



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101491670 B

(45) 授权公告日 2012. 01. 18

(21) 申请号 200910118522. 0

W0 0037095 A1, 2000. 06. 29,

(22) 申请日 2003. 05. 15

CN 1276381 A, 2000. 12. 13,

(66) 本国优先权数据

审查员 曹扣

PCT/CN02/00349 2002. 05. 24 CN

(62) 分案原申请数据

03811866. 1 2003. 05. 15

(73) 专利权人 上海泽生科技开发有限公司

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区居
里路 68 号

(72) 发明人 周明东

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61K 45/06 (2006. 01)

A61P 9/00 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 0064400 A2, 2000. 11. 02,

权利要求书 1 页 说明书 61 页 附图 12 页

(54) 发明名称

神经调节蛋白用于心血管疾病治疗的方法和
组合物

(57) 摘要

本发明涉及预防、治疗或延缓哺乳动物尤其是人类各种心血管疾病、心血管紊乱的组合物和方法。更具体说, 本发明提供了神经调节蛋白或其功能片段、或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸, 或提高所述神经调节蛋白产量和 (或) 功能的物质在预防、治疗或延缓哺乳动物各种心血管疾病及紊乱的组合物和方法。

1. NRG 蛋白或其包含 EGF 样结构域的功能片段、或编码 NRG 蛋白或其包含 EGF 样结构域的功能片段的核酸在制备药物中的应用,该药物用来预防、治疗或延缓哺乳动物的心脏疾病,其中所述心脏疾病是病毒性心肌炎 ;其中进一步包括使用预防或治疗病毒性心肌炎的药物。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中预防或治疗病毒性心肌炎的药物选自抗生素、心肌保护剂、抗氧化剂、营养心肌的药物。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其中抗生素是青霉素。

4. 根据权利要求 2 所述的应用,其中心肌保护剂为牛磺酸。

5. 根据权利要求 2 所述的应用,其中抗氧化剂选自维生素 C、维生素 E、辅酶 Q₁₀。

6. 根据权利要求 2 所述的应用,其中营养心肌的药物为能量合剂。

神经调节蛋白用于心血管疾病治疗的方法和组合物

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为 2003 年 5 月 15 日,申请号为 03811866.1,发明名称为“神经调节蛋白用于心血管疾病治疗的方法和组合物”。

[0002] 本申请涉及下列专利申请:PCT/CN02/00349,申请日:2002.05.24;PCT/CN02/00664,申请日:2002.09.18;中国专利申请号:02145145.1,申请日:2002.11.08;中国专利申请号:03109976.9,申请日:2003.04.09。本申请公开的内容包括上述专利申请文件的全部。

技术领域

[0003] 本发明涉及预防、治疗或延缓哺乳动物尤其是人类各种心血管疾病、心血管紊乱的组合物和方法。更具体说,本发明提供了神经调节蛋白或其功能片段、或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸,或提高所述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质在预防、治疗或延缓哺乳动物各种心血管疾病及紊乱的组合物和方法。

背景技术

[0004] 病毒性心肌炎(Viral Myocarditis)是因多种病毒侵犯心脏,引起局灶性或弥漫性心肌间质炎性渗出和心肌纤维变性、坏死或溶解,伴有心包或心内膜炎症,导致心肌损伤,心功能障碍,心律失常和周身症状。病毒性心肌炎可发生于任何年龄,近年来发生率有增多的趋势。其后遗症为心律失常,心力衰竭,心源性休克,甚至猝死。若病程迁延不愈,导致心脏肥大,导致心肌永久性损害,并因免疫反应逐渐发展为心肌病。病毒性心肌炎的临床治疗原则主要是改善心肌功能,修复损伤心肌,控制心力衰竭。病毒性心肌炎的临床治疗用药包括抗生素、心肌保护剂、抗氧化剂如大剂量维生素C、维生素E、辅酶Q₁₀等以及营养心肌的药物如能量合剂以加强心肌营养。但上述疗效并不十分理想,尤其是针对心肌炎导致的心肌结构及功能改变尚无疗效肯定的治疗措施。

[0005] 扩张性(充血性)心肌病(Dilated(congestive)Cardiomyopathy, DCM)是原因不明的各种心肌疾病的最后结局,它是非风湿性、非高血压性、非冠状动脉性的心肌结构和功能的病理改变。扩张性心肌病主要表现为心室高度扩张和心肌收缩期泵功能障碍或充血性心力衰竭为特征。扩张性心肌病的心肌轻度损伤常表现为细胞核及细胞器的肥大,重度损伤表现为细胞结构的改变、细胞坏死,由此导致的纤维化。DCM的发病原因及机制均尚未阐明且因无有效的防治方法而预后极差。多数患者常因心力衰竭进行性加重死亡或因心律失常而发生猝死。常规治疗DCM除使用强心剂、利尿剂、ACEI等治疗外,第三代钙离子拮抗剂阿罗地平和第三代 β -受体阻滞剂如卡维地洛亦用于DCM的临床治疗。由于缺乏随机、双盲临床试验证实,甲状腺素和生长激素的疗效有争议。目前,仍无特效治疗DCM药物。左室减容手术虽能减小左心室内径,心功能暂时得以改善,而减容手术后因心衰加重,心律失常的死亡率较高,限制了左室减容手术在临床上的应用。动态心肌成形术虽然能改善患者心功能,但手术创伤大,病人不易耐受,仅作为心脏移植禁忌时的替代方法。心脏移植作为DCM的根本治疗手段因缺乏供体心脏,费用昂贵,术后感染以及移植后产生排异反应而影响

治疗。因此,提供 DCM 特效治疗的药物是临床所急需解决的问题。

[0006] 阿霉素 (Doxorubicin or Adriamycin, ADM) 属蒽环类抗肿瘤药,具有抗癌谱广、作用强等特点。在临床上广泛应用于肺癌、乳腺癌、膀胱癌、睾丸癌、甲状腺癌、软组织肿瘤、骨肉瘤、神经母细胞癌、急性白血病和恶性淋巴瘤以及胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤的治疗。其作用机制主要是 ADM 分子嵌入 DNA 而抑制核酸的合成。ADM 为细胞周期非特异性药,对 S 期作用最强, M、G1 和 G2 期也有作用。有许多病例揭示无论是对转移乳腺癌还是对术后乳腺癌的辅助化疗,在单位时间内,用较大剂量化疗药物方案能产生较好的有效率和较长的生存期。随后,又有一些研究证实了高剂量和剂量强度的重要性,肯定了剂量和剂量强度与疗效的关系。

[0007] 但 ADM 的毒性副作用,限制了其应用。ADM 的毒性包括骨髓抑制,约有 60 ~ 80% 的患者在用药后 10 ~ 15 天,白细胞及血小板降低至最低水平,约 21 天恢复到正常水平。而消化道反应主要有恶心、呕吐、厌食、胃炎甚至溃疡、口腔粘膜炎症。同时,几乎所有用药者都发生不同程度的脱发,但停药后,该反应停止。

[0008] 限制高剂量 ADM 等蒽环类药物在临床应用的主要原因是心脏毒性, ADM 心脏毒性的作用机制主要是产生的氧自由基,由于 ADM 分子结构中的半醌基发生氧化还原反应引起膜脂质过氧化,引起细胞损伤。氧自由基引起脂质过氧化反应增强,损伤细胞膜及细胞器膜,改变膜上蛋白质的功能及酶的活性,导致细胞内钙超载,核酸、蛋白质合成受抑制,能量代谢障碍,严重影响心肌的收缩和舒张功能。

[0009] ADM 在体内积聚量过多时,由于 ADM 与心肌组织的亲和力明显高于其他组织,使心肌组织更容易受 ADM 的损害,产生心脏毒性。心脏毒性表现为急性及慢性毒性反应两种。急性反应表现为心脏的各种功能性变化,如窦性心动过速、心律不齐、传导阻滞及 ST-T 段的改变等。在 ADM 用药早期易出现心律失常,急性心脏毒性还表现为左心室射血分数 (LVEF) 的减低,心搏量 (SV)、心排出量 (CO)、心排指数 (CI) 相应减低,说明 ADM 对患者左心收缩功能以及左心泵功能均有抑制效应。ADM 导致慢性反应表现为不可逆的充血性心力衰竭。一旦出现充血性心力衰竭,其病死率可达 30% ~ 50%。这在一定程度上限制了 ADM 的大剂量、长期应用,迫使癌症患者中断治疗。

[0010] 如何在临床使用 ADM 时不影响其化疗效果同时减少其心脏毒性已有广泛的研究。如适当减少 ADM 的总量,并增加营养心肌如大量维生素 C 配合使用,经常输血、使用铁离子螯合剂 ICRF-187 等保护心肌。然而,这些药物在保护心肌的同时,对减少 ADM 的心脏毒性作用甚微。因此,需要预防、治疗或延缓因使用 ADM 导致的心脏毒性作用,同时不影响其疗效的药物。

[0011] 许多病因可引起心力衰竭如冠状动脉硬化、高血压、炎症引起心肌损伤导致难治愈的心脏疾病。这些因素导致心肌细胞结构、功能的改变,最终使心室射血功能下降导致心力衰竭。心力衰竭是严重影响人类健康的疾病,其发病率及死亡率在全球都很高。在美国,心力衰竭每年住院率为 30-40%,确诊的心力衰竭患者 5 年死亡率,男性为 60%,女性为 45%;平均生存时间,男性为 3.2 年,女性为 5.4 年,终末期的心力衰竭患者的生存率只有 20%。

[0012] 神经调节蛋白 -1 (neuregulin-1, NRG-1) 又称 Neu Differentiation Factor (NDF) 或 glial growth factors (GGF), 是 ErbB3、ErbB4 的配体。用神经调节蛋白基因严重缺陷的

小鼠胚胎的研究证明神经调节蛋白对于心脏和神经发育是必需的。然而,关于神经调节蛋白控制细胞分化和控制下游信号途径的信息是有限的。在心脏发育的早期,神经调节蛋白和 ErbB 受体分别在心内膜内层和心肌层表达。这二层分开很宽,神经调节蛋白必须穿过二层细胞中的空间,再激活 ErbB 受体。激活心肌细胞中的这些受体促进心肌细胞生长或迁移到心内膜。W000/37095 发现神经调节蛋白增强心肌细胞的分化,肌原纤维节和细胞骨架的组合与细胞间的粘合。W000/37095 发现神经调节蛋白与它的细胞作用可能适用于探测,诊断与处理心脏疾病。W000/37095 提出神经调节蛋白及其类似物在体外促进心肌细胞分化,诱导心肌细胞内肌原纤维节和细胞骨架结构重建或细胞间粘合,识别能抑制神经调节蛋白刺激心肌细胞分化的多肽或化合物,可应用于治疗心脏病和心力衰竭中。

[0013] 因此,需要更有效和(或)性价比更好有关 NRG 治疗病毒性心肌炎、DCM、预防或治疗药物导致的心脏毒性如 ADM,不影响其疗效和心肌梗死的方案。本发明提供了上述需求的方法及应用。

发明内容

[0014] 治疗病毒性心肌炎或扩张性(充血性)心肌病

[0015] 一方面,本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物病毒性心肌炎或 DCM 方法,该方法包括对需要或希望预防、治疗或延缓的哺乳动物施用有效量的神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质,从而预防、治疗或延缓病毒性心肌炎或 DCM。优选地,在体内施用神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质。

[0016] 另一方面,本发明涉及一种组合物,该组合物包括有效量的神经调节蛋白或其功能片段,或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质以及有效量的预防或治疗病毒性心肌炎或 DCM 的药物组成。

[0017] 另一方面,本发明还提供了预防、治疗或延缓哺乳动物尤其是人类病毒性心肌炎或 DCM 的药物有效成分,该药物有效成分包括有效量的神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质,从而预防、治疗或延缓病毒性心肌炎或 DCM。

[0018] 治疗药源性心脏毒性

[0019] 本发明提供了预防、治疗或延缓因药源性导致的心脏毒性的方法。具体说,本发明提供了预防、治疗或降低药源性心肌病心脏毒性的方法。

[0020] 本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物心脏毒性的方法,该方法包括对需要或希望预防、治疗或延缓的哺乳动物在体内施用有效量的预防、治疗药物和有效量的(i)神经调节蛋白、或其功能片段;(ii)编码该蛋白或功能片段的核酸;(iii)提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质,从而预防、治疗或延缓药源性心脏毒性的方法。

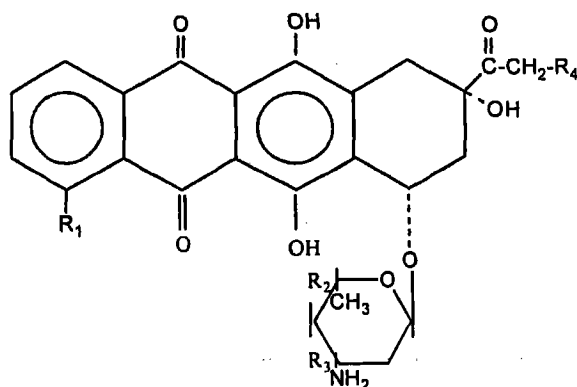
[0021] 本发明可预防、治疗或延缓本领域普通技术人员所知心脏毒性明显的临床症状,包括但不限于急性或慢性心脏毒性。例如,本发明可预防、治疗或延缓心动过速、心律失常、心力衰竭。在具体实施例中,急性心脏毒性的临床症状,例如,窦性心动过速、心律不齐、传导阻滞及 ST-T 段的改变,以及左室射血分数(LVEF)的减低,心搏量(SV)、心排出量(CO)、

心排指数 (CI) 减低可以得到预防、治疗或延缓。本发明可预防、治疗或延缓心脏毒性导致左心室收缩及泵出功能下降。

[0022] 本发明提供了预防、治疗或延缓药源性心脏毒性的方法。在具体实施例中, 治疗或预防性药物产生的氧自由基导致心脏毒性。在另一具体实施例中, 治疗或预防性药物增强脂质过氧化反应导致心脏毒性。

[0023] 本发明提供了预防、治疗或延缓抗肿瘤药物导致心脏毒性的方法。抗肿瘤药物是蒽环类抗肿瘤药。更具体说, 抗肿瘤药物是具有下列通式的化合物:

[0024]



[0025] R1 为甲氧基或氢, R2, R3 和 R4 为羟基或氢。蒽环类抗肿瘤药包括但不限于下列如 ADM、柔红霉素、表阿霉素、去甲氧柔红霉素、米托蒽醌、丝裂霉素、博莱霉素、环磷酰胺、氟脲嘧啶、放线菌素 D、长春新碱。本发明提供了神经调节蛋白作为抗心脏毒性药物可以预防、治疗或延缓化疗药物如 ADM 单独或与其它药物联合使用导致心脏中毒。

[0026] 本发明提供了预防、治疗或延缓抗精神病药物导致心脏毒性的方法。抗精神病药物可以是氯丙嗪、奋乃静、三氟拉嗪。

[0027] 本发明提供了预防、治疗或延缓三环类抗抑郁病药物导致心脏毒性的方法。三环类抗抑郁病药物可以是氯丙咪嗪, 阿米替林, 多虑平。

[0028] 本发明提供了预防、治疗或延缓干扰素如干扰素- α 或白细胞介素如白细胞介素-2 导致心脏毒性的方法。

[0029] 本发明提供了预防、治疗或延缓抗感染药物如吐根碱导致心脏毒性的方法。

[0030] 在本发明中使用神经调节蛋白可以是神经调节蛋白 1、神经调节蛋白 2、神经调节蛋白 3 或神经调节蛋白 4。在一些实施例中, 本发明方法使用神经调节蛋白可以是神经调节蛋白是神经调节蛋白 $\alpha 2$ 或神经调节蛋白 $\beta 2$ 。在另一些实施例中, 神经调节蛋白片段是包含有 SEQID:4 的氨基酸序列的神经调节蛋白 $\beta 2$ 片段。

[0031] 本发明使用的神经调节蛋白可以是神经调节蛋白或其功能片段。本发明方法可使用编码该蛋白或功能片段的核酸, 可使用任何可提高上述神经调节蛋白产量和 (或) 功能的物质。神经调节蛋白可单独使用或与药学上可接受的载体或赋形剂使用。神经调节蛋白或其功能片段, 或编码该蛋白或功能片段的核酸, 或提高上述神经调节蛋白产量和 (或) 功能的物质可在预防、治疗性药物之前、同时或之后使用。

[0032] 在一些实施例中, 在神经调节蛋白或其功能片段, 或编码该蛋白或功能片段的核酸, 或提高上述神经调节蛋白产量和 (或) 功能的物质存在的情况下, 预防、治疗性药物的

用量可高于其最大允许用量。

[0033] 在另一些实施例中,本发明提供了对需要或希望预防、治疗或延缓的人类心脏毒性方法。优选地,使用在患有恶性肿瘤如肺癌、乳腺癌、膀胱癌、睾丸癌、甲状腺癌、软组织肿瘤、骨肉瘤、神经母细胞瘤、急性白血病和恶性淋巴瘤以及胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤的人类。

[0034] 治疗心肌梗死

[0035] 本发明还提供了预防、治疗或延缓哺乳动物尤其是人类心肌梗死的组合物,该组合物包括有效量的神经调节蛋白、或其功能片段、或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质以及有效量的预防或治疗心肌梗死的药物。

[0036] 本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包括放置在容器的上述组合物和使用上述组合物预防、治疗或延缓心肌梗死说明书。

[0037] 本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物心肌梗死方法,该方法包括对需要或希望预防、治疗或延缓的哺乳动物尤其是人类施用有效量的神经调节蛋白、或其功能片段、或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质,从而预防、治疗或延缓心肌梗死。

[0038] 药物组合物安全剂量范围

[0039] 一方面,本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物疾病的药物组合物,该药物组合物包括神经调节蛋白或其功能片段其 a) 安全剂量小于 170U/kg,或 b) 有效疗程总剂量小于 3600U/kg。

附图说明

[0040] 图 1. 神经调节蛋白工程菌株构建的技术路线。

[0041] 图 2. 神经调节蛋白基因的扩增。泳道 1 是通过 RT-PCR 扩增大小为 183bp 的目的片段,泳道 2、3 为 DNA Markers。

[0042] 图 3. PET22b 质粒物理图谱。

[0043] 图 4. 重组神经调节蛋白表达质粒的构建。泳道 1、3 为 DNA Markers,泳道 2 是酶切后神经调节蛋白片段。

[0044] 图 5. 高效表达工程菌鉴定。泳道 1 Marker ;泳道 2 未诱导工程菌 ;泳道 3 诱导后 1h ;泳道 4 诱导后 2h ;泳道 5 诱导后 3h ;泳道 6 诱导后 4h ;泳道 7-9 不同工程菌诱导后

[0045] 图 6. 大鼠假手术组心肌组织病理切片,心肌组织无特殊病理学改变 (I) (10×10)。

[0046] 图 7. 模型组可见大面积红染区 (10×10)。

[0047] 图 8. 重组人神经调节蛋白高剂量组 (I) (20 μ g/kg) 可见散在分布红染心肌细胞 (10×10)。

[0048] 图 9. 重组人神经调节蛋白中剂量组 (I) (10 μ g/kg) 可见片状分布的红染心肌细胞及纤维组织 (10×10)。

[0049] 图 10. 重组人神经调节蛋白低剂量组 (I) (5 μ g/kg) 可见片状分布的红染心肌细胞及纤维组织 (10×10)。

[0050] 图 11. 大鼠假手术组心肌组织病理切片,心肌组织无特殊病理学改变 (II)

(10×10)。

[0051] 图 12. 模型组 (II) (10×10) 可见大面积红染区。

[0052] 图 13. 重组人神经调节蛋白高剂量组 (20 μg/kg) 可见散在分布红染心肌细胞 (10×10)。

[0053] 图 14. 重组人神经调节蛋白中剂量组 (II) (10 μg/kg) 可见片状分布的红染心肌细胞及纤维组织 (10×10)。

[0054] 图 15. 重组人神经调节蛋白低剂量组 (II) (5 μg/kg) (10×10) 可见片状分布的红染心肌细胞及纤维组织。

[0055] 图 16. rhNRG-1 β 对模型动物心脏纤维化区域毛细血管增生的影响 (I) (HE 染色, 50x) A :假手术组 :正常心肌结构, 无纤维化改变 ;B :模型组 :心肌纤维化明显, 可见少量毛细血管增生 ;C :rhNRG-1 β (20 μg/kg) 组 :心肌呈片状纤维化, 毛细血管增生明显 ;D :rhNRG-1 β (10 μg/kg) 组 :纤维化明显, 内有较多毛细血管增生 ;E :rhNRG-1 β (5 μg/kg) 组 :片状纤维化, 可见毛细血管增生。

[0056] 图 17. rhNRG-1 β 对模型动物心脏纤维化区域毛细血管增生的影响 (II) (HE 染色, 50 倍 x) A :假手术组 :正常心肌结构, 无纤维化改变 ;B :模型组 :心肌纤维化明显, 可见少量毛细血管增生 ;C :rhNRG-1 β (20 μg/kg) 组 :心肌呈片状纤维化, 毛细血管增生明显 ;D :rhNRG-1 β (10 μg/kg) 组 :纤维化明显, 内有较多毛细血管增生 ;E :rhNRG-1 β (5 μg/kg) 组 :片状纤维化, 可见毛细血管增生。

[0057] 图 18. ADM 导致 SD 大鼠中毒性心肌炎心肌病理切片。A. 对照组心肌病理评分 0 分, 心肌细胞无萎缩及肥大, 无空泡, 横纹清晰, 心肌排列整齐, 心内膜、心外膜均无异常, 血管和间质无变化。B. 模型组心肌病理评分 3 分, 心肌大面积坏死溶解。

[0058] 图 19. rhNRG-1 β 对模型组动物存活率的影响。

[0059] 图 20. rhNRG-1 β 对模型组动物心肌结构的影响。

[0060] 图 21. rhNRG-1 β 对病毒感染导致小鼠心肌损伤治疗作用的病理切片。A. 正常组 ; B. 模型组 ;C. 安慰剂 ;D. 高剂量组 ;E. 中剂量组 ;F. 低剂量组。

[0061] 图 22. rhNRG-1 β 对病毒感染导致小鼠心肌损伤治疗作用的病理切片。A. 正常组 ; B. 模型组 ;C. 安慰剂 ;D. 高剂量组 ;E. 中剂量组 ;F. 低剂量组。

[0062] 图 23. rhNRG-1 β 不同用药天数对病毒感染导致小鼠心肌损伤治疗作用的病理切片。A. 正常组 ;B. 模型组 ;C. 用药 3 天 ;D. 用药 5 天 ;E. 用药 7 天。

[0063] 图 24. rhNRG-1 β 不同用药天数对病毒感染导致小鼠心肌损伤治疗作用的病理切片。A. 正常组 ;B. 模型组 ;C. 用药 3 天 ;D. 用药 5 天 ;E. 用药 7 天。

具体实施方式

[0064] 为清楚公开发明内容而不是限制发明, 分以下小节详细说明。

[0065] A. 释义

[0066] 除另有定义, 这里使用的所有科技术语与本发明所属技术领域的普通技术人员理解含义相同。所有专利文献、专利申请文献、公开的专利文献和其它出版物均作为参考。如本节阐述的定义与上述参考文献所述的定义不一致或相反时, 以本节阐述的定义为准。

[0067] 在此所用“一个”的意思是“至少一个”或“一个或多于一个”。

[0068] 在此所用“神经调节蛋白”(neuregulin)是包括可以激活 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异源二聚体蛋白激酶的蛋白或多肽,例如神经调节蛋白异构体,神经调节蛋白 EGF 结构域,神经调节蛋白突变体以及可以激活上述受体的任何神经调节蛋白样基因产物。典型的神经调节蛋白的片段是具有和受体结合部位如包括 EGF 结构域的人神经调节蛋白 β 2 片断,它能激活 EGF 受体家族的 Erb 受体,并调控多种生物反应:如刺激乳腺癌细胞分化和乳蛋白分泌;诱导神经脊细胞分化为 Schwann 细胞;刺激骨骼肌细胞内乙酰胆碱受体的合成;以及促进心肌细胞存活和 DNA 合成。神经调节蛋白也包括替代保守氨基酸,但对抗病毒性心肌炎、抗 DCM、抗心脏毒性或抗心肌梗死的作用不变的神经调节蛋白变异体。合适的替代保守氨基酸是本领域的普通技术,在多肽的非功能区域的个别氨基酸的改变对其功能无影响在本领域已是共识(see, e.g., Watson 等. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p. 224)。常见神经调节蛋白包括神经调节蛋白和多肽,神经调节蛋白核酸包括神经调节蛋白核酸和多聚核酸。

[0069] 在此所用“上皮生长因子样结构域”或“EGF 样结构域”是指由神经调节蛋白基因编码的结构域多肽,结合并激活 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或由它们组成的二聚体。具有与 EGF 受体结合区域相同结构域参见 WO 00/64400, Holmes 等, Science, 256: 1205-1210(1992); U. S. Patent Nos. 5,530,109 and 5,716,930; Hijazi 等, Int. J. Oncol., 13:1061-1067(1998); Chang 等, Nature, 387:509-512(1997); Carraway 等, Nature, 387:512-516(1997); Higashiyama 等, J. Biochem., 122:675-680(1997); 及 WO 97/09425。

[0070] 在此所用神经调节蛋白“功能衍生物或功能片段”是指神经调节蛋白的衍生物或功能片段或编码这些衍生物或功能片段核酸,这些衍生物或功能片段对抗病毒性心肌炎、抗 DCM、抗心脏毒性或抗心肌梗死的作用不变。通常,这些衍生物或功能片段至少保留 50% 预防、治疗或延缓抗病毒性心肌炎、抗 DCM、抗心脏毒性或抗心肌梗死的作用。更好的情况下,这些衍生物或功能片段至少保留 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 或 100% 抗病毒性心肌炎、抗 DCM、抗心脏毒性或抗心肌梗死的作用。

[0071] 在此所用“提高神经调节蛋白产量的物质”是指可以提高神经调节蛋白基因的转录、翻译作用的物质,或提高神经调节蛋白基因翻译后修饰作用的物质和(或)提高 NRG 前体细胞通讯的物质,或提高神经调节蛋白半衰期的物质。

[0072] 在此所用“提高神经调节蛋白功能的物质”是指可以或提高神经调节蛋白在抗病毒性心肌炎、抗 DCM、抗心脏毒性或抗心肌梗死的作用,或提高神经调节蛋白在抗病毒性心肌炎、抗 DCM、抗心脏毒性或抗心肌梗死的作用的信号传导途径中配体灵敏度的物质,或降低神经调节蛋白拮抗剂作用的物质,但不包括神经调节蛋白及其编码神经调节蛋白的核酸。

[0073] 在此所用“混合物”是指两种或两种以上物质。

[0074] 在此所用“组合物”是指两种或两种以上的物质或化合物组成。可以是溶液、悬浮剂、液体、粉剂、药膏、水溶剂、非水溶剂或它们的混合

[0075] 在此所用“erb”指两种癌基因, erb A 和 erb B, 与骨髓成红血细胞增多症病毒相关(一种急性的转化性逆转录病毒)。

[0076] 在此所用“用于治疗特定疾病的化合物有效用量”是指足以改善或以某种方式减少与该疾病相关症状的用量。该用量可为单一剂量或根据疗程确定的有效剂量。该用量可

以治愈疾病,但通常是减轻病情。为减轻病情,可能需要连续服用。

[0077] 在此所用“心力衰竭”是指心功能异常,表现为心脏不能以组织代谢所需的速度供血。心力衰竭包括范围广泛的疾病状态如充血性心力衰竭、心肌梗死、快速心律不齐、家族性肥大心肌病、缺血性心脏病、自发扩张型心肌病、心肌炎。许多因素可导致心力衰竭包括缺血性、先天性、风湿性或自发性。慢性心肌肥大是充血性心力衰竭和心脏停止跳动前的明显的疾病状态。

[0078] 在此所用“重组方法生产”是指用重组核酸方法的生产方法。本方法是以众所周知的克隆核酸表达其所编码蛋白质的分子生物学方法。

[0079] 在此所用“互补的”当是指两个核酸分子的核苷酸序列能杂交,优选是低于 25%,更优选是低于 15%,更加优选是低于 5%,最优选是在相对核苷酸处不存在错误配对。优选在严格条件下,这两个分子杂交。

[0080] 在此所用决定错误配对百分率的“杂交的严格性”规定如下:

[0081] 1) 高严格性:0.1x SSPE,0.1% SDS,65°C;

[0082] 2) 中等严格性:0.2x SSPE,0.1% SDS,50°C;(也指适度严格性)

[0083] 3) 低严格性:1.0x SSPE,0.1% SDS,50°C;

[0084] 应理解为使用对等的缓冲液、盐和温度,可以获得相当的严格性。

[0085] 在此所用“载体(或质粒)”是指用于将外源 DNA 导入细胞进行表达或复制的不连续元件。本领域技术人员熟知选择及使用这些载体的技术。表达载体包括 DNA 表达载体,该载体有效与调控序列,例如启动子区域连接在一起调控该 DNA 片段的表达。所以,一个表达载体是指重组 DNA 或 RNA 构建物,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其它载体,当它们导入适当的宿主细胞中,可使克隆的 DNA 表达。本领域技术人员清楚适当的表达载体、能在真核细胞和(或)原核细胞中复制的载体以及保持游离态或整合进宿主细胞基因组的载体。

[0086] 在此所用“启动子区域或启动子元件”是指调控 DNA 或 RNA 转录并与其有效连接的 DNA 片段或 RNA 片段。启动子区域是 RNA 聚合酶识别、结合和转录起始的特定序列,这部分启动子区域特指启动子。同时,启动子区域还包括调控 RNA 聚合酶识别、结合和转录起始活动的序列。这些序列可以对顺式作用因子或对反式作用因子作出响应。根据调控性质,启动子可以是组成型或调控型。用于原核生物典型的启动子包括噬菌体 T7 和 T3 启动子和类似的启动子。

[0087] 在此所用“有效连接和有效结合”是具有调控和效应功能的 DNA,如启动子、增强子、转录和翻译终止位点及其它信号序列的核苷酸序列与功能的关系。例如,DNA 和启动子的有效连接是指 DNA 和启动子间结构和功能的关系,RNA 聚合酶能专一识别启动子、结合和转录该段 DNA,并从启动子开始该段 DNA 转录。为优化表达和(或)体外转录,有必要去掉、增加或改变克隆的 5' 不翻译部分,以消除多余、潜在不适当的替代性翻译(如起始)密码子或其它不论是在转录或翻译水平上干扰或减少表达的序列。而其它方法包括将核糖体结合位点共有序列紧接起始密码子的 5' 插入,可增强表达(参见, Kozak. 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)1991;266:19867-19870)。这一纠正的愿望(或需要)可由经验来决定。

[0088] 在此,通过服用特定的药物组合物治疗达到特定不适的症状“改善”是指任何的减轻,不管是永久还是暂时,持续还是短暂,可归于或与服用药物组合物有关系。

[0089] 在此所用“治疗药物”的意思是使任何传统的药物或本领域技术人员所知的治疗

药物,包括但不限于预防性或化疗药物。

[0090] 在此所用“治疗有效用量”是指足以改善或以某种方式减少与疾病相关症状的用量。该用量可为单一剂量或根据疗程确定的有效剂量。为减轻病情,可能需要连续服用。

[0091] 在此所用“使用”是指对治疗目标以任何方式使用药物。

[0092] 在此所用“治疗”的意思是使任何临床症状、不适或疾病的症状得到改善或有益改变的方法。治疗也包括任何药物组合物的应用。改善特定不适的症状是指任何的减轻,不管是永久还是暂时,可归于或与服用药物组合物有关系

[0093] 在此所用“肿瘤”是指不正常的新生长,包括良性和恶性肿瘤。不同于增生,在没有原有刺激后,肿瘤仍会继续增殖。

[0094] 在此所用“抗肿瘤药剂”是指任何可用于用于预防肿瘤、癌症发生或减轻肿瘤、癌症严重程度的任何药剂。抗肿瘤药剂包括,如抗血管生成剂、烷化剂、抗代谢剂、天然产品、铂配位络合物、蒽二酮、取代尿素、甲胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素和拮抗剂、癌基因抑制剂、肿瘤抑制基因或蛋白、抗肿瘤基因抗体、抗肿瘤基因反义寡聚核苷酸。

[0095] 在此所用“抗精神病药物”是指治疗精神病的药物。抗精神病药物可以是但不限于三环吩噻嗪、噻吨、二苯西平、苯丁酮类、杂环族化合物、实验用苯甲酰胺。

[0096] 在此所用“三环类抗抑郁病药物”是指治疗抗抑郁病的药物。三环类抗抑郁病药物可以是但不限于抑制神经末梢吸收去甲肾上腺素及 5-羟色胺、在大脑促进产生去甲肾上腺素功能。

[0097] 在此所用“抗感染药物”是指治疗感染的药物。抗感染药物可以是但不限于抗寄生虫感染、细菌性感染、微生物的感染。

[0098] 在此所用“安全剂量”是用于足以预防、治疗或延缓哺乳动物疾病,但不引起副作用发生及不良反应的药物剂量。

[0099] 在此所用“心肌梗死”是冠状动脉闭塞,血流中断,使部分心肌因严重的持久性缺血而发生局部坏死。

[0100] B. 预防、治疗或延缓病毒性心肌炎、扩张性(充血性)心肌病方法

[0101] 本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物病毒性心肌炎、扩张型心肌病方法,该方法包括对需要或希望预防、治疗或延缓的哺乳动物尤其是人类施用有效量的神经调节蛋白或其功能片段、或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质,从而预防、治疗或延缓病毒性心肌炎、扩张型心肌病。

[0102] 本发明的方法能用于任何哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔子、猫、狗、猪、奶牛、牛、绵羊、山羊、马、猴子和其它非人灵长类动物预防、治疗或延缓哺乳动物病毒性心肌炎、扩张型心肌病。优选地,本发明的方法用于人类预防、治疗或延缓哺乳动物病毒性心肌炎、扩张型心肌病。

[0103] 任何适当的神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸能用于本方法中。在特定的实施方案中,神经调节蛋白通过与 ErbB2-ErbB4 受体结合,产生抗病毒性心肌炎、扩张型心肌病的作用。在另一特定的实施方案中,其中神经调节蛋白可以选自神经调节蛋白 1、神经调节蛋白 2、神经调节蛋白 3 或神经调节蛋白 4。神经调节蛋白 1 的同义词包括 heregulin, GGF2 及 p185erbB2 的配体,参见 WO 00/64400、U. S. Patent Nos. 5, 530, 109、5, 716, 930。神经调节蛋白 $\alpha 2$ 或神经调节蛋白 $\beta 2$ 均可用于本方法。优

选地, 包含有 SEQID :4 的氨基酸序列神经调节蛋白 β 2 片段, 用于本方法。

[0104] 在其他的实例方案中, 在下述专利、专利申请和 GenBank 中的神经调节蛋白或其功能片段可用于本方法中。如, 美国专利 6, 252, 051、6, 121, 415 (NRG3); 6, 087, 323 (神经调节蛋白与 p185erbB2, p185erbB3 或 p185erbB4 结合活性); 6, 033, 906 (神经调节蛋白作为选自 p185erbB2 和 p180erbB4 受体的配体); US2002002276 (嵌合型 ErbB 异源多聚体作为神经调节蛋白竞争性拮抗剂或拮抗剂); W001/81540 (NRG-4); W001/64877 (NRG1); W001/64876 (NRG1AG1); W001/58948 (神经调节蛋白- β); W001/26607 (SMDF 和 GGF 神经调节蛋白拼接变异体); W000/70322 (CRD-神经调节蛋白); W000/64400; W099/18976; W098/02540 (嵌合型 ErbB 异源多聚体作为神经调节蛋白竞争性拮抗剂或拮抗剂); W096/30403; W096/15812; BC017568 (人, 类似神经调节蛋白-4); BC007675 (人, 神经调节蛋白-1); AF142632 (*Xenopus laevis*, 富含半胱氨酸结构域的神经调节蛋白-1); AF194439 (*Rattus norvegicus* SMDF 神经调节蛋白 α 2a (Nrg1)); AF194438 (*Rattus norvegicus* SMDF 神经调节蛋白- β 1a (Nrg1)); HS2NRG12 (*Homo sapiens* 可选择拼接神经调节蛋白 2 (NRG2)); HS2NRG08 (*Homo sapiens* 可选择拼接神经调节蛋白 2 (NRG2)); HS2NRG07 (*Homo sapiens* 可选择拼接神经调节蛋白 2 (NRG2)); AF083067 (*Mus musculus* 神经调节蛋白-4 短同源体 (Nrg4)); AF076618 (*Xenopus laevis* 神经调节蛋白 α -1); AF045656 (*Gallus gallus* 神经调节蛋白- β -2b); AF045655 (*Gallus gallus* 神经调节蛋白- β -2a); AF045654 (*Gallus gallus* 神经调节蛋白- β -1a); MAU96612 (*Mesocricetus auratus* 神经调节蛋白); AF010130 (*Mus musculus* 神经调节蛋白-3 (NRG3))。公开的神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸, 用于本方法中。优选地, GenBank Accession No. NT_007995 (gi :18570363) 公开神经调节蛋白, 用于本方法中。

[0105] 本发明提供了预防、治疗或延缓任何病毒性心肌炎的方法。例如, 柯萨奇 A 及 B 组病毒, 埃柯病毒, 脊髓灰质炎病毒等。优选, 本发明的方法用于预防、治疗或延缓柯萨奇 B 组 (Coxsackie) 病毒。

[0106] 本发明提供了预防、治疗或延缓病毒性心肌炎的临床症状的方法。例如, 心包或心内膜炎症可以得到预防、治疗或延缓。还包括如心肌损伤、心功能障碍、心律失常、周身症状、心肌病等临床症状可得到预防、治疗或延缓。本发明提供了预防、治疗或延缓急性或慢性病毒性心肌炎的方法。优选, 本发明提供了预防、治疗或延缓急性病毒性心肌炎导致心律失常、心力衰竭、心源性休克的方法。本发明提供了预防、治疗或延缓病毒性心肌炎导致心脏肥大, 永久性心肌损害的方法。

[0107] 本发明提供了预防、治疗或延缓 DCM 的各种临床症状的方法。例如, 心室肥大、心肌泵功能障碍或充血性心力衰竭等临床症状可得到预防、治疗或延缓。

[0108] 神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可单独使用, 可选择神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸与其它药剂、载体或赋形剂联合使用。

[0109] 神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可在哺乳动物体内直接使用, 可选择神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可在哺乳动物体外使用, 如可针对细胞、组织、器官或在细胞、组织、器官使用

神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸后转染哺乳动物。

[0110] 在一些实例方案中,可使用神经调节蛋白或其功能片段。在另一些实例方案中,可使用编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸。

[0111] 神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可单独使用,可选择神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸与其它预防、治疗病毒性心肌炎、扩张型心肌病的药物联合使用。神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可在其它预防、治疗病毒性心肌炎、扩张型心肌病的药物之前、同时、之后用。

[0112] 任何合适的预防、治疗病毒性心肌炎药物可用于本方法中。如预防、治疗病毒性心肌炎、药物包括抗生素如青霉素、心肌保护剂如牛磺酸、抗氧化剂如维生素 C、维生素 E、辅酶 Q₁₀ 以及营养心肌的药物如能量合剂。

[0113] 任何合适的预防、治疗 DCM 药物可用于本方法中。如预防、治疗 DCM 的药物强心剂如地戈辛、西地兰,利尿剂 (Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (9th Ed.), McGraw-Hill (1996) pp683-713), 如碳酸酐酶抑制剂、袢利尿剂、排钾利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪类盐皮质激素受体的拮抗剂等治疗外, ACEI、钙离子拮抗剂如阿罗地平和 β -受体阻滞剂如卡维地洛可用于本方法中。

[0114] C. 预防、治疗或延缓病毒性心肌炎、扩张性(充血性)心肌病的药物有效成分、试剂盒和组合物。

[0115] 一方面,本发明涉及预防、治疗或延缓哺乳动物病毒性心肌炎、扩张性(充血性)心肌病的组合物,该组合物包括有效量的神经调节蛋白或其功能片段,或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质。

[0116] 在 B 小节中所述的任何合适的神经调节蛋白或其功能片段,或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸可用于本发明的药物组合物中。在特定的实施方案中,神经调节蛋白通过与 ErbB2-ErbB4 受体结合,产生抗病毒性心肌炎、扩张型心肌病的作用。在另一特定的实施方案中,其中神经调节蛋白可以选自神经调节蛋白 1、神经调节蛋白 2、神经调节蛋白 3 或神经调节蛋白 4。神经调节蛋白 1 包括 heregulin, GGF2 及 p185erbB2 的配体,参见 . WO 00/64400、U. S. Patent Nos. 5, 530, 109、5, 716, 930. 神经调节蛋白 α 2 或神经调节蛋白 β 2 均可用于本方法。优选,包含有 SEQ ID :4 的氨基酸序列神经调节蛋白 β 2 片段,用于本组合物中。

[0117] 神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或功能片段的核酸可以任何合适的剂量。例如,神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸剂量可以从 25 μ g 到 2500 μ g。

[0118] 另一方面,本发明还提供一种试剂盒。该试剂盒包括置于容器中上述的药物组合物及用于预防、治疗或延缓病毒性心肌炎、扩张性(充血性)心肌病的该组合物使用说明书。

[0119] 另一方面,本发明包括一种组合物,该组合物包括神经调节蛋白或其功能片段、或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质以及有效量的预防或治疗病毒性心肌炎或 DCM 的药物组成。

[0120] 在 B 小节中所述的任何合适的神经调节蛋白或其功能片段,或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸可用于本发明的药物组合物中。在特定的实施方案中,神经调节蛋白通过与 ErbB2-ErbB4 受体结合,产生抗病毒性心肌炎、扩张型心肌病的作用。在另一特定的实施方案中,其中神经调节蛋白可以选自神经调节蛋白 1、神经调节蛋白 2、神经调节蛋白 3 或神经调节蛋白 4。神经调节蛋白 1 同义词包括 heregulin, GGF2 及 p185erbB2 的配体,参见 .WO 00/64400、U. S. PatentNos. 5, 530, 109、5, 716, 930. 神经调节蛋白 α 2 或神经调节蛋白 β 2 均可用于本方法。优选,神经调节蛋白 β 2 片段,包含有 SEQ ID :4 的氨基酸序列用于本组合物中。

[0121] 任何合适的预防、治疗病毒性心肌炎药物可用于本方法中。如预防、治疗病毒性心肌炎、药物包括抗生素如青霉素、心肌保护剂如牛磺酸、抗氧化剂如维生素 C、维生素 E、辅酶 Q₁₀ 等以及营养心肌的药物如能量合剂。

[0122] 任何合适的预防、治疗 DCM 药物可用于本方法中。如预防、治疗 DCM 的药物强心剂如地戈辛、西地兰,利尿剂 (Goodman 和 Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (9th Ed.), McGraw-Hill (1996) pp683-713), 如碳酸酐酶抑制剂、袢利尿剂、排钾利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪类、盐皮质激素受体的拮抗剂, ACEI、钙离子拮抗剂如阿罗地平和 β -受体阻滞剂如卡维地洛可用于本方法中。

[0123] 本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包括放置在容器的上述组合物和使用上述组合物预防、治疗或延缓病毒性心肌炎、扩张性(充血性)心肌病说明书。

[0124] D. 预防、治疗或延缓心脏毒性的方法

[0125] 神经调节蛋白可以促进心肌细胞的分化,增强肌原纤维节和细胞骨架的组合与细胞间的粘合(W000/37095)。神经调节蛋白可适用于探测,诊断与治疗心脏病。在本发明提供的方法中,神经调节蛋白可作为心肌保护剂预防、治疗或延缓因治疗或预防性药物导致心脏毒性的方法。

[0126] 本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物心脏毒性方法,该方法包括对需要或希望预防、治疗或延缓的哺乳动物在体内施用有效量的预防、治疗的药物和有效量的 (i) 神经调节蛋白、或其功能片段;(ii) 编码该蛋白或功能片段的核酸;(iii) 提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质,心脏毒性是使用预防或治疗性药物导致的。本发明的方法能用于任何哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔子、猫、狗、猪、奶牛、牛、绵羊、山羊、马、猴子和其它非人的灵长类动物预防、治疗或延缓哺乳动物心脏毒性。优选地,本发明的方法用于人类预防、治疗或延缓哺乳动物的心脏毒性。

[0127] 1. 神经调节蛋白

[0128] 任何合适的神经调节蛋白或其功能片段,或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸可用于本发明的方法中。在一些的实施例,本发明使用神经调节蛋白的片段是具有和受体结合部位如包括 EGF 结构域的人神经调节蛋白 β 2 片断,它能激活 EGF 受体家族的 ErbB 受体,并调控多种生物反应(如刺激乳腺癌细胞分化和乳蛋白分泌;诱导神经脊细胞分化为 Schwann 细胞;刺激骨骼肌细胞内乙酰胆碱受体的合成;以及促进心肌细胞存活和 DNA 合成)。神经调节蛋白或其功能片段,或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸可以本领域技术人员已知的合适的方式产生,包括但不限于重组技术、化学合成或两者结合产生。优选,神经调节蛋白或其功能片段,或编码该神经调节蛋白或其功能片段的核酸通过重组

技术产生 (see e. g., Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, page 224, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 1987)。

[0129] 替代保守氨基酸的神经调节蛋白,但对抗心脏毒性的作用不变的神经调节蛋白变异体可用于本发明的方法中。在本领域已是共识,在多肽的非功能区域的个别氨基酸的改变对其功能无影响 (see, e. g., Watson 等. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224)。

[0130] 编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸能以裸露 DNA、复合 DNA、cDNA、质粒 DNA、RNA 或其它混合物形式作为基因转移系统的成分使用。在另一实施方案中,编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸包含于病毒载体中。任何适合于基因治疗的病毒载体能联合使用。例如,腺病毒载体 (美国专利 No. 5, 869, 305)、猴病毒载体 (美国专利 No. 5, 962, 274)、条件复制型人免疫缺陷型病毒载体 (美国专利 No. 5, 888, 767)、反转录病毒、猿猴病毒 -40、单纯性疱疹病毒扩增子载体和牛痘病毒载体。而且,这些基因能转入非病毒载体系统,例如脂质体,脂质在凝聚过程中保护 DNA 或其它生物物质不受氧化。

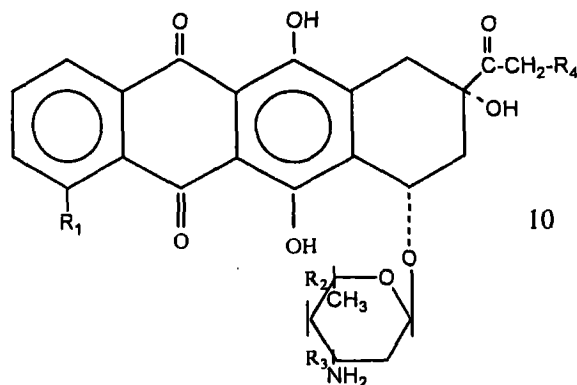
[0131] 在实施方案中,神经调节蛋白通过与 ErbB2-ErbB4 受体结合,产生抗心脏毒性的作用。在另一特定的实施方案中,其中神经调节蛋白可以选自神经调节蛋白 1、神经调节蛋白 2、神经调节蛋白 3 或神经调节蛋白 4。神经调节蛋白 1 包括 heregulin, GGF2 及 p185erbB2 的配体,参见 WO 00/64400、U. S. Patent Nos. 5, 530, 109、5, 716, 930。神经调节蛋白 α 2 或神经调节蛋白 β 2 均可用于本方法。优选,包含有 SEQ ID :4 的氨基酸序列神经调节蛋白 β 2 片段,用于本方法中。

[0132] 在其他的实例方案中,在下述专利、专利申请和 GenBank 中的神经调节蛋白或其功能片段可用于本方法中。如,美国专利 6, 252, 051、6, 121, 415 (NRG3); 6, 087, 323 (神经调节蛋白与 p185erbB2, p185erbB3 或 p185erbB4 结合活性); 6, 033, 906 (神经调节蛋白作为选自 p185erbB2 和 p180erbB4 受体的配体); US2002002276 (嵌合型 ErbB 异源多聚体作为神经调节蛋白竞争性拮抗剂或拮抗剂); W001/81540 (NRG-4); W001/64877 (NRG1); W001/64876 (NRG1AG1); W001/58948 (神经调节蛋白 - β); W001/26607 (SMDF 和 GGF 神经调节蛋白拼接变异体); W000/70322 (CRD-神经调节蛋白); W000/64400; W099/18976; W098/02540 (嵌合型 ErbB 异源多聚体作为神经调节蛋白竞争性拮抗剂或拮抗剂); W096/30403; W096/15812; BC017568 (人, 类似神经调节蛋白 -4); BC007675 (人, 神经调节蛋白 -1); AF142632 (*Xenopus laevis*, 富含半胱氨酸结构域的神经调节蛋白 -1); AF194439 (*Rattus norvegicus* SMDF 神经调节蛋白 α 2a (Nrg1)); AF194438 (*Rattus norvegicus* SMDF 神经调节蛋白 - β 1a (Nrg1)); HS2NRG12 (*Homo sapiens* 可选择拼接神经调节蛋白 2 (NRG2)); HS2NRG08 (*Homo sapiens* 可选择拼接神经调节蛋白 2 (NRG2)); HS2NRG07 (*Homo sapiens* 可选择拼接神经调节蛋白 2 (NRG2)); AF083067 (*Mus musculus* 神经调节蛋白 -4 短同源体 (Nrg4)); AF076618 (*Xenopus laevis* 神经调节蛋白 α -1); AF045656 (*Gallus gallus* 神经调节蛋白 - β -2b); AF045655 (*Gallus gallus* 神经调节蛋白 - β -2a); AF045654 (*Gallus gallus* 神经调节蛋白 - β -1a); MAU96612 (*Mesocricetus auratus* 神经调节蛋白); AF010130 (*Mus musculus* 神经调节蛋白 -3 (NRG3))。公开的神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸,用于本方法中。优选地, GenBank Accession No. NT_007995 (gi :18570363) 公开神经调节蛋白,用于本方法中。

[0133] 2. 预防或治疗药物

[0134] 本发明提供了预防、治疗或延缓因药源性导致的心脏毒性的方法。神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质可在使用预防、治疗性药物之前、同时或之后使用。本发明提供了预防、治疗或延缓预防或治疗药物导致心脏毒性的方法。预防或治疗药物包括但不限于下列如抗精神病药物、三环类抗抑郁病、干扰素、白细胞介素、抗感染药物导致心脏毒性的方法。任何抗肿瘤药物可用于本发明的方法中。优选,抗肿瘤药物具有下列通式的化合物:

[0135]



[0136] R1 为甲氧基或氢, R2, R3 和 R4 为羟基或氢。

[0137] 蒽环类抗肿瘤药包括但不限于下列如 ADM、柔红霉素、表阿霉素、去甲氧柔红霉素、米托蒽醌、丝裂霉素、博来霉素、环磷酰胺、氟脲嘧啶、放线菌素 D、长春新碱及其衍生物(参见 Goodman&Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, pp. 1264-1269, McGraw-Hill 1996)。本发明方法中使用的另一些抗肿瘤药包括包括在美国专利申请号 2002/044919 描述。抗肿瘤药包括但不限于下列如胞嘧啶、阿糖腺苷、柔红霉素、氨甲蝶呤(MTX), 氟嘧啶如 5-氟尿嘧啶(5-FU), 羟基脲、6-巯基嘌呤、植物碱如长春新碱(VCR), VP-16 和长春碱(VLB), 烷基化物、顺铂、氮芥、三胺、甲基苄肼、博来霉素、丝裂霉素 C、放线菌素 D 或酶如 L-天(门)冬酰胺酶(参见 Goodman&Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, pp. 1227-1229)。

[0138] 任何抗精神病药物可用于本发明。抗精神病药物可以是但不限于氯丙嗪、奋乃静、三氟拉嗪。其它抗精神病药物可参见 Goodman&Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, pp. 400-420。

[0139] 任何三环类抗抑郁病药物可用于本发明。三环类抗抑郁病药物可以是但不限于氯丙咪嗪, 阿米替林, 多虑平。其它三环类抗抑郁病药物可参见 Goodman&Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, pp. 431-434。

[0140] 任何干扰素优选干扰素- α 可用于本发明。在一些实施例中, 干扰素是人干扰素- α 。生产干扰素- α 的方法可参见美国专利号 6, 005, 075 ; 5, 834, 235 ; 5, 503, 828 ; 和 4, 820, 638。

[0141] 任何白细胞介素可用于本发明。优选, 如白细胞介素-2 用于本发明。在一些实施例中, 白细胞介素是白细胞介素-2。生产白细胞介素-2 的方法可参见美国专利号 5, 834, 441 ; 5, 795, 777 ; 5, 419, 899 ; and 5, 399, 699。

[0142] 任何抗感染药物可用于本发明。优选, 抗感染药物是吐根碱。其它抗感染药物可

参见 Goodman&Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, pp. 965-1008。

[0143] 神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可在哺乳动物体内直接使用, 可选择神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可在哺乳动物体外使用, 如可针对细胞、组织、器官或在细胞、组织、器官使用神经调节蛋白或其功能片段, 或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸后转染哺乳动物。

[0144] E. 治疗心肌梗死

[0145] 一方面, 本发明一种组合物, 该组合物包括有效量的神经调节蛋白或其功能片段, 或编码该蛋白或功能片段的核酸, 或提高上述神经调节蛋白产量和 (或) 功能的物质以及有效量的预防或治疗心肌梗死的药物。优选, 该组合物还包括药物学上可接受的载体或赋形剂。

[0146] 任何适当的神经调节蛋白能用于本组合物。在特定的实施方案中, 神经调节蛋白通过与 ErbB2-ErbB4 受体结合, 产生抗心肌梗死的作用。在另一特定的实施方案中, 神经调节蛋白可以选自神经调节蛋白 1、神经调节蛋白 2、神经调节蛋白 3 或神经调节蛋白 4。优选, 神经调节蛋白 $\alpha 2$ 或神经调节蛋白 $\beta 2$ 均可用于本组合物。在另一实施例中, 包含有 SEQ ID :4 的氨基酸序列的神经调节蛋白 $\beta 2$ 片段, 用于本组合物。上述小节描述的神经调节蛋白可用于本组合物。

[0147] 任何适当的预防、治疗心肌梗死药物能用于该组合物中。例如, 预防、治疗心肌梗死的药物可以是 ACEI、钙离子拮抗剂、 β 阻滞剂、阿斯匹林、阿托品、硝化甘油、东莨菪碱及溶血栓药。

[0148] 可以用任何适当的 ACEI, 如卡托普利、雷米普利、福辛普利、赖诺普利、依那普利或喹那普利等。可以用任何适当的钙离子拮抗剂如地尔硫草。可以用任何适当 β 阻滞剂如阿替洛尔、美托洛尔、普萘洛尔或塞吗洛尔等。可以用任何适当的溶血栓药如链激酶、组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA)、阿尼链菌酶。

[0149] 另一方面, 本发明提供一种试剂盒, 该试剂盒包括置于容器中的所述的药物组合物及其该组合物用于预防、治疗和延缓心肌梗死使用说明。

[0150] 另一方面, 本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物心肌梗死方法, 该方法包括对需要或希望预防、治疗或延缓的哺乳动物尤其是人类施用有效量的神经调节蛋白、或其功能片段、或编码该蛋白或功能片段的核酸, 或提高上述神经调节蛋白产量和 (或) 功能的物质, 从而预防、治疗或延缓心肌梗死。

[0151] 可以用任何适当的神经调节蛋白。例如, 神经调节蛋白通过与 ErbB2-ErbB4 受体结合, 产生抗心肌梗死的作用。在另一特定的实施方案中, 其中神经调节蛋白可以选自神经调节蛋白 1、神经调节蛋白 2、神经调节蛋白 3 或神经调节蛋白 4。优选, 神经调节蛋白 $\alpha 2$ 或神经调节蛋白 $\beta 2$ 均可用于本方法。优选, 包含有 SEQ ID :4 的氨基酸序列的神经调节蛋白 $\beta 2$ 片段用于本方法中。前述小节描述的神经调节蛋白可用于本方法。

[0152] 在另一实施方案中, 神经调节蛋白或其功能片段, 或编码该蛋白或功能片段的核酸, 或提高上述神经调节蛋白产量和 (或) 功能的物质可拮抗心肌梗死的左心室舒张期最大内径 (LVEDD) 左心室收缩期最小内径 (LVESD) 的增加。在另一特定的实施方案中, 神经

调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或其功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质可拮抗心肌梗死的心室射血分数(EF)降低。

[0153] 本发明的方法能用于任何哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔子、猫、狗、猪、奶牛、牛、绵羊、山羊、马、猴子和其它非人的灵长类动物预防、治疗或延缓哺乳动物心肌梗死。优选地,本发明的方法用于人类预防、治疗或延缓哺乳动物心肌梗死。

[0154] 在本发明中,心肌梗死的临床症状及并发症可以得到预防、治疗或延缓。例如,左心室扩张、收缩功能下降、充盈压增加可以得到预防、治疗或延缓。

[0155] 神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或其功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质可单独使用。优选,神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或其功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质与药学上可接受的载体或赋形剂使用。在另一实施方案中,使用神经调节蛋白或其功能片段。在另一实施方案中,使用编码该蛋白或其功能片段的核酸。任何给药途径可以使用,优选以静脉途径给药。

[0156] 任何适当的可以预防、治疗或延缓心肌梗死药物能用于本发明的方法中。例如,预防、治疗心肌梗死的药物可以是ACEI、钙离子拮抗剂、 β 阻滞剂、阿斯匹林、阿托品、硝化甘油、东莨菪碱及溶血栓药。

[0157] 可以用任何适当的ACEI,如卡托普利、雷米普利、福辛普利、赖诺普利、依那普利或喹那普利等。可以用任何适当的钙离子拮抗剂如地尔硫草。可以用任何适当 β 阻滞剂如阿替洛尔、美托洛尔、普萘洛尔或塞吗洛尔等。可以用任何适当的溶血栓药如链激酶、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、阿尼链菌酶。

[0158] 在优选的实施例,神经调节蛋白或其功能片段,或编码该蛋白或其功能片段的核酸,或提高上述神经调节蛋白产量和(或)功能的物质在体内使用。

[0159] F. 安全剂量范围

[0160] 一方面,本发明提供了一种预防、治疗或延缓哺乳动物疾病的药物组合物,该药物组合物包括神经调节蛋白或其功能片段其a)安全剂量小于170U/kg,或b)有效疗程总剂量小于3600U/kg。

[0161] 本发明的药物组合物可以合适的疗程和(或)给药方案。在一个实施方案中,本发明的药物组合物的用药时间小于21天。在另一个实施方案中,本发明的药物组合物可以连续或非连续。

[0162] 本发明的药物组合物可单独使用。优选,本发明的药物组合物与药学上可接受的载体或赋形剂使用。

[0163] 可以用任何适当的药物组合物。例如,神经调节蛋白通过与ErbB2-ErbB4受体结合,产生抗疾病的作用。在另一特定的实施方案中,其中本发明的药物组合物可以选自神经调节蛋白1、神经调节蛋白2、神经调节蛋白3或神经调节蛋白4。优选,神经调节蛋白 α 2或神经调节蛋白 β 2。在另一特定的实施方案中,包含有SEQ ID:4的氨基酸序列的神经调节蛋白 β 2片段用于本发明的药物组合物中。可用前述小节描述的神经调节蛋白。

[0164] 本发明的方法能用于任何哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔子、猫、狗、猪、奶牛、牛、绵羊、山羊、马、猴子和其它非人的灵长类动物预防、治疗或延缓哺乳动物心肌梗死。优选地,本发明的方法用于人类预防、治疗或延缓哺乳动物疾病。

[0165] 本发明的药物组合物可预防、治疗或延缓哺乳动物疾病。优选地,本发明的药物组合物可预防、治疗或延缓心血管疾病如病毒性心肌炎、DCM、心脏毒性、心肌梗死等。

[0166] 在一优选方案中,本的药物组合物以静脉途径给药。

[0167] 以下为典型的、快速、灵敏、高通量、定量测定 NRG-1 体外生物学活性的方法,采用利用神经调节蛋白与细胞表面 ErbB3/ErbB4 分子结合、间接介导 ErbB2 蛋白磷酸化的特性(参见 Michael D. Sadick et al. *Analytical Biochemistry*, 1996, 235, 207-214)。根据实施例 8. NRG-1 体外活性测定方法,可以确定不同来源的神经调节蛋白的生物学活性大小。

[0168] 通过酶联免疫吸附试验确定激酶受体活化。该方法包括两独立的 96 孔细胞培养板及 Costar 96 孔酶标检测板。其一进行细胞培养,配体激活、细胞裂解/受体溶液,另一进行受体破获及磷酸化。本检测以乳腺癌 MCF-7 细胞,分析 heregulin 诱导 ErbB2 活性。膜蛋白溶解在 Triton-X 100 细胞裂解液,受体用与 ErbB3 和 ErbB4 无交叉反应的抗 ErbB2 抗体包被在 ELISA 孔。ELISA 抗磷酸化水平确定受体磷酸化。HER2/neu 基因编码一具有酪氨酸蛋白激酶活性的穿膜蛋白 p185,常与 ErbB3 或 ErbB4 形成异源二聚体,通过 ErbB3 或 ErbB4 与相应配体 (Neuregulin-1) 的结合,激活 HER2 编码的酪氨酸蛋白激酶,介导功能信号的传递。利用神经调节蛋白能与细胞表面 ErbB3/ErbB4 分子结合、间接介导 ErbB2 蛋白磷酸化的特性,建立快速、灵敏、高通量、定量测定重组人神经调节蛋白体外生物学活性的方法。

[0169] 由于基因工程药物多为蛋白质、多肽,其活性由产品的氨基酸序列或空间结构所形成的活性中心所决定。蛋白质、多肽的活性效价和其绝对质量不一致,所以不能按化学药品用重量单位决定。而基因工程药物生物学活性与药效学基本一致,用特定的生物学活性建立特定的测定效价体系,定出其效价单位,因此,生物学活性测定是测量生物活性物质效价的过程,是基因工程产品质量控制的重要组成部分,也是保证产品药效的重要手段。为了准确控制基因工程产品质量标准,保证临床用药,制定生物学活性标准至为重要。

[0170] 本发明中能诱导 50% 最大反应的标准品的量在这里定义为一个活力单位 (1U),这样,使不同批次的制品用统一的标准校正。

[0171] G. 剂型、剂量以及给药途径

[0172] 神经调节蛋白或其功能片段,或编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸使用配方、剂量和给药途径,尤其作为药物组合物时,可根据本技术领域所知的方法加以确定。可根据本技术领域普通技术人员所知的方法确定(参见:Alfonso R. Gennaro, *雷明顿药剂学科学与实践* (Remington: The Science and Practice of Pharmacy), Mack 出版社,1997 年 4 月;Banga, *治疗用多肽和蛋白的配方、加工和传递系统* (Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems), 1999;Hovgaard 和 Frkj, *肽和蛋白制药配方的发展* (Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins), Taylor&Francis 公司,2000;Lasic 和 Papahadjopoulos, *脂质体的医学应用* (Medical Applications of Liposomes), Elsevier Science, 1998;Jain, *基因治疗教程* (Textbook of Gene Therapy), Hogrefe&Huber 出版社,1998;Seth, *腺病毒:基因治疗的基本生物学* (Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy), 15 卷, Landes Bioscience, 1999;Wu-Pong 和 Rojanasakul, *生物制药的药物设计和发展* (Biopharmaceutical Drug Design and Development), Humana 出版社,1999;治疗学上的血管发生:Dole 等, *从基础科学到临床* (Therapeutic Angiogenesis: From Basic Science to the Clinic), 28 卷,

Springer-Verlag New York, 1999)。神经调节蛋白或其功能片段,或编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可配制成用于口服,直肠给药,局部用药,吸入用药,口腔用药(例如舌下),注射用药(例如,皮下、肌肉、皮内、静脉用药),经皮或其他适合的给药途径。在任何给定的情况下,最合适的给药途径取决于要治疗性质和严重程度以及所用的特定神经调节蛋白或其功能片段,或编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸的性质。

[0173] 神经调节蛋白或其功能片段,或编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸,可单独使用,选择和优选方式,神经调节蛋白或其功能片段,或编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸与药物治疗上可接受的载体或者赋形剂共同使用。任何合适的药物治疗可以接受的载体或者赋形剂能用于本方法中(参见, Alfonso R. Gennaro, 雷明顿药剂学科学与实践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy), Mack 出版社, 1997 年 4 月)。

[0174] 编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸能以裸露 DNA、复合 DNA、cDNA、质粒 DNA、RNA 或其它混合物形式作为基因转移系统的成分使用。在另一实施方案中,编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸包含于病毒载体中。任何适合于基因治疗的病毒载体能联合使用。例如,腺病毒载体(美国专利 No. 5, 869, 305)、猴病毒载体(美国专利 No. 5, 962, 274)、条件复制型人免疫缺陷型病毒载体(美国专利 No. 5, 888, 767)、反转录病毒、猿猴病毒-40、单纯性疱疹病毒扩增子载体和牛痘病毒载体。而且,这些基因能转入非病毒载体系统,例如脂质体,脂质在凝聚过程中保护 DNA 或其它生物物质不受氧化。

[0175] 根据本发明,神经调节蛋白或其功能片段,或者编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸,无论单独或与其它药剂、载体或赋形剂联合使用可以任何给药途径,诸如海绵体内注射、皮下注射、静脉注射、肌肉注射、皮内注射、口服或局部用药。本方法可以单位剂量、一次用量针剂或备有防腐剂容器的多剂量使用。该配方可以采用悬浊液,溶液或油质或水质赋形剂的乳浊液形式,并且可包含悬浮剂、稳定剂和(或)分散剂。例如,活性成分也可能是粉状,在使用前与适合的载体、无菌不含热源的水或其他溶剂混合。本发明的局部用药可以采用泡沫状物、凝胶体、霜、药膏、透皮药膏或软膏。

[0176] 用于本发明的药物学上可接受的组合物和方法包括但不限于美国专利 Nos. 5, 736, 154、6, 197, 801 B1、5, 741, 511、5, 886, 039、5, 941, 868、6, 258, 374 B1 和 5, 686, 102 中。

[0177] 用于治疗、预防的药物剂量大小将随治疗疾病的严重程度和给药途径变化。剂量和剂量频率也将根据病人年龄、体重、状况和反应相适应。

[0178] 主治医生应当知道怎样和何时由于药物毒性或副作用终止、中断或将治疗调整到低剂量。相反,医生应当知道怎样和何时由于临床作用不足(排除毒性副效应)将治疗调整到高水平。

[0179] 任何适合的给药途径可以使用。剂型包括片剂、锭剂、扁囊剂、分散剂、悬浊液、溶液、胶囊、药膏和类似形态(参考,雷明顿药物治疗科学)。

[0180] 在实际应用时,神经调节蛋白或其功能片段,或编码神经调节蛋白或其功能片段的核酸可单独使用或作为活性成分,根据传统药物混合技术形成紧密混合物与其它药剂联合使用,如 β -环糊精和 2-羟基-丙基- β -环糊精的药物载体或赋形剂。载体根据可能的使用方式,局部或注射用药,采取多种配制形式。在制备用于注射剂的组合物时,例如静脉注射或静脉输液,制药介质可使用水、乙二醇、油、缓冲液、糖、防腐剂、脂质体和其他

本领域技术人员所知的介质。注射组合物的实例包括但不限于,5% w/v 的葡萄糖、生理盐溶液或其他溶液。无论单独或是与其它药剂联合使用,待给药的神经营调蛋白或其功能片段,或编码神经调蛋白或其功能片段的核酸的总剂量可以在瓶含有体积从 1mL 到 2000mL 的静脉注射液中使用。根据所用总剂量,稀释液体积有所变化。

[0181] 本发明还提供了进行本发明治疗方案的试剂盒。该试剂盒包括置于一个或多个容器中的单独或与其它药剂联合使用的药物学上可接受形式的有效量的神经调蛋白或其功能片段,或编码神经调蛋白或其功能片段的核酸。优选的药物形式是与无菌生理盐水,葡萄糖溶液、缓冲液溶液或制药上可以接受的其它无菌液联合使用。可选择方式,该药物组合物可用冻干或干燥方法产生;试剂盒可包括存于一个容器中的药理学上可接受的溶液、优选无菌液,以形成复合物注射溶液。典型的药理学上可接受的溶液是生理盐水和葡萄糖溶液。

[0182] 在另一实施方案中,本发明的试剂盒包含用于注射组合物的无菌包装的注射针或注射器和(或)包装的酒精衬垫。适合于医生或病人使用本组合物的指示性说明包含在试剂盒中。

[0183] H. 实施例

[0184] 本发明的研究者发现重组人神经调蛋白(rhNRG-1 β _{S177-Q237})可以修复损伤的心肌细胞的结构,加强心肌细胞之间的连接,改善心肌功能,加强心肌生物学功能。以下研究揭示了发现重组人神经调蛋白(rhNRG-1 β _{S177-Q237})在体内可有效治疗各种心血管疾病如病毒性心肌炎或 DCM、药源性心脏毒性、心肌梗死,同时不影响正常动物血液动力学。

[0185] 实施例 1. 重组神经调蛋白的制备

[0186] 图 1. 人神经调蛋白工程菌株的构建设计方案的技术路线。

[0187] 人神经调蛋白基因定位于染色体 8P12,有 13 个外显子结构。神经调蛋白 β 2 片段由 61 个氨基酸组成,理论分子量为 7055D, SDS-PAGE 电泳表观分子量为 6500-7000D,等电点在 6.5 左右,无糖基化位点,含三个二硫键,适合用大肠杆菌系统进行表达。

[0188] 选用 PET22b 作为表达质粒,导入人神经调蛋白基因后转化大肠杆菌 BL21,经过筛选得到高表达重组人神经调蛋白的工程菌株。

[0189] 图 2. 神经调蛋白基因的扩增。

[0190] 从人 5 个月胚胎脑组织提取总 RNA 和 mRNA,逆转录成 cDNA,以此为模板,进行 RT-PCR 获得目的基因。引物为 P1,TCG AAC ATATGA GCC ATC TTG TAA AAT GTG CGG(SEQ ID NO:1)and P2,TCGAAG GGC CCT CAC TGG TAC AGC TCC TCC(SEQ ID NO:2),取 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳,可见特异的 183bp 大小扩增片段,与设计片段长度相符。泳道 1 是扩增大小为 183bp 的目的片段,泳道 2、3 为 DNA Markers。

[0191] 图 3. PET22b 质粒物理图谱

[0192] 图 4. 重组人神经调蛋白表达质粒的构建。

[0193] 用氯化钙沉淀法将人神经调蛋白基因克隆至 PET22b 表达质粒中,构建成重组人神经调蛋白表达质粒(PET22b-人神经调蛋白),此蛋白在 T7 启动子的驱动下,高效表达。表达基因 N 端从 NdeI 位点插入,C 端有终止子紧接在最后一个氨基酸处,所得蛋白不与任何氨基酸形成融合蛋白。经酶切切出约 183bp 的正确片段。转化子经酶切鉴定后,提取双链 DNA 进行核苷酸序列测定。结果证实,表达载体上的人神经调蛋白序列完全正确。

[0194] 神经调节蛋白 cDNA 的顺序为：

[0195] AGC CAT CTT GTA AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC

[0196] TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT

[0197] TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG

[0198] TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC

[0199] TTC TAC AAG GCG GAG GAG CTG TAC CAG (SEQ ID NO :3)

[0200] 根据上述 cDNA 顺序编码的氨基酸顺序为：

[0201] SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRC

[0202] QNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO :4)

[0203] 图 5. 高效表达工程菌鉴定。

[0204] 取经 PCR 和酶切鉴定的工程菌克隆 (BL21-PET22b- 人神经调节蛋白), 随机挑选一系列单菌落接种于 2ml LB-Amp 液体培养基, 置 37℃、250rpm 培养过夜, 然后按一定比例接种于 20ml LB-Amp 培养液中, 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 达 1.0 时加入 IPTG 诱导 4h, 收集菌体。破菌后收集包涵体, 15% SDS-PAGE 电泳、薄层扫描分析、Western-blotting 鉴定, 经反复筛选获得一株稳定高表达目的蛋白神经调节蛋白的工程菌 (BL21-PET22b- 人神经调节蛋白)。该菌株表达的目的蛋白占菌体总蛋白的 10% 左右。经高压匀浆破菌后, 目的蛋白以包涵体形式存在。工程菌在 IPTG 诱导 4h 后, 菌体经 SDS-PAGE 电泳, 包涵体占菌体总蛋白 20% 左右; 纯化后的重组神经调节蛋白比活性 $> 5 \times 10^3$ EU/mg, 表明神经调节蛋白工程菌株构建成功。在筛选工程菌时进行的 SDS-PAGE、Western Blot、生物学活性测定的基础上, 进行人神经调节蛋白氨基酸组成分析、N- 末端序列分析, 表明所表达的重组人神经调节蛋白氨基酸序列与设计相符。

[0205] 实施例 2. 重组人神经调节蛋白对冠状动脉结扎所致大鼠心力衰竭的治疗作用

[0206] 1 摘要

[0207] 目的研究重组人神经调节蛋白 (rhNRG-1 $\beta_{S177-Q237}$) 对冠状动脉结扎所致大鼠心力衰竭的治疗作用。方法大鼠开胸, 用医用无损伤缝合线, 在左心耳和肺动脉圆锥之间结扎冠状动脉前降支, 建立大鼠心脏亚急性心力衰竭模型。通常在结扎后 6 天左右, 大鼠左心室射血分数下降 50% 左右时, 将模型动物随机分组, 设置模型组、受试药组和假手术组即只开胸, 不结扎冠状动脉组。每组 10 ~ 13 只, 受试药组设置 3 个剂量, 分别为 5、10、20 μ g/kg, 尾静脉注射, 每天一次, 连续 10 天。第 6 天给药前进行心功能 (超声) 检测, 用药结束后再次进行心功能检测, 并解剖试验动物, 称心重、测心室壁厚度, 进行心脏病理学检查以及血浆肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮水平检测等。结果较之模型组动物的射血分数 ($50.2 \pm 8.4\%$) 和缩短分数值 ($22.4 \pm 4.6\%$), 重组人神经调节蛋白 3 个剂量, 连续用药 5 天, 均能升高模型动物的射血分数 ($71.1 \pm 12.0\%$ 、 $64.4 \pm 12.9\%$ 、 $62.9 \pm 8.4\%$) 和缩短分数 ($36.9 \pm 9.7\%$ 、 $32.0 \pm 9.5\%$ 、 $30.3 \pm 6.1\%$), 20 μ g/kg、10 μ g/kg 与模型组比较, 差异有显著性 ($p < 0.01$), 并且 20 μ g/kg 用药组模型动物射血分数的改变可维持用药后 35 天左右 ($p < 0.05$); 20 μ g/kg 重组人神经调节蛋白能明显减小心肌缺血缺氧面积, 增加纤维化病灶区毛细血管数 ($p < 0.05$); 20 μ g/kg、10 μ g/kg 重组人神经调节蛋白能降低模型动物外周血中血管紧张素 I (AI)、血管紧张素 II (AII)、肾素 (PRA)、醛固酮 (ALD) 的水平, 与模型组相比, 差别有显著性 ($p < 0.01$, $p < 0.05$); 连续用药 10 天, 以上各参数与连续用药 5 天

相比,无明显变化 ($p > 0.05$)。结论一定剂量的重组人神经调节蛋白,连续静脉注射 5 天,能有效治疗冠状动脉结扎所致大鼠的心力衰竭。

[0208] 2 试验目的

[0209] 观察重组人神经调节蛋白对冠状动脉结扎所致大鼠心力衰竭的治疗作用。

[0210] 3 受试药物

[0211] 重组人神经调节蛋白,上海泽生科技开发有限公司研制,批号:200110006-2;浓度:500 $\mu\text{g}/\text{支}$;效价测定:5000u/支;纯度: $> 95\%$ (HPLC-C8)。

[0212] 4 实验动物

[0213] 4.1 品系、来源、合格证号:SD 大鼠,由中国科学院上海实验动物中心提供,合格证号:中科院动管会 003 号;

[0214] 4.2 体重、性别:200 ~ 220g,雄性。

[0215] 5 试剂、仪器

[0216] 5.1 心脏超声心动检测仪, Hewlett Packard sonos 5500,探头型号:S12;

[0217] 5.2 六导电生理记录仪, SMUP-C-6 型,上海医科大学生理教研室研制;

[0218] 5.3 精密电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

[0219] 5.4 动静脉留置针,20G,中美合资温州华利医疗器械有限公司生产;

[0220] 5.5 微型游标卡尺,哈尔滨量具刃具厂;

[0221] 5.6 γ 放射免疫计数器,GC-1200,中国科学技术大学科技实业总公司,中佳光电仪器分公司;

[0222] 5.7 肾素、血管紧张素检测试剂盒, AI:北京北方生物技术研究所,批号:0210; AII:北京北方生物技术研究所,批号:0208; ALD:北京北方生物技术研究所,批号:0208;

[0223] 5.8 脱毛剂,8%硫化钠,广东西陇化工厂,批号:010622;

[0224] 5.9 盐酸氯胺酮注射液,上海中西药业股份有限公司,批号:20010401。

[0225] 6 实验方法

[0226] 6.1 实验组别

[0227] 实验设置假手术组、模型组、受试药组。

[0228] 假手术组 ($n = 10$),即开胸,但不结扎冠脉;

[0229] 模型组(阴性对照组) ($n = 12$):即注射制剂配方赋形剂(10mM PB, 0.2%人血清白蛋白,5%甘露醇);

[0230] 受试药组 ($n = 13$):重组人神经调节蛋白组,3个剂量,每个剂量分设2组,一组作为用药后长期观察。

[0231] 6.2 受试药物剂量设置及药物配制、给药途径、给药次数、给药浓度和容积

[0232] 参考受试药预实验结果,设置高、中、低三个剂量组,分别为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。用制剂配方缓冲液(10mM PB, 0.2%人血清白蛋白,5%甘露醇)稀释受试药物至所需浓度;

[0233] 受试药组和模型组给药途径均为大鼠尾静脉注射,每天一次(qd),连续给药5天。第6天给药前行心功能(超声)检测后,再连续给药5天。每次给药容积为 0.4ml/100g 体重。

[0234] 6.3 试验方法

[0235] 6.3.1 大鼠冠状动脉前降支结扎致心力衰竭动物模型的建立

[0236] 大鼠腹腔注射氯胺酮 100mg/kg 麻醉后,仰卧固定于鼠板,颈部及胸部去毛后用新洁尔灭消毒。颈部做正中切口,钝性分离颈前肌肉找到气管,用 18G 动静脉留置针于第 3-5 气管软骨间穿入气管后,退出针芯,将塑料套管推入气管内 1-2cm,固定后以备接小动物呼吸机(潮气量约 20ml,频率 80 次/分钟)。胸部左前皮肤切开后,钝性分离胸部肌肉,暴露第 4、5 肋骨,用弯头纹式止血钳从肋间穿透胸壁,分离肋骨下组织后剪断第 4 肋,接通开启呼吸机,暴露心脏,观察肺充气及心跳情况,撕开心包,将上部脂肪垫上翻,充分暴露左心耳和肺动脉圆锥,于二者之间用 6/0 医用无损伤缝合线结扎左冠状动脉前降支,可看到结扎后病毒性心肌炎、扩张型心肌病区(约 8mm×8mm)局部呈现紫色,膨突,活动明显减弱,然后缝合胸壁,堵住呼吸机回气口使肺充盈后,用力挤压胸部以排气,再缝合胸部肌肉和皮肤。观察呼吸情况,看到有自主呼吸后去除呼吸机,放回笼内饲养。假手术组开胸后撕开心包,不结扎冠状动脉。

[0237] 术后 6 天左右,对手术大鼠进行心超检测,选用 EF 值下降到 50%左右的大鼠,按 EF 值重新随机分组,使每组 EF 值均为 50%左右,开始给药。

[0238] 6.3.2 药效试验

[0239] 将 EF 值为 50%左右的模型动物随机分组,分别为模型组(阴性对照组),3 个剂量的受试药组,每组 12~13 只。受试药组和模型组给药途径均为尾静脉注射,每天一次(qd),连续给药 5 天。第 6 天给药前行心脏超声检测后,再连续给药 5 天。每次给药容积为 0.4ml/100g 体重。

[0240] 用药结束后再次进行心超检测,并解剖试验动物,称心重,测心室壁厚度,进行心脏病理检查,收集外周血,分离血浆,进行肾素-血管紧张素-醛固酮含量测定。

[0241] 另留存不同组别的受试动物,进行长期观测。

[0242] 6.3.3 观测指标

[0243] 6.3.3.1 心功能检测

[0244] 分别于大鼠结扎后用药前、用药第 6 天、11 天(共 3 次),氯胺酮麻醉状态下,进行心脏超声心动图检测,主要指标包括:

[0245] EF:心室射血分数,反应心室射血功能;

[0246] FS:心室短轴缩短率,反应心室收缩功能;

[0247] LVDd:左心室舒张期最大内径(cm);

[0248] LVDs:左心室收缩期最小内径(cm)。

[0249] 6.3.3.2 血浆肾素-血管紧张素-醛固酮含量检测

[0250] 委托复旦大学附属中山医院同位素室进行。

[0251] 大鼠颈动脉放血,按试剂盒要求留取血浆,-20℃冻存。用放免法检测肾素活性(PRA)、血管紧张素 I(AI)、血管紧张素 II(AII)、醛固酮(ALD)含量。

[0252] 6.3.3.3 心肌病理组织切片

[0253] 委托上海市疑难病理会诊中心王炳森教授进行。

[0254] 大鼠心脏经 10%福尔马林液固定后,沿心脏长轴 3 等分切取心肌,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,对各组动物心脏纤维化区域面积进行图像分析,并计数纤维化病灶内毛细血管数(计量单位:个/mm²);Nagar-oslen 染色,观察各组心肌缺血缺氧区域大小。

[0255] 7 数据处理

[0256] 所得实验数据进行 t 检验。

[0257] 8 实验结果

[0258] 8.1 重组人神经调节蛋白对大鼠缺血心脏功能的影响

[0259] 用药 5 天进行心超检测的结果显示,模型组 EF 值 ($50.2 \pm 8.4\%$) 和 FS 值 ($22.4 \pm 4.6\%$) 明显低于假手术组 EF ($91.1 \pm 2.4\%$) 和 FS ($57.3 \pm 3.9\%$),两者比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。用药组 (20、10、5 $\mu\text{g/kg}$) 的 EF 值 ($71.1 \pm 12.0\%$ 、 $64.3 \pm 12.8\%$ 、 $62.9 \pm 8.4\%$) 及 FS 值 ($36.9 \pm 9.7\%$ 、 $32.0 \pm 9.5\%$ 、 $30.3 \pm 6.1\%$) 均明显回升,与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

[0260] 用药 10 天后再次心超检测的结果显示,模型组 EF 值 ($42.7 \pm 6.4\%$) 和 FS 值 ($18.3 \pm 3.2\%$) 仍明显低于假手术组 EF ($95.0 \pm 2.8\%$) 和 FS ($65.3 \pm 6.8\%$),具有显著性差异 ($P < 0.01$)。而用药组 (20、10、5 $\mu\text{g/kg}$) EF 值 ($75.7 \pm 10.8\%$ 、 $61.4 \pm 15.0\%$ 、 $59.2 \pm 12.4\%$) 和 FS 值 ($41.3 \pm 11.0\%$ 、 $30.3 \pm 10.4\%$ 、 $28.4 \pm 8.6\%$) 仍保持较高水平,与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$),但与用药 5 天相比无显著性差异 ($p > 0.05$)。两次实验结果详见表 1 ~ 6。

[0261] 用药 5 天,停药后 35 天观察模型动物和受试药组大鼠心脏 EF 值变化,结果显示,20 $\mu\text{g/kg}$ 的重组人神经调节蛋白用药组大鼠心脏 EF 值持续稳定在较高水平,与模型组比较,差别有显著性 ($p < 0.05$) (表 7)。

[0262] 表 1 大鼠冠状动脉前降支结扎致心力衰竭模型动物用药前心功能测量参数

组别	LVDd	LVDs	EF	FS
假手术组(n=6)	$0.572 \pm 0.033^{**}$	$0.258 \pm 0.046^{**}$	$89.5 \pm 4.4^{**}$	$55.2 \pm 5.8^{**}$
模型组(n=12)	0.705 ± 0.117	0.558 ± 0.119	48.3 ± 10.3	21.3 ± 5.6
神经调节蛋白组 20 $\mu\text{g/kg}$ (n=13)	0.730 ± 0.108	0.575 ± 0.119	49.3 ± 11.4	21.7 ± 6.4
神经调节蛋白组 10 $\mu\text{g/kg}$ (n=13)	0.709 ± 0.099	0.555 ± 0.102	49.5 ± 11.0	22.1 ± 6.1
神经调节蛋白组 5 $\mu\text{g/kg}$ (n=13)	0.761 ± 0.075	0.596 ± 0.092	49.3 ± 10.6	22.0 ± 5.9

[0264] 与模型组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

[0265] 表 2 大鼠冠状动脉前降支结扎致心力衰竭模型动物用药 5 天后心功能测量参数

[0266]

组别	给药方案	LVDd	LVDs	EF	FS
假手术组(n=6)	iv qd $\times$ 5	$0.549 \pm 0.046^{**}$	$0.234 \pm 0.027^{**}$	$91.1 \pm 2.4^{**}$	$57.3 \pm 3.9^{**}$
模型组 (n=12)	iv qd $\times$ 5	0.79 ± 0.08	0.61 ± 0.09	50.24 ± 8.41	22.43 ± 4.62
神经调节蛋白 20 $\mu\text{g/kg}$ (n=13)	iv qd $\times$ 5	$0.70 \pm 0.07^{**}$	$0.46 \pm 0.09^{**}$	$71.07 \pm 11.99^{**}$	$36.88 \pm 9.66^{**}$
神经调节蛋白 10 $\mu\text{g/kg}$ (n=13)	iv qd $\times$ 5	$0.71 \pm 0.05^{*}$	$0.51 \pm 0.09^{**}$	$64.35 \pm 12.85^{**}$	$32.01 \pm 9.54^{**}$
神经调节蛋白 5 $\mu\text{g/kg}$ (n=11)	iv qd $\times$ 5	$0.73 \pm 0.05^{*}$	$0.54 \pm 0.09^{*}$	$62.90 \pm 8.39^{**}$	$30.32 \pm 6.11^{**}$

[0267] 与模型组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

[0268] 表 3 大鼠冠状动脉前降支结扎致心力衰竭模型动物用药 10 天后心功能测量参数

[0269]

组别	给药方案	LVDd	LVDs	EF	FS
假手术组 (n=6)	iv qd×10	0.466±0.041**	0.159±0.036**	95.0±2.8**	65.3±6.8**
模型组 (n=10)	iv qd×10	0.8±0.11	0.7±0.11	42.7±6.36	18.3±3.19
组兰格 20μg/kg (n=10)	iv qd×10	0.6±0.12**	0.5±0.14**	75.7±10.78**	41.3±10.98**

[0270]

神经调节蛋白 10μg/kg(n=10)	iv qd×10	0.7±0.07**	0.51±0.14**	61.4±15**	30.3±10.36**
神经调节蛋白 5μg/kg(n=10)	iv qd×10	0.72±0.10*	0.55±0.12*	59.2±12.37**	28.4±8.62**

[0271] 与模型组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

[0272] 表 4 大鼠冠状动脉前降支结扎致心力衰竭模型动物用药前心功能测量参数

[0273]

组别	LVDd	LVDs	EF	FS
假手术组(n=6)	0.544±0.071*	0.215±0.053**	93±2.9**	60.8±5.2**
模型组(n=12)	0.66±0.10	0.52±0.11	46.98±14.17	20.85±7.38
神经调节蛋白 20 μg/kg(n=12)	0.74±0.12	0.56±0.11	52.29±12.87	23.89±7.28
神经调节蛋白 10 μg/kg(n=12)	0.64±0.11	0.49±0.11	51.67±11.92	23.27±6.73
神经调节蛋白 5 μg/kg(n=12)	0.66±0.11	0.51±0.12	50.81±12.55	22.83±6.92

[0274] 与模型组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

[0275] 表 5. 大鼠冠状动脉前降支结扎致心力衰竭模型动物用药 5 天后心功能测量参数

[0276]

组别	给药方案	LVDd	LVDs	EF	FS
假手术组(n=6)	iv	0.553	0.215	93.1	61.4
	qd×5	±0.063**	±0.052**	±3.9**	±6.2**
模型组(n=10)	iv	0.87	0.74	38.00	16.35
	qd×5	±0.11	±0.14	±12.36	±5.55
神经调节蛋白 20μg/kg (n=9)	i.v	0.68	0.46	65.47	34.23
	qd×5	±0.11**	±0.17**	±20.48**	±15.42**
神经调节蛋白 10μg/kg (n=12)	iv	0.72	0.54	56.51	26.53
	qd×5	±0.13**	±0.14**	±12.68**	±8.48**
神经调节蛋白 5μg/kg (n=10)	iv	0.74	0.58	56.76	28.35
	qd×5	±0.11*	±0.18*	±16.10**	±10.64**

[0277] 与模型组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

[0278] 表 6 大鼠冠状动脉前降支结扎致心力衰竭模型动物用药 10 天后心功能测量参数

组别	给药方案	LVDd	LVDs	EF	FS
[0279] 假手术组 (n=6)	iv	0.539	0.204	93.8	62.2
	10qd	±0.015**	±0.017**	±1.6**	±3.6**
模型组 (n=10)	iv	0.81	0.69	36.13	15.18
	10qd	±0.13	±0.13	±10.10	±5.01
[0280]	神经调节蛋白 20μg/kg iv (n=8)	0.65	0.42	70.22	36.49
	10qd	±0.09**	±0.13**	±14.15**	±11.27**
	神经调节蛋白 10μg/kg iv (n=12)	0.68	0.49	66.54	34.28
	10qd	±0.08**	±0.17**	±15.81**	±12.64**
	神经调节蛋白 5μg/kg iv (n=9)	0.70	0.53	57.90	29.26
	10qd	±0.08*	±0.16*	±19.54**	±14.19*

[0281] 与模型组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

[0282] 表 7 模型动物用药 5 天, 停药 35 天后的心功能 EF 值变化

[0283]

	结扎后用药前	用药 5 天后	用药 5 天后, 停药 35 天
神经调节蛋白 20μg/kg	52.4±13.8	79.2±4.7*	73.0±20.3*
神经调节蛋白 10μg/kg	52.2±12.8	77.3±11.6	63.8±23.8
神经调节蛋白 5μg/kg	53.1±12.8	75.8±15.3	69.9±28.6
模型组	53.0±12.6	62.6±16.7	52.5±29.9
假手术组	94.4±3.7**	94.1±2.5**	95.1±2.3**

[0284] *与模型组比较, $p < 0.05$; **与模型组比较, $p < 0.01$

[0285] 8.2 重组人神经调节蛋白对模型大鼠心肌病理组织学的影响

[0286] 8.2.1 重组人神经调节蛋白对模型大鼠缺血心肌缺血缺氧程度的影响

[0287] Nagar-oslen 染色, 正常心肌着色浅, 呈黄色, 缺血缺氧区域着色深, 呈红色。用该方法可以分析心肌缺血缺氧的变化并进行定性或半定量比较。

[0288] 各试验组动物病理组织学改变详见图 1 ~ 10。模型组心肌组织着色深, 大片心肌染成红色, 而假手术组呈均一的黄色, 没有红染区; 重组人神经调节蛋白 20 μ g/kg 组, 红染心肌细胞仅呈点状分布; 10 μ g/kg、5 μ g/kg 组, 红染组织呈片状分布, 表明重组人神经调节蛋白能减轻心肌缺血、缺氧程度。

[0289] 8. 2. 2 重组人神经调节蛋白对模型大鼠缺血心肌纤维化区域毛细血管再生的影响

[0290] 应用 Leica 图像分析系统检测各实验组心肌组织毛细血管数量的变化。结果发现, 重组人神经调节蛋白用药组模型动物的心肌纤维化病灶区毛细血管数增加, 20 μ g/kg 组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0. 01$), 10 μ g/kg、5 μ g/kg 组与模型组无统计学差异。表明高剂量 (20 μ g/kg) 的重组人神经调节蛋白能促进冠脉结扎后大鼠心肌纤维化病灶区毛细血管增生 (详见表 8, 图 11, 12)。

[0291] 表 8 重组人神经调节蛋白对模型动物心肌纤维化区域毛细血管再生的影响

	组别	给药方案	毛细血管计数 (I) 毛细血管计数 (II)	
[0292]	假手术	iv qd x 10	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	模型组	iv qd x 10	6.49 $\pm$ 2.17	13.7 $\pm$ 5.5
	神经调节蛋白 20 μ g/kg	iv qd x 10	10.12 $\pm$ 3.0**	24.6 $\pm$ 9.5**
	神经调节蛋白 10 μ g/kg	iv qd x 10	8.99 $\pm$ 3.3	19.6 $\pm$ 8.5
	神经调节蛋白 5 μ g/kg	iv qd x 10	9.35 $\pm$ 4.2	15.0 $\pm$ 6.9

[0293] ** 与模型组相比, $P < 0. 01$

[0294] 8. 3 重组人神经调节蛋白对模型动物血浆肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮水平的影响

[0295] 用放射免疫法测定不同试验组动物血浆肾素 (PRA)、血管紧张素 I (AI)、血管紧张素 II (AII)、醛固酮 (ALD) 水平。结果显示: 模型组 PRA、AI、AII、ALD 分别为 3. 506 $\pm$ 1. 78ng/ml. h、10. 655 $\pm$ 1. 18ng/ml、1366. 38 $\pm$ 577. 33pg/ml、1. 738 $\pm$ 0. 34ng/ml, 与假手术组 (分别为 1. 315 $\pm$ 0. 96ng/ml. h、8. 125 $\pm$ 1. 57ng/ml、564. 37 $\pm$ 273. 56pg/ml、1. 113 $\pm$ 0. 45ng/ml) 相比, 含量显著升高, 差别具有显著性 ($P < 0. 05$)。

[0296] 重组人神经调节蛋白 20、10 μ g/kg 组模型动物血浆 AI (7. 40 $\pm$ 12. 15、7. 65 $\pm$ 1. 40ng/ml)、AII (641. 47 $\pm$ 283. 86、468. 58 $\pm$ 165. 10pg/ml) 水平显著降低, 与模型组比较, 差别有显著性 ($P < 0. 01$); PRA (1. 337 $\pm$ 1. 09、1. 075 $\pm$ 1. 50ng/ml. h)、ALD (1. 02 $\pm$ 0. 27、1. 26 $\pm$ 0. 38ng/ml) 水平亦显著下降, 与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0. 05$)。但与假手术组相比, 无统计学意义 ($P > 0. 05$)。表明一定剂量的重组人神经调节蛋白 (20、10 μ g/kg) 能降低冠状动脉结扎大鼠血液中 PRA、AI、AII、ALD 含量 (详见表 9)。

[0297] 表 9 不同实验组模型动物血浆肾素 (PRA)、血管紧张素 I (AI)、血管紧张素 II (AII)、醛固酮 (ALD) 水平

	组别	给药方案	AI(ng/ml)	AII(Pg/ml)	ALD(ng/ml)	PRA(ng/ml·h)
[0298]	假手术	iv	8.125	564.370	1.113	1.315
	n=6	qd×10	±1.573*	±273.56*	±0.447*	±0.96*
	模型组 (n=6)	iv	10.655	1366.38	1.738	3.506
		qd×10	±1.178	±577.33	±0.337	±1.78
	神经调节蛋白	iv	7.400	641.47	1.018	1.337
	20μg/kg (n=6)	qd×10	±2.15**	±283.86*	±0.266**	±1.09*
	神经调节蛋白	iv	7.654	468.583	1.264	1.075
	10μg/kg (n=6)	qd×10	±1.399**	±165.1**	±0.382*	±1.5*
	神经调节蛋白	iv	10.036	807.304	1.472	4.032
	5μg /kg (n=6)	qd×10	±2.283	±333.46	±0.413	±1.81

[0299] 与模型组比较, * p < 0.05, ** p < 0.01

[0300] 9 结论

[0301] 较之模型对照动物的射血分数 (50.2±8.4%) 和缩短分数值 (22.4±4.6%), 重组人神经调节蛋白 3 个剂量, 连续用药 5 天, 均能升高模型动物的射血分数 (71.1±12.0%、64.4±12.9%、62.9±8.4%) 和缩短分数 (36.9±9.7%、32.0±9.5%、30.3±6.1%), 20 μg/kg、10 μg/kg 与模型组比较, 差异有显著性 (p < 0.01), 并且 20 μg/kg 用药组模型动物射血分数的改变可维持用药后 35 天左右 (p < 0.05); 20 μg/kg 重组人神经调节蛋白能明显减小心肌缺血缺氧面积, 增加纤维化病灶区毛细血管数 (p < 0.05); 20 μg/kg、10 μg/kg 重组人神经调节蛋白能降低模型动物外周血中血管紧张素 I (AI)、血管紧张素 II (AII)、肾素 (PRA)、醛固酮 (ALD) 的水平, 与模型组相比, 差别有显著性 (p < 0.01, p < 0.05)。连续用药 10 天, 以上各参数与连续用药 5 天相比, 无明显变化 (p > 0.05)。试验结果表明, 一定剂量的重组人神经调节蛋白, 连续静脉注射 5 天, 能有效治疗冠状动脉结扎所致的大鼠心力衰竭。

[0302] 实施例 3. 重组人神经调节蛋白对阿霉素致 SD 大鼠心力衰竭的治疗作用

[0303] 1 摘要

[0304] 目的观察重组人神经调节蛋白对阿霉素致大鼠中毒性心肌炎的治疗作用。方法选用 SD 大鼠, 3.3mg/kg 阿霉素尾静脉注射, 每周一次, 连续 4 次, 建立阿霉素致 SD 大鼠中毒性心肌炎模型。受试药重组人神经调节蛋白设置 3 个剂量组, 分别为 10、20、40 μg/kg, 静脉注射, 每天一次 (qd), 连续 10 天。试验期间观测模型动物的存活率; 试验结束时, 监测模型动物的血流动力学指标, 测心重 / 体重比, 心肌组织进行病理学检查并进行血清肌钙蛋白 T (cTnT) 水平测定。结果较之模型组 15% 的动物存活率, 40、20、10 μg/kg 3 个剂量的重组人神经调节蛋白均显著提高模型动物的存活率, 分别达到 85%、90% 和 60%; 高、中、低 3 个剂量受试药模型动物的 dp/dt、-dp/dt、LVPmax 值明显提高, dp/dt 分别为 5954±689, 6107±418, 4875±636, -dp/dt 分别为 -4794±954, -4323±457, -3672±884, LVPmax 分别为 165.7±22.7, 156.1±17.7, 145±15.2, 与模型组相比, 差异均具有显著性 (p < 0.001), 而且 40、20 μg/kg 用药组 dp/dt、-dp/dt、LVPmax 值与 10 μg/kg 组相比, 差别亦有显著性 (p < 0.05), 并表现出一定的剂量效应依赖性; 40、20、10 μg/kg 3 个剂量的重组人神经调

节蛋白均能有效减轻模型动物心肌损伤程度,降低血清中肌钙蛋白 T(cTnT) 含量,分别为 0.025 ± 0.011 , 0.031 ± 0.006 , 0.074 ± 0.024 , 与模型组 0.205 ± 0.072 相比,差别有显著性 ($p < 0.01$)。结论重组人神经调节蛋白能有效治疗阿霉素致大鼠的中毒性心肌损害。

[0305] 2 试验目的

[0306] 观察重组人神经调节蛋白对阿霉素致大鼠中毒性心肌炎的治疗作用。

[0307] 3 受试药物

[0308] 重组人神经调节蛋白,上海泽生科技开发有限公司提供。批号:200110006-2,规格:500 μ g/支。效价测定:5000u/支;纯度: $> 95\%$ (HPLC-C8)。

[0309] 4 实验动物

[0310] SD 大鼠:复旦大学医学院实验动物中心提供,动物合格证号为医动字第 02-22-11。体重为 250 ± 30 g,雄性。动物随机分组,每组 20 只,分笼饲养。动物室温度 $18 \sim 22^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $50 \sim 70\%$ 。

[0311] 5 试剂、仪器

[0312] 六导生理记录仪(复旦大学医学院生理教研室研制,型号:SMUP-C-6)

[0313] 换能器(日本光电工业株式会社,NIHON KOHDEN,型号:TP-400T)

[0314] 电化学发光全自动免疫分析仪(2010 型):罗氏诊断有限公司,批号 158468)

[0315] 电子精密天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,Max:610gd = 0.01g)

[0316] 微型四用游标卡尺(0-70mm)(哈尔滨量具刃具厂,0.05mm)

[0317] 动静脉留置针(中美合资温州华丽医疗器械有限公司)

[0318] 血清肌钙蛋白检测试剂盒(Behring Diagnostic Inc.)

[0319] 6 实验方法

[0320] 6.1 实验组别

[0321] 实验设正常对照组,模型组及受试药组。

[0322] 模型组(阴性对照组):阿霉素,汕头经济特区明治医药有限公司生产(批号:000201,有效期:2003.2)。

[0323] 受试药组:重组人神经调节蛋白组。

[0324] 6.2 受试药物剂量设置及药物配制、给药途径、给药次数、给药浓度和容积

[0325] 受试药设 3 个剂量组,分别为 10、20、40 μ g/kg 剂量组。用 1ml 注射用水溶解后,再用赋形剂调整到所需浓度。赋形剂主成分:5%注射用甘露醇,0.2%注射人血白蛋白,10mM 磷酸盐缓冲液,由上海泽生科技开发有限公司提供。试验用药临用前配制。

[0326] 第一次注射阿霉素 24h 内,尾静脉注射重组人神经调节蛋白,qd $\times$ 10。根据体重调整剂量,给药容积 0.2ml/100g。

[0327] 6.3 试验方法

[0328] 6.3.1 动物心衰模型制作方法

[0329] 参照《新药临床前研究指导原则》,3.3mg/kg 阿霉素尾静脉注射,每周一次,连续注射 4 次,建立阿霉素致大鼠中毒性心肌炎模型。

[0330] 6.3.2 药效试验

[0331] 第一次注射阿霉素 24h 内,尾静脉注射重组人神经调节蛋白,qd $\times$ 10。试验期间,动态检测动物的存活率,至第五周,监测心功能指标(左室内压最大上升速率,dt/dpmax,

左室内压最大下降速率, $-dp/dt$, 左室收缩末压 LVP_{max} , 左室舒张末压 LVP_{min})。取心脏组织, 切片观察心肌组织的病理变化。

[0332] 6.3.3 观察指标

[0333] 6.3.3.1 存活率

[0334] 每周记录动物的存活情况, 并计算各实验组存活率。存活率(%) = 存活动物数 / 实验动物数 $\times 100\%$ 。

[0335] 6.3.3.2 心重 / 体重比, 心脏组织病理切片

[0336] 开胸剪取心脏(注意保留心房), 吸纸吸干后称重, 计算心重 / 体重比; 在心脏垂直位 1/2 处测量外周直径; 将左心室中部横向切开, 测量左室游离壁的最大厚度; 用 10% 福尔马林固定心脏, 常规石蜡包埋切片后 HE 染色, 光镜下观察心肌组织结构, 给出病理评分。

[0337] 病理评分标准:

[0338] 0 级: 正常心肌结构, 心肌细胞无萎缩与肥大, 无空泡, 横纹清晰; 心肌排列整齐; 心内、外膜均无异常; 血管和间质无变化。

[0339] 1 级: 散在的单个心肌细胞表现为局部肌浆溶解和空泡, 而邻近的心肌细胞仍正常。

[0340] 2 级: 小至中等范围的成簇心肌细胞表现有萎缩、肌浆溶解和空泡, 可见小灶性心肌细胞坏死。

[0341] 3 级: 大范围弥漫性心肌细胞萎缩、肌浆溶解或空泡, 有较明显的坏死。

[0342] 根据情况, 可在 1 至 2 级, 2 至 3 级之间评分, 如 1.5、2.5 等。

[0343] 6.3.3.3 血流动力学指标测定

[0344] 动物麻醉状态下, 用六导生理记录仪记录颈动脉压、室内压、 dp/dt 等血流动力学指标。主要步骤: 分离右侧颈总动脉, 结扎其远心端, 用动脉夹阻断其近心端, 在两端之间用 20G 动静脉留置针穿入颈总动脉, 取出金属针芯, 放掉动脉夹, 将留置针塑料套管向心推入适当深度, 留置 10 分钟, 观察生理记录仪显示的波形, 待稳定后记录颈动脉压, 再将套管进一步插入左心室, 留置 15 分钟, 待其稳定后记录 dp/dt , $-dp/dt$, LVP_{max} , LVP_{min} 等数值。

[0345] 6.3.3.4 血清肌钙蛋白 T(cTnT) 水平检测

[0346] 采集动脉血 2ml, 收取血清, -20°C 冻存。委托中山医院检验科用电化学发光法检测血清 cTnT 含量。

[0347] 7 数据处理

[0348] 数据资料以 $\bar{X} \pm SD$ 表示。组间差异用单因素方差分析。

[0349] 8 试验结果

[0350] 8.1 阿霉素可诱导大鼠发生中毒性心肌炎并心力衰竭

[0351] 见表 10, 图 13。阿霉素 3.3mg/kg, 每周一次, 连续 4 次静脉给药, 五周后, SD 动物存活率为 15%, 存活大鼠心功能明显受损, 其 dp/dt 、 $-dp/dt$ 、 LVP_{max} 、 LVP_{min} 分别为正常的 43%, 47%, 58%, 37%, 心肌组织病理评分为 2.33 ± 0.26 , 相对病变率为 100%, 血清 cTnT 值明显升高, 达 0.2ng/ml。表明成功建立了阿霉素致大鼠中毒性心肌炎并致心力衰竭模型。

[0352] 表 10 阿霉素诱导 SD 大鼠中毒性心肌炎模型各项检测指标

[0353]

	对照组	模型组
动物存活率 (%)	100	15
心肌组织病理评分	0	2.33 ± 0.26 *
dp/dt (mmHg/s)	6235 ± 423	2674 ± 446 **
- dp/dt	-4590 ± 1003	- 2141 ± 596 **
LVPmax (mmHg)	181.4 ± 15.4	106.1 ± 21.2 *
LVPmin	-27.1 ± 10.2	-10.0 ± 4.7 **
cTnT (ng/ml)	0.001 ± 0.000	0.205 ± 0.072 **
心重/体重	0.0032 ± 0.0002	0.0031 ± 0.0001

[0354]

左室壁厚度 (mm)	1.88 ± 0.15	1.73 ± 0.16
心脏周长 (mm)	31.0 ± 1.1	30.6 ± 0.1

[0355] n = 20, X ± SD, 与正常组比较, 方差分析, * p < 0.05 ** p < 0.001

[0356] 8.2 重组人神经调节蛋白对模型动物存活率的影响

[0357] 结果表明, 随着实验时间的延长, 重组人神经调节蛋白 3 个剂量, 都明显降低模型动物的死亡率, 20 μg/kg 剂量组模型动物存活率高达 90% (p < 0.01) (图 14)。

[0358] 8.3 重组人神经调节蛋白对模型动物心功能的影响

[0359] 用药后, 各受试药组动物的 dp/dt、LVPmax 均有升高。用 SPSS 软件, 经单因素方差分析, 组间比较, 受试药组 (40、20、10 μg/kg) 动物的 dp/dt、-dp/dt 明显高于模型组 (P < 0.001), 与对照组比较差别无显著性 (P > 0.05)。40、20 μg/kg 受试组明显高于 10 μg/kg 组 (P < 0.01); 受试药组 (40、20、10 μg/kg) 动物的 LVPmax 也明显高于模型组 (P < 0.001), 而且各用药组之间的差异亦有显著性 (P < 0.05)。表明重组人神经调节蛋白能有效改善模型动物的心功能且具有剂量效应关系。二次试验结果一致, 详见表 11, 12。

[0360] 表 11 重组人神经调节蛋白对模型动物心功能参数的影响 (I)

组别	给药方案	+dp/dt (mmHg/s)	-dp/dt (mmHg/s)	LVPmax (mmHg)	LVPmin (mmHg)
正常对照组					
(n=8)		6235±423**	-4590±1003**	181.4±15.4**	-27.1±10.2**
模型组 (n=6)	iv qd×10d	2674±446	-2141±596	106.1±21.2	-10±4.7
[0361] 神经调节蛋白					
40μg/kg (n=8)	iv qd×10d	5954±689**	-4794±954**	165.7±22.7**	-27.4±10**
神经调节蛋白					
20μg/kg (n=8)	iv qd×10d	6107±418**	-4323±457**	156.1±17.7**	-26.9±9.7**
神经调节蛋白					
10μg/kg (n=8)	iv qd×10d	4875±636**	-3672±884**	145±15.2**	-24.5±9.6**

[0362] 与模型组相比, * p < 0.05; ** p < 0.001

[0363] 表 12 重组人神经调节蛋白对模型动物心功能参数的影响 (II)

[0364]

组别	给药方案	+dp/dt (mmHg/s)	-dp/dt (mmHg/s)	LVPmax (mmHg)	LVPmin (mmHg)
正常组(n=8)		5872±342**	-4626±896**	159±25**	-22.7±12*
模型组 (n=8)	iv qd×10d	2675±359	-2137±334	103.9±11.5	-11.3±5.4
神经调节蛋白(n=7)					
40μg/kg	iv qd×10d	6041±461**	-4529±274**	166.3±12.4**	-22.2±11.4*
神经调节蛋白(n=7)					
20μg/kg	iv qd×10d	5833±416**	-4345±807**	157.7±12**	-26.6±7.4*
神经调节蛋白(n=8)					
10μg/kg	iv qd×10d	4956±352**	-3626±1056**	158.2±22.9**	-22.4±18

[0366] 与模型组相比, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

[0367] 8.4 重组人神经调节蛋白对模型动物心肌组织结构的影响

[0368] 重组人神经调节蛋白明显降低模型动物心肌细胞损害程度, 病理评分明显降低, 与模型组相比, 差别有显著性 ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。二次实验结果详见表 13, 14, 图 15。

[0369] 表 13 重组人神经调节蛋白对模型动物心肌组织病理变化的影响

[0370]

组别	给药方案	病理评分
正常组(n=6)		0.00±0.00**
模型组 (n=6)	iv qd×10d	2.33±0.26
神经调节蛋白 40μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.33±0.41**
神经调节蛋白 20μg/kg(n=6)	iv qd×10d	1.17±0.93*
神经调节蛋白 10μg/kg (n=6)	iv qd×10d	1.83±0.41*

[0371] 与模型组相比, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

[0372] 14 重组人神经调节蛋白对模型动物心肌组织病理变化的影响

组别	给药方案	病理评分
正常组(n=6)		0±0**
模型组 (n=6)	iv qd×10d	2.75±0.274
神经调节蛋白 40μg/kg (n=6)	iv qd×10	0.583±0.204**
神经调节蛋白 20μg/kg (n=6)	iv qd×10d	1.667±0.931*
神经调节蛋白 10μg/kg (n=6)	iv qd×10d	2.167±0.516*

[0374] 与模型组相比, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

[0375] 8.5 重组人神经调节蛋白对模型动物血清 cTnT 的影响

[0376] 用药后, 各组动物血清中 cTnT 含量明显降低, 高、中、低受试药组动物血清中 cTnT

明显低于模型组 ($P < 0.001$)。二次试验结果一致,见表 15,16。

[0377] 表 15 重组人神经调节蛋白对模型动物血清 cTnT 的影响 (I)

[0378]	组别	给药方案	cTnT (ng/ml)
	正常组(n=5)		0.001±0.000**
	模型组 (n=6)	iv qd×10d	0.205±0.072
	神经调节蛋白 40μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.025±0.011**
	神经调节蛋白 20μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.031±0.006**
	神经调节蛋白 10μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.074±0.024**

[0379] 与模型组相比, ** $p < 0.001$

[0380] 表 16 重组人神经调节蛋白对模型动物血清 cTnI 的影响 (II)

[0381]	组别	给药方案	cTnI (ng/ml)
	正常组(n=6)		0.433±0.079**
	模型组(n=6)	iv qd×10d	20.525±20.638
	神经调节蛋白 40μg/kg (n=6)	iv qd×10	0.874±0.108**
	神经调节蛋白 20μg/kg (n=6)	iv qd×10d	1.677±0.589**
	神经调节蛋白 10μg/kg (n=6)	iv qd×10d	8.342±13.537**

[0382] 与模型组相比, ** $p < 0.001$

[0383] 8.6 重组人神经调节蛋白对模型动物心脏大小的影响

[0384] 试验结果详见表 17,18。受试药组模型动物心脏的物理参数没有明显改变,各组间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

[0385] 表 17 重组人神经调节蛋白对模型动物心脏大小的影响 (I)

[0386]	组别	给药方案	心重/体重	左室壁厚度(mm)
	正常组(n=20)		0.0032±0.0002	2.01±0.07**
	模型组 (n=6)	iv qd×10d	0.0031±0.0001	1.717±0.154
	神经调节蛋白 40μg/kg (n=16)	iv qd×10d	0.0031±0.0002	1.813±0.12
	神经调节蛋白 20μg/kg (n=18)	iv qd×10d	0.0032±0.0001	1.789±0.133
	神经调节蛋白 10μg/kg (n=13)	iv qd×10d	0.00301±0.0002	1.773±0.115

[0387] 与模型组相比, ** $p < 0.01$

[0388] 表 18 重组人神经调节蛋白对模型动物心脏大小的影响 (II)

[0389]

组别	给药方案	心重/体重	左室壁厚度(mm)
正常组(n=20)		0.00310±0.000	2.19±0.2**
模型组 (n=10)	iv qd×10d	0.00298 ± 0.000	2.065±0.17
神经调节蛋白 40μg/kg (n=18)	iv qd×10	0.00297±0.000	2.06±0.2
神经调节蛋白 20μg/kg (n=19)	iv qd×10d	0.00303±0.000	2.15±0.24
神经调节蛋白 10μg/kg g(n=16)	iv qd×10d	0.00307±0.000	2.18±0.21

[0390] 与模型组相比，** p < 0.01

[0391] 9 结论

[0392] 较之模型组 15%的动物存活率,40、20、10 μ g/kg 3 个剂量的重组人神经调节蛋白均显著提高模型动物的存活率,分别达到 85%,90%和 60%;高、中、低 3 个剂量受试药模型动物的 dp/dt、-dp/dt、LVPmax 值明显提高, dp/dt 分别为 5954±689,6107±418,4875±636,-dp/dt 分别为 -4794±954,-4323±457,-3672±884,LVPmax 分别为 165.7±22.7,156.1±17.7,145±15.2,与模型组相比,差异均具有显著性 (p < 0.001),而且 40,20 μ g/kg 用药组 dp/dt、-dp/dt、LVPmax 值与 10 μ g/kgd 组相比,差别亦有显著性 (p < 0.05),表现为一定的剂量效应依赖性;40、20、10 μ g/kg 3 的重组人神经调节蛋白均能有效减轻模型动物心肌损伤程度,降低血清中肌钙蛋白 (cTnT) 含量,分别为 0.025±0.011,0.031±0.006,0.074±0.024,与模型组 0.205±0.072 相比,差别有显著性 (p < 0.01)。

[0393] 试验结果表明:重组人神经调节蛋白通过改善受损的心肌组织,减少 cTnT 的血清释放及心肌纤维的坏死,增强心脏收缩功能,减少动物死亡率,有效治疗阿霉素所致大鼠的中毒性心肌损伤。

[0394] 实施例 4. 重组人神经调节蛋白对病毒感染致小鼠急性心肌损伤的治疗作用

[0395] 本实验旨在研究重组人神经调节蛋白 (rhNRG-1 β_{S1Q237}) 对病毒感染致小鼠急性心肌损伤的治疗作用。实验包括二部分。第一部分旨在观测重组人神经调节蛋白对病毒性心肌炎小鼠模型动物存活率、心脏功能和心肌组织病理变化、血清肌钙蛋白 (CTnI) 水平等影响,确定最佳有效剂量;第二部分为重组人神经调节蛋白不同用药时间对上述指标的具体影响,旨在确定最佳用药时间。结果表明,重组人神经调节蛋白 30 μ g/kg,连续静脉注射 5 天,可减轻心脏组织的病理变化,降低血清中 cTnI 的浓度,改善心脏功能,提高模型动物的存活率,有效治疗病毒感染所致小鼠的急性心肌损伤。

[0396] 重组人神经调节蛋白对病毒感染致小鼠急性心肌损伤的治疗作用

[0397] 1 摘要

[0398] 目的观察重组人神经调节蛋白对病毒 (Coxsackie B3) 感染致小鼠急性心肌损伤的治疗作用。方法小鼠腹腔注射柯萨奇 B₃ 病毒 (CVB₃) 建立病毒感染致急性小鼠急性心肌炎模型。模型动物随机分组,设置正常对照、模型组、受试药组。每组 20 只。重组人神经调节蛋白设置 3 个浓度,分别为 30、15、7.5 μ g/kg,同一天开始尾静脉注射,连续 5 天。试验期间,观察模型动物存活率。第七天进行心功能 (心超) 检测,第八天处死小鼠,取血清进行肌钙蛋白 I (cTnI) 水平检测,心脏病理组织学检查等。结果重组人神经调节蛋白 30 μ g/kg,15 μ g/kg 组 EF 值 (90.2±2.5%,86.0±2.9%),FS 值 (55.7±2.1%,50.7±4.3%) 均明显升高,

与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), LVDd 值 ($0.187 \pm 0.006, 0.189 \pm 0.008$) 和 LVDs 值 ($0.085 \pm 0.009, 0.099 \pm 0.027$) 均显著低于模型组 ($0.208 \pm 0.015, 0.142 \pm 0.020$), $P < 0.05$; 重组人神经调节蛋白能减轻模型动物心肌病理损害程度, 有效降低模型动物血清中肌钙蛋白 (cTnI) 水平, $30 \mu\text{g/kg}$ 剂量组 ($7.98 \pm 6.07\text{ng/ml}$)、 $15 \mu\text{g/kg}$ 剂量组 cTnI ($19.43 \pm 10.76\text{ng/ml}$) 明显低于模型组 ($44.44 \pm 12.39\text{ng/ml}$), 两者相比, 差别有显著性 ($P < 0.001, P < 0.05$); 与模型组动物 50% 的存活率相比, 重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$ 组可显著提高模型动物的存活率, 达 80%, $p < 0.05$ 。结论一定剂量的重组人神经调节蛋白, 能有效治疗病毒感染致小鼠的急性心肌损伤。

[0399] 2 试验目的

[0400] 观察重组人神经调节蛋白对病毒感染致小鼠急性心肌损伤的治疗作用, 确定最佳有效剂量。

[0401] 3 受试药物

[0402] 重组人神经调节蛋白, 上海泽生科技开发有限公司研制, 批号: 200110006-2; 浓度: $500 \mu\text{g/支}$; 效价: 5000u; 纯度: $> 95\%$ (HPLC-C8)。

[0403] 4 实验动物

[0404] 4.1 品系、来源、合格证号: 4 周龄纯种 BALB/C 小鼠, 由复旦大学实验动物部提供, 合格证号: 医动字第 22-9 号。

[0405] 4.2 体重、性别: $10 \sim 12\text{g}$, 雄性。

[0406] 4.3 每组动物数: 实验组每组 20 只, 正常对照组为 10 只。

[0407] 5 病毒

[0408] 柯萨奇 B3 病毒 (Coxsackie Virus B₃, CVB₃), Nancy 株, 由卫生部病毒性心脏病重点实验室 (上海市心血管研究所) 提供。

[0409] 6 材料、仪器

[0410] 6.1 心脏超声检测仪, Hewlett Packard sonos 5500; 探头型号: S12;

[0411] 6.2 Immuno-Assay System **Opus®** Plus, 购自 Behring Diagnostic Inc. 用于检测血清中心肌钙蛋白 I (cTnI), 批号: CTE8;

[0412] 6.3 精密电子天平, KERN 822;

[0413] 6.4 注射用水, 湛江安度斯生物有限公司, $10 \times 5\text{ml}$, 批号: 0112180;

[0414] 6.5 脱毛剂, 8% 硫化钠, 广东西陇化工厂, 批号: 010622。

[0415] 7 实验方法

[0416] 7.1 实验组别

[0417] 实验设置正常小鼠对照组、模型组、受试药组、空白对照组。正常小鼠对照组 ($n = 10$);

[0418] 模型组即阴性对照组 ($n = 20$): 给予制剂配方缓冲液 ($10\text{mM PB}, 0.2\%$ 人血白蛋白, 5% 甘露醇);

[0419] 受试药组 ($n = 20$): 重组人神经调节蛋白高、中、低 3 个剂量组;

[0420] 空白对照组 ($n = 20$): 小鼠腹腔接种无 CVB₃ 的冻融细胞上清液, 0.2ml/只 ;

[0421] 7.2 受试药物剂量设置及药物配制、给药途径、给药次数、给药浓度和容积

[0422] 参考预实验结果, 重组人神经调节蛋白设置高、中、低三个剂量组, 分别为 $30 \mu\text{g/}$

kg、15 μg/kg、7.5 μg/kg。用制剂配方缓冲液(10mMPB, 0.2%人血白蛋白, 5%甘露醇)稀释受试药物至所需浓度;

[0423] 受试药组和模型组给药均为小鼠尾静脉注射, 每天一次(qd), 连续给药5天。每次给药容积为0.2ml/只。

[0424] 7.3 试验方法

[0425] 7.3.1 小鼠急性病毒性心肌炎动物模型的建立

[0426] 由复旦大学附属中山医院提供100x TCID₅₀的CVB₃病毒, 腹腔注射0.2ml/只, 造成心肌炎模型。小鼠将于随后的一周内逐步出现竖毛、脱毛、消瘦、呆滞、死亡等表现, 到第8天时死亡将近一半。

[0427] 7.3.2 药效试验

[0428] 于小鼠腹腔感染病毒当天开始尾静脉给药, 连续5天。试验期间, 观察动物的存活率, 试验结束后, 进行心脏超声, 心肌病理组织学检查, 血清肌钙蛋白检测。

[0429] 7.3.3 观测指标

[0430] 7.3.3.1 小鼠心功能检测

[0431] 于注射病毒后第7天, 将小鼠胸部脱毛, 用优力舒胶带固定小鼠于特制的固定架上, 用S12高频探头进行心脏超声心动图检测, 主要指标包括:

[0432] EF: 左室射血分数, 反应左心室射血功能的主要指标;

[0433] FS: 左室缩短分数, 反应左心室收缩功能的指标;

[0434] LVDd: 左心室舒张期最大内径(cm);

[0435] LVDs: 左心室收缩期最小内径(cm);

[0436] 7.3.3.2 小鼠血清中肌钙蛋白I(cTnI)的检测

[0437] 通过检测血清中cTnI的释放量来判断心肌细胞损伤程度, 比传统的CK、LDH、AST等指标具有高特异性、高敏感性等优点。因此, 本实验采用检测血清中cTnI的含量, 作为反映心肌细胞损伤程度的客观指标。

[0438] 注射病毒后第8天, 小鼠称重后, 眼眶取血, 分离血清, -20℃冰箱冻存, 用发光法测定血清cTnI。

[0439] 7.3.3.3 小鼠心肌病理检查

[0440] 委托复旦大学上海医学院病理教研室进行。

[0441] 将存活小鼠颈椎脱臼致死, 无菌开胸摘出心脏, 称重后, 将心肌浸入福尔马林液固定, 石蜡包埋、连续切片, 进行病理学组织学检查, 观察心肌细胞炎症细胞浸润、变性、坏死等病理改变。参考新药评审指导原则, 病理评分标准如下:

[0442] 0分: 病变面积为0%;

[0443] 1分: 病变面积为25%;

[0444] 2分: 病变面积为50%;

[0445] 3分: 病变面积为75%;

[0446] 4分: 病变面积为100%;

[0447] 介于两者之间的可根据病变面积给予相应的评分, 如病变面积为80%评为3.2分。

[0448] 7.3.3.4 小鼠存活率观察

[0449] 试验期间,观测不同用药组模型动物的死亡情况。

[0450] 8 数据处理

[0451] 所得实验数据进行相关资料配对 t 检验。

[0452] 9 结果

[0453] 9.1 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠心功能的影响

[0454] 结果显示,模型组 EF 值 ($67.1 \pm 9.9\%$) 和 FS 值 ($32.0 \pm 7.2\%$) 均显著低于正常值 (EF, $92.5 \pm 2.3\%$ /FS, $59.2 \pm 3.1\%$), $p < 0.05$ 。重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$ 、 $15 \mu\text{g/kg}$ 组 EF 值 ($90.2 \pm 2.5\%$, $86.0 \pm 2.9\%$), FS 值 ($55.7 \pm 2.1\%$, $50.7 \pm 4.3\%$) 有明显升高,与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。 $7.5 \mu\text{g/kg}$ 组 EF/FS 与模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

[0455] 模型组 LVDd 值 ($0.208 \pm 0.015\text{cm}$) 和 LVDs 值 ($0.142 \pm 0.020\text{cm}$) 均显著高于正常对照组 (LVDd, $0.179 \pm 0.007\text{cm}$ /LVDs, $0.073 \pm 0.006\text{cm}$), 两者比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)。重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$ 、 $15 \mu\text{g/kg}$ 组 LVDd 值和 LVDs 值均显著低于模型组 ($P < 0.05$), $7.5 \mu\text{g/kg}$ 组与模型组相比则无显著性差异 ($P > 0.05$)。2 次重复试验的结果详见表 19, 20。

[0456] 表 19 病毒感染小鼠用药 5 天后心功能测量参数

组别	给药	LVDd	LVDs	EF	FS
	方案	(cm)	(cm)	(%)	(%)
正常对照		0.179	0.073	92.5	59.2
		$\pm 0.007^{**}$	$\pm 0.006^{**}$	$\pm 2.3^{**}$	$\pm 3.1^{**}$
模型组	iv	0.208	0.142	67.1	32.0
	qdx5	± 0.015	± 0.020	± 9.9	± 7.2
[0457] 神经调节蛋白	iv	0.187	0.085	90.2	55.7
	qdx5	$\pm 0.006^{**}$	$\pm 0.009^{**}$	$\pm 2.5^{**}$	$\pm 2.1^{**}$
30 $\mu\text{g/kg}$ 神经调节蛋白	iv	0.189	0.099	81.3	44.5
	qdx5	$\pm 0.008^{*}$	$\pm 0.027^{*}$	$\pm 6.28^{*}$	$\pm 8.27^{*}$
15 $\mu\text{g/kg}$ 神经调节蛋白	iv	0.191	0.114	78.1	41.7
	qdx5	± 0.012	± 0.028	± 9.3	± 9.6
7.5 $\mu\text{g/kg}$ 神经调节蛋白	iv				
	qdx5				

[0458] 以上数据每组 $n = 6$, 经 SPSS one-way anova 分析, 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

[0459] 表 20 病毒感染小鼠用药 5 天后心功能测量参数

组别	给药方案	LVDd(cm)	LVDs(cm)	EF(%)	FS(%)
正常对照		0.189 ±0.008**	0.069 ±0.006**	94.5 ±0.56**	63.7 ±3.01**
模型组	iv	0.232 ±0.023	0.159 ±0.031	63.1 ±18.47	30.3 ±10.75
[0460] 神经调节蛋白	iv	0.196 ±0.011**	0.094 ±0.011**	87.7 ±3.76**	51.8 ±5.24**
30μg/kg	qd×5	0.201 ±0.011*	0.114 ±0.018*	81.6 ±4.59*	44.9 ±5.68*
神经调节蛋白	iv	0.213 ±0.009	0.133 ±0.015	71.9 ±6.69	35.7 ±5.60
15μg/kg	qd×5				
神经调节蛋白	iv				
7.5μg/kg	qd×5				

[0461] n = 6, SPSS one-way anova 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0462] 9.2 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠血清 cTnI 的影响

[0463] 结果显示, 模型组 cTnI 均值 (44.44±12.39ng/ml) 显著高于正常对照组 (3.28±4.55ng/ml), 重组人神经调节蛋白 30 μg/kg 剂量组 (7.98±6.07ng/ml) 明显低于模型组 (P < 0.001), 15 μg/kg 剂量组 (19.43±10.76ng/ml) 与模型组相比, 差异亦有显著性 (P < 0.05), 7.5 μg/kg 剂量组 (29.05±17.06ng/ml) 与模型组相比, 差异无统计学意义。2 次试验结果详见表 21, 22。

[0464] 表 21 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠血清 cTnI (ng/ml) 含量的影响

组别	给药方案	cTnI(ng/ml) (Mean±SD)
正常对照组		3.28±4.55 **
模型组	iv qd×5	44.44±12.39
[0465] 神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×5	7.98±6.07 **
神经调节蛋白 15μg/kg	iv qd×5	19.43±10.76 *
神经调节蛋白 7.5μg/kg	iv qd×5	29.05±17.06
空白对照组		3.75±2.36 **

[0466] n = 10, SPSS 软件 Nonparametric tests(Independent samples tests) 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0467] 表 22 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠血清 cTnI (ng/ml) 含量的影响 (II)

组别	给药方案	cTnI(ng/ml) (Mean±SD)
正常对照组		0.19±0.06 **
模型组	iv qd×5	34.05±16.50
[0468] 神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×5	0.54±0.53 **
神经调节蛋白 15μg /kg	iv qd×5	15.59±14.94 *
神经调节蛋白 7.5μg /kg	iv qd×5	26.85±15.20
空白对照组		0.14±0.03 **

[0469] n = 10, 经 SPSS 软件 Nonparametric tests (Independent samples tests) 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0470] 9.3 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠心肌病理损伤的影响

[0471] 实验结果显示, 正常组心肌病理评分为 0.0±0.00, 模型组心肌病理评分 (2.22±0.97), 两者比较具有显著性差异 (P < 0.01)。重组人神经调节蛋白高剂量组与中剂量组病理评分均显著下降 (分别为 0.56±0.47, 0.73±0.58), 与模型组比较具有显著性差异 (P < 0.01), 低剂量组与模型组相比无显著性差异 (P > 0.05)。2 次试验结果详见表 23, 24 和图 16, 17。

[0472] 表 23 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠心肌病理变化的影响 (I)

组别	给药方案	病理评分 (Mean±SD)
[0473] 正常对照组 (n=10)		0.00±0.00 **
模型组 (n=10)	iv qd×5	2.22±0.97
神经调节蛋白 30μg /kg (n=17)	iv qd×5	0.56±0.47 **
神经调节蛋白 15μg /kg (n=13)	iv qd×5	0.73±0.58 **
[0474] 神经调节蛋白 7.5μg /kg (n=10)	iv qd×5	1.52±0.74
空白对照组(n=10)		0.00±0.00 **

[0475] 以上数据经 SPSS 软件 Nonparametric tests (Independent samples tests) 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0476] 表 24 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠心肌病理变化的影响

组别	给药方案	病理评分 (Mean±SD)
正常对照组 (n=10)		0.00±0.00 **
模型组 (n=10)	iv qd×5	2.03±1.44
[0477] 神经调节蛋白 30μg/kg (n=17)	iv qd×5	0.23±0.26 **
神经调节蛋白 15μg/kg (n=13)	iv qd×5	0.57±0.58**
神经调节蛋白 7.5μg/kg (n=10)	iv qd×5	1.34±1.16
空白对照组 (n=10)		0.00±0.00 **

[0478] 以上数据经 SPSS 软件 Nonparametric tests (Independent samples tests) 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0479] 9.4 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠存活率的影响

[0480] 2 次实验结果见表 25, 26。注射病毒后一周, 模型组小鼠存活率为 50% 和 55%, 使用重组人神经调节蛋白后分别上升为 85% 及 80% (30 μg/kg) 和 70%、65% (15 μg/kg)。

[0481] 表 25 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠存活率的影响

[0482]

组别	给药方案	存活动物数 (相对存活率%)							
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	处死
正常对照		10	10	10	10	10	10	10	10**
(n=10)									100
		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	%
模型组	iv	20	20	20	18	17	14	11	10
(n=20)	qd×5	100%	100%	100%	90%	85%	70%	55%	50%
神经调节蛋白 30μg/kg	iv	20	20	20	20	20	18	17	16*
(n=20)	qd×5	100%	100%	100%	100%	100%	90%	85%	80%
神经调节蛋白 15μg/kg	iv	20	20	20	20	19	17	14	13
(n=20)	qd×5	100%	100%	100%	100%	95%	85%	70%	65%
神经调节蛋白 5μg/kg	iv	20	20	20	19	18	15	13	10
(n=20)	qd×5	100%	100%	100%	95%	90%	75%	65%	50%
空白对照组		20	20	20	20	20	20	20	20**
(n=20)									100
		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	%

[0483] SPSS 软件, Survival Life Tables 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0484] 表 26 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠存活率的影响

[0485]

组别	给药 方案	存活动物数 (相对存活率%)							
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	处死
正常对照 (n=10)		10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10** 100%
模型组 (n=20)	iv qdx5	20 100%	20 100%	20 100%	18 90%	15 75%	13 65%	10 50%	10 50%
神经调节蛋白 30 μ g/kg (n=20)	iv qdx5	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	18 90%	17 85%	17* 85%
神经调节蛋白 15 μ g/kg (n=20)	iv qdx5	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	18 90%	16 80%	13 65%	13 65%
神经调节蛋白 7.5 μ g/kg (n=20)	iv qdx5	20 100%	20 100%	20 100%	18 90%	17 85%	14 70%	11 55%	10 50%
空白对照组 (n=20)		20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	20** 100%

[0486] SPSS 软件, Survival Life Tables 分析, 与模型组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

[0487] 9 结论

[0488] 重组人神经调节蛋白 30 μ g/kg、15 μ g/kg 组 EF 值 ($90.2 \pm 2.5\%$, $86.0 \pm 2.9\%$), FS 值 ($55.7 \pm 2.1\%$, $50.7 \pm 4.3\%$) 均明显升高, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), LVDd 值 (0.187 ± 0.006 , 0.189 ± 0.008) 和 LVDs 值 (0.085 ± 0.009 , 0.099 ± 0.027) 均显著低于模型组 (0.208 ± 0.015 , 0.142 ± 0.020), $P < 0.05$; 重组人神经调节蛋白能减轻模型动物心肌病理损害程度, 有效降低模型动物血清中肌钙蛋白 I (cTnI) 水平, 30 μ g/kg 剂量组 (7.98 ± 6.07 ng/ml)、15 μ g/kg 剂量组 cTnI (19.43 ± 10.76 ng/ml) 明显低于模型组 (44.44 ± 12.39 ng/ml), 两者相比, 差别有显著性 ($P < 0.001$, $P < 0.05$); 与模型组动物 50% 的存活率相比, 重组人神经调节蛋白 30 μ g/kg 组可显著提高模型动物的存活率, 达 80%, $p < 0.05$ 。

[0489] 试验结果表明: 重组人神经调节蛋白能在 30 μ g/kg 的剂量水平, 能有效治疗病毒感染致小鼠的急性心肌损伤。

[0490] 实施例 5. 重组人神经调节蛋白对病毒感染致小鼠急性心肌损伤的疗效观察

[0491] 1 摘要

[0492] 目的明确重组人神经调节蛋白治疗病毒感染致小鼠急性心肌损伤的有效用药时间。方法小鼠腹腔注射柯萨奇 B₃ 病毒 (CVB₃) 建立病毒感染致动物急性心肌损伤模型。模型动物随机分组, 设置正常对照、模型组、受试药组。每组 20 只。重组人神经调节蛋白 30 μ g/kg, 同一天开始尾静脉注射, 分别连续 3、5 和 7 天。试验期间, 观察模型动物存活率, 第七天心超检测, 第八天处死小鼠, 取血清检测 cTnI 水平, 心脏病理组织学检查等。结果重组人神经调节蛋白 30 μ g/kg, 连续静脉注射 3 天、5 天和 7 天, 均能提高模型动物的 EF/FS 值, 5 天与 7 天用药组 EF/FS 值 ($86.8 \pm 4.4\%$ / $51.9 \pm 5.8\%$, $87.0 \pm 3.3\%$ / $51.8 \pm 5.1\%$) 与模型组 EF/FS 值 ($66.5 \pm 5.6\%$ / $31.8 \pm 3.7\%$) 相比, 均有显著性差异 ($P < 0.01$), 5 天与 7

天用药组 LVDs 值均显著下降 (分别为 0.090 ± 0.011 , 0.092 ± 0.012 cm), 与模型组比较 (0.133 ± 0.012) 均有显著性差异 ($P < 0.01$); 重组人神经调节蛋白能减轻模型动物心肌病理损害程度, 有效降低模型动物血清中肌钙蛋白 I (cTnI) 水平, 5 天用药组 (1.06 ± 1.32 ng/ml)、7 天用药组 cTnI (1.05 ± 1.2 ng/ml) 明显低于模型组 (23.54 ± 16.96 ng/ml), $P < 0.01$; 与模型组动物 50% 的存活率相比, 重组人神经调节蛋白连续静脉注射 5 天和 7 天, 可显著提高模型动物的存活率, 达 85%, $p < 0.05$ 。结论重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$ 连续给药 5 天, 可有效治疗病毒感染致小鼠急性心肌损伤。

[0493] 2 目的

[0494] 明确重组人神经调节蛋白治疗病毒感染致小鼠急性心肌损伤的有效用药时间。

[0495] 3 受试药物

[0496] 重组人神经调节蛋白, 上海泽生科技开发有限公司研制, 批号: 200110006-2; 浓度: $500 \mu\text{g/支}$; 效价测定: 5000u; 纯度: $> 95\%$ (HPLC-C8)。

[0497] 4 实验动物

[0498] 4.1 品系、来源、合格证号: 4 周龄纯种 BALB/C 小鼠, 由复旦大学实验部提供, 合格证号: 医动字第 22-9 号。

[0499] 4.2 体重、性别: 每鼠 $13 \sim 15\text{g}$, 雄性。

[0500] 4.3 每组动物数: 模型组 20 只, 正常组 10 只。

[0501] 5 病毒

[0502] 同前部分。

[0503] 6 材料、仪器

[0504] 同前部分。

[0505] 7 实验方法

[0506] 7.1 实验组别

[0507] 实验设置正常小鼠对照组、模型组、受试药组。

[0508] 正常小鼠对照组 ($n = 10$);

[0509] 模型组 ($n = 20$): 注射制剂配方缓冲液;

[0510] 受试药组: 重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$, 分连续 3、5、7 天三个不同疗程的给药组, 每组 20 只动物;

[0511] 7.2 受试药物剂量设置及药物配制、给药途径、给药次数、给药浓度和容积

[0512] 重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$, 用制剂配方缓冲液 (10mM PB, 0.2% HAS, 5% 甘露醇) 稀释受试药物至所需浓度;

[0513] 受试药分成 3 个给药组, 分别为每天连续静脉注射 3 天、5 天和 7 天, 每次给药容积为 0.2ml/只 ;

[0514] 模型组给药为小鼠尾静脉注射制剂配方缓冲液, 每天一次 (qd), 连续给药 7 天。每次给药容积为 0.2ml/只 ;

[0515] 7.3 试验方法

[0516] 7.3.1 小鼠急性病毒性心肌炎动物模型的建立

[0517] 由复旦大学附属中山医院提供 $100 \times \text{TCID}_{50}$ 的 CVB₃ 病毒, 腹腔注射 0.2ml/只 , 造成急性心肌炎模型。小鼠将于随后的一周内逐步出现竖毛、脱毛、消瘦、呆滞、死亡等表现,

到第 8 天时死亡将近一半。

[0518] 7.3.2 药效试验

[0519] 同前部分。

[0520] 7.3.3 观测指标

[0521] 同前部分。

[0522] 8 数据处理

[0523] 所得数据进行相关 t 检验或方差分析。

[0524] 9 结果

[0525] 9.1 重组人神经调节蛋白用药 3、5、7 天对病毒感染小鼠心功能的影响

[0526] 结果显示,模型组 EF/FS 值 ($66.5 \pm 5.6\%$ / $31.8 \pm 3.7\%$) 明显低于正常组 ($93.5 \pm 0.9\%$ / $68.1 \pm 1.3\%$),两者比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。重组人神经调节蛋白 5 天组与 7 天组 EF/FS 值 ($86.8 \pm 4.4\%$ / $51.9 \pm 5.8\%$, $87.0 \pm 3.3\%$ / $51.8 \pm 5.1\%$),与模型组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)。重组人神经调节蛋白用药 3 天组 EF 值也有回升 ($73.1 \pm 6.6\%$),但与模型组相比,差异无显著性 ($P > 0.05$)。

[0527] 模型组 LVDs 值 ($0.133 \pm 0.012\text{cm}$) 高于正常组 ($0.059 \pm 0.006\text{cm}$),两者比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。重组人神经调节蛋白 5 天组、7 天组 LVDs 值均显著下降(分别为 0.090 ± 0.011 , $0.092 \pm 0.012\text{cm}$),与模型组比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)。神经调节蛋白 3 天组 LVDs 值 ($0.123 \pm 0.012\text{cm}$) 与模型组比较则无显著性差异 ($P > 0.05$)。2 次实验结果详见表 27,28。

[0528] 表 27 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠心功能参数的影响

[0529]

组别	给药方案	LVDd(cm)	LVDs(cm)	EF(%)	FS(%)
正常对照		0.179*	0.059**	93.5**	68.1**
		± 0.007	± 0.006	± 0.9	± 1.3
模型组	iv qd $\times$ 7	0.194	0.133	66.5	31.8
		± 0.012	± 0.012	± 5.6	± 3.7
神经调节蛋白 30 μg /kg	iv qd $\times$ 3	0.194	0.123	73.1	36.7
		± 0.008	± 0.012	± 6.6	± 4.7
神经调节蛋白 30 μg /kg	iv qd $\times$ 5	0.187	0.090**	86.8**	51.9**
		± 0.006	± 0.011	± 4.4	± 5.8
神经调节蛋白 30 μg /kg	iv qd $\times$ 7	0.192	0.092**	87.0**	51.8**
		± 0.008	± 0.012	± 3.3	± 5.1

[0530] 以上每组数据 $n = 6$,经 SPSS one-way anova 分析,与模型组比较,* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

[0531] 表 28 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠心功能参数的影响 (II)

组别	给药方案	LVDd(cm)	LVDs(cm)	EF(%)	FS(%)
正常对照		0.189** ±0.008	0.080** ±0.007	90.9** ±2.6	57.5** ±3.5
模型组	iv qd × 7	0.206 ±0.008	0.126 ±0.006	75.4 ±5.2	39.0 ±4.3
[0532] 神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd × 3	0.211 ±0.016	0.121 ±0.016	81.0 ±5.4	43.9 ±5.1
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd × 5	0.199 ±0.000	0.100* ±0.014	85.8** ±4.205	50.0** ±6.350
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd × 7	0.194 ±0.017	0.092** ±0.008	87.283** ±1.694	52.367** ±1.847

[0533] 以上每组数据 n = 6, 经 SPSS one-way anova 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0534] 9.2 重组人神经调节蛋白对病毒感染小鼠血清 cTnI 的影响

[0535] 结果显示, 正常组 cTnI 均值为 0.12±0.03ng/ml, 模型组 cTnI 均值明显增高为 23.54±16.96ng/ml, 二者比较具有显著性差异 (P < 0.01)。重组人神经调节蛋白 5 天组与 7 天组 cTnI 值均显著下降 (分别为 1.06±1.32ng/ml, 1.05±1.20ng/ml), 与模型组比较均具有显著性差异 (P < 0.01), 用药 3 天组与模型组比较无显著性差异 (P > 0.05)。二次实验结果分别详见表 29, 30。

[0536] 表 29 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠血清 cTnI (ng/ml) 的影响

组别 (n=9)	给药方案	cTnI(ng/ml) (Mean±SD)
正常对照		0.12±0.03**
模型组	iv qd×7	23.54±16.96
[0537] 神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×3	13.37±9.53
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×5	1.06±1.32**
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×7	1.05±1.20**

[0538] SPSS 软件 Nonparametric tests (Independent samples tests) 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0539] 表 30 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠血清 cTnI (ng/ml) 的影响

[0540]	组 别 (n=8)	给药方案	cTnI(ng/ml) (Mean±SD)
	正常对照		0.15±0.03**
	模型组	iv qd×7	30.13±21.75
	神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×3	12.32±18.36
	神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×5	0.44±0.24**
	神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×7	0.51±0.28**

[0541] SPSS,Nonparametric tests(Independent samples tests) 分析,与模型组比较,
* P < 0.05 ** P < 0.01

[0542] 9.3 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠心肌病理损伤的影响

[0543] 实验结果显示,正常组病理评分为 0.0±0.00,模型组病理评分升高(1.44±1.19),二者比较有显著性差异(P < 0.01)。重组人神经调节蛋白 5 天组与 7 天组病理评分明显下降(分别为 0.11±0.14,0.13±0.13),与模型组比较均有显著性差异(P < 0.01)。用药 3 天组心肌细胞损伤亦有改善(0.33±0.155),与模型组比较有显著性差异,但与用药 5 天组比较,5 天组心肌细胞改善明显好于 3 天组,二者比较具有显著性差异(P < 0.01)。而 5 天组与 7 天组病理评分无显著性差异(P > 0.05)。二批实验结果相似(详见表 31,32,图 18,19)。

[0544] 表 31 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠心肌病理变化的影响
[0545]

组 别	给药方案	病理评分 (Mean±SD)
正常对照		0.00±0.00 **
模型组	iv qd×7	1.44±1.19
神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×3	0.33±0.155*
神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×5	0.11±0.140**
神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×7	0.13±0.132**

[0546] n = 10,SPSS,Nonparametric tests(Independent samples tests) 分析,与模型组比较,* P < 0.05 ** P < 0.01

[0547] 表 32 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠心肌病理变化的影响

[0548]	组 别(n=10)	给药方案	病理评分 (Mean±SD)
	正常对照		0.00±0.00 **
	模型组	iv qd×7	1.86±1.20
	神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×3	0.55±0.476*
	神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×5	0.17±0.157**
	神经调节蛋白 30μg /kg	iv qd×7	0.19±0.168**

[0549] n = 10,经 SPSS 软件 Nonparametric tests(Independent samples tests) 分析,

与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0550] 9.4 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠存活率的影响

[0551] 结果见表 33, 34。2 次实验, 模型组小鼠存活率分别为 50% 和 60%, 重组人神经调节蛋白 5 天组与 7 天组均上升为 85% 和 90%, 与模型组相比差别有显著性, $p < 0.05$ 。3 天组存活率上升为 65% 和 75%, 但与模型组相比, 差别无显著性 ($p > 0.05$)。

[0552] 表 33 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠存活率的影响 (I)

[0553]

组别	给药 方案	存活动物数 (相对存活率%)						
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天处死
正常对照		10	10	10	10	10	10	10**
n=10		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
模型组	iv qd×7	20	20	20	18	16	13	10
n=20		100%	100%	100%	90%	80%	65%	50%
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×3	20	20	20	19	18	16	14
n=20		100%	100%	100%	95%	90%	80%	70%
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×5	20	20	20	20	19	19	18
n=20		100%	100%	100%	100%	95%	95%	90%
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×7	20	20	20	20	20	19	19
n=20		100%	100%	100%	100%	100%	90%	90%

[0554] SPSS 软件, Survival Life Tables 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0555] 表 34 重组人神经调节蛋白不同用药天数对病毒感染小鼠存活率的影响 (II)

[0556]

组别	给药 方案	存活动物数 (相对存活率%)						
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天处死
正常对照		10	10	10	10	10	10	10**
n=10		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
模型组	iv qd×7	20	20	20	18	17	14	12
n=20		100%	100%	100%	90%	85%	70%	60%
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×3	20	20	20	20	19	16	15
n=20		100%	100%	100%	100%	95%	80%	75%
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×5	20	20	20	20	19	19	18
n=20		100%	100%	100%	100%	95%	95%	90%
神经调节蛋白 30μg/kg	iv qd×7	20	20	20	20	20	19	18
n=20		100%	100%	100%	100%	100%	95%	90%

[0558] SPSS, Survival Life Tables 分析, 与模型组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

[0559] 10 结论

[0560] 重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$, 连续静脉注射 3 天、5 天和 7 天, 均能提高模型动物的 EF/FS 值, 5 天与 7 天用药组 EF/FS 值 ($86.8 \pm 4.4\%$ / $51.9 \pm 5.8\%$, $87.0 \pm 3.3\%$ / $51.8 \pm 5.1\%$), 与模型组 EF/FS 值 ($66.5 \pm 5.6\%$ / $31.8 \pm 3.7\%$) 相比, 均有显著性差异 ($P < 0.01$), 5 天与 7 天用药组 LVDs 值均显著下降 (分别为 0.090 ± 0.011 , $0.092 \pm 0.012\text{cm}$), 与模型组比较 (0.133 ± 0.012) 均有显著性差异 ($P < 0.01$); 重组人神经调节蛋白能减轻模型动物心肌病理损害程度, 有效降低模型动物血清中肌钙蛋白 (cTnI) 水平, 5 天用药组 ($1.06 \pm 1.32\text{ng/ml}$)、7 天用药组 cTnI ($1.05 \pm 1.2\text{ng/ml}$) 明显低于模型组 ($23.54 \pm 16.96\text{ng/ml}$), $P < 0.01$; 与模型组动物 50% 的存活率相比, 重组人神经调节蛋白连续静脉注射 5 天和 7 天, 可显著提高模型动物的存活率, 达 85%, $p < 0.05$ 。

[0561] 试验结果表明: 重组人神经调节蛋白 $30 \mu\text{g/kg}$ 连续给药 5 天可有效治疗病毒感染致小鼠急性心肌损伤。

[0562] 实施例 6. 重组人神经调节蛋白对下腔静脉缩窄致犬充血性心力衰竭的治疗作用

[0563] 1 摘要

[0564] 目的观察重组人神经调节蛋白对下腔静脉缩窄 (TIVCC) 所致犬充血性心力衰竭的治疗效果。方法经胸缩窄犬下腔静脉约 50% 后 1 周左右, 心超检测 EF 值下降约 20% 或心输出量减少 20%, 表明已建立了稳定的低心排、充血性心衰动物模型。随后动物随机分组, 每组 6 条犬, 每天静脉注射重组人神经调节蛋白, 设置 3 个剂量组, 分别为 1、3、 $10 \mu\text{g/kg}$, 连续 5 天。给药结束后进行心功能 (心脏超声) 检测, 并分别经颈静脉和颈动脉插管分析模型动物血流动力学各项参数的改变。结果 3 个剂量的重组人神经调节蛋白 (1、3、 $10 \mu\text{g/kg}$), 连续用药 5 天, 均能升高模型动物的 EF/FS 值和心输出量 (CO), 用药前后以及与模型组相比, 差别均有显著性 ($p < 0.05$, $p < 0.01$); 1、3、 $10 \mu\text{g/kg}$ 重组人神经调节蛋白能有效提高动物左心 dp/dt, 与模型组相比差别均具有显著性 ($p < 0.01$), 能有效提高模型动物的 LVPmax, 降低 LVPmin 值, 与模型组相比, $p < 0.05$, 而对右心室的作用不很明显。结论重组人神经调节蛋白能有效治疗下腔静脉缩窄致犬的充血性心力衰竭。

[0565] 2 目的

[0566] 明确重组人神经调节蛋白对下腔静脉缩窄所致犬充血性心衰的治疗效果。

[0567] 3 受试样品

[0568] 重组人神经调节蛋白成品, 上海泽生科技开发有限公司研制, 批号: 200110006-2, 浓度: $500 \mu\text{g/支}$; 效价: 5000u/支 , 纯度 $> 95\%$ (HPLC-C8)。

[0569] 4 实验动物

[0570] 4.1 品系、来源、合格证号: 杂种犬, 由复旦大学中山医院提供, 经复旦大学实验动物部检疫合格。

[0571] 4.2 体重、性别: $13 \sim 18\text{kg}$, 雄性。

[0572] 4.3 动物数: 每组 6 条。

[0573] 5 材料、仪器

[0574] 5.1 心脏超声心动仪, Hewlett Packard sonos 5500; 探头型号: S4;

[0575] 5.2 注射用水, 购自湛江安度斯生物有限公司, $10 \times 5\text{ml}$, 批号 0112180;

[0576] 5.3 高频电刀, 上海沪通电子仪器厂, GD350-D;

[0577] 5.4 心电图记录仪, Nihon Kohden ECG-6511;

- [0578] 5.5 监护电极,加拿大 Ludlow 公司,型号:MT-200;
- [0579] 5.6 生理记录仪,上医大医疗器械研究中心,SMUP-B;
- [0580] 5.7 电动呼吸器,上海医疗器械四厂,SC-3;
- [0581] 5.8 三腔气囊漂浮导管,Edwards 114F7。
- [0582] 6 实验方法
- [0583] 6.1 实验组别
- [0584] 实验设置假手术组、模型组和受试药组。
- [0585] 假手术组 ($n = 6$):仅开胸不缩窄下腔静脉。
- [0586] 模型组 ($n = 6$):建立心衰模型后,注射制剂缓冲液。
- [0587] 受试药组:建立心衰模型后,注射重组人神经调节蛋白。
- [0588] 6.2 受试药物剂量设置、配制方法及给药方案
- [0589] 受试药重组人神经调节蛋白高、中、低 3 个剂量组,分别为 1、3、10 $\mu\text{g/kg}$,用制剂缓冲液(赋形剂)稀释至所需浓度,静脉注射,每天一次,连续 5 天。模型组静脉注射制剂缓冲液,每天一次,连续 5 天。给药容积均为 0.8ml/kg 体重。
- [0590] 6.3 试验方法
- [0591] 6.3.1 犬下腔静脉缩窄致心衰动物模型的建立
- [0592] 经外周静脉推注 3%戊巴比妥钠 (30mg/kg),使犬麻醉后气管插管。无菌条件下经右胸 4~5 肋间打开胸腔,测量距右心房 3cm 处的下腔静脉周长。选择周长相当于其 1/3~1/2 的硬质短管,用 7 号丝线将短管与下腔静脉一同结扎,抽出短管,充分止血后关闭胸腔。饲养约 1 周后,根据腹水形成多少等情况,进行心超检测,当发现 EF 下降约 20%或左心扩大约 20%,确定已建立了稳定的低排充血性心衰动物模型。随后每天静脉给药,连续 5 天。假手术组仅开胸,不进行下腔静脉缩窄。
- [0593] 6.3.2 药效试验
- [0594] 确认动物模型建立后,按照动物分组和给药方案进行试验。
- [0595] 6.3.3 观测指标
- [0596] 6.3.3.1 心功能检测
- [0597] 分别于手术前、用药前和用药 5 天后,在犬麻醉状态下进行心脏功能指标检测。主要指标包括:
- [0598] EF(Ejective Fraction):心室射血分数,系指心室舒张末期 (EDV) 和收缩末期容积 (ESV) 之差与心室舒张末期 (EDV) 的比值,是反应心泵功能尤其收缩功能的常用指标;
- [0599] FS:心室缩短分数,是反应心室收缩功能的指标;
- [0600] CO:心输出量,每分钟射出的血液量。
- [0601] 6.3.3.2 血流动力学指标检测
- [0602] 分别于手术前、用药前以及给药 5 天后,在犬麻醉状态下,经右侧颈静脉插入 7F 三腔气囊漂浮导管,记录右房压、右室压、肺动脉压及肺动脉楔压。
- [0603] 再经左侧颈动脉插入 6F 三腔气囊漂浮导管,用生理记录仪记录主动脉压,左室压等指标,主要指标包括 LVPmax、LVPmin、+dp/dt、-dp/dt。
- [0604] 7 数据处理
- [0605] 所得数据用 SPSS 软件进行配对资料 t 检验或非参数检验。

[0606] 8 结果

[0607] 8.1 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬心功能的影响

[0608] 8.1.1 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬左心 EF/FS 值的影响

[0609] 通过超声检测显示,模型组动物缩窄前 EF 和 FS 值分别为 $82.3 \pm 1.6\%$ 和 $49.2 \pm 2.6\%$,手术后分别降到 $59.1 \pm 7.3\%$ 和 $29.3 \pm 3.9\%$,缩窄前后相比差异有显著性 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),5 天后 EF 和 FS 值继续维持在 $55.5 \pm 10.9\%$ 和 $28.5 \pm 6.6\%$ 水平,表明我们建立的下腔静脉缩窄致犬充血性心力衰竭模型成立而且比较稳定。

[0610] 重组人神经调节蛋白用药后,3 个剂量组模型动物左心室的 EF 和 FS 值均被明显提高,低剂量组 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) 的 EF 和 FS 值分别由 57.7 ± 10.9 和 30.6 ± 8.0 提高至 70.4 ± 8.4 和 39.7 ± 5.7 ,用药前后比较差异有显著性 ($P < 0.05$),同时与模型组比较差别也有显著性 ($P < 0.05$)。同样,中、高剂量组模型动物左心室 EF/FS 值也被明显提高,给药前后以及与模型组比较,差别均具有显著性 ($p < 0.01$),结果详见表 35。

[0611] 表 35 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬左室 EF/FS 的影响

[0612]

组别	FS (%)			EF (%)		
	手术前	给药前	给药后	手术前	给药前	给药后
假手术	51.7 ± 2.2	$47.4 \pm 1.3^{**}$	$50.3 \pm 2.2^{**}$	84.1 ± 1.4	$81.4 \pm 1.1^{**}$	$83.1 \pm 1.6^{**}$
模型组	49.2 ± 2.6	29.3 ± 3.9	28.5 ± 6.6	82.3 ± 1.6	59.1 ± 7.3	55.5 ± 10.9
神经调节蛋白 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$	50.5 ± 3.3	27.7 ± 5.6	$41.5 \pm 3.1^{**\Delta\Delta}$	82.9 ± 2.6	55.8 ± 10.0	$74.7 \pm 3.2^{**\Delta\Delta}$
神经调节蛋白 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$	51.7 ± 2.9	29.9 ± 6.4	$42.4 \pm 4.4^{**\Delta\Delta}$	84.7 ± 2.8	58.0 ± 8.3	$74.7 \pm 4.6^{**\Delta\Delta}$
神经调节蛋白 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$	50.8 ± 4.0	30.6 ± 8.0	$39.7 \pm 5.7^{*\Delta}$	82.8 ± 3.0	57.7 ± 10.9	$70.4 \pm 8.4^{*\Delta}$

[0613]

[0614] $n = 6$, * 与模型组相比 $P < 0.05$; ** 与模型组相比 $P < 0.01$; Δ 用药前后相比 $P < 0.05$

[0615] $\Delta\Delta$ 用药前后相比 $P < 0.01$

[0616] 8.1.2 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬心输出量 (CO) 的影响

[0617] 表 36 结果显示,重组人神经调节蛋白能明显提高模型动物的心输出量, $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 用药组动物心输出量由 2.4 ± 0.5 增加至 3.7 ± 0.8 ,用药前后相比差别有显著性 ($p < 0.05$),同时与模型组动物相比,差别也有显著性 ($p < 0.05$)。3、 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组的 CO 变化则更加明显 ($p < 0.01$)。对心率变化的检测结果显示,重组人神经调节蛋白对模型动物的心率影响不大 (结果未显示)。

[0618] 表 36 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬心输出量的影响 (Lmin)

[0619]

组别	CO (L/min)		
	手术前	给药前	给药后
假手术组	4.3 ± 0.7	3.9 ± 0.6	4.0 ± 0.6**
模型组	4.7 ± 1.3	2.5 ± 0.8	2.7 ± 0.5
神经调节蛋白 10μg/kg	4.3 ± 0.6	1.9 ± 0.3	3.6 ± 0.7**▲▲
神经调节蛋白 3μg/kg	4.3 ± 0.8	2.1 ± 0.7	4.0 ± 0.9*▲▲
神经调节蛋白 1μg/kg	4.2 ± 0.6	2.4 ± 0.5	3.7 ± 0.8*▲

[0620] n = 6 *与模型组相比 P < 0.05 ; **与模型组相比 P < 0.01 ; ▲与用药前相比 P < 0.05

[0621] ▲▲与用药前相比 P < 0.01

[0622] 8.2 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬血流动力学的影响

[0623] 采用漂浮导管技术检测模型动物左右心室 dp/dt 和收缩 / 舒张末压变化。结果显示, 1、3、10 μg/kg 重组人神经调节蛋白能有效提高动物左心 dp/dt, 与模型组相比差别均具有显著性 (p < 0.05) ; 有效提高模型动物的 LVPmax, 降低 LVPmin 值, 与模型组相比, p < 0.05 ; 重组人神经调节蛋白对左心 -dp/dt 和右心室 ±dp/dt 及心室末压影响不大, 结果详见表 37, 38。

[0624] 表 38 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬左室 dp/dt 的影响

[0625] 组别	L(+dp/dt) (mmHg/s)	L(-dp/dt) (mmHg/s)
假手术组	5088.99 ± 982.87**	-3233.39 ± 923.82
模型组	2017.75 ± 295.25	-2384.94 ± 1062.31
[0626] 神经调节蛋白 10μg/kg	5104.88 ± 1332.05**	-3658.34 ± 1390.97
神经调节蛋白 3μg/kg	5000.45 ± 1535.88**	-3249.52 ± 973.32
神经调节蛋白 1μg/kg	4024 ± 1006 635.63**	-2933 ± 613.44

[0627] n = 6, *与模型组相比 P < 0.05 ; **与模型组相比 P < 0.01

[0628] 表 39 重组人神经调节蛋白对 TIVCC 犬左室 LVPmax/LVPmin 的影响

[0629] 组别	LVPmax (mmHg)	LVPmin (mmHg)
假手术组	145.04 ± 15.17**	-0.03 ± 6.48
模型组	95.07 ± 11.62	2.42 ± 2.86
神经调节蛋白 10μg/kg	122.87 ± 17.37*	-0.69 ± 1.05*
神经调节蛋白 3μg/kg	114.68 ± 17.12*	-1.12 ± 1.34*
神经调节蛋白 1μg/kg	102.12 ± 12.42	0.59 ± 3.05

[0630] n = 6, *与模型组相比 P < 0.05 ; **与模型组相比 P < 0.01

[0631] 10 结论

[0632] 3 个剂量的重组人神经调节蛋白 (1、3、10 μg/kg), 连续用药 5 天, 均能升高模型动

物的 EF/FS 值和心输出量 (CO), 用药前后以及与模型组相比, 差别均有显著性 ($p < 0.05$, $p < 0.01$); 1、3、10 $\mu\text{g/kg}$ 重组人神经调节蛋白能有效提高动物左心 dp/dt , 与模型组相比差别均具有显著性 ($p < 0.05$), 能有效提高模型动物的 LVPmax, 降低 LVPmin 值, 与模型组相比, $p < 0.05$, 而对右心室的作用不很明显。

[0633] 结果表明: 重组人神经调节蛋白能有效治疗下腔静脉缩窄致犬的充血性心力衰竭。

[0634] 实施例 7. NRG-1 长期毒性试验

[0635] 1. 试验目的:

[0636] 观察恒河猴静脉注射重组人神经调节蛋白三周, 停药后继续观察三周, 了解对机体产生的毒性反应及严重程度, 毒性反应的靶器官及其损害的可逆性, 确定无毒性反应剂量, 为临床拟定人用安全剂量提供参考。

[0637] 2. 受试药物:

[0638] 2.1 名称: 重组人神经调节蛋白

[0639] 2.2 批号: 200210024

[0640] 2.3 提供单位: 上海泽生科技开发有限公司

[0641] 2.4 含量: 3.75mg/ml。

[0642] 2.5 比活性: $1.12 \times 10^4 \text{u/mg}$ 。

[0643] 2.6 性状: 无色透明溶液。

[0644] 2.7 保存条件: 4°C 保存。

[0645] 2.8 赋形剂: 0.15M NaCl, 10mM 磷酸钠盐, pH 6.0。

[0646] 2.9 配制方法: 用生理盐水稀释至所需浓度。

[0647] 3. 动物:

[0648] 3.1 动物品系: 恒河猴

[0649] 3.2 动物来源: 安徽省利辛县大李集猕猴养殖场, 合格证号: 皖发驯繁 2002-6 号。

[0650] 3.3 动物接收时间: 2002 年

[0651] 3.4 体重: 给药开始时 2.6-5.9kg。

[0652] 3.5 性别: 雌雄各半。

[0653] 3.6 动物数: 共 24 只。

[0654] 3.7 动物标识: 采用胸牌标记。

[0655] 3.8 饲养条件: 单笼饲养, 用市售猴用颗粒饲料 (上海仕林科学技术有限公司提供) 喂养。每日喂二次, 每次 100 克, 每日喂水果 100 克左右。动物房温度 $20 \sim 25^\circ\text{C}$, 相对湿度 $50 \sim 70\%$, 每天光照 12hr。

[0656] 3.9 适应环境时间: 给药前适应环境饲养 25 天。

[0657] 4. 剂量:

[0658] 4.1 剂量设置:

[0659] 对照组: 0U/kg/d (注射等容量的赋形剂)

[0660] 低剂量组: 84U/kg/d (相当于猴等效剂量 2 倍)

[0661] 中剂量组: 168U/kg/d (相当于猴等效剂量 4 倍)

[0662] 高剂量组: 840U/kg/d (相当于猴等效剂量 20 倍)

[0663] 4.2 剂量设置依据：

[0664] 重组人神经调节蛋白临床拟用适应症为心力衰竭的治疗。小鼠药效模型为嗜心性柯萨奇 B3 病毒致心肌炎模型，剂量为 84,168,840U/kg (相当于猴 21,42,84U/kg)，连续静脉注射给药 5 天，病理评分分别为 1.5, 0.7, 0.56 (病理评分标准为：0 分：病变面积为 0%，1 分：病变面积为 25%，2 分：病变面积为 50%，3 分：病变面积为 75%，4 分：病变面积为 100%)。故小鼠 168,840U/kg 剂量可明显减轻心脏的损伤。临床拟给药途径为静脉注射，临床拟用方案为每天给药一次，连续给药 3-5 天。以猴等效剂量 42U/kg 为明显有效剂量，拟定猴长期毒性剂量为动物有效剂量的 2, 4, 20 倍。

[0665] 5. 给药期限：

[0666] 每天给药一次，连续给药 3 周。

[0667] 6. 恢复期限：3 周。

[0668] 7. 给药容量：1.0ml/kg 体重。

[0669] 8. 给药途径：缓慢静脉注射，与临床拟用途径一致。

[0670] 9. 试验方法：

[0671] 试验动物购入前经肠虫清驱肠寄生虫，进行结核菌素试验，经适应环境并进行血液学、血清生化、尿液及心电图等检查二次，确定为健康动物（雌性须未孕）作为受试动物。按体重和性别随机分为 4 组，每组 6 只，雌雄各半。给药容量 1.0ml/kg 体重，每周给药前称一次体重，根据体重调整给药容量，给药三周后 24 小时和恢复期 3 周结束时各组分别处死 2/3 和 1/3 动物（雌、雄猴各 2 只和 1 只），进行系统尸解、脏器称重，计算脏器系数并进行病理组织学检查。给药 10 天及解剖前采血进行各项血液及生化等指标检查，并采骨髓作涂片检查。

[0672] 9.1 试剂：

[0673] 9.1.1 血清生化试剂：Trace 进口生化试剂

[0674] 9.1.2 血液学测定试剂

[0675] 9.1.3 抗体检测主要试剂

[0676] ①包被液： NaHCO_3 0.293g, Na_2CO_3 0.159g, 溶于 100ml 水中。

[0677] ②底物缓冲液：pH5.0, 柠檬酸 1.02g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.68g 溶于水中。

[0678] ③洗液：0.01M PBS 加 1：2000 Tween-20

[0679] ④封闭液：脱脂奶粉 5g, 溶于 100ml, pH 7.4 的 0.01M PBS 中。

[0680] ⑤HRP 标记兔抗猴二抗：美国 Sigma 公司产品，批号：A-2054。

[0681] ⑥Tween-20：进口分装，上海实生细胞生物技术有限公司提供。

[0682] ⑦四甲基邻苯胺 (TMB)：进口分装，上海华美生物工程公司提供。

[0683] ⑧ H_2SO_4 ：分析纯，上海凌峰化学试剂有限公司。

[0684] 9.2 仪器：

[0685] Hitachi-7060 型自动生化分析仪

[0686] Roche Haematology Vet 型血球计数仪

[0687] 550 型酶标仪：美国 BIO-RAD 产品

[0688] Heraeus 低温离心机，德国 Heraeus 公司

[0689] Hewlett Packard sonos 5500 型心脏超声仪，S4 探头。

[0690] 9.3 血液学和生化检测方法：见下表

[0691] 血液学试验方法

[0692]

试验名称	测定方法
WBC 白细胞	仪器分析
RBC 红细胞	仪器分析
PLT 血小板	仪器分析
Ht 红细胞压积	仪器分析
Hb 血红蛋白	仪器分析
MCV 红细胞平均体积	仪器分析
MCH 红细胞平均血红蛋白	仪器分析
MCHC 红细胞平均血红蛋白浓度	仪器分析
Ret 网织红细胞	煌焦油蓝法
DC 白细胞分类计数	瑞氏染色
CT 凝血时间	玻片法

[0693] 血清生化试验方法

[0694]

试验名称	测定方法
ALT/GPT 丙氨酸转氨酶	IFCC w/o P-5-P
AST/GOT 天冬氨酸转氨酶	IFCC w/o P-5-P
ALP 碱性磷酸酶	Tris/Carb
LDH 乳酸脱氢酶	L→P 酶法
CPK 肌酸磷酸激酶	NAC 酶法
BUN 尿素氮	Urease-GLDH-Kinetic
CRE 肌酐	Jaffe-Kinetic

[0695]

GLU 葡萄糖	Oxidase
T-Bil 总胆红素	二甲亚砷法
T-CHO 总胆固醇	Enzymatic
TP 总蛋白	Biuret
ALB 白蛋白	溴甲酚绿法
K ⁺ 钾	电极法
Na ⁺ 钠	电极法
Cl ⁻ 氯	电极法
P ⁺⁺⁺ /PHOS 无机磷	Phosphomolybdate-UV
Ca ⁺⁺ 钙	邻甲酚酞络合酮法
Mg ⁺⁺ 镁	Calmagite 络合指示法

[0696] 9.4 抗体检测方法：

[0697] 包被抗原：用包被缓冲液稀释重组人神经调节蛋白至 6 μg/ml，以 100 μl/孔加至 96 孔酶标板内，37℃，1hr。

[0698] 封闭：洗板 5 次，用洗涤液配 5% 脱脂奶粉，以 200 μl/孔加至板内，置 37℃，2hr。

[0699] 稀释待检血清：用样品稀释液稀释样品，浓度为 1：100。

[0700] 加样：将封闭好的酶标板洗板 3 次，加入待检血清，100 μl/孔，37℃，1hr。

[0701] 加酶标抗体：洗板 5 次，加入 1：1000 稀释 HRP 标记的兔抗猴免疫球蛋白，100 μl/孔，37℃，1hr。

[0702] 底物：洗板 5 次。加入新鲜配制的底物工作液，100 μl/孔，37℃，10min。

[0703] 终止：加入 2N H₂SO₄，50 μl/孔，终止反应。

[0704] OD 值检测：用酶标仪检测，测定波长 450nm。

[0705] 结果判断：检测样品 OD 值大于阴性对照 2.1 倍以上（1：1000 稀释）作为阳性结果。

[0706] 10. 观察指标和测定指标的时间：

[0707] 10.1 死亡情况：

[0708] 每天观察 1～2 次，如有动物死亡，记录死亡时间。

[0709] 10.2 一般征状：

[0710] 包括外观、体征、行为活动，笼子表面粘血或渗出物，皮毛光泽度等一般征状。每天观察 1～2 次。

[0711] 10.3 体重：

[0712] 每周给药前称一次体重。

[0713] 10.4 体温：

[0714] 给药第 1、3 和 5 天测给药前和给药后 1 小时的体温。

[0715] 10.5 摄食量：

[0716] 每天每只猴加颗粒饲料 200g,另给水果 100g,计算每天每只猴的食物消耗量。

[0717] 10.6 心电图检查：

[0718] 分别在给药前测二次,给药开始后第 10 天、给药结束时及停药恢复期末测定各导联心电图,计算 P-R、QRS、QT、HR、ST 值。

[0719] 10.7 心脏 B 超检查：

[0720] 给药结束及恢复期结束解剖前 1 天,拟解剖动物用 3%戊巴比妥钠 (30mg/kg) 静脉注射麻醉后,用心脏 B 超测定动物室间隔厚度 (IVS),左室后壁厚度 (PW),左室舒张末容积 (LVDd),左室收缩末容积 (LVDs),射血分数 (EF),缩短分数 (Fs),二尖瓣血流峰值 (MV),主动脉瓣血流峰值 (AV),心率 (HR)。

[0721] 10.8 血液学指标：

[0722] 给药前测二次,给药开始后第 10 天、给药结束时及停药 3 周恢复期末解剖前一天,经隐静脉采血 0.5ml,用 3.8% EDTA 抗凝,测定以下指标:红细胞数 (RBC),网织红细胞数 (Ret),血红蛋白 (Hb),白细胞总数 (WBC) 与分类 (DC) 包括:中性 (N)、嗜酸 (E)、淋巴 (L) 与单核 (M),血小板数 (PLT),凝血时间 (CT)、红细胞压积 (Ht)、红细胞平均体积 (MCV)、红细胞平均血红蛋白 (MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度 (MCHC)。

[0723] 10.9 血清生化指标：

[0724] 给药前测二次,给药开始后第 10 天、给药结束时及恢复期 3 周解剖前一天,由隐静脉采血 5ml,离心后取血清,测定天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸磷酸激酶 (CPK)、尿素氮 (BUN)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、葡萄糖 (GLU)、血清总胆红素 (T-Bil)、肌酐 (CRE)、总胆固醇 (T-CHO)、钠 (Na⁺)、钾 (K⁺)、氯 (Cl⁻)、钙 (Ca⁺⁺)、镁 (Mg⁺⁺)、磷 (P⁺⁺⁺)。

[0725] 10.10 尿常规检查：

[0726] 给药前测二次,给药开始后第 10 天、给药结束时及恢复期 3 周解剖前,取尿样,检测白细胞、亚硝酸盐、酸碱度 (pH 值)、尿蛋白、尿糖、酮体、尿胆原、尿胆红素及血红蛋白。

[0727] 10.11 粪便检查：

[0728] 给药前检查粪便虫卵及隐血。给药开始后第 10 天、给药结束时及恢复期 3 周各进行一次粪隐血检查。

[0729] 10.12 眼底检查：

[0730] 于解剖前将动物麻醉用检眼镜检查眼底。

[0731] 10.13 脏器系数：

[0732] 给药 3 周后 24 小时和停药恢复期结束时各组分别处死 2/3 和 1/3 动物 (雌、雄猴各 2 只和 1 只),进行尸解。解剖时取心、脑、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、淋巴结、甲状腺、睾丸或子宫、卵巢或前列腺称重并计算各自的脏器系数。

[0733] 10.14 病理组织学检查：

[0734] 取心 (左心室前壁、右心室、室间隔、左心房、右心房)、肝、脾、肺、脑、胃、十二指肠、回肠、结肠、肾、膀胱、肾上腺、垂体、甲状腺、胸腺、胰、睾丸、前列腺、卵巢、子宫、淋巴结 (颈、肠系膜) 和注射局部的血管和皮下组织进行病理组织学检查。

[0735] 10.15 骨髓检查：

[0736] 解剖前,动物麻醉后从股骨采取骨髓,涂片、染色,光镜下镜检巨系、粒系、红系、淋

巴和浆细胞以及其它类型细胞,每只动物以四象限及中央部共 5×100 个有核细胞进行计数分类,计算 GE 比值,并进行摄片。

[0737] 10.16 血清抗神经调节蛋白抗体的检测:

[0738] 给药开始后第 1、2、3 周及恢复期结束时检测血清中抗神经调节蛋白抗体,一旦抗体呈阳性且为中和抗体即停止给药。

[0739] 10.17 数据处理及统计分析方法:

[0740] 各剂量给药组与对照组的数据用方差分析进行统计检验。

[0741] 11. 试验结果:

[0742] 11.1 死亡情况:

[0743] 试验期间未出现与给受试物有关的动物死亡。给药 3 周结束时,动物麻醉后进行心脏 B 超检查,对照组 8# 雄猴因麻醉过度,于计划解剖前夜死亡;恢复期 3 周结束时,动物麻醉后进行心脏 B 超检查前,发现对照及低剂量组各有 1 只动物 (5#,6#) 心率明显减慢 (20-30 次/min),系麻醉过度表现,故提前 1 天解剖。

[0744] 11.2 一般征状:

[0745] 给药第 2 天高剂量组 1 只雄猴于静脉注射后 30min 出现呕吐。给药第 2-7 天期间中、高剂量组各有 1 只动物于静脉注射后 20-30min 内出现呕吐。给药一周后各给药组均有部分动物出现流涎,其中高剂量组出现的例数明显多于其它给药组;低剂量组仅 1 只动物于给药第 9 天出现 1 次流涎。高剂量组动物给药 2 周后出现竖毛、皮毛无光泽、活动减少、厌食。给药第 3 天开始给药局部皮肤及血管出现轻度苍白,变硬,进行性加重,呈明显剂量依赖关系。高剂量组 21# 动物给药第 3 周开始出现稀便,呈淡黄色,无明显规律。对照组动物给药期间及停药恢复期无任何异常表现。

[0746] 11.3 体重变化:

[0747] 给药期间各组动物体重与对照组相比无显著性差异 ($p > 0.05$);各组动物给药前后自身对照,高剂量组动物体重明显下降 ($p < 0.01$)。

[0748] 11.4 体温:

[0749] 给药第 1、3 和 5 天测给药前和给药后 1 小时的体温,给药前后均无明显差异。

[0750] 11.5 摄食量:

[0751] 中、高剂量组动物给药 1 周后,陆续有明显剩食,摄食量为 50 ~ 150g 不等。对照组及低剂量组动物试验期间未出现剩食。恢复期所有动物均无剩食。

[0752] 11.6 心电图检查结果:

[0753] 给药 3 周各给药组心率明显减慢,与对照组相比 $p < 0.05$, $p < 0.01$,同时 P-R、QRS、QT 间期也相应延长,以低、中剂量组较为明显;中、高剂量组 RV1 电压较高,低、中剂量组 SV1 加深,各给药组 RV3 电压较高。($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)。其它个别参数于不同检测时间的数值略有波动,但均在正常范围内。

[0754] 11.7 心脏 B 超检查结果:

[0755] 给药 3 周及恢复 3 周结束时,心脏 B 超检查,对照组及各给药组各参数均无明显差异 ($p > 0.05$)

[0756] 11.8 血液学检查结果:

[0757] 整个试验期间除个别参数在正常范围内波动外,未见明显异常变化。

[0758] 11.9 血清生化检查结果：

[0759] 整个试验期间除个别参数在正常范围内波动外，未见明显异常变化（见表 14～17）。

[0760] 11.10 尿常规检查结果：

[0761] 给药前、给药开始后第 10 天、第 3 周及恢复期 3 周解剖前进行尿液检查，对照组及各给药组均有个别动物尿蛋白含量增加，酮体呈阳性，无规律性。对照组及各给药组均有个别动物有一过性红细胞增加。未见其它明显异常。

[0762] 11.11 粪便检查结果：

[0763] 所有动物给药前、给药开始后第 10 天、第 3 周及恢复期 3 周解剖前进行粪便潜血试验均为阴性，无虫卵或寄生虫。

[0764] 11.12 眼底检查结果：

[0765] 给药 3 周及恢复期 3 周解剖前，各组动物眼底检查未发现明显异常。

[0766] 11.13 系统解剖：

[0767] 给药 3 周，中剂量组 2# 雄猴及 23#、24# 雌猴心包内见少量积液；高剂量组 1#、11# 雄猴及 21# 雌猴心包内见积液，各抽出约 2-3ml，澄清，色微黄；高剂量组 1# 及 21# 动物脑内蛛网膜下腔见脑积水，各抽出约 1-2ml，澄清，色微黄；21# 动物腹腔内有积液，大肠粘膜面见出血点，并见小灶性溃疡。高剂量组 22# 雌猴，肺叶见充血、出血灶。8# 猴解剖时已死亡，尸检肺部呈明显充血和片状出血，其余未见明显异常。

[0768] 恢复期 3 周结束时，高剂量组雌雄各 1 只动物（10#，14#）脑内蛛网膜下腔见脑积水，分别抽出 0.5ml 和 3ml；因麻醉过度提前解剖动物未见明显异常。

[0769] 其余脏器未见明显异常。

[0770] 上述积液进行体液常规检查均为漏出液。

[0771] 11.14 脏器重量及其系数：

[0772] 解剖时，主要脏器称重并计算脏器系数。各脏器重量未见与给受试物有关的异常变化。

[0773] 11.15 病理组织学检查结果：

[0774] 给药 3 周，高剂量组 1#、11# 雄猴及 21# 雌猴心脏心房和心室心肌纤维见弥漫性空泡样变性，心内膜及外膜则未见明显异常。另外，11# 及 21# 猴软脑膜下见血管充血、轻度水肿；21# 动物结肠部分粘膜坏死、粘膜及浆膜明显水肿、并有炎症细胞浸润。对照组 8# 解剖时已死亡动物肺脏肺泡隔增厚、充血，片状出血，部分肺泡内充满水肿液，肾脏、胃、大肠、小肠及胰腺组织部分自溶。其余未见异常。

[0775] 恢复期 3 周结束时，高剂量组 14# 雌猴心肌纤维见轻度空泡样变性，软脑膜下见血管充血。因麻醉过度提前解剖动物未见明显异常。

[0776] 各给药组注射部位血管除出血性改变外，未见明显的刺激反应。

[0777] 结论：给药组部分动物心脏心包积液和脑积液的大体改变及其组织学检查结果与给受试物相关。其余一些动物脏器见散在、偶发的病变，如肺脏及胃肠道炎性反应等，多系动物的自发性病变。

[0778] 11.16 骨髓检查结果：

[0779] 给药 3 周及恢复期 3 周猴麻醉后，解剖前，从右侧髌骨采取骨髓、涂片、染色，光镜

下镜检巨系、粒系、红系、淋巴和浆细胞以及其它类型细胞,每只动物以四象限及中央部共 5×100 个有核细胞进行计数分类,计算GE比值,并进行显微摄影。

[0780] 结果:各组动物粒、红、巨三系细胞均正常增生,粒红比值正常,未见异常病理细胞,未引起骨髓毒性病理损害。)

[0781] 11.17 血清抗神经调节蛋白抗体检查结果:

[0782] 给药开始后第1、2、3周及恢复期3周结束时检测血清中抗人神经调节蛋白抗体,各给药组均为阴性。

[0783] 12. 讨论:

[0784] 以84,168,840U/kg剂量给恒河猴连续静脉注射重组人神经调节蛋白3周(相当于猴等效剂量2,4,20倍),以赋形剂作对照,停药后继续观察3周。

[0785] 试验结果表明:试验期间未出现与给受试物有关的动物死亡。给药1周后各给药组均有部分动物出现呕吐、恶心、流涎。高剂量组动物给药2周后出现竖毛、皮毛无光泽、活动减少、厌食;给药局部皮肤及血管出现轻度苍白,变硬。对照组动物给药期间及停药恢复期无任何异常表现。

[0786] 高剂量组动物给药3周时体重明显降低。摄食量明显减少。所有动物给药前后体温无明显变化。

[0787] 血液学检查、血清生化检查及尿、粪常规检查均未见明显的毒理学变化。

[0788] 心电图检查在给药3周时,各给药组心率明显减慢,可能与该受试物的药理作用有关。此外,V1,V3的心电图R波和S波的改变可能与动物胸导联差异有关。心脏超声检查未见明显异常,病理学检查也未发现心肌肥厚性变化。

[0789] 眼底检查未发现异常变化。

[0790] 骨髓涂片检查未见明显毒性病理改变。

[0791] 给药3周后大体解剖,发现中、高剂量组各有3只动物有明显心包积液,各可抽取2-3ml漏出液不等;高剂量组还发现2只动物蛛网膜下腔有脑积水,抽得漏出性积液1-2ml。停药3周解剖时,高剂量组2只动物蛛网膜下腔有脑积水,分别抽得漏出性积液约0.5及3ml。

[0792] 病理组织学检查上述高剂量组有心包积液动物的心肌纤维呈弥漫性空泡样变性,有脑积液动物软脑膜下见血管充血、轻度水肿,均与给受试物有关。

[0793] 抗体检测为阴性。

[0794] 动物出现的上述呕吐、恶心、厌食等胃肠道症状,进而可导致高剂量组体重下降,可能与受试物在动物胃肠道的分布与消除有关。动物出现的流涎,给药局部皮肤苍白、变硬及心包积液、脑积液等征状,表明中、高剂量组重组人神经调节蛋白可使恒河猴出现毛细血管渗漏综合征,进而导致软脑膜下充血水肿。3周恢复期未完全恢复。此外,动物出现的心率减慢、高剂量组动物心肌纤维空泡样变性均与给药物有关。

[0795] 实施例8. NRG-1 体外活性测定(激酶受体活化的酶联免疫吸附试验)

[0796] 1 实验原理

[0797] HER2/neu 基因编码一具有酪氨酸蛋白激酶活性的穿膜蛋白p185,常与ErbB3或ErbB4形成异源二聚体,通过ErbB3或ErbB4与相应配体(Neuregulin-1)的结合,激活HER2编码的酪氨酸蛋白激酶,介导功能信号的传递。我们利用神经调节蛋白能与细胞表面

ErbB3/ErbB4 分子结合、间接介导 ErbB2 蛋白磷酸化的特性,建立快速、灵敏、高通量、定量测定重组人神经调节蛋白体外生物学活性的方法。

[0798] 2 试验材料

[0799] 2.196 孔细胞培养板 (Corning 公司);Costar 96 孔酶标检测板。

[0800] 2.2 人乳腺癌细胞株 (MCF-7),引自美国 ATCC,用基础培养基,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

[0801] 2.3DMEM 培养基

[0802] 称取一定量的 DMEM,定量至相应的体积,加入 3.7g/L NaHCO₂,0.1g/L 谷氨酰胺,5.5g/L HEPES。

[0803] 2.4 基础培养基

[0804] DMEM 培养基添加 10%胎牛血清,胰岛素 9mg/L,4℃保存。

[0805] 2.5 无菌 PBS(0.01M, pH 7.4)

[0806] 2.60.5%胰酶

[0807] 用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 离子的 PBS 配制。

[0808] 2.7 抗 ErbB2 单克隆抗体,包被缓冲液,洗液

[0809] 选用泽生公司研制的鼠抗人 ErbB2 细胞外功能域 H4 单克隆抗体,与 ErbB3 和 ErbB4 无交叉反应。

[0810] 包被缓冲液:pH9.60.05M 碳酸盐缓冲液

[0811] 洗液:0.01M PBS+0.05% Tween-20

[0812] 2.8 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人磷酸化蛋白酶单抗 (anti-P-tyr-HRP)

[0813] 2.9 底物、底物缓冲液

[0814] 底物 (TMB):2mg/ml TMB(用无水乙醇配制)

[0815] 底物缓冲液:0.2M 柠檬酸+0.1M Na₂HPO₄(pH5.0)

[0816] 工作用底物:底物缓冲液 9ml+TMB 1ml+3% H₂O₂ 10ul(即配即用)

[0817] 2.10 终止液

[0818] 2N H₂SO₄。

[0819] 2.11 细胞裂解液

[0820] 150mM NaCl+50mM Hepes+1% Triton-X 100+2mM 钒酸钠 (sodium orthovanadate)+0.01%硫柳汞 (thimerosal)。临用前每 25ml 加一片混合蛋白酶抑制剂 (Tabletten, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail)

[0821] 2.12 标准品和待测样品

[0822] 3 试验步骤

[0823] 第 1 天进行 3.1 项,第 2 天进行 3.2 ~ 3.3 项,第 3 天进行 3.4 ~ 3.12 项;其中 3.1 和 3.2 项各步骤应于无菌条件下进行。

[0824] 3.1 接种细胞

[0825] 扩增至一定数量的 MCF-7 细胞,用无菌 PBS 液清洗后,用 0.25%胰蛋白酶消化,计数后用基础培养基调整细胞浓度,加至 96 孔细胞培养板,5×10⁴/孔,100 μl/孔,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养过夜。

[0826] 3.2 细胞饥饿

[0827] 吸净 96 孔板中的培养基,用 37℃温育后的 PBS 清洗每个孔,然后加入 100 μ l DMEM 培养基 (不含牛血清和胰岛素),再置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 24h。

[0828] 3.3 包被

[0829] 用包被缓冲液稀释抗 ErbB2 细胞外功能域 H4 抗体至 6 μ g/ml,以 50 μ l/孔加至 96 孔酶标板内,置 4℃过夜 (16 ~ 18 小时)。

[0830] 3.4 稀释工作参考品和待测样品溶液

[0831] 取工作参考品、待测样品分别用 DMEM 培养基 (不含小牛血清和胰岛素) 稀释至 2 μ g/ml,再作 3 倍梯度稀释,共做 9 个稀释度。

[0832] 3.5 细胞磷酸化

[0833] 将饥饿后的 96 孔板细胞培养基吸净,分别加入标准品和测试样品,100 μ l/孔,每种浓度设置 2 个复孔。同时设置阴性对照 (即 DMEM 培养基空白对照)。37℃作用 20min。

[0834] 3.6 细胞裂解

[0835] 迅速吸去样品并用 PBS 洗涤一遍,每孔加入 100 μ l 细胞裂解液,置 4℃冰箱裂解 30min。冰浴条件下水平摇动至贴壁细胞完全脱落,4℃,15000rpm 离心 15min。

[0836] 3.7 封闭酶标检测板

[0837] 洗板 5 次。用洗涤液配 5%脱脂奶粉,以 200 μ l/孔加至板内,置 37℃ 2h。

[0838] 3.8 加样

[0839] 将封闭好的酶标板洗板 3 次后,加入标准和待检样品的细胞裂解液,90 μ l/孔。同时设置阴性对照。置 37℃,1h。

[0840] 3.9 加酶标抗体

[0841] 洗板 5 次,用洗液 1 : 500 (根据产品使用说明和使用时间决定) 稀释 HRP 酶联鼠抗磷酸化酪氨酸蛋白抗体,以 100 μ l/孔加至板内,置 37℃ 1h。

[0842] 3.10 底物显色

[0843] 洗板 5 次。以 100 μ l/孔加入临时配制的底物工作液,置 37℃,10min。

[0844] 3.11 终止

[0845] 以 50 μ l/孔加入 2N H₂SO₄ 终止反应。

[0846] 3.12 读 OD 值

[0847] 酶标仪上比色,测定波长 450nm,参比波长 655nm,记录测定结果。

[0848] 4 结果计算

[0849] 用重组人神经调节蛋白浓度对相应的 OD 值作图,用直线回归法进行分析,分别计算各待检样品的半效剂量。

[0850] 5 所需试剂配方

[0851] 1. DMEM 基础培养基

[0852] 胎牛血清 100ml

[0853] 胰岛素 9.2mg

[0854] 加于 1L 的 DMEM 培养基中混匀即可。

[0855] 2. 细胞裂解液

[0856] NaCl 4.38g

[0857] HEPES 5.96g

- [0858] 钒酸钠 0.368g
- [0859] 硫柳汞 0.05g
- [0860] Triton-X100 5mL
- [0861] 溶于 500mL H₂O 中
- [0862] 3. 包被液 (pH 9.6)
- [0863] NaHCO₃ 0.293g
- [0864] Na₂CO₃ 0.159g
- [0865] 溶于 100mL H₂O 中。
- [0866] 4. 100mL 底物缓冲液 (pH 5.0)
- [0867] 柠檬酸 1.02g
- [0868] Na₂HPO₄·12H₂O 3.68g
- [0869] 溶于 H₂O 中。
- [0870] 5. 封闭液 (5%脱脂奶粉)
- [0871] 脱脂奶粉 5g
- [0872] 溶于 100mL pH 7.4 的 0.01M PBS 中。
- [0873] 6. 0.01M PBS (pH 7.4)
- [0874] Na₂HPO₄·12H₂O 2.9014g
- [0875] NaH₂PO₄·4H₂O 0.2964g
- [0876] NaCl 8.5g
- [0877] 溶于 1000mL H₂O 中。
- [0878] 7. 0.01M PBS-T (PH 7.4)
- [0879] 在 2000ML 0.01M PBS 加 1ml Tween 20 混匀。
- [0880] 8. 2mg/ml 四甲基邻苯胺 (TMB)
- [0881] TMB 20mg
- [0882] 溶于 10mL 无水乙醇中。
- [0883] 9. 20×PBS (1000ML)
- [0884] Na₂HPO₄·12H₂O 58g
- [0885] NaH₂PO₄·4H₂O 5.9g
- [0886] NaCl 170g
- [0887] 溶于 1000mL H₂O 中。
- [0888] 序列表
- [0889] <110> 上海泽生科技开发有限公司
- [0890] <120> 神经调节蛋白用于心血管疾病治疗的方法和组合物
- [0891] <130> CPCNZ42655D3
- [0892] <140>
- [0893] <141> 2003-5-15
- [0894] <150> PCT/CN02/00349
- [0895] <151> 2002-5-24
- [0896] <160> 2

[0897] <170>FastSEQ for Windows Version 4.0
 [0898] <210>1
 [0899] <211>183
 [0900] <212>DNA
 [0901] <213> 智人 (homo sapiens)
 [0902] <400>1
 [0903] agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgcc 60
 [0904] ttcattgtga aagaccttcc aaaccctcgc agatacttgt gcaagtgcgc aaatgagttt 120
 [0905] actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctgtac 180
 [0906] cag 183
 [0907] <210>2
 [0908] <211>61
 [0909] <212>PRT
 [0910] <213> 智人 (homo sapiens)
 [0911] <400>2
 [0912] Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val
 [0913] 1 5 10 15
 [0914] Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser
 [0915] 20 25 30
 [0916] Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys
 [0917] 35 40 45
 [0918] Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 [0919] 50 55 60
 [0920] Gln



图 1

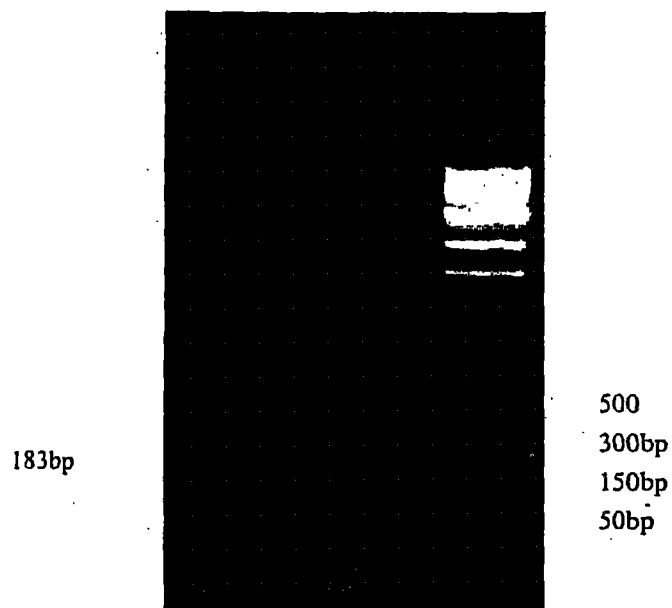


图 2

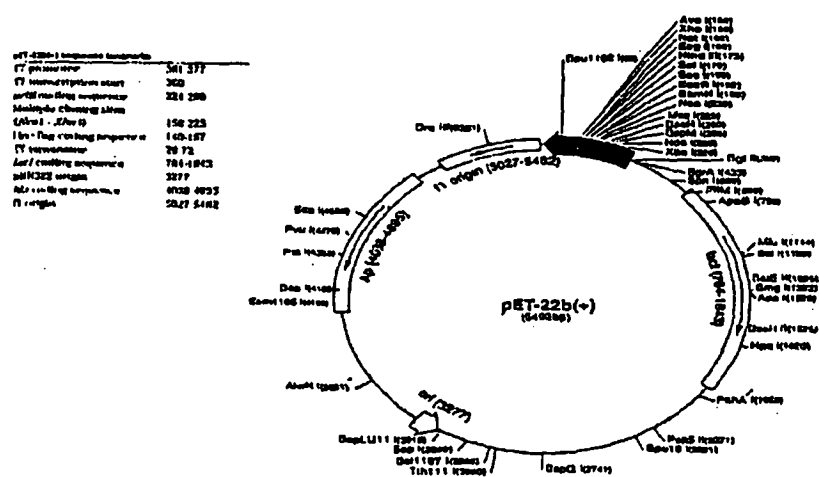


图 3

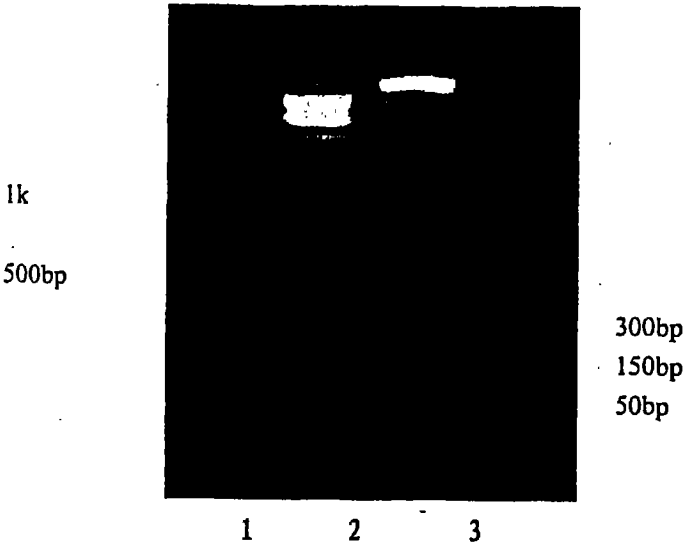


图 4

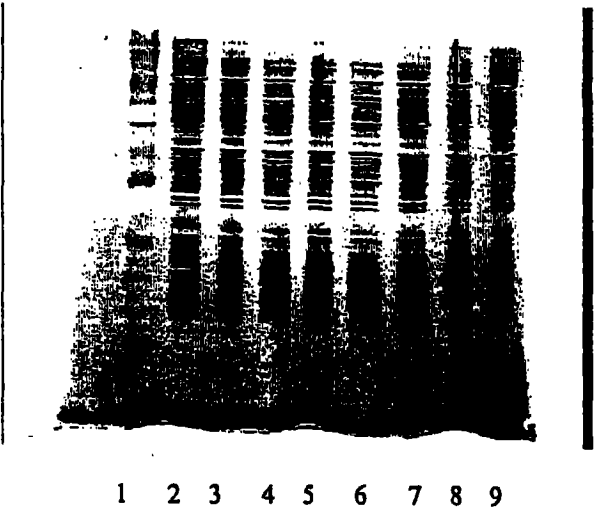


图 5

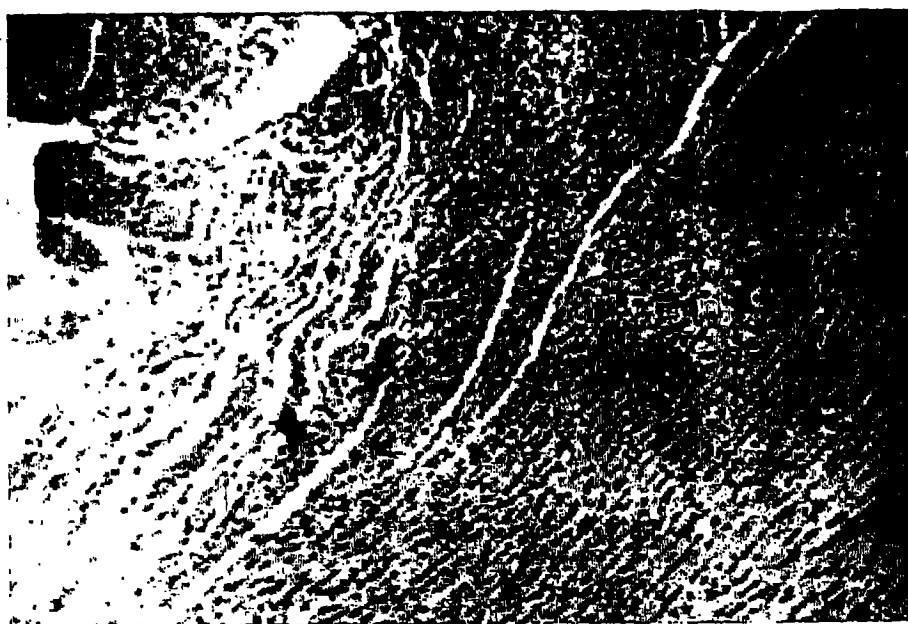


图 6

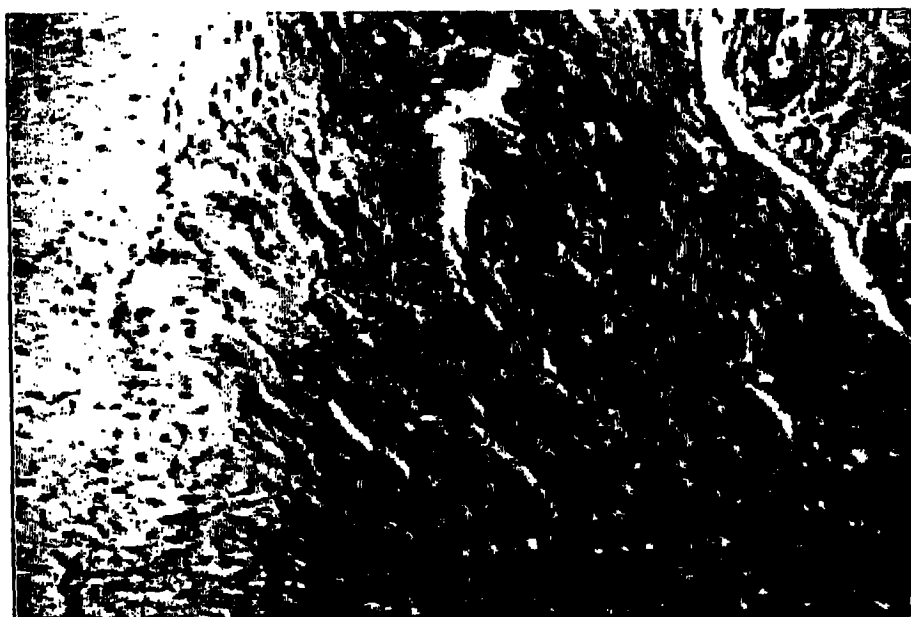


图 7



图 8



图 9

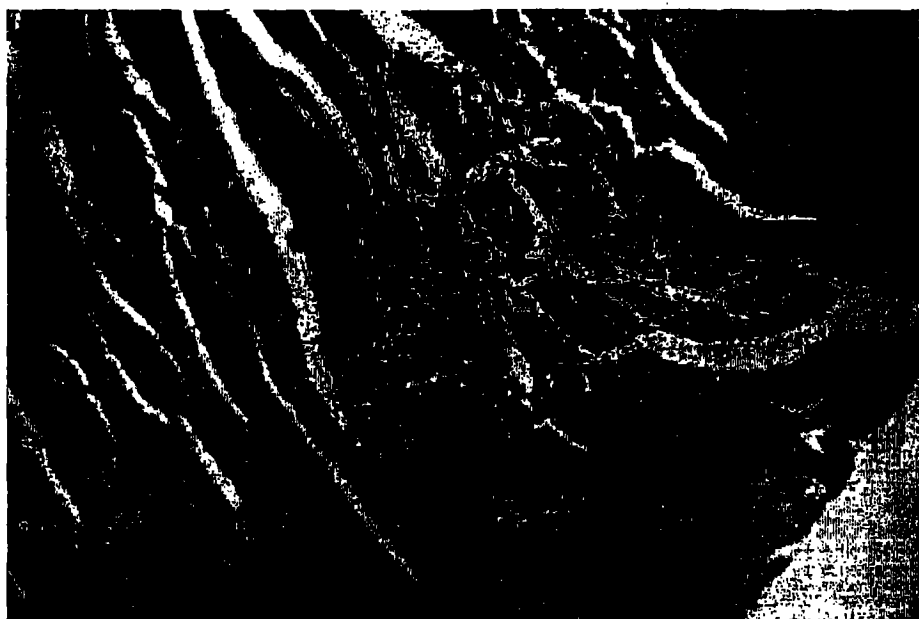


图 10

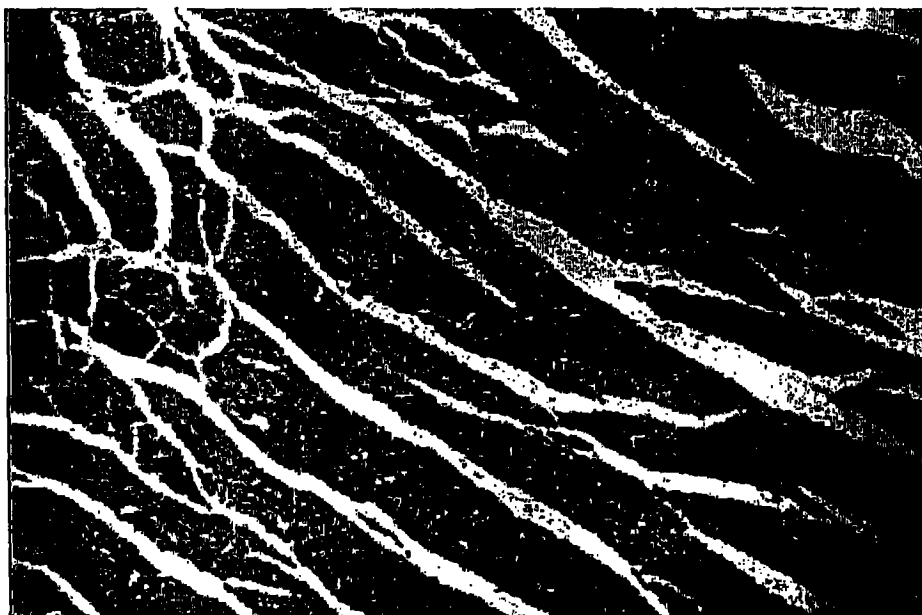


图 11



图 12

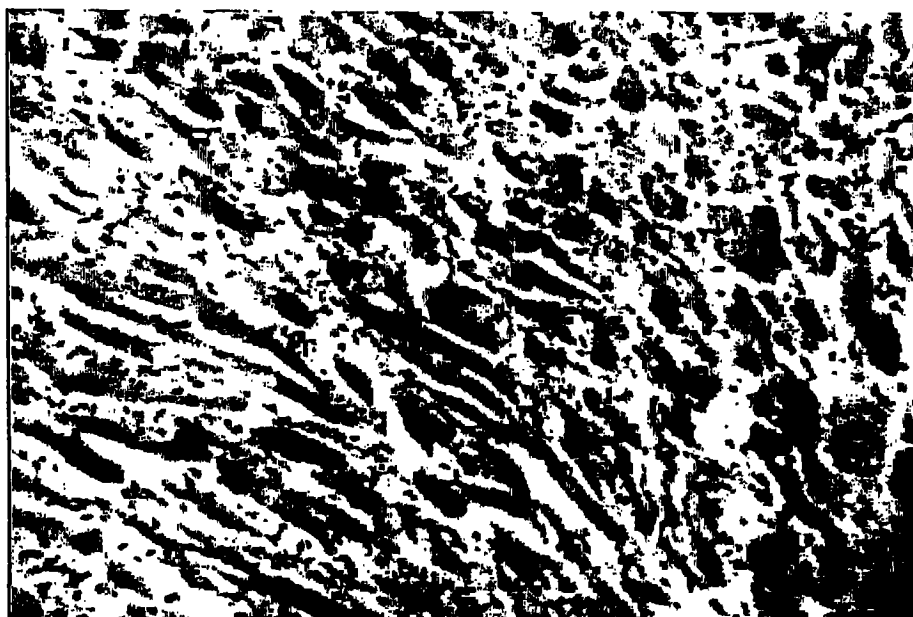


图 13



图 14



图 15

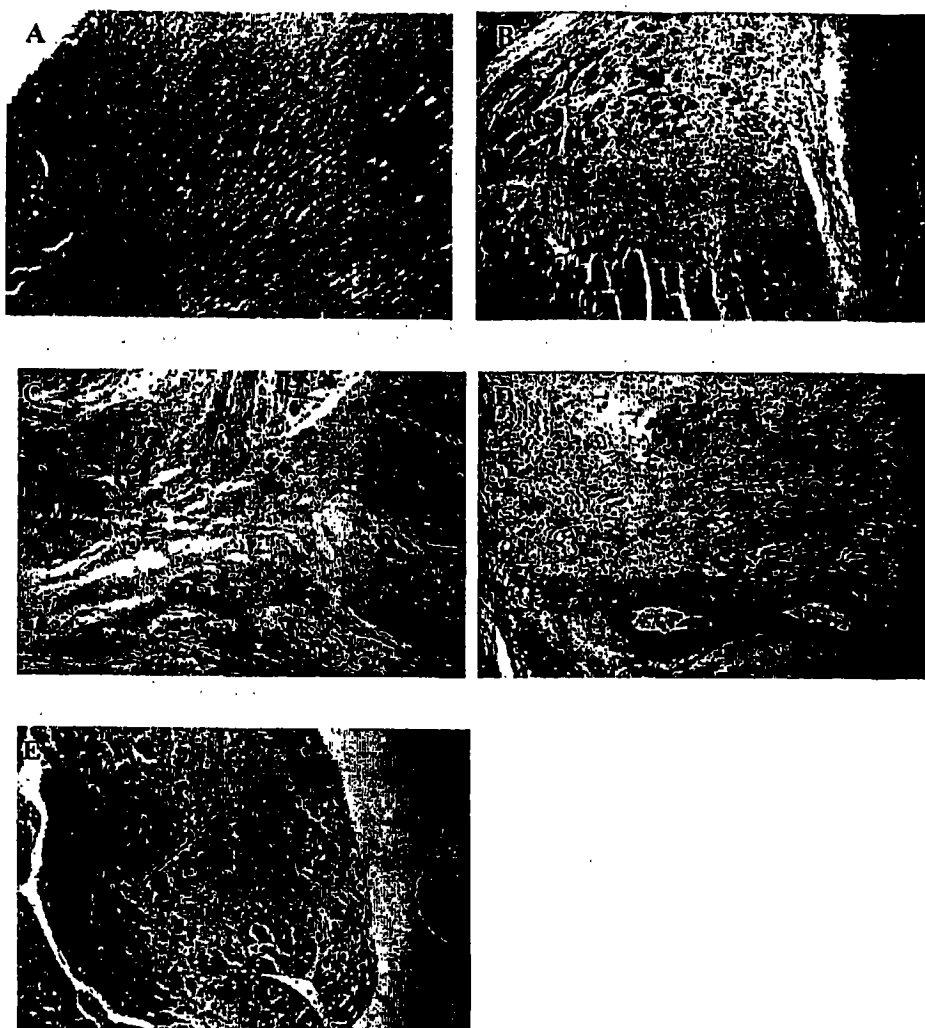


图 16

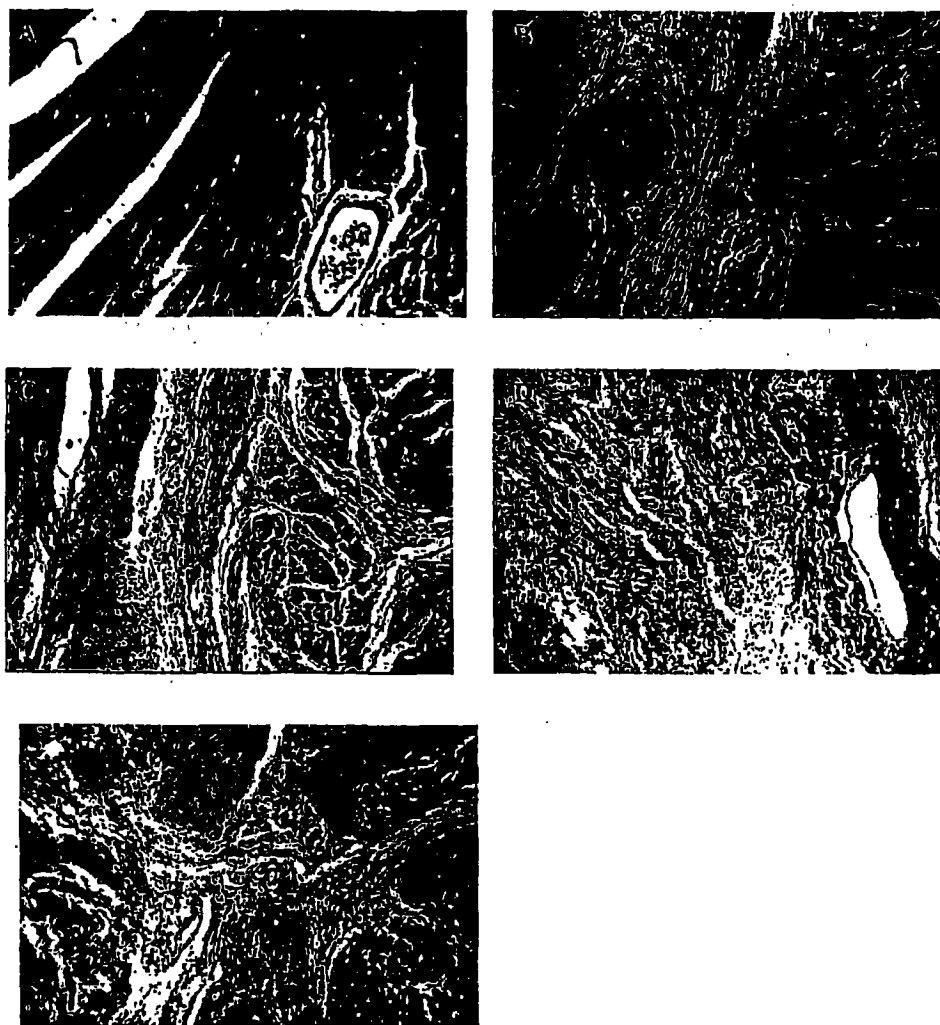


图 17

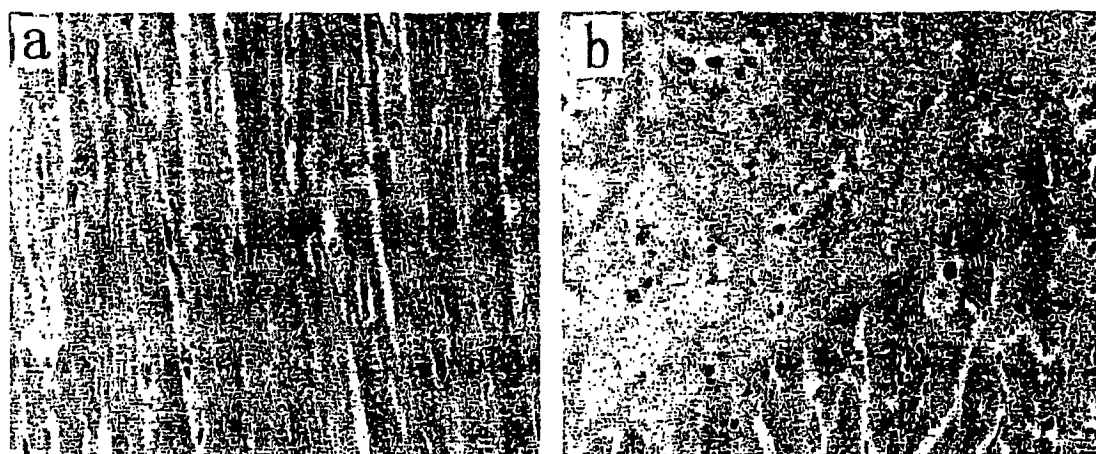


图 18

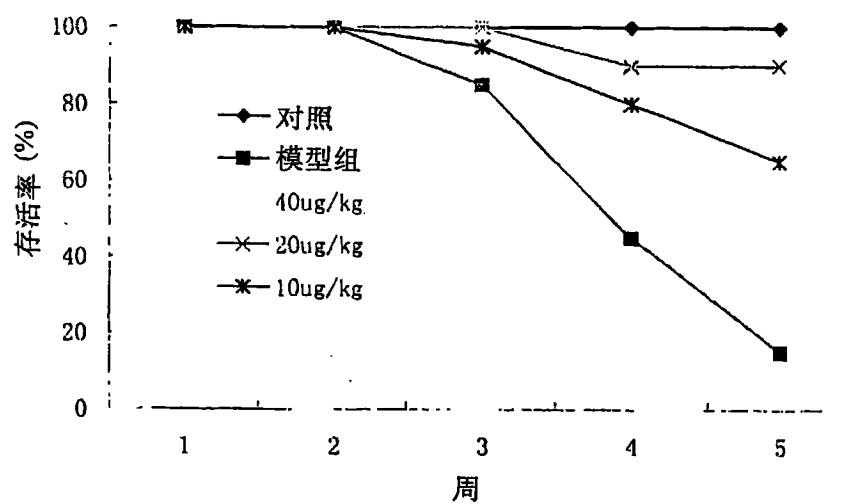


图 19

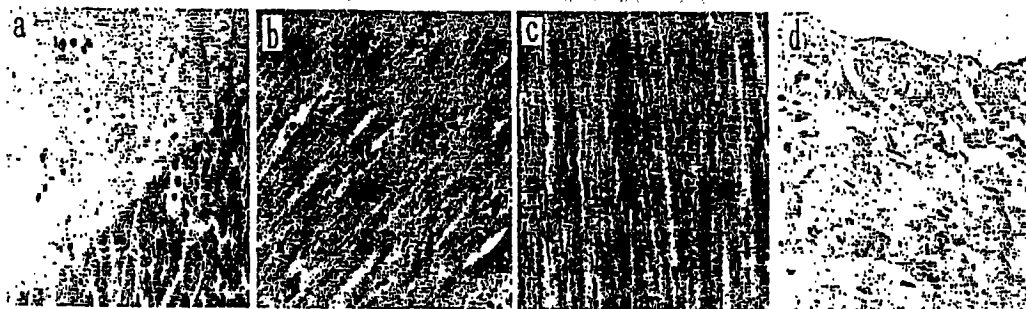


图 20

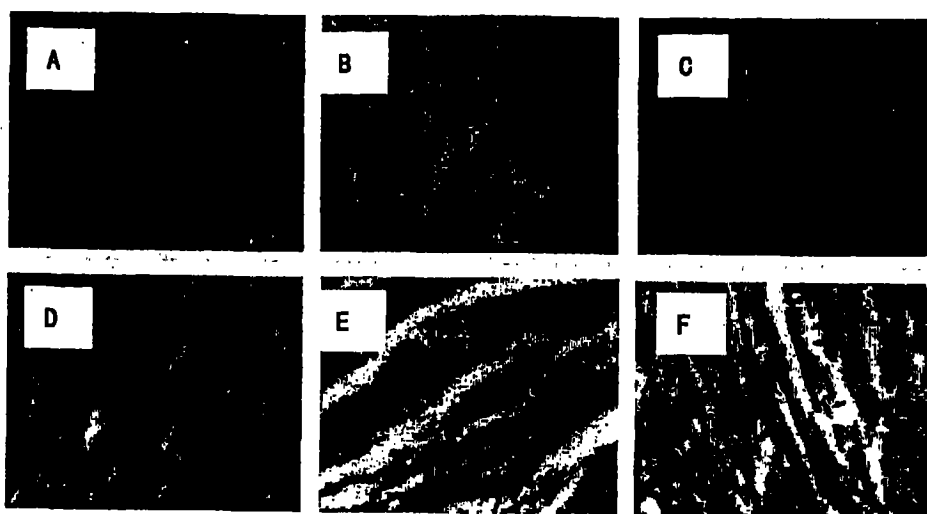


图 21

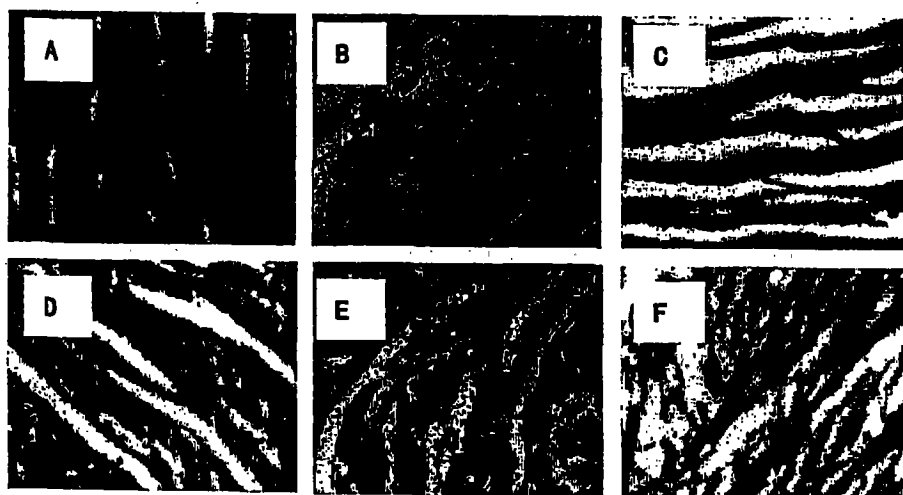


图 22

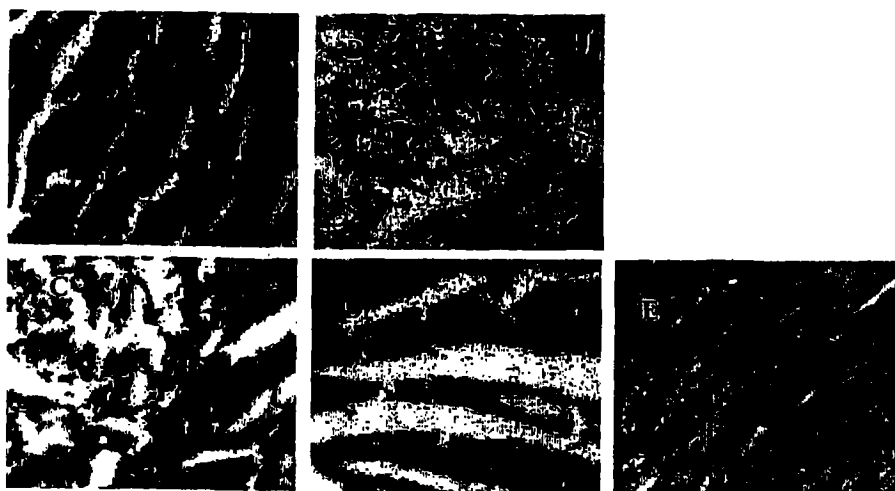


图 23

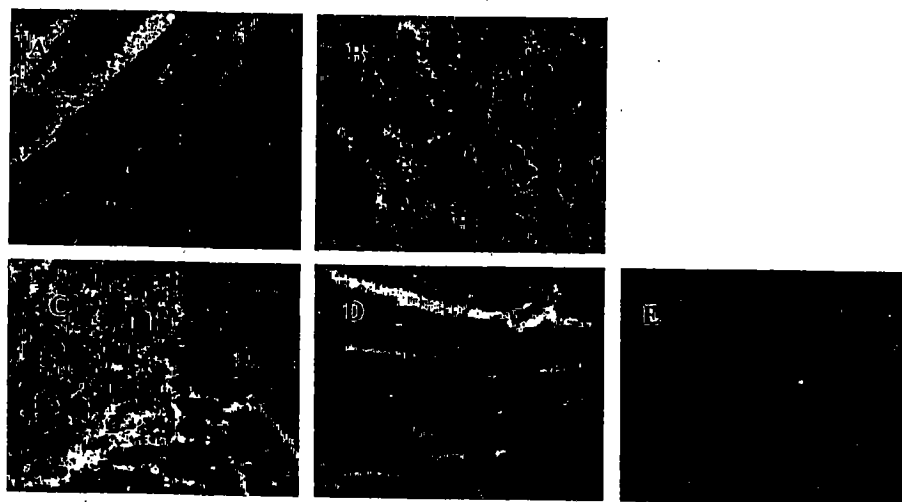


图 24