



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106132405 B

(45)授权公告日 2019.06.18

(21)申请号 201580017210.4

(22)申请日 2015.03.31

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106132405 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(30)优先权数据
1406115.4 2014.04.04 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.09.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2015/050999 2015.03.31

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/150793 EN 2015.10.08

(73)专利权人 埃梅拉米德有限公司
地址 爱尔兰都柏林

(72)发明人 博伊德·尤金·哈利
雷格纳·阿克塞尔·西奥多·克林
伯格

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 穆彬

(51)Int.Cl.

A61K 31/166(2006.01)

(续)

(56)对比文件

US 20100227812 A1,2010.09.09,

US 20100227812 A1,2010.09.09,

Irfan Rahman.Antioxidant therapeutic
advances in COPD.《Therapeutic Advances in
Respiratory Disease》.2008,第2卷(第6期),第
351-374页.

Rishi B. Patel等.Thiol-redox
antioxidants protect against lung
vascular endothelial cytoskeletal
alterations caused by pulmonary fibrosis
inducer, bleomycin: comparison between
classical thiol-protectant, N-acetyl-L-
cysteine, and novel thiol antioxidant, N,
N'-bis-2-mercap.《TOXICOLOGY MECHANISMS
AND METHODS》.2012,第22卷(第5期),第383-396
页. (续)

审查员 洪梦实

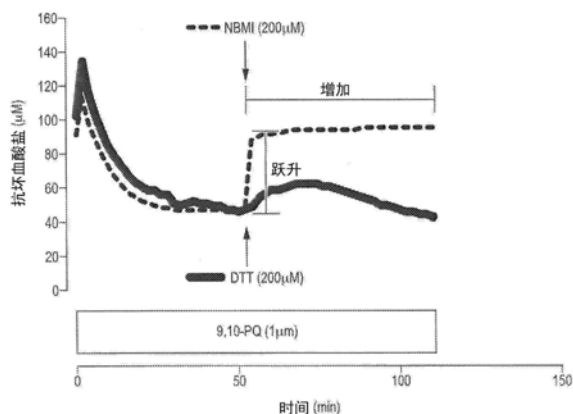
权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

N,N-二-2-巯基乙基异邻苯二甲酰胺的用途

(57)摘要

根据本发明,提供N,N-二-2-巯基乙基异邻
苯二甲酰胺或其药用盐或衍生物,其用于全身性
再生抗坏血酸盐并且因此用于治疗性治疗慢性
阻塞性肺病。



[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

A61P 21/00(2006.01)

A61P 11/14(2006.01)

A61P 11/10(2006.01)

(56) 对比文件

Rishi B. Patel等.Thiol-redox

antioxidants protect against lung
vascular endothelial cytoskeletal
alterations caused by pulmonary fibrosis
inducer, bleomycin: comparison between
classical thiol-protectant, N-acetyl-L-
cysteine, and novel thiol antioxidant, N,
N'-bis-2-mercap.《TOXICOLOGY MECHANISMS
AND METHODS》.2012,第22卷(第5期),第383-396
页.

1. N,N-二-2-巯基乙基异邻苯二甲酰胺或其药用盐用于制备药物的用途,所述药物用于治疗慢性阻塞性肺病。

2. 如权利要求1所述的用途,其中施用的N,N-二-2-巯基乙基异邻苯二甲酰胺或其盐的剂量能够全身性再生抗坏血酸盐。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述治疗降低患者中呼吸系统发病和/或死亡的风险。

4. N,N-二-2-巯基乙基异邻苯二甲酰胺或其药用盐用于制备药物的用途,所述药物用于减轻患有慢性阻塞性肺病的患者中的慢性阻塞性肺病的一种或多种症状的方法。

5. 如权利要求4所述的用途,其中所述症状是骨骼肌疲劳和/或咳嗽/产痰。

6. 如权利要求1或权利要求4所述的用途,其中治疗的方法是针对为吸烟者或曾经的吸烟者的患者。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述患者还接受包括施用选自支气管扩张药、抗胆碱药或皮质类固醇的活性成分的疗法。

N,N-二-2-巯基乙基异邻苯二甲酰胺的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及已知的重金属螯合化化合物的用途。

[0002] 背景和现有技术

[0003] 慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种阻塞性肺病,其表征为慢性气流不畅(poor airflow)、呼吸短促、咳嗽和产痰。

[0004] 据信在世界范围内COPD影响接近600,000,000名个体。绝大多数患有COPD的患者是吸烟者或曾经的吸烟者。

[0005] 已知COPD有许多可能的病因,吸烟是最常见的。其他病因包括空气污染,特别是燃料燃烧(例如木头烟)所致的空气污染。据信该病症也有遗传成分。

[0006] 被理解的是,COPD由长期暴露于这些刺激物从而在肺部产生炎症反应所致。这导致支气管收缩和肺组织损坏(肺气肿)。

[0007] 虽然COPD被认为是一种在很大程度上可以被预防的疾病(例如通过减少对导致其的病原体的暴露),但其仍是世界上第三位的常见的死亡原因。

[0008] 对患者的治疗提出很大的挑战。目前的第一线治疗包括吸入式支气管扩张药和皮质类固醇。然而,COPD患者中的气流减弱通常不随目前采用的药物的施用而显著改善,这意味着通常采用更剧烈的措施,包括氧疗和甚至肺移植。症状恶化通常需要住院治疗。

[0009] 由于缺少有效的治疗,COPD的经济负担巨大,2010年估计为\$2.1万亿。COPD的社会-经济成本可能随发达国家和发展中国家中的寿命增加而增加。在欧盟,治疗2百万受影响最大的患者的直接成本为约每年€30Bn(€15,000/患者/年)。治疗另外2千万受影响者的直接成本为约€10Bn(€500/患者/年)。因此,总成本为约€40Bn,这不包括由于丧失生产力所致的额外的间接成本。并发症在COPD中非常常见,这进一步增加了治疗成本。

[0010] 因此,对于COPD的新的和/或更好的治疗存在很大的临床上未满足的需要。对于能够靶向关键病理过程从而可能改变疾病的进展、减少进展到更严重的疾病阶段的患者数目的改进疗法也有明显的需要。

[0011] N,N-二-2-巯基乙基异邻苯二甲酰胺(NBMI)首先被公开在美国专利号US 6,586,600 B2中。其作为饮食补充物以及在减轻氧化应激中的用途被公开在美国专利申请2010/0227812中。已知NBMI是强效的重金属(包括汞、镉和铅)螯合剂。还参见Patel等, Toxicology Mechanisms and Methods,22,383(2012)。

[0012] NBMI的类似物已被特别地公开在US 8,426,368 B2和国际专利申请WO 2011/038385和WO 2012/121798中。

[0013] 然而,上述文献都没有公开NBMI或相关化合物在COPD的潜在治疗中的潜在用途。

[0014] 通常已知的是,在COPD患者中,在肺内以及在全球发生增加的氧化应激,两者都是由于香烟的烟本身以及因此的自炎性细胞释放的反应性氧种类(ROS)的增加所致的氧化负担。

[0015] 细胞内真核细胞具有由其氧化产物脱氢抗坏血酸盐(DHA)再生抗坏血酸盐的酶系统,从而防止其不可逆地氧化成缺少抗氧化功能的下游产物(参见例如Corti等,

Arch.Biochem.Biophys.,500,107 (2010))。因此,该机制对于维持细胞抗坏血酸盐浓度是必要的并且可以通过脱氢抗坏血酸盐还原酶如谷氧还蛋白(参见Saaranen等, Antioxid.Redox Signal.,12,15 (2010))和蛋白质二硫键异构酶(Nardai等, J.Biol.Chem.,276,8825 (2001))的作用而在使用酶的情况下发生,并且可以通过用GSH将其还原(Winkler等,Free Radic.Biol.Med.,17,333 (1994))而在不使用酶的情况下发生。

[0016] 最近的研究表明,抗坏血酸盐注入增加患有COPD的患者中的骨骼肌疲劳耐受(参见例如Rossman等,Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.,305, (2013))。

[0017] 我们发现,不仅NBMI能够抑制已知在COPD患者中表达的关键抗炎标记物如白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的释放(参见,例如,Rubini等, Inflamm.Allergy Drug Targets,12,315 (2013),Thorleifsson等,Respir.Med.,103,1548 (2009) 和Tang,J.Interferon Cytokine Res.,34,162 (2014) 以及Dadvand等, Eur.Respir.J., (2014),Feb 20),而且,非常出人意料地,NBMI能够在气道衬液(lining fluid)内再生抗坏血酸盐。此外,已经发现,NBMI可以通过充当抗坏血酸盐循环的电子供体来发挥该作用。我们还惊人地发现NBMI可以被施用于患者以通过改善症状和改变/阻止疾病的进展来治疗性治疗COPD,而不产生显著的不良反应。

[0018] 方面内容

[0019] 根据本发明的第一方面,提供NBMI或其药用盐或其衍生物,其用于治疗COPD的方法。此种方法包括向需要此种治疗的患者施用药物有效量的NBMI。

[0020] 要理解术语“COPD”包括在文献中被不同地称为“慢性阻塞性肺病(chronic obstructive lung disease,COLD)或“慢性阻塞性气道病(chronic obstructive airway disease,COAD)”的那些病症,所述病症表征为例如慢性气流不畅、呼吸短促、咳嗽和产痰。

[0021] 为了避免疑义,在本发明的语境中,术语“治疗”、“疗法”和“治疗方法”包括治疗性或或缓解性治疗有需要的COPD或本文提及的其他相关病症的患者。“患者”包括人患者。

[0022] 可以提及的NBMI的药用盐包括碱土金属盐,并且更特别是碱金属盐,如锂盐、钠盐、钾盐、铷盐、铯盐和钫盐。

[0023] 此种盐可以通过常规方式形成,例如通过使NBMI与一当量以上的合适的碱任选地在溶剂中或在盐不溶的介质中反应,之后使用标准技术除去所述溶剂或所述介质(例如在真空中,通过冻干或通过过滤)。盐也可以通过以下方式制备:例如使用合适的离子交换树脂,将盐形式的活性成分的抗衡离子与另一种抗衡离子交换。

[0024] NBMI的药用衍生物包括谷胱甘肽、半胱氨酸、 α 二氢硫辛酸、胱胺、硫醇磷酸盐、5'-硫醇腺苷、L-高半胱氨酸、辅酶A、2-巯基乙醇、二硫苏糖醇、碘代乙酸盐、溴代乙酸盐、氟代乙酸盐或氯代乙酸盐衍生物。此种衍生物可以如例如美国专利申请2011/0237776中所述制备。

[0025] NBMI、其药用盐及其药用衍生物在下文中一起被简单地统称为“NBMI”。

[0026] 根据本发明的另一方面,提供治疗患者中的COPD的方法,所述方法是通过在所述患者中以能够再生抗坏血酸盐(例如全身性地)的足够的、药物有效剂量施用NBMI来进行。

[0027] 技术人员充分了解,在文献中“抗坏血酸盐”也可以被不同地称为抗坏血酸(ascorbic acid)、L-抗坏血酸和/或维生素C。

[0028] 已知COPD与呼吸系统发病和死亡相关,根据本发明,利用NBMI可以降低其风险。

[0029] 根据本发明的另一方面,提供降低患者中呼吸系统发病和死亡的风险(即预防)的方法,所述方法包括向显示COPD症状的此种患者施用NBMI。

[0030] 技术人员将理解,术语“发病”通常包括任何至少部分地使人虚弱的疾病状态、残疾或疾病和/或不良的健康状态。“呼吸系统”发病因此包括这样的作为例如COPD的结果显示的状态。

[0031] 已经发现NBMI用于减轻COPD的症状,包括疲劳(例如骨骼肌疲劳)、呼吸短促、咳嗽和产痰。

[0032] 根据本发明的另一方面,提供减轻患有COPD的患者中COPD的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述患者施用NBMI。

[0033] 虽然不限于此,可以提及的根据本发明的治疗用途和方法包括其中患者是吸烟者或曾经的吸烟者的那些。

[0034] 在本文所述的用途和方法中,NBMI优选以包含药用剂量形式的化合物的药物制剂的形式局部施用或全身施用,例如口服施用、静脉内施用或动脉内施用(公开通过血管内或其他血管周围的设备/剂型(例如支架))、肌肉内施用、经皮施用、皮下施用、透黏膜施用(例如舌下施用或经颊施用)、经直肠施用、透皮施用、经鼻施用、经肺施用(例如通过吸入、经气管施用或经支气管施用)、局部施用或通过任何其他肠胃外途径。优选的递送方式包括经口递送(特别地)、静脉内递送、经皮递送或皮下递送、经鼻递送、肌肉内递送或腹膜内递送。

[0035] NBMI通常以与药用佐剂、稀释剂或载体混合的一种或多种药物制剂的形式施用,所述药用佐剂、稀释剂或载体可以根据计划的给药途径和标准制药学实践来选择。所述药用载体可以在化学上对活性化合物是惰性的并且可以在使用条件下不具有有害的副作用或毒性。所述药用载体也可以提供立即的或改变的NBMI释放。

[0036] 合适的药物制剂可以是市售的或是文献中描述的,所述文献例如,Remington The Science and Practice of Pharmacy,第19版,Mack Printing Company,Easton, Pennsylvania(1995)和Martindale-The Complete Drug Reference(第35版)以及其中引用的文献,所有所述文献中的相关公开内容都通过引用结合于此。另外,合适制剂的制备可以由技术人员使用常规技术非创造性地实现。适用于NBMI的药物制剂也被描述在美国专利申请2010/0227812中。

[0037] 制剂中NBMI的量将取决于病症的严重性和受治的患者以及采用的化合物,但是可以由技术人员非创造性地确定。

[0038] 取决于受治的患者以及给药途径,可以将NBMI以不同的治疗有效剂量施用给需要其的患者。

[0039] 然而,在本发明的语境中,施用于人的剂量应当足以在合理的时间范围内(如前文所述的)实现治疗反应。本领域技术人员将认可,准确的剂量和组成以及最合适的递送方案的选择还将特别受制剂的药学性质、治疗的病症的性质和严重性和接受者的身体状况和精神敏度以及受治患者的年龄、状态、体重、性别和反应和疾病的阶段/严重性以及患者间的遗传差异影响。

[0040] NBMI的施用可以是连续的或间歇的(例如通过推注)。所述剂量也可以通过施用的时间安排和频率来确定。

[0041] 因此,NBMI的合适剂量为每天每公斤患者总重量约0.5至约100.0mg,包括约1至约

60mg,例如约1.5至约40mg的化合物。

[0042] 在任何情况下,医疗从业者或其他技术人员都将能够常规地确定最适合于个体患者的实际剂量。上述剂量是平均情况的示例;当然可能存在这样的个体情况,其中更高或更低的剂量范围是有益的,并且这也在本发明的范围内。

[0043] 在本文所述的用途和方法中,NBMI也可以与可能用于或已被指定用于治疗COPD的一种或多种活性成分组合。因此,所述患者也可以(和/或已经)接受基于施用一种或多种所述活性成分的治疗,这是指在用NBMI治疗前、用NBMI额外治疗和/或在用NBMI治疗后接受指定剂量的一种或多种本文提及的那些活性成分。

[0044] 此种活性成分包括短效支气管扩张药(如沙丁胺醇(salbutamol/albuterol)、左旋沙丁胺醇(levosalbutamol/levalbuterol)、吡布特罗(pirbuterol)、肾上腺素(epinephrine)、麻黄碱(ephedrine)和特布他林(terbutaline))、长效支气管扩张药(如沙美特罗(salmeterol)、克伦特罗(clenbuterol)、福莫特罗(formoterol)、班布特罗(bambuterol)和茚达特罗(indacaterol))、抗胆碱药(如噻托溴铵(tiotropium)和异丙托溴铵(ipratropium bromide))、皮质类固醇(如氟尼缩松(flunisolide)、丙酸氟地松(fluticasone propionate)、曲安奈德(triamcinolone acetonide)、丙酸倍美松(beclomethasone dipropionate)和布地缩松(budesonide))和其他用于治疗COPD的药物,包括长期抗生素(例如大环内酯类(macrolides)如红霉素(erythromycin))、溶粘蛋白药(mucolytics)和氧。

[0045] NBMI也可以与抗氧化剂或螯合剂,包括维生素-E、维生素-D、半胱氨酸、胱氨酸、谷胱甘肽、硫辛酸谷胱甘肽(GSH)、二氢硫辛酸(DLPA)、硫辛酸(LPA)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、二巯基丙磺酸酯(DMPS)、二巯基琥珀酸(DMSA)、乙二胺四乙酸(EDTA)及其混合物一起施用。

[0046] 可以提及的可用于治疗COPD的其他活性成分的药用盐包括酸加成盐和碱加成盐。此种盐可以通过常规方式形成。

[0047] 可用于治疗COPD的其他活性成分的合适剂量是本领域技术人员已知的并且包括在医学文献中针对目的药物列出的那些,所述文献如Martindale-Complete Drug Reference(第35版)及其中引用的文献,所有所述文献中的相关公开内容通过引用结合于此。

[0048] 当在本文中使用词语“约”时,例如在量(例如活性成分的剂量)的语境中,要理解的是,此种变量是大致的并且因此可以与本文中指定的数目有 $\pm 10\%$,例如 $\pm 5\%$,并且优选 $\pm 2\%$ (例如 $\pm 1\%$)的变化。

[0049] 与现有技术中已知的用于此种治疗的类似方法(治疗)相比,本文所述的用途/方法可以具有这样的优点,即在COPD的治疗中,其对医生和/或患者可以是更方便的,可以是更有效的,可以是毒性更低的,可以具有更宽的活性范围,可以是更强效的,可以产生更少的副作用,或其可以具有其他有用的药理学性质。

[0050] 通过以下实施例来说明而绝非限制本发明,其中:

[0051] 图1显示,在抗坏血酸盐氧化模型中,抗坏血酸盐通过9,10-菲醌(9,10-PQ)氧化成DHA,之后DHA通过NBMI和二硫苏糖醇(DTT)再循环。

[0052] 图2显示,在抗坏血酸盐氧化模型中,抗坏血酸盐通过 CuSO_4 氧化成DHA,之后在10、20和30分钟添加的NBMI和DTT使DHA再循环,其中抗坏血酸盐氧化和再循环动力学显示在左

图中,而在添加NBMI和DTT后抗坏血酸盐浓度的相应跃升和持续增加显示在右图中。

[0053] 实施例1

[0054] 使用NBMI抑制IL-6和IL-8

[0055] 使用以下方法在A549和BEAS-2B细胞中测量响应于颗粒暴露的促炎性细胞因子白介素(IL)-6、IL-8(以及GM-CSF和MCP-1)向细胞培养基中的分泌。

[0056] 以 5×10^4 将肺上皮细胞接种到24孔板中。在与NBMI、用作阳性对照的抗氧化剂化合物N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)或载体预孵育3小时后,除去培养基。

[0057] 含有不同浓度的各种颗粒(如下)的新鲜培养基的总体积为0.5ml,持续24小时。然后通过离心将上清液与细胞分离。

[0058] 使用DuoSet ELISA Development试剂盒(R&D Systems, Abingdon, UK),根据制造商的方案,在无细胞的液体中测量IL-8、IL-6、GM-CSF和MCP-1。

[0059] 仅暴露于培养基充当阴性对照。每个实验以4个重复进行两次。

[0060] 通常,P25型二氧化钛和城市灰尘(参考SRM 1649b)两者在肺上皮细胞系A549和BEAS-2B中引起促炎性细胞因子的产生。

[0061] 以各种浓度的相关颗粒测试利用50 μ M NBMI的预孵育对颗粒引发的细胞因子形成的作用。

[0062] 研究证明,在两种细胞系中,NBMI都能够减少颗粒引发的促炎性细胞因子的分泌,虽然仅在一些例子中降低至背景水平。

[0063] 在暴露于75 μ g/cm²的TiO₂P25的A549细胞的上清中获得最高浓度的IL-8和IL-6。在该剂量,50 μ M NBMI使IL-8分泌减少29%并且使IL-6分泌减少38%。

[0064] 在A549细胞中,在100 μ g/cm²城市灰尘的情况下,与50 μ M NBMI预孵育使IL-8分泌减少30%,并且使IL-6分泌减少38%。

[0065] 在BEAS-2B细胞中,在100 μ g/cm²TiO₂P25的情况下,与50 μ M NBMI预孵育使IL-8分泌减少49%,并且使IL-6分泌减少37%。

[0066] 在BEAS-2B细胞中,在100 μ g/cm²城市灰尘的情况下,与50 μ M NBMI预孵育使IL-6分泌减少47%。

[0067] 与5mM NAC预孵育在减少炎性细胞因子分泌方面也是有效的。

[0068] 实施例2

[0069] 使用NBMI再生抗坏血酸盐

[0070] 检测NBMI以观察其是否能够充当抗坏血酸盐再循环的电子供体。

[0071] 使用抗坏血酸盐损耗测定(Kelly等,Res.Rep.Health Eff.Inst.,163,3(2011)检查1 μ M 9,10-PQ和2 μ M硫酸铜(CuSO₄)发起的抗坏血酸盐氧化的动力学。采用9,10-PQ以致NBMI的作用可以在其螯合性质的分离中检查。

[0072] 所有实验一式三份地在UV 96孔平底板(Greiner bio-one)中以200 μ L的终体积进行。通过以下方式开始暴露:向含有160 μ L Chelex-100树脂处理的水(含10%DMSO)的各孔中添加20 μ L抗坏血酸盐浓缩储液(2mM),加上10 μ L水、4mM的CuSO₄储液或2mM的9,10-PQ储液以及10 μ L NBMI(4mM和200 μ L)。

[0073] 所有溶液都在Chelex-100树脂处理的水(含10%DMSO)中制备。这在所述孔中产生200 μ L抗坏血酸盐、2 μ M CuSO₄或1 μ M 9,10-PQ和10至200 μ M NBMI的终浓度。

[0074] 在向各测定孔添加抗坏血酸盐前,将平板在37℃在读板仪(Spectra Max 190)中预孵育10分钟。在暴露期间,将平板保持在该温度。在添加抗坏血酸盐后,通过测量265nm的吸光度来监测各孔中剩余的浓度,每2分钟一次,达两小时。关于标准曲线确定抗坏血酸盐浓度,通过使用Microcal Software Limited's OriginLab(版本5.0)经由浓度对时间图的起始部分进行线性回归来确定抗坏血酸盐氧化速率。这对三份中的每一份进行并且抗坏血酸盐损耗速率最终表示为平均 $\text{mol s}^{-1} \times 10^{-9}$ 抗坏血酸盐损耗 \pm 标准差。

[0075] 对于其中测量向抗坏血酸盐添加NBMI的影响的实验,随后检查随时间的 CuSO_4 和9,10-PQ损耗测定。仅前55-60分钟平板在有190 μL 的情况下进行测定,其后将其从读板仪中取出并且向各孔中加入10 μL 的NBMI或已知的还原剂、DTT储液或水。然后将平板放回读板仪并且监测265nm的吸光度达另外60分钟。

[0076] 确定测量的抗坏血酸盐浓度的立即增加并且其被称为‘跃升(jump)’,并作为立即再循环能力的量度。也确定剩余的60分钟孵育内的持续‘增加’。两者之间的差异反映添加的化合物随后抑制 CuSO_4 或9,10-PQ发起的抗坏血酸盐氧化的速率的能力。

[0077] 图1显示实验的前60分钟通过与9,10-PQ孵育发起的抗坏血酸盐氧化的动力学。在该时间,添加NBMI(200 μM)并且其被证明导致42.8 μM 的抗坏血酸盐的立即的回弹增加。其后,抗坏血酸盐氧化速率相对于前60分钟下降。

[0078] 抗坏血酸盐的此种回弹增加(其表示DHA再循环回抗坏血酸盐)是惊人的,并且当与使用(DTT,200 μM)所实现的相比时明显更大,使用(DTT,200 μM)实现较低的抗坏血酸盐的立即恢复(5.1 μM),其也不是持续的。

[0079] 图2显示在 CuSO_4 抗坏血酸盐模型中,利用10、20和30分钟的孵育,NBMI使DHA再循环的能力。聚焦于这些较早的时间点,NBMI添加后抗坏血酸盐的回弹增加在较高的两个测试浓度最明显,随后的氧化速率猝灭,这可能是由于化合物的螯合性质所致。

[0080] 在60分钟添加NBMI和DTT(都为200 μM)的情况下重复这些实验。这显示在使用DTT的情况下的 $7.93 \pm 6.58 \mu\text{M}$ 的抗坏血酸盐浓度的立即‘跃升’,与之相比的是在使用NBMI的情况下的 $24.98 \pm 5.54 \mu\text{M}$ 增加。在剩余的60分钟孵育里,对于DTT和NBMI,抗坏血酸盐的持续‘增加’分别为 $10.79 \pm 2.45 \mu\text{M}$ 相比于 $25.45 \pm 2.45 \mu\text{M}$ 。

[0081] 这些结果指示NBMI的迄今未知的和惊人的性质,提示其可以使DHA再循环回抗坏血酸盐。

[0082] 实施例3

[0083] 治疗患有COPD的患者

[0084] 居住在美国的退休女性,若干年前在医学上被诊断为患有COPD,规律性地在任意24小时时期内经历咳嗽发作二至四次,在白天或夜晚的任意时间开始并且持续约40至75分钟。

[0085] 由于这些咳嗽发作,患者的呼吸浅,其喉咙受刺激,其声音沙哑,其能量水平非常低并且其生活质量非常差。

[0086] 每天用在胶囊中的100mg NBMI剂量治疗三次(在吃饭时)达八天时间,导致症状的明显改善。到治疗的第八天,患者没有经历咳嗽发作并且呼吸明显改善。

[0087] 实施例4

[0088] 体内“吸烟小鼠”研究I

[0089] 研究显示,当暴露于每周5天每天5-6只香烟时,香烟烟雾可以在C57B1/6和Balb/c小鼠二者中引起炎症肺反应(参见例如D'hulst等,Eur.Respir.J.,26,204 (2005) 和Jung等,BMC Complement.Altern..Med.,13,219 (2013))。

[0090] 开发香烟烟雾(CS)引起的气道疾病的小鼠模型,其中使用吸烟机将四组BALB/c小鼠暴露于CS(仅鼻子),持续2周,每周7天,所述吸烟机由过滤的研究香烟产生侧流烟和主流烟的组合。

[0091] 作为14天的剂量发现研究的部分,在每次暴露于CS前给三组小鼠皮下施用NBMI(5、30或150mg/kg)。进行支气管肺泡灌洗液(BAL)中的炎症细胞计数、BAL中的流式细胞术(FACS)分析和细胞因子分析。

[0092] 材料和方法

[0093] 将雌性BALB/c小鼠(Harlem实验室,Netherlands)用于该研究。使其居于具有吸收性垫料的塑料笼中并且保持12小时日光周期。随意提供食物和水。其看护和实验方案由Umeå的动物实验地区伦理委员会(Regional Ethics Committee on Animal Experiments)批准。当开始香烟暴露方案时,小鼠为12周龄。

[0094] CS暴露方案

[0095] 使动物遭受吸入的CS(侧流烟和主流烟皆有)。在由研究香烟(1R5F,University of Kentucky,Lexington,KY,USA)产生烟雾的微处理器控制的吸烟机(TE-10,Teague Enterprises,CA,USA)中进行CS暴露。

[0096] 香烟被自动加载到轮子中,点燃,吸进并喷出。每只香烟被吸10分钟并且通过机器的气流被设定为12L/min。将香烟存储在-20℃直至需要。使小鼠每10分钟经受4只香烟x 3(即30分钟12只香烟),每天一次,每周7天,持续两周。烟雾被转移到烟塔(EMMS,UK)中,从而提供均等的和同时对CS的暴露。

[0097] 将小鼠置于塑料小室中并“仅通过鼻子”吸入而经受CS。对照小鼠每天处理并且呼吸室内空气,但不被从其笼中取出。

[0098] 因此,5个处理组如下:

[0099] 1.每天暴露于干净空气(安慰剂组)

[0100] 2.每天暴露于CS(CS暴露的安慰剂组)

[0101] 3.每天暴露于CS;用5mg/kg剂量的NBMI处理(NBMI 5mg/kg组)

[0102] 4.每天暴露于CS;用30mg/kg剂量的NBMI处理(NBMI 30mg/kg组)

[0103] 5.每天暴露于CS;用150mg/kg剂量的NBMI处理(NBMI 150mg/kg组)

[0104] 在第15天,给小鼠放血并进行支气管肺泡灌洗(BAL)。经由气管导管用总体积1mL+3x 1mL无Ca²⁺/Mg²⁺Hanks平衡盐溶液(HBSS,Sigma-Aldrich,Steinheim,Germany)将肺灌洗四次。

[0105] 然后立即将BAL液离心(10分钟,4℃,1750rpm)。在除去上清后直至进一步分析,将细胞沉淀重悬然后用0.5mL PBS稀释。在血球计中手动对白细胞计数以致可以加载20,000个细胞并使用Cytospin®离心机(Shandon® cytopsin 3细胞离心机,细胞制备系统)离心。

[0106] 将经细胞离心的制剂用May-Grünwald-Giemsa试剂染色并且使用标准形态学标准进行肺炎性细胞(巨噬细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和嗜曙红细胞)的差异细胞计数并且

每个细胞涂片 (cytospin) 制备物计数300个细胞。

[0107] 对于白介素 (IL) -1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL17、嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin)、G-CSF、INF γ 、GM-CSF、KC、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES和TNF α 的存在,分析BAL和血清中的炎性介质。所有细胞因子分析利用多路 (multiplex) 试剂盒 (BioPlex™ Pro Mouse Cytokine 23-plex panel) 根据生产商的使用说明 (Bio-Rad) 同时进行并且在Bio-Plex™系统 (Luminex Bio-Plex™ 200System, Bio-Rad, Hercules, CA) 上进行分析。

[0108] 来自BAL的白细胞利用流式细胞术使用BD FACSort™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) 来分析。将来自BAL的细胞重悬在PBS中,如上所述。抗体染色在96孔板中以 2.0×10^5 个细胞/样品进行。

[0109] 将细胞与FcR封闭抗体 (抗-CD16/CD32; 克隆2.4G2) 预孵育以减少非特异性结合。用于鉴别T细胞亚型的mAb为:CD3-FITC (克隆17A2)、CD4-PE (克隆H129.19) 和CD8a-PE-Cy5 (克隆53-6.7)。同种型匹配抗体用作阴性对照。使用BD FACSort™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) 根据标准程序进行流式细胞术并且利用BD FACSDiva软件进行分析。所有抗体都来源于BD Sciences Pharmingen (San Diego, CA)。T细胞限定为CD3⁺。

[0110] 结果以平均值 \pm 平均值的标准差 (S.E.M) 显示。通过参数方法使用双因素方差分析 (ANOVA) 评估统计学显著性以确定组间差异,之后是Bonferroni事后 (post hoc) 检验。适当时,使用单因素ANOVA或Student非配对t检验。 $p < 0.05$ 的统计结果被认为是显著的。

[0111] 进行统计分析并且利用GraphPad Prism (版本6.0 GraphPad软件Inc., San Diego, CA, USA) 制图。

[0112] 结果

[0113] 从第1天开始每天给所有动物称重,直到第15天,在最后一次烟雾暴露后24小时。在第1天,小鼠没有任何明显的体重差异。在第15天,NBMI 5mg/kg组中的动物比暴露于CS (20.3 ± 0.3 g, $p < 0.05$) 的小鼠具有更低的终体重 (19.5 ± 0.3 g)。不管NBMI的剂量如何,所有暴露于CS的小鼠从第1天到第15天都有明显体重损失。

[0114] CS暴露的动物中的总BAL细胞计数 (第15天) 并不明显高于对照组 (有CS的情况下为 $296,700 \pm 43,650$ 个细胞/mL,没有CS的情况下为 $284,670 \pm 63,200$ 个细胞/mL, $p > 0.05$)。CS暴露引起BAL液中嗜中性粒细胞的显著增加 (有CS的情况下为 940 ± 250 个细胞/mL,没有CS的情况下为 260 ± 160 个细胞/mL, $p < 0.05$)。在第15天,NBMI 150mg/kg组和NBMI30mg/kg组中的动物比仅暴露于CS的小鼠的嗜中性粒细胞数目明显低。

[0115] 两周的CS暴露没有明显增加BAL中炎性介质的水平,除了G-CSF以外。与CS暴露的安慰剂组相比,NBMI 5mg/kg组具有降低的MIP-1 α 水平 ($p < 0.05$)。分析的炎性介质之间没有其他显著差异。

[0116] 两周的CS暴露没有明显增加血清中炎性介质的水平。与CS暴露的安慰剂组相比,NBMI 150mg/kg组具有明显降低水平的IL-1 β 、IL-3、IL-6、嗜酸性粒细胞趋化因子、MIP-1 α 和RANTES。NBMI 30mg/kg组的血清中的IL-10水平增加。分析的炎性介质之间没有其他显著差异。

[0117] 两周的CS暴露没有明显增加BAL液中CD4细胞或CD8细胞的水平。任何组间没有显著差异。

[0118] NBMI 150mg/kg组中的小鼠在颈部出现伤口。另两个NBMI组没有显示溃疡的征候,并且安慰剂组也没有。

[0119] 实施例5

[0120] 体内“吸烟小鼠”研究II

[0121] 从以上实施例4中描述的研究的结果得出的结论是,两周的吸烟在时间上可能不足以引起炎症反应。

[0122] 因此,在所述14天剂量发现研究后,使用与以上实施例4中所述的基本相同的设备和方案进行90天研究。

[0123] 在此情况下,5个处理组如下:

[0124] 1.每天暴露于干净空气(安慰剂组;第1组)

[0125] 2.每天暴露于CS(CS暴露的安慰剂组;第2组)

[0126] 3.每天暴露于CS;用30mg/kg剂量的NBMI处理(NBMI 30mg/kg组;第3组)

[0127] 4.每天暴露于CS;用60mg/kg剂量的NBMI处理(NBMI 60mg/kg组;第4组)

[0128] 5.每天暴露于CS;用150mg/kg剂量的NBMI处理(NBMI 150mg/kg组;第5组)

[0129] 在第91天,给动物称重并且用戊巴比妥钠麻醉(90mg/kg体重,腹膜内注射)。用18-规格的套管给小鼠进行气管切开术并且以类似正弦的方式利用小动物呼吸器(flexiVent™, SCIREQ®)以3Hz的频率和12mL/kg体重的潮气量(V_T)进行机械呼吸。施用3cm H₂O的呼气末正压。

[0130] 在整个呼吸机制评估期间,监测动物的心脏输出。用泮库溴铵(pancuronium)(0.1mg/kg体重,腹膜内注射(局部补充器))将小鼠麻痹,之后在试验开始时以3x V_T 进行4次叹气操作(sigh manoeuvre)以建立稳定的基线呼吸机制并且保证在实验前的相似的体积史。

[0131] 通过施加正弦标准化呼吸测量动态肺机制并且使用单室模型和多重线性回归进行分析,给出呼吸阻抗(R_{RS})、倒电容(E_{RS})和顺应性(compliance) (C_{RS})。 R_{RS} 的测量值反映导电的气道的窄化和肺的改变。 C_{RS} 和 E_{RS} 的测量值仅反映肺外围事件,特别是导致肺单位减振(de-recruitment)的气道关闭。形成对比的是, C_{RS} 的选择性改变指示更远的动作位点。

[0132] 根据Jonasson等,Respir.Res.,9,23(2008)和Respir.Physiol.Neurobiol.,165,229(2009)使用强迫振荡技术(FOT)对肺机制进行更彻底的评估。该研究中获自FOT测量的参数为:牛顿阻抗(R_N)、组织减幅(G)(其与组织阻抗密切相关并且反映肺组织中的能量消耗);和组织倒电容(H)(其表征组织硬度并且反映组织中的能量存储)。

[0133] 通过给肺充气至30cm H₂O的最大压力确定动态压力体积(PV)曲线,允许使用计算机控制的Flexivent呼吸器的被动呼气来测量体积和压力。汇编来自各动物的个体结果。所有PV测量一式三份地进行。准静态PV回路(PV loop)通过对肺进行缓慢的逐步充气和放气获得。进行PV回路用于PEEP水平,3cm H₂O。PV回路的递减分支的形状因子(k)通过将数据拟合到Salazar-Knowles等式的数据来计算。据信,参数k的值随纤维化和肺气肿特征性改变。还获得足以达到20cm水的准静态顺应性(C_{st})和倒电容(E_{st})和吸入的空气体积。

[0134] 基本上如以上实施例4中所述的那样进行支气管肺泡灌洗(BAL),来自BAL的细胞的流式细胞术分析和BAL和血清中的炎性介质分析也是如此。

[0135] 在4℃使用混合磨机(Retch mm400)将冷冻的肺组织与1mL PBS一起在2mL管中匀

浆化2分钟。匀浆化后立即将管离心15分钟(1500rpm,4℃)。将上清取出并保存以用于使用NanoDrop分光光度计(Proteins A280)的蛋白质浓度测定。在分析蛋白质含量后,保留等量的来自各样品的蛋白质用于转化生长因子 β (TGF β) 1-3分析。使用多路试剂盒(Bio-Plex Pro TGF- β 3-Plex Immunoassay)根据生产商的使用说明(Bio-Rad)同时分析肺组织匀浆中的TGF β 1-3并且在Bio-Plex™系统(Luminex Bio-Plex™ 200System,Bio-Rad,Hercules, CA)上进行分析。

[0136] 进行组织学分析的动物不进行呼吸功能测试以保护组织完整性。将右肺叶取出并且在4%多聚甲醛中固定直至石蜡包埋。在包埋在石蜡中后,将组织切成3 μ m厚的切片并且安装在带正电荷的载玻片上。为了评估炎性细胞渗透,将所述切片脱石蜡,脱水,并且用苏木精和曙红染色。对染色的切片的组织病理学评估由在Uppsala,Sweden的National Veterinary Institute (SVA)的专门研究小动物的专业病理学家进行。

[0137] 基本上如以上实施例4中所述的那样进行统计分析。

[0138] 结果

[0139] 在以下表1中,列出用于不同分析的小鼠数目。血液取样自所有小鼠。

[0140] 表1

[0141]

	气道生理学,BAL和血清	组织学和血清
第1组	9	3
第2组	7	3
第3组	9	3
第4组	8	3
第5组	7	3

[0142] 在90天暴露期间,5只小鼠死亡。在大多数情况下,其由于恶化的健康状况(如体重大幅下降和嗜睡)而被实施安乐死,参见表5。在分析期间,6只小鼠是明显的异常值并因此被从数据组中排除(表2)。

[0143] 表2

[0144]

	由于 CS 期间恶化的健康状	从数据组中排除(统计测试
--	----------------	--------------

[0145]

	况而被排除	的)
第 1 组	-	2
第 2 组	2	1
第 3 组	-	3
第 4 组	1	-
第 5 组	2	-

[0146] 所有CS暴露的小鼠都明显受暴露影响。它们遭受皮毛起皱和肌肉力量丧失。接受

NBMI (第3组和第4组)的动物在一定程度上表现为比接受安慰剂的其他组更健康(动物技术员的观察)。改变皮下施用NBMI的注射位点以避免结疤和溃疡。虽然进行了这种努力,但第5组中的小鼠还是在颈部出现了伤口和囊炎(bunion)。另两个NBMI组没有显示溃疡的征候,安慰剂组也没有。对照动物接受与第5组中的NBMI相同浓度的DMSO。

[0147] 在第90天,CS暴露的动物显示明显的与对照动物的体重差异。对照小鼠体重增加15% ($2.8 \pm 0.2\text{g}$),而暴露于CS的小鼠体重没有显著成都的增加 ($-0.1 \pm 0.3\text{g}$)。接受NBMI的动物与起始重量相比都增加了重量(第3组: $1.0 \pm 0.4\text{g}$,第4组: $0.7 \pm 0.2\text{g}$ 和第5组: $0.6 \pm 0.2\text{g}$)。

[0148] 在第90天,CS暴露的动物中的总BAL细胞计数明显高于对照组(在CS的情况下为 $246,700 \pm 21,980$ 个细胞/mL而在无CS的情况下为 $152,000 \pm 20,540$ 个细胞/mL, $p < 0.01$)。CS暴露引起BAL液中巨噬细胞的明显增加(在CS的情况下为 $229,300 \pm 21,400$ 个细胞/mL,而在无CS的情况下为 $134,200 \pm 18,600$ 个细胞/mL, $p < 0.01$)。

[0149] 与对照组(第1组)相比,CS暴露没有增加BAL液中渗透的嗜中性粒细胞和淋巴细胞的数目。接受NBMI (30、60和150mg/kg)的动物的BAL液中的巨噬细胞数目并不明显更低。然而,第4组和第5组中有较低数目嗜中性粒细胞的趋势并且在用NBMI处理的组中有较低数目淋巴细胞的趋势。

[0150] 如FACS分析显示的,九十天的CS暴露没有显著增加BAL液中T辅助(CD4+/CD3+)或T细胞毒性(CD8+/CD3+)淋巴细胞的水平。在NBMI处理后,这两种淋巴细胞的百分比都没有明显改变。然而,因为在NBMI处理后淋巴细胞减少,所以与第2组相比,NBMI处理的动物中的BAL液中的T细胞毒性(CD8+/CD3+)淋巴细胞显著减少。

[0151] 九十天的CS暴露与对照动物相比(第2组相比第1组)引起肺的结构变化,如由较大和较小的气道中的CS引起的改变(增加的 E_{RS} 和H以及减小的 C_{RS})所显示的。CS减小的滞后性(hysteresivity)系数 η 反映肺中异质性的减小。

[0152] 较高剂量的NBMI(第4组和第5组)显著增加较小和较大气道阻抗(R_{RS} 和G)。

[0153] 在暴露于CS的小鼠(第2组)中测量PV曲线并将其与暴露于室内空气的小鼠(第1组)相比。CS暴露使得肺明显更硬并且需要更大的压力来给肺充气。接受NBMI (30、60和150mg/kg)的动物与安慰剂组(第2组)相比没有显示明显改变的呼吸系统功能。 C_{st} 、 E_{st} 和 k 未受烟雾暴露影响。

[0154] 九十天的CS暴露没有显著增加BAL和血清中的炎性介质水平。当与CS暴露的安慰剂组(第2组)相比时,在NBMI 150mg/kg组(第5组)中,血清中的MIP-1 β ($p < 0.05$)和GM-CSF ($p < 0.01$)水平较低。分析的炎性介质之间没有其他显著差异。

[0155] 与对照组(第1组)相比,CS暴露的动物(第2组)没有显示肺匀浆中增加的TGF β 水平。与接受CS的安慰剂组(第2组)相比,接受NBMI的动物的TGF β 1-3的量没有显著变化。

[0156] 所有肺中的支气管腔和肺泡都显示少许巨噬细胞。在处理组中,巨噬细胞稍多并且显示胞质黄色色素或黑色色素颗粒。黑色色素可能是来源于香烟暴露的烟灰而黄色色素可能是脂褐质。

[0157] 在CS暴露的动物中,偶尔在肺泡隔并且同样在胸膜下在肺周围区域中观察到低数目的白细胞(嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞、单核细胞、巨噬细胞)。香烟暴露组中巨噬细胞数目的轻微升高不十分明显并且肺很好地保持在炎症阈值以下。观察到的变化不足够强以引

起临床征候。

[0158] 该研究中的对照动物与CS暴露的小鼠相比显示明显更好的气道功能和更大的体重增加,但是BAL液中的细胞的增加与第2组没有明显不同。除了暴露于CS烟雾以外,对照小鼠接受的处理与第2组相同。然而,所有动物在实验室中共享相同的空间。

[0159] 结论

[0160] CS暴露的小鼠显示重量损伤(或缺少增加的重量),巨噬细胞增加,和更硬的肺以及呼吸顺应性下降。

[0161] 用NBMI处理(第3组和第4组)改善每日暴露于CS达90天的小鼠的健康状况。积极治疗效果得到以下各项支持:与CS暴露的安慰剂组(第2组)相比,增加的重量以及BAL液中淋巴细胞数目减少的趋势和CD8+细胞的减少。

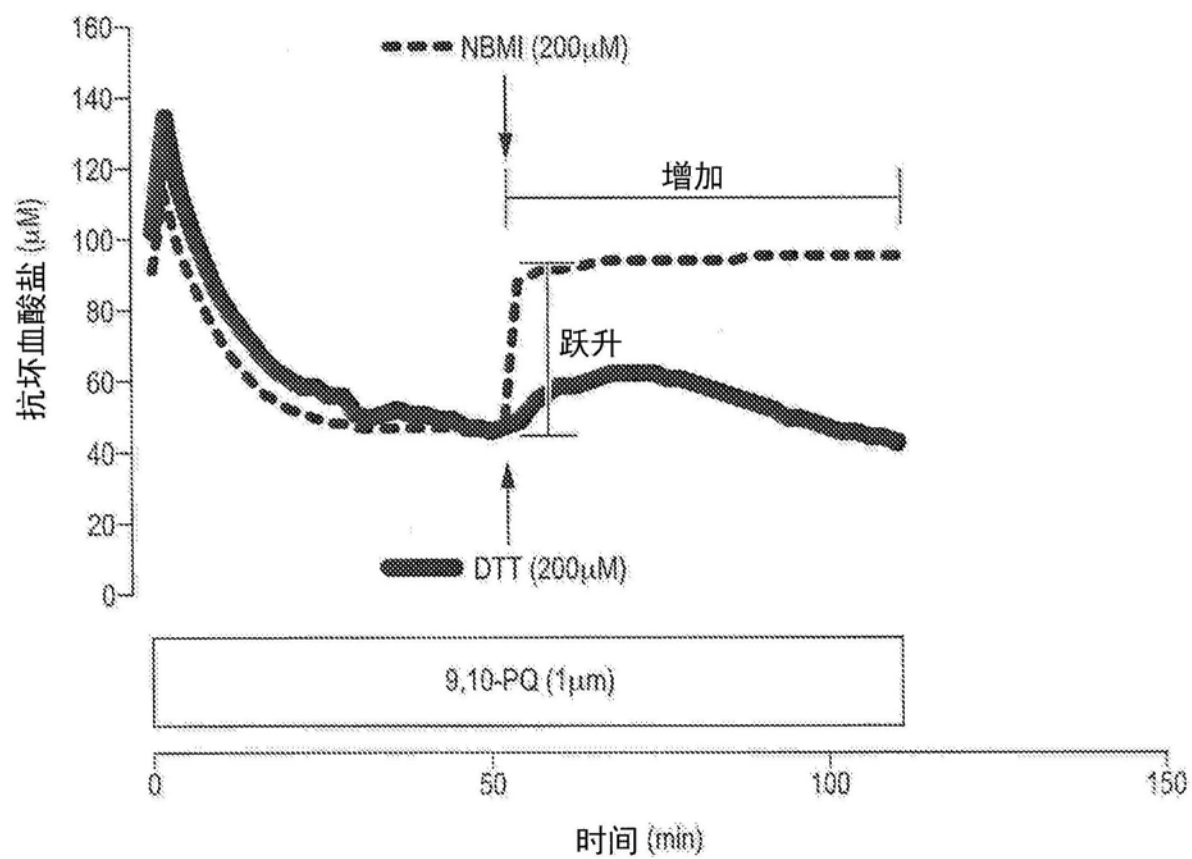


图1

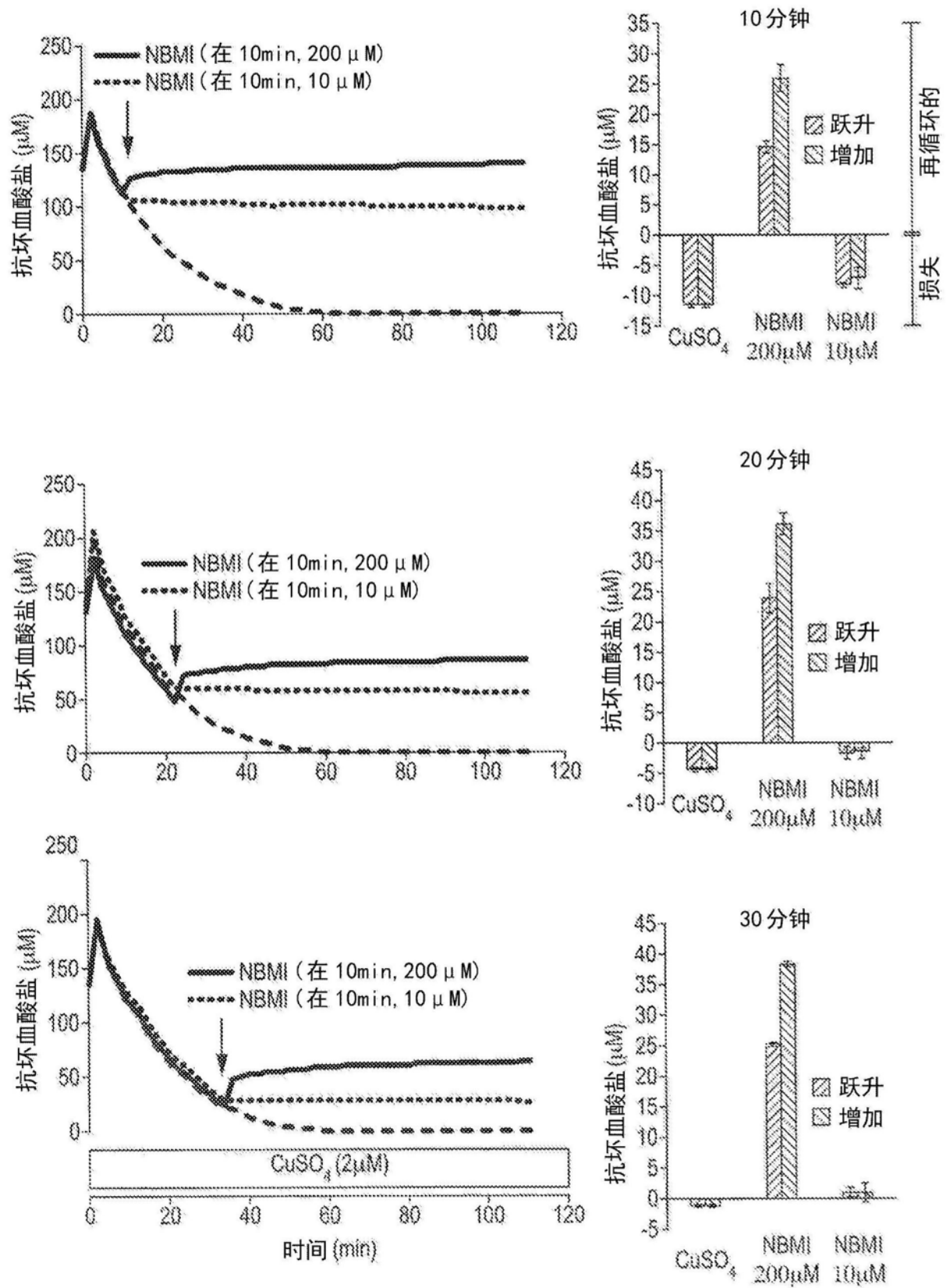


图2