



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106619700 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611216078.2	A61P 17/02(2006.01)
(22)申请日 2010.03.04	A61P 25/00(2006.01)
(30)优先权数据	A61P 17/00(2006.01)
61/157,215 2009.03.04 US	A61P 17/14(2006.01)
(62)分案原申请数据	A61P 17/06(2006.01)
201080018569.0 2010.03.04	A61P 17/08(2006.01)
(71)申请人 瑞吉纳拉制药公司	A61P 3/04(2006.01)
地址 以色列雷霍沃特市	A61P 31/00(2006.01)
(72)发明人 Z·哈赞	A61P 41/00(2006.01)
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245	A61P 35/00(2006.01)
代理人 赵蓉民 王永伟	A61P 9/10(2006.01)
(51)Int.Cl.	A61P 11/00(2006.01)
A61K 31/745(2006.01)	
A61K 36/22(2006.01)	

权利要求书3页 说明书41页 附图15页

(54)发明名称

乳香部分的治疗应用

(57)摘要

一种乳香部分的治疗应用。本发明涉及包含聚合月桂烯的药物组合物和制剂。更具体地,本发明涉及包含在疏水载体中聚合月桂烯分离组分的组合物和制剂,其维持活性聚合物的生物活性。

1. 包含乳香分离组分和药学上可接受的载体的组合物在制备用于治疗伤口的药物中的应用, 并且特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂, 并且其中所述乳香分离组分基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物, 其中所述极性有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合; 其中所述非极性有机溶剂选自戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯及其异构体和混合物。

2. 根据权利要求1所述的应用, 其中所述伤口选自静脉溃疡、压力性溃疡、糖尿病足部溃疡、烧伤、截肢伤口、褥疮性溃疡(褥疮)、分层皮供体移植、植皮供区、医疗装置植入位点、咬伤伤口、冻伤伤口、刺伤伤口、弹片伤口、皮肤磨擦术、挫伤、感染伤口和外科伤口。

3. 根据权利要求1所述的应用, 其中所述药物被配制以通过选自口服、局部、肠胃外和经皮的途径给药。

4. 根据权利要求1所述的应用, 其中所述药物被配制以通过选自静脉内、肌内、皮下、皮内、腹膜内、动脉内、脑内、脑室内、骨内和鞘内的肠胃外途径给药。

5. 根据权利要求1所述的应用, 其中所述药物被配制以通过局部施用给药, 所述局部施用选自皮肤、阴道、直肠、吸入、鼻内、眼部、耳部和颊部。

6. 包含治疗有效量的乳香分离组分的组合物在制备用于诱导神经元细胞类型的细胞分化的药物中的应用, 其中所述分离组分的特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂, 并且基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物, 其中所述极性有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合; 其中所述非极性有机溶剂选自戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯及其异构体和混合物。

7. 根据权利要求6所述的应用, 其中所述药物被配制以通过选自口服、局部、肠胃外和经皮的途径给药。

8. 包含乳香分离组分和药学上可接受的载体的组合物在制备用于治疗皮肤或头皮病症的药物中的应用, 并且特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂, 并且其中所述乳香分离组分基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物, 其中所述极性有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,

2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合；其中所述非极性有机溶剂选自戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯及其异构体和混合物。

9. 根据权利要求8所述的应用，其中所述皮肤或头皮病症选自脱毛症、湿疹、牛皮癣、脂溢性角化病和皮脂溢。

10. 根据权利要求8所述的应用，其中所述药物被配制以通过选自口服、局部、肠胃外和经皮的途径给药。

11. 根据权利要求8所述的应用，其中所述药物被配制以通过选自静脉内、肌内、皮下、皮内、腹膜内、动脉内、脑内、脑室内、骨内和鞘内的肠胃外途径给药。

12. 包含乳香分离组分和药学上可接受的载体的组合物在制备用于治疗组织损伤的药物中的应用，并且特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂，并且其中所述乳香分离组分基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物，其中所述极性有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合；其中所述非极性有机溶剂选自戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯及其异构体和混合物。

13. 根据权利要求12所述的应用，其中所述组织损伤与损伤或创伤相关，所述损伤或创伤选自心肌梗塞、肺栓塞、脑梗塞、外周动脉闭塞症、疝、脾梗塞、静脉溃疡、轴索断裂、感染和外科手术程序。

14. 根据权利要求12所述的应用，其中所述药物被配制以通过选自口服、局部、肠胃外和经皮的途径给药。

15. 根据权利要求12所述的应用，其中所述药物被配制以通过选自静脉内、肌内、皮下、皮内、腹膜内、动脉内、脑内、脑室内、骨内和鞘内的肠胃外途径给药。

16. 根据权利要求1所述的应用，其中所述乳香从黄连木属物种获得，所述黄连木属物种选自乳香黄连木、大西洋黄连木、*P. palestina*、*P. saportae*、黑黄连木、*P. vera*和全缘叶黄连木。

17. 包含乳香分离组分和药学上可接受的载体的组合物在制备用于治疗肥胖的药物中的应用，并且特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂，并且其中所述乳香分离组分基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物，其中所述极性有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸

丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合；其中所述非极性有机溶剂选自戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯及其异构体和混合物。

18. 包含乳香分离组分和药学上可接受的载体的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的应用，并且特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂，并且其中所述乳香分离组分基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物，其中所述极性有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合；其中所述非极性有机溶剂选自戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯及其异构体和混合物。

19. 根据权利要求18所述的应用，其中所述癌症选自黑素瘤和成神经细胞瘤。

乳香部分的治疗应用

[0001] 本申请是分案申请，原申请的申请日为2010年03月04日，申请号为201080018569.0 (PCT/IL2010/000183)，发明名称为“乳香部分的治疗应用”。

发明领域

[0002] 本发明涉及乳香以及其中所发现的化合物包括聚合月桂烯的治疗应用。更具体地，本发明涉及用包含聚合月桂烯的组合物治疗神经功能缺损的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 对得自植物和植物产品、用于多种治疗应用的新药物实体的追寻来源于古代并持续至今。一种这样的来源是乳香 (mastic)，也被称为乳香 (gum mastic) 或乳香 (mastic gum)，其是作为漆树科 (Anacardiaceae) 成员洋乳香树 (*Pistacia lentiscus* L) 的渗出物获得的树脂。乳香在古地中海世界被用于胃肠功能紊乱，如胃痛、消化不良和消化性溃疡。已公开向患有十二指肠溃疡的人类患者和患有诱发性胃溃疡和十二指肠溃疡的实验大鼠口服给予乳香具有治疗作用 (Al-Habbal等 (1984) *Clin Exp Pharmacop Physio* 11 (5) : 541-4; Said等 (1986) *J Ethnopharmacol* 15 (3) : 271-8)。虽然已公开乳香对幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) ——引起消化性溃疡病的病原体——具有体外杀菌作用 (Marone等 (2001) *J Chemother* 13:611-614)，但其他报道公开了乳香在被给予幽门螺旋杆菌 (*H. pylori*) 阳性人类患者 (Bebb等 (2003) *J Antimicrob Chemother* 52:522-23) 或给予实验感染小鼠 (Loughlin等 (2003) *J Antimicrob Chemother* 51:367-371) 时不发挥抗细菌活性。

[0005] 希腊专利号GR 1,003,541公开了提取自*Pistacia lentiscus* var *Chia*的叶、枝和果实的chios乳香油的抗微生物和抗真菌作用。希腊专利号GR 1,003,868公开了得自*Pistacia lentiscus* var. *Chia*的产物作为抗氧化剂、作为伤口愈合诱导剂和作为细胞生长抑制剂的应用。

[0006] 美国专利申请公开号2005/0238740公开了提取自乳香树脂的某些组分呈抗微生物和抗细胞增殖活性。根据该公开，第一提取物 (被称为“总组分”或“全部提取物”) 包含除聚合物树脂外的乳香的所有化合物；第二提取物是包含总组分所有三萜酸的酸性组分，第三提取物是包含总组分所有其他萜烯的中性组分。还公开了通过蒸馏得到的精油，其包含单萜，包括 β -月桂烯。该申请公开了药物制剂，其包含任选地与精油组合的上述总组分、酸性组分或中性组分中的任意组分或其合成的等同物，或包含分离的成分产物或其合成的等同物；及其在用于治疗微生物感染的方法中的应用，该微生物感染包括幽门螺旋杆菌、丙酸杆菌 (*Propionibacterium*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和细胞过度增殖。被上述专利申请的发明人中的一些授权的Paraschos等 (2007) 公开了不含聚合物 (TMEWP) 的总乳香提取物的制备，其通过对粗乳香进行极性溶剂萃取并从其中去除不溶性聚合物聚- β -月桂烯以及从TMEWP分离酸性和中性组分而制备 (Paraschos等 (2007) *Antimicrob Agents Chemother* 51 (2) : 551-559)。根据该公开，向幽门螺旋杆菌感染的小鼠给予TMEWP 3个月时间造成细菌定殖30倍减少，很大程度上归因于从酸性组分纯化的特

定化合物。作者指出,由于推测在前研究所用的粗乳香制品中高百分比的聚- β -月桂烯阻碍在口服给药过程中潜在的体内活性,因此制备了TMEWP。作者进一步公开,聚- β -月桂烯的去除造成具有抗幽门螺旋杆菌活性的治疗部分增强。

[0007] EP专利申请号1520585公开了得自黄连木属 (*Pistacia*) 植物的产物对于生产治疗或预防癌症的药物的应用。根据该公开,从不同黄连木属物种的叶、枝、果实、坚果和花蒸馏出的精油包含不同比例的大量单体萜烯化合物,特别是 β -月桂烯。该申请还公开了油对某些肿瘤细胞系如结肠和卵巢腺癌具有活性,以及乙酸龙脑酯是唯一一个被发现具有抗癌活性的成分。

[0008] 国际专利申请公开号WO 2005/112967公开了从乳香提纯具有抗增殖作用的抗癌物质,该抗癌物质被发现于可溶性组分中,该可溶性组分通过如下得到:将乳香悬浮在溶剂中,该溶剂选自非酸性脂肪烃、包含至少25%水溶性非酸性脂肪烃的水溶液或其组合;和去除不溶性组分。该申请还公开了治疗癌症细胞的方法,包括给予药学有效量的乳香树脂组分,该组分抑制癌症细胞的生长。根据该公开,抗癌化合物对于多种癌症细胞包括人类结肠癌症细胞均有效。

[0009] Van der Berg等(1998)公开了利用萃取和尺寸排阻层析分离和纯化乳香的聚合物组分(Van der Berg等(1998) *Tetrahedron Lett* 3:2645-2648)。根据该公开,该聚合物具有宽的分子量分布,即20,000至100,000Da,由136Da的单体单元组成,并且具有1,4-聚- β -月桂烯的结构,其顺式与反式构型的比例为3:1。作者认为,其公开是天然存在的单萜聚合物的首次报道。

[0010] Barra等(2007)公开了从洋乳香树 (*P. lentiscus* L.) 对精油的萃取和气相色谱分析(Barra等(2007) *J Agric Food Chem* 55 (17):7093-7098)。根据该公开,确定了共45种化合物,包括 β -月桂烯作为其中一种主要化合物。Marner等(1991)公开了从乳香黄连木 (*P. lentiscus*) 的乳香中确定多种三萜类(Marner等(1991) *Phytochemistry*, 30, 3709-3712)。

[0011] 美国专利号5,506,406公开了乳香油,其通过将乳香溶于油或脂肪产生,并被装入软胶囊,该软胶囊任选地进一步包含两亲性物质,如几丁质或壳聚糖。根据该公开,该胶囊有效消除和抑制幽门螺旋杆菌以及减少粪便的气味。

[0012] 美国专利号5,637,290公开了口腔卫生产品,其包括牙膏和选自以下的成分的组合:天然乳香、提取的乳香油和合成的乳香油剂。还公开了将乳香引入防晒霜、护发产品和化妆品的应用。

[0013] 美国专利号6,623,728公开了美容护肤乳液组合物,其包含约0.001wt%至约10wt%的溶解乳香;挥发性水混溶性溶剂;和美容上可接受的载体。根据该公开,该乳液优选为水包油乳液,并且优选的溶剂包括乙醇、甲醇、丙醇、异丙醇及其混合物。根据该公开,使用同种溶剂得到溶解的乳香。

[0014] 美国专利号6,811,769公开了口服组合物,其包含乳香的油提取物,如用橄榄油或棕榈油制备的油提取物;和消炎剂,如甘草酸。根据该公开,该组合物对牙周病相关细菌和对龋齿相关细菌具有抗细菌作用。

[0015] 美国专利号7,294,651公开了类异戊二烯化合物——特别是萜烯化合物——对于抑制革兰氏阳性细菌胞外蛋白质——如金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 产生的毒性休克综合

征毒素(Toxic Shock Syndrome Toxin)-1——生成的应用。根据该公开,适当的萜烯可以是环状的或无环的、饱和或不饱和的,并且除其他外还包括聚萜烯。还公开了这种化合物对于制备可被掺入水溶液的组合物如阴道清洁制剂的应用。

[0016] 美国专利号4,564,718公开了功能终止聚合物的制备——该功能终止聚合物被称为“液体橡胶”,具有基本低于室温的玻璃化转变温度——其通过如下制备:具有可用于聚合的双键或共轭双键的萜烯或其氧衍生物与提供所需功能终止的引发剂聚合。根据该公开,该聚合物优选具有500至20,000的分子量,并且用于其制备的优选无环单萜为 β -月桂烯及其他。该专利公开了分子量约2000和约4000的聚合月桂烯的制备。该专利进一步公开了该发明的聚合物可与其他试剂进一步反应,提供弹性剂、密封剂或粘合剂,或其可用作橡胶增韧剂。进一步公开了从月桂烯制备羟基封端的聚月桂烯,及其对于制备聚氨酯弹性剂的应用。

[0017] Newmark等J.Polymer Sci 26,71-77 (1988) 公开了具有观测分子量87,000和计算分子量46,000的聚月桂烯的合成。

[0018] 美国专利号4,374,957公开了粘性热塑性弹性线性三嵌段聚合物,其相应于式A-B-A,其中A是单乙烯基芳烃的非弹性线性均聚物嵌段,其平均分子量在10,000和60,000之间,且玻璃化转变温度在70°C以上,其中B是月桂烯的弹性均聚嵌段,其平均分子量在50,000和200,000之间,且玻璃化转变温度在约-40°C以下。

[0019] 美国专利号5,759,569公开了可生物降解可堆肥的制品,其至少部分包含某些反式聚合物,其中该聚合物具有至少约20,000的重均分子量,并且通过聚合单体成分制成,该单体成分包括:(1)约70至100摩尔%的1,3-二烯,特别是 β -月桂烯;和(2)高达约30摩尔%的其他相容的共聚单体。根据该公开,该制品除其他外包括包装材料;一次性吸收剂制品(例如,尿布、卫生棉);服装制品,如防护衣、手术帘、手术衣、手术单;机织、编织和非机织织物;手术海绵、棉球涂药器、一次性注射器和容器。

[0020] 美国专利号7,232,872和7,214,750公开了聚合方法,包括使一种或多种单体——特别是月桂烯、一种或多种路易斯酸、一种或多种引发剂和含有一种或多种氢氟碳的稀释剂在反应器中接触。

[0021] 美国专利申请公开号2007/0179260和美国专利号7,417,103公开了高方向规整度(regioregularity)的基于3,4-异戊二烯的聚合物及其制备方法。根据这些公开,该聚合物的数均分子量为5000至6,000,000,并且该聚合物也可包含1,4-异戊二烯如月桂烯单元。根据该公开,该聚合物由于其机械耐久性和热耐久性适用作塑料材料。

[0022] 现有技术未公开乳香或其组分对于治疗神经系统疾病的应用。现有技术未教导或暗示任何分离的乳香组分在用于治疗神经系统疾病的组合物中的应用。现有技术也未教导或暗示无论得自乳香或化学合成的分离的聚合月桂烯组分有利地用作药物组合物或治疗应用中的活性成分。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明提供了具有神经保护性和神经再生性的组合物和用其治疗一系列神经系统疾病和病症的方法。更具体地,现公开包含提取自乳香的分离组分(馏分, fraction)的组合物具有神经保护活性,并可用于促进神经元细胞类型及其他细胞类型的分化和成熟。

[0025] 本发明部分基于如下意外的发现:乳香的分离组分呈神经保护和神经再生生物活

性,其可用于多种治疗用途。更具体地,包含这种分离组分的组合物具有诱导多种细胞型——包括神经元细胞类型——细胞分化的活性。已在多种细胞系中观测到分化诱导活性,包括来自外胚层、中胚层和内胚层谱系的多种细胞类型。

[0026] 可用本领域已知的乳香分离组分和提取物中的任一种实践本发明所述的新方法和治疗。但是,本发明进一步公开,一些包含较高分子量乳香成分的选定组分尤其有益于在本发明所述组合物和方法中的应用。

[0027] 已知乳香提取物包含聚合形式的单萜化合物,其被称为月桂烯。由此进一步首次公开的是,包含聚合月桂烯的乳香分离组分可用作治疗神经退行性疾病的药物组合物的活性成分。适于用本发明的组合物治疗的疾病包括不同类型的痴呆,包括但不限于阿尔茨海默病、中风和帕金森病。同样首次公开的是,聚合月桂烯的分离组分,无论得自植物来源或化学合成,均可用作治疗神经退行性疾病和治疗组织损伤的药物组合物的活性成分。

[0028] 本发明的教导已经由包含聚合月桂烯的乳香分离组分和由化学合成的聚合月桂烯——相应于从乳香分离的聚合物——示例。本发明相对于现有技术教导尤其令人惊讶并且意外,现有技术教导公开了已去除聚合月桂烯的乳香提取物组分对于不同治疗适应症的应用。此外,现有技术认为,得自乳香的聚合组分在治疗上不可用,以及聚合月桂烯在治疗组合物中的存在实际上抑制活性化合物有益的生物活性和生物利用度。因此,现有技术将乳香的治疗活性归因于多种低分子量萜烯型分子,特别是单体月桂烯和小低聚形式的月桂烯。但是,本发明的发明人惊讶地发现,与现有技术的教导相反,即乳香提取物中存在的某些低分子量萜烯实际上妨碍和阻滞了本文公开的组分和组合物诱导细胞分化的活性。由此公开的是,本文公开的组分和组合物的新生物活性由于多种萜烯的某些单体和小低聚形式的存在而受到抑制。

[0029] 不希望受任何具体理论或作用机制束缚,如本文公开的包含聚合月桂烯的组合物诱导神经元细胞分化的活性使本发明可用于改善(再形成)神经元间的连接和克服在受与突触形成不足有关的病理影响的脑和神经组织中有缺陷的神经元间连通。该病理引起多种神经系统病理,包括例如阿尔茨海默病。进一步,本发明可用于逆转作用于神经系统的多种药物如麻醉剂的不利影响。本发明进一步可用于大量细胞和组织的复壮。

[0030] 如本文所用,“聚合月桂烯”包括聚合度至少为6的月桂烯聚合形式。聚合月桂烯无限制地包括,聚合 β -月桂烯(聚 β -月桂烯)、聚合 α -月桂烯(聚 α -月桂烯)、其均聚物和包含月桂烯亚单元的杂聚物(也被称为共聚物)。同样包括聚合月桂烯化合物的几何异构体、光学异构体和非对映异构体。

[0031] 如本文所用, β -月桂烯指7-甲基-3-亚甲基-1,6-辛二烯, α -月桂烯指结构异构体2-甲基-6-亚甲基-1,7-辛二烯。

[0032] 根据第一方面,本发明提供了治疗神经功能缺损的方法,该方法包括向对其有需要的个体给予治疗有效量的组合物——该组合物包含从乳香分离的提取物和药学上可接受的载体,从而治疗神经功能缺损。

[0033] 根据另一方面,本发明提供了治疗神经功能缺损的方法,该方法包括向对其有需要的个体给予治疗有效量的组合物——该组合物包含含聚合月桂烯的分离组分和药学上可接受的载体,从而治疗神经功能缺损。

[0034] 根据另一方面,本发明提供了治疗神经系统疾病或病症的方法,包括向对其有需

要的个体给予治疗有效量的组合物,该组合物包含乳香的分离组分,其中该分离组分的特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂,并且基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物。

[0035] 根据另一方面,本发明提供了促进或诱导组织再生的方法,该方法包括向对其有需要的个体给予治疗有效量的组合物,该组合物包含乳香的分离组分,其中该分离组分的特征在于其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂,并且基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物;从而促进或诱导组织再生。

[0036] 根据还有另一方面,本发明提供了促进或诱导组织再生的方法,该方法包括向对其有需要的个体给予治疗有效量的组合物,该组合物包含含聚合月桂烯的分离组分和药学上可接受的载体;从而治疗组织损伤。

[0037] 如本文所用,组织修复包括诱导和促进组织再生,包括神经组织。

[0038] 在多个实施方式中,通过适当的途径实施给药步骤,该途径选自口服、局部、经皮或肠胃外。根据具体实施方式,给药途径是通过局部应用进行的,该局部应用选自以下:皮肤、阴道、直肠、吸入、鼻内、眼部、耳部和颊部。根据可选的实施方式,给药途径是通过肠胃外注射的。在多个实施方式中,通过肠胃外途径实施给药步骤,该肠胃外途径选自静脉内、肌肉内、皮下、皮内、腹膜内、动脉内、脑内、脑室内、骨内和鞘内。

[0039] 在具体实施方式中,给药步骤包括用组合物接触特定类型或特定谱系或在特定分化阶段的细胞。在具体实施方式中,细胞选自神经细胞、神经元细胞、内皮细胞、上皮细胞和干细胞。在多个实施方式中,细胞是选自以下谱系的细胞:外胚层、中胚层和内胚层谱系。在多个实施方式中,接触细胞的步骤在体内、离体或在体外实施。

[0040] 在具体实施方式中,神经功能缺损包括功能的减弱,该功能选自认知功能、感觉功能、运动功能、神经心理功能、精神功能及其组合。在具体实施方式中,神经功能缺损与以下病症或疾病有关:包括,例如,创伤、血管性痴呆、老年性痴呆、阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化(ALS)、多发性硬化症、帕金森病、中风、精神分裂症、双相性精神障碍、抑郁、肥胖、厌食、恶病质、感染和免疫性疾病。在具体实施方式中,神经功能缺损源于暴露于药物,如麻醉剂。

[0041] 在具体实施方式中,接触细胞的步骤在体外或离体实施。在具体实施方式中,细胞是干细胞。在具体实施方式中,意图将该细胞植入个体或移植到个体中。在具体实施方式中,细胞是意图植入个体或移植到个体中的器官或组织的细胞。在具体实施方式中,该细胞分泌可溶性因子。

[0042] 在具体实施方式中,组合物包含基于组合物总重量约0.01至约25% (w/w) 的乳香分离组分。在具体实施方式中,组合物包含基于组合物总重量约0.01至约12% (w/w) 的乳香分离组分。

[0043] 在具体实施方式中,通过这样的方法获得乳香分离组分,其包括以下步骤:用至少一种极性有机溶剂处理乳香和分离可溶于所述极性有机溶剂的组分。在具体实施方式中,通过这样的方法获得乳香分离组分,其包括以下步骤:用至少一种非极性有机溶剂处理乳香和分离可溶于所述非极性有机溶剂的组分。

[0044] 在具体实施方式中,乳香分离组分的特征在于:其可溶于至少一种极性有机溶剂和至少一种非极性有机溶剂。在具体实施方式中,乳香分离组分的进一步特征在于:其基本

不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物。

[0045] 在具体实施方式中,乳香分离组分的特征在于:其既可溶于至少一种极性有机溶剂又可溶于至少一种非极性有机溶剂,并且基本不含可溶于所述极性有机溶剂但不溶于所述非极性有机溶剂的化合物。

[0046] 在具体实施方式中,通过这样的方法获得乳香的分离组分,其包括以下步骤:

[0047] (a) 用极性有机溶剂处理乳香;

[0048] (b) 分离可溶于所述极性有机溶剂的组分;

[0049] (c) 任选地去除所述极性有机溶剂;

[0050] (d) 用非极性有机溶剂处理在步骤(b)或(c)得到的可溶性组分;

[0051] (e) 分离可溶于所述非极性有机溶剂的组分;和

[0052] (f) 任选地去除所述非极性有机溶剂;

[0053] 其中步骤(d)至(f)可先于步骤(a)至(c)。

[0054] 适于获得可用于本发明方法的提取物的极性有机溶剂包括醇、醚、酯、酰胺、醛、酮、腈及其组合。极性有机溶剂的具体实例为甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合。

[0055] 适于实施本发明的非极性溶剂包括无环或环状的、饱和或不饱和的脂肪烃和芳烃,例如,C5-C10烷烃、C5-C10环烷烃、C6-C14芳烃及其组合。上述每一种均可被一个或多个卤素任选地取代,例如,C7-C14全氟烷烃。非极性有机溶剂的具体实例为戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯和异构体及其混合物。

[0056] 在具体实施方式中,获得乳香分离组分的过程进一步包括步骤(c)或步骤(f)后得到的可溶性组分的大小分级。在具体实施方式中,大小分级包括尺寸排阻层析。在具体实施方式中,步骤(c)或(f)包括通过选自旋转蒸发、高真空应用及其组合的手段去除溶剂。在具体实施方式中,步骤(a)至(c)在步骤(d)至(f)前实施。在具体实施方式中,步骤(d)至(f)在步骤(a)至(c)前实施。在具体实施方式中,极性有机溶剂包括乙醇,非极性有机溶剂包括己烷。在具体实施方式中,步骤(a)至(c)和步骤(d)至(f)各自独立地实施多个循环。

[0057] 在具体实施方式中,乳香得自黄连木属物种,选自乳香黄连木、大西洋黄连木(*P. atlantica*)、*P. palestina*、*P. saportae*、黑黄连木(*P. terebinthus*)、*P. vera*和全缘叶黄连木(*P. integerrima*)。

[0058] 在具体实施方式中,乳香的分离组分包括聚合月桂烯。

[0059] 在具体实施方式中,组合物包含基于组合物总重量约0.01至约12% (w/w) 的聚合月桂烯。

[0060] 在具体实施方式中,聚合月桂烯选自聚合 β -月桂烯(聚 β -月桂烯)、聚合 α -月桂烯(聚 α -月桂烯)、月桂烯共聚物及其组合。在具体实施方式中,聚 β -月桂烯选自1,4-聚 β -月桂烯、3,4-聚 β -月桂烯、1,2-聚 β -月桂烯及其组合。在具体实施方式中,聚合月桂烯包

括月桂烯异构体,该月桂烯异构体选自顺式异构体、反式异构体及其组合。在具体实施方式中,1,4-聚- β -月桂烯选自顺式1,4-聚- β -月桂烯、反式1,4-聚- β -月桂烯及其组合。在具体实施方式中,聚合月桂烯包括顺式1,4-聚- β -月桂烯。在具体实施方式中,聚合月桂烯具环状构象。在具体实施方式中,聚合月桂烯具有支链构象。

[0061] 在具体实施方式中,聚合月桂烯的聚合度在至少约6至约1800的范围内。在具体实施方式中,聚合度为至少约10。在具体实施方式中,聚合度为至少约15。在具体实施方式中,聚合度为至少约25。在具体实施方式中,聚合度为至少约35。在具体实施方式中,聚合度在约6至约30的范围内。在具体实施方式中,聚合度在约30至约500的范围内,例如,在约35至约150的范围内。

[0062] 各种可能性均代表本发明单独的实施方式。

[0063] 要理解的是,组合物可包含不同分子量的聚合月桂烯组分,例如在至少约800至约100,000的范围内或其多种组合。在具体实施方式中,聚合月桂烯的多分散指数低于5。

[0064] 在具体实施方式中,根据本发明其中一些方法所用的聚合月桂烯是化学合成产物。在具体实施方式中,化学合成包括将单体月桂烯用作底物。在具体实施方式中,底物是 β -月桂烯。在具体实施方式中, β -月桂烯底物得自植物。

[0065] 在具体实施方式中,化学合成产物包括顺式1,4-聚- β -月桂烯。在具体实施方式中,化学合成包括阴离子聚合反应。在具体实施方式中,将得自化学合成的聚合月桂烯溶于疏水性载体,如至少一种植物油。

[0066] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分得自天然来源。在具体实施方式中,天然来源是归类为漆树科的植物。在具体实施方式中,该植物被归类为选自以下的属:黄连木属(*Pistacia*)、松属(*Pinus*)、云杉属(*Picea*)、桧属(*Juniperus*)、*Alsies*、落叶松属(*Larix*)、金鱼草属(*Antirrhinum*)、乳香属(*Boswellia*)、柑桔属(*Citrus*)和三七草属(*Gynura*)。在具体实施方式中,该植物是黄连木属物种,选自乳香黄连木、大西洋黄连木、*P. palestina*、*P. saportae*、黑黄连木、*P. vera*和全缘叶黄连木。在具体实施方式中,该植物是洋乳香树。在具体实施方式中,天然来源是植物材料选自树脂、叶、枝、根、花、种子、芽、树皮、坚果和根。在具体实施方式中,天然来源是归类于选自以下属的植物:罗勒属(*Ocimum*)、月桂属(*Laurus*)和薰衣草属(*Lavendula*)。

[0067] 在具体实施方式中,通过这样的方法获得含聚合月桂烯的分离组分,该方法包括以下步骤:

[0068] (a) 用至少一种极性有机溶剂接触植物材料;

[0069] (b) 分离可溶于至少一种极性有机溶剂的组分;

[0070] (c) 任选地去除所述极性有机溶剂;

[0071] (d) 用至少一种非极性有机溶剂处理在步骤(b)或(c)得到的可溶性组分;

[0072] (e) 分离可溶于所述非极性有机溶剂的组分;和

[0073] (f) 任选地去除所述非极性有机溶剂;

[0074] 其中步骤(d)至(f)可先于步骤(a)至(c),并且其中步骤(a)至(c)和步骤(d)至(f)各自独立地实施多个循环;从而获得含聚合月桂烯的分离组分。

[0075] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分的纯度为至少约80% (w/w)。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分的纯度可以为至少约85% (w/w)。在具体实施方式

中,含聚合月桂烯的分离组分的纯度为至少约90% (w/w),或至少约93%,或至少约95%,或至少约97%,或至少约98%,或至少约99%。

[0076] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分的纯度为至少80%,并且聚合月桂烯的聚合度为至少6。

[0077] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分的纯度为至少90%,并且聚合月桂烯的聚合度为至少10。

[0078] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含顺式1,4-聚- β -月桂烯和反式1,4-聚- β -月桂烯的混合物,其中混合物包含至少50% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量为至少800,或至少1,000,或至少5,000,或至少10,000。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少80% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量在约800至约5,000的范围内。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量在约1000至约10,000的范围内。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量在约5000至约20,000的范围内。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量在约10,000至约20,000的范围内。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量在约20,000至约30,000的范围内。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量在约30,000至约50,000的范围内。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚- β -月桂烯,该顺式1,4-聚- β -月桂烯的数均分子量在约50,000至约80,000的范围内。

[0079] 在具体实施方式中,组合物包含低于约10% (w/w),更优选低于约5% (w/w) 的萜烯化合物,该萜烯化合物可溶于极性有机溶剂且不溶于非极性有机溶剂。在具体实施方式中,组合物基本不含萜烯化合物,该萜烯化合物可溶于极性有机溶剂且不溶于非极性有机溶剂。在具体实施方式中,组合物包含低于约10% (w/w),更优选低于约5% (w/w) 的单体萜烯化合物。在具体实施方式中,组合物基本不含月桂烯单体。

[0080] 如本文所述,萜烯化合物包括单体和低聚形式的萜烯化合物,包括各种被归类为单萜、二萜、倍半萜、三萜和四萜的萜烯化合物,包括其酸、醛和醇形式。在具体实施方式中,组合物包含低于约10% (w/w),更优选低于约5% (w/w) 的单萜化合物,其选自: β -月桂烯、 α -月桂烯、顺式 α -罗勒烯、二氢月桂烯、柠檬烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯及其组合。

[0081] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分得自植物,并且组合物基本不含月桂烯单体和聚合度低于约6的月桂烯低聚形式。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分得自植物,并且组合物基本不含可溶于至少一种极性有机溶剂且不溶于至少一种非极性有机溶剂的萜烯化合物。

[0082] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分是化学合成产物,并且组合物基本不含月桂烯单体和聚合度低于约6的月桂烯低聚形式。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的

分离组分是化学合成产物,并且组合物基本不含可溶于极性有机溶剂的萜烯化合物。

[0083] 在具体实施方式中,药学上可接受的载体包括疏水载体。在具体实施方式中,药学上可接受的疏水载体包括至少一种油。在具体实施方式中,油选自矿物油、植物油及其组合。在具体实施方式中,植物油选自杏仁油、油菜油、椰子油、玉米油、棉花籽油、葡萄籽油、橄榄油、花生油、藏花油、芝麻油、大豆油及其组合。在具体实施方式中,矿物油是轻矿物油。在具体实施方式中,疏水载体包括至少一种蜡。在具体实施方式中,疏水载体包括至少一种油和至少一种蜡的组合。

[0084] 在具体实施方式中,组合物的形式选自胶囊、片剂、脂质体、栓剂、悬浮液、软膏、乳剂、洗剂、溶液、乳液、膜、粘固剂、粉末、胶液、气溶胶和喷雾剂。

[0085] 在具体实施方式中,组合物是药物组合物。在具体实施方式中,组合物的形式适于美容性或皮肤病学给药。

[0086] 在本文所公开方法的具体实施方式中,给药或接触细胞的步骤包括使用制品,其中组合物处于制品上或制品内。在具体实施方式中,组合物以涂层的形式处于制品上。在具体实施方式中,制品包括容器,其中组合物处于容器内。在具体实施方式中,制品选自织物制品、尿布、伤口敷料、医疗装置、一个或多个针、一个或多个微针、注射装置和喷雾器。在具体实施方式中,制品包括多个微针。在具体实施方式中,医疗装置选自假肢、人造器官或其组件、阀门、导管、管、支架、人造膜、起搏器、传感器、内窥镜、成像装置、泵、导线和植入物。在具体实施方式中,植入物选自心脏植入物、耳蜗植入物、角膜植入物、颅植入物、牙齿植入物、颌面植入物、器官植入物、矫形植入物、血管植入物、关节内植入物和胸植入物。

[0087] 在具体实施方式中,在医疗装置植入个体前或后实施本方法。在具体实施方式中,医疗装置是器官植入物。在具体实施方式中,器官植入物包括个体自身的细胞。在具体实施方式中,在细胞、组织或器官移植到个体前或后实施本方法。

[0088] 在具体实施方式中,给药或接触步骤包括选自以下的手段:电穿孔、超声处理、射频、加压喷雾及其组合。

[0089] 在具体实施方式中,接触步骤包括建立间液与组合物之间的接触。在具体实施方式中,建立间液与组合物之间接触的步骤包括用针、微针或包含多个针或微针的设备刺穿和/或挑拨皮肤。

[0090] 在具体实施方式中,个体是人类。在具体实施方式中,个体选自非人哺乳动物、鱼和鸟。

[0091] 根据另一方面,本发明提供了乳香的分离组分用于制备治疗神经功能缺损的药物的应用。

[0092] 根据另一方面,本发明提供了乳香的分离组分,用于治疗神经功能缺损。

[0093] 根据另一方面,本发明提供了药物组合物——该组合物包含乳香的分离组分和药学上可接受的载体,用于治疗神经功能缺损。

[0094] 根据另一方面,本发明提供了含聚合月桂烯的分离组分,用于治疗神经功能缺损。

[0095] 根据另一方面,本发明提供了药物组合物——该组合物包含含聚合月桂烯的分离组分和药学上可接受的疏水载体,用于治疗神经功能缺损。

[0096] 根据另一方面,本发明提供了乳香的分离组分用于制备诱导或促进组织再生的药物的应用。

- [0097] 根据另一方面,本发明提供了乳香的分离组分,用于诱导或促进组织再生。
- [0098] 根据另一方面,本发明提供了药物组合物——该组合物包含乳香的分离组分和药学上可接受的载体,用于诱导或促进组织再生。
- [0099] 根据另一方面,本发明提供了含聚合月桂烯的分离组分,用于诱导或促进组织再生。
- [0100] 根据另一方面,本发明提供了药物组合物——该组合物包含含聚合月桂烯的分离组分和药学上可接受的疏水载体,用于诱导或促进组织再生。
- [0101] 要明确理解的是,本发明的范围包括较短和较长形式的聚合月桂烯,包括合成和半合成形式,包括月桂烯共聚物和用多个官能团取代的衍生物以及与另外的分子的结合体——如本领域已知,并规定这些变体和改变保持本发明方法背景下的聚合月桂烯的治疗能力。
- [0102] 本发明其他目的、特征和优势将由于以下描述和附图而更加明确。
- [0103] 附图简述
- [0104] 图1显示利用SEDEX和PDA检测器的乳香树脂提取物尺寸排阻层析。
- [0105] 图2显示通过制备型尺寸排阻层析获得的乳香树脂提取物的低(图2A)和重(图2B)分子量分数。
- [0106] 图3显示通过乳香树脂提取物的制备型SEC获得的重MW分数的¹H-NMR光谱。
- [0107] 图4显示通过乳香树脂提取物的制备型尺寸排阻层析获得的重MW组分的¹³C-NMR光谱。
- [0108] 图5显示聚合月桂烯化学合成法获得的高(图5A)和低(图5B)产物的分析型尺寸排阻层析。
- [0109] 图6显示合成的1,4-聚-β-月桂烯的¹H-NMR光谱。
- [0110] 图7显示合成的1,4-聚-β-月桂烯的¹³C-NMR光谱。
- [0111] 图8显示RPh-1对ARPE-19细胞的影响。图8A,用油载体处理的对照培养物;图8B,给予RPh-1(0.1%;1mg/ml)和温育后48小时的测试培养物;图8C,给予RPh-1(0.25%;2.5mg/ml)和温育后48小时的测试培养物;图8D,给予RPh-1(0.25%;2.5mg/ml)和温育后72小时的测试培养物。
- [0112] 图9显示用RPh-1温育72小时前(左侧)和后(右侧)的分化ARPE-19细胞的免疫荧光分析,表明经处理后微管蛋白、β3(TUBB3)、活性调节细胞骨架相关蛋白(Arc/Arg3.1)和神经元正五聚蛋白(pentraxin)II(NPTX2)得到表达。
- [0113] 图10显示RPh-1对ARPE-19细胞增殖的影响,如评价总蛋白含量的分析所监测。
- [0114] 图11显示多级分化的ARPE-19细胞。图11A,分化级3;图11B,分化级4;图11C,分化级5。
- [0115] 图12显示RPh-1对人类黑素瘤细胞的影响。图12A,油载体处理的对照细胞;图12B,48小时温育后经RPh-1(5μL)处理的细胞;图12C,48小时温育后经RPh-1(2μL)处理的细胞;图12D,72小时温育后经RPh-1(5μL)处理的细胞。
- [0116] 图13显示化学合成的聚合月桂烯对RPh-1细胞的影响。图13A,经组分18.1诱导的分化;图13B,经组分18.2诱导的分化。
- [0117] 图14显示患有与脱毛症有关的皮肤病变的衰老雄性金毛寻回犬(Golden

Retriever male dog) 经RPh-1治疗后的毛皮再生。图14A, 治疗前;图14B, 治疗2周后。

[0118] 图15显示实验小鼠中RPh-1对造成的伤口的伤口愈合的影响, 由以下表示: 通过SC注射 (A组, 灰色条)、局部 (B组, 黑色条) 用RPh-1治疗的小鼠以及仅用载体 (C组, 空白条) 治疗的小鼠在伤口造成后不同时间点的伤口大小 (mm^2)。

[0119] 图16显示血管性痴呆大鼠模型中RPh-1对脑血流灌注不足恢复的影响, 由Morris水迷宫测试进行评价。

[0120] 对RPh-1治疗的动物 (A组; 交叉线条)、载体治疗的动物 (B组; 水平纹条) 和假对照动物 (实心条) 的表现进行以下测试: 在平台位置的频率 (图16A); 在平台区域的耗时 (图16B); 找到平台的等待时间 (图16C); 在区域1位置的频率 (图16D); 在有光部分 (light part) 的耗时 (图16E); 找到平台的等待时间 (图16F); 和速率 (图16G)。

[0121] 图17显示RPh-1对体重增加的影响。

[0122] 图17A显示血管性痴呆大鼠模型中动物脑血流灌注不足后的体重增加。B组动物 (RPh-1治疗的; 三角符号) 重量的恢复显著快于A组动物 (载体治疗的; 正方形符号)。

[0123] 图17B显示通过皮下给药 (A组; 菱形标志) 或通过局部给药 (B组; 正方形标志) 用RPh-1治疗或仅用载体 (C组; 三角符号) 治疗后的肥胖小鼠的体重增加 (ob/ob)。B组和C组小鼠分别增加10.2%和9.1%。以斜率表示的所有组的体重增加速率相似 ($p=0.07$ (A对B)、 0.08 (A对C) 和 0.43 (B对C))。

[0124] 图18显示大鼠中风模型中RPh-1对从短暂大脑中动脉闭塞 (tMCAO) 恢复的影响。

[0125] 图18A显示用RPh-1 (A组) 或用载体 (B组) 治疗大鼠的MCAO后所示以天 (d) 表示的不同时间点的神经肌肉分值 (神经分值)。显著差异仅在A组第8天与第14天之间和第8天与第28天之间可见。

[0126] 图18B显示用RPh-1 (A组; 黑色条) 或用载体 (B组; 空白条) 治疗大鼠的MCAO后不同时间点的阶梯测试结果。仅在第28天发现两组间的显著差异。

[0127] 图18C显示用RPh-1 (A组) 或用载体 (B组) 治疗大鼠的MCAO后所示以天 (d) 表示的不同时间点的粘合剂去除测试结果。显著差异仅在A组第2天与其他天之间可见。

[0128] 图19显示经RPh-1治疗和经对照治疗的大鼠在视神经轴索显微外科手术 (axotomy) 后存活的视网膜神经节细胞 (RGC) 的平均数。

[0129] 图20显示视网膜脱落后用RPh-1或载体治疗的动物的脱落的视网膜 (RD) 和未损伤的视网膜 (对照) 中的SEMA3 (图20A) 和胱天蛋白酶-3 (图20B) 表达的蛋白质印迹分析。

[0130] 发明详述

[0131] 本发明提供了具有神经保护和神经再生特性的组合物和用其治疗一系列神经系统疾病和病症的方法。更具体地, 现公开包含提取自乳香的分离组分的组合物具有神经保护活性, 并且可用于促进神经元细胞类型及其他细胞类型的分化和成熟。

[0132] 此外, 已发现聚合月桂烯是这种乳香提取物的主要成分。聚合月桂烯的化学合成和生物测试已确定, 该化合物呈现上述神经保护和神经再生生物活性。此外, 这些发现大大出乎根据现有技术的意料之外, 现有技术教导得自乳香的聚合组分不具有治疗有益性, 并且事实上妨碍归因于粗乳香制品和乳香提取物的某些生物活性。

[0133] 本文首次公开, 由于其刺激和诱导细胞再生的多种活性, 本文所述的乳香分离组分可作用于多种与神经功能缺损有关的治疗适应症和需要组织修复的病症的药物组合

物的活性成分。在接触人类和非人类个体的细胞时,组合物诱导多种组织、细胞区室和细胞谱系的细胞分化,包括皮肤、内皮、粘膜、骨、腱和软骨。此外,可利用药物组合物的细胞分化活性促进体内并入医疗装置、植入物和器官移植物。

[0134] 定义

[0135] 如本文所用,术语“乳香”(mastic、gum mastic和mastic gum)和“乳香树脂”交替使用,意指以任何被归类为漆树科的树的渗出物得到的树脂(也被称为油树脂)。黄连木属的树——最显著的是洋乳香树,具体是*P.lentiscus* L.cv.Chia栽培品种(在希腊的Chios岛上栽培),以其乳香高产量闻名。其他品种包括*P.lentiscus*.var.*emarginata* Engl.和*P.lentiscus*.var.*latifolia* Coss.更多黄连木属物种包括:例如,大西洋黄连木、*P.palestina*、*P.saportae*、黑黄连木、*P.vera*和全缘叶黄连木。

[0136] 如本文所用,术语“聚合物”指化合物或化合物的混合物,其包含具有同一化学结构的重复亚单元(也被称为单体),其中单体共价连接。可形成聚合物的单体实例是萜烯,例如单萜,如月桂烯。聚合物可具有不同的聚合度,因此包括多种链长的聚合形式。聚合物包括均聚物和杂聚物(也被称为共聚物),并且可具有多种异构构型和非对映异构构型。

[0137] 如本文所用,术语“聚合月桂烯”和“聚月桂烯”可交替地指由月桂烯单体形成的聚合物。聚合月桂烯包括具有不同聚合度的聚合形式,优选聚合度为至少6的月桂烯聚合物。本发明无限制地包括聚合 β -月桂烯(聚 β -月桂烯)、聚合 α -月桂烯(聚 α -月桂烯)、其均聚物、包含月桂烯单体的杂聚物(也被称为共聚物)——该月桂烯单体与异种单体直接或间接共价连接、其反式和顺式异构体、其D-和L-对映异构体或其组合。聚合月桂烯可以以分离的形式得自植物来源——具体得自乳香,或可以是化学合成反应的产物。

[0138] 如本文所用,术语“乳香的分离组分(部分,馏分,fraction)”指在至少一种极性或非极性有机溶剂或其组合中对乳香进行萃取后得到的组分。本发明所述的分离组分一般可溶于极性和非极性有机溶剂中的一者或二者。

[0139] 如本文所用,术语“含聚合月桂烯的分离组分”指具有限定分子量或分子量范围的聚合月桂烯制备物,其从该聚合月桂烯所分离的来源中存在的其他化学成分中分离出来,该来源具体是化学反应混合物或植物提取物。

[0140] 如本文所用,术语“纯度”指特定化合物在制备物中的含量,表示为特定化合物相对于制备物中其他化合物的重量/重量基础下的百分比。

[0141] 如本文所用,“均聚物”指由一类单体生成的聚合物。例如,聚合月桂烯在其仅由月桂烯单体例如 β -月桂烯生成时是均聚物。均聚物也可以是由同一单体生成但具有不同聚合度——即链长——的聚合物的混合物。因此,聚合月桂烯可包括一系列具有不同链长从而不同分子量的化合物。进一步,均聚物可包含具有不同异构构型的单体,例如, β -月桂烯和 α -月桂烯。

[0142] 如本文所用,“杂聚物”和“共聚物”指由一个以上单体类型生成的聚合物。因此,例如,月桂烯共聚物由月桂烯单体以及非月桂烯的异种类型的单体生成。如本领域已知,共聚物包括交替共聚物、周期共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物和统计共聚物。

[0143] 如本文所用,“聚合度”指共价连接在一起以形成聚合物的单体或单体单元数,例如,聚合月桂烯化合物中的月桂烯单体数。

[0144] 如本文所用,“重均分子量”指如下式表示的具有不同链长分子的聚合物的平均分

子量:

$$[0145] \quad \bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

[0146] 其中 N_i 是分子量 M_i 的分子数。重均分子量可通过如下确定:例如,光散射、小角中子散射、X射线散射和沉降速率。

[0147] 如本文所用,“数均分子量”指如下式表示的具有不同链长分子的聚合物的平均分子量:

$$[0148] \quad \bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

[0149] 其中 N_i 是分子量 M_i 的分子数。数均分子量可通过如下确定:例如,凝胶渗透色谱(也被称为尺寸排阻层析)或粘度测定。

[0150] 术语“多分散指数”和“分子分布”在本文中交替使用,指重均分子量与数均分子量的比。

[0151] 如本文所用,“萜烯化合物”指含有异戊二烯的烃及相关的含氧化合物如醇、醛或酮(类萜)。异戊二烯单元($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$)是这种化合物的基本结构单元。萜烯烃一般具有分子式 $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$,包括单萜、倍半萜、二萜、三萜和四萜,其分别具有2、3、4、6和8个异戊二烯单位。萜烯可被进一步分类为无环的或环状的。

[0152] 单萜实例包括月桂烯、柠檬烯和蒎烯,其分别为无环、单环和双环单萜的实例。倍半萜的实例包括橙花叔醇和法呢醇。二萜的实例包括咖啡醇和植醇。三萜和四萜的实例分别为角鲨烯和胡萝卜素。

[0153] 如本文所用,“基本不含”指根据本发明所述的制备物或药物组合物一般包含低于3%、低于1%、最优选低于0.5%的所述物质。

[0154] 如本文所用,“治疗有效量”指显著引起、促进或造成所需治疗效果的药物分量。

[0155] 如本文所用,“药学上可接受的载体”指这样的稀释剂或载体:其用于增强与其所配制的药物成分的输送和/或药代动力学特性,但其本身没有治疗效果,其也不引起或造成个体体内任何不需要或有害的影响或者不良反应。

[0156] 如本文所用,“药学上可接受的疏水载体”指其中溶解或悬浮聚合月桂烯的疏水非极性稀释剂或载体。

[0157] 如本文所用,“细胞分化”指较不特化的细胞变为较特化的细胞的过程。细胞分化可在多种细胞特性中任意种的改变的基础上建立,该特性包括但不限于大小、形状、细胞器外观、膜电位、代谢活性和信号响应性。可对细胞类型给出具体“级”以描述分化程度。

[0158] 如本文所用,“神经功能缺损”指感觉、认知或运动功能中至少一项相对于以往功能或活性水平和/或相对于根据公认标准匹配的非缺损个体的下降或减少。

[0159] 本文所述的数值将被理解为所述值 $\pm 10\%$ 。

[0160] 乳香分离组分和聚合月桂烯

[0161] 本发明采用含聚合月桂烯的分离组分。该组分可来自植物来源——具体为乳香,或其可以是化学合成产物。用于本发明的聚合月桂烯是聚合物化合物或不同分子量聚合物的混合物,其由月桂烯亚单元形成。适当的聚合月桂烯植物来源包括被归类为漆树科或不

同植物科的植物来源。可得到聚合月桂烯产物的植物物种无限制地包括黄连木属、松属、云杉属、桧属、Alsies、落叶松属、罗勒属、月桂属和薰衣草属的植物物种。可用的黄连木属物种无限制地包括乳香黄连木、大西洋黄连木、*P. palestina*、*P. saportae*、黑黄连木、*P. vera*和全缘叶黄连木。聚合月桂烯可得自任何植物部分,包括例如,树脂、叶、枝、浆果和种子。含聚合月桂烯的分离组分可最便利地得自乳香,尽管其他植物部分和产物也可使用。本文实施例1和2示例了获得和表征分离组分——包括乳香的聚合月桂烯——的多种方法。乳香商业制备物可从例如Chios Gum Mastic Growers Association或G. Baldwin & Co., U.K. 获得。

[0162] 或者,聚合月桂烯可作为天然存在的聚合物的合成等同物化学生成,如顺式1,4-聚- β -月桂烯,或者其可以是在自然界中的未知存在的月桂烯聚合物,如聚合 α -月桂烯。本发明不受生成聚合月桂烯的方法或其是否为天然、合成或半合成所限。

[0163] 设想聚合月桂烯可以是合成产物,通过用单体形式的单萜月桂烯作底物的化学法生成。单体月桂烯底物可以从植物分离,或可以从前体萜烯化学转化或酶法转化,如本领域所知。例如,通过化学法可将从植物来源分离的单体 β -月桂烯随后聚合为聚合 β -月桂烯。当月桂烯底物得自天然来源时,生成的产物可被称为半合成产物。以下公开了聚合 β -月桂烯的化学法:例如美国专利号4,564,718;5,759,569;7,232,872和7,214,750以及Newmark等(1988) *J. Polymer Sci.* 26,71-77 (1988) and in Cawse等(1986) *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 31, 1963-1975。

[0164] 适当的化学合成法利用阴离子聚合反应,例如包括应用至少一种烷烃或环烷烃溶剂和至少一种烷基碱金属的阴离子聚合反应。例如,烷基碱金属可以是丁基锂,烷烃溶剂可以是己烷,或环烷烃溶剂可以是环己烷。烷烃溶剂和烷基碱金属引发剂可以以至少20:1的比存在于反应混合物中。阴离子聚合反应可由化合物如水、醇、分子氧和二氧化碳终止。

[0165] 本文(实施例3)公开的1,4-聚- β -月桂烯合成方法尤其适于保持聚合物的多种生物活性,如促进细胞分化。已知单体 β -月桂烯存在于多种植物中,包括松属、云杉属、桧属、Alsies和落叶松属的树和金鱼草属、乳香属、柑桔属和三七草属的花。

[0166] 可得到含聚合月桂烯的分离组分作为纯化的化学合成反应的产物,如本文实施例3所示。可将化学合成的聚合月桂烯从未反应的底物和其他试剂中分离,分析并进一步利用本领域已知的分析和分离方法根据分子量分级。这些方法包括在大小、电荷或疏水性的基础上分离分子的方法,包括:例如,尺寸排阻层析(SEC)、高压液相色谱(HPLC)、气液相色谱(GLC)及其组合。

[0167] 用于测定所得聚合物的精确化学结构的分析方法包括核磁共振(例如 ^1H NMR和 ^{13}C NMR)、粘度测定、多种质谱法(例如MALDI-TOF)、组合方法如液相色谱-质谱法(LC-MS)、光散射技术如例如多角度激光光散射(MALLS)、总碳分析、UV-VIS分光光度法、IR和FT-IR分光光度法以及本领域已知的其他方法。可利用相同方法和方案从植物纯化和表征聚合月桂烯,如本文实施例2所示。

[0168] 在特别优选的实施方式中,作为化学合成产物的聚合月桂烯组分应基本不含月桂烯单体和聚合度低于约6的月桂烯低聚形式。同样优选的是,分离的产物基本不含可溶于极性有机溶剂的单体萜烯化合物。

[0169] 当聚合月桂烯将得自植物来源如乳香时,可利用类似的方法获得乳香分离组分和聚合月桂烯分离组分。总体描述为,将收集的植物材料例如乳香在适当的容器中与适当的

溶剂——常为极性溶剂——混合。适当的极性溶剂包括例如，醇、醚、酯、酰胺、醛、酮、腈及其组合。极性有机溶剂的具体实例为甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、1-丁醇、2-丁醇、仲丁醇、叔丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、新戊醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-甲基-2-丁醇、乙二醇、乙二醇单甲醚、二乙醚、甲基乙醚、乙基丙醚、甲基丙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二氢呋喃、呋喃、吡喃、二氢吡喃、四氢吡喃、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙醛、甲酸甲酯、甲酸乙酯、丙酸乙酯、丙酸甲酯、二氯甲烷、氯仿、二甲基甲酰胺、乙酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、丙酮、乙基甲基酮、二乙基酮、乙腈、丙腈及其组合。

[0170] 优选混合乳香和溶剂，使溶剂大大过量，例如10:1或20:1。可周期性或连续搅拌混合物一段时间，该时间范围为数分钟至数小时。可无任何处理地将溶剂滗出，或任选地可将混合物首先进行低速离心，例如在100至2000rpm下，如本领域已知。从提取物回收不溶物，并向该不溶物添加新等份溶剂，以使萃取和溶解过程重复多个循环，从而获得尽可能多的极性溶剂可溶性化合物。在最后的溶解步骤后，组合包含极性溶剂可溶物的提取物，并蒸发极性溶剂（例如通过利用本领域已知的旋转蒸发），从而生成极性溶剂可溶物，其可被称为粗提取物或“第一步”提取物。

[0171] 将第一步提取物与非极性有机溶剂组合，并通过振荡1小时时间进行萃取。适当的非极性溶剂包括无环或环状的、饱和或不饱和的脂肪烃和芳烃，例如，C5-C10烷烃、C5-C10环烷烃、C6-C14芳烃及其组合。前述中的每一种可被一个或多个卤素任选地取代，例如，C7-C14全氟烷烃。非极性有机溶剂的具体实例为戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、苯、甲苯、二甲苯和异构体及其混合物。

[0172] 除去和弃去在非极性溶剂的存在下保持不溶性或沉淀的物质。然后可通过蒸发非极性溶剂（例如通过旋转蒸发）获得非极性溶剂可溶性组分。该组分可被称为纯化的提取物或“第二步”提取物，相应于乳香的分离组分，其特征在于以下事实：其可溶于极性溶剂和非极性溶剂，而可溶于极性溶剂但不溶于非极性溶剂的物质已被去除。该特征使本发明所述的分离组分与现有技术乳香提取物得以区分，后者一般包括多种仅可溶于极性溶剂的化合物。根据本发明的教导，这种化合物妨碍本文公开的分离组分的有益生物活性。

[0173] 可通过如下进一步干燥第二步提取物：例如高真空处理（例如<0.01mbar长达数天），从而去除残留的溶剂和其他挥发性材料，将其称重并与适当的非极性有机溶剂或影响其溶解的其他载体混合。如本文实施例1和2所公开，该分离组分包含聚合月桂烯。得到的含聚合月桂烯的组分可直接使用，或利用本领域已知的手段进行进一步纯化、表征和/或分级，如上所述。

[0174] 在具体实施方式中，可通过这样的方法获得本发明所述的分离组分，该方法包括以下步骤：

[0175] (a) 用极性有机溶剂处理乳香；

[0176] (b) 分离可溶于所述极性有机溶剂的组分；

[0177] (c) 任选地去除所述极性有机溶剂；

[0178] (d) 用非极性有机溶剂处理在步骤(b)或(c)得到的可溶性组分；

[0179] (e) 分离可溶于所述非极性有机溶剂的组分；和

[0180] (f) 任选地去除所述非极性有机溶剂；

[0181] 其中步骤(d)至(f)可先于步骤(a)至(c)。

[0182] 本方法可进一步包括将步骤(c)或步骤(f)后获得的可溶性组分进行大小分级,例如通过尺寸排阻层析或本领域已知的任何其他方法。

[0183] 本方法可进一步包括在步骤(c)或(f)任一者或二者后去除溶剂。可通过本领域已知的任何手段进行溶剂的去除,例如旋转蒸发、高真空应用及其组合。在具体实施方式中,步骤(a)至(c)先于步骤(d)至(f)进行,或反之。在具体实施方式中,极性有机溶剂包括乙醇,非极性有机溶剂包括己烷。本领域技术人员容易理解,步骤(a)至(c)和步骤(d)至(f)可各自独立地实施多个循环,以优化萃取过程和产物的纯度。

[0184] 对于制备治疗用途组合物,可使用适当的载体,如疏水载体,包括药学上可接受的油,任选地与蜡组合,如本文所述。

[0185] 在特别优选的实施方式中,如本文所述包含从乳香分离的组分的组合物应包含低于约20% (w/w)的单体和低聚萜烯化合物——该单体和低聚萜烯化合物可溶于极性有机溶剂且基本不溶于非极性有机溶剂,其中上述溶剂指用于制备该组分的溶剂。更优选地,分离组分包含低于约5% (w/w)的这种萜烯化合物。甚至更优选地,分离组分基本不含这种萜烯化合物。本文实施例8示例了包含这种低分子量化合物的组分对聚合月桂烯生物活性的抑制效果。

[0186] 在另一个具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分得自植物且基本不含月桂烯单体和聚合度低于6的月桂烯低聚形式。在另一个具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分得自植物且基本不含可溶于极性有机溶剂但基本不溶于非极性有机溶剂的萜烯化合物。

[0187] 要理解的是,聚合月桂烯可以不具有单一的分子量,而具有分子量的分布,表示具有不同链长——即聚合度——的聚合月桂烯分子群。

[0188] 对聚合月桂烯的分子量或聚合度没有具体上限。在本发明的一个当前优选的实施方式中,聚合度为至少约6。在具体实施方式中,聚合度为至少约10。在具体实施方式中,聚合度为至少约25。在具体实施方式中,聚合度为至少约35。在具体实施方式中,聚合月桂烯的聚合度在至少约6至约1800的范围内。适当的示例性范围包括约30至约500或约35至约150。

[0189] 聚合月桂烯的数均分子量优选至少约800。更优选地,数均分子量为至少约1000,如至少2000或至少3000,甚至更优选地,数均分子量为至少约5000。在具体实施方式中,聚合月桂烯的数均分子量在至少约800至约100,000的范围内。在具体实施方式中,数均分子量在选自以下的范围内:至少约800至约5000;至少约800至约15,000;约5000至约15,000;约5000至约20,000;约15,000至约30,000;约25,000至约40,000;约35,000至约50,000;约45,000至约60,000;约55,000至约70,000;约65,000至约80,000;约75,000至约90,000;约85,000至约100,000;及其组合。在具体实施方式中,数均分子量为至少约5000。在具体实施方式中,聚合月桂烯的数均分子量在约5000至约20,000的范围内。要理解的是,组合物可包含不同分子量的聚合月桂烯组分,例如在至少约5000至约20,000的范围内以及在约25,000至约40,000的范围内。在具体实施方式中,聚合月桂烯的分子分布低于5。

[0190] 在具体实施方式中,分离组分主要由数均分子量在约5000至约20,000范围内的聚合月桂烯组成。

[0191] 可以以多种方式表示聚合产物的分子量,例如,重均分子量或数均分子量,如本领域已知。可通过多种手段中的任意手段测定分子量,如光散射、多角度激光光散射(MALLS)、

小角中子散射、X射线散射、沉降速率、粘度测定 (Mark-Houwink equation)、质谱 (例如, MALDI-TOF) 和凝胶渗透色谱。

[0192] 聚合月桂烯可以以不同的几何异构体存在,源于取代基在碳碳双键周围的排列。这种异构体被命名为顺式或反式构型(也被分别称为Z或E构型),其中顺式(或Z)表示取代基在碳碳双键同一侧,反式(或E)表示取代基在碳碳双键相对侧。各种几何异构体及其混合物被囊括在本发明的范围内。

[0193] 聚合月桂烯产物可包含一个或多个不对称碳原子,因此可呈现光学异构现象和/或非对映异构现象。所有立体异构体和非对映异构体均被囊括在本发明的范围内,无论是单一的异构体或是立体化学异构形式的混合物。利用常规技术可分离各种立体异构体和非对映异构体,例如色谱或分级结晶。或者,通过如下可制备所需的光学异构体:在不会引起外消旋化或差向异构化的条件下适当的光学活性原料的反应;或通过衍生化,例如在由常规手段进行的非对映异构衍生物分离后用纯手性酸进行衍生化。

[0194] 适当的聚合月桂烯形式包括聚合 β -月桂烯(聚 β -月桂烯),包括1,4-聚 β -月桂烯、3,4-聚 β -月桂烯、1,2-聚 β -月桂烯、顺式1,4-聚 β -月桂烯、反式1,4-聚 β -月桂烯;聚合 α -月桂烯(聚 α -月桂烯);或其组合。从乳香分离和表征1,4-聚 β -月桂烯被公开于:例如 Van der Berg等(1998) *Tetrahedron Lett* 3:2645-2648。

[0195] 在具体实施方式中,聚合月桂烯具有线性构象、支链构象或环构象。

[0196] 根据本发明所述的含聚合月桂烯的分离组分具有至少90%的纯度,如至少93%,或至少95%,或至少97%,或至少98%,或至少99%的纯度。如本领域所知,期望尽可能高的纯度,特别是为了确保符合卫生监管机构的要求。但要理解的是,聚合月桂烯的组分可包含具有各种分子量——如,在限定的窄范围或宽范围内——的月桂烯聚合物种类,而不降低指定纯度。此外,含聚合月桂烯的分离组分可包含聚合月桂烯的上述不同的结构异构体,而不降低指定纯度。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 的顺式1,4-聚 β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含顺式1,4-聚 β -月桂烯和反式1,4-聚 β -月桂烯的混合物,其中该混合物包含至少80% (w/w) 的顺式1,4-聚 β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量为至少800的顺式1,4-聚 β -月桂烯。数均分子量可以是至少1000。平均分子量可以是至少2000。数均分子量可以是至少3,000。数均分子量可以是至少5000。数均分子量可以是至少10,000。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量在约800至约5000范围内的顺式1,4-聚 β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量在约1000至约10,000范围内的顺式1,4-聚 β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量在约10,000至约20,000范围内的顺式1,4-聚 β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量在约5000至约20,000的范围内的顺式1,4-聚 β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分主要由数均分子量在约5000至约20,000范围内的顺式1,4-聚 β -月桂烯组成。

[0197] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分的纯度为至少90%,且聚合月桂烯的聚合度为至少10。

[0198] 在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量在

约20,000至约30,000范围内的顺式1,4-聚- β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量在约30,000至约50,000范围内的顺式1,4-聚- β -月桂烯。在具体实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分包含至少90% (w/w) 数均分子量在约50,000至约80,000范围内的顺式1,4-聚- β -月桂烯。

[0199] 在特别优选的实施方式中,含聚合月桂烯的分离组分基本上纯化掉可溶于极性有机溶剂但基本不溶于非极性有机溶剂的萜烯化合物。具体地,组合物应包含低于约10% (w/w),更优选低于约5% (w/w),最优选低于约3% (w/w) 的可溶于极性有机溶剂但基本不溶于非极性有机溶剂的萜烯化合物。在具体实施方式中,组合物基本不含可溶于极性有机溶剂但不溶于非极性有机溶剂的萜烯化合物。在具体实施方式中,组合物包含低于约10% (w/w),更优选低于约5% (w/w),最优选低于约3% (w/w) 的单体萜烯化合物。在具体实施方式中,组合物基本不含月桂烯单体和聚合度低于约5的月桂烯低聚形式。在具体实施方式中,组合物包含低于约10% (w/w),更优选低于约5% (w/w),最优选低于约3% (w/w) 的萜烯化合物,该萜烯化合物选自: β -月桂烯、 α -月桂烯、顺式 α -罗勒烯、二氢月桂烯、柠檬烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯及其组合。

[0200] 药物组合物

[0201] 用于本发明的组合物包含治疗有效量的含聚合月桂烯的分离组分和药学上可接受的疏水载体。

[0202] 适当的疏水载体包含至少一种油,如例如矿物油、植物油或其组合。

[0203] 术语“矿物油”指得自石油蒸馏的透明、无色、几乎无嗅且无味的液体。其也被称为白油、白矿物油、液体矿脂、液体石蜡或白石蜡油。根据本发明的具体实施方式,该矿物油是轻矿物油,是可以以NF (国家药典) 级产品或USP (US药典) 级产品获得的商用产品。对于本发明的应用,该矿物油优选不含芳香族和不饱和化合物。

[0204] 适当的植物油包括但不限于杏仁油、油菜油、椰子油、玉米油、棉花籽油、葡萄籽油、橄榄油、花生油、藏花油、芝麻油、大豆油或其组合。在具体实施方式中,矿物油是轻矿物油。

[0205] 药学上可接受的载体可取而代之或另外包含适当的油替代物。油替代物包括具有至少10个碳的烷烃(例如,异十六烷)、苯甲酸酯、脂肪酯、非引起粉刺的酯、挥发性硅氧烷化合物(例如,环聚二甲基硅氧烷(cyclomethicone)) 和挥发性硅氧烷替代品。苯甲酸酯的实例包括C₁₂C₁₅烷基苯甲酸酯、硬脂酰苯甲酸酯、2-乙基己基苯甲酸酯、二丙二醇苯甲酸酯、辛基十二烷基苯甲酸酯、硬脂酰苯甲酸酯和苯甲酸山萮酯。脂肪酯的实例包括C₁₂C₁₅烷基辛酸酯和马来酸二辛酯。非引起粉刺的酯(noncomedogenic ester) 的实例包括异壬酸异壬酯、异壬酸异癸酯、二异硬脂酰二聚二亚油酸酯、花生醇丙酸酯和异十三烷基异壬酸酯。挥发性硅氧烷替代品的实例包括癸酸异己酯、异壬酸辛酯、辛酸异壬酯和二乙二醇二辛酸酯。

[0206] 环聚二甲基硅氧烷是蒸发性硅氧烷,该硅氧烷可被包含在载体中以便于制成适于从喷雾分配器喷出的组合物。此外,由于其蒸发性,环聚二甲基硅氧烷可有助于将制剂保持和固定在其所喷雾的表面例如伤口位置上。

[0207] 疏水载体可进一步包括至少一种蜡。蜡包括:例如,蜂蜡;植物蜡、甘蔗蜡、矿物蜡和合成蜡。植物蜡包括:例如,棕榈蜡、小烛树蜡、冠椰子蜡和霍霍巴蜡。矿物蜡包括:例如,石蜡、褐煤蜡、微晶蜡和地蜡。合成蜡包括:例如,聚乙烯蜡。

[0208] 可将药物组合物配制成多种形式中的任意形式,如,例如,胶囊(包括软胶囊)、片剂、凝胶、脂质体、栓剂、悬浮液、软膏、溶液、乳液或微乳液、膜、粘固剂、粉末、胶液、气溶胶、喷雾剂和凝胶。

[0209] 对于制备药物组合物,可将聚合月桂烯适当地配制成包合络合物、纳米乳液、微乳液、粉末和脂质体。在具体实施方式中,包合络合物包含至少一种环糊精。在具体实施方式中,环糊精包括羟丙基- β -环糊精。在具体实施方式中,纳米乳液包含平均颗粒大小低于800nm的液滴。在具体实施方式中,液滴的平均颗粒大小低于500nm。在具体实施方式中,液滴的平均颗粒大小低于200nm。在具体实施方式中,粉末是喷雾干燥的粉末。在具体实施方式中,脂质体包括多层囊泡。在具体实施方式中,微乳液包含非离子型表面活性剂。非离子型表面活性剂无限制地包括聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯(聚山梨酸酯)、泊洛沙姆、维生素E的衍生物、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯硬脂酸酯、饱和聚乙二醇甘油酯或其组合。

[0210] 本文实施例17-21公开了聚合月桂烯的各种制剂及其制备物。本发明的药物组合物可通过实现其意图目的的任何手段给予。例如,可通过口服、肠胃外、局部或经皮途径给予。肠胃外给药包括静脉内、肌内、皮下、皮内、腹膜内、动脉内、子宫内、尿道内、心脏内、脑内、脑室内、肾内、肝内、腱内、骨内和鞘内给药途径。局部给药包括通过以下途径的应用:选自皮肤、阴道、直肠、吸入、鼻内、眼部、耳部和颊部。给药可另外包括如电穿孔或超声处理的技术或手段,从而有助于其输送,例如经皮输送。其他可用的技术包括:例如,射频或加压喷雾应用。

[0211] 给药剂量将取决于个体的年龄、健康状况和体重、并行治疗——如有——的使用、治疗频率以及预期效果的性质。任何单位剂型中本发明的聚合月桂烯的量包括治疗有效量,其可取决于受体、给药途径和频率而改变。

[0212] 一般,基于组合物总重量,药物组合物中存在的聚合月桂烯或分离的乳香组分的含量可适当地在重量/重量基础上约0.01%至约25%,如0.01%至约12%的范围内。对于局部应用,聚合月桂烯或分离的乳香组分在组合物中的百分比可以在约0.05%至约2.5%的范围内。对于注射给药,聚合月桂烯或分离的乳香组分在组合物中的百分比可以在约0.1%至约7%的范围内。对于口服给药,聚合月桂烯或分离的乳香组分在组合物中的百分比可以在约0.005%至约7%的范围内。

[0213] 可以以如下本身为本领域技术人员所知的方式制备本发明的药物组合物:例如,通过常规的混合、粒化、制造糖衣药丸、软胶封装、溶解、萃取或冻干法手段。在优选的实施方式中,该制剂无水和/或不包含直接接触聚合月桂烯活性成分的极性溶剂,从而避免活性成分的生物活性损失。因此,口服用药物组合物可通过将活性化合物与固体和半固体赋形剂及适当的防腐剂和/或抗氧化剂组合获得。任选地,可磨碎和处理生成的混合物。如必要,在添加适当的助剂后,生成的微粒混合物可用于获得片剂、软胶、胶囊或糖衣药丸核心。

[0214] 适当的赋形剂具体为填充剂,如糖类,例如,乳糖或蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制备物和/或磷酸钙,例如,磷酸三钙或磷酸氢钙;和粘合剂,如淀粉糊,其利用例如,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、凝胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮。如需,可添加崩解剂,如上述淀粉以及羧甲基淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐——如海藻酸钠。助剂为流动调节剂和润滑剂,例

如,二氧化硅、滑石、硬脂酸或其盐——如硬脂酸镁或硬脂酸钙——和/或聚乙二醇。糖衣药丸核心被提供适当的包衣,如需要,该包衣对胃液具有耐受性。为此目的,可使用浓缩的糖溶液,其可任选地包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和适当的有机溶剂或溶剂混合物。为生成对胃液具有耐受性的包衣,使用适当的纤维素制备物如醋酸纤维素邻苯二甲酸酯或羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯的溶液。可向片剂或糖衣药丸包衣添加染料或颜料,从而例如,用于识别或便于表征活性化合物药剂组合。

[0215] 其他口服用药物组合物包括由凝胶制成的压接(push-fit)胶囊和由凝胶和增塑剂如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊。压接胶囊可包含微粒形式的活性化合物,该活性化合物可与如下混合:填充剂,如乳糖;粘合剂,如淀粉;和/或润滑剂,如滑石或硬脂酸镁;以及任选地,稳定剂。在软胶囊中,活性化合物优选溶解于或悬浮于适当的液体,如脂肪油或液体石蜡。此外,可添加稳定剂。

[0216] 其他口服用药物组合物包括膜,该膜被指定粘附于口腔粘膜,如以下所公开:例如,美国专利号4,713,243;5,948,430;6,177,096;6,284,264;6,592,887;和6,709,671。

[0217] 栓剂形式的药物组合物由活性化合物(一种或多种)与栓剂基料的组合组成。适当的栓剂基料包括例如,天然或合成甘油三酯、聚乙二醇或石蜡烃。

[0218] 肠胃外给药制剂包括适当的活性化合物悬浮液和微粒分散液。在具体实施方式中,可给予油性注射悬浮液。适当的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油,例如,芝麻油或合成脂肪酸酯,例如,油酸乙酯、甘油三酯、聚乙二醇-400、克列莫佛(cremophor)或环糊精。注射悬浮液可包含使悬浮液粘度增大的物质,例如,羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。任选地,悬浮液也可包含稳定剂。

[0219] 也可利用包含活性成分的脂质体制备药物组合物。本领域已知,脂质体一般得自磷脂或其他脂类物质。脂质体由分散在水介质中的单层或多层水合液态晶体形成。任何能形成脂质体的无毒、生理上可接受和可代谢的脂质均可使用。一般,优选的脂质为磷脂和磷脂酰胆碱(卵磷脂),天然和合成均可。形成脂质体的方法在本领域已知,如以下公开:例如, in Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976) 和美国专利号7,048,943。

[0220] 局部给药制剂包括软膏。适当的载体包括植物或矿物油、白矿脂、支链脂肪或油、动物脂肪和蜡。优选的载体是活性成分可溶于其中的载体。也可包含稳定剂、湿润剂和抗氧化剂以及——如需——赋予颜色或香味的剂。通过如下可制成软膏:例如,混合活性成分的植物油——如杏仁油——溶液和温软石蜡,并使混合物冷却。

[0221] 药物组合物可包括水包油乳液或微乳液,以有助于其口服用、肠胃外用或局部用制剂。这种乳液/微乳液一般包含脂质、表面活性剂、任选地湿润剂以及水。适当的脂质包括一般已知可用于生成水包油乳液/微乳液的脂质,例如脂肪酸甘油酯。适当的表面活性剂包括一般已知可用于生成水包油乳液/微乳液的表面活性剂,其中脂质被用作乳液中的油成分。可优选非离子型表面活性剂,如例如,乙氧基化蓖麻油、磷脂和环氧乙烷与环氧丙烷的嵌段共聚物。适当的湿润剂——如使用——包括:例如,丙二醇或聚乙二醇。

[0222] 可将药物组合物配制成凝胶形式,如水凝胶——其由如下形成凝胶的聚合物形成:卡拉胶、黄原胶、梧桐胶、阿拉伯胶、刺槐豆胶、瓜尔豆胶。水凝胶可与含活性成分的水包油乳液组合。

[0223] 可将药物组合物配制成粘固剂形式,如矫形手术中所用的含聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或磷酸钙的粘固剂。

[0224] 可将药物组合物配制成粉末形式,特别是如利用射频用于经皮应用的粉末,如例如美国专利号6,074,688和6,319,541以及WO 2006/003659所述。

[0225] 可将药物组合物配制成胶液形式,如含辛基氰基丙烯酸酯、用于伤口闭合应用的胶液。

[0226] 在具体实施方式中,药物组合物基本不含单体萜烯化合物和低分子量萜烯化合物,包括例如,被归类为单萜、二萜、倍半萜、三萜、四萜的萜烯化合物。萜烯化合物的实例包括 β -月桂烯、 α -月桂烯、顺式 α -罗勒烯、二氢月桂烯、柠檬烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯、甘遂醇、桉木醛(betulonal)、乳香二烯酮酸、乳香二烯醇酸、异乳香二烯酮酸、异乳香二烯醇酸、齐墩果酸和齐墩果酮酸。

[0227] 治疗应用

[0228] 本发明提供了治疗神经功能缺损和诱导或促进组织再生的治疗应用和方法。本方法包括向个体给予治疗有效量的组合物,该组合物包含乳香的分离组分或含聚合月桂烯的分离组分,如本文所述。

[0229] 给予组合物的步骤可包括任何可接受的途径,包括口服、局部、肠胃外和经皮。肠胃外给药包括静脉内、肌肉内、皮下、皮内、腹膜内、动脉内、子宫内、尿道内、心脏内、脑内、脑室内、肾内、肝内、腱内、骨内和鞘内给药途径。局部给药包括通过选自以下的途径的应用:皮肤、阴道、直肠、吸入、鼻内、眼部、耳部和颊部。

[0230] 在具体实施方式中,给药步骤包括用组合物接触特定类型、特定谱系或在特定分化阶段的细胞。该细胞可以是多种细胞类型中的任意种,特别地包括神经细胞、神经元细胞、内皮细胞、上皮细胞和所述谱系的干细胞。进一步,该细胞可以属于任何谱系,例如,外胚层、中胚层、内胚层谱系,并可以是所述谱系的干细胞。在多个实施方式中,接触细胞的步骤在体内、离体或在体外进行。

[0231] 本文公开的治疗神经功能缺损的方法特别有利于患有神经变性病症和疾病的个体,该病症和疾病特别地包括创伤、血管性痴呆、老年性痴呆、阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、多发性硬化症、中风和帕金森病。在其他情况下,本方法可有利地用于患有由感染(例如,病毒、细菌、真菌、寄生虫)引起的神经功能缺损或免疫性疾病的个体。在具体实施方式中,神经功能缺损由于暴露于药物如麻醉剂所致。神经功能缺损也可与选自以下的病症有关:精神分裂症、双相性精神障碍、抑郁、肥胖、厌食和恶病质。

[0232] 本文公开的诱导或促进组织再生的方法特别有利于遭受组织损伤的个体,该组织损伤——例如——可与损伤或创伤相关或由损伤或创伤所致。诱导或促进组织再生的方法可用于遭受选自如下损伤或创伤的个体:心肌梗塞、肺栓塞、脑梗塞,外周动脉闭塞症、疝、脾梗塞、静脉溃疡、轴索断裂(axotomy)、视网膜脱落、伤口(例如,烧伤伤口、咬伤伤口、冻伤伤口、刺伤伤口、弹片伤口、挫伤、感染伤口或外科伤口)、感染和外科手术程序。

[0233] 本文公开的实施例中示例了本发明的方法。实施例4公开了含聚合月桂烯的分离组分(得自黄连木属乳香)诱导视网膜色素上皮细胞分化。

[0234] 实施例5公开了聚合月桂烯缩短实验动物的麻醉恢复时间。

[0235] 实施例6公开了同一组分具有诱导黑素瘤和成神经细胞瘤肿瘤细胞系分化的活

性。

[0236] 实施例7公开了化学合成的具有各种分子量范围的聚合月桂烯诱导视网膜色素上皮细胞的分化。

[0237] 实施例8公开了,根据本发明,在其仅可溶于极性溶剂的基础上,在其制备过程中从聚合月桂烯分离的小分子量乳香化合物干扰、降低和妨碍聚合月桂烯产生的细胞分化诱导活性。

[0238] 实施例9、10和11公开了本发明可用于哺乳动物和非哺乳动物个体的伤口愈合。

[0239] 实施例12公开了包含根据本发明聚合月桂烯的组合物在血管性痴呆动物模型中具有改善性效果。

[0240] 实施例13公开了本发明可用于刺激患有多种导致食欲丧失或病态体重增加以及导致肥胖的疾病的个体的食欲。

[0241] 实施例14公开了包含根据本发明聚合月桂烯的组合物在中风动物模型中具有改善性效果。

[0242] 实施例15公开了包含根据本发明聚合月桂烯的组合物在视神经损伤/创伤动物模型中具有改善性效果。

[0243] 实施例16公开了包含根据本发明聚合月桂烯的组合物在视网膜脱落动物模型中具有改善性效果,并提供了伤口无疤修复的证据。

[0244] 接触细胞的步骤可在体外或离体进行。具体地,可根据本发明处理意图植入个体或移植到个体中的细胞或其衍生的器官或组织。例如,可使在培养中生长和保持的细胞外植体或细胞或组织与组合物接触。该细胞可以源自例如自身或同源供体的干细胞,并且其用途在于器官再生和/或植入受体。在其他情况下,该细胞来自异源供体,并且其用途在于植入或移植入受体。在具体实施方式中,该细胞是来自异源供体的器官或组织、其用途在于植入或移植入受体的细胞。在具体实施方式中,该细胞是分泌可溶性因子的细胞。

[0245] 本方法可在医疗装置植入个体前或后实施。医疗装置包括但不限于假肢、人造器官或其组件、阀门、导管、管、支架、人造膜、起搏器、传感器、内窥镜、成像装置、泵、导线和植入物。植入物包括但不限于心脏植入物、耳蜗植入物、角膜植入物、颅植入物、牙齿植入物、颌面植入物、器官植入物、矫形植入物、血管植入物、关节内植入物和胸植入物。

[0246] 在具体实施方式中,医疗装置是器官植入物,在某些情况下其可包括个体自身的细胞。

[0247] 在具体实施方式中,接触步骤包括选自以下的手段:电穿孔、超声处理、射频、加压喷雾及其组合。

[0248] 在具体实施方式中,接触步骤包括建立间液与组合物之间的接触。其可特别有利于被间液包围的伤口。间液与组合物的接触可通过用针、微针或包含多个针或微针的设备刺穿和/或挑拨皮肤来实现。这样的针或微针优选非中空的,并可被制成多针形式,例如在梳子或刷子样装置上的多针形式。

[0249] 本发明方法适用于人、非人的哺乳动物、鱼类和鸟类。

[0250] 制品

[0251] 本发明方法可包括结合了含本文所述聚合月桂烯的组合物制品的应用。

[0252] 药物组合物可以是制品上的包衣(涂层)的形式,或可被包含在与该制品构成一体

的容器中。药物组合物有利地以装置上的包衣存在,该装置被嵌入机体且其目的在于在其中整合,例如植入物。因此,药物组合物可由于聚合月桂烯诱导细胞分化的活性而促进组织在植入物上闭合。

[0253] 药物组合物可有利地被结合到用于伤口愈合或组织修复的制品上或制品中,例如,敷料或绷带。因此,药物组合物可由于聚合月桂烯诱导细胞分化的活性而促进伤口愈合。

[0254] 在其他情况下,药物组合物可被结合到输送装置,如针、注射装置或喷雾分配器中,组合物从该装置被输送到需要治疗的机体部位,例如伤口部位。

[0255] 制品包括但不限于织物制品、尿布、伤口敷料、医疗装置、针、微针、注射装置和喷雾分配器。在具体实施方式中,制品包括多个微针。医疗装置和植入物如上文所述。

[0256] 提出以下实施例以更充分地说明本发明的某些实施方式。但其无论如何都不应被解释为限制本发明的宽泛范围。本领域技术人员可容易地对本文所公开的原理作出多种改变和修正,而不脱离本发明的范围。

实施例

[0257] 实施例1植物来源的乳香分离组分的制备

[0258] 方法1.将乳香树脂(10g)与无水乙醇(200ml)混合,并使混合物保持过夜。振荡混合物,使较大的不溶性颗粒沉降20分钟,并将乙醇转移至新烧瓶。用新的无水乙醇部分(150ml)振荡残余物10分钟。将该乙醇部分与第一部分混合。用另一150ml无水乙醇部分重复该程序,将该部分与前两个乙醇部分混合。随后,利用旋转蒸发器(水浴温度30°C)在真空中去除乙醇。向残余物添加己烷(300ml),并反复振荡混合物经过两小时的时间。保持在封闭的烧瓶中过夜以完成可溶物的溶解和任何不溶物的沉淀,然后将澄清的己烷溶液转移至干净、预称重的烧瓶,并利用旋转蒸发器去除己烷。立即向所获得的分离组分添加所需量的油,并振荡混合物直到获得均质的混合物。

[0259] 方法2.将乳香树脂(10g)与无水甲醇(300ml)混合,并使混合物保持过夜。振荡混合物,使较大的不溶性颗粒沉降20分钟,并将甲醇可溶性组分转移至新烧瓶。用新的无水甲醇部分(200ml)振荡残余不溶物10分钟。将该第二甲醇可溶性组分与第一甲醇可溶性组分混合。用另一200ml无水甲醇部分重复该程序,并将该第三甲醇可溶性组分与前两个甲醇可溶性组分混合。随后,利用旋转蒸发器(水浴温度30°C)在真空中去除甲醇。向残余物添加己烷(300ml),并反复振荡混合物经过两小时的时间。保持在封闭的烧瓶中过夜以完成可溶物的溶解和任何不溶物的沉淀,然后将澄清的己烷溶液转移至干净、预称重的烧瓶,并利用旋转蒸发器去除己烷。立即向所获得的分离组分添加所需量的油,并振荡封闭烧瓶中的混合物直到获得均质的混合物。

[0260] 方法3.用研杵和研钵研磨乳香树脂(5g),并将其与己烷(200ml)混合。在8小时时间内每30分钟振荡混合物,然后留至过夜。将己烷可溶性组分从不溶物去除,并转移至干净的烧瓶。利用旋转蒸发器从己烷可溶性组分中去除己烷。然后对残余物经历高真空系统(<0.01mbar)至少24小时,从而去除额外的挥发性物质。然后向残余物添加无水乙醇(100ml),并反复振荡混合物1小时时间。将乙醇可溶性组分转移至干净的烧瓶,并用另外的100ml无水乙醇部分反复进行萃取。将乙醇可溶性组分组合,并使任何残留的不溶物沉降过夜。将

澄清的乙醇溶液转移至干净、预称重的烧瓶中,并在真空下去除乙醇。立即向残余物添加所需量的油,并振荡混合物直到获得均质制剂。

[0261] 方法4.收集、清洗和研磨洋乳香树、大西洋黄连木或*P. palestina*树的叶、软枝、果实和浆果。首先进行乙醇或甲醇溶解,基本如方法1和2所述,随后用乙醇或甲醇与植物油的组合以多个循环进行溶解。

[0262] 方法5.收集、清洗洋乳香树叶(30g),并用刀将其切成小片,置于食物处理器中。添加并处理橄榄油(100ml)。将全部混合物移出,并置于玻璃烧杯中。添加200ml乙醇(96%),并将混合物加热至65°C 20min。将全部混合物置于纱布中,并将液体挤出。通过移液将上层乙醇相去除,弃用。可通过蒸发将剩余的乙醇从油相去除。

[0263] 方法6.用乙醇(96%,200ml)洗涤月桂树(*Laurus nobilis*)的浆果(25克)(于五月或六月收集)30秒。去除乙醇和浆果,并向残余物添加橄榄油。使任何不溶物沉淀,并分离澄清的油溶液。

[0264] 方法7.对于每一次制备,使用约10克从Zikhron Yaakov,Israel地区的洋乳香树、大西洋黄连木或*P. palestina*树收集的树脂渗出物。将该树脂在适当的玻璃容器中与30ml甲醇混合,并在30分钟至2小时的时间内反复剧烈振荡混合物。溶解部分树脂,此时不溶物沉降在容器底部。滗去上层液体,如上添加另外的甲醇等份试样,并反复进行振荡和滗去过程。然后将残留的不溶物浸泡在蒸馏水中30秒至1分钟,产生残留不溶物的白色乳状液。用水和甲醇进行若干次交替快速循环处理,然后将残留的不溶物风干并称重。一般,从10克起始树脂得到约1-3克不溶物。用乙醇作为溶剂代替甲醇得到相似的结果。在干燥后,通过添加植物油——一般为橄榄油或葡萄籽油,立即进行最终不溶物组分的溶解,植物油的量足以提供所需浓度的溶液,一般为1%或10%。

[0265] 方法8.对于每一次制备,使用约10克的(i)树脂渗出物,收集自生长在Carmel Mountain Region,Israel的洋乳香树或*P. palestina*树皮;或(ii)购得的Chios乳香(购自例如the Chios Mastic Growers Association或G.Baldwin&Co.)。将树脂在研钵中研磨,转移至玻璃烧杯,并添加100ml乙醇(98%)。振荡数分钟,然后滗去乙醇,留下由于去除了可溶物而质量减少的树脂。添加额外量的乙醇,并快速反复进行振荡、滗去和溶剂添加步骤多个循环,每循环持续5至30分钟之间。将最终循环后残留的不溶物(一般相应于按重量计购买原料的20至35%或收集的树脂原料的10至25%)溶解在橄榄油、花生油、葡萄籽油、芝麻油、棉花油或大豆油中的一种,给出最终浓度8至10%(w/w)。

[0266] 方法9.将研磨的乳香(~10g)与100ml甲醇混合。振荡数分钟后,将甲醇滗去,留下由于去除了溶解物而质量减少的不可溶性白色物。添加额外量的甲醇,并快速反复进行振荡、滗去和溶剂添加步骤多个循环。将最终循环后残留的不溶物(一般相应于按重量计原料的20至30%)溶解在橄榄油中。溶解过程一般涉及温至45°C的橄榄油和烧杯中轻微的搅拌。

[0267] 方法10.将研磨的乳香(~10g)与25ml大豆油和100ml甲醇在玻璃烧杯中混合。用磁力搅拌器进行搅拌2小时。滗去溶剂,并添加新的甲醇,然后搅拌1小时。滗去溶剂,然后在真空下蒸发,去除残留的溶剂。

[0268] 方法11.将研磨的乳香(~10g)与100ml乙醇在玻璃烧杯中混合。用磁力搅拌器进行搅拌10分钟。滗去溶剂,并添加额外量的乙醇,然后搅拌5分钟,并滗去溶剂。溶剂添加、搅拌和滗去步骤反复4个循环。然后向不溶性白色物添加正己烷(100ml),接着反复进行振荡

直到该物质溶解。将少量样本干燥和称重,从而测定浓度。将大量己烷溶液施加于校准的尺寸排阻柱,并弃去分子量1500以下的组分。将分子量高于1500的组分与20克重石蜡软膏混合。通过反复混合使混合物均质化,并在真空下通过蒸发去除己烷。

[0269] 也可通过混合石蜡和具有增大的分子量的蜡进行该程序,从而获得更稳固的产物。

[0270] 本文所用的术语“RPh-1”指以上述方法中任一种制备然后溶解在适当的油、蜡或其组合中的分离组分。

[0271] 将RPh-1直接用于体外细胞培养实验或治疗测试动物,一般以如下最终浓度:本文所述的具体油或油混合物中0.025至5%的范围内。此外,如实施例2所示,RPh-1的主要成分被测定为1,4-聚- β -月桂烯,其分子量在5000至20,000的范围内。

[0272] 实施例2.从植物来源分离的聚合月桂烯的化学表征

[0273] 概述

[0274] 根据方法1或2提取洋乳香树的乳香树脂,从而获得所需组分(被称为RPh-1),将该组分通过尺寸排阻层析(SEC)进行分析,从而界定分子量分布。通过在制备型SEC分级后进行核磁共振(NMR),分析RPh-1的化学结构。

[0275] 发现RPh-1包含分子量在1000以下的“轻”组分和分子量在5000至20,000范围内的“重”聚合物组分。基于NMR分析($^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$),“重”组分中的主要化合物的结构与1,4-聚- β -月桂烯一致。

[0276] 用乙酸乙酯和四氢呋喃(THF)作为洗脱液进行制备型分离。在两种情况下,观测到“重”聚合物组分呈现多种有益的生物活性,包括诱导细胞分化的生物活性,如实施例4和6所述。相反,“轻”组分在利用着色的视网膜上皮细胞进行的体外效力实验中证实了毒性。发现为保留聚合物组分的活性,通过将其稀释在疏水溶剂——优选油,任选地与蜡组合——中以保护其不发生氧化或交联反应至关重要。

[0277] 方法

[0278] 将乳香树脂(10g)与无水乙醇(200ml)混合,并使混合物保持过夜。振荡混合物,使较大的不溶性颗粒沉降20分钟,并将乙醇转移至新烧瓶中。将残余物与新的无水乙醇部分(150ml)一起震荡10分钟。将该乙醇组分与第一部分混合。用另一150ML无水乙醇部分反复进行该程序,将该无水乙醇部分与前两个乙醇组分混合。随后,在旋转蒸发器中真空去除乙醇(水浴温度30°C)。向残余物添加己烷(300ml),并反复振荡混合物经过两小时的时间。在封闭的烧瓶中保持过夜从而完成任何不溶物的沉淀,然后将澄清的己烷溶液转移至干净的烧瓶中,并用于分析型分离和制备型分离。

[0279] 在其被从固定相洗脱出的基础上,利用尺寸排阻层析(SEC)分离大分子。在SEC中,最高分子量的化合物全部从装填孔(packing pore)洗脱出,因此第一个洗脱物。在与用分子量已知的化合物——例如聚苯乙烯标准品——构建的标准曲线进行比较的基础上,通过SEC可评价聚合物测试化合物的分子量。但是,在这种比较基础上确定的聚合物分子量可具有固有误差容限至少约10至15%,因为所有聚合物的流体力学体积与分子量之间的关系并不相同,因此仅可以做出近似测定。

[0280] 对于分析型SEC,使用PLgel(7.5*300mm $5\mu\text{10}^3\text{A}^\circ$)柱,并用分子量1000、2000、5000、10000、30000和70000的聚苯乙烯标准品对其进行校准。所用溶剂(己烷、乙酸乙酯、四

氢呋喃 (THF)、二氯甲烷 (DCM) 和丙酮) 均是用于液相色谱的分析级。对于以分析为目的, 发现 THF 是最理想的。所用的色谱仪是 ThermoPhinnigan TSP, 配置二极管阵列检测器或 ELSD 检测器, 应用流速 1ml/min, 运行时间为 15min, 且流动相为 100% THF。

[0281] 应用以下条件进行制备型 SEC:

[0282] 1. THF 的条件:

[0283] 柱: PLgel: 25*300mm 5 μ 10³A°

[0284] 流动相: 己烷 60%/THF 40%, 流速 11ml/min。

[0285] 将 1ml 提取物各反复分离 12 次, 并收集两个组分: 1) 高 MW 部分 (content); 2) 低 MW 部分。

[0286] 2. DCM 的条件:

[0287] 柱: PLgel: 25*300mm 5 μ 10³A°。

[0288] 流动相: 己烷 70%/DCM 30%, 流速 11ml/min。

[0289] 将 1ml 提取物各反复分离 12 次, 并收集两个组分: 1) 高 MW 部分; 2) 低 MW 部分。

[0290] 对于每次制备型 SEC 运行, 用分子量 1000、2000、5000、10000、30000 和 70000 的聚苯乙烯标准品对柱进行校准。

[0291] 将从这两种不同的流动相收集的组分分成两份, 一半用蒸发器蒸干, 并添加 3ml 油。向第二半添加 3ml 油, 然后蒸发有机溶剂。分析所获得样本的生物活性。

[0292] 分别在 300MHz 和 75MHz 下通过 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 分析 THF 洗脱液的高 MW 物质。

[0293] 结果

[0294] 分析型 SEC

[0295] 图 1 显示利用 PDA 检测器 (虚线) 和 ELSD-SEDEX 检测器 (粗线) 得到的 SEC 分析型色谱图。仅用 ELSD 检测器检测到相应于分子量约 60,000 至约 5000 范围内的组分 (在 5-7 分钟时洗脱)。两种检测器均表明存在分子量 < 1000 范围内的组分。

[0296] 制备型 SEC

[0297] 图 2 显示通过制备型 SEC 获得的高分子量 (图 2B) 和低分子量 (图 2A) 组分。高分子量组分是通过在 DCM/己烷中运行的 SEC 获得的, 而低分子量组分是通过在 THF/己烷中运行的 SEC 获得的。表 1 概括了利用制备型 SEC 和多种溶剂系统获得的组分。

[0298] 表 1. 利用多种洗脱液和蒸发方式从制备柱收集的组分。

[0299]

组分号	分子量范围	洗脱液/蒸发方式
19-1	高	THF/己烷有油蒸发
19-2	低	
19-3	高	THF/己烷无油蒸发
19-4	低	
19-5	高	DCM/己烷有油蒸发
19-6	低	
19-7	高	DCM/己烷无油蒸发
19-8	低	

[0300] NMR 分析

[0301] 图3显示得自在己烷60%/THF 40%中运行的制备型SEC的高MW物质的¹H-NMR光谱。图4显示得自在己烷50%/THF 50%中运行的制备型SEC的高MW物质的¹³C-NMR光谱。

[0302] ¹H-NMR和¹³C-NMR分析表明,1,4-聚合β-月桂烯是得自极性溶剂-乳香不溶物(RPh-1)的制备型SEC的高MW组分的主要成分。

[0303] 实施例3. 1,4-聚合β-月桂烯的化学合成

[0304] 利用总体上基于Newmark等(1988) J. Polym. Sci. 26:71-77所公开程序的方法,制备不同分子量的合成1,4-聚合β-月桂烯制品。

[0305] 方法

[0306] 向配备冷凝器的250ml三颈烧瓶添加以下试剂:β-月桂烯、己烷和在环己烷中的仲丁基锂,均在氮气氛下,其量如表2所示。各反应中所用的己烷体积一般为丁基锂引发剂体积的至少约20至25倍。将各反应混合物加热至80℃,并搅拌约1小时。为评价聚合物的浓度,取少量等份试样(几毫升)溶液并蒸干。

[0307] 对于一些反应混合物,在反应后通过用过量己烷稀释最终混合物并用水洗涤两次而去除锂。将有机相分离,并用硫酸钠干燥。

[0308] 对用于生物活性分析和分子量表征,通过添加橄榄油至最终浓度10%(无己烷)和蒸发己烷溶剂,制备10%合成聚合物的橄榄油溶液。利用SEC和由校准曲线进行的计算确定表观分子量,该校准曲线用分子量2000、5000、10000、30000和70000的聚苯乙烯标准品制成。用于SEC的条件如下:

[0309] 柱:PLgel:7.5*300mm 5μ10³A°

[0310] 流动相:100% THF

[0311] 流速1ml/min

[0312] 检测器:ELSD

[0313] 结果

[0314] 在不同反应条件下生成的聚合β-月桂烯的预期分子量和计算分子量如表2所示。

[0315] 表2. 试剂量和化学合成聚合月桂烯的产物分子量。

[0316]

计算 MW	预期 MW	β-月桂烯 (mol)	仲丁基锂 (mol)	仲丁基锂 (ml)	反应
3816.05	2381	0.0735	0.00420	3	1
7007.32	3571	0.0735	0.00280	2	2
11400.54	7143	0.0735	0.00140	1	3
27153.13	14286	0.0735	0.00070	0.5	4
46034.97	28571	0.0735	0.00035	0.25	5
2845.24	1786	0.0735	0.00560	4	6

[0317] 由表2可见,不同的反应条件生成计算分子量在约3000至约46,000的范围内的聚合月桂烯。产物可被界定为在“高”分子量聚合月桂烯范围内——即<20,000至约50,000,和“低”分子量聚合月桂烯范围内——即<3000至约11,000。“高”分子量和“低”分子量聚合β-月桂烯的代表性分析型SEC曲线分别如图5A和图5B所示。

[0318] 分析型SEC中用水洗涤的反应产物产生基本相同的结果。

[0319] 图6显示β-月桂烯聚合产物的代表性¹H-NMR光谱。图7显示β-月桂烯聚合产物的代表性¹³C-NMR光谱。

[0320] ¹H-NMR和¹³C-NMR分析表明,聚合反应产物的结构与1,4-聚-β-月桂烯的结构一致。

[0321] 用于制备聚合β-月桂烯的合成反应涉及阴离子聚合(被称为“迈克尔加成反应”)的机制。

[0322] 为成功起始,起始步骤的自由能必须适当。因此,有必要用适当强度的引发剂配合单体,以使第一次添加是“下滑性的”(downhill)。典型的阴离子反应是利用丁基锂C₄H₉Li在惰性溶剂如正己烷中进行苯乙烯聚合。当在适当条件下进行时,终止反应不发生在阴离子聚合中。由于与链末端碳负离子的快速反应,一般添加化合物如水、醇、分子氧或二氧化碳以终止进程。

[0323] 由于不存在转移过程,阴离子聚合引起非常明显的分子质量分布。如果溶剂极纯,聚合物链将在所有单体耗尽后仍具活性。

[0324] 聚合度被表示为:

$$[0325] \quad \bar{n} = \frac{[M]}{[I]}$$

[0326] 其中M=单体,I=引发剂。

[0327] 如上所述,丁基锂是含异戊二烯分子如萜烯阴离子聚合的适当引发剂。因此,其已被用于合成本发明的1,4-聚月桂烯。

[0328] 虽然上述程序在现有技术中已被一般公开(参见例如Newmark等(1988) J. Polym Sci. 26:71-77),但本文公开的重要修正在于如下发展:己烷高度稀释液以及将溶剂变为油的最终步骤,从而获得保留其生物活性并具有高电势的聚合物。

[0329] 实施例4.RPh-1诱导视网膜色素上皮细胞培养物的神经元型分化。

[0330] 概述

[0331] 本发明涉及诱导分化和细胞成熟,并直接用于功能组织——特别是神经元组织——的再生。我们的实验发现显示,RPh-1诱导视网膜色素上皮细胞——神经元源上皮组织——分化为形态学神经元细胞,该形态学神经元细胞生成轴突、树突和被称为突触的细胞间接点。经RPh-1处理细的胞形态学分化伴随神经元特异性分化抗原B3微管蛋白的重新表达。神经元细胞分化的诱导有力地表明RPh-1对神经元干细胞分化成功能性神经元具有影响。当前关于痴呆和阿尔茨海默病病理的教条认为,该缺陷涉及神经元不能形成功能性突触接点(参见例如,Kimura R,Ohno M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. Neurobiol Dis. 2008 Nov 5)。

[0332] 因此,本文所述实验支持实施例1所述的乳香分离组分以及聚合月桂烯——RPh-1中的活性分子——的应用,作为引起神经退行性疾病如痴呆和阿尔茨海默病中神经再生的治疗方式。

[0333] 合成的聚合月桂烯也在本发明的范围内,并且可用于本发明的治疗方法。

[0334] 视网膜色素上皮(RPE)细胞

[0335] 目的在于评价RPh-1对多种人源细胞系的作用的研究引出ARPE-19细胞——非恶性人类视网膜色素上皮细胞系——的应用。

[0336] 视网膜色素上皮 (RPE) 是单层神经元六角形着色上皮细胞, 其形成眼视网膜最外细胞层, 并附于下方脉络膜。RPE的作用包括支持、给养和保护下方的神经视网膜感光器。

[0337] RPE细胞涉及维生素A循环中感光细胞外节的吞噬作用, 在该循环中, 其使全-反式视黄醇异构化为11-顺式视网膜; 并涉及为感光器提供D-葡萄糖、氨基酸和抗坏血酸。

[0338] 虽然RPE在体内着色, 但ARPE-19细胞不形成黑色素, 并且未着色。在培养中, 细胞生长为纺锤形和多角形细胞。

[0339] 方法

[0340] 将ARPE-19细胞 (得自the American Type Culture Collection, ATCC) 在生长培养基中以每孔 $2-5 \times 10^3$ 个细胞 ($1-2.5 \times 10^4$ 细胞/mL) 的浓度在平底96孔组织微量培养板 (Costar) 中铺平板, 该培养基由补充以10%胎牛血清、200mM谷氨酰胺、100单位/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM:Ham F-12, 1:1组成。在用RPh-1处理前, 使细胞粘附平板表面过夜。

[0341] RPh-1基本如实施例1的方法1所述制备, 提供10%载体溶液, 该载体由葡萄籽油、橄榄油、棉花籽油、Mygliol[®]810或Mygliol[®]812组成。将制备物以0.5 μ l、2 μ l、5 μ l和20 μ l的体积添加到培养物中。引入200 μ l样本培养基总体积的这些体积分别相应于0.025%、0.1%、0.25%和1%的最终RPh-1浓度。油载体用作载体对照, 并以相同的体积用于对照培养物。

[0342] 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中温育培养物72hr。然后去除培养基, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤培养物两次, 用无水乙醇固定10分钟, 并用Hemacolor[®]试剂 (Boehringer Mannheim) 染色, 该Hemacolor[®]试剂以类似于Giemsa的方式对细胞进行染色, 并且可用于定量细胞生存力分析 (参见Keisari, Y. A colorimetric microtiter assay for the quantitation of cytokine activity on adherent cell in tissue culture. J. Immunol. Methods 146, 155-161, 1992)。染料用20%SDS洗脱, 并在630nm下于ELISA读数仪中进行定量 (一式三份样本进行评估)。为确定 β -3微管蛋白的表达, 将细胞以培养基中 10^5 个细胞/孔的浓度在浸泡在6孔微量培养板中的无菌玻璃盖玻片上铺平板, 该培养基由补充以10胎牛血清和青霉素 (100单位/ml)、链霉素 (100 μ g/ml) 和谷氨酰胺 (2mM) 的Dulbecco最低限度必需培养基 (DMEM) 和Ham F12培养基的1:1混合物组成。使细胞粘附于盖玻片过夜, 并将橄榄油中7%RPh-1 (或仅橄榄油作为对照制备物) 以25 μ l/ml培养基的体积注入培养物, 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下温育72hr。然后细胞用PBS洗涤2X, 并用4%多聚甲醛固定。为确定 β -3微管蛋白在细胞中的表达, 将玻璃盖玻片用针对人 β -3微管蛋白的鼠单克隆初次抗体染色, 然后用二次FITC标记的抗鼠IgG染色。对DAPI染色的细胞核进行计数。然后在共焦显微镜中评价测试制备物和对照制备物。

[0343] 结果

[0344] 意外地发现, 用RPh-1对ARPE-19RPE细胞的处理诱导了巨大的形态学改变, 该形态学改变明显是神经分化的特征。形态学改变在仅用油载体处理的对照培养物中没有发生, 并且在用RPh-1处理的测试培养物之中观察到类似的结果, 而不考虑用作活性化合物的载体的油。形态学改变也与细胞增殖停止相关联, 进一步支持了RPh-1诱导神经分化的结论。

[0345] 对照油处理的培养物显示出ARPE-19RPE细胞典型的纺锤形和多角形生长图案特征 (图8A)。在培养物中温育48小时后, 用RPh-1 (0.1%; 1mg/ml) 处理的已处理细胞的形状改变, 并且生成厚重、稠密染色的单个极长突出, 其表明是神经元细胞轴突 (图8B)。温育48小

时后,用RPh-1 (0.25%;2.5mg/ml)处理的细胞显示出大量较细长突出,其表明是树突(图8C)。用RPh-1温育72小时后,细长突出与相邻细胞的类似突出形成连接点,生成相互连接的细胞网,潜在地能够在彼此之间传递信息(图8D)。类似的网通常存在于中枢神经系统的神经元之间,并能传输和处理信息。

[0346] 在对照细胞在72小时温育期间增殖时,RPh-1处理的细胞迅速停止增殖,并且细胞保持稀疏密度,进一步支持细胞分化的观点。

[0347] 利用上述不诱导分化的RPh-1失活制备物,ARPE-19细胞开始生成大量黑色素微粒,这些培养物继续增殖,且细胞密度增大以汇合。

[0348] 用RPh-1(棉花籽油中5%)对ARPE-19细胞的处理显示出造成如下的表达:神经元和突触发生标记 β 3微管蛋白(TUBB3)、神经元型分化标记;Arc/Arg3.1,与突触塑性有关;和神经元正五聚蛋白II(NPTX2),神经元即早基因,其作用于兴奋性突触发生。分化ARPE-19细胞的免疫荧光分析显示,用RPh-1温育72小时后,细胞对于 β 3TUB、Arc/Arg3.1和NPTX2阳性染色(图9,右侧),而观察到这些标记在处理前极少表达或不表达(图9,左侧)。

[0349] 进一步得到如下证据:RPh-1处理ARPE-19细胞导致细胞复制停止。用RPh-1处理细胞72小时,并将总蛋白含量(涉及培养物中存在的细胞总数)与未经处理的对照ARPE-19细胞进行比较。如图10所示,与对照培养物相比,RPh-1处理的培养物含有明显较低的蛋白质含量,从而确定细胞增殖基本终止。

[0350] RPh-1诱导细胞分化效力的评分系统

[0351] 在以上结果的基础上,以每孔 2×10^3 个细胞铺平板,建立评分系统以评价RPh-1诱导细胞培养物分化的效力。级别及其各自的描述列于表3中。

[0352] 表3.

[0353]

级别	分化效果描述
0	无影响。细胞增殖,培养物汇合,并且细胞保持其典型纺锤形和多角形形态。
1	细胞产生着色颗粒化,仍继续增殖。
2	低于10%的细胞发生形态学改变,生成伸长的树突状突出。
3	约10-30%细胞显示伸长的突出。相对于未经处理的对照细胞,细胞增殖减少。

[0354]

级别	分化效果描述
4	多于30%的细胞形成伸长的树突状突出——该突出在相邻细胞之间形成连接点——和厚重轴突状延伸。
5	全部培养物发生分化。细胞保持稀疏,且其全部发生形态学改变,伸长的树突状突出、轴突状结构和细胞间连接点的形成达到顶点。

[0355] 第3、4和5级细胞培养物的代表性实施例分别如图11A、11B和11C所示。

[0356] 实施例5.RPh-1缩短麻醉的恢复期。

[0357] 日益显著的是,麻醉与神经元损伤有关,需要安全有效的方法以进行神经保护,免受这种损伤。

[0358] 方法

[0359] 经过7天对每组8只C57B1/6小鼠通过皮下途径以0.05mL 3%葡萄籽油溶液注射RPh-1三次(每隔一天),剂量为30mg/kg。然后使小鼠经受亚致死剂量(120mg/kg)的氯胺酮,将其给予小鼠。用0.05mL葡萄籽油载体处理对照组。

[0360] 结果

[0361] 在麻醉后,RPh-1处理的小鼠的恢复明显更快,如其完全的活动性所证,而对照仍不可活动。对照组中由可活动能力限定的恢复比RPh-1处理组用时长3分钟。该观察结果表明,RPh-1中的活性成分聚合月桂烯缩短了从麻醉的恢复期,并且可用于神经保护,免受与麻醉药物有关的不良副作用。

[0362] 实施例6. 肿瘤细胞系中细胞死亡后RPh-1诱导细胞分化。

[0363] 对RPh-1对两种黑素瘤细胞系和三种成神经细胞瘤细胞系的影响进行研究。人黑素瘤细胞系5151和鼠黑素瘤细胞系B16F10均在组织培养物中以未分化的形式增殖,不生成黑色素。人成神经细胞瘤细胞系Lan-1、Lan-5和SY5Y在培养物中增殖为不呈现分化形态的纺锤形细胞。

[0364] 方法

[0365] 将细胞以每孔 2×10^3 个细胞在96孔平底微量培养板(Costar)铺平板,并在补充有10胎牛血清、200mM L-谷氨酰胺、100单位/ml青霉素和100微克/ml链霉素(所有试剂均来自Gibco-BRL)的200ml培养基DMEM(Dulbecco培养基)中培养。经过夜粘附后,将RPh-1(自10%葡萄籽油溶液)添加到细胞培养物中以提供0.025%、0.1%、0.25%和0.5%的最终浓度,并继续温育48和72小时。用葡萄籽油载体作为对照。72小时后,细胞用甲醇固定,并用**Hemacolor®**试剂(Boehringer Mannheim)染色。

[0366] 结果

[0367] 发现24-48hr后,相对于图12A中经对照处理的细胞,用RPh-1对黑素瘤细胞的处理诱导黑色素形成,如图12B和图12C所示。RPh-1处理进一步造成复制终止,如减少的细胞密度所示,例如图12D中。72小时后,在用四种测试RPh-1浓度中的每一种温育的培养物中均观察到细胞死亡。

[0368] 在用RPh-1(最终浓度0.025%)处理成神经细胞瘤细胞系Lan-1、Lan-5和SY5Y时,细胞开始生成树突状突出,且细胞增殖停止。较高RPh-1浓度造成全部培养物中细胞死亡。因此,RPh-1处理诱导形态学神经元样分化特征,其后细胞死亡。

[0369] 在用聚合月桂烯的分离组分(最终浓度0.025%)处理成神经细胞瘤细胞系Lan-1、Lan-5和SY5Y时,细胞开始生成树突状突出,且细胞增殖停止。较高RPh-1浓度造成全部培养物中细胞死亡。因此,RPh-1处理诱导形态学神经元样分化特征,其后细胞死亡。

[0370] 结论

[0371] 聚合月桂烯——RPh-1的活性成分,与诱导多种细胞系的分化有关,该细胞系源自恶性肿瘤黑素瘤和成神经细胞瘤。

[0372] 终末分化障碍(block)被认为是癌症中细胞增殖持续的主要途径。克服该障碍已被证明是若干形式癌症的有效治疗方式(例如,治疗急性早幼粒细胞白血病的维甲酸类),

现被称为“靶向治疗”。靶向治疗并不杀死癌细胞,但改变其行为,主要通过诱导分化进行。因此,可降低多种癌症的攻击性。

[0373] 如本文公开,聚合月桂烯——RPh-1的活性成分,已被发现克服肿瘤细胞分化的障碍——如神经元细胞树突在成神经细胞瘤细胞系中形成和黑色素的形成在黑素瘤细胞系中被诱导所示。在这两种情况下,这些改变与细胞增殖停止和细胞死亡有关。

[0374] 实施例7.化学合成的聚合月桂烯诱导视网膜色素上皮细胞培养物的细胞分化。

[0375] 进行实验以确定两种不同分子量范围的合成聚合月桂烯是否诱导ARPE-19细胞的神经分化。

[0376] 方法

[0377] 将ARPE-19细胞以生长培养基中每孔 5×10^3 个细胞(2.5×10^4 细胞/mL)的浓度在平底96孔组织微量培养板(BIOFIL)中铺平板,该生长培养基由DMEM:Ham F-12,1:1组成,补充以10%胎牛血清、200mM谷氨酰胺、100单位/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素。在用化学合成的聚合月桂烯组分处理前,使细胞粘附平板表面过夜。

[0378] 在RPE细胞分化分析中测试具有不同分子量的分离组分——化学合成的聚合月桂烯——的活性。实施例3所述的组分18-1(分子量在约50,000道尔顿的范围内)和组分18-2(分子量在约20,000道尔顿的范围内)为所使用的组分18-1和18-2,并且在橄榄油中每一个以浓度10%制备RPh-1。将各制备物添加到ARPE-19细胞培养物中,所用体积为0.5 μ l、2 μ l、5 μ l和20 μ l,分别相应于0.025%、0.1%、0.25%和1%的最终浓度。橄榄油用作载体对照,并以相同体积被施用于对照培养物。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中温育培养物72hr。然后去除培养基,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤培养物两次,用无水乙醇固定10分钟,并用Hemacolor[®]试剂染色。

[0379] 结果

[0380] 两组分18-1和18-2均显示具有诱导ARPE-19细胞神经分化的活性(图13和表4)。观测到0.25%的组分18-1具有最佳活性(如图13A所示),而0.1%略微有效,0.025%无效(表4)。组分18-2的效果如图13B所示。

[0381] 表4.组分18-1和18-2对ARPE-19细胞分化的影响

组分	体积(ul)	结果
18-1	0.5	高细胞密度, 无分化
	2	高密度, 分化细胞
	5	较低密度, 分化细胞, 长轴突, 具有细胞间接点
	20	细胞死亡
18-2	0.5	低密度, 少量完全分化的细胞。
	2	分化细胞, 但轴突较短且比 18-1 少
	5-20	细胞死亡
RPh-1	0.5	分化细胞簇, 长轴突
	2	密度较低的分化细胞, 长轴突
	5-20	细胞死亡
油 载体	0.5-20	极高细胞密度, 无分化

[0383] 结论

[0384] 观测结果支持以下结论: RPh-1——乳香分离组分制剂, 具有诱导神经元细胞分化的活性。

[0385] 观测结果也支持以下结论: 聚合月桂烯, 无论从植物来源分离或化学合成, 均具有诱导神经元细胞分化的活性。

[0386] 实施例8. RPh-1诱导细胞分化的效果受乳香树脂中存在的极性溶剂可溶性组分阻碍。

[0387] 概述

[0388] 乳香树脂以及在其中鉴定的多种化合物与多种有益的生物活性和治疗活性有关。各种现有技术公开表明, 生物活性与通过用极性溶剂萃取乳香和回收极性溶剂可溶物而获得的组分有关。相反, RPh-1是在其可溶于极性有机溶剂和非极性有机溶剂的基础上从乳香树脂分离的组分, 而仅可溶于极性有机溶剂但不溶于非极性有机溶剂的化合物被弃去(后者在本文中被称为组分SP)。RPh-1的主要成分是聚合月桂烯, 如实施例2所示。但是, 该化合物在前从未被认为具有有益效果, 而被公认干扰乳香树脂中存在的活性化合物的口服给药和生物利用度。组分SP相应于现有技术中被认为具有多种有益生物活性的乳香组分。本研究的目的在于评价SP对RPh-1所发挥的细胞分化作用的影响。现公开SP中存在的化合物干扰和阻碍RPh-1诱导的细胞分化作用。

[0389] 方法

[0390] 基本如实施例1的方法1所述, 用乙醇作为极性溶剂, 乳香树脂经处理得到RPh-1。从不溶物中滗去乙醇可溶性组分, 得到组分SP。如下制备不同比例的RPh-1和组分SP混合物:

[0391]

混合物	RPh-1 (%)	组分SP (%)
A0	95	5
A1	90	10

A2	80	20
A3	70	30
A4	50	50
A5	25	75

[0392] 此外,制备溶于油(加温至60℃)的全部乳香,得到制备物TC。

[0393] 本研究的结果,被概括在表5中,表明富含RPh-1 (A0和A1) 的组分有效诱导ARPE-19分化。在这些培养物中所观察到的形态学改变与图8B和8C所示的相似。随着组分SP在混合物中的比例增加,细胞死亡增加,没有观察到细胞分化。仅用SP处理的培养物中的细胞在所有测试剂量下均死亡,组分TC仅发挥可忽略的作用。

[0394] 这些结果显示,有效的神经分化诱导活性仅由RPh-1中的聚合物提供,而SP极性组分仅导致细胞死亡。

[0395] 表5. RPh-1和SP的混合物对细胞分化的影响

[0396]

组分	体积(ul)	结果
A0	0.5	高细胞密度, 分化细胞。
	2	较低细胞密度, 具有长轴突的分化细胞。
	5-20	细胞死亡。
A1	0.5	高细胞密度。分化细胞比 A0 少。
	2	分化。
	5	低细胞密度, 具有长轴突的分化细胞。
	20	细胞死亡。
A2	0.5	低细胞密度, 分化。

[0397]

组分	体积(ul)	结果
	2	部分分化的细胞(仅短树突), 与细胞死亡有关。
	20	细胞死亡。
A3	0.5	零星部分分化。高细胞密度(细胞增殖)。
	2-20	细胞死亡。
A4	0.5	细胞死亡, 毒性。
	2-20	细胞死亡。
A5	0.5-20	细胞死亡。
RPh-1	2	分化细胞, 具有细胞间接点和长轴突。
	5	分化和长轴突。
	20	细胞死亡。
SP	0.5-20	细胞死亡。
TC	0.5	可忽略的效果。
	2	细胞死亡。
载体	0.5-20	高密度。

[0398] 实施例9.犬伤口愈合。

[0399] 老龄雄性金毛寻回犬 (golden retriever dog) 患有开放式慢性腿伤超过6个月。皮肤病变与脱毛症 (毛皮脱落) 和周围毛皮脱色相关联。通过若干RPh-1局部治疗循环对该犬进行治疗。在初步施用后,短暂的浮肿和肿胀发生16-20hr。然后由于肉芽组织快速和蓬勃形成,正常组织的轮廓重新形成功能性上皮组织 (上皮形成) 以及发生新血管生成 (微血管新形成)。伤口愈合向内朝向伤口中心收缩,表明存在 (中胚层源的) 纤维肌细胞。

[0400] 伤口在约12周内完全愈合,且皮肤显著具有功能性,毛皮再生。图14显示了RPh-1治疗前 (图14A) 和治疗后 (图14B) 的患病区域。

[0401] 在另一患有脱毛症的老龄雄犬中,RPh-1局部治疗导致毛皮再生,从而与周围毛皮合为一体。

[0402] 另一狗患有颌肿瘤 (非诱导),该颌肿瘤的部分突起到口腔中。突起部分被外科手术切除,而嵌入颌内的肿瘤部分不能被去除。该肿瘤经诊断为肉瘤。将在葡萄籽油中配制成的RPh-1施用于患病颌区域。该处理使覆盖外科手术切口处的牙龈近似完全被治愈至如下程度:没有留下疤痕,并且外科手术切口处不再可辨。甚至肿瘤从嵌入颌的部分的预期复发也被防止数周的延长。RPh-1处理引起外科手术切口处极快地愈合和牙龈完全再生。

[0403] 在以上两种情况下,所治疗犬的伤口愈合均伴有活力、精神意识和身体活动性总体提高。

[0404] 以上结果支持聚合月桂烯——RPh-1的活性成分——对于伤口愈合、毛囊再生和神经系统退化逆转的应用。

[0405] 实施例10.鱼伤口治疗。

[0406] 金鱼和锦鲤 (均为鲤科) 易患细菌——特别是嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)——引起的体被溃疡。

[0407] 将均患有细菌性溃疡的每条重约100克的金鱼分成单独罐中两组,每组包括4条鱼。各罐装有100升体积的水,并用空气泵保持通气。各组重量和伤口大小 (在1-1.5cm×1-1.5cm的范围) 随机。用20微升仅葡萄籽油 (对照组) 或1%RPh-1的葡萄籽油溶液 (治疗组) 穿过完整的体被在离溃疡约5mm处对各鱼进行肌内注射。

[0408] 测试组的鱼在4个RPh-1治疗循环后开始日益改善,并且经过一个月时间被治愈。经过本研究六周时间,该组所有鱼均存活。这些鱼也呈现灵活和响应性行为,包括积极游水、寻找和抢夺在水面提供的食物以及响应于罐壁敲击的迅速惊吓的离开移动。

[0409] 相反,对照组的鱼其溃疡情况未显示改善。该鱼嗜眠,呈现在罐底的久栖行为,并且对刺激无响应。该组的所有鱼均在6周结束时死亡。

[0410] 这两组的以下两个参数的差异非常显著:鱼存活率和伤口闭合。

[0411] 实施例11.利用B6.V-Lepob/01ahsd小鼠模型的RPh-1在伤口愈合中的作用。

[0412] 利用B6.V-Lepob/01ahsd (ob/ob) 小鼠 (在4周龄表现肥胖) 评价RPh-1在伤口愈合中的作用。利用一次性活组织检查穿孔器 (**Uni-Punch® Disposable Biopsy Punch**, Premier) 在各鼠背部远端区进行全厚皮肤穿孔。穿刺为椭圆形。穿刺的平均长轴长度在5.1至5.3mm的范围内。穿刺的平均宽轴长度在4.8至5.1mm的范围内。将橄榄油中的RPh-1 (5%) 皮下注射在距伤口边缘3-5毫米的两个伤口周围处 (A组, n=6), 或局部注射在伤口上 (B组, n=6)。将载体局部施用于小鼠伤口上 (C组, n=6)。其后, RPh1 (5%) 以20ul剂量体积 (注射)

或50u1剂量体积(局部给予)每周施用3次,本研究16天内共7次。

[0413] 图15显示伤口造成后第11天,与仅用载体治疗的小鼠(C组)相比,RPh-1治疗的小鼠(A组)的伤口大小(伤口面积)显著减小($p=0.005$)。RPh-1治疗的小鼠在伤口造成后第0天至第11天期间的伤口愈合速度明显快于仅用载体治疗的小鼠($p=0.034$)。

[0414] 实施例12.RPh-1在逆转大鼠模型慢性脑灌注不足(血管性痴呆)的神经退行性效应中的作用。

[0415] 血管性痴呆(VD)是痴呆的子类,在西方社会中其患病率仅次于阿尔茨海默病。VD引起多种神经精神和身体问题,并带来严重的经济负担。脑成像已揭示大脑皮层和脑白质的显著变化,这些病变被认为是血管性痴呆患者认知下降的核心病理(参见例如,Farkas等.,*Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain*.*Acta Neuropathol.*2004;108:57-64; Stenset等.,*White matter lesion subtypes and cognitive deficits in patients with memory impairment*.*Dement Geriatr Cogn Disord.*2008 26:424-431)。

[0416] 通过可影响认知功能的两颈总动脉的持续闭塞,可在大鼠脑中实验性诱导脑病变。该模型类似于血管性痴呆,并且实验技术可减少大脑皮层和海马中高达40-80%的血流数月,诱导某些学习障碍。因此,该模型被用于研究RPh-1治疗在逆转由血管性痴呆病变引起的缺陷中的作用。

[0417] 总共40只动物被随机分成3组,即未经治疗的假对照组、载体对照组和RPh-1治疗组(每组10-15只动物)。其被随机分成3组,未经治疗的假对照组、载体对照组和RPh-1治疗组。皮下给予10 μ l RPh-1(棉花籽油中5%)或载体2x/wk,并且在诱导血管性痴呆后14天给予第一剂。

[0418] Morris水迷宫(MWM)测试对海马功能敏感。利用前述方法进行水迷宫工作以评价两种CCA相关学习缺陷(Watanabe等.,*Cilostazol Stroke.*2006;37(6):1539-1545)。在直径160-cm充有深20-cm的水的圆形水池中准备圆形透明丙烯酸平台,其顶面在水下3cm。将大鼠面相池壁释放,记录逃至该平台所用的时间,作为逃脱等待时间。在CCA闭塞前第3天和CCA闭塞后第14、35、56、84和112天进行测试。在训练第6天,每天以2min的测试间隔进行训练测试。将动物置于水池中六个起始位置之一处。在每次训练测试中,记录逃至隐藏的平台所需的时间和路径长度。将六个训练测试的结果求平均,得到一个代表值,并且将该平均值用于最终统计分析。找到平台的动物可以停留在平台上30sec。90sec内没有找到平台的动物在测试结束时被温和地导向平台30sec。

[0419] 以如下测试经RPh-1治疗的动物(交叉线条)、经载体治疗的动物(空白条)和假对照动物(黑色条)的性能:在平台位置的频率(图16A);在平台区域的耗时(图16B);找到平台的等待时间(图16C);在区域1位置的频率(图16D);在有光部分的耗时(图16E);找到平台的等待时间(图16F);和速率(图16G)。全部测试均显示,经RPh-1治疗的动物的性能远远高于对照组中的至少一个。

[0420] 实施例13.RPh-1的病理性重量调控效果(开胃和抗肥胖效果)。

[0421] 实施例9所述带有多个伤口的犬另外遭受食欲不振,并且不进食放在其面前的食物。经所述RPh-1治疗约10天后,该犬对食物逐渐重拾兴趣,并且开始进食。一个月内,该犬对食物显示出强烈的兴趣,并且食欲类似于正常健康犬的食欲。

[0422] 实施例10所述患有溃疡的鱼另外遭受食欲不振。对照组持续忽视向水中提供的食物,而经RPh-1治疗的鱼对于食物给予以快速的移动热切地做出响应。

[0423] 实施例12所述的大鼠在慢性脑灌注不足后另外遭受重量减轻。在治疗35天(研究第56天)后,所述经RPh-1治疗的大鼠其重量的恢复显著快于经载体治疗的动物(图17A)。

[0424] 实施例11所述的小鼠一般遭受突变瘦蛋白基因引起的肥胖。图17B显示对小鼠皮下给予RPh-1(A组;菱形符号)造成体重增加明显低于经载体治疗动物(C组;三角符号)或通过局部给予RPh-1治疗的动物(B组;正方形符号)。A组小鼠在11天内增重4.9%。体重增加是相对于原(第0天)体重的。A组的体重增加明显低于B组小鼠的平均体重增加(p 值=0.02, T检验, Excel)。C组小鼠类似于B组小鼠(p =0.08),并且增加的体重明显不同于A组小鼠(p 值=0.04)。B组和C组小鼠分别增重10.2%和9.1%。所有组以斜率表示的体重增加速度相似(p =0.07(A对B)、0.08(A对C)和0.43(B对C))。

[0425] 以上观察结果支持如下结论:RPh-1是病理重量紊乱的调节剂,并且可充当开胃剂(食欲刺激剂)或抗肥胖剂。

[0426] 实施例14. RPh-1在大鼠短暂大脑中动脉闭塞(tMCAO)中风模型中的作用。

[0427] 在利用大鼠短暂大脑中动脉闭塞模型(tMCAO)评价RPh-1预防或逆转局部缺血引起的神经缺损的能力的研究中,以10 μ l剂量皮下给予RPh-1(棉花籽油中5%),并且第一次给药在外科程序后3h进行,然后每周两次直到第28天研究终止。在该研究过程中,以行为测试组对神经、运动和躯体感觉功能进行测试。

[0428] 在整个研究中,没有观察到两组之间总体生理情况、体重增加或总体临床症状的显著差异。

[0429] 在中风后的28天期间,RPh-1治疗组和载体治疗对照组之间可见中风后神经功能恢复的明显差异。一般,加速和改善的恢复在经RPh-1治疗的动物中得到证实。躯体感觉功能对治疗最为敏感,并且显著的反应早在中风后第8天得到证实(图18A和18C)。对神经值表示的显著差异的评价仅见于经RPh-1治疗的大鼠(A组)第8天与第14天之间、第8天与第28天之间(图18A)。如贴剂去除测试(patch removal test)评价的神经恢复仅在经RPh-1治疗的大鼠(A组)第2天与其余天之间明显(图18C)。如阶梯测试评价的运动功能改善仅在经RPh-1治疗的大鼠(黑色条)第28天明显(图18B)。

[0430] 实施例15. RPh-1对视网膜神经节细胞(RGC)的影响。

[0431] 对深度麻醉的大鼠(每组19只大鼠)右眼进行视神经轴索显微外科手术。测试组接受颈后部区域皮下注射RPh-1(棉花籽油中5%;0.025ml/注射),对照组被类似地注射相同体积的载体。手术后对全部动物直接给予第一次注射。随后的注射(相同的剂量和给予方法)给予每周两次,每三至四天。

[0432] 轴索断裂后14天,将荧光逆行神经示踪剂(fluorescent retrograde neurotracer)(Di-Asp)插入轴索断裂的视神经,从而使存活的视网膜神经节细胞(RGC)被染色,24小时后,将大鼠在CO₂饱和室中处死,并摘除受伤的右眼。将视网膜分离,平铺在玻片上,并用基于二甲苯的固定介质固定。

[0433] 用荧光显微镜评价整装视网膜。人工计数染色的细胞。每组RGC的平均数如图19所示,显示RPh-1测试组中的细胞数明显更多。

[0434] 实施例16. 视网膜脱落(RD)模型。

[0435] 在用托品酰胺滴剂0.5%进行瞳孔扩张后对深度麻醉的动物(甲苯噻嗪50mg/kg和氯胺酮35mg/kg)的右眼进行视网膜脱落(RD)。通过在视网膜的锯齿缘生成小开口然后用30G注射针在视网膜下注射5 μ l盐水引起RD。约半个视网膜区域通过该程序分离。

[0436] 将RD的大鼠分成两个实验组,并且测试组接受颈后部区域皮下注射RPh-1(棉花籽油中5%;0.025ml/注射),对照组被注射相同体积的载体。手术后对全部动物直接给予第一次注射。手术后48小时给予第二次注射(相同的剂量和给予方法)。

[0437] 在RD后第3天和第14天,对被操作的大鼠在CO₂饱和室中实施安乐死。将受伤的右眼和未经治疗的左眼摘除。视网膜经分离,在干冰上冷冻和处理以进行蛋白质印迹分析或免疫组织化学分析。左眼视网膜充当未操作的对照。

[0438] 研究脑信号蛋白3A(Sema3A)、神经毡蛋白1(NP1)和GAP43的表达水平,将胱天蛋白酶3用作凋亡标记,并检测Müller和小神经胶质细胞的形态学改变。

[0439] Sema3A是轴突生长抑制剂,其显示出涉及视神经损伤后的视网膜神经节细胞损失。RD后在视网膜中检测出高水平的Sema3A,如蛋白质印迹分析(图20A)所示。RPh-1治疗使Sema3A在未损伤的视网膜对照和RD的视网膜(图20A)中的表达水平均显著降低。使样本相对于 β -肌动蛋白表达(下方条带,图20A)标准化。

[0440] 对20 μ m用抗Sema3A抗体和核染料Sytox Blue温育的视网膜切片的免疫组织化学分析显示,脱落的视网膜中的Sema3A表达显著高于对照。主要在视网膜神经节细胞周围观测到Sema3A表达。与蛋白质印迹分析中观测的结果相似,经RPh-1治疗的RD动物的Sema3A表达减少。

[0441] NP1是功能性Sema3A受体。TUNEL阳性细胞——指示凋亡过程,在视网膜脱落后24小时显著,并在7天后增加。

[0442] 胱天蛋白酶-3响应于RD被激活。但是,经RPh-1治疗的RD动物中胱天蛋白酶-3的增多在被显著削弱(图20B)。

[0443] GAP43是与生长锥体细胞的膜紧密联系的胞内蛋白。其在突触发生过程中正常表达。在视网膜中,GAP43于胚胎发生早期在神经元中表达,此时视神经仍在伸长。在大鼠视神经中,GAP43被发现于RGC的轴突和细胞体中,但表达在8至16周龄消失,并被再次发现于局部缺血或视神经损伤后。

[0444] 通过胶质纤维酸性蛋白(GFAP)染色研究Müller细胞的形态学改变。GFAP标记视网膜中的Müller细胞,并常被用作压力指示剂。完整对照视网膜中的GFAP标记在GCL浓缩。免疫组织化学分析显示脱落的视网膜中的GFAP水平比对照高。用RPh-1治疗的脱落的视网膜呈现较高的GFAP水平。

[0445] 小神经胶质侵入和活化被认为是对神经元有害或有益的。急性CNS损伤后的小神经胶质活化主要是反应性和适应性神经胶质细胞反应,其被受伤的神经元引起,并且其被设计以改善主要的组织损伤,并因此促进随后的修复和神经胶质增生(神经胶质疤痕)。小神经胶质通常在损伤后于视网膜中活化,刺激和募集内皮细胞和成纤维细胞。经IB4标记和核染料PI染色的脱落和未损伤的视网膜切片的免疫组织化学分析显示活化小神经胶质细胞仅在脱落的视网膜中的证据。但是,用RPh-1治疗的动物的脱落的视网膜中的小神经胶质活化相对于用载体治疗的动物的脱落的视网膜显著减少。

[0446] 结果显示,损伤区域周围的活性小神经胶质募集减少,并且支持伤口的无疤痕修

复机制。

[0447] 实施例17. 环糊精与聚合月桂烯的络合物的制备。

[0448] 环糊精, 由于其与多种药物形成包合络合物的能力, 可使生物药物——特别是被定义为不溶于水的生物药物, 如聚合月桂烯——的水溶性显著提高。环糊精是水溶性化合物, 其可与水溶性差的分子形成可逆的络合物, 生成可溶性分子包合络合物。当药物-环糊精组合的包合络合物在足够大量的水或血液中稀释时, 其迅速溶解, 释放螯合的药理活性剂。

[0449] 聚合月桂烯与 β -HPCD的络合将如下进行:

[0450] a. 预称重的聚合月桂烯在最少量的非极性溶剂如己烷、庚烷或类似溶剂中溶解。

[0451] b. 向 β -HPCD粉末滴加非极性溶剂。

[0452] c. 在50-80°C进行干燥, 直到非极性溶剂蒸发。

[0453] d. 与必需量的水的混合。

[0454] e. 在超声处理和加热下溶解。

[0455] f. 通过0.2-0.45 μ m过滤器过滤。

[0456] 实施例18. 聚合月桂烯纳米乳液的制备。

[0457] 液体水包油纳米乳液制剂将通过全部脂质成分的高压乳化技术制备, 将活性成分聚合月桂烯溶于脂质油相, 并用水相乳化, 经设计导致稳定、球状和均匀分散的含药物脂质纳米液滴形成。乳液液滴大小的减小对生成具有高稳定性的药物制剂至关重要。优选的纳米乳液液滴的平均液滴大小低于1微米(一般在0.1-0.2 μ m的范围内), 均匀地分散在水相中。纳米乳液液滴的内部大疏水性油核心的独特性为水不溶性化合物如聚合月桂烯提供了高溶解能力。

[0458] 1. 油相的制备

[0459] 油相由13%类脂E-75、0.026% α TP-琥珀酸酯、对羟苯甲酸丙酯作为抗氧化剂和86.9%**Miglyol**[®]810组成。将如实施例1制备的聚合月桂烯溶于油相。在轻度加热下混合成分, 直到得到均质的完全溶解的溶液。

[0460] 2. 水相的制备

[0461] 水相由0.1%EDTA、0.5%Tween-80、2.3%甘油、对羟基苯甲酸甲酯作为防腐剂和97.1%水组成。通过NaOH 1N将pH调整至7.4。

[0462] 3. 油相和水相的混合

[0463] 将油相(3.7g)加热, 并添加到70ml水相(预热)中。在室温下轻轻搅拌混合物10-15min。

[0464] 4. 水包油粗乳液的制备

[0465] 利用中等大小的分散器和高剪切力均质装置**Polytron**[®]在20,000rpm下5min制备水包油乳液。

[0466] 5. 通过**Gaulin**[®]高压均质器标定乳液为亚微米范围

[0467] 通过在800bar压力下利用**Gaulin**[®]Microlab 70高压均质器使乳液经受高剪切力均质化, 将步骤4后得到的乳液的液滴大小减小至亚微米(纳米大小)范围。应进行总共5-6个循环, 以得到均质的纳米乳液液滴, 该液滴的平均颗粒大小低于200nm。颗粒大小将利用N4MD颗粒大小分析仪(**Coulter**[®]Electronics, UK)通过光子相关光谱(PCS)确定。当多数颗粒

(>90%) 小于200nm时,确定标定大小的过程完成。

[0468] 6. 无菌过滤

[0469] 利用0.2 μ m PES无菌过滤器在无菌条件下将纳米乳液过滤到无菌小瓶中,并在40 $^{\circ}$ C下保存。

[0470] 实施例19. 喷雾干燥的聚合月桂烯粉末的制备。

[0471] 考虑成本效益和推广方面的考虑,制备聚合月桂烯-脂质混合物产物的便捷方法是通过从包含所有脂质成分的非极性溶剂分散液和包含亲水成分的水的混合物的直接喷雾干燥。所选的喷雾干燥法被优化,从而得到细微、自由流动的粉末。将聚合月桂烯溶于包含脂质成分卵磷脂、三癸酸甘油酯(癸酸甘油三酯)、生育酚琥珀酸酯的脂质相,并在非极性溶剂中加热(\sim 40 $^{\circ}$ C)直到得到良好的分散液。通过使粉末在纯水中膨胀制备气相二氧化硅(Cab-O-Sil[®])的水分散液(5%)。然后将生成的浆液(预加热至40 $^{\circ}$ C)缓慢倒入非极性溶剂脂质分散液,并在40 $^{\circ}$ C下搅拌混合物约1hr,直到得到均质的分散液。然后利用Yamato Pulvis[®] GA32喷雾干燥器对混合物进行喷雾干燥。喷雾干燥条件为:流速7ml/min,入口温度130 $^{\circ}$ C,出口温度70 $^{\circ}$ C,干燥空气流速0.5m³/min。预期得到包含聚合月桂烯-脂质混合物的均质干燥粉末。

[0472] 预期通过直接喷雾干燥法制备的聚合月桂烯-脂质混合物制剂显示良好的水分散性,因此适于制备固体剂型如硬胶囊或片剂,以增强具有潜在良好口服生物利用度的聚合月桂烯的口服输送。

[0473] 实施例20. 包含聚合月桂烯的脂质体制备物的制备。

[0474] 将包含溶解的聚合月桂烯的脂质在圆底烧瓶中溶于100ml二氯甲烷,并在室温下搅拌30min,直到得到澄清透明的溶液。利用旋转蒸发装置在39 $^{\circ}$ C下将溶剂蒸发。首选,在大气压下以4.5rpm旋转烧瓶5min,然后在低真空下旋转10-30min(直到溶剂完全蒸发),最后在全真空下旋转15min。在蒸发过程结束时,将生成均匀的脂质膜。将该脂质膜溶于15ml等渗缓冲液。通过如下制备脂质体:通过利用多腕(multi-wrist)振荡器剧烈振荡10-30min,直到均匀乳状的多层载体(MLV)分散液形成并且没有明显的残留脂质膜。为得到平衡和同质的脂质体制备物,在37 $^{\circ}$ C下以270rpm进一步振荡烧瓶30-90min。

[0475] 实施例21. 包含聚合月桂烯的微乳液的制备。

[0476] 多种肠胃外常用的表面活性剂可用于生成注射、口服和局部施用可接受的水包油微乳液和油包水微乳液。适于形成微乳液制剂的药学上可接受表面活性剂为非离子型表面活性剂,包括聚氧乙烯40氢化蓖麻油(以商标名克列莫佛RH40[®]出售)、聚氧乙烯35蓖麻油(以商标名克列莫佛[®]EL出售)、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯(聚山梨酸酯)、泊洛沙姆(Pluronic[®])、维生素E-TPGS 1000(VE-TPGS1000)、聚氧乙烯烷基醚、Solutol[®]HS-15、Tagat[®] T0、Peglicol 6-油酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯或饱和聚乙二醇甘油酯,其全部为商业上可获得的。优选的表面活性剂包括聚氧乙烯40氢化蓖麻油(克列莫佛[®] RH40[®])、聚氧乙烯35氢化蓖麻油(克列莫佛[®] EL)、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯(聚山梨酸酯)、泊洛沙姆(Pluronic[®])和维生素E-TPGS 1000。表面活性剂在组合物中的总量一般为约100至约700mg/g,优选约300至约500mg/g。

[0477] 包含聚合月桂烯的微乳液的制备可通过如下进行:将聚合月桂烯在适当的小瓶中

溶于适当量油,如中等链甘油三酯(Miglyol)。然后将小瓶加盖。将该小瓶置于约50-60℃的水浴中并轻轻振荡,直到全部药物材料完全溶解。将小瓶冷却至室温,然后添加适当量的表面活性剂(如**克列莫佛®**EL或VE-TPGS),如有,接着添加甘油单酯和甘油二酯与脂肪酸的混合物。然后将小瓶加盖,并置于约50-60℃的水浴中。轻轻振荡小瓶,得到澄清均匀的溶液。该溶液可被装入HPMC胶囊,并在口服服药前于室温下保存。或者,可将替代的聚合物粉末(如HPMC)在适当的搅动(即,搅拌、振荡)下添加到溶液中,得到均匀的聚合物悬浮液。然后可将生成的组合物装入软胶囊或硬胶囊,并在口服服药前于室温下保存。或者,可将微乳液制剂用作局部或穿过0.2um膜过滤,以在肠胃外给予。

[0478] 包含聚合月桂烯的微乳液在水介质中稀释时具有良好的水分散性和自乳化性,形成微小的纳米胶束,其生物利用度被提高。

[0479] 以上具体实施方式的说明将如此完全地揭示本发明的总体性质,即其他人通过利用现有知识不需要过分实验并在没有脱离总体构思下可容易地将这些具体实施方式修改和/或修正以用于多种用途。因此,这种修正和修改应当并且意图被认为在所公开的实施方式的等同实施方式的意义和范围内。要理解的是,本文所用的用语或术语的目的是为说明,而非限制。用于实施多种所公开的功能的手段、材料和步骤可采取多种没有脱离本发明的替代形式。

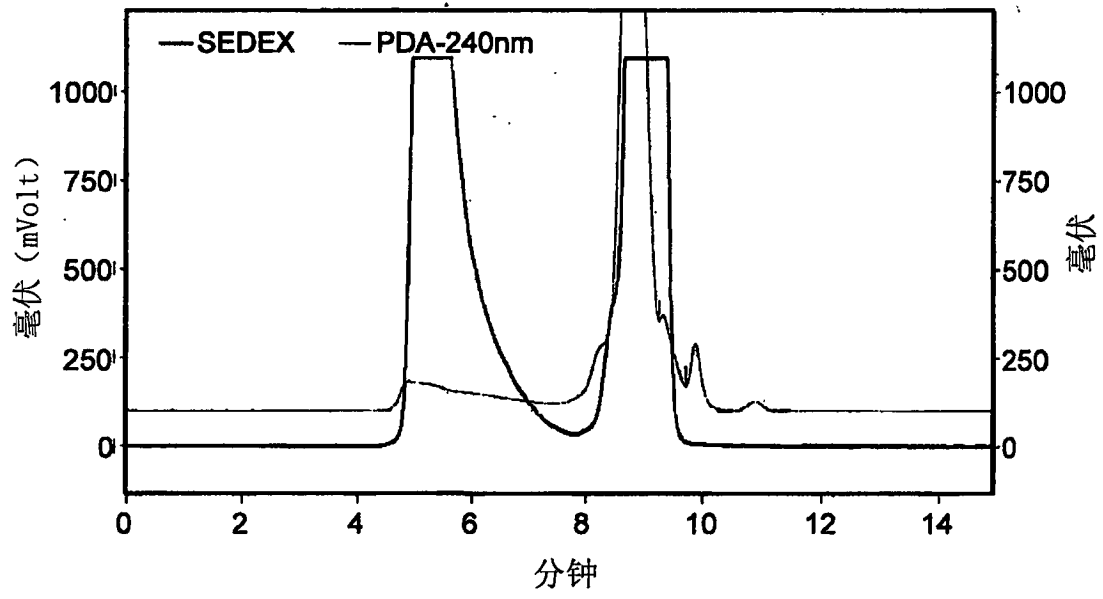


图1

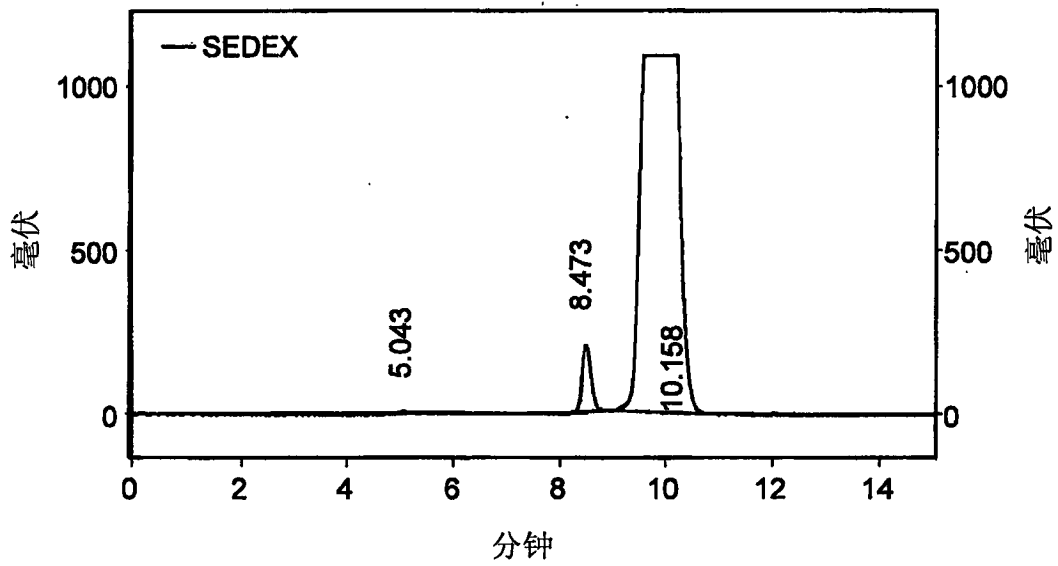


图2A

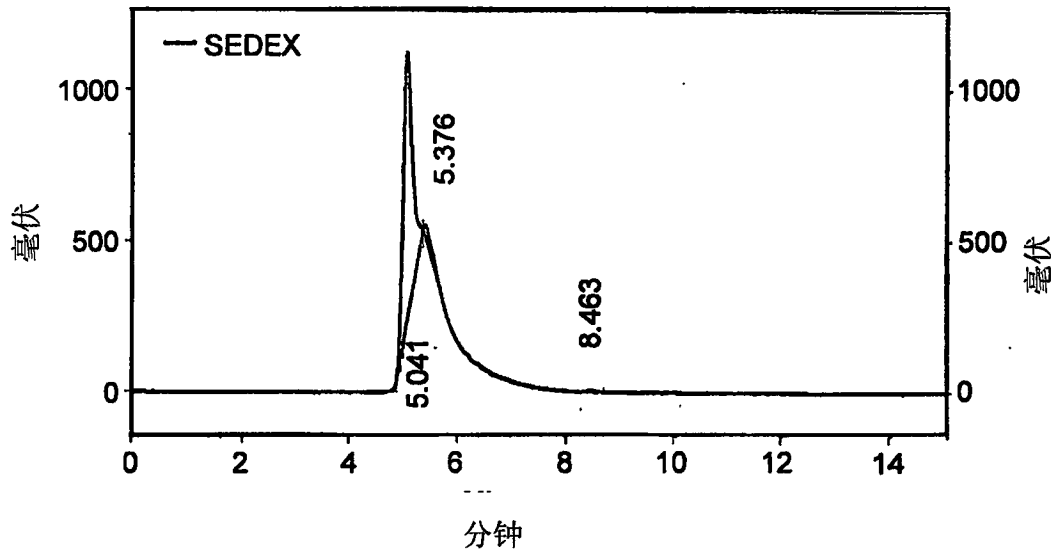


图2B

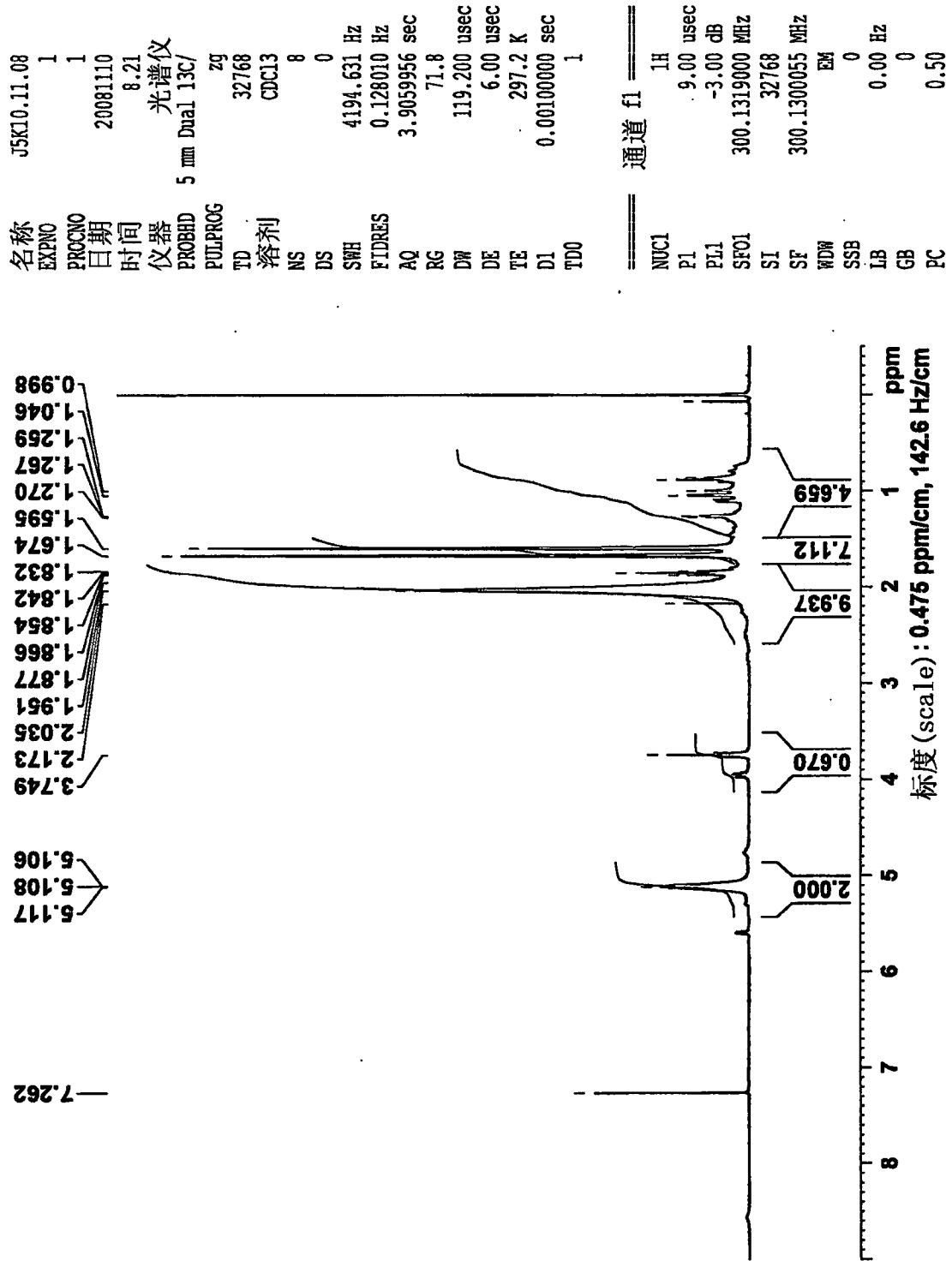


图3

名称 J5K10.11.08
 EXPNO 2
 PROCNO 1
 日期 20081110
 时间 8.26
 仪器 光谱仪
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zgdc
 TD 32768
 溶剂 CDCl3
 NS 1808
 DS 0
 SWH 19723.865 Hz
 FIDRES 0.601925 Hz
 AQ 0.8307188 sec
 RG 5792.6
 DF 25.350 usec
 DE 9.46 usec
 TE 297.2 K
 D1 0.1000000 sec
 d11 0.0300000 sec
 TD0 1
 通道 f1 13C
 NUC1 13C
 P1 3.00 usec
 PL1 -5.00 dB
 SF01 75.4759867 MHz
 通道 f2
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PLI2 12.00 dB
 SF02 300.1312000 MHz
 SI 32768
 SF 75.4677482 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 5.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

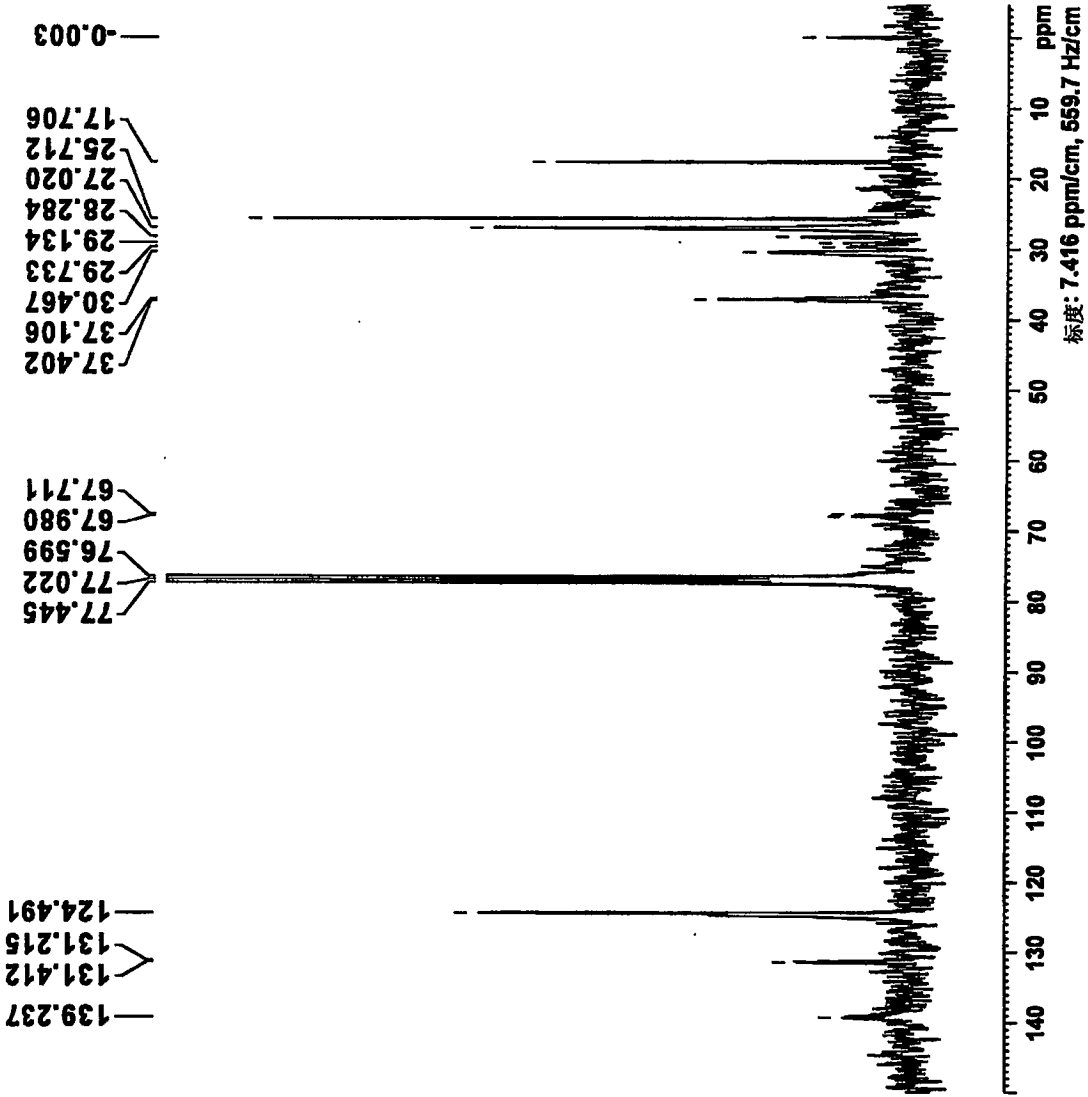


图4

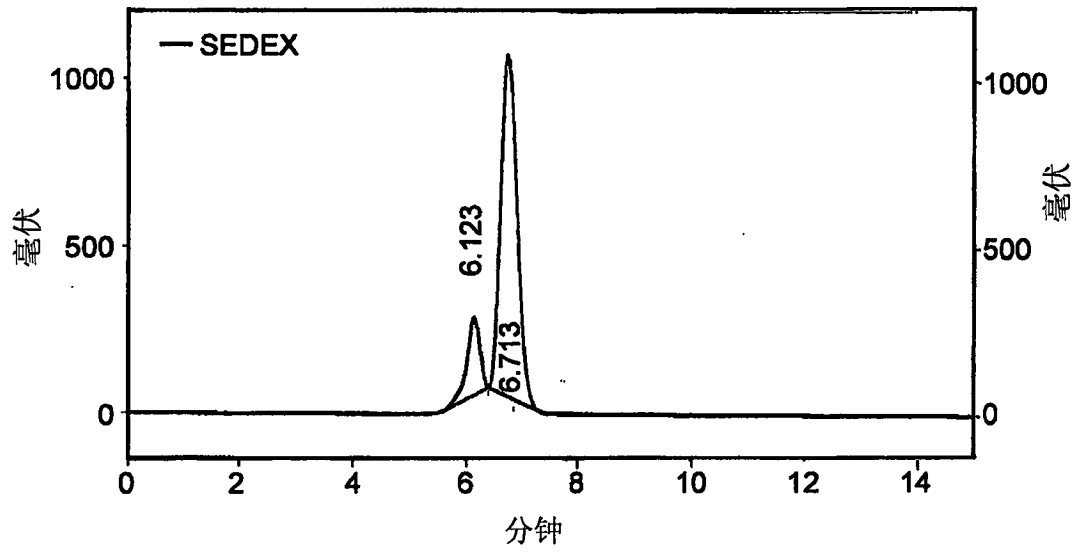


图5A

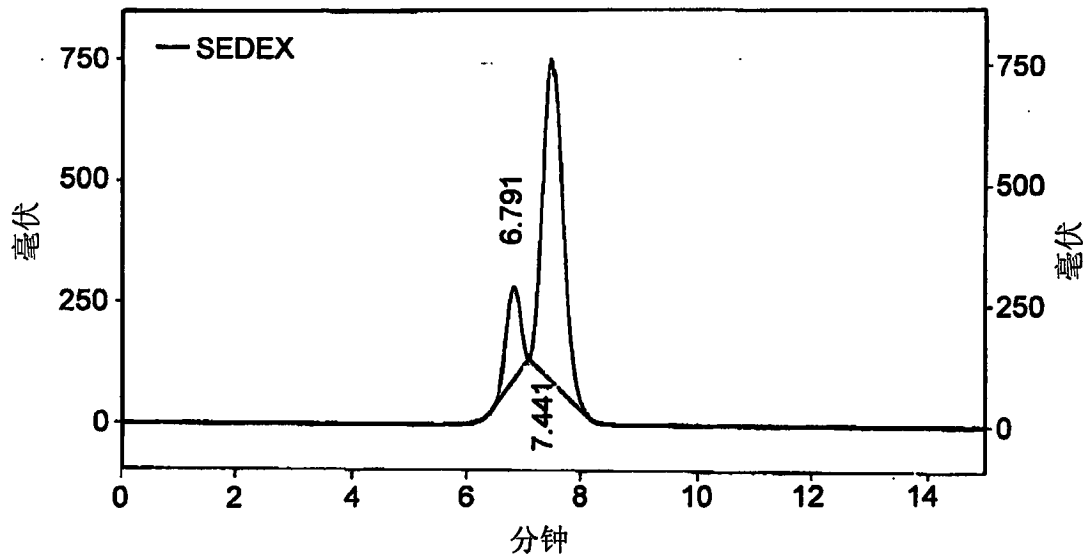


图5B

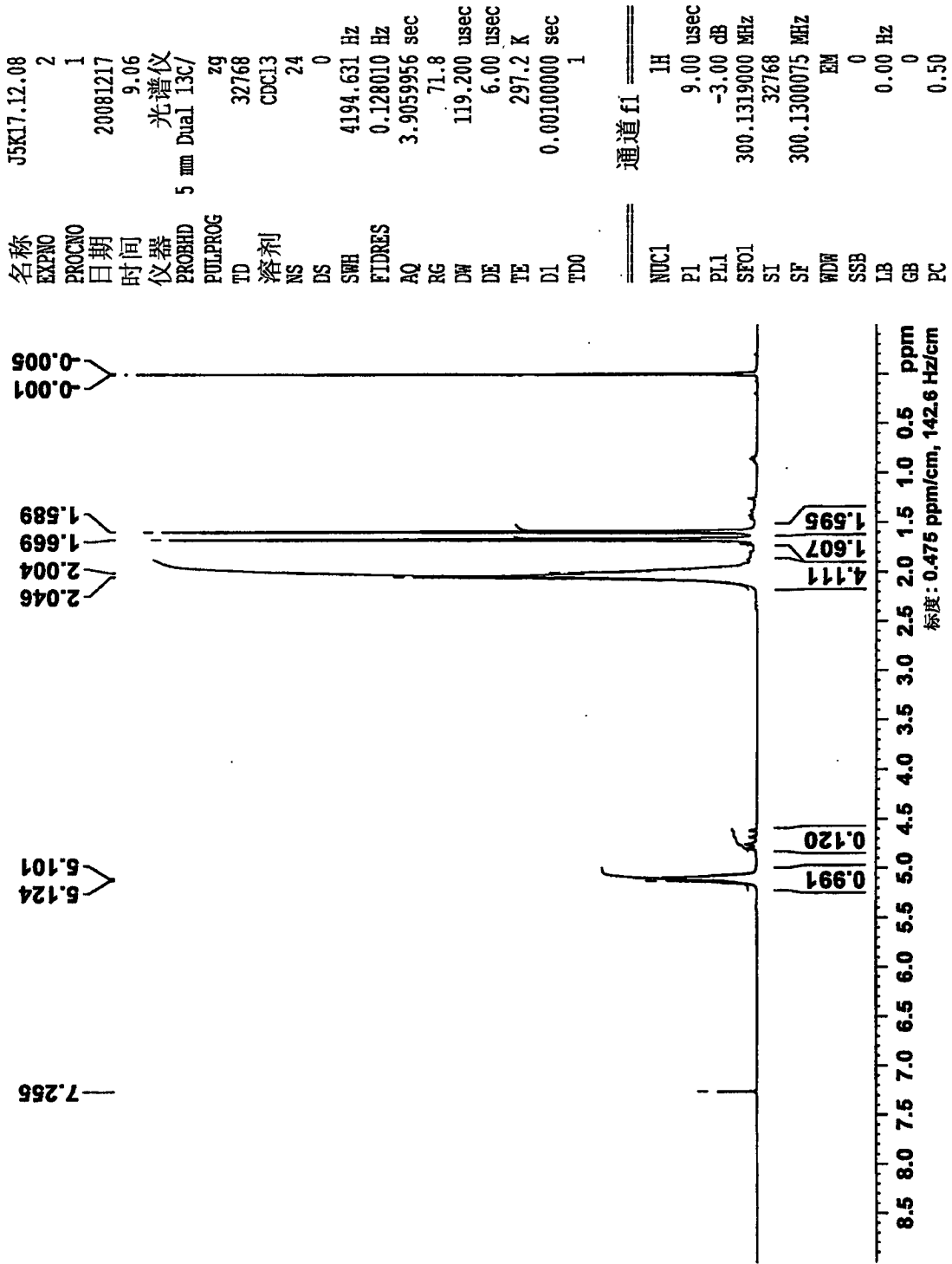


图9

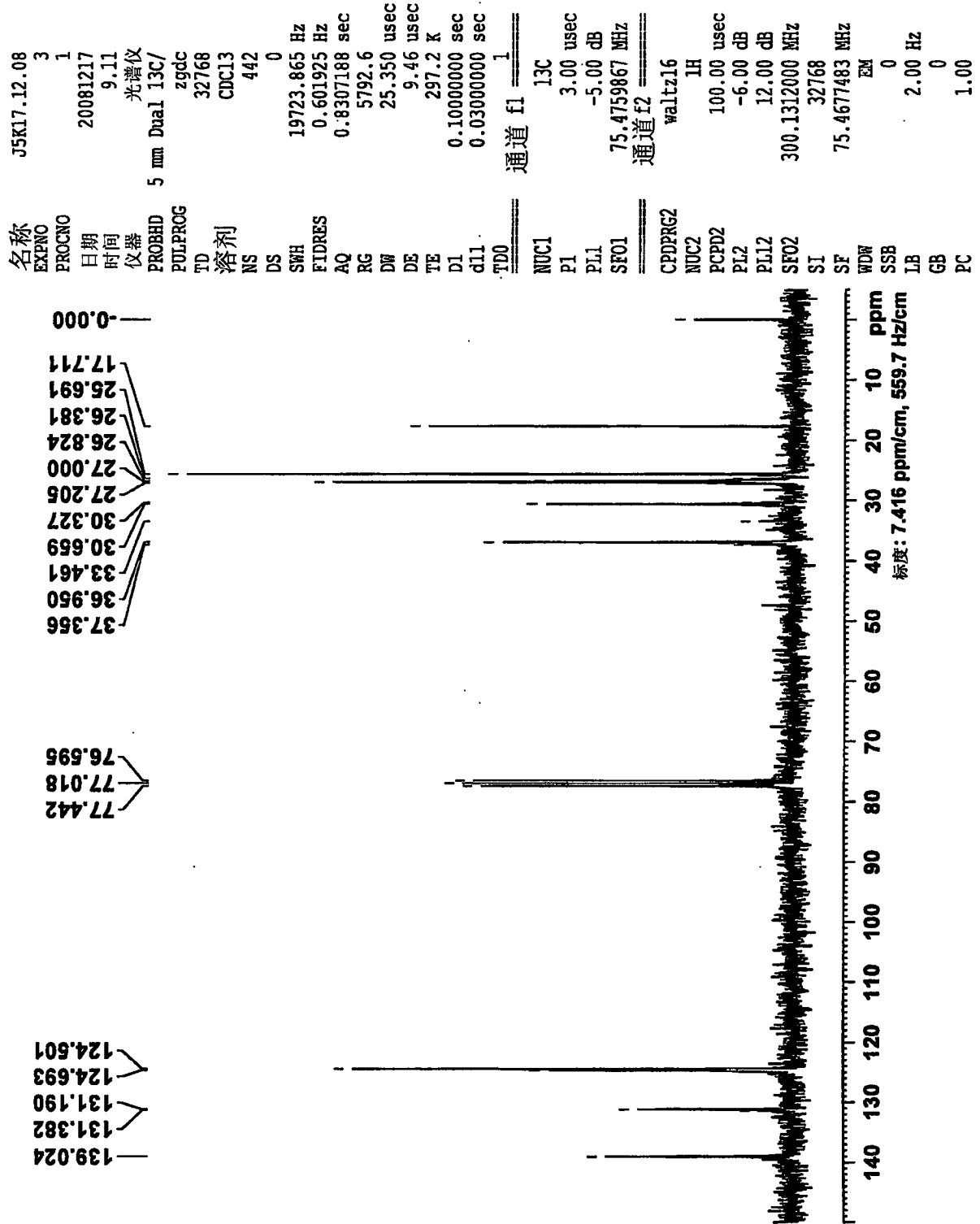


图7

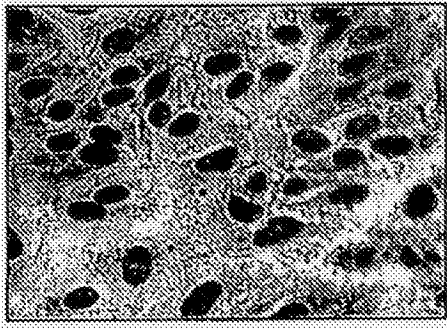


图8A

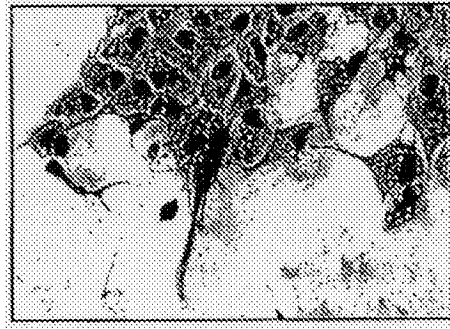


图8B

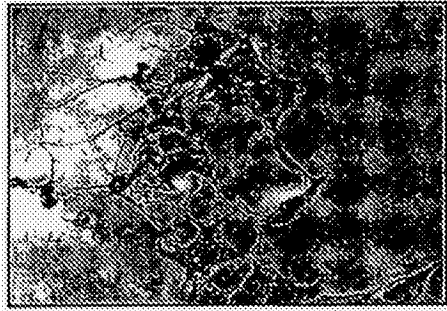


图8C

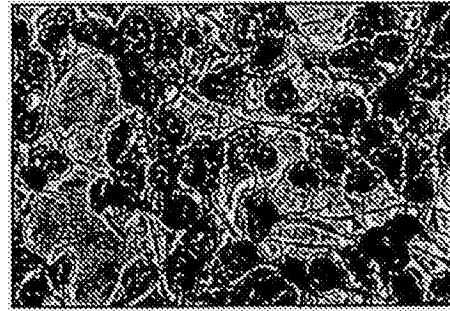


图8D

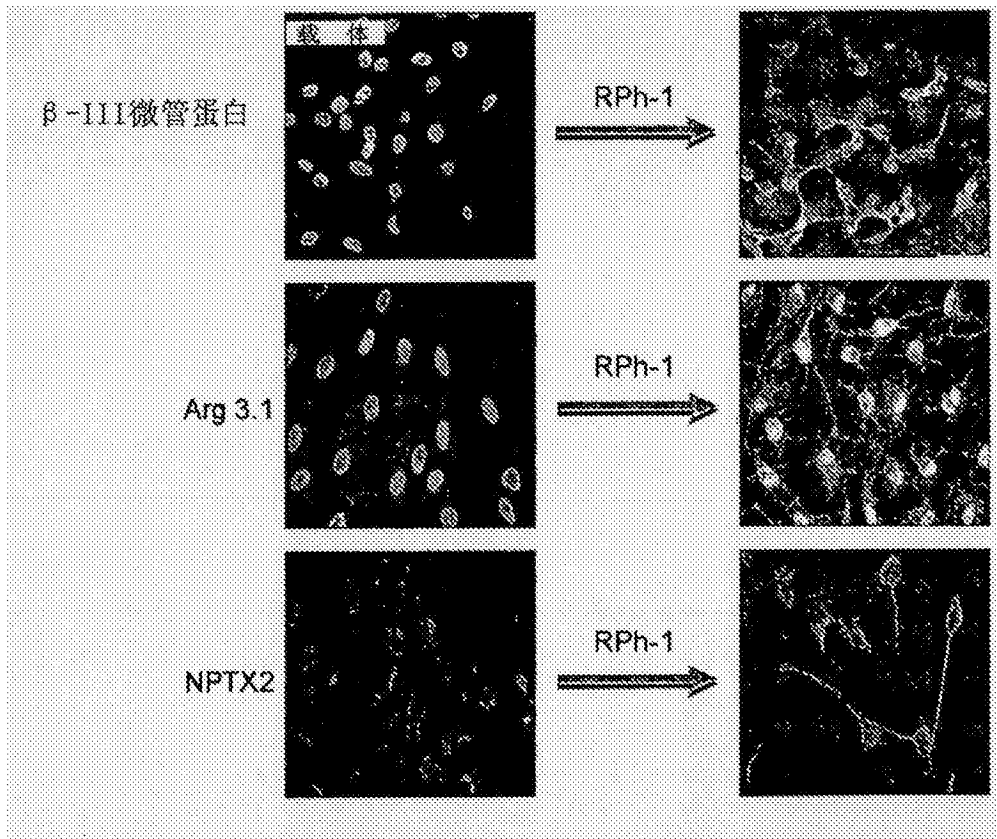


图9

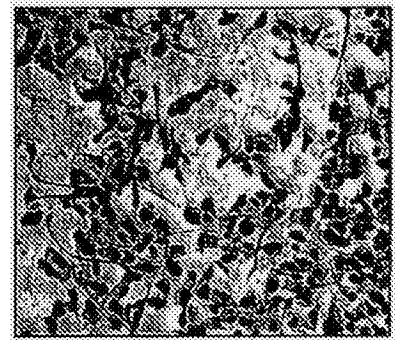
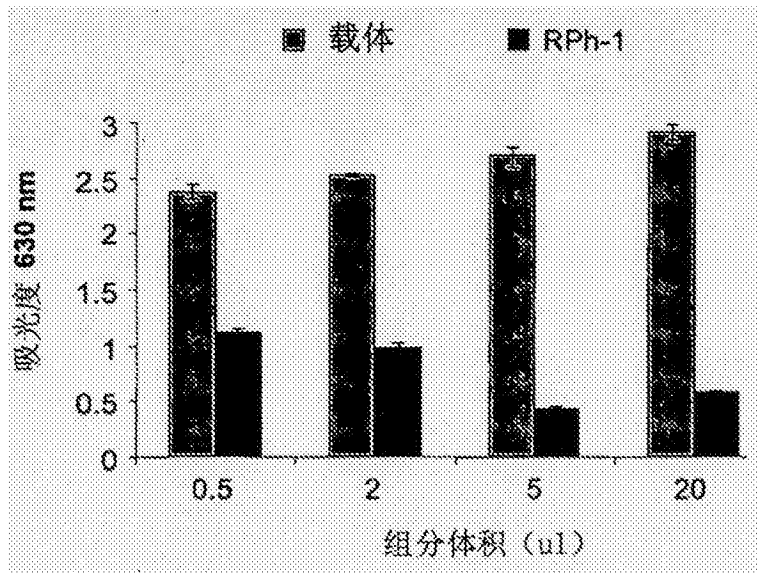


图11A

图10

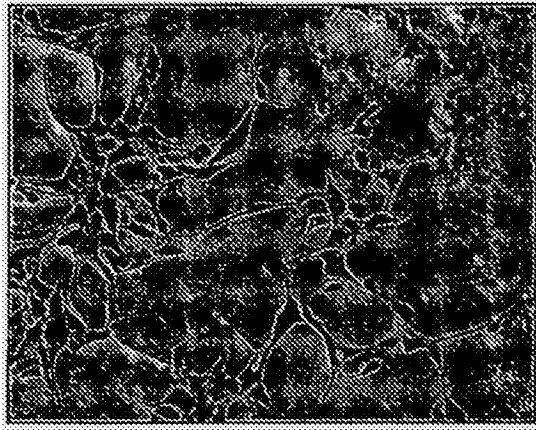


图11B

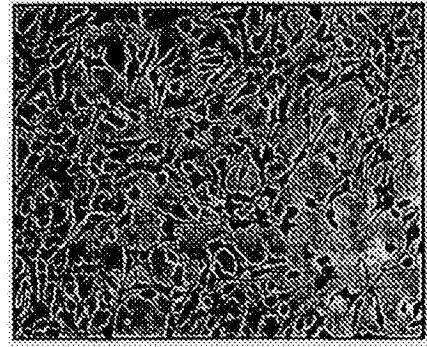


图11C

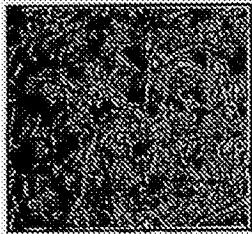


图12A

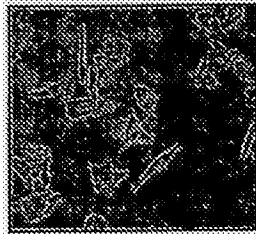


图12B

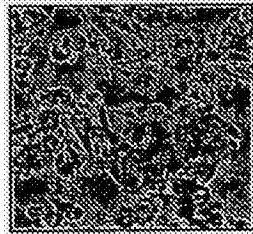


图12C

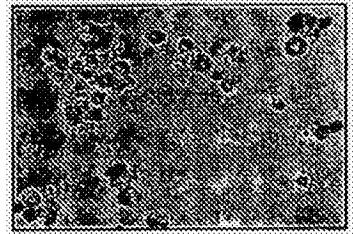


图12D

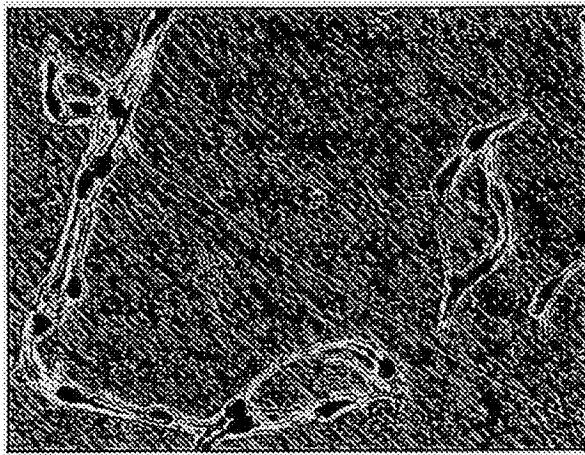


图13A

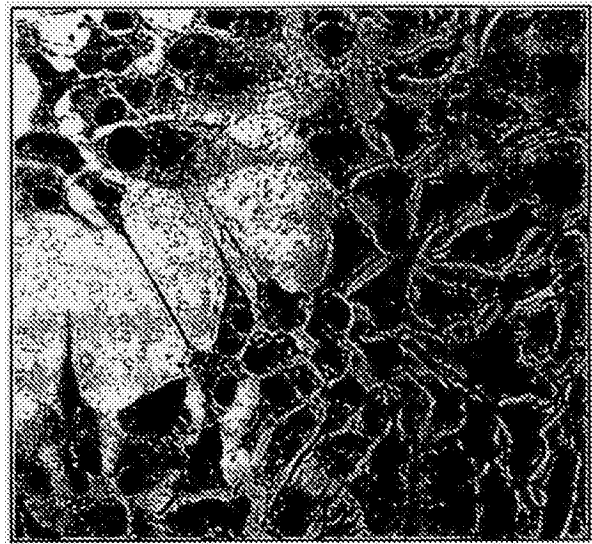


图13B

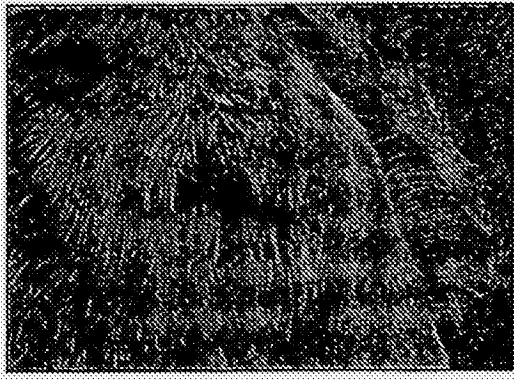


图14A

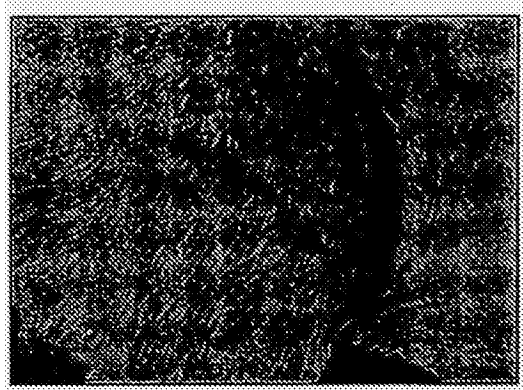


图14B

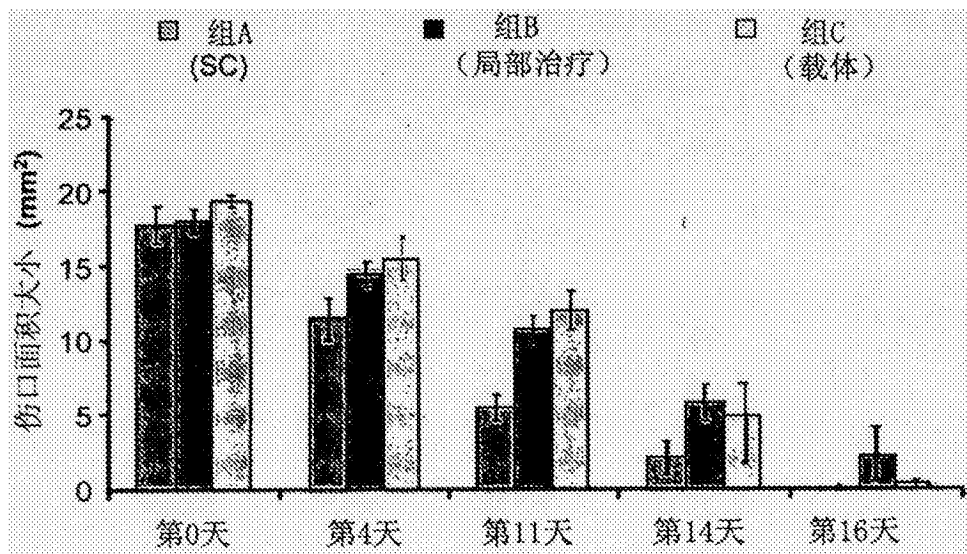


图15

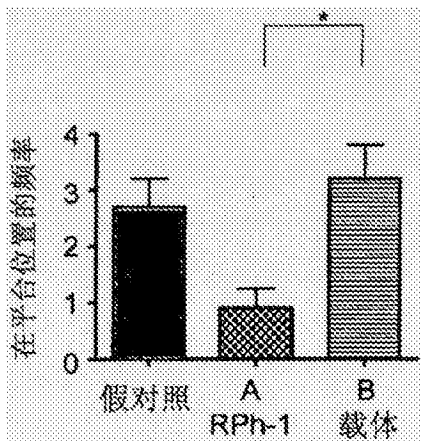


图16A

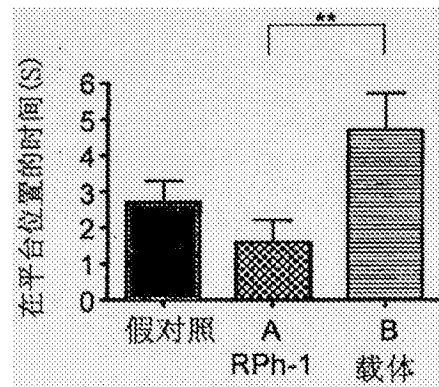


图16B

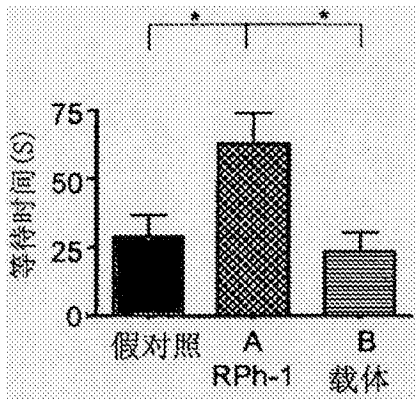


图16C

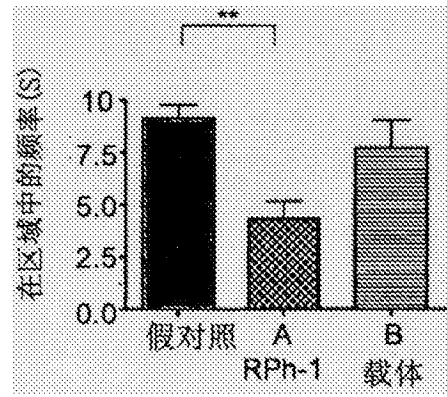


图16D

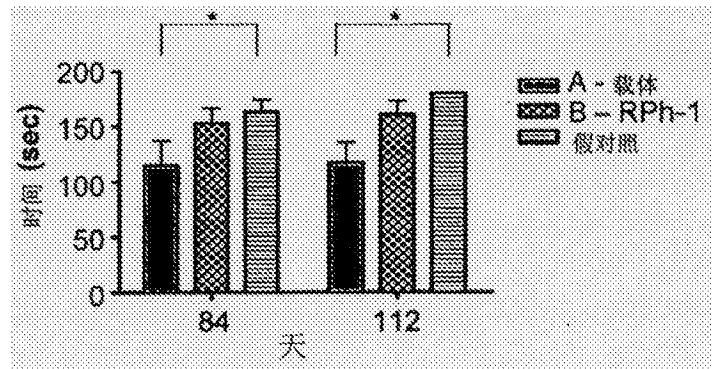


图16E

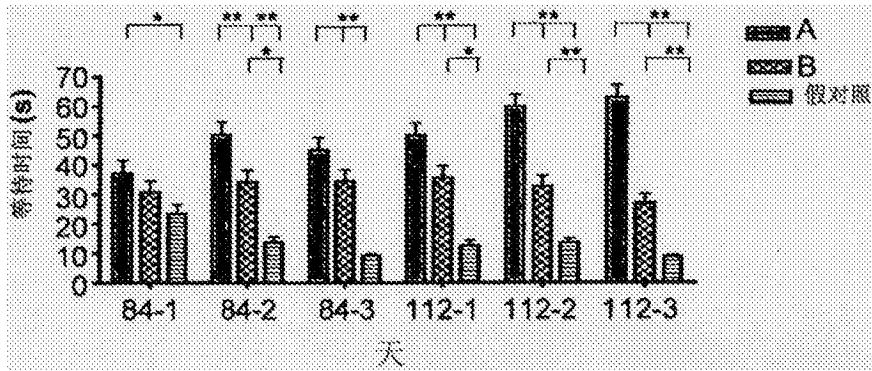


图16F

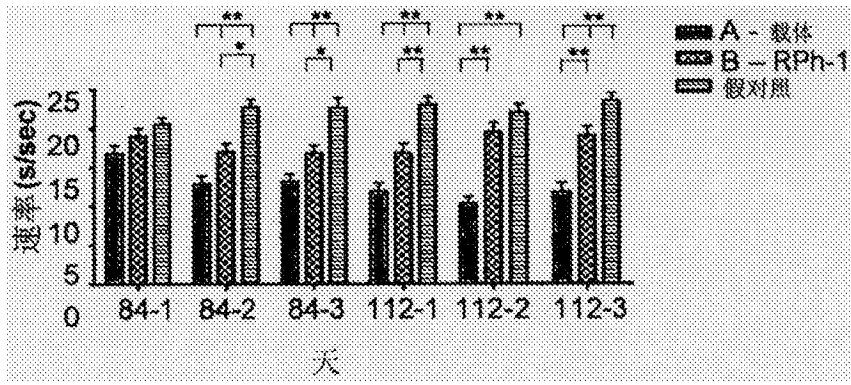


图16G

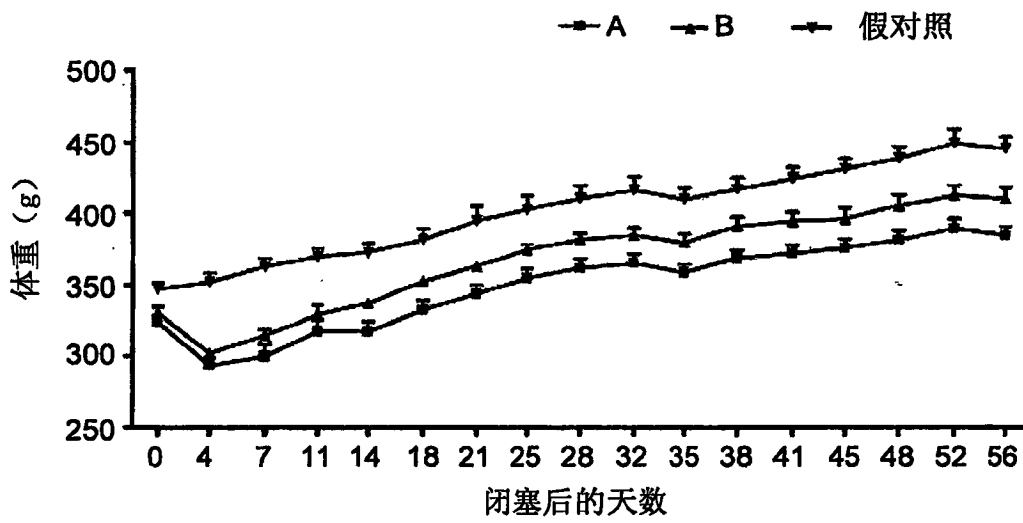


图17A

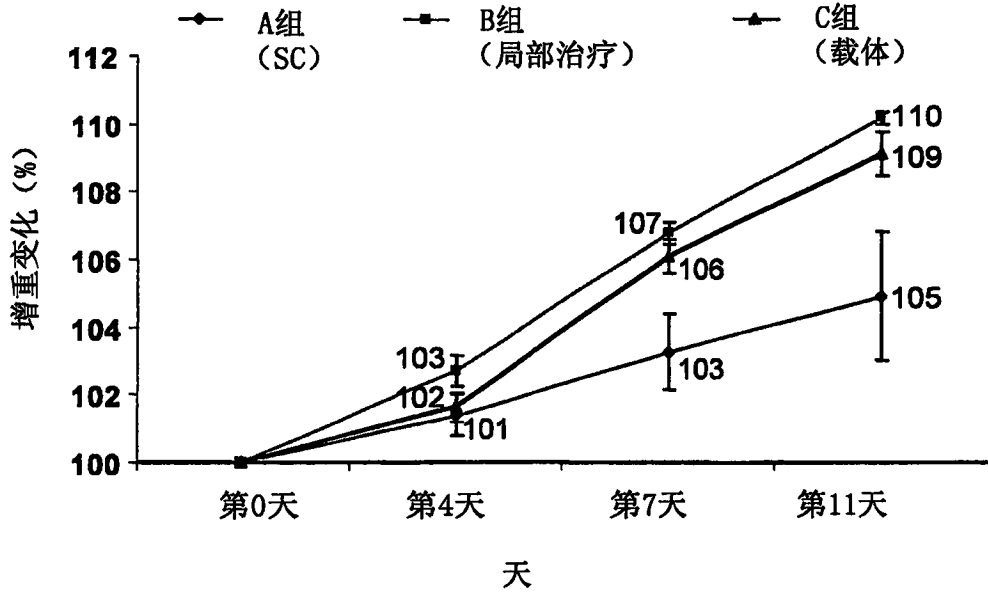


图17B

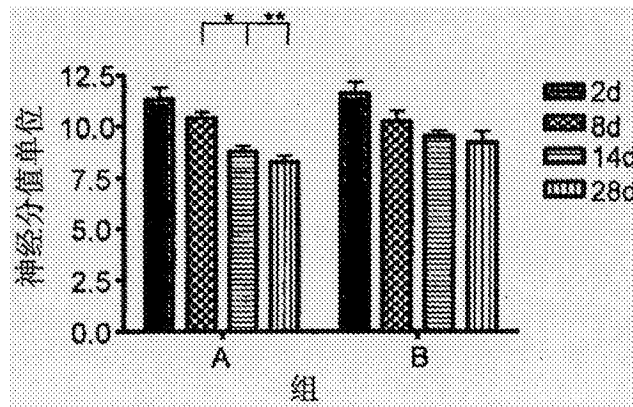


图18A

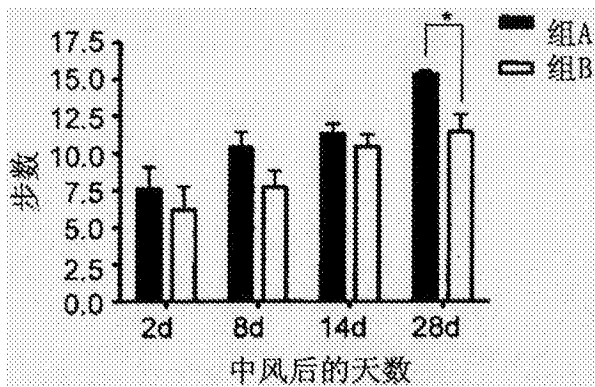


图18B

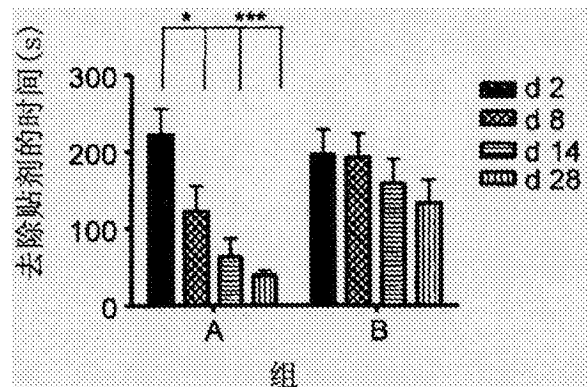


图18C

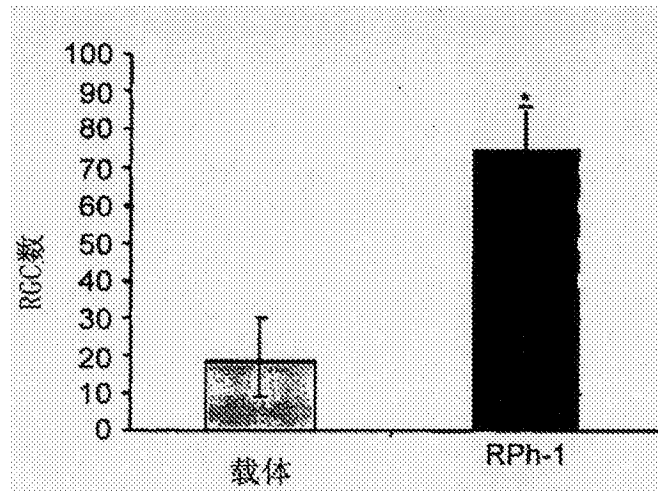


图19

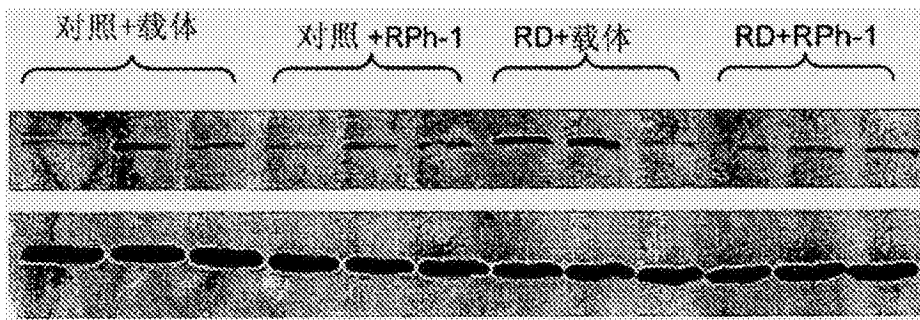


图20A

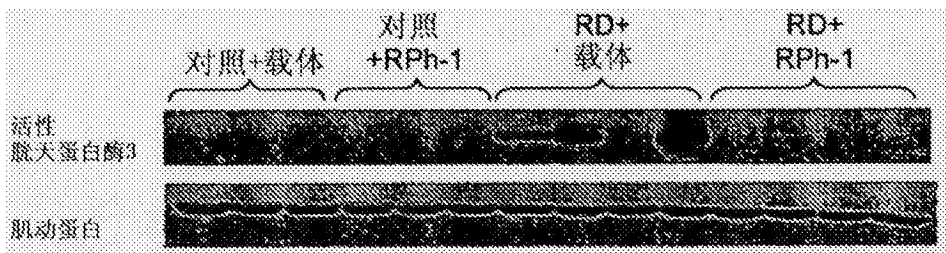


图20B