

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/65

A61K 31/56 A61K 31/33

A61K 31/16 A61K 31/19

A61P 25/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99813548.8

[43] 公开日 2001 年 12 月 12 日

[11] 公开号 CN 1326351A

[22] 申请日 1999.9.23 [21] 申请号 99813548.8

[30] 优先权

[32] 1998.9.25 [33] SE [31] 9803276 - 6

[32] 1998.10.29 [33] SE [31] 9803710 - 4

[86] 国际申请 PCT/SE99/01671 1999.9.23

[87] 国际公布 WO00/18409 英 2000.4.6

[85] 进入国家阶段日期 2001.5.21

[71] 申请人 A + 科学投资有限公司

地址 瑞典哥特堡

[72] 发明人 K · 奥尔马克 B · 赖德维克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 钟守期

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 应用某些药物治疗神经根损伤

[57] 摘要

本发明涉及用于治疗 TNF - α 释放引起的脊柱病症的药用组合物，该组合物包含有效量 TNF - α 抑制剂，本发明还涉及治疗这类病症的方法和应用 TNF - α 抑制剂制备用于所述治疗的药用组合物。

权利要求书

1. TNF- α 抑制剂的用途，用于制备通过抑制椎间盘 TNF- α 治疗脊柱病症的药用组合物，所述病症例如为 TNF- α 释放以及 TNF- α 释放或存在激发产生的化合物引起的神经根损伤，所述 TNF- α 选自碱或其加成盐形式的除外甲泼尼龙的金属蛋白酶抑制剂、包括化学修饰四环素的四环素类、喹诺酮、皮质类固醇、肽胺哌啶酮、拉扎洛依类、己酮可可碱、异羟肟酸衍生物、碳环酸、naphthopyrans、可溶性细胞因子受体、抗 TNF- α 单克隆抗体、氨力农、匹莫苯、维司力农、磷酸二酯酶 III 抑制剂、乳铁蛋白和乳铁蛋白衍生的类似物以及褪黑激素。
2. 按照权利要求 1 的用途，其中所述活性组分选自碱或加成盐形式的四环素、多西环素、赖四甲环素、土霉素、米诺环素及化学修饰的四环素类去二甲基氨基四环素。
3. 按照权利要求 2 的用途，其中所述活性组分为多西环素。
4. 按照权利要求 1 的用途，其中所述活性组分选自碱或加成盐形式的异羟肟酸化合物、碳环酸及其衍生物、肽胺哌啶酮、拉扎洛依类、己酮可可碱、naphthopyrans、可溶性细胞因子受体、抗 TNF- α 单克隆抗体、氨力农、匹莫苯、维司力农、磷酸二酯酶 III 抑制剂、褪黑激素。
5. 按照权利要求 1 的用途，其中所述活性组分选自碱或加成盐形式的诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、gatifloxacine、培氟沙星、洛美沙星及替马氟沙星。
6. 按照权利要求 1 的用途，其中所述活性组分为碱或加成盐形式的金属蛋白酶抑制剂。
7. 按照权利要求 1 的用途，其中所述活性组分包括抑制由 TNF- α 的释放激发产生的化合物的物质，该物质为碱或加成盐形式，例如 γ -干扰素、白介素-1 及一氧化氮(NO)。
8. 治疗包括人类在内的哺乳动物脊柱病症如 TNF- α 释放引起的

01-05-21

神经根损伤的方法，包括给予药学有效量的 TNF- α 抑制剂，该抑制剂选自碱或其加成盐形式的除外甲泼尼龙的金属蛋白酶抑制剂、包括化学修饰四环素的四环素类、喹诺酮、皮质类固醇、肽胺哌啶酮、拉扎洛依类、己酮可可碱、异羟肟酸衍生物、碳环酸、naphthopyrans、可溶性细胞因子受体、抗 TNF- α 单克隆抗体、氯化农、匹莫苯、维司力农、磷酸二酯酶 III 抑制剂、乳铁蛋白和乳铁蛋白衍生的类似物以及褪黑激素。

说 明 书

应用某些药物治疗神经根损伤

5

技术领域

本发明涉及使用 TNF- α 抑制剂制备治疗神经根损伤的药用组合物以及治疗神经根损伤的方法。

10

本发明的目的是希望通过阻断椎间盘有关的细胞因子治疗椎间盘突出(disk herniation)引起的神经根损伤，该损伤表现为手臂和腿(坐骨神经痛)的放射性疼痛。

发明背景

椎间盘突出是令人讨厌的病症，它可引起显著的疼痛和肌肉功能障碍并因此丧失工作能力。椎间盘突出可发生于脊柱的任何椎间盘，但腰椎和颈椎椎间盘突出最为常见。颈椎椎间盘突出可引起手臂的放射性疼痛和肌肉功能障碍，而腰椎椎间盘突出可引起腿部放射性疼痛和肌肉功能障碍。腿部放射性疼痛通常称作“坐骨神经痛”。椎间盘突出会引起不同程度的障碍，而疼痛可持续 1 个月或 2 个月或在严重情况下长达 6 个月。因为椎间盘突出发生的手臂或腿部疼痛可能非常强烈并可因此在患病期间影响患者个体的整个生活状况。

US-A-5,703,092 公开了异羟肟酸化合物和碳环酸用作金属蛋白酶和 TNF 抑制剂，而且特别用于治疗关节炎和其它相关炎性疾病。未公开或暗示这类化合物用于治疗神经根损伤。

25

US-A-4,925,833 公开了使用四环素促进骨蛋白的合成以及治疗骨质疏松。

US-A-4,666,897 公开了用四环素抑制哺乳动物溶胶原酶。溶胶原活性表现为过度的骨重吸收、牙周病、类风湿关节炎、角膜溃疡或皮肤或其它结缔组织胶原的重吸收。

上述后两个文献均未提及神经根损伤或其治疗。

本发明的描述

目前令人惊奇地证实，使用包含治疗有效量 TNF- α 抑制剂和药学上可接受的载体的药用组合物能够治疗神经根损伤或至少减轻神经根损伤的症状，所述 TNF- α 抑制剂选自除外甲泼尼龙的金属蛋白酶抑制剂、四环素类(包括化学修饰四环素)、喹诺酮、皮质类固醇、肽胺哌啶酮、拉扎洛依类(lazaroides)、己酮可可碱(pentoxyphylline)、异羟肟酸衍生物、naphthopyrans、可溶性细胞因子受体、抗 TNF- α 单克隆抗体、氨力农、匹莫苯、维司力农、磷酸二酯酶III抑制剂、乳铁蛋白和乳铁蛋白衍生的类似物以及褪黑激素，它们为碱或加成盐形式。

有效治疗量为使用这类化合物作其它治疗之用时通常使用的剂量。这类药物中许多药物是已知的市售注册药物。

具有这种活性的化合物为四环素类如四环素、多西环素、赖甲四环素、土霉素、米诺环素及化学修饰的四环素类去二甲基氨基四环素(dedimethylaminotetracycline)、异羟肟酸化合物、碳环酸及其衍生物、肽胺哌啶酮、拉扎洛依类(lazaroides)、己酮可可碱、naphthopyrans、可溶性细胞因子受体、抗 TNF- α 单克隆抗体、氨力农、匹莫苯、维司力农、磷酸二酯酶III抑制剂、乳铁蛋白和乳铁蛋白衍生的类似物、褪黑激素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、gatifloxacin、培氟沙星、洛美沙星(lemefloxacin)及替马氟沙星。这些化合物可以碱或加成盐形式存在，无论哪种形式均具有最佳的药物学作用及最佳的性质以加入适当的药用组合物。

此外，所述活性组分包括抑制 TNF- α 释放激发产生的化合物的物质，这类物质为碱或加成盐形式，例如 γ -干扰素、白介素-1 以及一氧化氮(NO)。

本发明还涉及抑制神经根损伤症状的方法。

已研究了多西环素、可溶性细胞因子受体及单克隆细胞因子抗体

的作用，并将所用方法及所获结果公开如下。

实施例

研究设计

5 用免疫组化和记录神经传导速率建立的实验评价髓核(nucleus pulposus)和阻断 TNF- α 活性而各种治疗的效果。

背景资料概述

10 对观测到的髓核所产生作用的 meta-analysis 显示，这些作用可能与一种特殊细胞因子即肿瘤坏死因子 α (TNF (α))有关。

目的

评价猪髓核细胞 TNF (α)的存在及观察是否 TNF (α)的阻断还阻断髓核引起的神经根传导速率的降低。

15

方法

系列-1：用 TNF (α)单克隆抗体对培养的髓核细胞进行免疫组化染色。

20 系列-2：从 13 只猪的腰椎间盘收集髓核并将其应用到 13 只猪的自体骶尾的马尾(sacrococcygeal carda equina)。给 4 只猪静脉注射 100 mg 多西环素，给 5 只猪在髓核局部应用阻断性 TNF- α 单克隆抗体，并保留 4 只猪不作处理而形成对照。应用 3 天后通过局部电刺激测定应用区域神经根传导速率。

25 系列-3：类似于系列 2，将 13 只猪自体髓核置于它们的骶尾马尾。5 只猪(体重 25 kg)术前静脉注射 100 mg Remicade^R (infliximab)，给 8 只猪在术前皮下注射 12.5 mg Enbrel^R (etanercept)，并于术后 3 天再皮下注射 12.5 mg Enbrel^R。应用髓核后 7 天按照系列-2 通过局部电刺激检测应用区域神经根传导速率。

结果

系列-1：发现 TNF- α 存在于髓核细胞中。

系列-2：TNF- α 选择性抗体限制了神经传导速率的降低，但是与对照系列相比不具有统计学意义。然而，用多西环素治疗显著阻断了髓核诱导的传导速率的降低。

系列-3：用这两种药物治疗后发现两种药物 (infliximab 和 etanercept) 有效阻断髓核诱导的神经损伤并观察到正常的平均神经传导速率。

结论

首次发现，一种特异性物质即肿瘤坏死因子- α 与局部应用髓核后对神经根产生的作用有关。虽然该物质的此类作用可与其它类似物质协同发生，但是本研究的数据可能对继续了解髓核的生物活性具有重要意义，并且可能对将来的坐骨神经痛治疗策略也具有潜在的用途。

以前认为髓核在椎间盘突出处仅作为非生物活性组织组分压迫脊神经根，最近发现它具有高度活性，当在硬膜外应用(24,37,38,41,42)时引起邻近神经根的结构和功能的双重变化。因此确证自体髓核可能诱导轴索变化和特征性髓磷脂损伤(24,38, 41,42)、增加血管渗透性(9,44)、血管内凝血作用(24,36)，并且确证髓核细胞的膜结合结构或物质与这些作用有关(24,37)。还发现甲基强的松龙和环孢菌素 A (2,38)有效阻断这些作用。严格考察这些数据，人们认识到至少有一种细胞因子即肿瘤坏死因子 α (TNF- α)与所有这些作用有关。为了判定 TNF- α 是否参与髓核诱导的神经根损伤，鉴定 TNF- α 存在于髓核细胞中并研究髓核诱导作用是否能够被多西环素、可溶性 TNF-受体以及选择性 TNF 单克隆抗体所阻断，将后者同时局部应用于髓核和全身应用。

材料和方法

系列-1，在猪髓核细胞中存在 TNF- α 。

从取自一只作它用猪的腰椎和胸椎椎间盘(总数为 13)获得髓核(NP). 将 NP 在 Ham's F12 培养基(Gibco BRL, Paisley Scotland)中洗涤一次, 然后离心并在 37°C 下于 25 cm² 组织培养瓶中以 5 ml 胶原酶的 Ham's F12 培养基(0.8 mg/ml, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)溶液中悬浮 40 分钟. 将分离的 NP-细胞团悬浮于补充 1% 的 200 mM L-谷氨酰胺(Gibco BRL, Paisley, Scotland)、50 µg/ml 硫酸庆大霉素(Gibco BRL, Paisley, Scotland)及 10% 胎牛血清(FCS)的 DMEM/F12 1:1 培养基(Gibco BRL, Paisley, Scotland) 中. 将细胞在 37°C 及 5%CO₂ 的空气中培养 3-4 周, 然后直接培养于经组织培养基处理的载玻片上(Becton Dickinson & Co Labware, Franklin Lakes, NJ, 美国). 在载玻片上培养 5 天后用丙酮将细胞原位固定 10 分钟. 将不相关抗原用 3% H₂O₂ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, 美国)封闭 30 分钟及用马血清(ImmunoPure ABC, 过氧化酶鼠 IgG 染色试剂盒 nr.32028, Pierce, Rockford, IL)封闭 20 分钟后, 加入 1:10、1:20 及 1:40 稀释的一抗(抗猪 TNF-α 单克隆纯化抗体, Endogen, Cambridge, MA, 美国)在 +40°C 下过夜. 作为对照, 以同样的方式应用悬于 PBS (磷酸盐缓冲盐水, Merck, Darmstadt, 德国)中的 BSA (牛血清白蛋白, Intergen Co, New York, 美国). 次日用含 1% BSA 的 PBS 洗涤这些细胞并加入二抗(ImmunoPure ABC, 过氧化酶鼠 IgG 染色试剂盒 nr.32028, Pierce, Rockford, IL)处理 30 分钟. 为促进该反应, 再使这些细胞与抗生素蛋白-生物素(Avidin-Biotin)复合物作用 30 分钟(ImmunoPure ABC, 过氧化酶鼠 IgG 染色试剂盒 nr.32028, Pierce, Rockford, IL). 然后将这些细胞在含 20 mg DAB (3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐 nr.D-5905, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, 美国)和 0.033 ml 3% H₂O₂ 的 10 ml 盐水中反应 10 分钟. 将细胞用 PBS 洗涤, 在系列乙醇中脱水, 在消除系统误差的情况下置于光学显微镜下由观察者观测, 出现褐色着色表明存在 TNF-α.

系列-2, 神经生理学评价:

给 13 只猪(体重 25-30 kg) 肌内注射 20 mg/kg 体重的 Ketalar^R (氯胺酮 50 mg/ml, Parke-Davis, Morris Plains, New Jersey) 以及静脉注射 4 mg/kg 体重的 Hypnodil^R (methomidate chloride 50 mg/ml, AB Leo, Helsingborg, 瑞典) 和 0.1 mg/kg 体重的 Stresnil^R (阿扎哌隆 2 mg/ml, Janssen Pharmaceutica, Beerse, 比利时)。通过额外静脉注射 2 mg/kg 体重 Hypnodil^R 和 0.05 mg/kg 体重 Stresnil^R 维持麻醉。术后还给这些猪静脉注射 0.1 mg/kg Stesolid Novum^R (安定, Dumex, Helsingborg, 瑞典)。

通过腹膜后方法(42)从第 5 腰椎椎间盘收集髓核。通过对第一尾椎的中线切口及椎板切除术将约 40 mg 髓核应用于骶尾的马尾。4 只猪未予进行任何处理(未处理)。给另外 4 只猪在 1 小时内静脉滴注含 100 mg 多西环素(Vibramycin, Pfizer Inc., New York, USA) 的 100 ml 盐溶液。对于 5 只猪, 应用髓核前, 将其与 100 gl 系列 1 中所用 1,11 mg/ml 抗 TNF- α 抗体悬浮液混合。

应用后 3 天, 通过肌内注射 20 mg/kg 体重 Ketalar^R 及静脉内注射 35 mg/kg 体重 Pentothal^R (硫喷妥钠, Abbott 实验室, 芝加哥, IL) 将这些猪再麻醉。这些猪利用人工呼吸装置换气。通过静脉大量注射 100 mg/kg 体重氯醛糖(α -D (+)-葡萄糖-氯醛糖(Merck, Darmstadt, 德国) 及连续供给 30 mg/kg/小时氯醛糖维持麻醉。进行第 4 骶椎至第 3 尾椎的椎板切除术。将这些神经根用 Spongostane^R (Ferrosan, 丹麦) 覆盖。持续监测局部组织温度并用加热灯将温度保持在 37.5-38.0°C。

用两个与 Grass SD9 刺激器(Grass Instrument Co., Quincy, MA) 相连的 E2 皮下铂针电极(Grass Instrument Co., Quincy, MA) 刺激马尾, 所述电极轻轻地首先置于马尾的颅侧前 10 mm, 然后间断性置于尾侧距暴露区 10 mm 处。为确保只记录源自暴露神经纤维的脉冲, 切断源自两个刺激位点之间的椎管神经根。通过置入尾部脊柱旁肌肉的两个相距约 10 mm 的皮下铂针电极记录 EMG。该方法具有可重复性并测量马尾神经根运动神经纤维机能。使用带有 Superscope 软件和 MacAdiosII AID 转换器(GW Instrument, Sommerville, MA) 及 Grass P18

前置放大器(Grass Instrument Co., Quincy, MA)的 Macintosh IIci 计算机观察 EMG。测定两次记录的第一 EMG 峰之间的距离，并用卡钳测量马尾上两个刺激位点间的距离。由此从这两个测量值计算这两个刺激位点之间的神经传导速率。

5 进行神经生理学分析的人员不知道各动物的实验方案，并在完成全部研究后将数据分成三个实验组并通过 Student's t 检验判定各组间统计学差异。该实验的实验方案得到当地动物研究伦理委员会许可。

10 系列-3：类似系列-2，将 13 只猪自体髓核置于其骶尾的马尾。5 只猪(体重 25 kg)在术前静脉注射 100 mg 人/鼠单克隆抗体 Remicade^R (infliximab, Immunex Corporation, Seattle, WA 98101, 美国)，给 8 只猪术前皮下注射 12.5 mg Enbrel^R (etanercept, Centocor B.V., Leiden, 荷兰)及在术后 3 天再皮下注射 12.5 mg Enbrel^R。应用髓核后 7 天按照系列-2 通过局部电刺激检测应用区域神经根传导速率。为作双盲研究，神经生理学评价与另外一个研究并列进行，并且进行所述分析的人员不知道每只特定动物接受哪种研究及何种处理。由于预先已知应用髓核或脂肪(对照)7 天后的神经传导速率，所以在系列-3 中不包括未处理动物。通过使用 ANOVA 和 Fisher's PLSD 评价 infliximab 和 etanercept、未治疗的髓核(源自先前数据的阳性对照)以及腹膜后应用脂肪(源自先前数据的阴性对照) 的各组之间的 5% 的统计学差异。

20

结果

系列-1，在猪髓核细胞中存在 TNF- α

染色载玻片的光学显微镜观察实例。在以溶于 PBS 的 BSA 作为“一抗”(对照)的切片中未观察到染色，证实没有标记或显现不相关抗原。当以 1:40 稀释液应用抗 TNF- α 抗体时只有较弱的染色。然而随抗体稀释度的减少染色增强。染色见于细胞体中，而无法区分 TNF- α 是位于胞浆、还是在细胞表面结合于细胞膜或两种并存。

系列-2，神经生理学评价

与上述试验相似，应用未修饰的髓核而且未作任何处理时引起神经传导速率的降低(表 1)，而用多西环素处理完全阻断了这种降低(Student's t 检验， $p<0.01$)。局部应用抗 TNF- α 抗体也部分阻止这种减少，但是不象多西环素完全阻断且与未处理系列相比无统计学意义。

5 系列-3，因为这两个处理组的平均神经传导速率与先前研究中所见的脂肪-应用系列的平均传导速率(表 2)接近，所以用这两种药物治疗似乎阻止了髓核诱导的神经根传导速率的降低。这两种药物与应用髓核但是没有作任何治疗的组相比，均具有统计学意义。

10 表 1-系列-2

<u>治疗</u>	<u>n</u>	<u>NCV (m/s±SD)</u>
局部应用抗 TNF- α	5	64±28
多西环素	4	76±9
未治疗	4	46±12

表 2-系列-3

<u>治疗</u>	<u>n</u>	<u>NCV (m/s±SD)</u>
脂肪 *	5	76±11
Embel ^R	8	78±14
Remicade ^R	5	79±15
未治疗 *	5	45±19

* 包括参考文献第 42 条 Olmarker 等，1993 数据

15 讨论

本研究的数据证实，TNF- α 可见于猪的髓核细胞。如果局部应用选择性单克隆抗体阻断 TNF- α ，则部分阻断所述髓核诱导的神经根传导速率的降低，但是与未治疗动物系列相比无统计学意义。然而，如果用多西环素、infliximab 及 etanercept 全身治疗以抑制 TNF- α ，则显

著阻止神经传导速率的降低。

近几年，已证实局部应用自体髓核可损伤邻近的神经根。因此椎间盘突出中所见到的神经根损伤显然不可能仅仅是由于神经根的机械变形，而且也可能由于未知的与硬膜外存在的髓核突出相关的“生化作用”所致。虽然这一新的研究领域进行了许多实验研究，但是对所涉及的机理和物质尚未完全了解。已发现局部应用自体髓核可诱导轴索损伤(24,37,38,40-42)、髓磷脂鞘的特征性损伤(24,38,40-42)、局部血管渗透性增加(9,36,44)、血管内凝血作用、神经内血流减少(43)以及白细胞趋向性(36)。已发现髓核相关作用可被甲泼尼龙(38)和环孢菌素 A (2)有效阻断，以及被消炎痛 (3)和利多卡因 (69)轻度有效阻断。此外，已知这些作用由髓核细胞介导 (37)，尤其是由与细胞膜结合的物质或结构介导 (25)。当严格考察这些数据时，显然至少一种特异的细胞因子，即肿瘤坏死因子 α (TNF- α)可能与所观察的这些作用相关。TNF- α 可诱导神经损伤 (29,31,45,50,66)，主要表现为特征性髓磷脂损伤，该损伤与髓核诱导的髓磷脂损伤(29,47,51,54,62,64,66,70)非常相似。TNF- α 还可导致血管渗透性增加(47,66)及启动凝血反应(22,34,63)。此外，TNF- α 可被类固醇(4,8,21,61,68)及环孢菌素 A (11,55,67,68)阻断。然而 NSAID 对 TNF- α 的阻断作用不是如此显著(14,17,20)，而利多卡因的阻断作用非常弱或相反(5,32,46,60)。最近观察到局部应用髓核可引起大鼠疼痛相关性作用，尤其是热痛觉过敏(23,40)。还发现 TNF- α 与这类疼痛作用的变化相关(12,35,56,66)，并且还与一般神经病相关(30,54,56,57)。然而没有评价 TNF- α 可能存在于髓核细胞的研究。

为了评价 TNF- α 是否与所观察到的髓核诱导的神经根传导速率的降低相关，有必要首先分析髓核细胞中是否存在 TNF- α 。所述数据清楚地表明 TNF- α 存在于这些细胞中。TNF- α 作为与膜结合的前体(前 TNF)产生，该前体由锌依赖性金属内肽酶(TNF- α 转化酶，TACE)裂解细胞膜激活(6,15,16,48,49)。因此这可能与仅应用自体髓核细胞的细胞膜诱导神经传导速率降低的实验结果密切相关，此结果表明该作用通

过膜结合物质介导。其次，TNF- α 的作用得以调控的方式阻断。那么应用前我们首先选择将与系列-1 免疫组化所用抗体相同的选择性抗体用于髓核，已知该抗体还可阻断 TNF- α 的作用。我们还选择用多西环素治疗所述猪，已知多西环素阻断 TNF- α (26,27,33,52,53)。然而由于多西环素制剂的 pH 值低，所以选择它通过静脉注射治疗这些猪，而不是局部加入应用于髓核，因为发现低 pH 髓核加强髓核的作用 (38,39)。

本研究还包括两种最近开发的特异性抑制 TNF- α 的药物。
 Infliximab 是由人抗体恒定区和鼠抗体的可变区组成的单克隆抗体，它
 特异性结合人 TNF- α 。与在系列-2 中 3 天观察期内所使用的单克隆抗
 10 体相反，Infliximab 不是局部应用于自体移植的髓核，而是以临床推荐
 剂量(4 mg/kg)全身给予。Etanercept 是由人 IgG Fc 部分组成的二聚体
 15 二融合蛋白。该药物以与小儿科推荐使用剂量(0.5 mg/kg，一周两次)
 相当的剂量给药。

关于神经传导速率的数据表明，所述神经传导速率的降低完全被
 全身性治疗阻断，并且这些系列中的神经传导速率与先前研究中应用
 对照物质(腹膜后脂肪)后的传导速率(42)接近。将抗 TNF- α 抗体应用于
 髓核还部分阻止了神经传导速率的降低，然而不如多西环素显著，并
 且由于数据的标准差较大，该系列中的速率与未处理动物系列中的速
 20 率无统计学差异。

局部抗 TNF- α 抗体治疗只部分阻断髓核诱导的神经传导速率的降
 低以及这些数据标准差高的事实可能至少有三种不同的解释。首先，
 如果看一下该组内的具体数据，发现 2 只动物神经传导速率低(平均
 25 37.5 m/s) 而 3 只动物神经传导速率高(平均 81.3 m/s)。因此在抗 TNF- α 治疗系列中有两组明显不同的数据。这将说明高标准差的原因并可能
 提示在 3 只动物中阻断作用是充分的而在 2 只动物中阻断作用是不充
 分的。这些动物中阻断作用的缺乏可能只是基于与 TNF- α 分子相关的
 抗体量不充足，而且使用更高剂量的抗体时，甚至在这些动物中 TNF- α

作用会因此被阻断。那么这种情况理论上可能提示 TNF- α 单独与所观察的髓核诱导作用有关，并且由于抗体量太低以至这一点不能由实验证实。

其次，还已知四环素如多西环素和米诺环素可阻断许多细胞因子和其它物质。例如它们可阻断 IL-1 (1,28,58)、IFN γ (27)、NO 合成酶以及金属蛋白酶(1,53,58)。尤其是已知 IL-1 和 IFN γ 与 TNF- α 协同作用，而且已知它们或多或少具有神经毒性(7,10,13,18,19,56,59)。类固醇和环孢菌素 A 也阻断这些物质，这与先前对髓核诱导的神经根损伤的观察结果非常一致，证实髓核诱导的作用可被这些物质阻断(8,67)。因此还可以考虑选择性阻断 TNF- α 可能不足以完全阻断髓核诱导的对神经功能的作用的可能性，从而其它协同物质的同时阻断也是必要的。因此，另一方面，该情况提示不仅仅是 TNF- α 影响髓核诱导的作用，而且被多西环素阻断的其它协同物质可能是必需的。

第三种解释可能是髓核中 TNF 含量可能足以启动神经根局部病理生理级联反应，包括血管渗透性增加和全身白细胞的聚集以及募集作用。然而正是这些白细胞含有大量 TNF- α ，而足够剂量的全身治疗阻断这些白细胞的作用，并由此也阻断导致神经损伤的过程是必需的。

TNF- α 可具有各种病理生理作用。它可直接作用于组织如神经组织和血管，它可触发其它细胞生成其它致病物质，并可触发炎性细胞和神经组织局部的 Schwann 细胞释放更多的 TNF- α (65)。因此就是这个原因使人们相信即使少量 TNF- α 可能足以启动这些过程，以及存在着细胞因子生成细胞的局部募集，然后使其它细胞因子以及 TNF- α 的产生和释放增加。因此 TNF- α 可能起作病理生理过程的“点火键”作用并对髓核诱导神经损伤之后的病理生理级联反应的启动起重要作用。然而 TNF- α 的主要作用可能来自募集、聚集甚至可能是渗出的白细胞，并且只有通过全身治疗才可能实现成功的药理阻断。

总之，虽然从所述实验结果不能完全了解 TNF- α 的确切作用，但

是我们可以得出的结论是：首次提出一种特异性物质(TNF- α)与髓核诱导的神经根损伤有关。这一新的信息可能对继续了解髓核诱导的神经损伤以及提出干预 TNF- α 和相关物质的药理作用以治疗坐骨神经痛在将来临床使用中的潜力问题是非常重要的。

因此，免疫组化证实在猪髓核细胞中存在 TNF- α 。局部应用单克隆抗体阻断 TNF- α 部分限制了髓核诱导的神经根传导速率的降低，而用多西环素、infliximab 及 etanercept 静脉内注射治疗显著阻断这种降低作用。这些数据首次将一特异性物质 TNF- α 与髓核诱导的神经损伤联系起来。

已证实氨基胍通过抑制可诱导的一氧化氮合成酶从而抑制在神经根损伤部位释放一氧化氮(NO)，因此氨基胍是抑制 TNF- α 的释放激发产生的化合物的一种化合物。

本发明的化合物可以各种剂型给予，如以片剂、胶囊剂、糖或膜包衣片剂、液体溶液剂的形式口服；以栓剂形式由直肠给药；胃肠外给药如肌肉内或静脉内注射或滴注。对不同临床综合症的治疗方案必须适合于通常需要考虑的病理类型，还有给药途径、所述化合物的给药形式以及受治患者的年龄、体重及病情。

通常对需要这类化合物的所有疾病采用口服途径。在紧急情况下优选静脉内注射。为此本发明的化合物可以约 20-1500 mg/天的剂量口服给药。当然可调节这些剂量方案以获得最佳的治疗反应。

当然，包含本发明化合物与药学上可接受的载体或稀释剂的药用组合物的性质取决于所需要的给药途径。该组合物可用常用成分以常规方式配制。例如本发明的组合物可以水溶液剂或油溶液剂或悬浮剂、片剂、小丸剂、明胶胶囊剂(硬胶囊或软胶囊)、糖浆剂、滴剂或栓剂的形式给予。

因此，对于口服给药，包含本发明化合物的药用组合物优选为片剂、小丸剂或明胶胶囊剂，它们含有所述活性物质以及稀释剂，例如乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素；润滑剂如二氧化硅、

滑石、硬脂酸、硬脂酸镁或硬脂酸钙和/或聚乙二醇；或者它们也可包含粘合剂如淀粉、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、阿拉伯胶、黄芪胶、聚乙烯吡咯烷酮；崩解剂如淀粉、海藻酸、海藻盐、淀粉羟乙酸钠、微晶纤维素；泡腾剂如碳酸盐和碳酸；染料；甜料；湿润剂如卵磷脂、聚山梨醇酯、十二烷基硫酸盐以及用于配制药用组合物的基本无毒的药学惰性物质。所述药用组合物可以已知的方式生产，例如通过混合、成粒、制片、糖包衣或膜包衣工艺方法。在膜包衣情况下可选择化合物以在肠道吸收的适当部位释放并获得最大功效。因此可用 pH 依赖性膜形成剂以使其照此在肠道内吸收，所以通常使用不同的邻苯二甲酸盐或丙烯酸/甲基丙烯酸衍生物以及聚合物。

用于口服给药的液体分散剂可以是如糖浆剂、乳剂及悬浮剂。

所述糖浆剂可包含如蔗糖、蔗糖和甘油和/或甘露醇和/或山梨醇作为载体。

所述悬浮剂和乳剂可包含例如天然胶，如阿拉伯胶、黄原胶、琼脂、藻酸钠、果胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯醇作为载体。

所述肌肉内注射的悬浮剂或溶液剂可包含所述活性化合物以及药学上可接受的载体如无菌水、橄榄油、油酸乙酯、二元醇如丙二醇，而且如果有此需要，可包含适当量的利多卡因盐酸盐。也可加入激发注射效果的辅助剂。

所述静脉内注射或滴注的溶液剂可包含如无菌水或最好是无菌等渗盐溶液作为载体以及用于活性化合物注射剂领域的辅助剂。

所述栓剂可包含所述活性化合物以及药学上可接受的载体如可可油聚乙二醇、聚乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯表面活性剂或卵磷脂。

参考文献

1. Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB. 四环素作用的新机制：对一氧化氮合成的影响。 *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14014-9.
- 5 2. Arai I, Konno S, Otani K, Kikuchi S, Olmarker K. 环孢菌素 A 阻断髓核对脊神经根的毒性作用。手稿。
3. Arai I, Mao GP, Otani K, Konno S, Kikuchi S, Olmarker K. 消炎痛在邻近神经根中阻断髓核相关作用。手稿。
- 10 4. Baumgartner RA, Deramo VA, Beaven MA. 免疫细胞系中细胞因子合成和释放的组成和诱导机制。 *J Immunol* 1996; 157: 4087-93.
- 5 5. Bidani A, Heming TA. 利多卡因在尘细胞中对胞质 pH 调节和刺激诱导的效应物机能的作用。 *Lung* 1997; 175: 349-61.
- 15 6. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. 从细胞中释放肿瘤坏死因子- α 的金属蛋白酶解离因子(disintegrin)。 *Nature* 1997; 385: 729-33.
7. Bluthe RM, Dantzer R, Kelley KW. 白介素-1 介导小鼠肿瘤坏死因子 α 的作用而不是代谢作用。 *Eur J Pharmacol* 1991; 209: 281-3.
- 20 8. Brattsand R, Linden M. 糖皮质激素对细胞因子的调节作用：在细胞研究中的机制和作用。 *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 81-90.
9. Byr öd G, Otani K, Rydevik B, Olmarker K. 对脊神经根硬膜外应用髓核诱导神经组织血管渗透性的迅速增加。手稿。
- 25 10. Chao CC, Hu s, Ehrlich L, Peterson PK. 白介素-1 和肿瘤坏死因子 α 协同作用介导神经毒性：一氧化氮和 N-甲基-D-天冬氨酸受体的参与。 *Brain Behav Immun* 1995; 9: 355-65.
11. Dawson J, Hurtenbach U, MacKenzie A. 环孢菌素 A 通过非 T 细胞依赖性机制抑制体内白介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的生成，而不是

- 白介素-6 的生成。 Cytokine 1996; 8: 882-8.
12. DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ. 两种单一神经病动物模型中细胞因子和生长因子免疫组化脊髓分布形态。 Brain Res 1997; 759: 50-7.
- 5 13. Gradient RA, Cron KC, Otten U. 白介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 协同作用刺激从培养的大鼠星形细胞中释放神经生长因子(NGF)。 Neurosci Lett 1990; 117: 335-40.
- 10 14. Garcia-Vicuna R, Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, del Pozo MA, Moilinedo F, Cabanas C, Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F. 普康类非类固醇抗炎药物阻止细胞因子诱导的白细胞粘附受体的变化。 Arthritis Rheum 1997; 40: 143-53.
- 15 15. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drumond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL 等。 用金属蛋白酶处理肿瘤坏死因子- α 前体。 Nature 1994; 370: 555-7.
16. Gazelle EJ, Banda MJ, Leppert D. 免疫中的基质金属蛋白酶。 J Immunol 1996; 156: 14.
- 20 17. Gonzalez E, de la Cruz C, de Nicolas R, Egido J, Herrero-Beaumont G. 非类固醇抗炎药物对骨化病患者血细胞产生细胞因子和其它炎性介质的长期作用。 Agents Actions 1994; 41: 171-8.
18. Hartung HP, Jung S, Stoll G, Zielasek J, Schmidt B, Archelos JJ, Toyka KV. CNS 和 PNS 脱髓鞘病中的炎性介质。 J Neuroinununol 1992; 40: 197-210.
- 25 19. Hattori A, Iwasaki S, Murase K, Tsujimoto M, Sato M, Hayashi K, Kohno M. 肿瘤坏死因子与白介素 I 和干扰素- γ 显著协同作用刺激成纤维细胞产生神经生长因子中。 FEBS Lett 1994; 340: 177-80.
20. Herman JH, Sowder WG, Hess EV. 非类固醇抗炎药物对假膜修复术诱导的骨吸收的调节作用。 J Rheunutol 1994; 21: 338-43.
21. Iwamoto S, Takeda K. [TNF 体外细胞毒性的可能机制]。 Hum Cell 1990; 3: 107-12.

22. Jurd KM, Stephens CJ, Black MM, Hunt BJ. 皮肤节脉管炎中内皮细胞的活化. Clin Exp Dermatol 1996; 21: 28-32.
23. Kawakami M, Tamaki T, Weinstein JN, Hashizume H, Nishi H, Meller ST. 大鼠椎间盘同种移植植物产生的疼痛相关病症的发病机制. Spine 1996; 21: 2101-7.
24. Kayama S, Konno S, Olmarker K, Yabuki S, Kikuchi S. 环状纤维变性切口引起的神经根形态、血管及功能的变化: 一个实验研究. Spine 1996; 21: 2539-43.
25. Kayamas, Olmarker K, Larsson K, Sjögren-Jansson E, Lindahl A, Rydevik B. 培养的自体髓核细胞诱导脊神经根结构和功能的变化. Spine, 1998, 23: 90: 2155-58.
26. Kloppenburg M, B ~ an BM, de Rooij-Dijk HH, Miltenburg AM, Daha MR, Breedveld FC, Dijkmans BA, Verweij C. 四环素衍生的米诺环素差别影响单核细胞和T淋巴细胞产生细胞因子. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 934-40.
27. Kloppenburg M, Verweij CL, Miltenburg AM, Verboeven AJ, Daha MR, Dijkmans BA, Breedveld FC. 四环素类对T细胞活化的影响. Clin Exp Immunol 1995; 102: 635-41.
28. Lamster IB, Pullman JR, Celenti RS, Grbic JT. 四环素的纤维化治疗对缝液(crevicular fluid) β -葡萄糖醛酸酶和白介素-1 β 的作用. I Clin Periodontol 1996; 23: 816-22.
29. Liberski PP, Yanagihara R, Nerurkar V, Gajdusek DC. 对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)引起的视神经损伤的超微结构的进一步研究: 与实验性 Creutzfeldt-Jakob 病的比较. Acta Neurobiol Exp (Warsz) 1994; 54: 209-18.
30. Lin XH, Kashima Y, Khan M, Heller KB, Gu XZ, Sadun AA. 对 AIDS 病患者视神经中的 TNF- α 的免疫组化研究. Curr Eye Res 1997; 16: 1064-8.

31. Madigan MC, Sadun AA, Rao NS, Dugel PU, Tenhula WN, Gill PS. 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)引起的兔视神经病变. *Neurology* 1996; 18: 176-84.
- 5 32. Matsumori A, Ono K, Nishio R, Nose Y, Sasayama S. 氨碘酮抑制人单核细胞产生肿瘤坏死因子 α : 其在心脏衰竭中可能的作用机制. *Circulation* 1997; 96: 1386-9.
- 10 33. Milano S, Arcoleo F, D'Agostino P, Cillari E. 腹膜内注射四环素保护小鼠免于下调各器官中可诱导性一氧化氮合酶及血中细胞因子和硝酸盐分泌的致死性内毒素血症. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 117-21.
34. Nawroth P, Handley D, Matsueda G, De Waal R, Gerlach H, Blohm D, Stem D. 肿瘤坏死因子/恶液质素诱导的 meth A 纤维肉瘤中血管内的纤维蛋白形成. *J Exp Med* 1988; 168: 637-47.
- 15 35. Oka T, Wakugawa Y, Hosoi M, Oka K, Hori T. 脑室内注射肿瘤坏死因子- α 诱导大鼠热痛觉过敏. *Neuroimmunomodulation* 1996; 3: 135-40.
36. Olmarker K, Blomquist J, Stromberg J, Nannmark U, Thomsen P, Rydevik B. 髓核的致炎性质. *Spine* 1995; 20: 665-9.
- 20 37. Olmarker K, Brisby H, Yabuki S, Nordborg C, Rydevik B. 正常、冷冻及透明质酸酶消化的髓核对神经根结构和功能的影响. *Spine* 1997; 22: 4715; 讨论 476.
38. Olmarker K, Byrod G, Comefjord M, Nordborg C, Rydevik B. 甲基强的松龙对髓核诱导的神经根损伤的作用. *Spine* 1994; 19: 1803-8.
- 25 39. Olmarker K, Lwabuchi M, Larsson K, Rydevik B. 退化的髓核对神经根传导速率的体外作用. 手稿.
40. Olmarker K, Myers RR. 坐骨神经痛的发病机理: 髓核突出和脊神经根变形及 DRG 的作用. *Pain*, 1998, 78: 9-105.

41. Olmarker K, Nordborg C, Larsson K, Rydevik B. 自体髓核诱导的脊神经根超微结构的变化。Spine 1996; 21: 411-4.
42. Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C. 自体髓核引起猪马尾神经根的神经生理学和组织学变化 [见评论]。Spine 1993; 18: 1425-32.
- 5 43. Otani K, Arai I, Mao GP, Konno S, Olmarker K, Kikuchi S. 髓核引起的神经根损伤。血流和神经传导速率的关系。手稿。
44. Otani K, Mao GP, Arai I, Konno S, Olmarker K, Kikuchi S. 髓核引起神经根的血管渗透性增加。手稿。
45. Petrovich MS, Hsu HY, Gu X, Dugal P, Heller KB, Sadun AA.
10 乙酮可可碱对 TNF- α 介导的兔视神轴索变性的抑制。Neurol Res 1997; 19: 551-4.
46. Pichler WJ, Zanni M, Von Geyterz S, Schnyder B, Mauri-heUweg D, Wendland, T. 人药物特异性 T 细胞克隆产生高浓度的 IL-5。 Int Arch Allergy Immunol 1997; 113: 177-80.
- 15 47. Redford EJ, Hall SM, Smith KJ. 神经内注射肿瘤坏死因子诱导的血管变化和脱髓鞘作用。Brain 1995; 118: 869-78.
48. Robache-Gallea S, Bruneau JM, Robbe H, Morand V, Capdevila C, Bhatnagar N, Chouaib S, Roman-Roman S. 肿瘤坏死因子- α 转化活性的部分纯化和特性鉴定。Eur J Immunol 1997; 27: 1275-82.
- 20 49. Rosendahl MS, Ko SC, Long DL, Brewer MT, Rosenzweig B, Hedl E, Anderson L, Pyle SM, Moreland J, Meyers MA, Kohno T, Lyons D, Lichenstein HS. 从锌金属蛋白酶 ADAM 家族鉴定和表征前肿瘤坏死因子- α 加工酶的。J Biol Chem 1997; 272: 24588-93.
50. Said G, Hontebeyrie-Joskowicz M. 巨噬细胞活化引起的神经损伤。Res Immunol 1992; 143: 589-99.
- 25 51. Sehnaj KW, Raine CS. 肿瘤坏死因子体外介导髓磷脂和少突神经胶质细胞的损伤。Ann Neurol 1988; 23: 339-46.
52. Shapira L, Houri Y, Barak V, Halabi A, Soskoine WA, Stabholz A. 人单核细胞对牙周病牙齿的牙骨质提取物的应答：四环素的调节

- 作用。 *J Periodontol* 1996; 67: 682-7.
- 5 53. Shapira L, Houri Y, Barak V, Soskolne WA, Halabi A, stabholz A. 四环素抑制体内 *Porphyromonas* 齿龈炎脂多糖诱导的损伤及体外 TNF- α 加工。 *J Periodontal Res* 1997; 32: 183-8.
- 5 54. Sharief MK, Ingram DA, Swash M. 循环的肿瘤坏死因子 α 与 Guillain-Barre 综合征的电诊断异常相关。 *Ann Neurol* 1997; 42: 68-73.
- 5 55. Smith CS, Ortega G, Parker L, Shearer WT. 环孢菌素 A 阻断人 B 淋巴细胞中肿瘤坏死因子- α 的诱导作用。 *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 383-90.
- 10 56. Sonuner C, Schmidt C, George A, Toyka KV. 金属蛋白酶抑制剂减少实验性神经病小鼠的疼痛相关行为。 *Neurosci Lett* 1997; 237: 45-8.
- 5 57. Sorkin LS, Xiao WH, Wagner R, Myers RR. 肿瘤坏死因子 α 引起初级传入神经纤维损害的异位活性。 *Neuroscience* 1997; 81: 255-62.
- 15 58. Steinmeyer J, Daufeldt S, Taiwo YO. 四环素对白介素-1 治疗的关节软骨的蛋白聚糖酶的药理学作用。 *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 93-100.
- 5 59. Stoll G, Jung S, Jander S, van der Meide P, Hartung HP. 免疫介导的大鼠外周神经系统脱髓鞘作用和 Wallerian 退化作用中的肿瘤坏死因子 α 。 *Neuroimmunol* 1993; 45: 175-82.
- 20 60. Takao Y, Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H. 利多卡因减轻兔氧过量性肺损伤。 *Acta Anaesthesiol Scand* 1996; 40: 318-25.
- 5 61. Teoh KH, Bradley CA, Galt J, Burrows H. 类固醇抑制 warm 心脏手术后细胞因子介导的血管舒张。 *Circulation* 1995; 92: 11347-53.
- 25 62. Tsukamoto T, Ishikawa M, Yamamoto T. TNF- α 对体外髓磷脂形成的抑制作用。 *Acta Neurol Scand* 1995; 91: 71-5.
63. van der Poll T, Jansen PM, Van Zee KJ, Welborn MBr, de Jong I,

Hack CE, Loetscher H, Lesslauer W, Lowry SF, Moidawer LL. 肿瘤坏死因子- α 通过对 p55 受体的特异性作用激活鲎凝血作用和纤维蛋白溶解作用。 Blood 1996; 88: 922-7.

5 64. Villarroya H, Violleau K, Ben Younes-Chennoufi A, Baumann N. 髓磷脂诱导的 Lewis 大鼠实验过敏性脑脊髓炎: tumor necrosis factor alpha levels in serum of cerebrospinal fluid immunohistochemical expression in glial cells and neurophages of optic nerve and spinal cord. J Neuroimmunol 1996; 64: 55-61.

10 65. Wager R, Myers RR. Schwann 细胞产生肿瘤坏死因子 α : 在损伤的非损伤神经中的表达。 Neuroscience 1996; 73: 625-9.

66. Wagner R, Myers RR. 神经内注射 TNF- α 引起神经性疼痛。 Neuroreport 1996; 7: 2897-901.

15 67. Wasaki S, Sakaida I, Uchida K, Kiinura T, Kayano K, Okita K. 环孢菌素 A 对大鼠实验性急性肝损伤的预防作用。 Liver 1997; 17: 107-14.

68. Wershil BK, Furuta GT, Lavigne JA, Choudhury AR, Wang ZS, Galli SJ. 地塞米松环孢菌素 A 通过多重机制抑制肥大细胞-白细胞细胞因子级联反应。 Int Arch Allergy Immunol 1995; 107: 323-4.

20 69. Yabuki S, Kawaguchi Y, Olmarker K, Rydevik B. 利多卡因对髓核诱导的神经根损伤的作用。 Spine, 1998, 23: 29: 2383-89.

70. Zhu J, Bai XF, Mix E, Link H. 外周神经系统中细胞因子的二分式影响实验过敏性神经炎的结果: mRNA 表达 IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 、TNF- β 及溶细胞素的动力学。 Clin Immunol Immunopathol 1997; 84: 85-94.