



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103054840 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201310008036. X

审查员 雷耀龙

(22) 申请日 2013. 01. 09

(73) 专利权人 杭州雷索药业有限公司

地址 311200 浙江省杭州市萧山区北干街道
金城路 1038 号 817 室

(72) 发明人 李春启 吴转斌 朱晓宇 朱凤

(74) 专利代理机构 浙江翔隆专利事务所(普通
合伙) 33206

代理人 张建青

(51) Int. Cl.

A61K 31/137(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101103963 A, 2008. 01. 16, 摘要.

权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

左旋沙丁胺醇在制备抗血管生成类药物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及左旋沙丁胺醇在制备抗血管生成类药物中的应用。至今尚未见有关于左旋沙丁胺醇抗血管生成活性的相关报道。本发明提供左旋沙丁胺醇在制备抗血管生成类药物、抗肿瘤药物及抗湿性老年视黄斑变性药物中的应用。利用斑马鱼血管生成模型进行体内药效学实验证实,左旋沙丁胺醇能够显著抑制斑马鱼血管生成、显著抑制移植的人类癌细胞的生长及对湿性老年视黄斑变性具有治疗作用。因此,左旋沙丁胺醇可以用于抗血管生成类、抗肿瘤作用或湿性老年视黄斑变性药物的制备。

1. 左旋沙丁胺醇在制备抗肿瘤药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的左旋沙丁胺醇通过抑制肿瘤内新血管的生成来预防或治疗肿瘤。
3. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述药物为片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服液、注射液、贴剂或凝胶剂形式。
4. 左旋沙丁胺醇在制备抗湿性老年视黄斑变性药物中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在于,所述的左旋沙丁胺醇通过抑制脉络膜血管异常增生来预防或治疗湿性老年视黄斑变性。
6. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在于,所述药物为片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服液、注射液、贴剂或凝胶剂形式。

左旋沙丁胺醇在制备抗血管生成类药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体地说是左旋沙丁胺醇在制备抗血管生成类药物中的应用。

背景技术

[0002] 血管生成 (angiogenesis) 与人类多种重大疾病高度相关,如恶性肿瘤,老年视黄斑变性 (Age-related macular degeneration,AMD),动脉粥样硬化 (Atherosclerosis),风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis),糖尿病视网膜变性 (Diabetic retinopathy) 以及肿瘤转移 (Tumormetastasis) 等。随着中国人口老龄化逐渐加剧,目前这些重大疾病已严重危害我国人民群众的生命健康。

[0003] 1971年,哈佛大学 Judah Folkman 教授首次提出抗肿瘤血管疗法,他认为实体肿瘤的生长和扩散依赖于肿瘤内新血管的形成,并通过新生血管获取养分;新血管的形成和生长,促进了肿瘤细胞的转移。经过40年大量的基础理论研究,目前基于这一疗法,已有多个重磅专利新药上市,如罗氏的 Bevacizumab(商品名 Avastin,2010年全球销售额67亿美元),拜耳的 Sorafenib(商品名 Nexavar,2010年全球销售额9.94亿美元),辉瑞的 Sunitinib(商品名 Sutent,2010年全球销售额10.7亿美元)。但这些药物价格十分昂贵,均为外企医药巨头垄断。国内目前只有1支真正意义的抗肿瘤血管生成药物通过SFDA批准上市(恩度,先声药业,2005年上市),但年销售额很少(2010年销售额仅2.5亿人民币),尚无法参与全球竞争。其次,由于恩度(重组人血管内皮抑制素注射液,Recombinant Human Endostatin Injection)为大分子蛋白质类药物,生产这类高纯度安全制剂需要很高的技术门槛,而且此类型的药物在体内的半衰期较短,从而限制了这些活性蛋白的临床应用。

[0004] 老年视黄斑变性 (Age-related macular degeneration,简称 AMD) 是一种累及眼底视网膜黄斑区的变性眼疾。它因年龄增长而产生黄斑区变性,可引起中心视力急剧下降。据统计,全世界超过3000万人罹患此病。黄斑变性分为干性和湿性两种。湿性老年视黄斑变性主要因为脉络膜血管异常生成,新生的无效微血管出现渗漏,血管渗漏的液体进而破坏黄斑,导致中心视力显著下降,影响生活质量,甚至变盲。湿性老年视黄斑变性 (AMD) 已经成为65岁以上老年人失明的罪魁祸首。

[0005] 治疗湿性 AMD 的方法主要有光动力疗法和抗血管药物疗法。光动力疗法主要通过静脉注入光敏药物,继而采用特定波长的非热能激光照射脉络膜新生血管病灶,将光敏药物活化。用光动力疗法治疗湿性 AMD,只能稳定或降低湿性 AMD 视力下降的风险,并非对因治疗,不能阻止复发的可能。一般需要多次治疗。而且治疗后要避光48小时,以免发生光敏反应,造成皮肤灼伤,因此,给患者带来很多痛苦。目前治疗湿性 AMD 的药物主要有:辉瑞的派加他尼钠 (Pegaptanib,商品名 Macugen),诺华的兰尼单抗 (Ranibizumab,商品名 Lucentis),拜耳的艾力亚 (VEGF-Trap-eye,商品名 Eylea),这些药物的价格非常昂贵,一般需要每月经玻璃体内注射给药,这种冗长的给药过程很难被患者接受。因此,开发新型廉价的滴眼液来治疗老年黄斑变性是未来的发展趋势。

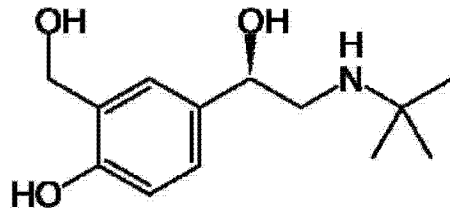
[0006] 综上所述,在小分子化合物中寻求新的血管生成抑制剂来有效治疗上述疾病已成为研发热点,开发抗血管生成小分子药物迫在眉睫。

[0007] 左旋沙丁胺醇,英文通用名:Levalbuterol;一般名称:左旋沙丁胺醇;别名:盐酸左旋沙丁胺醇;左旋沙丁胺醇盐酸盐;左旋沙丁胺醇酒石酸盐;R-Albuterol;Levasalbutamol;Levalbuterol HCl;Levalbuterol Hydrochloride;Xopenex;分子量:275.78。

[0008] 沙丁胺醇(Albuterol)是一种非常有效的 β_2 肾上腺素受体激动剂,临床上广泛用于哮喘的治疗,是目前用于缓解急性哮喘发作的首选药物,1998年销售额达12亿美元,为世界十大畅销单药。沙丁胺醇为消旋体,由2个对映异构体组成,即左旋沙丁胺醇和右旋沙丁胺醇。其中,只有左旋沙丁胺醇能够产生舒张支气管平滑肌的作用,右旋沙丁胺醇无此作用。左旋沙丁胺醇的药效是右旋沙丁胺醇的80倍,左旋沙丁胺醇只需消旋体1/4的剂量便可产生相同的疗效,1/2剂量时,其作用优于消旋体。此外,左旋沙丁胺醇在体内的吸收率要比右旋沙丁胺醇高。1999年3月,美国FDA批准了Sepracor公司的新药左旋沙丁胺醇盐酸盐(Levalbuterol, Xopenex®)替代沙丁胺醇用于治疗哮喘病。与消旋沙丁胺醇相比,左旋沙丁胺醇具有疗效更好、副作用更小、服用量更少等优点。据美国Sepracor公司称:左旋沙丁胺醇将是当前市场用于预防和治疗的唯一速效气管扩张药,有较少的骨骼肌震颤副作用,这对于老年人尤为重要。左旋沙丁胺醇(Levalbuterol)将取代沙丁胺醇(Albuterol)成为缓解急性哮喘发作的首选药物。

[0009] 左旋沙丁胺醇的化学结构式如下:

[0010]



[0011] 至今尚未见有关于左旋沙丁胺醇抗血管生成(anti-angiogenesis)活性的相关报道。

发明内容

[0012] 本申请的发明人意外发现,左旋沙丁胺醇具有抗血管生成的作用。

[0013] 因此,本发明提供左旋沙丁胺醇在制备抗血管生成类药物中的应用。

[0014] 本发明还提供左旋沙丁胺醇在制备抗肿瘤药物中的应用,所述的左旋沙丁胺醇通过抑制肿瘤内新血管的生成来预防或治疗肿瘤。

[0015] 本发明还提供左旋沙丁胺醇在制备抗湿性老年视黄斑变性药物中的应用,所述的左旋沙丁胺醇通过抑制脉络膜血管异常增生来预防或治疗湿性老年视黄斑变性。

[0016] 上述药物为口服给药剂型、注射给药剂型、粘膜给药剂型或经皮给药剂型,更具体讲,如片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服液、注射液、贴剂或凝胶剂形式。可以通过本领域已知的方法制备药物制剂。

[0017] 本发明利用斑马鱼血管生成模型进行左旋沙丁胺醇抗血管药效学实验,与传统的血管研究模型(啮齿类的老鼠和鸡胚尿囊膜)相比,目前大量的研究证实,斑马鱼是最

理想的血管生物学以及抗血管生成药物评价模型。啮齿类的老鼠和鸡胚尿囊模存在各自的缺点。通过利用斑马鱼血管生成模型进行药效学评价和药物新靶点验证,已有多支抗癌药物进入临床前实验(Pre-clinical Trial)或者临床试验(Clinical Trial)阶段(包括已获得FDA批准上市的药物),如 Vatalanib(Novartis)、Thalidomide(Celgene)、Compound6(TargeGen)、Rosuvastatin、Solenopsin(EliLilly)等等。

[0018] 经斑马鱼两套体内血管模型证实,左旋沙丁胺醇对斑马鱼体节间血管(intersegmental vessel, ISV)和肠下血管(subintestinal vessel, SIV)均有显著抑制的功能,因此,可用于制备抗血管生成抑制剂。

[0019] 经斑马鱼人类结肠癌(Colo320)移植模型证实,左旋沙丁胺醇能够显著抑制人类结肠癌(Colo320)的生长;经斑马鱼视黄斑变性模型证实,左旋沙丁胺醇对湿性老年视黄斑变性具有显著的治疗效果。因此,左旋沙丁胺醇可用于抗肿瘤及治疗湿性老年视黄斑变性。

[0020] 本发明左旋沙丁胺醇价格低廉、安全性高、原料来源广泛,辅以药学上可接受的辅料,采用常规制剂技术即可制成各种口服、注射、外用制剂等剂型,具有良好的市场前景。

附图说明

[0021] 图1为本发明受精后48h(48hpf)血管转基因荧光斑马鱼体节间血管(ISV)模型。框定区域为斑马鱼体节血管网络局部放大观察的部位。箭头指示体节间血管(ISV, intersegmental vessel)。

[0022] 图2a-c为本发明定性观察左旋沙丁胺醇对斑马鱼体节间血管生成(angiogenesis)的抑制效果。图2a-c,为受精后23hpf的斑马鱼经过药物处理25h,观察时相为48hpf。图2a为阴性对照(0.1%DMSO),图2b为左旋沙丁胺醇处理组,图2c为阳性对照(10 μ M洛伐他汀)。与阴性对照相比,10 μ M左旋沙丁胺醇能够显著抑制斑马鱼体节间血管(ISV)的生成,表现为体节间血管管腔异常狭窄、管腔基本上处于崩塌状态(箭头指示),这些异常的血管都已丧失功能。

[0023] 图3为本发明受精后72小时(72hpf)血管转基因荧光斑马鱼肠下血管(SIV)模型。框定区域为肠下血管(SIV)网络局部放大观察的部位。箭头指示肠下血管(SIV, subintestinal vessel)。

[0024] 图4a-e为本发明左旋沙丁胺醇对斑马鱼肠下血管(SIV)的抑制效果观察。图4a-e,为受精后48hpf的斑马鱼经过药物处理24h,观察时相为72hpf。图4a为阴性对照(0.1%DMSO),图4b-d为不同浓度的左旋沙丁胺醇处理组,图4e为阳性对照(10 μ M洛伐他汀)。虚线区域为肠下血管(SIV, subintestinal vessel)面积放大观察的部位。

[0025] 图5为本发明定量评价左旋沙丁胺醇对斑马鱼肠下血管(SIV)的抑制效果。与阴性对照相比,左旋沙丁胺醇能够显著抑制斑马鱼肠下血管(SIV)的生成,表现为肠下血管面积减小,并呈现明显的剂量依耐性,见图中的f。* $P < 0.05$,差异显著;*** $P < 0.001$,差异极显著。

[0026] 图6为本发明左旋沙丁胺醇对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率。左旋沙丁胺醇对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,各浓度左旋沙丁胺醇组对斑马鱼肠下血管(SIV)生成的抑制率分别为:5 μ M(16.79%),10 μ M(34.19%),

25 μ M (51.06%)。

[0027] 图 7a-f 为本发明斑马鱼人类结肠癌 (CoLo320) 移植模型评价左旋沙丁胺醇的抗肿瘤药效。图 7a-f, 移植人类结肠癌 (CoLo320) 后 2dpf 的斑马鱼经过药物处理 4d, 观察时相为 6dpf。图 7a 为空白对照, 图 7b 为阴性对照 (0.1%DMSO), 图 7d-f 为不同浓度的左旋沙丁胺醇处理组, 图 7c 为阳性对照 (1000 μ M5-FU)。

[0028] 图 8 为本发明左旋沙丁胺醇对移植癌细胞的生长抑制率。左旋沙丁胺醇对人类移植癌细胞生长的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加, 三个左旋沙丁胺醇浓度组抑制率分别为: 1 μ M (10.8%), 2.5 μ M (23.2%), 10 μ M (48.6%)。

[0029] 图 9a-e 为本发明定量评价左旋沙丁胺醇对视黄斑变性的治疗作用。图 9a-e, 受精后 1dpf 的斑马鱼经过药物处理 4d, 观察时相为 5dpf。虚线所示圆形区域内为脉络膜血管。图 9a 为阴性对照 (0.1%DMSO), 图 9b 为模型组 (1mg/ml 氯化钴), 图 9c-e 为不同剂量的左旋沙丁胺醇处理组。

[0030] 图 10 为本发明左旋沙丁胺醇对脉络膜血管异常增生的抑制率。左旋沙丁胺醇对脉络膜血管异常增生的抑制率随着注射剂量的上升而呈现梯度增加, 三个左旋沙丁胺醇剂量组抑制率分别为: 0.28 μ g (10.3%), 0.93 μ g (29.5%), 2.76 μ g (41.8%)。

具体实施方式

[0031] 下面结合说明书附图和实施例对本发明作进一步阐述, 但本发明的保护范围并不限于此。

[0032] 斑马鱼相关缩略词

[0033] 受精后小时数: hpf-hours postfertilization, 简称 hpf,

[0034] 背长轴血管: DLAV-dorsal longitudinal anastomotic vessel, 简称 DLAV,

[0035] 体节间血管: ISV-intersegmental vessel, 简称 ISV,

[0036] 背主动脉: DA-dorsal aorta, 简称 DA,

[0037] 后主静脉: PCV-posterior cardinal vein, 简称 PCV,

[0038] 肠下静脉血管: SIV-subintestinal vein, 简称 SIV,

[0039] 绿色荧光蛋白: GFP-green fluorescent protein, 简称 GFP。

[0040] 实施例 1 定性观察左旋沙丁胺醇对斑马鱼体节间血管 (ISV) 生成模型的抑制效果

[0041] 斑马鱼:

[0042] 本实施例使用的斑马鱼为血管转基因绿色荧光斑马鱼 (一种由斑马鱼内皮细胞特异表达的基因作为驱动子驱动绿色荧光蛋白在斑马鱼血管内皮细胞特异表达), 饲养和使用标准严格参照美国实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 的要求进行。

[0043] 养鱼水 (Fish water):

[0044] 配置方法: 1L 反渗透水 (reverse osmosis (RO) water) 加入 0.3g 海盐 (Instant Ocean salts)。

[0045] 二甲基亚砜 (DMSO, 分析纯):

[0046] 购买于上海晶纯实业有限公司 (货号 #1095515, 批号 #30573)。0.1%DMSO 溶液 (阴性对照) 配置: 使用时, 用养鱼水配置成浓度为 0.1% 的工作液, 现配现用。

[0047] 洛伐他汀 (阳性对照):

[0048] 购买于大连美仑,纯度大于 98%(HPLC 法)。使用时,用 0.1%DMSO 溶液配置成实验所需的浓度,本实验中阳性对照药的使用浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 。

[0049] 左旋沙丁胺醇 (Levalbuterol) :

[0050] 购买于 Sigma-Aldrich 公司 (货号 #50293-90-8,批号 #091M4729V),使用时用 0.1%DMSO 溶液配置成不同浓度的左旋沙丁胺醇溶液,使用浓度分别为 $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $25\ \mu\text{M}$ 。

[0051] 斑马鱼血管内皮细胞出芽从受精后 20hpf 开始,30-31hpf 左右形成主要的体节间血管网络,如背长轴血管 (DLAV) 和体节间血管 (ISV),48hpf 基本上形成完整的体轴血管网络,此时清晰可见完整的体节间血管 (ISV)。完整的体节间血管主要指连接背主动脉 (DA) 和背长轴血管之间 (DLAV) 之间的那一段血管,见图 1 (48hpf 血管转基因荧光斑马鱼体节间血管模型)。48hpf 的斑马鱼一共有 28 对完整的体节间血管 (ISVs)。实验方法如下:

[0052] (1) 实验分组及胚胎处理:取 45 只发育良好的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后 23hpf (hour-postfertilization, hpf),随机分为 3 组 (阴性对照组,左旋沙丁胺醇药物处理组,阳性对照组),每组胚胎数量为 15 只。操作时将胚胎均匀分配至 48 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中,每孔 15 只胚胎,每孔胚胎饲养用水 1ml。

[0053] (2) 药物处理:用移液器 (量程 $100 \sim 1000\ \mu\text{l}$, Eppendorf) 迅速将预先配置好的药液加入 48 孔细胞培养平板对应的孔中,每孔 1ml。加药液之前,用移液器 (量程 $10 \sim 1000\ \mu\text{l}$, Eppendorf) 将 48 孔板中孵育胚胎的饲养用水尽力移出,此操作需在短时间内预先完成,以防止胚胎干燥。实验环境温度控制在 28.5°C 左右,相对湿度 $40 \sim 70\%$ 。然后用锡箔纸将 48 孔板包裹好,做好实验标记,迅速放置于斑马鱼培养箱中继续培养 24h (培养箱温度控制在 $28.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)。

[0054] (3) 表型观察及统计:在体式显微镜下观察各孔胚胎的表型,观察指标:观察药物对胚胎发育、血液循环以及心脏跳动等方面的影响。然后,将血液循环受到影响的胚胎置于体式荧光显微镜 (Nikon AZ100 体式荧光显微镜) 下进一步观察拍照,拍照时相为 48hpf,以确认血管生成抑制表型。

[0055] 实验结果见图 2。

[0056] 实施例 2 定量评价左旋沙丁胺醇对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成模型的抑制效果

[0057] 斑马鱼肠下血管 (SIV, subintestinal vessel) 生长在卵黄囊两侧,其形状似一个篮子,肠下血管 (SIV) 由体节腹侧向下延伸的长度约为 $50 \sim 100\ \mu\text{m}$ 。见图 3 (72hpf 血管转基因荧光斑马鱼肠下血管模型)。实验方法如下:

[0058] (1) 实验分组及胚胎处理:取 150 只发育良好的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后 48hpf (hour-postfertilization, hpf),随机分为 5 组,见下表:

[0059]

组别	药物浓度	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	48~72hpf
左旋沙丁胺醇	$5\ \mu\text{M}$	
	$10\ \mu\text{M}$	
	$25\ \mu\text{M}$	
阳性对照	$10\ \mu\text{M}$ 洛伐他汀	

[0060] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 48 孔细胞培养平板

(Greiner, 德国) 中, 每孔 15 只胚胎, 每个药物浓度处理 30 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 1ml。

[0061] (2) 药物处理: 见实施例 1 中的实验方法操作步骤 (2)。

[0062] (3) 表型观察及定量统计: 将各药物浓度处理后的胚胎在体式荧光显微镜 (Nikon AZ100 体式荧光显微镜) 下进行观察拍照, 拍照时相为 72hpf, 以分析各药物浓度对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的影响。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计, 统计指标如下:

[0063] ① 肠下血管面积 (SIV area): 利用 Nikon AZ100 体式荧光显微镜配置的 NIS-Elements3.1 软件进行计算

[0064] ② 肠下血管(SIV)生成抑制率 (%) = $(1 - \frac{\text{(药物处理组) SIV面积}}{\text{(阴性对照组) SIV面积}}) \times 100\%$

[0065] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图, 实验结果见图 4 ~ 图 6: 左旋沙丁胺醇对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加, 各浓度左旋沙丁胺醇组对斑马鱼肠下血管 (SIV) 生成的抑制率分别为: 5 μM (16.79%), 10 μM (34.19%), 25 μM (51.06%)。

[0066] 实施例 3 斑马鱼人类结肠癌 (Co1o320) 移植模型评价左旋沙丁胺醇的抗肿瘤药效

[0067] 实体肿瘤的生长和扩散依赖于肿瘤内新血管的形成, 并通过新生血管获取养分; 新血管的形成和生长, 促进了肿瘤细胞的转移。本实施例用于说明左旋沙丁胺醇能够抑制肿瘤的生长和迁移。实验方法如下:

[0068] (1) 实验分组及胚胎处理: 取 150 只移植有人类结肠癌 (Co1o320) 细胞的斑马鱼胚胎, 胚胎发育时相为受精后 2dpf (day-postfertilization, dpf), 随机分为 5 组, 见下表:

[0069]

组别	药物浓度	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	2~6dpf
左旋沙丁胺醇	1 μM	
	2.5 μM	
	10 μM	
阳性对照	1000 μM 5-FU	

[0070] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 6 孔细胞培养平板 (Greiner, 德国) 中, 每孔 30 只胚胎, 每个药物浓度处理 30 只胚胎, 每孔胚胎饲养用水 3ml。

[0071] (2) 药物处理: 用移液器迅速将预先配置好的药液加入 6 孔细胞培养平板对应的孔中, 每孔 3ml。然后用锡箔纸将 6 孔板包裹好, 做好实验标记, 放置于斑马鱼培养箱中继续培养 4d (培养箱温度控制在 $35.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$)。

[0072] (3) 表型观察及定量统计: 将各浓度药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜 (Nikon AZ100 体式荧光显微镜) 下进行观察拍照, 拍照时相为 6dpf, 以分析各药物浓度对斑马鱼人类结肠癌 (Co1o320) 移植模型的抑制作用。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计, 统计指标如下:

[0073] ① 定性评价左旋沙丁胺醇对肿瘤转移的抑制作用;

[0074] ② 定量评价左旋沙丁胺醇对肿瘤生长的抑制作用: 利用尼康 NIS-Elements3.1 软件计算肿瘤细胞荧光强度 (S), 统计学处理结果以 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示; 左旋沙丁胺醇对肿瘤生长的抑制效果计算公式如下:

[0075]

$$\text{肿瘤生长抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{S(\text{药物处理组})}{S(\text{阴性对照组})}\right) \times 100\%$$

[0076] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图,实验结果见图 7~图 8:左旋沙丁胺醇对人类移植癌细胞生长的抑制率随着浓度的上升而呈现梯度增加,三个左旋沙丁胺醇浓度组抑制率分别为:1 μM (10.8%),2.5 μM (23.2%),10 μM (48.6%)。

[0077] 实施例 4 定量评价左旋沙丁胺醇对湿性老年视黄斑变性的治疗作用

[0078] 湿性老年视黄斑变性主要因为脉络膜血管异常生成,新生的无效微血管出现渗漏,血管渗漏的液体进而破坏黄斑。本实施例用于说明左旋沙丁胺醇对湿性老年视黄斑变性具有治疗效果。实验方法如下:

[0079] (1) 实验分组及胚胎处理:取 150 只发育良好的斑马鱼胚胎,胚胎发育时相为受精后 1dpf(day-postfertilization, dpf),随机分为 5 组,见下表:

[0080]

组别	药物剂量	药物处理时间窗口
阴性对照	0.1% DMSO	1~5dpf
模型组	1mg/ml 氯化钴	
治疗组	0.28μg 左旋沙丁胺醇+1mg/ml 氯化钴	
	0.93μg 左旋沙丁胺醇+1mg/ml 氯化钴	
	2.76μg 左旋沙丁胺醇+1mg/ml 氯化钴	

[0081] 每组斑马鱼胚胎数量 30 只。操作时将胚胎均匀分配至 6 孔细胞培养平板(Greiner, 德国)中,每孔 30 只胚胎,每孔胚胎饲养用水 3ml。

[0082] (2) 药物处理:阴性对照组中加入 DMSO,使其终浓度为 0.1%;模型组中加入氯化钴,使其终浓度为 1mg/ml;左旋沙丁胺醇通过显微注射方式给药,每组均注射 30 只胚胎,注射后将胚胎按组分别放入 3ml 含有 1mg/ml 氯化钴的饲养用水中。

[0083] (3) 表型观察及定量统计:将各剂量药物处理后的胚胎在体式荧光显微镜(Nikon AZ100 体式荧光显微镜)下进行观察拍照,拍照时相为 5dpf,以分析各药物剂量对斑马鱼眼部脉络膜异常增生血管的抑制作用。从各实验组随机取 10 只胚胎进行定量统计,统计指标如下:

[0084] ①定性评价左旋沙丁胺醇对眼部脉络膜异常增生血管的抑制作用;

[0085] ②定量评价左旋沙丁胺醇对脉络膜异常增生血管的抑制作用:利用 NIS-Elements3.1 软件计算脉络膜异常增生血管荧光强度(S),统计学处理结果以 mean±SE 表示;左旋沙丁胺醇对脉络膜异常增生血管的抑制效果计算公式如下:

[0086]

$$\text{脉络膜血管异常增生抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{S(\text{药物处理组})}{S(\text{模型组})}\right) \times 100\%$$

[0087] 利用 GraphPad Prism 软件进行统计作图,实验结果见图 9~图 10:左旋沙丁胺醇对脉络膜血管异常增生的抑制率随着剂量的上升而呈现梯度增加,三个左旋沙丁胺醇剂量组抑制率分别为:0.28 μg (10.3%),0.93 μg (29.5%),2.76 μg (41.8%)。

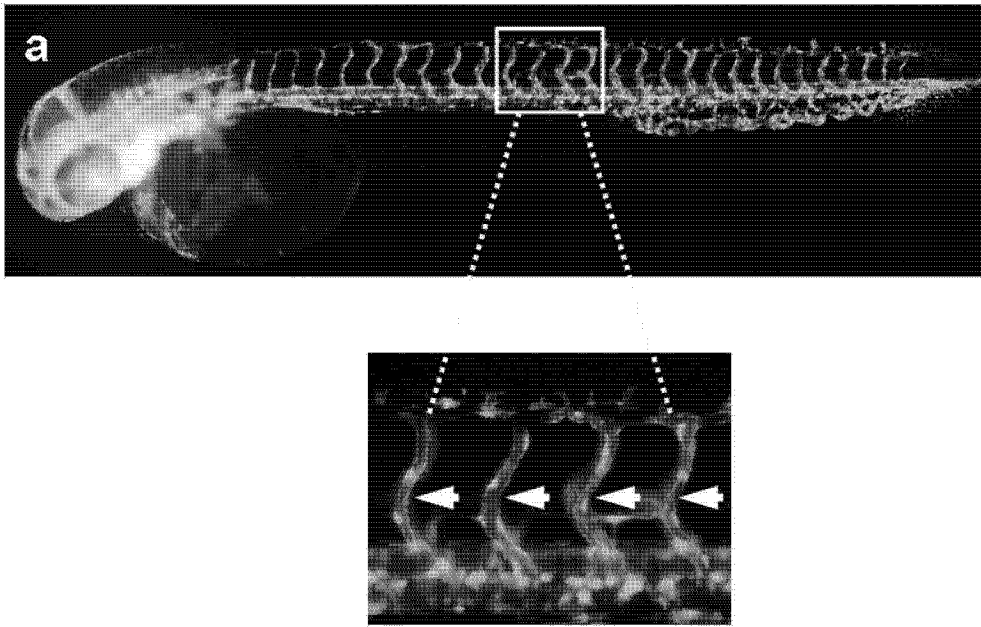


图 1

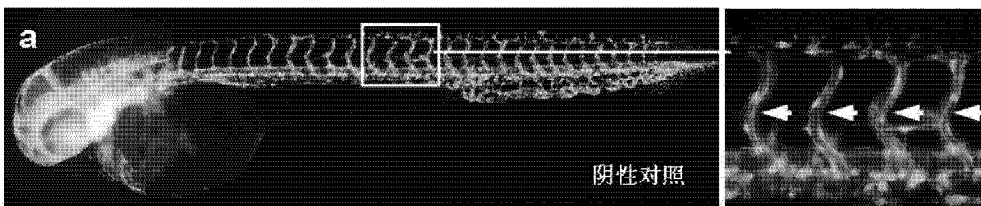


图 2a

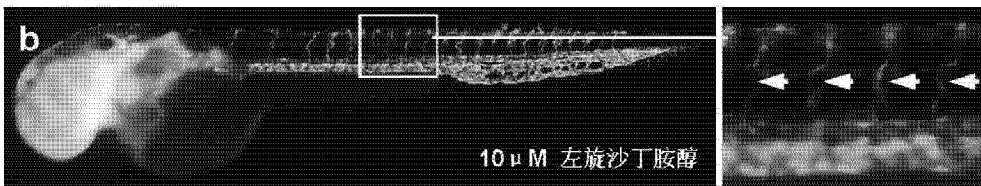


图 2b

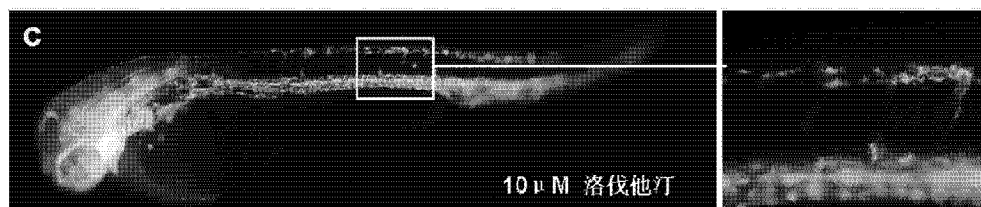


图 2c

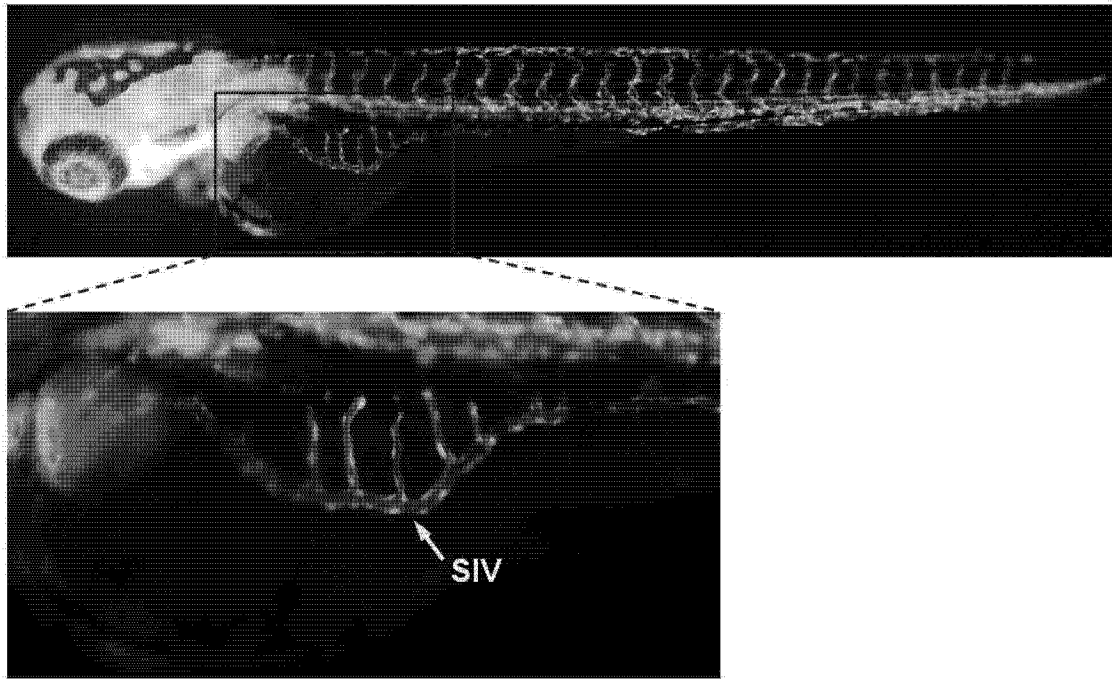


图 3

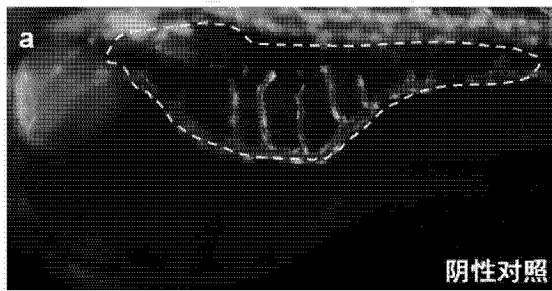


图 4a

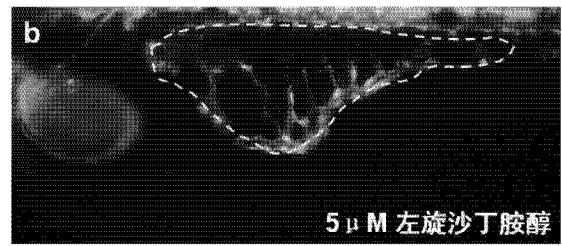


图 4b

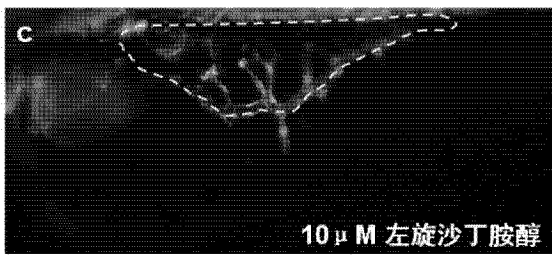


图 4c

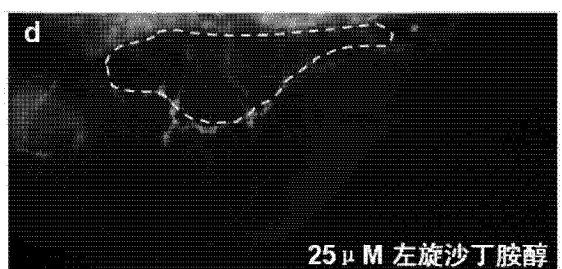


图 4d

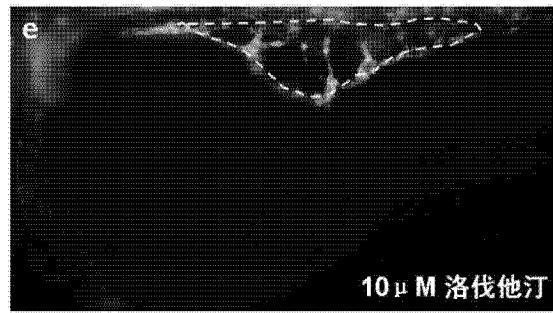


图 4e

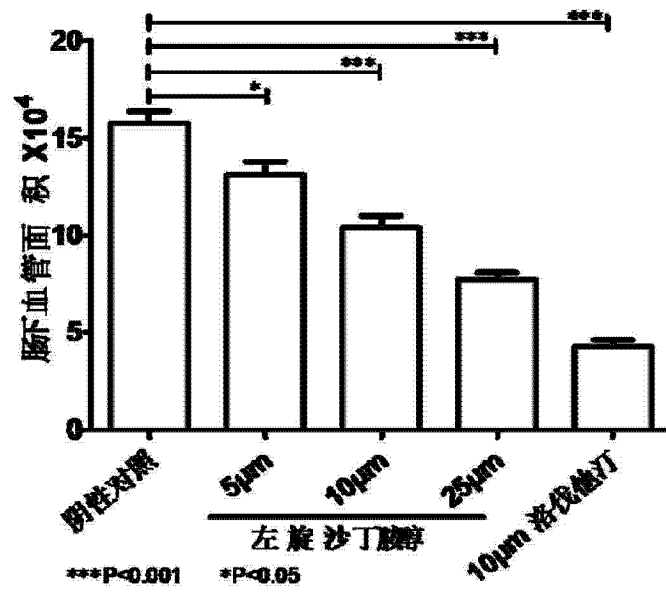


图 5

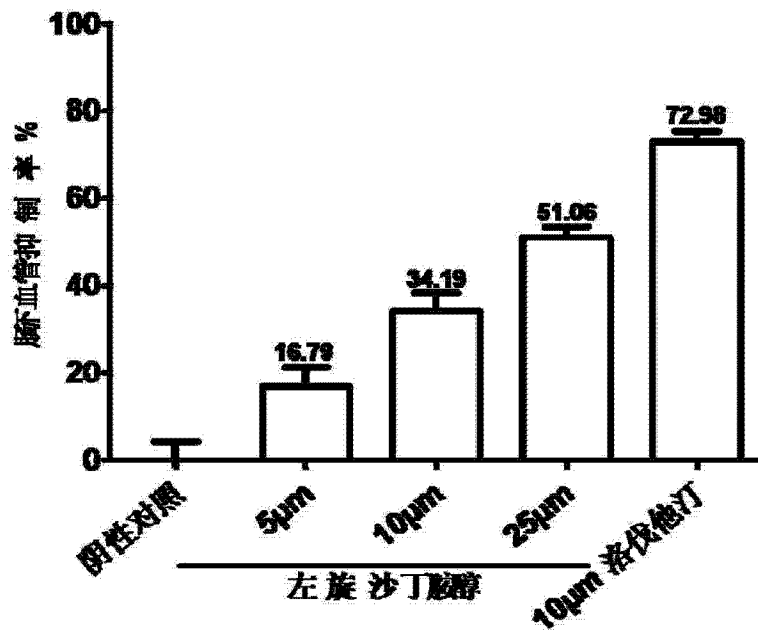


图 6

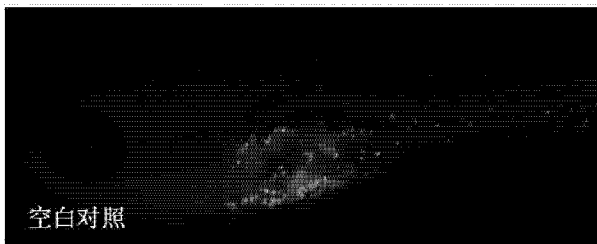


图 7a

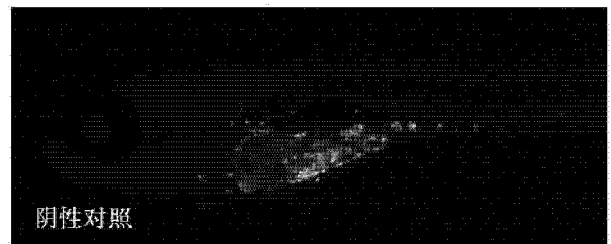


图 7b



图 7c



图 7d



图 7e

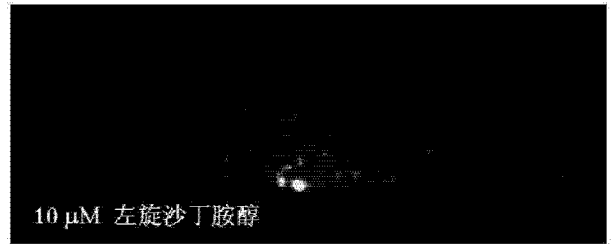


图 7f

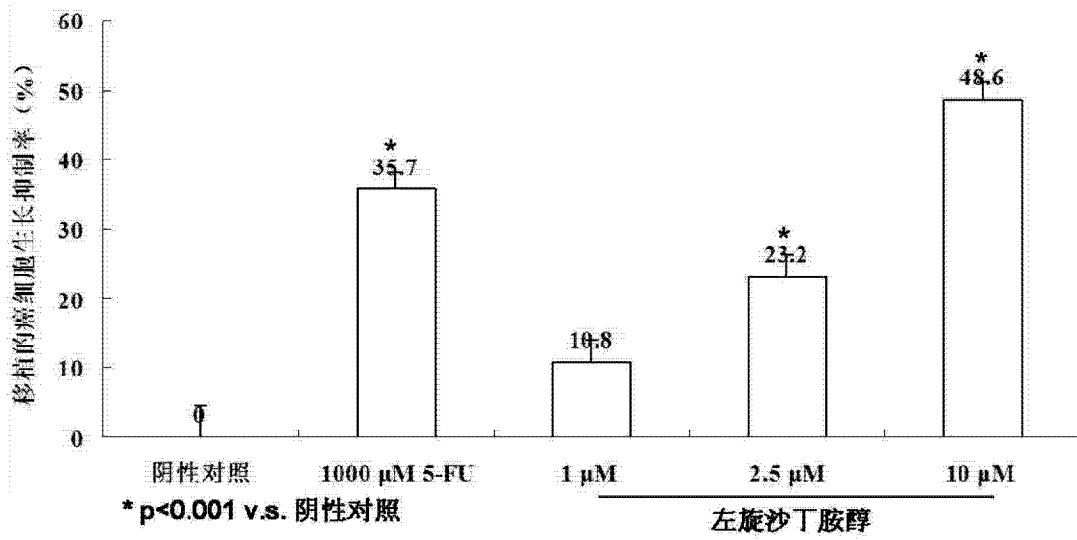


图 8

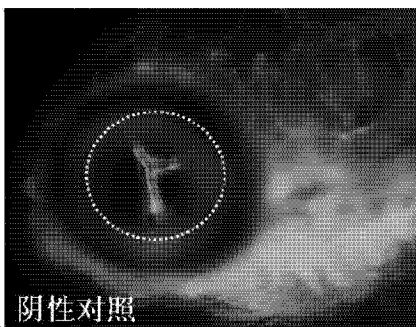


图 9a

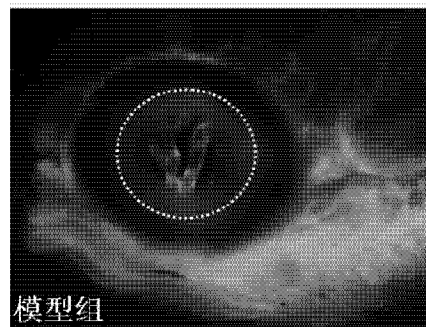


图 9b

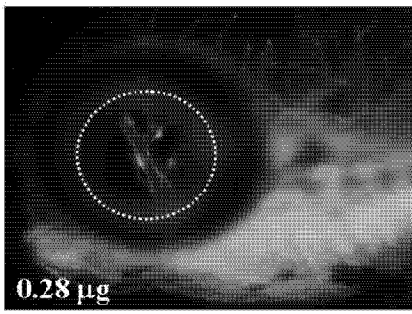


图 9c

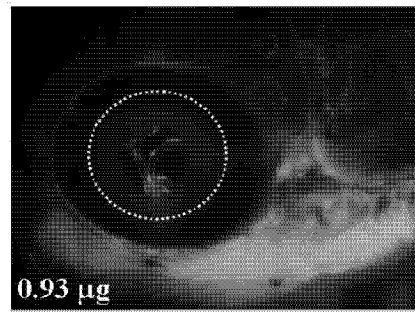


图 9d

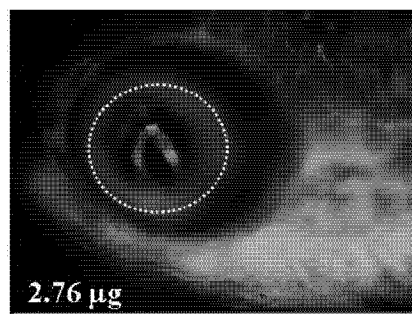


图 9e

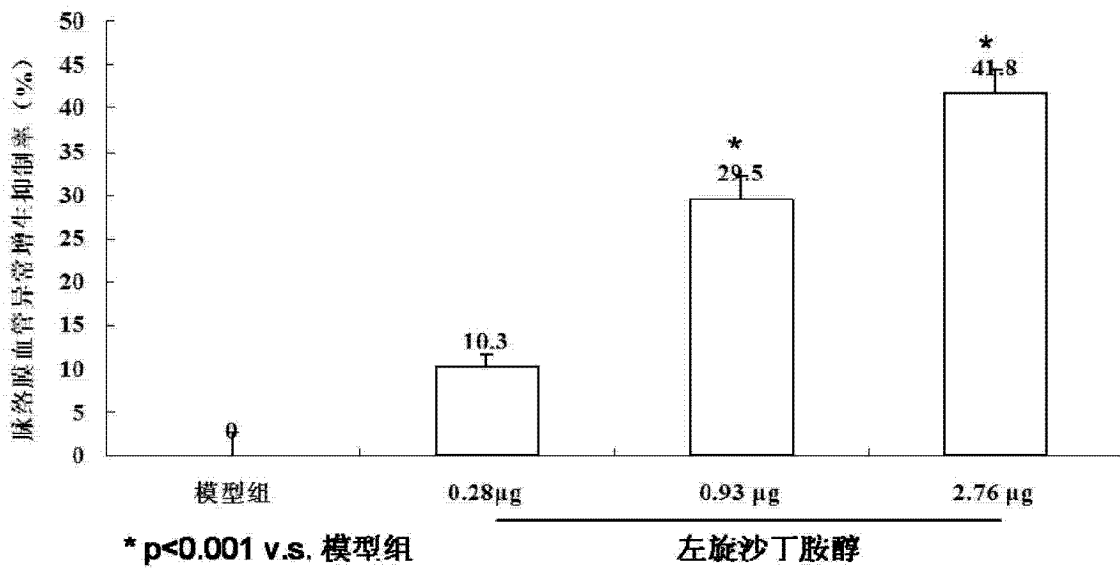


图 10