(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111432845 B
(45)授权公告日 2024.02.06

(21)申请号 201880062272.0

(22)申请日 2018.07.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111432845 A

(43)申请公布日 2020.07.17

(30)优先权数据
62/537,049 2017.07.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/043821 2018.07.26

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/023418 EN 2019.01.31

(73)专利权人 詹森药业有限公司
地址 比利时贝尔瑟

(72)发明人 G·艾肯鲍姆 A·托内利

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 曹雯 黄歆

(51)Int.Cl.
A61K 47/60(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2008119384A12008.05.22
US 2008119384 A1,2008.05.22
WO 2007087428 A2,2007.08.02
WO 9640750 A1,1996.12.19
WO 2005023834 A2,2005.03.17
WO 9825965 A2,1998.06.18
CN 1895276 A,2007.01.17
孔宪明等主编.《心血管疾病诊疗技术》.人民卫生出版社,2001,第779-780页.
李慧文 李航编著.血小板及其捐献与输注.《血小板及其捐献与输注》.中国科学技术出版社,2017,第15页.
Masaru Yamaguchi et al..Thrombopoietin-Mimetic Romiplostim Confers the Complete Survival Rate to Mice Exposed to Lethal Ionizing Radiation.《Blood》.2015,第126卷(第23期),第2390页.
D.D.WAGNER et al..How platelets safeguard vascular integrity.《Journal of Thrombosis and Haemostasis》.2011,第9卷第56-65页.
Robert Pirker et al..Anemia in Lung Cancer: Clinical Impact and Management.《Clinical Lung Cancer》.2003,第5卷(第2期),第90-97页.
Kathleen A. Ashcraft et al..Application of a Novel Murine Ear Vein Model to Evaluate the Effects of a Vascular Radioprotectant on Radiation-Induced Vascular Permeability and Leukocyte Adhesion.《RADIATION RESEARCH》.2018,第190卷第12-21页.

审查员 于彦民

权利要求书1页 说明书24页
序列表3页 附图12页

(54)发明名称

保护靶向放射治疗诱导下的血管完整性的方法

(57)摘要

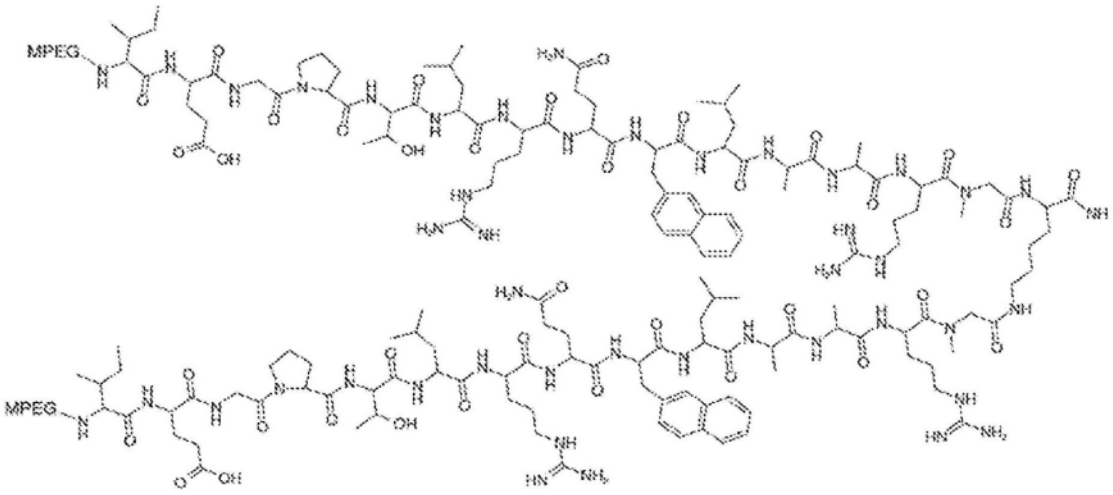
本发明涉及保护暴露于靶向放射治疗的受试者的血管完整性的方法。具体而言,在放射治疗后将有效量的血小板生成素(TPO)模拟物(例如TPOm)用于保护血管完整性。

CN 111432845 B

1.血小板生成素(TPO)模拟物在制备用于保护暴露于靶向放射治疗的受试者的血管完整性的药物中的用途,其中

所述血小板生成素(TPO)模拟物选自:

具有以下式(I)的结构的RWJ-800088或其药学上可接受的盐或酯:



式(I)

其中MPEG代表甲氧基聚乙二醇20000;

和

包含SEQ ID NO:4的罗米洛司汀;

所述保护血管完整性是指:

保护接受靶向放射治疗的受试者免于阴部动脉血管舒张受损;

或

减少接受靶向放射治疗的受试者的血管收缩。

2.权利要求1的用途,其中所述暴露于靶向放射治疗的受试者正在接受癌症治疗。

3.权利要求2的用途,其中所述癌症选自前列腺癌、头颈癌、肝细胞癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、胰腺癌和乳腺癌。

4.权利要求1至3中任一项的用途,其中在所述受试者暴露于放射后10分钟至420分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

5.权利要求4的用途,其中在所述受试者暴露于放射后20分钟至360分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

6.权利要求5的用途,其中在所述受试者暴露于放射后40分钟至240分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

7.权利要求6的用途,其中在所述受试者暴露于放射后60分钟至180分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

8.权利要求1至3中任一项的用途,其中所述靶向放射治疗选自体外射束放射治疗、内部放射治疗和全身放射性同位素治疗。

9.权利要求1至3中任一项的用途,其中以10-70戈瑞(Gy)的剂量给予靶向放射。

保护靶向放射治疗诱导下的血管完整性的方法

[0001] 电子提交的序列表的引用

[0002] 本申请包含序列表,通过EFS-Web电子提交的ASCII格式的序列表文件名为“序列表”,创建日期为2018年7月24日,大小为3.7kb。通过EFS-Web提交的序列表是本说明书的一部分,并全部援引并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及保护血管完整性的方法,更具体地,涉及保护暴露于靶向放射治疗的受试者的血管完整性的方法。所述方法包括向受试者给药有效量的血小板生成素(TPO)模拟物。

背景技术

[0004] 急性放射综合症(ARS),也称为放射毒性(radiation toxicity)或放射病(radiation sickness),是由高剂量的穿透性放射物在很短的时间内照射(irradiation)整个身体(或身体的大部分)引起的急性疾病。这是一个可能导致发病和死亡的多阶段的过程(Waselenko et al.,Ann.Intern Med.140(12):1037-51(2004))。照射的直接作用在脉管系统内观察到,随后是明显的造血作用(Krigsfeld et al.,Radiat.Res.180(3):231-4(2013))。照射后24小时内,血管内皮细胞表达粘附分子(例如L-选择素),其促进白细胞粘附和外渗,并可以导致炎症反应(Hallahan et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.217(3):784-95(1995);Hallahan et al.,Radiat.Res.152(1):6-13(1999))。这些早期的血管效应可能伴随着基底膜的暴露和出血,然后导致微小血凝块形成。根据微小血凝块形成的程度,这可能会导致血小板减少和纤溶因子减少。由于造血干细胞因照射减少,减少的血小板不能得到高效的补充,继而发生血小板减少症,导致血管进一步变薄并发展为弥散性血管内凝血病。因此,保护血管内皮可减轻放射性损伤和死亡(Rotolo et al.,J.Clin.Invest.122(5):1786-90(2012))。

[0005] 经受放射暴露导致周围正常组织受伤的发病机理很复杂。电离放射通过直接的细胞毒性(活性氧的过量生成)、炎症和固有免疫应答而导致实质性的和血管性的细胞死亡(Kim et al.,Radiat.Oncol.J.32(3):103-15(2014))。有些变化是急性发生的(即炎症、血管内皮损伤、微出血),而其他变化在放射暴露后数周至数月显现出来(即慢性炎症、神经功能障碍、瘢痕形成和纤维化)。成纤维细胞增殖是晚期放射治疗(RT)损伤的关键组分(Brush et al.,Semin.Radiat.Oncol.17(2):121-30(2007))。

[0006] 鉴于放射诱导的发病率和死亡率的多个方面源于血小板减少,一些研究者评估了基于血小板生成素(TPO)的疗法在预防急性放射综合症方面是否有效(Mouthon et al.,Can.J.Physiol.Pharmacol.80(7):717-21(2002);Neelis et al.,Blood 90(7):2565-73(1997))。生存期延长的潜在机制包括其骨髓保护作用和血小板刺激作用以及对血管内皮的直接的保护作用和/或修复作用。血小板生成素(TPO)是一种由肝脏合成和分泌的生长因子。TPO通过与巨核细胞上的c-mpl结合(以刺激血小板成熟)以及与现存血小板上的c-mpl

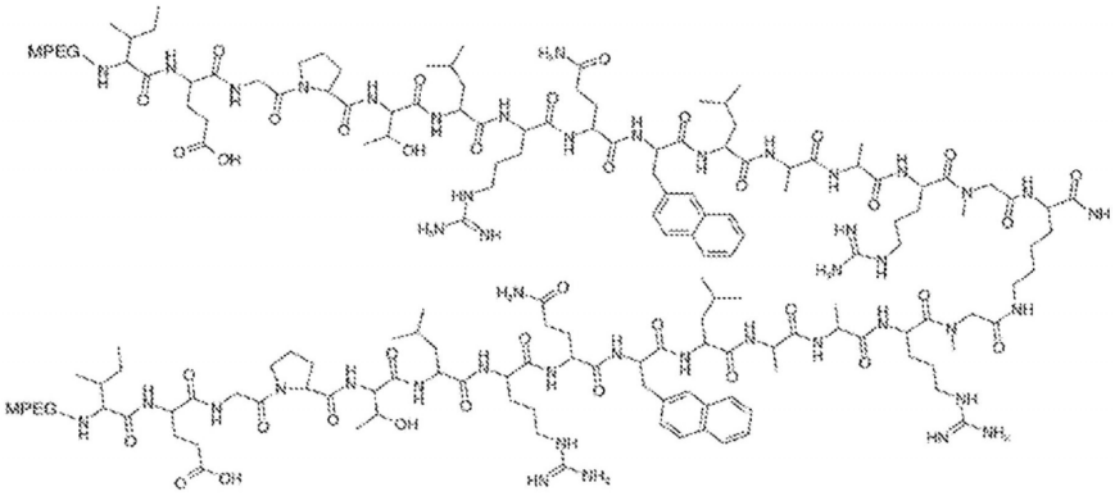
结合(以提供负反馈)来调节血小板水平(Mitchell and Bussell,Semin.Hematol.52(1):46-52(2015))。TPO还可以通过与位于血管内皮细胞上的c-mpl受体结合而直接作用于脉管系统(Langer et al.,J.Mol.Cell Cardiol.47(2):315-25(2009))。有几项研究表明血小板生成素在阿霉素(doxorubicin)介导的心血管损伤(Chan et al.,Eur.J.Heart Fail.13(4):366-76(2011))、心血管缺血再灌注损伤(Baker et al.,Cardiovasc.Res.77(1):44-53(2008))和中风(Zhou et al.,J.Cereb Blood Flow Metab.31(3):924-33(2011))的动物模型中具有直接的血管保护作用。然而,由于抗内源性TPO的交叉反应抗体的诱导可导致慢性血小板减少症,因此重组人TPO疗法在人体中不可行(Li et al.,Blood 98(12):3241-8(2001))。

[0007] 靶向放射,例如高剂量立体定向放射治疗(SBRT)或立体定向放射外科手术(SRS),可以引起相当大的血管损伤(Park et al.,Radiation Research:March 2012,Vol.177,No.3,pp.311-327)。有人提出放射诱导的血管损伤可能在人类肿瘤对高剂量定向放射的反应中起重要作用,例如,对肿瘤内微环境的损伤可能导致肿瘤细胞的间接死亡,同上(Id)。然而,许多接受靶向放射治疗的患者由于其治疗而出现副作用。例如,抱有治愈目的接受靶向放射治疗的的头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)患者中,有90%会出现副作用,包括皮炎、口腔干燥症(唾液分泌减少)和口腔粘膜炎(口咽和/或食道粘膜的炎症和溃疡)(Birer et al.,Radiation Research,188(1):94-104(2017))。假设血管损伤在靶向放射后起一定作用的另一例子是在用于治疗前列腺癌的前列腺靶向照射后的勃起功能障碍的背景下(Gaither et al.,The Journal of Sexual Medicine,2017,14(9):1071-8and Nolan et al.,Int J Radiat Oncol Biol Phys.2015,91(4):796-806)。TPO或TPO模拟物对靶向放射治疗诱导的血管变化的影响尚无报道。

[0008] 对于放射治疗后提供对正常组织的保护的方法和组合物的需求是重要的且未得到满足。

发明内容

[0009] 在本发明中令人惊讶地发现,血小板生成素(TPO)模拟物保护接受靶向放射治疗的正常组织中的脉管系统并保护血管完整性。因此,本文提供保护暴露于靶向放射治疗的受试者的血管完整性的方法。所述方法包括向暴露于靶向放射治疗的受试者给药有效量的血小板生成素(TPO)模拟物,优选地,所述TPO模拟物包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,更优选地,所述TPO模拟物为RWJ-800088或罗米洛司汀(romiplostim)。根据本申请的实施方案,在受试者暴露于靶向放射治疗后至少约10分钟至至少约420分钟给药所述TPO模拟物,更优选地,所述TPO模拟物是具有以下式(I)结构的TPOm或其药学上可接受的盐或酯:

[0010] 

式(I)

[0011] 其中MPEG代表甲氧基聚乙二醇(methoxypolyethylene glycol)或甲氧基聚(乙二醇)(methoxypoly(ethylene glycol));并且其中向受试者给药有效量的TPO模拟物来保护受试者的血管完整性。

[0012] 在某些实施方案中,暴露于靶向放射治疗的受试者正在接受癌症治疗。所述癌症可以例如选自前列腺癌、头颈癌、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)、结肠癌、肺癌、黑色素瘤和乳腺癌。

[0013] 在某些实施方案中,在受试者暴露于靶向放射治疗后至少约20分钟至至少约360分钟、至少约40分钟至至少约240分钟、至少约60分钟至至少约180分钟,或者这些范围中的任意时间,向受试者给药TPO模拟物。

[0014] 在某些实施方案中,向受试者给药一个剂量的有效量的TPO模拟物。

[0015] 在某些实施方案中,通过静脉内、肌内、皮内或皮下注射向受试者给药有效量的TPO模拟物。在优选的实施方案中,通过皮下注射给药TPO模拟物。

[0016] 在另一总的方面,本申请涉及用于保持有需要的受试者的血管完整性的试剂盒。所述试剂盒包含药物组合物以及至少一种用于保持血管完整性的其他治疗剂或装置,所述药物组合物包含有效量的TPO模拟物和药学上可接受的载体。任选地,所述试剂盒进一步包含用于向受试者给药所述TPO模拟物的工具。优选地,所述试剂盒包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的TPO模拟物,更优选地包含RWJ-800088或罗米洛司汀的TPO模拟物。

附图说明

[0017] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的前述概述以及以下对本发明的优选实施方案的详细描述。然而,应当理解,本申请不限于附图中所示的确切实施方案。如图1至10中所用,“TPOm”是指RWJ-800088。

[0018] 图1示出在对前列腺进行20Gy靶向放射治疗(RT)的治疗的平均大鼠体重。图1A示出图表,表明不论何种治疗,所有大鼠在接受放射治疗后体重仍继续增加。图1B示出图表,表明组之间的体重增加速率(平均克/周/大鼠)差异显著,仅在TPOm/假手术大鼠和盐水/RT大鼠之间配对检验存在显著差异,*表示$p<0.01$。N=8-9只大鼠/组。

[0019] 图2示出图表,表明TPOm保护接受前列腺RT的大鼠免于阴部动脉血管舒张受损。在

RT后九周,用超声心动图使阴部动脉可视化,并在静脉注射0.4mg/kg肼屈嗪(hydralazine)之前(Pre)和之后(Post)测量直径。*表示之前和之后的动脉直径之间存在显著差异(p<0.05)(配对t检验)。N=5-8只大鼠/组。

[0020] 图3显示TPOm保护放射场之外的脉管系统。图3A示出RT后九周对CD31染色的血管内皮细胞的免疫荧光图像。为了创建免疫荧光图像,将阴茎组织切除、冷冻切片,并用CD31免疫荧光使血管内皮细胞可视化。图3B示出显示阴茎动脉的横截面积的图。图3C示出图表,显示表示为像素/微米的CD31密度(CD31表达/动脉周长)的量化。N=4-6/组。

[0021] 图4示出图表,表明在RT后10分钟给药单一剂量的TPOm没有预防前列腺RT(20Gy)在大鼠中诱导的勃起功能障碍(ED)。在RT(20Gy)后9周对海绵体神经刺激后测试了海绵体内压(ICP),并将其平均动脉压(MAP)进行归一化。用4V、6V或8V刺激神经,并将每只大鼠的最佳反应用于分析。星号*表示放射的显著影响(p=0.004,双向ANOVA)。N=6-7只大鼠/组。

[0022] 图5示出时间活动曲线(time activity curve,TAC)的提取方案,以RT+TPOm臂(arm)的小鼠表示。图5A示出在脉管系统周围选择的矩形的关注区域(ROI)的图像,显示了在研究的早期时间点葡聚糖的表达(expression)。图5B示出了通过在图5A中的ROI内,设定强度阈值为第80百分位数,鉴定出的脉管系统的子区域的图像。图5C示出了在研究的最后一个时间点观察到的与图5A中相同的场的图像。注意到相对于图5A,血管外表达增强。图5D示出了图表,其显示了整个视野的TAC(或总体TAC)以及图5B中ROI的TAC(或血管TAC),以10秒的间隔测量了150个时间点。每个观察值都是该时间点相关区域中所有像素的表达均值。每种类型的ROI各有三条线,代表3个连续的组织切片。注意到,血管TAC(红色)在所有时间比总体TAC(黑色)都具有更高的像素强度。

[0023] 图6示出了图表,显示基于图5所示的研究提取的时间活动曲线(TAC),用Patlak分析估算切片的渗透率。点表示数量x(t)和数量y(t)的观察的Patlak绘图(Patlak plot),如方程式(1.5)所给出的。线显示数据拟合的最小二乘法拟合。给出了拟合线的方程。根据拟合线的系数估算渗透率。注意到切片之间估算的系数具有低可变性。

[0024] 图7示出图表,显示在处理前、照射后第3天和第7天的葡聚糖渗透率;照射后6小时,给药生理盐水和TPOm(300ug/kg)。

[0025] 图8示出图表,表明盐水/RT组中单个动物RT后第3天和第7天的渗透率之间没有相关性。图中的每个点是给定动物中所有切片的平均估算渗透率值。

[0026] 图9显示了用吖啶橙活体显微镜检查评估的白细胞/内皮细胞相互作用。图9A示出了代表性图像序列,显示三个着边的白细胞在1秒的时程中行进。沿血管内皮滚动的白细胞由于与周围血流相比速度较慢而易于区分。图9B示出了图表,显示每只小鼠的剪切速率对L/E相互作用作图,并且计算了斜率。图9C示出了图表,表明RT显著改变了剪切速率与L/E相互作用之间的关系,而TPOm阻止了较高剪切速率下的L/E相互作用。

[0027] 图10显示了吖啶橙分析的血管特征。为每只小鼠最多选择四条血管,并确定每条的血流速度和血管直径。剪切速率通过公式((速度)x(8))/直径来计算。每个标记代表每只小鼠的平均值,误差线代表平均值±SEM。处理组之间无显著差异。

具体实施方式

[0028] 本发明基于,至少部分基于,鉴定血小板生成素(TPO)模拟物为用于保护暴露于靶

向放射治疗的受试者的血管完整性的治疗剂。可以配制并将TPO模拟物给予暴露于靶向放射治疗的受试者,以保护受试者的脉管系统,特别是健康组织的脉管系统免受放射的负面影响。

[0029] 背景技术和整个说明书中引用或描述了各种出版物、文章和专利。这些参考文献中的每一个均援引整体并入本文。本说明书中已包括的对文件、行为、材料、装置、物品等的讨论是为了提供本发明的背景。对于所公开或要求保护的任何发明,这种讨论并非承认这些物质的任何或所有构成现有技术的一部分。

[0030] 除非另有定义,否则本文用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。否则,本文中使用的某些术语具有说明书中阐明的含义。

[0031] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所用,除非上下文另外明确指出,单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数形式。

[0032] 除非另有说明,否则任何数值,例如本文所述的浓度或浓度范围,在任何情况下均应理解为由术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述数值的±10%。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1%至10%(w/v)的浓度范围包括0.9%(w/v)至11%(w/v)。如本文所用,除非上下文另外明确指出,否则数值范围的使用明确地包括所有可能的子范围,该范围内的所有单个数值,包括该范围内的整数以及数值的分数。

[0033] 除非另有说明,否则一系列元素之前的术语“至少”应理解为是指该系列中的每个元素。仅通过常规实验,本领域技术人员将认识到或能确定本文所述的本发明的特定实施方案的许多等同物。这样的等同物旨在涵盖在本发明之内。

[0034] 如本文所用,术语“包括”、“包含”、“具有”或“含有”或其任何其他变化将理解为暗示包含声明的整数或整数组,而非排除任何其他整数或整数组,并且意为非排他性的或开放式的。例如,包含一系列元素的组合物、混合物、过程、方法、物品或设备不一定仅限于那些元素,而是可以包括未明确列出或固有于这类组合物、混合物、过程、方法、物品或设备的其他元素。此外,除非明确指出相反的意思,否则“或”是指包含性的“或”而非排他性的“或”。例如,情况A或B由以下任一项满足:A为真(或存在)且B为假(或不存在)、A为假(或不存在)且B为真(或存在),以及A和B都为真(或存在)。

[0035] 如本文所用,多个所列举的元素之间的结合术语“和/或”应理解为涵盖单独的和组合的选项。例如,在两个元素由“和/或”连接的情况下,第一种选项是指在没有第二个元素的情况下第一个元素的适用性。第二种选项是指第二个元素在没有第一个元素的情况下的适用性。第三种选项是指第一和第二元素一起适用。这些选项中的任意一个都应理解为落入该含义内,并因此满足本文所用术语“和/或”的要求。多个选项中的一个以上的并存适用性也应理解为在其含义之内,因此满足术语“和/或”的要求。

[0036] 如本文所用,在整个说明书和权利要求书中使用的术语“由……组成”或诸如“由……组成”或“由……组成”的变化表示包括任何所述整数或整数组,但是另外的整数或整数组不可以添加到指定的方法、结构或组合物中。

[0037] 如本文所用,在整个说明书和权利要求书中使用的术语“基本上由……组成”或诸如“基本上由……组成”或“基本上由……组成”的变体表示包括任何所述整数或整数组,并且可选地包含不会实质上改变指定方法、结构或组合物的基本性质或新颖性质的任何所述整数或整数组。见M.P.E.P.§2111.03。

[0038] 如本文所用,“受试者”是指将要或已经通过根据本发明的实施方案的方法对其进行疫苗接种的任何动物,优选为哺乳动物,最优选为人。如本文所用,术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的例子包括但不限于牛、马、羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴、人等,更优选人。

[0039] 词语“右”、“左”、“下方”和“上方”指明在附图中相对于参照物的方向。

[0040] 如本文所用,在对受试者给予两种或更多种疗法的上下文中,术语“组合”是指使用一种以上疗法。术语“组合”的使用不限制对受试者给予疗法的顺序。例如,可以在向受试者给予第二种疗法之前(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之前)、同时或之后(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之后)给予第一疗法(例如本文所述的组合物)。

[0041] 还应理解,当提及优选发明的组分的尺寸或特征时,本文使用的术语“约”、“大约”、“通常”、“基本上”以及类似术语表示所描述的尺寸/特征,不是严格的边界或参数,也不排除在功能上相同或相似的微小变化,正如本领域普通技术人员所理解的。至少,包括数字参数的这类引用将包括使用本领域公认的数学和工业原理(例如,舍入、测量或其他系统误差,制造允差等)不会改变最低有效位数。

[0042] 如本文所用,术语“保护血管完整性”是指在接受RT的受试者中保持和维持血管系统的功能和结构中的至少一种。血管系统的主要功能是将血液和淋巴液输送到个体的全身,输送氧气和营养,并带走组织废物。术语“保护血管完整性”可以指保持或维持血管系统的功能,使得在暴露于靶向放射治疗后,全身血液和淋巴的循环不会受到显著影响或不会显著改变。术语“保护血管完整性”还可以指保持或维持血管系统的一种或多种其他功能,例如保护接受RT的受试者免于阴部动脉血管舒张受损或减少接受RT的受试者的血管收缩。血管系统包括遍及全身的分别负责血液循环和淋巴循环的血管(例如,动脉、静脉和毛细血管)和淋巴管。从结构上讲,血管包括内皮外层和三个组织层:外膜、中膜和内膜。术语“保护血管完整性”可以进一步指保持或维持血管系统的结构,使得接受放射治疗的血管系统的结构不会明显改变或受影响,例如,在RT后没有实质性的血管渗漏或血管内皮白细胞的相互作用没有实质性的增加。

[0043] 靶向放射治疗

[0044] 如本文所用,术语“RT”、“TRT”或“靶向放射治疗”是指使用电离放射的疗法,其优先地靶向或定位于身体的特定器官或部分。它通常用作癌症治疗的一部分。靶向放射治疗(TRT)有时也称为放射治疗、放疗、照射(irradiation)或X射线治疗。靶向放射治疗主要分为三类:体外射束放射治疗(EBRT或XRT)、内部放射治疗和放射性同位素全身治疗(systemic radioisotope therapy)。有时,放射可以通过几次治疗进行,来递送相同或稍高的剂量,这称为分割放射治疗(fractioned radiation therapy)。

[0045] 体外射束放射治疗(EBRT)使用的机器将高能射线从体外引导入肿瘤中。EBRT的示例包括但不限于立体定向放射治疗(stereotactic radiation therapy)、图像引导放射治疗(IGRT)、调强放射治疗(intensity modulated radiation therapy,IMRT)、螺旋断层疗法(helical-tomotherapy)、质子束放射治疗和术中放射治疗(IORT)。

[0046] 内部放射也称为近距离放射治疗(brachytherapy),其中将放射性植入物置于体内的肿瘤内或肿瘤附近。与外部放射治疗相比,它可以在较小的区域内提供更高剂量的放射。它使用的放射源通常密封在称为植入物的小固定物中。不同类型的植入物可以称为小球(pellet)、种子(seed)、带(ribbon)、线(wire)、针(needle)、胶囊(capsule)、气球(ballon)或管(tube)。内部放射的一个这样的例子是经动脉化学栓塞(transarterial chemoembolization,TACE)。

[0047] 全身放射性同位素治疗(Systemic radioisotope therapy,SRT)也称为非密封源放射治疗。靶向放射性药物在SRT中用于全身性治疗某些类型的癌症,例如甲状腺癌、骨癌和前列腺癌。这些通常与靶向实体(例如单克隆抗体或细胞特异性配体)相连的药物,可以通过口或静脉给药。然后它们穿过人体,直到到达期望的靶标,药物在其中会以相对较高的浓度积累。

[0048] 在一实施方案中,本发明涉及用于治疗头颈癌的靶向放射治疗。针对头颈部癌症的典型放射疗程为持续3-5周的每天治疗。但是,如果长时间以日剂量进行放射治疗,则对快速生长的癌症控制不佳。因此,对于某些迅速增长的头颈癌,例如鼻咽癌,可以加速放射的递送,并每天进行两次或更多次治疗(超分割)。在一些实施方案中,与由每天给予较低剂量组成的标准疗法相比,用每日两次给予较高剂量的放射疗法治疗患有头颈癌的受试者。

[0049] EBRT和/或近距离放射治疗通常用于头颈部放射治疗。例如,可移除的植入物可用于治疗口、舌、喉和鼻咽的癌症,接受外部放射治疗时,它们可作为腔内增强物给予。将植入物放置在癌症区域,并在给予适当剂量后将其取出。可移除植入物中最常用的放射性物质是铱192。在一些实施方案中,可能需要永久放置放射源,例如,在治疗复发性鼻咽恶性肿瘤中,来减轻口腔和咽喉主要部位的可及的复发,或减轻颈部淋巴结转移。碘125和钯103可以是用于永久性植入物的放射性物质。

[0050] 头颈癌靶向放射的副作用包括,例如粘膜炎、口腔或咽喉的粘膜发炎或口干(口干燥症)。头颈癌放射治疗的另一常见并发症是甲状腺激素水平异常低,称为甲状腺功能减退。

[0051] 在另一实施方案中,本发明涉及用于治疗前列腺癌的靶向放射治疗。EBRT和高剂量率(HDR)近距离放射治疗是治疗前列腺癌的两种主要放射疗法。前列腺癌靶向放射的副作用包括,例如尿频、排尿困难或疼痛、血尿、漏尿、排便疼痛、直肠出血和性功能障碍,例如勃起功能障碍。

[0052] TPO模拟物

[0053] 如本文所用,“TPOm”、“TPO模拟物”或“血小板生成素模拟物”是指包含能够结合并激活血小板生成素受体的肽的化合物。优选地,在可用于本发明的TPO模拟物中,能够结合并激活血小板生成素受体的肽与血小板生成素(TPO)没有显著同源性。与TPO缺乏同源性降低了产生TPO抗体的可能性。可用于TPO模拟物的这类肽的实例包括但不限于在美国公开号2003/0158116;2005/0137133;2006/0040866;2006/0210542 2007/0148091;2008/0119384;美国专利号5,869,451;7,091,311;7,615,533;8,227,422;国际专利公开WO2007/021572;WO2007/094781以及WO2009/148954,其全部内容援引并入本文。更优选地,在可用于本发明的TPO模拟物中,能够结合并激活血小板生成素受体的肽与改善所述肽的一种或多种特性的部分共价连接。作为非限制性实例,所述部分可以是亲水性聚合物,包括但不限

于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚乳酸和聚乙醇酸。所述部分也可以是多肽,例如Fc区或白蛋白。

[0054] 在一优选实施方案中,可用于本发明的TPO模拟物包含具有以下氨基酸序列的肽:IEGPTLRQXaaLAARYaa(SEQ ID NO:1),其中Xaa是色氨酸(W),或β-(2-萘基)丙氨酸(在本文中称为"2-Nal"),并且Yaa是丙氨酸(A),或肌氨酸(在本文中称为"Sar")。优选地,SEQ ID NO:1的肽与PEG共价连接或与Fc结构域融合。

[0055] 在一些实施方案中,可用于本发明的TPO模拟物包含与PEG共价连接的SEQ ID NO:1的肽,优选地,所述PEG是平均分子量为约5,000至约30,000道尔顿的PEG。优选地,所述PEG选自单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH2)、单甲氧基聚乙二醇-三苯甲酸酯(monomethoxypolyethylene glycol-tresylate,MePEG-TRES)和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(monomethoxypolyethylene glycol-imidazolyl-carbonyl,MePEG-IM)。肽的PEG化会降低化合物的清除率,而不会降低效力。参见,例如,美国专利号7,576,056,其全部内容援引并入本文。

[0056] 在一优选实施方案中,可用于本发明的TPO模拟物是RWJ-800088或其衍生物。如本文所用,"RWJ-800088"是指如下具有通过赖氨酰胺残基连接的两个相同的14-mer的29-mer肽:

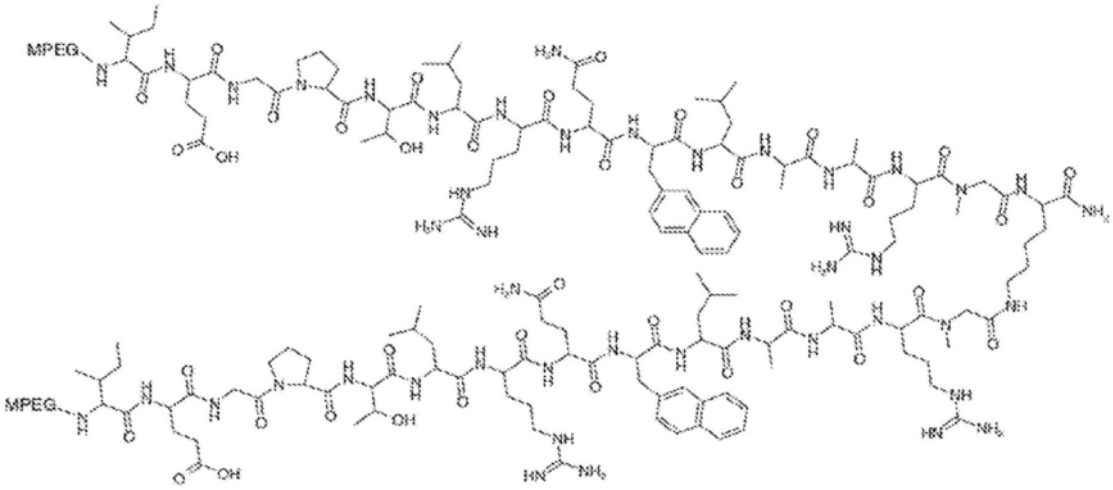
I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R (Sar)

[0057] K(NH_2)

I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R (Sar)

[0058] 并且具有与每个N端异亮氨酸共价连接的甲氧基聚乙二醇(MPEG),或其药学上可接受的盐或酯。所述14-mer与SEQ ID NO:1相同,其中Xaa为2-Nal,Yaa为Sar。因此RWJ-800088包括赖氨酰胺残基连接的两条SEQ ID NO:2(IEGPTLRQ(2-Nal)LAAR(Sar))的14个氨基酸肽链,并且每个N端异亮氨酸均与甲氧基聚乙二醇(MPEG)链连接。因此,RWJ-800088的简化的分子结构为(MPEG-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-(2-Nal)-Leu-Ala-Ala-Arg-(Sar))$_2$-Lys-NH_2;其中(2-Nal)是β-(2-萘基)丙氨酸,(Sar)是肌氨酸,并且MPEG是甲氧基聚(乙二醇),或其药学上可接受的盐或酯。优选地,MPEG具有大约20,000道尔顿的分子量或代表甲氧基聚乙二醇20000。

[0059] 在一实施方案中,RWJ-800088具有式(I)的分子结构,或为其药学上可接受的盐或酯:

[0060] 

式(I)

[0061] 在一优选实施方案中,RWJ-800088中的MPEG是甲氧基聚乙二醇20000,并且RWJ-800088的完整的化学名称为:甲氧基聚乙二醇20000-丙酰基-L-异亮氨酰基-L-谷氨酰基-甘氨酰基-L-脯氨酰基-L-苏氨酸-L-亮氨酰基-L-精氨酰基-L-谷氨酰胺基-L-2-萘基丙氨酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-丙氨酰基-L-精氨酰基-肌氨酰基-Ne-(甲氧基聚乙二醇20000-丙酰基-L-异亮氨酰基-L-谷氨酰基-甘氨酰基-L-脯氨酰基-L-苏氨酰基-L-亮氨酰基-L-精氨酰基-L-谷氨酰胺基-L-2-萘基丙氨酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-丙氨酰基-L-精氨酰基-肌氨酰基-)-赖氨酰胺,或其药学上可接受的盐或酯。没有PEG的肽的分子量为3,295道尔顿,而具有两条20,000道尔顿的MPEG链的肽的分子量为大约43,295道尔顿。

[0062] 在一些实施方案中,可用于本发明的TPO模拟物包含与Fc结构域融合的SEQ ID NO:1的肽。将肽与Fc结构域融合可在体内稳定肽。参见,例如,美国专利号6,660,843,其全部内容援引并入本文。

[0063] 在另一优选实施方案中,可用于本发明的TPO模拟物是罗米洛司汀。如本文所用,“罗米洛司汀”是指具有与SEQ ID NO:1的肽的N-末端异亮氨酸连接的Fc结构域的融合蛋白,其中Xaa为W并且Yaa为A。具体地,罗米洛司汀具有以下氨基酸序列:

[0064] MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGIEGPTLRQWLAARAGG
GGGGGGIEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO:4),

[0065] 它具有血小板生成素受体结合域氨基酸序列IEGPTLRQWLAARA(SEQ ID NO:3)。

[0066] 剂量与给药

[0067] TPO模拟物可以例如作为药物组合物的活性成分与药物载体或稀释剂一起给药。TPO模拟物可以通过口服、经肺、肠胃外(肌内、腹腔内、静脉内(IV)或皮下注射)、吸入(通过微粉制剂)、经皮肤、经鼻、经阴道、经直肠或舌下给药途径给药,以适合各个给药途径的剂型配制。参见,例如国际公开号WO1993/25221(Bernstein et al.)和WO1994/17784(Pitt

et al.),其相关内容援引并入本文。

[0068] 口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这类固体剂型中,将活性肽化合物与至少一种药学上可接受的载体,例如蔗糖、乳糖或淀粉混合。这类剂型还可以按照常规包括惰性稀释剂以外的其他物质,例如润滑剂,例如硬脂酸镁。就胶囊、片剂和丸剂而言,剂型还可包含缓冲剂。片剂和丸剂还可以额外用肠溶衣制备。

[0069] 口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂、酏剂,与包含本领域常用的惰性稀释剂(例如水)。除这类惰性稀释剂外,组合物还可包含佐剂,例如润湿剂、乳化剂和助悬剂、以及甜味剂、调味剂和增香剂。

[0070] 用于肠胃外给药的制品包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液或乳剂。非水溶液或非水媒介物的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油和玉米油)、明胶和可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。这类剂型还可包含佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。它们可以通过例如细菌截留滤器过滤、在组合物中包含灭菌剂、照射组合物或加热组合物来进行灭菌。它们也可以在临用前用无菌水或一些其他无菌注射介质制备。

[0071] TPO模拟物的给药通常是肌内、皮下或静脉内。然而,也可以设想其他给药方式,例如经皮肤、皮内或经鼻给药。肌肉注射TPO模拟物可以通过使用针头注射TPO模拟物组合物的悬浮液来实现。备选方案是使用无针注射装置来给药组合物(使用例如Biojector™)或TPO模拟组合物的冻干粉末。

[0072] 对于静脉内、经皮肤或皮下注射,或在患处注射,TPO模拟组合物可以是肠胃外可接受的水溶液形式,其不含热原并具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域技术人员能够用例如等渗媒介物(如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液)来制备合适的溶液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。也可使用缓释制剂。

[0073] 用于直肠或阴道给药的组合物优选是栓剂,其除了包含活性TPO模拟物外还可包含赋形剂,例如可可脂或栓剂蜡。经鼻或舌下给药的组合物也用本领域熟知的标准赋形剂制备。

[0074] 通常,给药的目的为维持和保护给予靶向放射治疗的受试者的血管完整性。在靶向放射治疗期间或之后,将TPO模拟组合物给药于受试者,并且以足以保护受试者健康组织中的血管完整性的量给药TPO模拟物组合物,优选以不降低RT疗效的量给药TPO模拟组合物。

[0075] 将含有TPO模拟物的药学上可接受的组合物给药于受试者,从而对受试者的脉管系统产生保护作用。足以对受试者的脉管系统产生保护作用的组合物的量定义为组合物的“有效剂量”或“有效量”。TPO模拟物组合物的有效量将取决于,例如,受试者的状态(例如,脉管系统完整性的严重程度、靶向放射治疗的暴露时间)、受试者的身体特征(例如,身高、体重等)以及RT的性质(例如,类型和放射剂量、频率等)。鉴于本发明,本领域技术人员可以确定实际给药量以及给药速度和时程。

[0076] 治疗的处方,例如剂量的决定等,是全科医生和其他医生的责任,或者在兽医的背景下是兽医的责任,并且通常要考虑要治疗的疾病、个体患者的状况、递送位点、给药方法和从业人员已知的其他因素。上面提到的技术和方案的例子可以在Remington’s Pharmaceutical Sciences,16th edition,Osol,A.ed.,1980中找到。

[0077] 在某些实施方案中,在受试者暴露于靶向放射治疗后至少约10分钟至至少约420分钟、至少约10分钟至至少约300分钟、至少约10分钟至至少约180分钟、至少约10分钟至至少约60分钟、至少约20分钟至至少约420分钟、至少约20分钟至至少约300分钟、至少约20分钟至至少约180分钟、至少约20分钟至至少约60分钟、至少约40分钟至至少约420分钟、至少约40分钟至至少约300分钟、至少约40分钟至至少约180分钟、至少约40分钟至至少约60分钟、至少约60分钟至至少约420分钟、至少约60分钟至至少约300分钟、至少约60分钟至至少约180分钟、至少约60分钟至至少约120分钟、至少约60分钟至至少约90分钟、至少约80分钟至至少约420分钟、至少约80分钟至至少约300分钟、至少约80分钟至至少约180分钟、至少约80分钟至至少约120分钟、至少约100分钟至至少约420分钟、至少约100分钟至至少约300分钟、至少约100分钟至至少约180分钟、至少约100分钟至至少约150分钟、至少约120分钟至至少约420分钟、至少约120分钟至至少约300分钟、至少约120分钟至至少约180分钟、至少约140分钟至至少约420分钟、至少约140分钟至至少约300分钟、至少约140分钟至至少约180分钟、至少约160分钟至至少约420分钟、至少约160分钟至至少约300分钟、至少约160分钟至至少约180分钟、至少约180分钟至至少约420分钟、至少约180分钟至至少约300分钟或上述范围中的任何时间,向受试者给药TPO模拟物。在某些实施方案中,在受试者暴露于靶向放射治疗后至少约10、至少约20、至少约40、至少约60、至少约80、至少约100、至少约120、至少约140、至少约160、至少约180、至少约200、至少约220、至少约240、至少约260、至少约280、至少约300、至少约320或至少约340分钟给药TPO模拟物。在某些实施方案中,在受试者暴露于靶向放射治疗后至少约8、至少约10、至少约12、至少约14、至少约16、至少约18、至少约20、至少约22、至少约24小时给药TPO模拟物。在某些实施方案中,在受试者暴露于靶向放射治疗后不晚于约10、约20、约40、约60、约80、约100、约120、约140、约160、约180、约200、约220、约240、约260、约280、约300、约320、约340、约360、约420分钟给药TPO模拟物。在某些实施方案中,在受试者暴露于靶向放射治疗后不晚于约8、约10、约12、约14、约16、约18、约20、约22、约24小时给药TPO模拟物。

[0078] 在制备TPO模拟物和将TPO模拟物任选地配制成组合物之后,可以将组合物给药于个体,特别是人或其他灵长类动物。可以向人类或另一哺乳动物给药,例如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、绵羊、山羊、猪、马、牛、驴、猴、狗或猫。递送至非人类哺乳动物不必出于治疗目的,而是可以用于实验背景下,例如用于研究由于给药TPO模拟物而保护血管完整性的机制。

[0079] 本发明的TPO模拟组合物可以单独给药或与其他治疗组合给药,取决于待治疗的病症同时给药或顺序给药。

[0080] 如需要,TPO模拟组合物可以呈现于试剂盒、包装或分配器中,所述试剂盒、包装或分配器可以包含一个或多个含有活性成分的单位剂型。试剂盒例如可以包括金属或塑料箔,例如泡罩包装。试剂盒、包装或分配器可随附给药说明。试剂盒中包括的装置可以是例如容器、递送媒介物或给药装置。

[0081] 试剂盒可以进一步包含用于保护血管完整性的至少一种另外的治疗剂或的装置。试剂盒中包含的另外的治疗剂是指与TPO或TPO模拟物一起给药时已知或显示出有利特性的任何化合物或治疗剂。这类物质的例子可以是但不限于:其他TPO模拟物、可用于保护血管完整性的其他物质(例如放射防护剂,例如Ethyol®或氨磷汀(amifostine))、放射增敏

剂(例如IUdR、BUdR、硝基咪唑(misonidazole)、尼莫拉唑(nimorazole)、依他硝唑(etanidazole)、氟路索(Fluosol)、RSR-13和莫特沙芬钆(motexafin gadolinium)(MGd))、激素(例如用于头颈癌的甲状腺剂)或促黄体激素释放激素(LHRH)激动剂(也称为LHRH类似物或GnRH激动剂)。LHRH的例子包括但不限于亮丙瑞林(Luprolide)(利普安(Lupron),Eligard)、戈舍瑞林(Goserelin)(诺雷德(Zoladex))、曲普瑞林(Triptorelin)(Trelstar)或组氨瑞林(Histrelin)(Vantas)。

[0082] 实施方案

[0083] 本发明还提供以下非限制性实施方案。

[0084] 实施方案1为在一种保护暴露于靶向放射治疗的受试者的血管完整性的方法,所述方法包括向所述受试者给药有效量的血小板生成素(TPO)模拟物。

[0085] 实施方案1(a)为实施方案1的方法,其中所述TPO模拟物包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。

[0086] 实施方案1(b)为实施方案1(a)的方法,其中所述肽具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0087] 实施方案1(c)为实施方案1(a)或1(b)的方法,其中所述TPO模拟物进一步包含与所述肽共价连接的亲水性聚合物。

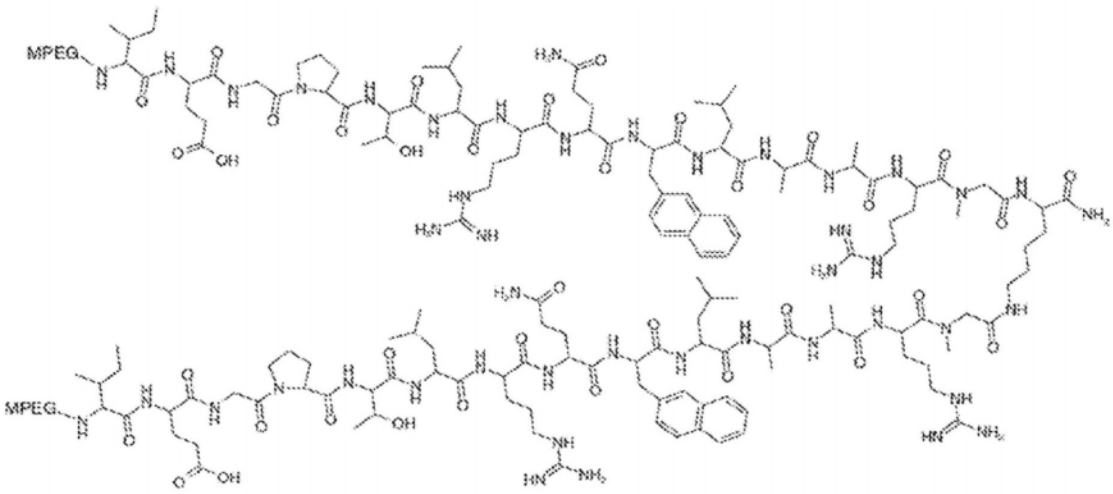
[0088] 实施方案1(d)为实施方案1(c)的方法,其中所述亲水性聚合物是以下任意一种:i)聚乙二醇(PEG),ii)聚丙二醇,iii)聚乳酸,或iv)聚乙醇酸。

[0089] 实施方案1(e)为实施方案1(d)的方法,其中所述亲水性聚合物是PEG。

[0090] 实施方案1(f)为实施方案1(e)的方法,其中所述PEG是单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH2)、单甲氧基聚乙二醇-三苯甲酸酯(MePEG-TRES)或单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)中的任意一种。

[0091] 实施方案1(g)为实施方案1(e)的方法,其中所述PEG是甲氧基聚(乙二醇)(MPEG)。

[0092] 实施方案1(h)为实施方案1(g)的方法,其中所述TPO模拟物是具有式(I)的分子结构的RWJ-800088,或其药学上可接受的盐或酯:

[0093] 

[0094] 实施方案1(i)为实施方案1(h)的方法,其中RWJ-800088中的MPEG是甲氧基聚乙二醇20000。

[0095] 实施方案1(j)为实施方案1(a)的方法,其中所述肽具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0096] 实施方案1(k)为实施方案1(j)的方法,其中所述肽与多肽融合。

[0097] 实施方案1(l)为实施方案1(k)的方法,其中所述多肽是Fc结构域。

[0098] 实施方案1(m)为实施方案1(l)的方法,其中所述TPO模拟物是罗米洛司汀。

[0099] 实施方案1(n)为实施方案1(m)的方法,其中罗米洛司汀包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0100] 实施方案2为实施方案1至1(n)中任一项的方法,其中所述暴露于靶向放射治疗的所述受试者正在接受癌症治疗。

[0101] 实施方案2(a)为实施方案2的方法,其中所述癌症选自前列腺癌、头颈癌、肝细胞癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、胰腺癌和乳腺癌。

[0102] 实施方案2(b)为实施方案2的方法,其中所述癌症为前列腺癌。

[0103] 实施方案2(c)为实施方案2的方法,其中所述癌症为头颈癌。

[0104] 实施方案3为实施方案1至2(c)中任一项的方法,其中在向所述受试者给予靶向放射治疗后至少约10分钟至至少约420分钟向所述受试者给药所述药物组合物。

[0105] 实施方案3a为实施方案3的方法,其中在所述受试者暴露于靶向放射治疗后至少约20分钟至至少约360分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

[0106] 实施方案4为实施方案3的方法,其中在所述受试者暴露于靶向放射治疗后至少约40分钟至至少约240分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

[0107] 实施方案5为实施方案3的方法,其中在所述受试者暴露于靶向放射治疗后至少约60分钟至至少约180分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

[0108] 实施方案6为实施方案3的方法,其中在所述受试者暴露于靶向放射治疗后至少约10分钟向所述受试者给药所述TPO模拟物。

[0109] 实施方案7为实施方案1至6中任一项的方法,其中向所述受试者给药一个剂量以上的有效量的所述TPO模拟物。

[0110] 实施方案8为一种保护接受靶向放射治疗的受试者免于阴部动脉血管舒张受损的方法,所述方法包括向有需要的受试者给药有效量的血小板生成素(TPO)模拟物。

[0111] 实施方案9为一种减少接受靶向放射治疗的受试者的血管收缩的方法,所述方法包括向有需要的受试者给药有效量的血小板生成素(TPO)模拟物。

[0112] 实施方案10为一种减少接受靶向放射治疗的受试者的血管渗漏的方法,所述方法包括向有需要的受试者给药有效量的血小板生成素(TPO)模拟物。

[0113] 实施方案11为一种减少接受靶向放射治疗的受试者的血管内皮白细胞相互作用的方法,所述方法包括向有需要的受试者给药有效量的血小板生成素(TPO)模拟物。

[0114] 实施方案11(a)为实施方案8至11中任一项的方法,其中所述TPO模拟物包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。

[0115] 实施方案11(b)为实施方案11(a)的方法,其中所述肽具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0116] 实施方案11(c)为实施方案11(a)或11(b)的方法,其中所述TPO模拟物进一步包含与所述肽共价连接的亲水性聚合物。

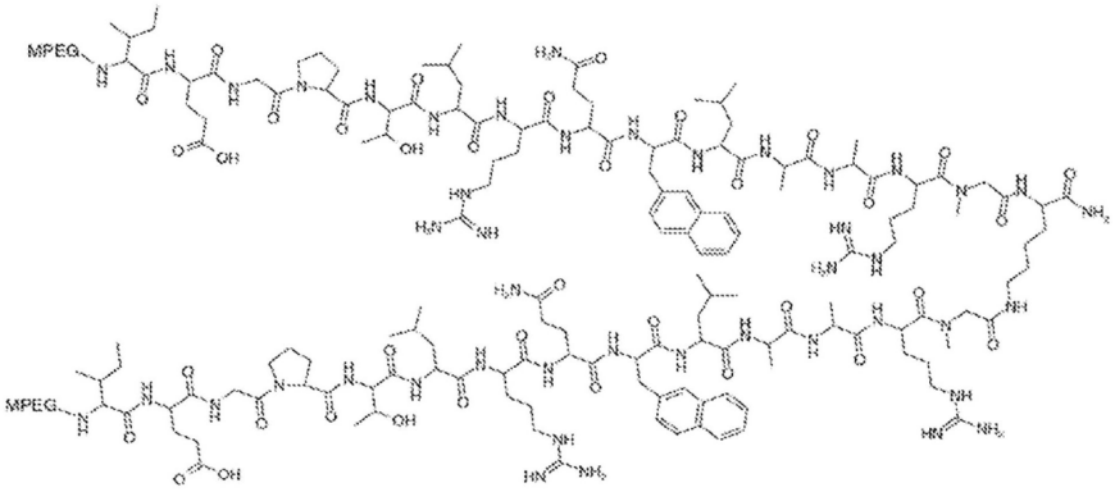
[0117] 实施方案11(d)为实施方案11(c)的方法,其中所述亲水性聚合物是以下任意一种:i)聚乙二醇(PEG),ii)聚丙二醇,iii)聚乳酸,或iv)聚乙醇酸。

[0118] 实施方案11(e)为实施方案11(d)的方法,其中所述亲水性聚合物是PEG。

[0119] 实施方案11(f)为实施方案11(e)的方法,其中所述PEG是单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH2)、单甲氧基聚乙二醇-三苯甲酸酯(MePEG-TRES)或单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)中的任意一种。

[0120] 实施方案11(g)为实施方案11(e)的方法,其中所述PEG是甲氧基聚(乙二醇)(MPEG)。

[0121] 实施方案11(h)为实施方案11(g)的方法,其中所述TPO模拟物是具有式(I)的分子结构的RWJ-800088或其药学上可接受的盐或酯:

[0122] 

[0123] 实施方案11(i)为实施方案11(h)的方法,其中所述RWJ-800088中的MPEG是甲氧基聚乙二醇20000。

[0124] 实施方案11(j)为实施方案11(a)的方法,其中所述肽具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0125] 实施方案11(k)为实施方案11(j)的方法,其中所述肽与多肽融合。

[0126] 实施方案11(l)为实施方案11(k)的方法,其中所述多肽是Fc结构域。

[0127] 实施方案11(m)为实施方案11(l)的方法,其中所述TPO模拟物是罗米洛司汀。

[0128] 实施方案11(n)为实施方案11(m)的方法,其中罗米洛司汀包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0129] 实施方案12为实施方案8至11(n)中任一项的方法,其中向所述受试者给予所述靶向放射治疗来治疗癌症或肿瘤。

[0130] 实施方案13为实施方案12的方法,其中所述癌症选自前列腺癌、头颈癌、肝细胞癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、胰腺癌和乳腺癌。

[0131] 实施方案13(a)为实施方案13的方法,其中所述癌症为前列腺癌。

[0132] 实施方案13(b)为实施方案13的方法,其中所述癌症为头颈癌。

[0133] 实施方案14为一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,其包括向受试者给予靶向放射治疗和有效量的血小板生成素(TPO)模拟物。

[0134] 实施方案14(a)为实施方案14的方法,其中所述TPO模拟物包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。

[0135] 实施方案14(b)为实施方案14(a)的方法,其中所述肽具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0136] 实施方案14(c)为实施方案14(a)或14(b)的方法,其中所述TPO模拟物进一步包含与所述肽共价连接的亲水性聚合物。

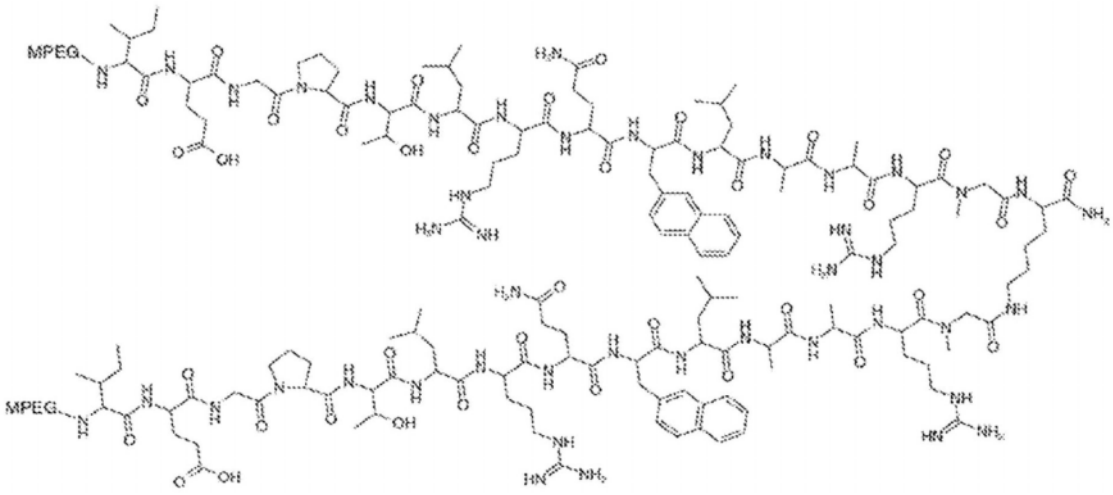
[0137] 实施方案14(d)为实施方案14(c)的方法,其中所述亲水性聚合物是以下任意一种:i)聚乙二醇(PEG),ii)聚丙二醇,iii)聚乳酸,或iv)聚乙醇酸。

[0138] 实施方案14(e)为实施方案14(d)的方法,其中所述亲水性聚合物是PEG。

[0139] 实施方案14(f)为实施方案14(e)的方法,其中所述PEG是单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH2)、单甲氧基聚乙二醇-三苯甲酸酯(MePEG-TRES)或单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)中的任意一种。

[0140] 实施方案14(g)为实施方案14(e)的方法,其中所述PEG是甲氧基聚(乙二醇)(MPEG)。

[0141] 实施方案14(h)为实施方案14(g)的方法,其中所述TPO模拟物是具有式(I)的分子结构的RWJ-800088或其药学上可接受的盐或酯:

[0142] 

[0143] 实施方案14(i)为实施方案14(h)的方法,其中所述RWJ-800088中的MPEG是甲氧基聚乙二醇20000。

[0144] 实施方案14(j)为实施方案14(a)的方法,其中所述肽具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0145] 实施方案14(k)为实施方案14(j)的方法,其中所述肽与多肽融合。

[0146] 实施方案14(l)为实施方案14(k)的方法,其中所述多肽为Fc结构域。

[0147] 实施方案14(m)为实施方案14(l)的方法,其中所述TPO模拟物为罗米洛司汀。

[0148] 实施方案14(n)为实施方案14(m)的方法,其中罗米洛司汀包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0149] 实施方案15为实施方案14至14(n)中任一项的方法,其中所述癌症选自前列腺癌、头颈癌、肝细胞癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、胰腺癌和乳腺癌。

[0150] 实施方案15(a)为实施方案15的方法,其中所述癌症为前列腺癌。

[0151] 实施方案15(b)为实施方案15的方法,其中所述癌症为头颈癌。

[0152] 实施方案16为实施方案14至15(b)中任一项的方法,其中在向所述受试者给予靶向放射后至少约10分钟至至少约420分钟给药所述TPO模拟物。

[0153] 实施方案17为实施方案14至16中任一项的方法,其中在给予靶向放射治疗以及有效量的所述TPO模拟物后,所述受试者被保护免于阴部动脉血管舒张受损。

[0154] 实施方案18为实施方案14至16中任一项的方法,其中在给予靶向放射治疗以及有效量的所述TPO模拟物后,所述受试者的血管收缩减少。

[0155] 实施方案19为实施方案14至16中任一项的方法,其中在靶向放射治疗以及给药有效量的所述TPO模拟物后,所述受试者的血管渗漏减少。

[0156] 实施方案20为实施方案14至16中任一项的方法,其中在靶向放射治疗以及给药有效量的所述TPO模拟物后,所述受试者的血管内皮白细胞相互作用减少。

[0157] 实施方案21为一种药物组合物,其包含用于在暴露于靶向放射治疗的受试者中保护血管完整性的有效量的血小板生成素(TPO)模拟物和装置和/或其他物质,其中所述TPO模拟物包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。

[0158] 实施方案22为实施方案21的药物组合物,其中所述其他物质选自其他所述TPO模拟物、放射防护剂、放射增敏剂、激素和黄体激素释放激素(LHRH)激动剂(也称为LHRH类似物或GnRH激动剂)。

[0159] 实施方案22a为实施方案22的药物组合物,其中所述放射防护剂包括Ethyol®(amifostine)。

[0160] 实施方案22b为实施方案22或22a的药物组合物,其中所述放射增敏剂包括IudR、BudR、硝基咪唑(misonidazole)、尼莫拉唑(nimorazole)、依他硝唑(etanidazole)、氟路索(Fluosol)、RSR-13或莫特沙芬钆(motexafin gadolinium)(MGd))。

[0161] 实施方案22c为实施方案22至22b中任一项的药物组合物,其中所述激素用是于头颈癌治疗的甲状腺剂。

[0162] 实施方案22d为实施方案22至22c中任一项的药物组合物,其中所述LHRH激动剂包括亮丙瑞林(Luprolide)(利普安(Lupron),Eligard)、戈舍瑞林(Goserelin)(诺雷德(Zoladex))、曲普瑞林(Triptorelin)(Trelstar)或组氨瑞林(Histrelin)(Vantas)。

[0163] 实施方案23为实施方案1-20中任一项的方法,其中所述靶向放射以10-70戈瑞(Gray,Gy)的剂量给予。

[0164] 实施方案23(a)为实施方案23的方法,其中所述放射的剂量为10戈瑞(Gy)。

[0165] 实施方案23(b)为实施方案23的方法,其中所述放射的剂量为20戈瑞(Gy)。

[0166] 实施方案23(c)为实施方案23的方法,其中所述放射的剂量为30戈瑞(Gy)。

[0167] 实施方案23(d)为实施方案23的方法,其中所述放射的剂量为40戈瑞(Gy)。

[0168] 实施方案23(e)为实施方案23的方法,其中所述放射的剂量为50戈瑞(Gy)。

[0169] 实施方案23(f)为实施方案23的方法,其中所述放射的剂量为60戈瑞(Gy)。

[0170] 实施方案23(g)为实施方案23的方法,其中所述放射的剂量为70戈瑞(Gy)。

[0171] 实施方案23(h)为实施方案23-23(g)中任一项的方法,其中将放射剂量以1到10个部分(fraction)给予所述受试者。

[0172] 实施方案23(i)为实施方案23-23(h)中任一项的方法,其中所述受试者每天接受一次靶向放射治疗。

[0173] 实施方案23(j)为实施方案23-23(i)中任一项的方法,其中所述受试者每天接受两次靶向放射治疗。

[0174] 实施方案24为实施方案1-20和23-23(j)中任一项的方法,其中所述靶向放射选自体外射束放射治疗、内部放射治疗和全身放射性同位素治疗。

[0175] 实施方案25为实施方案24的方法,其中所述靶向放射为分割(fractioned)放射治疗。

[0176] 实施例

[0177] 实施例1:在勃起功能障碍的大鼠前列腺照射模型中给药血小板生成素模拟物保持血管功能

[0178] 材料和方法

[0179] 动物:

[0180] 从查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)(莫尔文,PA)获得了三十五只八周大的雄性Sprague Dawley大鼠,并在标准饲养条件下配对饲养。将动物分为4组:盐水/假手术、盐水RT、TPOm/假手术、TPOm/RT。杜克大学医学院的机构动物护理和使用委员会(Duke University School of Medicine Institutional Animal Care and Use Committee)批准了所有动物工作。

[0181] TPOm合成和治疗:

[0182] TPOm由杨森制药(Janssen Pharmaceuticals)如前所述(Knight et al., Int.J.Toxicol.30(4):385-404(2011))合成,并以冻干粉的形式在干冰上运输到杜克大学。将TPOm在无菌盐水中重构,无菌过滤,分装,并在-20℃下保存直至使用。RT后10分钟,以单一剂量通过皮下注射(3,000μg/kg)给药TPOm。这个剂量的选择是基于其在大鼠全身放射研究中的有效性,在多个时间点给药时,与安慰剂相比,它产生了显著的生存益处。

[0183] 前列腺照射:

[0184] 如先前公开的那样进行立体定向图像引导的前列腺单分割RT(Kimura et al., J.Sex Med.9(6):1535-49(2012))。简而言之,将大鼠麻醉并固定在聚苯乙烯块上。使用GE Discovery RT590(英国Little Chalfont的GE Healthcare)进行CT扫描使整个骨盆成像。使用Eclipse治疗计划系统(Varian Medical Systems,加利福尼亚州帕洛阿尔托)为每只大鼠准备了个性化的治疗计划。将前列腺和直肠轮廓化,通过将前列腺扩张1mm,然后减去直肠扩张1mm来得到主要治疗体积。使用以单个动态共形弧(conformal arc)方案归一化的方案,用6MV的束能量来单次递送20Gy至95%的主要治疗体积,避开部分直肠。大部分膀胱、阴茎和睾丸被排除在区域外。然后,在与计划相同的麻醉窗口内使用锥形束计算机断层扫描在NovalisTx放射外科手术直线加速器(Brainlab AG,慕尼黑,DE and Varian Medical Systems)上对大鼠进行处理,再进行骨图像引导治疗。将大鼠麻醉,并固定在聚苯乙烯块上,不进行照射,为经过假照射手术的大鼠。

[0185] 海绵体内压(ICP)测量:

[0186] 对于海绵体内压(ICP)测量,依照之前发表的protocol(Kimura et al.,J.Sex Med.8(8):2215-26(2011))。简而言之,用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉大鼠。在腹颈皮肤上切开一

个切口以使颈动脉可视化,并插入一个含有肝素化盐水的聚乙烯(PE)-50管,用于连续平均动脉压(MAP)监测。然后打开腹膜并使睾丸缩回。观察到沿后外侧前列腺的海绵状神经,并将连接至充满生理盐水的PE-60管的23G针插入阴茎根部附近的同侧腿中。将两个管都连接到压力传感器(World Precision Instruments,佛罗里达州萨拉索塔)。分离海绵状神经并用连接到S48刺激器(Grass Technologies,罗德岛州西沃里克)的双极电极用4、6或8V刺激一分钟,刺激之间休息一分钟。使用LabChart 7软件(ADInstruments,冷泉港,CO)记录MAP和ICP,并将其表示为比率来将大鼠间基线压力的差异与麻醉效果的差异最小化。

[0187] 肼苯哒嗪诱导的血管舒张的超声测量:

[0188] ICP测量后,将声学凝胶应用于前列腺区域,并将小鼠高频回声换能器(MS5505)应用于阴部内动脉。使用Vevo 2100机器(Visual Sonics;安大略省多伦多)以B模式采集图像,来通过二维超声心动图评估动脉直径。通过在所有动物中使用相同的美国标准的(US-measured)的距耻骨的距离来验证可重复的US放置(US placement)。然后在1分钟内通过颈动脉导管注入肼屈嗪(Sigma,密苏里州圣路易斯)(0.4mg/kg),并重复超声心动图检查。使用Vevo 2100软件的血管程序包测量动脉直径。

[0189] CD31染色和定量:

[0190] 将阴茎在液氮中速冻并保存在-80℃直至使用。使用Crytome FSE低温恒温器(ThermoFisher Scientific,密歇根州卡拉马祖)制备冷冻切片(10μm)。将切片在丙酮中固定20分钟,风干,并用10%驴血清(Sigma)封闭。分别应用一抗(小鼠抗大鼠CD31,克隆TLD-3A12,BD Pharmingen,新泽西州富兰克林湖)和二抗(Alexa Fluor 488偶联驴抗小鼠IgG;Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫)1小时后,将切片用2.5μg/ml的Hoechst 33342(Sigma)复染5分钟,然后固定在福尔马林中,并用Cytoseal60(ThermoScientific)密封。使用配备ZEN 2软件的Zeiss Axio Imager显微镜对切片成像。样品在染色后的24小时内成像,样品间使用相同的曝光时间。使用ImageJ软件将CD31表达归一化至血管周长。首先,将测量全局校准至已知长度(100微米)的比例尺。然后使用ImageJ的等高线工具获得周长(以微米为单位)和面积(以微米^{2}为单位)的测量值。然后通过仅突出显示各血管周围的CD31染色部分并使用所有图像上的统一阈值获得染色区域的像素数来量化CD31表达。为了解决血管大小的变化,对于每个血管,将CD31表达的原始计数归一化为该血管的周长。所有分析均以盲式完成。

[0191] 统计学:

[0192] 使用Prism 6(GraphPad,LaJolla,CA)完成统计分析。对体重增加率和ICP使用双向ANOVA,并使用未配对的t检验比较组织学变化。使用Wilcoxon配对t检验比较肼苯哒嗪给药前后每只大鼠的动脉直径。使用双向重复测量ANOVA评估大鼠体重。

[0193] 结果

[0194] TPOm防止放射治疗(RT)后体重增加率降低。

[0195] 放疗后,所有大鼠均继续增重,这说明放射治疗的精确性,并且能够最小化对胃肠组织的暴露。但是,与所有其他治疗组相比,盐水治疗的经照射的大鼠的体重与时间的关系图显示出体重速率和幅度降低(图1A)。进行了两次双向重复测量ANOVA,结果表明体重增加、放疗后时间和治疗方式之间存在显著(p=0.0054)相互作用。在盐水/假手术组(27.5±2.8g/周)、TPOm/假手术组(37.7±3.3g/周)、盐水/RT组(21.6±1.6g/周)和TPOm/RT组

(28.6±3.9g/周)之间的平均体重增加率存在差异(图1B);但是,采用双向ANOVA和Tukey's事后检验,仅发现TPOm/假手术组和盐水/RT组之间配对检验存在显著差异($p<0.05$)。

[0196] TPOm保持RT后动脉功能。

[0197] 为了评估TPOm是否能够保持血管功能,用超声心动图测量响应于阴茎嗪给药的阴部动脉扩张(图2)。各组的基线动脉直径相对于放射($p=0.86$)、TPOm($p=0.47$)或相互作用($p=0.46$)没有显著差异。注射阴茎嗪后,盐水/假手术大鼠的动脉直径平均显著增加了28.8%±14.6%。单独用TPOm治疗的未经照射的大鼠的直径增加10.4%±10%。阴茎嗪后,来自Saline/RT大鼠的动脉无法扩张,直径与基线相比无显著变化-7.4%±9.9%,表明RT损害了大鼠的动脉功能,例如,阴部动脉血管舒张。然而,RT后的TPOm治疗保持动脉功能,例如保护大鼠免于阴部动脉血管舒张受损,动脉对阴茎嗪的响应显示直径变化24.1%±7.2%,与未经照射的对照组无显著差异。

[0198] TPOm防止血管收缩。

[0199] 为了评估RT和TPOm相互作用对阴茎动脉的影响,组织学评估了冷冻保存的阴茎的CD31表达,以鉴定脉管系统(图3A)。在盐水或TPOm治疗的未经照射的大鼠中,阴茎动脉周长没有差异,但是与假手术/生理盐水对照相比,放射线使动脉的横截面积显著减少($p<0.01$)。在TPOm/RT大鼠中未观察到这种阴茎动脉横截面积的减少(图3B),表明对RT诱导的血管收缩的保护作用。将CD31染色($CD31^+$像素数)用作血管内皮厚度的标志,对其评估。将$CD31^+$像素数归一化至动脉周长来解决动脉大小的差异。当以$CD31^+$像素/μm表示时,双向ANOVA显示了RT的显著影响,但任意治疗组之间CD31密度配对检验均无差异(图3C)。

[0200] 在测试的条件下,在第9周时TPOm的血管保护作用不足以保持勃起功能。

[0201] 先前已经观察到,放射诱导的ED的大鼠模型在放射剂量和ED的发病率之间显示出S形关系(sigmoidal relationship)(Koontz et al.,"Dose dependence of radiation-induced erectile dysfunction in an animal model,"J.Sex.Med.9(第17届北美性医学学会年度秋季科学会议论文集,内华达州拉斯维加斯,11月10日至13日(2011年)(2012))。14、20和25Gy的剂量分别在50%、80%和100%的大鼠中导致ED(数据未显示)。为了测试TPOm的缓解效果,应用20Gy的剂量检测剂量反应曲线的S形部分的变化。单独用TPOm治疗的大鼠显示出ICP:MAP的变化性增加,但平均值与用盐水治疗的未经照射的大鼠无显著差异(图4)。在仅用RT治疗的六只大鼠中,有五只没能产生大于0.6的ICP:MAP比率,表明在这个研究中ED外显率为83%。放射后的TPOm治疗没有预防ED,外显率达67%。双向ANOVA显示RT的影响显著($p=0.0043$),Tukey's事后检验分析确定了未经照射的假手术对照与盐水/RT和TPOm/RT大鼠之间的显著差异。

[0202] 实施例2:应用新型鼠耳静脉模型评估血小板生成素模拟物对放射诱导的血管渗透性和白细胞粘附的影响

[0203] 材料和方法

[0204] 动物

[0205] 在杜克大学育种核心设施内繁殖Flk1-mCherry小鼠(Larina et al.,Anat.Rec.292(3):333-41(2009))。在整个实验过程中,将至少8周龄的雄性和雌性小鼠转移到无障碍设施中并分组饲养。Flk1-mCherry小鼠的血管内皮细胞组成性表达mCherry,这有助于活体显微镜成像和分析。杜克大学医学院的机构动物护理和使用委员会批准了所有

动物工作。

[0206] 耳部照射

[0207] 通过腹腔注射80/8mg/kg氯胺酮/甲苯噻嗪来麻醉小鼠。将小鼠放在圆柱形的铅夹具(jig)中,该铅夹具屏蔽左耳耳廓以外的整个身体,并使用正电压X射线320放射器(Precision X-ray Inc.;康涅狄格州北布兰福德)以20 3cGy/分钟的剂量率照射(320kVp/10mA,2mm Al滤波器)。在开始实验之前,所有剂量测定均由杜克放射物理学(Duke Radiation Physics)确认。

[0208] TPOm合成和给药

[0209] TPOm由杨森制药(Janssen Pharmaceuticals)如前所述(Knight et al., Int.J.Toxicol.30(4):385-404(2011))合成,并以冻干的形式运输到杜克大学。将TPOm在无菌盐水中重构,无菌过滤,分装,并在-20℃下保存直至使用。临注射前,解冻分装并稀释。放射后6小时,小鼠接受皮下注射TPOm(3,000μg/kg)。

[0210] 活体显微镜术

[0211] 通过异氟烷(2%,与氧气混合)麻醉小鼠,对耳部进行化学脱毛(Nair™)并用70%乙醇清洗。将小鼠置于Zeiss Observer.Z1(Carl Zeiss AG,德国奥伯科亨)倒置显微镜下的加热台上。用双面胶带将放射的耳朵固定在有机玻璃载玻片上。使用Zen Imaging软件(Carl Zeiss AG,德国奥伯科亨)获取图像。Flk1-mCherry小鼠的血管内皮细胞表达mCherry,可使用Zeiss Texas Red滤光片(Ex:560/40;Em:630/75)进行可视化。使用Zeiss eGFP/FITC/Alexa488滤光片(Ex:470/40;Em:525/50)观察吖啶橙(acridine orange)和FITC-葡聚糖。

[0212] 白细胞-内皮细胞(L/E)相互作用

[0213] 将小鼠在显微镜上定向后,静脉注射0.5mg吖啶橙(Sigma,密苏里州圣路易斯;溶于无菌盐水)。吖啶橙标记血液中所有有核细胞(即白细胞)。血管成像60秒,每200ms拍摄一次图像。滚动白细胞定义为沿血管壁边缘且明显与血流分离的细胞。根据直径为每只小鼠鉴定出四条微静脉(venule),并计数滚动通过每条微静脉中三个预选点的白细胞的数量。还测量了血管直径(D)和自由流动的白细胞速度(V),并用于计算剪切速率,定义为(8×V)/D。所有视频由对治疗分组未知的研究人员分析。

[0214] 血管渗透性测量和评估

[0215] 将小鼠在显微镜上定向后,将与Tygon Microbore管导管(catheter)(Harvard Apparatus)相连的30G的针头插入尾静脉。每10秒钟获取FITC和mCherry通道的Z-堆叠图像,并在采集第三组图像后通过导管注射0.5mg的FITC偶联的70kDa葡聚糖。每10秒进行一次图像获取,持续25分钟。

[0216] 使用$C_T(t)$的方程式假设一个渗透率的单室模型。在时间t处,血管外组织中葡聚糖的组织浓度(称为时间活动曲线[TAC])由下式给出:

[0217] $$\frac{dC_T(t)}{dt} = k_1 C_B(t-\Delta) \qquad (0.1)$$

[0218] 模型(0.1)假设,在时间t组织浓度的变化与$C_B(t-\Delta)$(即在延迟Δ处脉管系统中葡聚糖的浓度)成比例。为简单起见,排除了葡聚糖从血管外组织返回血管腔的可能性。在

此背景下,感兴趣的数量为k_1,即渗透率。假设初始条件$C_B(0)=0$(在时间0处组织中没有葡聚糖),则微分方程式(0.1)可求解为:

[0219] $$C_T(t)=k_1\int_0^t C_B(s-\Delta)ds \qquad (0.2)$$

[0220] 从方程式(0.2)估计k_1需要了解在时间t处葡聚糖的血管内浓度和血管外浓度,$C_B(t)$和$C_T(t)$。由于缺乏可靠的血管标记,难以准确区分图像中的血管成分和血管外成分。然而,由于最早的葡聚糖信号仅在脉管系统中可见,因此能够识别出部分脉管系统。通过在这个区域上绘制ROI(TPOm保护放射场之外的脉管系统。图3A示出RT后九周对CD31染色的血管内皮细胞的免疫荧光图像。为了创建免疫荧光图像,将阴茎组织切除、冷冻切片,并用CD31免疫荧光使血管内皮细胞可视化。图3B示出显示阴茎动脉的横截面积的图。图3C示出图表,显示表示为像素/微米的CD31密度(CD31表达/动脉周长)的量化。N=4-6/组。

[0221] 图4示出图表,表明在RT后10分钟给药单一剂量的TPOm没有预防前列腺RT(20Gy)在大鼠中诱导的勃起功能障碍(ED)。在RT(20Gy)后9周对海绵体神经刺激后测试了海绵体内压(ICP),并将其归一化为平均动脉压(MAP)。用4V、6V或8V刺激神经,并将每只大鼠的最佳反应用于分析。星号*表示放射的显著影响(p=0.004,双向ANOVA)。N=6-7只大鼠/组。

[0222] 图),可以估算出血管TAC $C_B(t)$。假设TAC在整个脉管系统的其他部分是均匀的。计算了由血管成分和组织成分组成的整个视野$C_F(t)$的平均活动,而不是尝试识别血管外区域。在不失一般性的前提下,这种总体活动可以表示如下:

[0223] $C_F(t)=v_bC_B(t)+(1-v_b)C_T(t)$ (0.3)

[0224] 其中v_b是由脉管系统组成视野中的(未知)面积分数。然后可以用方程式(0.2)替换方程式(0.3)中的未知组织TAC $C_T(t)$,如下所示:

[0225] $$C_F(t)=v_bC_B(t)+(1-v_b)k_1\int_0^t C_B(s-\Delta)ds \qquad (0.4)$$

[0226] 假设血管TAC,$C_B(t)$严格为正(>0),可以将(0.4)的两边除以它得到转换后的方程:

[0227] $$\frac{C_F(t)}{C_B(t)}=v_b+(1-v_b)k_1\frac{\int_0^t C_B(s-\Delta)ds}{C_B(t)}$$

[0228] 即$y(t)=v_b+mx(t)$ (0.5)

[0229] 其中$y(t)=\frac{C_F(t)}{C_B(t)}$, $x(t)=\frac{\int_0^t C_B(s-\Delta)ds}{C_B(t)}$并且$m=(1-v_b)k_1$。

[0230] 方程式(0.5)可以看成是直线形式,其可以使用线性回归拟合。未知常数v_b和m估算为拟合回归线的斜率和截距。这种估算技术通常称为Patlak图形分析,用于估算动态PET研究中放射性示踪剂的组织传输速率(Patlak et al.,J.Cereb Blood Flow Metab.3(1):

1-7(1983))。在实践中,在(0.5)中描述的线性关系导致图6所示的斜率之前,需要一段时间才能达到平衡。因此,通过排除研究的前10分钟来拟合线性关系。为此,渗透性常数可以估算为:

[0231] $\hat{k}_1 = \hat{m}/(1-\hat{v}_b)$。

[0232] 循环血细胞分析

[0233] 腹腔注射50μL Euthasol(Virbac,德克萨斯州沃思堡)对小鼠实施安乐死。在小鼠对捏脚趾无反应后,但在心跳停止之前,通过肝素化注射器通过心脏穿刺收集了500μL血液,并立即与20μL肝素一起涡旋。使用杜克大学兽医诊断实验室(Duke University Veterinary Diagnostic Laboratory)的IDEXX ProCyte Dx血液分析仪进行CBC分析。

[0234] 结果

[0235] TPOm对血管渗透性的影响

[0236] 放射介导的血管内皮细胞凋亡的后果之一是血管完整性降低,导致血管渗漏(Weintraub et al.,Am.Coll.Cardiol.55(12):1237-9(2010))。静脉注射70kDa FITC-葡聚糖后,通过量化从脉管系统中外渗的葡聚糖来评估血管完整性。选择这种大小的葡聚糖是因为它接近白蛋白的大小;因此,其外渗是生理相关的(Dreher et al.,J.Natl.Cancer Inst.98(5):335-44(2006))。成像开始后30秒注入葡聚糖,以建立背景信号。注射后,在脉管系统内观察到强烈的荧光信号,其遍布整个血管网络。源自血管内的FITC信号的“扩散”表示观察到渗漏。

[0237] 尽管考虑了包括从组织到脉管系统的反向转运的模型,但在两个方向上都有转运的标准模型假定血液TAC具有负指数形状,这意味着血液TAC随时间单调减少。基于此处展示的观察到的血液TAC,在许多情况下都违反这一模型,其中某些个体在成像后期的时间先升高后降低。这表明标准模型对某些数据的拟合较差。拟合的模型更强大,因为它使用了经验观察到的数据,而没有预先假设任何特定形式的血液TAC。

[0238] TPOm治疗通过减少渗漏保持血管完整性

[0239] 未经照射的对照小鼠表现出较强的血管完整性,并且信号保留在血管内,并在25分钟的成像过程中没有明显变化。在被RT损害了血管完整性的小鼠中,FITC信号明显超出了血管遮罩(mask)。计算了每只小鼠的渗透率并示于图7中。放射显著提高了照射后第3天和第7天的渗透率(与对照组相比,$p<0.05$,见表1)。然而,在两个时间点,放射后用TPOm治疗的小鼠的渗透率与未照射的对照无显著差异。然而,在第7天,在对照组中有一些动物的渗透性升高,而TPOm组中没有动物的渗透性升高。在第3天和第7天的渗透率之间没有相关性,表明损伤可能不会在动物之间同时达到高峰(图8)。

[0240] 表1:修订后的葡聚糖渗透率比较的ANOVA结果

[0241]

项目	影响(Effect)	标准误差	t值	p值
基线	0.0012	0.0003	3.7025	0.0003
RT D3	0.0013	0.0006	2.0089	0.0483*
RT D7	0.0015	0.0006	2.2727	0.0260*
RT+TPO D3	0.0009	0.0007	1.2689	0.2086
RT+TPO D7	-0.0002	0.0007	-0.2346	0.8152

[0242] TPOm对白细胞-内皮细胞相互作用的影响

[0243] 先前的研究已经利用活体显微镜术来量化照射介导的炎症反应,造成在受照射的小肠(Johnson et al.,BMC Surgery 4:10(2004))、皮肤(Kimura et al.,Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.33(3):627-33(1995))和舌下粘膜(Birer et al.,"Inhibition of the continuum of radiation-induced normal tissue injury by a redox-active mu porphyrin,"Radiation Research,188(1):94-104(2017))的末端微静脉中滚动白细胞增加。为了评估白细胞与内皮的相互作用,获取了照射后(6Gy)24小时的耳部脉管系统的实时图像。血管内注射吖啶橙后标记白细胞核,可以通过荧光显微镜可视化。可以清楚地看到,在假手术和RT小鼠中,清晰观察到滚动白血球沿血管壁边缘化,速率与自由流动明显不同(

[0244] A)。

[0245] 使用毛细血管后微静脉进行分析,根据直径(直径大约15-60μm)和血流汇聚的证据,将其与其他血管区分开。治疗对所选血管中的平均血流速度、直径或剪切速率无显著影响(图10)。

[0246] 剪切速率,即平行于血管壁的血流的力量,对L/E相互作用有直接影响。较高的剪切速率减少了白细胞与粘附分子的相互作用。这意味着在高剪切速率下较少的L/E相互作用以及当绘制剪切速率与L/E相互作用的曲线时的负斜率。为了研究RT在这种关系上的作用,为每只小鼠的至少四个血管确定剪切速率和L/E相互作用,将每个血管的值绘制为散点图(

[0247] B),并使用GraphPad Prism计算每一单只小鼠的斜率。正如预期的那样,L/E相互作用随剪切速率的增加而降低,产生-14.4±5.1的斜率(

[0248] C)。然而,在照射后24小时,发生了充分的内皮细胞活化作用,使得即使在较高的剪切速率下,L/E相互作用仍然持续,造成5.6±3.6的平均斜率。

[0249] 为了排除观察结果是由白细胞计数的系统性变化引起的可能性,进行了全血细胞计数(表2)。照射后24小时,RT小鼠的血小板略有减少,但这并不显著。各组之间的总白细胞、中性粒细胞或淋巴细胞无显著差异,RT、TPOm或相互作用对其的影响也不显著。因此,观察到的L/E相互作用的增加不仅仅是血液成分升高的副产物。

[0250] 表2:在RT后24小时获得全血细胞计数。N=5/组;数据表示为平均值±SEM

[0251]

	盐水，0 Gy	TPOm，0 Gy	盐水 6 Gy	TPOm，6 Gy	TPOm 的影响 (p 值)	RT 的影响 (p 值)	相互作用的影响 (p 值)
血小板 (K/μL)	582±80	531±68	370±70	548±105	0.4523	0.2543	0.1815
白细胞 (K/μL)	2.5±0.5	2.55±0.48	3.64±0.7	2.11±0.33	0.2603	0.9926	0.1073
中性粒细胞 (K/μL)	0.368±0.05	0.68±0.31	0.456±0.09	0.232±0.05	0.7929	0.291	0.1235
淋巴细胞 (K/μL)	1.79±0.44	1.77±0.23	1.52±0.12	1.33±0.24	0.7046	0.2292	0.7779

[0252] 在耳部接受6Gy治疗并在六个小时后皮下注射生理盐水或300μg/kg TPOm的小鼠中，对L/E相互作用与剪切速率之间的关系的影响具有统计学上的显著性，盐水组中平均斜率为-14.4±10.9，而TPOm治疗组与未经照射的对照之间没有差异(平均斜率为-8.7±6.4)。这些发现支持了如下假设，TPOm减少放射后血管内皮白细胞相互作用，因此可能促进照射后血管完整性的维持。

[0253] 本领域技术人员将理解，可以在不脱离其广泛的发明构思的情况下对上述实施方案进行改变。因此，应理解，本发明不限于所公开的特定实施方案，而是旨在涵盖在本说明书所限定的本发明的精神和范围内的修改。

[0001] 序列表

[0002] <110> 詹森药业有限公司

[0003] <120> 保护靶向放射治疗诱导下的血管完整性的方法

[0004] <130> 688097.0510/334WO

[0005] <150> us 62/537,049

[0006] <151> 2017-07-26

[0007] <160> 4

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 14

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 合成肽

[0015] <220>

[0016] <221> X

[0017] <222> (9)..(9)

[0018] <223> 色氨酸或β-(2-萘基)丙氨酸

[0019] <220>

[0020] <221> X

[0021] <222> (14)..(14)

[0022] <223> 丙氨酸或肌氨酸

[0023] <400> 1

[0024] Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Xaa Leu Ala Ala Arg Xaa

[0025] 1 5 10

[0026] <210> 2

[0027] <211> 14

[0028] <212> PRT

[0029] <213> 人工序列

[0030] <220>

[0031] <223> 合成肽

[0032] <220>

[0033] <221> X

[0034] <222> (9)..(9)

[0035] <223> β-(2-萘基)丙氨酸

[0036] <220>

[0037] <221> X

[0038] <222> (14)..(14)

[0039] <223> 肌氨酸

[0040] <400> 2

[0041] Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Xaa Leu Ala Ala Arg Xaa

[0042] 1 5 10

[0043] <210> 3

[0044] <211> 14

[0045] <212> PRT

[0046] <213> 人工序列

[0047] <220>

[0048] <223> 合成肽

[0049] <400> 3

[0050] Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala

[0051] 1 5 10

[0052] <210> 4

[0053] <211> 269

[0054] <212> PRT

[0055] <213> 人工序列

[0056] <220>

[0057] <223> 重组肽

[0058] <400> 4

[0059] Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

[0060] 1 5 10 15

[0061] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

[0062] 20 25 30

[0063] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

[0064] 35 40 45

[0065] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

[0066] 50 55 60

[0067] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

[0068] 65 70 75 80

[0069] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

[0070] 85 90 95

[0071] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

[0072] 100 105 110

[0073] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

[0074] 115 120 125

[0075] Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

[0076] 130 135 140

[0077] Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

[0078] 145 150 155 160

[0079] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

[0080] 165 170 175

[0081] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

[0082] 180 185 190

[0083] Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

[0084] 195 200 205

[0085] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

[0086] 210 215 220

[0087] Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg

[0088] 225 230 235 240

[0089] Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile

[0090] 245 250 255

[0091] Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala

[0092] 260 265

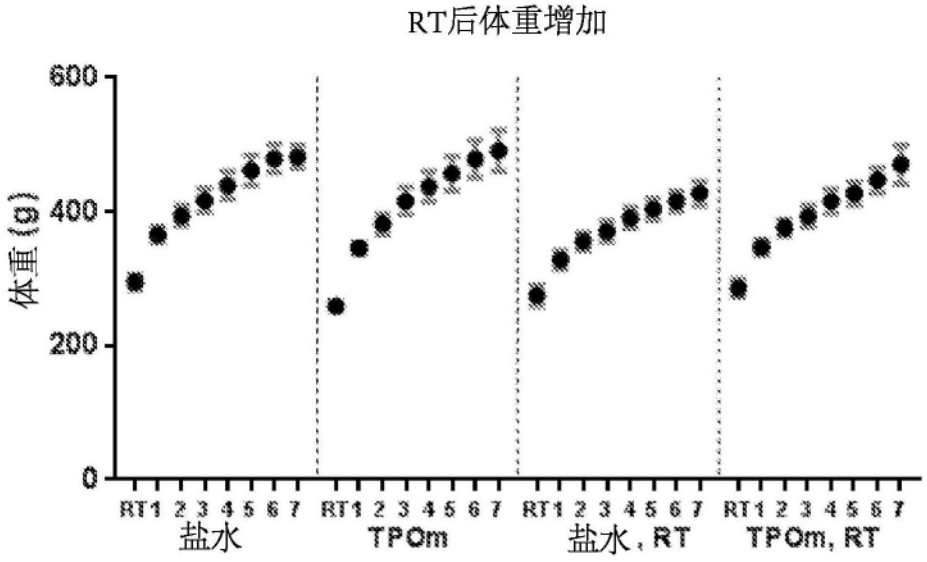

RT后体重增加
600
400
200
0
体重(g)
RT1 2 3 4 5 6 7
盐水
TPOm
盐水，RT
TPOm, RT

图1A

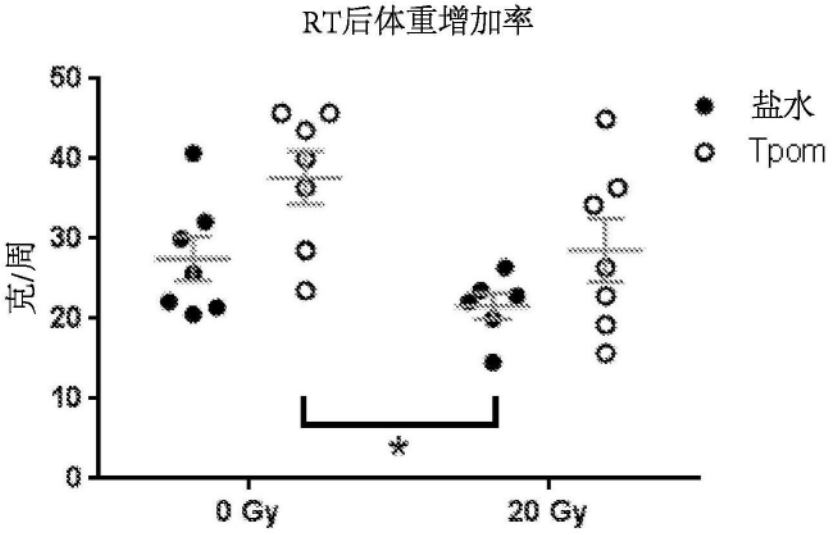

RT后体重增加率
50
40
30
20
10
0
克/周
盐水
Tpom
*
0 Gy
20 Gy

图1B

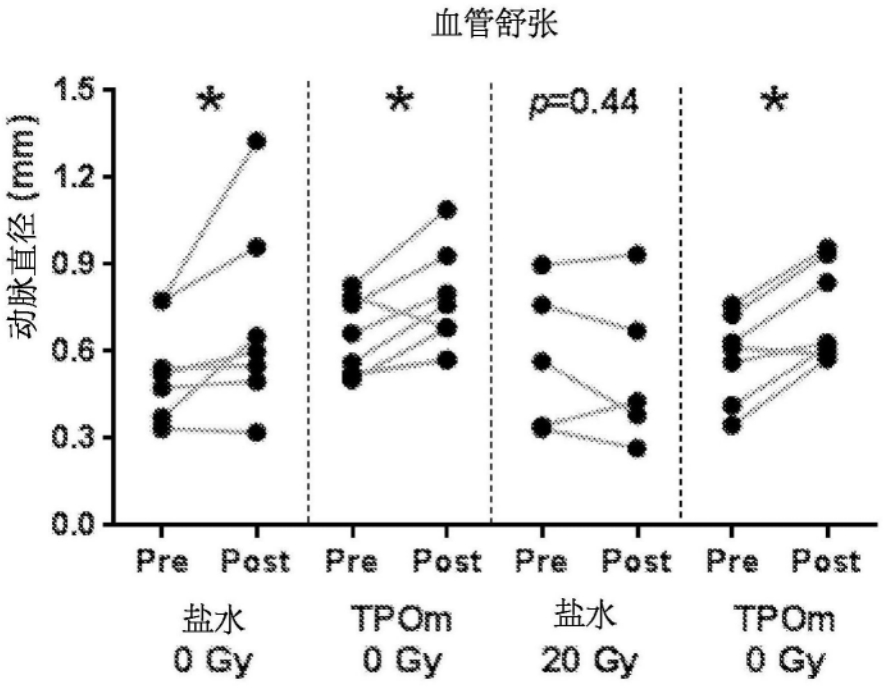

血管舒张
动脉直径 (mm)
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
*
*
p=0.44
*
Pre
Post
Pre
Post
Pre
Post
Pre
Post
盐水
0 Gy
TPOm
0 Gy
盐水
20 Gy
TPOm
0 Gy

图2

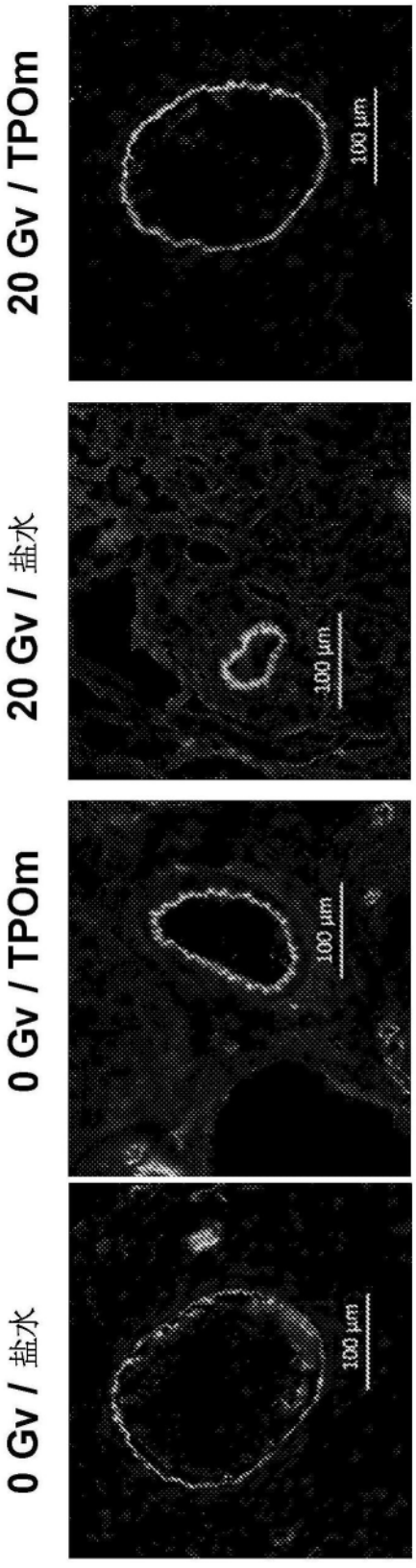


图3A

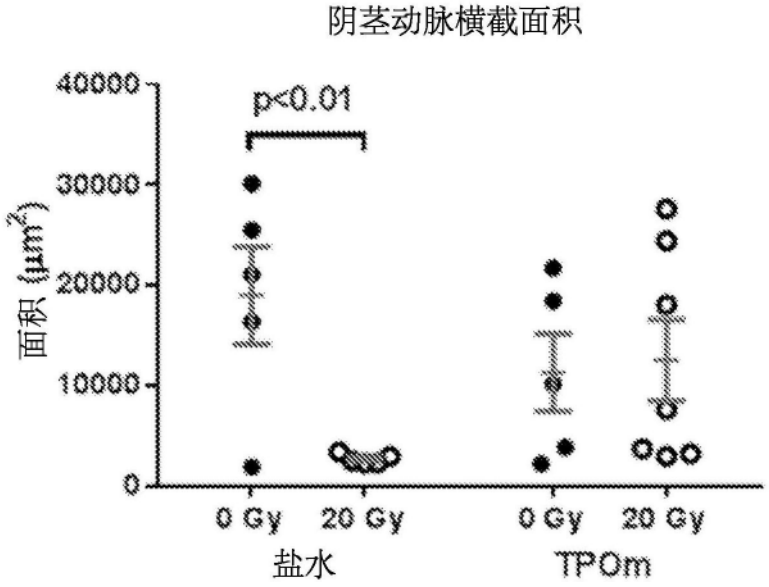

阴茎动脉横截面积
40000
30000
20000
10000
0
面积 (μm²)
p<0.01
0 Gy
20 Gy
0 Gy
20 Gy
盐水
TPOm

图3B

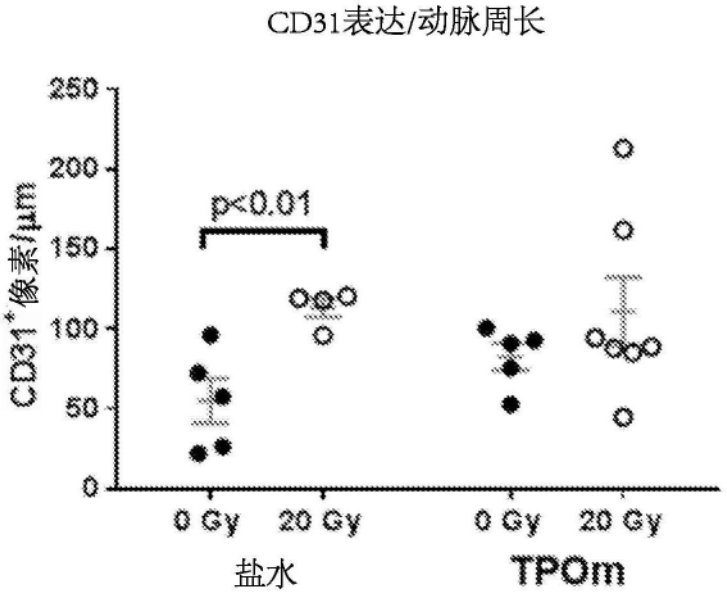

CD31表达/动脉周长
250
200
150
100
50
0
CD31⁺像素/μm
p<0.01
0 Gy
20 Gy
0 Gy
20 Gy
盐水
TPOm

图3C

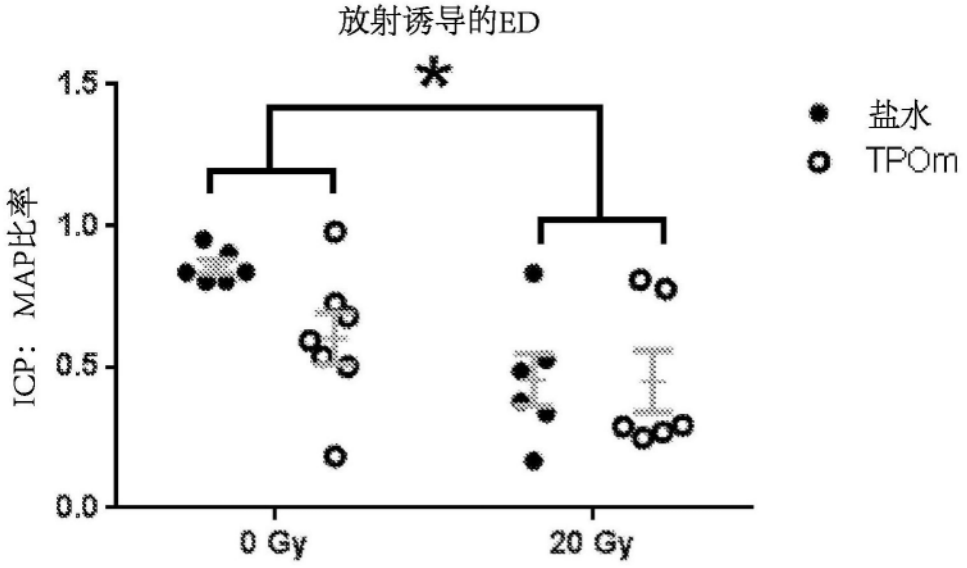


图4

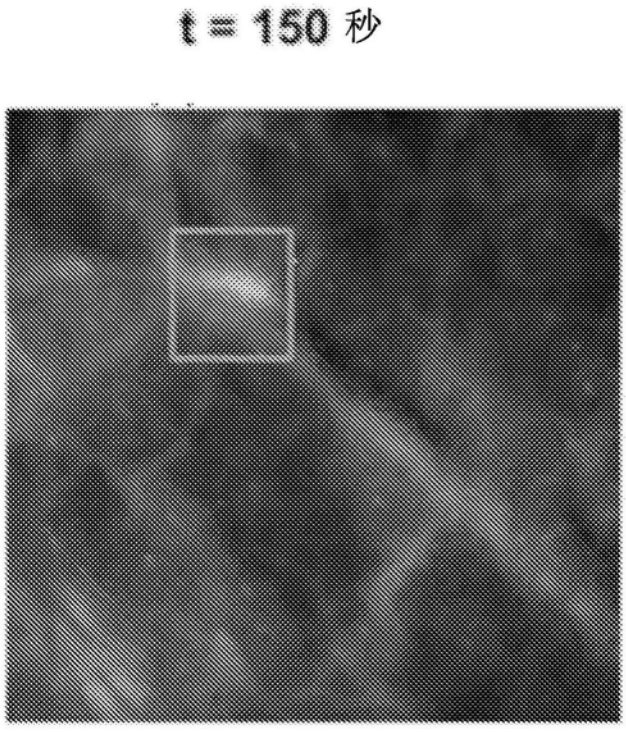


图5A

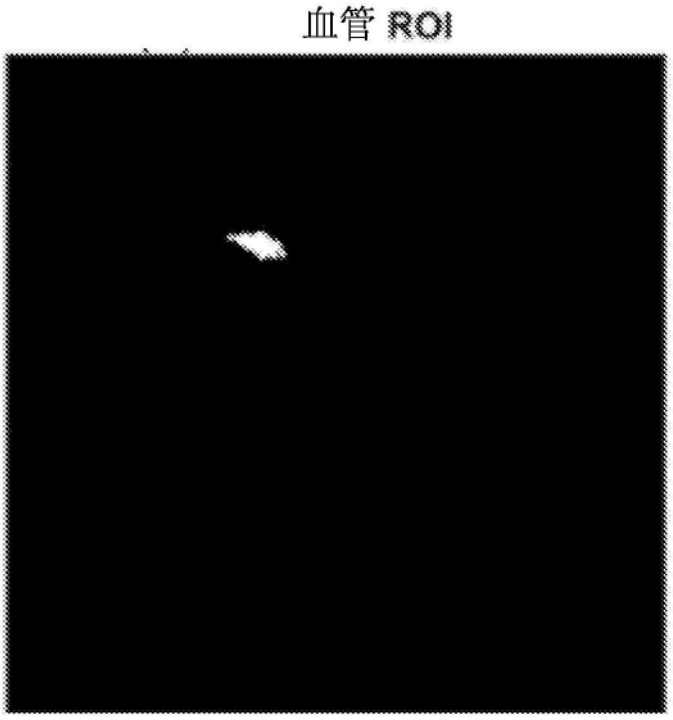


图5B

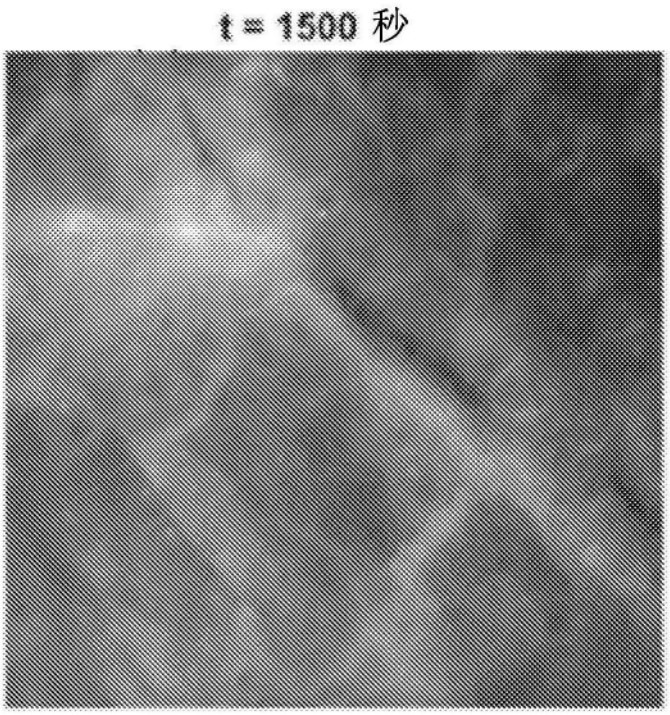


图5C

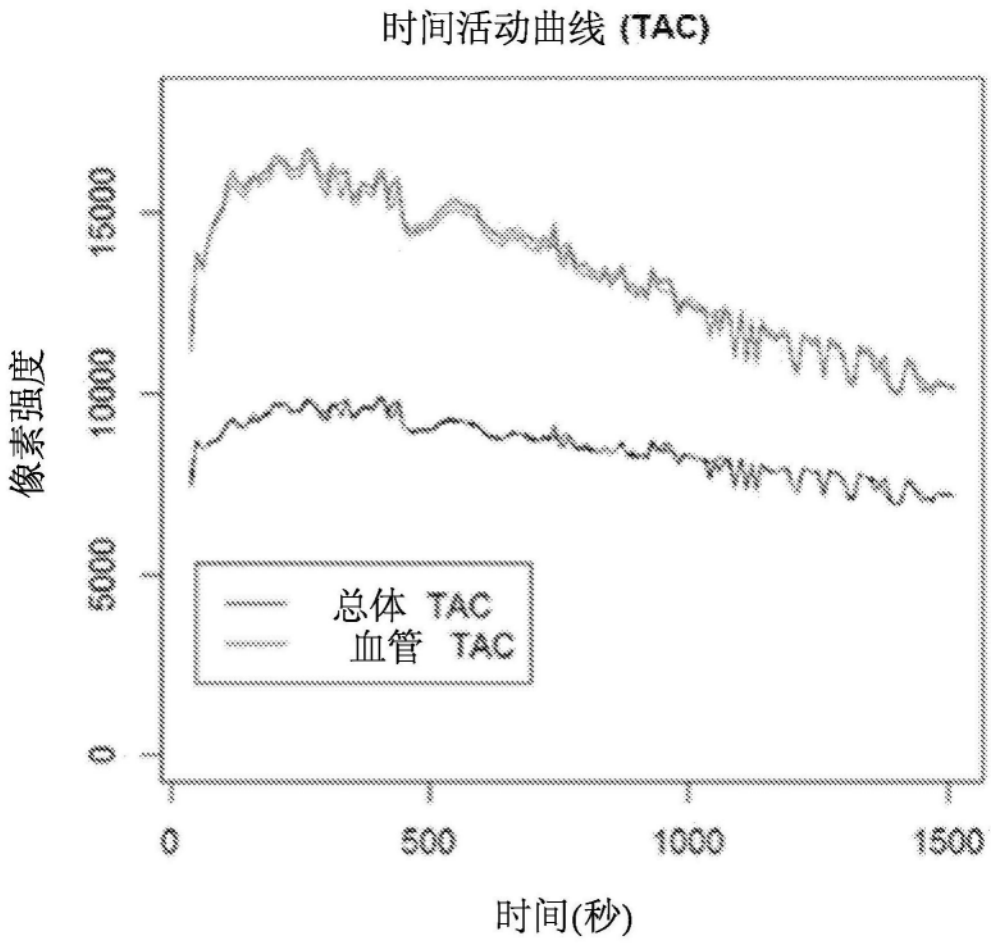
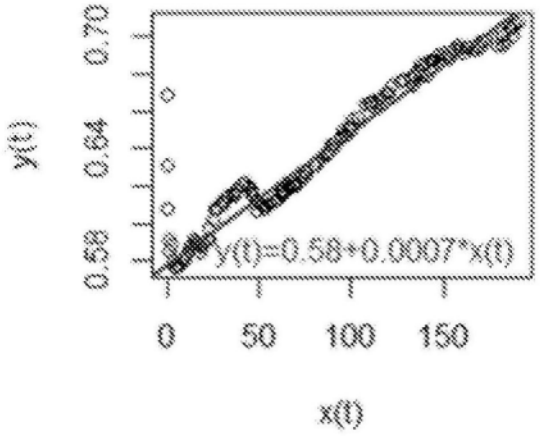
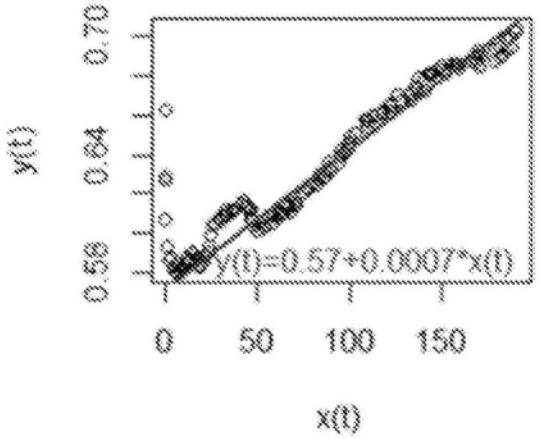

时间活动曲线 (TAC)
像素强度
15000
10000
5000
0
总体 TAC
血管 TAC
0
500
1000
1500
时间(秒)

图5D

切片1



切片2



切片3

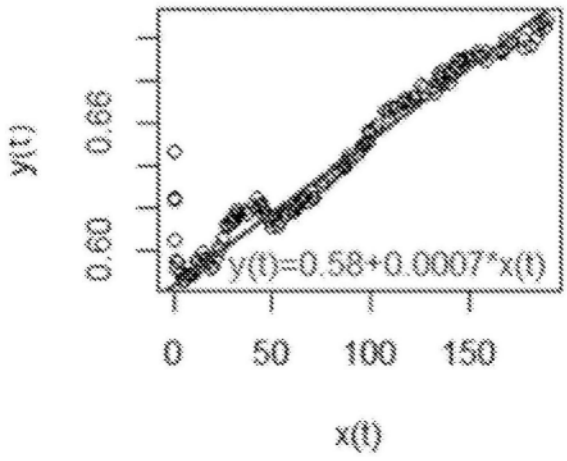


图6

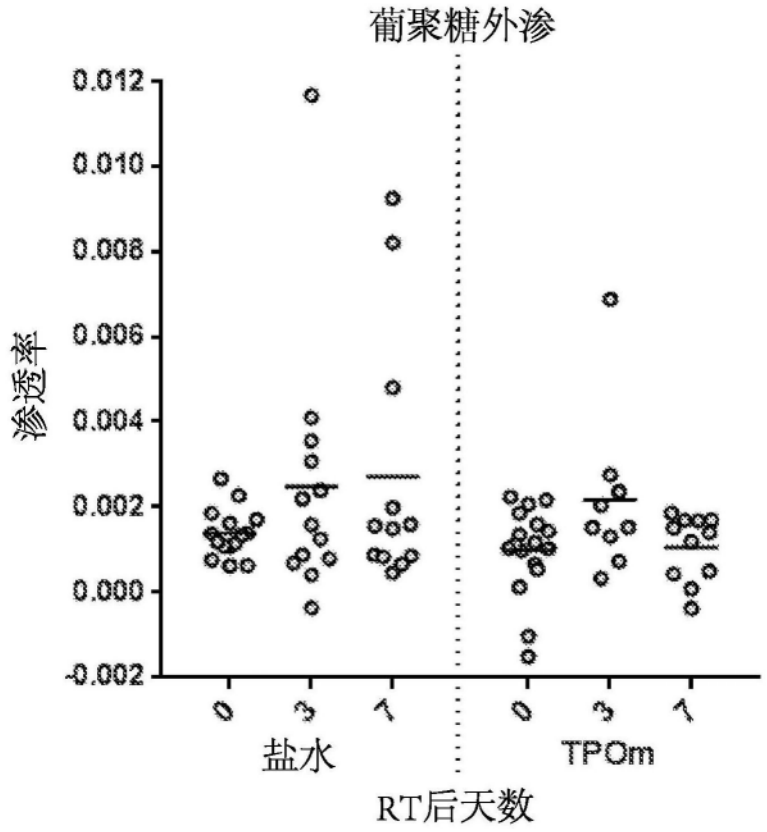

葡聚糖外渗
渗透率
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
-0.002
0
3
7
0
3
7
盐水
TPOm
RT后天数

图7

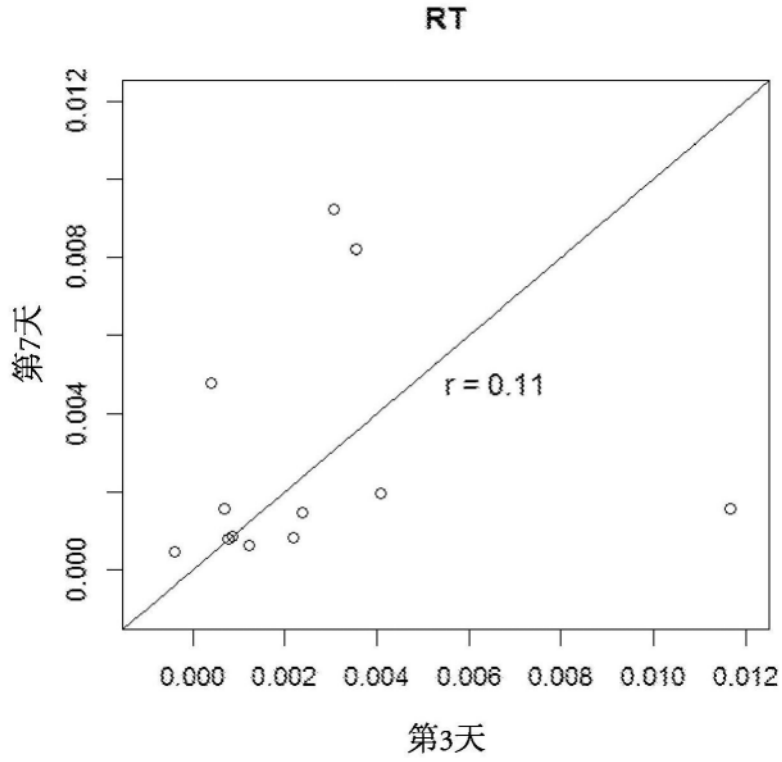

RT
第7天
0.012
0.008
0.004
0.000
r = 0.11
0.000
0.002
0.004
0.006
0.008
0.010
0.012
第3天

图8

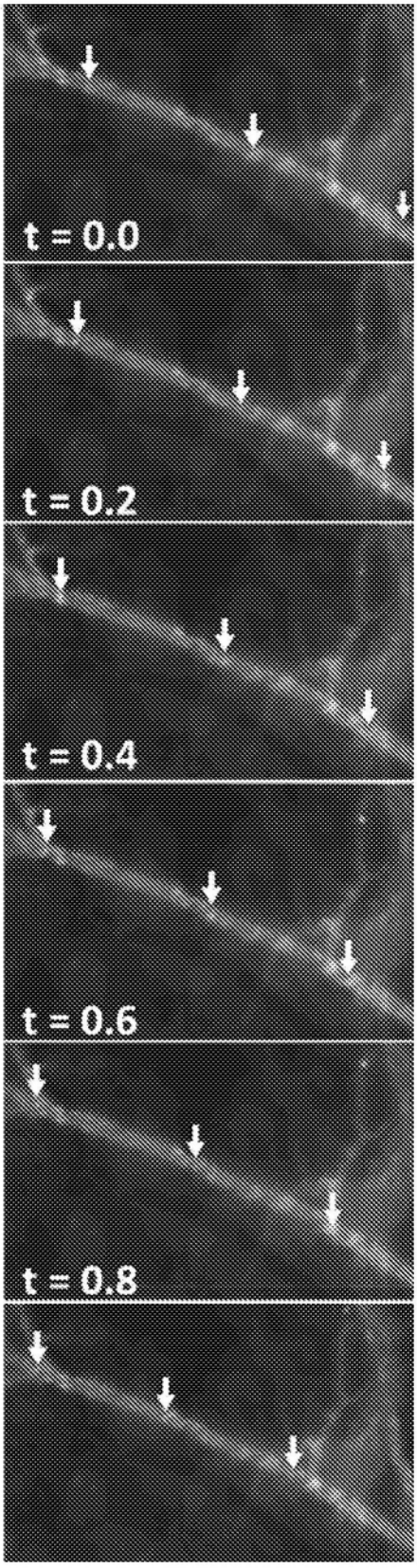


图9A

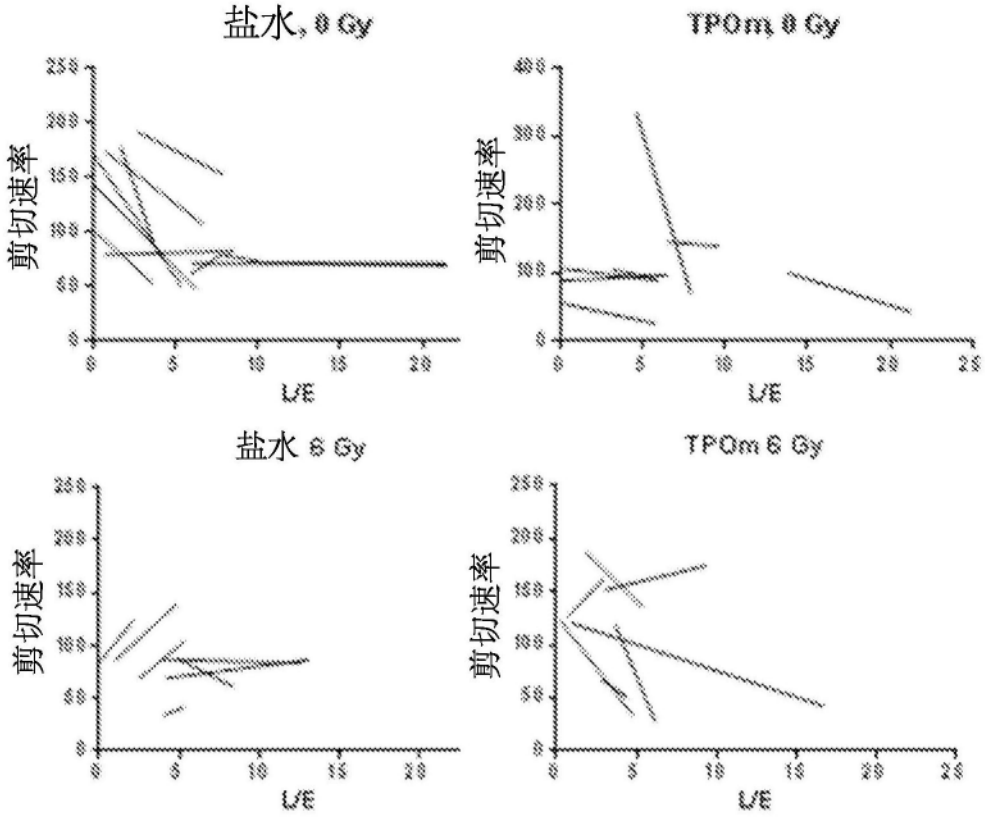

盐水, 0 Gy
TPOm, 0 Gy
盐水 6 Gy
TPOm 6 Gy
剪切速率
L/E

图9B

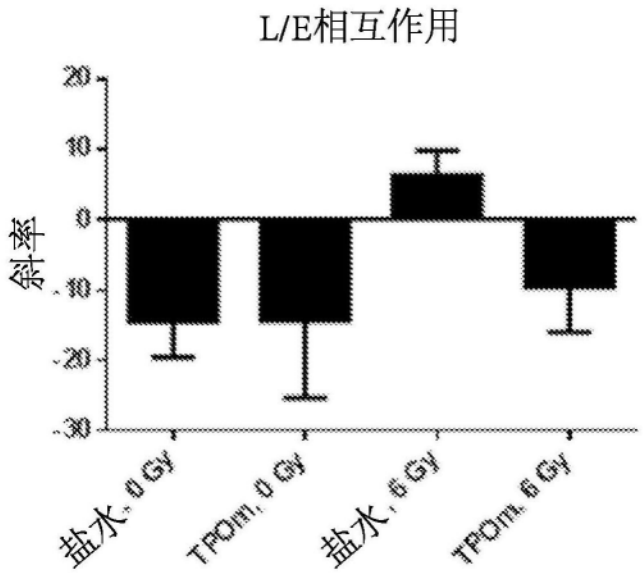

L/E相互作用
斜率
20
10
0
-10
-20
-30
盐水, 0 Gy
TPOm, 0 Gy
盐水, 6 Gy
TPOm, 6 Gy

图9C

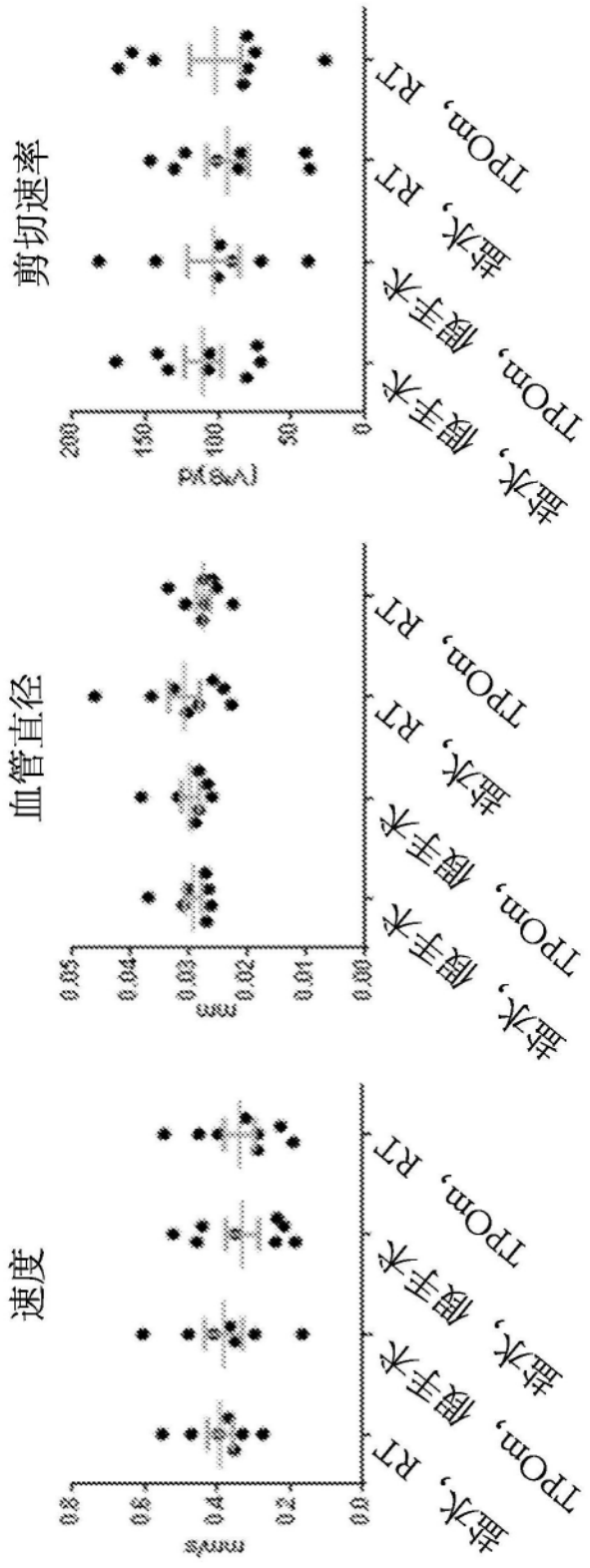

剪切速率
血管直径
速度
盐水，RT
TPOm，RT
盐水，极手术
TPOm，极手术
盐水，RT
TPOm，RT
盐水，极手术
TPOm，极手术

图10