



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110464709 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910643063.1 *A61K 47/24*(2006.01)
(22)申请日 2012.09.21 *A61K 47/10*(2006.01)
(30)优先权数据 *A61K 41/00*(2006.01)
61/682,130 2012.08.10 US *A61K 33/00*(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
(62)分案原申请数据 *A61P 7/04*(2006.01)
201210356929.9 2012.09.21 *A61P 7/02*(2006.01)

(71)申请人 德克萨斯州大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 黄韶玲 M·E·克莱格曼 耿永健
金亨建 D·D·麦克弗森

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
代理人 陶家蓉

(51)Int.Cl.
A61K 9/127(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页 附图15页

(54)发明名称

用于治疗中风的神经保护性脂质体组合物
和方法

(57)摘要

本发明提供了通过施用负载氙(Xe)的脂质体组合物来治疗中风(诸如不明来源的中风)的方法。在一些方面,将Xe包封在发生回波的脂质体中,并且通过施加超声刺激,可以增强Xe的释放。还提供了用于治疗中风的组合物,诸如负载了Xe或者与H₂或H₂S相组合的Xe的脂质体。

1. 一种用于在尚未确定患有血栓性中风或出血性中风的受试者中治疗中风的组合物，所述组合物包括有效量的负载氘的发生回波的脂质体。
2. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述受试者尚未确定患有血栓性中风。
3. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述的组合物供静脉内、动脉内、颅内、经由静脉内输注或经由动脉内输注施用。
4. 根据权利要求1所述的组合物，它还包含负载 H_2S 或 H_2 的发生回波的脂质体。
5. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述组合物是冻干的，或是冷冻的，或在悬浮液中。
6. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述组合物另外包含冷冻保护剂。
7. 根据权利要求6所述的组合物，其中所述冷冻保护剂是甘露醇。
8. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述脂质体包含磷脂酰胆碱 (PC)、磷酸乙醇胺 (PE)、聚乙二醇 (PEG)、磷脂酰甘油 (PG) 或磷脂酰丝氨酸 (PS) 或胆固醇。
9. 根据权利要求8所述的组合物，其中所述脂质体包含至少一种PC、PE、带负电荷的脂质、聚乙二醇化的脂质和胆固醇分子。
10. 根据权利要求8所述的组合物，其中：
 - (a) 所述PC包括二棕榈酰基磷脂酰胆碱 (DPPC) 或卵磷脂酰胆碱 (EPC)；
 - (b) 所述PEG包括PEG2000-DPPE；或
 - (c) 所述PG包括1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-消旋-甘油)。

用于治疗中风的神经保护性脂质体组合物和方法

[0001] 发明背景

[0002] 本发明在国立卫生研究院授予的授权号NS067454、HL 074002、HL 059586和HL069509的政府支持下完成。政府具有本发明的某些权利。

1. 发明领域

[0003] 本发明整体涉及医学、生物化学和分子生物学领域。更具体地,涉及用于治疗中风的、使用生物保护性的脂质体的组合物和方法。

[0004] 2. 相关技术的描述

[0005] 血栓性中风和出血性中风也称作脑血管意外(CVA),二者一起成为美国的第四主要死因,并且是成年人残疾的最常见原因。两种类型的中风的特征在于,由向脑供血的紊乱造成的脑功能的快速丧失。在血栓性中风中,由血块造成的脑动脉的阻塞会导致脑组织缺血或流向一部分脑的脑血流的阻塞,最终导致脑损伤。相反地,在出血性中风中,血液从在脑内或在脑表面上的破损血管泄漏或爆发,导致神经学损伤。不论中风的类型如何,通过医学干预在早期保护脑组织免于由血栓形成或出血造成的急性血管事件,仍然是挽救患者生命的最重要的要素。早期脑组织保护可以拓宽鉴别诊断和有效治疗的安全窗口。尽管在发作时具有类似的初始征状,有效的治疗干预取决于患者发生的中风的类型。例如,已经证实,组织纤溶酶原激活剂(tPA)的施用会至少部分有效地治疗血栓性中风,但是被禁止用于治疗出血性中风。仍然需要用于治疗中风的新的有效治疗剂,特别是顺从在中风发作后立即施用的治疗剂。

发明内容

[0006] 在第一个实施方案中,提供了用于治疗受试者的中风的方法,所述方法包括:给所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含负载氙的发生回波的脂质体(Xe-ELIP)。在一些方面,所述受试者已经被确定患有出血性中风。在另一个实施方案中,提供了治疗受试者的不明来源的中风(即,没有确定受试者患有血栓性中风还是出血性中风)的方法,所述方法包括:给所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含有效量的Xe-ELIP。因而,在一些方面,提供了用于治疗受试者(例如,已经被诊断出出血性中风和/或血栓性中风的受试者)的出血性中风和血栓性中风的方法。在其它方面,将所述实施方案的方法定义为,治疗受试者的颅内动脉瘤或蛛网膜下腔出血的方法,所述方法包括:给所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含有效量的Xe-ELIP。在一些实施方案中,提供了组合物,所述组合物包含在药学上可接受的载体中的Xe-ELIP。

[0007] 在另一个实施方案中,提供了治疗受试者的血栓性中风的方法,所述方法包括:(a)给所述受试者施用有效量的包含Xe-ELIP的第一组合物;和(b)给所述受试者施用有效量的包含组织纤溶酶原激活剂(tPA)的第二组合物。例如,在某些方面,顺序地或基本上同时地(例如,在包含Xe-ELIP和tPA的组合物中)施用Xe-ELIP和tPA。在一些方面,所述实施方案的方法包括:在施用所述第一组合物以后约或小于约2、3、4、5、6、7或8小时,施用所述第

二组合物。在其它方面,所述第一组合物的施用是在中风发作的约6小时内或更短。在其它方面,所述第二组合物另外包含有效量的Xe-ELIP。在另一个方面,所述实施方案的方法包括:(a)给患有中风或具有不明来源中风的征状的受试者施用有效量的包含Xe-ELIP的第一组合物;(b)鉴别所述受试者是患有血栓性中风还是患有出血性中风;和(c)给被鉴别为患有血栓性中风的受试者施用有效量的包含tPA的第二组合物。

[0008] 因而,在其它实施方案中,提供了包含Xe-ELIP和tPA的药物组合物。在一些方面,所述组合物的tPA被包含在脂质体(例如,发生回波的脂质体)中。在其它方面,所述组合物包含至少2种不同脂质体的料浆,其中第一脂质体包含Xe-ELIP,而第二脂质体包含tPA(例如,其中tPA脂质体基本上不含有Xe)。

[0009] 在另一个实施方案中,提供了包含Xe-ELIP和脂质体(例如,发生回波的脂质体)的药物组合物,所述脂质体负载了H₂S和/或H₂。例如,在一些方面,所述气体被包含在所述组合物的单独脂质体(例如,负载了不同气体的脂质体的料浆)中。在其它方面,所述气体中的2种或更多种被包含在相同的脂质体中。例如,组合物可以包含这样的脂质体:所述脂质体包含Xe和H₂、Xe和H₂S、或者Xe、H₂和H₂S。在其它方面,所述实施方案的脂质体包含约0.1%至5%、0.1%至3%、或0.5%至2%H₂S(作为脂质体中的总气体的百分比)。例如,所述脂质体可以包含约1%H₂S和约99%Xe。在其它方面,所述实施方案的脂质体包含约1%至50%、5%至40%、或10%至40%H₂(作为脂质体中的总气体的百分比)。例如,所述脂质体可以包含约30%H₂S和约70%Xe。

[0010] 所述实施方案的某些方面涉及包含tPA的组合物。在一些方面,所述tPA是纯化的或重组的哺乳动物tPA(例如,人tPA)。这样的tPA组合物可以被包含在药学上可接受的载体中。在某些方面,所述tPA被包含在脂质体中。用于包封tPA的脂质体可以选自本领域已知的或本文详述的任意其它脂质体。例如,在一些方面,所述tPA被包含在所述实施方案的发生回波的脂质体中。在某些优选的方面,包含tPA的脂质体基本上不含有Xe(即,tPA和Xe没有负载到相同的脂质体囊泡中)。

[0011] 经由多种方法,可以将根据所述实施方案的组合物施用给受试者。例如,在一些方面,静脉内地、动脉内地、颅内地、经由静脉内输注或经由动脉内输注,施用组合物(例如,含有Xe或tPA的组合物)。在优选的方面,在中风或中风征状发作以后不久,诸如中风发作或中风征状发作的约或小于约1、2、3、4、5、6或8小时,施用所述实施方案的组合物。因而,在一些方面,由第一响应者(例如,护士或医疗技师)施用所述实施方案的组合物。

[0012] 在某些方面,所述实施方案的方法包括:给受试者施用一个或多个剂量的ELIP组合物(例如,Xe-ELIP组合物)。例如,在一些方面,给受试者施用剂量为约0.6至3.0mg/kg的Xe-ELIP,诸如约0.8至2.8mg/kg(mg-脂质/kg-受试者)的剂量。在其它方面,给受试者施用剂量为约1.0至2.5mg/kg的ELIP组合物,诸如约1.14mg/kg或约2.27mg/kg。在其它方面,提供了ELIP组合物,其包含在合适的容纳装置中的单个单位剂量(例如,Xe-ELIP的单个单位剂量)。例如,所述单个单位剂量(即,适合约60kg的人受试者的剂量)可以是约100至约3,000mg、约250至约2,000mg、约250至约1,000mg、或约400至约900mg(例如,480-900mg)的具有被包封的气体的ELIP(基于总脂质重量)。在其它方面,可以由被包封的Xe的总体积限定Xe-ELIP的单个单位剂量。在一些方面,在单个剂量中的Xe的总体积是小于约5ml,诸如约0.1至2.5ml、约0.2至2.0ml、或0.5至1.5ml(例如,约1.0ml的剂量)的Xe。因而,在一些具体

方面,提供了Xe-ELIP的单个单位剂量,其包含在合适的容纳装置中的250至约1,000mg的脂质和约0.1至2.5ml的Xe。技术人员会认识到,任意前述剂量范围也可应用于包括H₂和/或H₂S的Xe-ELIP组合物(在该情况下,气体体积可以应用于被包封的气体的总量)。

[0013] 在另一个方面,所述实施方案的组合物(例如,ELIP组合物)在多个剂量中施用给受试者。例如,在一些方面,给所述受试者施用所述组合物第2次、第3次或第4次。在某些方面,可以相对于第一次给药调节第二剂量或以后的给药的制剂、剂量或途径。在一些方面,第2次或以后的给药是在初次给药以后约或小于约2、3、4、5、6、7或8小时(例如,在第1次给药以后约4-6小时内)。在一些方面,在中风或中风征状发作的约12小时内,给受试者施用所述实施方案的组合物2次。

[0014] 在优选的方面,根据所述实施方案进行治疗的受试者是人受试者。但是,在一些方面,所述受试者可以是非人动物,诸如非人灵长类动物或驯化的动物,诸如马、狗或猫。在其它方面,所述受试者被鉴别为具有中风征状,诸如突然的记忆丧失、完全或部分麻痹、定向障碍、说话困难、突然的视力障碍、部分身体的麻木、突然的严重的头痛、或者行走或平衡困难。在一些方面,所述患有中风或具有中风征状的受试者尚未被鉴别为患有血栓性中风或出血性中风。在其它方面,所述受试者已经被鉴别为患有血栓性中风和/或出血性中风。

[0015] 在其它方面,给受试者施用所述实施方案的ELIP组合物另外包括:以有效地促进气体从脂质体中释放出的量,给所述受试者施加超声刺激。例如,可以在施用ELIP组合物以后或伴随地,施加超声刺激。在一些方面,在施用ELIP组合物(例如,Xe-ELIP)以后,诸如施用以后约或小于约10秒、20秒、30秒或1、2、3、4或5分钟,施加超声刺激。在某些情况下,在希望的脂质体释放气体的部位处或附近,施加超声刺激。例如,在具有中风的受试者的情况下,可以将超声刺激施加于头或颈(例如,在颈动脉处),从而刺激邻近脑的脂质体有效载荷(payload)释放。

[0016] 多种用于给受试者施加超声刺激的方法是已知的,且可以根据所述实施方案进行使用。例如,可以用常规超声探头或颈圈超声装置施加超声刺激(例如,以提供在颈处的刺激)。施加给受试者的超声刺激的功率和频率可以变化,但是通常是有效地促进从脂质体释放Xe(例如,体内释放)的量。例如,可以以约1至8MHz的频率施加超声刺激,机械指数为约0.1至1.4。

[0017] 在其它方面,所述实施方案的方法另外包括:给所述受试者至少施用第二治疗剂。例如,在血栓性中风的情况下,所述第二治疗剂可以是减少血块的血栓溶解剂。在其它方面,所述第二治疗剂是抗炎剂或神经保护剂。在一些具体方面,例如,在血栓性中风的情况下,给受试者施用tPA。

[0018] 在某些具体方面,所述第二治疗剂包含负载H₂S和/或H₂的发生回波的脂质体。在一些情况下,负载H₂S和/或H₂的发生回波的脂质体和负载Xe的发生回波的脂质体被包含在相同的组合物中。例如,所述实施方案的组合物可以包含这样的发生回波的脂质体:所述脂质体分别包含Xe、H₂S和/或H₂。或者,所述组合物可以包含这样的发生回波的脂质体:所述脂质体包含2种或3种气体(例如,选自Xe、H₂S和H₂的2种或更多种气体)。

[0019] 在其它方面,根据所述实施方案的施用方法包括:在施用给受试者之前,制备液体脂质体悬浮液。例如,在一些方面,在施用之前不超过30分钟、10分钟、5分钟或2分钟,制备所述液体脂质体悬浮液。例如,在一些方面,制备液体脂质体悬浮液包括:将冻干的脂质体

悬浮于溶液中,或融化冷冻的脂质体悬浮液。

[0020] 在其它方面,所述实施方案的ELIP组合物包含额外的组分,诸如防腐剂、稳定剂和/或盐。在一些方面,ELIP组合物至少包含第一种冷冻保护剂。根据所述实施方案使用的冷冻保护剂包括、但不限于:甘露醇、甘油、海藻糖、1,2-丙二醇或二甲基亚砜(DMSO)。

[0021] 本文使用的“发生回波的脂质体”是指,通过超声可以成像的脂质体。在具体的方面,发生回波的脂质体是这样的脂质体:所述脂质体包含气体组分(例如,Xe、H₂S和/或H₂),诸如包含在脂质体的疏水层中的气体。发生回波的脂质体组合物和用于制备这种组合物的方法,提供在例如美国专利5,612,057、5,858,399和7,976,743中,它们中的每一篇通过引用并入本文。在一些方面,由平均粒度限定所述实施方案的脂质体(例如,ELIP组合物)。例如,在一些方面,所述脂质体具有约0.4至10微米或0.8至10微米的平均尺寸(例如,约0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0或10.0微米的平均尺寸)。

[0022] 多种组分可以用于配制所述实施方案的脂质体,诸如负载了气体(诸如Xe、H₂和/或H₂S)的ELIP。例如,所述实施方案的脂质体可以包含任意形式的磷脂酰胆碱(PC)(诸如二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC))、任意形式的磷酸乙醇胺(PE)、聚乙二醇(PEG)或聚乙二醇化的磷脂、任意形式的磷脂酰甘油(PG)(诸如1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-消旋-甘油)(DPPG))和/或胆固醇。在一些方面,脂质体包含至少一种PC、PE、带负电荷的脂质、聚乙二醇化的脂质(例如,PEG2000-DPPE)和胆固醇分子。在一些具体方面,脂质体包含DPPC、卵PC(EPC)、PEG2000-DPPE、DPPG和胆固醇。在其它方面,所述实施方案的脂质体由DPPC、EPC、PEG2000-DPPE、DPPG、胆固醇和氙组成,或基本上由它们组成。在其它方面,脂质体由DPPC、EPC、PEG2000-DPPE、DPPG、胆固醇、Xe和H₂、H₂S、或H₂和H₂S的组合组成,或基本上由它们组成。

[0023] 如在本说明书中使用的,“一个”或“一种”可以表示一个(种)或多个(种)。如在权利要求中使用的,当结合词语“包含”使用时,词语“一个”或“一种”可以表示一个(种)或超过一个(种)。

[0024] 在权利要求中使用的术语“或”用于表示“和/或”,除非明确地指出是仅指替代方案,或所述替代方案是相互排斥的,尽管公开内容支持仅指替代方案和“和/或”的定义。本文使用的“另一个(种)”可以表示至少第二个(种)或更多。

[0025] 在本申请的通篇中,术语“约”用于表示,数值包括测定所述数值所用的装置、方法所固有的误差变化,或者研究受试者之间存在的变化。

[0026] 从下述的详细描述,会明白本发明的其它目的、特征和优点。然而,应当理解,详细描述和具体实施例尽管示出了本发明的优选实施方案,但仅仅以例举的方式给出,因为本领域的技术人员从该详细描述会明白在本发明的精神和范围内的各种改变和变型。

附图说明

[0027] 下述附图形成本说明书的一部分,且被包括用于进一步证实本发明的某些方面。结合本文呈现的具体实施方案的详细描述,参照这些附图中的一幅或多幅,可以更好地理解本发明。

[0028] 图1:含有氙的脂质体和超声触发的氙释放的表征。(a)没有气体的传统脂质体。(b)通过加压冷冻方法制备的含有Xe的脂质体,其中Xe被捕集在脂质双层中作为溶解的气

体或气泡。(c和d)传统脂质体和含有气体的脂质体的电子显微镜图像示出了含有气体的脂质体的宽脂质双层。传统脂质体(e)和含有Xe的脂质体(f)的血管内超声成像示出了来自含有Xe的脂质体的高超声反射率。(g)氙从Xe-ELIP的超声释放具有2个阶段:在前30min内快速释放,随后是持续超过18h的缓慢释放(半衰期 4.97 ± 0.7 小时)。超声以功率依赖性的方式触发Xe从Xe-ELIP的释放(h)。

[0029] 图2: Xe-ELIP的神经保护作用的时间窗。没有治疗(a)和在再灌注以后10min(b)、1h(c)和3h(d)用Xe-ELIP(7mg/kg)治疗的大脑中动脉阻塞的冠状脑切片(TTC染色)。白色区域是大脑中动脉阻塞以后的梗塞区域;脑的梗塞体积的定量表明,在再灌注以后10min和1h时的Xe-ELIP施用显著不同于无治疗组。肢体放置(f)、横梁行走(g)和网格行走(h)的神经学评估表明与TTC染色类似的结果。数据是平均值 \pm 标准差。

[0030] 图3: Xe-ELIP对BDNF表达和细胞凋亡的影响。在中风以后24h在大脑皮质组织中的BDNF(a)、phos-Akt(b)和phos-ERK(c)的蛋白印迹分析表明,Xe增加了BDNF(d)、总Akt(e)和phos-ERK(f)的表达。来自假手术组(g)、中风组(h)和经过Xe-ELIP治疗的中风组(i)的脑切片的半影区的TUNEL染色,示出了经Xe-ELIP治疗的动物中的细胞凋亡的减少。细胞凋亡的蛋白印迹和显微照片是3个独立实验的代表。数据是平均值 \pm SD。

[0031] 图4: Xe-ELIP的神经保护作用的剂量响应。将没有治疗(a)和用3.5mg/kg(b)、7mg/kg(c)和14mg/kg(d)的Xe-ELIP治疗过的大脑中动脉阻塞的冠状脑切片(用TTC染色)成像。白色区域是大脑中动脉阻塞以后的梗塞区域。在(e)中显示了脑的梗塞体积的定量。在指示的图中提供了肢体放置(f)、横梁行走(g)和网格行走(h)的神经学评估。数据是平均值 \pm 标准差。

[0032] 图5: 与Xe递送相组合的静脉内tPA对大脑缺血的影响。在(a)假的、(b)没有治疗的缺血性中风、(c)经过tPA治疗的缺血性中风、(d)与tPA相组合的Xe-ELIP治疗过的缺血性中风以后,将代表性的经TTC染色的冠状脑切片成像,所述切片示出了在大脑中动脉阻塞以后3天的大鼠中的脑梗塞。(e)治疗组之间的梗塞体积对比,示出了单独的tPA会使梗塞体积减小69%,与静脉内tPA相组合的Xe-ELIP会使梗塞体积减小75%。在指示的图中示出了肢体放置(f)、横梁行走(g)和网格行走(h)的神经学评估。数据是平均值 \pm 标准差。

[0033] 图6a-b: (a)当在恢复血流之前或之后施用, Xe-ELIP会提供神经保护作用。(b)在用Xe-ELIP和/或tPA进行指定的治疗以后,动物中的凝块质量损失百分比。

[0034] 图7: 示意地示出了用于制备所述实施方案的发生回波的脂质体的实施例方案。

[0035] 图8: 结果表明, Xe-ELIP会在丝穿孔蛛网膜下腔出血(SAH)大鼠模型中减少出血。

[0036] 图9: 结果表明, Xe-ELIP会改善SAH大鼠的一般神经学评价尺度和运动功能。

[0037] 图10: 结果表明, Xe-ELIP会预防神经元凋亡性细胞死亡。代表性的显微照片示出了来自出血性中风组(上图)和经过Xe-ELIP治疗的出血性中风组(下图)的脑切片的TUNEL染色。左图是总细胞的DAPI染色。中图是凋亡细胞的tunel染色。右图是合并的图像。

[0038] 图11: 结果表明, Xe-ELIP会降低SAH大鼠的死亡率,但是不会极大地影响脑水肿和脑血流量。

[0039] 图12: 这些图示出了实施例4的实验的时间线。

[0040] 图13: 示出了在tMCAO模型中用Xe-ELIP、H₂S/Xe-ELIP和H₂/Xe-ELIP治疗中风的结果。

[0041] 图14:这些图示出了用指示的组合物治疗的大鼠中的神经残疾的行为测试的结果,它们通过指示的肢体放置、横梁行走和网格行走来评估。

[0042] 图15:这些图示出了使用乳酸脱氢酶(LDH)释放试验的Xe-ELIP试剂保护人脑星形胶质细胞免于 H_2O_2 (10mM)细胞毒性的效力测试的结果。

[0043] 图16:这些图示出了在干细胞中的Xe-ELIP细胞毒性的测试结果。 H_2O_2 会造成鼠胚胎干细胞中的显著LDH释放,但是Xe和Xe-ELIP试剂不会。在培养结束之前,用Xe-试剂(3mg ELIP/30 μ l气体/ml)和对照介质处理细胞4小时和2小时;加入10mM H_2O_2 。

[0044] 示例性实施方案的描述

[0045] I. 本发明

[0046] 中风也称作脑血管意外(CVA),是美国的第三主要死因,并且是成年人残疾的最常见原因。中风的特征在于,由向脑供血的紊乱造成的脑功能的快速丧失。在血栓性中风中,脑动脉的阻塞(血块)会导致流向一部分脑的血流受阻。相反地,在出血性中风中,血液从在脑中的血管泄漏或爆发,导致神经学损伤。早期治疗和/或外科手术在减轻中风导致的神经学损伤中是重要的。但是,取决于中风的类型,施用的疗法是非常不同的,达到下述程度:在已经确定地鉴别出中风的类型之前,不可将治疗剂(诸如tPA)施用给患有中风的患者。不幸的是,在中风的治疗中最重要的因素是及时干预,这会限制治疗剂(诸如tPA)的有用性。

[0047] 本文详述的研究证实了一种新类型的发生回波的脂质体的合成,所述脂质体包封氙气体(Xe-ELIP)。经证实,所述Xe-ELIP制剂在施加超声以后会快速地且有效地释放出被包封的Xe(图1)。还表明,包含这些脂质体的组合物不仅有效地治疗血栓性中风,而且还令人惊奇地有效地治疗出血性中风(参见图2、4、8和9)。因而,Xe-ELIP首次代表治疗剂,所述治疗剂可以在中风(或中风症状发作)以后立即施用给患者,且在可以确定地鉴别出中风的类型之前。不同于任意其它经鉴定的疗法,Xe-ELIP因而可以保护神经元免于由血块(缺血)和出血导致的损伤。重要的是,通过保护脑免于过度的神经学损伤(通过实际的神经元损伤和行为测试来评估),Xe-ELIP为患者赢得重要的时间,同时可以进行外科手术或其它治疗干预。因此,该新类型的治疗剂会提供显著改善所有中风类型的临床结果的可能性。

[0048] 令人感兴趣地,本文详述的研究同样证实,Xe-ELIP可以与tPA施用协同地起作用,从而提供血栓性中风的有效治疗(参见,图5)。另外,使用Xe-ELIP的早期治疗会在评估中风诊断的同时防止过度的神经元损伤。随后的tPA施用(有或没有另外的Xe-ELIP)则会介导凝块分解,从而产生与单独的tPA相比明显更好的临床结果。

[0049] 本文呈现的其它研究证实,共同施用(或施用被共同包封的) H_2 或 H_2S 气体可以进一步增强Xe-ELIP的神经保护作用。如图13-14所示,当与Xe-ELIP结合施用时, H_2 和 H_2S 能够进一步减小梗塞体积,并进一步改善在中风受试者中的结果,这通过行为测试来评估。此外,如在图16中所证实的,没有ELIP组合物(其包含Xe或Xe和 H_2 或 H_2S)表现出显著毒性,这在鼠胚胎干细胞中进行评估。因此, H_2 和/或 H_2S 向Xe-ELIP组合物中的进一步掺入,可以进一步增强它们的神经保护效力。

[0050] II. 脂质体和脂质体组合物

[0051] “脂质体”是一般术语,包括通过产生封闭的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质媒介物。脂质体可以表征为具有双层膜的囊泡结构,其通常包含磷脂和内部介质,所述内部介质通常包含水性组合物。本文提供的脂质体包括单层脂质体、多层脂质体和

多泡脂质体。本文提供的脂质体可以由带正电荷的、带负电荷的或中性的磷脂组成。在某些实施方案中,所述脂质体在电荷方面是中性的。

[0052] 多层脂质体具有被水性介质隔开的多个脂质层。当含有磷脂的脂质悬浮于过量的水溶液中时,多层脂质体自然地形成。在形成封闭结构之前,脂质组分进行自身重排,并且在脂质双层之间捕获水和溶解的溶质(Ghosh和Bachhawat,1991)。亲脂分子或具有亲脂区域的分子也可以溶解在脂质双层中或与其结合。

[0053] 在具体的方面,气体被包封在脂质体中,以产生发生回波的脂质体,后者可以通过超声的适当施加来成像和/或破裂。下面详述了用于气体包封的具体方法,并在实施例1以及图1和7中进行例证。

[0054] 如本领域普通技术人员已知的,通过不同的方法,可以制备根据本发明的实施方案使用的脂质体。例如,可以将磷脂(Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL)(例如中性磷脂二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)和/或EPC)溶解在醇或其它有机溶剂中,然后与要包含在脂质双层中的组分混合。所述混合物可以另外包括不同的去污剂。通常,涡旋脂质混合物,在干冰/丙酮浴中冷冻,并冻干过夜。将冻干的制剂在-20℃或以下储存延长的时间段。当需要时,重构冻干的脂质体,例如,在0.9%盐水中。

[0055] 或者,通过在容器(例如,梨形玻璃烧瓶)中在溶剂中混合脂质,可以制备脂质体。该容器的体积应该是预期的脂质体悬浮液的体积的十倍大。通过使用旋转蒸发器,在负压下在大约40℃去除溶剂。所述溶剂通常在约5分钟至2小时内被去除,这取决于希望的脂质体体积。所述组合物可以在真空下在干燥器中进一步干燥。由于随时间变质的趋势,经干燥的脂质通常在约1周后丢弃。

[0056] 在其它替代方法中,根据其它已知的实验方法,可以制备脂质体(例如,参见Bangham等人,1965;Gregoriadis,1979;Deamer和Uster,1983;Szoka和Papahadjopoulos,1978,各自通过在相关部分中的引用并入本文)。可以与本发明的实施方案一起使用的其它脂质体包括:阳离子型脂质体,例如,如在W002/100435A1、美国专利5,962,016、美国申请2004/0208921、W003/015757A1、W004029213A2、美国专利5,030,453、和美国专利6,680,068(在没有放弃声明下,它们都通过引用整体并入本文)中所述。在W004/002453A1中也描述了制备脂质体的方法。可以将中性脂质掺入阳离子型脂质体中(例如,Farhood等人,1995)。可以在某些实施方案中使用的不同的中性脂质体,公开在美国专利5,855,911(它通过引用并入本文)中。这些方法的差别在于,它们各自的捕获水性物质的能力以及它们各自的水性间隙与脂质之比。

[0057] 脂质体的尺寸随合成方法而异。在本发明的实施方案中的脂质体可以是多种尺寸。在某些实施方案中,脂质体较小,例如,外径小于约100nm、约90nm、约80nm、约70nm、约60nm或小于约50nm。

[0058] 在制备这样的脂质体时,可以使用本文描述的或本领域普通技术人员已知的任何方法。制备脂质体的其它非限制性实例描述在下述文献中:美国专利4,728,578、4,728,575、4,737,323、4,533,254、4,162,282、4,310,505和4,921,706;国际申请PCT/US85/01161和PCT/US89/05040;英国专利申请GB 2193095A;Mayer等人,1986;Hope等人,1985;Mayhew等人1987;Mayhew等人,1984;Cheng等人,1987;和Liposome Technology,1984,每篇通过引用并入本文。

[0059] 在某些实施方案中,基于脂质的纳米颗粒是中性脂质体(例如,DOPC脂质体)。本文使用的“中性脂质体”或“不带电荷的脂质体”被定义为,具有一种或多种脂质组分的脂质体,所述脂质组分产生基本上中性的净电荷(基本上不带电荷)。“基本上中性的”或“基本上不带电荷”是指,在给定的群体(例如,脂质体群体)内很少的(如果有的话)脂质组分包括未被另一组分的相反电荷抵消的电荷(即,少于10%的组分包括未被抵消的电荷,更优选地少于5%,最优选地少于1%)。在某些实施方案中,中性脂质体可以主要包括它们本身在生理条件下(即,在约pH 7)是中性的脂质和/或磷脂。

[0060] 本发明的实施方案的基于脂质体和/或脂质的纳米颗粒可以包含磷脂。在某些实施方案中,可以使用单一种类的磷脂来制备脂质体(例如,磷脂,诸如DPPC(由全部饱和的磷脂酰甘油或磷脂酰丝氨酸组成),可以用于产生脂质体)。在其它实施方案中,可以使用超过一类磷脂来产生脂质体(例如,DPPC和EPC)。

[0061] 磷脂包括,例如,磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油和磷脂酰乙醇胺;因为磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱在生理条件下(即,在约pH 7)是不带电荷的,这些化合物可以具体地用于产生中性脂质体。在某些实施方案中,所述磷脂DOPC用于产生不带电荷的脂质体。在某些实施方案中,可以使用不是磷脂的脂质(例如,胆固醇)。

[0062] 磷脂包括甘油磷脂和某些鞘脂。磷脂包括、但不限于:二油酰基磷脂酰胆碱(“DOPC”)、卵磷脂酰胆碱(“EPC”)、二月桂酰基磷脂酰胆碱(“DLPC”)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(“DMPC”)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(“DPPC”)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(“DSPC”)、1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(“MPPC”)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(“PMPC”)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基磷脂酰胆碱(“PSPC”)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱(“SPPC”)、二月桂酰基磷脂酰甘油(“DLPG”)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(“DMPG”)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(“DPPG”)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(“DSPG”)、二硬脂酰基鞘磷脂(“DSSP”)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(“DSPE”)、二油酰基磷脂酰甘油(“DOPG”)、二肉豆蔻酰基磷脂酸(“DMPA”)、二棕榈酰基磷脂酸(“DPPA”)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(“DMPE”)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(“DPPE”)、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(“DMPS”)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(“DPPS”)、脑磷脂酰丝氨酸(“BPS”)、脑鞘磷脂(“BSP”)、二棕榈酰基鞘磷脂(“DPSP”)、二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DAPC”)、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DBPC”)、1,2-二十碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(“DEPC”)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(“DOPE”)、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(“POPC”)、棕榈酰油酰基磷脂酰乙醇胺(“POPE”)、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺和二亚油酰基磷脂酰胆碱。

[0063] 磷脂可以来自天然的或合成的来源。在某些实施方案中,使用来自天然来源的磷脂(诸如卵或大豆磷脂酰胆碱、脑磷脂酸、脑或植物磷脂酰肌醇、心脏心磷脂和植物或细菌磷脂酰乙醇胺(或它们的氢化形式))作为磷脂。在一些方面,使用聚乙二醇化的脂质,诸如PEG2000-DPPE=1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](它们可以都是mPEG mPEG磷脂,或都是磷脂酰乙醇胺)。

[0064] 技术人员同样会理解,可以调节各种脂质体组分的摩尔比,以优化递送、封装等。在一些方面,例如,脂质体包含比率为约30-50:10-30:5-15:5-15:10-20或约40-50:20-30:5-10:5-10:10-20的DPPC:EPC:PEG2000-DPPE:DPPG:CH。具体比率的一些实例包括、但不限

于:50:20:10:10:15;60:30:10:10:12;46:23:8:8:15;47:27:9:8:13;或48:28:7:7:13。

[0065] 在某些实施方案中,所述基于脂质的囊泡是DOTAP:胆固醇纳米颗粒。通过混合阳离子型脂质DOTAP (1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基铵基)-丙烷)与胆固醇,制备DOTAP:胆固醇纳米颗粒。可以进一步用核酸制备囊泡,且囊泡可以形成这样的结构(称作“夹心”):其中所述核酸显得浓缩在2个脂质双层之间(美国专利6,770,291和6,413,544)。

[0066] A. 负载气体的脂质体

[0067] 在某些实施方案中,本发明提供了容易地生产含有气体的脂质体并同时进行药物包封的方法。在示例性的实施方案中(参见实施例1),通过水合脂质膜、声处理、冷冻和融化等常规操作,制备磷脂和胆固醇的脂质体。通过在声处理以后包括将脂质置于目标气体压力下的步骤,产生的脂质含有空气。在平衡以后,冷冻所述样品。然后使压力降低至大气压,并融化悬浮液。该操作导致在适当(10mg/ml)浓度的脂质分散体捕集最高约10%(按体积计算)的量的空气。被包封的气体的量随着气体压力和脂质浓度而增加。使用0.32M甘露醇来提供具有生理渗透性的水相,将1、2、4或6个大气压施加于4mg脂质。这会分别导致10、15、20和30 μ l气体的包封。尽管本发明的实施方案不限于任何具体机制,气体包封的机制大概依赖于下述事实:即空气(主要是氮和氧)像大多数溶质一样难溶于冰中,因此从在冷冻过程中形成的冰中排除。被排除的空气然后作为气袋离开溶液,所述气袋通过脂质包被而以某种形式稳定化。空气在这些制品中的存在,会使它们对超声敏感,使得最多一半的它们的水性内容物(可包括水溶性的药物)可以在施加超声的短时间(例如,10秒)被释放。

[0068] 本发明提供了将气体导入脂质体中的方法,所述导入使得脂质体不仅反射超声,而且在暴露于超声或其它触发操作时释放它们的内容物。具有实践重要性的是,在某些实施方案中使用与冷冻相组合的高压的方法是非常简单的,并允许与选择的气体的掺入一起容易地包封溶质。所述方法适用于制备超声造影剂和超声控制的药物递送系统。

[0069] 用于制备脂质体的常规操作不允许掺入气体,因为气体在水中的溶解度较低。但是,根据亨利定律,气体在液体中的溶解度与液体上面的气体的压力直接成比例。当所述气体的压力低于、等于或大于局部温度下的平衡饱和值时,则认为溶液是不饱和的、饱和的或过饱和的。因而,如果增加压力,会增加溶液中的气体分子浓度,且当降低压力时,多余的气体作为蒸气释放。

[0070] 本发明的某些实施方案的加压-冷冻方法是基于该原理。冷冻的基本作用是,浓缩气体和溶质分子,从而有利于它们的包封。实际上,多年来已知下述基本现象,即在冷冻过程中,空气会释放,并经常作为气泡捕集在得到的冰中,此外还已知,细胞中的气泡形成明显促进长期保存细胞和组织时的冷冻损伤。

[0071] 在下面,具体地在实施例1以及图1和7中,提供了生产发生回波的脂质体的方法的示例性步骤。气体在脂质体中的掺入与压力成比例。如上面所指出的,如果脂质体的气体吸收与第一步中在溶液中的量成比例,这从亨利定律可以预见到。尽管这会影响到气体捕集,但是冷冻步骤对溶解的气体具有较大影响,并因而对气体包封具有较大影响。尽管本发明不限于任何机理,但是据信,冷冻可能用于2个目的:增加溶解的气体的局部浓度,和使主体气相的小袋形成成核。像其它溶质一样,气体在液体水中的溶解度大于在固体冰中的溶解度。因而,随着冰晶体生长,溶解的气体逐渐从冰移动至未冻结的溶液,结果是,溶解的气体在越来越少的液体溶液体积中越来越浓缩。当溶解的气体浓度变得足够高时,气体气泡可能

成核并生长。根据成核理论,当总溶解的气体压力和周围液体中的环境压力之间的差异超过拉普拉斯压力(Laplace pressure)(由于在表面张力影响下表面的收缩,在气泡中产生的压力)时,气泡形成。

[0072] 尽管显而易见的是,冷冻会从水相中驱除气体,但是如此驱除的气泡停留在冷冻的分散体内何处是未知的。为了使分散体变得可反射超声,必须存在具有高声阻抗的表面的气袋(如图1所示)。气体可能离开溶液,与脂质双层的疏水内部接触,所述疏水内部具有对于空气的相对较低的表面张力;但是,海藻糖对空气掺入的影响提示,涉及更复杂的过程。海藻糖(其通过促进玻璃态形成而不是它自身的或水的结晶,起冷冻保护剂的作用)比甘露醇支持远远更少的回声产生(echogenicity)。甘露醇在糖类中的非常独特之处在于,在冷却以后,易于从溶液中结晶出。以前有人提出,冷冻甘露醇溶液会对脂质体造成损伤。与该发现相一致,且基于成核理论,多年前就做出提示:在被损伤膜的表面处的极性-非极性界面,可能是氮气泡在减压病中释放的优选成核部位,所述减压病影响快速减压的潜水员。

[0073] 另外,尽管本发明不限于任何具体机制,认为下述内容是含有气体的脂质体形成过程的一部分。尽管在冰形成过程中的液相过饱和会造成初期的气袋形成,这不可能是全部情况(whole story),因为,如果是这样的话,当在将压力降回环境压力之前融化样品时,回声产生不会特别低。在这些条件下,冰会融化,且产生的水基本上被脱气,所以与脂质(处于所有形式)结合的空气会扩散进该水中。另一方面,当先降低压力再融化样品时,在最初融化的溶液中的空气浓度较高,因为它含有在加压以后溶解在悬浮液中的大部分空气。因为它的高溶质(甘露醇)含量,在脂质体环境中的冰会首先融化,然后立即将脂质暴露于环境压力(1个大气压)。该最初融化阶段不仅被空气高度过饱和,而且还可能如在前一段中所述,含有气袋,所述气袋当暴露于环境压力时会生长。因此,空气会离开溶液,从而扩大气体核(其大概在冷冻过程中形成)。结果是被脂质单层稳定化的气袋的形成。

[0074] 此外,气体(例如,Xe)和水性溶质的共包封在药物递送中具有优点,因为它允许通过施加超声来释放脂质体内容物。由于有声学活性的脂质体也会反射超声,因此不仅可以根椐超声的施加部位来定位药物的释放,而且可以在活化治疗剂进行递送的同时对治疗剂成像。此外,脂质体本身的分子靶向也是可能的。

[0075] 除了释放脂质体内容物和提供该过程的图像以外,超声可能对组织产生与药物递送相协同的影响,即超声的空化效应,这可以促进药物向它的靶标的接近。例如,以前的方法发现,通过用高强度超声破坏靶区域中的药物填充的造影微气泡,可以实现位点特异性的药物递送(Porter等人,JUltrasound Med 1996;15(8):577-84.)。另外,Shohet等人(Circulation2000;101(22):2554-6.)发现,白蛋白包被的微气泡可以用于经由超声介导的(US-mediated)微气泡破坏将腺病毒转基因有效地递送至大鼠心肌。以前的工作还已经发现,在有声学活性的脂质体存在下,并同时施加超声,会增强质粒DNA的摄入(Huang等人,Mol.Ther.2003;7(5):422,第2部分)。

[0076] 通过改变脂质体组成、被包封的气体和/或超声施加参数,能够进一步提高发生回波的脂质体对超声刺激的敏感性。脂质双层通过疏水相互作用保持在一起,所述疏水相互作用倾向于使所述脂质双层具有自密封性质,使得脂质体的脂质壳在表面更替以后迅速重新密封。因此,改变脂质膜的刚度可能会影响它对超声的响应。最佳气体的选择涉及在脂质

体中的高体积和在血流中的低释放速率。最有效的超声脉冲似乎是，在所述组织可以耐受的最高强度下的小量。

[0077] B. 脂质体的靶向

[0078] 通过在不损害脂质体递送它们的有效载荷的能力的情况下添加配体，实现靶向递送。预见到，这会实现向特定细胞、组织和器官（例如，脑中的特定部位）的递送。基于配体的递送系统的靶向特异性，是基于配体受体在不同细胞类型上的分布。所述靶向配体可以与纳米颗粒非共价地或共价地结合，且可以通过本文讨论的多种方法与纳米颗粒缀合。

[0079] 可以用于以所述实施方案的脂质体为靶标的分子的实例包括：抗体（或其片段）和适体（aptamer）。替代地或额外地预见到，可以使用细胞渗透性肽来将脂质体直接地递送进细胞中。

[0080] III. 药物组合物和给药途径

[0081] 在临床上应用脂质体（例如，包含气体的脂质体）的情况下，必须制备脂质体复合物，作为适于预定用途的药物组合物。通常，需要制备基本上不含热原以及可能对人或动物有害的任何其它杂质的药物组合物。通常还希望采用适宜的缓冲剂，以使复合物稳定，并允许其被靶细胞摄取。本发明的水性组合物包含有效量的Xe，所述Xe封装在如以上所讨论的脂质体中，所述脂质体进一步分散在药学上可接受的载体或水性介质中。这种组合物还称为接种物。短语“药学上”或“药理学上可接受的”是指这样的组合物：当施用给适当的动物或人时，其不会产生相反的、变应性的或其它不希望的反应。本文使用的“药学上可接受的载体”包括任意的和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药物活性物质的这样的介质和试剂的使用是本领域公知的。除了与活性成分不相容的任何常规介质或试剂外，预见到其在治疗组合物中的应用。还可以在所述组合物中掺入补充性的活性成分。

[0082] 在适当地与表面活性剂（诸如羟丙基纤维素）相混合的水中，可以制备治疗组合物的溶液。还可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中以及在油中制备分散体。在常规的贮存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂，以防止微生物的生长。本发明的治疗组合物有利地以可注射的组合物的形式（作为液体溶液或悬浮液）施用；还可以制备固体形式，其适合在注射之前溶解或悬浮于液体中。还可以乳化这些制剂。用于这种目的的典型组合物包含药学上可接受的载体。例如，所述组合物可以含有在每毫升磷酸盐缓冲盐水中的10mg、25mg、50mg或高至约100mg的人血清白蛋白。其它药学上可接受的载体包括水溶液、无毒的赋形剂，包括盐、防腐剂、缓冲剂等。

[0083] 非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。水性载体包括：水、醇/水溶液、盐水溶液、肠胃外的媒介物（诸如氯化钠、林格氏葡萄糖等）。静脉内的媒介物包括流体和营养物补充剂。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。根据众所周知的参数，调节药物组合物的各种组分的pH和确切浓度。其它制剂适用于口服给药。口服制剂包括诸如下述的典型的赋形剂：例如，药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。所述组合物通常采取溶液或悬浮液的形式。

[0084] 本发明的实施方案的治疗组合物可以包括经典的药物制剂。根据本发明的治疗组合物的施用可以是经由任意常规途径，只要经由该途径可到达靶组织即可。在该情况下，静脉内的注射或输注可能是优选的。这种组合物通常作为药学上可接受的组合物（其包含生

理上可接受的载体、缓冲剂或其它赋形剂)来施用。

[0085] 基于预期的目标,确定治疗组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指,适用于受试者中的物理上离散的单元,每个单元含有预定量的治疗组合物,经计算所述预定量与它的施用(即,适当的途径和治疗方案)相结合,会产生在上面讨论的希望响应。根据治疗的次数和单位剂量,要施用的量取决于希望的保护。

[0086] 从在动物研究中确定的有效剂量,可以外推出治疗剂的有效剂量范围。一般而言,根据下式,可以计算出以mg/kg为单位的人等效剂量(HED)(参见,例如,Reagan-Shaw等人,FASEB J.,22(3):659-661,2008,它通过引用并入本文):

[0087] $HED(mg/kg) = 动物剂量(mg/kg) \times (动物K_m / 人K_m)$

[0088] K_m 因子在转换中的使用,会产生更准确的HED值,所述值是基于体表面积(BSA),而不仅仅基于体重。人和各种动物的 K_m 值是众所周知的。例如,平均60kg的人(具有 $1.6m^2$ 的BSA)的 K_m 是37,而20kg的儿童(BSA $0.8m^2$)具有25的 K_m 。一些有关的动物模型的 K_m 也是众所周知的,包括:小鼠 K_m 为3(假定体重为0.02kg,且BSA为0.007);仓鼠 K_m 为5(假定体重为0.08kg,且BSA为0.02);大鼠 K_m 为6(假定体重为0.15kg,且BSA为0.025);猴 K_m 为12(假定体重为3kg,且BSA为0.24)。

[0089] 治疗组合物的精确量取决于从业人员的判断,且是每个个体所特有的。尽管如此,计算的HED剂量会提供一般指导。影响剂量的其它因素包括:患者的身体状态和临床状态、给药途径、预期的治疗目标以及具体治疗制剂的效能、稳定性和毒性。对于本发明的实施方案,预见到,治疗性脂质体(例如,Xe-ELIP)剂量在人(成年人)中的量是大于约0.568mg/kg。例如,人剂量范围可以是约0.6至3.0mg/kg、约0.8至2.8mg/kg或约1.0至2.5mg/kg。在一些具体方面,以约1.14mg/kg至约2.27mg/kg的剂量,将Xe-ELIP施用给人受试者。

IV. 实施例

[0090] 包括下述的实施例,以证实本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该了解,在下述实施例中公开的技术代表由发明人揭示的在本发明的实践中作用良好的技术,并因而可以认为构成其实践的优选方式。然而,本领域技术人员在考虑本公开内容以后应当了解,在公开的具体实施方案中可以做出一些改变,并仍然获得类似的或同样的结果,而不脱离本发明的精神和范围。

[0091] 实施例1-Xe-ELIP生产和实验方法

[0092] Xe-ELIP生产

[0093] 使用在图7中示意地图解的冻融方案(也参见,美国专利7,976,743,通过引用并入本文),生产氙-ELIP。简而言之,脂质体由下述物质组成:L- α -磷脂酰胆碱(卵PC),1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC;Avanti Polar Lipids,Alabaster,Ala),1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](16:0PEG2000PE)和胆固醇(Sigma,StLouis,Mo)。在氯仿中混合5毫克脂质,在50°C水浴中用氙蒸发溶剂,以在玻璃瓶上形成薄膜。将脂质膜在真空下放置4至6小时,以完全去除溶剂。用0.32mol/L甘露醇水合干燥的脂质膜,至10mg脂质/毫升的浓度,随后声处理5分钟。将经声处理的脂质体转移至2-mL玻璃瓶,用特氟隆-橡胶隔片密封盖子。用连接到27号1/2英寸的针的12-mL注射器,穿过特氟隆橡胶隔片将6毫升Xe(100%)(Concorde Specialty Gas Inc,Eatontown,NJ)注射进

玻璃瓶中(应当指出,在该阶段,可以掺入其它气体和/或气体混合物)。用干冰在 -70°C 下冷冻加压的脂质体分散体至少半小时。在通过去除盖子去掉瓶子的压力以后,使脂质体分散体融化。Xe-ELIP的结构和气体保留性质示于图1。

[0094] MCA阻塞的大鼠模型

[0095] 所有动物实验均得到位于休斯顿(Houston)的得克萨斯保健科学中心大学(The University of Texas Health Science Center)的动物福利委员会的批准。在外科手术之前,将雄性Sprague-Dawley大鼠(260-280g, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN)禁食24小时,自由获取水。在外科手术之前,如下诱导麻醉:将啮齿类动物放入连续流入异氟烷的密封诱导室(咨询Melanie)中5分钟。在手术部位处皮下注射丁哌卡因(2mg/kg),以提供局部镇痛。如下诱导脑缺血:使用以前描述的管腔内缝合方法(Britton, 等人2010, 通过引用并入本文),阻塞右大脑中动脉(MCA)2小时。简而言之,在头骨中制作1mm直径钻孔,以利于在阻塞MCA之前测量局部脑灌注(CP)。接着,通过中线颈切口,暴露右颈总动脉(CCA)。然后在右颈外动脉(ECA)的远端端部附近结扎它。分离内动脉,并与邻近的组织分开。从右ECA推进制造的25-cm 4-0尼龙单丝,并插入右MCA中2小时,以引起缺血。使用激光多普勒流量计(其放置在缺血区上面在前凶后面2mm和侧面6mm处),证实穿过MCA的局部血流的中断。在所有实验中,在缺血过程中维持体温在 37°C 。将聚乙烯导管插入右股动脉,用于压力记录。

[0096] 治疗时间窗的测定

[0097] 将动物随机地分成4组(在每组中, $n=8$): (1) 无治疗组-仅MCA阻塞; (2) 治疗组“a”-在再灌注以后10min施用Xe-ELIP; (3) 治疗组“b”-在再灌注以后60min施用Xe-ELIP; (4) 治疗组“c”-在再灌注以后180min施用Xe-ELIP。通过将改进的PES0管道插入右内颈动脉中,在4分钟的时段内给每个治疗组的所有大鼠施用 $200\mu\text{l}$ 的Xe-ELIP。在Xe-ELIP施用过程中,将ICA暴露于1-MHz连续波超声,所述超声具有 0.18MPa 的峰至峰压力波幅($1\text{-W}/\text{cm}^2$ 拨号设置)。在以后的3天中,进行神经学评估。在MCAO以后第3天,通过2%2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色,测定梗塞体积。

[0098] 剂量依赖性的测定和Xe-ELIP施用的影响

[0099] 将动物随机地分成4组(在每组中, $n=8$): (1) 无治疗组-仅MCA阻塞; (2) 治疗组“a”-接受 $100\mu\text{l}$ 剂量的Xe ($10\text{mg Xe-ELIP}/\text{ml}$); (3) 治疗组“b”-接受 $200\mu\text{l}$ 剂量的Xe-ELIP ($10\text{mg Xe-ELIP}/\text{ml}$); (3) 治疗组“c”接受 $400\mu\text{l}$ 剂量的Xe-ELIP ($10\text{mg Xe-ELIP}/\text{ml}$)。通过将改进的PES0管道插入右内颈动脉中,在再灌注以后60min每个治疗组的所有大鼠接受Xe-ELIP。在Xe-ELIP施用过程中,将ICA暴露于1-MHz连续波超声,所述超声具有 0.18MPa 的峰至峰压力波幅($1\text{-W}/\text{cm}^2$ 拨号设置)。在MCAO以后3天,通过TTC染色,测定梗塞体积。在以后的3天中,进行神经学评估。在MCAO以后第3天,通过2%TTC染色,测定梗塞体积。

[0100] 神经学评估

[0101] 由不了解治疗组的观察人员,在安静且低照明的房间中进行小鼠的所有行为试验。在外科手术以后第1、2和3天,通过记录肢体放置、横梁行走和网格行走能力,测试每只动物的运动功能和神经学结果。

[0102] 通过观察当提起动物的尾巴悬在桌子上方时动物的抬头和向桌子伸出前肢的能力,评估肢体放置(零评分-无反应;评分为1-10反应缓慢或延迟;评分为2-反应迅速,且充

分执行)。通过观察在跨横梁(2.5x2.5x80cm)移动时保持平衡的能力,评估跨横梁行走的能力。如下指定反应评分:评分0-没有脚滑动地走过横梁;评分1-抓住横梁的侧面进行移动;评分2-表现出跨横梁的艰难蠕动,但是能够移动;评分3-由于行走困难,需要超过10秒才能走过横梁;评分4-不能走过横梁;评分5-不能在横梁上移动身体或任何肢体;评分6-不能在横梁上停留超过10秒。通过将动物放在不锈钢网格地板(20cm x 40cm,具有2cm x 2cm的孔大小)上,评估网格行走能力。计数迈步的总数,直到最多50步。记录脚错失误(foot faulterror)(通过落入网格中的前肢或后肢的误放来定义)的数目。

[0103] 梗塞体积测量

[0104] 在神经学评估以后第3天,处死动物。取出脑。使用Jacobowitz脑切片机,切成2mm厚的冠状切片,然后用在PBS中的2%2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)在37°C处染色20分钟,用于梗塞体积测定。将染色的切片转移至10%磷酸盐缓冲的福尔马林进行贮存。用Canon G7 10.0兆像素照相机,对切片拍摄照片,所述照相机安装在Polaroid落地三脚架上,物距为8.5cm。使用Image Pro-Plus,传递和分析图像,以计算梗塞体积。通过测量在均匀地切片(1mm)的脑切片上的梗塞面积,并将它们累加到一起(Simpson法则),计算梗塞体积。通过将TTC未染色的(梗塞的)组织的体积除以全脑的体积,计算归一化的梗塞体积与全脑体积之比。

[0105] 凝胶电泳和免疫印迹

[0106] 将动物分成3组:1)假的外科手术,没有缺血;2)MCAO 2小时,没有治疗;和3)MCAO 2小时,并在动脉内施用Xe-ELIP(400 μ l)以后,再灌注1小时。收集脑组织切片,并在1ml RIPA(Radio ImmunoPrecipitation Assay)缓冲液(Cell Signaling Technology,MA,USA)中匀浆化,所述缓冲液含有蛋白酶抑制剂、苯基甲基磺酰氟(PMSF,1mM)和磷酸酶抑制剂混合液(Santa Cruz Biotechnology,CA,USA)。在中风发作以后7和24小时,收获脑组织。提取全细胞蛋白,并用SONICS VibraCell(SONICS&MATERIALS Inc,CT,USA)声处理3次。收集上清液,并测量蛋白浓度。加载等量的蛋白(80 μ g),并使用Tris-甘氨酸运行缓冲液系统电泳,在12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离2小时,然后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Millipore,MA,USA)。在不含吐温-20的非哺乳动物封闭试剂(LI-COR Biosciences,NE,USA)中封闭1小时以后,与BDNF的第一抗体(1:250,Santa Cruz Biotechnology,CA,USA)、磷酸化的AKT的第一抗体(1:250,Cell Signaling Technology,MA,USA)或总Akt的第一抗体(1:500,Cell Signaling Technology,MA,USA)和磷酸-ERK1/2的第一抗体(1:250,Cell Signaling Technology,MA,USA)或Erk1/2的第一抗体(1:500,Cell Signaling Technology,MA,USA)一起在4°C温育膜过夜。在用含有0.1%吐温-20的Tris缓冲的盐水(TBS-T)洗涤膜以后,与IRDye 800CW Dky抗-兔IgG第二抗体(H+L)(LI-COR Biosciences,NE,USA)一起在室温温育膜1小时。在TBS-T 0.1%中充分洗涤(冲洗2次,并洗涤3次,每次5min)以后,通过odyssey红外成像系统(LI-COR Biosciences,NE,USA)使印迹显影。为了确保等量的蛋白加载,用抗b-肌动蛋白(Sigma,MO,USA)在室温重新探测膜1小时,然后与IRDye 680L T Gt抗-小鼠IgG(H+L)(LI-COR Biosciences,NE,USA)一起温育1小时。使用相同的odyssey红外成像系统,扫描膜。使用NIHImageJ软件,分析所有蛋白带的光密度。通过向b-肌动蛋白归一化,定量所有靶蛋白,并计算为对应的对照组的倍数。

[0107] 统计分析

[0108] 通过2个组的Wilcoxon秩检验或多个组的Kruskal-Wallis方差分析(ANOVA),进行非参数统计分析,并报告为大多数实验的平均值和标准差。当在总体对比中检测到差异时,进行所有组的平均秩的多重比较,用于所有逐对对比。将治疗组之间的神经学结果对比报告为中位值和四分位数。使用Statistica(第9版,StatSoft Inc.,Tulsa,OK)软件进行统计分析。认为 $p < 0.05$ 是显著的。

[0109] 实施例2-作为中风治疗剂的Xe-ELIP

[0110] 首先,如下研究了Xe-ELIP疗法的剂量依赖性:在MaleSprague-Dawley大鼠模型的中风发作以后3小时,注射1-4mg/大鼠的剂量范围(3.5、7和14mg/kg)的Xe-ELIP,所述大鼠模型具有右大脑中动脉血管内丝暂时阻塞(MCAO)(2小时)。在中风发作以后3小时接受7mg/kg或14mg/kg的Xe-ELIP的治疗组的归一化梗塞体积分别减少至 $6.0 \pm 2\%$ ($p = 0.04$)和 $3.7 \pm 2\%$ ($p = 0.002$) (图4a-e)。该研究证实,在中风发作以后3小时内以大于2-4mg(例如,7mg/kg或更大)的剂量施用的Xe-ELIP会提供最好的神经保护。

[0111] 在外科手术以后第1、2和3天,以观察人员不知情的方式,通过在安静且低照明的房间中记录肢体放置、横梁行走和网格行走能力,进行神经学损伤的行为评估。示于图4f-h的结果证实了用7mg/kg或14mg/kg治疗的动物的非常显著的行为改善。

[0112] 然后在大鼠丝MCAO和血栓性MCAO模型上进一步研究了Xe-ELIP的治疗时间窗。在中风发作以后2、3和5小时(在再灌注以后10min、1小时和3小时),穿过上升右颈总动脉,给丝MCAO模型施用Xe-ELIP。在非治疗组中,形成大梗塞,其主要涉及大脑皮质和纹状体,归一化的梗塞体积占全脑的 $16 \pm 5.2\%$ ($228 \pm 74\text{mm}^3$) (图2a,e)。在中风发作以后10min和2小时施用Xe-ELIP,使归一化的梗塞体积从 $15 \pm 5.1\%$ (对照)分别下降至 $4.9 \pm 1.2\%$ ($p = 0.005$)和 $6.0 \pm 3.4\%$ ($p = 0.002$) (图2a-e)。在MCA阻塞和再灌注的最初几个小时期间,组之间的核心体温没有差异。

[0113] 在外科手术以后第1、2和3天,以观察人员不知情的方式,通过在安静且低照明的房间中记录肢体放置、横梁行走和网格行走能力,进行神经学损伤的行为评估。在中风发作以后3小时施用Xe-ELIP的组,在执行行为任务中表现出微小改善。在10分钟和1小时时施用Xe-ELIP的组,从第1天开始在所有行为测试中表现出改善的行为,在第3天之前在所有测试中具有显著的改善(图2f-h)。经证实,氙作为谷氨酸受体(NMDA)拮抗剂来保护神经元损伤,而在早期的缺血事件中观察到由过量胞外谷氨酸盐积累造成的兴奋性中毒效应。

[0114] 在中风发作以后2小时(在再灌注以后10min)时的Xe-ELIP治疗时间窗表现出治疗效果。在临床场合,用于中风治疗的tPA施用受限于它的狭窄的治疗时间窗。尽管85%的中风是由于循环凝块对脑动脉的阻塞,15%的中风是出血性的。在从血栓性中风中排除出血性中风之前,不可以施用静脉内tPA。因而,在静脉内tPA之前施用神经保护剂来延长tPA治疗时间窗,是一个非常有前途的临床相关策略。因而,在中风发作以后2小时,但是在再灌注以前和以后,进一步研究了Xe-ELIP施用的神经保护作用。在图6a中,示出了在治疗之前和之后Xe-ELIP对脑梗塞的减小。在再灌注以前和在再灌注以后,Xe-ELIP分别使归一化的梗塞体积减小了 $86 \pm 12\%$ 和 $67 \pm 7\%$ 。

[0115] 在缺血性中风发作的4.5h内施用tPA,仍然是已经证实具有临床益处的唯一治疗。神经保护性联合治疗可以使缺血性神经元损伤的有害效应最小化。为了测试Xe-ELIP对tPA活性的影响,在猪血块上,对比了tPA在有Xe-ELIP存在下和单独的tPA的血栓溶解有效性。

在掺合游离Xe (Xe饱和溶液) 30分钟以后, tPA的血栓溶解作用受到抑制。当用Xe-ELIP掺合tPA时, 它具有与单独的tPA相同的血栓作用。这证实了ELIP保护Xe免于与tPA相互作用的效应(图6b)。

[0116] 接着研究了Xe-ELIP在大鼠栓塞性中风模型中的治疗效果。通过将13mm长的血块注射进大脑中动脉中, 在雄性Sprague-Dawley大鼠 (n=16) 中诱导血栓性中风。在治疗组中, 在发作阻塞以后2小时, 静脉内地输注tPA (10mg/kg)。在静脉内tPA之前, 静脉内地施用Xe-ELIP。在5min的Xe-ELIP施用过程中, 施加连续波超声 (1MHz, 50%工作循环, 0.5W/cm²), 以触发从ELIP释放Xe。没有任何治疗的血栓性中风对照组表现出最大的损伤和梗塞体积 (全脑的17±5%) (图5a-e)。tPA治疗会将损伤和梗塞体积减小至5.2±0.4% (p=0.025, 相对于中风)。与Xe-ELIP相组合的tPA治疗会将梗塞体积进一步减小至1.5±0.4% (p=0.05, 相对于tPA组)。行为缺陷与梗塞体积反相关。在tPA和tPA+Xe-ELIP治疗组中, 通过激光多普勒流量计监测的局部血流速度是类似的 (图5f-h)。该研究证实了通过施加1MHz超声释放的被ELIP包封的氙的神经保护作用。Xe-ELIP可以与tPA组合地使用, 而不影响tPA血栓溶解活性。由治疗条件导致的死亡率示于下面的表1。

[0117] 表1:

[0118]

组	死亡率	阻塞率	静脉内 tPA 以后的再灌注率
假的	0	0	-
中风	60%	58±9%	-
中风+ tPA	31%	50±8%	21±17%
中风+ Xe-ELIP + tPA	29%	53±6%	23±14%

[0119] 还评估了Xe-ELIP对BDNF表达和细胞凋亡的影响 (参见, 例如, 图3)。在中风以后24h在大脑皮质组织中的BDNF (a)、phos-Akt (b) 和phos-ERK (c) 的蛋白印迹分析证实, Xe增加了BDNF (d)、总Akt (e) 和phos-ERK (f) 的表达 (图3a-f)。在来自假手术组 (g)、中风组 (h) 和用Xe-ELIP治疗的中风组 (i) 的脑切片的半影区中的TUNEL染色, 证实了经Xe-ELIP治疗的动物中的细胞凋亡的减少 (图3)。细胞凋亡的蛋白印迹和显微照片是3个独立实验的代表。数据是平均值±SD。

[0120] 实施例3-Xe-ELIP会在出血性中风中提供有效保护

[0121] 如在实施例1中详述的, 生产Xe-ELIP组合物。为了评估Xe-ELIP的效力, 采用蛛网膜下腔出血的大鼠模型。简而言之, 获得体重为260-280克的健康的雄性Sprague Dawley大鼠 (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN)。在解剖显微镜下, 在被麻醉的动物上进行全部外科手术。分离右颈外动脉, 并穿过内动脉插入4.0制造的尖锐的尼龙单丝, 以刺穿大脑中动脉。立即缩回单丝, 以恢复流向大脑中动脉的血流。监测血流, 以证实出血。

[0122] 在诱导出血以后, 穿过股静脉输注Xe-ELIP (600μl, 10mg/ml) 5分钟, 并同时在内颈动脉上面施加超声 (0.5MPa), 以触发氙从循环的Xe-ELIP释放进脑中。在外科手术以后, 进

行神经学和行为测试3天。在神经学和行为评估以后第3天,处死动物,用于SAH评级(以评价出血程度)、脑水容纳(以评价水肿)和TUNEL染色(以检查细胞凋亡)。

[0123] 在图8中示出了来自脑组织的体格检查的结果。为了评分,将基底池分成6个区段。评估这些区段中的每一个的出血,并评分为0至3(0:无SAH;1:微小SAH;2:中等血块,具有可识别的动脉;3:血块掩盖动脉)。累加总评分,将出血的严重性评分为:0-7:轻微的SAH;8-12:中等SAH;13-18:严重的SAH。Xe-ELIP会在丝穿孔蛛网膜下腔出血(SAH)大鼠模型中减少出血。

[0124] 在图9中示出了经治疗的大鼠的行为测试的结果。下图解释了动物进行的多个行为测试。在上图的图中示出了神经学评价、横梁行走和网格行走的结果。在每种情况下,用Xe-ELIP治疗的大鼠的表现显著优于未经治疗的大鼠。实际上,使用TUNEL染色的脑切片的显微镜检查(图10)表明,与Xe-ELIP治疗组(下图)的出血性中风相比,来自出血性中风组的脑切片(上图)具有显著更多的凋亡细胞(对比中图)。可能最重要的是,Xe-ELIP治疗降低了SAH大鼠的死亡率,但是没有表现出对脑水肿和大脑血流量的显著影响(图11)。脑水肿是中风的重要的危及生命的并发症。它经常伴有蛛网膜下腔出血、血管痉挛和缺血性再灌注损伤。本文示出的结果证实,仅含有一种气体(Xe)的ELIP制剂不会影响脑水肿和血管活性。已经表明,在中风以后施用氢可以通过降低血脑屏障渗透性而消除脑水肿,而H₂S会通过抗炎作用而抑制血管痉挛。因而,在一些方面,将氢气体和/或硫化氢气体与Xe-ELIP共包封的制剂会对脑水肿和大脑血管痉挛具有累加效应。

[0125] 实施例4-H₂和H₂S会增强Xe-ELIP效力

[0126] 接着进行研究,以评价Xe与氢或硫化氢一起共包封进ELIP中。ELIP由磷脂和胆固醇组成,且如实施例1所详述地进行生产。但是,在该情况下,除了使用100%Xe以外,通过加压-冷冻方法将30%氢+70%氙或1%硫化氢+99%氙的气体混合物加载到ELIP上。

[0127] 在图12中图解了效力实验的设计。如指示的,为了测试H₂/Xe-ELIP或H₂S/氙ELIP的治疗效果,在右大脑中动脉阻塞以后(在3h),分别将400μl的每种(除了单独的Xe-ELIP)静脉内地施用进Sprague-Dawley大鼠中。使用指向内颈动脉的1兆赫兹低波幅(0.18MPa)连续波超声,触发从循环的Xe-ELIP释放气体。

[0128] 然后对动物进行行为测试,并检查它们的脑,以评估存在的物理损伤。如图13所示,H₂和H₂S的加入均进一步增加了Xe-ELIP减小经治疗大鼠的脑中的归一化的梗塞体积的能力。可能更重要的是,用与H₂或H₂S相组合的Xe-ELIP治疗的动物也倾向于在行为测试中具有更好的表现,所述行为测试包括肢体放置、横梁行走和网格行走(图14)。具体地,表明了与对照(未经治疗的)大鼠和用单独的Xe-ELIP治疗的大鼠相比,所述联合疗法在改善网格行走能力方面明显更好。

[0129] 实施例5-Xe-ELIP保护培养的人脑星形胶质细胞免于过氧化氢(H₂O₂)细胞毒性或氧化性应激

[0130] 人脑星形胶质细胞在维持神经细胞功能和对抗氧化性应激的存活中起关键作用。培养的人脑星形胶质细胞向H₂O₂的暴露,会造成所述细胞的显著损伤,并造成它们释放大量的LDH。但是,用Xe-ELIP试剂预处理所述脑细胞,会显著减少LDH释放(图15),这指示Xe-ELIP对氧化性应激损伤的脑细胞的保护作用。在用单独的ELIP或对照介质处理的细胞中,没有或几乎没有发现保护作用(图15)。

[0131] 实施例6-Xe-ELIP对鼠干细胞没有细胞毒性

[0132] 在有或没有Xe-ELIP存在下,用或不用H₂O₂处理鼠胚胎干细胞,并检查它们的生长和存活。通过评估LDH的释放,测定细胞存活性。在有ELIP(其负载或没有负载Xe或其它气体)存在下,培养物中的LDH水平保持显著的水平(图16)。通过对比H₂O₂(10mM)的加入,在暴露于氧化性应激剂H₂O₂ 2小时内,发现显著的LDH释放(图16)。

[0133] ***

[0134] 考虑到本公开内容,无需过多实验就可以制成和实施本文公开的和要求保护的所有方法。虽然已经以优选实施方案的方式描述了本发明的组合物和方法,但是本领域技术人员显而易见,可以改变所述方法、所述步骤、或本文所述的方法的步骤的顺序,而不脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地,应当明白,某些化学上和物理上相关的试剂可替代本文所述的试剂,并且会获得相同或相似的结果。认为本领域技术人员显而易见的所有这样的类似替代和改变都在所附权利要求书限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0135] 参考文献

[0136] 就它们提供示例性的程序细节或其它细节来补充本文所述的内容而言,下述参考文献明确地通过引用并入本文。

[0137] 美国专利号5,612,057

[0138] 美国专利号5,858,399

[0139] 美国专利号7,976,743

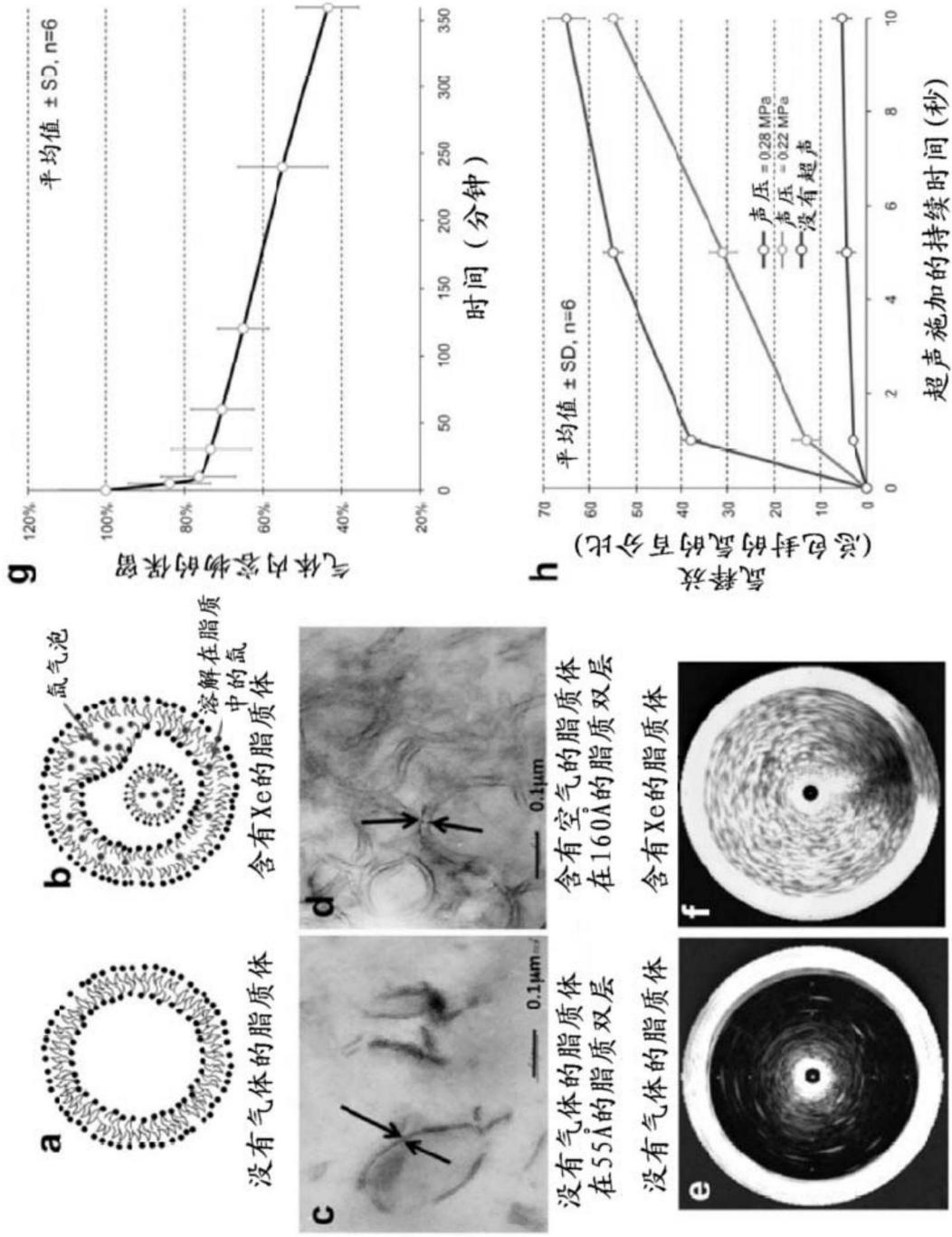


图1

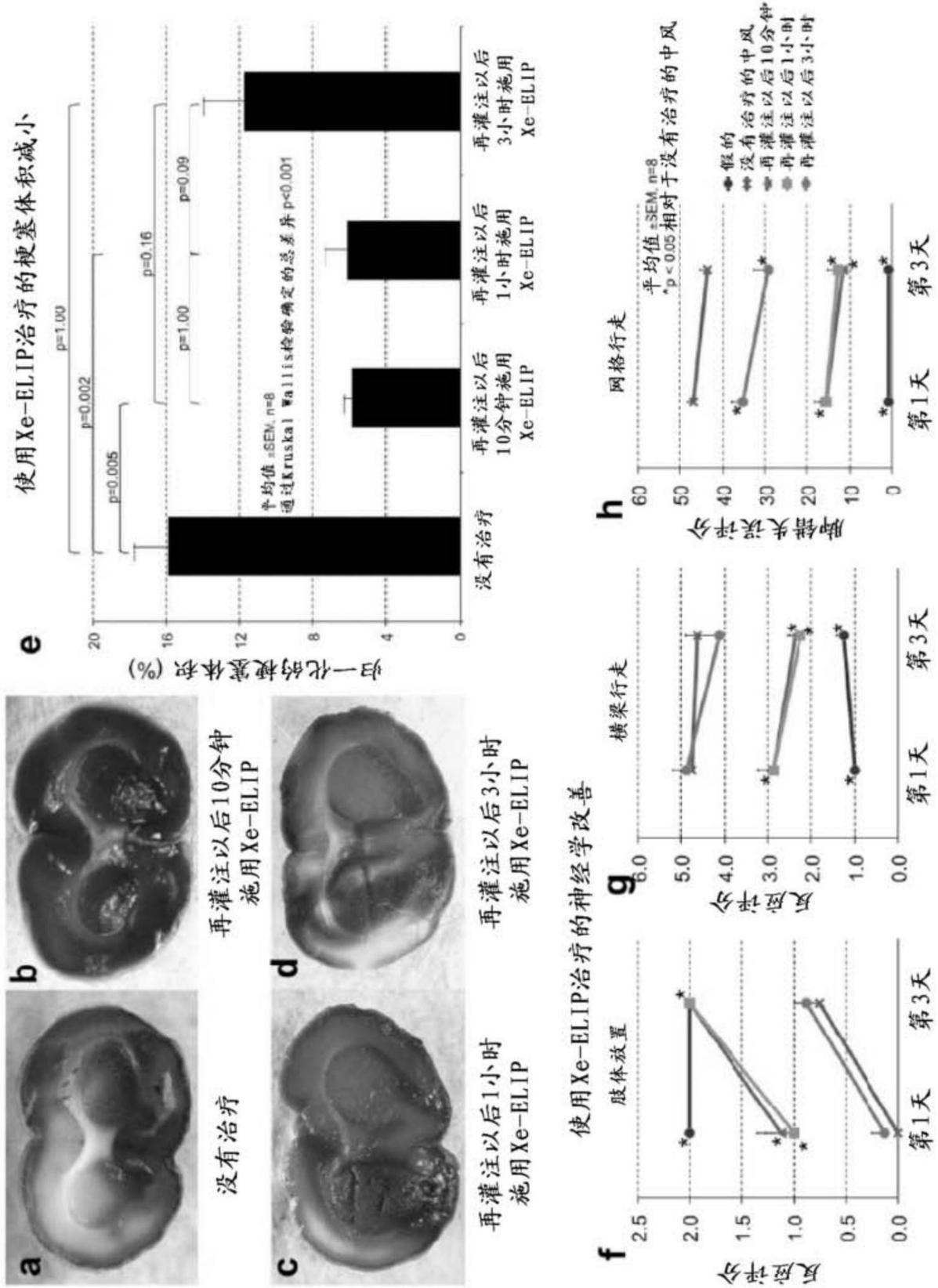


图2

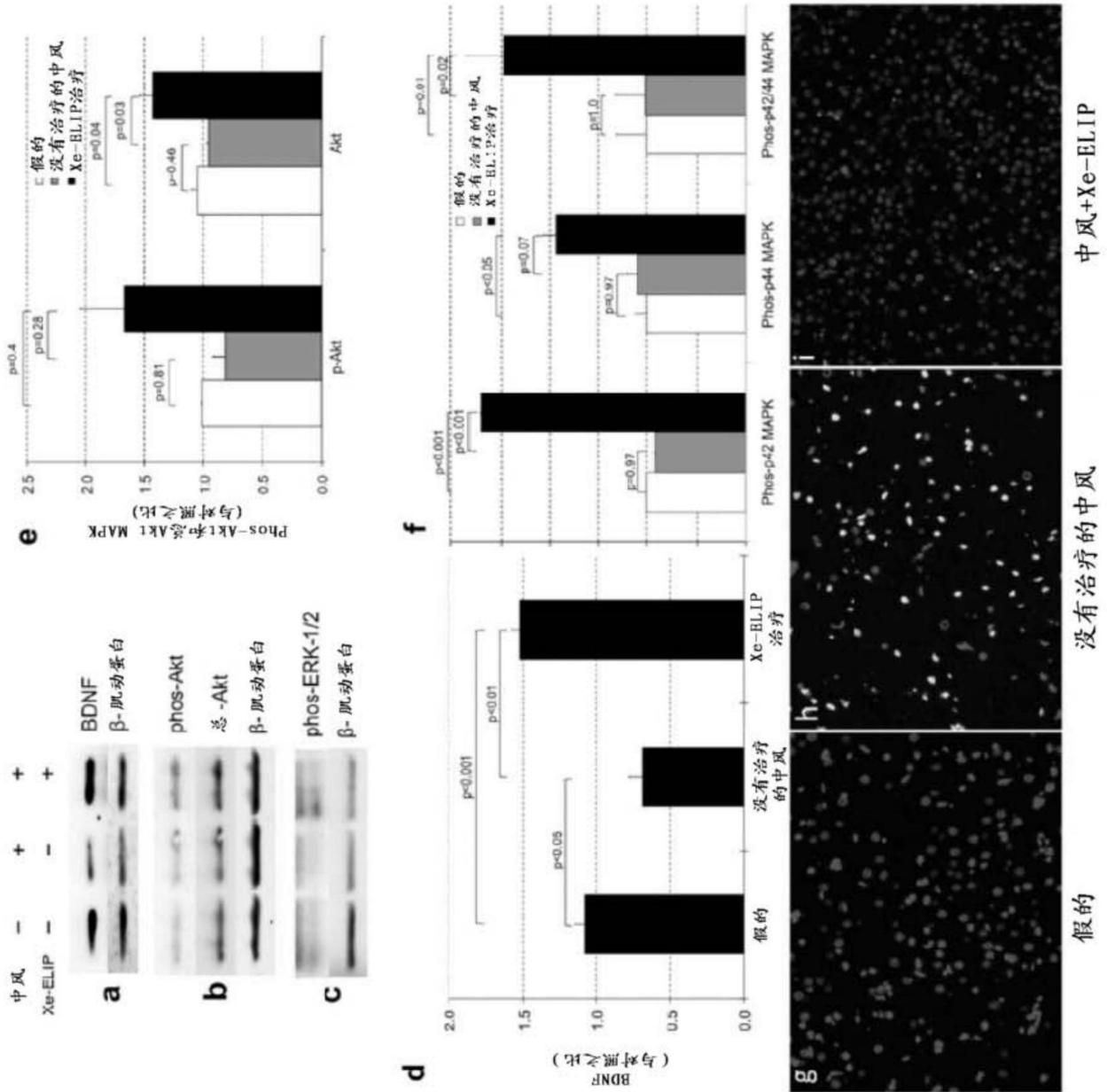


图3

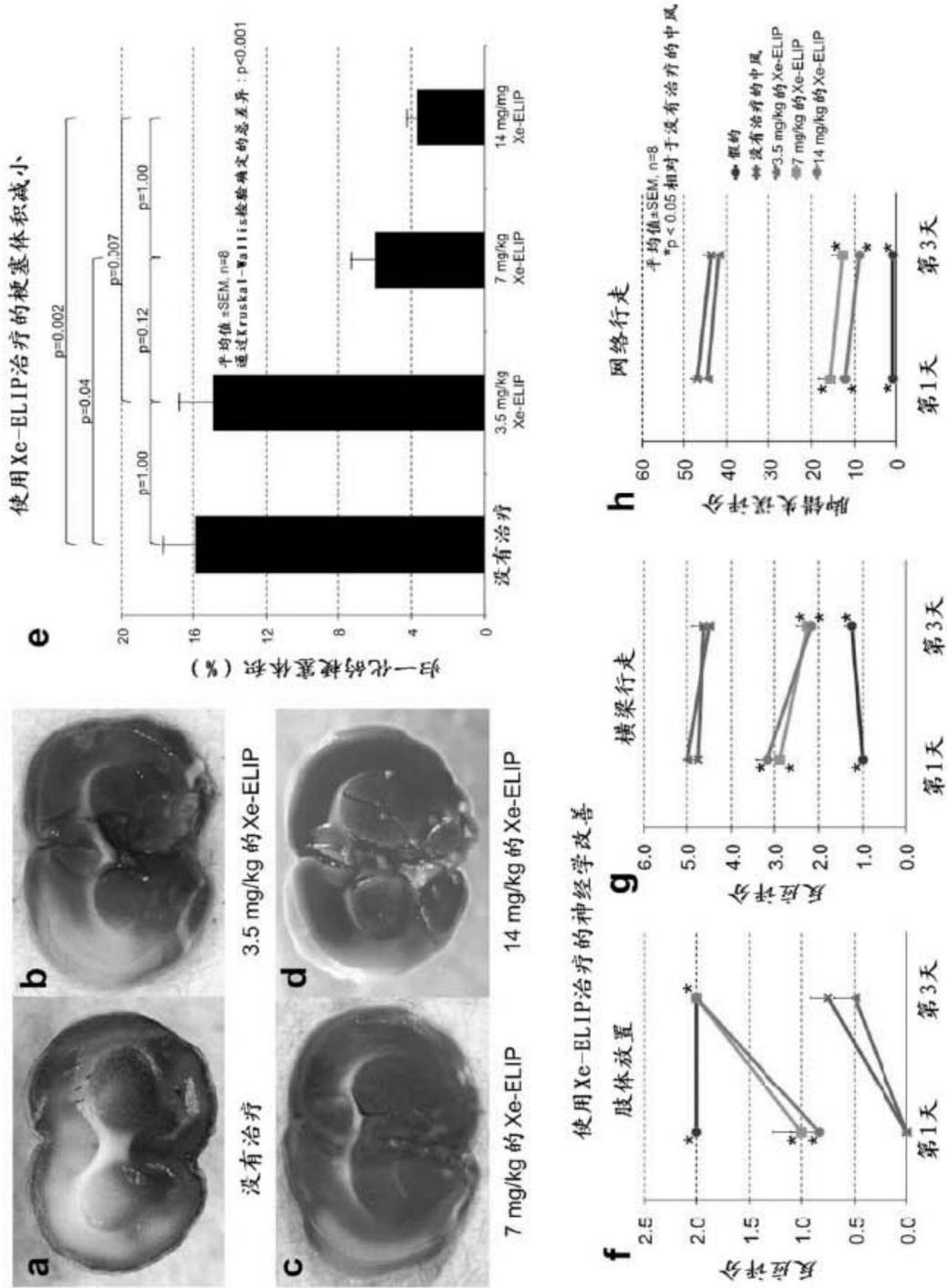


图4

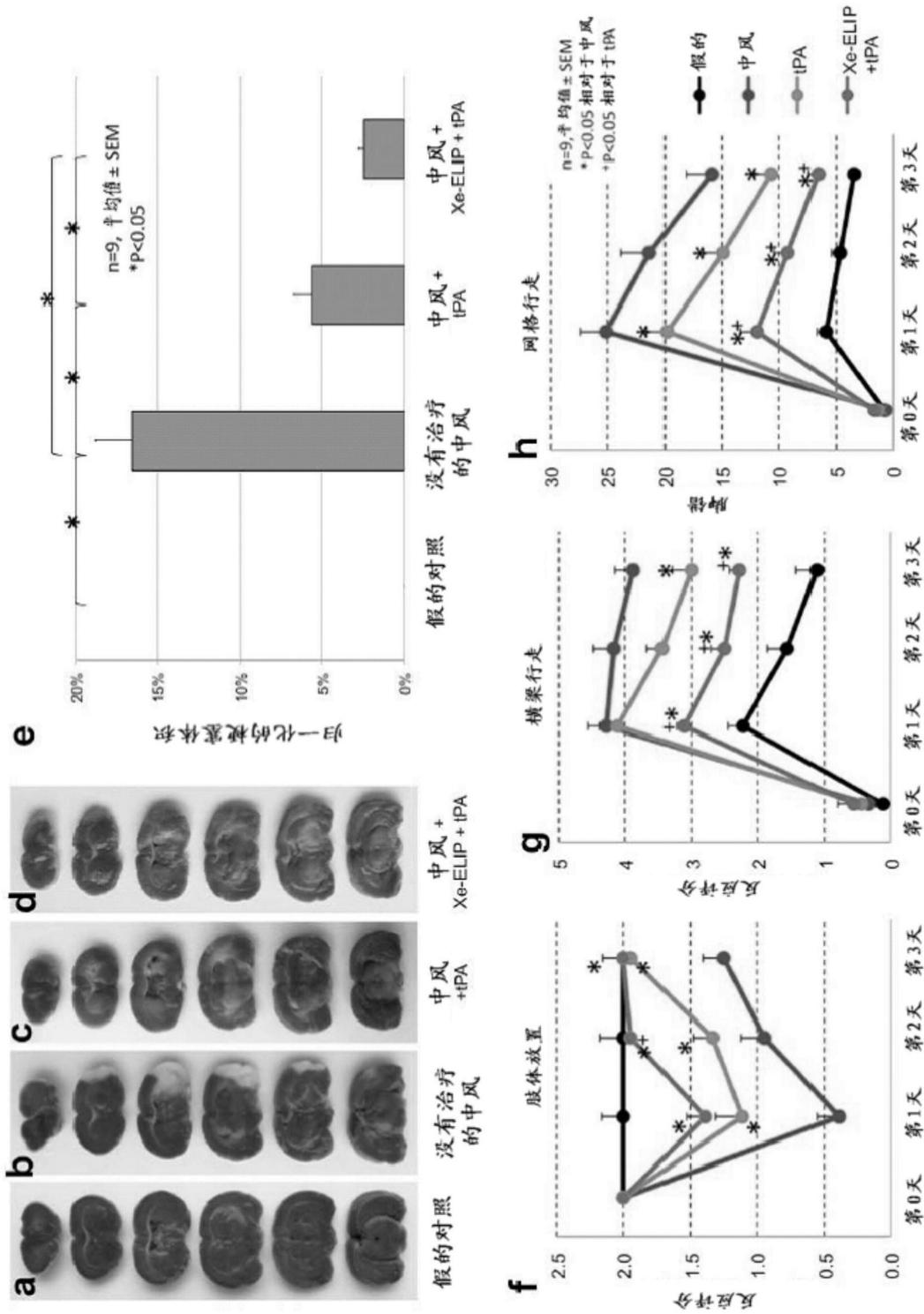


图5

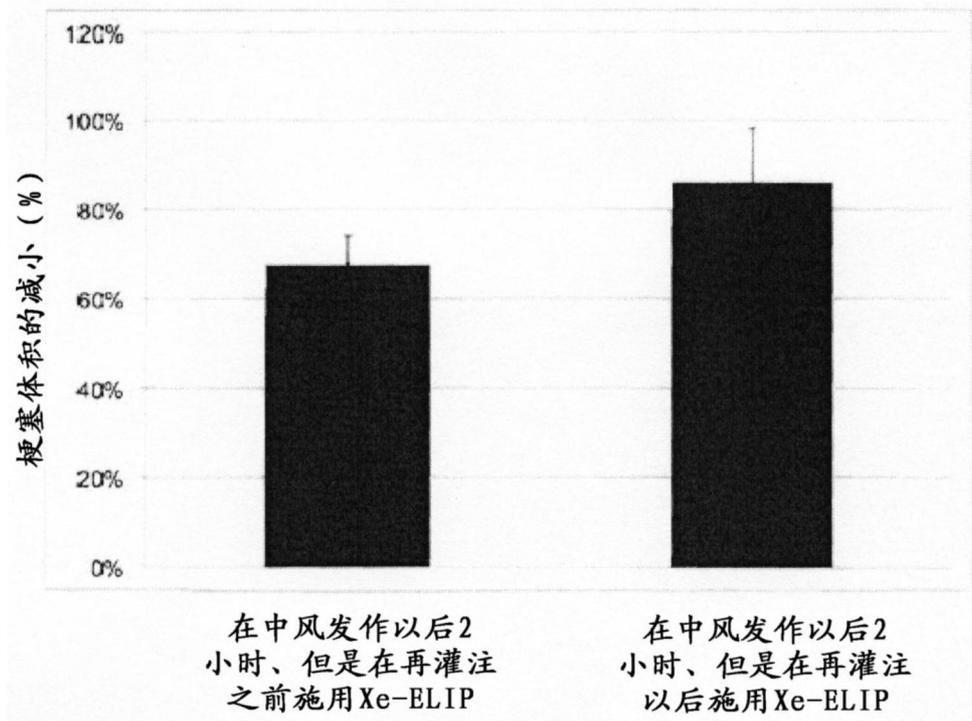


图6a

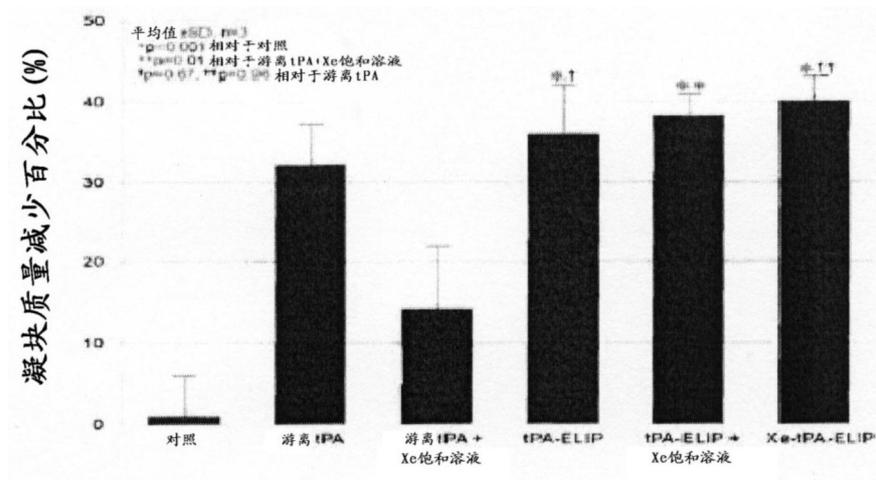


图6b

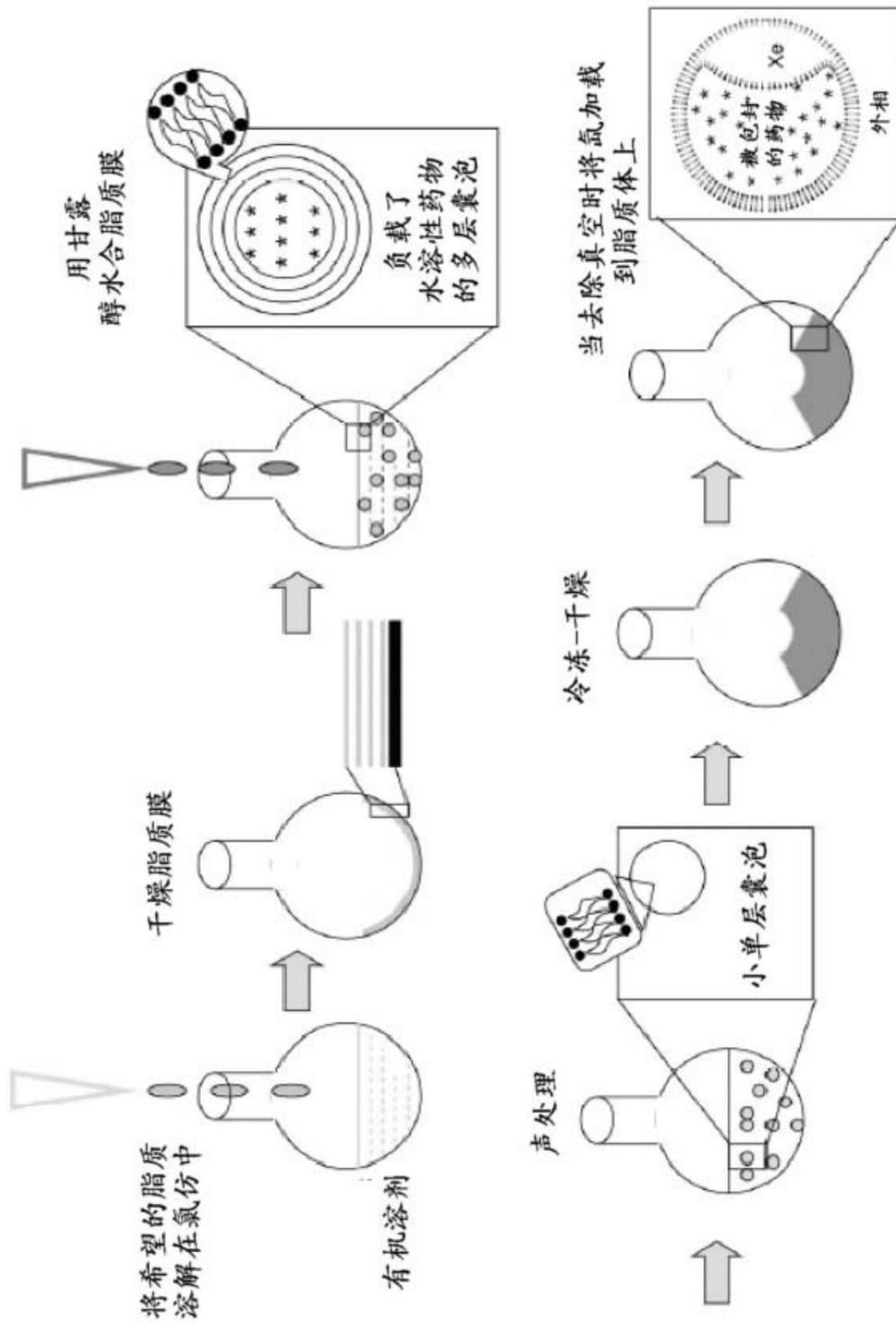


图7

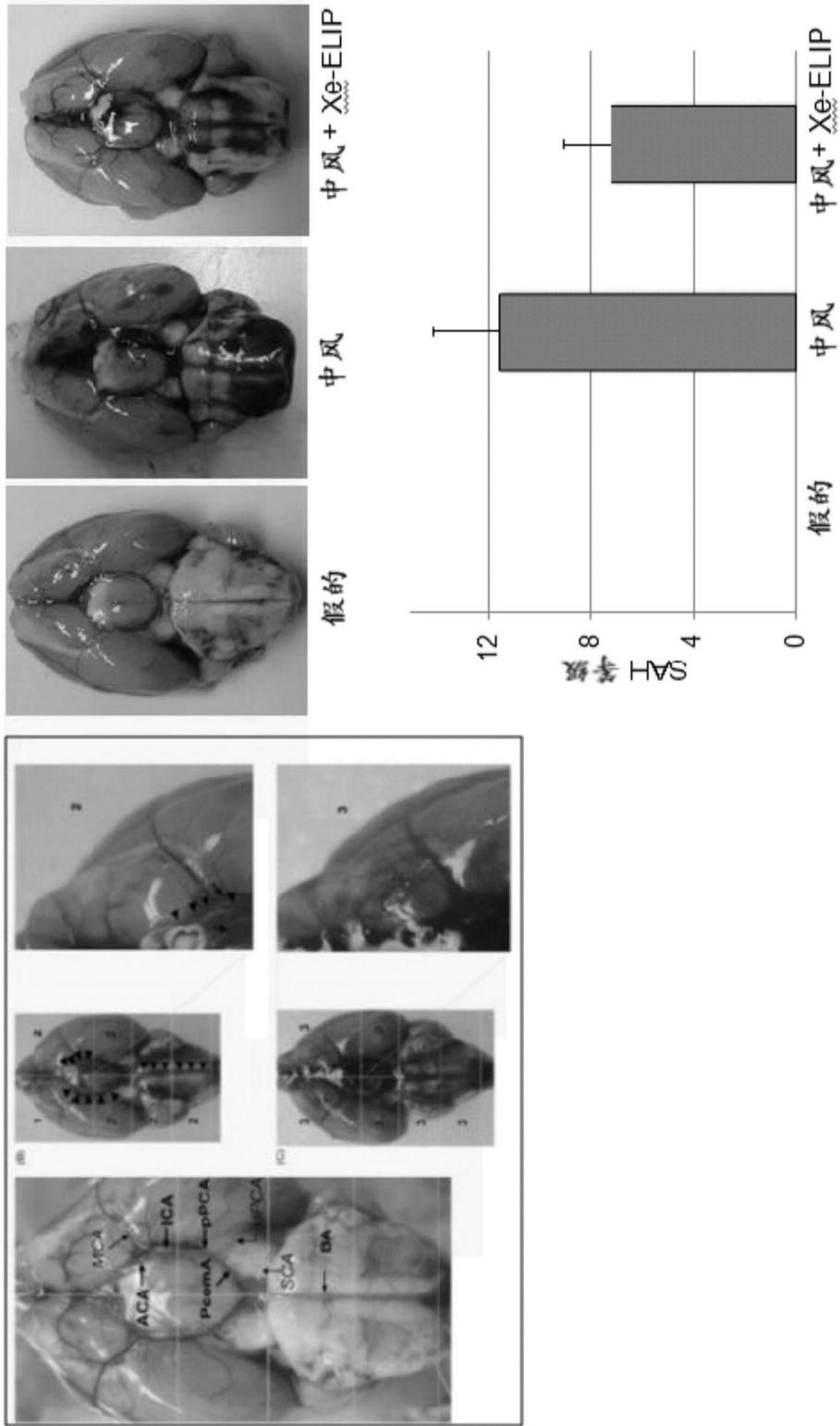


图8

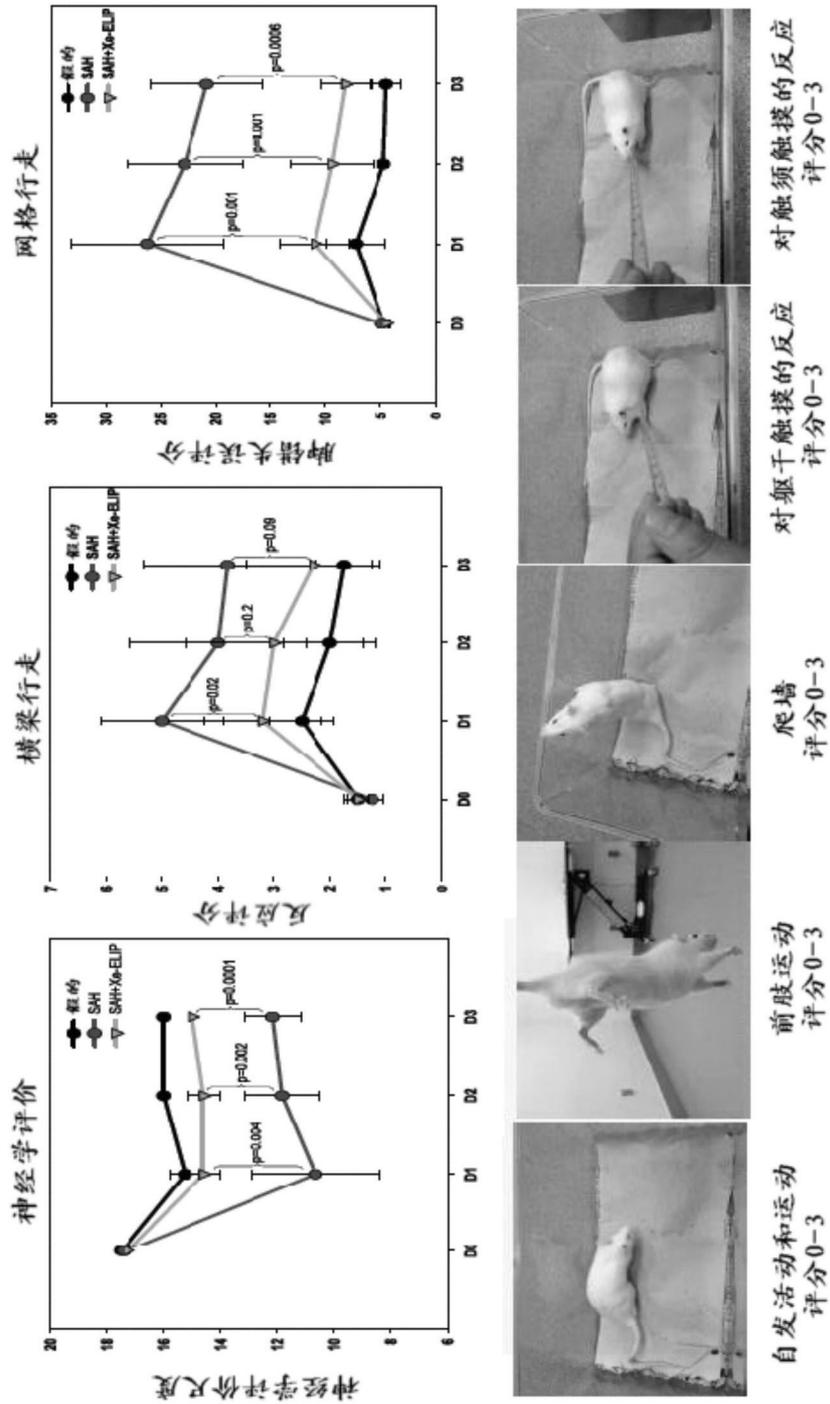


图9

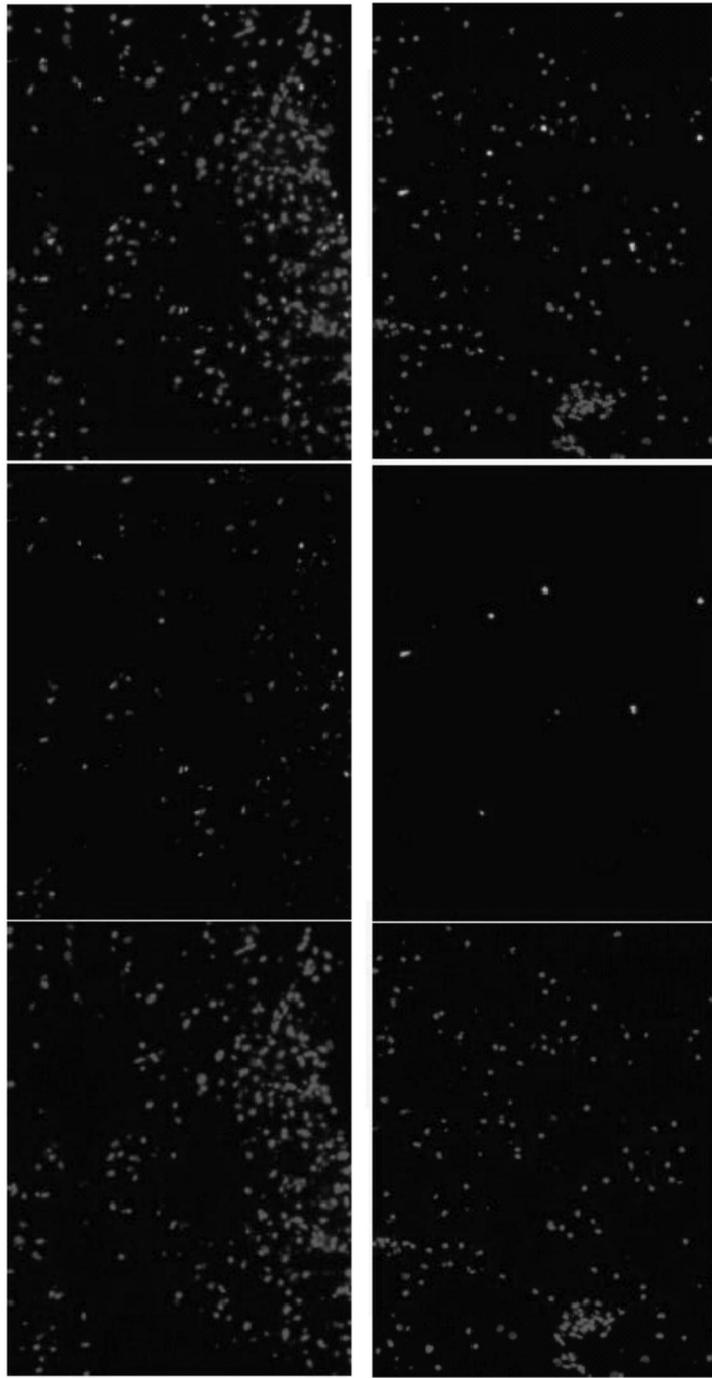


图10

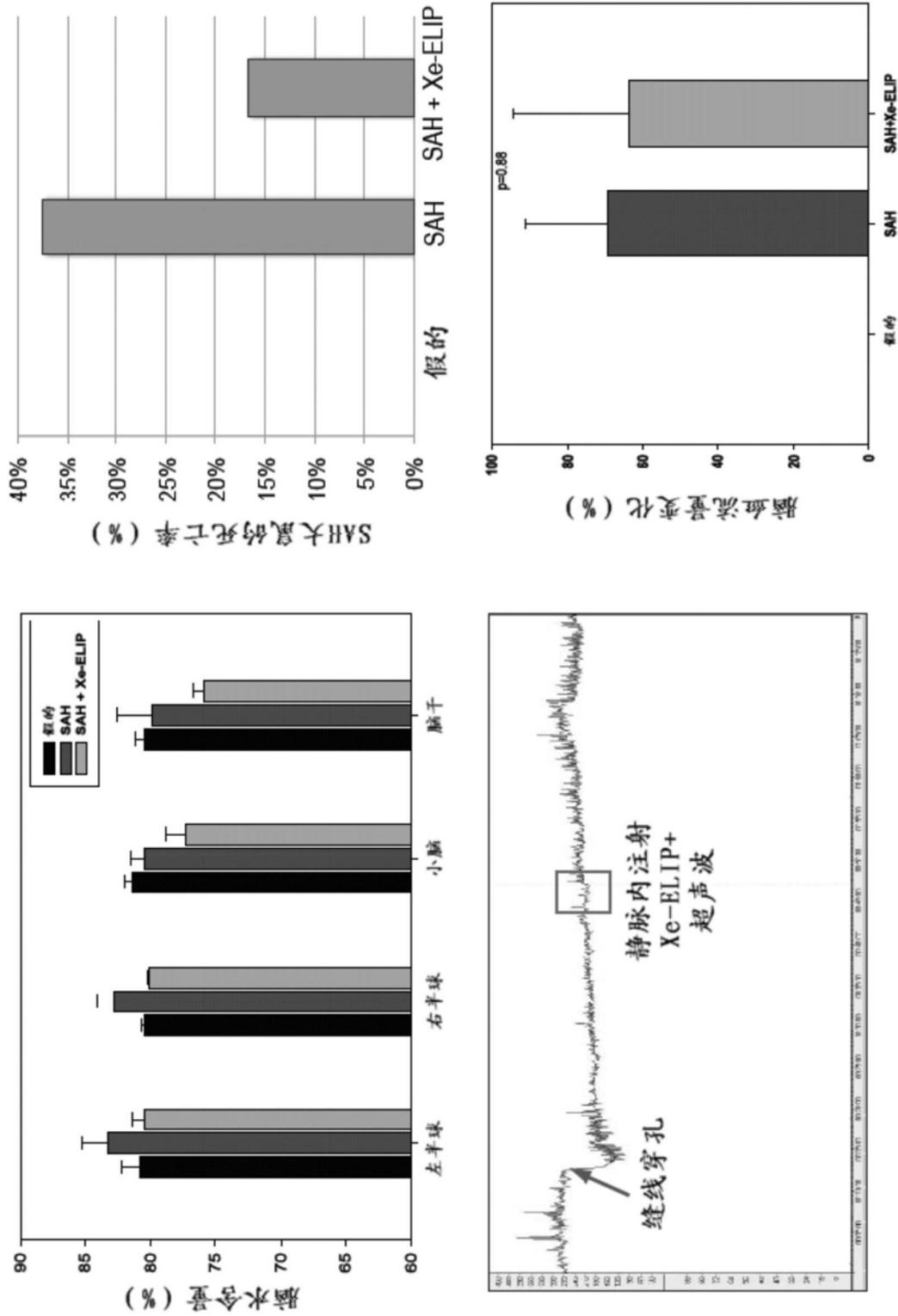


图11

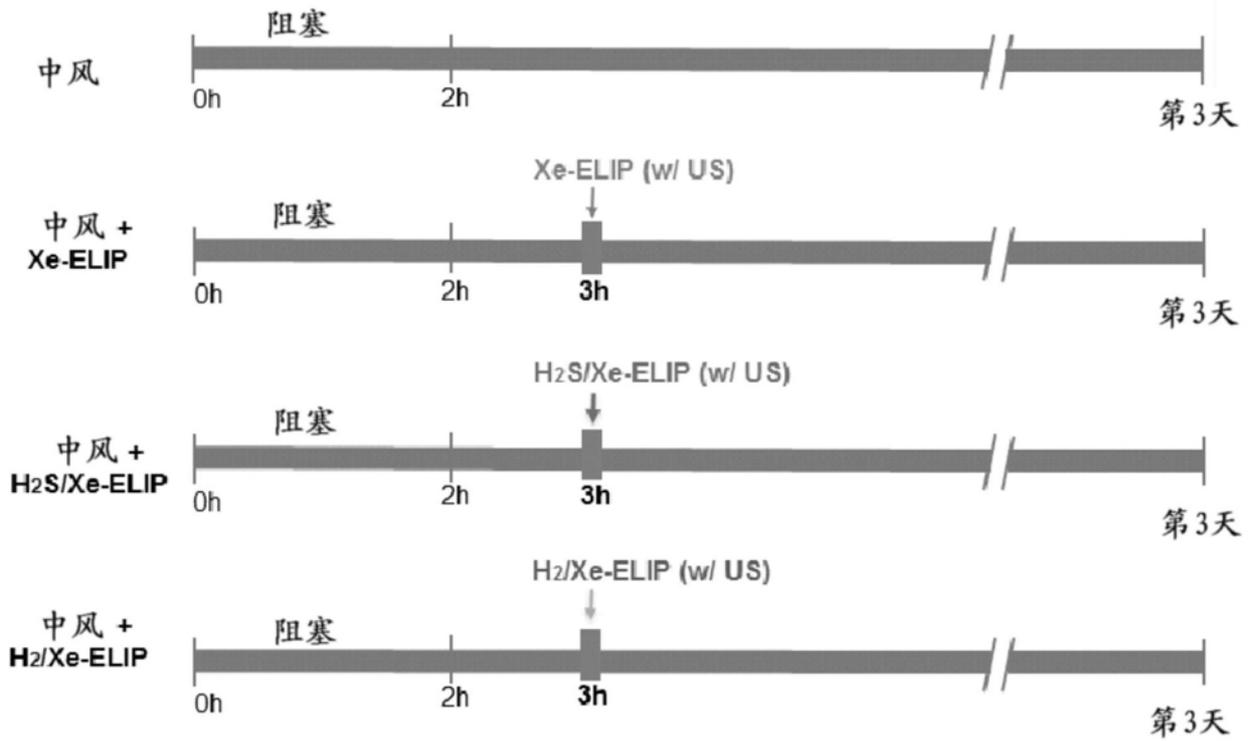


图12

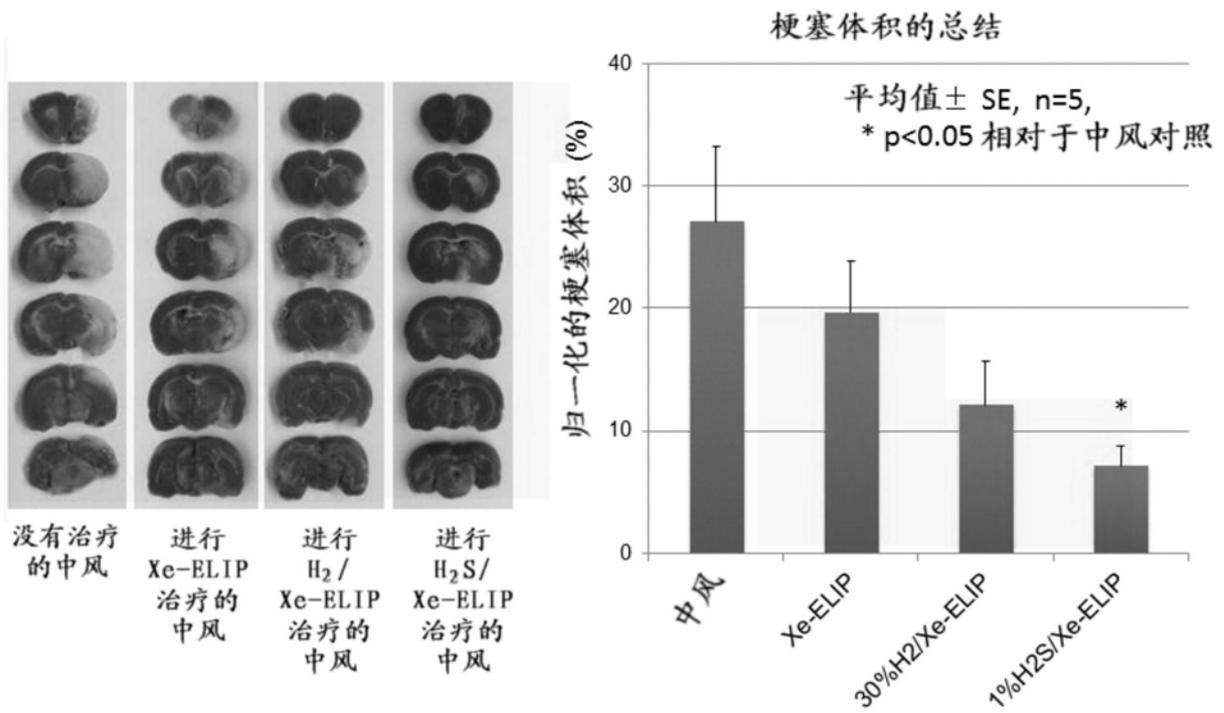


图13

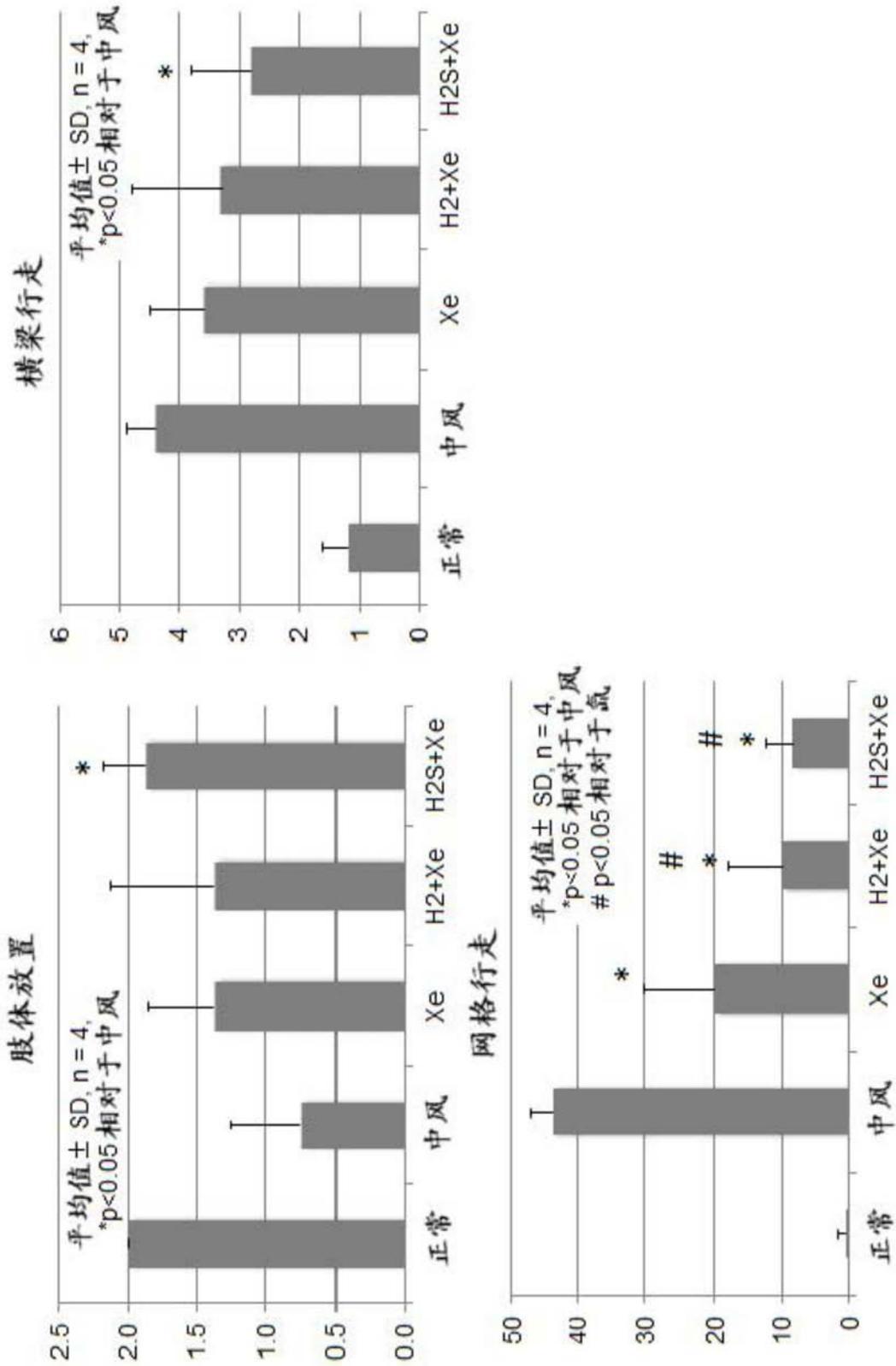


图14

效力

Xe-ELIP试剂保护人脑星形胶质细胞免于H₂O₂ (10mM) 细胞毒性: LDH释放试验

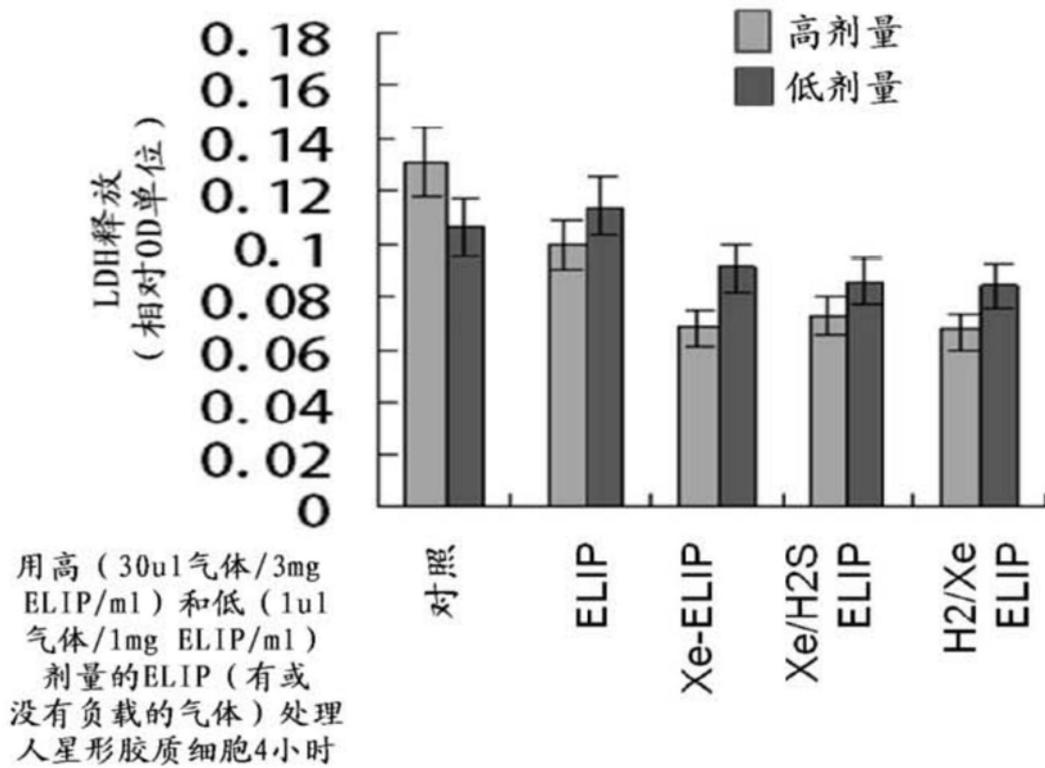


图15

毒性

H₂O₂会造成鼠胚胎干细胞中的显著LDH释放，
但是Xe和Xe-ELIP试剂不会
(在培养结束之前，用Xe-试剂和对照处理细胞
4小时和2小时；加入10mM H₂O₂)

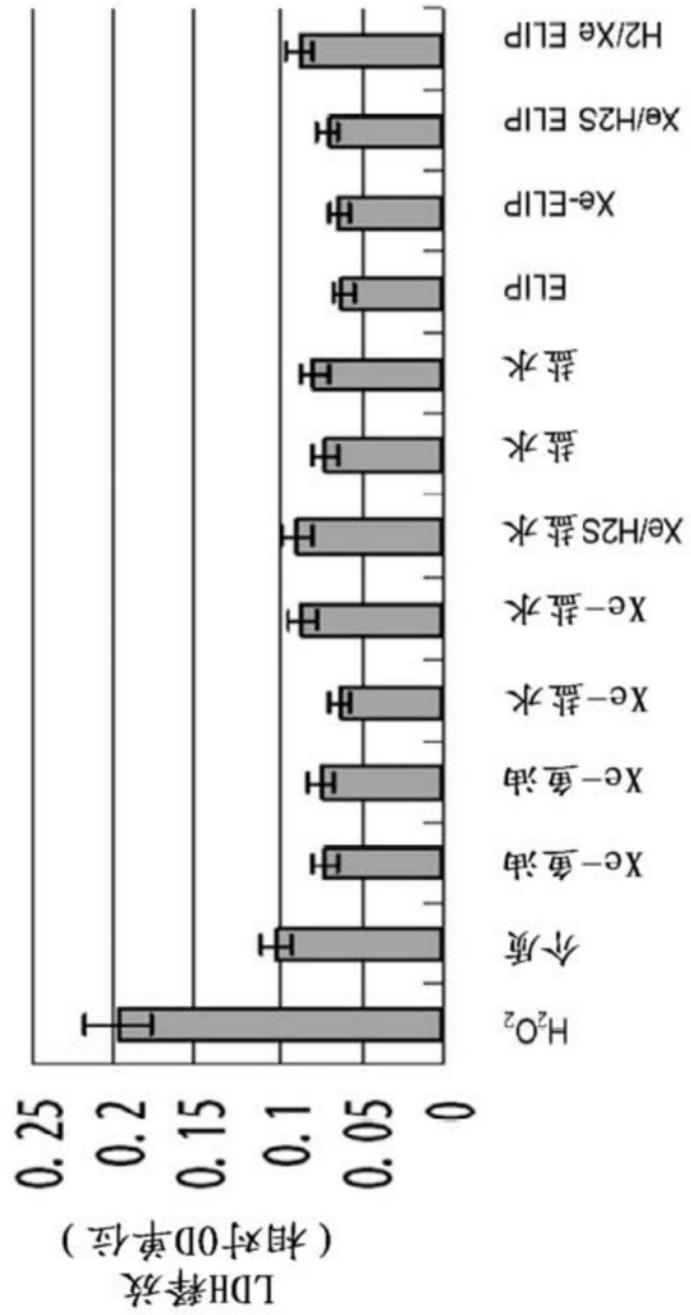


图16