(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101612384 B
(45)授权公告日 2012.06.20

(21)申请号 200910055203.X

(22)申请日 2009.07.23

(73)专利权人 中国人民解放军第二军医大学
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

(72)发明人 芮耀诚 李铁军 杨鹏远 章越凡

(74)专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204
代理人 丁振英

(51)Int.Cl.
A61K 38/08(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)

(56)对比文件
CN 101490080 A,2009.07.22, 全文 .
CN 101361961 A,2009.02.11, 全文 .
CN 1552439 A,2004.12.08, 全文 .

审查员 张蕾

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54)发明名称

多肽小分子 MLIF 在制备防治心肌缺血药物中的应用

(57)摘要

本发明涉及生物医药技术领域，是一种多肽小分子 MLIF 用于制备防治心肌缺血药物的新用途。多肽小分子 MLIF 的氨基酸序列为 Met-Gln-Cys-Asn-Ser。经大鼠冠状动脉结扎造成心肌缺血模型的药理实验，多肽小分子 MLIF 能显著降低心肌缺血所致大鼠心肌损伤和心肌梗塞区范围，表明其具有防治心肌缺血功能，因此可用于制备防治心肌缺血药物。

CN 101612384 B

1. 多肽小分子 MLIF 在制备减少心肌缺血引起的心肌梗塞面积或降低心肌缺血引起的血清 LDH 和 CK 含量的药物中的应用，所说多肽小分子 MLIF 的氨基酸序列为 Met-Gln-Cys-Asn-Ser。

多肽小分子 MLIF 在制备防治心肌缺血药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域，是一种多肽小分子 MLIF 用于制备防治心肌缺血药物的新用途。

背景技术

[0002] 心肌缺血，是指心脏的血液灌注减少，导致心脏的供氧减少，心肌能量代谢不正常，不能支持心脏正常工作的一种病理状态。临床显示：引起心肌缺血最主要、最常见的病因，是冠状动脉狭窄。而冠状动脉狭窄的主要原因是动脉粥样硬化。因冠状动脉粥样硬化引起的心脏病就是大家常说的冠心病。心肌缺血是冠心病的一种，目前有多种治疗方案如放置支架、球囊扩张术，但药物治疗仍为主要的方法。可选择硝酸酯类药物（如单硝酸异山梨酯或其缓释剂型），β－受体阻断剂如普萘洛尔和钙通道阻滞药如硝苯地平；主要是扩张冠状动脉，增加心肌的供氧；减少外周阻力、心脏做功，降低心肌耗氧。还应该服用他汀类药物（如阿伐他汀、辛伐他汀）一方面降低血浆中的胆固醇，一方面稳定动脉斑块，防止斑块脱落形成血栓，造成中风等。

[0003] 炎症反应在心肌缺血损伤中起重要作用，主要过程包括中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞等炎症细胞的趋化、浸润以及炎症因子的合成和分泌。但目前临床尚无主要从抗炎机制保护心肌缺血的药物。单核细胞移动抑制因子 (MLIF)，是一种抗炎性反应的多肽，是从无菌培养的溶组织内阿米巴中发现的五肽，其氨基酸序列为：Met-Gln-Cys-Asn-Ser。体外培养和体内实验证明该肽能抑制人单核细胞、多形核白细胞的移动。溶组织内阿米巴通过产生该抗炎症多肽，影响细胞因子分泌，限制炎症的产生，逃避宿主免疫。文献报道，这种五肽分子不仅可以直接作用于炎症细胞，也可以通过干扰炎症细胞因子的分泌影响炎症反应的过程，对 MIP-1α、MIP-1β 等炎症趋化因子有显著的抑制作用，同时还可以抑制 1L-1β、TNF-α 等炎症细胞因子分泌以及相应受体的表达。本发明人在研究中发现，MLIF 具有防治缺血性脑血管病的功能，并已申请专利（申请号：200810200610.0），但迄今为止，尚未见该多肽具有防治心肌缺血功能的报道。

发明内容

[0004] 本发明对多肽小分子 MLIF 提供一种用于制备防治心肌缺血药物的新用途。

[0005] 经大鼠冠状动脉结扎造成心肌缺血模型的药理实验，多肽小分子 MLIF 能显著降低心肌缺血所致大鼠心肌损伤和心肌梗塞区范围，表明其具有防治心肌缺血功能，因此可用于制备防治心肌缺血药物。

具体实施方式

[0006] 现对本发明作详细描述。

[0007] 一．多肽小分子 MLIF：

[0008] 氨基酸序列为 Met-Gln-Cys-Asn-Ser

[0009] 由上海生工生物科技公司合成，纯度在95％以上。

[0010] 二．动物实验：

[0011] （一）对大鼠急性心肌缺血损伤心肌梗死体积的保护作用

[0012] 1. 实验动物：SD大鼠，雄性，清洁级，体重：200-220克，由中国人民解放军第二军医大学实验动物中心提供（许可证号：SCXK（沪）-2007-0003）。

[0013] 2、实验分组

[0014] 将实验大鼠随机分成4组：假手术组8只，模型组9只，MLIF低剂量组11只，MLIF高剂量组12只，给药剂量按体重计，MLIF低剂量组给予0.15mg/kg，MLIF高剂量组给予0.5mg/kg，以生理盐水为溶剂配成注射液，尾静脉注射给药。

[0015] 3、大鼠冠状动脉结扎及心肌梗塞面积的测量：

[0016] 将雄性SD大鼠分别用25％乌拉坦（0.4ml/100g）腹腔麻醉，仰卧位固定，在胸左侧第五肋间处切开胸壁并沿胸骨左缘2mm处切断第四和第五肋骨，剪开心包膜，暴露心脏，于左冠状动脉前降支下穿1根0/3号缝合线，从股静脉缓慢注射给药10min后立刻结扎左心冠状动脉前降支，将心脏放回胸腔，用手尽量排出胸内残留气体，迅速关闭胸腔并拉紧荷包抽口，整个开胸到闭胸操作过程在30S内完成，大鼠冠脉结扎后造成心肌缺血，假手术组大鼠冠脉不结扎。冠脉结扎后15min各大鼠尾静脉注射给药，MLIF低剂量组给予0.15mg/kg，MLIF高剂量组给予0.5mg/kg，假手术组和模型组注射等体积生理盐水。各组动物都在冠脉结扎后5h处死大鼠。取出心脏，在冠脉结扎线下，平行于冠状沟，将心室肌平均横切成5片，将5片心肌置于硝基四氮唑蓝（N-BT）染液中，振摇染色15min后取出，正常心肌染为暗蓝色，梗塞区心肌则不着色，通常呈浅黄色。在解剖镜下分离梗塞区，分别称全心重、左心重、梗死重，以梗塞区心肌重量占心肌重量的百分比（％）来作为衡量梗塞范围的测量指标。

[0017] 4、数据及统计学处理：实验数据以$\bar{x}\pm SD$表示，用SPSS 10.0进行方差分析，做差异的显著性检验。结果见表1

[0018] 表1 药物对冠脉结扎大鼠心肌缺血损伤的影响($\bar{x}\pm SD$)

[0019]

组 别	动物数	全心重（mg）	左心室重（mg）	梗塞区重量（mg）	梗塞区/全心（％）	梗塞区/左心室（％）
假手术组	8	728±58	497±36	0±0	0±0	0±0
模型组	9	763±45	532±33.1	201±37.4$^{\Delta\Delta}$	26±4.1$^{\Delta\Delta}$	38±6$^{\Delta\Delta}$
药物低剂量组	11	832±63.5	566±48.1	187±22.8$^{\Delta\Delta}$	22±1.9$^{\Delta\Delta,*}$	33±3.2 $^{\Delta\Delta,*}$
药物高剂量组	12	779±51.2	526±31.5	158±22.4$^{\Delta\Delta}$	20±2.7 $^{\Delta\Delta,**}$	30±3.7$^{\Delta\Delta,**}$

[0020] 与假手术比较，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

[0021] 由表1可见，大鼠冠脉结扎后缺血5h，模型组梗塞区／全心和梗塞区／左心室的百分比分别为26±4.1％，38±6％，与假手术比较差异非常显著（$P<0.01$）。MLIF高剂量组（0.5mg/kg）梗塞区／全心和梗塞区／左心室的百分比为20±2.7％，30±3.7％，与模型组比较，差异非常显著（$P<0.01$）；低剂量组（0.15mg/kg）梗塞区／全心和梗塞区／左心室的百分比为22±1.9，33±3.2％，与模型组比较，差异显著（$P<0.05$）。说明MLIF可减小缺血所致大鼠心肌损伤心肌梗塞区范围，对心肌缺血损伤有保护作用。

[0022] （二）对急性心肌缺血大鼠血清肌酸激酶（CK）和乳酸脱氢酶（LDH）的影响：

[0023] 1. 实验动物：SD 大鼠，雄性，清洁级，体重：200-220 克，由中国人民解放军第二军医大学实验动物中心提供（许可证号：SCXK（沪）-2007-0003）。

[0024] 2、实验分组

[0025] 将实验大鼠随机分成 4 组：假手术组 7 只，模型组 8 只，MLIF 低剂量组 8 只，MLIF 高剂量组 9 只，给药剂量按体重计，MLIF 低剂量组给予 0.15mg/kg，MLIF 高剂量组给予 0.5mg/kg，以生理盐水为溶剂配成注射液，尾静脉注射给药。

[0026] 3、大鼠冠状动脉结扎及血清 CK 及 LDH 的测定：

[0027] 大鼠冠状动脉结扎如前。各组动物在冠脉结扎后 5h 股动脉取血 3ml，按常规离心取血清，半自动生化仪测定其血清乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸激酶（CK）活性。

[0028] 4、数据及统计学处理：实验数据以$\bar{x} \pm SD$表示，用 SPSS 10.0 进行方差分析，做显著性检验。结果见表 2。

[0029] 表 2 药物对冠脉结扎大鼠的肌酸激酶（CK）和乳酸脱氢酶（LDH）的影响（$\bar{x} \pm SD$）

[0030]

组 别	动物数	CK (IU/L)	LDH (IU/L)
假手术组	7	2633±344.9	1226±421.3
模型组	8	$7680 \pm 2380^{\triangle\triangle}$	$4736 \pm 755.7^{\triangle\triangle}$
药物低剂量组	8	$5258 \pm 2114.3^{\triangle\triangle,*}$	$3156 \pm 864.1^{\triangle\triangle,**}$
药物高剂量组	9	$5244 \pm 1787.8^{\triangle\triangle,*}$	$3642 \pm 817^{\triangle\triangle,**}$

[0031] 与假手术比较，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

[0032] 由表 2 可见，大鼠冠脉结扎后造成心肌缺血，心肌细胞损伤，细胞内 LDH、CK 释放入血，模型组大鼠血清 LDH 和 CK 增加，分别为 4736±755.7IU/L 和 7680±2380IU/L，与假手术比差异非常显著（$P < 0.01$）。高剂量组（0.5mg/kg）大鼠血清 LDH 和 CK 分别为 3642±817IU/L（$P < 0.01$）和 5244±1787.8IU/L（$P < 0.05$）；低剂量组（0.15mg/kg）大鼠血清 LDH 和 CK 分别为 3156±864.1IU/L（$P < 0.01$）和 5258±2114.3IU/L（$P < 0.05$）。说明药物可降低心肌缺血大鼠血清 LDH 和 CK 含量，对心肌缺血损伤有保护作用。

[0033] 上述实验结果表明，MLIF 0.15mg/kg 和 0.5mg/kg 能降低冠脉结扎大鼠心肌梗塞面积，降低血清 CK 及 LDH，表明对心肌缺血损伤具有保护作用。因此，MLIF 可用于制备防治心肌缺血药物。