

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510054702.9

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 29/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1321686C

[22] 申请日 2000.5.9

[21] 申请号 200510054702.9

分案原申请号 00814257.2

[30] 优先权

[32] 1999.10.12 [33] US [31] 09/417195

[73] 专利权人 阿勒根公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 K·R·奥基 崔明磊

[56] 参考文献

US5714468A 1998.2.3

WO9801754A 1998.1.15

Actions of intrathecal diphtheria toxin - substance P fusionprotein on models of persistent pain.

Benoliel Rafael et al, Pain, Vol. 79 No. 2.3 1999

Effect of intrathecal injection of pertussis toxin on substanceP norepinephrine and serotonin contents in various neuralstructures of arthritic rats - Garzon J. et al, Life sciences, Vol. 47 No. 21 1990

Selective neurotoxic lesions of descending serotonergic andnoradrenergic pathways in the rat - Berge O. G. , et al, Journal of neurochemistry, Vol. 44 No.4 1985

审查员 吴文英

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 范 赤 王景朝

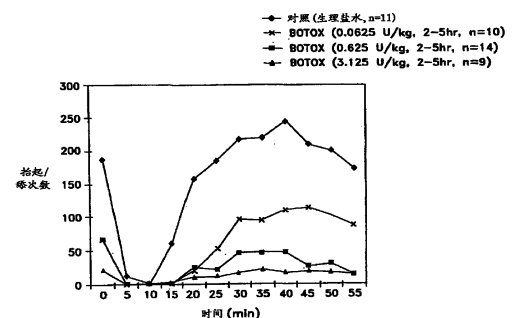
权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 7 页

[54] 发明名称

肉毒杆菌毒素 B、C、D、E、F 或 G 型用于制备药剂的水溶液的用途

[57] 摘要

公开了有效量的未连接到神经元靶定部分的肉毒杆菌毒素 B、C、D、E、F 或 G 型用于制备用于在鞘内给药时减轻疼痛的药剂的水溶液的用途。



1. 有效量的未连接到神经元靶定部分的肉毒杆菌毒素 B、C、D、E、F 或 G 型用于制备用于在鞘内给药时减轻疼痛的药剂的水溶液的用途。

2. 具有抗疼痛活性、不包括神经元靶定部分的肉毒杆菌毒素 B、C、D、E、F 或 G 型在制备用于在将含有有效量肉毒杆菌毒素的药剂鞘内给药至选择的病人影响疼痛活动的脊柱区部分时治疗疼痛的药剂中的用途。

3. 有效量的、未连接到神经元靶定部分的肉毒杆菌毒素 B、C、D、E、F 或 G 型在制备用于在鞘内给药至哺乳动物的脊柱区或者脊神经节时减轻哺乳动物患有的疼痛的药剂中的用途。

肉毒杆菌毒素 B、C、D、E、F 或 G 型用于 制备药剂的水溶液的用途

本申请是国际申请 PCT/US00/12597 进入中国的专利申请 00814257.2 的分案申请。

技术领域

本发明涉及到治疗疼痛的方法。尤其，本发明涉及到通过神经毒素的脊柱内给药治疗疼痛的方法。

背景技术

很多身体疾病，即使不是大多数，会引起疼痛。一般地当在皮肤以及某个内部组织内构成痛觉感受器的游离神经末梢受到机械的、热的或化学品刺激时，会感觉到疼痛。痛觉感受器沿传入神经元传输信号至中枢神经系统，由此至大脑。

疼痛的起因包括炎症、损伤、疾病、肌肉痉挛和神经性事件或综合病症。无法治愈的疼痛对于患者是危害性的，由于限制机能、减少活动性、影响睡眠和极大地干涉生活的质量。

组织损伤时炎性痛发生，它可由外科手术或者归因于不利的物理、化学或热事件或者生物因素感染产生。当损伤组织业已被修复或者清除疼痛诱导刺激时，尽管炎性痛通常是可逆和平息的，目前治疗炎性痛的方法具有许多缺点和不足。从而，治疗疼痛症状的镇痛药或例如治疗炎性痛起因因子的抗菌素的常规的经口、非肠道的或局部给药，能引起广泛的药物全身分布和不希望的副作用。另外，当前的炎性痛治疗药效持续时间短，这迫使经常发生药物重复给药，并可能引起耐药性、抗体产生和/或药物依赖性和上瘾，所有这些都不令人满意的。此外，经常的给药增加了病人治疗方案的费用，并且需要病人记住遵守给药计划。

神经性痛是持续的或慢性的疼痛综合症，它可由神经系统、外周神经、脊神经节或背根或者中枢神经系统的损伤产生。神经性痛综合症包括异常性疼痛、各种神经痛，例如后疱疹神经痛和三叉神经神经痛，幻痛，以及综合区疼痛综合症，例如反射交感神经营养障碍和灼痛。灼痛特征在于结合痛觉过敏和异常性疼痛的自发的烧灼疼痛。

不幸的是，当前治疗神经性痛的方法，例如通过靶向触发点、外

周神经、plexi、背根和交感神经系统的局部麻醉传导阻滞仅仅具有短暂的抗疼痛作用。另外，长期持久的镇痛剂治疗方法，例如通过苯酚注射阻滞或者冷冻疗法，增加了相当大风险的不可逆功能损伤。此外，如可乐定、类固醇、鸦片样物质或咪达唑仑的慢性硬膜外或鞘内(总起来说"脊柱内的")给药具有显著的副作用和可疑的功效。

不幸地，不存在足够、可预测和明确地治疗确定的神经性痛的方法(Woolf C. 等, Neuropathic Pain: Aetiology, Symptoms, Mechanisms, and Management, Lancet 1999; 353:1959-64)，由于目前的神经性痛治疗方法包括仅仅试图经心理上或职业上的疗法帮助病人应付，而不是通过减轻或消除经受的疼痛。

强直或肌肉痉挛是脊髓外伤或其它引起脊髓内损伤的疾病的严重的并发症，肌肉痉挛通常伴随着疼痛。肌肉痉挛期间经受的疼痛起因于肌肉痉挛刺激机械敏感的痛觉感受器的直接作用或者痉挛压迫血管并引起局部缺血的间接作用。由于痉挛增加了受影响的肌肉组织内代谢的速率，有关的局部缺血变重，从而引起疼痛诱导物质的释放。

在经椎管对脊髓通过椎骨的包围之内，脊髓由三个脊膜鞘环绕，它与包围脑的脑膜鞘是连续的。这三个脊膜鞘的最外面是硬脊膜物质、致密的、纤维膜，它通过硬膜外腔与椎骨骨膜在前面分离。硬脊膜物质后面是硬膜下腔。硬膜下腔环绕三个脊膜鞘的第二个，它围绕脊髓、蛛网膜。蛛网膜通过蛛网膜下腔或鞘内腔与第三脊膜鞘、软膜分隔。蛛网膜下腔充满脑脊髓液(CSF)。在软膜的下面是脊髓。因此，向内或者以椎骨后方式进行的级数是硬膜外腔、硬脊膜物质、硬膜下腔、蛛网膜、鞘内腔、软膜和脊髓。

某些药物脊柱内治疗给药，换言之或者硬膜外腔或者鞘内腔，是已知的。药物给药可以或者通过腰椎穿刺注射或者通过导管插入直接进入鞘内腔。鞘内药物给药能避免一些药物口服时的失活以及口服或静脉给药的全身作用。另外地，鞘内给药允许使用仅仅为口服或非肠道给药所需有效剂量一部分的有效量。此外，鞘内腔一般足够宽，以便容纳小导管，因此可用慢性药物运输系统。从而，通过巴氯芬的鞘内给药治疗痉挛状态是已知的。另外，为了肌肉肉毒杆菌减少肌肉痉挛状态的附加作用，巴氯芬的鞘内给药与肌肉注射肉毒杆菌毒素结合是已知的。此外，通过鸦片样物质吗啡和芬太尼的脊柱内给药治疗疼

痛是已知的, 如 Gianno, J., 等于 Intrathecal Drug Therapy for Spasticity and Pain, Springer-Verlag (1996) 阐述的, 此公开的内容本文一并参考。

当前慢性疼痛的鞘内治疗方法是通过利用鞘内泵, 例如 SynchroMed® 输入系统, 一种得自 Minneapolis, Minn. Medtronic, Inc. 的可编程的、植入泵。泵是需要的, 由于当前使用中抗疼痛或镇痛药具有短持续时间的活性, 由此必须经常地重复给药, 这种重复给药实际上不通过每天腰椎穿刺注射进行。泵用外科手段放置于病人腹部皮肤下。导管的一端与泵连接, 导管的另一端穿入 CSF 填充的蛛网膜下或病人脊髓中鞘内的腔。植入泵可编程以便药物经鞘内放置的导管连续或间歇输注。并发症可出现, 由于必需的外科手术植入步骤, 并且用于治疗疼痛的药物已知的鞘内给药具有以下缺点: 活性持续时间短, 允许通过鞘内腔和全身运输和/或扩散至较高 CNS 区域的脂溶性, 和可能的呼吸抑制结果。

因此, 即使并非全部, 许多已知的鞘内给药的药物用于治疗疼痛的显著问题是, 无论是腰椎穿刺还是导管插入, 因为药物的溶解度特性, 药物会离开鞘内腔, 并且另外由于差的神经元结合特性, 药物会在 CSF 内循环至 CNS 的区域, 在这里可能会影响大脑功能。

肉毒杆菌毒素

厌氧革兰氏阳性细菌肉毒梭状芽孢杆菌产生有效的多肽神经毒素, 肉毒杆菌毒素, 它引起称之为肉毒中毒的人和动物的神经性麻痹疾病。肉毒梭状芽孢杆菌的孢子发现在土壤中, 并且在不适当地灭菌和本部罐头厂的密闭食物容器中生长, 它是许多肉毒中毒病例的原因。肉毒中毒作用一般在食用肉毒梭状芽孢杆菌培养物或孢子感染的食品之后 18 至 36 小时显示。肉毒杆菌毒素显然能未削弱地通过肠层并攻击中枢神经系统。首先影响最高的脑神经, 接着较低的脑神经, 然后外周运动神经元。未经治疗的肉毒杆菌毒素中毒症状包括内侧直肌轻瘫、上睑下垂、瞳孔对光的呆滞反应、行走困难、吞咽和说话、呼吸肌麻痹和死亡, 并由它们发展。

肉毒杆菌毒素 A 型是已知对人最致命的天然生物剂。已经测定,

39 单位每千克(U/kg)的肌内的 BOTOX®(肉毒杆菌毒素 A 型纯化神经毒素复合体, 得自 Irvine, California 的 Allergan, Inc.). 肉毒杆菌毒素 A 型复合体亦得自 Proton Products, Ltd., U. K., 商品名为 DYSPORT) 对灵长目是 LD₅₀。一单位(U)的肉毒杆菌毒素可定义为基于小鼠腹膜内注射的 LD₅₀。BOTOX®每 100 单位小瓶包含约 4.8 ng 的肉毒杆菌毒素 A 型复合体。从而, 对于 70 kg 人约 40 U/kg 的 LD₅₀ 是约 134ng 或 28 小瓶(2800 单位)肌内 BOTOX®。已经表征了七种免疫学清楚的血清型的肉毒杆菌神经毒素, 分别为神经毒素血清型 A, B, C1, D, E, F 和 G, 其中的每一个通过中和类型特异的抗体区分。神经毒素成分非共价地结合无毒蛋白, 以形成高分子量复合体。不同的血清型的肉毒杆菌毒素在它们感染的动物种中不同, 并且它们引起的麻痹的严重性和持续时间不同。例如, 当以大鼠产生的麻痹速率计量时, 已经测定出肉毒杆菌毒素 A 型的效力 500 倍于肉毒杆菌毒素 B 型。另外地, 已经测定肉毒杆菌毒素 B 型的 480U/kg 剂量在灵长目是无毒的, 该剂量大约是肉毒杆菌毒素 A 型的灵长目 LD₅₀ 的 12 倍(Moyer E 等, 肉毒杆菌毒素 B 型: Experimental and Clinical Experience, 第 6 章, Jankovic, J. 等编辑(1994) "肉毒杆菌毒素治疗", 71-85 页, Marcel Dekker, Inc.)。

微小数量的肉毒杆菌毒素业已用于减少过量骨骼和平滑肌和括约肌收缩。肉毒杆菌毒素可直接注射入机能亢进的或高张的肌肉或者其紧邻的附近地区, 确信它通过进入外周、神经肌肉接点突触前神经终端并阻滞乙酰胆碱的释放发挥作用。受影响的神经终端因此抑制刺激肌肉收缩、引起肌紧张性还原。从而, 当以治疗剂量肌内注射时, 肉毒杆菌毒素 A 型可用于产生限于局部的化学去神经, 由此产生局部的虚弱或麻痹并且减轻过度的无意识的肌肉收缩。

通常在注射一周之内观察到外周肌内肉毒杆菌毒素 A 型的临床作用。一次肌肉注射肉毒杆菌毒素 A 型的症状减轻的通常时间平均是约三个月。以肉毒杆菌毒素治疗学治疗的肌肉最终从毒素诱导的暂时麻痹复原, 可能归因于新神经萌芽或者初生突触神经传递再现, 或者归因于两者。神经萌芽能建立新的神经肌肉接点。从而, 神经肌肉传递在几个月的时期内逐渐地恢复至正常。

在骨骼和平滑肌组织中, 肉毒杆菌毒素显示不具有明显的器官或

组织亲和性，除了在毒素结合的神经肌肉接点的胆碱能神经元之外，并且通过神经元受体内在化，以及，如指出地，阻滞神经递质乙酰胆碱突触前释放，不会引起神经元细胞死亡。

肉毒杆菌毒素业已用于涉及胆碱能神经系统传递的递增值疾病的治疗，特征在于，例如，特定病灶内或部分条纹或平滑肌区机能亢进的神经肌肉活性。如此，一种或多种肉毒杆菌毒素血清型的肌内注射已经用于治疗，眼睑挛、痉挛性斜颈、半面痉挛、痉挛性发音困难、口下颌张力障碍和四肢张力障碍、肌原纤维痛、磨牙症、弛缓不能、下巴震颤、痉挛状态、幼年大脑麻痹、hyperhydrosis、多涎、非张力障碍的震动、眉沟、病灶张力障碍、肌紧张性头痛、偏头痛和腰背痛。经常地，显著量的痛减轻已经由肌内治疗获得。在局部肌内注射，最普遍地为肉毒杆菌毒素 A 型，或者一种或另一种其它的肉毒杆菌神经毒素血清型之后，观察到这些优点。与相同剂量水平的肉毒杆菌毒素 A 型相比，肉毒杆菌毒素血清型 B, C1, D, E 和 F 明显具有较低的效力和/或更短的活性持续时间。

尽管所有肉毒杆菌毒素血清型明显抑制神经肌肉接点的神经递质乙酰胆碱释放，它们通过作用不同的神经分泌蛋白和/或在不同位点裂开这些蛋白这样做。例如，肉毒杆菌 A 型和 E 型都裂开 25 千道尔顿 (kD) 的突触体相关蛋白 (SNAP-25)，但是它们在此蛋白内靶向不同的氨基酸序列。肉毒杆菌毒素 B, D, F 和 G 型作用于泡相关蛋白 (VAMP，亦称为小突触泡蛋白)，每个血清型在不同的位点裂开蛋白。最后，肉毒杆菌毒素 C1 型已显示裂开突触融合蛋白和 SNAP-25，这些作用机理的差别能够影响各种肉毒杆菌毒素血清型的相对作用效力和/或作用持续时间。

对于所有七种已知的肉毒杆菌毒素血清型，分泌的肉毒杆菌毒素蛋白分子的分子量大约是 150kD。有趣地，肉毒杆菌毒素由梭状芽胞杆菌细菌作为含 150kD 肉毒杆菌毒素蛋白分子连同缔合非毒素蛋白的复合体释放。因此，肉毒杆菌毒素 A 型复合体可由梭状芽胞杆菌以 900kD、500kD 和 300kD 形式生产。肉毒杆菌毒素 B 型和 C1 明显仅生产为 500kD 复合体。肉毒杆菌毒素 D 型生产为 300kD 和 500kD 复合体。最后，肉毒杆菌毒素 E 和 F 型仅生产为约 300 kD 复合体。这些复合体 (即，分子量大于约 150kD) 确信含有非毒素血细胞凝集素蛋白和非毒

素和无毒性非血细胞凝集素蛋白。这两种非毒素蛋白(同含相关的神经毒素复合体的肉毒杆菌毒素分子一起)能够起提供抗肉毒杆菌毒素分子变性的稳定性,以及当摄取毒素时抗消化酸的保护作用。另外,这种情况是可能的,较大的(大于约 150kD 分子量)肉毒杆菌毒素复合体以较慢的速率引起肉毒杆菌毒素离开肉毒杆菌毒素复合体肌肉注射位点的扩散。

肉毒杆菌毒素对中枢神经组织作用的生物化学机理是有争论的。另外,影响的 CNS 神经递质的数量以及肉毒杆菌毒素对不同的 CNS 神经递质的合成、释放、蓄积和代谢的影响程度和本质仍然在检测。体外研究已经表明肉毒杆菌毒素抑制钾阳离子诱导的乙酰胆碱和去甲肾上腺素从脑组织原代细胞培养物的释放。另外,已报道了肉毒杆菌毒素抑制甘氨酸和谷氨酸盐在脊髓神经元原代培养物的诱发的释放,以及在脑突触小体制剂中肉毒杆菌毒素抑制神经递质乙酰胆碱、多巴胺、去甲肾上腺素、CGRP 和谷氨酸盐中每一种的释放。

肉毒杆菌毒素 A 型可由在发酵罐中建立和生长肉毒梭状芽孢杆菌培养物获得,然后按照已知的步骤收获和净化发酵的混合物。所有肉毒杆菌毒素血清型最初是作为非活性的单链蛋白合成的,应由蛋白酶裂开或切口以变成神经活性的。这种细菌菌株使肉毒杆菌毒素血清型 A 和 G 具有内原蛋白酶,并且血清型 A 和 G 因此能从细菌培养物中主要以其活性形式回收。相反地,肉毒杆菌毒素血清型 C1, D 和 E 由非蛋白水解菌株合成,并且因此在从培养物回收时一般未活化。血清型 B 和 F 由蛋白水解和非蛋白水解菌株产生,并且因此能够以活化或非活化形式回收。然而,即使蛋白水解菌株产生例如肉毒杆菌毒素 B 型,仅仅裂开部分产生的毒素。切口与未切口分子的准确比例取决于培养的长度和培养的温度。因此,一定百分比的任何制剂,例如肉毒杆菌毒素 B 型毒素,有可能是非活性的,或许解释了与肉毒杆菌毒素 A 型相比已知的肉毒杆菌毒素 B 型显著低的效力。临床制剂中非活性肉毒杆菌毒素分子的存在对于制剂的全部载荷有贡献,它已与增加的抗原性连系,无助于其临床功效。另外地,已知肉毒杆菌毒素 B 型对于肌肉注射具有较短持续时间的活性,在同一剂量水平效力低于肉毒杆菌毒素 A 型。

因此,需要一种通过药剂脊柱内给药有效治疗疼痛和/或痉挛的方

法,该方法具有如下特性:长持续时间的活性,离开给药鞘内腔的低速率扩散,低速率扩散至给药部位之外的其它鞘内区,适于疼痛治疗和在治疗剂量水平的有限的或不显著的副作用。

发明内容

本发明符合这种需要并通过神经毒素鞘内给药提供有效治疗疼痛的方法,该方法具有长持续时间的活性,从例如给药鞘内腔扩散出的低速率,低速率扩散至给药部位之外的其它鞘内区,适于疼痛治疗和在治疗剂量水平的有限的或不显著的副作用特性。

按照本发明的一种治疗疼痛的方法,具有神经毒素对哺乳动物的脊柱内给药的步骤,从而减轻哺乳动物患有的疼痛。优选地,使用的神经毒素是肉毒杆菌毒素,例如肉毒杆菌毒素血清型 A, B, C, D, E, F 和 G 的一种或一种或多种的组合。最优选地,使用的肉毒杆菌毒素是肉毒杆菌毒素 A 型,由于肉毒杆菌毒素 A 型的高效、易得性和治疗各种疾病临床应用的长期历史。

按照本发明方法的脊柱内给药的神经毒素未结合、依附、附加或熔合神经元靶向部分,并且未与神经元靶向部分结合给药。神经元靶向部分是一种化合物,它功能上与神经元上结合位点交互作用,引起靶向部分和/或连接靶向部分的轭合物以及例如原代感觉传入的神经元表面物理缔合。从而,靶向部分提供适于一种或多种类型神经元的特异性或者结合亲和性。本发明中,任何掺入神经毒素以便按照公开的方法使用的药物制剂(即,神经毒素、氯化钠(生理盐水)和例如白蛋白的稳定剂的重组溶液)缺乏或基本上不含任何有意连接或准备的神经元靶向部分。

由于不必要的一种或多种靶向部分人工制品或构建体的用途被排除在本发明的范围之外,因为我们令人惊奇地发现按照本发明的脊柱内神经毒素给药提供显著的疼痛减轻,即便神经毒素并未与任何非天然或非内在的神经毒素神经元靶向部分结合给药。从而,我们意想不到地发现天然神经毒素,例如肉毒杆菌毒素 A 型,能够接着脊柱内给药后与 CNS 神经元互相作用并且引起疼痛减轻,即使神经毒素未人工地或控制地给予任何神经元特异性或结合亲和性,例如通过神经元靶向部分与神经毒素的连接。在我们的发明之前,人们确信,如以下讨论的,神经毒素,例如肉毒杆菌毒素 A 型,基于脊柱内(包括鞘内)给

药,产生对 CNS 广泛的、不集中的扩散和有害的作用,这样的有害作用包括痉挛状态。因此,认为神经元靶向部分有意与神经毒素连接具有必要性,以减弱或消除这些假定的由神经毒素(例如肉毒杆菌毒素 A 型)的脊柱内给药引起的有害作用。

我们令人惊讶地发现肉毒杆菌毒素,例如肉毒杆菌毒素 A 型,能够以约 10^{-3} U/kg 和约 60U/kg 之间的量脊柱内给药,以减轻哺乳动物(例如人类患者)患有的疼痛。优选地,使用的肉毒杆菌毒素以约 10^{-2} U/kg 和约 50U/kg 之间的量脊柱内给药。更优选地,肉毒杆菌毒素以 10^{-1} U/kg 和约 40U/kg 之间的量脊柱内给药。最优选地,肉毒杆菌毒素以 1U/kg 和约 30U/kg 之间的量脊柱内给药。在本公开的方法的特别优选的实施方法中,肉毒杆菌毒素以约 1U/kg 和约 20U/kg 之间的量给药,在一些临床设定中,肉毒杆菌毒素能够以约 1U/kg 和约 10U/kg 之间的量有益地给药。显著地,本公开方法的疼痛减轻效果能够持续最高 10 天,或者持续最高 20 天,和取决于一些因素,例如使用的剂量,每次神经毒素给药持续最高 3 个月。

神经毒素的脊柱内给药优选通过鞘内给药,例如鞘内给药至中枢神经系统的颅、颈、胸、腰、骶骨或尾骨区,并且给药步骤包括进入哺乳动物中枢神经系统的蛛网膜下腔,注射神经毒素至蛛网膜下腔。进入步骤可由实行腰椎穿刺实施。

选择性地,脊柱内给药步骤包括哺乳动物中枢神经系统的蛛网膜下腔的导管插入步骤,然后经导管插入步骤插入的导管注射神经毒素至蛛网膜下腔。注意在注射步骤之前,在哺乳动物中可以连接或移植适于神经毒素对哺乳动物中枢神经系统给药的给药装置。这种给药装置可由神经毒素的贮器组成,这里贮器可操作地连接泵装置,以便从贮器中泵出等分部分的神经毒素,进入蛛网膜下腔导管的末端。

值得注意的是,给药步骤能够在疼痛(炎症、神经病、损伤诱发的、癌症引起的、痉挛,等等)事件或哺乳动物患有的综合症发生开始或随后进行。因此,在疼痛事件开始之前的大约超过 0.5 小时至大约 14 天能够实施给药步骤。更优选地,在疼痛事件开始之前的大约超过 0.5 小时至大约 10 天能够实施给药步骤。最优选地,在疼痛事件开始之前的大约超过 0.5 小时至大约 7 天、4 天、24 小时或 6 小时能够实施给药步骤。在本发明特别优选的实施方案中,在疼痛事件开始之前的大

约 2 小时到大约 5 小时实施给药步骤。本方法可以用于治疗与异常性疼痛有关的疼痛。

本发明范围之内方法的详细的实施方案包括如下步骤：首先经哺乳动物的真皮切口导管插入哺乳动物的中枢神经系统的蛛网膜下腔，然后经切口穿线导管至蛛网膜下腔，该导管具有开口的始端和远处开口的末端。其次，在哺乳动物中连接或植入给药装置，以便向哺乳动物的中枢神经系统蛛网膜下腔给予肉毒杆菌毒素，这种给药装置包括容纳多剂量肉毒杆菌毒素的贮器，该贮器与泵装置相连，以便从贮器泵取等分部分的肉毒杆菌毒素至导管的始端，导管的始端与泵装置相连。第三，启动泵装置，最后经导管的末端将大约 10^{-3} U/kg 和大约 60 U/kg 之间的肉毒杆菌毒素注入哺乳动物中枢神经系统蛛网膜下腔，从而减轻哺乳动物患有的疼痛。

在本发明范围之内另一优选的方法是体内减弱人类患者的疼感活性或感受的方法，该方法包括脊柱内给予人患者治疗有效量的肉毒杆菌毒素的步骤，从而引起人类患者疼感活性或感受的体内减弱。脊柱内给药步骤可以在疼感活性、感受、感觉或综合症发生或开始之前或随后进行。

本发明范围内的进一步优选的方法是一种治疗疼痛的方法，其通过选择具有抗疼痛活性的神经毒素，选择影响疼感活性的患者部分中枢神经系统；和向选择的该部分中枢神经系统脊柱内给予选择的神经毒素。

特别地，用于实践本方法的神经毒素可由梭状芽胞杆菌细菌制备，例如一种或多种的肉毒梭状芽胞杆菌、*Clostridium butyricum* 和 *Clostridium beratti* 种。

本发明范围内的另一优选方法是治疗疼痛的方法，该方法包括给予哺乳动物中枢神经系统或脊神经节以神经毒素的步骤，因此减轻哺乳动物患有的疼痛。本发明范围内的进一步优选的方法是改善病人机能的方法，该方法包括给予哺乳动物中枢神经系统或脊神经节以神经毒素的步骤，通过测定减轻疼痛、减少卧床时间、增加可动性、较健康体态和较多样化的生活方式的一种或多种因素的改善，从而改善病人的机能。

本发明也包括在其方法范围内使用改性的神经毒素。按照改性神

经毒素，它意指已删除、改性或代替(与天然神经毒素相比)一种或多种氨基酸的神经毒素，包括重组技术制备的神经毒素以及重组生产的神经毒素的衍生物和片段。

附图说明

从以下说明书、权利要求和附图中能够更好的理解本发明的这些和其它特征、方面和优点，这里在以下所有附图 1-7 中，"注射"意谓鞘内注射。

图 1 是显示本发明范围内的方法减轻大鼠福尔马林模型诱导炎性痛的剂量反应曲线。x 轴表示大鼠福尔马林模型开始后以分钟计的时间。y 轴表示紧接着使用对照(生理盐水, n=11)和在福尔马林刺激开始之前 2 小时至 5 小时注射 0.0625U/kg (n=10)、0.625U/kg (n=14) 和 3.125U/kg (n=9) 浓度的 BOTOX®(肉毒杆菌毒素 A 型纯化神经毒素复合体)注射液，福尔马林注射过的爪的抬起和舔的次数。

图 2 是表示在福尔马林试验开始之前超过二分之一小时注射时，本发明范围内的方法减轻大鼠福尔马林模型诱导炎性痛至少 7 天的时程曲线。x 轴表示大鼠福尔马林模型开始之后的以分钟计的时间。y 轴表示紧接着使用对照(生理盐水, n=8)和在福尔马林刺激开始之前 0.5 小时、2 小时至 5 小时(n=14)和 7 天注射 0.625 U/kg 浓度的 BOTOX®注射液，福尔马林注射过的爪的抬起和舔的次数。

图 3 是表示使用各种浓度的肉毒杆菌毒素 A 型时，本发明范围内的方法减轻大鼠福尔马林模型诱导的炎性痛至少七天的剂量反应曲线。x 轴表示大鼠福尔马林模型开始之后以分钟计的时间。y 轴表示紧接着使用对照(生理盐水, n=11)和在福尔马林刺激开始 7 天前以 0.0625U/kg (n=8)、0.625U/kg (n=7)、3.125U/kg (n=6) 浓度注射的 BOTOX®注射液，福尔马林注射过的爪的抬起和舔的次数。

图 4 是显示本发明范围内的方法减轻大鼠福尔马林模型诱导的炎性痛的时程曲线。x 轴表示大鼠福尔马林模型开始后以分钟计的时间。y 轴表示紧接着注射对照(生理盐水, n=11)和在福尔马林刺激开始 2 小时 14 天前以 0.625 U/kg 浓度注射 BOTOX®, 福尔马林注射过的爪的抬起和舔的次数。

图 5 是显示肉毒杆菌毒素 A 型和蝇蕈醇基于大鼠福尔马林模型诱发的炎性痛镇痛作用的对比曲线。x 轴表示大鼠福尔马林模型开始之后

以分钟计的时间。y轴表示紧接着使用对照注射液(生理盐水, n=11)、在福尔马林刺激开始之前2至5小时或六天以0.625 U/kg浓度注射的BOTOX®注射液、之前10分钟或六天注射的1 μ g蝇蕈醇, 福尔马林注射过的爪的抬起和舔的次数。

图6表示具有局部鞘内镇痛作用的本发明范围内的方法减轻大鼠福尔马林模型诱发的炎性痛的曲线。x轴表示大鼠福尔马林模型开始之后以分钟计的时间。y轴表示紧接着使用对照(这里使用的用于鞘内注射生理盐水的导管近尾部地(因此在其腰膨大)位于其植入点或者4.5cm(n=1)或者8.5cm(n=11)), 和经近尾部地位于其植入点仅4.5cm的导管以0.625U/kg(n=3)或3.125U/kg(n=4)浓度注射的BOTOX®, 福尔马林注射过的爪的抬起和舔的次数。

图7是显示本发明范围内的方法减轻外科手术诱发的神经性痛的曲线。x轴表示或者生理盐水(n=8)或者浓度为0.625U/kg(n=11)或3.125U/kg(n=9)的BOTOX®注射之后以小时计的时间。y轴表示G值, 镇痛作用尺度。BL意指基线。

本发明包括治疗疼痛的方法。我们已经发现神经毒素对病人中枢神经系统的脊柱内给药能够导致显著和长期持久的疼痛减轻, 并且没有显著的不希望的副作用。从而, 本发明范围内的方法提供抗疼痛或镇痛减轻功效。

本文使用的"脊柱内"意指硬膜外腔、鞘内腔里或之内、白色或灰色脊髓物质或者附属结构, 例如背根和脊神经节。

在我们的发明之前, 本领域熟练人员确信神经毒素, 例如肉毒杆菌毒素的鞘内给药, 会(1)在受体中诱导显著的痉挛状态和(2)对脊髓和脑功能促成有害的影响。从而, 考虑到引用的有害作用(1): 例如, Williamson 等于 Clostridial Neurotoxins and Substrate Proteolysis in Intact Neurons, J. of Biological Chemistry 271:13; 7694-7699 (1996)报道了破伤风毒素和肉毒杆菌毒素A型抑制神经递质甘氨酸和谷氨酸由鼠胎脊髓细胞培养物的诱发释放, 而 Hagenah 等在 Effects of Type A Botulinum Toxin on the Cholinergic Transmission at Spinal Renshaw Cells and on the Inhibitory Action at Ia Inhibitory Interneurons, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 299, 267-272 (1977)报道了直

接脊柱内注射在实验中制备的肉毒杆菌毒素 A 型，麻醉鼠抑制 CNS 闰绍细胞的活性。中枢甘氨酸和谷氨酸神经递质释放的抑制以及闰绍细胞活性下降调节大概都能够引起体内显著的运动神经元机能亢进的促进以及外周肌肉痉挛状态。

至于有害作用 (2)：确信破伤风神经毒素的鞘内给药，通过破伤风毒素沿 CNS 神经元逆行移动，对脊髓和大脑功能产生显著的负面作用，因此禁忌有关神经毒素，例如肉毒杆菌毒素的鞘内给药。尤其，肉毒杆菌毒素和破伤风毒素均由梭状芽胞杆菌细菌制成，尽管是由不同种的梭状芽胞杆菌。值得注意地，一些研究人员报道了肉毒杆菌毒素至少在在一定程度上具有破伤风毒素显著的神经上升特征。参见，例如 Habermann E., ¹²⁵I-Labeled Neurotoxin from Clostridium Botulinum A: Preparation, Binding to Synaptosomes and Ascent in the Spinal Cord, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281, 47-56 (1974)。

我们的发明令人惊奇地均未遭遇到有害作用 (1) 或者 (2)，可以实践本发明公开的方法以提供有效和长期持久的疼痛减轻，以及在治疗的病人的生活质量上提供广泛改善。病人患有的疼痛可归因于，例如损伤、外科、感染、事故或疾病 (包括癌和糖尿病)，包括神经性疾病和紊乱。

优选地，用于实践本发明范围内的方法的神经毒素是肉毒杆菌毒素，例如肉毒杆菌毒素血清型 A, B, C, D, E, F 或 G 的一种。优选地，使用的肉毒杆菌毒素是肉毒杆菌毒素 A 型，由于它在人体中的高效力、易得到性以及肌肉注射局部给药时用于治疗骨骼和平滑肌疾病的已知用途。肉毒杆菌毒素 B 型并不是用于本公开方法的优选毒素，由于 B 型与 A 型比较已知具有显著较低的效力和功效，并不易于得到，以及在人的临床用途中具有有限的历史。

按照公开的发明，可以基于例如选择的神经毒素的溶解度性质和神经毒素给药的量，选择神经毒素的脊柱内给药途径。神经毒素给药量可根据治疗的具体疾病、其严重性和包括大小、体重、年龄和治疗应激性的其它各种变数广泛变化。例如，CNS 痛觉传入神经元体受影响的区域范围确信与神经毒素注射的体积成比例，而止痛量，对于大多数剂量范围，确信与注射的神经毒素浓度成比例。此外，适于神经毒

素给药的具体的脊柱内位置取决于待治疗疼痛 dermosome 的位置。确定适当的给药途径和剂量的方法一般在病例上由主治医师在病例基础上确定。这些确定对于本领域普通技术人员是常规的(参见, 例如 Harrison's Principles of Internal Medicine(1997), Anthony Fauci 等编辑, 第 14 版, McGraw Hill 出版)。

优选地, 鞘内实施脊柱内给药, 由于其中进入相对较大的鞘内腔更方便, 并且由于优选的神经毒素肉毒杆菌毒素在富脂硬膜外环境中一般显示低溶解度。另外, 硬膜外神经毒素给药是脊柱内给药很少优选的途径, 因为神经毒素必需经鞘内腔扩散, 以通过确信基于 CNS 和脊神经节(DRG)神经元的作用具有抗疼痛作用。我们发现通过这种公开的方法可有效治疗炎性和神经性痛, 不具有显著的肌肉痉挛状态或弛缓或者其它副作用。

按照本发明的神经毒素脊柱内给药能够通过各种途径, 例如导管插入或腰椎穿刺。本发明长期持久的治疗作用大体上消除了慢性抗疼痛药物给药的需要, 这样以致于可以通过不经常的神经毒素腰椎穿刺注射有益地实践本方法。另外, 与移动导管进入其它的 CNS 位置相比, 鞘内腰椎穿刺神经毒素给药途径促进毒素更准确和局部化的输送, 对 CNS 损害危险较小。

鞘内神经毒素可通过弹丸注射或导管插入给药。导管可于 L3-4 或 L4-5 处(距离脊髓是安全距离, 其在人体中终端于 L1)植入, 并且在蛛网膜下腔向上引导以在预期的位置停止。对于疼痛处理, 导管的安置或注射器弹丸注射的位置取决于察觉到疼痛的位置和医师的优选。

值得注意的是, 可以在疼痛事件或综合症发生之前或期间, 按照本公开方法实施治疗神经毒素给药。

我们已经发现, 神经毒素, 例如肉毒杆菌毒素, 可以以约 10^{-3} U/kg 至约 60U/kg 之间的量, 按照本公开方法脊柱内给药。约 10^{-3} U/kg 剂量能够产生抗疼痛作用, 如果直接传输至或在 CNS 的背角之上, 和/或如果肉毒杆菌毒素传输通过如离子电渗疗法辅助。小于约 10^{-3} U/kg 剂量的脊柱内给药不会产生显著或持久的治疗结果。大于 60U/kg 的脊柱内剂量接近神经毒素的致死量, 例如肉毒杆菌毒素。用于获得任一抗疼痛作用的神经毒素接触 CNS 神经以致有利地影响或向下调节神经支配的器官或组织的疼痛或肌肉痉挛感觉, 这样是希望的。因此, 神经毒

素通过例如硬膜外注射的脊柱内给药需要增加剂量十倍，以解决在神经毒素从硬膜外腔至鞘内腔然后至 CNS 外部神经的扩散中的稀释。

肉毒杆菌毒素，例如肉毒杆菌毒素 A 型，鞘内给药以便在治疗的病人中获得抗疼痛作用的优选范围是约 10^{-2} U/kg 至约 50U/kg。少于约 10^{-2} U/kg 产生相对较小的，尽管仍能观察到，抗疼痛作用，而大于约 50U/kg 能引起部分肌肉软弱和毒素中毒症状。肉毒杆菌毒素，例如肉毒杆菌毒素 A 型，鞘内给药以便在治疗的病人中获得抗疼痛作用更优选的范围是约 10^{-1} U/kg 至约 30U/kg。小于约 10^{-1} U/kg 可产生小于最优或最长可能持续时间的预期的治疗作用，而大于约 30 U/kg 仍然能够引起部分肌肉软弱症状。肉毒杆菌毒素，例如肉毒杆菌毒素 A 型，鞘内给药以便在治疗的病人中获得抗疼痛作用最优选的范围是约 1U/kg 至约 20U/kg。肉毒杆菌毒素，例如肉毒杆菌毒素 A 型，在这种优选范围内鞘内给药能够提供惊人的治疗成效。此外，我们的实验工作表明约 1U/kg 至约 10U/kg 的剂量范围对于病人中的炎性和神经性痛的治疗，能够提供显著和长期持久的抗疼痛作用，且没有显著的副作用。

通过 BOTOX[®]生产的裂开的 SNAP-25 蛋白免疫组织化学染色，我们已经确定 BOTOX[®]鞘内给药散布在大鼠背角表层中，它是痛觉传入纤维终止的脊髓层。因此，不希望束缚于任何具体的理论，我们假设鞘内肉毒杆菌毒素的抗疼痛作用归因于其对中枢端感觉传入神经和/或背角二级突触神经各种神经递质释放的特异抑制。

本发明包括局部应用至病人中枢神经系统时，在其范围内任何具有长期持久抗疼痛作用的神经毒素的用途。例如，由任何毒素生产梭状芽胞杆菌细菌，例如肉毒梭状芽胞杆菌、*Clostridium butyricum* 和 *Clostridium beratti*，生产的神经毒素可用于或者使适用于本发明的方法。另外，所有肉毒杆菌血清型 A, B, C, D, E, F 和 G 能够有益地用于本发明的实践，尽管如上解释，A 型是最优选的，B 型是最不优选的血清型。本发明的实践每次注射能够在人体中提供 3 个月或更长的镇痛作用。

显著地，本发明范围内的方法能够提供改善的患者功能。"改善患者功能"可定义为这样的改善，这种改善由如减少疼痛、减少卧床时间、增加可动性、更健康大的体态、多样的生活方式和/或正常肌紧张性允许的治疗等因素测量。

如上阐述, 我们已经发现通过对痛苦的病人进行神经毒素脊柱内给药, 能够获得惊人的效果和长期持久的疼痛治疗。在其最优选的实施方案中, 本发明通过肉毒杆菌毒素 A 型鞘内注射实施。显著地, 我们已经发现通过神经毒素经本文公开的方法脊柱内给药, 可以获得惊人的、长期持久的镇痛和/或改善病人功能的作用, 即使神经毒素并未通过各种处理技术或工艺连接或融合神经元靶向部分, 例如非神经毒素蛋白, 以提供神经毒素对一种或多种具体类型神经元的靶向特异性。因此, 本发明将任何与一种或更多人工地连接或融合神经元靶向部分的用途排除在其范围之外。神经毒素显示对神经元(即, 对神经元表面具体的受体)天然的结合亲和力, 由于存在天然神经毒素分子结构固有的结合部分(例如, 肉毒杆菌毒素重链结合域, 即 Hc 片段)。因此, 为明晰起见, 本文使用的"靶向部分"或"神经元靶向部分"意谓提供神经毒素特异性或增强的神经元结合亲和性的靶向部分, 并且它不是具有这样的靶向部分的神经毒素的天然或固有特征。反之, 本文使用的"结合部分"意谓提供神经元结合亲和性的天然神经毒素的固有成分。

本发明在其范围内包括: (a) 通过细菌培养、毒素提取、浓缩、保藏、冻干和/或重组得到或加工的神​​经毒素; 和 (b) 改性或重组神经毒素, 换言之已经由已知的化学/生物化学氨基酸改性步骤或者利用已知宿主细胞/重组载体重组技术有意删除、改性或取代一个或多个氨基酸或氨基酸序列的神经毒素, 以及如此制备的神经毒素衍生物或片段, 但是, 如表明的, 排除了具有一个或多个连接神经元靶向部分的神​​经毒素。

按照本发明使用的肉毒杆菌毒素可以冻干或真空干燥形式在容器中负压下贮藏。冷冻干燥之前, 肉毒杆菌毒素可组合药​​学上可接受的赋形剂、稳定剂和/或载体, 例如白蛋白。冻干材料可与生理盐水或水重组。

具体实施方式

实施例

下列实施例以本发明范围内特别优选的方法供给本领域普通熟练人员以便实施本发明, 并不是有意限制本发明人认为的发明范围。实施例 1-4 和 6 显示肉毒杆菌 A 的鞘内给药具有对炎性痛的镇痛作用, 而实施例 5 和 7 显示肉毒杆菌 A 鞘内给药对神经性疼痛具有镇痛作用。

实施例1

肉毒杆菌毒素A型鞘内给药对炎性痛镇痛作用

本实验的目的是采用大鼠福尔马林模型研究肉毒杆菌毒素A型对炎性痛的镇痛作用。

体重270g至350g的雄性Sprague-Dawley大鼠每只以异氟烷麻醉。在此和以后所有实施例中,通过经在池上的硬脊膜切口植入约10cm长的PE(聚乙烯)-10管,沿着大鼠脊髓近尾部穿线约8.5cm至腰膨大附近实施的鞘内套管插入术,实施神经毒素的鞘内给药,如Yaksh T.等, Chronic Catheterization of the Spinal Subarachnoid Space, *Physio & Behav* 17: 1031-1036 (1976)介绍的。BOTOX[®]或者对照液体生理盐水经腰膨大设置的导管从福尔马林试验之前0至5小时鞘内给药。

如Dubuisson D.等于The Formalin Test: A Quantitative Study of the Analgesic Effects of Morphine, Merperdine, and Brain Stem Stimulation in Rats and Cats, *Pain*, 4 (1977), 161-174阐明的评定止痛的福尔马林试验如下。因此,福尔马林(5%, 50 μ l)皮下注入大鼠右后爪。我们评估福尔马林引起的缩回反应次数和在时间段内舔已注射爪的次数。在福尔马林试验中,早期反应(早期)的记录立即开始并持续5分钟(0-5分钟)。后期反应(后期)记录在福尔马林注射之后10分钟开始并持续50分钟(10-60分钟)。

图1表示在福尔马林注射之前2-5小时的BOTOX[®]鞘内给药(0.0625 U/kg, 0.625 U/kg或3.125 U/kg)减少福尔马林模型诱发的炎性痛。对照组(n=11)以生理盐水鞘内治疗。在大鼠右后爪注射福尔马林在头5分钟(第一阶段)和10-60分钟(第二阶段)产生一致的抬起/舔和缩回反应。剂量为0.0625U/kg (0.003 ng/kg; n=10), 0.625 U/kg (0.03 ng/kg, n=14)和3.125 U/kg (0.15 ng/kg, n=9)的BOTOX[®]在第一和第二阶段显著减少了抬起/舔次数。按照惯例,一单位(U)的重组BOTOX[®]在小鼠中提供腹膜内中值致死量(LD₅₀)。

第一阶段(图1的时间0至加上约5-10分钟)确信是典型的无髓原代传入神经活性短期持续发作。在较长的第二阶段(图1中约加5-10分钟起),确信延长低水平的C-纤维活性产生其中WDR(DR意指背根)神经元的输出与C-纤维输入相比很大的促进。

由于第一和第二阶段期间测得抬起/舔次数的显著减少,本实施例表明肉毒杆菌毒素型鞘内给药,在 0.0625 U/kg (0.003 ng/kg; n=10), 0.625 U/kg (0.03 ng/kg, n=14) 和 3.125 U/kg (0.15 ng/kg, n=9) 剂量下具有对炎性痛显著的镇痛作用。

实施例 2

肉毒杆菌毒素 A 型鞘内给药对炎性痛的镇痛作用持续至少 14 天

如实施例 1 阐明的进行雄性 Sprague-Dawley 大鼠鞘内套管插入术。图 2 (对照, n=8) 显示以 BOTOX® (0.03 ng/kg 或 0.625 U/kg, n=14) 在福尔马林注射之前 2 至 5 小时预处理的大鼠在第一和第二阶段均减少了抬起/舔次数。BOTOX® 的镇痛作用在 BOTOX® 治疗后持续 7 天 (0.625 U/kg, n=5), 但是与 2 小时预处理相比减少了 (图 2)。另外, 如图 3 所示, 肉毒杆菌 A 型鞘内给药之后七天的镇痛作用是剂量依赖的。此外, 如图 4 所示, BOTOX® 的镇痛作用持续至少 14 天 (0.625 u/KG, N=4)。如图 2 所示, 在福尔马林刺激开始之前 0.5 小时以 BOTOX® 预处理大鼠未能减少福尔马林诱导的疼痛。

该实施例表明鞘内肉毒杆菌毒素 A 型的显著的镇痛作用在大鼠毒素给药之后持续至少 14 天。可以合理的假定, 由所得的数据推断, 在大鼠中镇痛持续至少约 20 天。因此可以预计源自肉毒杆菌毒素 A 型的鞘内给药在人体中的抗炎性痛镇痛将持续至少约 60 天。

实施例 3

肉毒杆菌毒素 A 型和蝇蕈醇鞘内给药对炎性痛的镇痛作用比较

如实施例 1 阐明的进行受检大鼠鞘内套管插入术。鞘内给予 BOTOX® (0.625 U/kg, 福尔马林试验之前 2-5 小时或 6 天) 或者短期起镇痛作用的蝇蕈醇 (1 μ g, 福尔马林试验之前 10 分钟或六天), 并且在指明的随后时间进行福尔马林试验。

如图 5 所示 (对照生理盐水, n=11), 在福尔马林试验六天前 BOTOX® 给药的镇痛作用, 与福尔马林试验六天前蝇蕈醇鞘内给药的镇痛作用相比, 经过阶段 2 大部分, 具有更长的镇痛活性持续时间。另外, 图 5 显示在福尔马林刺激 2-5 小时前 BOTOX® 鞘内给药和福尔马林刺激 10 分钟前蝇蕈醇鞘内给药产生可相当的镇痛。

实施例 4

肉毒杆菌型 A 鞘内给药对炎性痛的位置特异性镇痛作用

如实施例 1 阐明的实施鞘内造管术,除了近尾部地植入导管仅仅约 4.5cm,与常规的 8.5-10cm 相对。对照(生理盐水)导管在 8.5cm(n=11)或 4.5cm(n=1)位置植入。经近尾部植入 4.5cm 的导管以 0.625U/kg(n=3)或 3.125U/kg(n=4)剂量给予 BOTOX[®]。然后进行大鼠福尔马林试验。如图 6 所示, BOTOX[®]经位于 4.5cm 安置的导管鞘内给药,在大鼠福尔马林试验中有很小或没有镇痛作用。

已知人足跟和底部是源自腰膨大的第五腰神经的皮区(参见,例如 plate 150 in Netter, F. Atlas of Human Anatomy, 第二版(1997), Novartis),而且神经分布大概与大鼠中的相似。因此,可以假设由于注射福尔马林的大鼠足底受神经支配,它自沿大鼠脊髓约 7.5cm 至 9cm 近尾部处理(取决于受体大鼠的大小)的腰膨大发出,近尾部仅 4.5cm 的鞘内导管的放置不会产生镇痛作用,如果鞘内给予 BOTOX[®]对脊髓神经元显示位置特异性作用。并且这种假设由图 5 所示的数据证实。

本实施例支持肉毒杆菌毒素鞘内给药的功效和安全性,由于我们在使用的剂量观察到既没有运动原短缺也没有血压改变发生,由 BOTOX[®]鞘内给药,我们也确定(图 5)鞘内的 BOTOX[®]仅在其鞘内给药位置明显具有对 CNS 的局部化作用。

实施例 5

肉毒杆菌毒素 A 型鞘内给药对神经性痛的镇痛作用

本实施例研究肉毒杆菌毒素 A 型是否能够减少由 L5、L6 神经结扎诱发的异常性疼痛。以异氟烷麻醉雄性 Sprague Dawley 大鼠(100-120g),按照 Kim S. 等在 An Experimental Model for Peripheral Neuropathy Produced by Segmental Spinal Nerve Ligation in the Rat, Pain, 50 (1992), 355-363 中所述方法的外科神经操作。暴露并除去 L6 横突。接着分隔 L4 和 L5 脊神经并是可见的,通过以 3-0 丝线紧紧扎住进行 L5 结扎。L6 脊神经位于骶髂接点尾部内侧并以 6-0 缝线结扎。一个月后对显示异常性疼痛的大鼠进行鞘内套管插入术(如实施例 1 阐述)。

手术后注意到后爪变形和趾甲生长。通过对采用下列方案的普通无害机械刺激的敏感反应,大鼠发生异常性疼痛。采用 von Frey 毛发触觉测量器测量触觉异常性疼痛。在作为 BOTOX[®]的肉毒杆菌毒素 A 型给药之前(基线)和之后,测试大鼠。仅仅在小时生理节奏循环的白天

进行试验。大鼠置入具有丝网底的塑料笼内，这样能够完全接触爪子。适应环境大约 30 分钟直到笼探索和主要的准备活动停止。测试区是坐骨神经分布的中部足底左后爪，避开较差敏感性隆凸(脚垫)。爪用一系列的具有实验上增加的硬度的 8 只 von Frey 毛发(0.41, 0.70, 1.20, 2.00, 3.63, 5.50, 8.50, 和 15.10 g)接触(Stoelting)。von Frey 毛发垂直触及足底表面，具有顶在爪上引起轻微屈曲的足够的力量并且保持约 6-8 秒。以几秒的间隔进行刺激，使可以清晰分析任何对先前刺激的行为反应。如果剧烈地缩回爪，记录为阳性反应。移动认为是不明确的反应，在这样的情形下重复刺激。基于对正常、未手术大鼠和痊愈、人工手术的大鼠的观察，选择 15.10g 毛发(较小大鼠体重的约 10%)中止作为试验的上限，因为毛发会举高整个肢体而不弯曲，从而实质上改变了刺激的性质。

采用升降方法测定 50%缩回(withdraw)阈值(G 值)(Dixon W., Efficient Analysis of Experimental Observations, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1980, 20: 441-62)。在此范例中，试验以 2.0g 毛发，该系列中的中间毛发，开始。刺激总以连续方式进行，无论上升的还是下降。在缺乏爪对最初选择头发的缩回反应时，进行更强的刺激。如果爪缩回，接着选择下一更弱的刺激。通过这种方法的最优阈值计算需要 50%阈值附近的六个反应。由于阈值不是已知的，当从任何方向达到阈值时可以产生相似反应的条件(strings)。于是，尽管记录了所有反应，临界六个数据点计数并未开始，直至越过反应阈值，此时跨阈值的两个反应在后面指定为六个的系列中的头两个反应。对持续进行刺激的另外四个反应，并且其基于大鼠反应上或下顺序地变化，组成了该系列的剩余部分。

如此，收集的实际反应数从最小值 4(爪从首先的 2.0g 毛发递减至最弱的 0.4g 毛发的连续缩回情况下：阈值低于实际刺激范围)，改变至最大值 9(在首次缩回发生在 15.1g 的第 5 递增刺激，继之以诱发四个另外反应的情形下，假定缩回在或低于 15.1g 持续发生)。观察到连续的阳性或阴性反应连续发生至刺激设定用尽的情形下，分别地指定 15.00g 和 0.25g 的值。采用惯例，X=缩回(阳性反应)，0=无缩回(阴性反应)，列表显示所得模式的阳性和阴性反应，采用公式，50%克阈值 $= (10[Xf=k\theta]) / 10000$ 以内插替换 50%反应阈值，这里 Xf=最后的 von

Frey 毛发使用值(对数单位); k =该模式阳性和阴性反应列表值, 和 θ =刺激之间的均差(对数单位)。

图 7(对照, $n=8$)显示 BOTOX®对神经病大鼠以 0.625 U/kg, 0.03 ng/kg ($n=11$), 或者以 3.125 U/kg, 0.15 ng/kg ($n=9$)的鞘内给药, 明显减少了大鼠的异常性疼痛, 镇痛作用持续超过一周。图 4 中沿 x 轴的时间间隔是 BOTOX®鞘内给药之后的时间。较高的 G 值表明在爪缩回之前需要更强的力量。

以上的实施例显示肉毒杆菌毒素 A 型的鞘内给药对于炎性和神经性痛具有显著的和长期持久的镇痛作用, 并且镇痛作用是剂量依赖性的和位置特异性的。

另外的观察显示, 对于这些剂量, 鞘内使用 BOTOX®不会产生血压的任何显著变化, 并且此外在受体大鼠中不会引起任何显著的运动原缺乏。

实施例 6

炎性痛的治疗

年龄 45、患急性炎性痛的病人通过鞘内给药, 例如通过向腰部腰椎穿刺, 以约 0.1 U/kg 和 30 U/kg 之间的肉毒杆菌毒素 A 型治疗, 如前所述, 具体的毒素剂量和注射位置, 以及毒素给药的频率, 取决于主治医师技能之内的种种因素。在毒素给药之后 1-7 天之内, 实质上减轻了病人的疼痛。

可以在不同的脊柱级注射肉毒杆菌毒素以治疗各种 dermosome, 换言之治疗各种身体部分的疼痛。另外, 采用 Tuohy 针在椎骨级 L3-4 或 L4-5 经腰椎穿刺, 可以经皮植入导管至鞘内腔。当 CSF 流可识别时, 将硅橡胶导管采用 C-臂向头侧穿过以验证导管放置。导管可进入各种椎骨位置和/或采用不同的剂量浓度治疗各种类型的疼痛和/或痉挛。从而, 导管可在鞘内腔内放在经受疼痛或痉挛的皮区水平。

实施例 7

神经性痛的治疗

年龄 36、患神经病性起源疼痛的病人通过经向腰部腰椎穿刺的鞘内给药给予约 0.1 U/kg 和 30 U/kg 之间的肉毒杆菌毒素 A 型进行治疗。1-7 天之内实质地减轻了疼痛症状。

实施例 8

脊髓损伤后疼痛的治疗

年龄 39、患有脊髓损伤后疼痛的病人,通过对脊髓(例如脊髓腰部)鞘内给药,例如经腰椎穿刺或导管插入,给予约 0.1U/kg 和 30U/kg 之间的肉毒杆菌毒素 A 型进行治疗,如前所述,具体的毒素剂量和注射位置,以及毒素给药的频率,取决于主治医师技能之内的种种因素。在毒素给药之后 1-7 天之内,实质地减轻了病人的疼痛。

实施例 9

四肢损伤后疼痛的治疗

年龄 51、患有手、臂、足或腿损伤后疼痛的病人,通过对脊髓(例如脊髓腰部)鞘内给药,例如经腰椎穿刺或导管插入,给予约 0.1U/kg 和 30U/kg 之间的肉毒杆菌毒素 A 型进行治疗,如前所述,具体的毒素剂量和注射位置,以及毒素给药的频率,取决于主治医师技能之内的种种因素。在毒素给药之后 1-7 天之内,实质地减轻了病人的疼痛。

实施例 10

癌痛的治疗

年龄 63、遭受癌痛的病人,通过对脊髓(例如脊髓腰部)鞘内给药,例如经腰椎穿刺或导管插入,给予约 0.1U/kg 和 30U/kg 之间的肉毒杆菌毒素 A 型进行治疗,如前所述,具体的毒素剂量和注射位置,以及毒素给药的频率,取决于主治医师技能之内的种种因素。在毒素给药之后 1-7 天之内,实质地减轻了病人的疼痛。

实施例 11

糖尿病痛的治疗

年龄 47、遭受糖尿病痛的病人,通过对脊髓(例如脊髓腰部)鞘内给药,例如经腰椎穿刺或导管插入,给予约 0.1U/kg 和 30U/kg 之间的肉毒杆菌毒素 A 型治疗,如前所述,具体的毒素剂量和注射位置,以及毒素给药的频率,取决于主治医师技能之内的种种因素。在毒素给药之后 1-7 天之内,实质地减轻了病人的疼痛。

按照本文公开的发明治疗疼痛的神经毒素脊柱内给药方法具有许多益处和优点,包括如下:

1. 显著减轻疼痛症状。
2. 每次注射神经毒素,可减轻疼痛症状约 2 至约 4 个月。
3. 注射的神经毒素往往产生 CNS 位置特异性抗疼痛作用。

4. 注射的神经毒素显示很少或者无扩散或转移出该 CNS 注射部位的趋势。

5. 神经毒素脊柱内注射发生很少或不发生显著的不希望的副作用。

6. 脊柱内注射神经毒素的量可以显著地小于其它给药途径(即, 肌肉、括约肌内、经口或非肠道)需要的相同神经毒素的量, 并获得相当的作用。

7. 本方法的抗疼痛作用通常产生预期的副作用: 较大的患者可动性、更加积极的体态和改善的生活质量。

尽管通过一些优选的方法详细介绍了本发明, 本发明范围内的其它实施方案、改型和改进是可能的。例如, 广泛的神经毒素可有效用于本发明的方法。另外, 本发明包括脊柱内给药方法, 其中并行或接连给予两种或更多神经毒素, 例如两种或多种肉毒杆菌毒素。例如, 肉毒杆菌毒素 A 型可以脊柱内给药直至临床反应消失或中和抗体产生, 接着给予肉毒杆菌毒素 E 型。选择性地, 可以脊柱内给予肉毒杆菌血清型 A-G 任何两种或多种的组合, 以控制希望的治疗结果的开始和持续时间。此外, 可以在神经毒素给药之前, 并行地或随后地脊柱内给予非神经毒素化合物以提供附加作用, 例如在例如肉毒杆菌毒素的神经毒素产生镇痛作用之前, 增强镇痛或使镇痛更迅速地开始。

我们的发明在其范围内也包括神经毒素(例如肉毒杆菌毒素)在制备通过神经毒素脊柱内给药治疗疼痛的药剂中的用途。

因此, 下列权利要求的精神和范围并不局限于以上阐述的优选实施方案的说明。

- 对照 (生理盐水, n=11)
- ×— BOTOX (0.0625 U/kg, 2-5hr, n=10)
- BOTOX (0.625 U/kg, 2-5hr, n=14)
- ▲— BOTOX (3.125 U/kg, 2-5hr, n=9)

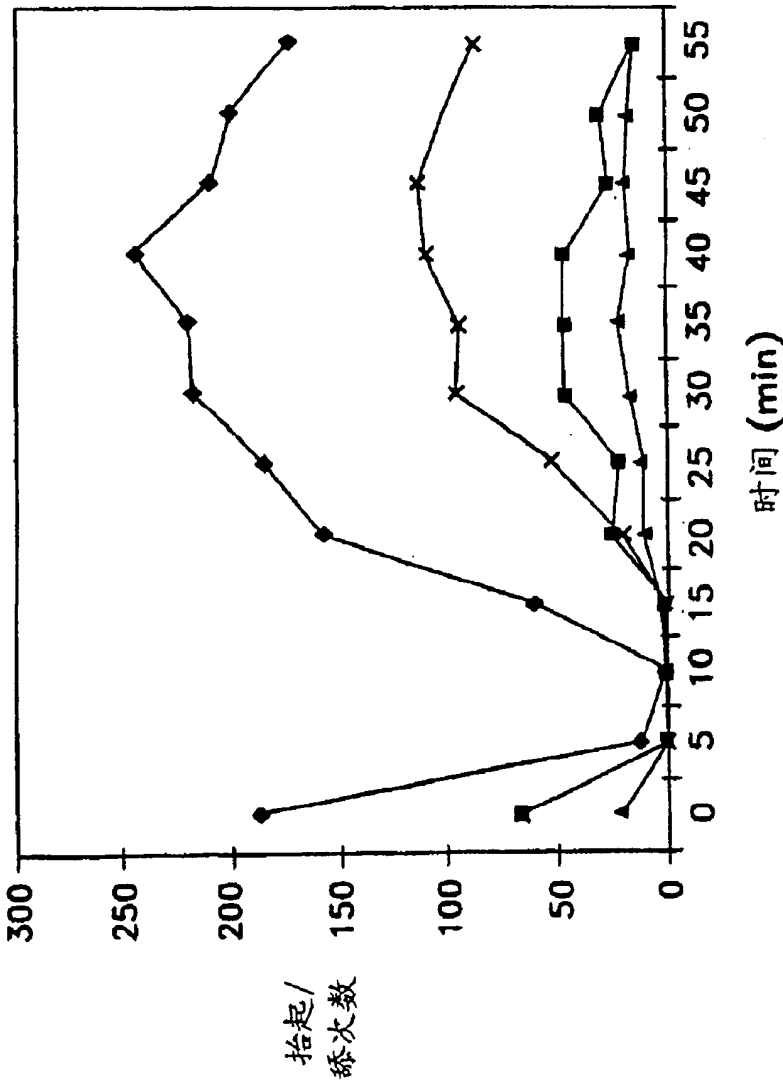


图 1

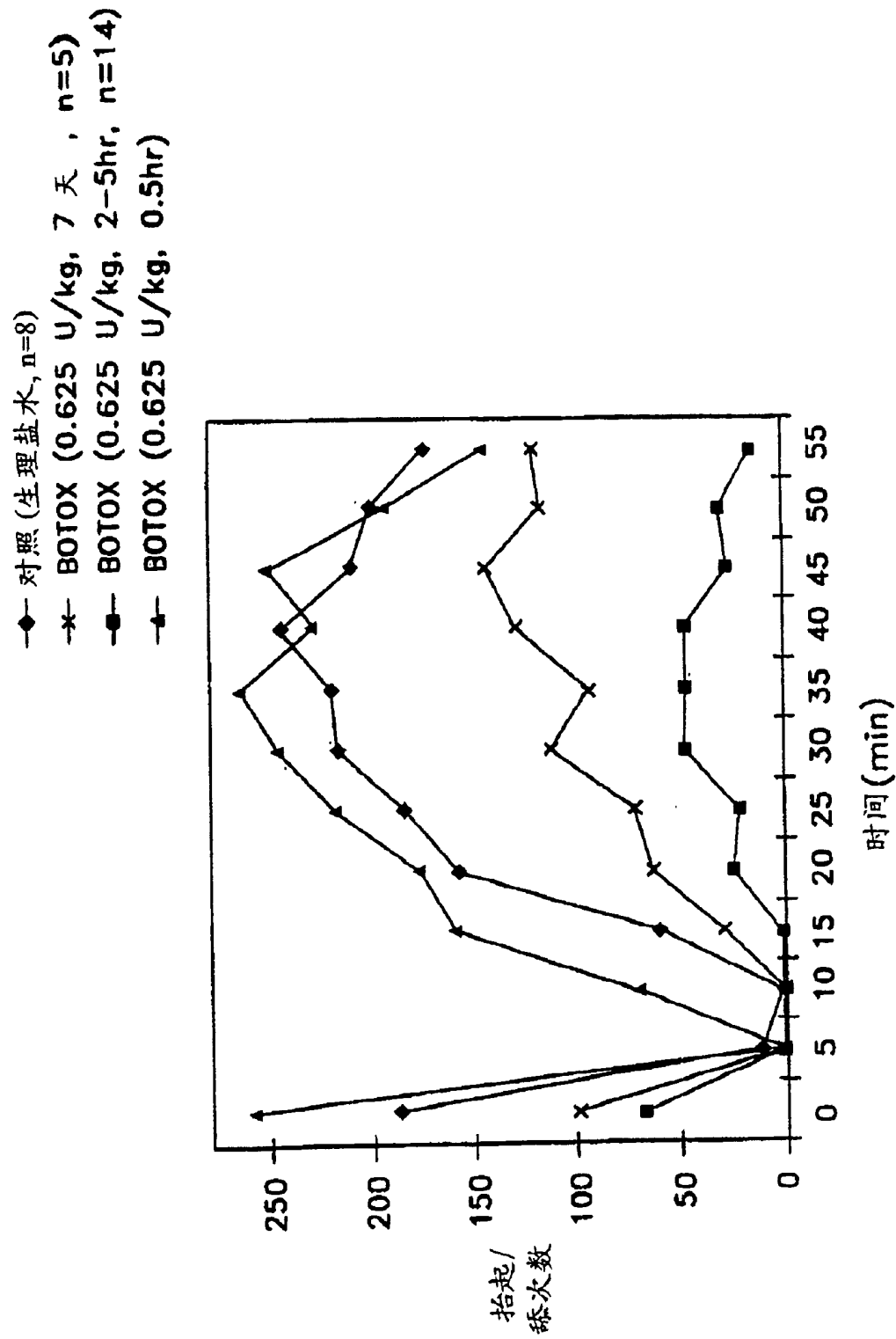


图 2

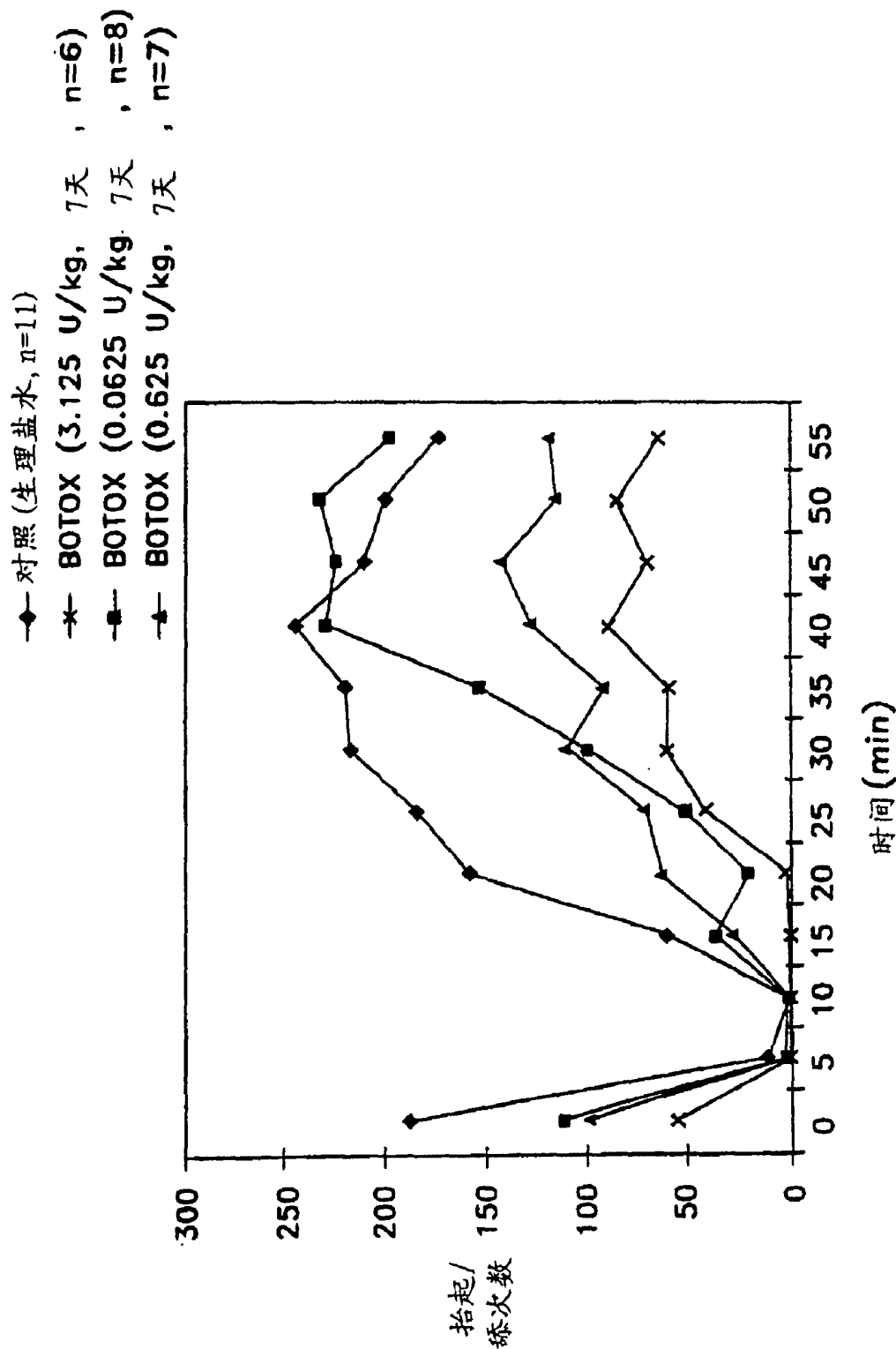


图 3

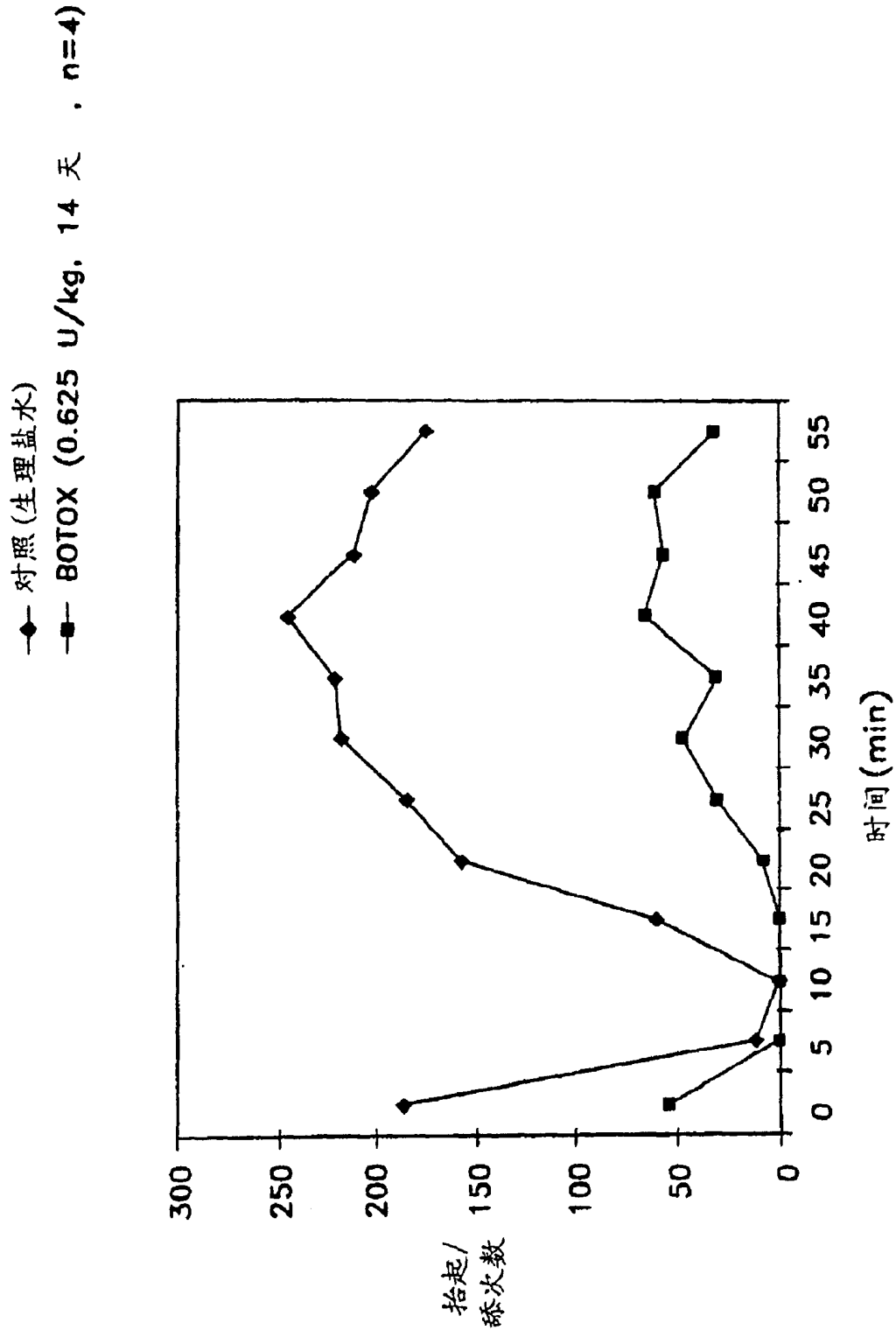


图 4

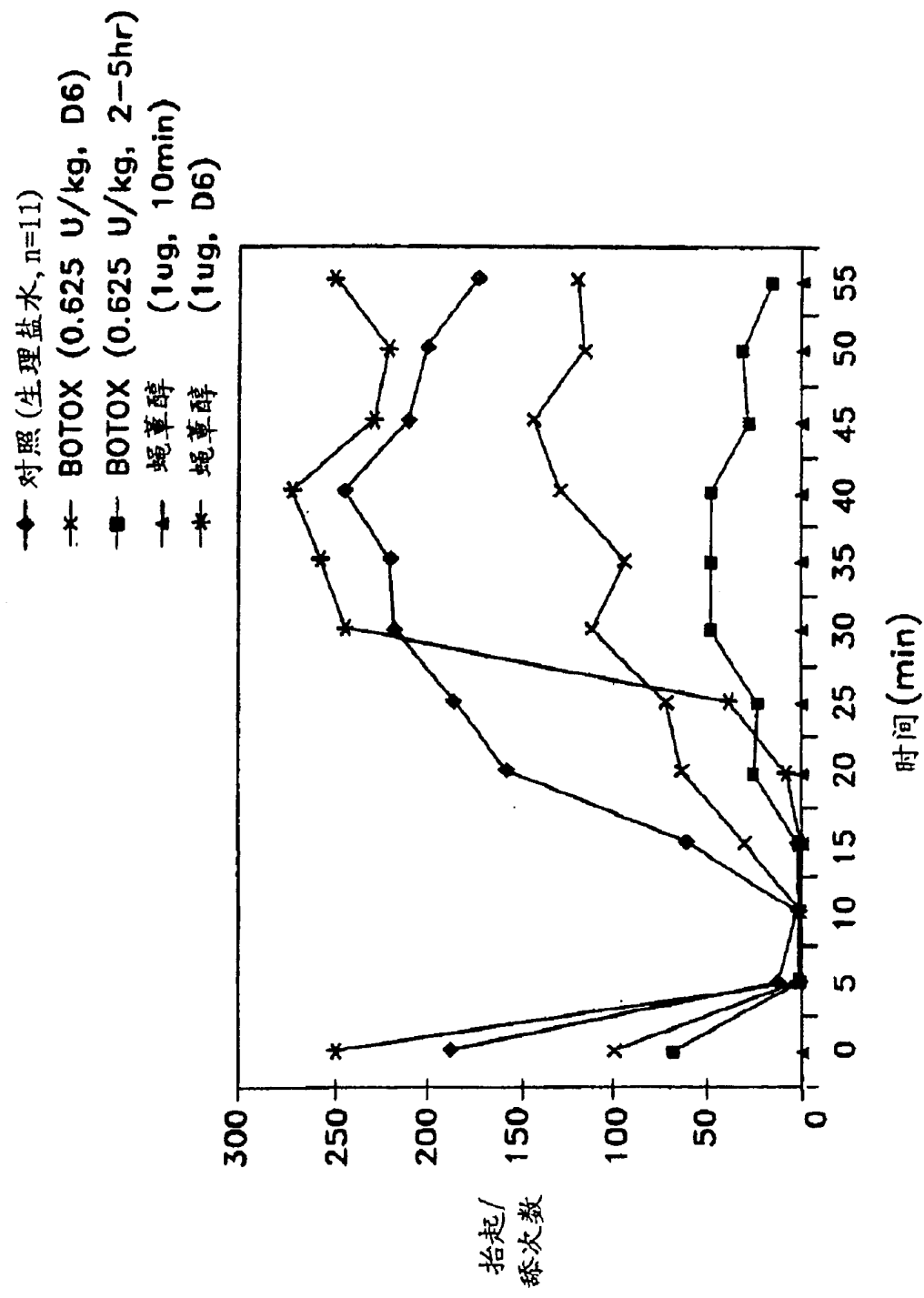


图 5

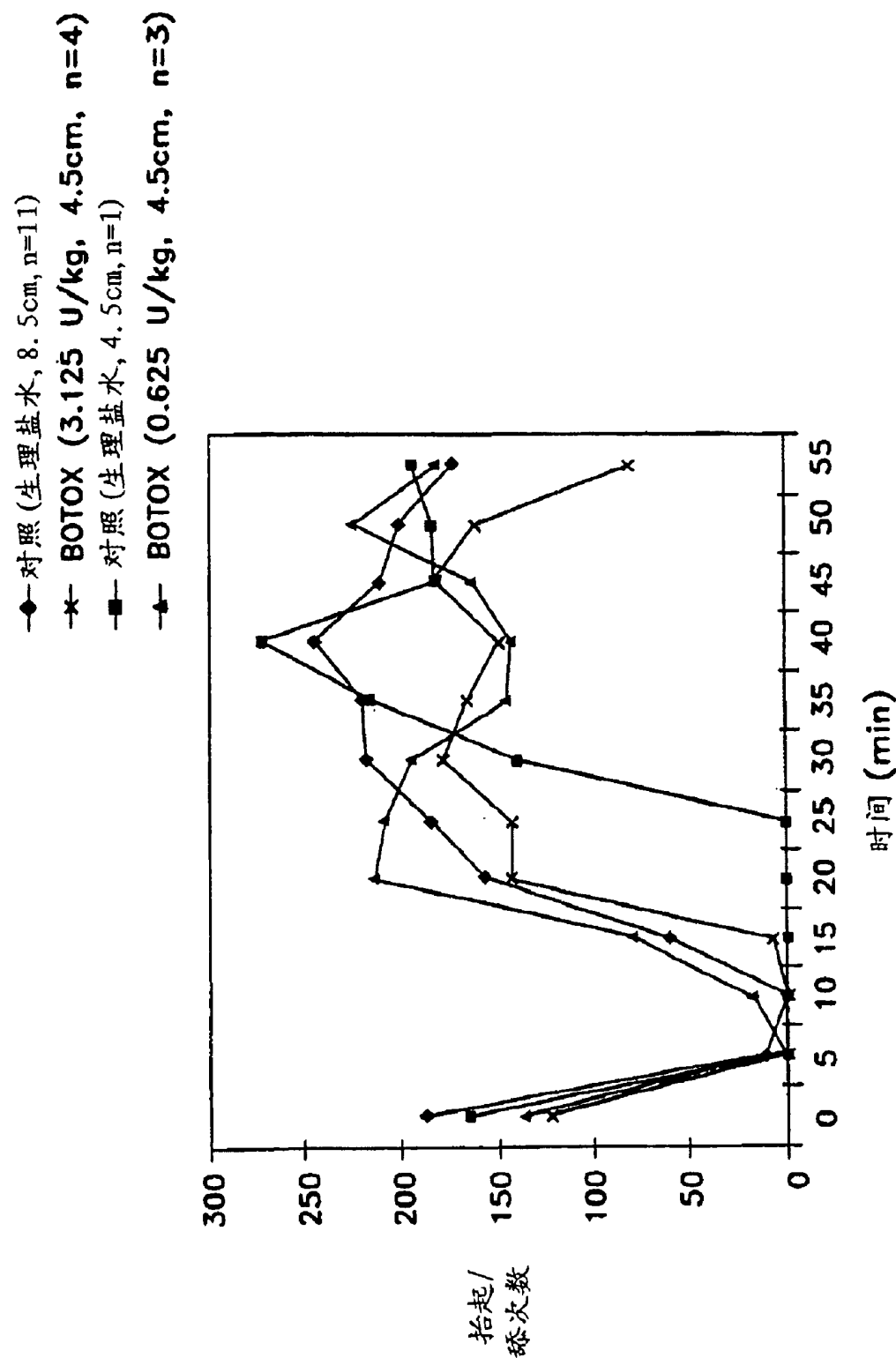


图 6

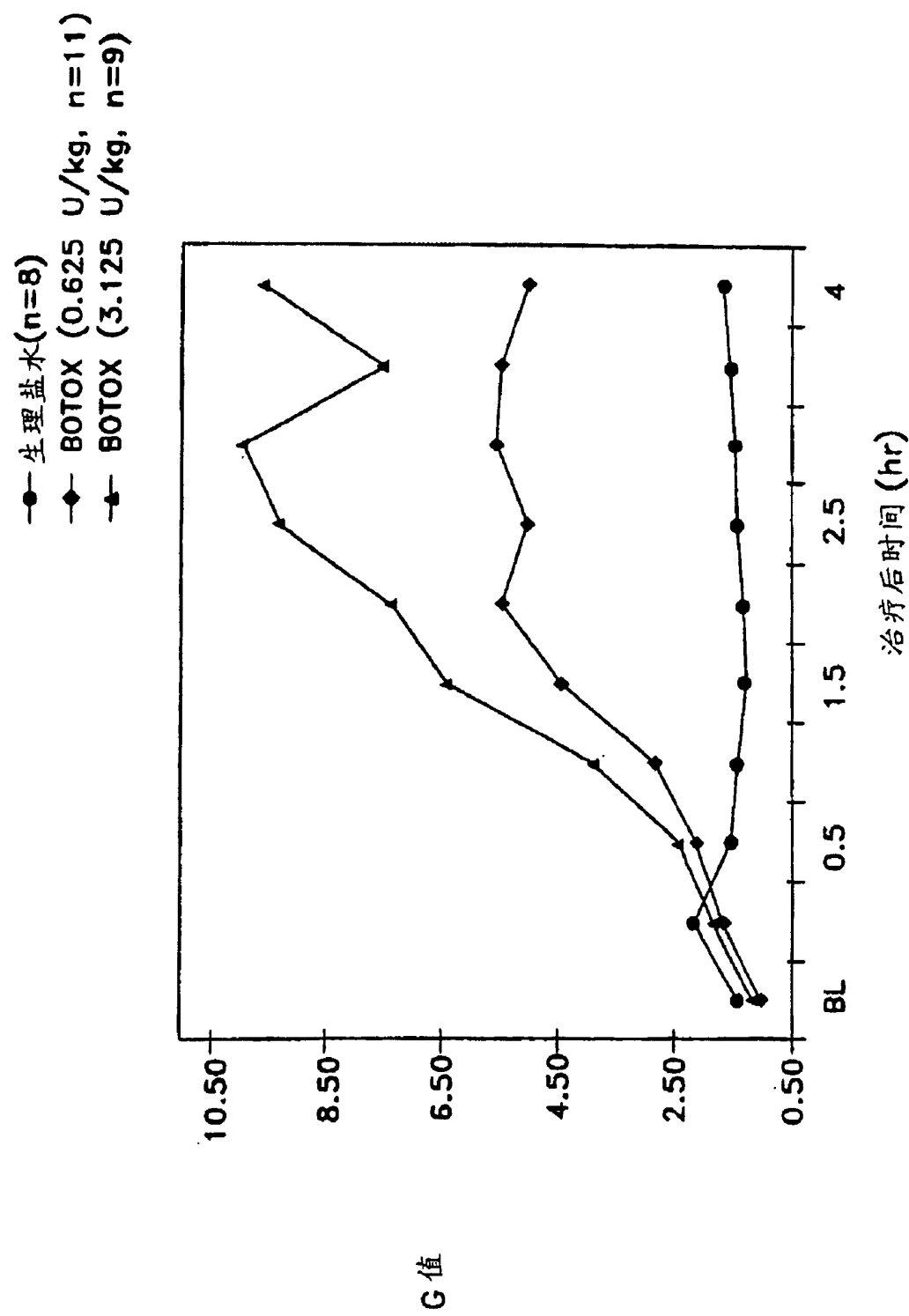


图 7