

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：096137579

A61K 31/126 (2006.01)

※ 申請日期：96年10月5日

※IPC 分類：C08B 37/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 25/00 (2006.01)

促進脊髓損傷中神經軸突再生及行為功能恢復之方法

A METHOD FOR PROMOTING AXONAL RE-GROWTH AND

BEHAVIOR RECOVERY IN SPINAL CORD INJURY

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

ID : H120003863

鄭宏志/CHENG,HENRICH

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北市北投區石牌路二段 322 號

NO.322, SHIH-PAI ROAD SEC.2, PEI-TOU DIST.TAIPEI

國 籍：(中文/英文)

中華民國/R.O.C

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

ID:

1. 黃文成/WEN-CHENG HUANG

ID: A121931814

2. 郭玟君/KUO, WEN-CHUN

ID: S222300472

3. 鄭宏志/CHENG,HENRICH

ID: H120003863

國 籍：(中文/英文)

1-3 均中華民國/R.O.C

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國:2006年10月06日:60/828,450

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

促進脊髓損傷中軸突再生和行為功能恢復的藥物組合物

【先前技術】

本發明係關於一種用於促進脊髓損傷軸突再生(axonal regrowth)和行為功能恢復(behavior recovery)的方法及藥物組合物。

在哺乳動物中，成年人的神經組織具有有限的再生能力。因此，許多大腦或脊髓損傷不能自體修復或連接重建功能。許多複雜的原因，包括免疫調控分子和抑制因子影響成年人中樞神經系統的再生能力。在脊髓損傷(SCI)後，損傷部位的星形細胞和少突膠質細胞會增加硫酸軟骨素蛋白多糖(CSPGs)的產生，因而限制了軸突再生。

某些報告已經表明在損傷後 CSPG 之表現通常會增加，最近的研究聚焦在不同的損傷後各個家族成分表現的改變。CSPGs 由葡糖胺聚糖(glycosaminoglycan)(GAG)組成，其為一種阻斷軸突生長的關鍵性限制因素。軟骨素酶 ABC (ChABC) 是一種細菌酶，其消化 CSPGs 的 GAG 側鏈。然而，由於 ChABC 的毒性，其很少被用於脊髓損傷病例的臨床試驗。

【發明內容】

本發明提供 ChABC 以低劑量治療受試者中神經損傷的用途。

本發明一方面提供一種用於促進患有神經損傷的受試者軸突再生和行為功能恢復的方法，包括向受試者神經損傷的部位給藥，包含安全有效量的軟骨素酶 ABC(ChABC)的藥物組合物，比如劑量範圍為從約 0.1 U/ml 至約 10 U/ml，較適當的量約 0.5 U/ml 至約 5 U/ml，更適當的量為 1 U/ml。

本發明另一方面提供 ChABC 在製備用於促進受試者軸突再生和行為功能恢復的藥物組合物的用途，其中所述組合物包含安全有效量的 ChABC，比如劑量範圍為從約 0.1 U/ml 至約 10 U/ml，較適當的量約 0.5 U/ml 至約 5 U/ml，更適當的量為 1 U/ml。

本發明另個方面提供一種用於受試者的神經損傷的部位，來促進患有神經損傷的受試者軸突再生和行為功能恢復的藥物組合物，其包含安全有效量的軟骨素酶 ABC(ChABC)，比如劑量範圍為從約 0.1 U/ml 至約 10 U/ml，較適當的量約 0.5 U/ml 至約 5 U/ml，更適當的量為 1 U/ml。

本發明的另一個目的和適當實施方法將在隨後的說明書各部分中闡述，並且所述部分根據說明書是顯而易見的。本發明的目的和優點特別是在所附之申請專利範圍中指出的部分和組合來實現和獲得。

要注意的是，前述的一般說明及其後的詳細說明僅僅作為例示性的說明，而不限制本發明之要求。

【實施方式】

本發明涉及一種促進患有神經損傷的受試者軸突再生和行為功能恢復的方法，該方法包括向受試者神經損傷的部位給藥，包含有安全有效量的軟骨素酶 ABC (ChABC)的藥物組合物。所述受試者包括哺乳動物，包括人類。所述神經損傷包括中樞神經系統(CNS)損傷或周圍神經系統(PNS)損傷，比如脊髓損傷。在本發明的一個實施方案中，發現了在 ChABC 治療後對軸突再生的明顯改善作用和對行為功能恢復的顯著性改善。

根據本發明的一個實施態樣，通過向受試者的神經損傷部位輸注 ChABC，比如通過插入到脊髓損傷部位藉由導管來給藥受試者。

根據本發明的一個實施態樣，所述導管可以是插入到脊髓損傷部位的硬膜外鞘內導管(epidural intrathecal catheter)，且具有輸注到 ChABC 的表面化(externalized)的一端。然而，輸注 ChABC 的方式將不會同樣地受到限制。用於向受試者輸注或給藥 ChABC 的其他方法也可包括在本發明中，只要他們向受試者提供無毒有效的劑量。而且，輸注的 ChABC 的相對低劑量為約 0.5 至約 10 U/ml ChABC，適當量約 0.5 U/ml 至約 5 U/ml，更適當量為約 1 U/ml。另外，在人類受試者可以每週給藥一次，取決於受試者的個體需要。

本發明還提供 ChABC 在製備用於促進患有神經損傷的受試者軸突再生和行為功能恢復的組合物中的用途，其中所述組合物包含相對低劑量的 ChABC。ChABC 的相對低劑量為約 0.5 至約 10 U/ml ChABC，適當量約 0.5 U/ml 至約 5 U/ml，更適當量為約 1 U/ml。可以加入其他不會降低 ChABC 的治療效果之活性或穩定的成分。

目前已知 CSPGs 經由星形細胞和少突膠質細胞的產生會限制軸突再生。根據本發明，向損傷部位輸注的 ChABC 可分解 CSPGs，因此可以促進軸突再生。

根據本發明的一個實例，經由傷口將硬膜外鞘內導管插入到患有神經損傷的受試者的脊髓損傷部位。然後，閉合所述傷口，使其遠離用於輸注 ChABC 的表面化的硬膜外鞘內導管的一端。在本發明中意外地發現了 ChABC 對患有神經損傷的受試者的軸突再生以及行為功能恢復的顯著作用。

根據個體受試者的需要，可以給藥 ChABC 或包含 ChABC 的組合物，比如給予所需之受者每週一次。在本發明的一個實施方案中，用 1 U/ml 的 ChABC 每隔一天給藥於受試者(比如大鼠)兩周(總共 8 次)。

本發明現在將參照具體但非限定性的實例進一步詳細地描述。

實施例 1：在 T8 完全脊髓橫切(T8 complete spinal cord transection)後導管的插入和軟骨素酶 ABC 的輸注

在該試驗中使用雌性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(每隻稱重 250 至 300 g)。在用異氟烷吸入麻醉和在 homoeothermic blanket 上保持體溫為約 37°C 下進行所有的外科手術。將皮膚打開約酒瓶口的大小，進行縱中切口暴露頭狀骨和 C1 層。就在 C1 層上建立硬膜外腔，將導管插入達到 T8-T9 水準。層疊層地閉合傷口，表面化導管用於輸注軟骨素酶 ABC。

在插入導管和證實後肢運動正常後一周，這些動物接受以 T8 水準的 T8 總的椎板切除術用於暴露脊髓和插入的導管。在舉起兩個殘肢(stumps)的方式下進行完全脊髓橫切用於完成脊髓橫切，兩個殘肢靠近在一起。也在 T8 髓(cord)水準切開導管用於輸注 ChABC。在脊髓橫切穿過硬膜外鞘內導管後的 2、4 和 6 周給予第一次劑量的 ChABC。一層一層地打開傷口。在外科手術後，立即將動物放置在 homoeothermic blanket 上，在熱燈下保持一周。經由每日插入導管兩次排尿，直到排尿功能變成正常。為了預防尿路感染，每日一次給藥預防性抗生素直到動物排泄出它自己的尿。

根據脊髓橫切和輸注 ChABC 的間隔時間將雌性 SD 大鼠分成三組。在完成脊髓橫切後，以三種不同的濃度 1、5 和 10 U/ml 輸注 ChABC。在吸入麻醉下每隔一天給予 ChABC，持續兩周(總共 8 周，每次 6 μ l)。在最後一次輸注 ChABC 後 2 周，切開表面化的管並移除。實驗總共分為五組，雌性 SD 大鼠接受(1)僅 T8 脊髓橫切(僅僅 T8 tx)、(2)僅 T8 脊髓橫切和插入硬膜外鞘內導管(僅 T8 tx + 管)、(3)損傷，僅導管插入和生理鹽水輸注(T8 tx + 生理鹽水)、(4)損傷，導管插入和 8 周輸注 1U/ml ChABC、(5)損傷，導管插入和 8 周輸注 5 U/ml ChABC。

實施例 2：行為功能的評價

外科手術後每週，所有的動物接受行為功能測定 8 周。錄影所有的行為功能測定，參與行為功能評價的兩個檢查者對每組是盲的(blinded)。通過 Basso, Beattie, Bresnahan(BBB) 開放(照影)野測定評價大鼠的後肢 locomotor's 行為功能。每次評價時間持續 5 分鐘。通過包括軀幹、尾部和後肢的行為功能的觀察和得分測定從 0 至 21 的開放(照影)野 locomotor's 活性得分(0 為沒有運動，21 為正常運動)。

參照圖 1，在外科手術和 ChABC 處理後，ChABC 1U/ml 組(T8 tx + chABC 1U)、ChABC 5U/ml 組(T8 tx + chABC 5U) 和對照組(T8 tx + 生理鹽水，僅僅 T8 tx + 管和僅僅 T8 tx)之間的後肢 locomotor's 功能評價中存在統計學差異。

實施例 3：穿過橫切部位的軸突的順行性標記

8 周後，在吸入異氟烷下麻醉雌性 SD 大鼠。以 T10 水準暴露脊髓，將 4% WGA-HRP 經由微型注射器注入到腦的運動皮質。通過緩慢的泵壓系統注射三個部位(在每側 $0.24 \mu\text{l} \times 3$ 上分散注射(disperse injecting))。微量注射後兩天，在麻醉下經頸動脈輸注 4% 低聚甲醛死亡之所述動物。取下脊髓和腦幹，後固定並冷凍保存在 30% 蔗糖中一個晚上用於連續切片。以 $30 \mu\text{m}$ 的厚度縱向切片(sectioned)脊髓和沿冠狀(coronary)切片腦幹。

實施例 4：免疫組織化學

收集脊髓，浸入 4% 的低聚甲醛在磷酸鹽緩衝液中過夜，接著轉移到 30% 的蔗糖溶液中。將脊髓的橫的或橫向冷凍切片(每個具有 $20 \mu\text{m}$ 厚)放置在聚 L-賴氨酸塗層的載玻片上用於免疫染色。在用 5% 的 PBS 中的牛血清蛋白培養 30 分鐘後

，使用對 CS-56(1:500 ; Sigma, St. Louis, MO)、2B6(1:5000 ; Seikagaku Corporation)、GAP-43(1:1000 ; Sigma, St. Louis, MO) 的單株抗體作為一級抗體。使用適當的二級抗體加抗生物素蛋白生物素複合物(ABC)過程用於過氧化物酶染色。陰性對照組為不含有(omission)對 CS-56 (一種 CSPG)、2B6(CSPG 的降解產物)和 GAP-43 (一種新形成的軸突)的一級抗體來檢驗，抗體也用於評價 CSPG 的降解和軸突穿過損傷部位的再生。

如在圖 2 所示，通過與對照組比較來觀察在 ChABC 1U/ml 組和 ChABC 5U/ml 組中的形態學癥痕組織。然而，如圖 2B 所示，在 ChABC 5U/ml 組中接近橫切部位觀察到大的囊腫。

如圖 3 所示，在脊髓損傷和 ChABC 治療後 8 周，與 ChABC 5 U/ml 組和對照組相比，在用 ChABC 1 U/ml 處理的組中，CS-56 的免疫染色，其為在脊髓損傷部位上的完全創痕 CSPGs 結構，顯示出顯著地降低。未消化的(undigested)癥痕組織會表現 CS-56 的強免疫陽性(immunopositive)。如圖 4 所示，在 1 U/ml ChABC 處理後 2 周內檢測到最低量的 CS-56，但是在 ChABC 處理後 4 周 CS-56 仍增加。在 ChABC 1U/ml 組中，CS-56 免疫染色在脊髓損傷後 2 周達到峰水準，與之相比，T8 橫切組的 CS-56 免疫染色在 6 周達到峰水準並持續至多 8 周。

2B6 在 ChABC 1U/ml 組中的表達比對照組更強。在 ChABC 處理後 8 周，在 ChABC 1 U/ml 組、ChABC 5 U/ml 組和對照組之間，在 2B6 (ChABC 對 CSPGs 的降解產物)的免疫染色不存在差異。參照圖 5，與對照組相比，在 ChABC 處理後 2 周，在 1U/ml ChABC 組中觀察到 2B6 免疫染色。

如圖 6 所示，在 ChABC 1 U/ml 組中穿過橫切部位觀察到小麥胚芽凝集的辣根過氧化物酶(WGA-HRP)標記的軸突。小尺寸的癥痕不會阻斷軸突再生。參照圖 7，在橫切後 8 周，再

ChABC 1 U/ml 組中穿過 T8 橫切部位觀察到一些 GAP-43 免疫陽性突起。如圖 7B 所示，在上側殘肢(rostral stump)損傷部位觀察到大量軸突。如圖 7C 所示，在癒痕組織的中心區域，發現了更少和更薄的軸突。

根據本發明公開的內容，本領域普通技術人員應當理解本發明的方法相當適於治療患有神經損傷的任一種脊椎動物。所述脊椎動物包括，但不限於人類之市售有關的哺乳動物，例如牛、豬、馬、羊、貓、狗、小鼠、大鼠、兔子，也包括市售有關的禽類比如小雞、鴨、鵝和火雞。

本領域技術人員應當理解，在不背離其發明精神下，可對如上述的實施例進行變化。因此，應當理解本發明不限於所載的特定實施例，其意味著包括如附加權利要求書定義的本發明的精神和範圍內的修飾。

【圖式簡單說明】

當與附圖一起說明時，有助於闡述之前發明物概述以及詳細說明中所載內容，並能更清楚瞭解本發明。

在附圖中：

圖 1 為表示在根據本發明的不同處理組中，在 T8 橫切(T8 transection)後，雌性 SD 大鼠的 Basso、Beattie、Bresnahan(BBB)開放(照影)野(open field) locomotor's 檢驗得分。

圖 2A 顯示了在根據本發明的不同處理組中在 T8 橫切後 8 周脊髓的形態學。

圖 2B 顯示了在根據本發明的不同處理組中在 T8 橫切後 8 周脊髓的組織化學橫切面。

圖 3 顯示了在根據本發明的不同處理組中在 T8 橫切後 8 周脊髓損傷部位的組織化學橫切面。

圖 4 顯示了在 ChABC 1 U/ml 組和對照組中 CS-56 免疫染色的大鼠脊柱的組織化學橫切面。

圖 5 顯示了在 ChABC 1 U/ml 組和對照組中 2B6 免疫染色的大鼠脊柱的組織化學橫切面。

圖 6 顯示了在 ChABC 1 U/ml 組中 HRP 描繪的(HRP traced)大鼠脊柱的組織化學橫切面。

圖 7A 顯示了在 ChABC 1 U/ml 組中 GAP-43 免疫染色的大鼠脊柱的組織化學橫切面。

圖 7B 顯示了得自圖 7A 的上側殘肢(rostral stump)損傷部位的高解析度圖像。

圖 7C 為得自圖 7A 的癥痕組織(C)的中心區域的高解析度圖像。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

提供一種用於受試者神經損傷的損傷部位的來促進患有神經損傷的受試者軸突再生和行為功能恢復的藥物組合物，其包含安全有效量的軟骨素酶 ABC(ChABC)和藥學可接受的載體。

六、英文發明摘要：

A method for promoting axon re-growth and behavior recovery in a subject suffering from a nerve injury comprising administration a relative low dose of chondroitinase ABC (ChABC) to the subject is provided.

十、申請專利範圍：

1. 一種利用藥物組合物促進受試者軸突再生和行為功能的用途，其中所述藥物組合物包含用於促進患有神經損傷的受試者軸突再生和行為功能恢復的安全有效量的軟骨素酶 ABC(ChABC)。

2. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中所述藥物組合物包含約 0.1 U/ml 至約 10 U/ml 的 ChABC。

3. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中所述藥物組合物包含約 0.5 U/ml 至約 5 U/ml 的 ChABC。

4. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中所述藥物組合物包含約 1 U/ml 的 ChABC。

5. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中所述藥物組合物為由輸注給藥至損傷部位。

6. 根據申請專利範圍第 5 項的用途，其中所述藥物組合物為經由硬膜外鞘內導管給藥。

7. 根據申請專利範圍第 5 項的用途，其中每次輸注約 1 μ l 至約 100 μ l 的藥物組合物給藥至損傷部位。

8. 根據申請專利範圍第 7 項的用途，其中所述輸注為每天進行一次或每隔一天進行一次。

9. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中所述神經損傷包括中樞神經系統(CNS)損傷或周圍神經系統(PNS)損傷。

10. 根據申請專利範圍第 9 項的用途，其中所述神經損傷包括脊髓損傷。

11. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中所述受試者為哺乳動物。

12. 根據申請專利範圍第 1 項的用途，其中所述受試者為人

類。

13. 一種用於促進患有神經損傷的受試者軸突再生和行為功能恢復的藥物組合物，所述藥物組合物包含安全有效量的軟骨素酶 ABC(ChABC)和醫藥上可接受的載體。

14. 根據申請專利範圍第 13 項的藥物組合物，其包含約 0.1 U/ml 至約 10 U/ml 的 ChABC。

15. 根據申請專利範圍第 13 項的藥物組合物，其包含約 0.5 U/ml 至約 5 U/ml 的 ChABC。

16. 根據申請專利範圍第 13 項的藥物組合物，其包含約 1 U/ml 的 ChABC。

十一、圖式：

（此處為圖式內容，因圖式模糊，無法辨識具體內容）

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：