(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 1451041 B
(45)授权公告日 2010.06.16

(21)申请号 01809095.8

(22)申请日 2001.03.26

(85)PCT申请进入国家阶段日
2002.11.06

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2001/009590 2001.03.26

(87)PCT申请的公布数据
WO01/73003 EN 2001.10.04

(73)专利权人 生物细胞实验室
地址 美国弗吉尼亚州

(72)发明人 泽诺维伊·特卡丘克

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
代理人 杨青 樊卫民

(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
全文.
WO 9402595 A1,1994.02.03, 全文.
US 3615654 A,1971.10.26, 全文.
全文.
US 5712256 A,1998.01.27, 全文.

审查员 魏春宝

权利要求书 2 页 说明书 36 页

(54)发明名称

用于治疗炎性失调及炎性相关失调的化合物、组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及由RNA尤其是从酵母中提取的RNA组成的化合物、包含这样的RNA的药物组合物以及用于治疗炎性和炎性相关失调的方法，所述方法包括给需要这种治疗的患者施用药物组合物，所述药物组合物包含对缓解炎症或炎性相关失调的症状有效量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂。本发明所用的外源酵母RNA在大范围的浓度内具有显著的膜稳定作用。同时，酵母RNA使花生四烯酸的代谢及其关键代谢物、血栓烷和白三烯的水平正常化。其抗炎性作用伴随着NO合成酶活性和抗氧化活性的正常化。

CN 1451041 B

1. 通过稳定细胞膜来预防或治疗炎症的药物组合物，其特征在于所述组合物包括一定量的纯化核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂，所述纯化核糖核酸的量可有效缓解炎症的症状，其中所述纯化核糖核酸为总酵母提取物，通过下列步骤得自产朊假丝酵母(Candidautilis)并纯化：

用10-12％的氯化钠溶液在100-110℃进行酵母RNA提取；

RNA溶液从酵母沉淀物中分离出来；

冷却至0℃并用盐酸酸化至pH 1-2，得到RNA沉淀；

以酒精漂洗，干燥沉淀；以及

进行下列纯化步骤得到RNA提取物：

沉淀溶于水形成溶液，

该溶液由氢氧化钠调节至pH 8.0-8.2，加入胰蛋白酶后在37-40℃放置1小时，然后加热使酶失活，

过滤溶液，

RNA由冷却的酒精沉淀，以及

用盐酸酸化至pH 1-2，并干燥纯化的沉淀。

2. 根据权利要求1的药物组合物，其中纯化进一步包括下列步骤：

纯化的沉淀过滤，以酒精漂洗，并通过加入氢氧化钠调节至pH6.2-6.5溶解于水，

乙醇沉淀，沉淀物过滤并干燥。

3. 根据权利要求1的药物组合物，其中纯化骤进一步包括下列步骤：

纯化的沉淀通过胰蛋白酶又一次处理，在37-40℃温育1小时，然后加热5-10分钟使酶失活，

过滤溶液，

乙醇沉淀后再酸化至pH 1-2，

过滤沉淀，以酒精漂洗并干燥。

4. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述纯化核糖核酸的量在0.1mg-1g/kg哺乳动物重量范围内。

5. 根据权利要求4的药物组合物，其特征在于所述纯化核糖核酸的量在0.1-1g范围内。

6. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述纯化核糖核酸的氮含量按重量计超过14.5％。

7. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述纯化核糖核酸的磷含量按重量计超过8.5％。

8. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述组合物适于施用的途径是皮内、皮下、口服、腹腔内、肌内或静脉内，或者将所述组合物直接施用到炎症的部位。

9. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述组合物为胶囊形式。

10. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述组合物为栓剂形式。

11. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述纯化核糖核酸具有超过14.7％重量的氮和超过8.6％重量的磷。

12. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述纯化核糖核酸具有超过

15.0％重量的氮和超过9.0％重量的磷。

13. 根据权利要求1-3任一项的药物组合物，其特征在于所述纯化核糖核酸具有15.49％重量的氮和9.05％重量的磷。

用于治疗炎性失调及炎性相关失调的化合物、组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗炎症以及伴随有炎性过程尤其是影响细胞膜的炎性过程的疾病的化合物和药物组合物。本发明还涉及缓解或预防炎性过程的症状的治疗方法。

[0002] 发明背景

[0003] 炎性过程

[0004] 炎症通常伴随着花生四烯酸代谢、氧化氮代谢以及自由基产生的变化。抗炎性非类固醇药(NSAIDS)如阿司匹林可阻断炎性过程的某些联系，但这些药物不能稳定受损细胞膜，这使得它们对炎性过程的影响有限和不充分。

[0005] 炎症是由于损伤所导致的生命组织的局部反应，其可由各种内源和外源因素引起。外源因素包括物理、化学和生物因素。内源因素包括炎性介质、抗原和抗体。内源因素经常在外源损害的影响下发展。炎性反应不可避免地跟随着细胞膜结构和穿透性的变化。在组织和器官水平，炎症的症状有疼痛、肿胀、发红(reddening)、温度上升以及在一些情况下功能丧失。炎症以亚致死损害开始并以完全恢复或长期组织毁坏终止。损伤没有炎症就没有恢复。

[0006] 对组织损害的立即应答是通过介质来实现的，这些介质是由于细胞的胞吐或溶解而释放的。主要炎症介质有激肽(kinine)和纤维蛋白溶解系统、补体系统、花生四烯酸的代谢物、血管活性胺的化合物以及其他化合物。炎症的化学介质包括：组胺、5-羟色胺、前列腺素、CGRP、氧化氮等。

[0007] 在炎症中发挥重要作用的是各种含有活性氧的化学物质。这些化合物是当氧把它们转化成很不安全的形式时合成的，产生自由基，这些自由基是带有不配对电子的原子和分子。不同的自由基具有不同的活性水平。

[0008] 炎症开始受到各种外源和内源介质的影响。内源因素即介质、抗原和自身抗原(autogens)限定了炎性反应的性质和类型，尤其限定了损伤区的疗程。在将组织损害限制于生成介质的情况下，出现了炎症的急性形式。如果免疫反应也通过抗原、抗体和自身抗原的相互作用参与此过程，则将出现长期炎性过程。各种外源因素例如感染、损伤、辐射在分子水平通过损害发动生化反应的细胞膜也提供了炎性过程的进程。

[0009] 炎性过程依赖于花生四烯酸的代谢，其转化为前列腺素(PG)、血栓烷(tromboxane)(TX)以及白三烯(LT)。前列腺素、血栓烷和白三烯是所有炎性过程的主要参与者。有两种已知途径的花生四烯酸级联。第一条途径导致生成前列腺素 G_2 和 H_2。该过程由前列腺素环氧化酶催化。环氧化酶催化产生 PGA_2、PGE_2、PGD_2 和 $PGF_{2\alpha}$，而 PGH_2 合成血栓烷生成血栓烷 A_2(TXA_2)。

[0010] 众所周知，花生四烯酸的变态的级联是细胞膜和磷脂酶A2的产物。通过环加氧化酶(cyclogenase)和脂肪氧化酶级联，花生四烯酸分别转化成前列腺素和白三烯。环氧化酶途径导致形成两个生物活性产物：前列环素(PGI_2)和血栓烷(TXA_2)。这些产物参与许多炎性过程：支气管狭窄、血管舒张(vazodilation)、血管收缩、血小板凝集、痛觉丧失、发热

等。

[0011] 花生四烯酸代谢采用 5- 脂肪氧化酶的另一途径导致白三烯的合成 :LTA_4、LTB_4、LTC_4、LTD_4、LTE_4 和 LTF_4。这些白三烯具有强大的抗炎性和支气管狭窄作用,它们在血管穿透性方面发挥重要作用。另外,白三烯已知是潜在的趋化因子,它们增加了 WBC 的迁移并对过敏症 (anafilaxis)(SRS-A) 的慢释放物质有重要影响。

[0012] 前列腺素在全身性炎性反应的发展方面发挥重要作用。在风湿性关节炎中,滑液中大量的 PG 和 LT 支持炎性过程的发展和骨组织周围接缝的软化。白三烯已知是炎性反应的主要病理生理介质。它们比前列腺素更大程度地影响血管穿透性和白细胞附着到血管壁以及水肿发展。

[0013] 前列腺素有效地调节血小板的凝聚。PGE_1 是血小板凝聚的有效抑制剂,而 PGE_2 从血小板中正常释放,刺激此作用。然而在血液可凝聚性中起最重要作用的是 PGI_2 或前列环素,在血管壁中由花生四烯酸合成。其是血小板凝聚的最有效的抑制剂,具有舒张血管的特性。血栓烷是在血小板中合成的,具有反作用。

[0014] 当内皮受损时,血小板与内皮下组织粘着以及血小板凝聚启动。在此过程中起主要作用的是血栓烷 A_2。相反,前列腺素 I_2 抑制血小板凝聚。所以,PGI_2 和 TXA_2 的比例对凝固过程至关重要。

[0015] 另外,在炎症恢复过程中起特别作用的是一氧化氮 (NO)。该气体容易地穿透不同器官和组织,并作为自由基具有强大的反应性。一氧化氮是有效的血管舒张剂、神经递质以及炎性介质,其在哮喘炎症中发挥显著作用。

[0016] 一氧化氮内源地由 L- 精氨酸和 NO 合成酶产生。有三种已知形式的 NO 合成酶,其中两种是组成型的,一种是可诱导的。可诱导 NO 合成酶在上皮细胞中表达,当释放抗炎性细胞因子 (如白介素 1β (IL-1β)) 和肿瘤坏死因子 (TNF-α) 时,其活性快速增加。

[0017] 关于炎性反应,一氧化氮既具有阳性特性也具有阴性特性。一个重要和潜在的阳性特性是其松弛支气管平滑肌的能力,这种能力导致支气管舒张。其阴性特性包括在鸟嘌呤单磷酸 (guasine-monophosphate) 依赖的机理帮助下,通过增加趋化性嗜中性粒细胞、单核细胞和 Oesinofils 帮助炎性过程的能力。据认为一氧化氮抑制白细胞粘附到血管内皮和支气管上皮。

[0018] NO 在限定基础性血管紧张、调节心肌收缩以及调节血小板和血管壁之间的相互作用方面发挥重要的生物作用 (Zhou Q., HellermannG.R., Solomonson L.P.,从休眠血小板中释放氧化氮 (Nitric oxiderelease from resting human platelets),Thromb.Res.,1 ;77(1) :87-86 ;1995)。血小板活化在人各种血小板 - 血管的病状的发病机理中的作用以及有关在高血压中降低NO介导的效应的证据 (Claver A.,Collier J.,Moncada S.,Vallance P.,在有高血压的病人中局部动脉内 NG- 单甲基 -L- 精氨酸的作用 :氧化氮扩张肌机制表现异常 (Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginin in patients with hypertension :the nitricoxide dilator mechanism appears abnormal), J.Hypertens.,10(9) :1025-1031 ;1990)、糖尿病 (Calver A.,Collier J.,Valance P.,在患有胰岛素依赖性糖尿病患者的人前臂动脉床中氧化氮合成的抑制和刺激 (Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human foreamarterial bed of patients with insulin-dependent diabet), J.Clin.Invest.,90(6) :2548-2554 ;1992)

和动脉硬化症 (artherosclerosis)(Drexler H.，Zeiher A.M.，Meinzer K.，Juat H.，在血胆固醇过多的病人的冠状微循环中 L- 精氨酸与内皮功能失调的修正 (Correction of endothelialdysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patientby L-arginine)，Lancet.，21-28；338(8782-8783)；1546-1550；1991) 暗示增加 NO 合成酶活性的药物可有效用于患者治疗中。人血小板能合成氧化氮。例如在内皮细胞中，大量氧化氮可由完整的血小板产生以及由受激的血小板产生。所以，血小板起源的氧化氮在血管体内平衡的维持和其他 NO 敏感过程中发挥重要作用 (Zhou et al，1995)。

[0019] 除了一些常见特征以外，各个个体情况下的炎性过程还具有某些涉及身体器官功能特性和涉及导致损伤的因素即病毒、微生物、损伤和中毒等的特征之间的一些差异。

[0020] 例如，心脏病包括急性心肌梗塞的一种常见机理是心脏细胞的细胞膜的结构和功能的失常。结果，具有冠状收缩、产生心律不齐、血吸 (hemoattractive) 和凝集前 (pro-aggregate) 作用的白三烯、血栓烷等的合成增加 (Bangham A.D.，Hill M.W.，Miller N.，作为生物膜模型的脂质体的制备和应用 (Preparation and use of liposome as model ofbiological membranes)，Methods in Membrane Biology，Acad.Press，V.1，N.Y.，P.1-68，1974)。

[0021] 心脏损伤的发病机理中的另一重要因素是脂肪氧化酶衍生物 LTC_4、LTD_4 和 LTB_4 的冠状收缩和血吸（关于嗜中性粒细胞）作用 (Hoshida S，Kuzuya T.，Nishida M. 等，Amer.J.Cardiol，7；63(10)；24E-2E；1989；Lam B.K.，Gagnon L.，Austen K.F. 等，J.Biol.Chem.，15；265(23)；13438-1341；1990；Svendsen J.N.，Hansen P.R.，Ali S. 等，Cardiovac.Res.，27(7)；1288-1294；1993)。能阻断该过程的物质可依次减少急性心肌梗塞中坏死的大小，所以，显著降低心脏病严重情况下的致死率，如全部心肌梗塞。同时，这些物质可稳定心脏细胞的膜。此外，已知在梗塞过程中的冠状收缩和血吸作用伴随着血小板凝聚的提高。所以，阻断该过程也导致损伤大小的降低。

[0022] 进一步，血凝状态的失调在各种疾病的发病机理中发挥重要作用。这在人的血小板 - 血管病的发病机理中尤其明显。已知体内平衡的血小板 - 血管连接中的失常是通过引起血液的流变特性的变化并引发内在血管凝聚形成导致血凝状态失调的关键因素。血小板相关损伤导致微循环过程的衰竭，其导致血流进入组织的缺少。在血块形成的起始阶段，血小板变得活化并进一步附着到受损伤的内皮上。然后它们凝集并且起始血小板血块形成。

[0023] 今天，在炎症、血凝状态的失调和心血管病之间有密切关系有足够的证据 (Anderson J.L.Carlqist J.L. 等，作为冠状动脉疾病和心肌梗塞的危险因素的 C 反应蛋白，一个炎性标记和感染血清学的评估 (Evaluation of C-reactive protein an inflammatory marker,and infectiousserology as risk factors for coronary artery disease and myocardialinfarction)，J.Am.Coll.Card.，32；35-41；1998)。

[0024] 对人体中细胞膜或炎性过程的损伤经常伴随着血液的血球减少。在大多数情况下，这些患者有贫血症、血小板减少或嗜中性粒细胞减少症。贫血症伴随着红细胞或血红蛋白量上的减少，这归因于血液的丧失、红细胞产生失常、红细胞破坏增加或这些原因的组合。在血小板减少症的情况下，血液中血小板的数量减少，这引发血栓形成和随后出血的失常。嗜中性粒细胞减少症是在血液中嗜中性粒细胞 (neutrophile) 数量的减少，这通常导致对各种感染的灵敏度增加。

[0025] 血细胞的正常形成或血细胞生成开始于称作 CFU-GEMM 的造血干远祖细胞，其在成年人的骨髓中形成，并在生长因子的影响下，被转化成专门的血细胞中。例如，红细胞在促红细胞生成素的影响下从 CFU-GEMM 中形成。如果受到促红细胞生成素的影响，CFU-GEMM 被转化成血小板。相类似，在粒细胞巨嗜细胞集落刺激因子的影响下，CFU-GEMM 或者被转化成粒细胞和单核细胞。同样，淋巴细胞起源于淋巴干细胞。

[0026] 有严重后果的最显著的血细胞减少症发生在癌症患者中，尤其发生在 AIDS 病患者和那些被 HIV 感染的患者化疗和放疗后 (J.Crawford，J.L.Gabrilove，贫血和疲劳的治疗选择 (Therapeutic Option for Anemiaand Fatigue)，Medscape，Oncology Treatment Update，2000，Medscape，Inc.)。

[0027] 细胞膜在炎性过程中的作用

[0028] 细胞膜的功能及其与炎性过程的关系已被记录下来。已知原生质细胞膜在其他细胞膜结构中占用特别的位置，执行如屏障和转运的重要功能，提供与细胞外围环境的接触，参与细胞稳态的调节，支持这种调节的信号机理，并限定细胞的个性和整体性。红细胞膜的结构构成、动力学和功能以及各种溶血模式，如渗透、氧化、免疫（由溶血病毒、毒素、补体诱导）、去污剂溶血、光溶血等已深入研究（参见，例如 Bashford C.L.，Alder G.M.，Menestrina G. 等，溶血病毒、毒素、补体和其它细胞毒性剂对膜的损坏。二价阳离子阻止的共同机制 (Membrane damage by hemolytic viruses，toxins，complement，and othercytotoxic agents.A common mechanism blocked by divalent cation)，J.Biol.Chem.，15；261(20)：9300-9308，1986；Osorie e Castro V.R.，Ashwood E.R.，Wood S.G.，Vernon L.P.，肽毒素、脂族醇、相关乙二醇和亚苄基衍生物引发的红细胞溶血和荧光极化的变化 (Hemolysis oferythrocytes and fluorescence polarization changes elicited by peptidetoxins，aliphatic alcohols，related glycols and benzylidene derivatives)，Biochim.Biophys.Acat.，16；1029(2)：252-258；1990)。

[0029] 实验表明外围环境 pH 的变化打乱了影响膜的力的平衡，这导致膜蛋白的结构和凝集程度的变化。膜结构变化分成两种：一种是 pH 变化范围在 7.0-6.0 之间所导致的那些膜结构变化，另一种是 pH 水平低于 4.5 时的那些膜结构变化 (Zavodnik I.B.，Pileckaya T.P.，人红细胞的酸性溶解 (Acid lysis of human erythrocytes)，Biophizika.，V.42，N.5，P.1106-1112，1997)。在后一种情况下，膜失去稳定并接着发生红细胞溶解。已知在 pH 4.7 时，孔在糖萼红细胞膜中形成 (Arvine T.，CuddA.，Schulz B.，Nicolau C.，Biochim.Biophys.Acta.，19；981(1)：61；1989)。具体而言，环境 pH 水平的降低改变了膜模型中磷脂的构型、包装类型和流动性。因此，由于 pH 降低导致膜蛋白的凝集变性是膜损伤和红细胞酸解的原因。

[0030] HCl 溶血红细胞的模式的提出是根据位于基质中心或红细胞膜上协作的质子化作用，随后产生孔，所述孔足够释放血红蛋白。通过研究酸解过程的机理和模式，可获得有关膜的结构构造和膜稳定作用的信息。

[0031] 对红细胞溶血的内源稳定剂认识最多的（等渗溶血是研究最深的）有血浆的白蛋白、金属离子 K+、Na+ 和 Mg2+，尤其是 Ca2+，这些金属离子调节原生质红细胞膜通道，可能包括质子通道 (AndersonD.R.，Davis J.L.，Carraway K.L.，人红细胞膜的钙促进变化。血影蛋白、反式谷氨酸酶和膜结合蛋白酶的参与 (Calcium-promoted changes of

thehuman erythrocyte membrane.Involvement of spectrin, transglutaminase, and a membrane-bound protease), J.Biol.Chem.,10 ;252(19) :6617-6623,1977),还有吸附在红细胞表面上的胆固醇 (Hui S.W., Stewart C.M., Carpenter M.P., Stewart T.P.,人红细胞膜中胆固醇对脂结构的影响 (Effects of cholesterol on lipid organization in human erythrocytemembrane), J.Cell.Biol.,85(2) :283-291 ;1980),以及多胺,其与膜磷脂的脂肪酸残基结合 (Rennert O.M., Shukla J.B.,健康和疾病中的多胺,多胺研究进展 (Polyamines in health and disease Advances inPolyamine research), Raven Press, V.2, N.Y, P.195-21,1978)。认识最多的红细胞内源溶血的激活剂有长链脂肪酸 (Rybszynska M., CsordasA.,游离脂肪酸与红细胞膜的依赖链长度的相互作用 (Chain length-dependent interaction of free fatty acids with the erythrocyte membrane), Life Sci.,44(9) :625-632 ;1989),尤其是氧和氮的自由基 (Sato Y., Kamato S.,Takahashi T.等,自由基诱导的人红细胞溶血的机制 :水可溶性自由基启始剂的溶血作用 (Mechanism of free radical-inducedhemolysis of human erythrocytes :hemolysis by water-soluble radicalinitiator),18 ;34(28) :8940-8949 ;1955 ;Sen T., Ghosh T.K., ChaudhuriA.K. 葡萄糖氧化酶诱导的红细胞的溶解 (Glucose oxidase-induced lysisof erythrocytes), J.Exp.Biol.,33(1) :75-76 ;1995 ;Wollny T., YacovielloL. 大鼠中急性溶血的出血时间的传导 :氧化氮的作用 (Propogation ofbleeding time by acute hemolysis in rats :a role for nitric oxide), Am.J.Physiol.272(6) : 2875-2884 ;1997)。

[0032] 总之,有证据显示在炎性过程中膜结构发生了改变。但是,炎性过程中的膜损伤模型还未用于筛选药物和治疗或预防炎性和炎性相关失调。

[0033] 现有药物不能令人满意

[0034] 现有抗炎性药物不能令人满意,这是因为各种复杂的生化反应参与炎症,并且有关炎性发病机理的可靠信息缺乏使得实验选择能调节炎症的药物化合物复杂化。因此,选择的药物对炎症的单个组成具有效应。迄今为止,还没有药物能调节任何炎性反应的大多数组成。

[0035] 大多数已知的非类固醇抗炎性药物 (NSAIDS) 选择性地影响该病理过程的某些阶段。首先,它们影响血管的通透性,这在急性炎症中经常改变,以及影响各种细胞反应,这些反应常见于慢性炎症。同时许多 NSAIDS 通过自由基机理也影响代谢。

[0036] 抗炎性过程的初期筛选通常采用三组方法。首先,研究药物对容易鉴定的炎性症状的影响。这些症状包括肿胀、充血和坏死等。更高级的分析包括实验疗法,采用模型关节炎和心脏炎等,这些模型与人的小病类似。第三阶段包括分析药物如何影响某些代谢途径。

[0037] 在花生四烯酸的代谢进行详细研究后,其作用是调节这些代谢产物形成的许多抗炎性化合物被提了出来。在大多数情况下,这些药物充当花生四烯酸代谢酶的抑制剂。一个例子是环加氧酶 2 抑制剂和白三烯 A.sub.4 水解酶抑制剂的抗炎性药物组合 (Isakson, P.C., AndersonG.D., Gregory, S.A.,用环加氧酶 -2 抑制剂和白三烯 A.sub.4 水解酶抑制剂的组合治疗炎症和炎症相关的失调 (Treatment of inflammation andinflammation-related disorders with a combination of a cyclooxygenase-2inhibitor and a leukotriene A.sub.4 hydrolase inhibitor),美

国专利号 5,990,148,1999 年 11 月）。依据核酸成分嘧啶的类似物提出了相似的方法（Connor D.T.，Kostlan C.R.，Unangst P.C.，用作抗炎剂的 2- 杂环 -5- 羟基 -1,3- 嘧啶（2-heterocyclic-5-hydroxy-1,3-pyrimidines useful asantiinflammatory agents），美国专利号 5,240,929,1993 年 8 月）。既然这些化合物是花生四烯酸、5- 脂肪氧化酶和环加氧酶的关键代谢酵素的抑制剂，因此作者建议它们用作抗炎性药物，适于治疗大范围的疾病，从过敏症状和类风湿性关节炎到动脉硬化症和心肌梗塞。而其他研究者推荐，将环前列腺素类似物用于治疗血小板凝集和支气管狭窄（Haslanger M.F.，环前列腺素类似物和他们在抑制花生四烯酸诱导的血小板凝集和支气管狭窄中的用途（Prostacyclin analogs and their usein inhibition of arachidonic acid-induced platelet aggregation andbronchoconstriction），美国专利号 4,192,891,1980 年 3 月）。

[0038] 然而，由于炎性过程启动许多不同代谢级联，抑制剂或花生四烯酸的代谢类似物的使用不能平衡全部这些反应，因而不能以令人满意的方式调节复杂的炎性过程。

[0039] 进一步，已在应用医药领域长时间使用的阿司匹林也被提了出来，因为其可阻断花生四烯酸的代谢酵素。前列腺素的抑制剂如阿司匹林十分有效地影响炎性过程。为此，它们成功地应用在临床用于治疗类风湿性关节炎、骨关节炎以及其他相似的炎性过程。阿司匹林还具有抗凝固特性，因为其抑制 TXA_2 的合成，并且至少部分影响 PGI_2 的合成。每天剂量 3g 的阿司匹林通常用作梗塞后和损害后治疗预防心绞痛，或用于心血管病高风险的患者。

[0040] 但是，对 TXA_2 和 PGI_2 的体内合成的研究已经显示口服阿司匹林只能减少 PGI_2 分泌 2-3 小时，而可停止分泌血栓烷 10 天（Vesterqvist O.，在人中血栓烷和环前列腺素的体内合成的测定（Measurements of the invivo synthesis of thromboxane and prostacyclin in humans），Scand.J.Clin.Lab.Invest.48(5)：401-407；1988）。该作者以及其他作者（参见，例如 Lorenz R.L.，Boehlin B.，Uedelhoven M.W.，Weber P.C.，轮流每天脉冲式给予剂量比分开剂量施用阿斯匹林具有更高的抗血小板作用（Superior antiplatelet action of alternate day pulsed dosing versus splitdose administration of aspirin），Am.J.Cardiol.15；64(18)：1185-1188；1989）不仅表示了施用正确剂量的阿司匹林的困难，而且还提供了长期使用阿司匹林导致的经常性副作用的实验根据。

[0041] 具体而言，阿司匹林和其他非类固醇抗炎性药物可能是过敏个体中类过敏反应的原因。这些反应的机理是剂量依赖的毒性特应性而非免疫性的。阿司匹林还是偶发性中毒最常见的原因。中毒前用阿司匹林治疗的儿童也是高风险的。阿司匹林过量经常发生，难以校正。用于许多疾病包括类风湿性关节炎的有效阿司匹林剂量为每天 3-6.5mg，这导致对胃肠道的刺激。胃肠道病患者难以忍受阿司匹林。阿司匹林还诱发糜烂、出血性胃溃疡、腹泻和十二指肠溃疡。进一步，阿司匹林通常用于对抗血小板作用的治疗，但是其有严重的耐药性并且长时间服用会导致副作用。此外，通过抑制非选择性地环加氧发生（cyclooxygenesis），阿司匹林干扰血栓烷的合成，血栓烷是有效的团聚剂（aggregant）和血管收缩剂，并且阿司匹林也可导致环前列腺素水平的降低，环前列腺素是抗团聚剂和血管舒张剂。

[0042] 阿司匹林和其他 NSAIDS 的所有这些阴性副作用激发了新药物的研究，这些新药物将具有抗炎性特性，在大范围的浓度下无毒性，长期使用无副作用，并且能够预防和终止

炎性过程。

[0043] 进一步，血细胞减少症的综合治疗利用了造血生长因子 (J.Crawford，造血生长因子：现有的实践和将来的方向，第 42 届美国血液学协会年会 (Hematopoietic Growth factor：Current Practice and FutureDirections，42-nd Annual Meeting of the American Society ofHematology)，2000，Medscape，Inc.)。然而这种方法十分复杂而且昂贵。例如，对 HIV 感染的患者中血细胞减少症的治疗依赖于变态的的特异原因，使用造血生长因子。红细胞生成素用于治疗贫血症，血小板生成素用于治疗血小板减少症，以及 G-CSF 用于治疗 HIV 感染的患者中的嗜中性粒细胞减少症。因此，治疗 HIV- 感染患者的血细胞减少症需要对这些生长因子的外源水平进行很昂贵的诊断以及昂贵的生长因子，这些因子通常通过重组技术获得。

[0044] 为此，寻找能使贫血症、血小板减少症和嗜中性粒细胞减少症正常化的便宜药物是重要的。

[0045] 核酸的药物用途

[0046] 核酸常用于药物学中 (Rothenberg M.，Jonson G.，Laughlin C. 等，寡脱氧核苷酸作为基因表达的反义抑制剂：治疗含意 (Oligodeoxynucleotides as anti-sense inhibitors of gene expression：therapeutic implications)，J.Natl.Cancer Inst.，18；81(20)：1539-1544；1989；Zon G.，寡核苷酸类似物作为潜在的化学治疗剂 (Oligonucleotides analogues as potential chemotherapeutic agents)，Pharm.Res.，5；(9)：539-549；1988)。但是，核酸的药物用途未包括炎性或炎性相关的失调。例如，Anderson 等提出了在寡核苷酸的帮助下调节细胞巨化病毒感染的效应的方法用于治疗人中细胞巨化病毒感染，所述寡核苷酸与细胞巨化病毒的 mRNA 结合用于治疗人的细胞巨化病毒感染 (Anderson K.，Draper K.，Baker B.，调节细胞巨化病毒感染作用的寡核苷酸 (Oligonucleotides for modulating the effects ofcytomegalovirus infections)，美国专利号 5,442,049，1995 年 8 月 15 日)。在编码蛋白激酶 C 的 3' 非翻译部分演替的特异核酸的基础上，Boggs 等提出与蛋白激酶 Cα 相关疾病的诊断和治疗的方法 (BoggsR.T.，Dean.N.M.，编码蛋白质激酶 C 的核酸序列和其表达的反义抑制 (Nucleic acid sequences encoding protein kinase C and antisenseinhibition of expression thereof)，美国专利号 5,681,747，1997 年 10 月)。Yano 等还将从牛分枝杆菌和枯草芽孢杆菌中获得的 DNA 化合物用于治疗胃溃疡申请了专利 (Yano O.，Kitano T.，治疗消化性溃疡的方法 (Method for the treatment of digestive ulcers)，美国专利号 4,657,896，1987 年 4 月)。

[0047] 尤其已知的是核糖核酸 (RNA)、其部分水解产物以及合成的多核糖核苷酸具有大范围的生物活性 (Kordyum V.A.，Kirilova V.S.，Likhachova L.I.，外源核酸的生物作用 (Biological action of exogenousnucleic acids)，Visnyk ASC USSR，V.41，N.6，P.67-78，1977)。它们活化细胞中的蛋白合成 (Sved S.C.，注射进小鼠的外源核糖核酸的代谢 (The metabolism of exogenous ribonucleic acids injected into mice)，Canad.J.Biochem.，V.43，N.7，P.949，1965) 并具有抗肿瘤活性 (NiuM.C.，核糖核酸对小鼠酸性细胞的影响 (Effect of ribonucleic acid onmouse acids cells)，Sciens.，N.131，P.1321，1960)。RNA 能增加抗体产生并减少抗体发生的诱导阶段 (Johnson A.G.，Schmidtke I.，Merrit K. 等，核酸和他们的衍生物增强抗体的形成，免疫学中的核酸 (Enhancement of

antibody formation by nucleic acids and theirderivatives, in Nucleic acid in immunology), Berlin,第 379 页,1968 ;Merrit K., Johnson A.G.,细菌内毒素佐剂抗体形成的研究,6. 核酸增强抗体的形成(Studies on the adjuvant of bacterial endotoxins on antibodyformation,6.Enhancement of antibody formation by nucleic acids), J.Immunol., V.94, N.3, P.416,1965 ;Brown W., Nakono M.,寡脱氧核糖核苷酸对抗体形成的早期事件的影响 (Influence ofoligodeoxyribonucleotides on early events in antibody formation), Proc.Soc.Exper.Biol.Med.,5, V.119, N.3, P.701,1967)。某些增加或减少的免疫性指征显示在 RNA 影响下正常化了。RNA 第一次应用于 T 淋巴细胞、T 和 B 淋巴细胞的合作和巨噬细胞功能的活化等。

[0048] 进一步,外源 RNA 用于细胞分裂中的 DNA 合成,并用于细胞代谢中的 RNA 合成。还确定了导入后 2 小时,外源 RNA 包括在淋巴细胞和巨噬细胞的 RNA 中 (Enesco N.E.,感染到小鼠中的 14C-RNA 的命运 (Fate of 14C-RNA infected into mice),Exper.Cell Res., V.42, N.3, P.640,1966)。有证据显示酵母 tRNA 以完整分子形式包括在细胞中 (Herrera F.,Adamson R.H.,Gallo R.C.,正常细胞和白血病细胞对转移核糖核酸的吸收 (Uptake of transfer ribonucleic acid by normal andleucemic cells), Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 67(4) :1943-1950 ;1970)。

[0049] 通过分析方法确定了 RNA 实际上存在于所有动物细胞的细胞膜中 (内质网膜、线粒体膜、核膜以及质膜)。其含量依赖于组织类型和膜分离方法占到膜干重的 0.5-4.0%。实验结果显示特殊膜 RNA 存在于分离的膜中 (Shapot V.S., Davidova S.Y.,脂核蛋白作为动物细胞膜的整合部分 (Liponucleoprotein as an integral part of animal cellmembrans), Prog.Nucleic Acid Res.11 :81-101 ;1971 ;Rodionova N.P., Shapot V.S.,动物细胞内质网的核糖核酸 (Ribonucleic acid of theendoplasmatic reticulum of animal cells), Biochim et Biophis Acta,24 ;129(1) :206-209 ;1966)。膜 RNA 的功能未被充分了解。

[0050] 核糖体中的膜 RNA 的功能已被较好研究 (Cundliffe E.,巨大芽孢杆菌中的细胞内核糖体和多核糖体的分布 (Intracellular distributionof ribosoms and poliribosomes in Bacillus megaterriium), J.Mol.Biol.,28 ;52(3) :467-481 ;1970)。核糖体 RNA 包含在细菌细胞膜,细胞核的外膜,线粒体的内外膜,与质膜连接的高尔基体的内膜,粗糙的内质网,动物、人、植物、微生物和原生动物的不同组织中。含有 N- 乙酰神经氨酸的膜糖脂和糖蛋白可能参与核糖体中核糖体 RNA 结合位点的形成,这是由于膜经神经元酶 (neuronidase) 处理后丧失结合核糖体的能力 (Scott-Burden T.,Hawtrey A.O.,用氧化锂的方法从大鼠肝微体制备核糖体游离膜 (Preparation of ribosome free membranes from ratliver microsomes by means of lithium chloride), Biochem.J.115(5) :1063-1069 ; 1969)。进一步,核糖体结合位点和细胞膜可能受到性激素的活化,并且致癌物损伤该生理机理。此结论得到了衰老过程中 (Mainwaring W.J.,年龄对小鼠肝中蛋白质合成的影响 (The effectof age on protein synthesis in mouse liver), Biochem J.113(5) : 869-878 ;1969) 和动物阉割后 (Tata J.R.,诱导两栖动物变态过程中核糖体和微体膜的形成、分布和功能 (The formation, distribution and function ofribosomes and microsomal membranes during induced amphibianmetamorphosis), Biochem J.105(2) :

783-801,1967) 膜结合的 RNA 水平降低的支持。从膜中抽提精胺导致结合 RNA 与膜的分离 (KhawajaJ.A.,核糖体和核糖体亚颗粒与内质网膜在体外的相互作用 :精胺和镁的影响 (Interaction of ribosomes and ribosomal subparticles withendoplasmic reticulum membranes in vitro :effect of spermine andmagnesium), Biophis.Acta.,29 ;254(1) :117-128 ;1971)。当细胞膜用骨髓瘤细胞的天然小核糖体的 RNA 处理后,天然小核糖体从细胞膜中分离,而大天然核糖体亚单位保持与膜的结合 (Mechler B.,Vassalli P.,骨髓瘤细胞中与膜结合的核糖体。I. 游离的和与膜结合的核糖体部分的制备。方法的评估和核糖体的特性 (Membrane-bound ribosomes ofmyeloma cells.I.Preparation of free and membrane-bound ribosomalfractions.Assessment of the methods and properties of ribosomes), J.Cell.Biol.67(1) :1-15 ;1975)。各种膜酶的核苷酸成分例如磷酸果糖激酶的多聚A-RNA酶组成可能的膜RNA池 (Hofer H.W.,Pette D.,磷酸果糖激酶-含有核酸的酶的综合性质 (The comples nature ofphosphofructokinase-a nucleic acid containing enzyme), Life Sci.4(16) :1591-1596 ;1965)。

[0051] 但是,核酸尤其是 RNA 以及含有所述核酸的组合物未被用于治疗或预防炎性或炎性相关失调。具体而言,上述的大多数研究依赖于体外的实验。进一步,这些方法中没有一种针对治疗或预防炎症或炎性相关失调。

[0052] 需要新药物

[0053] 从上可知,存在新的抗炎性药物的需要,所述药物可调节血液凝集状态的失调,并具有比阿司匹林和其他 NSAIDS 更少的副作用。具体而言,由于起始阶段中炎性过程跟随着参与炎性过程的许多细胞的膜的结构和功能的改变,因此,需要的药物不仅调节炎性代谢级联的全部成分,而且使参与细胞的膜结构和功能稳定。详细而言,由于传统疗法对大面积梗塞效果微小,所述大面积梗塞与心原性休克相牵连,因此,需要新药物能阻止心肌细胞的破坏。

[0054] 发明概述

[0055] 本发明提供了用于治疗或预防炎症和伴随炎性过程的疾病的化合物、药物组合物和方法。所述化合物是由 RNA 组成的活性成分,尤其是从酵母中抽提的 RNA。酵母 RNA 是低聚合体的 RNA 的异源化合物,其包括各种数量的核苷酸、核苷酸聚合体以及通常 5-25 个核苷酸。带有大量稀有碱基的寡核苷酸和转运 RNA 在酵母 RNA 中占优。

[0056] 由于所有炎性过程在分子水平上的共同特征之一是改变的膜的通透性和结构,因此,本发明的完成采用基于使炎症中的细胞膜稳定的能力选择药物的方法。所以,通过分析由质膜中各种因子诱导的破坏性机理以及研究有关它们相互作用的结构元件,所述元件提供了细胞的最佳构造,为应用医学选择出具有膜稳定作用的药物是可能的。具体而言,现已确立,由于膜含有可能发挥膜稳定作用的低分子 RNA,因此,将外源低分子 RNA 导入体内可导致扰乱细胞膜,例如参与炎性过程的细胞膜的稳定。

[0057] 由本发明化合物带来的细胞膜的稳定导致花生四烯酸代谢和氧化氮代谢的正常化,它们具有强大的抗炎性作用并且是全部炎性过程的主要参与者,所述炎性过程如类风湿性关节炎、骨关节炎、过敏 (如哮喘) 以及其他炎性疾病,例如疼痛,肿胀,发热,牛皮癣,炎性肠病,胃肠溃疡,心血管病包括局部缺血性心病和动脉硬化症,由击打导致的部分脑损伤,皮肤病 (湿疹、晒斑、粉刺),肺、肾、胃肠道、皮肤的白三烯介导的炎性疾病,前列腺炎和

牙周炎。

[0058] 酵母 RNA 可有效降低自身免疫作用过程中在其起始过程和慢性阶段的 iNOS 的活性。该特性使得酵母 RNA 用于伴随 iNOS 诱导的病理状况 :糖尿病、肿瘤、肝炎、感染、神经退化疾病（帕金森病、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、脑炎）以及其他疾病。

[0059] 此外，尤其考虑到持续不断地与食品一起进入人和动物体内的事实，天然核酸分子如本发明的化合物作为药物化合物高浓度应用没有或很少诱发副作用。

[0060] 进一步，本发明提供治疗炎症或炎性相关失调的方法，其包括给需要这种治疗的哺乳动物施用一定量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂，所述量能有效缓解炎症或炎性相关失调的症状。

[0061] 更进一步，本发明提供使受损细胞膜稳定的方法，其包括给细胞膜已经受损的哺乳动物施用一定量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂，所述量能有效使所述的受损细胞膜稳定。

[0062] 更进一步，本发明提供使哺乳动物中 NO 合成酶的能力正常化的方法，其包括给需要这种治疗的哺乳动物施用一定量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂，所述量能有效使哺乳动物中 NO 合成酶的能力正常化。

[0063] 更进一步，本发明提供抑制哺乳动物细胞膜的成分氧化的方法，其包括给需要这种治疗的哺乳动物施用一定量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂，所述量能有效抑制哺乳动物细胞膜的成分氧化。

[0064] 更进一步，本发明提供抑制血小板凝集的方法，其包括给需要这种治疗的哺乳动物施用一定量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂，所述量能有效抑制血小板凝集。

[0065] 更进一步，本发明提供提高至少一种血液指示剂水平的方法，其包括给需要这种治疗的哺乳动物施用一定量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂，所述量能有效提高血液指示剂水平。血液指示剂是白细胞、红细胞、血小板、血红蛋白、嗜中性粒细胞和血细胞比容各个水平中的任一个。

[0066] 更进一步，本发明提供预防或治疗血细胞减少症、贫血症、血小板减少症和嗜中性粒细胞减少症的任一种的方法，其包括给需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂。

[0067] 核糖核酸的给药量可以在从约 0.1mg 至约 1g/kg 哺乳动物重量的范围内，例如在从约 0.1 至约 1g，更具体地从约 250 至约 350mg 的范围内。

[0068] 本发明还提供由从酵母中提取出的核糖核酸组成的化合物，所述酵母如酿酒酵母或产朊假丝酵母。按重量计，所述核糖核酸优选具有氮含量超过 14.5％和磷含量超过 8.5％，更优选氮含量超过 14.7％以及磷含量超过 8.6％，甚至更优选氮含量超过 15.0％和磷含量超过 9.0％。

[0069] 进一步，本发明提供用于治疗或预防炎症或炎性相关失调的药物组合物，其包括核糖核酸和可药用媒介物、载体或稀释剂。

[0070] 发明详述

[0071] 采用各种体外和体内模型进行已知核酸的综合分析。模型的选择对应于炎性过程的某些类型，所述炎性过程既有常见起因也有免疫起因。在测试中，将核糖核酸 (RNA) 尤其是酵母 RNA 的效应与现有抗炎性药物在大范围的抗炎性活性上进行比较。

[0072] 实验模型和结果概述

[0073] 1. 体外血小板凝集模型

[0074] 在由花生四烯酸诱导的人血小板凝集模型上体外进行外源核酸的初始筛选(Born L.V.R.，difosfate凝聚血小板和逆转(The aggregation ofblood platelets by difosfate and its reversal)，Nature，V.94，P.327，1962)。分析来自原核生物和真核生物的外源DNA和RNA。我们使用阿司匹林作为标准抗炎性药物的代表。

[0075] 实验表明阿司匹林一定程度上抑制了由花生四烯酸诱导的血小板凝集。从“Reanal”(匈牙利)生产的鸡红细胞中获得的脱氧核糖核酸(DNA-CE)在阿司匹林范围内抑制了血小板凝集。进一步，“Reanal”(匈牙利)生产的牛胸腺DNA(DNA-CT)和“Serva”(美国)生产的大肠杆菌转运RNA(tRNA)几乎抑制了诱导的血小板凝集有二倍。总酵母RNA显示了最高的抑制效果，其在大范围的浓度中显著抑制了血小板凝集。酵母RNA对血小板凝集的抑制依赖于形式(酸或其钠盐)、纯度和蛋白存在。有蛋白混合物的RNA-F有效性减少三分之一。酵母RNA-PN的钠盐在高浓度下只有一半的有效性，并在低浓度下不发挥作用。

[0076] 由于由花生四烯酸诱导的血小板凝集模型被认可用于筛选抗炎性药物，因此，这种比较测试的结果显示核酸尤其是RNA，具体是酵母RNA，具有显著的抗炎性特性。

[0077] 2. 体外红细胞膜的酸抗性模型

[0078] 根据细胞膜的不稳定是炎性过程的主要指征的认识，我们使用了体外红细胞膜酸抗性模型进行药物的膜保护特性即抗炎性特性的筛选。我们选择了大鼠红细胞以研究外源核酸的免疫稳定作用。我们分析了红细胞膜对氧化氮破坏性影响的反应。根据动力学方法(TerskovI.A.，Hittelzon I.I.，化学(酸)红细胞象图方法(Chemical(acid)erythrogram method)，Biophizika，2(2)：259-266；1957)通过计算红细胞的酸抗性我们估计了外源核酸的膜稳定作用以及内源和外源亚硝酸根阴离子的损伤作用。此方法的主要目的是确定细胞数的历史变化，细胞最终在弱酸影响下发生溶血。酸性环境下，红细胞溶解历经三个阶段：氢离子(质子，H^+)渗透红细胞的质膜，血红蛋白和膜蛋白的质子化，最终结果，红细胞的渗透性破坏。

[0079] 采用这种方法，我们估计了外源核酸对质子渗透通过红细胞质膜的动力学的影响，质子渗透依赖于膜的性质。质子在胞液中的渗透速度在很大程度上依赖于脂成分的氧化状态(Kellogg E.W.，Fridovich I.，由酶产生的过氧化物和过氧化氢所导致的脂质体氧化和红细胞溶解(Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generatedsuperoxide and hydrogen peroxide)，J.Biol.Chem.10；252(19)：6721-6728；1977)以及蛋白成分，尤其是质膜带3的氧化，并被[H^+]-腺苷三磷酸酶的活性和各种交换剂的活性所限定(Sato Y.，Kamo S.，Takahashi T.，Suzuki Y.，人红细胞中游离自由基诱导的溶血的机制：水溶性的自由基启动剂的溶血(Mechamism of free radical-induced hemolysis of humanerythrocytes：hemolysis by water-soluble radical initiator)，Biochemistry，18；34(28)：8940-8949；1995；Lukacs G.L.，Kapus A.，Nanda A.等，质膜的质子传导性：特性、调节和功能作用(Proton conductance of the plasmamembrane：properties，regulation，and functional role)，Am.J.Physiol，265(1 Pt 1)：C3-C14；1993)。

[0080] 酸性红细胞象图由动力学方法记录。在体外测试中，在亚硝酸钠(损伤剂)和不

同浓度的外源核酸存在下记录酸性红细胞象图。

[0081] 体外测试使用由氧化氮的稳定代谢物亚硝酸根阴离子氧化损伤的红细胞模型，说明了外源核酸有稳定和膜保护剂作用。

[0082] 在红细胞膜的酸抗性模型上，我们测试了如在血小板凝集模型中相同组的制剂。

[0083] 酵母 RNA 制剂表明了在大范围浓度下膜保护的特性。更详细的分析显示酵母 RNA 的膜保护剂作用依赖于它们的形式（酸或钠盐）、纯度和蛋白存在。其红细胞象图在浓度 10 和 100μkg 下与标准对应的经良好纯化的核糖核酸 RNA-P 显示最高的有效性。酵母 RNA-PN 的钠盐有效性较小，尤其在浓度 10μkg 下。RNA-F 中的蛋白的混合物导致完全丧失膜稳定作用。其他制剂如 tRNA、DNA-CT 和 DNA-EC 使红细胞膜在测试浓度下不稳定，这表示尽管在其他模型上它们显示了抗炎性特性，但它们还不能方便地用作抗炎性药物，。

[0084] 3. 大鼠红细胞自身免疫反应模型

[0085] 我们使用了红细胞质膜的酸性损伤模型来研究外源核酸的膜稳定作用。在自身免疫反应（佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis)）的发展过程中对红细胞质膜的蛋白和脂成分的酸性损伤进行体内测试。活性氧化剂氧化氮的生物合成受到活化，尤其是红细胞的血红蛋白 (EichR.F.，Li T.，Lemon D.D.，NO 诱导的肌红蛋白和血红蛋白的氧化的机制 (Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin)，Biochemistry，4；35(22)：6976-6983；1966；Huot A.E.，Kruszyna H.，Kruszyna R. 等，在红细胞与取自博来霉素处理的大鼠的泡状巨噬细胞的共培养中氧化氮血红蛋白的形成 (Formation of nitric oxidehemoglobin in erythrocytes co-cultured with alveolar macrophages takenfrom bleomycin-treated rats)，Biochem.-Biophys.Res.Commun.，15；182(1)：151-158；1992；Kosaka H.，Harada N.，Watanabe M. 等，通过重组白介素 1 和肿瘤坏死因子在大鼠中协同刺激氧化氮血红蛋白的产生 (Synergistic stimulation of nitric oxide hemoglobin production in rats byrecombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor)，Biochem.Byophis.Res.Commun.30；189(1)：392-398；1992)。氧化氮以及过氧化氢在自身免疫反应的发展过程中对细胞包括血细胞的损伤中起到关键作用。抗炎性细胞因子（γ-干扰素、IL-1）诱导表达可诱导的 NO 合成酶的同工酶 (iNOS)。

[0086] 为了评价制剂的免疫调节效应以及获得有关活性最大的氧化溶血剂 (hemolytics) 之一氧化氮（以其稳定的代谢物的形式，硝酸根阴离子）的可能水平的信息，我们研究了自身免疫反应（佐剂性关节炎）发展中大鼠血液内 NOS 的活性变化。我们计算了 NO 合成酶 (NOS) 的酶活性，NOS 生成内源亚硝酸根阴离子。这些值赋予外源核酸抵御亚硝酸根阴离子对红细胞膜损伤影响的保护效应的特征。我们的焦点集中在自身免疫反应过程中红细胞稳定性的变化上，这是由于有大量现有的证据支持红细胞的免疫调节特性 (Karalnik B.V.，红细胞、他们的受体和免疫性 (Erythrocytes，their receptors，and immunity)，UspekhiSovremennoy Biologii.，V.112，N.1，P.52-61，1992；Prokopenko L.H.，Siplivaya L.E.，红细胞作为免疫球蛋白反应的调节剂 (Erythrocytes asmodulators of immunologic reactions)，Uspekhi Phiziologicheskikh Nauk.，V.23，N.4，P.89-106，1992)，这已导致术语“红细胞免疫系统”的使用。

[0087] 在与正常红细胞的抗性比较中，在早期阶段自身免疫过程的发展伴随着红细胞酸抗性的实质性降低，但到终了阶段却相反，高出标准相当的过量。

[0088] 酵母 RNA 增加了膜稳定性，即使质子的转运过程（这归功于红细胞质膜的蛋白和脂成分的状态）在初始阶段正常化，并且在随后的自身免疫反应阶段保持稳定，接近于标准。

[0089] 进一步，实验显示在自身免疫过程发展中，大鼠血液中的 NOS 活性发生了变化。在初始和终了阶段，大鼠血液中 NOS 的活化增加得到证实。酵母 RNA 降低了 NOS 活性，因此在终了阶段，活性实际上是正常的。

[0090] 同样，在与正常红细胞的抗性比较中，早期阶段，自身免疫过程的发展伴随着红细胞酸抗性的实质性降低，但到终了阶段却相反，高出标准相当过量。通过使质子的转运过程正常化，酵母 RNA 在初始阶段增加了膜稳定性，质子转运过程依赖于红细胞质膜的蛋白和脂成分的状态，并且在随后的自身免疫反应阶段保持稳定，接近于标准。

[0091] 根据以上描述，如在自身免疫过程的模型上所显示的酵母 RNA 的保护活性确立了其不仅治愈过敏性疾病的能力，而且还治愈其他慢性炎性过程如关节炎、动脉硬化以及其他参与自身免疫反应的疾病的能力。

[0092] 4. 大鼠中由角叉藻聚糖诱导的肿胀模型

[0093] 为了筛选核酸的抗炎性作用，我们使用了小鼠腿的炎性肿胀的常规模型，所述炎性肿胀由跖面下注射角叉藻聚糖诱发。角叉藻聚糖诱导的肿胀对减少毛细管通透性的化合物的作用敏感。

[0094] 初始阶段，在角叉藻聚糖的抗炎性效应的机理中发挥显著作用的是激肽，而到终了阶段，蛋白水解酵素和前列腺素变得更加重要。角叉藻聚糖模型发展较慢，可保存足够时间，这使得对药物的抗炎性作用的生化机理进行研究成为可能。所以，我们采用该模型来研究酵母 RNA 对血栓烷和白三烯合成的影响。同时，我们分析酵母 RNA 对 NO 合成酶活性的影响。

[0095] 对角叉藻聚糖模型中核酸抗炎性作用的分析显示它们全部具有一定的抗炎性作用。然而，只有酵母 RNA 在浓度为每只小鼠 10mg 的药物下导致肿胀减少 50％。小鼠中测试的酵母 RNA 浓度表示每只小鼠 1-15mg。浓度低于每只小鼠 1mg 的酵母 RNA 制剂不表现任何作用。在浓度高于 15mg 下，减少肿胀约 53-55％。进一步，生化测试揭示了酵母 RNA 对 NO 合成酶活性以及对血栓烷和白三烯量的有稳定影响，其量在肿胀过程中发生变化。

[0096] 与此相反，阿司匹林在建议的治疗剂量 20mg/kg 下测试，相当小程度上影响肿胀，并且在生化代谢水平上不显示稳定特性。

[0097] 5. 大鼠中急性局部缺血模型

[0098] 在大鼠心肌的急性局部缺血再灌注模型上进行酵母 RNA 的进一步分析。该模型是基于各种不同心脏病的发展中共同的基本机理，所述基本机理包括内皮细胞、心细胞和其他心脏细胞中膜结构和功能的改变。这种改变导致膜磷脂的降解以及高度有效的生物活性化合物如白三烯或血栓烷的产生，这些生物活性化合物具有冠状收缩 (coronaroconstrictor)、arythmogen、化学活性以及预凝集 (pre-aggregant) 的作用 (Bangham A.D.，Hill M.W.，Miller N.，作为生物膜模型的脂质体的制备和应用 (Preparation and use of liposom as model ofbiological membranes)，Method in Membrane Biology，Acad.Press，V.1，N.Y.，P.1-16，1974)。

[0099] 如测试所显示，酵母 RNA 以每只大鼠 40mg 的浓度静脉内注射大鼠，使急性梗塞中

的心脏功能正常化。这表现出化合物显著的抗心律不齐作用以及在心脏的局部缺血的心肌中实质性地减少坏死面积。所述药物几乎使血液以及局部缺血的心脏边缘区中的 NO 合成酶活性完全正常化。酵母 RNA 注射使急性梗塞动物的血液和心脏中花生四烯酸的含量正常化到一定水平。在局部缺血条件下，酵母 RNA 的注射几乎使大鼠血液中类花生酸的水平完全正常化。髓过氧化物酶是嗜中性粒细胞的标记酶，其活性帮助评价制剂的抗氧化作用，在用酵母 RNA 治疗梗塞的动物中降低了几乎二倍。

[0100] 在大鼠的局部缺血再灌注模型中对酵母 RNA 活性的分析确定了药物在局部缺血心脏中对炎性过程的不同级联具有实质稳定作用，其表现出长期抗梗塞作用并减少心肌中梗塞面积的大小。

[0101] 依据对酵母 RNA 在动物心脏的局部缺血再灌注中作用的研究，我们可得出结论：通过使内皮细胞、心细胞和其他心细胞的细胞膜的结构和功能稳定，酵母 RNA 具有抗梗塞作用或梗塞中的抗炎性作用。

[0102] 6. 酵母 RNA 对血液指示剂的作用

[0103] 通过测定 1μl 血中的白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC) 和血小板 (PLT) 的数量，血红蛋白 (HGB) 的数量 g/dl，嗜中性粒细胞 (NTP) 和血细胞比容 (HCT) 的百分数，我们研究了用酵母 RNA 化合物治疗前后从患者组采集的血样。酵母 RNA 化合物的施用或是胶囊，浓度为每只胶囊 250mg 的酵母 RNA，或是栓剂，浓度为每只栓剂 1.0g 的酵母 RNA。

[0104] 选择患者组以便研究相对健康的个体、运动员、癌症患者以及 HIV 感染个体中的酵母 RNA 的效应。测试结果显示用酵母 RNA 治疗导致血液指示剂的稳定或改进。尤其是癌症和 HIV 感染的患者用酵母 RNA 治疗后导致血细胞减少症的稳定正常。

[0105] 实验程序和测试结果

[0106] 实施例 1. 制备酵母 RNA 的方法

[0107] 实施例 1.1 酵母 RNA 的生产

[0108] 从酿酒酵母中制备 RNA-D 以及从产朊假丝酵母中制备 RNA-P、RNA-PN 和 RNA-F。用 10-12％的氯化钠溶液在 100-110℃进行酵母 RNA 提取。RNA 溶液从酵母沉淀物中分离出来，冷却至 0℃并用盐酸酸化至 pH 1-2。沉淀 RNA 用酒精漂洗后，干燥并溶解在水中。该溶液由氢氧化钠调节至 pH 8.0-8.2。加入胰蛋白酶后在 37-40℃放置约 1 小时。加热使酶失活，然后过滤溶液。RNA 由冷却的酒精沉淀，被盐酸酸化至 pH 1-2，并干燥。以此方式制备 RNA-F。进一步，过滤沉淀，以酒精漂洗，然后通过加入氢氧化钠调节至 pH 6.2-6.5 溶解于水中。RNA-PN 被乙醇沉淀。沉淀物过滤并干燥。RNA-P 来自 RNA-F，方法是通过胰蛋白酶又一次处理，并在 37-40℃温育 1 小时，从蛋白中再次纯化。然后，加热 5-10 分钟使酶失活。过滤含有 RNA-P 的溶液，并用乙醇沉淀后再酸化至 pH 1-2。过滤 RNA-P 沉淀，以酒精漂洗并干燥。所得化合物的颜色是微灰黄色。

[0109] 表 1

[0110] 酵母 RNA 制剂的化学分析

[0111]

种类	RNA-P	RNA-D	RNA-F	RNA-PN
氮含量%	15.49	15.16	14.16	14.65
磷含量%	9.05	8.6	8.2	8.54
双缩脲反应	(-)	(-)	(+)	(-)
DNA 含量%	1	1.1	1.2	1.1

[0112] 测试的RNA(RNA-P和RNA-D)具有下列如表1所示的特性:N≥14.7%,P(总)≥8.6%,蛋白(双缩脲反应)-阴性,DNA(比色法)-2.0%,糖(色谱法)-阴性,多糖(生物测试法)-阴性。

[0113] 实施例1.2.没有毒性

[0114] 我们证实了酵母RNA-P和RNA-D无毒性。以生物活性量(250-500mg/kg体重)腹腔内施用单剂量或多剂量的酵母RNA,没有导致小鼠外周淋巴细胞量的实质性变化。这些变化将是内毒素的特征指示剂。

[0115] 静脉内导入核酸得到了类似结果。在兔的静脉内注射100mg的酵母RNA-P或RNA-D溶液后1-3小时,我们测试了外周白细胞量的变化。静脉内注射0.85%的NaCl溶液用作非毒性标准。实验结果证明,与标准类似,注射酵母RNA-P或RNA-D在导入3小时内没有诱发白细胞数的变化。在施用0.85% NaCl溶液的动物中,白细胞量等于13000±980,而那些施用了RNA-P或RNA-D的动物相应为12700±850和12900±980,结果正常。当兔接受10mg的变形杆菌多糖后,白细胞的量在1小时内从13050±1100下降到2900±210,并在测试持续中(3小时)维持在该水平。这些结果证明酵母RNA无毒性。进一步,当100mg的酵母RNA-P或RNA-D/kg体重给兔静脉内施用时,未测出急性阶段C反应蛋白,这显示没有内毒性作用。

[0116] 此外,酵母RNA表现在兔子身上不是致热性的。给一组兔子测定温度每天4次,每次间隔2小时,连续测温2天。第三天,给兔子注射0.85%的NaCl,并在注射后1、2和3小时再次测温。第六天,将兔子分成3组,其中2组分别静脉内接受100mg的RNA-P和RNA-D。再次测定温度。对照组动物显示温度波动在0.1-0.4℃内。测试动物温度波动在相同的限度内:0.1-0.4℃。这些结果证明酵母RNA无热源性。

[0117] 实施例2.基于体外血小板凝集模型核酸的抗炎性作用

[0118] 根据Born方法(Born L.V.R.,双磷酸对血液血小板的凝聚和其逆转(The aggregation of blood platelets by diphosphate and its reversal),Nature,V.94,P.327,1962),我们在体外血小板凝集模型上研究了核酸的抗炎性作用。将静脉血采接在Becton Dickson的硅管中,其中含有3.8%的柠檬酸钠溶液。为了获得富含血小板的血浆,将含有柠檬酸的血液以1500rpm离心7分钟。将2.0ml采自中层的血浆以3000rev/min离心15分钟可获得不含血小板的血浆。我们对含血小板的血浆中血小板进行了计数,其后来被不含血小板的血浆稀释至终浓度200.0-300.0×10^8/1。

[0119] “Tromlite”(波兰)生产的凝集计(Aggregometer)用于血小板凝集。为了诱导

凝集，将花生四烯酸用 Michaelis 缓冲液稀释为浓度比 1mg/ml。将 2 个管子插入在凝集计中，其中一个管子是 0.2ml 含血小板的血浆，而另一个为 0.2ml 不含血小板的血浆和 0.1ml 等渗氯化钠溶液。在装置开启后，加入 0.1ml 花生四烯酸至含有血浆和血小板的管子中。然后，在 5 分钟过程中测定含血小板血浆的光线透明度，这是血小板凝集的阶段。

[0120] 在用于研究核酸对血小板凝集的影响的测试变化中，在测定前，将血小板血浆溶液与 0.1ml 核酸在对应浓度下 37℃初步温育 5 分钟。将 0.2ml 等渗氯化钠溶液加入到带有不含血小板的血浆的管子中。温育后，关闭该装置，并将 0.1ml 花生四烯酸加入到带有血小板血浆和核酸的管子中。5 分钟后，进行测定以便确定血小板凝集的最后阶段。

[0121] 作为凝集参数，我们采用了细胞凝集指标 (IA)，其等于：

[0122] $$IA = \frac{D1-D2}{D1} \times 100\%$$

[0123] D1- 含血小板的血浆在用花生四烯酸诱导凝集后的光密度。

[0124] D2- 含血小板的血浆的光密度，其和核酸预温育后再用花生四烯酸诱导凝集。

[0125] 采用斯氏标准并在实施例 4.1 所述的软件的帮助下进行结果的统计处理。

[0126] 对下列核酸以终浓度 1×10^{-2}% 进行研究：DNA-CT、DNA-EC、tRNA 和总酵母 RNA-D。阿司匹林以每管 0.06mg 的浓度也作为标准抗炎性剂被测试，所述管中含有血小板血浆。

[0127] 测试结果显示在下表 2 中。

[0128] 表 2

[0129] 核酸和阿司匹林对花生四烯酸诱导的血小板凝集的影响

[0130]

	RNA-D	阿司匹林	DNA-CT	DNA-EC	t-RNA
M	59.73	38.66	54.45	36.93	52.23
±m	4.24	6.71	3.76	1.88	8.13
		P < 0.02	P < 0.2	P < 0.01	P > 0.5

[0131] 测试结果显示核酸在浓度 1×10^{-2}% 下抑制由花生四烯酸诱导的血小板的凝集。进一步，酵母 RNA-D 在浓度 1×10^{-2}% 下抑制了诱导的血小板凝集有效性几乎两倍于阿司匹林 (38.66%)：酵母 RNA 显示 59.73%，而转运大肠杆菌 RNA 具有 52.23%。来自鸡红细胞的 DNA 在相同水平上充当阿司匹林 (36.93%)，但来自牛胸腺的 DNA 抑制血小板凝集 54.45%，这几乎是酵母 RNA 的水平。由于 DNA 总是含有显著量的 RNA，DNA 的抑制效应可能归因于含在 DNA 中的 RNA。

[0132] 进一步，分析不同浓度的酵母 RNA 对诱导血小板的凝集的影响显示酵母 RNA 在大范围浓度从 0.1% -1×10^{-5}% 下是有效的，并且抑制凝集 78.5% 和 14.2%，如下表 3 所示。

[0133] 表 3

[0134] 酵母 RNA-D 对花生四烯酸诱导的血小板凝集的影响的浓度依赖性

[0135]

	RNA 0.1%	RNA 1×10^{-2}%	RNA 1×10^{-3}%	RNA 1×10^{-4}%	RNA 1×10^{-5}%
M	78.58	53.08	28.88	43.35	14.23
±m	7.51	3.23	1.63	10.30	4.98
		P < 0.01	P < 0.001	P < 0.01	P > 0.001

[0136] 更进一步，实验表明对凝集的抑制效应依赖于酵母 RNA 的纯度及其钠盐，如下表 4 所示。

[0137] 表 4

[0138] 酵母 RNA-P、-PN 和 -F 对由花生四烯酸诱导的血小板凝集的影响

[0139]

浓度 0.1%	RNA-P	RNA-PN	RNA-F
M	84.09	45.96	57.90
±m	3.77	8.96	9.58
		P < 0.001	P < 0.02
浓度 1×10^{-2}%	RNA-P	RNA-PN	RNA-F
M	71.91	55.44	60.90
±m	8.45	8.04	10.39
		P < 0.2	P > 0.5
浓度 1×10^{-3}%	RNA-P	RNA-PN	RNA-F
M	29.76	3.72	18.26
±m	5.36	2.40	5.46
		P < 0.001	P < 0.1

[0140] 表 4 显示含有蛋白质混合物以及氮和磷含量水平较低的 RNA-F 在浓度范围从 1×10^{-1}% 到 1×10^{-3}% 中作用的有效性较低。例如，在其最高浓度，RNA-F 抑制了血小板凝集 57%，而在其最低浓度，抑制只有 22.7%。同时，纯度良好的 RNA-P 抑制血小板凝集更有效，超出三分之一，分别达到 84% 和 29.7%。同样，当 RNA 转化成其钠盐时，抗凝集特性急

剧降低。因此，RNA-PN 在其最高浓度时，有效性只有其酸形式一半（44.4％），而在其最低浓度时，RNA-PN 不表现出任何抗凝集特性。

[0141] 所以，根据由花生四烯酸诱导的血小板凝集模型，实验表明 RNA 化合物尤其是纯化的酵母 RNA 在大范围浓度内具有显著的抗凝集特性，这说明了它们的抗炎性作用。

[0142] 实施例 3. 基于体外红细胞膜稳定模型的核酸抗炎性作用

[0143] 用大鼠红细胞体外测试对核酸的膜稳定和抗自由基作用进行评价。红细胞膜被硝酸根阴离子损伤，硝酸根阴离子是氧化氮的稳定代谢物，这导致膜的蛋白（尤其是血红蛋白）成分和脂成分的氧化损伤。

[0144] 为了评价核酸抗自由基影响的膜稳定作用，我们计算了从血浆分离的正常大鼠红细胞的酸抗性。将大鼠红细胞用冰冷（4℃）0.15M 的 NaCl 溶液漂洗两次。去除白细胞和血小板层。加入 10μl 悬浮液诱导剩余红细胞的酸性溶解，其被稀释至红细胞浓度（0.7×10^6 细胞 /ml 等渗介质），并含有 0.14M NaCl、0.01M 柠檬酸－磷酸缓冲液 pH 2.5、不同浓度（10 或 100μg）的核酸以及稳定浓度的亚硝酸钠 250μg/ml，从而起始红细胞的氧化损伤。

[0145] 加入 1ml 0.004N 的 HCl 启动红细胞溶解；在 750nmol 记录实体变化。计算方法在实施例 6.3 中说明。实验显示酵母 RNA-D 在剂量为 10 和 100μg 时增加了红细胞的总抗性水平，从 288 单位（没有酵母 RNA 时用于 NaNO2 影响所记录的对照值）增加至 449 单位（酵母 RNA 浓度 10μg）和 437 单位（酵母 RNA 浓度 100μg），这接近于标准（475 单位）。RNA-PN 在剂量 10μg 时增加总抗性至 328 单位，并在剂量为 100μg 时增加至 415 单位。RNA-P 在剂量 10μg 时增加总抗性至 315 单位，并在剂量为 100μg 时增加至 462 单位（最大地接近于这种指示剂的正常水平）。RNA-F 在剂量为 10μg 时增加总抗性至 338 单位，但在剂量为 100μg 时却相反稍有降低（至 271 单位）。

[0146] DNA-CT 在剂量 10μg 时增加总抗性至 338 单位，并在剂量为 50μg 时增加至 654 单位（这是对照值的两倍，甚至大于标准（没有 $NaNO_2$ 的有害影响））。但在剂量为 100μg 时，其效应是相反的膜稳定，这表现在总抗性降低至 158 单位，几乎是对照值的一般。

[0147] 在我们的氧化损伤模型中，DNA-EC 在剂量为 100μg 时不改变红细胞的酸抗性。在剂量为 10μg 时，其增加酸抗性至 408 单位，这略低于 RNA-D 的计算保护作用（在剂量 10μg 时 449 单位）。

[0148] 所以，不管起源如何，外源 DNA 对细胞膜都具有显著的抗稳定影响。由于它们损伤细胞膜，因此它们不能用作药物或食品添加剂。

[0149] t-RNA 制剂在两种剂量下（10μg 时是 279 单位，而 100μg 时是 296 单位）都不影响红细胞的酸抗性。

[0150] 测试显示酵母 RNA 当体外测试时根据其形式、起源和纯度表现出膜稳定和抗自由基特性。对其抗炎性特性的研究更为详细的纯化良好的酵母 RNA-P 表现了最好的有效性。

[0151] 实施例 4. 基于由角叉藻聚糖（LPS）诱发的局部炎症模型的核酸抗炎性作用

[0152] 实施例 4.1. 在体内由角叉藻聚糖（LPS）诱发的局部炎症模型中酵母 RNA 对肿胀的作用

[0153] 为了研究药物的抗炎性作用，我们使用了小鼠局部炎症的模型。将 BALB 系小鼠的炎症在典型引发炎症（phlogogenic）剂角叉藻聚糖的帮助下制成模型。注射前 30 分钟，在小鼠腹腔内注射药物，所述药物溶解在 2mg 的生理溶液（PS）中。将 Serva Fein

Biochemica(德国)生产的角叉藻聚糖(LPS)制成1%的PS溶液形式。将所得的粘性溶液40ml跖面下注射到左后腿中。将右边完整的腿作为对照。注射角叉藻聚糖4小时后,斩首处死小鼠,将它们的后退以相同位置从身体分离,位置稍高于踝关节。然后,仔细称重腿部,精确到1mg。所得结果采用MultiFac 2.2.SPSS 8/0软件进行统计学处理。药物的抗炎性效应按如下公式计算:

[0154]

$$\text{炎症减少百分数} = \frac{V_K - V_O}{V_K} \times 100\%$$

[0155] V_K-对照小鼠中肿胀腿的平均体积(质量)增加

[0156] V_0-被处理的小鼠中肿胀腿的平均体积(质量)增加

[0157] 在第一次测试中,将小鼠分成8组。第一组由对照动物组成,它们被腹腔内注射2ml的PS。同样,左腿被注射40ml的PS。研究该组以确定注射对腿部炎症过程的影响。第二组,以LPS为对照,腹腔内施用2mg的PS,并在左腿接受LPS注射。第三组施用溶解于PS中的2mg的阿司匹林,每个小鼠0.4mg浓度。第四、第五和第六组,将酵母RNA-D溶解在PS中,每只动物施用2ml的PS,各含有5、10和15mg的酵母RNA-D。将LPS注射到左腿中以诱发肿胀。第七和第八组分别用DNA-TC和DNA-EC治疗,它们以15mg的浓度被注射到每只小鼠中,如上所说用于RNA治疗的组。

[0158] 右腿保持完整。4小时后,将动物斩首。将两只腿从身体中分离,对各组动物的质量进行研究。这些对核酸抗炎性作用的测试结果呈现存下列表5中。

[0159] 表5

[0160] 核酸对小鼠腿部局部炎症的影响

[0161]

对照 +PS	对照 +LPS	阿司匹林	RNA-D 5mg/m	RNA-D 10mg/m	RNA-D 15mg/m	DNA-TC 15mg/m	DNA-EC 15mg/m
0	43.31 +2.43	35.5 +2.8	27.4 +2.05	28.88 +2.27	20.3 +3.17	31.8 +2.59	289
抑制%		18.03%	36.74%	47.17%	53.13%	26.58%	33.27%
		P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001

[0162] 如表5所示,施用浓度的阿司匹林减少了小鼠腿部肿胀的发展18.03%。这与其他文献中所引用的对该模型的结果相一致,并证实模型炎症的适当性。阿司匹林浓度也对应于剂量20mg/kg,该剂量目前被推荐用于临床应用,并且长期使用在各种形式的炎性过程中具有较少的阴性结果。

[0163] 进一步,酵母RNA-D的制剂显示了显著的抗炎性作用,这直接依赖于浓度。在浓度为每只小鼠5、10和15mg下,药物相应抑制肿胀36.74%、47.17%和53.13%。尽管在相当高的浓度(每只小鼠15mg)下,DNA-TC和DNA-EC的制剂也显示了某些抗炎性作用,并且抗

炎性作用的指示剂低于两倍（分别为 26.58％和 33.27％）。

[0164] 在这些结果的基础上，我们可得出结论：核酸同阿司匹林比较已经相当地提高了抗炎性特性，而酵母 RNA 迄今为止作用最显著。

[0165] 实施例 4.2. 体外由角叉藻聚糖 (LPS) 诱发的局部炎症模型中酵母 RNA 对生化标记的作用

[0166] 在发展炎性反应的动力学中（第 0、30、60 和 320 分钟），针对 LPS 注射后的小鼠，将酵母 RNA 的抗炎性作用与阿司匹林的作用进行比较。我们测试了酵母 RNA 对血浆和红细胞中的 NO 合成酶 (NOS) 活性的影响，以及对血浆中游离花生四烯酸及其氧化代谢产物的含量的影响，该测试是以脂肪氧化酶（白三烯 C_4(LTC_4)）和环加氧酶（血栓烷 B_2(TXB_2)）方式进行。

[0167] 实施例 4.2.1. 酵母 RNA 对 NO 合成酶活性的作用

[0168] 采用比色法对血浆和红细胞中的 NO 合成酶活性进行测定，所述比色法适用于反应结果亚硝酸根阴离子 (Yan L.，Vandivier R.W.，Suffredini A.F.，Danner R.L.，人多形核白细胞缺乏可检测的氧化氮合成酶活性 Human polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitricoxide synthetase activity)，J.Immunol.，15；153(4)：1825-1834；1994)。温育混合物 (1ml) 由 50mM 的 HEPES(pH 7.4)、1.25mM 的 $CaCl_2$、1mM 的 NADPH、80mM 的 FAD、20mM 的四氢生物蝶呤、13mg/ml 的钙调蛋白、1mM 的 L- 精氨酸、60mM 的 L- 缬氨酸和 100 单位 /ml 的超氧化物歧化酶组成。HEPES 是 Sigma 化学公司（美国）的 N(二羟乙基)-1- 哌嗪乙烷磺酸，NADPH 是 Sigma 化学公司（美国）的还原型 β 尼克酰胺腺苷二核苷酸磷酸。加入 0.1ml 含有 500μg 由 Bradford 方法确定的总蛋白的探针启动反应。27℃温育持续 60 分钟。加入 0.2ml 的 2N $HClO_4$ 终止反应。混合物以 10000g 离心 10 分钟，上清液用于测定亚硝酸根阴离子（稳定的氧化氮代谢物）的含量。

[0169] 亚硝酸根阴离子的确定采用格斯 (Gris) 试剂进行比色反应，如 Green 等描述 (Green L.C.，Waagner D.A.，Glogowski J. 等，生物流体中硝酸、亚硝酸和 [15N] 硝酸的分析 (Analysis of nitrate，nitrite and[15N]nitrate in biological fluids)，Anal. Biochem.，126(1)：131-138；1982)。格斯试剂的制备是在测定前立即混合等部分的 0.1％萘二胺盐酸的水溶液和溶于 5％ H_3PO_4 的 1％磺胺溶液。通过以 1 ：1 比例加入格斯试剂在探针的非蛋白等份中进行测定。在混合后的 5 分钟测定 543nm 处吸光。通过 $NaNO_2$ 建立的标准曲线测定 NO_2 的量。测试结果呈现在下列表 6 中。

[0170] 表 6

[0171] 酵母 RNA 和阿司匹林对角叉藻聚糖注射后的小鼠血浆中 NOS 活性的作用

[0172] （单位是皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白；M±m；n ＝ 5）

[0173]

	LPS（对照）				+酵母 RNA			+阿司匹林
	0 分钟标准	30 分钟	60 分钟	320 分钟	30 分钟	60 分钟	320 分钟	320 分钟
M	18.41	189.45	72.03	110.48	35.40	9.61	107.14	42.24
±m	2.24	21.34	9.25	22.79	7.73	0.96	13.26	4.50
P1		<0.001	<0.001	<0.01	>0.05	<0.01	<0.001	<0.01
P2					<0.01	<0.01	>0.5	>0.05

[0174] P1- 与标准 (LPS 注射前) 差异概率

[0175] P2- 与对照 (没有酵母 RNA) 差异概率

[0176] 表 6 显示,在没有预先注射酵母 RNA 对照的情况下,实验证实 :LPS 注射后,血浆中 NOS 活性急剧增加 30 分钟 (超过 10 倍)。然后酶活性降低,后来又稍有增加 (虽然水平比正常高得多)。

[0177] 在炎症发展的初始阶段 (第 30-60 分钟),预先给小鼠注射酵母 RNA,显著降低了血浆中 NOS 活性的升高。这种酵母 RNA 的保护特性在炎性发展的第 320 分钟不明显,而阿司匹林注射在此时期恰好降低了 NOS 活性。

[0178] 因此,在引入 LPS 后,酵母 RNA 对 L- 精氨酸代谢的氧化途径的活化具有显著的抑制作用,这表现在血浆中 NOS 活性的抑制。

[0179] 由于 NOS 的各种组成型和诱导型的同工酶存在于血浆的不同核细胞 :嗜中性粒细胞、血小板、淋巴细胞和巨噬细胞 (Hibbs J.B., TaintorR.R., Vavrin Z., Rachlin E.M., 氧化氮 :细胞毒性激活的巨噬细胞效应分子 (Nitric oxide :a cytotoxic activated macrophage effector molecule.Biochem.Biophis), Res.Commun.30 ;157(1) ;87-94 ; 1988 ;SalkowskiC.A.,可诱导的氧化氮信使 RNA- 表达的调节和体内脂多糖生产氧化氮 :巨噬细胞、内源 IFN- γ 和 TNF 受体 -1- 介导的信号的作用 (Regulationof inducible nitric oxid messenger RNA-expression and nitric oxidproduction by lipopolysaccharide in vivo :the role of macrophage,endogenous IFN-gamma and TNF receptor-1-mediated signaling), J.Immunol.15 ;158(2) :905-912 ;1997) 中,我们可推断在引入 LPS 的初始阶段 (第 30-60 分钟),发生了组成型 (神经元和内皮细胞) 活化,而血液巨噬细胞的可诱导型 (iNOS) 可能在后期 (第 320 分钟) 活化的。

[0180] 进一步,下表 7 显示 LPS 引入后的小鼠血红细胞中改变 NOS 活性的动力学。对照动物显示在第 30 分钟 NOS 活性稍有增加,而红细胞中 NOS 活性显著降低 (几乎两倍)。

[0181] 表 7

[0182] 酵母 RNA 和阿司匹林对角叉藻聚糖注射后的小鼠红细胞中 NOS 活性的作用

[0183] (单位是皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白 ;M±m ;n = 5)

[0184]

	LPS (对照)				+酵母 RNA			+阿司匹林
	0 分钟 (标准)	30 分钟	60 分钟	320 分钟	30 分钟	60 分钟	320 分钟	320 分钟
M	4.336	7.768	2.323	2.232	14.245	10.213	1.146	3.613
±m	1.105	0.999	0.383	0.515	1.109	1.924	0.242	0.595
P1		>0.05	>0.1	>0.1	<0.001	<0.05	<0.05	>0.5
P2					<0.01	<0.01	>0.05	<0.2

[0185] P1- 与标准 (角叉藻聚糖注射前) 差异概率

[0186] P2- 与对照 (没有酵母 RNA) 差异概率

[0187] 在预先注射酵母 RNA 后,NOS 活性修饰的相同的动力学或者甚至是更显著的动力学在小鼠红细胞中得到证实。因此,在第 30 分钟和第 60 分钟,NOS 活性增加明显 (分别超过 3 倍和 2 倍)。红细胞中 NOS 可靠降低 (超过 3 倍) 记录在 LPS 作用的第 320 分钟。

[0188] 一些作者 (Chen L.Y., Mehta J.L., 人细血红胞中 L- 精氨酸 - 氧化氮途径存

在的证据：红血细胞对血小板功能的影响的相关性(Evidencefor the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red bloodcells:relevance in the effects of red blood cells on plateled function)，J.Cardiovasc.Pharmacol.32(1)：57-61；1998)说明红细胞含有NOS的组成型、钙依赖的同工型。因此，在由LPS引入所诱导的炎性反应的初始阶段红细胞NOS活性的增加可能是因为血浆红细胞的细胞间钙水平的增加所致。

[0189] 实施例4.2.2.酵母RNA对花生四烯酸的氧化代谢的作用

[0190] 游离花生四烯酸(AA)的含量的测定采用如Tsunamoto等所论述的二维薄层色谱(TLC)(Tsunamoto K.，Todo S.，Imashuku S.，通过二维薄层层析分离前列腺素和血栓烷(Separation of prostaglandinesand thromboxane by two-dimensional thin-layer chromatography)，J.Chromatog.3；417(2)；414-419；1987))。血栓烷A2(TXB2)的稳定代谢物的含量采用探针通过用Amersham International PLC(英国)的TXB_2[^{3}H]RIA试剂盒的放射性免疫方法进行研究(McCann D.S.，Tokarsky J.，Sorkin R.P.，对血浆血栓烷B_2的放射免疫测定(Radioimmuno assay for plasma thromboxane B_2)，Clin.Chem.，27(8)：1417-1420，1981)。LTC_4含量的检测采用探针通过用Du Pont Ltd.Hertfordshire(英国)的LTC_4[^{3}H]RIA试剂盒的放射性免疫方法进行(Levine L.，Morgan R.A.，Levis R.A.等，过敏性慢反应性物质白三烯的放射免疫测定(Radioimmunoassay of the leukotrienes of slowreactivity substance of anaphylaxis)，Proc.Natl.Acad.Sci.USA.78(12)：7692-7696；1981)。

[0191] 下列表8显示在LPS引入后小鼠血浆的游离花生四烯酸变化的动力学。

[0192] 表8

[0193] 酵母RNA和阿司匹林对角叉藻聚糖注射后小鼠血浆中游离花生四烯酸含量的作用

[0194] (单位是纳摩尔/mg蛋白；M±m；n＝5)

[0195]

	LPS(对照)				+酵母RNA			+阿司匹林
	0分钟(标准)	30分钟	60分钟	320分钟	30分钟	60分钟	320分钟	320分钟
M	2.54	2.36	3.34	3.37	1.97	1.60	2.66	2.64
±m	0.26	0.23	0.37	0.11	0.13	0.16	0.20	0.13
P1		<0.1	>0.1	<0.05	>0.05	>0.02	>0.1	>0.1
P2					<0.01	<0.01	<0.02	<0.01

[0196] P1-与标准(在角叉藻聚糖注射前)差异的概率

[0197] P2-与对照(无酵母RNA)差异的概率

[0198] 如表8所示，对照动物只在LPS引入后第320分钟显示了花生四烯酸水平的增加。酵母RNA在LPS作用的第60分钟明显降低了血浆中AA含量。在第30分钟的降低不明显。与对照组比较，在LPS引入后第320分钟，酵母RNA明显降低了血浆中AA的含量。

[0199] 已知当膜磷脂用AA磷脂酶水解时产生了游离的花生四烯酸，其在游离的离子化钙增加的水平时被活化(Leslie C.C.，Channon J.Y.，阴离子磷脂刺激来自巨噬细胞的水解arachinoil的磷脂酶A2和减小对钙活性的需要(Anionic phospholipids stimulate

an arachinoil-hydrolyziningphospholipase A2 from macrophage and reduce the calcium requirementfor activity), Biochim. Biophys. Acta. 6 ;1045(3),261-270 ; 1990)。另外,有其他可能途径释放游离 AA,例如采用胆固醇脂酶水解胆固醇脂 (Moscat J., Moreno F. Herrero C. 等,猪主动脉内皮细胞中的花生四烯酸释放系统 (Arachidonic acid releasing systems in pig aorta endothelialcells), Biochem. Biophys Res. Commun. 30 ;139(3) :1098-1103 ;1986)。由于游离花生四烯酸合成的第一途径在炎性过程中更频繁,因此,测试结果说明酵母 RNA 可能抑制血浆中磷脂酶的活性。

[0200] 进一步,下列表 9 显示酵母 RNA 对血栓烷 B_2 的含量的作用,血栓烷 B_2 是血栓烷 A_2 稳定的代谢产物,是在花生四烯酸的氧化环加氧化酶代谢过程中产生。

[0201] 表 9

[0202] 酵母和阿司匹林对角叉藻聚糖注射后小鼠血浆中血栓烷含量的作用

[0203] (单位是皮摩尔 /mg 蛋白 ;M±m ;n = 5)

[0204]

	LPS (对照)				+酵母 RNA			+阿司匹林
	0 分钟 (标准)	30 分钟	60 分钟	320 分钟	30 分钟	60 分钟	320 分钟	320 分钟
M ±m	142.61 0 34.210	415.25 0 66.600	578.77 5 123.80	358.24 0 11.150	394.94 0 23.550	560.81 3 67.280	217.60 2 32.270	153.903 15.880
P1		<0.1	<0.2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.2	>0.5
P2					>0.5	>0.5	<0.001	<0.001

[0205] P1- 与标准 (在角叉藻聚糖注射前) 差异的概率

[0206] P2- 与对照 (无酵母 RNA) 差异的概率

[0207] 如表 9 所示,在 LPS 引入后,在第 30 分钟尤其在第 60 分钟,小鼠血浆中 TXB_2 池急剧增加。在第 320 分钟,TXB_2 水平开始下降。酵母 RNA 如同已知是花生四烯酸的环加氧化酶 (环加氧化酶和血栓烷合成酶) 代谢的抑制剂的阿司匹林强化了在炎性过程的早期阶段快速增加后的 TXB_2 水平的降低。

[0208] 接下来,表 10 显示 LPS 注射后小鼠血浆中 AA 的脂肪氧化酶氧化的代谢物肽白三烯 C4 含量变化的动力学。

[0209] 表 10

[0210] 酵母 RNA 和阿司匹林对角叉藻聚糖注射后小鼠血浆中白三烯 C4 含量的作用

[0211] (单位是皮摩尔 /mg 蛋白 ;M±m ;n = 5)

[0212]

	LPS (对照)				+酵母 RNA			+阿司匹林
	0 分钟 (标准)	30 分钟	60 分钟	320 分钟	30 分钟	60 分钟	320 分钟	320 分钟
M ±m	71.60 10.72	156.64 10.03	266.33 41.09	226.78 7.48	92.18 15.66	227.00 36.12	129.35 19.25	93.99 1.99
P1		<0.001	<0.01	<0.001	<0.5	<0.01	<0.5	<0.1
P2					<0.02	<0.5	<0.01	<0.001

[0213] P1- 与标准（在角叉藻聚糖注射前）差异的概率

[0214] P2- 与对照（无酵母 RNA）差异的概率

[0215] 如表 10 所示，对照组的动物显示在第 30 和第 60 分钟间隔中 LTC_4 含量的增加，在第 320 分钟比正常水平稍有下降。施用酵母 RNA 的动物显示 LTC_4 水平，它们在 LPS 作用的第 30 和第 320 分钟低于对照。阿司匹林显示了相似的抑制作用，其在第 320 分钟比酵母 RNA 的作用更显著。

[0216] 总之，上述测试结果说明酵母 RNA 不仅在 LPS 引入后抑制的游离花生四烯酸的生成，而且抑制通过脂肪氧化酶和环加氧化酶的氧化。

[0217] 实施例 5. 基于大鼠局部缺血再灌注模型研究酵母 RNA 的抗炎性作用

[0218] 实施例 5.1. 酵母 RNA 的心脏保护作用

[0219] 13 只身体质量为 200-250g 的白大鼠用尿烷麻醉并以 1.25g/kg 的剂量接受腹腔内注射 (Kogan A.H.，制作心肌梗塞模型 (Modeling themyocardial infarction)，M.，1979)。给大鼠进行带有插管的气管造口。肺的人工空气流通由 Vita-1 装置提供。皮肤和组织从中胸线直至肋间肌以 2-3mm 的凹陷度 (indention) 切割。4-4.5cm 的切割从颈的底切部伸展到剑状的附件。第 2、3 和 4 根肋骨的下部以及介于第 3 和第 4 肋骨之间的肋间肌被眼科剪切开。左冠状动脉的初始部分通常位于左耳廓眼和肺锥形体之间的空间。

[0220] 大小为 1.5-2mm×1-1.5mm 的心肌条沿着能易见的动脉初始部分用 3/0 无创伤针缝合。显露的绷带包扎在动脉和外围肌肉的四周。然后，我们开始观察局部缺血的初始巨大信号和发展梗塞。在局部缺血的第一个 10-20 秒，组织变白，尤其是心脏的上部，然后部分或整体变兰（青紫）。闭合区挛缩减弱，并膨胀。距离肢端 (extremities) 相同标准距离的 ECG 在局部缺血 30 分钟和再灌注 60 分钟过程中已被连续记录。在开始局部缺血之前 30 分钟，注射 200mg/kg 的酵母 RNA 和 20mg/kg 的阿司匹林。

[0221] 为了确定大鼠中后梗塞疤痕的面积和大小，根据 P- 氮蓝四唑方法 (Mueller B.，Maass B.，Krause W.，Witt W.，在大鼠中冠状动脉连接后 24 小时和 7 天，稳定的前列腺素类似物 iloprost 对心肌未灌注面积和坏死带的限制 (Limitation of myocardial unperfused area and necroticzone 24 hours and 7 days after coronary artery ligation in rats by the stableprostacyclin analogue iloprost)，Prostaglandins Leucot.Med.21(3)：331-340；1986) 将心肌部分染色。再灌注后，动物被肝素化 (150IU/kg i.v.)，在乙醚深度麻醉下移出心脏，并用含有 0.05％对氮蓝四唑的磷酸缓冲溶液逆灌注 (30 分钟；100mmHg；37℃)。甲醛溶液固定 24 小时后，心室称重，各横切成 5 片，并将不染色面积从染色心肌中分开并称重。计算坏死区域。

[0222] 局部缺血后 60 分钟对坏死区域的分析确定心脏左心室的危险区构成了左心室 33.3+3.4％的质量。在对照组中，梗塞区构成了危险区的 60.3+3.8％。梗塞开始前 30 分钟，注射酵母 RNA 使得梗塞和危险区间的比例从 41％降到 32.1％。

[0223] 大鼠心肌的局部缺血再灌注中 ECG 的分析显示了预先注射酵母 RNA 化合物降低了期外收缩的量。在该组 5 只大鼠的只有一个大鼠中，检测到 4 个期外收缩。在由不经酵母 RNA 治疗的大鼠所组成的对照组中，我们在 3 只大鼠中登记了有期外收缩，平均为 8.7+1.7。对照组中突发性心动过速的间隔持续更长时间：5 只大鼠中的 2 只平均持续了 4.2+1.3 秒。

[0224] 在用酵母 RNA 治疗的组中，5 只大鼠中只有一只有突发性心动过速，其持续了 1.5

秒。ECG 分析显示了酵母 RNA 在心肌的局部缺血再灌注中改进了心脏功能，稳定了最主要的心脏系统，并通过降低期外收缩数量和缩短突发性心动过速间隔而具有显著的抗心律不齐作用。

[0225] 总而言之，这些测试结果表示酵母 RNA 对大鼠心肌梗塞具有显著的心脏保护作用。

[0226] 实施例 5.2. 酵母 RNA 对心肌局部缺血部分的髓过氧化物酶活性的作用

[0227] 采用 Grisfwold 等对 Bradley 等方法 (Bradley P.P.，Priebet D.A.，Christensen R.D. 等，皮炎症的测量：用酶标记估计嗜中性粒细胞含量 (Measurement of cutateous inflammation：estimation of neutrophilcontent with an enzyme marker)，J.Invest.Dermatol.，78(3)：206-209；1982) 的修饰方法 (Griswold D.E.，Hillegass L.M.，Hill D.E. 等，大鼠心脏组织中心肌梗塞和炎症细胞渗入的定量方法 (Method forquantification of myocardial infarction and inflammatory cell infiltrationin rat cardial tissue)，J.Pharmacol.Methods，20(3)：225-235，1988)，对心肌中的髓过氧化物酶活性 (MPA) 进行研究。为此目的，抽提心脏并在冷却至 0℃的生理溶液中漂洗。漂洗后，局部缺血的中心区的心肌部分 (1g 组织) 被切除并冷冻于 -30℃。将终了部分室温下用含有 0.5％溴化十六碳三甲铵的抽提缓冲液制成 10％的匀浆。接着于 4℃以 12000g 离心 20 分钟。

[0228] 将上层部分 (30μl) 用于和 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 中的 0.167mg/ml 邻联二茴香胺反应。加入 0.005％的 H_2O_2 溶液启动反应。反应在 460nm 波长处已连续测试 5 分钟，每分钟记录读数。制作标有读数的示意图。MPA 单位定义为在 25℃ 1 分钟分解 1 微摩尔 H_2O_2 所需的酶量。数据计算成每克组织的 MPA。

[0229] 局部缺血和再灌注诱发了急性炎性反应，嗜中性粒细胞被认为在其中起关键作用 (Entman M.L.，Smith C.W.，再灌注后炎症：对心血管病中损伤反应的模型 (Postreperfusion inflammation：a model for reactionto injury in cardiovascular disease)，Cardiovasc.Res.28(9)：1301-1311，1994)。因为局部缺血心肌的再灌注伴随着危险区内强浓度的嗜中性粒细胞 (Hearse D.J.，Bolli R.，再灌注诱导损伤：现象、机理和临床相关性 (Reperfusion induced injury：manifestation，mechamisms and clinicalrelevance)，Cardiovasc.Res.26(2)：101-108；1992)，其释放各种炎性介质，如氧自由基、细胞因子和血因子 (haemokine)，并增加心肌的局部缺血灌注损伤 (Entman M.L.，Michael L.，Rossen R.D. 等，早期心肌局部缺血过程中的炎症 (Inflammation in the course of earlymyocardial ischemia)，FASEB J.，5(11)：2529-2537；1991)，直接联系存在于局部缺血心肌的嗜中性粒细胞浓度的加强和髓过氧化物酶活性之间，所述髓过氧化物酶是嗜中性粒细胞中含有的特殊酶，因而 MPA 活性的增加直接与白细胞迁移至炎症区域的数量相关。

[0230] 在大鼠左冠状动脉闭合 30 分钟和再灌注 1 小时后，对心肌的局部缺血部分中髓过氧化物酶活性的分析，显示其等于对照组中的 211.8+16.7 单位 /g 组织。当动物用阿司匹林注射时，活性降低到 176.1+5.9。RNA-D 注射降低三分之一活性至 152.3+9.8 单位 /g 组织。

[0231] 进一步，在局部缺血前 30 分钟给大鼠静脉内注射剂量为 200μg/kg 的酵母 RNA，降

低了长达小时的再灌注后的危险区中嗜中性粒细胞的浓度。嗜中性粒细胞的数量降低了约30%，这是采用阿司匹林（20μg/kg）所得结果的两倍。这使我们得出结论：在局部缺血和心肌再灌注的情况下，当用作心脏保护剂时的酵母RNA是有效的。

[0232] 实施例5.3. 在局部缺血情况下酵母RNA对NOS活性的作用

[0233] 测试在带有心肌梗塞的大鼠上进行，所述心肌梗塞在实验中由冠状动脉闭合30分钟诱导。从冠状动脉和心脏中采集血液，其被分成完整区、边缘区和梗塞区。在不同心脏区和血液中测定NOS酶的活性。同样，我们测定了游离花生四烯酸（心脏和血液）及其氧化代谢产物（血液）的含量。测试结果显示在下表11中。

[0234] 表11

[0235] 酵母RNA对局部缺血的大鼠心脏中NOS活性的作用

[0236] （单位是皮摩尔/mg蛋白；M±m；n = 5）

[0237]

	局部缺血30分钟（对照）				局部缺血30分钟+酵母RNA		
	完整（标准）	边缘区	梗塞区	合计	边缘区	梗塞区	合计
M	46.500	259.310	185.626	129.655	59.634	115.122	122.630
±m	7.000	60.683	48.635	30.341	11.649	40.509	26.413
P1		<0.01	<0.05	<0.2	<0.5	<0.1	>0.05
P2					<0.2	<0.5	<0.05

[0238] P1-与标准（在局部缺血前）差异的概率

[0239] P2-与对照（无酵母RNA）差异的概率

[0240] 表11的数据表明在短期局部缺血过程中，NOS的活性在梗塞区增加了三倍多（在测试组和对照组中相应为115±40和186±49pmol/分钟/mg蛋白）。因而，酵母RNA几乎使局部缺血心脏梗塞的边缘区中的NOS活性完全正常化，这可能是其心脏保护作用的机理之一。

[0241] 由于心肌细胞含有可诱导型NOS同工酶和组成型同工酶（Balligand J.L.，Kobzik L.，Han X.等，依赖氧化氮的副交感神经信号是由于组成型内皮（type III）氧化氮合成酶在心肌细胞中的活化（Nitricoxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation ofconstitutive endothelial(type III)nitric oxid synthetase in cardiacmyocytes），J.Biol.Chem.，16；270(24)；14582-14586；1995；Peng H.B.，Spiecker M.，Liao J.K.，可诱导的氧化氮：血管炎症的自身调节反馈抑制剂（Inducible nitric oxid:an autoregulatory feedback inhibitor ofvascular inflammation），J.Immunol.15；161(4)：1970-1976；1998；OddisC.V.，Simmons R.L.，Haffler B.G.，Finkel M.S.，心肌细胞中cAMP增强可诱导的氧化氮合成酶mRNA稳定性（cAMP enchances inducible nitricoxid synthase mRNA stability in cardiac myocytes），Am.J.Physiol.269(6)：H2044-2050；1995），考虑到局部缺血的短期（30分钟），可推测酵母RNA抑制NOS的组成型同工酶。同时，由于存在iNOS，酵母RNA在局部缺血心肌细胞中也可充当可诱导NOS活性的抑制剂。

[0242] 进一步，酵母RNA对局部缺血中大鼠血的NOS活性的影响显示在下列实施例5.4的表12中。表12的测试结果表明，与心脏中不同，局部缺血的对照动物血中NOS的活性降

低了两倍（在局部缺血和含氧量正常中分别为 14.222+1.43 和 30.35+3.40pmol/mg 蛋白），这通常用于缺氧症 (Arnet W.A.，McMillan A.，Dinerman J.L. 等，在缺氧过程中内皮氧化氮合成酶的调节 (Regulation of endothelial nitric oxidsynthase during hypoxia)，J.Biol.Chem.271(25)：15069-15073；1996)。酵母 RNA 的引入几乎使 30 分钟局部缺血后的大鼠血中 NOS 活性完全正常化。

[0243] 实施例 5.4. 在局部缺血情况下酵母 RNA 对花生四烯酸氧化代谢的作用

[0244] 下表 12 显示正常动物和局部缺血动物的血液中 NOS 和游离花生四烯酸的含量。

[0245] 表 12

[0246] 酵母 RNA 对局部缺血的大鼠血中 NOS 活性和花生四烯酸含量的作用

[0247]

	NOS 活性 单位为皮摩尔/mg 蛋白；M±m；n=5			游离花生四烯酸的含量 （nmol/mg 蛋白）		
	标准	局部缺血 30 分钟	局部缺血 ＋酵母 RNA	标准	局部缺血 30 分钟 (对照)	局部缺血 ＋酵母 RNA
M ±m	30.35 3.40	14.22 1.43	26.45 3.73	0.77 0.13	0.24 0.04	0.48 0.02
P1		<0.01	<0.5		<0.01	>0.05
P2			<0.05			<0.01

[0248] P1- 与标准（在局部缺血前）差异的概率

[0249] P2- 与对照（无酵母 RNA) 差异的概率

[0250] 如表 12 所示，动物的对照组表明游离 AA 的水平降低了三倍以上（在含氧量正常和局部缺血的情况下，分别为 0.77±1.43 和 30.35±3.40nmol/ 分钟 /mg 蛋白）。酵母 RNA 的引入通过比对照值增加两倍的量使 AA 含量稍稍正常化 ($P < 0.001$)。

[0251] 表 13 说明在局部缺血情况下不同心脏区中游离花生四烯酸的含量。

[0252] 表 13

[0253] 酵母 RNA 对局部缺血的大鼠心脏中游离花生四烯酸含量的作用

[0254] （单位是 nmol/mg 蛋白；M±m；n = 5)

[0255]

	局部缺血 30 分钟（对照）				局部缺血 30 分钟+酵母 RNA		
	完整 （标准）	边缘区	梗塞区	合计	边缘区	梗塞区	合计
M ±m	4.827 0.378	9.910 1.003	9.716 0.947	9.813 0.919	7.270 0.456	8.530 0.741	7.900 0.493
P1		<0.01	<0.01	<0.001	<0.01	<0.01	<0.01
P2					>0.05	>0.05	>0.5

[0256] P1- 与标准（在局部缺血前）差异的概率

[0257] P2- 与对照（无酵母 RNA) 差异的概率

[0258] 如表 13 所示，动物的对照组表明了 AA 水平在大鼠心脏的边缘区和梗塞区中可靠的增加（两倍以上，$P < 0.01$)。酵母 RNA 的引入稍稍降低了上述两个心脏区中花生四烯酸

的水平，但差异不明显 (P ＞ 0.05)。

[0259] 下表 14 显示酵母 RNA 在局部缺血的情况下对大鼠血中类花生酸水平的作用。

[0260] 表 14

[0261] 酵母 RNA 化合物对局部缺血的大鼠血中类花生酸的作用

[0262] （单位是皮摩尔 /mg 蛋白 ;M±m ;n ＝ 5)

[0263]

	血栓烷 B2			白三烯 C4		
	标准	局部缺血 30 分钟 (对照)	局部缺血 ＋酵母 RNA	标准	局部缺血 30 分钟 (对照)	局部缺血 ＋酵母 RNA
M ±m	53.00 10.67	130.72 33.92	62.49 7.98	24.10 3.94	39.62 10.18	25.69 4.04
P1		<0.05	>0.5		<0.2	>0.5
P2			<0.1			<0.5

[0264] P1- 与标准（在局部缺血前）差异的概率

[0265] P2- 与对照（无酵母 RNA) 差异的概率

[0266] 如表 14 所示，动物的对照组表明 TBX2 的环加氧化酶反应产物的水平增加（两倍以上，但差异不明显 -P ＞ 0.05) 而非 LTC4 脂肪氧化酶反应产物的水平 (P ＜ 0.2) 增加。在局部缺血情况下，酵母 RNA 的引入几乎使大鼠血中类花生酸的含量完全正常。

[0267] 总而言之，除了在局部缺血中调节对 NOS 活性的影响外（心肌细胞中抑制，但在血中反而提高)，酵母 RNA 的心脏保护作用也可通过调节花生四烯酸的氧化代谢来进行介导。

[0268] 实施例 6. 基于体内自身免疫病理模型（佐剂性关节炎）酵母 RNA 的抗炎性作用

[0269] 佐剂性关节炎在大鼠用弗氏佐剂注射后而形成，是总过程的部分，其伴随着骨和连接组织的损伤。形态学测试显示在佐剂性关节炎发展过程中，炎性退化的变化出现在关节周围的组织以及关节囊内和关节软骨中。据信这种炎性反应具有免疫过程的所有特征并构成了对微生物抗原延迟的免疫反应。佐剂性关节炎的病理过程与人关节炎很相似。

[0270] 实施例 6.1. 酵母 RNA 在自身免疫病理模型（佐剂性关节炎）中的作用

[0271] 根据 Courtright 等的方法在雄性大鼠中制成佐剂性关节炎模型 (Courtright L.J., Kuzell W.C., 神经缺陷和创伤对大鼠佐剂性关节炎过程的保守作用 (Sparing effect of neurological deficit and trauma on thecourse of adjuvant arthritis in the rat), Ann. Reum. Dis. 24(4) :360-368 ;1965)。对照动物在其尾部远端皮下接受单一剂量的 0.1ml 标准弗氏佐剂。佐剂性关节炎在注射后第 14-20 天形成。关节炎症状由 X 射线确定 ;后腿关节周围的变暗区和阴影暗示关节和软骨组织开始损伤。

[0272] 在测试组中，酵母 RNA 经 0.9％浓度的 NaCl 稀释后，在弗氏佐剂注射的前一天，以每只大鼠 100mg 的浓度腹腔内注射。4 天内间隔 3 天注射三次佐剂后，也可导入酵母 RNA。

[0273] 分析结果显示在第 14 天对照组的关节炎开始形成，并由滑囊的渗出性增殖生长和软骨损伤来证明。第 20 天，可看见关节周围的组织硬化以及滑囊的纤维化开始。第 30 天，软骨损坏变明显。在施用了酵母 RNA 的测试组中，20 天未见关节症状。关节症状仅在第 30 天出现，相似于第 14 天对照组中可见的症状。

[0274] 在佐剂性关节炎的形成中，对照组动物的后腿变得更大。具体而言，对照组中第 30

天，后腿的大小明显增加了 1.04mm（与实验开始时的 3.86±0.1 比较是 4.9±0.13）。而在测试组中，腿仅生长了 0.24mm（从实验开始时的 3.96±0.08 到实验第 30 天的 4.1±0.11）。因此，酵母 RNA 延迟了佐剂性关节炎的形成，这也从后腿生长速率降低得到支持。

[0275] 实施例 6.2. 在自身免疫病理（佐剂性关节炎）中酵母 RNA 对大鼠血 NOS 活性的作用

[0276] 在大鼠对照组（即不施用酵母 RNA）和测试动物组的自身免疫病理过程中第 3(I)、8(II) 和 14(III) 天以及正常大鼠的血中对 NOS 活性进行评价，所述测试动物组用酵母 RNA 注射。结果显示在下表 15 中。

[0277] 表 15

[0278] 在佐剂性关节炎的动力学中酵母 RNA 化合物对大鼠血中 NOS 活性的作用

[0279] （单位是皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白 ;M±m ;n = 5）

[0280]

	标准	对照			+酵母 RNA		
		I 第 3 天	II 第 8 天	III 第 14 天	I 第 3 天	II 第 8 天	III 第 14 天
M	30.650	236.760	24.340	111.540	70.000	40.660	33.960
±m	7.352	76.418	8.596	15.777	9.245	5.052	6.036
P1		<0.05	>0.5	<0.01	<0.02	<0.5	>0.5
P2					<0.02	<0.1	<0.01

[0281] P1- 与标准（佐剂性关节炎）差异的概率

[0282] P2- 与对照（无酵母 RNA）差异的概率

[0283] 如表 15 所示，动物对照组在自身免疫病理的第 3 天和第 14 天与标准比较表现了 NOS 活性的实质性增加（标准中 30.65±7.35 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白，第 3 天 236.76±76.42 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白，以及第 14 天 111.54±15.78 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白）。这种 NOS 活性的显著增加说明可诱导 NOS 同工酶（iNOS）的活性是计算 NOS 活性的主要化合物，所述 iNOS 的合成由抗炎性细胞因子 INF-γ、IL-1β 和 TNF-α 等启动。

[0284] 在介于第 3 天（自身免疫过程的启动）和第 14 天（病理发展）期间，我们观察了血中 NOS 活性的正常化（24.34±8.60 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白）。这可能归因于身体活化的保护反应，并且能由 NOS 表达的抑制及其 mRNA 稳定性的调节或其翻译过程的抑制来进行诱导。

[0285] 在施用酵母 RNA 的动物组中，自身免疫过程的启动（第 3 天）伴随着血中 NOS 活性更小（与对照组比较）的增加（70.00±9.24 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白对 236.76±76.42 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白）。此外，NOS 活性在自身免疫过程发展中的下一个时期逐渐降低（第 8 天为 40.66±5.05 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白以及第 14 天为 33.96±6.04 皮摩尔 / 分钟 /mg 蛋白）。

[0286] 所以，在自身免疫过程中我们对大鼠血液的 NOS 活性变化的测试得出结论 ：酵母 RNA 在自身免疫过程中，既在起始过程又在慢性阶段，对降低 iNOS 活性是有效的。这种特性使得酵母 RNA 用于由 iNOS 诱导相伴随的病理疾病 ：炎性过程、糖尿病、动脉硬化、肿瘤、肝炎、感染、神经元退化疾病（帕金森病、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、脑炎）及其他。

[0287] 实施例 6.3. 酵母 RNA 的膜保护作用

[0288] 在慢性自身免疫过程的模型上进行体内测试，所述慢性自身免疫过程在起始的早期阶段伴随着大量自由基的生成（尤其是氧化氮）。酵母 RNA 的膜保护作用的研究通过在自身免疫过程中红细胞的酸抗性来进行评价。酸抗性赋予红细胞膜的整体特征。它增加了不同病理的慢性阶段，而降低了发展的急性阶段（起始过程）。例如，在炎症发展的早期阶段，由氧和氮自由基的生成所诱导的自由基过程，包括由 NOS 的可诱导同工酶 (iNOS) 所生成的氧化氮，被高度活化。

[0289] 在自身免疫过程中受到各种有害因子影响的红细胞损伤的水平由溶血动力学指示剂进行评价，其由环境中的 pH 降低所诱导。记录溶血的动力学指示剂，受损细胞数通过分光光度计在相等时间期间 (30 秒）内由红细胞悬浮液（Δ ＝ 750nmol）的光弥散积分值变化来进行确定。吸收光谱通过光谱仪 SF-26（俄罗斯）记录。加入 10μl 血液启动红细胞酸解，所述血用 0.14 摩尔 NaCl+0.01 摩尔柠檬酸 - 磷酸缓冲液 pH 2.0-3.5 的等渗介质稀释 20 倍（体积 :1ml ;悬浮液中的红细胞密度 :0.7×10^{6} 细胞 /ml）。对于这种密度，红细胞的光弥散积分值依赖于细胞的计数、大小和形状，并于悬浮液中的细胞数成比例。

[0290] 结果以下表 16 中的红细胞酸性溶血图表代表，作为该过程的积分参数 :红细胞酸抗性的总和计算方法是将在时间 a_j 和 t_j 期间发生溶血的细胞数 a_i 相加（总抗性 (I) ＝ $\sum a_i.t_i$）。

[0291] 溶血图标上降低的消光水平代表红细胞连续进入溶血增加抗性。消光通常在溶血注射后 1.5-2 分钟开始降低 (1ml 0.004N HCl，其从 0.1NHCl 制备而来并经滴定检查）。溶血的延迟期是由红细胞形式（小球形）的预溶血变化造成的。单个红细胞的溶血不超过 10 秒。因此，实体水平测定之间间隔 30 秒排除了对经受溶解的相同红细胞计数两次的可能性。接着，通过溶血动力学的光度测定记录，我们能从间隔 30 秒的实体衍生系列中计算出红细胞抗性组别分布的百分数。

[0292] 从溶血开始 (E_b, t_b) 到其最终完成 (E_e, t_e) 实体的变化同参与溶血的全部细胞数 (100％）成比例，因此 :

[0293] $\Delta E = E_e - E_b = 100\%$

[0294] 这种经受溶血的红细胞总数 (100％）由在溶血历时间隔 t_e-t_b 中各 30 秒 ($E_{i+1}-E_i$) 经受溶血的红细胞数量组成 :

[0295] $\Delta E = \Delta E_{i+1}-E_i = 100\%$

[0296] 结果显示在下表 16 中。

[0297] 表 16

[0298] 在佐剂性关节炎动力学中酵母 RNA 化合物对红细胞酸抗性的作用

[0299] （总抗性 ;M±m ;n ＝ 5）

[0300]

	标准	对照			+酵母 RNA		
		I 第 3 天	II 第 8 天	III 第 14 天	I 第 3 天	II 第 8 天	III 第 14 天
M ±m	712.333 85.429	95.400 37.776	448.600 95.843	1013.800 290.509	372.600 72.667	638.800 78.903	565.800 80.244
P1		<0.01	<0.1	<0.5	<0.05	>0.5	>0.5
P2					<0.02	<0.2	<0.2

[0301] P1- 与标准（佐剂性关节炎）差异的概率

[0302] P2- 与对照（无酵母 RNA）差异的概率

[0303] 如表 16 所示，在自身免疫过程中没有非骤现的大鼠红细胞的总抗性。对于标准红细胞，指示剂为 712±85 单位。在自身免疫过程起始中，红细胞的总抗性降低了 7 倍并构成了 95±38 单位。其在病理过程中逐渐增加并在第 14(III) 天达到 1114±290 单位。

[0304] 这种红细胞酸抗性的显著降低说明细胞质膜的实质性变化，这可能是由于血浆中自由基包括氧化氮对蛋白和脂膜成分的氧化，所述自由基在该阶段主动生成，从中我们可推断游离胆固醇、多胺和其他稳定剂含量的调节以及去稳定剂如多不饱和游离脂肪酸的水平增加。

[0305] 施用了酵母 RNA 的动物在自身免疫过程起始阶段不具有如同对照组中红细胞酸抗性的降低。总抗性等于 373±73 单位，该值尽管低于标准 ($P < 0.05$) 但大于对照组 ($P < 0.05$)。在自身免疫病理发展的后期阶段，施用酵母 RNA 的动物中红细胞的总抗性处于正常水平。

[0306] 所以，酵母 RNA 具有免疫稳定作用。考虑该病理学中损伤的主要机理是由自由基造成的质膜成分的氧化压力和损伤，我们还可得出结论：酵母 RNA 是抗自由基的。

[0307] 实施例 7. 酵母 RNA 对血液指示剂的作用

[0308] 在奥地利产全自动血细胞计数仪“Serono1900”上，根据厂商说明，对用酵母 RNA 化合物治疗前后从患者中采集的血样进行研究。首先测定 1μl 血中白细胞 [WBC]、红细胞 [RBC] 和血小板 [PLT] 的数量，血红蛋白 [HGB] 的量 g/l，嗜中性粒细胞 [NTP] 和血细胞比容 [HCT] 的百分数。在预先分析上述的指示剂后，筛选患者和健康的志愿者。与正常水平比较，将上述一种或多种指示剂显示了大大减少的 4-6 个个体的组别筛选出来用于进一步分析。取决于疾病种类，治疗进行 1-18 周。酵母 RNA 化合物的施用或者采用胶囊，含量为每只胶囊 250mg 酵母 RNA，或者采用栓剂，含量为每只栓剂 1.0g 酵母 RNA。

[0309] 实施例 7.1. 在相对健康的个体和运动员中酵母 RNA 对血液血细胞减少症的影响

[0310] 治疗历时 10 天至 6 周。化合物以胶囊施用，每天 1 只胶囊，或以栓剂施用，每 3 天 1 只栓剂。测试进行每周 1-2 次，结果表示在表 17 和 18 中。表 17 显示了对带有贫血症状的患者组别连续 3 周每天施用胶囊酵母 RNA 化合物 1g 的治疗结果。从表中可明显看出，治疗导致血红蛋白浓度从 12.0g/l 稳定增加到 14.0g/l，而血细胞比容百分数从 30% 稳定增加到 37%。相同组别也显示了 RBC 浓度增加了 17.7% 以及 WBC 和 PLT 的数量相应增加了 26.5% 和 59.9%。

[0311] 表 17

[0312] 在相对健康的个体中酵母 RNA（胶囊 1g/ 天）对血液血细胞减少症的影响

[0313]

血液测试	标准	治疗前	治疗 4 天	治疗 11 天	治疗 21 天
WBCM ±M	4.3-10.8 千 /mkl	6.28 0.512	5.78 0.512	7.20 0.531	7.95 1.090
RBCM ±M	＜ 4.0mln/mkl	3.77 0.117	4.13 0.137	4.34 0.124	4.44 0.188
PLTM ±M	200-300 千 /mkl	211.75 13.931	224.00 12.623	266.00 9.229	338.75 44.205
HGBM ±M	14-16g/l	12.95 0.433	13.78 0.585	14.55 0.556	13.90 0.438
HCTM ±M	43-47％	30.00 0.599	31.58 1.009	34.68 0.986	37.35 1.767

[0314] 由于化合物本身的用途导致其快速水解，实际上进入到血液中的浓度更小。所以，采用栓剂以每天 1g 的剂量在相对健康的个体中对酵母 RNA 化合物的影响进行研究。在第 1 天、第 3 天和第 6 天施用栓剂。研究结果显示血细胞比容从 33.2％增加到 41.5％，而血红蛋白从 13.5g/l 增加到 14.5g/l。白细胞量增加了 46.5％，红细胞量增加了 10.6％。血小板量维持稳定。所以，以栓剂形式应用酵母 RNA 化合物等同于静脉内注射化合物，以比采用胶囊快三倍的速度获得相同的结果（采用栓剂 7 天对采用胶囊 21 天），并以减少 7 倍的酵母 RNA 总浓度从 21g 到 3g 持续治疗。当需要输血时，这种血液指示剂的加速标准化在出血过程中是重要的。

[0315] 表 18 显示运动员中降低血液指示剂的治疗结果。已知在剧烈活动后，这些个体经常已降低血液指示剂：血细胞比容、血红蛋白及其他。酵母 RNA 化合物以每天 1.5g 剂量施用 25 天。测定血细胞比容和血红蛋白水平。

[0316] 表 18

[0317] 酵母 RNA(1.5g/l 以胶囊形式）对运动员血液系数的影响

[0318]

	正常	治疗前 3 天	治疗天	治疗 10 天	治疗 18 天	治疗 25 天
HGBM ±m	14-16％	13.88 0.678	13.55 0.685	14.13 0.611	14.30 0.688	14.85 0.584
HCTM ±m	43-47％	42.80 1.672	40.60 1.272	43.78 1.664	45.70 1.857	46.57 1.707

[0319] 因此，实验表明在剧烈活动 2 天中血细胞比容和血红蛋白水平分别从 42.7％和

13.9g/l下降到41.0%和13.5g/l。施用酵母RNA后10天,它们分别增加到43.7%和14.1g/dl;施用16天后相应增加到45.7%和14.3g/dl,以及施用21天后增加到46.5%和14.8g/dl。所以,该组显示剧烈运动3周后血细胞比容增加了13.4%以及血红蛋白增加了6%。

[0320] 实施例7.2.酵母RNA对癌症患者中血液血细胞减少症的影响

[0321] 贫血对癌症患者尤其是化疗或放疗后起到很大的负作用。血红蛋白水平低于8g/l的患者通常根本不允许采用化疗或放疗。一系列研究已显示贫血的治疗和血红蛋白水平的增加对经受了化疗的癌症患者进行治疗至关重要(J.W.Adamson,H.Ludwig.,在癌症的盆血治疗中对重组人的红细胞生长素(Epoetinα)的造血应答的预测(Predicting theHematopoietic Response to Recombinant Human Erythropoietin(EpoetinAlfa)in the Treatment of the Anemai of Cancer),Oncology,Vol.56,pp.46-53(1999))。

[0322] 通过给经受了化疗的患者采用红细胞生成素治疗,已显示血红蛋白从8g/dl增加到10g/dl,并伴随着癌症患者生活质量的适度提高。在生活质量测定中,显著提高发生在血红蛋白从10g/l增加到12g/l。因此,根据生活质量的测定和治疗结果,12g/l的血红蛋白水平对癌症患者最佳(J.Crawford,贫血、疲劳和促红细胞生成素,美国血液协会第42届年会(Anemia,Fatigue,and Erythropoietin,42nd Annual Meetingof the American Society of Hematology),2000,Medscape,Inc.)。

[0323] 对一组癌症患者进行研究,其中患者在化疗前、化疗过程中、化疗中断期间以及重复化疗后以每天1-2g酵母RNA化合物的剂量施用胶囊8天。根据上述方法,对血液进行测试。分析结果呈现在表19中。

[0324] 表19

[0325] 酵母RNA(1-2g/天以胶囊形式)对癌症患者的血液血细胞减少症的影响

[0326]

血液测试	标准	治疗前	治疗1周	治疗2周	治疗4周	治疗5周	治疗6周
WBCM ±m	4.3-10.8 千/mkl	5.73 2.448	5.20 1.079	4.53 0.180	5.10 0.715	5.10 1.373	4.20 0.091
RBCM ±m	＜4.0mln /mkl	2.58 0.131	3.10 0.147	3.38 0.131	3.43 0.18	3.85 0.218	3.90 0.204
PLTM ±m	200-300 千/mkl	84.00 6.069	93.75 18.414	125.00 20.207	166.25 19.512	161.25 7.181	193.75 5.543
HGBM ±m	14-16g/l	67.25 4.423	85.75 3.945	92.75 4.768	98.75 6.369	110.75 6.356	121.00 1.958
HCTM ±m	43-47%	22.75 1.109	31.00 3.109	33.00 1.472	36.00 2.739	36.75 2.626	40.00 0.707

[0327] 如表 19 所报道，从用酵母 RNA 化合物治疗开始，患者在血红蛋白水平、血细胞比容百分数、红细胞和血小板数量中都表现出稳定的增加。在治疗 6 周过程中，血红蛋白的数量增加了几乎两倍，从 67g/l 增加到 121g/l，红细胞数量增加了 51％，以及血小板增加了 130％。患者未显示在其他血液指示剂上的恶化，但是随着血红蛋白水平增加到 120g/l，有记录显示患者安康幸福的感觉增加。

[0328] 实施例 7.3. 酵母 RNA 对 HIV 感染的患者中血液血细胞减少症的影响

[0329] HIV 感染的患者具有复杂的造血作用故障，导致从生血祖细胞起源的全部 3 种细胞系失去正常。所以，至少 80％的 HIV 感染患者在 HIV 感染过程中贫血，超过 50％的患者有嗜中性粒细胞减少症，以及约 40％的患者有血小板减少症。因此，HIV 感染个体的血细胞减少症是首先感染症状之一 (A.M.Levin，贫血症、嗜中性粒细胞减少症和血小板减少症：HIV 感染患者中的病理和演化治疗选项 (Anemia，Neutropenia，and Thrombocytopenia：Pathogenesis and EvolvingTreatment Option in HIV-Infected Patients)，HIV Clinical Management，Vol.10，1999，Medscape，Inc.)。

[0330] 在医师监督下，对一组选择的 HIV 感染患者进行约 6 个月的研究。在分析他们的生血作用后，患者开始用酵母 RNA 胶囊以每天 1-2g 的剂量治疗 18 周。每 1-2 周进行血液学和生化测试。治疗结果表示在表 20 中。研究发现 HIV 感染的患者在过去 6 个月中具有显著的血细胞减少症，并降低了血红蛋白水平、血小板和嗜中性粒细胞的数量以及血细胞比容的百分数。许多病人患有肝炎。在用酵母 RNA 治疗的第 12 至第 14 周之间，由于传染性，患者得了流感，这导致肺部炎症。所以在此期间采用抗生素额外治疗。

[0331]

表 20

酵母 RNA（1-2g/天以胶囊形式）对 HIV 感染患者中血液血细胞减少症的影响

血液测试	标准	治疗前	治疗后周数								
			2	4	6	8	10	12	14	16	18
WBC M ±m	4.3-10.8 千/mkl	3.28±0.1	4.00±0.3	5.10±0.1	4.35±0.3	5.2±0.07	5.9±0.1	5.25±0.2	5.38±0.3	5.35±0.08	5.15±0.08
RBC M ±m	<4.0mln/mkl	3.48±0.2	3.83±0.1	4.00±0.4	4.20±0.2	4.1±0.2	4.3±0.2	4.15±0.2	4.30±0.2	4.33±0.2	4.33±0.1
PLT M ±m	200-300 千/mkl	121.2±9.2	132.5±7.5	192.5±29.8	185.0±11.9	247.5±26.2	196.5±22.3	208.7±4.2	216.2±8.9	207.5±8.5	223.7±32.8
NTP M ±m	34-83%	36.75±3.1	44.00±2.3	49.75±3.1	34.5±0.6	46.7±3.0	54.0±3.7	46.5±2.9	46.0±3.1	53.0±0.9	43.0±4.7
HGB M ±m	14-16g/l	99.43±4.2	109.6±4.4	125.0±6.1	130.9±8.1	129.8±8.4	133.2±9.1	127.5±5.5	128.9±5.5	132.8±6.7	125.6±3.1
HTC M ±m	43-47%	30.5±1.0	37.75±1.4	35.5±4.6	42.5±0.8	44.2±0.6	43.0±1.47	43.7±3.2	41.5±3.0	42.7±3.1	40.7±1.1

[0332] 如表 20 所显示，治疗导致 HIV 患者在 4-6 周后全部血液指标稳定正常。正常的红细胞、嗜中性粒细胞和血小板在 4 周后变得清晰可见，对应于全部 3 种祖 CFU-GEMM 细胞系

分化的复杂正常化。未检测到淋巴细胞数量的异常刺激。血红蛋白 4 周后从 99.43g/l 增加到 125g/l，并直至测试结束保持稳定。嗜中性粒细胞在 4 周后从 36.75％增加到 49％，并在接着的 18 周中以一定偏差在这些限度内维持。

[0333] 因此，用酵母 RNA 治疗 HIV 感染患者，导致血细胞减少症的稳定正常化。这可得出结论：该化合物可成功地用于预防和治疗炎性过程并使患者在高水平上维持工作能力和生活质量。