

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780036781.8

[51] Int. Cl.

A61K 31/77 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 16 日

[11] 公开号 CN 101534843A

[22] 申请日 2007.8.1

[21] 申请号 200780036781.8

[30] 优先权

[32] 2006.8.1 [33] US [31] 60/834,728

[86] 国际申请 PCT/US2007/017182 2007.8.1

[87] 国际公布 WO2008/016640 英 2008.2.7

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.1

[71] 申请人 普里克萨斯医药股份有限公司

地址 美国密歇根州

[72] 发明人 布鲁斯·E·马克哈姆

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 曹立莉

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 4 页

[54] 发明名称

泊洛沙姆用于预防和/或治疗心力衰竭的用途

[57] 摘要

本发明提供了治疗或预防受试者心力衰竭的方法，所述方法包括向有此需要的受试者给药治疗有效量的泊洛沙姆(例如，泊洛沙姆 188)。

1. 治疗或预防受试者心力衰竭的方法,所述方法包括向有此需要的受试者给药治疗有效量的泊洛沙姆。
2. 如权利要求1的方法,其中所述心力衰竭是缺血性心力衰竭。
3. 如权利要求1的方法,其中所述心力衰竭是慢性心力衰竭。
4. 如权利要求1的方法,其中所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188。
5. 如权利要求1的方法,其中给药泊洛沙姆-188恢复心脏中肌养蛋白水平。
6. 如权利要求1的方法,其中给药泊洛沙姆1至26周。
7. 在心力衰竭患者中恢复心肌细胞膜完整性的方法,所述方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。
8. 如权利要求7的方法,其中所述泊洛沙姆是P-188。
9. 在心力衰竭患者中改善心肌细胞膜功能的方法,所述方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。
10. 如权利要求9的方法,其中所述泊洛沙姆是P-188。
11. 在心力衰竭患者中改善舒张心功能的方法,所述方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。
12. 如权利要求11的方法,其中所述泊洛沙姆是P-188。
13. 在心力衰竭患者中降低细胞内钙水平并维持细胞内钙水平在正常水平的方法,所述方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。
14. 如权利要求17的方法,其中所述泊洛沙姆是P-188。
15. 在心力衰竭患者中降低左心室终末舒张压和增加左心室射血分数的方法,所述方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。
16. 如权利要求15的方法,其中所述泊洛沙姆是P-188。
17. 如权利要求16的方法,其中P-188每剂量的范围从0.15至480 mg/kg。
18. 如权利要求17的方法,其中P-188每剂量为约460 mg/kg。
19. 如权利要求15的方法,其中所述泊洛沙姆每1至15周给药一次。
20. 如权利要求19的方法,其中所述泊洛沙姆每1、2或12周给药一次。
21. 如权利要求19的方法,其中所述泊洛沙姆是P-188。

22. 在心力衰竭患者中降低左心室终末舒张压同时不增加左心室射血分数的方法, 所述方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。

23. 如权利要求 22 的方法, 其中所述泊洛沙姆是 P-188。

24. 如权利要求 23 所述, 其中 P-188 每剂量的范围从约 0.15 至 15 mg/kg。

25. 如权利要求 24 的方法, 其中 P-188 每剂量的范围从约 1 至 15 mg/kg。

26. 如权利要求 25 的方法, 其中 P-188 每剂量的范围为约 4.6 mg/kg。

27. 如权利要求 22 的方法, 其中所述泊洛沙姆每 1 至 15 周给药一次。

28. 如权利要求 27 的方法, 其中所述泊洛沙姆每 1、2 或 12 周给药一次。

29. 如权利要求 27 的方法, 其中所述泊洛沙姆是 P-188。

30. 测定受试者中密封剂的细胞膜封闭活性的方法, 包括测定和比较在给予受试者密封剂前血清中渗漏蛋白的水平和在给予受试者密封剂后相同渗漏蛋白的水平。

31. 如权利要求 30 的方法, 其中在给药密封剂前的渗漏蛋白的水平比给药相同密封剂后的渗漏蛋白的水平高。

32. 如权利要求 30 的方法, 其中所述密封剂是泊洛沙姆。

33. 如权利要求 32 的方法, 其中所述泊洛沙姆是 P-188 或 P-407。

34. 如权利要求 30 的方法, 其中所述受试者患有心力衰竭。

35. 如权利要求 34 的方法, 其中所述渗漏蛋白来自受试者心脏的心肌细胞。

36. 如权利要求 35 的方法, 其中所述渗漏蛋白是 N 末端 B 型利钠尿肽原、心肌肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I 或肌酸激酶 MB 亚型。

## 泊洛沙姆用于预防和/或治疗心力衰竭的用途

### 交叉参照相关申请

此申请要求于 2006 年 8 月 1 日提交的美国序列号 60/834,728 的优先权, 本文包括上述申请的全部内容。

### 发明背景

心力衰竭(HF)是心脏不能维持充足的血液循环所导致的综合征或临床症状。可为慢性或急性, 并具有多种病因, 包括缺血性梗塞或心肌梗塞。

根据美国心脏协会(American Heart Association), 估算 2005 年美国心力衰竭的总直接和间接花费为\$279 亿元。一段时间, 心力衰竭市场缺乏新药, 因为心力衰竭市场药物开发是晚期失败率最高之一。然而, 由于人口老龄化和心血管病患者生存增加, 导致心力衰竭的流行和发病率增加。这导致对新治疗的需求增加。美国心力衰竭市场预期从 2004 年的\$13.3 亿元增长到 2011 年的 \$43.3 亿元。市售产品包括血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂例如依那普利(Vasotec)和雷米普利(Altace)、 $\beta$ -肾上腺素能阻断剂 (ARBs)例如 Troprol 和 Coreg、一氧化氮增强治疗(BiDil)、血管紧张素 II 受体阻断剂例如代文(Diovan)和坎地沙坦(Atacand)、盐皮质激素受体拮抗剂例如 Inspra, 和重组人 B 型利钠尿肽(Natrecor)。还有一般正性肌力药(inotropes)、血管扩张剂和利尿药。新出现的治疗包括他汀类药(statins)、伴随钙增敏剂和 PDE 性质的正性肌力药、重组红细胞生成蛋白、 $\alpha$ -人利钠尿肽、加压素拮抗剂、晚期糖基化终末产物 (AGE) 交联裂解剂, 和黄嘌呤氧化酶抑制剂和其它。

在美国, 约有 5 百万的心力衰竭患者, 并且每年多于 285,000 人死于这种疾病 (美国心脏协会, Heart Disease and Stroke Statistics, 2006 更新, Dallas, TX)。患者的数量正在上升, 预期在 2011 年达到 1150 万 (Frost & Sullivan, U.S. Heart Failure Therapeutics Markets, F666-52, 2006; <http://www.frost.com>)。约 160 万的患者患有纽约心脏学会分级 III 级或 IV 级的心力衰竭, 包括具有中度至重度症状的人群。这些症状一般经过 3 至 10 年从 III 级进展到 IV 级, 其中患者可能使用最佳的药物治疗, 例如  $\beta$ -阻断剂、I 型血管紧张素 II 受体

阻断剂、血管紧张素 I 转化酶抑制剂、钙通道阻断剂和血管扩张剂。当其它的症状发生时,患者可能需要医疗装置例如植入式起搏器或除颤器,并且可能需要左心室辅助装置(LVADs)。除可能使用的 LVADs 外,这些治疗延长生命,但不能阻止或逆转心功能的衰退。在这种疾病的中期和晚期,患者经常由于呼吸急促伴随危险的左心室射血分数低(患有慢性心力衰竭或急性心力衰竭患者的急性代偿失调)而住院。这些患者需要 IV 类正性肌力药,以增加心肌的收缩力,IV 类利尿药以降低液体负担,和 IV 类血管扩张剂以减少外周血管阻力(ACC 2005)。然而,患者出院时伴有心力衰竭体征和症状,且在出院后 2 个月内,再入院率为约 30%,并且死亡率为 10%。见例如 Gheorghiade, M. 等人, *Early Management of Acute Heart Failure Symptoms, Cardiovascular Emergencies*, 2006, Omni, Atlanta, 2006 年 3 月 11 日。因此,急需治疗急性心力衰竭的更好的治疗方法。

心力衰竭表现为心肌功能障碍,例如心肌的异常收缩,例如舒张或收缩功能障碍。虽然几种治疗方法可用于治疗异常收缩,但是当前没有治疗方法用于治疗心肌舒张功能障碍,在约 230 万患者中可见这种功能障碍。尽管心力衰竭有各种病因,但在大多数患者中其症状是高度相关的,并且收缩和舒张功能障碍共存。见,例如, Dyer, G.S.M. 等人, *Heart Failure, Pathophysiology of Heart Disease* (L.S. Lilly 编), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2003, p. 234。心脏舒张功能障碍是由代偿的心室心脏松弛(充盈)导致,出现异常的心脏收缩和射血分数。见,例如, Zile, M.R. 等人, *Circulation*, 2002, 105:1387-1393。舒张性心力衰竭 (DHF) 最常伴随冠状动脉疾病、高血压、衰老和浸润性心肌病。当前对于慢性心脏舒张功能障碍的治疗没有一致的指导方针,而对于收缩-相关心力衰竭有 ACC/AHA 治疗作为指导方针。

心脏功能障碍可伴随心肌细胞膜中的肌养蛋白的丧失或缺少 (Takahashi, M. 等人, *Eur. J. Pharmacol.*, 2005, 522: 84-93; Yasuda, S. 等人, *Supra*; Kaprielian, R.R. 等人, *Circulation*, 2000, 101: 2586-2594; Toyo-Oka, T. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101: 7381-7385)。肌养蛋白是参与肌细胞中细胞组织并促进肌原纤维和肌膜 (肌细胞膜) 稳定性的结构蛋白。见,例如, Kaprielian, R.R. 等人, *Circulation*, 2000, 101: 2586-2594。遗传性的肌养蛋白缺乏或异常肌养蛋白水平分别是 Duchenne 型肌营养不良 (DMD) 和 Becker 型肌营养不良(BMD)的病因。在 DMD 和 BMD 中的心脏病表现为扩

张型心肌病 (DCM)、心律失常或两者均有。在到 6 岁的青年患者中发病率为 26%，并且导致这些患者一般在 20 岁早期死亡。约 20% 的 DMD 患者和 50% 的 BMD 患者死于心力衰竭。患有 DMD 或 BMD 的女性也存在心肌病的风险。对于患者，发病年龄不清，但认为是在成年发病。心脏损害范围从无症状至重度心力衰竭。见，例如，American Academy of Pediatrics, Clinical Report, *Pediatrics*, 2005, 116:1569-1573。

在肌细胞膜中的肌养蛋白也可被环境因素影响，例如病理性应激，包括儿茶酚胺给药、冠状动脉结扎导致的急性心肌缺血和心肌梗塞 (MI) 后的慢性心力衰竭。已明确在 MI 后在心力衰竭中有细胞内钙 ( $\text{Ca}^{+2}$ ) 的增加，伴随钙处理的变化，例如肌浆网(SR)细胞内钙去除受损，兰诺定(ryanodine)受体外漏、钠/钙交换体活性的降低，和受磷蛋白活性的增加伴随心脏松弛和收缩功能的损伤。见，例如，Morgan, J.P. 等人, *Circulation*, 1990, 81:III21-III32; Iwanaga, Y. 等人, *J. Clin Invest.*, 2004, 113:727-736; Zhang, X.-Q. 等人, *J. Appl. Physiol.*, 2002, 93:1925-1931; Wehrens, X.H. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103:511-518; Angeja, B.G. 等人, *Circulation*, 2003, 107:659-663。这些机理可作用于增加钙，最初导致钙蛋白酶(calpains) (钙激活蛋白酶) 和重塑通路的激活。钙蛋白酶的激活可导致膜的肌养蛋白的最初丧失，导致膜不稳定并易受收缩性应激影响。心力衰竭患者和动物心力衰竭模型的心肌细胞膜的肌养蛋白和肌养蛋白-相关蛋白的丧失已有充分记载。见，例如，Kawada, T. 等人, *Pharmacol. Therap.*, 2005, 107: 31-43; Kaprielian, R.R. 等人, *Circulation*, 2000, 101:2586-2594)。这些蛋白形成复合物，提供了对肌膜过度膨胀的机械阻力。这些蛋白的丧失与摄取膜不渗透的染料伊文思蓝(Evans Blue)的心肌细胞数量的增加相关。见，例如，Takahashi, M. 等人, *Eur. J. Pharmacol.*, 2005, 522:84-93。

此外，心肌炎模型中表明钙蛋白酶的增加，其中肌养蛋白的丧失与功能缺陷相关 (Lee, G.-H. 等人, *Circ. Res.*, 2000, 87:489-495)。

已表明在肌膜中的撕裂(tears)是钙进入细胞的导管，并增加细胞内钙。已提出导致细胞内钙持续增加的应激直接或间接的导致晚期心力衰竭，这之间存在恶性循环。见，例如，Kawada, T. 等人, *Pharmacol. Therap.*, 2005, 107:31-43。在此循环中，持续增加的钙激活钙蛋白酶分裂肌养蛋白。这导致更多的膜不稳定性，更多的撕裂和更多的钙。由于要求增加的作用导致剩余

的心肌细胞是应激的，因此它们也进入此循环。

ACE 抑制剂和 ARBs 是已表现出改善心脏血流动力学和患有心力衰竭的患者存活的药物。在心力衰竭的大鼠 MI 模型中，MI 后，推测通过降低总钙蛋白酶含量，这些药物都表现出阻止心肌细胞的膜碎片的肌养蛋白水平的降低。当梗塞后，用这些药物慢性治疗大鼠 2-8 周时表现出这种作用。见 Takahashi, M. 等人, *Cardiovasc. Res.* 2005, 65: 356-365。

细胞内钙的持续增加导致信号通路的激活也是确定的，随后导致心脏的不适重塑，导致功能性问题。见，例如，Molkentin, J.D. 等人, *Cell*, 1998, 93: 215-228; Wilkins, B.J. 等人, *Circulation Research*, 2004, 94:110-8)。

总之，肌养蛋白的丧失和膜的不稳定性导致心力衰竭中的心肌功能障碍。

#### 发明概述

本发明一方面涉及治疗或预防受试者心力衰竭的方法，其中所述方法包括向有此需要的受试者给药治疗有效量的泊洛沙姆(Poloxamer)。如本文所用，术语“治疗有效量”指可导致受试者病情或临床作用改善的泊洛沙姆的量。如本文所用，术语“受试者”指哺乳动物，并且包括例如人、大鼠或马。

在一些实施方案中，心力衰竭是缺血性心力衰竭。

在一些实施方案中，心力衰竭是由任何除肌养蛋白的遗传性丧失之外的应激物引起的。

在一些实施方案中，心力衰竭是慢性或急性心力衰竭。

在一些实施方案中，泊洛沙姆是泊洛沙姆 188 (下文表示为“P-188”)或泊洛沙姆 407 (下文表示为“P-407”)。

在一些实施方案中，泊洛沙姆恢复心力衰竭 (例如，慢性心力衰竭)所影响的组织中的细胞膜的肌养蛋白水平。组织和膜的实例分别包括心肌和肌膜。

在一些实施方案中，向有此需要的受试者给药泊洛沙姆 1 至 26 周，或所需要的时期，这由患有心力衰竭的受试者的病情决定。

在一些实施方案中，泊洛沙姆每 1 至 15 周给药 1 次。例如，泊洛沙姆可每 1、2 或 12 周给药 1 次。

在一些实施方案中，每剂量(或给药)泊洛沙姆约 0.15 至约 480 mg/kg (例

如, 约 1 至 15 mg/kg), 基于受试者体重。每剂量具体的实例包括约 1、4.6、10、100、400 mg/kg, 和 460 mg/kg。

本发明的另一个方面涉及改善心力衰竭受试者的心肌细胞膜功能的方法, 其中该方法包括向受试者给药治疗有效量的泊洛沙姆。术语“改善膜的功能”包括改善膜结构, 并因此预防膜撕裂或渗漏。适合的泊洛沙姆的实例包括 P-188 和 P-407。

本发明的另一方面涉及用于恢复心力衰竭受试者的心肌细胞膜的完整性的方法, 其中该方法包括向受试者给药治疗有效量的泊洛沙姆。适合的泊洛沙姆的实例包括 P-188 和 P-407。

此外, 本发明的另一方面涉及用于治疗患者伴随肌养蛋白缺乏的骨骼肌疾病的方法, 其中该方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。适合的泊洛沙姆的实例包括 P-188 和 P-407。

此外, 本发明的另一方面涉及用于在心力衰竭患者中降低细胞内钙水平并且保持正常的细胞内钙水平的方法, 其中该方法包括向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆。适合的泊洛沙姆的实例包括 P-188 和 P-407。

此外, 本发明的另一方面涉及在向患者给药治疗有效量的泊洛沙姆的几小时内, 左心室的快速和缓慢重塑。适合的泊洛沙姆的实例包括 P-188 和 P-407。

本发明还提供了在心力衰竭患者中用于降低左心室终末舒张压 (LVEDP) 和增加左心室射血分数 (LVEF) 的方法, 该方法包括向患者给药泊洛沙姆。适合的泊洛沙姆的实例包括 P-188 和 P-407。

本发明的范围也包括用于修复除心脏外的肌肉组织的泊洛沙姆 (例如, P-188 或 P-407) 的用途。肌肉组织可为, 例如, 骨骼肌。

本发明还提供了通过使用不超过 4.6 mg/kg 的治疗量的泊洛沙姆, 降低 LVEDP, 这与增加 LVEF 的作用是独立的。

除上述给药泊洛沙姆例如 P-188 或 P-407 外, 本发明的方法还可包括与其它物质的组合, 例如 ACE 抑制剂、ARB、 $\beta$ -肾上腺素能阻断剂、一氧化氮增强治疗、盐皮质激素受体拮抗剂、重组人 B-型利钠肽、钙通道阻断剂、血管扩张药、利尿药和正性肌力药。

本发明还提供了在受试者中密封剂(sealant)的细胞膜密封活性的测量方法, 所述方法包括给予受试者密封剂, 测量并比较在给予受试者密封剂之前

血清中渗漏蛋白(leakage protein)的水平和给予受试者密封剂之后相同渗漏蛋白的水平。

在一些实施方案中,在给予受试者密封剂之前渗漏蛋白的水平比给予受试者相同的密封剂之后高(例如,中度升高例如 200%,或显著升高例如 10 倍)。

在一些实施方案中,密封剂是泊洛沙姆(例如,P-188 或 P-407)。

在一些实施方案中,受试者患有心力衰竭。

在一些实施方案中,渗漏蛋白来自受试者心脏的心肌细胞(例如,N 末端 B 型利钠肽原(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide)、心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T)、肌钙蛋白 I(troponin I)或肌酸激酶的 MB 亚型(MB isoform of creatine kinase))。

下文为本发明的详述,仅用作说明目的,并且不应解释为以任何方式限制本发明的范围。所有出版物在此全部引用作为参考。

#### 附图简述

图 1 表明 P-188 对心肌细胞顺应性和细胞内钙的作用。

图 2 表明 P-188 对左心室终末舒张压的作用。

图 3 表明 P-188 对左心室射血分数的作用。

图 4 表明 P-188 对左心室终末舒张直径的作用。

#### 发明详述

本发明提供了通过使用治疗有效量的泊洛沙姆(例如,P-188)治疗或预防受试者心力衰竭的方法。这基于发现泊洛沙姆(例如,P-188)改善由 MI 引起的心力衰竭(由于它们与膜损伤区域的相互作用而产生,其中引起疏水区被暴露)中的心脏血流动力学,恢复细胞膜的完整性。

泊洛沙姆是非离子型嵌段共聚物,由聚氧丙烯的中心疏水链和侧面的聚氧乙烯的两个亲水链组成。因为可定制共聚物嵌段的长度,所以存在许多性质稍不同的不同型号的泊洛沙姆。这些聚合物通常称为泊洛沙姆,后跟数字,以表明所讨论的聚合物(例如 泊洛沙姆 407 或泊洛沙姆 188)。

泊洛沙姆 188 (P-188)是泊洛沙姆家族中的一种。它是非离子型三嵌段共聚物,化学式为聚(氧乙烯)<sub>80</sub>-聚(氧丙烯)<sub>30</sub>-聚(氧乙烯)<sub>80</sub>,分子量约 8,400

道尔顿。这种化合物有几个商品名,例如 Pluronic F68、RheothRx 和 FLOCOR。它的一些生物学用途包括作为几种市售轻泻药中的软便剂、作为化妆品中的成分,和作为药物乳化剂。见,例如, Ho, H.-O. 等人, *J. Controlled Release*, 2000, 68: 433-440。已表明 P-188 插入脂质单层 (Maskarinec, S.A., 等人, *Biophys. J.*, 2002, 82: 1453-1459), 并修复电损伤的细胞膜 (Lee, R.C., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:4524-4528)。也用于控释药物的递送, 用于使肿瘤对化疗敏化 (Kabanov, A.V. 等人, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54:759-779), 并作为基因治疗的载体。P-188 已处于镰状红细胞疾病的血管阻塞危象的 III 期临床实验 (Adams-Graves, P. 等人, *Blood*, 1997, 90:2041-2046; Emanuele, R.M., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 1998, 7:1193-1200), 并且在患有急性 MI (CORE)患者中评价溶栓活性 (Schaer, G.L., 等人, *Circulation*, 1996, 94:298-307; Chareonthaitawe, P., 等人, *Heart*, 2000, 84:142-148)。在这些实验中, P-188 的有效性是不明确的。当急性给予 P-188 高达 72 小时时, P-188 是安全的, 并且在反复暴露于儿童和成年人中是良好耐受的 (高达 6 次暴露)。见, 例如, Gibbs, W.J. 等人, *Ann. Pharmacother.*, 2004, 38: 320-324。在用 RheothRx(较低纯度的 P-188)的研究中, 最显著的不良反应为肾功能障碍, 然而, 在使用更纯形式的 FLOCOR 中没有发现 (Emanuele, R.M., *supra*)。P-188 在啮齿类的血浆中的半衰期是 7.5 小时, 并且在人受试者中是 18 小时, 在生物膜上的半衰期尚未确定。药物代谢动力学研究已表明低于 5%的纯化的 P-188 代谢为更高分子量和较低清除率的单一代谢物。肾清除是消除的主要途径。P-188 是非致突变的, 并且不引起染色体异常。

泊洛沙姆 407 (P-407)是泊洛沙姆更常用类型共聚物的亲水性非离子型表面活性剂。P-407 三嵌段共聚物, 含两个亲水性的嵌段(聚乙二醇), 它们被疏水性嵌段(聚丙二醇)分开。两个 PEG 嵌段的每个的大致长度为约 101 个重复单元, 而丙二醇嵌段的长度大约为 56 个重复单元。这种特殊的化合物也称为商品名 Lutrol F-127(BASF 公司)。

不同级别的泊洛沙姆 (包括 P-188 和 P-407)可容易地从商业来源获得, 例如, BASF。此外, 熟练的聚合物化学家也可合成所需性质和分子量的泊洛沙姆, 并且通过本领域已知的方法进行纯化。见, 例如, 美国专利号 RE 36,665, RE 37,285, RE 38,558, 6,747,064, 6,761,824,和 6,977,045。也见 Reeve,

L. E., Poloxamers; Their Chemistry and Applications, in *Handbook of Biodegradable polymers*, Domb, A.J. 等人 (编), Hardwood Academic Publishers, 1997。所有出版物在此全部引用作为参考。

可通过任何合适途径向有此需要的受试者给药泊洛沙姆, 例如, 口服或输注(静脉内)。本领域已知的实验可用于确定泊洛沙姆在治疗心力衰竭中的有效性, 例如, 通过测量 LVEDP 或 LVEF。

提供下列实施例以说明本发明并不用于以任何方式限制本发明。

### 实施例 1: 小鼠体外和体内的膜完整性和血流动力学研究

研究完整、单个、成人的心肌细胞的主动和被动力量(force)发育和膜中细胞内钙的功能实验方法在本领域是已知的。见, 例如, Yasuda, S. 等人, *supra*。此研究用于确定在单个的分离的 *mdx* 心肌细胞中细胞顺应性的主要缺陷, 这由对拉伸介导(stretch-mediated)的膜不稳定性和钙依赖的过度收缩的易感性增加证明。

如图 1 所示, 左图 A, 在舒张期的肌节长度 (SL) 的生理范围内 (1.80-2.20 mm), P-188 完全恢复 *mdx* 心肌细胞顺应性和细胞内钙至对照水平。如图 1 所示, 左图 B, 硝苯地平(Nifedipine), L-型钙通道阻断剂, 不能阻止拉伸引起的细胞钙水平的升高, 表明钙水平通过不同的机理升高。由于钙漏通道(calcium leak channels)不被拉伸激活, 所以钙必然通过另一种机制进入细胞, 例如, 通过膜上的显微撕裂。使用脂质染料实验证明了此观点。见, 例如, Yasuda, S. 等人, *supra*。对从金毛寻回犬(golden retriever) 肌肉肌养蛋白 (GRMD) 动物分离的心室肌细胞的前期研究 (见图 1, 中间图) 表明被动张力-拉伸曲线与对照犬心肌细胞相比显著向上向左移动。这证明来自 *mdx* 小鼠的心肌细胞中的显著的细胞顺应性缺陷比 GRMD 犬中显著得多。此外, 表明 P-188 (150 $\mu$ M) 恢复细胞的顺应性, 这可由被动张力-拉伸(passive tension-extension)曲线的形状和位置表明, 其几乎完全与对照相同 (见图 1, 右图, A 部分)。因此, P-188 作用的强度比在小鼠心肌细胞中大。

如图 1 所示, 右图, A 和 B, P-188 阻止 *mdx* 小鼠体内心脏功能障碍, 这与 P-188 阻止拉伸诱导的膜损伤的细胞作用一致。在 *mdx* 小鼠中, 基线左心室血液动力学行为被抑制, 包括左心室终末舒张容量(LVEDV)减少。

P-188 静脉内输注增加 LVEDV 至对照心脏水平。下表 1 所示是输注后

血液动力学数据的总结。表1中提供的血液动力学的变化指数表明急性P-188给药的主要作用是恢复终末舒张容量，不显著改变终末舒张压或其它参数，这与P-188对改善体外mdx心肌细胞顺应性的作用一致(见图1，左图)。心血管应激物可导致mdx小鼠的急性心肌病和衰竭(Danialou, G. 等人, *FASEB J.*, 2001, 15:1655-1657)。其中一种应激物，急性多巴酚丁胺应激攻击(challenge)，用于确定是否P-188可阻断这些体内事件。在30分钟的应激-检测方案中，未处理的mdx小鼠对多巴酚丁胺输注的血液动力学响应非常弱，且急性心脏衰竭显著发生(见图1，右图, C)。使用P-188的mdx动物预防治疗立即改善对多巴酚丁胺输注的血液动力学响应并保护多巴酚丁胺-诱导的体内急性心力衰竭( $P=0.005$ )。这些结果表明急性心力衰竭患者的P-188治疗改善心脏功能，并且改善正性肌力功能支持(inotropic functional support)。

表1. mdx小鼠中基线血液动力学数据总结(数据为均数 $\pm$  SEM)。

|                                 | C57BL/10<br>(n=13) | C57BL/10 + P-188<br>(n=7) | mdx (n= 13)      | mdx + P-188<br>(n=11) |
|---------------------------------|--------------------|---------------------------|------------------|-----------------------|
| 心率 (bpm)                        | 598 $\pm$ 13       | 600 $\pm$ 7               | 582 $\pm$ 10     | 585 $\pm$ 13          |
| 终末收缩容量 (mL)                     | 19 $\pm$ 2         | 19 $\pm$ 4                | 7 $\pm$ 1        | 13 $\pm$ 3            |
| 终末舒张容量(mL)                      | 36 $\pm$ 5         | 36 $\pm$ 4                | 22 $\pm$ 3       | 34 $\pm$ 3            |
| 终末收缩压 (mmHg)                    | 102 $\pm$ 4        | 111 $\pm$ 6               | 79 $\pm$ 3       | 76 $\pm$ 3            |
| 终末舒张压 (mmHg)                    | 5.3 $\pm$ 0.4      | 6.1 $\pm$ 1.4             | 5.8 $\pm$ 0.5    | 7.0 $\pm$ 0.4         |
| 每搏输出量(ml)                       | 19 $\pm$ 2         | 19 $\pm$ 3                | 16 $\pm$ 2       | 24 $\pm$ 2            |
| (dP/dt) <sub>最大值</sub> (mmHg/s) | 11,440 $\pm$ 660   | 13,390 $\pm$ 460          | 10,110 $\pm$ 619 | 10,880 $\pm$ 610      |
| (dP/dt) <sub>最小值</sub> (mmHg/s) | -11,420 $\pm$ 616  | -11,810 $\pm$ 440         | -8,140 $\pm$ 580 | -7,110 $\pm$ 390      |
| Tau (毫秒)                        | 7.64 $\pm$ 0.3     | 8.4 $\pm$ 0.8             | 8.6 $\pm$ 0.5    | 9.5 $\pm$ 0.7         |

## 实施例2. 高剂量的泊洛沙姆在MI大鼠心力衰竭模型中的心脏血流动力学的体内研究

在本研究中使用的大鼠MI模型中，结扎左冠状动脉前降支(LAD)产生大于40%的梗塞。大鼠在1-3周后稳定，并在第3周表现出显著的左心室功能障碍。这些大鼠(心力衰竭大鼠)MI后8周肌养蛋白丧失。对照包括未处理的心力衰竭大鼠和假手术动物，假手术动物中暴露LAD但不结扎。

治疗当天,大鼠经 30 分钟以 460 mg/kg 输注 P-188,并且心脏插管并监测 4 小时血流动力学。

与未处理的 MI 大鼠相比, P-188 治疗导致显著的: 1) LVEDP 降低,表明心脏松弛能力增加; 2) 在测量中 LVEF 显著增加(~45%),说明心脏收缩期间心脏排空其容量的能力; 和 3) 等容舒张 (LV -dP/dt)显著降低,所述等容舒张为检测压力的下降速率。心率(HR)、左心室收缩压 (LVSP)、左心室等容收缩(LV +dP/dt)和左心室终末收缩容量没有显著变化。测量得到的数据总结在下表 2 中。

**表 2. 未治疗和 P-188 (460 mg/kg)治疗的充血性心力衰竭(HF)大鼠的血液动力学参数**

|                 | HR (脉搏<br>/分) | LV SP<br>(mmHg) | LV EDP<br>(mmHg) | LV dP/dt (+)<br>(mmHg/秒) | LV dP/dt (-)<br>(mmHg/秒) |
|-----------------|---------------|-----------------|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 心力衰竭<br>(HF)    | 245±11        | 91±4            | 22±1             | 3574±363                 | 2572±247                 |
| 心力衰竭 +<br>P-188 | 214±18        | 87±7            | 15±2*            | 3100±286                 | 1767±249*                |

数据为均值±SE. 与心力衰竭组相比\*P < 0.05; 每组 N=6。

来自此研究的结果表明 P-188 对心脏血流动力学有作用。LVEF 增加约 45%是临床上有意义的。射血分数是终末舒张容量(作为每搏输出量射出)的百分数,并且衡量泵功能。可受血压(后负荷),血液回流至心脏的量(前负荷),心室容量和心率的影响。我们的数据表明由于 LVSP 不升高,所以 P-188 治疗不影响 HR,并且不增加后负荷。因此 P-188 对前负荷有作用,前负荷可受血液静脉回流至心脏和心肌顺应性影响。LVEDP 也受这些参数的影响,在我们的实验中 LVEDP 降低。静脉回流的显著下降应伴随血压的改变,但在 P-188 治疗中未见。此结果表明 P-188 增加工作心脏的顺应性。

**实施例3: 在使用低剂量的泊洛沙姆的 MI 大鼠心力衰竭模型中的心脏血流动力学的体内研究.**

在治疗当天,大鼠经 30 分钟以 4.6 mg/kg 输注 P-188,心脏插管并监测 4 小时血流动力学。一些动物通过超声心动图监测。

如图 2 所示,经 30 分钟使用 4.6 mg/kg 的 P-188 处理或未处理充血性心力衰竭 (CHF)和假手术对照大鼠,并在给药后监测 LVEDP 4 小时。在梗塞和治疗之间的 8 周内,未治疗的 CHF 大鼠表现出 LVEDP 升高 20 mm。与未处理的 CHF 动物相比,使用 4.6 mg/kg 的 P-188 治疗使 LVEDP 降低 9 mm Hg。该剂量的 P-188 治疗对假手术对照大鼠中的 LVEDP 无影响。

如上所述,以 460 mg/kg 剂量的 P-188 治疗 CHF 大鼠导致 LVEF 增加。在与未治疗的 CHF 大鼠相比,4.6 mg/kg 的 P-188 对 LVEF 无作用(见图 3)。此结果是令人吃惊的且完全出乎意料,因为以 4.6 mg/kg 剂量保持或甚至增加了对 LVEDP 的作用。

来自高和低剂量实验的结果表明 P-188 降低 LVEDP 的作用与对 LVEF 的作用是独立的。这些结果表明膜修复的显著增加可能是对 LVEF 的作用所必需的。因此,4.6 至 460 mg/kg 剂量范围的 P-188 治疗导致在 CHF 大鼠中 LVEDP 的降低,这是有统计学和可能的临床意义的。结果表明低于 4.6 mg/kg 剂量的 P-188 可有效降低 LVEDP。

除使用 4.6 mg/kg 的 P-188 治疗的 CHF 大鼠中 LVEDP 降低外,也观察到左心室终末舒张直径 (LVEDD)的降低(见图 4)。这种降低表明向正常的 LVEDD 移动。令人吃惊的事实是此测定是在治疗后 4 小时进行的。这种快速的心肌重塑是出乎意料的,并且如此快速的重塑未见于在之前报道的任何心力衰竭治疗。通过超声心动图观察到高剂量对 LVEDD 没有显著改变。其原因还需进一步证明,但可能是由于高剂量的 P-188 的非特异性作用可能遮盖了这类化合物的机理作用。

基于剂量,P-188 的独立作用是临床上有用的。在具有急性代偿失调发作的慢性心力衰竭患者中,LVEF 可能降低至危险的低水平。在这种患者中,大于 4.6 mg/kg 的 P-188 的剂量可用于增加射血分数,以帮助重建代偿状态。在患有慢性心力衰竭的稳定的患者中(足够高的射血分数),4.6 mg/kg 或低于 4.6 mg/kg 的 P-188 的剂量在维持左心室顺应性和维持心室直径方面是有用的。

#### 实施例 4. 在大鼠心力衰竭的 MI 模型中使用 P-188 慢性治疗心力衰竭

研究进行 18 周。下表 3 说明可能研究的设计和流程。特别的，在研究前大鼠适应 12 小时日夜循环 2 周。所用动物通过 MI 后的周数(W)标记组。使用 P-188 治疗表示为 T，并且 NT 代表未治疗。在研究开始时每组中大鼠数量以在 MI 后 1 周 25% 死亡率为界。在每个 16W 组进行血液动力学测定 (Hemo-meas.) (N=12)。收集所有剩余动物的心脏，并使用冰冷的缓冲液冲洗，并在下述其它实施例列出的实验中使用。从所有大鼠中收集血液样品，放入 EDTA 收集管中，待用。通过结扎左冠状动脉前降支 (LAD) 诱导心肌梗塞，如 Day, S.M. 等人, *Supra*; Tarnavski, O. 等人, *Physiol. Genomics*, 2004, 16: 349-360 所述；并修改模型。简言之，使用腹腔内注射氯胺酮(50 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)麻醉 Sprague-Dawley 大鼠 (250-300 g)，插管并使用 2% 异氟烷机械通气。进行左侧开胸术并用缝线环绕近端 LAD。结扎缝线，通过 LV 前壁的颜色变化(变苍白)确认阻塞。假手术对照不结扎缝线。对于 MI 大鼠，预期第 1 周死亡率约 25%。在 MI 后 9 周，代表接受 P-188 治疗或溶媒的 56 只大鼠如上述方法麻醉。涂有乌拉坦的抗凝血性血管插管插入颈静脉，并从颈背侧取出。插管充满生理盐水和肝素，并闭合（见，例如，<http://www.braintreesci.com/Thoracic.htm>）。在 MI 后第 13 周开始，这 28 只大鼠每日、每周、隔周或每月输注 P-188，剂量为 1 至 480 mg/kg (例如，约 4.6 mg/kg 或 460 mg/kg)，速度为 0.2 mL/Kg/分钟。

表 3. 存活过程(Life Procedure)设计

| 组            | 16W<br>NT | 16W<br>T | 16W<br>NT | 12W<br>NT | 8W<br>NT | 4W<br>NT | 4W<br>NT | 8W<br>NT | 12W<br>NT | 16W<br>T | 16W<br>NT |
|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| 组            |           |          |           |           |          |          |          |          | 16W<br>NT |          |           |
| 周            | 1         | 2        | 3         | 4         | 5        | 6        | 10       | 13       | 16        | 17       | 18        |
| # 大鼠         | 32        | 32       | 32        | 19        | 19       | 19       |          |          |           |          |           |
| # 大鼠<br>sac. |           |          |           |           |          |          | 14       | 14       | 42        | 28       | 28        |
| 流程           | MI        | MI       | 假手术       | MI        | MI       | MI       |          |          |           |          |           |
| # 大鼠天        | 8         | 8        | 8         | 8/3       | 8/3      | 8/3      |          |          |           |          |           |

| # 天/周                   | 4 | 4 | 4 | 2/1 | 2/1 | 2/1 |    |    |                   |    |    |
|-------------------------|---|---|---|-----|-----|-----|----|----|-------------------|----|----|
| 血液动力学测定<br>(Hemo meas.) |   |   |   |     |     | -   | -  | -  | 16W<br>NT<br>(12) | 12 | 12 |
| 心脏<br>其它                |   |   |   |     |     |     | 14 | 14 | 30                | 16 | 16 |
| 血清                      |   |   |   |     |     |     | 14 | 14 | 42                | 28 | 28 |

当比较多于两组数时，使用方差分析 (ANOVA) 检测是否存在组间显著性差异。当 ANOVA 表明不同组相互作用时，使用 Student's-Neuman-Keuls post hoc 检测确定两均值的显著性差异。均值来自至少 5 个观测的样品。设置概率低于 0.05。

**实施例5： 在慢性心力衰竭大鼠中测定对肌养蛋白水平的作用。**

已表明肌养蛋白缺乏显著影响生理负担下单个心肌细胞中的缓慢松弛行为。P-188急性改正这种松弛缺陷。见，例如，Yasuda, S. 等人, *supra*。

肌养蛋白从 MI 大鼠心肌细胞的肌膜上的丧失在 MI 后 8 周出现。了解这种丧失是否是进行性的是重要的，因为对 P-188 响应的大小可与膜易碎性和显微撕裂的数量直接相关。此信息可能对根据患者疾病史预测患者的结果有用。

在此研究中，根据 Dai 等人, *J. Biol. Chem.*, 2002, 276: 37178-37185; Molkentin 等人, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268: 19512-19520 中描述的流程，通过蛋白免疫印迹法(western blotting)和免疫组学方法评价肌养蛋白和其它膜蛋白。蛋白免疫印迹法用于测定心脏非梗塞区域中的细胞的膜碎片中的肌养蛋白。每个时间点分析最少 6 个 MI 心脏，在确定血液动力学参数后从动物中取出(见下)。制备肌膜碎片，冷冻细胞质碎片，并且储存在-80°C。在蛋白确定后，来自每个样品的相同量的蛋白在 6%或 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上跑胶，并用各自的抗体对聚偏氟乙烯(PVDF)膜和合适的蛋白产生印记。使用的抗体抗肌养蛋白、 $\alpha$ -sarcoglycan ( $\alpha$ -SG)、 $\beta$ -sarcoglycan、 $\gamma$ -sarcoglycan ( $\gamma$ -SG)

和  $\beta$ -肌养蛋白聚糖(dystroglycan), 所用抗体为市售(例如, 来自 Novocastra)。之前已表明肌养蛋白和  $\alpha$ -SG 在 MI 后 8-周降低, 而  $\gamma$ -SG 保持不变。见, 例如, Yoshida, H. 等人, *Cardiovas. Res.*, 2003, 59: 419-427)。使用这种  $\gamma$ -SG 作为加样对照。在 MI 大鼠中这些蛋白的水平与未手术和假手术对照心脏比较, 以确定肌养蛋白和  $\gamma$ -SG 随时间的相对降低。

MI 和对照心脏的非梗塞 LV 和隔膜在 5 体积的冰冷缓冲液 (300mM 苯甲磺酰基氟化物 (PMSF)、320 mM 蔗糖、1 mM EGTA、20 mM Tris-HCL pH 7.4) 中匀浆。匀浆液以 1000 X g 在 4 °C 离心 10 分钟。上清液以 8000 X g 离心 20 分钟, 并且获得的上清液在 4 °C 以 100,000 X g 重离心 20 分钟。获得的沉淀, 肌膜碎片, 在没有 PMSF 的缓冲液中重悬, 并测定蛋白浓度 (Yoshida, H. *Supra*)。上清液是细胞质碎片。如果膜碎片的数据不确定, 浓缩碎片, 通过电泳分离碎片并印迹分裂的产物或膜分裂蛋白。

进行免疫组学以确定是否膜肌养蛋白的任何变化反映了在一些心肌细胞中大的丧失或更一般的作用。将心脏冷冻在液氮中冷冻的异戊烷中。组织切成 4-10 $\mu$ m 的切片, 并在涂被组织切片粘合剂的载玻片上风干。未固定的组织切片在 25 °C 与一抗孵育 1 小时, 在缓冲液(1% 牛血清白蛋白/磷酸缓冲盐溶液(PBS))中清洗 3 次, 每次 10 分钟, 并且之后用荧光标记的二抗在 25 °C 孵育 1 小时。之后用缓冲液冲洗 3 次组织切片。之后组织切片包埋在 Vectashield (Vector Labs) 中, 并用共聚焦显微镜观察。每个组织切片拍摄数码照片。为了确认肌养蛋白的膜定位, 一些组织切片与纽蛋白抗体孵育, 并与肌养蛋白染色比较。

在印迹和抗体染色后, 通过增强化学发光可视化蛋白免疫印迹上的蛋白, 并且在 X-射线胶片上带显影。在胶片上的带通过光密度测定法定量, 并对  $\gamma$ -SG 标准化, 以进行不同胶之间的比较。通过考马斯亮蓝凝胶染色检查上样。对于蛋白免疫印迹, 需要等量的蛋白/泳道。冷冻切片的图片使用 Image Pro 图像分析软件分析。而后者用于确定跨越心脏非梗塞区的肌养蛋白/ $\alpha$ -SG 丧失的宽度。

如果后几次不再观察到这些蛋白水平的减少, 可能是改变太小而检测不到。在 MI 后的 8 周后不见显著的改变, 说明显著的膜稳定性的改变发生在早期, 并且 P-188 有效降低肌养蛋白水平(降低 25-30%), MI 后的 8 周后  $\alpha$ -SG 水平也降低 40-50%。

### 实施例 6: 膜渗漏的确定

在 MI 后 8 周, 在分离的细胞中表现出膜摄取非渗透性染料伊文思蓝 (EB) 表明肌膜心脏心肌细胞完整性的丧失 Kawada T., *supra*. (EB 染料与白蛋白形成紧密复合物, 并且这种复合物被损伤细胞摄取)。使用 EB 方法评价心脏和骨骼肌损伤在 Straub, V. 等人, *J. Cell Biol.*, 1997, 139: 375-385; Bansal, V. 等人, *Nature*, 2003, 423:168-172; Coral-Vazquez, R. 等人, *Cell*, 1999, 20: 465-474 中描述。

此研究的大鼠在表 2 中说明。在每个时间点, 从研究中取出动物(N= 6-7)并尾静脉注射灭菌的 EB 染料溶液。EB 染料溶解在 PBS (10 mg/ml) 中, 并且通过孔径为 0.2 mm 的膜滤器灭菌。大鼠注射 0.025 mL/g 体重的染料溶液, 在给药 EB 染料后 6 小时处死。在注射和处死期间, 大鼠饲养在标准实验室鼠笼中。用于显微 EB 检测的心肌组织切片在 -20 °C 的冰冷丙酮中孵育 10 分钟, 使用 PBS 清洗, 并用 Vectashield 包埋剂 (Vector Labs) 包埋。心脏组织切片用荧光显微镜观察, 其中 EB 染色区域为红色。拍摄所有组织切片, 并且分析照片以确定 EB 阳性和阴性细胞染色的区域。这些区域与假手术动物 (N=7) 和未手术动物 (N=12) 比较。

每个心脏, 包埋并拍摄 5-7 个 7-mm 的组织切片。使用 Image Pro 软件分析照片。描记 EB 染料染色的区域, 并定量描记的区域。描记区域面积对组织切片中非梗塞组织面积标准化。在不同时间点从心脏取相似的组织切片。以这种方式, 确定是否在 MI 后 EB 染色细胞数量增加。当多于两组数据比较时, 使用方差分析 (ANOVA) 检测是否两组之间存在显著性差异。当 ANOVA 表明各个组之间相互作用, 使用 Student's-Neuman-Keuls post hoc 检验以确定两个均值之间的显著性差异。均值基于至少 5 个观察的样品量。设置概率小于 0.05。

预期在假手术对照或正常 Sprague-Dawley 大鼠心脏中无伊文思蓝染色区域。在 MI 后 12 和 16-周, 预期缺乏抵抗力的细胞数量增加, 尽管不如在 4 到 8 周期间数量大。这可能是因为在在此模型中衰竭稳定期延长。

### 实施例 7: 慢性治疗对心脏血流动力学的影响

如上表 3 所列, 在 MI 后从 12 至 16 周, 大鼠插管并用纯化的 P-188(16

WT 组)或溶媒(16W NT)处理总共 4 周。16WNTS 组不插管或不接受溶媒。在 MI 后 16 周,麻醉这些动物,插管并机械通气。进行正中胸骨切开术,通过顶点将压力-容量传导插管插入 LV,以获得血液动力学数据,使用 ARIA 1 压力-容量分析软件 (Milar Instruments)分析。分析下列参数:最大 LV 射血分数、每搏输出量、 $dP/dT$ 、终末收缩容量、终末收缩压、终末舒张压、终末舒张容量和 $-dP/dT$ 。在测量后,处死动物并收集血液获得血清,心脏如特殊目标 2 免疫组学中所述进行冷冻。

根据 P-188 通过修复这些缺乏抵抗力的(compromised)区域而发挥作用的假设,可以预期在细胞死亡前, P-188 对心脏中更多缺乏抵抗力的细胞的作用更大。也预期如果更多细胞是缺乏抵抗力的,更多的肌养蛋白从膜上丧失。在此,我们将确定在研究的存活 16 周部分中缺乏抵抗力的心脏心肌细胞的数量是否增加。

我们预期 P-188,在慢性给药方法中,在 MI 后 16 周将改善 LVEDP 且由此改善舒张功能障碍。这些结果与 MI 后 8 周模型(急性给药)的结果比较,以开始研究重塑对 P-188 有效性的可能的影响。在高剂量 (例如 460 mg/kg),也预期 P-188 治疗通过增加 LVEF 改善收缩功能。无论此研究的结果如何,获得的结果提供对 P-188 有效性、治疗的患者类型和预期的临床结果的有意义研究。这些结果对于可能的临床实验的设计是非常重要的。

**实施例 8: 确定在大鼠中心力衰竭期间心肌损伤的血清标记物是否增加,和 P-188 治疗是否降低这些标记物的水平。**

有几篇文献报道说明一些心脏蛋白 (渗漏蛋白)的血清水平升高,没有急性缺血性事件或可检测的坏死位点证据 (Tschope, C. 等人, *J. Card. Fail.*, 2005, 11: Suppl. S28-S33; Nunes, J.P., *Rev. Port. Cardiol.*, 2001, 20: 785-788; Zhu, T. 等人, *Circulation*, 2005, 112: 2650-2659; Lowbeer, C. 等人, *Scand. J. Clin. Lab Invest.*, 2004, 64: 667-676. 在 Zhu, T. 等人, *supra* 中,这表明通过替换  $\delta$ -SG 和随后的在血清中 CK-MB 水平的下降,恢复了膜完整性。在 Nunes, J.P., *supra* 中,表明 TnI 可从心肌细胞释放,而膜没有完全破坏。这些论文表明可能渗漏一般与坏死损伤相关的标记物。认为这些标记物通过在心肌膜中的撕裂渗漏,这种撕裂是可修复的。因此,在 MI 后 4 至 16 周,在血清中这些标记物水平的增加,可为部分可修复的膜撕裂的测量。如果 P-188 通

过修复这些撕裂发挥作用，那么可预期这些标记物在血清中水平的下降，并且可作为 P-188 治疗的可能的临床机理生物标记物使用。

同肌养蛋白，和可能的来普汀(leptin)一起测定心肌损伤标记物心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、心肌肌钙蛋白 T (cTnT)、脑肌酸激酶和肌肉亚型(CK-MB 和 CK-M 和 CK-B)、脑利钠尿肽前体(proBNP)、心房利钠尿肽 (ANP)、肌球蛋白轻链 I (MLC-I)和心脏脂肪酸结合蛋白 (hFABP)的血清水平 (Schulze, P.C. 等人, *Clin. Chem. Acta*, 2005, 362:1-11)。大鼠 cTnI 和 hFABP ELISA(酶联免疫吸附测定) 试剂盒在 Life Diagnostic 有售，大鼠 BNP 来自 BioCat，大鼠 ANF 来自 Blossom Biotechnologies，并且大鼠瘦素来自几个商业来源。对大鼠 CK-MB、cTnT、MLC-1 和肌养蛋白的 ELISA 的建立的抗体是市售的。ELISA 的建立已经标准化，并且几个生产商使之成为试剂盒形式。它们的内容全部相似，但检测方法和流程不同，这依赖于使用的抗体类型。这些抗体的各自抗原也有售，并且可用于确定实验的敏感性和线性。在测定每只 MI 大鼠的血清之前，测定来自最少 20 只对照 Sprague-Dawley 大鼠的血清的每种蛋白，以设定基线范围。在处死前，两只正常大鼠接受 EB 染料染色 6 小时，以确定这种药物对心脏标记物范围的影响。在离心管中收集每只大鼠血液，见实验的存活部分，在处死时，在室温将红细胞凝集 15 分钟，并在台式离心机中以 1500 RPM 离心。冷冻血清并在-80°C 储存，直至使用。

收集每只动物血清，包括用 EB 染料处理的动物，以确定 EB 染料处理和未处理动物的标记物之间的任何固有差异。在每只动物血清样品中出现的标记物的量使用标准曲线定量，并表示为 mg/ml。对于 CK，确定心脏 MB 的量，和 CK-M 和 B 的量，从而表示为 CK-MB/CK<sub>总计</sub>的比值以精确反映缺乏抵抗力的心肌细胞。

如上所述，预期一种或多种的选择标记物在 MI 后 8 至 16 周表现出持续增加，并且 4 周的 P-188 治疗预期导致所有升高的标记物的水平降低，接近正常范围。此结果表明 P-188 刺激心肌细胞修复其肌膜，并为此生物标记物可用于临床实验提供了证据。

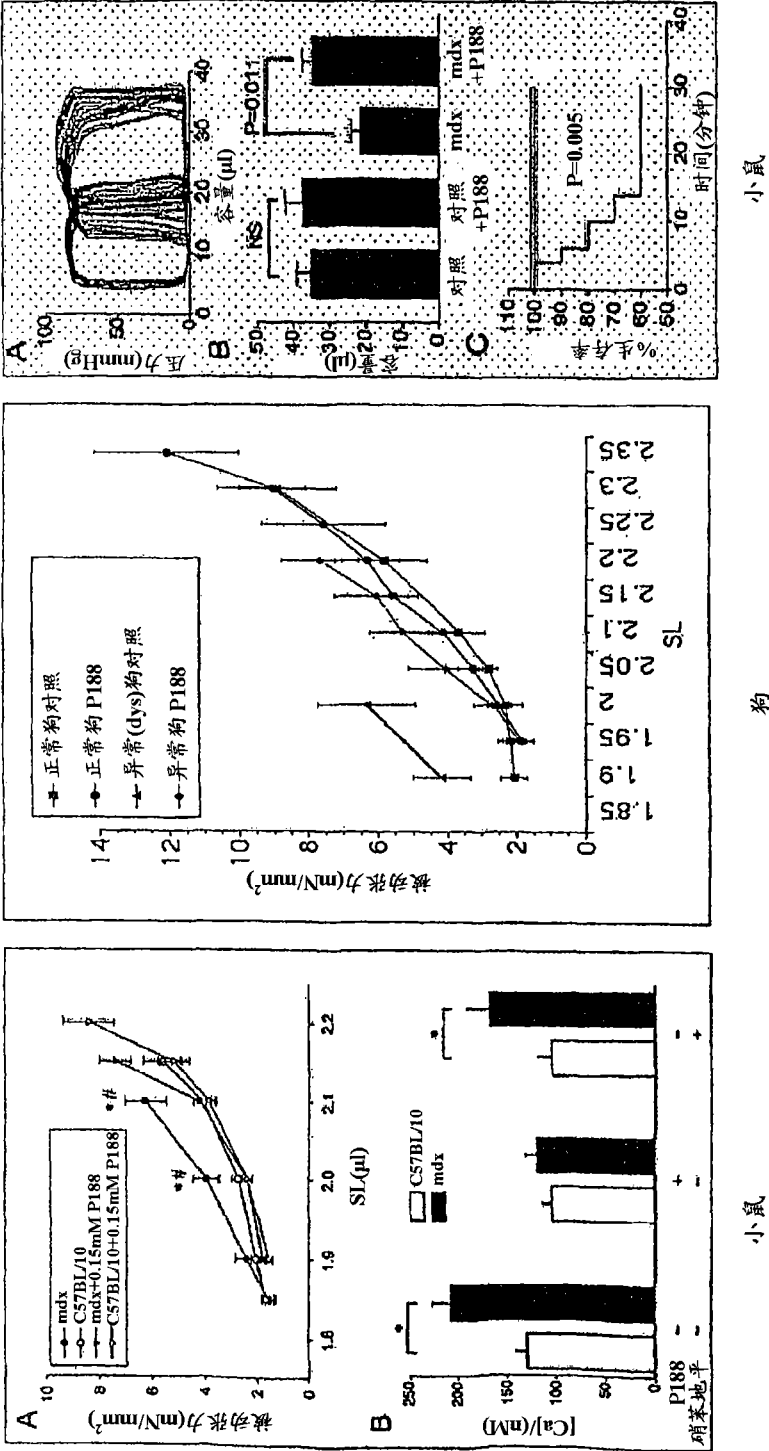
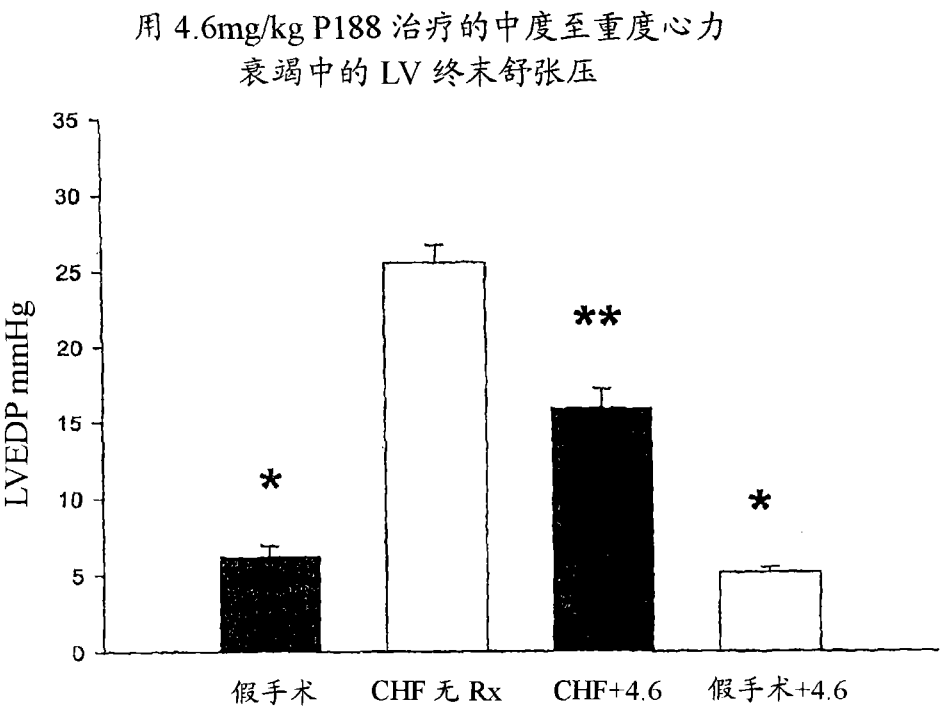


图 1



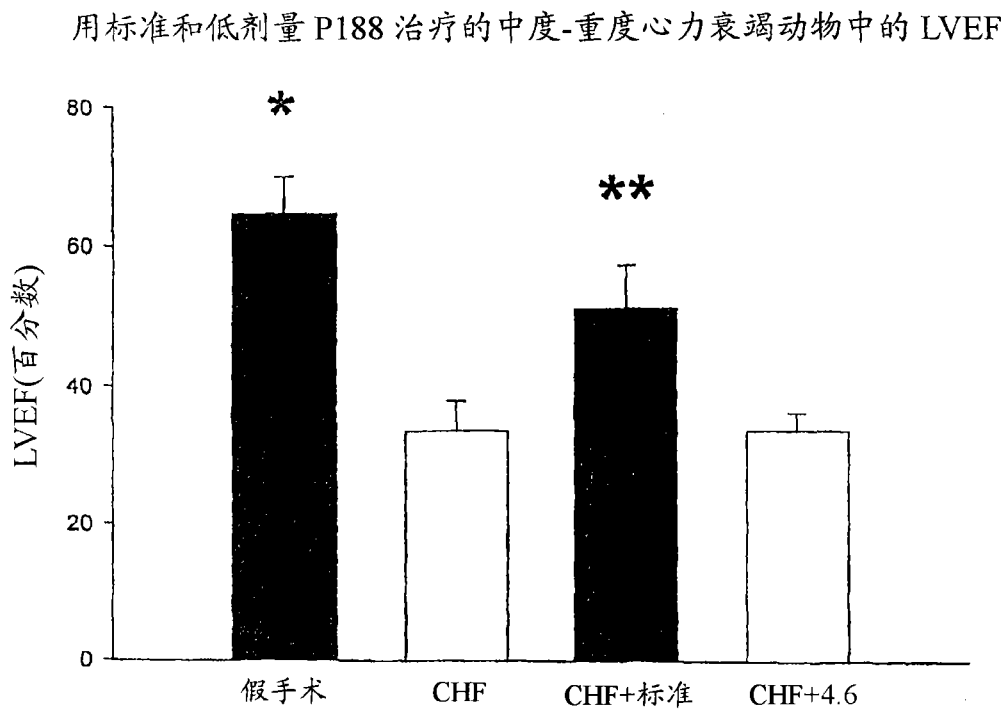
在假手术组、心力衰竭未治疗动物组(CHF 无 Rx)、用 4.6mg/kg P188 治疗的心力衰竭组(CHF+4.6)和用 4.6 mg/kg 治疗的假手术组中的 LVEDP(mmHg).

\* $P < 0.05$ , 与 CHF 无 rx 组和 CHF 4.6 组相比;

\*\* $P < 0.05$ , 与 CHF 无 Rx 组和假手术组  $\pm$  4.6 mg/kg 组相比.

数据为均值  $\pm$  SE, 假手术组  $n=4$ , CHF 组  $n=6$ , 4.6 假手术和 CHF 组  $n=11$

图 2



在 MI 后，用标准和低剂量(4.6mcg/kg)治疗 8 周，在中度-重度心力衰竭动物中的 LVEF(百分数)

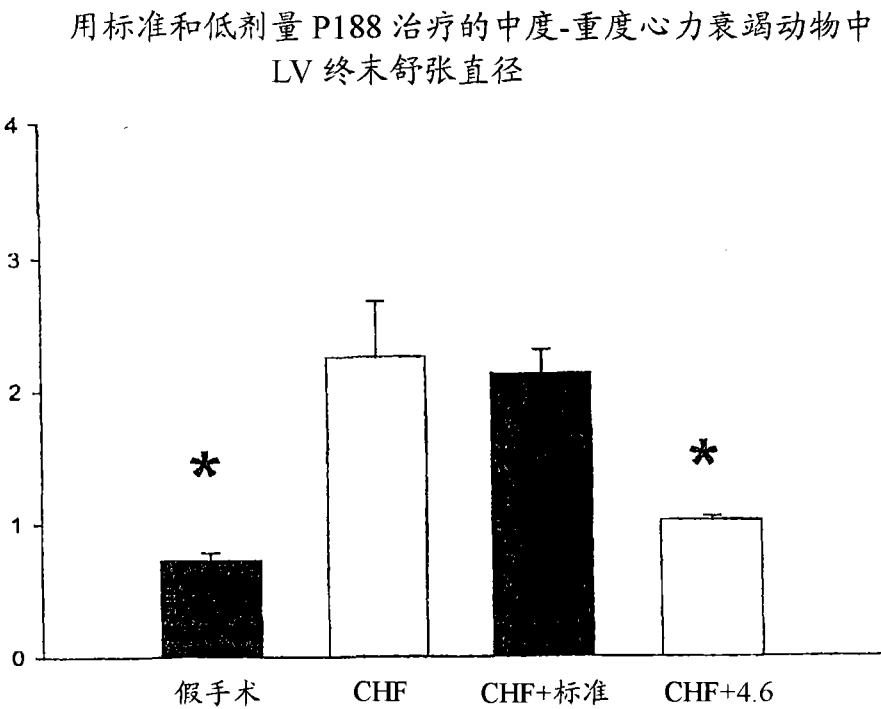
数据为均值 ± SE

假手术组 n=4, CHF 组 n=6, 标准组 n=6, 4.6 组 n=11

\*P < 0.05, 与所有组相比

\*\*P < 0.05, 与 CHF 组相比

图 3



在 MI 后, 用标准和低剂量(4.6mcg/kg)P188 治疗 8 周的中度-重度心力衰竭动物中 LV 终末舒张直径.  
数据时均值  $\pm$  SE, 假手术组 n=4, CHF 和标准组 n=6, 低剂量组 n=11  
\*P < 0.05, 与 CHF 和标准剂量组相比

图 4