

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/17

A61P 35/00 A61P 29/00

A61P 43/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02150688.4

[43] 公开日 2003 年 7 月 16 日

[11] 公开号 CN 1429623A

[22] 申请日 1997.9.10 [21] 申请号 02150688.4

[28] 分案原申请号 97199338.6

[30] 优先权

[32] 1996.9.11 [33] US [31] 08/712358

[71] 申请人 东卡罗莱娜大学

地址 美国北卡罗莱娜州

[72] 发明人 阿塔纳修斯 A·阿纳诺斯托

乔治·西高纳斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

[54] 发明名称 治疗内皮创伤的方法

[57] 摘要

描述了人红细胞生成素(EPO)在预防或治疗由于化疗、放疗、机械创伤或由于损害内皮的疾病(如炎症、心脏病或癌症)造成的内皮创伤中的用途。描述了EPO在与化疗剂联合给药中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 红细胞生成素在制备一种药物中的应用，所述药物用于与化疗剂联合给药以增强用化疗剂治疗的个体的内皮细胞抑制。
2. 根据权利要求 1 的应用，其中所述红细胞生成素与所述化疗剂同时给药。
3. 根据权利要求 1 的应用，其中所述红细胞生成素在所述化疗剂之前给药。
4. 根据权利要求 1 的应用，其中所述红细胞生成素在所述化疗剂之后给药。
5. 根据权利要求 1 的应用，其中所述化疗剂为顺铂。
6. 根据权利要求 1 的应用，其中所述个体患有选自小脑成血管细胞瘤、乳腺管癌以及喉鳞状上皮细胞癌的肿瘤生长。
7. 红细胞生成素在制备一种药物中的应用，所述药物用于与抗癌化疗剂联合给药以治疗个体的实体血管瘤。
8. 根据权利要求 7 的应用，其中所述红细胞生成素与化疗剂同时给药。
9. 根据权利要求 7 的应用，其中所述红细胞生成素在所述化疗剂之前给药。
10. 根据权利要求 7 的应用，其中所述红细胞生成素在所述化疗剂之后给药。
11. 红细胞生成素在制备一种药物中的应用，所述药物用于治疗个体的由机械创伤、暴露于放射线下、炎症、心脏病或癌症导致的内皮创伤。

治疗内皮创伤的方法

5 本申请是1997年9月10日提交的、发明名称为“治疗内皮创伤的方法”的97199338.6号专利申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及人红细胞生成素(EPO)在预防或治疗由于化疗、放疗、机械创伤或由于损害内皮的疾病(如炎症、心脏病或癌症)造成的内皮创伤中的用途。本发明进一步涉及EPO在与化疗结合使用中的用途。

10 发明背景技术

红细胞生成素(EPO)是一种在肾脏中产生的糖蛋白,是起刺激红细胞产生(红细胞发生)作用的主要激素。EPO刺激骨髓中定向红细胞先祖的分裂和分化。正常的血浆红细胞生成素的水平变化范围为0.01-0.03单位/mL,在低氧或贫血期间可增加高达100-1000倍。参见Graber和Krantz, 15 医学年述(Ann. Rev. Med. 29:51 (1978); Eschbach和Adamson国际肾脏杂志(Kidney Intl.) 28:1 (1985)。重组人红细胞生成素(rHuEpo或epoetin α)可以Epogen®(Amgen公司, Thousand Oaks, CA)和Procrit®(Ortho生物技术公司, Raritan, NJ)的形式商购获得。EPO被用来治疗贫血,包括与癌症化疗、慢性衰竭、恶性肿瘤、成年和幼年类风湿性关节炎、血红蛋白合成障碍、早熟以及HIV感染的齐多夫定(zidovudine) 20 治疗相关的贫血。

血管内皮是一层贴附在内层血管壁并与血液直接接触的细胞,其在循环系统与血管外腔隙之间提供了一个有活性的天然屏障。内皮在细胞、组织和器官水平上参与信号和信息的传递,在细胞介导以及体液免疫应答中都起作用。内皮细胞具有代谢活性,通常产生许多对血管腔以及血 25 小板产生作用的物质。内皮血管舒张剂包括前列腺环素(PGI₂)和内皮衍生松弛因子(EDRF,它可能是一氧化氮或其较稳定的加合物);这两种物质还发挥作用以抑制血小板聚集。

由物理创伤或如形成动脉粥样硬化斑块的病程导致的内皮的创伤 30 或破坏可减少EDRF的生成,从而导致血管收缩。更为扩散和锐敏的内皮创伤,例如由慢性高血压或局部缺血后的血液再充满导致的内皮创伤,也导致变化的EDRF的产生。被定位于管腔内皮表面的内皮产物包括外ADP酶(ectoADPase)和血栓调节蛋白。内皮释放的血管收

缩剂包括内皮缩血管肽。内皮细胞还分泌增强内皮有丝分裂发生并可诱导新血管形成(血管发生)的生长因子。已报道粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)刺激内皮细胞的增殖和迁移。白介素-3(IL-3)也增强这些细胞的增殖。参见 Bussolino 等 自然 337: 471(1989); Brizzi 等 临床研究杂志(J. Clin. Invest.) 91: 2887(1993).

发明概述

本发明的第一个方面是一种通过将内皮保护量的红细胞生成素与化疗剂联合给药来减少由化疗剂导致的内皮创伤的方法。内皮保护量的红细胞生成素可与化疗剂同时或在化疗剂给药之前或之后给药。

本发明的第二个方面是一种在用化疗剂治疗的个体中增强内皮细胞抑制的方法,包括将化疗剂与内皮抑制量的红细胞生成素联合给药。内皮抑制量的红细胞生成素可与化疗剂同时或在化疗剂给药之前或之后给药。

本发明的另一个方面是一种治疗实体血管瘤的方法,包括将内皮抑制量的红细胞生成素与抗癌化疗剂联合给药。内皮抑制量的红细胞生成素可与化疗剂同时或在化疗剂给药之前或之后给药。

本发明的另一个方面是一种治疗由机械创伤、暴露于放射线下、炎症、心脏病或癌症导致的内皮创伤的方法,包括将内皮保护量的红细胞生成素对需要这种治疗的个体给药。

本发明前面以及其它的目的将在下面提供的说明书中详细解释。

附图简要说明

图 1 是显示置于顺铂后内皮细胞存活率的剂量反应曲线。

图 2 显示与仅置于顺铂的对照组内皮细胞培养物比较,同时置于铂顺和不同剂量的 EPO 的内皮细胞培养物的反应。

图 3 显示首先置于顺铂,两小时后再置于不同剂量的 EPO 的内皮细胞培养物的反应(与仅置于顺铂的对照组内皮细胞培养物比较)。

图 4 显示首先置于不同剂量的 EPO,两小时后再置于顺铂的内皮细胞培养物的反应(与仅置于顺铂的对照组内皮细胞培养物比较)。

发明详述

本发明人以前已证实重组人红细胞生成素(EPO)对人脐静脉内皮细胞和牛毛细血管内皮细胞有促有丝分裂和化学引诱剂作用(迁移)。参见 Anagnostou 等 Proc.Natl. Acad. Sci. USA 87:5978 (1990)。内皮细胞的迁移和增殖是生成血管过程中的关键步骤。

5 本发明人已发现 EPO 可有效地防止和/或修复由化疗剂导致的内皮创伤。本发明人发现与化疗剂联合给药 EPO 产生双相应答：一定剂量的 EPO 保护内皮细胞免于化疗剂的有害影响，同时剂量的增加增强由化疗剂导致的内皮生长抑制。

10 EPO 在化疗期间增强内皮生长抑制中的用途可用于治疗生血管肿瘤，这是希望阻止或减慢支持肿瘤生长的新血管的形成。肿瘤需要充足的血液供应，肿瘤组织分泌的生血管因子刺激了新血管在肿瘤实体中的生长。在动物模型中，已表明抑制肿瘤组织中的血管生成触导致肿瘤退化。高度血管化的实体肿瘤包括小脑成血管细胞瘤、乳腺管癌和喉鳞状上皮细胞癌。异常的血管生成与其它病理疾病有关，包括糖
15 尿病性视网膜病、新血管性青光眼、类风湿性关节炎以及牛皮癣。EPO 降低或防止异常血管生成的能力在防止或降低与这些病情相关的血管生成中将是有益的。

根据本发明的一种方法是 EPO 作为致癌性疾病化疗中的辅助剂的用途。当希望保护内皮免于化疗剂的不利影响时，EPO 以内皮保护量
20 提供。根据本发明的第二种方法是 EPO 作为致癌性疾病化疗中的辅助剂的用途，其中希望增强化疗剂对内皮的不利影响(例如增强内皮生长的抑制)。在这种情况下，EPO 以内皮抑制量提供。

如本文所采用的，EPO 的内皮保护量指能降低或防止本来是由于暴露于化疗剂或放射线、机械创伤或已知创伤内皮的病情而另外产生的
25 的内皮生长的抑制的剂量。另一方面，EPO 的内皮保护量可定义为在暴露于化疗剂或放射线、机械创伤或患有已知创伤内皮的疾病后能增加可存活内皮细胞数目的那些剂量；可存活细胞数目的增加是指与没有 EPO 时所预期的数目进行比较而有所增加。EPO 最有效的内皮保护量可随给药的时间以及内皮创伤的病因，不同而发生变化。

30 在内皮创伤是由于置于化疗剂时，根据 EPO 是否与化疗剂同时，或在之前或之后给药，EPO 最有效的内皮保护量将发生变化，并可能随所用的具体化疗剂的不同而发生变化。

如本文所采用的，EPO的内皮抑制量指能增强或增加本来是由于暴露于化疗剂或放射线、机械创伤或患有已知创伤内皮的疾病而产生的内皮生长的抑制的剂量。另一方面，EPO的内皮抑制量可定义为在暴露于化疗剂或放射线、机械创伤或患有已知创伤内皮的病情后减少可存活内皮细胞数目的那些剂量；可存活细胞数目的减少是指与没有EPO时所预期的数目进行比较而有所减少。EPO最有效的内皮抑制量可随给药的时间以及内皮创伤的病因，不同而发生变化。

在内皮创伤是由于置于化疗剂时，根据EPO是否与化疗剂同时，或在其之前或之后给药，EPO最有效的内皮抑制量将发生变化，并可随所用的具体化疗剂的不同而发生变化。

可通过内皮细胞增殖的减少和/或可存活内皮细胞数目的减少来评价导致可存活内皮细胞总的数目减少的内皮创伤。这种可存活内皮细胞数目的减少也可称为内皮生长抑制或内皮细胞抑制或抑制作用。

如本文所采用的，一种减少由于对个体给药化疗剂而造成的个体内皮创伤的方法指减少或防止本来由于给药化疗剂而造成的可存活内皮细胞减少的方法。如本文所采用的，一种增强由于对个体给药化疗剂造成的个体中的内皮抑制的方法指增加或增强本来是由于给药化疗剂而造成的可存活内皮细胞减少的方法。

内皮细胞的创伤也可由放疗、机械创伤以及由如炎症、心脏病(如动脉粥样硬化)和癌症的疾病造成。例如在动脉粥样硬化中，内皮创伤或功能异常导致血管舒张反应减弱以及增加血小板在动脉壁上的沉积。从沉积的血小板中释放的血清紧张素和血栓烷 A_2 引起动脉收缩和痉挛，增加血小板的黏附和聚集，并促进动脉粥样硬化。通过生血管刺激而形成新的冠状血管经常使冠状动脉阻塞的后果得以改善。EPO在增强内皮生长和/或修复或防止内皮创伤中的使用将使其成为一个有效的治疗由于机械创伤、放疗或由于对内皮产生不利影响的疾病而造成的内皮创伤剂。

如本文所采用的，人红细胞生成素(EPO)指天然产生的人红细胞生成素糖蛋白以及重组人红细胞生成素(rHuEpo或epoetin α ，可以Epogen®(Amgen公司，Thousand Oaks, CA)和Procrit®(Ortho生物技术公司，Raritan, NJ)的形式商购获得)。EPO的肽类似物也可

用于本发明的方法中。如本文所采用的，肽类似物为虽然不具有与 EPO 相同的氨基酸序列，但具有类似的三维结构的那些化合物。在与受体相互作用的蛋白分子中，相互作用发生在稳定的三维分子的表面可达位点。可根据已知方法，通过以适宜构象排列关键的结合位点残基，
5 设计和合成模拟 EPO 结合区的必需的表面特征的肽。具有与 EPO 结合表面基本相同的分子拓扑结构的表面区域的分子将能够模拟 EPO 与 EPO 受体的相互作用。业已知确定肽三维结构以及其类似物的方法，有时被称为‘合理的药物设计技术’。参见例如 Geysen 的美国专利号 4,833,092; Nestor 的美国专利号 4,859,765; Pantoliano 的美国专利号 4,853,871; Blalock 的美国专利号 4,863,857(申请人特别
10 说明本文所引用的全部美国专利公开被全文引作参考)。

在本发明的方法中，模拟红细胞生成素生物活性的肽(EPO 受体肽配体)可替代 EPO。这些肽的序列可代表全长 EPO 蛋白序列的片段，其中该片段能与 EPO 受体结合以及活化它。此外，在这些肽模拟 EPO 生物活性时，具有不类似于 EPO 的序列的肽可用于本发明的方法中。
15 Wrighton 等报道了结合并活化靶细胞表面上的红细胞生成素受体的小分子肽的鉴定和表征，虽然这些肽序列不类似于 EPO 的一级结构(Wrighton 等 科学 273: 458 (1996, 7, 26))。(用二硫键结合的 14 氨基酸环肽代表这些肽激动剂，其中环肽具有已鉴定的最小共有序
20 列。Livnah 等，科学 273: 464(1996, 7, 26)描述了一种这样的肽模拟物与红细胞生成素受体的复合物的结构。

如本文所采用的，术语化疗剂指细胞毒性抗肿瘤剂，即治疗上用来阻止或降低肿瘤细胞的生长，优先杀死肿瘤细胞或打断迅速增殖细胞的细胞周期的化学物质。化疗剂也称为抗肿瘤药物或细胞毒性剂并
25 为本领域所熟知。如本文所采用的，化疗包括用一种化疗剂或用化疗剂的组合物进行治疗。在需要治疗的个体中，化疗可与外科治疗或放疗或与其它抗肿瘤治疗方法结合。

作为实例的化疗剂为长春花生物碱、表鬼臼毒素、蒽环霉素抗生素、放线菌素 D、普卡霉素、(嘌呤霉素、短杆菌肽 D、
30 paclitaxel(Taxol®, Bristol Myers Squibb)、秋水仙碱、细胞松弛素 B、依米啉、美登素以及安吡啉(或“mAMSA”)。长春花生物碱类描述在 Goodman 和 Gilman 的治疗的药理学基础，1227-1280(第 7

版, 1985)(下文为“Goodman和Gilman”)。长春花生物碱的实例为长春花新碱、长春碱和长春地辛。表鬼白毒素类描述在 Goodman 和 Gilman, 见上文 1280-1281。表鬼白毒素的实例为依托泊甙、依托泊甙正醌和替尼泊甙。蒽环霉素抗生素类描述在 Goodman 和 Gilman, 5 见上文 1283-1285。蒽环霉素抗生素的实例为柔红霉素、阿霉素、米托蒽醌和比生群。放线菌素 D, 也称为更生菌素描述在 Goodman 和 Gilman, 见上文 1281-1283。普卡霉素, 也称为光神霉素, 描述在 Goodman 和 Gilman, 见上文 1287-1288。其它的化疗剂包括顺铂 (Platinol®, Bristol Myers Squibb); 卡铂 (Paraplatin®, 10 Bristol Myers Squibb); 丝裂霉素 (Mutamycin®, Bristol Myers Squibb); 六甲蜜胺 (Hexalen®, U.S. Bioscience, Inc.); 环磷酰胺 (Cytosan®, Bristol Myers Squibb); 洛莫司叮 [CCNU] (CeeNU®, Bristol Myers Squibb); 卡莫司叮 [BCNU] (BiCNU®, Bristol Myers Squibb)。

15 如本领域技术人员所知, 化疗药物的给药方法根据所使用的具体的化疗剂而发生变化。根据所使用的化疗剂, 例如可通过注射(静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下、肿瘤内、胸膜内)或口服给药化疗剂。

如本文所采用的, 一种化合物与另一种化合物“联合”给药指以足够接近的时间给药两种化合物, 这样一种化合物的存在改变另一种 20 的生物作用。两种化合物可同步(同时)或依次给药。可通过在给药前混合化合物, 或通过在不同时间点但在不同的组织位点给药化合物或使用不同的给药途径来完成同时给药。

如本文所采用的短语“同时的给药”、“同步的给药”或“同时 25 给药”指化合物在相同的时间点或彼此紧接着给药。在后一种情况下, 两种化合物在足够接近的时间内给药, 以致观察到的结果与化合物在相同时间点给药时获得的结果难以区别。

用本发明方法治疗的个体包括人和动物(例如狗、猫、牛、马)个体, 优选为哺乳动物个体。

30 许多化疗剂在细胞周期的特定时期起作用, 并仅对处于分裂过程中的细胞具有活性。对化疗最敏感的肿瘤为具有高百分比处于细胞分裂过程的细胞的肿瘤, 包括但不局限于乳腺、肝、脑、肺以及卵巢癌。高度血管化的实体瘤适宜于用内皮抑制量的 EPO 结合化疗剂治疗, 因

为这些肿瘤依赖于血管生成以为生长的肿瘤组织提供足够的血液供应。

5 可通过本领域技术人员显而易见的任何适宜的方式给药根据本发明所使用的 EPO。可全身(例如静脉内)或局部(例如注射至肿瘤、紧围绕肿瘤的组织中或注射至包含肿瘤的解剖学腔隙中)给药 EPO。例如,在内皮抑制量的 EPO 作为化疗的辅助剂使用时,可将 EPO 局部给药至希望防止血管生成的肿瘤(或紧围绕肿瘤的组织)中。例如在全身性地递送化疗剂时,可通过静脉注射全身性地给药内皮保护量的 EPO。

10 与化疗剂结合使用的 EPO 的给药剂量和给药时间将类似地取决于所希望达到的效果。本发明人发现根据 EPO 的给药时间(同时、在化疗剂给药之前或之后)以及给药剂量的不同,EPO 既能起保护内皮免受化疗剂的生长抑制作用,又能起增强使用化疗剂所见到的内皮生长抑制的作用。如何通过常规实验确定与特定的化疗剂结合使用以获得所需效果 15 的 EPO 的给药剂量和时间对于本领域技术人员来讲是显而易见的。

未确定可以单次量或多次量给药的 EPO 的最大量。在三至四周中已给药高达 1,500 单位/kg 的剂量而没有由于 EPO 本身引起的毒性作用。参见 Eschbach 等, 慢性尿毒症的预防 (Prevention of Chronic Uremia) (Friedman 等编), Field and Wood Inc., Philadelphia, 20 pp 148-155 (1989)。在本方法中,在希望保护内皮免受由化疗剂导致的内皮创伤和/或内皮生长抑制时,以内皮保护量给药 EPO。适宜的内皮保护剂量为约 100U/kg - 约 200U/kg。在本方法中,在希望增强由化疗剂导致的内皮创伤和/或内皮生长抑制时,EPO 以内皮抑制量给药,其可为约 750U/kg - 约 2000U/kg。如上所述,与化疗剂结合使用的 EPO 的给药剂量和时间将取决于所需效果以及使用的化疗剂。 25

提供下面的实施例以说明本发明,不应被认为是对它们的限定。

实施例 1

材料和方法

30 细胞培养 人脐静脉内皮细胞是从来源于剖腹产术的脐带中得到的 (HUVECs)。用标准方法在覆盖有 0.5%猪皮明胶(Sigma 化学公司, St. Louis, MO)的 25cm²T-烧瓶中培养 HUVECs。补充有 20%规定的胎牛

血清(FBS)(Hyclone, Logan, UT), 16U/ml 肝素(Sigma), 50ug/ml 来源于牛下丘脑的内皮促细胞分裂剂(Biomedical Technologies, Stoughton, MA), 100U/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素的培养基 199 被用于 HUVECs 的生长(Life Technologies, Gaithersburg, MD)。

- 5 如本领域所知, 内皮细胞的特征为冯维勒布兰德氏因子抗原阳性、相似及典型的鹅卵石(cobblestone)形态以及存在 Weillebrand-Palade 氏体。

保护/抑制分析 使用比色法确定在将内皮细胞培养物置于试验物后的代谢活性细胞的数目。本项分析使用四唑铕化合物[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑铕] (MTS) 和电子偶合剂吩嗪甲硫酸盐(PMS; 可从 Promega 公司购得, Madison, Wisconsin) 的溶液。参见 Denizot 和 Lang, 免疫学方法杂志(J. Immunol. Methods) 89: 271 (1986); Promega Corporation Technical Bulletins 112, 152 和 169。MTS 被在代谢活性细胞中发现的脱氢酶生物还原为甲臆。以 490nm 处的吸光率测定甲臆的量, 它与培养物中的活细胞的数目成正比。

收集在完全(补充)M199 培养基中生长的对数期内皮细胞。在 80-90%完全铺满时, 将 EC 培养物单细胞层用磷酸缓冲液(PBS)洗涤, 用 0.25%胰蛋白酶的 1mM EDTA 溶液处理 1-2 分钟, 接着将细胞悬浮在完全培养基中。分别使用血细胞计数器和锥虫蓝染色确定细胞的数目和存活率。制备 7.22×10^4 细胞/ml 培养基的细胞悬液, 将 90ul (6.5×10^3 细胞)分散在 96 井平板的各井中。在 37°C, 5% CO₂, 增湿空气下培养过夜后, 在下面描述的实施例中说明的浓度和顺序加入 EPO 和/或化疗剂。接着再将平板保温 24 小时。如制造商所推荐, 在保温末期, 将 20ul 新制备的混合 MTS/PMS (20:1 比例)溶液加入到各井中, 将平板再保温 1-4 小时。使用 ELIAS 平板计数器记录在 490nm 处各井的吸光率。通过将 490nm 处的校正的吸光率对加入物(EPO、化疗剂或其混合物)的浓度作图确定 LD50 以及各种处理对细胞存活率以及化学敏感性的影响。

- 30 统计学研究 对于保护/抑制分析, 将实验重复三次。所有其它实验进行至少 5 次。将结果取平均值并以平均值±SD 表示。所有实验的对照组包括用下面一种处理的 1-2 个重复三次的井:

- 1) 1ug/ml 顺铂;
- 2) 50ug/ml 顺铂;
- 3) 10 或 20U/ml EPO;
- 4) 0.6 或 1.2U/ml EPO.

5 因此, 对于每个实验, 3-6 个井获得了上面四种对照组处理(总共 12-24 个对照组井)。还对由重复三次的未处理细胞井构成的其它对照组进行了实验。

实施例 2

顺铂 LD50 的测定

10 如实施例 1 描述地制备含有内皮细胞的 96 井平板, 在 37℃, 5% CO₂, 增湿空气下培养过夜。制备 160ug/ml 顺铂溶液, 将系列稀释物加入到各井中(5ul/井; 浓度从 0.03125ug/ml 变化至 4.0ug/ml。接着将平板保温两天(48 小时)), 使用实施例 1 描述的 MTS/PMS 方法确定内皮细胞的存活率。使用 ELISA 平板计数器记录 490nm 处各井的
15 吸光率。将校正的 490nm 处的吸光率对顺铂的浓度(ug/ml)作图(图 1)以提供剂量-反应曲线。产生 50% 最大反应所需顺铂的浓度(顺铂的 LD50)被确定为 0.45ug/ml。

根据上面的发现, 如下面实施例所提供的, 用 1ug/ml 剂量的顺铂来测定 EPO 对内皮细胞的影响。

20 实施例 3

顺铂和 EPO 同时给药对内皮细胞的影响

为了确定 EPO 和顺铂结合使用对内皮细胞的影响, 将 EPO 的系列稀释物与顺铂一起同时加入到内皮细胞培养物中。

如实施例 1 描述地制备内皮细胞培养物。将顺铂(最终浓度为
25 1ug/ml)与 5ul 各种浓度的 EPO 制备物(最终 EPO 浓度从 0.15 变化至 20U/ml)同时加入到各试验井中。使用实施例 1 描述的 MTS/PMS 比色分析法确定内皮细胞的存活率。将结果与对照组井比较(仅用 1ug/ml 顺铂处理的内皮细胞, 其被当作基线并在图 2 中以 0% 代表)。结果提供在图 2 中; “对照组的百分数”为相对于对照组, 490nm 处的光密度变化的百分数, 这样“0%”说明试验井具有与对照组类似数目的
30 代谢活性细胞, 而“50%”说明多 50%, “-50%”说明少 50% 的代谢活性细胞。

如图 2 所示, 当 EPO 与顺铂同时加入到细胞培养物中时, 观察到双相反应。当 EPO 与顺铂同时加入时, 用 0.15-1.25U/ml EPO 处理的内皮细胞培养物被保护免于顺铂的创伤作用。当 EPO 与顺铂同时加入时, 0.3U/ml 的 EPO 浓度提供内皮细胞的最大保护; 存活细胞的数目比在仅用顺铂处理的对照组培养物中观察到的高约 30%。

还如图 2 所示, 与单独用顺铂处理的培养物比较, 当 EPO 与顺铂同时加入时, 在用 5-20U/ml EPO 处理的培养物中的内皮细胞生长被抑制。与仅暴露于顺铂的对照组细胞相比, 用 5U/ml EPO 和 1 μ g/ml 顺铂处理的培养物显示存活细胞的数目减少了 33%。

10 实施例 4

在暴露于顺铂后给药的 EPO 对内皮细胞的影响

在本实验中, 在培养物暴露于顺铂 2 小时后, 将 EPO 的系列稀释物加入到内皮细胞培养物中。

如实施例 1 描述地制备内皮细胞的培养物。将顺铂加入到各试验井中(顺铂的最终浓度为 1 μ g/ml); 2 小时后, 加入最终浓度变化范围为 0.15-20U/ml 的 EPO 制备物。使用如实施例描述的 MTS/PMS 比色法确定内皮细胞的存活率。将结果与对照组井(仅用 1 μ g/ml 顺铂处理的内皮细胞)比较。

结果提供在图 3 中, 表明当在加入顺铂后将 EPO 加入到细胞培养物时观察到了双相反应。当在暴露于顺铂 2 小时后加入 EPO 时, 用 0.15-5U/ml EPO 处理的内皮细胞培养物被保护免于顺铂的创伤作用。在暴露于顺铂之后用 1.25U/ml EPO 处理过的内皮细胞培养物中, 存活细胞的数目比对照组高 34%。相反, 在暴露于顺铂 2 小时后给药 10-20U/ml EPO 的内皮细胞培养物中, 细胞的存活率比在对照组(仅暴露于顺铂中)中所观察到的要低。

25 实施例 5

在暴露于顺铂之前给药的 EPO 对内皮细胞的影响

在本实验中, 在将培养物暴露于顺铂之前 2 小时, 将 EPO 的系列稀释物加入到内皮细胞培养物中。

30 如实施例 1 描述地制备内皮细胞的培养物。每个试验井加入 5 μ l 浓度为 0.15-20U/ml 的 EPO 制备物; 2 小时后, 将顺铂加入到各试验井中(5 μ l 1 μ g/ml 的顺铂)。使用如实施例描述的 MTS/PMS 比色法确

定内皮细胞的存活率。将结果与对照组并(仅用 1 μ g/ml 顺铂处理的细胞)比较。

5 结果提供在图 4 中, 表明了暴露于顺铂之前 2 小时暴露于 EPO 后的存活内皮细胞的数目的降低(与仅暴露于顺铂的对照组细胞比较)。与对照组比较, 细胞增殖和存活率降低了 81%。抑制为剂量依赖性的; 与对照组比较, 低如 5 和 2.5U/ml 的 EPO 浓度分别降低细胞生长 58% 和 48%。

前面是对本发明的说明, 不应认为是对它们的限定。本发明用下面的权利要求来定义, 权利要求的等效物应被包括在其中。

10

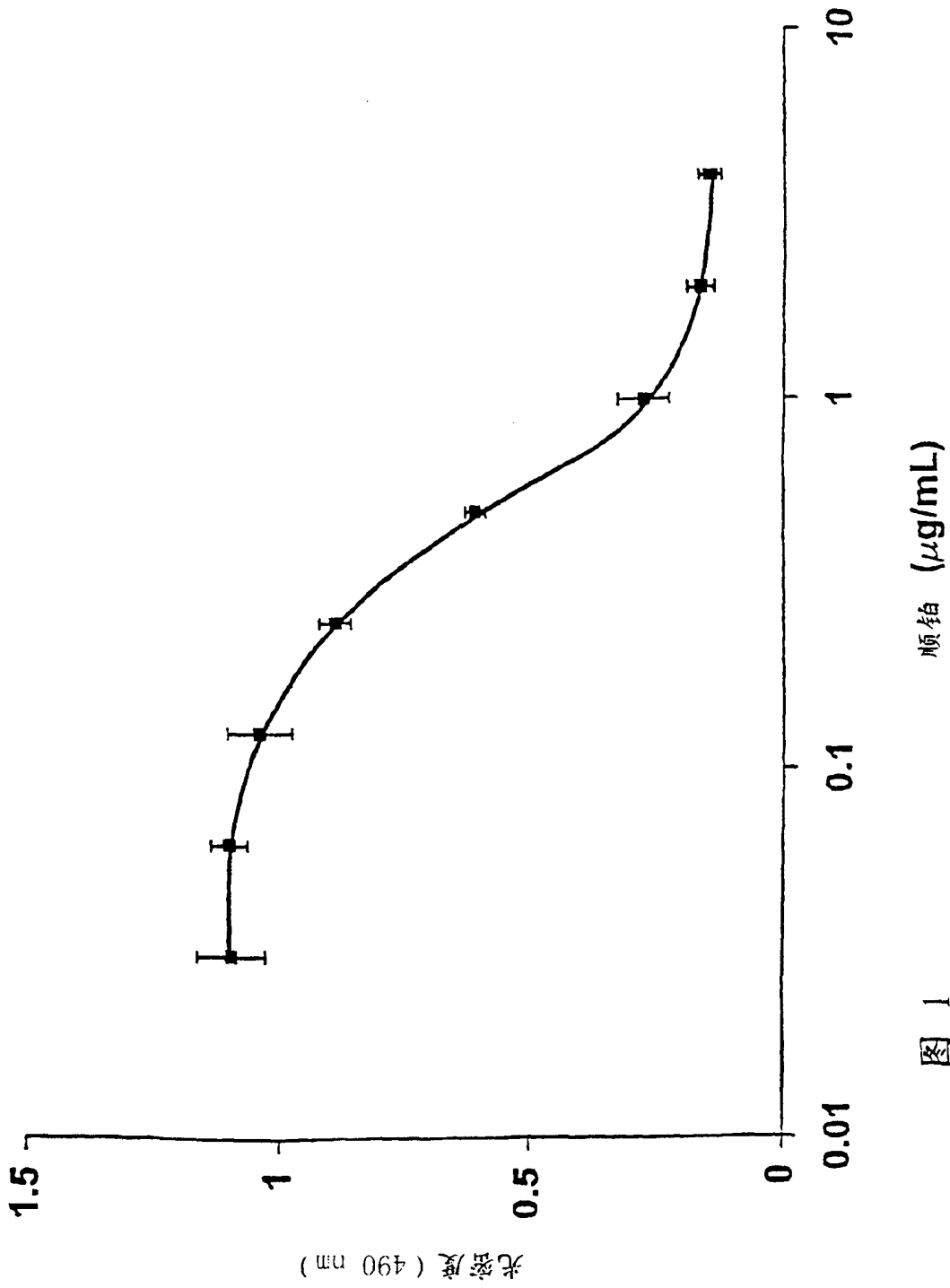


图 1

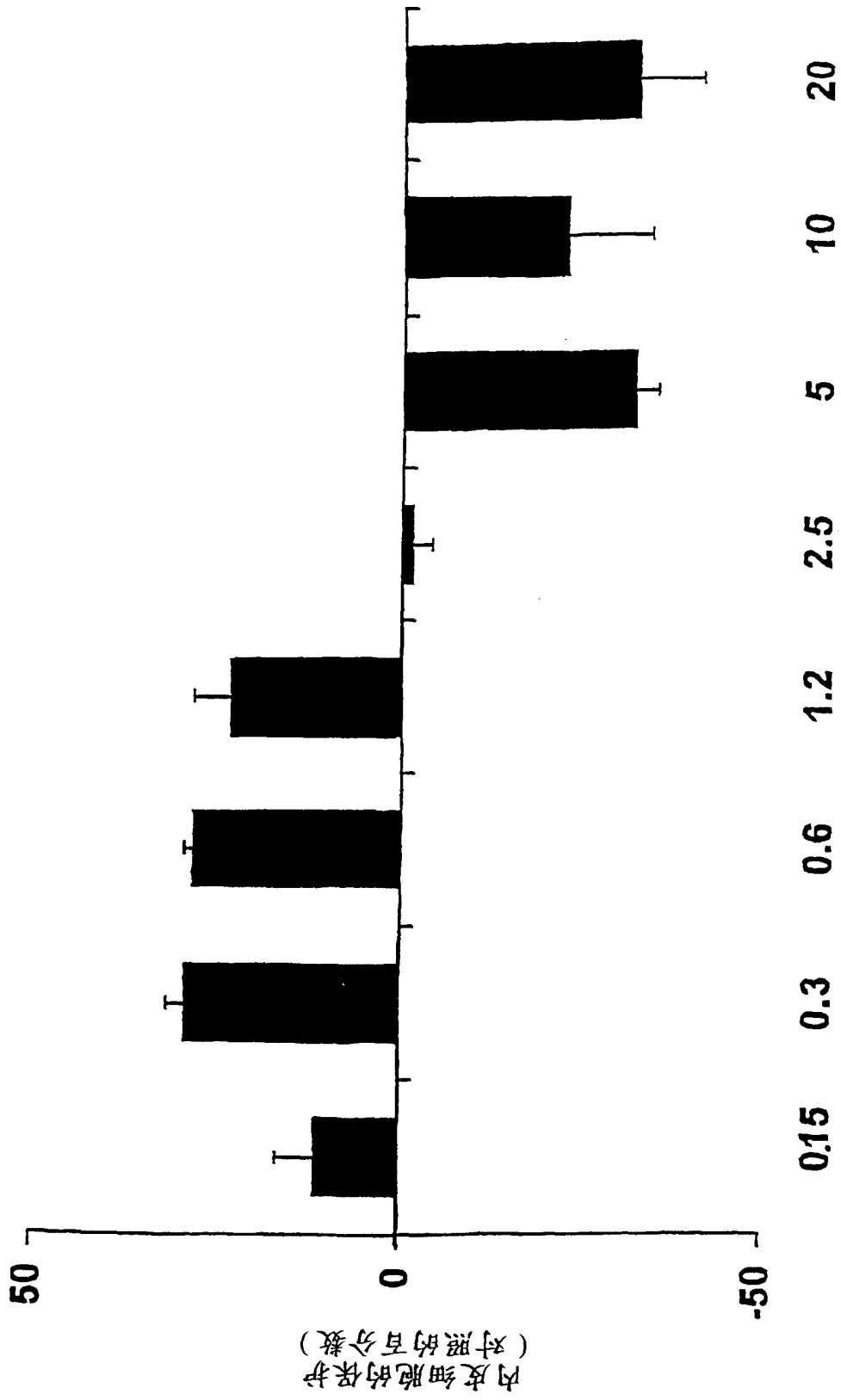


图 2 红细胞生成素 (单位/mL)

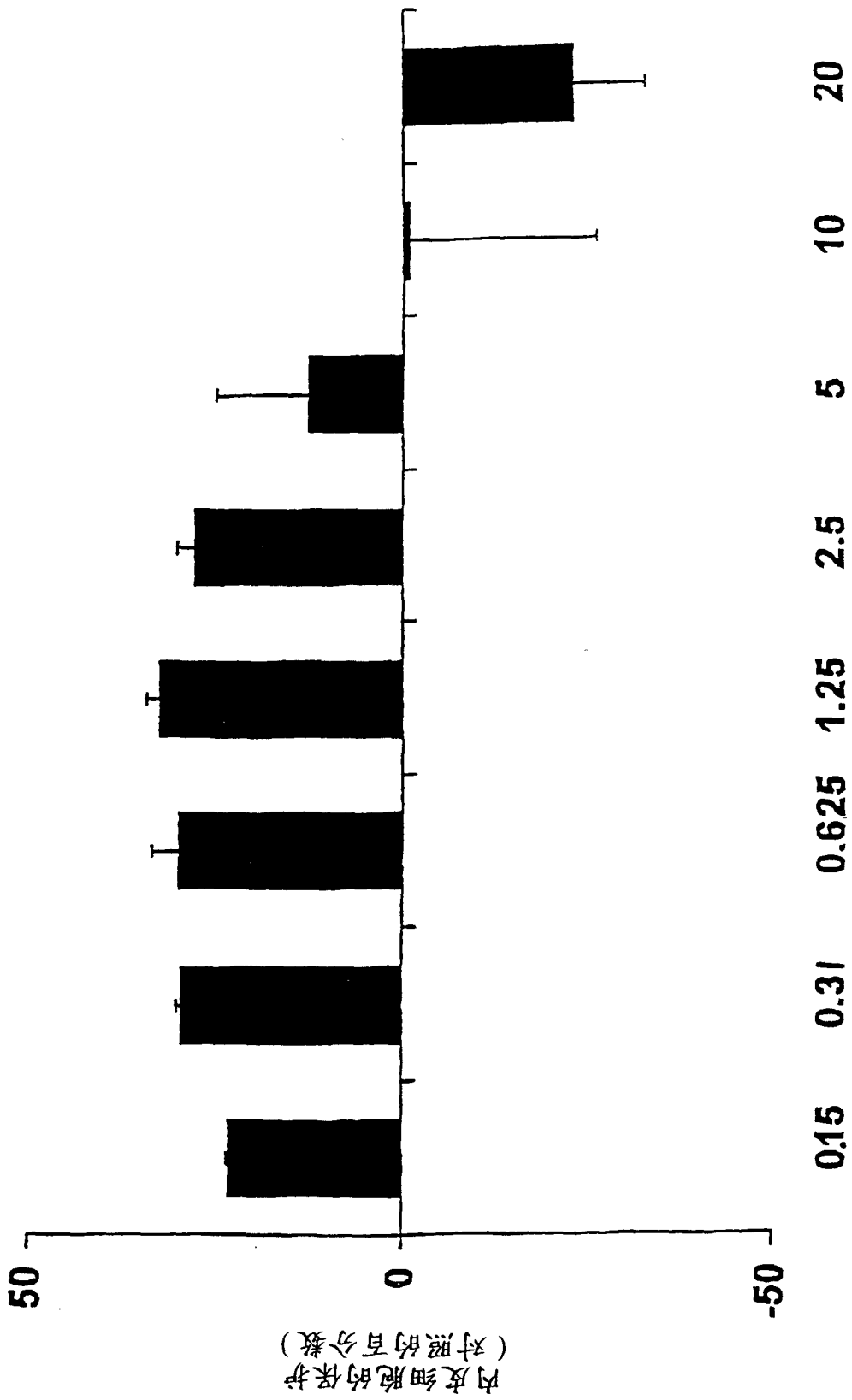


图 3 红细胞生成素 (单位/mL)

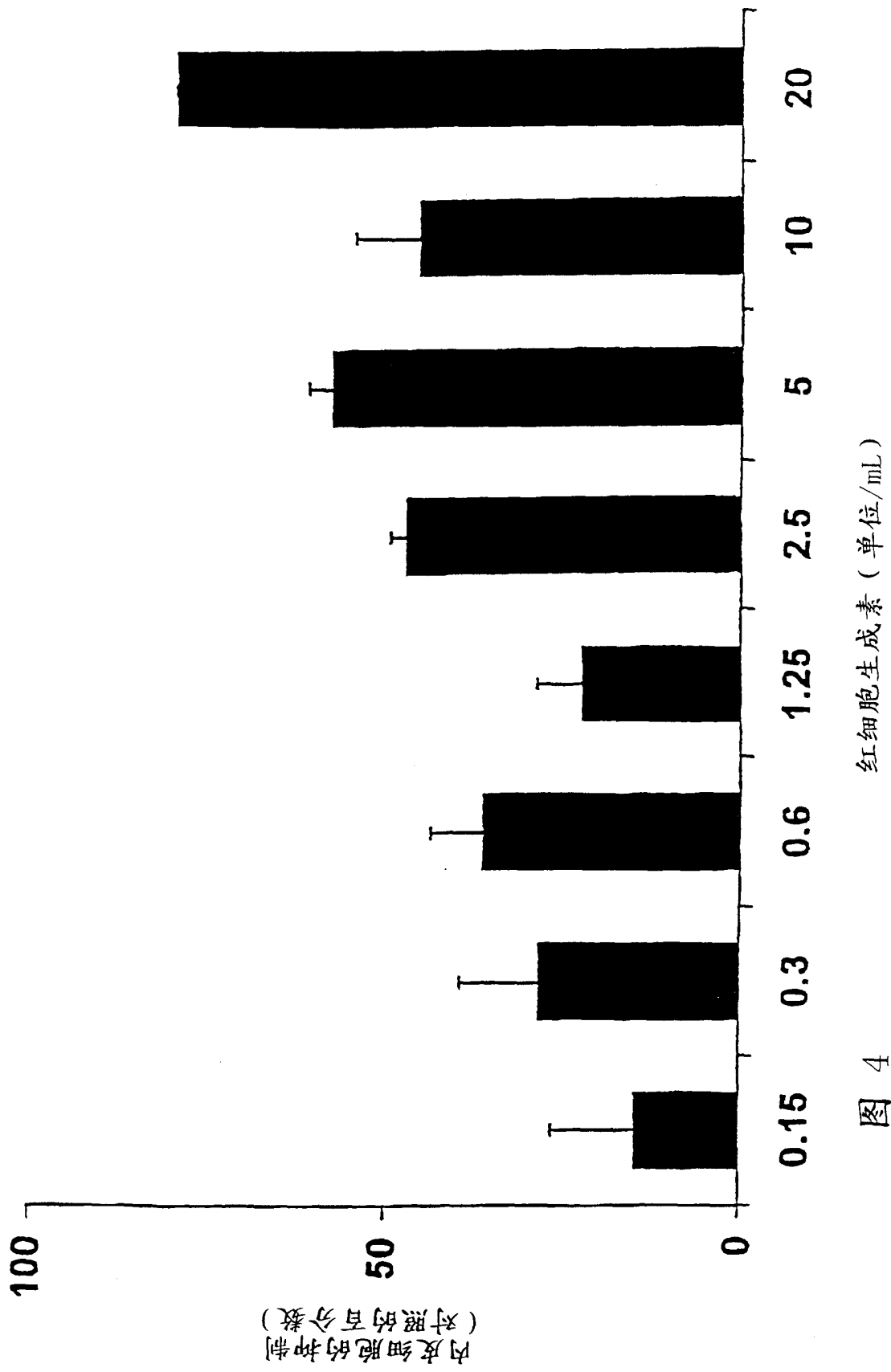


图 4