



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115666551 A

(43) 申请公布日 2023. 01. 31

(21) 申请号 202180025683.4

欧文·H·朱克 王汉军

(22) 申请日 2021.03.12

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

(30) 优先权数据

专利代理师 赵昊 张璐

63/002,165 2020.03.30 US

63/122,858 2020.12.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

A61K 31/357 (2006.01)

2022.09.28

A61P 11/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/022089 2021.03.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/202084 EN 2021.10.07

(71) 申请人 索伦托药业有限公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 内布拉斯加大学董事会

(72) 发明人 亚历西斯·拿哈马 H·H·吉

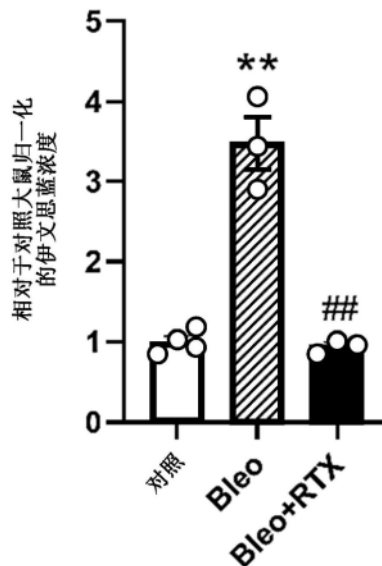
权利要求书2页 说明书16页 附图14页

(54) 发明名称

通过施用树脂毒素治疗与COVID-19相关的肺部炎性疾病

(57) 摘要

公开了一种用于治疗肺部炎性疾病的方法，该方法包括通过硬膜外、神经节周围或神经节内施用来施用有效量的树脂毒素 (RTX)。在一些实施方式中，用于成人的RTX剂量为约0.1 μg到约100 μg。



1. 一种用于治疗肺部炎性疾病的方法,所述方法包括向需要治疗肺部炎性疾病的受试者硬膜外地、神经节周围地或神经节内地施用有效量的树脂毒素 (RTX)。

2. 一种用于在治疗需要治疗肺部炎性疾病的受试者的方法的用途的组合物,所述组合物包含树脂毒素 (RTX)。

3. 根据权利要求2所述的用途的组合物,其中所述方法包括向所述受试者硬膜外地、神经节周围地或神经节内地施用所述组合物。

4. 根据权利要求1所述的方法或根据权利要求2或3所述的用途的组合物,其中所述有效量的RTX引起包括IL-6、IL-1 β 和/或IFN γ 的一种或多种细胞因子减少。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述有效量的RTX引起肺功能改善。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述有效量的RTX引起肺水肿减轻。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述受试者是成人。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述RTX以约0.1 μ g到约100 μ g的剂量施用。

9. 根据权利要求8所述的方法或用途的组合物,其中所述剂量为约0.1 μ g到约1 μ g、约1 μ g到约5 μ g、约5 μ g到约10 μ g、约10 μ g到约20 μ g、约20 μ g到约50 μ g或约50到约100 μ g。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述方法包括硬膜外施用。

11. 根据权利要求1到9中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述方法包括神经节周围神经阻滞。

12. 根据权利要求1到9中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述方法包括神经节内施用。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述RTX以包含所述RTX和药学上可接受的载体的药物调配物施用。

14. 根据权利要求13所述的方法或用途的组合物,其中所述药学上可接受的载体包括水。

15. 根据权利要求13所述的方法或用途的组合物,其中所述药学上可接受的载体包括盐水。

16. 根据权利要求13到15中任一项所述的方法或用途的组合物,其中所述RTX以在1 μ g/ml到100 μ g/ml范围内的浓度存在于所述药物调配物中。

17. 根据权利要求16所述的方法或用途的组合物,其中所述RTX以在1 μ g/ml到5 μ g/ml、5 μ g/ml到10 μ g/ml、10 μ g/ml到20 μ g/ml、20 μ g/ml到50 μ g/ml或50 μ g/ml到100 μ g/ml范围内的浓度存在于所述药物调配物中。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物,其中所述肺部炎性疾病选自由以下组成的组:急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肺动脉高压 (PAH)、慢性炎性肺病、肺纤维化、肺血管炎、肺结节病、与肺移植相关的炎症和/或感染、急性或肺排斥和/或功能障碍、支气管炎、鼻窦炎、哮喘、囊性纤维化、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染、病毒感染、闭塞性细支气管炎综合征 (BOS)、原发性纤毛运动障碍 (PCD)、肺泡蛋白沉积症、

特发性肺纤维化 (IPF)、嗜酸粒细胞性肺炎、嗜酸粒细胞性支气管炎、与机械通气相关的炎症和/或感染、呼吸机相关性肺炎、石棉相关性气道病症或疾病、粉尘相关性气道病症或疾病、硅肺、以及放射或化学药剂相关性气道疾病或病症及其任何组合。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物,其中所述肺部炎性疾病是急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物,其中所述肺部炎性疾病是慢性阻塞性肺病 (COPD)。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物,其中所述肺部炎性疾病是肺动脉高压 (PAH)。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物,其中所述肺部炎性疾病是与机械通气相关的炎症和/或感染和/或呼吸机相关性肺炎。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物,其中所述肺部炎性疾病与 COVID-19 相关。

通过施用树脂毒素治疗与COVID-19相关的肺部炎性疾病

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年3月30日提交的美国临时申请第63/002,165号以及于2020年12月8日提交的美国临时申请第63/122,858号的优先权,这些美国临时申请中的每一个的公开内容特此通过引用整体并入。

[0003] 在整个本申请中,引用了各种出版物、专利和/或专利申请。这些出版物、专利和/或专利申请的公开内容特此通过引用整体并入本申请,以更全面地描述本公开所涉及领域的现状。

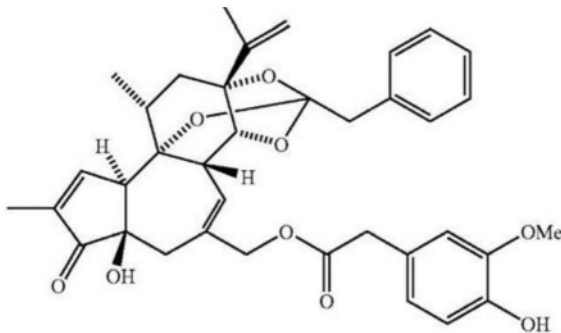
技术领域

[0004] 本公开提供了一种用于治疗肺部炎性疾病的方法,该方法包括通过硬膜外、神经节周围或神经节内施用来施用有效量的树脂毒素(RTX)。

背景技术

[0005] RTX充当红辣椒的主要辛辣成分辣椒素的超强效类似物。RTX是从大戟属(Euphorbia)的某些物种中分离的三环二萜。高香草基是辣椒素的重要结构特征,并且是区别树脂毒素与典型的佛波醇相关化合物的最显著特征。天然RTX具有以下结构:

[0006]



[0007] RTX和类似物化合物如亭牙毒素(tinyatoxin)和其它化合物(二萜的20-高香草基酯,如12-脱氧佛波醇13-苯乙酸酯20-高香草酸酯和密执毒素20-高香草酸酯)在美国专利第4,939,194号;第5,021,450号和第5,232,684号中进行了描述。还已鉴定了其它树脂毒素类型的佛波香草(resiniferatoxin-type phorboid vanilloid)(Szallasi等人(1999)《英国药理学杂志(Brit.J.Pharmacol.)》128:428-434)。

[0008] RTX被称为TRPV1激动剂。TRPV1,瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员1(也称为香草素受体-1(VR1)),是一种主要在伤害性初级传入神经元中表达的多聚体阳离子通道(Caterina等人(1997)《自然(Nature)》389:816-824;Tominaga等人(1998)《神经元(Neuron)》21:531-543)。TRPV1的激活通常通过施加令人疼痛的热量而发生在神经末梢,并且在某些类型的炎性刺激期间上调。化学激动剂对外周组织中TRPV1的激活导致钙通道的打开和痛觉的传导(Szallasi等人(1999)《分子药理学(Mol.Pharmacol.)》56:581-587)。然而,将某些TRPV1激动剂直接施加于表达TRPV1的神经元(神经节)的细胞体将打开钙通道并引发一连串导致程序性细胞死亡(“凋亡”)的事件(Karai等人(2004)《临床研究杂志

(J.of Clin.Invest.)》113:1344-1352)。

[0009] 由急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 引起的呼吸衰竭是与新型冠状病毒SARS-CoV-2感染 (COVID-19疾病) 相关的死亡的主要原因之一 (53%) (Ruan等人 (2020)《重症监护医学 (Intensive Care Med)》3月3日:10-3), 并且也可以由其它疾病和病症引起, 包括其它病毒性疾病或肺损伤。约10%的患者需要具有通气支持的重症监护室 (ICU) 护理, 并且据报道, ICU死亡率为79% (Huang等人 (2020)《柳叶刀 (Lancet)》第394卷, 第10233期, P497-506)。

[0010] 冠状病毒是一组在鸟类、哺乳动物和人类中引起疾病的病毒。这些疾病包括可以是轻微的或致命的呼吸道感染和肠道感染。冠状病毒是套式病毒目 (Nidovirale)、冠状病毒科 (Coronaviridae)、正冠状病毒亚科 (Orthocoronavirinae) 中的病毒。冠状病毒属包括禽传染性支气管炎病毒、牛冠状病毒、犬冠状病毒、人冠状病毒299E、人冠状病毒OC43、鼠肝炎病毒、大鼠冠状病毒和猪血凝性脑脊髓炎病毒。环曲病毒 (Torovirus) 属包括伯尔尼病毒 (Berne virus) 和布雷达病毒 (Breda virus)。冠状病毒是具有正义单链RNA基因组和螺旋对称的核衣壳的包膜病毒。冠状病毒的基因组大小在大约26千碱基到32千碱基的范围内, 被认为是最大的RNA病毒。一种新型冠状病毒, 世界卫生组织 (WHO) 将其命名为2019-nCoV, 也被称为SARS-CoV-2, 导致冠状病毒疾病2019或COVID-19。

[0011] ARDS首次描述于1967年 (Ashbaugh等人 (1967)《柳叶刀》2:319-323), 且其特征在于弥漫性肺微血管损伤, 导致由肺内分流引起的渗透性增加和血氧不足。ARDS进展的前两个阶段 (即发病后12-72小时) 是干预的关键窗口, 因为如果可以控制引发因素和炎性介质, 则该综合征可以逆转。如果在如确定败血症、胃内容物误吸、多次输血、严重骨折、烧伤、胰腺炎或严重创伤时已知引发刺激物, 则也有助于早期诊断。在ARDS进展到第三阶段时, 肺动脉高压增加, 心率增加以补偿血氧不足, 并且通常需要机械通气支持疗法。在病理上, 随着中性粒细胞的持续浸润和单核细胞、淋巴细胞和成纤维细胞浸润的增加, 细胞浸润更加密集。

[0012] 在老年患者中, 该疾病更为严重, 其中80%的死亡病例发生在年龄超过60-65岁的患者中 (CDC COVID-19应急响应小组 (CDC COVID-19Response Team) (2020)《MMWR发病率和死亡率周报 (MMWR Morb Mortal Wkly Rep)》69:343-346), 而年轻感染者似乎不太容易受到影响并表现出中度-轻度症状 (Wu等人 (2020)《美国医学会杂志 (JAMA)》2020年2月24日在线发布)。一旦下呼吸道受到影响, 呼吸窘迫就会进展得非常快, 尽管有呼吸机缓和的支持, 但据报道在初始症状起最快14天死亡。有人提出, 受COVID-19感染的易感人群的严重程度和死亡率与细胞因子风暴有关, 其中促炎物质的过度产生在短时间内被释放到肺部微环境中 (Mehta等人 (2020)《柳叶刀》第395卷, 第10229期, P1033-1034)。

[0013] 迫切需要新的救生策略来降低与急性呼吸窘迫相关的高死亡率, 该急性呼吸窘迫包括与晚期病毒感染相关的此类窘迫。

发明内容

[0014] 本公开提供了一种用于治疗肺部炎性疾病的方法, 该方法包括通过硬膜外、神经节周围或神经节内施用来施用有效量的树脂毒素 (RTX)。在一些实施方式中, 用于成人的RTX剂量为约0.1 μ g到约100 μ g。

[0015] 实施方式1是一种用于治疗肺部炎性疾病的方法, 该方法包括向需要治疗肺部炎

性疾病的受试者硬膜外地、神经节周围地或神经节内地施用有效量的树脂毒素 (RTX)。

[0016] 实施方式2是一种用于治疗需要治疗肺部炎性疾病的受试者的方法的用途的组合物,该组合物包含树脂毒素 (RTX)。

[0017] 实施方式3是根据实施方式2所述的用途的组合物,其中该方法包括向该受试者硬膜外地、神经节周围地或神经节内地施用该组合物。

[0018] 实施方式4是根据实施方式1所述的方法或根据实施方式2或3所述的用途的组合物,其中该有效量的RTX引起包括IL-6、IL-1 β 和/或IFN γ 的一种或多种细胞因子减少。

[0019] 实施方式5是根据前述实施方式中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该有效量的RTX引起肺功能改善。

[0020] 实施方式6是根据前述实施方式中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该有效量的RTX引起肺水肿减轻。

[0021] 实施方式7是根据前述实施方式中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该受试者是成人。

[0022] 实施方式8是根据前述实施方式中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该RTX以约0.1 μ g到约100 μ g的剂量施用。

[0023] 实施方式9是根据实施方式8所述的方法或用途的组合物,其中该剂量为约0.1 μ g到约1 μ g、约1 μ g到约5 μ g、约5 μ g到约10 μ g、约10 μ g到约20 μ g、约20 μ g到约50 μ g或约50到约100 μ g。

[0024] 实施方式10是根据前述实施方式中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该方法包括硬膜外施用。

[0025] 实施方式11是根据实施方式1到9中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该方法包括神经节周围神经阻滞。

[0026] 实施方式12是根据实施方式1到9中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该方法包括神经节内施用。

[0027] 实施方式13是根据前述实施方式中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该RTX以包含该RTX和药学上可接受的载体的药物调配物施用。

[0028] 实施方式14是根据实施方式13所述的方法或用途的组合物,其中该药学上可接受的载体包括水。

[0029] 实施方式15是根据实施方式13所述的方法或用途的组合物,其中该药学上可接受的载体包括盐水。

[0030] 实施方式16是根据实施方式13到15中任一项所述的方法或用途的组合物,其中该RTX以在1 μ g/ml到100 μ g/ml范围内的浓度存在于该药物调配物中。

[0031] 实施方式17是根据实施方式16所述的方法或用途的组合物,其中该RTX以在1 μ g/ml到5 μ g/ml、5 μ g/ml到10 μ g/ml、10 μ g/ml到20 μ g/ml、20 μ g/ml到50 μ g/ml或50 μ g/ml到100 μ g/ml范围内的浓度存在于该药物调配物中。

[0032] 实施方式18是根据前述实施方式中任一项所述的方法或组合物,其中该肺部炎性疾病选自由以下组成的组:急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肺动脉高压 (PAH)、慢性炎性肺病、肺纤维化、肺血管炎、肺结节病、与肺移植相关的炎症和/或感染、急性或肺排斥和/或功能障碍、支气管炎、鼻窦炎、哮喘、囊性纤维化、细菌感染、真菌感染、

寄生虫感染、病毒感染、闭塞性细支气管炎综合征 (BOS)、原发性纤毛运动障碍 (PCD)、肺泡蛋白沉积症、特发性肺纤维化 (IPF)、嗜酸粒细胞性肺炎、嗜酸粒细胞性支气管炎、与机械通气相关的炎症和/或感染、呼吸机相关性肺炎、石棉相关性气道病症或疾病、粉尘相关性气道病症或疾病、硅肺、以及放射或化学药剂相关性气道疾病或病症及其任何组合。

[0033] 实施方式19是根据前述实施方式中任一项所述的方法或组合物,其中该肺部炎性疾病是急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。

[0034] 实施方式20是根据前述实施方式中任一项所述的方法或组合物,其中该肺部炎性疾病是慢性阻塞性肺病 (COPD)。

[0035] 实施方式21是根据前述实施方式中任一项所述的方法或组合物,其中该肺部炎性疾病是肺动脉高压 (PAH)。

[0036] 实施方式22是根据前述实施方式中任一项所述的方法或组合物,其中该肺部炎性疾病是与机械通气相关的炎症和/或感染和/或呼吸机相关性肺炎。

[0037] 实施方式23是根据前述实施方式中任一项所述的方法或组合物,其中该肺部炎性疾病与COVID-19相关。

附图说明

[0038] 图1A-B示出了研究设计(图1A)和具有时间线的治疗计划(图1B)的示意图。在图1A中,箭头表示将博莱霉素(bleomycin, Bleo) (2.5mg/kg, ~0.15mL) 气管内施用到肺部。正方形示出了收集肺组织以进行细胞因子测量的位置。如图1B所示出的,在第0天,气管内给予Bleo或盐水;在第3天,向硬膜外腔或星状神经节中给予树脂毒素(RTX)或媒剂(Veh);在第7天,将大鼠处死。

[0039] 图2A-B示出了用于星状神经节分离和施用Veh或RTX的程序。图2A示出了该程序的步骤1——使星状神经节暴露。箭头示出了星状神经节位于胸内动脉起点和肋颈动脉起点的中间。图2B示出了该程序的步骤2——将RTX (5 μ L, 50mg/mL) 注射到左和右星状神经节中。箭头示出了星状神经节内部5- μ L注射器的尖端。

[0040] 图3A-C示出了在施用Bleo后的第7天的时间点,硬膜外RTX处理后血浆外渗减少。图3A-B示出了来自Bleo组(图3A)和Bleo+RTX组(图3B)的肺部代表性图像。图3C示出了对照组、Bleo组和Bleo+RTX组的伊文思蓝(Evans blue)浓度。^{**}P<0.01对对照。^{##}P<0.01对Bleo。

[0041] 图4A-C示出了在第3天Veh或硬膜外RTX施用后,第7天肺组织细胞因子水平。图4A示出了白细胞介素6(IL-6)。图4B示出了白细胞介素1 β (IL-1 β)。图4C示出了干扰素 γ (IFN γ)。^{*}P<0.05和^{**}P<0.01对对照。[#]P<0.05和^{##}P<0.01对Bleo。

[0042] 图5A-C示出了在第3天Veh或硬膜外RTX施用后,第7天血浆细胞因子水平。

[0043] 图6A-D示出了在施用Bleo后的第7天的时间点,在星状神经节RTX注射后伊文思蓝外渗减少。图6A-C示出了来自假手术(图6A)、Bleo+Veh组(图6B)和Bleo+RTX组(图6C)的肺部代表性图像。箭头指向伊文思蓝外渗的区域。图6D示出了每组的平均伊文思蓝浓度。^{**}P<0.01对假手术。[#]P<0.05对Bleo+Veh。^{\$}P<0.05对假手术。

[0044] 图7A-H示出了在损伤后第3天星状神经节内施用后,第7天假手术、Bleo+Veh和Bleo+RTX大鼠的动脉血气。图7A示出了pH。图7B示出了二氧化碳的分压(PCO₂)。图7C示出了氧气的分压(PO₂)。图7D示出了碱过量(BE)。图7E示出了碳酸氢盐(HCO₃)。图7F示出了总CO₂

(TCO₂)。图7G示出了氧饱和度(sO₂)。图7H示出了乳酸盐(Lac)。*P<0.05对假手术。†P<0.05对Bleo+Veh。

[0045] 图8A-B示出了在第3天Veh或星状神经节RTX施用后,第7天肺组织细胞因子水平。图8A示出了IL-6。图8B示出了IL-1β。

[0046] 图9A-H示出了各组的体重(BW)和单个器官的重量。图9A示出了体重。图9B示出了心脏。图9C示出了肺。图9D示出了脾脏。图9E示出了肝脏。图9F示出了肾脏。图9G示出了心脏/BW。图9H示出了肺/BW。与假手术大鼠相比,在Bleo+Veh大鼠中,湿肺重量(WLW)以及WLW与BW的比率明显更高,而该WLW以及该WLW与BW的比率通过星状神经节内注射RTX显著降低。这些数据表明,星状神经节内注射RTX减少了Bleo后的肺水肿。

具体实施方式

[0047] 现在将详细参考本发明的某些实施方式,附图中展示了这些实施方式的实例。尽管将结合所展示的实施方式描述本发明,但应当理解,其并不旨在将本发明限制于那些实施方式。相反,本发明旨在覆盖可以包含在由所附权利要求书限定的本发明内的所有替代方案、修改和等效物。

[0048] 在详细描述本发明的教导之前,应理解,本公开不限于具体的组合物或工艺步骤,因为此类组合物或工艺步骤可以变化。应注意的是,除非上下文另外明确指示,否则如在本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一个(a/an)”以及“该(the)”均包含复数指代物。因此,例如,对“缀合物(a conjugate)”的引用包括多个缀合物,并且对“细胞(cell)”的引用包括多个细胞等。应理解,替代方案(例如“或”)在本文中的使用用于意指替代方案中的任一个或两个或其任何组合。

[0049] 在本文中使用的术语“和/或”将被视为意指在有或没有另一者的情况下明确公开了指定特征或组分中的每个特征或组分。例如,本文中在如“A和/或B”等短语中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)以及“B”(单独)。同样,在如“A、B和/或C”等短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每个方面:A、B、和C;A、B、或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0050] 如本文所使用的,术语“包括(comprising)”、“包含(including)”、“具有(having)”和“含有(containing)”以及其语法变体旨在是非限制的,使得列表中的一个项或多个项不排除可以被替代或添加到所列项的其它项。应理解的是,当在本文中无论何处用语言“包括”来描述方面时,还提供了关于“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其它类似方面。

[0051] 如本文所使用的,术语“约(about)”是指如由本领域普通技术人员所确定的在特定值或组合物的可接受的误差范围内的值或组合物,这将部分地取决于如何测量或确定值或组合物,即,测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约(about)”或“大约(approximately)”可以意指在一个或大于一个标准偏差内。可替代地,根据测量系统的限制,“约”或“大约”可以意指至多10%(即,±10%)或更多的范围。例如,约5mg可以包括在4.5mg与5.5mg之间的任何数字。此外,特定地关于生物系统或过程,该术语可以意指高至一个数量级或高至值的5倍。当在本公开中提供了特定值或组合物时,除非另外陈述,否则“约”或“大约”的含义应被假定在该特定值或组合物的可接受误差范围之内。在一些实施方

式中,“约”涵盖所陈述值的10%、5%、2%、1%或0.5%以内的变化。

[0052] 数字范围包括限定范围的数字。考虑到有效数字和与测量相关的误差,测得值和可测量值被理解为近似值。而且,在不存在如“不包括端点”等明确排除的情况下,所有范围应解释为涵盖端点;因此,例如“在1到10的范围内”包括值1和10以及大于1且小于10的所有整数和(在适当的情况下)非整数值。

[0053] “包括(comprise/comprises/comprising)”、“含有(contain/contains/containing)”以及“包含(include/includes/including)”的使用并非旨在是限制性的。应当理解,上述的一般描述和详细描述两者均仅是示例性和解释性的,并且不限制本教导。除非在以上说明书中具体指出,否则在说明书中叙述“包括”各种组分的实施方式也被设想为“由所叙述组分组成”或“基本上由所叙述组分组成”;在说明书中叙述“由各种组分组成”的实施方式也被设想为“包括”所叙述组分或“基本上由所叙述组分组成”;并且在说明书中叙述“基本上由各种组分组成”的实施方式也被设想为“由所叙述组分组成”或“包括”所叙述组分(此互换性不适用于这些术语在权利要求书中的使用)。

[0054] 本文所使用的章节标题仅仅是出于组织的目的并且不应被解释为以任何方式限制所期望的主题。在通过引用并入的任何文献与本说明书中所定义的任何术语相矛盾的情况下,以本说明书为准。虽然结合各个实施方式对本发明教导进行了描述,但是本发明教导并非旨在受限于此类实施方式。相反,本发明教导涵盖各种替代方案、修改和等同物,如本领域的技术人员将理解的。

[0055] 定义

[0056] 如本文所使用的,“肺部炎性疾病”用于综合地指代与炎性过程相关的急性和慢性病理学病状。肺部炎性疾病的非限制性实例包括急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺炎(pneumonia)、肺炎(pneumonitis)、支气管炎、肺部感染、肺不张、与如化疗剂(例如博来霉素)诱导的肺损伤、胰腺炎诱导的肺损伤、高氧诱导的肺损伤等炎性肺损伤相关的病状、胺碘酮(amiodarone)诱导的肺炎、放射性肺炎、氯气或烟雾吸入损伤、闭塞性细支气管炎/阻塞性肺炎(BOOP)、病毒性和支原体性肺炎(例如军团菌(Legionella)和CMV肺)、尘肺病、肺血管炎、肺结节病、气道细菌感染、气道真菌感染、气道寄生虫感染、气道病毒感染、与机械通气相关的炎症和/或感染、呼吸机相关性肺炎。肺部慢性病理学病状的非限制性实例包括慢性阻塞性肺病(COPD)、肺动脉高压(PAH)、囊性纤维化、硅肺、石棉沉滞症、哮喘、动脉粥样硬化、慢性支气管炎、由慢性细菌或病毒感染引起的慢性炎症、冠状动脉疾病、特发性肺纤维化(IPF)、家族性肺纤维化(FPF)、脱屑性间质性肺炎(DIP)、过敏性肺炎、间质性肺炎、胶原性血管病、结节病、煤工尘肺、支气管肺发育不良、炎性假瘤。

[0057] 如本文所使用的,“硬膜外施用”是指将药物或药物调配物递送到硬膜外腔(也称为“硬膜上腔”或“硬膜外间隙”)中,该硬膜外腔是椎管的最外部分。它是位于硬脑膜(其包围蛛网膜、蛛网膜下腔、脑脊液和脊髓)外部的管(由周围的椎骨形成)内的空间。例如,硬膜外递送可以包括递送到硬膜外腔而不直接注射到神经,或者可以包括硬膜外递送到神经组织。

[0058] 如本文所使用的,“神经节周围施用”是指将药物或药物调配物递送到神经节周围的空间中。

[0059] “神经节内施用”是指施用于神经节。神经节内施用可以通过直接注射到神经节中

实现,并且还包选择神经根注射,其中化合物向上经过神经周围的结缔组织套,并从刚好在脊柱外的神经根进入神经节。

[0060] 术语“有效量”、“治疗有效量”或“有效剂量”或相关术语可以互换使用并且是指当施用于受试者时,足以影响肺部炎性疾病的可测量的改善或预防的治疗剂的量。例如,施用有效剂量可以改善肺功能,该肺功能表示为在动脉血中测量的CO₂分压(pCO₂)、O₂分压(pO₂)和氧饱和度(sO₂)。在另一个实例中,有效剂量可以减轻肺水肿。本文中提供的治疗剂的治疗有效量当单独使用或与抗病毒剂组合使用时将根据治疗剂的相对活性并且根据被治疗的受试者和疾病病状、受试者的体重和年龄以及性别、受试者的疾病病状的严重程度、施用方式等而变化,这些可以由本领域普通技术人员容易地确定。在一个实施方式中,治疗有效量将取决于被治疗的受试者和被治疗的病症的某些方面并且可以由本领域技术人员使用已知技术查明。另外,如本领域已知的,可能需要调整年龄以及体重、总体健康状况、性别、饮食、施用时间、药物相互作用以及疾病的严重程度。

[0061] 如本文所使用的,术语“受试者”和“患者”是指人和非人动物,包括脊椎动物、哺乳动物和非哺乳动物。在一个实施方式中,受试者可以是人、非人灵长类动物、猿、类人猿、鼠类(例如,小鼠和大鼠)、牛、猪、马、犬、猫科动物、山羊、狼、蛙科动物或鱼。

[0062] 术语“施用(administering/administered)”以及语法变体是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何一种将治疗剂物理引入到受试者。本文所公开的调配物的示例性施用途径包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、脊髓或其它肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所使用的,短语“肠胃外施用”意指除了肠内施用和局部施用之外的施用模式(通常通过注射),并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注以及体内电穿孔。在一个实施方式中,调配物通过非肠胃途径(例如,口服)施用。其它非肠胃途径包括局部、表皮或粘膜途径施用,例如,鼻内、阴道、直肠、舌下或局部施用。也可以例如一次、多次和/或在一个或多个延长的时段内执行施用。

[0063] “治疗”应广义地理解并且涵盖任何有益效果,包括例如延缓、减缓或阻止与肺部炎性疾病相关的症状恶化或至少部分地改善此类症状。治疗还涵盖带来任何形式的患者功能的改善,如下面详细讨论的。在一些实施方式中,治疗还意味着与未接受治疗的情况下的预期存活期相比,存活期延长。需要治疗的人包括已经患有该疾病或病症的人,以及易患上该疾病或病症的人或应该预防该疾病或病症的人。

[0064] 用于治疗目的的“药学上可接受的媒剂”是可以施用于受试者的物理实施方式。药学上可接受的媒剂包括丸剂、胶囊、囊片、片剂、口服液、注射液、喷雾剂、气雾剂、锭剂、膳食补充剂、乳膏、洗剂、油、溶液、糊剂、粉末、蒸汽,或者药学上可接受的媒剂可以是液体,但不限于这些。药学上可接受的媒剂的实例是缓冲等渗溶液,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0065] 据观察,COVID-19的临床体征与在病毒性肺炎中观察到的体征一致。这些肺部变化可能是导致高炎性状态的全身和局部免疫应答两者的原因。患者的死亡率被怀疑与病毒驱动的细胞因子风暴有关,该细胞因子风暴类似于在SARS-CoV-2感染中所见到细胞因子风暴。细胞因子风暴是肺中严重免疫反应的结果,如通过血浆中高炎性标志物(c-反应性蛋白、血清铁蛋白)水平和细胞因子水平(IL-6、IL-2、IL-7、IL-10、GSCF、IP10、MCP1、MIP1A、

神经刺激器来确保施用部位非常靠近神经时,可以使用较低剂量和/或体积。可替代地,可以使用更大的体积来实现神经阻滞,以确保与期望的神经接触。值得注意的是,RTX对TRPV1受体具有特异性,并且因此不影响非靶向神经,如运动神经元,这些非靶神经没有足够的TRPV1受体以对RTX敏感。

[0075] 文献中有许多RTX调配物的实例。参见例如Ueda等人(2008)《心血管药理学杂志(J.of Cardiovasc.Pharmacol.)》51:513-520和US 2015/0190509 A1。可以使用任何适合肠胃外施用(例如注射)的RTX调配物。

[0076] 在一些实施方式中,RTX可以以上文所讨论的剂量与药学上可接受的载体一起施用。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括水。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括聚山梨醇酯80。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括聚乙二醇。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括糖或糖醇。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括甘露醇。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括右旋糖。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括药学上可接受的缓冲液。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括磷酸盐缓冲液。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括药学上可接受的盐。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括NaCl。在一些实施方式中,药学上可接受的载体包括有机溶剂,如乙醇或DMSO,例如,作为在主要含水组合中稀释之前辅助溶解RTX的少数或残留组分。

[0077] 调配物中RTX的浓度可以是用于递送预期剂量的任何合适的值。在一些实施方式中,药物调配物中RTX的浓度在0.1到300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。在一些实施方式中,药物调配物中RTX的浓度范围为0.1-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、150-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或250-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一些实施方式中,药物调配物中RTX的浓度范围为5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或8-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0078] 从浓缩的储备溶液出发,可以通过在如盐水等合适的稀释剂中稀释来制备用于递送到受试者的RTX调配物。

[0079] 该调配物可以具有任何适于关节内施用的pH。在一些实施方式中,包含RTX和药学上可接受的载体的药物调配物的pH在6到7.6的范围内。在一些实施方式中,包含RTX和药学上可接受的载体的药物调配物的pH在6到6.4、6.3到6.7、6.4到6.8、6.8到7.2、7到7.4或7.2到7.6的范围内。在一些实施方式中,包含RTX和药学上可接受的载体的药物调配物的pH为6.5或7.2。

[0080] 在一些实施方式中,该调配物包含聚山梨醇酯80和右旋糖。在一些实施方式中,聚山梨醇酯80的浓度为0.03-7%w/v。在一些实施方式中,聚山梨醇酯80的浓度为2-4%w/v,和/或右旋糖的浓度为4-6%w/v。在一些实施方式中,聚山梨醇酯80的浓度为3%w/v,和/或右旋糖的浓度为5%w/v。该调配物可以进一步包含缓冲液,如磷酸盐缓冲液(例如磷酸钠缓冲液)。在一些实施方式中,磷酸盐缓冲液的浓度为10-50mM。在一些实施方式中,磷酸盐缓冲液的浓度为10-30mM。在一些实施方式中,磷酸盐缓冲液的浓度为10mM。在一些实施方式中,磷酸盐缓冲液的浓度为30mM。该调配物的pH可以在7-7.5的范围内,如约7.2。在一些实施方式中,在任何前述调配物中,RTX的浓度可以是10-30mcg/ml,如10mcg/ml或25mcg/ml。在一些实施方式中,该调配物进一步包含例如表1中针对磷酸盐缓冲液所示的浓度和pH的磷酸盐缓冲液。在一些实施方式中,该调配物进一步包含例如表1中针对NaCl所示的浓度的

NaCl。当两者都存在时，磷酸盐缓冲液和NaCl可以(但不一定)以针对单独调配物所示的浓度和磷酸盐缓冲液pH的组合存在。

[0081] 下表示出了RTX的示例性调配物。

[0082] 表1. 示例性RTX溶液调配物

调配物编号	调配物组分	组分浓度
1	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.44% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 7.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
[0083] 2	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.73% NaCl 的 10 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 0.8% w/v 10 mM, pH 6.5
3	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 具有 0.86% NaCl 的 10 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 30.0% v/v 1.0% w/v 10 mM, pH 6.5
4	RTX	200 mcg/mL

[0084]

	聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 具有 0.88% NaCl 的 10 mM 磷酸盐缓冲液	30.0% v/v 0.04% w/v 10 mM, pH 6.5
5	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 3.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
6	RTX 聚山梨醇酯 80 甘露醇 具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 3.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
7	RTX 聚山梨醇酯 80 甘露醇 具有 0.45% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 7.0% w/v 0.8% w/v 30 mM, pH 7.2
8	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 甘露醇 具有 0.74% NaCl 的 10 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 0.8% w/v 10 mM, pH 6.5
9	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.34% NaCl 的 10 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 3.0% w/v 10 mM, pH 6.5
10	RTX 聚乙二醇 300 聚山梨醇酯 80 甘露醇 具有 0.36% NaCl 的 10 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 3.0% v/v 0.1% w/v 3.0% w/v 10 mM, pH 6.5
11	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 0.03% w/v 0.05% w/v 30 mM, pH 7.2
12	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 3.0% w/v 5.0% w/v 30 mM, pH 7.2
13	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	25 mcg/mL 3.0% w/v 5.0% w/v 30 mM, pH 7.2
14	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖	25 mcg/mL 0.03% w/v 0.05% w/v

	具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	30 mM, pH 7.2
[0085]	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	100 mcg/mL 0.03% w/v 0.05% w/v 30 mM, pH 7.2
	RTX 聚山梨醇酯 80 右旋糖 具有 0.54% NaCl 的 30 mM 磷酸盐缓冲液	200 mcg/mL 7.0% w/v 5.0% w/v 30 mM, pH 7.2

[0086] 在一些实施方式中,表1中的调配物包含右旋糖。在实施方式中,右旋糖的浓度为0.05-5%w/v。在一些实施方式中,右旋糖的浓度为0.8-5%w/v。在一些实施方式中,右旋糖的浓度为0.05%w/v。在一些实施方式中,右旋糖的浓度为0.8%w/v。在一些实施方式中,右旋糖的浓度为3.0%w/v。在一些实施方式中,右旋糖的浓度为5.0%w/v。

[0087] 在一些实施方式中,表1中的调配物包含甘露醇。在一些实施方式中,甘露醇的浓度为0.8-3.0%w/v。在一些实施方式中,甘露醇的浓度为0.8%w/v。在一些实施方式中,甘露醇的浓度为3.0%w/v。

[0088] 在一些实施方式中,表1所示出的调配物中省略了右旋糖或甘露醇。

[0089] 在一些实施方式中,将表1所示出的调配物中RTX的浓度调整到本文公开的任何RTX浓度或浓度范围。例如,在一些实施方式中,将表1所示出的调配物中RTX的浓度调整到0.3-200mcg/ml。在一些实施方式中,表1所示出的调配物中RTX的浓度为200mcg/ml。在一些实施方式中,表1所示出的调配物中RTX的浓度为0.3-100mcg/ml。在一些实施方式中,表1所示出的调配物中RTX的浓度为100mcg/ml。在一些实施方式中,将表1所示出的调配物中RTX的浓度调整到0.3-50mcg/ml。在一些实施方式中,表1所示出的调配物中RTX的浓度为25mcg/ml。作为另一个实例,在一些实施方式中,将表1所示出的调配物中RTX的浓度调整到0.3-15mcg/ml。作为另一个实例,在一些实施方式中,将表1所示出的调配物中RTX的浓度调整到0.5-10mcg/ml。作为另一个实例,在一些实施方式中,将表1所示出的调配物中RTX的浓度调整到0.6-1.5mcg/ml。具有经调整的RTX浓度的任何此类调配物中省略了右旋糖或甘露醇。

[0090] 表1中的调配物可以根据以下示例性方法制备,这些方法是针对调配物3和5而提供的,但可以由本领域技术人员修改以适用于其它调配物。调配物3可以通过向100ml容量瓶中添加46mg磷酸二氢钠一水合物、94.7mg无水磷酸氢二钠和860mg NaCl来制备。添加50ml注射用水(WFI)以溶解容量瓶中的组分,然后添加1.0g聚山梨醇酯80,以形成含水组分。将20mg RTX添加到容量瓶内的含水组分中,并用盐酸/氢氧化钠将pH调整到7.2。然后添加30mL PEG 300,并且对溶液进行超声处理以溶解固体。应注意的是,有时最初RTX会沉淀在水溶液和PEG的界面处,但在超声处理后会回到溶液中。用水(WFI)将容量瓶中的全部混合物稀释到定容体积(100.00ml),并通过倒置过程进行混合。通过0.2 μ m聚四氟乙烯(PTFE)过滤器过滤完整调配物。

[0091] 调配物5可以通过向100ml容量瓶中添加138mg磷酸二氢钠一水合物、284.1mg无水磷酸氢二钠和540mg NaCl来制备。添加50ml注射用水(WFI)以溶解容量瓶中的组分,然后添加3.0g聚山梨醇酯80和800mg右旋糖,以形成含水组分。将20mg RTX添加到容量瓶内的含水组分中,并用盐酸/氢氧化钠将pH调整到7.2。然后对溶液进行超声处理,以溶解所有固体。

(可替代地,最初可以将RTX溶解在少量乙醇或DMSO中,然后将此溶液添加到含水组分中。)用水(WFI)将容量瓶中的全部混合物稀释到定容体积(100.00ml),并通过倒置过程进行混合。通过0.2 μ m PTFE过滤器过滤完整调配物。

[0092] 使用200mcg RTX、300mcg聚山梨醇酯80(使用可商购获得的聚山梨醇酯80)、5.4mg氯化钠、500mcg右旋糖、1.38mg磷酸二氢钠一水合物、2.84mg无水磷酸氢二钠和1mL水(WFI)制备根据调配物11的调配物,然后用盐酸/氢氧化钠将pH调整到7.2。如上所述,右旋糖可以省略。

[0093] 使用25mcg RTX、30mg聚山梨醇酯80(使用可商购获得的聚山梨醇酯80)、5.4mg氯化钠、50mg右旋糖、1.38mg磷酸二氢钠一水合物、2.84mg无水磷酸氢二钠、1mL水(WFI)制备根据调配物13的调配物,然后用盐酸/氢氧化钠将pH调整到7.2。如上所述,右旋糖可以省略。

[0094] 在一些实施方式中,药物调配物呈单位剂型形式。在这种形式中,该制剂被细分成含有适当量的活性组分的单位剂量。单位剂型可以是包装的制剂,该包装件含有离散量的调配物,如处于小瓶或安瓿或预装注射器中。此外,单位剂型可以是例如溶液或用于重构的冻干组合物。

[0095] 用于调配和施用的技术的另外细节可以在Gennaro,A.编辑,《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第18版,(1990)(宾夕法尼亚州伊斯顿马克出版公司(Mack Publishing Co.,Easton,Pa))中找到。

[0096] 在一些实施方式中,RTX可以以一次性单剂量施用。在一些实施方式中,定期施用RTX。在一些实施方式中,根据需要,向需要治疗肺部炎性疾病的受试者定期施用RTX,以降低疾病的严重程度。

[0097] 本文提供了用于治疗肺部炎性疾病的组合物和方法,方法包括通过硬膜外、神经节周围或神经节内注射向受试者施用RTX。一个实施方式提供了治疗患有ARDS的哺乳动物受试者的方法。

[0098] 在示例性实施方式中,可以施用RTX来减轻患者的症状,或者可以施用RTX来对抗疾病自身的机制。本领域技术人员将会理解,这些治疗目标通常是相关的,并且可以基于各种因素针对个体患者调整治疗。这些因素包括患者的年龄、性别或健康状况、肺部炎性疾病的进展、呼吸困难的程度、患者呼吸道组织损伤量、患者吸烟史以及各种环境因素(例如温度、湿度和空气污染),这些因素可能会影响患者的病状。可以根据剂量、定时、施用途径以及通过同时或依次施用其它治疗剂来调整患者的疗法。

[0099] 实施例

[0100] 1. 树酯毒素(RTX)在啮齿动物肺损伤模型中改善急性呼吸窘迫综合征(ARDS)

[0101] 由ARDS引起的呼吸衰竭是与包括COVID-19在内的急性肺损伤(ALI)相关的主要原因之一。ALI/ARDS可能与急性细胞因子释放、肺水肿以及长期纤维化有关。这些病理学变化的潜在机制尚不完全了解。在实例1中,研究了在ALI/ARDS期间介导肺部病理的通过心肺脊髓传入神经的新神经组分。

[0102] 支配心脏和肺部的感觉神经元通过两种途径之一进入中枢神经系统:通过迷走神经进入结状神经节内有细胞体的脑干(髓质)和直接进入细胞体位于背根神经节(DRG)的脊髓。传入神经由对如机械变形、热、冷、pH和炎性介质等各种感觉形式作出应答的元素构成。

刺激这些传入神经后的反射效应取决于刺激的类型和所涉及的神经过路。迷走神经传入通路的激活往往是交感抑制性和抗炎性的 (Komeage等人 (2018)《大脑、行为与免疫 (Brain, Behavior, and Immunity)》73:441-449; Bonaz等人 (2016)《生理学杂志 (The Journal of Physiology)》594:5781-5790)。另一方面,脊髓传入神经的激活往往是交感兴奋性和促炎性的 (Shanks等人 (2019)《高血压 (Hypertension)》74:910-920; Shanks等人 (2018)《生理学报告 (Physiological Reports)》6:313742; Alawi等人 (2010)《药理学和治疗学 (Pharmacol. Ther.)》125:181-195; Lazar等人 (2018)《胰腺 (Pancreas)》47:110-115; Abdulla等人 (2017)《生理学报 (Acta Physiologica)》(Osf) 220:404-416; Wang等人 (2017)《生理学杂志》595:2519-2534)。据推测,通过施加超强效选择性传入神经毒素RTX以消融肺传入神经支配(胸脊髓)将改变病理过程,包括与进行性ALI相关的肺水肿和局部肺部炎症。

[0103] 方法

[0104] 大鼠肺损伤模型。如下将大鼠随机分为三组并在滴注后1周进行评估:假手术大鼠、使用盐水的暴露于博来霉素 (Bleo) 的大鼠 (硬膜外或星状神经节内注射) 和使用RTX的暴露于Bleo的大鼠 (硬膜外或星状神经节内注射)。将Bleo (2.5mg/kg, ~0.15mL) 在3%异氟醚麻醉下经气管内滴注到肺部。假手术对照大鼠经受盐水的气管内滴注。在Bleo递送后3天,通过硬膜外T1-T4 DRG途径 (6 μ g/ml, 10 μ l/每个神经节) 或星状神经节内施用 (50 μ g/ml, 5 μ l/每侧) 用RTX或媒剂 (Veh; 磷酸盐缓冲盐水) 对动物进行处理 (图1A-B)。

[0105] RTX的硬膜外施用。通过硬膜外施加RTX来消融上胸脊髓传入神经。用于硬膜外施用的程序基本上如Shanks等人 (2018)《生理学报告》6:e13742所述。简而言之,使用2%-3%异氟醚:氧气混合物麻醉大鼠。将大鼠置于俯卧位,并且在T13-L1胸椎区域切出小型中线切口。在解剖浅表肌肉后,在T13椎骨的左侧和右侧开两个小孔 (大约2mm \times 2mm)。通过一个孔将聚乙烯导管 (PE-10) 插入蛛网膜下腔,并缓慢推进约4cm,以接近T1水平。通过经由导管将超强效TRPV1受体激动剂树脂毒素 (RTX; 西格玛奥德里奇公司 (Sigma Aldrich)) 注射到蛛网膜下腔中来消融上胸交感传入神经节。将RTX (1mg; 西格玛奥德里奇公司) 溶解于乙醇、吐温80 (西格玛奥德里奇公司) 和等渗盐水的1:1:8混合物中。第一次注射RTX (6 μ g/ml, 10 μ l) 的速度非常慢 (~1分钟),以使药物的扩散最小化。然后将导管分别拉回到T2、T3和T4,以在每个区段处进行连续注射 (10 μ l/每次)。拔出导管,并且在另一侧重复同样的注射。使用硅酮凝胶密封T13椎骨上的孔。用3-0聚丙烯简单间断缝线缝合肌肉上的皮肤,并将必妥碘 (betadine) 涂敷于伤口。对于术后疼痛管理,手术后立即皮下注射丁丙诺啡 (buprenorphine) (0.05mg/kg),每天两次,持续2天。

[0106] 星状神经节内注射RTX。使用2%-3%异氟醚:氧气混合物麻醉大鼠。在对气管进行插管后,开始机械通气 (683型,马萨诸塞州南纳蒂克哈佛仪器公司 (Harvard Apparatus, South Natick, MA))。切开从胸骨喙端到第三根肋骨水平的皮肤。切割并解剖部分浅层和深层胸肌和第一肋间肌。为了定位左或右星状神经节,用钩状玻璃或钢条将左或右前腔静脉从头肱动脉侧向分离,以暴露胸廓内动脉和肋颈动脉,该胸廓内动脉和肋颈动脉是右锁骨下动脉的降支。星状神经节和锁骨下祥位于胸廓内动脉起点和肋颈动脉起点的中间。然后,用5- μ l Hamilton注射器 (Microliter#95,美国内华达州里诺的汉密尔顿公司 (Hamilton, Reno, NV, USA)) 将RTX (5 μ l, 50mg/ml) 经30秒两侧地注射到神经节中。图2A-B示出了此程序的图像。在这些操作之后,用连续的4-0Dexon II涂覆的编织可吸收聚乙醇酸缝线缝合第一

肋间隙与第二肋间隙之间的胸腔,并且用3-0聚丙烯缝线缝合皮肤,并排空胸腔。将必妥碘涂敷于伤口,并且让大鼠从麻醉中恢复。对于术后疼痛管理,手术后立即皮下注射丁丙诺啡(0.05mg/kg),每天两次,持续2天。

[0107] 血气分析。从大鼠尾部腹面的动脉收集少量血液(~0.1mL),用于分析Bleo处理后第7天的动脉血气。用商购限制器约束该动物,使得可接触该动物的尾部。通过交替使用酒精预制片和碘预制片三次来对尾部进行无菌处理,并且使用24G针穿刺动脉。将少量血液(~0.1mL)缓慢吸入注射器中以进行血气分析(iSTAT,美国伊利诺伊州芝加哥雅培公司(Abbott,Chicago,IL,USA))。在收集样品后,移除针,并且将纱布拭子牢牢按压在穿刺部位上以止血。

[0108] 细胞因子测定。根据制造商说明,用R&D细胞因子ELISA测定(美国明尼苏达州明尼阿波利斯市(Minneapolis,MN,USA))测量肺和血浆细胞因子。死后评估器官重量。

[0109] 肺血浆外渗、组织提取和伊文思蓝定量。用戊巴比妥(pentobarbitone)(40mg/kg)麻醉大鼠。静脉内施用20mg/kg伊文思蓝(10mg/ml,溶解于盐水+100IE每ml肝素)。10分钟后,通过穿心灌注PBS(0.01M,pH 7.4)使大鼠安乐死。将肺取出并首次拍照。然后,立即称量肺样品,将其置于2ml N,N'-二甲基甲酰胺中,切成小片,并在50°C水浴中加热过夜。然后将肺组织离心(1分钟,14,000rpm),并在96孔酶标仪(infinite M200,瑞士门内多夫的TECAN公司(TECAN, Männedorf,CH,Switzerland))中在620nm下测定上清液中肺的伊文思蓝含量(每孔100μl样品)。通过将实验值与已知标准进行比较,将伊文思蓝外渗表示为mg伊文思蓝/g肺组织。

[0110] 统计。使用GraphPad Prism(加利福尼亚州圣地亚哥GraphPad软件(GraphPad Software, San Diego,CA.),8版)进行统计评估分析。使用重复测量ANOVA的混合效应模型确定处理之间的差异。为了在三组(假手术、Bleo+Veh和Bleo+RTX实验)之间进行比较,使用了图基校正(Tukey correction)和邦费罗尼校正(Bonferroni correction)进行多重比较。

[0111] 结果

[0112] 血浆外渗(伊文思蓝)用于评估ALI后的血管通透性。如图3A-C所示,经Bleo处理的肺在其两侧表现出广泛的伊文思蓝区域分布。在每个肺的内侧显示出伊文思蓝的最高强度。在施用Bleo后的第7天的时间点,硬膜外RTX处理后伊文思蓝区域减少。

[0113] 图4A-C示出了Bleo处理后肺中普遍存在的三种促炎组织细胞因子。IL-6(图4A)、IL-1β(图4B)和IFN γ(图4C)在Bleo处理后升高。在经RTX处理的大鼠中,这些细胞因子水平降低。

[0114] 在硬膜外施加RTX后,对Bleo作出应答的细胞因子水平也降低(图5A-C)。

[0115] 在星状神经节注射RTX后,对Bleo作出应答的血浆外渗减少。如图6A-D所示,在星状神经节注射RTX后,肺中的伊文思蓝染料显著减少。

[0116] 评估用Veh与RTX星状神经节内处理的大鼠的动脉血气数据(图7A-H)。结果示出,在经Bleo和Veh处理的大鼠中,pCO₂升高(图7B),并且pO₂降低(图7C),sO₂一样降低(图7G)。RTX的星状神经节施用扭转了这些变化,从而表明肺功能和气体交换改善。

[0117] 图8A-B示出了在星状神经节RTX施用后,肺组织中的IL-6(图8A)和IL-1β(图8B)水平显著降低。

[0118] 图9A-H示出了各组的体重(BW)和单个器官的重量。与假手术大鼠相比,在经Bleo和Veh处理的大鼠中,湿肺重量(WLW)以及WLW与BW的比率明显更高,而该WLW以及该WLW与BW的比率通过星状神经节内注射RTX显著降低。数据表明,星状神经节内注射RTX减轻了Bleo处理后的肺水肿。

[0119] 数据证明,在存在ALI的情况下,使用通过靶向心肺传入神经的两种不同途径中的任一种递送的RTX来消融TRPV1感觉传入神经导致肺部微血管通透性的快速降低以及组织和血浆炎症标志物的降低。虽然在这一系列实验中没有直接测量肺功能,但动脉血气数据表明气体交换有所改善。在接受RTX的星状神经节施用后,肺损伤大鼠的身体改善和肺重量减轻表明了减轻肺水肿的潜在临床益处,以及对非肺器官的保护作用,否则非肺器官会受到肺部触发的全身性炎性过程的影响。

[0120] 肺由包括迷走传入神经和脊髓传入神经的双重感觉系统支配。迷走传入纤维和脊髓传入纤维两者均由A组纤维(高传导速度)和C组纤维(低传导速度)轴突构成。这些纤维及其感觉末梢表达多种介导离子通道功能的膜受体,包括传统的 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 通道(电压和配体门控)。已经制定了一种策略来调节TRPV1传入神经元的病理学效应。超强效神经毒素RTX与TRPV1受体紧密结合。一旦激活,TRPV1通道对钙具有高度通透性(Hsu等人(1985)《应用生理学杂志(Journal of Applied Physiology)》118:1533-1543;Brown等人(2015)《疼痛(Pain)》156:1018-1024)。在初始刺激后,细胞内高水平的钙介导对神经元功能的抑制。RTX的位点特异性递送可以用于干预各种病状,以缓解疼痛、炎症、纤维化和血浆外渗。已经表明,RTX诱导的TRPV1感觉传入神经缺失可以阻断含有传入神经的神经肽的释放并减轻炎症疼痛(Karai等人(2004)《临床研究杂志(The Journal of Clinical Investigation)》113:1344-1352)。心肺脊髓传入神经也可以通过将RTX施加于胸段T1-T4 11处的硬膜外腔中(其中一些扩散到更高和更低的区段)或注射到星状神经节中来靶向。虽然DRG被认为性质上仅仅是感觉性的,但星状神经节含有用于交感传出纤维和胸廓传入神经的通道纤维(fiber of passage)的体细胞,因为它们穿过DRG并进入脊髓。应当注意的是,在人中,星状神经节可以容易地被鉴定,并且这种类型的经皮程序可以利用荧光镜或超声引导(神经节内或神经‘阻滞’方法)来进行。此外,星状神经节内注射要求体积较小(双侧注射 $10\mu\text{l}$),这降低了全身吸收RTX的风险,并允许局部注射使用更高剂量的RTX。

[0121] 本文引用的所有出版物的完整公开内容以全文引用的方式并入本文,就好像每一个出版物都在本文中单独充分地阐述并并入一样。

[0122] 在不脱离本公开的范围和精神的情况下,对本文公开的实施方式的各种修改和变更对于本领域技术人员将变得显而易见。说明性实施方式和实施例仅作为实施例提供并且不旨在限制本发明的范围。

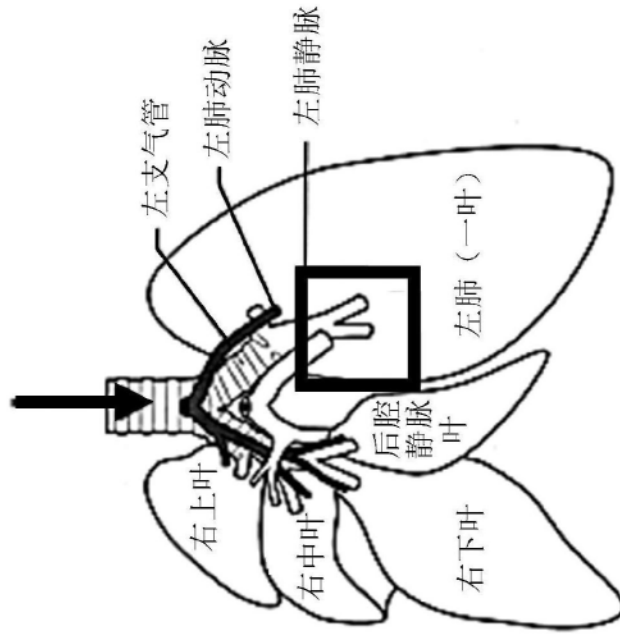


图1A

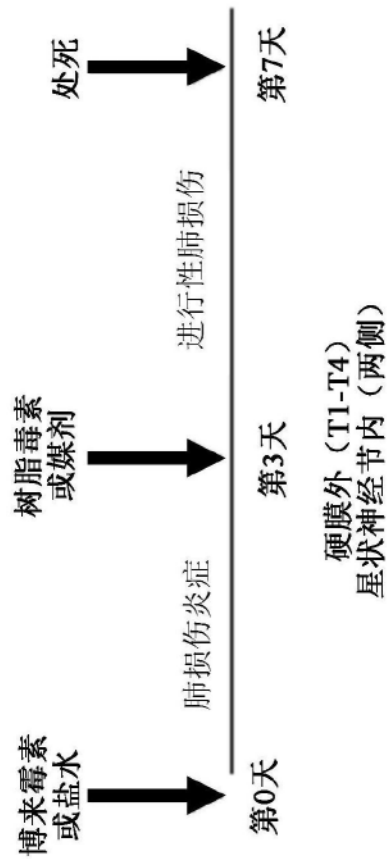


图1B

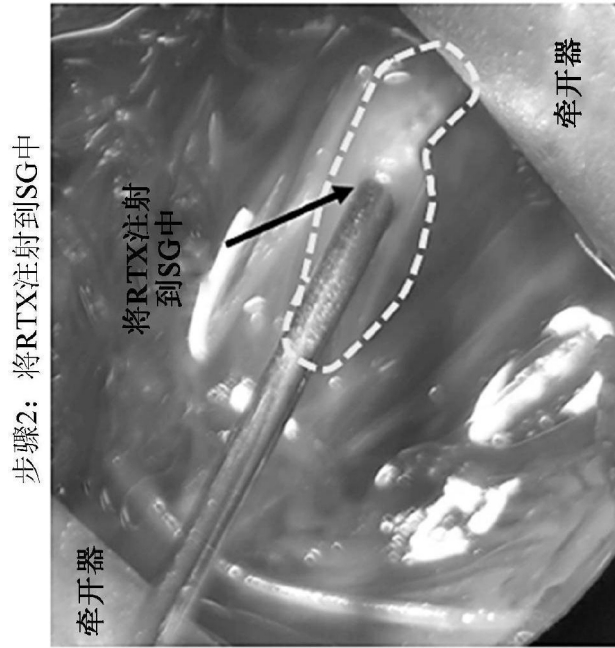


图2B

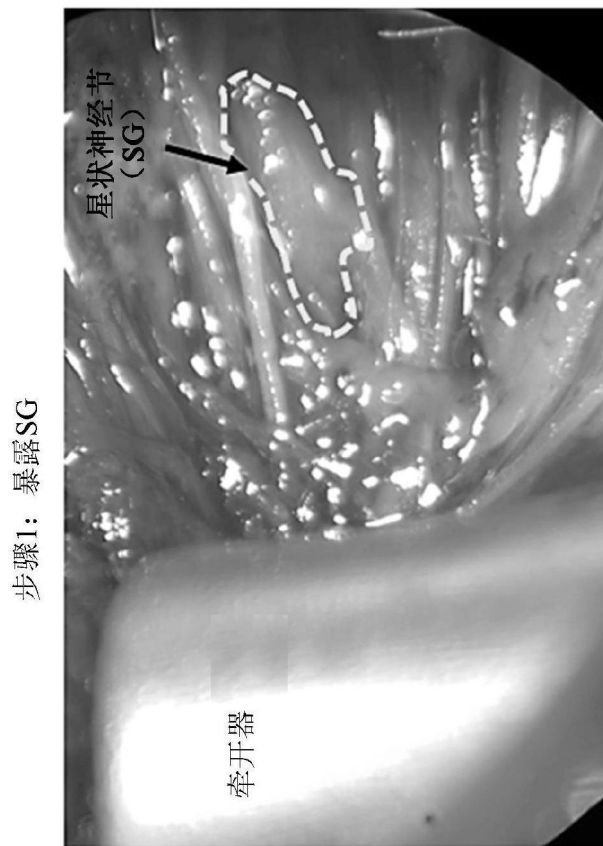
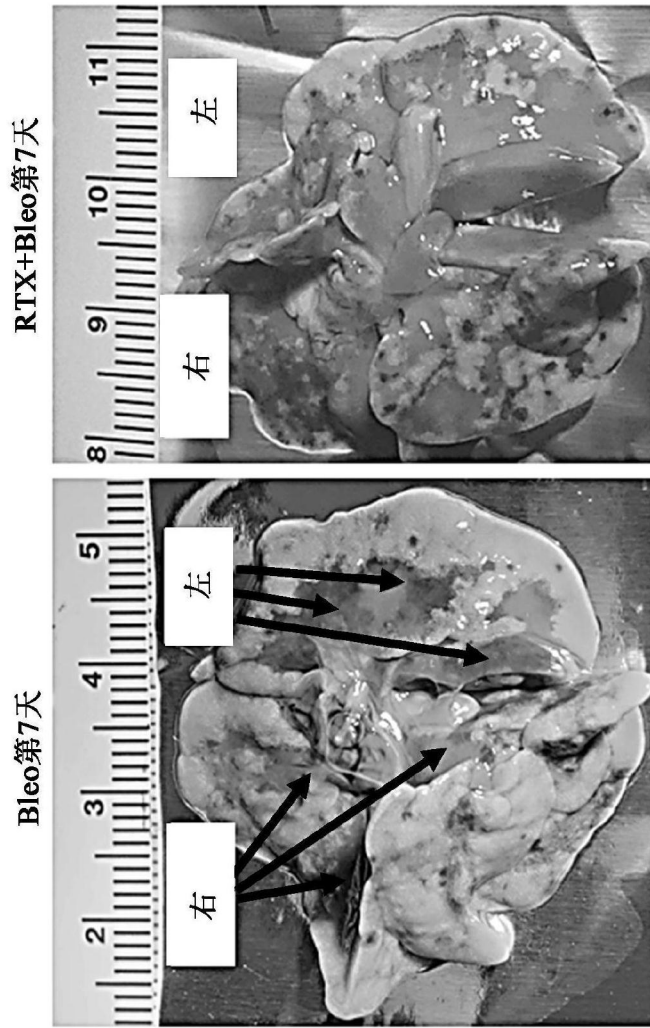


图2A



**P<0.01对对照组; ##P<0.01对Bleo组

图3B

图3A

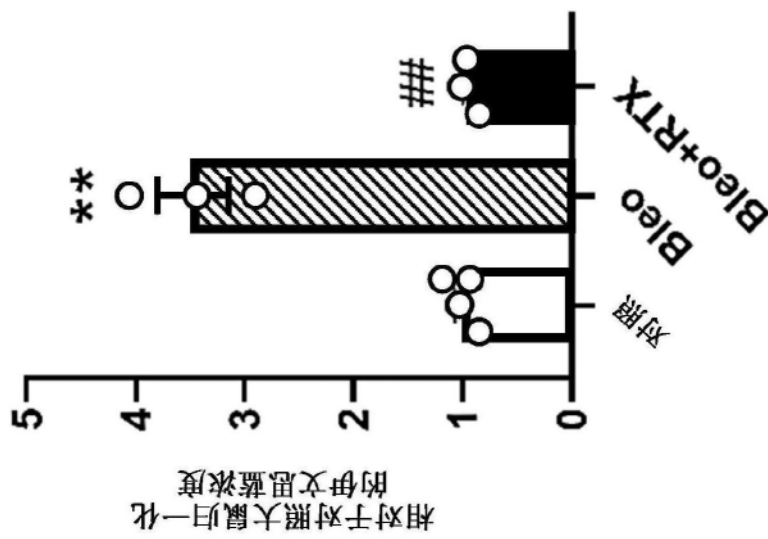


图3C

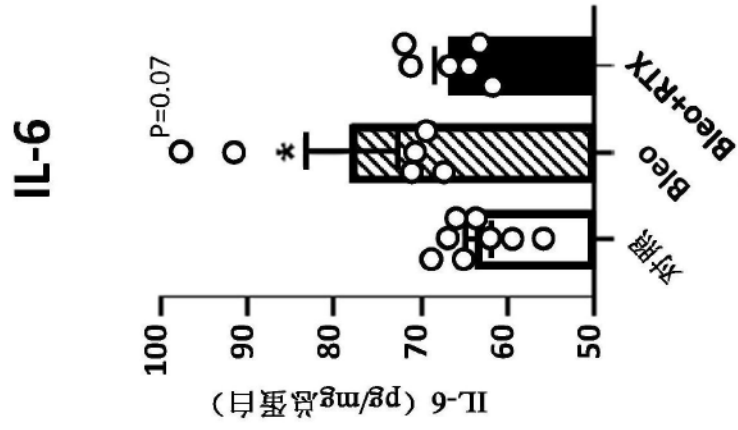


图4A

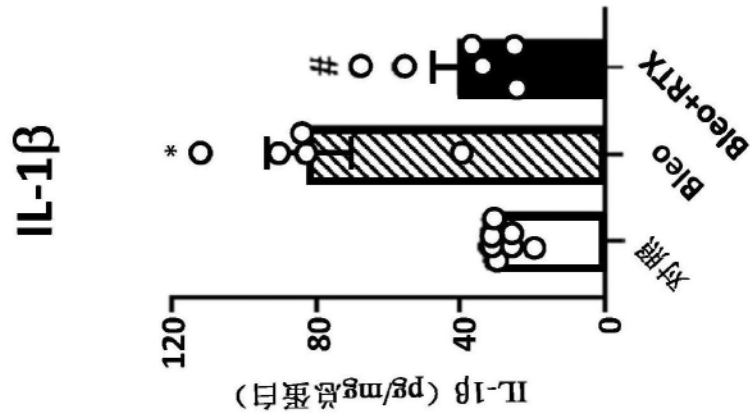


图4B

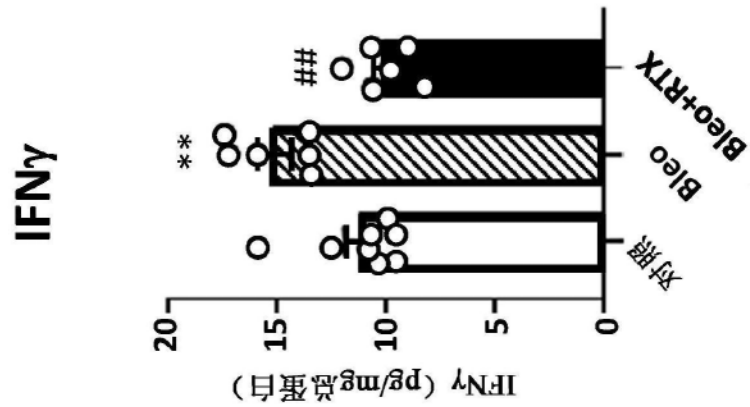


图4C

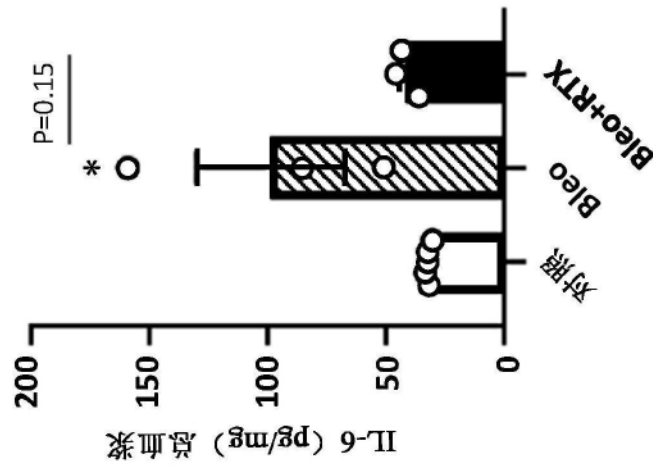


图5A

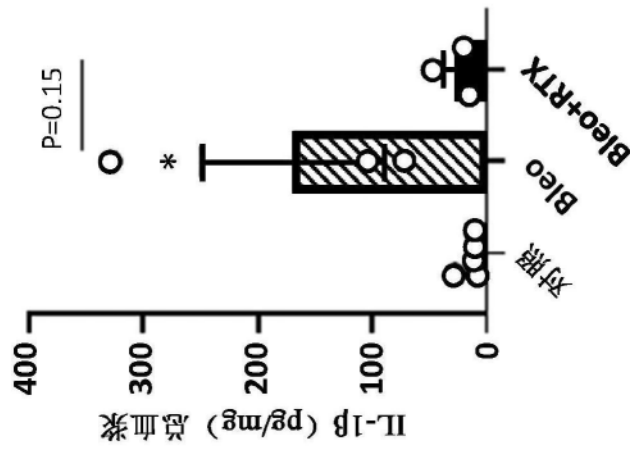


图5B

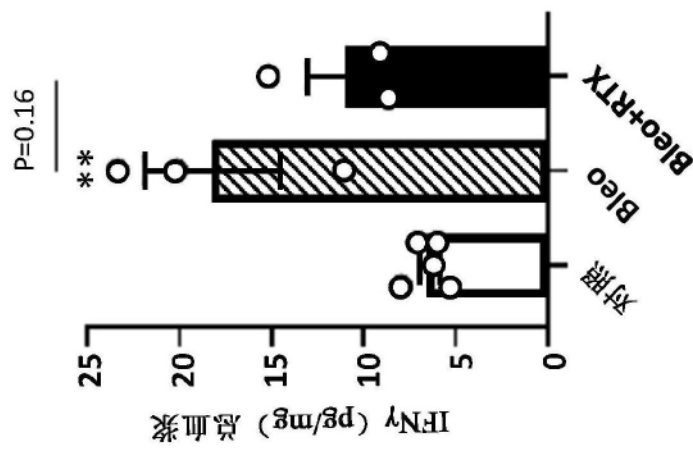


图5C

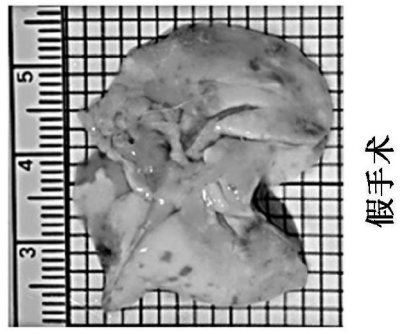


图6A

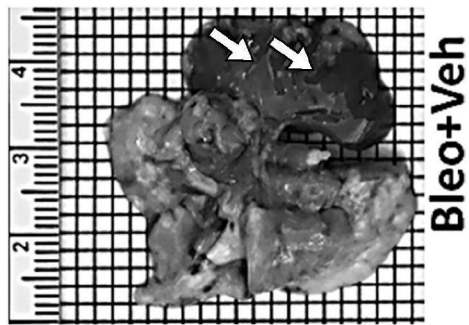


图6B

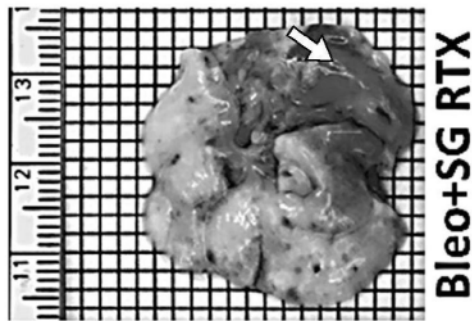


图6C

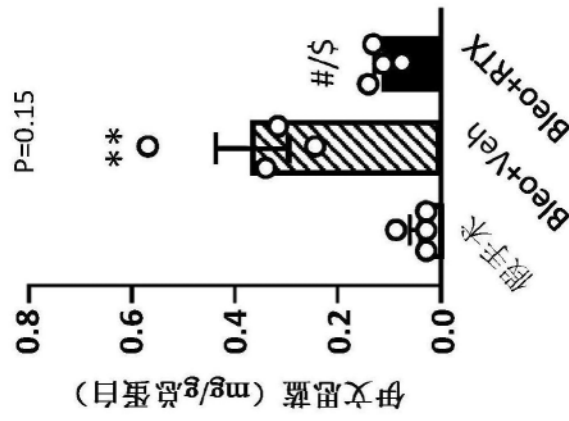


图6D

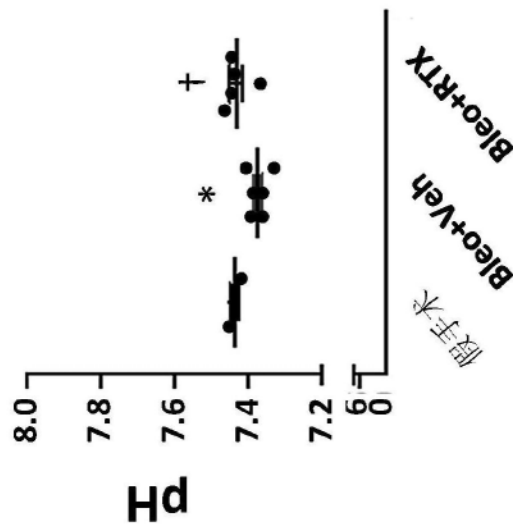


图7A

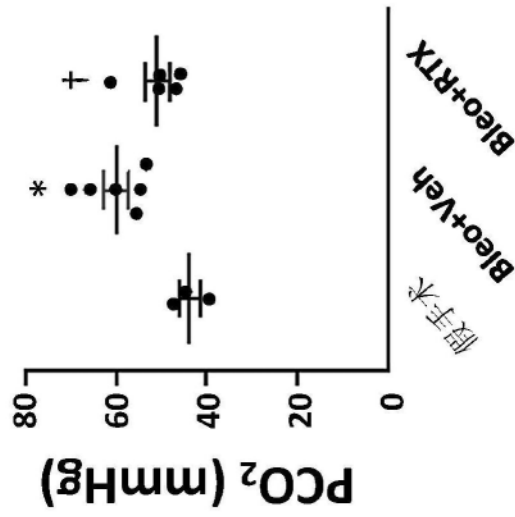


图7B

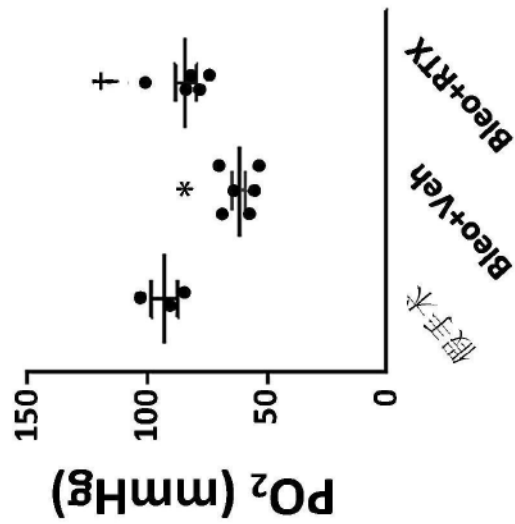


图7C

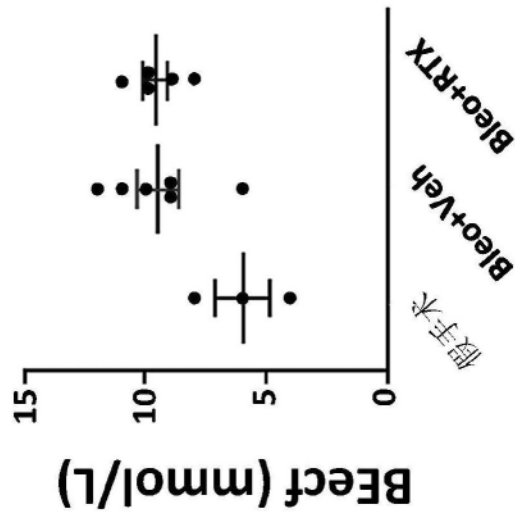


图7D

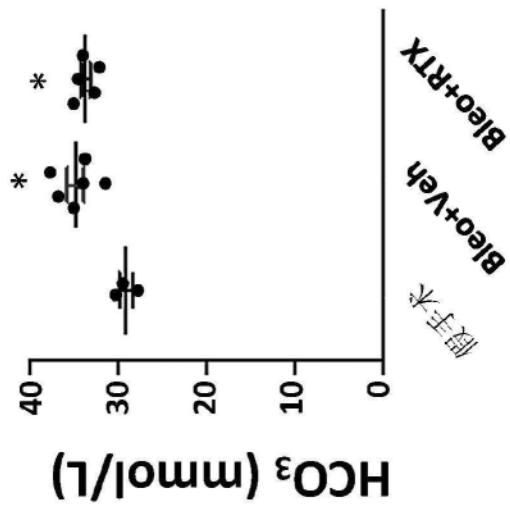


图7E

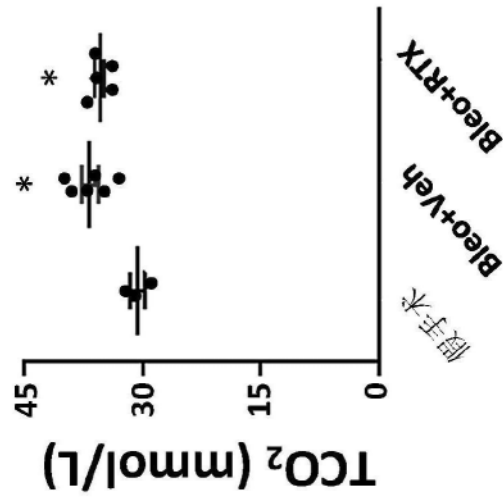


图7F

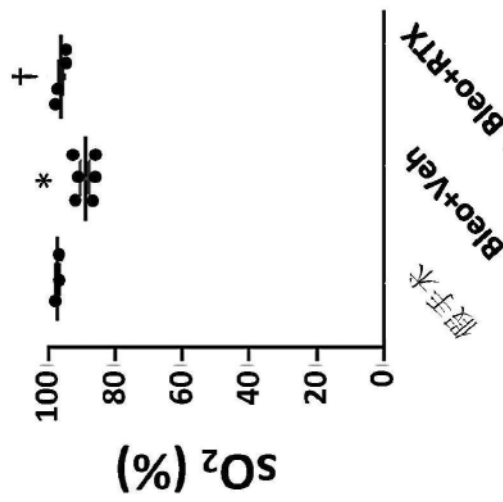


图7G

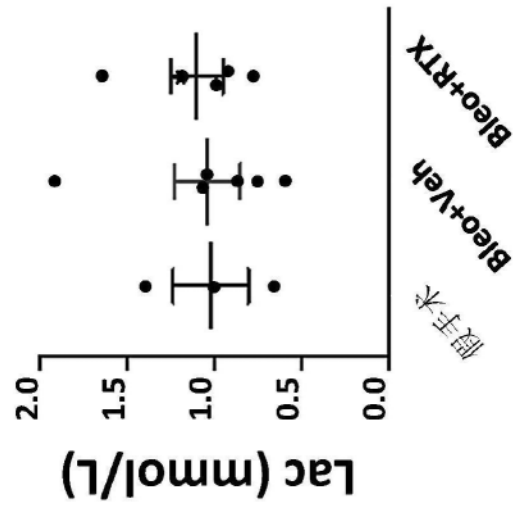


图7H

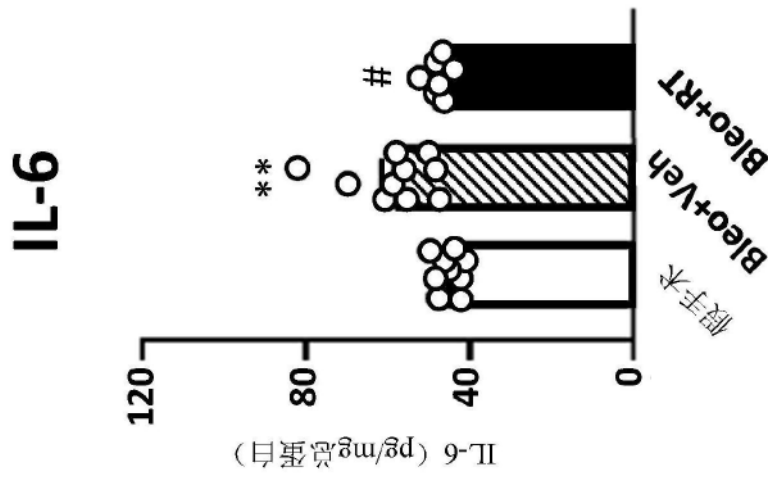


图8A

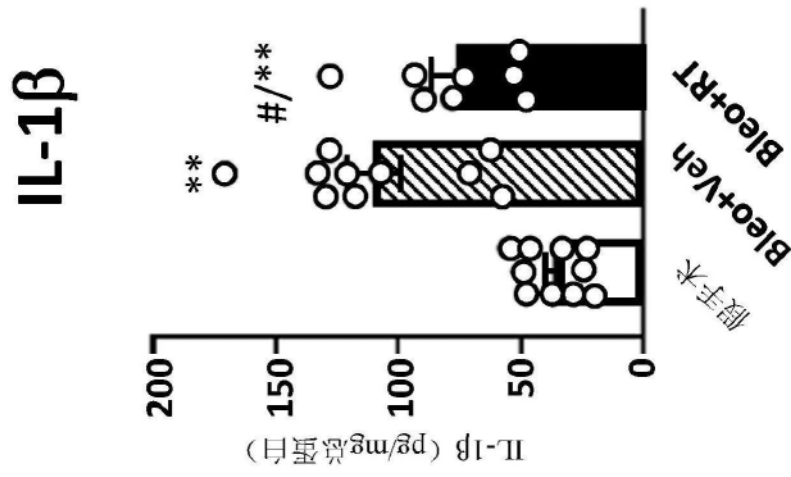


图8B

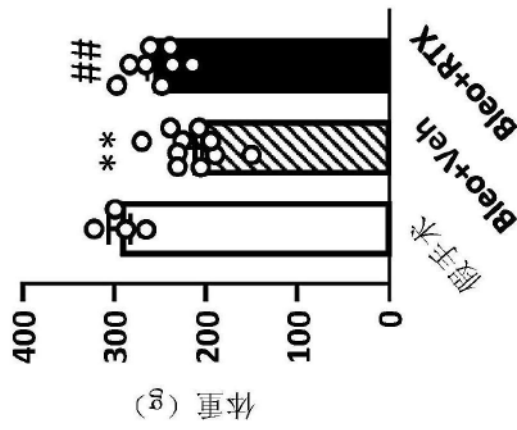


图9A

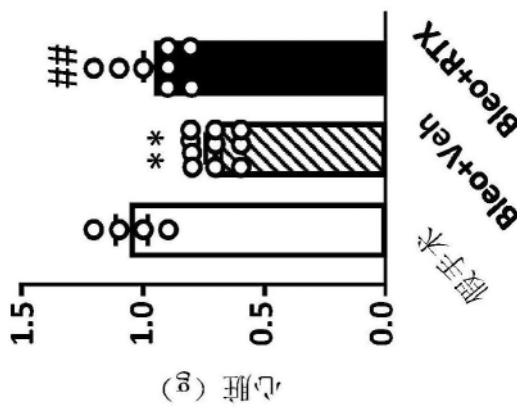


图9B

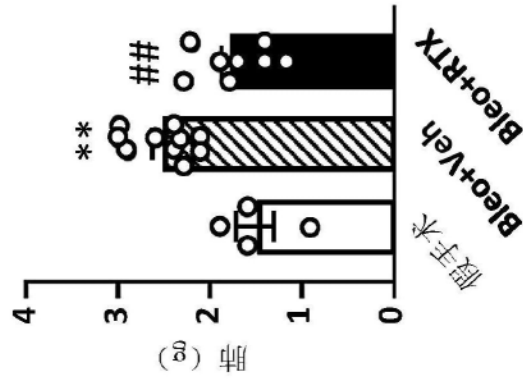


图9C

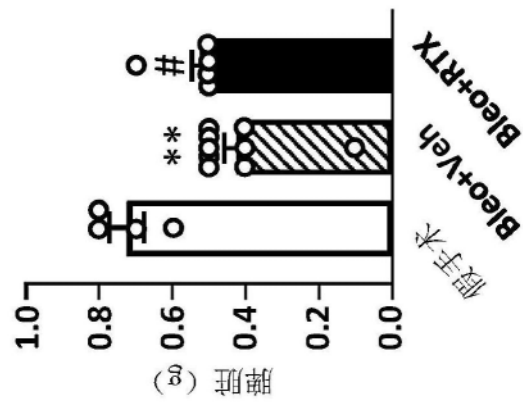


图9D

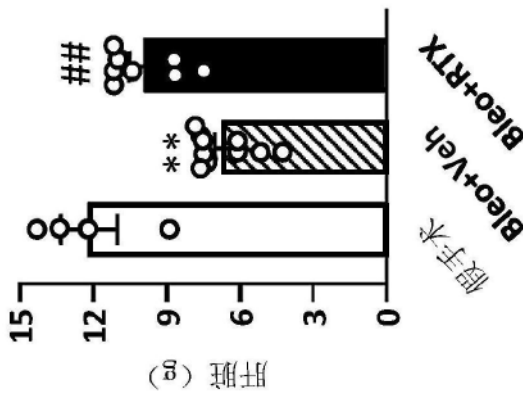


图9E

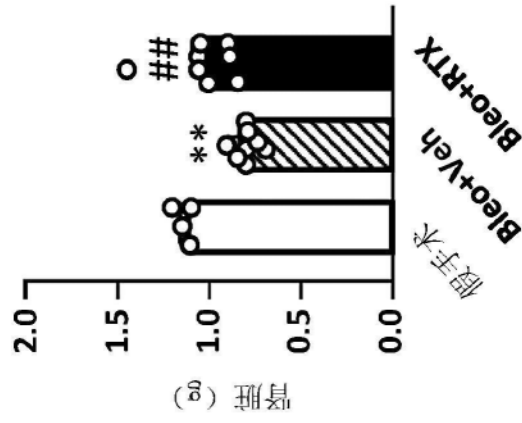


图9F

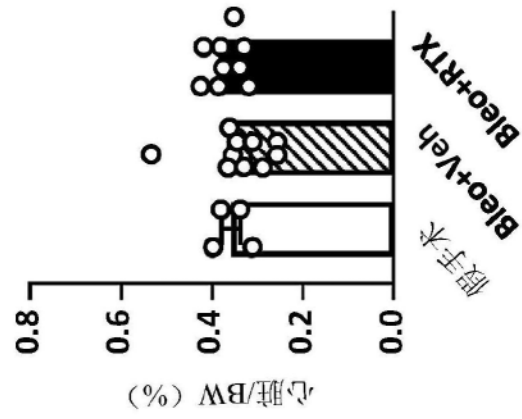


图9G

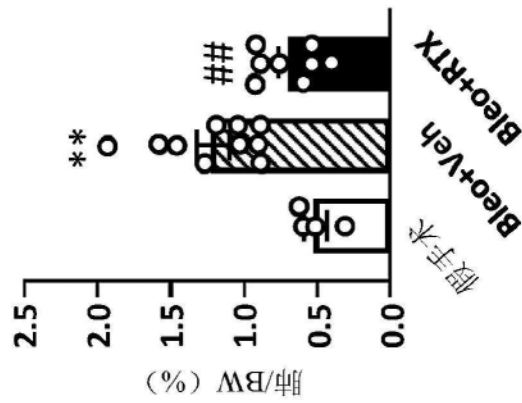


图9H