(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115243692 A
(43)申请公布日 2022.10.25

(21)申请号 202180017585.6

(22)申请日 2021.02.15

(30)优先权数据
2020900433 2020.02.16 AU
2021900204 2021.01.29 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.08.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2021/050128 2021.02.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/159187 EN 2021.08.19

(71)申请人 科微范国际澳大利亚私人有限公司
地址 澳大利亚维多利亚
申请人 帕纳菲克斯公司

(72)发明人 杨龙镇

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王建秀 刘小立

(51)Int.Cl.
A61K 33/36(2006.01)
A61K 9/20(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书64页 附图11页

(54)发明名称

使用偏亚砷酸盐的治疗方法

(57)摘要

本发明关于偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾在以下方法中的用途:a)减少由病毒感染导致的发炎反应的方法,b)治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况的方法,或c)治疗或预防由病毒感染导致的高细胞因子血症的方法。本发明还涉及治疗或预防个体的病毒感染的方法。

CN 115243692 A

1.一种减少个体的由病毒感染导致的发炎反应的方法,其包括向所述个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

2.如权利要求1的方法,其中所述病毒感染为冠状病毒感染。

3.如权利要求2的方法,其中所述冠状病毒为SARS-CoV-2。

4.如权利要求1的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)口服施用。

5.如权利要求1的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

6.一种治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况的方法,其包括向所述个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

7.如权利要求6的方法,其中所述病毒感染为冠状病毒感染。

8.如权利要求7的方法,其中所述冠状病毒感染由SARS-CoV-2引起。

9.如权利要求6的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)口服施用。

10.如权利要求6的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

11.一种治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症(hypercytokinemia)的方法,其包括向所述个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

12.如权利要求11的方法,其中所述病毒感染是冠状病毒的感染。

13.如权利要求12的方法,其中所述冠状病毒为SARS-CoV-2。

14.一种治疗个体的病毒感染的方法,其包括向所述个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

15.如权利要求14的方法,其中所述病毒感染归因于冠状病毒的感染。

16.如权利要求15的方法,其中所述冠状病毒为SARS-CoV-2。

17.如权利要求14的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)口服施用。

18.如权利要求14的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

19.一种治疗个体的冠状病毒感染的方法,其包括向所述个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

20.如权利要求19的方法,其中所述冠状病毒感染由SARS-CoV-2引起。

21.如权利要求19的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)口服施用。

22.如权利要求19的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

23.一种减少罹患由病毒感染导致的发炎病况的个体中的TNF-α、IL-1β和/或IL-6含量的方法,其包括向所述个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

24.如权利要求23的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)口服施用。

25.如权利要求23的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

26.如权利要求1至25中任一项的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以包含以下的组合物施用:

(a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核,其中所述一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化;

和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,且其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

27.如权利要求1至25中任一项的方法,其中所述偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以包含以下的组合物施用:

(a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核:

(i)约5至95%w/w范围的填充剂或稀释剂,

(ii)约10至90%w/w范围的崩解剂,

(iii)约0.1至5%w/w范围的助滑剂,

(iv)约0.1至5%w/w范围内润滑剂,和

(v)任选地0至约30%w/w范围的黏合剂;

和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

其中所述药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化,

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,以及

其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

28.一种药物组合物,当用于通过口服施用减少由病毒感染导致的发炎反应和/或治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况时,所述组合物包含:

(a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核,其中所述一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化;

和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,且其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

29.一种药物组合物,当用于通过口服施用减少由病毒感染导致的发炎反应和/或治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况时,所述组合物包含:

(a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核：

(i)约5至95%w/w范围的填充剂或稀释剂，

(ii)约10至90%w/w范围的崩解剂，

(iii)约0.1至5%w/w范围的助滑剂，

(iv)约0.1至5%w/w范围的润滑剂,和

(v)任选地0至约30%w/w范围的黏合剂；

和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

其中所述药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化，

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,以及

其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

30.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应的药物中的用途。

31.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况的药物中的用途。

32.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症的药物中的用途。

33.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗个体的病毒感染的药物中的用途。

34.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于减少罹患由病毒感染导致的发炎病况的个体中的TNF-α、IL-1β和/或IL-6含量的药物中的用途。

35.如权利要求30至34中任一项的用途,其中所述病毒感染为冠状病毒感染。

36.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗个体的冠状病毒感染的药物中的用途。

37.如权利要求35或36的用途,其中所述冠状病毒感染由SARS-CoV-2引起。

38.如权利要求30至37中任一项的用途,其中所述药物被配制用于口服施用。

39.如权利要求30至38中任一项的用途,其中所述药物包含药物组合物,所述药物组合物包含：

(a)包含偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核,其中所述一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化;和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,且其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

40.如权利要求30至38中任一项的用途,其中所述药物包含药物组合物,所述药物组合物包含：

(a)包含偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)及以下药学上可接受的

赋形剂的实心核：

(i)约5至95%w/w范围的填充剂或稀释剂，

(ii)约10至90%w/w范围的崩解剂，

(iii)约0.1至5%w/w范围的助滑剂，

(iv)约0.1至5%w/w范围的润滑剂,和

(v)任选地0至约30%w/w范围的黏合剂；

和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

其中所述药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化，

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,以及

其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

41.一种用于口服施用的药物组合物,其包含：

(a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核,其中所述一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化；

和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,且其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5%至约15%；

所述药物组合物用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应；

所述药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况；

所述药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症；

所述药物组合物用于治疗个体的病毒感染；

所述药物组合物用于减少罹患由病毒感染导致的发炎病况的个体中的TNF-α、IL-1β和/或IL-6含量;或

所述药物组合物用于治疗个体的冠状病毒感染。

42.一种用于口服施用的药物组合物,其包含：

(a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核：

(i)约5至95%w/w范围的填充剂或稀释剂，

(ii)约10至90%w/w范围的崩解剂，

(iii)约0.1至5%w/w范围的助滑剂，

(iv)约0.1至5%w/w范围的润滑剂,和

(v)任选地0至约30%w/w范围的黏合剂；

和

(b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

其中所述药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化，

其中所述肠溶包衣的重量百分比相对于所述药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w,以及

其中所述包衣厚度为所述药物组合物的厚度的约6.5％至约15％；

所述药物组合物用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应；

所述药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况；

所述药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症；

所述药物组合物用于治疗个体的病毒感染；

所述药物组合物用于减少罹患由病毒感染导致的发炎病况的个体中的TNF-α、IL-1β和/或IL-6含量;或

所述药物组合物用于治疗个体的冠状病毒感染。

使用偏亚砷酸盐的治疗方法

[0001] 本申请要求2020年2月16日提交的澳大利亚临时专利申请号2020900433及2021年1月29日提交的澳大利亚临时专利申请号2021900204的优先权。澳大利亚临时专利申请号2020900433及2021900204的全部内容以引用方式并入本文中。

技术领域

[0002] 本发明关于一种减少个体中由病毒感染所致的发炎反应的方法，及一种治疗或预防个体中由病毒感染所致的发炎病况的方法。

背景技术

[0003] 发炎反应由身体响应于损伤、感染及其他伤害而产生。发炎反应涉及促炎细胞因子及消炎细胞因子两者的级联(cascade)。这些细胞因子之间的平衡通常决定感染或损伤之后的结果。

[0004] 对于感染或损伤之后的成功结果，促炎细胞因子的产生使得血白细胞募集、组织巨噬细胞活化及免疫介质产生。

[0005] 然而，在某些情况下，诸如败血症，或由感染物，诸如病毒，诸如禽流感或某些冠状病毒株(例如SARS-CoV及SARS-CoV-2)感染之后，对感染的发炎反应可引起急性发炎病况，其中存在促炎细胞因子，诸如肿瘤坏死因子α(tumour necrosis factor alpha，TNF-α)、白介素1β(interleukin1beta，IL-1β)及白介素6(interleukin 6，IL-6)的产生失调。此类促炎细胞因子的产生失调可引起肺炎和/或多重器官衰竭，且对易感个体可致命。

[0006] 促炎细胞因子的过量、且在一些情况下失调的分泌及/或产生通常为一些病毒感染中的因素，其可引起疾病症状的快速恶化。举例而言，冠状病毒(coronavirus，CoV)为引起范围介于普通感冒至更严重疾病的疾病之较大病毒家族，且已知会引起促炎细胞因子的增加的、且在一些情况下失调的分泌。冠状病毒之实例包括MERS-CoV、SARS-CoV及SARS-CoV-2。冠状病毒感染的常见病征包括呼吸系统症状、发热、咳嗽、呼吸短促及呼吸困难。在更严重情况下，感染可引起肺炎、严重急性呼吸症候群、肾衰竭及死亡。

[0007] 因此，需要改良的药物组合物用于治疗或预防发炎病况，在所述发炎病况中归因于病毒感染，促炎细胞因子的产生失调。

发明内容

[0008] 本发明人已发现偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)(sodium meta-arsenite，SMA)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)(potassium meta-arsenite，KMA)能够减少或抑制促炎细胞因子TNF-α、IL-1β及IL-6自巨噬细胞的产生。

[0009] 因此，第一方面提供一种减少个体的由病毒感染导致的发炎反应的方法，其包括向所述个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)。

[0010] 另一个第一方面提供偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)，其用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应；或偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝

$As-O^-K^+$)在制备用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应的药物中的用途。

[0011] 本发明人设想SMA及KMA可用于治疗或预防由对病毒感染的发炎反应引起的病况(由病毒感染导致的发炎病况)。

[0012] 因此,第二方面提供一种治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)。

[0013] 另一个第二方面提供偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$),其用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况;或偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)在制备用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况的药物中的用途。

[0014] 第三方面提供一种治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症(hypercytokinemia)的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)。

[0015] 另一个第三方面提供偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$),其用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症;或偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)在制备用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症的药物中的用途。

[0016] 第四方面提供一种治疗个体的病毒感染的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)。

[0017] 另一个第四方面提供偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$),其用于治疗个体的病毒感染;或偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)在制备用于治疗个体的病毒感染的药物中的用途。

[0018] 第五方面提供一种治疗个体的冠状病毒感染之方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)。

[0019] 另一个第五方面提供偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$),其用于治疗个体的冠状病毒感染;或偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)在制备用于治疗个体的冠状病毒感染的药物中的用途。

[0020] 第六方面提供一种减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)。

[0021] 另一个第六方面提供偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$),其用于减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中TNF-α、IL-1β和/或IL-6产生;或偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)在制备用于减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中TNF-α、IL-1β和/或IL-6产生的药物中的用途。

[0022] 第七方面提供一种治疗个体的冠状病毒SARS-CoV-2感染的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)。

[0023] 另一个第七方面提供偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$),其用于治疗个体的冠状病毒SARS-CoV-2感染;或偏亚砷酸钠(O=$As-O^-Na^+$)或偏亚砷酸钾(O=$As-O^-K^+$)在制备用于治疗个体的冠状病毒SARS-CoV-2感染的药物中的用途。

[0024] 第八方面提供一种治疗或预防个体的由归因于病毒感染的升高的TNF-α、IL-1β

及/或IL-6含量介导的疾病或病况的方法，其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)。

[0025] 另一个第八方面提供偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)，其用于治疗或预防个体的由归因于病毒感染的升高的TNF-α、IL-1β及/或IL-6介导的疾病或病况；或偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗或预防个体的由归因于病毒感染的升高的TNF-α、IL-1β及/或IL-6介导的疾病或病况的药物中的用途。

[0026] 第九方面提供一种药物组合物，当用于减少由病毒感染导致的发炎反应，和/或治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况时，该组合物包含偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)。

[0027] 第十方面提供一种药物组合物，当用于通过口服施用减少由病毒感染导致的发炎反应，和/或治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况时，该组合物包含：

[0028] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核，其中该一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化；

[0029] 及

[0030] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

[0031] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w，且其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5％至约15％。

[0032] 第十一方面提供一种药物组合物，当用于通过口服施用减少由病毒感染导致的发炎反应，和/或治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况时，该组合物包含：

[0033] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核：

[0034] (i)约5至95％w/w范围的填充剂或稀释剂，

[0035] (ii)约10至90％w/w范围的崩解剂，

[0036] (iii)约0.1至5％w/w范围的助滑剂，

[0037] (iv)约0.1至5％w/w范围的润滑剂，及

[0038] (v)任选地0至约30％w/w范围的黏合剂；

[0039] 及

[0040] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

[0041] 其中该等药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化，

[0042] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w，及

[0043] 其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5％至约15％。

[0044] 第十二方面提供一种治疗个体的由病毒感染导致的疾病或症状的方法，其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)。

[0045] 另一个第十二方面提供偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)，其用于治疗个体的由病毒感染导致的疾病或症状；或偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗个体的由病毒感染导致的疾病或症状的药物中的用途。

[0046] 本发明提供以下各项：

[0047] 1.一种减少个体的由病毒感染导致的发炎反应的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0048] 2.如第1项的方法,其中该病毒感染为冠状病毒感染。

[0049] 3.如第2项的方法,其中该冠状病毒为SARS-CoV-2。

[0050] 4.如第1项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)是口服施用的。

[0051] 5.如第1项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

[0052] 6.一种治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0053] 7.如第6项的方法,其中该病毒感染为冠状病毒感染。

[0054] 8.如第7项的方法,其中该冠状病毒感染由SARS-CoV-2引起。

[0055] 9.如第6项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)是口服施用的。

[0056] 10.如第6项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

[0057] 11.一种治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症(hypercytokinemia)的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0058] 12.如第11项的方法,其中该病毒感染为冠状病毒导致的感染。

[0059] 13.如第12项的方法,其中该冠状病毒为SARS-CoV-2。

[0060] 14.一种治疗个体的病毒感染的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0061] 15.如第14项的方法,其中该病毒感染归因于冠状病毒导致的感染。

[0062] 16.如第15项的方法,其中该冠状病毒为SARS-CoV-2。

[0063] 17.如第14项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)是口服施用的。

[0064] 18.如第14项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

[0065] 19.一种治疗个体的冠状病毒感染的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0066] 20.如第19项的方法,其中该冠状病毒感染由SARS-CoV-2引起。

[0067] 21.如第19项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)是口服施用的。

[0068] 22.如第19项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

[0069] 23.一种减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0070] 24.如第23项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)是口服施用的。

[0071] 25.如第23项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)以每天2mg至每天20mg范围的剂量施用。

[0072] 26.如第1至25项中任一项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)以包含以下的组合物施用:

[0073] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核,其中该一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化;

[0074] 及

[0075] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

[0076] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,且其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

[0077] 27.如第1至25项中任一项的方法,其中该偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)以包含以下的组合物施用:

[0078] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核:

[0079] (i)约5至95%w/w范围的填充剂或稀释剂,

[0080] (ii)约10至90%w/w范围的崩解剂,

[0081] (iii)约0.1至5%w/w范围的助滑剂,

[0082] (iv)约0.1至5%w/w范围的润滑剂,及

[0083] (v)任选地0至约30%w/w范围的黏合剂;

[0084] 及

[0085] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

[0086] 其中该药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化,

[0087] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药学组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,及

[0088] 其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

[0089] 28.一种药物组合物,当用于通过口服施用减少由病毒感染导致的发炎反应,和/或治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况时,该组合物包含:

[0090] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核,其中该一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化;

[0091] 及

[0092] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

[0093] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,且其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

[0094] 29.一种药物组合物,当用于通过口服施用减少由病毒感染导致的发炎反应,和/或治疗或预防由病毒感染导致的发炎病况时,该组合物包含:

[0095] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核：

[0096] (i)约5至95％w/w范围的填充剂或稀释剂，

[0097] (ii)约10至90％w/w范围的崩解剂，

[0098] (iii)约0.1至5％w/w范围的助滑剂，

[0099] (iv)约0.1至5％w/w范围的润滑剂，及

[0100] (v)任选地0至约30％w/w范围的黏合剂；

[0101] 及

[0102] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

[0103] 其中该药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化，

[0104] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w，及

[0105] 其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5％至约15％。

[0106] 30.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应的药物中的用途。

[0107] 31.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况的药物中的用途。

[0108] 32.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症的药物中的用途。

[0109] 33.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗个体的病毒感染的药物中的用途。

[0110] 34.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量的药物中的用途。

[0111] 35.如第30至34项中任一项的用途，其中该病毒感染为冠状病毒感染。

[0112] 36.偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)在制备用于治疗个体的冠状病毒感染的药物中的用途。

[0113] 37.如第35或36项的用途，其中该冠状病毒感染由SARS-CoV-2引起。

[0114] 38.如第30至37项中任一项的用途，其中该药物被配制用于口服施用。

[0115] 39.如第30至38项中任一项的用途，其中该药物包含药物组合物，该药物组合物包含：

[0116] (a)包含偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核，其中该一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化；

[0117] 及

[0118] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

[0119] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w，且其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5％至约15％。

[0120] 40.如第30至38项中任一项的用途，其中该药物包含药物组合物，该药物组合物包含：

[0121] (a)包含偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)及以下药学上可接受的赋形剂的实心核：

[0122] (i)约5至95％w/w范围的填充剂或稀释剂，

[0123] (ii)约10至90％w/w范围的崩解剂，

[0124] (iii)约0.1至5％w/w范围的助滑剂，

[0125] (iv)约0.1至5％w/w范围的润滑剂，及

[0126] (v)任选地0至约30％w/w范围的黏合剂；

[0127] 及

[0128] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

[0129] 其中该药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化，

[0130] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w，及

[0131] 其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5％至约15％。

[0132] 41.一种用于口服施用的药物组合物，其包含：

[0133] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核，其中该一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化；

[0134] 及

[0135] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

[0136] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w，且其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5％至约15％；

[0137] 该药物组合物用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应；

[0138] 该药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况；

[0139] 该药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症；

[0140] 该药物组合物用于治疗个体的病毒感染；

[0141] 该药物组合物用于减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量；或

[0142] 该药物组合物用于治疗个体的冠状病毒感染。

[0143] 42.一种用于口服施用的药物组合物，其包含：

[0144] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核：

[0145] (i)约5至95％w/w范围的填充剂或稀释剂，

[0146] (ii)约10至90％w/w范围的崩解剂，

[0147] (iii)约0.1至5％w/w范围的助滑剂，

[0148] (iv)约0.1至5％w/w范围的润滑剂，及

[0149] (v)任选地在0至约30％w/w范围的黏合剂；

[0150] 及

[0151] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣；

[0152] 其中该药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用

最小化，

[0153] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6％w/w至约20％w/w，及

[0154] 其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5％至约15％；

[0155] 该药物组合物用于减少个体的由病毒感染导致的发炎反应；

[0156] 该药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况；

[0157] 该药物组合物用于治疗或预防个体的由病毒感染导致的高细胞因子血症；

[0158] 该药物组合物用于治疗个体的病毒感染；

[0159] 该药物组合物用于减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量；或

[0160] 该药物组合物用于治疗个体的冠状病毒感染。

附图说明

[0161] 图1A至图1C为展示经培养大鼠原代巨噬细胞的平均值(±SEM)细胞毒性和生存率的图，所述巨噬细胞在含有100ng/mL的脂多醣(lipopolysaccharide，LPS)及偏亚砷酸钠(A；30、10、7、5、3、1、0.3及0.1μM)或对照(B及C)；n＝3的培养基中培育24小时。

[0162] 图2A至图2F为展示经培养原代大鼠巨噬细胞的平均值(±SEM)TNF-α(A)、IL-1β(C)或IL-6(E)分泌及生存率的图，所述巨噬细胞在含有100ng/mL的LPS及各种浓度的偏亚砷酸钠(30、10、7、5、3、1、0.3及0.1μM)相对于阳性(塞来昔布(celecoxib))及阴性(媒剂)对照(B，D及F)；n＝3的培养基中培育24小时；没有共同文字的值有显著的不同(p≤0.05)。

[0163] 图3A及图3B为：A.展示由RAW264.7细胞在用LPS刺激以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理之后产生一氧化氮的图(即展示偏亚砷酸钠对一氧化氮产生的作用(iNOS分析))；及B.展示在用LPS及偏亚砷酸钠(*：与对照(LPS+)相比，p<0.01)处理之后的细胞生存率的图。

[0164] 图4为展示由RAW264.7细胞在用LPS刺激以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理之后产生前列腺素E2(Prostaglandin E2，PGE2)的图(即展示偏亚砷酸钠对PGE2产生的作用(PGE2分析)；*：与对照(LPS+)相比，p<0.01)。

[0165] 图5为展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中iNOS及COX-2蛋白的表达的蛋白印迹分析(Western blot)(即展示偏亚砷酸钠对iNOS及COX2蛋白表达的作用)。

[0166] 图6为展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中TNF-α及ILD-1β蛋白表达的蛋白印迹分析(即展示偏亚砷酸钠对TNF-α及IL-1β蛋白表达的作用)。

[0167] 图7为展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中如由iNOS及COX-2的RT-PCR确定的mRNA表达的电泳凝胶图(即展示偏亚砷酸钠对iNOS及COX-2基因表达的作用)。

[0168] 图8为展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中的iNOS mRNA表达的图(即展示偏亚砷酸钠对iNOS mRNA表达的作用(实时PCR)；*：与对照(LPS+)相比，p<0.01)。

[0169] 图9为RT-PCR产物的凝胶电泳图,其展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中TNF-α、IL-1β及IFN-βmRNA表达(即展示偏亚砷酸钠对TNF-α、IL-1β及IFN-β基因表达的作用)。

[0170] 图10为展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中的NF-kB转录活性的图(即展示偏亚砷酸钠对LPS诱导的NF-κB转录活性的作用;*:与对照(LPS+)相比,p<0.01)。

[0171] 图11为展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中的NF-kB(p50)及(p65)蛋白表达的蛋白印迹分析(即展示偏亚砷酸钠对NF-kB蛋白表达的作用)。

[0172] 图12为展示用LPS以及用与不用各种浓度的偏亚砷酸钠处理的RAW264.7细胞中IκB及IKK蛋白表达的蛋白印迹分析。

[0173] 图13为展示来自用PAX-1(SMA)、地塞米松(dexamethasone)处理之后或未处理的ARDS小鼠模型的支气管肺泡灌洗液中TNF-α含量的AUC(曲线下面积)值的图。数据展现为平均值±95%置信区间(*:p<0.05,**:P<0.005)

[0174] 图14为展示来自用PAX-1(SMA)、地塞米松(dexamethasone)处理之后或未处理的ARDS小鼠模型的支气管肺泡灌洗液中IL-6含量的AUC(曲线下面积)值的图。数据展现为平均值±95%置信区间(*:p<0.05,**:P<0.005)

[0175] 图15为展示来自用PAX-1(SMA)、地塞米松(dexamethasone)处理之后或未处理的ARDS小鼠模型的支气管肺泡灌洗液中IL-1β含量的AUC(曲线下面积)值的图。数据展现为平均值±95%置信区间(*:p<0.05,**:P<0.005)

[0176] 图16为展示用PAX-1(SMA)、地塞米松处理之后或未处理的ARDS小鼠模型中之小鼠存活率的图(G1(阴性对照,0mg/kg),G2(PAX-1,1.03mg/kg),G3(PAX-1,1.54mg/kg),G4(PAX-1,2.05mg/kg),G5(地塞米松,3mg/kg);**p＜0.005,根据时序(Mantel-Cox)检验与阴性对照(G1)显著差异;***p＜0.0005,根据时序(Mantel-Cox)检验与阴性对照(G1)显著差异;****p＜0.0001,根据时序(Mantel-Cox)检验与阴性对照(G1)显著差异;n＝10)。

[0177] 图17为展示通过氯奎(chloroquine)、瑞德西韦(remdesivir)、咯匹那韦(lopinavir)、含PAX-1(SMA)的DMSO(“Komipharm(DMSO)”)及含PAX-1(SMA)的PBS(“Komipharm(PBS)”)抑制SARS-CoV-2复制的图。

具体实施方式

[0178] 在下文中仅通过实例描述本发明优选的实施方式。

[0179] 定义

[0180] 除非本文中另外定义,否则以下术语应理解为具有以下通用含义。除非另外指明,否则下文所提及的术语具有当单独使用术语时及当该术语与其他术语组合使用时遵循的一般含义。

[0181] 如本文所用,“治疗(treating)”意为影响个体、组织或细胞以获得所需药理学及/或生理作用,且包括抑制病况,即遏制其发展;或缓解或改善病况的影响,即引起病况影响的逆转或消退。

[0182] 如本文所用,“预防(preventing)”意为预防病况在处于可能患有该病况风险下的

细胞、组织或个体中发生，但不必然意味着该病况最终将不发展，或个体将最终不罹患病况。预防包括延迟细胞、组织或个体中的病况发作。

[0183] 如本文所用，“减少由病毒感染导致的发炎反应(reducing an inflammatory response due to a viral infection)”意为相对于未治疗发炎反应的严重程度，减轻对病毒感染的发炎反应的严重程度。减轻严重程度可涉及，例如，相对于在未经治疗的反应期间展现的症状严重程度或数目，减少所展现症状的严重程度或数目，或相对于未经治疗的反应中的一或多种促炎细胞因子的血清含量，减少一或多种促炎细胞因子的血清含量。

[0184] 如本文所用，“由病毒感染导致的发炎病况(an inflammatory condition due to a viral infection)”系指由对病毒感染的发炎反应产生的病况。典型地，发炎病况在病毒感染期间至少部分由增加的且在一些情况下失调的一或多种促炎细胞因子含量引起。在病毒感染期间，促炎免疫细胞迁移至感染部位且通过在受感染区域中分泌大量促炎细胞因子，诸如TNF-α、IL-1β及IL-6，且尤其IL-1β及IL-6来起反应。此类促炎细胞因子的分泌进一步促进免疫细胞迁移至感染部位。由于免疫细胞的快速流入及促炎细胞因子的进一步分泌及受感染细胞的损坏，流体在受感染区域中积累并发生组织损伤。举例而言，冠状病毒为感染个体肺部的呼吸道病毒。对冠状病毒的发炎反应致使呼吸道发炎，使得流体在肺泡中积聚，引起呼吸短促及严重情况下引起肺炎。随时间推移，来自发炎的液体硬化，且可引起肺纤维化且在一些情况下引起死亡。即使在个体存活的情况下，发炎可使得肺功能降低。

[0185] 如本文所用，“减少TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量(reducing TNF-α,IL-1βand/or IL-6levels)”系指减少自免疫细胞(典型地，巨噬细胞)分泌的TNF-α、IL-1β及/或IL-6的量。自免疫细胞分泌的TNF-α、IL-1β及/或IL-6的量可通过例如测定个体中的TNF-α、IL-1β及/或IL-6的血清含量来测定。

[0186] 如本文所使用，术语“个体(subject)”系指哺乳动物。哺乳动物可为人类或非人类。非人类的实例包括灵长类动物、家畜动物(例如绵羊、牛、马、驴、猪)、伴侣动物(例如狗、猫)、实验室测试动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠)、捕获的野生动物(例如狐、鹿)。哺乳动物典型地为人类或灵长类动物。更典型地，哺乳动物为人类。

[0187] 术语“组合物(composition)”涵盖包含活性药物成分(active pharmaceutical ingredient)(“API”)以及赋形剂或载剂的组合物及配制物，以及具有包封材料作为载剂以提供胶囊的组合物及配制物，在所述胶囊中由包封载剂包围活性药物成分(具有或不具有其他载剂)。在药物组合物中，赋形剂或载剂为“药学上可接受(pharmaceutically acceptable)的”，意为其在生物学上或在其他方面不是不期望的，即，该材料可并入至向患者施用的药物组合物中而不会引起任何不期望的生物效应或以有害方式与含有其的组合物的其他组分中的任一者相互作用。补充活性成份也可并入组合物中。

[0188] 本文中“药学上可接受的”，诸如在“药学上可接受的盐(pharmaceutically acceptable salt)”或“药学上可接受的赋形剂或载剂(pharmaceutically acceptable excipient or carrier)”的叙述中，意为材料在生物学上或在其他方面不是不期望的，即该材料可并入至向患者施用的药物组合物中而不会引起任何不期望的生物效应或以有害方式与含有其的组合物的其他组分中的任一者相互作用。

[0189] 术语“有效量(effective amount)”或“治疗有效量(therapeutically effective amount)”系指在以本发明的方式使用时，足以产生所需治疗反应而不会产生过度不良副作

用(诸如毒性、刺激或过敏反应)、与合理益处/风险比相称的活性药物成分的量。此量例如可有效通过免疫细胞,更典型地巨噬细胞,来减少个体的TNF-α、IL-1β及/或IL-6的产生。特定有效量或治疗有效量将随诸如以下因素而变化:个体的所治疗的特定病况、年龄、体重、一般健康状况、身体状况、性别及饮食、治疗持续时间、并行疗法(若存在)的性质及特定病况的严重程度。

[0190] 如本文所用,"载剂(carrier)"包括任何及所有溶剂、分散介质、媒剂、包衣、稀释剂、抗细菌及抗真菌剂、等张及吸收延迟剂、缓冲剂、载剂溶液、悬浮液、胶体及其类似者。此类介质及试剂用于药学活性物质的用途在所属技术领域中熟知。除非任何习知介质或试剂与活性成分不兼容,否则考虑将其用于治疗性组合物中。

[0191] 如本文所用,"施用(administration)"或"施用(administer)"或"施用(administering)"系指向个体分配、施加或投用两种或超过两种药剂(例如偏亚砷酸钠及/或三氧化二砷及顺铂、阿霉素(adriamycin)及/或紫杉烷,例如紫杉醇或多烯紫杉醇)。施用可使用所属技术领域中已知的多种方法中的任一者进行。举例而言,如本文所用的"施用"意为经由输注(静脉内施用(intravenous administration,i.v.))、肠胃外及/或口服施用。"肠胃外(parenteral)"意为静脉内、皮下及肌肉内施用。应了解,实际优选的方法及施用次序将尤其根据正利用的SMA或KMA的特定配制物而变。根据给定病况集合施用SMA或KMA的方法及次序可由所属技术领域技术人员使用常规技术及鉴于本文所阐明的信息来确定。

[0192] 如本文所用,术语"约"意为指定值的略微变化,优选在指定值的10%内。尽管如此,术语"约"可意指变化的较高容限,其取决于例如所使用的实验技术。指定值的该等变化为所属技术领域技术人员所了解且在本发明的上下文内。另外,为了提供更简明的描述,本文所给出的一些定量表述并未使用术语"约"限定。应理解,不论是否明确使用术语"约",本文给出的每个量意欲指实际给出值,且其也意欲指基于一般技术合理推断的该给出值的近似值,包括由于该给出值的实验及/或测量条件而获得的等效值及近似值。

[0193] 除非另外说明,否则所有量在本文中表示为重量百分比(%w/w)。

[0194] 当然,用于制备本文所描述的药物组合物的任何材料应为药学上纯的且在所用量下实质上无毒。

[0195] 发炎反应

[0196] 一个方面提供一种减少个体的由病毒感染导致的发炎反应的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0197] 由病毒感染导致的发炎反应为对病毒感染的免疫反应,其中促炎细胞因子由免疫细胞,典型地巨噬细胞响应于病毒感染而分泌。在一个具体实例中,促炎细胞因子包含TNF-α、IL-1β及/或IL-6。在一些具体实例中,发炎反应包括高细胞因子血症(也称为"细胞因子风暴(cytokine storm)")。

[0198] 归因于病毒感染的发炎反应可为急性或慢性的。急性发炎典型地仅持续几天。相比之下,慢性发炎典型地持续数周、数月或甚至无限期,且可造成组织损伤。

[0199] 一个方面提供一种治疗或预防个体的由病毒感染导致的发炎病况的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。由病毒感染导致的发炎病况为由对病毒感染的发炎反应产生的病况。

[0200] 在一个实施方案中,发炎病况是由病毒感染导致的全身性发炎反应症候群

(systemic inflammatory response syndrome,SIRS)。在一个实施方案,病毒感染归因于RNA病毒。

[0201] 在一个实施方案中,发炎病况归因于流感感染。在一个实施方案中,流感为禽流感。在一个实施方案中,由流感感染导致的发炎病况为肺炎。

[0202] 在一个实施方案中,发炎病况归因于冠状病毒感染。在一个实施方案中,冠状病毒选自由以下组成的组:229E、NL63、OC43、HKU1、MERS-CoV、SARS-CoV及SARS-CoV-2。在一个实施方案中,冠状病毒为MERS-CoV。在一个实施方案中,冠状病毒为SARS-CoV。在一个实施方案中,冠状病毒为SARS-CoV-2(也称为"2019新型冠状病毒(2019novel coronavirus)")。

[0203] 在各种实施方案中,发炎病况选自中东呼吸道症候群(MERS-由MERS-CoV引起)及重度急性呼吸道症候群(SARS-由SARS-CoV引起)或由2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的病况(例如COVID-19)。

[0204] 在一个实施方案中,发炎病况为由COVID-19引起的肺炎。

[0205] 本文所描述的方法涉及施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0206] 如实例中所描述,本发明人已发现偏亚砷酸钠能够减少或抑制自巨噬细胞的促炎细胞因子TNF-α、IL-1β及/或IL-6的产生和/或分泌。

[0207] 一个方面提供一种减少患有由病毒感染导致的发炎病况的个体中的TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量,典型地血清含量的方法,其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0208] 在一个实施方案中,该方法减少个体中的TNF-α含量。典型地,该方法减少个体中的TNF-α血清含量。

[0209] 在一个实施方案中,该方法减少个体的IL-1β含量。典型地,该方法减少个体中的IL-1β血清含量。

[0210] 在一个实施方案中,该方法减少个体中的TNF-α及IL-1β含量。典型地,该方法减少个体中的TNF-α及IL-1β血清含量。

[0211] 在一个实施方案中,该方法减少个体中的IL-6含量。典型地,该方法减少个体中的IL-6血清含量。

[0212] 在一个实施方案中,该方法减少个体中的IL-1β及IL-6含量。典型地,该方法减少个体中的IL-1β及IL-6血清含量。

[0213] 在一个实施方案中,该方法减少个体中的TNF-α、IL-1β及IL-6含量。典型地,该方法减少个体中的TNF-α、IL-1β及IL-6血清含量。

[0214] 一个方面提供一种治疗或预防个体的由归因于病毒感染的升高的TNF-α、IL-1β及/或IL-6含量介导的疾病或病况的方法,其包括向个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O=As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O=As-O$^-$K$^+$)。

[0215] 在一个实施方案中,疾病或病况为肺炎。在一个实施方案中,病毒感染为冠状病毒感染。在一个具体实例中,冠状病毒为SARS-CoV-2。

[0216] 在一个实施方案中,疾病或病况为MERS或SARS。

[0217] 在一个实施方案中,疾病或病况为高细胞因子血症。在一个实施方案中,病毒感染为冠状病毒感染。在一个实施方案中,冠状病毒为SARS-CoV-2。

[0218] 一个方面提供一种治疗个体的由病毒感染导致的疾病或症状的方法，其包括向该个体施用有效量的偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)。

[0219] 在一个实施方案中，疾病或症状为疾病，诸如发热、发冷、流感类症状、发炎或脑雾或其组合。因此，在一个实施方案中，疾病或症状为发热。在另一实施方案中，疾病或症状为发冷。在另一实施方案中，疾病或症状为流感类症状。在另一实施方案中，疾病或症状为发炎。在另一实施方案中，疾病或症状为脑雾。

[0220] 流感类症状包括头痛、发热、咳嗽、呼吸短促(呼吸困难)、呼吸艰难、有痰、胸闷、疲劳、喉咙痛、流鼻涕、食欲不振及疼痛(包括肌肉疼痛及身体疼痛)。

[0221] 在一个实施方案中，病毒感染为冠状病毒感染。在一个实施方案中，冠状病毒为SARS-CoV-2。

[0222] 在一个实施方案中，疾病或症状由偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)通过消炎机制及/或通过抑制病毒复制来治疗。在一个实施方案中，疾病或症状由偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)通过消炎机制来治疗。在一个实施方案中，疾病或症状由偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)通过抑制病毒复制来治疗。在一个实施方案中，疾病或症状由偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)通过消炎机制及抑制病毒复制来治疗。

[0223] 典型地，偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)以包含偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)及药学上可接受的载剂的药物组合物形式施用。

[0224] 在一些实施方案中，载剂为非天然存在的载剂。

[0225] 药物组合物

[0226] 如上文所描述，典型地，用于本文所描述的方法及用途中的偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)以包含偏亚砷酸钠(O＝As-O$^-$Na$^+$)或偏亚砷酸钾(O＝As-O$^-$K$^+$)及药学上可接受的载剂的药物组合物的形式施用。

[0227] 药物组合物可含有如上文所描述的其他药剂或其他活性剂，且可例如根据诸如医药配制物领域中所熟知的那些技术的技术，通过采用常规固体或液体媒剂或稀释剂以及具有适合于所需施用模式的类型的药学添加剂(例如，赋形剂、黏合剂、防腐剂、稳定剂、调味剂等)来配制(参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,2005,Lippincott Williams&Wilkins)。

[0228] 药物组合物可适合于静脉内、口服、经鼻、局部(包括经皮、颊内及舌下)或肠胃外(包括肌肉内、皮下及静脉内)施用或呈适用于通过吸入或吹入施用的形式。

[0229] 本文所描述的化合物以及药学上可接受的载剂因此可置于药物组合物及其单位剂量的形式中。药物组合物可为固体，诸如片剂或填充胶囊，或液体，诸如溶液、悬浮液、乳液、酏剂或填充有上述液体的胶囊，以用于口服施用。药物组合物可为用于玻璃体内施用的液体，诸如溶液、悬浮液或乳液。

[0230] 此类药物组合物及其单位剂型可包含以常规比例的常规成分，有或无额外活性化合物或成分，且此类单位剂型可含有与所预定采用的日剂量范围相当的任何适合有效量的活性成分。

[0231] 为自本文所描述的化合物制备药物组合物，药学上可接受的载剂可为固体或液体。固体形式制剂包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、锭剂(固体或咀嚼)、栓剂及可施配颗

粒。固体载剂可为一或多种物质，其亦可充当稀释剂、调味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、黏合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包封材料。

[0232] 合适载剂为碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄蓍、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂及其类似物。片剂、粉剂、胶囊、丸剂、扁囊剂及锭剂可以适合于口服的固体形式使用。

[0233] 液体形式制剂包括溶液、悬浮液及乳液，例如水或水-丙二醇溶液。举例而言，肠胃外注射液制剂可以于盐水、水或聚乙二醇水溶液中的溶液形式配制。

[0234] 无菌液体形式组合物包括无菌溶液、悬浮液、乳液、糖浆及酏剂。活性成份可溶解或悬浮于药学上可接受的载剂(诸如无菌水、无菌有机溶剂或二者的混合物)中。

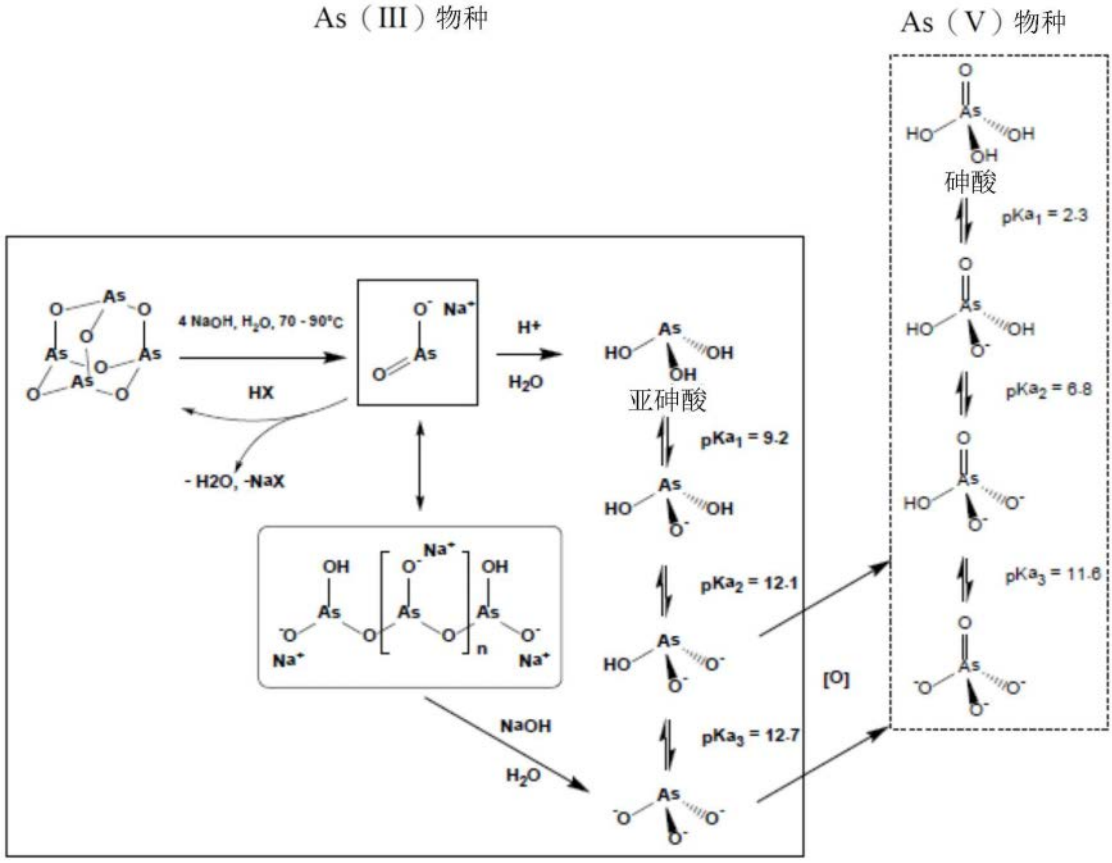
[0235] 在一个实施方案中，偏亚砷酸钠及偏亚砷酸钾被配制用于口服施用。用于口服施用的组合物可为固体或液体制剂。

[0236] 在一个实施方案中，用于口服施用的组合物为固体制剂。

[0237] 偏亚砷酸钠及偏亚砷酸钾可由三氧化二砷(As_2O_3)合成。举例而言，偏亚砷酸钠可通过使三氧化二砷(As_2O_3)与氢氧化钠水溶液反应以形成三价偏亚砷酸钠来合成(以下流程1的左上方)。冷却溶液，过滤偏亚砷酸钠，且蒸发水。随后用甲醇洗涤所形成的偏亚砷酸钠以移除水，在真空下过滤，且随后干燥。可使用氢氧化钾水溶液而非氢氧化钠水溶液以类似于偏亚砷酸钠的方式制备偏亚砷酸钾。

[0238] 然而，偏亚砷酸盐(O＝As-O^-的盐)的主要复杂情况为其物种形成化学方法及其转化为溶液中的多种不同形式的能力，诸如当包含偏亚砷酸钠(O＝As-O^-Na^+)或偏亚砷酸钾(O＝As-O^-K^+)的口服剂型溶解于胃中时。举例而言，偏亚砷酸钠(O＝As-O^-Na^+)易溶于强酸中、强碱中以及中性条件中。所存在的形式视溶液的pH及偏亚砷酸钠对氧化的倾向而定(以下流程1)。偏亚砷酸钾以类似于偏亚砷酸钠的方式表现。一般而言，中性至碱性条件易于促成As(III)(亚砷酸盐)的形成(或保持)，而酸性条件(尤其在氯离子存在下，诸如在胃中)倾向于促成As(V)(砷酸盐)的形成。

[0239]



[0240] 流程1

[0241] 另外，当氯化物、金属离子或水分（例如在溶解介质内或赋形剂内；赋形剂可催化氧化，例如具有金属离子（尤其铁）的赋形剂）或大气氧存在时，偏亚砷酸盐（0＝As-O^-）可在储存期间氧化成偏砷酸盐。偏亚砷酸盐的氧化可在较低的pH下相当快速地发生。偏亚砷酸钠（0＝As-O^-Na^+）及偏亚砷酸钾（0＝As-O^-K^+）均为吸湿性的。

[0242] 在溶液中，偏亚砷酸钠的主要降解物为由氧化反应形成的五价偏砷酸钠（AsO_4^{3-}或As（V））物种。假设这可如下文方框1中所示进行，然而理论上，可在不吸收氧气的情况下发生氧化（价数变化）（例如通过与赋形剂相互作用或与存在于偏亚砷酸钠或组合物中的金属离子反应）。

[0243]

还原形式	氧化形式		
As^{3+}	$As^{5+} + 2e^-$	As价数变化	（方程式1）
$AsO_2^- + O_2$	AsO_4^{3-}	吸收氧气	（方程式2）

[0244] 方框1

[0245] 由偏亚砷酸钠（0＝As-O^-Na^+）或偏亚砷酸钾（0＝As-O^-K^+）溶解于胃中引起的另一复杂情况为由胃中氯离子形成氯化砷（III）（$AsCl_3$）。当存在氯化物时，偏亚砷酸盐的氧化可能更快速地发生。氯化砷（III）对人类具有毒性且引起严重不良影响。

[0246] 在其中组合物用于口服施用的一些实施方案中，提供一种肠溶包衣固体药物组合物，其包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾，其适用于口服施用，且其穿过胃且在小肠（其中酸度

在pH 6.5-7.5之间)中开始溶解。通过采用适合赋形剂及载剂及适合厚度的适合肠溶包衣来使偏亚砷酸盐形式氧化成偏砷酸盐形式(在胃中或在储存期间)的风险及由胃中氯离子形成有毒氯化砷(III)的风险降至最低。肠溶包衣固体药物组合物在小肠中的溶解可快速发生或在延长的时间段内(例如0.5、0.75、1、2、3、4、5或6小时,优选在2小时内)发生。

[0247] 用于口服施用的药物组合物的优选实施方案描述于下文中。用于口服施用的药物组合物可通过如下文所描述的有效方法制造。

[0248] 用于口服施用的药物组合物

[0249] 在一个实施方案中,适用于口服施用的药物组合物包含:

[0250] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以及一或多种药学上可接受的赋形剂的实心核,其中该一或多种药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化;

[0251] 及

[0252] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

[0253] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,且其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

[0254] 举例而言,在以上实施方案中,一或多种药学上可接受的赋形剂可选自填充剂或稀释剂、崩解剂、助滑剂、润滑剂及黏合剂。在一些实施方案中,实心核可包含这些赋形剂中的两者或多于两者、这些赋形剂中的三者或多于三者、这些赋形剂中的四者或多于四者或所有这些赋形剂。因此,在一些实施方案中,实心核包含填充剂或稀释剂、崩解剂、助滑剂、润滑剂及黏合剂。

[0255] 在一个实施方案中,适用于口服施用的药物组合物包含:

[0256] (a)包含偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾及以下药学上可接受的赋形剂的实心核:

[0257] (i)约5至95%w/w范围的填充剂或稀释剂,

[0258] (ii)约10至90%w/w范围的崩解剂,

[0259] (iii)约0.1至5%w/w范围的助滑剂,

[0260] (iv)约0.1至5%w/w范围的润滑剂,及

[0261] (v)任选地0至约30%w/w范围的黏合剂;

[0262] 及

[0263] (b)包含肠溶聚合物的肠溶包衣;

[0264] 其中所述药学上可接受的赋形剂被选择为使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化,

[0265] 其中该肠溶包衣的重量百分比相对于该药物组合物的总重量为约6%w/w至约20%w/w,及

[0266] 其中该包衣厚度为该药物组合物的厚度的约6.5%至约15%。

[0267] 药物组合物可呈肠溶包衣片剂或肠溶包衣胶囊形式。在一些实施方案中,药物组合物为肠溶包衣片剂。在一些实施方案中,药物组合物为肠溶包衣胶囊。

[0268] 在药物组合物中,活性药物成分(API)为偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾。

[0269] 偏亚砷酸钠及偏亚砷酸钾可以高纯度(>98%As(III)及最小As(V)含量)商业上获得。偏亚砷酸钠及偏亚砷酸钾为吸湿性的。

[0270] 相较于典型片剂赋形剂(典型片剂赋形剂通常为具有大致1.2至1.6g/cm^{3}的密度的有机物质),为无机化合物的偏亚砷酸钠及偏亚砷酸钾各自具有较高粒子(真)密度(例如对于偏亚砷酸钠,大致2.1至2.3g/cm^3,且对于偏亚砷酸钾,约8.76g/cm^3)。

[0271] 当API的粒度及赋形剂的粒度存在差异时,API在组合物中分离的可能性较高。所属技术领域技术人员应了解,使用API的优选粒度有利地引起改良的粉末混合及掺合均匀性,最小化或消除粉末在压缩时的分离,且实现组合物中令人满意的含量均匀性。

[0272] 在用于口服施用的组合物的一些实施方案中,API的粒度为约50至150微米。在一些实施方案中,API的粒度为约70至120微米。在一些实施方案中,API的粒度为约90至100微米。

[0273] 在一些实施方案中,API为偏亚砷酸钠。

[0274] 在一些实施方案中,API为偏亚砷酸钾。

[0275] 在一些实施方案中,用于口服施用的药物组合物的实心核中的API的量为约0.1至5.0%w/w实心核,优选约0.5至3.0%w/w实心核,更优选约1.0至2.5%w/w实心核,甚至更优选约1.5至2.0%w/w实心核,且最优选约1.6至1.8%w/w实心核,例如,实心核的约1.65%w/w、约1.66%w/w、约1.67%w/w、约1.68%w/w、约1.69%w/w、约1.70%w/w、约1.71%w/w、约1.72%w/w、约1.73%w/w、约1.74%w/w或约1.75%w/w。

[0276] 在一些实施方案中,API的粒度及药学上可接受的赋形剂的粒度类似。有利地,使用具有类似粒度的API及赋形剂可引起改良的粉末混合及掺合均匀性,可最小化或消除粉末在压缩时的分离,且可实现组合物中令人满意的含量均匀性。

[0277] 在一些实施方案中,API被微粉化。所属技术领域技术人员应了解,当API以较低含量存在时,通过微粉化减小API粒度可改良剂型(诸如片剂)中的掺合均匀性及含量均匀性。

[0278] 在一些实施方案中,API未被微粉化。所属技术领域技术人员应了解,使吸湿性API(诸如偏亚砷酸钠及偏亚砷酸钾)微粉化可能由于较大表面区域及反应性而引起增加的分解风险。

[0279] 在一个实施方案中,除偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以外,用于口服施用的药物组合物包含一或多种药学上可接受的赋形剂,其经选择以使得偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化作用最小化。

[0280] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂经选择以使得在室温下储存至少约1个月、优选至少约2个月、更优选至少约3个月、甚至更优选至少约4个月且最优选至少约6个月之后,少于约10%w/w、优选少于约5%w/w、更优选少于约2%w/w、甚至更优选少于约1%w/w且最优选少于约0.5%w/w的偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾氧化成偏砷酸钠或偏砷酸钾。

[0281] 在另一实施方案中,除偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾以外,用于口服施用的药物组合物包含以下药学上可接受的赋形剂:

[0282] (i)填充剂或稀释剂,

[0283] (ii)崩解剂,

[0284] (iii)助滑剂,

[0285] (iv)润滑剂,及

[0286] (v)任选地黏合剂。

[0287] 所属技术领域技术人员应了解,一些赋形剂具有多种功能。当包含于药物组合物

中的赋形剂具有多种功能时，认为药物组合物包括具有那些功能的赋形剂，例如若赋形剂充当黏合剂及崩解剂两者，则应理解，药物组合物包含黏合剂及崩解剂。

[0288] 一般而言，一或多种药学上可接受的赋形剂与偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾相容。优选地，药学上可接受的赋形剂具有低水分含量或低水分活性以使偏亚砷酸盐至偏砷酸盐的氧化可能性最小化。因此，优选地，用于口服施用的药物组合物不含有具有高水分含量或高水活性的赋形剂(此类赋形剂可催化氧化，例如具有金属离子、尤其铁的赋形剂)。然而，所属技术领域技术人员应了解，对于用于口服施用的药物组合物而言存在此可实用性的限制，因为一些可用水分为用于令人满意的压缩所必需的。

[0289] 在一些实施方案中，API的粒度及药学上可接受的赋形剂的粒度类似。有利地，使用具有类似粒度的API及赋形剂可引起改良的粉末混合及掺合均匀性，可最小化或消除粉末在压缩时的分离，且可实现实心核中令人满意的含量均匀性。

[0290] 在一些实施方案中，在可能的情况下，选择较高密度型式的主要赋形剂以努力匹配偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾的密度(偏亚砷酸钠的估计真密度为大致2.1至2.3g/cm^3，且偏亚砷酸钾的估计真密度为大致8.76g/cm^3)；作为有机物质的典型片剂赋形剂具有大致1.2至1.6g/cm^3的密度。

[0291] 填充剂或稀释剂可选自例如无水磷酸氢二钙、部分预胶凝化淀粉、硅化微晶纤维素、微晶纤维素、二水合硫酸钙、乳糖、磷酸氢钙、碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸钠或其混合物。在一些实施方案中，填充剂或稀释剂为无水磷酸氢二钙、部分预胶凝化淀粉或其混合物。在一些实施方案中，填充剂或稀释剂为无水磷酸氢二钙。在一些实施方案中，填充剂或稀释剂为部分预胶凝化淀粉。在一些实施方案中，稀释剂可为可压缩稀释剂，例如硅化微晶纤维素、微晶纤维素或部分预胶凝化淀粉。

[0292] 填充剂或稀释剂可以约5至95％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中。在一些实施方案中，填充剂或稀释剂以约10至90％w/w实心核的量存在于药物组合物的实心核中，例如以约10％w/w实心核、约15％w/w实心核、约20％w/w实心核、约25％w/w实心核、约30％w/w实心核、约35％w/w实心核、约40％w/w实心核、约45％w/w实心核、约50％w/w实心核、约55％w/w实心核、约60％w/w实心核、约65％w/w实心核、约70％w/w实心核、约75％w/w实心核、约80％w/w实心核、约85％w/w实心核或约90％w/w实心核的量。

[0293] 崩解剂可例如选自L-羟丙基纤维素、部分预胶凝化淀粉、交联聚维酮、马铃薯淀粉、玉米淀粉、羟基乙酸淀粉钠及海藻酸。羟基乙酸淀粉钠及交联聚维酮为超崩解剂。在一些实施方案中，崩解剂为L-羟丙基纤维素、部分预胶凝化淀粉、羟基乙酸淀粉钠或其两者或多于两者的混合物。在一些实施方案中，崩解剂为L-羟丙基纤维素。在一些实施方案中，崩解剂为部分预胶凝化淀粉。在一些实施方案中，崩解剂为羟基乙酸淀粉钠。

[0294] 崩解剂可以约10至90％w/w实心核，例如约10至50％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中。在一些实施方案中，崩解剂以约15至85％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中，例如以约15％w/w实心核、约20％w/w实心核、约25％w/w实心核、约30％w/w实心核、约35％w/w实心核、约40％w/w实心核、约45％w/w实心核、约50％w/w实心核、约55％w/w实心核、约60％w/w实心核、约65％w/w实心核、约70％w/w实心核、约75％w/w实心核、约80％w/w实心核或约85％w/w实心核的量。

[0295] 助滑剂可例如选自胶态二氧化硅及滑石。在一些实施方案中，助滑剂是胶态二氧

化硅。在一些实施方案中，助滑剂为滑石。

[0296] 助滑剂可以约0.1至5％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中。在一些实施方案中，助滑剂以约0.3至4％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中，例如以约0.3％w/w实心核、约0.4％w/w实心核、约0.5％w/w实心核、约0.6％w/w实心核、约0.7％w/w实心核、约0.8％w/w实心核、约0.9％w/w实心核、约1.0％w/w实心核、约1.1％w/w实心核、约1.2％w/w实心核、约1.3％w/w实心核、约1.4％w/w实心核、约1.5％w/w实心核、约1.6％w/w实心核、约1.7％w/w实心核、约1.8％w/w实心核、约1.9％w/w实心核、约2.0％w/w实心核、约2.1％w/w实心核、约2.2％w/w实心核、约2.3％w/w实心核、约2.4％w/w实心核、约2.5％w/w实心核、约2.6％w/w实心核、约2.7％w/w实心核、约2.8％w/w实心核、约2.9％w/w实心核、约3.0％w/w实心核、约3.1％w/w实心核、约3.2％w/w实心核、约3.3％w/w实心核、约3.4％w/w实心核、约3.5％w/w实心核、约3.6％w/w实心核、约3.7％w/w实心核、约3.8％w/w实心核、约3.9％w/w实心核或约4.0％w/w实心核的量。

[0297] 润滑剂可例如选自硬脂酰反丁烯二酸钠、硬脂酸镁、硬脂酸、滑石及二氧化硅。在一些实施方案中，润滑剂为硬脂酰反丁烯二酸钠。在一些实施方案中，润滑剂为硬脂酸镁。在一些实施方案中，润滑剂为硬脂酸。在一些实施方案中，润滑剂为滑石。在一些实施方案中，润滑剂为二氧化硅。

[0298] 润滑剂可以约0.1至5％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中。在一些实施方案中，润滑剂以约0.3至4％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中，例如以约0.3％w/w实心核、约0.4％w/w实心核、约0.5％w/w实心核、约0.6％w/w实心核、约0.7％w/w实心核、约0.8％w/w实心核、约0.9％w/w实心核、约1.0％w/w实心核、约1.1％w/w实心核、约1.2％w/w实心核、约1.3％w/w实心核、约1.4％w/w实心核、约1.5％w/w实心核、约1.6％w/w实心核、约1.7％w/w实心核、约1.8％w/w实心核、约1.9％w/w实心核、约2.0％w/w实心核、约2.1％w/w实心核、约2.2％w/w实心核、约2.3％w/w实心核、约2.4％w/w实心核、约2.5％w/w实心核、约2.6％w/w实心核、约2.7％w/w实心核、约2.8％w/w实心核、约2.9％w/w实心核、约3.0％w/w实心核、约3.1％w/w实心核、约3.2％w/w实心核、约3.3％w/w实心核、约3.4％w/w实心核、约3.5％w/w实心核、约3.6％w/w实心核、约3.7％w/w实心核、约3.8％w/w实心核、约3.9％w/w实心核或约4.0％w/w实心核的量。

[0299] 若存在，黏合剂可例如选自硅化微晶纤维素、微晶纤维素、部分预胶凝化淀粉、L-羟丙基纤维素(低取代羟丙基纤维素)、羟丙基纤维素、共聚普维酮(copovidone)(聚乙烯吡咯啶酮)、预胶凝化玉米淀粉、羟基丙基甲基纤维素、淀粉、阿拉伯胶、玉米淀粉及明胶。在一些实施方案中，黏合剂为L-羟丙基纤维素(低取代羟丙基纤维素)。在一些实施方案中，黏合剂为L-羟丙基纤维素(低取代羟丙基纤维素)与羟丙基纤维素的混合物。在一些实施方案中，黏合剂为部分预胶凝化淀粉。

[0300] 黏合剂可以约0至30％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中。在一些实施方案中，黏合剂以约1至30％w/w实心核，例如以约5至25％w/w实心核的量存在于用于口服施用的药物组合物的实心核中。举例而言，黏合剂可以约5％w/w实心核、约10％w/w实心核、约15％w/w实心核、约20％w/w实心核、约25％w/w实心核、约30％w/w实心核的量存在于药物组合物的实心核中。

[0301] 用于口服施用的药物组合物可任选地在实心核中包含抗氧化剂。抗氧化剂通过以

下充当还原剂:(a)降低氧化还原电势,(b)清除氧,或(c)通过封端自由基反应(充当自由基抑制剂)。机制(a)及(b)与偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾至偏砷酸钠或偏砷酸钾的降解最相关。有利地,抗氧化剂用以减少或防止组合物中的As(III)氧化成As(V)。

[0302] 可用于实心核的抗氧化剂的实例包括:亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、硫酸钠、硫代硫酸钠、半胱胺酸盐酸盐、抗坏血酸、没食子酸丙酯、丁基化羟基甲苯(butylated hydroxytoluene,BHT)及丁基化羟基大茴香醚(butylated hydroxyanisole,BHA)。

[0303] 抗氧化剂可以约0.01至0.2%w/w,例如0.01%w/w、0.02%w/w、0.03%w/w、0.04%w/w、0.05%w/w、0.06%w/w、0.07%w/w、0.08%w/w、0.09%w/w、0.10%w/w、0.11%w/w、0.12%w/w、0.13%w/w、0.14%w/w、0.15%w/w、0.16%w/w、0.17%w/w、0.18%w/w、0.19%w/w或0.20%w/w实心核的量存在于实心核中。

[0304] 应了解,所属技术领域技术人员应理解,实心核中的API(偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾)、赋形剂及其他成分的量经调整以构成100%实心核。

[0305] 有利地,用于口服施用的药物组合物的实心核由于使用如上文所述的适合赋形剂而具有良好掺合均匀性及含量均匀性。

[0306] 在一些实施方案中,用于口服施用的药物组合物的实心核不包含以下中的任何一或多者:硅化微晶纤维素、微晶纤维素、二水合硫酸钙、共聚普维酮(聚乙烯吡咯啶酮)、交联普维酮、硬脂酸、滑石及偏亚硫酸氢钠。

[0307] 用于口服施用的药物组合物可包括包含肠溶聚合物的肠溶包衣。可通过使用所属技术领域中已知的适合包衣技术来应用肠溶包衣。肠溶包衣材料可分散或溶解于水中或适合的有机溶剂中。

[0308] 作为肠溶包衣聚合物,可例如分开地或组合地使用以下中的一或多者:丙烯酸及其酯或甲基丙烯酸或其酯的共聚物的溶液或分散液、聚山梨醇酯、邻苯二甲酸乙酸纤维素聚合物、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素聚合物、乙酸丁二酸羟丙基甲基纤维素、聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、乙酸纤维素苯偏三酸酯、羧甲基乙基纤维素、虫胶或其他适合肠溶包衣聚合物。

[0309] 在一些实施方案中,肠溶包衣系基于甲烷丙烯酸酯的包衣,例如其包含甲基丙烯酸及丙烯酸乙酯的共聚物。若干有用产品为可商购的。

[0310] 肠溶包衣聚合物产品可以商标EUDRAGIT®购自Rohm GmbH公司,达姆施塔特(Darmstadt),德国(Germany),包括L100、L100-55及S100。有用的EUDRAGIT®产品的实例包括EUDRAGIT L100-55、EUDRAGIT S100及EUDRAGIT L30D-55。EUDRAGIT L100-55为聚(甲基丙烯酸-共-丙烯酸乙酯)(1:1)。EUDRAGIT S100为甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物(1:2)。EUDRAGIT L30D-55为在pH 5.5或高于此值下可溶以用于在十二指肠中靶向递送的pH值依赖性聚合物水性分散液。甲基丙烯酸共聚物EUDRAGIT L30D-55为1:1比率的甲基丙烯酸及丙烯酸乙酯的共聚物且具有式$(C_5H_2O_2 \cdot C_4H_6O_2)_x$。

[0311] 来自Colorcon的Acryl-EZE®为水性丙烯酸肠溶系统,可分散于水中,用于将肠溶膜包衣应用于固体剂型,诸如片剂、颗粒及珠粒。有用的Acryl-EZE®产品的实例包括Acryl-EZE II白(493Z180022)及Acryl-EZE绿(93011863)。

[0312] 肠溶包衣可进一步含有药学上可接受的塑化剂以获得所需机械特性,诸如肠溶包

衣的可挠性及硬度。此类塑化剂为例如(但不限于)三醋精、柠檬酸酯、邻苯二甲酸酯、癸二酸二丁酯、十六醇、聚乙二醇、聚山梨醇酯或其他塑化剂。防黏剂,诸如硬脂酸镁、二氧化钛、滑石,及其他添加剂亦可包括于肠溶包衣中。

[0313] 在一些实施方案中,肠溶包衣提供约7至17%w/w实心核的重量增加,例如约8至14%w/w实心核的重量增加。在一些实施方案中,肠溶包衣提供约8%w/w的重量增加、约8.5%w/w的重量增加、约9%w/w的重量增加、约9.5%w/w的重量增加、约10%w/w的重量增加、约10.5%w/w的重量增加、约11%w/w的重量增加、约11.5%w/w的重量增加、约12%w/w的重量增加、约12.5%w/w的重量增加、约13%w/w的重量增加、约13.5%w/w/w的重量增加或约14%w/w的重量增加。在一些实施方案中,肠溶包衣提供约12%w/w实心核的重量增加。

[0314] 在一些实施方案中,实心核可在用肠溶包衣包覆之前,使用所属技术领域中已知适用于次包衣的聚合物次包覆。

[0315] 在一个实施方案中,用于口服施用的药物组合物为经肠溶包衣的固体,且适用于口服施用,例如肠溶包衣片剂或肠溶包衣胶囊。

[0316] 在一些实施方案中,用于口服施用的药物组合物为具有直径为约5至8mm的实心核的肠溶包衣片剂。直径为实心核的最宽尺寸的直径。在一些实施方案中,实心核直径为约5.5至7.5mm。在一些实施方案中,实心核直径为约6.0至7mm,例如约6mm、约6.5mm或约7mm。优选地,用于口服施用的药物组合物为具有直径6.5mm的实心核的肠溶包衣片剂。更优选地,本发明的药物组合物为具有直径为6.5mm的实心核且包含偏亚砷酸钠的肠溶包衣片剂。

[0317] 在一些实施方案中,肠溶包衣片剂的实心核的厚度可为约2mm至6mm,例如约2mm至5mm。肠溶包衣片剂的实心核的厚度为实心核的深度,即当实心核停置于平坦表面上时所测量的实心核的高度。在一些实施方案中,肠溶包衣片剂的实心核的厚度为约3至4.5mm。在一些实施方案中,肠溶包衣片剂的实心核的厚度为约3.1至4.2mm,例如约3.1mm、约3.2mm、约3.3mm、约3.4mm、约3.5mm、约3.6mm、约3.7mm、约3.8mm、约3.9mm、约4.0mm、约4.1mm或约4.2mm。优选地,肠溶包衣片剂的实心核的厚度为约3.4mm、约3.5mm、约3.6mm、约3.7mm、约3.8mm或约3.9mm。

[0318] 在一些实施方案中,用于口服施用的药物组合物为具有长度为约8.0至16mm的实心核的肠溶包衣胶囊。在一些实施方案中,实心核长度为约8.5至15mm。在一些实施方案中,实心核长度为约8.5至14.5mm,例如约8.5mm、约9.0mm、约9.5mm、约10.0mm、约10.5mm、约11.0mm、约11.5mm、约12.0mm、约12.5mm、约13.0mm、约13.5mm、约14mm或约14.5mm。优选地,用于口服施用的药物组合物为具有长度为约14.3mm的实心核的肠溶包衣胶囊。更优选地,本发明的药物组合物为肠溶包衣胶囊,其具有长度为约14.3mm的实心核且包含偏亚砷酸钠。

[0319] 在一些实施方案中,肠溶包衣胶囊的实心核的厚度可为约3mm至8mm,例如约4.0mm至7.0mm。肠溶包衣胶囊的实心核的厚度为实心核的深度,即当实心核停置于平坦表面上时所测量的实心核的高度。在一些实施方案中,实心核的厚度为约4.5至6.5mm,例如约4.5mm、约4.6mm、约4.7mm、约4.8mm、约4.9mm、约5.0mm、约5.1mm、约5.2mm、约5.3mm、约5.4mm、约5.5mm、约5.6mm、约5.7mm、约5.8mm、约5.9mm、约6.0mm、约6.1mm、约6.2mm、约6.3mm、约6.4mm或约6.5mm。优选地,肠溶包衣胶囊的实心核的厚度为约5.31mm。

[0320] 在一些实施方案中,实心核的硬度为约50N至约200N,例如约50至约150N或约70至

约120N。在一些实施方案中，实心核的硬度为约80N至约115N，例如约85N、约90N、约95N、约100N、约105N或约110N。在一些实施方案中，实心核的硬度为至少约50N、至少约55N、至少约60N、至少约65N、至少约70N、至少约75N、至少约80N、至少约85N、至少约90N、至少约95N、至少约100N、至少约105N、至少约110N、至少约115N、至少约120N、至少约125N、至少约130N、至少约135N、至少约140N、至少约145N、至少约150N、至少约155N、至少约160N、至少约165N、至少约170N、至少约175N、至少约180N、至少约185N、至少约190N、至少约195N或约200N。优选地，实心核的硬度为至少约85N，更优选至少约90N，甚至更优选至少约100N，且最优选至少约110N。典型地，实心核的硬度不超过约210N。

[0321] 在一些实施方案中，实心核的脆度小于约0.5％，优选小于约0.45％，更优选小于约0.4％，甚至更优选小于约0.35％，且最优选小于约0.3％。在一些实施方案中，实心核的脆度小于约0.25％。在一些实施方案中，实心核的脆度小于约0.2％。在一些实施方案中，实心核的脆度小于约0.15％。在一些实施方案中，实心核的脆度小于约0.1％，例如约0.08％。

[0322] 在一些实施方案中，实心核的质量为约50mg至250mg。在一些实施方案中，实心核的质量为约80mg至220mg。在一些实施方案中，实心核的质量为约100mg至200mg。在一些实施方案中，实心核的质量为约120mg至180mg。在一些实施方案中，实心核的质量为约140mg至160mg，例如约140mg、约145mg、约150mg、约155mg或约160mg。优选地，实心核的质量为150mg。

[0323] 在一些实施方案中，用于口服施用的药物组合物包含选自以下的实心核：

[0324] ●实心核，其包含偏亚砷酸钠、无水磷酸氢二钙、L-羟丙基纤维素、羟丙基纤维素、胶态二氧化硅及硬脂酰反丁烯二酸钠；

[0325] ●实心核，其包含偏亚砷酸钠、无水磷酸氢二钙粉末、部分预胶凝化淀粉、无水磷酸氢二钙、羟基乙酸淀粉钠、胶态二氧化硅及硬脂酰反丁烯二酸钠；

[0326] ●实心核，其包含偏亚砷酸钠、无水磷酸氢二钙粉末、无水磷酸氢二钙、L-羟丙基纤维素、羟基乙酸淀粉钠、胶态二氧化硅及硬脂酰反丁烯二酸钠；

[0327] ●实心核，其包含偏亚砷酸钠、无水磷酸氢二钙、部分预胶凝化淀粉、羟基乙酸淀粉钠、胶态二氧化硅及硬脂酰反丁烯二酸钠；及

[0328] ●实心核，其包含偏亚砷酸钠、无水磷酸氢二钙、硅化微晶纤维素、羟基乙酸淀粉钠、胶态二氧化硅及硬脂酰反丁烯二酸钠。

[0329] 在一些实施方案中，用于口服施用的药物组合物为肠溶包衣片剂，其包含实心核的1.67％w/w偏亚砷酸钠，且具有约6.5mm的实心核直径、150mg的实心核质量及添加约12％w/w实心核的肠溶包衣。

[0330] 在一些实施方案中，用于口服施用的药物组合物为肠溶包衣片剂，其包含实心核的1.67％w/w偏亚砷酸钠，且具有约6.5mm的实心核直径、150mg的实心核质量及具有约0.2mm的包衣厚度的肠溶包衣。

[0331] 在一些实施方案中，在施用用于口服施用的药物组合物之后，药物组合物具有以下溶解特性：在45分钟内不少于75％，优选在30分钟内不少于75％。

[0332] 在一些实施方案中，本发明的药物组合物的溶解及API在小肠中的释放快速发生或在延长的时间段内(例如0.5、0.75、1、2、3、4、5或6小时，优选在2小时内)发生。

[0333] 在一些实施方案中，在肠溶包衣溶解时，实心核在小于约10分钟、优选小于约8分

钟、更优选小于约6分钟、甚至更优选小于约5分钟且最优选小于约4分钟内崩解。

[0334] 用于口服施用的药物组合物优选以单位剂型展现。单位剂型可为封装制剂，该封装含有离散量的药物组合物，诸如封装片剂或胶囊。此外，单位剂型可为片剂或胶囊本身，或其可为适当数目的呈封装形式的这些单位剂型中的任一者。举例而言，封装形式可包含金属或塑料箔，诸如泡壳包装，诸如对氧气为不可渗透或较不可渗透的Alu-Alu泡壳。封装形式可伴随有施用说明书。

[0335] 在一些实施方案中，用于口服施用的药物组合物可在环境或室温下储存至少三个月，优选至少六个月，更优选至少一年，且最优选18-24个月。在一些实施方案中，用于口服施用的药物组合物可被冷藏(例如在约2-8℃下)。

[0336] 药物组合物可通过WO 2019/178643 A1中所公开的方法制造。

[0337] 用于非口服施用的组合物

[0338] 在某些情况下，将需要肠胃外、静脉内、肌肉内或甚至腹膜内递送本文所公开的药物组合物。活性化合物(如游离碱或药理学上可接受的盐)的溶液可于水中适当地与界面活性剂(诸如羟丙基纤维素)混合来制备。也可在甘油、液态聚乙二醇及其混合物中及在油中制备分散液。在一般储存及使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0339] 适合于可注射用途的医药形式包括无菌水溶液或分散液及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂。在所有情况下，所述形式必须为无菌的且必须为流体，达到存在可容易注射性的程度。其必须在制造及储存条件下稳定，且必须保护其免遭微生物(诸如细菌及真菌)的污染作用。载剂可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液体聚乙二醇及其类似物)、其适合混合物及/或植物油的溶剂或分散介质。适当流动性可例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过维持所需粒度及通过使用界面活性剂来维持。微生物作用的预防可通过各种抗细菌剂及抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞及其类似物)来促进。在许多情况下，优选地包括等张剂，例如糖或氯化钠。延长可注射组合物的吸收可通过在组合物中使用延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝及明胶)来实现。

[0340] 对于以水溶液形式肠胃外施用，例如，所述溶液必要时应经适当缓冲且先用足够盐水或葡萄糖使液体稀释剂具有等张性。这些特定水溶液尤其适于静脉内、肌肉内、皮下及腹膜内施用。就此而论，根据本发明，可采用的无菌水性介质将为所属技术领域技术人员已知。举例而言，可将一剂溶解于1ml等张NaCl溶液中且添加至1000ml皮下灌注流体或在所提议的输注部位注射。视所治疗个体的病况而定，将必要性地产生一些剂量变化。在任何事件中，负责施用的人员将判定个别个体的适当剂量。此外，对于人类施用，制剂应符合国家或地区生物制剂标准办公室(national or regional offices of biologics standards)所要求的无菌性、发热性及一般安全性及纯度标准。

[0341] 无菌可注射溶液如下制备：将所需量的活性化合物视需要与上文列举的若干其他成分一起并入适当溶剂中，随后过滤杀菌。一般而言，通过将各种灭菌活性成分并入含有碱性分散介质及来自上文列举的那些成分的所需其他成分的无菌媒剂中来制备分散液。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的情况下，优选制备方法为真空干燥及冻干技术，由其先前无菌过滤溶液产生活性成分加任何额外所需成分的粉末。

[0342] 配制物易于以多种剂型，诸如可注射溶液、药物释放胶囊及其类似物施用。

[0343] 治疗剂可被配制用于通过注射，例如通过推注注射或连续输注来肠胃外施用。此类配制物为无菌的。注射用配制物可呈单位剂型，例如安瓿或多剂量容器，添加有防腐剂。组合物可采用诸如于油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式，且可含有诸如悬浮剂、稳定剂及/或分散剂的配制剂。替代地，活性成分可呈在使用之前用适合媒剂(例如，无菌无热原质水)复原的粉末形式。

[0344] 除先前所描述的配制物以外，化合物还可被配制为储槽式制剂。此类长效配制物可通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射施用。因此，举例而言，化合物可用适合的聚合物或疏水性材料(例如配制成于可接受的油中的乳液)或离子交换树脂配制，或配制成微溶性衍生物，例如微溶性盐。脂质体及乳液为用于亲水性药物的递送媒剂或载剂的熟知实例。

[0345] 待用于本发明的药物制剂中的适当药学上可接受的载剂及稀释剂为将化合物配制成药物组合物领域技术人员所熟知。呈适用于肠胃外施用的形式的本发明的药物制剂可以所属技术领域技术人员熟知的多种方式用药学上可接受的载剂配制用于静脉内输注或注射。在某些实施方案中，这些药物制剂呈单位剂型中活性成分的冻干混合物形式，其通过常规技术制备，可在施用时用水或其他适合的输注液体复原。

[0346] 剂量

[0347] 偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾的适合剂量可容易地由所属技术领域技术人员确定。

[0348] 向个体施用的偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾的适当剂量浓度一般为每天每公斤个体体重约0.01-0.8mg，例如每天每公斤个体体重约0.05-0.7mg、每天每公斤个体体重约0.1-0.6mg或每天每公斤个体体重约0.2-0.5mg，其可以每天单次或多次剂量施用。

[0349] 举例而言，向患者(例如罹患冠状病毒感染，诸如SARS-CoV-2感染的患者)施用的偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾的适当剂量水平可为约2.0至30mg(毫克)/天/人，例如约2.5至20.0mg/天/人或约2.5至17.5mg/天/人。优选地，所施用偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾的剂量水平为约5.0至12.5mg/天/人，更优选为约10.0至12.5mg/天/人，例如5.0mg/天/人、5.5mg/天/人、6.0mg/天/人、6.5mg/天/人、7.0mg/天/人、7.5mg/天/人、8.0mg/天/人、8.5mg/天/人、9.0mg/天/人、9.5mg/天/人、10.0mg/天/人、10.5mg/天/人、11.0mg/天/人、11.5mg/天/人、12.0mg/天/人或12.5mg/天/人。在一些实施方案中，向患者施用的偏亚砷酸钠或偏亚砷酸钾的剂量水平为7.5mg/天。

[0350] 应理解，任何特定个体的特定剂量水平及给药频率可变化且将视多种因素而定，包括个体的年龄、体重、一般健康状况、性别及饮食、施用模式及时间、排泄率、药物组合及特定病况的严重程度。

[0351] 本发明的药物组合物可在用餐之前(例如30分钟之前)、用餐期间或用餐之后(例如30分钟之后)服用。优选地，紧接在用餐之后服用本发明的药物组合物。

[0352] 具有2.5mg偏亚砷酸钠(SMA)的本发明片剂的示例性给药方案在下文陈述：

[0353] ■5.0mg SMA摄入：早餐之后立刻1×片剂，晚餐之后立刻1×片剂；

[0354] ■7.5mg SMA摄入：早餐之后立刻2×片剂，晚餐之后立刻1×片剂；

[0355] ■10.0mg SMA摄入：早餐之后立刻2×片剂，晚餐后立刻2×片剂。

[0356] 与其他药剂一起施用

[0357] 在一些实施方案中，药物组合物可与一或多种其他药剂组合使用。

[0358] 举例而言，本文中所描述的药物组合物可与其他治疗剂一起施用，该等治疗剂诸如镇痛剂、麻醉剂、抗真菌剂、抗生素、抗组织胺剂、抗高血压剂、抗疟疾剂、抗微生物剂、防腐剂、抗关节炎剂、抗凝血酶剂、抗结核剂、止咳药、抗病毒剂、加强心脏功能的药物、祛痰剂、免疫抑制剂、镇静剂、拟交感神经药、毒素(例如霍乱毒素)、镇定药及抗泌尿感染剂。

[0359] 依序或实质上同时施用各治疗剂可通过任何适当途径实现，包括但不限于口服途径、静脉内途径、肌肉内途径、经由黏膜组织直接吸收及其组合。治疗剂可通过相同途径或通过不同途径施用。举例而言，所选择组合的第一治疗剂可通过静脉内注射施用(例如顺铂或三氧化二砷)，而另一治疗剂(例如偏亚砷酸钠)可口服施用。替代地，举例而言，两种或全部治疗剂可通过静脉内注射或输注施用。治疗剂所施用的序列并非关键的。

[0360] 试剂盒

[0361] 本发明亦提供用于进行本发明的治疗方案的试剂盒。此类试剂盒包含于具有治疗有效量的呈药学上可接受形式的SMA或KMA的一或多个容器中。本发明试剂盒的小瓶中的SMA或KMA可呈药学上可接受的溶液形式，例如与无菌盐水、右旋糖溶液或缓冲溶液或其他药学上可接受的无菌流体组合。替代地，SMA或KMA可被冻干或干燥；在此情况下，试剂盒视需要进一步在容器中包含药学上可接受的溶液(例如盐水、右旋糖溶液等)，优选为无菌的，以复原复合物从而形成用于注射目的的溶液。试剂盒还可包含用于以适当量治疗疼痛及/或发炎的另一治疗剂。此类另一治疗剂可与试剂盒中所含有的SMA或KMA配制为组合药物，或可分开配制。

[0362] 本发明在下文中进一步参考以下非限制性实例进行描述。

[0363] 实施例

[0364] 实施例1-抑制促炎细胞因子分泌

[0365] 材料及方法

[0366] 用于制造下文所例示的药物组合物的所有材料均购自商业来源。

[0367] 巨噬细胞生长培养基

[0368] 所用巨噬细胞为原代大鼠腹膜巨噬细胞。巨噬细胞在DMEM、高葡萄糖、丙酮酸盐(Invitrogen目录#11995)中生长，其补充有最终浓度达10％的热灭活胎牛血清(Invitrogen目录号10099-141)、最终浓度达100U/mL/100μg/mL的青霉素/链霉素(Invitrogen目录号15140-122)、最终浓度达2mM的glutamax(Invitrogen目录号35050-061)及最终浓度匹配MEM培养基(Invitrogen目录号11095)的MEM NEAA(Invitrogen Cat.no.11140-050)。

[0369] THP-1细胞及THP-1巨噬细胞在RPMI,ATCC修饰(Invitrogen目录号A10491-01)中生长，其补充有最终浓度达10％的热灭活胎牛血清(Invitrogen目录号10099-141)及最终浓度达0.05mM的2-巯基乙醇。

[0370] 所有细胞在37℃、5％CO_2的潮湿氛围中培育。

[0371] 细胞毒性及生存率(基于MTT)分析

[0372] 在处理后24小时使用CytoTox-GLO试剂盒(细胞毒性)及MTT分析(生存率)测定与一系列$NaAsO_2$浓度一起培育的经培养原代巨噬细胞相对于媒剂对照物的细胞毒性及生存率。

[0373] 在第1天，巨噬细胞通过将125μL 1×10^6个细胞/毫升的生长培养基添加至涂布有

10％聚-L-赖氨酸的96孔培养板的各孔中来接种于96孔培养板中。3小时后移除非贴壁细胞。

[0374] 在第2天，将生长培养基轻缓地用100μL/孔新鲜无血清DMEM培养基替换3小时。无血清培养基替换为63μL含有一系列$NaAsO_2$浓度(30、10、7、5、3、1、0.3、0.1及0μM)及100ng/mL LPS或对照的培养基，且培育24小时。

[0375] 在第3天：

[0376] 1.细胞毒性系使用CytoTox-GLO试剂盒根据制造商说明书测定。

[0377] 2.MTT用DMEM复原至5mg/mL的最终浓度。

[0378] 3.在处理后24小时，将6.3μL复原MTT溶液添加至各孔中且在CO_2培育箱中培育4小时。

[0379] 4.通过将70μL MTT溶解溶液添加至各孔中且再吸液10×来溶解所得甲月暨晶体。

[0380] 5.使用分光亮度计在570nm的波长处测量各孔的吸收率，其中减去在690nm处的背景吸收率。

[0381] 细胞因子分泌

[0382] 为了研究$NaAsO_2$对来自大鼠巨噬细胞的原代培养物分泌细胞因子的作用，使用MesoScale Discovery V-PLEX试剂盒分析来自与各种浓度的$NaAsO_2$及LPS一起培育24小时的巨噬细胞孔的上清液的促炎细胞因子浓度。

[0383] 第1天

[0384] 通过将323μL 1×10^6个细胞/毫升的生长培养基添加至涂布有10％聚-L-赖氨酸的24孔培养板的各孔中来将巨噬细胞接种至24孔培养板中。3小时之后移除非贴壁细胞且培养基用500μL/孔新鲜DMEM培养基替换。

[0385] 第2天

[0386] 1.轻缓地用500μL/孔新鲜无血清DMEM培养基替换生长培养基3小时。

[0387] 2.用含有一系列$NaAsO_2$浓度(30、10、7、5、3、1、0.3、0.1及0μM)及100ng/mL LPS(诱导发炎状态)或对照的250μL生长培养基替换无血清培养基，且培育24小时。

[0388] 第3天

[0389] 1.处理后24小时，收集细胞上清液且储存于-80℃下。

[0390] 2.根据制造商说明书使用MesoScale Discovery V-PLEX试剂盒测量促炎细胞因子。

[0391] THP-1细胞分化

[0392] 第1天

[0393] 将250μL 2×10^5个细胞/毫升的含有1μL/mL佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate，PMA)的THP-1生长培养基添加至涂布有10％聚-L-赖氨酸的96孔培养板的各孔中，来将THP-1细胞接种于96孔培养板中。

[0394] 第2天

[0395] 轻缓地用100μL/孔新鲜无血清生长培养基替换生长培养基2小时。用含有一系列$NaAsO_2$浓度(30、10、7、5、3、1、0.3、0.1及0μM)及100ng/mL LPS(诱导发炎状态)或对照的63μL生长培养基替换无血清培养基，且培育24小时。

[0396] 第3天

[0397] 在处理后24小时，如上文所详述执行MTT分析。

[0398] 数据分析

[0399] 数据展现为平均值(±SEM)，且使用ANOVA，通过事后杜凯氏多重比较测试(post-hoc Tukey's Multiple Comparison test)确定原代巨噬细胞细胞因子分泌对照的差异。Prism版本6.05用于所有数据图、统计分析及IC_{50}计算。统计显著性标准为$p \leq 0.05$。

[0400] 结果

[0401] 自大鼠收集原代腹腔巨噬细胞，在LPS(100ng/mL)及浓度范围(0.1-30μM)中的偏亚砷酸钠中培养24小时，随后使用CytoTox-GLO及MTT分析试剂盒评定细胞毒性及细胞生存率(图1A)。相较于CytoTox-GLO试剂盒中的媒剂，对细胞具有细胞毒性的清洁剂毛地黄皂苷(Digitonin)引起较高毒性(图1B)。另外，曲拉通-X(Triton-X)，另一清洁剂，在MTT分析中与媒剂相比引起较低细胞生存率(图1C)。与偏亚砷酸钠一起培育时，存在细胞毒性的浓度依赖性增加且相应的生存率的浓度依赖性降低。用于导出EC_{50}及IC_{50}值的细胞毒性及细胞生存率曲线展示类似但相反关系，指示偏亚砷酸钠培育期间生存率的降低可能归因于细胞死亡，而非仅细胞内机制失效。

[0402] TNF-α、IL-1β及IL-6分泌浓度依赖性降低，使得IC_{50}值分别为2.3、0.8及0.5μM(图2A、图2C及图2E)。重要地，细胞生存率的IC_{50}在5.7μM时较高，显示偏亚砷酸钠以低于细胞生存率IC_{50}的浓度抑制相关细胞因子自所培养原代巨噬细胞释放。这些结果表明偏亚砷酸钠可以不杀死细胞的浓度抑制来自经培养大鼠巨噬细胞的细胞因子TNF-α、IL-1β及IL-6分泌。重要地，塞来昔布(10μM)成功地抑制所有三种促炎细胞因子的分泌(图2B、图2D及图2E)。

[0403] 总结

[0404] 促炎细胞因子的分泌存在浓度依赖性降低，使得用偏亚砷酸钠以3μM培育细胞，引起在不存在显著细胞死亡的情况下自这些细胞释放的IL-1β及IL-6的分泌完全抑制。

[0405] 在偏亚砷酸钠的不显著降低细胞生存率的浓度下，自巨噬细胞分泌TNF-α、IL-1β及IL-6存在显著抑制。

[0406] 总之，本文中的体外数据展示将所培养大鼠原代巨噬细胞与偏亚砷酸钠一起培育24小时产生促炎细胞因子分泌的浓度依赖性抑制。

[0407] 实施例2

[0408] 在此研究中，我们研究了偏亚砷酸钠是否可遏制鼠类巨噬细胞RAW264.7细胞中的脂多醣(LPS)诱导的发炎反应。由脂多醣活化的巨噬细胞产生许多与急性发炎相关的分子及蛋白，诸如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)、IL-1β、诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase，iNOS)、环加氧酶-2(COX-2)及自由基。反应通过细胞内级联NF-κB通路诱导。因此，此通路的调控在控制发炎方面极其重要。

[0409] 细胞培养物

[0410] 鼠类巨噬细胞细胞株RAW 264.7(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)，ATCC；美国弗吉尼亚州马纳萨斯(Manassas，VA，USA))在补充有10%热灭活的FBS及抗生素抗霉菌素(100U/ml青霉素G钠，100μg/ml链霉素硫酸盐及0.25mg/ml两性霉素)的DMEM中生长。经pNF-κB-SEAP-NPT质粒稳定转染的RAW 264.7细胞(SEAP-RAW细胞)由Yeong Shik Kim博士提供(Seoul National University，Korea)。SEAP-RAW细胞维持

于含有500μg/ml G418的DMEM中。所有细胞在37℃下在5％CO_2下在潮湿氛围中培育。

[0411] 一氧化氮(nitric oxide,NO)分析

[0412] RAW 264.7巨噬细胞细胞株与脂多醣(LPS,大肠杆菌内毒素)一起培育,且随后测量由COX-2及iNOS诱导的NO含量。使用磺酰罗丹明(sulforhodamine)B分析或溴化3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓(MTT)测定细胞毒性。

[0413] PGE2积聚的测量

[0414] 为了评估测试材料对COX-2的抑制活性,将RAW 264.7细胞与1μg/ml LPS一起培育。再培育20小时后,移出培养基且通过PGE2酶联免疫吸附分析(PGE2 enzyme-linked immunosorbent assay,PGE2-ELISA)进行分析。在这些分析中,活性定义为在无偏亚砷酸钠存在下及在偏亚砷酸钠存在下PGE2积聚之间的差异。

[0415] COX-2酶活性分析

[0416] 为测量过表达的COX-2酶抑制活性,用LPS(1μg/ml)处理RAW 264.7细胞20小时且用偏亚砷酸钠处理细胞30分钟。随后,用COX-2底物(二十碳四烯酸,10μM)处理细胞且使用PGE2-ELISA测定PGE2含量。

[0417] RT-PCR分析

[0418] 为在RAW 264.7细胞用偏亚砷酸钠预处理30分钟后提取总RNA,用LPS(1μg/ml)处理细胞5小时。偏亚砷酸钠对于iNOS、COX-2mRNA及细胞因子的基因表达的作用通过反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)测定。

[0419] 蛋白印迹分析

[0420] RAW 264.7细胞用偏亚砷酸钠预处理30分钟且培养16小时,接着用LPS处理(1μg/ml)。使用BSA分析测定获自破裂细胞的蛋白的浓度。通过蛋白印迹分析测定偏亚砷酸钠对于iNOS、COX-2、细胞因子及NF-κB、Akt的蛋白表达的作用。

[0421] 报告基因分析

[0422] 用偏亚砷酸钠预处理SEAP-RAW细胞2小时之后,将细胞与LPS(1μg/ml)一起培育18小时。所收集的上清液在65℃下加热5分钟,在黑暗中在37℃下给予SEAP分析缓冲液(2M二乙醇胺、1mM $MgCl_2$、500μM 4-甲基香豆素磷酸酯(4-methylumbelliferylphosphate,MUP)]1小时。使用96孔微量培养盘式荧光计,在360nm激发及449nm发射下测量来自SEAP/MUP产物的荧光,且通过蛋白浓度归一化。数据表示为无LPS情况下经偏亚砷酸钠处理与经媒剂处理的对照细胞的比例。

[0423] 结果

[0424] 偏亚砷酸钠对一氧化氮(NO)产生的作用

[0425] 一氧化氮(NO)为发炎发病机制中熟知的促炎介质。大部分NO通过诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)合成。iNOS为与发炎反应及癌症形成密切相关的酶。已描述由iNOS产生的NO对COX-2的活性及表达的作用。为研究偏亚砷酸钠是否具有NO抑制活性,在LPS诱导的RAW 264.7小鼠巨噬细胞中在0.625～10μM的偏亚砷酸钠存在下测定NO产生。

[0426] NO产生由偏亚砷酸钠(在10、5、2.5、1.25及0.625μM的浓度下)分别显著且浓度依赖性地减少100.2％、77.2％、42.2％、21.5％及12.5％。偏亚砷酸钠的NO产生的抑制的IC50值为约2.87μM(图3A)。

[0427] 偏亚砷酸钠对于PGE2产生的作用

[0428] iNOS高度表达于巨噬细胞中,其导致一些发炎及自体免疫性疾病中的器官破坏。COX-2亦为促炎酶,通过将二十碳四烯酸转化为前列腺素产生前列腺素E2(PGE2)。PGE2亦为自二十碳四烯酸代谢物产生的另一重要介质,所述代谢物由COX-2在发炎反应中催化。在基础条件下,iNOS及COX-2的产物,包括NO及前列腺素,涉及调节细胞功能及体内平衡。

[0429] 为研究偏亚砷酸钠是否可通过COX-2调控PGE2的产生,在用偏亚砷酸钠(2.5、5、7.5及10μM)处理后的RAW264.7细胞中测量PGE2产生。偏亚砷酸钠以剂量依赖性方式抑制PGE2产生。在偏亚砷酸钠的最大剂量(10μM)下,PGE2产生受到20%抑制(图4)。

[0430] 对偏亚砷酸钠在蛋白表达上的评定

[0431] 偏亚砷酸钠对iNOS及COX-2的蛋白表达的作用

[0432] 为评估偏亚砷酸钠对iNOS诱导的COX-2产生的抑制作用,通过蛋白印迹分析来分析iNOS及COX-2蛋白含量。Raw 264.7细胞用2.5、5、7.5或10μM偏亚砷酸钠预处理30分钟且用1μg/ml LPS刺激16小时。如图5中所示,iNOS表达由偏亚砷酸钠以浓度依赖性方式显著抑制。COX-2的表达略微受偏亚砷酸钠抑制。

[0433] 偏亚砷酸钠对TNF-α及IL-1β的蛋白表达的作用

[0434] 发炎细胞因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α)被视为发炎反应中的关键介质。响应于LPS,其亦通过分泌包括IL-1β及PGE2的各种促炎介质来介导发炎反应。IL-1β为具有显著的广泛范围功能的促炎细胞因子。通过蛋白印迹分析来分析偏亚砷酸钠对TNF-α及IL-1β蛋白含量的作用。Raw 264.7细胞用2.5、5、7.5或10μM偏亚砷酸钠预处理30分钟且用1μg/ml LPS刺激8小时。TNF-α及IL-1β表达由偏亚砷酸钠以浓度依赖性方式显著抑制(图6)。

[0435] 对偏亚砷酸钠在基因表达上的评定

[0436] 偏亚砷酸钠对iNOS及COX-2的mRNA表达的作用

[0437] 通过RT-PCR研究偏亚砷酸钠对iNOS及COX-2mRNA表达的作用。Raw 264.7细胞用2.5、5、7.5或10μM偏亚砷酸钠预处理30分钟且用1μg/ml LPS刺激8小时。且随后将所获得的1μg总RNA用于RT-PCR。

[0438] iNOS表达由偏亚砷酸钠以浓度依赖性方式显著抑制(图7及图8)。COX-2的表达不受偏亚砷酸钠影响(图7)。

[0439] 这确认偏亚砷酸钠在iNOS而非COX-2上显示抑制作用,表明偏亚砷酸钠经由调控iNOS表达而强力抑制发炎反应(图6)。通过蛋白印迹分析来分析iNOS及COX-2基因表达。iNOS的mRNA含量通过实时PCR测量且由偏亚砷酸钠以浓度依赖性方式显著抑制(图8)。

[0440] 偏亚砷酸钠对TNF-α及IL-1β的mRNA表达的作用

[0441] 发炎细胞因子TNF-α被视为发炎反应的关键介质。响应于LPS,其亦通过分泌包括TNF-α、IL-1β及PGE2的各种促炎介质来介导发炎反应。在促炎细胞因子之中,IL-1β或IFN-β具有引起对宿主组织损伤的最高潜力之一,且实际上,各种机制致力于通过谨慎地控制其转录及通过发炎反应处理而在细胞内限制其活性。因此,偏亚砷酸钠对TNF-α、IL-1β及IFN-βmRNA含量的作用通过RT-PCR分析来分析。

[0442] Raw 264.7细胞用2.5、5、7.5或10μM偏亚砷酸钠预处理30分钟且用1μg/ml LPS刺激5小时。且随后将所获得的1μg总RNA用于RTPCR。TNF-α的mRNA含量由偏亚砷酸钠以浓度依赖性方式显著减少,但偏亚砷酸钠对RAW 264.7巨噬细胞中的IL-1β或IFN-βmRNA的表达无作用(图9)。

[0443] 偏亚砷酸钠对核因子κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)的转录活性的作用

[0444] NF-κB转录因子已展示在包括iNOS的促炎介质的LPS诱导表达中起重要作用。编码iNOS的基因的启动子区含有NF-κB结合基序,且已展示NF-κB与iNOS启动子上游的NF-κB位点的结合在LPS诱导的iNOS基因上调中起重要作用。为研究由偏亚砷酸钠介导的NF-κB转录的抑制的分子机制,使用报告基因分析系统研究NF-κB转录活性。RAW 264.7细胞经pNF-κB-分泌碱性磷酸酶(secretory alkaline phosphatase,SEAP)-NPT质粒稳定转染,该质粒含有与作为报告基因(reporter)的SEAP融合的κB序列的四个复本。构建含有新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase,NPT)基因用于宿主细胞中的遗传霉素抗性的pNF-κB-SEAP-NPT质粒,且转染至RAW 264.7巨噬细胞中。加热培养基的等分试样且接着与4-甲基香豆素磷酸酯(MUP)反应。SEAP活性经测量为相对荧光单元(relative fluorescence unit,RFU)。LPS处理经转染细胞18小时相较于无LPS的对照细胞,SEAP表达增加大致3倍。用偏亚砷酸钠处理细胞以浓度依赖性方式显著抑制LPS诱导的SEAP表达(图10)。

[0445] 为检验偏亚砷酸钠是否调控NF-κB信号转导通路,在偏亚砷酸钠(2.5、5、7.5或10μM)预处理30分钟情况下,用LPS(1μg/mL)处理RAW264.7巨噬细胞持续15分钟,且亦通过蛋白印迹分析来分析p65、p50、IκB及IKK的含量。

[0446] 偏亚砷酸钠以浓度依赖性方式明显地减少NF-κB蛋白含量(图11)。偏亚砷酸钠以浓度依赖性方式明显地抑制IκB降解(图12)。

[0447] 实施例3-制备口服组合物

[0448] 口服组合物

[0449] 偏亚砷酸钠(“SMA”)获自Sigma Aldrich Fine Chemicals。如所供应,SMA药物物质呈现极高纯度(>98%As(III))及最小As(V)含量。下表1提供所供应的SMA药物物质的特性。

[0450] 表1:所供应的SMA药物物质的特性

[0451]

特性	**值/观测**

[0452]

外观	白色至灰白色粉末
熔点	615℃
溶解度	大致950mg/mL
典型分析 (As (III))	98 - 99%
典型杂质含量 (As (V))	≤ 0.2%
典型含水量	< 1.0%
吸湿性 (水分吸收)	在75% RH时~40% 在80% RH时>80% 在90% RH时>130%
密度 (真/粒子)	2.1 - 2.3 g/cm^3

[0453] 下表2中所列的材料用于制备2.5mg偏亚砷酸钠(“SMA”)肠溶包衣片剂。可能时,选择较高密度型式的主要赋形剂以努力匹配SMA的密度(具有大致2.1至2.3g/cm^{-3}的估计真密度的无机材料,其与大部分赋形剂相比非常致密)。

[0454] 表2:材料清单

材料	功能	商品名/ 供货商
偏亚砷酸钠（“SMA”）（纯度>98%）	活性药物成分	Sigma Aldrich Fine Chemicals （美国威斯康星州麦迪逊（Madison, Wisconsin, USA））
二水合硫酸钙	填充剂	Compactrol/JRS pharma
碳酸钙	填充剂	PressCAL MD 92.5/JRS
碳酸钙较细级别	填充剂	不适用/JRS
无水磷酸氢二钙	填充剂	Fujicalin/Fuji chemicals
无水磷酸氢二钙粉末	填充剂	A Comprez/JRS pharma
无水磷酸氢二钙细级别	填充剂	A-Comprez/JRS pharma
硅化微晶纤维素（silicified microcrystalline cellulose, sMCC）高密度级别	填充剂、可压缩稀释剂	Prosolv HD 90

[0455]

[0456]

材料	功能	商品名/供货商
微晶纤维素（MCC）高密度级别	黏合剂	Avicel PH302/FMC
部分预胶凝化淀粉	黏合剂、崩解剂、填充剂	Lycatab C-LM/Roquette
部分预胶凝化淀粉	黏合剂、崩解剂、填充剂	淀粉1500（Starch 1500）/Colorcon
羟丙基纤维素	黏合剂	Klucel EXF/Ashland
L-羟丙基纤维素	黏合剂、崩解剂	LH-B1/Shin-EtSu
胶态二氧化硅	助滑剂	Aerosil 200/Evonik
羟基乙酸淀粉钠	超崩解剂	Explotab/JRS Pharma
交联羧甲基纤维素钠	超崩解剂	Ac-di-Sol/FMC
硬脂酰反丁烯二酸钠	润滑剂	PRUV/JRS pharma
Opadry II（20A280013）	底衣层	Colorcon
Acryl-EZE II白（493Z180022）	包衣聚合物	Colorcon

[0457] 下表3中所列的设备用于制备及分析SMA肠溶包衣组合物。

[0458] 表3:设备清单

[0459]

设备名称	制造商	用途
天平	Sartorius	称重材料及片剂
Turbula掺合器	Turbula	掺合
2 L Turbula混合罐	Turbula	掺合
密度计	Copley	密度测量
Manesty F3压机（单冲头）	Manesty	压片
轮转压机（7个工位）	SCI	压片
6.5 mm圆形普通双凹面NCCP工具	Natoli	压片
0.25英寸工具Key International压片机	Key International	压片
硬度测试仪	Copley	测量片剂硬度

[0460]

设备名称	制造商	用途
测微仪（Micrometer）	Mitsuyi	测量片剂厚度
脆度测试仪	Copley	测试脆度
崩解浴	Copley	测试崩解度
15"包衣盘	Thai Coater	包衣

[0461] 制造实施例1

[0462] 遵循下文所描述的程序制备配制物实施例1.1至1.4的肠溶包衣片剂，其包含作为活性药物成分(API)的偏亚砷酸钠(“SMA”)。

[0463] 一般而言，且如下文详细描述，将偏亚砷酸钠(“SMA”)及赋形剂掺合在一起(在不使用水或溶剂的情况下的三阶段掺合制程中)以形成粉末掺合物。随后压缩粉末掺合物以形成片剂的实心核。接着，片剂的实心核用肠溶包衣包覆。

[0464] 掺合

[0465] 下文所描述的掺合过程用于掺合成分。

[0466] 分配API及组合物的其他成分且称重。由于API的浓度极低，因此努力利用三阶段掺合过程(利用“API预混物(API premix)”及“主要混合物(main mix)”)以改良掺合物均匀性。

[0467] 经由200μm筛(手筛)筛分API。筛分时间在5-8分钟之间。

[0468] 通过用Turbula掺合器以49rpm将经筛分的API与数克(对于500g批量大小为20g且对于700g批量大小为30g)的填充剂在合适容器(对于500g批量大小为100ml容器且对于700g批量大小为150ml)中掺合10分钟，来制备含有API的预混物(“API预混物(API premix)”)。

[0469] 助滑剂(胶态二氧化硅)经由500μm筛来筛分以去聚结。随后将除润滑剂(硬脂酰反丁烯二酸钠)外的所有其他分配成分，包括经筛分助滑剂，添加至2L玻璃Turbula罐中，其中API预混物包夹在粉末物质中间。

[0470] 使用Turbula掺合器在49rpm下将所得混合物(“主要混合物”)掺合约10至约20分钟以形成掺合粉末(“主要掺合物(main blend)”)。

[0471] 润滑剂(硬脂酰反丁烯二酸钠)使用500μm筛与一小部分主要掺合物一起筛分，且随后将一起筛分的混合物添加至主要掺合物中。此润滑步骤分开进行以努力避免过度润滑导致的可能复杂情况(例如降低片剂硬度或溶解问题)。

[0472] 在Turbula掺合器中以49rpm混合所得混合物2分钟，从而形成粉末掺合物。针对流动特性表征粉末掺合物。

[0473] 压缩

[0474] 粉末掺合物以150mg的目标片剂重量，使用6.5mm普通凹面平面(normal concave plain,NCCP)工具，在Manesty F3单冲头压片机上压缩。Manesty F3仅具有用于压缩力的任意单位(arbitrary unit,AU)且不可能直接测量所施加力。目标硬度水平高于90N。

[0475] 肠溶包衣

[0476] 20％w/w固体含量肠溶包衣分散液通过将Acryl-EZE II白(493Z180022)分散于去离子水中来制备。在使用之前及在整个包覆过程中使用浆式搅拌器搅拌分散液45分钟。在使用之前通过250μm筛来筛选分散液。

[0477] 使15”包衣盘(Thai Coater)平衡至设定点温度,随后用片剂的实心核装入。归因于较小批量大小,向API实心核添加“填充惰性物(bulking inert)”以满足包衣盘装载要求。使片剂的实心核在包覆之前在干燥盘中平衡10分钟。相同温度及气流用于加热、包覆及干燥阶段。包衣片剂在包衣后在盘中干燥10分钟。在8、10及12%w/w重量增加之后收集样品。

[0478] 溶解研究

[0479] 使用500mL介质及USP方法2(桨叶)最初以100rpm的桨叶速度进行溶解研究。检测单一组六个肠溶包衣片剂(n=6)。在酸中2小时后取出溶解介质的样品,且测定偏亚砷酸钠含量以评定胃抗性。用pH 6.8磷酸盐缓冲液替换介质且以15分钟的时间间隔抽取样品以产生溶解概况。

[0480] 此方法基于用于肠溶剂型的药典方法(EP.2.9.3及USP<711>),如以下表4中所示。

[0481] 表4:溶解研究的条件

[0482]

阶段	条件	描述	目的	要求
1	0.01M HCl	酸相	耐酸性	2小时内不超过10%释放
2	pH 6.8磷酸盐缓冲液	缓冲相	释放曲线	典型地,30-45分钟内不少于75%

[0483] 配制物

[0484] 使用上文在制造实施例1中所述的方法制备包含作为活性药物成分(API)的偏亚砷酸钠(SMA)的固体药物组合物(P63)。

[0485] 以700g规模制造组合物。收集掺合均匀性及含量均匀性样品以在20分钟主要掺合时间之后评定均匀性。

[0486] 下表5提供包含2.53mg偏亚砷酸钠(在包覆步骤之前)的片剂的实心核的组成。(下表5.1提供包含2.50mg偏亚砷酸钠(在包覆步骤之前)的片剂的实心核的另一可能组成。)

[0487] 表5:P63片剂的实心核的组成

[0488]

材料	功能	mg/片剂	% w/w
偏亚砷酸钠	API	2.53	1.69
无水磷酸氢二钙(A-Comprez细粒)	填充剂	82.22	54.81
L-羟丙基纤维素(LH-B1级别)	黏合剂、崩解剂	60.00	40.00
羟丙基纤维素(Klucel EXF)	黏合剂	3.00	2.00
胶态二氧化硅(Aerosil 200)	助滑剂	0.75	0.50
硬脂酰反丁烯二酸钠(PRUV)	润滑剂	1.50	1.00

[0489]

总计		**150.00**	**100.00**

[0490] 在掺合步骤之后,粉末掺合物展现良好流动特性,如由卡尔指数(Carr's Index)(29.3%)所指示。粉末掺合物在压缩之前具有以下特性:

[0491] ●充气密度:0.64g/cm^3

[0492] ●振实密度(tapped density):0.91g/cm^3

[0493] ●卡尔指数:29.3%

[0494] ●豪斯纳比值(Hausner ratio):1.30

[0495] 粉末掺合物极良好地压缩且在整个操作期间未观测到重量变化及/或视觉分离。实现高片剂硬度(104.8N)及低脆度(0.08%),且崩解时间(34秒)相对快速。片剂的实心核的平均厚度为3.63mm。

[0496] 掺合均匀性样品在掺合20分钟之后采集且在压缩运作开始、中间及结束时采集含量均匀性样品。掺合均匀性结果呈现极佳均匀性,其中相对标准偏差%(relative standard deviation,RSD)值为1.3。整个压缩运行(开始、中间及结束)中片剂的实心核的含量均匀性展示出良好均匀性,因为实现<7.4的最大接受值(acceptance value,AV)值(AV值<15为可接受的)。

[0497] 在压缩步骤之后,片剂的实心核包覆有Acryl-EZE II白(493Z180022)肠溶包衣聚合物系统,其如制造实施例1中所描述来制备。包衣参数展示于下表6中。

[0498] 表6:包衣参数

[0499]

参数	结果
包衣盘	15" Thai Coater
进入温度	90-110°C
排出温度	~50°C
滚筒速度	16 rpm
喷涂速度	10-11 g/min
床温度	~35°C
进入及排出口关闭	两者均在中间段
喷枪至床距离	5 cm（挡板不可见）
流体喷嘴（mm）	1.2 mm
风机气压	20 psi
喷枪气压	10 psi

[0500]

参数	结果
填充惰性物重量（g）	2500.0 g
活性片剂重量（g）	473.0 g
片剂床重量（g）	2973.0 g
20个片剂的初始重量（g）	3.017 g
12%包衣的目标重量增加（g）	3.379 g
12%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.381 g （12.06%重量增加）

[0501] 肠溶包衣片剂呈现可接受的溶解概况(500ml介质,桨叶速度100rpm)。在120分钟之后,组合物在酸性介质(pH 1.0)中完整,同时释放0%API。在pH 6.8下135分钟后,释放91%API。在pH 6.8下150分钟之后,释放98%API。在pH 6.8下165分钟之后,释放100%API。

[0502] 肠溶包衣片剂展现令人满意的耐胃性,且满足所提出的对于肠溶剂型在45分钟内不少于75%释放的初步规格。

[0503] 下表5.1提供包含2.50mg偏亚砷酸钠(在包覆步骤之前)的片剂的实心核的另一可能组成。具有表5.1中所描述的组分的实心核可以与上文针对具有表5中所描述的组分的实心核所描述类似的方式制备。

[0504] 表5.1:P63片剂的实心核的替代组成

[0505]

材料	功能	mg/片剂	% w/w
偏亚砷酸钠	API	2.50	1.67
无水磷酸氢二钙（A-Comprez细粒）	填充剂	82.25	54.83
L-羟丙基纤维素（LH-B1级别）	黏合剂、崩解剂	60.00	40.00
羟丙基纤维素（Klucel EXF）	黏合剂	3.00	2.00
胶态二氧化硅（Aerosil 200）	助滑剂	0.75	0.50
硬脂酰反丁烯二酸钠（PRUV）	润滑剂	1.50	1.00
总计		**150.00**	**100.00**

[0506] 配制物实施例1.2

[0507] 使用上文在制造实施例1中所述的方法制备包含作为活性药物成分(API)的偏亚砷酸钠(SMA)的固体药物组合物(P23)。

[0508] 以500g规模制造组合物。在主要掺合时间的10、15及20分钟之后收集掺合均匀性样品。压缩掺合物以形成片剂的实心核，且接着片剂的实心核被包覆。

[0509] 下表7提供包含2.50mg偏亚砷酸钠(在包覆步骤之前)的片剂的实心核的组成。

[0510] 表7:P23片剂的实心核的组成

[0511]

材料	功能	mg/片剂	% w/w
偏亚砷酸钠	API	2.50	1.67
无水磷酸氢二钙粉末（A-Comprez粉末）	填充剂	37.50	25.00
部分预胶凝化淀粉（淀粉1500）	黏合剂、崩解剂、填充剂	45.00	30.00
无水磷酸氢二钙颗粒（Fujicalin）	填充剂	58.25	38.83
羟基乙酸淀粉钠（Explotab）	超崩解剂	4.50	3.00
胶态二氧化硅（Aerosil 200）	助滑剂	0.75	0.50
硬脂酰反丁烯二酸钠（PRUV）	润滑剂	1.50	1.00
总计		**150.00**	**100.00**

[0512] 在掺合步骤之后，粉末掺合物展现良好流动特性，如由卡尔指数(Carr's Index)(26.37%)所指示。粉末掺合物在压缩之前具有以下特性：

[0513] ●充气密度:0.67g/cm^3

[0514] ●振实密度:0.91g/cm^3

[0515] ●卡尔指数:26.37%

[0516] ●豪斯纳比值:1.36

[0517] ●静止角:24.32°

[0518] 掺合均匀性样品在掺合主要掺合时间的10、15及20分钟之后收集。组合物在20分钟掺合时间时呈现良好均匀性。

[0519] 在使用6.5mm NCCP工具的Manesty F3单冲头机器上进行压缩。平均实心核硬度为94.3N,平均厚度为3.62mm,脆度为0.33%,且崩解时间为39秒。

[0520] 实心核的重量在整个压缩运作中一致且产生可接受的实心核。未观测到视觉分离。在压缩运作开始、中间及结束时收集样品(一式两份的10个实心核)且发送用于内容均匀性测试。

[0521] 在压缩步骤之后,片剂的实心核涂布有Acryl-EZE II白(493Z180022)肠溶包衣聚合物系统,其如制造实施例1中所述制备,且在8、10及12%w/w重量增加之后收集样品。包衣参数展示于下表8中。

[0522] 表8:包衣参数

[0523]

参数	结果
包衣盘	Thai Coater
进入温度	81 - 90℃
排出温度	~50℃
滚筒速度	18rpm减少至16rpm
初始喷涂速度	7 g/min
30分钟后喷涂速度	11 g/min
床温度	~35℃
进入及排出口关闭	两者均在中间段
喷枪至床距离	5 cm（挡板不可见）
泵速	05
流体喷嘴（mm）	1.2mm
喷枪气压	10psi
风机气压	20psi
填充惰性物重量（g）	3000 g
活性片剂重量（g）	240 g
片剂床重量（g）	3240 g
20个片剂的初始重量（g）	3.015 g
片剂包衣的% w/w目标	8%
8%包衣的目标重量增加（g）	3.256 g
经喷洒以实现8%重量增加的分散液的量（g）	1900 g
8%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.248 g
片剂包衣的% w/w目标	10%
10%包衣的目标重量增加（g）	3.317 g
经喷洒以实现10%重量增加的分散液的量（g）	2400 g
10%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.328 g
片剂包衣的% w/w目标	12%

[0524]

参数	结果
12%包衣的目标重量增加（g）	3.377 g
经喷洒以实现12%重量增加的分散液的量（g）	2900 g
12%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.384 g

[0525] 重量增加8％、10％及12％w/w的肠溶包衣片剂经历溶解测试(500ml溶解介质，桨叶速度75rpm)以鉴别适合含量的肠溶包衣。溶解结果展现于下表9中。

[0526] 表9:溶解结果

[0527]

样本名称	平均值（药物释放%）				
时间（分钟）	120	135	150	165	195
介质	pH 1.0	pH 6.8	pH 6.8	pH 6.8	pH 6.8
8% w/w肠溶包衣片剂	00	67	80.5	87	90
10% w/w肠溶包衣片剂	00	26	82	89	未测定
12% w/w肠溶包衣片剂	00	27	83	90	92

[0528] 在120分钟之后，肠溶包衣片剂在酸性介质中完整。肠溶包衣片剂展现令人满意的耐胃性，且满足所提出的在45分钟内在肠溶剂型中不低于75％释放的初步规格。

[0529] 基于溶解结果，发现12％w/w为最佳包衣重量增加。

[0530] 配制物实施例1.3

[0531] 使用上文在制造实施例1中所述的方法制备包含作为活性药物成分(API)的偏亚砷酸钠(SMA)的固体药物组合物(P31)。

[0532] 以500g规模制造组合物。在主要掺合时间的10、15及20分钟之后收集掺合均匀性样品。压缩掺合物以形成片剂的实心核，且接着片剂的实心核经包覆。L-羟丙基纤维素(L-Hydroxypropyl cellulose，L-HPC；低取代羟丙基纤维素LH-B1级别)以其充当黏合剂及崩解剂使用。由于L-HPC不溶于水，预期其将产生硬质片剂。

[0533] 下表10提供包含2.50mg偏亚砷酸钠(在包覆步骤之前)的片剂的实心核的组成。

[0534] 表10：P31片剂的实心核的组成

[0535]

材料	功能	mg/片剂	% w/w
偏亚砷酸钠	API	2.50	1.67
无水磷酸氢二钙粉末（A-Comprez粉末）	填充剂	37.50	25.00
无水磷酸氢二钙颗粒（Fujicalin）	填充剂	80.75	53.83
L-羟丙基纤维素（LH-B1级别）	黏合剂、崩解剂	22.50	15.00
羟基乙酸淀粉钠（Explotab）	超崩解剂	4.50	3.00
胶态二氧化硅（Aerosil 200）	助滑剂	0.75	0.50
硬脂酰反丁烯二酸钠（PRUV）	润滑剂	1.50	1.00
总计		**150.00**	**100.00**

[0536] 在掺合步骤之后，粉末掺合物展现良好流动特性，如由卡尔指数(Carr's Index)(23.68％)所指示。粉末掺合物在压缩之前具有以下特性：

[0537] ●充气密度：0.58g/cm^3

[0538] ●振实密度：0.76g/cm^3

[0539] ●卡尔指数：23.68％

[0540] ●豪斯纳比值：1.31

[0541] ●静止角：27.96°

[0542] 掺合均匀性样品在掺合主要掺合时间的10、15及20分钟之后收集。组合物在20分钟掺合时间时呈现良好均匀性。

[0543] 在使用6.5mm NCCP工具的Manesty F3单冲头机器上进行压缩。平均实心核硬度为

104.3N,平均厚度为3.52mm,脆度为0.23%,且崩解时间为30秒。

[0544] 实心核的重量在整个压缩运作中一致且产生可接受的实心核。未观测到视觉分离。在压缩运作开始、中间及结束时收集样品(一式两份的10个实心核)且发送用于内容均匀性测试。

[0545] 在压缩步骤之后,片剂的实心核涂布有Acryl-EZE II白(493Z180022)肠溶包衣聚合物系统,其如制造实施例1中所述制备,且在8、10及12%w/w重量增加之后收集样品。包衣参数展示于下表11中。

[0546] 表11:包衣参数

[0547]

包衣盘	Thai Coater
进入温度	81 - 90°C
排出温度	50°C
滚筒速度	18rpm减少至16rpm
初始喷涂速度	7 g/min
30分钟后初始喷涂速度	11 g/min
床温度	35°C
进入及排出口关闭	两者均在中间段
喷枪至床距离	5 cm（挡板不可见）
泵速	05
流体喷嘴（mm）	1.2mm
喷枪气压	10psi
风机气压	20psi
填充惰性物重量（g）	3000 g
活性片剂重量（g）	260 g
片剂床重量（g）	3260 g
20个片剂的初始重量（g）	2.995 g
片剂包衣的% w/w目标	8%
8%包衣的目标重量增加（g）	3.235 g
经喷洒以实现8%重量增加的分散液的量（g）	1900 g
8%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.231 g

[0548]

包衣盘	Thai Coater
片剂包衣的% w/w目标	10%
10%包衣的目标重量增加（g）	3.295 g
经喷洒以实现10%重量增加的分散液的量（g）	2400 g
10%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.282 g
片剂包衣的% w/w目标	12%
12%包衣的目标重量增加（g）	3.354 g
经喷洒以实现12%重量增加的分散液的量（g）	2900 g
12%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.362 g

[0549] 重量增加8%、10%及12%w/w的肠溶包衣片剂经历溶解测试(500ml溶解介质,桨叶速度75rpm)以鉴别适合含量的肠溶包衣。溶解结果展现于下表12中。

[0550] 表12:溶解结果

[0551]

样本名称	平均值（药物释放%）				
时间（分钟）	120	135	150	165	195
介质	pH 1.0	pH 6.8	pH 6.8	pH 6.8	pH 6.8
8% w/w肠溶包衣片剂	19.6	0*	0*	0*	0*
10% w/w肠溶包衣片剂	00	55	74	86	未测定
12% w/w肠溶包衣片剂	00	67	81	88	91

[0552] *所有片剂均在酸中破裂。0%药物溶解于pH 6.8介质中,因为破裂的片剂将导致在酸相中的降解且因此API未在缓冲相中检测到。

[0553] 8%w/w重量增加肠溶包衣片剂未通过抗酸性测试。10%w/w重量增加肠溶包衣片剂及12%w/w重量增加肠溶包衣片剂展现令人满意的胃抗性,且满足所提出的对于肠溶剂型在45分钟内不少于75%释放的初步规格。

[0554] 基于溶解结果,发现12%w/w为最佳包衣重量增加。

[0555] 配制物实施例1.4

[0556] 使用上文在制造实施例1中所述的方法制备包含作为活性药物成分(API)的偏亚砷酸钠(SMA)的固体药物组合物(P66)。

[0557] 以700g规模制造组合物。收集掺合均匀性及含量均匀性样品以在20分钟主要掺合时间之后评定均匀性。

[0558] 下表13提供包含2.53mg偏亚砷酸钠(在包覆步骤之前)的片剂的实心核的组成。

[0559] 表13:P66片剂的实心核的组成

[0560]

材料	功能	mg/片剂	% w/w
偏亚砷酸钠	API	2.53	1.69
无水磷酸氢二钙（A-Comprez细粒）	填充剂	71.55	47.70
部分预胶凝化淀粉（淀粉1500）	黏合剂、崩解剂、填充剂	67.67	45.11
羟基乙酸淀粉钠（Explotab）	超崩解剂	6.00	4.00
胶态二氧化硅（Aerosil 200）	助滑剂	0.75	0.50
硬脂酰反丁烯二酸钠（PRUV）	润滑剂	1.50	1.00
总计		**150.00**	**100.00**

[0561] 在掺合步骤之后,粉末掺合物展现良好流动特性,如由卡尔指数(Carr's Index)(25.74%)所指示。粉末掺合物在压缩之前具有以下特性:

[0562] ●充气密度:0.75g/cm^3

[0563] ●振实密度:1.01g/cm^3

[0564] ●卡尔指数:25.74%

[0565] ●豪斯纳比值:1.35

[0566] 粉末掺合物极良好地压缩且在整个操作期间未观测到重量变化和/或视觉分离。实现高实心核硬度(87.4N)及低脆度(0.11%),且崩解时间(2分钟52秒)相对快速。实心核的平均厚度为3.66mm。

[0567] 掺合均匀性样品在掺合20分钟之后采集且在压缩运作开始、中间及结束时采集含量均匀性样品。掺合均匀性结果呈现极佳均匀性,其中相对标准偏差%(RSD)值为2.1。整个压缩运作(开始、中间及结束)中实心核的含量均匀性展示出良好均匀性,因为实现了<6.3的最大接受值(AV)值(AV值<15为可接受的)。

[0568] 在压缩步骤之后,片剂的实心核包覆有Acryl-EZE II白(493Z180022)肠溶包衣聚合物系统,其如制造实施例1中所描述来制备。包衣参数展示于下表14中。

[0569] 表14:包衣参数

[0570]

参数	结果
包衣盘	15" Thai Coater
进入温度	90-110°C
排出温度	~50°C
滚筒速度	16 rpm
喷涂速度	10-11 g/min
床温度	~35°C
进入及排出口关闭	两者均在中间段
喷枪至床距离	5 cm（挡板不可见）
流体喷嘴（mm）	1.2 mm
风机气压	20 psi
喷枪气压	10 psi
填充惰性物重量（g）	2600.0 g
活性片剂重量（g）	350.0 g
片剂床重量（g）	2950.0 g
20个片剂的初始重量（g）	3.010 g
12%包衣的目标重量增加（g）	3.371 g
12%重量增加后20个片剂的重量（g）	3.380 g (12.2%重量增加)

[0571] 肠溶包衣片剂呈现可接受的溶解概况(500ml介质,桨叶速度100rpm)。在120分钟之后,组合物在酸性介质(pH 1.0)中完整,释放0%API。在pH 6.8下135分钟后,释放21%API。在pH 6.8下150分钟之后,释放86%API。在pH 6.8下165分钟之后,释放96%API。在pH 6.8下195分钟之后,释放98%API。

[0572] 肠溶包衣片剂展现令人满意的耐胃性,且满足所提出的对于肠溶剂型在45分钟内不少于75%释放的初步规格。

[0573] 制造实施例2

[0574] 下表15提供包含2.5mg偏亚砷酸钠作为活性药物成分(API)的肠溶包衣片剂的组成。肠溶包衣片剂使用下文所述的方法制备。

[0575] 表15:制造实施例2的肠溶包衣片剂的组成

[0576]

材料	功能	mg/片剂	% w/w
偏亚砷酸钠（SMA）	API	2.50	1.67
无水磷酸氢二钙，USP（粉末状级别）	稀释剂、填充剂	37.50	25.00
硅化微晶纤维素（Prosolv HD90）	填充剂、可压缩稀释剂	107.00	71.33
羟基乙酸淀粉钠(Explotab)	超崩解剂	1.50	1.00
胶态二氧化硅（Cab-o-sil）	助滑剂	0.75	0.50
硬脂酰反丁烯二酸钠（PRUV）	润滑剂	0.75	0.50
总计-核：		150.00	100
Acryl-EZE绿（93O11863）肠溶聚合物包衣	肠溶包衣	16.50	
总计-呈包衣片剂形式：		166.50	

[0577] 一般而言,且如下文详细地描述,将偏亚砷酸钠(“SMA”)及赋形剂掺合在一起(不使用水或溶剂的二阶段掺合过程)以形成粉末掺合物。随后压缩粉末掺合物以形成片剂的实心核。接着,片剂的实心核用肠溶包衣包覆。

[0578] 掺合

[0579] 下文所描述的掺合过程用于掺合成分。

[0580] 分配API及组合物的其他成分且称重。由于API的浓度极低,因此努力利用二阶段掺合过程(利用“API预混物”及“主要混合物”)以改良掺合物均匀性。

[0581] API经由106μm筛来筛选(筛分时间为约5至8分钟)。

[0582] 向经筛分的API中添加一部分磷酸氢二钙,且将所得混合物掺合30分钟以得到“API预混物”。

[0583] API预混物随后与剩余磷酸氢二钙及其他赋形剂(硅化微晶纤维素、羟基乙酸淀粉钠、胶态二氧化硅及硬脂酰反丁烯二酸钠)掺合,得到“主要混合物”。主要混合物用加强杆掺合4分钟,得到粉末掺合物。

[0584] 压缩

[0585] 粉末掺合物在Key International压锭机上使用0.25英寸工具压缩至150mg+5%

的目标片剂重量(范围142.5-157.5mg)。将实心核除尘。

[0586] 最终实心核展现无显著脆度(0.00%)且硬度为156.9N(16kp)。

[0587] 肠溶包衣

[0588] 通过将Acryl-EZE绿粉末分散于去离子水中来制备25%w/w固体含量肠溶包衣分散液。搅拌分散液约30分钟(直至均匀)。

[0589] 用分散液对经除尘的实心核进行喷涂(350g/min),重量增加约10至12%w/w。盘速度为约6-8rpm。包衣后干燥包衣片剂。

[0590] 实施例4-单次剂量的SMA在BALB/c小鼠中LPS诱导的ARDS模型中的抑制性作用

[0591] 此研究通过在口服施用SMA、测试物质及地塞米松(阳性对照物质)之后测量细胞因子在支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中的含量,来评估物质控制ARDS模型中急性呼吸窘迫症候群(acute respiratory distress syndrome,ARDS)的能力,所述ARDS模型通过向小鼠(Mus musculus)(BALB/c)气管内施用LPS来诱导。

[0592] 有五组小鼠G1至G5:(G1)阴性对照;(G2)1.03mg/kg剂量的SMA;(G3)1.54mg/kg剂量的SMA;(G4)2.05mg/kg剂量的SMA;及(G5)3mg/kg剂量的阳性对照物质地塞米松。各组中存在10只小鼠。

[0593] 在诱导ARDS之前2小时口服施用SMA测试物质一次,且在诱导ARDS之前1小时口服施用阳性对照物质地塞米松。

[0594] 在隔离环境适应时间段结束之后一天一次观测大体症状。在获取动物之前两次测量动物的重量且开始测试。直至测试结束,在所有组中未观测到因施用物质所致的异常。

[0595] 在群组分配时,测量所有动物的体重,将动物随机分配至各组,且所有组中的动物的体重无统计显著性。

[0596] 存活率分析展示,存活率通过施用测试物质而延长,具有统计显著性(G3:$p<0.005$(LPS处理后48小时);G4:$p<0.0005$(LPS处理后48小时);G5:$p<0.0001$(LPS处理后48小时)。

[0597] TNF-α分析展示,测量在所有时间点均高于定量限制(limit of quantitation,LoQ),且目标表达以统计学上显著的方式受施用的测试物质抑制(G4:$p<0.005$(LPS施用之后1小时、2小时、6小时及12小时);G5:$p<0.0005$(LPS施用之后4小时)及$p<0.0001$(LPS施用之后1小时、2小时、6小时及12小时)),除LPS预施用(0小时)及24小时以外。

[0598] IL-6分析发现测量在所有时间点高于LoQ且目标表达以统计学上显著的方式受到所施用测试物质抑制(G4:$p<0.05$(LPS施用之后2小时及4小时)及$p<0.005$(LPS施用之后6小时及12小时);G5:$p<0.05$(LPS施用之后1小时、2小时、4小时及24小时)及$p<0.0005$(LPS施用之后6小时)及$p<0.0001$小时(LPS施用之后12小时),除LPS预施用(0小时)以外。

[0599] IL-1β分析发现在4小时及6小时时IL-1β测量高于LoQ,且发现目标表达以统计显著方式受所施用测试物质抑制(G4:$p<0.005$(LPS施用之后4小时及6h);G5:$p<0.0005$(LPS施用之后4小时及6小时)),除LPS预施用(0小时)、1小时、2小时、12小时及24小时以外。发现表达在LPS施用之后12小时为统计显著的(G4:$p<0.005$;G5:$p<0.0005$),但被排除在外,因为测量结果不高于LoQ。

[0600] IFN-γ数据由于未能在所有测量点超过LoQ而自分析排除。

[0601] 作为GM-CSF分析的结果,所有测量值均自分析排除,因为除了测量在LPS施用之后6小时进行的G1组外,其并未超过LoQ。LPS施用之后4小时的表达分析为统计显著的(G2:p<

0.05,G3:p<0.05,G4:p<0.05,G5:p<0.05),但被排除在外,因为测量值不高于LoQ。

[0602] 通过在ARDS模型中施用测试物质SMA来进行此研究,以检验测试物质SMA对LPS刺激的促炎介质的抑制能力,所述ARDS模型通过重复气管内施用LPS至小鼠(BALB/c)来诱导。在此研究中,在用测试物质或阳性对照物质施用的组中评估测试物质及阳性对照物质对LPS刺激的促炎介质的作用。发现,当使用BALF分析时,施用测试物质的组中及施用阳性对照物质的组中显著抑制被称为ARDS的主要介质的细胞因子(TNF-α、IL-6及IL-1β)含量。

[0603] 据确认,测试物质SMA在特定测量点处以剂量依赖性方式抑制LPS刺激的TNF-α及IL-6的产生,证明SMA作为治疗剂预防ARDS的功效。

[0604] 在IFN-γ、GM-CSF及IL-1β的情况下,在一些测量点处自通过LoQ分析的范围排除分析值,但在一些测量点发现测试物质SMA以剂量依赖性方式抑制IL-1β的产生。

[0605] 总之,SMA对诸如TNF-α、IL-6及IL-1β的促炎介质的产生发挥快速抑制作用,且因此可用于通过缓解急性呼吸症候群来延长存活。

[0606] 在实施例4的图及表中,SMA被称为"PAX-1"。

[0607] 4.1实验综述

[0608] 进行此研究以评估控制急性呼吸窘迫症候群(ARDS)的能力,其通过向小鼠(BALB/c)经由气管内施用而在LPS诱导的ARDS模型中口服施用SMA、测试物质及地塞米松(阳性对照)之后,测量支气管肺泡灌洗液中的细胞因子释放量。

[0609] 4.2.研究材料及程序

[0610] 4.2.1测试物质

[0611]

物质名词	SMA
物理特性	白色粉末
储存条件	在室温下储存
处置预防措施	储存在室温下直至处理
特别注意	避免光照

[0612] 4.2.2阳性对照物质

[0613]

物质名称	地塞米松(目录D2915;购自Sigma-Aldrich Korea公司)
物理特性	白色粉末
储存条件	保持冷藏(4℃)
处置预防措施	储存在室温下直至处理
特别注意	保持冷藏直至处理为止;在处理当天制备及使用

[0614] 4.2.3媒剂

[0615]

物质名称	无菌注射用水(序号C4V1AF3,购自韩国Dai Han Pharm公司)
储存条件	室温

[0616] 4.2.4制备测试物质及配制物分析

[0617] 测试物质(SMA)通过将成分称重至1.03、1.54及2.05mg/kg的剂量浓度来制备。

[0618] 4.2.5急性呼吸窘迫症候群(ARDS)模型的产生

[0619] 4.2.5.1诱导物质

[0620]

名称	脂多醣；来自大肠杆菌（*Escherichia coli* ）的LPS（O111:B4）（目录L4130； 购自Sigma-Aldrich Korea公司）
溶解度	5mg/mL

[0621] 4.2.5.2制备及处理方法

[0622] 制备(BALF)

[0623] 在LPS处理当天，基于动物体重的所需体积以100μg LPS称量与500μL所添加的注射用水的比率制备。含有混合物的管使用涡流混合器充分混合且在处理前保持在冰上。

[0624]

名称	组成
LPS	1mg
注射用水	5mL
总体积	5mL

[0625] 制备(存活率)

[0626] 在LPS处理当天，通过对48mg LPS称重且添加12mL注射用水来制备基于动物体重的所需体积。含有混合物的管使用涡流混合器充分混合且在施用前保持在冰上。

[0627]

名称	组成
LPS	48mg
注射用水	12mL
总体积	12mL

[0628] 4.2.6测试动物

[0629]

物种及品种	BALB/cAnNTac
制造商	韩国DaehanBiolink公司
年龄	8周龄
D.O.B.	2020.02.10 ～ 12 （BALF）
D.O.B.	2020.04.01 ～ 03 （存活率）
性别	雄性（BALF），雌雄（存活率）
购买地	韩国DaehanBiolink公司

[0630] 在入选时的性别、动物数目、年龄及体重范围(BALF)

[0631] 雄性，360只小鼠，8周龄，19.2g～25.0g

[0632] 在入选时的性别、动物数目及体重范围(存活率)

[0633] 雌性,60只小鼠,6周龄,18.2g～21.3g

[0634] ARDS诱导

[0635] BALF

[0636] 在隔离环境适应周期结束之后一天测量小鼠体重之后,使用抛弃式吸液管尖部装载50μL LPS混合物,且经由气管内向已麻醉小鼠进行强制施用10μg/50μL/头。检查小鼠,同时其在施用之后自麻醉恢复。小鼠用LPS处理两次,且在第1天及第5天进行处理。每天一次观测经处理小鼠的一般症状。

[0637] 存活率

[0638] 在完成隔离环境适应周期之后一天测量体重之后,LPS混合物使用抛弃式注射器(1mL,26G)以20mg/kg的浓度注射至腹膜中。对于一般症状每小时观测经处理小鼠,且检查死亡小鼠。

[0639] 群组分配

[0640] BALF

[0641] 在初级经LPS处理的小鼠中,在第二次施用(加打)之前无健康问题者按各组的体重尽可能均匀地组分离为总共5组,每组70只小鼠。

[0642] 存活率

[0643] 在隔离适应周期之后,将无异常的动物按各组的体重尽可能均匀地组分离为总共5组,每组10只小鼠。

[0644] 4.2.7处理

[0645] 处理途径

[0646] 研究物质:口服(强制施用至胃中)

[0647] LPS(BALF):强制施用至支气管中

[0648] (气管内注射)

[0649] LPS(存活率):腹膜内

[0650] 处理方法及频率

[0651] 处理使用抛弃式注射器(BD 1ml注射器,目录:REF301321,批次:9326990BD,U.S.A.)进行一次,且各研究物质基于其诱导急性呼吸窘迫症候群(LPS处理)所花费的时间进行处理。

[0652] SMA(测试物质)在2小时之前

[0653] 地塞米松(阳性对照物质)在1小时之前

[0654] 4.2.8群组组成及处理剂量

[0655] 4.2.8.1群组组成(BALF)

[0656]

	组	BALF取样时间点	处理剂量(mg/kg)	处理体积(mL/kg)	动物数目*(实体编号)
G1	阴性对照	LPS之前	0	10	70 (2101 ～ 2170)
G2	SMA(低)	处理(0h)	1.03	10	70 (2201 ～ 2270)
G3	SMA(中)	1小时、2小时、4小时、6小时、12小时	1.54	10	70 (2301 ～ 2370)
G4	SMA(高)	及24小时	2.05	10	70 (2401 ～ 2470)
G5	地塞米松	(总共7次)	3	10	70 (2501 ～ 2570)

[0657] *BALF取样由每组10只小鼠构成,且其对总共70只小鼠进行7次。

[0658] 4.2.8.2群组组成(存活率)

[0659]

	组	LPS (mg/kg)	处理剂量 (mg/kg)	处理体积 (mL/kg)	动物数目 (实体编号)
G1	阴性对照	20	0	10	10 (2101 ～ 2110)
G2	SMA（低）	20	1.03	10	10 (2201 ～ 2210)
G3	SMA（中）	20	1.54	10	10 (2301 ～ 2310)
G4	SMA（高）	20	2.05	10	10 (2401 ～ 2410)
G5	地塞米松	20	3	10	10 (2501 ～ 2510)

[0660] 4.2.8.3处理剂量的设定

[0661] 测试物质(SMA)的处理剂量计划为5、7.5及10mg,其将在临床环境下应用于60kg健康成人体重。人类等效剂量(human equivalent dose,HED)由FDA指南*的计算方法使用身体表面积计算,且通过取代以调整测试动物(小鼠)的身体表面积,其设定为1.03、1.54及2.05mg/kg。

[0662] *根据行业指导提取,估计成年健康志愿者的治疗剂在初始临床试验中的最大安全起始剂量

[0663]

基于身体表面积由动物剂量转化至人类等效剂量（HED）

[0664]

物种	为将以mg/kg为单位的动物剂量转化为以mg/m^2为单位的剂量，乘以k_m	或将以mg/kg为单位的动物剂量转化为以mg/kg为单位的HED*：	
		由以下除以动物剂量	由以下乘以动物剂量
人类	37	-	-
小鼠	3	12.3	0.08

[0665] *基于成年重量,60kg

[0666] 4.2.9观测及体重测量

[0667] 一般症状的观测结果

[0668] 在观察期间,检查一般症状,诸如每日一次外观、行为及粪便,及死亡动物。

[0669] 死亡动物的安置

[0670] 在观测期期间,发生总共8只死亡案例,且其自分析排除。

[0671] 体重测量

[0672] 在细胞系移植当天、一周一次及在处死当天测量体重。若在处理当天测量体重,则在施用之前测量体重。

[0673] 4.2.10BALF取样及细胞因子分析

[0674] 支气管肺泡灌洗液的取样;BALF

[0675] 切开使用麻醉剂的经麻醉实体的呼吸道,暴露支气管,且将抛弃式22G导管(BD,目录:REF382423,U.S.A.)插入至支气管中。将插入导管及支气管缝合(AILEE,目录号:SK521,批次:7908772U,KOREA)以固定,从而防止输注渗漏,经由导管用装载于抛弃式注射器(BD 1ml注射器,BD,目录:REF301321,批次:9326990,U.S.A.)中的600μL的PBS(welgene,目录:

ML008-01,批次:ML08200201,KOREA)缓慢洗涤肺内部两次,且灌洗转移至微管(SPL,目录:60015,批次:LAOC16A60015,KOREA)。转移的BALF(肺灌洗)立即离心(Hanil,HI_SM-13/A2.0,KOREA)以分离细胞及上清液,且上清液转移至新试管,且在细胞因子分析之前在使用液氮在深度冰箱中快速冷冻后储存。

[0676] 细胞因子分析

[0677]

用于分析的样品	目标	分析方法
BALF	IL-1β、IL-6、TNF-α、GM-CSF、IFN-γ	Multiplex（多重）
	iNOS、COX-2、NF-kB	ELISA*

[0678] *提供分析试剂盒

[0679] 4.2.11存活率分析

[0680] 每小时检查死亡动物直至LPS处理之后24小时及48小时。

[0681] 4.2.12对数据的统计分析

[0682] 使用Prism(Graphpad,第7版)进行获自研究的支气管肺泡灌洗液(BALF)的细胞因子的分析结果。

[0683] 使用D'Agostino-pearson多用常态性测试进行等方差性检验(equal variance test)。由于样品的分析结果(除体重数据以外)缺乏样品数量,因此拒绝等方差性检验。对于体重分析,若进行等效单因素方差分析(one-way analysis of variance,ANOVA;显著性水平:0.05)且若观测到显著性,则进行Dunnett t检验的多个检验,以确认各测试组(G2～G5)相对于阴性对照组(G1)之间的显著性(显著性水平:单侧0.05及0.01)。当对于若干体重测量时间点及细胞因子分析结果排斥测试时,进行Kruskal-Wallis检验(显著性水平:0.05),且若观测到显著性,则进行Dunn检验的多个检验,以确认各测试组(G2～G5)相对于阴性对照组(G1)之间的显著性(显著性水平:单侧0.05及双侧0.1)。

[0684] 关于存活率分析的结果,进行对数秩(Mantel-Cox)检验以确认各测试组(G2～G5)相对于阴性对照组(G1)之间的显著性(显著性水平:单侧0.05及双侧0.1)。

[0685] 4.3.结果与讨论

[0686] 4.3.1对细胞因子产生及抑制的评估

[0687] 4.3.1.1.对细胞因子产生的分析(图13～15,表16-19)

[0688] Multiplex(Luminex,Austin,TX,USA)用于分析TNF-α、IL6、IL-1β、IFN-γ及GM-CSF,其测量中值荧光强度(median fluorescent intensity,MFI)。通过按群组及BALF获取时间点对各样品进行分拣,总共7个集合用于分析且其经设计以分配每个集合来自各组的一个样品。

[0689] 所有分析通过用由四次多项式计算的各集合的标准曲线公式取代测量的MFI值来运算。在所有分析中,标准值的R^2值确认为1,且测量数据被确认为高度可信的。

[0690] 使用来自研究方案的试剂稀释由于定量限制而排除在分析外的那些样品。

[0691] 因为稀释比率应用于分析LPS刺激的高水平细胞因子释放,所以确认具有低值的那些被测量为低于定量限值且被包括为不准确的测量结果。尽管这些根据稀释比率由于扩增而自分析排除,但已产生表及图,包括所有数据。

[0692] 对TNF-α的分析(图13,表16)

[0693] 在预LPS处理(0小时)及24小时分析中测量所有组中TNF-α的表达为2pg/mL及11～12pg/mL。然而,其自数据分析排除,因为其低于MFI的定量界限。在LPS处理后1小时、2小时、6小时及12小时进行分析。

[0694] 表16:BALF中的平均TNF-α含量的概述

[0695]

组/剂量 (mg/kg)		含TNF-α的BALF (pg/mL)						
		施用之后的时间 (小时)						
		0	1	2	4	6	12	24
G1	平均值	2	1,997	1,417	1,036	735	249	11
0	S.D.	0	578	315	454	188	23	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
G2	平均值	2	1,303	1,004	794	502	174	12
1.03	S.D.	0	225	377	187	188	21	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
G3	平均值	2	1,062	707	611	407	120	12
1.54	S.D.	0	445	227	297	49	17	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
G4	平均值	2	729	559	539	303	38	12
2.05	S.D.	0	139	60	137	111	5	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
			##	##		##	##	
G5	平均值	2	508	394	338	204	23	11
3	S.D.	0	140	87	48	24	5	2
	N	7	7	7	7	7	7	7
			####	####	###	####	####	

[0696] G1(阴性对照,0mg/kg)、G2(PAX-1,1.03mg/kg)、G3(PAX-1,1.54mg/kg)、G4(PAX-1,2.05mg/kg)、G5(地塞米松,3mg/kg)

[0697] 各点表示平均值+S.D.(n＝7)

[0698] $^{##}p<0.005$,根据Dunn检验与阴性对照(G1)显著差异

[0699] $^{###}p<0.0005$,根据Dunn检验与阴性对照(G1)显著差异

[0700] $^{####}p<0.0001$,根据Dunn检验与阴性对照(G1)显著差异

[0701] 0小时及24小时的结果由于定量限制而排除。

[0702] N:动物数目

[0703] 阴性对照组(G1)中TNF-α产量的变化始于1,997pg/mL,且随后1,417pg/mL、1,036pg/mL、735pg/mL及249pg/mL;观测到LPS诱导的TNF-α产量以时间依赖性方式增加且随后减少。

[0704] 用1.03mg/kg SMA(G2)处理的组中TNF-α产量的变化为1,303pg/mL、1,004pg/mL、794mg/mL、502pg/mL及174pg/mL。观测到LPS诱导的TNF-α产量以时间依赖性方式增加且随后减少;然而,当其时间依赖性TNF-α产量与阴性对照组(G1)的时间依赖性TNF-α产量相比时,不存在统计显著性($p<0.05$)。

[0705] 用1.54mg/kg SMA(G3)处理的组中TNF-α产量的变化为1,062pg/mL、707pg/mL、

611pg/mL、407pg/mL及120pg/mL。观测到LPS诱导的TNF-α产量以时间依赖性方式增加且随后减少;然而,当其时间依赖性TNF-α产量与阴性对照组(G1)的时间依赖性TNF-α产量相比时,不存在统计显著性($p<0.05$)。

[0706] 用2.05mg/kg SMA(G4)处理的组中TNF-α产量的变化为729pg/mL、559pg/mL、539pg/mL、303pg/mL及38pg/mL。观测到LPS诱导的TNF-α产量以时间依赖性方式增加且随后减少,且在一些时间点处,当相比于阴性对照组(G1)时,其TNF-α值在统计学上显著($p<0.005$:1小时、2小时、6小时及12小时)。

[0707] 用3mg/kg阳性对照物质、地塞米松(G5)处理的组中TNF-α产量的变化为508pg/mL、394pg/mL、338pg/mL、204pg/mL及23pg/mL。观测到当相比于阴性对照组(G1)时,LPS诱导的TNF-α产量以时间依赖性方式增加且随后减少,且在一些时间点,其TNF-α值在统计学上显著($p<0.0005$:4小时,$p<0.0001$:1小时、2小时、6小时、12小时)。

[0708] 所有组(G1-G5)中TNF-α产量的变化绘制于随时间推移的图上(数据未示出),通过计算各组的AUC(曲线下面积)值来获取TNF-α的总体减少量(图13)。相比于阴性对照组(G1),在用SMA或地塞米松处理的所有组中,TNF-α产量的统计学上显著减少显而易见($p<0.005$:G2-G5)。以下表19提供各组药物处理的AUC值的数值及统计分析。

[0709] 对IL-6的分析(图14,表17)

[0710] 在LPS处理之前的分析(0小时)中,所有组中IL-6的表达经测量为12～13pg/mL。然而,由于这些值低于MFI的定量极限,故其自数据分析排除,且LPS处理后1小时、2小时、4小时、6小时、12小时及24小时的数据用于分析。

[0711] 表17:BALF中的平均IL-6含量的概述

[0712]

组/剂量(mg/kg)		含IL-6的BALF(pg/mL)						
		施用之后的时间(小时)						
		0	1	2	4	6	12	24
G1	平均值	13	3,663	10,238	13,015	10,298	8,169	3,513
0	S.D.	3	1,062	2,529	2,255	1,692	1,021	1,496
	N	7	7	7	7	7	7	7
G2	平均值	13	2,984	10,188	12,871	8,954	7,276	3,402
1.03	S.D.	3	332	3,985	3,450	1,714	2,255	1,249
	N	7	7	7	7	7	7	7
G3	平均值	13	3,152	7,107	9,842	6,814	5,094	3,623
1.54	S.D.	3	610	2,473	2,427	1,075	1,541	936
	N	7	7	7	7	7	7	7
G4	平均值	13	2,193	4,701	8,209	4,341	2,629	2,096
2.05	S.D.	3	764	2,376	2,321	798	652	335
	N	7	7	7	7	7	7	7
				#	#	##	##	
G5	平均值	12	2,172	4,411	7,727	2,064	1,294	1,804
3	S.D.	2	416	770	2,308	274	467	550
	N	7	7	7	7	7	7	7
			#	#	#	###	####	#

[0713] G1(阴性对照,0mg/kg)、G2(PAX-1,1.03mg/kg)、G3(PAX-1,1.54mg/kg)、G4(PAX-1,

2.05mg/kg)、G5(地塞米松,3mg/kg)

[0714] 各点表示平均值+S.D.(n＝7)

[0715] #p<0.05,根据Dunn检验与阴性对照(G1)显著差异

[0716] ##p＜0.005,根据Dunn检验与阴性对照(G1)相比的显著差异

[0717] ###p＜0.0005,根据Dunn检验与阴性对照(G1)显著差异

[0718] ####p<0.0001,根据Dunn检验与阴性对照(G1)显著差异

[0719] 0小时的结果由于定量限制而被排除。

[0720] N:动物数目

[0721] 阴性对照组(G1)中IL-6产量的变化始于3,663pg/mL,且随后10,238pg/mL、13,015pg/mL、10,298pg/mL、8,169pg/mL及3,513pg/mL;观测到LPS诱导的IL-6产量以时间依赖性方式增加且随后减少。

[0722] 经1.03mg/kg SMA(G2)处理的组中IL-6产量的变化为2,984pg/mL、10,188pg/mL、12,871pg/mL、8,954pg/mL、7,276pg/mL及3,402pg/mL。观测到LPS诱导的IL-6产量以时间依赖性方式增加且随后减少;然而,当其时间依赖性IL-6产量与阴性对照组(G1)相比时,不存在统计显著性(p<0.05)。

[0723] 经1.54mg/kg SMA(G3)处理的组中IL-6产量的变化为3,152pg/mL、7,107pg/mL、9,842pg/mL、6,814pg/mL、5,094pg/mL及3,623pg/mL。观测到LPS诱导的IL-6产量以时间依赖性方式增加且随后减少;然而,当其时间依赖性IL-6产量与阴性对照组(G1)相比时,不存在统计显著性(p<0.05)。

[0724] 经2.05mg/kg SMA(G4)处理的组中IL-6产量的变化为2,193pg/mL、4,701pg/mL、8,209pg/mL、4,341pg/mL、2,629pg/mL及2,096pg/mL。观测到LPS诱导的IL-6产量以时间依赖性方式增加且接着减少,且在一些时间点处,当与阴性对照组(G1)的IL-6值相比时,其IL-6值在统计学上显著(p<0.05:2小时及4小时,p<0.005:6小时及12小时)。

[0725] 用3mg/kg阳性对照物质地塞米松(G5)处理的组中IL-6产量的变化为2,172pg/mL、4,411pg/mL、7,727pg/mL、2,064pg/mL、1,294pg/mL及1,804pg/mL。观测到当相比于阴性对照组(G1)时,LPS诱导的IL-6产量以时间依赖性方式增加且随后减少,且在一些时间点,其IL-6值在统计学上显著(p<0.05:1小时、2小时、4小时及24小时,p<0.0005:6小时,p<0.0001:12小时)。

[0726] 所有组(G1-G5)中IL-6产量的变化绘制于随时间推移的图上(数据未示出),通过计算各组的AUC(曲线下面积)值来获取IL-6的总体减少(图14)。相比于阴性对照组(G1),在用SMA或地塞米松处理的一些组中,IL-6产量的统计学上显著减少是明显的(p<0.005:G3、G5)。以下表19提供各组药物处理的AUC值的数值及统计分析。

[0727] 对IL-1β的分析(图15,表18)

[0728] 在LPS处理前(0小时)及LPS处理后1小时、2小时及24小时的分析中,所有群组中IL-1β的表达测量为203～295pg/mL。然而,由于这些值低于MFI的定量极限,故其已自数据分析排除,且来自LPS处理后4小时、6小时及12小时的数据用于分析。

[0729] 表18:BALF中的平均IL-1β含量的概述

[0730]

组/剂量（mg/kg）		含IL-1β的BALF（pg/mL）						
		施用之后的时间（小时）						
		0	1	2	4	6	12	24
G1	平均值	212	210	246	510	686	414	295
0	S.D.	16	15	24	46	77	17	28
	N	7	7	7	7	7	7	7
G2	平均值	215	210	249	468	600	405	294
1.03	S.D.	13	15	29	49	37	34	25
	N	7	7	7	7	7	7	7
G3	平均值	209	205	256	413	517	382	285
1.54	S.D.	14	14	25	48	18	16	32
	N	7	7	7	7	7	7	7
G4	平均值	212	203	251	374	483	335	288
2.05	S.D.	14	9	24	31	36	15	26
	N	7	7	7	7	7	7	7
					##	##	##	
G5	平均值	208	210	241	350	458	318	258
3	S.D.	12	19	23	30	37	28	25
	N	7	7	7	7	7	7	7
					###	###	###	

[0731]

[0732] G1(阴性对照,0mg/kg)、G2(PAX-1,1.03mg/kg)、G3(PAX-1,1.54mg/kg)、

[0733] G4(PAX-1,2.05mg/kg)、G5(地塞米松,3mg/kg)

[0734] 各点表示平均值+S.D.(n＝7)。

[0735] ##p＜0.005,根据Dunn检验与阴性对照(G1)相比的显著差异

[0736] ###p＜0.0005,根据Dunn检验与阴性对照(G1)相比的显著差异

[0737] 0小时、1小时、2小时及24小时的结果由于定量限制而被排除。

[0738] N:动物数目

[0739] 阴性对照组(G1)中的IL-1β产量的变化始于510pg/mL,且随后686pg/mL及414pg/mL。观测到LPS诱导的IL-1β产量增加且接着以时间相依方式减小。

[0740] 用1.03mg/kg SMA(G2)处理的组中的IL-1β产量的变化为468pg/mL、600pg/mL及405pg/mL。观测到LPS诱导的IL-1β产量以时间依赖性方式增加且随后减少;然而,当其时间依赖性IL-1β产量与阴性对照组(G1)相比时,不存在统计显著性($p<0.05$)。

[0741] 用1.54mg/kg SMA(G3)处理的组中的IL-1β产量的变化为413pg/mL、517pg/mL及382pg/mL。观测到LPS诱导的IL-1β产量以时间依赖性方式增加且随后减少;然而,当其时间依赖性IL-1β产量与阴性对照组(G1)相比时,不存在统计显著性($p<0.05$)。

[0742] 用2.05mg/kg SMA(G4)处理的组中IL-1β产量的变化为374pg/mL、483pg/mL及335pg/mL。观测到LPS诱导的IL-1β产量以时间依赖性方式增加且随后减少,且在一些时间点处,当相比于阴性对照组(G1)时,其IL-1β值在统计学上显著($p<0.005$:4小时、6小时及12小时)。

[0743] 用3mg/kg阳性对照物质地塞米松(G5)处理的组中IL-1β产量的变化为350pg/mL、

458pg/mL及318pg/mL。观测到LPS诱导的IL-1β产量以时间依赖性方式增加且随后减少，且在一些时间点处，当相比于阴性对照组(G1)时，其IL-1β值在统计学上显著(p<0.0005:4小时、6小时及12小时)。

[0744] 所有组(G1-G5)中IL-1β产量的变化绘制于随时间推移的图上(数据未示出)，通过计算各组的AUC(曲线下面积)值来获取IL-1β的总体降低(图15)。相比于阴性对照组(G1)，在用SMA或地塞米松处理的一些组中，IL-1β产量的统计学上显著减少是明显的(p<0.005：G3、G5)。以下表19提供各组药物处理的AUC值的数值及统计分析。

[0745] 表19:细胞因子参数的概述

[0746]

细胞因子	组	处理	平均AUC+ (h* pg/mL)	p值*
TNF-α (图13)	G1	阴性对照 (n=7)	11390.1	
	G2	PAX-1 1.03 mg/kg (n=7)	7984.4	0.0073
	G3	PAX-1 1.54 mg/kg (n=7)	6064.8	**0.0022**
	G4	PAX-1 2.05 mg/kg (n=7)	4215.8	**0.0022**
	G5	地塞米松3 mg/kg (n=7)	2815.4	**0.0022**
IL-6 (图14)	G1	阴性对照 (n=7)	180548.1	
	G2	PAX-1 1.03 mg/kg (n=7)	165404.0	0.6093
	G3	PAX-1 1.54 mg/kg (n=7)	128034.8	**0.0022**
	G4	PAX-1 2.05 mg/kg (n=7)	78963.1	**0.0022**
	G5	地塞米松3 mg/kg (n=7)	54684.9	**0.0022**
IL-1β (图15)	G1	阴性对照 (n=7)	4866.3	
	G2	PAX-1 1.03 mg/kg (n=6)	4272.9	0.1004

[0747]

	G3	PAX-1 1.54 mg/kg (n=7)	3738.3	**0.0049**
	G4	PAX-1 2.05 mg/kg (n=7)	3045.8	**0.0022**
	G5	地塞米松3 mg/kg (n=7)	2637.5	**0.0022**

[0748] +基线调整

[0749] *相较于阴性对照，Wilcoxon秩和检验(Wilcoxon rank sum test)

[0750] 对IFN-γ的分析

[0751] 对IFN-γ的分析自数据分析排除，因为其MFI在所有时间点低于定量限制。

[0752] 对GM-CSF的分析

[0753] 对GM-CSF的分析自数据分析排除，因为其MFI在所有时间点低于定量限制。

[0754] 4.3.1.2对产生率的分析

[0755] 将阴性对照组标准化为100％，计算用测试物质及阳性对照物质处理的组的细胞因子产生的抑制率。

[0756] 对TNF-α的分析

[0757] 用1小时、2小时、4小时、6小时及12小时的数据进行对TNF-α的产生率分析，且排除0小时及24小时的数据。

[0758] TNF-α产生的抑制率在经1.03mg/kg SMA(G2)处理的组中为65％、71％、77％、68％及70％，且自所有统计分析未观测到显著差异(p<0.05)。

[0759] 在用1.54mg/kg SMA(G3)处理的组中,TNF-α产生的抑制率为53%、50%、59%、55%及48%,且自所有统计分析未观测到显著差异(p<0.05)。

[0760] 在用2.05mg/kg SMA(G4)处理的组中,TNF-α产生的抑制率为37%、39%、52%、41%及15%。在一些时间点,观测到SMA的降低作用在统计学上显著(p<0.005:1小时、2小时、6小时及12小时)。

[0761] 在用3mg/kg地塞米松阳性对照物质(G5)处理的组中,TNF-α产生的抑制率为25%、28%、33%、28%及9%。在一些时间点,观测到地塞米松的降低作用在统计学上显著(p<0.0005:4小时,p<0.0001:1小时、2小时、6小时及12小时)。

[0762] 对IL-6的分析

[0763] 由1小时、2小时、4小时、6小时、12小时及24小时的数据进行对IL-6的产生率分析,且排除0小时的数据。

[0764] IL-6产生的抑制率在用1.03mg/kg SMA(G2)处理的组中为81%、100%、99%、87%、89%及97%,且自所有统计分析未观测到显著差异(p<0.05)。

[0765] IL-6产生的抑制率在用1.54mg/kg SMA(G3)处理的组中为86%、69%、76%、66%、62%及103%,且自所有统计分析未观测到显著差异(p<0.05)。

[0766] 在用2.05mg/kg SMA(G4)处理的组中IL-6产生的抑制率为60%、46%、63%、42%、32%及60%。在一些时间点处,观测到SMA的降低作用在统计学上显著(p<0.05:2小时及4小时,p<0.005:6小时及12小时)。

[0767] 在用3mg/kg地塞米松阳性对照物质(G5)处理的组中,IL-6产生的抑制率为59%、43%、59%、20%、16%及51%。在一些时间点,观测到地塞米松的降低作用在统计学上显著(p<0.05:1小时、2小时、4小时及24小时,p<0.0001:6小时及12小时)。

[0768] 对IL-1β的分析

[0769] 用4小时、6小时及12小时的数据进行对IL-1β的产生率分析,且排除0小时、1小时、2小时及24小时的数据。

[0770] 在用1.03mg/kg SMA(G2)处理的组中,IL-1β产生的抑制率为92%、87%及98%,且自所有统计分析未观测到显著差异(p<0.05)。

[0771] 在用1.54mg/kg SMA(G3)处理的组中,IL-1β产生的抑制率为81%、75%及92%,且自所有统计分析未观测到显著差异(p<0.05)。

[0772] 在用2.05mg/kg SMA(G4)处理的组中,IL-1β产生的抑制率为73%、70%及81%。在一些时间点,观测到SMA的降低作用在统计学上显著(p<0.05:4小时、6小时及12小时)。

[0773] 在用3mg/kg地塞米松阳性对照物质(G5)处理的组中,IL-1β产生的抑制率为69%、67%及77%。在一些时间点,观测到地塞米松的降低作用在统计学上显著(p<0.0001:4小时、6小时及24小时)。

[0774] 对IFN-γ的分析

[0775] IFN-γ的分析自产生率分析排除,因为其MFI在所有时间点低于定量界限。

[0776] 对GM-CSF的分析

[0777] GM-CSF的分析自产生率分析排除,因为其MFI在所有时间点低于定量界限。

[0778] 4.3.2存活率分析

[0779] 4.3.2.1存活率分析(图16)

[0780] 在处理20mg/kg LPS之后每小时检测死小鼠。当与阴性对照组(G1)相比具有统计显著性(G3:p<0.005,G4:p<0.0005,G5:p<0.0001)时,存活率确认为延长的。

[0781] 4.3.3体重及一般症状

[0782] 体重

[0783] 在入选时所有小鼠的平均体重为22.3g且在分组时为24.1g。在隔离环境适应期期间观测到正常体重增加。

[0784] 进行分组,使得所有组均具有平均体重。相比于阴性对照组(G1),不存在统计显著性(p<0.05)。

[0785] 一般症状

[0786] 在隔离环境适应期期间,其中每日进行一般症状的观察结果,未观察到异常。

[0787] 在研究期期间,由于经由气管内方法的肺液输注用于LPS处理,发生总共8例死亡。就在气管内施用结束之后的实体中出现呼吸窘迫症状。尽管在用LPS处理的所有小鼠中均观测到暂时呼吸窘迫,但似乎暂时呼吸窘迫归因于来自LPS施用的液体体积而非LPS诱导的呼吸窘迫症候群。然而,8只小鼠似乎没有从症状中恢复。对于患有重度呼吸窘迫的这8只小鼠,进行诸如心肺复苏及体温维持的操作;然而,其死亡且未获得用于分析的样品。

[0788] 4.4.结论

[0789] 进行此研究以确认测试物质SMA对小家鼠(BALB/c)的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)模型中的LPS诱导的促炎介质的抑制作用,所述急性呼吸窘迫症候群(ARDS)模型通过经由气管内施用的重复LPS处理诱导。此研究的结果确认测试物质及阳性对照物质对LPS诱导的促炎介质的抑制作用,且展示已知为急性呼吸窘迫症候群的主要介体(TNF-α、IL-6、IL-1β)的细胞因子在支气管肺泡灌洗液(BALF)中的表达被显著抑制。

[0790] 此研究确认测试物质SMA在特定时间点抑制TNF-α及IL-6的产生,且测试物质SMA作为急性呼吸症候群的预防性治疗为有效的。

[0791] 尽管IFN-γ、GM-CSF及IL-1β的分析值在一些时间点处低于定量界限,且因此自分析排除,测试物质SMA在一些时间点以剂量依赖性方式抑制IL-1β的产生。

[0792] 总之,SMA对诸如TNF-α、IL-6及IL-1β的促炎介质的产生发挥快速抑制作用,且因此,可用于通过缓解急性呼吸症候群来延长存活。

[0793] 实施例5-体内实验展示SMA呈现出针对SARS-CoV-2的病毒抑制作用

[0794] 以上实施例4中所述的体内实验确认,PAX-1(SMA)在抑制发炎细胞因子方面有效,类似于地塞米松的抑制作用,一种欧洲批准用作治疗SARS-CoV-2相关肺炎的药物。

[0795] 实施例5描述一种体内研究,其亦揭示,PAX-1呈现出与抗病毒药物瑞德西韦类似的病毒抑制作用。PAX-1具有抗病毒及消炎特性且有效治疗诸如病毒感染诱导的肺炎的疾病。预期用PAX-1治疗使恢复时段显著减少至短至一周。若在感染早期阶段期间使用PAX-1,则可预防COVID-19相关疾病的进展。

[0796] 5.1病毒抑制/死亡及发炎细胞因子的抑制的机制

[0797] PAX-1的作用机制涉及PAX-1与实体人类肿瘤细胞株的端粒的特异性结合,引起端粒相关DNA损伤、端粒腐蚀及细胞死亡(Phatak P,Dai F,Butler M等人(2008)KML001 Cytotoxic Activity Is Associated with Its Binding to Telomeric Sequences and Telomere Erosion in Prostate Cancer Cells.Cancer Therapy:Preclinical 14(14):

4593-4603)。PAX-1亦展示通过减少参与端粒酶mRNA转录的转录因子的表达来抑制癌细胞增殖。此外,PAX-1与端粒序列以每三个TTAGGG重复序列一个分子的比率结合引起被称为端粒酶逆转录酶(hTERT)的端粒酶催化次单元易位至细胞质中,从而抑制端粒酶活性且最终杀死癌细胞。近来的研究已发现,hTERT结构域通过具有由右手侧架构(手指、拇指及掌型结构域)组成的保守逆转录酶基序而与病毒RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase)(RdRP)具有结构及功能类似性(Machitani M,Yasukawa M,Nakashima J,Furuichi Y,Masutomi K.RNA-dependent RNA polymerase,RdRP,a promising therapeutic target for cancer and potentially COVID-19.Cancer Sci.2020年8月17日;111(11):3976-84.doi:10.1111/cas.14618)。病毒RdRP在病毒基因体转录及复制中发挥重要功能,且RdRP的抑制被视为抗病毒药物的主要目标之一。鉴于PAX-1对hTERT的已证实抑制作用及病毒RdRP及hTERT RdRP结构域的结构类似性,似乎合理的是提出可将通过PAX-1抑制hTERT的RdRP活性应用于抑制冠状病毒的RdRP活性。此外,PAX-1的抗病毒特性不限于冠状病毒,而亦可适用于更宽范围的病毒,指示PAX-1用于抗癌及抗病毒治疗的多样化治疗特性(Machitani M,Yasukawa M,Nakashima J,Furuichi Y,Masutomi K.RNA-dependent RNA polymerase,RdRP,a promising therapeutic target for cancer and potentially COVID-19.Cancer Sci.2020年8月17日;111(11):3976-84.doi:10.1111/cas.14618)。

[0798] 偏亚砷酸钠已展示为人类端粒酶的强力抑制剂。

[0799] 响应于病毒感染的细胞因子过量产生已广泛接受为COVID-19诱导的肺炎(发炎)的主要原因。

[0800] 病毒感染之后为基因表现的异常细胞活化,其引起细胞因子的过量释放,此转而诱导发炎(肺炎)。在实施例4中PAX-1显示抑制或减少促炎细胞因子TNF-α、IL-1β及IL-6的产生/分泌。

[0801] 5.2对PAX-1针对SARS-CoV-2感染细胞的抗病毒作用的体内评估

[0802] 5.2.1.综述

[0803] 此研究的目标为验证PAX-1针对SARS-CoV-2的抗病毒功效。该化合物的抗病毒功效通过SARS-CoV-2细胞感染模型中的剂量响应曲线(dose response curve,DRC)实验来测定。经由免疫荧光使用针对病毒核衣壳(N)蛋白的特异性抗体来使经感染细胞成像,且使用Columbus软件(Perkin Elmer)分析所获取的影像。

[0804] 根据由巴斯德研究所(Pasteur Institute)进行的实验,PAX-1的抗病毒作用(IC_{50}=4.25μM)稍微高于瑞德西韦(IC_{50}=5.27μM),指示PAX-1具有与瑞德西韦相当的抗病毒特性。

[0805] 5.2.2.材料及方法

[0806] 5.2.2.1病毒及细胞株

[0807] SARS-CoV-2由韩国疾病控制与预防中心(Korea Centers for Disease Control and Prevention,KCDC)提供,且Vero细胞系获自ATCC(ATCC-CCL81)。

[0808] 5.2.2.2反应剂

[0809] 氯奎、咯匹那韦及瑞德西韦用作参考化合物且分别购自Sigma-Aldrich、SelleckChem及MedChemExpress。对抗SARS-CoV-2N蛋白具有特异性的一级抗体系购自Sino

Biological,且二级抗体Alexa Fluor 488山羊抗兔IgG及Hoechst 33342系购自Molecular Probes。

[0810] 5.2.2.3通过免疫荧光法的剂量响应曲线分析

[0811] 384组织培养盘每孔接种有1.2×10^4个Vero细胞。在接种24小时之后,通过在DMSO及PBS中连续稀释制备10种不同浓度的化合物,且处理细胞,其中最高浓度为50μM。在药物处理后一小时,细胞用SARS-CoV-2(0.0125MOI)在BSL3设施中感染且在37℃下培育24小时。其后,细胞用4%多聚甲醛(PFA)固定,接着渗透。接着,细胞用抗SARS-CoV-2核衣壳(N)一级抗体、Alexa Fluor 488结合的山羊抗兔IgG二级抗体及Hoechst 33342染色。使用影像分析装置Operetta(Perkin Elmer)获取受感染细胞的荧光影像。

[0812] 5.2.2.4图像分析

[0813] 使用Columbus软件分析所获取的影像。对每孔用Hoechst染色的细胞的总数进行计数且视为细胞的总数。表达病毒N蛋白的细胞数被视为经感染细胞的总数。感染比率计算为表达N蛋白的细胞数/细胞总数。

[0814] 将每孔感染程度归一化至相同培养盘中的未感染细胞(空白对照)的孔的平均感染性及用0.5%DMSO(v/v)处理的经感染细胞的孔的平均感染性。

[0815] 通过将各孔中的细胞数目归一化至空白对照组孔中的细胞的平均数目来归一化化合物的细胞毒性,且在图中表示为“相对于空白对照的细胞数目(cell number to mock)”。

[0816] 使用XLFit 4(IDBS)软件的等式Y=底部+(顶部-底部)/(1+(IC_{50}/X)^{希尔斜率})导出得自各药物浓度的响应曲线及IC_{50}及CC_{50}值。所有IC_{50}及CC_{50}值均自由独立实验的两个复本获得的拟合剂量反应曲线计算,且选择性指数(SI)值计算为CC_{50}/IC_{50}。

[0817] 5.2.3.结果-化合物的剂量响应曲线(DRC)分析

[0818] 此研究探索PAX-1相较于瑞德西韦(亦即在COVID-19流行性疾病期间待授权使用的第一抗病毒药)及咯匹那韦(亦即当前正在评估中作为与利托那韦(ritonavir)组合对COVID-19进行抗病毒治疗的药物)对Vero细胞中SARS-CoV-2(COVID-19病毒)的复制的抗病毒作用以及其可能的细胞毒性作用。

[0819] Vero细胞为广泛使用及认可的用于复制及分离SARS-CoV-2的细胞模型。简言之,在不同浓度的测试药物或DMSO/PBS(对照)存在下,Vero细胞(ATCC-CCL81)以0.0125的感染倍率(multiplicity of infection,MOI)用SARS-CoV-2(获自韩国疾病控制及预防机构(Korea Disease Control and Prevention Agency))感染。感染后24小时固定所感染细胞且使用免疫荧光染色方法用抗SARS-CoV-2核衣壳抗体及Hoechst 33342染色,以鉴别总感染细胞数。使用Operetta(Perkin Elmer)进行图像分析。使用拟合的剂量响应曲线测定各药物的半最大抑制浓度(IC_{50})及半最大细胞毒性浓度(CC_{50})值。

[0820] 结果展示于图17中。蓝点指示化合物的SARS-CoV-2抑制感染,且红方块指示化合物的细胞毒性。

[0821] 如图17中所示,由PAX-1(图17中的“Komipharm(PBS)”)以与瑞德西韦相当且比咯匹那韦更有效的方式抑制SARS-CoV-2复制。SARS-CoV-2感染的PAX-1抑制的IC_{50}值为4.25μM,即与瑞德西韦(IC_{50}=5.27μM)具有相同数量级及低于咯匹那韦(IC_{50}=13.11μM)的数量级。与瑞德西韦及咯匹那韦两者的大于50μM相比较,PAX-1的CC_{50}值为21.05μM。尽管PAX-1展

示相比于其他两种化合物略微更大的细胞细胞生存率的抑制，但其抗病毒活性相对于细胞毒性的SI(根据CC_{50}/IC_{50}运算)与咯匹那韦的SI相当。因此，PAX-1在体内有效抑制SARS-CoV-2复制。

[0822] 5.2.4.讨论

[0823] 正常细胞上PAX-1的细胞毒性浓度(CC_{50})为21.05μM，其比其抗病毒活性指数(IC_{50}，4.25μM)高4.96倍，指示药物安全性。不需要采用高于IC_{50}值5倍的PAX-1浓度以实现抗病毒作用。

[0824] 对PAX-1毒性的近期研究涉及对瑞德西韦及咯匹那韦的同时测试以用于比较。实验结果展示，咯匹那韦的以下指数：IC_{50}＝13.11μM，CC_{50}>50μM，且SI值为3.81，与PAX-1相比，报导较高细胞毒性。咯匹那韦目前经历由美国FDA领导的作为COVID-19的治疗的临床试验。

[0825] 考虑到以上因素，PAX-1亦可用作抗病毒剂而不会在治疗期间引起副作用或严重不良作用。

[0826] PAX-1结合至端粒序列，一种连接于末端染色体的增殖潜力。用于抑制发炎细胞因子的PAX-1浓度对正常免疫细胞无细胞毒性作用。此外，PAX-1在使用之后72小时完全代谢且自身体排出。

[0827] PAX-1临床试验中的一部分患者(迄今为止472名患者参与临床试验)给与每天至多20毫克(一天服用8颗片剂)。未报导由于药物的毒性导致的死亡，表明PAX-1为非常安全的物质。

[0828] 增加的证据指示冠状病毒抗体快速地减弱且来自动物物种的冠状病毒可突变且跨越传至人类，从而产生再感染的风险。毫无疑问，非常需要快速研发针对COVID-19的抗病毒药物。

[0829] 实施例6-COVID-19患者日记(用SMA治疗)

[0830] 实施例6描述对感染SARS-CoV-2且用SMA治疗的59岁女性(无预先存在的病况)的每日记录。此实施例展示SMA有效缓解或治疗SARS-CoV-2感染的症状，例如胸闷、呼吸艰难、呼吸短促(呼吸困难)、发热、食欲不振、流鼻涕、咳嗽、有痰及疼痛。

[0831]

天	时间		观测
1			症状急剧发作（尚未能适当进食持续3天）。
4			脱水症状（包括口干）。
	3pm		送至急诊室，经由i.v.接收电解质溶液
			唯一症状为轻度发热，因此出院。
			自服口服电解质。
6	3am		由于呼吸短促至医疗中心就诊。
			呼叫应急服务，由救护车（有氧气疗法）载至主要医院。
	3.30am		SARS-CoV-2诊断测试开始，开处医药。
	4am		出院。
7	2am		由于具有脱水症状的呼吸困难至医疗中心就诊。
			呼叫应急服务，由救护车（无氧气疗法）载至主要医院。
	3am		除SARS-CoV-2确认的处方以外无特殊治疗。
			[处方（5天）] ● Meiact（美爱克）片100 mg/1片，一天3次（头孢妥仑匹酯（cefditoren pivoxil）） ● Rulide（罗力得）片150 mg/1片，一天两次 ● Gaster D（盖世特D）片20 mg/1片，一天两次（法莫替丁（famotidine）） ● 咳嗽糖浆20 ml/一天三次 ● 扎托洛芬（Zaltoprofen）80mg/1片，一天三次

[0832]

天	时间		观测
	4am		出院。
	9am		SARS-CoV-2诊断得到确认。
	10am		第二请求以被准入至公共卫生中心（无床可供使用，等待家庭治疗的指令）。
			* 患者服用处方医药但无改善。 * 出现发热。 * 逐渐进食汁、粥、汤。
	3pm		用餐之后服用SMA。
	4pm		胸闷及轻度疼痛。
	7.30pm		用餐之后服用SMA。
	8pm		胸闷及疼痛缓解。
8	2am		由于胸闷及呼吸困难的复发而服用SMA。
			暂时症状缓解。
	11am		用餐之后服用SMA。
			暂时症状缓解。
			* 罹患睡眠剥夺。 * 由于住院延迟而焦虑。
	5.30pm		用餐之后服用SMA。
			自公共卫生中心递送经确认的COVID-19患者的处方。
			[处方（5天）] ● Tamitra Semi片/1片，一天3次（对乙酰氨基酚/曲马多（tramadol）） 左羟丙哌嗪（Levodropropizine）60 mg片/1片，一天3次 ● Nucomyt胶囊 200 mg/1胶囊，一天3次（乙酰半胱胺酸） ● 链激酶片10 mg/1片，一天3次 ● Mucosil片/1片 一天3次（乙酰半胱胺酸）
	6pm		开始用于确认COVID-19患者的处方医药。
	6pm		接收来自公共卫生中心的呼叫。
			（接收建议，保持活跃、进食及睡

[0833]

天	时间		观测
			觉良好以维持健康）， 解释镇静剂必要时可与处方医药一起服用。 * 病患具有自己使用的P.R.N.镇静剂，一周使用2-3次（前3个月开始）。
	7pm		当服用SMA时，胸闷缓解。当服用来自公共卫生局的处方医药时，胸闷及发炎感觉在30分钟内加剧。
	12pm		用餐之后服用SMA。在30分钟后服用公共卫生局医药及镇静剂。
9	10am		能够由于镇静剂而入睡。然而，感觉有点昏睡的副作用。
	11:30am		用餐之后服用SMA。
	12中午		服用公共卫生局医药。
			无呼吸困难症状。小睡一会（由于延长的镇静剂副作用）。
	5:20pm		在用餐之后服用公共卫生局医药。
	5:40pm		用餐之后服用SMA。
			* 自早晨起无胸闷及呼吸困难。
			* 由于额外睡眠而病况恢复。 * 开始一日一次抗坏血酸（维生素C）3000 mg。 * 可再次食用常规食物。
	6pm		来自公共卫生中心的回应-治疗中心可提供入院。
	8pm		发热，口干。
			服用抗发热及胃保护性医药。
			* 无呼吸艰难，但有一些痰。 （总体上感觉比初始症状要好）。
	11:40pm		用餐之后服用SMA。
10	8am		在用餐之后服用SMA及公共卫生局医药。
			自第9天起不能入睡。存在发热及口干。
			胸闷、有痰及轻微咳嗽（无呼吸短促）。

[0834]

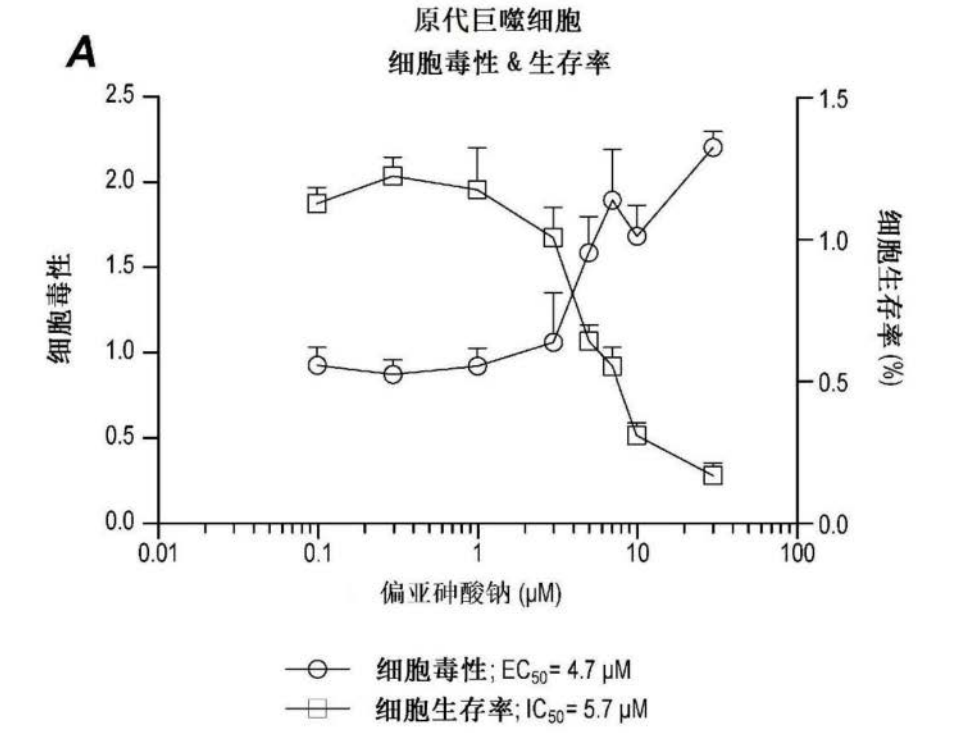
天	时间		观测
			* 缺少睡眠对病况具有显著影响。
	4pm		在用餐之后服用SMA及公共卫生局医药。
			持续性口干。
	8pm		胸闷消退。
			口干、支气管炎咳嗽、头痛。
			服用咳嗽糖浆/镇静剂。
	10:30pm		由于镇静而昏睡。
	11:50pm		在用餐之后服用SMA及公共卫生局医药。
11			由于镇静剂而入睡。
	8am		在用餐之后服用SMA及公共卫生局医药。
			由于镇静剂而入睡。
	11am		由于睡眠而病况得以改良。
			持续支气管炎咳嗽；口干及胸闷消退。
	4pm		在用餐之后服用SMA及公共卫生局医药。
			持续性支气管炎咳嗽。
	6pm		由救护车转移至治疗中心（容许）。
	10pm		服用SMA及公共卫生局医药。
12	9am		在用餐之后服用SMA及公共卫生局医药。
			良好状况，轻微咳嗽/有痰，但轻度。
			无其他症状，体温36.8℃（正常范围）。
	11am		无其他SARS-CoV-2相关症状。
			* 治疗中心未开处其他医药。
	2:30pm		用餐之后服用SMA。
			轻微流鼻涕，停用公共卫生局医药（将在晚餐后开始新医药）。
	8pm		正常体温（38℃）。轻度咳嗽及胃肠症状。
	8:40pm		用餐之后服用SMA。
	9pm		服用抗发热及胃保护性医药。

[0835]

天	时间		观测
13	9:30am		用餐之后服用SMA。
			食欲改善且总体状况极佳（恢复正常的日常功能）。
			轻度有痰。正常体温（36.4℃）。

[0836] 应理解，若在本文中引用任何先前技术公开，此引用并不构成对该公开在澳大利亚或任何其他国家中形成本领域中的公共常识的部分的承认。

[0837] 在以下权利要求及对本发明的上文说明中，除上下文由于明确语言或必要暗示以其他方式需要外，词“包含(comprise)”或其诸如“包含(comprises/comprising)”的变形以包括性含义使用，即，指定所陈述特征的存在但并不排除本发明的各种具体实例中其他特征的存在或添加。


A
原代巨噬细胞
细胞毒性 & 生存率
细胞毒性
细胞生存率 (%)
偏亚砷酸钠 (μM)
细胞毒性; EC50= 4.7 μM
细胞生存率; IC50= 5.7 μM

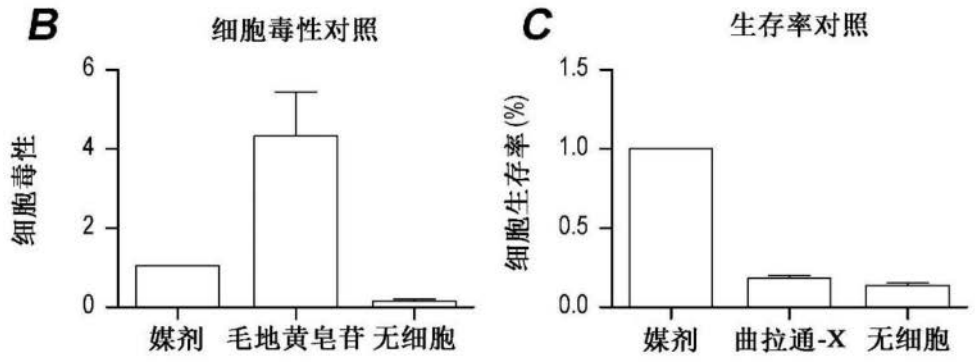
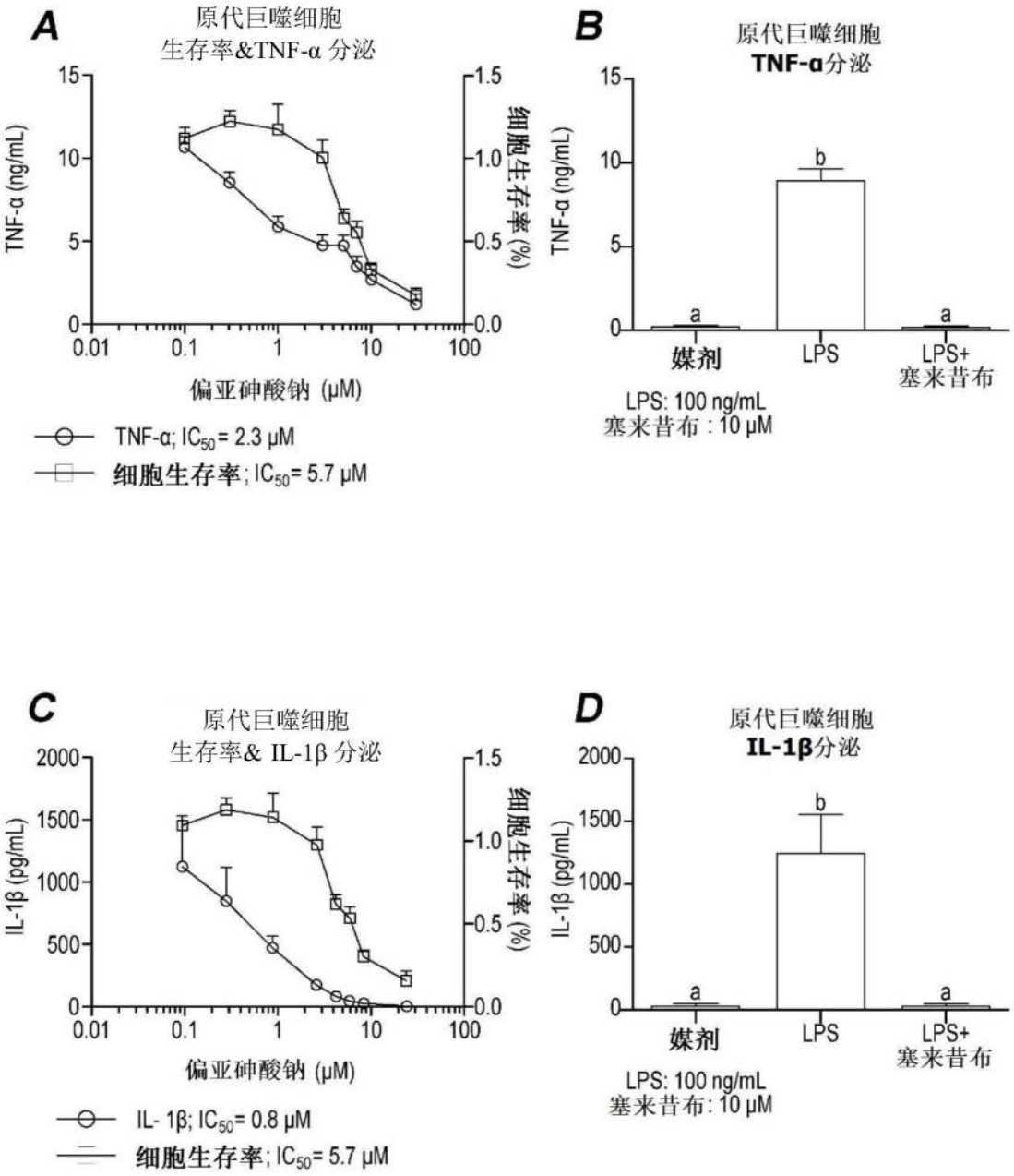

B
细胞毒性对照
细胞毒性
媒剂
毛地黄皂苷
无细胞
C
生存率对照
细胞生存率 (%)
媒剂
曲拉通-X
无细胞

图1


A
原代巨噬细胞
生存率&TNF-α 分泌
TNF-α (ng/mL)
细胞生存率 (%)
偏亚砷酸钠 (μM)
TNF-α; IC50= 2.3 μM
细胞生存率; IC50= 5.7 μM
B
原代巨噬细胞
TNF-α分泌
TNF-α (ng/mL)
媒剂
LPS
LPS+
塞来昔布
LPS: 100 ng/mL
塞来昔布 : 10 μM
C
原代巨噬细胞
生存率& IL-1β 分泌
IL-1β (pg/mL)
细胞生存率 (%)
偏亚砷酸钠 (μM)
IL- 1β; IC50= 0.8 μM
细胞生存率; IC50= 5.7 μM
D
原代巨噬细胞
IL-1β分泌
IL-1β (pg/mL)
媒剂
LPS
LPS+
塞来昔布
LPS: 100 ng/mL
塞来昔布: 10 μM

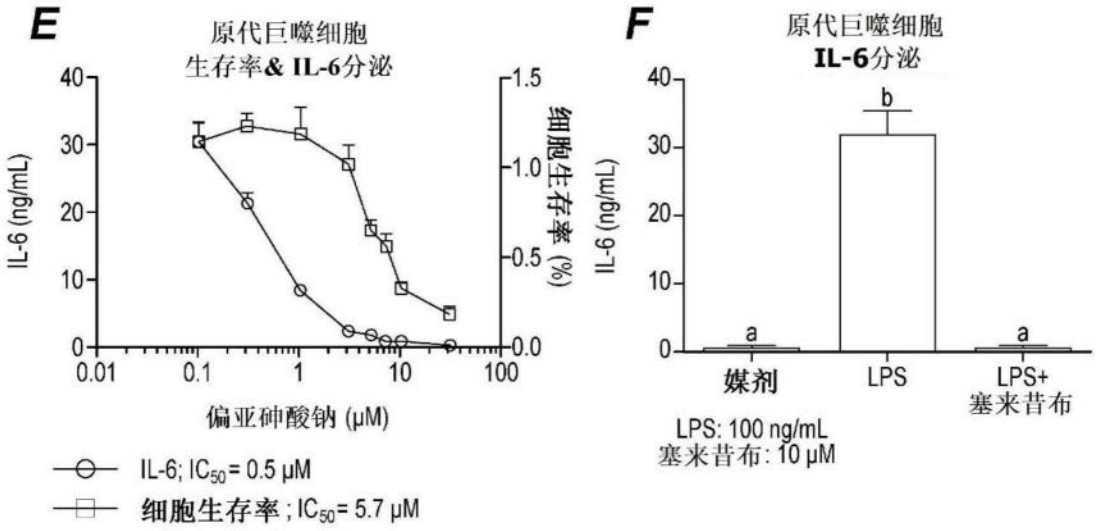

E
原代巨噬细胞
生存率& IL-6分泌
IL-6 (ng/mL)
细胞生存率 (%)
偏亚砷酸钠 (μM)
IL-6; IC50= 0.5 μM
细胞生存率 ; IC50= 5.7 μM
F
原代巨噬细胞
IL-6分泌
IL-6 (ng/mL)
媒剂
LPS
LPS+
塞来昔布
LPS: 100 ng/mL
塞来昔布: 10 μM

图2

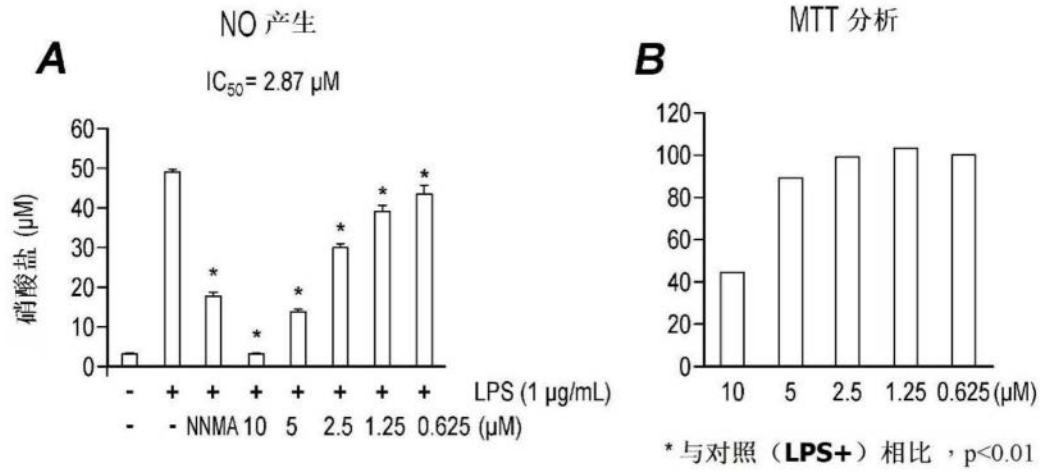
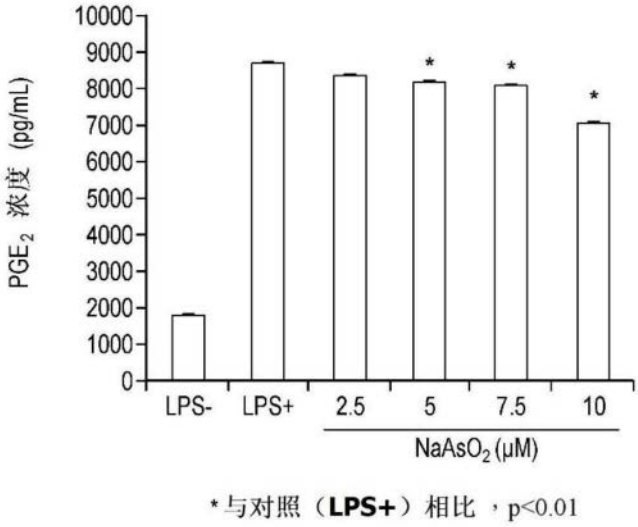

NO 产生
A
IC50= 2.87 μM
硝酸盐 (μM)
LPS (1 μg/mL)
NNMA 10 5 2.5 1.25 0.625 (μM)
MTT 分析
B
* 与对照（LPS+）相比 ，p<0.01

图3



*与对照（**LPS+**）相比 ，$p<0.01$

图4

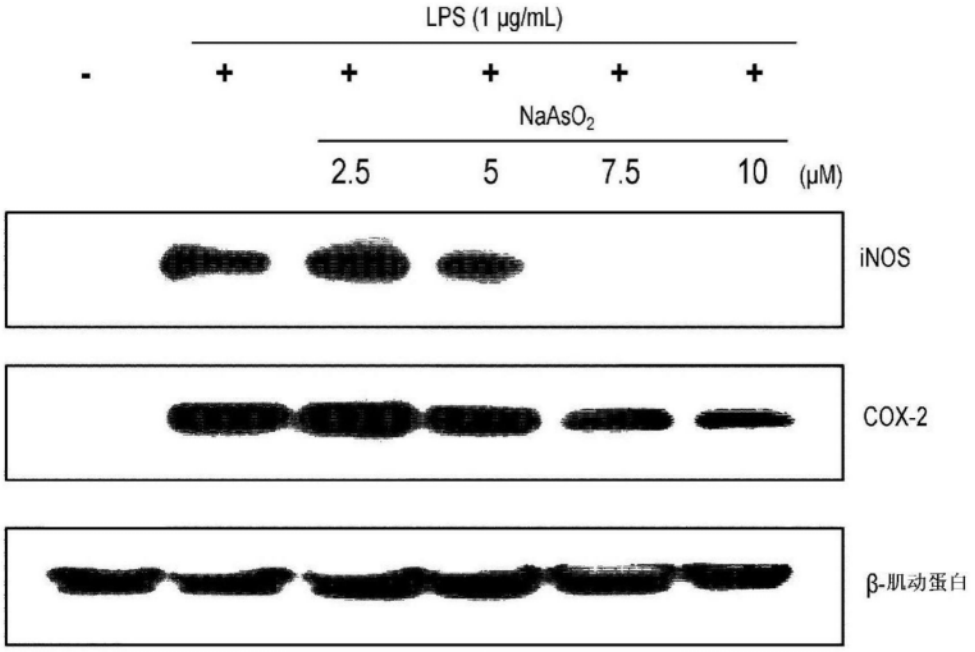


图5

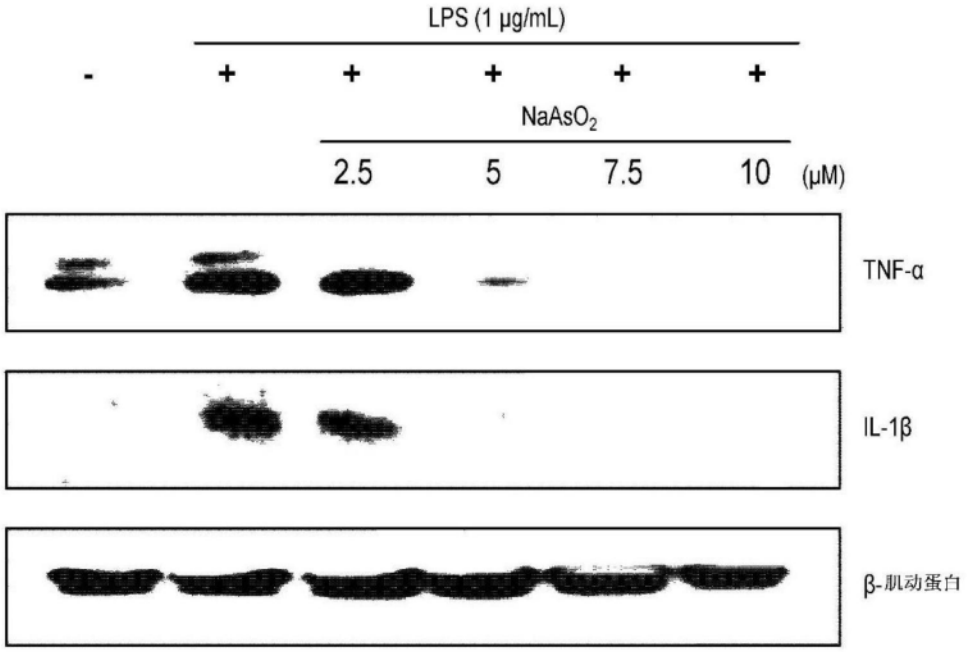

LPS (1 μg/mL)
-
+
+
+
+
+
NaAsO2
2.5
5
7.5
10
(μM)
TNF-α
IL-1β
β-肌动蛋白

图6

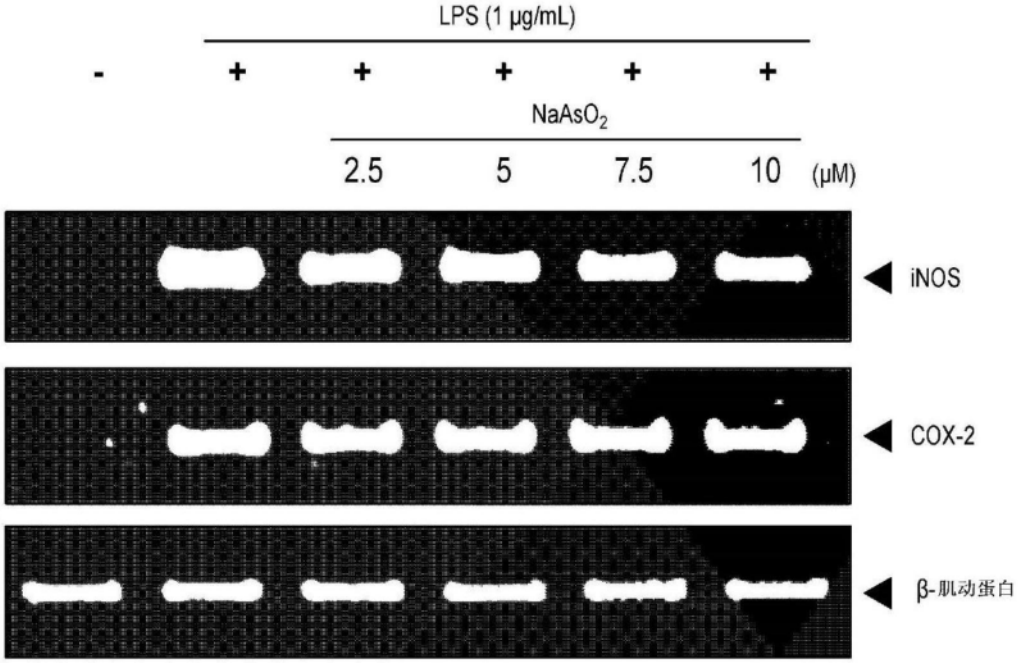

LPS (1 μg/mL)
-
+
+
+
+
+
NaAsO2
2.5
5
7.5
10
(μM)
iNOS
COX-2
β-肌动蛋白

图7

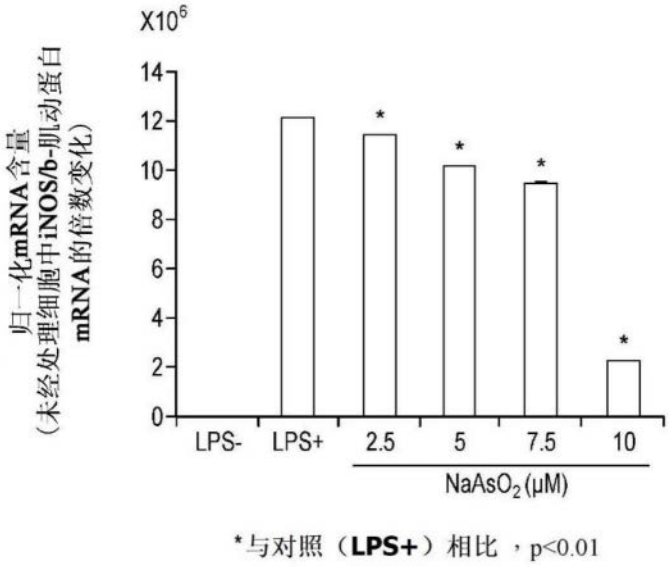

X10^6
归一化mRNA含量
（未经处理细胞中iNOS/b-肌动蛋白
mRNA的倍数变化）
14
12
10
8
6
4
2
0
LPS-
LPS+
2.5
5
7.5
10
NaAsO2 (μM)
*与对照（LPS+）相比 ，p<0.01

图8

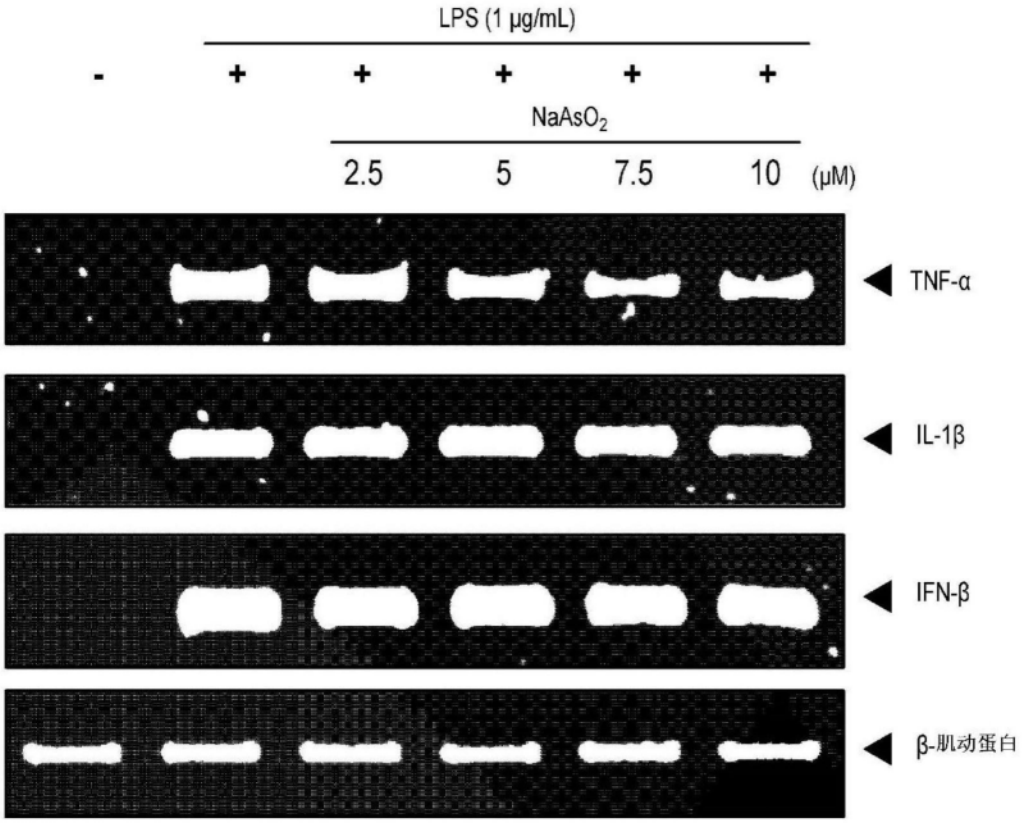
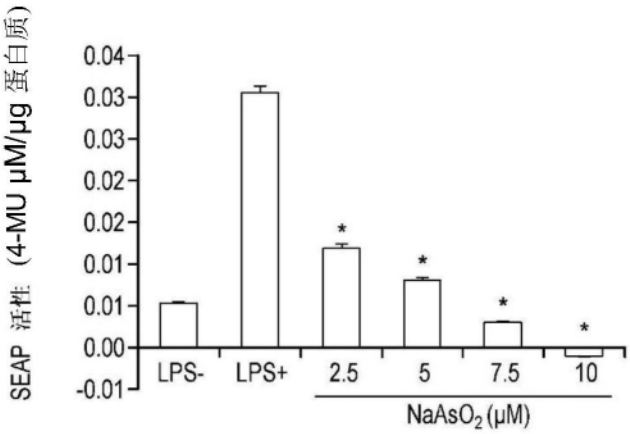

LPS (1 μg/mL)
-
+
+
+
+
+
NaAsO2
2.5
5
7.5
10
(μM)
TNF-α
IL-1β
IFN-β
β-肌动蛋白

图9



* 与对照（LPS +）相比，p<0.01

图10

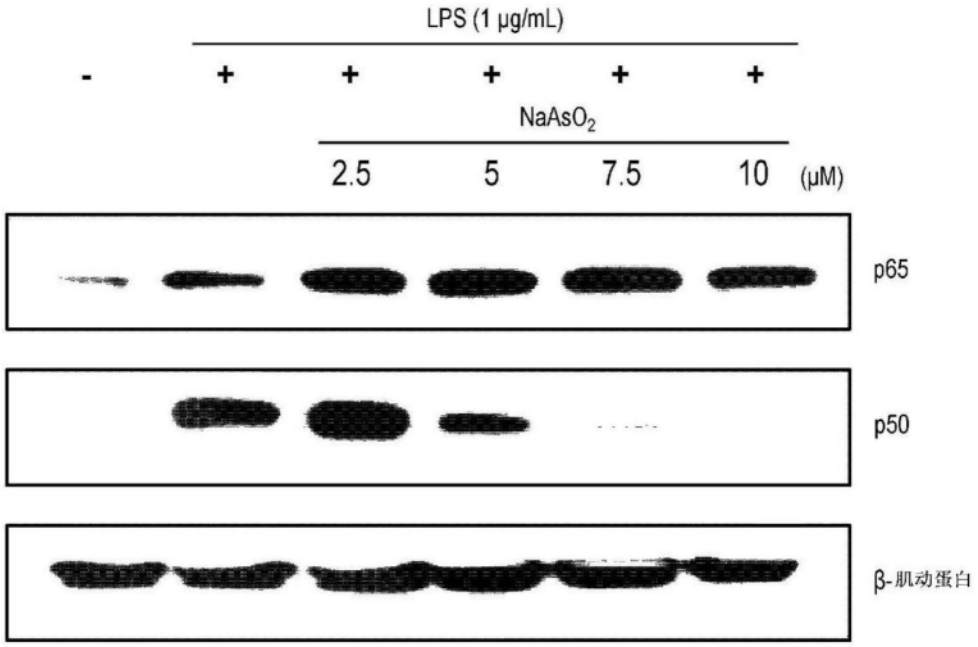


图11

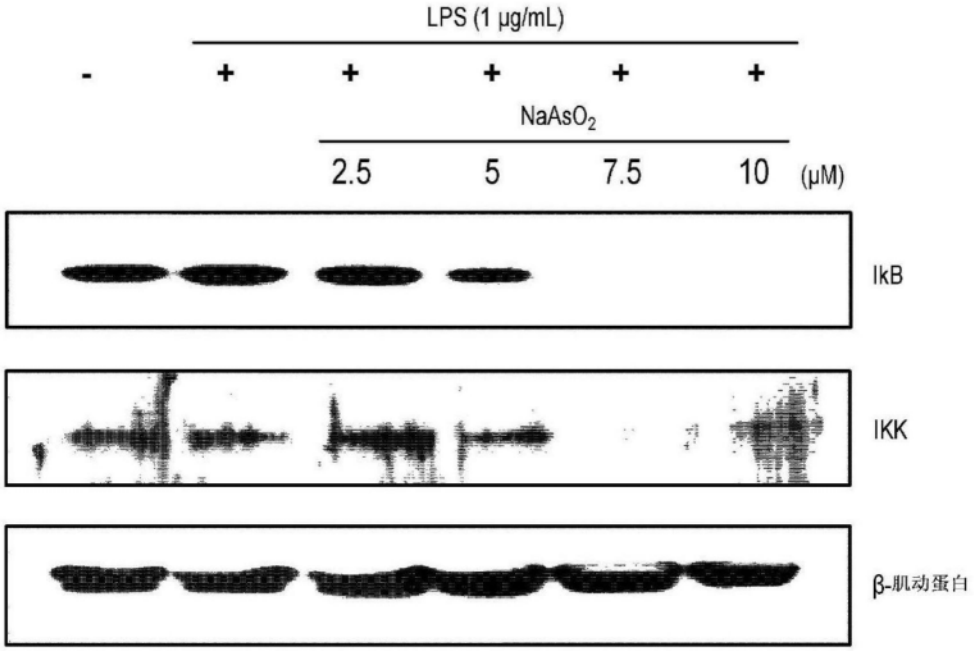

LPS (1 μg/mL)
-
+
+
+
+
+
NaAsO2
2.5
5
7.5
10
(μM)
IkB
IKK
β-肌动蛋白

图12

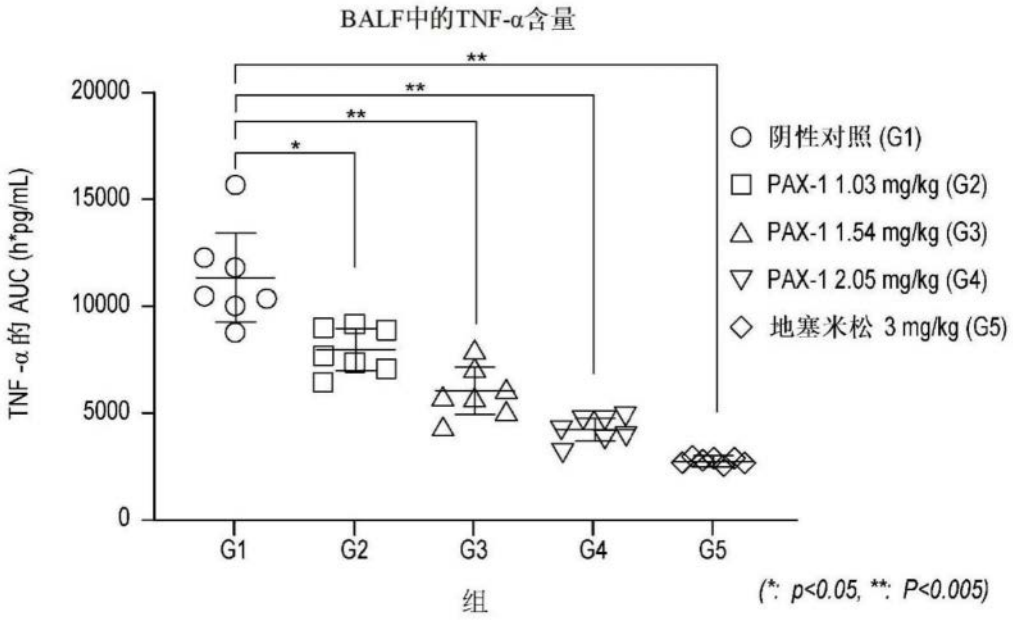

BALF中的TNF-α含量
TNF -α 的 AUC (h*pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
**
**
**
*
G1
G2
G3
G4
G5
组
阴性对照 (G1)
PAX-1 1.03 mg/kg (G2)
PAX-1 1.54 mg/kg (G3)
PAX-1 2.05 mg/kg (G4)
地塞米松 3 mg/kg (G5)
(*: p<0.05, **: P<0.005)

图13

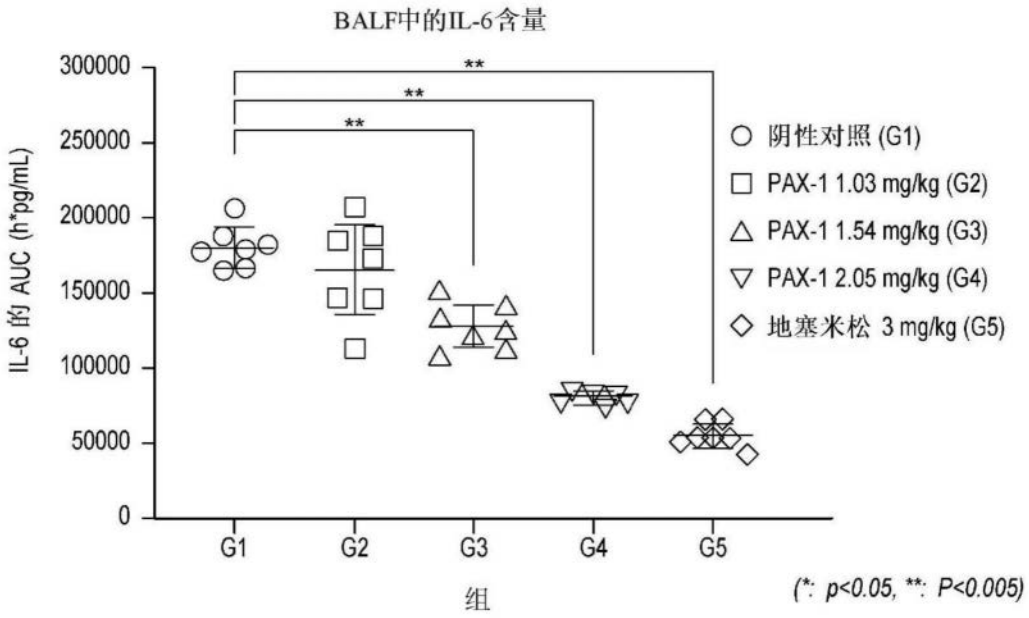

BALF中的IL-6含量
IL-6 的 AUC (h*pg/mL)
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
**
**
**
G1
G2
G3
G4
G5
组
阴性对照 (G1)
PAX-1 1.03 mg/kg (G2)
PAX-1 1.54 mg/kg (G3)
PAX-1 2.05 mg/kg (G4)
地塞米松 3 mg/kg (G5)
(*: p<0.05, **: P<0.005)

图14

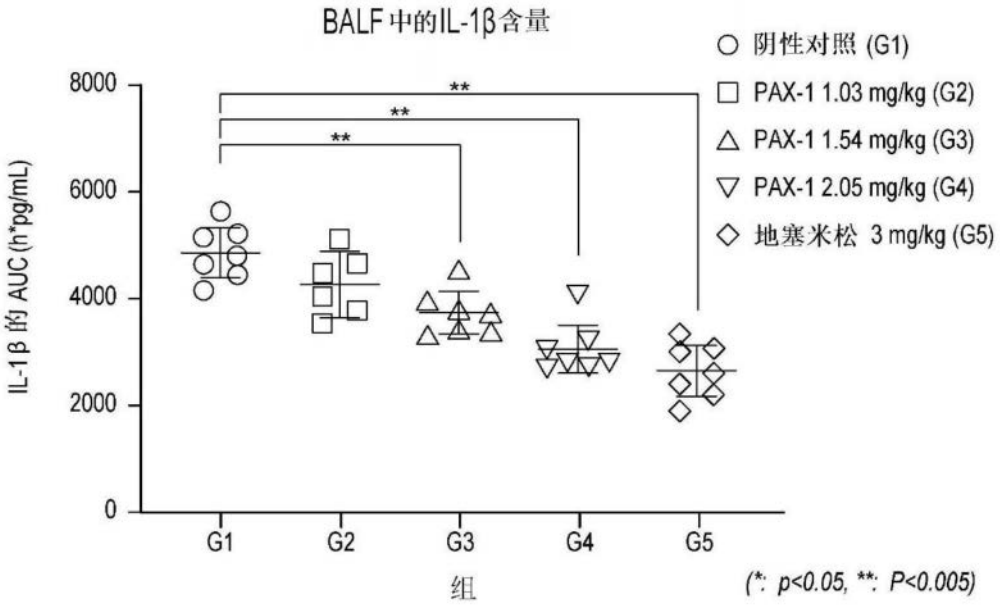

BALF 中的IL-1β含量
IL-1β 的 AUC (h*pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
**
**
**
G1
G2
G3
G4
G5
组
阴性对照 (G1)
PAX-1 1.03 mg/kg (G2)
PAX-1 1.54 mg/kg (G3)
PAX-1 2.05 mg/kg (G4)
地塞米松 3 mg/kg (G5)
(*: p<0.05, **: P<0.005)

图15

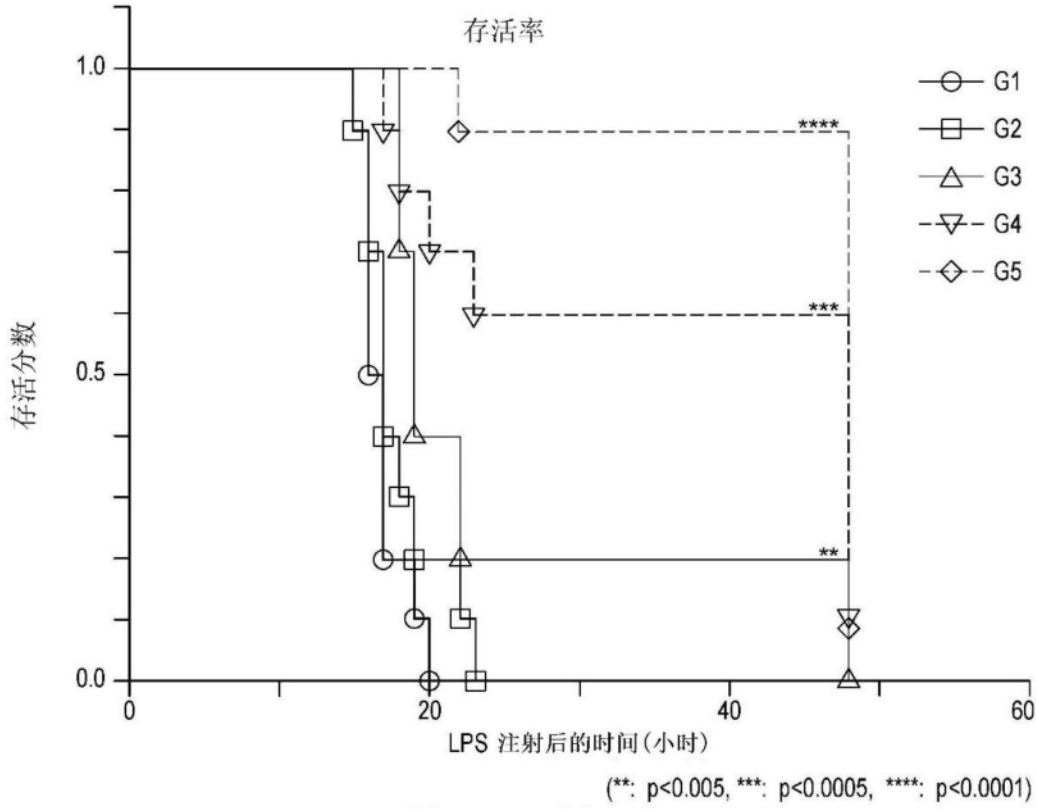

存活率
1.0
0.5
0.0
存活分数
0
20
40
60
LPS 注射后的时间(小时)
G1
G2
G3
G4
G5
****
***
**
(**: p<0.005, ***: p<0.0005, ****: p<0.0001)

图16

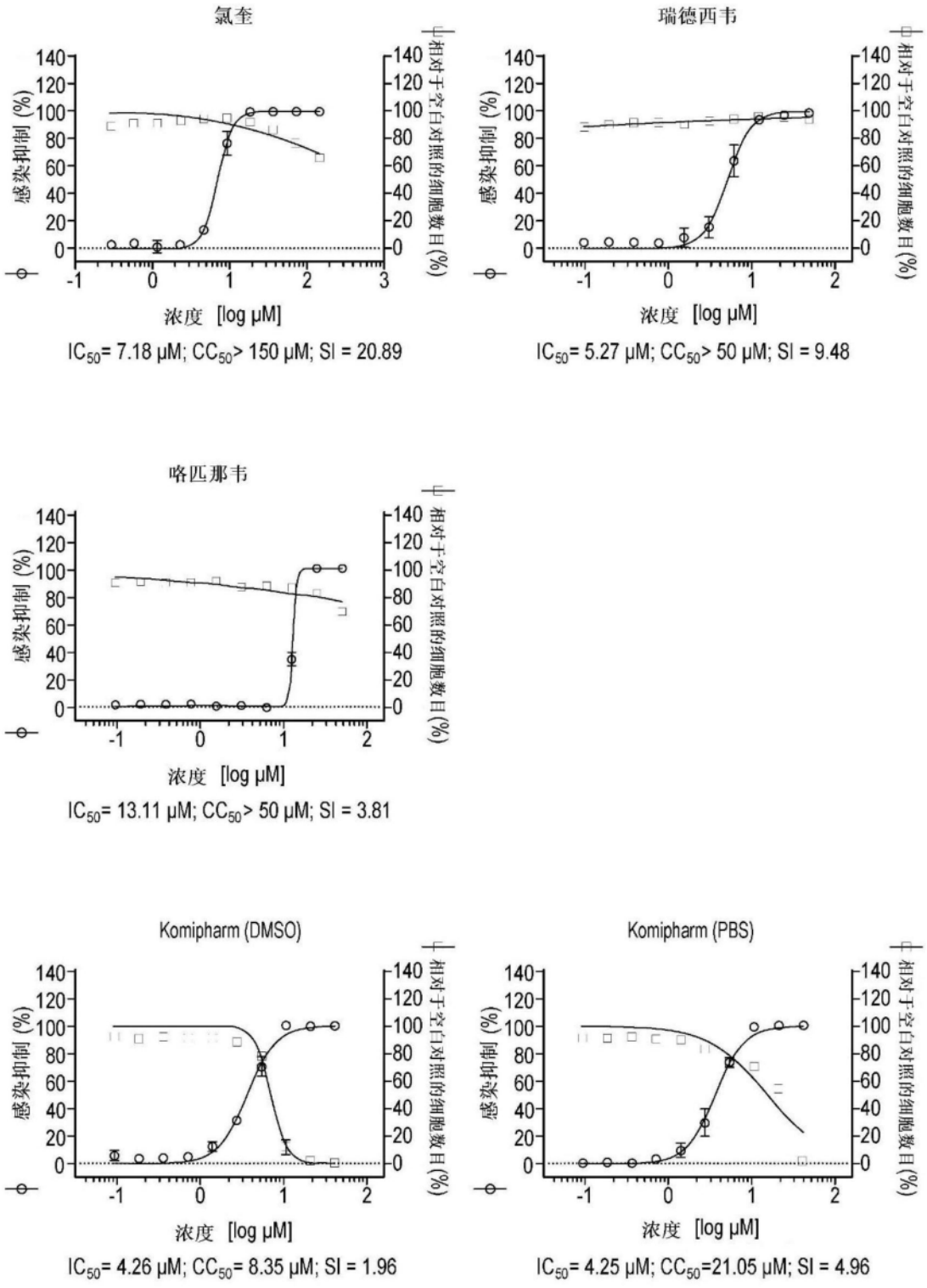

氯奎
感染抑制 (%)
相对于空白对照的细胞数目 (%)
浓度 [log μM]
IC50= 7.18 μM; CC50> 150 μM; SI = 20.89
瑞德西韦
感染抑制 (%)
相对于空白对照的细胞数目 (%)
浓度 [log μM]
IC50= 5.27 μM; CC50> 50 μM; SI = 9.48
喀匹那韦
感染抑制 (%)
相对于空白对照的细胞数目 (%)
浓度 [log μM]
IC50= 13.11 μM; CC50> 50 μM; SI = 3.81
Komipharm (DMSO)
感染抑制 (%)
相对于空白对照的细胞数目 (%)
浓度 [log μM]
IC50= 4.26 μM; CC50= 8.35 μM; SI = 1.96
Komipharm (PBS)
感染抑制 (%)
相对于空白对照的细胞数目 (%)
浓度 [log μM]
IC50= 4.25 μM; CC50=21.05 μM; SI = 4.96

图17