



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107820423 A

(43)申请公布日 2018.03.20

(21)申请号 201680040346.1

(22)申请日 2016.05.10

(30)优先权数据

15167129.4 2015.05.11 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2016/000890 2016.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/181226 EN 2016.11.17

(71)申请人 爱尔兰詹森科学公司

地址 爱尔兰科克郡

(72)发明人 A.H.范迪克 J.门施

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李进 鲁炜

(51)Int.Cl.

A61K 9/16(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

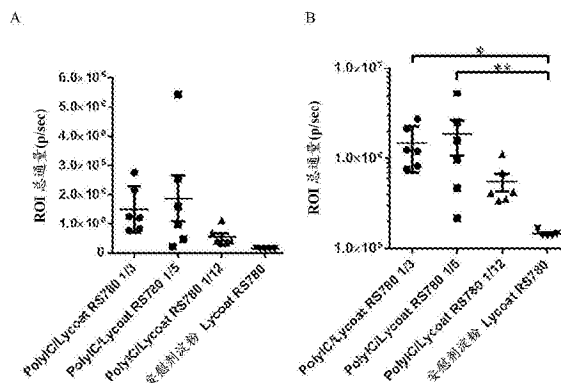
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

用于预防和/或治疗上呼吸道感染的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))豌豆淀粉制剂

(57)摘要

本发明涉及包含聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和豌豆淀粉的微粒的组合物,该组合物用于预防和/或治疗上呼吸道病毒感染如病毒性呼吸道感染或普通感冒,还涉及装置,优选经鼻递送系统,其包含所述组合物供需要的患者用于预防和/或治疗所述感染或普通感冒。



1. 包含聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉的微粒,其中所述微粒中聚肌苷酸-聚胞苷酸与淀粉的比例为约1:1至约1:5。

2. 根据权利要求1所述的微粒,其中所述微粒中聚肌苷酸-聚胞苷酸与淀粉的比例为约1:3至约1:5。

3. 根据权利要求2所述的微粒,其中所述微粒中聚肌苷酸-聚胞苷酸与淀粉的比例为约1:3或约1:5。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,其中所述淀粉是预胶化淀粉。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,其中所述淀粉是豌豆淀粉。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,其中所述聚肌苷酸-聚胞苷酸的平均链长为约300个碱基对至6000个碱基对。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,其中所述聚肌苷酸-聚胞苷酸的平均分子量为约180kDa至3,600kDa。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,其中所述聚肌苷酸-聚胞苷酸以钠盐的形式存在。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,还包含水。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,其中所述微粒基本上由聚肌苷酸-聚胞苷酸、淀粉和水组成。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的微粒,其中所述微粒具有0.1 μm 和100 μm 之间的尺寸。

12. 根据权利要求11所述的微粒,其中所述微粒具有4 μm 至27 μm 的尺寸。

13. 根据权利要求11所述的微粒,其中所述微粒具有2 μm 至20 μm 的尺寸。

14. 组合物,该组合物包含多个根据前述权利要求中任一项所述的微粒。

15. 包含微粒的组合物,其中所述微粒包含聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉。

16. 根据权利要求14或15所述的组合物,其中所述组合物的微粒具有0.1 μm 至200 μm 的Dv50。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述组合物的微粒具有1 μm 至50 μm 的Dv50。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述组合物的微粒具有2 μm 至20 μm 的Dv50。

19. 根据权利要求14至18中任一项所述的组合物,其中所述组合物是液体。

20. 根据权利要求14至19中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含有机溶剂。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述有机溶剂是甘油、乙醇或其组合。

22. 根据权利要求14至19中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含磷酸盐缓冲盐水。

23. 根据权利要求14至18中任一项所述的组合物,其中所述组合物是干粉。

24. 根据权利要求23所述的组合物,其中所述颗粒在室温储存一个月期间是稳定的。

25. 根据权利要求14至24中任一项所述的组合物,其应用于治疗或预防上呼吸道感染的方法中,其中所述方法包括将所述组合物给予患者。

26. 根据权利要求25所述的组合物的应用,其中所述病毒感染是人鼻病毒感染或流感病毒感染。

27. 根据权利要求14至24中任一项所述的组合物,其应用于预防患有慢性阻塞性肺病

(COPD) 的患者中的上呼吸道病毒感染的方法中,其中所述方法包括将所述组合物给予患者。

28. 应用于治疗或预防上呼吸道病毒感染的方法中的组合物,其中:

所述组合物包含微粒;

所述微粒包含比例为约1:1至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉;并且

所述方法包括将所述组合物给予患者。

29. 应用于预防患有慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中的上呼吸道病毒感染的方法中的组合物,其中:

所述组合物包含微粒;

所述微粒包含比例为约1:1至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉;并且

所述方法包括将所述组合物给予患者。

30. 根据权利要求25-29中任一项所述的应用的组合物,其中给予组合物包含经鼻给药。

31. 治疗或预防受试者中的病毒感染的方法,所述方法包括给予受试者权利要求14至24中任一项所述的组合物。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述病毒感染是人鼻病毒感染或流感病毒感染。

33. 预防患有慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中的上呼吸道病毒感染的方法,所述方法包括给予受试者权利要求14至24中任一项所述的组合物。

34. 治疗或预防受试者中的病毒感染的方法,所述方法包括给予受试者包含微粒的组合物,其中所述微粒包含比例为约1:1至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述病毒感染是人鼻病毒感染或流感病毒感染。

36. 预防患有慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中的上呼吸道病毒感染的方法,所述方法包括给予受试者包含微粒的组合物,其中所述微粒包含比例为约1:1至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉。

37. 根据权利要求31至36中任一项所述的方法,其中给予组合物包含经鼻给药。

38. 经鼻递送系统,该系统包含权利要求14至30中任一项所述的组合物。

39. 经鼻递送系统,该系统包括包含微粒的组合物,其中所述微粒包含比例为约1:1至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉。

40. 权利要求14至24中任一项所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗上呼吸道病毒感染。

41. 包含微粒的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗上呼吸道病毒感染,其中所述微粒包含比例为约1:1至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉。

42. 权利要求14至24中任一项所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防患有慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中的上呼吸道病毒感染。

43. 包含微粒的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防患有慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中的上呼吸道病毒感染,其中所述微粒包含比例为约1:1至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和淀粉。

用于预防和/或治疗上呼吸道感染的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))豌豆淀粉制剂

[0001] 优先权

本申请要求于2015年5月11日提交的欧洲专利申请No. 15167129.4的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0002] 背景

普通感冒(又称鼻咽炎、急性病毒性鼻咽炎、急性鼻炎或感冒)是由病毒引起的上呼吸系统的病毒感染性疾病。流感或流感样病也是由病毒感染引起的。

[0003] 普通感冒是上呼吸道的病毒感染。最常涉及的病毒是鼻病毒(30-50%),这是具有99种已知血清型的小核糖核酸病毒类型。其它包括冠状病毒(10-15%)、流感(5-15%)、人副流感病毒、人呼吸道合胞病毒、腺病毒、肠道病毒和偏肺病毒。

[0004] 共有超过200种血清学不同的病毒类型引起感冒。冠状病毒特别涉及成人感冒。在30多种冠状病毒中,3或4种引起人类感染,但它们在实验室中难以生长,因此其意义不够充分理解。由于许多不同类型的病毒及其持续突变的趋势,不可能获得对普通感冒的完全免疫。

[0005] 上呼吸道病毒的第一个征兆通常是喉咙疼痛或发痒。其它常见症状是流鼻涕、充血和打喷嚏。这些有时伴有结膜炎(红眼病)、肌肉痛、疲劳、不适、头痛、虚弱或食欲不振。咳嗽和发烧一般表示流感,而不是上呼吸道病毒,阳性预测值约为80%。婴儿和幼儿的症状可能更为严重,在这些情况下可能包括发烧和荨麻疹。吸烟者上呼吸道病毒也可能更严重。

[0006] 初次接触后2-6小时开始病毒复制。症状通常在初次感染后2至5天开始,但偶尔会在短至10小时内发生。症状起始后2-3天症状达到峰值,而流感症状持续且立即发生。目前还没有已知的治疗缩短该持续时间;然而,症状通常在7至10天内自发消退,一些症状可能持续最长达三周。在儿童中,咳嗽持续超过10天的有35-40%的病例,持续超过25天的有10%的病例。普通感冒是人类最常见的感染性疾病,平均成人每年感染2至4次,平均儿童在6-12岁之间每年感染几次。

[0007] 普通感冒在症状的前两天至三天内是最具感染性的,但在症状起始之前几天也是具有感染性的,并且直至症状完全消退仍可稍具感染性。

[0008] 人鼻病毒(HRV)是小核糖核酸病毒科(*Picornaviridae* family)肠道病毒属(*Enterovirus* genus)的成员。HRV颗粒包含由4种多肽(VP1、VP2、VP3和VP4)组成的27-30nm无包膜衣壳。病毒衣壳含有约7200个碱基的单链RNA基因组。病毒编码的蛋白质(VPg)共价连接到RNA基因组的5'末端。人类鼻病毒(HRV)感染的临床过程已得到很好的表征。HRV可感染上下气道、鼻粘膜、鼻窦和中耳,感染产生“普通感冒”症状(见上文)。感染是自限性的,通常限制在上气道。在感染的前2-3天期间,外周白血细胞计数可能升高。

[0009] HRV感染还可能导致下气道感染、中耳炎(特别是在幼儿中)和鼻窦炎。鼻病毒感染引起的严重并发症(如肺炎)是罕见的,据报道发生在婴儿和幼儿,特别是具有例如支气管肺发育异常、先天性心脏病、早产和神经病症的潜在病症的婴儿和幼儿,以及免疫抑制(骨髓移植接受者)成人。虽然小核糖核酸病毒科的其它成员可以感染中枢神经系统(即脊髓灰

质炎病毒、肠道病毒),但HRV感染人类中枢神经系统尚未见报道。

[0010] 没有商品化的抗病毒药物用于治疗鼻病毒感染或预防普通感冒。治疗由鼻病毒引起的上呼吸道感染是基于通常使用非处方抗组胺药、阿司匹林、咳嗽抑制剂和鼻减充血剂来管理症状(打喷嚏、鼻充血、鼻漏、眼刺激、喉咙痛、咳嗽、头痛、发烧、发冷)。HRV感染的更严重的并发症(例如肺炎)使用医学上适当的护理标准来管理。

[0011] 气道上皮细胞是上呼吸道(URT)感染物如鼻病毒和冠状病毒的主要靶标。由于这些病毒感染发生在反映被感染细胞的免疫系统清除的症状起始之前,直接的抗病毒治疗干预不太可能证明是非常有效的。此外,由于鼻粘膜的高更新率(turnover),实现并维持鼻粘膜中直接抗病毒化合物的活性水平是非常困难的。另一方面,通过利用身体自身防御并在鼻上皮细胞中诱导抗病毒状态的预防已经显示出针对随后的病毒攻击产生显著保护作用以及降低疾病相关症状。

[0012] 虽然感冒可能只持续一两个星期,严重感冒可持续长达一个月。成人平均每年感冒2-3次,儿童平均每年感冒6-10次,取决于其年龄和暴露。有数百种不同的感冒病毒血清型,使得不可能开发有效针对所有血清型的标准的疫苗预防。

[0013] 对症治疗通常涉及使用诱导睡眠的口服抗组胺药和/或具有刺激副作用的血管收缩性减充血剂。这只是稍微有效,这些副作用经常与感染本身一样使人虚弱。尽管预防是理想的解决方案,但出于上述原因,针对所有不同血清型的广泛有效疫苗的可能性在不久的将来是非常不太可能的。因此,在缺乏隔离的情况下,人们会定期暴露于这些感染物,特别是在“感冒季节”,所以广泛有效、方便、无副作用的预防将对公共卫生和工作场所生产力具有重大影响。

[0014] 概述

本发明涉及包含聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和豌豆淀粉聚合物的微粒的组合物,该组合物用于治疗 and/或预防感染如病毒性呼吸道感染或普通感冒,还涉及装置,优选经鼻递送系统,其包含所述组合物供需要的患者用于预防和/或治疗所述感染或普通感冒。

[0015] 附图的简要说明

图1由两个面板组成,标为面板(A)和面板(B)。每个面板是描述小鼠的感兴趣区域(ROI)的辐射的图,所述小鼠被给予了包含比例为1:3 (PolyIC/Lycoat RS780 1/3)、1:5 (PolyIC/Lycoat RS780 1/5)或1:12 (PolyIC/Lycoat RS780 1/12)的聚肌苷酸-聚胞苷酸(PolyIC)和豌豆淀粉(Lycoat RS780®),以及阴性对照(安慰剂淀粉Lycoat RS780)的微粒。小鼠在干扰素 β (INF- β) 基因座中包含萤火虫荧光素酶基因,因此辐射与INF- β 表达相关。面板A和B描述了用线性y轴(A)或对数y轴(B)绘制的相同数据。

[0016] 图2由两个面板组成,标为面板(A)和面板(B)。每个面板包含在干扰素 β (INF- β) 基因座中包含萤火虫荧光素酶基因的小鼠的图像,所述小鼠在给予包含聚肌苷酸-聚胞苷酸(PolyIC)和豌豆淀粉(Lycoat RS780®)的微粒前2-3小时(面板(A))或者在给予微粒后24小时(面板(B))被给予了荧光素。面板(A)和(B)中的顶行四个图像是被给予了包含比例为1:3(每个图像左边的小鼠)、1:5(每个图像中间的小鼠)或1:12(每个图像右边的小鼠)的聚肌苷酸-聚胞苷酸(PolyIC)和豌豆淀粉(Lycoat RS780®)的微粒的小鼠的重复实验。中间行的四个图像描述了两只对照小鼠,每只对照小鼠分别成像(左图像和右中图像),以及各三只小鼠的两个图像(左中图像和右图像),三只小鼠按顶行的顺序排列。底行的三个图像

由给予了包含比例为1:3的聚肌苷酸-聚胞苷酸 (PolyIC) 和豌豆淀粉 (Lycoat RS780®) 的微粒的小鼠 (左图像和中图像, 各描述三只小鼠) 和给予了仅包含豌豆淀粉的微粒的小鼠 (Lycoat RS780®; 右图像, 描述了三只小鼠) 组成。

[0017] 图3由两个面板组成, 标为面板 (A) 和面板 (B)。每个面板是描述小鼠的感兴趣区域 (ROI) 的辐射的图, 所述小鼠被给予了包含比例为1:3 (PolyIC/Lycoat RS780 1/3)、1:5 (PolyIC/Lycoat RS780 1/5) 或1:12 (PolyIC/Lycoat RS780 1/12) 的聚肌苷酸-聚胞苷酸 (PolyIC) 和豌豆淀粉 (Lycoat RS780®), 以及阴性对照 (安慰剂淀粉Lycoat RS780) 的微粒。小鼠在干扰素 β (INF- β) 基因座中包含萤火虫荧光素酶基因, 因此辐射与INF- β 表达相关。面板A和B描述了用线性y轴 (A) 或对数y轴 (B) 绘制的相同数据。图3基于第二个实验, 所述第二个实验被设计以确定图1的结果是否可重复。

[0018] 图4由两个面板组成, 标为面板 (A) 和面板 (B)。每个面板是描述小鼠的感兴趣区域 (ROI) 的辐射的图, 所述小鼠被给予了包含比例为1:3 (PolyIC/Lycoat RS780 1/3)、1:5 (PolyIC/Lycoat RS780 1/5) 或1:12 (PolyIC/Lycoat RS780 1/12) 的聚肌苷酸-聚胞苷酸 (PolyIC) 和豌豆淀粉 (Lycoat RS780®), 以及阴性对照 (安慰剂淀粉Lycoat RS780) 的微粒。小鼠在干扰素 β (INF- β) 基因座中包含萤火虫荧光素酶基因, 因此辐射与INF- β 表达相关。面板A和B描述了用线性y轴 (A) 或对数y轴 (B) 绘制的相同数据。图4基于合并数据, 包括图1和3以及第三个实验中的数据点。

[0019] 详细说明

本发明的各个方面涉及触发分子 (聚 (I:C)) 的制剂, 其可以以可测量和可控制的方式使用, 例如每几天、每周一次或甚至每几周使用, 以准备 (prime) 先天免疫系统, 并提供针对病毒感染的保护。下面概述的方法采用现有的药物聚 (I:C), 其已经显示了效果, 但不实用, 下面概述的方法使用制剂科学使其方便和有效。

[0020] To11样受体3 (TLR3) 是人类由TLR3基因编码的蛋白质。TLR3是先天免疫系统的模式识别受体的To11样受体家族的成员, 其在病原体识别和先天免疫的激活中起着重要作用。TLR从果蝇到人类是高度保守的, 共同享有结构和功能的类似性。它们识别在感染物上表达的病原体相关的分子模式 (PAMP), 并介导发展有效免疫所必需的细胞因子的产生。各种TLR表现出不同的表达模式。该TLR3受体也由气道上皮细胞表达, 并限于白细胞的树枝状亚群。

[0021] TLR3识别双链RNA (dsRNA)。双链RNA是具有可在病毒复制周期期间形成的两条互补链的RNA。在识别后, TLR3诱导转录因子如NF- κ B和干扰素调节因子3 (IRF3) 的活化以增加I型干扰素的产生, 其向其它细胞发出信号以增加它们的抗病毒防御。

[0022] TLR3的结构形成大的马蹄形, 与邻近的马蹄接触, 形成两个马蹄的“二聚体”。大部分TLR3蛋白表面被糖分子覆盖, 使其成为糖蛋白, 但在一个面上 (包括两个马蹄之间的提议的界面), 有大的无糖表面。该表面还含有两个不同的富含带正电荷的氨基酸的补丁 (patch), 这可能是带负电荷的双链RNA的结合位点。

[0023] 聚肌苷酸-聚胞苷酸 (聚 (I:C)) 是具有最高达例如3,600,000道尔顿的MW分布的双链RNA分子。聚 (I:C) 是模拟病毒RNA的To11样受体3 (TLR3) 配体, 是已知的先天免疫反应的刺激剂。当经鼻给药时, 其在鼻上皮中诱导抗病毒蛋白如干扰素 α 和 β 的表达。已经证明其减少鼻病毒感染的数量和严重性。

[0024] 聚(I:C)在当量水溶液(normal aqueous solutions)中通常是不稳定的分子。目前,为了达到有效的治疗或预防效果,聚(I:C)需要在即将使用前重新溶解,并且每2小时给药。为了改善患者依从性并减少给药频率,已开发了稳定且显示出增强的效果的新制剂。

[0025] 在本发明中,现已经用生物粘附聚合物豌豆淀粉配制了聚(I:C),所述生物粘附聚合物豌豆淀粉可以延长在鼻上皮上的停留时间并提供对先天免疫系统的更有效和可控的刺激。

[0026] 本发明令人惊奇地提供了独特的制剂的鉴别,该制剂可以在室温下几乎无限期地储存,并且保留其先天免疫系统刺激活性。

[0027] 本发明制剂含有水溶性豌豆淀粉,并且具有低粘度特性的优点。

[0028] 当在包含聚(I:C)的组合物的制剂中使用豌豆淀粉时,与用于相同目的的任何其它淀粉相比,当小瓶、管或装置必须填充有本发明的组合物时,这样的组合物令人惊讶地显示出对这样的小瓶、管或装置(如喷雾器)内部的较小的粘性行为。技术优势在于,所述聚(I:C)的剂量可以更准确地给予需要的患者,因为相应地较少的组合物将粘附到鼻喷雾装置的内侧。

[0029] 此外,该制剂增强聚(I:C)的效果,并且允许明显更低频率的给药且甚至具有更高的TLR3刺激活性。

[0030] 因此,本发明涉及包含聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和豌豆淀粉聚合物的微粒的组合物,聚(I:C)与豌豆淀粉的比例为1:3。

[0031] 在本发明中获得和使用的微粒是平均颗粒尺寸在0.1 μ m和100 μ m之间的颗粒。优选地,载体聚合物是从山豆属植物,更具体地从豌豆获得的淀粉。

[0032] 包含在组合物中的聚(I:C)-载体-聚合物微粒或者也称为所谓的微粒通过颗粒形成方法如喷雾干燥方法产生。

[0033] 根据本发明的组合物中的微粒的D_v50(=颗粒的基于体积的50%累积不足尺寸(volume based 50% cumulative undersize))的范围为0.1 μ m至200 μ m,优选1 μ m至50 μ m,更优选2 μ m至40 μ m,甚至更优选2 μ m至20 μ m,最优选10 μ m至20 μ m。

[0034] 高度优选13、14或15 μ m的根据本发明的组合物中的微粒的D_v50(=颗粒的基于体积的50%累积不足尺寸)以获得最佳性能。

[0035] 本发明的组合物可以是双相悬浮液或包含有机溶剂的液体组合物,其中有机溶剂基于甘油或乙醇或其组合。用于相同目的其它有机溶剂是三氟烷(trifluranes)或其它醚类推进剂。

[0036] 本发明的组合物可以用于人和/或动物药物,优选用于预防和/或治疗人上呼吸道的病毒感染,例如被称为“普通感冒”的疾病。

[0037] 对于动物用途,根据本发明的组合物可以在例如厩、谷仓、鸡群等中用作气雾剂制剂。

[0038] 目前的组合物可以被患有哮喘和/或COPD(慢性阻塞性肺病)的患者使用,以便潜在地预防和/或治疗即将到来的普通感冒症状或病,从而防止其潜在病/症状的恶化。

[0039] 预防和/或治疗上呼吸道感染的优选方式是通过经鼻给予本发明组合物进行的。

[0040] 包含聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和豌豆淀粉聚合物的微粒的本发明的组合物可以用于治疗和/或预防(病毒)感染或普通感冒,其中所述组合物通过以一天到一个月范

围,更优选每几天或甚至一周一次或两周一次的时间间隔经鼻施用而给予。

[0041] 上述组合物,其中聚(I:C)/豌豆淀粉的比例为1/3,且组合物中微粒尺寸范围为0.1 μm 至200 μm ,优选1 μm 至50 μm ,更优选2 μm 至40 μm ,甚至更优选2 μm 至20 μm ,最优选10 μm 至20 μm ,高度优选13、14或15 μm ,可以用于治疗和/或预防(病毒)感染或普通感冒,其中所述组合物通过以一天到一个月范围,更优选每几天或甚至一周一次或两周一次的时间间隔经鼻施用而给予。

[0042] 本发明的部分另外是包含根据本发明的组合物的装置,特别是经鼻递送系统。

[0043] 根据本发明,聚(I:C)被配制成用于经鼻给药的干粉。为了提高稳定性,由含有豌豆淀粉和聚(I:C)的水性混合物喷雾干燥聚(I:C)。

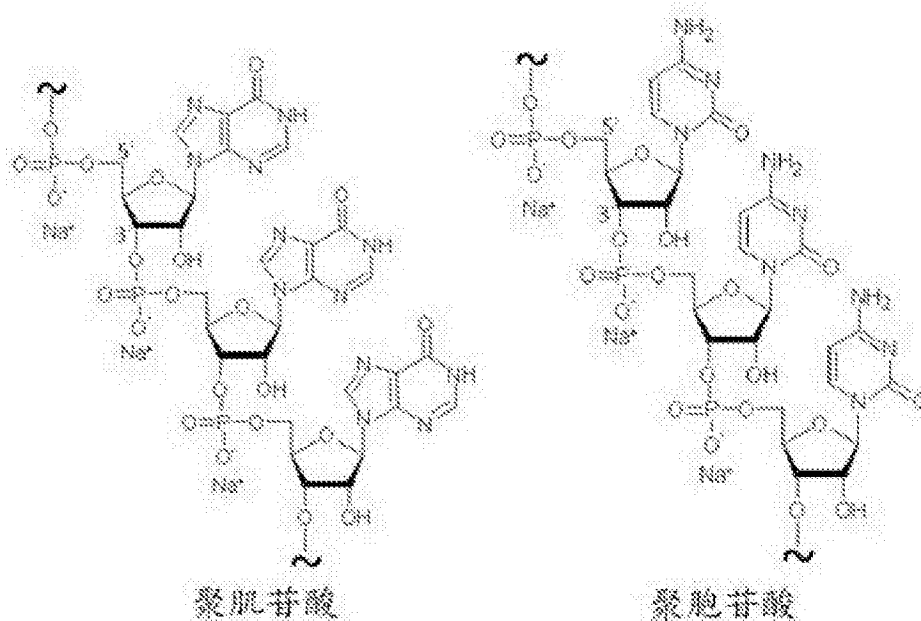
[0044] 据信淀粉具有双重功能:(1)在鼻中起到生物粘附剂的作用,(2)用作稳定聚(I:C)的保护基质。淀粉,特别是豌豆淀粉,是用于经鼻施用的优选赋形剂,因为通过淀粉酶降解预防了聚集。

[0045] 具有高支链淀粉含量或具有化学改性淀粉的淀粉显示良好的粘膜粘附性(muco-adhesion)。在本发明中使用特定地羟丙基化(预胶化)的豌豆淀粉(化学改性的),因为这些是冷水溶胀的并含有冷水溶性部分,使得当在低剪切下与聚(I:C)混合时得到均匀的分散体。所得的淀粉分散体具有低至中等粘度,允许甚至在高淀粉比例下喷雾干燥成均匀的粉末。

[0046] 经鼻给药优选使用单剂量经鼻粉末装置(由Aptar Pharma Germany提供的单位剂量装置)实现。单位剂量装置是主动递送系统,意味着患者不需要吸气,并且性能是独立于患者的。剂量给药通过促动来进行,由超压控制。每喷的剂量由喷雾干燥粉末中聚(I:C)的浓度和发射的粉末的重量决定。每喷将使用新装置将粉末给予至每个鼻孔中。

[0047] 如上所述,聚(I:C)是由肌苷酸和胞苷酸钠盐的反平行多核苷酸链组成的合成双链RNA。所述链通过肌苷和胞嘧啶碱基之间形成的氢键非共价地结合。

[0048] 聚(I:C)的平均链长在300–6,000个碱基对之间,对应于约180,000至约3,600,000道尔顿。分子式为 $(\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{P})_x \cdot (\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_7\text{P})_x$ 。



[0049] 聚(I:C)可以购得,但是也可以任选地使用例如以下程序内部(in house)制备。双重产物聚(I:C)由单独的均聚物聚肌苷(I)和聚胞苷(C)制成。聚I和聚C通过存在多核苷酸磷酸化酶(PNPase)存在下单独聚合核苷二磷酸肌苷和胞苷来合成。每种核苷二磷酸通过PNPase单独聚合20-24小时以控制所得到的核糖核酸聚合物的长度。然后加入酶(蛋白激酶)以终止聚合反应。得到的均聚物(即单链RNA分子)被水解以将每种聚合物产物的分子量范围控制在特定的范围内。用乙醇处理水解产物以从溶液中沉淀出单链RNA分子(ssRNA)。将沉淀与上清液分离并溶于水中。然后将ssRNA溶液过滤以除去颗粒,超滤以除去低分子量污染物,然后冻干。冻干的ssRNA产物单独测试纯度、分子量和其它质量属性以确保产物符合规定。

[0050] 单独的单链均聚物(聚I和聚C)单独溶于0.015M氯化钠中,然后合并以退火该链,形成双链的双重产物(聚I:聚C)。混合后,将所得溶液过滤。将滤液超滤以除去低分子量污染物。然后冻干超滤产物。所得双重产物储存在-20℃。测试冻干的dsRNA产物的纯度、分子量和其它质量属性以确保产物符合规定。

[0051] 在一些方面,本发明涉及包含比例为1/3(w/w)的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))和豌豆淀粉的微粒的组合物。聚(I:C)-豌豆淀粉微粒可以例如通过颗粒形成方法如喷雾干燥方法来产生。微粒的Dv50可以在0.1μm至200μm的范围内。该组合物可以是包含有机溶剂(例如基于甘油或乙醇或其组合)的液体组合物。在一些实施方案中,本发明提供了包含该组合物的装置,例如经鼻递送装置。该组合物可以用于药物中,例如治疗和/或预防感染、普通感冒或流感样病。该组合物可用于制造药物,该药物用于通过经鼻给药预防和/或治疗上呼吸道感染。

[0052] 在一些方面,本发明涉及包含聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉的微粒。

[0053] 在优选的实施方案中,微粒包含比例大于1:9的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉。例如,微粒可以包含以下比例的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉:约1:1至约1:8,例如约1:1至约1:7,约1:1至约1:6,约1:1至约1:5,约1:1至约1:4,约1:1至约1:3,约1:2至约1:8,约1:2至约1:7,约1:2至约1:6,约1:2至约1:5,约1:2至约1:4,约1:2至约1:3,约1:3至约1:8,约1:3至约1:7,约1:3至约1:6,约1:3至约1:5,或约1:3至约1:4。在优选的实施方案中,微粒包含比例为约1:1至约1:7的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉。在更优选的实施方案中,微粒包含比例为约1:1至约1:6的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉。在甚至更优选的实施方案中,微粒包含比例为约1:2至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉。在最优选的实施方案中,微粒包含比例为约1:3至约1:5的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉。

[0054] 微粒可以包含以下比例的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉:约1:1,约1:2,约1:3,约1:4,约1:5,约1:6,约1:7,或约1:8。在优选的实施方案中,微粒包含以下比例的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉:约1:1,约1:2,约1:3,约1:4,约1:5,约1:6,或约1:7。在更优选的实施方案中,微粒包含以下比例的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉:约1:1,约1:2,约1:3,约1:4,约1:5,或约1:6。在甚至更优选的实施方案中,微粒包含以下比例的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉:约1:2,约1:3,约1:4,或约1:5。在最优选的实施方案中,微粒包含以下比例的聚肌苷酸-聚胞苷酸和淀粉:约1:3,约1:4,或约1:5。

[0055] 淀粉可以是玉米淀粉(即玉米淀粉)、小麦淀粉、马铃薯淀粉或豌豆淀粉。淀粉可以是香蕉淀粉、米淀粉、大麦淀粉、黑麦淀粉、黍淀粉、燕麦淀粉、山药淀粉、甘薯淀粉、木薯淀

粉(即木薯淀粉)、西米淀粉、竹芋淀粉、蚕豆淀粉、扁豆淀粉、绿豆淀粉或鹰嘴豆淀粉。淀粉可以包含来自多于一种来源的淀粉,例如,淀粉可以包含豌豆淀粉、马铃薯淀粉、小麦淀粉和/或玉米淀粉。在本发明的每个实施方案中,上述淀粉和它们的组合中的每一种可与豌豆淀粉互换,在本发明的任何实施方案中,豌豆淀粉可以用任何来源的淀粉(或淀粉的组合)代替。在优选的实施方案中,淀粉包含豌豆淀粉,或者甚至由豌豆淀粉组成或基本上由豌豆淀粉组成。在一些优选的实施方案中,淀粉包含玉米淀粉(例如蜡质玉米淀粉),或甚至基本上由玉米淀粉(例如蜡质玉米淀粉)组成。

[0056] 淀粉可以包含至少约20%的直链淀粉,例如至少约25%的直链淀粉或至少约30%的直链淀粉。在某些实施方案中,淀粉包含至少约25%的直链淀粉。淀粉可包含约20%直链淀粉至约85%直链淀粉,如约20%至约40%,约30%至约50%,约40%至约60%,约50%至约70%,约60%至约80%,约20%至约30%,约25%至约35%,约30%至约40%,约35%至约45%,约40%至约50%,约45%至约55%,约50%至约60%,约55%至约65%,约60%至约70%,约65%至约75%,约70%至约80%或约75%至约85%直链淀粉。淀粉可包含0%至约10%直链淀粉,如0%至约5%,0%至约4%,0%至约3%,0%至约2%或0%至约1%直链淀粉。淀粉可以包含高直链淀粉,例如高直链玉米淀粉(例如EURYLON®)。在一些优选的实施方案中,淀粉包含约15%直链淀粉至约50%直链淀粉,更优选约20%直链淀粉至约45%直链淀粉,最优选约25%直链淀粉至约40%直链淀粉。在其它优选的实施方案中,淀粉可包含小于约5%的直链淀粉,如小于4%,小于约3%,小于约2%或小于约1%的直链淀粉。非直链淀粉的淀粉部分优选为支链淀粉,例如包含约20%至约40%直链淀粉的淀粉优选包含约60%至约80%支链淀粉,且包含0%至约10%直链淀粉的淀粉优选包含约90%至100%的支链淀粉。

[0057] 该淀粉可以包含约15%至约80%的支链淀粉,如约20%至约40%,约30%至约50%,约40%至约60%,约50%至约70%,约60%至约80%,约15%至约25%,约20%至约30%,约25%至约35%,约30%至约40%,约35%至约45%,约40%至约50%,约45%至约55%,约50%至约60%,约55%至约65%,约60%至约70%,约65%至约75%或约70%至约80%的支链淀粉。淀粉可以包含约90%至100%的支链淀粉,如约95%至100%,约96%至100%,约97%至100%或约98%至100%的支链淀粉。在一些优选的实施方案中,所述淀粉包含约50%至约85%的支链淀粉,更优选约55%至约80%的支链淀粉,最优选约60%至约75%的支链淀粉。在一些优选的实施方案中,淀粉包含至少约90%的支链淀粉,如至少约95%,约96%,约97%,约98%或至少约99%的支链淀粉。非支链淀粉的淀粉部分优选为直链淀粉,例如包含约60%至约70%支链淀粉的淀粉优选包含约30%至约40%直链淀粉,且包含约95%至100%支链淀粉的淀粉优选包含0%至约5%的直链淀粉。

[0058] 在一些优选的实施方案中,淀粉是预胶化淀粉。例如,在某些优选的实施方案中,淀粉可以是预胶化豌豆淀粉或预胶化玉米淀粉(例如,预胶化蜡质玉米淀粉)。淀粉胶凝化可以增加淀粉的溶解度。

[0059] 淀粉可以是改性淀粉,如糊精、酸处理淀粉、碱处理淀粉、漂白淀粉、氧化淀粉、酶处理淀粉、单淀粉磷酸酯、二淀粉磷酸酯、磷酸化二淀粉磷酸酯、乙酰化二淀粉磷酸酯、淀粉乙酸酯、乙酰化二淀粉己二酸酯、羟丙基淀粉、羟丙基二淀粉磷酸酯、羟丙基二淀粉甘油、辛烯基琥珀酸淀粉钠、辛烯基琥珀酸淀粉铝、乙酰化氧化淀粉、阳离子淀粉、羟乙基淀粉或羧甲基化淀粉。改性可改变淀粉的疏水性、亲水性、电荷、吸湿性、粘度和/或溶解度。例如Lycoat RS780®是预胶化的羟丙基豌豆淀粉,其中豌豆淀粉的一些羟基已被羟丙基取代。

在一些实施方案中,淀粉的0%至约40%的羟基是羟丙基化的,例如1%至约20%,或约2%至约10%。在一些实施方案中,淀粉的羟基的0%至约40%是羟乙基化的,例如1%至约20%,或约2%至约10%。在某些优选的实施方案中,淀粉是羟丙基淀粉,如羟丙基豌豆淀粉。在某些优选的实施方案中,淀粉是预胶化羟丙基淀粉,例如预胶化羟丙基豌豆淀粉。在某些优选的实施方案中,淀粉是羟乙基淀粉,如羟乙基玉米淀粉。在某些优选的实施方案中,淀粉是预胶化羟乙基淀粉,例如预胶化羟乙基玉米淀粉。

[0060] 在一些实施方案中,聚肌苷酸-聚胞苷酸的平均链长为约300个碱基对至6,000个碱基对。例如,聚肌苷酸-聚胞苷酸可包含平均链长为约300个核苷酸至6,000个核苷酸的聚肌苷酸和平均链长为约300个核苷酸至6,000个核苷酸的聚胞苷酸。在一些实施方案中,聚肌苷酸-聚胞苷酸的平均分子量为约180kDa至3,600kDa。聚肌苷酸-聚胞苷酸可以以盐的形式存在,例如钠盐。

[0061] 在一些实施方案中,微粒可以包含水。微粒可以基本由聚肌苷酸-聚胞苷酸、淀粉和水组成,例如其中聚肌苷酸-聚胞苷酸包含钠或另外的阳离子。微粒可以由聚肌苷酸-聚胞苷酸、淀粉和水组成。

[0062] 微粒可以具有以下尺寸:0.1 μ m至200 μ m,优选1 μ m至50 μ m,更优选2 μ m至40 μ m,甚至更优选2 μ m至20 μ m,并且最优选10 μ m至20 μ m。微粒可以具有以下尺寸:约2 μ m至约30 μ m,例如约4 μ m至约30 μ m,约5 μ m至约30 μ m或约6 μ m至约30 μ m。微粒可以具有以下尺寸:约2 μ m至约27 μ m,例如约4 μ m至约27 μ m,约5 μ m至约27 μ m或约6 μ m至约27 μ m。微粒可以具有以下尺寸:约2 μ m至约20 μ m,例如约4 μ m至约20 μ m,约5 μ m至约20 μ m或约6 μ m至约20 μ m。微粒可以具有以下尺寸:约2 μ m至约10 μ m,例如约4 μ m至约10 μ m,约5 μ m至约10 μ m或约6 μ m至约10 μ m。

[0063] 在一些方面,本发明涉及包含多个如本文所述(例如上文)的微粒的组合物。该组合物可以具有以下的D_{v50}:约1 μ m至约200 μ m,如约1 μ m至约50 μ m,约2 μ m至约40 μ m,约2 μ m至约20 μ m或约10 μ m至约20 μ m。该组合物可以具有以下的D_{v50}:约4 μ m至约20 μ m,约5 μ m至约20 μ m,约6 μ m至约20 μ m,约7 μ m至约20 μ m,约8 μ m至约20 μ m,约9 μ m至约20 μ m,或约10 μ m至约20 μ m。

[0064] 包含多个微粒的组合物可以是液体或干粉。包含多个微粒的组合物可以包含有机溶剂如甘油、乙醇或其组合。包含多个微粒的组合物可以进一步包含磷酸盐缓冲盐水。在优选的实施方案中,包含多个微粒的组合物在室温储存至少1个月,如至少2个月,至少3个月,至少4个月,至少5个月,至少6个月,至少7个月,至少8个月,至少9个月,至少10个月,至少11个月或至少12个月期间是稳定的。包含多个微粒的组合物在室温储存约1个月,约2个月,约3个月,约4个月,约5个月,约6个月,约7个月,约8个月,约9个月,约10个月,约11个月或约12个月期间可以是稳定的。

[0065] 在一些方面,本发明涉及经鼻递送系统,其包括包含如本文所述(例如上文)的微粒的组合物。

[0066] 在一些方面,本发明涉及包含多个如本文所述的微粒的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗上呼吸道感染。在一些实施方案中,本发明涉及包含如本文所述的微粒的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防患有慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中的上呼吸道感染。

[0067] 包含多个如本文所述的微粒的组合物可用于治疗或预防上呼吸道的病毒感染,例如鼻病毒感染或流感病毒感染。病毒感染可由小核糖核酸病毒(例如鼻病毒)、冠状病毒、流

感病毒、人副流感病毒、人呼吸道合胞病毒、腺病毒、肠道病毒或偏肺病毒引起。包含多个如本文所述的微粒的组合物可用于预防患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 的受试者中的上呼吸道感染或其症状。方法可以包括例如通过经鼻给药将组合物给予受试者。受试者可以是人或动物, 优选人。

[0068] 在一些方面中, 本发明涉及治疗或预防受试者中的病毒感染的方法, 包括给予受试者包含多个如本文所述的微粒的组合物。病毒感染可由小核糖核酸病毒 (例如鼻病毒)、冠状病毒、流感病毒、人副流感病毒、人呼吸道合胞病毒、腺病毒、肠道病毒或偏肺病毒引起。在某些优选的实施方案中, 病毒感染是鼻病毒感染或流感病毒感染。给予组合物可以包含例如经鼻给药。受试者可以是人或动物, 优选人。

[0069] 在一些方面, 本发明涉及预防患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 的受试者中的上呼吸道感染的方法, 包括给予受试者包含多个如本文所述的微粒的组合物。给予组合物可以包含例如经鼻给药。受试者可以是人或动物, 优选人。

[0070] 例证

实施例1. 制备和表征微粒的方法

聚 (I:C) 与豌豆淀粉的喷雾干燥

在Buchi B290 Mini喷雾干燥器 (Buchi, Flawil, 瑞士) 上进行喷雾干燥过程。将无核酸酶的水加入到玻璃烧杯中, 并在磁力搅拌器混合的同时加入豌豆淀粉, 直到淀粉完全分散。将聚 (I:C) 溶于无核酸酶的水中并在磁力搅拌器上搅拌直至聚 (I:C) 完全溶解。将溶解的聚 (I:C) 加入到分散的豌豆淀粉中并在室温下搅拌过夜。使用4.7% (w/w) 的总固体浓度和1/3 (w/w) 的聚 (I:C) /豌豆淀粉比例。

[0071] 通过蠕动泵将溶液进料至喷雾干燥器顶部的二流体喷嘴 (two-fluid nozzle) (直径: 0.7mm)。喷雾干燥器以并流氮气流模式操作。将喷雾干燥的颗粒收集在连接到旋风分离器的储器中。收集颗粒后, 将玻璃圆筒 (cylinder) 和旋风分离器冷却至室温。将收集的粉末转移到琥珀色玻璃瓶中, 并将该瓶放入铝蒸气锁袋 (aluminum vapor lock bag) 中。小瓶在室温下储存。

[0072] 扫描电子显微镜

样品用直径 $\pm 30-50\text{nm}$ 的金颗粒溅射。使用具有Everhart Thornley检测器的FEI扫描电子显微镜Quanta 200F型产生图像。

[0073] 水分含量-Karl Fischer滴定

所述概念的水分含量通过直接体积Karl Fisher滴定法测定。使用KF TITRATOR V30 (Mettler Toledo, US)。将粉末 (50-100mg) 转移到含有Hydranal[®] 无水甲醇 (Hydranal[®] Methanol Dry) (Sigma Aldrich) 的滴定容器中并搅拌300秒。使用5ml滴定管以2mg/ml浓度用Hydranal[®] 复合物2 (Hydranal[®] Composite 2) (Sigma Aldrich) 进行滴定。15微克/分钟的停止漂移 (stop drift) 用于终止。样品一式三份分析。

[0074] 颗粒尺寸的测定

存在仅基于感兴趣的产物的体积分布评估颗粒尺寸分布数据的倾向。因此, 技术人员通常将评估限于 D_v10 、 D_v50 和 D_v90 累积不足尺寸的比较。然而, 比较 d_vx 累积不足尺寸可能并不总是直接的, 这是因为不同的技术和仪器容易导致不同的结果这一事实。另外, 技术人员通过从不同角度查看数据 (即使用其它参数), 可以从颗粒尺寸 (或形状) 分布数据获得更多

的信息。

[0075] 为了测定颗粒尺寸分布,使用激光衍射测试方法。该分析在配备有Hydro2000S湿分散模块的Malvern Mastersizer 2000激光衍射仪(或等同系统)上进行。以20nm至2mm的尺寸范围以蓝光ON检测模式使用该仪器。本发明中测得的体积颗粒尺寸分布对于D_v10为4μm,对于D_v50为14μm,而对于D_v90为27μm。

[0076] 实施例2.流感小鼠模型中制剂的体内测试

所有的动物研究都经伦理委员会批准,并按照国家 and 国际准则进行。使用8-12周龄的雌性瑞士小鼠(Janvier)。所有鼻内处理均在异氟烷(isoflurane)麻醉下进行。为了给予一定量的液体,将液滴直接施加在鼻孔的顶部,并且通过关闭口,使液滴通过鼻孔进入鼻腔。喷雾干燥的聚(I:C)-豌豆淀粉粉末是在即将进行每个实验之前新鲜制备的并且用粉末尖端装置(powder tip device)给予。未配制的聚(I:C)以1mg/ml的浓度在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中给予。

[0077] 测试不同比例(1/3,1/5,1/12)的polyIC/Lycoat RS780(=豌豆淀粉)的IFN-β诱导能力

干扰素-β(IFN-β)基因活化的荧光素酶报告基因(reporter)可以在用不同的poly IC制剂刺激后提供对IFN-β活化的了解。poly IC是通过模式识别受体(PRR)刺激先天免疫系统从而模拟dsRNA病毒的合成类似物。当poly IC与其PRR(TLR3)、RIG-1和/或MDA 5结合时,信号级联启动并导致I型干扰素的活化,其中IFN-β是代表性的。由于IFN-β基因座中的靶向突变,杂合IFN-β+/Δβ-luc白化(Tyrc2J) C57BL/6小鼠产生由IFN-β启动子驱动的萤火虫荧光素酶。对于光学成像,全身给予荧光素,并使用IVIS200系统(CaliperLS)监测光子发射。

[0078] 以1/3,1/5和1/12的不同比例PolyIC /Lycoat RS780(=豌豆淀粉)测试干粉制剂中化合物的IFN-β诱导能力。包括只含豌豆淀粉的制剂作为阴性对照。将化合物鼻内给予IFN-β报告基因小鼠,并在给药前和在给药后24小时进行体内成像。

[0079] 实验方案

小鼠. 先前已经描述了IFN-β报告基因小鼠的产生(Lienenklaus等,2009)。简而言之,由于IFN-β基因座中的靶向突变,小鼠产生由IFN-β启动子驱动的萤火虫荧光素酶。本研究中使用的小鼠是杂合IFN-β+/Δβ-luc白化(Tyrc2J) C57BL/6。使用12至14周龄的雄性和雌性。动物被安置在IVC架(IVC racks)中,为其随意提供食物和水。

[0080] 化合物的给予. 使用31只8-12周龄的雄性和雌性杂合IFN-β+/Δβ-luc白化(Tyrc2J) C57BL/6。所有鼻内给药均在注射麻醉下进行(氯胺酮/甲苯噻嗪)。使用自制的尖端装置给予干粉。使用尖端装置将2mm粉末给予到左鼻孔中,并将另外2mm粉末给予到鼻子上。给予粉末后,将小鼠置于红灯下使其醒来。

[0081] 小鼠成像. 为了体内成像,小鼠静脉注射D-荧光素-萤火虫-钾盐(D-Luciferin, firefly, potassium salt)(30mg/ml,在PBS中;100μl/20g小鼠)。小鼠用异氟烷麻醉,在注射荧光素后~5 min使用IVIS200系统(CaliperLS)监测光子发射。成像在化合物给予之前4小时(背景信号)和之后24小时进行。进行了给予荧光素和成像之间的时间跨度的数据校正:校正的通量=总通量+Δt[min]*(0.0459*总通量)。

[0082] 结果

实际数据的统计分析显示组别PolyIC/Lycoat RS780 (=豌豆淀粉) 1/3和1/12之间还有组别PolyIC/Lycoat RS780 1/3和安慰剂淀粉Lycoat RS780组之间的显著差异(图1)。对数转换数据的统计分析显示组别PolyIC/Lycoat RS780 1/3和安慰剂淀粉Lycoat RS780组之间,1/5组和安慰剂组之间,以及1/12组和安慰剂组之间的显著差异(图2)。总之,制剂的活性(IFN反应)与制剂中PolyIC/Lycoat RS780的比例之间具有良好的相关性。当使用较高比例的PolyIC/Lycoat RS780淀粉时,IFN反应增加。

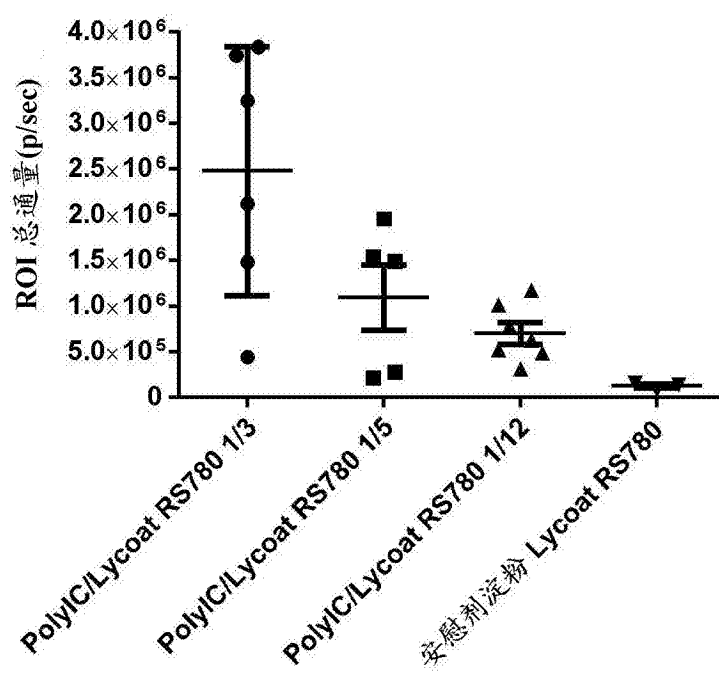
[0083] 实施例3. 体内测试的可重复性

重复实施例2的方法。图2描述了在给予微粒之前(图2A)和之后(图2B)针对荧光素酶活性成像的小鼠。图3描述了给予微粒后小鼠测得的辐射,所述微粒包含1:3,1:5或1:12的聚肌苷酸-聚胞苷酸与淀粉(Lycoat RS780®)的比例,或阴性对照(安慰剂淀粉Lycoat RS780)。在辐射的线性分析中没有观察到统计显著性(图3A),但对数据进行对数转换后在1:3组和阴性对照之间($p=0.0002$)以及1:5组和阴性对照之间($p=0.0006$)观察到统计显著性(图3B)。但是在删除与高反应者相关的数据点后,1:5组和阴性对照之间的统计显著性丧失($p=0.1897$)。

[0084] 将来自实施例2和3的数据与来自第三个类似进行的实验的数据合并(图4)。当使用线性分析分析数据时,在1:3组和阴性对照之间($p=0.0002$),1:3组和1:12组之间($p=0.0060$),以及1:5组和阴性对照之间($p=0.0020$)观察到统计显著性。当进行对数转换后分析数据时,在1:3组和阴性对照之间($p<0.0001$),1:3组和1:12组之间($p=0.0017$),1:5组和阴性对照之间($p<0.0001$),1:5组和1:12组之间($p<0.0001$),以及1:12组和阴性对照之间($p<0.0001$)观察到统计显著性,但在1:3组和1:5组之间没有观察到统计显著性($p=0.7064$)。

[0085] 尽管已经参考本公开的具体实施方案描述了本公开,但是本领域技术人员应该理解,在不脱离本公开的真实精神和范围的情况下可以进行各种改变并且可以替换等同物。另外,可以进行许多修改以使得特定的情况、材料、物质组成、方法、一个或多个方法步骤适应本公开的目的、精神和范围。所有这些修改意图在本公开的范围之内。

A



B

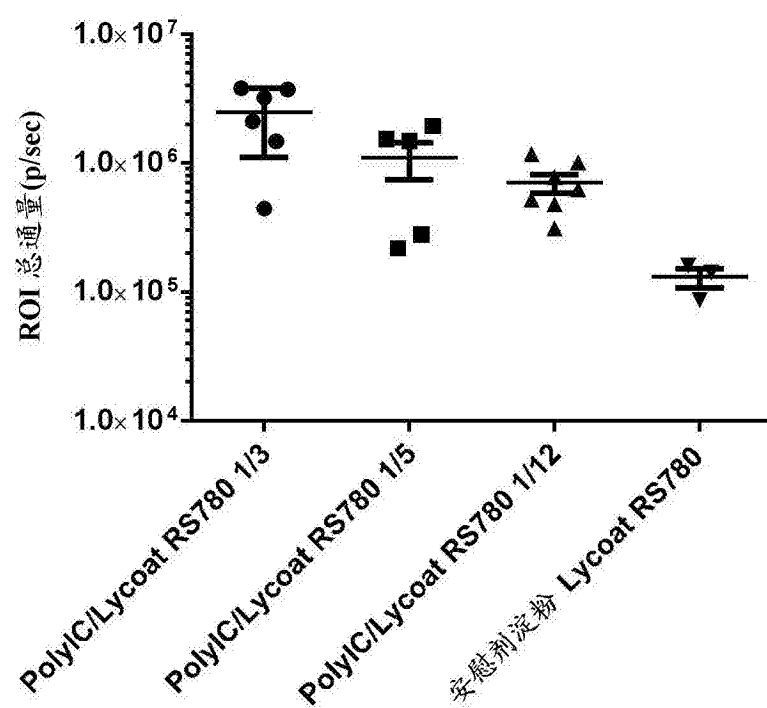
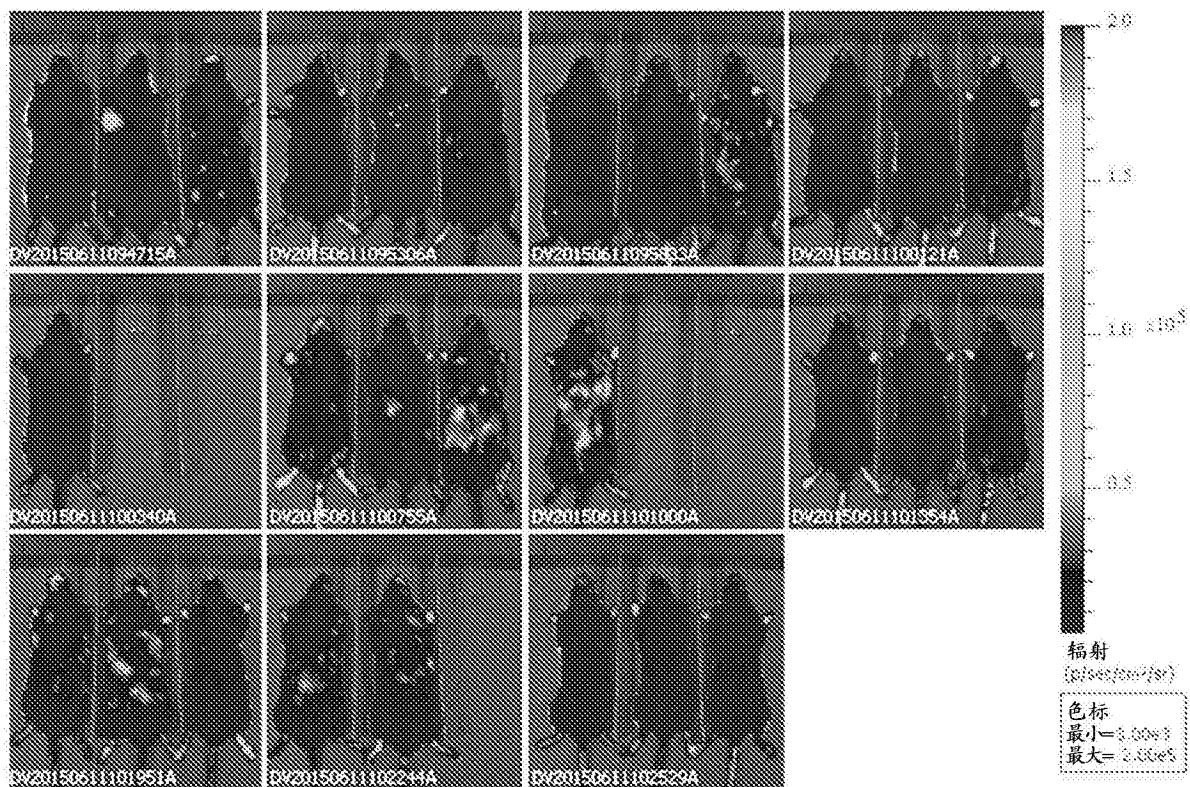


图 1

A

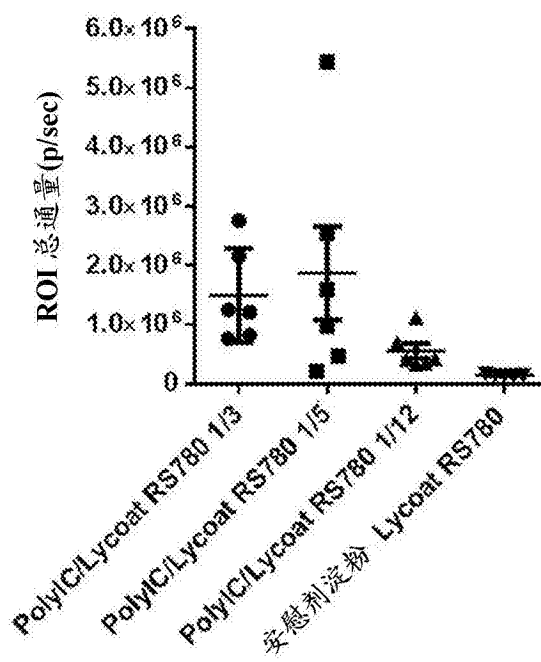


B



图 2

A



B

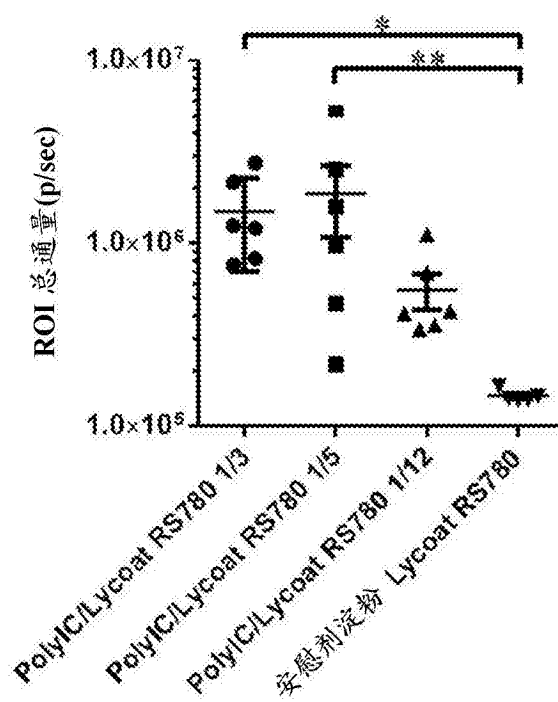
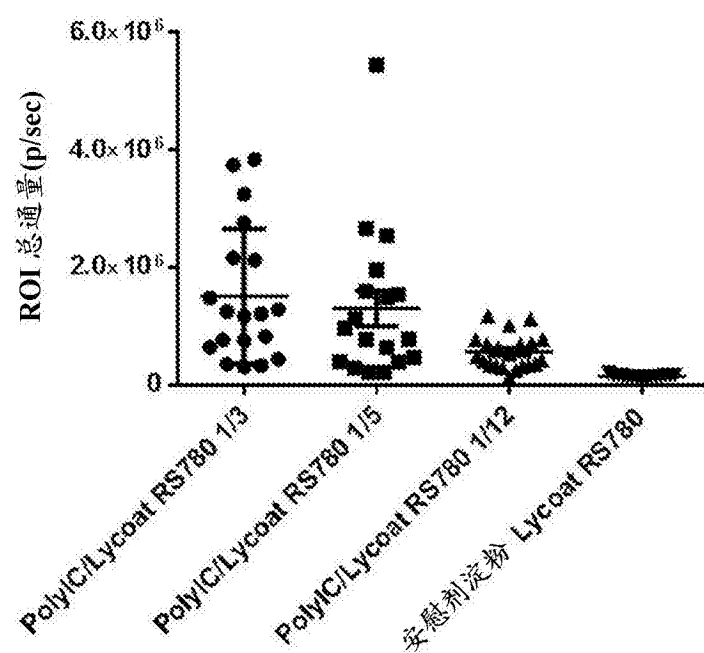


图 3

A



B

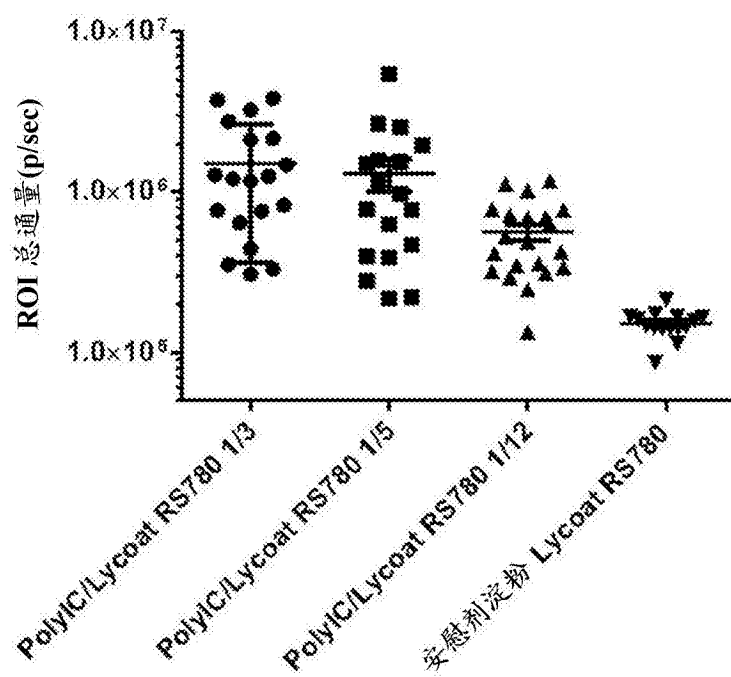


图 4