



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101099860 B

(45) 授权公告日 2011.06.01

(21) 申请号 200710127914.4

A61P 13/12(2006.01)

(22) 申请日 2003.07.25

A61P 15/00(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 29/00(2006.01)

10234192.3 2002.07.26 DE

A61P 43/00(2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 31/198(2006.01)

03822116.0 2003.07.25

A61K 31/366(2006.01)

A61K 31/40(2006.01)

(73) 专利权人 依泊加两合公司

(56) 对比文件

地址 德国汉诺威

US 6274158 B1, 2001.08.14, 全文.

(72) 发明人 费迪南德·赫尔曼·巴尔曼

W0 02/14356 A2, 2002.02.21, 权利要求

赫尔曼·哈勒尔

35-36, 说明书第 60 页倒数第 2 行.

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

张芸. 辛伐他汀对糖尿病肾病肾功

31002

能的保护作用. 中国新药与临床杂志 19

代理人 薛琦

2. 2000, 19(2), 105-107.

(51) Int. Cl.

赵同峰 等. L- 精氨酸对急性肾衰的

A61K 38/18(2006.01)

保护作用. 肾脏病与透析肾移植杂志 8

A61K 9/08(2006.01)

6. 1999, 8(6), 550-551.

A61K 9/10(2006.01)

审查员 潘天耀

A61K 9/107(2006.01)

A61K 9/20(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 9/08(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 10 页

(54) 发明名称

促红细胞生成素的应用

(57) 摘要

本发明涉及到促红细胞生成素的应用, 该物质用于刺激内皮祖细胞的生理动员、增殖和分化; 用于刺激血管发生; 用于治疗与内皮祖细胞功能障碍有关的疾病; 以及用于生产治疗这些疾病的药物组合物, 和生产包含促红细胞生成素和其它合适的能刺激内皮祖细胞的活性成分的药物组合物。

1. 相当于每周 1～90IU EPO/kg 体重的亚红细胞增多剂量的促红细胞生成素在制备用于治疗人体或动物体内与内皮祖细胞的机能障碍有关的病理状态或疾病的药物中的应用；所述的与内皮祖细胞的机能障碍有关的病理状态或疾病为终末期肾功能衰竭。

促红细胞生成素的应用

[0001] 本申请为申请日为 2003 年 7 月 25 日,申请号为 03822116.0(国际申请号为 PCT/EP03/08229),发明名称为“促红细胞生成素的应用”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及到促红细胞生成素的应用,该物质用于刺激内皮祖细胞的生理动员、增殖和分化;用于刺激血管发生;用于治疗与内皮祖细胞机能障碍有关的疾病;以及用于生产治疗这种疾病的药物组合物,和生产包含促红细胞生成素和其它合适的能刺激内皮祖细胞的活性成分的药物组合物。

背景技术

[0003] 血管内皮是排列衬于血管内壁的一层细胞。内皮将血和其它血管层隔开,但内皮不仅仅是被动的血管屏障,而是还能积极调节血管紧缩状态。因此,在此还提及内皮依赖的血管舒张。由于内皮的位置关系,内皮始终承受血液动力学及新陈代谢的应激反应。因此,一些病理状态,如血压升高、LDL 值升高、肾功能受损,或者血糖升高,通常与内皮的功能缺陷有关,从而产生形态上的损坏,例如出现动脉粥样硬化等类似疾病。内皮功能发生变化、降低或者内皮功能障碍的早期征兆是内皮依赖的血管舒张减少。

[0004] 在患冠心病时,或者即使不患冠心病但存在风险因素时,比如说患有高血压、高脂蛋白血症或者糖尿病,内皮功能缺陷表现在 NO(=EDRF)的生成减少,和内皮素(Endothelin)生成增加。高的内皮素血浆水平会导致异常的细胞粘附、炎症、血管增生及严重的血管狭窄。内皮功能障碍的另一个特征是:类似于 ICAM-1 以及 VCAM-1 的粘附分子的过度生成,造成血小板及单核细胞大量地附着在内皮上,从而加重了血管的紧缩状态。由此,各个系统发生失衡,从而促进了血管收缩、粘附、聚集、血液凝固、动脉粥样硬化,并进一步促使动脉血栓形成。甚至心理应激也会导致可测量的内皮机能障碍,这种障碍可以持续至 4 小时。

[0005] 内皮细胞同样参与新血管形成。血管的形成对许多过程,如胚胎形成、妇女的生殖周期、伤口愈合、肿瘤生长以及局部缺血的区域新血管形成过程,具有重要意义。最初,出生后血管的形成,主要归因于血管新生的过程。血管新生(angiogenesis),是指通过毛细血管从已经存在的血管系统中芽生出新的血管。在血管新生过程中,首先是包围血管的基膜通过蛋白水解酶被分解,并且在血管周围区域内的细胞外基质裂解。在此过程中,由此释放出来的血管新生刺激物质会使早已存在的已分化的内皮细胞沿着趋化刺激物移行,与此同时,这种内皮细胞进行增殖和变形转化。而后,通过内皮细胞的相邻沉积,形成毛细血管状腔的新的血管袢。然后,就开始新的基膜的合成。

[0006] 但最近的研究表明,在成年机体中新血管的形成不仅基于血管新生,而且基于血管发生机制。血管发生(vasculogenesis)是指由不同分化位点的内皮祖细胞形成的新血管。新发现在健康人和动物的外周血中存在内皮祖细胞(EPC),这对血管发生局限于胚胎发育期这一教条进行了有力批驳。应用动物模型可以证明,源自骨髓的内皮祖细胞积极参

与新血管形成。其也表明,能表达内皮特异性抗原的、特异性的 CD34 阳性的白细胞亚群,可以移植生长于局部缺血区域。除此以外,在体外从 CD133⁺ 和 CD34⁺ 细胞中可以提取出内皮祖细胞 (EPC),该内皮祖细胞对成年机体中的血管形成做出了显著贡献 (Asahara et al., Science, 275(1997), 964-967; Crosby et al., Circ. Res., 87(2000), 728-730; Gehling et al., Blood, 95(2000), 3106-3112)。另外还有证据表明,注射分离的 CD34⁺ 细胞或者培植的内皮祖细胞,可以促进糖尿病老鼠的血流恢复 (Schattmann et al., J. Clin. Invest., 106(2000), 571-578), 并且增进体内新血管形成 (Asahara et al., Circ. Res., 85(1999), 221-228; Crosby et al., Circ. Res., 87(2000), 728-730; Murohara et al., J. Clin. Invest., 105(2000 年), 1527-1536)。除此以外,也有证据表明,通过 CD34⁺ 细胞诱导的新血管形成改善了心脏功能 (Kocher et al., Nat. Med., 7(2001), 430-436)。

[0007] 但是,目前尚未完全搞清内皮祖细胞的动员和分化的基础机制。分子生物学及细胞生物学的研究表明,不同的细胞因子以及血管生成生长因子对骨髓中的内皮祖细胞的动员产生刺激作用。因此可以很清楚地表明血管新生因子,如 VEGF 以及 GM-CSF,可以提高内皮祖细胞的数目 (Asahara et al., EMBOJ., 18(1999), 3964-3972; Takahashi et al., Nat. Med., 5(1999), 434-438)。所谓的 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, 血管内皮生长因子) 是一种蛋白质,可以不同亚型出现,可与例如出现在不断生长的内皮细胞表面上的两种酪氨酸激酶受体 VEGF-R1 (flt-1) 和 VEGF-R2 (flk-1) 相结合 (Wernert et al., Angew. Chemie, 21(1999), 3432-3435)。VEGF 受体的活化,是通过 Ras-Raf-MAP 激酶途径,来表达蛋白酶以及在內皮细胞或者说內皮祖细胞表面上的特异性整合素 (Integrinen),并且最终启动这种细胞的增生,并使其朝血管新生刺激物的方向移行。至于 GM-CSF (中性粒细胞-巨噬细胞-集落刺激因子),是一种细胞因子,其先前尤以刺激白血球包括中性粒细胞、巨噬细胞以及嗜伊红细胞而闻名。众所周知,PlGF (胎盘生长因子) 能刺激内皮祖细胞的动员,但不刺激其增殖。Llevadot 等 (J. Clin. Invest., 108(2001), 399-405) 的研究结果表明, HMG-CoA 还原酶抑制剂,特别是他汀类 (Statine), 作为降低脂质的药物并减少冠状动脉疾病的发病率和死亡率,可以动员内皮祖细胞。此外, Dimmeler 等 (J. Clin. Invest., 108(2001), 391-397) 也可以表明, 象阿伐他汀 (Atorvastatin) 和辛伐他汀 (Simvastatin) 这样的他汀类药物,可以在体内及体外显著改善从外周血分离的单个核细胞及 CD34⁺ 干细胞中的内皮祖细胞的分化程度。因此,用他汀类对老鼠进行治疗,则会导致分化的内皮祖细胞的数目上升,在此过程中,他汀类显示出和 VEGF 一样强的作用。

[0008] 对内皮祖细胞的动员和 / 或分化进行刺激,是一项重要而崭新的治疗策略,它可以提高出生后的新血管形成的数量,尤其是血管发生的数量,并且可以用于治疗与内皮祖细胞和 / 或内皮细胞的机能障碍有关的疾病。

发明内容

[0009] 本发明便是基于该技术问题,即如何提供更好地刺激内皮祖细胞以及治疗疾病,尤其是那些与内皮祖细胞的机能障碍有关的疾病的手段和方法。

[0010] 本发明解决了这一技术难题——公开了在人体或动物体内应用促红细胞生成素和 / 或其衍生物,以刺激内皮祖细胞的生理动员,内皮祖细胞的增殖,内皮祖细胞向内皮细胞的分化和 / 或使内皮祖细胞朝血管发生或血管新生刺激物方向移行。本发明还通过公开

应用促红细胞生成素和 / 或其衍生物来治疗与内皮祖细胞和 / 或内皮细胞的机能障碍有关的疾病或病理状态来解决这一技术难题。

[0011] 根据本发明,令人惊讶地是,用促红细胞生成素进行治疗可以产生内皮祖细胞的生理动员,在此过程中,循环的内皮祖细胞的数量上升,并且诱导其分化,尤其在 EPO 剂量相对较低时。除此以外,在一些病理情况下出现的内皮祖细胞的功能不足会得到代偿。根据本发明可表明,患有晚期慢性肾脏疾病的病人,与健康的受检者拥有同样数量的循环的干细胞数量,但对这些病人来说,这种干细胞已经丧失了通过内皮祖细胞向内皮细胞分化的能力。因此,与健康的受检者相比,患有慢性肾脏疾病的病人中具有粘附能力、且显示内皮细胞表型的细胞数量明显减少。根据本发明发现,在用促红细胞生成素对这种病人进行治疗后,循环的干细胞数量明显增加了 50% 以上,尤其是那些显示出内皮表型的细胞的数量大幅度地增加。就像一项功能性细胞培植试验所证明的那样,对患有慢性肾脏疾病的病人来说,受损的内皮祖细胞的粘附能力,通过促红细胞生成素进行治疗后,增加了三倍。分化的内皮祖细胞或内皮细胞具备的粘附能力是形成新的组织和 / 或血管的基本前提之一。促红细胞生成素可以以这种方式在组织或器官中诱导新血管形成,尤其是诱导血管发生,在这些组织或器官中释放出相应的血管新生或血管发生刺激物。

[0012] 根据本发明,促红细胞生成素 (以下称为 EPO) 可以用来在人体或动物体内,尤其在成年机体内,刺激内皮祖细胞的生理动员、刺激内皮祖细胞的增殖,刺激内皮祖细胞向内皮细胞的分化,和 / 或使内皮祖细胞沿着血管新生或血管发生刺激物的方向移行。因此,根据本发明,促红细胞生成素可有利于通过血管发生,在存在有血管病损的组织或器官中刺激新血管的形成。除此以外,由于促红细胞生成素可以刺激内皮祖细胞,还可以诱导内皮组织的形成,因此根据本发明,促红细胞生成素同样可以用来治疗人体或动物体中与内皮祖细胞和 / 或内皮细胞的机能障碍有关的疾病。

[0013] 根据本发明,“促红细胞生成素”或者说“EPO”是指一种能控制干细胞的生长、分化和成熟,经幼红细胞转化成红细胞的物质。促红细胞生成素是一种糖蛋白,经证明,它具有 166 种氨基酸、三个糖基化点以及大约 34,000Da 的分子量。在 EPO 诱导的红系祖细胞的分化过程中,其诱导合成珠蛋白,提高了血红素复合体的合成,而且提高了铁蛋白受体的数量。细胞会因此吸收更多的铁,并且由此合成功能性血红蛋白。在成熟的红血球里,血红蛋白与氧气相结合。因此,红血球和包含其中的血红蛋白,对机体的供氧起着关键作用。通过 EPO 与红系祖细胞的细胞表面上相应的受体之间的相互作用,来启动这些过程 (Graber 和 Krantz, Ann. Rev. Med. 29 (1978), 51-56)。

[0014] 促红细胞生成素主要在肾脏中生成,但在肝脏和脑中也会出现少量的此类物质。在血清中同样发现了少量的促红细胞生成素,并且在生理条件下,至少也会部分地排泄于尿中。对患有肾功能衰竭的病人来说,其体内形成的促红细胞生成素是不足的,并因此患有贫血。众所周知,可以通过给予促红细胞生成素来弥补其供应不足。促红细胞生成素的其它临床应用,表现在对恶性疾病或者病毒感染进行化疗或放疗后出现的医疗性贫血进行治疗 (EP0456153B1)。美国专利 4,732,889 公开了包含促红细胞生成素的组合物可以用来治疗与类风湿性关节炎有关的贫血。此外,公开号为 W088/03808 的专利,揭示了利用含有 EPO 的组合物来治疗血色素沉着症。

[0015] 这里所使用的术语“促红细胞生成素”包括每一种来源的 EPO,尤其是人类或动物

的 EPO, 不仅包括天然的 EPO, 即 EPO 的野生型; 而且包括 EPO 的衍生物、类似物、修饰物、突变体、变异体或其它物质, 只要它们显示出野生型促红细胞生成素的生物作用。

[0016] 根据本发明, “衍生物”是指获得的促红细胞生成素的功能性等价物或衍生物, 其保持了促红细胞生成素基本结构, 取代一个或多个原子、分子官能团或基团, 尤其是取代诸如乙二醇 (Ethylenglycol) 的糖链; 和 / 或那些氨基酸序列在至少一个位置上与天然的人或动物促红细胞生成素蛋白有差异, 但基本上具有该氨基酸水平的高度同源性和相当的生物活性。本发明中例举使用的促红细胞生成素衍生物已由专利 WO 94/25055, EP 0 148 605 B1 或者 WO95/05465 所揭示。

[0017] “同源性”尤其意味着至少 80% 的序列一致, 较佳地是至少 85% 的序列一致, 更佳地是至少超过 90%、95%、97% 和 99% 的序列一致。因此, 技术人员所熟悉的术语“同源性”, 是指两种或多种多肽分子之间的相似程度, 而这种相似程度是通过序列之间的一致性来确定的。在此, 一致性不仅可以意味着相同的一致性, 而且也可以意味着保守性氨基酸交换。

[0018] 根据本发明, “衍生物”这个术语同样包括融合蛋白; 对这些融合蛋白而言, 在其 N- 终端部分或者 C- 终端部分存在另一种蛋白的功能区。在本发明的一个实施例中, 所述的另一种蛋白, 可以是 GM-CSF、VEGF、PIGF、他汀类或另一种会对内皮祖细胞产生刺激作用的因子。在本发明的另一实施例中, 所述的另一种蛋白同样可以是对分化的内皮细胞产生刺激作用的因子, 如血管新生因子 (Angiogenin) 或者 bFGF (basic fibroblast growth factor, 碱性成纤维细胞生长因子)。众所周知, bFGF 这种生长因子对内皮细胞施加很强的促细胞分裂及趋化活性。

[0019] 促红细胞生成素衍生物和天然的促红细胞生成素之间的差别, 可以通过突变, 例如删除、取代、插入、添加、碱基交换和 / 或对促红细胞生成素氨基酸序列进行编码的核苷酸序列的重组来实现。当然在此也可以指以自然方式出现的各种序列变异, 如来自另一个有机体的序列, 或以自然方式突变的序列, 或者一些变异, 这些变异通过本领域熟知的助剂, 如化学试剂和 / 或物理因子, 有目的地被引入编码促红细胞生成素的核苷酸序列中。因此, 根据本发明, “衍生物”这一概念同样包括变异的促红细胞生成素分子, 也就是说促红细胞生成素变异体。

[0020] 根据本发明, 同样可以使用促红细胞生成素的肽或蛋白类似物。在本发明的实施例中, “类似物”这一概念包括一些化合物, 这些化合物没有与促红细胞生成素的氨基酸序列相同的氨基酸序列, 但所具有的氨基酸序列的三维结构与促红细胞生成素的三维结构极其类似, 因此具有相当的生物活性。促红细胞生成素类似物可以是一些化合物, 这些化合物包含负责促红细胞生成素与其受体相结合的适当构形的氨基酸残基, 因此其可以模仿促红细胞生成素结合区的实质性表面特性。在 Writhton 等, 科学 (Science), 273 (1996), 458 里对这些化合物作了描述。

[0021] 根据本发明, 可以用不同的方式生产出所使用的促红细胞生成素, 如从人尿液中分离, 或者从患有再生障碍性贫血的病人的尿液或血浆 (包括血清) 中分离出来 (Miyake et al., J. B. C. 252 (1977), 5558)。人类的 EPO 也可以从人的肾癌细胞的组织培养物中 (JA-OS55790/1979), 具有生成人的 EPO 能力的人类原始淋巴细胞中 (JA-OS40411/1982), 以及从通过人的细胞系的细胞融合而获得的杂交瘤细胞培养物中来提取。同样也可以通过

基因工程技术方法来生产 EPO, 借助于合适的、编码相应的 EPO 氨基酸的 DNA 或 RNA, 例如在细菌中、酵母中、植物细胞系或动物细胞系中生产所需要的重组蛋白。例如, 在 EP 0 148 605 B2 或 EP 0 205 564 B2 以及 EP 0 411 678 B1 中对这些方法进行了描述。

[0022] 本发明尤其涉及到促红细胞生成素(以下称为 EPO) 和 / 或其衍生物的应用, 此应用就是在人体或动物体内, 尤其在一个成熟机体内刺激内皮祖细胞的生理动员、刺激内皮祖细胞的增殖、刺激内皮祖细胞向内皮细胞的分化和 / 或使内皮祖细胞沿着血管新生或血管发生刺激物方向移行。

[0023] 根据本发明, “内皮祖细胞”(endothelial progenitor cells, EPC) 是指在血液循环过程中循环流动的细胞, 这些细胞具有分化成内皮细胞的能力。而在胚胎培育过程中出现的内皮祖细胞则是指成血管细胞; 在成年机体中出现的内皮祖细胞则是指类似于成血管细胞的细胞, 它们可以从单个核细胞, 尤其是从 $CD34^+$ $CD14^+$ 单核细胞和 / 或自外围血液中分离出来的 $CD34^+$ 干细胞中得到。

[0024] 根据本发明, “动员”或“生理性动员”是指干细胞和 / 或来自骨髓的祖细胞通过生长因子而激活的过程, 在这过程中, 干细胞或者说祖细胞进入血液循环, 尤其进入外围血液中。

[0025] 根据本发明, “增殖”是指细胞进行扩大且随后分裂为二个或多个子细胞的能力。因此, 由 EPO 介导的对内皮祖细胞产生的刺激活动, 尤其关系到内皮祖细胞的数目, 并因此进一步关系到内皮祖细胞的分裂特性。

[0026] 根据本发明, 内皮祖细胞的“分化”是指从来自骨髓的单个核细胞, 经内皮祖细胞, 到内皮细胞的演变过程。在此, “内皮细胞”是指形成内皮的细胞, 也就是说, 这种细胞形成血管和浆液腔的单层细胞的内衬。内皮细胞的特征是, 它们释放出血管活性的物质, 比如: 诸如 EDRF (endothelial derived relaxing factor, 内皮源性舒张因子) 的血管舒张物质, 或者诸如内皮素 (Endothelin) 的收缩物质, 抑制或激活血液凝结的因子和调节血管渗透性的因子。内皮细胞同样合成内皮下结缔组织的成份, 尤其是 IV 型和 V 型胶原; 细胞粘附蛋白, 例如层粘连蛋白 (Laminin)、纤维结合蛋白和血小板反应蛋白 (Thrombospondin); 生长因子, 诸如平滑肌细胞的生长因子; 以及形成新血管的因子。

[0027] 根据本发明, 内皮祖细胞的“移行”是指血液循环中的内皮祖细胞沿着血管发生或血管新生刺激物的方向移行, 并且集中在血管新生或血管发生刺激物的区域内。“血管发生刺激物”是指在人体或动物体内的组织或血管中的化学刺激物, 此刺激物特异性地对内皮祖细胞产生作用并促使其朝体内最初产生该化学刺激物的部位移行。按照这种方式, 该血管发生刺激物诱导血管发生的过程。而“血管新生刺激物”则是指在人体或动物体内的组织或血管中的化学刺激物, 此刺激物特别对分化的内皮细胞产生作用, 并促使其朝体内最初产生该化学刺激物的部位移行。按照此方式, 血管新生刺激物诱导了血管新生。

[0028] 在本发明的另一实施例中, 提供了促红细胞生成素(以下称为 EPO) 和 / 或其衍生物用于提高分化的内皮祖细胞的粘附能力的用途。根据本发明, 特别是促红细胞生成素被用来改善内皮祖细胞的粘附能力, 也就是说改善细胞-细胞之间的粘附能力。进行分化的内皮祖细胞的粘附或者已分化形成的内皮细胞的粘附, 是形成新血管或者新内皮组织的基本前提之一。而细胞粘附则通过蛋白质分子来介导。

[0029] 本发明同样涉及到促红细胞生成素在用来刺激新血管的形成, 尤其是刺激血管发

生中的应用。根据本发明,“血管发生”是指从在不同分化位点进行分化的内皮祖细胞中形成新的血管。根据本发明,使用促红细胞生成素可以使得内皮祖细胞在很大程度上参与新血管形成,或参与新血管的局部形成来恢复受损的血管部分。因此,根据本发明提供促红细胞生成素和 / 或其衍生物用来促进新血管的形成,和 / 或促进通过局部新血管形成来替代受损的血管部分的用途。

[0030] 在本发明的另一实施例中,提供了促红细胞生成素和 / 或其衍生物用来刺激内皮祖细胞形成内皮组织的用途。

[0031] 在本发明的一个特别优选的实施例中,提供了将促红细胞生成素和 / 或其衍生物用来治疗与内皮祖细胞的机能障碍有关的人体或动物体的病理状态或疾病或其后遗症的用途。

[0032] 根据本发明,“疾病”、“病理状态”或“病症”是指在器官或整个有机体中生命过程的紊乱,其结果是引起主观上感受到的或客观上可以确定的生理或心理上的变化。本发明尤其涉及到与内皮祖细胞的机能障碍有关的疾病,也就是说这种疾病要么是这些细胞机能障碍的结果,要么是由这些细胞介导引起的疾病。而“后遗症”是指继发性疾病,也就是指继发于原始病理状态的第二病症。

[0033] 根据本发明,内皮祖细胞的“机能障碍”是指这些细胞的基本细胞功能,诸如新陈代谢活性、对刺激的应答、能动性、分裂行为或分化行为的紊乱。例如,内皮祖细胞的机能障碍可能在于这种细胞没有增殖或者增殖不够。因为通过使用促红细胞生成素可以刺激内皮祖细胞的增殖,所以不仅可以此对内皮祖细胞的分裂行为不足,而且也可以对已经分化出来的内皮细胞的分裂行为不足进行代偿,并且可以提高内皮祖细胞或内皮细胞的数量。又例如,内皮祖细胞的机能障碍可能在于这种细胞分化成内皮细胞的功能受损。内皮祖细胞的机能障碍同样可能因其粘附功能受损和 / 或沿着血管新生或血管发成刺激物方向移行的能力下降而引起。内皮祖细胞的这种机能障碍会导致一些不良后果,例如,新内皮组织的形成和 / 或血管发生受到影响或阻碍。内皮祖细胞的机能障碍也可能由病理性因素,如由高血压、高脂蛋白血症、尿毒症或糖尿病所引起。内皮祖细胞的机能障碍可以表现为 NO 合成酶将 L- 精氨酸合成 NO (= EDRF) 的量减少,内皮素的量增加和 / 或粘附分子、如 ICAM-1 和 VCAM-1 的量上升。

[0034] 根据本发明,与内皮祖细胞的机能障碍有关的疾病,尤其是指高胆固醇血症,糖尿病,内皮介导的慢性炎症、诸如脉管炎,包括网状内皮细胞增生症的内皮细胞增生症 (Endotheliose),动脉粥样硬化,冠心病,心肌缺血,心绞痛,年龄相关性心血管病症,四肢的缺血疾病,雷诺病,先兆子痫,妊高症,慢性或急性肾功能衰竭、尤其是终末期肾功能衰竭,心力衰竭,伤口愈合以及这些疾病的后遗症。

[0035] “高胆固醇血症”的特征是,血液中胆固醇浓度升高。目前原发性高胆固醇血症的最为常见的形式就是多基因高胆固醇血症。继发性高胆固醇血症经常出现在糖尿病、肾病综合症、甲状腺功能减退及肝病患者身上。

[0036] 至于“糖尿病”,包括各种形式的、病因及症状各异的葡萄糖代谢紊乱病症。糖尿病的血管相关性并发症的发生发展特别是由 AGE-RAGE 系统引起。AGEs (Advanced Glycation Endproducts, 晚期糖基化终产物) 是在蛋白质或脂质长时间持续的暴露,以减少诸如葡萄糖等糖份之后,由一系列复杂的反应产生。晚期糖基化终产物可在正常的老化过程中形成,

但在糖尿病以及早老性痴呆 (Alzheimer's disease) 中程度越来越重。通过与晚期糖基化终产物进行结合,就会导致氧化应激反应、激活 NF- κ B 转录因子,并因此导致内皮的内环境紊乱。

[0037] “内皮介导的慢性炎症”就是指人体或动物体由于机体或其组织对有害刺激做出的防御反应而引起的病症或状态,其中特定的信号分子改变内皮细胞的特性,以致于与其它细胞类型的激活一起协同作用的白细胞就一直黏附在内皮细胞上,最后穿透进该组织中并引发炎症。内皮介导炎症的一个例子就是白细胞性血管炎。在内皮介导的炎症激活过程中,起中心作用的是转录因子 NF- κ B。另一个导致内皮介导的慢性炎症发生的系统就是 AGE-RAGE 系统。

[0038] “内皮细胞增生症”是指与非血小板减少性紫癜有关的变性和增生的内皮变化。“网状内皮细胞增生症”则是指网状内皮系统疾病,如网状组织、网状细胞增生、网状组织细胞增生症以及 Hand-Schüller-Christian 病。

[0039] “心肌缺血”是指无血流或者供血不足,也就是说由于动脉供血不足或缺失而引起的心肌壁的血供障碍。至于“心肌梗塞”或者“心肌梗塞”则是指局部区域心肌的坏死,此病在病人患有慢性冠心病的情况下经常作为急性并发症出现。“冠心病”或者“缺血性心脏病”则是指冠状动脉退化性病症,它由于心脏冠状血管变细或闭塞导致心肌供血减少。“心绞痛”是指急性冠状动脉机能不全或者狭心症,它可能是在病人患有冠心病、冠状动脉痉挛、血流障碍、心律紊乱、高血压或者低血压的情况下由于氧供应和氧需求之间的不平衡而引起的。“雷诺病”是指由于血管收缩,也就是说由于阵发性的血管痉挛,通常发生在手指动脉的缺血状态。原发性雷诺病是供血四肢末端的小血管的纯功能性障碍,而继发性雷诺病则继发于其它疾病,如血管炎症。

[0040] “先兆子痫”是母体的内皮及血管疾病,可能是来自胎盘的嗜内皮物质所产生的影响。先兆子痫是一种多系统病症,它会导致大量器官的机能障碍并且会呈现多种多样的症状。血供障碍是该病症最典型的表现,是由于血管阻力增加的后果,可能还伴有严重的局部变异。现认为已证实内皮机能障碍是先兆子痫发病机理的中心组成部分。

[0041] 根据本发明,“肾功能衰竭”是指肾脏常规经尿排泄物质的排泄能力受到限制,并进一步失去调节电解质、水以及酸碱平衡的能力。终末期的肾功能衰竭的特征是:肾脏的排泄及内分泌功能崩溃。

[0042] 根据本发明,肾功能衰竭可以是急性肾功能衰竭,它又被称为急性肾衰、休克肾或休克无尿症。急性肾功能衰竭的特征是:由于通常是可逆的肾脏损伤的原因,肾脏突然部分或全部丧失排泄功能。该原因可能是由于血容量过低、低血压和脱水引起的低灌注,而其直接原因是失血(多处损伤、胃肠道出血或产后出血、对心脏、血管、腹部或前列腺进行的较大的手术)、休克(心肌梗塞)、严重感染(败血症、腹膜炎、胆囊炎)、溶血(溶血性尿毒症综合症、阵发性血红蛋白尿、输血反应)、肌溶解症(挤压综合症、横纹肌溶解症、肌炎、烧伤)、失水或电解质缺失(大量呕吐、腹泻、过度出汗、肠梗阻、急性胰腺炎)等。其它的原因可能是肾毒素,如外源毒素(例如苯胺、乙二醇类化合物、甲醇及类似化合物),或者内源毒素(例如肌血蛋白或者草酸盐)。引起急性肾功能衰竭的其它原因还有肾脏疾病,例如炎症性肾病或肾脏移植之后的排异反应。急性肾功能衰竭同样也会因由于排尿受阻而造成的尿路梗阻引起。根据本发明,用促红细胞生成素对急性肾功能衰竭进行治疗,可以阻止,或者

至少减缓了急性肾功能衰竭的进程。

[0043] 根据本发明,肾功能衰竭可以包括慢性肾功能衰竭。慢性肾功能衰竭是血管、肾小球或小管间质性肾脏病症,感染以及先天性或后天获得性结构缺陷。慢性肾功能衰竭的原因包括慢性肾小球疾病、慢性肾盂肾炎、镇痛药性肾病、尿路梗阻以及小动脉硬化症和动脉硬化症。慢性肾功能衰竭最后就进展成尿毒症。根据本发明,用促红细胞生成素对慢性肾功能衰竭进行治疗,可以减缓慢性肾功能衰竭的进程。

[0044] 根据本发明,“心力衰竭”是指一种又被称为心功能不全或者心肌无力的病理状态。心力衰竭的特征是心脏的功能不足,心脏不能完成所需的供给功率。心功能不全可以根据不同方面进行划分。例如,根据受累的心室,划分为右心室功能不全、左心室功能不全以及双室功能不全(全心功能不全);根据生理及治疗机制所影响的平衡稳定性,则可以划分为代偿型及非代偿型心功能不全;根据变化过程,则划分为急性和慢性心功能不全。此外,心力衰竭的原因是心肌梗塞、心肌病、先天或后天获得性心脏缺陷、原发性高血压病、肺动脉高压、心律失常、冠心病或心肌炎。

[0045] 根据本发明,“伤口愈合”是指遭到损伤的组织进行恢复,以及伤口闭合的生理过程,尤其是结缔组织和毛细血管的重新形成。伤口愈合,可以是一期伤口愈合,其特征是快速和无并发症的基本完全的愈合,是由于具有好的血供和恰可近似于清洁伤口的伤口两端边缘之间只有最小程度的新结缔组织生成。若是伤口边缘较为分散的伤口,尤其是挤压的或者坏死的伤口,以及感染的伤口,则愈合需经延迟的二期愈合(二级愈合),是由于细菌感染而使组织缺损处填满肉芽组织,并有疤痕的广泛形成。自伤口边缘开始的上皮形成至伤口愈合结束。伤口愈合可分为三个阶段,也就是潜伏期、增殖期和修复期。潜伏期还可划分为痂形成的渗出期,尤其是伤口出现后的起初几个小时内;以及分解代谢自溶的吸收期,此阶段为出现伤口之后的一到三天。增殖期的特征是合成代谢性恢复,在此阶段由成纤维细胞形成胶原,处于出现伤口后的第四天到第七天。自出现伤口后的第八天起,则开始修复期,其特征是由肉芽组织转变为疤痕。

[0046] 根据本发明,“伤口”是指机体组织的关联的中断,伴或不伴物质的缺失,由机械或物理原因造成的细胞损坏。伤口类型有机械伤口、热伤口、化学伤口、辐射伤口以及疾病相关的伤口。机械伤口由于外部力量作用而产生,特别在切割伤和刺伤、挤压伤、撕裂伤、裂口和摩擦伤、抓伤和咬伤以及枪伤时出现。热伤口是由于炎热或寒冷时发生。化学伤口的出现原因很多,尤其是由酸或碱腐蚀引起。辐射伤口,例如发生在暴露于光化学和电离辐射时。疾病相关的伤口,主要是充血相关的伤口、创伤性伤口、糖尿病伤口等。本发明,特别地提供了运用促红细胞生成素治疗伤口,优选局部使用或静脉内使用。

[0047] 因此,本发明涉及到促红细胞生成素用于治疗高胆固醇血症,糖尿病,内皮介导的慢性炎症、诸如脉管炎,包括网状内皮细胞增生症的内皮细胞增生症,动脉粥样硬化,冠心病,心肌缺血,心绞痛,年龄相关性心血管病症,四肢的缺血疾病,雷诺病,先兆子痫,妊高症,慢性或急性肾功能衰竭、尤其是终末期肾功能衰竭,心力衰竭,伤口愈合以及这些疾病的后遗症。

[0048] 本发明提供了将促红细胞生成素以治疗有效量给病人使用,此剂量足以治疗上述疾病,尤其足以治疗与内皮祖细胞的机能障碍有关的疾病,或者预防这些病症,阻止其进展和/或减轻这些病的症状。该剂量取决于多种因素,如病人的年龄、体重和性别,疾病的严

重程度等。

[0049] 根据本发明,特别优选地将促红细胞生成素以很少的用量用于本发明揭示的各种用途、方法和组合物中。此用量低于现所使用的已知剂量,尤其应用在体内,也就是说,每个病人的EPO剂量为200到2000单位(IU,国际单位)/星期,优选的剂量是500到2000单位/星期,用量根据病症的严重程度以及肾脏功能。按照本发明规定的剂量,即200到2000单位(IU)/星期/病人,尤其按照剂量500到2000单位/星期/病人使用促红细胞生成素时,使用的是亚红细胞增多的剂量,也就是此剂量不会导致红细胞压积大于50%的红细胞增多症。根据本发明提供的亚红细胞增多剂量,相当于每周约1到90单位EPO/kg体重的剂量,尤其相当于1到45 IU EPO/kg体重的剂量;或者相当于周剂量为0.005到0.45 μ g/kg体重,特别是0.005到0.225 μ g/kg体重的安然爱斯普(Aranesp)的剂量。所谓的Aranesp就是双重聚乙二醇化EPO。根据本发明,用来治疗由内皮祖细胞的机能障碍引起的疾病和病理状态的剂量,即200到2000单位/星期/病人,尤其是500到2000IU/星期/病人,这种剂量与通常用来治疗肾性贫血所使用的初始剂量,即50-150单位/千克体重/星期相比是很低的(通常一开始是4000到8000IU/星期,但此剂量在治疗效果不满意的情况下还要提高用量)。

[0050] 在本发明的一较佳实施例中,涉及到将促红细胞生成素或/及其衍生物用作活性成分用来生产药物组合物或治疗与内皮祖细胞机能障碍有关的疾病或病理状态的药物制剂。

[0051] 根据本发明,“活性成分”是指在接触靶向分子或靶向细胞或者靶向组织时,以不同的方式影响组织、器官或机体的特异性功能的内源或外源性物质。因此本发明提供了促红细胞生成素作为符合本发明要求的药物组合物的活性成分,在与人体或动物机体内的内皮祖细胞接触时,对这些内皮祖细胞的增殖、分化和/或移行的行为产生了影响,从而使内皮祖细胞的机能障碍得到代偿,而且能够有效地控制、缓解或消除由于这种机能障碍而出现的疾病,或者能够有效预防这些疾病。

[0052] 根据本发明,“药物组合物”或者说“药物制剂”是指用于诊断、治疗和/或预防目的、能促进或恢复人体或动物体健康的混合物,此混合物至少包括一种以天然或合成方式制得的具有治疗效果的活性成分。药物组合物不仅可以是固体的,也可以是液体的混合物。比如说,一种包括活性成分的组合物可以包括一种或多种制药学上可接受的组分。除此以外,药物组合物通常可以包括在本领域内普遍使用的添加剂,比如说稳定剂、制造材料、释放剂、崩解剂、乳化剂、或者其它通常用来生产药物组合物的物质。

[0053] 本发明尤其提供了促红细胞生成素和/或其衍生物作为生产药物制剂的活性成分的应用,而该药物制剂则用来治疗高胆固醇血症,糖尿病,内皮介导的慢性炎症、诸如脉管炎,包括网状内皮细胞增生症的内皮细胞增生症,动脉粥样硬化,冠心病,心肌缺血,心绞痛,年龄相关性心血管病症,四肢的缺血疾病,雷诺病,先兆子痫,妊高症,慢性或急性肾功能衰竭、尤其是终末期肾功能衰竭,心力衰竭,伤口愈合以及这些疾病的后遗症。

[0054] 本发明的药物组合物,不仅适合局部使用,而且可以全身使用。

[0055] 本发明的一个优选实施例提供了药物组合物可以通过胃肠外的方法,尤其通过静脉注射、肌肉注射、皮内注射或皮下注射等方法使用。包含促红细胞生成素的药物制剂优选地适合使用注射或输注的方法。

[0056] 包含促红细胞生成素的药物组合物的另一种使用方法是口服给药。例如,包含促红细胞生成素的药物制剂以液体形式,如溶液、混悬液、乳剂,或者以固体形式、如片剂方式给药。

[0057] 另一种药物组合物的使用方法是适合于肺部或者吸入给药。因此根据本发明,提供了将促红细胞生成素以具有疗效的方式直接作用在病人的肺部。促红细胞生成素的这种使用方式,可以将促红细胞生成素的剂量快速释放在病人身上,而无需进行注射。当肺吸收促红细胞生成素时,可以使大量促红细胞生成素通过肺进入血液循环中,这样就提高了血液循环中促红细胞生成素的含量。在本发明的另一个优选实施例中,通过肺部吸收的药物组合物,是一种水状或非水状的溶液,或者是一种干粉。当通过肺进行给药时,包含促红细胞生成素的药物制剂是干粉状的。这种药物制剂优选地包括含有促红细胞生成素的颗粒,该颗粒的直径小于 $10\ \mu\text{m}$,这样,此药物制剂同样可以到达病人肺的远端区域。在本发明的一种特别优选的实施例中,通过肺途径给药的药物制剂是气雾剂的剂型。

[0058] 本发明的一个特别优选的实施例涉及到将促红细胞生成素用于生产药物组合物,用来治疗与内皮祖细胞的机能障碍有关的疾病,该药物组合物除了包含用作活性成分的促红细胞生成素之外,还至少包括另外一种用以刺激内皮祖细胞的附加活性成分。

[0059] 在优选情况下,这里另一种活性成分尤其是指刺激骨髓中内皮祖细胞的生理动员的活性成分。不过,根据本发明,这里另一种活性成分也可以是指特别对内皮祖细胞的分裂行为,也就是对内皮祖细胞的增殖行为起刺激作用的活性成分。但是,根据本发明同样存在这样的可能性,即这种所谓的另一种活性成分可特别刺激内皮祖细胞的分化行为和 / 或移行行为。该刺激内皮祖细胞的另一种活性成分,特别优选地是 VEGF ;PIGF ;GM-CSF ;HMG-CoA 还原酶抑制剂,尤其是指他汀类,如辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀 ;和 / 或 NO 供体,尤其是 L- 精氨酸。

[0060] 本发明同样提供至少一种特别用以刺激已分化出来的内皮细胞的,也就是说对内皮细胞的增殖和 / 或移行进行刺激,而不是对内皮祖细胞进行刺激的另一种活性成分。该另一种活性成分,特别优选地是 bFGF(basic fibroblast growth factor,碱性成纤维细胞生长因子)或血管生成素(Angiogenin)。

[0061] 本发明的另一实施例涉及到将促红细胞生成素和 / 或其衍生物用作活性成分来生产药物组合物,以刺激内皮祖细胞,尤其刺激内皮祖细胞的动员、增殖、向内皮细胞的分化和 / 或使内皮祖细胞朝着血管发生或血管新生刺激物方向移行。此外,本发明提供了将促红细胞生成素和 / 或其衍生物用作活性成分来生产药物组合物,以刺激血管形成和 / 或内皮形成,特别是成年人类或动物机体内的血管形成和 / 或内皮形成。

[0062] 因此,本发明同样涉及药物组合物,用来刺激内皮祖细胞,尤其刺激其动员、增殖、向内皮细胞的分化和 / 或使内皮祖细胞朝着血管发生或血管新生刺激物方向移行,用来刺激血管形成和 / 或内皮形成,用来治疗人体或动物体的与内皮祖细胞和 / 或内皮细胞的机能障碍有关的疾病。本发明尤其涉及药物组合物或药物制剂,其包含用作活性成分的促红细胞生成素,和至少一种用以刺激内皮祖细胞和 / 或已分化出来的内皮细胞的另一种活性成分。在一优选实施例中,本发明涉及药物组合物,其包括促红细胞生成素和至少一种选自下列组合的另一种活性成分:VEGF ;PIGF ;GM-CSF ;HMG-CoA 还原酶抑制剂,尤其是诸如辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀的他汀类 ;和 / 或 NO 供体,尤其是 L- 精氨酸 ;bFGF 和血管生

成素。

[0063] 本发明的另外一个优选实施例涉及促红细胞生成素用来生产可移植的内皮细胞制剂的用途。本发明在此特别提供了利用促红细胞生成素在体外通过培育内皮祖细胞来制造内皮细胞,并且随后植入受者机体中,尤其是植入患有与内皮祖细胞机能障碍有关的疾病的机体中。例如,可以将血液中的单个核细胞(MNC)通过密度梯度离心法分离出来,并且在体外合适的培养基中进行培养。单个核细胞分离及体外培养的方法,已在Asahara,科学,275(1997),964-967;Dimmeler等,临床研究杂志(J. Clin. Invest.),108(2001),391-397;以及Lievadot等,临床研究杂志,108(2001),399-405中得到描述。随后,继续利用促红细胞生成素对单个核细胞进行培养,以便刺激在MNCs中的内皮祖细胞的增殖及分化行为,尤其是为了提高分化出来的粘附的内皮细胞的数量。本发明还提供了利用促红细胞生成素以及至少一种刺激内皮祖细胞的增殖和分化的另一种物质,来对MNCs进行培养。该另一种物质尤其是优选自VEGF;PIGF;GM-CSF;诸如L-精氨酸的NO供体;或者象他汀类,尤其是辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀这样的HMG-CoA还原酶抑制剂。

[0064] 在本发明的另一优选实施例中,提供了促红细胞生成素用来对有待移植的组织或器官进行预处理和/或再处理的应用。这种情况下,在移植前,优选在移植即要开始前,将还在捐献者机体中的移植物用促红细胞生成素进行处理。至于受者机体,同样可以在上述时刻用红细胞生成素进行同样处理。根据本发明,不仅在移植开始之前,而且在移植之后都用促红细胞生成素对待移植的器官或组织进行这种处理,由于诱导了血管形成,可以以此使移植物被移植到体内后可以快速形成新的血管,并且这些新形成的血管会快速与受者机体的血管系统相连接。内皮形成也可以快速地通过这种方式完成。因此,用促红细胞生成素对器官移植物或组织移植物进行处理,可以使这些系统较快地整合入体内,这样就极大地降低排异风险。

[0065] 在本发明的另一个实施例中,提供了在移植前用促红细胞生成素,并且结合至少另一种刺激内皮祖细胞的因子对器官移植物或组织移植物进行处理。该因子较佳地选自下列物质组成的组合:VEGF;PIGF;GM-CSF;HMG-CoA还原酶抑制剂,例如他汀类,尤其是辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀;或者NO供体,尤其是L-精氨酸。在另一实施例中提供了在移植前除了用促红细胞生成素外,还用能刺激已分化的内皮细胞的增殖和移行的另一种物质,对器官移植物或组织移植物进行处理。该物质特别优选血管生成素或者bFGF。在另一实施例中进一步提供了在使用分离的,并合适的话,用在体外扩增的内皮祖细胞的情况下,用促红细胞生成素对器官或组织移植物进行预处理。

[0066] 在本发明的另一特别优选的实施例中,提供了促红细胞生成素用来生产可以植入的或者可移植的含细胞的体外器官和组织。本发明尤其提供了在移植前或植入前用促红细胞生成素在体外对这种体外制得的器官或组织进行处理,以便对受者机体内存在的内皮祖细胞、尤其是内皮祖细胞的生理动员、移行、增殖及分化进行刺激。在优选情况下,在移植或植入体外器官或组织之后,再用符合本发明要求剂量的促红细胞生成素对受者机体进行处理。根据本发明,在移植或植入之前用促红细胞生成素对体外器官或组织进行处理,并且合适的话,用促红细胞生成素对受者机体进行后处理,使得体外器官或组织在移植或植入体内后,其系统中由于诱导了血管形成而快速形成新的血管,并且这些快速形成的血管迅速与受者机体相连接。依照这种方式同样快速形成内皮,并由此快速进行再内皮化。因而,用

促红细胞生成素对体外器官或体外组织进行处理,可以使这些系统较快整合入体内,这样就极大地降低排异风险,并且有助于保护移植植物。

[0067] “体外器官或体外组织系统”是指可移植的或可植入的含有细胞的器官或组织,这种器官或组织是在采用规定的细胞和 / 或组织,和规定的培养条件下生产出来的。“可植入的体外器官或者体外组织系统”是指除了包括细胞外、还包括外源性材料的系统。“可移植的体外器官或体外组织系统”尤其是指含有细胞的系统,其除了包括相同或不同个体的细胞、组织或器官外,还包括内源性物质。体外器官或组织尤其是指在其结构方面基本上与原来有待替换的本体器官或组织相一致,因而能够承担被替换的原来体内器官或组织的功能。

[0068] 在本发明进一步的实施例中,在移植前或植入前,用促红细胞生成素,并结合至少一种刺激内皮祖细胞的另一种因子,对这种体外器官和组织系统进行处理。该另一种因子优选自下列一组物质:VEGF;PIGF;GM-CSF;HMG-CoA 还原酶抑制剂,尤其是辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀;或者 NO 供体。在另一个进一步的实施例中,在移植或植入之前除了用促红细胞生成素外,还用另外一种刺激已分化出来的内皮细胞的增殖和移行的物质对体外器官或组织进行处理。该物质特别优选血管生成素或者 bFGF。本发明进一步提供了这种体外器官或体外组织系统还额外地包括分离的,并且适当的话,在体外扩增的内皮祖细胞。

[0069] 本发明的另一较佳实施例涉及到将促红细胞生成素用来生产人工血管或心脏瓣膜,其中,在人工血管或心脏瓣膜在被植入体内之前,尤其在被植入人体之前,用促红细胞生成素对其进行涂覆。用促红细胞生成素对人工血管或者心脏瓣膜进行涂覆,可以使其达到刺激受者机体内的内皮祖细胞的目的,尤其是刺激内皮祖细胞从骨髓中的动员、增殖、向内皮细胞的分化,并且刺激其朝向所用的人工血管或心脏瓣膜进行移行。在将按此方法生产出来的人工血管或者心脏瓣膜植入体内之后,可以用促红细胞生成素,特别以符合本发明要求的剂量对其进行再处理。这样,就会更快地在所用的人工血管上面形成内皮层,并且可以使人工血管或心脏瓣膜更快地整合入相关的身体部位中。在一较佳方案中,另外再使用分离的,如适合的话,用在体外扩增的内皮祖细胞来涂覆人工血管和心脏瓣膜。

[0070] 本发明同样涉及到模拟内皮细胞在体外形成的方法,它包括:

[0071] a) 通过密度梯度离心法,将包含内皮祖细胞的细胞群从血液中分离出来;

[0072] b) 在细胞培养基中培养该分离的、包括内皮祖细胞的细胞群,并且

[0073] c) 采用促红细胞生成素来培养细胞群。

[0074] 根据本发明,可以采用刺激内皮祖细胞的另一种物质来培养细胞群。

[0075] 此外,本发明还涉及到治疗与内皮祖细胞的机能障碍有关的疾病的方法,其采用给患有该疾病的病人使用一定剂量的促红细胞生成素,通常是 200 到 2000IU/ 星期,尤其是 500 到 2000IU/ 星期。本发明的方法特别适合用来治疗人体疾病,诸如高胆固醇血症,糖尿病,内皮介导的慢性炎症、诸如脉管炎,包括网状内皮细胞增生症的内皮细胞增生症,动脉粥样硬化,冠心病,心肌缺血,心绞痛,年龄相关性心血管病症,四肢的缺血疾病,雷诺病,先兆子痫,妊高症,慢性或急性肾功能衰竭、尤其是终末期肾功能衰竭,心力衰竭,伤口愈合以及这些疾病的后遗症。

[0076] 在本发明治疗与内皮祖细胞机能障碍有关疾病的方法之一较佳实施例中,给病人的药物中,除了促红细胞生成素之外,还有至少一种从由 VEGF、PIGF、GM-CSF、HMG-CoA 还原

酶抑制剂和 NO 供体所组成的组合中选取的另一种活性成分。所使用的 HMG-CoA 还原酶抑制剂较佳地是一种他汀类,如辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀。所使用的 NO 供体优选 L- 精氨酸。

[0077] 在本发明用来治疗与内皮祖细胞机能障碍有关疾病的方法之另一较佳实施例中,从人体血液中分离出内皮祖细胞,在使用促红细胞生成素的情况下在体外使其增殖及分化成内皮细胞,且在纯化和分离已分化出来的内皮细胞或进行分化的内皮祖细胞之后,随即有针对性地移植到病人由于内皮祖细胞和 / 或内皮细胞的机能障碍而受到损坏的身体部位、组织或器官中,以在那里诱导新内皮的局部形成。通过这种方式,可以更有针对性地、且更快地对病人受伤的身体部位、组织和 / 或器官进行治疗。本发明用来治疗与内皮祖细胞机能障碍有关的病的方法中之实施例,包括以下几个步骤:

[0078] a) 通过密度梯度离心法,将包含内皮祖细胞的细胞群从血液中分离出来,

[0079] b) 在细胞培养基中培养该包括内皮祖细胞的细胞群,

[0080] c) 采用刺激内皮祖细胞的增殖和 / 或内皮祖细胞向内皮细胞分化的促红细胞生成素,来培养该包含内皮祖细胞的细胞群,

[0081] d) 分离和纯化已分化出来的内皮细胞,并且

[0082] e) 将该已分化出来的内皮细胞移植到患有与内皮祖细胞机能障碍有关的疾病的身体内。

[0083] 在将那些已分化出来的内皮细胞移植到体内后,可以用促红细胞生成素,特别是根据本发明的 200 到 2000IU/ 星期的剂量,对该机体进行进一步治疗。

[0084] 根据本发明,可以在体外且结合使用至少一种选自 VEGF、PIGF、GM-CSF、HMG-CoA 还原酶抑制剂和 NO 供体所组成的组合中的另一种活性成分,来培养该包括内皮祖细胞的细胞群。在优选的情况下,用来进行培养的 HMG-CoA 还原酶抑制剂是一种他汀类,如辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀。

[0085] 本发明的另一较佳实施例涉及治疗血管病症的方法,其包括:

[0086] a) 通过密度梯度离心法,将包含内皮祖细胞的细胞群从血液中分离出来,

[0087] b) 在细胞培养基中培养该包括内皮祖细胞的细胞群,

[0088] c) 采用刺激内皮祖细胞的增殖和 / 或内皮祖细胞向内皮细胞分化的促红细胞生成素,来培养该包含内皮祖细胞的细胞群,

[0089] d) 分离和纯化已分化出来的内皮细胞,并且

[0090] e) 将该内皮细胞移植到患有血管疾病的身体内。

[0091] 在将内皮细胞移植到患有血管疾病的身体内后,可以用促红细胞生成素,以符合本发明要求的剂量,较佳地以 200 到 2000IU/ 星期的剂量,对该机体进行进一步治疗。

[0092] 根据本发明存在着这样的可能性:即采用至少一种从 VEGF、PIGF、GM-CSF 和 / 或 HMG-CoA 还原酶抑制剂所组成的组合中选取的另一种活性成分,来培养该包括内皮祖细胞的细胞群。用来起培养作用的 HMG-CoA 还原酶抑制剂较佳地是一种他汀类,如辛伐他汀、美伐他汀或者阿伐他汀。

[0093] 因此,本发明用来治疗血管病症的方法因而提供了从人体血液中分离出内皮祖细胞,在使用促红细胞生成素的情况下在体外使其增殖,及向内皮细胞分化,并且在纯化和分离已分化的内皮细胞或进行分化的内皮祖细胞之后,随即有针对性地移植到损坏的血管或

缺血部位,以在那里诱导局部新血管的形成。通过这种方式,可以更有针对性地、且更快地治疗损坏的血管或缺血的组织。本发明用以治疗血管病症的方法,尤其适合治疗缺血性血管病症,尤其诸如脑缺血、四肢缺血性病症、心肌缺血、心肌梗塞、中风、冠心病、心绞痛、急性动脉闭塞、动脉闭塞性疾病、雷诺病和麦角中毒等。

[0094] 本发明的其它有益方案可从从属权利要求中清楚地看出。

附图说明

[0095] 以下将通过附图及实施例来详细地对本发明进行阐述。

[0096] 图 1 显示了对循环的 CD34⁺ 干细胞 (cSC) 进行 FACS 分析的结果。

[0097] (A-D):病人的样品;(E-F):同型对照组。通过 CD34 标记的附加表达 (B 和 F)、通过特定的低到中度的 CD45 抗原表达 (C 和 G)、并且通过特定的光散射性能 (D 和 H) 来识别 cSC。按照每 100,000 个单个核细胞和淋巴细胞来计算绝对的 cSC 数目。

[0098] 图 2 显示了通过流式细胞计数法测定循环干细胞数量的结果。此图显示了在应用 rhEPO(重组的人类促红细胞生成素)0、2、4、6 和 8 个星期后采用促红细胞生成素治疗的时间依赖的效果。 $n = 11$,这些值符合平均值 $\pm$ 标准差。其中位数已用线条示出。

[0099] *:与两星期相比, $p < 0.01$; Ψ :与四星期相比, $p < 0.05$; #:与八星期相比, $p < 0.05$ 。

[0100] 图 3 显示了经培养的内皮祖细胞 (EPC) 的数量测定结果。此图显示了用 rhEPO 进行治疗提高了 EPCs 的相对数量。在用 rhEPO 对肾脏病患者进行治疗之前,以及用 rhEPO 对病人进行治疗的 2、4、6 和 8 个星期之后分别分离出 EPCs,并且用粘附能力以及两个标记 acLDL-DiI 和 UEA-1FITC 进行表征。 $n = 11$,这些值符合平均值 $\pm$ 标准差。其中位数已用线条示出。

[0101] *: $p < 0.01$,与治疗前相比;

[0102] #: $p < 0.001$,与治疗前相比。

[0103] 图 4 显示了经培养的内皮祖细胞 (EPC) 的数量测定结果。此图显示了在使用 rhEPO 治疗之前, EPCs 的绝对数目相对于年龄与性别匹配的健康受试者显著地降低。因此,与对照组受试者相比,患有肾脏贫血症的病人具有明显的 EPC 机能障碍。对肾性贫血进行 rhEPO 治疗八个星期后,功能性 EPC 减少的数目得到代偿。在用 rhEPO 对肾脏病患者进行治疗之前以及用 rhEPO 对病人进行治疗的 2、4、6 和 8 星期之后,分别分离出 EPCs,并且用粘附能力以及两个标记 acLDL-DiI 和 UEA-1FITC 表征。 $n = 11$ 。作为范例描绘出 8 星期和所有对照组的变化曲线。这些绝对数值在一方面被作为单个数值描绘出来,此外,还描绘了箱线图 (Boxplots) (第 90/75/50/25 及第 10 百分点,以及平均值)。年龄和性别匹配的受试者当作健康的受检者,用类似方法将这些人的 EPCs 分离并进行表征 ($n = 11$)。

[0104] 图 5 显示了促红细胞生成素对伤口愈合的作用。此图显示了在老鼠身上用组织钻作出一标准化的皮肤伤口,该伤口在用促红细胞生成素进行治疗治疗 7、8 天之后就已完全愈合,而用生理盐水溶液 (Saline) 对伤口进行治疗时,该伤口在 13 到 14 天之后才完全愈合。在制造皮肤伤口七天前开始用促红细胞生成素或生理盐水溶液进行处理。每周一次通过 s. c. (皮下) 注射使用重组的人促红细胞生成素 ($0.1 \mu\text{g/kg}$ Aranesp) (每组 $n = 5$)。

[0105] 图 6 显示了促红细胞生成素减少了急性肾衰 (急性肾功能衰竭) 后肾功能的减退。斯普拉格-道利鼠 (Sprague-Dawley rats) (250-300 克) 被用作研究对象。用氯胺

酮 (Ketamin) (120mg/kg) 和甲苯噻嗪 (Rompun) (10mg/kg) 对老鼠进行麻醉。其中一个试验组,在诱导急性肾功能衰竭之前,每天接受一次 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 体重的 Aranesp。作为比较,对一组试验动物按照相同时间通过皮下注射盐水。在右肾动脉上夹上动脉钳,使流入肾脏的血流阻断 45 分钟。在这段时间里,进行左侧肾切除手术。对另外一个对照组进行假手术。此时,打开腹腔,解剖暴露左肾动脉,但血流供应没有中断,并且取走对侧的右肾。所有动物都被麻醉 60 分钟,并且在手术 24 小时后被处死。保留的右侧肾脏在 45 分钟的缺血之后,接下来予以再灌注血液,这在经过盐水治疗的动物身上产生大范围急性肾功能损伤。这一点反映在血清肌酐水平在缺血-再灌注 24 小时之后比缺血-再灌注之前的数值高了 7 倍 ($p < 0.05$)。与此相比,用促红细胞生成素类似物 Aranesp 进行治疗过的动物,在诱导缺血-再灌注损伤一天之后,其血清肌酐水平仅上升四倍。对进行左侧肾切除手术而右侧进行假手术的动物来说,其滞留水平没有上升。此图显示在缺血-再灌注 (IR) 损伤之前与 24 小时之后,在分别经过 EPO 治疗 (IR+EPO)、NaCl 治疗 (IR) 以及假手术的动物的血清肌酐的浓度。由此图可以看出,经过 Aranesp 治疗过的动物,在缺血-再灌注损伤 24 小时之后,其血清肌酐浓度与未用其治疗 (盐水治疗) 的对照组动物相比,几乎只有后者的一半。

[0106] 图 7 显示了两个试验组在诱导产生慢性肾功能衰竭且经过 Aranesp 或 NaCl 治疗后的 Kaplan-Meyer 存活曲线。8 星期大的 Sprague-Dawley 鼠被用作研究对象。用氯胺酮 (120mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10mg/kg) 对老鼠进行麻醉。它们在第 0 天被切除右侧肾脏,随即被固定在福尔马林中以进行组织学研究。而将向左侧肾脏的上、下极供血的段动脉结扎。由此导致相应的肾脏区域出现肾脏梗塞,而只有中间的三分之一肾脏部分保持正常功能。每周一次对老鼠皮下注射 Aranesp ($0.1 \mu\text{g/kg}$ 体重) 或者 NaCl。经过促红细胞生成素类似物 Aranesp 治疗过的动物,与经过盐水治疗过的动物相比,具有十分显著的存活优势 ($p = 0.027$; 时序检验)。

[0107] 图 8-15 显示了两个试验组在被诱导慢性肾功能衰竭 6 个星期之后在光学显微镜下面的肾脏剖面,这两组接受了 Aranesp 或 NaCl 治疗,它们的 Kaplan-Mayer 存活曲线被描绘在图 7 中。

[0108] 图 8 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 NaCl 治疗,为期 6 个星期。慢性肾功能衰竭的产生原因是:切除右肾脏,将向左肾上、下极供血的节动脉结扎。此图显示了与严重的高血压性损伤、即伴有动脉内膜炎的所谓 Fahr's 恶性肾硬化有关的,中等大小的肾小球前动脉具有特征性的洋葱皮样血管壁增生。

[0109] 图 9 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 老鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 NaCl 治疗,为期 6 个星期。产生慢性肾功能衰竭的原因是:切除右肾脏,将向左肾上、下极供血的节动脉结扎。此图显示了进展迅速的局灶性肾小球硬化,即所谓的增生型局灶性节段性肾小球硬化症 (FSGS) (右侧肾小球)。另一肾小球 (左侧) 则显示了袢回的缺血性萎陷。在此图下方可以看到遭受严重内皮损伤的小血管。所观察到的组织学变化符合高血压性器官损伤,或者说符合在切除 5/6 肾脏后的超负荷肾病的变化。

[0110] 图 10 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 老鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 NaCl 治疗,为期 6 个星期。产生慢性肾功能衰

竭的原因是：切除右肾脏，将向左肾上、下极供血的节动脉结扎。此图显示了代偿增大、且伴有相关入球小动脉显著的透明样变或纤维素样变性的肾小球的几乎完全的硬化或者说毁损。

[0111] 图 11 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 老鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 NaCl 治疗，为期 6 个星期。产生慢性肾功能衰竭的原因是：切除右肾脏，将向左肾上、下极供血的节动脉结扎。此图显示了在遭受严重的高血压性损伤、即所谓的恶性肾硬化后的一个肾小球前小动脉特征性的洋葱皮样血管壁增生和血管壁坏死（请对照图右侧）。在左边可以看到一个正常的未受损伤的小动脉。

[0112] 图 12 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 老鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 Aranesp (EPO) 治疗 ($0.1 \mu\text{g/kg}$ Aranesp)，为期 6 个星期。产生慢性肾功能衰竭的原因是：切除右肾脏，将向左肾上、下极供血的节动脉结扎。此图显示了一个正常的肾小球，具有柔嫩的入球小动脉，没有发现小管间质性病变。

[0113] 图 13 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 老鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 Aranesp (EPO) 治疗 ($0.1 \mu\text{g/kg}$ Aranesp)，为期 6 个星期。产生慢性肾功能衰竭的原因是：切除右肾脏，将向左肾上、下极供血的节动脉结扎。此图显示了一个正常的肾小球，具有柔嫩的入球小动脉（放大 630 倍），没有发现小管间质性病变。

[0114] 图 14 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 老鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 Aranesp (EPO) 治疗 ($0.1 \mu\text{g/kg}$ Aranesp)，为期 6 个星期。慢性肾功能衰竭的产生原因是：切除右肾脏，将向上、下肾脏极供血的弧形动脉压向左侧肾脏。此图显示了一个正常的肾小球，具有柔嫩的入球小动脉，没有发现小管间质性病变。

[0115] 图 15 显示了患有慢性肾功能衰竭的 Sprague-Dawley 老鼠的组织学变化。其在诱导了慢性肾功能衰竭后立即开始每周一次的 Aranesp (EPO) 治疗 ($0.1 \mu\text{g/kg}$ Aranesp)，为期 6 个星期。产生慢性肾功能衰竭的原因是：切除右肾脏，将向左肾上、下极供血的节动脉结扎。此图显示了一个正常的肾小球，具有柔嫩的入球小动脉（放大 630 倍），没有发现小管间质性病变。

具体实施方式

[0116] 实施例 1：

[0117] EPO 对患有肾性贫血的病人的作用

[0118] 对于 EPO 在患有肾性贫血 ($\text{Hb} < 10.5 \text{g/dl}$) 的病人的作用进行了调查研究。其中，该肾性贫血是肾脏疾病晚期（肾功能衰竭终极前期，肌酐清除率 $< 35 \text{ml/min}$ ）的必然结果。按照每周平均 5000 IU 的剂量，以静脉注射或皮下注射的方式对 11 名病人进行 rhEPO（重组的人促红细胞生成素）治疗，疗程至少 8 个星期。在进行促红细胞生成素治疗后，在 20 个星期内对病人血液中的内皮祖细胞进行了研究，在这过程中，分别在 0、2、4、6 和 8 个星期之后，通过流式细胞计数法及培养分析法对内皮祖细胞的数量及其分化状态进行分析。

[0119] 循环的外周血干细胞 (CPBSC) 包括可以同时表达 CD34 抗原和 CD45 抗原的小细胞群。在 ISHAGE 指南 (Sutherland 等, J. Hematother., 5 (1996), 213-226) 的基础上，开发了

通过流式细胞计数法确定 CPBSC 数量的分析方法。本分析办法不仅用来确定 CD34 细胞和 CD45 细胞的表达形式,而且可确定干细胞的形态。而且每 μL 的 CPBSC 的绝对数量及 CPBSC 在白细胞总量中所占的百分比数均可通过这种方法确定。

[0120] 图 1 显示了在 ISHAGE 指南基础上对循环的 CD34⁺ 干细胞进行 FACS 分析的结果。

[0121] 图 2 显示了在 8 星期内通过 FACS 分析法测出的 CD34⁺ 干细胞的数量。

[0122] 细胞培养分析法

[0123] 根据在 Asahara, 科学, 275(1997), 964-967 中所描述的方法, 通过菲科尔 (Ficoll) 密度离心法从人血样中分离出外周血单个核细胞 (PBMCs)。将这些细胞接种在具有纤维连结蛋白的培养皿上, 并保留在 EC 基础培养基上。EC 基础培养基由 EBM-2 基础培养基 (Clonetics 公司产品) 和 EGM-2 Quots[hEGF, GA-1000 (庆大霉素, 两性霉素 B), 小牛血清 (FBS), VEGF, hFGF-B (含肝素), R³-IGF-1, 抗坏血酸, 肝素] 所组成。培养 4 天后, 通过清洗培育皿, 除去非粘壁细胞。用胰蛋白酶对存留的粘壁细胞进行处理, 并重新接种。随后再对其培养三天。在分离后第七天, 通过正染色用两种不同的内皮标记鉴定出内皮表型的细胞。这些是 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (acLDL-DiI) 和荆豆凝集素 (UEA-1)。研究结果详见图 3。

[0124] 研究结果表明, 促红细胞生成素可以使内皮祖细胞动员, 并提高循环的内皮祖细胞的数量。而且, 在某种病态情况下, 如肾性贫血, 出现的功能缺陷得到了代偿。这些结果如图 4 所示。

[0125] 通过流式细胞计数法发现, 患有晚期肾病的病人体内循环的 CD34⁺ 干细胞数量与健康受试者血液中循环的 CD34⁺ 干细胞的数量相当。在开始进行促红细胞生成素治疗之后, 血液循环中的 CD34⁺ 干细胞的数量显著增加, 超过了 50%。细胞培养分析法则表明在用促红细胞生成素进行治疗后, 显示出内皮表型的细胞数量得到急剧增长。在功能性细胞培养分析中, 先前能力受损的内皮祖细胞的能力提高了 3 倍之多。

[0126] 实施例 2

[0127] 通过系统地使用 rhEPO 来改善伤口愈合

[0128] 对 FVB/N- 老鼠通过吸入异氟醚 (Isoflorane) 实施麻醉。用脱毛液去掉两条后腿上的毛发, 并用 70% 的酒精消毒。而后用无菌的 4mm 一次性活组织检查钻, 分别在这些老鼠的右侧制造皮肤伤口, 对侧则作为对照。术后用青霉素 G (20000 单位 / 千克) 进行一次性的抗生素处理。在整个试验研究期间, 每周一次通过皮下注射重组的人促红细胞生成素模拟物 Aranesp (0.1 $\mu\text{g/kg}$ 体重)。在取走活组织钻的七天前开始进行治疗。见图 5 所示, 结果表明, 使用 EPO 十分显著地加速了伤口愈合过程。

[0129] 实施例 3

[0130] 通过促红细胞生成素的治疗来阻止慢性肾功能衰竭的发展

[0131] 用氯胺酮 (120mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10mg/kg) 对 8 星期大的 Spraque-Dawley 鼠进行麻醉。在第 0 天取走这些老鼠的右肾, 并随即固定在福尔马林中以进行组织学研究。将向左肾上、下极供血的段动脉结扎。由此导致相应的肾脏区域发生肾脏梗塞, 而只有中间的三分之一肾脏区域保持正常功能。每周一次以皮下注射的方式给这些老鼠注射剂量为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 体重的促红细胞生成素类似物 Aranesp, 或者 NaCl 作为对照组。

[0132] 图 7 显示了两个试验组的 Kaplan-Mayer 存活曲线。与经过盐水治疗的对照组老

鼠相比,经过 Aranesp 治疗的老鼠其存活率明显改善。

[0133] 图 12-15 表明,在用促红细胞生成素进行治疗后,肾脏组织没有显示任何病理性变化,而用盐水进行治疗的则明显看出严重的病理性变化(请对照图 8-11)。进一步的组织学研究表明,经过 Aranesp 治疗的动物,与经过盐水治疗的动物相比,具有明显的较高的血管密度(CD31)(数据没有显示)。

[0134] 实施例 4:

[0135] 阻止急性肾功能衰竭的发展

[0136] 这项研究使用了体重为 250 到 300 克的 Sprague-Dawley 鼠。其中一个试验组在被诱导急性肾功能衰竭前的当天被一次性注入剂量为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 体重的 Aranesp。用氯胺酮(120mg/kg 体重)和甲苯噻嗪(10mg/kg)对这些老鼠进行麻醉。作为对照,同时对其中一组试验老鼠以皮下注射的方式注入盐水。通过给右侧肾脏动脉夹上动脉钳,使流入肾脏的血流中断 45 分钟,在这段时间里进行左侧肾脏切除手术。对另外一个对照组进行假手术,这时要打开腹腔,解剖并暴露左侧肾动脉,但不中断血流供应,并取走对侧的右肾。所有动物都被麻醉 60 分钟,并且在手术 24 小时后处死。

[0137] 45 分钟的缺血之后,接下来给保留的右肾进行再灌注,这使进行盐水治疗的动物产生了大范围急性肾功能损伤。这一点反映在血清肌酐水平增加了 7 个系数($p < 0.05$)。与此相比,用促红细胞生成素的类似物 Aranesp 进行治疗过的动物,在诱导缺血-再灌注损伤一天之后,其血清肌酐水平仅上升四倍。对进行左侧肾切除手术而右侧进行假手术的动物来说,其滞留值没有上升。这些结果请见图 6。

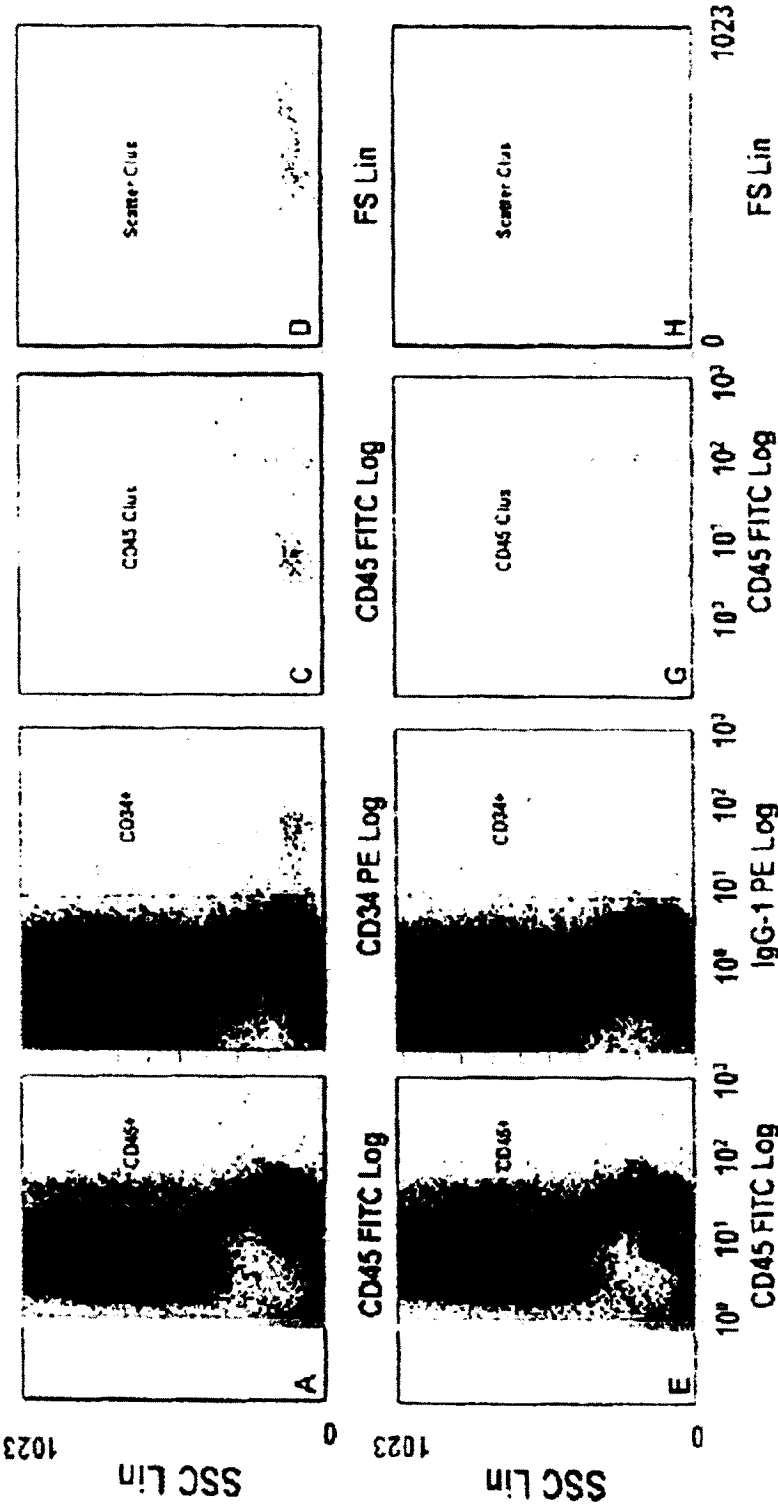


图 1

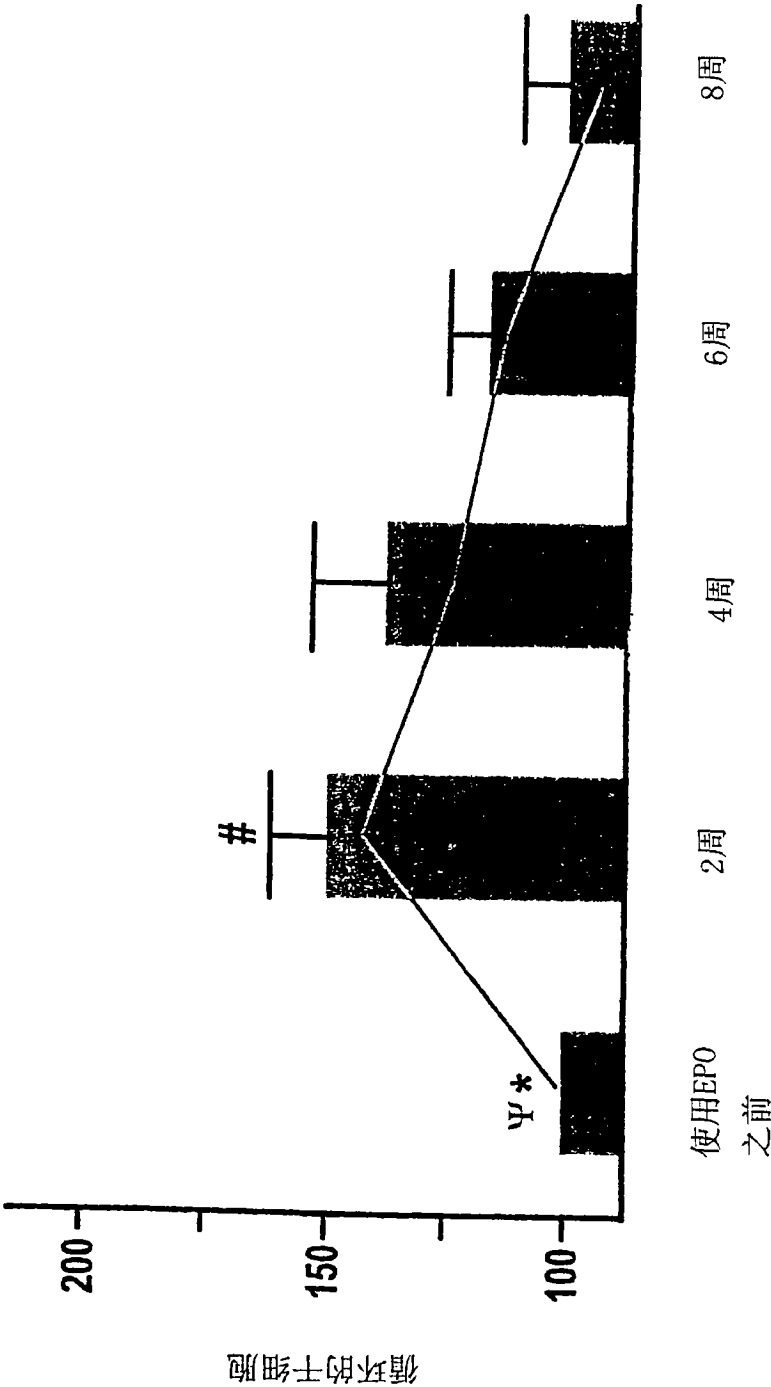


图2

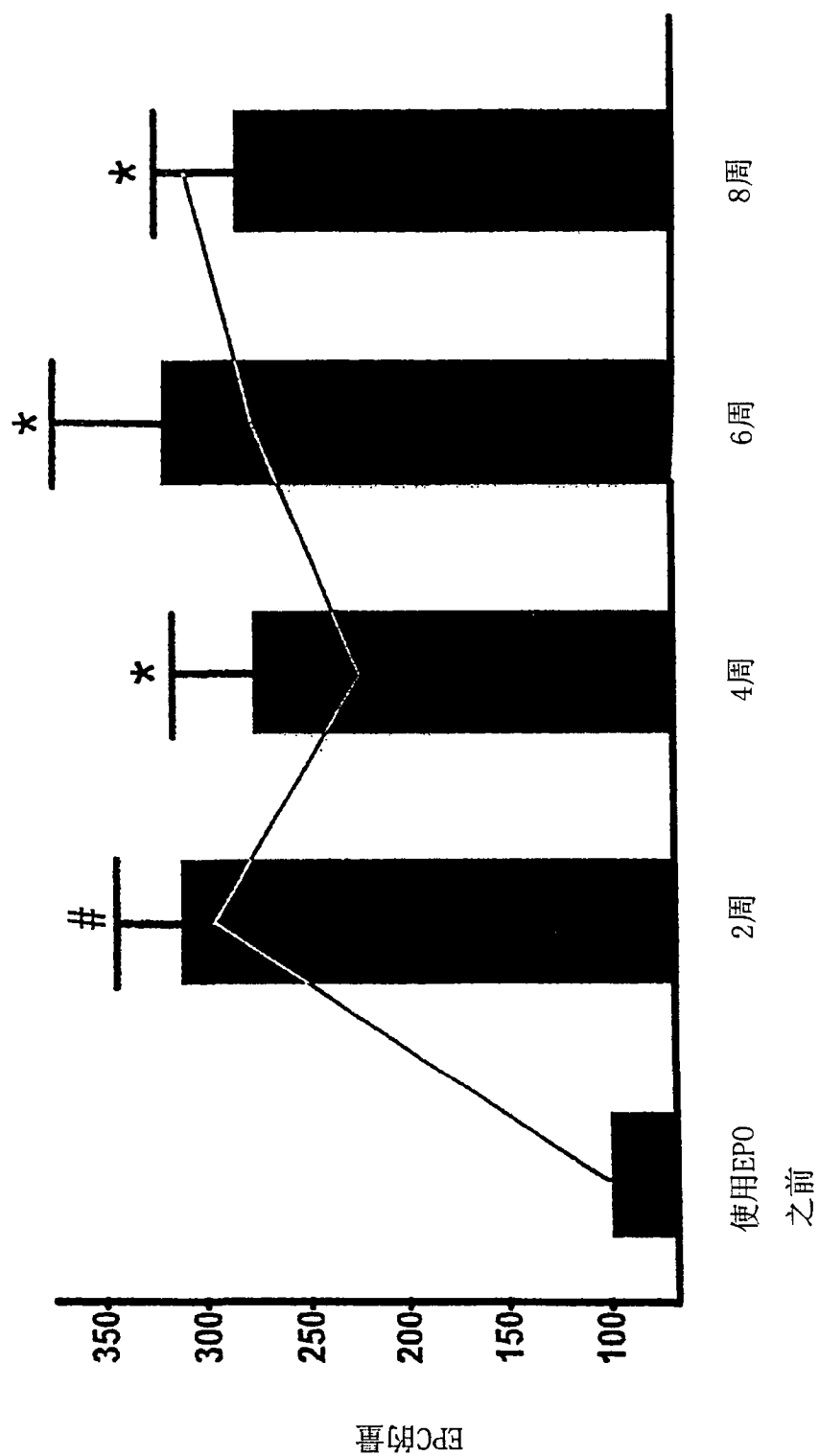


图3

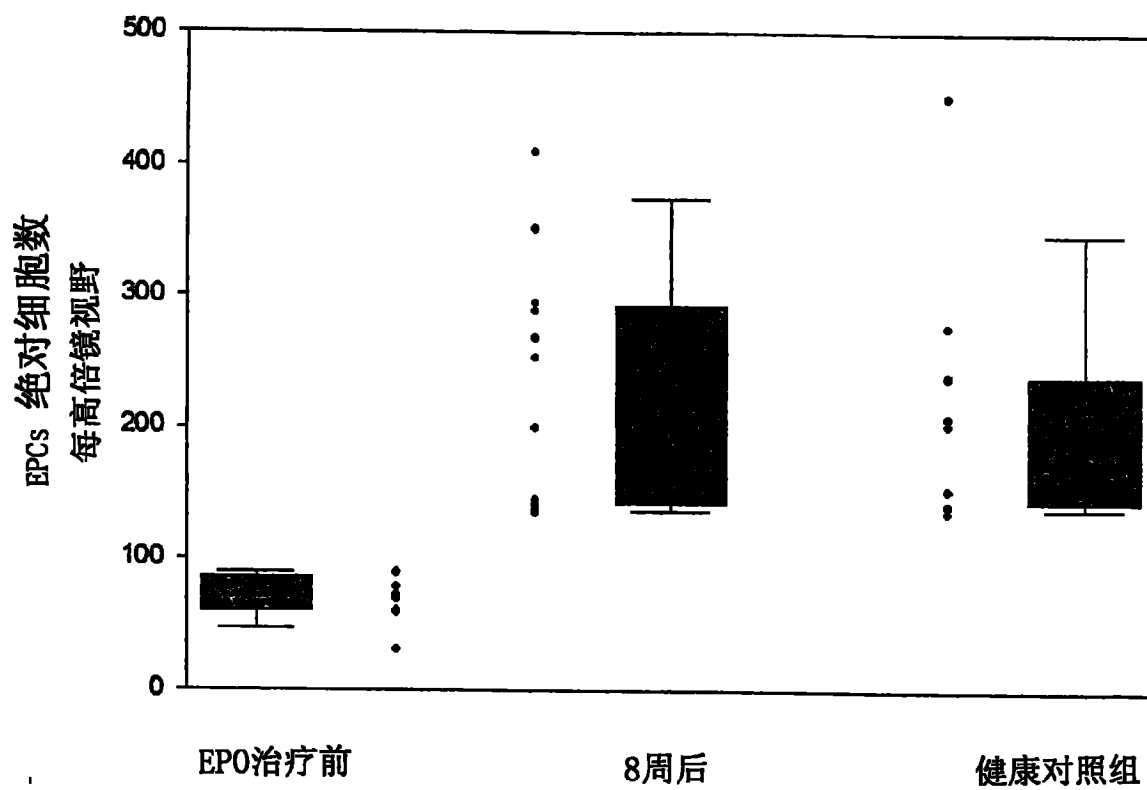


图 4

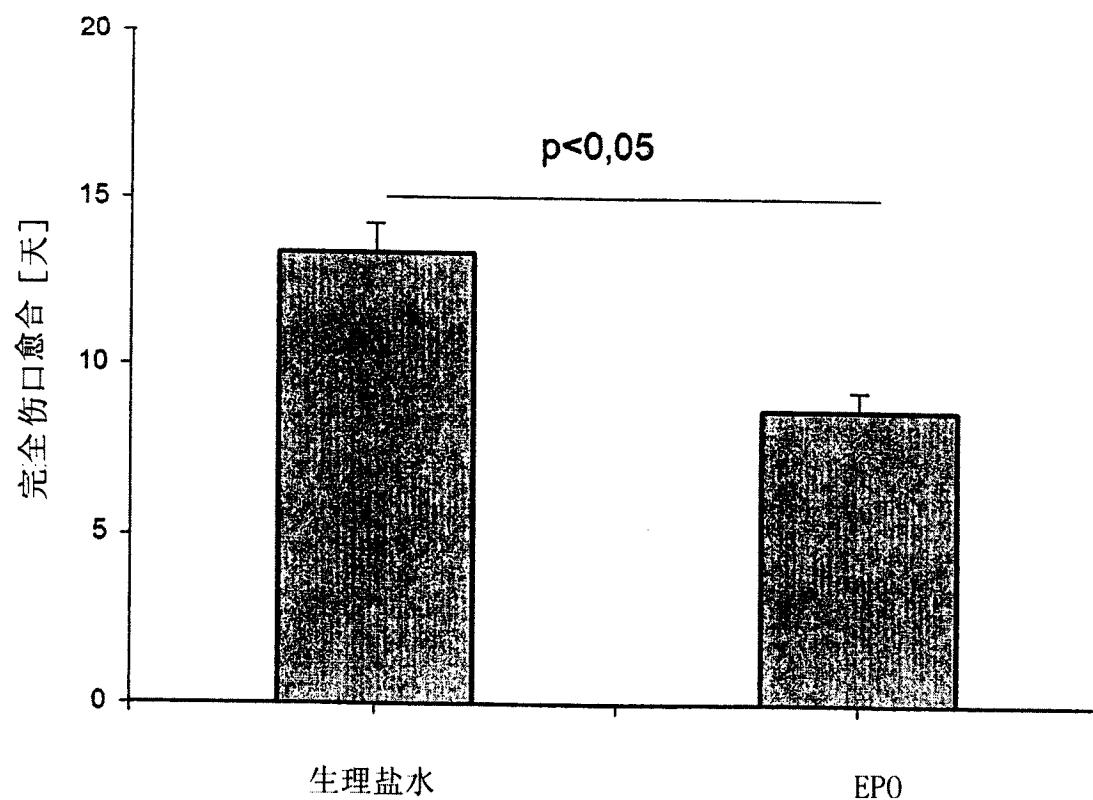


图 5

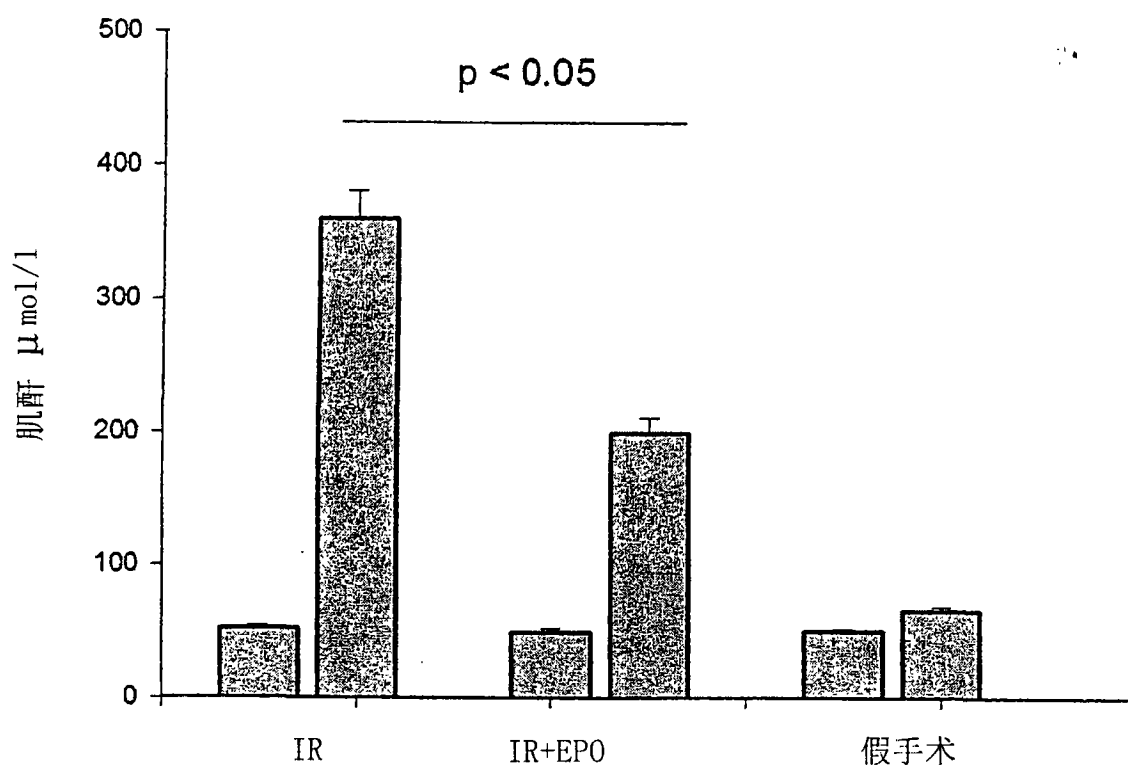


图 6

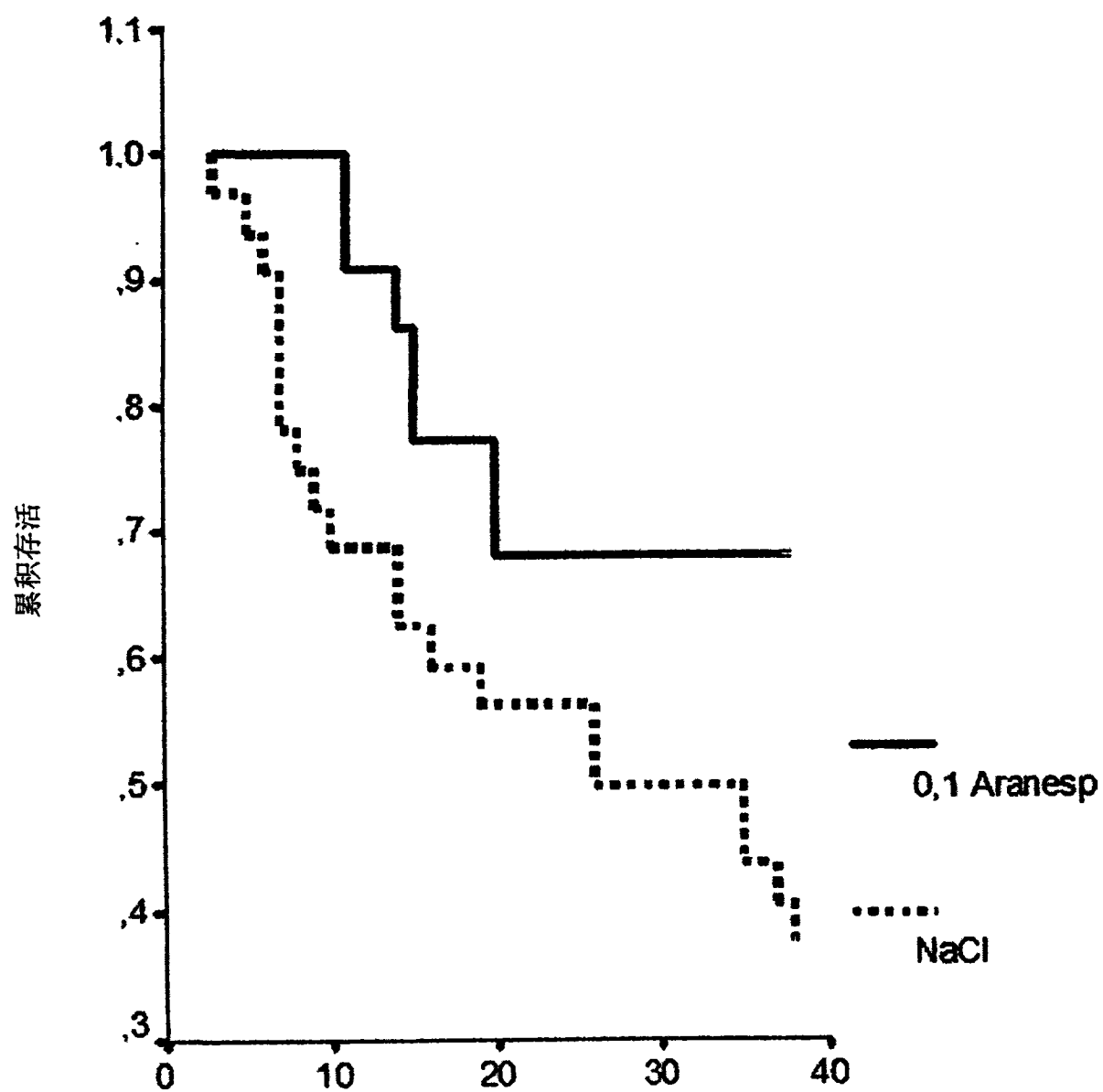


图 7

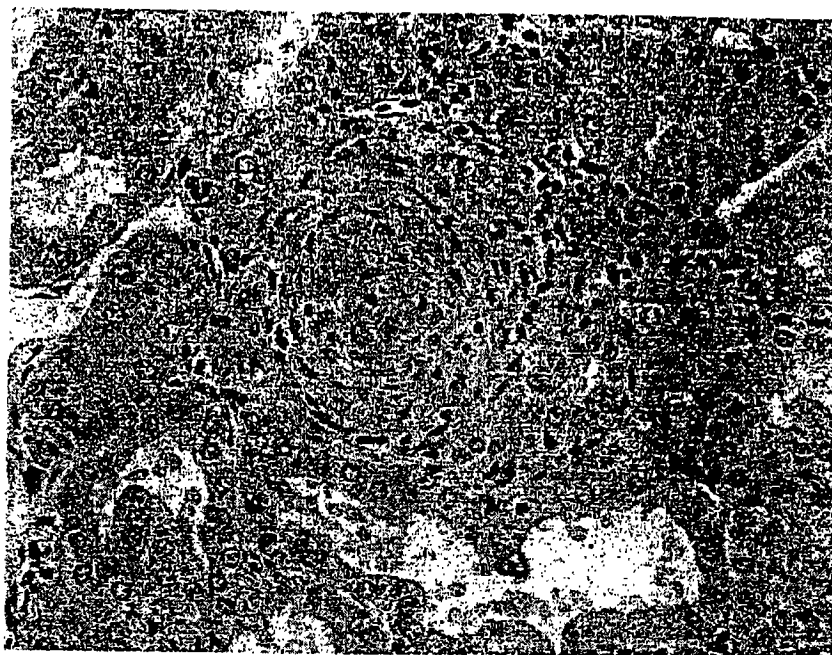


图 8



图 9



图 10

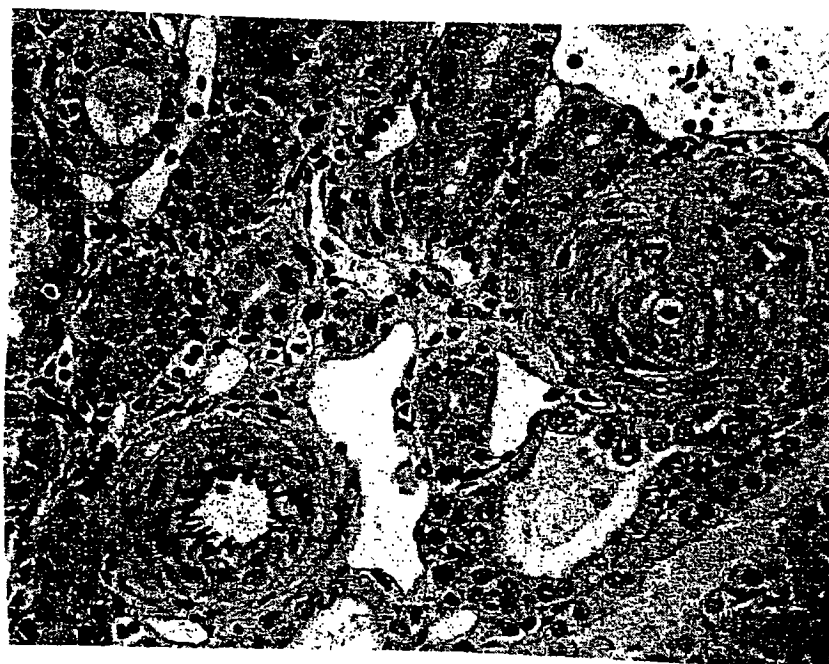


图 11

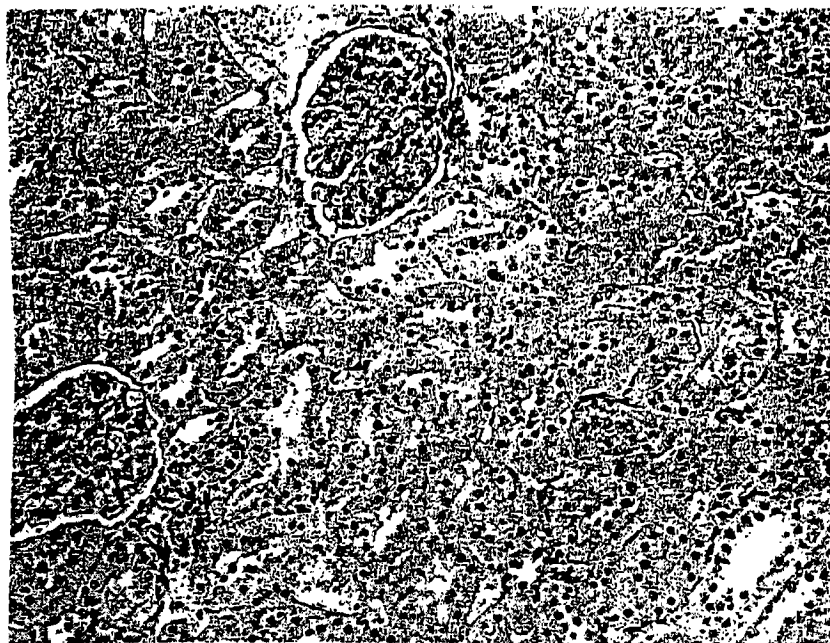


图 12

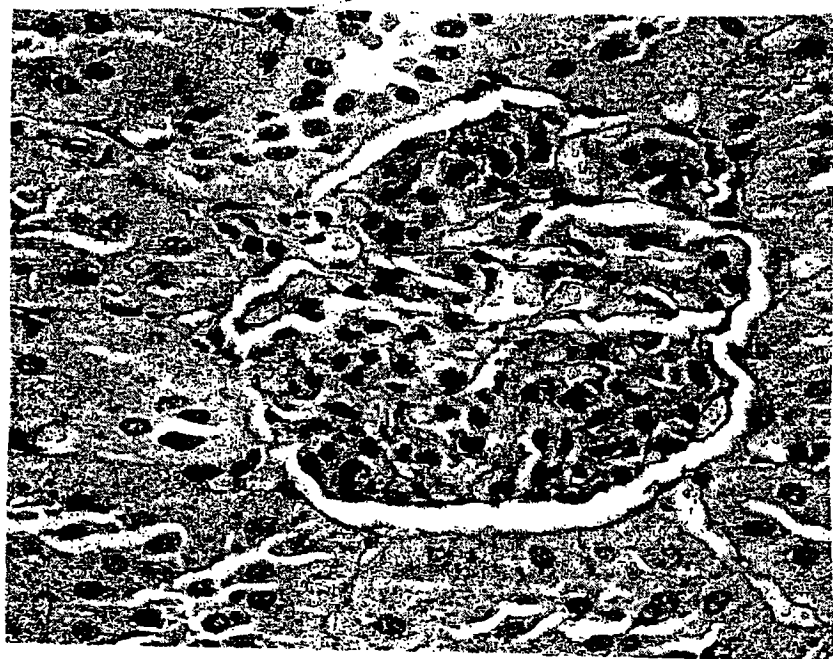


图 13

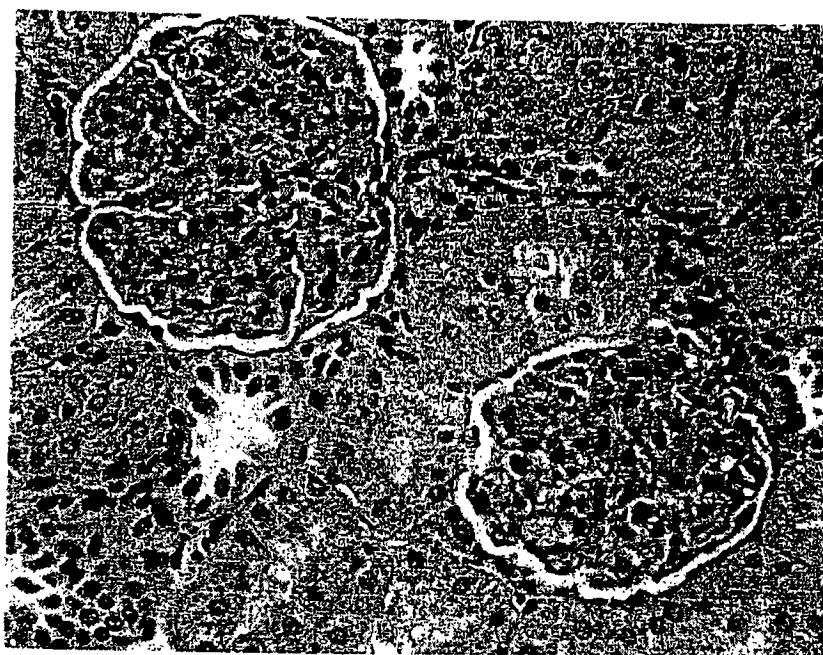


图 14

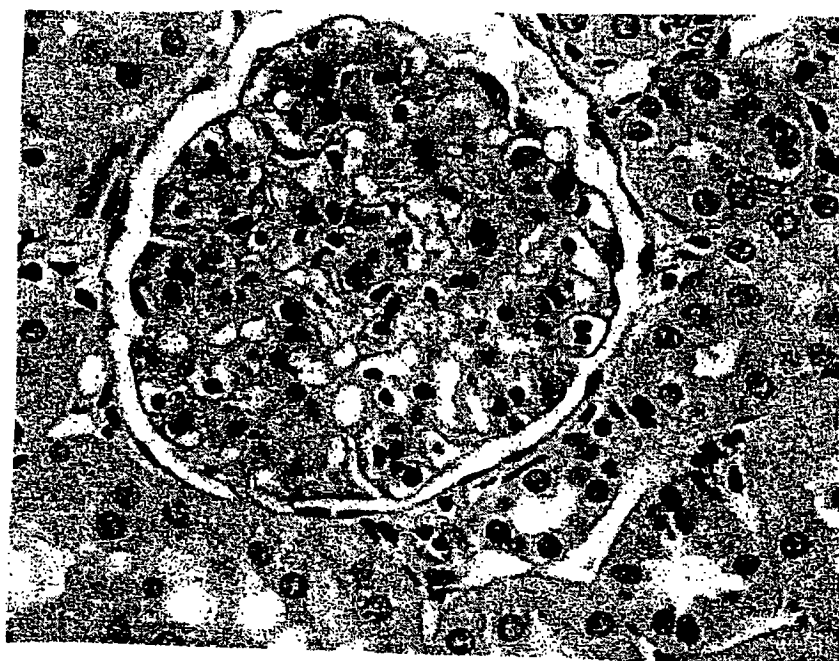


图 15