

發明專利說明書

※申請案號：095103817

※IPC分類：

一、發明名稱：

分泌神經素於治療腦組織損害之醫藥用途

MEDICAL USE OF SECRETONEURIN FOR TREATING BRAIN TISSUE DAMAGES

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種治療腦組織損害之方法，該方法包括對有需要之個體投予有效量之分泌神經素。本發明揭示促進個體腦中血管發生或神經發生之方法。本發明亦揭示一種使幹細胞返回個體腦內之方法及一種防止神經元細胞發生細胞死亡之方法。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 本發明係關於一種治療腦組織損害之方法，該方法包括對有需要之個體投予一有效量之分泌神經素。本發明揭示促進個體腦中血管發生或神經發生之方法。本發明亦揭示一種使幹細胞返回個體腦內之方法及一種防止神經細胞發生細胞死亡之方法。

【先前技術】

[0002] 由損傷或病症(例如，神經變性疾病及腦血管疾病)引起之腦組織損害係一造成長期殘疾之主要原因。由於胚胎幹細胞(ES細胞)具有多能性，故被認為很有希望用其來治療腦組織損害(Taguchi等人，2004，J. Clin. Invest.；114(3)：330-338)。然而，倫理及邏輯上的考慮阻礙了對其之使用(Barinaga，2000，Science，287(5457)：1421-1422)。利用非ES多能性細胞之用途已被開發。其包括成人骨髓間質幹細胞或基質細胞(Sanchez-Ramos等人，2000，Exp. Neurol.，164(2)：247-256及Woodbury等人，2000，J. Neurosci. Res.，61(4)：364-370)及臍帶血細胞(Galvin-Parton等人，2003，Pediatr. Transplant. 2003；7(2)：83-85及Ha等人，2001 Neuroreport.，2(16)：3523-3527)。然而，需要體外增殖及HLA配型限制了此等細胞之臨床應用。因此需要一治療腦組織損害之替代方法。

【發明內容】

[0003] 本發明係基於，至少部分基於，投予分泌神經素可修復腦組織損害之發現。

[0004] 因此，本發明之一特徵態樣係一種治療腦組織損害之方法。該方法包括投予有需要之個體有效量之分泌神經素。該方法可用於治療由大腦局部缺血(例如，中風)或神經變性疾病(例如，阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、癲癇、亨庭頓氏症(Huntington's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)或脊髓小腦疾病)引起之腦組織損害。該方法可進一步包括投予該個體者有效量之幹細胞。適宜的幹細胞包括造血幹細胞、臍帶來源之間質幹細胞及c-kit⁺或CD34⁺之幹細胞。較佳地，該等幹細胞為該個體自體之幹細胞。例如，該等細胞可由該個體之血液或骨髓中富集。

[0005] 「治療」一詞係指對個體投予一化合物或組合物，該個體係患有腦組織損害或引起此損害之病症或處於形成彼等之風險中，其目的在於治癒、減輕、緩解、治療、預防或改善該損害/病症、該損害/病症之症狀、該損害/病症之繼發性疾病狀態或易於引起該損害/病症之因素。「有效量」一詞係指化合物或組合物的量，其係可在經治療個體中產生醫學上欲求之結果(例如，如上所述者)。該治療方法可單獨實施或可與其他藥物或療法併用。

[0006] 本發明另一特徵係一種促進個體大腦血管發生之方法。該方法包括經大腦內投予有需要之個體有效量之分泌神經素。該方法進一步包括在投予分泌神經素之前及之後量測該個體大腦血管發生程度以確認大腦血管發生之促進作用。該方法亦可包括投予給該個體有效量之幹細胞，諸如彼等上文所述者。

[0007] 本發明之範圍亦涵蓋促進個體腦內神經發生之方法。該方法包括經大腦內投予有需要之個體有效量之分泌神經素。該方法進一步包括在投予促進之前及之後量測該個體腦內神經發生程度以確認神經發生之促進作用。為此目的，吾人可使用標準神經行為量測法，包括彼等下文實例中所述者。該方法亦可包括投予給該個體有效量之幹細胞，諸如彼等上文所述者。

[0008] 本發明又一特徵係藉由經大腦內投予有需要之個體有效量之分泌神經素以促進幹細胞返回該個體腦內之方法。適宜的幹細胞包括彼等上文所述者。

- [0009] 本發明亦涵蓋保存神經元細胞之方法。所述方法包括使該細胞與分泌神經素接觸。
- [0010] 下文之說明內容將詳細闡述本發明之一或多個實施例。借由該說明內容及申請專利範圍可更加清楚地瞭解本發明之其他特徵、目標及優點。
- 【實施方式】**
- [0011] 本發明係關於使用分泌神經素治療腦組織損害。分泌神經素為一33個胺基酸之神經肽(TNEIVEEQYTPQSLATLESVVFQELGK LTGPNNQ: SEQ ID NO: 1)，其係由嗜鉻粒蛋白/分泌粒蛋白(Cg/Sg)家族蛋白之內蛋白水解獲得。其係在內分泌組織及神經系統之大緻密核心囊泡中含量豐富的蛋白質(Kirchmair等人, 1993, *Neuroscience*, 53, 359-365; Saria等人, 1993, *Neuroscience*, 54, 1-4; Kahler等人, 1996, *Eur. J. Pharmacol.*, 304, 135-139; Fischer-Colbrie等人, 1995, *Prog. Neurobiol.* 46, 49-70及Cozzi等人, 1989, *Neuroscience* 28, 423-41)如下文實例所述, 是分泌神經素可出乎意料地增強幹細胞對受損腦之返巢作用、保護神經元免於細胞死亡、並促進受損腦之神經發生及血管發生。其不僅保護腦內現有神經元或神經膠質細胞, 而且亦可促進神經再生以替代受損神經元神經膠質細胞。
- [0012] 儘管有多種分泌神經素製劑可使用實施於本發明, 但以高純分泌神經素較佳。實例包括哺乳動物之分泌神經素(例如, 人類、小鼠及大鼠之分泌神經素)或與哺乳動物之分泌神經素具有大致相同生物活性之非哺乳動物分泌神經素。天然存在之分泌神經素、化學合成之分泌神經素及基因工程分泌神經素皆可使用。由化學合成或基因工程得到之分泌神經素可以係與天然存在之分泌神經素具有相同胺基酸序列者或其功能等效物。「功能等效物」一詞係指天然存在之分泌神經素(SEQ ID NO: 1)的多肽衍生物, 例如, 具有一或多個點突變、插入、缺失、截斷之蛋白質、融合蛋白或其組合。該功能等效物具有一或多種分泌神經素活性, 例如, 保護細胞免於細胞死亡、促進血管發生或神經發生及將骨髓源性幹細胞移動至周邊血液或腦中之活性。「分泌神經素」一詞亦涵蓋化學修飾之分泌神經素。化學修飾之分泌神經素之實例包括構象改變、糖鏈添加或刪除之分泌神經素。一旦經標準方法純化及測試, 即可如下文所述將分泌神經素授予個體。
- [0013] 欲實施本發明治療方法, 吾人可經由大腦內注射授予分泌神經素。可根據本發明所屬技術領域中之習知技術使用適宜的分散劑或潤濕劑(例如Tween 80)及懸浮劑調配無菌可注射的組合物(例如, 水性或油質懸浮液)。無菌可注射製劑亦可為於無毒非經腸可接受之稀釋劑或溶劑中的無菌可注射溶液或懸浮液, 例如, 溶於1, 3-丁二醇之溶液。在可接受之媒劑及溶劑中, 可使用者包括甘露醇、水、林格氏(Ringer's)溶液以及等滲氯化鈉溶液。此外, 無菌固定油劑為習知技術使用之溶劑或懸浮介質(例如, 合成之單一或二-甘油酯)。脂肪酸(諸如油酸及其甘油酯衍生物)可用於製備注射劑, 如同天然的醫藥上可接受之油, 諸如橄欖油或蓖麻油, 尤其係彼等之聚氧乙基化形式。此等油質溶液或懸浮液亦可包含長鏈醇稀釋劑或分散劑、或羧甲基纖維素或類似分散劑。
- [0014] 醫藥組合物中載劑必須係「可接受的」, 其係表示可與調配物之活性成份相容(且較佳地, 能夠使其穩定)及對擬治療個體無害。例如, 可使用增溶劑(諸如環糊精, 其可與萃取物之一或多種活性化合物形成專一性之更易溶之複合物)作為用於遞送活性化合物之醫藥賦形劑。其他載劑實例包括膠體二氧化矽、硬脂酸鎂、纖維素、月桂基硫酸鈉及D&C Yellow #10。
- [0015] 可使用適宜的活體外分析來初步評估分泌神經素製劑之功效。例如, 吾人可量測該製劑之神經保護性作用。更具體而言, 可將該製劑添加至適宜的細胞培養中(例如, 如下文實例1中所述之大鼠或小鼠神經元-神經膠質細胞的初代皮層細胞培養)中並測定保護程度。然後吾人可將該保護程度與不存在該製劑時得到之對照組之保護程度加以比較。若測試組之保護程度高於對照組之保護程度, 則將該製劑鑒定為具有治療腦組織損害之活性。吾人亦可根據標準方法藉由檢查該分泌神經素製劑對細胞死亡之影響來評估該製劑之功效。例如, 吾人可量測參與細胞死亡之蛋白質(例如, 卡斯蛋白酶)含量。若該含量低於該製劑不存在時得到之含量, 則確定該製劑具有活性。
- [0016] 可進一步藉由活體內分析檢測該製劑在將骨髓源性幹細胞移動至周邊血液或腦中之功效。例如, 可在動物(例如, 小鼠或大鼠模式)中評估該製劑。移動至周邊血液或腦中的幹細胞的量可藉由標準方法測定。
- [0017] 亦可將該製劑授予具有腦組織損害或引起該損害之病症的動物模式中。然後根據標準方法(例如, 彼等闡述於下文實例2至8中者)評估該製劑之療效。為確認促進腦血管血管發生方面之功效, 吾人可在治療之前及之後藉由標準大腦造影技術(諸如電腦斷層攝影(CT)、多普勒(Doppler)超音波成像(DUI)、核磁共振造影(MRI)及質子磁共振頻譜分析(^1H -MRS))檢測該動物。
- [0018] 吾人亦可在授予分泌神經素之前或之後量測自該動物獲得之樣品(例如, 腦脊液)中神經元標記物、血管標記物、神經膠質標記物、滋養因子或細胞死亡相關蛋白質的表現量來確認其功效。該表現量可在mRNA層級或蛋白質層級測定。量測組織樣品中或體液中mRNA量之方法為本發明所屬技術領域中所熟知。為量測mRNA量, 可將細胞溶解並藉由例如雜交分析(使用可檢測之標記基因特异性DNA或RNA探針)及定量或半定量RT-PCR(使用適宜基因特异性引子)測定溶胞產物(不論是純化的還是未純化的)中mRNA量。或者, 可在組織切片上或未溶解之細胞懸浮液中使用可檢測(例如, 螢光或酵素)之標記DNA或RNA探針實施定量或半定量原位雜交分析。其他mRNA定量方法包括RNA保護分析(RPA)法及基因表現連續分析(SAGE)法以及陣列型分析技術。
- [0019] 用於量測組織樣品或體液中蛋白質量之方法亦為本發明所屬技術領域中所熟知。其中一些方法係採用可特異結合標的蛋白之抗體(例如, 單株或多株抗體)。在此等分析中, 該抗體本身或可與其特異結合之二級抗體可經可檢測之標記物標記。或者, 該抗體可與生物素相連。該抗體的存在可藉由可檢測之標記抗生物素蛋白(可與生物素結合之多肽)來檢測。此等方法之組合(包括「多層三明治」分析)可用來提高該等方法之靈敏度。一些蛋白質量測分析(例如, ELISA或西方墨點法)可應用於體液或細胞溶胞產物中, 而其他分析法(例如, 免疫組織學方法或螢光流式細胞儀)可應用於組織切片或未溶解之細胞懸浮液中。適宜的標記物包括放射性核素(例如, ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 或 ^{32}P)、酵素(例如, 鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、螢光素酶或 β -半乳糖苷酶), 螢光劑/發光劑(例如, 螢光素、若丹明、藻紅素、GFP、BFP及由Quantum Dot公

- 司, Palo Alto, CA提供之Qdot™奈米顆粒)。其他可應用之方法包括定量免疫沉澱法或補體結合分析。
- [0020] 根據來自上述分析之結果, 可確定適宜的劑量範圍及投予途徑。所需劑量需視下列因素而定: 投予途徑之選擇、調配物性質、病患的疾病情形、個體體型、體重、表面積、年齡及性別、投予之其他藥物及主治醫師之判斷。適宜的劑量範圍係介於0.001至100毫克/公斤之間。鑒於可用之化合物種類不同及各種投予途徑效率不同, 故劑量必定會有所差異。以最優化之標準經驗程序來調整該等劑量差異, 為本發明所屬技術領域中所熟知。一般而言, 分泌神經素可按10至500微克/天/公斤體重投予2至10天; 較佳地, 可按20至200微克/天/公斤體重投予3至8天; 且更佳地, 可按50至100微克/天/公斤體重投予4至6天。
- [0021] 本發明之治療方法視情況可包括投予給個體有效量之幹細胞。異體或自體幹細胞二者皆可使用。在異體幹細胞情形中, 應進行HLA配型以避免或最小化宿主反應。在自體幹細胞情形中, 自擬治療個體富集並純化自體細胞, 之後將該等自體細胞導回至該個體體內。
- [0022] 在兩種情形中, 分泌神經素皆可用作將造血幹細胞(HSC)移出骨髓以增加周邊血液中可返回至腦之幹細胞(HSC, 當存在於周邊血液中時稱作周邊血液幹細胞或PBSC)數目的活性成份。
- [0023] 亦可使用其他因子(諸如粒細胞群落刺激因子(G-CSF))移動HSC。在一實施例中, PBSC以如下方法自一個體中獲得: 首先投予個體G-CSF以使HSC自骨髓移到周邊血液中。此富集步驟後, 收集周邊血液並純化PBSC。為製備PBSC, 按10至200微克/天/公斤體重投予G-CSF 2至10天。該G-CSF可經由任何適宜途徑投予個體。實例包括皮下注射、肌內注射及腹膜內注射。通常根據PBSC之物理及化學性質對其加以純化。例如, 可藉由下列方法濃縮周邊血液細胞以得到造血幹細胞: 離心、逆流淘析、用細胞表面標記物(例如, CD34⁺或幹細胞相關抗體)選擇或去除譜系陽性(定型)造血細胞。此等方法為本發明所屬技術領域中所熟知。例如參見美國專利第5,061,620號、第5,087,570號、第5,061,620號、第4,714,680號、第4,965,204號及第5,035,994號。使用G-CSF獲得純度大於90%之PBSC的詳細資料可見於美國專利申請案第11/134,613號中。
- [0024] 可使用PBSC以外之幹細胞, 只要其具有分化成血管或神經—神經膠質譜系細胞之潛能即可。製備及測試此等細胞之方法為本發明所屬技術領域中所熟知。實例包括胚胎幹細胞(Thomson等人, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92: 7844—7844; 1996, Biol. Reprod. 55: 254—259; Shamblott等人, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 13726及美國專利第6,921,632號及第6,875,607號)、骨髓源性間質幹細胞(Tse等人, 2000, Journal of the American Society of Hematology, 第96卷, No. 11; Woodbury等人, 2002, J. Neuroscience Res. 96: 908—917; Sanchez—Ramos等人, 2000, Exp. Neurol., 164(2): 247—256; Woodbury等人, 2000, J. Neurosci. Res., 61(4): 364—370及美國專利第5,486,359號、第6,355,239號)及臍帶來源之幹細胞(Mitchell等人, 2003, Stem Cells. 2003; 21(1): 50—60; Galvin—Parton等人, 2003, Pediatr. Transplant. 2003; 7(2): 83—85; Ha等人, 2001 Neuroreport., 2(16): 3523—3527及美國專利臨時申請案第60/706,377號。
- [0025] 藉由標準技術測試並保存純化幹細胞。可經大腦內將其投予需要其之個體。一般而言, 投予 1×10^4 及 1×10^6 (例如, 5×10^4 至 8×10^6 且更佳為 1×10^5 至 6×10^5)個細胞。視特定損害之部位及性質而定可於多個部位投予。下文實例闡述用於在大鼠或小鼠中投予細胞之近似坐標。用於其他物種之其他病症之坐標可相應地根據比較解剖學確定。治療之前或之後, 可對該個體加以檢查以確認療效。為此, 吾人可使用上文及下文實例中所述適宜之標準測試或技術。
- [0026] 應理解下文具體實例僅為闡釋之目的, 且無論如何不以任何方式限制其餘揭示內容。無需贅述, 相信本發明所屬技術領域中具有通常知識者可根據本文所述內容充分地實施本發明。本文引用的所有出版物之全部內容皆以引用方式併入本文中。此外, 下文所提出之任一機制不以任何方式限制本發明範疇。
- [0027] 在活體外評估分泌神經素(SN)之神經保護作用。自Sprague—Dawley大鼠妊娠第17天胚胎之大腦皮層製備初代皮層細胞, 如Murphy等人, 1990, FASEB J. 4, 1624—33中所述。4天後, 用含有0.5克/公升BSA及N—2添加物、 0.5×10^{-3} 莫耳/公升丙酮酸鹽及抗生素之最低必需培養基(MEM, GIBCO—BRL)補充該等細胞培養物。最後, 在第7天將培養基更換為含有 1×10^{-3} 莫耳/公升丙酮酸鹽、 1×10^{-3} 莫耳/公升麩胺酸鹽、0.5克/公升BSA、 0.3×10^{-3} 莫耳/公升KCl及抗生素之無血清MEM。
- [0028] 將所製備之初代皮層神經元培養物接種於24—孔盤中並用1微克/公升SN(Neosystems, Strasbourg, France)預處理。20分鐘後, 向培養基中添加 H_2O_2 (10^{-5} 或 10^{-4} 莫耳/公升)。培育24小時後, 收集培養基以用於乳酸脫氫酶(LDH)活性分析, 如Koh等人, 1987, J. Neurosci. Methods 20, 83—90中所述。然後量測在經或未經SN處理培育之培養物中的LDH活性。
- [0029] 發現於 H_2O_2 培育前用SN(1微克/毫升)處理與對照組相比顯著降低了暴露於 H_2O_2 之培養物中的LDH活性。
- [0030] 為分析在 H_2O_2 毒性條件下SN對神經元存活之影響, 將MAP(神經元標記物)陽性之細胞加以定量。簡言之, 該初代皮層細胞培養物用PBS洗滌, 並用1%低聚甲醛固定。根據Wang等人, 2001, Stroke 32, 2170—8(2001)中所述之方法, 以抗MAP—2之專一性抗體(1:1000, BM)進行免疫染色程序及MAP—2⁺細胞之定量。
- [0031] 發現以SN(1微克/毫升)預處理與媒劑對照組相比可顯著增加初代皮層神經元培養物中MAP—2⁺細胞密度。
- [0032] 為檢查SN在初代皮層培養物上之抗細胞凋亡作用, 實施卡斯蛋白酶—3活性及卡斯蛋白酶—3免疫組織化學分析。按上述方式得到初代皮層神經元培養物, 用10微克/公升SN培育, 並用 10^{-5} 莫耳/公升 H_2O_2 處理24小時。使用市售套組(Bio—Rad)按照廠商之說明書實施卡斯蛋白酶—3活性之螢光分析。使用抗卡斯蛋白

酶-3活性片段(R&D Systems)之初級抗體根據Niquet等人, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100, 2825-30中所述方法實施初代皮層神經元培養物中經活化之卡斯蛋白酶-3的免疫螢光染色。結果顯示, 經SN處理之初代皮層細胞中卡斯蛋白酶-3活性顯著低於對照組細胞。

- [0033] 為研究SN抗細胞凋亡作用之分子機制, 實施西方墨點分析以檢查細胞凋亡相關蛋白質(諸如磷酸化Stat-3、ERK1/2、p38、JNK、Akt、Bcl-2、Bcl-xL、Bax及Bad)的表現。
- [0034] 簡言之, 用SN(10微克/公升)培育上述初代皮層細胞持續不同時間(0.5小時、1小時、3小時、8小時及12小時), 之後於含有320 mM蔗糖、5 mM HEPES、1微克/毫升亮抑蛋白酶肽及1微克/毫升抑肽酶之緩衝液中將其溶解。將所得細胞溶胞產物以13,000 g離心15分鐘。將沉澱重新懸浮於樣品緩衝液(62.5 mM Tris-HCl、10%甘油、2% SDS、0.1%溴酚藍及50 mM DTT)中並進行SDS-聚丙烯醯胺凝膠(4至12%)電泳。將該凝膠轉移至Hybond-P耐綸膜上且隨後用下列經適當稀釋之抗體培育: 抗p-ERK1/2抗體(按1:200稀釋; Santa-Cruz)、抗p-p38抗體(按1:200稀釋; Santa-Cruz)、抗p-JNK抗體(按1:200稀釋; Santa-Cruz)、抗p-Akt抗體(按1:200稀釋; Calbiochem)、抗p-Stat-3抗體(按1:200稀釋; Santa-Cruz)、抗Bcl-2抗體(按1:200稀釋; Santa-Cruz)、抗Bcl-xL抗體(按1:200稀釋; Transduction Laboratories)、抗Bax抗體(按1:200稀釋; Santa-Cruz)、抗Bad抗體(按1:200稀釋; Transduction Laboratories)及抗P-肌動蛋白抗體(按1:2000稀釋; Santa-Cruz)。將專一性p-ERK1/2途徑抑制劑PD98059(10 μ M)(Cell Signaling Technology)及p-Akt途徑抑制劑渥曼青黴素(wortmannin)或LY294002(10 nM, Calbiochem)施用於初代皮層培養物中以抑制酵素結合從而阻斷p-ERK1/2及p-Akt之轉錄信號。可根據廠商之程序對每一抗體實施膜阻隔、初級及二級抗體培育及化學發光反應。各條帶之強度藉由Kodak Digital Science ID影像分析系統(Eastman Kodak, Rochester, NY)定量。
- [0035] 亦實施明膠酶譜法分析。簡言之, 如上所述在SN(5微克/公升)、PD98059(5 μ M)及渥曼青黴素(50 nM)存在下形成初代皮層培養物。如Gursoy-Ozdemir等人, 2004, J Clin Invest 113, 1447-55中所述實施酶譜分析。
- [0036] 已發現各種抗細胞凋亡蛋白質(諸如Bcl-2)之表現量在用H₂O₂處理之初代皮層神經元中皆降低, 且SN預處理可顯著抑制此種降低。亦發現被活化的Akt及ERK1/2之表現在SN處理1小時後以與時間相依性之方式增加。此時p-Akt與p-ERK1/2/肌動蛋白之比率達到峰值水平, 其中經處理細胞與對照細胞相比該比率增加約2倍。p38與JNK之表現量在經處理細胞和對照細胞之間在統計學上未顯示出顯著差異。然而, 發現在向經10⁻⁴莫耳/毫升H₂O₂處理之細胞中添加被活化的Akt(LY294002)與被活化的ERK1/2(PD98059)之專一性抑制劑後, 與媒劑對照比較SN(1微克/毫升)不能增加初代皮層神經元培養物中MAP-2免疫反應性細胞密度。
- [0037] 在活體內研究SN之神經保護作用。為誘發局部缺血, 用水合氯醛(0.4克/公斤, ip)麻醉成年雄性Sprague-Dawley大鼠(每隻重量大於300克)並根據Chen等人, 1986, Stroke 17, 738-43(1986)中所述方法使其接受右側大腦中動脈(MCA)結紮及雙側頸總動脈(CCA)鉗夾術。將該等大鼠分成兩組, SN組與對照組, 每組各10隻。MCA結紮後30分鐘, 藉由26號Hamilton注射器(Hamilton公司, Reno, NV)對SN組中每一大鼠經大腦內注射重組人類SN(4微克/4微升)(ProSpec-Tany TechnoGene, Israeli), 對照組中每一大鼠注射媒劑(4微升, PBS)。SN或媒劑各注射至3個鄰近右側MCA之皮層區, 硬膜下3.0至5.0毫米。對於此等部位之近似坐標係前窗前方1.0至2.0毫米及中線旁2.5至3.0毫米, 前窗後方0.5至1.5毫米及中線旁3.5至4.0毫米, 以及前窗後方3.0至4.0毫米及中線旁4.5至5.0毫米。局部缺血90分鐘後, 去除MCA上之10-0縫合線及CCA上之動脈鉗以使再灌注。
- [0038] 在大腦局部缺血前3天及大腦局部缺血後72小時實施行為評定。該等測試量測(a)軀體不對稱性及(b)運動能力(Chang等人, 2003, Stroke 34, 558-64)。發現大腦局部缺血後3天SN組大鼠相對於對照組大鼠展現出顯著降低之軀體不對稱性。在該等接受SN處理之大鼠測得的運動能力(諸如垂直活動、垂直運動時間及垂直運動數量)顯著高於對照大鼠。
- [0039] 此外, 根據對Dunnett等人, 1998, Neurosci Lett 246, 1-4中所述方法加以改進之方法使用握力計(Grip Strength Meter)(TSE-Systems, Germany)分析握力。簡言之, 分別量測每一前肢之握力分配並計算為局部缺血對側與局部缺血同側拉動20次之平均力量之間的比率。此外, 亦計算處理後與基線間握力比並以基線值的百分比表示其變化。
- [0040] 而且, 在基線時及三次處理每進行一次後28天時實施握力量測以檢查所有實驗大鼠之前肢力量。最終結果顯示, 相對於對照組大鼠在SN組中發現更高之握力比。
- [0041] 檢查SN對於降低腦梗塞體積之作用。在16隻大鼠中以上述相同方式誘發大腦局部缺血。30分鐘後, 8隻大鼠接受SN, 而另外8隻接受鹽水。3天後, 將每一大鼠安樂死, 用鹽水進行心臟內灌注, 並藉由標準方法使其接受TTC染色(Wang等人, 2001, Stroke 32, 2170-8)。為使人為的局部缺血後水腫導致的梗塞組織降至最低, 亦藉由一種對Lin.等人, 1993, Stroke 24, 117-21中方法加以修飾之方法計算腦梗塞體積。
- [0042] 發現經SN處理大鼠與經鹽水處理對照組之平均總腦梗塞體積分別係73±17 mm³及182±16 mm³。兩組中最大梗塞面積分別係9.4±3.3 mm²及19.7±2.9 mm²。梗塞切片亦顯著不同, 其中對照為6.7±0.4片/大鼠而經SN處理大鼠中為3.1±0.5片/大鼠。
- [0043] 亦量測7隻經SN處理大鼠及7隻經鹽水處理大鼠之生理學參數。在體循環血壓、血液氣體、血糖或血清電解質測量值中皆未發現差異, 表示SN不會影響生理學參數。上述結果表示, 經大腦內投予SN可改善神經行為並可在由大腦局部缺血造成大腦梗塞後降低腦梗塞體積。
- [0044] 藉由免疫染色神經元專一性蛋白質Neu-N及MAP-2驗證SN之神經保護作用。發現局部缺血核心周圍之半影區中對於MAP-2及Neu-N呈陽性之細胞數在經SN處理大鼠中顯著高於經媒劑處理大鼠。

- [0045] 已知卡斯蛋白酶-3可由大腦局部缺血活化。為研究SN之神經保護機制，MCA結紮後8小時對6隻經SN處理大鼠及6隻對照大鼠施以安樂死，用4%低聚甲醛灌注，並使其接受卡斯蛋白酶-3免疫反應性測試。藉由標準程序由該等大鼠製備切片並用偶聯有Cy3(1:500, Jackson Immunoresearch)之抗卡斯蛋白酶-3(分解之卡斯蛋白酶-3抗體, D175, 按1:500稀釋; Cell Signaling)初級抗體在4°C下培育20小時，用PBS洗滌3次，且隨後用螢光顯微鏡(Carl Zeiss, Axiovert 200M)觀察。將細胞凋亡程度量測為每平方毫米之卡斯蛋白酶-3⁺凋亡細胞數。此外，亦在經SN處理大鼠及對照大鼠中使用西方墨點分析檢查細胞凋亡相關蛋白質(Harada, 等人2005, Nat. Med. 11, 305-11)。
- [0046] 發現經SN處理大鼠中局部缺血核心周圍之半影中含有之表現被活化的卡斯蛋白酶-3之細胞少於對照大鼠。亦發現經SN處理大鼠中抗細胞凋亡蛋白質(諸如Bcl-2及Bcl-xL)之表現顯著多於對照大鼠。
- [0047] 上述結果表明，在大腦局部缺血時SN可藉由抑制卡斯蛋白酶-3之活化及上調抗細胞凋亡蛋白質(例如，Bcl-2及Bcl-xL)來保護細胞免於凋亡。
- [0048] 為確定在經SN處理時幹細胞是否會返回至受損腦組織，於大腦局部缺血後7天使用溴脫氧尿苷(BrdU)標記來追蹤調查HSC向腦之移入。
- [0049] BrdU係一胸苷類似物，可在S-一期攝入分裂中細胞的DNA中並因此可用於有絲分裂標記(Sigma Chemical, MO)。以上述方式誘發形成大鼠大腦局部缺血，注射BrdU，並在3至7後天犧牲該等大鼠。然後使用專一性抗BrdU抗體(1:400, Mannheim, Germany)對其進行BrdU染色並藉由標準方法定量(Zhang等人, 2001, Neuroscience 105, 33-41)。累積的BrdU標記顯示在接近梗塞邊界之同側皮層中及局部缺血半球室下區中存在少量BrdU免疫反應性細胞。亦發現BrdU免疫反應性細胞存在於局部缺血半球血管周圍部分中不同管徑血管內腔周圍。亦實施BrdU脈衝標記實驗。發現經SN處理之大鼠(n=8)中BrdU免疫反應性細胞較彼等鹽水處理之對照大鼠(n=8)中BrdU免疫反應性細胞有顯著增加。
- [0050] 上述結果表示與HSC有關且SN可誘發幹細胞移動/返回至局部缺血的腦中。
- [0051] 在來自經SN處理大鼠及對照大鼠之腦切片上實施雙重免疫組織化學染色以確定移動的HSC是否會在局部缺血部位分化成神經元及神經膠質細胞。
- [0052] 為鑑定BrdU⁺細胞中細胞類型專一性標記物之表現，實施雙重免疫螢光染色以測試神經膠質纖維酸性蛋白(GFAP)、馮維布蘭德因子(von Willebrand factor)(vWF)、微管相關蛋白2(MAP-2)及神經元核(Neu-N)之表現。使用一標準方法採用抗下列各物之專一性抗體實施免疫螢光染色：偶聯有FITC(1:500, Jackson Immunoresearch)或Cy3(1:500, Jackson Immunoresearch)之BrdU(1:400, Mannheim, Germany)、偶聯有Cy3(1:500, Jackson Immunoresearch)之GFAP(1:400, Sigma)、偶聯有Cy3之MAP-2(1:200, BM)、偶聯有FITC之巢蛋白(1:400, Sigma)、偶聯有FITC之Neu-N(1:200, Chemicon)、偶聯有Cy3之vWF(1:400, Sigma)、偶聯有Cy3之CXCR4(CD 184, 1:100, Torrey Pines Biolab)及偶聯有Cy3之雙腎上腺皮質素(Doublecortin, Dcx, 1:100, Santa Cruz Biotechnology)(Li, 等人, 2002, Neurology 59, 514-23)。
- [0053] 用一Carl Zeiss LSM510雷射掃描共聚焦顯微鏡分析組織切片。結果顯示，在來自經SN處理大鼠之腦切片中有些BrdU⁺細胞與GFAP、Neu-N及MAP-2的分佈位置相同。相對於經鹽水處理大鼠，經SN處理大鼠在局部缺血皮層區亦具有更多共表現GFAP⁺、Neu-N⁺及MAP-2⁺細胞神經元表型之BrdU⁺細胞。
- [0054] 為研究幹細胞之返回及遷移，亦實施CXCR4及Dcx專一性標記物之雙重免疫螢光分析。發現大部分半影區表現CXCR4之專一性表型標記物，其與BrdU免疫染色的位置相同。於雙重免疫染色分析中亦在局部缺血區周圍發現Dcx標記物。
- [0055] 上述結果表示，SN可增強活體內神經發生且植入的幹細胞可遷移返回半影區以修復受損腦。
- [0056] 實施雙重免疫組織化學染色、FITC-葡聚糖灌注及血管密度分析以證明SN是否會藉由在局部缺血部位經返回的HSC分化成血管內皮細胞而誘發血管發生。
- [0057] 為檢查血管，將螢光血漿標記物(FITC-葡聚糖, Sigma)經靜脈投予給大鼠。根據Morris等人, 1999, Brain Res Brain Res. Protoc. 4, 185-91中所述方法使用螢光顯微鏡(Carl Zeiss, Axiovert 200M)觀察每一大鼠中之大腦微循環。為定量大腦血管密度及檢查藉由巨噬細胞進行之血管重塑，用水合氯醛麻醉每一大鼠並用4%低聚甲醛灌注。得到組織學切片(6微米)並用抗CD-31(1:100, BD Pharmingen)、OX-42(1:400, Serotec)、ED-1(1:500, Serotec)專一性抗體染色並與Cy-3(1:500, Jackson Immunoresearch PA USA)偶聯。藉由Taguchi等人, 2004, J. Clin. Invest. 114, 330-8中所述方法測定血管數。
- [0058] 結果表明若干BrdU⁺細胞展現血管的表型(vWF⁺細胞)。發現其位於經SN處理大鼠之局部缺血半球之血管周圍區及內皮區附近。同樣的，與對照處理相比(n=6)經SN處理(n=6)顯著增強大腦微血管之FITC-葡聚糖灌注。經CD31免疫反應性檢查之血管密度的定量量測表示，經SN處理之局部缺血大鼠(n=6)中半影區之新生血管系統顯著多於對照組(n=6)。
- [0059] 為證明血管發生與巨噬細胞/微膠質細胞(MA/MI)之間的關聯性，根據Pipp等人, 2003, Circ. Res. 92, 378-85中所述方法計數每一切片之陽性MA/MI總數。結果表明，若干細胞表現MA/MI表型(OX-42/ED-1細胞)並滲入經SN處理大鼠之局部缺血半球的血管周圍區(FITC-葡聚糖灌注之血管)附近。經SN處理大鼠中血管周圍之MA/MI顯著多於對照大鼠。
- [0060] 此外，亦藉由西方墨點分析使用專一性抗β1-整合素抗體(Chemicon)研究β1-整合素之蛋白表現。為瞭解β1-整合素的活化是否為合成之環狀RGD肽所阻斷，在注射入局部缺血腦之前將該肽(1微克/毫升, Chemicon)添加於SN中。亦以上述方式實施藉由TTC染色進行之腦梗塞體積分析及神經行為量測。
- [0061] 發現經SN處理大鼠(n=4)較對照大鼠(n=4)具有更高之表現量。然而，添加合成之環狀RGD肽後，兩組大鼠在β1-整合素表現或梗塞尺寸上未顯示出顯著差異。上述結果證明，SN誘發了血管發生及血管重塑

且該誘發涉及幹細胞來源之巨噬細胞/微膠質細胞(MA/MI)及 $\beta 1$ -整合素。

- [0062] 增加之血管密度會提高神經元存活率，尤其伴隨大腦血流(rCBF)增加，從而促進氧及營養之有效遞送。為檢測局部缺血腦中rCBF，使上述實驗大鼠接受乙醯唑胺(diamox)注射並在大腦局部缺血後於麻醉狀態下藉由雷射多普勒血流儀(LDF)加以監測。
- [0063] 將每一大鼠置於一立體定位架中且在大腦局部缺血後用雷射多普勒血流儀(LDF監測器，Moore Instructment England)在麻醉狀態下(水合氯醛)如先前所述改進之方法(Tuettenberg等人，2001，Neurosci Lett 315，65-8)每天量測基線局部皮層血流(bCBF)，持續5天。腹膜內注射50毫克/公斤乙醯唑胺(Diamox，Lederle)後檢查rCBF並將其定義為bCBF變化百分比。
- [0064] 發現經SN處理大鼠(n=6)局部缺血腦之MCA皮層中rCBF與對照大鼠(n=6)相比顯著增加。結果表示，SN可促進局部缺血腦中之rCBF。
- [0065] 已知c-kit受體調節途徑在幹細胞移動/返回中扮演重要角色。為闡明SN誘發之幹細胞移動/返回的細胞機制，誘發成年雄性c-kit突變小鼠(W/W^V)及其正常同胞小鼠(NL)(重量>30克)形成大腦局部缺血，並對其進行進一步檢測。
- [0066] 自Jackson實驗室購買到WBReJ W/+及C57BL/6 W^V/+小鼠。藉由異配子動物之兄妹交配維持群體。W/+成年小鼠具有中等大小之白色腹部斑點、白足及白梢尾。在c-kit基因位置2007處之C變為T可產生一可用於鑒定W^V等位突變之Nsil位點(Yoshinaga等人，1991，Development 113，689-99)。用水合氯醛(0.3克/公斤，ip)麻醉成年c-kit突變小鼠(W/W^V)及其正常同胞小鼠並使其接受右側大腦中動脈(MCA)結紮及雙側頸總動脈(CCA)鉗夾術(Chen等人，1986，Stroke 17，738-43)。MCA結紮後15分鐘，如上所述藉以26號Hamilton注射器(Hamilton公司，Reno，NV)對小鼠經大腦內注射重組人類SN(2微克/4微升PBS)(Neosystems，Strasbourg，France)或媒劑(4微升PBS)，至3個鄰近右側MCA之皮層區，如前述位於硬膜下1.0至2.0毫米。對於此等部位之近似坐標係前窗前方0.5至1.0毫米及中線旁1.0至2.0毫米，前窗後方0至0.5毫米及中線旁1.5至2.0毫米，以及前窗後方1.0至2.0毫米及中線旁2.5至3.0毫米。局部缺血60分鐘後，去除MCA上之10-0縫合線及CCA上之動脈鉗以使再灌注。然後實施5天BrdU累積標記。如上所述進行BrdU免疫染色及定量。
- [0067] 結果顯示，經SN之處理之NL小鼠中有許多BrdU免疫反應性細胞分散於半影區、室下區、海馬迴及血管周圍區。相對而言，在W/W^V小鼠中幾乎未發現BrdU免疫反應性細胞。在定量分析中，經SN處理之NL小鼠(n=6)中BrdU免疫反應性細胞相對於W/W^V小鼠(n=6)中BrdU免疫反應性細胞有顯著增加。
- [0068] 此外，每一小鼠皆接受H&E染色並量測其腦梗塞體積。發現經SN處理之NL小鼠中平均腦梗塞體積顯著小於W/W^V小鼠中平均腦梗塞體積。結果證明，SN可經由c-kit受體調節途徑促使幹細胞移動/返回至局部缺血組織中。
- [0069] 上述實例中所有量測皆為盲測。結果以平均值±SEM表示。評估行為分數以確定行為正常性。使用Student的t檢驗評估對照組與經SN處理組之間的平均值差異。
- [0070] 本說明書中揭示之所有特徵皆可以任何組合方式相組合。本說明書中揭示之每一特徵皆可由一相同、等效或類似目的之替代特徵所代替。因此，除非另外明確說明，否則所揭示之每一特徵僅係等效或類似特徵之總稱系列之一個實例。
- [0071] 自上述闡述，本發明所屬技術領域中具有通常知識者可易於確定本發明之本質特徵，且可對本發明進行各種改變及修改以使其適於各種用途及條件而不違背本發明之精神及範疇。因此，其他實施例亦涵蓋於隨附申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

1. 一種用於經大腦內投予有需要之個體以治療其腦組織損害的醫藥組合物，其包括有效量之分泌神經素，其中該腦組織損害係由大腦局部缺血或由中風引起。
2. 如請求項1之醫藥組合物，其中該腦組織損害係由大腦局部缺血引起。
3. 如請求項1之醫藥組合物，其中該腦組織損害係由中風引起。
4. 一種分泌神經素之用途，其係用以製造用於經大腦內投予有需要之個體以治療其腦組織損害之藥物，其中該腦組織損害係由大腦局部缺血或由中風引起。
5. 如請求項4之用途，其中該腦組織損害係由大腦局部缺血引起。
6. 如請求項4之用途，其中該腦組織損害係由中風引起。
7. 一種用於經大腦內投予罹患大腦局部缺血或中風之個體以促進其大腦血管發生之醫藥組合物，其包括有效量之分泌神經素。
8. 如請求項7之醫藥組合物，其中該個體罹患中風。
9. 如請求項7之醫藥組合物，其中該個體罹患大腦局部缺血。
10. 一種分泌神經素之用途，其係用以製造用於經大腦內投予罹患大腦局部缺血或中風之個體以促進其大腦血管發生之藥物。
11. 如請求項10之用途，其中該個體罹患中風。
12. 如請求項10之用途，其中該個體罹患大腦局部缺血。
13. 一種用於經大腦內投予罹患大腦局部缺血或中風之個體以促進神經元存活之醫藥組合物，其包括有效量之分泌神經素。
14. 如請求項13之醫藥組合物，其中該個體罹患中風。
15. 如請求項13之醫藥組合物，其中該個體罹患大腦局部缺血。

16. 一種分泌神經素之用途，其係用以製造用於經大腦內投予罹患大腦局部缺血或中風之個體以促進其神經元存活之藥物。

17. 如請求項16之用途，其中該個體罹患中風。

18. 如請求項16之用途，其中該個體罹患大腦局部缺血。

八、圖式：