑缺

血 - 再灌注损伤方法。

1. C1-抑制剂在制备用于预防受试者中枢神经系统CNS继发性水肿形成和/或减小其大小的药物中的用途,其中所述受试者具有或已经具有至少一种选自中风、外伤性脑损伤和脊髓损伤的疾病。

2. 权利要求1的用途,其中所述中风选自缺血性中风、出血性中风和围产期中风。

3. 权利要求1的用途,其中所述CNS的继发性水肿是继发性脑水肿或继发性脊髓水肿。

4. 权利要求2的用途,其中所述CNS的继发性水肿是继发性脑水肿或继发性脊髓水肿。

5. 权利要求1的用途,其中所述继发性水肿是血管源性水肿。

6. 权利要求2的用途,其中所述继发性水肿是血管源性水肿。

7. 权利要求3的用途,其中所述继发性水肿是血管源性水肿。

8. 权利要求4的用途,其中所述继发性水肿是血管源性水肿。

9. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述继发性水肿在导致权利要求1或2所限定的至少一种疾病的最初损伤后1-10天发生。

10. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述继发性水肿在导致权利要求1或2所限定的至少一种疾病的最初损伤后2-5天发生。

11. 权利要求9的用途,其中所述最初损伤是血管阻塞或脑内出血。

12. 权利要求10的用途,其中所述最初损伤是血管阻塞或脑内出血。

13. 权利要求11的用途,其中所述受试者是人。

14. 权利要求12的用途,其中所述受试者是人。

15. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述抑制剂是血浆衍生的或重组的C1-抑制剂。

16. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述抑制剂与天然存在的人蛋白质或其变体相同。

17. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述抑制剂是人C1酯酶抑制剂。

18. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述继发性水肿的大小比未治疗的继发性脑水肿减小了至少10%。

19. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述继发性水肿的大小比未治疗的继发性脑水肿减小了至少20%。

20. 权利要求1-8任一项的用途,其中所述继发性水肿的大小比未治疗的继发性脑水肿减小了至少30%。

21. 权利要求1-8任一项的用途,其中通过静脉内或皮下给予所述抑制剂。

22. 权利要求1-8任一项的用途,其中给予1-1000单位/kg体重的剂量的所述抑制剂。

23. 权利要求1-8任一项的用途,其中给予5-500单位/kg体重的剂量的所述抑制剂。

24. 权利要求1-8任一项的用途,其中以如下剂量给予所述抑制剂:(i)作为注射或输注的单剂量;或(ii)以多剂量形式,它们各自为注射或输注的形式;或(iii)作为长期输注或施用。

25. 权利要求1-8任一项的用途,其中以如下剂量给予所述抑制剂:(i)作为注射或输注的单剂量;或(ii)以2次剂量形式,它们各自为注射或输注的形式;或(iii)作为长期输注或施用。

26. 权利要求1-8任一项的用途,其中在最初损伤后最迟10天给予所述抑制剂。

27. 权利要求1-8任一项的用途,其中在最初损伤后最迟5天给予所述抑制剂。

28. 权利要求1-8任一项的用途,其中在最初损伤后再灌注开始后最迟10天给予所述抑制剂。

29. 权利要求1-8任一项的用途,其中在最初损伤后再灌注开始后最迟5天给予所述抑制剂。

30. 权利要求1-8任一项的用途,其中给予2次所述抑制剂,在最初损伤后和再灌注开始前给予1次并且在最初损伤后再灌注开始后第二次给予。

C1-抑制剂在治疗中枢神经系统继发性水肿中的应用

[0001] 在最一般的方面中,本发明的主题是预防和/或治疗继发性水肿。特别地,本发明涉及C1-抑制剂,其用于预防受试者中枢神经系统(CNS)继发性水肿形成和/或减小其大小的方法,其中所述受试者具有或已经具有至少一种选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤和脊髓损伤的疾病。优选CNS的继发性水肿是继发性脑水肿。本发明的另一个主题是治疗与血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加相关的疾病。且第三个主题是血浆衍生的C1-抑制剂,其用于预防、减轻或治疗脑缺血-再灌注损伤方法。

[0002] 在本说明书中,引述了许多文献。将这些文献的公开内容包括制造商的手册完整地引入本文参考。

[0003] 脑缺血和随后因再灌注导致的损伤(脑缺血-再灌注损伤)的病理学是复杂的且涉及众多不同的分子和细胞途经。其中持续性缺血的一个特征在于血脑屏障的结构裂解,由此导致形成脑水肿。过度水肿还可能简单地通过机械压力损害健康脑区域,并且是中风患者中神经症状恶化的常见原因。迄今为止,缺乏基于抗击急性缺血性发作中的水肿形成的药理学的令人信服的策略。

[0004] 将脑水肿定义为因脑实质内流体局限性或弥漫性异常蓄积导致的脑容量增加。一般而言,将脑水肿分成4种不同类型:血管源性水肿、细胞毒性水肿、脑积水水肿(或间质水肿)和渗透性水肿(或堕积性水肿)。尽管存在不同形式的水肿的这种分类,但是在大部分临床情况中,存在不同类型的水肿的组合,这取决于该病的时程。在脑血流受到干扰后的水肿形成和脑出血方面,细胞毒性和/或血管源性脑水肿似乎起主要作用。此外,考虑到脑水肿形成中涉及的介体,可以举出许多介体(例如缓激肽),它们具有许多不是对于脑水肿形成的作用的特性(Nag等人(2009)Acta Neuropathol.;118:197-217)。

[0005] 在脑水肿中,最初脑容量的改变由脑脊髓液和血容量的减少代偿,由此原发性脑水肿主要是细胞毒性水肿。在大的半球损害中,进行性膨胀超过了这些代偿机制且颅内压增加(即继发性或恶性脑水肿形成)导致脑组织疝形成,从而造成死亡。因此,血管源性恶性脑水肿持续是不同类型脑病理性情况例如大脑梗死、出血、外伤、感染和肿瘤后死亡率的主要原因。对脑水肿缺乏有效疗法仍然是持续关注和研究动力。

[0006] 在缺血性发作方面,继发性脑水肿是缺血性发作过程中继发性梗死生长和随后神经症状恶化的常见原因(Ayata和Ropper(2002)J Clin Neurosci.;9:113-124;Bardutzky和Schwab(2007)Stroke;38:3084-3094)。在缺血性发作中,恶性大脑中动脉(MCA)梗死是用于描述具有显著性空间占有作用和脑组织疝形成的完全MCA区域梗死的术语。据估计恶性MCA梗死的发生率为全部中风的1%以下。使用保守形式的医疗方法的死亡率约为80%,且昏迷状态在发作的2-5天内脑死亡中终止。死亡通常因缺血性脑组织进行性膨胀、脑组织转移、颅内压局灶性增加和缺血向邻近血管区域扩展而发生。这种类型的中风的幸存患者因生活质量差而残疾。迄今为止,没有药物证实可持续地减轻脑缺血症中的脑水肿,且通常作为救生步骤的最终的治疗方法是减压的偏侧颅骨切除术。此外,显然不了解缺血性发作中的水肿形成和连续的神经元变性的基础分子机制。

[0007] 激肽释放酶-激肽系统(KKS)通过凝血因子XII(FXII,Hageman因子)启动且在调节

血管通透性和水肿形成中起重要作用(Leeb-Lundberg等人(2005)Pharmacol.Rev.;571:27-77)。近来还在中风患者中证实了KKS活化(Wagner等人(2002)J.Neurol.Sci.;202:75-76)。激肽类(例如缓激肽、胰激肽)构成了KKS的终产物。激肽类是高度活性促炎肽激素,其不同类型的组织损伤(包括脑缺血)过程中由激肽释放酶类从其前体激肽原类中释放。激肽类的细胞效应由两种不同的缓激肽受体B1R和B2R介导。活化这些受体触发靶器官中的炎症性过程,例如释放促炎细胞因子或吸引免疫细胞以及血管通透性增加。

[0008] 近来,阻断B1R、但不阻断B2R减轻了小鼠局灶性脑缺血(Austinat等人(2009)Stroke;40:285-293)和外伤性脑损伤(Raslan等人(2010)J.Cereb.Blood Flow Metab.;30:1477-1486)实验模型中的血脑屏障损害和水肿形成,表明KKS对缺血性发作和外伤性脑损伤的急性期中脑水肿形成的功能关联性。

[0009] 在通过抑制FXII预防KKS活化的研究中,FXII在接触带负电荷的表面时以生理学方式被活化(表面激活),研究了急性实验性中风后的神经病理学结果(Hagedorn等人(2010)Circulation;121:1510-1517;Kleinschnitz等人(2006)JEM;203(3):513)。

[0010] C1-酯酶抑制剂(C1-INH)是478氨基酸的糖蛋白,其属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族,称作舍平类。其命名来源于最初描述为血液和组织中经典补体途径的唯一已知的生理学抑制剂。然而,C1-INH还是通过阻断活化的FXII和血浆激肽释放酶的KKS的主要调节剂。除几种另外的功能(例如FXIIa抑制)外,它是唯一已知的C1s和C1r即补体系统的第一种成分的活化的同源性丝氨酸蛋白酶的生理学抑制剂。

[0011] 以前的研究已经证实C1-INH制剂在缺血性发作自身动物模型(De Simoni等人(2004)Am.J.Pathol.;164:1857-1863;Gesuete等人(2009)Ann.Neurol.;66:332-342)以及外伤性脑损伤动物模型(Longhi等人(2009)Crit.Care Med.;37:659-665)和外伤性脊髓损伤动物模型(Tei等人(2008)Neurol.Res.;30:761-767)中的有益作用,但基础分子机制在很大程度上是未知的。此外,这些研究集中于急性神经病理学结果,而未公开对(继发性)脑水肿的作用,即预防其形成和/或减小其大小。此外,de Simoni等人(2004;Am.J.Pathol.;164:1857-1863)公开了在再灌注开始给予时,血浆衍生的C1-抑制剂(15U/小鼠)恰好在缺血/再灌注损伤鼠模型中有效,而在再灌注开始后30分钟给予时效力完全消失。

[0012] 因此,显而易见,对治疗或预防脑内血管阻塞后出现的继发性脑水肿的药物仍然存在需求。所以,本发明的一个目的在于满足这种需求。

[0013] 因此,本发明中的技术问题在于提供成功地靶向继发性脑水肿的可选和/或改进的方式和方法,它构成了研发用于治疗 and/或预防继发性脑水肿的多种令人满意的药物的基础或能够研发这些药物。

[0014] 通过提供以权利要求为特征的实施方案解决了这一技术问题。

[0015] 令人意外地,申请人已经发现,通过给予C1-抑制剂可以预防或减轻在最初损伤后发生的继发性脑水肿。这种最初的损伤或原发性疾病可以是脑内的血管阻塞,例如缺血性发作,或脑内出血,例如出血性中风。

[0016] 因此,一般地,本发明涉及C1-抑制剂,其用于预防受试者中枢神经系统(CNS)继发性水肿形成和/或减小其大小的方法,其中所述受试者具有或已经具有至少一种选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤和脊髓损伤的疾病。特别地,所述出血性中风是脑出血或蛛网膜下出血。

[0017] 在本发明的一个优选的实施方案中,所述中枢神经系统(CNS)继发性水肿是继发性脑水肿或继发性脊髓水肿。

[0018] 本发明的另一个方面是用于稳定受试者血脑屏障或血脊髓屏障的C1-抑制剂,其中所述受试者具有或已经具有至少一种疾病,其选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤、脊髓损伤、糖尿病、多发性硬化、CNS细菌感染如脑膜炎、感染脑的病毒感染如HIV、和脑瘤、特别是转移性脑瘤。

[0019] 因此,请求保护用于治疗与受试者血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加相关的疾病的C1-抑制剂,其中所述疾病选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤、脊髓损伤、糖尿病、多发性硬化、CNS细菌感染如脑膜炎、感染脑的病毒感染如HIV、和脑瘤、特别是转移性脑瘤。

[0020] 此外,请求保护C1-抑制剂,其用于预防或减轻与受试者血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加的方法,其中这种通透性增加与疾病相关,所述疾病选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤、脊髓损伤、糖尿病、多发性硬化、CNS细菌感染、优选脑膜炎、感染脑的病毒感染、优选HIV、和脑瘤、优选转移性脑瘤。

[0021] 本发明的第三个方面是血浆衍生的C1-抑制剂,其用于预防、减轻或治疗受试者脑缺血-再灌注损伤的方法,其中在再灌注开始后30分钟或以上给予所述抑制剂。

[0022] 在一些实施方案中,在使用血浆衍生的C1-抑制剂治疗脑缺血-再灌注损伤方面,所述脑缺血-再灌注损伤在选自中风、缺血性发作、出血性中风和围产期中风的疾病之后发生。

[0023] 根据本发明,术语“C1-抑制剂”、“C1酯酶抑制剂”和“C1-INH”是指作为丝氨酸蛋白酶抑制剂的蛋白质或其片段,发挥抑制与补体系统相关的蛋白酶、优选蛋白酶C1r和C1s以及MASP-1和MASP-2、与激肽释放酶-激肽系统相关的蛋白酶、优选血浆激肽释放酶和因子XIIa、与凝固系统相关的蛋白酶、优选因子XIa的作用。此外,C1-INH可以用作减少选择蛋白-介导的白细胞与内皮细胞粘附的抗炎分子。本文所用的C1-INH可以是天然的丝氨酸蛋白酶抑制剂或其活性片段,或它可以包含重组肽、合成肽、肽模拟物或提供类似功能特性-例如抑制蛋白酶C1r和C1s和/或MASP-1和MASP-2和/或因子XIIa和/或因子XIa的肽片段。有关进一步有关C1-抑制剂的结构和功能的公开内容,参见美国专利US4,915,945;美国专利US5,939,389;美国专利US6,248,365;美国专利US7,053,176;和WO 2007/073186,将这些文献完整地引入本文参考。

[0024] 因此,在本发明的一个优选的实施方案中,所述抑制剂是血浆衍生的或重组的C1-抑制剂。在另一个优选的实施方案中,所述抑制剂与天然存在的人蛋白质或其变体相同。C1-INH应包含所有天然存在的等位基因,其具有与C1-抑制剂相同的功能。在最优选的实施方案中,所述抑制剂是人C1酯酶抑制剂。

[0025] 在另一个优选的实施方案中,修饰本发明的C1-抑制剂以改善生物利用度和/或半衰期,改善效力和/或减少潜在的副作用。这种修饰可以通过重组或其他步骤进行。这种修饰的实例可以是所述C1-抑制剂的糖基化或白蛋白融合。有关蛋白质糖基化和白蛋白融合的进一步公开内容,参见WO 01/79271,将该文献完整地引入本文参考。

[0026] 在不同的实施方案中,可以根据本领域技术人员公知的方法生产C1-抑制剂。例如,可以通过从几个供体中采集血浆制备血浆衍生的C1-INH。血浆供体应是如本领域中所

定义的健康的血浆供体。优选地,采集若干个(1000或以上)健康供体的血浆并且任选地进一步加工。制备用于治疗目的的C1-抑制剂的典型方法公开在美国专利US4,915,945中,将该文献的公开内容完整地引入本文参考。或者,在一些实施方案中,可以使用本领域公知的技术从天然组织来源中采集和浓缩C1-INH。包含C1-抑制剂的商购产品是,例如血浆衍生的**Cinryze**[®](Viropharma)、重组**Ruconest**[®]或**Rhucin**[®](均为Pharming)和血浆衍生的**Berinert**[®](CSL Behring)。显示**Berinert**[®]用于治疗遗传性血管水肿和先天性缺乏。重组C1-INH可以通过已知方法制备。

[0027] 术语“中枢神经系统水肿”或“CNS水肿”是指水在中枢神经系统(CNS)细胞内和/或细胞外隙过度蓄积。术语“脑部水肿”或“脑水肿”是指在脑细胞内和/或细胞外隙过度蓄积。甚至不了解CNS急性或原发性水肿、优选原发性脑水肿形成的病理生理学且特别是短暂延迟的(即中风发作后的数小时或数天)CNS恶性或继发性水肿、优选继发性脑水肿发生及其涉及的(分子)病理机制,且其看起来相当复杂。在脑血流受阻和脑出血后的水肿形成方面,血管源性和/或细胞毒性脑水肿看起来起主要作用。

[0028] 原发性CNS水肿、优选原发性脑水肿是在最初损伤期间或损伤后短暂或即刻(即数分钟内)发生的水肿。它主要是因受损脑细胞的异常吸水导致的细胞毒性水肿。

[0029] 相反,继发性CNS水肿、优选继发性脑水肿随后即在损伤后数小时乃至数天发生,且主要是血管源性水肿。例如,在外伤性脑损伤(TBI)中,恶性脑水肿是罕见的(<10%),但通常是致命性(~100%)并发症。它根据为对医疗处置顽固性的损伤后数小时内颅内压快速(ICP)增加诊断。

[0030] 因此,本文所用的术语“继发性脑水肿”或“继发性脑部水肿”或“恶性脑水肿”或“恶性脑部水肿”是指任何延迟的损伤后脑肿胀,即在最初损伤后数小时或数天内发生晚期肿胀。特别地,本发明的继发性脑水肿基本上是血管源性水肿。在这类水肿中,由于血脑屏障破坏,所以通常排除血管内蛋白质和流体透入大脑实质细胞外隙。一旦血浆成分通过血脑屏障,则水肿扩散且这可能是十分快速和广泛的。

[0031] 本文所用的术语“继发性脊髓水肿”是指脊髓的任何延迟的损伤后肿胀,即在最初损伤后数小时或数天内发生晚期肿胀。特别地,本发明的继发性脊髓水肿基本上是血管源性水肿。在这类水肿中,通常排除血管内蛋白质和流体透入大脑实质细胞外隙。一旦血浆成分通过血脊髓屏障,则水肿扩散且这可能是十分快速和广泛的。

[0032] 优选继发性水肿在导致至少一种疾病的最初损伤后1-10天、更优选2-5天发生,所述疾病涉及继发性脑水肿。在一些实施方案中,继发性水肿在最初损伤后2、3、4或5天或在它们之间的各任意时间发生。

[0033] 术语“预防继发性水肿形成”是指C1-抑制剂的使用方法,其中继发性水肿形成完全或部分得以预防。完全预防继发性水肿形成是指继发性水肿完全不会发生,条件是在形成前预先给予C1-抑制剂。部分预防继发性水肿形成是指在方案中减小继发性水肿的大小,其中在继发性水肿已经开始出现前给予C1-抑制剂且随后出现的水肿大小小于未治疗患者的水肿大小。在本发明的一个优选的实施方案中,继发性水肿的大小即继发性水肿的体积与未治疗继发性水肿的大小相比被预防了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%(或它们之间的任意百分比)。

[0034] 本文所用的术语“减轻”包括减少个体或动物中继发性水肿的可能性,降低任何症状的严重性和/或减少处于发生最初损伤后发生继发性水肿风险中的群体中患者的比例。因此,“减轻”是指减轻、降低、减少、限制、改善或改进继发性水肿病情。减小继发性水肿的大小可以包括,例如防止继发性水肿发生;降低继发性水肿风险、在其发展时或其一旦已发展降低继发性水肿的严重性;限制继发性水肿损害;减少继发性水肿扩散,例如限制最初损伤后发生的水肿的体积;或改善与继发性水肿相关的脑或脊髓中的病情。

[0035] 术语“减小继发性水肿的大小”是指C1-抑制剂的使用方法,其中继发性水肿的大小减小,无论继发性水肿是否是在给药当时开始。因此,减小继发性水肿的大小是指:减小方案中继发性水肿的体积,其中给予C1-抑制剂以减小已经存在的继发性水肿的大小,所述继发性水肿在给药后发生;和减小方案中继发性水肿的体积,其中给予C1-INH以减小已经出现、但仍然生长的继发性水肿的大小。在本发明的一个优选的实施方案中,减小继发性水肿的大小是指继发性水肿的大小与未治疗的继发性水肿即不存在治疗的大小或体积相比减小了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%(或它们之间任意的百分比)。

[0036] 因此,在本发明的一个优选的实施方案中,继发性水肿的大小与未治疗的继发性水肿的体积相比减小了至少10%、优选至少20%、更优选至少30%、更优选至少40%、更优选至少50%、更优选至少60%、更优选至少70%、更优选至少80%、更优选至少90%。

[0037] 在本发明的一些实施方案中,所述治疗受试者的继发性水肿是预防性的和/或治疗性的。本发明C1抑制剂的应用可以以预防和/或治疗目的使用,以预防继发性水肿形成和/或减小继发性水肿大小。

[0038] 涉及继发性水肿的疾病由最初的损伤诱发,本文所用的最初的损伤可以称作术语“最初损伤”,即最初损伤导致至少一种与继发性水肿相关的疾病。本发明的最初损伤的实例是脑缺血。优选这种最初的损伤可以是血管阻塞,例如缺血性发作或出血,例如出血性中风。更优选所述最初的损伤是脑内血管阻塞或脑内出血。

[0039] 与继发性水肿相关的至少一种疾病选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤和脊髓损伤。或者,可以对具有如感染或脑瘤这样的疾病的受试者给予C1-INH。

[0040] 本发明中所用的术语“中风”是本领域众所周知的,且有时也称作脑血管意外(CVA)或脑梗死。中风在医学上是对脑的供血下降而导致脑功能缺失而定义的医学病症,特别是归因于缺血。所述供血下降可以因例如血栓形成或栓塞导致。此外,中风可以因出血过程导致。因此,一般将中风分成两个主要类型,即i)缺血性发作和ii)出血性中风。缺血归因于血液循环中断且出血归因于血管破裂或异常血管结构,两种情况最终均导致脑组织损害。约87%的中风因缺血导致,其余的由出血导致。一些出血发生在缺血区域内部(“出血转化”)。尚不了解有多少出血实际上作为缺血性发作开始。

[0041] 根据本发明,所述中风由此优选为缺血性发作或出血性中风。

[0042] 在缺血性发作中,对部分脑的供血减少,导致该区域中的脑组织功能障碍和坏死。主要存在3个致病原因:血栓形成(由局部形成血块阻塞血管)、栓塞(同前归因于来自体内另外区域的血块/栓塞物)和全身性灌注不足(供血普遍减少,例如在休克中)。根据本发明,血栓形成可以优选在动脉、静脉、小动脉、小静脉和毛细血管中发生,而栓塞可以优选在动

脉、小动脉和毛细血管中发生。

[0043] 出血性中风即颅内出血是血液蓄积在颅穹窿内的任何区域。轴内出血(脑内部血液)与轴外出血(颅骨内部、但脑外部的血液)之间存在差别。

[0044] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述出血性中风是脑出血或蛛网膜下出血。

[0045] 脑出血或脑内出血是发生在脑组织自身内部的颅内出血的亚型。脑出血可以因慢性高血压或脑外伤导致,或它可以是药物诱发的,例如因抗血小板治疗(例如乙酰水杨酸)或抗凝治疗(例如维生素K拮抗剂,如苯丙香豆素)诱发,或它可以在出血性中风中自主发生。非创伤性脑内出血是自发出血进入脑组织。脑出血是轴内出血;即它可以发生在脑组织内而非其外部。存在两种类型的轴内出血:脑实质出血和脑室内出血(脑室系统内的血液)。颅内出血的另一种类型是轴外出血,例如硬膜上血肿、硬膜下血肿和蛛网膜下血肿,它们均出现在颅骨内、但在脑组织外。

[0046] 蛛网膜下出血出血进入蛛网膜下腔-脑周围蛛网膜与软脑脊膜之间的区域。这种情况自发方式,通常归因于破裂的脑动脉瘤或可能因头部损伤导致。

[0047] 本发明中所用的围产期中风是导致胎儿或新生儿期间脑中损伤的脑血管局灶性病。围产期是指从妊娠中期(胎儿生命)直至出生和生命的第一个月的时间期限。因此,围产期中风是指从妊娠28周开始直到出生后28天的任意阶段婴儿发生的中风。在一些情况中,它导致儿童期癫痫。

[0048] 本发明的外伤性脑损伤(TBI)也称作颅内损伤在外力创伤性损伤脑时发生。TBI可以基于严重性、机制(闭合性头部外伤或穿通性头部外伤)或其他特征(例如发生在特别位置或广泛区域内)分类,且可以导致众多身体、认知、社会、情感和行为效应,且结果可以从完全恢复到永久性残疾或死亡。将外伤性脑损伤定义为因外部机械力导致的脑损害,例如快速加速或减速、撞击、冲击波或抛射物穿透。大脑功能暂时或永久地受损,且结构损害可能使用当前技术检测到,也可能不能检测到。

[0049] 本文所用的术语“脊髓损伤”(SCI)是因创伤而不是疾病导致的对脊髓的任何损伤。根据脊髓和神经根受损区域的不同,症状可以从疼痛到麻痹至失禁广泛地改变。将脊髓损伤描述为不同水平的“不完全”,可以从对患者无影响到意味着总体功能缺失的“完全”损伤。脊髓损伤存在许多原因,但典型地与由例如机动车辆事故、跌落、体育运动损伤和暴力导致的大创伤相关。

[0050] 糖尿病(diabetes mellitus)、通常称作糖尿病(diabetes)是一组代谢性疾病,其中人具有高血糖,这归因于身体无法产生足够的胰岛素或因为细胞对产生的胰岛素无应答。在血脑屏障方面的显著改变发生,其影响屏障效应和运输功能。

[0051] 多发性硬化(MS,称作弥漫性硬化或弥漫性脑脊髓炎)是炎性疾病,其中脑和脊髓轴突周围的脂肪髓鞘受损,导致脱髓鞘和瘢痕形成以及广谱征兆和症状。MS是CNS感染,其中淋巴细胞和巨噬细胞浸润入CNS。

[0052] 脑膜炎是覆盖脑和脊髓的保护膜(共同称作脑脊膜)的炎症。这种炎症可能因感染病毒、细菌或其他微生物导致,但因一些药物导致的较不常见。脑膜炎可能因炎症接近脑和脊髓而威胁生命。

[0053] 人免疫缺陷病毒(HIV)是慢病毒属(lentivirus)(逆转录病毒家族的一员),其导

致获得性免疫缺陷综合征(AIDS),即人体中免疫系统进行性衰竭导致威胁生命的机会致病细菌感染和癌症繁殖的病症。HI病毒在感染后迅速穿透血脑屏障。

[0054] 脑瘤是颅内的实体瘤,即脑或中枢脊髓内的肿瘤(定义为细胞异常生长)。

[0055] 在本发明的一些实施方案中,具有最初损伤的受试者不是先天性缺乏C1-抑制剂的受试者,即对具有C1酯酶抑制剂先天性缺乏的受试者不给予C1-抑制剂。

[0056] 在本发明的一个优选的实施方案中,C1-抑制剂用于预防人体中继发性水肿形成和/或减小其大小,即本发明优选的受试者是人。而根据本发明,还可以对是动物的受试者给予C1-抑制剂,优选家畜,更优狗、猫或马。

[0057] 在一些实施方案中,制备用于治疗CNS继发性水肿或脑缺血-再灌注损伤和/或治疗血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加的药物组合物,其包含C1-INH。包含C1-INH的药物组合物的配制方法是本领域公知的。例如,如果提供粉末或冻干形式的C1-INH(例如通过冷冻干燥)且期望水性药物,则可以通过混合药物制剂的水性成分溶解粉末并且使用适合的技术例如涡旋或适度搅拌进行搅拌。在其他实施方案中,提供冻干形式的C1-INH,并且使其与水性药用成分(例如另外的活性成分或无活性成分,例如填充剂、稳定剂、溶剂或载体)合并,然后给药。

[0058] 在一些实施方案中,药物组合物可以包含至少一种添加剂,例如填料、填充剂、缓冲剂、稳定剂或赋形剂。标准药物制剂技术是本领域技术人员众所周知的(例如,参见2005Physicians' Desk *Reference*[®], Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Gennado等人, Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000)。适合的药用添加剂包括,例如甘露糖醇、淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。在一些实施方案中,药物组合物还可以包含pH缓冲试剂和湿润剂或乳化剂。在另外的实施方案中,组合物可以包含防腐剂或稳定剂。

[0059] 药物组合物的制剂可以根据预期的给药途径和其他参数的不同而改变(例如,参见Rowe等人, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第4版, APhA Publications, 2003)。在一些实施方案中,药物组合物可以是冻干的饼状物或粉末。例如,可以使用无菌注射用水(USP)重构冻干的组合物以用于通过静脉内注射给药。在其他实施方案中,组合物可以是无菌无热原溶液。在另外的实施方案中,以粉末形式在丸剂或片剂中递送组合物。

[0060] 所述药物组合物可以包含C1-INH作为唯一活性化合物或可以与至少另一种化合物、组合物或生物材料组合的方式递送。这种化合物的实例包括维生素、抗生素或预期除去或抑制脑中血块形成的化合物(例如组织型纤溶酶原激活物、乙酰水杨酸、氯吡格雷或双嘧达莫)。

[0061] 还公开了用于治疗CNS继发性水肿和治疗脑缺血-再灌注损伤或治疗血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加的药盒。在一些实施方案中,所述药盒包含(a)C1-INH、(b)用于治疗CNS继发性水肿或脑缺血-再灌注损伤或用于治疗治疗血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加的使用说明书和任选的(c)至少另一种治疗活性化合物或药物。C1-INH成分可以是液体或固体形式(例如冻干后)。如果是液体形式,则C1-INH可以包含添加剂,例如稳定剂和/或防腐剂,例如脯氨酸、甘氨酸或蔗糖或其他增强贮存期限的添加剂。

[0062] 在一些实施方案中,所述药盒可以包含另外的化合物,例如治疗活性化合物或药物,将它们在C1-INH之前、与之同时或在其之后给予。这种化合物的实例包括维生素、抗生素、抗病毒药等。在其他实施方案中,预期除去或抑制脑中血块形成的化合物(例如组织型纤溶酶原激活物、乙酰水杨酸、氯吡格雷或双嘧达莫)可以包括在所述药盒中。

[0063] 在不同的实施方案中,药盒的使用说明书包括使用药盒成分治疗CNS继发性水肿或脑缺血-再灌注损伤或用于治疗血脑屏障或血脊髓屏障通透性增加的指导说明。该说明还可以包含有关如何制备(例如稀释或重构,在冷冻干燥的蛋白质的情况下)C1-抑制剂的信息。该说明还可以包括有关给药剂量和频率的指导原则。

[0064] 可以通过任意适合的给药方式对个体递送C1-抑制剂制剂。不同的递送系统是公知的且可以用于通过任意便利的途径给予所述组合物。在一个优选的实施方案中,通过全身给予C1-抑制剂制剂。对于全身应用,为了经胃肠外或肠(例如口服、阴道或直肠)递送,根据常规方法配制治疗蛋白。胃肠外给药可以包括、但不限于静脉内、皮下、肌肉、腹膜内、脑内、硬膜下、通过鞘内注射或通过直接注入脑、肺内、透皮或鼻内给药。最优选的给药途径是静脉内给药。可以通过输注或通过快速浓注连续给予所述制剂。一些制剂包括缓释系统。

[0065] 在有关治疗继发性水肿的一些实施方案中,在最初损伤已经开始后5、10、20、30、40或50分钟或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、72、96、120或240小时(或它们之间的任意时间时)给予C1-INH。在一个优选的实施方案中,给予在最初损伤后最迟10天、优选最迟5天、更优选最迟3天、更优选最迟1天、更优选最迟12小时、更优选最迟6小时、更优选最迟3小时、更优选最迟1小时、更优选最迟30分钟和甚至更优选在最初损伤后直接(或在它们之间的任意时间时)进行。

[0066] 在人C1酯酶抑制剂长的半衰期和/或预防性治疗方面,优选的给药应在最初损伤发生后尽可能快地进行。

[0067] 在其他优选的实施方案中,使用C1-INH治疗可以从因最初损伤导致的阻塞后再灌注开始后即刻或至多10天开始。优选地,这种治疗在再灌注开始后尽可能快地进行。在一些实施方案中,治疗从最初损伤后再灌注开始后5、10、20、30、40或50分钟或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、72、96、120或240小时(或它们之间的任意时间时)进行。在一个优选的实施方案中,给药在最初损伤后再灌注开始后最迟10天、优选最迟5天、更优选最迟3天、更优选最迟1天、更优选最迟12小时、更优选最迟6小时、更优选最迟3小时、更优选最迟1小时、更优选最迟30分钟和甚至更优选在最初损伤后再灌注开始后直接进行。

[0068] 在有关使用血浆衍生的C1-抑制剂治疗脑缺血-再灌注损伤的一些实施方案中,治疗可以从再灌注开始后30分钟—至多10天开始。在优选的实施方案中,治疗在再灌注开始后30、40或50分钟或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、72、96、120或240小时(或它们之间的任意时间时)进行。在其他实施方案中,给药从再灌注开始后不迟于10天、优选不迟于5天、更优选不迟于3天、更优选不迟于1天、更优选不迟于12小时、更优选不迟于6小时、更优选不迟于3小时、更优选不迟于1小时、更优选不迟于45分钟和甚至更优选不迟于30分钟(或它们之间的任意时间时)进行。优选地,这种治疗在再灌注开始后30分钟—10天、更优选在再灌注开始后30分钟—5天、更优选30分钟—3天和更优选30分钟—1天(或它们之间的任意时间时)进行。

[0069] 对患者给药可以以单剂量或重复给药和任意各种生理学可接受的盐形式和/或使用可接受的药用载体和/或添加剂作为药物组合物的组成部分进行。因此,在一些实施方案中,以如下剂量给予C1-抑制剂:(i)单剂量作为注射或输注;或(ii)以多剂量形式,优选2剂量,它们各自为注射或输注形式;或(iii)作为长期输注或施用。长期输注/施用在一定时间期限内给予,优选30分钟-2周、更优选30分钟-1周、更优选30分钟-6天、更优选30分钟-5天、更优选30分钟-4天、更优选30分钟-3天、更优选30分钟-2天、更优选30分钟-1天、更优选30分钟-12小时、更优选30分钟-6小时(或它们之间的任意时间期限)的期限内。

[0070] 在一个优选的实施方案中,对患者给药可以以双倍剂量,即最初损伤后和在再灌注开始前1次和在最初损伤后再灌注开始后1次进行。

[0071] 可以以治疗有效量对患者给予包含C1-INH的组合物。一般而言,治疗有效量可以因受试者年龄、一般情况和性别以及受试者中医学病症的严重性的不同而改变。该剂量可以由临床医师决定且如果必要,可以调整以适合于所观察到的治疗效果。在一些实施方案中,C1-INH的剂量可以约为1U/kg-5000U/kg体重。在不同的实施方案中,C1-INH的剂量为1、5、7.5、10、15、20、25、30、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、450、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000或4500U/kg体重(或它们之间的任意值)。C1-INH给药的典型治疗范围还公开在美国专利US5,939,389中,将该文献的公开内容完整地引入参考。优选以1-1000单位/kg体重、更优选5-500单位/kg体重、更优选10-200单位/kg体重的剂量且最优选20-100单位/kg体重的剂量给予C1-抑制剂。

[0072] 所给予的药物组合物可以包含C1-INH作为唯一活性化合物或可以将其与至少另一种化合物、组合物或生物材料组合递送。这种化合物的实例包括维生素、抗生素或预期除去或抑制脑中血块形成的化合物(例如组织型纤溶酶原激活物、乙酰水杨酸、氯吡格雷或双嘧达莫)。

[0073] 在本发明的另一个实施方案中,提供了预防受试者中枢神经系统(CNS)继发性水肿形成和/或减小其大小的方法,其中所述受试者具有或已经具有至少一种疾病,其选自中风、缺血性发作、出血性中风、围产期中风、外伤性脑损伤和脊髓损伤。优选所述CNS继发性水肿是继发性脑水肿或继发性脊髓水肿。

[0074] 附图显示:

[0075] 图1:C1-INH降低了小鼠急性缺血性发作后的死亡率并且改善了其功能性结果。(a)C1-INH-治疗小鼠(分别为7.5U或15.0U)和对照组中直到tMCAO后第7天的死亡率($n=10$ /组);** $p=0.0087$, * $p=0.0215$, 与对照组小鼠比较的时序检验(log-rank test)。(b) tMCAO后第5天时的长期功能性结果(Bederson评分)($n=3-9$ /组);** $p<0.01$, 克-瓦二氏检验(Kruskal-Wallis test), 然后是Dunn多重比较检验。

[0076] 图2:C1-INH显示缺血性发作中显著的血脑屏障稳定和消水肿效应。(a)上部图:有代表性的相应对照组小鼠(Ctrl)的冠状脑切片和在血管示踪剂伊文思蓝注射后tMCAO后第1天(最初损伤后24h)时使用7.5U C1-INH或15.0U C1-INH在最初损伤后1h治疗的小鼠。在C1-INH治疗后血管渗漏明显减少。注意伊文思蓝外渗物甚至在接受C1-INH的小鼠中还存在梗死的区域(基底神经节,红色箭头)中甚至几乎不存在。下部图:通过tMCAO后24h治疗和未治疗小鼠的缺血性半球中的面积法确定的伊文思蓝外渗物体积($n=7-10$ /组);* $p<0.05$, 单因素方差分析(1-way ANOVA), 与未治疗的对照组小鼠比较的Bonferroni事后检验(post-

hoc test)。(b)根据对照组小鼠(Ctrl)和在tMCAO后第1天(最初损伤后24h)时使用7.5U C1-INH或15.0U C1-INH在最初损伤后1h治疗的小鼠的缺血性半球中脑含水量确定的水肿形成($n=5/\text{组}$);*** $p<0.0001$,单因素方差分析,与未治疗的对照组小鼠比较的Bonferroni事后检验。(c)假拟操作的小鼠、对照组(Ctrl)和tMCAO后24h使用7.5U C1-INH或15.0U C1-INH在最初损伤后1h治疗的小鼠皮质和基底神经节中内皮缩血管肽-1的相对基因表达($n=6-14/\text{组}$)。注意15.0U C1-INH防止了两个脑区域中内皮缩血管肽-1的诱导;*** $p<0.0001$,^{##} $p<0.0001$,两因素方差分析(2-way ANOVA),与假拟操作的小鼠比较的Bonferroni事后检验(分别为皮质(*)或基底神经节(#))。(d)对照组小鼠或分别接受7.5U C1-INH或15.0U C1-INH的小鼠(最初损伤后1h治疗)在tMCAO后第1天(最初损伤后24h)时缺血性发作基底神经节中闭锁蛋白的蛋白质印迹分析($n=4/\text{组}$), $*p<0.05$,单因素方差分析,与未治疗的小鼠比较的Bonferroni事后检验。

[0077] 图3:C1-INH治疗减少了大鼠中中风时的脑水肿形成。使大鼠经受90分钟tMCAO并且在再灌注后即刻用20U/kg C1-INH治疗。在第1天时(最初损伤后24h)通过来自TTC-染色的脑切片进行面积法计算脑水肿的程度($n=15/\text{组}$);*** $p<0.0001$,与媒介物治疗的对照组比较的双尾学生t-检验(two-tailed Student's t-test)。

[0078] 图4:C1-INH治疗减少了中风后的脑内血栓形成。(a)上部图:纤维蛋白(原)在对照组小鼠(Ctrl)和使用7.5U C1-INH或15.0U C1-INH治疗的小鼠的梗死(i)和对侧(c)皮质和基底神经节中的蓄积,正如在tMCAO后24h通过免疫印迹确定的。显示了每个组的2个有代表性的免疫印迹。下部图:上述小鼠组和脑区域中血栓形成的光密度测定法定量($n=3-5/\text{组}$);*** $p<0.0001$,^{##} $p<0.01$,两因素方差分析,与对照组比较的Bonferroni事后检验(分别为皮质(*)或基底神经节(#))。(b)上部图:来自对照组小鼠(Ctrl)和在tMCAO后第1天时使用15.0U C1-INH治疗的小鼠的梗死基底神经节的有代表性的H&E染色。血栓形成血管在对照组小鼠中丰富(箭头),而在接受15.0U C1-INH(箭头)的小鼠中微血管开放性显著增加,这一结果通过计算血栓形成指数得以证实($n=5/\text{组}$)(下部图); $*p<0.05$,单因素方差分析,与对照组比较的Bonferroni事后检验。刻度条:100 μm 。

[0079] 图5:延迟的C1-INH治疗减少了脑内血栓形成。上部图:纤维蛋白(原)在对照组小鼠(Ctrl)和中风后6h使用7.5U C1-INH或15.0U C1-INH治疗的小鼠的梗死皮质和基底神经节中的蓄积,正如在tMCAO后24h通过免疫印迹确定的。下部图:上述小鼠组和脑区域中血栓形成的光密度测定法定量($n=4/\text{组}$); $*p<0.05$, $**p<0.01$,^{###} $p<0.0001$,两因素方差分析,与对照组比较的Bonferroni事后检验(分别为皮质(*)或基底神经节(#))。

[0080] 图6:C1-INH在施用于tMCAO后延迟环境中时仍然有效。(a)上述小鼠组中tMCAO后第1天(最初损伤后24h)时的神经学Bederson评分(上部图)和握力试验评分(下部图)($n=8-16/\text{组}$)。最初损伤后6h接受15.0U C1-INH的小鼠的行为明显优于对照组或接受较低剂量(7.5U)C1-INH的小鼠; $*p<0.05$,克-瓦二氏检验,然后是Dunn多重比较检验。

[0081] 实施例示例本发明,而绝不限本本发明。

[0082] 缺血模型.在本研究中包括C57B1/6小鼠和CD大鼠,根据使用实验动物的制度性指导原则进行且方案得到政府当局批准(Regierung von Unterfranken,Würzburg,Germany; **Regierungspräsidium** Giessen,Germany)。通过短暂性大脑中动脉闭塞(tMCAO)、使用管腔内丝线技术诱发局灶性脑缺血症60分钟(6-8周或20周龄C57B1/6小鼠)或90分钟(7-9

周龄CD大鼠)(Longa,E.Z.,Weinstein,P.R.,Carlson,S.,&Cummins,R.,Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.Stroke 1989;20(1):84-91;Kleinschnitz等人Stroke 2011)。控制动物的关键生理参数,它们可能影响中风后果(例如脑血流量)。全部中风实验均根据目前建立的ARRIVE指导原则进行(<http://www.nc3rs.org/ARRIVE>)。将动物由不参与数据采集和分析的独立的人随机分给操作人员。我们进行手术并且评价全部读出参数,而对实验组是不了解的。详细的研究设计(包括排除标准)如下所示。

[0083] 小鼠脑缺血的诱导.如所述的(Kleinschnitz等人,J Exp Med 2006;PloS Biol 2010),在6-8-周或20周龄小鼠中通过60分钟短暂性大脑中动脉闭塞(tMCAO)诱发局灶性脑缺血症。用在70%N₂O/30%O₂混合物中2.5%的异氟烷(Abbott,Wiesbaden,Germany)麻醉小鼠。通过使用反馈控制加热装置在手术的自始至终将核心体温维持在37℃。在颈部中线皮肤切开后,连接近端颈总动脉和颈外动脉并且插入标准化硅橡胶-涂敷的6.0尼龙单丝(6021;Docol Corp.,Redlands,CA,USA),且通过右颈内动脉推进以封闭右侧MCA起点。管腔内缝合线原位进行60分钟。然后重新麻醉动物并且抽出封闭用单丝以便能够再灌注。

[0084] 小鼠中功能结果的评价.在第1天(最初损伤后24h)和在tMCAO后第5天时,根据Bederson对神经性缺陷评分并且定量(Bederson JB,Pitts LH,Tsuji M,Nishimura MC,Davis RL,Bartkowski H.Rat middle cerebral artery occlusion:evaluation of the model and development of a neurologic examination.Stroke.1986;173:472-476):0,无缺陷;1,前肢弯曲;2,如1+对侧面挤压的抗性减小;3,单向转圈;4,纵向旋转;5,不活动。对于握力试验(Moran PM,Higgins LS,Cordell B,Moser PC.Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein.Proc Natl Acad Sci U S A.1995;9212:5341-5345),将小鼠置于两个支持物之间的带上中间位置并且如下分级:0,跌落;1,用1个或2个前爪紧握带;2,如1且尝试攀爬带;3,用1个或2个前爪+1个或2个后爪紧握带;4,用前爪和后爪握紧带+尾部盘绕带;5,逃逸(至支持物)。

[0085] 大鼠中脑缺血的诱导.使用管腔内丝线技术使7-9周龄大鼠经受90分钟tMCAO(Longa,E.Z.,Weinstein,P.R.,Carlson,S.,&Cummins,R.,Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.Stroke 1989;20(1):84-91)。具体而言,在异氟烷室内用5%异氟烷(CP Pharma,Burgdorf,Germany)在自主呼吸动物中诱发麻醉且随后通过面罩维持2.5%异氟烷。在手术期间,将动物置于加热装置上以确保正常体温(37℃)。在颈部中线皮肤切开后,分离左颈总动脉和颈外动脉并且连接。在动脉切开术后,将通过加热使其尖端钝端化的标准化硅橡胶-涂敷的4.0尼龙单丝(**Ethilon**[®];Johnson&Johnson,St-Stevens-Woluwe,Belgium)插入颈内动脉且向颅脑方向推进至大脑中动脉起点,直到感觉到适度阻力为止。使封闭用丝线保持原位90分钟。然后重新麻醉动物并且抽出封闭用单丝以便能够再灌注。

[0086] C1-INH治疗.诱发tMCAO(最初损伤)后1h或6h,小鼠接受单一静脉内注射血浆人C1-INH(**Berninert**[®]P,CSL Behring GmbH,Marburg,Germany),剂量为用150μl载体溶液(等渗盐水)稀释的7.5单位(U)或15.0U。基于预先公开的工作,在脑缺血症啮齿动物中选择

相应剂量,且15.0U相当于得到小鼠中补体溶血活性90%—95%抑制所需的C1-INH的量(Longhi L等人,Crit Care Med 2009;Storini C等人,Neurobiol Dis,2005)。在大鼠中,在诱发tMCAO(诱发再灌注后即刻)后90分钟通过静脉内注射20U/kg体重剂量的C1-INH。对照组小鼠和大鼠接受等体积的等渗盐水(媒介物)。

[0087] 中风研究设计.将媒介物治疗的小鼠或大鼠或接受C1-INH的小鼠或大鼠由不参与数据采集和分析的独立的人随机分给操作人员。我们进行手术并且评价全部读出参数,而对实验组是不了解的。下列条件从终点分析中排除动物(排除标准):

[0088] 1.MCAO后24h内死亡

[0089] 2.蛛网膜下出血(SAH)(在脑采样期间肉眼评价或通过MRI评价)

[0090] 3.Bederson评分=0(tMCAO后24h,仅小鼠)

[0091] 中途退出率均匀地分布于各组之间。

[0092] 血脑屏障渗漏和脑水肿的确定.为了确定血脑屏障渗漏,在诱发auf tMCAO后1h通过静脉内注射用0.9%NaCl稀释的100μl 2%伊文思蓝示踪剂(Sigma Aldrich,Germany)(Austinat等人,Stroke 2011)。24h后,通过贲门给C1-INH-治疗的小鼠和对照组灌注4%低聚甲醛(PFA),并且快速取出脑并且使用小鼠脑切片基质(Harvard Apparatus,Holliston,MA,USA)切成2mm厚度的冠状切片。用伊文思蓝染色对脑实质进行平面测量(ImageJ software,National Institutes of Health,USA)以评估血脑屏障损害。

[0093] 为了评价继发性脑水肿程度,在tMCAO后24h处死C1-INH-治疗的小鼠或对照组。取出脑,分离半球,称重以评价湿重(WW)。此后,将半球在60°C干燥72h,并且测定干重(DW)。使用下列公式计算半球含水量(%): $((WW-DW)/WW) \times 100$ (Austinat等人,Stroke2009)。

[0094] 在大鼠中,根据下列等式通过来自TTC-染色脑切片的面积法计算继发性脑水肿的程度:

[0095] 脑水肿的面积(%)= $[(AL+AI+AC) \times 100 / (AC \times 2)] - 100$,

[0096] 而AL表示TTC-负值(缺血性)脑组织的总面积,AI表示同侧(中风的)半球的活组织总面积,AC表示对侧(健康)半球的总面积。

[0097] 使用下列方案进行计算大鼠中脑水肿所需的TTC(2,3,5-三苯基氯化四氮唑)染色:在tMCAO后24h处死大鼠。快速取出脑,并且使用保险刀片(VWR International GmbH,Darmstadt,Germany)切成6个2-mm厚度的冠状切片。在37°C用PBS中2%TTC(Merck Eurolab GmbH,Darmstadt,Germany)将切片染色15分钟以显示梗死(Bederson JB,Pitts LH,Germano SM,Nishimura MC,Davis RL,Bartkowski HM.Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats.Stroke.1986;176:1304-1308)。

[0098] 组织学和免疫组织化学.将冷冻-包埋的脑切成10-μm厚度切片并且用丙酮固定以便中性粒细胞染色,或固定在4%PFA的PBS溶液中以便染色小神经胶质细胞/巨噬细胞和闭锁蛋白。通过用在PBS中的牛血清白蛋白(BSA)预处理45分钟封闭表位以防止非特异性结合。对于侵入的免疫细胞染色(Austinat等人,2009),在4°C加入以1:1000稀释的大鼠抗-小鼠Ly-6B.2异型抗原(中性粒细胞;MCA771GA,AbD Serotec,Germany)和在包含1%BSA的PBS中以1:100稀释的大鼠抗-小鼠CD11b(小神经胶质细胞/巨噬细胞;MCA711,AbD Serotec,Germany)过夜。此后,将切片与用包含1%BSA的PBS以1:100稀释的生物素标记的抗大鼠IgG

(BA-4001, Vector Laboratories, USA)一起在室温温育45分钟。在用抗生物素蛋白/生物素封闭溶液(抗生物素蛋白/生物素封闭试剂盒, Sp-2001, Vector Laboratories, Inc., California, USA)处理以抑制内源性过氧化物酶活性后,通过链霉抗生物素、根据制造商的说明(Vectorstain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Vector Laboratories, Inc., California, USA)使二次抗体与生物素标记的过氧化物酶(POD)连接。通过POD、使用色原体3,3'-二氨基联苯胺(DAB)(Kem-En-Tec Diagnostics, Denmark)使抗原显现。为了对免疫细胞定量,选择在来自C1-INH-治疗小鼠和对照组的基底神经节(距离前囟点前0.5mm)水平上相同的脑切片(厚度10- μ m)并且从来自4只不同动物的5个随后的切片中在Nikon显微镜Eclipse 50i(Nikon, Germany)下进行细胞计数(距离10 μ m)(Austinat等人, 2009)。

[0099] 为了进行针对闭锁蛋白的免疫荧光染色,在包含1%BSA的PBS中按照1:100稀释施用家兔抗-小鼠闭锁蛋白抗体(ab 31721, Abcam, UK)过夜(4℃)。用在1%BSA的PBS溶液中按照1:300稀释的Cy3-标记的山羊抗-家兔二次抗体检测蛋白质。为了染色DNA,以0.4mg/ml的浓度加入荧光Hoechst染料(Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, Germany)30分钟。在Axiophot 2(Zeiss, Germany)下分析切片。

[0100] 为了计算血栓形成指数,在tMCAO后24h将全脑切片。根据标准方法进行H&E染色。为了定量,在安装CCD照相机(Visitron Systems)的显微镜(Axiophot2, Carl Zeiss AG)下以盲式方式检查染色。对于对照组小鼠或分别用7.5U C1-INH或15.0U C1-INH治疗的小鼠,使用40-倍放大倍数在每一第10个切片中计数缺血性基底神经节内闭塞的血管数量。

[0101] 所有组织学实验的阴性对照均不包括初级或二次抗体且不产生可检测到的信号(未显示)。

[0102] PCR研究.如所述的(Austinat等人, Stroke 2009),进行组织匀化、RNA分离和实时RT-PCR。使用TRIzol **reagent**[®](Invitrogen, Germany),用Miccra D-8功率匀化器(ART, Germany)制备总RNA并且通过分光光度法定量。然后用**TaqMan**[®]逆转录试剂(Applied Biosystems, Germany)、根据制造商的说明、使用随机六聚体逆转录1 μ g总RNA。使用荧光**TaqMan**[®]技术对内皮缩血管肽-1(测定ID:Mm00438656_m1, Applied Biosystems, Germany)的相对基因表达水平进行定量。GAPDH(**TaqMan**[®]预先研发的用于基因表达的测定试剂,分配编号:4352339E, Applied Biosystems, Germany)用作内源性对照以校正样品RNA的量。使用等量的cDNA在StepOnePlus[™]实时PCR系统(Applied Biosystems, Germany)中、应用**TaqMan**[®] Universal 2x PCR Master Mix(Applied Biosystems, Germany)进行PCR。将反应体系(总体积12.5 μ l)在50℃温育2分钟,在95℃温育10分钟,然后进行在95℃ 15s和在60℃ 1分钟的40个循环。包括水对照以确保特异性。每一样品均一式三份测定,且通过分析扩增图检验数据点的完整性。对比Ct方法用于如所述的基因表达定量(Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25:402-408)。

[0103] 蛋白质印迹.从天然脑中分离脑皮质或基底神经节并且在包含0.1%SDS和4%蛋白酶抑制剂(完全蛋白酶抑制剂混合物, Roche)的RIPA缓冲液(25mM Tris pH 7.4, 150mM

NaCl, 1% NP-40) 中匀化。将样品声处理(sonified) 10 秒。此后, 将组织裂解物在 4°C 以 $15.000 \times g$ 离心 30 分钟, 并且将上清液用于 BCA 蛋白质测定和随后的蛋白质印迹分析。在 95°C 用 4x SDS-PAGE 加样缓冲液(终浓度 62.5mM Tris pH6.8, 3% β -巯基乙醇, 8% SDS, 15% 甘油) 将总裂解物处理 5 分钟。使 20 μ g 总蛋白质电泳移动并且转至 PVDF 膜。用封闭缓冲液(5% 脱脂奶粉, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.05% Tween-20) 封闭 30 分钟后, 将膜与以如下稀释的初级抗体一起在 4°C 温育过夜: 抗-纤维蛋白原 pAb 1:500 (Acris Antibodies), 抗-纤维蛋白原 pAb 1:1000 (Abcam, UK), 和抗-肌动蛋白 mAb 1:75.000 (Dianova)。在用 TBS-T (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.05% Tween-20) 的洗涤步骤后, 将膜与以 1:5000 稀释的 HRP-缀合的驴抗-家兔 IgG (对于纤维蛋白原和闭合蛋白) (Dianova, Germany) 或驴抗-小鼠 IgG (对于肌动蛋白) (Dianova, Germany) 一起温育 1h 并且最终使用 ECLplus (GE Healthcare) 展开 (Kraft 等人, Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficient mice are susceptible to intracerebral thrombosis and ischemic stroke. PLoS One 2010)。

[0104] 统计学

[0105] 将全部结果表示为平均值 $\pm$ 标准偏差 (s.d.), 除去描述为散布图的顺序功能结果等级 (包括具有文本中括号内给出的 25% 百分率和 75% 百分率的中位值)。通过事前检力分析 (priori power analysis) 与如下假设计算检测有关梗死体积 ≥ 0.15 的标准化效应大小的实验次数: $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.2$, 平均值, 平均值的标准偏差 10%。为了进行统计学分析, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件包 (La Jolla, CA, USA)。使用 D'Agostino 和 Pearson 综合正态性检验测试数据的高斯分布, 然后通过单因素方差分析或在测定两种因素同时的两因素方差分析的效应的情况中使用 p 值的事后 Bonferroni 调整进行分析。通过克-瓦二氏检验与事后 Dunn 多重比较检验比较非参数功能结果评分。为了比较存活曲线, 使用时序检验。通过不对的双尾学生 t-检验 (中风大小、脑水肿) 或非参数曼-怀二氏检验 (功能评分) 比较大鼠数据。将 P-值 < 0.05 视为具有统计学显著性。

[0106] 结果

[0107] 测定缺血性发作后较长时间期限内 C1-INH-治疗小鼠和对照组的功能结果和死亡率 (图 1a, b)。在 60 分钟 tMCAO 后 7 天, 10 只对照组小鼠中的 9 只 (90%) 已经死亡, 这与在先的报告一致 (Kleinschnitz 等人, PLoS Biol 2010)。相反, 用 7.5U C1-INH 治疗的 10 只小鼠中的 7 只 (70%) 和用较高剂量的 15.0U C1-INH 治疗的 10 只小鼠中的 9 只 (90%) 存活至第 7 天 (分别为 $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$) (图 1a)。与这些发现一致, 接受 15.0U C1-INH 的小鼠在梗死发展的晚期阶段即在 tMCAO 后的第 5 天时的 Bederson 评分方面也明显优于对照组 (Bederson 评分: 分别为中位值 2.0 [2.0, 3.0] [对照组] 与 0.0 [0.0, 1.0] [15.0U]; $p < 0.01$) (图 1b)。

[0108] C1-INH 通过使接触-激肽系统的关键蛋白酶例如因子 XIIa 或血浆激肽释放酶失活在调节血管通透性和抑制炎症方面起重要作用 (Alvin E. Davis III, Pedro Mejia, Fengxin Lu, Molecular Immunology 2008)。因此, 解决了缺血性半球中的血脑屏障损害和水肿形成程度。在 tMCAO 后的第 1 天时, 根据血管示踪剂伊文思蓝渗漏入脑实质的体积所确定的血脑屏障完整性在中风后 1h 用 15.0U C1-INH 治疗的小鼠中得到保护且在注射 7.5U C1-INH 后与使用首次用于实验的对照组治疗相比显著性也较低 (平均值 $51.6 \pm 30.6 \text{ mm}^3$ [对照组] 分别对比 $33.1 \pm 25.0 \text{ mm}^3$ [7.5U] 或 $13.9 \pm 11.4 \text{ mm}^3$ [15.0U]; $p < 0.05$ [对照组对比 15.0U]) (图 2a)。这一发现与治疗 C1-INH 施用后继发性脑水肿形成显著减少相关 (湿/干重

法)(平均值 $4.3 \pm 1.1\%$ [对照组]分别对比 $2.9 \pm 1.0\%$ [7.5U]或 $0.2 \pm 0.9\%$ [15.0U]; $p < 0.0001$ [对照组对比15.0U])(图2b),即也在大鼠中得到证实的结果(图3)。重要的是,在脑区域中几乎未发现血脑屏障破坏(基底神经节),其中在C1-INH-治疗的小鼠中也有规则地存在梗死(图2a,箭头)。这表明在C1-INH组观察到的较小水肿是特定现象且机理相关,但并非简单地归因于这些动物中梗死体积较小。

[0109] 还分析了C1-INH-治疗的小鼠和对照组的缺血性脑中的内皮缩血管肽-1的表达。已经证实内皮缩血管肽-1关键地参与调节不同病理生理学条件下(包括缺血性发作)的血管完整性和水肿形成(Matsuo Y, Mihara Si, Ninomiya M, Fujimoto M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 2001;32:2143-2148; Barone FC, Globus MY, Price WJ, White RF, Storer BL, Feuerstein GZ, Busto R, Ohlstein EH. Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:337-342)。tMCAO后24h,在媒介物-治疗的小鼠和接受7.5U C1-INH的小鼠与假拟操作的小鼠相比的皮质和基底神经节中内皮缩血管肽-1mRNA水平显著升高(相对基因表达皮质: 1.0 ± 0.2 [假拟]分别对比 16.0 ± 6.3 [对照组]或 15.6 ± 6.8 [7.5U], $p < 0.0001$;相对基因表达基底神经节: 1.0 ± 0.2 [假拟]分别对比 4.3 ± 1.2 [对照组]或 4.2 ± 1.5 [7.5U], $p < 0.0001$)(图2c)。相反,在用15.0U C1-INH治疗后的脑区域中未观察到内皮缩血管肽-1转录物的显著性诱导($p > 0.05$)。此外,内皮缩血管肽-1表达在高剂量(15.0U)C1-INH治疗后的基底神经节中也保持较低(图2c),不过,在所有动物中包括均匀地进入梗死区域的基底神经节。

[0110] 与C1-INH在中风中的血脑屏障稳定效应一致,在来自用15.0U C1-INH治疗的小鼠的缺血性基底神经节血管中针对紧密连接蛋白闭锁蛋白的免疫反应性得以保护,但是在对照组小鼠或接受7.5U C1-INH的小鼠中得到减量调节,正如免疫组织化学所显示的。为了更具体地对闭锁蛋白的蛋白质表达进行定量,还进行了蛋白质印迹分析(图2d)。此外,tMCAO后第1天时来自未治疗小鼠的缺血性基底神经节中的闭锁蛋白的量较低(光密度: 0.08 ± 0.10)。相反,在用7.5U C1-INH治疗后可分别明显地检测到更多的闭锁蛋白(光密度: 0.6 ± 0.3 , $p < 0.05$)或15.0U(光密度: 0.5 ± 0.2 , $p < 0.05$)。

[0111] 已经通过结合细胞粘附分子证实了C1-INH抑制细胞从脉管系统迁移至炎症部位(Cai S, Davis III, AE, 2004, *J Immunol*)。因此,已经通过免疫细胞化学法对侵入缺血性脑的免疫细胞的数量进行了定量。在诱导tMCAO后24h,相比中风后1h用15.0U C1-INH治疗的小鼠,明显多的中性粒细胞(平均值 299.1 ± 138.1 [对照组]对比 107.2 ± 109.5 [15.0U], $p < 0.05$)以及巨噬细胞/小神经胶质细胞(平均值 676.3 ± 150.4 [对照组]对比 117.1 ± 64.9 [15.0U], $p < 0.0001$)进入未治疗对照组小鼠的缺血性基底神经节。相反,较低剂量的7.5U C1-INH不能减少局灶性脑缺血后的细胞运输($p > 0.05$)。

[0112] C1-INH还对FXIIa发挥作用,其为血凝的内源性途径的主要激活物(Alvin E. Davis III, Pedro Mejia, Fengxin Lu, *Molecular Immunology* 2008)。因此,我们分析了C1-INH对脑缺血/再灌注损伤后血栓形成活性的影响。实际上,通过蛋白质印迹检测,在缺血性皮质中纤维蛋白(原)的量(平均光密度 2.8 ± 1.1 [对照组]分别对比 1.7 ± 0.8 [7.5U]或 0.03 ± 0.02 [15.0U]; $p < 0.0001$ [对照组对比15.0U])和基底神经节中纤维蛋白(原)的量(平

均光密度 2.8 ± 1.0 [对照组]对比 1.2 ± 0.7 [7.5U]或 0.3 ± 0.2 [15.0U]; $p < 0.001$ [对照组对比15.0U])在中风后第1天时在诱导tMCAO后1h施用高剂量(15.0U)C1-INH后显著减少(图4a)。因此,在C1-INH-治疗的小鼠中微血管开放性比首次用于实验的对照组增加(血栓形成指数: 15.8 ± 3.0 [对照组]分别对比 12.2 ± 2.8 [7.5U]或 9.8 ± 2.4 [15.0U]; $p < 0.05$ [对照组对比15.0U])(图4b)。重要的是,当在延迟环境即tMCAO后6h施用C1-INH时,在皮质和基底神经节中血栓形成活性仍然显著减少(图5)。

[0113] 在尝试延长外源性施用的C1-INH的治疗时间窗的过程中,C57B1/6小鼠还在延迟环境中即再灌注开始后5h(即诱导tMCAO后6h)接受7.5U或15.0U C1-INH。最值得注意的是,在第1天时,在15.0U C1-INH组中,神经性功能障碍比7.5U C1-INH组或对照组动物仍然显著减少(Bederson评分:中位值3.0[3.0,4.0][对照组]分别对比3.0[2.0,3.0][7.5U]或3.0[1.0,3.0][15.0U], $p < 0.05$;握力试验评分中位值3.0[1.0,4.0][对照组]分别对比4.0[3.0,4.0][7.5U]或4.0[3.0,5.0][15.0U], $p < 0.05$)(图6)。

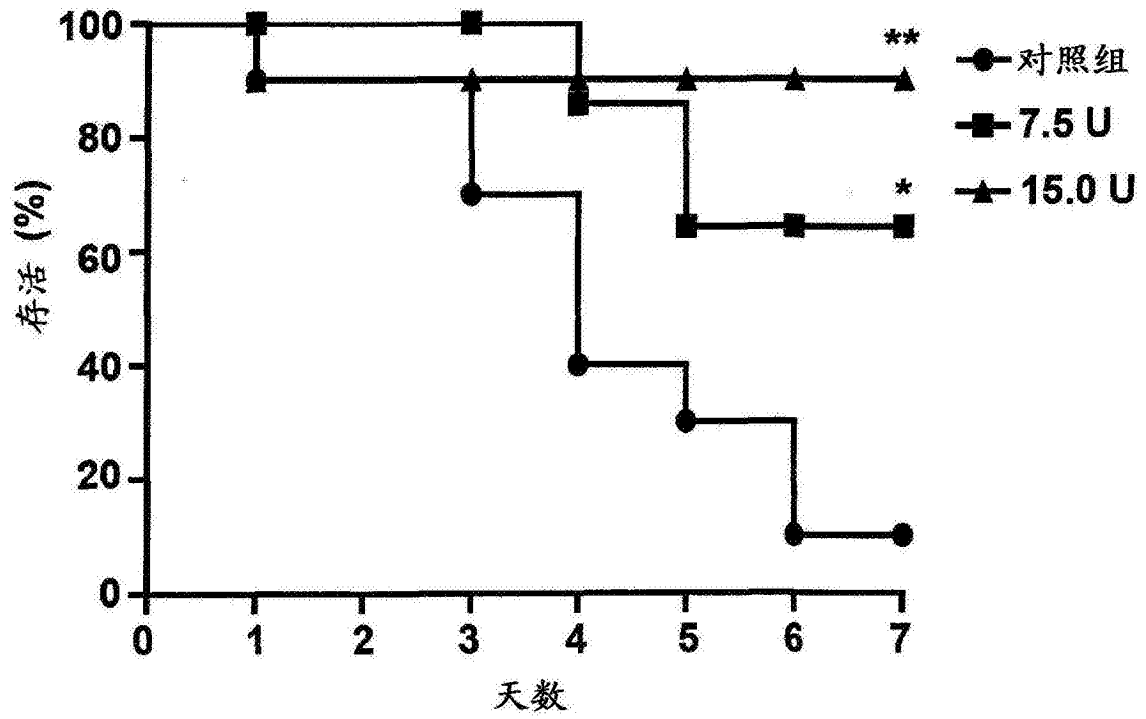


图1a

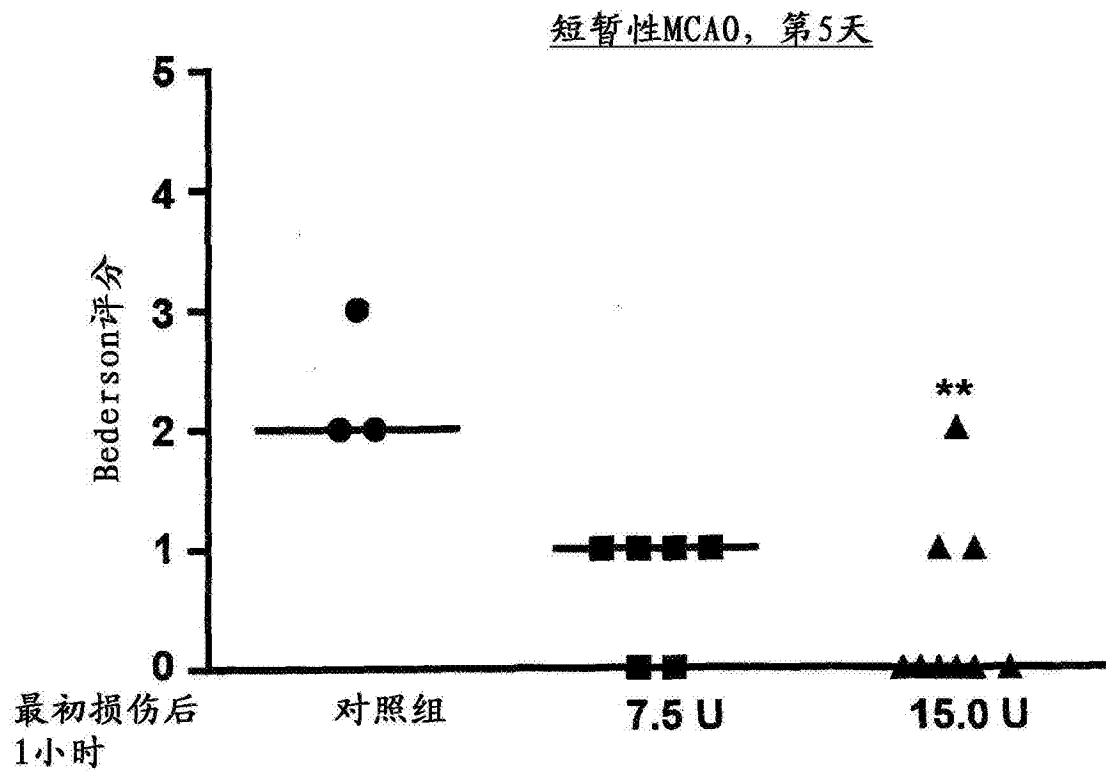


图1b

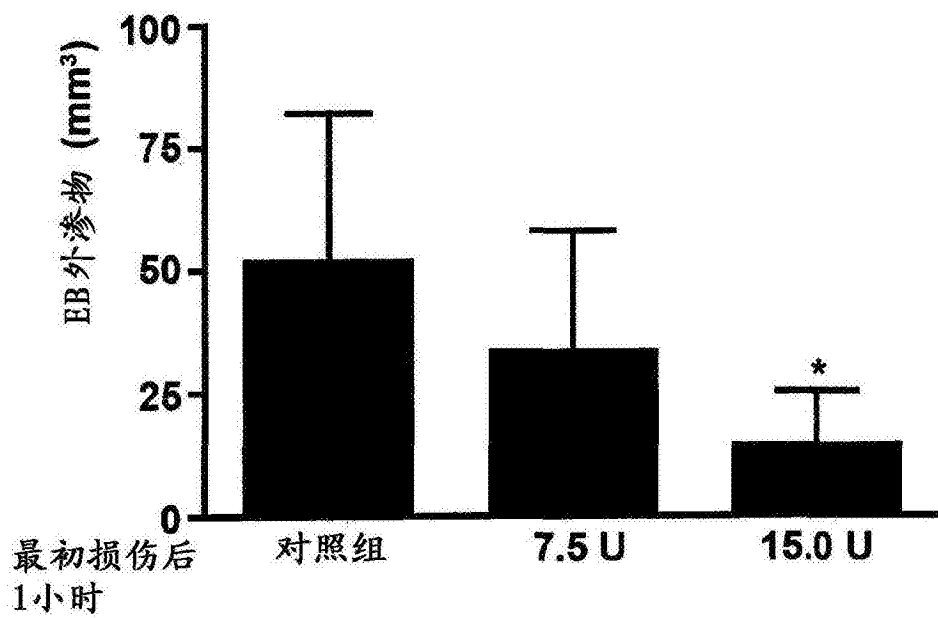
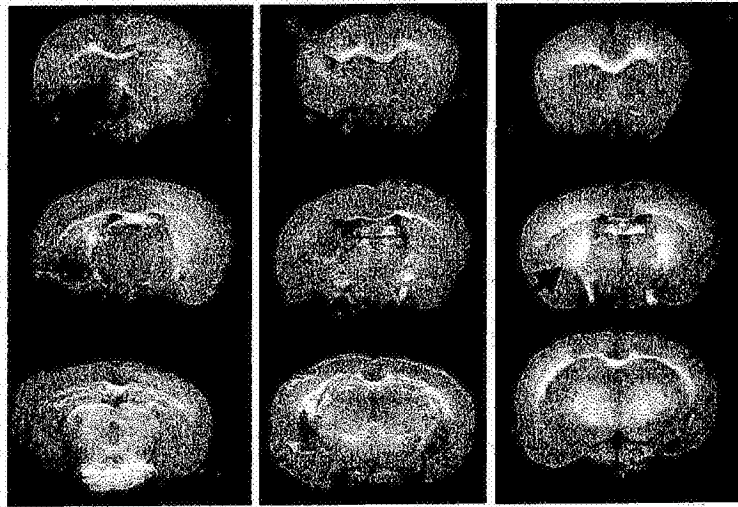
短暂性MCAO, 第1天

图2a

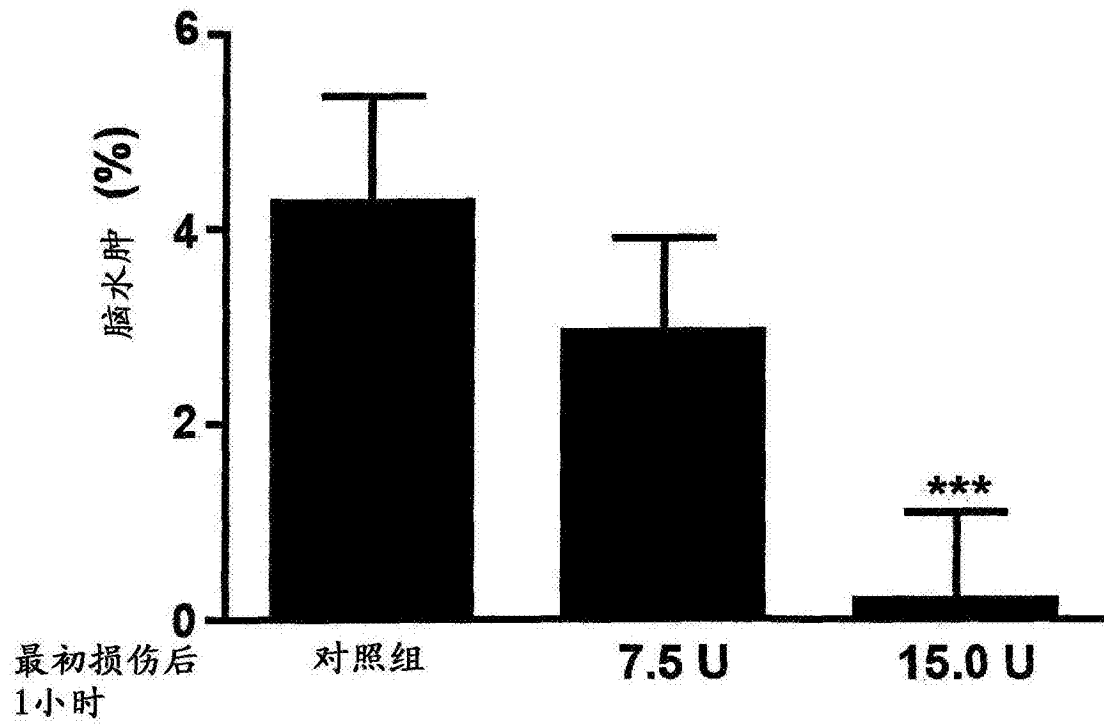


图2b

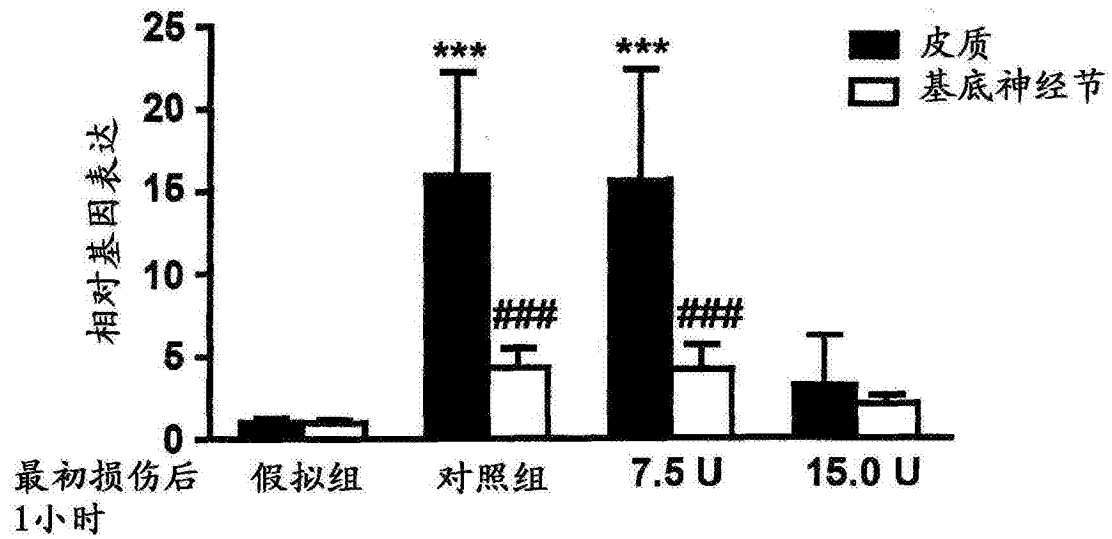
内皮缩血管肽-1

图2c

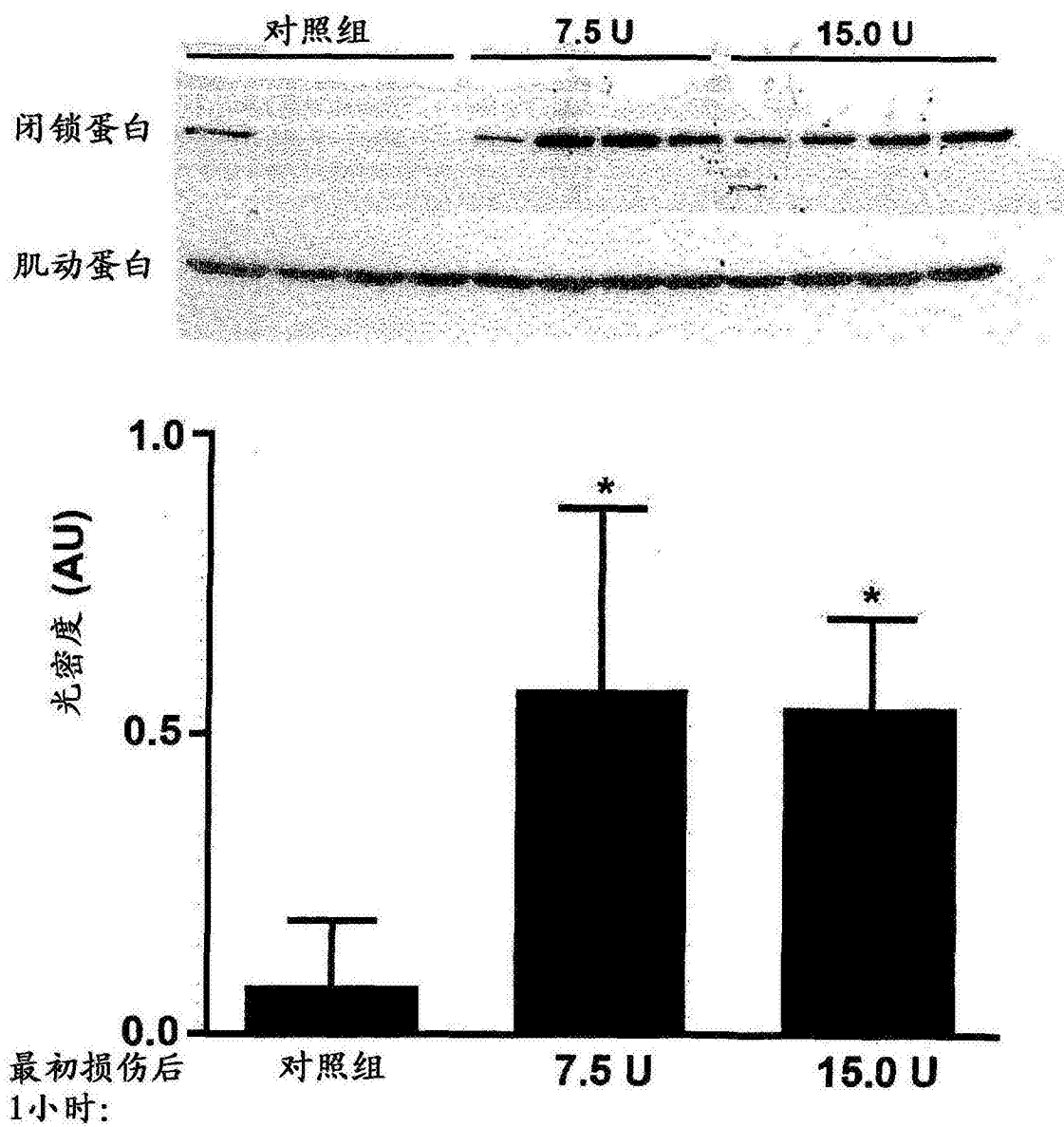


图2d

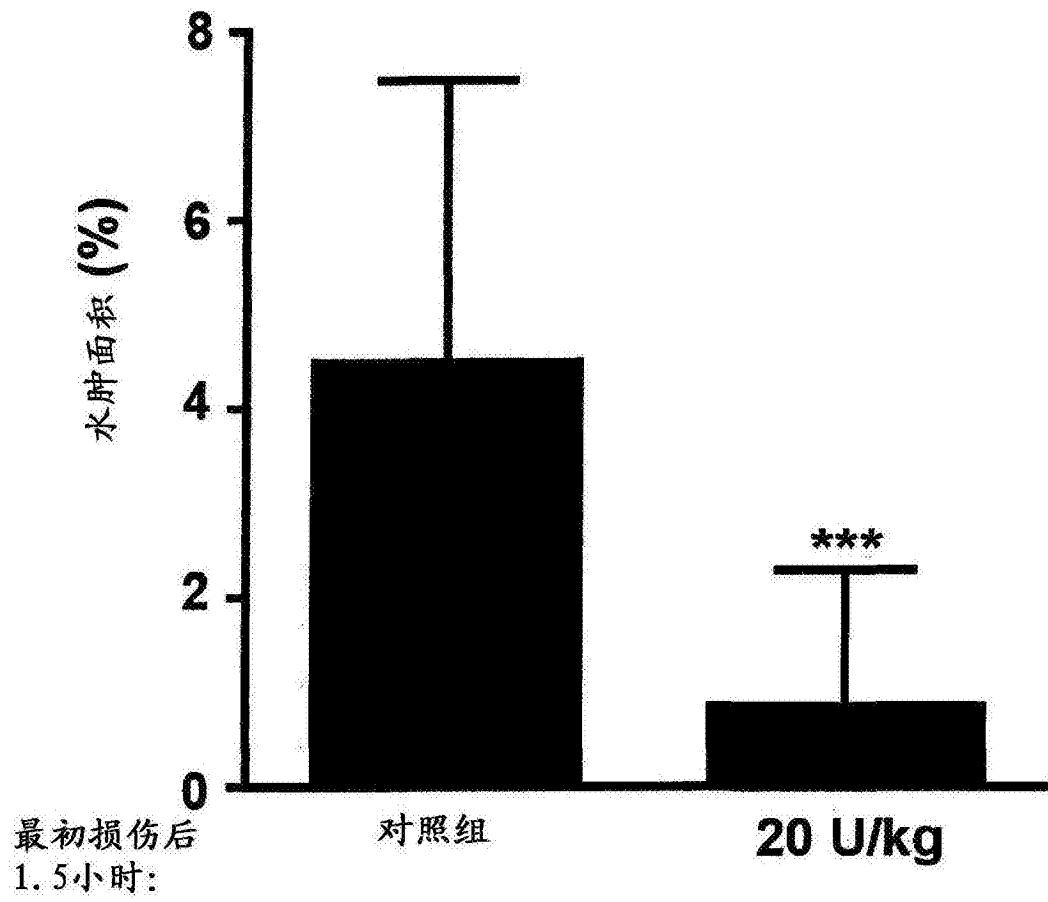


图3

短暂性MCAO, 第1天

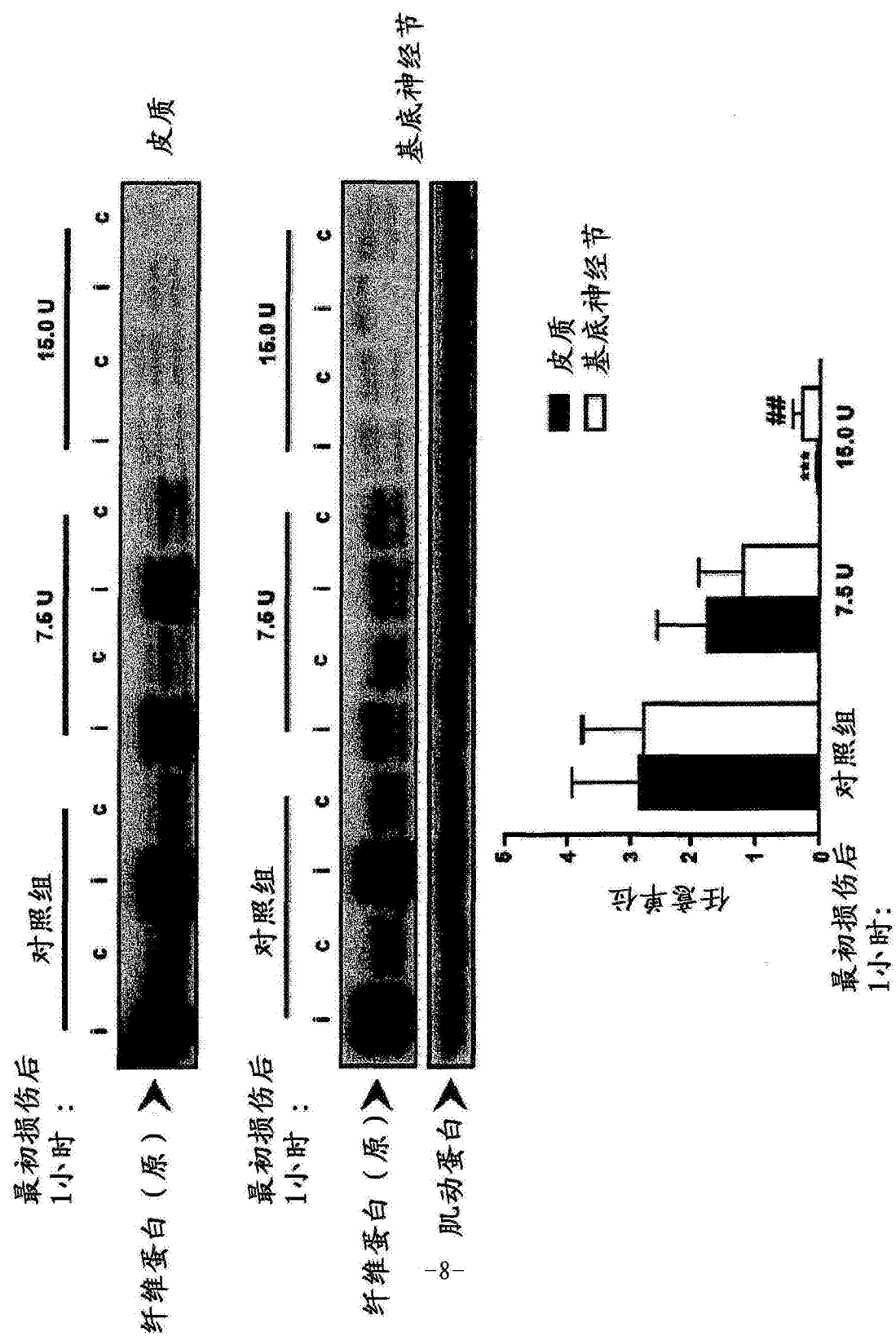


图4a

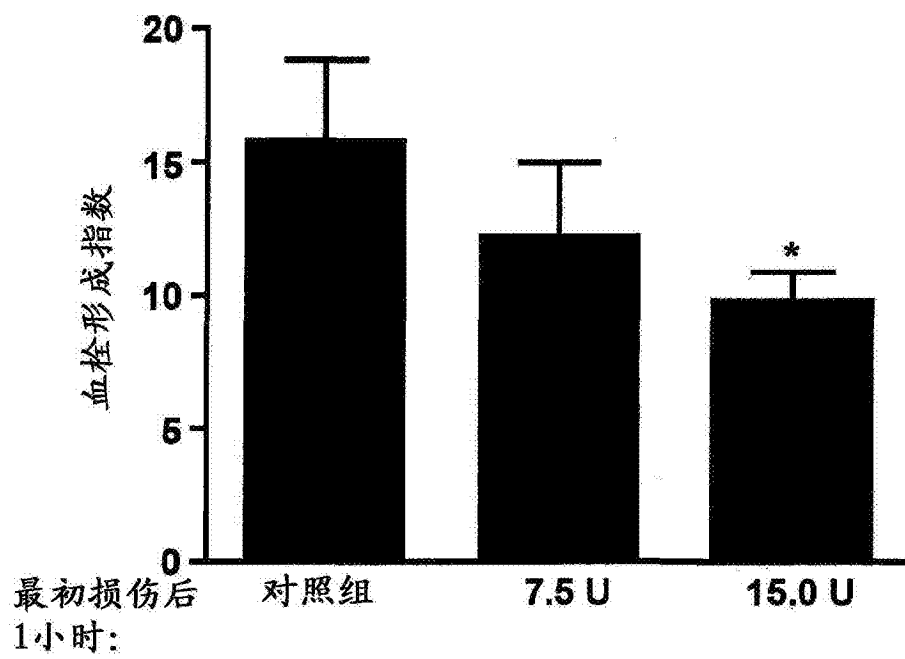
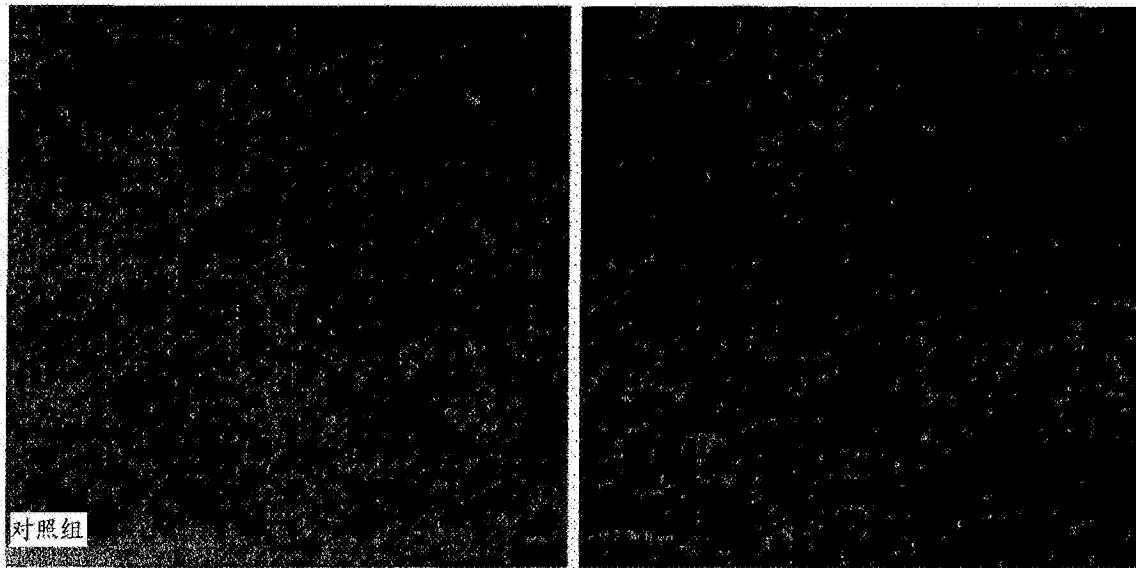
基底神经节，第1天

图4b

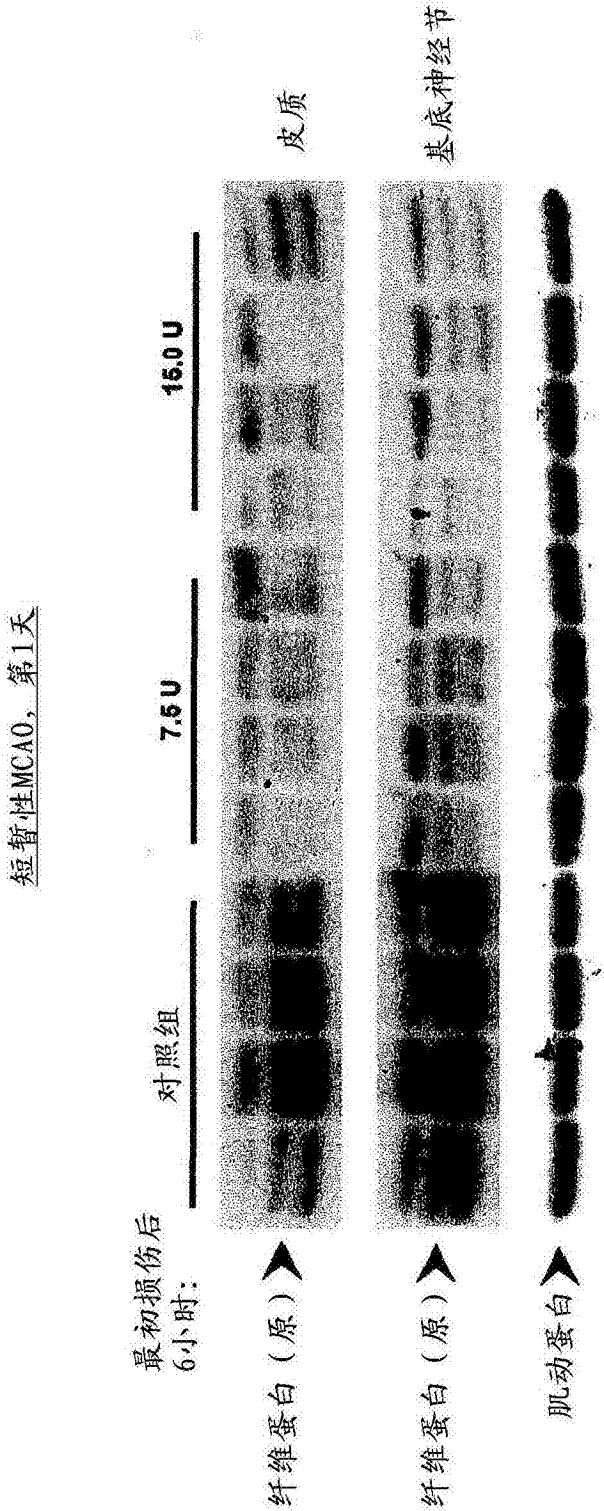


图5

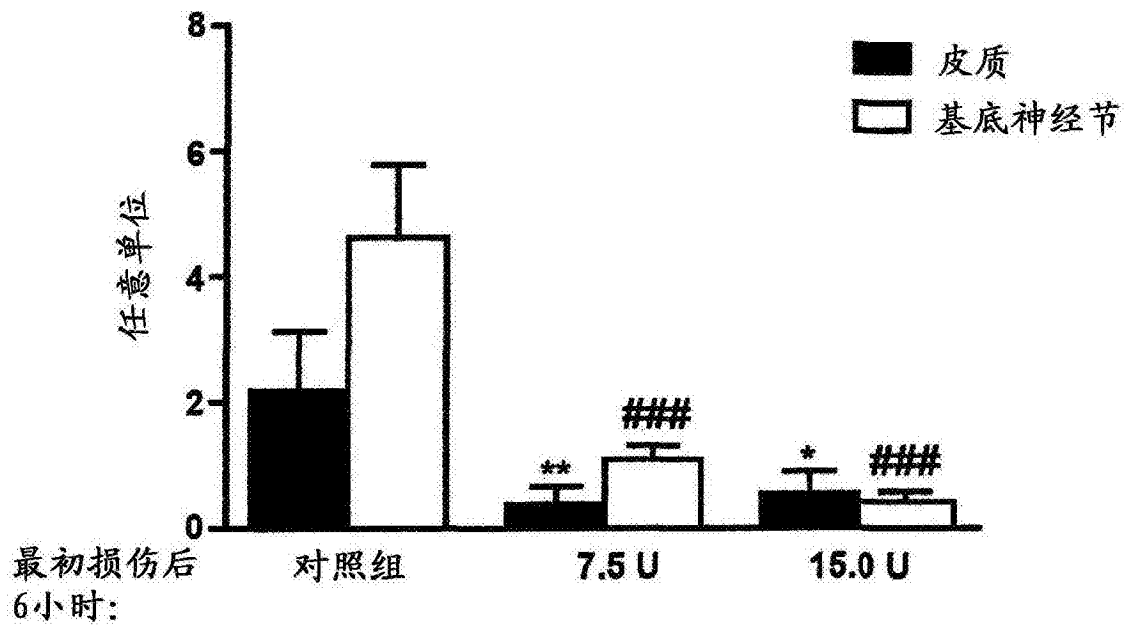


图5(续)

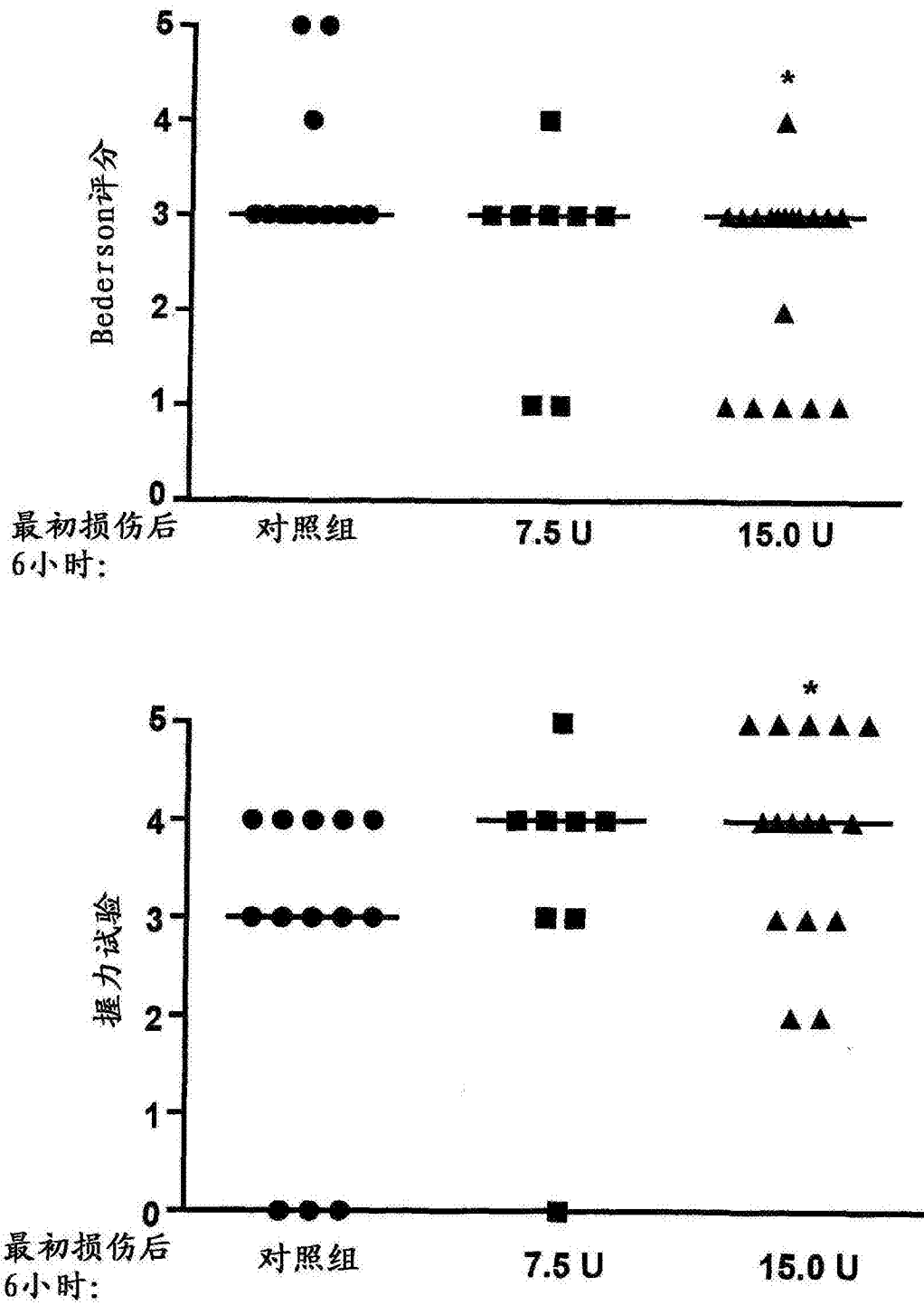


图6