

[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 200680034781.X

[51] Int. Cl.

A61K 9/72 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月29日

[11] 公开号 CN 101296692A

[22] 申请日 2006.7.27

[21] 申请号 200680034781.X

[30] 优先权

[32] 2005.7.22 [33] CU [31] 2005-0138

[86] 国际申请 PCT/CU2006/000007 2006.7.27

[87] 国际公布 WO2007/009404 西 2007.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.20

[71] 申请人 药物研发中心

地址 古巴哈瓦那

[72] 发明人 A·马诺兹塞尔纳达

J·C·加西亚罗德里古兹

Y·纳恩兹费古尔利多

Z·帕尔多卢兹

J·D·加西亚塞尔曼

I·索萨特斯特

D·库尔贝罗德里古兹

J·克鲁兹罗德里古兹

N·苏比洛斯玛提内兹

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 袁志明

权利要求书1页 说明书27页 附图14页

[54] 发明名称

用于治疗中枢神经系统疾病的含有低浓度唾液酸的重组人红细胞生成素的鼻用制剂

[57] 摘要

本发明涉及生物制药工业，特别涉及药物的开发，该药物拟用于治疗脑血管、神经变性和精神病学疾病，并含有有效成分重组人促红细胞生成素(rh-Epo)和低浓度的唾液酸。在rh-Epo生产过程中，当用(碱性)唾液酸保护小于40%的该糖蛋白分子时，获得的该糖蛋白有不同浓度的唾液酸，再这种情况下，以全身性途径给药它是无生物活性的并且被肝酶失活。令人意外地的是，发现经鼻施用的碱性rh-Epo比酸性rh-Epo具有更大的治疗益处。本发明的碱性rh-Epo鼻用制剂包括生物粘附性聚合物，其增加在鼻腔内的停留时间，从而提高其治疗效果。所述制剂也包括其它辅助性物质，例如防腐剂物质、表面活性剂、pH调节剂、等渗剂和蛋白质稳定剂。

1. 包含具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的鼻用制剂，其特征在于制成的形式通过鼻途径给药。
2. 根据权利要求1的包含具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的鼻用制剂，其特征在于制成的形式是滴鼻剂。
3. 根据权利要求1的包含具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的鼻用制剂，其特征在于制成的形式是鼻喷雾剂。
4. 根据权利要求1、2和3的包含具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的鼻用制剂，其特征在于使用生物粘附性聚合物，例如羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)和甲基纤维素(MC)。
5. 根据权利要求1、2和3的包含具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的鼻用制剂，其特征在于使用抗微生物的防腐剂，例如苯扎氯铵、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯。
6. 根据权利要求3、4和5的包含具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的鼻用制剂，其特征在于使用蛋白质稳定剂，例如L-色氨酸、L-亮氨酸、盐酸L-精氨酸和/或盐酸L-组氨酸和/或它们的盐。
7. 根据权利要求1的鼻用制剂，其用于治疗急性或慢性脑血管、精神病学或神经变性性疾病、新生儿缺氧、心血管原因引起的缺氧、事故、创伤、中毒、痴呆、记忆丧失、精神能力降低、精神退化、由疾病引起的神经学表现、生理系统的损伤或改变、疾病引起的精神病学表现、生理系统的损伤或改变、外周性疾病产生的神经学表现、外周性疾病产生的精神病学表现、癫痫产生的神经学表现。

用于治疗中枢神经系统疾病的含有低浓度唾液酸的 重组人红细胞生成素的鼻用制剂

技术领域

本发明涉及生物制药工业，特别涉及含有低含量(碱性)唾液酸的 rhEPO 鼻内药物的制备，其通过遗传工程开始于中国仓鼠卵巢细胞，用于治疗脑血管、神经变性和精神病学疾病。

背景技术

促红细胞生成素(EPO)是一种糖蛋白激素，其分子量在 34 kDa 范围内；该蛋白质部分由大约 166 个氨基酸组成；它产生于肾、肝脏和中枢神经系统的细胞中，并且它参与红细胞和其它造血细胞的增殖、分化和成熟。

1998 年，Sakanaka 和合作者报告了在沙土鼠的颈总动脉阻塞（一个全球性的缺血模型），接着将 rhEPO 注入侧脑室后，rhEPO 对抗体内缺血损伤的神经元保护特性。那些作者观察到对 CA1 海马神经元的缺血性损伤的减少。

rhEPO 的神经元保护作用可能归于不同的因素，包括：拮抗谷氨酸诱导的细胞毒性、增加抗氧化性酶的表达、减少自由基介导的一氧化氮(NO)的形成、使脑血流正常化、影响神经递质的释放、促进新血管发生、抑制兴奋性毒素或一氧化氮诱导的细胞凋亡、增加抗细胞凋亡基因的表达、神经营养作用、降低神经元兴奋性、脑抗炎作用、抑制 kainato 诱导的细胞凋亡和促炎性细胞因子的产生、血管原性和神经原性作用。此外，rhEPO 有助于缺血预调节。整体而言，这些原因可以证明 rhEPO 在治疗脑血管、神经变性、精神病学疾病中的应用。

rhEPO 的神经元保护特性能预防神经元死亡或使神经元死亡复原，神经元死亡成为许多中枢神经系统疾病，例如缺血、神经性创伤

和神经变性和神经元炎性疾病的特征性事件。

还描述了神经变性过程促使触发精神分裂症的生理病理学。这就是为什么神经元保护性药物可以是治疗该疾病的有效替代治疗。

一旦将生物暴露于某些病理学条件，例如低血糖症或强烈的神经元去极化，或由于线粒体产生氧-反应性物种，rhEPO 的表达显著增加。

另一方面，炎症过程通过不同的机理增加脑损伤，并且它们甚至直接局部抑制 EPO 的产生。事实上，即使在脑缺血后内源性产生 rhEPO，其表达也显著地受到炎性细胞因子的抑制。该抑制降低了 rhEPO 的神经元保护能力并证明了 rhEPO 的外源性施用对脑血管、神经变性或精神病学疾病特别有益。

此外，众所周知，rhEPO 分子对其受体 (receiver) 的亲合力 (并且，因此，对该分子的生理学反应的有效性) 与和它结合的唾液酸百分比反相关。

通过静脉内途径对脑缺血的鼠模型施用，rhEPO 的神经元保护作用 [LM Brines and cols, PNAS97 (19): 10526-10531, 2000] 减少了由缺血引起的损伤 50% 到 75%，并且在人类中产生类似的效果 (WO 0354475)。然而，使用酸性重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 的临床和实验结果还没有评估使用该分子对诱导红细胞生成的潜在负性中期影响，因为已知血脑屏障 (BBB) 的低渗透性和 CNS 中 rhEPO 受体的低亲和性，为了相对长时间获得有效的药理学效果，需要相对大量的 rhEPO。在这些条件下，人们冒增加血液粘度和增加溶血栓事件 (其导致大脑缺血) 的可能性的风险。已经报道了应用酸性 rhEPO 的这些负性结果是用该分子治疗的肾炎患者中的并发症。

为了开发出增加 BBB 渗透性 (其被认为是将物质结合至脑组织中的关键步骤) 的方法，已经进行了研究 (US 5260308; WO 8901343; US 4801575; US 5442043; JP 57146710 和 JP 01149718)。这些方法中的许多方法包括形成肽的缀合物的所谓的载体 (US 5442043)，或它们使用嵌合肽 (US 48015575) 来将物质结合到脑。已经报道过包含促红细

胞生成素的脂质体的制剂 (JP 08231417)。已报道了关于神经节苷脂的使用鼻内途径使分子达到 CNS (US 4639437)，以及关于神经元治疗药通过鼻粘膜对它们的吸收并随后通过神经嗅觉途径将它们输送到达脑 (EP 504263)。

存在几个涉及 rhEPO 液体制剂保护的专利，下面列出其中最具有代表性的专利：

液体制剂，其中使用的有效成分是 rhEPO 并且其中在任何情况下，蛋白质以可注射的形式提供（例如：CIPO-2041989；CIPO-2353553）。这种给药方式表明使用的 rhEPO 为酸类型，就是说，超过 40% 的分子为唾液酸所覆盖，否则它将被肝脏酶灭活，并且它在临床上不会有效。

专利 CIPO-2074820 使用鼻内途径来施用蛋白质。在该情况下，环糊精用作制剂的成分，并且同样追求 rhEPO 的全身性吸收，以至于蛋白质也是酸性的。

存在涉及使用生物粘附剂增加蛋白质在鼻腔内的停留时间的科学出版物 Polireddy D 和 cols, [International Journal of Pharmaceutics (127): 115 - 133, 1996]；然而，没有关于在含有 rhEPO 的制剂中使用生物粘附剂的报道。

专利 CIPO-2353553 证明了外源性施用 rhEPO 用于治疗大脑缺血，但与以前的情况完全一样，该研究是蛋白质直接或者间接有效地进入血流以便有效，以至于我们同样地在存在含有高含量唾液酸的 rhEPO。

专利 CIPO-2408685 覆盖了 rhEPO 的不同制剂，但在这种情况下，打算让它们用于治疗贫血，所以它是酸性 rhEPO，因为碱性 rhEPO 不能促进红细胞的增殖、分化和成熟。

专利 CIPO-2437333 详细说明了保护的制剂是起源于 α 促红细胞生成素，也就是起源于酸性 rhEPO。

在以前披露和文献中修订的所有情况中，提到的是酸性 rhEPO，而我们正在申请的专利打算保护起源于碱性 rhEPO 的液体制剂。

发明内容

在 rhEPO 的生产过程中，获得有不同含量唾液酸的糖蛋白。小于 40% 的其分子被(碱性)唾液酸保护的蛋白质正常被清除，因为它通过全身途径而不具有生物学活性。含有低含量唾液酸的这种碱性 rhEPO 代表了全部产生的 rhEPO 的 70%。令人意外地是，我们已发现鼻内施用碱性 rhEPO 能够比酸性 rhEPO 具有更高的治疗价值；本发明的结果使得能利用 rhEPO 的碱性同工型，其当时没有被回收而且容易获得。这代表了很大的经济优势，因为它允许回收在当时组成 rhEPO 生产的废物。

在初级卫生保健系统水平，在能走的基础上，该制剂可以用来治疗和/或预防中枢神经系统疾病，包括脑血管，神经变性和精神疾病。建议的溶液的优势包括使用具有低含量唾液酸的 rhEPO 用于允许在较小剂量下有更大保护作用的治疗目标。实现了治疗药快速到达作用部位，而这对在存在脑缺氧的情况下，获得满意的治疗效果是关键。在脑血管疾病的特殊情况下，在级联缺血的一些过程发生之前，在急性期从治疗干预开始是必要的。这称为治疗窗口期。

鼻内施用碱性 rhEPO 消除了诱导红细胞生成的危险。红细胞浓度的增加将增加血液粘度，从而使阻塞或出血事件后再灌注危险，以至于脑血流将减少并因此将阻碍氧和养分到达脑组织。

鼻内途径比其它施用形式有更大的优势，允许快速到达脑；它比静脉内或脑室内途径的侵入性更小，并且一定百分比的 rhEPO 能到达脑脊液而不必首先传到血流，这避免首过肝脏步骤代谢，从而防止了它随后失活。鼻内应用不是创伤性的并且消除了外科手术危险和其它由创伤性途径产生的可能并发症。它构成了在不损害 BBB 的条件下到达脑的可替代性途径。使用血管途径的可替代性的施用途径保证了分子经通过组织液的扩散，到达中枢神经系统的很少或无血液灌注的区域。

考虑到鼻内施用的主要限制之一是快速纤毛-诱导的粘液清除，本

发明采取了使用生物粘附性聚合物的策略，该生物粘附性聚合物增加了 rhEPO 在鼻腔内的停留时间。在制剂的开发过程中，为了获得具有物理、化学和微生物学稳定性（该稳定性自始至终保持其治疗特性）的制剂，也混合了其它的辅助性物质或赋形剂，例如防腐剂、张力活性剂、pH 调节剂、等渗剂和蛋白质稳定剂，所述自始至终保持其治疗特性。

使用的 rhEPO 在其分子中包含小于 40% 的唾液酸（就是碱性 rhEPO），其浓度在 0.5 到 2 mg/mL 的范围内。因此，提供的制剂为液体、无色、透明制剂，无机械杂质，表观粘度在 10 到 250 mPas 的范围内。使用了浓度 0.4 到 0.9% 的羟丙基甲基纤维素(HPMC)，0.2 到 0.8% 的羟丙基纤维素(HPC)，0.25 到 0.5% 的甲基纤维素（MC）作为生物粘附性聚合物。

主要使用浓度从 20 到 100 mM/L 的磷酸盐和柠檬酸盐缓冲液将 pH 值调节到 6.0 到 7.5 的范围。

渗透压可以用不同的等渗剂，除了其它的以外，例如氯化钠、甘露醇、山梨醇、葡萄糖调节，浓度范围为 0.05 到 10 g/L。

使用的防腐剂是：浓度从 0.01 到 0.02% 的苯扎氯铵联合浓度为 0.01% 的乙二胺四乙酸二钠、0.3 到 0.5% 的三氯叔丁醇、0.02 到 0.035 % 的对羟基苯甲酸甲酯和从 0.01 到 0.02 % 的对羟基苯甲酸丙酯。

为了避免蛋白质粘附到容器壁上，使用了非离子型表面活性剂，例如浓度范围从 0.01 到 1 g/L 的月桂酸聚乙烯山梨坦(吐温 20 到 80)、cremophor RH 40、三油酸山梨坦（司盘 35 到 80）。

使用不同的氨基酸作为蛋白质稳定剂，尤其是：L-色氨酸、L-亮氨酸、盐酸 L-精氨酸和盐酸 L-组氨酸，浓度在 0.1 和 10 mg/mL 的范围之间。在所有情况下使用的溶剂是注射用水。

在大鼠中进行鼻粘膜的刺激性试验，并且在该水平没有发现刺激的指征。这与该产物的优良耐受性一起为在人类中使用碱性 rhEPO 提供了毒理学的验证。

稳定性研究显示，蛋白质浓度与时间的适当行为。应用罗氏

(Lowry) 蛋白质含量测定法($\pm 10\%$)时, 建立了位于限度内的 pH。

附图说明

图 1. 酸性和碱性促红细胞生成素对 PC12 细胞的培养物中 GST 的酶活性的作用。该图显示神经起源的细胞如何通过改变 GST 酶的活性而对存在的 rhEPO 起反应。该图中的值代表了各自三个独立培养物的平均值。

图 2. 蒙古沙土鼠的脑缺血模型中, 对两性死亡率的作用。

图 3. 在圆筒中蒙古沙土鼠的运动-功能性活动。

图 4. 损伤后 24 小时, 动物的神经学状态。

图 5. 在单侧脑缺血后 5 周期间, 鼻内施用 rhEPO 对治疗动物体重的作用。

图 6. a 和 b. rhEPO 对脑水肿的作用。

图 7. 在沙土鼠的海马 CA1 扇形面中损伤的组织病理学得分。

图 8. 缺血损伤后沙土鼠海马的显微照片, 未治疗(A)和通过鼻内施用 rhEPO 治疗(B)。观察在治疗的动物中 CA1 扇形面的完整性。

图 9. 酸性和碱性促红细胞生成素对中枢神经系统组织中脂质 (lipodic) 过氧化物的保护作用。该图显示具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素如何减少了研究的大鼠脑中三个区域的匀浆中 MDA + 4 HDA 的产生 13%(0-23%)。该减少依赖于使用的剂量。在海马和小脑中观察到保护的最高水平, 其中已经检测到相当水平的 rhEPO 受体。

图 10. 对用 rhEPO 治疗组三个样品分析的血液学变量平均值行为, 与第一次抽样的正常范围 $X \pm 2SD$ 有关。

图 11. 具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素从鼻腔传递到嗅球和小脑。图中每一条代表了六只动物的平均值。该图显示具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素如何在至少 5 分钟内到达脑区域, 并随时间从脑的前面到尾侧区域逐渐减少。从应用起 60 分钟, 仍有一些 rhEPO 在嗅球和小脑区域。从应用 5 分钟, 80 到 85%之间的

到达脑的 rhEPO 在嗅球被检测到，而接近 20% 的在小脑被检测到。大约 30 分钟后，这些浓度几乎相等，并且 60 分钟后小脑有 30% 放射活性，并且嗅球只有 10%。

具体实施方式

工作实施例

实施例 1

具有低含量唾液酸的 rhEPO 的纯化

为了获得唾液酸含量小于 40% 的碱性促红细胞生成素，进行了三个基本色谱法步骤，从非常复杂和有大量污染蛋白质的材料开始，因为该材料含有 5% 胎牛血清。然后进行附加步骤以获得目标同工型。

为了碱性 rhEPO 的渗滤和浓缩，使用了实验室规模的超滤系统 (SARTOFLOW SLICE 200)，其与蠕动泵 (IP55 Watson-Marlow) 连接。使用 10 kDa 的 Hydrosart 膜。该工作以 1.9 ± 0.25 mL/min 流速、推进压力 (P1) 2.9 ± 0.25 bar、保留级分压力 (P2) 0.65 ± 0.1 bar 和跨膜 (TM) 压力 1.8 ± 0.2 bar 进行。为了测定蛋白质浓度，在 $\lambda = 280$ nm 使用 Ultrospec TM 3100 分光光度计。对渗滤过程，使用 pH 6.0 和电导率 3.25 ms/cm 的 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 的鼻内缓冲溶液。pH 值通过使用 Sartorius pH 计和 Omega 电导仪进行控制。发现该过程的收率在 75–95% 的范围内。

表 1 显示该过程的结果

时间 (h)	pH	电导率 (ms/cm)	浓度 (mg/mL)	混合的鼻内溶液的 体积 (mL)	实际体积 (mL)
0	7.12	14.29	1.72	-	290.0
6.0	6.5	4.5	1.3	800	-
12	6.0	3.5	2.1	1100.0	210.0

实施例 2

含有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其使用 HPMC 作为生物粘附性聚合物、盐酸组氨酸作为稳定剂、吐温 80 作为非离子型表面活性剂和苯扎氯铵作为防腐剂。

制备方法：

该溶液的制备从体积占制剂总体积 30% 的注射用水开始。该体积用于溶解防腐剂、缓冲剂和等渗剂。除此之外，在适当容量的容器中，放入体积等于制剂总体积的 15% 的注射用水，并加温至温度为 85 到 95℃，并且在剧烈的不断的搅拌下分散聚合物。一旦聚合物被湿润，将先前制备的溶液掺入其中，同时剧烈摇动直到全部匀化。然后为了掺入相应量的碱性 rhEPO、非离子型表面活性剂和蛋白质稳定剂，减少摇动。最后，用注射用水将体积加到制剂最终体积的 100%。随后通过 0.2 微米的乙酸钠纤维素膜将该制剂过滤，并且测试 pH 以验证其保持在确定的范围内。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
氯化钠	7.4 mg/mL
乙二胺四乙酸二钠	0.1 mg/mL
苯扎氯铵	0.2 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 3

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与前面的实施例相似，但使用甲基纤维素作为生物粘附性聚合物

制备方法：与实施例 2 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
甲基纤维素	3.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
氯化钠	7.4 mg/mL
乙二胺四乙酸二钠	0.1 mg/mL
苯扎氯铵	0.2 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 4

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与实施例 2 相似，但使用吐温 20 作为非离子型表面活性剂。

制备方法：与实施例 2 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL

磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 20	0.20 mg/mL
氯化钠	7.4 mg/mL
乙二胺四乙酸二钠	0.1 mg/mL
苯扎氯铵	0.2 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 5

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与前面的实施例相似，但有 1.2 mg/ml 的有效成分并且不含盐酸组氨酸作为蛋白质稳定剂。

制备方法：与实施例 2 相似，但不使用盐酸组氨酸。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	1.2 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 20	0.20 mg/mL
氯化钠	7.7 mg/mL
乙二胺四乙酸二钠	0.1 mg/mL
苯扎氯铵	0.2 mg/mL
注射用水	csp 1 ml

实施例 6

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与实施例 2 相似，但有 1.2 mg/ml 的有效成分并且不含盐酸组氨酸作为蛋白质稳定剂。

制备方法：与实施例 2 相似，但是没有使用盐酸组氨酸。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	1.2 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
氯化钠	7.7 mg/mL
乙二胺四乙酸二钠	0.1 mg/mL
苯扎氯铵	0.2 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 7

用于鼻内施用的基于具有低含量唾液酸的 rhEPO 的制剂，其与实施例 2 相似但含有对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯作为抗微生物防腐剂。

制备方法：

该溶液的制备从体积占该制剂总体积 30% 的注射用水开始。该体积用于溶解缓冲剂和等渗剂。除此之外，在适当容量的容器中，放入体积等于制剂总体积 15% 的注射用水，并加热至温度为 90 到 95℃。溶解对羟基苯甲酸酯类，然后在剧烈的不断的摇动下掺入聚合物。一旦聚合物被湿润，将先前制备的溶液掺入其中，同时剧烈摇动直到全部匀化。然后为了掺入相应量的碱性 rhEPO、非离子型表面活性剂和盐酸组氨酸，减少摇动。最后，用注射用水将体积加到制剂最终体积的 100%。随后通过 0.2 微米乙酸纤维素膜将该制剂过滤，并且测试 pH 以验证其保持在确定的范围内。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
氯化钠	7.5 mg/mL
对羟基苯甲酸甲酯	0.33 mg/mL
对羟基苯甲酸丙酯	0.17 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 8

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与前面的实施例相似，但使用甲基纤维素作为生物粘附性聚合物。

制备方法：与实施例 6 相似。

制成的形式的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
甲基纤维素	3.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
氯化钠	7.5 mg/mL
对羟基苯甲酸甲酯	0.33 mg/mL
对羟基苯甲酸丙酯	0.17 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 9

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与实施例 7 相似，但使用吐温 20 作为非离子型表面活性剂

制备方法：与实施例 7 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 20	0.20 mg/mL
氯化钠	7.5 mg/mL
对羟基苯甲酸甲酯	0.33 mg/mL
对羟基苯甲酸丙酯	0.17 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 10

基于具有低含量唾液酸的 rhEPO 的制剂，其与前面的实施例相似，但不含盐酸组氨酸作为稳定剂而且使用葡萄糖作为等渗剂

制备方法：与实施例 7 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	1.2 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL

吐温 20	0.20 mg/mL
葡萄糖	48.0 mg/mL
对羟基苯甲酸甲酯	0.33 mg/mL
对羟基苯甲酸丙酯	0.17 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 11

基于具有低含量唾液酸的 rhEPO 的制剂，其与前面的实施例相似，但用吐温 80 作为非离子型表面活性剂。

制备方法：与实施例 7 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	1.2 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
葡萄糖	48.0 mg/mL
对羟基苯甲酸甲酯	0.33 mg/mL
对羟基苯甲酸丙酯	0.17 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 12

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与实施例 7 相似，但使用三氯叔丁醇作为抗微生物的防腐剂。

制备方法：与实施例 7 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
氯化钠	6.2 mg/mL
三氯叔丁醇	5.0 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 13

基于具有低含量唾液酸的 rhEPO 的制剂,其与前面的实施例相似,但用甲基纤维素作为生物粘附性聚合物。

制备方法:与实施例 2 相似。

制成的制剂的组成如下:

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
甲基纤维素	3.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 80	0.25 mg/mL
氯化钠	6.2 mg/mL
三氯叔丁醇	5.0 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 14

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与实施例 12 相似，但使用吐温 20 作为非离子型表面活性剂。

制备方法：与实施例 2 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	0.8 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5.0 mg/mL
盐酸组氨酸	1.0 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 20	0.20 mg/mL
氯化钠	6.2 mg/mL
三氯叔丁醇	5.0 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 15

具有低含量唾液酸的 rhEPO 鼻用制剂，其与实施例 5 相似，但有三氯叔丁醇作为抗微生物的防腐剂。

制备方法：与实施例 2 相似。

制成的制剂的组成如下：

组分	比例
碱性 rhEPO	1.2 mg/mL
羟丙基甲基纤维素	5 mg/mL
磷酸二氢钠	2 mg/mL
磷酸氢二钠	0.7 mg/mL
吐温 20	0.20 mg/mL

氯化钠	6.5 mg/mL
三氯叔丁醇	5.0 mg/mL
注射用水	足量 1 ml

实施例 16

“体外”评价具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素鼻用制剂对神经起源细胞的刺激作用

为了证明 rhEPO 对神经起源细胞上的酶谷胱甘肽-S-转移酶(GST)比活性的诱导作用, 以及证明酸性和碱性重组人促红细胞生成素对神经起源的细胞具有相似的作用, 用 PC12 细胞进行了体外研究。在补充了 2mM L-谷氨酰胺、100 单位/毫升青霉素 G、100 微克/毫升链霉素(GIBCO)、含有 10 % (v/v) 10 mM Hepes 缓冲液的 DMEM 培养基中, 使细胞保持未分化。培养基用 10%的全马血清制备。将细胞加入 0,6 和 15 毫微摩尔重组人促红细胞生成素中, 其具有低含量的唾液酸(实施例 5 和 6)或是酸性(完全糖唾液酸化的(glycosilated))促红细胞生成素。作为对照, 将细胞加到相似数量的先前通过加热灭活的 rhEPO 中。将在这些培养基中获得的 GST 的比活性值看作 100 %。为了测定 GST 的比活性, 使用了用酸性或碱性 rhEPO 培养的细胞匀浆; 这是在 4°C、用 0.1 M 磷酸盐缓冲液, pH=6.95, 在完全用玻璃制造的匀化系统中进行的。该不含细胞的匀浆是通过在冷却的高速离心机中, 在 4°C、以 16000 X g 离心获得的。将如此获得的匀浆保持于冰水浴中并根据 Habig 的方法(Habig, W.H., Pabst, J.J., and Jakoby, W.B. 1974; Biol. Chem. 249 (22): 7130-7139), 用于测定 GST 的比活性。蛋白质的测定是通过 Bradford 的方法进行的(Bradford Anal MM. Biochem, 72, (176) 158)。获得的主要结果是神经起源的细胞通过改变 GST 酶的活性而对存在的 rhEPO 起反应。图(图 1)中的值代表三个独立培养物的平均值。对具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的反应与对酸性 rhEPO 的反应相似。

实施例 17

鼻内施用具有低含量唾液酸的 rhEPO 的治疗有效性

使用体重在 60 和 70 克之间的两性蒙古沙土鼠。在整个实验期间它们随意饮水和摄食,并保持 12 小时明亮与 12 小时黑暗交替的周期。

在用地西泮(5.0 mg/kg)作为前驱麻醉剂,通过腹膜内途径深度麻醉下,对动物进行永久性右颈动脉单侧阻塞。使用氯胺酮(47 mg/kg)和阿托品(0.02 mg/kg)作为麻醉剂。在立体镜下暴露右颈动脉,双重结扎并剪断。假手术动物用相同的操作制备,但没有结扎或剪断颈动脉。

对于临床和组织病理学评价,实验组是:

对照组: 分离颈动脉,没有任何其它操作(假手术)(n = 10)。

没有治疗的损伤动物组: 损伤的动物,没有经受其它任何操作(n = 20)。

有治疗的损伤动物组: 分离颈动脉,双重结扎并剪断,鼻内施用具有低含量唾液酸的 rhEPO (实施例 10)(n = 20)。

治疗包括 10 μ l rhEPO 或其赋形剂,每日每 8 小时应用于鼻腔,从手术后 1 小时直到手术之后的第 4 天。

根据从 2 到 5 等级,检查每一动物以确定其神经学状态,包括身体状况(corporal tone)、抓握力和姿势与行走的改变。没有病理学体征的存活动物在该等级中的值是 5。

该功能评价是通过观察动物的自发性探查活动进行的,即通过计数当啮齿类探查新容器时做出的身体用后腿站立动作(即,站在后爪脚尖上的情况)的数量。使用的容器是垂直圆筒状盒子,直径 30 厘米并且高 25 厘米。每一沙土鼠放于该盒子中央,并且计数 3 分钟间隔期间完成的用后腿站立的动作。

手术后 7 天,用在 pH=7.0 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中的 4% 甲醛溶液,通过左脑室灌注动物。取出脑并放于该溶液中数天。然后将脑包于石蜡中,切为 4 微米厚的薄片,并用苏木精和伊红染色。这些切片没有以前它们同一性的知识,以 10 x 和 40 x 进行评估。

对于脑水肿的评价,使用了体重 60 到 70g 之间,90 只雌性动物,

包含于 3 个实验组中：

假手术的动物 (n = 20)。

损伤未治疗的动物 (n = 35)。

损伤并治疗的动物(n = 35)。

在损伤后 3、12 或 24 小时，对动物进行麻醉并用盐水溶液灌注。从颅腔取出脑并彼此分离大脑半球。根据 Calapai 和 cols. 2000 描述的重量分析法，根据方程式： $\text{水}\% = [(\text{大脑半球湿重} - \text{大脑半球干重}) \times 100 \times \text{湿重}^{-1}]$ 进行水含量的测定。为了分析该数据，通过 Student 检验、方差分析（单因素检测）和多重比较的邓奈特(Dunnett)检验，对每一变量确定组和样品之间的差异。

为了评价动物体重，将雄性动物随机分入三个实验组中（每组 10 只动物），继之按照前面试验中使用的相同处理要点。在手术当日和之后连续 5 周（每周一次），使用 Sartorius 分级对动物称重。

在用经鼻施用 rhEPO 描述的实验期间，观察到在手术之后的数天期间，在治疗的两性动物中死亡率较低，如通过分析比例所证明（图 2）。

单侧结扎后 24 小时，部分动物在神经学状态上显示装模作样，其通过描述的检测显示并通过得分表示（图 3）。如可被观察到的，在损伤的未治疗动物中，出现了明显的功能性损伤。运动-功能性探查活动在未治疗的缺血动物中出现抑制（图 4），而在用 rhEPO 治疗的动物中，该活动与对照保持类似。

在永久性单侧缺血模型中，损伤并鼻内施用 rhEPO 对动物体重的作用显示于图 5。损伤并治疗组的损伤动物组和假手术组之间的比较显示了不同行为的重量曲线。与损伤、未治疗动物体重减轻对比，对照组和损伤治疗组有相似的曲线。在数周的过程中，该组不能超过实验开始时的平均重量。

在于脑水肿减少的该结果是由于鼻内施用 rhEPO，其在全部治疗的动物中防止形成脑水肿提供了明显的保护（图 6, a 和 b）。事实上，没有发现在用 rhEPO 治疗的动物和对照之间水含量的不同。在损伤的

未治疗的动物组中，发现了正相反的对立的情况，其中在损伤的（右）大脑半球中水含量在研究的所有时间内（3，12 和 24 小时）增加，并且发现在损伤后 24 小时高度显著性（ $p < 0.001$ ）。

在组织病理学发现方面，有完整脑的动物的频率在对照动物中大于未治疗的动物（ $p=0.002$ ），并且在用 rhEPO 治疗的动物中也比在未治疗的动物中大（ $p=0.03$ ），（图 7）。

未治疗的动物受全身性水肿和整个右半球核固缩，以及右侧海马伞和右半球顶叶皮层、右半球中水肿性区域和密度、弥散性染色质、海马中固缩神经元出血的影响（图 8）。

实施例 18

在大鼠的海马、脑皮质和小脑的解剖区域的匀浆中，具有低含量唾液酸的碱性重组人促红细胞生成素（实施例 10）的抗氧化能力的体外评价。

为了证明酸性和碱性 rhEPO 二者能对抗大鼠脑匀浆中的丙二醛（MDA）和 4-羟基烯磺（hydroxyalkenals）（4HDA）的产生，进行了体内实验。为此目的，使用了体重在 180 到 200g 之间的雄性 Wistar 大鼠（ $n = 15$ ）。在整个实验期间，动物随意摄取水和食物并生活于 12 小时明亮与 12 小时黑暗交替方案下。应用以获得解剖区域的方法学如下：

通过颈脱位法和断头术处死动物，快速将脑从颅腔中取出并且将该组织立即冷冻至 -70°C 。在立体定位图的帮助下，解剖每只动物的海马、脑皮质和小脑（Paxinos, G., 和 Watson, C., 1986. Academic Press, New York. pp 230-259）。将这些区域的每一个都形成一个池并且制备每一区域的匀浆，其中每份磷酸盐缓冲液 0.1M pH=7.0 中含有 1:8 份的组织。无细胞的液体是通过在 4°C ，10000g 离心 30 分钟获得的。匀浆保持于冰水浴中，直到使用 Labo Med, Inc. 的 Spectro UV-VIS RS 数字分光光度计测定酶活性。获得的主要结果是具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素减少了研究的大鼠脑中三个区域的匀浆中 MDA + 4 HDA 的产生 13%（0-23 %）。该减少依赖于使用的剂量。在

海马和小脑中观察到保护的最高水平，其中已经检测到相当水平的 rhEPO 受体。酸性和碱性 rhEPO 的反应是相似的（图 9）。

实施例 19

应用 90 000 IU 具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素（根据实施例 6 中的制剂）不诱导显著的红细胞生成反应。

为了证明在试验中使用的具有低含量唾液酸的碱性重组人促红细胞生成素在体内没有任何明显的红细胞生成活性，在用 10 只动物（5 只施用 rhEPO 和 5 只对照）的对比研究中，使用 90 000 IU 剂量评估了其对蒙古沙土鼠的红细胞生成的作用。监测所有动物（施用前、施用后 7 天和施用后 14 天），使用 *Micros ABX* 自动计数器来处理样品，在全血（10 μ L EDTA，占 10%/mL 血液）中进行完全的血象。使用基于 Windows 的统计软件包 SPSS，设置 $p=0.05$ 作为置信水平，来处理变量。获得下面的结果（表 1）。

表 1. 获得的不同组的血液学参数

		样品					
		1		2		3	
		X	SD	X	SD	X	SD
1 组	HB (g/dL)	13,3	1,1	13,2	0,7	12,8	0,9
	ETO ($10^6/\mu\text{L}$)	7,82	0,95	8,04	0,54	7,63	0,59
	HTC (%)	41,9	4,5	43,2	2,8	41,4	3,6
	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	612	214	670	101	761	75
	VCM (fL)	53	1	54	1	54	1
	HCM (pg)	17,0	0,7	16,4	0,3	16,8	0,2
	CHCM (g/dL)	31,7	0,9	30,5	0,5	31,0	0,6
	LEUC ($10^3/\mu\text{L}$)	9,7	4,9	8,8	3,6	6,0	2,8
	RETIC (%)	1,6	0,7	1,9	0,8	3,0	1,3
	RETIC ($10^6/\mu\text{L}$)	0,12	0,05	0,16	0,07	0,22	0,09
	2 组	HB (g/dL)	13,4	0,5	14,3	0,3	13,3
ETO ($10^6/\mu\text{L}$)		8,21	0,55	8,82	0,41	8,13	0,45
HTC (%)		43,4	2,4	48,1	1,1	43,9	1,7
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)		503	213	673	197	714	134
VCM (fL)		53	2	55	2	54	2
HCM (pg)		16,4	0,9	16,2	0,6	16,4	0,8
CHCM (g/dL)		31,0	0,9	29,7	0,5	30,4	0,7
LEUC ($10^3/\mu\text{L}$)		5,4	1,2	4,9	0,9	5,1	0,9
RETIC (%)		1,3	0,6	1,6	0,5	2,1	1,3
RETIC ($10^6/\mu\text{L}$)		0,11	0,05	0,14	0,04	0,17	0,10

通过抽样 $p=0.05$ 和 $n=10$, 每一血液学参数的群体分布显示为正态分布。在方差均一性分析中观察到, 一般来说, 方差有均匀的行为,

抽样 I 中的 HB 和 HTC 除外，也就是 LEUC。在比较不同抽样中组的血液学变量的方差时，观察到在抽样 II 的 HB, ETO, HTC 和 CHCM 中的差异，其中对照组和治疗组之间的差异得到证明。在比较每一组的抽样之间的方差时，观察到对照组的 CHCM 中的差异（抽样 I 对抽样 II），而治疗组显示在 HB 和 HTC（抽样 II 对抽样 I 和 III）和 CHCM（抽样 II 对抽样 I）中的差异。为了评价抽样引起的上述变量的组间差异，抽样 I 作为比较的参比抽样。考虑到在组间和抽样间显示了一些统计学差异 $p = 0.05$ ，决定对获得的数据进行更整合的评价；为此目的，将抽样 I 的值归类，计算在动物还没有治疗的时刻 $n = 10$ ，和该群体的范围 $X \pm 2 SD$ ，然后对每一变量的平均值的行为作图（图 10）。这些变量的平均值同样与对于该物种其他作者报道的那些比较，然后确定在所有组和抽样中，获得的值与文献中报道的那些相似（表 2）。

即使统计学比较显示变量 HB、ETO 和 HTC 在抽样 II 中显著增加，在根据在文献(Handbook of Care and Use of Experimental Animals, Canadian Council for Animal Protection. Volume 1, 第 2 版. 1998)中报道的正常范围 $X \pm 2 SD$ 和平均值分析该行为时，人们能够注意到该行为缺少生物学显著性，以至于人们能够得出结论：具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素在研究的物种中不诱导任何显著的红细胞生成反应。

表 2. 沙土鼠的正常血液学值。

参数	沙土鼠的正常血液学值
ERIT ($10^6/\mu\text{L}$)	8.5 (7.0-10.0)
Hb (g/dL)	15.0 (12.1-16.9)
PCV (L/L)	0.48 (0.41-0.52)
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	638
LEUC.T ($10^3/\mu\text{L}$)	4.3-21.6
中性白细胞 ($10^3/\mu\text{L}$)	0.3-4.1
淋巴细胞 ($10^3/\mu\text{L}$)	3.2-9.7
血液 V. (mg/kg)	60-85

实施例 20

具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素的 I¹²⁵ 标记

为了确定通过鼻内施用具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素(实施例 3 和 5)至中枢神经系统区域的传递,根据来自美国伊利诺州 61105 Pierce, Rockford 的商业方法(YODOGEN),用碘 125 标记 rhEPO。从该放射性标记开始,制备鼻内制剂。使用了总共 18 只体重 180 和 200g 之间的雄性 Wistar 大鼠。动物通过鼻内施用该标记有 I¹²⁵ 的具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素制剂进行治疗。每一动物接受鼻内施用 5 到 100 微升该制剂。以 5、30 或 60 分钟间隔,动物在麻醉下通过断头术处死。将脑快速取出(在少于 70 秒内)。提取嗅球和小脑区域。用 γ 计数器进行放射性计数。获得下面的结果:应用具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素,在至少 5 分钟内到达脑部区域,并且它从脑的前面到尾侧区域逐渐随时间减弱。从应用起 60 分钟时,在嗅球和小脑区域仍然有一些 rhEPO。这些结果表明大约 1-5%之间的鼻应用的 rhEPO 到达脑。在嗅球中检测到 80 和 85 %之间的到达脑的 rhEPO,而从应用起 5 分钟时,在小脑中检测到接近 20%。在 30 分钟之后,这些浓度几乎相等,并且 60 分钟后小脑有 30% 的放射活性,而嗅球只有 10%。在小脑区域存在标记的分子表明通过了 BBB;另一方面,在与嗅觉途径(小脑)不相关区域水平的分子检测表明不仅嗅觉途径参与了分子到脑的传递,而且更为普遍、更快的机制,可能通过粘液扩散并随后透过特别地存在于斑点筛板(*macula cribosa*)区域中嗅觉上皮区域中的间断,其允许具有低含量唾液酸的重组人促红细胞生成素到达远离嗅觉途径的区域。图 11 中的每一条代表了六只动物的平均值。

实施例 21

碱性 rhEPO 对兔蛛网膜下腔出血的作用

对重量在 3 到 4kg 的雄性新西兰兔进行试验,用肌肉内注射氯胺酮 40 mg/kg 进行麻醉。稍后,从耳的中央动脉抽取 5ml 血液,并通过

经皮途径注射进小脑延髓池。监测动物 72 小时。

将兔分为 3 个实验组，每组 8 只动物：

I 组：对照动物。

II 组：损伤动物。

III 组：损伤动物+碱性 rhEPO 20 μ g (实施例 5)。

在诱导蛛网膜下腔出血后 5 分钟进行施用碱性 rhEPO，并在 72 小时期间每 8 小时进行重复。

为神经学评价，根据 Grasso G, 2002，在试验期间跟踪动物的运动-功能性行为。

结果显示于表 I 中。观察到在对照动物(未损伤)和用碱性 rhEPO 治疗的动物中，比损伤的未治疗动物更好的运动-功能性行为。

诱导出血后 72 小时观察的神经学评价				
组	神经学评价分级			
	1	2	3	4
对照动物	8	0	0	0
损伤动物*	0	0	2	6
损伤动物 + 碱性 rhEPO	6	2	0	0

神经学损伤程度分类为：

1: 无损伤指征。

2: 最小损伤。

3: 无异常运动的中度损伤。

4: 存在异常运动的重度损伤。

*: 在损伤并用碱性 rhEPO 治疗动物和损伤动物之间存在显著性差异 $p < 0.05$ 。

实施例 22

碱性 rhEPO 对痴呆治疗的作用

在 36 只蒙古沙土鼠中，在麻醉下扎紧右侧颈动脉。在手术后 1 小

时时间间隔内开始，在 7 天期间动物每日接受鼻内施用 40 IU 的 rhEPO(实施例 10 和 11)。其它进行相似的处理的 24 只动物接受等量的赋形剂。进行颈动脉分离未结扎的 9 只沙土鼠组成对照组。

手术后 8 天，在进行单侧缺血并用 rhEPO 治疗的组和只用赋形剂处理的组中，分别有 27 和 13 只动物存活。对照组无死亡数。

在颈动脉单侧结扎之前 1 天和之后 1 周，对动物进行习惯形成测试。该测试基于在圆筒状盒子中，在分为三个三分之一的 9 分钟间隔期间，计数用后腿站立动作。在每个三分之一中用后腿站立动作的比例决定该三点之间的最佳拟合直线。通过 Mann 和 Whitney's U 检验，使用斜率建立组之间的比较。通过存活动物的 Wilcoxon's 范围比较检验进行前后比较。结果如下：

组	之前	之后	P 值
对照	-14.2	-12.3	0.2
赋形剂	-16.6	-7.9 ^{a, b}	0.01
rhEPO	-15.3	-14.0	0.1

a- 与对照不同；b-与 rhEPO 不同；p < 0.05。

该结果显示对患有缺血的动物，较小的斜率（接近于 0），缺血之后 1 周，并与用 rhEPO 治疗的那些和对照比较。较小的斜率证明了在 9 分钟间隔的后三分之二中，动物探查其环境的持久性，显示了习惯形成的丧失，其可以表征为缺血诱导的认知功能障碍。用碱性 rhEPO 的治疗预防了该功能障碍的出现。

动物的行为显示了缺血诱导的大脑退化，其可以表示为在它们关在圆柱内期间，该物种雄性有代表性的筑巢能力的丧失；也可表示为进攻性增强和自梳理行为的丧失。通过卡方独立性检验对结果进行比较并在表中以百分比表示：

组	筑巢	进攻性	自梳理
对照	88	11	88
赋形剂	23 ^{a, b}	92 ^{a, b}	30 ^a
rhEPO	77	44 ^a	66

a – 与对照不同; b – 与 rhEPO 不同; $p < 0.05$

在麻醉下通过灌注 10%缓冲的中性福尔马林将动物处死。取出脑并进行处理来获得 8 μm 厚冠状切片，用苏木精和伊红染色。该切片用明亮视野显微镜检测组织病理学标记。该比较通过卡方独立性检验进行。表中的结果以百分比表示：

组	固缩	神经胶质增生	水肿	神经元损失
对照	22	0	0	0
赋形剂	100 ^a	92 ^{a, b}	23 ^{a, b}	69 ^{a, b}
碱性 rhEPO	55	44 ^a	0	33 ^a

a – 与对照不同; b – 与 rhEPO 不同; $p < 0.05$

明显的是该治疗完全预防水肿并减少一半固缩、神经胶质增生和神经元损失的发生率。

行为的退化可以适于作为在未治疗组观察到的神经元损失和其它组织病理学发现的反映。在蒙古沙土鼠中，用 rhEPO 治疗至少部分地预防脑血流减少诱导的行为退化。提示 rhEPO 的神经元保护作用，其能对抗表现为于人类血管起因的痴呆的功能性退化，在此意义上该结果是优异的。

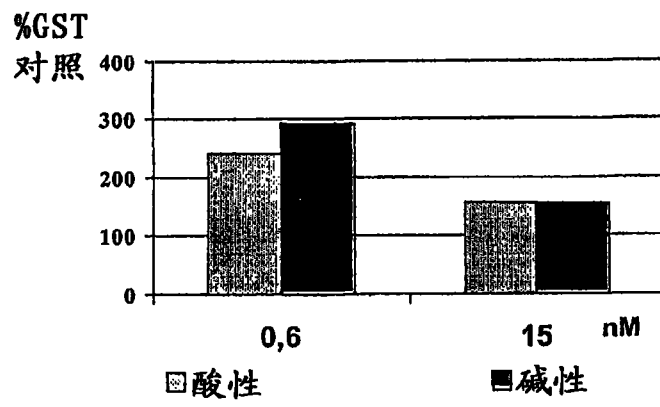


图1

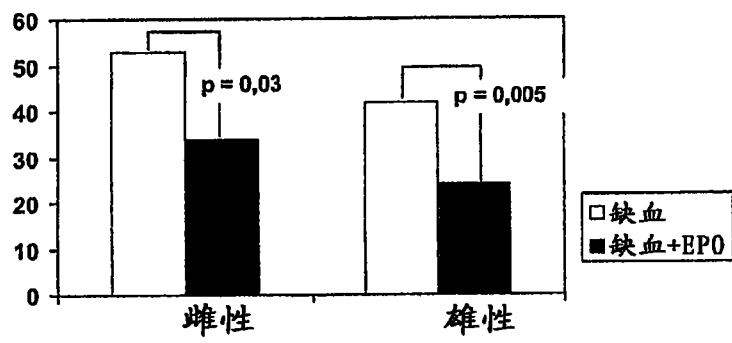


图 2

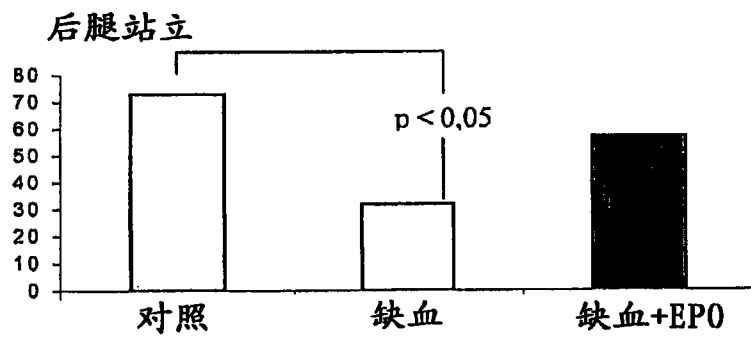


图 3

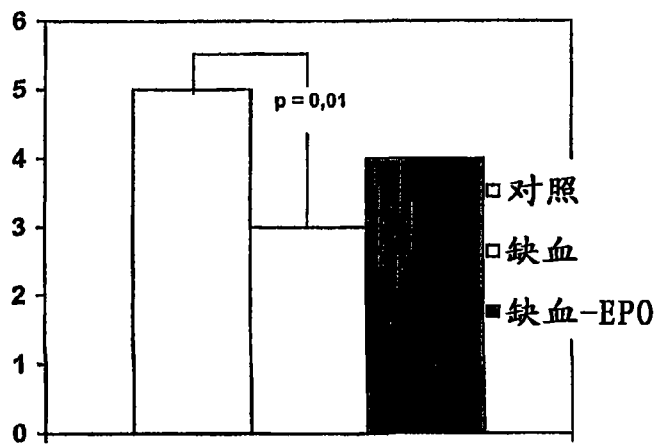


图4

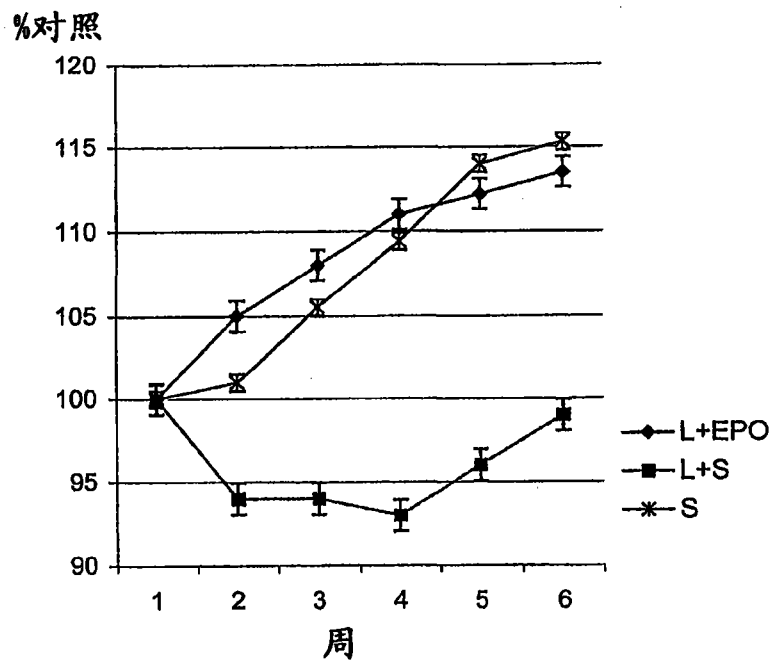
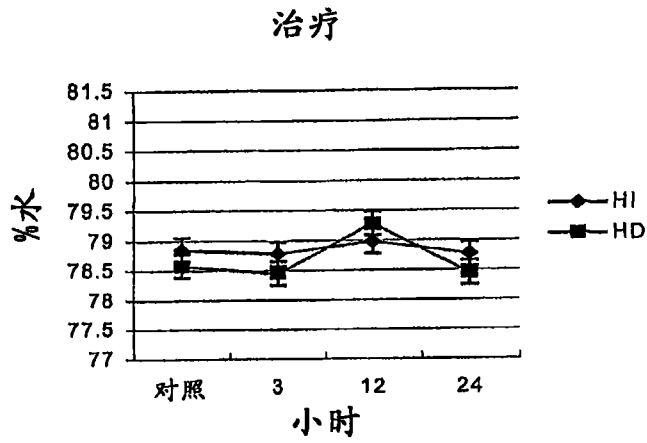
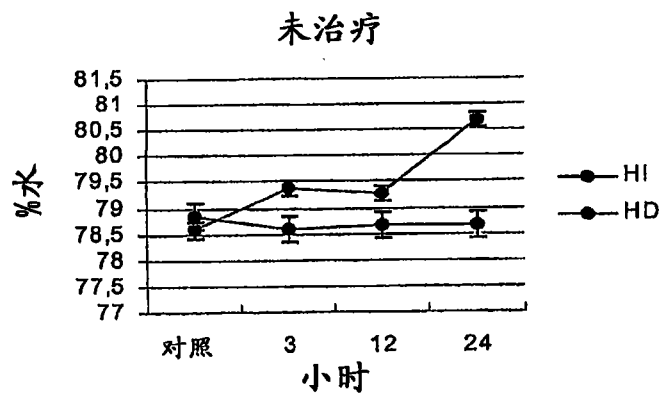


图5



6a



6b

图6a和6b

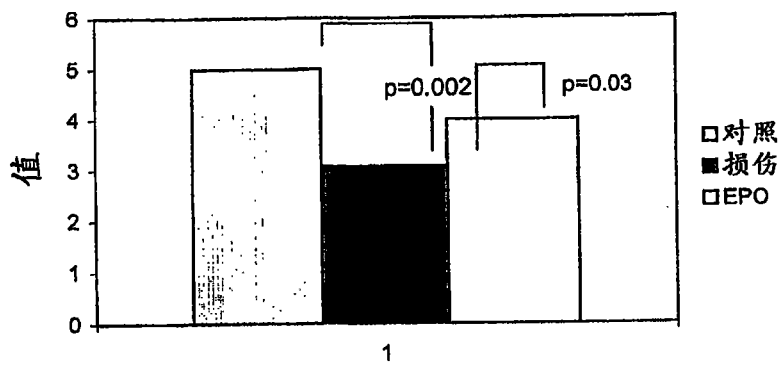


图7

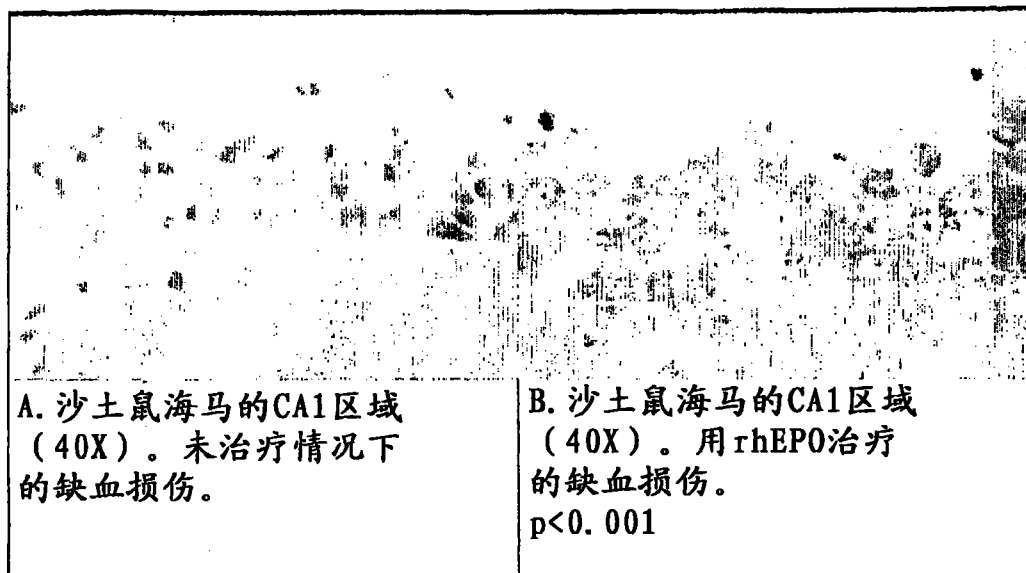


图 8

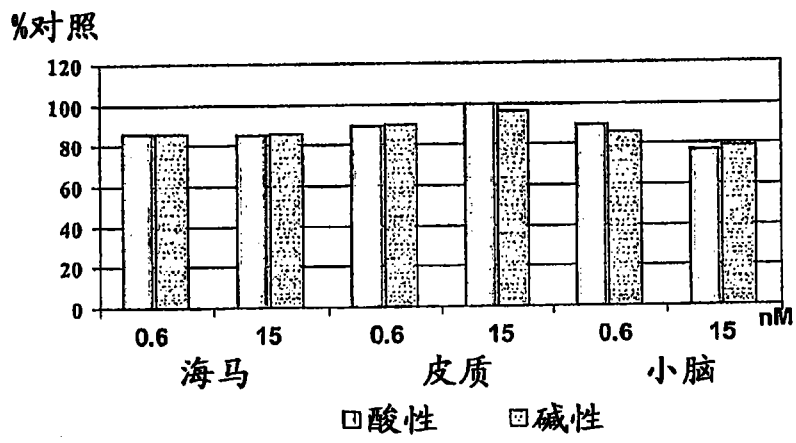
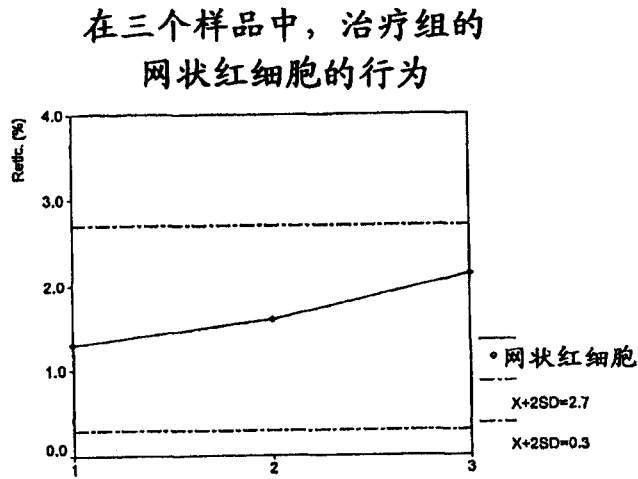


图9



图例:

X: 平均数

SD: 标准差

2SD: 两倍SD

HB: 血红蛋白浓度 (g/dL)

HTC: 红细胞压积 (%)

ETO: 红细胞($\times 10^6/\mu\text{L}$)

PLT: 血小板($\times 10^3/\mu\text{L}$)

LEUC.: 总白细胞($\times 10^3/\mu\text{L}$)

VCM: 红细胞平均容积 (fL)

HCM: 红细胞平均血红蛋白量 (pg)

CHCM: 红细胞平均血红蛋白浓度 (g/dL)

图10a

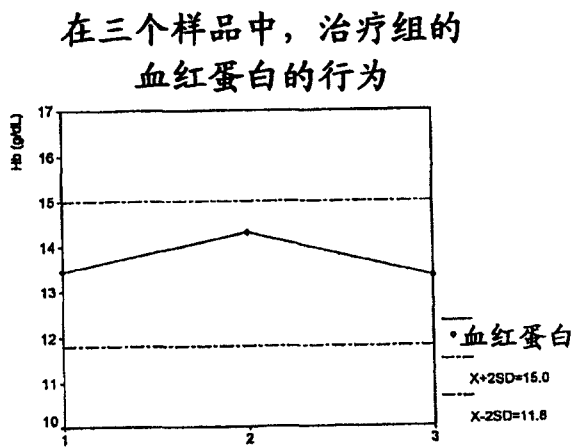


图10b

在三个样品中，治疗组的
红细胞的行为

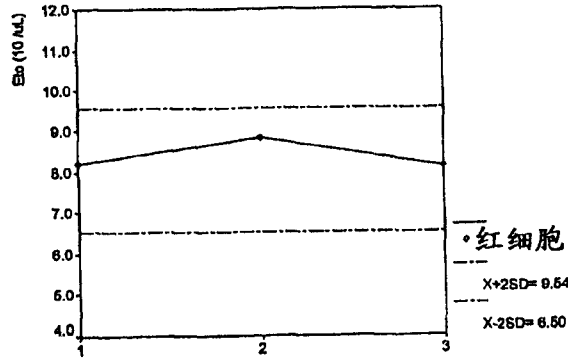


图10c

在三个样品中，治疗组的
血细胞比容的行为

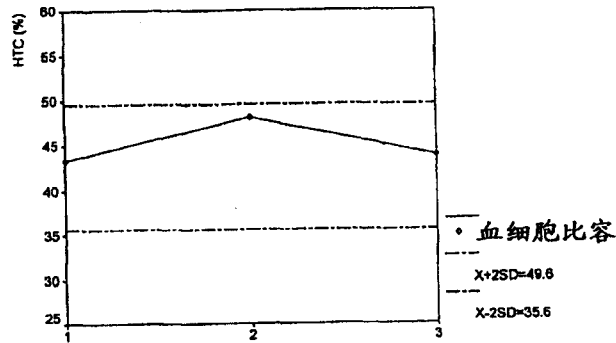


图10d

在三个样品中，治疗组的
血小板的行为

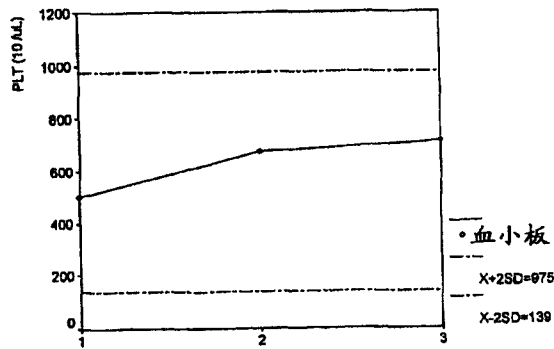


图10e

在三个样品中，治疗组的
VCM 的行为

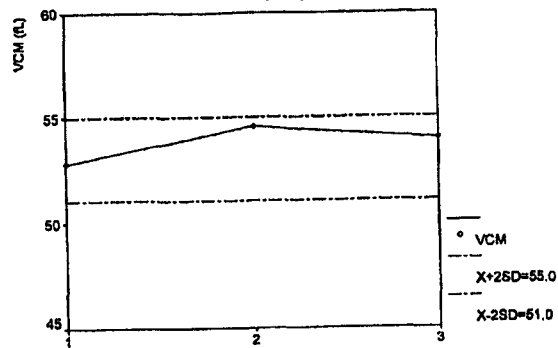


图10f

在三个样品中，治疗组的
HCM 的行为

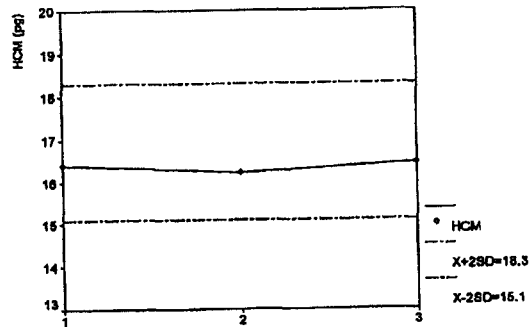


图10g

在三个样品中，治疗组的
CHCM 的行为

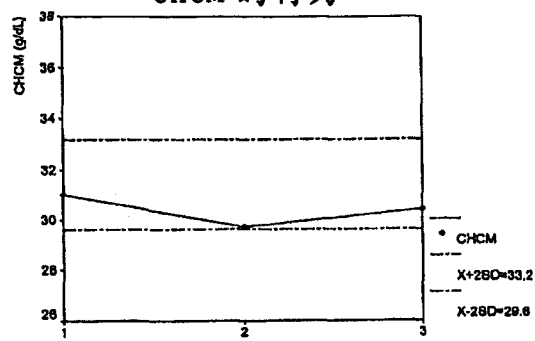


图 10h

在三个样品中，治疗组的
白细胞的行为

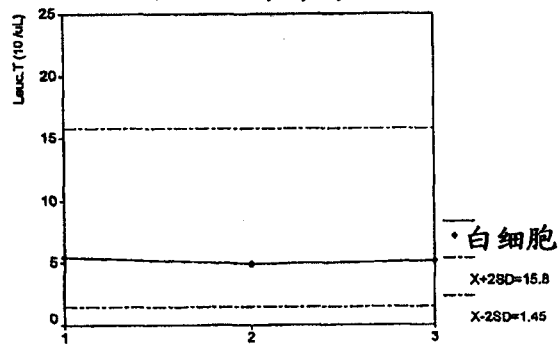


图 10i

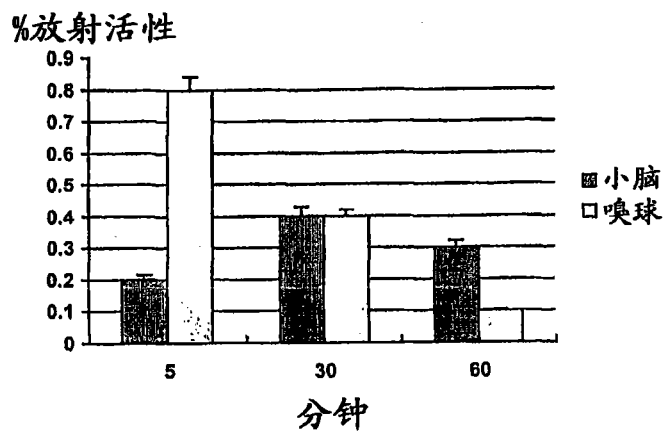


图 11