



(10) 授权公告号 CN 111212648 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 09

(21) 申请号 201880050726.2

(22) 申请日 2018.06.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111212648 A

(43) 申请公布日 2020.05.29

(30) 优先权数据
62/517,758 2017.06.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.04

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/036727 2018.06.08

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/227134 EN 2018.12.13

(73) 专利权人 莱兰斯坦福初级大学评议会
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 迈欧伏特治疗公司

(72) 发明人 哈维·菲什曼 凯瑟琳·柯廷
克里斯托弗·佩恩
斯科特·德尔普 威威克·沙诺伊

海伦·M·布劳 安得烈·崔范何
阿德莱达·R·帕拉

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
A61K 31/58 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2013331389 A1, 2013.12.12
US 5962528 A, 1999.10.05
US 7632848 B1, 2009.12.15
Wei Shen等. Inhibited Skeletal Muscle
Healing in Cyclooxygenase-2 Gene-
Deficient Mice: The Role of PGE2 and PGF2
 α . Journal of Applied Physiology. 2006, 第
101卷1215-1221.

审查员 张茜

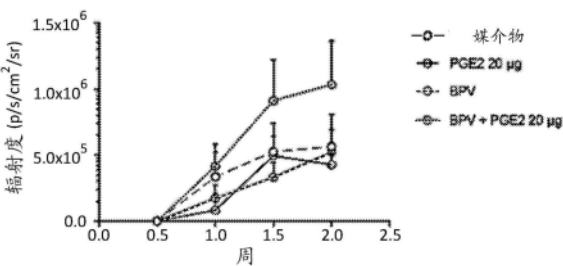
权利要求书1页 说明书111页 附图72页

(54) 发明名称

用于预防或治疗肌肉疾患的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了用于预防或治疗肌肉疾患诸如肌肉破损、损伤或萎缩的组合物。在一些实施方案中,组合物包含前列腺素E2 (PGE2) 化合物和肌肉毒素。在一些实施方案中,肌肉损伤、损伤或萎缩是神经损伤、手术程序或创伤性损伤的结果。本文还提供了促进肌肉再生的方法和增加肌肉质量的方法。



1. 包含前列腺素E2 (PGE2) 化合物和肌肉毒素的组合物在制备用于治疗肌肉疾患的药物中的用途,

其中所述肌肉疾患选自肌肉破损、肌肉萎缩和肌肉损伤;

其中所述PGE2化合物是PGE2或16,16-二甲基前列腺素E2;

其中所述肌肉毒素是布比卡因。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述肌肉疾患选自:急性肌肉损伤、肌肉减少症和急性肌肉创伤。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物被配置成肌肉施用。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述肌肉疾患是肌肉减少症。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述肌肉疾患是骨骼肌的萎缩、损伤或破损。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述PGE2化合物是PGE2。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述PGE2化合物是16,16-二甲基前列腺素E2。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物还包含药学上可接受的载体。

用于预防或治疗肌肉疾患的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年6月9日提交的美国临时申请No.62/517,758的优先权,该申请的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0003] 关于根据联邦赞助的研究和开发取得的发明权的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的Grant No.AG020961d的政府资助下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 肌肉损伤(muscle injuries)是一种非常普遍的现象,范围从相对轻度到极度严重,并且可以采取多种形式。此外,肌肉损伤是由多种原因引起的。例如,肌肉经常在手术程序(如,手术治疗)期间偶然损伤。这在手术程序诸如剖腹产和关节置换手术(如,膝关节和髋关节置换手术)的情况下尤其明显。此外,许多肌肉损伤是产生切割、压迫和/或挤压肌肉组织的创伤和意外事件的结果。此外,许多肌肉损伤是固定(如,肢体固定)和/或神经损伤(如,外周神经损伤)的结果。

[0007] 外周神经损伤(PNI)是由于疾病导致的创伤或固定的常见结果,并可产生严重的运动障碍,最终影响受影响者的身体、心理和社会福祉。特别地,外周神经在作战中普遍受到高速枪伤和爆炸碎片的伤害。此外,作战PNI越来越普遍,因为防弹衣的改进和快速撤离使更多的士兵能够经受住严重的肢体创伤。在伊拉克和阿富汗冲突中,英国有8%的作战伤亡发生了PNI。在具有作战PNI的那些中,只有约9%可以重返工作岗位。

[0008] 压迫性PNI(诸如腕管综合征(CTS))是一类由神经收缩引起的神经损伤。压迫性PNI在退伍老兵群体中尤其常见。例如,在2007-2008年,有120,000名老兵接受了CTS诊断,并且其中10,000名接受了腕管松解术。

[0009] PNI后(由于作战或压迫所致)的主要发病率是肌肉失神经支配时发生的肌肉萎缩。失神经支配的肌肉的恢复是一个复杂的过程,尚未得到充分理解;然而,肌肉的内在再生因子已知是至关重要的,并且可受到因素诸如年龄的影响。对于患有严重CTS的那些来说,失神经支配的肌肉是外展拇指短肌(APB),它使拇指从手掌平面伸出来,并且是许多精细运动活动不可或缺的(图1)。迄今为止,唯一的医学干预手段是通过手术释放束缚正中神经的束带。这允许运动神经再生和肌肉潜在恢复。不幸的是,即使在神经被释放后,许多患有严重CTS的那些的功性恢复也很差。

[0010] 需要改善肌肉和神经损伤后肌肉功能恢复的新疗法。本发明满足了这种需求,并且还提供了相关的优势。

[0011] 发明简述

[0012] 在第一方面,本文提供了用于预防或治疗肌肉疾患的组合物。在一些实施方案中,组合物包含前列腺素E2(PGE2)化合物和肌肉毒素。

[0013] 在第二方面,本文提供了药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包括包含PGE2化合物和肌肉毒素的本文所述的组合物。

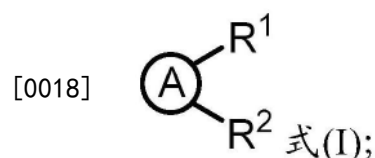
[0014] 在第三方面,本文提供了用于在有需要的受试者中促进肌肉再生和/或增加肌肉

质量的方法。在一些实施方案中,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。

[0015] 在第四方面,本文提供了用于预防或治疗有需要的受试者中的肌肉疾患的方法。在一些实施方案中,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在其他实施方案中,该方法包括施用PGE2受体激动剂和肌肉毒素给受试者。

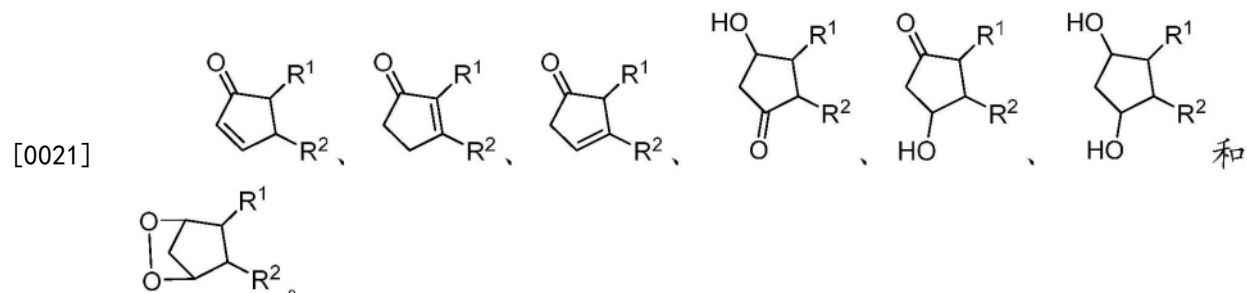
[0016] 在第五方面,本文提供了用于在有需要的受试者中促进肌肉再生、增加肌肉力量和/或增加肌肉质量的试剂盒。在一些实施方案中,该试剂盒包括本文所述的包含PGE2化合物和肌肉毒素的组合物。在其他实施方案中,该试剂盒包括本文所述的药物组合物。

[0017] 本文描述了用于预防或治疗肌肉疾患的组合物,所述组合物包含前列腺素E2 (PGE2) 化合物和肌肉毒素。在一些实施方案中,PGE2化合物选自:PGE2、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、其衍生物、其类似物及其组合。在一些实施方案中,PGE2受体激动剂包括式(I)的化合物、其衍生物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物、其立体异构体或其组合,

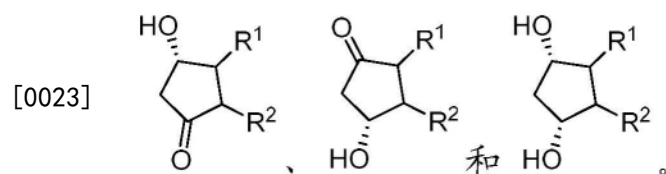


[0019] 其中环A是经取代的4-至6-元环烷基环或经取代的4-至6-元环烯基环,其包含独立选自经取代的C₁-C₁₀烷基和经取代的C₂-C₁₀烯基的取代基R¹和R²,并且环A还包含一个或多个另外的取代基。

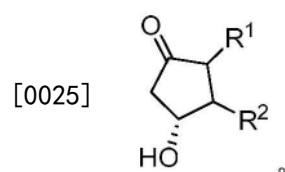
[0020] 在一些情况下,环A是经取代的环戊基环或经取代的环戊烯基环。在一些情况下,环A上的一个或多个另外的取代基选自:氘、羟基、氨基、氧代基、C₁-C₆烷基和卤素。在一些情况下,环A上的一个或多个另外的取代基是羟基或氧代基。在一些实施方案中,环A具有一起形成共价键以形成杂环烷基环的两个另外的取代基。在一些实施方案中,环A选自:



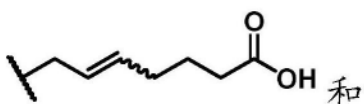
[0022] 在一些实施方案中,环A选自:

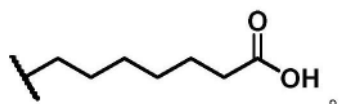


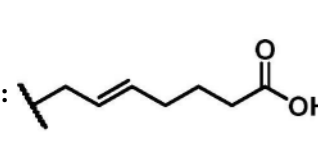
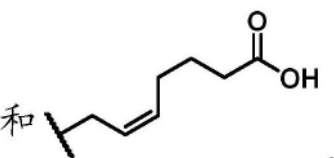
[0024] 在一些实施方案中,环A是



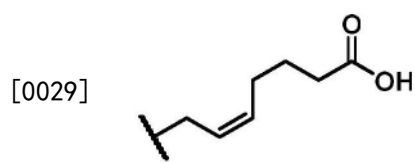
[0026] 在一些实施方案中, R^1 是经取代的 C_1-C_{10} 烷基。在一些实施方案中, R^1 是经取代的 C_2-C_{10} 烯基。在一些实施方案中, R^1 上的取代基选自: 氘、羟基、氧代基、 C_1-C_6 烷基、 $-COOR^3$

和卤素, 其中 R^3 是氢或 C_1-C_6 烷基。在一些实施方案中, R^1 选自:  和



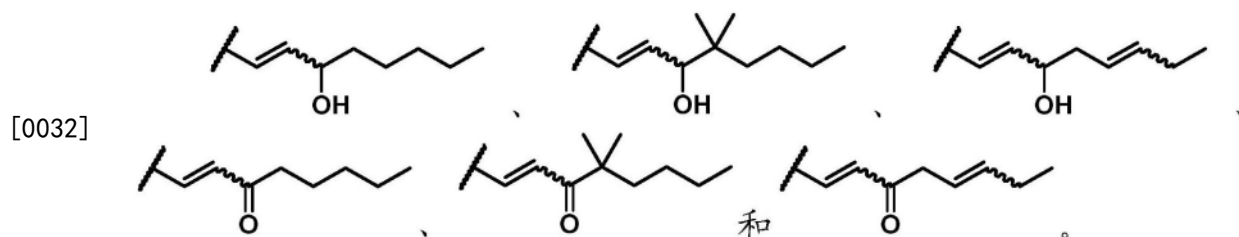
[0027] 在一些实施方案中, R^1 选自:  和 。

[0028] 在一些实施方案中, R^1 是

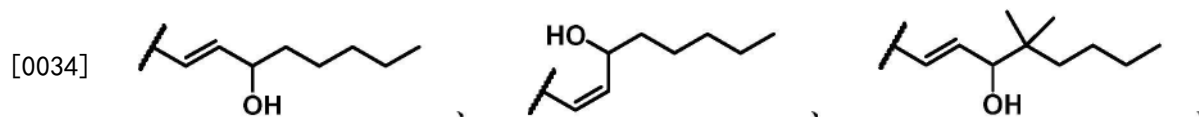


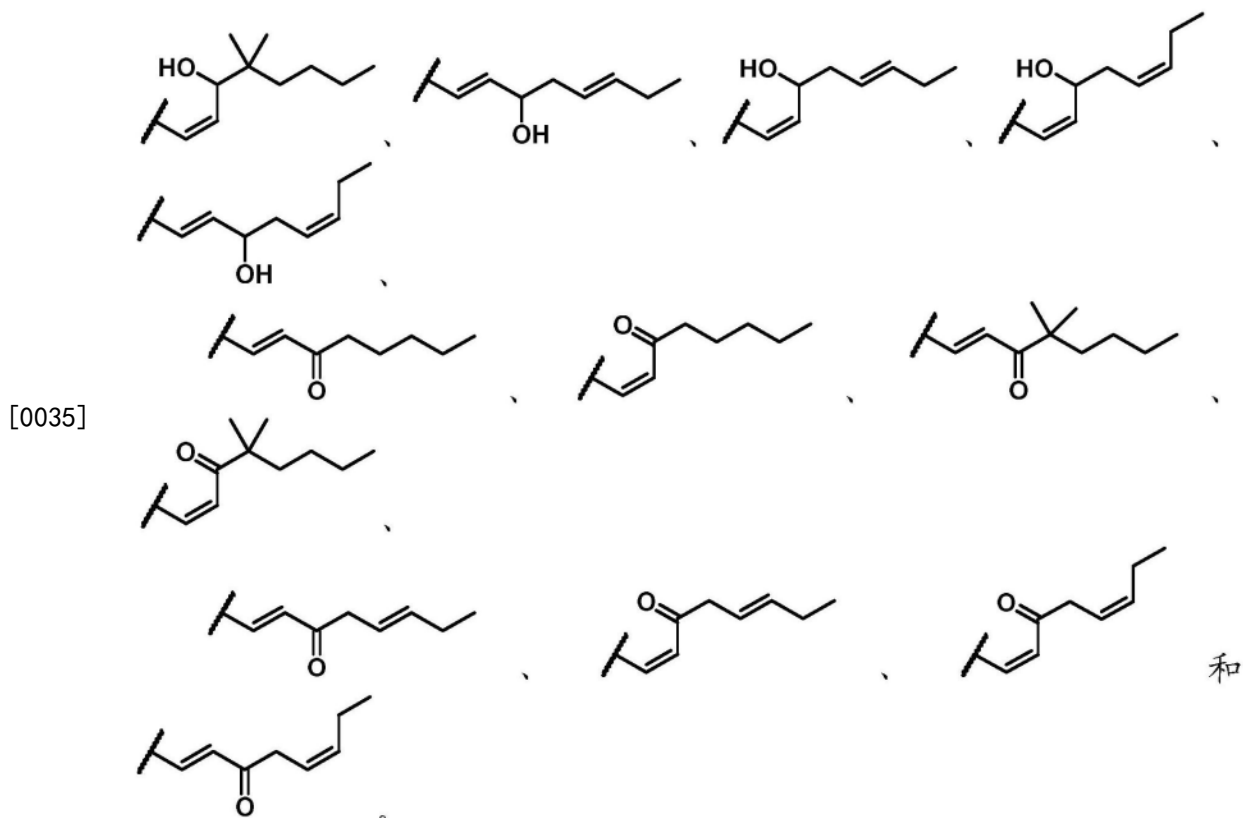
[0030] 在一些实施方案中, R^2 是经取代的 C_1-C_{10} 烷基。

[0031] 在一些实施方案中, R^2 是经取代的 C_2-C_{10} 烯基。在一些实施方案中, R^2 上的取代基选自: 氘、羟基、氧代基、 C_1-C_6 烷基、 $-COOR^3$ 和卤素, 其中 R^3 是氢或 C_1-C_6 烷基。在一些实施方案中, R^2 选自:

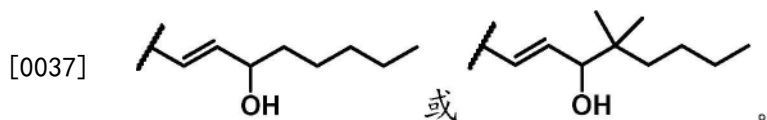


[0033] 在一些实施方案中, R^2 选自:

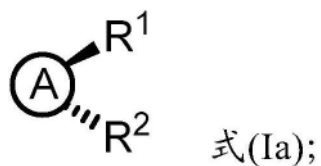




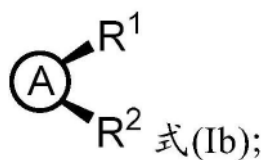
[0036] 在一些实施方案中, R^2 是

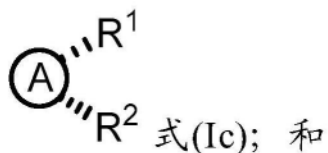


[0038] 在一些实施方案中,式(I)的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物或其立体异构体是式(Ia)、式(Ib)、式(Ic)或式(Id)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或立体异构体:

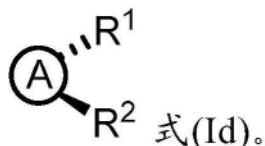


[0039]





[0040]



[0041] 在一些实施方案中,式(I)的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物或其立体异构体是式(Id)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或立体异构体。

[0042] 在一些实施方案中,PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。在一些实施方案中,减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PGT或SLCO2A1)的化合物、中和肽或中和抗体。在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2。

[0043] 在一些实施方案中,肌肉毒素选自:麻醉剂、二价阳离子、蛇毒、蜥蜴毒、蜂毒及其组合。在一些实施方案中,麻醉剂选自:氨基-酰胺麻醉剂、氨基-酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基-酰胺麻醉剂选自:布比卡因、左布比卡因、阿替卡因、罗哌卡因、布坦卡因、卡替卡因、地布卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌卡因、丙胺卡因、三甲卡因、及其组合。在一些实施方案中,氨基-酯麻醉剂选自:氨基苯甲酸酯麻醉剂、苯甲酸酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基苯甲酸酯麻醉剂选自:苯佐卡因、布他卡因、氨苯丁酯、氯普鲁卡因、二甲卡因、哌啶卡因(lucaine)、美普卡因、间布他明、美布卡因、nitracaine、邻卡因、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、利索卡因、丁卡因及其组合。在一些实施方案中,苯甲酸酯麻醉剂选自:阿米卡因、可卡因、环美卡因、 α -优卡因、 β -优卡因、海克卡因、异布卡因、哌罗卡因及其组合。在一些实施方案中,蛇毒或蜥蜴毒选自:虎蛇毒素、心脏毒素、银环蛇毒素及其组合。在一些实施方案中,二价阳离子选自: Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、其盐及其组合。

[0044] 在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2和/或16,16-二甲基前列腺素E2和肌肉毒素是布比卡因。

[0045] 在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2和/或16,16-二甲基前列腺素E2和肌肉毒素是布比卡因。在一些实施方案中,肌肉疾患与肌肉破损、损伤或萎缩相关。

[0046] 本文描述了包含本文所述的组合物和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,药学上可接受的载体包括水基。在一些实施方案中,药学上可接受的载体包括低粘度化合物。在一些实施方案中,低粘度化合物包括明胶。在一些实施方案中,低粘度化合物包括水凝胶。

[0047] 本文描述了用于在有需要的受试者中促进肌肉再生和/或增加肌肉质量的方法,所述方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,PGE2化合物选自:PGE2、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、其衍生物、其类似物及其组合。在一些实施方案中,PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。在一些实施方案中,减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺

素脱氢酶 (15-PGDH) 或者失活或阻断前列腺素转运蛋白 (PGT或SLCO2A1) 的化合物、中和肽或中和抗体。在一些实施方案中, PGE2化合物是PGE2。

[0048] 在一些实施方案中, 肌肉毒素选自: 麻醉剂、二价阳离子、蛇毒、蜥蜴毒、蜂毒及其组合。在一些实施方案中, 麻醉剂选自: 氨基-酰胺麻醉剂、氨基-酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中, 氨基-酰胺麻醉剂选自: 布比卡因、左布比卡因、阿替卡因、罗哌卡因、布坦卡因、卡替卡因、地布卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌卡因、丙胺卡因、三甲卡因及其组合。在一些实施方案中, 氨基-酯麻醉剂选自: 氨基苯甲酸酯麻醉剂、苯甲酸酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中, 氨基苯甲酸酯麻醉剂选自: 苯佐卡因、布他卡因、氨苯丁酯、氯普鲁卡因、二甲卡因、哌啶卡因、美普卡因、间布他明、美布卡因、nitracaine、邻卡因、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、利索卡因、丁卡因及其组合。在一些实施方案中, 苯甲酸酯麻醉剂选自: 阿米卡因、可卡因、环美卡因、 α -优卡因、 β -优卡因、海克卡因、异布卡因、哌罗卡因及其组合。在一些实施方案中, 蛇毒或蜥蜴毒选自: 虎蛇毒素、心脏毒素、银环蛇毒素、及其组合。在一些实施方案中, 二价阳离子选自: Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、其盐及其组合。

[0049] 在一些实施方案中, PGE2化合物是PGE2和/或16, 16-二甲基前列腺素E2和肌肉毒素是布比卡因。在一些实施方案中, PGE2化合物和肌肉毒素同时施用。在一些实施方案中, PGE2化合物和肌肉毒素依序施用。在一些实施方案中, PGE2化合物在肌肉毒素之前施用。在一些实施方案中, PGE2化合物在肌肉毒素之后施用。

[0050] 在一些实施方案中, 施用PGE2化合物、肌肉毒素或两者包括局部、经口、腹膜内、肌肉内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心脏内施用。在一些实施方案中, 施用包括肌肉施用。在一些实施方案中, PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量基于靶肌肉尺寸来确定。在一些实施方案中, 靶肌肉是外展拇短肌并且PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量是约10 μg 。

[0051] 在一些实施方案中, 该方法包括使靶肌肉经受机械损伤。在一些实施方案中, 机械损伤包括切割、灼烧、冷冻、针刺、练习、手术程序、创伤性损伤或其组合。在一些实施方案中, 该方法还包括施用经分离的肌细胞群给受试者。在一些实施方案中, 经分离的肌细胞群对于受试者是自体的。在一些实施方案中, 经分离的肌细胞群对于受试者同种异体的。在一些实施方案中, 经分离的肌细胞群经纯化。在一些实施方案中, 将经分离的肌细胞群与PGE2化合物、肌肉毒素或两者一起培养, 之后施用给受试者。在一些实施方案中, 培养经分离的肌细胞群与PGE2化合物、肌肉毒素或两者包括急性、间歇或持续暴露经分离的肌细胞群至PGE2化合物、肌肉毒素或两者。在一些实施方案中, 其中施用经分离的肌细胞群包括注射或移植细胞至受试者中。在一些实施方案中, 其中施用经分离的肌细胞群和施用PGE2化合物和肌肉毒素同时进行。在一些实施方案中, 施用经分离的肌细胞群和施用PGE2化合物和肌肉毒素依序进行。在一些实施方案中, 受试者患有肌肉疾患。

[0052] 在一些实施方案中, 肌肉疾患与肌肉破损、损伤、萎缩或其任何组合相关。在一些实施方案中, 肌肉疾患选自: 创伤性损伤、急性肌肉损伤、急性神经损伤、慢性神经损伤、软组织手损伤、腕管综合征 (CTS)、杜氏肌营养不良 (DMD)、贝克肌营养不良、肢节肌营养不良、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、远端肌营养不良 (DD)、遗传学肌病、强直性肌营养不良 (MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病 (MM)、重症肌无力 (MG)、充血性心力衰竭、周期性瘫痪、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌症恶病质、AIDS恶病质、心脏恶病质、应激诱导的尿失禁、肌肉减少症、脊髓性肌肉萎缩、肛门括约肌功能障碍、贝尔氏麻痹、肩袖损伤、脊髓损伤、髋关节置换、膝

关节置换、腕骨折和糖尿病性神经病变。

[0053] 在一些实施方案中,PGE2化合物和肌肉毒素在创伤性损伤之后立即施用。在一些实施方案中,受试者接受手术程序。在一些实施方案中,手术程序用于预防神经损伤、减少神经损伤、修复神经损伤或其任何组合。在一些实施方案中,手术程序包括切割肌肉、修复肌肉或两者。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2化合物和肌肉毒素之前接受手术程序。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2化合物和肌肉毒素的同时接受手术程序。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2化合物和肌肉毒素之后接受手术程序。在一些实施方案中,神经损伤是外周神经损伤。在一些实施方案中,手术程序包括腕管松解程序。

[0054] 本文描述了用于预防或治疗有需要的受试者中的肌肉疾患的方法,所述方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,PGE2化合物选自:PGE2、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、其衍生物、其类似物及其组合。在一些实施方案中,PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。在一些实施方案中,减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PGT或SLC02A1)的化合物、中和肽或中和抗体。在一些实施方案中,其中PGE2化合物是PGE2。在一些实施方案中,肌肉毒素选自:麻醉剂、二价阳离子、蛇毒、蜥蜴毒、蜂毒及其组合。在一些实施方案中,麻醉剂选自:氨基-酰胺麻醉剂、氨基-酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基-酰胺麻醉剂选自:布比卡因、左布比卡因、阿替卡因、罗哌卡因、布坦卡因、卡替卡因、地布卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌卡因、丙胺卡因、三甲卡因及其组合。在一些实施方案中,氨基-酯麻醉剂选自:氨基苯甲酸酯麻醉剂、苯甲酸酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基苯甲酸酯麻醉剂选自:苯佐卡因、布他卡因、氨苯丁酯、氯普鲁卡因、二甲卡因、哌啶卡因、美普卡因、间布他明、美布卡因、nitracaine、邻卡因、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、利索卡因、丁卡因及其组合。在一些实施方案中,苯甲酸酯麻醉剂选自:阿米卡因、可卡因、环美卡因、 α -优卡因、 β -优卡因、海克卡因、异布卡因、哌罗卡因及其组合。在一些实施方案中,蛇毒或蜥蜴毒选自:虎蛇毒素、心脏毒素、银环蛇毒素及其组合。在一些实施方案中,二价阳离子选自: Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、其盐及其组合。

[0055] 在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2和肌肉毒素是布比卡因。在一些实施方案中,PGE2化合物和肌肉毒素同时施用。在一些实施方案中,PGE2化合物和肌肉毒素依序施用。在一些实施方案中,PGE2化合物在肌肉毒素之前施用。在一些实施方案中,PGE2化合物在肌肉毒素之后施用。在一些实施方案中,施用PGE2化合物、肌肉毒素或两者包括局部、经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心脏内施用。在一些实施方案中,施用包括肌内施用。在一些实施方案中,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量基于靶肌肉尺寸来确定。在一些实施方案中,靶肌肉是外展拇短肌并且PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量是约10 μg 。

[0056] 在一些实施方案中,该方法还包括使靶肌肉经受机械损伤。在一些实施方案中,机械损伤包括切割、灼烧、冷冻、针刺、练习、手术程序、创伤性损伤或其组合。

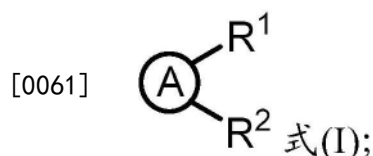
[0057] 在一些实施方案中,该方法还包括施用经分离的肌细胞群给受试者。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群对于受试者是自体的。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群对于受试者是同种异体的。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群经纯化。在一些实施方案

中,将经分离的肌细胞群与PGE2化合物、肌肉毒素或两者一起培养,之后施用给受试者。在一些实施方案中,培养经分离的肌细胞群与PGE2化合物、肌肉毒素或两者包括急性、间歇或持续暴露经分离的肌细胞群至PGE2化合物、肌肉毒素或两者。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群包括注射或移植细胞至患者中。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群和施用PGE2化合物和肌肉毒素同时进行。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群和施用PGE2化合物和肌肉毒素依序进行。

[0058] 在一些实施方案中,肌肉疾患与肌肉破损、损伤、萎缩或其任何组合相关。在一些实施方案中,肌肉疾患选自:创伤性损伤、急性肌肉损伤、急性神经损伤、慢性神经损伤、软组织手损伤、腕管综合征(CTS)、杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、肢节肌营养不良、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、远端肌营养不良(DD)、遗传学肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性瘫痪、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌症恶病质、AIDS恶病质、心脏恶病质、应激诱导的尿失禁、肌肉减少症、脊髓性肌肉萎缩、肛门括约肌功能障碍、贝尔氏麻痹、肩袖损伤、脊髓损伤、髋关节置换、膝关节置换、腕骨折和糖尿病性神经病变。

[0059] 在一些实施方案中,PGE2受体激动剂和肌肉毒素在创伤性损伤之后立即施用。在一些实施方案中,受试者接受手术程序。在一些实施方案中,手术程序用于预防神经损伤、减少神经损伤、修复神经损伤或其任何组合。在一些实施方案中,手术程序包括切割肌肉、修复肌肉或两者。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2化合物和肌肉毒素之前接受手术程序。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2化合物和肌肉毒素同时接受手术程序。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2化合物和肌肉毒素之后接受手术程序。在一些实施方案中,神经损伤是外周神经损伤。在一些实施方案中,手术程序包括腕管松解程序。在一些实施方案中,治疗受试者导致受试者中肌肉力量、肌肉协调或两者提高。

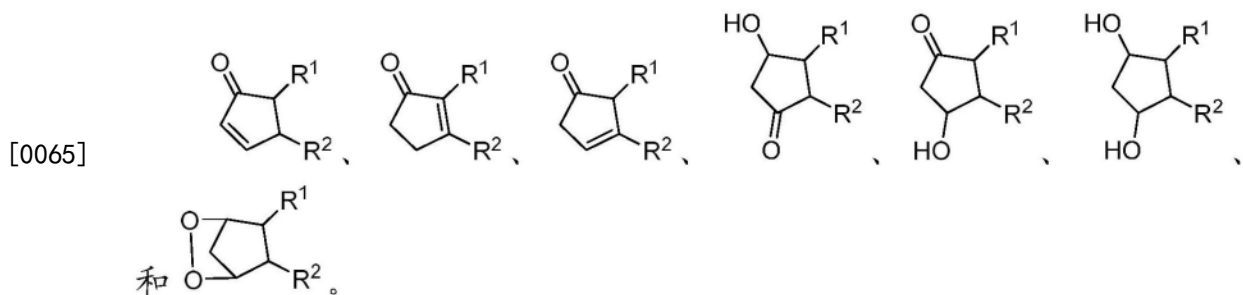
[0060] 本文描述了用于预防或治疗有需要的受试者中的肌肉疾患的方法,该方法包括施用前列腺素E2(PGE2)受体激动剂给受试者。在一些实施方案中,PGE2受体激动剂包括式(I)的化合物、其衍生物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物、其立体异构体或其组合,



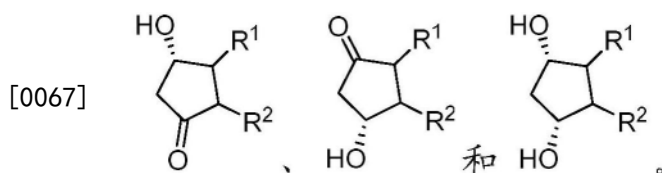
[0062] 其中环A是经取代的4-至6-元环烷基环或经取代的4-至6-元环烯基环,其包含独立选自经取代的C₁-C₁₀烷基和经取代的C₂-C₁₀烯基的取代基R¹和R²,并且环A还包含一个或多个另外的取代基。

[0063] 在一些实施方案中,A是经取代的环戊基环或经取代的环戊烯基环。在一些实施方案中,环A上的一个或多个另外的取代基选自:氘、羟基、氨基、氧代基、C₁-C₆烷基和卤素。在一些实施方案中,环A上的一个或多个另外的取代基是羟基或氧代基。在一些实施方案中,环A具有一起形成共价键以形成杂环烷基环的两个另外的取代基。

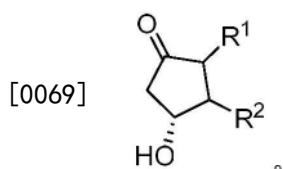
[0064] 在一些实施方案中,环A选自:



[0066] 在一些实施方案中,环A选自:



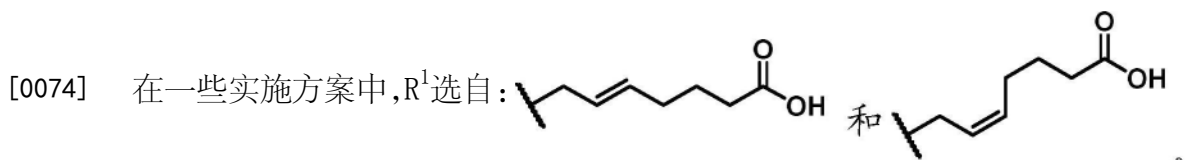
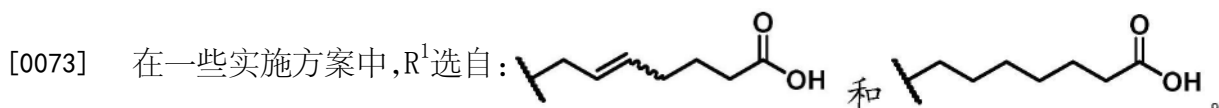
[0068] 在一些实施方案中,环A是



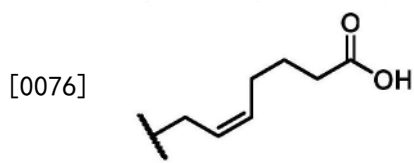
[0070] 在一些实施方案中, R^1 是经取代的 C_1 - C_{10} 烷基。

[0071] 在一些实施方案中, R^1 是经取代的 C_2 - C_{10} 烯基。

[0072] 在一些实施方案中, R^1 上的取代基选自:氘、羟基、氧代基、 C_1 - C_6 烷基、 $-COOR^3$ 和卤素,其中 R^3 是氢或 C_1 - C_6 烷基。

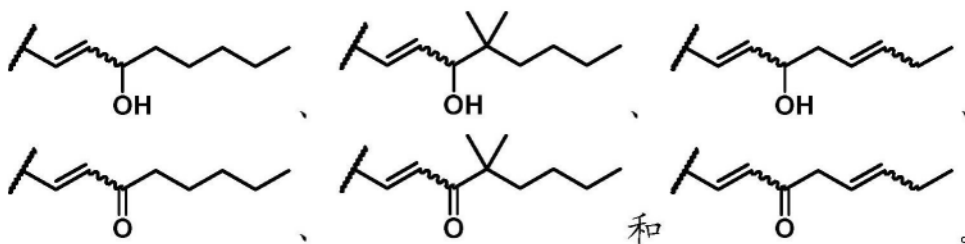


[0075] 在一些实施方案中, R^1 是

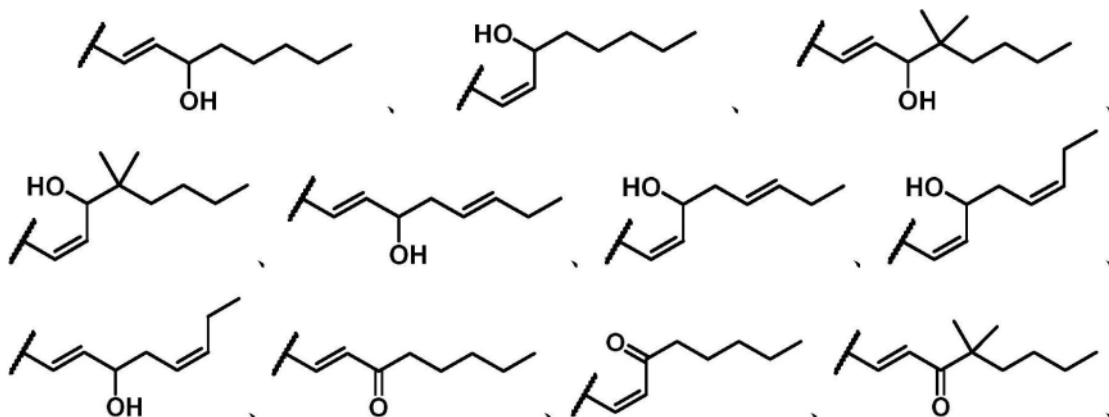


[0077] 在一些实施方案中, R^2 是经取代的 C_1 - C_{10} 烷基。在一些实施方案中, R^2 是经取代的 C_2 - C_{10} 烯基。在一些实施方案中, R^2 上的取代基选自:氘、羟基、氧代基、 C_1 - C_6 烷基、 $-COOR^3$ 和卤素、其中 R^3 是氢或 C_1 - C_6 烷基。在一些实施方案中, R^2 选自:

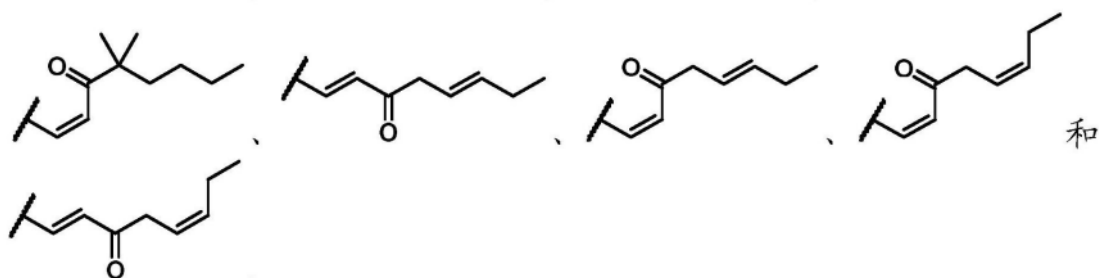
[0078]

[0079] 在一些实施方案中, R^2 选自:

[0080]



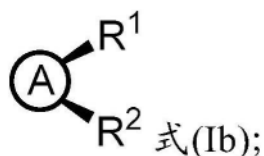
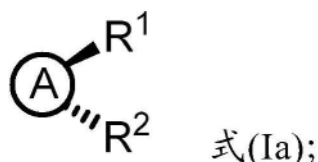
[0081]

[0082] 在一些实施方案中, R^2 是

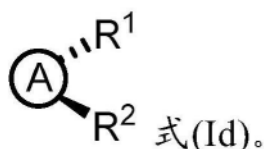
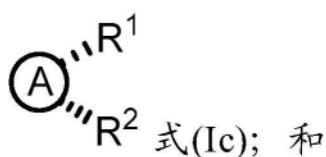
[0083]



[0084] 在一些实施方案中, 式 (I) 的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物或其立体异构体是式 (Ia)、式 (Ib)、式 (Ic) 或式 (Id) 的化合物、或其药学上可接受的盐、溶剂化物或立体异构体:



[0085]



[0086] 在一些实施方案中,式(I)的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物或其立体异构体是式(Id)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或立体异构体。

[0087] 在一些实施方案中,PGE2受体激动剂包括PGE2、16,16-二甲基前列腺素E2或两者。

[0088] 在一些实施方案中,该方法还包括施用肌肉毒素给受试者。在一些实施方案中,肌肉毒素选自:麻醉剂、二价阳离子、蛇毒、蜥蜴毒、蜂毒及其组合。在一些实施方案中,麻醉剂选自:氨基-酰胺麻醉剂、氨基-酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基-酰胺麻醉剂选自:布比卡因、左布比卡因、阿替卡因、罗哌卡因、布坦卡因、卡替卡因、地布卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌卡因、丙胺卡因、三甲卡因及其组合。在一些实施方案中,氨基-酯麻醉剂选自:氨基苯甲酸酯麻醉剂,苯甲酸酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基苯甲酸酯麻醉剂选自:苯佐卡因、布他卡因、氨苯丁酯、氯普鲁卡因、二甲卡因、哌啶卡因、美普卡因、间布他明、美布卡因、nitracaine、邻卡因、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、利索卡因、丁卡因及其组合。在一些实施方案中,苯甲酸酯麻醉剂选自:阿米卡因、可卡因、环美卡因、 α -优卡因、 β -优卡因、海克卡因、异布卡因、哌罗卡因及其组合。在一些实施方案中,蛇毒或蜥蜴毒选自:虎蛇毒素、心脏毒素、银环蛇毒素及其组合。在一些实施方案中,二价阳离子选自: Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、其盐及其组合。在一些实施方案中,PGE2受体激动剂是PGE2、16,16-二甲基前列腺素E2或两者,和肌肉毒素是布比卡因。

[0089] 在一些实施方案中,该方法还包括使靶肌肉经受机械损伤。在一些实施方案中,机械损伤包括切割、灼烧、冷冻、针刺、练习、手术程序、创伤性损伤或其组合。

[0090] 在一些实施方案中,该方法还包括施用经分离的肌细胞群给受试者。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群对于受试者是自体的。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群对于受试者是同种异体的。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群经纯化。在一些实施方案

中,将经分离的肌细胞群与PGE2受体激动剂一起培养,之后施用给受试者。在一些实施方案中,培养经分离的肌细胞群与PGE2化合物包括急性、间歇或持续暴露经分离的肌细胞群至PGE2化合物。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群包括注射或移植细胞至受试者中。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群和施用PGE2受体激动剂同时进行。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群和施用PGE2受体激动剂依序进行。

[0091] 在一些实施方案中,肌肉疾患与肌肉破损、损伤、萎缩或其任何组合相关。在一些实施方案中,肌肉疾患选自:创伤性损伤、急性肌肉、急性神经损伤、慢性神经损伤、软组织手损伤、腕管综合征(CTS)、杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、肢节肌营养不良、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、远端肌营养不良(DD)、遗传学肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性瘫痪、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌症恶病质、AIDS恶病质、心脏恶病质、应激诱导的尿失禁、肌肉减少症、脊髓性肌肉萎缩、肛门括约肌功能障碍、贝尔氏麻痹、肩袖损伤、脊髓损伤、髋关节置换、膝关节置换、腕骨折和糖尿病性神经病变。

[0092] 在一些实施方案中,PGE2受体激动剂在创伤性损伤之后立即施用。

[0093] 在一些实施方案中,受试者接受手术程序。在一些实施方案中,手术程序用于预防神经损伤、减少神经损伤、修复神经损伤或其任何组合。在一些实施方案中,手术程序包括切割肌肉、修复肌肉或两者。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2受体激动剂之前接受手术程序。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2受体激动剂同时接受手术程序。在一些实施方案中,受试者在施用PGE2受体激动剂之后接受手术程序。在一些实施方案中,神经损伤是外周神经损伤。在一些实施方案中,手术程序包括腕管松解程序。在一些实施方案中,未施用麻醉剂给受试者。

[0094] 本文描述了用于促进有需要的受试者中的肌肉再生、增加有需要的受试者中的肌肉质量或用于两者或者用于预防或治疗有需要的受试者中的肌肉疾患的试剂盒,该试剂盒包括本文所述的组合物或本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,受试者患有肌肉疾患。在一些实施方案中,肌肉疾患与肌肉破损、损伤、萎缩或其任何组合相关。在一些实施方案中,肌肉疾患选自:创伤性损伤(如,急性肌肉创伤、急性神经创伤)、急性肌肉损伤、急性神经损伤、慢性神经损伤、软组织手损伤、腕管综合征(CTS)、杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、肢节肌营养不良、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、远端肌营养不良(DD)、遗传学肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性瘫痪、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌症恶病质、AIDS恶病质、心脏恶病质、应激诱导的尿失禁、肌肉减少症、脊髓性肌肉萎缩、肛门括约肌功能障碍、贝尔氏麻痹、肩袖损伤、脊髓损伤、髋关节置换、膝关节置换、腕骨折和糖尿病性神经病变。

[0095] 在一些实施方案中,该试剂盒还包括经分离的肌细胞。在一些实施方案中,该试剂盒还包括使用说明书。在一些实施方案中,该试剂盒还包括一种或多种试剂。在一些实施方案中,该试剂盒还包括用于施用组合物、药物组合物、经分离的肌细胞或其任何组合给受试者的递送设备。

[0096] 本文描述了用于治疗有需要的受试者中的骨盆底病症的方法,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的盆底肌。在一些实施方案中,盆底肌是肛提肌、尾骨肌或两者。

在一些实施方案中,肛提肌包括耻骨尾骨肌、髂骨尾骨肌、耻骨直肠肌或其组合。在一些实施方案中,骨盆底病症选自:应激性尿失禁、过度活跃的膀胱/尿急迫性失禁、混合性尿失禁、盆腔器官脱垂和大便失禁。在一些实施方案中,该方法还包括施用适用于治疗、预防或改善与骨盆底病症相关的症状的疗法给受试者。在一些实施方案中,另外的疗法选自:肌肉训练/生物反馈、神经调节、药理治疗、手术及其组合。

[0097] 本文描述了用于治疗有需要的受试者中的眼疾病或病症的方法,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,眼疾病或病症包括受损的眼睑功能。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的眼睑肌。在一些实施方案中,眼睑肌选自:苗勒氏肌、枕额肌、颞顶肌、降眉间肌、鼻肌、降鼻中隔肌、眼轮匝肌、皱眉肌、降眉肌、耳前肌、耳上肌、耳后肌、口轮匝肌、降口角肌、笑肌、颧大肌、颧小肌、提上唇肌、提上唇鼻翼肌、降下唇肌、提口角肌、颊肌、颞肌、额肌及其组合。在一些实施方案中,受损的眼睑功能选自:眼睑下垂、上睑下垂、皮肤松垂及其组合。在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行提眼手术。在一些实施方案中,受损的眼睑功能与不规则散光相关。在一些实施方案中,眼疾病或病症选自:眨眼受损、湿眼综合征、干眼综合征、泪腺萎缩、第7面神经麻痹、复发性睑腺炎及其组合。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的眼肌。在一些实施方案中,眼肌选自:若兰氏肌、霍纳氏肌、额肌、枕额肌、颞顶肌、降眉间肌、鼻肌、降鼻中隔肌、眼轮匝肌、皱眉肌、降眉肌、耳前肌、耳上肌、耳后肌、口轮匝肌、降口角肌、笑肌、颧大肌、颧小肌、提上唇肌、提上唇鼻翼肌、降下唇肌、提口角肌、颊肌、颞肌及其组合。在一些实施方案中,眼疾病或病症是睑外翻或睑内翻。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的眼肌。在一些实施方案中,眼肌选自:额肌、枕额肌、颞顶肌、降眉间肌、鼻肌、降鼻中隔肌、眼轮匝肌、皱眉肌、降眉肌、耳前肌、耳上肌、耳后肌、口轮匝肌、降口角肌、笑肌、颧大肌、颧小肌、提上唇肌、提上唇鼻翼肌、降下唇肌、提口角肌、颊肌、颞肌及其组合。在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行眼睑手术。在一些实施方案中,眼睑手术是外侧睑板条程序。在一些实施方案中,眼疾病或病症是斜视或眼球震颤。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的眼外肌。在一些实施方案中,眼外肌选自:外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌、下斜肌及其组合。在一些实施方案中,斜视与以下中的任一种有关:阿佩尔综合征、脑麻痹、先天性风疹、血管瘤、色素失调症、努南综合征、普拉德-威利综合征、早产儿视网膜病、前列腺癌、创伤性脑损伤、三体性-18、肉毒中毒、糖尿病、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、格林-巴利综合征、眼损伤、贝类中毒、中风和由眼疾病或损伤导致的视力丧失。在一些实施方案中,眼球震颤与以下中的任一种有关:婴儿眼球震颤综合征、服用药物或医药、过量饮酒、损害迷路功能的镇静药物、头损伤、内耳病症、中风、硫胺素或维生素B12缺乏和帕金森氏病。在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行眼手术。在一些实施方案中,眼疾病或病症与受损的虹膜功能相关。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的虹膜括约肌或虹膜扩张肌。在一些实施方案中,眼疾病或病症是老花眼。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的睫状肌。在一些实施方案中,眼疾病或病症是近视。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的睫状肌、巩膜内肌、巩膜周肌、眼内肌或其组合。

[0098] 本文描述了用于治疗有需要的受试者中的肌肉骨骼病症的方法,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,肌肉骨骼病症包括受损的手功能。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的手肌。在一些实施方案中,手肌选自:外展拇短肌、拇短屈肌、拇对掌肌、外展小指肌、小指短屈肌、小趾对掌肌、背侧骨间肌、掌侧骨间肌、蚓状肌、掌短肌、内收拇肌、外展拇长肌、伸拇短肌、屈拇长肌、屈腕桡肌、屈指深肌、屈指浅肌、尺侧腕屈肌、桡侧腕长伸肌、桡侧腕短伸肌、伸食指肌、伸指总肌、伸小指肌、伸腕尺肌及其组合。

[0099] 在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行手手术。在一些实施方案中,肌肉骨骼病症包括受损的拇指功能。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的手肌。在一些实施方案中,手肌选自:外展拇短肌、拇对掌肌、拇短屈肌及其组合。在一些实施方案中,受损的拇指功能由于鱼际萎缩导致。

[0100] 在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行手手术。在一些实施方案中,手手术是腕管综合征手术。在一些实施方案中,受损的拇指功能与肘管综合征或胸廓出口综合征相关。

[0101] 在一些实施方案中,肌肉骨骼病症包括受损的足功能。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的足肌肉。在一些实施方案中,足肌肉选自:屈趾短肌、外展拇指肌、外展小指肌、跖方肌、蚓状肌、屈趾长肌、内收拇指肌、屈拇短肌、屈拇长肌、小指短屈肌、背侧骨间肌、骨间足底肌、屈拇内侧肌、屈拇外侧短肌、内收拇指肌横头、内收拇指肌斜头及其组合。在一些实施方案中,受损的足功能是由于足底筋膜炎导致的。在一些实施方案中,受损的足功能是足下垂。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的足肌肉或小腿肌。在一些实施方案中,足肌肉或小腿肌选自:胫前肌、第三腓骨肌、趾长伸肌、拇长伸肌及其组合。

[0102] 在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行手术。在一些实施方案中,足下垂与以下中的任一种相关:腓神经压迫;神经根损害;肌营养不良;肌萎缩侧索硬化症;多发性硬化;或中风。在一些实施方案中,肌肉骨骼病症是废用诱导的肌肉萎缩。在一些实施方案中,废用诱导的肌肉萎缩由远端桡骨骨折导致。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的手肌或下臂肌。在一些实施方案中,手肌或下臂肌选自:屈腕桡肌、屈拇长肌、屈指浅肌、屈指深肌、尺侧腕屈肌、桡侧腕短伸肌、桡侧腕长伸肌、伸拇长肌、伸指总肌、伸腕尺肌及其组合。

[0103] 在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行手术。在一些实施方案中,手术是腕关节镜。在一些实施方案中,废用诱导的肌肉萎缩由髌骨折导致。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的髌肌肉。在一些实施方案中,髌肌肉选自:髂肌、腰大肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、阔筋膜张肌、上孖肌、下孖肌、闭孔内肌、闭孔外肌、股方肌、梨状肌、大收肌、长收肌、短收肌、小收肌、耻骨肌、股直肌、股外肌、股内肌、股中间肌、股四头肌、缝匠肌、股二头肌、半腱肌、半膜肌、腰小肌、髂腰肌、股薄肌及其组合。

[0104] 在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间或之后对受试者进行手术。在一些实施方案中,手术是关节成形术。在一些实施方案中,废用诱导的肌肉萎缩由肩袖损伤导致。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的肩袖肌。

在一些实施方案中,肩袖肌选自:棘上肌、棘下肌、肩胛下肌、小圆肌及其组合。

[0105] 本文描述了用于治疗有需要的受试者中的胃食管反流病(GERD)的方法,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的脚膈肌。

[0106] 本文描述了用于治疗有需要的受试者中的阻塞性睡眠呼吸暂停的方法,所述方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者的上呼吸道肌。在一些实施方案中,上呼吸道肌选自:颊舌肌、腭帆张肌、下颌舌骨肌及其组合。

[0107] 本文描述了用于治疗有需要的受试者中的眼咽肌营养不良的方法,所述方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给上眼睑肌或喉肌。

[0108] 本文描述了用于治疗有需要的受试者中的糖尿病性神经病变的方法,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,施用包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给足小肌、小腿肌或足内在肌。在一些实施方案中,PGE2化合物选自:PGE2、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、其衍生物、其类似物及其组合。在一些实施方案中,PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。在一些实施方案中,减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PGT或SLCO2A1)的化合物、中和肽或中和抗体。在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2。在一些实施方案中,肌肉毒素选自:麻醉剂、二价阳离子、蛇毒、蜥蜴毒、蜂毒及其组合。在一些实施方案中,麻醉剂选自:氨基-酰胺麻醉剂、氨基-酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基-酰胺麻醉剂选自:布比卡因、左布比卡因、阿替卡因、罗哌卡因、布坦卡因、卡替卡因、地布卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌卡因、丙胺卡因、三甲卡因及其组合。在一些实施方案中,氨基-酯麻醉剂选自:氨基苯甲酸酯麻醉剂、苯甲酸酯麻醉剂及其组合。在一些实施方案中,氨基苯甲酸酯麻醉剂选自:苯佐卡因、布他卡因、氨苯丁酯、氯普鲁卡因、二甲卡因、哌啶卡因、美普卡因、间布他明、美布卡因、nitracaine、邻卡因、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、利索卡因、丁卡因及其组合。在一些实施方案中,苯甲酸酯麻醉剂选自:阿米卡因、可卡因、环美卡因、 α -优卡因、 β -优卡因、海卡卡因、异布卡因、哌罗卡因及其组合。在一些实施方案中,蛇毒或蜥蜴毒选自:虎蛇毒素、心脏毒素、银环蛇毒素及其组合。在一些实施方案中,二价阳离子选自: Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、其盐、及其组合。在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2和/或16,16-二甲基前列腺素E2和肌肉毒素是布比卡因。在一些实施方案中,PGE2化合物和肌肉毒素同时施用。在一些实施方案中,PGE2化合物和肌肉毒素依序施用。在一些实施方案中,PGE2化合物在肌肉毒素之前施用。在一些实施方案中,PGE2化合物在肌肉毒素之后施用。在一些实施方案中,施用PGE2化合物、肌肉毒素或两者包括局部、经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心脏内施用。在一些实施方案中,施用包括肌内施用。在一些实施方案中,其中PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量基于靶肌肉尺寸来确定。在一些实施方案中,靶肌肉是外展拇短肌并且PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量是约10 μg 。

[0109] 在一些实施方案中,该方法还包括使靶肌肉经受机械损伤。在一些实施方案中,机械损伤包括切割、灼烧、冷冻、针刺、练习、手术程序、创伤性损伤或其组合。在一些实施方案

中,该方法还包括施用经分离的肌细胞群给受试者。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群对于受试者是自体的。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群对于受试者是同种异体的。在一些实施方案中,经分离的肌细胞群经纯化。在一些实施方案中,将经分离的肌细胞群与PGE2化合物、肌肉毒素或两者一起培养,之后施用给受试者。在一些实施方案中,培养经分离的肌细胞群与PGE2化合物、肌肉毒素或两者包括急性、间歇或持续暴露经分离的肌细胞群给PGE2化合物、肌肉毒素或两者。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群包括注射或移植细胞至受试者中。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群和施用PGE2化合物和肌肉毒素同时进行。在一些实施方案中,施用经分离的肌细胞群和施用PGE2化合物和肌肉毒素依序进行。

[0110] 通过以下详述和附图,本发明的其他目的、特征和优势对于本领域的技术人员将是显而易见的。

[0111] 附图简述

[0112] 图1显示了外展拇短肌 (APB) 肌肉 (左) 的说明。箭头标记了APB萎缩的位置,也如右图所示。

[0113] 图2A-2H显示了瞬时PGE2治疗在体外促进年幼MuSC增殖。图2A:年幼胫前肌 (TA) 肌肉损伤 (虎蛇毒素,NTX) 后PGE2水平;对照是通过ELISA测定的未损伤对侧TA;(n=4只小鼠/时间点)。图2B:通过RT-qPCR确定虎蛇毒素损伤后通过MuSC确定的PGE2合成酶 (Ptges2和Ptges) 表达 (n=3只小鼠/时间点)。图2C:用媒介物 (-) 或PGE2 (10ng/ml) 治疗24小时后并随后在水凝胶上培养直至第7天 (急性治疗),MuSC数量增加;(n=在4次独立实验中的12只小鼠)。图2D:在不存在或存在EP4拮抗剂 (ONO-AE3-208, 1 μ M) 的情况下,用媒介物 (-) 或PGE2 (10ng/ml) 进行24小时短暂治疗后,MuSC数量增加;(n=在3次独立实验中测定的9只小鼠)。图2E-2G:EP4无效MuSC的增殖。将EP4^{f/f} (无效) MuSC用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导,并用编码Cre的慢病毒载体 (+Cre) 或不编码Cre的慢病毒载体 (-Cre;空载体) 处理以缺失EP4等位基因。随后,将MuSC用媒介物 (-) 或PGE2 (10ng/ml) 处理24小时,并在水凝胶上培养三天。图2E:描绘了EP4-无效MuSC分析的方案。图2F:EP4无效MuSC号;(n=2次独立实验中的6只小鼠)。图2G:代表性图像。条=40mm;GFP,绿色;mCherry,红色。图2H:在水凝胶上每两天在经媒介物 (-) 或PGE2 (10ng/ml) 处理的木炭剥离培养基中培养7天后的MuSC数;(n=3只小鼠,进行3次技术重复)。*P<0.05,**P<0.001,***P<0.0005****P<0.0001。使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较 (图2A、2B、2D和2F);配对t检验 (图2C);曼惠特尼检验 (图2H)。平均值+s.e.m.n.s.,不显著。

[0114] 图3A-3J显示了年老MuSC对PGE2的异常响应。图3A:年老TA损伤 (虎蛇毒素,NTX) 后的PGE2水平;对照是通过ELISA确定的未损伤对侧TA;(n=4只小鼠/时间点)。图3B:通过ELISA确定的损伤的年幼 (n=7只小鼠) 和年老 (n=5只小鼠) 小鼠的TA中的PGE2水平。图3C:显示经由15-PGDH降解酶进行的至其非活性PGE代谢物13,14-二氢-15-酮PGE2 (PGEM) 的PGE2分解代谢的方案。图3D:通过质谱定量的PGEM水平;(n=4只小鼠/年龄组)。图3E:PGE2降解酶15-PGDH (Hpgd) 的表达;(n=3只小鼠,进行2次技术重复)。图3F:在第7天测定的用媒介物 (-)、PGE2 (10ng/ml) 或15-PGDH抑制剂SW033291 (1 μ M;SW) 进行24小时急性处理后,年老MuSC数量增加;(n=5次独立实验中的15只小鼠)。图3G:在水凝胶上每两天在经媒介物 (-) 或PGE2 (10ng/ml) 处理的木炭剥离培养基中培养7天后的年老MuSC数;(n=3只小鼠,进行3

次技术重复)。图3H:描绘了PGE2对MuSC的作用的方案。PGE2通过EP4受体/cAMP(环状AMP)信号传导途径起作用来促进增殖。在年老MuSC中,在通过PGT(前列腺素转运蛋白)进行细胞内转运后,PGE2分解代谢由15-PGDH介导为非活性形式PGEM。图3I:对于对照(左)和经PGE2进行急性处理后(右),通过延时显微术在微孔中追踪48小时的年老MuSC克隆的轨迹。原始细胞及其每个新生后代的轨迹均以不同的颜色表示。图3J:通过延时显微术追踪的对照(左, $n=32$ 个克隆)和经PGE2进行急性处理后(右, $n=45$ 个克隆)的克隆中,年老MuSC活细胞计数(数目)的变化。在所有时间点,每代(G1-G6)中活细胞的比例显示为归一化至100个单一MuSC起始群的细胞数。活细胞计数的增加百分比为4.0%(对照)和5.4%(PGE2-处理)(上图)。通过延时显微镜术追踪的对照(左)和经PGE2进行急性处理后(右)的克隆中年老MuSC死细胞计数(数量)的变化。在所有时间点,每代(G1-G6)中死细胞的比例均显示为归一化至100个单一MuSC起始群的细胞数。死细胞计数的增加百分比为1.0%(对照)和0.1%(PGE2-处理)(下图)。* $P<0.05$,** $P<0.001$,*** $P<0.0005$ 。使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较(图3A和3F);曼惠特尼检验(图3B、3D、3E和3G)。平均值 $\pm$ s.e.m.n.s.,不显著。

[0115] 图4A-4D显示了急性PGE2处理在体内促进MuSC植入和再生。图4A:在如图2C所示用媒介物(-)或PGE2进行急性处理之后,植入从转基因小鼠分离的经培养的GFP/luc-标记的年幼MuSC(250个细胞)。移植方案(上)。非侵入式生物发光成像(BLI)信号,以每个TA的辐射度测量;($n=5$ 只小鼠/条件)(下)。图4B:植入在培养中用Cre(+Cre)处理或不用Cre处理(-Cre;空载体)的GFP/luc-标记的EP4^{f/f} MuSC(1,000个细胞)以缺失EP4等位基因。将EP4^{f/f} MuSC用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导以进行BLI。移植方案(上)。移植后BLI信号($n=5$ 只小鼠/条件)(下)。图4C:植入与媒介物(-)或dmPGE2共注射的新鲜分选的GFP/luc-标记的年幼MuSC(250个细胞)。移植方案(上)。移植后BLI信号;(对于媒介物和经处理的dmPGE2分别为 $n=4$ 和 $n=5$ 只小鼠)。图4D:植入用媒介物(-)或dmPGE2共注射的GFP/luc-标记的年老MuSCs(250个细胞);($n=3$ 只小鼠/条件)(下)。将年老MuSC用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导以用于BLI。移植方案(上)。移植后的BLI信号表示为平均辐射度($\text{ps}^{-1}\text{cm}^{-2}\text{sr}^{-1}$)。每种情况的代表性BLI图像。条=5mm(图4A-4D)。数据代表两个独立实验。* $P<0.05$,** $P<0.001$ 和*** $P<0.0005$ 。ANOVA检验用于组比较,以及费舍尔检验用于终点显著性差异。平均值 $\pm$ s.e.m。

[0116] 图5A-5R显示了单独的PGE2肌内注射促进MuSC扩增、改善再生并增加力。年幼:(图5A-5D)年幼小鼠的TA肌肉在心脏毒素(CTX)损伤后48小时注射了媒介物(-)或dmPGE2;($n=3$ 只小鼠/条件)。图5A:实验程序方案(上)。心脏毒素损伤后14天,有细胞核(DAPI;蓝色)、层粘连蛋白(绿色)和PAX7(红色)染色的代表性TA横截面(下)。箭头指示PAX7⁺MuSC。条=40 μm 。图5B:年幼小鼠的TA横截面中每100根纤维中PAX7表达卫星细胞的免疫荧光确定的内源性MuSC增加。图5C:使用肌纤维分的Baxter算法定量的媒介物(-,空心白条)和dmPGE2处理(实心蓝条)年幼TA中的肌纤维横截面积(CSA)。图5D:小(<1,000 μm^2 CSA)和大(>1,000 μm^2 CSA)肌纤维的分布。(图5E-5G)通过Pax7-荧光素酶测定的内源性MuSC增加。将Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc小鼠用他莫昔芬(TAM)腹膜内治疗,使TA经受心脏毒素(CTX)损伤,于3天后注射媒介物(-)或dmPGE2,并通过BLI监测;($n=3$ 只小鼠/条件)。图5E:实验程序的方案。图5F:BLI($n=3$ 只小鼠/条件)。图5G:代表性BLI图像。条=5mm。年老:(图5H-5K)在心脏毒素(CTX)损伤后48小时,在体内用媒介物(-)或dmPGE2治疗年老小鼠的TA;($n=3$ 只小鼠/条

件)。图5H:实验程序的方案(上)。心脏毒素损伤后14天,有细胞核(DAPI;蓝色)、层粘连蛋白(绿色)和PAX7(红色)染色的代表性TA横截面(下)。箭头指示PAX7⁺肌肉干细胞。条=40 μ m。图5I:如图5B中的年老小鼠的内源性MuSC增加。图5J:如图5C中的年老TA的肌纤维横截面积(CSA)。图5K:如图5D中的年老TA的CSA分布。(图5L-5P)在体内测量为下坡跑步机跑步后的肌肉收缩力的年老小鼠中力量增加。小鼠连续20周在20°下坡跑步机上跑步,并在第5周测定力。在第1周期间,给年老小鼠的内侧和外侧腓肠肌(GA)注射媒介物(-)或dmPGE2。 $n=10$ 或8次生物重复,分别用于媒介物(-)治疗或dmPGE2治疗,每个均进行5次技术重复。图5L:实验方案。代表性颤搐力(图5M)和强直力(图5N)。通过将力归一化至生理横截面积(PCSA),计算出比肌肉颤搐力(图5O)和比肌肉强直力(图5P)。配对t检验(图5B、5D、5I和5K);ANOVA检验用于组比较和终点显著性差异通过费舍尔检验(图5F);曼惠特尼检验(图5O和5P)。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.001$ 和 $***P<0.0001$ 。平均值 $\pm$ s.e.m。图5Q:仅施用PGE2或媒介物的年老小鼠中的肌肉颤搐力。图5R:仅施用PGE2或赋形剂的小鼠中的肌肉强直力。

[0117] 图6A-6K显示了PGE2促进MuSC扩增。图6A:如通过ELISA测定,与对侧未受伤对照相比,年幼小鼠胫前肌(TA)后肢肌肉在冷冻损伤后第3天的PGE2水平; $(n=4$ 只小鼠/时间点/条件)。图6B:在用PGE2(10ng/ml)处理24天(d0至d1)或赋形剂(-)后1小时内用EdU(红色)标记并用成肌素(绿色)染色的分裂肌干细胞(MuSC)的代表性图像。条表示40 μ m。图6C:如(b)中,用EDU标记的分裂MuSC的百分比; $(n=6$ 只小鼠,在两个独立的实验中进行了3次技术重复)。图6D:用媒介物(-)或指定剂量的PGE2(1-200ng/ml)处理后,通过代存活力测定VisionBlue测量的增殖增加; $(n=6$ 只小鼠,在两次独立实验中进行了3次技术重复)。图6E:用媒介物(-)或PGE2处理24小时后,由MuSC表达前列腺素受体(Ptger 1-4); $(n=3$ 只小鼠,进行2次技术重复)。图6F:PGE2处理1小时后,MuSC中的cAMP水平相对于未处理的对照(-)的增加; $(n=6$ 只小鼠,在2个独立实验中测定了3次技术重复)。图6G-6H:用媒介物(-)或PGE2处理24小时后,由MuSC表达Pax7(图6G)和成肌素(图6H); $(n=3$ 只小鼠,进行2次技术重复)。图6I-6J:将EP4^{f/f} MuSC用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导并用编码Cre的慢病毒载体(+Cre)或不编码的慢病毒载体(-Cre;空载体)处理以缺失EP4等位基因。条形图显示+Cre MuSC(图6I)和GFP/Luc⁺ MuSC(图6J)的百分比。图6K:每两天在补充有赋形剂(-)或(10ng/ml)的含有木炭剥离的胎牛的成肌细胞培养基中7天后水凝胶培养物中MuSC的代表性图像。条表示40 μ m。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.001$ 、 $***P<0.0005$ 。配对t检验(图6A、6E、6G和6H);曼惠特尼检验(图6C)。平均值 $\pm$ s.e.m.n.s.,不显著。

[0118] 图7A-7C显示了年轻和年老肌肉的质谱分析,以检测前列腺素和PGE2代谢物。图7A:分析的前列腺素(PGE2、PGF2a和PGD2)和PGE2代谢物(15-酮PGE2和13,14-二氢-15-酮PGE2)的化学结构、化学式、确切的质量和分子量。将内标PGF2a-D9和PGE2-D9添加至所有复合标准物。图7B:通过将原液稀释至最终浓度为0.1ng/ml至500ng/ml来制备液相色谱-电喷雾离子化-串联质谱(LC-ESI-MS/MS)分析的校准线。显示了每个标准的标准曲线等式和和相关系数。图7C:代表性色谱图。分开的峰显示了所分析的前列腺素及其代谢物的出色色谱分离。cps,每秒计数。

[0119] 图8A-8G显示了响应于PGE2处理,年老MuSC增加增殖和细胞存活。图8A-8C:对于年幼和年老MuSC,将通过qRT-PCR测量的mRNA水平归一化至Gapdh; $(n=3$ 只小鼠,进行2次技术重复)。图8A:由Slco2a1基因编码的前列腺素转运蛋白(PGT)。图8B:PGE2合成酶,Ptges和

Ptges2。图8C:由基因Ptger1-4编码的EP1-4受体。图8D:用媒介物(-)处理或PGE2处理24小时后MuSC中的Pax7 mRNA水平;(n=3只小鼠,进行2次技术重复)。图8E:用媒介物(-;上)或PGE2(下)进行急性处理后,通过延时显微术追踪的单个年老MuSC克隆。对于每个克隆,显示了经过48小时延时追踪后的活细胞(空心条)和死细胞(黑条)的数量。图8F:在48小时内通过媒介物(-)或瞬态PGE2处理的延时显微术评估的经追踪的活年老MuSC的增殖曲线。图8G:用媒介物(-)或PGE2处理24小时后年老MuSC上的凋亡膜联蛋白V⁺并在水凝胶上生长后7天进行分析的流式细胞术分析;(n=于3次独立实验中的9只小鼠)。曼惠特尼检验(图8A-8D)和配对t检验(图8G)在 $\alpha=0.05$ 处。平均值+s.e.m.n.s.,不显著。

[0120] 图9A-9B显示了用于肌肉横截面积的肌纤维分析的Baxter算法。图9A:在心脏毒素(CTX)损伤后48小时用媒介物(-)或PGE2处理的年幼小鼠的胫前肌肌纤维的代表性横截面图像。图像显示了用层粘连蛋白(绿色)和DAPI(蓝色)染色。图9B:通过用于肌纤维分析的Baxter算法分析以确定损伤后第14天肌纤维横切面(底部)的横截面积(CSA)的来自图9A的相应分割图像。条表示40 μ m。

[0121] 图10A-10G显示了,MuSC中PGE2受体EP4的缺失减少了损伤后骨骼肌的再生和力。用他莫昔芬治疗的Pax7-特异性EP4条件性敲除小鼠(Pax7^{CreERT2};EP4^{f1/f1})的胫前肌(TA)分别在虎蛇毒素损伤后第6天(图10C-10D)、第21天(图10B和10E)和第14天(图10F和10G)测定;(n=3只小鼠/条件)。图10A:实验方案。图10B:损伤后来自对照或EP4 KO小鼠的分选MuSC(a⁷⁺CD34⁺lin⁻)中的Ptger4(EP4受体)表达。图10C:代表性TA横截面。DAPI,蓝色;胚胎肌球蛋白重链(eMyHC),红色。条=40 μ m。图10D:eMyHC⁺纤维的百分比。图10E:对照和Pax7-特异性EP4敲除TA中的肌纤维横截面积(CSA)。图10F:虎蛇毒素损伤后第14天肌肉颤搐力和(图10G)肌肉强直力。曼惠特尼检验(图10B、10C、10F和10G);ANOVA检验用于组比较和每个小区间的显著性差异通过费舍尔检验(图10E)。*P<0.05、***P<0.0005和****P<0.0001。平均值+s.e.m。

[0122] 图11A-11C显示了在再生的早期时间点,肌肉中内源性PGE2信号传导的阻滞减小了再生和力。在心脏毒素损伤后注射媒介物(-)或NSAID(吲哚美辛)至胫前肌(TA)中之后,通过非侵入性生物荧光成像(BLI),在用他莫昔芬(TAM)治疗的Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠中测定的内源性MuSC;(n=3只小鼠/条件)。图11A:实验方案。图11B:BLI;(n=3只小鼠/条件)。图11C:虎蛇毒素损伤后第14天的肌肉颤搐力(对于经媒介物处理,n=8,和对于经NSAID处理,n=10)。ANOVA检验用于组比较和终点显著性差异通过费舍尔检验(图11B)。曼惠特尼检验(图11C)。*P<0.05、**P<0.001、***P<0.0005和****P<0.0001。平均值+s.e.m。

[0123] 图12A-12K显示了受损肌肉组织中PGE2的短暂增加加速了MuSC增殖。图12A:Ptger4在来自未损伤的小鼠后肢的新鲜分离的肌肉干细胞(MuSC)(新鲜MuSC)、在水凝胶上培养了两天的MuSC(培养的MuSC)、在生长培养基中培养的原代成肌细胞(成肌细胞GM)和分化培养基中培养24小时的分化原代成肌细胞(成肌细胞DM)中的表达(n=3次生物重复/条件)。图12B:用虎蛇毒素对胫前肌(TA)肌肉损伤后,通过ELISA测定的PGE2水平;(n=4只小鼠/测量的条件)。对照是指对侧未受伤的腿。图12C:虎蛇毒素损伤后3天和6天的代表性TA横截面。DAPI,蓝色;层粘连蛋白,白色;PGE2,绿色。条=40 μ m。图12D:TA肌肉损伤(虎蛇毒素)后前列腺素合成酶Ptges和Ptges2的表达(n=3只小鼠,进行2次技术重复)。对照是指对

侧未受伤的腿。图12E:通过ELISA测定的吲哚美辛 (Indo) 存在或不存在下从经分离的纤维的条件化培养基的PGE2水平; ($n=3$ 只小鼠/条件)。图12F:用媒介物或PGE2 (10ng/ml) 处理24小时并随后在水凝胶上培养直至第7天后的MuSC数; ($n=$ 于4次独立实验中的12只小鼠)。图12G:通过延时显微术确定的经媒介物 (上) 或PGE2 (下) 处理的MuSC克隆的轨迹, 历时38小时。图12H:媒介物 (左, $n=40$ 个克隆) 和PGE2处理 (右, $n=44$ 个克隆) 后, 通过延时显微术追踪的克隆中MuSC细胞计数 (数目) 的变化。图12I:用媒介物或PGE2处理的每个MuSC克隆涂铺后分裂的时间图。显示了38小时的分裂时间的克隆是指在记录的时延内从未分裂的克隆。线表示来自高斯对数正态拟合的非线性回归曲线, $R^2=0.9$ (对照) 和 0.97 (PGE2)。图12J:在用媒介物或PGE2处理的MuSC克隆中涂铺后分裂时间的Violin图。图12K:用媒介物或PGE2处理的追踪MuSC的细胞大小。 $*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.0005$ $****P<0.0001$ 。曼惠特尼检验 (图12A、12E、12J、12K); 使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较 (图12B、12D); 配对t检验 (图12F)。平均值+s.e.m。

[0124] 图13A-13G显示了PGE2处理增强肌肉再生。图13A:植入用媒介物或PGE2共注射的新鲜分选的GFP/luc-标记的MuSC (250个细胞)。移植方案 (上)。移植后的生物发光成像 (BLI) 信号表示为平均辐射度 ($\text{ps}^{-1}\text{cm}^{-2}\text{sr}^{-1}$); (对于媒介物和PGE2处理分别为 $n=4$ 和 $n=5$ 只小鼠, 下)。移植后第4周, 用虎蛇毒素使接受者小鼠重新损伤。图13B-13E:心脏毒素 (CTX) 损伤后向小鼠的TA注射了媒介物或PGE2; ($n=3$ 只小鼠/条件, 媒介物处理了对侧腿)。图13B:实验方案 (上)。代表性TA横截面 (下)。DAPI, 蓝色; 层粘连蛋白, 绿色; PAX7, 红色。箭头指示PAX7⁺MuSC。条=40 μm 。图13C:每100根显微中PAX7⁺卫星细胞的定量。图13D:媒介物 (空心白条) 和PGE2处理 (实心蓝条) 的TA中的代表性肌纤维横截面积 (CSA)。图13E小 (<1,000 μm^2 CSA) 和大 (>1,000 μm^2 CSA) 肌纤维的分布。图13F和13G:通过BLI在用他莫昔芬 (TAM) 处理的Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc小鼠中测定的内源性MuSC; 通过BLI用他莫昔芬 (TAM) 处理的Rosa26-LSL-Luc小鼠; ($n=3$ 只小鼠/条件)。图13F:实验方案。图13G BLI (左); ($n=3$ 只小鼠/条件)。代表性BLI图像 (右)。条=5mm。 $*P<0.05$, $**P<0.001$ 。ANOVA检验用于组比较和终点显著性差异通过费舍尔检验 (图13A、13G); 配对t检验 (图13C、13E)。平均值+s.e.m。

[0125] 图14A-14E显示了EP4在MuSC中介导PGE2信号传导。图14A:用媒介物或PGE2处理24小时后, 由MuSC表达前列腺素受体 (Ptger1-4); ($n=3$ 只小鼠, 进行2次技术重复)。图14B: PGE2处理1小时后, MuSC中的cAMP水平; ($n=6$ 只小鼠, 在2个独立实验中测定了3次技术重复)。图14C:在不存在或存在EP4拮抗剂 (ONO-AE3-208, 1 μM) 的情况下, 用媒介物或PGE2处理24小时后的MuSC数。图14D:用媒介物或PGE2处理的EP4空MuSC的增殖。将EP4^{f/f} MuSC用编码Cre的慢病毒载体 (+Cre, EP4-无效) 或不编码的慢病毒载体 (-Cre; 对照) 处理, 以缺失EP4等位基因。描绘了EP4-无效和对照MuSC分析的方案 (上)。EP4-无效和对照MuSC数; ($n=2$ 次独立实验中的6只小鼠) (下)。图14E:在培养物中植入用Cre (+Cre) 或不用 (-Cre; 空载体) 处理的GFP/luc-标记的EP4^{f/f} MuSC (1,000个细胞), 以缺失EP4等位基因。将EP4^{f/f} MuSC用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导以用于BLI。移植方案 (上)。移植后BLI信号 ($n=5$ 只小鼠/条件) (左下)。代表性BLI图像 (右下)。条=5mm。 $*P<0.05$, $**P<0.001$, $****P<0.0001$ 。曼惠特尼检验 (图14A、14B); 使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较 (图14C、14D); ANOVA检验用于组比较和终点显著性差异通过费舍尔检验 (图14E)。平均值+s.e.m. n.s., 不显著。

[0126] 图15A-15G显示了Nurr1是MuSC中PGE2/EP4信号传导的下游效应子。图15A:24小时

后,媒介物或经PGE2处理的MuSC中差异表达的转录因子的热图。图15B:TA肌肉损伤(虎蛇毒素)后Nurr1的表达($n=3$ 只小鼠/时间点)。图15C:用媒介物或PGE2处理24小时后,由MuSC表达Nurr1; $(n=3$ 只小鼠,在3次独立实验中进行)。图15D:用媒介物或PGE2处理24小时的成肌祖细胞中NURR1或IgG对照的流式细胞4分析。图15E:用PGE2或媒介物处理24小时后,并随后在水凝胶上培养直至shSCR或shNurr1转染细胞的第7天($n=$ 进行了2次独立实验的6只小鼠)后的MuSC数。图15F:在体外用4-羟基他莫昔芬(4OHT)处理或未用4-羟基他莫昔芬(4OHT)处理并随后暴露于媒介物或PGE2持续24小时的Pax7^{CreERT2}:EP4^{f/f}(EP4 cKO) MuSC中的Nurr1表达; $(n=3$ 只小鼠)。图15G:Nurr1在MuSC、于生长培养基中培养的原代成肌细胞(Myob.GM)和于分化培养基中培养的分化原代成肌细胞(Myob.DM)的表达($n=3$ 个生物复制/条件)。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.001$ 、 $***P<0.0005$ 。使用Bonferroni校正进行的ANOVA检验用于多重比较(图15B、15E、15F、15G);曼惠特尼检验(图15C)。平均值 $\pm$ s.e.m.,不显著。

[0127] 图16A-16L显示了MuSC中PGE2信号通路的功能丧失损害了肌肉再生和力量。图16A-16H:在虎蛇毒素损伤后第7天(图16C,16E)、14(图16G,16H)和21(图16B,16D)天测定用他莫昔芬(TAM)处理的Pax7特异性EP4条件性敲除小鼠(Pax7^{CreERT2}:EP4^{f/f},EP4 cKO)的胫前肌(TA);(对于所有时间点, $n=3$ 只小鼠/条件)。图16A:实验方案。图16B:损伤后21天,来自对照或EP4 cKO小鼠的分选MuSC(α^{7+} CD34⁺lin⁻)中的Ptger4(EP4受体)表达。图16C:损伤后7天,胚胎肌球蛋白重链(eMyHC)阳性纤维的百分比。图16D:损伤后21天,对照组和EP4 cKO TA中的肌纤维横截面积(CSA)。图16E:损伤后7天的代表性TA横截面,DAPI,蓝色;eMyHC,红色(左);和损伤后21天,DAPI,蓝色,层粘连蛋白,绿色(右)。条=40 μ m。图16F:体内肌肉收缩力测定方案。图16G:虎蛇毒素损伤后第14天的代表性颤搐力(左)和强直力(右)。图16H:量化肌肉颤搐力(左)和强直力(右)。(对于对照, $n=8$,并且对于EP4 cKO, $n=3$)。(图16I,16J)心脏毒素损伤后注射媒介物或NSAID(吲哚美辛)至TA中后,通过非侵入性生物发光成像(BLI),在用他莫昔芬(TAM)治疗的Pax7^{CreERT2}:Rosa26-LSL-Luc小鼠中测定的内源性肌肉干细胞(MuSC)。图16I:实验方案(上)。代表性BLI图像(下)。条=5mm。图16J:BLI; $(n=3$ 只小鼠/条件,在2次独立实验中进行;图代表一个实验)。(图16K,16L)在心脏毒素后第14天在C57Bl/6小鼠(2-4月龄)中,在媒介物或NSAID(吲哚美辛)后测量肌力。图16K:代表性颤搐力。图16L:肌肉颤搐力的量化(对于媒介物处理, $n=8$,对于NSAID处理, $n=10$)。 $*P<0.05$ 、 $***P<0.0005$ 和 $****P<0.0001$ 。曼惠特尼检验(图16B、16C、16H、16L);ANOVA检验用于组比较和每个小区间的显著性差异通过费舍尔检验。图16D,ANOVA检验用于组比较和终点显著性差异通过费舍尔检验图16J。平均值 $\pm$ s.e.m。

[0128] 图17显示了用于PGE2信号传导的模型,以在再生中扩展MuSC功能。显示了PGE2在MuSC中的作用。损伤后,释放到肌肉小生境中的PGE2作用于EP4受体,所述EP4受体通过cAMP/磷酸-CREB进行信号传导,导致Nurr1增殖诱导转录因子表达。这促进了MuSC扩展,以实现高效的肌肉再生。NSAID处理导致PGE2/EP4信号传导丧失或EP4受体的特异性丧失导致异常MuSC功能和受损肌肉再生和力量恢复。

[0129] 图18A-18G显示了PGE2促进MuSC增殖。图18A:冷冻损伤后通过ELISA测定的胫前肌(TA)的PGE2水平; $(n=3$ 只小鼠/条件)。对照是指对侧未受损的腿。图18B:用媒介物或指定剂量的PGE2(1-200ng/ml)处理后,通过代谢存活力测定VisionBlue测量的增殖; $(n=6$ 只小鼠,在两个独立的实验中进行了3次技术重复)。图18C:用PGE2(10ng/ml)处理24小时或赋形

剂后,在1小时内标记有EdU(红色)并与成肌素(绿色)共染色的MuSC的代表性图像。条表示40 μ m。图18D:在图18C中用EdU标记的分裂MuSC的百分比;(n=6只小鼠,在两个独立的实验中进行了3次技术重复)。图18E:每天用媒介物或PGE2处理的有正常血清(未剥离的血清)的生长培养基或木炭剥离培养基(剥离的血清)中培养7天后的MuSC值;(n=3次独立实验中的6只小鼠)图18F:通过媒介物(左)或PGE2(右)处理后的时延分析的每个单独的MuSC克隆涂铺后达到第一分裂的时间。图18G:在整个时延持续时间(38小时)内涂铺所有追踪的MuSC克隆后,分裂时间的累积频率。 $*P<0.05$, $**P<0.001$ 。曼惠特尼检验(图18A,18D)。使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较(图18E)。平均值+s.e.m.n.s.,不显著。

[0130] 图19A-19E显示了PGE2直接注射增强了肌肉再生而不促进肥大。图19A:TA的代表性横截面图像,显示了在植入后8周与PGE2共注射的新鲜分选的GFP/luc-标记MuSC(250个细胞)植入后的GFP⁺MuSC。图像显示了用GFP(绿色)、层粘连蛋白(红色)和DAPI(蓝色)染色。条表示40 μ m。图19B:TA的代表性横截面图像,显示了在植入后8周与PGE2共注射的新鲜分选的GFP/luc-标记MuSC(250个细胞)植入后的GFP⁺肌纤维。图像显示GFP(绿色)、小麦胚芽凝集素(WGA)或层粘连蛋白(红色)和DAPI(蓝色)染色。条表示40 μ m。图19C:在损伤后48小时用媒介物或PGE2体内治疗的心脏毒素(CTX)损伤后第14天的C57B1/6小鼠的TA肌纤维的代表性横截面图像。图像显示层粘连蛋白(绿色)和DAPI(蓝色)染色。条代表40 μ m。图19D:来自通过用于肌纤维分析的Baxter算法分析的(A)的相应分割图像,以确定损伤后第14天的肌纤维横切面(下)的横截面积(CSA)。条代表40 μ m。图19E:损伤后第14天媒介物或PGE2-处理的TA的质量。曼惠特尼检验(图19E)。平均值+s.e.m.n.s.,不显著。

[0131] 图20A-20G显示了MuSC中EP4功能的丧失导致增殖减少。图20A-20D:用编码mCherry/Cre的慢病毒载体(+Cre)或不编码的慢病毒载体(-Cre;空载体)处理EP4^{f/f} MuSC,以缺失EP4等位基因。条形图显示了Cre⁺MuSC(图20A)和GFP/Luc⁺MuSC(图20B)的百分比。图20C:代表性图像。条=40 μ m;GFP,绿色;mCherry,红色。图20D:通过EP4^{f/f} MuSC $\pm$ Cre表达Ptger4。图20E-20G:从在体外用4-羟基他莫昔芬(4OHT)处理的Pax7^{CreERT2};EP4^{f/f}或对照Pax7^{+/+};EP4^{f/f}小鼠中分离的Pax7特异性EP4敲除MuSC(n=3只小鼠/条件)。图20E:实验方案。图20F:培养7天后的MuSC数。图20G:通过qRT-PCR表达前列腺素受体(Ptger 1-4)。 $*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.0005$, $****P<0.0001$ 。曼惠特尼检验(图20D);使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较(图20F,20G)。平均值+s.e.m.n.s.,不显著。

[0132] 图21A-21E显示了经PGE2处理的MuSC的转录组分析。图21A:24小时后,媒介物或PGE2处理的MuSC的转录组的热图,显示为相对于媒介物处理的MuSC的表达倍数变化。图21B:通过Ingenuity途径分析表明的在PGE2处理的MuSC中差异表达的上调基因经富集的分子和细胞功能途径。图21C:由Metacore分析表明,PGE2处理的MuSC中差异表达的上调基因的富集途径图。图21D:shSCR(对照)或shNurr1转染的细胞中NURR1的流式细胞术分析。图21E:在体外用或不用4-羟基他莫昔芬(4OHT)处理并随后暴露于媒介物或PGE2持续24小时的Pax7^{CreERT2};EP4^{f/f} MuSC中Ptger4(EP4受体)的表达(n=3只小鼠)。 $****P<0.0001$ 。使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较(图21E)。平均值+s.e.m.n.s.,不显著。

[0133] 图22A和22B显示,在损伤后PGE2功能丧失之后,肌肉质量没有改变。图22A:损伤后第14天,对照或MuSC-特异性EP4条件性敲除小鼠的TA质量。图22B:损伤后第14天媒介物或NSAID-处理的TA的治疗。曼惠特尼检验。平均值s.e.m.n.s.,不显著。

[0134] 图23A-23C显示了,包含PGE2衍生物(16,16-二甲基前列腺素E2;dmPGE2)和布比卡因(BPV)的组合物在再生期间增强了肌肉干细胞扩增。图23A显示了说明经由生物发光成像(BLI)在再生期间对他莫昔芬(TAM)治疗的Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠中的内源性肌肉干细胞(MuSC)扩增进行体内分析的实验程序的方案。图23B显示了损伤后2周对照(BPV/媒介物)和实验(BPV/dmPGE2)小鼠肢体的代表性BLI图像。条=5mm。图23C显示了损伤后2周,对照组和实验组之间的BLI信号的log倍数变化。数据显示为平均值±s.e.m.(n=6)。星号(*)表示统计学差异,其中p<0.05。

[0135] 图24显示了当与dmPGE2组合施用,布比卡因在再生期间诱导肌肉干细胞扩增中的剂量依赖性作用。该图显示了Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠中相对内源性小鼠肌肉干细胞扩增,如通过注射后第3天的生物发光成像(BLI)的辐射度倍数变化测量。对照组相对于治疗组的差异的统计学显著性是通过使用Bonferroni多重比较校正的单向ANOVA检验确定的。误差条表示s.e.m.并且n>3/条件。

[0136] 图25A-25D描述了用于评估本发明的组合物和方法的益处的手持式微型内窥镜。图25A显示了微型内窥镜和相关工作站的照片。图25B显示了微型内窥镜的示意图。图25C显示了由微型内窥镜产生的示例性图像。图25D显示了由微型内窥镜生成的更高放大的示例性图像。

[0137] 图26显示了用于临床试验的示例性时间线。

[0138] 图27A-27C显示了将PGE2化合物与肌肉毒素组合以诱导肌肉再生并改善肌肉功能的协同作用。将Pax7-CreERT2;Rosa-LSL-荧光素酶小鼠(2-4月龄)在体内用他莫昔芬处理连续五天以获得表达Pax7促进剂的荧光素酶小鼠。一周后,在注射药物之前(时间点第0天),使用脚板力测量仪测量胫前肌的基线强直力。随后向小鼠注射50μl媒介物(盐水)、肌肉干细胞激活剂前列腺素E2(PGE2,20μg)、肌肉干细胞扩增剂布比卡因(BPV,0.25%)或组合药物(布比卡因0.25%与PGE220μg一起)至胫前肌(TA)肌肉中。图27A显示了每3天测量一次持续2周的生物发光(BLI,以辐射度测量)以测量肌肉干细胞扩增。图27B显示了从相同小鼠在第4周测量的所得强直力,其中计算了与基线力的百分比差。图27C:在4周(终点)分离出TA,并根据由肌肉长度、重量和垂度角计算出的生理横截面积(PCSA)获得比力(mN/mm²)。与媒介物和两种单独注射的小分子相比,组合药物的比力和强直力百分比差显著增加。*P<0.05、**P<0.001。ANOVA检验用于组比较并且终点显著性差异通过费舍尔检验进行(图27A)。使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较(图27B、图27C)。数据显示为平均值±SEM。

[0139] 发明详述

[0140] I. 引言

[0141] 最近的研究表明了肌肉干细胞(MuSC)在刺激失神经支配的肌肉中神经肌肉连接中的重要性,尽管直到最近失神经支配后提高肌肉功能恢复仍是未解决的问题。该问题的解决方案在于通过刺激和增强已经存在于肌肉中的MuSC或通过刺激和增强来自肌肉移植的MuSC来逆转或预防失神经支配萎缩的能力。

[0142] 本发明部分地基于以下发现:前列腺素E2(PGE2)化合物和肌肉毒素诸如布比卡因的组合调用休眠的MuSC参与肌肉再生并恢复力量。在一些情况下,添加肌肉毒素会诱导肌肉再生。在那些情况下,向PGE2化合物中添加肌肉毒素改善肌肉再生,比仅由PGE2化合物诱

导的肌肉再生更好。因此,在某些方面,本发明的组合物和方法可特别用于促进神经释放手术后萎缩性外展拇短肌 (APB) 肌肉再生,从而促进神经肌肉接头建立和肌肉收缩功能和体积恢复。

[0143] 最近的研究表明,肌肉干细胞 (MuSC) 在刺激失神经支配肌肉中的神经肌肉连接中的重要性 (Liu等人,2015),尽管直到最近失神经支配后改善肌肉功能恢复仍是未解决的问题。该问题的解决方案在于能够通过刺激和增强肌肉中已经存在的MuSC来逆转或预防失神经支配萎缩。

[0144] II. 定义

[0145] 除非另有说明,否则如本文所用,以下术语具有所赋予的含义。

[0146] 如本文所用的术语“一”、“一个”或“该”不仅包括具有一个成员的方面,而且还包括具有一个以上成员的方面。例如,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一”、“一个”或“该”包括复数指代物。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括多个这样的细胞,而对“该剂”的提及包括对本领域技术人员已知的一种或多种剂的提及,以此类推。

[0147] 术语“前列腺素E2”或“PGE2”是指可以经由花生四烯酸通过环氧合酶 (COX) 酶和末端前列腺素E合酶 (PGES) 合成的前列腺素。PGE2在许多生物功能中起作用,包括血管舒张、炎症和调节睡眠/唤醒周期。

[0148] 术语“前列腺素E2受体激动剂”或“PGE2受体激动剂”是指可以结合至并激活任何PGE2受体、从而刺激PGE2信号传导途径的化学化合物、小分子、多肽、生物产物等。

[0149] 术语“减弱PGE2分解代谢的化合物”是指可降低或减少PGE2分解的化学化合物、小分子、多肽、生物产物等。

[0150] 术语“中和PGE2抑制的化合物”是指可以阻止或阻碍PGE2合成、活性、分泌、功能等的抑制剂的化学化合物、小分子、多肽、生物产物等。

[0151] 术语“减弱PGE2分解代谢的化合物”是指一种减少PGE2经由转运蛋白转运以在细胞内分解PGE2的物理过程。该过程可能是前列腺素转运蛋白的物理阻滞物,所述前列腺素转运蛋白在细胞内转运PGE2以用于由15-PGDH进行分解代谢。前列腺素转运蛋白也被称为2310021C19Rik、MATR1、Matrin F/Q、OATP2A1、PGT、PHOAR2、SLC21A2、溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员2A1和SLC02A1。

[0152] 在化合物的上下文中,术语“衍生物”包括但不限于给定化合物的酰胺、醚、酯、氨基、羧基、乙酰基和/或醇衍生物。

[0153] 术语“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”是指以下任一项:缓解疾病的一种或多种症状;在此类症状发生之前预防其表现;减慢或完全预防疾病的进展 (如可能通过复发发作之间更长时间、减慢或预防症状恶化等方面显而易见);增强缓解期的发作;减慢在疾病的进展-慢性阶段 (包括初级阶段和二级阶段) 中引起的不可逆的损害;延迟所述渐进阶段的发作;或其任何组合。

[0154] 术语“施用 (administer)”、“施用 (administering)”或“施用 (administration)”是指可用来使得能够递送试剂或组合物诸如本文所述的化合物和细胞至期望的生物作用位点的方法。这些方法包括但不限于,肠胃外施用 (如,静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内、动脉内、血管内、心脏内、鞘内、鼻内、皮内、玻璃体内等)、透粘膜注射、经口施用、作为栓剂施用和局部施用。本领域技术人员将知道用于施用治疗有效量的本文所述的化合物和/或细胞以预

防或缓解与疾病或疾患相关的一种或多种症状的另外方法。

[0155] 术语“治疗有效量”或“治疗有效剂量”或“有效量”是指足以带来有益或所需临床作用的化合物、治疗剂(如,细胞)和/或药用药物的量。治疗有效量或剂量可以根据每个患者的具体因素而定,包括但不限于患者的年龄、大小、疾病类型或程度、疾病阶段、再生细胞施用途径、所用补充疗法的类型或程度、进行中的疾病进展和所需的治疗类型(如,侵袭性治疗对比常规治疗)。可以首先从细胞培养物和动物模型中估计如本文所述的药物化合物或组合物的治疗有效量。例如,在细胞培养方法中确定的 IC_{50} 值可以用作动物模型中的起点,而在动物模型中确定的 IC_{50} 值可以用于寻找人中的治疗有效剂量。

[0156] 术语“药学上可接受的载体”是指不会对生物提造成重大刺激并且不会消除所施用化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。

[0157] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文可互换使用以指代脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人类。哺乳动物包括但不限于鼠、大鼠、猿猴、人类、农场动物、运动动物和宠物。

[0158] 术语“机械损伤”是指由物理过程诱导的肌毒性作用,非限制性实例包括切割、灼烧、冷冻、针刺和练习。在一些情况下,机械损伤由于手术程序(如,包括切割、切开、缝合和和/或修复肌肉的手术程序或治疗)或创伤性损伤(如,意外的创伤或损伤)而发生的,非限制性实例是钝性和/或挤压损伤(如,涉及四肢或附属器诸如手臂、腿、手、脚和手指)。

[0159] 术语“肌肉毒素”意指在肌肉细胞中诱导损害或死亡的化合物。在一些实施方案中,肌肉毒素在肌肉细胞中产生的毒性作用(如,肌肉细胞损害、肌肉细胞死亡)可能直接或间接触发随后的肌肉干细胞激活、肌肉再生或两者。肌肉毒素的非限制性实例包括麻醉剂(如,布比卡因)、二价阳离子、蛇毒、蜥蜴毒、蜂毒和(如,虎蛇毒素、心脏毒素和银环蛇毒素)内所含的化合物。

[0160] 在一些情况下,肌肉毒素是温和肌肉毒素。如本文所用的温和肌肉毒素意指肌肉组织受到组织学评估的轻微破损。如本文所用的温和肌肉毒素可以包括会引起短暂但可逆的肌肉破损或细胞死亡的任何化合物。肌肉施用的赋形剂的肌毒性可通过监测对炎症细胞(白细胞、巨噬细胞和其他单核细胞)的募集、诱导短暂细胞因子水平、生长因子和炎性代谢物来评估。在组织学上,可以通过破坏肌纤维结构和周围的基质、诱导急性细胞死亡和坏死、诱导急性肌肉驻留细胞增殖(包括肌肉干细胞)、诱导胚胎肌球蛋白重链(eMHC)表达以及肌纤维内中央核位置的存在来评估肌毒性。全身性地,肌毒性也可以通过肌肉肌酸激酶水平来检测。功能性上,肌毒性可通过肌力减少和神经肌肉接头破坏来检测。

[0161] 肌毒性的可逆性可以通过在短持续时间(例如,在小鼠模型中约21天内)受损的肌纤维组织学恢复、组织中缺乏纤维化(缺乏过多的胶原蛋白沉积或其他基质成分)和缺乏脂质沉积(脂肪细胞转分化)来评估。

[0162] 温和肌肉毒素的非限制性实例可包括麻醉剂,诸如布比卡因或多卡因。

[0163] 术语“急性暴露”在施用化合物的上下文中是指将化合物临时或短暂地施加给受试者如人受试者或细胞。在一些实施方案中,急性暴露包括在治疗过程中或在延长的时间段内化合物的单次施用。

[0164] 在施用化合物的上下文中,术语“间歇暴露”是指将化合物反复施用给受试者如人受试者或细胞,其中在两次施加之间经过期望的时间段。

[0165] 术语“急性方案”在施用化合物的上下文中是指将化合物临时或短暂施加给受试

者如人受试者,或将化合物反复施加给受试者如人受试者,其中在两次施加之间经过期望的时间段(如1天)。在一些实施方案中,急性方案包括经治疗时间段内或经延长的时间段内急性暴露(如,单剂量)化合物给受试者。在其他实施方案中,急性方案包括间歇暴露(如,重复剂量)的化合物给受试者,其中在每次暴露之间经过期望的时间段。

[0166] 术语“持续暴露”在施用化合物的上下文中是指在延长的时间段内将化合物反复长期地施加给受试者如人受试者或细胞。

[0167] 术语“慢性方案”在施用化合物的上下文中是指经延长的时间段将化合物反复长期地施加给受试者如人受试者,使得化合物的量或水平经所选时间段内基本恒定。在一些实施方案中,慢性方案包括经延长的时间段持续暴露化合物给受试者。

[0168] III. 实施方案详述

[0169] A. 组合物和药物组合物

[0170] 在本发明的一方面,本文提供了用于预防或治疗肌肉疾患的组合物。在一些实施方案中,该组合物包含前列腺素E2 (PGE2) 化合物和肌肉毒素。在一些实施方案中,PGE2化合物选自:PGE2、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、其衍生物、其类似物及其组合。PGE2的前药例如在施用或肌肉再生位点处或当前药暴露于肌肉细胞时可被代谢为药理活性PGE2药物。

[0171] 在具体的实施方案中,PGE2化合物是含有增加其稳定性、活性、降解抗性、转运至肌肉细胞(如,促进细胞摄取)和/或滞留在肌肉细胞中(如,在摄取后减少从肌肉细胞分泌)的一种或多种PGE2修饰的PGE2衍生物或类似物。

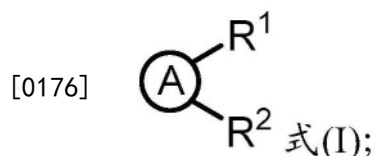
[0172] 不受限制,PGE2衍生物和类似物的实例包括2,2-二氟-16-苯氧基-PGE2化合物、2-脱羧-2-羟基甲基-16-氟-PGE2化合物、2-脱羧-2-羟基甲基-11-脱氧-PGE2化合物、19(R)-羟基PGE2、16,16-二甲基PGE2、16,16-二甲基PGE2对(对乙酰氨基苯甲酰氨基)苯基酯、11-脱氧-16,16-二甲基PGE2(dmPGE2)、9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE2、9-脱氧-9-亚甲基PGE2、布他前列素、硫前列酮、恩前列素、PGE2丝氨酸酰胺、PGE2甲酯、16-苯基四降PGE2、5-反式-PGE2、15(S)-15-甲基PGE2和15(R)-15-甲基PGE2。另外的PGE2衍生物和类似物示于如,美国专利No.5,409,911中。

[0173] PGE2衍生物和类似物的另外的非限制性实例包括PGE2的乙内酰脲衍生物,其中羟基环戊酮环被杂环状环替换并且不饱和 α -烯基链被苯乙基链取代的Zhao等人(Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,17:6572-5(2007))中描述的更稳定的PGE2类似物,Ungrin等人(Mol.Pharmacol.,59:1446-56(2001))中描述的PGE2类似物,Tanami等人(Bioorg.Med.Chem.Lett.,8:1507-10(1998))中描述的13-脱氢衍生物及美国专利No.8,546,603和8,158,676中描述的经取代的环戊烷。

[0174] 在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2受体(如,EP1受体、EP2受体、EP3受体和EP4受体)的激动剂。PGE2受体激动剂的非限制性实例包括ONO-DI-004、ONO-AE1-259、ONO-AE-248、ONO-AE1-329、ONO-4819CD(Ono Pharmaceutical Co.,Japan)、L-902688(Cayman Chemical)、CAY10598(Cayman Chemical)和CP-533536(Pfizer)。另外的PGE2受体激动剂描述于如,美国专利No.6,410,591;6,610,719;6,747,037;7,696,235;7,662,839;7,652,063;7622,475;和7,608,637中。

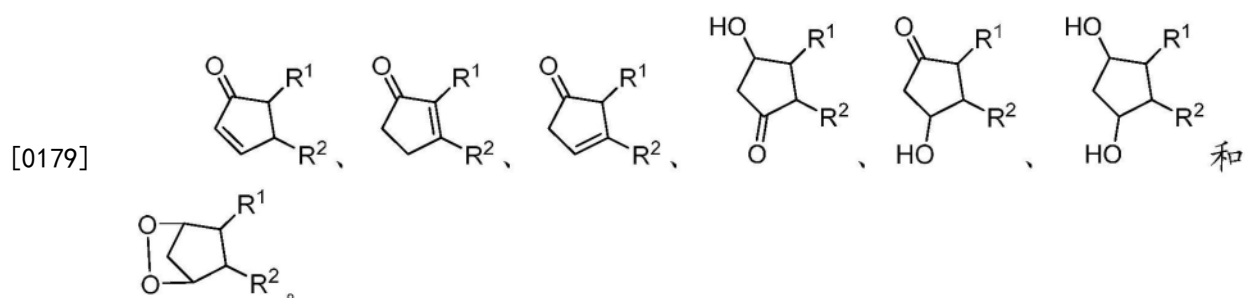
[0175] 在具体的实施方案中,PGE2受体激动剂包括式(I)的化合物、其衍生物、其药学上

可接受的盐、其溶剂化物、其立体异构体或其组合，

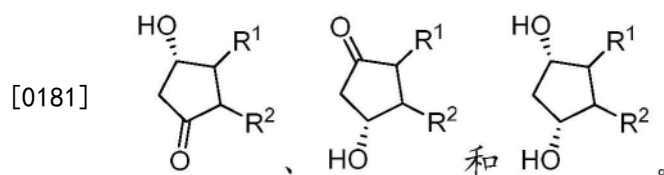


[0177] 其中环A是经取代的4-至6-元环烷基环或经取代的4-至6-元环烯基环,其包含独立选自经取代的C₁-C₁₀烷基和经取代的C₂-C₁₀烯基的取代基R¹和R²,并且环A还包含一个或多个另外的取代基。在一些实施方案中,环A是经取代的环戊基环或经取代的环戊烯基环。在具体的实施方案中,环A上的一个或多个另外的取代基选自:氘、羟基、氨基、氧代基、C₁-C₆烷基和卤素。在一些情况下,环A上的一个或多个另外的取代基是羟基或氧代基。在一些实施方案中,环A具有一起形成共价键以形成杂环烷基环的两个另外的取代基。

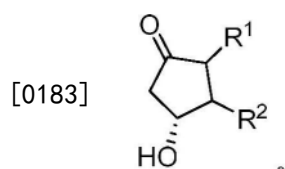
[0178] 在一些实施方案中,环A选自:



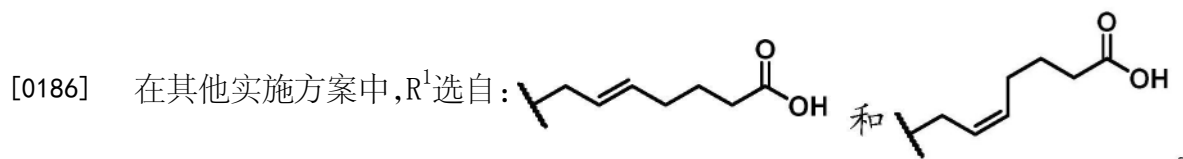
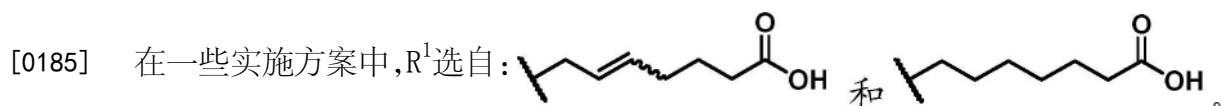
[0180] 在具体的实施方案中,环A选自:

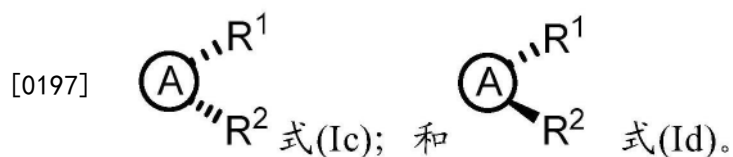
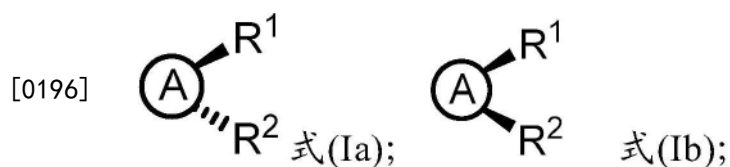


[0182] 在一些情况下,环A是



[0184] 在一些实施方案中,R¹是经取代的C₁-C₁₀烷基。在其他实施方案中,R¹是经取代的C₂-C₁₀烯基。在一些实施方案中,R¹选自:氘、羟基、氧代基、C₁-C₆烷基、-COOR³和卤素,其中R³是氢或C₁-C₆烷基。



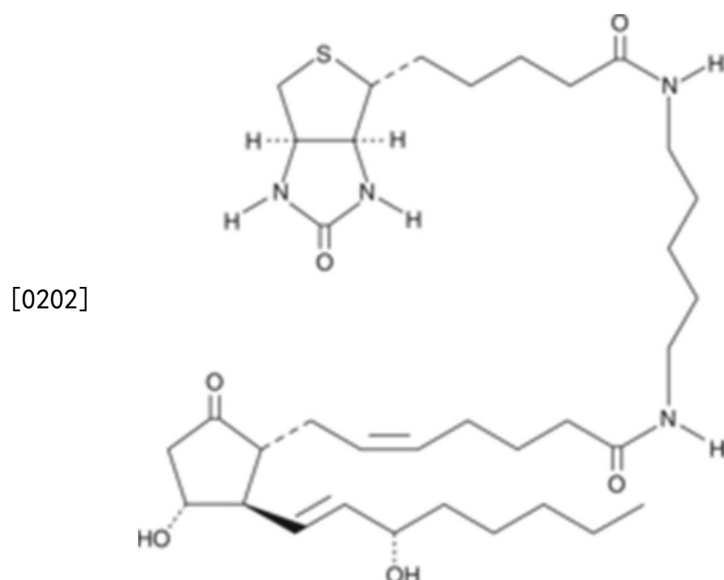


[0198] 在一些情况下,该化合物是式(Id)的。

[0199] 在一些实施方案中,PGE2化合物是PGE2。在其他实施方案中,PGE2化合物是PGE2的衍生物。在一些情况下,衍生物是16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)。在具体的实施方案中,PGE2化合物是PGE2和/或dmPGE2。

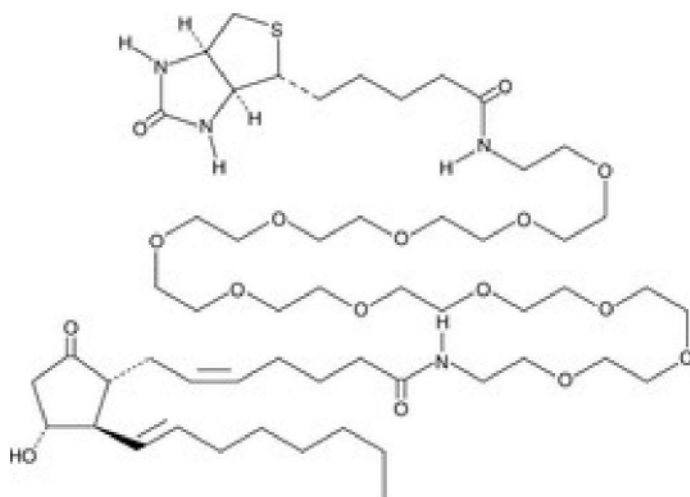
[0200] 在其他实施方案中,PGE2化合物是PGE2的衍生物。在一些情况下,衍生物是缀合至部分的PGE2。在具体的实施方案中,PGE2化合物是PGE2-生物素或PGE2-PEG(聚乙二醇)水凝胶。示例性实施方案显示于下:

[0201] PGE2-生物素



[0203] PGE2-PEG11-生物素

[0204]



[0205] 在一些实施方案中,PGE2衍生物包含缀合至分子探针的PGE2化合物。在一些情况下,分子探针是肽序列、抗原-结合片段(Fab)、仅重链抗体(HcAb)、全长抗体(Ab)、单结构域抗体/纳米抗体(Nb)或纳米颗粒或组合。在一些情况下,分子探针能够经由全身递送归巢至并靶向肌肉组织。

[0206] 在那些实施方案中,包含缀合至分子探针的PGE2化合物的PGE2衍生物可增加PGE2化合物的半寿期、增加PGE化合物的特异性和减少PGE2化合物的脱靶副作用。缀合至分子探针的PGE2的非限制性实例包括PGE2-整合素- $\alpha 7$ 抗体或纳米抗体;PGE2-M-钙粘蛋白抗体或纳米抗体;和PGE2-抗PGE2抗体。在一些情况下,包含缀合至分子探针的PGE2化合物的PGE2衍生物可用于治疗肌肉减少症或恶病质。

[0207] 在一些实施方案中,PGE2化合物是减弱PGE2分解代谢的化合物。在一些情况下,减弱PGE2分解代谢的化合物可以是失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白的化合物、中和肽或中和抗体,其转运细胞内的PGE2以用于由15-PGDH进行分解代谢。前列腺素转运蛋白也被称为2310021C19Rik、MATR1、Matrin F/Q、OATP2A1、PGT、PHOAR2、SLC21A2、溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员2A1和SLCO2A1。

[0208] 在一些实施方案中,该组合物可包括干细胞诱导分子。在一些情况下,干细胞诱导分子是如本文所述的PGE2化合物。在一些情况下,该组合物包括干细胞诱导分子组合有肌肉毒素。可在本文中使用的干细胞诱导分子的其他非限制性实例包括催产素、 β 整合素激活抗体、雷帕霉素、SetD7抑制剂、p38 MAPK抑制剂(诸如SB202190和SB203580)、神经调节蛋白、神经生长因子(NGF)、Hif2 α 抑制剂、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、成纤维细胞生长因子4(FGF4)、表皮生长因子(EGF)、白介素-1 α 、白介素-13、TNF α 、LIF、IL6、干扰素 γ 、抑瘤素M(OSM)、饥饿素和爱帕林。

[0209] 在一些实施方案中,肌肉毒素选自:麻醉剂、二价阳离子、来自蛇的毒汁、来自蜥蜴的毒汁、来自蜜蜂的毒汁及其组合。适合的二价阳离子包括但不限于Ba²⁺、Sr²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、其盐及其组合。在一些实施方案中,蛇毒或蜥蜴毒选自:虎蛇毒素、心脏毒素、银环蛇毒素及其组合。

[0210] 在一些实施方案中,麻醉剂选自:氨基-酰胺麻醉剂、氨基-酯麻醉剂及其组合。在一些情况下,麻醉剂是温和肌肉毒素。氨基-酰胺麻醉剂的非限制性实例包括布比卡因、左布比卡因、阿替卡因、罗哌卡因、布坦卡因、卡替卡因、地布卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌

卡因、丙胺卡因和三甲卡因。在一些实施方案中,组合物包括氨基-酰胺麻醉剂的组合。

[0211] 在一些实施方案中,麻醉剂是氨基-酯麻醉剂。在具体的实施方案中,氨基-酯麻醉剂是氨基苯甲酸酯麻醉剂、苯甲酸酯麻醉剂或其组合。氨基苯甲酸酯麻醉剂的非限制性实例包括苯佐卡因、布他卡因、氨苯丁酯、氯普鲁卡因、二甲卡因、哌啶卡因、美普卡因、间布他明、美布卡因、nitracaine、邻卡因、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、利索卡因和丁卡因。苯甲酸酯麻醉剂的非限制性实例包括阿米卡因、可卡因、环美卡因、 α -优卡因、 β -优卡因、海克卡因、异布卡因和哌罗卡因。在具体的实施方案中,该组合物包含一种或多种氨基苯甲酸酯麻醉剂和/或一种或多种苯甲酸酯麻醉剂的组合。

[0212] 可具有温和细胞毒性作用的麻醉剂的其他非限制性实例包括苯佐那酯、地哌冬、福莫卡因、扶涂卡因(fotocaine)、羟基普鲁卡因、奥昔卡因、奥布卡因、对乙氧基卡因、芬那卡因、匹多卡因、普莫卡因、阿替卡因、普鲁卡因酰胺、丙美卡因、吡咯卡因、奎尼卡因、托利卡因和托派可卡因。

[0213] 在一些实施方案中,该组合物包含包括PGE2和/或dmPGE2的PGE2化合物和为布比卡因的肌肉毒素。

[0214] 本发明的组合物可适用于治疗任何数量的肌肉疾患,包括但不限于与肌肉破损、损伤或萎缩相关的肌肉疾患。该组合物还可用于促进有需要的受试者中的肌肉再生、用于增加有需要的受试者中的肌肉质量或两者。适用于用本发明的组合物预防或治疗的疾患的非限制性实例包括创伤性损伤(如,急性肌肉创伤、急性神经创伤)、急性肌肉损伤、急性神经损伤、慢性神经损伤、软组织手损伤、腕管综合征(CTS)、杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、肢节肌营养不良、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、远端肌营养不良(DD)、遗传学肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性瘫痪、多肌炎、横纹肌溶解、皮肌炎、癌症恶病质、AIDS恶病质、心脏恶病质、应激诱导的尿失禁、肌肉减少症、脊髓性肌肉萎缩、肛门括约肌功能障碍、贝尔氏麻痹、肩袖损伤、脊髓损伤、髋关节置换、膝关节置换、腕骨折、糖尿病性神经病变、胃食管反流病(GERD)、阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)、骨盆底病症(如,应激性尿失禁、过度活跃的膀胱/尿急迫性失禁、混合性尿失禁、盆腔器官脱垂、大便失禁)、肌肉骨骼病症(如,受损的手功能、受损的拇指功能、受损的足功能)、足底筋膜炎、足下垂、废用诱导的肌肉萎缩、受损的眼睑功能(如,眼睑下垂、眨眼受损、睑内翻、睑外翻)、斜视、眼球震颤和老花眼。适用于用本发明的组合物预防或治疗的疾患的另外实例可包括影响可用局部移植小数目细胞再生的经分离的小肌肉的肌肉病症,包括:神经损伤或直接创伤之后面部或手中的萎缩和肌肉功能障碍,其在神经再支配之后不恢复;眼外肌损伤,导致格雷夫斯氏病中所见的不能移动眼睛和复视(diplopia);创伤性损伤和进展性外部眼肌麻痹,和尿失禁和大便失禁。

[0215] 在本发明的另一方面,本文提供了药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的载体和包括PGE2化合物和肌肉毒素的本文所述的组合物。在某些方面,药学上可接受的载体通过待施用的特定组合物以及通过用于施用组合物的特定方法部分确定。因此,存在本发明的药物组合物的各种各样的适合制剂(参见,如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1990))。

[0216] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括配制药物组合物领域的普通技术人员已知的任何标准药学上可接受的载体。因此,诸如作为药学上可接受的盐或作为缀合物存在

的细胞或化合物本身可在药学上可接受的稀释剂中制备为制剂；例如，盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)，水性乙醇，或以下的溶液：葡萄糖、甘露糖醇、右旋糖酐、丙二醇、油(如，植物油、动物油、合成油等)、微晶纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸钙、明胶、聚山梨醇酯80等，或在适当的赋形剂中制备为固体制剂。

[0217] 药物组合物通常还包含一种或多种缓冲液(如，中性缓冲的盐水或磷酸盐缓冲的盐水)、碳水化合物(如，葡萄糖、甘露糖、蔗糖或右旋糖酐)、甘露糖醇、蛋白、多肽或氨基酸诸如甘氨酸、抗氧化剂(如，抗坏血酸、焦亚硫酸钠、丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚等)、抑菌剂、螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽、赋予制剂以与接受者血液等渗、低渗或弱高渗的溶质、助悬剂、增稠剂、防腐剂、调味剂、甜味剂和着色化合物(根据需要)。

[0218] 本发明的药物组合物可以以与剂量制剂相容的方式施用，并且以治疗有效的量施用。待施用的量可以取决于多种因素，包括如个体的年龄、体重、身体活性和饮食、要治疗的疾患或疾病以及疾患或疾病的阶段或严重性。在某些实施方案中，剂量的大小也可以由特定个体中伴随一种或多种治疗剂施用的任何不良副作用的存在、性质和程度来确定。

[0219] 然而，应当理解，任何特定患者的具体剂量水平和剂量频率可以变化，并且可以取决于多种因素，包括所采用的具体化合物的活性、代谢稳定性和化合物的作用长度、年龄、体重、遗传特征、一般健康状况、性别、饮食、施用模式和时间、排泄率、药物组合、特定疾患的严重程度以及接受治疗的宿主。

[0220] 在某些实施方案中，化合物的剂量可以采取固体、半固体、冻干粉或液体剂型的形式，诸如例如片剂、丸剂、小丸、胶囊剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、栓剂、保留灌肠剂、乳膏剂、软膏剂、洗剂、凝胶剂、气雾剂、泡沫等，优选呈适合于简单施用精确剂量的单位剂型。

[0221] 如本文所用，术语“单位剂型”是指与适合的药物赋形剂(如，安瓿)结合的适合作人和其他哺乳动物的单位剂量的物理上不连续的单位，每个单位均包含经计算可产生所需的发作、耐受性和治疗作用的预定量的治疗剂。此外，可以制备更浓的剂型，然后可以从中制备更稀的单位剂型。因此，更浓的剂型可含有是所述量的基本上更大，如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍的治疗性化合物。

[0222] 用于制备此类剂型的方法是本领域技术人员已知的(参见，如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 同上)。剂型通常包含常规药物载体或赋形剂，并且可以另外包括其他药剂、载体、佐剂、稀释剂、组织渗透增强剂、增溶剂等。可以通过本领域公知的方法(参见，如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 同上)使适当的赋形剂适应特定的剂型和施用途径。

[0223] 适合的赋形剂的实例包括但不限于乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、盐水、糖浆、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和聚丙烯酸诸如Carbopol 如，Carbopol 941、Carbopol 980、Carbopol 981等。剂型还可以包括润滑剂诸如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油；润湿剂；乳化剂；混悬剂；防腐剂诸如羟基-苯甲酸甲酯、羟基-苯甲酸乙酯和羟基-苯甲酸丙酯(即对羟基苯甲酸酯)；pH调节剂，诸如无机和有机酸和碱；甜味剂；和调味剂。剂型还可以包含可生物降解的聚合物珠、右旋糖苷、水凝胶和环糊精包合复合物。

[0224] 对于经口施用，治疗有效剂量可以呈片剂、胶囊剂、乳剂、混悬剂、溶液、糖浆剂、喷雾剂、锭剂、粉剂和持续释放制剂的形式。适用于经口施用的赋形剂包括药用级甘露糖醇、

乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

[0225] 治疗有效剂量也可以冻干形式提供。此类剂型可以包括缓冲液,如碳酸氢盐,用于在施用之前复溶,或者该缓冲液可以被包含在冻干剂型中,以用于用如水复溶。冻干剂型还可以包含适合的血管收缩剂,如肾上腺素。冻干剂型可以在任选地与缓冲液一起包装以用于复溶的注射器中提供,使得复溶的剂型可以立即施用给个体。

[0226] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含包括水基的药学上可接受的载体。在其他实施方案中,药学上可接受的载体包括低粘度化合物。在一些情况下,低粘度化合物包括明胶。在其他的情况下,低粘度化合物包括水凝胶。

[0227] B. 用于促进肌肉再生和预防或治疗肌肉疾患的方法

[0228] 在本发明的另一方面,本文提供了用于促进有需要的受试者中的肌肉再生、用于增加有需要的受试者中的肌肉质量的方法或两者。在一些实施方案中,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,将包含药学上可接受的载体与PGE2化合物和肌肉毒素的组合的药物组合物施用给受试者。在一些实施方案中,施用治疗有效量的PGE2化合物给受试者。在其他实施方案中,施用治疗有效量的肌肉毒素给受试者。在具体的实施方案中,施用治疗有效量的PGE2化合物和肌肉毒素给受试者。

[0229] 在本发明的又一方面,本文提供了用于预防或治疗有需要的受试者中的肌肉疾患的方法。在一些实施方案中,该方法包括施用PGE2化合物和肌肉毒素的组合给受试者。在一些实施方案中,将包含药学上可接受的载体与PGE2化合物和肌肉毒素的组合的药物组合物施用给受试者。在一些实施方案中,将治疗有效量的PGE2化合物施用给受试者。在其他实施方案中,将治疗有效量的肌肉毒素施用给受试者。在具体的实施方案中,将治疗有效量的PGE2化合物和肌肉毒素施用给受试者。

[0230] 在本发明的又另一方面,本文提供了用于预防或治疗有需要的受试者中的肌肉疾患的方法。在一些实施方案中,该方法包括施用PGE2受体激动剂给受试者。在其他实施方案中,该方法还包括施用肌肉毒素给受试者。在一些实施方案中,将包含药学上可接受的载体、PGE2受体激动剂和任选的肌肉毒素的药物组合物施用给受试者。在一些实施方案中,将治疗有效量的PGE2受体激动剂施用给受试者。在其他实施方案中,将治疗有效量的肌肉毒素施用给受试者。在具体的实施方案中,将治疗有效量的PGE2受体激动剂和肌肉毒素施用给受试者。

[0231] 在一些实施方案中,该方法包括施用选自以下的PGE2化合物:PGE2、PGE2前药(如偶联至神经钙粘蛋白(NCAD)的PGE2,其靶向NCAD受体)、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、其衍生物、其类似物及其组合。PGE2的前药可在例如施用或肌肉再生位点处或当前药暴露于肌肉细胞时被代谢为药理活性PGE2药物。在一些情况下,PGE2化合物是生物素化的药物或保留PGE2受体啮合和信号传导但预防内化的其他修饰-从而导致延长的活性和克服降解途径。

[0232] 在具体的实施方案中,施用的PGE2化合物是含有一种或多种PGE2修饰的PGE2衍生物或类似物,所述修饰增加其稳定性、活性、对降解的抗性、转运至肌肉细胞中(如,促进细胞摄取)和/或在肌肉细胞中滞留(如,在摄取后减少来自肌肉细胞的分泌)。

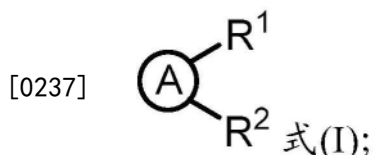
[0233] 不希望受限,施用于根据本发明的方法施用的PGE2衍生物和类似物的实例包括2,2-二氟-16-苯氧基-PGE2化合物、2-脱羧-2-羟基甲基-16-氟-PGE2化合物、2-脱羧-2-羟基

甲基-11-脱氧-PGE₂化合物、19(R)-羟基PGE₂、16,16-二甲基PGE₂、16,16-二甲基PGE₂对-(对乙酰氨基苯甲酰氨基)苯基酯、11-脱氧-16,16-二甲基PGE₂(dmPGE₂)、9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE₂、9-脱氧-9-亚甲基PGE₂、布他前列素、硫前列酮、恩前列素、PGE₂丝氨酸酰胺、PGE₂甲酯、16-苯基四降PGE₂、5-反式-PGE₂、15(S)-15-甲基PGE₂和15(R)-15-甲基PGE₂和PGE₂-生物素或PGE₂-PEG(聚乙二醇)水凝胶。另外的PGE₂衍生物和类似物示于如美国专利No.5,409,911中。

[0234] 用于施用的PGE₂衍生物和类似物的另外非限制性实例包括PGE₂的乙内酰脲衍生物,Zhao等人(Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,17:6572-5(2007))描述的更稳定的PGE₂类似物(其中羟基环戊酮环被杂环状环替换并且不饱和 α -烯基链被苯乙基链取代),Ungrin等人(Mol.Pharmacol.,59:1446-56(2001))中描述的PGE₂类似物,Tanami等人(Bioorg.Med.Chem.Lett.,8:1507-10(1998))中描述的PGE₂的13-脱氢衍生物,和美国专利No.8,546,603和8,158,676中描述的经取代的环戊烷。

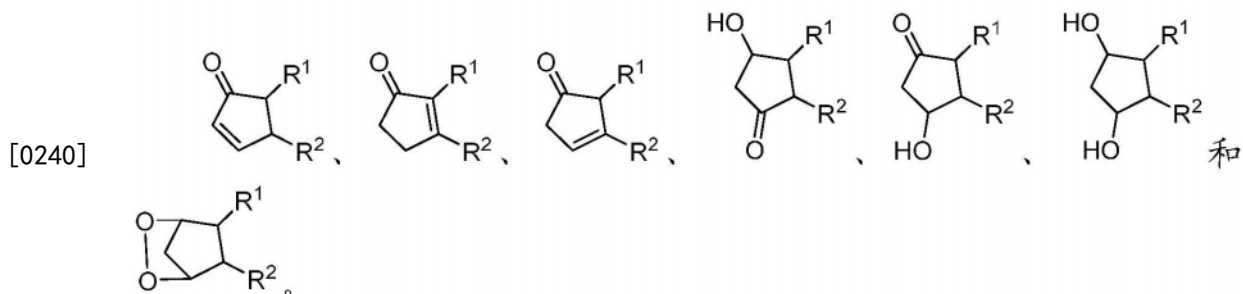
[0235] 在一些实施方案中,施用作为PGE₂受体(如EP1受体、EP2受体、EP3受体和EP4受体)激动剂的PGE₂化合物。PGE₂受体激动剂的非限制实例包括ONO-DI-004、ONO-AE1-259、ONO-AE-248、ONO-AE1-329、ONO-4819CD(Ono Pharmaceutical Co.,Japan)、L-902688(Cayman Chemical)、CAY10598(Cayman Chemical)和CP-533536(Pfizer)。另外的PGE₂受体激动剂描述于如美国专利No.6,410,591;6,610,719;6,747,037;7,696,235;7,662,839;7,652,063;7622,475;和7,608,637中。

[0236] 在具体的实施方案中,根据本发明的方法施用的PGE₂受体激动剂包括式(I)的化合物、其衍生物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物、其立体异构体或其组合,

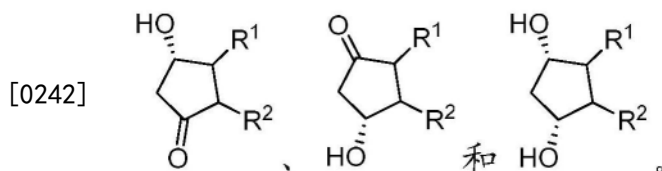


[0238] 其中环A是经取代的4-至6-元环烷基环或经取代的4-至6-元环烯基环,其包含独立选自经取代的C₁-C₁₀烷基和经取代的C₂-C₁₀烯基的取代基R¹和R²,并且环A还包含一个或多个另外的取代基。在一些实施方案中,环A是经取代的环戊基环或经取代的环戊烯基环。在具体的实施方案中,环A上的一个或多个另外的取代基选自:氘、羟基、氨基、氧代基、C₁-C₆烷基和卤素。在一些情况下,环A上的一个或多个另外的取代基是羟基或氧代基。在一些实施方案中,环A具有一起形成共价键以形成杂环烷基环的两个另外的取代基。

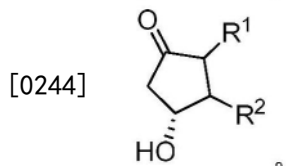
[0239] 在一些实施方案中,环A选自:



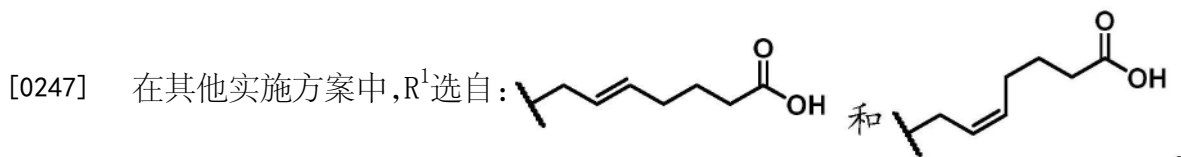
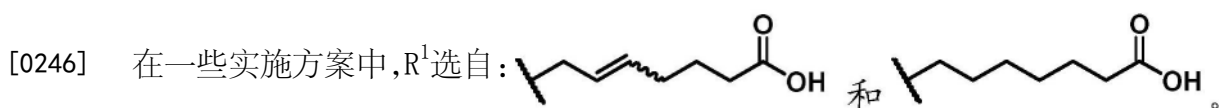
[0241] 在具体的实施方案中,环A选自:



[0243] 在一些情况下,环A是

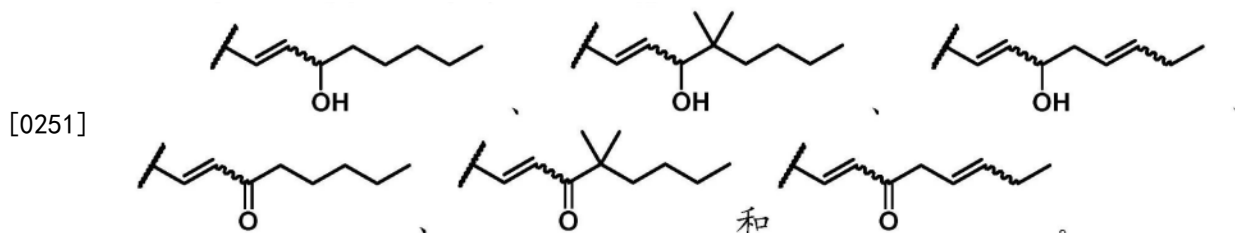


[0245] 在一些实施方案中, R^1 是经取代的 C_1 - C_{10} 烷基。在其他实施方案中, R^1 是经取代的 C_2 - C_{10} 烯基。在一些实施方案中, R^1 选自:氘、羟基、氧代基、 C_1 - C_6 烷基、 $-COOR^3$ 和卤素,其中 R^3 是氢或 C_1 - C_6 烷基。

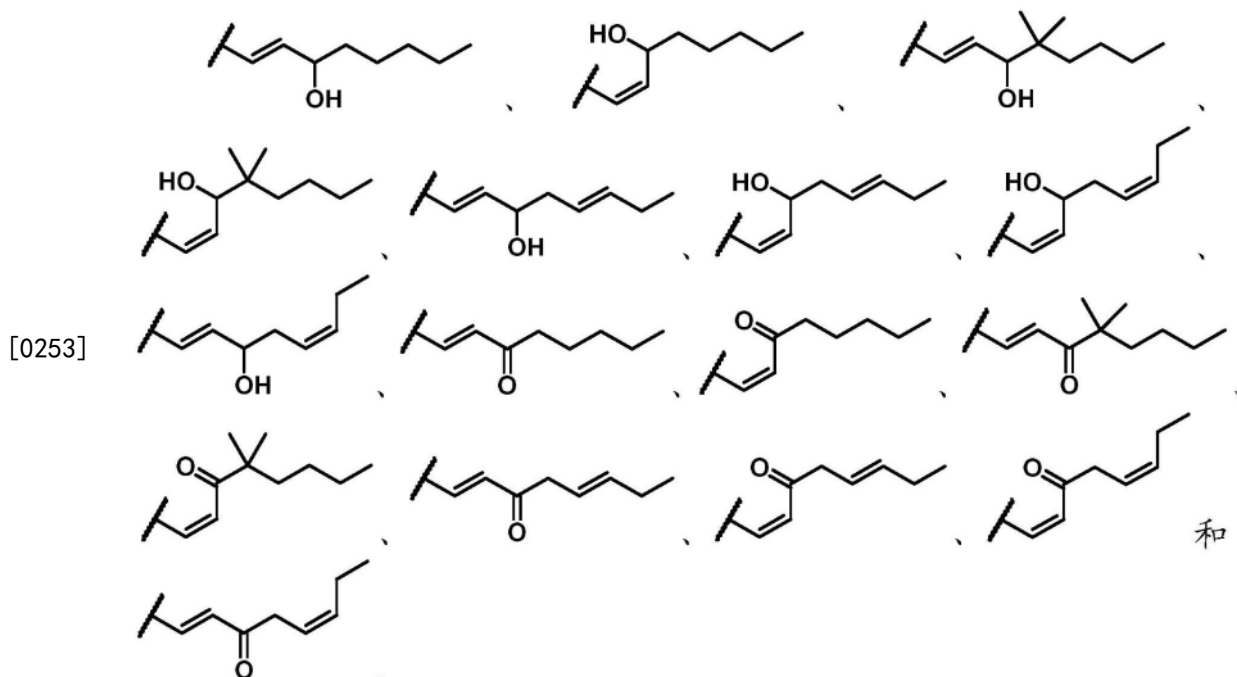


[0249] 在一些实施方案中, R^2 是经取代的 C_1 - C_{10} 烷基。在其他实施方案中, R^2 是经取代的 C_2 - C_{10} 烯基。在一些实施方案中, R^2 上的取代基选自:氘、羟基、氧代基、 C_1 - C_6 烷基、 $-COOR^3$ 和卤素,其中 R^3 是氢或 C_1 - C_6 烷基。

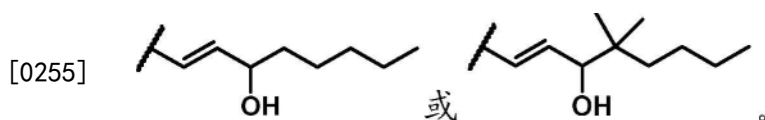
[0250] 在一些实施方案中, R^2 选自:



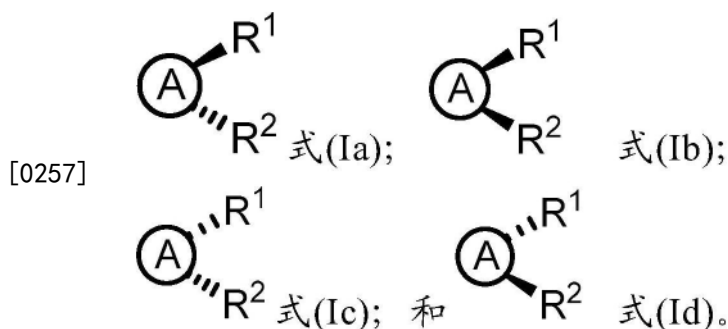
[0252] 在一些实施方案中, R^2 选自:



[0254] 在一些情况下, R^2 是



[0256] 在一些实施方案中, 式 (I) 的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂化物或其立体异构体是式 (Ia)、式 (Ib)、式 (Ic) 或式 (Id) 的化合物, 或是其药学上可接受的盐、其溶剂化物或其立体异构体:



[0258] 在一些情况下, 该化合物是式 (Id) 的。

[0259] 在一些实施方案中, 根据本发明的方法施用的PGE2化合物包括PGE2。在其他实施方案中, 经施用的PGE2化合物包括PGE2的衍生物。在一些情况下, 衍生物是16, 16-二甲基前列腺素E2 (dmPGE2)。在具体的实施方案中, 经施用的PGE2化合物包括PGE2和/或dmPGE2。

[0260] 在一些实施方案中, 经施用的PGE2化合物是减弱PGE2分解代谢的化合物。在一些情况下, 减弱PGE2分解代谢的化合物可为失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶 (15-PGDH) 或者失活或阻断前列腺素转运蛋白的化合物、中和肽或中和抗体, 其转运细胞内的PGE2以用于由15-PGDH进行分解代谢。前列腺素转运蛋白也被称为2310021C19Rik、MATR1、Matrin F/Q、OATP2A1、PGT、PHOAR2、SLC21A2、溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员2A1和SLC02A1。

[0261] 在一些实施方案中, 根据本发明的方法施用的组合物可包含干细胞诱导的分子。

在一些情况下,干细胞诱导的分子是如本文所述的PGE2化合物。干细胞诱导的分子的其他非限制性实例包括催产素、 β 整合素激活抗体、雷帕霉素、SetD7抑制剂、p38 MAPK抑制剂(诸如SB202190和SB203580)、神经调节蛋白、神经生长因子(NGF)、Hif2 α 抑制剂、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、成纤维细胞生长因子4(FGF4)、表皮生长因子(EGF)、白介素-1 α 、白介素-13、TNF α 、LIF、IL6、干扰素 γ 、抑瘤素M(OSM)、饥饿素和爱帕林。

[0262] 在一些实施方案中,根据本发明的方法施用的肌肉毒素选自:麻醉剂、二价阳离子、来自蛇的毒汁、来自蜥蜴的毒汁、来自蜜蜂的毒汁及其组合。适合的二价阳离子包括但不限于Ba²⁺、Sr²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、其盐及其组合。在一些实施方案中,蛇毒或蜥蜴毒选自:虎蛇毒素、心脏毒素、银环蛇毒素及其组合。

[0263] 在一些实施方案中,麻醉剂选自:氨基-酰胺麻醉剂、氨基-酯麻醉剂及其组合。在一些情况下,麻醉剂是温和的肌肉毒素。氨基-酰胺麻醉剂的非限制性实例包括布比卡因、左布比卡因、阿替卡因、罗哌卡因、布坦卡因、卡替卡因、地布卡因、依替卡因、利多卡因、甲哌卡因、丙胺卡因和三甲卡因。在一些实施方案中,该组合物包含氨基-酰胺麻醉剂的组合。

[0264] 在一些实施方案中,麻醉剂是氨基-酯麻醉剂。在具体的实施方案中,氨基-酯麻醉剂是氨基苯甲酸酯麻醉剂、苯甲酸酯麻醉剂或其组合。氨基苯甲酸酯麻醉剂的非限制性实例包括苯佐卡因、布他卡因、氨苯丁酯、氯普鲁卡因、二甲卡因、哌啶卡因、美普卡因、间布他明、美布卡因、nitracaine、邻卡因、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、利索卡因和丁卡因。苯甲酸酯麻醉剂的非限制性实例包括阿米卡因、可卡因、环美卡因、 α -优卡因、 β -优卡因、海克卡因、异布卡因和哌罗卡因。在具体的实施方案中,组合物包含包含一种或多种氨基苯甲酸酯麻醉剂和/或一种或多种苯甲酸酯麻醉剂的组合。

[0265] 可具有温和肌毒性作用的麻醉剂的其他非限制性实例包括苯佐那酯、地哌冬、福莫卡因、fotocaine、羟基普鲁卡因、奥昔卡因、奥布卡因、对乙氧基卡因、芬那卡因、匹多卡因、普莫卡因、阿替卡因、普鲁卡因酰胺、丙美卡因、吡咯卡因、奎尼卡因、托利卡因和托哌可卡因。

[0266] 在一些实施方案中,用于根据本发明的方法施用的组合物包含包括PGE2和/或dmPGE2的PGE2化合物和为麻醉剂(如,布比卡因)的肌肉毒素。在具体的实施方案中,未施用麻醉剂给受试者。在一些实施方案中,将不是麻醉剂的肌肉毒素施用给受试者。

[0267] 本文提供的方法可用于预防或治疗有需要的受试者中的肌肉疾患或疾病(如,与肌肉破损、损伤或萎缩相关的肌肉疾患或疾病)。该方法可向可能经历肌肉疾患(如,肌肉破损、损伤或萎缩)的受试者提供预防性治疗。在一些实施方案中,该患者可患有具有影响肌肉的可能的次级症状的疾患或疾病。在其他实施方案中,该患者已经经历了手术或治疗性程序或干预以治疗肌肉疾患或疾病,和本文公开的方法用于预防或抑制复发或再发。在一些实施方案中,该受试者患有影响肌肉的本文所述的任一种疾患或疾病。

[0268] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”涵盖了在疾病症状发作之前和/或在临床表现或疾患或疾病的其他表现之后,以适当形式施用化合物和/或细胞以降低疾病严重程度、停止疾病进展或消除疾病。术语“疾病的预防”或“预防疾病”包括优选在对该疾患或疾病的易感性增加的受试者中延长或延迟该疾患或疾病的症状发作。在一些实施方案中,治疗受试者产生了肌肉力量和/或肌肉协调中的提高。

[0269] 本文提供的方法可用于促进有需要的受试者中的肌肉再生,用于增加有需要的受

试者中的肌肉质量或两者。肌肉的再生包括由肌肉干细胞、卫星细胞、肌肉祖细胞及其任何组合形成新的肌肉纤维。该方法也可用于增强或加强肌肉修复、维持或两者。此外,通过促进肌肉再生,本文提供的方法还促进了神经肌肉连接建立和肌肉收缩功能和体积恢复。

[0270] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括在体内施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的组合物至肌肉或肌肉细胞。在其他实施方案中,本文提供的方法包括向肌肉细胞离体提供包含PGE2化合物的第一组合物,和体内施用肌肉细胞至肌肉。在一些情况下,第一组合物还可包含肌肉毒素。在其他的情况下,体内施用肌肉细胞至肌肉还包括在体内施用肌肉毒素至肌肉。

[0271] 在一些实施方案中,本文提供的方法还包括施用衰老裂解药物(senolytic drug)。衰老裂解药物是诱导产生衰老-相关分泌表型的衰老细胞的裂解的药物。在一些情况下,衰老裂解药物是靶向涉及BCL-2、BCL-XL、MDM2、p53、p21、丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpine) (PAI-1&2)、HSP-90、PI3K δ 、AKT、HIF1 α 、蝶素、或其组合的途径的药物。衰老裂解药物的实例包括达沙替尼、阿螺旋霉素、格尔德霉素、替拉替尼;非瑟酮、ABT-263、ABT-767、A1331852和A1155463。在一些情况下,施用衰老裂解药物在施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的组合物之前、期间、之后或组合。

[0272] 根据本发明的方法,本发明的组合物和药物组合物(如,包含PGE2化合物和肌肉毒素的组合,或包含PGE2受体激动剂和任选的肌肉毒素)可被施用给经历肌肉疾患诸如肌肉损伤、变性、损害、萎缩或其任何组合的受试者。在一些情况下,肌肉疾患是部分或完全失神经支配的结果。肌肉萎缩可包括肌肉质量减轻、肌肉力量减轻或两者。肌肉萎缩可影响受试者的任何肌肉。在一些情况下,需要本文提供的组合物、方法和试剂盒的受试者可展现或经历由于如年龄、失活、损伤、疾病或其任何组合导致的肌肉减轻。

[0273] 在一些实施方案中,化合物可激活肌肉细胞增殖、肌肉细胞分化、肌肉细胞融合或其任何组合。在一些情况下,可再生肌肉组织。在其他的情况下,可恢复或增强肌肉功能(如,肌肉质量、肌肉力量、肌肉收缩或其任何组合)。在一些情况下,可改善肌无力和萎缩。

[0274] 受损的肌肉可以是身体的任何肌肉,包括但不限于复合胸肌(musculi pectoralis complex)、背阔肌、大圆肌和肩胛下肌、肱桡肌、肱二头肌、肱肌、旋前方肌、旋前圆肌、屈腕桡肌、尺侧腕屈肌、屈指浅肌、屈指深肌、拇短屈肌、拇对掌肌、内收拇肌(如,外展拇短肌、外展拇长肌)、拇短屈肌、髂腰肌、腰肌、腹直肌、股直肌、臀大肌、臀中肌、中部腘绳肌(medial hamstrings)、腓肠肌、侧部腘绳肌(lateral hamstring)、四头肌装置(quadiceps mechanism)、长收肌、短收肌、大收肌、内侧腓肠肌、外侧腓肠肌、比目鱼肌、胫后肌、胫前肌、屈趾长肌、屈趾短肌、屈拇长肌、拇长伸肌、手肌、臂肌肉、足肌肉、腿肌肉、胸腔肌、胃肌、背肌、臀肌、肩肌、头颈肌、面肌、眼咽肌等。在一些情况下,肌肉可以是外展拇短肌肌肉。

[0275] 需要肌肉再生的受试者可具有肌肉骨骼损伤(如,骨折、拉紧、扭伤、急性损伤、过劳性损伤等)、四肢或面部创伤后损害、运动性损伤、老年人骨折后、软组织手损伤、肌肉萎缩(如,肌肉质量减轻)、杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、福山型先天性肌营养不良(FCMD)、肢带型肌营养不良(LGMD)、先天性肌营养不良、面肩胛臂肌营养不良(FHMD)、肌强直性肌营养不良、眼咽肌营养不良、远端肌营养不良、Emery-Dreifuss肌营养不良、先天性肌强直、肌强直性营养不良、其他肌肉营养不良、肌肉耗损病、诸如由于癌症导致的恶病质、

终末期肾病(ESRD)、全身性自身免疫性疾病(AIDS)或慢性阻塞性肺病(COPD)、手术后肌无力、创伤后肌无力、肌肉减少症、失活(如,肌肉废用或不动)、尿道括约肌缺乏、尿道括约肌缺陷、神经肌肉病等。

[0276] 神经肌肉病的非限制性实例包括但不限于、酸性麦芽糖酶缺乏、肌萎缩侧索硬化症、Andersen-Tawil综合征、贝克肌营养不良、贝克先天性肌强直、贝特莱姆肌病(Bethlem myopathy)、延髓肌萎缩、肉碱缺乏、肉碱棕榈酰基转移酶缺乏、肌中央轴空病、中央核肌病、夏科-马利-杜斯氏病(Charcot-Marie-Tooth disease)、先天性肌营养不良、先天性肌无力综合征、先天性肌强直性营养不良、科里病(Cori disease)、脱支酶缺乏症、Dejerine-Sottas病、皮炎、远端肌营养不良、杜氏肌营养不良、强直性肌营养不良症、Emery-Dreifuss肌营养不良、内分泌肌病、尤兰伯格病、面肩胛臂肌营养不良、胫骨远端肌病、弗里德希氏共济失调、福山型先天性肌营养不良、糖原贮积病10型、糖原贮积病11型、糖原贮积病2型、糖原贮积病3型、糖原贮积5型、糖原贮积病7型、糖原贮积病9型、Gowers-Laing远端疾病、遗传性包涵体肌炎、甲亢肌病、甲状腺功能减退性肌病、包涵体肌炎、遗传学肌病、整合素-缺乏性先天性肌营养不良、脊髓-延髓肌萎缩、脊髓性肌肉萎缩、乳酸脱氢酶缺乏症、兰伯特-伊顿肌无力综合征、McArdle病、嗅觉蛋白-缺乏性先天性肌营养不良、肌肉代谢病、线粒体肌病、三好远端肌病、运动神经元病、肌肉-眼-脑病、重症肌无力、肌腺苷酸脱氨酶缺乏症、肌原纤维肌病、肌磷酸化酶缺乏症、先天性肌强直1、肌强直性肌营养不良、肌管性肌病、线状体肌病、野中远端肌病、眼咽肌营养不良、先天性副肌强直、皮尔森综合征、周期性瘫痪、磷酸果糖激酶缺乏、磷酸甘油酸激酶缺乏、磷酸甘油酸变位酶缺乏症、磷酸化酶缺乏症、多肌炎、庞贝病、渐进性外眼肌麻痹、脊髓性肌肉萎缩、乌尔里奇先天性肌营养不良、Welander远端肌病、ZASP-相关的肌病等。

[0277] 肌肉萎缩(如,肌肉耗损)可由以下引起或与以下相关:例如,正常老化(如,肌肉减少症)、遗传异常(如,突变或单核苷酸多态性)、营养不良、循环不良、激素支持缺失、由于缺乏练习(如,卧床休息、肢体固定在石膏中等)而导致的肌肉废用、手术程序(如,手术治疗)、创伤(如,意外创伤)、损伤(如,意外损伤)、老化、支配肌肉的神经的损害、脊髓灰质炎、肌萎缩侧索硬化症(ALS或卢伽雷氏病)、心力衰竭、肝病、糖尿病、肥胖、代谢性综合征、脱髓鞘病(如,多发性硬化、夏科-马利-杜斯氏病、Pelizaeus-Merzbacher病、脑脊髓炎、视神经脊髓炎、肾上腺脑白质营养不良和格林-巴利综合征)、失神经支配、疲劳、练习-诱导的肌肉疲劳、虚弱、神经肌肉病、无力、慢性疼痛等。

[0278] 在具体的实施方案中,经预防或治疗的肌肉疾患或疾病选自:创伤性损伤(如,急性肌肉创伤、急性神经创伤)、急性肌肉损伤、急性神经损伤、慢性神经损伤、软组织手损伤、腕管综合征(CTS)、杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、肢节肌营养不良、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、远端肌营养不良(DD)、遗传学肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性瘫痪、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌症恶病质、AIDS恶病质、心脏恶病质、应激诱导的尿失禁、肌肉减少症、脊髓性肌肉萎缩、肛门括约肌功能障碍、贝尔氏麻痹、肩袖损伤、脊髓损伤、髋关节置换、膝关节置换、腕骨折、糖尿病性神经病变、胃食管反流病(GERD)、阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)、骨盆底病症(如,应激性尿失禁、过度活跃的膀胱/尿急迫性失禁、混合性尿失禁、盆腔器官脱垂、大便失禁)、肌肉骨骼病症(如,受损的手功能、受损的拇指功能、受损的足功能)、足底筋膜炎、足下

垂、废用诱导的肌肉萎缩、受损的眼睑功能(如,眼睑下垂、眨眼受损、睑内翻、睑外翻)、斜视、眼球震颤和老花眼。在一些情况下,受试者患有尺神经卡压(如,在肘部),伴有或没有肌肉耗损。适合的疾患的另外实例可包括影响可用局部移植小数目细胞再生的经分离的小肌肉的肌肉病症,包括:神经损伤或直接创伤之后面部或手中的萎缩和肌肉功能障碍,其在神经再支配之后不恢复;眼外肌损伤,导致格雷夫斯氏病所见的不能移动眼睛和复视;创伤性损伤和进展性外部眼肌麻痹,和尿失禁和大便失禁。

[0279] 在一些实施方案中,受试者已接受创伤性损伤。在其他实施方案中,治疗的肌肉疾患是创伤性损伤。在具体的实施方案中,创伤性损伤包括钝性创伤或挤压损伤。在一些情况下,创伤性损伤包括对肢体(如,手臂、腿、手、足、手指)的钝性创伤或挤压损伤。在一些实施方案中,创伤性损伤是意外的。在一些实施方案中,PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)在创伤性损伤发生之后立即施用。在一些实施方案中,PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和肌肉毒素的组合在创伤性损伤发生之后立即施用。在一些实施方案中,PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和肌肉毒素同时施用给受试者。在一些实施方案中,PGE2化合物或PGE2化合物和肌肉毒素的组合在创伤性损伤发生后约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60分钟内施用。在其他实施方案中,PGE2化合物或PGE2化合物和肌肉毒素的组合在创伤性损伤发生的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时内施用。PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)或PGE2化合物和肌肉毒素的组合可在创伤性损伤发生后施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多次。

[0280] 在一些实施方案中,根据本发明的方法治疗(如,肌肉疾患或疾病,或预防性地)的受试者接受了手术程序(如,手术治疗)。在一些实施方案中,手术程序用于预防、减少或修复神经损伤。作为非限制性实例,神经损伤(如,经手术治疗)可以是外周神经损伤。在一些情况下,根据本发明的方法治疗或给予预防性治疗(如,用于肌肉疾患或疾病)的受试者经历了腕管松解程序。在一些实施方案中,手术程序包括切割肌肉、修复肌肉或两者。作为非限制性实例,PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)或PGE2化合物和肌肉毒素的组合可结合剖腹产、髋关节置换或膝关节置换施用(如,PGE2化合物或PGE2化合物和肌肉毒素的组合可在进行剖腹产、髋关节置换或膝关节置换的同时施用)。在一些实施方案中,本发明的方法增强了术后恢复。本发明的方法还可用于增强小肌肉的功能、小肌肉的力量或两者(如,手肌肉、面部肌肉、眼咽肌)。当结合手术程序使用时,本发明的方法可在手术之前、在手术期间、在手术之后或其任何组合进行。在一些实施方案中,仅施用PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)(如,在手术程序之前、同时或之后)。在具体的实施方案中,未递送麻醉剂。作为非限制性实例,在一些情况下,本发明的方法可消除施用麻卡因的需要。

[0281] 组合物和药物组合物(如,包含PGE2化合物和肌肉毒素,或包含PGE2受体激动剂和任选的肌肉毒素)可局部、经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内、颅内、鞘内、脊柱内、病灶内、鼻内、脑室内、通过吸入和/或通过心脏内注射施用。组合物可根据急性方案(如,单次或间歇给药)或慢性方案(如,持续给药)施用。

[0282] 当施用PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和肌肉毒素的组合时,PGE2化合物和肌肉毒素可同时或依序施用。当PGE2化合物和肌肉毒素依序施用时,可首先施用PGE2化合物,

然后施用肌肉毒素,或反之亦然。在一些实施方案中,依序施用的顺序交替或以其他方式在治疗之间变化(如,在一次治疗期间,首先施用PGE2化合物,然后施用肌肉毒素,然后在随后治疗期间,首先施用肌肉毒素,然后施用PGE2化合物)。

[0283] 当依序施用PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和肌肉毒素时,化合物施用可间隔一定长度的时间。在一些情况下,化合物的施用间隔约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更多分钟。在其他的情况下,化合物的施用间隔约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或更多小时。在其他的情况下,化合物的施用间隔约1、2、3、4、5、6、7或更多天。

[0284] 在一些实施方案中,PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)、肌肉毒素或两者的剂量基于靶肌肉的尺寸确定。作为非限制性实例,当靶肌肉是外展拇短肌肌肉(如,大概平均尺寸的外展拇短肌肌肉)时,剂量可包括约10 μ g的PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)、肌肉毒素或两者。作为其他非限制性实例,剂量可以包括每kg肌肉组织约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、25、40、45、50或更多mg的PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)、肌肉毒素或两者。

[0285] 在其他实施方案中,PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)、肌肉毒素或两者的剂量基于受试者的体重。在具体的实施方案中,PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)、肌肉毒素或两者的剂量是约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、25、40、45、50或更多mg/受试者体重kg。

[0286] 在一些实施方案中,还向受试者施用了受试者自体或同种异体的经分离的(或经分离和纯化)肌肉细胞群。该细胞可通过本领域技术人员已知的任何方法分离、纯化或两者。细胞可以是肌肉细胞的同质或异质群体。

[0287] 经分离的肌细胞可通过注射或移植来施用。在一些实施方案中,本文所述的组合物、药物组合物或两者(如,包含PGE2化合物和肌肉毒素,或包含PGE2受体激动剂和任选的肌肉毒素)和细胞可一起或同时施用。在其他实施方案中,组合物、药物组合物或两者和细胞可依序施用。在一些情况下,组合物、药物组合物或两者可在细胞之前施用。在其他的情况下,可在组合物、药物组合物或两者之前施用细胞。此外,可在手术程序(如,手术治疗,如,用于治疗神经损伤或肌肉疾患或疾病)之前、期间或之后施用细胞。

[0288] 施用给受试者的肌肉细胞群可以包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌肉细胞、诱导型多能干细胞来源的肌肉细胞、去分化的肌肉细胞或其任何组合。另外,施用给受试者的肌肉细胞可以是肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维或其任何组合。本文所述的组合物和/或药物组合物(如,包含PGE2化合物和肌肉毒素,或包含PGE2受体激动剂和任选的肌肉毒素)可以通过局部、经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心脏内施用来施用给受试者。在一些情况下,组合物和/或药物组合物可直接施用给功能障碍、受伤、受损和/或萎缩的肌肉。组合物和/或药物组合物可以根据急性方案(如,单次或间歇给药)或慢性方案(如连续给药)施用。

[0289] 卫星细胞是可以驻留在肌肉组织中的小型单核祖细胞。这些细胞可以被诱导以增殖并分化为肌肉细胞,并在某些情况下,与肌纤维融合。在肌肉破损或损伤期间,静态卫星细胞(如,目前尚未分化或正在进行细胞分裂的卫星细胞)和肌肉干细胞可以被激活以增殖,和/或迁移出肌肉干细胞小生境。卫星细胞和肌肉干细胞也可以分化为肌细胞、成肌细胞或其他肌肉细胞类型。

[0290] 用于从胚胎干细胞生成肌肉细胞的方法和方案描述于如Hwang等人,PLoS One, 2013,8(8):e72023;和Darabi等人,Cell Stem Cell,2012,10(5):610-9。用于从诱导的多能干细胞生成肌肉细胞的方法和方案描述于如Darabi等人,Cell Stem Cell,2012,10(5):610-9;Tan等人,PLoS One,2011;和Mizuno等人,FASEB J.,2010,24(7):2245-2253中。

[0291] 在一些实施方案中,肌肉细胞通过活检从肌肉中获取,诸如成熟的或成体肌肉,如四头肌、臀大肌、肱二头肌、三头肌或来自个体的任何肌肉。肌肉可以是骨骼肌、平滑肌或心肌。分离平滑肌干细胞的方法的详述可见于如,U.S.8,747,838,和美国专利申请公布No.20070224167中。从肌肉组织分离目标肌肉细胞诸如肌肉干细胞或卫星细胞的方法详述于例如Blanco-Bose等人,Exp.Cell Res.,2001,26592:212-220中。

[0292] 用于纯化目标肌肉细胞群(如肌肉干细胞、肌肉卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管和/或肌纤维)的方法包括选择、分离或富集具有特异性细胞表面标记或特异性多肽(在目标肌肉细胞的细胞表面上表达)的细胞。有用的细胞表面标记描述于如,Fukada等人,Front.Physiol.,2013,4:317中。可以进行细胞分选方法诸如流式细胞术,如荧光激活的细胞分选(FACS);磁珠细胞分离,如磁激活的细胞分选(MACS),和其他抗体-基细胞分选方法以分离或分开目标肌肉细胞与其他细胞类型。

[0293] 可以使用常规的基于培养的方法扩增或繁殖经分离的目标肌肉细胞群。用于培养肌肉细胞的方法见于如,美国专利No.5,324,656。在一些情况下,可以在支架或凝胶诸如水凝胶上培养细胞。

[0294] 在一些实施方案中,可通过培养细胞与PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和/或肌肉毒素来刺激细胞增殖,之后将它们施用给受试者。可使细胞在体外培养期间急性、间歇或暴露于化合物。在一些情况下,肌肉细胞群可在与PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和/或肌肉毒素培养后增加至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约200%、至少约500%、至少约1000%或更多。

[0295] 本文所述的方法可用于增加肌肉纤维数目至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约200%、至少约500%、至少约1000%或更多。在一些实施方案中,该方法可增加受损、受伤、萎缩或退化的肌肉的生长。

[0296] 在一些实施方案中,可使靶肌肉经受机械损伤。作为非限制性实例,机械损伤可包括切割、灼烧、冷冻、针刺、练习(如,短暂或长期的练习)、手术程序(如,手术治疗)、创伤性损伤(如,意外创伤或损伤)或其组合。在一些情况下,机械损伤在PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)施用之后、之后或同时。在一些实施方案中,当结合PGE2化合物(如,PGE2受体激动

剂)施用进行时,机械损伤用作刺激肌肉细胞增殖、肌肉细胞生长、肌肉细胞存活、肌肉再生、肌肉生长和/或肌肉质量增加的再生诱导剂。在具体的实施方案中,当不向受试者施用肌肉毒素时,机械损伤用作再生诱导剂。

[0297] 在一些情况下,机械损伤在PGE2受体激动剂施用之前、之后或同时。在一些情况下,机械损伤在肌肉毒素施用之前、之后或同时。在一些其他情况下,机械损伤在PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和肌肉毒素的组合施用之前、之后或同时。

[0298] C. 治疗眼病症或疾病的方法

[0299] 在一方面,该方法可包括将如本文所述的包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物施用给有需要的受试者的眼系统。在一些实施方案中,可以将包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物施用给有需要的受试者以治疗眼病症或疾病。在其他实施方案中,可以将包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物施用给有需要的受试者,以改善眼睛功能。在另外的实施方案中,可以将包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物施用给有需要的受试者,以增强现有方法(诸如白内障手术或视网膜手术)治疗眼病症或疾病的有效性。

[0300] 眼睑功能

[0301] 眼睑保护眼睛。当眨眼时,眼睑将水分扩散到眼睛上。眨眼还有助于将污垢和其他颗粒从眼睛表面移开。当有物体靠近眼睛时,眼睑闭合以保护眼睛免受损伤。眼睑功能可能受损并导致眼病症或疾病。在一些情况下,眼睑可能下垂,从而导致病症诸如上睑下垂。在其他的情况下,眼睑可能会转入或转出,从而导致病症诸如睑内翻或睑外翻。在其他的情况下,眼睑可能有异常的眨眼或颤搐,从而导致病症诸如干眼综合征或湿眼综合征(泪溢)。在某些方面,本文提供了用于治疗由于受损的眼睑功能导致的眼疾病或病症的方法。在一些情况下,该方法包括将包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物施用给有需要的受试者以改善眼睑功能。在一些情况下,可以通过诱导眼肌中的肌肉再生来改善眼睑功能。眼肌可以是影响眼睑功能的肌肉。眼肌的非限制性实例包括提肌、苗勒氏肌或轮匝肌。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,PGE2化合物和/或肌肉毒素)给眼肌。

[0302] 眼睑下垂

[0303] 眼睑下垂是上眼睑的过度下垂。在一些情况下,上眼睑的边缘可低于其应在的位置,也被称为上睑下垂。在其他的情况下,上眼睑中可有多余的松弛皮肤,也被称为皮肤松垂。在其他的情况下,其可是上睑下垂和皮肤松垂的组合。眼睑下垂可能是由于眼睑肌无力所致。在一些情况下,眼睑肌无力的原因可以是正常的老化过程所致,或是损伤或疾病的结果。在一些情况下,眼睑下垂可以与另一种病症有关,诸如眼周围或后方的肿瘤、糖尿病、霍纳综合征、重症肌无力、中风、眼睑肿胀(如,麦粒肿)。在其他的情况下,眼睑下垂可以是先天性的。在其他的情况下,眼睑下垂可由于保妥适施用/暴露所致。

[0304] 在一些方面,本公开的方法可以涉及治疗眼睑下垂。在一些情况下,该方法可以包括向患有眼睑下垂、疑似患有眼睑下垂或有发展眼睑下垂风险的受试者施用包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物。在一些情况下,眼睑下垂可包括上睑下垂、皮肤松垂或两者。在一些实施方案中,治疗眼睑下垂可包括治疗上睑下垂、皮肤松垂或两者。在一些实施方案中,该方法可涉及治疗由眼肌无力(诸如由于老化过程导致的无力)导致或由损伤或

疾病导致的眼睑下垂。在一些实施方案中,该方法可涉及治疗由眼睛周围或后方的肿瘤、霍纳综合征、重症肌无力、中风或眼睛中的肿胀(如,麦粒肿)导致的眼睑下垂。在一些情况下,该方法涉及施用本公开的治疗性组合物给患有眼睑下垂的受试者的眼睑肌。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导受试者的眼睑肌的肌肉再生来治疗眼睑下垂。在一些情况下,眼睑肌可以是提肌、苗勒氏肌、轮匝肌、额肌或任一种面部肌肉。在一些情况下,所述方法可涉及施用本公开的治疗性组合物给提肌、苗勒氏肌、轮匝肌、额肌或面部肌肉中的任一种。

[0305] 在一些实施方案中,治疗性组合物可与提眼手术(如,睑成形术)组合施用以治疗眼睑下垂。在一些情况下,治疗性组合物可在手术前、手术期间、手术后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物可在无提眼手术的情况下施用以治疗眼睑下垂。

[0306] 在一些实施方案中,治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)可通过局部施用、皮内施用、肌肉施用或其组合来施用。在一些情况下,治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射眼睑肌。眼睑肌可包括提肌、苗勒氏肌、轮匝肌、额肌或面部肌肉中任一种。在一些情况下,麻醉剂可在注射治疗性组合物之前施用给受试者的眼睛。在一些情况下,眼睑肌可在手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,眼睑肌可在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,27-、28-、29-或30-规格针可用于注射眼睑肌。

[0307] 在一些实施方案中,本公开的方法可涉及用体积为约0.01mL至约0.15mL的本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)注射有需要的受试者的眼睑肌。在一些实施方案中,眼睑肌可用至少约0.01mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,眼睑肌可用至多约0.15mL的本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)注射。在一些实施方案中,眼睑肌可用大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)注射。

[0308] 在一些方面,本公开的治疗性组合物治疗眼睑下垂的有效性可通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定。在一些情况下,该测试可确定在施用之前、施用之后或两者眼睑下垂的程度。在一些情况下,该测试可以是裂隙灯检查、拉伸测试、视野测试或其组合。在一些实施方案中,可以在确定在先施用的有效性后调整治疗性组合物的剂量。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可不改变。在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物、肌肉毒素或两者)的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗眼睑下垂。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后减少。

[0309] 在一些实施方案中,可以通过在治疗性组合物施用之前进行测试来鉴定需要本公开的治疗性组合物的受试者。在一些情况下,该测试可以是苯肾上腺素化学测试。在此类情况下,对苯肾上腺素化学测试的阳性反应可鉴定该受试者为苗勒氏肌再生的候选人。在一

些情况下,可以通过向苗勒氏肌注射本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物、肌肉毒素或两者)来治疗受试者的眼睑下垂。

[0310] 在一些方面,提供了用于治疗不规则散光的方法,该方法包括向有需要的受试者施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物、肌肉毒素或两者)。不规则散光可由于眼睑下垂导致的角膜瘢痕所致。在一些情况下,不规则散光可以通过治疗如本文所述的眼睑下垂来治疗。

[0311] 眨眼受损

[0312] 眨眼防止有害物质进入眼睛,并且在健康的眼泪和角膜上皮表面的稳态可能很重要。泪腺为眼睛产生润滑液。眨眼时,眼睑将液体从泪腺移动并到眼睛中。当眼睛受刺激时,泪腺产生多余的液体,以洗净任何杂质。多余的液体通过泪液管排出并进入鼻腔。眼睛的眨眼功能可能受损,从而影响眼睛的健康。在一些情况下,眨眼受损可导致干眼综合征,或类似干眼综合征的症状。在其他的情况下,眨眼受损可导致湿眼综合征,或类似湿眼综合征的症状。眨眼受损可能是由于多种原因所致,包括眼睑松弛、眼睑控制不足和其他眼肌无力。眨眼受损可能因干燥引起对角膜的严重损害,并可能导致破坏性角膜疾病诸如神经营养性角膜。

[0313] 在一些方面,提供了用于治疗有需要的受试者中的眨眼受损的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有眨眼受损、疑似患有眨眼受损或处于发展眨眼受损风险的受试者。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物给患有干眼综合征、疑似患有干眼综合征或处于发展干眼综合征风险的受试者。在一些实施方案中,可施用治疗性组合物以治疗与眨眼受损、泪腺萎缩、第七神经麻痹或反复出现的麦粒肿相关的干眼综合征。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物给患有湿眼综合征(泪溢或过度流泪)、疑似患有湿眼综合征(泪溢或过度流泪)或处于发展湿眼综合征(泪溢或过度流泪)风险的受试者。

[0314] 在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导受试者的眼肌中的肌肉再生来治疗眨眼受损、干眼综合征、湿眼综合征或其组合。在一些情况下,眼肌包括影响眨眼的肌肉。在一些情况下,眼肌可包括以下中的任一种:轮匝肌、若兰氏肌、霍纳氏肌、额肌或面部肌肉。面部肌肉可包括枕额肌、颞顶肌、降眉间肌、鼻肌、降鼻中隔肌、眼轮匝肌、皱眉肌、降眉肌、耳肌(前、上和后)、口轮匝肌、降口角肌、笑肌、颧大肌、颧小肌、提上唇肌、提上唇鼻翼肌、降下唇肌、提口角肌、颊肌或颞肌。在一些情况下,眨眼受损、干眼综合征或湿眼综合征可通过施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物、肌肉毒素或两者)至轮匝肌、若兰氏肌、霍纳氏肌、额肌、任一种面部肌肉或其组合来治疗。最近的研究表明,肌肉干细胞(MuSC)在刺激失神经支配的神经肌肉连接中的重要作用(Liu等人,2015),尽管直到最近改善失神经支配后肌肉功能的恢复仍是未解决的问题。该问题的解决方案在于通过刺激和增强肌肉中已经存在的MuSC来逆转或预防失神经支配萎缩的能力。

[0315] 在一些实施方案中,治疗眨眼受损、干眼综合征或湿眼综合征的方法可包括通过局部施用、皮内施用、肌肉施用或其组合来施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给有需要的受试者。在一些情况下,治疗性组合物可通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用可包括注射眼肌。眼肌可包括以下中任一种:轮匝肌、若兰氏肌、霍纳氏肌、额肌或面部肌肉。最近的研究表明,肌肉干细胞(MuSC)在刺激失神经支配的

神经肌肉连接中的重要作用,尽管直到最近改善失神经支配后肌肉功能的恢复仍是未解决的问题。该问题的解决方案在于通过刺激和增强肌肉中已经存在的MuSC来逆转或预防失神经支配萎缩的能力。

[0316] 在一些实施方案中,该方法可以包括施用本公开的治疗性组合物给影响泪腺功能的肌肉,以治疗与泪腺功能障碍有关的眨眼受损,诸如泪腺萎缩。在一些情况下,可以在注射治疗性组合物之前向眼睛施用麻醉剂。在一些情况下,眼睑肌可在手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,眼睑肌可在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,可以使用27-、28-、29-或30-规格针注射眼睑肌。

[0317] 在一些实施方案中,治疗眨眼受损、干眼综合征、湿眼综合征或其组合的方法可包括以约0.01mL至约0.15mL的体积施用(如,肌肉注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的眼肌。在一些实施方案中,眼肌可用至少约0.01mL的本公开的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,眼肌可用至多约0.15mL的本公开的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,眼肌可用大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的本公开的治疗性组合物注射。

[0318] 在一些方面,可以通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定治疗性组合物的施用的有效性。为了治疗湿眼综合征,可以进行荧光素和丽丝胺绿染色测试,或泪膜(OCT)的光学相干性断层摄影术或两者。为了治疗干眼综合征,可以进行视敏度测量、裂隙灯检查、泪膜破裂时间(TBUT)测量、泪液产生速率测量(Schirmer测试)、泪液浓度(克分子渗透压重量浓度)测量或其组合。在一些情况下,该测试可涉及测量炎性或生长因子分子(包括但不限于MMP-9、乳铁蛋白和NGF-1)的水平。

[0319] 在一些实施方案中,可以在确定在先施用的有效性后调整治疗性组合物的剂量。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者是剂量可不改变。在一些实施方案中,在确定治疗性组合物的在先施用的有效性后,可以调整本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)的施用频率。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗眨眼受损、干眼综合征或湿眼综合征。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物以治疗眨眼受损、干眼综合征或湿眼综合征。在一些情况下,在确定在先施用的有效性后,施用频率可增加。在其他的情况下,在确定在先施用的有效性后,施用频率可减少。

[0320] 睑内翻和睑外翻

[0321] 眼睑保护眼睛免受异物。在一些情况下,眼睑不能正确地放在眼睛上。例如,睑内翻是眼睑边缘内旋。在一些情况下,它会使眼睫毛摩擦眼睛。这可导致过度流泪、眼睛不适、眼疼、眼睛刺激、眼睛发红并在一些极端情况下还导致角膜损害和视力下降。睑内翻的原因可包括眼肌特别是眼下部肌肉疲软。睑外翻是眼睑外旋,使内表面暴露。在一些情况下,睑外翻可导致眼睛干燥、疼痛,眼睛过度流泪,慢性结膜炎,角膜炎,眼睛发红或其组合。睑外翻的原因可由于因老化过程、面部麻痹等导致的眼睑疲软。

[0322] 在一些方面,提供了用于治疗睑内翻、睑外翻或两者的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有睑内翻

或睑外翻、疑似患有睑内翻或睑外翻或处于发展睑内翻或睑外翻风险的受试者。在一些实施方案中,治疗睑内翻或睑外翻的方法可涉及施用本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的眼肌。在一些情况下,眼睑肌可以是轮匝肌、额肌或任何面部肌肉。面部肌肉可包括枕额肌、颞顶肌、降眉间肌、鼻肌、降鼻中隔肌、眼轮匝肌、皱眉肌、降眉肌、耳肌(前、上和后)、口轮匝肌、降口角肌、笑肌、颧大肌、颧小肌、提上唇肌、提上唇鼻翼肌、降下唇肌、提口角肌、颊肌或颏肌。

[0323] 在一些实施方案中,治疗性组合物可与眼睑手术(如,外侧睑板条程序)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物可在无眼手术的情况下施用。

[0324] 在一些实施方案中,本文提供的方法可包括通过局部施用、皮内施用、肌肉施用或其组合来施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给有需要的受试者。在一些情况下,治疗性组合物可通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射眼肌。在一些情况下,眼肌可包括轮匝肌、额肌或面部肌肉中的任一种。在一些情况下,可在注射之前施用麻醉剂给有需要的受试者的眼睛。在一些情况下,眼肌可在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,眼肌可在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,可使用27-、28-、29-或30-规格针注射眼肌。

[0325] 在一些实施方案中,治疗睑外翻、睑内翻或两者的方法可包括以约0.01mL至约0.15mL的体积施用(如,肌肉注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的眼肌。在一些实施方案中,眼肌可用至少约0.01mL的本公开的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,眼肌可用至多约0.15mL的本公开的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,眼肌用大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的本公开的治疗性组合物注射。

[0326] 在一些方面,施用本公开的治疗性组合物(如,以治疗睑内翻、睑外翻或两者)的有效性可通过在施用之前、在施用之后或两者进行测试来确定。在一些情况下,测试可包括对眼睛、眼睑或其组合的检查。在一些实施方案中,可以在确定在先施用的有效性后调整治疗性组合物的剂量。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可不改变。在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)的施用频率可在确定施用治疗性组合物(如,以治疗睑外翻、睑内翻或两者)的有效性之后调整。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗睑内翻或睑外翻。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物以治疗睑内翻或睑外翻。在一些情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性后增加。在其他的情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性后减少。

[0327] 眼外肌

[0328] 眼外肌包括控制眼睛运动的六种肌肉(外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌和下斜肌)和控制眼睑提高的一种肌肉(睑提肌)。对这些眼外肌中的任一种的损害或损伤、削弱或不适当的神经支配都可能导致眼病症或疾病,并降低视觉功能。在一些方面,提供了用于通过施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)治疗眼病症或疾

病的方法。在一些情况下,可将治疗性组合物施用给至少一种眼外肌,如,外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌、下斜肌或睑提肌。在一些情况下,所述方法可包括施用本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的眼外肌以诱导肌肉再生。

[0329] 斜视

[0330] 斜视是一种双眼不在同一方向排列的眼病症。结果,眼睛不会同时看同一物体。该疾患更通常被称为“交叉眼”。六种不同的眼外肌(外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌和下斜肌)环绕每只眼睛,并共同作用,以使两只眼睛都可以聚焦在同一物体上。在患有斜视的患者中,这些肌肉无法共同作用。结果,一只眼睛看着一个物体,而另一只眼睛朝着不同的方向转向以聚焦在另一物体上。在许多情况下,斜视的原因尚不清楚。在一些情况下,在出生时或之后不久就观察到眼排列不当(先天性斜视)。在一些情况下,儿童中与斜视相关的病症可包括但不限于阿佩尔综合征、脑麻痹、先天性风疹、血管瘤、色素失调症综合征、努南综合征、普拉德-威利综合征、早产儿视网膜病、前列腺癌、创伤性脑损伤和三体性18。斜视可在成人中发展并且可能由于许多不同的原因所致,包括但不限于肉毒中毒、糖尿病、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、眼损伤、贝类中毒、中风、创伤性脑损伤和由眼疾病或损伤导致的视力丧失。

[0331] 在一些方面,提供了用于治疗斜视或先天性斜视的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有斜视或先天性斜视、疑似患有斜视或先天性斜视或处于发展斜视或先天性斜视风险的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导至少一种眼外肌(如,外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌和下斜肌)的中的肌肉再生来治疗斜视或先天性斜视。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物给外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌、和下斜肌中的任一种。在一些情况下,每种眼肌可具有约5mm至约7mm的宽度、约10mm的长度和小于或等于1mm的厚度。

[0332] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物可以与眼肌手术组合施用以治疗斜视或先天性斜视。在一些情况下,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他的情况下,治疗性组合物可在无眼肌手术的情况下施用以治疗斜视或先天性斜视。

[0333] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)可通过注射眼外肌(如,外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌和下斜肌)来施用以治疗斜视或先天性斜视。在其他的情况下,本公开的治疗性组合物可经由在药物释放贮库中的缓慢药物释放、通过可包括产生本公开的组合物(如,PGE2化合物、肌肉毒素)的细胞基质贮库的基因疗法方法、或者放置在肌肉附近或邻近的聚合物植入物来施用。在一个示例性实施方案中,局部麻醉剂、眼用解充血药或两者可在注射眼外肌之前施用给有需要的受试者的眼睛。在一些情况下,眼外肌可在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,眼外肌可在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,眼外肌可在有心电图引导的情况下注射;在其他实施方案中,眼外肌可在无心电图引导的情况下注射。在一些实施方案中,27-、28-、29-或30-规格针可用于注射眼外肌。为了纠正眼排列不当,可以根据需要注射一种或多种眼外肌。在一些实施方案中,可以注射双眼中的眼外肌来纠正排列不当。

[0334] 在一些实施方案中,治疗斜视的方法可以包括以约0.05mL至约0.15mL的体积施用

(如,肌肉注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的眼外眼肌。在一些实施方案中,眼外肌可用至少约0.05mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,眼外肌可用至多约0.05mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,眼外肌可用大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的治疗性组合物注射。

[0335] 在一些方面,可以通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定本公开的治疗性组合物(如,以治疗斜视)的有效性。在一些情况下,测试可确定眼睛失准的程度。在一些实施方案中,可以进行角膜反射测试、覆盖/去遮盖测试、视网膜检查、眼科检查、视觉灵敏度或其组合。在一些情况下,施用治疗性组合物的有效性可通过施用之前和施用之后的眼睛对齐的变化来确定。在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可不变。

[0336] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)的施用频率可在确定施用治疗性组合物(如,以治疗斜视)的有效性之后调整。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗斜视。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后减少。

[0337] 眼球震颤

[0338] 眼球震颤或眼震颤是用来描述眼睛快速、不可控制的移动的术语。移动可以是从小的一侧至另一侧(水平眼球震颤);上和下(垂直眼球震颤),或旋转(旋转或扭转眼球震颤)。在一些情况下,移动可在一只眼睛中。在其他的情况下,移动可在两只眼睛中。在一些情况下,眼球震颤可在出生时存在(婴儿眼球震颤综合征(INS))。在一些情况下,眼球震颤可由眼睛的先天性疾病导致。在其他的情况下,眼球震颤可由于多种原因获得的,包括摄入某些药物或医药(如,苯妥英)、过量饮酒、可损害迷宫功能的镇静药物、头部损伤、内耳疾病(如,迷路病或美尼尔病)、中风和硫胺素或维生素B12缺乏症。在一些情况下,眼震颤可继发于其他病症诸如帕金森氏病。

[0339] 在一些方面,提供了用于治疗眼球震颤的方法。在一些情况下,眼球震颤是水平眼球震颤、垂直眼球震颤、旋转或扭转眼球震颤或其任何组合。在一些情况下,眼球震颤是婴儿眼球震颤综合征。在一些情况下,该方法包括向患有眼球震颤、疑似患有眼球震颤或处于发展眼球震颤风险的受试者提供本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导至少一种眼外肌(如,外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌和下斜肌)中的肌肉再生来治疗眼球震颤。在一些情况下,治疗性组合物可施用给至少一种眼外肌,如外直肌、内直肌、上直肌、下直肌、上斜肌,和下斜肌,以用于治疗眼球震颤。

[0340] IRIS

[0341] 位于角膜和晶状体之间的虹膜包括括约肌(瞳孔括约肌)和扩张肌(瞳孔扩张肌)。虹膜的圆形中央开口被称为瞳孔。虹膜调节瞳孔的大小,以控制有多少光进入眼睛。虹膜受损可导致受损视觉功能。

[0342] 在一些方面,提供了用于治疗受损视觉功能的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有受损视觉功能、疑似患有受损视觉功能或处于发展受损视觉功能风险的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导虹膜肌中肌肉再生来治疗受损视觉功能。虹膜肌可以是括约肌、扩张肌或两者。在一些情况下,治疗性组合物可局部、皮内或眼内施用给有需要的受试者。在一些情况下,治疗性组合物可通过肌肉内施用给虹膜肌(如括约肌、扩张肌)来施用。在一些方面,治疗的有效性可以通过观察在施用之前、施用之后或两者的光敏度变化来确定。

[0343] 睫状肌和其他眼内肌

[0344] 睫状体是含有睫状肌的圆形结构。在称为适应的过程中,当眼睛聚焦在附近物体上时,睫状肌改变晶状体的形状。老花眼是其中眼睛的晶状体失去聚焦能力从而难以近距离观察物体的疾患。老花眼被认为是老化过程的自然部分。治疗老花眼的一种方法可以是诱导睫状肌的肌肉再生。因此,本文提供了治疗老花眼的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有老花眼、疑似患有老花眼或处于发展老花眼的风险的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导睫状肌的肌肉再生来治疗老花眼。在一些方面,治疗的有效性可通过在施用之前、施用之后或两者进行阅读测试来确定。

[0345] 在某些方面,提供了用于治疗近视或调节近视消退的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有近视、疑似患有近视或处于发展近视风险的受试者,或受试者以调节近视消退。在一些情况下,可将治疗性组合物施用给眼肌,诸如睫状肌、巩膜内肌、巩膜周肌或眼内肌。

[0346] 眼咽肌营养不良

[0347] 眼咽肌营养不良是一种遗传性病症,其特征是影响上眼睑和喉咙的肌肉的缓慢发展的肌肉疾病(肌病)。发作通常是成年期间,最常见于40至60岁之间。症状可包括但不限于:眼睑下垂(上睑下垂)、手臂和腿无力以及吞咽困难(咽下困难)。

[0348] 在一些方面,提供了用于治疗眼咽肌营养不良的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有眼咽肌营养不良、疑似患有眼咽肌营养不良或处于发展眼咽肌营养不良风险的受试者。在一些情况下,治疗眼咽肌营养不良可涉及施用治疗性组合物给上眼睑肌、喉肌或两者。

[0349] D. 治疗肌肉骨骼病症的方法

[0350] 本文提供了施加本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给肌肉骨骼系统。在一些实施方案中,可将治疗性组合物施用给有需要的受试者以治疗肌肉骨骼病症。在一些情况下,肌肉骨骼病症是肌肉病症。在其他实施方案中,可将治疗性组合物施用给有需要的受试者以改善肌肉骨骼系统的功能。在另外的实施方案中,可将治疗性组合物施用给有需要的受试者以增强肌肉骨骼系统的病症或疾病的现有治疗(诸如腕掌关节成形术)的有效性。

[0351] 受损的肌肉骨骼系统功能可由于不同的因素所致。在一些情况下,肌肉病症可由于老化所致。例如,肌肉减少症是骨骼肌肉质量的退行性损失,在50岁以后每年的肌肉损失从0.5%到1%不等,并且与老化有关。在其他的情况下,肌肉病症可由于受影响的肌肉废用所致。在一些情况下,废用可由于固定(如,夹板、石膏)所致。在其他的情况下,废用可由于

疼痛(如,关节炎)所致。在一些情况下,肌肉病症可以是由于失神经支配导致的肌肉萎缩。影响下运动神经元的疾病可损害肌纤维的神经支配,导致肌肉萎缩。在其他的情况下,肌肉病症可由于代谢原因,诸如糖皮质激素-诱导的肌肉萎缩所致。例如,过量饮酒可导致酒精性肌病。在另一个实例中,慢性糖尿病可损害神经支配手和脚的神经,从而导致糖尿病性肌萎缩。受损肌肉功能的其他原因可包括创伤和肌肉相关的变性疾病。本文提供了治疗由于本文所述的任何原因引起的肌肉病症的方法。在一些情况下,该方法包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)。

[0352] 老化手

[0353] 体内老化骨骼肌最常见的变化之一就是肌肉质量从25%大幅减少到45%,有时被称描述为“老年肌肉减少症”。手中有11种内在肌肉和15种外在肌肉具有直接功能性作用。外在和内在手肌产生抓握物体所需的力(握力)。60岁以后,手握力迅速下降,下降高达20-25%。这伴随着肌肉纤维的大量损失和减少的肌肉纤维长度,特别是在鱼际肌群中,并且在动作电位降低中起重要作用。拇指的内在肌肉组织约占手总内在肌肉组织的40%。三种主要的肌肉,即拇收肌斜头、拇对掌肌和拇短屈肌,在紧捏握物体期间稳定拇指起着重要作用,并且这些移动通常表现出与年龄相关的功能障碍。老年人的鱼际肌的收缩能力已通过强直刺激正中神经来评估。老年人较高的肌肉疲劳抗性归因于外周神经系统和中枢神经系统两者中的差异。与老年人的手肌相关的动作电位和可活动的运动单位数量均大大减少。

[0354] 在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,PGE2化合物和/或肌肉毒素)给有需要的受试者。在一些实施方案中,受试者是大于50岁、大于55岁、大于60岁、大于65岁或大于70岁。在一些实施方案中,受损的手功能可以是老化的结果。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导受试者的手肌中的肌肉再生来治疗受损的手功能。在一些情况下,手肌可以是内在肌肉。内在肌肉可包括以下中的任一种但不限于:三种鱼际肌、三种小鱼际肌、骨间肌、蚓状肌、掌短肌和内收拇肌。在一些情况下,手肌是外在肌肉。外在肌肉可包括以下中的任一种但不限于:外展拇长肌、伸拇短肌、屈拇长肌、屈腕桡肌、屈指深肌、屈四指浅肌、尺侧腕屈肌、桡侧腕长伸肌、桡侧腕短伸肌、伸食指肌、伸指总肌、伸小指肌和伸腕尺肌。

[0355] 在一些实施方案中,治疗性组合物可与手手术(如,闭合复位和固定手术、腱修复、神经修复、手术引流和/或清创术或关节置换)组合施用。在此类情况下,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物可在无手手术的情况下施用。

[0356] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)可通过局部施用、皮内施用、肌内施用或其组合来施用。在一些情况下,治疗性组合物可通过肌内施用来施用。在一些情况下,肌内施用可包括注射手肌。手肌可包括以下中的任一种:鱼际肌、小鱼际肌、骨间肌、蚓状肌、掌短肌、内收拇肌、外展拇长肌、屈拇长肌、屈腕桡肌、屈指深肌、屈四指浅肌、尺侧腕屈肌、伸拇短肌、桡侧腕长伸肌、桡侧腕短伸肌、伸食指肌、伸指总肌、伸小指肌或伸腕尺肌。在一些情况下,可将麻醉剂施用给受试者的手,之后注射治疗性组合物。在一些情况下,手肌可在手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,手肌可在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,20-、21-、22-、23-、24-或25-规格针可用于注射手肌。

[0357] 在一些实施方案中,治疗受损的手功能的方法可包括以约0.01mL至约0.15mL的体积施用(如,肌肉注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的手肌。在一些实施方案中,向手肌注射至少约0.01mL治疗性组合物。在一些实施方案中,向手肌注射至多约0.15mL治疗性组合物。在一些实施方案中,向手肌注射大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的治疗性组合物。

[0358] 在一些方面,可以通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定施用本公开的治疗性组合物(如,以治疗受损的手功能)的有效性。在一些情况下,测试可以在施用之前、施用之后或两者测量手功能。在一些情况下,测试可以是最大捏力测试、稳定性捏力测试、钉板测试、两点辨别测试、精密捏稳定性测试、手握力测试或其组合。

[0359] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物的剂量可在确定之前施用(如,治疗受损的手功能)有效性之后调整。在一些情况下,可增加PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量。在其他的情况下,可减少PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量。在一些情况下,可不改变PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量。

[0360] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗受损的手功能。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物以治疗受损的手功能。在一些情况下,在确定在先施用的有效性后,施用频率可增加。在其他的情况下,在确定在先施用的有效性后,施用频率可减少。

[0361] 在一些实施方案中,有需要的受试者可以通过在施用治疗性组合物之前进行的测试来鉴定。在一些情况下,测试可以是最大捏力测试、稳定性捏力测试、钉板测试、两点辨别测试、精密捏稳定性测试、手握力测试或其组合。

[0362] 鱼际萎缩

[0363] 压迫性外周神经损伤(PNI)是一类由神经收缩引起的神经损伤。腕管综合征(CTS)是最常见的外周压迫性神经病,由腕部的正中神经压迫引起。腕管综合征的症状可包括外展拇短肌(APB)、拇对掌肌和拇短屈肌浅腹部(其是内在的正中神经支配的鱼际肌)的感觉受损(如,麻木和感觉异常)和运动缺陷。正中神经的长期压迫可能扰乱鱼际肌的运动功能,并且在患有严重腕管综合征的患者中,可能导致鱼际肌萎缩。例如,严重的CTS导致APB肌肉的失神经支配和萎缩。APB肌肉使拇指从手掌的平面中伸出,并且是许多精细运动活动不可或缺的部分。CTS的手术治疗是释放束缚正中神经的束带。这允许运动神经再生和肌肉潜在恢复。不幸的是,即使在神经被释放后,许多患有严重CTS的患者功能性恢复也很差。恢复控制手握的这些特定肌肉群的功能可以增加独立性和整体生活质量。

[0364] 在一些方面,提供了用于治疗受损的拇指功能的方法。在一些情况下,该方法包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有受损的拇指功能、疑似患有受损的拇指功能或处于发展受损的拇指功能的风险的受试者。在一些实施方案中,受损的拇指功能由于鱼际萎缩所致。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导受试者的手肌中的肌肉再生来治疗受损的拇指功能。在一些情况下,施用治疗性组合物给受试者的手肌以治疗受损的拇指功能。在一些情况下,手肌是外展拇短肌(APB)、拇对掌肌或拇短屈肌。在一些情况下,手肌是外展拇短肌。

[0365] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物可组合手手术来施用以治疗受损的拇指功能。在一些情况下,手手术可为腕管综合征手术。在一些情况下,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物可在无手手术的情况下施用。

[0366] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)可通过局部施用、皮内施用、肌内施用或其组合来施用以治疗受损的拇指功能。在一些情况下,治疗性组合物可通过肌内施用来施用。在一些情况下,肌内施用包括注射手肌。在一些情况下,手肌可包括鱼际肌。在一些情况下,手肌可包括外展拇短肌(APB)、拇对掌肌或拇短屈肌。在一些情况下,手肌可为外展拇短肌。在一些情况下,麻醉剂可在注射本公开的治疗性组合物之前施用给有需要的受试者的手。在一些情况下,手肌可在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,手肌可在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,20-、21-、22-、23-、24-或25-规格针可用于注射手肌。

[0367] 在一些方面,治疗受损的拇指功能的方法可包括以约0.01mL至约0.15mL的体积施用(如,肌内注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的手肌。在一些实施方案中,手肌可用至少约0.01mL的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,手肌可用至多约0.15mL的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,手肌可用大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的治疗性组合物注射。

[0368] 在一些方面,本公开的治疗性组合物的施用的有效性可通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定。在一些情况下,测试可在施用之前、施用之后或两者测量手功能。在一些情况下,测试可以是指尖捏力测试、莫伯格拾取测试或两者。在一些情况下,测试可以是以患者为中心的总体生活质量测量,诸如加拿大职能表现测量表(Canadian Occupational Performance Measure, COPM)。

[0369] 在一些方面,可以在确定在先施用的有效性后调整本公开的治疗性组合物的剂量。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可不变。

[0370] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗受损的拇指功能。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物以治疗受损的拇指功能。在一些情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后减少。

[0371] 在一些实施方案中,患有受损的拇指功能、疑似患有受损的拇指功能或处于发展受损的拇指功能的风险的受试者可通过在施用本公开的治疗性组合物之前进行测试来鉴定。在一些情况下,测试可以是指尖捏力测试、莫伯格拾取测试或两者。

[0372] 在一些方面,提供了用于治疗由压迫性外周神经损伤引起的肌肉受损的方法。在一些情况下,该方法包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有压迫性外周神经损伤、疑似患有压迫性外周神经损伤或处于发展压迫性外周神经损

伤的风险的受试者。例如,肘管综合征由尺神经卡压在肘部导致并且是上肢的第二种最常见的上肢卡压。尺骨神经压迫导致第四指和第五指疼痛或感觉异常。除了手和手指麻痹和刺痛之外,肌肉萎缩是尺骨神经压迫的常见结果。在另一个实例中,胸廓出口综合征由于肩膀和颈部之间的神经压迫导致,被称为臂神经丛。这可导致一个或两个上肢疼痛、无力、麻木、刺痛、冷觉,或有时是更普遍类型的不适。常见的症状是疼痛、麻木和刺痛,其从肩膀下方向下辐射到手部,并通常进入小指和无名指。这种疾患也可导致手的内在肌肉萎缩。

[0373] 足底筋膜炎

[0374] 足底筋膜是脚底的厚组织。它将脚跟骨连接到脚趾,并形成脚弓。当该组织肿胀或发炎时,其被称为足底筋膜炎。足底筋膜炎是脚跟疼痛的最常见原因之一,并且据估计在美国影响约200万人,导致初级护理医师和足部专家的拜访人数超过一百万。足底筋膜炎影响久坐不动的人和运动的人,并且被认为是由于生活方式或练习引起的慢性过负荷所致。目前的文献表明,足底筋膜炎被更正确地称为筋膜病,因为这种疾病的长期性以及退变性而不是炎症的证据。

[0375] 肌无力可能是慢性足底筋膜炎的潜在原因。研究表明,在承载肢体中,有被动和主动机构支撑内侧纵弓。通过张紧的足底筋膜可以被动地获得支撑,并且通过足底内在足肌(PIFM)和胫后肌(TP)肌肉可以主动地获得支撑。足底筋膜炎与前脚的PIFM萎缩有关。患有慢性足底筋膜炎的足的前足体积平均比对侧健康足少5.2%。前足肌肉包括屈拇内侧短肌、屈拇外侧短肌、内收拇指肌横头、内收拇指肌斜头和骨间足底肌。患有外展小指肌萎缩的患者也比无外展小指肌萎缩的那些发生跟腱炎、跟骨水肿、跟骨骨刺、足底筋膜炎和胫骨后肌腱功能障碍的频率明显更高。另外,加强弱化或萎缩的屈趾短肌也可以帮助稳定内侧纵弓。

[0376] 在一些方面,提供了用于治疗受损的足功能的方法。在一些情况下,该方法包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE₂化合物和/或肌肉毒素)给患有受损的足功能、疑似患有受损的足功能或处于发展受损的足功能的风险的受试者。在一些实施方案中,受损的足功能由于足底筋膜炎所致。因此,在一些实施方案中,治疗性组合物可适合于治疗足底筋膜炎。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导有需要的受试者的足肌肉内的肌肉生成来治疗受损的足功能。在一些情况下,足肌肉是足底内在足肌肉、屈拇内侧肌、屈拇外侧短肌、内收拇指肌横头、内收拇指肌斜头、背侧和骨间足底肌、外展小指肌和屈趾短肌。

[0377] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物可与足手术组合施用。在一些情况下,治疗性组合物可以在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他的情况下,治疗性组合物可在无足手术的情况下施用。

[0378] 在一些实施方案中,治疗性组合物可与另一种治疗组合施用。在一些情况下,另一种治疗包括非甾体类抗炎药、拉伸、夜间夹板、定制矫形器、皮质类固醇注射物、富含血小板的血浆注射物、体外冲击波疗法、筋膜切开术或其组合。

[0379] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物可通过局部施用、皮内施用、肌肉施用或组合来施用。在一些情况下,治疗性组合物可通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用可包括注射足肌肉。在一些情况下,足肌肉可包括足底内在足肌肉、屈拇内侧肌、屈拇外侧短肌、内收拇指肌横头、内收拇指肌斜头、背侧和骨间足底肌、外展小指肌和屈趾短肌。

[0380] 在一些情况下,可在注射本公开的治疗性组合物之前将麻醉剂施用给有需要的受试者的足。在一些情况下,足肌肉可在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,足肌肉

可在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,20-、21-、22-、23-、24-或25-规格针可用于注射足肌肉。

[0381] 在一些实施方案中,治疗受损的足功能的方法可包括以约0.01mL至约0.15mL的体积施用(如,肌肉注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的足肌肉。在一些实施方案中,足肌肉可用至少约0.01mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,足肌肉可用至多约0.15mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,足肌肉可用大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL治疗性组合物注射。

[0382] 在一些方面,本公开的治疗性组合物的施用的有效性可通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定。在一些情况下,测试可在施用之前、施用之后或两者测量足功能。在一些情况下,测试可以是物理检查,以确定脚底疼痛、沿脚掌疼痛、扁平足、高足弓、足肿胀、足发红、脚底中足弓僵硬或紧张或其组合。

[0383] 在一些实施方案中,可以在确定在先施用的有效性后调整治疗性组合物的剂量。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可不变。

[0384] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物治疗受损的足的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗受损的足功能。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物以治疗受损的足功能。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0385] 在一些实施方案中,可以在施用治疗性组合物之前通过测试来鉴定需要受损的足功能治疗的受试者。在一些情况下,测试可以是体检,以确定脚底疼痛、沿脚掌疼痛、扁平足、高足弓、足肿胀、足发红、脚底中足弓僵硬或紧张或其组合。

[0386] 足下垂

[0387] 足下垂,也称为下垂足,是指难以抬起脚前部的术语。在某些情况下,脚的前部可能会在步行期间在地面上拖动。足下垂削弱了行走,并可导致跌倒。足下垂是由抬起脚前部所涉及的一种或多种肌肉的无力或麻痹引起的。足下垂有多种原因。例如,压迫腿中控制抬起脚前部所涉及的肌肉的神经(腓神经)是足下垂的常见原因。这种神经也可在髋关节或膝关节置换手术期间受伤。脊柱中的神经根损伤“挟捏神经”也可引起足下垂。糖尿病也可能使受试者更容易患上与脚下垂有关的神经病症。各种形式的肌营养不良导致进行性肌无力。此外,影响脊髓或大脑的病症诸如肌萎缩侧索硬化症(ALS)、多发性硬化或中风可导致足下垂。

[0388] 本文描述了治疗足下垂的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的足肌或小腿肌中的肌肉生成来治疗受损的足功能。在一些情况下,足肌或小腿肌是胫前肌、第三腓骨肌、趾长伸肌、拇长伸肌或其组合。

[0389] 在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(如,神经手术)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方

案中,治疗性组合物在无足或小腿手术的情况下施用。

[0390] 在一些实施方案中,与另一种治疗组合施用治疗性组合物。在一些情况下,另一种治疗包括支架或夹板、物理疗法、神经刺激、神经手术或其组合。

[0391] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过局部施用、皮内施用、肌肉施用或组合来施用。在一些情况下,治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射足肌或小腿肌。足肌或小腿肌可包括胫前肌、第三腓骨肌、趾长伸肌、拇长伸肌。在一些情况下,麻醉剂可在注射之前施用给有需要的受试者的足肌或小腿肌。在一些情况下,足肌或小腿肌在手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,足肌或小腿肌在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,20-、21-、22-、23-、24-或25-规格针用于注射足肌或小腿肌。

[0392] 在一些实施方案中,有需要的受试者的足肌或小腿肌用体积为约0.01mL至约0.15mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,足肌或小腿肌用至少约0.01mL的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,足肌或小腿肌用至多约0.15mL的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,足肌或小腿肌用大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0393] 施用治疗性组合物的有效性可通过在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。测量可测量施用之前和/或之后的足或小腿功能。测试可以是体检以观察步态、确定腿肌肉无力、确定胫骨、足和/或脚趾麻木或其组合。

[0394] 在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。

[0395] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要仅单次施用治疗性组合物以治疗受损的足或小腿功能。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0396] 糖尿病性神经病变

[0397] 在美国,糖尿病是神经病的最常见原因,而神经病是糖尿病的最常见的并发症。足小肌肉的萎缩在糖尿病中很常见,并且与外周运动神经病有关。在长期糖尿病患者中,与非神经病患者相比,神经病患者中小腿肌(包括足肌肉)的肌无力和萎缩很常见。与非神经性糖尿病患者和非糖尿病对照相比,神经性糖尿病患者的内在足肌肉体积被证明较低。足内在肌肉的萎缩可导致固定的爪和锤状趾畸形,这在神经性糖尿病患者中很常见。另外,足内在肌肉稳定了足弓。高足弓常见于足底内在肌肉(如外展拇指肌、屈拇短肌和内收拇指肌)萎缩。

[0398] 在一些方面,提供了用于治疗糖尿病性神经病变或相关病症的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有糖尿病性神经病变或相关病症、疑似患有糖尿病性神经病变或相关病症或处于发展糖尿病

性神经病变或相关病症的风险的受试者。在一些情况下,与糖尿病性神经病变相关的病症可包括但不限于足小肌肉萎缩、小腿肌的肌无力和萎缩以及足内在肌肉的萎缩。在一些情况下,该方法包括施用治疗性组合物给足小肌肉、小腿肌或足内在肌肉。

[0399] 废用诱导的肌肉萎缩

[0400] 在肢体固定、卧床休息、脊髓损伤和部分/完全外周神经损伤后的临床环境中,骨骼肌质量损失经常发生,导致肌肉质量和力产生的重大损失。废用条件下的肌肉萎缩的程度是可变的,并且可取决于多种因素,包括年龄、肌肉的生理功能和纤维类型组成以及卸荷和失活的程度。废用-诱导的萎缩可能影响每个人的一生,并且尤其可使老年人衰弱。目前,没有好的药物物理学策略来治疗废用诱导的肌肉萎缩。

[0401] 本文描述了治疗废用诱导的肌肉萎缩的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,受影响的肌肉已经经历了卸荷、失活或组合持续大于1天、大于5天、大于10天、大于50天或大于100天。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的肌肉中的肌肉生成来治疗废用诱导的萎缩,其中肌肉已经经历了长时间卸荷和/或失活。在一些情况下,肌肉是骨骼肌。在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射受影响的肌肉。

[0402] 在一些实施方案中,废用诱导的肌肉萎缩由于远端桡骨骨折,也被称为柯莱斯骨折所致。柯莱斯骨折导致手相对于手腕向后和向外定位。这在老年人中很常见。导致肌肉质量的损失可由于固定而发生。本文描述了治疗由于远端桡骨骨折所致的肌肉萎缩的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的肌肉中的肌肉生成来治疗肌肉萎缩。在一些情况下,肌肉是屈腕桡肌、屈拇长肌、屈指浅肌、屈指深肌、尺侧腕屈肌、桡侧腕短伸肌/桡侧腕长伸肌、伸拇长肌、伸指总肌、伸腕尺肌或其组合。在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(如,腕关节镜)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物在无手术的情况下施用。

[0403] 在一些实施方案中,治疗性组合物与另一种治疗组合施用。在一些情况下,另一种治疗包括支架或夹板、物理疗法、神经刺激、神经手术或其组合。

[0404] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过局部施用、皮内施用、肌肉施用或组合来施用。在一些情况下,治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射手肌或下臂肌。手肌或下臂肌可包括屈腕桡肌、屈拇长肌、屈指浅肌、屈指深肌、尺侧腕屈肌、桡侧腕短伸肌/桡侧腕长伸肌、伸拇长肌、伸指总肌、伸腕尺肌或其组合。

[0405] 在一些情况下,可以在注射前将麻醉剂施用给有需要的受试者的手或下臂。在一些情况下,手肌或下臂肌在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,手肌或下臂肌在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,使用20-、21-、22-、23-、24-或25-规格针注射手肌或下臂腿肌。

[0406] 在一些实施方案中,需要的受试者的手肌或下臂肌用体积为约0.01mL至约0.15mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,手肌或下臂肌用至少约0.01mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,手肌或下臂肌至多约0.15mL治疗性

组合物注射。在一些实施方案中,手肌或下臂肌用大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0407] 施用治疗性组合物的有效性可通过在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。测试可在施用之前和/或之后测量手或下臂功能。测试可包括手腕的活动范围、握力、患者报告的结果诸如臂、肩和手残疾(Disability of Arm Shoulder and Hand)或其组合。

[0408] 在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。

[0409] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要仅单次施用治疗性组合物以治疗受损的手或下臂功能。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0410] 在一些实施方案中,废用诱导的肌肉萎缩由于髌骨折所致。髌骨折可由于大或小创伤所致。对于因骨质疏松症而骨骼衰弱的老年人,相对较小的创伤,甚至走路,都可能导致髌骨折。肌肉质量损失可由关节固定和卧床休息所致。肌肉损失可由卸荷和失活的组合所致。老年患者股骨近端移位骨折后,髌肌肉无力是一种经常发生的情况。本文描述了治疗由于髌骨折导致的肌肉萎缩的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的髌肌肉中的肌肉生成来治疗肌肉萎缩。在一些情况下,髌肌肉是髂肌、腰大肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、阔筋膜张肌、上孖肌、下孖肌、闭孔内肌、闭孔外肌、股方肌、梨状肌、大收肌、长收肌、短收肌、小收肌、耻骨肌、股直肌、股外肌、股内肌、股中间肌、股四头肌、缝匠肌、股二头肌、半腱肌、半膜肌、腰小肌、髂腰肌、股薄肌或其组合。

[0411] 在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(例如,关节成形术)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可以在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物在无手术的情况下施用。

[0412] 在一些实施方案中,治疗性组合物与另一种治疗方案组合施用。在一些情况下,另一种治疗方案包括支架或夹板、物理疗法、神经刺激、神经手术或其组合。

[0413] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过局部施用、皮内施用、肌内施用或组合来施用。在一些情况下,治疗性组合物通过肌内施用来施用。在一些情况下,肌内施用包括注射髌肌肉。在一些情况下,髌肌肉是髂肌、腰大肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、阔筋膜张肌、上孖肌、下孖肌、闭孔内肌、闭孔外肌、股方肌、梨状肌、大收肌、长收肌、短收肌、小收肌、耻骨肌、股直肌、股外肌、股内肌、股中间肌、股四头肌、缝匠肌、股二头肌、半腱肌、半膜肌、腰小肌、髂腰肌、股薄肌或其组合。

[0414] 在一些情况下,麻醉剂可在注射之前施用给有需要的受试者的髌。在一些情况下,髌肌肉在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,髌肌肉在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,20-、21-、22-、23-、24-或25-规格针用于注射髌肌肉。

[0415] 在一些实施方案中,有需要的受试者的髋肌肉用体积为约0.5mL至约5mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,髋肌肉用至少约0.5mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,髋肌肉用至多约4mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,髋肌肉用大于0.5mL、大于1.0mL、大于1.5mL、大于2.0mL、大于2.5mL、大于3.0mL、大于3.5mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0416] 施用治疗性组合物的有效性可以通过在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。测试可在施用之前和/或之后测量髋相关的功能。测试可以是髋肌肉和膝肌肉的力量测试以及功能性测试诸如站起来和行走测试或其组合。

[0417] 在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。

[0418] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要仅单次施用治疗性组合物以治疗受损的手或下臂功能。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0419] 在一些实施方案中,废用诱导的肌肉萎缩由于肩袖损伤所致。在一些情况下,肩袖损伤可由于急性肩袖撕裂所致。在一些情况下,肩袖损伤可由于退行性和/或慢性肩袖所致。退行性和/或慢性肩袖撕裂可由于重复应力、血液供应不足、骨刺或其组合所致。40岁以上的人患肩袖撕裂的风险更大。肌肉质量损失可由于肌肉缺乏张力以及关节僵硬而发生。肌肉损失可由卸荷和失活的组合所诱导。本文描述了治疗由于肩袖损伤引起的肌肉萎缩的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的肩袖肌中的肌肉生成来治疗肌肉萎缩。在一些情况下,肩袖肌是棘上肌、棘下肌、肩胛下肌、小圆肌或其组合。

[0420] 在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(如,肩袖关节镜术)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可以在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物在无手术的情况下施用。

[0421] 在一些实施方案中,治疗性组合物与另一种治疗方案组合施用。在一些情况下,另一种治疗方案包括支架或夹板、物理疗法、神经刺激、神经手术或其组合。

[0422] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过局部施用、皮内施用、肌内施用或组合来施用。在一些情况下,治疗性组合物通过肌内施用来施用。在一些情况下,肌内施用包括注射肩袖肌。在一些情况下,肩袖肌是棘上肌、棘下肌、肩胛下肌、小圆肌或其组合。

[0423] 在一些情况下,麻醉剂可以在注射之前施用给有需要的受试者的肩袖肌。在一些情况下,肩袖肌在手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,肩袖肌在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,20-、21-、22-、23-、24-或25-规格针用于注射肩袖肌。

[0424] 在一些实施方案中,有需要的受试者的肩袖肌用体积为约0.5mL至约5mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肩袖肌用至少约0.5mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肩袖肌用至多约4mL治疗性组合物注射。在一些实施

方案中,肩袖肌用大于0.5mL、大于1.0mL、大于1.5mL、大于2.0mL、大于2.5mL、大于3.0mL、大于3.5mL包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0425] 施用治疗性组合物的有效性可以通过在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。测试可在施用之前和/或之后测量肩袖相关的功能。测试可以是肩外展、外旋和向前弯曲的力量测试,满罐和空罐测试,悬臂测试以及肩袖生活质量测量(The Quality of Life Outcome Measure for Rotator Cuff)或其组合。

[0426] 在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。

[0427] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要单次施用治疗性组合物以治疗受损的手或下臂功能。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0428] E. 治疗骨盆底病症的方法

[0429] 骨盆底病症(PFD)由盆底肌的功能障碍导致。盆底肌经常因分娩和骨盆手术而受损。骨盆底病症也由其他创伤、老化、肥胖、神经系统疾病和其他损伤导致。最常见的骨盆底病症至少部分是由于盆底肌功能降低所致。这些病症包括应激性尿失禁、过度活跃的膀胱/尿急迫性失禁、混合性尿失禁、盆腔器官脱垂和大便失禁。

[0430] 在男性和女性中,骨盆底病症包括各种各样的疾患,尽管女性更容易受到影响。骨盆底为盆腔器官(膀胱、前列腺、直肠、子宫阴道)提供解剖支撑,并且是泌尿系统正常功能、性和生殖功能以及结直肠功能不可或缺的。骨盆底由盆底肌以及相关的结缔组织(韧带、肌腱和上覆筋膜)组成。盆底肌包括肛提肌和尾骨肌。肛提肌具有三部分:耻尾肌、髂尾肌和耻骨直肠肌。

[0431] 增强或改善盆底肌功能可以治疗这些类型的骨盆底病症。此外,增强或改善盆底肌的功能可预防骨盆底病症在鉴定为高危(如,复杂的分娩后,某些类型的盆腔手术后)的患者中发展。这种施加还可与骨盆底病症的现有治疗(如,肌肉训练/生物反馈、神经调节、药物治疗、手术)组合使用,以改善治疗结果。

[0432] 本文提供了治疗或预防骨盆底病症的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有骨盆底病症、疑似患有骨盆底病症或处于发展骨盆底病症风险的受试者。在一些情况下,骨盆底病症选自:应激性尿失禁、过度活跃的膀胱/尿急迫性失禁、混合性尿失禁、盆腔器官脱垂和大便失禁。在一些方面,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的盆底肌。在一些情况下,盆底肌包括肛提肌、尾骨肌或两者。在一些情况下,肛提肌包括耻尾肌、髂尾肌和耻骨直肠肌。

[0433] 在一方面,本文提供了如本文其他地方所述的包含前列腺素E2(PGE2)化合物和肌肉毒素的治疗性组合物在泌尿生殖系统中的应用。在一些实施方案中,可以施用治疗性组合物以改善泌尿生殖系统的功能。在另外的实施方案中,可以施用治疗性组合物以增强现有方法治疗泌尿生殖系统疾病或病症的有效性。泌尿生殖系统的疾病或病症可以是泌尿科

病症、妇科病症、结直肠病症或其组合。

[0434] 盆底肌支撑膀胱和尿道。大多数成人可以在膀胱中容纳400mL以上的尿液。尿液从膀胱经尿道流到外面。膀胱开口周围是括约肌。它挤压以防止尿液通过尿道漏出。这些肌肉中的任一种的损伤都可导致泌尿外科病症诸如应激性尿失禁。此外,增强这些肌肉中的任一种可以用于治疗泌尿外科病症,如过活动膀胱病症和活动低下膀胱病症。

[0435] 应激性尿失禁

[0436] 应激性尿失禁发生在膀胱在体力活动或运动(诸如咳嗽、举起重物、练习或位置改变)期间尿液泄漏时。它当控制将尿液保留在膀胱中的任何肌肉的功能变弱或受损时就会发生。当任何肌肉诸如骨骼外尿道肌,耻骨尿道肌变弱时,在膀胱上施加压力时尿液便可以通过。减退的肌肉可由分娩、尿道区损伤、医药、骨盆区手术诸如前列腺手术、渐进性萎缩和骨骼肌收缩性减弱、神经损害导致。目前的治疗包括手术干预和注射“增容剂”。

[0437] 本文描述了治疗应激性尿失禁(SUI)的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的肌肉中的肌肉再生来治疗SUI。在一些情况下,肌肉是骨骼外尿道肌、耻骨尿道肌或外尿道括约肌。

[0438] 在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(例如,前列腺手术)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可以在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物在无手术的情况下施用。

[0439] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射骨骼外尿道肌、耻骨尿道肌和外尿道括约肌。在一些情况下,麻醉剂可在注射之前施用。在一些情况下,肌肉在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,肌肉在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,18-、19-、20-、21-、22-或23-规格针用于注射肌肉。

[0440] 在一些实施方案中,有需要的受试者的肌肉用体积为约2mL或更少的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用至少约2mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用小于2mL、小于1.8mL、小于1.6mL、小于1.4mL、小于1.2mL、小于1mL、小于0.8mL、小于0.6mL、小于0.4mL或小于0.2mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0441] 施用治疗性组合物的有效性可通过在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。测试可为膀胱镜检查、垫重量测试、排尿日记、盆腔或腹部超声、排尿后残余(PVR)、尿分析、尿压力测试、尿动力学研究诸如漏尿点压、x射线与对比染料或其组合。在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要单次施用治疗性组合物。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0442] 混合型失禁或过活动膀胱

[0443] 过活动膀胱 (OAB) 是膀胱在错误的时间挤出尿液的疾患。例如,患有过活动膀胱的人可以一天要排尿八次或更多次,或者晚上要排尿两次或更多次;可以有突然且强烈的立即排尿需要;或者在突然、强烈的排尿冲动后漏尿。若干种疾患可导致过度活动膀胱的体征和症状,包括神经系统病症(如,中风,多发性硬化)、糖尿病、利尿剂、尿路感染、肿瘤、膀胱结石、前列腺肿大、便秘、咖啡因或酒精过量摄入、由于老化导致的认知功能下降和膀胱排空不全。增强和改善外尿道括约肌的功能可以影响膀胱和尿道之间的正反射和负反射作用。例如,改善的尿道括约肌收缩作用可以给膀胱抑制尿流的信号。

[0444] 本文描述了治疗过活动膀胱 (OAB) 的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的肌肉中的肌肉再生来治疗OAB。在一些情况下,肌肉是骨骼外尿道肌。

[0445] 在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(如,前列腺手术)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物在无手术的情况下施用。

[0446] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射骨骼外尿道肌。在一些情况下,麻醉剂可在注射之前施用。在一些情况下,肌肉在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,肌肉在无手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,18-、19-、20-、21-、22-或23-规格针用于注射肌肉。

[0447] 在一些实施方案中,有需要的受试者的肌肉用体积为约2mL或更小的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用至少约2mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用小于2mL、小于1.8mL、小于1.6mL、小于1.4mL、小于1.2mL、小于1mL、小于0.8mL、小于0.6mL、小于0.4mL或小于0.2mL包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0448] 施用治疗性组合物的有效性可在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。测试可以是排尿后残余 (PVR) 测试、尿流速测试、膀胱压力测试或其组合。在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要单次施用治疗性组合物。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0449] 产科肛门括约肌损伤 (OASIS)

[0450] 产科肛门括约肌损伤 (OASIS) 是分娩期间对肛门括约肌的损害,并可导致严重的合并症,包括肛门失禁、直肠阴道囊和疼痛。它们更常与强制分娩相关,而非真空辅助阴道分娩。它们还与产后尿潴留风险增加有关。肛门括约肌的手术修复可能无法完全恢复肌肉功能。

[0451] 本文描述了治疗产科肛门括约肌损伤的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉

毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的肛门肌的肌肉再生来治疗OAB。在一些情况下,肛门肌是肛门外括约肌或肛门内括约肌。

[0452] 在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(如,肛门外括约肌修复、肛门内括约肌修复)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或任何其他组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物在无手术的情况下施用。

[0453] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射骨骼肛门外括约肌。在一些情况下,麻醉剂可在注射之前施用。在一些情况下,肌肉在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,肌肉在无手术暴露的情况下注射肌肉。在一些实施方案中,18-、19-、20-、21-、22-或23-规格针用于注射肌肉。

[0454] 在一些实施方案中,有需要的受试者的肛门括约肌用体积为约2mL或更少的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用至少约2mL的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用小于2mL、小于1.8mL、小于1.6mL、小于1.4mL、小于1.2mL、小于1mL、小于0.8mL、小于0.6mL、小于0.4mL或小于0.2mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0455] 施用治疗性组合物的有效性可在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要单次施用治疗性组合物。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0456] 大便失禁

[0457] 大便失禁,也被称为排便失禁或遗粪症,是无法控制排便,导致粪便/大便意外地从直肠泄露。其范围从排气时偶尔出现的粪便泄露到完全失去肠道控制。原因包括腹泻、便秘、肌肉破损或神经损害。在一些情况下,肌肉损害由于分娩所致或与老化有关。

[0458] 本文描述了治疗大便失禁的方法,其包括施用包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物给有需要的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物通过诱导有需要的受试者的肛门肌的肌肉再生来治疗大便失禁。在一些情况下,肛门肌是肛门外括约肌或肛门内括约肌。

[0459] 在一些实施方案中,治疗性组合物与手术(如,肛门外括约肌修复、肛门内括约肌修复)组合施用。在那些实施方案中,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或任何其他组合施用。在其他实施方案中,治疗性组合物在无手术的情况下施用。

[0460] 在一些实施方案中,包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用包括注射骨骼肛门外括约肌。在一些情况下,麻醉剂可在注射之前施用。在一些情况下,肌肉在有手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,肌肉在无

手术暴露的情况下注射。在一些实施方案中,18-、19-、20-、21-、22-或23-规格针用于注射肌肉。

[0461] 在一些实施方案中,有需要的受试者的肛门括约肌用体积为约2mL或更少的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用至少约2mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,肌肉用小于2mL、小于1.8mL、小于1.6mL、小于1.4mL、小于1.2mL、小于1mL、小于0.8mL、小于0.6mL、小于0.4mL或小于0.2mL的包含PGE2化合物和肌肉毒素的治疗性组合物注射。

[0462] 施用治疗性组合物的有效性可在施用之前、施用之后或其组合进行测试来确定。在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物和/或肌肉毒素的剂量可保持相同。在一些实施方案中,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素的治疗性组合物的施用频率可在确定施用治疗性组合物的有效性之后调整。在一些情况下,需要单次施用治疗性组合物。在一些情况下,需要两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次施用治疗性组合物。在一些情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率在确定在先施用的有效性之后减少。

[0463] F. 治疗胃食管反流病的方法

[0464] 胃食管反流病(GERD)在成年人口中患病率为10-20%,是上消化道最常见的疾病之一。当食管底部的肌肉环被削弱或受损时,使胃酸进入食管远端时,就会发生GERD。酸刺激化学受体,引起刺激并导致症状发作。GERD的食管症状(如,烧心)和食管外症状(如,口、咽、喉和肺病症)是由粘膜暴露于胃酸触发的,并与反流事件频率和粘膜酸化的持续时间相关。其他GERD症状可包括上腹胀满、压力或疼痛、消化不良、恶心、发肿、打嗝、慢性咳嗽、支气管痉挛、喘息、嘶哑和哮喘。

[0465] 抗反流屏障包括两种括约肌-胃食管连接处的下食管括约肌(LES)和横隔膜括约肌。两种括约肌维持括约肌机制的强直闭合和增强的反射闭合。LES由平滑肌组成,并且由于肌源性以及神经源性因素,它可以维持强直收缩。横隔膜括约肌由横纹肌组成,横纹肌由于兴奋性神经也表现出结实和收缩。哺乳动物横隔膜主要是呼吸肌。然而,它由两种独立的肌肉组成:脚膈肌和膈肋肌。膈肋肌是呼吸肌,而脚膈肌具有两种功能:呼吸和胃肠道。脚膈肌由骨骼肌组成。横隔膜括约肌的收缩在食管的下端提供了强大的括约肌机制,从而有助于在LES水平上强直性(维持)压和相压增加。脚肌切开术研究表明,自发性胃酸反流明显增加。在去除脚膈肌后,内在食管肌无法完全补偿脚肌的损失。在人类中,膈肌裂孔是最小的GEJ开口孔的位点,并且食管裂孔疝显示出过多的反流,表明脚膈肌具有关键的屏障作用。一项研究还表明,患有食管炎的患者强制吸入期间可具有更薄的脚膈肌和GEJ活性不足。脚膈肌患者的解剖学变化和功能衰竭是支持GERD中的骨骼肌缺乏症的可能性的食管炎患者。

[0466] GERD的主要治疗是抑酸抑,这可以通过多种机制来实现,包括抗酸剂、组胺受体拮抗剂或质子泵抑制剂。手术疗法可包括腹腔镜下胃底固定术或减肥手术。抗反流手术的并发症可包括足够严重以致约6%用胃底固定术治疗的患者需要食管扩张的咽下困难,以及肠胃气胀和无法打嗝(气胀综合征)显著增加。

[0467] 在一些方面,提供了用于治疗胃食管反流病(GERD)的方法。在一些情况下,该方法

可包括施用本公开的治疗性组合物(如,PGE2化合物和/或肌肉毒素)给患有GERD、疑似患有GERD或处于患有GERD风险的受试者。在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导脚膈肌中的肌肉再生来治疗GERD。

[0468] 在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物可与手术程序组合施用以治疗GERD。在一些情况下,治疗性组合物可在手术之前、手术期间、手术之后或其任何组合施用。在一些情况下,脚膈肌可通过腹腔镜评估并用本公开的治疗性组合物注射。在一些情况下,脚膈肌的位置可通过定位食管和膈肌裂孔来鉴定,并然后用本文提供的治疗性组合物注射食管邻近的隔膜。在一些情况下,注射可在食管周围沿圆周方向进行。在一些情况下,可在食管周围进行至少一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或多于十次的圆周注射。在一些实施方案中,27-、28-、29-或30-规格针可用于注射脚膈肌。

[0469] 在一些实施方案中,治疗GERD的方法可包括以约0.05mL至约0.15mL的体积施用(如,肌肉注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的脚膈肌。在一些实施方案中,脚膈肌可用至少约0.05mL治疗性组合物注射。在一些实施方案中,脚膈肌可用至多约0.15mL治疗性组合物。在一些实施方案中,脚膈肌可用大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL治疗性组合物注射。

[0470] 在一些方面,施用本公开的治疗性组合物(如,以治疗GERD)的有效性可通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定。在一些情况下,测试可包括烧心特异性生活质量(Heartburn Specific Quality of Life,HBQQL)调查表、GERD健康相关生活质量(GERD Health-Related Quality of Life,GERD-HRQL)调查表或两者。在一些情况下,测试可包括使用内窥镜超声监测脚膈肌厚度增加。

[0471] G. 治疗阻塞性睡眠呼吸暂停的方法

[0472] 阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)、窒息或呼吸不足的特征是在睡眠过程中上呼吸道完全或部分阻塞的反复发作。上呼吸道分为三个区域:鼻咽、口咽和下咽。口咽细分为腭后区(从硬腭的后边缘到软腭的尾边缘)和舌后区(从软腭的尾边缘到会厌底部)。大多数OSA患者在腭后区、舌后区或两者中有上呼吸道狭窄。

[0473] 咽呼吸道周围的骨骼肌在吸气期间被阶段性地激活,这可有助于扩张呼吸道并使呼吸道壁变硬。咽肌有助于调节软腭、舌头、舌骨装置和后外侧咽壁的位置。腭肌内特定肌肉的收缩打开了腭后区中的呼吸道。与单独激活时相反,一致激活时咽肌可具有不同的作用。前咽壁诸如颏舌骨和胸骨舌骨中的肌肉共激活作用于舌骨,以使其腹侧移动。腭帆张肌腹侧移动软腭。颏舌肌用于使舌头腹侧位移。舌头的外在肌肉由颏舌肌、舌骨舌肌和茎突舌肌组成,并且对舌头的伸出和缩回很重要。颏舌肌是舌头的主要突出肌,其收缩在保持咽呼吸道开放方面起着重要作用,主要是通过在前-后维度上扩大口咽。在吸气期间,咽肌的瞩目目标是保持呼吸道开放,以允许空气流入和流出肺脏。

[0474] 在健康个体中,咽肌能够充分补偿呼吸道阻力的增加,以维持呼吸道通畅。然而,由于肥胖或阻塞呼吸道的骨性结构而具有上呼吸道狭窄的个体在睡眠期间的咽塌陷风险增加。OSA的特征是睡眠期间上呼吸道易塌陷性增加,这导致气流减少(呼吸不足)或气流阻塞(窒息),从而导致间歇性缺氧。上呼吸道可塌陷,因为扩张肌可能无法维持呼吸周期的各个部分的通畅。颏舌肌是主要的上呼吸道扩张肌。在OSA患者中,颏舌肌在结构和功能性方

面已显示出异常。这些上呼吸道扩张肌衰竭的一种潜在机制是疲劳。疲劳是在负荷下的肌肉活动所引起的发展力量的肌肉能力的丧失,并在休息后可逆。在OSA中,上呼吸道扩张性肌肉在每次阻塞性窒息结束时反复经受强力收缩,这可能每晚发生数百次。在OSA夜间的后期,阻塞性窒息的频率和持续时间更长,这可能暗示颏舌肌疲劳是一个促成因素。

[0475] 鉴于上呼吸道肌在保持通畅中的重要性,降低的肌肉功能可能有助于咽闭合。为了适应增加的收缩需求,骨骼肌纤维表型可能会从抗氧化的慢颤搐抗疲劳I型转变为糖酵解的快颤搐II型,这产生增加的力,但更容易疲劳。快颤搐肌肉纤维疲劳比慢颤搐纤维更快速。快颤搐纤维的增加将有望提高上呼吸道肌的疲劳能力,使呼吸道容易塌陷,并在夜间重复激活后随着疲劳水平的提高而导致越来越严重的发作循环。尽管颏舌肌只是协同作用以防止咽部流量受限的众多肌肉之一,但当充分激活以获得最佳的舌头前移时,其可大大改善咽通畅性。

[0476] 上呼吸道肌张力和力量的减少可能是OSA病因的关键因素之一。这些肌肉可包括颏舌肌和腭帆张肌。在一些情况下,提高这些肌肉的力量可改善上呼吸道通畅性,并减轻OSA症状。此外,可能导致上呼吸道通畅的其他上呼吸道肌可包括下颌舌骨肌。单独或组合地靶向这些肌肉,可以改善上呼吸道通畅性,以治疗OSA。尽管许多因素可能导致OSA,但上呼吸道的可塌陷性和解剖结构在OSA发病中至关重要。因此,上上呼吸道咽肌无力的OSA患者可能是该疗法的潜在靶标。

[0477] 持续正气道压(CPAP)是中度至重度OSA的标准治疗。然而,睡眠期间CPAP所需的鼻罩会导致不良的接受度和依从率。口腔矫治器(OA)疗法也广泛用于中度和重度OSA的治疗。这些由上颌和下颌夹板组成,它们在睡眠过程中将下颌保持向前。然而,OA的功效不如CPAP。上呼吸道刺激通过单侧刺激舌下神经来增强咽肌的神经驱动。这种方法的主要局限性是植入设备的风险手术程序、较高的前期成本和可变的响应。已经提出了许多手术方法,如舌根的RF消融、颏舌肌前移、舌骨悬吊、上下颌前移和舌根悬吊。与任何手术干预一样,这些方法也存在手术并发症风险和高昂的前期成本。此外,已经提出了基于多种机制的药物疗法,但收效甚微。这些包括上呼吸道扩张肌结实度增加、通气驱动力增加、快速眼动(REM)睡眠比例减少、睡眠期间胆碱能级紧张性增加、唤醒阈值增加、呼吸道阻力降低和上呼吸道表面张力降低。

[0478] OSA具有多种病理生理原因,包括解剖学上受损或可塌陷的上呼吸道、睡眠期间上呼吸道扩张肌的响应不足(EMG活性对负咽压的最小增加)、过早地醒来至气道狭窄(低呼吸唤醒阈值),或具有过度敏感的通气控制系统。因此,有效的治疗可需要治疗OSA的主要原因或治疗组合原因。

[0479] 在一些方面,提供了用于治疗阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)的方法。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE₂化合物和/或肌肉毒素)给患有OSA、疑似患有OSA或处于发展OSA的风险的受试者。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物给患有呼吸不足、疑似患有呼吸不足或处于发展呼吸不足的风险的受试者。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物给患有窒息、疑似患有窒息或处于发展窒息的风险的受试者。在一些情况下,该方法可包括施用本公开的治疗性组合物给受试者以补充或增强另外疗法或干预的功效以治疗OSA。

[0480] 在一些实施方案中,治疗性组合物可通过诱导受试者的上呼吸道肌中的肌肉再生

来治疗阻塞性睡眠呼吸暂停、呼吸不足、窒息或其组合。在一些情况下,上呼吸道肌包括颏舌肌。在一些情况下,上呼吸道肌包括腭帆张肌。在一些情况下,上呼吸道肌包括下颌舌骨肌。在一些情况下,OSA、呼吸不足或窒息可通过施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给上呼吸道肌(如,颏舌肌、腭帆张肌、下颌舌骨肌或其任何组合)来治疗。

[0481] 在一些实施方案中,治疗OSA、呼吸不足或窒息的方法可包括通过局部施用、皮内施用、肌肉施用或其组合施用本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)给有需要的受试者。在一些情况下,治疗性组合物可通过肌肉施用来施用。在一些情况下,肌肉施用可包括注射上呼吸道肌。上呼吸道肌可包括颏舌肌、腭帆张肌、下颌舌骨肌或其组合。在一些情况下,可施用麻醉剂给上呼吸道,之后注射治疗性组合物。在一些情况下,上呼吸道肌可在手术暴露的情况下注射;在其他的情况下,上呼吸道肌可在无手术暴露的情况下注射。在一些情况下,改变上呼吸道的解剖学的手术程序可通过增加上呼吸道肌的力量(如,通过施用本公开的治疗性组合物给上呼吸道肌)来增强。在一些实施方案中,27-、28-、29-或30-规格针可用于注射上呼吸道肌。

[0482] 在一些实施方案中,治疗OSA、呼吸不足、窒息或其组合的方法可包括以约0.01mL至约0.15mL的体积施用(如,肌肉注射)本公开的治疗性组合物给有需要的受试者的上呼吸道肌。在一些实施方案中,上呼吸道肌可注射有至少约0.01mL的本公开的治疗性组合物。在一些实施方案中,上呼吸道肌可注射有至多约0.15mL的本公开的治疗性组合物。在一些实施方案中,上呼吸道肌可注射有大于0.01mL、大于0.02mL、大于0.03mL、大于0.04mL、大于0.05mL、大于0.06mL、大于0.07mL、大于0.08mL、大于0.09mL、大于0.10mL、大于0.11mL、大于0.12mL、大于0.13mL或大于0.14mL的本公开的治疗性组合物。

[0483] 在一些方面,施用治疗性组合物的有效性可通过在施用之前、施用之后或两者进行测试来确定。在一些情况下,测试可使用窒息/呼吸不足指数(AHI)和与OSA相关的白天嗜睡水平(由Epworth嗜睡量表(ESS)来估计)来评估OSA患者的临床益处。在一些情况下,测试可包括多导睡眠描记参数(如,AI、HI、RERAr1、Ar1、LSat)、睡眠相关的生活质量(Sleep Related Quality of Life,FOSQ)和反应时间测试(Reaction Time Testing,PVT)。

[0484] 在一些实施方案中,治疗性组合物的剂量可在确定在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可增加。在其他的情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可减少。在一些情况下,PGE2化合物、肌肉毒素或两者的剂量可不变。在一些实施方案中,本公开的治疗性组合物(如,包含PGE2化合物和/或肌肉毒素)的施用频率可在确定治疗性组合物的在先施用的有效性之后调整。在一些情况下,可需要仅单次施用治疗性组合物以治疗OSA、呼吸不足或窒息。在一些情况下,可需要两次、三次、四次、五次或多于五次施用治疗性组合物以治疗OSA、呼吸不足或窒息。在一些情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后增加。在其他的情况下,施用频率可在确定在先施用的有效性之后减少。

[0485] H. 试剂盒

[0486] 在本发明的又一方面,本文提供了用于在有需要的受试者中促进肌肉再生和/或增加肌肉质量或用于在有需要的受试者中预防或治疗肌肉疾患的试剂盒。在一些实施方案中,该试剂盒包括包含PGE2化合物(如,PGE2受体激动剂)和肌肉毒素的组合的本文所述的

组合物。在其他实施方案中,该试剂盒包括本文所述的药物组合物。该试剂盒通常含有可以由多种材料(诸如玻璃或塑料)制成的容器,并且可以包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。标签通常附在试剂盒上,并包括任何书面或记录的材料,这些材料可以是提供说明书或其他用于试剂盒内容物的信息的电子或计算机可读形式。

[0487] 本发明的试剂盒可适用于治疗任何数量的肌肉疾患,包括但不限于与肌肉破损、损伤或萎缩相关的肌肉疾患。该试剂盒还可用于促进有需要的受试者中的肌肉再生和/或增加肌肉质量。适用于用本发明的试剂盒预防或治疗的疾患的非限制性实例包括创伤性损伤(如,急性肌肉创伤、急性神经创伤)、急性肌肉损伤、急性神经损伤、慢性神经损伤、软组织手损伤、腕管综合征(CTS)、杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、肢节肌营养不良、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、远端肌营养不良(DD)、遗传学肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性瘫痪、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌症恶病质、AIDS恶病质、心脏恶病质、应激诱导的尿失禁、肌肉减少症、脊髓性肌肉萎缩、肛门括约肌功能障碍、贝尔氏麻痹、肩袖损伤、脊髓损伤、髋关节置换、膝关节置换、腕骨折、糖尿病性神经病变、胃食管反流病(GERD)、阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)、骨盆底病症(如,应激性尿失禁、过度活跃的膀胱/尿急迫性失禁、混合性尿失禁、盆腔器官脱垂、大便失禁)、肌肉骨骼病症(如,受损的手功能、受损的拇指功能、受损的足功能)、足底筋膜炎、足下垂、废用诱导的肌肉萎缩、受损的眼睑功能(如,眼睑下垂、眨眼受损、睑内翻、睑外翻)、斜视、眼球震颤、老花眼。适用于用本发明的试剂盒预防或治疗的疾患的另外实例可包括可用定位移植少量细胞来再生的影响经分离的小肌肉的肌肉病症,包括:神经损伤或直接创伤之后面部或手中的萎缩和肌肉功能障碍,其在神经再支配之后不恢复;眼外肌损伤,导致格雷夫斯氏病中所见的不能移动眼睛和复视;创伤性损伤;渐进性外眼肌麻痹;和尿失禁和大便失禁。

[0488] 在一些实施方案中,该试剂盒还包括经分离的肌细胞。在其他实施方案中,该试剂盒还包括使用说明书(如,给试剂盒使用者)。在一些实施方案中,该试剂盒还包括用于例如施用本发明的组合物和/或药物组合物、施用经分离的肌细胞(如,给有需要的受试者)或其组合的一种或多种试剂和/或一种或多种设备(如,递送设备)。

[0489] IV. 实施例

[0490] 将通过具体实施例更详细地描述本发明。提供以下实施例仅用于说明性目的,并不旨在以任何方式限制本发明。

[0491] 实施例1:在年老小鼠中急性前列腺素E2递送增强了骨骼肌肉再生和力量。

[0492] 本实施例说明,肌肉干细胞功能在再生期间需要PGE2信号传导。

[0493] 老年人遭受进行性的骨骼肌耗损和再生衰竭,这降低了活动度和生活质量。对肌肉再生至关重要是成年肌肉干细胞(MuSC),它一生位于肌肉组织内的小生境中、保持对损伤作出响应和修复骨骼肌。老化期间,功能性MuSC的比例明显下降,阻碍了肌肉再生。迄今为止,临床使用中还没有靶向MuSC以对抗这种再生下降的治疗剂。在这里,我们鉴定了天然的免疫调节剂,前列腺素E2(PGE2),作为肌肉再生所必需的MuSC功能的有效调节剂。我们发现PGE2受体EP4对MuSC体外增殖和体内植入小鼠至关重要。在年老小鼠的MuSC中,由于细胞固有的分子缺陷,使得PGE2失活的前列腺素降解酶(15-PGDH)升高,导致PGE2途径失调。通过将MuSC短暂地急性暴露于稳定的降解抗性PGE2即16,16-二甲基PGE2(dmPGE2),以及同

时将MuSC移植到受伤的肌肉中,来克服这一缺陷。值得注意的是,单次肌肉注射单独的dmPGE2就足以加速再生,这在损伤后内源性MuSC数量和肌纤维大小的早期增加中显而易见。此外,年老小鼠肌力产生能力响应于练习诱导的再生和急性dmPGE2治疗方案而增加。我们的发现揭示了PGE2的一种新型治疗指征作为肌肉再生和力量的有效诱导剂。

[0494] 为了应对肌肉再生潜能的下降,我们寻求了靶向MuSC的治疗剂,也被称为卫星细胞,是专门用于肌肉再生的干细胞群。由于短暂的炎性响应和纤维脂肪生成响应在肌肉再生中起着至关重要的作用,因此我们试图鉴定由损伤诱导的炎性调节剂,其可以克服与年龄相关的MuSC功能下降。对我们转录组数据库的分析表明,一种在急性炎症期间天然有效的脂质介体PGE2的Ptger4受体在新鲜分离的MuSC上以高水平表达。在肌肉组织裂解物中,我们通过必需虎蛇毒素注射或冷冻损伤的标准损伤范例对年幼(2-4个月)小鼠肌肉的损伤之后三天PGE2水平激增(图2A和6A),和其合成酶Ptges和Ptges2随之上调(图2B)。这个早期和短暂的时间窗口与充分证实的损伤后MuSC扩增和炎性细胞因子累积的动力学相吻合。为了确定PGE2处理是否能增强MuSC行为,我们从年幼小鼠(2-4个月)的后肢肌中提取出FACS-纯化的MuSC,并将其涂铺在12kpa硬度的水凝胶上,以维持干细胞功能。我们发现,PGE2(10ng/ml)增加了通过EDU掺入测定的细胞分裂(图2B-2D),并且一周后急性1天暴露于PGE2诱导了MuSC数量相对于对照增加6倍(图2C)。

[0495] 已知PGE2通过四个G蛋白偶联的受体(Ptger1-4;EP1-4)进行信号传导,但是这些受体在MuSC中的表达以前没有被描述。对不同受体(Ptger1-4)的转录物水平的分析揭示了,PGE2处理MuSC后上调的唯一受体是Ptger1和Ptger4(图6E)。受PGE2刺激的MuSC使细胞内cAMP升高,证实PGE2通过EP4进行信号传导以促进增殖和干细胞转录状态(图6F-6H)。在存在EP4拮抗剂ONO-AE3-208的情况下,由PGE2诱导的增殖减弱(图2D)。然而,在cre-介导的条件消融后缺乏受体的MuSC中,最清楚地显示了PGE2对EP4的特异性(图2E-2G和6I-6J)。实际上,即使存在富含生长因子的培养基,这些EP4无效的MuSC仍无法增殖。最后,我们发现因暴露于带有木炭剥离血清的培养基而停止的MuSC生长在添加PGE2后分裂(图2H和6K)。因此,对于MuSC繁殖,PGE2/EP4凸显出是必要和充分的。

[0496] 我们试图确定PGE2是否可以改善以前针对年老MuSC报道的肌肉再生缺陷。与年幼鼠肌肉(2-4个月)相反,虎蛇毒素对年老肌肉(18-20个月)的损害并未导致PGE2合成增加。相反,年老肌肉中稳态PGE2水平在损害后保持不变(图3A),并且显著高于年幼肢胫前肌(TA)肌肉(图3B)。我们假设,由于分解代谢缺陷,年老肌肉中的PGE2可能是功能异常的。确实,当我们通过质谱分析存在于年幼和年老TA肌肉组织中的PGE2时,我们发现非活性形式13,14-二氢-15-酮PGE2(PGEM)的相对量在年老中显著增加(图3C-3D和7A-7C)。这证明是由于编码PGE2降解酶(15-PGDH)的mRNA水平相应增加了7倍,这是将PGE2转化为其非活性形式的初始步骤(图3E)。相比之下,在年幼和年老的MuSC之间,前列腺素转运蛋白(PGT)、PGE2合成酶和EP4受体的相对水平没有差异(图8A-8C)。另外,当年老MuSC暴露于PGE2的1天脉冲或15-PGDH的抑制剂(SW033291)时,克服了15-PGDH的作用,并观察到Pax7表达的增殖和维持的特征性增加(图3F和8D)。像年幼一样,年老MuSC不能在由木炭剥离的血清组成的培养基中增殖,但通过添加单独PGE2就得以拯救(图3G)。我们推测,在年老MuSC中,由于细胞固有的分子缺陷升高的15-PGDH而使PGE2途径失调,而升高的15-PGDH可以通过急性暴露于PGE2或SW来克服(图3H)。

[0497] 由于年老MuSC是异质的,因此我们试图确定PGE2在单细胞水平上的作用。克隆分析可以揭示将群体作为总体进行分析所掩盖的差异。因此,我们在短暂暴露于PGE2 1天的单个年老MuSC和未处理的对照MuSC的水凝胶‘微孔’中进行了长期延时显微术。在48小时时间段内收集数据,然后使用我们先前描述的用于细胞跟踪和谱系重建的Baxter算法(Baxter Algorithms for Cell Tracking and Lineage Reconstruction)进行分析。我们观察到响应PGE2的累积细胞数量显著增加,其中最稳健的克隆跨越6代(图3I-3J)。由于增殖显著增加(图3I-3J和8E-8F),同时伴随着细胞死亡显著减少(图3J和8E-8G),PGE2处理后每个克隆的细胞数大大增加。这些协同作用导致观察到年老MuSC数响应于PGE2而增加。

[0498] 为了测试用PGE2短暂治疗年幼MuSC是否增强再生,我们将培养的经PGE2处理的MuSC移植到小鼠受伤的后肢肌肉中。为了以定量方式在体内监测随时间变化的再生动力学,我们利用了先前为监测移植后MuSC功能开发的灵敏和定量的生物发光成像(BLI)测定。将MuSC从表达GFP和荧光素酶的年幼转基因小鼠(2-4个月)(GFP/Luc小鼠)中分离,暴露于急性1天PGE2处理,在第7天收获并移植。将等量的dmPGE2处理和对照MuSC(250个细胞)移植到年幼(2-4个月)NOD-SCID小鼠的受伤后肢中。用PGE2进行急性处理后,当通过BLI评估时,年幼MuSC再生能力提高了一个数量级(图4A)。相比之下,移植了多4倍数量的由于条件消融而缺乏EP4受体的培养的MuSC(图4B)之后,最初检测到的BLI信号逐渐下降至低于显著性阈值的水平(图4B)。

[0499] 此外,当在肌肉干细胞特异性缺失EP4的小鼠模型($Pax7^{CreERT2};EP4^{f1/f1}$)中进行虎蛇毒素损伤(图10A-10B)时,肌肉再生受损,如通过胚胎肌球蛋白重链(eMHC)阳性纤维数量增加观察到(图10C-10D)。这伴随着在再生时间点(第21天)结束时评估的 $Pax7^{CreERT2};EP4^{f1/f1}$ 组中小鼠纤维的横截面积减少(图10E)。在损伤后第14天也检测到力输出(强直)显著降低(图10F-10G)。因此,体内MuSC再生需要经由EP4受体进行的PGE2信号传导。

[0500] 为了测试在没有培养基的情况下直接注射PGE2是否可以有效地促进体内再生,我们将PGE2与新鲜分离的MuSC一起共注射。对于所有后续的体内注射实验,我们使用了经修饰的更稳定形式的PGE2,即16,16-二甲基PGE2(dmPGE2)。我们假设,对于年老MuSC实验,经修饰的15-PGDH-抗性dmPGE2的递送尤为重要,因为在年老MuSC中15-PGDH明显升高(图3E)。使用dmPGE2,我们观察到相对于对照,年幼和年老MuSC的植入显著增强,其响应于虎蛇毒素损伤(一种公认的严格干细胞功能测试)而进一步增加(图4C-4D)。因此,dmPGE2的与MuSC细胞群一起递送足以增强再生。

[0501] 我们推测单独的PGE2的递送可以刺激肌肉再生。为了测试这一点,用心脏毒素损伤了年幼小鼠的肌肉,并且三天后,将团注的dmPGE2注射至年幼小鼠的后肢肌肉中。我们观察到损伤后14天,基底膜下和肌纤维上的经典卫星细胞小生境中内源性PAX7-表达MuSC增加($60 \pm 15\%$)(图5A-5B),而在没有损伤的情况下dmPGE2没有作用。此外,在这个早期时间点,使用用于肌纤维分析的Baxter算法进行的横截面积所评估的,肌纤维的分布向较大的尺寸转移,表明PGE2加速了再生(图5C-5D和9A-9B)。此外,我们通过使用转基因小鼠模型 $Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc$ (图5E)的荧光素酶表达追踪了内源性MuSC对损伤和dmPGE2的响应。BLI数据与组织学数据一致(图5F-5G)。

[0502] 我们测试了注射吲哚美辛(一种非甾体类抗炎药(NSAID))和减少PGE2合成的COX2抑制剂对肌肉再生的作用。在心脏毒素损伤后三天,当将吲哚美辛注射到同一 $Pax7^{CreERT2};$

Rosa26-LSL-Luc小鼠模型的后肢肌肉中后,我们观察到荧光素酶活性显著降低,表明肌肉干细胞激活和再生(图11A-11B)。与在损伤后第14天评估的对照组相比,将吲哚美辛注射到心脏毒素-损伤的肌肉中也导致颤搐力的明显降低(图11C)。在年老小鼠中,我们还检测到,单次dmPGE2注射后损伤后14天,内源性MuSC的数量显著增加($24 \pm 2\%$)(图5H-5I),并且同时肌纤维尺寸随之增加(图5J-5K)。因此,仅暴露于dmPGE2影响了内源性修复的幅度和时程。

[0503] 作为最终测试,我们确定了dmPGE2增强的再生能否在下坡跑步机跑步诱导的自然损害后导致肌肉力量增加。在这种情况下,损害是由在20度下降的下坡跑步机上每天跑10分钟引起的。在第一周期间,处理组中的年老小鼠连续跑了5天,并且在练习后每天注射dmPGE2。在第二周期间,处理组中的年老小鼠连续跑了5天,但在练习后没有接受另外的治疗(图5L)。比较了dmPGE2处理和未处理的腓肠肌小鼠肌肉(GA)的比颤搐力和比强直力,并且两者均明显增加(图5M-5P)。因此,急性暴露于dmPGE2并伴随练习-诱导的损伤可以使年老肌肉力量显著增加。

[0504] 我们发现了骨骼肌再生中PGE2的新适应证。先前对PGE2对骨骼肌的影响的研究表明,它改变了组织培养物中成肌细胞的增殖、融合、蛋白质降解和分化。因此,这些研究与我们的研究不同,因为成肌细胞是失去干细胞功能的祖细胞。卫星细胞(MuSC)对发育和再生至关重要,并通过在年幼和年老的小鼠和人类中奔跑或进行其他高强度练习,它们的数量会增加。据报道,非甾体类抗炎药减少了练习诱导的MuSC增加。我们的数据提供了新的证据,证明有效的肌肉再生所特有的炎症早期瞬态波动的有益作用部分归因于对于MuSC增殖和植入是必需且足够的PGE2及其受体EP4。对于造血、肝脏和结肠组织,最近显示15-PGDH抑制剂SW033291的递送增强了再生。值得注意的是,PGE2及其类似物已在人患者中安全使用了数十年,例如以引产并促进造血干细胞移植,从而为其在损伤后恢复肌肉中的临床应用铺平了道路。总而言之,我们的研究结果表明,急性PGE2方案足以快速且稳健地增强练习诱导的损害的再生,并克服年龄相关的局限性,从而导致力量增加。

[0505] 小鼠:我们按照斯坦福大学(Stanford University)和实验室动物护理行政小组(Administrative Panel on Laboratory Animal Care, APLAC)的机构指南进行了所有实验和方案。我们从美国国家老化研究所(S National Institute on Aging, NIA)获得了用于年老肌肉研究的野生型年老C57BL/6(18-20个月)小鼠,并从杰克逊实验室(Jackson Laboratory)获得了年幼野生型C57BL/6小鼠。如前¹所述生成了双转基因GFP/luc小鼠。简而言之,将在泛Actb启动子的调控下表达萤火虫荧光素酶(luc)转基因的小鼠维持在FVB菌株中。将在泛UBC启动子的调控下表达绿色荧光蛋白(GFP)转基因的小鼠维持在C57BL/6菌株中。我们将来自GFP/luc的细胞用于同种异体移植实验到NOD-SCID(Jackson Laboratory)接受者小鼠中。EP4^{flox/flox}(EP4^{f/f})小鼠是来自K. Andreasson(Stanford University)的友情馈赠²。双-转基因Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc通过杂交获自Jackson Laboratory (Stock#017763)³的Pax7^{CreERT2}小鼠和获自Jackson Laboratory (Stock#005125)⁴的Rosa26-LSL-Luc生成。我们通过适当的基于PCR的策略验证了这些基因型。来自转基因菌株的所有小鼠均为幼龄的。所有菌株的年幼小鼠年龄为2-4个月("mo"),并且年老小鼠年龄为18-20个月。这些研究中使用的所有小鼠均为雌性。

[0506] 肌肉干细胞分离:如前所述^{1,5,6},我们分离并富集了肌肉干细胞。简而言之,通过

MACs Dissociator进行的温和的胶原酶消化和切碎可以使许多单纤维解离,然后进行分散酶消化,以从其小生境中释放单核细胞。随后,使用磁珠柱(Miltenyi)耗竭细胞混合物中的造血谱系表达和非肌肉细胞(CD45⁻/CD11b⁻/CD31⁻)。然后使剩余的细胞混合物进行FACS分析,以分选共表达CD34和a7-整合素标记的MuSC。我们使用FlowJo v10.0生成并分析了流式细胞术散点图。对于每种类型,我们将来自至少三只独立供体雌性小鼠的MuSC(每个~5,000个)汇集在一起。

[0507] 肌肉干细胞移植:如前所述^{1,5,6},我们在FACS分离后或从细胞培养物收集后立即将250个MuSC(图4A、4C和4D)或1,000个MuSC(图4B)直接移植到接受者小鼠的胫前肌(TA)肌肉中。对于年幼MuSC研究,我们将来自GFP/luc小鼠(2-4月龄)的细胞移植到后肢-辐照的NOD-SCID小鼠中。如前所述⁵,对于年老MuSC研究,我们移植了在移植前在培养的第2天用luc-IRES-GFP慢病毒(GFP/luc病毒)转导持续24小时的时间段的来自年老C57BL/6小鼠(18-20个月,NIH)的细胞(细节参见下文“肌肉干细胞培养、处理和慢病毒感染”部分)。在移植肌肉干细胞之前,我们通过腹膜内注射用氯胺酮(每只小鼠2.4mg)麻醉NOD-SCID接受者小鼠。然后,我们以18Gy的单剂量辐照后肢,身体的其余部分用铅夹具屏蔽。我们在辐照的2d内进行了移植。

[0508] 按指示处理培养的细胞(媒介物或PGE2处理10ng/ml),并在37℃下通过与0.5%胰蛋白酶的PBS溶液孵育2分钟来从水凝胶培养物中收集,并使用血细胞计数仪计数。我们将细胞以所需的细胞浓度重悬于0.1%明胶/PBS中,然后通过肌肉注射将它们(250MuSC/TA)以10μl体积移植到TA肌肉中。对于新鲜的MuSC移植,我们将分选的细胞与13nmol的16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)(Tocris,目录号4027)或媒介物对照(PBS)共注射。我们通过移植到同一只小鼠对侧腿的TA肌肉中比较了来自不同条件下的细胞。移植后一个月,我们注射了10μl虎蛇毒素(10μg ml⁻¹;Latoxan,France),以损伤接受者肌肉并在体内激活MuSC。移植后八周,对小鼠实施安乐死并收集TA进行分析。

[0509] 生物发光成像:如前所述^{1,5,6},我们使用Xenogen-100系统进行了生物发光成像(BLI)。简而言之,我们使用异氟烷吸入麻醉小鼠,并通过腹膜内注射施用120μL D-荧光素(0.1mmol kg⁻¹,于PBS中复溶;Caliper LifeSciences)。我们在荧光素注射后5分钟在F-终止=1.0下使用60秒暴露获取了BLI。使用Living Image软件(Caliper LifeSciences)记录和分析数字图像。我们分析了在每个后肢上方放置的一致目标区域(ROI)的图像,以计算生物发光信号。我们计算了以辐射度(ps⁻¹cm⁻²sr⁻¹)值计的为10⁴的生物发光信号,以定义植入物阈值。10⁴的辐射度阈值大约等于先前报告的以p/s计的总通量阈值。该BLI阈值对应于一种或多种GFP+肌纤维的组织学检测^{1,5,6}。我们在移植后每周进行BLI成像。

[0510] 肌肉损伤:我们使用了必需肌肉注射10μl虎蛇毒素(10μg ml⁻¹;Latoxan)或心脏毒素(10μM;Latoxan)到TA肌肉中的损伤模型。对于冷冻损伤,在TA肌肉上方的皮肤上制造了一个切口,并将在液氮中冷却的铜探针以三个10s间隔施加至TA肌肉,使肌肉在每次施加冷冻探针之间解冻。当指示时,在损伤后48小时,将16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)(13nmol,Tocris,目录号4027)或媒介物对照(PBS)注射到TA肌肉中。将对侧TA用作内部对照。我们在受伤后14天收集了组织进行分析。

[0511] 对于Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠实验,我们用连续五次每天腹膜内注射他莫昔芬处理小鼠,以激活在Pax7启动子的控制下的荧光素酶表达。在最后一次他莫昔芬注射

后一周,使小鼠经受10 μ l心脏毒素(10 μ M;Latoxan)的肌内注射,我们将其指定为测定的第0天。三天后,将13nmol dmPGE2(13nmol)或媒介物对照(PBS)注射至TA肌肉中。对侧TA用作内部对照。在损伤后第3、7、10和14天测定生物发光。

[0512] 组织组织学:如先前所述^{5,6},我们收集并制备了接受者TA肌肉组织用于组织学。我们用抗层粘连蛋白(Millipore,克隆A5,目录号05-206,1:200)和抗PAX7(Santa Cruz Biotechnology,目录号sc-81648,1:50)一级抗体孵育横切面,然后用AlexaFluor二级抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories,1:200)孵育。我们用DAPI(Invitrogen)复染细胞核。我们使用带有Plan NeoFluar 10 $\times$ /0.30NA或20 $\times$ /0.75NA物镜(Carl Zeiss)以及由SlideBook(3i)软件控制的ORCA-ER数字相机(Hamamatsu Photonics)的AxioPlan2落射荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging)获取图像。使用Adobe Photoshop裁剪图像,并对来自同一实验的所有图像进行一致的对比度调整。图像合成使用Adobe Illustrator生成。我们使用MetaMorph图像分析软件(Molecular Devices)分析了PAX7阳性细胞的数量,并使用了用于肌纤维分析的Baxter算法(其在图像中鉴定纤维并分割纤维以分析每根纤维的面积)分析了纤维面积。对于PAX7定量,我们检查了跨越至少2mm深度的TA的连续切片。对于纤维面积,如上对于每只小鼠,至少要捕获涵盖400多个肌纤维的10个视场的层粘连蛋白-染色的肌纤维横切面。数据分析是设盲的。进行成像采集和评分的研究人员并未意识到所分析样品组的处理条件。

[0513] 水凝胶制造:我们从如前所述合成的PEG前体制造了聚乙二醇(PEG)水凝胶⁶。简而言之,我们通过使用公开的制剂产生出水凝胶,以获得1mm厚度的12kPa(杨氏模量)刚度水凝胶,这是培养MuSC和维持在培养中的干细胞命运的最佳条件⁶。如前所述⁶,我们为克隆增殖实验制造了12-kPa的水凝胶微孔阵列。我们切割并粘附所有水凝胶以覆盖12孔或24孔培养板的表面积。

[0514] 肌肉干细胞培养、处理和慢病毒感染:分离后,我们将MuSC重悬在含有DMEM/F10(50:50)、15%FBS、2.5ng ml⁻¹成纤维细胞生长因子-2(FGF-2也被称为bFGF)和1%青霉素-链霉素的成肌细胞培养基中。我们以每cm²表面积500个细胞的密度接种MuSC混悬液。我们将细胞培养物保持在37 $^{\circ}$ C 5%CO₂下,并且每天更换培养基。对于PGE2、15-PGDH抑制剂和EP4受体拮抗剂治疗研究,我们添加了1-200ng/ml前列腺素E2(Cayman Chemical)(除非在图例中指定,否则使用的浓度为10ng/ml)和/或1 μ M EP4拮抗剂(ONO-AE3-208,Cayman Chemical)或1 μ M 15-PGDH抑制剂(SW033291,Cayman Chemical)至在胶原蛋白包被培养皿上培养的MuSC持续前24小时。然后将细胞用胰蛋白酶消化,并将细胞重新接种到水凝胶上再培养6天。将所有处理与其溶剂(DMSO)媒介物对照进行比较。对于剥离的血清测定,我们将经分离的MuSC重悬在含有DMEM/F10(50:50)、15%的木炭剥离的FBS(Gibco,目录号12676011)、2.5ng ml⁻¹bFGF和1%青霉素-链霉素的培养基中。当在图中指明时,我们另外将剥离的血清细胞培养基中添加1.5 μ g/ml胰岛素(Sigma,I0516)和0.25 μ M地塞米松(Sigma,D8893)。对于这些实验,在水凝胶上培养MuSC,并在每次更换培养基时(每两天)将媒介物(DMSO)或10ng/ml PGE2(Cayman Chemical)添加至培养物。在7天后测定了增殖(参见下文)。

[0515] 除非另有说明,否则我们在培养1周后进行所有MuSC培养测定和移植。对于年老MuSC移植研究,我们在培养物中用编码延伸因子-1 α 启动子驱动的luc-IRES-GFP(GFP/luc

病毒)的慢病毒感染MuSC 24小时,如前所述³。对于EP4^{f/f} MuSC研究,如上所述我们分离了MuSC(肌肉干细胞分离),并用GFP/luc病毒感染所有细胞,并将其的亚组在培养物中用编码pLM-CMV-R-Cre的慢病毒(mCherry/Cre病毒)共转染24小时。pLM-CMV-R-Cre是来自Michel Sadelain(Addgene质粒#27546)⁷的馈赠。我们移植了年老MuSC(250个细胞)或EP4^{f/f} MuSC(1,000个细胞)至年幼(2-4个月)NOD-SCID接受者小鼠的18-gy辐照的TA中。对于体外增殖测定,将EP4^{f/f} MuSC在感染后涂铺在水凝胶上并用媒介物(DMSO)或10ng/ml PGE2处理24小时,并在3天后测定增殖。使用倒置荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging)在感染后48小时测定细胞的GFP和/或mCherry表达。通过FACS从小鼠新鲜分离出MuSC,并将其培养最长一周的时间段,因此未评估支原体污染。

[0516] 增殖测定:为了测定增殖,我们使用了三种不同的测定(血细胞计数仪、VisionBlue和EdU)。对于每一种,我们将MuSC以每cm²表面积500个细胞的密度接种在平面水凝胶(血细胞计数仪和VisionBlue)或胶原蛋白包被的板(EdU测定)上。对于血细胞计数仪的细胞数计数,我们在指示的时间点通过在37℃下用0.5%胰蛋白酶在PBS中孵育细胞5分钟来收集细胞,并使用血细胞计数仪对其至少定量3次。另外,我们使用VisionBlue快速细胞存活活力荧光测定试剂盒(BioVision,目录号K303)作为培养中细胞生长的读出。简而言之,我们将MuSC与10%VisionBlue在培养基中孵育3小时,并在荧光读板仪(Infinite M1000 PRO, Tecan)上于Ex=530-570nm、Em=590-620nm下测量荧光强度。我们使用Click-iT EdU Alexa Fluor 555成像试剂盒(Life Technologies)测定了增殖。简而言之,我们在固定前将活细胞与EdU(20μM)孵育1小时,并根据制造商的指南将染色的细胞核与抗成肌素(Santa Cruz,目录号sc576,1:250)一起染色以测定分化。我们用DAPI(Invitrogen)复染细胞核。我们使用带有Plan NeoFluar 10×/0.30NA或20×/0.75NA物镜(Carl Zeiss)以及由SlideBook(3i)软件控制的ORCA-ER数码相机(Hamamatsu Photonics)的AxioPlan2落射荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging)获取图像。我们使用MetaMorph图像分析软件(Molecular Devices)对EdU阳性细胞进行了定量。数据分析是设盲的,其中进行细胞评分的研究人员没有意识到给予所分析样品组的处理条件。

[0517] 克隆肌肉干细胞增殖和命运分析:如前所述^{5,6},我们通过延时显微术测定了克隆肌肉干细胞的增殖。简而言之,我们用PGE2(Cayman Chemical)或媒介物(DMSO)处理了经分离的年老MuSC 24小时。在水凝胶上生长五天后,将细胞以cm²表面积500个细胞的密度重新接种在直径600μm的水凝胶微孔中。对于延时显微术,从开始12小时(第0天)至接种后两天,我们监测了具有单细胞的那些孔的细胞增殖,并使用具有定制的环境控制室和电动平台的PALM/AxioObserver Z1系统(Carl Zeiss MicroImaging)每3分钟以10×放大记录图像。在获取时间间隔之间,我们每隔一天更改一次培养基。我们使用用于细胞追踪和谱系重建的Baxter算法分析了延时图像顺序,以鉴定和追踪单细胞并生成谱系树^{5,6,8-10}。

[0518] 活细胞和死细胞分别基于相差边界和运动性维持或丧失以延时顺序进行区分。我们发现两种情况下的繁殖(分裂)率和死亡率随时间变化,因此,我们分别估计了第一个和第二个24小时时间间隔的比率。该值是使用⁶中描述的等式估算的,并在表1中找到。我们表示两个间隔中的增殖率 p_{24} 和 p_{48} 和相应的死亡率 d_{24} 和 d_{48} 。作为一个实例,在第二个24小时期间在处理条件中的增殖率是每小时5.38%。表1(下)显示,在第一时间间隔内,两种条件下的增殖率和死亡率相似,并且实验结束时的细胞数差异是由于第二时间间隔内的分裂率和死亡

率的差异所致的。两个时间间隔内的建模的细胞计数由下式给出：

$$[0519] \quad c(t) = \begin{cases} c_0 \exp((p_{24} - d_{24})t) & 0 \leq t \leq 24 \\ c(24) \exp((p_{48} - d_{48})(t - 24)) & 24 < t \leq 48 \end{cases}$$

[0520] 其中 c_0 是发作时的细胞数。在图8F中将建模曲线与实际细胞数一起绘制。

[0521] 表1. 估计的每小时增殖和死亡率。

[0522]		p_{24}	p_{48}	d_{24}	d_{48}
	DMSO	0.0488	0.0403	0.0045	0.0112
	E2	0.0475	0.0538	0.0067	0.0012

[0523] 数据分析是设盲的。进行成像采集和评分的研究人员并未意识到所分析样品组的治疗条件。

[0524] 定量RT-PCR: 我们使用RNeasy Micro Kit (Qiagen) 从MuSC中分离了RNA。对于肌肉样品, 我们将组织在液氮中快速冷冻, 用研钵和研棒将组织匀浆, 然后用注射器和针头研磨, 然后使用Trizol (Invitrogen) 分离RNA。我们使用SensiFAST™ cDNA合成试剂盒 (Bioline) 从每个样品的总mRNA中逆转录cDNA。我们在ABI 7900HT实时PCR系统 (Applied Biosystems) 中使用SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 或TaqMan测定 (Applied Biosystems) 对cDNA进行了RT-PCR。我们将样品在95℃下循环10分钟, 然后在95℃下进行40次循环持续15秒并在60℃下持续1分钟。为了定量相对转录物水平, 我们使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较经处理的样品和未处理的样品, 并相对于Gapdh表示结果。对于SYBR Green qRT-PCR, 我们使用以下引物序列: Gapdh, 正向5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3', 反向5'-CCCTTTTGGCTCCACCCT-3'; Hpgd, 正向5'-TCCAGTGTGATGTGGCTGAC-3', 反向5'-ATTGTTACAGCCTGCATTGT-3'; Ptges, 正向5'-GCTGTCATCACAGGCCAGA-3', 反向5'-CTCCACATCTGGGTCACTCC-3'; Ptges2, 正向5'-CTCCTACAGGAAAGTGCCCA-3', 反向5'-ACCAGGTAGGTCTTGAGGGC-3'; Ptger1, 正向5'-GTGGTGTCTGTCATCTGCT-3', 反向, 5'-CCGCTGCAGGGAGTTAGAGT-3', 和Ptger2, 正向5'-ACCTTCGCCATATGCTCCTT-3', 反向5'-GGACCGGTGGCCTAAGTATG-3'。根据制造商的说明, 使用TaqMan测定 (Applied Biosystems) 与TaqMan Universal PCR Master Mix试剂盒 (Applied Biosystems) 一起, 对样品中的Pax7、成肌素、Slco2a1 (PGT)、Ptger3和Ptger4进行定量。转录物水平相对于Gapdh水平表达。对于SYBR Green qPCR, 使用Gapdh qPCR归一化输入的cDNA样品。对于Taqman qPCR, 多重qPCR使目标信号 (FAM) 能够通过其内部Gapdh信号 (VIC) 进行单独归一化。

[0525] PGE2 ELISA: 将肌肉收获, 在含有双喹啉美辛 (5.6μg/ml) 的冰冷PBS中冲洗, 并在液氮中速冻。将冷冻的样品在液氮中粉碎。将粉末转移至含500μl裂解物缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、4mM CaCl₂、1.5% Triton X-100、蛋白酶抑制剂和微球菌核酸酶) 的Eppendorf管, 然后使用组织均质器均化。使用PGE2 ELISA试剂盒 (R&D Systems, 目录号KGE004B) 测量上清液的PGE2水平, 并相对于通过BCA测定 (BioRad) 测量的总蛋白质表示, 并表示为PGE2的ng。每个样品一式两份并且在两个独立的实验中的每一个中进行测定。

[0526] cAMP活性测定: 将MuSC用DMSO (媒介物) 或PGE2 (10ng/ml) 处理1h, 并根据制造商 (Promega) 优化的cAMP-Glo测定方案测量环状AMP水平。每种样品均一式三份和在两个独立实验中进行测定。

[0527] 流式细胞术:我们在对媒介物(DMSO)或PGE2进行了最初的急性(24小时)处理后,在水凝胶上培养7天后,将膜联蛋白V测定为MuSC凋亡的读出。我们根据制造商的方案使用了FITC膜联蛋白V凋亡检测试剂盒(Biolegend,目录号640914)。我们在使用NIH S10共享仪器授权(S10RR027431-01)购买的共享FACS设施中使用FACSDiva软件(BD Biosciences)在FACS LSR II细胞仪上分析了膜联蛋白V的细胞。

[0528] 质谱-分析物:所有前列腺素标准品-PGF2 α ;PGE2;PGD2;15-酮基GE2;13,14-二氢15-酮基PGE2;PGE2-D4;和PGF2 α -D9-购自Cayman Chemical。对于PGE2-D4内标,将位置3和4用总共四个氘原子标记。对于PGF2 α -D9,位置17、18、19和20用总共九个氘原子标记。

[0529] 校准曲线制备:在DMSO中制备分析物原液(5mg/mL)。将这些原液用乙腈/水(1:1v/v)进行连续稀释,以获得一系列标准工作溶液,这些标准工作溶液用于生成校准曲线。通过将10 μ L每种标准工作溶液加标到200 μ L均质缓冲液(丙酮/水1:1v/v;0.005% BHT以防止氧化)中,然后添加10 μ L内标溶液(3000ng/mL,每种PGF2 α -D9和PGE2-D4),制得校正曲线。用每组样品新鲜制备校准曲线。校准曲线范围:对于PGE2和13,14-二氢15-酮基PGE2,从0.05ng/mL至500ng/mL;对于PGD2和PGF2 α ,从0.1ng/mL至500ng/mL;和对于15-酮基PGE2,从0.025ng/mL至500ng/mL。

[0530] 提取程序:该提取程序是从Prasain等人¹¹的提取程序修改而来的,并且包括丙酮蛋白沉淀,然后进行两步液-液提取;后者增强了LC-MS/MS灵敏度。丁基化羟基甲苯(BHT)和在氮气(N₂)气体下蒸发用于防止氧化。

[0531] 收获固体组织,称重,并用液氮速冻。将肌肉组织与均质珠和200 μ L均质缓冲液在聚丙烯管中合并,并在FastPrep 24均质器(MP Biomedicals)中以6m/s的速度处理40秒。均质后,将10 μ L内标溶液(3000ng/mL)加入组织匀浆,然后进行超声处理并振摇10分钟。离心样品,并将上清液转移至干净的eppendorf管。将200 μ L己烷添加至样品,然后振摇15分钟,然后离心。将样品在-80℃下冷冻40分钟。从冷冻的下部水层中倾倒出己烷层,并丢弃。解冻后,向底部水层中添加25 μ L 1N甲酸,并将样品涡旋。对于第二提取,将200 μ L氯仿添加至水相。振摇样品15分钟以确保完全提取。进行离心分离各层。将氯仿下层转移到新的eppendorf管,并在40℃在氮气下蒸发至干。将无水残余物复溶于100 μ L乙腈/10mM乙酸铵(2:8v/v)中,并通过LC-MS/MS分析。

[0532] LC-MS/MS:由于许多前列腺素是具有相同质量的位置异构体且具有相似片段化图,所以色谱分离至关重要。为每种分析物精心选择了两个SRM转变-一个定量和一个定性。不同的定性离子强度比和滞留时间对认证目标分析物至关重要。所有分析均通过负电喷雾LC-MS/MS使用LC-20AD_{XR} Prominence液相色谱和8030三重四极杆质谱仪(Shimadzu)进行。HPLC条件:Acquity UPLC BEH C18 2.1x100mm,1.7 μ m粒径柱在50℃下以0.25mL/min的流速运行。流动相由A:0.1%乙酸于水中和B:0.1%乙酸于乙腈中组成。洗脱曲线:最初在35%B下保持5分钟,然后在3分钟内梯度35%-40%,然后在3分钟内梯度40%-95%;总运行时间为14分钟。注射体积为20 μ L。使用这些HPLC条件,我们实现了目标分析物的基线分离。

[0533] 所选反应监测(SRM)用于定量。质量转变如下:PGD2:m/z 351.10 $\rightarrow$ m/z 315.15(定量)和m/z 351.10 $\rightarrow$ m/z 233.05(定质);PGE2:m/z 351.10 $\rightarrow$ m/z 271.25(定量)和m/z 351.10 $\rightarrow$ m/z 315.20(定质);PGF2 α :m/z 353.10 $\rightarrow$ m/z 309.20(定量)和m/z 353.10 $\rightarrow$ m/z 193.20(定质);15酮基-PGE2:m/z 349.30 $\rightarrow$ m/z 331.20(定量)和m/z 349.30 $\rightarrow$ m/z 113.00

(定质);13,14-二氢15-酮基PGE2:m/z 351.20→m/z 333.30(定量)和m/z 351.20→m/z 113.05(定质);PGE2-D4:m/z 355.40→m/z 275.20;和PGF2 α -D9:m/z 362.20→m/z 318.30。停留时间为20-30ms。

[0534] 使用LabSolutions LCMS(Shimadzu)进行定量分析。使用内标方法进行定量:使用PGE2-D4作为内标进行PGE2、15-酮基PGE2和13,14-二氢15-酮基PGE2定量。PGF2 α -D9是用于定量PGD2和PGF2 α 的内标。使用 $1/X^2$ 的权重因子,校准曲线在浓度范围内为线性的($R>0.99$),其中X为浓度。反算的标准浓度为标称值的 $\pm 15\%$,和在定量下限(LL0Q)的 $\pm 20\%$ 。

[0535] 体内肌力测量:使年老小鼠(18个月)连续2周经受下坡跑步机跑步。在第1周期间,小鼠每天跑步一次,持续5天,并且在第6和第7天休息。在第1周期间,在每次跑步机跑步后两个小时,将来自每只小鼠的双腿的每种(外侧和内侧)腓肠肌(GA)肌肉注射了一定剂量的PBS(媒介物对照)或13nM dmPGE2(实验组)。在第2周期间,仅对小鼠进行了5天的跑步机跑步。跑步机跑步使用Exer3/6(Columbus Instruments)进行。小鼠在下坡20度的跑步机上以7米/分钟的速度开始跑了10分钟。3分钟后,速度以1米/分钟的速度增加到14米/分钟的最终速度。选择10分钟跑步时间,因为在12分钟的中值下,在独立对照年老小鼠组中观察到定义为尽管有电刺激动物仍无法在跑步机上停留的疲劳。根据先前公开的方案⁵,在第5周对GA肌肉进行力测量。简要地,对于每只小鼠,产生切口以暴露出GA。我们割下了具有完整的跟腱的跟骨骨,并将腱-骨复合体用薄金属钩附接至300C-LR力传感器(Aurora Scientific)。通过定期用盐水(0.9%氯化钠)溶液润湿,使肌肉和肌腱保持湿润。通过金属夹将下肢固定在膝下方,而不会损害腿部的血液供应。在整个力测量期间将小鼠置于吸入麻醉剂(2%异氟烷)下,并通过加热灯维持体温。在所有测量中,我们在预定的超最大刺激电压下使用了0.1-ms脉冲。使用递送恒定电流2mA(矩形脉冲宽度为0.1ms)的双极电刺激袖带,经由近端坐骨神经刺激GA肌肉。用单个0.1-ms脉冲刺激GA肌肉以进行颤搐力测量,并用一串150Hz的0.3s脉冲刺激以进行强直力测量。我们对每种肌肉进行了五次颤搐测量,然后进行了五次强直测量,每次测量之间恢复了2-3分钟,n=5只小鼠/组。将数据用PCI-6251采集卡(National Instruments)收集并在Matlab中分析。我们通过归一化按肌肉生理性横切面积(PCSA)计的力测量值来计算比力值,其在对照组和实验PGE2处理组之间相似(表2)。PCSA(以mm²测量)根据以下公式计算¹²:

[0536] $PCSA(mm^2) = [质量(g) \times \cos\theta] \div [\rho(g/mm^3) \times 纤维长度(mm)]$,

[0537] 其中 θ 是纤维的羽状角,并且 ρ 是肌肉密度(0.001056g/mm³)。

[0538] 统计分析:我们在至少三个独立实验中进行了细胞培养实验,其中三个生物重复实验汇集在每个中。通常我们在至少两个独立实验中进行了MuSC移植实验,其中每种条件至少3-5个总移植。我们使用了配对t-检验用于其中对照样品在体外来自相同的实验或在体内来自对侧肢体的实验。非参数曼惠特尼检验用于使用 $\alpha=0.05$ 确定未处理(-)vs处理(PGE或dmPGE2)组之间的显著性差异。进行ANOVA或多重t-检验以用于以进行多重比较,其中使用Bonferroni校正或费舍尔检验确定显著性水平,如图例中所指示。除非另有描述,否则数据显示为平均值 $\pm$ s.e.m。

[0539] 方法参考文献:Sacco,A.,Doyonnas,R.,Kraft,P.,Vitorovic,S.&Blau,H.M.Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells.Nature 456,502-506,doi:10.1038/nature07384(2008);Schneider,A.et

al.Generation of a conditional allele of the mouse prostaglandin EP4 receptor.Genesis 40,7-14,doi:10.1002/gene.20048 (2004);Murphy,M.M.,Lawson,J.A.,Mathew,S.J.,Hutcheson,D.A.&Kardon,G.Satellite cells,connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration.Development 138,3625-3637,doi:10.1242/dev.064162(2011);Safran,M.et al.Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination.Molecular imaging 2,297-302 (2003);Cosgrove,B.D.et al.Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles.Nature medicine 20,255-264,doi:10.1038/nm.3464(2014);Gilbert,P.M.et al.Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture.Science 329,1078-1081,doi:10.1126/science.1191035(2010);Papapetrou,E.P.et al.Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells.Nature biotechnology 29,73-78,doi:10.1038/nbt.1717 (2011);Chenouard,N.et al.Objective comparison of particle tracking methods.Nature methods 11,281-289,doi:10.1038/nmeth.2808(2014);Magnusson,K.E.,Jalden,J.,Gilbert,P.M.&Blau,H.M.Global linking of cell tracks using the Viterbi algorithm.IEEE transactions on medical imaging 34,911-929,doi:10.1109/TMI.2014.2370951(2015);Maska,M.et al.A benchmark for comparison of cell tracking algorithms.Bioinformatics 30,1609-1617,doi:10.1093/bioinformatics/btu080(2014);Prasain,J.K.,Hoang,H.D.,Edmonds,J.W.&Miller,M.A.Prostaglandin extraction and analysis in Caenorhabditis elegans.Journal of visualized experiments:JoVE,doi:10.3791/50447(2013);Burkholder,T.J.,Fingado,B.,Baron,S.&Lieber,R.L.Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb.J Morphol 221,177-190,doi:10.1002/jmor.1052210207(1994)。

[0540] 表2:练习后第5周的年老腓肠肌的生理横截面积(PCSA)。

[0541]

小鼠 ID	腿	羽状角 θ (度)	余弦(θ)	纤维 长度 (mm)	GA 质量 (g)	PCSA (内侧+ 外侧)(mm ²)
对照-1	左	21	0.93	6.88	0.18	23.13
	右	21	0.93	6.64	0.18	23.82

[0542]

对照-2	左	26	0.90	4.03	0.16	33.79
	右	22	0.93	5.34	0.16	26.31
对照-3	左	21	0.93	4.52	0.15	29.34
	右	23	0.92	4.59	0.17	32.28
对照-4	左	24	0.91	5.07	0.14	23.89
	右	23	0.92	4.75	0.13	23.86
对照-5	左	19	0.95	6.07	0.16	17.75
	右	18	0.95	6.05	0.15	10.25
dmPGE2-1	左	12	0.98	7.60	0.25	30.47
	右	腱损害	-	-	-	-
dmPGE2-2	左	12	0.96	4.85	0.16	30.56
	右	16	0.91	4.80	0.14	26.55
dmPGE2-3	左	14	0.97	5.89	0.17	26.52
	右	13	0.94	5.63	0.14	22.94
dmPGE2-4	左	14	0.97	6.67	0.14	19.29
	右	13	0.97	7.74	0.16	19.07
dmPGE2-5	左	11	0.98	5.56	0.17	28.42
	右	11	0.98	5.54	0.16	26.85

平均对照

25.09

平均 dmPGE

25.63

[0543] 实施例2:前列腺素E2 (PGE2) 注射后肌力增加.

[0544] 本实施例表明,在注射了PGE2的年老小鼠中,腓肠肌肌肉的比颤搐力增加。使年老小鼠(18个月大)每天在跑步机上跑到疲劳,持续10天。跑步机跑步使用Exer3/6 (Columbus Instruments) 进行。小鼠以10米/分钟的速度开始在下坡20度的跑步机上跑步。3分钟后,速度增加1米/分钟,达到20米/分钟的最终速度。疲倦的定义是尽管有电刺激,动物仍无法保留在跑步机上。每次跑步机跑步后2小时,每只小鼠的两个腓肠肌肌肉均注射有PBS (对照组) 或3nM PGE2 (实验组)。在最后一次跑步机跑步后4周,使用300C-LR力传感器 (Aurora Scientific) 以预定的超最大刺激强度以单个0.1ms脉冲进行力测量。

[0545] 在图5M-5N中提供了单个腓肠肌肌肉的代表性原始肌力迹线。肌力和同步脉冲经由PCI-6251采集卡 (National Instruments) 进行记录,并使用Matlab进行分析。图5O-5P显示了通过用肌肉生理横截面积对力测量值进行归一化而计算出的比肌力值。比颤搐力值 (kN/m^2) 由Box和Whiskers图表示,该图显示了最小值、最大值和中值。从每种肌肉进行五次重复测量。对于对照组, $N=4$, 并且对于PGE2注射组, $n=5$ 。**表示通过双尾曼惠特尼检验确

定的统计显著性值 $p < 0.005$ 。

[0546] 图5Q和5R分别显示了来自单独实验的颤搐力和强直力数据,其中小鼠仅用PGE2或媒介物处理。重要的是,我们观察到注射了PGE2并经受下坡跑步机练习的年老(18-22个月)小鼠中等距力增加。简而言之,年老小鼠每天跑步一次(在20度下坡和14米/分钟最大速度持续10分钟下)持续5天并在第6天和第7天休息。这种偏心练习制度由于肌肉退行和再生循环而导致MuSC扩增。在第1周期间每次下坡跑步后两小时,向每只小鼠的两条腿的TA肌肉注射PBS(媒介物对照组)或10 μ g PGE2(实验组)。在第2周期间,使小鼠仅经受5天下坡跑步。在第5周使用我们之前公开的方案,对TA肌肉进行力测量(颤搐和强直)。PGE2处理组表现出相较于对照组力显著增加。

[0547] 实施例3:前列腺素E2对于有效骨骼肌干细胞功能是必需的,从而增强再生和力量。

[0548] 骨骼肌具有能够在整个生命中进行组织再生的静态肌肉特异性干细胞(MuSC)。肌肉损伤促成了多种细胞类型、细胞因子和生长因子(包括前列腺素)参与其中的复杂炎症响应。在这里,我们显示了前列腺素E2(PGE2)经由EP4受体直接靶向MuSC,从而导致MuSC扩增。用PGE2进行的急性治疗足以通过内源性或移植性MuSC稳健地增强肌肉再生。EP4受体在MuSC中的特异性遗传消融导致PGE2信号传导丧失损害了再生,导致肌力减小。正好在损伤之后通过NSAID施用来抑制PGE2产生同样会阻碍再生并损害肌肉力量。从机制上讲,PGE2EP4相互作用通过触发环状AMP/磷酸CREB途径,继而激活增殖-诱导转录因子Nurr1来引起MuSC扩增。我们的发现揭示了,从损伤中恢复期间,丧失PGE2信号传导至MuSC会阻碍肌肉修复和力量。通过这种功能实验的增加或丧失,我们发现PGE2信号信号充当肌肉干细胞功能的变阻器。由于NSAID所致的PGE2信号传递减少或由于外源性递送所致的PGE2增加决定了MuSC功能,丧失MuSC功能决定再生结果。在PGE2的肌肉递送后,受损肌肉的恢复明显增强和加速,表明该治疗剂有新的适应证。

[0549] 损伤后的肌肉修复必需协调有效再生的免疫响应。在这里,我们将前列腺素E2(PGE2)鉴定为肌肉干细胞(MuSC)(肌肉再生的结构单元)的关键炎症介体。响应于损伤,合成并分泌PGE2到干细胞小生境中,从而导致稳健的MuSC增殖,这是肌纤维修复的关键。EP4是在MuSC中介导PGE2信号传导的受体,而在MuSC中缺乏EP4的经遗传工程化的小鼠再生受损。通常用于治疗肌肉损伤后的疼痛的非甾体抗炎药物(NSAID)抑制PGE2合成,阻碍肌肉再生并导致肌肉衰弱。重要的是,用PGE2对受伤的肌肉进行单一治疗显著加速肌肉修复和力量恢复。

[0550] 卫星细胞也被称为肌肉干细胞(MuSC)对肌肉再生至关重要。它们处于静止状态,处于与肌肉组织中的肌纤维并列的小生境中,保持在其一生中响应于损害和修复骨骼肌(1-4)。肌肉损伤促成了炎症响应,其标志是多种细胞类型(包括嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、T-细胞和纤维脂肪细胞)依序浸润,并伴有肌肉干细胞激活。在这种炎症期期间,细胞因子和生长因子的同时波释放,包括CC-趋化因子配体2(CCL2)、IL-10、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF α)、转化生长因子- β 1(TGF β 1)(3,5-10)。此外,前列腺素,炎症的有效脂质介体,是由免疫细胞和成肌细胞合成和分泌的(6,11)。前列腺素源自花生四烯酸,其通过磷脂酶A2从膜磷脂中释放出来并被环氧合酶(COX-1和-2)转化为前列腺素H2(PGH2),随后转化为不同的前列腺素亚型PGD2、PGE2、PGF2 α 、PGI2或凝血噁烷(TXA2)。对PGE2生成有特异性的

是前列腺素合酶 (PGES:mPGES-1、mPGES-2和cPGES) (11-13)。

[0551] 尽管PGE2已经与肌肉再生有关,但是直到本发明的发明人发现这种益处之前,对肌肉再生和力量没有直接的有益作用仍是未知的。相互矛盾的报道表明,PGE2可以促进成肌细胞在培养中增殖或分化(14-18)。在缺少PGE2的COX2敲除小鼠模型中,再生被延迟。然而,由于COX2的系统性组成丧失以及随之而来的对许多细胞类型的非特异性作用,在这些研究中无法确定PGE2发挥作用的机制(15,19)。同样,在给予COX-2抑制剂的小鼠中损伤后的肌肉恢复也受损(15)。另外,用通过抑制COX1和COX2阻断了前列腺素产生的非甾体抗炎药物(NSAID)治疗的小鼠展示出再生缺陷(20,21)。此外,NSAID导致活检中练习-诱导的人卫星细胞扩增减少(20)。同样,糖皮质激素通过遏制磷脂酶A2、COX-2和mPGES-1表达来减少前列腺素合成,对多肌炎患者的肌肉力量恢复产生不利影响(22)。然而,由于NSAID和糖皮质激素的靶标是COX酶,因此这种作用可必需除了PGE2之外的许多前列腺素亚型并因此具有多效性作用。因此,迄今为止,PGE2在肌肉再生中的时空效应仍未得到解决。此外,尽管显示出抑制PGE2合成和活性对肌肉功能恢复是有害的,但是这里引用的研究没有提供任何暗示施用PGE2可以直接有益于肌肉再生和肌肉功能恢复。

[0552] 本发明人已经发现,响应于损伤,在肌肉组织中瞬时诱导了PGE2。为了确定PGE2是否直接作用于MuSC,即肌肉再生的结构单元,我们生成了其中可以在MuSC中条件性消融PGE2受体EP4的小鼠。此外,我们建立了转基因报告基因小鼠,其能够通过PGE2递送后的生物发光成像,随着时间的推移动态且灵敏地特异性追踪MuSC对再生的贡献。我们将这些模型与肌力的测定结合起来,并发现MuSC响应于PGE2的能力和再生之间存在直接联系,从而导致力恢复。功能实验的增加和丧失揭示了,PGE2信号传导充当肌肉干细胞功能的变阻器。我们提供的证据表明,尽管PGE2通常是在损伤后合成的,但通过将PGE2的水平暂时提高到正常内源水平以上,增强了再生。我们的数据表明PGE2影响再生并具有治疗性应用。

[0553] PGE2在受损肌肉组织中的激增加速了MuSC的增殖:我们试图通过利用介导肌肉再生的炎性响应来鉴定MuSC功能的激活剂。由于肌肉损伤触发了立即炎性响应(5、7、8、23),因此我们假设短暂诱导的炎性调节剂可以调节MuSC功能并在再生中起关键作用。我们进行了qRT-PCR,并检测到通过解离肌肉组织、然后进行荧光激活细胞分选(FACS)获得的经分离的MuSC上PGE2(一种急性炎症期间的有效脂质介体(11))的Ptger4受体(EP4)的水平升高(图12A)。根据受体表达,在必需虎蛇毒素注射或冷冻损伤的标准范式造成损伤后三天,我们检测到小鼠肌肉裂解物中PGE2的水平激增(图12B、12C和18A)。还检测到其合成酶Ptges和Ptges2的伴随瞬时上调(图12D)。尽管在肌肉中其他细胞类型也可能会响应于损伤产生PGE2诸如内皮细胞、炎性细胞和FAP,但包围MuSC的肌纤维是PGE2的来源,如在条件化培养基中从解离的肌纤维观察到(图12E)。此外,在用吲哚美辛(一种抑制COX2的NSAID)处理肌纤维后,PGE2合成显著降低(图12E)。PGE2水平的峰值在时间上与MuSC的扩增和损伤后有充分记录的炎性细胞因子诸如TGF β 1、CCL2、IL-10、IL-1 β 和TNF α 的积累相吻合,其中发生MuSC激活和扩增(3、5、7、8)。尽管PGE2先前已参与炎性损害响应,但其在肌肉再生中发挥作用的细胞机制和分子机制尚待解决。

[0554] 为了确定PGE2是否对MuSC扩增有直接影响,我们评估了用PGE2(10ng/ml)处理的FACS分离的MuSC(24)在培养中的增殖潜力。PGE2的这一浓度是根据剂量响应测定选择的,该测定解析了促进稳健MuSC增殖响应的最低药物浓度(图18B)。我们发现,培养中1天暴露

于PGE2诱导了相对于一周后的对照的MuSC数量增加6倍(图12F)。通过EdU掺入,PGE2处理后细胞分裂的这种增加也很明显(图18C和18D)。在含有木炭剥离血清的培养基(耗尽了脂质组分,包括前列腺素(25))中培养MuSC显著阻碍了细胞增殖。添加PGE2中挽救了这种增殖阻断(图18E)。值得注意的是,尽管新鲜分离的MuSC表达相对高水平的EP4受体mRNA,但随着细胞在培养中产生分化程度越来越高的肌肉细胞,表达逐渐下降至可以忽略的水平。该结果表明,MuSC是对PGE2最有响应的成肌细胞类型(图12A)。我们通过在水凝胶‘微孔’平台中通过延时显微术分析追踪单个MuSC,进一步分析了单细胞水平上PGE2的作用,如前所述(26, 27)(图12G-K和18F-H)。克隆测定可以揭示群体作为整体进行分析所掩盖的差异。将数据在38小时时间段内收集,然后使用用于细胞追踪和谱系重建的Baxter算法进行分析(26-28)。我们观察到响应PGE2的累积细胞分裂和细胞数量显著增加,其中最稳健的克隆跨越6代(图12G和12H)。PGE2处理的细胞与媒介物处理的对照之间存在差异的基础是,在涂铺后PGE2添加之后立即加速了进入有丝分裂,这是随后扩增增加的原因(图12I、12J、18G和18H)。在这两种情况下,随后细胞的指数增加都会加剧发作时的差异,最终在38小时时间跨度结束时,总细胞数几乎翻倍(图18G和18H)。PGE2处理后观察到的较大细胞尺寸的发生率随之增加(图12K),支持了其在有丝分裂事件中的作用(29)。

[0555] PGE2治疗增强了肌肉再生:为了确定PGE2是否影响MuSC在再生中的功能,我们进行了体内实验。为了以定量方式监测再生随时间推移的动态变化,我们利用了先前为监测移植后MuSC功能开发的灵敏和定量的生物发光成像(BLI)测定(24、26、27、30)。从表达GFP和荧光素酶的转基因小鼠(GFP/Luc小鼠)中分离出MuSC,并将等数量的MuSC(250个细胞)与单独的PGE2或媒介物共注射至NOD-SCID γ (NSG)小鼠的受损TA中。与BLI评估的对照相比,PGE2共注射将MuSC的再生能力增强了近两个数量级。组织学分析揭示了,GFP⁺MuSC植入小生境中和因在时程内融合而产生的GFP⁺纤维(图13A、19A和19B)。此外,在植入后,次级损伤引发了相对于对照,PGE2处理的MuSC的BLI信号激增,表明干细胞再增殖增强(图13A)。值得注意的是,已知PGE2在体内具有相对短的半寿期(31)。因此,这些实验证明,在共递送至受伤的肌肉时,短暂暴露MuSC至PGE2足以显著增强肌肉再生。

[0556] 我们假设递送单独的PGE2可增加内源性MuSC数量并增强再生,从而避免了对细胞治疗剂的需求。我们认为,在损伤后立即早期窗口期间递送的PGE2可以增强先天性炎症响应和PGE2激增的有益作用。为了测试这种可能性,年幼小鼠的肌肉受伤,并且三天后,我们注射了团注的PGE2(图13B)。我们观察到损伤后14天,在基底层下方和肌纤维上方的经典卫星细胞小生境中,内源性PAX7-表达MuSC显著增加($65 \pm 7\%$)(图13B和13C)。PGE2仅在损伤后才有效,因为在没有组织损害的情况下未观察到与媒介物-注射的对照的差异(数据未显示)。在再生的时程内,作为横截面积评估的肌纤维分布从较小尺寸向较大尺寸的惊人变化是显著的(图13D、13E、19A和19B)。这种变化反映了伴随观察到的加速再生,对肌纤维结构的重塑,因为在该时间段内肌肉质量没有增加(图19C)。此外,我们使用转基因小鼠模型Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc通过荧光素酶表达追踪了内源性MuSC对损伤和PGE2的响应(图13F和13G)。BLI数据与组织学数据一致(图13B和13C)。损伤后单次注射PGE2足以增加内源性MuSC数量和再生功能从而导致这种程度的加速再生是非常意外的。

[0557] EP4受体介导了PGE2信号传导以促进MuSC增殖和植入:PGE2已知通过四种G蛋白偶联受体(Ptger1-4;EP1-4)进行信号传导(6、11),但这些受体在MuSC中的表达以前没有报道

过。对不同受体 (Ptger1-4) 的转录物水平进行分析后揭示了, PGE2处理后24小时, MuSC中最高度表达的受体是Ptger4 (图14A)。经PGE2处理的MuSC表现出升高的下游细胞内环状AMP (cAMP) 水平 (图14B), 即与EP4信号传导相关的响应 (11), 并且在存在EP4拮抗剂ONO-AE3-208的情况下, 由PGE2诱导的增殖响应增加被钝化 (图14C)。该数据证实PGE2通过EP4受体进行信号传导以促进增殖。在从EP4^{f/f}小鼠中分离的MuSC中, 在Cre介导的条件性消融EP4后, 缺乏受体的MuSC的繁殖显著降低, 最清楚地表明了PGE2对EP4的特异性 (图14D和20A-D)。通过他莫昔芬处理从Pax7^{CreERT2}:EP4^{f/f}小鼠中分离的MuSC确认了在PGE2的增殖响应中对EP4的需求, 其中Cre介导的EP4消融受MuSC-特异性Pax7启动子的控制 (图20E和20F)。值得注意的是, 在缺乏EP4的MuSC中, 其他PGE2受体不会发生补偿, 因为在MuSC中, EP1、EP2和EP3受体 (Ptger1-3) 的表达仍然较低 (图20G)。总之, 这些数据表明PGE2及其受体EP4对MuSC增殖至关重要。为了确定EP4是否在体内MuSC功能中起作用, 我们将在培养中进行条件性消融后缺乏EP4受体的表达荧光素酶的MuSC移植到NSG小鼠的受损TA中。最初检测到的BLI信号逐渐下降到低于显著性阈值的水平 (图14E和20A-D)。因此, 在没有PGE2的情况下, 经由EP4受体再生进行的信号传导受损。

[0558] 转录因子Nurr1是MuSC中的PGE2/EP4信号传导的下游介体: 为了进行对介导MuSC功能增强作用的PGE2信号传导下游的介体的无偏搜索, 我们进行了比较用媒介物 (对照) 或PGE2处理24小时的经分离的MuSC的RNA-seq分析 (图21A)。使用Ingenuity途径分析 (IPA) 和Metacore软件包进行的生物信息学分析揭示了, 除了PGE2代谢的调节剂之外, MuSC的PGE2处理导致与干细胞扩增一致的分子和细胞功能 (包括cAMP信号通路和细胞周期调节) 增加 (图21B和21C)。在未经调整的p值<0.05的前200种差异表达基因中, 仅鉴定出11种转录因子 (图15A)。Nurr1是少数差异表达的基因。Nurr1以前还被证明通过cAMP和磷酸-CREB介导PGE2信号介导, 以诱导结直肠癌和神经元细胞中细胞增殖 (32, 33)。为了研究其在MuSC中作为EP4信号传导的下游效应子的推定作用, 我们检查了其在体内的表达。值得注意的是, Nurr1表达的时间窗口反映了肌肉组织中PGE2的时间窗口, 在损伤后第3天达到峰值 (图15B和12B)。在培养中, PGE2处理增加了Nurr1 mRNA和蛋白表达 (图15C和15D), 并且Nurr1敲低钝化了PGE2诱导MuSC繁殖的作用 (图4E和21D)。为了确定Nurr1转录调控对PGE2介导的EP4受体信号传导的特异性, 我们通过他莫昔芬处理消除了Pax7^{CreERT2}:EP4^{f/f} MuSC中的EP4受体 (图21E)。在EP4敲除MuSC中PGE2处理后Nurr1未上调 (图15F)。根据EP4的表达模式, 在EP4基因敲除的MuSCs (图15F) 中, Nurr1的表达在MuSC中最高, 并且在成肌细胞分化开始时下降 (图15G)。总之, 这些数据暗示了Nurr1转录因子作为触发MuSC扩增的PGE2/EP4信号传导的介体。

[0559] 丧失PGE2信号传导损害了肌肉再生和力量: 为了确定体内再生是否需要EP4, 我们使用了Pax7^{CreERT2}:EP4^{f/f}小鼠模型, 其中通过依序腹膜内他莫昔芬注射至小鼠中在MuSC中特异地和条件性地消融了EP4 (图16A)。在他莫昔芬处理和损伤后, 诱导EP4消融在体内在Pax7⁺细胞中高度有效。在分选的MuSC中检测到的Ptger4 mRNA水平比对照中低96% (图16A和16B)。在MuSC中没有EP4信号传导的情况下, 我们观察到在损伤后第7天表达胚胎肌球蛋白重链 (eMyHC) 的未成熟中央成核再生肌纤维的异常持续存在 (图16C和16E)。相对于损伤后第21天的对照, 肌纤维朝向在横截面积上减小的肌纤维的转变证实了受损再生的这种证据 (图16D和16E)。在这些实验中, PGE2可以在再生过程中作用于肌肉组织中的其他细胞类

型,诸如成熟的肌纤维、纤维脂肪形成祖细胞(FAP)和免疫细胞;然而,这些细胞不足以恢复EP4缺陷型MuSC功能。这些特征提供了有力的证据,即在不存在EP4信号传导的情况下,有效的肌肉再生受到了阻碍。

[0560] 我们进一步测试了由于MuSC中EP4特异性丧失而引起的肌肉修复缺陷是否影响肌肉力量。令人惊讶的是,仅在MuSC上消除通过EP4进行的信号传导导致颤搐力和强直力分别下降 $35 \pm 6\%$ 和 $31 \pm 4\%$ (图16F-H),而肌肉质量没有明显丧失(图22A)。为了确定PGE2的缺失是否在受损后改变了肌肉的再生能力和力量,我们使小鼠经受了非甾体抗炎药物(NSAID, 吲哚美辛)的治疗。损伤后三天,对Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠模型的TA肌肉进行单次吲哚美辛注射导致BLI相对于对照下降,表明肌肉干细胞扩增和再生受损(图16I和16J)。与对照相比,NSAID治疗后这种再生能力的丧失伴随着颤搐力的显著减少 $33 \pm 7\%$ (图16K、16L和22B)。PGE2合成对整体肌肉抑制后所减弱的力量反映了对具有MuSC-EP4特异性敲除的再生肌肉所观察到的力量,表明MuSC扩增占PGE2介导的对肌肉再生作用的大部分。

[0561] 我们发现,PGE2在肌肉再生期间的主要作用是直接靶向MuSC。PGE2被认为是一种免疫调节剂,作用于对损伤后的早期炎症响应至关重要的嗜中性粒细胞、肥大细胞和巨噬细胞。认为随后的细胞因子风暴会诱导再生中的肌肉干细胞功能(3、6、7、11)。消除了所有前列腺素合成的全身COX2 KO小鼠的研究均支持该结论(15、19)。已提出成肌细胞作为培养中对PGE2响应的细胞类型(14、16-18、34、35),但这些细胞在再生中的表现较差(24),并且无法解释观察到的作用。此外,牵涉到再生中的PGE2的其他研究都遭受了对多种细胞类型的多效性作用的影响。

[0562] MuSC对于发育和再生至关重要(1-3、24、36-38),并且它们的数目响应于损害小鼠和人类肌肉的伤害而急剧增加(5、20、39-42)。将MuSC注射到受伤的肌肉中会导致其指数增加,而注射其成肌细胞衍生物会导致数量下降,从而揭示这两种细胞类型的再生能力有显著差异(24)。在这里,我们显示PGE2在肌肉再生期间的主要作用是在MuSC上的,并且这种作用是直接的并由EP4受体介导。值得注意的是,EP4在MuSC上稳健表达,并在分化成肌细胞上逐渐降低至可忽略的水平,这表明对PGE2响应最强的成肌细胞类型是MuSC。从机制上讲,一旦PGE2啮合EP4受体,它激活cAMP和下游诱导-增殖的转录因子Nurr1,从而导致加速的MuSC增殖(图17)。尽管Nurr1通过直接阻断肠道上皮细胞中的细胞周期抑制剂p21(Waf1/Cip1)而在肠道上皮细胞中与增殖和再生的诱导相关联(43),但它在干细胞并且尤其是肌肉干细胞的扩增中的作用以前没有描述。进一步证实Nurr1在体内介导MuSC增殖发现的发现是,其水平在损伤后三天在肌肉组织中瞬时达到峰值,与观察到的PGE2激增相伴。

[0563] 我们通过使用两种方法对EP4进行条件和特异性消融,表明MuSC功能和植入严格依赖于通过其受体进行的PGE2信号传导。在体外在MuSC上消融EP4,然后在体内进行移植,导致通过BLI显著的植入减少。关于EP4关键作用的最显著的证据是它特别是在内源性MuSC上在体内对EP4的消融,导致损伤后的肌肉力量显著减少,伴随着相对于对照,向更小且更不成熟的肌纤维转变(图17)。因此,在没有EP4受体的情况下,移植的和内源的MuSC的再生都会严重受损。

[0564] PGE2损伤后的激增是瞬时的。同样,急性PGE2治疗长期增强和加速肌肉再生。当将新鲜分离的MuSC与PGE2共注射到受伤的肌肉中时,通过BLI显著的是肌肉修复增强。造血干

细胞单次离体暴露于PGE2对移植后随后的干细胞扩增和血液重构具有相似的显著作用(44)。实际上,将单独的PGE2(无MuSC)直接单次注射到受伤的肌肉中导致内源性MuSC数量和肌纤维尺寸显著增加,这在2周内是显著的。PGE2降解酶(15-PGDH)的抑制剂SW033291的递送对造血、肝脏和结肠再生的有益作用可能是由于内源性PGE2水平的相似增加所致(45)。值得注意的是,PGE2及其类似物已在患者中安全使用了十多年,例如以引产(46)和促进造血干细胞移植(44)。结合我们的发现,这些研究为其在促进损伤后肌肉修复中的临床应用铺平了道路。

[0565] 我们显示PGE2水平充当控制再生功效的变阻剂。增强对损伤的先天性促炎性PGE2响应导致MuSC扩增和肌肉再生加速。相比之下,一种惯常做法,即在损伤时控制疼痛的NSAID施用消除了该效应,表明在这种早期时间窗期间PGE2信号传导对其有益作用至关重要。最令人惊讶的是我们发现,单次PGE2处理足以快速且稳健地激发肌肉干细胞响应,从而增强受损肌肉的再生并恢复力量。

[0566] 我们按照斯坦福大学(Stanford University)和实验室动物护理行政小组(Administrative Panel on Laboratory Animal Care, APLAC)的机构指南进行了所有实验和方案。我们从杰克逊实验室(Jackson Laboratory)获得了年幼野生型C57BL/6小鼠。如先前所述获得双转基因GFP/luc小鼠(杰克逊实验室, Stock#008450) (24)。NOD-scid γ (NSG) 从杰克逊实验室(Stock#0055570)获得。EP4^{flox/flox} (EP4^{f/f}) 小鼠是K. Andreasson(斯坦福大学)(杰克逊实验室, Stock#028102)的馈赠(47)。双-转基因Pax7^{CreERT2}; EP4^{f/f}通过使获自杰克逊实验室(Stock#017763) (48)和EP4^{f/f}小鼠杂交来生成。双-转基因Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc通过使Pax7^{CreERT2}小鼠和获自杰克逊实验室的Rosa26-LSL-Luc(Stock#005125)杂交生成(49)。我们通过适当的基于PCR的策略验证了这些基因型。来自转基因和野生型菌株的所有小鼠均为幼龄的(2-4个月)。所有实验均使用与年龄和性别相匹配的对照进行,并将同窝仔随机分配至实验组。

[0567] 我们使用了必需肌内注射10 μ l虎蛇毒素(10 μ g ml⁻¹; Latoxan, 目录号L8104)或心脏毒素(10 μ M; Latoxan, 目录号L8102)进入胫前肌(TA)肌肉中的损伤模型。对于冷冻损伤,在TA肌肉上方的皮肤中切开一个切口,并将在液氮中冷却的铜探针以3个10秒的间隔施加到TA肌肉,从而使肌肉在每次施加冷冻探针之间解冻。当指示时,在损伤后48小时,16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2) (13nmol, Tocris, 目录号4027)、吡罗美辛(35 μ g, Sigma, 目录号I7378)或媒介物对照(PBS)注射至TA肌肉中。将对侧TA用作内部对照,除了力测量实验以外,其中每只小鼠的双腿都在相同的条件下受伤并且每种条件都使用独立的小鼠。

[0568] 对于Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc小鼠实验,我们用连续五次每天腹膜内注射他莫昔芬处理小鼠,以激活在Pax7启动子的控制下的荧光素酶表达。在最后一次他莫昔芬注射后一周,使小鼠经受10 μ l心脏毒素(10 μ M; Latoxan)的肌内注射,我们将其指定为测定的第0天。三天后,将13nmol dmPGE2或媒介物对照(PBS)注射至TA肌肉中。对侧TA用作内部对照。在损伤后第3、7、10和14天测定生物发光。

[0569] 对于Pax7^{CreERT2}; EP4^{flox/flox}小鼠实验,我们用连续五次每天腹膜内注射他莫昔芬处理小鼠,以切除Pax7表达细胞中的EP4等位基因。在最后一次他莫昔芬注射后一周,使小鼠经受肌内注射10 μ l虎蛇毒素(10 μ g ml⁻¹; Latoxan),我们将其指定为测定的第0天。作为对照小鼠,使用相同性别的Pax7^{+/+}; EP4^{flox/+}同窝仔。

[0570] 如前所述(24、26、27),我们分离和富集了肌肉干细胞。简而言之,使用具有改良的制造商方案(Miltenyi Biotech)的温和MACS Octo Dissociator分离并解离小鼠后肢肌肉。解离的肌肉用0.2%胶原酶(Roche)消化60分钟,然后用胶原酶/分散酶(0.04U ml^{-1} ; Roche)消化30分钟。用18G针通过注射器解离释放单核细胞。对于小鼠肌肉干细胞,将单细胞混悬液与针对CD11b(1:800)、CD45(1:500)、Sca1(1:200)和CD31(1:200)的生物素化抗体一起孵育,然后与链霉亲和素磁珠(Miltenyi Biotech)、链霉亲和素-APC-Cy7、整合素- α_7 -PE(1:500)和CD34-eFluor660(1:67)一起孵育。在基于磁性的针对生物素-阳性细胞的选择柱(Miltenyi)上,耗竭细胞混合物的造血谱系表达和非肌肉细胞。然后将剩余的细胞混合物进行FACS分析,以分选纯度>95%的CD45⁻CD11b⁻CD31⁻Sca1⁻CD34⁺整合素- α_7 ⁺MuSC(DIVA-Van, Becton-Dickinson)。我们使用FlowJo v10.0生成并分析了流式细胞术散点图。对于野生型MuSC种类,我们将来自至少三只独立的年龄和性别匹配的供体小鼠的MuSC(各~5,000个)汇集在一起。

[0571] 我们在使用媒介物(DMSO)或PGE2(10ng/ml)处理24小时后或者从用shSCR或shNurr1转染的MuSC,使用成肌祖细胞,通过流式细胞术分析了NURR1水平(参见敲低测定部分)。我们在37℃下用0.5%胰蛋白酶在PBS中孵育2分钟来收集细胞。我们在PBS中使用1.6%的多聚甲醛固定细胞,然后在冰冷的甲醇中透化。然后,我们在室温下在染色缓冲液(0.5%BSA于PBS中)中封闭它们30分钟,并用小鼠单克隆抗-Nurr1(Abcam,目录号ab41917,1:75)一级抗体或抗小鼠IgG对照(Jackson ImmunoResearch Laboratories)进行染色。然后,我们用太平洋蓝-缀合的山羊抗小鼠二级抗体(Thermo Fisher Scientific,目录号P-10994,1:500)对细胞进行染色。我们在使用NIH S10共享仪器授权(S10RR027431-01)购买的斯坦福共享FACS设施中使用FACSDiva软件(BD Biosciences)在FACS LSR II细胞仪上分析了细胞。

[0572] 如前所述,我们将来自细胞培养物的250个MuSC(图13A)或1,000个MuSC(图14E)直接移植到接受者小鼠的TA肌肉中(24、26、27)。对于野生型MuSC研究,我们将来自GFP/luc小鼠(2-4月龄)的细胞移植到后肢辐照的NSG小鼠中。对于EP4^{flox/flox} MuSC研究,我们移植了用luc-IRES-GFP慢病毒(GFP/luc病毒)转导的来自EP4^{flox/flox}小鼠(2-4个月)的细胞,和一个亚组在移植之前在培养的第2天接受了mCherry/Cre慢病毒或模拟感染持续24小时的时间,如前所述(26)(有关详细信息,参见以下“肌肉干细胞培养、处理和慢病毒感染”部分)。在移植肌肉干细胞之前,我们通过腹膜内注射用氯胺酮(每只小鼠2.4mg)麻醉NSG接受者小鼠。然后,我们以18Gy的单剂量辐照后肢,其余部分用铅夹具屏蔽。我们在辐照2天内进行了移植。我们将MuSC以所需的细胞浓度重悬于0.1%明胶/PBS中,然后通过肌内注射将它们(每个TA,250或100个小鼠MuSC)以15 μ l体积移植到TA肌肉中。对于新鲜的MuSC移植,我们将分选的细胞与13nmol的16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)(Tocris,目录号4027)或媒介物对照(PBS)共注射。移植后一个月,我们注射了10 μ l虎蛇毒素(10 μ g ml⁻¹;Latoxan, France),以损伤接受者肌肉并在体内重激活MuSC。我们通过移植到同一只小鼠对侧腿的TA肌肉中比较了来自不同条件的细胞。如图例所示,在移植后三周或八周,对小鼠实施安乐死并收集TA用于分析。

[0573] 我们使用Xenogen-100系统进行了生物发光成像(BLI),如前所述(24、26、27、30)。简而言之,我们使用异氟烷吸入麻醉小鼠,并通过腹膜内注射施用120 μ L D-荧光素

(0.1mmol kg^{-1} ,在PBS中复溶;Caliper LifeSciences)。我们在荧光素注射后5分钟在F-终止=1.0下使用60秒暴露获得了BLI。使用Living Image软件(Caliper LifeSciences)记录和分析数字图像。我们分析了在每个后肢上方放置一致的目标区域(ROI)的图像,以计算生物发光信号。我们计算了以辐射度($\text{ps}^{-1}\text{cm}^{-2}\text{sr}^{-1}$)值计的为 10^4 的生物发光信号,以定义植入物阈值。该 10^4 的辐射度阈值大约等于如先报告的由类似尺寸的目标区域定义的 10^5p/s 总通量阈值。该BLI阈值对应于一种或多种GFP+肌纤维的组织学检测(24、26、27)。我们在移植后每周进行BLI成像。

[0574] 我们从如前所述合成的PEG前体制造了聚乙二醇(PEG)水凝胶(27)。简而言之,我们通过使用公开的制剂产生出水凝胶,以达到1k厚度的12kPa(杨氏模量)刚度,其是培养MuSC和维持在培养中的干细胞命运的最佳条件(27)。如前所述(27),我们为克隆增殖实验制造了12-kPa的水凝胶微孔阵列。我们切割并粘附所有水凝胶以覆盖12孔或24孔培养板的表面积。

[0575] 分离后,我们将MuSC重悬于含有DMEM/F10(50:50)、20%FBS、 2.5ng ml^{-1} 成纤维细胞生长因子-2(FGF-2也被称为bFGF)和1%青霉素-链霉素的成肌细胞培养基中。我们以每 cm^2 表面积500个细胞的密度接种MuSC混悬液。我们将细胞培养物维持在 37°C ,5% CO_2 中,并且隔天更换培养基。对于PGE2,EP4受体拮抗剂治疗研究,我们添加了1-200ng/ml前列腺素E2(Cayman Chemical)(除非在图例中指定,否则10ng/ml是使用的标准浓度)和/或 $1\mu\text{M}$ EP4拮抗剂(ONO-AE3-208,Cayman Chemical)转移到在胶原蛋白包被的培养皿上培养前24小时的MuSC。然后将细胞胰蛋白酶化,并将细胞重新接种到水凝胶上再培养6天。将所有处理与其溶剂(DMSO)媒介物对照进行比较。对于剥离的血清测定,我们将分离的MuSC重悬在含有DMEM/F10(50:50)、20%木炭剥离的FBS(Gibco,目录号12676011)、 2.5ng ml^{-1} bFGF和1%青霉素-链霉素的经剥离的血清培养基中。对于这些实验,在水凝胶上培养MuSC,并在每次更换培养基时(每两天)将媒介物(DMSO)或10ng/ml PGE2(Cayman Chemical)添加至培养物。在7天后测定了增殖(参见下文)。除非另有说明,否则我们在培养1周后进行所有MuSC培养测定和移植。

[0576] 对于EP4^{f/f} MuSC研究,如前所述我们分离了MuSC(肌肉干细胞分离),并且如前所述(26)在培养中用编码EF1 α -luc-IRES-GFP的慢病毒(GFP/luc病毒)感染所有细胞24小时,并将其中的一个亚组用编码pLM-CMV-R-Cre的慢病毒(mCherry/Cre病毒)在培养中共感染24小时。pLM-CMV-R-Cre是来自Michel Sadelain(Addgene质粒#27546)的馈赠(50)。我们将EP4^{f/f} MuSC(1,000个细胞)移植到NSG接受者小鼠的年幼(2-4个月)18-gy辐照的TA中。对于体外增殖测定,将EP4^{f/f} MuSC在感染后涂铺在水凝胶上并用媒介物(DMSO)或10ng/ml PGE2处理24小时,并在3天后测定增殖。使用倒置荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging)在感染后48小时测定细胞的GFP和/或mCherry表达。另外,我们还用从Pax7^{CreERT2};EP4^{flox/flox}或对照Pax7^{+/+};EP4^{flox/+}同窝仔中分离的MuSC进行了实验。将MuSC涂铺在胶原蛋白包被的板上,并在48小时内用 $1\mu\text{M}$ 4-羟基他莫昔芬或媒介物(95%乙醇)处理,然后在7天后通过水凝胶上以评估增殖,或用PGE2或媒介物处理并收集进行分析。通过FACS从小鼠新鲜分离出MuSC,并将其培养最长一周的时间,因此未评估支原体污染。

[0577] 如前所述,我们通过延时显微术测定了克隆肌肉干细胞增殖(26、27)。简而言之,我们从C57B1/6小鼠(2-4个月)中分选了MuSC,将其涂铺在胶原蛋白包被的板上,并对其进

行了24小时的PGE2 (Cayman Chemical) 或媒介物 (DMSO) 处理。然后将细胞进行胰蛋白酶化, 并以每 cm^2 表面积500个细胞的密度重接种在直径600 μm 的水凝胶微孔中。对于延时显微术, 我们监测了在接种后具有单细胞的那些孔的细胞增殖持续38天, 并使用具有定制的环境控制室和电动平台的PALM/AxioObserver Z1系统 (Carl Zeiss MicroImaging) 每3分钟以10 $\times$ 放大记录图像。我们使用用于细胞追踪和谱系重建的Baxter算法分析了延时图像顺序, 以鉴定和追踪单细胞并生成谱系树 (26-28、51、52)。

[0578] 活细胞和死细胞分别基于相差边界和运动性维持或丧失而在延时期序列中进行区分。在所有时间点, 每代 (G1-G6) 中活细胞的比例显示为归一化至100个单个MuSC的起始群体的细胞数。数据分析是设盲的。进行成像采集和评分的研究人员并未意识到给予所分析样品组的治疗条件。

[0579] 为了测定增殖, 我们使用了三种不同的测定 (血细胞计数仪、VisionBlue和EdU)。对于每一种, 我们将MuSC以每 cm^2 表面积500个细胞的密度接种在平面水凝胶 (血细胞计数仪和VisionBlue) 或胶原蛋白包被的板 (EdU测定) 上。对于血细胞计数仪细胞数计数, 我们在指示的时间点通过在37 $^{\circ}\text{C}$ 下用0.5%胰蛋白酶在PBS中孵育5分钟来收集细胞, 并使用血细胞计数仪对其至少定量3次。另外, 我们使用VisionBlue快速细胞存活力荧光测定试剂盒 (BioVision, 目录号K303) 作为培养中细胞生长的读出。简而言之, 我们将MuSC与10% VisionBlue在培养基中孵育3小时, 并在荧光读板仪 (Infinite M1000 PRO, Tecan) 上于 $\text{Ex} = 530\text{-}570\text{nm}$ 、 $\text{Em} = 590\text{-}620\text{nm}$ 下测量荧光强度。我们使用Click-iT EdU Alexa Fluor 555 成像试剂盒 (Life Technologies) 测定了增殖。简而言之, 我们在固定前将活细胞与EdU (20 μM) 孵育1小时, 并根据制造商的指南将染色的细胞核与抗成肌素 (Santa Cruz, 目录号sc576, 1:250) 一起染色以测定分化。我们用DAPI (Invitrogen) 复染细胞核。我们使用带有Plan NeoFluar 10 $\times$ /0.30NA或20 $\times$ /0.75NA物镜 (Carl Zeiss) 以及由SlideBook (3i) 软件控制的ORCA-ER数码相机 (Hamamatsu Photonics) 的AxioPlan2落射荧光显微镜 (Carl Zeiss Microimaging) 获取图像。我们使用MetaMorph图像分析软件 (Molecular Devices) 对EdU阳性细胞进行了定量。数据分析是设盲的, 其中进行细胞评分的研究人员没有意识到给予所分析样品组的处理条件。

[0580] 对于MuSC中的Nurr1沉默, 通过根据制造商的方案使用FuGENE-6 (Promega) 共转染所有质粒, 使用包装质粒pLP1、pLP2和pLP/VSVG (Invitrogen), 在293T细胞中产生了含有pLK0.1-scramble shRNA (shSCR) 和pLK0.1-Nurr1 shRNA (Mission shRNA, TRCN0000026029, Sigma) 的慢病毒。在感染前一天将细胞涂铺, 并每12小时从293T细胞中收集上清液, 持续两天。将新鲜分选的MuSC接种在胶原蛋白包被的板上24小时, 然后用慢病毒感染。48小时后, 将细胞传到水凝胶上并用PGE2或媒介物 (DMSO) 处理24小时。7天后测定增殖。

[0581] 我们使用RNeasy Micro Kit (Qiagen) 从MuSC中分离了RNA。对于肌肉样品, 我们将组织在液氮中快速冷冻, 用研钵和研棒将组织匀浆, 然后用注射器和针头研磨, 然后使用Trizol (Invitrogen) 分离RNA。我们使用SensiFASTTM cDNA合成试剂盒 (Bioline) 从每个样品的总mRNA中逆转录cDNA。我们在ABI 7900HT实时PCR系统 (Applied Biosystems) 中使用SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 或TaqMan测定 (Applied Biosystems) 对cDNA进行了RT-PCR。我们将样品在95 $^{\circ}\text{C}$ 下扩增10分钟, 然后在95 $^{\circ}\text{C}$ 下进行40次循环持续

15秒并在60℃下持续1分钟。为了定量相对转录物水平,我们使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较经处理的样品和未处理的样品,并相对于Gapdh表示结果。对于SYBR Green qRT-PCR,我们使用以下引物序列:Gapdh,正向5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3',反向5'-CCCTTTTGGCTCCACCCT-3';Ptges,正向5'-GCTGTCATCACAGGCCAGA-3',反向5'-CTCCACATCTGGGTCCTCC-3';Ptges2,正向5'-CTCCTACAGGAAAGTGCCCA-3',反向5'-ACCAGGTAGGTCTTGAGGGC-3';Ptger1,正向5'-GTGGTGTGCTGCATCTGCT-3',反向,5'-CCGCTGCAGGGAGTTAGAGT-3',和Ptger2,正向5'-ACCTTCGCCATATGCTCCTT-3',反向5'-GGACCGGTGGCCTAAGTATG-3'。根据制造商的说明,使用TaqMan测定(Applied Biosystems)与TaqMan Universal PCR Master Mix试剂盒(Applied Biosystems)一起,对样品中的Pax7、成肌素、Nurr1、Ptger3和Ptger4进行定量。转录物水平相对于Gapdh水平表达。对于SYBR Green qPCR,使用Gapdh qPCR归一化输入的cDNA样品。对于Taqman qPCR,多重qPCR使目标信号(FAM)能够通过其内部Gapdh信号(VIC)进行单独归一化。

[0582] 将肌肉收获,在含有双吡啶美辛(5.6μg/ml)的冰冷PBS中冲洗,并在液氮中速冻。将冷冻的样品在液氮中粉碎。将粉末转移至含500μl裂解物缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、4mM CaCl₂、1.5% Triton X-100、蛋白酶抑制剂和微球菌核酸酶)的Eppendorf管,然后使用组织均质器均化。使用PGE2 ELISA试剂盒(R&D Systems,目录号KGE004B)测量上清液的PGE2水平,并相对于通过BCA测定(BioRad)测量的总蛋白质表示,并表示为PGE2的ng。每个样品一式两份并且在两个独立的实验中的每一个中进行测定。

[0583] 对于条件化培养基测定,如前所述(53)从趾长伸肌(EDL)中分离出肌纤维。在存在或不存在吡啶美辛(1μM, Sigma)的条件下,在剥离的血清培养基中培养纤维24小时。使用PGE2 ELISA试剂盒(R&D Systems,目录号KGE004B)收集和测量条件化培养基,并相对于收集的体积(ml)进行表达。每种样品均一式三份和在两个独立实验中进行测定。

[0584] 将MuSC用DMSO(媒介物)或PGE2(10ng/ml)处理1h,并根据制造商(Promega)优化的cAMP-Glo测定方案测量环状AMP水平。每种样品均一式三份和在两个独立实验中进行测定。

[0585] 如肌肉损伤部分所述,小鼠受伤。根据先前公开的方案,在损伤后第14天对TA肌肉进行力测量(26、54)。简而言之,将小鼠用与O₂混合的2-5%挥发异氟烷麻醉。将小鼠定位在加热灯下以将身体和肌肉温度保持在30℃。将TA肌肉的远端肌腱解剖,并通过手术缝合将其绑在300C-LR力传感器(Aurora Scientific)。将动物的膝固定至固定的钢柱,并将脚系带至平台,以防止其他肌肉群的收缩引起移动。将电刺激跨两个针电极施加,该针电极穿过皮肤正好放置在膝上方和TA肌肉下方,以刺激胫神经。在所有测量中,我们在预定的超最大刺激电压下使用了0.1ms的脉冲。用0.1ms的单个脉冲刺激TA肌肉以进行颤搐力测量,并用一串150Hz的0.3s脉冲刺激以进行强直力测量。我们对每种肌肉进行了五次颤搐测量,然后进行了五次强直测量,每次测量之间恢复了2-3分钟。将数据用PCI-6251采集卡(National Instruments)收集并在Matlab中分析。我们通过归一化按肌肉生理性横切面积(PCSA)计的力测量值来计算比力值,其在对照组之间相似(表2)。PCSA(以mm²测量)根据以下公式计算(55):

[0586] $PCSA(mm^2) = [质量(g) \times \cos\theta] \div [\rho(g/mm^3) \times 纤维长度(mm)]$,

[0587] 其中 θ 是纤维的羽状角并且 ρ 是肌肉密度(0.001056g/mm³)。

[0588] 对于RNA测序,将 $\alpha 7$ -整合素⁺CD34⁺肌肉干细胞如上所述分离,接种在胶原包被的板

上,一天后用PGE2或媒介物(DMSO)处理,并在处理24小时后进行处理。使用Qiagen RNAEasy Micro试剂盒从5,000-10,000个细胞中分离RNA,并使用NuGEN Ovation RNA-Seq System v2试剂盒生成和扩增cDNA。使用TruSEQ RNA文库制备试剂盒v2(Illumina)从cDNA构建文库,并在使用NIH S10共享仪器授权(S100D018220)购买的来自Stanford功能性基因组学设施的HiSEQ2500上,将其测序为30-40x106 1x75bp读段/样品。

[0589] 对于RNA-Seq分析,使用STAR将RNA序列与小家鼠基因组进行比对(56)。RSEM(57)用于识别转录物并计算每百万转录物(TPM)值,以及总计数。获得包含每个基因和每个样品的计数数目的计数矩阵。通过DESeq分析该矩阵,以计算样品之间基因的显著性(58)的统计分析。

[0590] 如前所述,我们收集并制备了用于组织学的接受者TA肌肉组织(26、27)。对于小鼠损伤测定,我们孵育了横切面与兔多克隆抗-PGE2(abcam,目录号ab2318,1:100)大鼠多克隆抗-层粘连蛋白(克隆A5)(EMD Millipore,目录号05-206,1:200)、小鼠单克隆抗-Pax7(Santa Cruz,目录号sc-81648,1:50)、AlexaFluor 647-缀合的小麦胚凝集素(WGA)抗体(W32466,Thermo Fisher Scientific)、兔多克隆抗-GFP(A11122,Thermo Fisher Scientific,1:500)和小鼠单克隆抗-胚胎肌球蛋白重链(DSHB,目录号F1.652,1:10)一级抗体,然后与AlexaFluor二级抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories,1:500)孵育。我们用DAPI(Invitrogen)复染了细胞核。

[0591] 我们使用带有Plan NeoFluar 10×/0.30NA或20×/0.75NA物镜(Carl Zeiss)以及由SlideBook(3i)软件控制的ORCA-ER数字相机(Hamamatsu Photonics)的AxioPlan2落射荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging)或带有20×/0.75NA物镜的KEYENCE BZ-X700多合一荧光显微镜(Keyence,Osaka,Japan)获取图像。使用Adobe Photoshop裁剪图像,并对来自同一实验的所有图像进行一致的对比度调整。图像合成使用Adobe Illustrator生成。我们使用MetaMorph图像分析软件(Molecular Devices)分析了PAX7阳性细胞的数量,并使用了用于肌纤维分析的Baxter算法(其在图像中鉴定纤维并分割纤维以分析每根纤维的面积)分析了纤维面积。对于PAX7定量,我们检查了跨越至少2mm深度的TA的连续切片。对于纤维区域,使用Keyence分析软件捕获并缝合了具有最大受伤区域的TA的整个横截面。数据捕获和分析是设盲的。进行成像采集和评分的研究人员并未意识到所分析样品组的处理条件。

[0592] 我们在至少三个独立实验中进行了细胞培养实验,其中三个生物重复实验汇集在每个中。通常我们在至少两个独立实验中进行了MuSC移植实验,其中每种条件至少3-5个总移植。我们使用了配对t-检验用于其中对照样品在体外来自相同的实验或在体内来自对侧肢体的实验。非参数曼惠特尼检验用于使用 $\alpha=0.05$ 确定媒介物-处理组vs PGE2-处理组之间的显著性差异。进行ANOVA或多重t-检验以用于以进行多重比较,其中使用Bonferroni校正或费舍尔检验确定显著性水平,如图例中所指示。除非另有描述,否则数据显示为平均值 $\pm$ s.e.m.p值<0.05的差异被认为是显著的(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001)。

[0593] RNASeq数据已经以MIME兼容格式提交给GEO,登录号为GSE97375。

[0594] 参考文献:Chakkalakal JV,Jones KM,Basson MA,&Brack AS(2012)The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence.Nature 490(7420):355-360;Kuang S,Gillespie MA,&Rudnicki MA(2008)Niche regulation of muscle satellite cell

self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2(1):22-31; Shi X & Garry DJ (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 20(13):1692-1708; Tierney MT, et al. (2014) STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. *Nat Med* 20(10):1182-1186; Chazaud B (2016) Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management. *Immunol Cell Biol* 94(2):140-145; Korotkova M & Lundberg IE (2014) The skeletal muscle arachidonic acid cascade in health and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol* 10(5):295-303; Tidball JG (2017) Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol* 17(3):165-178; Joe AW, et al. (2010) Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 12(2):153-163; Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, & Tsuchida K (2010) Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 12(2):143-152; Tidball JG (2011) Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* 1(4):2029-2062; Ricciotti E & FitzGerald GA (2011) Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31(5):986-1000; Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548):1871-1875; Simmons DL, Botting RM, & Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56(3):387-437; Beaulieu D, et al. (2012) Abnormal prostaglandin E2 production blocks myogenic differentiation in myotonic dystrophy. *Neurobiol Dis* 45(1):122-129; Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, & Pavlath GK (2004) The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2):C475-483; Mo C, Romero-Suarez S, Bonewald L, Johnson M, & Brotto M (2012) Prostaglandin E2: from clinical applications to its potential role in bone-muscle crosstalk and myogenic differentiation. *Recent Pat Biotechnol* 6(3):223-229; Mo C, et al. (2015) Prostaglandin E2 promotes proliferation of skeletal muscle myoblasts via EP4 receptor activation. *Cell Cycle* 14(10):1507-1516; Otis JS, Burkholder TJ, & Pavlath GK (2005) Stretch-induced myoblast proliferation is dependent on the COX2 pathway. *Exp Cell Res* 310(2):417-425; Shen W, Prisk V, Li Y, Foster W, & Huard J (2006) Inhibited skeletal muscle healing in cyclooxygenase-2 gene-deficient mice: the role of PGE2 and PGF2 α . *J Appl Physiol* (1985) 101(4):1215-1221; Mackey AL, et al. (2007) The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *J Appl Physiol* (1985) 103(2):425-431; Schoenfeld BJ (2012) The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for exercise-induced muscle damage: implications for skeletal muscle development. *Sports Med* 42(12):1017-1028; Lundberg I, Kratz AK,

Alexanderson H,&Patarroyo M(2000)Decreased expression of interleukin-1alpha, interleukin-1beta,and cell adhesion molecules in muscle tissue following corticosteroid treatment in patients with polymyositis and dermatomyositis.Arthritis Rheum 43(2):336-348;Arnold L,et al.(2007)Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis.J Exp Med 204(5):1057-1069;Sacco A,Doyonnas R,Kraft P,Vitorovic S,&Blau HM(2008)Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells.Nature 456(7221):502-506;Smethurst M&Williams DC(1977)Levels of prostaglandin E and prostaglandin F in samples of commercial serum used for tissue culture.Prostaglandins 13(4):719-722;Cosgrove BD,et al.(2014)Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles.Nat Med 20(3):255-264;Gilbert PM,et al.(2010)Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture.Science 329(5995):1078-1081;Magnusson KE,Jalden J,Gilbert PM,&Blau HM(2015)Global linking of cell tracks using the Viterbi algorithm.IEEE Trans Med Imaging 34(4):911-929;Rodgers JT,et al.(2014)mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(A)Alert).Nature 510(7505):393-396;Ho AT&Blau HM(2016)Noninvasive Tracking of Quiescent and Activated Muscle Stem Cell (MuSC) Engraftment Dynamics In Vivo.Methods Mol Biol 1460:181-189;Bygdeman M(2003)Pharmacokinetics of prostaglandins.Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 17(5):707-716;Holla VR, Mann JR,Shi Q,&DuBois RN(2006)Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer.J Biol Chem 281(5):2676-2682;Volakakis N,et al.(2010)NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection.Proc Natl Acad Sci U S A 107(27):12317-12322;Baracos V, Rodemann HP,Dinarello CA,&Goldberg AL(1983)Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyrogen(interleukin-1).A mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever.N Engl J Med 308(10):553-558;Rodemann HP&Goldberg AL(1982)Arachidonic acid,prostaglandin E2 and F2 alpha influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle.J Biol Chem 257(4):1632-1638;Mauro A(1961)Satellite cell of skeletal muscle fibers.J Biophys Biochem Cytol 9:493-495;Montarras D,et al.(2005)Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration.Science 309(5743):2064-2067;Pawlikowski B,Pulliam C,Betta ND,Kardon G,&Olwin BB(2015)Pervasive satellite cell contribution to uninjured adult muscle fibers.Skelet Muscle 5:42;Cramer RM,et al.(2004)Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise.J Physiol 558(Pt 1):333-340;Darr KC&Schultz E(1987)Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal

muscle. *J Appl Physiol* (1985) 63 (5) :1816-1821; Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, & Wiswell RA (2006) Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* 33 (2) :242-253; Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, & Peake JM (2012) Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc Immunol Rev* 18:42-97; Zu G, et al. (2017) Nurr1 promotes intestinal regeneration after ischemia/reperfusion injury by inhibiting the expression of p21 (Waf1/Cip1). *J Mol Med (Berl)* 95 (1) :83-95; North TE, et al. (2007) Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447 (7147) :1007-1011; Zhang Y, et al. (2015) Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science* 348 (6240) :aaa2340; Thomas J, Fairclough A, Kavanagh J, & Kelly AJ (2014) Vaginal prostaglandin (PGE2 and PGF2a) for induction of labour at term. *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD003101; Schneider A, et al. (2004) Generation of a conditional allele of the mouse prostaglandin EP4 receptor. *Genesis* 40 (1) :7-14; Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, & Kardon G (2011) Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138 (17) :3625-3637; Safran M, et al. (2003) Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination. *Mol Imaging* 2 (4) :297-302; Papapetrou EP, et al. (2011) Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29 (1) :73-78; Chenouard N, et al. (2014) Objective comparison of particle tracking methods. *Nat Methods* 11 (3) :281-289; Maska M, et al. (2014) A benchmark for comparison of cell tracking algorithms. *Bioinformatics* 30 (11) :1609-1617; Moyle LA & Zammit PS (2014) Isolation, culture and immunostaining of skeletal muscle fibres to study myogenic progression in satellite cells. *Methods Mol Biol* 1210:63-78; Hakim CH, Wasala NB, & Duan D (2013) Evaluation of muscle function of the extensor digitorum longus muscle ex vivo and tibialis anterior muscle in situ in mice. *J Vis Exp* (72); Burkholder TJ, Fingado B, Baron S, & Lieber RL (1994) Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. *J Morphol* 221 (2) :177-190; Dobin A, et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29 (1) :15-21; Li B & Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12:323; Anders S & Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11 (10) :R106.

[0595] 肌肉损伤:我们使用了必需肌内注射10 μ l虎蛇毒素(10 μ g ml⁻¹; Latoxan, 目录号#L8104)或心脏毒素(10 μ M; Latoxan, 目录号#L8102)到胫前肌肌肉中的损伤模型。对于冷冻

损伤,在TA肌肉上方的皮肤上制造了一个切口,并将在液氮中冷却的铜探针以三个10s间隔施加至TA肌肉,使肌肉在每次施加冷冻探针之间解冻。当指示时,在损伤后48小时,将16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)(13nmol,Tocris,目录号4027)、吡喹美辛(35 μ g,Sigma,目录号I7378)或媒介物对照(PBS)注射到TA肌肉中。将对侧TA用作内部对照,除了力测量实验以外,其中每只小鼠的双腿都在相同的条件下受伤并且每种条件都使用独立的小鼠。

[0596] 对于Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠实验,我们连续五次每天用他莫昔芬的腹膜内注射来处理小鼠以激活在Pax7启动子的控制下的荧光素酶表达。在最后一次他莫昔芬注射后一周,小鼠接受了10 μ l心脏毒素(10 μ M;Latoxan)的肌肉注射,我们将其指定为测定的第0天。三天后,将13nmol dmPGE2或媒介物对照(PBS)注入TA肌肉。将对侧TA用作内部对照。在损伤后第3、7、10和14天测定生物发光。

[0597] 对于Pax7^{CreERT2};EP4^{flox/flox}小鼠实验,我们用连续五次每天腹膜内注射他莫昔芬处理小鼠,以切除Pax7表达细胞中的EP4等位基因。在最后一次他莫昔芬注射后一周,使小鼠经受肌肉注射10 μ l虎蛇毒素(10 μ g ml⁻¹;Latoxan),我们将其指定为测定的第0天。作为对照小鼠,使用相同性别的Pax7^{+/+};EP4^{flox/+}同窝仔。

[0598] 用于小鼠肌肉干细胞的荧光激活的细胞分选:对于肌肉干细胞分离,使用具有改良的制造商方案(Miltenyi Biotech)的温和MACS Octo Dissociator解离小鼠后肢肌肉。解离的肌肉用0.2%胶原酶(Roche)消化60分钟,然后用胶原酶/分散酶(0.04U ml⁻¹;Roche)消化30分钟。用18G针通过注射器解离释放单核细胞。对于小鼠肌肉干细胞,将单细胞混悬液与针对CD11b(1:800)、CD45(1:500)、Sca1(1:200)和CD31(1:200)的生物素化抗体一起孵育,然后与链霉亲和素磁珠(Miltenyi Biotech)、链霉亲和素-APC-Cy7、整合素- α_7 -PE(1:500)和CD34-eFluor660(1:67)一起孵育。在基于磁性的针对生物素-阳性细胞的选择柱(Miltenyi)上,耗竭细胞混合物的造血谱系表达和非肌肉细胞。然后将剩余的细胞混合物进行FACS分析,以分选纯度>95%的CD45⁻CD11b⁻CD31⁻Sca1⁻CD34⁺整合素- α_7 ⁺MuSC(DIVA-Van,Becton-Dickinson)。我们使用FlowJo v10.0生成并分析了流式细胞术散点图。对于野生型MuSC种类,我们将来自至少三只独立的年龄和性别匹配的供体小鼠的MuSC(各~5,000个)汇集在一起。

[0599] 肌肉干细胞移植:对于野生型MuSC研究,我们将来自GFP/luc小鼠(2-4月龄)的细胞移植到后肢辐照的NSG小鼠中。对于EP4^{flox/flox} MuSC研究,我们移植了用luc-IRES-GFP慢病毒(GFP/luc病毒)转导的来自EP4^{flox/flox}小鼠(2-4个月)的细胞,和一个亚组在移植之前在培养的第2天接受了mCherry/Cre慢病毒或模拟感染持续24小时的时间,如前所述(26)(有关详细信息,参见“肌肉干细胞培养、处理和慢病毒感染”部分)。在移植肌肉干细胞之前,我们通过腹膜内注射用氯胺酮(每只小鼠2.4mg)麻醉NSG接受者小鼠。然后,我们以18Gy的单剂量辐照后肢,其余部分用铅夹具屏蔽。我们在辐照2天内进行了移植。我们将MuSC以所需的细胞浓度重悬于0.1%明胶/PBS中,然后通过肌肉注射将它们(每个TA,250或100个小鼠MuSC)以15 μ l体积移植到TA肌肉中。对于新鲜的MuSC移植,我们将分选的细胞与13nmol的16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)(Tocris,目录号4027)或媒介物对照(PBS)共注射。移植后一个月,我们注射了10 μ l虎蛇毒素(10 μ g ml⁻¹;Latoxan,France),以损伤接受者肌肉并在体内重激活MuSC。我们通过移植到同一只小鼠对侧腿的TA肌肉中比较了来自不同条件的细胞。如图例所示,在移植后三周或八周,对小鼠实施安乐死并收集TA用于分析。

[0600] 生物发光成像:对于生物发光成像(BLI),我们使用异氟烷吸入麻醉小鼠,并通过腹膜内注射施用120 μ L D-荧光素(0.1mmol kg^{-1} ,于PBS中复溶;Caliper LifeSciences)。我们在荧光素注射后5分钟在F-终止=1.0下使用60秒暴露获取了BLI。使用Living Image软件(Caliper LifeSciences)记录和分析数字图像。我们分析了在每个后肢上方放置的一致目标区域(ROI)的图像,以计算生物发光信号。我们计算了以辐射度($\text{ps}^{-1}\text{cm}^{-2}\text{sr}^{-1}$)值计的为 10^4 的生物发光信号,以定义植入物阈值。这一 10^4 的辐射度阈值大约等于如先前报告的类似尺寸的目标区域定义的 10^5p/s 的总通量阈值。该BLI阈值对应于一种或多种GFP+肌纤维的组织学检测(24、26、27)。我们在移植后每周进行BLI成像。

[0601] 水凝胶制造:我们通过使用公开的制剂产生出水凝胶,以获得1mm厚度的12kPa(杨氏模量)刚度水凝胶,这是培养MuSC和维持在培养中的干细胞命运的最佳条件(27)。如前所述(27),我们为克隆增殖实验制造了12-kPa的水凝胶微孔阵列。我们切割并粘附所有水凝胶以覆盖12孔或24孔培养板的表面积。

[0602] 克隆肌肉干细胞增殖和命运分析:为了进行延时分析,我们从C57B1/6小鼠(2-4个月)中分选了MuSC,将其涂铺在胶原蛋白包被的板上,并对其进行了24小时的PGE2(Cayman Chemical)或媒介物(DMSO)处理。然后将细胞进行胰蛋白酶化,并以每 cm^2 表面积500个细胞的密度重接种在直径600 μm 的水凝胶微孔中。对于延时显微术,我们监测了在接种后具有单细胞的那些孔的细胞增殖持续38天,并使用具有定制的环境控制室和电动平台的PALM/AxioObserver Z1系统(Carl Zeiss MicroImaging)每3分钟以 $10\times$ 放大记录图像。我们使用用于细胞追踪和谱系重建的Baxter算法分析了延时图像顺序,以鉴定和追踪单细胞并生成谱系树(26-28、51、52)。

[0603] 活细胞和死细胞分别基于相差边界和运动性维持或丧失而在延时期序中进行区分。在所有时间点,每代(G1-G6)中活细胞的比例显示为归一化至100个单个MuSC的起始群体的细胞数。数据分析是设盲的。进行成像采集和评分的研究人员并未意识到给予所分析样品组的治疗条件。

[0604] 增殖测定:为了测定增殖,我们使用了三种不同的测定(血细胞计数仪、VisionBlue和EdU)。对于每一种,我们将MuSC以每 cm^2 表面积500个细胞的密度接种在平面水凝胶(血细胞计数仪和VisionBlue)或胶原蛋白包被的板(EdU测定)上。对于血细胞计数仪的细胞数计数,我们在指示的时间点通过在 37°C 下用0.5%胰蛋白酶在PBS中孵育细胞5分钟来收集细胞,并使用血细胞计数仪对其至少定量3次。另外,我们使用VisionBlue快速细胞存活力荧光测定试剂盒(BioVision,目录号K303)作为培养中细胞生长的读出。简而言之,我们将MuSC与10%VisionBlue在培养基中孵育3小时,并在荧光读板仪(Infinite M1000 PRO, Tecan)上于 $\text{Ex}=530\text{-}570\text{nm}$ 、 $\text{Em}=590\text{-}620\text{nm}$ 下测量荧光强度。我们使用Click-iT EdU Alexa Fluor 555成像试剂盒(Life Technologies)测定了增殖。简而言之,我们在固定前将活细胞与EdU(20 μM)孵育1小时,并根据制造商的指南将染色的细胞核与抗成肌素(Santa Cruz,目录号sc576,1:250)一起染色以测定分化。我们用DAPI(Invitrogen)复染细胞核。我们使用带有Plan NeoFluar $10\times/0.30\text{NA}$ 或 $20\times/0.75\text{NA}$ 物镜(Carl Zeiss)以及由SlideBook(3i)软件控制的ORCA-ER数码相机(Hamamatsu Photonics)的AxioPlan2落射荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging)获取图像。我们使用MetaMorph图像分析软件(Molecular Devices)对EdU阳性细胞进行了定量。数据分析是设盲的,其中进行细胞评分

的研究人员没有意识到给予所分析样品组的处理条件。

[0605] PGE2 ELISA:将肌肉收获,在含有双咪唑美辛(5.6 μ g/ml)的冰冷PBS中冲洗,并在液氮中速冻。将冷冻的样品在液氮中粉碎。将粉末转移至含500 μ l裂解物缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、4mM CaCl₂、1.5% Triton X-100、蛋白酶抑制剂和微球菌核酸酶)的Eppendorf管,然后使用组织均质器均化。使用PGE2 ELISA试剂盒(R&D Systems,目录号KGE004B)测量上清液的PGE2水平,并相对于通过BCA测定(BioRad)测量的总蛋白质表示,并表示为PGE2的ng。每个样品一式两份并且在两个独立的实验中的每一个中进行测定。

[0606] 对于条件化培养基测定,如前所述(53)从趾长伸肌(EDL)中分离出肌纤维。在存在或不存在咪唑美辛(1 μ M, Sigma)的条件下,在剥离的血清培养基中培养纤维24小时。使用PGE2 ELISA试剂盒(R&D Systems,目录号KGE004B)收集和测量条件化培养基,并相对于收集的体积(ml)进行表达。每种样品均一式三份和在两个独立实验中进行测定。

[0607] 体内肌力测量:为了进行力测量,首先将小鼠用与O₂混合的2-5%挥发异氟烷麻醉。将小鼠定位在加热灯下以将身体和肌肉温度保持在30 $^{\circ}$ C。将TA肌肉的远端肌腱解剖,并通过手术缝合将其绑在300C-LR力传感器(Aurora Scientific)。将动物的膝固定至固定的钢柱,并将脚系带至平台,以防止其他肌肉群的收缩引起移动。将电刺激跨两个针电极施加,该针电极穿过皮肤正好放置在膝上方和TA肌肉下方,以刺激胫神经。在所有测量中,我们在预定的超最大刺激电压下使用了0.1ms的脉冲。用0.1ms的单个脉冲刺激TA肌肉以进行颤搐力测量,并用一串150Hz的0.3s脉冲刺激以进行强直力测量。我们对每种肌肉进行了五次颤搐测量,然后进行了五次强直测量,每次测量之间恢复了2-3分钟。将数据用PCI-6251采集卡(National Instruments)收集并在Matlab中分析。我们通过归一化按肌肉生理性横切面积(PCSA)计的力测量值来计算比力值,其在对照组之间相似(表2)。PCSA(以mm²测量)根据以下公式计算(55):

[0608] $PCSA(mm^2) = [质量(g) \times \cos\theta] \div [\rho(g/mm^3) \times 纤维长度(mm)]$,

[0609] 其中 θ 是纤维的羽状角和 ρ 是肌肉密度(0.001056g/mm³)。

[0610] 实施例4:在小鼠中建立最佳PGE2剂量以与布比卡因组合使用并监测MuSC数和肌肉再生的研究。

[0611] 该实施例描述了双转基因小鼠模型和生物发光成像用于检查本发明的组合物对肌肉再生的作用并建立最佳剂量的PGE2或PGE2衍生物(16,16-二甲基前列腺素E2)与布比卡因组合使用的用途。

[0612] 通过使从杰克逊实验室(Stock#005125)获得的Pax7^{CreERT2}小鼠和Rosa26-LSL-Luc小鼠杂交来产生双转基因Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠。这些基因型已通过适当的基于PCR的策略进行了验证。来自转基因和野生型菌株的所有小鼠均为幼龄的(2-4个月)。所有实验均使用年龄和性别匹配的对照进行。如图23A所示的实验方案所描绘,用连续五次每天腹膜内注射他莫昔芬来治疗小鼠,以激活在Pax7启动子的控制下的荧光素酶表达。在最后一次他莫昔芬注射后一周,在Hamilton注射器上使用30规格针,向胫前肌(TA)肌肉肌内注射了50 μ L含有0.125%、0.25%或0.5%布比卡因(BPV)(Cayman Chemical目录号16618)和10 μ g 16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2;Tocris,目录号4027)的药物混合物。对侧TA接受了50 μ L的含有0.5%布比卡因(BPV)和DMSO媒介物混合物作为基线假手术对照。在损伤后第3、7、10和14天测定生物发光。

[0613] 如前所述使用Xenogen-100系统进行生物发光成像(BLI)。简而言之,使用异氟烷吸入麻醉小鼠,并通过腹膜内注射施用120 μ L D-荧光素(0.1mmol/kg,在PBS中复溶;Caliper LifeSciences)。荧光素注射后5分钟,在F-终止=1.0下使用60秒暴露获取了BLI。使用Living Image软件(Caliper LifeSciences)记录和分析数字图像。分析在每个后肢上方放置的一致目标区域(ROI)的图像,以计算生物发光信号。计算以辐射度($\text{ps}^{-1}\text{cm}^{-2}\text{sr}^{-1}$)值计的为 10^4 的生物发光信号,以定义相对于本底的阈值信号。BPV与dmPGE2或媒介物共同注射后,每两周进行一次BLI成像,持续2周。

[0614] 图23A-C和24中的数据显示为平均值 $\pm$ s.e.m,其中n=6只小鼠。进行每个时间点的多次t检验或单向ANOVA,以比较治疗组(BPV/dmPGE2)和对照组(BPV/媒介物)。p值<0.05的差异表示为*(星号),被认为是显著的。

[0615] 图23B显示了BLI信号的实例,其在用BPV和dmPGE2组合治疗的肌肉中比单独用BPV治疗的肌肉高。BLI图像是在注射后两周获得的。如图23C所示,与BPV/媒介物组相比,BPV/dmPGE2组在注射后两周BLI的对数倍数变化显著更高($p<0.05$),这表明当使用BPV和dmPGE2组合时,肌肉再生更为显著。在阴性对照(仅DMSO媒介物)和仅dmPGE2组中未注意到可检测的变化。

[0616] 如图24所示,当与dmPGE2组合给予时,BPV使肌肉再生产生剂量依赖性增加(如由BLI信号的较大倍数变化证明),在注射后两周明显的是统计学上的显著变化。

[0617] 总之,这些数据表明,与单独dmPGE2或BPV相比,dmPGE2和BPV的组合在促进肌肉再生方面更为有效,并且更高剂量的dmPGE2导致更明显的肌肉再生。

[0618] 参考文献:Safran,M.et al.Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination.Molecular imaging 2,297-302(2003);Cosgrove,B.D.et al.Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles.Nature medicine 20,255-264(2014);Gilbert,P.M.et al.Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture.Science 329,1078-1081(2010);Sacco,A.,Doyonnas,R.,Kraft,P.,Vitorovic,S.&Blau,H.M.Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells.Nature 456,502-506(2008);Ho,A.T.&Blau,H.M.Noninvasive Tracking of Quiescent and Activated Muscle Stem Cell (MuSC) Engraftment Dynamics In Vivo.Methods in molecular biology 1460,181-189(2016)。

[0619] 实施例5:在小鼠中建立最佳PGE2剂量以与布比卡因组合使用并监测MuSC数和肌肉再生的研究。

[0620] 该实施例说明了可以进行以优化与布比卡因一起的PGE2的有效剂量的研究。布比卡因组分有两个作用:其为注射提供麻醉,并还刺激再生中的肌肉干细胞功能。待测试的剂量包括先前已在患者中用于每种单独的药物的范围。在每种情况下,都将PGE2-布比卡因总剂量分四次注射来递送,以使由于针头和轻度肌毒性麻醉剂引起的肌肉干细胞激活最大化。为了通过BLI非侵入性地测试肌肉再生能力,使用了Pax7-荧光素酶转基因小鼠模型,该模型非侵入地提供了随着时间的推移增加的内源性干细胞功能的生物发光读出。使用了坐骨神经痛神经横断模型,它是一种良好耐受、经验证的和可重复的失神经支配-诱导的啮齿

动物骨骼肌萎缩模型。该技术导致模拟在CTS患者中所见的萎缩性外展拇短肌 (APB) 肌肉的肌肉质量丧失。然后将团注的PGE2-布比卡因递送至四个随机分组的小鼠组中,以测试三种PGE2剂量的范围,将其与未处理的对照组进行比较。这些实验可用于定义PGE2和布比卡因注射组合的最佳剂量,以用于临床试验。

[0621] PGE2和布比卡因两者先前已在人临床试验中用于其他适应证(参见,NCT01861665,但在肌肉中未一起使用。对于该实施例中所述的研究,可以使用已公开的有效剂量和FDA批准的剂量,其处于0.5%布比卡因的NOAEL。目的是测试最大程度增强萎缩的后肢肌肉中内源性鼠MuSC功能的最佳PGE2剂量。在这些实验中,评估内源性MuSC扩增必需在一定时程内一系列的快速灵敏且非侵入性BLI测量。最后,组织学在萎缩的肌肉组群分析中特别有用,以确定PGET2和布比卡因注射的组合诱导的失神经支配和早期肌肉破损的程度,以及可归因于治疗终点的肌肉功能恢复的随后肌肉再生和神经再支配的程度。

[0622] 建立有效剂量的PGE2在体内刺激内源性MuSC数量

[0623] 生物发光成像 (BLI) 测定用作方便的非侵入性方法,以通过使用肌肉干细胞报告基因小鼠模型(即, $Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc$) 在诱导神经横断后诱导的萎缩和GA注射PGE2和布比卡因的组合之后,来快速评估体内MuSC扩增并提供了再生潜力的灵敏度量。每种情况下的PGE-布比卡因总剂量均以4次注射来递送,以最大程度地暴露整个肌肉,并增强由于针头和温和肌肉毒素麻醉剂所致的肌肉干细胞的激活和再生。

[0624] BLI由于其高的信噪比而提供非凡的灵敏度,因为不需要用于荧光成像中的激发光(其产生背景噪声)。冷却电荷耦合器件 (CCD) 摄像机直接记录了由在经扩增的内源性肌肉干细胞表达的荧光素酶进行的荧光素催化反应发射的BLI信号。这种动态读出允许在同一小鼠中随时间推移对MuSC功能进行体内纵向研究,并因此构成了再生肌肉的末期连续切片和免疫荧光分析的有用辅助工具。

[0625] 肌肉再生是通过将布比卡因用作肌肉毒素而诱导的。在先前对肌肉干细胞的研究中,发现布比卡因在肌肉损伤/再生模型中是有效的。使用0.5%布比卡因的剂量,该剂量已被充分证明诱导小鼠肌肉中的稳健再生。该剂量与在患者中临床上用于局部麻醉和外周神经阻滞的剂量相当。

[0626] 用一定范围的PGE2浓度测试固定剂量的布比卡因的组合制剂,所有这些浓度均低于FDA批准的最大PGE2剂量(参见,NCT00602095)。使用例如可以从Pfizer Pharmaceuticals,UK获得的FDA批准的GMP级PGE2。

[0627] 将包含PGE2和布比卡因的制剂递送至双腿的经诱导的萎缩腓肠肌 (GA) 肌肉,作为混合快和慢纤维类型组合物,并且GA小鼠肌肉的尺寸($135 \pm 22.6\text{mg}$)比先前研究的胫前肌肌肉更密切接近人ABP肌肉($261 \pm 119\text{mg}$)。小鼠GA肌肉的纤维长度/肌肉长度比($45.5\% \pm 4.5\%$)与人APB肌肉($69\% \pm 9\%$)相似。先前的研究表明,移植的MuSC可恢复营养不良小鼠受伤GA肌肉的力量。

[0628] 使用建立的坐骨神经横断模型来模拟在CTS患者中所见的萎缩性APB肌肉,从而诱导小鼠后肢肌肉萎缩。该模型导致后下肢肌肉失神经支配一段时间(即在神经横断后),导致萎缩,并且随后是肌肉的神经再支配(在神经轴突再生回到其运动终板之后)。

[0629] 使用MuSC报告基因小鼠模型和BLI技术,确定在通过BLI确定的增强内源性MuSC再生功能中最有效的剂量。具体而言,小鼠用五次连续的每日腹膜内注射他莫昔芬来治疗,以

激活荧光素酶表达。在最后一次他莫昔芬注射后一周,对小鼠进行坐骨神经横断。两周后,在明显出现肌肉萎缩的时间点,进行50 μ L PGE2-布比卡因混合物的肌肉注射。先前的报道表明,可以将建议的最大剂量的PGE2 20 μ g (或4mg/kg)施用给啮齿动物,而不会产生有害作用。因此,将5、10和20 μ g范围的PGE2剂量递送至GA。递送必需进行四次12.5 μ L注射,每条腿每块GA肌肉两次(总计0.5cc)。作为对照,GA肌肉注射单独的媒介物(即PBS)、单独的0.5%布比卡因或单独的PGE2 (5、10或20 μ g)。损伤后2周,每2天通过生物发光成像(BLI)评估体内MuSC活性,此后每2周一次持续3个月。最佳PGE2-布比卡因剂量是对肌肉再生具有饱和作用的最低有效剂量,如通过BLI评估。据信内源性MuSC群最初被激活,然后迅速增殖,导致BLI信号呈指数增加,其达到峰值,然后在再生达到内稳态时达到平稳。根据BLI强度的双侧 α 为0.05和标准偏差为 6.24×10^5 p/s/cm²/sr (基于先前的数据),分析每种条件6只小鼠(总共48只小鼠),以实现95%的统计功效。

[0630] 总之,本部分中描述的实验确定增强再生中内源性MuSC数量扩增的PGE2的配方或最佳剂量。然后将最佳剂量用于本实施例以下部分所述的实验中。

[0631] 通过免疫组织学评估PGE2-布比卡因制剂对肌肉再生的长期作用:用MuSC数目和BLI测量的肌肉再生的增加用独立转基因小鼠系Pax7^{CreERT2} Rosa26-LSL-dtTOMATO中的肌纤维大小、结构和干细胞数目的组织学分析证实。使用该系评估了MuSC活性,并根据谱系追踪和评估损伤后dtTOMATO+肌纤维数目评估了再生。如上所述建立的最佳剂量的PGE2用于萎缩性Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-dtTOMATO小鼠肌肉中。TOMATO信号用于在肌肉纤维组织切片中从组织学上追踪激活的干细胞及其分化后代。

[0632] 尽管生物发光和TOMATO测定追踪内源性干细胞扩增,但是它们不区分干细胞、包括祖细胞的亚群和分化的成肌细胞。为了满足这一需求,在每个实验结束时,用针对标记干细胞(如,Pax7)、祖细胞(如,Myf5)和分化细胞(如,MyoD)的成肌转录因子的抗体进行组织学分析和免疫染色。MuSC对肌纤维和自我更新以在小生境中在卫星细胞位置中沿着肌纤维产生干细胞的贡献也得到了量化。通过用层粘连蛋白和肌球蛋白重链(MHC)抗体免疫染色来鉴定肌纤维。根据以前的工作,预计在PGE2处理后不久,相对于GA肌肉中分化程度更高的细胞,干细胞的比例将会提高。

[0633] 为了分析肌肉神经再支配,将“神经再支配比”评分为神经再支配的神经肌肉连接(NMJ)的频率。该比率得自随 α -银环蛇毒素和Schwann细胞GAP-43免疫反应性标记的神经肌肉连接(总NMJ)频率变化的被神经丝和突触血管蛋白(SV2)免疫反应性标记的总NMJ(新NMJ)。

[0634] 为了更定量地评估总GA肌肉,对解离的野生型肌肉组织进行FACS分析,以确定肌肉干细胞(Pax7⁺)与激活的(Pax7⁺/Myf5⁺)和定型(MyoD⁺/成肌素⁺)成肌细胞之比。这对于确定PGE2增强干细胞活性至关重要。

[0635] 对于这些实验,每组使用6只小鼠:单独的媒介物、单独的布比卡因、单独的最佳PGE2剂量,以及布比卡因和最佳PGE2剂量一起用于组织学(n=24只小鼠)和FAC分析(n=24只小鼠),以达到95%的统计功效。非参数t检验(如,曼-惠特尼检验)用于评估所有提议的动物实验的统计学显著性。

[0636] 实施例6:通过评估力量、结构和肌肉体积来评估小鼠肌肉对PGE2的响应。

[0637] 该实施例说明了可用于使用多种技术评价小鼠中的肌肉功能改善的研究。使用了

由斯坦福大学Delp实验室(图25)建立的新型手持式显微内窥镜,其允许测量小鼠或人类中的单个运动单元的收缩动力学。根据肌节位移的时程计算力产生动力学。同时,体内力测量使用斯坦福大学Blau和Delp实验室开发的独立技术进行,以评价力量并评估颤搐力和强直力。另外,通过超声测量肌肉体积的增加,以确定受伤肌肉恢复肌肉质量的程度。这些测量评估了PGE2-布比卡因制剂在促进萎缩性GA小鼠模型中的肌肉再生中的功效。基于内窥镜和超声研究,对神经再支配的纤维大小和范围进行组织学评估,以交叉验证结果。重要的是,显微内窥镜和超声评估方法可以直接转化并用于评价患者的人手肌,以评估基线功能和干预后恢复。

[0638] 在以上实施例5中描述的实验之后,如本文所述,使用超声、显微内窥镜和力测定评估小鼠以评估肌肉体积、结构和力量的增加。使用新型手持式显微内窥镜,可以对单个运动单元的收缩动力学进行非侵入式测量。根据肌节位移的时程计算力产生。在一些情况下,该测定经8周时呈每周一次进行。目的是评估与对照组相比,已接受PGE2和布比卡因治疗组合的肌肉的功能性改善。还通过超声分析来评价所处理的肌肉的体积。

[0639] 使用显微内窥镜测量力量来评价肌肉功能:PGE2和布比卡因的组合对肌肉再生的作用的最终测试是进行肌力增加的功能性测定。使用小至350微米的显微内窥镜,可以在被动和激活的肌肉中对单个肌节进行成像,从而可以以动态方式直接可视化单个肌节和长度变化,这是Delp实验室开发的技术。如本文所述,测量由在注射在以上实施例5中确定的最佳PGE2-布比卡因剂量后由内源性MuSC产生的肌肉组织的收缩动力学和力产生能力组成。还使用微创光学显微内窥镜评估肌节长度,以观察治疗后小鼠肌肉纤维中产生的光的第二谐波频率。横纹骨骼肌由肌节(基本收缩单位)组成。用于进行这些测量的有用仪器包括:激光扫描显微镜(适用于允许添加用于深部组织成像的显微内窥镜)和超短脉冲钛蓝宝石激光器,以产生第二谐波信号。这种微创技术可以容易地应用于临床,以评估肌肉功能参数,并可以用于评价患者体内的经PGE2-布比卡因处理的外展拇短肌(APB)的功效(参见,以下实施例7)。在PGE2-布比卡因处理后6周,评估如实施例5所述处理的小鼠体内的力。因此,与PBS对照相比,最佳PGE2-布比卡因剂量不仅产生最高的BLI信号,而且还产生最强的力输出。作为显微内窥镜的替代,可以通过先前由Blau实验室建立的力传感器技术在体内评估力量。每个条件分析6只独立小鼠,以获得95%的统计功效。

[0640] 通过超声成像来评价肌肉体积。超声成像是一种非侵入性方法,可用于根据肌肉体积评估肌肉再生。此外,超声是一种快速且非侵入性的方法,允许随时间进行重复测量以评价本发明的组合物和方法对肌肉质量的作用。肌肉的超声成像基于超声束遇到组织时产生的不同声阻抗。由于肌肉的超声检查表现与周围的脂肪、纤维组织、神经、血管和骨骼完全不同,因此可以通过测量肌肉的厚度来容易地量化萎缩和由于再生所致的增加的肌肉质量。

[0641] 由于CTS所致的神经肌肉萎缩引起可以用超声可视化的结构性肌肉改变。萎缩可以通过测量肌肉厚度来确定(即,在超声图像上肌肉变白)。与肌电图(EMG)和临床观察相比,超声在检测束缚方面更加灵敏,因为超声可以可视化较大的肌肉面积和更深的肌肉,尤其是在手中。随着分辨率和帧数的提高,可以通过超声检测较小规模的自发性肌肉活性诸如纤颤。

[0642] 实施例7:用于治疗腕管综合征的临床试验.

[0643] 该实施例说明了经设计以确定本发明的组合物和方法对重度腕管综合征 (CTS) 患者的治疗的益处的临床试验。该试验的干预通过在腕管松解术后2个月将PGE2-布比卡因制剂注射至失神经支配的外展拇短肌 (APB) 肌肉中来测试治疗性策略。评估了以下结果:1) 使用上肢PROMIS评估上肢功能;2) 如通过加拿大职能表现测量表标准化的自我评价调查表评估的患者结果;3) 莫伯格拾取测试;4) 超声体积测量;5) 使用“数字捏力测力计”设备使用捏力获得功能强度;以及6) 通过超声确定肌肉质量和通过显微内窥术确定肌肉结构。在干预后1、3和6个月进行评估。该实施例中所述的研究可作为治疗CTS肌肉萎缩的II期临床试验,并为作为双方战斗伤亡和人口老龄化的主要问题的其他神经相关性肌萎缩的治疗提供平台。

[0644] 设计:该研究是一项随机安慰剂对照试验,以评估肌内PGE2施用是否改善失神经支配后的肌肉恢复。该临床试验将产生两个可交付成果:(1) 它将揭示PGE2是否改善失神经支配的肌肉再生能力;(2) 它还将测试PGE2是否改善失神经支配/神经再支配后肌肉的功能。

[0645] 研究群体

[0646] 纳入标准:符合以下标准的受试者将被纳入试验中:

[0647] ●患者计划在Palo Alto VA接受腕管切开松解术

[0648] ●神经传导研究显示了APB肌肉的运动影响,且远端运动潜伏期至APB<6.5ms

[0649] ●腕管松解术后2个月,APB肌肉持续无力,如通过尖端捏测量测试

[0650] 排除标准:具有以下一项或多项的受试者被排除参与试验:

[0651] ●诊断为青光眼

[0652] ●无法完成学习表格(教育、认知能力、心理状况、医疗状况)。

[0653] ●先前对前列腺素有不良反应。

[0654] ●哮喘

[0655] ●施用干预时收缩压大于170mm/hg

[0656] ●怀孕

[0657] ●干预前后两天无法停用NSAIDS

[0658] ●持续性手术部位疼痛大于3(0-10级量表)

[0659] 退出:记录所有试图接受筛选的患者,同意参加的人数,提供知情同意的人数,完成基线评价测量的人数,接受随机化的人数以及完成分配组的试验的人数。询问选择不进行随机化的患者是否将参加与提议的临床试验相同但没有任何主动干预的观察性研究。通过这种方式,尝试从未参与研究的人群以及接受随机化的人群中收集随访数据,以鉴定试验人群与未参加研究的人群是否存在显著差异。患者可以随时退出。

[0660] 手术:手术是开放的腕管松解术。这些程序在含有1%利多卡因和肾上腺素的局部麻醉剂下进行。该程序使用在手的手掌面上的纵向切口。将患者包裹在没有夹板固定的轻纱布中,并返回12天以去除缝合线。在12天随访中,向患者教授疤痕按摩,并且只有在遇到困难时才可以再次随访。

[0661] 医药/随机化:以10mg/ml稀释液(在0.5ml安瓿(Pfizer,UK)中)在溶液中的PGE2(地诺前列酮)用于干预组。地诺前列酮已在孕妇中用作引产药物多年。这项研究改变了这种临床可用医药的用途。在人类中最常见的副作用很大程度上与怀孕有关:子宫破裂和羊

膜栓塞。报告的其他副作用包括过敏反应、发热、胸痛、心律不齐、恶心以及其他。该药物的半寿期小于5分钟。

[0662] 用布比卡因将这种药物稀释至最佳剂量,如由一个或多个先前的动物试验指导以达到最佳剂量。将外观相同的匹配安慰剂注射剂在药房内混合。使用斯坦福大学生物统计学系编写的R程序准备随机化(即,将受试者分配至治疗组或对照组)。该程序采用“偏性掷币”方法,该方法会逐渐改变随机分配的可能性,以纠正先前随机化的受试者中的任何失衡。这种“偏性掷币”方法减少了所有层中治疗组之间出现严重失衡的可能性,同时,在每个处理分配中均保持了不可预测性。以治疗与安慰剂的比率为1:1进行随机化。

[0663] 招募:对在体检时患有APB无力的受试者试图进行招募和登记,并完成术前评估。APB力量使用测力法使用指尖捏力进行评估。指尖捏合是用于评估CTS中APB力量的推荐措施。指尖捏合也是在腕管松解术后显示有所改善的第一捏合/握力测试。为了纳入试验,APB力量必须比规范数据低15%,或者在女性中为3.84kg和在男性中为5.78kg。

[0664] 手术两个月后,对受试者进行了重新评价。持续无力的那些则继续进行干预。这样可以允许治疗未能从仅神经释放中恢复的那些。持续无力是使用对APB进行力测量来定义的,其中患者的受力比对侧小15%。然后排除手术部位持续疼痛大于3的患者。疼痛大于三是中度疼痛,并可能会干扰力产生。先前的研究表明(米诺环素试验)6%在3个月时仍会出现中度疼痛。

[0665] 约50%的受试者具有APB失神经支配。这些人中有50%预计在2个月时会持续无力。

[0666] 术前数据采集:招募后,参与者完成基线评估。这是在腕管松解术之前完成的。该评估包括以下列出的措施:

[0667] 人口统计数据:种族、民族、年龄、性别和医疗合并症。

[0668] 表3:神经传导严重性评分

[0669]

级别	定义
0	无异常
1	仅在最敏感的测试中才能证明的CTS
2	感觉传导慢,但末端运动潜伏期正常
3	SNAP保留,运动减慢,远端运动潜伏期至APB<6.5ms
4	SNAP不存在但保留了运动响应,远端运动潜伏期至APB<6.5ms
5	末端延迟到APB>6.5ms
6	感觉和运动电位实际上无法记录

[0670] 这是使用神经传导研究对腕管严重程度进行分类的评分。神经传导研究取决于操作员,并且值可在各个点之间变化。该评估通过使用此测试站点的那个测试的异常值而不是精确值来消除该问题。

[0671] 上肢PROMIS仪器:PROMIS上肢仪器是一种计算机适应测试,它从PROMIS项库(v1.0:PF)中提取项,该项具有一组定义并量化了特定的症状的校准问题或功能问题。它使用项选择算法,使评估程序能够根据对应答者当前项的响应来选择应答者的下一项,从而避免出现多余、无关或在其他方面靶向较差的项。PROMIS评分报告为T评分,平均值为50且SD为10;评分越高表示PF水平越高。该测试已经过评价,并显示出对于代表性美国样品,可靠性>

0.95。

[0672] 加拿大职能表现测量表 (COPM) : 这项以患者为中心的检查测量了患者在自我保健、休闲和生产力方面的感知职能表现。它是在嵌套在提供者进行的半结构化访谈中的5步骤过程中完成的, 通常需要10020分钟施用。患者确定困难区域并对其进行优先排序。在对患者重要的区域中对患者的表现和满意度进行评级。随着时间推移, 测量表现和满意度评分的变化。COPM已显示出对变化的响应, 表现评分的两分提高被认为是临床上显著的。

[0673] 莫伯格拾取测试: 在该测试中, 拇指、食指和中指用于随机拾取12个不同的物体, 一次一个。患者应尽快将它们放在开放盒中。测量完成任务所需的时间 (以秒计), 并将其记录为终点。执行两次, 直到拾取所有物体, 或者直到花费30秒未能成功尝试拾取已鉴定的物体为止。在有眼罩和无眼罩的情况下重复测试。对未受伤的手将执行相同的程序。这将被评分为受伤手和另一只手之间的指数。该测试提供了有关手精细运动和感觉功能的信息。

[0674] 指尖捏力: 指尖捏力是使用数字捏力测力计测量的, 所述数字捏力测力计用于测量患者手部力量以评价患者APB肌肉功能障碍的程度。该指尖捏合将拇指指腹的力施加到食指指腹。患者以测试臂位于其一侧并且肘部弯曲90°坐着。手掌朝下, 并在拇指垫与食指垫之间测量捏力。患者挤压、握住并释放。该测试在2分钟的互测间隔内在三个连续的测量中进行。

[0675] APB的超声体积测量: 超声已用于评估APB和手中其他小肌肉的体积。超声可以检测肌肉的多个方面。首先, 超声可以鉴定肌肉的大小。这通常是通过测量横截面积 (CSA) 来完成的。APB的CSA与肌肉力量密切相关。通过将探针放在第一掌骨的近端三分之一处来测量APB肌肉。CSA的图像另存为位图图像文件, 然后传输到个人计算机。使用Adobe Photoshop CS6 Extended进行图像分析。套索工具用于鉴定考虑中的肌肉。使用分析选项计算CSA。筋膜划定了APB肌肉的边缘, 并允许APB与拇对掌肌 (相邻的鱼际肌) 分离。

[0676] 还测量了肌肉的回声强度, 并且其是失神经支配的迹象。实际上, 肌肉的回声强度和均匀性与CTS的严重程度有关。APB肌肉是使用B模式用5-10MHz传感器和以下设备设置通过超声测量的: 增益50dB, 动态范围56dB和深度3cm。受试者坐着, 双手完全仰转。测量CSA。将所有测量重复三次, 并将平均值视为最终测量。

[0677] 十项测试: 十项测试是评估感觉的有效方法, 并且是腕管综合征严重程度的标记。该测试是在患者手心朝上的情况下进行的。建议患者测试为0-10评分。检查员使用食指指腹, 并轻轻抚摸正常感觉的区域 (通常是对侧手指)。指示参与者这表示量表上为10的评分。随后, 使用相同的压力同时刺激异常区域和正常区域, 并且与正常锚定区域比较, 参与者对患肢上的刺激评分 (0-10)。从这些测量中, 得出感觉比率。

[0678] 干预: 在手术释放后2个月, 通过指尖捏力重新评价患者的APB持续无力。继续保持无力的那些参加试验, 并随机化至安慰剂vs. PGE2和布比卡因组合。如上文实施例5和6中所述, 从小鼠中确定的最佳剂量推断出剂量。在临床前的初步研究中, 每平均GA肌肉质量 (135mg) 施用10μg PGE2。人中的剂量从小鼠所用的剂量推算出来, 因为该药物并未全身递送。在APB肌肉中使用的剂量远低于临床上用作在孕妇中引产的药物的剂量 (即每次治疗1-5mg)。

[0679] 为了进行干预, 使用了防腐技术, 并用大量的1%利多卡因麻醉皮肤。然后使用30号针将0.5cc PGE2和布比卡因的组合或盐水和布比卡因的组合以4等份注入APB肌肉。注射

后半小时对患者进行监测。PGE2的半寿期为5分钟,因此30分钟足以检测对医药的任何急性反应。

[0680] 练习是肌肉再生的重要组成部分。为所有患者给予练习程序,以增强他们的APB肌肉,并指导他们每天至少进行10分钟练习。为每名患者提供Theraputty以协助他们家庭治疗程序。每周与患者联系以鼓励他们每天进行活动。

[0681] 手术后数据采集:在手术后4个月和6个月(干预后2个月和4个月)对患者进行评估。术后评估将包括:

[0682] 1. 上肢PROMIS

[0683] 2. COPM

[0684] 3. 莫伯格拾取测试

[0685] 4. 超声体积测量

[0686] 5. 指尖捏力

[0687] 6. 参加正式的物理疗法:询问每名患者他们是否曾经与物理治疗师一起对他们的手进行处理。正式的物理疗法可能会影响结果。因此,那些接受物理疗法的人被排除在外。

[0688] 7. 练习依从性:询问每名参与者他们练习的频率:每天、每周几次、每周一次或根本不做。

[0689] 8. 不良事件:询问受试者自上次随访以来是否有任何健康问题。

[0690] 示例性主题时间线在图26中示出。

[0691] 显微内窥镜:选择两组进行显微内窥镜。在试验开始时对5名健康志愿者进行了显微内窥镜,以了解健康的肌肉结构。干预前和干预后4个月也对20名受试者进行了显微内窥镜,以评估改善。由于这是一项双盲研究,因此将通过随机选择将受试者纳入两组。因此,预计将代表每组至少有5人(PGE2 vs. 安慰剂)。在之前的研究中,这个数字足以产生重大发现。对于所有人,技术都是相同的。受试者舒适地坐着,手处于仰卧位放松。使用防腐技术,并使用超声引导将显微内窥镜放于APB肌肉中。超声有助于确定肌肉位置和纤维方向。显微内窥镜以1mm的增量缓慢抽出。至少对3种不同的纤维成像。

[0692] 分析

[0693] 终点和测量:该试验具有三种类型的终点:可行性终点、安全终点和功效终点。

[0694] 主要可行性终点:可行性终点被设计为在完成研究过程时提供功效的可靠度量。主要的可行性终点是其被随机化至的组中的完成研究的筛选人员的百分比。

[0695] 安全性和不良事件终点:在医药施用期间完成了对副作用的主动捕获,并在干预后第2天进行电话随访,专门询问水肿、淤青或疼痛加剧。试验期间每两个月记录并回顾一次不良事件。

[0696] 功效终点:主要功效终点是使用通过测力法测量的以kg计的指尖捏力进行的APB力测量。次要终点包括APB肌肉横截面积的变化。这是使用超声记录的,并以 cm^2 计进行测量。

[0697] 分析群体:所有随机化的患者都纳入意向治疗分析中。每个方案分析中均纳入100%依从性的患者。

[0698] 背景和人口学特性:人口学统计和背景信息用描述性统计数据(如,平均值、标准偏差、百分比等)总结

[0699] 可行性分析:基于同意时获得的基线变量,对导致未能完成研究方案的因素进行正式分析。根据主要可行性终点(即,他们是否在随机化其的研究组中完成研究)将患者分为两类。逻辑回归用于鉴定与未能完成研究相关的因素。

[0700] 功效分析:使用线性回归模型分析主要和次要功效终点。将控制患者因素,诸如年龄、糖尿病状况和NCS评分。研究样品大小和功效来源于该比较(见下文)。校正主要终点的次要分析以用于多重比较。未校正探索子组分析以用于多重比较。

[0701] 安全性分析:进行与干预相关的不良事件的描述性统计和计数。比较安慰剂组和干预组之间的比率。

[0702] 用于处理丢失数据和不遵循方案的方法:主要分析是意在处理。对具有完整方案遵循性的那些也要进行单独的功效分析。

[0703] 评价试验进行(包括应计率、数据质量):每20个主要终点事件都要审查试验进行。审查了可行性终点,以确保完成试验的可能性。对于这些审查,将准备关于方案违规的应计率和累积统计数据。

[0704] 亚组分析:亚组分析检查了由年龄大于70岁和用于神经传导研究的严重卡压评分定义的预定义的高风险亚组中的治疗功效。

[0705] 样品大小

[0706] 应计估值:在30个月的时间内登记了60名受试者。这相当于每月大约有2名患者。

[0707] 样本大小合理:招募60名患者进行研究。样品大小的依据如下。零假设是治疗组之间APB的力测量没有变化。另一种假设是,PGE2和布比卡因的组合会显著改变APB的力测量值。

[0708] 具有相等方差的两样品t检验用于测试安慰剂组和PGE2-布比卡因组之间APB力测量的差异。基于先前研究的强直力测量值相差10.0N的小鼠的数据,以80%的功效寻求主要结果的总效果大小的差异。因此,使用具有以下参数的统计分析软件(SAS 9.4版),使用Proc Power计算来计算用于检验假设的功效:组分配=1:1,合并标准偏差=7.62N,单侧 α 为0.05。每组具有80%功效且单侧 α 为0.05所需的受试者数被确定为每组25名患者。如果计划退出15%,则每组需要29位患者,或总共58位患者。基于临床前数据,可以预料,当转换为针对CTS患者报告的侧向捏力时,治疗组中力增加的幅度将对受试者产生显著的差异。根据公布的结果,预期的力增加将使受试者能够执行以前无法完成的某些日常基本任务,诸如能够握住叉子或拉起拉链(Smaby等人,2004)。

[0709] 另外的分析:可以评估其他几种结果,包括COPM评分的变化和莫伯格拾取测试的时间。这两个都是连续的变量,并使用曼惠特尼U检验进行比较。还可以基于显微内窥术测量对APB功能进行统计分析。

[0710] 潜在危险

[0711] 招募不足:如果在招募足够数目的受试者时遇到困难,则招募池可以扩展到包括在具有内在肌肉耗损的肘部有尺骨神经卡压的那些。这种疾病的过程类似于腕管综合征,其手部多条小肌肉由耗损。如果以这种方式更改招募,则对方案进行如下更改。

[0712] 1) 注射时间为释放后4个月,以便为神经再生提供更多时间。

[0713] 2) 要进行评估的肌肉是第一背侧骨间肌。第一背侧骨间肌也已经用超声测量过,大小与力量有关。

[0714] 3) 分析计划仍包括上述评估。在进行的尺骨神经释放中,约50%具有萎缩。

[0715] 老兵群体:在一些情况下,研究群体可能不代表一般群体。例如,退伍老兵较老,并且男性人口较高。然而,PGE2的干预对于老年小鼠缺乏再生似乎特别有效。因此,老年群体更多可能最适合看到这种干预的移除。

[0716] 军事益处和影响

[0717] PNI是一种常见的战斗损伤,防止许多士兵返回现役。此外,许多年长的老兵由于压迫性损伤而患有PNI,从而导致他们丧失了进行日常活动的能力。PNI后肌肉功能的丧失仍然是一个艰难且尚未解决的问题。改善神经再生的研究仍在继续,但通过神经再支配改善肌肉再生的研究很少。需要医药治疗以改善神经损伤和修复后的肌肉恢复量。除了这项针对CTS的试验之外,潜在的应用很广,并且可以允许治疗神经和肌肉。

[0718] 尽管为了清楚理解起见,通过图示和实施例对上述发明进行了详细描述,但是本领域的技术人员将理解,可以在所附权利要求的范围内进行某些改变和修改。此外,本文提供的每个参考文献通过引用整体并入,其程度与每个参考文献单独通过引用方式并入相同。

[0719] 参考文献:Abe,T.,Counts,B.R.,Barnett,B.E.,Dankel,S.J.,Lee,K.,and Loenneke,J.P. (2015).Associations between Handgrip Strength and Ultrasound-Measured Muscle Thickness of the Hand and Forearm in Young Men and Women.Ultrasound Med Biol 41,2125-2130;Anderson,K.D. (2004).Targeting Recovery:Priorities of the Spinal Cord-Injured Population.Journal of Neurotrauma 21,1371-1383;Armand,A.S.,Launay,T.,Gaspera,B.D.,Charbonnier,F.,Gallien,C.L.,and Chanoine,C. (2003).Effects of eccentric treadmill running on mouse soleus:degeneration/regeneration studied with Myf-5and MyoD probes.Acta physiologica Scandinavica 179,75-84;Badr,C.E. (2014).Bioluminescence imaging: basics and practical limitations.Methods Mol Biol 1098,1-18;Barr,C.,Suarez, P.,Ota,D.,and Curtin,C.M. (2011).Is carpal tunnel release under-utilized in veterans with spinal cord injury?J Spinal Cord Med 34,563-568;Bauder,A.R.,and Ferguson,T.A. (2012).Reproducible mouse sciatic nerve crush and subsequent assessment of regeneration by whole mount muscle analysis.J Vis Exp;Berger, M.J.,Regan,W.R.,Seal,A.,and Bristol,S.G. (2016).Reliability of the"Ten Test" for assessment of discriminative sensation in hand trauma.J Plast Reconstr Aesthet Surg 69,1411-1416;Birch,R.,Misra,P.,Stewart,M.P.,Eardley,W.G., Ramasamy,A.,Brown,K.,Shenoy,R.,Anand,P.,Clasper,J.,Dunn,R.,and Etherington,J. (2012a).Nerve injuries sustained during warfare:part II:Outcomes.J Bone Joint Surg Br 94,529-535;Birch,R.,Misra,P.,Stewart,M.P.M.,Eardley,W.G.P.,Ramasamy, A.,Brown,K.,Shenoy,R.,Anand,P.,Clasper,J.,Dunn,R.,and Etherington,J. (2012b).Nerve injuries sustained during warfare:Part I-Epidemiology.The Bone&Joint Journal 94-B,523-528;Blaauw,B.,Canato,M.,Agatea,L.,Toniolo,L.,Mammucari,C., Masiero,E.,Abraham,R.,Sandri,M.,Schiaffino,S.,and Reggiani,C. (2009).Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite

cell activation.FASEB J 23,3896-3905;Bland,J.D. (2000) .A neurophysiological grading scale for carpal tunnel syndrome.Muscle Nerve 23,1280-1283;Blau,H.M., Cosgrove,B.D.,and Ho,A.T. (2015) .The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging.Nature medicine 21,854-862;Bondesen,B.A., Mills,S.T.,and Pavlath,G.K. (2006) .The COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms.American journal of physiology Cell physiology 290,C1651-1659;Chambers,J.A.,Hiles,C.L.,and Keene,B.P. (2014) .Brachial Plexus Injury Management in Military Casualties:Who,What,When,Why, and How.Military Medicine 179,640-644;Champion,H.R.,Holcomb,J.B.,Lawnick, M.M.,Kelliher,T.,Spott,M.A.,Galarneau,M.R.,Jenkins,D.H.,West,S.A.,Dye,J., Wade,C.E.,et al. (2010) .Improved characterization of combat injury.J Trauma 68,1139-1150;Chen,X.,Sanchez,G.N.,Schnitzer,M.J.,and Delp,S.L. (2016) .Changes in sarcomere lengths of the human vastus lateralis muscle with knee flexion measured using in vivo microendoscopy.Journal of Biomechanics 49,2989-2994; Cooney,D.S.,Wimmers,E.G.,Ibrahim,Z.,Grahammer,J.,Christensen,J.M.,Brat,G.A., Wu,L.W.,Sarhane,K.A.,Lopez,J.,Wallner,C.,et al. (2016) .Mesenchymal Stem Cells Enhance Nerve Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Repair and Hindlimb Transplant Model.Scientific Reports 6,31306;Cosgrove,B.D.,Gilbert,P.M., Porpiglia,E.,Mourkioti,F.,Lee,S.P.,Corbel,S.Y.,Llewellyn,M.E.,Delp,S.L.,and Blau,H.M. (2014) .Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles.Nature medicine 20,255-264;Cox,C.R., Faccenda,K.A.,Gilhooly,C.,Bannister,J.,Scott,N.B.,and Morrison,L.M. (1998) .Extradural S(-)-bupivacaine:comparison with racemic RS-bupivacaine.Br J Anaesth 80,289-293;FDA (2005) .Guidance for Industry:Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Adult Healthy Volunteer., (Rockville,MD:U.S.Food and Drug Administration);Funk,C.D. (2001) .Prostaglandins and leukotrienes:advances in eicosanoid biology.Science 294,1871-1875;Geere,J.,Chester,R.,Kale,S.,and Jerosch-Herold,C. (2007) .Power grip,pinch grip,manual muscle testing or thenar atrophy-which should be assessed as a motor outcome after carpal tunnel decompression?A systematic review.BMC Musculoskelet Disord 8,114;Gilbert, P.M.,Havenstrite,K.L.,Magnusson,K.E.,Sacco,A.,Leonardi,N.A.,Kraft,P.,Nguyen, N.K.,Thrun,S.,Lutolf,M.P.,and Blau,H.M. (2010) .Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture.Science 329,1078-1081; Gilbertson,L.,and Barber-Lomax,S. (1994) .Power and Pinch Grip Strength Recorded Using the Hand-Held Jamar (R) Dynamometer and B+L Hydraulic Pinch Gauge:British Normative Data for Adults.The British Journal of Occupational Therapy 57,483-488;Hansen,M.O.,Polly,D.W.,McHale,K.A.,and Asplund,L.M. (1994) .A prospective evaluation of orthopedic patients evacuated from Operations Desert Shield and Desert Storm:the Walter Reed experience.Military medicine

159,376-380;Jackman,M.,Novak,I.,and Lannin,N. (2014).Effectiveness of functional hand splinting and the cognitive orientation to occupational performance(CO-OP)approach in children with cerebral palsy and brain injury: two randomised controlled trial protocols.BMC Neurol 14,144;Kamiya,H.,Kimura,M.,Hoshino,S.,Kobayashi,M.,and Sonoo,M. (2016).Prognosis of severe carpal tunnel syndrome with absent compound muscle action potential.Muscle Nerve 54, 427-431;Kim,J.-S.,Seok,H.Y.,and Kim,B.-J. (2016).The significance of muscle echo intensity on ultrasound for focal neuropathy:The median-to ulnar-innervated muscle echo intensity ratio in carpal tunnel syndrome.Clinical Neurophysiology 127,880-885;Korotkova,M.,and Lundberg,I.E. (2014).The skeletal muscle arachidonic acid cascade in health and inflammatory disease.In Nature Publishing Group, (Nature Publishing Group) ,pp.295-303;Lavasani,M.,Thompson,S.D.,Pollett,J.B.,Usas,A.,Lu,A.,Stolz,D.B.,Clark,K.A.,Sun,B.,Peault,B.,and Huard,J. (2014).Human muscle-derived stem/progenitor cells promote functional murine peripheral nerve regeneration.J Clin Invest 124,1745-1756;Liu,W.,Wei-LaPierre,L.,Klose,A.,Dirksen,R.T.,and Chakkalakal,J.V. (2015).Inducible depletion of adult skeletal muscle stem cells impairs the regeneration of neuromuscular junctions.eLife 4;Llewellyn,M.E.,Thompson,K.R.,Deisseroth,K.,and Delp,S.L. (2010).Orderly recruitment of motor units under optical control in vivo.Nature medicine 16,1161-1165;Magown,P.,Shettar,B.,Zhang,Y.,and Rafuse,V.F. (2015).Direct optical activation of skeletal muscle fibres efficiently controls muscle contraction and attenuates denervation atrophy.Nature Communications 6,8506;Marti,A.,and Fernandez-Otero,M.P. (1994).Prostaglandin E2 accelerates enzymatic and morphological maturation of the small intestine in suckling rats.Biol Neonate 65,119-125;Masini,B.D.,Waterman,S.M.,Wenke,J.C.,Owens,B.D.,Hsu,J.R.,and Ficke,J.R. (2009).Resource utilization and disability outcome assessment of combat casualties from Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom.J Orthop Trauma 23, 261-266;McColl,M.A.,Law,M.,Baptiste,S.,Pollock,N.,Carswell,A.,and Polatajko,H.J. (2005).Targeted applications of the Canadian Occupational Performance Measure.Can J Occup Ther 72,298-300;Mele,A.,Fonzino,A.,Rana,F.,Camerino,G.M.,De Bellis,M.,Conte,E.,Giustino,A.,Conte Camerino,D.,and Desaphy,J.F. (2016).In vivo longitudinal study of rodent skeletal muscle atrophy using ultrasonography.Sci Rep 6,20061;Mo,C.,Zhao,R.,Vallejo,J.,Igwe,O.,Bonewald,L.,Wetmore,L.,and Brotto,M. (2015).Prostaglandin E2 promotes proliferation of skeletal muscle myoblasts via EP4 receptor activation.Cell cycle 14,1507-1516;Moberg,E. (1958).Objective methods for determining the functional value of sensibility in the hand.J Bone Joint Surg Br 40-B,454-476;Mohseny,B.,Nijhuis,T.H.,Hundepool,C.A.,Janssen,W.G.,Selles,R.W.,and Coert,J.H. (2015)

.Ultrasonographic quantification of intrinsic hand muscle cross-sectional area;reliability and validity for predicting muscle strength.Arch Phys Med Rehabil 96,845-853;Murphy,M.M.,Lawson,J.A.,Mathew,S.J.,Hutcheson,D.A.,and Kardon,G. (2011).Satellite cells,connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration.Development 138,3625-3637; NCT01861665.Weill Medical College of Cornell University.Marcaine Use in Laparoscopic Gynecological Surgery (Marcaine).In:ClinicalTrials.gov[Internet]. Bethesda (MD):National Library of Medicine (US).2000-[cited 2016 Nov 14]. Available from:<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01861665> NLM Identifier:NCT01861665;NCT02051296.VA Palo Alto Health Care System.Minocycline to Reduce Pain After Carpal Tunnel Release.In: ClinicalTrials.gov[Internet].Bethesda (MD):National Library of Medicine (US).2000-[cited 2016 Nov 14].Available from:<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02051296> NLM Identifier:NCT02051296;NCT00602095.Karolinska University Hospital.Labour Induction With Misoprostol,Dinoprostone and Bard Catheter (LI).In:ClinicalTrials.gov[Internet].Bethesda (MD):National Library of Medicine (US).2000-[cited 2016 Nov 14].Available from:<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00602095> NLM Identifier:NCT00602095;Omer,G.E. (1974).Injuries to Nerves of the Upper Extremity.The Journal of Bone& Joint Surgery 56,1615;Overbeek,C.L.,Nota,S.P.,Jayakumar,P.,Hageman,M.G.,and Ring,D. (2015).The PROMIS physical function correlates with the QuickDASH in patients with upper extremity illness.Clin Orthop Relat Res 473,311-317; Owens,B.D.,Kragh,J.F.,Jr.,Macaitis,J.,Svoboda,S.J.,and Wenke,J.C. (2007a).Characterization of extremity wounds in Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom.J Orthop Trauma 21,254-257;Owens,B.D.,Kragh,J.F., Macaitis,J.,Svoboda,S.J.,and Wenke,J.C. (2007b).Characterization of Extremity Wounds in Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom.Journal of Orthopaedic Trauma 21,254-257;Palmer,B.N. (2011).Carpal tunnel syndrome,active component,U.S.Armed Forces,2000-2010.MSMR 18,12-15;Pillen,S.,and van Alfen,N. (2011).Skeletal muscle ultrasound.Neurol Res 33,1016-1024;Plant,D.R., Colarossi,F.E.,and Lynch,G.S. (2006).Notexin causes greater myotoxic damage and slower functional repair in mouse skeletal muscles than bupivacaine.Muscle Nerve 34,577-585;Powell,P.L.,Roy,R.R.,Kanim,P.,Bello,M.A., and Edgerton,V.R. (1984).Predictability of skeletal muscle tension from architectural determinations in guinea pig hindlimbs.J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol 57,1715-1721;Reigner,B.G.,and Blesch,K.S. (2002).Estimating the starting dose for entry into humans:principles and practice.Eur J Clin Pharmacol 57,835-845;Rivera,J.C.,Glebus,G.P.,and Cho,M.S. (2014).Disability following combat-sustained nerve injury of the upper

limb. *The Bone&Joint Journal* 96-B, 254-258; Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S., and Blau, H.M. (2008). Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 456, 502-506; Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J.H., Artandi, S.E., and Blau, H.M. (2010). Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* 143, 1059-1071; Safran, M., Kim, W.Y., Kung, A.L., Horner, J.W., DePinho, R.A., and Kaelin, W.G., Jr. (2003). Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination. *Mol Imaging* 2, 297-302; Sanchez, G.N., Sinha, S., Liske, H., Chen, X., Nguyen, V., Delp, S.L., and Schnitzer, M.J. (2015). In Vivo Imaging of Human Sarcomere Twitch Dynamics in Individual Motor Units. *Neuron* 88, 1109-1120; Shen, W., Prisk, V., Li, Y., Foster, W., and Huard, J. (2006). Inhibited skeletal muscle healing in cyclooxygenase-2 gene-deficient mice: the role of PGE2 and PGF2alpha. *Journal of applied physiology* 101, 1215-1221; Simmons, D.L., Botting, R.M., and Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56, 387-437; Smaby, N., Johanson, M.E., Baker, B., Kenney, D.E., Murray, W.M., and Hentz, V.R. (2004). Identification of key pinch forces required to complete functional tasks. *J Rehabil Res Dev* 41, 215-224; Spring, K.R. (2013). Cameras for digital microscopy. *Methods Cell Biol* 114, 163-178; Strauch, B., Lang, A., Ferder, M., Keyes-Ford, M., Freeman, K., and Newstein, D. (1997). The ten test. *Plast Reconstr Surg* 99, 1074-1078; Thomas, J., Fairclough, A., Kavanagh, J., and Kelly, A.J. (2014). Vaginal prostaglandin (PGE2 and PGF2a) for induction of labour at term. *The Cochrane database of systematic reviews* 6, CD003101; Toomey, M., Nicholson, D., and Carswell, A. (1995). The clinical utility of the Canadian Occupational Performance Measure. *Can J Occup Ther* 62, 242-249; Trombly, C. (1995). Clinical practice guidelines for post-stroke rehabilitation and occupational therapy practice. *Am J Occup Ther* 49, 711-714; Tyser, A.R., Beckmann, J., Franklin, J.D., Cheng, C., Hon, S.D., Wang, A., and Hung, M. (2014). Evaluation of the PROMIS physical function computer adaptive test in the upper extremity. *J Hand Surg Am* 39, 2047-2051e2044; Valero-Cuevas, F.J., Smaby, N., Venkadesan, M., Peterson, M., and Wright, T. (2003). The strength-dexterity test as a measure of dynamic pinch performance. *J Biomech* 36, 265-270; Ward, S.R., and Lieber, R.L. (2005). Density and hydration of fresh and fixed human skeletal muscle. *J Biomech* 38, 2317-2320; Weinreb, M., Suponitzky, I., and Keila, S. (1997). Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. *Bone* 20, 521-526; Whiteside, J.B., and Wildsmith, J.A. (2001). Developments in local anaesthetic drugs. *Br J Anaesth* 87, 27-35; Xu, X., Wilschut, K.J., Kouklis, G., Tian, H., Hesse, R., Garland, C., Sbitany, H., Hansen, S., Seth, R., Knott, P.D., et al.

(2015). Human Satellite Cell Transplantation and Regeneration from Diverse Skeletal Muscles. Stem Cell Reports 5, 419-434; Zeale, D.L., Mainthia, R., Li, Y., Kunibe, I., Katada, A., Billante, C., and Nomura, K. (2014). Stimulation of denervated muscle promotes selective reinnervation, prevents synkinesis, and restores function. Laryngoscope 124, E180-187.

[0720] 实施例8. PGE2化合物和肌肉毒素组合在肌肉再生中的协同作用

[0721] 将Pax7-CreERT2; Rosa-LSL-荧光素酶小鼠(2-4月龄)连续五天用他莫昔芬处理,以获得体内表达Pax7启动子的荧光素酶小鼠。一周后,在药物注射之前(时间点第0天)使用脚板力测量仪测量胫前肌的基线强直力。随后给小鼠注射50 μ l媒介物(盐水)、肌肉干细胞激活剂前列腺素E2(PGE2, 20 μ g)、肌肉干细胞膨胀剂布比卡因(BPV, 0.25%)或组合药物(布比卡因0.25%与PGE2 20 μ g一起)至胫前肌(TA)肌肉中。图27A显示了每2天测量一次持续两周的生物发光(BLI, 测量为辐射度),以测量肌肉干细胞扩增。图27B显示了在第4周从同一只小鼠测得的强直力,其中计算了与基线力的百分比差。图27C:在4周(终点)分离TA,并基于由肌肉长度、重量和羽状角计算出的生理横截面积(PCSA)获得比力(mN/mm²)。与媒介物和两个单独注射的小分子相比,组合药物的比力和强直力的百分比差显著增加。*P<0.05, **P<0.001。ANOVA检验用于组比较并且终点显著性差异通过费舍尔检验进行(图27A)。使用Bonferroni校正的ANOVA检验用于多重比较(图27B、图27C)。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0722] 结果显示,PGE2化合物与肌肉毒素诸如布比卡因的组合对肌肉再生具有协同作用。如图27A所示,PGE2和布比卡因的组合诱导的肌肉干细胞扩增大于单独的PGE2或单独的布比卡因所诱导的。重要的是,观察到的肌肉干细胞扩增大于单独的PGE2和单独的布比卡因的肌肉干细胞扩增之和。用另一种测定也确认了对肌肉再生的协同作用。如图27B所示,用组合的PGE2和布比卡因处理的肌肉的强直力的增加大于用PGE2处理的肌肉的强直力的增加之和。

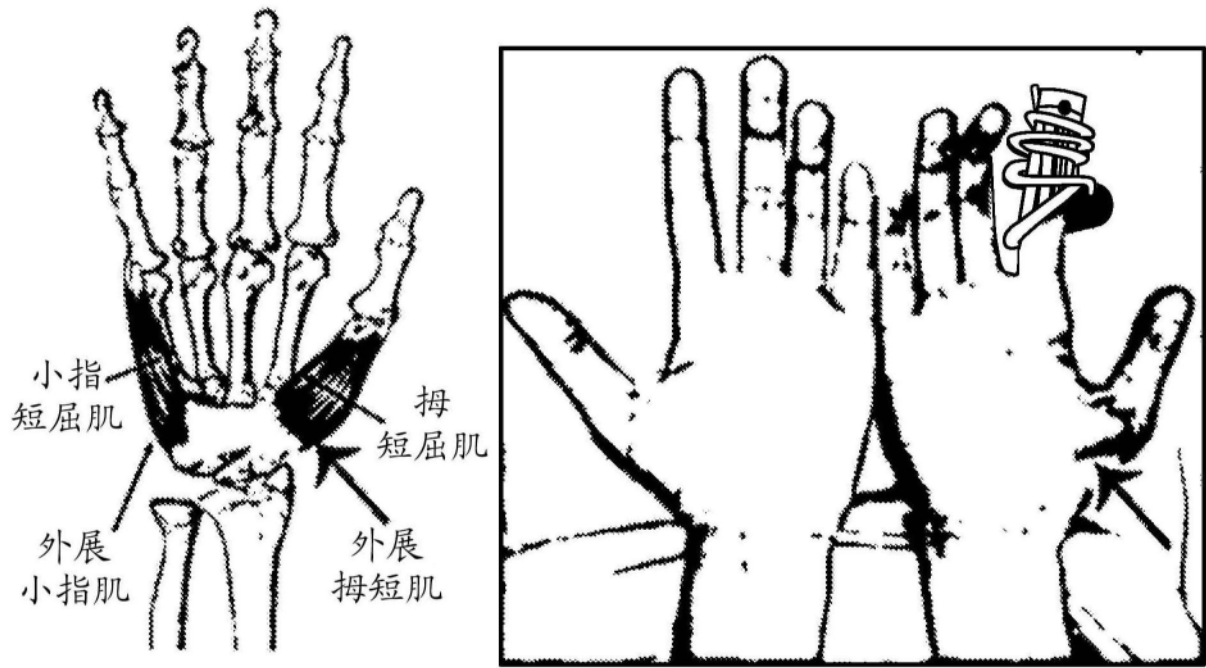


图1

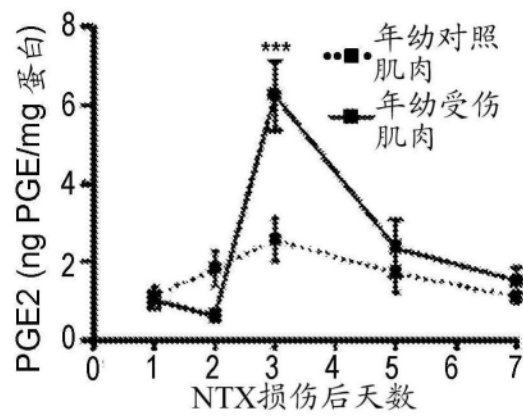


图2A

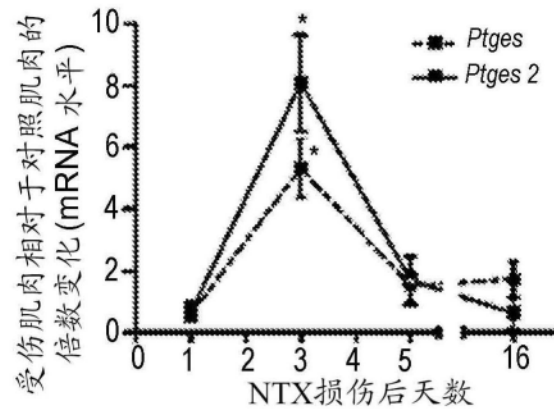


图2B

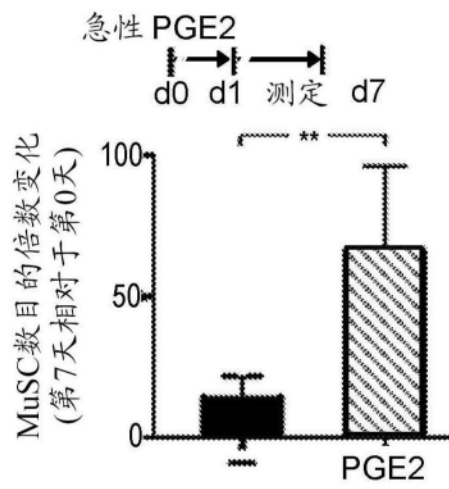


图2C

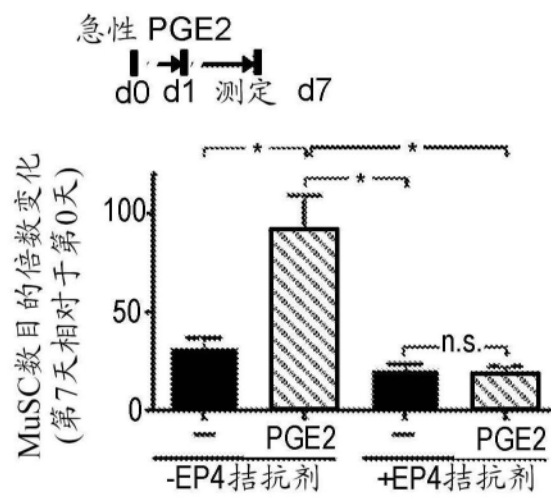


图2D

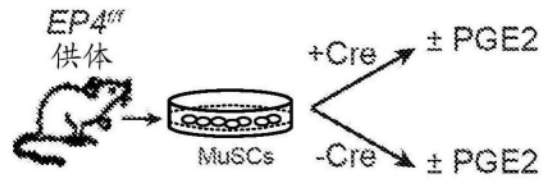


图2E

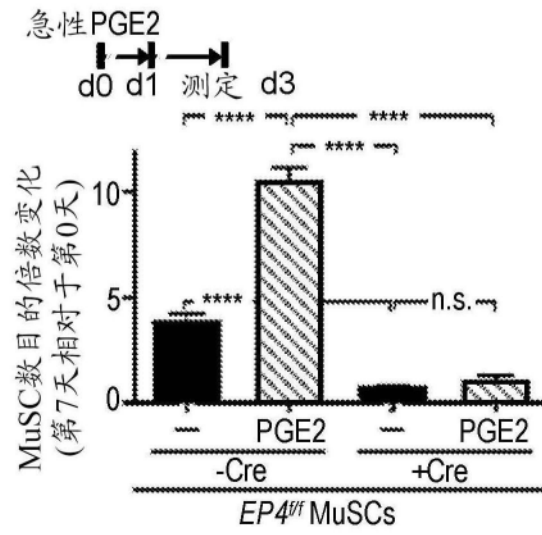


图2F

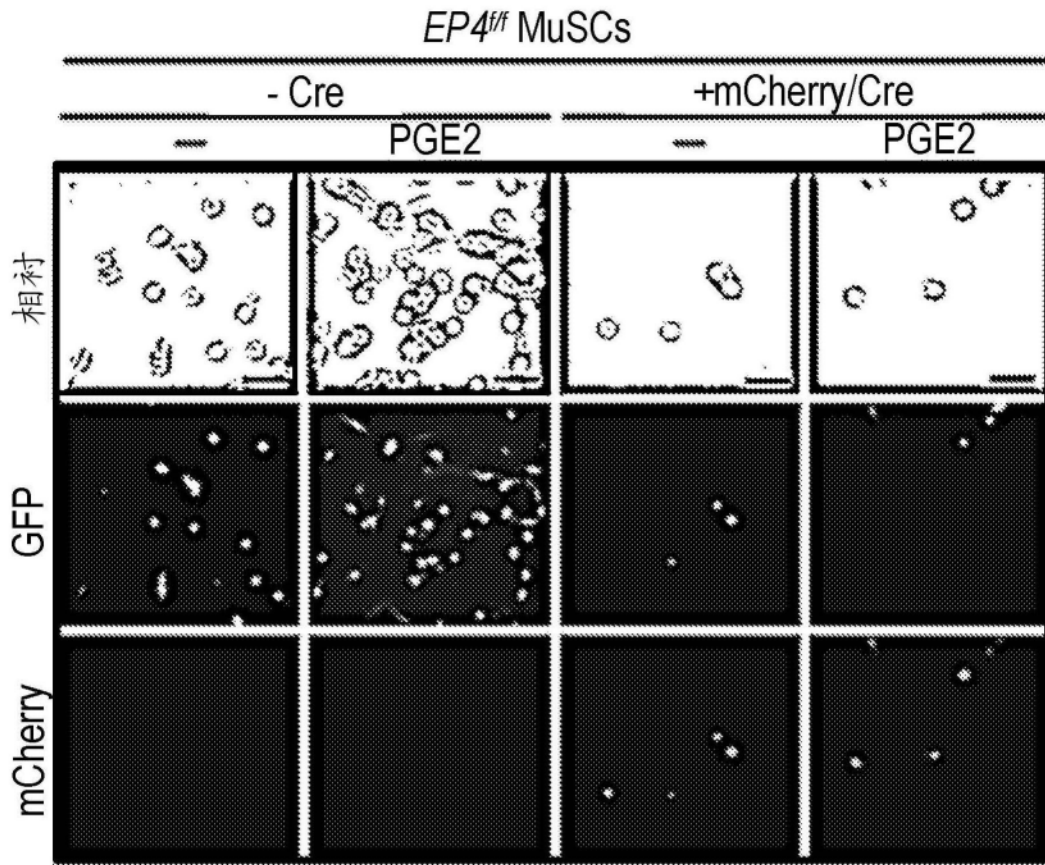


图2G

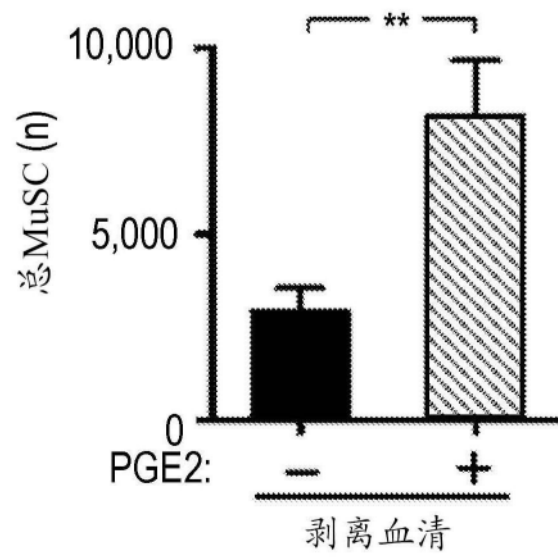


图2H

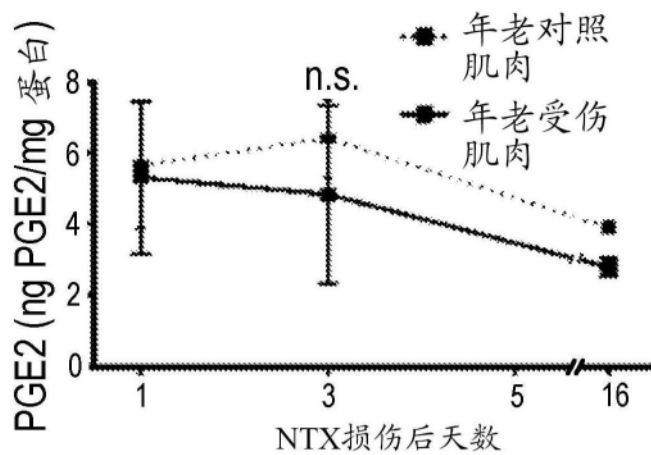


图3A

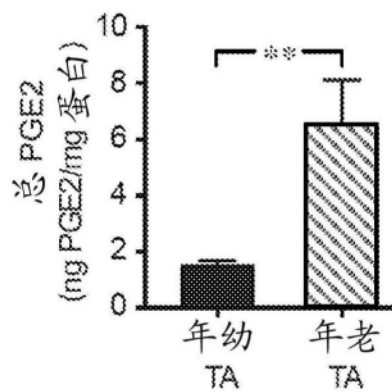


图3B

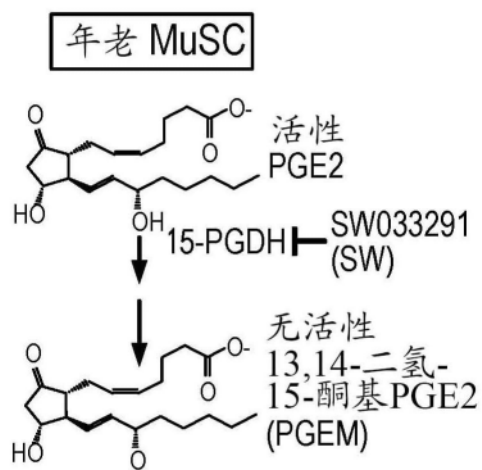


图3C

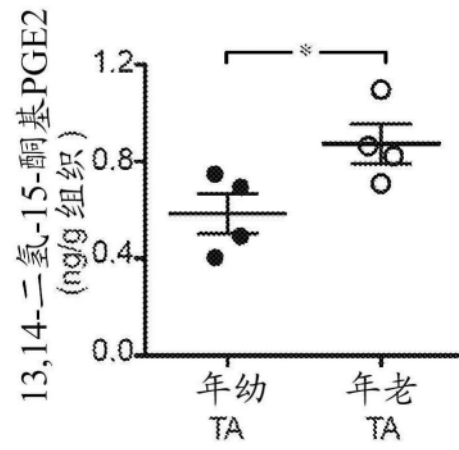


图3D

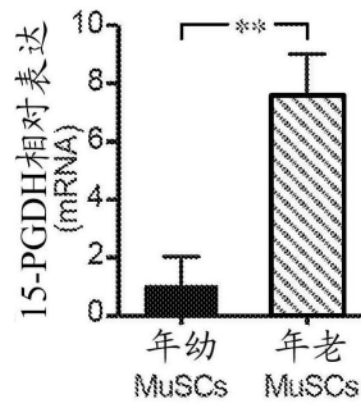


图3E

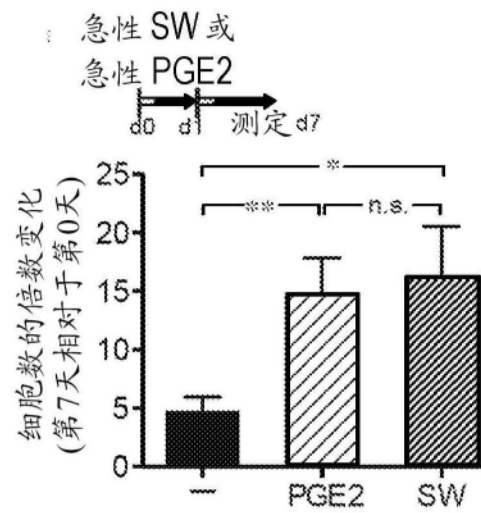


图3F

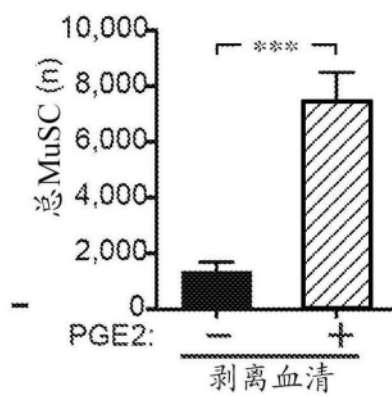


图3G

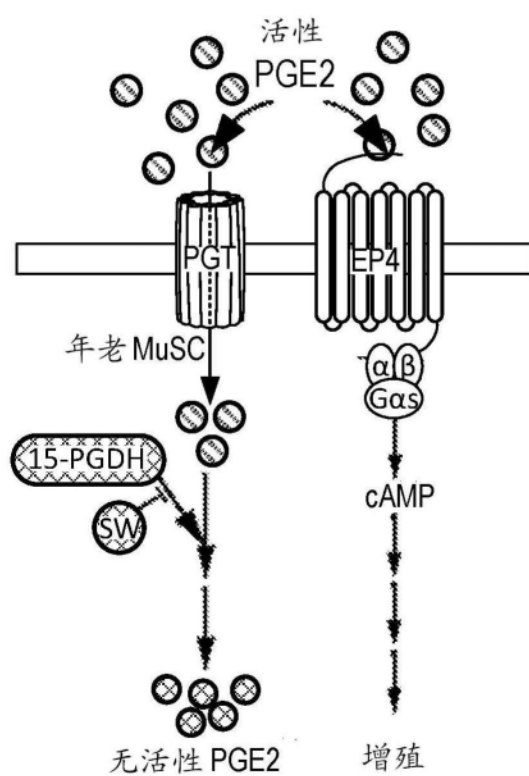


图3H

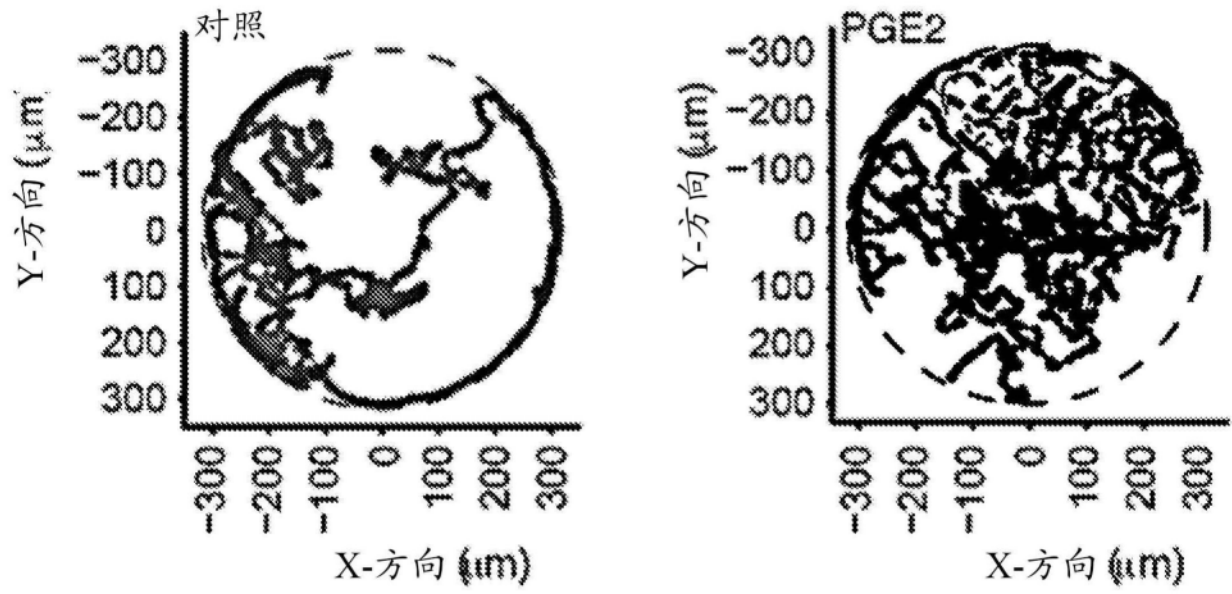


图3I

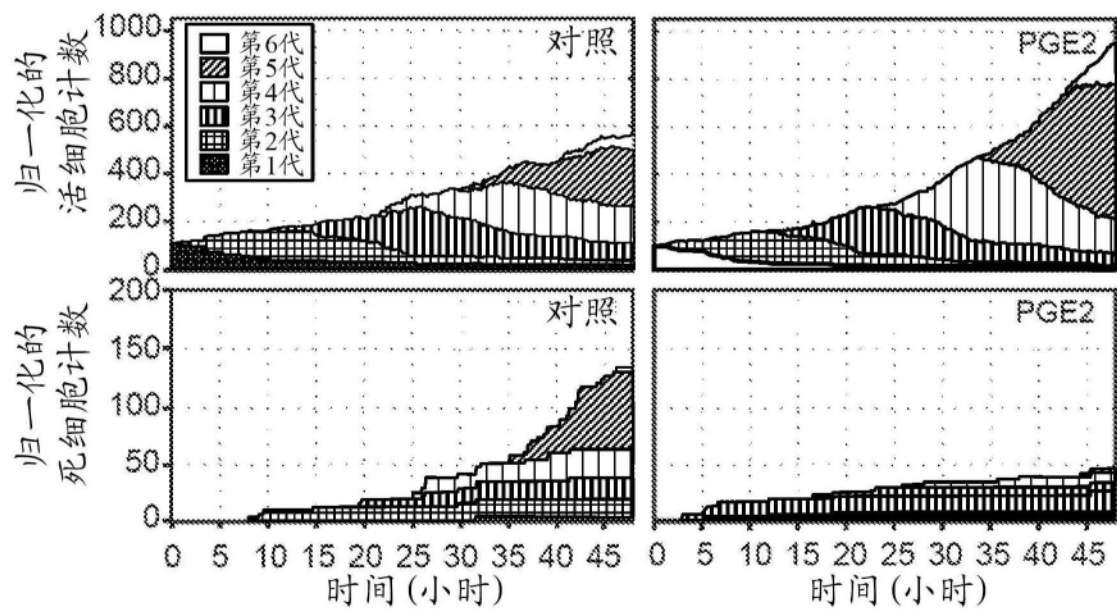


图3J

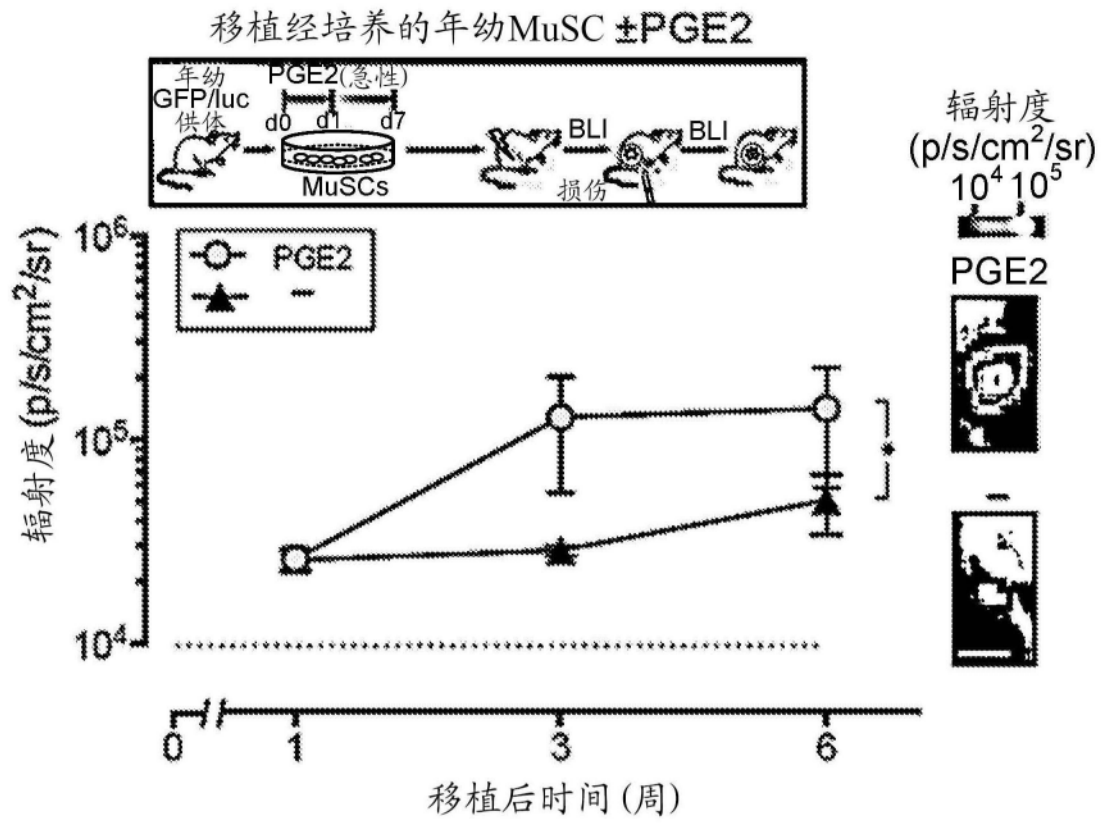


图4A

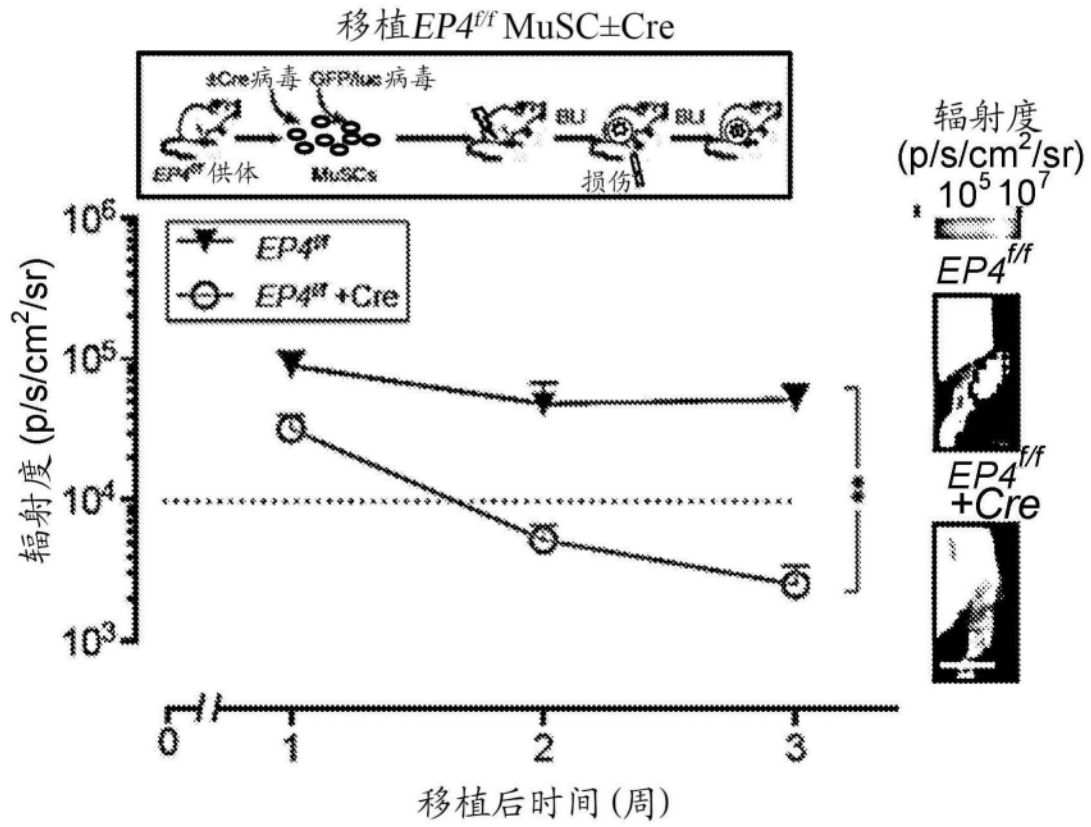


图4B

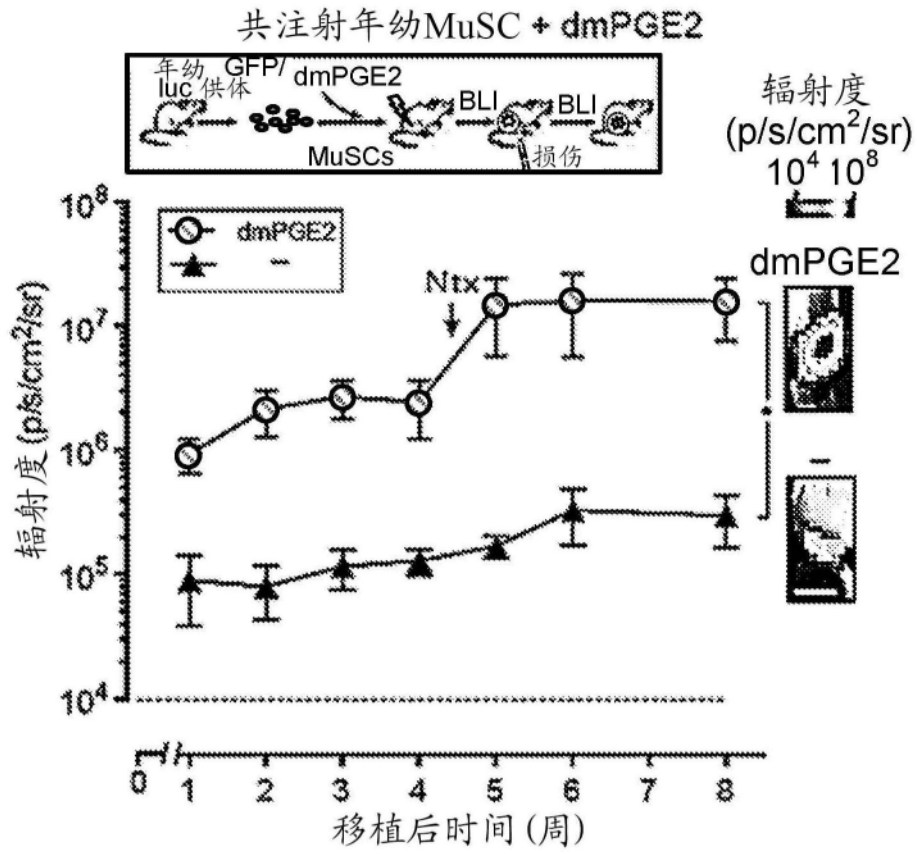


图4C

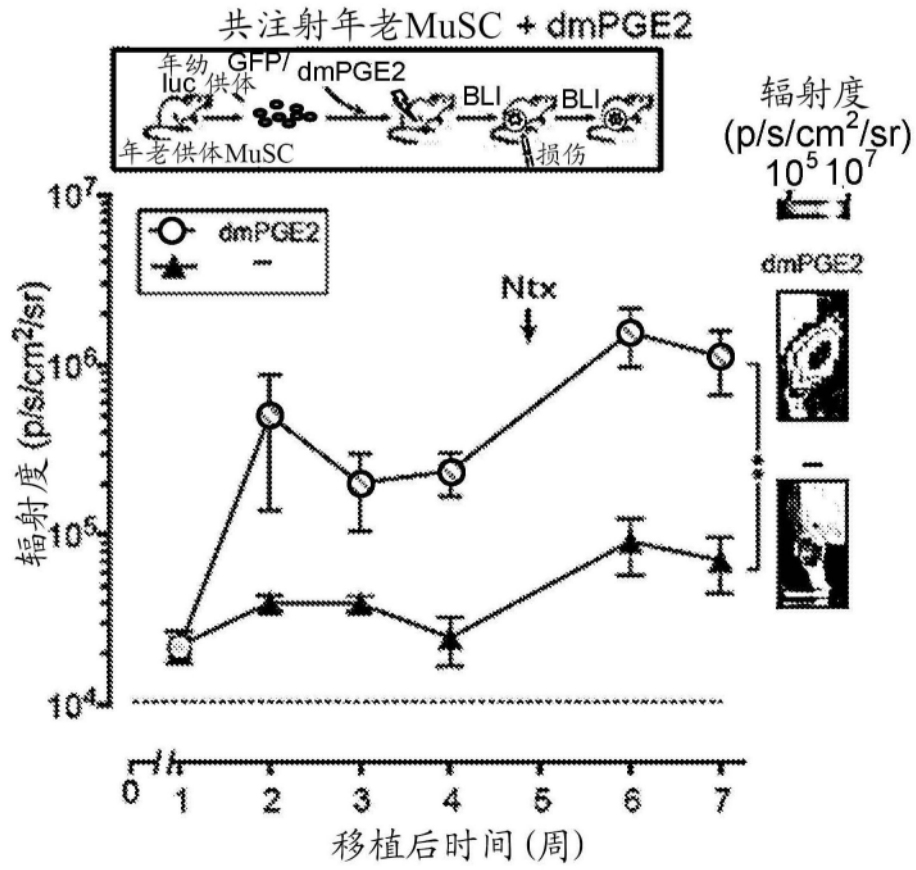


图4D

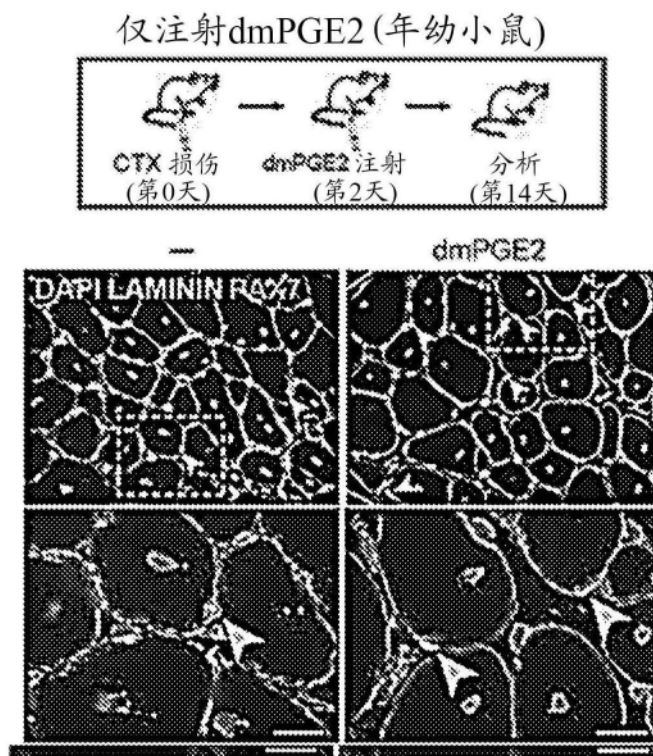


图5A

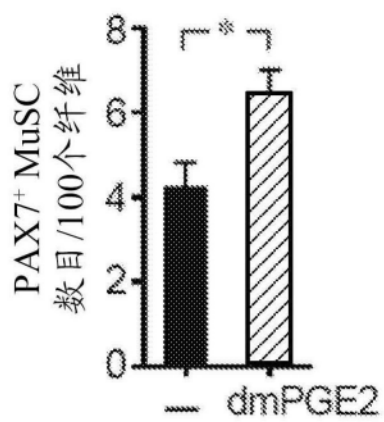


图5B

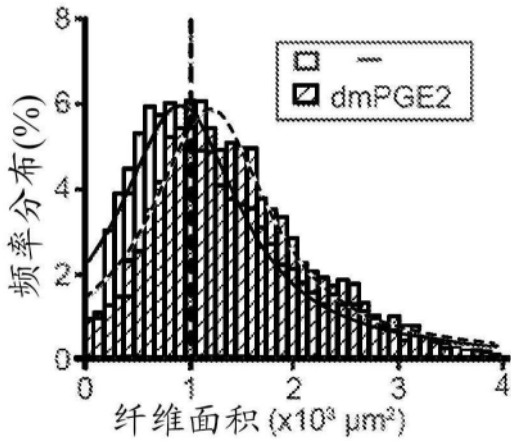


图5C

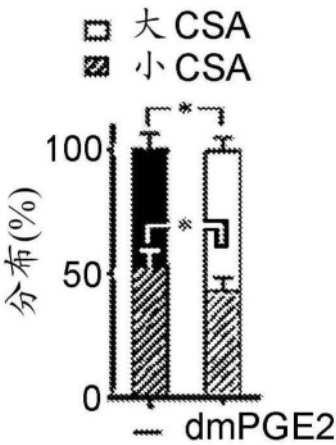


图5D

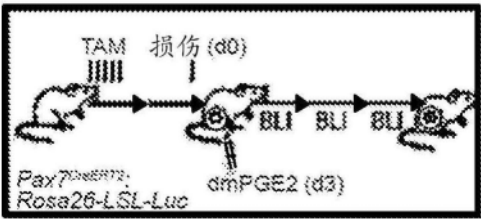


图5E

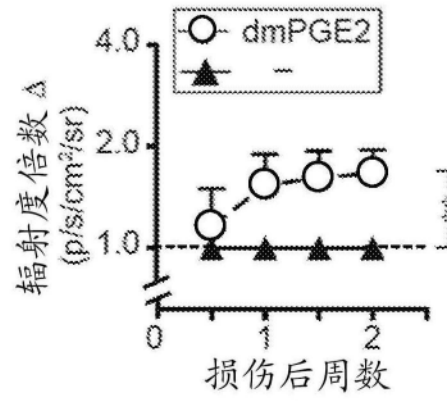


图5F

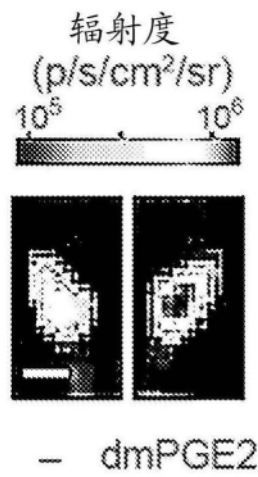


图5G

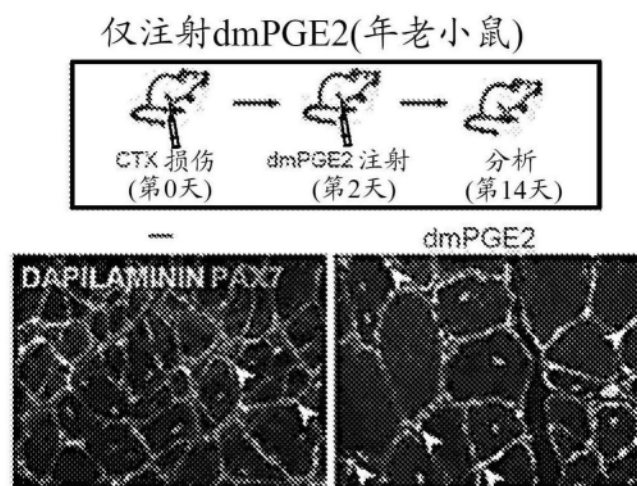


图5H

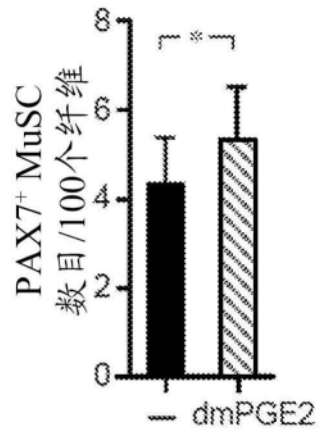


图5I

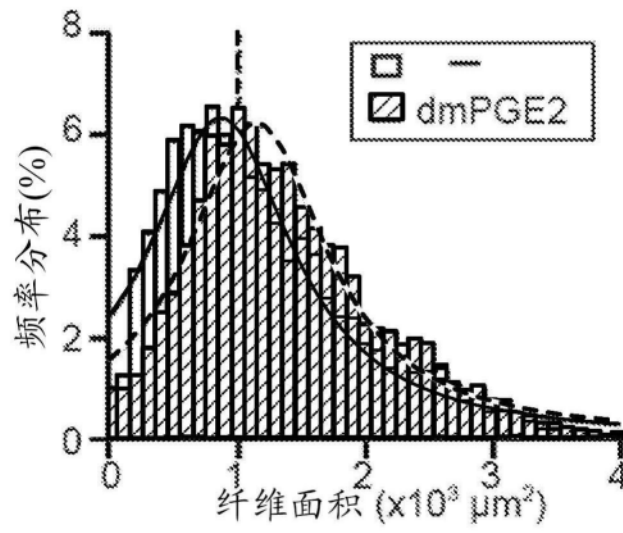


图5J

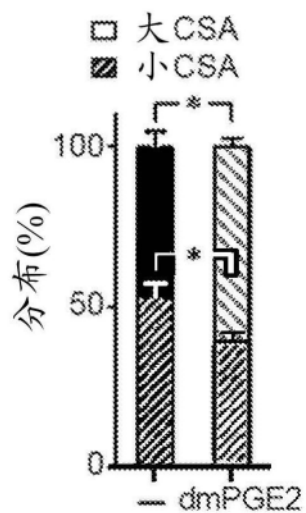


图5K

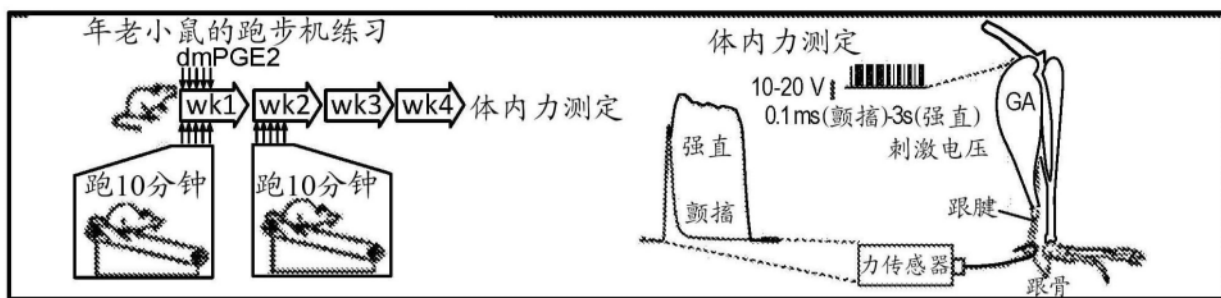


图5L

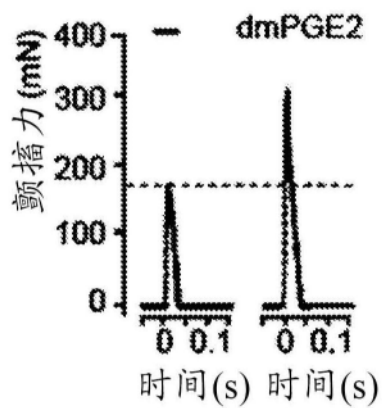


图5M

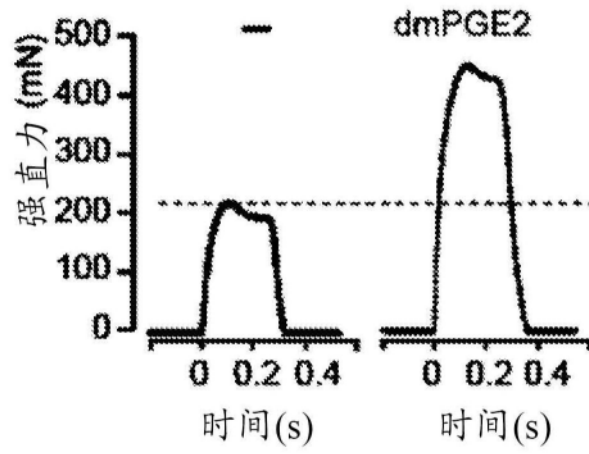


图5N

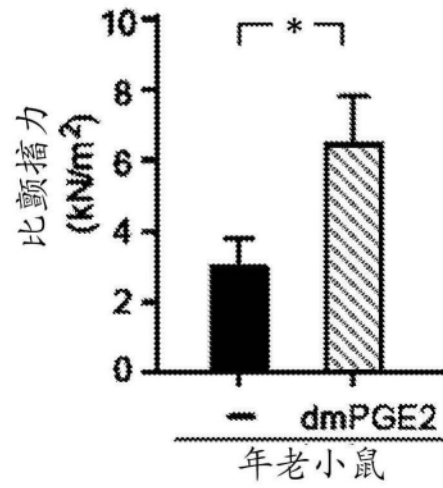


图5O

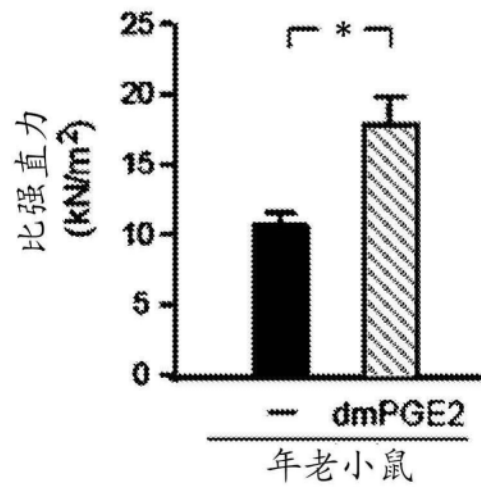


图5P

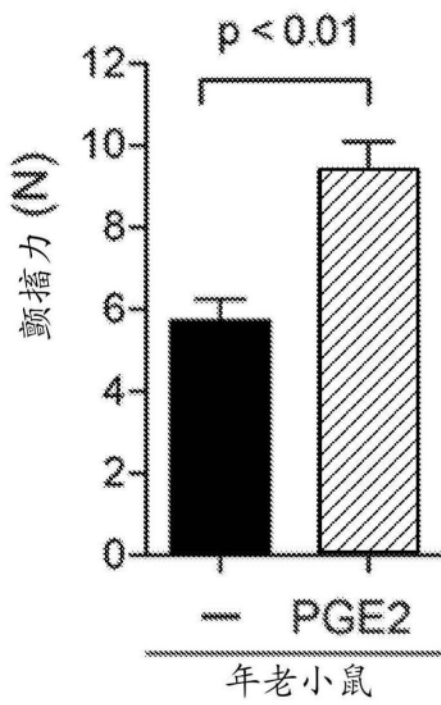


图 5Q

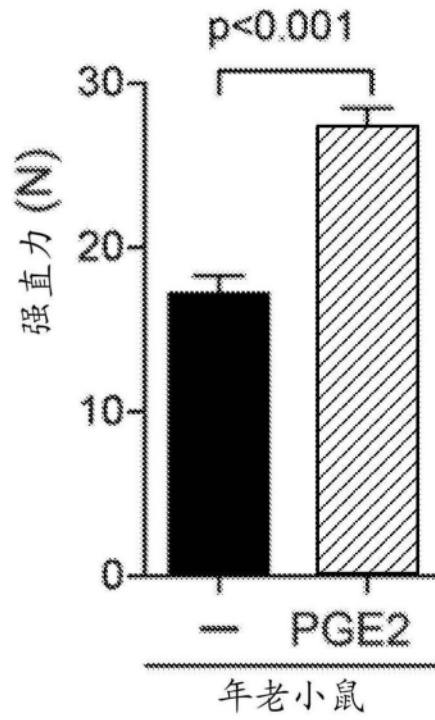


图 5R

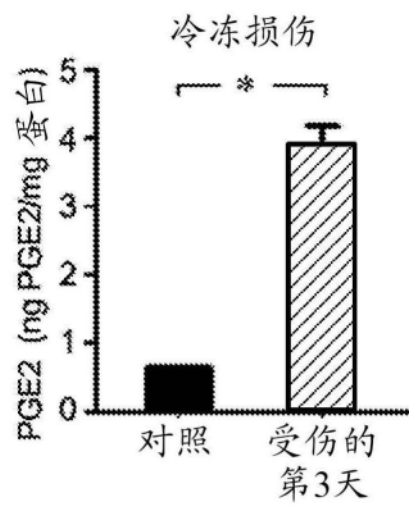


图6A

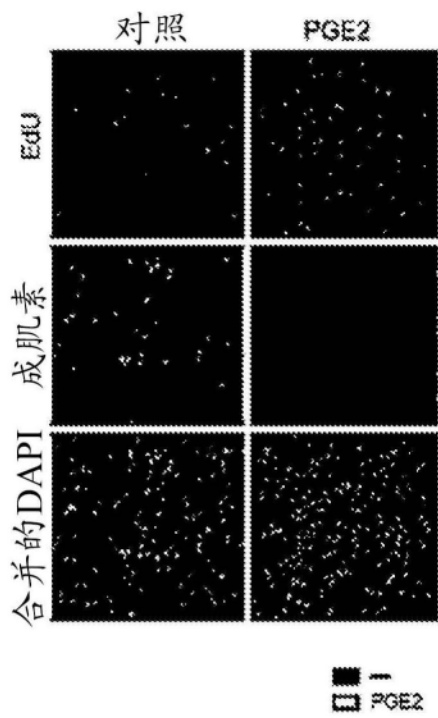


图6B

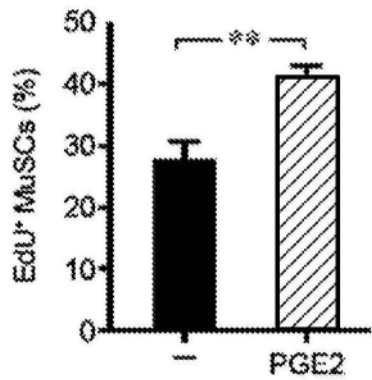


图6C

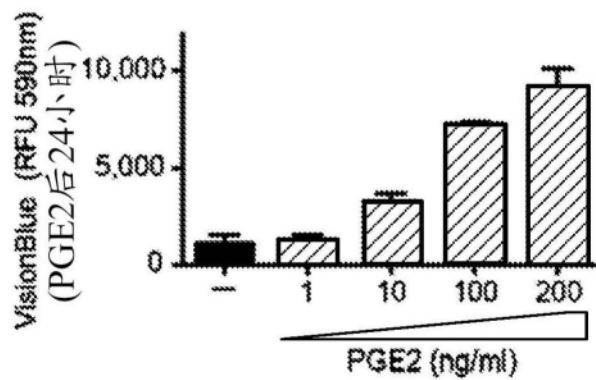


图6D



图6E

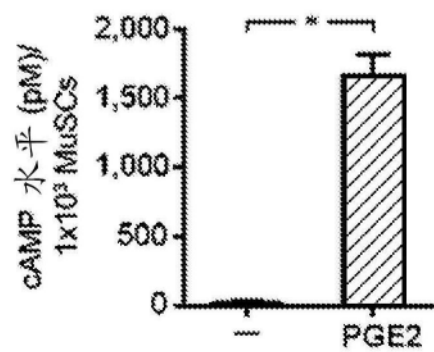


图6F

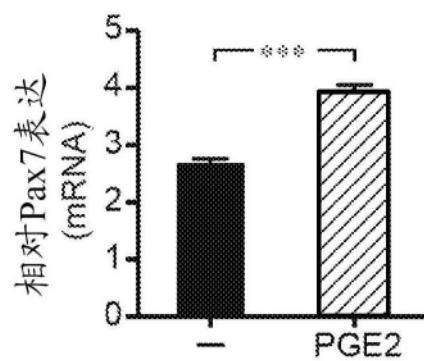


图6G

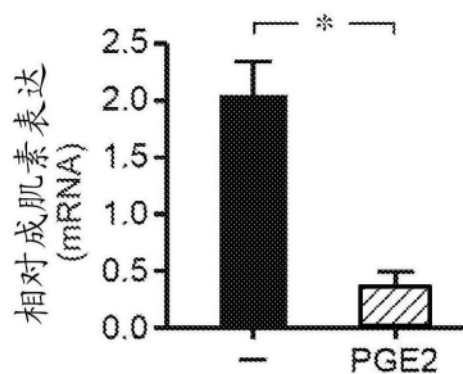


图6H

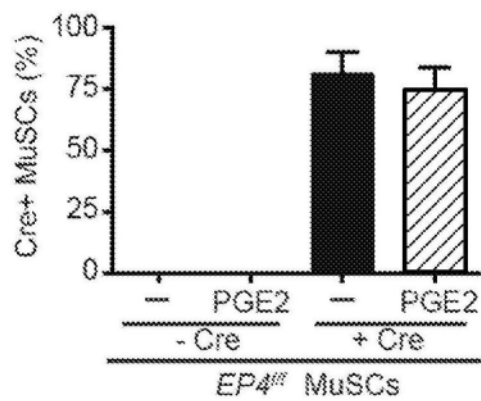


图6I

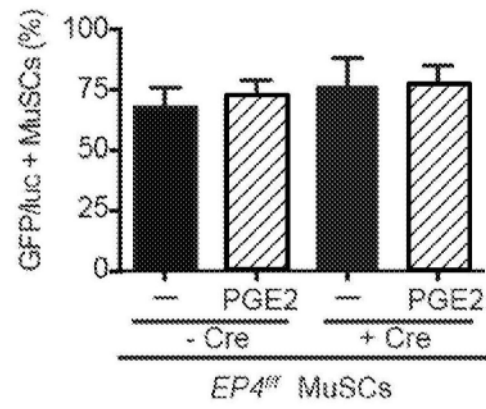


图6J

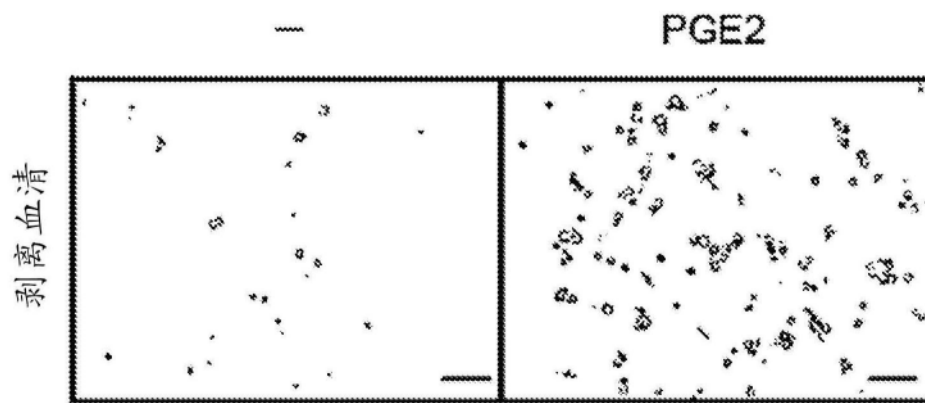


图6K

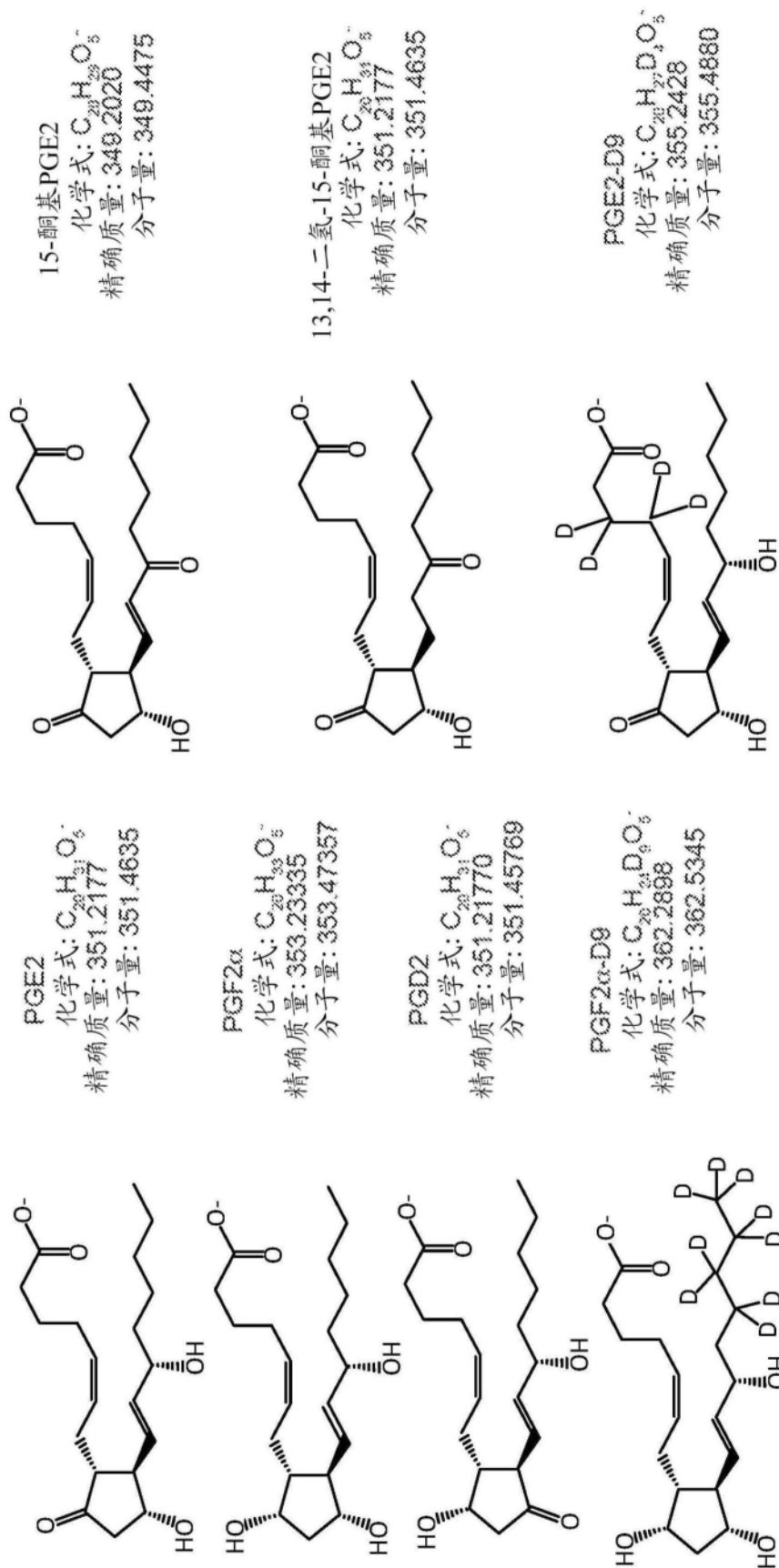


图7A

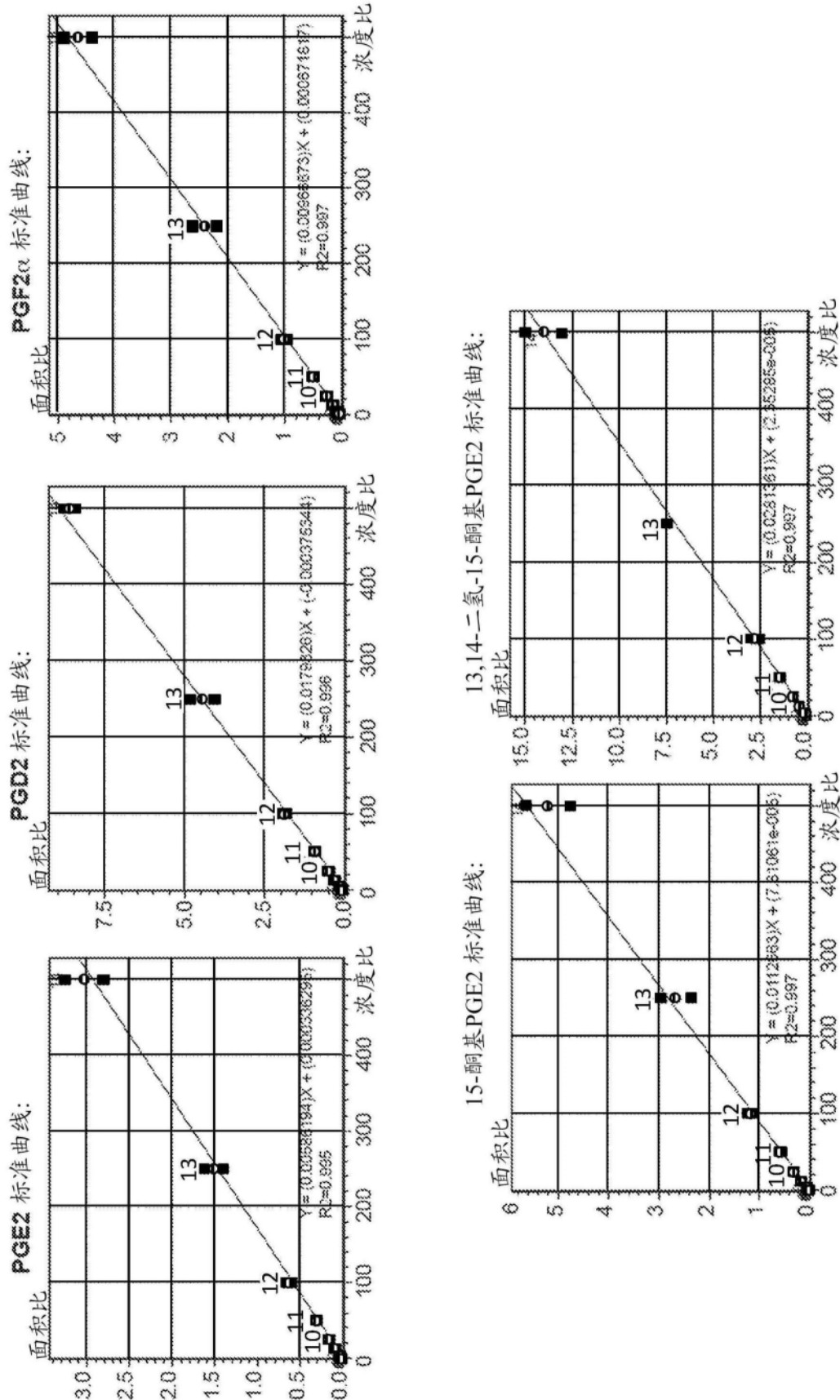


图7B

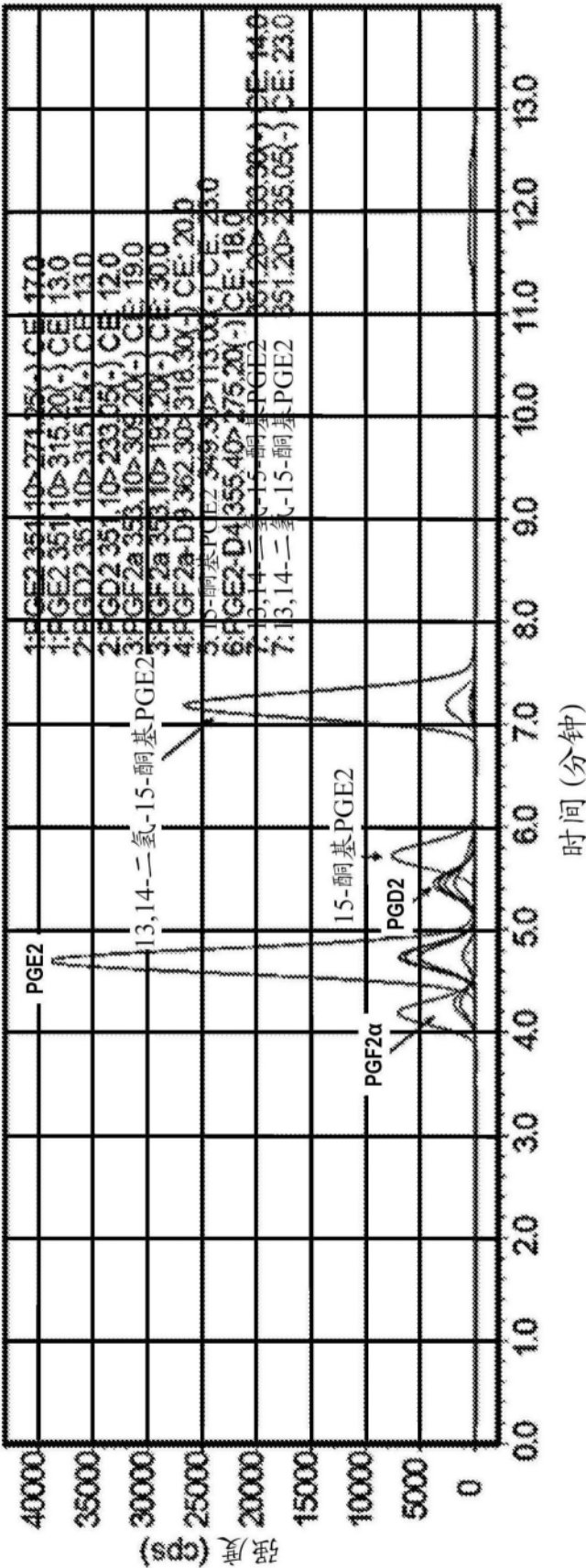


图7C

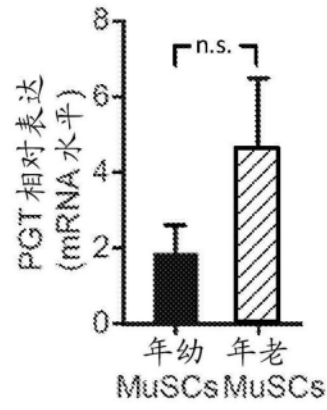


图8A

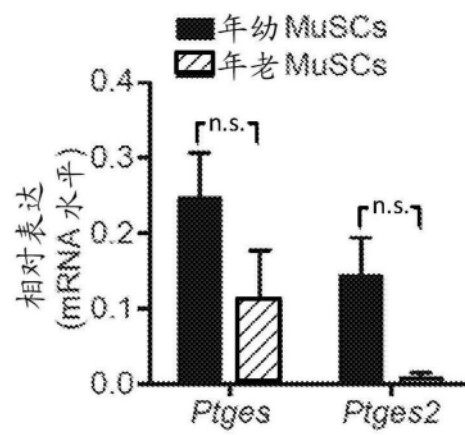


图8B

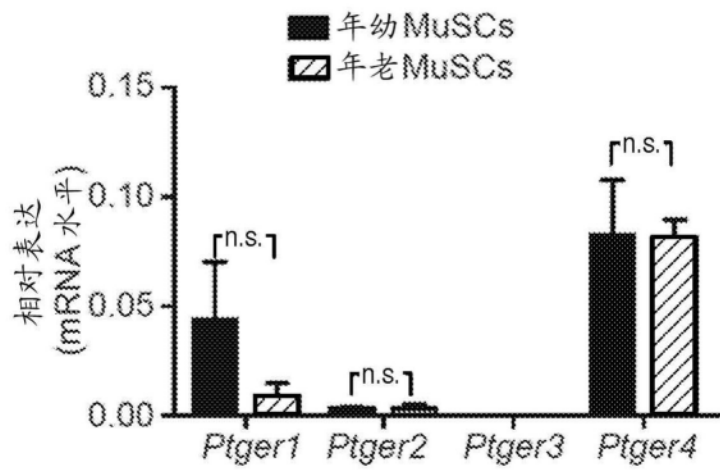


图8C

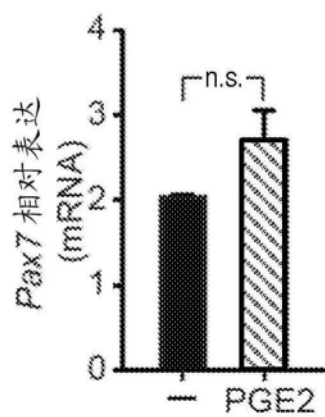


图8D

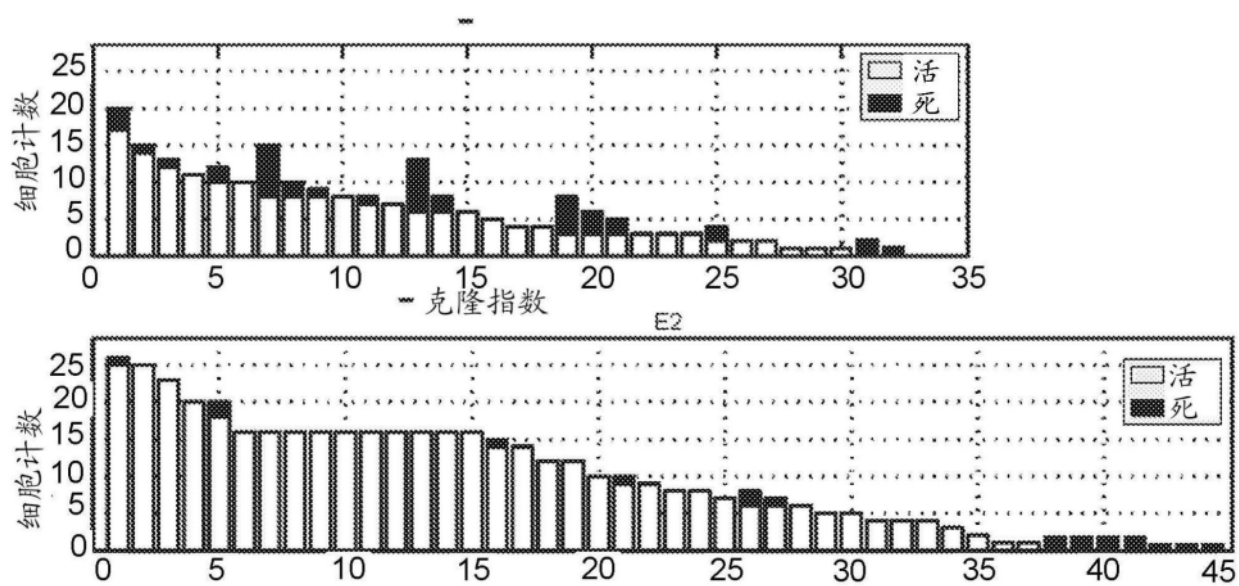


图8E

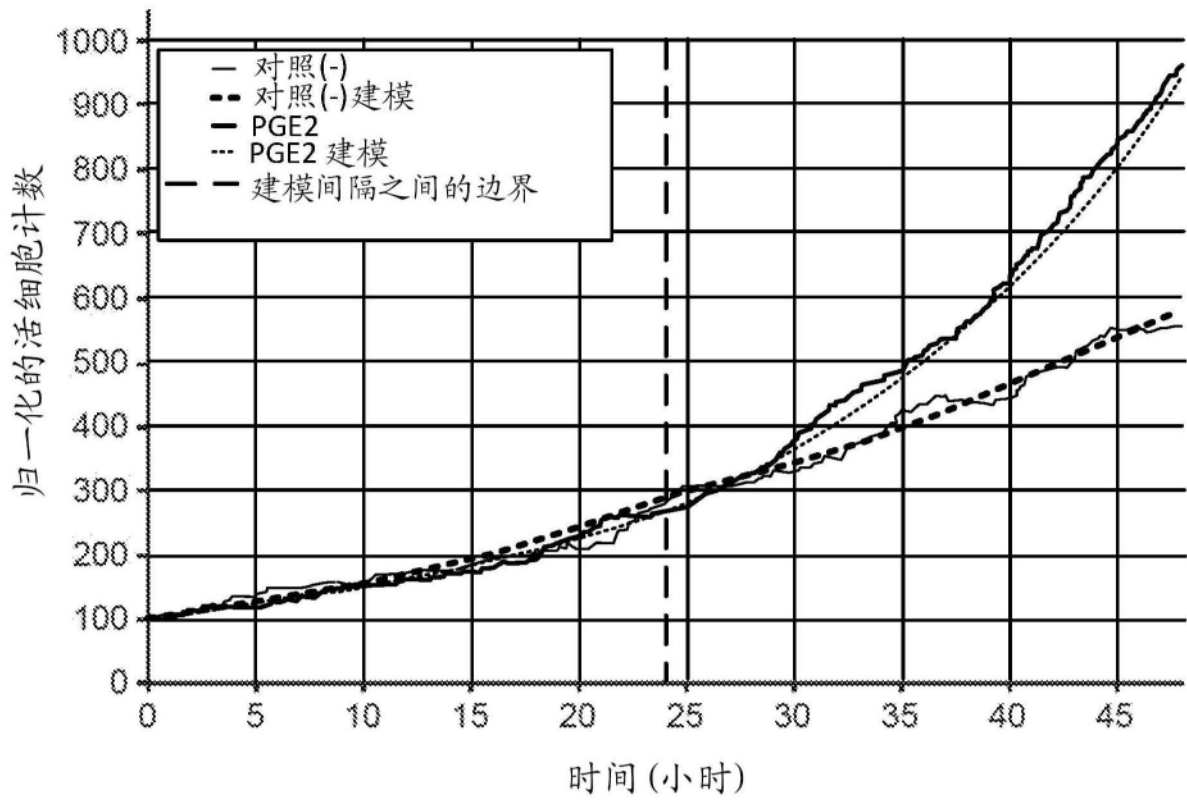


图8F

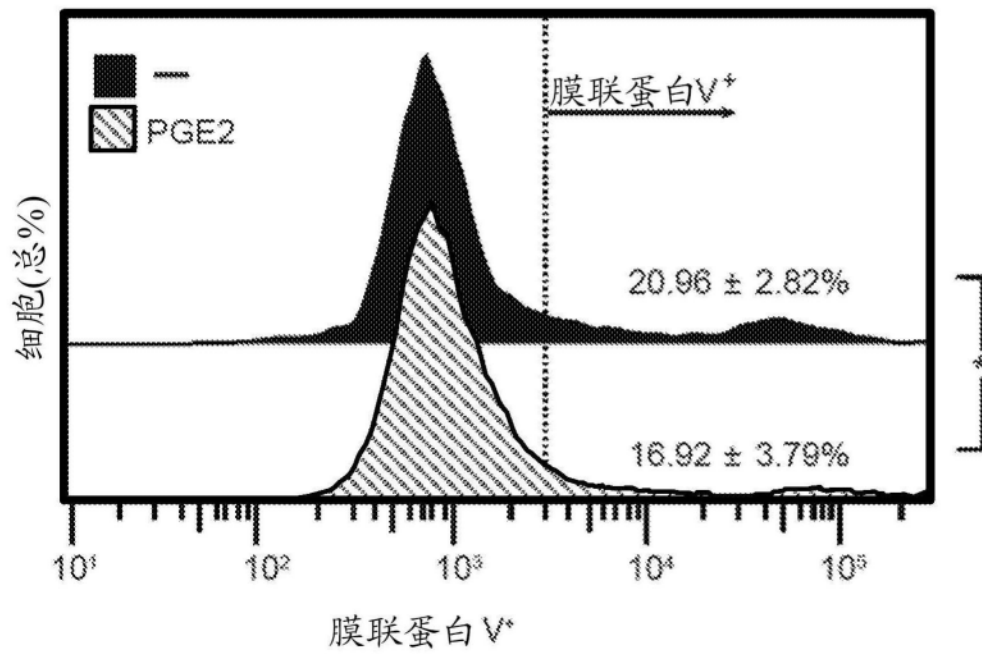


图8G

TA横截面中肌纤维的免疫荧光染色

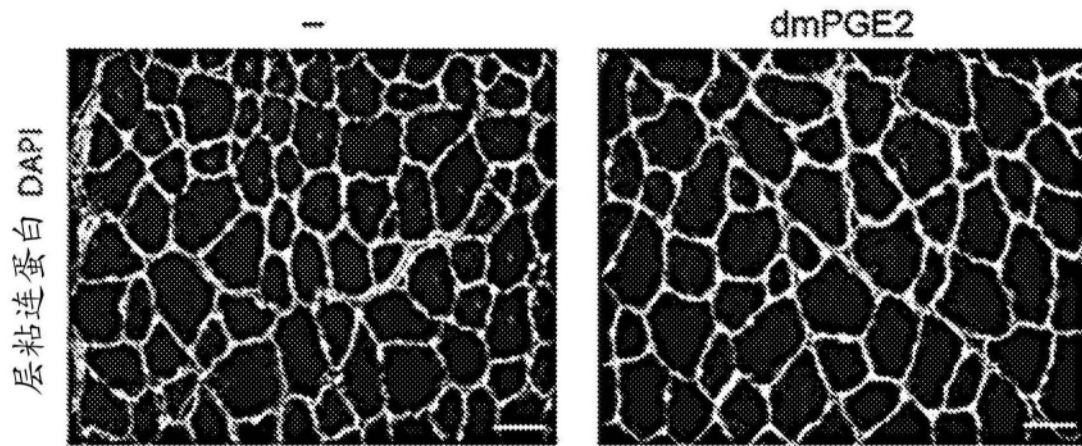


图9A

肌纤维分割用于定量横截面积(CSA)

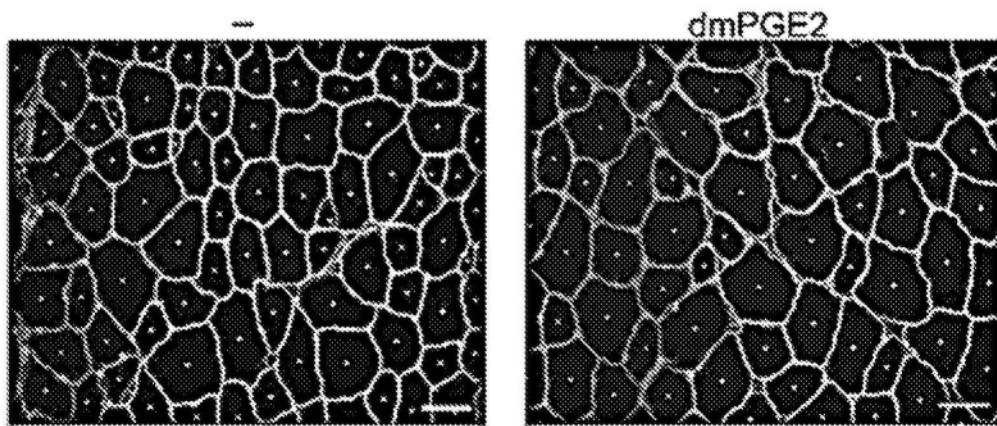


图9B

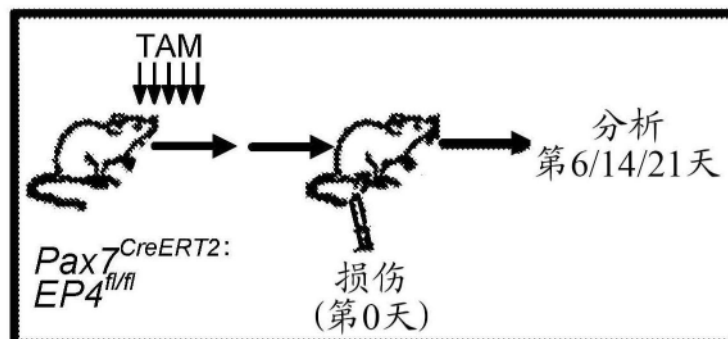


图10A

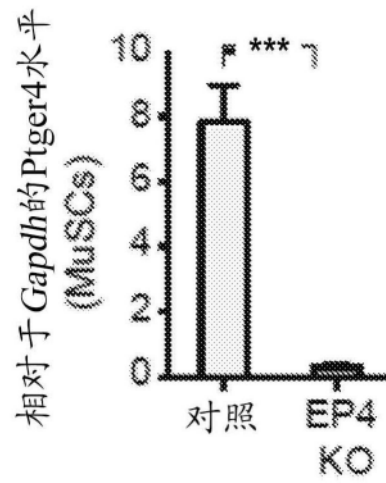


图10B

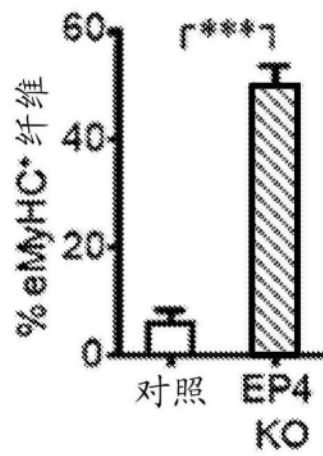


图10C

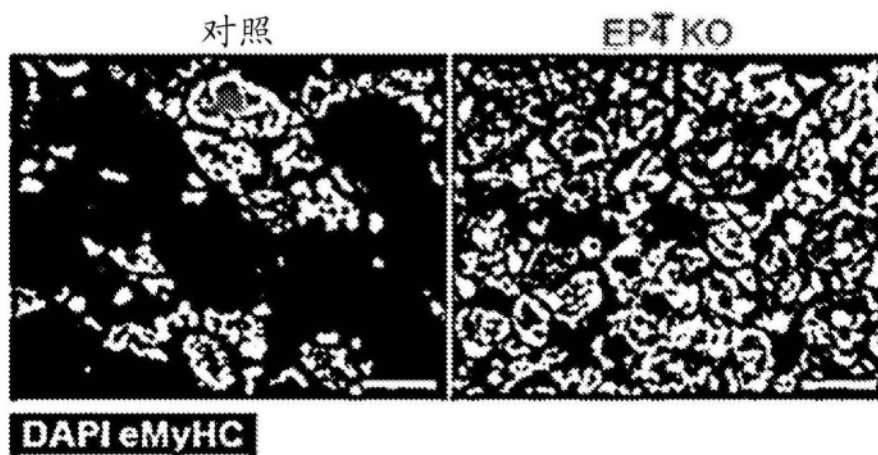


图10D

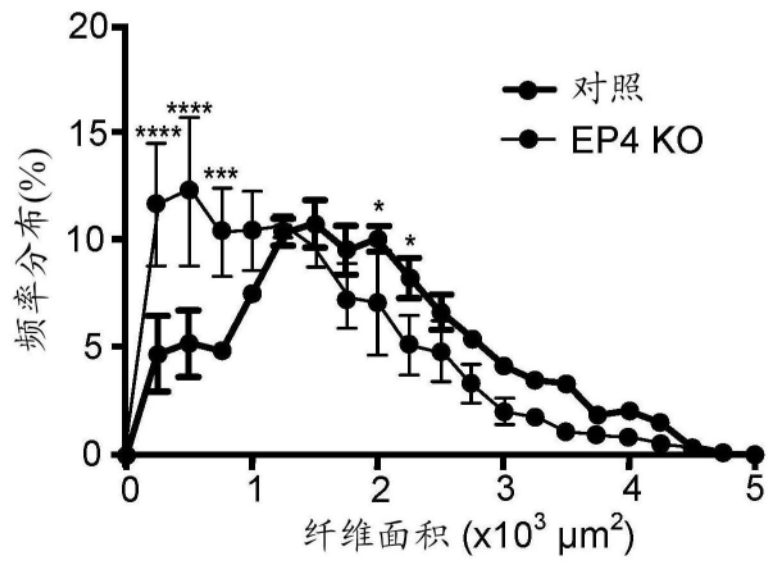


图10E

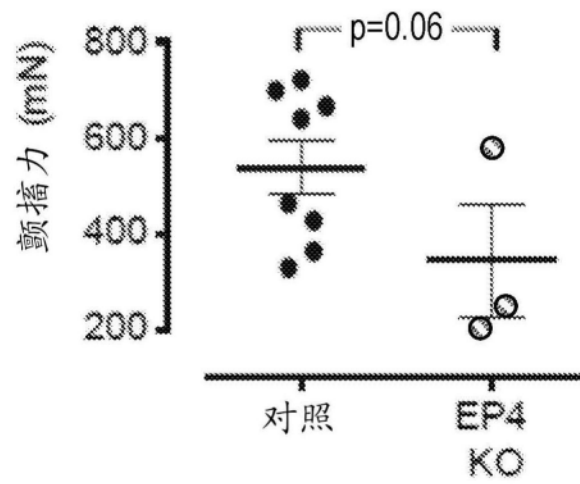


图10F

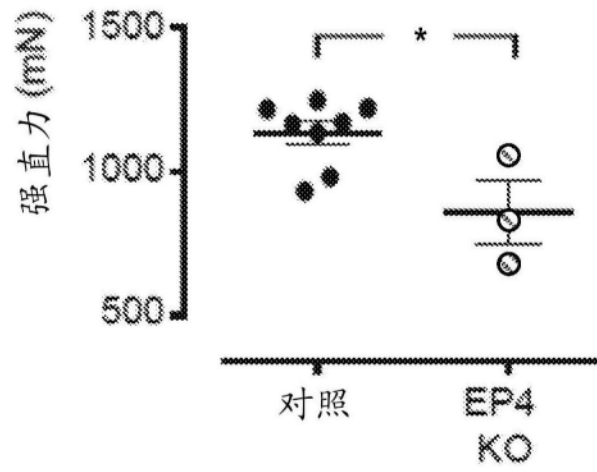


图10G

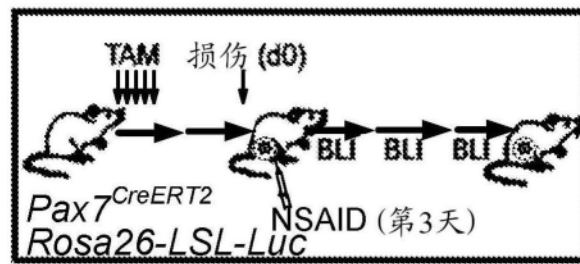


图11A

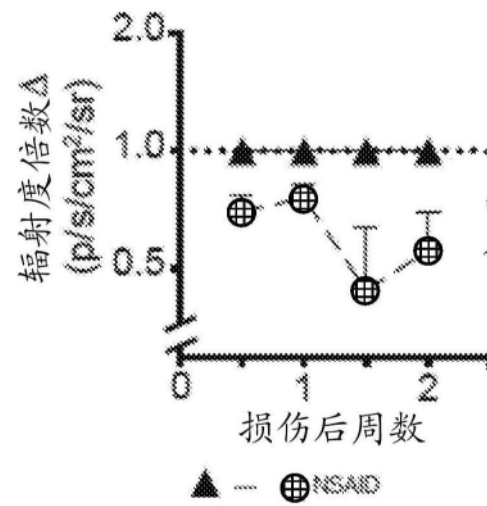


图11B

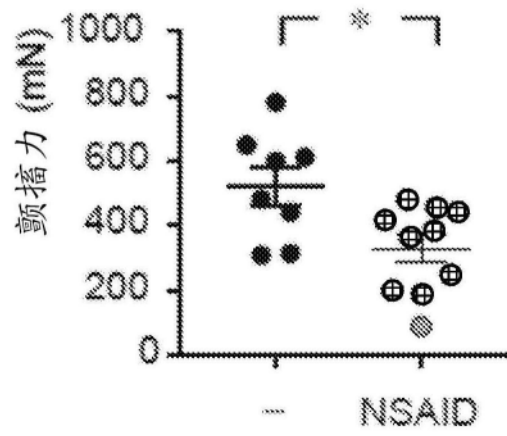


图11C

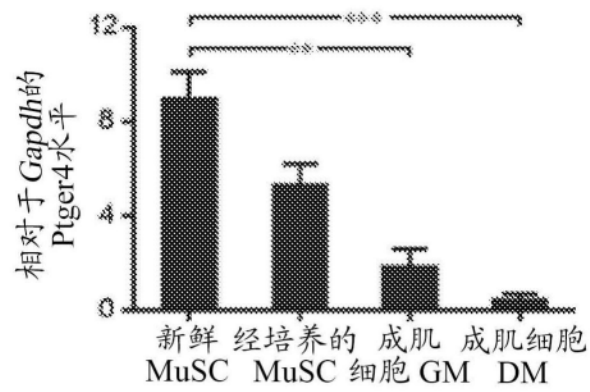


图12A

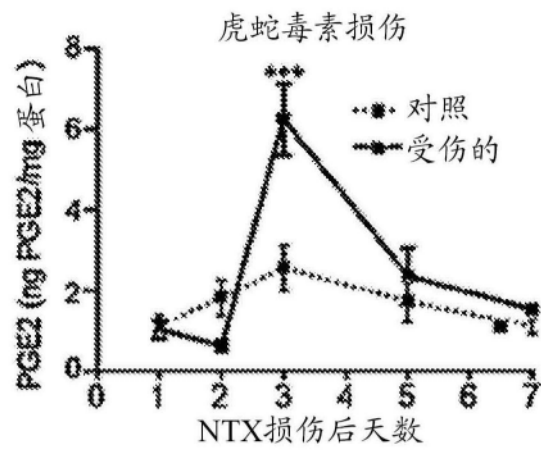


图12B

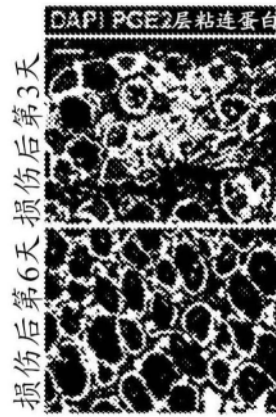


图12C

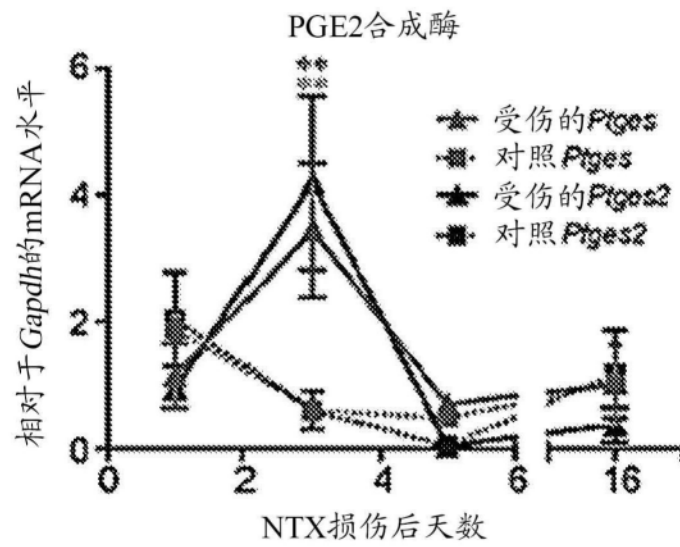


图12D

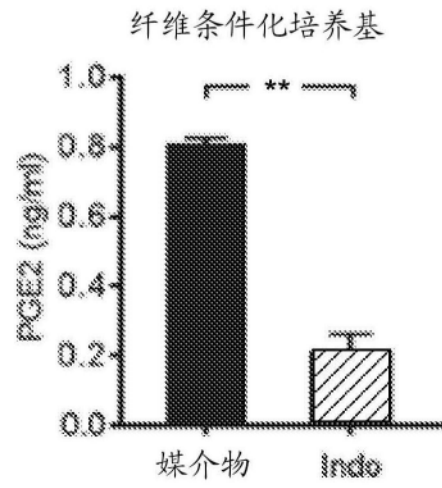


图12E

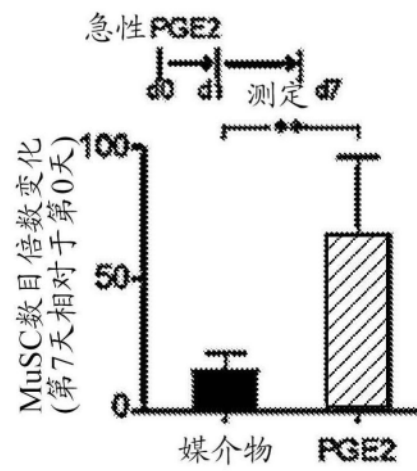


图12F

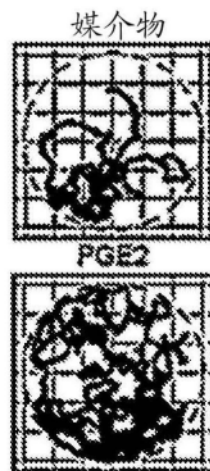


图12G

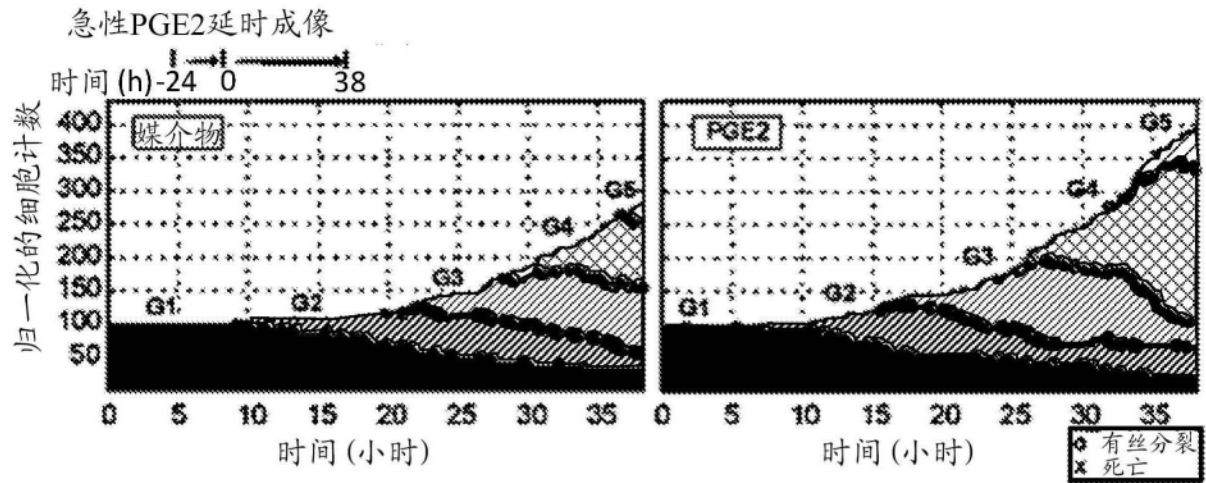


图12H

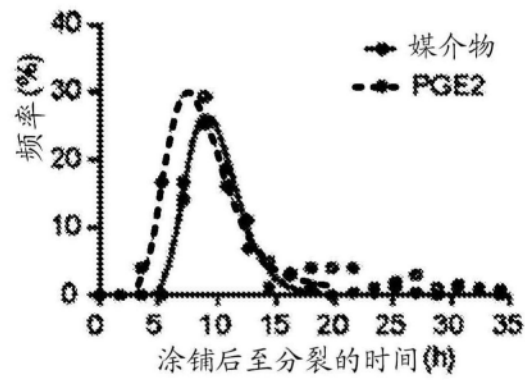


图12I

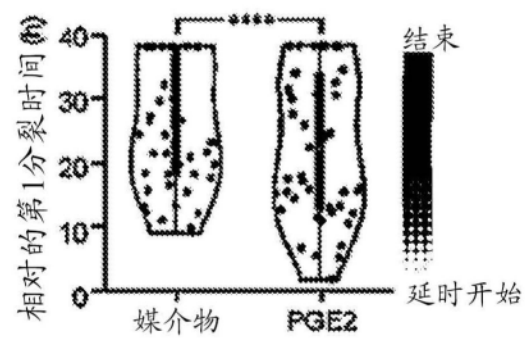


图12J

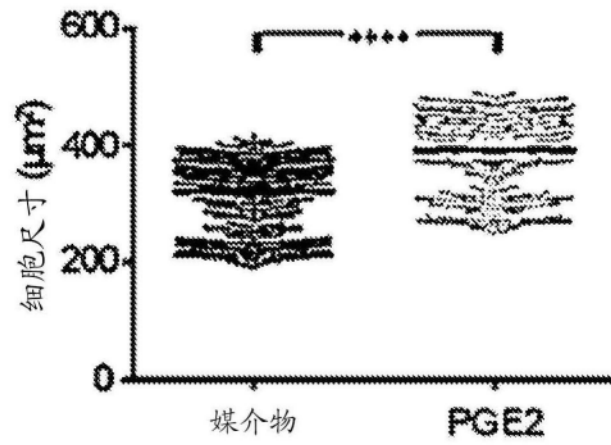


图12K

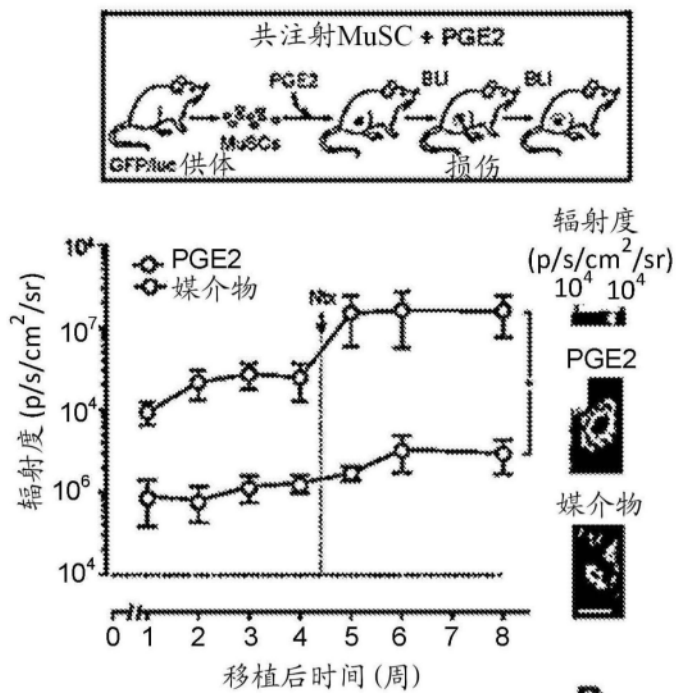


图 13A

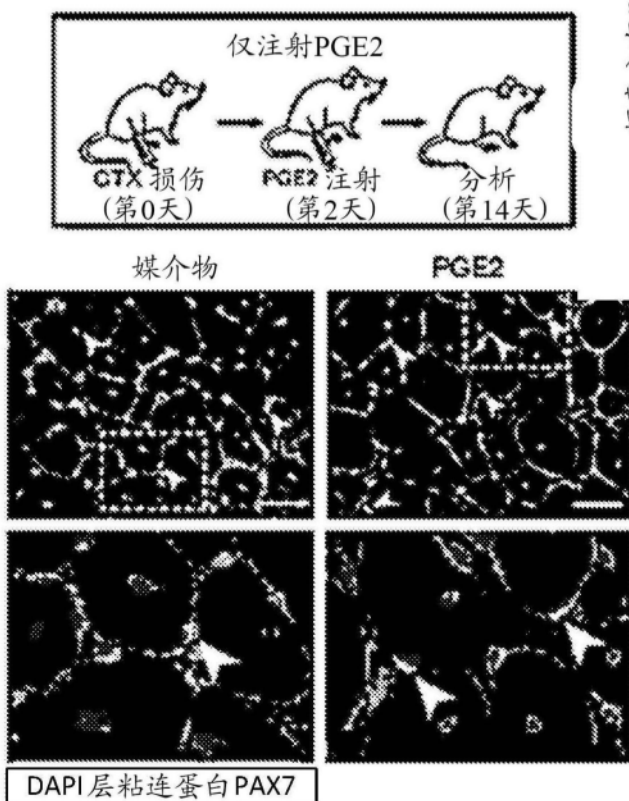


图 13B

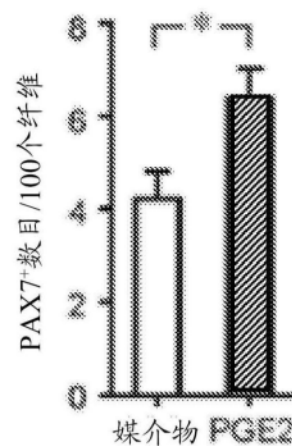


图 13C

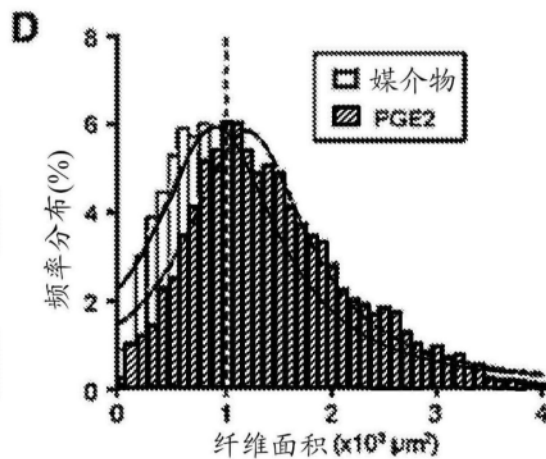


图 13D

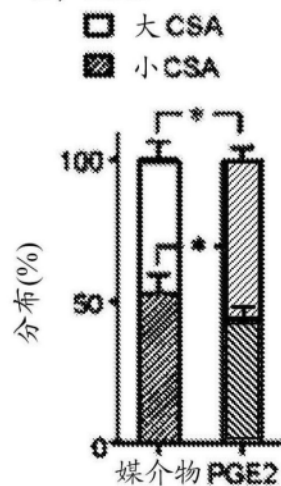


图 13E

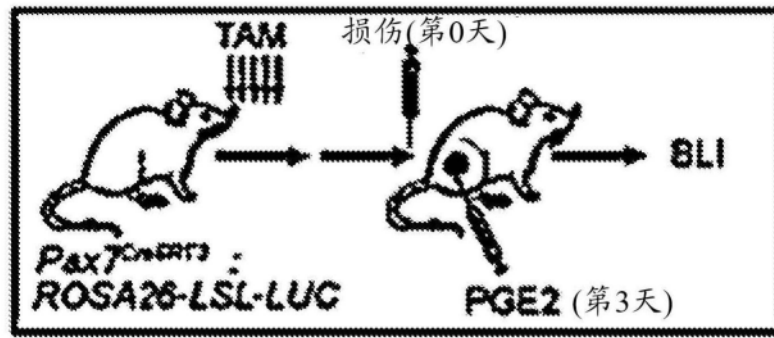


图13F

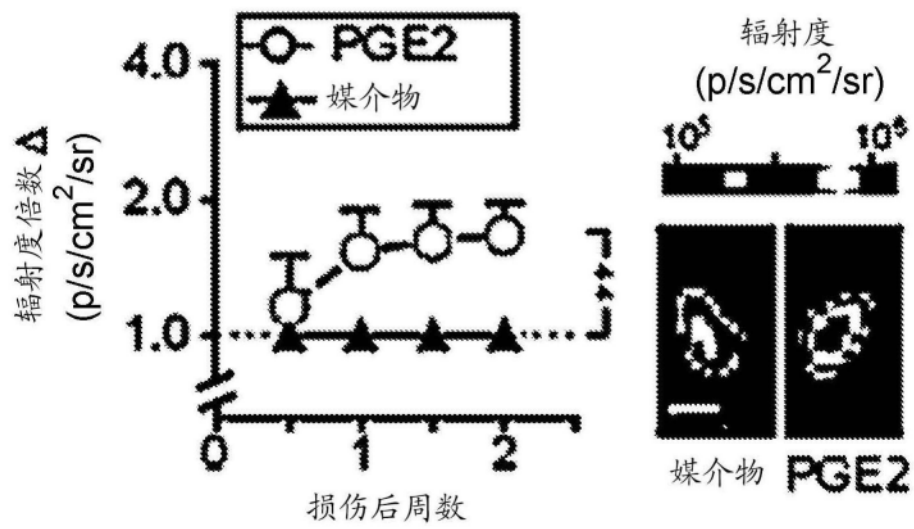


图13G

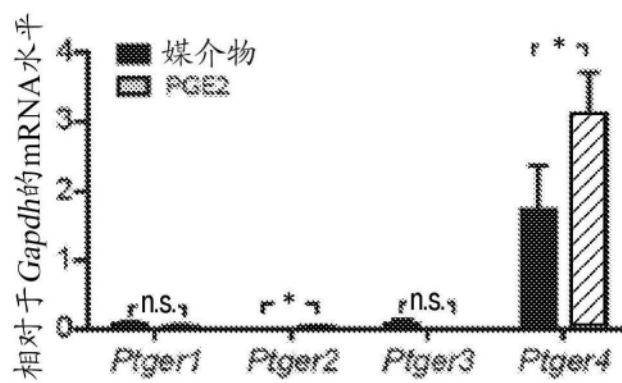


图14A

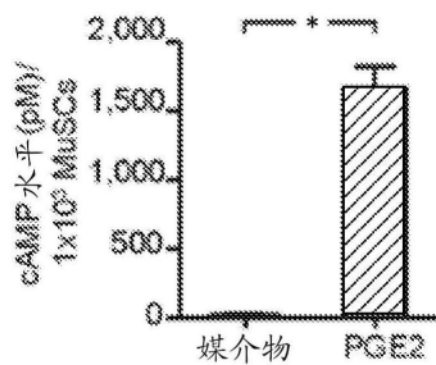


图14B

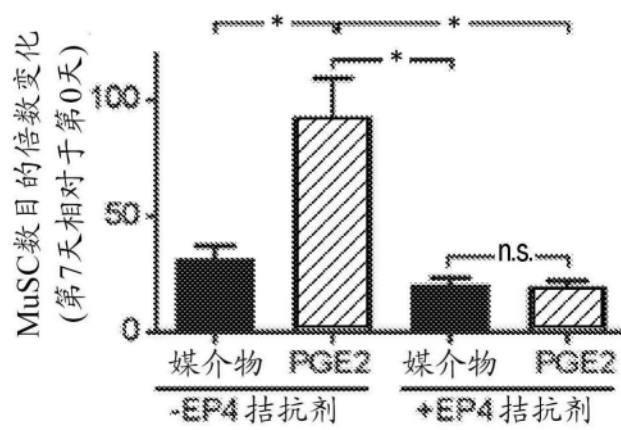


图14C

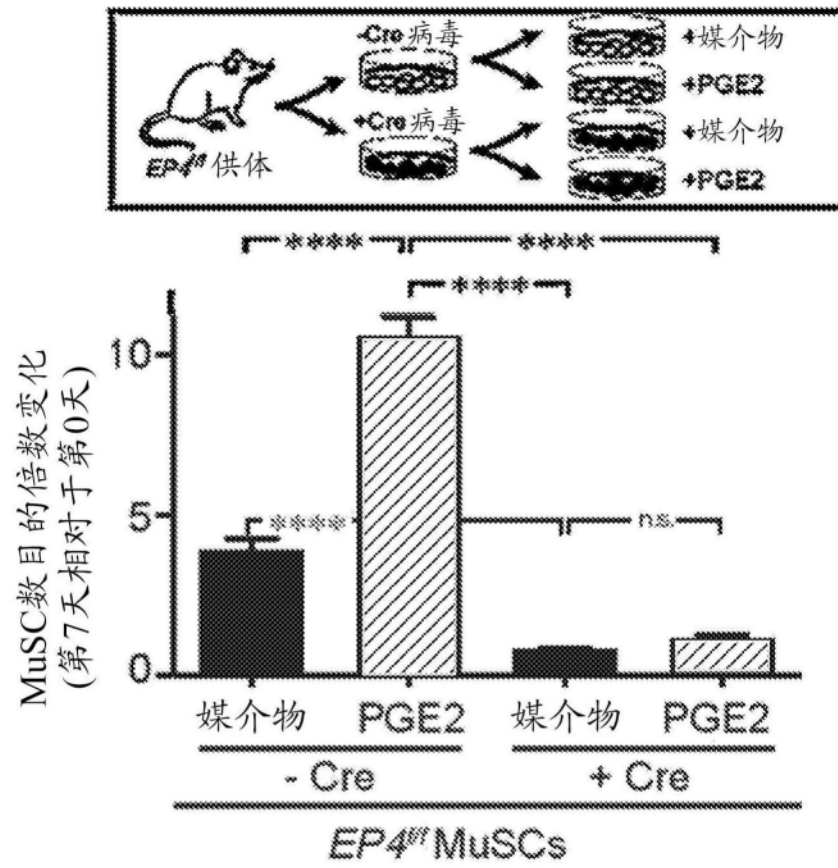


图14D

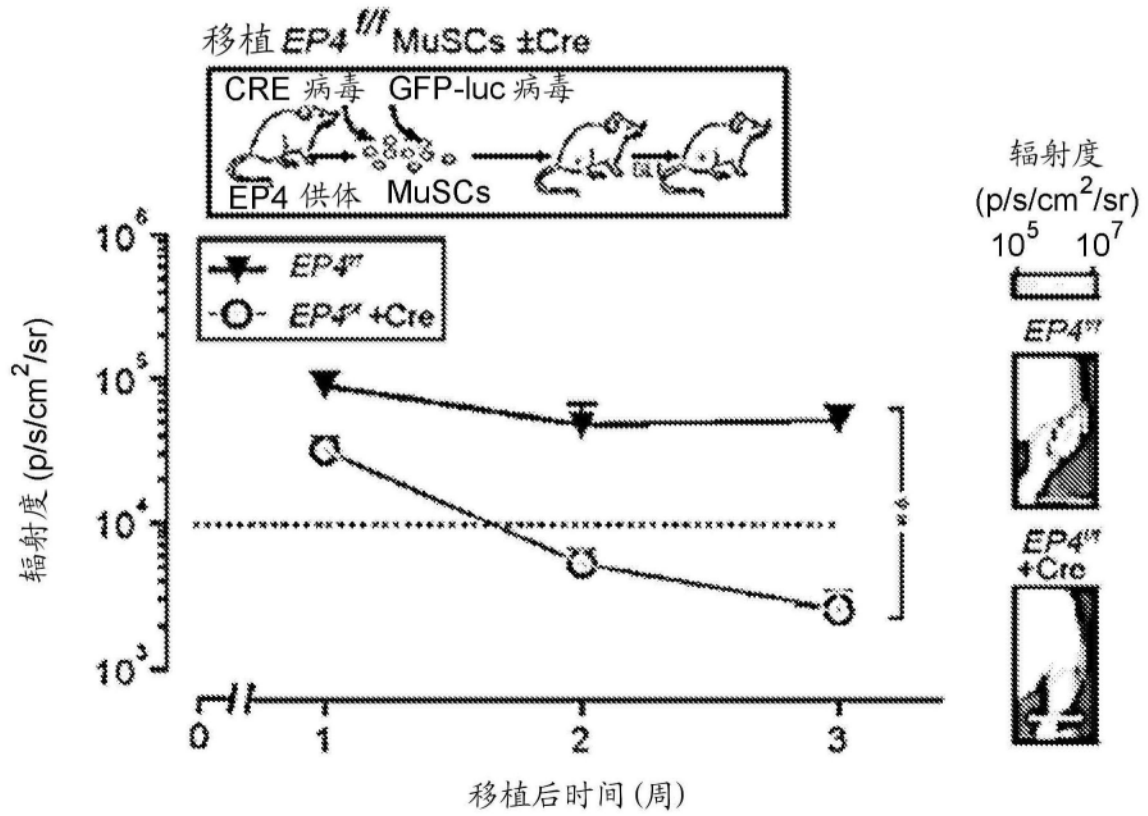


图14E

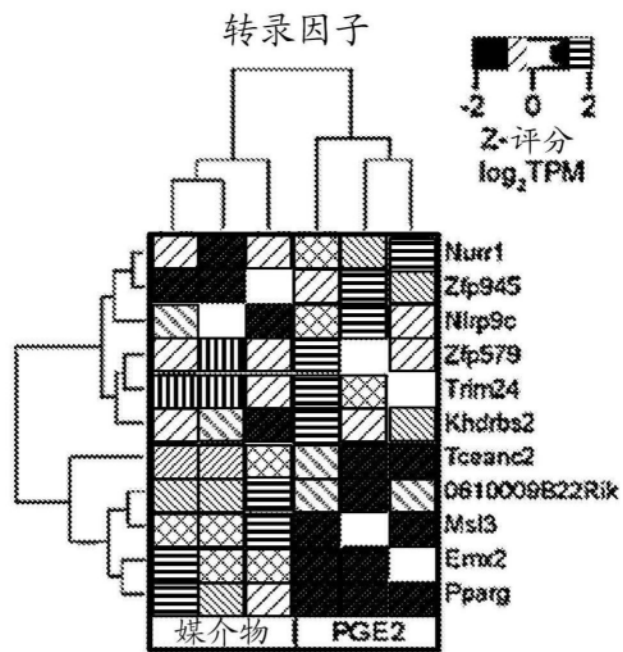


图15A

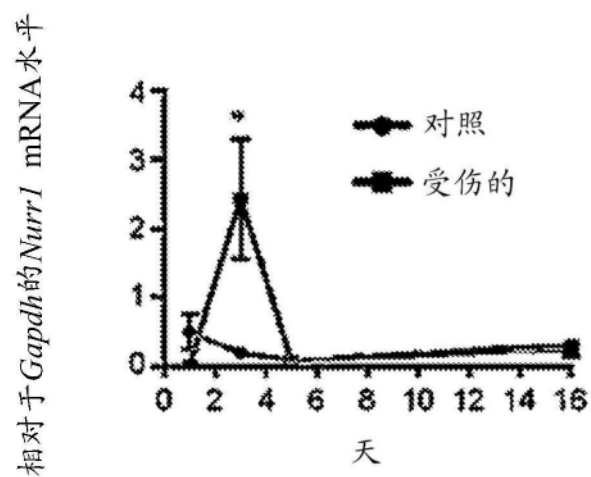


图15B

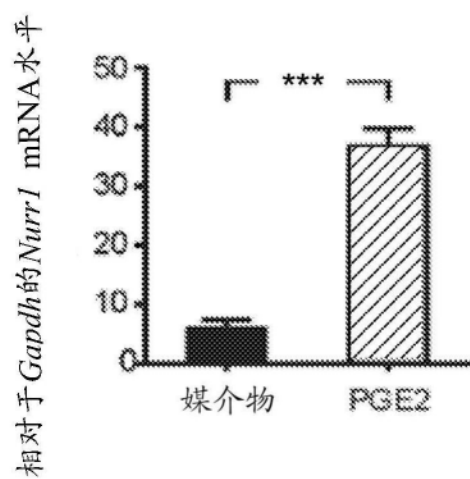


图15C

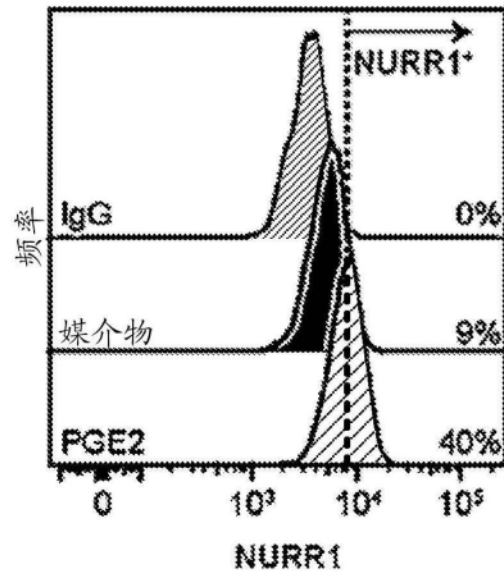


图15D

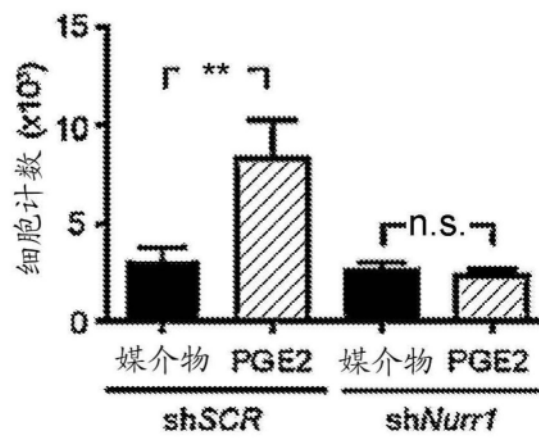


图15E

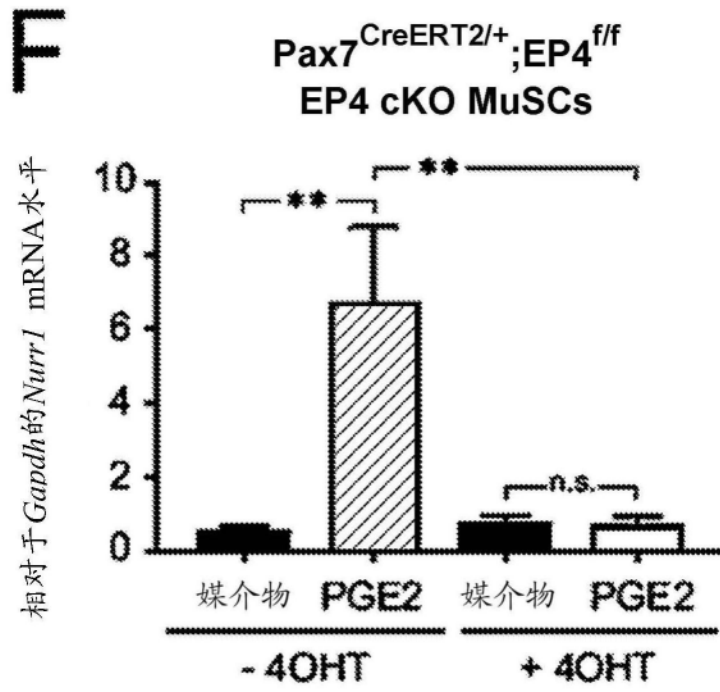


图15F

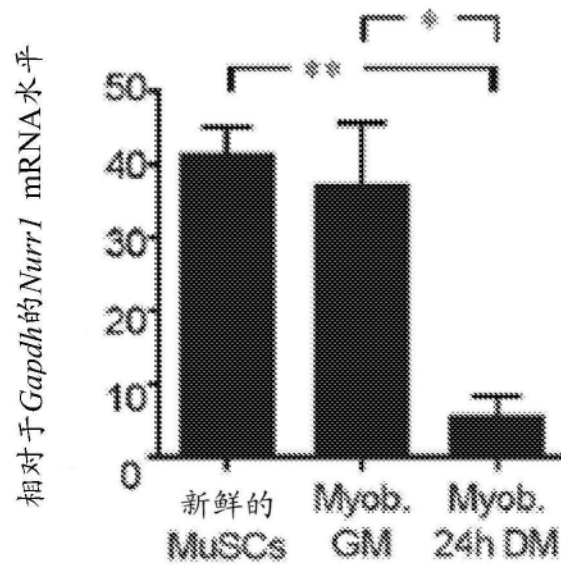


图15G

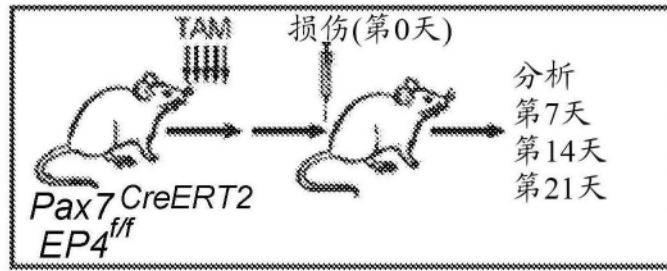


图16A

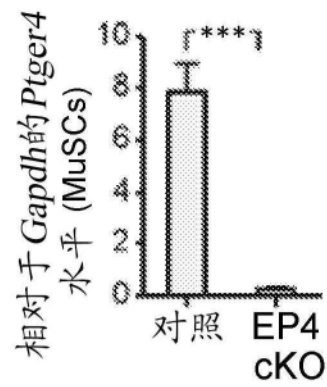


图16B

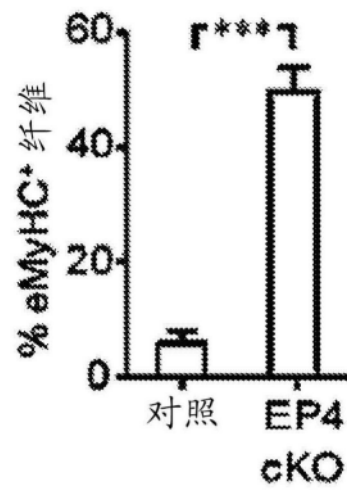


图16C

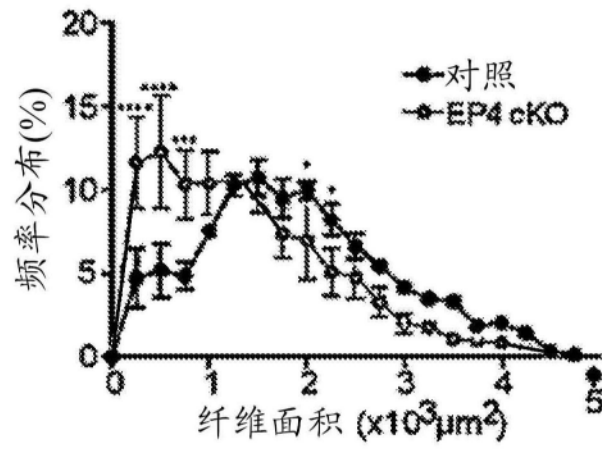


图16D

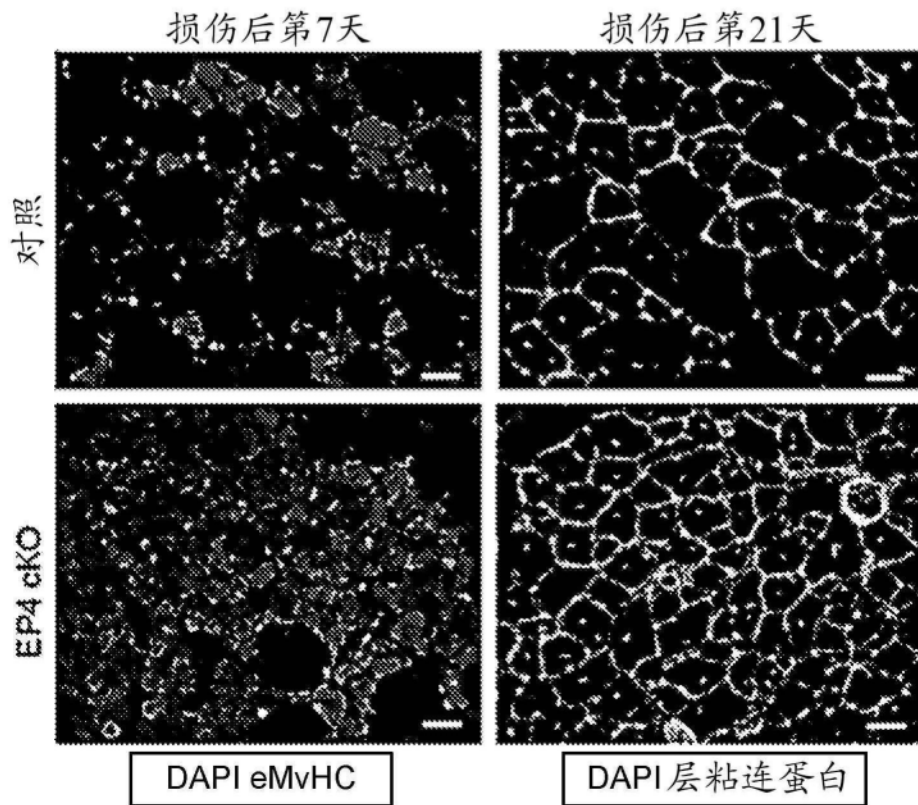


图16E

体内力测量

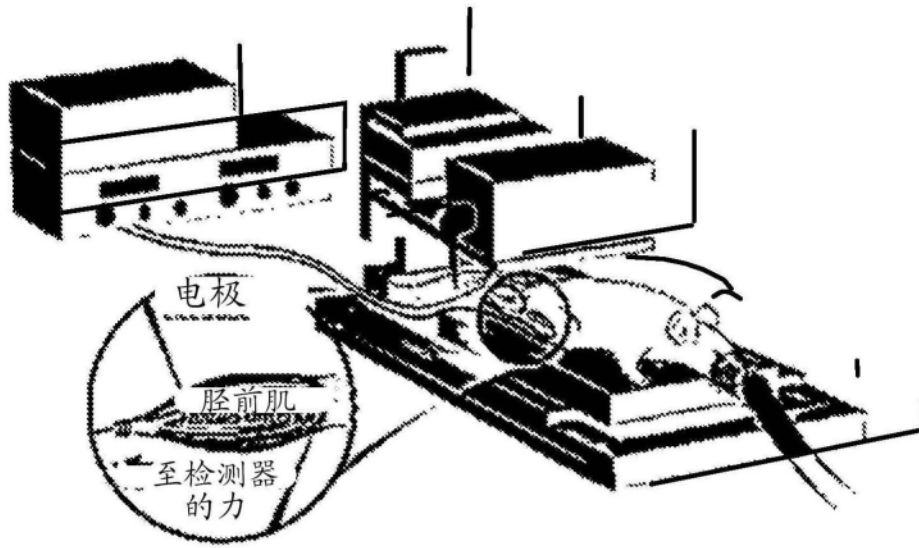


图16F

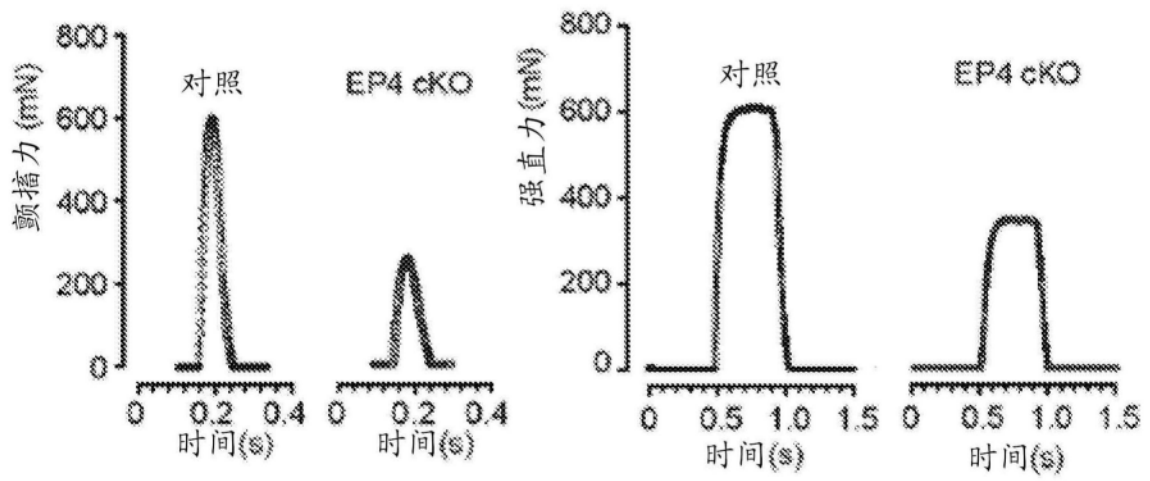


图16G

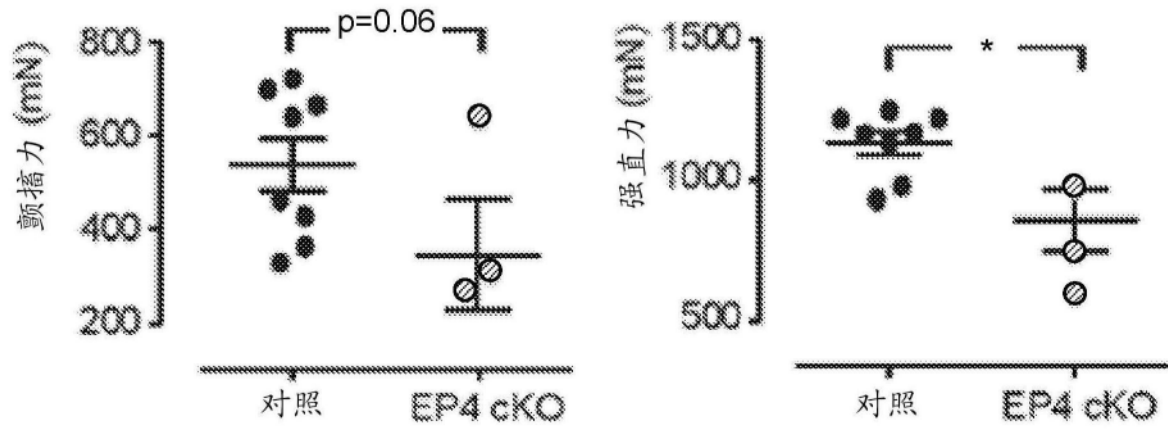


图16H

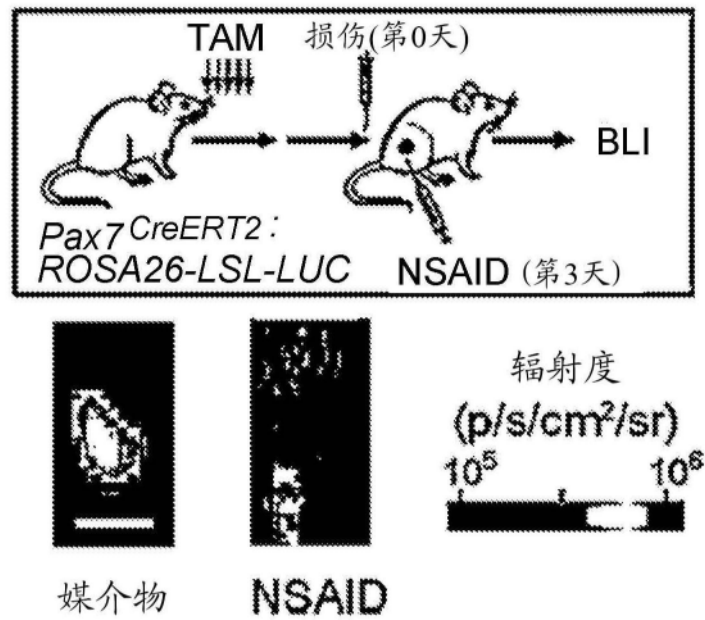


图16I

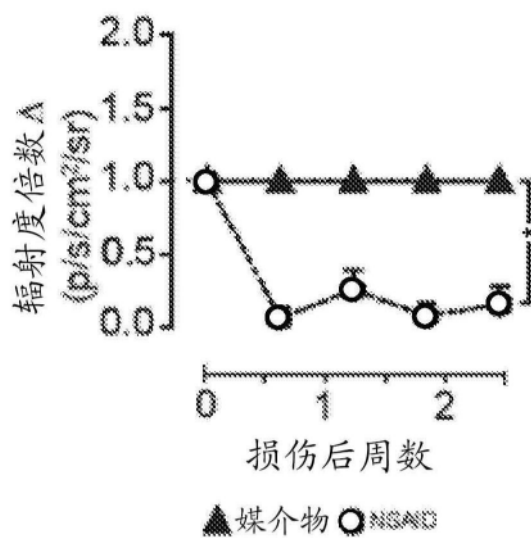


图16J

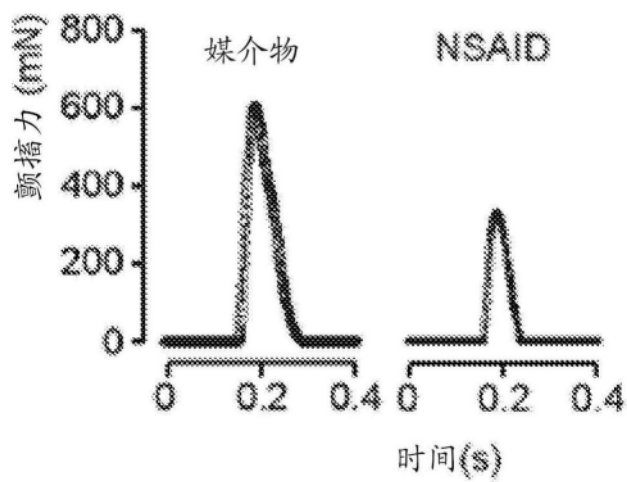


图16K

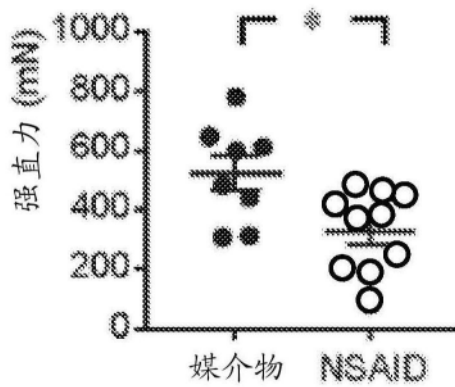


图16L

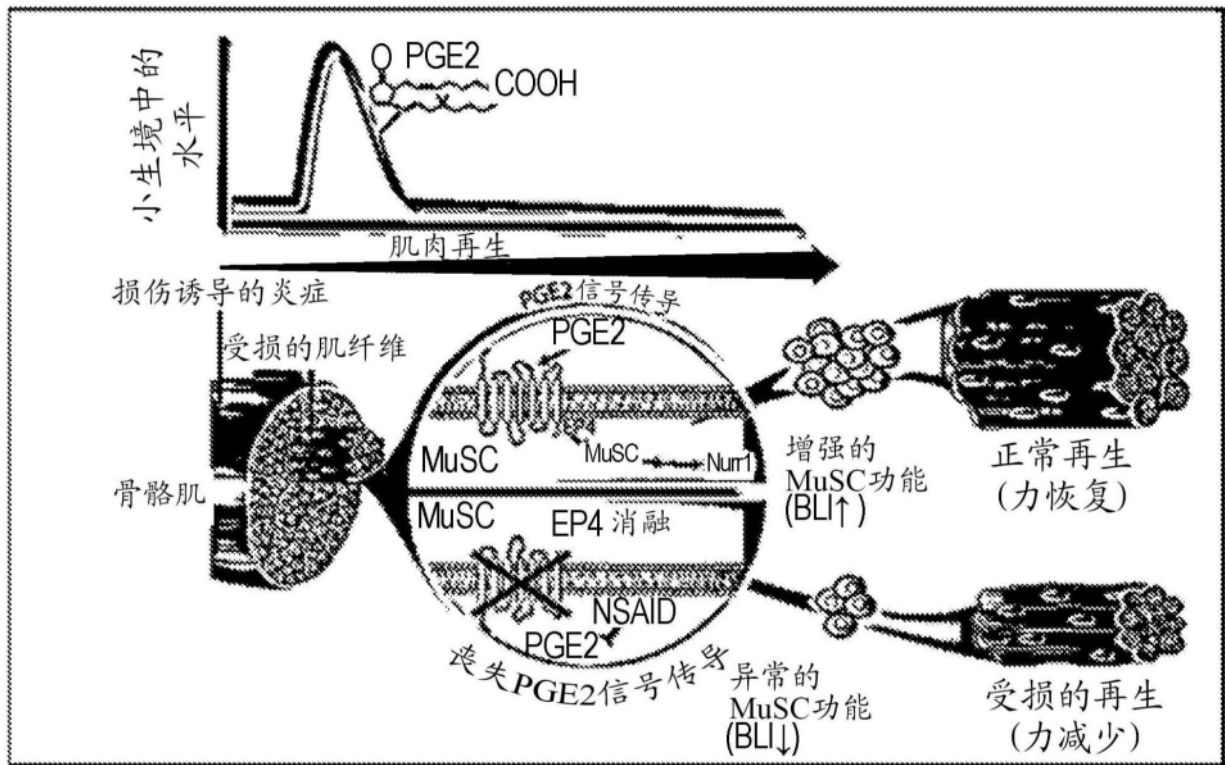


图17

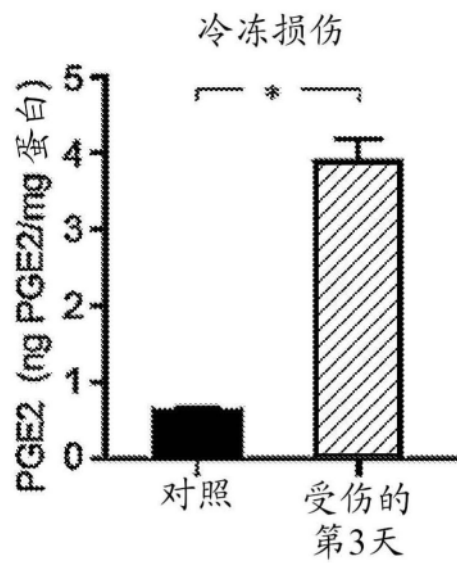


图18A

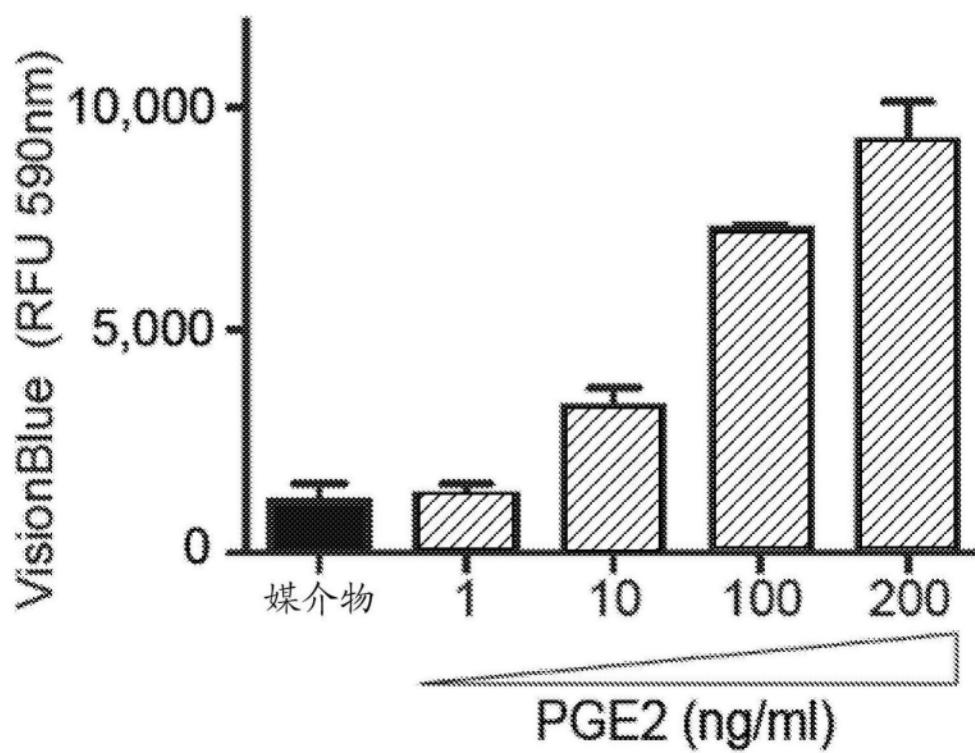


图18B

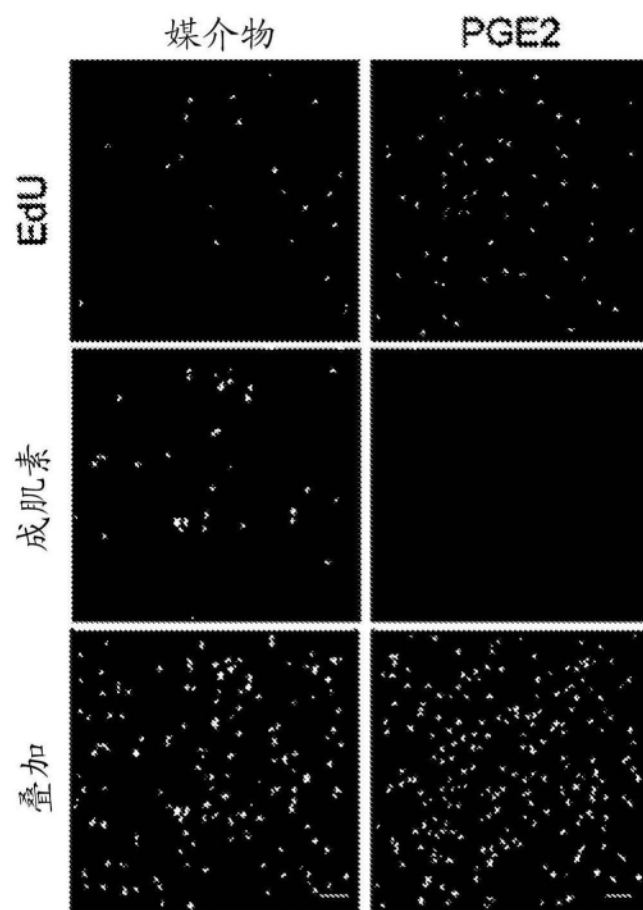


图18C

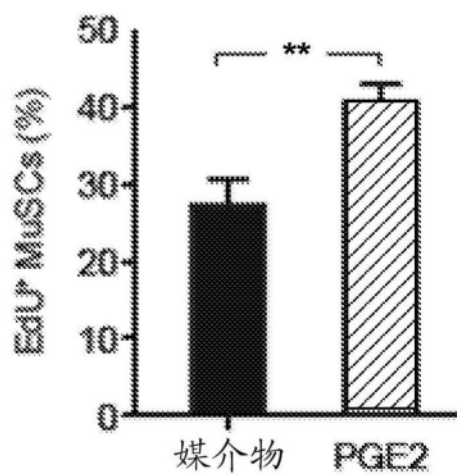


图18D

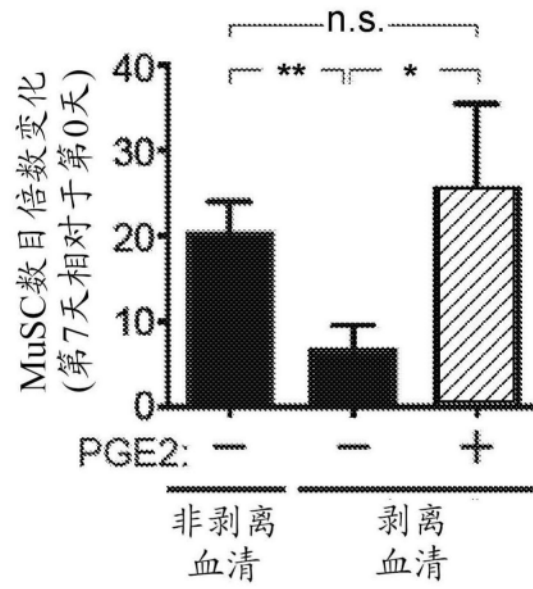


图18E

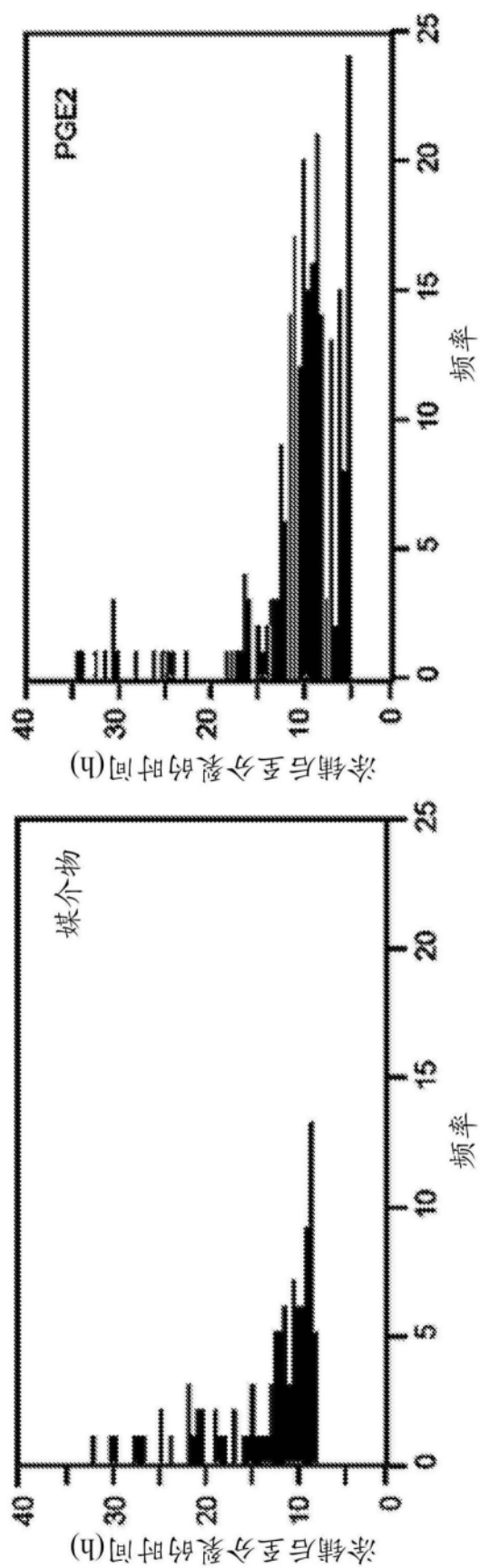


图18F

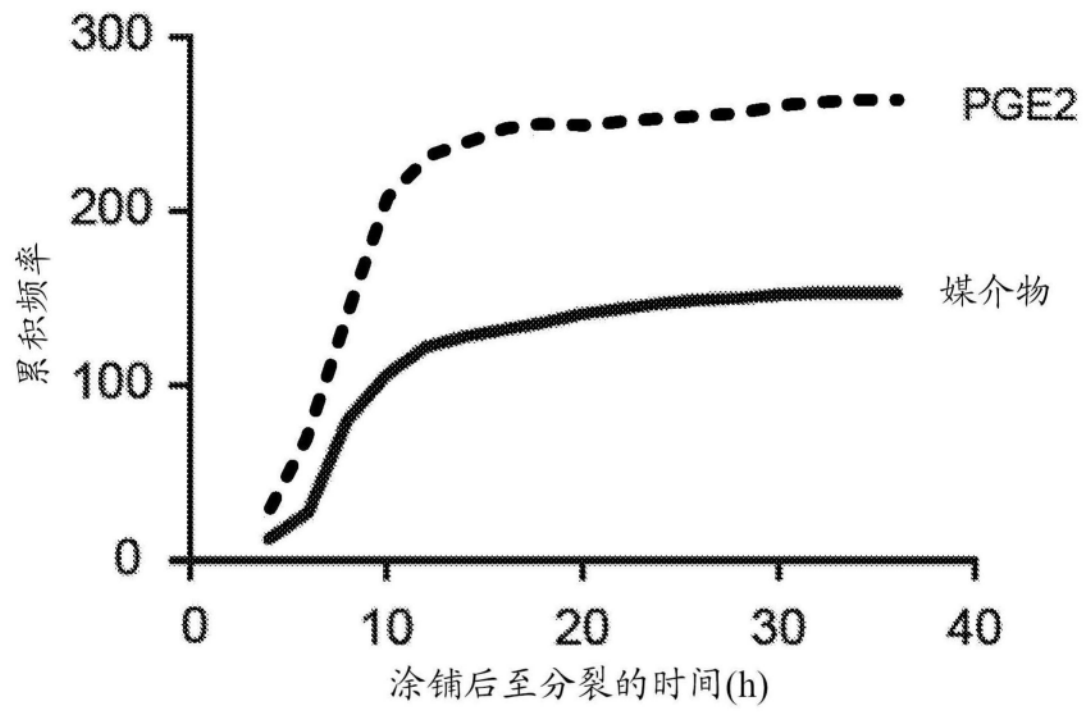


图18G

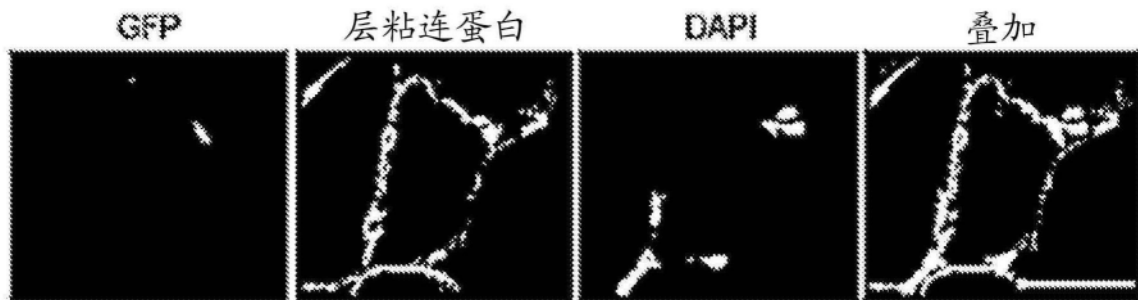


图19A

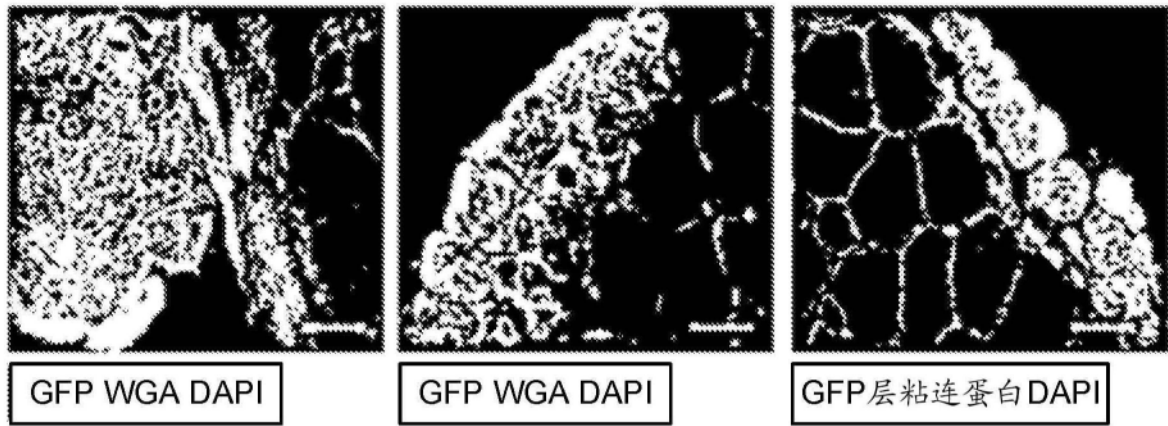


图19B

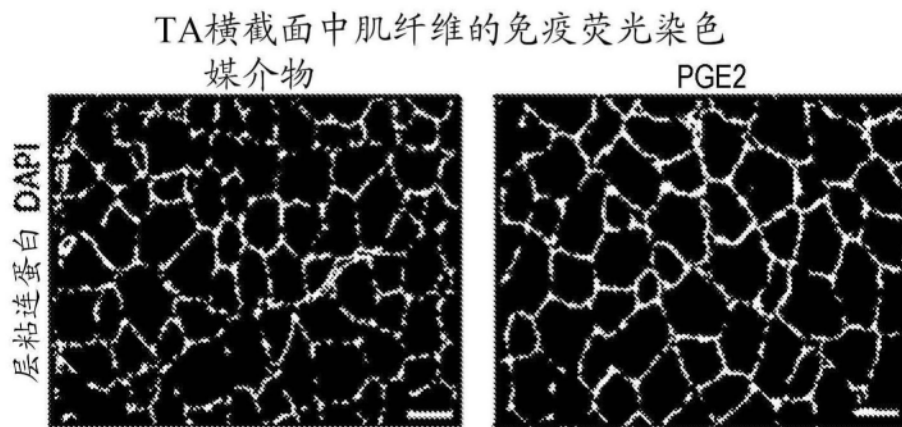


图19C

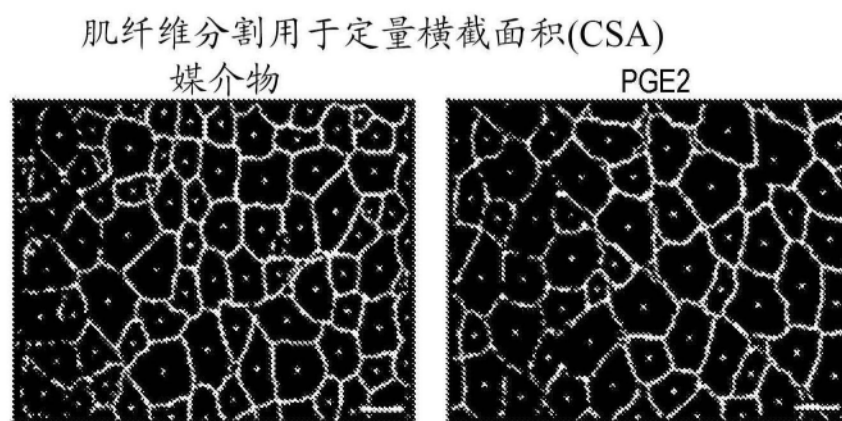


图19D

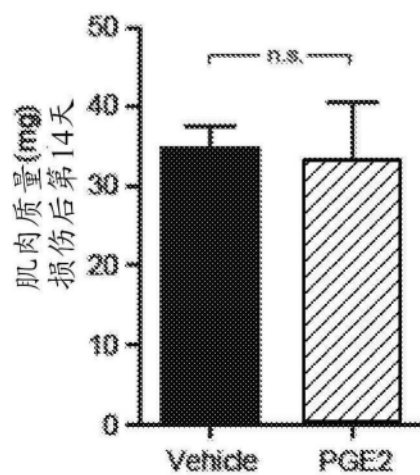


图19E

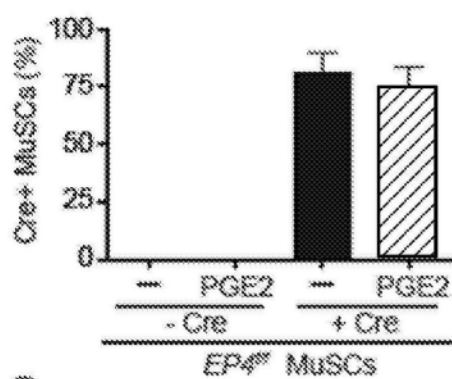


图 20A

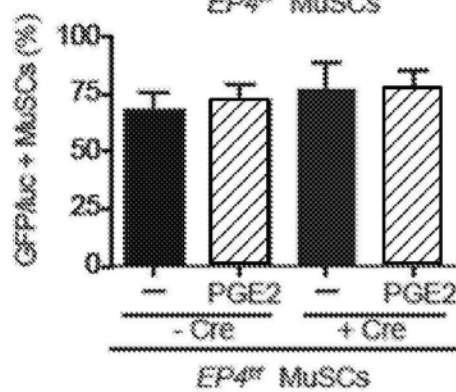


图 20B

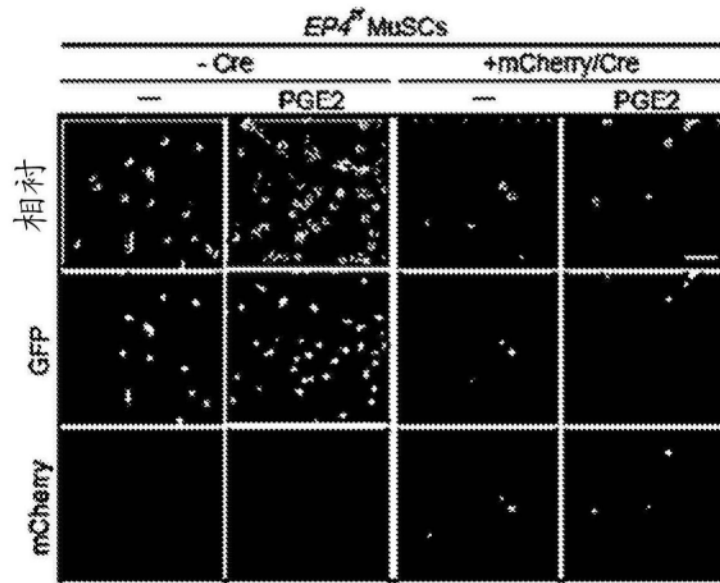


图20C

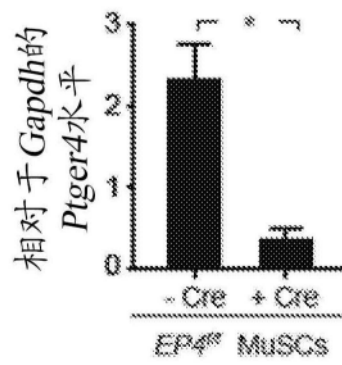


图20D

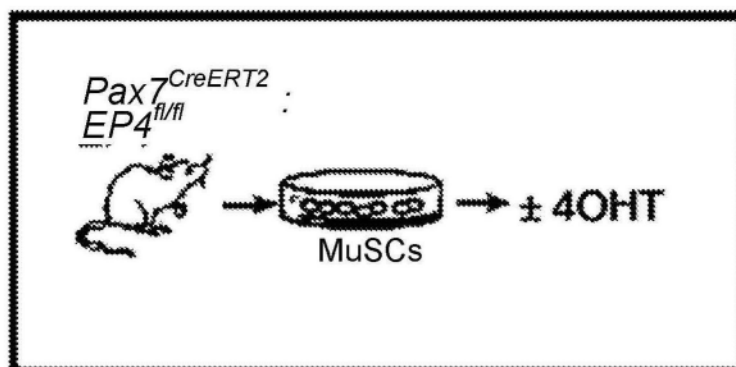


图20E

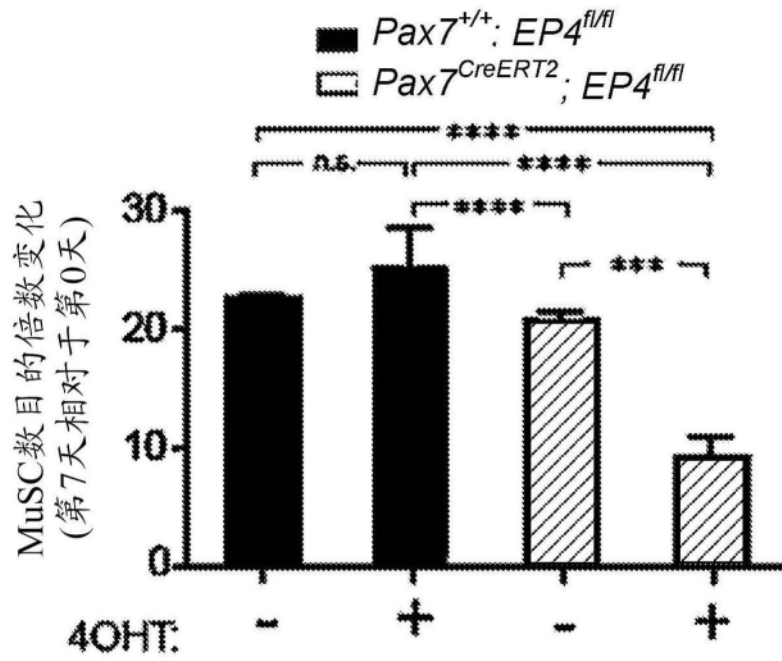


图20F

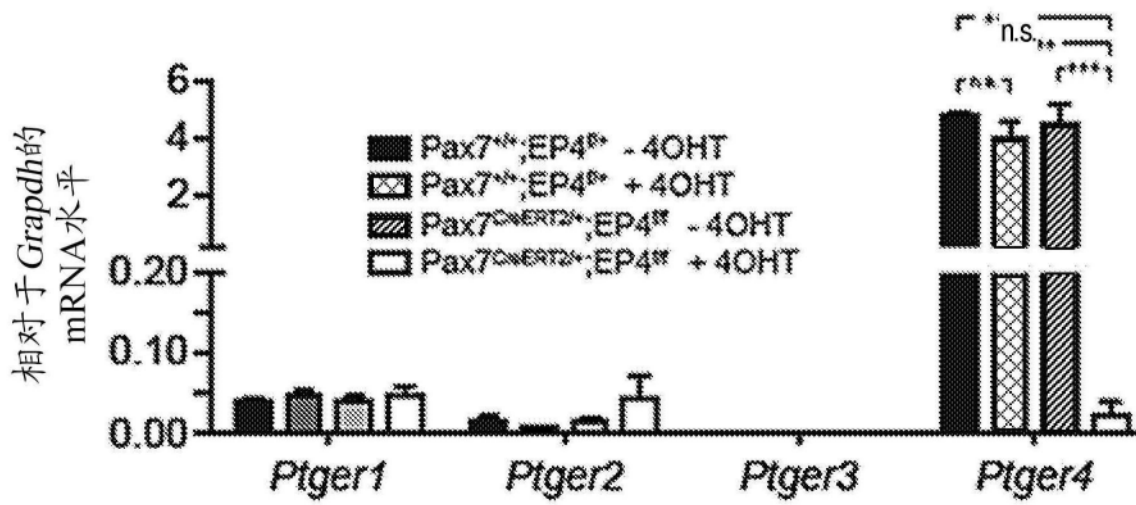


图20G

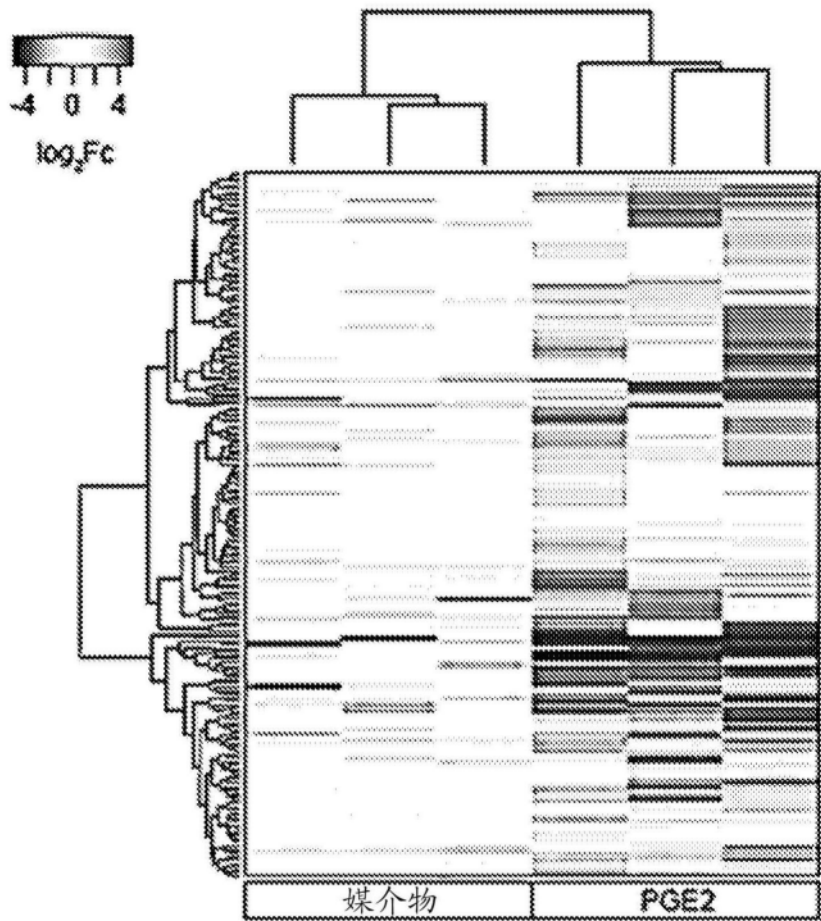


图21A

分子功能和细胞功能	p-值
细胞形态	4.22E-05
脂质代谢	4.45E-04
分子运输	4.45E-04
小分子生物化学	4.45E-04
细胞至细胞信号传导和相互作用	4.83E-04

图21B

途径富集	p-值
痛觉受体信号传导	6.591E-03
PGE2途径	2.649E-03
经由环状AMP进行的信号传导	2.255E-03
代谢物运输	2.014E-03
氧化应激调控	1.684E-03
细胞循环调控	1.214E-03
调控G1/S检查点	1.128E-02
调控G2/M检查点	1.128E-02

图21C

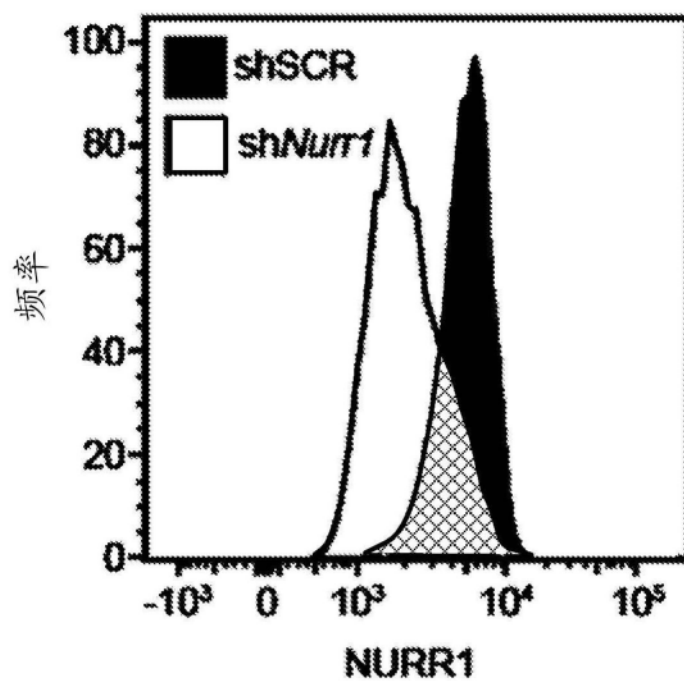


图21D

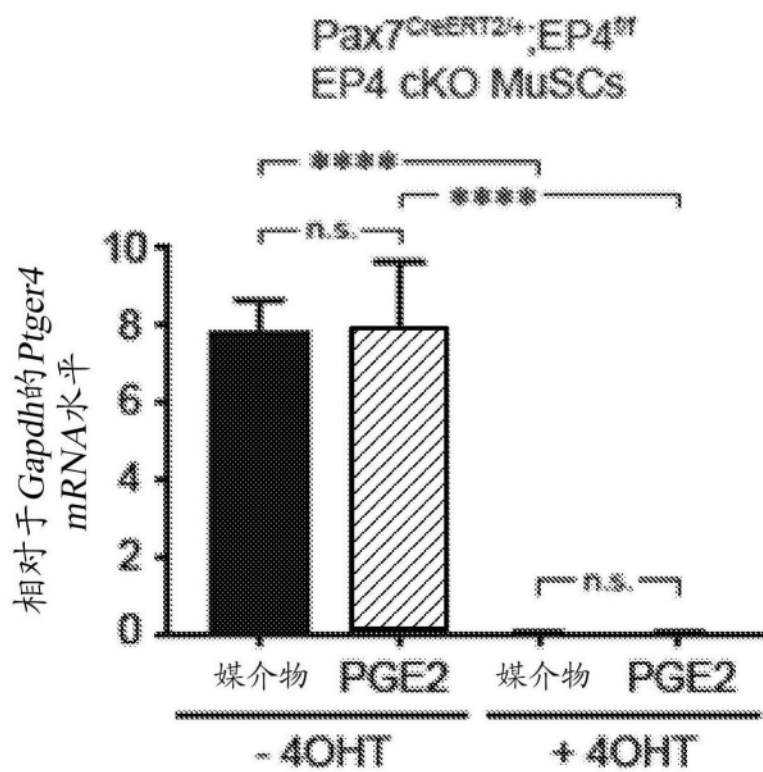


图21E

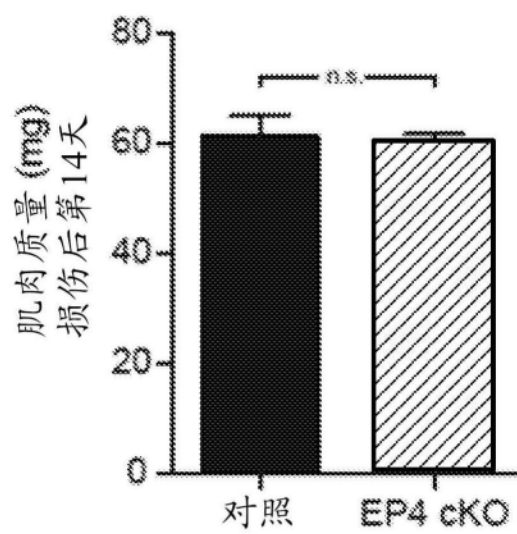


图22A

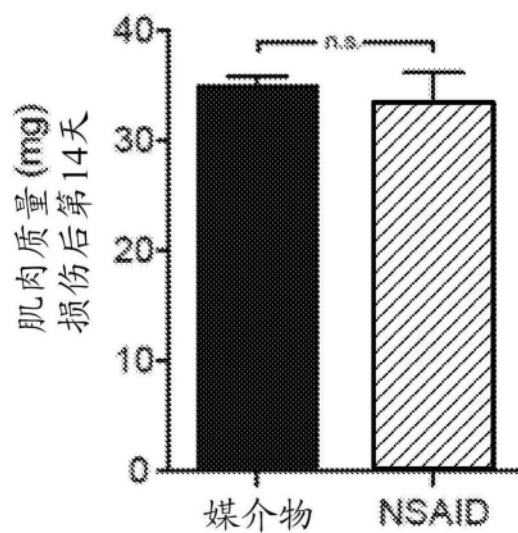


图22B

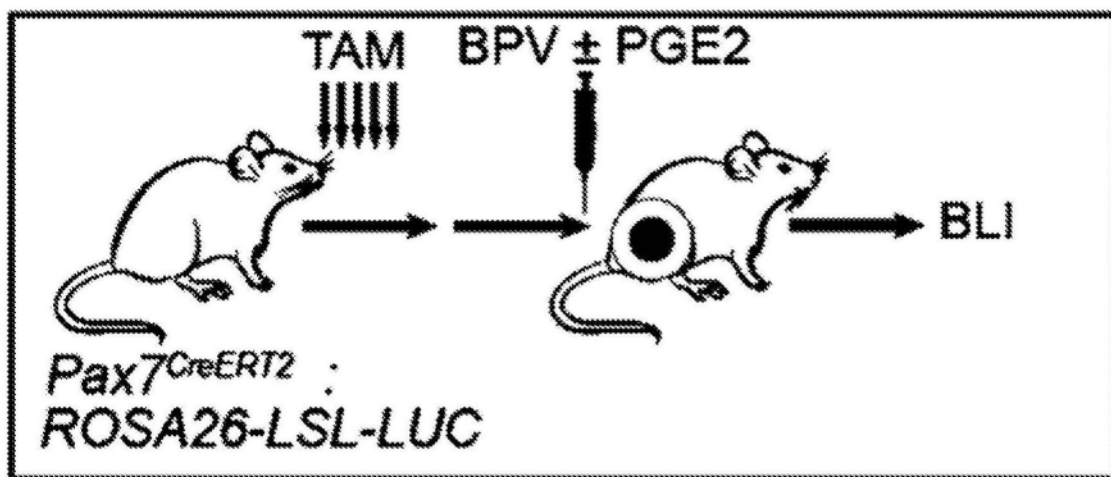


图23A

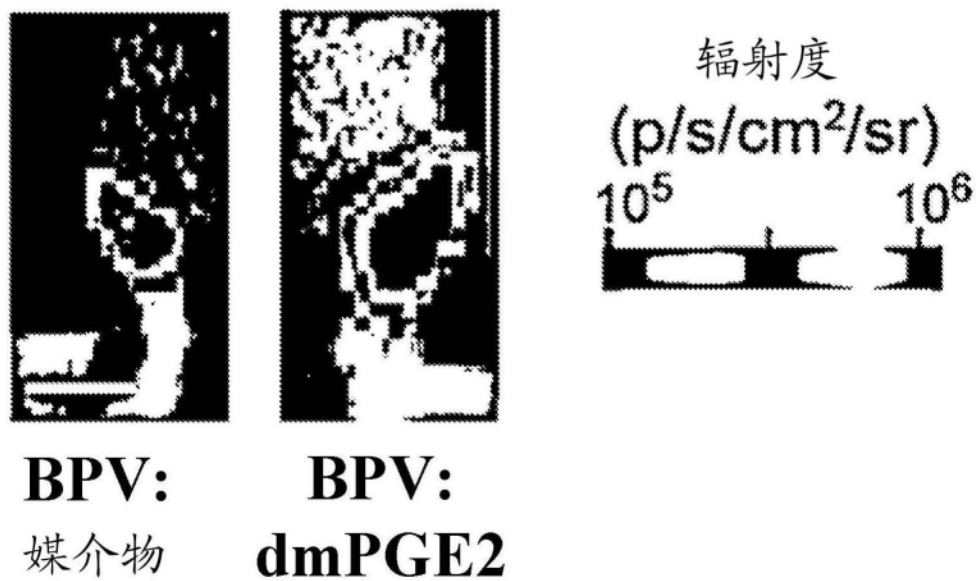


图23B

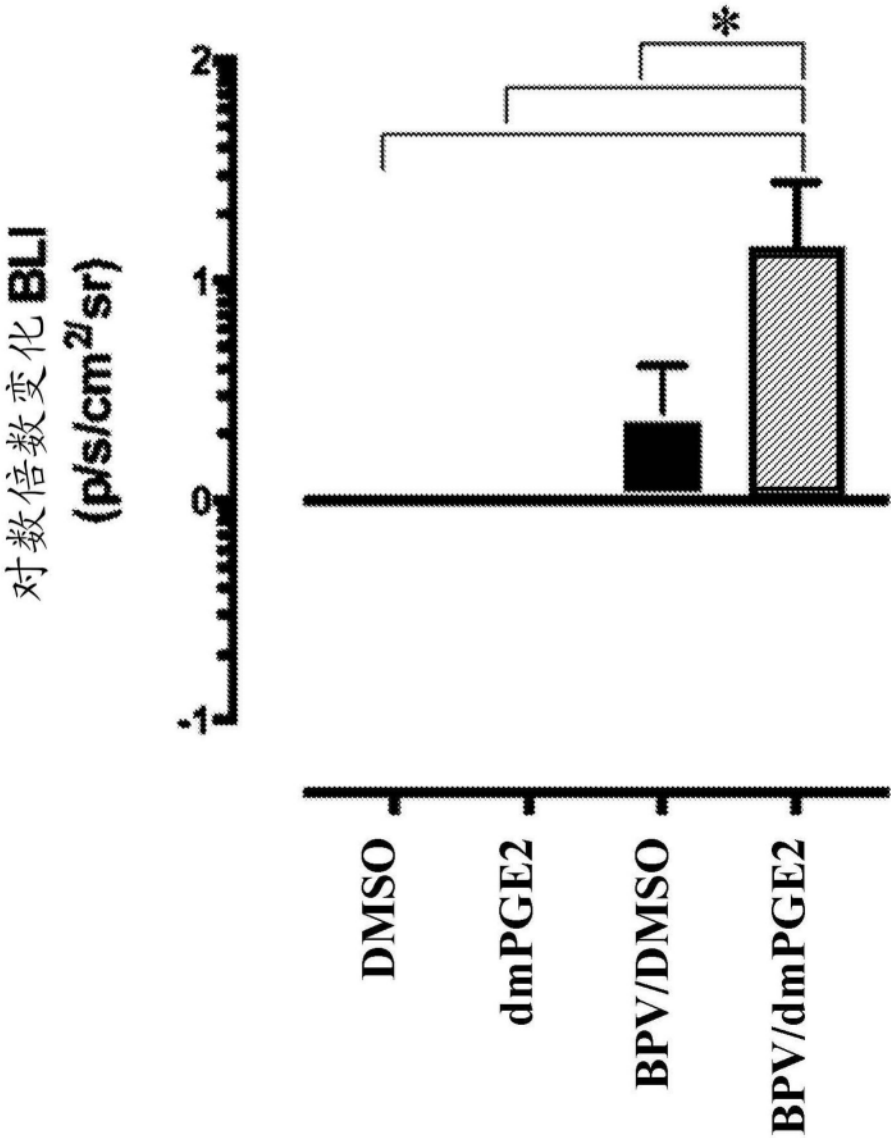


图23C

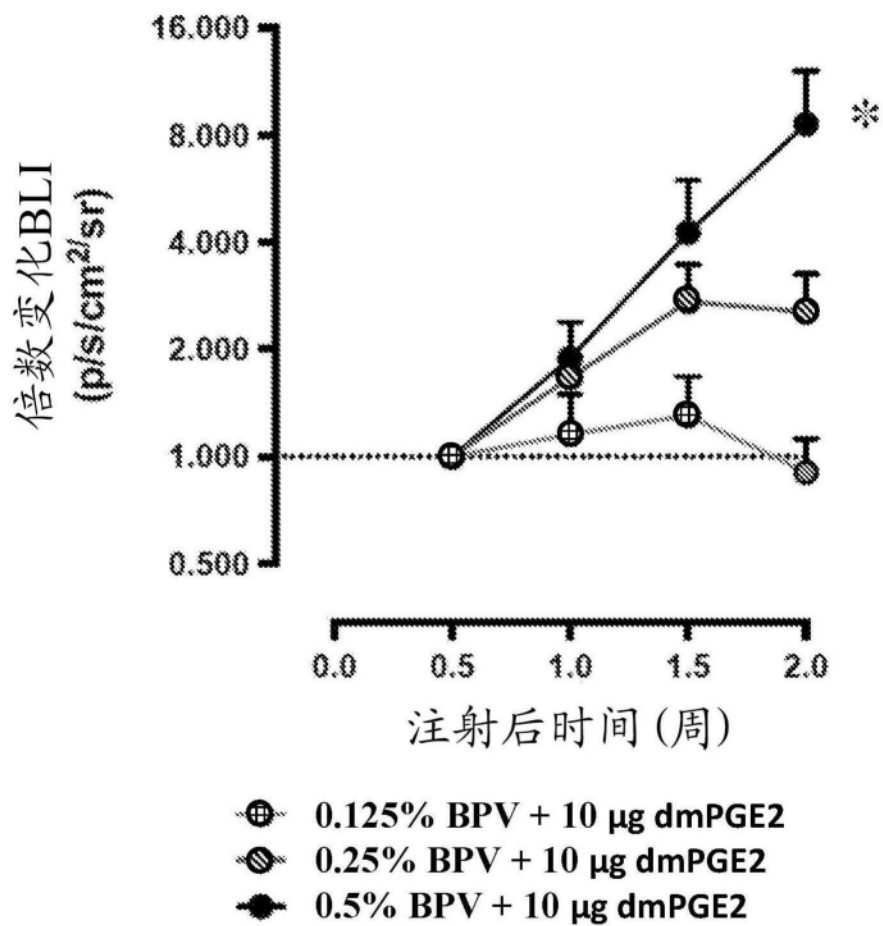


图24

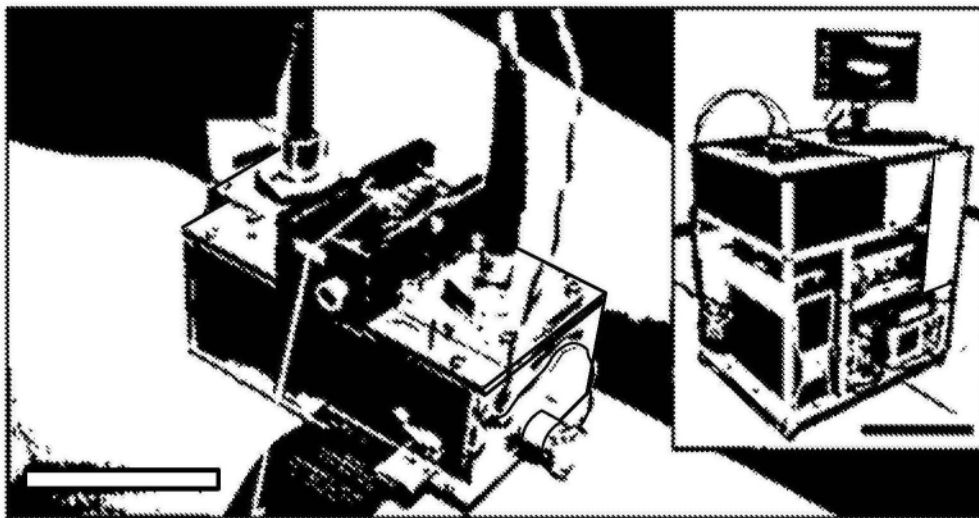


图25A

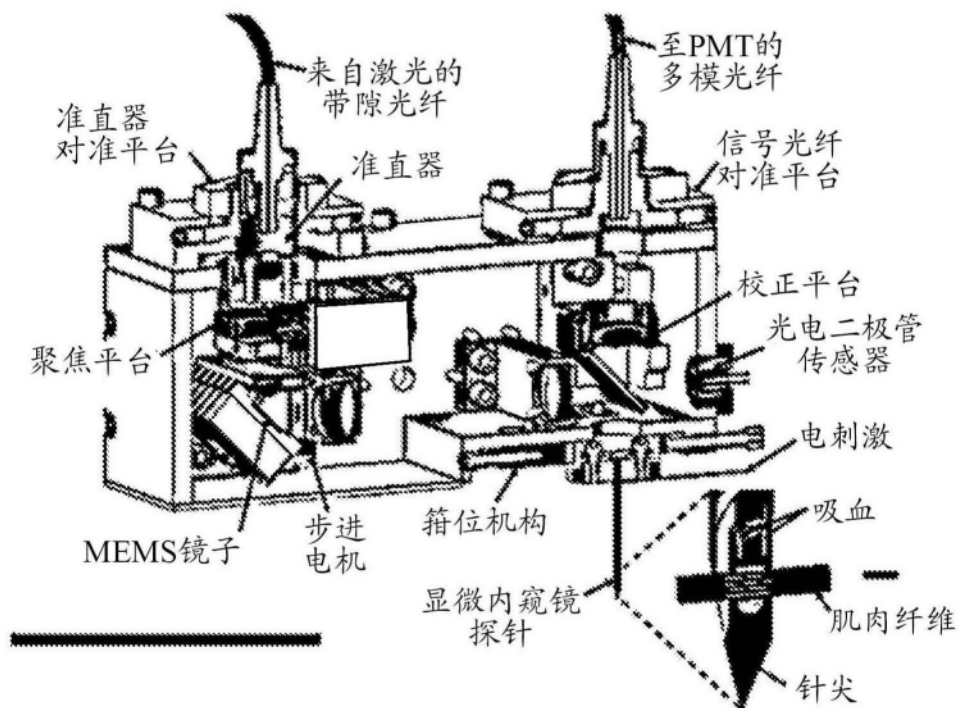


图25B

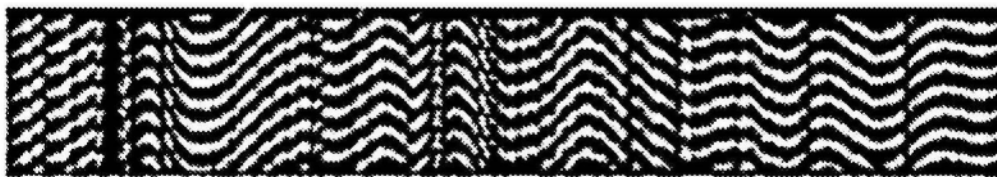


图25C

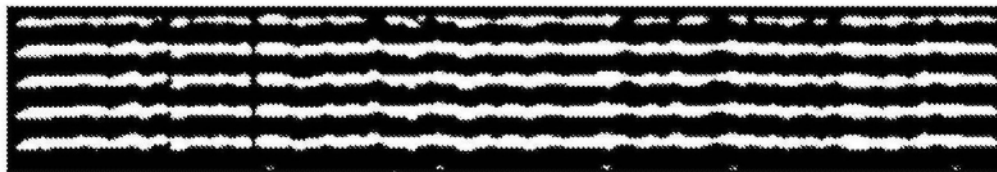


图25D

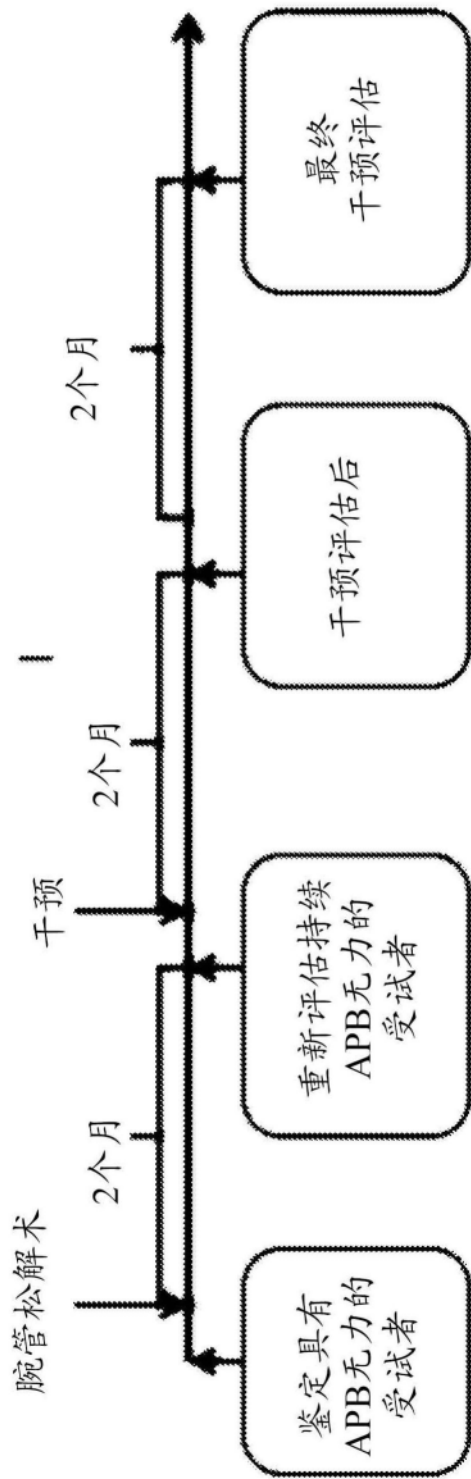


图26

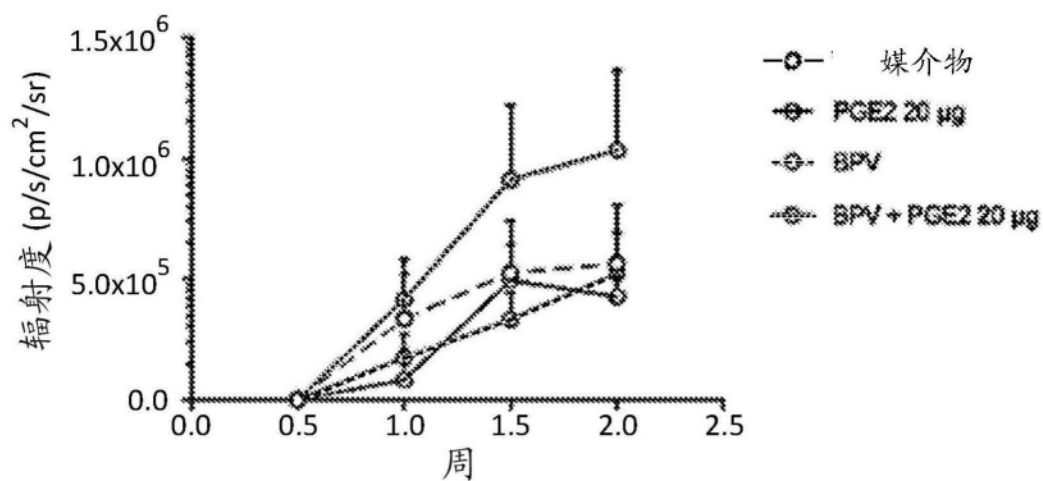


图27A

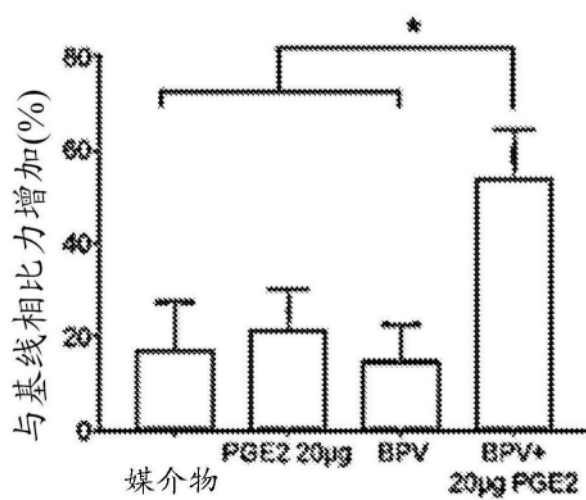


图27B

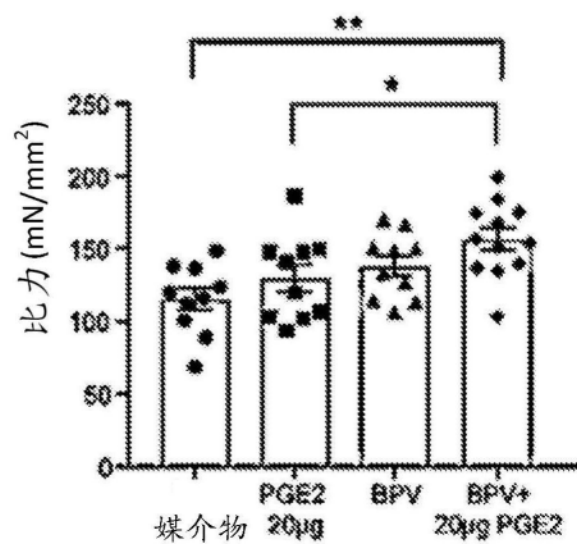


图27C