(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110312513 B
(45)授权公告日 2022.07.08

(21)申请号 201880002883.6
(22)申请日 2018.07.04
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110312513 A
(43)申请公布日 2019.10.08
(66)本国优先权数据
PCT/CN2017/091819 2017.07.05 CN
PCT/CN2018/087058 2018.05.16 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.01.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2018/094441 2018.07.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/007356 EN 2019.01.10

(73)专利权人 艾缇亚(上海)制药有限公司
地址 201318 上海市浦东新区青黛路800号1幢2层A座201、202、203室
(72)发明人 B·I·塞缪森 顾铭
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
A61K 31/519(2006.01)
A61K 9/10(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2008106081 A1,2008.09.04
WO 2007126865 A2,2007.11.08
US 2003207932 A1,2003.11.06

审查员 李钢

权利要求书2页 说明书34页 附图12页

(54)发明名称

包含孟鲁司特与贻贝粘附蛋白的组合的局部制剂

(57)摘要

本申请提供了包含孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物的局部药物制剂,以及包含(a)至少一种贻贝粘附蛋白或其衍生物和(b)孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物的组合产品。所述制剂和组合产品可特别用于直接局部给药,以治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症的病状,包括伤口、烧伤、牛皮癣、痤疮和特应性皮炎。

CN 110312513 B

1.一种适合于局部给药的药物制剂在制备用于通过向皮肤的伤口或烧伤直接局部施用所述制剂使所述伤口或烧伤愈合或恢复的药物中的用途,所述药物制剂包含:孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物与药学上可接受的局部辅料的混合物。

2.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为擦伤。

3.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为抓痕。

4.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为切口。

5.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为撕裂。

6.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为皮肤刺伤。

7.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为撕脱伤。

8.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为瘀伤。

9.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为疤痕。

10.权利要求1所述的用途,其中所述伤口为水泡。

11.权利要求1所述的用途,其中所述伤口是痔疮。

12.权利要求1所述的用途,其中所述伤口或烧伤由热引起。

13.权利要求1所述的用途,其中所述伤口或烧伤由化学品引起。

14.权利要求1所述的用途,其中所述伤口或烧伤由晒伤或冻疮引起。

15.权利要求1所述的用途,其中所述伤口或烧伤由冻伤引起。

16.权利要求1所述的用途,其中所述伤口是疾病的结果。

17.权利要求1所述的用途,其中所述伤口是皮肤的溃疡。

18.权利要求17所述的用途,其中所述溃疡是皮肤的难以痊愈的溃疡。

19.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述伤口或烧伤包括对表皮或真皮的损伤和/或真皮以下的损伤。

20.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述伤口或烧伤包括表皮以下的损伤。

21.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述制剂用于进一步治疗与所述伤口或烧伤相关的疼痛和/或发痒。

22.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述制剂用于进一步防止由所述伤口或烧伤导致的体液的渗出和/或感染的风险,和/或进一步防止源自伤口愈合过程或烧伤愈合过程的生理性反应。

23.权利要求22所述的用途,其中所述生理性反应包括疤痕形成和/或黑色素沉着。

24.权利要求23所述的用途,其中所述黑色素沉着与以下相关:黄褐斑、雀斑、黑变病、面颊疹和/或具有黑素瘤的皮肤癌。

25.权利要求23所述的用途,其中所述黑色素沉着与以下相关:由暴露于日光引起的色素沉着。

26.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述局部给药是给药于皮肤。

27.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述制剂为凝胶、乳膏剂或软膏剂的形式。

28.权利要求27所述的用途,其中所述制剂包含聚乙二醇。

29.权利要求28所述的用途,其中所述聚乙二醇是聚乙二醇400。

30.权利要求22所述的用途,其中所述生理性反应包括疤痕形成。

31.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述制剂进一步包含至少一种贻贝粘附蛋白或其衍生物。

32.权利要求1-18中任一项所述的用途,其中所述制剂是进一步包含另一种药物制剂的套装药盒的一部分,所述另一种药物制剂包含:至少一种贻贝粘附蛋白或其衍生物与药学上可接受的辅料的混合物,其中两种制剂各自以适于与另一种联合给药的形式提供。

33.权利要求32所述的用途,其中所述两种制剂适于在治疗所述伤口或烧伤中依序、单独和/或同时使用。

34.权利要求31所述的用途,其中所述至少一种贻贝粘附蛋白选自:mefp-1、mefp-2、mefp-3、mefp-4、mefp-5、mefp-6及其组合。

35.权利要求34所述的用途,其中所述至少一种贻贝粘附蛋白包括mefp-1。

36.权利要求31所述的用途,其中所述衍生物包括贻贝粘附蛋白的衍生物,其为序列Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys的肽或其盐。

37.权利要求32所述的用途,其中所述至少一种贻贝粘附蛋白选自:mefp-1、mefp-2、mefp-3、mefp-4、mefp-5、mefp-6及其组合。

38.权利要求37所述的用途,其中所述至少一种贻贝粘附蛋白包括mefp-1。

39.权利要求32所述的用途,其中所述衍生物包括贻贝粘附蛋白的衍生物,其为序列Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys的肽或其盐。

包含孟鲁司特与贻贝粘附蛋白的组合的局部制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及新型药物组合，和涉及新型药物用途和组合物。

[0002] 背景技术和现有技术

[0003] 炎症的特征通常在于对例如微生物、某些抗原、受损细胞或物理和/或化学因子的入侵的局部组织应答。炎症性反应一般来说是一种保护性机制，其用于消灭、稀释或隔离伤害因子和损伤组织两者、以及用于引发组织愈合。

[0004] 炎症可能源自物理性创伤、感染、某些慢性病(例如牛皮癣和自身免疫性疾病诸如类风湿性关节炎)和/或对外部刺激的化学和/或生理反应(例如作为变态反应的部分)。可能牵涉一系列复杂事件，其中炎症介质增加血流量和使局部血管扩张，这导致发红和发热，使得分泌液体，这通常导致局部肿胀，使得白细胞迁移进发炎区，和引起疼痛。

[0005] 很多病状/病症的特征在于非正常的组织损伤性炎症、和/或由非正常的组织损伤性炎症引起。这样的病状的特征通常在于激活免疫防御机制，对宿主所产生的有害影响大于对宿主的益处，且通常与以下有关：各种程度的组织发红或充血、肿胀、高热、疼痛、发痒、细胞死亡、组织破坏、细胞增殖和/或丧失功能。实例包括炎症性肠病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、牛皮癣、血管球性肾炎和移植排斥。

[0006] 通常，一系列复杂事件产生炎症性变化，诸如通过局部血管扩张增加血流量，这导致发红和发热，白细胞和血浆外渗，这通常导致局部肿胀，激活感觉神经(导致一些组织中存在疼痛)，和丧失功能。这些炎症性变化由一连串的细胞和生物化学事件触发，涉及细胞如嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞连同炎症介质诸如血管活性胺、细胞因子、补体因子和活性氧簇。

[0007] 炎症尤其在伤口愈合过程中起关键作用。伤口和烧伤因此可分类为与炎症相关的病状。本领域中的传统想法是不应该将抗炎药直接施用于开放性伤口，因为这将有害于伤口愈合的进行。

[0008] 贻贝粘附蛋白(MAP)也称为贻贝足丝蛋白(Mytilus edulis foot protein)(mefp)，其为由海洋贝类物种分泌的蛋白质，所述物种诸如为紫贻贝(Mytilus edulis)、厚壳贻贝(Mytilus coruscus)和翡翠贻贝(Perna viridis)。粘附蛋白由贻贝从足丝腺分泌，其中所述粘附蛋白在足丝腺中产生和储存。当在固体(诸如岩石)以及其它固体对象(诸如金属、木材、玻璃等)的表面上分泌时，形成防水粘结(water-proof bond)，其将贻贝固定于固体对象。贻贝通常以群的形式贴附于海岸礁或贴附于船的底部。该粘结极为强力，具有抵抗沿海水域中的波浪冲击的能力。

[0009] 对紫贻贝(Mytilus edulis)、地中海贻贝(Mytilus galloprovincialis)、加州贻贝(Mytilus californias)和翡翠贻贝(Perna viridis)的研究迄今已经识别出11种源自贻贝的单独的粘附蛋白亚型：mfp-1(有时称为“mefp-1”，下文可互换使用)，mfp-2/mefp-2，mfp-3/mefp-3，mfp-4/mefp-4，mfp-5/mefp-5，mfp-6/mefp-6；胶原蛋白pre-COL-P，pre-COL-D和pre-COL-NG；以及贻贝足丝基质蛋白PTMP(近端丝基质蛋白)和DTMP(远侧近端丝基质蛋白)。参见，例如，Zhu et al，Advances in Marine Science，32，560(2014)和Gao et

al,Journal of Anhui Agr.Sci.,39,19860(2011))。

[0010] 所有贻贝粘附蛋白(包括其亚型)具有两种结构特征,在于它们包括:(1)赖氨酸,使得所述蛋白质携载高正电荷荷电(由于NH_2末端);(2)3,4-二羟基苯基丙氨酸(DOPA,多巴胺),其邻苯二酚部分负责形成强的共价键,由此赋予使贻贝粘附蛋白结合于固体表面的能力。

[0011] 基于贻贝粘附蛋白产物的产品目前用于数量有限的领域(包括作为组织粘合剂用于微孔粘结,和治疗伤口和烧伤)。商业产品或直接作为贻贝粘附蛋白的溶液使用或作为冻干粉储存以在使用前溶解。

[0012] 孟鲁司特(Montelukast)是口服活性的非类固醇免疫调节化合物,其经口给予胃肠道,以维持季节性过敏反应的治疗和预防(参见例如Hon et al,Drug Design,Development and Therapy,8,839(2014))。其通过阻断主要是白三烯D4(以及白三烯C4和E4)在呼吸道中对半胱氨酰白三烯受体CysLT1的作用来起作用。

[0013] 虽然孟鲁司特在治疗各种其它炎症性病症中的潜在用途已经描述于文献中,但是据申请人所知,孟鲁司特从未局部给予例如皮肤以治疗炎症。

[0014] 此外,据申请人所知,现有技术并未具体公开使用包含尤其是贻贝粘附蛋白和孟鲁司特的组合产品以治疗例如炎症。

发明内容

[0015] 根据本发明的第一方面,提供了组合产品,其包含:

[0016] (a)至少一种贻贝粘附蛋白或其衍生物,诸如药学上可接受的衍生物;和(b)孟鲁司特,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0017] 所述组合产品在下文称为“根据本发明的组合产品”。

[0018] 在本发明的上下文中,术语“贻贝粘附蛋白”包括可以源自贻贝物种的任何粘附蛋白,包括本申请提及的那些和优选为紫贻贝(Mytilus edulis)(蓝贻贝(blue mussel))。

[0019] 该术语因此包括全长蛋白,包括所有亚型,其源自或可以源自贻贝,诸如胶原蛋白pre-COL-P、pre-COL-D和pre-COL-NG,贻贝足丝基质蛋白PTMP和DTMP,和更优选为mfps或mefps,诸如mefp-2、mefp-3、mefp-4、mefp-5、mefp-6,和尤其是mefp-1,并且包括任何这些蛋白质的混合物或组合,诸如mefps。虽然根据本发明,上述MAP亚型的混合物/组合可以作为MAP“组分”提供,但是优选的是主要的MAP亚型(例如mefp-1)的纯度为任何这样的混合物的总量的至少25重量%。

[0020] 作为本发明组合产品的必要要素的至少一种贻贝粘附蛋白在下文称为至少一种“MAP”。贻贝粘附蛋白在下文共同或另行地称为“MAP”。

[0021] 可以使用提取、制备、分离和纯化天然存在的MAP的已知方法,例如混合吸附色谱(参见中国专利号ZL200710179491.0)、羧基甲基离子交换色谱(参见中国专利号ZL200710179492.5)和/或盐析和透析(中国专利号ZL200910087567.6)。MAP的商业来源包括USUN Bio Co.(中国;作为MAP Medical Device®出售)、BD Biosciences(美国)、Kollodis(韩国)和Biopolymer(瑞典)。MAP或者可以使用已知的重组DNA方法制备。

[0022] MAP的衍生物包括分离的药学上可接受的衍生物,诸如较低分子量产物(例如分子量范围为约500Da至约2,000(例如约1,200,诸如约800)Da,其可允许较易渗透通过生物膜

诸如皮肤屏障或粘膜表面。这样的衍生物也可以包括含有氨基酸序列的其它化合物，所述序列与已经在天然存在的MAP中确定的序列相同或者是其(例如次要)变体，并且所述化合物可以通过化学和/或生物方法(例如天然存在的MAP的化学修饰，或直接合成)合成。我们用“天然存在的MAP中确定的氨基酸序列的(例如次要)变体”表示那些序列中的变化，所述变化不会负面地影响有关天然存在的MAP的必要性质达可测量的程度。

[0023] MAP的衍生物包括“MAP肽”及其盐(例如阳离子盐)，其为具有以下序列的十肽：Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys(参见Waite,Int.J.Adhesion and Adhesives,7,9(1987))。MAP肽可以作为天然存在的MAP的低分子量衍生物衍生和/或分离，或者可以例如按照Yamamoto在J.Chem.Soc.,Perkin Trans.1,613(1987)中的描述合成。也参见Dalsin et al,J.Am.Chem.Soc.,125,4253(2003)。

[0024] 这样的MAP的衍生物可以单独用于根据本发明的组合产品，或者与一种或多种其它这样的衍生物和/或上述全长MAP组合使用。

[0025] 可以提及的孟鲁司特的药学上可接受的盐包括酸加成盐和碱加成盐。这样的盐可以通过常规手段形成，例如通过活性成分与一当量或更多当量的合适酸或碱任选在溶剂中或在盐不溶于其中的介质中的反应，然后使用标准技术(例如在真空中，通过冻干或过滤)除去所述溶剂或所述介质进行。也可以如下制备盐：例如使用适宜的离子交换树脂使盐形式的活性成分的抗衡离子与另一种抗衡离子交换。

[0026] 优选的盐包括，例如，盐酸盐、硫酸氢盐、马来酸盐、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、碱土金属盐诸如钙盐和镁盐，或碱金属盐诸如钠盐和钾盐。优选的孟鲁司特的盐包括钠盐和二环己基胺盐。

[0027] 孟鲁司特可以按对映异构体富集形式使用。我们用“对映异构体富集”分别表示孟鲁司特的对映异构体的任何混合物，其中一种异构体以大于另一种异构体的比例存在。例如，可以使用光学纯度(对映异构体过量;e.e.)大于90％的孟鲁司特的对映异构体。

[0028] 根据本发明的组合产品提供至少一种MAP或其(例如药学上可接受的)衍生物与孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物联合给药，并因此可以体现为单独制剂，其中那些制剂的至少一种包含MAP/衍生物，和至少一种包含孟鲁司特/盐/溶剂化物，或者可以体现(即配制)为组合制剂(即体现为包括MAP/衍生物和孟鲁司特/盐/溶剂化物的单一制剂)。

[0029] 因此，进一步提供了：

[0030] (1)药物制剂，其包含：至少一种MAP或其衍生物；孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物；和药学上可接受的辅料、稀释剂或载体(所述制剂在下文称为“组合制剂”)；和

[0031] (2)套装药盒(kit of parts)，其包含以下组分：

[0032] (A)药物制剂，其包含：至少一种MAP或其衍生物与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体的混合物；和

[0033] (B)药物制剂，其包含：孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体的混合物，

[0034] 其中组分(A)和(B)各自以适于与另一种联合给药的形式提供。

[0035] 根据本发明的再一方面，提供了制备如上定义的套装药盒的方法，所述方法包括使如上定义的组分(A)与如上定义的组分(B)联合，由此使得两种组分适于彼此联合给药。

[0036] 通过使两种组分彼此“联合”在一起，我们要求(include)，套装药盒的组分(A)和

(B)可以：

[0037] (i)作为单独的制剂(即彼此独立)提供，然后将它们放置在一起，以在组合疗法中彼此联合使用；或

[0038] (ii)作为“组合包”的单独组分一起包装和提供，以在组合疗法中彼此联合使用。

[0039] 因此，进一步提供了包含以下的套装药盒：

[0040] (I)如上定义的组分(A)和(B)之一；连同

[0041] (II)使用说明，以将该组分与两种组分的另一种联合使用。

[0042] 本申请所述的套装药盒可以包含多于一种包含适当量/剂量的MAP/衍生物的制剂，和/或多于一种包含适当量/剂量的孟鲁司特/盐/溶剂化物的制剂，以便于提供重复给药。如果存在多于一种制剂(包含任一种活性化合物)，则这样的制剂在任一化合物的剂量、化学组成和/或物理形式方面可以相同或可以不同。

[0043] 关于本申请所述的套装药盒，我们用“与…联合给药”包括在治疗相关病状的期间将包含MAP(或其衍生物)和孟鲁司特(或其盐/溶剂化物)的相应制剂依序、单独和/或同时给药。

[0044] 因此，关于根据本发明的组合产品，术语“与…联合给药”包括组合产品的两种组分(MAP和孟鲁司特)或一起、或在时间上充分接近地给药(任选重复地)，以使得在治疗相关病状的期间对患者的有益效果大于以下情况：在相同的治疗期间，包含MAP的制剂、或包含孟鲁司特的制剂在没有另一种组分的情况下单独给药(任选重复地)。确定一种组合是否关于特定病状和在治疗特定病状的期间提供较大的有益效果将取决于待治疗或预防的病状，但是可以由本领域技术人员按常规技术手段实现。

[0045] 此外，在根据本发明的套装药盒的上下文中，术语“与…联合”包括两种制剂中的一种或另一种可以在另一组分的给药之前、之后、和/或与其同时给药(任选重复地)。当用于该上下文时，术语“同时给药”和“与…同时给药”包括单剂量的有关MAP和孟鲁司特在彼此的48小时(例如24小时)内给药。

[0046] 根据本发明的组合产品可用于治疗炎症。“治疗炎症”包括不考虑原因在身体的任何器官(包括软组织、关节、神经、血管系统、内部器官，尤其是粘膜表面，特别是皮肤)中治疗炎症，并且也包括所有这样的炎症性病症或病状、和/或特征在于炎症(例如作为症状)的病症或病状。

[0047] 炎症性病状的特征可以(且通常)在于激活免疫防御机制，对宿主所产生的有害影响大于对宿主的益处。这样的病状通常与以下有关：各种程度的组织发红或充血、肿胀、高热、疼痛(包括酸痛)、体液渗出、发痒(瘙痒)、细胞死亡和组织破坏、细胞增殖和/或丧失功能。

[0048] 可以提及的炎症性病状包括动脉炎、糖尿病、代谢综合征、酒糟鼻、哮喘和过敏性反应、强直性脊柱炎、慢性阻塞性肺病、痛风性关节炎、炎症性肠病(诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎)、多发性硬化症、骨关节炎、胰腺炎、前列腺炎、牛皮癣性关节炎、类风湿性关节炎、腱炎、滑液囊炎、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、荨麻疹、血管炎、肥大细胞增多症、糖尿病血管并发症、偏头痛、动脉粥样硬化和相关的心血管疾病。可以特别提及的病情是慢性阻塞性肺病(COPD)。

[0049] 可以更特别提及的炎症性病状包括皮肤或粘膜(包括口腔粘膜、鼻粘膜、眼粘膜、

阴道粘膜、子宫颈粘膜和/或肛肠粘膜，更特别是口腔粘膜或鼻粘膜)的炎症，诸如由于感染(诸如病毒和/或细菌感染)带来的炎症，或过敏性/特应性病状(诸如鼻炎、咽炎、牙周炎、齿龈炎、干眼症、结膜炎、皮炎、荨麻疹(urticaria,hives)和食物过敏)；和其它炎症性病状，诸如疱疹、药疹、多形性日光疹、晒伤、皮肤癌的早期表现(红斑样皮肤损伤)、病理性脱发(包括在皮肤移植之后)、化疗疹(chemo rash)、牛皮癣、多形红斑、毛囊炎、湿疹和外耳道炎。

[0050] 更特别地，根据本发明的组合产品可以用于治疗特征在于炎症、和/或与炎症相关的某些病状。这样的病状可以包括伤口(包括擦伤(抓痕)、切口(包括手术切口)、撕裂、刺伤、撕脱伤、瘀伤和疤痕形成)、烧伤(包括由于烧伤之后的外科手术诸如皮肤移植引起的炎症)和其它病状诸如痔疮。

[0051] 皮肤或粘膜的伤口可以产生于对膜表面的内部或外部物理性损伤，或者可以由其引起(即，是潜在生理失调的症状)。

[0052] 物理性(例如“开放性”)伤口可以由以下引起：利器(割伤、切口、刺伤)或钝器/机械力(撕裂、擦伤、撕脱伤)、物理打击(瘀伤)、热或化学品(烧伤和水泡)、UV光(晒伤)、寒冷(冻疮或冻伤)。伤口可以是表面伤口(仅损伤表皮和/或真皮)或者可以是全层皮肤缺损的伤口(full thickness wound)(表皮和/或真皮以下的损伤)。在严重的情况中，皮下和/或粘膜下组织诸如肌肉、骨骼、关节、和甚至内部器官可能被损伤。

[0053] 本发明的组合产品不仅可以用于治疗与伤口本身以及愈合过程相关的炎症、疼痛(包括酸痛)和/或瘙痒(发痒)，而且它们也可以用于防止体液从伤口渗出、感染的风险，以及防止源自炎症和/或伤口愈合过程的生理性反应诸如疤痕形成和黑色素沉着。

[0054] 疤痕形成是炎症和/或伤口愈合的结果，且是作为这样的炎症/愈合的结果的纤维化组织形成的通用术语。

[0055] 本发明的组合产品也可以用于抑制可能产生自炎症/伤口愈合的黑色素沉着的产生。本发明的组合产品也可以用于抑制与黑色素沉着相关的病症，诸如黄褐斑、雀斑、黑变病、面颊疹和其它色素沉着、具有黑素瘤的皮肤癌(skin cancer with melanoma)，和由暴露于阳光引起的色素沉着或皮肤病如痤疮。

[0056] 伤口也可以作为疾病或病症的结果产生。这些可以包括皮肤和粘膜的水泡形成和/或溃疡。这些是通常长期和难以治疗的普通病状。皮肤组织通常可以是损伤的、除去的、液化的、感染的和/或坏死的。溃疡可以导致对健康的二次结果，特别是如果它们变得感染的话，其难以痊愈且造成重大损失。它们也可以对患者造成明显的心理压力和经济损失，影响总体幸福感和生活质量两者。

[0057] 在可替换的实施方式中，其中根据本发明的组合产品可特别用于其的炎症性皮肤病状或疾病包括牛皮癣、痤疮、湿疹和皮炎，尤其是过敏性/特应性皮炎。

[0058] 牛皮癣是慢性炎症性皮肤病，其往往会复发(一些患者在其整个生命过程中从未痊愈)。牛皮癣的临床表现主要包括红斑和鳞屑(scales)。其可以发生在整个身体上，但是更常在头皮和肢体上观察到。

[0059] 痤疮是毛囊(毛囊皮脂腺单位)的慢性炎症性皮肤病，其发生于下述主要因素紧密相关，例如皮脂分泌过多，闭塞性皮脂腺管(包括闭合性和开放性粉刺)，细菌感染和炎症性反应，其往往在青年时期发生，特征在于面部上的多形性皮肤损伤。术语痤疮因此包括寻常

痤疮和酒糟鼻痤疮(即,褐鼻病)。

[0060] 湿疹是具有由多种内部和外部因素引起的强烈发痒的皮肤炎症性反应。其具有三个阶段,即急性期、亚急性期和慢性期。在急性期,往往产生渗出物,而慢性期则包括浸润和肥大。皮肤损伤通常发痒且容易复发。

[0061] 皮炎是常见皮肤病,其特征在于粗糙、发红、发痒、湿疹和干燥。由皮炎引起的小肿块、难治性溃疡和色素斑,如果未立即治疗,则可能发展成基底细胞瘤、鳞状细胞癌和恶性黑素瘤。皮炎可能由各种内部和外部感染性或非感染性因素引起,包括物质(接触性皮炎)或过敏性反应(过敏性/特应性皮炎)。也包括脂溢性皮炎(脂溢性湿疹)和所有形式的类固醇依赖性皮炎(包括光敏性皮脂溢疹、口周皮炎、酒糟鼻样皮炎、类固醇酒糟鼻、类固醇诱导的酒糟鼻、医源性酒糟鼻、类似于类固醇皮炎的酒糟鼻、局部皮质类固醇诱导的酒糟鼻样皮炎,和更特别是面部皮质类固醇成瘾性皮炎(facial corticosteroid addictive dermatitis)(FCAD)或面部皮质类固醇依赖性皮炎(facial corticosteroid-dependent dermatitis)(FCDD),特征在于在用(包括不受控使用、滥用或错用)局部皮质类固醇长期治疗之后在面部区域出现的脸红、红斑、毛细管扩张、萎缩、丘疹和/或脓泡;参见,例如,Xiao et al,J.Dermatol.,42,697(2015)和Lu et al,Clin.Exp.Dermatol.,35,618(2009))。

[0062] 已经发现,根据本发明的组合产品在减轻由各种病状(包括本申请一般和具体提及的那些)引起的红斑、发红和肿胀、水肿、水泡和大疱性类天疱疮方面具有正面效果,并且可以抑制皮下组织液的渗出,和抑制由这样的炎症性病状引起的发痒和疼痛。

[0063] 可以提及的其它炎症性病状包括:

[0064] (a)粘膜炎症,诸如口腔粘膜炎、口腔溃疡、中耳炎、喉炎、气管炎、食管炎、胃炎、肠炎和小肠结肠炎(包括细菌性痢疾、慢性阿米巴痢疾、血吸虫病、非特异性溃疡性结肠炎和节段性肠炎)、子宫颈炎和子宫颈内膜炎、子宫内膜炎、由吸入性损伤引起的炎症等,以及与癌症和感染(例如病毒感染,诸如普通感冒或流感)相关的炎症,其影响粘膜表面,诸如口腔、鼻咽、耳朵、咽喉、气管、胃肠道、子宫颈等中的粘膜表面。

[0065] (b)与例如骨折、骨骼和关节的化脓性感染相关的骨科炎症,由以下引起的炎症:风湿性骨病,以及化脓性骨髓炎(急性、慢性、局部的、硬化的、外伤后的),化脓性关节炎;骨肿瘤(骨瘤、骨样骨瘤、软骨瘤)、骨囊肿、破骨细胞瘤、原发性骨肉瘤(骨肉瘤、软骨肉瘤、骨纤维肉瘤、尤文氏肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、骨髓瘤、脊索瘤)、骨转移瘤、骨的肿瘤样病变(骨囊肿、动脉瘤性骨囊肿、嗜酸细胞肉芽肿、骨纤维异常增殖症);和类风湿性关节炎。

[0066] (c)神经炎症,诸如多发性末梢神经炎、面神经炎、末梢神经炎、皮下神经炎、尺神经炎、肋间神经炎等。

[0067] (d)皮下和粘膜下软组织炎症,诸如肌炎、韧带炎、腱炎、脂膜炎、囊炎、淋巴腺炎、腹股沟腺炎(bubonadentitis)、扁桃体炎、滑膜炎、筋膜炎,和由肌肉、韧带、筋膜、腱、滑膜、脂肪、关节囊和淋巴组织的损伤、挫伤或撕裂引起的软组织炎症。

[0068] (e)血管炎症,诸如变应性白细胞碎裂性小血管炎、变应性皮肤血管炎、结节性多动脉炎、血栓性血管炎、肉芽肿性血管炎、淋巴细胞性血管炎、血液组成中具有异常的血管炎和风湿性血管炎,以及与由以下引起的血管癌相关的血管炎症:变应性白细胞碎裂性小血管炎、结节性多动脉炎、血栓性血管炎、肉芽肿性血管炎、淋巴细胞性血管炎、血液组成中具有异常的血管炎和风湿性血管炎。

[0069] (f)内部器官(例如心脏、胃、肠、肺、肝、脾、肾、胰腺、膀胱、卵巢,和前列腺)的炎症,包括但不限于心包炎、心肌炎、心内膜炎、肺炎、肝炎、脾炎、肾炎、胰腺炎、膀胱炎、卵巢炎、前列腺炎和胃溃疡的治疗。

[0070] 根据本发明的再一个方面,提供了治疗炎症、炎症性病症、和/或特征在于炎症(例如作为症状)的病症/病状的方法,该方法包括将根据本发明的组合产品给予需要这种治疗的患者。

[0071] 为了避免疑惑,在本发明的上下文中,术语"治疗"、"疗法"和"治疗方法"包括有需要的患者的治疗性或减轻性治疗,以及易患炎症和/或炎症性病症的患者的预防性治疗和/或诊断。

[0072] "患者"包括两栖动物和优选哺乳动物(特别是人)患者。

[0073] 根据本发明,MAP/衍生物和孟鲁司特/盐/溶剂化物优选局部或全身给药,例如口服给药、静脉内或动脉内给药(包括通过血管内和其它血管周装置/剂型(例如支架))、肌内给药、经皮给药、皮下给药、透粘膜给药(例如舌下或口腔给药)、经直肠给药、阴道内给药、透皮给药、经鼻给药、经肺给药(例如经气管给药或经支气管给药)、局部给药或通过任何其它非肠道途径给药,形式为药学上可接受的剂型中包含化合物的药物制剂。当待治疗的病状是鼻炎或源自呼吸道的病毒感染(普通感冒、流感)的炎症时,通过吸入(例如经鼻)给药特别有用。当待治疗的病状是COPD时,经肺给药特别有用。可以通过产生包含活性成分的喷雾(spray)增强局部给药形式,例如通过使用粉末气溶胶(aerosol)或借助于使用适当的雾化技术或设备诸如喷雾器的水雾(aqueous mist)。

[0074] MAP及其衍生物的优选递送模式包括在适当的(例如药学上可接受的)媒介物和/或商购制剂中局部递送至炎症部位,但是也可以包括口服、静脉内、经皮或皮下、经鼻、肌内或腹膜内递送。可以提及的孟鲁司特/盐/溶剂化物的递送模式包括在已知的药学上可接受的和/或商购制剂中口服递送,但是也可以包括静脉内、经皮或皮下、经鼻、肌内或腹膜内递送,以及在适当的(例如药学上可接受的)媒介物中局部给予炎症部位。

[0075] MAP/衍生物和孟鲁司特将通常以与药学上可接受的辅料、稀释剂或载体混合的一种或多种(例如药物)制剂的形式共同或单独给药,所述辅料、稀释剂或载体可以适当考虑预定给药途径和标准制药实践来选择。这样的药学上可接受的载体可以对活性化合物具有化学惰性,并且可以在使用条件下不具有有害副作用或毒性。这样的药学上可接受的载体也可以赋予任一种活性成分的立即释放(immediate release)或改良释放(modified release),不管是在组合制剂中一起给药还是以套装药盒的形式给药。

[0076] 适宜的药物制剂可以商购或以其它方式根据文献中描述的技术制备,例如,Remington The Science and Practice of Pharmacy,22nd edition,Pharmaceutical Press(2012)和Martindale-The Complete Drug Reference,38th Edition,Pharmaceutical Press(2014)以及其中提及的文件,所有文件中的相关公开内容并入本申请以作参考。否则,适宜制剂的制备,特别是包含MAP/衍生物和孟鲁司特/盐/溶剂化物两者的组合制剂的制备可以由本领域技术人员使用常规技术无创造性地实现。

[0077] 活性成分(诸如MAP(例如Mefp-1)及其衍生物,以及孟鲁司特)可以为含水制剂的形式诸如乳液、悬浮液和/或溶液(例如(任选)缓冲的含水制剂(例如溶液)、诸如含生理盐水的制剂(例如溶液)、含磷酸盐的制剂(例如溶液)、含醋酸盐的制剂(例如溶液)或含硼酸

盐的制剂(例如溶液)),或冻干粉。

[0078] 在可替换的实施方式中,活性成分可以与适当的赋形剂组合以制备:

[0079] • 凝胶制剂(对其适宜的凝胶基质材料包括纤维素衍生物、卡波姆和海藻酸盐、西黄蓍胶、明胶、果胶、卡拉胶、结冷胶、淀粉、黄原胶、阳离子瓜尔胶、琼脂、非纤维素多糖、乙烯基聚合物、丙烯酸树脂、聚乙烯醇、羧基乙烯基聚合物,和特别是透明质酸);

[0080] • 洗剂(浓缩物;对其适宜的基质材料包括纤维素衍生物、甘油、非纤维素多糖、具有不同分子量的聚乙二醇和丙二醇);

[0081] • 糊剂或软膏剂(对其适宜的糊剂基质材料包括甘油、凡士林(vaseline)、石蜡、具有不同分子量的聚乙二醇等);

[0082] • 乳膏剂或泡沫剂(对其适宜的赋形剂(例如发泡剂)包括羟基丙基甲基纤维素、明胶、具有不同分子量的聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、脂肪醇钠、聚氧乙烯醚磺酸盐、玉米蛋白粉和丙烯酰胺);

[0083] • 粉末气溶胶(对其适宜的赋形剂包括甘露醇、甘氨酸、糊精、右旋糖、蔗糖、乳糖、山梨醇和聚山梨酯);和/或

[0084] • 液体(气溶胶)喷雾,用于口服使用或用于吸入(对其适宜的赋形剂包括粘度调节剂,诸如透明质酸、乳化剂、缓冲剂、醇、水、防腐剂、甜味剂、香料等)。

[0085] 视情况而定,以下物质也可以包括在这样的制剂中:保湿剂,诸如甘油(glycerol)、丙三醇(glycerin)、聚乙二醇、海藻糖、甘油、矿脂(petrolatum)、石蜡油、透明质酸及其盐(例如钠盐和钾盐)、辛酸/羊脂酸甘油三酯等;和/或抗氧化剂,诸如维生素和谷胱甘肽;和/或pH调节剂,诸如酸、碱和pH缓冲剂。此外,可以包括以下物质:表面活性剂/乳化剂,诸如十六烷醇(鲸蜡醇)、脂肪酸(例如硬脂酸)、十二烷基硫酸钠(月桂基硫酸钠)、山梨聚糖酯(例如山梨聚糖硬脂酸酯、山梨聚糖油酸酯等)、单酰基甘油酯(诸如单硬脂酸甘油酯)、聚乙氧基化醇、聚乙烯醇、多元醇酯、聚氧乙烯烷基醚(例如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、乙氧基化脂肪酸酯、聚氧甘油酯、月桂基二甲基胺氧化物、胆汁盐(例如脱氧胆酸钠、胆酸钠)、磷脂、N,N-二甲基十二烷胺-N-氧化物、十六烷基三甲基溴化铵、泊洛沙姆、卵磷脂、固醇(例如胆固醇)、糖酯、聚山梨酯等;防腐剂,诸如苯氧基乙醇、乙基己基甘油等;和增稠剂,诸如牛磺酸丙烯酰基二甲基酯/VP共聚物。特别地,硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、十六醇、山梨聚糖硬脂酸酯、鲸蜡醇、辛酸/羊脂酸甘油酯等可以特别包括在乳膏制剂中。

[0086] 我们已经发现,可以如下有利地配制孟鲁司特及其盐,以局部用作乳膏剂、洗剂、蜡、或特别是软膏剂:将具有不同分子量的聚乙二醇(PEG)配制在一起,所述聚乙二醇的分子量可以是约62至约22,000之间的任何分子量(例如PEG150、PEG、200、PEG 350、PEG 400、PEG 600、PEG 800、PEG 1000、PEG 2000、PEG 3350、PEG 4000、PEG 6000)。孟鲁司特可以首先溶解于低分子量PEG中,诸如PEG 200,或更特别是PEG 400,可以向该低分子量PEG中添加其它赋形剂,包括具有较高分子量的PEG(例如PEG1000、PEG 3350、PEG 4000或PEG 6000),溶剂诸如低级烷基醇(例如乙醇)或水,和/或其它成分诸如以上列出的那些。

[0087] 我们已经意外地发现,孟鲁司特可以容易溶解于这样的基于PEG的溶剂中,以制备乳膏剂和软膏剂,所述乳膏剂和软膏剂具有较低的pH(例如pH 5.9至7.5)而非主要在含水制剂(例如具有极低量乙醇的水)中观察到并且可能刺激皮肤或粘膜的较高的pH(pH 9.5)。

孟鲁司特可以按该方式溶解，然后将其配制为乳膏剂或软膏剂，所述乳膏剂或软膏剂出乎意料地稳定(即，不易氧化)，其pH对于皮肤/粘膜而言较可接受/具有较小刺激，且当溶解于水时较接近MAP的pH。

[0088] 活性成分(诸如MAP(例如Mefp-1)及其衍生物，以及孟鲁司特)和包含它们(例如，药物)的制剂(例如，如上所述的含水溶液、凝胶、乳膏剂、软膏剂、洗剂/浓缩物、泡沫剂和/或糊剂)可以进一步与适当的基质材料组合以制备用于施用在生物表面诸如皮肤或粘膜表面上的敷料(dressing)或治疗贴片(therapeutic patch)。这样的制剂因此可以用于浸渍基质材料，诸如纱布、无纺布或丝纸。治疗贴片或者可以是，例如，创可贴、面膜、眼膜、手膜、足膜等。

[0089] 凡士林可以用于将这样的敷料施用于伤口，但是我们也已经发现上述基于PEG的软膏剂可以与基质材料组合以在无需使用凡士林的情况下制备敷料。

[0090] 活性成分(诸如MAP(例如Mefp-1)及其衍生物，以及孟鲁司特)也可以与一种或多种选自以下的生长因子组合进行治疗：血小板型生长因子(包括血小板源性生长因子，PDGF)；骨肉瘤源性生长因子(ODGF)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGFα和TGFβ)、成纤维细胞生长因子(αFGF、βFGF)、胰岛素样生长因子(IGF-I、IGF-II)、神经生长因子(NGF)、白细胞介素型生长因子(IL-1、IL-1、IL-3)、促红细胞生成素(EPO)和集落刺激因子(CSF)。

[0091] 活性成分的给药可以是连续的或间歇的。给药模式也可以由给药的时机和频率确定，但是在治疗性处理炎症的情况下也取决于病状的严重程度。

[0092] 取决于待治疗的病症和患者以及给药途径，活性成分可以按不同的治疗有效剂量给予有其需要的患者。

[0093] 类似地，活性成分在制剂中的量将取决于病状的严重程度，和取决于待治疗的患者，但是可以由本领域技术人员确定。

[0094] 适宜剂量的活性成分包括在医学文献中提及的那些，诸如Martindale-The Complete Drug Reference，38th Edition，Pharmaceutical Press(2014)以及其中提及的文件，所有这些文件的相关公开内容并入本申请以作参考。

[0095] 在任何事件中，取决于病状的严重程度和给药途径，医学从业者或其它技术人员将能够按常规确定最适宜于个体患者的实际剂量。上述剂量是平均情况的示例；当然可以存在个别情况，在这些情况中较高或较低的剂量范围是有利的，这些也在本发明的范围内。

[0096] 口服和局部剂量可以每日给药一次至每日给药四次。

[0097] MAP及其衍生物在含水溶液产物中的适当浓度可以为约0.01(例如约0.1)至约15.0(例如约1.5)mg/mL，并且适当的pH值的范围为约1.0至约7.0(例如约3.0至约6.5)，而不管使用的制剂是如本申请所述的组合制剂还是套装药盒。这样的含水溶液的适宜商业来源包括USUN Bio Co.，Jiangyin，Jiangsu Province，China。

[0098] MAP及其衍生物的适当的局部剂量为约0.1至约50μg/cm^{2}的治疗面积，诸如约1至约20μg/cm^{2}的治疗面积，包括约2至约10μg/cm^{2}的治疗面积，诸如约5μg/cm^{2}的治疗面积。

[0099] 孟鲁司特在含水溶液产品中的适当浓度可以为0.1至10mg/mL(以游离碱计算)，且这样的溶液的适当pH值为约5.0(例如约7.0)至约11.0(例如约5.5(例如约8.0)至约10.0，诸如约pH 9.0，或约5.5至约7.5)，而不管使用的制剂是如本申请所述的组合制剂还是套装药盒。

[0100] 孟鲁司特及其盐/溶剂化物的适当局部剂量为约0.01至约50(诸如约20,例如约17.5,包括约10)μg/cm^2的治疗面积,诸如约0.05(例如约0.1,包括约0.5)至约17.5,包括约10,诸如约7.5,例如约5)μg/cm^2的治疗面积,在所有的情况中均以游离碱计算。

[0101] 根据本发明的再一方面,提供了包含孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物的药物(例如基于液体或(例如含水)溶液的)制剂,所述制剂适合于、适应于和/或包装和提供以用于,(a)局部给药(例如给予粘膜或优选为给予皮肤);和/或(b)治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症的病状。类似地,提供了用于治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症(例如作为症状)的病状的所述制剂,其借助于直接局部给予这样的制剂(例如给予粘膜或优选为给予皮肤)进行。

[0102] 关于本发明的该方面,为避免疑问,包含孟鲁司特的局部制剂可以用于治疗任何和所有炎症、用于治疗任何和所有炎症性病症、和/或用于治疗任何和所有特征在于炎症的病状,如上文提及、定义或描述。类似地,可以提及的包含孟鲁司特的局部制剂(包括组合)包括任何和所有上文提及、定义或描述的制剂。将任何和所有与本发明该部分有关的以上相关公开内容并入本申请以作参考。

[0103] 然而,已经发现包含孟鲁司特或其药学上可接受的盐或溶剂化物的局部(例如基于液体或(例如含水)溶液的)制剂可特别用于伤口愈合,并且可以减轻与伤口本身和伤口愈合过程有关的疼痛(包括酸痛)和特别是瘙痒/发痒。我们也已经发现,这样的局部孟鲁司特制剂特别用于预防和/或抑制体液从伤口的渗出物,特别是在急性炎症期过程中,例如在首个48小时过程中,在已经遭受烧伤或伤口之后。这避免了感染和其它生理反应的风险。我们也已经发现,这样的局部孟鲁司特制剂可特别用于预防和/或抑制疤痕形成和黑色素沉着(见上),不管是与伤口还是与其它有关的。

[0104] 可以提及的孟鲁司特的适宜口服剂量为每天约0.25mg至约600mg,诸如约0.4mg至约200mg,优选约5mg至约100mg,例如约7mg(例如约8mg)至约25mg(例如约12mg),而不管使用的制剂是如本申请所述的组合制剂还是套装药盒。

[0105] 在任何事件中,关于任一种活性成分,在本发明的内容中给予哺乳动物特别是人的剂量应该足以在合理的时间表(如上文描述)内在哺乳动物中产生治疗响应。本领域技术人员将会认识到,对精确剂量和组合物以及最适当的递送方案的选择也将尤其由以下影响:制剂的药理学性质,待治疗的病状的性质和严重程度,和接受者的身体状况和精神敏度,以及待治疗患者的年龄、病状、体重、性别和响应,和疾病的分期/严重程度,以及患者之间的遗传差异。

[0106] 当措辞“约”用于本申请时,例如在量的上下文中,诸如活性成分的浓度和/或剂量、分子量或pH,应了解的是,这样的变量是近似值,就其本身而言可以在下述范围内变化:本申请指定的数字±10%,例如本申请指定的数字±5%,优选为本申请指定的数字±2%(例如±1%)。在这方面,术语“约10%”表示例如数字10周围的±10%,即,在9%和11%之间。

[0107] 一种或多种MAP或其衍生物和孟鲁司特的组合可以在生物和/或临床试验中表明清楚的协同效果。

[0108] 本申请所述的组合产品/方法具有的优势可以是,它们使得能够在局部给药的情况下给予通常口服给药的抗炎药孟鲁司特。

[0109] 本申请所述的组合产品/方法也可以具有下述优势,即,在上文提及的病状的治疗中,与现有技术中已知用于治疗炎症性病症的类似方法(治疗)或以其它方式治疗的方法相比,对于医生和/或患者而言本申请所述的组合产品/方法较方便,较有效,毒性较小,具有较宽范围的活性,较强势,产生较少的副作用,或者可以具有其它有用的药理学性质。

附图说明

[0110] 本发明由以下实施例说明,其中:

[0111] 图1和2展示用各种测试化合物测试的分别根据实施例1和2从来自在小鼠中诱导的气囊(air pouch)的渗出物获得的各种炎症性标志物的ELISA试验结果;

[0112] 图3说明用各种测试化合物测试的大鼠中诱导的三度烧伤的愈合随时间变化的烧伤得分;

[0113] 图4和5展示分别根据实施例4和5从来自在小鼠中诱导的气囊的渗出物获得的各种炎症性标志物的ELISA试验结果;

[0114] 图6显示在实施例6的急性伤口模型中孟鲁司特对伤口愈合的作用;

[0115] 图7显示在实施例6模型中样品中的伤口羟基脯氨酸含量;

[0116] 图8显示在实施例7的糖尿病伤口模型中孟鲁司特对伤口愈合的作用;

[0117] 图9显示在实施例7模型中在第6天样品中的伤口血管内皮生长因子含量(pg/g);

[0118] 图10显示在实施例7模型中在第6天和第12天样品中的组织病理学分析;

[0119] 图11显示在实施例16的体内大鼠模型中局部施用的孟鲁司特对烫伤伤口愈合的作用;

[0120] 图12和13显示在孟鲁司特单独局部施用的情况下(图12)和在最初施用MAP之后(图13),在类似的体内大鼠模型中孟鲁司特渗透进未受伤的皮肤和烫伤的皮肤(参见实施例17);

[0121] 图14显示与磺胺嘧啶银治疗相比,在具有二度烧伤的患者中局部施用的孟鲁司特的作用;

[0122] 图15显示在具有黑色素相关的皮肤病(黄褐斑和面颊疹)的患者中局部施用的孟鲁司特的作用;和

[0123] 图16显示在具有类固醇依赖性皮炎的患者中局部施用的孟鲁司特的作用。

实施例

[0124] 实施例1

[0125] 气囊模型I

[0126] 重量在20和30g之间的健康成年雄性C57BL/6小鼠由Changzhou Cvens Experimental Animal Co.Ltd(Changzhou,Jiangsu Province,China)提供。在进行任何实验之前,将小鼠安置在标准化的条件下(在22±2℃的恒定温度,其中亮暗各自交替12小时的时间段),小鼠以标准小鼠饮食与水喂食达约一周。

[0127] 使用腹膜内注射3%水合氯醛(Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd.,Shanghai,China);1mL/10g体重)来进行全身麻醉。在无菌空气注射之前1天,剃掉整个背部的毛发并脱毛。

[0128] 气囊如下产生:将无菌空气(5mL)皮下注射进小鼠的肩胛区。3天之后,另进行一次注射空气(3mL)以维持气囊。为了诱发急性炎症,在该最终注射之后3天,使动物接受注射无菌卡拉胶溶液(CP Kelco,Taixing,Jiangsu Province,China;1%,0.5mL;通过将0.1g卡拉胶粉末添加到包含10mL的0.9%盐水溶液的烧杯中并搅拌进行制备)。在将卡拉胶注射进皮下气囊之前的1小时和之后的23小时,将小鼠用测试样品或媒介物预处理。在注射卡拉胶之后24小时,将动物处死。

[0129] 皮肤活组织检查从气囊获取。将活组织检查的一部分固定于福尔马林(通过将超纯水添加到50mL的40%甲醛溶液(Nanchang Rain Dew Experimental Equipment Co.,Ltd.,Nanchang,Hubei Provence,China)以达500mL的总体积进行制备)中并通过组织埋进石蜡、切片并染色进行分析。

[0130] 将空腔用4mL无菌磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4;通过将4g的NaCl、0.1g的KCl、1.749g的$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$和0.1g的KH_2PO_4溶解在超纯水中,用HCl将pH调节至7.4和用水稀释至500mL的总体积进行制备)洗涤。

[0131] 收集渗出物并量化其体积。细胞的总数使用血细胞计数器(ADVIA 2120Hematology System,Siemens Healthineers)确定。将渗出物以3000rpm在4℃离心10分钟,收集上清液并将其在-20℃储存,以便使用标准ELISA测试试剂盒(Biolegend™,得自Dakewe Biotech Co.,Beijing,China,或Abcam™,Abcam(Shanghai)Trading Co.Ltd,China)和ELISA读取器(SH-1000Hitachi,Japan)对以下进行ELISA分析:组织坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素1-β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、前列腺素E2(PGE2)、干扰素-γ(IFN-γ)和5-羟基色胺(5-HT;血清素)。

[0132] 在进行一些初步实验以验证模型之后,进行下述实验,即其中根据以下表1给予测试样品或媒介物来处理小鼠。

[0133] 在表1中,MAP是Mefp-1溶液,其如下制备。在中国山东省沿海区域采集蓝贻贝。收集贻贝足丝,将其切成小片,并将其在包含5%乙酸在4mol/L含水脲中的提取缓冲液中进行均化。在离心之后收集粗制提取物,然后通过液相色谱纯化。将纯化蛋白质(半成品;浓度8mg/mL;通过HPLC测得的纯度为91.72%;pH 4.2)在0℃储存。以下使用的溶液如下制备:将盐水溶液添加到半成品中以获得表1中所述的浓度。孟鲁司特钠("Mon";MedChemExpress,Shanghai,China)和地塞米松(MedChemExpress)都以粉末形式获得,并且将其溶解于超纯水中,得到具有表1中所述浓度的溶液。表1中列出的所有物质都通过直接注射进气囊进行局部给药。

[0134] 表1

[0135]

组别	小鼠数目	药物浓度(mg/mL)	剂量/小鼠	治疗时机(在注射卡拉胶之前)
对照(仅注射空气)	6	生理盐水	4.5 mg (的 NaCl)	n/a
模型(注射卡拉胶)	6	生理盐水	4.5 mg (的 NaCl)	1 小时
阳性(地塞米松)	6	0.4	200 μg	1 小时
MAP	6	3	1.5 mg	1 小时
Mon (口服)	6	1	200 μg	1 小时
Mon (局部)	6	0.4	200 μg	1 小时
MAP + Mon (口服)	6	3 (MAP) 1 (Mon)	1.5 mg (MAP) 200 μg (Mon)	1 小时(MAP) 1.5 小时(Mon)
MAP + Mon (局部)	6	6 (MAP) 0.8 (Mon)	1.5 mg (MAP) 200 μg (Mon)	1 小时(MAP) 1.5 小时(Mon)
MAP 0.25mg	3	0.5	0.25 mg	1 小时
MAP 2.5mg	3	5	2.5 mg	1 小时
MAP 5mg	3	10	5 mg	1 小时
MAP 7.5mg	3	15	7.5 mg	1 小时

[0136] 对于各组,渗出物的体积和气囊壁的重量(±SD)在以下表2中制成表格。

[0137] 表2

[0138]

组别	渗出物体积(mL)	气囊壁重量(g)
对照	3.33±0.10	0.58±0.06
模型	3.73±0.12	0.81±0.14
阳性	3.60±0.14	0.72±0.09
MAP	3.62±0.12	0.66±0.06
Mon (口服)	3.58±0.15	0.67±0.10
Mon (局部)	3.68±0.15	0.66±0.13
MAP + Mon (口服)	3.53±0.08	0.61±0.12
MAP + Mon (局部)	3.60±0.09	0.66±0.07

[0139]

MAP 0.25mg	3.43±0.12	0.85±0.07
MAP 2.5mg	3.60±0.10	0.74±0.04
MAP 5mg	3.57±0.15	0.69±0.14
MAP 7.5mg	3.6±0.10	0.68±0.15

[0140] 总细胞计数和分类($x10^6$/mL)在以下表3中制成表格。

[0141] 表3

[0142]

组别	白细胞	嗜中性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞
对照	0.04	0.01	0.00	0.01
模型	5.06	0.28	0.10	4.57
阳性	2.48	0.22	0.05	2.08
MAP	2.71	0.23	0.10	2.24
Mon (口服)	2.38	0.21	0.07	1.98
Mon (局部)	3.82	0.29	0.17	3.22
MAP + Mon (口服)	1.53	0.21	0.06	1.16
MAP + Mon (局部)	1.65	0.19	0.11	1.27
MAP 0.25mg	0.40	0.09	0.01	0.26
MAP 2.5mg	1.26	0.18	0.05	0.94
MAP 5mg	1.19	0.17	0.04	0.92
MAP 7.5mg	1.65	0.27	0.07	1.22

[0143] 分析组织学样本，并如下估算炎症得分、活性得分(即，病理切片中所示的嗜中性粒细胞的数目和密度，指示炎症的程度，以及在开放性伤口和感染性疾病的情况下，感染的程度)、水肿得分和成纤维组织增生得分。

[0144] 在光学显微镜下观察HE染色切片，并根据感知的炎症水平(在显示仅少量炎症细胞散落在区域中的情况下—1分(轻微)；在其中观察到很多炎症细胞的情况下—2分(中等)；和，在具有弥漫性浸润的情况下—3分(严重))进行评分(1分，2分，或3分)。在总体观察之后，类似的评分系统用于水肿水平(最严重对应于3分，轻微对应于1分)。嗜中性粒细胞的得分使用与用于炎症细胞的方法相同的方法。

[0145] 表4

[0146]

组别	炎症得分	活性得分	水肿得分	总计	成纤维组织增生得分
对照	0.67	0.50	1.00	3.00	0.83
模型	3.00	2.00	1.50	6.67	0.17
阳性	1.50	0.83	1.67	4.00	0.00
MAP	2.67	1.50	1.67	6.00	0.17
Mon (口服)	1.83	1.00	1.00	4.17	0.33
Mon (局部)	2.17	1.00	1.50	5.50	0.83
MAP+Mon(口服)	1.83	1.00	0.67	4.83	1.33
MAP+Mon(局部)	2.00	1.17	0.83	4.33	0.33
MAP 0.25 mg	2.00	1.33	1.00	5.00	0.67
MAP 2.5 mg	1.67	1.00	1.67	4.67	0.33
MAP 5 mg	2.00	1.00	1.67	5.00	0.33
MAP 7.5 mg	2.00	1.00	1.00	5.00	1.00

[0147] 在对照组中,气囊壁显示少量的零散的炎症细胞浸润,稀少的嗜中性粒细胞浸润,轻微的水肿,和轻微的成纤维组织增生。

[0148] 在模型组中,气囊壁显示在整个层中的严重的炎症细胞浸润(大量嗜中性粒细胞),严重的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0149] 在阳性对照组中,气囊壁显示轻微到中等的炎症细胞浸润,偶尔在整个层中有浸润,严重的间质性水肿,且无纤维组织形成。

[0150] 在MAP(1.5mg)组中,气囊壁显示在整个层中的严重的炎症细胞浸润,中等到严重的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0151] 在Mon(口服)组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,有少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0152] 在Mon(局部)组中,气囊壁显示中等到严重的炎症细胞浸润,有少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微到中等的严重的间质性水肿,和轻微的成纤维组织增生。

[0153] 在MAP+Mon(口服)组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,有少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微的间质性水肿,和明显的成纤维组织增生。

[0154] 在MAP+Mon(局部)组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,有少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0155] 在MAP(0.25mg)组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,有少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微的间质性水肿,和轻微的成纤维组织增生。

[0156] 在MAP(2.5mg)组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,有少量的嗜中性粒细胞浸润,明显的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0157] 在MAP(5mg)组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,有少量的嗜中性粒细胞浸润,

轻微到中等的间质性水肿，偶尔有成纤维组织增生。

[0158] 在MAP(7.5mg)组中，气囊壁显示中等的炎症细胞浸润，有轻微到中等的嗜中性粒细胞浸润，轻微的间质性水肿，和轻微的成纤维组织增生。

[0159] 渗出物的ELISA试验结果显示PGE2和5-HT水平低于检测范围。TNF-α、IL-6、IL-10和IFN-γ的结果(±SD)在以下表5中制成表格，并且图示地显示于图1(关于其，在表5中给出缩写)。

[0160] 表5

[0161]

组别	TNF-α	IL-6	IL-10	IFN-γ
对照	8.62±0.10	2.3±0.00	24.32±0.00	-5.00±3.00
模型	674.65±244.26	34050±13984	72.13±33.13	167±44.48
阳性	71.31±111.19	3649±1764	52.33±11.60	2879±1267
MAP	55.45±11.51	10411±6948	65.79±12.64	1842±1129
Mon (口服) (MON-O)	39.41±17.62	8453±9758	52.59±7.22	2495±711
Mon (局部) (MON-T)	90.73 ±109.02	2528±1538	68.18±15.81	1690±725
MAP+Mon(口服) (MMO)	27.08±6.14	2459±681	37.06±11.91	1534±685
MAP+Mon(局部) (MMT)	27.87±8.49	330±0.00	56.24±13.73	2362±1233
MAP 0.25mg (0.25mg)	14.95±4.54	98.7±73.55	70.50±23.86	1778±1430
MAP 2.5mg (2.5mg)	21.53±2.69	5289± 5575	56.64±17.56	379.91±138.01
MAP 5mg (5mg)	21.76±3.84	811±224.56	65.50±9.33	575.66±289.83

[0162]

MAP 7.5mg (7.5mg)	26.23±2.02	757±331.78	56.51±7.15	688.76±374.80

[0163] 实施例2

[0164] 气囊模型II

[0165] 遵照以上实施例1所述的相同规程，进行进一步的对比实验，其中将小鼠(Comparative Medicine Centre,Yangzhou University,Jiangsu Province,China)通过根据以下表6给予测试样品或媒介物来处理。

[0166] 在表6中，“Dex”是地塞米松的缩写，“多巴胺”是多巴胺盐酸盐的(Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology Co.,Ltd.,Shanghai,China)的4mg/mL水溶液。

[0167] 表6

[0168]

组别	小 鼠数目	药物浓度(mg/mL)	剂量/小鼠	治疗时机(在注射卡拉胶之前)
对照	6	生理盐水	4.5 mg(的 NaCl)	n/a
模型	6	生理盐水	4.5 mg(的 NaCl)	1 小时
Dex	6	0.8	400 μg	1 小时
多巴胺	6	4	2 mg	1 小时
MAP	6	0.5	250 μg	1 小时
Mon +MAP	6	0.4 (Mon) 1 (MAP)	100 μg (Mon) 250 μg (MAP)	1.5 小时(Mon) 1 小时(MAP)
Dex +MAP	6	1.6 (Dex) 1 (MAP)	400 μg (Dex) 250 μg (MAP)	1.5 小时(Dex) 1 小时(MAP)
Mon	6	0.2	100 μg	1 小时

[0169] 对于各组,渗出物的体积和气囊壁的重量(平均值±SD)在以下表7中制成表格。

[0170] 表7

[0171]

组别	渗出物体积(mL)	气囊壁重量(g)
对照	2.57±0.05	0.44±0.02
模型	3.10±0.21	0.62±0.09

[0172]

Dex	2.87±0.06	0.45±0.01
多巴胺	2.93±0.06	0.44±0.07
MAP	3.00±0.10	0.49±0.04
Mon + MAP	2.90±0.10	0.53±0.04
Dex + MAP	3.03±0.06	0.48±0.05
Mon	2.83±0.15	0.52±0.03

[0173] 总细胞计数和分类($x10^6$/mL)在以下表8中制成表格。

[0174] 表8

[0175]

组别	白细胞	嗜中性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞
对照	0.07	0.02	0.03	0.01
模型	2.33	0.14	2.08	0.05
Dex	0.88	0.13	0.67	0.03
多巴胺	1.91	0.19	1.58	0.05
MAP	1.74	0.19	1.40	0.06

Mon+MAP	1.00	0.18	0.69	0.05
Dex+MAP	1.06	0.16	0.77	0.05
Mon	1.58	0.26	1.15	0.07

[0176] 分析组织学样本，按照以上实施例1估算炎症得分、活性得分和成纤维组织增生得分，并将其在以下表9中制成表格。

[0177] 表9

[0178]

组别	炎症得分	活性得分	水肿得分	总计	成纤维组织增生得分
对照	0.50	0.00	1.00	1.50	0.67
模型	2.17	1.83	2.00	6.00	0.00
Dex	0.83	0.33	0.83	2.00	0.00
多巴胺	2.00	1.67	2.33	6.00	0.00
MAP	1.33	1.17	1.67	4.17	0.00
Mon+MAP	1.67	1.17	1.17	4.00	0.00
Dex+MAP	1.00	0.17	1.17	2.33	0.00
Mon	1.83	1.50	1.50	4.83	0.00

[0179] 在对照组中，气囊壁显示少量的淋巴细胞浸润，无嗜中性粒细胞浸润，偏轻微到中等的水肿，和轻微的成纤维组织增生。

[0180] 在模型组中，气囊壁显示在整个层中的严重的炎症细胞浸润，严重的间质性水肿，且无成纤维组织增生。

[0181] 在Dex组中，气囊壁显示少量的淋巴细胞浸润，偶尔有轻微的嗜中性粒细胞浸润，轻微的间质性水肿，且无纤维组织形成。

[0182] 在多巴胺组中，气囊壁显示大量的炎症细胞浸润，轻微到中等的间质性水肿，且无成纤维组织增生。

[0183] 在MAP组中，气囊壁显示大量的炎症细胞浸润，轻微到中等的间质性水肿，且无成纤维组织增生。

[0184] 在Mon+MAP组中，气囊壁显示中等的炎症细胞浸润，轻微的间质性水肿，且无成纤维组织增生。

[0185] 在Dex+MAP组中，气囊壁显示少量的零散的淋巴细胞浸润，偶尔有嗜中性粒细胞浸润，轻微的间质性水肿，且无成纤维组织增生。

[0186] 在Mon组中，气囊壁显示大量的炎症细胞浸润，轻微到中等的间质性水肿，且无成纤维组织增生。

[0187] 对于TNF-α、IL-6、IL-10和IFN-γ，渗出物的ELISA试验结果总是显示稳定的高响应，具有类似的变化趋势。将IL-6和IFN-γ的结果(±SD)在以下表10中制成表格并图示地显示于图2。

[0188] 表10

[0189]

组别	IL-6	IFN-γ
对照	1083.94±433.74	-3.74±1.3
模型	1213.54±790.71	855.32±570.36
Dex	3697.30±5112.52	238.91±272.27
多巴胺	1740.11±765.02	5153.02±5773.45
MAP	1686.11±632.33	282.01±192.24
Mon+MAP	1674.80±696.85	1487.61±815.47
Dex+MAP	8352.25±6162.60	48.44±35.58
Mon	1493.42±564.77	896.90±633.60

[0190] 实施例3

[0191] 烧伤模型

[0192] 重量在200至300g之间的健康成年雄性Sprague-Dawley大鼠由Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co.Ltd,Beijing,China提供。

[0193] 在进行任何实验之前,将大鼠安置在标准化的条件下(在22±2℃的恒定温度,其中亮暗各自交替12小时的时间段),大鼠以标准大鼠饮食与水喂食。

[0194] 通过腹膜内注射给予3%水合氯醛(Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd.,Shanghai,China)(1mL/10g体重)来麻醉大鼠。用电动剃须刀剃掉每个大鼠的背侧干(dorsal trunk),用70%酒精擦拭进行外科准备。使用恒温恒压烫伤仪器(YLS-5Q,Shandong Academy of Medical Sciences,China),因为这允许精确测量施用于皮肤表面的压力。如下诱导产生热损伤:将触针(其表面积为4cm^2)加热至80℃,将触针施用于皮肤表面,接触时间为18秒。在操作期间施加500克压力。以这种方式在每只大鼠上产生四个二度从浅到深的烧伤伤口。将测试化合物或媒介物施用于伤口的表面。

[0195] 使大鼠保持处于单独的笼子中,但是允许其在整个试验期间自由活动。在第一次处理之后,在外科手术之后约3至4小时(第0天)施用500μL有关溶液,然后接下来的7天每日施用一次。每天观察烫伤伤口的总体外观。用数码相机在48小时(第2天)、以及在第4天和第7天拍摄照片以比较伤口愈合。评价以下标准的皮肤损伤:水泡、肿胀、发红、结痂、出血,、分泌、肉芽组织和疤痕组织。愈合的程度表示为伤口收缩率(WCR):

[0196] $WCR=(A_0-A_t)/A_0\times100\%$

[0197] 其中A_0和A_t分别表示初始面积和在时间t的伤口面积。

[0198] 在施用于烧伤之后的第2天、第4天和第7天,处死两只大鼠,切除烧伤的皮肤。将新鲜分离的皮肤在10%中性缓冲的福尔马林(其包含4%的甲醛)中固定。这用于组织学包埋、染色和免疫组织化学研究。

[0199] 通过根据以下表11给予测试样品或媒介物来处理大鼠。给予的溶液基本上如以上实施例1所述构成。

[0200] 表11

[0201]

组别	药物浓度(mg/mL)	剂量/伤口
对照(即，未处理的大鼠)	-	-
盐水	生理盐水	4.5 mg NaCl
地塞米松	0.8	0.4 mg

[0202]

MAP	0.5	0.25 mg
孟鲁司特	0.5	0.25 mg
MAP+地塞米松	1 (MAP) 1.6 (地塞米松)	0.25 mg (MAP) 0.4 mg (地塞米松)
MAP+孟鲁司特	1 (两者都是)	每种药物各 0.25 mg

[0203] 结果

[0204] 烧伤评分显示于以下表12并在图3中说明。将皮肤样品送至Department of Pathology of Nanjing Hospital of Chinese Medicine,China。将样品固定和包埋,将组织切片切割和染色。在光学显微镜下检查染色的切片,拍摄图片。根据以下标准解释和评分所有图片:一度—表皮受损,底层保持完整(评分1分);浅二度—表皮完全受损,乳头层受损(1.5分);深二度—表皮受损至网状层,保留一些真皮(2.5分);和三度—表皮完全受损,肌肉和/或骨骼受影响(3分)。

[0205] 表12

[0206]

组别	第2天	第4天	第7天
对照	0.00	0.00	0.00
盐水(模型)	2.70	2.94	1.88
地塞米松(Dex)	2.25	2.64	2.50
MAP	2.36	2.79	2.63
孟鲁司特(Mon)	1.50	2.38	2.00
MAP+地塞米松	2.50	2.63	2.75
MAP+孟鲁司特	1.80	2.00	2.00

[0207] 实施例4

[0208] 气囊模型:局部给药相比于口服给药

[0209] 基本上如实施例1所述进行实验(所不同的是,此次,C57BL/6小鼠由Nanjing Biomedical Research Institute of Nanjing University(NBRI)提供)。

[0210] 进行实验,其中通过根据以下表13给予测试样品或媒介物处理小鼠。如下局部给予表13中列出的所有物质:将其直接注射进气囊中,除了胃内给予的Mon(口服)(Mon-O)之外。

[0211] 表13

[0212]

组别	小鼠数目	药物浓度(mg/mL)	剂量/小鼠	治疗时机(在注射卡拉胶之前)
对照(仅注射空气)	6	生理盐水	4.5 mg(的 NaCl)	n/a
模型(注射卡拉胶)	8	生理盐水	4.5 mg(的 NaCl)	1 小时
阳性(地塞米松)	6	0.4	200 μg	1 小时
Mon-O	8	0.4	200 μg	1 小时
Mon-T	8	0.4	200 μg	1 小时

[0213] 对于各组,渗出物的体积和气囊壁的重量(平均值±SD)在以下表14中制成表格。

[0214] 表14

[0215]

组别	渗出物体积(mL)	气囊壁重量(g)
对照	3.48±0.12	0.68±0.07
模型	3.76±0.05	0.72±0.09
阳性	3.3±0.15	0.63±0.09
Mon-O	3.69±0.14	0.68±0.08
Mon-T	3.54±0.09	0.65±0.06

[0216] 将总细胞计数和分类($x10^6$/mL)在以下表15中制成表格。

[0217] 表15

[0218]

组别	白细胞	嗜中性粒细胞	单核细胞
对照	0.09	8.75	0.00
模型	3.34	260.03	74.17
阳性	3.49	285.97	62.53
Mon-O	2.66	216.89	46.81
Mon-T	2.19	170.98	42.10

[0219] 分析组织学样本,炎症得分、活性得分、水肿得分和成纤维组织增生得分主要如以上实施例1中所述估算,并且显示于以下表16中。

[0220] 表16

[0221]

组别	炎症得分	水肿得分	活性得分	总计
对照	0.33	1.17	0.00	1.50

[0222]

模型	2.17	2.67	1.17	6.00
阳性	1.83	1.67	0.67	4.17
Mon-O	2.33	2.17	1.67	6.17
Mon-T	2.00	1.50	1.00	4.50

[0223] 在对照组中,气囊壁显示少量零散的炎症性细胞浸润,轻微的水肿,且无明显的嗜中性粒细胞浸润。

[0224] 在模型组中，气囊壁显示在整个层中的中等到严重的慢性炎症细胞浸润，中等到严重的水肿和零散的嗜中性粒细胞浸润。

[0225] 在阳性对照组中，气囊壁显示中等的慢性炎症细胞浸润，中等的间质性水肿和少量的嗜中性粒细胞浸润。

[0226] 在Mon-O组中，气囊壁显示在整个层中的中等到严重的慢性炎症细胞浸润，和中等到严重的水肿。

[0227] 在Mon-T中中，气囊壁显示中等的慢性炎症细胞浸润，轻微到中等的水肿，和少量的嗜中性粒细胞浸润。

[0228] TNF-α、IL-6、IL-10和IFN-γ的渗出物的ELISA试验结果总是以相似的变化趋势显示稳定的高响应。TNF-α、IL-6和IFN-γ的结果(±SD)在以下表17中制成表格，并以图示显示于图4。

[0229] 表17

[0230]

组别	TNF-α	IL-6	IFN-γ
对照	8.42±5.65	36.95±14.22	18.34±33.65
模型	143.60±65.56	487.97±231.99	718.51±331.12
阳性	65.08±7.70	428.05±267.27	388.83±130.02
Mon-O	146.3±70.74	500.25±292.84	557.95±231.86
Mon-T	80.37±61.72	312.05±189.23	568.19±316.70

[0231] 实施例5

[0232] 气囊模型:孟鲁司特的组合

[0233] 遵照如以上实施例1所述的相同规程，进行进一步的对比实验，其中通过根据以下表18给予测试样品或媒介物处理小鼠(由Changzhou Cvens Experimental Animal Co.Ltd.提供)。

[0234] 表18

[0235]

组别	小鼠数目	药物浓度(mg/mL)	剂量/小鼠	治疗时机(在注射卡拉胶之前)
对照(仅注射空气)	6	生理盐水	4.5 mg(的 NaCl)	n/a
模型(注射卡拉胶)	6	生理盐水	4.5 mg(的 NaCl)	1 小时
阳性(地塞米松)	6	0.4	200 μg	1 小时
MAP	6	3	1.5 mg	1 小时
MON-O	6	1	200 μg	1 小时
MON-T	6	0.4	200 μg	1 小时
MAP+Mon (口服) (MMO)	6	3 (MAP) 1 (Mon)	1.5 mg (MAP) 200 μg (Mon)	1 小时(MAP) 1.5 小时(Mon)
MAP+Mon (局部) (MMT)	6	6 (MAP) 0.8 (Mon)	1.5 mg (MAP) 200 μg (Mon)	1 小时(MAP) 1.5 小时(Mon)

[0236] 对于各组,渗出物的体积和气囊壁的重量(平均值±SD)在以下表19中制成表格。

[0237] 表19

[0238]

组别	渗出物体积(mL)	气囊壁重量(g)
对照	3.33±0.10	0.58±0.06
模型	3.73±0.12	0.81±0.14
阳性	3.60±0.14	0.72±0.09
MAP	3.62±0.12	0.66±0.06
MON-O	3.58±0.15	0.67±0.10
MON-T	3.68±0.15	0.66±0.13
MMO	3.53±0.08	0.61±0.12
MMT	3.60±0.09	0.66±0.07

[0239] 将总细胞计数和分类($x10^6$/mL)在以下表20中制成表格。

[0240] 表20

[0241]

组别	白细胞	嗜中性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞
对照	0.04	0.01	0.00	0.01
模型	5.06	0.28	0.10	4.57
阳性	2.48	0.22	0.05	2.08

[0242]

MAP	2.71	0.23	0.10	2.24
MON-O	2.38	0.21	0.07	1.98
MON-T	3.82	0.29	0.17	3.22
MMO	1.53	0.21	0.06	1.16
MMT	1.65	0.19	0.11	1.27

[0243] 分析组织学样本,炎症得分、活性得分、水肿得分和成纤维组织增生得分如以上实施例1中所述估算,并且显示于以下表21中。

[0244] 表21

[0245]

组别	炎症得分	活性得分	水肿得分	总计	成纤维组织增生得分
对照	0.67	0.50	1.00	3.00	0.83
模型	3.00	2.00	1.50	6.67	0.17
阳性	1.50	0.83	1.67	4.00	0.00
MAP	2.67	1.50	1.67	6.00	0.17
MON-O	1.83	1.00	1.00	4.17	0.33
MON-T	2.17	1.00	1.50	5.50	0.83
MMO	1.83	1.00	0.67	4.83	1.33
MMT	2.00	1.17	0.83	4.33	0.33

[0246] 在对照组中,气囊壁显示少量零散的炎症细胞浸润,稀少的嗜中性粒细胞浸润,轻微的水肿,和轻微的成纤维组织增生。

[0247] 在模型组中,气囊壁显示在整个层中的严重的炎症细胞浸润(大量嗜中性粒细胞),严重的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0248] 在阳性对照组中,气囊壁显示轻微到中等的炎症细胞浸润,偶尔在整个层中有浸润,严重的间质性水肿,且无纤维组织形成。

[0249] 在MAP(1.5mg)组中,气囊壁显示在整个层中的严重的炎症细胞浸润,中等到严重的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0250] 在MON-O组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,与少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0251] 在MON-T组中,气囊壁显示中等到严重的炎症细胞浸润,与少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微到中等的间质性水肿,和轻微的成纤维组织增生。

[0252] 在MMO组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,与少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微的间质性水肿,和明显的成纤维组织增生。

[0253] 在MMT组中,气囊壁显示中等的炎症细胞浸润,与少量的嗜中性粒细胞浸润,轻微的间质性水肿,偶尔有成纤维组织增生。

[0254] 渗出物的ELISA试验结果显示,PGE2和5-HT水平低于检测范围。将TNF-α、IL-6、IL-10和IFN-γ的结果(±SD)在以下表22中制成表格,且图示地显示于图5。

[0255] 表22

[0256]

组别	TNF-α	IL-6	IL-10	IFN-γ
对照	8.62±0.10	2.3±0.00	24.32±0.00	-5.00±3.00
模型	674.65±244.26	34050±13984	72.13±33.13	167±44.48
阳性	71.31±111.19	3649±1764	52.33±11.60	2879±1267
MAP	55.45±11.51	10411±6948	65.79±12.64	1842±1129
Mon(口服)	39.41±17.62	8453±9758	52.59±7.22	2495±711
Mon(局部)	90.73±109.02	2528±1538	68.18±15.81	1690±725
MMO	27.08±6.14	2459±681	37.06±11.91	1534±685

MMT	27.87±8.49	330±0.00	56.24±13.73	2362±1233

[0257] 实施例6

[0258] 急性创伤性模型

[0259] 6-8周龄雄性C57BL/6小鼠由Changzhou Cvens Experimental Animal Co.Ltd提供。在进行任何实验之前，将小鼠安置在标准化的条件下(在22±2℃的恒定温度，其中亮暗各自交替12小时的时间段)，小鼠以标准小鼠饮食与水喂食达约一周。

[0260] 使用腹膜内3％水合氯醛(Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd.,Shanghai,China;1mL/10g体重)来进行全身麻醉。用婴儿剃发器将背部上的毛发剃掉，并用乳膏剂脱毛。用75％酒精将皮肤区域擦拭和消毒两次。

[0261] 使用具有0.6mm直径的EMS皮肤取样器(Electron Microscopy Sciences,P.O.Box 550,1560Industry Road,Hatfield,PA 19440)在背部中线的每一侧上产生两个圆形伤口。移除全层皮肤，伤口的深度达到筋膜。伤口保持开放，不进行缝合。

[0262] 将不同药物以20μL/伤口进行局部给药，从第0天至第12天每日给药一次。给予模型组相同量的生理盐水。在该实验中存在6个组，包括54只小鼠，显示于表23。购买重组人表皮生长因子(rhEGF,Shanghai Haohai Biological Technology Co.Ltd,Shanghai,China)，并根据制造商说明书进行制备。将rhEGF冻干粉(100000IU/小瓶)溶解于20mL生理盐水中，以制备具有5000IU/mL浓度的溶液。对于该实验，rhEGF的工作剂量为100IU/伤口。孟鲁司特钠(“Mon”;MedChemExpress,MCE China,Shanghai,China)以粉末形式获得，将其溶解于超纯水中，得到具有如表22中所述浓度的溶液(L、M和H分别表示低、中和高的孟鲁司特剂量)

[0263] 表23

[0264]

组别	第3天	第7天	第12天	总计	含义	剂量
对照	3	4	2	9	盐水	/
模型	3	4	2	9	模型+盐水	/
rhEGF	3	4	2	9	模型+rhEGF	100IU/伤口
Mon L	3	4	2	9	模型+Mon L	50μg/伤口
Mon M	3	4	2	9	模型+Mon M	100μg/伤口
Mon H	3	4	2	9	模型+Mon H	200μg/伤口

[0265] 在给予药物之后，用透明敷料敷裹伤口。

[0266] 从第0天每隔一天为每个伤口拍摄照片。将照片扫描进计算机中，使用ImageJ图像分析软件(National Institutes of Health,China)计算伤口面积。

[0267] 未愈合的伤口面积表示为初始伤口面积的百分比：

[0268] $A_t/A_0\times100\%$，

[0269] 其中A_0和A_t分别指在第0天的初始面积和在测量日(时间t)的伤口面积。

[0270] 在伤口-伤口浸润之后的第3天、第7天和第12天，获取样品。将小鼠处死，取面积为1.8cm x 2.5cm的伤口组织。将一半组织保藏在10％中性缓冲的福尔马林(Nanchang Rain Dew Experimental Equipment Co.,Ltd.,Nanchang,Hubei Provence,China)中，并通过组织包埋进石蜡、切片和染色进行分析。在光学显微镜下分析HE和Masson染色石蜡切片。估算皮肤再生、成纤维细胞增生、胶原蛋白再生得分和炎症得分。

[0271] 将剩余的样品在-80℃储存用于进一步分析。将组织切割成小片，添加液氮以增加脆度。将9mL生理盐水添加到1g组织中，然后将其使用组织破碎仪(Shanghai Jingxin Industrial Development Co.,Ltd.,Shanghai,China)以55Hz研磨60秒，然后以8000rpm在4℃离心10分钟。

[0272] 收集上清液，提取的蛋白质用于使用标准ELISA测试试剂盒和ELISA读取器(SH-1000Hitachi,Japan)进行ELISA分析。测定组织坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素1-β(IL-1β)和白细胞介素6(IL-6)、血管内皮生长因子(VEGF)和羟基脯氨酸(Hyp)。ELISA试剂盒购自Beijing 4A Biotech Co.,Ltd.(Beijing,China)。

[0273] 孟鲁司特对伤口愈合的作用显示于以下表24(其中数字表示在不同组中的各个时间点剩余的伤口面积相比于初始伤口的百分比(±SD;n＝5)和图6中。

[0274] 表24

[0275]

组别	模型	rhEGF	Mon L	Mon M	Mon H
第2天	90.58±6.48	85.73±10.29	78.41±9.51	79.97±11.79	76.11±6.40
第4天	79.97±12.74	68.15±16.47	57.59±11.54	55.09±8.83	48.60±6.49
第6天	48.79±9.10	30.85±1.87	27.53±3.76	28.51±1.03	29.13±6.16
第8天	24.76±6.29	16.93±4.03	14.08±2.85	13.87±3.51	14.59±3.04
第12天	10.66±4.13	5.02±3.03	1.15±2.29	2.15±3.73	2.48±3.43

[0276] 以上数据表明，孟鲁司特对伤口愈合具有显著作用。在第4天，在Mon H组中的改善率为约39％。

[0277] 样品中的伤口HYP(μg/mg)含量指示胶原蛋白再生，其显示于以下表25中和图7中。

[0278] 表25

[0279]

Hyp 含量(μg/mg 组织重量)					平均值(n=4)	SD
对照	4.43	5.06	5.50	5.03	5.01	0.44
模型	5.40	2.82	3.89	4.25	4.09	1.06
RhEGF	6.54	4.89	5.39	5.45	5.57	0.70
Mon L	4.65	4.41	6.71	6.05	5.46	1.11
Mon M	4.94	4.18	6.80	4.98	5.23	1.11
Mon H	4.62	5.83	3.99	4.64	4.77	0.77

[0280] 实施例7

[0281] 糖尿病伤口模型

[0282] 在8至12周龄雄性db/db小鼠(C57BL/KsJ-db/db，具有35-45g/小鼠的体重；由Changzhou Cvens Experimental Animal Co.Ltd.提供)上进行具有与以上实施例6中所述基本上相同的规程的类似实验。

[0283] 具有0.8mm直径的EMS皮肤取样器用于产生伤口。

[0284] 将不同药物以20μL/伤口进行局部给药，从第0天至第18天每日给药一次。给予模型组相同量的生理盐水。在该实验中存在3个组，包括39只小鼠，如以下表26所示。

[0285] 表26

[0286]

组别	第6天	第12天	第18天	总计	含义	剂量
模型	4	8	1	13	模型+盐水	/
rhEGF	4	8	1	13	模型+rhEGF	100IU/各伤口
Mon	4	8	1	13	模型+Mon	100μg/各伤口

[0287] 在伤口浸润之后的第6天、第12天和第18天，获取样品。

[0288] 孟鲁司特对伤口愈合的作用显示于图8。

[0289] 将VEGF含量(pg/g)在第6天的结果在以下表27中制成表格并图示地显示于图9。

[0290] 表27

[0291]

		模型	rhEGF	Mon
VEGF	平均值	3.15	4.55	5.47
	SD	0.97	1.60	1.31

[0292] 结果表明，孟鲁司特在受伤的组织中具有增加的VEGF产生，相比于在模型组中的产生增加约74％。

[0293] 分析组织学样本，如下估算皮肤再生、成纤维细胞增生、胶原蛋白再生得分(Masson得分)和炎症得分。

[0294] 在光学显微镜下观察HE和Masson染色切片，并根据以下标准评分(1分，2分，或3分)。当新产生的皮肤覆盖的面积不大于伤口面积的三分之一时，皮肤再生得分为1分；当新产生的皮肤覆盖的面积大于伤口面积的三分之一但是小于三分之二时，得分为2分；当新产生的皮肤覆盖的面积为伤口面积的至少三分之二时，得分为3分。

[0295] 成纤维组织增生按照以下标准评分：

[0296]

成纤维组织增生得分	
胶原纤维增生	得分
肌纤维母细胞增生	1
纤维组织增生	2
纤维组织之间出现的胶原蛋白	3

[0297] 炎症按照以下标准评分：

[0298]

炎症得分	
炎症细胞浸润	得分
偶尔(Occasional)	0
零星的(Sporadic)	1
明显的(Manifest)	2
弥漫性浸润	3

[0299] Masson染色样品的胶原沉积得分标准如下。与正常组织进行比较。无清晰的蓝色染色得0分;在零散图案中出现蓝色纤维评分为1分;如果出现更多的蓝色纤维,将其评分为2分,弥漫性蓝色得3分。

[0300] 组织病理学分析的结果显示于图10。

[0301] 结果表明,孟鲁司特对加速伤口愈合具有作用,尤其是在伤口浸润之后的早期阶段。

[0302] 实施例8

[0303] 孟鲁司特乳膏剂I

[0304] 制备基于孟鲁司特钠的乳膏剂,其由以下组分组成:孟鲁司特钠(200mg;Arromax Pharmatech Co.,Ltd,Suzhou,China),硬脂酸(2g),单硬脂酸甘油酯(2g),十六醇(2g),甘油(5g)和氢氧化钠(0.25g)(全部得自Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd,Shanghai,China);丙烯酰基二甲基牛磺酸铵/VP共聚物(0.13g;Clariant Chemical(Guangzhou)Co.,Ltd.,Guangzhou,China);苯氧基乙醇(0.3g)和乙基己基甘油(0.1g)(都得自Shanghai Rayson Chemicals Co.,Ltd.,Shanghai,China);和纯化水(88.42g)。

[0305] 将硬脂酸、单硬脂酸甘油酯和十六醇混合,并伴随搅拌加热至85℃,直到混合物完全熔融。

[0306] 伴随搅拌在85℃将丙烯酰基二甲基牛磺酸铵/VP共聚物、纯化水和氢氧化钠混合,形成均质的胶态悬浮液。

[0307] 然后伴随搅拌将孟鲁司特钠、甘油、苯氧基乙醇和乙基己基甘油组合,直到孟鲁司特完全溶解。

[0308] 将共聚物/水混合物添加到含硬脂酸的混合物中,通过使用乳化设备快速搅拌5分钟将其乳化。将所得乳液冷却至55℃,添加含孟鲁司特的混合物并混合。将所得混合物冷却至室温,获得成品。

[0309] 实施例9

[0310] 孟鲁司特乳膏剂II

[0311] 遵照与以上实施例8中所述的相似操作以制备第二乳膏剂。

[0312] 此次,首先伴随搅拌将硬脂酸(2g)和单硬脂酸甘油酯(2g)加热至85℃,直到混合物完全熔融;然后将聚山梨酯80(1g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)和透明质酸钠(0.4g;Shandong Focuschem Biotech Co.,Ltd,Shandong,China)与纯化水在85℃混合在一起,直到透明质酸钠完全溶胀。

[0313] 将这两种混合物组合、乳化和搅拌,然后冷却至55℃,然后添加相同的含孟鲁司特的混合物(如以上实施例8中所述)并混合。冷却至室温得到成品。

[0314] 实施例10

[0315] 孟鲁司特乳膏剂III

[0316] 遵照与以上实施例8中所述的相似操作以制备第三乳膏剂。

[0317] 此次,伴随搅拌将山梨聚糖单硬脂酸酯(0.6g)、聚山梨酯80(1g)、十六醇(2g)、辛酸/癸酸甘油三酯(5g)、石蜡油(4g)、单硬脂酸甘油酯(2g)和石油冻(petroleum jelly)(5g)(全部得自Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)混合并加热至85℃,直到混合物完全熔融。然后,在85℃将丙烯酰基二甲基牛磺酸铵/VP共聚物(0.13g)、甘油(4g)、海藻糖

(0.5g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)与纯化水(70.5g)混合在一起,直到各种组分均溶解。

[0318] 伴随搅拌制备包含孟鲁司特钠(200mg)、聚乙二醇200(4g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)、苯氧基乙醇(0.3g)和乙基己基甘油(0.1g)的第三混合物,直到孟鲁司特溶解。

[0319] 将共聚物/水混合物添加到含山梨聚糖单硬脂酸酯的混合物中,然后乳化,搅拌,并冷却至55℃。然后添加硅油(0.5g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)连同含孟鲁司特的混合物,并混合。冷却至室温得到成品。

[0320] 实施例11

[0321] 孟鲁司特软膏剂I

[0322] 如下制备软膏剂:首先通过伴随搅拌加热至60℃将聚乙二醇3350(21.3g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)溶解于聚乙二醇400(58.5g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)中。伴随搅拌将孟鲁司特钠(200mg)溶解于聚乙二醇400(20.0g)中。

[0323] 在将第一溶液冷却至40-50℃之后,伴随搅拌将第二溶液添加到其中并混合5至10分钟。冷却至室温得到成品。

[0324] 实施例12

[0325] 孟鲁司特软膏剂II

[0326] 其它软膏剂如实施例11所述制备,所不同的是将聚乙二醇4000(21.3g,Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)溶解于相同量的聚乙二醇400(58.5g)中。

[0327] 实施例13

[0328] 孟鲁司特气溶胶粉末喷雾

[0329] 如下制备基于气溶胶粉末喷雾:伴随搅拌将孟鲁司特钠(200mg)添加到乙醇(70g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)中,直到其完全溶解。

[0330] 将多孔淀粉(28g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)添加到所得溶液中,得到悬浮液,然后将其填充进气溶胶喷雾瓶中。

[0331] 实施例14

[0332] 孟鲁司特敷料

[0333] 如下制备敷料:用平板将按照以上实施例12中所述制备的孟鲁司特钠软膏剂均匀涂敷在纱布(Shanghai Health Materials Factory Co.,Ltd,Shanghai,China)上,将其冷却至室温。

[0334] 实施例15

[0335] 耳胀(Swollen Ear)模型

[0336] 6-8周龄且平均体重为18-25g的12只健康雄性BALB/c小鼠由Changzhou Cvens Experimental Animal Co.Ltd.提供,在实验前将其安置和照料约1周。安置温度为25-27℃,湿度为74%,其中亮暗各自交替12小时的时间段,其可自由获取食物和水。将小鼠随机分成4组,如表28中所述,其中每组3只小鼠。

[0337] 表28

[0338]

组别	药物浓度	在右耳上给予药物	药物的总量(μg/小鼠)
模型	/	二甲苯	/
空白	/	二甲苯+乳膏剂 无 API	/
Dex 乳膏剂	10 μg/μL	二甲苯+Dex 乳膏剂	400
Mon 乳膏剂	5 mg/g	二甲苯+Mon 乳膏剂	500

[0339] 孟鲁司特乳膏剂(Mon乳膏剂)是以上实施例8中所述的乳膏剂。空白乳膏剂遵照相同过程制备,不向混合物中添加孟鲁司特。地塞米松乳膏剂(Dex乳膏剂)也使用相同的操作制备,用地塞米松(160mg;Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology Co.Ltd.)代替孟鲁司特。

[0340] 每只小鼠的左耳用作自体对照。每只小鼠的右耳用各种处理物(treatment)处理。首先将20μL二甲苯(Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology Co.,Ltd.)施用于每只小鼠的右耳的内侧和外侧。在约4分钟之后耳朵开始肿胀。然后,将40μL各种乳膏剂施用于每组的右耳。将小鼠放回它们的笼子中。

[0341] 在40分钟之后通过颈椎脱位处死小鼠。将左耳和右耳割下。具有8mm直径的皮肤取样器(Electron Microscopy Sciences,Hatfield,PA,USA)用于从两只耳朵的相同部位取一片耳朵(a piece of the ear)。记录重量,肿胀率如下计算:

[0342] 肿胀率＝(右耳重量-左耳重量)/左耳重量×100%

[0343] 且结果显示于表29。

[0344] 表29

[0345]

组别	重量(g)			肿胀率	
	左耳	右耳	差值		
模型	0.013	0.025	0.012	0.923	97.4%
	0.012	0.021	0.009	0.750	
	0.012	0.027	0.015	1.250	
空白	0.013	0.025	0.012	0.923	83.5%
	0.012	0.023	0.011	0.917	
	0.015	0.025	0.010	0.667	
Dex 乳膏剂	0.013	0.019	0.006	0.462	48%
	0.013	0.022	0.009	0.692	
	0.014	0.018	0.004	0.286	
Mon 乳膏剂	0.012	0.018	0.006	0.500	38.1%
	0.014	0.020	0.006	0.429	
	0.014	0.017	0.003	0.214	

[0346] 结果表明,孟鲁司特乳膏剂显著减少小鼠耳朵中二甲苯诱导的肿胀。该效果甚至优于公知的局部抗炎药物地塞米松。

[0347] 实施例16

[0348] 大鼠烫伤模型I

[0349] 平均体重在250至300g之间的6-8周龄雄性Sprague Dawley大鼠由Changzhou Cvens Experimental Animal Co.Ltd.提供。在进行任何实验之前,将大鼠安置在标准化的条件下(在22±2℃的恒定温度,其中亮暗各自交替12小时的时间段),并以标准小鼠饮食与水喂食达约一周。

[0350] 使用自制模具。获取竹子的切片,沿其长度除去顶部1/3。在竹子的底部制出尺寸为2.5x 4.5cm的椭圆形孔,以使大鼠的背部暴露于热水。暴露的皮肤面积为其总体表面积(TBSA)的约10-13%:

[0351] TBSA(cm^2)=K x W x 2/3,

[0352] 其中K是对于给定物种恒定的校正系数(表面积相对于体重/形状)(对于大鼠为9.1),W是大鼠的体重(以g计)。

[0353] 将大鼠背部上的毛发剃掉。注射10%水合氯醛以麻醉大鼠(350mg/kg;3.5mL/kg)。

[0354] 将6只大鼠分成2组,一组3只大鼠。在麻醉之后,将大鼠固定在模具内部。胶带用于固定四肢和腹部,将竹子紧紧地贴附于背部,通过孔暴露皮肤。将100℃的沸腾热水施用于大鼠皮肤达12秒。

[0355] 然后将孟鲁司特乳膏剂(按照以上实施例8中所述制备)给予测试组的烫伤伤口,

将空白乳膏剂(不含活性成分的相同的乳膏剂)给予对照组。之后将处理物一天给予一次，共计10天。

[0356] 在烫伤之后10天，观察到在测试组的烫伤区域中开始长出毛发。在对照组的烫伤区域中没有毛发生长的迹象。这显示于图11，其表明孟鲁司特乳膏剂有助于在烧伤之后恢复皮肤功能。

[0357] 实施例17

[0358] 大鼠烫伤模型II

[0359] 将8只Sprague Dawley大鼠分成两组，一组4只。如下按与以上实施例16中所述基本上相同的方式施用烫伤伤口：施用(或者视情况而定不施用)热水，热水的温度和施用时间如以下表30中所示。

[0360] 在其中一组中，在烫伤之后立即将孟鲁司特乳膏剂(仅有；按照以上实施例8所述制备)施用于烫伤伤口。1g孟鲁司特乳膏剂用于各伤口。对于其它组，在烫伤之后立即将0.5mL浓度为4.9mg/mL的MAP盐水溶液施用于烫伤伤口的表面。短暂等待几分钟以使溶剂蒸发之后，再施用0.5mL的相同MAP溶液，将其总共重复3次。在此之后，将1g相同的孟鲁司特乳膏剂施用于MAP的顶部。

[0361] 表30

[0362]

组别	含义	治疗	药物给予
Mon	孟鲁司特乳膏剂	未烫伤	将1 g孟鲁司特乳膏剂施用于烫伤伤口的表面
		85°C 15s	
		85°C 10s	
		75°C 15s	
MM	涂敷MAP，	未烫伤	将MAP溶液施用3次，然后

[0363]

	然后孟鲁司特乳膏剂	85°C 15s	将1 g孟鲁司特乳膏剂施用于烫伤伤口的表面
		85°C 10s	
		75°C 15s	

[0364] 使用具有8mm直径的EMS皮肤取样器在0时间、然后在烫伤之后的1小时、2小时、3小时、6小时和8小时从每只大鼠获取样品。移除全层皮肤并称重。

[0365] 然后，将组织切成小片。将9mL生理盐水添加到1g组织中，然后使用Tissuelyser以55Hz将其研磨60秒，然后将其以8000rpm在4℃离心10分钟，收集上清液用于HPLC分析。

[0366] HPLC条件如下：柱：Angilent ZORBAX Eclipse XDB-C8(4.6×250mm，5μm)；缓冲液：A:0.1％TFA(三氟乙酸，(Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology Co.,Ltd.)在水中；B:0.1％TFA在乙腈中(Merck，Darmsladt，Germany)；梯度：0-20分钟；49％B；流动速率：1mL/min；检测波长：388nm；样品体积：20μL。

[0367] 检测包含在各样品中的孟鲁司特的量，并基于峰面积进行计算。峰面积相对于孟鲁司特量的标准曲线用于计算。

[0368] 未烫伤的完整皮肤样品的结果显示于以下表31中和图12中。

[0369] 表31

[0370]

取样时间(h)	峰面积	孟鲁司特量(g)	湿重(g)	孟鲁司特浓度(μg/g)
0	756	0	0.069	0
1	171262	2.53	0.069	36.69
2	381470	5.44	0.080	67.98
3	52374	0.89	0.066	13.44
6	53490	0.90	0.058	15.56
8	244228	3.54	0.064	55.32

[0371] 结果表明,在完整皮肤上,MM组中的浓度峰比Mon组中的浓度峰晚1小时。这表明MAP可以延迟孟鲁司特渗透进皮肤。

[0372] 烫伤组的结果显示于图13。

[0373] 与完整皮肤相比,看起来皮肤在烫伤之后变得较难渗透。在Mon组和MM组两者中,孟鲁司特的峰在2小时显示。但是,与Mon组相比,在MM组中包含在样品中的孟鲁司特的量随时间流逝显著减少。这些结果证明,MAP可以延迟孟鲁司特的渗透,而不管何种皮肤病。

[0374] 实施例18

[0375] 孟鲁司特乳膏剂治疗烧伤患者的水肿的临床实施例

[0376] 孟鲁司特乳膏剂根据与以上实施例8中所述的相同方法制备。乳膏剂中孟鲁司特钠的浓度为5mg/g。

[0377] 在研究中招募的受试者为头部和颈部区域具有二度烧伤的患者(图14;照片(a))。在烧伤伤害维持之后的20小时开始将孟鲁司特乳膏剂施用于患者面部的左侧上。将一种公认的局部烧伤处理物磺胺嘧啶银软膏剂施用于面部的右侧作为比较。两种药物都每天施用两次。

[0378] 如图14所述,在处理后1天(照片(b)),面部左侧的水肿明显比右侧减少的更快和更广。这种相对改善在接下来几天之内还在继续(在处理后2天(照片(c)),在处理后3天(照片(d)),和在处理后14天(照片(e)))。

[0379] 该实验表明,孟鲁司特乳膏剂有效治疗烧伤的急性炎症期中的水肿且比磺胺嘧啶银更有效。

[0380] 实施例19

[0381] 孟鲁司特乳膏剂治疗烧伤疤痕发痒的临床实施例

[0382] 孟鲁司特乳膏剂(含有5mg/g浓度的孟鲁司特钠)根据与以上实施例8中所述的相同方法制备。

[0383] 在研究中招募的受试者为具有陈旧瘢痕性疤痕的烧伤患者。症状包括不规则形状的增生性疤痕,伴有疼痛和发痒。已知环境温度变化或情绪激动会加重疼痛和/或发痒。

[0384] 要求受试者在早晚清洁疤痕之后使用乳膏剂。

[0385] 所有招募的受试者都感觉在首次使用的8分钟内缓解发痒,表明孟鲁司特乳膏剂可以用于治疗烧伤疤痕发痒。

[0386] 实施例20

[0387] 孟鲁司特乳膏剂治疗黑色素相关的皮肤病I的临床实施例

[0388] 孟鲁司特乳膏剂(含有5mg/g浓度的孟鲁司特钠)根据与以上实施例9中所述的相同方法制备。

[0389] 在研究中招募的受试者为具有黑色素相关的皮肤病的患者。症状包括在烧伤或痤疮爆发之后的色素沉着。要求受试者在早晚清洁面部之后使用乳膏剂。

[0390] 所有招募的受试者都感觉在使用2周之后皮肤颜色改善,表明孟鲁司特乳膏剂可以用于治疗黑色素沉着和/或黑色素相关的皮肤病。

[0391] 实施例21

[0392] 孟鲁司特乳膏剂治疗黑色素相关的皮肤病II的临床实施例

[0393] 孟鲁司特乳膏剂(含有5mg/g浓度的孟鲁司特钠)根据与以上实施例9中所述的相同方法制备。

[0394] 在研究中招募的受试者为具有黑色素相关的皮肤病的患者。症状包括黄褐斑和面颊疹。

[0395] 采用激光预处理试图除去症状中最差者。要求受试者在早晚清洁面部之后使用乳膏剂。

[0396] 受试者感觉在使用2周之后她的皮肤颜色有改善。这是可从图15所见的情况,其中在激光处理之前(照片(a))、开始用孟鲁司特乳膏剂处理之后7天(照片(b))、和用孟鲁司特乳膏剂处理之后14天(照片(c))可见面部的两侧。这表明,孟鲁司特乳膏剂可以用于治疗黑色素沉着和/或黑色素相关的皮肤病。

[0397] 实施例22

[0398] 孟鲁司特乳膏剂治疗类固醇依赖性皮炎的临床实施例

[0399] 孟鲁司特乳膏剂(含有5mg/g浓度的孟鲁司特钠)根据与以上实施例9中所述的相同方法制备。

[0400] 在研究中招募的受试者为具有类固醇依赖性皮炎的患者。症状包括皮肤发红、丘疹、发痒和肿胀。

[0401] 要求受试者在早晚清洁面部之后使用乳膏剂。

[0402] 观察到使用乳膏剂可在5分钟内缓解受试者的发痒。从图16(在治疗之前(照片(a)),和在治疗之后(照片(b)))可见,孟鲁司特乳膏剂可以用作类固醇依赖性皮炎的辅助治疗。

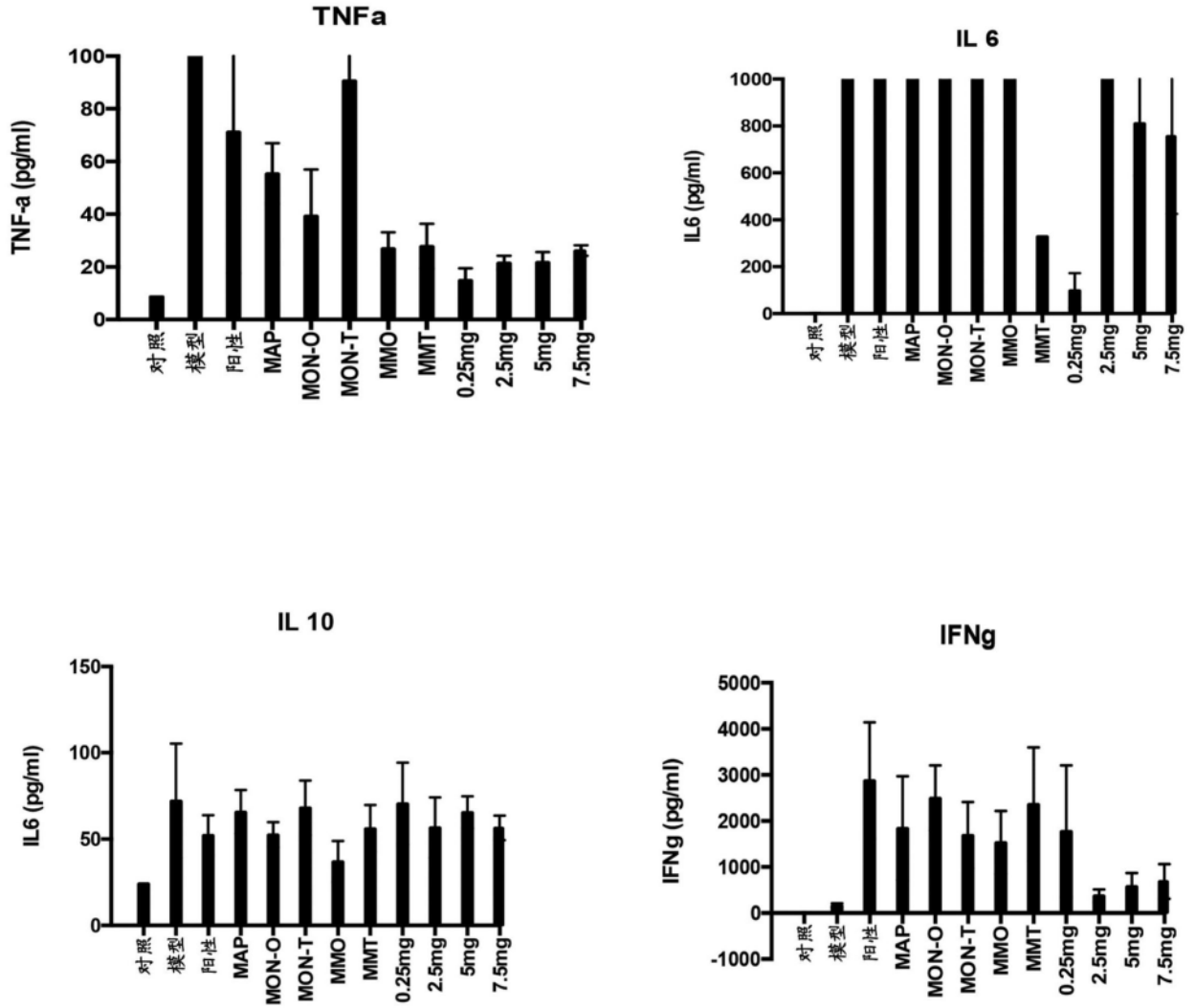

TNFa
TNF-a (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
对照
模型
阳性
MAP
MON-O
MON-T
MMO
MMT
0.25mg
2.5mg
5mg
7.5mg
IL 6
IL6 (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
IL 10
IL6 (pg/ml)
150
100
50
0
0.25mg
IFNg
IFNg (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000

图1

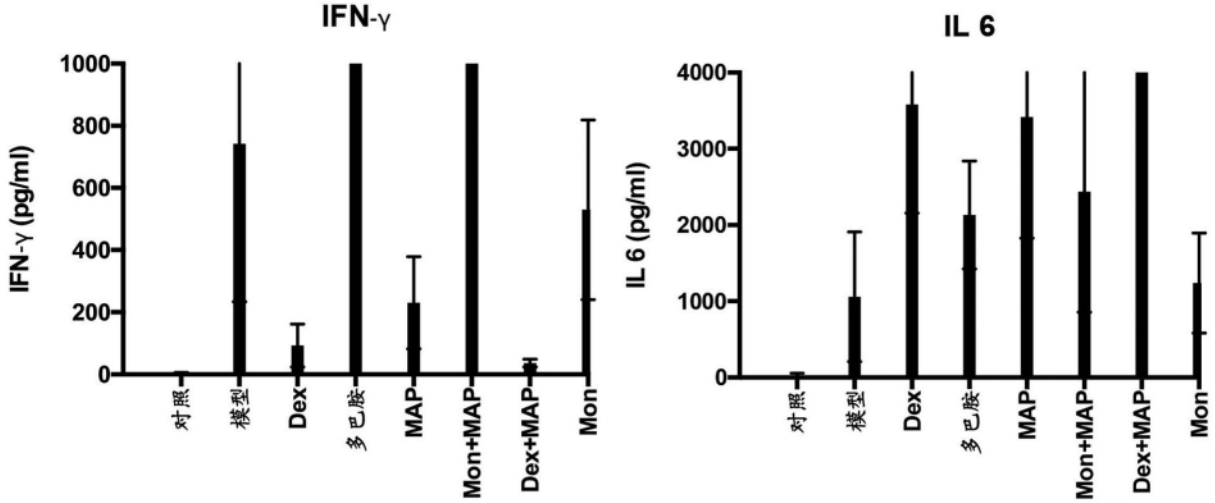

IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
对照
模型
Dex
多巴胺
MAP
Mon+MAP
Dex+MAP
Mon
IL 6
IL 6 (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0

图2

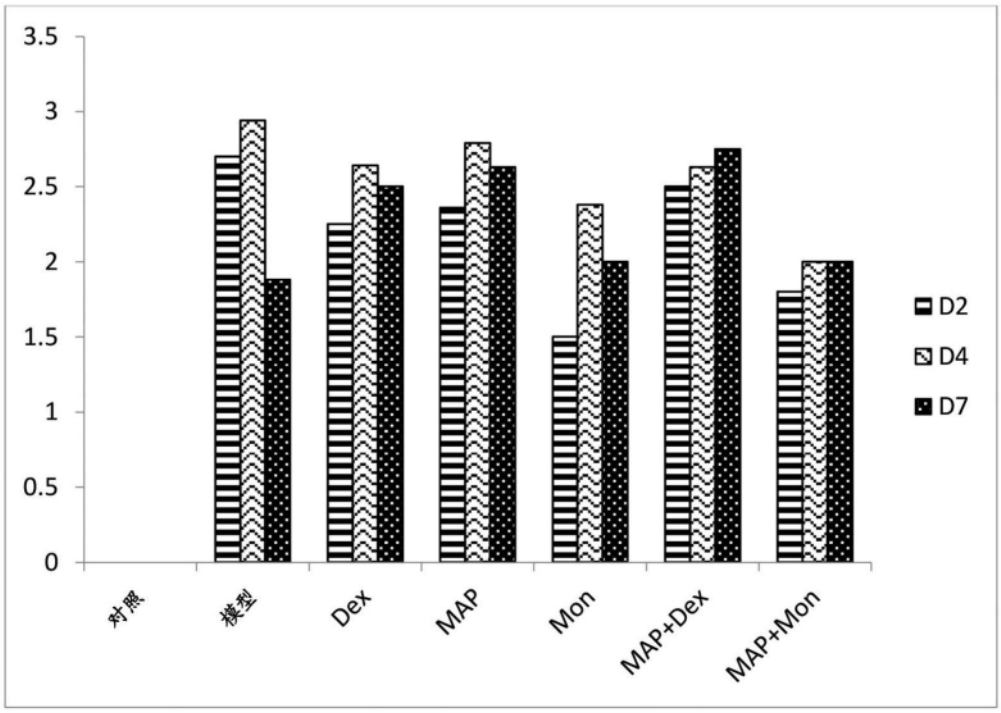


图3

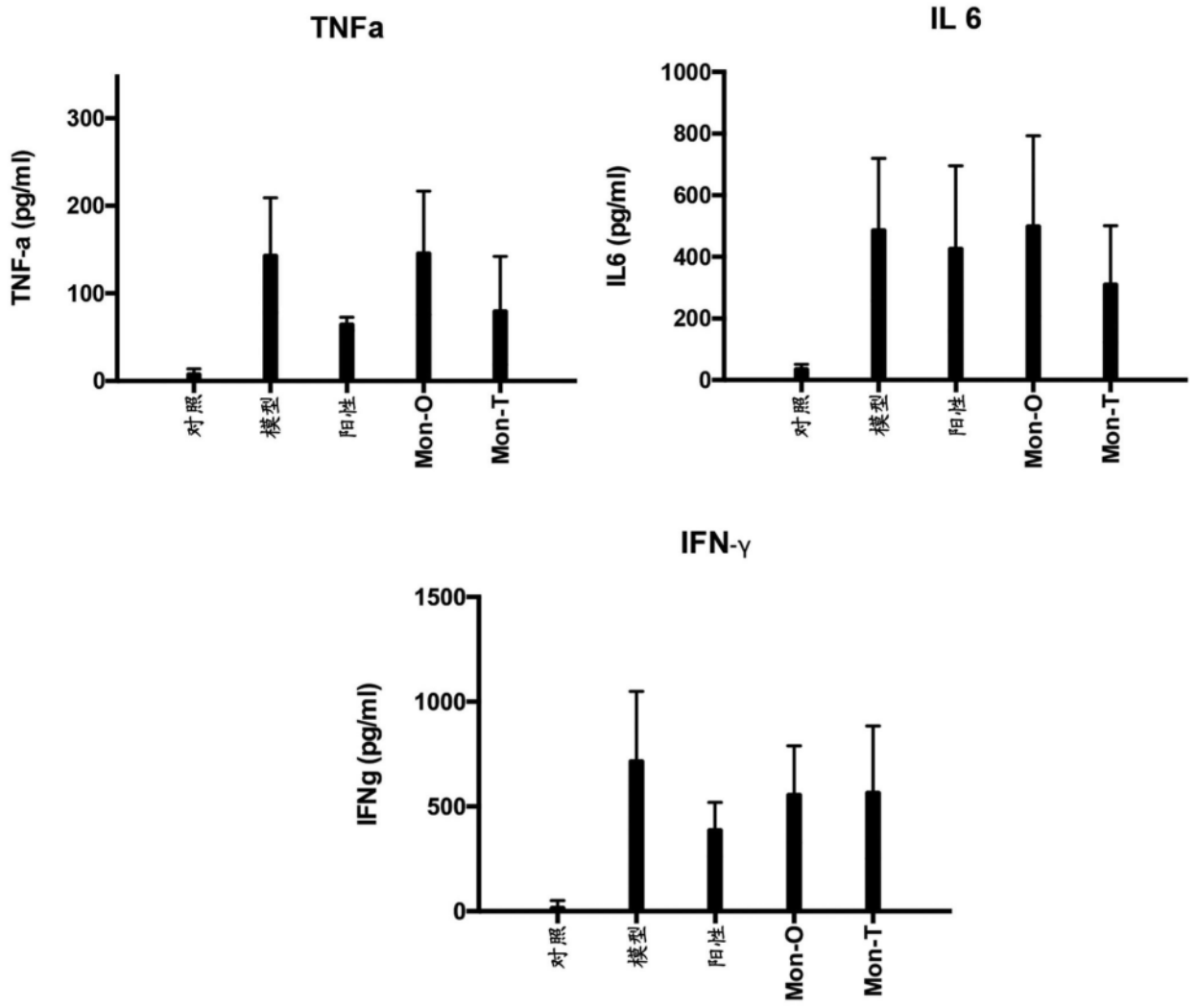

TNFa
TNF-a (pg/ml)
300
200
100
0
对照
模型
阳性
Mon-O
Mon-T
IL 6
IL6 (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
对照
模型
阳性
Mon-O
Mon-T
IFN-γ
IFNg (pg/ml)
1500
1000
500
0
对照
模型
阳性
Mon-O
Mon-T

图4

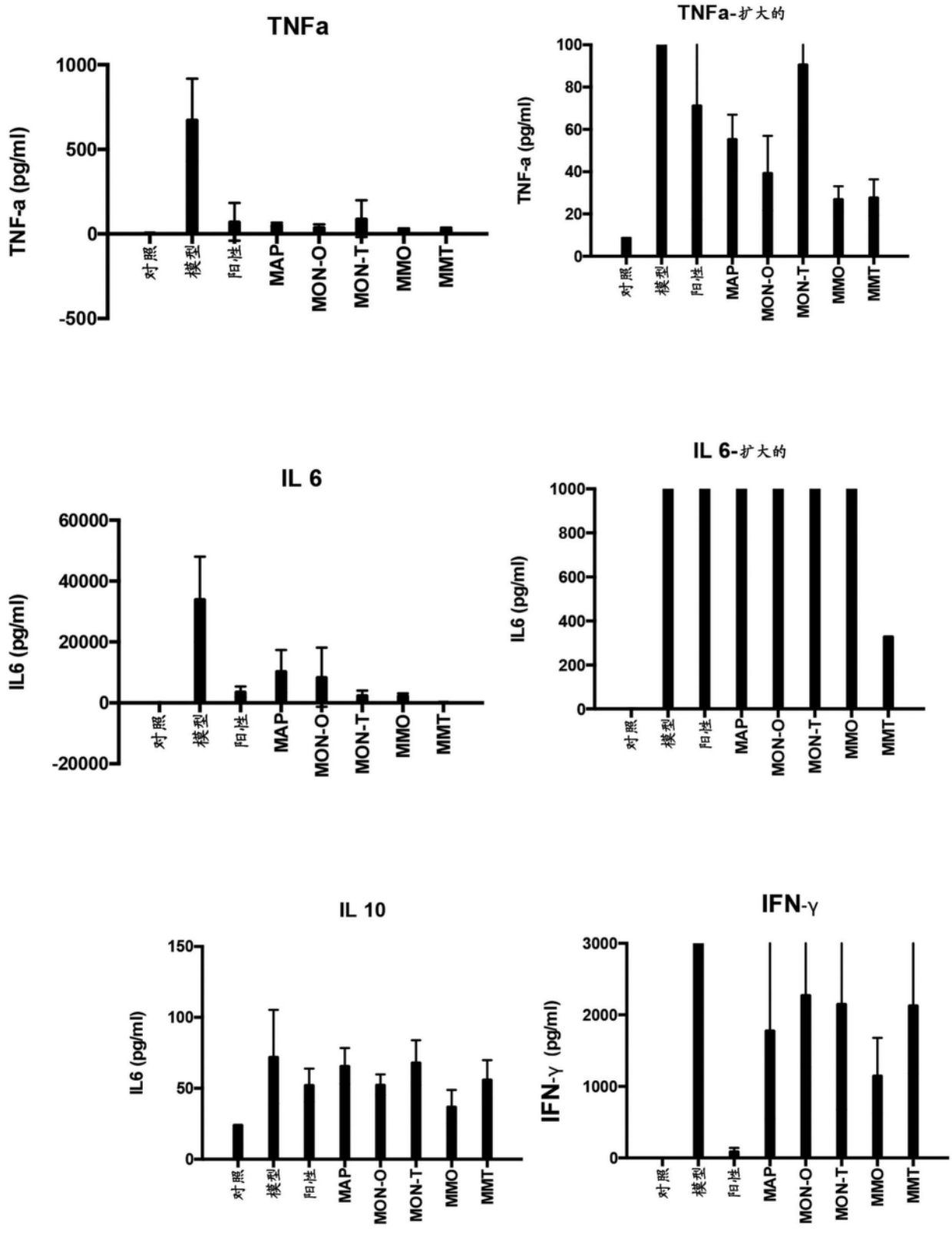

TNFa
TNF-a (pg/ml)
1000
500
0
-500
对照
模型
阳性
MAP
MON-O
MON-T
MMO
MMT
TNFa-扩大的
TNF-a (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
IL 6
IL6 (pg/ml)
60000
40000
20000
0
-20000
IL 6-扩大的
IL6 (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
IL 10
IL6 (pg/ml)
150
100
50
0
IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
3000
2000
1000
0

图5

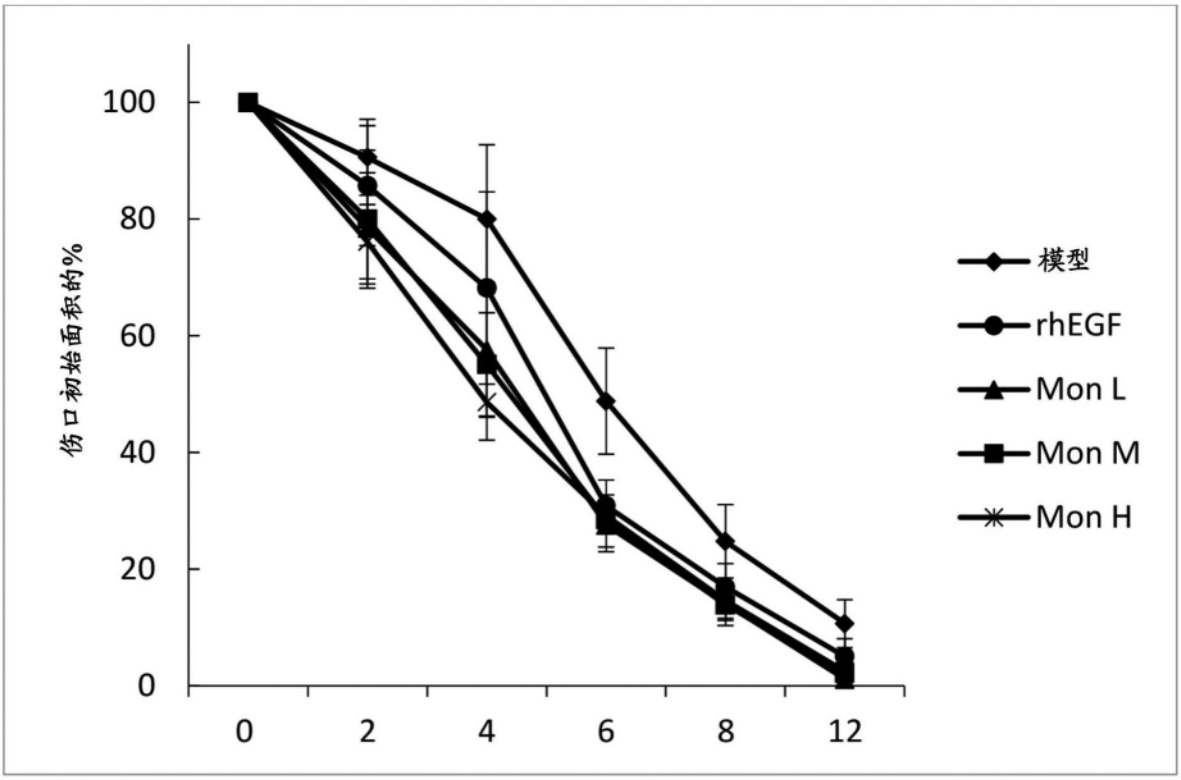

伤口初始面积的%
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
12
模型
rhEGF
Mon L
Mon M
Mon H

图6

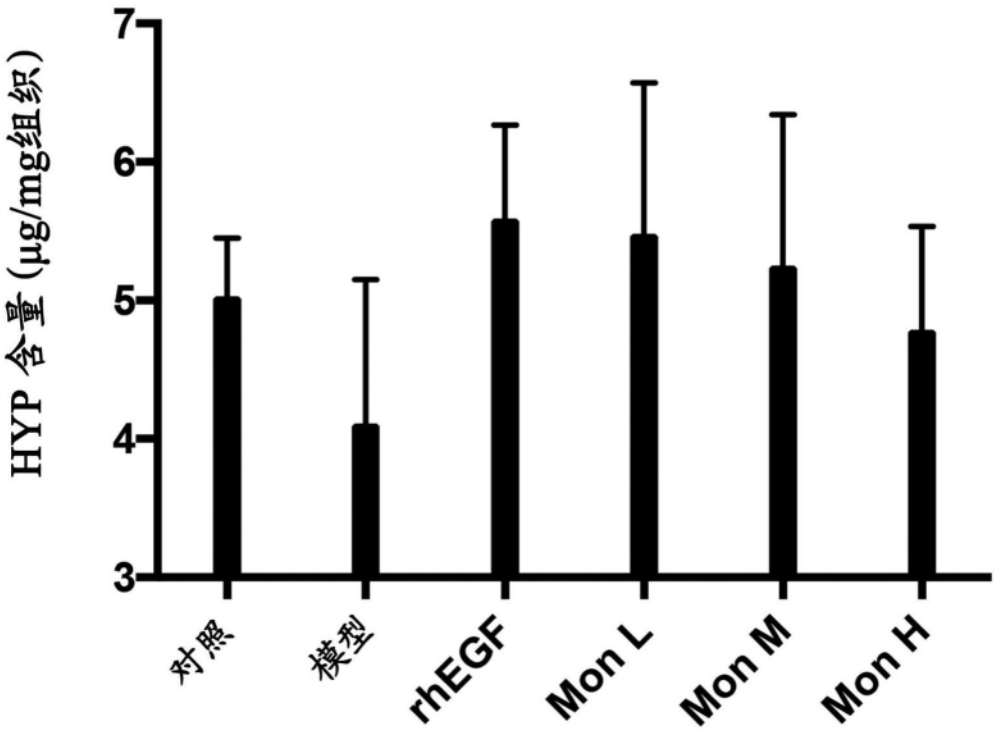

HYP 含量 (μg/mg组织)
7
6
5
4
3
对照
模型
rhEGF
Mon L
Mon M
Mon H

图7

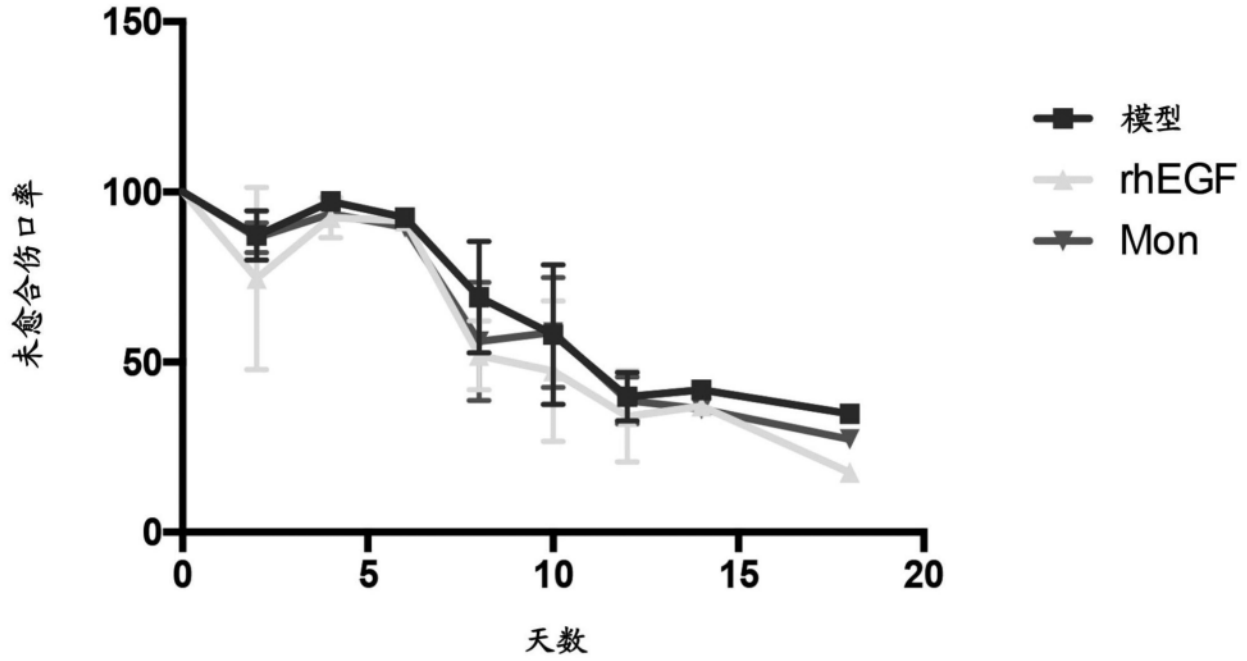

150
100
50
0
0
5
10
15
20
未愈合伤口率
天数
模型
rhEGF
Mon

图8

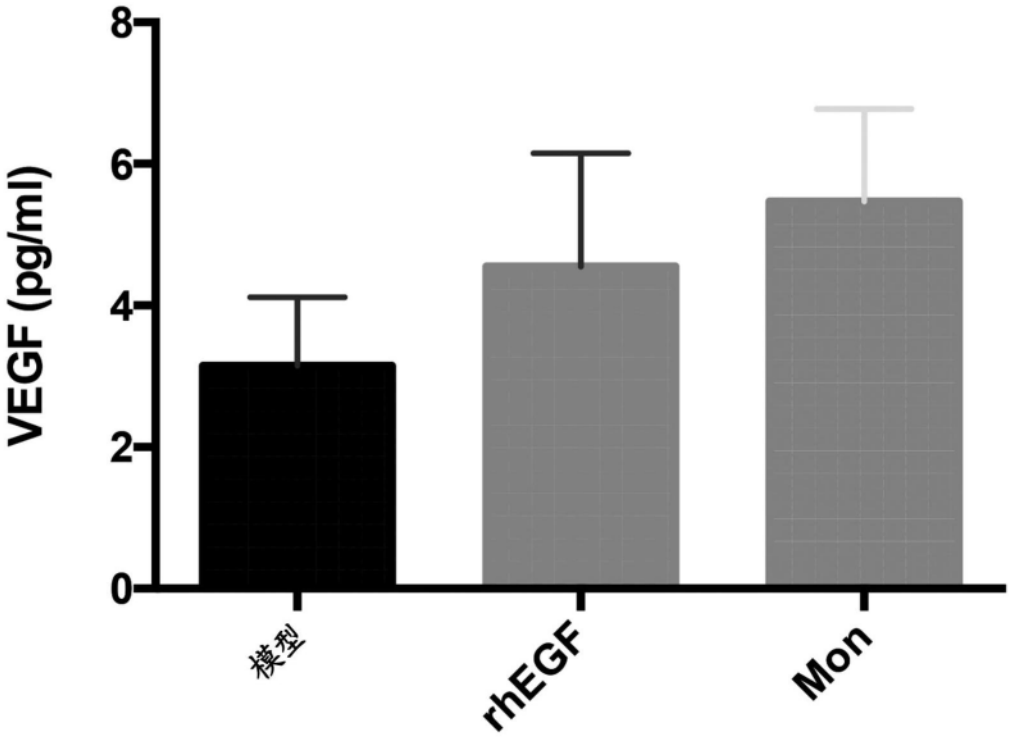

8
6
4
2
0
VEGF (pg/ml)
模型
rhEGF
Mon

图9

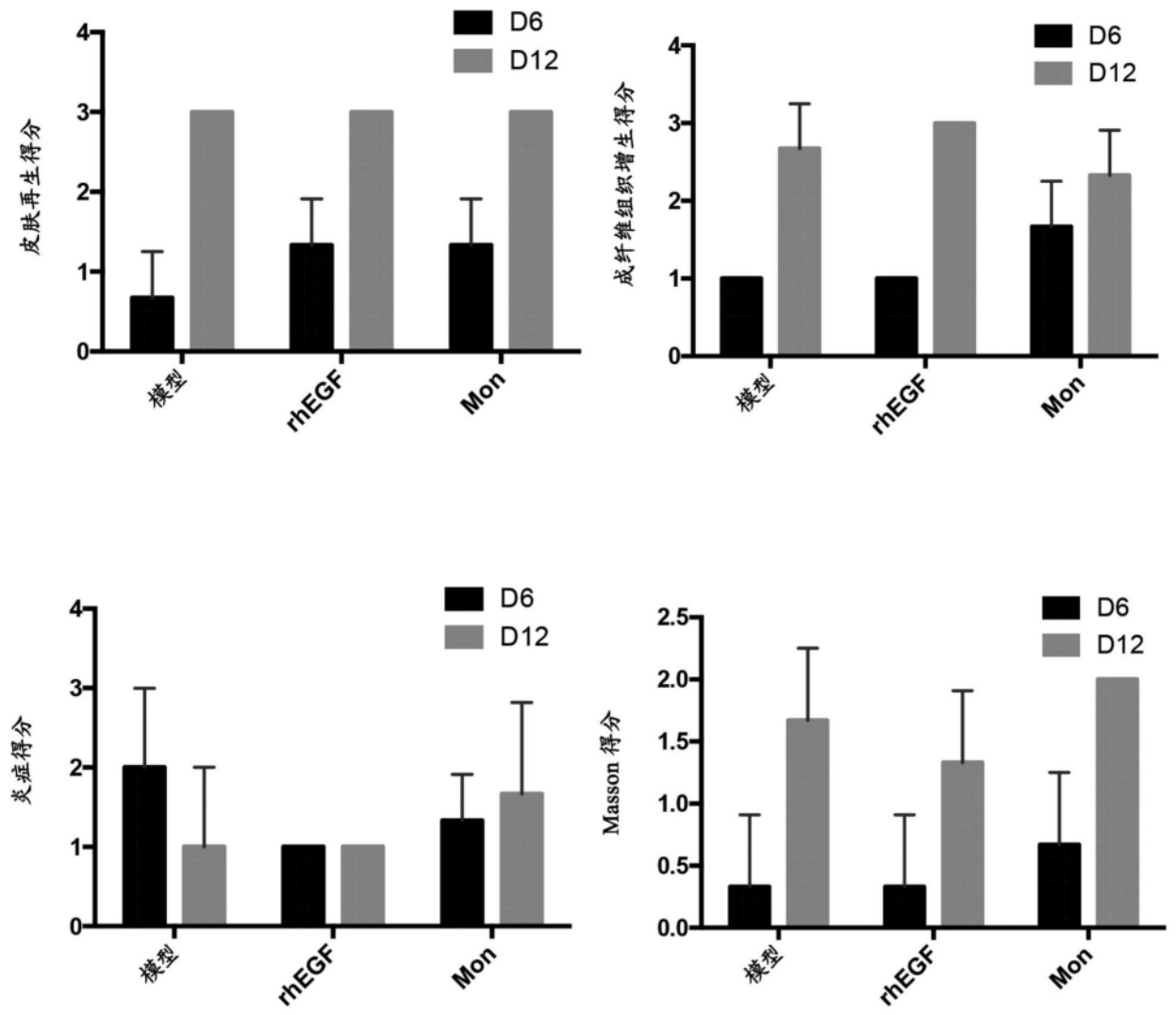
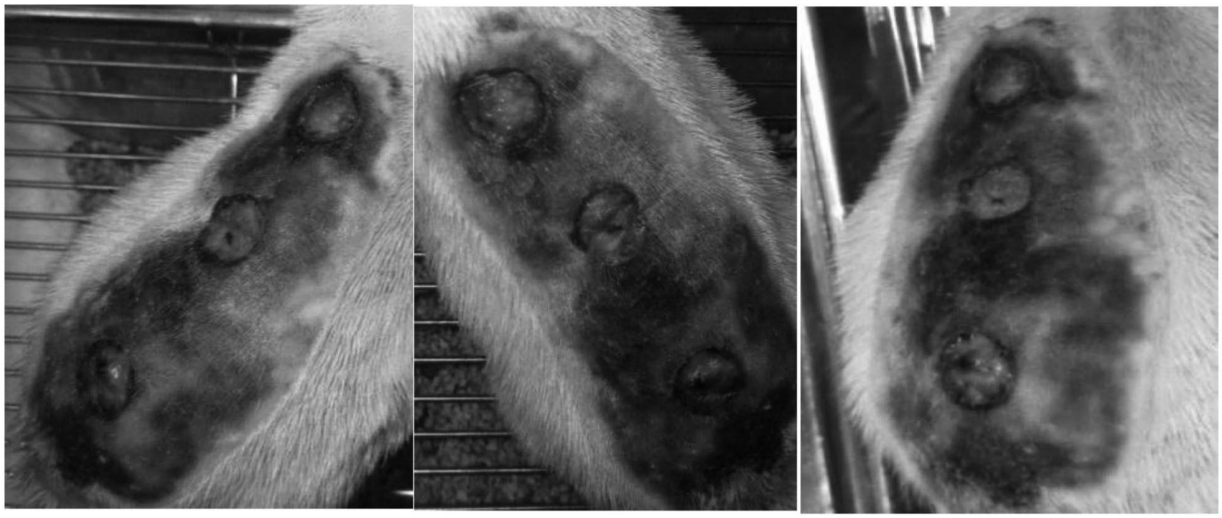


图10

对照组



试验组



图11

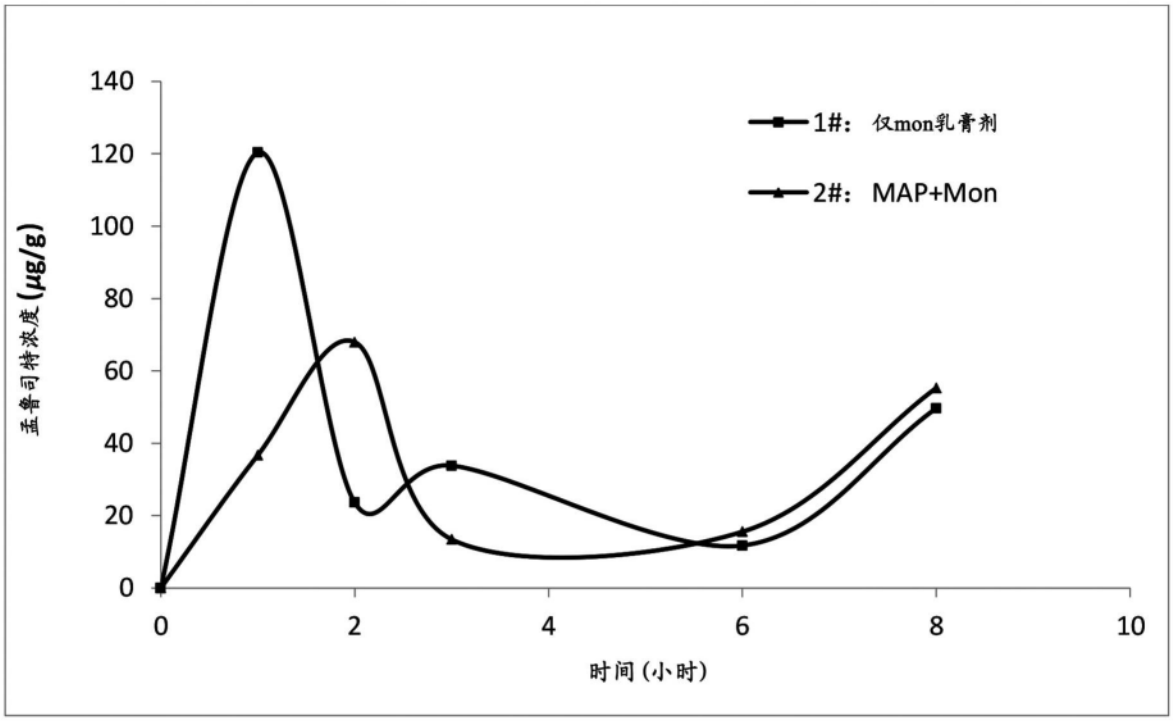

孟鲁司特浓度(μg/g)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
时间(小时)
1#：仅mon乳膏剂
2#：MAP+Mon

图12

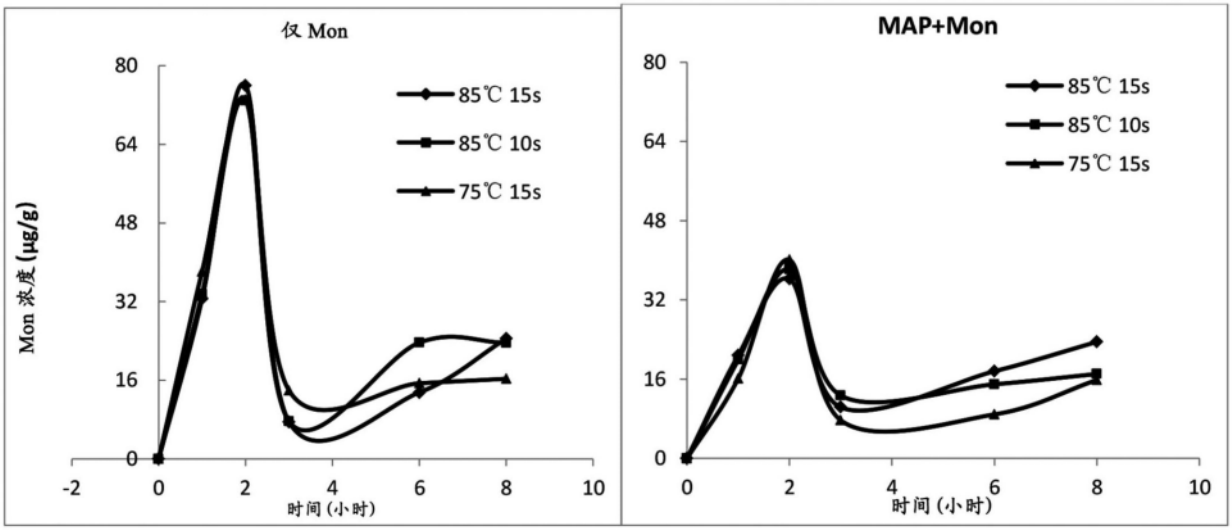

仅 Mon
Mon 浓度(μg/g)
80
64
48
32
16
0
-2
0
2
4
6
8
10
时间(小时)
85℃ 15s
85℃ 10s
75℃ 15s
MAP+Mon
80
64
48
32
16
0
0
2
4
6
8
10
时间(小时)
85℃ 15s
85℃ 10s
75℃ 15s

图13

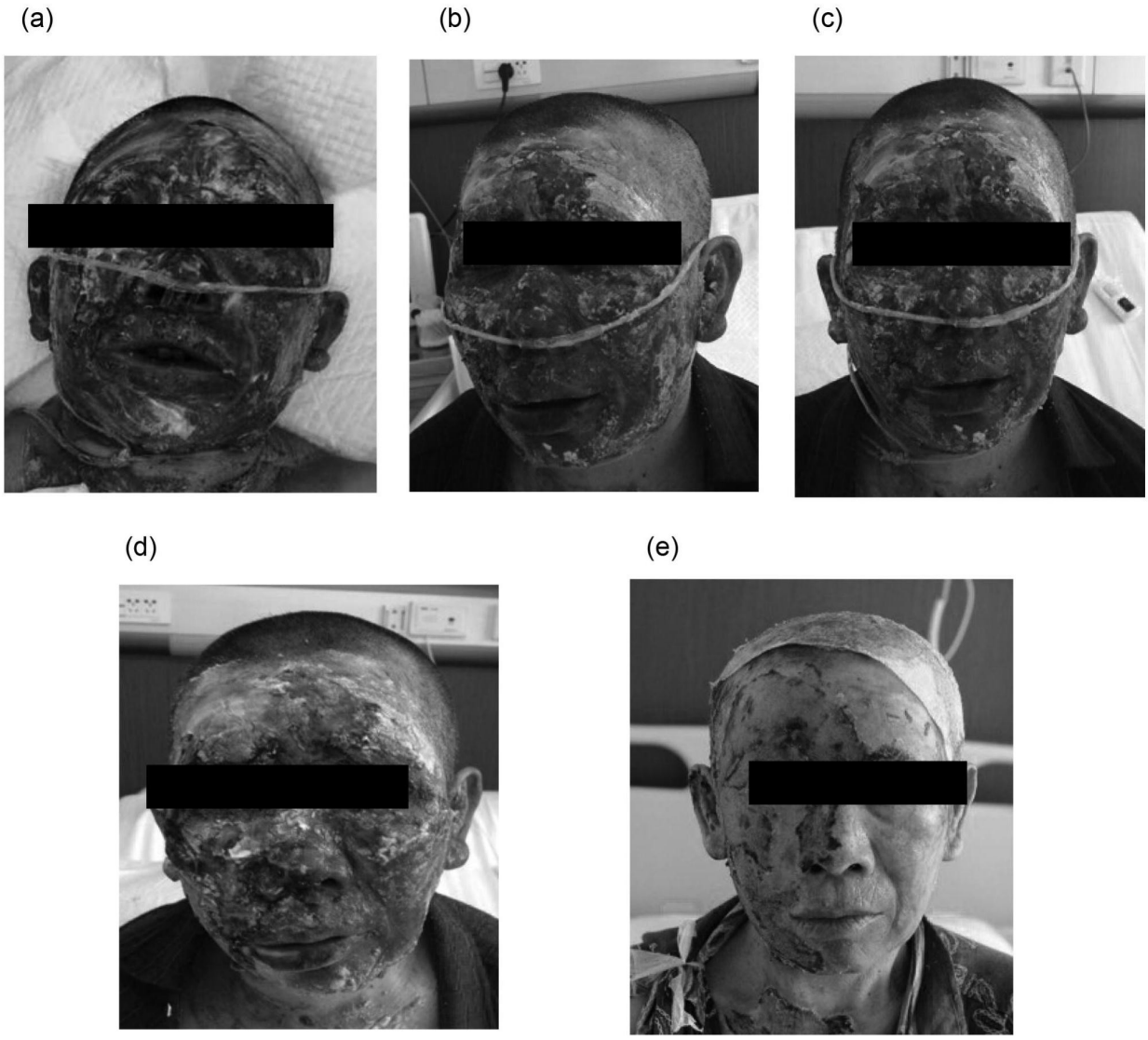
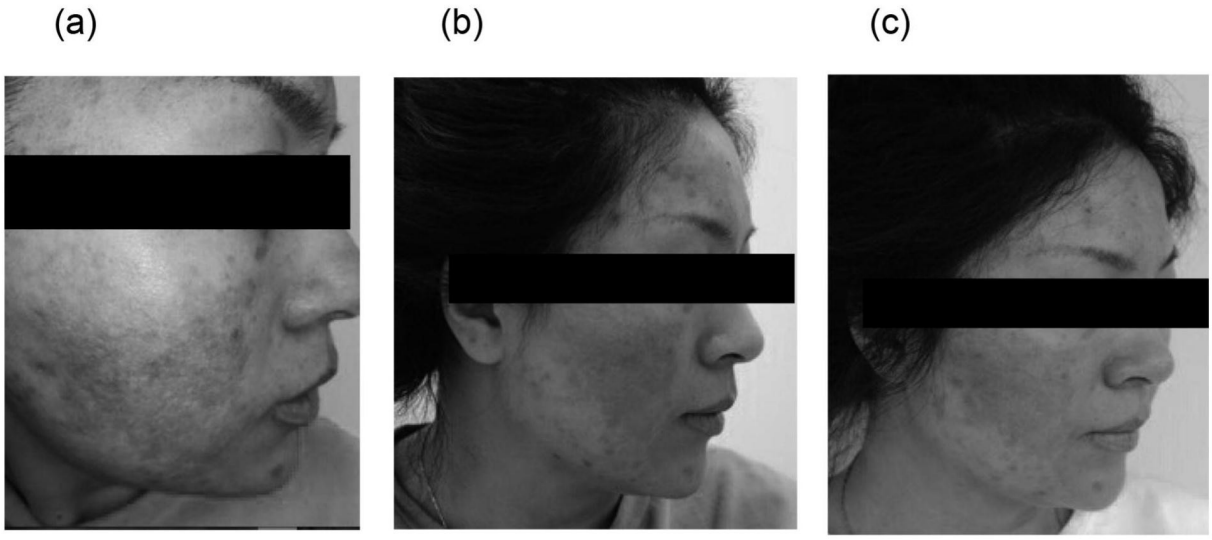


图14

右侧



左侧

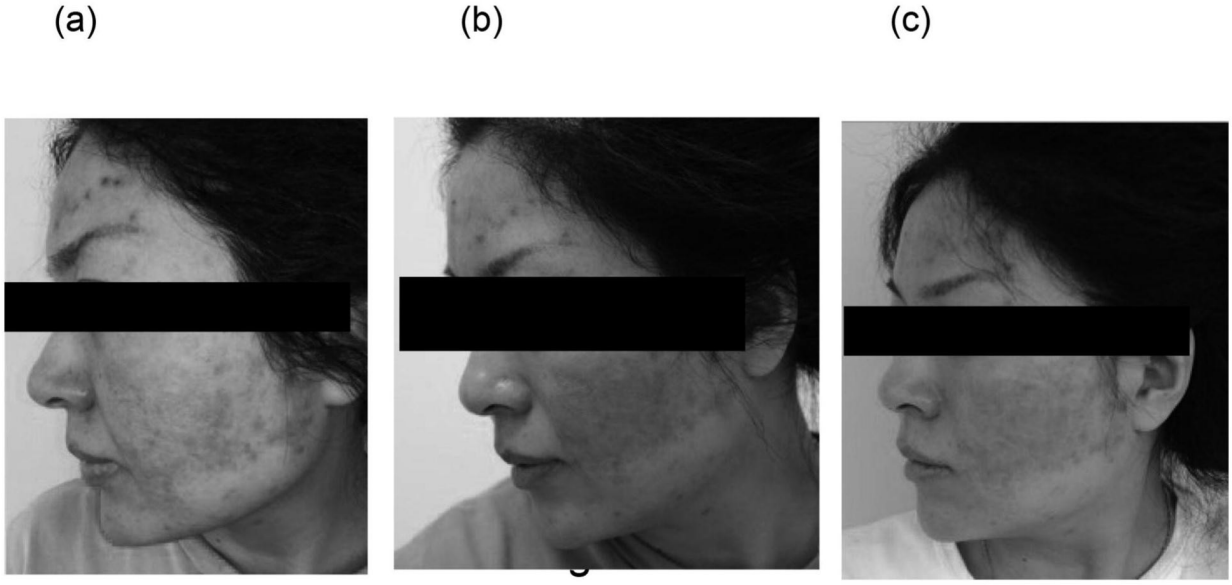
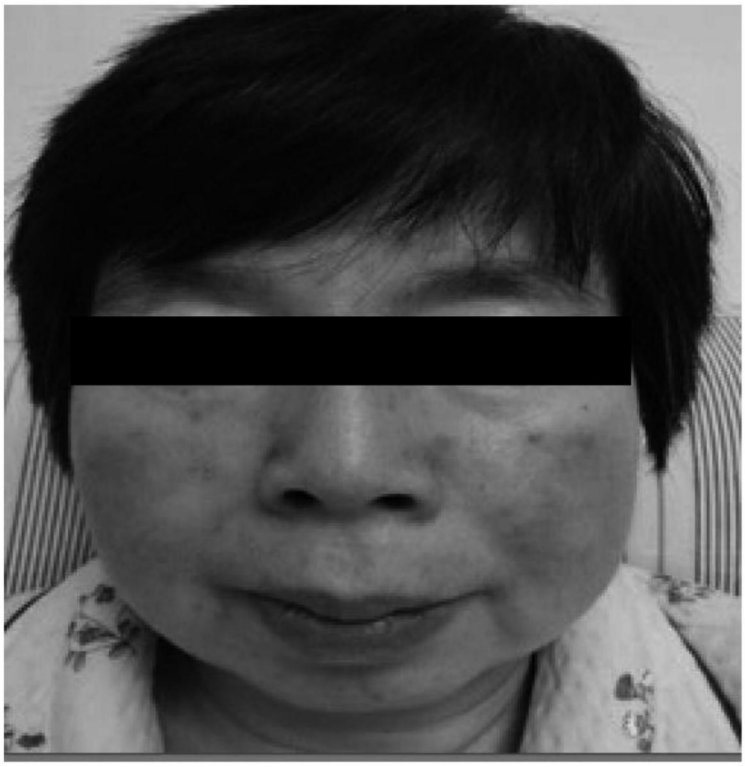


图15

(a)



(b)

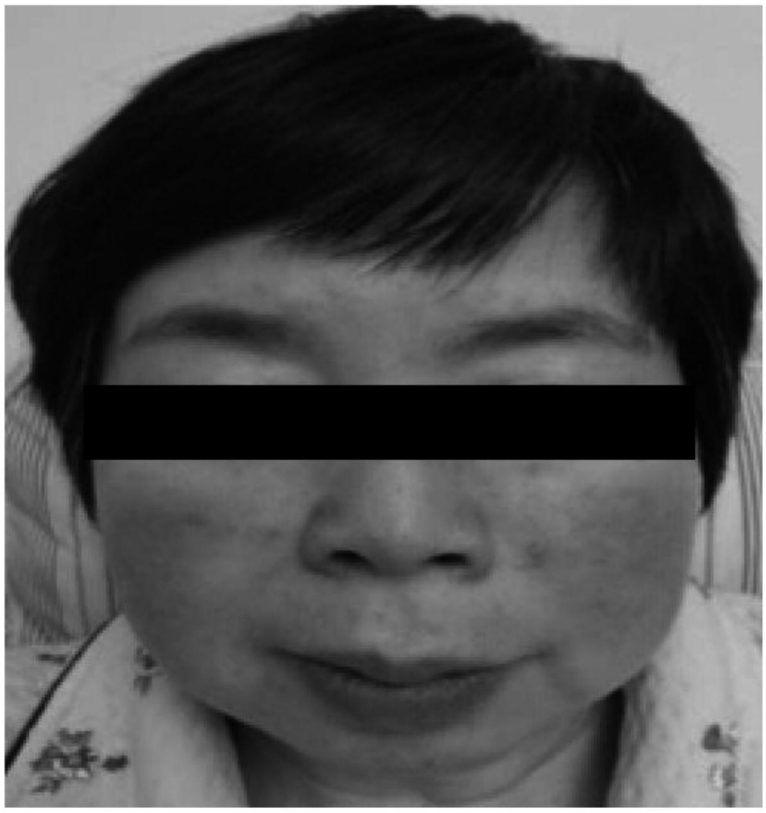


图16