

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/195
A23L 1/305 A23L 1/03
//(A61K31/195,38 : 13)
(A61K31/195,
31 : 435)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97196901.9

[45] 授权公告日 2004 年 4 月 21 日 [11] 授权公告号 CN 1146414C

[22] 申请日 1997.7.29 [21] 申请号 97196901.9
[30] 优先权
[32] 1996. 7.30 [33] US [31] 08/690,476
[86] 国际申请 PCT/EP1997/004125 1997.7.29
[87] 国际公布 WO98/04256 英 1998.2.5
[85] 进入国家阶段日期 1999.1.29
[71] 专利权人 诺瓦提斯营养股份公司
地址 瑞士伯尔尼
[72] 发明人 H·施内德
审查员 周 静

[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 刘金辉

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 5 页

[54] 发明名称 氨基酸组合物及其在免疫抑制中的
用途

[57] 摘要
本发明提供了甘氨酸在制备用于预防和/或治疗
由环孢菌素类或子囊霉素类诱发的肾功能障碍的
药物或营养制剂中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 甘氨酸在制备用于预防和/或治疗由环孢菌素类或子囊霉素类诱发的肾功能障碍或肾毒性的肠内给药药物或营养制剂中的用途, 其条件是所述药物和营养制剂不包含肉质蛋白。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其中该药物或营养制剂进一步含 L-精氨酸、L-鸟氨酸、甘油或其混合物。

3. 根据权利要求 1 的用途, 其中该药物或营养制剂中仅有的游离氨基酸是甘氨酸、或者是甘氨酸和 L-精氨酸的混合物、或者是甘氨酸和 L-鸟氨酸的混合物、或者是甘氨酸和 L-精氨酸和 L-鸟氨酸的混合物。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的用途, 其中该营养制剂是一种食物补充剂。

5. 根据权利要求 4 的用途, 其中该食物补充剂由甘氨酸和一种碳水化合物来源组成。

6. 根据权利要求 5 的用途, 其中该食物补充剂进一步含有一种蛋白质来源, 所述蛋白质来源是大豆蛋白、牛乳衍生的蛋白和/或其蛋白质水解产物。

7. 根据权利要求 1-3 任一项的用途, 其中该营养制剂是一种全配方食物。

8. 根据权利要求 1-3 任一项的用途, 其中该药物进一步含有一种环孢菌素或子囊霉素。

9. 一种药物或营养制剂, 含有治疗有效量的一种环孢菌素或子囊霉素并结合有甘氨酸, 甘氨酸的含量对抑制和/或改善由所述环孢菌素或子囊霉素诱发的肾功能障碍有效, 其中所述药物或营养制剂中仅有的游离氨基酸是甘氨酸、或者是甘氨酸和 L-精氨酸的混合物、或者是甘氨酸和 L-鸟氨酸的混合物、或者是甘氨酸和 L-精氨酸和 L-鸟氨酸的混合物。

氨基酸组合物及其在免疫抑制中的用途

本发明涉及甘氨酸在制备药物或营养制剂中的用途，该药物或营养制剂可以对患者给药以预防和/或治疗由属于环孢菌素和/或子囊霉素类物质诱发的肾功能障碍。

环孢菌素类包括一类结构上截然不同的、环状、多 N-甲基化的十一肽，通常各自或多或少具有免疫抑制、抗炎、抗病毒和/或抗寄生虫活性。第一个被鉴定的环孢菌素类是真菌代谢产物环孢菌素 A，或环孢素，其结构由《默克索引》第 11 版给出；Merck & Co., Inc.; Rahway, 新泽西，美国(1989)，见第 2759 表。后来被鉴定出来的环孢菌素是环孢菌素 B、C、D 和 G，它们也列在《默克索引》第 2759 表中。大量合成的类似物也是已知的，其中具有代表性的实例公开在 EP 296123、EP 484281 和 GB 2222770 中。环孢菌素 A 及其结构上相似的类似物和衍生物以及其代谢产物在本说明书中一般被称为“环孢菌素类”。

子囊霉素是另一类通常的免疫抑制物质，也被称为大环内酯免疫抑制剂，其中 FK-506 是最有名的。FK-506 是一种由第 9993 号 *Streptomyces tsukubaensis* 产生的大环内酯免疫抑制剂。在《默克索引》(同上)的附录第 A5 项中给出了 FK-506 的结构。保留了 FK-506 的基本结构和免疫学性质的大量相关化合物也是已知的。这些化合物公开在各种出版物中，例如 EP 184162、EP 315973、EP 323042、EP 423714、EP 427680、EP 465426、EP 474126、WO 91/13889、WO 91/19495、EP 484935、EP 532088、EP 532089、WO 93/5059 等等。本说明书中，把子囊霉素、FK-506 及其结构上相似的类似物和衍生物以及其代谢产物共同称为“子囊霉素类”。

由于具有极为有用的药学性质，环孢菌素类(特别是环孢菌素 A 和 G)和子囊霉素类(例如 FK-506)具有广泛的应用，例如用于预防移

植排斥反应，用于治疗自体免疫疾病，如类风湿性关节炎和牛皮癣，还用于治疗多发耐药性。环孢菌素类和子囊霉素类也具有一定副作用，最为显著的是肾功能障碍，特别是肾毒性，尤其是在高剂量的情况下。肾毒性的特征在于肾血流量减少和肾小球滤过作用降低，使血清肌酸酐、碱性磷酸酶和尿素相应升高，以及近基细胞溶胀与坏死和巨噬细胞浸润。某些研究显示，缺氧颇具选择性地损伤近端小管，而血流量的降低可能导致缺氧。在该病理学中已经提出的证据涉及细胞内的钙，钙通道阻断剂在使损伤降至最小上是有效的。不过， Ca^{++} 通道阻断剂不可能不产生损害。因此，针对对肾的这一重要副作用，目前尚没有已知的有用的疗法。

现在令人惊奇的发现，甘氨酸适合预防和/或治疗由环孢菌素类或子囊霉素类诱发的肾功能障碍。

按照本发明，更具体的发现是，食物中的甘氨酸抑制和/或改善长期环孢菌素 A 给药所带来的主要副作用之一——肾毒性。甘氨酸防止肾小球滤过率降低。甘氨酸也防止血清肌酸酐和尿素升高，并趋于使由环孢菌素 A 引起的碱性磷酸酶升高降至最小。食物中的甘氨酸还都防止了近端小管的溶胀与坏死和巨噬细胞的浸润。因此，显然，甘氨酸对由环孢菌素 A 引起的肾毒性具有重要的保护作用。

有鉴于上述作用，存在含有甘氨酸的药物和/或营养制剂，以及使用甘氨酸的方法。为了用在本发明的药物、营养制剂和方法中，甘氨酸宜以游离氨基酸的形式（相对盐形式而言）、甘氨酸前体——特别是丙氨酸或丝氨酸（L-丙氨酸、L-丝氨酸）——的形式被使用，后者同样以游离氨基酸形式、所述氨基酸的生理学上可接受的盐形式、或所述氨基酸和/或其生理学上可接受的盐的混合物形式被使用。甘氨酸优选以游离氨基酸形式（相对盐形式而言）、生理学上可接受的盐形式或以游离氨基酸形式的甘氨酸与生理学上可接受的盐形式的甘氨酸的混合物形式被使用；最优选地，甘氨酸是游离氨基酸的形式。按照本发明，甘氨酸也可以二肽形式使用。

本发明因此提供了甘氨酸在制备药物或营养制剂中的用途，该药物

或营养制剂用于由环孢菌素类或子囊霉素类诱发的肾功能障碍的预防和/或治疗。

本发明进一步提供了一种用于预防和/或治疗由环孢菌素类或子囊霉素类诱发的肾功能障碍的方法，该方法包括在用一种环孢菌素或子囊霉素治疗之前、同时或之后对人或其他哺乳动物给予一种含有甘氨酸的药物或营养制剂，甘氨酸的含量能有效抑制和/或改善肾功能障碍。

本发明更进一步提供了一种含有甘氨酸的、用于预防和/或治疗由环孢菌素类或子囊霉素类诱发的肾功能障碍的药物或营养制剂。

本发明还提供了一种含有治疗有效量的环孢菌素或子囊霉素并结合甘氨酸的药物或营养制剂，甘氨酸的含量能有效抑制和/或改善由该环孢菌素或子囊霉素诱发的肾功能障碍。

甘氨酸在预防和/或治疗肾功能障碍肾毒性上是特别有用的。

特别地，甘氨酸进一步可用于治疗和/或预防由环孢菌素类中的环孢菌素 A(环孢素)和 PSC 833 ([3'-脱氧-3'-氧代-MeBmt]¹[Val]²-环孢素，例如 EP 296122 中所述)、特别是由环孢菌素 A 诱发的肾功能障碍。

甘氨酸也特别可用于治疗和/或预防由子囊霉素 FK-506 和 ASM (33-表-氯-33-脱氧-子囊霉素，例如 EP 427680 的实施例 66a 中所述)、特别是由 FK-506 诱发的肾功能障碍。

而且，甘氨酸特别可用于预防和/或治疗由免疫抑制性环孢菌素类或子囊霉素类诱发的肾功能障碍。

营养制剂或药物可以对患者肠内给药或胃肠外给药。肠内给药途径是优选的。特别预期的肠内给药途径是口服给药和/或管饲法。药物或制剂宜以含水液体的形式给药。适合于肠内用药形式的药物或制剂因此优选为含水形式或粉末形式，其中该粉末在使用前宜加入到水中。对于在管饲法中的用途来说，加水量尤其取决于患者对流体的需要和状况。对急性治疗来说，胃肠外用药途径是优选的。

药物或制剂可以配制成以每 24 小时释放给患者 1 至 80g、优选为 10 至 60g、特别优选为 15 至 30g 的甘氨酸。药物或制剂的给药量在很大程度上取决于患者的特殊需要。甘氨酸的这种每日剂量适合所需效果

的治疗以及适合预防/预处理。含有甘氨酸的药物或制剂对患者的给药量可以是使患者血浆中的甘氨酸浓度升高至 0.5 与 2.0mM 之间、优选为 1.0 至 2.0mM。尽管较之更高的浓度是可以预料得到的，但预期如果提高该酸的浓度，由于制剂或药物的给药将获得显著的临床效果，因此在 1.2 至 1.5mM 的范围内。在外伤性、分解代谢过度的患者中，使血浆甘氨酸、丝氨酸或丙氨酸水平升高至对应于健康个体血浆甘氨酸水平的约 0.2 至 0.3mM 甚至是有利的。

优选地，药物或营养制剂仅含有甘氨酸以及任意性可有可无的 L-精氨酸或 L-鸟氨酸作为游离氨基酸（相对蛋白结合或肽结合氨基酸而言）。

若甘氨酸是以药物的形式给药，这样的药物每 100g 将含有 0.1 至 99g 的甘氨酸。

一般来说，若甘氨酸是以营养制剂的形式给药，可取得有利的效果，根据情况，该营养制剂可以是一种全配方食物（即，基本上供应所有必需的能量、氨基酸、维生素、矿物质和微量元素的食物）或一种食物补充剂(dietary supplement)。食物补充剂一般提供总的每日热量摄取量的 5 至 20%，优选约为 10%。营养制剂方便的是采取含水液体的形式。营养制剂因此可含有碳水化合物、类脂脂肪（脂肪来源）和/或蛋白质（氮源）来源，和甘氨酸，其特征在于甘氨酸在该配方食物中的含量约为 0.2 至 60g/100g 配方干重，优选为 5 至 45g、特别优选为 7.5 至 30g/100g 干重。营养制剂优选进一步含有其他营养学上有利的成分，例如维生素、矿物质、微量元素、纤维（优选为可溶性纤维）。碳水化合物的量在 0 - 85 重量% 范围内、优选为 25 至 75 重量%，脂肪的量在 0 - 30 重量% 范围内，蛋白质的量在 0 - 75 重量% 范围内、优选为 15 至 65%。优选的营养制剂含有下列成分：基本上由甘氨酸和碳水化合物组成的食物补充剂，基本上由甘氨酸、碳水化合物和蛋白质组成的食物补充剂和/或基本上由甘氨酸、碳水化合物、蛋白质、脂肪、维生素、矿物质、微量元素和任意性可有可无的纤维组成的全配方食物。这样的食物补充剂或全配方食物优选进一步含有 L-精氨酸或其他生理学上可

接受的、与氧化氮的合成有关的化合物，例如 L-鸟氨酸或甘油，其中 L-精氨酸是优选的。

适合的氮源实例包括营养学上可接受的蛋白质，例如衍生于大豆或牛乳的蛋白质，如乳清、酪蛋白酸盐或脱脂奶粉，和/或其蛋白质水解产物。适合的碳水化合物源包括所有的糖、麦芽糖糊精和淀粉。适合的脂肪源实例包括甘油三酯，以及甘油二酯和甘油一酯。

适合加入本发明药物或制剂中的维生素实例包括营养学上可接受形式的维生素 E、维生素 A、维生素 D、维生素 K、叶酸、硫胺素、核黄素、维生素 B₁、B₂、B₆ 及 B₁₂、烟酸、生物素和泛酸。

适合加入本发明药物或制剂中的矿质元素和微量元素实例包括营养学上可接受形式的钠、钾、钙、亚磷、镁、锰、铜、锌、铁、硒、铬和钼。

药物或制剂特别优选含有营养学上可接受形式的β-胡萝卜素（维生素 A）、维生素 E、维生素 C、硫胺素、维生素 B₁₂、胆碱、硒和锌。

本文所用的术语“可溶性纤维”指能够在结肠中发生显著发酵作用、最终产生短链脂肪酸的纤维。适合的可溶性纤维实例包括未水解或水解的果胶、瓜尔胶、刺槐豆胶、黄原胶。对成年人来说，每天可溶性纤维的总量宜在 3 至 30g 范围内。

可以如下所示将甘氨酸与一种或多种下列成分结合使用：

- (i) ω-3 多不饱和脂肪酸(PUFA)，如果需要的话混有 ω-6 PUFA；
- (ii) L-精氨酸或其他生理学上可接受的、与氧化氮的合成有关的化合物，或其混合物；和
- (iii) 一种核碱基（nucleobase）源。

其中优选使用含有甘氨酸并结合精氨酸或其他生理学上可接受的、与聚胺的合成有关的化合物 - 例如鸟氨酸 - 的药物或营养制剂。也优选使用含有甘氨酸、精氨酸或鸟氨酸和 ω-3 多不饱和脂肪酸(PUFA) 的药物或营养制剂。

适用于与甘氨酸结合使用的核碱基源包括或由天然核碱基、核苷、核苷酸、RNA、DNA、其等价物和/或含有一种或多种这些化合物的

混合物组成。

天然核碱基包括嘌呤类的腺嘌呤和鸟嘌呤，以及嘧啶类的胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。若核碱基源是游离核碱基的形式，优选其为尿嘧啶。

天然核苷包括核糖核苷类的腺苷、鸟苷、尿苷和胞苷，和脱氧核糖核苷类的脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷和脱氧胞苷。

天然核苷酸包括天然核苷的磷酸酯，例如一磷酸腺苷(AMP)、一磷酸鸟苷(GMP)、一磷酸尿苷(UMP)、一磷酸胞苷(CMP)、一磷酸脱氧胸苷(dTMP)、一磷酸脱氧胞苷(dCMP)，和天然核苷的二磷酸酯与三磷酸酯，例如 ADP 与 ATP。

精制过的核碱基源、例如酵母是优选的。不过，可以使用其他来源，例如肉类等。核碱基源优选为 RNA。

因此，本发明提供了药物或营养制剂，含有有效量的：

- (a)甘氨酸 ((a)成分)，结合一种或多种选自如下的成分
- (b) ω -3 PUFA，如果需要的话，与 ω -6 PUFA 混合 ((b)成分)；
- (c)L-精氨酸或其他生理学上可接受的、与氧化氮的合成有关的化合物，或它们的混合物 ((c)成分)；和
- (d)一种核碱基源 ((d)成分)。

剂量应当使药物或营养制剂有效预防和/或治疗由大环内酯免疫抑制药物诱发的肾毒性。

每单位剂量该药物或营养制剂优选含有 1.5 至 80 重量份的(a)成分并结合下列含量的一种或多种选自(b)至(d)的成分：0.1 至 20 重量份的(b)成分、3 至 40 重量份的(c)成分和 0.1 至 4.0 重量份的(d)成分。特别优选的每单位剂量含有 1.5 至 80 重量份的(a)成分并结合下列含量的一种或多种选自(b)至(d)的成分：2 至 5 重量份的(b)成分、7.5 至 20 重量份的(c)成分和 1.7 至 2.0 重量份的(d)成分。

(a)成分至(d)成分的每日给药量宜相应为 1.5 至 80g 的(a)成分，0.1 至 20g、优选为 2 至 5g 的(b)成分，3 至 40g、优选为 7.5 至 20g 的(c)成分，和 0.1 至 4.0g、优选为 1.7 至 2.0g 的(d)成分。

关于(d)成分,上述剂量是用来表示 RNA、DNA、核苷或核苷酸的。对核碱基来说,一重量单位的核碱基被认为是相当于 2.5 至 3.0 重量单位的 RNA、DNA、核苷或核苷酸。

如果所用的是含有甘氨酸并结合一种或多种上述(b)、(c)和(d)成分的药物或营养制剂,那么该药物或营养制剂宜在一单位剂量中含有

- (a) 1.5 至 80 重量份的甘氨酸,
- 结合一种或多种选自如下的化合物:
- (b) 2 至 5 重量份的 ω -3 多不饱和脂肪酸;
 - (c) 7.5 至 20 重量份的 L-精氨酸、L-鸟氨酸或甘油,或它们的混合物; 和
 - (d) 1.7 至 2.0 重量份的 RNA。

在本发明优选的技术方案中,其中所述药物或营养制剂进一步含 L-精氨酸、L-鸟氨酸、甘油或其混合物。

在本发明的药物或营养制剂中仅有的游离氨基酸是甘氨酸、或者是甘氨酸和 L-精氨酸的混合物、或者是甘氨酸和 L-鸟氨酸的混合物、或者是甘氨酸和 L-精氨酸和 L-鸟氨酸的混合物。

优选的药物或营养制剂在一单位剂量中含有:

- (a) 1.5 至 80 重量份的甘氨酸, 结合
- (c) 3 至 40 重量份、优选为 7.5 至 20 重量份的精氨酸或等量的一种或多种其他生理学上可接受的、与聚胺合成有关的化合物,或等量的精氨酸与该化合物的混合物。

更优选地,本发明药物或营养制剂含有(a)成分并结合(c)成分,其重量比为 1:2 至 4:1,特别优选的重量比为 1:1 至 2:1。

进一步优选的药物或营养制剂在一单位剂量中含有:

- (a) 1.5 至 80 重量份的甘氨酸, 结合
- (b) 0.1 至 20 重量份、优选为 2 至 5 重量份的 ω -3 PUFA; 和
- (c) 3 至 40 重量份、优选为 7.5 至 20 重量份的精氨酸或等量的一种或多种其他生理学上可接受的、与聚胺合成有关的化合物,或等量的精氨酸与该化合物的混合物。

宜将 ω -3 PUFA 保护起来,以防止在制剂的贮藏过程中发生过氧化作用。保护 ω -3 PUFA 在贮藏过程中不发生过氧化作用的生理学上可接受的方法是本领域所已知的。它们包括生理学上可接受的 ω -3 PUFA 的微囊包封和生理学上可接受的抗氧化剂的使用,其用量足以保护脂肪酸。

一个典型的适用作生理学上可接受的微囊包封剂实例是淀粉。微囊包封可以按照本身已知的方法进行。包封微囊可以按照本身已知的方法包衣，使用生理学上可接受的包衣剂，例如阿拉伯胶。

典型的适合于保护脂肪酸不发生过氧化作用的抗氧化剂实例包括维生素类抗氧化剂，例如维生素 C、维生素 E 或其混合物。

抗氧化剂的加入量应当足以防止 ω -3 PUFA 的过氧化作用。该加入量能够容易计算出来。一般来说，为方便起见，任何用来防止过氧化的抗氧化剂都过量使用。应理解的是，任何其他与 ω -3 PUFA 组合给药的试剂的存在都需要对抗氧化剂的用量进行调整。

所用的 ω -3 PUFA 可以适合生理学供应 ω -3 PUFA 的形式，例如游离酸形式、甘油三酯形式、或生理学上可接受的 ω -3 PUFA 的天然来源形式使用。该天然来源包括亚麻子油和鱼油，鱼油例如油鲱油、鲑鱼油、鲭鱼油、金枪鱼油、鳕鱼肝油和鳀鱼油。所述天然来源 - 特别是鱼油 - 含有大量的 ω -3 脂肪酸。如果所用的 ω -3 PUFA 是甘油三酯的形式，那么所述甘油三酯可以含有其他生理学上可接受的脂肪酸的酯。优选的 ω -3 PUFA 包括二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)，它们为游离酸形式、甘油三酯形式或具有高 EPA 和/或 DHA 含量的天然来源形式。

应当理解的是， ω -3 PUFA 可以以高于如上所示的剂量给药，而且该更高的剂量一般不会削弱所需效果或引起不希望的副作用。

特别适用作本发明制剂中(c)成分的化合物包括 L-精氨酸、甘油或 L-鸟氨酸，最优选为 L-精氨酸。所用(c)成分可以是游离形式、生理学上可接受的盐形式、或小肽形式，其中盐形式例如与磷酸、柠檬酸、酒石酸、富马酸、己二酸或乳酸形成的盐形式。优选使用游离形式的 L-精氨酸。

这里所用的术语小肽指具有 2 至 6、优选为 2 至 4 个氨基酸的肽。

正如已经说明过的， ω -3 PUFA 宜以被保护的或未被保护以抗过氧化作用的鱼油的形式给药。该鱼油还含有 ω -6 PUFA。

ω -6 PUFA 对免疫应答和抗外科手术感染也具有良好的效果。因

此, 本发明食物宜进一步含有 ω -6 PUFA。

对本发明而言, ω -6 PUFA 可以是游离酸形式或适合生理学供应 ω -6 PUFA 的形式, 例如甘油三酯的形式。按照本发明, 特别适用的 ω -6 PUFA 实例包括亚油酸和花生四烯酸, 其中亚油酸是最优选的。适合的 ω -6 PUFA 来源实例是本领域中已知的。它们包括鱼油和植物油。具有高亚油酸含量的 ω -6 PUFA 来源实例是例如红花油、向日葵油、豆油、棉油和玉米油。

ω -6 PUFA 的每日给药量在 1.5 至 5.0g 范围内一般足以获得良好的效果。一单位剂量如上定义的药物或营养制剂因此可以进一步含有 1.5 至 5 重量份的 ω -6 PUFA。

除了(b)成分、(c)成分、(d)成分和 ω -6 PUFA 以外, 向本发明食物中可以加入其他成分, 并且这些其他成分可对甘氨酸的活性具有有益效果。该有利成分的一个实例为 ω -9 PUFA。该脂肪酸混合物的一个优选的天然来源为鱼油。由于味道和其他原因, 口服用药形式的鱼油优选以包封的剂型使用。

如果本发明的营养制剂是打算用作食物补充剂的话, 那么由它所供应的能量不应当过量, 以避免不必要地抑制患者的食欲。补充剂所含有的能量来源量宜为供应 150 至 1000 千卡/天的量, 优选为 250 至 500 千卡/天。氮源、碳水化合物来源和类脂来源对每日总热量的贡献可以在较宽范围内变化。对于作为补充剂的用途来说, 可以以粉末或液体的形式给药。

治疗周期与用免疫抑制药物的治疗相符合。

食物补充剂的给药形式宜为适合每天 1 至 4 次补充剂给药的单位剂量形式。如果营养制剂含有能量来源, 不供应超过 1000 千卡/天是适当的。除了该关于能量供应的限制以外, 用于预防和/或治疗由大环内酯免疫抑制药物诱发的肾毒性的营养制剂可以并且适宜以如上所述的配方食物或食物补充剂形式供应。

典型的药理学上可接受的口服给药制剂形式(药物)进一步含有药理学上可接受的、适合加入该制剂中的稀释剂、载体、维生素、香料、

色素和/或其他熟练技术人员熟知的助剂，和任意性可有可无的一种大环内酯免疫抑制药物。

本发明的食物和制剂可以按照本身已知的方法得到，例如混合各组分。

通过下列实施例进一步对本发明进行举例说明，这些实施例不是要以任何方式限制所要求保护的发明的范围。

实施例 1

动物和食物

给重约 200g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠(Sasco)饲喂人造粉化食物三天，食物含有 5 % 甘氨酸和 15 % 酪蛋白（甘氨酸）或 20 % 酪蛋白（对照），然后开始环孢菌素 A 治疗。粉化食物的成分如表 1 所示。所有动物均按照制定的准则给以人道上的照管。在预饲喂阶段后，每天用口管饲法给以环孢菌素 A（25mg/kg，以 2.5mg/ml 溶于橄榄油中）或赋型剂，给药约 4 周。研究了四组动物（对照、甘氨酸、环孢菌素 + 对照、环孢菌素 + 甘氨酸），每组 6 - 8 只大鼠。每天测量动物体重和食物消耗量。

表 1

对照与甘氨酸食物的组成 %

成分	对照	甘氨酸
酪蛋白	20.0	15.0
甘氨酸	0.0	5.0
蔗糖	50.0	50.0
玉米油	5.0	5.0
纤维素	5.0	5.0
矿物质混合物	3.5	3.5
维生素混合物	1.0	1.0
DL-蛋氨酸	0.3	0.3
胆碱酒石酸氢盐	0.2	0.2
玉米淀粉	15.0	15.0

肾小球滤过率与临床化学

将动物置于代谢笼中 48 - 72 小时后处死，收集 24 小时尿样，并从尾静脉取 0.5ml 血，用于血肌酸酐测量。处死当天，另从腔静脉取 1ml 血，并用等体积的林格氏乳酸盐溶液代替。用希格玛试剂盒测量血清尿素（Coulombe, J. J. 和 L. Favreau. 1963. “一种新的用于比色检测尿素的简单半微量法”，《临床化学》 9:102-108）和肌酸酐（Heinegard, D. 和 G. Tiderstrom. 1973. “直接比色法检测血清肌酸酐”，《临床化学学报》 43:305-310）以及尿肌酸酐，同时用酶学方法测量血清碱性磷酸酶（环孢菌素 A 治疗约 4 周后收集血样）。由肌酸酐在尿/血中之比计算肾小球滤过率（Laiken, N. D. 和 D. D. Fanestil. 1985.《医疗实践的生理学基础中的滤过作用和血流量》，J. B. West, 编辑, Williams & Wilkins, 巴尔的摩/伦敦, 461-471），环孢菌素 A 治疗约 4 周后收集尿样。

组织学

处死当天，动物用戊巴比妥(50mg/1g)麻醉，打开腹部，主动脉插 24 French 静脉内注射套管，使唇部靠近肾动脉支。用夹子夹住肾动脉支上方的主动脉，并结扎肾动脉支下方的主动脉，左肾用 5ml 生理盐水漂洗，用在磷酸盐缓冲盐水中的 4 % 多聚甲醛溶液灌注 - 固定。除去肾脏，切成 0.5 厚切片，置于 10 % 福尔马林中。进行 Hemtoxyllin - 曙红切片，用显微镜分析。在 5 种不同的低倍视野(100X)中计数膨胀的小管，在高倍放大率(400X)下在 5 种不同的小管中计数坏死的细胞和浸润的巨噬细胞，计算平均值 $\pm$ SEM。

嗜中性白细胞的定量

在处死当天制备腔静脉血样的血涂片，用 Wright Giemsa 染料染色。在高倍放大率(400X)下对 200 个白细胞进行白细胞分类计数，计算百分率。

统计

所有统计使用单向方差分析（ANOVA），然后进行 Bonferonni post-hoc 检验。研究前选择 $p < 0.05$ 来表示显著性。

结果

临床化学与肾小球滤过率

已知环孢菌素 A 升高血清尿素。实际上，本研究中尿素升高了 70 % (表 2)。甘氨酸有使该升高最小化的趋势，不过该作用在统计学上是不显著的。环孢菌素 A 也升高碱性磷酸酶 (表 2)，甘氨酸有防止该升高的趋势。对照组和甘氨酸治疗组中血清肌酸酐在 0.4-0.6mg/dl 范围内 (图 1)，但是环孢菌素 A 显著地使该数值加倍。该升高被甘氨酸食物完全地防止了。数值为平均值 $\pm$ S.E.M. (方差分析 $P<0.01$ ；每组中 $n=5-6$)。a，与对照组相比 $p<0.05$ ；b，与环孢菌素 A 组相比 $p<0.05$ 。

还已知环孢菌素 A 降低肾小球滤过率。本研究中，环孢菌素 A 组的值约为对照组或单用甘氨酸组的 30 % (图 2)。肾小球滤过率的降低也被食物中的甘氨酸完全防止了。含有总热量 1 % 的甘氨酸的食物已经足以产生该作用 (结果没有表示出来)。数值为平均值 $\pm$ S.E.M. (方差分析 $P<0.01$ ；每组中 $n=5-6$)。a，与对照组相比 $p<0.05$ ；b，与环孢菌素 A 组相比 $p<0.05$ 。还注意到，尿量发生显著改变 (对照， $9.1\pm1.6\text{ml}/24\text{h}$ ；甘氨酸， 6.7 ± 0.8 ；环孢菌素 A， 14.4 ± 2.3 ；甘氨酸 + 环孢菌素 A， 11.8 ± 2.1)。

表 2

环孢菌素 A 与甘氨酸食物对血清尿素与碱性磷酸酶水平的影响

	尿素 (Mg/dl)	碱性磷酸酶 (UL)
对照	21.8 ± 1.8	46.5 ± 4.4
甘氨酸	20.6 ± 2.4	33.1 ± 5.6
环孢菌素 A	34.9 ± 3.7^a	65.9 ± 12.6
环孢菌素 A + 甘氨酸	31.2 ± 0.6^a	47.7 ± 8.8

数值为平均值 $\pm$ S.E.M.；a，与对照组相比，方差分析和 Student - Newman-Keuls 检验的 $p<0.05$ (每组中 $n=5-6$)。

组织学与白细胞

显然，随着相关白细胞的浸润，环孢菌素 A 导致近端小管溶胀和坏死，对此以前已有报道。这些作用被含甘氨酸食物完全地防止了。平均来说，环孢菌素 A 显著升高近端细胞溶胀和坏死以及巨噬细胞浸润（图 3、4）。每个载片在三个不同的低倍视野（放大率 100x）中计数膨胀的近端小管（图 3 图片 A），并计算平均值±S.E.M.. 每个载片在高倍(400x)下计数五个不同小管的坏死细胞（图 3 图片 B）（平均值±S.E.M., 方差分析的*=p<0.05）。图 4 中，每个载片在高放大率(400x)下计数 5 个不同小管周围的巨噬细胞，计数是由对治疗不知晓的人员对 hematoxyllin-曙红染色切片作出的，并计算平均值±S.E.M.（方差分析的*=p<0.05）。

而且，环孢菌素 A 治疗的大鼠血涂片中嗜中性白细胞升高了几乎 3 倍（图 5）。血涂片用 Wright Giemsa 染料染色，进行分类细胞计数（方差分析的*=p<0.05）。

实施例 2

肠内组合物

下列组合物中，MM 代表“矿物质混合物”，SM 代表“微量元素混合物”，VM 代表“维生素混合物”。这三种混合物的组成如下：

MM

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
麦芽糖糊精	34.40
柠檬酸 K/磷酸 K	34.60
二柠檬酸镁	8.20
氯化钙	8.00
柠檬酸钠/氯化钠	9.00
柠檬酸	3.50
酒石酸胆碱	2.30

SM

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
麦芽糖糊精	47.79
钼 - 酵母	18.00
铬 - 酵母	9.20
硫酸锌	7.00
硒 - 酵母	7.00
硫酸铁(II)	6.92
葡糖酸铜(II)	2.24
硫酸锰(II)	1.12
氟化钠	0.70
碘化钾	0.03

VM

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
麦芽糖糊精	43.44
抗坏血酸钠	35.00
维生素 E-Ac. 50%	16.00
烟酰胺	1.55
乙酸维生素 A	1.20
D-泛酸 Ca	0.98
维生素 K ₁ 1%	0.71
维生素 B ₁₂ 0.1%	0.30
维生素 D ₃	0.28
维生素 B ₆	0.20
维生素 B ₁	0.17
维生素 B ₂	0.15
叶酸	0.02
生物素	0.01

含有甘氨酸的组合物 I

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	12.28
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
类脂:	
棕榈油	2.33
向日葵油	0.26
乳化剂 Nathin E	<u>0.13</u>
	100.00

含有甘氨酸的组合物 II

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	10.10
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
MM	2.00
SM	0.05
VM	0.10
β-胡萝卜素	0.03
类脂:	
棕榈油	2.33
向日葵油	0.26
乳化剂 Nathin E	<u>0.13</u>
	100.00

含有甘氨酸和精氨酸的组合物

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	8.93
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
精氨酸	1.17
MM	2.00
SM	0.05
VM	0.10
β-胡萝卜素	0.03
类脂:	
棕榈油	2.36
向日葵油	0.23
乳化剂 Nathin E	<u>0.13</u>
	100.00

含有甘氨酸和鱼油（ω-3 脂肪酸）的组合物

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	10.10
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
MM	2.00
SM	0.05
VM	0.10
β-胡萝卜素	0.03
类脂:	
棕榈油	1.32

向日葵油	0.23
乳化剂 Nathin E	0.13
鱼油 EPAX 3000 TG	<u>1.04</u>
	100.00

含有甘氨酸和 RNA 的组合物

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	9.96
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
酵母提取物 RNA	0.14
MM	2.00
SM	0.05
VM	0.10
β -胡萝卜素	0.03
棕榈油	2.33
向日葵油	0.26
乳化剂 Nathin E	<u>0.13</u>
	100.00

含有甘氨酸、精氨酸和鱼油 (ω -3 脂肪酸) 的组合物

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	8.93
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
精氨酸	1.17
MM	2.00

SM	0.05
VM	0.10
β -胡萝卜素	0.03
类脂:	
棕榈油	1.32
向日葵油	0.23
乳化剂 Nathin E	0.13
鱼油 EPAX 3000 TG	<u>1.04</u>
	100.00

含有甘氨酸、精氨酸和 RNA 的组合物

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	8.79
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
精氨酸	1.17
酵母提取物 RNA	0.14
MM	2.00
SM	0.05
VM	0.10
β -胡萝卜素	0.03
类脂:	
棕榈油	2.33
向日葵油	0.26
乳化剂 Nathin E	<u>0.13</u>
	100.00

含有甘氨酸、RNA 和鱼油 (ω -3 脂肪酸) 的组合物

<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	9.96
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
酵母提取物 RNA	0.14
MM	2.00
SM	0.05
VM	0.10
β -胡萝卜素	0.03
类脂:	
棕榈油	1.32
向日葵油	0.23
乳化剂 Nathin E	0.13
鱼油 EPAX 3000 TG	<u>1.04</u>
	100.00

含有甘氨酸、精氨酸、RNA 和鱼油 (ω -3 脂肪酸) 的组合物

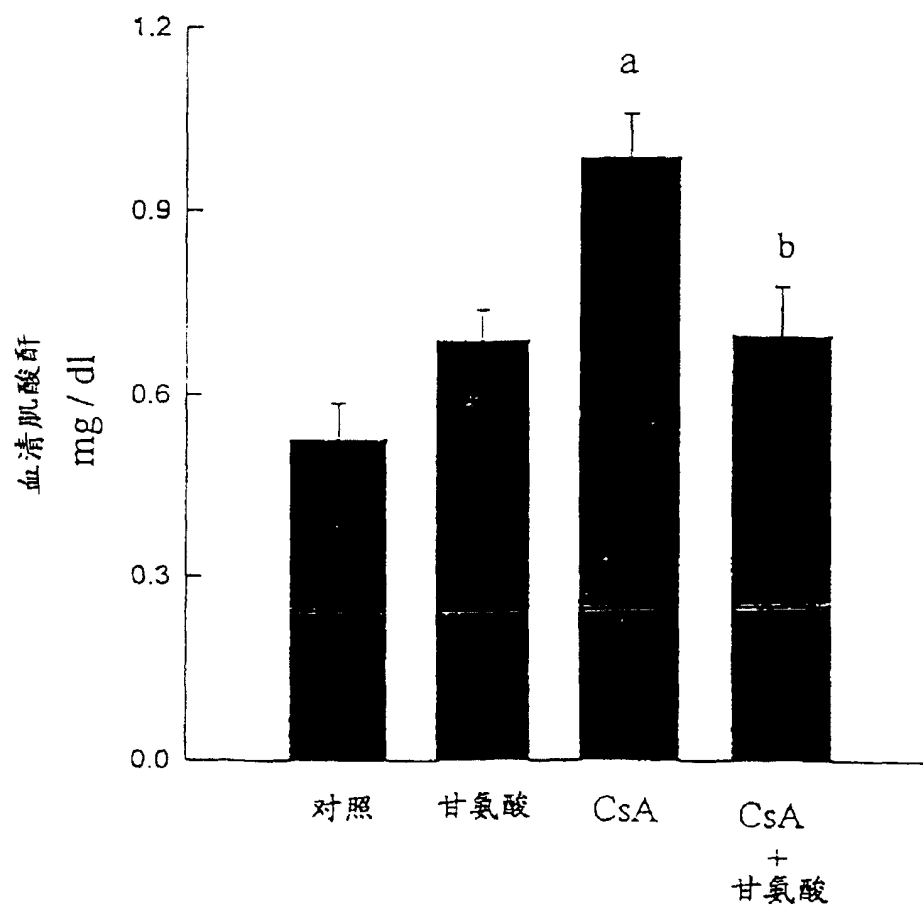
<u>组分</u>	<u>g/100g</u>
水	77.40
麦芽糖糊精	8.79
酪蛋白酸 Na/Ca	4.60
甘氨酸	3.00
精氨酸	1.17
酵母提取物 RNA	0.14
MM	2.00
SM	0.05
VM	0.10
β -胡萝卜素	0.03

类脂:

棕榈油	1.32
向日葵油	0.23
乳化剂 Nathin E	0.13
鱼油 EPAX 3000 TG	<u>1.04</u>
	100.00

已如上所述，鱼油是 ω -3 PUFA 的天然来源，而向日葵油是 ω -6 PUFA 的天然来源。

图 1



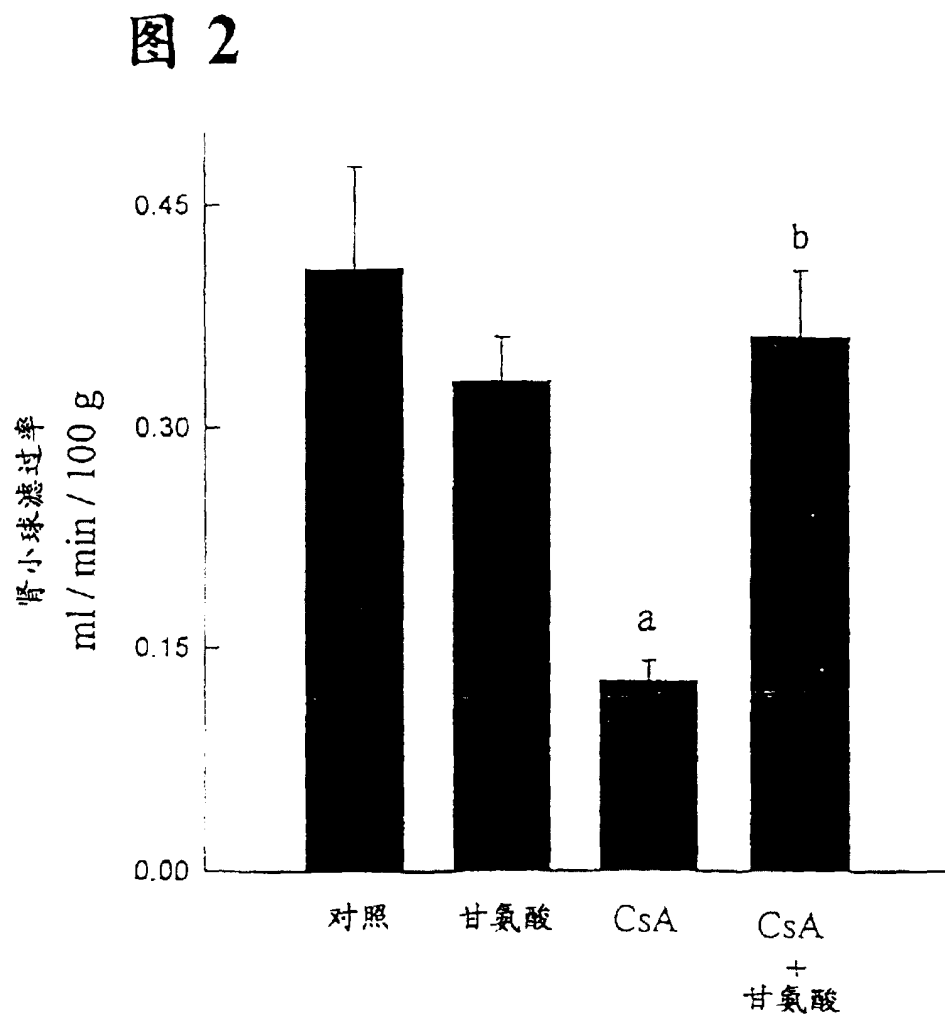
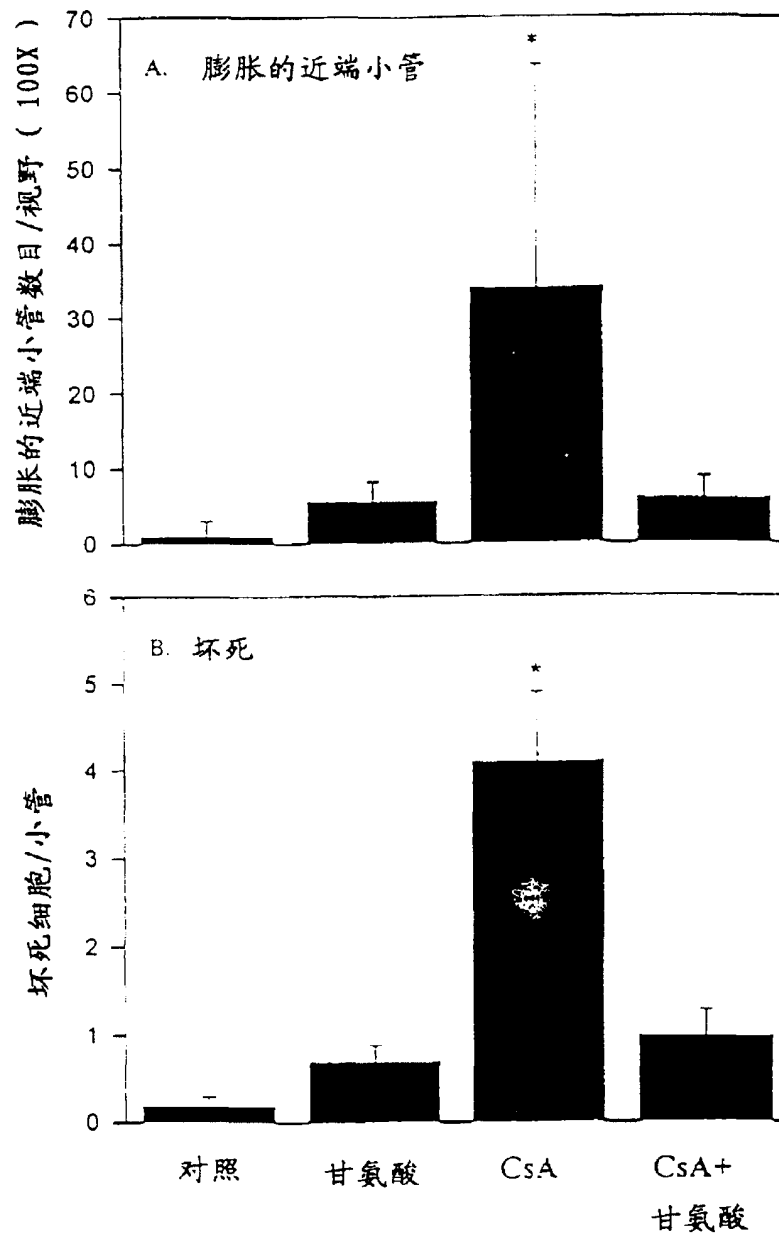


图 3

近端小管病理学



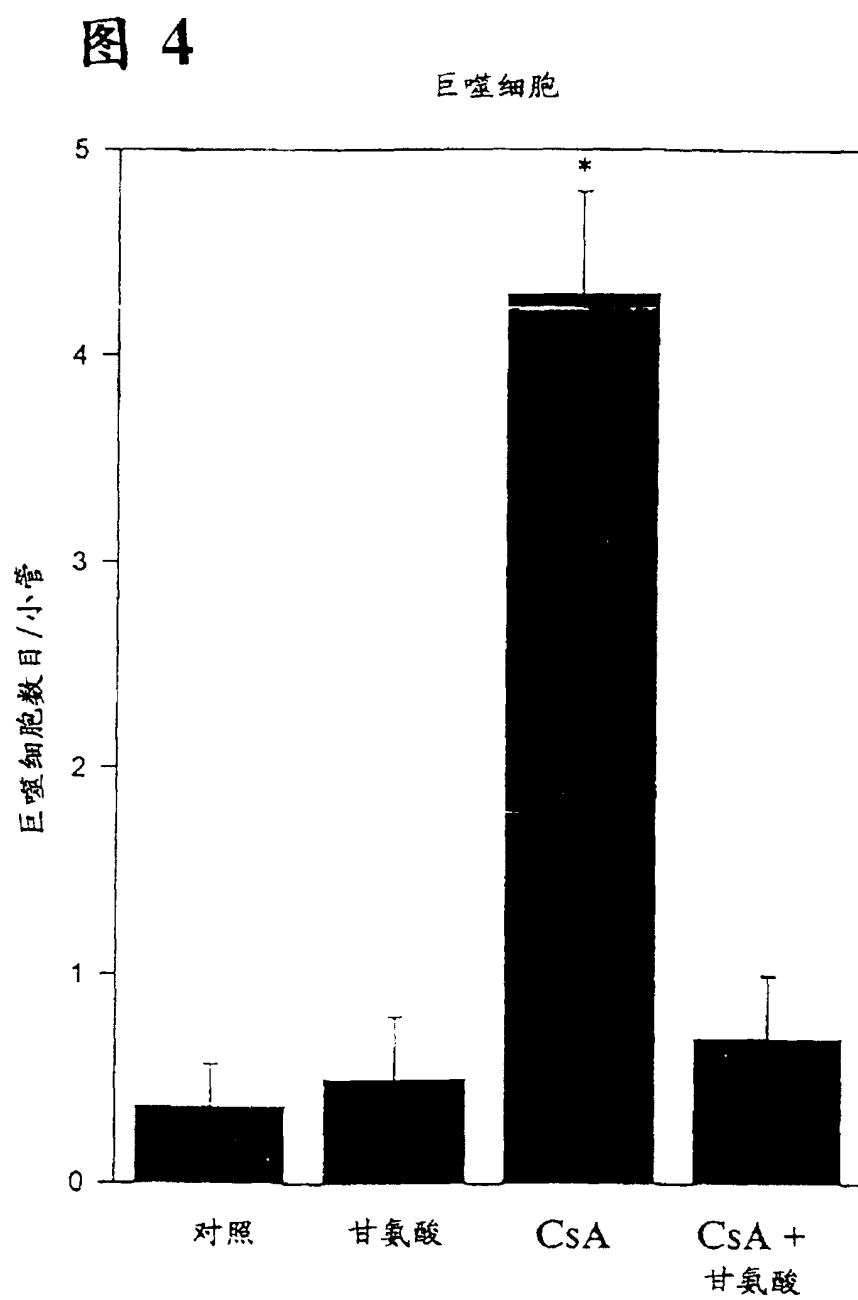


图 5

