



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102470161 A

(43) 申请公布日 2012.05.23

(21) 申请号 201080025127.9

(22) 申请日 2010.06.12

(30) 优先权数据

61/236,849 2009.08.25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.12.05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2010/000845 2010.06.12

(87) PCT申请的公布数据

W02010/142141 EN 2010.12.16

(71) 申请人 上海泽生科技开发有限公司

地址 201203 中国上海市浦东新区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)

A61P 9/04 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 23 页

序列表 1 页

(54) 发明名称

神经调节蛋白用于治疗心力衰竭的有效剂量

(57) 摘要

本发明涉及在哺乳动物特别是人体中用神经调节蛋白预防、治疗或延迟心力衰竭的方法。更为特别地,涉及神经调节蛋白用于预防、治疗或延迟心力衰竭的有效和安全的剂量。

1. 一种用于预防、治疗或者延迟哺乳动物心力衰竭的方法,其特征在于该方法将如下含量的 NRG-1 蛋白施用给哺乳动物:

(a) 0.3-2.4  $\mu$ g/kg/day;

(b) 6-48EU/kg/day 或

(c) 0.04-0.34nmol/kg/day。

2. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白是 NRG-1  $\beta$  2 亚型。

3. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白是 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白通过静脉给药的方式施用给哺乳动物。

6. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白在 1 天或几天内施用给哺乳动物。

7. 根据权利要求 6 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白施用给哺乳动物至少 10 天。

8. 根据权利要求 7 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白每天施用给哺乳动物持续时间 10m-12h。

9. 根据权利要求 8 中所述的方法,其特征在于所述 NRG-1 蛋白施用给哺乳动物连续 10 天,每天 10h。

10. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所述哺乳动物患有或疑似有心力衰竭。

11. 根据权利要求 10 中所述的方法,其特征在于所述心力衰竭由以下一种或多种因素引起:缺血,先天性,风湿性,特发性,病毒性或中毒性。

12. 根据权利要求 1 中所述的方法,其特征在于所述哺乳动物是人。

## 神经调节蛋白用于治疗心力衰竭的有效剂量

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在哺乳动物特别是人体中用神经调节蛋白预防、治疗或延迟心力衰竭的方法。更为特别地,涉及神经调节蛋白用于预防、治疗或延迟心力衰竭的剂量。

### 背景技术

[0002] 心力衰竭影响大约 500 万的美国人口,并且每年有超过 55 万的新增病例。目前对心力衰竭的治疗主要是使用血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂,其通过扩张血管降低外周阻力从而减轻心脏负荷。虽然 ACE 抑制剂对死亡率具有统计学意义的降低,然而其实际降低率大约为 3% -4%,同时其还具有比较明显的副反应其它心力衰竭的治疗手段也都具有显著的限制因素。比如心脏移植手术,价格昂贵、创伤性大、供体缺乏等因素限制了其广泛的应用。一些器械,比如双心室同步起搏器同样由于昂贵和创伤性大受到限制。基于以上原因,有必要开发一种新的治疗心衰的方法。

[0003] 对患有心衰或者可能发生心衰的病人给予神经调节蛋白 (neuregulin, NRG; heregulin, HRG) 的摄入将是一种有希望的治疗心力衰竭的新手段。NRG,属于表皮生长因子样 (EGF-like) 家族,是一类结构上相似的生长分化因子,包括 NRG1、NRG2、NRG3 和 NRG4 以及它们的异构体,行使了一系列的生物学作用:刺激乳腺癌细胞分化和乳蛋白的分泌;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;以及促进心肌细胞成活和 DNA 合成。用 NRG 基因严重缺陷的小鼠胚胎做的活体研究证明 NRG 对于心脏和神经发育是必需的。

[0004] NRG 的受体属于 EGF 受体家族,包括 EGFR, ErbB2, ErbB3 和 ErbB4,它们在多种细胞功能比如细胞生长、分化和存活中发挥了重要的作用。它们属于络氨酸激酶受体,有胞外的配体结合功能区、跨膜区和胞内的络氨酸激酶功能区组成。当 NRG 结合到 ErbB3 或 ErbB4 的胞外区后,引起其构象改变从而导致 ErbB3/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异二聚体的形成或 ErbB4/ErbB4 同二聚体的形成,并且引起其 C 末端的磷酸化。磷酸化的 C 末端可以进一步结合胞内的下游信号蛋白,激活 AKT 和 (或) ERK 信号通路,并最终引起一系列的细胞反应比如刺激或抑制细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、细胞迁移或细胞黏附。在这些受体中,在心脏组织表达的主要是 ErbB2 和 ErbB4。

[0005] 已有的证据表明, NRG-1 的 EGF 样结构域,包含 50 到 64 个氨基酸,足以结合并激活受体。NRG-1 $\beta$  可以以较高的亲和力结合到 ErbB3 和 ErbB4。而 ErbB2 可与 ErbB3 或 ErbB4 形成异源二聚体,其与配体的亲和力高于 ErbB3 或 ErbB4 同源二聚体与配体的亲和力。神经发育学的研究证实交感神经系统的形成需要 NRG-1 $\beta$ 、ErbB2 和 ErbB3 的信号传导。而干扰 NRG-1 $\beta$  或 ErbB2 或 ErbB4 的表达将由于心脏发育的缺陷引起胚胎死亡。最近的研究强调, NRG-1 $\beta$ 、ErbB2 和 ErbB4 不仅对心脏发育至关重要,同时对成年心脏的功能维持也起到非常重要的作用。NRG-1 $\beta$  被证明可以加强成年心肌细胞肌小节的形成。在多种心衰动物模型中发现, NRG-1 $\beta$  EGF 样结构域的摄入可以显著提高心脏功能,防止心功能的恶化。更为重要的是,它可以显著延长心衰动物的生存时间。这些证据表明 NRG-1 $\beta$  可以作为治疗

多种疾病引起的心力衰竭的先驱性药物。然而在临床应用之前,需要进一步了解它的安全、有效的使用剂量,以确保能够有效地治疗心脏疾病同时保证用药的安全性。

#### [0006] 发明概述

[0007] 本发明是基于 NRG 可以增强心肌细胞分化、改善肌小节和细胞骨架的结构和细胞连接的发现,同时本发明还是基于 NRG 可以显著提高心衰动物的心脏功能,防止其心功能进一步恶化,延长其生存时间的发现。NRG, NRG 多肽, NRG 突变体或其它具有 NRG 样功能的复合物都属于本发明的范畴。

[0008] 本发明的第一个方面,是提供了 NRG 蛋白用于哺乳动物(如人)的耐受剂量。所述耐受剂量是指将该剂量的 NRG 蛋白施用给该哺乳动物(如人)后,不会在该哺乳动物体中引起不良反应或只引起轻微的可接受的不良反应。在一个实施方案中,所述耐受剂量为不超过 2.4  $\mu$ g/kg/day,例如 2.4  $\mu$ g/kg/day、1.2  $\mu$ g/kg/day、0.6  $\mu$ g/kg/day、0.3  $\mu$ g/kg/day。在一个实施方案中,所述耐受剂量为不超过 48U/kg/day,例如 48U/kg/day、24U/kg/day、12U/kg/day、6U/kg/day。在另一个实施方案中,所述耐受剂量为不超过 0.34nmol/kg/day,例如 0.17nmol/kg/day、0.08nmol/kg/day、0.04nmol/kg/day。

[0009] 本发明的另一个方面,是提供了 NRG 蛋白用于哺乳动物(如人)预防、治疗或延迟心力衰竭的有效剂量。该有效剂量是指将该剂量的 NRG 蛋白施用给哺乳动物(如人)时,可以带来一种或多种有益效果。该有益效果可以是患有心力衰竭的患者的心脏功能的改善,或者是防止其心脏功能的进一步恶化,或者延迟可能患有心力衰竭的患者的心脏功能的恶化。在一个实施方案中,所述有效剂量的下限为 0.3  $\mu$ g/kg/day,上限为不超过耐受剂量即 2.4  $\mu$ g/kg/day,例如 0.3  $\mu$ g/kg/day、0.6  $\mu$ g/kg/day、1.2  $\mu$ g/kg/day、2.4  $\mu$ g/kg/day。在一个实施方案中,所述有效剂量的下限为 6U/kg/day,上限为 48U/kg/day,例如 6U/kg/day、12U/kg/day、24U/kg/day、48U/kg/day。在另一个实施方案中,所述有效剂量的下限为 0.04nmol/kg/day,上限为 0.34nmol/kg/day,例如 0.04nmol/kg/day、0.08nmol/kg/day、0.17nmol/kg/day、0.34nmol/kg/day。

[0010] 本发明的另一个方面,是提供了一种预防、治疗或延迟心力衰竭的方法,包括给哺乳动物(如人)施用耐受剂量范围内的 NRG 蛋白。在一个实施方案中,该耐受剂量范围内的 NRG 蛋白每天只被施用一次。在另一个实施方案中,该耐受剂量范围内的 NRG 蛋白每天被施用多次。在一个实施方案中,该耐受剂量范围内的 NRG 蛋白在一天内施用。在另一个实施方案中,该耐受剂量范围内的 NRG 蛋白在几天内施用。

[0011] 本发明的另一个方面,是提供了一种预防、治疗或延迟心力衰竭的方法,包括给哺乳动物(如人)施用有效剂量的 NRG 蛋白。在一个实施方案中,该有效剂量的 NRG 蛋白每天只被施用一次。在另一个实施方案中,该有效剂量的 NRG 蛋白每天被施用多次。在一个实施方案中,该有效剂量范围内的 NRG 蛋白在一天内施用。在另一个实施方案中,该有效剂量范围内的 NRG 蛋白在几天内施用。

[0012] 本发明的另一个方面,是提供了一种预防、治疗或延迟心力衰竭的药物制剂,其中包含了对预防、治疗或延迟心力衰竭有效且在耐受剂量范围内的 NRG 蛋白。

[0013] 本发明的另一个方面,是提供了一种预防、治疗或延迟心力衰竭的药物制剂,其中包含了对预防、治疗或延迟心力衰竭有效且在有效剂量范围内的 NRG 蛋白。

[0014] 本发明的另一个方面,是提供了一种预防、治疗或延迟心力衰竭的药盒,其中包含

了一次或多次使用剂量的上述预防、治疗或延迟心力衰竭的药物制剂。

[0015] 发明详述

[0016] 尽管在此所描述的任何方法的类似或相同方法同样可用于本发明的实施中,但此描述的是优选的方法和材料。

[0017] 本发明提供了用所需耐受和 / 或有效剂量范围内的 NRG 蛋白预防、治疗或延迟哺乳动物 ( 如人 ) 心力衰竭的方法。优选地,哺乳动物 ( 如人 ) 正在遭受心衰或是可能发展成为心衰的高危病人。

[0018] 为了充分公开而不是为了限定,此后的详述部分分为若干部分。所有在此提到的公开出版物通过引用完整的整合在此,公开和描述该出版物中引用的方法和 / 或材料。

[0019] A. 释义

[0020] 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完整的整合在此。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。

[0021] 除非特别指明,在此所用“一个”的意思是“至少一个”或“一个或多个”。

[0022] 此处所用“神经调节蛋白”或“neuregulin”或“NRG”是指能够结合并激活 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其异源或同源二聚体的蛋白或多肽,包括神经调节蛋白的异构体、神经调节蛋白中的 EGF 样功能域、包含神经调节蛋白 EGF 样功能域的多肽、神经调节蛋白的突变体或衍生物以及其它能够激活上述受体的神经调节蛋白样的基因产物。神经调节蛋白还包括 NRG-1, NRG-2, NRG-3 和 NRG-4 蛋白、多肽、片段以及具有 NRG 样功能的复合物。本发明所用神经调节蛋白可以激活上述受体并调节它们的生物学功能,比如刺激骨骼肌细胞合成乙酰胆碱受体;促进心肌细胞的分化、存活以及 DNA 合成。神经调节蛋白还包括那些具有并不实质性影响生物学功能的保守性突变的神经调节蛋白突变体。本领域技术人员熟知合适的氨基酸保守替换并不影响蛋白质的生物活性。本技术领域普通技术人员熟知,非关键区域的单个氨基酸的突变一般不会引起该蛋白或多肽的生物学功能的改变 ( 参见 Watson 等人, *Molecular Biology of the Gene*, 4<sup>th</sup> Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p. 224)。优选的,神经调节蛋白是可以结合并激活 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异源二聚体的蛋白或多肽。作为例子,但并非为了限制的目的,本发明的神经调节蛋白是 NRG-1 β 2 异构体的一个片段,即 177-237 位氨基酸片段,其中包含了 EGF 样功能域。该片段的氨基酸序列为 :SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO : 1)。

[0023] NRG 蛋白可根据本领域技术人员判断具体用何种方式施用,方法包括但不限于口服、吸入、非肠道摄入 ( 如静脉注射、肌肉注射、皮下或皮内注射 )。在某些实施例中,NRG 蛋白是口服的。在某些实施例中,NRG 蛋白是静脉注射的。在某些实施例中,NRG 蛋白是皮下注射的。在某些优选的实施例中,NRG 蛋白经静脉或皮下注射缓释到哺乳动物中。

[0024] NRG 蛋白的缓释能保证有治疗效果的 NRG 蛋白浓度在一段时间内恒定。在某些实施例中,NRG 蛋白在一段时间内释放,这段时间可以是 1 小时、2 小时、4 小时、8 小时、10 小时、12 小时、14 小时、16 小时、20 小时、24 小时甚至更长。在某些实施例中,NRG 蛋白在一段时间内释放,这段时间可以是 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天甚至更

长。在另一些实施例中, NRG 蛋白在一段时间内释放, 这段时间可以是 1 周、2 周、3 周、4 周甚至更长。在另一些实施例中, NRG 蛋白在一段时间内释放, 这段时间可以是 1 个月、2 个月、4 个月、8 个月、12 个月甚至更长。在另一些实施例中, NRG 蛋白在一段时间内释放, 这段时间可以是 1 年、2 年、3 年、4 年甚至更长。在另一些实施例中, NRG 蛋白每天施用 4 小时, 连续 3 天、5 天、7 天或 10 天, 或者每天施用 6 小时, 连续 3 天、5 天、7 天或 10 天, 或者每天施用 8 小时, 连续 3 天、5 天、7 天或 10 天。

[0025] 此处所用“EGF 样功能域”或“EGF-like domain”是指由 neuregulin 基因所编码的可以结合并激活 ErbB2、ErbB3、ErbB4 或其异源或同源二聚体的多肽片段, 并且与下述参考文献中描述的 EGF 受体结合区域具有结构相似性: WO 00/64400; Holmes 等, Science, 256:1205-1210(1992); 美国专利 5,530,109 和 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); 以及 WO 97/09425。在某些实施方案中, EGF 样功能域结合并激活 ErbB2/ErbB4 或 ErbB2/ErbB3 异源二聚体。在某些实施方案中, EGF 样功能域包含 NRG-1 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中, EGF 样功能域是指 NRG-1 的第 177-226 位、177-237 位或 177-240 位氨基酸。在某些实施方案中, EGF 样功能域包含 NRG-2 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中, EGF 样功能域包含 NRG-3 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中, EGF 样功能域包含 NRG-4 的受体结合区氨基酸。在某些实施方案中, EGF 样功能域包含美国专利 5,834,229 中描述的氨基酸序列: Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro (SEQ ID NO:2)。

[0026] 此处所用“耐受剂量”是指施用给哺乳动物后不会在该哺乳动物体内引起不良反应的最大剂量。在某些实施例中, 所述不良反应包括临床不良事件、生命体征如血压、心率、呼吸和体温的异常、心电图的异常、体格检查的异常和实验室检查的异常。在某些实施例中, 耐受剂量是指 NRG 蛋白施用给人体后不会引起严重不良事件的最大剂量。在某个实施例中, 严重不良事件是指致命的或危及生命的不良反应。在另一实施例中, 严重不良事件导致住院治疗或延长住院的不良反应。在另一实施例中, 严重不良事件导致持续的或严重的失去行为能力的不良反应。在另一实施例中, 严重不良事件导致心肌梗死、反复性心绞痛或其它形式的心肌缺血的不良反应。在另一实施例中, 严重不良事件导致发生新的持续性的心率不齐如心房扑动或颤动、室性心动过速或心室颤动、完全性传导阻滞的不良反应。在另一实施例中, 严重不良事件导致先天性异常的不良反应。在另一些实施例中, 严重不良事件或者虽然不立即引起死亡或者生命威胁或者住院治疗, 但有可能导致危害并需要通过干预手段来防止以上所述各种不良反应发生的不良反应。

[0027] 此处所用“有效剂量”是指施用给哺乳动物后能够在该哺乳动物中引起有益效果的药物剂量。其中所述人体是指患有心力衰竭或可能患有心力衰竭的病人。在某些实施例中, 所述有益效果可能取决于心脏功能的改善, 如但不限于核磁共振 MRI 所测量的 LVEF、LVEDV、LVESV 值。在某些实施例中, 所述有益效果可能取决于血液动力学的改善, 例如但不局限于心输出量、左右心室充盈压、肺部和全身血管压力以及肺部和全身血管阻力的改善。在某些实施例中, 所述有益效果可能取决于血液中神经激素和免疫学指标的改善, 例如去甲肾上腺素、醛固酮、I 型内皮素、末端脑钠素前体、III 型前胶原肽、超敏 C 反应蛋白、肿瘤

坏死因子和白介素 6 等指标的改善。在某些实施例中,所述有益效果可能取决于 6 分钟步行距离试验结果的改善。在某些实施例中,所述有益效果可能取决于纽约心脏病协会心功能分级的改善。在某些实施例中,所述有益效果可能取决于生活质量的改善 (QOL, Minnesota, 1986)。在某些实施例中,所述有益效果可能取决于患者再次入院的频率。在某些实施例中,所述有益效果可能取决于患者的生存率或死亡率。

[0028] 此处所用的“治疗”或“处理”是指可以使不适、紊乱或疾病的症状改善或向好的方向改变的任何方式。其效果可以是预防性的,比如完全或部分防止某一疾病或其症状发生,也可以是治疗性的,比如部分或完全治愈某一疾病和 / 或该疾病引起的不利影响。治疗还包括此处所述组合物的任何药物用途。

[0029] 此处所用“LVEF”是指左心室射血分数,即左心室每搏输出量占左心室舒张末期容积的百分比,可以用公式计算:  $LVEF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV$ 。

[0030] 此处所用“LVEDV”是指左心室舒张末期容积。

[0031] 此处所用“LVESV”是指左心室收缩末期容积。

[0032] 此处所用的“收缩分数 (fractional shortening)”或“FS”是指左心室收缩状态和舒张状态直径变化的比值。可用下列公式来定义:  $(\text{左心室舒张末期内径} - \text{左心室收缩末期内径}) / \text{左心室舒张末期内径}$ 。

[0033] 此处所用“心力衰竭”是指一种心脏功能的异常,在这种情况下,心脏不能按照组织代谢的需要进行供血。心力衰竭包括多种疾病状态比如充血性心力衰竭,心肌梗死,心律失常,家族性肥厚性心肌病,缺血性心脏病,特发性心肌病和心肌炎等之类的。心力衰竭可有多种因素导致,包括但不限于缺血性,先天性,风湿性,病毒性、毒性或特发性。慢性心脏肥大是一种充血性心力衰竭前期的疾病状态,其可以引起心脏停搏。

[0034] 此处所用的“蛋白”与“多肽”或“肽”的含义相同,除非文中另有明确说明。

[0035] 此处所用“活性单位”或“EU”或“U”是指能诱导 50% 最大活性反应的剂量。具体来说,我们定义与神经调节蛋白 EC50 等量的样品为一个活性单位。比如某一批次的神经调节蛋白的 EC50 为  $0.1 \mu\text{g}$ , 那么这个批次的神经调节蛋白的活性单位即为  $0.1 \mu\text{g}$ , 也就是说  $1 \mu\text{g}$  该批次的神经调节蛋白包含 10 个活性单位。EC50 的测定方法可以使用本发明中所使用的方法测定,亦可以通过其它本技术领域中所知的方法测定。这种活性单位测定的方法对于基因工程产物和临床药物的质量控制非常重要,它使得同一药物的不同批次以及不同的药物之间可以通过统一的标准来定量。

[0036] 以下简要描述本发明中所采用的一种快速、敏感、高通量的检测 NRG-1 活性单位的方法,其主要利用 NRG-1 可以结合并激活 ErbB3 和 ErbB4 受体,并间接导致 ErbB2 受体磷酸化的特性 (参见 Michael D. Sadick 等, 1996, Analytical Biochemistry, 235 :207-214 以及 W003/099300)。

[0037] 简言之,该方法名为激酶受体活化酶联免疫吸附试验 (kinase receptor activation enzyme-linked immunosorbant assay, KIRA-ELISA), 其主要包括两块微孔板。其中一块微孔板进行细胞培养、配体刺激、细胞裂解和受体游离。而另一微孔板则进行受体捕获和受体磷酸化 ELISA 检测。该方法测量了 NRG 蛋白诱导的贴壁的乳腺癌细胞系 MCF-7 的 ErbB2 受体活化和磷酸化水平。用 Triton-X100 裂解液来溶解膜蛋白,其中游离的 ErbB2 受体被包被在 ELISA 孔中的与 ErbB3 或 ErbB4 无交叉反应的 ErbB2 特异性抗体捕获,并

通过抗磷酸化抗体检测所捕获的 ErbB2 受体的磷酸化水平。制出有重复性的标准曲线, heregulin  $\beta$  1(177-244) 的 EC50 值大约为 360pM。当相同的样品用 Western Blot 的方法检测 ErbB2 受体的磷酸化水平时,可以发现这两种方法所测的 ErbB2 受体的磷酸化水平具有非常紧密的关联性。此处所描述的分析方法可特别得定量 ErbB2 的酪氨酸磷酸化,该磷酸化是 HRG 蛋白同 ErbB3 和 / 或 ErbB4 受体作用的结果。

[0038] 由于大多数基因工程药物是蛋白质或多肽类,它们的活性可通过其氨基酸序列或空间结构组成的活性中心所决定。蛋白质或多肽类的活性测定量与它们的绝对量并不一致,所以不能像化学药物一样用重量来计量活性测定量。然而,基因工程药物的生物活性同药物动力学和活性测定系统一致,该系统建立在考虑到生物活性决定计量单位的基础之上。因此,决定生物活性单位是测量物质生物活性的过程之一,同时也是基因工程产物的质量控制的重要组成部分。对于基因工程产物和临床用药,生物活性的标准的建立是相当重要的。

[0039] 标准品能引起最大反应 50% 的量被定义为 1 个活性单位 (1EU)。因此,不同的药物或不同批次的药物能用统一的标准来定量。

### 具体实施方式

[0040] 对以下实施例的描述是为了更加清楚地阐明本发明而非为了限制本发明。

[0041] 实施例 1 :开放、无对照的评价注射用人重组组兰格林单次给药的耐受性 I 期临床研究

[0042] 为了评估健康受试者单次剂量注射重组人组兰格林的安全性和耐受性,探索安全剂量,确定人体耐受量,在北京大学第一医院进行了 I 期耐受性临床研究 (方案号: KW-70112)。该 I 期临床试验实际入组 28 例,随机分配至 6 个剂量组,性别比为 1 : 1。

[0043] 药物 :

[0044] 说明:重组人组兰格林(纽卡定™),61 个氨基酸组成的多肽,包含 Neuregulin-1  $\beta$  2 亚型的 EGF 样功能域,含有 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列,其理论分子量为 7054Dal ( $1 \mu\text{g} = 0.14\text{nmol}$ )。250  $\mu\text{g}$  (5000EU) / 支 ( $1 \mu\text{g} = 20\text{EU}$ )。

[0045] 剂型:注射用冻干粉。

[0046] 给药方式:静脉推注 (20ml/10min,输液泵控制)。

[0047] 储存:避光,3-8℃,安全有权限要求的地方。

[0048] 剂量组设定:

[0049] 28 例健康受试者被随机分配至 6 个剂量组,剂量分别为 0.2  $\mu\text{g}$ , 0.4  $\mu\text{g}$ , 0.8  $\mu\text{g}$ , 1.2  $\mu\text{g}$ , 1.6  $\mu\text{g}$  以及 2.4  $\mu\text{g}$  每公斤体重 (参见表 1)。试验从最低剂量 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  开始,在确保安全和耐受的前提下递增到下一剂量。

[0050] 表 1. 各剂量组设定及受试者例数



	组别	剂量	例数
	A	0.2 $\mu$ g/kg(4EU/kg)	4
	B	0.4 $\mu$ g/kg(8EU/kg)	4
[0051]	C	0.8 $\mu$ g/kg(16EU/kg)	4
	D	1.2 $\mu$ g/kg(24EU/kg)	5
	E	1.6 $\mu$ g/kg(32EU/kg)	6
	F	2.4 $\mu$ g/kg(48EU/kg)	5

[0052] 研究流程：

[0053] 1) 筛选：

[0054] - 取得书面的知情同意书；

[0055] - 确认符合入选 / 排除标准；

[0056] - 取得人口统计学资料；

[0057] - 病史；

[0058] - 体格检查；

[0059] - 生命体征：血压（卧位）、心率、呼吸、体温；

[0060] - 血、尿常规；

[0061] - 血生化；

[0062] - 心肌酶谱；

[0063] - 心电图 ECG；

[0064] - 超声心动图；

[0065] - 凝血功能检查：部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）；

[0066] - 血清学检查（包括 HBsAg、抗 HCV、抗 HIV 检测，梅毒抗体检测）；

[0067] - 胸片；

[0068] - 尿 HCG 检测（女性受试者，如必要）；

[0069] - 记录不良事件和严重不良事件；

[0070] - 记录伴随用药。

[0071] 2) 基线：从开始试验用药前夜至给予试验用药前即刻

[0072] - 体格检查；

[0073] - 生命体征：血压（卧位）、心率、呼吸、体温；

[0074] - 特异性抗体检测；

[0075] - 再次确认受试者是否符合入选 / 排除标准；

[0076] - 记录不良事件和严重不良事件；

[0077] - 记录伴随用药。

[0078] 3) 试验用药日

[0079] - 给药；

[0080] - 心电图 ECG；

[0081] - 超声心动图；

- [0082] - 记录不良事件和严重不良事件；
- [0083] - 记录伴随用药（每天）。
- [0084] 4) 停药后第 1、7 天
- [0085] - 体格检查；
- [0086] - 生命体征：血压（卧位）、心率、呼吸、体温；
- [0087] - 特异性抗体检测；
- [0088] - 血、尿常规；
- [0089] - 血生化；
- [0090] - 心肌酶谱；
- [0091] - 心电图 ECG；
- [0092] - 超声心动图（停药后 7 天）；
- [0093] - 凝血功能检查：部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）；
- [0094] - 尿 HCG 检测（女性受试者，如必要）；
- [0095] - 记录不良事件和严重不良事件；
- [0096] - 记录伴随用药。
- [0097] 5) 停药后第 10 天
- [0098] 如停药后第 7 天某项检查结果异常，需于停药后第 10 天进行复查，以后每间隔一定时间进行复查，直至该项指标正常。
- [0099] 结果与分析：
- [0100] 全部 28 名健康受试者被随机分配至 6 个剂量组，剂量分别为 0.2  $\mu$ g, 0.4  $\mu$ g, 0.8  $\mu$ g, 1.2  $\mu$ g, 1.6  $\mu$ g 以及 2.4  $\mu$ g 每公斤体重，每个剂量组完成研究的受试者数目分别为 4, 4, 4, 5, 6, 5（参见表 1）。
- [0101] 从受试者签署知情同意书开始至试验结束，所有不良事件被监测并记录。16 例受试者（57.1%）发生了至少一次不良事件，所有不良事件均为轻度不良事件，没有受试者发生中度或重度不良事件。
- [0102] 表 2 中列举了试验中最常见的不良事件，而表 3 中则按照严重程度记录了各剂量组中发生不良事件的受试者数。
- [0103] 表 2. 不良事件列表
- [0104]

组别	受试者	不良反应	严重程度	转归
0.2µg/kg	402	心电图异常	轻度	消失
0.8µg/kg	101	恶心	轻度	消失
	102	恶心；腿无力	轻度	消失
	103	恶心；浑身无力；稀便；头晕	轻度	消失
	104	恶心；WBC 升高	轻度	消失
1.2µg/kg	601	心电图异常	轻度	消失
	603	血常规异常	轻度	消失
	605	心电图异常	轻度	消失
1.6µg/kg	201	食欲不振；血常规异常	轻度	消失
	202	心电图异常；尿常规异常	轻度	消失
	204	恶心；心电图异常	轻度	消失
	206	恶心；食欲不振	轻度	消失
2.4µg/kg	302	心电图异常	轻度	消失
	303	感冒	轻度	消失
	304	心电图异常	轻度	消失
	305	恶心；头晕；心电图异常	轻度	消失

[0105] 表 3. 按严重程度分类的不良事件

[0106]

	0.2µg/kg (N=4) n (%)	0.4µg/kg (N=4) n (%)	0.8µg/kg (N=4) n (%)	1.2µg/kg (N=5) n (%)	1.6µg/kg (N=6) n (%)	2.4µg/kg (N=5) n (%)	总计 (N=28) n (%)
发生至少一起不良事件的受试者	1 (25.0)	0 (0.0)	4 (100.0)	3 (60.0)	4 (66.7)	4 (80.0)	16 (57.1)
按最高严重程度的不良事件进行分类的受试者							
轻度	1 (25.0)	0 (0.0)	4 (100.0)	3 (60.0)	4 (66.7)	4 (80.0)	16 (57.1)
中度	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
重度	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
发生至少一起严重不良事件的受试者	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
发生至少一起导致试验提前结束的不良事件的受试者	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
死亡的受试者	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

[0107] 该临床试验中所发生的药物相关的不良事件主要为心电图异常 (8 例, 28.6%) 和胃肠道功能紊乱 (7 例, 25%)。心电图异常包括 ST-T 轻度压低、T 波降低或 T 波浅倒置, 用药及观测期间, 所有受试者无心前区不适、胸闷、胸痛, 无呼吸困难; 用药后 2 小时及 24 小时查血压无变化; 血生化、电解质、心肌酶谱以及心脏超声检查均无明显异常发现。

[0108] 各个剂量组受试者在各个访视期体格检查结果与基线资料相比均没有明显改变。

所有受试者血清抗体检测都为阴性（参见表 4）。

[0109] 表 4. 不同剂量组血清抗纽兰格林抗体水平

[0110]

	第一次血清		第二次血清		第三次血清	
	1:50	1:100	1:50	1:100	1:50	1:100
0.2 $\mu$ g/kg	0.18 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.02
0.4 $\mu$ g/kg	0.12 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01
0.8 $\mu$ g/kg	0.16 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.05
1.2 $\mu$ g/kg	0.12 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02
1.6 $\mu$ g/kg	0.21 $\pm$ 0.12	0.17 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.10	0.17 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.06
2.4 $\mu$ g/kg	0.15 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03

[0111] 该单剂量 I 期耐受性临床试验的结果显示,在剂量不超过 2.4  $\mu$ g/kg 时与药物相关的不良事件主要是轻度的心电图异常和胃肠道功能紊乱,没有出现中度或重度的不良事件,表明在单次给药时,2.4  $\mu$ g/kg 以下的剂量为耐受剂量。

[0112] 实施例 2:开放、无对照的评价注射用人重组纽兰格林连续给药的耐受性 I 期临床研究

[0113] 为了评估健康受试者连续 5 天应用注射用重组人纽兰格林的安全性和耐受性,探索安全剂量,在北京大学第一医院进行了 I 期耐受性临床研究(方案号:KW-70112)。该 I 期临床试验实际入组 32 例,随机分配至 4 个剂量组。

[0114] 药物:

[0115] 说明:重组人纽兰格林(纽卡定™),61 个氨基酸组成的多肽,包含 Neuregulin-1  $\beta$  2 亚型的 EGF 样功能域,含有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列,其理论分子量为 7054Dal (1  $\mu$ g = 0.14nmol)。250  $\mu$ g(5000EU)/支 (1  $\mu$ g = 20EU)。

[0116] 剂型:注射用冻干粉。

[0117] 给药方式:静脉推注(20ml/10min,输液泵控制)。

[0118] 储存:避光,3-8 $^{\circ}$ C,安全有权限要求的地方。

[0119] 剂量组设定:

[0120] 32 例健康受试者被随机分配至 4 个剂量组,剂量分别为 0.2  $\mu$ g,0.4  $\mu$ g,0.8  $\mu$ g 以及 1.2  $\mu$ g 每公斤体重(参见表 5)。试验从最低剂量 0.2  $\mu$ g/kg 开始,在确保安全和耐受的前提下递增到下一剂量。

[0121] 表 5. 连续给药 5 天各剂量组设定及受试者例数

	组别	剂量	例数
[0122]	I(5 天)	0.2 $\mu$ g/kg (4EU/kg)	8
	II(5 天)	0.4 $\mu$ g/kg (8EU/kg)	8
	III(5 天)	0.8 $\mu$ g/kg (16EU/kg)	8
	IV(5 天)	1.2 $\mu$ g/kg (24EU/kg)	8

- [0123] 研究流程：
- [0124] 1) 筛选：
- [0125] - 取得书面的知情同意书；
- [0126] - 确认符合入选 / 排除标准；
- [0127] - 取得人口统计学资料；
- [0128] - 病史；
- [0129] - 体格检查；
- [0130] - 生命体征：血压（卧位）、心率、呼吸、体温；
- [0131] - 血、尿常规；
- [0132] - 血生化；
- [0133] - 心肌酶谱；
- [0134] - 心电图 ECG；
- [0135] - 超声心动图；
- [0136] - 凝血功能检查：部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）；
- [0137] - 血清学检查（包括 HBsAg、抗 HCV、抗 HIV 检测，梅毒抗体检测）；
- [0138] - 胸片；
- [0139] - 尿 HCG 检测（女性受试者，如必要）；
- [0140] - 记录不良事件和严重不良事件；
- [0141] - 记录伴随用药。
- [0142] 2) 基线：从开始试验用药前夜至给予试验用药前即刻
- [0143] - 体格检查；
- [0144] - 生命体征：血压（卧位）、心率、呼吸、体温；
- [0145] - 再次确认受试者是否符合入选 / 排除标准；
- [0146] - 记录不良事件和严重不良事件；
- [0147] - 记录伴随用药。
- [0148] 3) 试验用药日（连续 5 日）
- [0149] - 给药；
- [0150] - 心电图 ECG；
- [0151] - 记录不良事件和严重不良事件（每天）；
- [0152] - 记录伴随用药（每天）。
- [0153] 4) 停药后第 1、7 天
- [0154] - 体格检查；
- [0155] - 生命体征：血压（卧位）、心率、呼吸、体温；
- [0156] - 血、尿常规；
- [0157] - 血生化；
- [0158] - 心肌酶谱；
- [0159] - 心电图 ECG；
- [0160] - 超声心动图；
- [0161] - 凝血功能检查：部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）；

[0162] - 尿 HCG 检测（女性受试者，如必要）；

[0163] - 记录不良事件和严重不良事件；

[0164] - 记录伴随用药。

[0165] 5) 停药后第 14 天

[0166] 如停药后第 7 天某项检查结果异常，需于停药后第 10 天进行复查，以后每间隔一定时间进行复查，直至该项指标正常。

[0167] 结果与分析：

[0168] 32 例健康受试者被随机分配至 4 个剂量组，分别为 0.2、0.4、0.8 和 1.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，每组 8 例受试者且性别比为 1 : 1。1.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  剂量组中一例受试者由于不良事件中止试验，其余受试者均完成试验。

[0169] 从受试者签署知情同意书开始至试验结束，所有不良事件被监测并记录。23 例受试者（71.9%）发生了至少一次不良事件，所有不良事件均为轻度不良事件，没有受试者发生中度或重度不良事件（参见表 6）。

[0170] 表 6. 按严重程度分类的不良事件

[0171]

	0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (N=8) n(%)	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (N=8) n(%)	0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (N=8) n(%)	1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (N=8) n(%)	总计 (N=32) n(%)
发生至少一起不良事件的受试者	4 (50.0)	5 (62.5)	7 (87.5)	7 (87.5)	23 (71.9)
按最高严重程度的不良事件进行分类的受试者					
轻度	4 (50.0)	5 (62.5)	7 (87.5)	7 (87.5)	23 (71.9)
中度	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
重度	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
发生至少一起严重不良事件的受试者	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
发生至少一起导致试验提前结束的不良事件的受试者	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	1 (3.1)
死亡的受试者	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

[0172] 该临床试验中所发生的药物相关的不良事件主要为心电图异常（14 例，40.63%）和胃肠道功能紊乱（9 例，28.13%）。心电图异常主要包括 ST-T 轻度压低、T 波降低或 T 波浅倒置，用药及观测期间，所有心电图异常的受试者无心前区不适、胸闷、胸痛，无呼吸困难。试验的整个过程中没有采取任何治疗手段，几乎所有的心电图异常在第 5 天给药后的 48 小时内恢复正常。

[0173] 与研究药物有关的胃肠道反应为胃部不适、恶心、呕吐和稀便（参见表 7）。

[0174] 表 7. 研究相关常见不良事件

[0175]

MedDRA 器官系统分类/ MedDRA 首选词	0.2µg/kg (N=8) n(%)	0.4µg/kg (N=8) n(%)	0.8µg/kg (N=8) n(%)	1.2µg/kg (N=8) n(%)	总计 (N=32) n(%)
发生至少一起不良事件的受试者	2 (25.0)	4 (50.0)	7 (87.5)	7 (87.5)	20 (62.5)
皮肤和皮下组织异常	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (25.0)	0 (0.0)	2 (6.3)
皮疹	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (25.0)	0 (0.0)	2 (6.3)
神经系统异常	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (3.1)
头痛	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (3.1)
胃肠道异常	0 (0.0)	1 (12.5)	4 (50.0)	4 (50.0)	9 (28.1)
恶心	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (50.0)	2 (25.0)	6 (18.8)
呕吐	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (25.0)	2 (6.3)
胃部不适	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.1)
稀便	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	1 (3.1)
心脏异常	2 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (6.3)
室性心率失常	2 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (6.3)
心电图异常	0 (0.0)	3 (37.5)	5 (62.5)	6 (75.0)	14 (43.8)
T波倒置	0 (0.0)	2 (25.0)	2 (25.0)	3 (37.5)	7 (21.9)
T波幅度下降	0 (0.0)	2 (25.0)	5 (62.5)	4 (50.0)	11 (34.4)
T波异常	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	1 (3.1)

[0176] 该多剂量连续给药 I 期耐受性临床试验的结果显示,在剂量不超过 1.2 µg/kg 时与药物相关的不良事件主要是轻度的心电图异常和胃肠道功能紊乱,没有出现中度或重度的不良事件。在多剂量连续给药试验中发生的不良事件与单剂量给药试验中发生的不良事件相似,表明不良事件的发生率和严重程度并没有随着给药天数的增加而增加。

[0177] 实施例 3. 开放、单中心、平行组的评价重组人组兰格林-1 治疗慢性心力衰竭的有效性和安全性的 II 期临床试验

[0178] 为了评价重组人组兰格林-1 对慢性心力衰竭的疗效,确定重组人组兰格林治疗慢性心力衰竭的有效剂量,同时评价其安全性,按照随机、开放、单中心、平行组、标准治疗基础上的原则,在澳大利亚 St Vincent's 医院开展了 II 期临床试验(方案号:HREC 06/035)。15 例慢性心力衰竭的病人入选并随机分配至 3 个剂量组。

[0179] 药物:

[0180] 说明:重组人组兰格林(纽卡定™),61 个氨基酸组成的多肽,包含 Neuregulin-1β 2 亚型的 EGF 样功能域,含有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列,其理论分子量为 7054Dal(1 µg = 0.14nmol)。250 µg(5000EU)/支(1 µg = 20EU)。

[0181] 剂型:注射用冻干粉。

[0182] 给药方式:静脉滴注。

[0183] 储存:避光,3-8°C,安全有权限要求的地方。

[0184] 剂量组设定:

[0185] 15 例慢性收缩性心力衰竭病人(LVEF ≤ 40%, NYHA 心功能分级 II/III,接受 ACEI/ARB、β 受体阻滞剂等心衰标准基础治疗剂量稳定 3 个月以上)入选并随机分配至 3 个剂量组,每组 5 例,具体剂量设定及相关疗程参见表 8。

[0186] 表 8. 澳大利亚 II 期临床试验剂量组设定及疗程

[0187]

组别	例数	剂量（第 1 天）	剂量（第 2-11 天）
A	5	1.2 $\mu$ g/kg/6hrs	2.4 $\mu$ g/kg/12hrs
B	5	1.2 $\mu$ g/kg/6hrs	1.2 $\mu$ g/kg/12hrs
C	5	1.2 $\mu$ g/kg/6hrs	0.6 $\mu$ g/kg/12hrs

[0188] 研究流程：

[0189] 1) 筛选和基线

[0190] - 取得书面知情同意书；

[0191] - 采集病史；

[0192] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；

[0193] - 体格检查；

[0194] - 入选 / 排除标准确认；

[0195] - 心电图 ECG；

[0196] - 空腹血糖 FBC；

[0197] - 神经激素和免疫学指标（NT-proBNP、PIIINP、NA、Aldos、Endothelin、hsCRP、TNF-a、IL-6）；

[0198] - 超声心动图；

[0199] - 核磁共振 MR I。

[0200] 2) 给药第 1 天

[0201] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；

[0202] - 给予研究药物；

[0203] - 心电图 ECG；

[0204] -RH 导管；

[0205] -NT-proBNP。

[0206] 3) 给药第 2-11 天

[0207] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；

[0208] - 给予研究药物；

[0209] - 心电图 ECG。

[0210] 4) 研究第 12 天

[0211] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；

[0212] - 心电图 ECG；

[0213] -RH 导管；

[0214] - 空腹血糖 FBC；

[0215] - 神经激素和免疫学指标（NT-proBNP、PIIINP、NA、Aldos、Endothelin、hsCRP、TNF-a、IL-6）；

[0216] - 超声心动图；

[0217] - 心脏核磁共振 MR I。

[0218] 5) 研究第 30 天



- [0219] - 生命体征 : 卧位血压, 心率, 呼吸, 体温 ;
- [0220] - 心电图 ECG ;
- [0221] - 空腹血糖 FBC ;
- [0222] - 神经激素和免疫学指标 (NT-proBNP、PIIINP、NA、Aldos、Endothelin、hsCRP、TNF-a、IL-6) ;
- [0223] - 超声心动图 ;
- [0224] - 核磁共振 MRI。
- [0225] 6) 研究第 60 天
- [0226] - 生命体征 : 卧位血压, 心率, 呼吸, 体温 ;
- [0227] - 心电图 ECG ;
- [0228] - 空腹血糖 FBC ;
- [0229] - 神经激素和免疫学指标 (NT-proBNP、PIIINP、NA、Aldos、Endothelin、hsCRP、TNF-a、IL-6)。
- [0230] 7) 研究第 90 天
- [0231] - 采集病史 ;
- [0232] - 生命体征 : 卧位血压, 心率, 呼吸, 体温 ;
- [0233] - 体格检查 ;
- [0234] - 心电图 ECG ;
- [0235] - 空腹血糖 FBC ;
- [0236] -RH 导管 ;
- [0237] - 神经激素和免疫学指标 (NT-proBNP、PIIINP、NA、Aldos、Endothelin、hsCRP、TNF-a、IL-6) ;
- [0238] - 超声心动图 ;
- [0239] - 核磁共振 MR I。
- [0240] 结果与分析 :
- [0241] 本试验中评价重组人组兰格林治疗慢性心力衰竭有效性的指标主要包括左心室功能和重建的指标 (核磁共振 MRI 测定 LVEF、LVESV、LVEDV 的变化), 次要的有效性指标为血流动力学指标以及神经激素和免疫学指标。
- [0242] 全部数据来看, 13 例病人 (13/15, 86.7%) 连续 11 天静脉注射测试药物, 1 例病人 (1/15, 6.7%) 连续 10 天静脉注射测试药物, 1 例病人 (1/15, 6.7%) 连续 7 天静脉注射测试药物。没有病人退出。
- [0243] A 组 (1.2  $\mu$ g/kg/ 天数 \*1 天 + 2.4  $\mu$ g/kg/ 天数 \*10 天) 中, 4 例病人 (4/5, 80%) 连续 11 天静脉注射测试药物, 1 例病人 (1/5, 20%) 连续 7 天静脉注射测试药物。B 组 (1.2  $\mu$ g/kg/ 天数 \*1 天 + 1.2  $\mu$ g/kg/ 天数 \*10 天) 中, 5 例病人 (5/5, 100%) 连续 11 天静脉注射测试药物。C 组 (1.2  $\mu$ g/kg/ 天数 \*1 天 + 0.6  $\mu$ g/kg/ 天数 \*10 天) 中, 4 例病人 (4/5, 80%) 连续 11 天静脉注射测试药物, 1 例病人 (1/5, 20%) 连续 10 天静脉注射测试药物。
- [0244] A 组中, 在给药结束后即研究第 12 天, LVEF(%) 增加 5.4%, 与基线相比增幅达 16%; 在研究第 30 天时, LVEF(%) 增加 3.3%, 增幅 8.8%; 在研究第 90 天时, LVEF(%) 增加 2.6%, 增幅 6.1%。

[0245] B组中,在给药结束后即研究第12天,LVEF(%)增加3.8%,与基线相比增幅达11.8%;在研究第30天时,LVEF(%)增加3.4%,增幅9.7%;在研究第90天时,LVEF(%)增加4.8%,增幅15.7%。

[0246] C组中,在给药结束后即研究第12天,LVEF(%)增加2.2%,与基线相比增幅达8.4%;在研究第30天时,LVEF(%)增加4.6%,增幅15.4%;在研究第90天时,LVEF(%)增加4.4%,增幅15.5%。

[0247] 所有15例病人均完成该研究,在研究第12、30、90天的LVEF(%)与基线相比的平均增加值分别为3.8%,3.8%,3.9%(参见表9)。

[0248] 表9. 重组人纽兰格林治疗慢性心力衰竭的LVEF改善情况

[0249]

剂量组	时间点	LVEF 值 (%)	LVEF 增量 (%)	LVEF 增幅 (%)
<b>A 组</b> (1.2mcg/kg/day*1 day + 2.4mcg/kg/day*10 days)	基线 (n=5)	33.2±9.7		
	Day 12 (n=5)	38.6±11.6	5.4±2.9	16.0±8.2
	1 Month (n=4)	37.5±13.1	3.3±2.8	8.8±6.3
	3 Months (n=5)	35.8±13.1	2.6±4.0	6.1±11.0
<b>B 组</b> (1.2mcg/kg/day*1day +1.2mcg/kg/day*10days)	基线 (n=5)	30.8±8.0		
	Day 12 (n=5)	34.6±10.0	3.8±2.6	11.8±5.9
	1 Month (n=5)	34.2±10.9	3.4±4.1	9.7±12.4
	3 Months (n=5)	35.6±9.4	4.8±3.4	15.7±11.2
<b>C 组</b> (1.2mcg/kg/day*1 day + 0.6mcg/kg/day*10 days)	基线 (n=5)	32.6±7.3		
	Day 12 (n=5)	34.8±5.4	2.2±3.7	8.4±11.9
	1 Month (n=5)	37.2±6.8	4.6±3.4	15.4±11.5
	3 Months (n=5)	37.0±5.2	4.4±3.0	15.5±12.9
<b>所有病例</b>	基线 (n=15)	32.2±7.9		
	Day 12 (n=15)	36.0±8.9	3.8±3.2	12.1±8.9
	1 Month (n=14)	36.2±9.6	3.8±3.3	11.5±10.3
	3 Months (n=15)	36.1±9.1	3.9±3.4	12.4±11.8

[0250] 所有15例病人的LVEDV(ml)值在各个时间点(研究第12、30、90天)没有统计学意义的改变。

[0251] 关于LVESV(ml)值,A组中,研究第12天LVESV(ml)值与基线相比降低8.4ml,降幅达4.9%;在研究第30天,LVESV(ml)值与基线相比降低14.3ml,降幅8.8%;在研究第90天,LVESV(ml)值与基线相比降低12.0ml,降幅8.3%。

[0252] B组中,研究第12天LVESV(ml)值与基线相比降低1.0ml,降幅达2.5%;在研究第30天,LVESV(ml)值与基线相比降低3.8ml,降幅2.5%;在研究第90天,LVESV(ml)值与基线相比降低12.6ml,降幅6.3%。

[0253] C组中,研究第12天LVESV(ml)值与基线相比降低11.4ml,降幅达8.6%;在研究第30天,LVESV(ml)值与基线相比降低8.0ml,降幅5.1%;在研究第90天,LVESV(ml)值与基线相比降低10.8ml,降幅7.1%。

[0254] 所有15例病人在研究第12、30、90天时的LVESV(ml)值比基线降低的平均值分别

为 6.9ml, 8.3ml, 11.8ml (参见表 10)。

[0255] 表 10. 重组人纽兰格林治疗慢性心力衰竭的 LVESV 改善情况

[0256]

剂量组	时间点	LVESV 值 (ml)	LVESV 增量 (ml)	LVESV 增幅 (%)
<b>A 组</b> (1.2mcg/kg/day*1 day + 2.4mcg/kg/day*10days)	基线 (n=5)	194.2±74.0		
	Day 12 (n=5)	185.8±73.2	-8.4±10.4	-4.9±6.3
	1 Month (n=4)	172.8±81.5	-14.3±14.9	-8.8±9.8
	3 Months (n=5)	182.2±83.4	-12.0±17.6	-8.3±11.4
<b>B 组</b> (1.2mcg/kg/day*1 day + 1.2mcg/kg/day*10 days)	基线 (n=5)	179.6±34.7		
	Day 12 (n=5)	178.6±60.5	-1.0±29.0	-2.5±16.6
	1 Month (n=5)	175.8±40.1	-3.8±14.5	-2.5±8.3
	3 Months (n=5)	167.0±26.0	-12.6±15.6	-6.3±8.3
<b>C 组</b> (1.2mcg/kg/day*1 day + 0.6mcg/kg/day*10 days)	Baseline (n=5)	182.4±70.5		
	Day 12 (n=5)	171.0±81.6	-11.4±22.2	-8.6±14.2
	1 Month (n=5)	174.4±73.4	-8.0±9.2	-5.1±6.9
	3 Months (n=5)	171.6±74.4	-10.8±8.9	-7.1±6.6
<b>所有病例</b>	基线 (n=15)	185.4±58.1		
	Day 12 (n=15)	178.5±67.2	-6.9±20.8	-5.3±12.4
	1 Month (n=14)	174.4±60.7	-8.3±12.7	-5.2±8.1
	3 Months (n=15)	173.6±61.7	-11.8±13.5	-7.2±8.4

[0257] 6 个小时 Neucardin™ 的注射, 对于血流动力学指标而言, 在给药后的早期 (给药开始 24 小时内) 就发生显著性的改变。表 11 中详细记录了各项指标的显著变化, 该变化均是积极的。

[0258] 表 11. 重组人纽兰格林治疗慢性心力衰竭血流动力学指标改善情况

[0259]

血流动力学参数	参数显著升高的时间点	参数显著降低的时间点
心率	1 小时, 2 小时, 4 小时, 6 小时	
收缩压	6 小时	
舒张压		24 小时
平均压		24 小时
右心房压		1 小时, 2 小时, 4 小时, 6 小时, 12 小时, 24 小时
肺动脉收缩压	30 分钟, 1 小时	
肺动脉舒张压		2 小时, 12 小时, 24 小时
平均肺动脉压		2 小时, 12 小时, 24 小时
肺动脉楔压		30 分钟, 1 小时, 2 小时, 4 小时, 6 小时, 12 小时, 24 小时
肺/肺内腔压差	30 分钟, 1 小时, 2 小时, 4 小时, 6 小时, 24 小时	
肺血管阻力		
系统血管阻力		30 分钟, 2 小时, 4 小时, 6 小时, 24 小时
心输出量	30 分钟, 1 小时, 2 小时, 4 小时, 6 小时, 24 小时	
心排指数	30 分钟, 1 小时, 2 小时, 4 小时, 6 小时, 24 小时	
每搏量	30 分钟, 2 小时, 4 小时, 12 小时, 24 小时	
每搏指数	30 分钟, 2 小时, 4 小时, 12 小时, 24 小时	

[0260] 研究后期血流动力学指标的显著变化可见下表（参见表 12）。

[0261] 表 12. 重组人纽兰格林治疗慢性心力衰竭血流动力学指标改善情况

[0262]

血流动力学参数	参数显著升高的时间点	参数显著降低的时间点
收缩压	12 天, 3 个月	
舒张压	12 天, 3 个月	
平均压	12 天, 3 个月	
肺 / 肺内腔压差	12 天, 3 个月	
肺动脉楔压		3 个月

[0263] 进一步观察给药前后血液中神经激素和免疫学指标的改变,发现在给药 6 小时后（第一天）血液中 NT-proBNP 的水平明显升高,至给药 24 小时后仍能检测到显著升高的 NT-proBNP 水平,之后研究末期下降到基线水平。

[0264] 所检测的免疫学指标 (hs-CRP) 没有发现显著性的改变。

[0265] 安全性评价:在 15 例受试者中,10 例受试者 (10/15,66.7%) 发生了至少一次不良事件。所发生的不良事件中主要包括恶心 (20%)、嗜睡 (20%) 和胸痛 (20%),与剂量

组没有明显的相关性。有 67% 的受试者出现了心电图 (ECG) 的异常, 比如 T 波倒置或低平, ST-T 段改变, 室性早搏, 非永久性的室上性心动过速、心室性心动过速、心室扑动或心室颤动, 但由于慢性心力衰竭患者本身出现心电图 (ECG) 异常的可能较大, 在没有安慰剂对照的情况下, 无法判断这些 ECG 的异常是否与纽兰格林的给药有关。

[0266] A 组 (2.4  $\mu$ g/kg/天) 1 例和 C 组 (0.6  $\mu$ g/kg/day) 1 例共两例病人发生了严重不良事件 (SAEs)。生命体征监测, 体格检查和实验室检查未发现异常改变。

[0267] 综合临床 II 期结果, 考虑有效性和安全性的评价, 我们认为在 0.6-2.4  $\mu$ g/kg/day (12-48EU/kg/day 或 0.08-0.34nmol/kg/day) 的剂量范围内, 重组人纽兰格林-1 可以有效且安全地用于治疗慢性心力衰竭病人。

[0268] 实施例 4: 随机、双盲、多中心、标准治疗基础上的安慰剂并行对照评价注射用重组人纽兰格林对慢性收缩性心力衰竭患者疗效与安全性的 II 期临床试验

[0269] 为了评价重组人纽兰格林-1 对慢性收缩性心力衰竭的疗效, 确定重组人纽兰格林治疗慢性收缩性心力衰竭的有效剂量, 同时评价其安全性, 按照随机、双盲、标准治疗基础上安慰剂并行对照的原则, 在中国多个临床中心同时开展了 II 期临床试验 (方案号: ZS-01-026)。64 例慢性收缩性心力衰竭患者入选并随机分配至 4 个剂量组, 64 例患者慢性心力衰竭起源于以下一个或多个因素: 扩张型心肌病, 高血压, 病毒性心肌炎, 心肌梗死, 酒精性心肌病。

[0270] 药物:

[0271] 说明: 重组人纽兰格林 (Neucadin™), 61 个氨基酸组成的多肽, 包含 Neuregulin-1  $\beta$  2 亚型的 EGF 样功能域, 含有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列, 其理论分子量为 7054Dal (1  $\mu$ g = 0.14nmol)。250  $\mu$ g (5000EU) / (1  $\mu$ g = 20EU)。

[0272] 剂型: 注射用冻干粉。

[0273] 给药方式: 静脉滴注。

[0274] 储存: 避光, 3-8°C, 安全有权限要求的地方。

[0275] 安慰剂:

[0276] 说明: 重组人纽兰格林 (Neucadin™) 赋形剂。250ug/支, 含有 0 活性单位 (U) 的重组人纽兰格林。

[0277] 剂量组设定:

[0278] 64 例慢性收缩性心力衰竭患者 (LVEF  $\leq$  40%, NYHA 心功能分级 II/III, 接受 ACEI/ARB、 $\beta$  受体阻滞剂、利尿剂、地高辛等心衰标准基础治疗近 1 个月未改变剂量) 入选并随机分配至 4 个剂量组: 每组 16 人 (参见表 13)。

[0279] 表 13. 剂量组及疗程设定

[0280]

剂量	0 $\mu$ g/kg/day	0.3 $\mu$ g/kg/day	0.6 $\mu$ g/kg/day	1.2 $\mu$ g/kg/day
给药途径	静脉滴注			
给药体积	50ml			
疗程	每天 10 小时, 连续 10 天			

- [0281] 研究流程：
- [0282] 1) 筛选与基线
- [0283] - 取得书面知情同意书；
- [0284] - 取得人口学资料；
- [0285] - 采集病史；
- [0286] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；
- [0287] - 体格检查；
- [0288] - 血、尿常规和血生化；
- [0289] - 凝血功能检查（APTT、PT）；
- [0290] -NT-proBNP；
- [0291] - 心电图 ECG；
- [0292] -NYHA 心功能分级；
- [0293] - 超声心动图；
- [0294] - 胸片；
- [0295] - 核磁共振 MR I；
- [0296] - 组织多普勒（乳腺、肝、胆、肾、肾上腺、胰腺、脾、卵巢、子宫、前列腺）；
- [0297] - 尿妊娠试验（育龄期女性患者）；
- [0298] - 安静状态下呼吸困难评估；
- [0299] - 生活质量评估；
- [0300] -6 分钟步行实验；
- [0301] - 入选 / 排除标准确认；
- [0302] -24 小时尿量记录；
- [0303] - 记录不良事件或严重不良事件；
- [0304] - 记录伴随用药。
- [0305] 2) 给药第 1-10 天
- [0306] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；
- [0307] - 心电图 ECG；
- [0308] - 给予研究药物；
- [0309] -24 小时尿量记录；
- [0310] - 记录不良事件或严重不良事件；
- [0311] - 记录伴随用药。
- [0312] 3) 研究第 11-13 天
- [0313] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；
- [0314] - 体格检查；
- [0315] - 心电图 ECG；
- [0316] - 血、尿常规和血生化；
- [0317] - 凝血功能检查（APTT、PT）；
- [0318] -NT-proBNP；
- [0319] - 尿妊娠试验（育龄期女性患者）；

- [0320] - 生活质量评估；
- [0321] -6 分钟步行实验；
- [0322] - 核磁共振 MR I；
- [0323] -NYHA 心功能分级；
- [0324] - 安静状态下呼吸困难评估；
- [0325] -24 小时尿量记录；
- [0326] - 记录不良事件或严重不良事件；
- [0327] - 记录伴随用药。
- [0328] 4) 第 30 和第 90 天
- [0329] - 生命体征：卧位血压，心率，呼吸，体温；
- [0330] - 体格检查；
- [0331] - 血、尿常规和血生化；
- [0332] - 凝血功能检查 (APTT、PT)；
- [0333] -NT-proBNP；
- [0334] - 心电图 ECG；
- [0335] - 胸片；
- [0336] -6 分钟步行实验；
- [0337] - 核磁共振 MRI；
- [0338] -NYHA 心功能分级；
- [0339] - 安静状态下呼吸困难评估；
- [0340] - 生活质量评估；
- [0341] - 记录不良事件或严重不良事件；
- [0342] - 记录伴随用药。
- [0343] 结果与分析：

[0344] 共有 40 例病人完成试验。判断有效的最主要指标是研究第 30 天的心脏功能参数 (LVEF, LVEDV 和 LVESV)。各组病人在试验 30 天时的 LVEF 检测显示,安慰剂组病人从受试前的均值 21.54%下降至 20.93%,而 0.3 μg/kg/day 组病人的在 30 天时的 LVEF 值稍有上升,从 25.08%升高至 26.61%,升高率平均 4.88%,0.6 μg/kg/day 组病人 LVEF 值有明显升高,从 23.03%升高至 28.01%,升高率平均达 27.11% (参见表 14)。

[0345] 表 14. 受试者治疗前后 LVEF 值 (左心室射血分数, %) 变化情况

[0346]

	A 组 (安慰剂) n=10	B 组 (0.3μg/kg/day) n=11	C 组 (0.6μg/kg/day) n=11	D 组 (1.2μg/kg/day) n=8
基线值 (%)	21.54±4.73	25.08±7.64	23.03±10.23	22.64±4.24
30 天 (%)	20.93±8.53	26.61±9.68	28.01±11.27	22.01±7.21
变化值 (%)	-0.61±8.22	1.53±3.81	4.98±5.37	-0.63±4.34
变化率 (%)	-1.39±33.34	4.88±17.07	27.11±31.12	-4.01±19.42

[0347] 各剂量组病人 30 天时 LVEDV 检测结果发现,安慰剂组病人的 LVEDV 值由受试前的 392.16ml 升高至 413.35ml,变化率达 5.93%。0.3 μg/kg/day 剂量组病人在 30 天时的 LVEDV 值则由受试前的 333.62ml 下降至 323.22ml,下降 3.28%。0.6 μg/kg/day 剂量组和 1.2 μg/kg/day 剂量组的 LVEDV 值均有明显的下降,分别从受试前的 408.51ml 和 397.04ml 下降至 386.89ml 和 374.46ml,下降幅度均超过 5% (参见表 15)。

[0348] 表 15. 受试者治疗前后 LVEDV (左心室舒张末期容积, ml) 变化情况

[0349]

	A 组 (安慰剂) n=10	B 组(0.3μg/kg/day) n=11	C 组 (0.6μg/kg/day) n=11	D 组 (1.2μg/kg/day) n=8
基线值 (ml)	392.16±107.38	333.62±106.14	408.51±142.85	397.04±86.94
30 天 (ml)	413.35±143.98	323.22±111.86	386.89±150.14	374.46±84.47
变化值 (ml)	21.20±108.13	-10.40±33.19	-21.63±42.72	-22.58±37.72
变化率 (%)	5.93±31.48	-3.28±11.34	-5.64±10.03	-5.41±8.53

[0350] 各剂量组 LVESV 变化情况同 LVEDV 相似,安慰剂组 30 天时 LVESV 测量值为 335.78ml,比受试前的 310.54ml 升高了 9.45%。而各用药组 30 天时的 LVESV 测量值均有不同程度的下降,其中以 0.6 μg/kg/day 剂量组的效果最为明显,从受试前的 325.02ml 下降至 291.71ml,下降幅度达 11.58% (参见表 16)。

[0351] 表 16. 受试者治疗前后 LVESV (左心室收缩末期容积, ml) 变化情况

[0352]

	A 组 (安慰剂) n=10	B 组(0.3μg/kg/day) n=11	C 组 (0.6μg/kg/day) n=11	D 组 (1.2μg/kg/day) n=8
基线值 (ml)	310.54±97.54	254.85±100.86	325.02±142.70	308.46±74.37
30 天 (ml)	335.78±145.37	244.01±110.30	291.71±147.66	292.22±69.20
变化值 (ml)	25.24±119.19	-10.84±25.10	-33.31±44.54	-16.24±20.89
变化率 (%)	9.45±48.04	-5.33±12.89	-11.58±12.74	-5.01±6.77

[0353] NT-proBNP 能够早期反映局部心脏结构改变导致的功能变化,是反映心衰长期预后的重要指标。从检测结果发现,安慰剂组和 1.2 μg/kg/day 剂量组在试验第 30 天和 90 天时 NT-proBNP 均有明显的升高,而 0.3 μg/kg/day 和 0.6 μg/kg/day 剂量组的测量值明显低于前两组,甚至有降低趋势,显示了较好的预后 (参见表 17)。

[0354] 表 17. 受试者治疗前后 NT-proBNP (氨基末端脑钠肽前体, fmol/ml) 变化情况

[0355]



	A 组 (安慰剂) n=10	B 组 (0.3 $\mu$ g/kg/day) n=11	C 组 (0.6 $\mu$ g/kg/day) n=11	D 组 (1.2 $\mu$ g/kg/day) n=8
基线值 (fmol/ml)	1013 $\pm$ 634.5	1732 $\pm$ 1638.4	1403 $\pm$ 1755.2	859 $\pm$ 460.7
30 天 (fmol/ml)	811 $\pm$ 436.6	1631 $\pm$ 1222.1	1021 $\pm$ 1045.9	822 $\pm$ 349.4
变化率 (%)	6.54 $\pm$ 74.29	25.68 $\pm$ 72.09	-4.27 $\pm$ 41.37	49.42 $\pm$ 118.19
90 天 (fmol/ml)	869 $\pm$ 440.9	1663 $\pm$ 1664.1	1112 $\pm$ 1418.5	847 $\pm$ 316.2
变化率 (%)	26.79 $\pm$ 102.61	-3.5 $\pm$ 60.07	8.66 $\pm$ 74.83	45.99 $\pm$ 97.45

[0356] 各剂量组均有不良事件的发生,其中以 1.2  $\mu$ g/kg/day 剂量组发生率最高,100% 的病人经历了至少一次不良事件。所发生的不良事件主要为恶心、食欲不振以及头痛等,各组均没有出现严重不良事件(参见表 18)。所发生的不良事件大部分不需处理,少数经过停药或给予其它药物治疗后症状消失且不留后遗症。

[0357] 各组病人的生命体征和体格检查没有明显变化。

[0358] 表 18. 受试者不良事件发生率

[0359]

	组别	有	无	发生率 (%)
不良事件	A 组 n = 11	6	5	54.5
	B 组 n = 11	7	4	63.64
	C 组 n = 12	8	4	66.67
	D 组 n = 10	10	0	100
严重不良事件	A 组 n = 11	0	11	0
	B 组 n = 11	0	11	0
	C 组 n = 12	0	12	0
	D 组 n = 10	0	10	0

[0360] 从以上安全性和有效性的结果来看,我们认为在 0.3-1.2  $\mu$ g/kg/day (6-24EU/kg/day 或 0.04-0.17nmol/kg/day) 的剂量范围内,重组人纽兰格林 -1 可以有效且安全地治疗慢性心力衰竭。

[0361] 从以上临床试验结果看来,我们得出结论:在 0.3-2.4  $\mu$ g/kg/day (6-48EU/kg/day 或 0.04-0.34nmol/kg/day) 的剂量范围内,重组人纽兰格林 -1 是可耐受且有效地治疗慢性心力衰竭。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 上海泽生科技开发有限公司

&lt;120&gt; 神经调节蛋白用于治疗心力衰竭的有效剂量

&lt;150&gt; CN 200910057390.5

&lt;151&gt; 2009-06-09

&lt;150&gt; US 61/236,849

&lt;151&gt; 2009-08-25

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人类 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
                   20                    25                    30  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
                   35                    40                    45  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln  
                   50                    55                    60

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人类 (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met  
 1                    5                    10                    15  
 Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro  
                   20