

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A01N 59/04 (2006.01)

A61K 33/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03825772.6

[43] 公开日 2006年1月11日

[11] 公开号 CN 1719975A

[22] 申请日 2003.9.30 [21] 申请号 03825772.6

[30] 优先权

[32] 2002.11.7 [33] US [31] 60/424,804

[86] 国际申请 PCT/US2003/030956 2003.9.30

[87] 国际公布 WO2004/043341 英 2004.5.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.7

[71] 申请人 联邦高等教育系统匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚州

共同申请人 耶鲁大学

[72] 发明人 蒂莫西·R·比利阿

奥古斯丁·M·K·乔伊

卡罗尔·A·麦克洛斯基

利奥·E·奥特贝因

布赖恩·S·朱克布朗

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

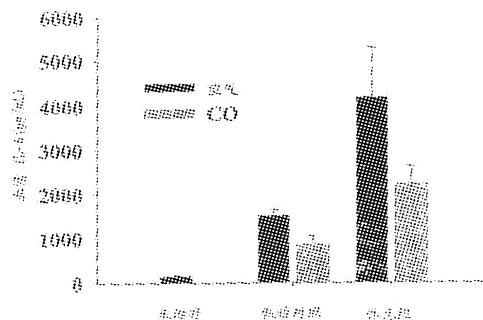
权利要求书4页 说明书19页 附图9页

[54] 发明名称

出血性休克的治疗

[57] 摘要

本发明涉及治疗患有出血性休克或有患出血性休克风险的患者的方法以及组合物。所述的治疗包括给予患者包含一氧化碳的药物组合物。



1. 一种治疗患者出血性休克的方法，包括：
给予诊断患有出血性休克的患者一定量包含一氧化碳的药物组合物以
5 有效减少由出血性休克导致的组织损伤。
2. 权利要求1的方法，进一步包括给予患者至少一种下列治疗：输血、
补水、外科手术、抗生素治疗和作用于血管的药物。
3. 权利要求1的方法，其中药物组合物是气体形式且通过吸入给予患
者。
- 10 4. 权利要求1的方法，其中药物组合物是气体形式且对除了肺部以外
的患者器官局部给药。
5. 权利要求1的方法，其中药物组合物是气体形式且对患者腹腔给药。
6. 权利要求1的方法，其中药物组合物是液体形式且经口服对患者给
药。
- 15 7. 权利要求1的方法，其中药物组合物是液体形式且对患者器官局部
给药。
8. 权利要求1的方法，其中药物组合物是液体形式且对患者腹腔给药。
9. 权利要求1的方法，其中药物组合物是液体形式且经静脉内或腹膜
内给药。
- 20 10. 权利要求1的方法，进一步包括观察与不进行有效治疗时相比全
身组织损伤减少的水平。
11. 权利要求1的方法，进一步包括监测出血性休克的征兆。
12. 一种治疗患者出血性休克的方法，包括：
给予诊断为处于患出血性休克风险的患者一定量包含一氧化碳的药物
25 组合物以有效减少由出血性休克导致的全身性组织损伤；以及
监测病人的出血性休克的征兆。
13. 权利要求12的方法，进一步包括给予患者至少一种下列治疗：输
血、补水、外科手术、抗生素治疗和作用于血管的药物。
14. 权利要求12的方法，其中药物组合物是气体形式且通过吸入给予
30 患者。
15. 权利要求12的方法，其中药物组合物是气体形式且对除了肺部以

外的患者器官局部给药。

16. 权利要求 12 的方法，其中药物组合物是气体形式且对患者腹腔给药。

5 17. 权利要求 12 的方法，其中药物组合物是液体形式且经口服对患者给药。

18. 权利要求 12 的方法，其中药物组合物是液体形式且对患者器官局部给药。

19. 权利要求 12 的方法，其中药物组合物是液体形式且对患者腹腔给药。

10 20. 权利要求 12 的方法，其中药物组合物是液体形式且经静脉内或腹膜内给药。

21. 一种治疗患者出血性休克的方法，包括：

(a) 确定患有出血性休克或有患出血性休克风险的患者；

(b) 给予该患者液体复苏；以及

15 (c) 步骤(b)的同时或之后，给予患者一定量包含一氧化碳的药物组合物，其量可有效减少由出血性休克导致的全身性组织损伤。

22. 权利要求 21 的方法，其中给予液体复苏包括给予患者液体一氧化碳组合物。

20 23. 权利要求 21 的方法，其中液体一氧化碳组合物是一氧化碳-饱和的林格溶液。

24. 权利要求 21 的方法，其中给予液体复苏包括给予患者被一氧化碳部分或完全饱和的血液。

25. 权利要求 21 的方法，其中给予液体复苏进一步包括给予患者被一氧化碳-饱和的林格溶液。

25 26. 权利要求 21 的方法，其中药物组合物是气体形式且通过吸入给予患者。

27. 权利要求 21 的方法，其中药物组合物是气体形式且对除了肺部以外的患者器官局部给药。

30 28. 权利要求 21 的方法，其中药物组合物是气体形式且经腹腔对患者给药。

29. 权利要求 21 的方法，其中药物组合物是液体形式且经口服对患者

给药。

30. 权利要求 21 的方法，其中药物组合物是液体形式且对患者器官局部给药。

5 31. 权利要求 21 的方法，其中药物组合物是液体形式且对患者腹腔给药。

32. 一种治疗患者出血性休克的方法，包括：

给予诊断患有因失血可能足以导致出血性休克的患者包含一定量溶解的一氧化碳的全血或血液成分，以有效减少由出血性休克导致的全身性组织损伤。

10 33. 权利要求 32 的方法，其中患者正在经受或已经经受了外科手术。

34. 一种向患者体内进行输血的方法，包括：

(a) 提供适于输注入患者体内的全血或血液成分；

(b) 使用一氧化碳部分或完全饱和该全血或血液成分；

15 (c) 将该部分和或完全饱和的全血或血液成分输注入患者体内，从而完成向患者体内的输血。

35. 权利要求 34 的方法，其中患者被诊断患有或有患出血性休克的风险。

36. 一种治疗患者出血性休克的方法，包括：

(a) 确定患有或有患出血性休克风险的患者；

20 (b) 提供装有包含一氧化碳的压缩气体的容器；

(c) 从容器中释放压缩气体，以形成包含一氧化碳气体的空气；以及

(d) 使患者接触该空气，其中该空气中一氧化碳的量足以减少出血性休克引起的全身性组织损伤。

37. 权利要求 36 的方法，其中患者持续接触空气至少 1 小时。

25 38. 权利要求 36 的方法，其中患者持续接触空气至少 6 小时。

39. 权利要求 36 的方法，其中患者持续接触空气至少 24 小时。

40. 权利要求 36 的方法，进一步包括监测患者体内出血性休克的症状。

41. 包含医用级压缩一氧化碳气体的容器，该容器具有指示该气体可以用来减少患者出血性休克有害后遗症的标签。

30 42. 权利要求 41 的容器，其中有害后遗症包括全身炎症。

43. 权利要求 41 的容器，其中有害后遗症包括全身组织损伤。

44. 权利要求 41 的容器，其中一氧化碳气体与含氧气体混合。
45. 权利要求 44 的容器，其中混合物中一氧化碳气体的浓度至少约为 0.025%。
46. 权利要求 44 的容器，其中混合物中一氧化碳气体的浓度至少约为 0.05%。
47. 权利要求 44 的容器，其中混合物中一氧化碳气体的浓度至少约为 0.10%。
48. 权利要求 44 的容器，其中混合物中一氧化碳气体的浓度至少约为 1.0%。
49. 权利要求 44 的容器，其中混合物中一氧化碳气体的浓度至少约为 2.0%。
50. 包含经一氧化碳部分或完全饱和的全血或血液成分的容器，该容器具有指示给予患者该全血或血液部分以减轻患者体内出血性休克有害后遗症的标签。
51. 一种商业方法，包括：
- (a) 提供适于输注入患者体内的全血或血液成分；
- (b) 使用一氧化碳处理该全血或血液成分以生产血液/一氧化碳产品；
- 以及
- (c) 将该血液/一氧化碳产品供给消费者，其带有对需要输血的患者给予该血液/一氧化碳产品的说明。
52. 权利要求 51 的商业方法，其中(b)包括使血液接触包含一氧化碳的空气。
53. 权利要求 51 的商业方法，其中消费者是医院或护理机构。
54. 权利要求 51 的商业方法，其中说明包括给予患有明显失血的患者该血液/一氧化碳产品。

出血性休克的治疗

5 发明领域

本发明涉及出血性休克患者的治疗。

发明背景

10 血红素加氧酶-1(HO-1)催化血红素降解的第一步。HO-1通过氧化断裂
b-型血红素分子的 α -中位碳桥从而得到等摩尔量的胆绿素 IXa、一氧化碳
(CO)和游离铁。接着,胆绿素经胆绿素还原酶转化为胆红素,且游离铁被
螯和入铁蛋白(其经游离铁诱导生成)。

现在认识到 CO 是重要的信号分子(Verma 等, Science 259: 381-384,
1993)。一氧化碳已被认为充当了大脑中的神经信使分子并充当下丘脑中神
15 经-内分泌的调质(Pozzoli 等, Endocrinology 735: 2314-2317, 1994)。与一氧
化氮相似(NO), 一氧化碳是平滑肌松弛剂(Utz 等, Biochem Pharmacol. 47:
195-201, 1991; Christodoulides 等, Circulation 97: 2306-9, 1995)并抑制血小板
凝集(Mansouri 等, Thromb Haemost. 48:286-8, 1982)。在一些模型中,吸入低
浓度的一氧化碳(CO)已显示具有抗炎作用。

20 出血性休克(Hemorrhagic shock 或“HS”)是由循环血容量和/或携氧能
力降低而引起的休克。HS 可由任何与失血相关的病情例如内出血(如胃肠出
血)或外出血以及创伤(如穿透性创伤或钝伤)等引起。

发明简介

25 本发明的特征在于治疗患者 HS 的方法。该方法包括给予经诊断患有或
有患 HS 风险的患者一定量的含一氧化碳的组合物以有效地减少 HS 例如
HS 引起的全身组织损伤。该方法可包括给药患者另一种治疗比如液体复苏
(fluid resuscitation)、补水、充氧、外科手术(例如,给患者止血)、血管活性
物质治疗和/或抗生素治疗。

30 本发明的特征还在于治疗患者 HS 的方法,通过:(a)确定患有或有患
HS 风险的患者,(b)给予患者液体复苏,以及(c)在(b)之前、同时或之后给予

患者包含一氧化碳的药物组合物，其量可有效治疗 HS 例如减少由 HS 引起的组织损伤(例如，至少一种器官的损伤或全身组织的损伤)。

液体复苏一般包括给予患者液体，特别是将其直接给予血管内(例如，经静脉内或经动脉内)。该液体例如可以是液态一氧化碳组合物(例如，一氧化碳-饱和的林格液，含有或不含乳酸盐)。此外，液体复苏可包括给予患者血液。该血液可以是全部和/或部分(例如，包装的红细胞、血小板、血浆和/或凝结因子沉淀物)血液(例如经水溶液例如林格液稀释)，并可以被一氧化碳完全或部分饱和。

该药物组合物可以是液体和气体形式，并且可以通过本领域已知的给予患者气体和液体的任何已知方法而给予患者，例如吸入、吹入、输注(如静脉内)、注射和/或口服。或者或另外，该组合物可以局部给药，例如对除肺部以外的患者器官局部给药。在本发明一个实施方案中，该药物组合物通过吸入给予患者。在另一个实施方案中该药物组合物经口服给予患者。在另一个实施方案中，该药物组合物直接对患者腹腔给药。

本发明还提供一种治疗或预防患者的出血性休克的方法，其包括给予经诊断患有失血(例如，大量失血(例如，失去超过约 15% 的总血容量，例如，超过 20%、25%、30%、35%、40% 或 50% 总容量，或者至少 1000 ml，例如至少 1500 ml 或至少 2000 ml 或任何足以引起患者出血性休克的量)或收缩压降低(例如，收缩压较患者正常收缩压低约 20 mmHg，或例如收缩压低于约 100 mmHg，例如低于约 90、60 或 50 mmHg)全血，或血液成分，包含溶解的 CO，其量足以减少由出血性休克引起的全身组织损伤。在一些实施方案中，患者这在经历或已经经历了医学过程例如外科手术或分娩。

本发明还包括一种向患者体内输血的方法。该方法包括(a)提供适于输入患者体内的全血或血液成分；(b)使用一氧化碳部分或完全饱和血液或血液成分；以及(c)将部分或完全饱和的血液或血液成分输注到患者体内。在一些实施方案中，患者被诊断患有或有患出血性休克的风险。

本发明还提供了一种治疗患者出血性休克的方法，包括(a)确定患有或有患出血性休克风险的患者；(b)提供装有包含一氧化碳的压缩气体的容器，(c)从容器中释放压缩气体形成包含一氧化碳气的空气，以及(d)使患者接触该空气，其中一氧化碳在该空气中的含量足以较少由出血性休克引起的全身组织损伤。该患者接触该空气的时间可以例如持续至少 1 小时例，如至

少 6、24、48、72 小时或更长。

在一些实施方案中，这里描述的治疗出血性休克的方法进一步包括监测患者的出血性休克的征兆。在另一实施方案中，该方法包括观察与没有进行有效的治疗相比全身组织损伤的水平下降。

5 包含医用级压缩一氧化碳气体的容器也包括在本发明范围内。该容器可以带有指明气体可用于治疗或预防患者的 HS 的标签，例如 HS 有害后遗症，例如由 HS 引起的全身炎症和/或全身组织损伤。CO 气体可与氮气、与一氧化氮和氮气、或与含氧的气体混合供应。该混合物中 CO 的浓度至少约为 0.025%，例如至少约 0.05%、0.10%、0.50%、1.0%、2.0%、10%、50
10 %、90% 或更高。

在另一方面，本发明包括全血或血液成分，其部分或完全被一氧化碳饱和，用于例如输注入患者体内以治疗或预防患者的 HS。例如，本发明包括容器(比如适于输血过程的血袋)中的全血或血液成分，其中全血或血液成分被 CO 部分或完全饱和。该容器可具有标签说明该全血或血液成分可用于
15 治疗或预防 HS，例如由 HS 引起的全身组织损伤。

在另一个方面中，本发明包括一种商业方法，包括：(a)提供适于输注入患者体内的全血或血液成分；(b)使用一氧化碳处理该血液(例如全部血液或部分血液)(例如，使该血液暴露于包含一氧化碳的空气)以生成血液/一氧化碳产品；以及(c)将该血液/一氧化碳产品提供给消费者(例如医院或护理机
20 构(caregiver))，并带有对需要输注(例如，由于大量失血)的患者给予该血液/一氧化碳产品的说明。

本发明还包括 CO 在制备治疗或预防 HS 例如由 HS 引起的组织损伤(例如全身性组织损伤)的药物中的应用。该药物可用于治疗 HS 和/或由出血性休克引起的组织损伤的方法，和/或将血液输注入患者体内的方法。该药物
25 可以为此处描述的任何形式例如液体或气体 CO 组合物。

除非特别指明，本文用到的所有技术和科学术语的含义均与本发明所属领域普通技术人员通常的理解一致。虽然与本文中所述相似或等同的方法和材料可用来实施或检验本发明，但适宜的方法和材料仍在下文有所表述。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参照均作为参考全部
30 引入。在发生冲突的情况下，以本说明书包括定义为准。材料、方法和实施例只是说明性的，并非限制性的。

本发明其它的特点和优势从下面详细描述以及权利要求变得明晰。

附图简介

5 附图 1 是举例说明 CO 对经受 HS/R 小鼠体内血清 IL-6 水平影响的条线图。N=3-4/组。

附图 2 是举例说明 CO 对经受 HS/R 的小鼠体内血清 IL-10 水平影响的条线图。N=3-4/组。

附图 3 是举例说明 CO 对经受 HS/R 的小鼠体内血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平影响的条线图。N=3-4/组。

10 附图 4A-D 肠切片的照片, 举例说明了 CO 对经受 HS/R 小鼠的肠损伤的影响。4A: 未经受 HS/R 接触空气的小鼠。4B: 经受 HS/R 接触空气的小鼠。4C: 未经受 HS/R 接触 CO 的小鼠。4D: 经受 HS/R 接触 CO 的小鼠。N=3-4/组。

15 附图 5A 是条线图, 举例说明了在液体复苏期间仅给予 CO 时, CO 对经受 HS/R 小鼠肺内髓过氧化物酶(MPO)活性的影响。

附图 5B 是条线图, 举例说明了在液体复苏期间仅给予 CO 时, CO 对经受 HS/R 小鼠体内血清 ALT 水平的影响。N=3-4/组。

附图 6 是举例说明 CO 对经受 HS/R 小鼠肺内 MPO 活性影响的条线图。

附图 7 是举例说明 CO 对出血-诱发的肝缺氧影响的条线图。

20 附图 8A 是举例说明 CO 对经受 HS/R 的 *il-10^{-/-}* 小鼠体内血清 ALT 水平影响的条线图。

附图 8B 是举例说明 CO 对经受 HS/R 的 *il-10^{-/-}* 小鼠肺内 MPO 活性影响的条线图。

25 发明详述

本发明部分基于这样的发现: 给予 CO 影响了患有 HS 并随后进行液体复苏(HS/R)的动物体内细胞激酶水平和出现的器官损伤。

30 术语“一氧化碳”(或“CO”)在此处用来描述气体状态的、压缩成液体形式的或溶解在含水溶液中的一氧化碳分子。术语“一氧化碳组合物”和“包含一氧化碳的药物组合物”在整个说明书中用来指可以对患者和/或某一器官例如受 HS 影响的器官施用的包含一氧化碳的气态或液态组合物。

熟练的从业人员可以根据给定的应用来判断出优选的药物组合物的形式，例如气体、液体或气液混合形式。

此处所用术语“有效量”和“治疗有效的”是指一段时间里(包括急性或慢性给予，以及周期性或持续给予)能有效地达到预期效果或生理学效果而采用的一氧化碳量或浓度。本发明中使用的一氧化碳的有效量包括，例如，减少受HS影响的具体器官的损伤或一般性地改善患者在HS后的预后的量。此处的术语“治疗”用于描述延缓发作、抑制或缓解病情的有害影响，例如与HS相关或由HS引起的器官损伤/衰竭。

对于气体而言，CO的有效量通常在约0.0000001%至约0.3%重量之间，例如，约0.0001%至约0.25%之间；优选至少约0.001%，例如，至少约0.005%、0.010%、0.02%、0.025%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.08%、0.10%、0.15%、0.20%、0.22%或0.24%重量的一氧化碳。优选范围包括，例如，约0.002%至约0.24%，约0.005%至约0.22%，约0.01%至约0.20%，以及约0.02%至约0.1%重量。对于CO的液体溶液，有效量通常在约0.0001至约0.0044克CO/100克液体之间，例如，至少0.0001、0.0002、0.0004、0.0006、0.0008、0.0010、0.0013、0.0014、0.0015、0.0016、0.0018、0.0020、0.0021、0.0022、0.0024、0.0026、0.0028、0.0030、0.0032、0.0035、0.0037、0.0040或0.0042克CO/100克液体溶液。优选范围包括，例如，约0.0010至约0.0030克CO/100克液体，约0.0015至约0.0026克CO/100克液体，或者是约0.0018至约0.0024克CO/100克液体。熟练的从业人员应理解为可以根据情况使用超出这些范围的用量。

整个说明书中使用的术语“患者”是指根据本发明的方法接受治疗的动物，人类或非人类。本发明清楚地包括了在兽医以及非兽医方面的应用。该术语包括但不限于鸟类、爬行类、两栖类和哺乳类动物，比如人类、其他灵长目动物、猪、啮齿类动物比如小鼠和大鼠、兔子、豚鼠、仓鼠、牛、马、猫、狗、绵羊和山羊。优选的对象是人类、畜禽动物以及猫和狗等家庭宠物。

整个说明书中使用的术语“器官”作为一般性的术语是指动物体内具有特定功能的任何解剖学部分或部件。部分器官(portions of organs)还包括在该术语含义范围内。这样的器官包括但不限于肾、肝、心、肠例如大肠或小肠、胰、脾、脑和肺。

此处所用术语“出血性休克”或“HS”一般是指由循环血容量和/或载氧能力(例如急性或慢性)损失引起的休克。出血性休克(HS/R)以及随后的复苏术引起全身炎症应答并经常导致器官损伤和衰竭。出血性休克后发生的损伤独特之处在于其损伤了所有器官体系。无法满足细胞代谢需求导致快速的组织损伤和器官功能障碍。HS的外在症状包括:例如排尿量降低(例如,少尿或无尿)、毛细血管再充盈延迟、心率增加、冷湿皮肤(cool and clammy skin)、精神状态受损(例如意识错乱、焦虑或嗜睡)、虚弱、以及呼吸速率增加。有经验的从业人员将认识到出血性休克可以由任何导致患者大量失血的因素或病情引起,例如创伤(例如穿透性创伤或钝伤)、外科手术、分娩以及内/外出血。出血性休克的标准治疗是液体复苏。

被认为有患 HS 风险的个体尤其可受益于本发明,主要是因为可在出现任何 HS 迹象前开始预防性治疗。“风险”的个体包括,例如患任何上述病情或具有另一种可使患者存在失血风险的因素例如慢性或遗传的紊乱(例如血友病)的个体。例如,所失血量尚不足以引起 HS 的创伤(例如,慢性创伤、刺伤或外科手术)或胃肠出血的患者可在出现 HS 之前根据本发明的方法进行。

有经验的从业人员将认识到可由通过本领域已知的任何任何方法如通过医师的诊断而确定有患 HS 风险的患者。有经验的从业人员还将认识到一氧化碳组合物不必由给患者进行诊断(或给患者开处方为一氧化碳)的同一人给予患者。一氧化碳组合物可通过例如诊断者和/或开处方者和/或其它个人包括患者自己(例如当患者能够自行服药的情况)给药(和/或监督给药)。

用来治出血性休克的有效量 CO,可以由医生或兽医在诊断患者患有出血性休克或具有与患者发生出血性休克的可能性增加相关的任何风险因素(例如,患者最近曾经或正失血,或者因为例如创伤预期将大量失血)的当天给予患者(或开处方)。患者可以吸入 10 ppm 至 3000 ppm 浓度范围内的 CO,比如,约 100 ppm 至约 800 ppm,约 150 ppm 至约 600 ppm,或者约 200 ppm 至约 500 ppm。优选浓度包括:例如,约 30 ppm、50 ppm、75 ppm、100 ppm、125 ppm、200 ppm、250 ppm、500 ppm、750 ppm 或约 1000 ppm。CO 可以间歇性地或者持续性地给予患者。可以给予 CO 至少约 1、2、4、6、8、10、12、14、18 或 20 天,例如 1、2、3、5 或 6 个月,或一直使用到患者不再

出现病症和紊乱的症状，或一直使用到患者被诊断不再有患 HS 或 HS 后续器官损伤的风险。在给定日期内，CO 可以全天持续给予，或间歇地给予，例如，每天吸一次 CO(这里使用高浓度)，或者每天高达 23 小时，例如每天高达 20、15、12、10、6、3 或 2 小时，或每天高达 1 小时。

- 5 关于医学过程例如外科手术和/或分娩，CO 可以在这些过程实施之前、之中和/或之后全身地或局部地给予患者。患者可以吸入 10 ppm 至 1000 ppm 浓度范围内的 CO，例如，约 100ppm 至约 800 ppm，约 150 ppm 至约 600 ppm，或约 200 ppm 至约 500 ppm。优选浓度包括：例如，约 30 ppm、50 ppm、75 ppm、100 ppm、125 ppm、200 ppm、250 ppm、500 ppm、750 ppm、或
- 10 约 1000 ppm。CO 可以间歇性地或者持续性地在这类过程前给予患者使用至少约 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、6 小时、12 小时、或至少约 1、2、4、6、8、10、12、14、18 或 20 天。它也可以在这些过程即将开始之前的一段时间以及任选在这些过程中持续给予，或在这些过程开始前刚好终止该给药或这些过程之前至少 15 分钟(例如，在手术开始前至少 30 分钟、1
- 15 小时、2 小时、3 小时、6 小时、或 24 小时)。或者或另外，CO 可以在这些过程中给予患者，例如，通过吸入和/或局部给药。或者或另外，CO 也可以在这些过程后给予患者，例如，这些过程一完成即开始，持续给药至少约 1、2、3、5、7 或 10 小时、或约 1、2、5、8、10、20、30、50 或 60 天、1 年、无限制地、或者直至手术后患者不再受 HS 或器官损伤之苦或不再有患 HS
- 20 或器官损伤的风险。

气体组合物的制备

- CO 组合物可以是气体组合物。适用于本发明方法中的压缩或加压气体可以自任何商业途径获得，并且可以装在任何类型的合适储存压缩气体的
- 25 容器内。例如，压缩或加压气体可以从任何提供医用的压缩气体如氧气的来源而获得。此处使用的术语“医用级”气体，是指如此处定义的适合给予患者的气体。本发明中方法所用的包括 CO 在内的加压气体可以以将最终组合物所需要的所有气体(如，CO，He，NO，CO₂，O₂，N₂)放在同一容器内的方式供应，除了 NO 和 O₂ 不能在一起存放。任选地，本发明方法也可以
- 30 通过不同容器分装不同气体的方式来实施。例如，用一个单独的容器存放混合或不混合其他气体的一氧化碳，该容器中的气体可任选与其它容器

中的气体混合，其它容器装有，例如，氧气、氮气、二氧化碳、压缩气体或其他适宜的气体及其混合物。

根据本发明对患者给予的气体组合物典型地包含 0%到约 79%重量的氮气，约 21%到约 100%重量的氧气以及约 0.0000001%到约 0.3%重量(相应于 1 ppb 或 0.001 ppm 至约 3,000 ppm)的 CO。优选地，气体组合物中的氮气体量约为 79%重量，氧气体量约为 21%重量以及 CO 量约为 0.0001%至约 0.25%重量，优选至少约 0.001%，例如，至少约 0.005%、0.01%、0.02%、0.025%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.08%、0.10%、0.15%、0.20%、0.22%或 0.24%重量。CO 的优选范围包括 0.005%至约 0.24%、约 0.01%至约 0.22%、约 0.015%至约 0.20%、约 0.08%至约 0.20%，以及约 0.025%至约 0.1%重量。应注意，根据情况，CO 浓度大于 0.3%(比如 1%或更大)的气体 CO 组合物可适于短期给药(例如，吸一次或若干次)。

气体 CO 组合物可以用来形成含有一氧化碳气体的空气。可以生成包含适当水平的一氧化碳气体的空气，例如，通过使用一个装有包含 CO 的加压气体的容器，并将容器中的加压气体释放到室内或空间内从而在室内或空间内形成包含 CO 气体的空气。或者，气体可以被释放到一种末端有呼吸面罩或呼吸管道的设备里，从而在呼吸面罩或管道里形成包含 CO 的空气，确保空间内只有患者一人可以接受到足够量的 CO。

空气或气流循环中 CO 的水平可以通过本领域已知的任何手段来测量和监测。这些手段包括电化学检测、气相色谱仪、放射性同位素计数、红外吸收、比色法和以选择性膜为基础的电化学方法(见 Sunderman 等, Clin. Chem.28:2026-2032, 1982; Ingi et al., Neuron 16:835-842,1996)。低于百万分之一的一氧化碳水平可以通过例如气相色谱仪以及放射性同位素计数法来测定。此外，本领域已知可以通过中红外气体感受器测量生物组织中 ppm 以下的一氧化碳水平(参见, Morimoto 等, Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol 280:H482-H488,2001)。一氧化碳传感器和气体探测设备可通过广泛的商业途径获得。

液体组合物的制备

包含 CO 的药物组合物也可以是液体组合物。通过本领域已知的可将气体溶解在液体中的方法能够将液体制备成包含 CO 的药物组合物。例如，

可以将液体置于所谓的“CO₂ 孵箱”中并直接接触连续的一氧化碳气流直到液体中的一氧化碳达到期望的浓度。另一个例子，CO 气体可以直接地“吹泡”进入液体直到液体中的 CO 达到期望的浓度。能溶解在给定的水溶液中的 CO 量随着温度的降低而增加。还有一个例子，适当的液体可以流过允许

5 气体扩散的管道，这里的管道通过包含一氧化碳的气体(例如，利用比如体外膜氧合器装置(extracorporeal membrane oxygenator))，或可选择地，将该气体泵穿过管道膜并在该管道外围绕与之相接触的液体。不论哪种方式，CO 都扩散到液体中产生液态一氧化碳药物制品。

很明显，意在引入活体动物中的这样的液体组合物在引入动物体内时

10 最好为或约为 37°C。

该液体可以是本领域技术人员已知的适于给予患者的任何液体(参见，例如，Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Edsv.,Oxford University Press(1994))。一般而言，该液体是水溶液。溶液的例子包括磷酸盐缓冲液(PBS)、CelsiorTM、PerfadexTM、Collins 溶液、柠檬酸盐溶液和威斯康星大学

15 (UW) 溶液(Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt,Edsv.,Oxford University Press(1994))。在本发明的一个实施方案中，该液体是林格溶液，例如，乳酸化的林格溶液，或能够用于流体复苏的任何其它液体。在另一个实例中，该液体包括血液，例如全血、一或多种单个血液成分和/或人工血液替代品。该血液可以完全地或部分地被一氧化碳所饱和。

20 任何合适的液体都能够通过气体扩散器饱和至 CO 的设定浓度。可选择地，可以使用经质量控制至包含设定水平的 CO 的预配制溶液。通过使用与 CO 分析仪相连的气体可透、液体不可透膜进行测量可以实现剂量的精确控制。溶液可以被饱和至期望的有效浓度并维持在这个水平上。

25 使用一氧化碳组合物对患者进行的治疗

可以通过本领域已知的给予患者气体和/或液体的任何方法使用一氧化碳组合物治疗患者。可以对诊断患有和/或有患例如 HS 风险的患者开处方或给予其一氧化碳组合物。本发明包含全身给予患者液体或气体一氧化碳组合物(例如，通过吸入和/或摄入的方式)，以及原位局部将该组合物给予

30 患者的器官(例如，通过摄入、吹入和/或引入腹腔)。该组合物可以由任何人员给予和/或在这些人员的监督下使用，例如卫生保健专业人员、兽医或

护理人员(例如,动物(例如狗或猫)的主人),这取决于接受治疗的患者,和/或由患者自己给予,如果患者具备作这些的能力。除下面描述的给予患者CO的方式以外或作为其替代方式,本发明包含可释放气体CO组合物或液体CO组合物的药物(例如,CO释放胶、乳膏、软膏、锭剂、贴片或绷带)。

5

气体CO的全身给药

可以全身给予患者气体CO组合物,例如,患者被诊断患有HS或确定有患HS的风险。气体CO组合物典型地通过嘴或鼻的吸入至肺部而给予,这里CO易于被患者的血液吸收。在治疗性的气体组合物中活性成分(CO)的浓度将取决于CO吸收、分布、失活和排泄(一般来说是通过呼吸)的速率,以及本领域已知的其他因素。还可理解为对于具体患者,应随时间推移根据个体要求以及负责和监督给予该组合物人员的专业判断而调整具体的剂量方案,这里所显示的浓度范围仅供参考,并非意在限制本发明的实践或范围。可以监测治疗并且调整CO的剂量从而确保患者得到最佳的治疗。本发明包含CO的急性、亚急性和长期给药,其取决于例如患者HS的严重程度。可以在一段足以治疗病症并达到所需药理作用或生物效应的时期内(包括无限期)持续给予患者CO。

下面是一些方法和设备的例子,可用于给予患者气体一氧化碳组合物。

20 呼吸器(Ventilators)

可购得与空气或另一含氧气体混合装于压缩气体标准罐中(例如,21%氧气,79%氮气)的医用级CO(浓度可变化)。它是惰性的,并且本发明方法中要求它的浓度远低于可燃范围(占空气的10%)。在医院里,气体可能会被输送到床边并在混合机中与氧气或室内空气混合至所需的ppm浓度(百万分之几),尽管也可以不需要用氧气或空气进一步稀释的浓度进行提供。患者可通过呼吸器吸入混合气体,基于患者的舒适度和需要设置该呼吸器的流速。这可以由呼吸图测量(即,呼吸速率,肺活量,等)。用来防止患者吸入多余不必要的一氧化碳,传输系统还设置了安全装置(fail-safe mechanism)。患者的CO水平可以通过下述指标监测:(1)碳氧血红蛋白(CO_{Hb}),可在静脉血液中测得;以及(2)由呼吸器侧口收集的呼出的CO量。可以根据患者的健康状态和标记物调节CO接触量。如果需要,可以通过转换至吸入100%

氧气从而排除患者体内的 CO。一氧化碳无法代谢，因此，不论吸入多少量都最终会被呼出，除了很少量的 CO 会转变成 CO₂。CO 也可以与任意量 O₂ 混合以确保输送治疗量 CO 后无缺氧症状。

5 面罩(face mask)和帷罩(tent)

按上述方法制备的包含 CO 的混合气体也可以通过面罩或帷罩让患者吸入。吸入一氧化碳的浓度可以改变，并且可以简单地通过换用 100% O₂ 而将其排除。CO 水平的监测将在面罩或帷罩旁边控制，并且面罩或帷罩旁边还设有可以防止吸入过高 CO 浓度的安全装置。

10

便携式吸入器

压缩的 CO 可以装入便携式吸入设备中，并定量吸入，例如，以供不住院的患者接受间歇性治疗。容器中可以装入不同浓度的 CO。该设备和小罐一样轻便(例如，低于 5 kg)，内含适当稀释的 CO 并且有一个开关阀和吸入管，患者可以按标准方案或需要通过吸入管吸入 CO。

15

静脉内人工肺

设计用来输送 O₂ 排出 CO₂ 的人工肺(用于血液中气体交换的导管设备)可用于 CO 的输送。导管被插入到大静脉中，并且可以以给定浓度向全身或局部部位输送 CO。这种传输可以是短时间内向器官部位如肝脏附近输送高浓度的 CO(高浓度在血流中可被迅速稀释)，或相对长时间的使用低浓度 CO(见，Hattler 等, *Artif. Organs* 18(11):806-812,1994); Golob 等, *ASAIO J.* 47(5):432-437, 2001)。

20

25 正常气压室

在一些情况下，可能需要让患者全部接触 CO 中。患者可能在一个充满 CO 的密封室内(以不会使患者有风险的浓度水平，或者旁人无接触风险、以可以接受的风险浓度水平)。在接触结束前，房间可以用空气或另一种含氧但缺乏 CO 的气体冲洗，并且取样并用 CO 分析仪来检测以确保在患者退出接触系统之前没有残留 CO。

30

液体 CO 组合物的全身给药

本发明更进一步地包括含 CO 的水溶液全身给予患者进行治疗，例如用于口服和/或从静脉、动脉、腹腔和/或皮下注入患者体内。例如，液体 CO 制品如 CO 饱和的 Ringer's 液(林格液)，可以在液体复苏期间注入患有或有患癌症风险的患者体内。

或者或另外，被 CO 部分或完全饱和的全(或部分)血也可以输注入患者体内以治疗或预防 HS。熟练的从业人员将认识到血液中 CO 的水平将通过研究血液中碳氧血红蛋白(COHb)的量而进行监测。例如，被 CO 部分饱和的血液显示了碳氧血红蛋白的量高于 10%，例如高于 15、25、30、50 或 90%，或更多的 COHb。全部或部分血液(如血浆)可以通过任何本领域已知的方法部分地或完全地被 CO 饱和。将气体比如 CO 引入血样(例如所捐献的血液)的例示性方法，但不是唯一已知的方法描述于 US 5,476,764 中，其在此全部引入作为参考。这样的方法还可用于制备用于输注入患者体内的 CO 饱和(或部分饱和)的血液。熟练的从业人员将认识到 CO 可以在从供血者取血后立即将 CO 引入血库的血液中；或在即将向患者体内输血之前(例如，由在事发现场的急救人员)；或在供血后输注前的存储或运输过程中。

CO 的局部器官治疗

或者或另外，CO 组合物也可以直接应用于患有或有患出血性休克风险的患者器官。气体组合物还可以通过本领域已知的任何气体吹入方法直接应用于患者的器官。在一个已知的为了其他目的的吹入例证中，气体例如二氧化碳分别在内窥镜和腹腔镜过程中被吹入患者胃肠道和腹腔以便于检测(参见，例如，Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994))。熟练的从业人员将理解为类似的方法可以用于将 CO 组合物直接给予给患者的器官。

液体 CO 组合物还可以局部用于患者的器官。组合物的液体形式可以通过本领域已知的给予患者液体的任何方法给药。例如，液体组合物可以口服，例如让患者摄入液体 CO 组合物的包封的或未包封的剂型。另一个例子，可以将液体比如包含溶解的 CO 的盐水等注射进 HS 患者的胃肠道和/或腹腔内。此外，可以使用液体一氧化碳组合物冲洗器官进行原位暴露(参见 Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press

(1994))。

血氧加和酶-1(hemoxygenase-1)及其它化合物的应用

本发明还包含与一氧化碳联合使用的血氧加和酶-1(HO-1)的诱导、表达
5 和/或给药。可以通过在患者体内诱导或表达 HO-1 而向患者提供 HO-1，或者直接给予患者外源性 HO-1。此处使用的术语“诱导”意指在离体细胞或组织、器官及动物细胞中利用细胞自身的内源性编码蛋白的(如，非重组的)基因导致蛋白例如 HO-1 生成的增加。

HO-1 可以通过本领域已知的任何方法在患者体内诱导。比如，HO-1
10 可分别由氯化高铁血红蛋白、铁血红蛋白、钴血红蛋白诱导。很多非血红素物质包括重金属、细胞因子、激素、一氧化氮(NO)、COCl₂、内毒素以及热休克也是 HO-1 表达的强诱导剂(Choi 等, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:517-554, 1997; 以及 Tenhunen 等., *J. Lab. Clin. Med.* 75: 410-421, 1970)。还可以通过很多产生氧化压力物质高度诱导 HO-1，包括过氧化氢、谷胱甘肽清除剂、紫外照射、内毒素和体内氧过多(Choi 等, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554, 1997; 和 Keyse 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:99-103, 1989)。或者或另外，HO-1 蛋白可直接在例如脂质体中给予患者。“包含 HO-1 诱导剂的药物组合物”意指包含任何能
15 在患者体内诱导 HO-1 的药物组合物，例如，上述任何物质比如 NO、氯化高铁血红蛋白、铁血红蛋白和/或钴血红蛋白。

HO-1 在细胞内的表达可以通过基因转移提高。此处所用的术语“表达”意指在离体细胞或组织、器官及动物细胞中利用外源性(如，重组的)基因导致某种蛋白质如 HO-1 或铁蛋白生成的增加。HO-1 或铁蛋白优选是与患者
25 为同一种属(例如，人类、小鼠、大鼠，等等)，从而使任何免疫反应最小化。通过构成的启动子(例如巨细胞病毒启动子)或组织特异性启动子(例如用于哺乳类细胞的乳清启动子，或用于肝细胞的白蛋白启动子)引发表达。编码 HO-1 或铁蛋白的合适的基因治疗载体(例如，逆转录酶病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、痘病毒(比如牛痘病毒)、人免疫缺损病毒(HIV)、小鼠微小病毒(the minute virus of mice)、乙型肝炎病毒、流感病毒、单纯疱疹病毒-1 和慢病毒)可通过口服、吸入或局部注射给予患者以治疗这里描述的紊乱或病
30

症。特别优选在 HS 发生之前、之间和/或之后直接对病症部位局部给药。类似地，还可以使用编码 HO-1 或去铁铁蛋白的质粒载体，例如，以裸露的 DNA，在脂质体或微粒体中。

此外，外源性 HO-1 蛋白可以通过本领域已知的任何方法直接给予患者。除此以外或作为替代性方法，外源性 HO-1 可直接用于上述的患者以诱导或表达 HO-1。HO-1 蛋白可以例如以脂质体和/或融合蛋白例如 TAT-融合蛋白的形式(参见 Becker-Hapak 等, Methods 24, 247-256 (2001))给予患者。

或者或另外，HO-1 的任何代谢产物例如胆红素(bilirubin)、胆绿素(biliverdin)、铁和/或铁蛋白可以与 CO 一起给予患有或有患 HS 风险的患者。进一步地，本发明还包括除铁蛋白之外的铁结合分子，例如去铁敏(DFO)、铁葡聚糖和/或去铁铁蛋白，也可以给予患者。此外，本发明还包括抑制催化这些产物分解的酶(如胆绿素还原酶)以产生/增强所需要的效果。以上任何物质可以经例如口服、静脉内、腹膜内或局部给药。

本发明还包括，在给药后能在体内释放 CO 的化合物(例如，释放 CO 的化合物，例如光敏的释放 CO 的化合物)，例如，金属羰基化合物，十羰基二锰，三羰基二氯化钨(II)二聚体和二氯甲烷(例如，剂量在 400 至 600mg/kg 之间，例如约 500mg/kg)，如碳氧血红蛋白和供给 CO 的血球蛋白(CO-donating hemoglobin)替代物一样也可以用于本发明方法。

上述物质可以任何方式给予患者，例如通过口服、腹腔、静脉或动脉给药等。任何上述任何化合物可经局部和/或全身给予患者，并可以联合使用。

联合疗法

本发明还包括在至少联合一项其它治疗方法的情况下给予患者 CO 以预防/治疗出血性休克。这样的治疗包括，例如控制出血的方法(例如压迫外部的出血点)和外科手术(例如给患者止血)。还可以进行全血输注，也可以输注部分血液(即一种或多种单独的血液成分(例如包装的红细胞、血小板、血浆和/或凝结因子沉淀物))以及血液(或单独的血液成分)与其他液体(例如稀释的全血或单独的血液成分)的混合物。口服和/或静脉内补水、液体复苏(例如，使用类晶体(crystalloid)、胶体(collid)或血液产品)、充氧、作用于血管的药物治疗(例如，给予收缩性(例如多巴胺和多巴酚丁胺)和/或血管收

缩剂(例如去氧肾上腺素、去甲肾上腺素和肾上腺素))以及抗生素(例如广谱抗生素)疗法等也可用于治疗或预防 HS。

下文的实施例部分阐述了本发明的内容,其并没有以任何方式限制了本发明。

5

实施例 1. 给予 CO 保护经受 HS/R 的动物器官

下述的研究证明了 CO 可以防止 HS/R 模型中的器官损伤。在出血性休克-诱发的多器官衰竭的小鼠模型中,接触低浓度的 CO 对出血性休克和复苏必然导致的炎症后遗症以及最终的器官损伤产生了有效的防御。CO 有效地抑制休克-诱发的肺、肝以及肠的损伤,分别测定了髓过氧化物酶活性、血清丙氨酸转氨酶水平的降低以及肠构建的变化。此外,CO 反常地消除了失血-诱发的肝细胞缺氧。总之,这些结果证明了 CO 在出血性休克-诱发的器官损伤中的保护性作用。

由于 HS 是全身性损伤,作为治疗剂的 CO 具有几种潜在的益处。例如,CO 可到达所有组织,并因此可在各器官内消除损伤的进程同时降低循环炎症细胞的激活。另一个例子,CO 可作为例如吸入剂在现场由急救医疗人员方便地给予(例如,通过面罩和/或气管)。

动物和出血性休克

在小鼠中诱发出血性休克的方法如下:重量为 20-26 克的 C57/BL6 或 $il-10^{-/-}$ 小鼠(Jackson Laboratories)(n=3/组)经戊巴比妥(70 mg/kg; IP)麻醉。对右和左股动脉进行插管。左动脉插管与监视器相连以追踪 MAP 和心率。10 分钟内,经右插管取血同时监测血压以达到 25 mmHg 的 MAP。必要时将血液取出且返回至动物体内从而维持 25 mmHg 的 MAP。假性对照动物(sham animal)被插管但经受失血。在休克期末(90-150 分钟),于 15-30 分钟内使用流出的血液外加两倍体积的林格乳酸盐溶液进行复苏。复苏开始 4-24 小时后处死动物,采集血液、肝、肺和肠。

细胞因子和血清 ALT 测量

根据制造商的说明通过酶联免疫吸附试验(ELISA)(R&D system)测定细胞因子白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白介素-10(IL-10)的血清

水平。测量这些细胞因子的原因在于它们介导炎症。促-炎症细胞因子水平在出血性休克后会增加并可以加重血液动力学并促成多器官功能障碍的发生。

- 5 血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平的色度法分析可用来确定是否在经受 HS/R 的小鼠体内发生了肝损伤。该丙氨酸转氨酶测试是被称为肝功能测试的一组测试之一，并用于监测肝损伤。丙氨酸转氨酶在肝中正常表达且在正常情况下其在血清样品中的水平非常低。血清中 ALT 水平增加预示了肝细胞死亡和/或肝衰竭。

10 髓过氧化酶活性

- 经如下方法观察肺中 MOP 活性：切除肺，在盐水中洗涤并在液氮中冷冻。解冻样品并在 20 mmol/L 磷酸钾(pH 7.4)中匀浆。4℃下于 15,000 x g 离心样品 30 分钟形成片状沉淀物。将该片状沉淀物再次悬浮于包含 0.5 % hexadecyltrimethylammonium bromide 的 50 mmol/L 磷酸钾(pH 6.0)中。样品经
15 超声波后在 4℃下于 15,000 x g 离心 10 分钟。然后将 5 微升上清液加入 196 μL 包含 530 nmol/L o-邻联二茴香胺和 150 nmol/L H₂O₂ 的 50 mmol/L 磷酸钾 (pH 6.0) 的反应缓冲液中。读取吸光度(490 nm 和 620 nm)并与标准物进行比较。使用 bicinchoninic assay(BCA)测定样品中的蛋白含量。结果标准化为含有蛋白的总量。

20

缺氧显像(Hypoxic imaging)

- 观察 EF5(2-[2-硝基-1H-咪唑-1-基]-N-(2,2,3,3,3-五氟丙基)乙酰胺)的摄取以监测组织缺氧的技术已充分建立起来并且是可靠的。EF5 的转运和染色按照如下方法进行：在休克发作 30 分钟后给各只动物提供 EF5(10 μl/g 的
25 10 mM 储备液；ip；缺氧显像组，University of pennsylvania)。休克发作 90 分钟后处死动物，采集肝并根据制造商的方案进行 EF5 的免疫组化分析。通过测量每只动物 10 张不同切片的平均荧光确定染色的强度(n=5 每组；MetaMorph®)。EF5 是可被所有细胞吸收并还原的硝基咪唑。在含氧量正常的情况下，电子从还原型 EF5 转移至氧，形成电子的“无效循环”。在缺氧
30 情况下，硝基咪唑进一步还原形成亚硝基以及羟氨。这些形式的化合物与细胞内蛋白不可逆地结合，其可经免疫组化检测。这样，EF5 结合的程度可

用于间接测量氧张力。在体内，阳性 EF5 染色与组织缺氧直接相关。

组织学

5 冲洗所收集的肠并在 2% 多聚甲醛中固定 2 小时，然后在 30% 蔗糖中固定 12 小时。在冷的 2-甲基丁烷中缓慢冷冻样本。使用苏木精和曙红(H&E)染色并评价结构上的变化。

CO 暴露

10 小鼠暴露于浓度为 250 ppm 的 CO。简言之，将含 1% CO 的空气与空气(21% 氧气)在不锈钢圆筒中混合，然后以 12 L/分钟的流速引入 3.70 ft³ 玻璃暴露室中。使用 CO 分析仪(Interscan, Chatsworth, CA) 持续测量室中的 CO 水平。在所有时间里将 CO 浓度维持在 250 ppm。如需要，将小鼠置于暴露室中。

15 在大多数试验中，在整个 HS/R 期间使用 CO(250 ppm)或标准的室内空气(对照)暴露小鼠，即在 HS 期开始 2.5 小时时开始给予 CO 并在液体复苏期 4 小时后终止给予。但是，在一次试验中(其液体复苏进行了 24 小时)，仅在液体复苏期间使用 CO 或室内空气处理小鼠(参见附图 5)。在所有情况下，在复苏期之后处死小鼠。

20 在出血性休克且复苏的模型中一氧化碳防止多器官损伤

吸入的一氧化碳不影响中枢血流动力学

假性对照动物和休克动物均如前述经麻醉并插入了动脉和静脉插管。在“休克”全过程内监测假性对照组和休克组的平均动脉血压(MAP)。与空气对照相比，CO 处理(250 ppm)没有改变假手术小鼠的 MAP 或心率。同样
25 的，为了达到 25 mmHg 的 MAP 而流出的出血体积对 CO-处理的小鼠和空气-处理的小鼠均是相同的。25 mmHg 的 MAP 在本领域中被认为是在小鼠中产生出血性休克的水平。尽管已知 CO 可活化溶解的鸟苷酸环化酶并具有血管扩张性质，但在本研究所应用的剂量下无法测量其对全身血压的影响。表 1(如下)举例说明了给予 CO 并不影响健康小鼠的 MAP。此外，表 1 显示
30 给予 CO 不影响为了达到 25 mmHg 的 MAP 而需要从小鼠体内移出的血液体积。

表 1

	MAP(假性) mmHg	流出的血液(休克)mL
空气	67.2 ± 5.1	0.72 ± 0.8
CO	68.9 ± 6.0	0.69 ± 0.6

CO 减少 HS/R-诱发的血清 IL-6 并增加 HS/R-诱发的血清 IL-10 水平
促-炎症细胞因子比如 IL-6 水平在出血性休克后增加。这些细胞因子可
5 恶化血流动力学并促进多器官功能障碍的发生。因此,考察了 CO 对 HS/R-
诱发的血清 IL-6 水平增加的影响。在复苏术 4 小时后考察细胞因子水平。
HS/R 组中血清 IL-6 水平较假性对照组高 2.82 倍(附图 1; P<0.05)。IL-6 的
这一增加在使用 CO 处理的动物中显著地消失(与未处理的 HS/R 小鼠相比
P<0.05)。因而,给予 CO 导致经受 HS/R 动物体内血清 IL-6 水平降低。CO-
10 诱发的 IL-6 降低可能是 CO 导致保护作用的一个重要机制。

此外,考察了 CO 对血清 IL-10(抗炎性细胞因子)的作用。在这一 HS/R
模型中,CO 处理使得休克小鼠的血清 IL-10 水平增加了 5.4 倍(附图 2; 与
假性对照或休克对照组相比 P<0.05)。因此给予 CO 导致经受 HS/R 动物体
15 内血清 IL-10 水平增加。CO-诱发的这种抗炎细胞因子水平的增加可能是 CO
导致保护作用的另一个重要机制。

CO 降低 HS/R 后的肝、肺和肠损伤

研究了 CO 是否可以保护器官免受 HS/R 诱发的损伤。如前述复苏术 4
小时后采集血清、肝、肺和肠。通过研究血清 ALT(附图 3)、肺 MPO 活性(附
20 图 6)和肠组织学(附图 4A 至 4D)分别考察肝、肺和肠损伤。在所有情况下,
HS/R 导致损伤和组织损害(参见附图 3、4B 和 6)。CO 处理,尽管在假动物
中没有可测量的作用,保护免受这些损伤。与未处理的小鼠相比,在接受
HS/R 的动物中,CO 显著地降低血清 ALT(附图 3)和肺 MPO 活性(附图
6)(P<0.05)。关于肠损伤,CO-处理的休克小鼠(附图 4D)的肠组织学与 CO-
25 和空气-处理的假性对照组极为相似(分别参见附图 4C 和 4A)。因此,给予
CO 显示可减少经受 HS/R 动物的肝、肺和肠损伤。

治疗性 CO 可防止器官损伤

在所有前述试验中,CO 处理与动物失血同时开始。因此,考察了在修
30 复期开始给予 CO 是否防止器官损伤。小鼠经受 2.5 小时的 HS,随后进行

24 小时液体复苏。在液体复苏期(并不在 HS 期间)给予小鼠 CO。尽管在复苏期开始 CO 处理 4 小时后显著改善了肺 MPO 活性(附图 5A),但在复苏后 4 小时时的检测没有证明可保护免受肝损伤(没有列出数据)。然而,在较晚时间点(复苏术后 24 小时)测验肝损伤时,与未处理的休克小鼠相比,CO-
5 处理的小鼠显著地降低了血清 ALT 水平(附图 5B)。因而,给予 CO 显示即使当 CO 处理延缓至开始液体复苏时也充分地减少了经受 HS/R 动物的肝损伤/衰竭。

一氧化碳降低肝缺氧

10 CO 可导致保护作用的一个机制可能是降低失血-诱发的组织缺氧。CO 对组织缺氧的作用可通过利用硝基咪唑 EF5 进行考察。在缺氧条件下,EF5 被还原并与细胞内蛋白不可逆结合。对此化合物免疫染色的样品用于监测细胞缺氧。假性对照小鼠以及休克小鼠经 CO(250 ppm; 在休克发作时开始)处理或不处理。在休克发作后 30 分钟将 EF5(10 μ l/g 的 10 mM 储备液; ip)
15 给予给各只动物。休克开始 90 分钟后处死动物,并如前述采集肝用于 EF5 的免疫组化分析。与空气-处理的假性对照组相比,空气-处理的休克小鼠肝内 EF5 染色增加了 17 ± 1.7 倍($P < 0.01$, 附图 7)。EF5 染色在中枢静脉周围的增加最为明显。CO 处理降低了休克动物肝中 EF5 染色,与空气-处理的假性对照组相比仅导致了 3.7 ± 0.7 倍的增加(与空气-处理的休克小鼠相比,
20 $P < 0.05$)。与空气-处理的假性对照组相比,CO-处理的假性对照组没有显示肝缺氧的增加。这些数据表明 CO 减低了伴随失血发生的组织缺氧。

在 il-10^{-/-}小鼠中 CO 不防止器官损伤

25 为了确定保护是否与 CO 增加 IL-10 表达的能力部分相关,在 IL-10-缺陷小鼠(il-10^{-/-})中进行了给予和不给予 CO 的 HS/R。分别使用肺 MPO 活性和血清 ALT 作为肺和肝损伤的测量尺度,在那些小鼠中 CO 没有显示防止 HS/R-诱发的器官损伤(参见附图 8A 和 8B)。这些结果与 IL-10 可能介导某些 CO 的保护作用的假设相一致。然而,如 HS/R 之后 ALT 和 MPO 增加量更大所例证的那样,与它们遗传上匹配的野生型(C57/BL6)相比,在这些
30 il-10^{-/-}小鼠中 HS/R-诱发损伤更加显著。il-10^{-/-}小鼠对于损伤增加的敏感性和对失血加重的应答可以解释 CO 无法在这些小鼠中产生保护作用的原因。

本发明已描述了大量的实施方案。然而,将理解为可在不偏离本发明的精神和范围内进行各种改变。因此,本发明权利要求的范围内包含其它的实施方案。

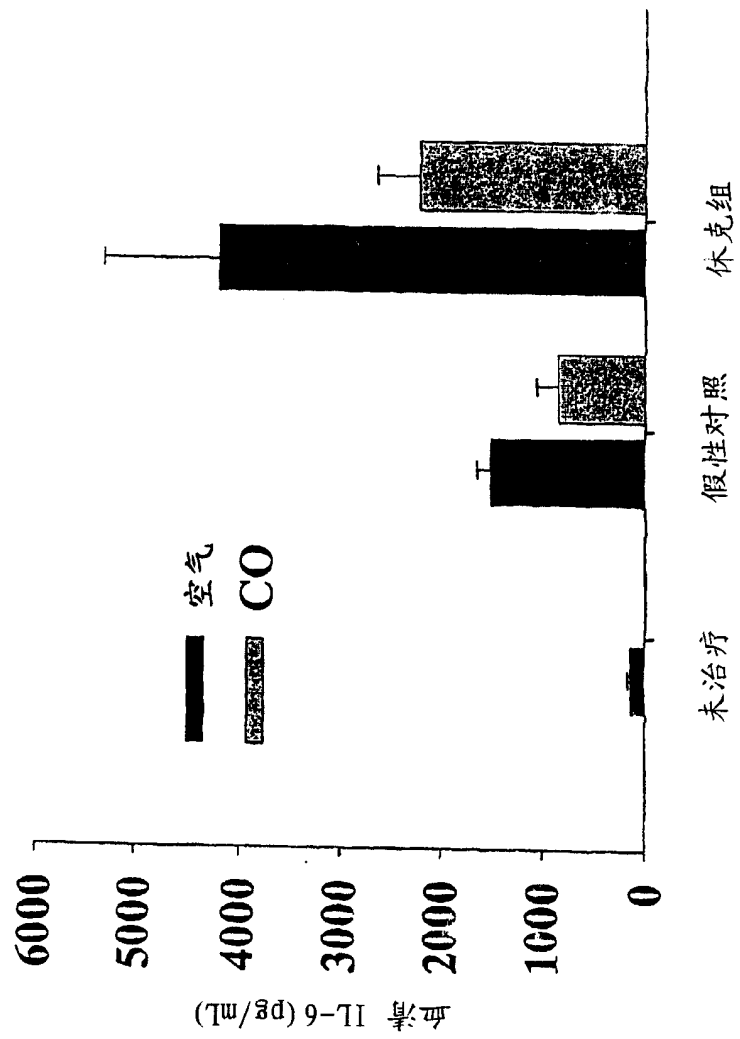


图 1

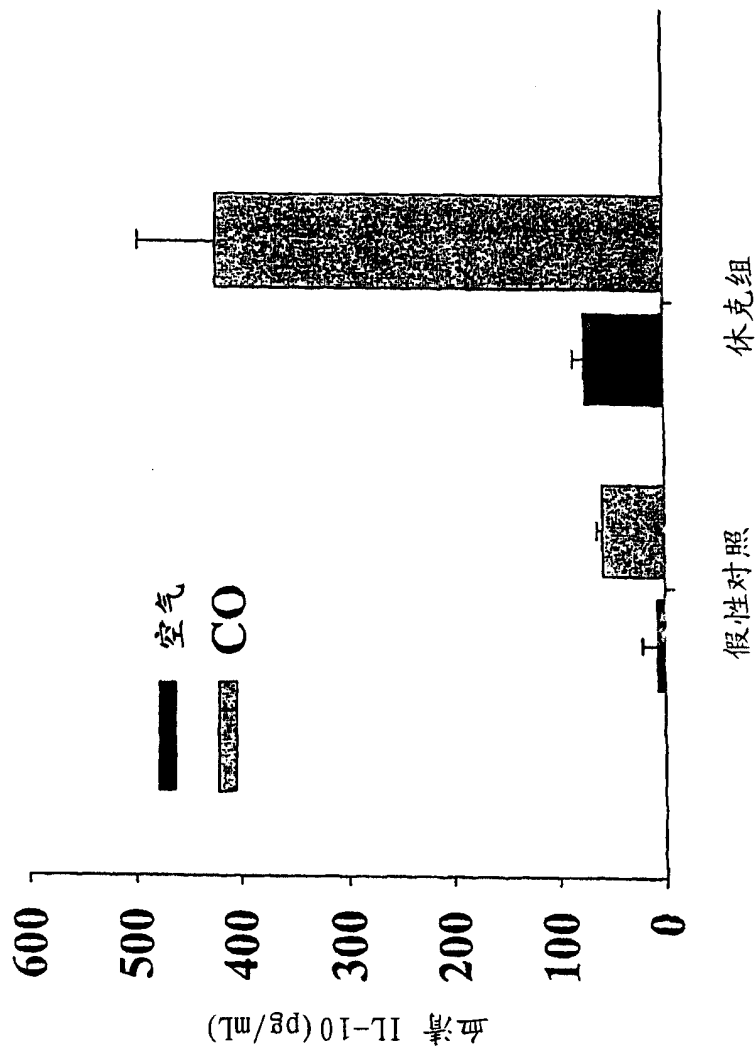


图 2

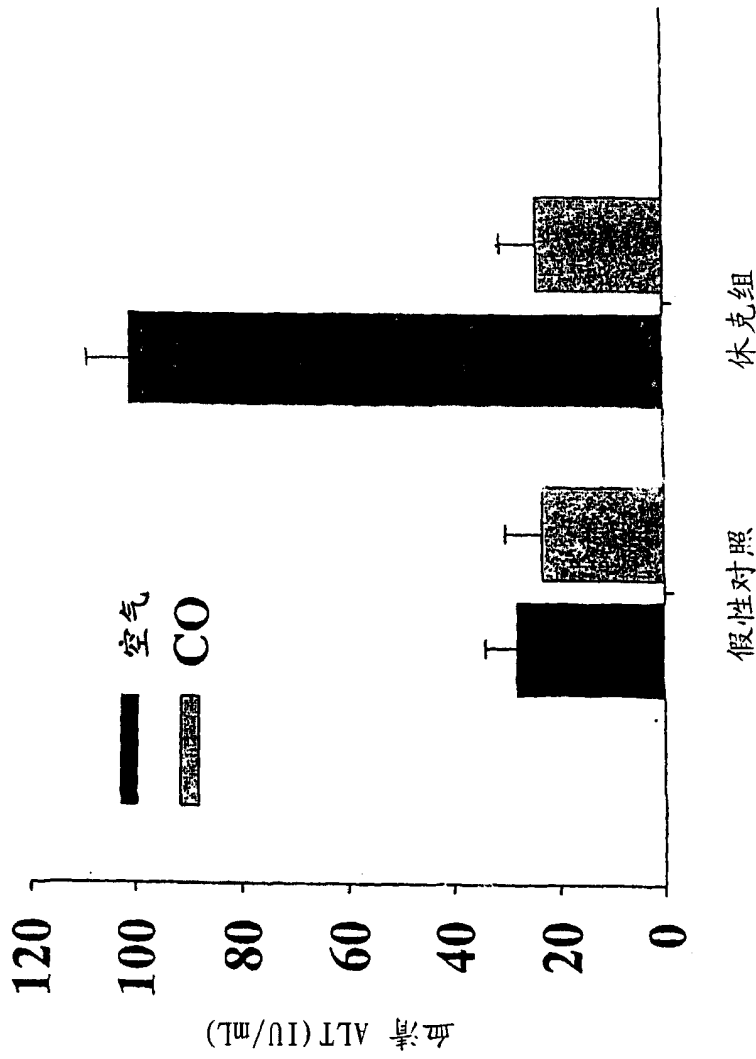


图 3

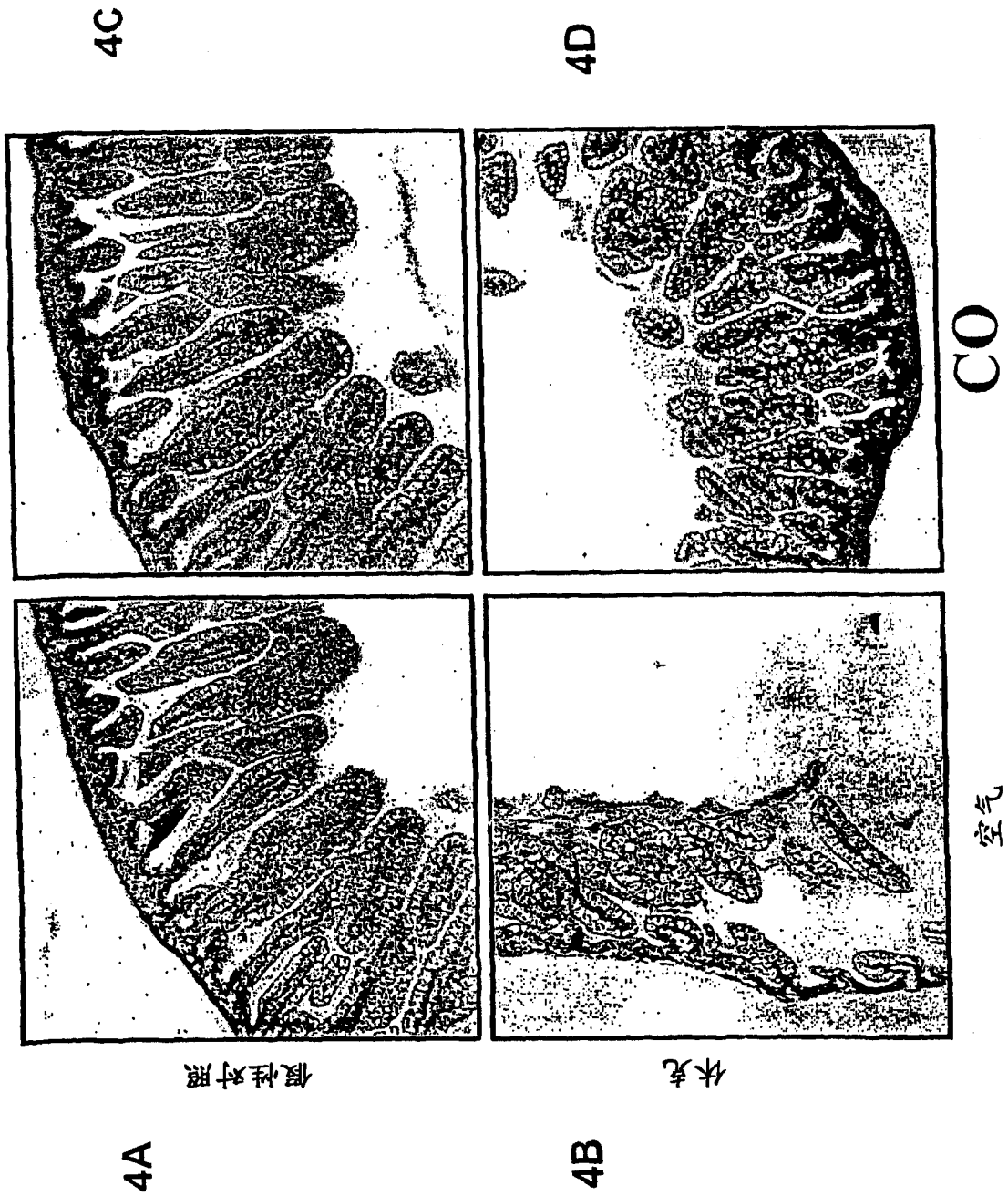


图 4A-4D

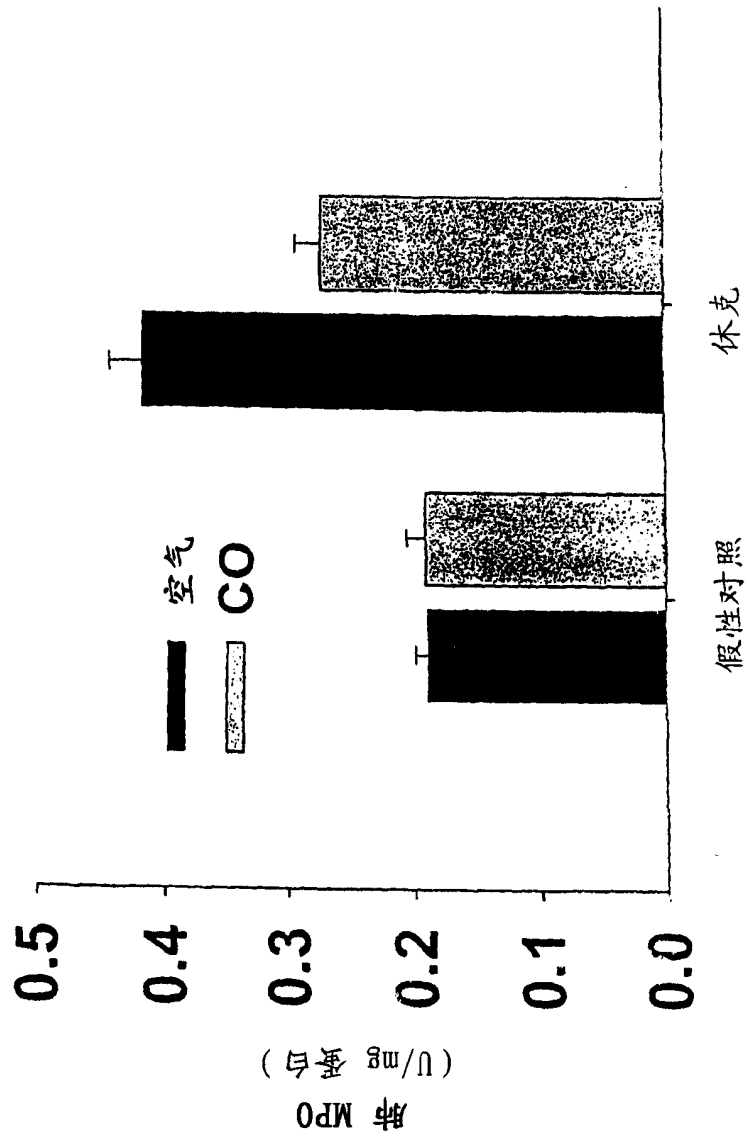


图 5A

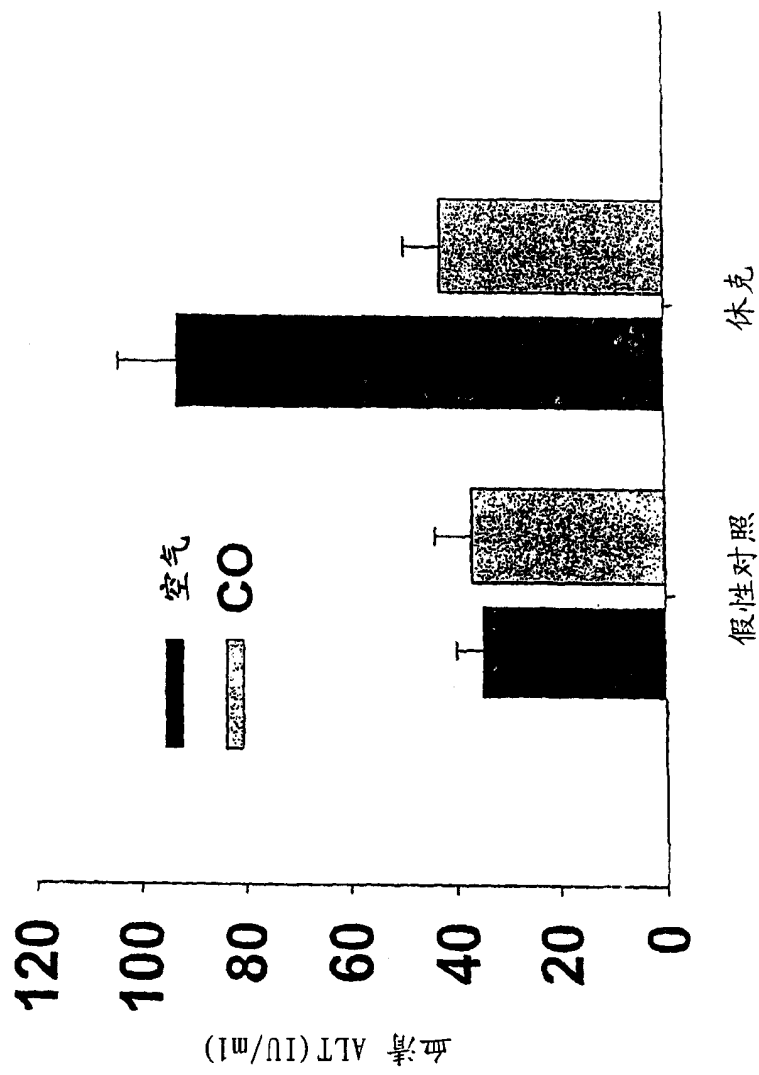


图 5B

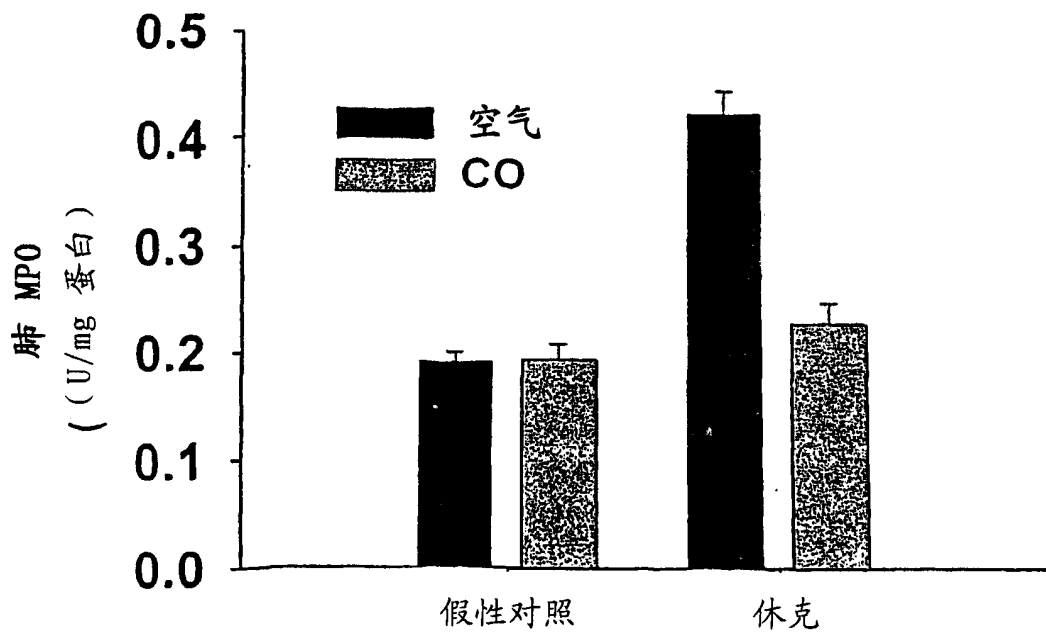


图 6

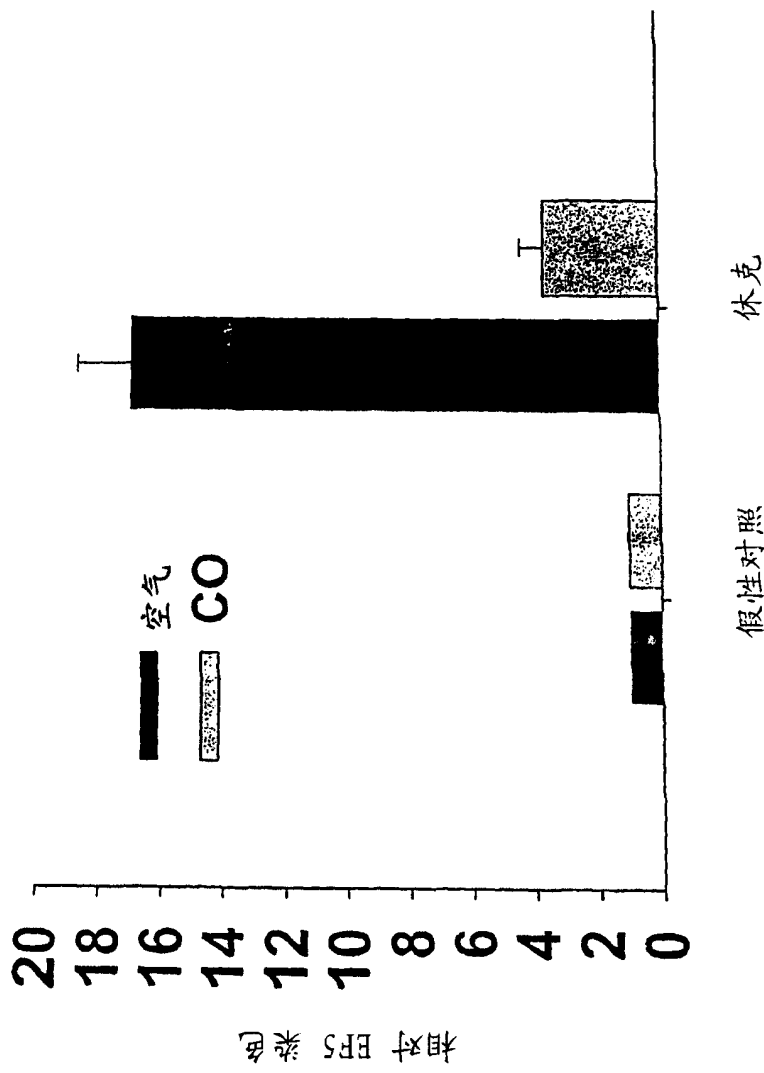


图 7

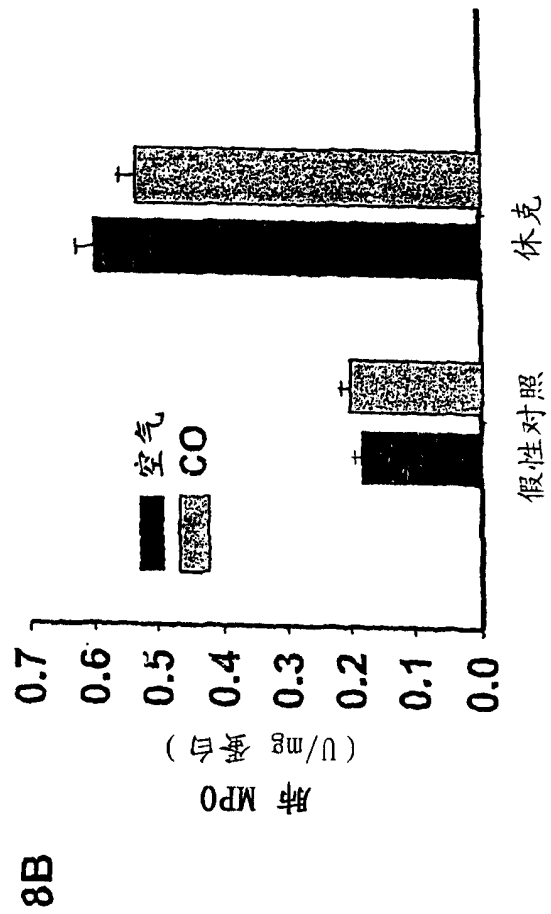
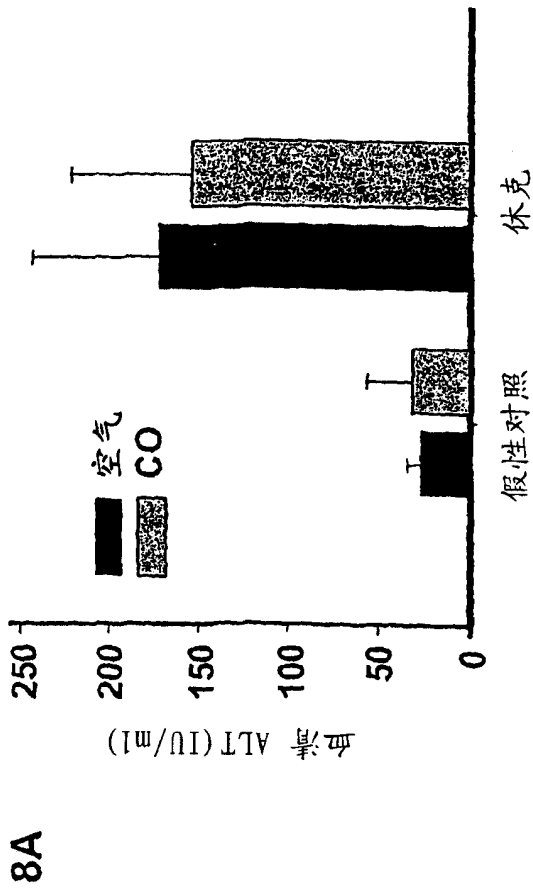


图 8A-8B