



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116829138 A

(43) 申请公布日 2023.09.29

(21) 申请号 202280011367.6

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

(22) 申请日 2022.01.24

专利代理人 张晶 谢顺星

(30) 优先权数据

2021-009754 2021.01.25 JP

(51) Int.Cl.

A61K 31/197 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/002413 2022.01.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/158591 JA 2022.07.28

(71) 申请人 学校法人顺天堂

地址 日本东京都

(72) 发明人 冈崎康司 冈崎敦子 美野轮治

早乙女秀雄 八塚由纪子

土田胜晴 市野纪子

权利要求书2页 说明书8页

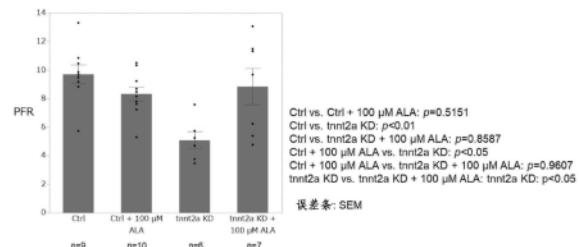
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

肥厚型心肌病治疗剂

(57) 摘要

本发明提供一种新型的肥厚型心肌病治疗剂。一种肥厚型心肌病治疗剂，其以5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐作为有效成分。



1. 一种肥厚型心肌病治疗剂, 其以5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐作为有效成分。
2. 一种肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂, 其以5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐作为有效成分。
3. 一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂, 其以5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐作为有效成分。
4. 一种肥厚型心肌病治疗剂, 其含有5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。
5. 一种肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂, 其含有5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。
6. 一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂, 其含有5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。
7. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐在制备肥厚型心肌病治疗剂中的应用。
8. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐在制备肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂中的应用。
9. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐的、肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂。
10. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合在制备肥厚型心肌病治疗剂中的应用。
11. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合在制备肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂中的应用。
12. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合在制备肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂中的应用。
13. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐, 其用于治疗肥厚型心肌病。
14. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐, 其用于改善肥厚型心肌病的左室舒张功能。
15. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐, 其用于改善肥厚型心肌病的心肌舒张速度。
16. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合, 其用于治疗肥厚型心肌病。
17. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合, 其用于改善肥厚型心肌病的左室舒张功能。
18. 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合, 其用于改善肥厚型心肌病的心肌舒张速度。
19. 一种肥厚型心肌病的治疗方法, 其特征在于, 给予有效量的5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐。
20. 一种改善肥厚型心肌病的左室舒张功能的方法, 其特征在于, 给予有效量的5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐。
21. 一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度的改善方法, 其特征在于, 给予有效量的5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐。
22. 一种肥厚型心肌病的治疗方法, 其特征在于, 联合给予5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

23.一种改善肥厚型心肌病的左室舒张功能的方法,其特征在于,联合给予5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

24.一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度的改善方法,其特征在于,联合给予5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

肥厚型心肌病治疗剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肥厚型心肌病治疗剂。

背景技术

[0002] 肥厚型心肌病(HCM)被定义为“以基于(1)左室或右室心肌的肥大与(2)心脏肥大的左室舒张功能下降为特征的一组疾病”，是一种被指定为难治性病的疾病(指定难治性病58)(非专利文献1)。此外，肥厚型心肌病被分类为引起左室流出道阻塞的阻塞性与不引起左室流出道阻塞的非阻塞性，前者会在收缩期产生左室内压差。具有常染色体性显性的家族史的例子较多。临幊上，肥厚型心肌病被定义为在使用超声心动图检查或者心脏MRI时为15mm以上的左室最大室壁厚(在有肥大心肌病的家族史的情况下为13mm以上)。

此外，肥厚型心肌病具有以下特征：在左室收缩功能正常且左室内径正常(或者缩小)的早期阶段，左室充盈压也会上升，对左室的舒张、伸展性产生障碍(非专利文献1)。

[0003] 肥厚型心肌病的大部分的患者多为无症状或仅表现出轻微症状，偶尔通过检查，以心脏杂音或心电图异常为契机做出诊断的实例不在少数。在出现症状时，会有心律失常所带来的心悸或头晕、运动时的呼吸困难、胸口压迫感等。而危重症状则为昏厥。

[0004] 作为治疗方法，禁止比赛运动等激烈运动。在具有心律失常的症状等的情况下，通过给予β受体阻断药或维拉帕米等改善症状。

然而，并不存在改善作为肥厚型心肌病的功能性症状的左室舒张功能下降、即左室舒张速度下降的治疗药。

[0005] 另一方面，5-氨基乙酰丙酸为卟啉合成路径的起始物质，其除了作为光敏剂而用于光动力学疗法(日光性角化病、粉刺、皮肤癌等的治疗)、光动力学诊断方法(脑肿瘤的术中诊断、经尿道膀胱肿瘤切除术等)等以外，还被用作植物生长促进剂。此外，还有报告指出，5-氨基乙酰丙酸能够通过与铁化合物进行联合使用，用于育毛剂(专利文献1)、针对线粒体病的酶增强疗法(非专利文献2)等。

进一步，还有报告指出，5-氨基乙酰丙酸具有增大急性心肌梗塞的动物模型心肌细胞中的琥珀酰辅酶A的量的作用(专利文献2)。

现有技术文献

专利文献

[0006] 专利文献1：国际公开第2005/105022号

专利文献2：国际公开第2020/59242号

非专利文献

[0007] 非专利文献1：心筋症診療ガイドライン(日本循環器学会/日本心不全学会合同ガイドライン、2018年改訂版)

非专利文献2：Scientific Reports (2019) 9:10549, PMID:31332208

发明内容

本发明要解决的技术问题

[0008] 本发明的技术问题在于提供一种新型的肥厚型心肌病治疗剂。

解决技术问题的技术手段

[0009] 对此,本申请的发明人使用来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞,对左室舒张功能指标、即心肌舒张速度产生影响的药物进行了探索,结果发现,5-氨基乙酰丙酸表现出较强的心肌舒张速度改善作用,并进一步改善左室舒张功能,从而完成了本发明。

[0010] 即,本发明提供以下的发明(1)~(24)。

(1)一种肥厚型心肌病,其以5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐作为有效成分。

(2)一种肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂,其以5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐作为有效成分。

(3)一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂,其以5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐作为有效成分。

(4)一种肥厚型心肌病治疗剂,其含有5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

(5)一种肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂,其含有5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

(6)一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂,其含有5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

(7)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐在制备肥厚型心肌病治疗剂中的应用。

(8)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐在制备肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂中的应用。

(9)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐的、肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂。

(10)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合在制备肥厚型心肌病治疗剂中的应用。

(11)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合在制备肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂中的应用。

(12)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合在制备肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂中的应用。

(13)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐,其用于治疗肥厚型心肌病。

(14)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐,其用于改善肥厚型心肌病的左室舒张功能。

(15)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐,其用于改善肥厚型心肌病的心肌舒张速度。

(16)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合,其用于治疗肥厚型心肌病。

(17)一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合,其用于改善肥厚型心肌病的左室舒张功能。

(18) 一种5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物的组合,其用于改善肥厚型心肌病的心肌舒张速度。

(19) 一种肥厚型心肌病的治疗方法,其特征在于,给予有效量的5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐。

(20) 一种改善肥厚型心肌病的左室舒张功能的方法,其特征在于,给予有效量的5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐。

(21) 一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度的改善方法,其特征在于,给予有效量的5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐。

(22) 一种肥厚型心肌病的治疗方法,其特征在于,联合给予5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

(23) 一种肥厚型心肌病的左室舒张功能的改善方法,其特征在于,联合给予5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

(24) 一种肥厚型心肌病的心肌舒张速度的改善方法,其特征在于,联合给予5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐与铁化合物。

发明效果

[0011] 若使用5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐,则能够改善肥厚型心肌病的左室舒张功能的指标、即心肌舒张速度,且能够使改善肥厚型心肌病的本质性的左室舒张功能症状的肥厚型心肌病治疗成为可能。

附图说明

[0012] 图1示出来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞的心肌舒张速度、及5-氨基乙酰丙酸对该舒张速度的作用。

图2示出正常对照(正常心肌细胞)的心肌舒张速度、及5-氨基乙酰丙酸对该舒张速度的作用。

图3示出来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞的舒张速度与正常心肌细胞的舒张速度的比较。

图4示出反映心肌细胞内 Ca^{2+} 的消失速度($=\text{Ca}^{2+}$ 进入肌质网的速度)的、5-氨基乙酰丙酸的添加对Ca-Imaging(钙离子成像)波形的峰宽(Peak Width)的变化的影响,其中,从a.正常对照($n=5$)、5-氨基乙酰丙酸10uM($n=6$)、5-氨基乙酰丙酸30uM($n=6$)、b.正常对照($n=5$)、5-氨基乙酰丙酸30uM($n=6$)中选择各1例,即,从前者的5例中选择孔排序为第三个的数据,从后者的6例中同样选择孔排序为第四个的数据,结合出峰时间,将各自的每3次搏动进行覆写。

图5示出5-氨基乙酰丙酸对斑马鱼心肌病模型的左室心肌舒张功能的作用。

具体实施方式

[0013] 本发明的肥厚型心肌病治疗剂的有效成分为5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐。

5-氨基乙酰丙酸、其酯或它们的盐(以下,有时也将它们总称为5-氨基乙酰丙酸类),例如记载于专利文献1中,为公知物质。

然而,完全不知晓5-氨基乙酰丙酸类对肥厚型心肌病的舒张速度改善作用。

[0014] 作为5-氨基乙酰丙酸酯的例子,可列举出可以具有羟基、烷氧基、苯基、苄基、羟甲基等取代基团的直链、直链或环状的碳原子数为1~24的烷基酯。作为5-氨基乙酰丙酸酯的具体实例,可列举出5-氨基乙酰丙酸甲酯、5-氨基乙酰丙酸乙酯、5-氨基乙酰丙酸异丙酯、5-氨基乙酰丙酸己酯、5-氨基乙酰丙酸环己酯、5-氨基乙酰丙酸庚酯、5-氨基乙酰丙酸辛酯、5-氨基乙酰丙酸壬酯、5-氨基乙酰丙酸十二烷基酯、5-氨基乙酰丙酸十六烷基酯、5-氨基乙酰丙酸苄酯、5-氨基乙酰丙酸苯乙酯、5-氨基乙酰丙酸苯基丙酯、5-氨基乙酰丙酸羟基乙酯、5-氨基乙酰丙酸乙氧基乙酯等。

[0015] 作为5-氨基乙酰丙酸或其酯的盐形态,例如可列举出磷酸盐、盐酸盐、硝酸盐、硫酸盐等无机酸盐;乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、戊酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、草酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、乙醇酸盐等有机酸盐;钠盐、钾盐等碱金属盐;钙盐等碱土类金属盐等。

[0016] 如后述实施例所示,5-氨基乙酰丙酸类具有使用了来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞的、显著改善左室舒张功能的指标、即心肌舒张速度的作用。此外,5-氨基乙酰丙酸通过改善 Ca^{2+} 进入肌质网的功能,可改善心肌舒张速度。进一步,5-氨基乙酰丙酸在活体内(*in vivo*)改善左室舒张功能。

因此,5-氨基乙酰丙酸类作为肥厚型心肌病的心肌舒张速度改善剂、肥厚型心肌病的左室舒张功能改善剂及肥厚型心肌病治疗剂是有用的。

[0017] 5-氨基乙酰丙酸类能够单独用作肥厚型心肌病治疗剂,但从补充生物体内所存在的铁化合物从而进一步增强所述技术效果的角度出发,优选联合使用5-氨基乙酰丙酸类与铁化合物。

[0018] 其中,作为铁化合物,可列举出铁络合物及铁盐。

作为铁络合物,例如可列举出血红素铁(heme-iron)、右旋糖酐铁、二乙三胺五乙酸铁钠、二乙烯三胺五乙酸铁铵、乙二胺四乙酸铁钠、乙二胺四乙酸铁铵、三乙烯四胺铁(Triethylenetetramine iron)、二羧甲基谷氨酸铁钠(Dicarboxymethyl glutamic acid iron sodium)等。

[0019] 作为铁盐,可列举出选自有机酸的铁盐及无机酸的铁盐中的一种或两种以上。作为铁盐的具体实例,可列举出柠檬酸亚铁、柠檬酸铁钠、柠檬酸铁铵、乙酸铁、草酸铁、琥珀酸亚铁、琥珀酸柠檬酸铁钠、焦磷酸亚铁、焦磷酸铁、乳酸铁、葡萄糖酸亚铁、甲酸亚铁、甲酸铁、草酸钾铁铵、硫酸亚铁、硫酸铁、硫酸铁铵、碳酸铁、氯化亚铁、氯化铁等。

[0020] 铁化合物的含量没有特别限定,但相对于1质量份的5-氨基乙酰丙酸类,优选为0.01质量份~1质量份,更优选为0.05质量份~1质量份,进一步优选为0.1质量份~1质量份。

[0021] 关于本发明的治疗剂的给药路径,能够根据疾病、症状等,选择全身给药及局部给药中的任意一种、经口路径及非经口路径中的任意一种,并且能够根据其给药方法、路径,选择适合的剂型,例如片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、液剂等形态的经口给药、或注射剂(例如静脉注射、肌肉注射等)、栓剂、经皮剂、经鼻剂、吸入剂等形态的非经口给药。

[0022] 作为本发明的用于经口给药的治疗剂,可列举出片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂等固体制剂。这些制剂能够按照常规方法通过对所述有效成分混合赋形剂、润滑剂、崩解剂、溶解助剂等进行制备。作为赋型剂,例如可列举出乳糖(Lactose)、纤维素、甘露醇、葡萄糖等。

作为润滑剂,例如可以为硬脂酸镁。作为崩解剂,例如可列举出羧基甲基淀粉钠、聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠等。片剂或丸剂可以根据需要使用糖衣或者胃溶性或肠溶性包衣剂包覆。

[0023] 作为用于经口给药的治疗剂,可以为药理学上允许的浸膏剂、乳剂、液剂、混悬剂、糖浆剂、酒精剂或酏剂等液体制剂。这些制剂含有通常使用的惰性溶剂(例如纯化水、乙醇等),可进一步含有增溶剂、湿润剂、混悬剂、甘味剂、矫味剂、芳香剂、缓冲剂(例如柠檬酸钠等)、稳定剂或防腐剂。

[0024] 作为用于非经口给药的治疗剂,可列举出无菌的水性或非水性的液剂、混悬剂、或者乳剂等注射剂、软膏及洗剂(lotion)、用于口腔内给药的舌下剂、口腔贴附剂、用于经鼻给药的气溶胶剂或栓剂。

在为注射剂的情况下,除了常规的静脉内给药、动脉内给药以外,还能够通过对皮下、皮内、肌肉内等进行注射而进行给药。作为注射剂用的水性溶剂,例如可列举出蒸馏水或生理盐水。作为注射剂用的非水性溶剂,例如可列举出丙二醇、聚乙二醇、橄榄油这种植物油、乙醇这种醇类或聚山梨醇酯80(药典名称)。

这些制剂可以进一步含有等渗调节剂(例如氯化钠、葡萄糖等)、防腐剂、湿润剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、pH调节剂(例如柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钠等)、缓冲剂、局部麻醉剂(例如盐酸普鲁卡因、盐酸利多卡因等)或溶解助剂。

这些制剂例如能够通过使用细菌截留过滤器进行的过滤、掺合杀菌剂或照射放射线进行无菌化。

[0025] 本发明的治疗剂的给药量因给药路径、症状、年龄等而异,通常,对于成人而言,以5-氨基乙酰丙酸类量计,优选为每日10mg~1g。

实施例

[0026] 接着,列举实施例对发明进行进一步详细说明,但本发明不受这些实施例限定。

[0027] 实施例1

(1)来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞

购入分化自来自肥厚型心肌病患者的iPS细胞的心肌细胞,在进行接种、培养之后,进行5-氨基乙酰丙酸/柠檬酸亚铁钠(ALA/SFC)的给予。作为心肌细胞,使用了4M Mycell Cardiomyocytes(4M Mycell心肌细胞)(MYH7 R403Q)(C1081,cat#556-3478I)(Cellular Dynamics)。作为对照,使用了来自正常者的iPS细胞的心肌细胞(Cell Cardiomyocytes(Control)(细胞心肌细胞(对照)))(C1056,cat#551-33491)(Cellular Dynamics)。作为细胞接种的培养液,使用了(iCell Plating medium(iCell平板培养基)(M1001,cat#550-33581)(Cellular Dynamics))。

在细胞培养中,作为培养液,使用了iCell Maintenance medium(iCell维持培养基)(M1003,cat#557-3359I)(Cellular Dynamics)。

[0028] (2)针对上述的来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞,通过以下的日程表进行实验。

试验日程表:

第1天:接种细胞(来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞、来自正常者iPS细胞的心肌细胞)。在96孔塑料板(nunc)的每个孔中接种 3×10^4 个细胞。

第15天：在使用SONY SI8000测定给予前的舒张速度之后，按照以下的给予量在同一天给予ALA/SFC。对于疾病心肌细胞、正常心肌细胞，给予量分别设为ALA/SFC 0μM/0μM、10μM/5μM、30μM/1μM、100μM/50μM的4组。药剂在使用iCell维持培养基(M1003)进行溶解以各自调整为上述浓度之后，通过用这些药剂对各孔的培养液进行置换，进行了给予。

关于舒张速度的测定，包括本次第15天的给予前在内，作为给予后，以如下方式再实施2次，合计实施3次。

第18天：第2次给予ALA/SFC

第20天：在使用SONY SI8000测定给予后第1次的舒张速度之后，在同一天第3次给予ALA/SFC。

第22天：第4次给予ALA/SFC

第24天：第5次给予ALA/SFC

第26天：使用SONY SI8000测定给予后第2次的舒张速度。

[0029] 将来自肥厚型心肌病患者iPS细胞的心肌细胞的心肌舒张速度、及5-氨基乙酰丙酸对该舒张速度的作用示于图1。在图1中，肥厚型心肌病的舒张速度为 $2.3 \pm 0.6 \mu\text{M}/\text{秒}$ (平均值±标准偏差)，显著低于正常心肌细胞的舒张速度。对于该舒张速度的下降，若添加5-氨基乙酰丙酸，则肥厚型心肌病的心肌细胞的舒张速度显著上升。

此外，将正常心肌细胞(正常心肌对照)的心肌舒张速度、及5-氨基乙酰丙酸对该舒张速度的作用示于图2。

根据图2可知，肥厚型心肌病的心肌细胞的舒张速度为 $4.4 \pm 0.6 \mu\text{M}/\text{秒}$ (平均值±标准偏差)，即使添加5-氨基乙酰丙酸，该舒张速度也未随时间增加。将两种细胞的舒张速度的比较示于图3。

由此可知，5-氨基乙酰丙酸类可改善肥厚型心肌病的心肌舒张速度下降，改善心肌舒张功能。

[0030] 实施例2

心肌舒张速度的决定因素为肌球蛋白和肌动蛋白的离解速度，限定离解速度的主要原因之一为存在于肌质网的纵管的ATP酶的Ca²⁺传导功能。因此，使用所述的来自肥厚型心肌病(HCM)患者iPS细胞的心肌细胞，测定钙离子成像波形的峰宽(Peak Width)，其可反映出添加5-氨基乙酰丙酸造成的心肌细胞内Ca²⁺的消失速度(=Ca²⁺进入肌质网的速度)。

[0031] (1) 在以下条件下，将作为肥厚型心肌病(HCM)模型的iPS细胞诱导心肌细胞、由来自肥厚型心肌病患者的iPS细胞诱导的心肌细胞(通过CDI co.获得)接种在96孔板中。将细胞的密度设为 $3 \times 10^4/\text{孔}$ 。接种用培养基使用CDI co.制造的iPs Cardiomyocyte Plating Medium(iPs心肌细胞平板培养基)(IPMM; M1001, cat#550-33581) (Cellular Dynamics)。对于长期培养而言，使用iPs Cardiomyocyte Maintenance Medium(iPs心肌细胞维持培养基)(ICMM; M1003, cat#557-33591) 培养液(100微升/孔)。在37°C、7%CO₂的条件下进行长期培养(一个月)。通过接种，在第7天、第14天、第21天分别进行钙成像测定。作为钙荧光测定试剂，分别以10nM或50nM的最终浓度使用Early Tox或者Cal520。5-氨基乙酰丙酸通过接种在第7天添加至培养液中，并持续进行给予，直到第14天、第21天的成像测定日。

[0032] (2) 荧光钙成像测定的条件

作为High Content Analysis(高内涵分析)用测定装置，使用横河・CQ1Image

Cytometer(细胞成像仪),以激发光488nm、荧光500-550nm进行测定(带有微透镜的旋转圆盘共焦;spinning disk confocal with microlens array)。测定规格;测定荧光滤光片;约500-550nm的透光滤光块(BandPass(带通):50nm),20×干物镜(UPLS APO 20×),共焦孔50μm,sCMOS 2560×2160像素16.6×14.0mm,获取图像尺寸500×500,视频获取时间分辨率为20fps。平台(stage)内环境;37℃、5%CO₂,加湿。图像数据的获取及向外部的传输使用分析软件CellPathfinder。

[0033] (3) 数据的分析方法

通过将得到的图像数据进行整个画面的荧光强度的连续数字化,得到荧光波形。通过波形分析软件Web finder对这些数值数据进行波形分析。由波形计算出的参数为:波形的高度各自为10%、20%、30%、50%、70%、90%处的谱线宽度(秒),角波之间的间隔长度(sec)及荧光强度(ΔF)。

将结果示于图4。由图4明确可知,通过添加5-氨基乙酰丙酸,波形的高度50%处的峰宽明显下降,Ca²⁺进入肌质网的功能得以改善。

[0034] 实施例3

研究了5-氨基乙酰丙酸对斑马鱼心肌病模型的作用。

(1) 斑马鱼心肌病模型(心肌肌钙蛋白T敲除(tnnt2a KD))的制造

使用阻碍斑马鱼心肌肌钙蛋白T(tnnt2a)的翻译的合成核酸吗啉代反义寡核苷酸(MO)。用于制造该心肌病模型的tnnt2a-MO的靶序列为5' -CATGTTGCTCTGATCTGACACGCA-3' (SEQ ID NO.1),用作阴性对照的Standard control MO (Control-MO) (标准对照MO(对照-MO))的靶序列为5' -CCTCCTACCTCAGTTACAATTATA-3' (SEQ ID NO.2)。所有MO均使用GeneTools公司制造的MO。进一步,将在3'末端标记了红色荧光物质Lissamine(丽丝胺)的Standard control MO (Lis-MO) (标准对照MO (Lis-MO))用作内部标准物质。粉末的MO将使用Nuclease free water(无核酸酶水)稀释为1mM的物质设作储备液,作为进行显微注射的工作液,使用无核酸酶水将tnnt2a-MO及对照-MO的终浓度调整为1.2μM、将Lis-MO的终浓度调整为50μM。在使用拉针仪(PC-100,NARISHIGE)对玻璃毛细管(GD-1,NARISHIGE)进行加工而制成的玻璃针中填充MO的工作液,并连接在DNA注射器(IM-400,0.2LE-8SBZN,MMO-220C,M-152,GJ-1,IP,NARISHIGE)的注射支架上进行使用。使斑马鱼成鱼(RIKEN-WT)自然交配,由相同的双亲获得受精卵,对每个1-4细胞期的受精卵中注入约3nL的工作液。在进行显微注射之后,将受精卵转移至10cm培养皿(Azunol(呱仑酸钠)灭菌培养皿)中,使用作为标准培育溶液的E2培养基,在设定为28℃的恒温箱内使其生长。

[0035] (2) 5-氨基乙酰丙酸的作用的研究按照以下的实验日程表实施。

第0天(受精7-8小时):将约50个胚胎转移至10cm培养皿中,将含有以阻碍黑色素色素生成为目的的0.003%的1-苯基-2-硫脲(P7629,Sigma-Aldrich)的E2培养基用作培育溶液。在实验组中以ALA/SFC:100μM/50μM进行调制,在对照组中以ALA/SFC:0μM/0μM进行调制。

第1天:进行第2次ALA/SFC给予。

第2天:进行第3次ALA/SFC给予。

第3天:在未麻醉下,使用1%低熔点琼脂糖凝胶,将个体载置在3cm玻底培养皿(greiner)上,使用设置在倒置显微镜CKX53(OLYMPUS)上的20倍物镜,在明亮视野下进行心

脏成像,获得视频。

[0036] (3) 图像分析使用ImageJ并通过以下方式实施。

将获得的视频转换为序列图像,作为Region of Interest(感兴趣区) (ROI),记录各帧(frame)的心室的轮廓(outline)。接着,通过Fit-to-Ellipse算法,测定近似于各序列图像上的ROI的椭圆的长径与短径,将各序列图像的旋转椭圆体的体积作为心室容量进行计算,由得到的心室容量的变化率测定峰充盈率(Peak filling rate) (PFR:舒张功能)。

将结果示于图5。由图5明确可知,通过5-氨基乙酰丙酸的给予,改善了活体内心肌病模型的左室舒张功能。

序列表

<110> 学校法人順天堂
<120> 肥厚型心肌病治疗剂
<130> KHP232110831.1
<150> JP 2021-009754
<151> 2021-01-25
<160> 2
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 1
catgttgct ctgatctgac acgca
<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 2
cctcctacct cagttacaat ttata

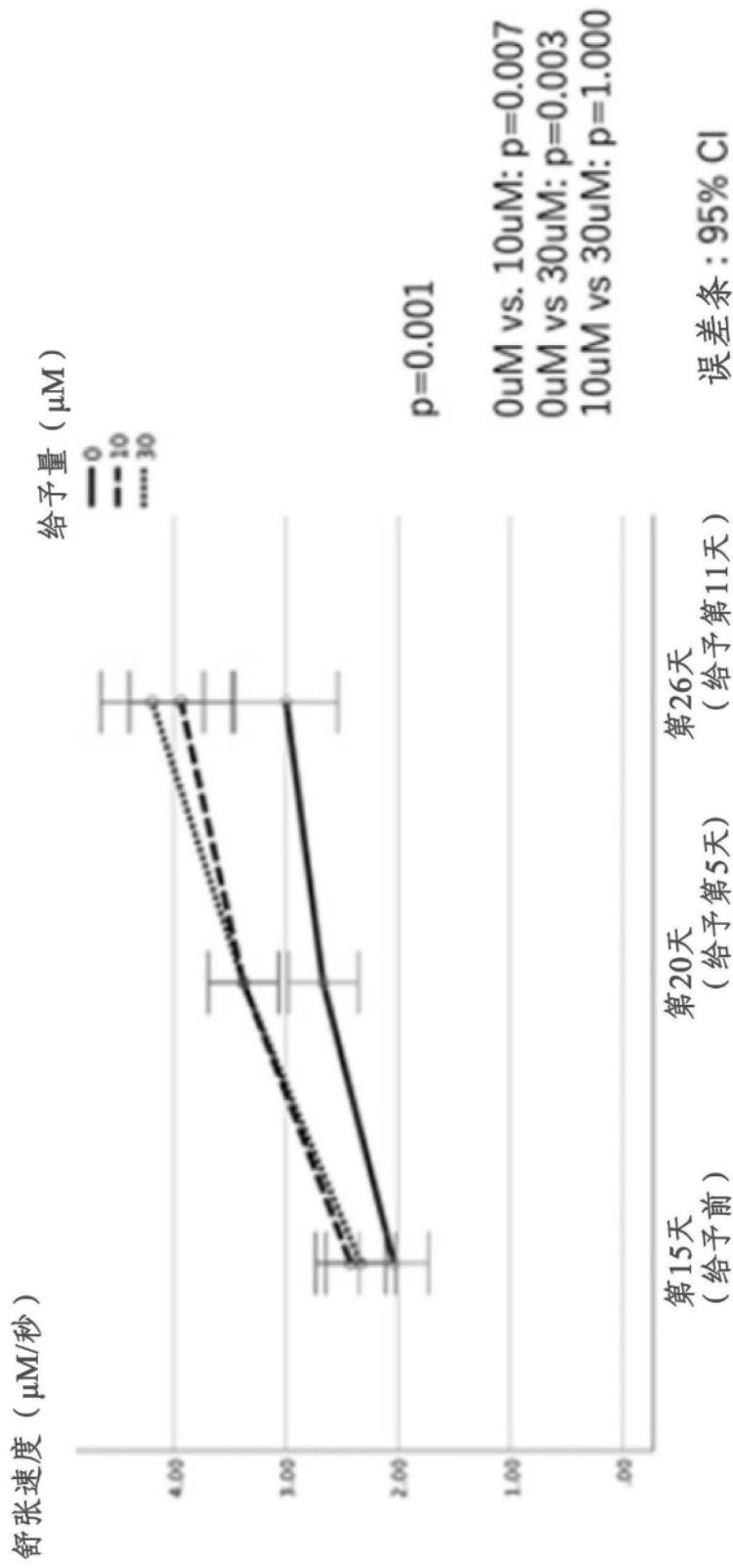


图1

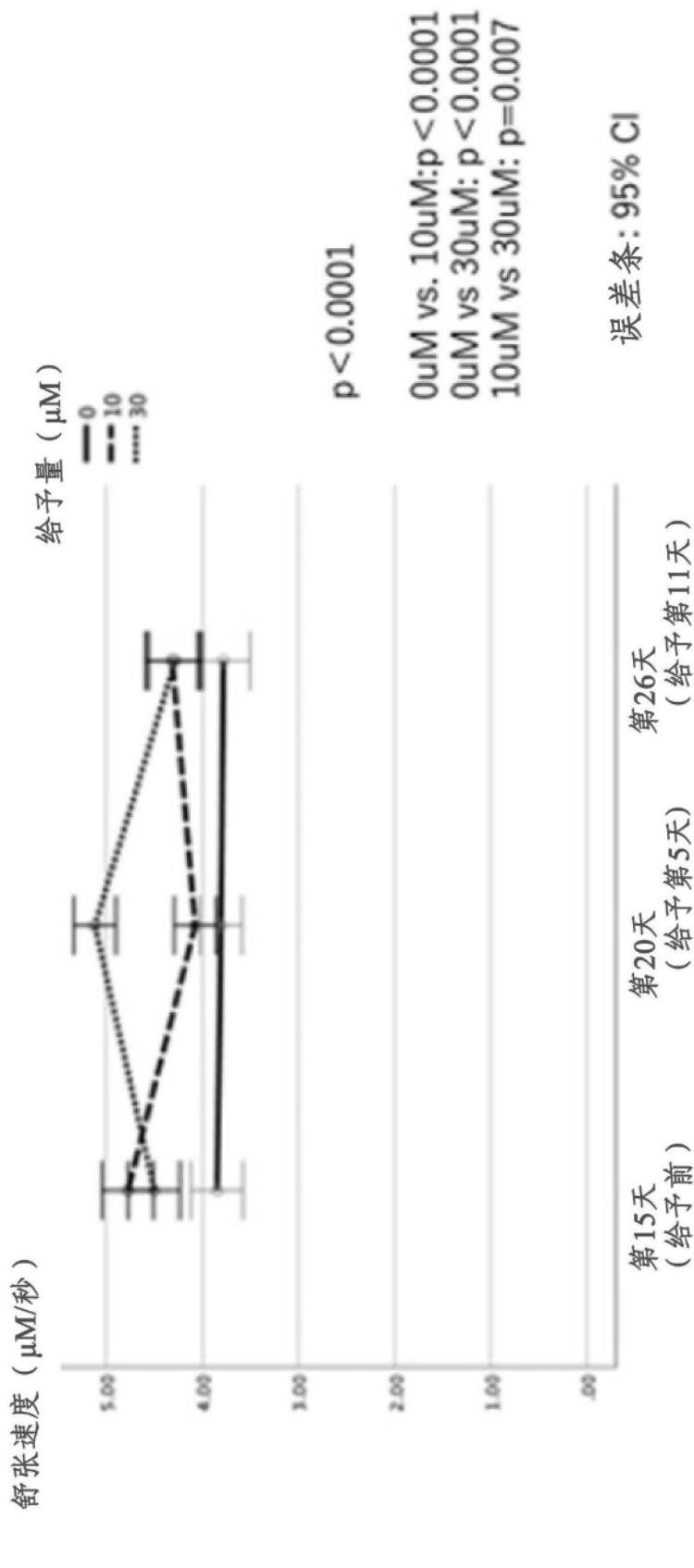


图2

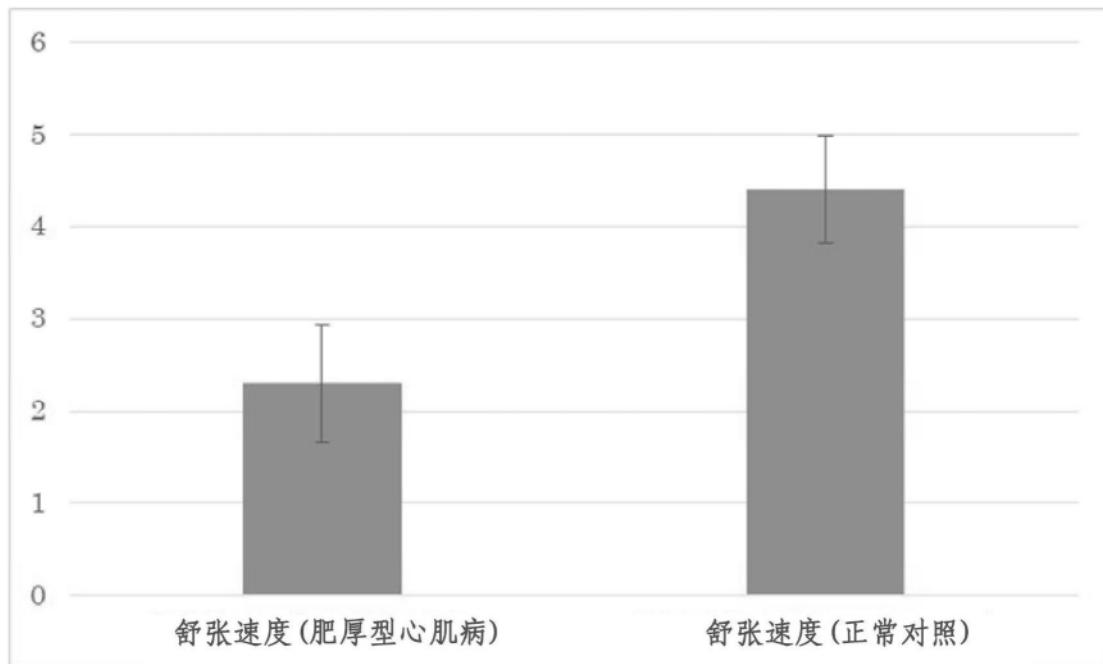
舒张速度 ($\mu\text{M}/\text{秒}$)

图3

(a) (b)

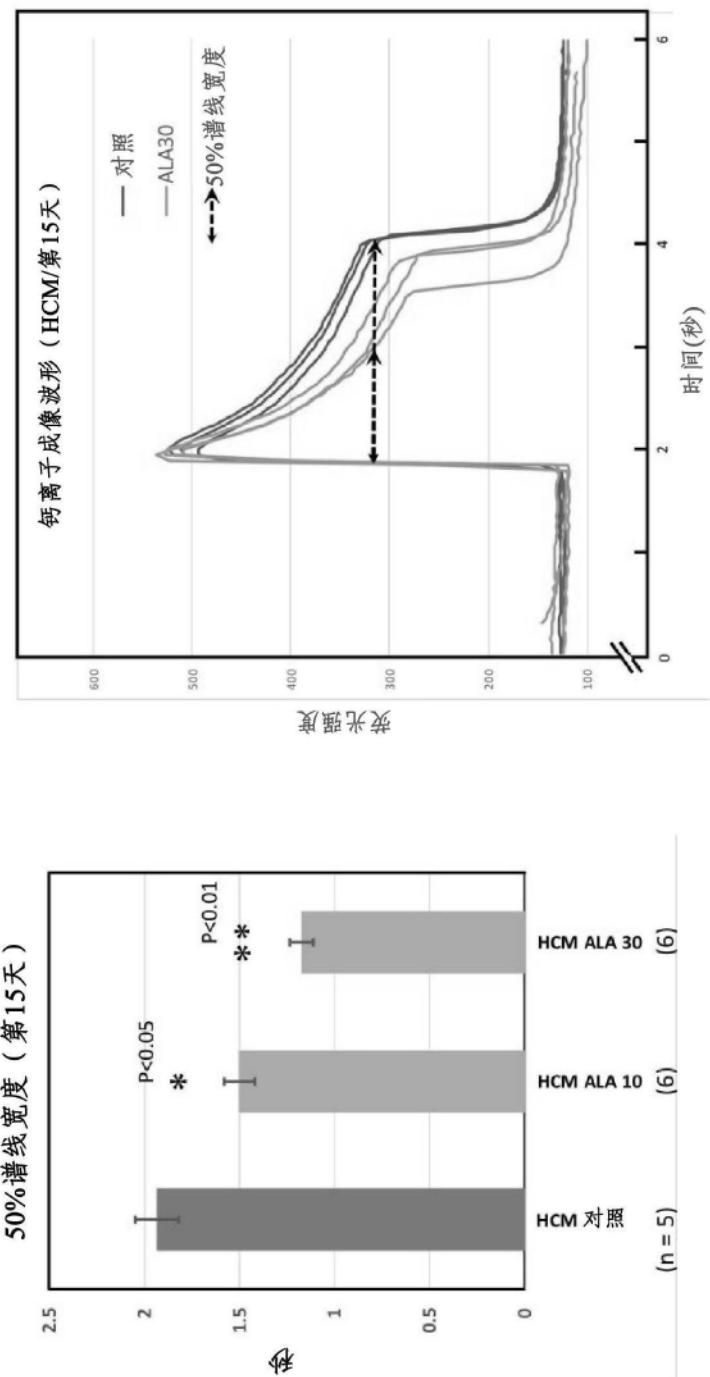


图4

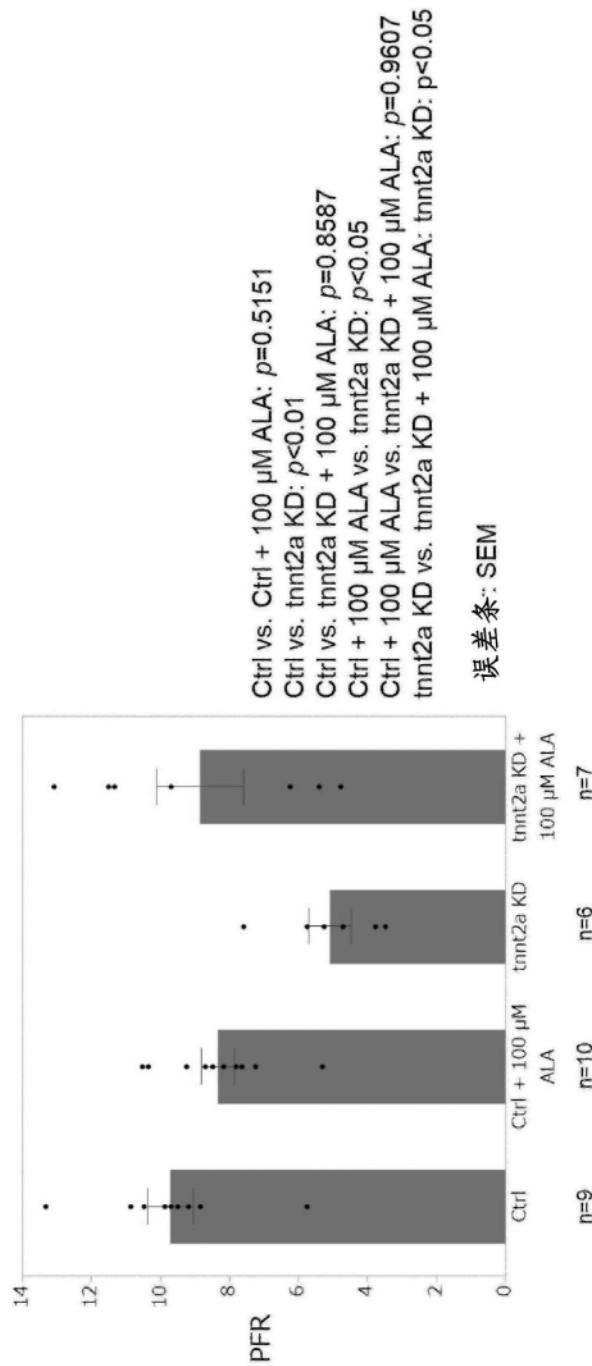


图5