



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 114555090 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 17

(21) 申请号 202080069308.5

(22) 申请日 2020.08.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114555090 A

(43) 申请公布日 2022.05.27

(30) 优先权数据
62/882937 2019.08.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/045026 2020.08.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/026247 EN 2021.02.11

(73) 专利权人 PTC医疗MP公司
地址 美国新泽西州
专利权人 弗吉尼亚联邦大学

(72) 发明人 E·梅扎罗马 C·拉本德
R·米克尔森 V·亚科夫列夫
N·史密斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 罗文锋 彭昶

(51) Int.Cl.
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(56) 对比文件
Maaïke Berbée et al.. “Novel
Strategies to Ameliorate Radiation
Injury: A Possible Role for
Tetrahydrobiopterin”.《Curr Drug Targets》
.2010,第11卷(第11期),第1366-1374页.
Zheng-Yi Zhang et al. .
“Tetrahydrobiopterin Protects against
Radiation-induced Growth Inhibition in
H9c2 Cardiomyocytes”.《Chin Med J》.2016,第
129卷(第22期),第2733-2740页.
Maaïke Berbée et al.. “Novel
Strategies to Ameliorate Radiation
Injury: A Possible Role for
Tetrahydrobiopterin”.《Curr Drug Targets》
.2010,第11卷(第11期),第1366-1374页.
审查员 甘露

权利要求书1页 说明书16页 附图25页

(54) 发明名称
墨蝶呤及其代谢物治疗辐射暴露的用途

(57) 摘要
本发明提供通过给予墨蝶呤、四氢生物蝶呤
或二氢生物蝶呤用于治疗受试者的辐射暴露的
方法。

1. 墨蝶呤或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于在暴露于辐射的受试者中减少或抑制组织和/或器官损伤,减少或抑制心脏和/或肺部毒性,减少胃肠、心脏和/或肺部内皮细胞死亡,或者减少胃肠、心脏和/或肺部上皮细胞中辐射引起的炎症,其中所述药物以有效量给予。

2. 墨蝶呤或其药学上可接受的盐在制备用于治疗受试者的急性辐射综合征的药物中的用途,其中所述药物以有效量给予。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予减少或抑制所述受试者体内的组织和/或器官损伤。

4. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予减少或抑制所述受试者体内的心脏和/或肺部毒性。

5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予减少所述受试者体内的胃肠、心脏和/或肺部内皮细胞死亡。

6. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予减少所述受试者体内的胃肠、心脏和/或肺部上皮细胞中辐射引起的炎症。

7. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述有效量为约0.1-约200mg/kg/天。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述受试者患有急性辐射综合征。

9. 根据权利要求2所述的用途,其中在暴露于辐射之后24小时内进行所述给予。

10. 根据权利要求2所述的用途,其中在暴露于辐射之后至少24小时进行所述给予。

11. 根据权利要求1所述的用途,其中所述受试者患有慢性辐射综合征。

12. 根据权利要求1所述的用途,其中所述受试者患有皮肤辐射综合征。

13. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述受试者在不到一天内暴露于至少0.3Gy。

14. 根据权利要求1所述的用途,其中所述受试患者在超过一天的时间段内暴露于至少0.7Gy。

15. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予至少每天进行一次,持续至少6天。

16. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予增加miR-15b-3p、miR-106a-5p、miR-133b、miR-136-5p、miR-451a、miR-1、miR-335-3p、let-7d-3p和/或let-7c-5p的表达。

17. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予降低IL-1 β 、IL-6、IL-17A、Spp2和/或TGF- β 1在肺部上皮细胞中的表达。

18. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予增加let-7a-5p、miR-1、miR-106b-3p、miR-106b-5p、miR-126-3p、miR-181a-5p、miR-335-3p和/或miR-335-5p的表达。

19. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予降低let-7g-5p、let-7i-5p和/或miR-16-5p的表达。

20. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述给予至少每天进行,持续至少14天。

墨蝶呤及其代谢物治疗辐射暴露的用途

[0001] 关于联邦资助研究的声明

[0002] 本发明在美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) (NIH) 授予的资助号R01 AI133595下在政府支持下完成。政府对本发明拥有一定权利。

[0003] 发明背景

[0004] 放射灾难的威胁都代表着潜在的灾难性公共卫生紧急情况,其强调需要开发医疗对策以减轻全身的辐射引起的损伤和死亡。全身辐射(TBI)暴露的初始健康后果为在辐射最敏感的器官出现急性辐射综合征(ARS),这种暴露的存活率取决于造血系统中的干细胞和祖细胞以及胃肠系统中的上皮细胞的损伤程度。造血生长因子、电解质和流体、输血和抗生素均为治疗ARS的疗法的进步,其已导致存活率的显著改善。然而,在造血和GI系统的ARS中存活的患者通常死于肺部和心脏的晚期损伤。

[0005] 因此,需要改善暴露于辐射的患者的死亡率和器官功能的治疗。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明的特征在于用于治疗患有辐射暴露的患者的方法。例如,本发明使用墨蝶呤(SP)来减轻对患者的心脏、胃肠道和/或肺部的毒性。

[0008] 在一方面,本发明提供通过给予受试者有效量的墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤或其药学上可接受的盐或共晶体来治疗暴露于辐射的受试者的方法。

[0009] 在某些实施方案中,给予减少或抑制受试者体内的组织和/或器官损伤;减少或抑制受试者体内的心脏、胃肠和/或肺部毒性;减少受试者体内的胃肠、心脏和/或肺部内皮细胞死亡;和/或减少受试者体内的胃肠、心脏和/或肺部上皮细胞中辐射引起的炎症。

[0010] 有效量为例如约0.1-约200mg/kg/天,例如约5mg/kg/天-约35mg/kg/天。

[0011] 在实施方案中,受试者患有急性辐射综合征,例如,其中在暴露于辐射之后24小时内进行给予。在实施方案中,受试者患有慢性辐射综合征。在实施方案中,受试者患有皮肤辐射综合征。在实施方案中,受试者在不到一天内暴露于至少0.3Gy。在实施方案中,受试者在超过一天的时间段内暴露于至少0.7Gy。

[0012] 在实施方案中,给予至少每天进行一次,持续至少6天,例如至少1周、至少10天(例如至少14天)、至少约1个月、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月或至少约1年。

[0013] 在实施方案中,给予增加miR-15b-3p、miR-106a-5p、miR-133b、miR-136-5p、miR-451a、miR-1、miR-335-3p、let-7d-3p和/或let-7c-5p的表达,例如血清外泌体的(例如当给予BH4时),和/或降低IL-1 β 、IL-6、IL-17A、Spp2和/或TGF- β 1在肺部上皮细胞中的表达(例如当给予SP时)。在实施方案中,给予增加let-7a-5p、miR-1、miR-106b-3p、miR-106b-5p、miR-126-3p、miR-181a-5p、miR-335-3p和/或miR-335-5p的表达和/或降低let-7g-5p、let-7i-5p和/或miR-16-5p的表达,例如血清外泌体的(例如当给予SP时)。

[0014] 在一方面,本发明的特征在于通过给予受试者有效量的墨蝶呤或其药学上可接受的盐来减少或抑制已暴露于辐射的受试者体内的组织和/或器官损伤的方法。

[0015] 在另一方面,本发明的特征在于通过给予受试者有效量的墨蝶呤或其药学上可接受的盐来减少或抑制已暴露于辐射的受试者体内的心脏和/或肺部毒性的方法。

[0016] 在另一方面,本发明的特征在于通过给予受试者有效量的墨蝶呤或其药学上可接受的盐来减少已暴露于辐射的受试者体内的心脏和/或肺部内皮细胞死亡的方法。

[0017] 在另一方面,本发明的特征在于通过给予受试者有效量的墨蝶呤或其药学上可接受的盐来减少受试者体内心脏和/或肺部上皮细胞中的辐射引起的炎症的方法。

[0018] 在前述四个方面的一个实施方案中,墨蝶呤或其药学上可接受的盐的有效量为小于1mg/kg。

[0019] 在前述四个方面的另一个实施方案中,墨蝶呤或其药学上可接受的盐在暴露于辐射之后约24小时给予。

[0020] 在前述四个方面的另一个实施方案中,方法包括以多个剂量给予墨蝶呤或其药学上可接受的盐。

[0021] 在前述四个方面的另一个实施方案中,方法包括每天给予墨蝶呤或其药学上可接受的盐,持续至少6天。

[0022] 在前述四个方面的另一个实施方案中,有效量的墨蝶呤或其药学上可接受的盐导致miR-15b-3p、miR-106a-5p、miR-133b、miR-136-5p、miR-451a、miR-1、miR-335-3p、let-7d-3p和/或let-7c-5p的表达增加。

[0023] 定义

[0024] 在本申请中,除非上下文另外明确说明,否则(i)术语“一种(a)”可被理解为意指“至少一种”;(ii)术语“或”可被理解为意指“和/或”;(iii)术语“包含”和“包括”可被理解为包括逐项列出的组分或步骤,无论是单独呈现还是与一种或多种另外的组分或步骤一起呈现;和(iv)术语“约”和“大约”可被理解为允许如会被本领域普通技术人员所理解的标准差;和(v)在提供范围的情况下,包括端点。

[0025] 在一些实施方案中,如本文使用的术语“约”意指指定值的 $\pm 10\%$ 。

[0026] 本文指涉“约”或“大约”一个值或参数包括(并描述)针对该值或参数本身的变化。例如,指涉“约X”的描述包括“X”的描述。

[0027] 如本文使用的,术语“给予”是指给予受试者组合物。可通过任何适当的途径给予动物受试者(例如给予人类)。例如,在一些实施方案中,给予可为支气管(包括通过支气管滴注)、口颊、肠内、皮间、动脉内、皮内、胃内、髓内、肌内、鼻内、腹膜内、鞘内、静脉内、心室内、粘膜、鼻腔、口服、直肠、皮下、舌下、局部、气管(包括通过气管内滴注)、透皮、阴道或玻璃体的。

[0028] 化合物的“有效量”可根据因素比如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及化合物引发期望的反应的能力而变化。治疗有效量包括其中化合物的任何毒性或有害作用被治疗有益作用超过的量。治疗有效量还包括足以赋予益处(例如临床益处)的量。

[0029] “水平”意指与参考相比较的化合物的水平。参考可为如本文定义的任何有用的参考。化合物的“降低的水平”或“提高的水平”意指与参考相比较化合物水平的降低或提高(例如降低或提高至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约300%、至少约400%、至少约500%或更多;降低或提高少于约0.01倍、少于约0.02倍、少于约0.1倍、少于约0.3倍、少于约0.5倍、少于约0.8

倍或更少；或者提高到多于约1.2倍、多于约1.4倍、多于约1.5倍、多于约1.8倍、多于约2.0倍、多于约3.0倍、多于约3.5倍、多于约4.5倍、多于约5.0倍、多于约10倍、多于约15倍、多于约20倍、多于约30倍、多于约40倍、多于约50倍、多于约100倍、多于约1000倍或更多)。化合物的水平可以质量/体积(例如g/dL、mg/mL、 μ g/mL、ng/mL)或相对于样品中总化合物的百分比表示。

[0030] 如本文使用的,术语“药用组合物”表示含有与药学上可接受的赋形剂一起配制的本文所述化合物的组合物。药用组合物可为经政府监管机构批准作为用于治疗哺乳动物疾病的治疗方案的一部分而进行制造或销售的组合物。例如,药用组合物可配制成单位剂型用于口服给予(例如片剂、胶囊剂、囊片、囊形片、用于混悬剂的粉剂、混悬剂、溶液剂或糖浆剂);用于局部给予(例如作为乳膏剂、凝胶剂、洗剂或软膏剂);用于静脉内给予(例如作为不含颗粒性栓子和在适合于静脉内使用的溶剂系统中的无菌溶液剂);或配制成任何其他药学上可接受的制剂。

[0031] 如本文使用的,术语“药学上可接受的盐”意指墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤的任何药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括固态和/或溶液中的墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤的离子对。药学上可接受的共晶体包括游离碱墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤和固态酸。盐形式和共晶体形式的混合物可存在于同一组合物中。例如,墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤的药学上可接受的盐包括在合理的医学判断范围内的、适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应并且与合理的益处/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐为本领域众所周知的。例如,药学上可接受的盐描述于:Remington (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (第22版) L.V.Allen, Jr. 编辑, 2013, Pharmaceutical Press, Philadelphia, PA)。盐可在本文所述化合物的最终分离和纯化期间原位制备,或通过使游离碱基与合适的有机酸反应单独制备。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐和戊酸盐。

[0032] “参考”意指用于比较化合物水平或其他症状的任何有用的参考,所述症状例如组织和/或器官损伤、毒性细胞、死亡或炎症。参考可为用于比较目的的任何样品、标准、标准曲线或水平。参考可为正常参考样品或参考标准或水平。“参考样品”可为例如对照,例如预定的阴性对照值,比如“正常对照”或取自同一受试者的先前样品;来自正常健康受试者的样品,比如正常细胞或正常组织;来自没有疾病的受试者的样品(例如细胞或组织);来自诊断患有疾病但尚未用本发明化合物治疗的受试者的样品;来自已用本发明化合物治疗的受试者的样品;或处于已知正常浓度的纯化化合物(例如本文所述的任何化合物)的样品。“参考标准或水平”意指源自参考样品的数值或数量。“正常对照值”为指示非疾病状态的预定值,例如在健康对照受试者中的预期值。一般地,正常对照值表示为范围(“在X和Y之间”)、

高阈值(“不高于X”)或低阈值(“不低于X”)。具有处于特定生物标志物正常对照值内的测量值的受试者一般被称为对于该生物标志物“在正常限度内”。正常参考标准或水平可为源自没有疾病或障碍(例如ARS)的正常受试者的数值或数量。在优选的实施方案中,参考样品、标准或水平通过以下标准中的至少一种与受试者样品进行匹配:年龄、体重、性别、疾病阶段和整体健康。纯化化合物(例如本文所述的任何化合物)在正常参考范围内的水平的标准曲线也可被用作参考。

[0033] 如本文使用的,术语“受试者”或“患者”是指可给予本发明的组合物,例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的的任何生物体。典型的受试者包括任何动物(例如哺乳动物,比如小鼠、大鼠、兔子、非人灵长类动物和人类)。受试者可能寻求或需求治疗、需要治疗、正在接受治疗、未来正在接受治疗或者为由受过训练的专业人员针对特定疾病或病症进行护理的人类或动物。

[0034] 如本文使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”或“治疗(treating)”意指治疗性治疗和预防性或防止性措施两者,其中目的为预防或减缓(减轻)不期望的生理状况、障碍或疾病,或者获得有益或期望的临床结果。有益或期望的临床结果包括但不限于缓解症状;减轻病症、障碍或疾病的程度;稳定(即不恶化)病症、障碍或疾病的状态;延缓病症、障碍或疾病进展的发生或减缓病症、障碍或疾病进展;改善病症、障碍或疾病状态或缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的;改善至少一种可测量的身体参数(患者不一定可辨别);或者增强或改善病症、障碍或疾病。治疗包括在没有过度副作用水平的情况下引发临床上显著的反应。治疗还包括与未接受治疗时的预期存活期相比较延长存活期。

[0035] 应当理解,本文描述的化合物、组合物、制剂和治疗方法的描述包括“包含”、“由……组成”和“基本上由……组成”的实施方案。在一些实施方案中,对于本文所述的所有组合物和使用本文所述组合物的所有方法,组合物可包含所列组分或步骤,或者可“基本上由所列组分或步骤组成”。当组合物被描述为“基本上由所列组分组成”时,该组合物含有所列组分,并且可含有不会显著影响所治疗病症的其他组分,但除明确列出的那些组分以外不含有任何显著影响所治疗病症的其他组分;或者,如果该组合物确实含有除所列那些以外的显著影响所治疗病症的额外组分,则该组合物不含有足够浓度或量的所述额外组分以显著影响所治疗病症。当方法被描述为“基本上由所列步骤组成”时,该方法含有所列步骤,并且可含有不会显著影响所治疗病症的其他步骤,但除明确列出的那些步骤以外,该方法不含有任何显著影响所治疗病症的其他步骤。作为一个非限制性的具体实例,当组合物被描述为“基本上由一种组分组成”时,该组合物可另外含有任何量的药学上可接受的载体、媒介物或稀释剂以及其他不会显著影响所治疗病症的此类组分。

[0036] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同含义。本文描述了用于本公开的方法和材料;本领域已知的其他合适的方法和材料也可被使用。材料、方法和实例仅为说明性的而不预期为限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献均通过参考以其全部结合。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0037] 本发明一个或多个实施方案的细节在以下描述中进行阐述。本发明的其他特征、目的和优点将从描述和权利要求中显而易见。

[0038] 附图简述

[0039] 图1说明用于本发明的实验方案。实验组接受辐射处理,随后为四氢生物蝶呤(BH4)、墨蝶呤(SP)或媒介物治疗,并在辐射处理之后10、30、60、90和180天时进行评价。

[0040] 图2说明辐射处理组的媒介物-、BH4-和SP-治疗组的异丙肾上腺素反应。在10、30、60、90和180天时测量收缩储备的评价。

[0041] 图3说明辐射处理组的媒介物-、BH4-和SP-治疗组的心肌性能指数。在10、30、60、90和180天时测量心肌性能指数的评价。

[0042] 图4说明用辐射处理随后为媒介物或SP进行治疗的实验组的存活率。

[0043] 图5说明辐射处理的实验组相对于对照组的呼吸率。

[0044] 图6A-6C说明辐射处理之后血清外泌体miRNA归一化至非处理的对照组的相对表达。提供了关于接受辐射、BH4或两者(6A)和辐射、墨蝶呤或两者(6B(抑制表达)和6C(诱导表达))处理的实验组的数据。

[0045] 图7说明辐射处理组的媒介物-或SP-治疗组的异丙肾上腺素反应。在0、30、60、90和180天时测量收缩储备的评价。在照射之后10、30、60、90和180天时与媒介物基线相比较,辐射引起照射的媒介物组的收缩储备减少(* $p < 0.05$ 相对于基线)。给予SP持续6天减缓了所有时间点处收缩储备的下降(# $p < 0.05$ 相对于媒介物相同时间点)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0046] 图8说明在辐射处理之后10、30、60、90和180天时媒介物-或SP-治疗组的收缩和舒张功能。将数据绘制为Tei指数和等容舒张时间(IRT)。墨蝶呤减轻辐射引起的收缩(Tei指数)和舒张(Tei指数和IRT)功能的抑制。从10天起并且直到180天,接受媒介物治疗的照射小鼠在Tei和IRT上显示出显著的逐渐增加(* $p < 0.05$ 相对于基线)。给予SP持续6天减缓了所有时间点处Tei指数和IRT上的增加(# $p < 0.05$ 相对于媒介物相同时间点)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0047] 图9说明接受媒介物或SP治疗的辐射处理的实验组的肺功能。每2周记录呼吸率持续5分钟。SP治疗的小鼠在所有测量点处的肺功能均有显著改善。对于照射+媒介物, $n = 7-12$,和对于照射+SP, $n = 8-14$ 。* $p < 0.05$ 。

[0048] 图10说明心脏和肺部组织中细胞因子mRNA表达的变化。绘制的的数据代表接受媒介物或SP治疗的辐射处理的实验组。接受媒介物或SP治疗的动物的肺部和心脏组织中细胞因子mRNA表达的照射后变化。在照射后的不同时间从动物收集肺部和心脏组织。从所有组织样品中提取总RNA,并对细胞因子mRNA进行qPCR。数据表示为每组中5-6只动物的平均值 $\pm$ SD。P值用学生t检验计算并显示为:**- $p < 0.05$;***- $p < 0.001$ 。

[0049] 图11A-11C说明在16周时测量的对照组以及接受媒介物或SP治疗的辐射处理的实验组的免疫组织化学(IHC)(11A-11B)和羟脯氨酸(11C)分析。

[0050] 图12说明辐射之后16周时媒介物-或SP-治疗的小鼠肺部中纤维化和细胞因子mRNA相对表达之间的Spearman相关性。辐射之后16周时媒介物-或SP-治疗的小鼠肺部中纤维化和细胞因子mRNA相对表达之间的显著Spearman相关性的分布图。最深的阴影代表具有较高炎症/纤维化的小鼠。IL=白细胞介素,Cc12=C-C基序趋化因子配体2,Runx2=Runt相关转录因子2,Cc12=C-C基序趋化因子配体2,Runx2=Runt相关转录因子2,Ctgf=结缔组织生长因子,Spp2=分泌性磷蛋白2,TGF- $\beta 1$ =组织生长因子 $\beta 1$,BMP2=骨形态发生蛋白2,

Trim72=含三重基序蛋白72(Tripartite Motif Containing 72),IR=辐射,M=雄性,F=雌性,r=Spearman秩相关系数。

[0051] 图13A-13D说明ELISA测量的作为潜在生物标志物的蛋白:CRP(13A)、纤维蛋白原(13B)、IL-6(13C)和中性粒细胞弹性蛋白酶(13D)。在4天、8天、16周和180天时对接受媒介物或SP治疗的辐射处理的实验组进行测量,并将其与对照组进行比较。

[0052] 图14A-14B说明媒介物(14A)和SP(14B)按性别评估的在辐射之后对收缩功能的影响。

[0053] 图15A-15B说明媒介物(15A)和SP(15B)按性别评估的在辐射之后对舒张功能的影响。

[0054] 图16A-16B说明媒介物(16A)和SP(16B)按性别评估的对收缩储备的影响。

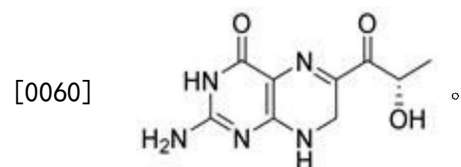
[0055] 发明详述

[0056] 本发明的特征在于使用墨蝶呤、四氢生物蝶呤、二氢生物蝶呤或其药学上可接受的盐或共晶体治疗暴露于辐射的受试者的方法。不希望受到理论的束缚,我们认为辐射引起的晚期肺部、胃肠和心脏毒性为内皮功能障碍的后果,所述障碍被定义为未偶联NOS活性和降低的NO生物利用度,其建立慢性炎症状态,该状态驱动与异常伤口修复和晚期正常组织损伤相关的持续性促纤维化过程。在具有与人类相似的辐射敏感性的鼠类模型中,我们显示墨蝶呤及其代谢物(比如四氢生物蝶呤和二氢生物蝶呤)可被用作辐射对策,以减轻辐射引起的心脏和肺损伤并提高存活率。

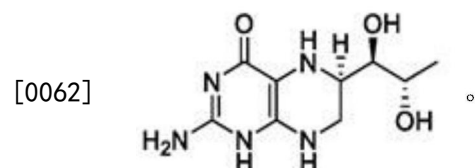
[0057] 活性化合物

[0058] 本发明方法的特征在于使用墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤或其盐和/或共晶体。墨蝶呤可在体内转化为二氢生物蝶呤和四氢生物蝶呤,并且二氢生物蝶呤和四氢生物蝶呤在体内相互转化。

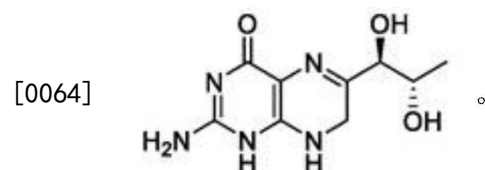
[0059] 墨蝶呤具有以下结构:



[0061] 四氢生物蝶呤具有以下结构:



[0063] 二氢生物蝶呤具有以下结构:



[0065] 活性化合物可以任何合适的形式使用,例如游离碱、盐或共晶体。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢

盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、龙胆酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐和戊酸盐。在一些实施方案中,活性化合物或其盐呈结晶形式。

[0066] 墨蝶呤的示例性盐、共晶体和结晶形式描述于WO 2018/102314、WO 2018/102315、WO 2019/046849和WO 2019/232120中,例如描述于WO 2018/102314或WO 2018/102315中的结晶形式A、B、C、D、E、F或G中的任何一种。其他盐类或晶体形式的墨蝶呤、二氢生物蝶呤和/或四氢生物蝶呤为本领域中已知的。

[0067] 治疗方法

[0068] 本发明提供在辐射暴露之后治疗受试者的方法,例如在治疗急性辐射综合征(ARS)、皮肤辐射综合征或慢性辐射综合征中。特别地,本发明提供在不到24小时的时间段内治疗患者暴露于至少约0.05Gy的方法。例如,患者可能已暴露于至少约0.3、至少约0.7、至少约1、至少约3、至少约5、至少约6、至少约8、至少约10、至少约15、至少约20、至少约30或至少约50Gy,比如约0.3-约6之间、约0.7-约6之间、约1-约2之间、约2-约6之间、约6-约20之间、约6-约10之间、约6-约8之间、约10-约20之间、约8-约12之间或约20-约50Gy之间,并且暴露的时间段可少于约18小时,例如少于约12、少于约6、少于约3、少于约1、少于约0.5或少于约0.1小时或者少于约5、少于约3、少于约2或少于约1分钟。或者,本发明提供治疗患者在超过24小时的时间段内暴露于至少约0.7Gy的方法。例如,患者可能已暴露于至少约0.7、至少约1、至少约2、至少约3、至少约4、至少约5、至少约6、至少约7或至少约8Gy,并且暴露的时间段可为至少约1周、至少约1个月、至少约3个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约1年、至少约2年、至少约3年或更长,例如约1周-3年、约1周-1年、约1周-1个月、约1个月-2年、约1个月-1年、约6个月-2年、约9个月-2年或约9个月-15个月。辐射暴露可为全身的或局限于例如皮肤的。在某些实施方案中,辐射不是由放射疗法产生的。

[0069] 根据本发明的治疗可导致减少或抑制已暴露于辐射的受试者的组织和/或器官损伤;降低或抑制已暴露于辐射的受试者的组织或器官毒性(例如肺部、心脏或胃肠(比如肺部或心脏)的);减少已暴露于辐射的受试者的内皮细胞死亡(例如肺部、心脏或胃肠(比如肺部或心脏)的);减少受试者的上皮细胞(例如肺部、心脏或胃肠(比如肺部或心脏)的)中的辐射引起的炎症;增加miR-15b-3p、miR-106a-5p、miR-133b、miR-136-5p、miR-451a、miR-1、miR-335-3p、let-7d-3p和/或let-7c-5p的表达;减少例如肺部上皮细胞中IL-1 β 、IL-6、IL-17A、Spp2和/或TGF- β 1的表达;增加let-7a-5p、miR-1、miR-106b-3p、miR-106b-5p、miR-126-3p、miR-181a-5p、miR-335-3p和/或miR-335-5p的表达;和/或降低let-7g-5p、let-7i-5p和/或miR-16-5p的表达。症状或细胞因子的减少可为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%,例如相对于参考。寡核苷酸表达的增加可为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约200%、至少约300%或至少约500%,例如相对

于参考。

[0070] 活性化合物可以任何合适的剂量给予。给予患者的本发明组合物的实际剂量可根据患者的身体和生理因素比如体重、病症的严重程度、先前或同时的治疗干预、特发病,以及根据给予途径来确定。取决于剂量和给予途径,优选剂量和/或有效量的给予次数可根据受试者的反应而变化。无论如何,负责给予的从业者将为个体受试者确定组合物中活性成分的浓度和适当的剂量。治疗有效量可为约0.1mg/kg/天-约200mg/kg/天,例如约0.1-约150mg/kg/天、约0.1-约125mg/kg/天、约0.1-约100mg/kg/天、约0.1-约80mg/kg/天、约0.1-约60mg/kg/天、约0.1-约40mg/kg/天、约0.1-约25mg/kg/天、约0.1-约20mg/kg/天、约0.1-约15mg/kg/天、约0.1-约10mg/kg/天、约0.1-约5mg/kg/天、约0.1-约2.5mg/kg/天、约0.1-约1mg/kg/天、约0.1-约0.5mg/kg/天、约0.5-约200mg/kg/天、约1-约200mg/kg/天、约2.5-约200mg/kg/天、约5-约200mg/kg/天、约10-约200mg/kg/天、约15-约200mg/kg/天、约20-约200mg/kg/天、约25-约200mg/kg/天、约40-约200mg/kg/天、约60-约200mg/kg/天、约80-约200mg/kg/天、约100-约200mg/kg/天、约120-约200mg/kg/天、约140-约200mg/kg/天、约160-约200mg/kg/天、约180-约200mg/kg/天、约5-约180mg/kg/天、约10-约160mg/kg/天、约20-约140mg/kg/天、约40-约120mg/kg/天、约60-约100mg/kg/天、约5-约50mg/kg/天或约10-约20mg/kg/天的活性化合物。给予可进行任何合适的次数,例如在治疗期间每天一次、每天两次或每天三次。只要需要,给予就可持续,例如从1天-约1年或至少6天、至少约1周、至少约2周、至少约1个月、至少约3个月、至少约6个月或至少约9个月。

[0071] 活性化合物可在任何合适的时间首次给予,例如在辐射暴露的约1小时内、约2小时内、约6小时内、约12小时内或约18小时内、约24小时内、约2天内或约1周内。

[0072] 制剂

[0073] 活性化合物可配制成如本领域已知的药用组合物。这类组合物可包括如本领域已知的各种组分,例如参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy, (第22版) L.V.Allen, Jr. 编辑, 2013, Pharmaceutical Press, Philadelphia, PA。

[0074] 组合物可包括药学上可接受的载体,例如常规使用并且仅受化学-物理考虑因素(比如溶解度和缺乏与化合物的反应性)以及给予途径限制的那些载体中的任何一种。本文所述的药学上可接受的载体,例如媒介物、佐剂、赋形剂或稀释剂,为本领域技术人员众所周知的并且易于被公众获得。优选的是药学上可接受的载体为对活性化合物呈化学惰性的载体以及在使用条件下没有有害的副作用或毒性的载体。

[0075] 抗氧化剂

[0076] 用于方法的药用组合物可包括或可不包括抗氧化剂。抗氧化剂可使活性化合物的氧化降解最小化。抗氧化剂的实例包括但不限于4-氯-2,6-二叔丁基苯酚、生育酚、 α -生育酚、烷基化二苯胺、抗坏血酸、抗坏血酸肉豆蔻酸酯、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸硬脂酸酯、 β -胡萝卜素、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、柠檬酸、半胱氨酸、D- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯、去铁胺甲磺酸酯、没食子酸十二酯、对羟基苯甲酸乙酯、叶酸、富马酸、没食子酸、谷胱甘肽、卵磷脂、苹果酸、对羟基苯甲酸甲酯、单硫代甘油、N-乙酰半胱氨酸、去甲二氢愈创木酸、没食子酸辛酯、对苯二胺、抗坏血酸钾、焦亚硫酸钾、山梨酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、视黄醇、山梨酸、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、连二亚硫酸钠、异抗坏血酸钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、硫代硫酸钠、酒石酸、叔丁基对苯二酚、生育酚乙酸酯、维生素A、维生素B6、维

生素B12或维生素E。在一些实施方案中,本发明的方法可使用包含抗坏血酸、生育酚、视黄醇、抗坏血酸棕榈酸酯、N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基甲苯和/或丁基羟基茴香醚作为抗氧化剂的药用组合物。

[0077] 在一些实施方案中,方法包括药用组合物,其包含按重量计少于约10%的抗氧化剂,例如少于约9%、少于约8%、少于约7%、少于约6%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%。在一些实施方案中,方法使用药用组合物,其包含按总重量计约2-9%的抗氧化剂,例如约2-4%、约3-5%、约4-6%、约5-7%、约6-8%或约7-9%。在一些实施方案中,方法使用药用组合物,其包含约5-100%的USP最大日剂量的抗氧化剂,例如在一些实施方案中,方法使用药用组合物,其包含约5%、约10%、约15%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%的USP最大日剂量的抗氧化剂。在一些实施方案中,墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤或其药学上可接受的盐和/或共晶体与抗氧化剂的比率为至少约1:1,例如至少约2:1、至少约3:1、至少约4:1、至少约5:1、至少约6:1、至少约7:1、至少约8:1、至少约9:1或至少约10:1wt/wt。在本文所述组合物的一些实施方案中,组合物包含抗氧化剂(例如抗坏血酸),其中墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤的药学上可接受的盐和/或共晶体与抗氧化剂的比率为按重量计(例如盐的重量比抗氧化剂的重量)大于约4:1(例如大于约5:1、大于约6:1、大于约7:1、大于约8:1、大于约9:1、大于约10:1、大于约15:1或大于约20:1)。

[0078] 分散剂

[0079] 在一些实施方案中,方法使用包含至少一种分散剂的药用组合物。分散剂可导致制剂中的颗粒分开,例如在与水分接触时释放其药用物质。分散剂的实例包括但不限于交联聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素(例如交联羧甲基纤维素盐,例如交联羧甲基纤维素钠)、淀粉(例如淀粉乙醇酸钠)或海藻酸。在一些实施方案中,药用组合物中的分散剂为羧甲基纤维素,比如交联羧甲基纤维素的药学上可接受的盐。在一些实施方案中,方法使用药用组合物,其可包含按总重量计约0.1-1.5%的分散剂,例如约0.1%、约0.5%、约1%或约1.5%。在一些实施方案中,方法使用药用组合物,其包含少于约1.5%的分散剂,例如少于约1%、少于约0.5%或少于约0.1%。

[0080] 抗结块剂

[0081] 通常将抗结块剂添加至药用组合物中以防止例如在溶液中形成团块。因此,在一些实施方案中,用于本发明方法的药用组合物包含至少一种抗结块剂。在一些实施方案中,用于本发明方法的药用组合物包含至少两种抗结块剂。示例性的抗结块剂包括胶体二氧化硅、微晶纤维素、磷酸三钙、微晶纤维素、硬脂酸镁、碳酸氢钠、亚铁氰化钠、亚铁氰化钾、亚铁氰化钙、磷酸钙、硅酸钠、胶体二氧化硅、硅酸钙、三硅酸镁、滑石粉、铝硅酸钠、硅酸铝钾、铝硅酸钙、膨润土、硅酸铝、硬脂酸和聚二甲基硅氧烷。在一些实施方案中,至少一种抗结块剂为胶体二氧化硅或微晶纤维素。在一些实施方案中,用于本发明方法的药用组合物可包含按总重量计约65-75%的抗结块剂,例如约65%、约67%、约70%、约73%或约75%。在一些实施方案中,用于本发明方法的药用组合物包含胶体二氧化硅和微晶纤维素两者。在一些实施方案中,用于本发明方法的药用组合物包含按总重量计约60-65%的微晶纤维素和按总重量计约5-7%的胶体二氧化硅。

[0082] 给药媒介物

[0083] 在一些实施方案中,用于本发明方法的药用组合物在给予之前与给药媒介物合并。在一些实施方案中,组合物可在粘度为约50-1750厘泊(cP)的给药媒介物中给予,例如以助于药用组合物的悬浮和给药。可使用的一种类型的悬浮剂为甘油和蔗糖在水中的组合(例如具有在水中的2.5%甘油和27%蔗糖的MEDISCA®口服混合物)。可将适量的组合物添加至给药媒介物混合物中,并在临给予之前将其进行搅拌以使组合物悬浮。

[0084] 其他悬浮剂也可用作给药媒介物。示例性的悬浮剂包括水、琼脂、海藻酸、羧甲基纤维素钠、卡拉胶、糊精、明胶、瓜尔胶、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、甲基纤维素、聚乙二醇、聚维酮、黄蓍胶、黄原胶或其他本领域已知的悬浮剂。

[0085] 给予途径

[0086] 存在多种多样适用于本发明的制剂。以下用于口服、气雾剂、胃肠外、皮下、静脉内、动脉内、肌肉、腹膜内、鞘内、直肠和阴道给予的制剂仅为示例性的并且绝不是限制性的。

[0087] 药用组合物可为液体制剂,比如呈溶液剂、混悬剂或乳剂的形式。适合于口服给予的制剂可由以下组成:(a) 胶囊剂、小袋、片剂、锭剂和糖锭剂,各自含有预定量的作为固体或颗粒的活性成分;(b) 粉剂;(c) 液体溶液剂,比如溶解于稀释剂(比如水、盐水或橙汁)中的有效量的化合物;(d) 在适当液体中的混悬剂;和(e) 合适的乳剂。优选的为固体口服剂型,比如胶囊剂形式、片剂形式和粉剂形式。胶囊剂形式可属于含有例如表面活性剂、润滑剂和惰性填充剂(比如乳糖、蔗糖、磷酸钙和玉米淀粉)的普通硬壳或软壳明胶类型。片剂形式可包含乳糖、蔗糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、瓜尔胶、胶体二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸和其他赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、润湿剂、防腐剂、矫味剂和药理学上相容性载体中的一种或多种。锭剂形式可包含活性成分于矫味剂中,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶,以及软锭剂包含活性成分于惰性基质中,所述惰性基质比如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶,乳剂、凝胶剂等除活性成分之外还含有如本领域已知的这类载体。

[0088] 适合于口服和/或胃肠外给予的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液剂(其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和/或使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质)以及水性和非水性无菌混悬剂(其可包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和/或防腐剂)。化合物可在药用载体中的生理学上可接受的稀释剂中给予,比如无菌液体或液体混合物,包括水、盐水、葡萄糖水溶液和相关的糖溶液、醇(比如乙醇、苄醇或十六烷醇)、二醇类(比如丙二醇或聚乙二醇和其他聚乙二醇类)、甘油缩酮类(比如2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇)、醚类(比如聚(乙二醇)400)、油、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯或乙酰化脂肪酸甘油酯,添加或不添加药学上可接受的表面活性剂(比如皂或去污剂)、悬浮剂(比如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素)或乳化剂和其他药用佐剂。

[0089] 可用于胃肠外制剂的油类包括石油、动物、植物或合成油类。油类的具体实例包括花生、大豆、芝麻、棉籽、玉米、橄榄、凡士林和矿物油。用于胃肠外制剂的合适的脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯为合适的脂肪酸酯类的实例。用于胃肠外制剂的合适的皂类包括脂肪碱金属、铵和三乙醇胺盐,并且合适的去污剂包括:(a) 阳离子去污剂,比如二甲基二烷基卤化铵和烷基吡啶鎓卤化物,(b) 阴离子去污剂,比如烷基、芳基和烯基磺酸盐,烷基、烯基、醚和甘油单酯硫酸盐,和磺基琥珀酸盐,(c) 非离子去污

剂,比如脂肪胺氧化物、脂肪酸烷醇酰胺和聚氧乙烯-聚丙烯共聚物,(d)两性去污剂,比如烷基- β -氨基丙酸盐和2-烷基-咪唑啉(imidazopeak)季铵盐,和(3)其混合物。

[0090] 胃肠外制剂一般地在溶液中含有按重量计约20-约30%的活性化合物。合适的防腐剂和缓冲剂可用于这类制剂。为最小化或消除注射部位的刺激,这类组合物可含有一种或多种亲水-亲油平衡(HLB)为约12-约17的非离子表面活性剂。这类制剂中表面活性剂的量的范围为按重量计约5-约15%。合适的表面活性剂包括聚乙烯失水山梨醇脂肪酸酯类(比如单油酸失水山梨醇酯)和环氧乙烷与疏水性碱的高分子量加合物(通过环氧丙烷与丙二醇的缩合形成)。胃肠外制剂可存在于单位剂量或多剂量密封容器(比如安瓿和小瓶)中,并且可储存于冷冻干燥(冻干)条件下,其仅需要在临用前添加注射用无菌液体载体,例如水。临时注射溶液剂和混悬剂可制备自先前描述种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂。

[0091] 药用组合物可为注射用制剂。对于注射用组合物的有效药用载体的要求为本领域普通技术人员众所周知的。参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,(第22版)L.V.Allen,Jr.编辑,2013,Pharmaceutical Press,Philadelphia,PA。

[0092] 局部制剂,包括可用于透皮药物释放的那些,是本领域技术人员众所周知的,并且适合于在本发明的上下文中施用于皮肤。局部施用的组合物通常呈液剂、乳膏剂、糊剂、洗剂和凝胶剂的形式。局部给予包括施用于口腔粘膜,包括口腔、口腔上皮、上颌、牙龈和鼻黏膜。在一些实施方案中,用于本发明方法的组合物含有墨蝶呤、四氢生物蝶呤或二氢生物蝶呤以及合适的媒介物或载体。其还可含有其他组分,比如抗刺激剂。载体可为液体、固体或半固体。在一些实施方案中,组合物为水溶液剂。或者,组合物可为各种组分的分散体、乳剂、凝胶剂、洗剂或乳膏剂媒介物。在一个实施方案中,主要媒介物为基本上为中性或已经变成基本上中性的水或生物相容性溶剂。液体媒介物可包括其他材料,比如缓冲剂、醇类、甘油和矿物油类,连同如本领域已知的各种乳化剂或分散剂,以获得期望的pH、稠度和粘度。有可能的是,组合物可被制成固体,比如粉剂或颗粒剂。该固体可直接施用,或者在使用之前溶解于水或生物相容性溶剂中以形成溶液剂,其基本上为中性或已经变成基本上中性的,并然后可被施用于目标部位。在本发明的实施方案中,用于局部施用于皮肤的媒介物可包括水、缓冲溶液、各种醇类、二醇类(比如甘油)、脂质材料(比如脂肪酸类)、矿物油类、磷酸甘油酯类、胶原蛋白、明胶和硅酮基材料。

[0093] 药用组合物可为经吸入给予的气雾制剂。可将这些气雾制剂置于加压的可接受的推进剂(比如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等)中。它们还可配制成用于非加压制剂的药物,比如在喷雾器或雾化器中。

[0094] 另外,药用组合物可为栓剂。适合于阴道给予的制剂可呈现为阴道栓剂、月经棉条、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂的形式,其除活性成分之外还含有本领域已知为适当的这类载体。

[0095] 用于口服给予的固体剂型

[0096] 用于口服使用的制剂包括含有与非毒性药学上可接受的赋形剂混合的活性化合物的颗粒剂,并且这类制剂为技术人员已知的(例如美国专利号5,817,307、5,824,300、5,830,456、5,846,526、5,882,640、5,910,304、6,036,949、6,036,949、6,372,218,特此通过参考结合)。赋形剂可为例如惰性稀释剂或填充剂(例如蔗糖、山梨醇、糖、甘露醇、微晶纤维素、淀粉(包括马铃薯淀粉)、碳酸钙、氯化钠、乳糖、磷酸钙、硫酸钙或磷酸钠);制粒和崩解

剂(例如纤维素衍生物(包括微晶纤维素)、淀粉(包括马铃薯淀粉)、交联羧甲基纤维素钠、海藻酸盐或海藻酸);粘合剂(例如蔗糖、葡萄糖、山梨醇、阿拉伯胶、海藻酸、海藻酸钠、明胶、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、硅酸铝镁、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇);和润滑剂、助流剂、抗粘合剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、二氧化硅、氢化植物油类或滑石)和抗结块剂(例如胶体二氧化硅、微晶纤维素、磷酸三钙、微晶纤维素、硬脂酸镁、碳酸氢钠、亚铁氰化钠、亚铁氰化钾、亚铁氰化钙、磷酸钙、硅酸钠、胶体二氧化硅、硅酸钙、三硅酸镁、滑石粉、铝硅酸钠、硅酸铝钾、铝硅酸钙、膨润土、硅酸铝、硬脂酸、聚二甲基硅氧烷)。其他药学上可接受的赋形剂可为着色剂、矫味剂、增塑剂、湿润剂和缓冲剂。在一些实施方案中,赋形剂(例如矫味剂)与组合物一起包装。在一些实施方案中,赋形剂(例如矫味剂)与组合物分开包装(例如在给予之前与组合物合并)。

[0097] 用于本发明方法的固体组合物可包括适于保护组合物免受不希望的化学变化(例如在活性物质释放之前的化学降解)的包衣。可以与Remington:The Science and Practice of Pharmacy,(第22版)L.V.Allen,Jr.编辑,2013,Pharmaceutical Press,Philadelphia,PA中描述的方式类似的方式将包衣施用于固体剂型上。

[0098] 粉剂和颗粒剂可使用上述成分以常规方式使用例如混合器、流化床设备、熔体凝结设备、转子制粒机、挤出/滚圆机或喷雾干燥设备进行制备。

实施例

[0099] 尽管本文已经说明和描述了本发明的某些特征,但本领域的普通技术人员现将想到许多修改、取代、变化和等同物。因此,应当理解,所附权利要求预期涵盖落入本发明真正精神内的所有这类修改和变化。因此,提供以下实施例以教导本发明的各个方面。这些实施例代表本发明各方面的单独的实施方案,并且本领域的技术人员将认识到可产生另外的实施例以同样地教导本发明的各方面。

[0100] 实施例1.C57L/J小鼠组的处理

[0101] 动物

[0102] 雄性和雌性C57L/J野生型6-8周龄小鼠两者均购自Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME)。小鼠按照12:12小时的明暗时间表进行关养,并随意获取水和食物。这些实验按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)出版的生物医学研究实验动物指南(2011年修订版)进行。研究方案获得弗吉尼亚联邦大学机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee of Virginia Commonwealth University)的批准。

[0103] 实验处理计划

[0104] 将相等数量的雄性和雌性小鼠分配至每组。在氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉(分别为100mg/kg和10mg/kg)下时,使用Varian 21EX LINAC(Palo Alto,CA)令小鼠接受5Gy全身照射(TBI),然后立即为对胸部补充6.5Gy剂量,总胸部剂量为11.5Gy。照射后24小时,通过口服管饲法用溶解于水中的1mg/kg墨蝶呤或5mg/kg BH4每天一次对小鼠进行治疗,持续6天(图1)。

[0105] 实施例2.心脏功能的评估

[0106] 超声心动图

[0107] 在浅麻醉(30mg/kg戊巴比妥钠)下,所有小鼠在基线(照射(IR)之前)、8、30、60、90和180天时接受经胸超声心动图检查。用Vevo770成像系统(VisualSonics,Toronto,Ontario,Canada)和30MHz探头进行超声心动图检查。从胸骨旁短轴和心尖切面以B模式显示心脏。左心室(LV)舒张末期直径(EDD)、LV收缩末期直径(ESD)、LV前壁舒张期厚度(AWDT)和LV后壁舒张期厚度(PWDT)、LV前壁收缩期厚度(AWST)和LV后壁收缩期厚度(PWST)在M模式下根据美国超声心动图学会(American Society of Echocardiography)的建议进行测量。LV射血分数(EF)和LV质量根据壁厚和腔室直径的测量值进行计算。如先前所述,LVEF为使用Teicholz公式($LVEF = [LVEDD3 - LVESD3] / LVEDD3$)得出的。从心尖四腔切面记录经二尖瓣LV流出道的多普勒频谱(E、A、ET),并且心肌性能指数(MPI)计算为等容收缩时间(ICT)和等容舒张时间(IRT)除以射血时间(ET)的比率。执行和阅读超声心动图的研究人员对治疗分配不知情。将 β -肾上腺素能激动剂异丙肾上腺素(Sigma Aldrich,St.Louis,MO,USA)20ng/小鼠用于评价未经SP治疗的照射小鼠的心肌收缩力。心肌收缩力(收缩储备)表示为静息时(LVEFr)和异丙肾上腺素注射之后3分钟时(LVEFi)测量的LVEF变化百分比,并计算为 $[(LVEFi - LVEFr) / LVEFr] * 100$ 。在基线、IR之后8、30、60、90和180天时进行了收缩储备的测量。超声心动图评价由对治疗分配不知情的操作者进行。

[0108] 墨蝶呤对IR引起的心肌病的影响

[0109] 在接受IR之前和开始SP治疗之前,在基线时评价所有小鼠的心脏性能。然后在接受IR之后将小鼠随机分配至治疗组(媒介物或SP)。我们的TBI模型的影响用胸部补充剂量对收缩和舒张功能以及响应异丙肾上腺素的收缩储备进行评估。辐射导致对异丙肾上腺素的反应减缓(图2和7)以及心肌性能指数(图3和8)和等容舒张时间的增加。IR之后持续6天每天口服给予SP能够恢复对异丙肾上腺素的 β -肾上腺素能刺激的反应。此外,SP治疗减少了收缩和舒张功能障碍的进展,改善心肌性能指数和IRT的逐渐增加。根据动物的性别进一步评估了这些结果。在收缩和舒张功能方面,心脏功能对辐射或1mg/kg SP的反应没有显著差异(图14A-14B和15A-15B)。然而,与雌性小鼠相比较,雄性小鼠在IR后90天和180天时的收缩储备有另外的显著丧失(图16A-16B)。重要的是,对于两种性别,SP在减轻这种收缩储备丧失方面都同样有效。

[0110] 实施例3.肺功能的评估**[0111] 通过呼吸率评价肺损伤**

[0112] 在第6周开始,使用Mouse O_x系统(STARR Life Sciences Corp.,Allison Park,PA)每隔一周测量呼吸率。将动物置于氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉下并在分析区域将其剃毛。注射后10分钟,将动物置于仰卧位,将传感器夹于大腿上部。记录呼吸率持续3分钟。使用Mouse O_x软件中的算法计算呼吸率。

[0113] SP和BH4减少辐射引起的肺功能丧失

[0114] 使用MouseO_x系统测量小鼠的呼吸率,作为照射、照射与SP(图9)和照射与BH4(图5)小鼠的呼吸功能的量度。与媒介物治疗的小鼠相比较,接受1mg/kg/天SP或5mg/kg BH4持续6天的小鼠具有肺损伤发展的显著延迟(SP为14周和媒介物为10周),并且在所有测量点的肺功能损伤均显著减少。

[0115] 实施例4.小鼠组的存活率评价

[0116] SP改善辐射后的存活率

[0117] 为确定改善的心肺功能是否影响总体存活率,在IR后对小鼠随访了180天。图4显示在有和没有1mg/kg/天SP持续6天的情况下,C57L/J小鼠在胸部总剂量为11.5Gy (5Gy TBI,然后是胸部6.5Gy剂量)后的Kaplan Meyer存活率图。暴露于辐射的未经治疗的小鼠导致存活率显著降低,中位存活期为137天和在研究结束时存活率为40%。相比之下,接受1mg/kg/天SP治疗持续6天的小鼠具有显著延迟并总体提高的存活率,71%的小鼠在180天(即研究结束)时存活。

[0118] 实施例5.血清外泌体miRNA表达

[0119] 使用EDTA小瓶通过心脏穿刺收集血液。将血液样品以3,000x g离心25分钟,并将血浆部分进行等分且保存于液氮的气相中。使用来自101Bio的外泌体分离试剂盒在图6A-6C所示的时间点从小鼠血浆中分离外泌体。通过EXOCET外泌体定量试剂盒(System Biosciences)量化外泌体浓度。对每个时间点合并来自5只动物的相等外泌体数量,并通过使用miRNeasy Micro Kit (QIAGEN)提取总外泌体RNA。对于miRNA表达谱分析,使用了miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR测定(QIAGEN)和ExiLENT SYBR®Green Maser Mix (QIAGEN)。通过在QuantStudio 5RT-PCR机器(Applied Biosystems)上使用Serum/Plasma LNATM miRNA PCR Panel (Cat.#YAHS-106Y, QIAGEN)进行外泌体miRNA表达的初始估计。

[0120] 图6B-6C中显示的循环阈值(Ct值)为来自每组5只小鼠的平均值,并针对hsa-miR-145-5p和hsa-miR-221-3p进行归一化,hsa-miR-145-5p和hsa-miR-221-3p在实验上被证明为高质量的归一化对照。显示了在IR之后30天时间点,在媒介物治疗和SP治疗的动物之间表现出显著差异的两组不同的外泌体miRNA。第一组包括let-7a-5p、miR-1、miR-106b-3p、miR-106b-5p、miR-126-3p、miR-181a-5p、miR-335-3p和miR-335-5p。与SP治疗的动物相比较,该组中miRNA的表达在媒介物治疗的动物中显著较低。在第二组中,与SP治疗的动物相比较,在媒介物治疗的动物中miRNA的表达显著更高。第二组包括let-7g-5p、let-7i-5p和miR-16-5p。在IR改变的外泌体miRNA表达或墨蝶呤对miRNA表达的影响两方面,在雄性和雌性之间没有显著差异。由于辐射而表现出表达显著变化并受墨蝶呤调节的miRNA参与炎症过程(例如let-7a-5p、miR-106b-3p、miR-181a-5p、let-7i-5p)、血管生成和血管完整性(miR-106b-3p、miR-126-3p)、心脏炎症和纤维化(miR-335-5p、let-7i-5p、miR-126-3p、miR-16-5p)。miR-16-5p抑制TGF- β /VEGF信号传导。用BH4治疗(图6A)显示出miR-15b-3p、miR-106a-5p、miR-133b、miR-136-5p、miR-451a、miR-1、miR-335-3p、let-7d-3p和/或let-7c-5p的表达增加。

[0121] 实施例6.心脏和肺部组织中的细胞因子mRNA表达

[0122] RNA分离和RT-PCR

[0123] 按照制造商的说明用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)从肺部和心脏组织样品中分离总RNA。通过使用NanoDrop ND-1000分光光度计(Thermo Scientific)评估RNA浓度。通过A260/A280和A260/A230的比率评价RNA纯度。使用Agilent 2100BioAnalyzer(Agilent Technologies)通过28S/18S核糖体RNA(rRNA)的比率和RNA完整性数值(RIN)评估RNA完整性。通过使用RT2 First Strand Kit(QIAGEN)进行cDNA合成和基因组DNA消除。使用来自QIAGEN的RT2 SYBR®Green qPCR Mastermix探针在QuantStudio 5RT-PCR机器(Applied

Biosystems) 上扩增样品。使用以下RT2 qPCR Primer Assays (QIAGEN): 小鼠肌动蛋白- β (NM_007393)、小鼠Bmp2 (NM_007553)、小鼠Cc12 (NM_011333)、小鼠Ctgf (NM_010217)、小鼠IL-1 β (NM_008361)、小鼠IL-6 (NM_031168)、小鼠IL-10 (NM_010548)、小鼠IL-17 α (NM_010552)、小鼠Runx2 (NM_001145920)、小鼠Spp1 (NM_001204201)、小鼠TGF- β 1 (NM_011577)、小鼠Trim72 (NM_001079932)。

[0124] 辐射之后细胞因子mRNA表达的变化

[0125] 在动物辐射和24小时后接受SP或水治疗6天之后评估肺部和心脏组织中不同细胞因子 (Bmp2、Cc12、Ctgf、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-17A、IL-33、Runx2、Spp2、TGF- β 1和Trim72) 的表达。在IR之后的3个不同时间点 (8天、30天、16周) 测试组织样品中的mRNA表达, 并与非治疗非照射对照动物中的mRNA表达比较 (图10)。所有被评估的细胞因子在媒介物治疗和SP治疗组动物之间在心脏组织中的表达上没有显著差异。在肺部组织中, 在IR之后的不同时间点, 细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-17A、Spp2和TGF- β 1在媒介物治疗和SP治疗组动物之间在表达上表现出显著差异。在8天和30天时间点, 与SP治疗组相比较, 媒介物治疗组动物肺部组织中IL-1 β 的相对表达显著更高 (分别为 2.9 ± 0.649 相对于 1.54 ± 0.825 和 3.39 ± 0.532 相对于 1.66 ± 0.51)。在IR之后的所有时间点, 与SP治疗组相比较, 媒介物治疗组的IL-6的相对表达显著更高 (8天: 16.88 ± 4.91 相对于 1.36 ± 0.509 ; 30天: 9.09 ± 0.533 相对于 4.96 ± 0.905 ; 16周: 28.85 ± 5.987 相对于 17.05 ± 4.12)。除IL-6以外, 在IR之后的所有时间点, 与SP治疗组相比较, 媒介物治疗组的细胞因子IL-17A也表现出显著更高的表达 (8天: 9.19 ± 2.783 相对于 2.71 ± 1.874 ; 30天: 5.65 ± 2.263 相对于 1.49 ± 0.379 ; 16周: 4.5 ± 0.824 相对于 2.12 ± 1.173)。在IR之后16周, 与SP治疗组相比较, 媒介物治疗组的细胞因子Spp2和TGF- β 1表现出显著更高的肺部组织表达 (4.25 ± 0.537 相对于 2.38 ± 0.211 和 3.26 ± 0.339 相对于 1.53 ± 0.367)。对所有动物在30天时间点细胞因子Cc12表现出在肺部组织中的相对表达显著增加, 在媒介物治疗和SP治疗的动物组之间没有显著差异。

[0126] 实施例7. 心脏和肺部组织的IHC分析

[0127] IHC分析

[0128] IR之后16周, 收集心脏和右肺用于组织学分析 (图11A-11C)。将心脏收集在福尔马林中, 包埋于石蜡中, 并切成5-mm切片。用OCT灌注右肺并切成6-mm切片。按照供应商的说明 (Richard-Allan Scientific Masson's trichrome kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 进行Masson三色染色以检测胶原纤维。使用计算机形态测量分析 (Image ProPlus 6.0软件, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) 将心肌和肺部纤维化的面积计算为胶原面积占总组织面积的百分比。测量炎症、血管生成和平滑肌细胞分化, 用以下抗体染色心脏和右肺: Ly-6G/Ly-6C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、F40/80和 α -sma (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、CD-31 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA)。通过二抗检测一抗, 然后用Novared (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 进行染色用于抗体检测。由两名对治疗分配不知情的研究人员基于二分法 (阳性/阴性) 进行染色评价, 并且阳性结果随后根据染色的强度和延展分级为轻度 (1)、中度 (2) 或强烈 (3) 染色。

[0129] 羟脯氨酸

[0130] 如先前所述, 使用来自Sigma Aldrich (St. Louis, MO) 的羟脯氨酸测定试剂盒测量肺部左上叶中的羟脯氨酸含量。

[0131] 实施例8.ELISA测量的蛋白

[0132] 血浆分析

[0133] 在处死时,通过心脏穿刺获得血液到含有EDTA的管中并以3000rpm离心25分钟以分离血浆。使用以下来自Abcam的ELISA板用于分析:纤维蛋白原(ab213478)、中性粒细胞弹性蛋白酶(ab252356)、C反应蛋白(ab157712)和IL-6(ab100713)。根据制造商的建议处理血浆样品并运行ELISA试剂盒。所有细胞因子均以绝对单位报告。凝血级联的关键分子参与者(如组织因子、凝血酶和纤维蛋白原)在流行病学和机制上与炎症成分相关。遗传和药理学研究已揭示了纤维蛋白原在确定局部或全身炎症程度中的关键作用。中性粒细胞弹性蛋白酶为存在于中性粒细胞的嗜天青颗粒中的丝氨酸蛋白酶,在炎症状态下进行释放,并由于其底物特异性低而分解细胞外基质,导致组织损伤。中性粒细胞弹性蛋白酶为体内最具破坏性的酶之一。一旦不受调控,这种酶就会扰乱肺部渗透性屏障的功能并诱导促炎细胞因子的释放,伴随急性肺损伤的刺激。炎症细胞因子IL-6可早在辐射之后6小时于肺部组织和血液中上调。血浆中高水平的IL-6可加剧肺部组织中的炎症反应,最终导致IL-6渗漏至支气管肺泡和进一步的肺部损伤。肺部组织中高水平的IL-6可将更多的炎症细胞(比如中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞)吸引至受损的局部肺,最终导致肺部严重损伤并导致慢性纤维化。血浆中IL-6的急性升高可导致C反应蛋白(CRP)增加。C反应蛋白(CRP)由肝脏产生,并且为对炎症或感染物的一般应激反应的生物标志物。表明了血清CRP水平可为用于预测放射性肺炎发生的有效指标和用于评估辐射引起的肺损伤程度的有价值因素。

[0134] IR之后血浆中细胞因子浓度的变化

[0135] 在IR之后4天、8天和180天时间点,与SP治疗组相比较,媒介物治疗组的动物表现出显著更高的血浆IL-6水平(分别为 $304.05 \pm 153.23 \text{ pg/ml}$ 相对于 $97.00 \pm 45.71 \text{ pg/ml}$ ($p=0.02$); $606.09 \pm 72.72 \text{ pg/ml}$ 相对于 $49.85 \pm 39.36 \text{ pg/ml}$ ($p<0.001$); 和 $197.22 \pm 55.55 \text{ pg/ml}$ 相对于 $40.06 \pm 43.26 \text{ pg/ml}$ ($p=0.018$)) (图13C)。在IR之后8天时间点,与SP治疗组相比较,媒介物治疗组的动物表现出显著更高的血浆纤维蛋白原水平($948.77 \pm 98.54 \mu\text{g/ml}$ 相对于 $332.38 \pm 109.02 \mu\text{g/ml}$ ($p<0.001$)) (图13B)。在IR之后180天时间点,与SP治疗组相比较,媒介物治疗组的动物表现出显著更高的血浆中性粒细胞弹性蛋白酶水平($25.21 \pm 6.54 \text{ ng/ml}$ 相对于 $12.15 \pm 2.87 \text{ ng/ml}$ ($p=0.034$)) (图13D)。在IR之后任何时间点,C反应蛋白在媒介物治疗和SP治疗的动物组之间都没有表现出显著差异(图13A)。

[0136] 实施例9.纤维化与细胞因子mRNA表达之间的Spearman相关性

[0137] 统计学分析

[0138] 双尾学生T检验被用于检查具有单个自变量的组中的统计显著性。 $P<0.05$ 被认为是显著的。Spearman秩相关性被用于评价特定mRNA表达与肺部纤维化程度之间的关系(图12)。对数秩分析被用于比较组间的存活率。

[0139] 结论.在辐射暴露之后24小时开始口服给予BH4或其代谢前体SP可增强肺部和心脏功能,如通过降低的呼吸频率、增强的收缩储备、改善的收缩和舒张功能以及增加的存活率所证明的。

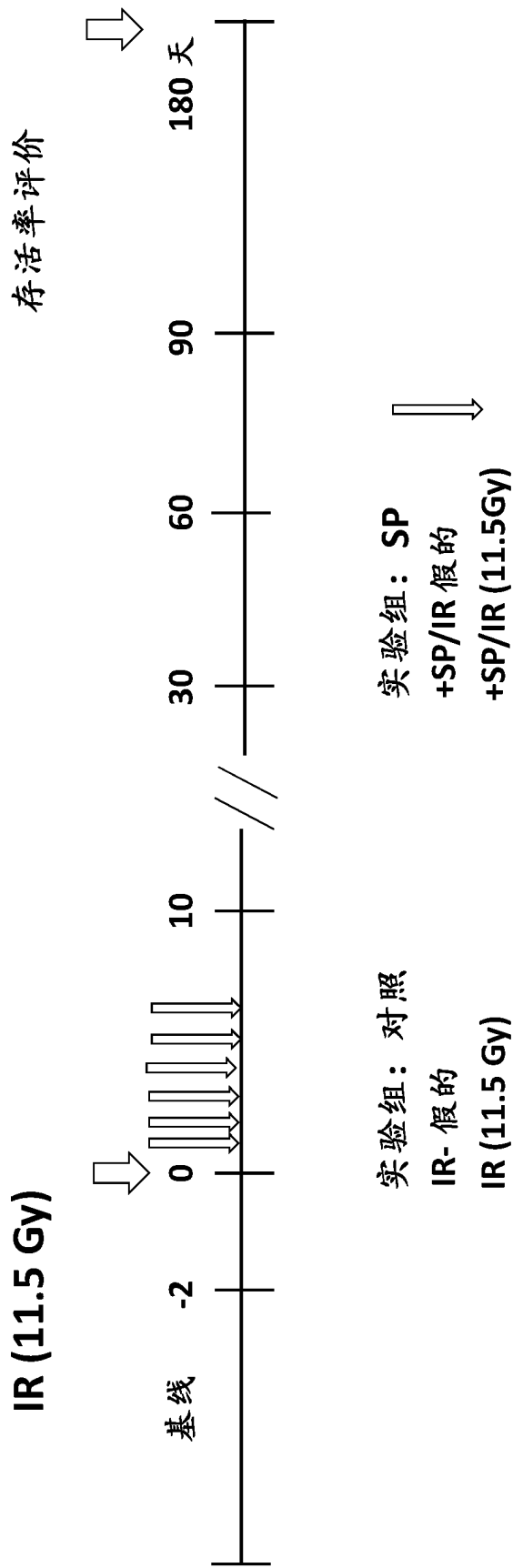


图 1

- 非侵入性测量：基线和RT后第10、30、90、180天的超声心动图、呼吸率、体重、CT，每个时间点n=15/组。
- 分子和免疫组织化学分析：基线和RT后第10、30、90、180天

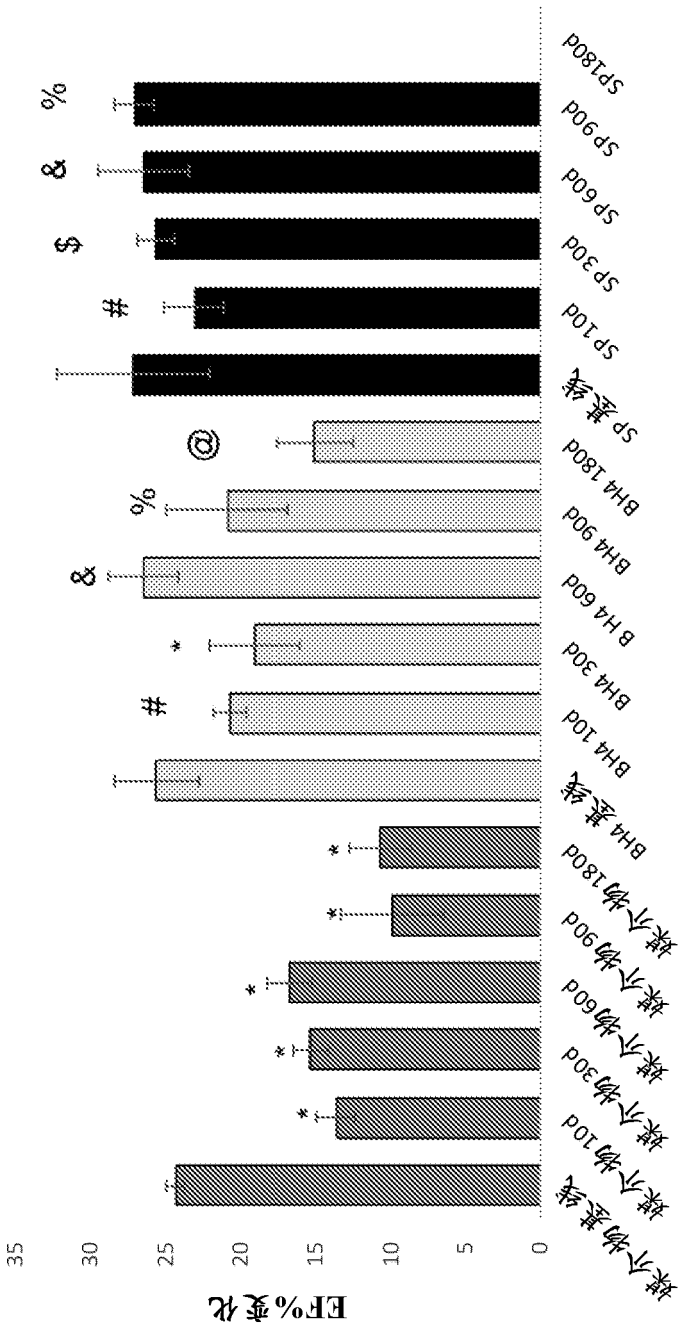
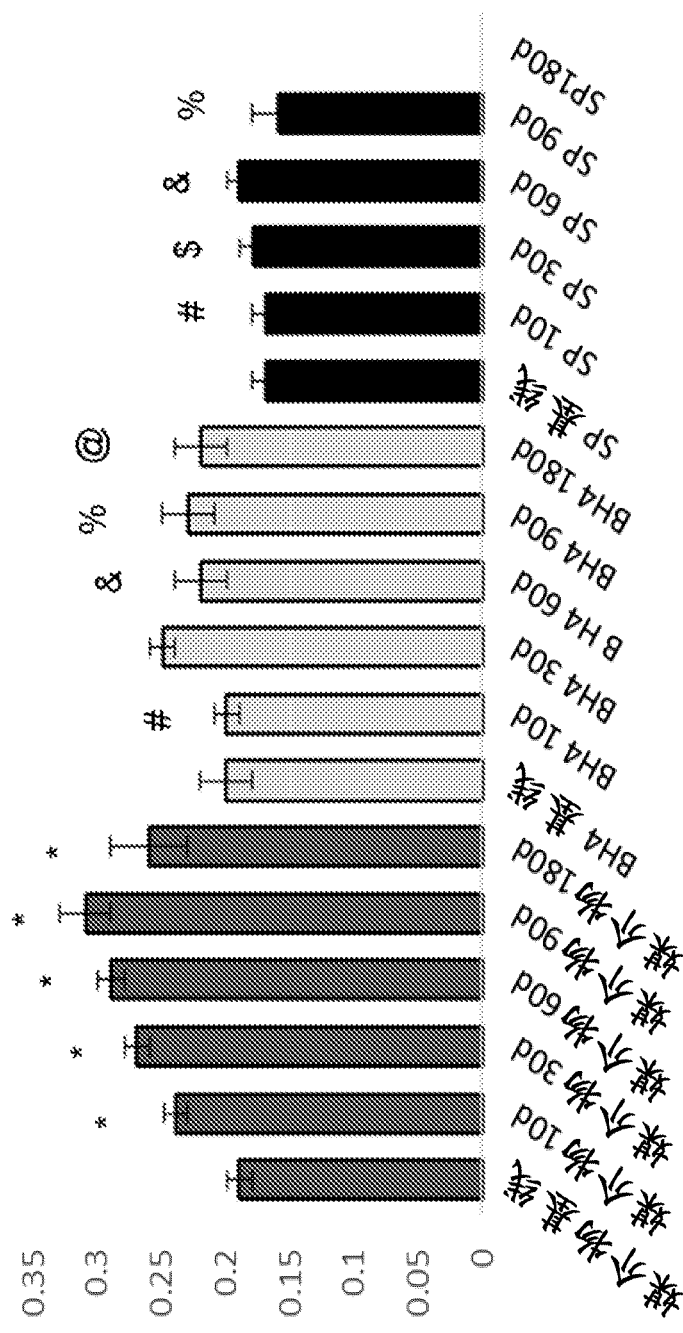


图 2

*p < 0.05 相对于基线
#p < 0.05 相对于媒介物10d, p < 0.05 相对于媒介物30d, p < 0.05 相对于媒介物60d,
p < 0.05 相对于媒介物90d,
@p < 0.05 相对于媒介物。



*p < 0.05 相对于基础线
#p < 0.05 相对于媒介物10d, p < 0.05 相对于媒介物30d, p < 0.05 相对于媒介物60d,
p < 0.05 相对于媒介物90d,
@p < 0.05 相对于媒介物。

图 3

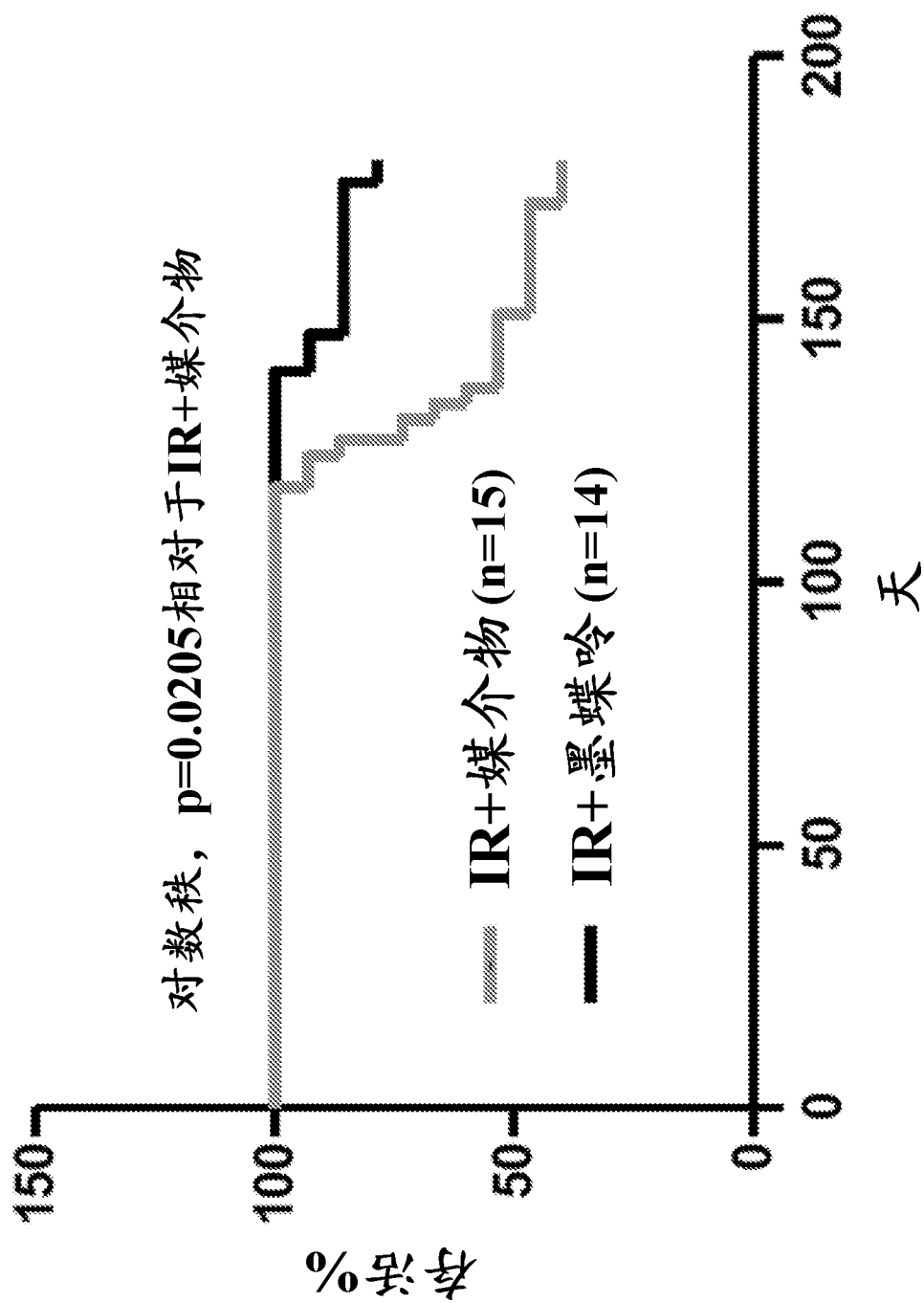


图 4

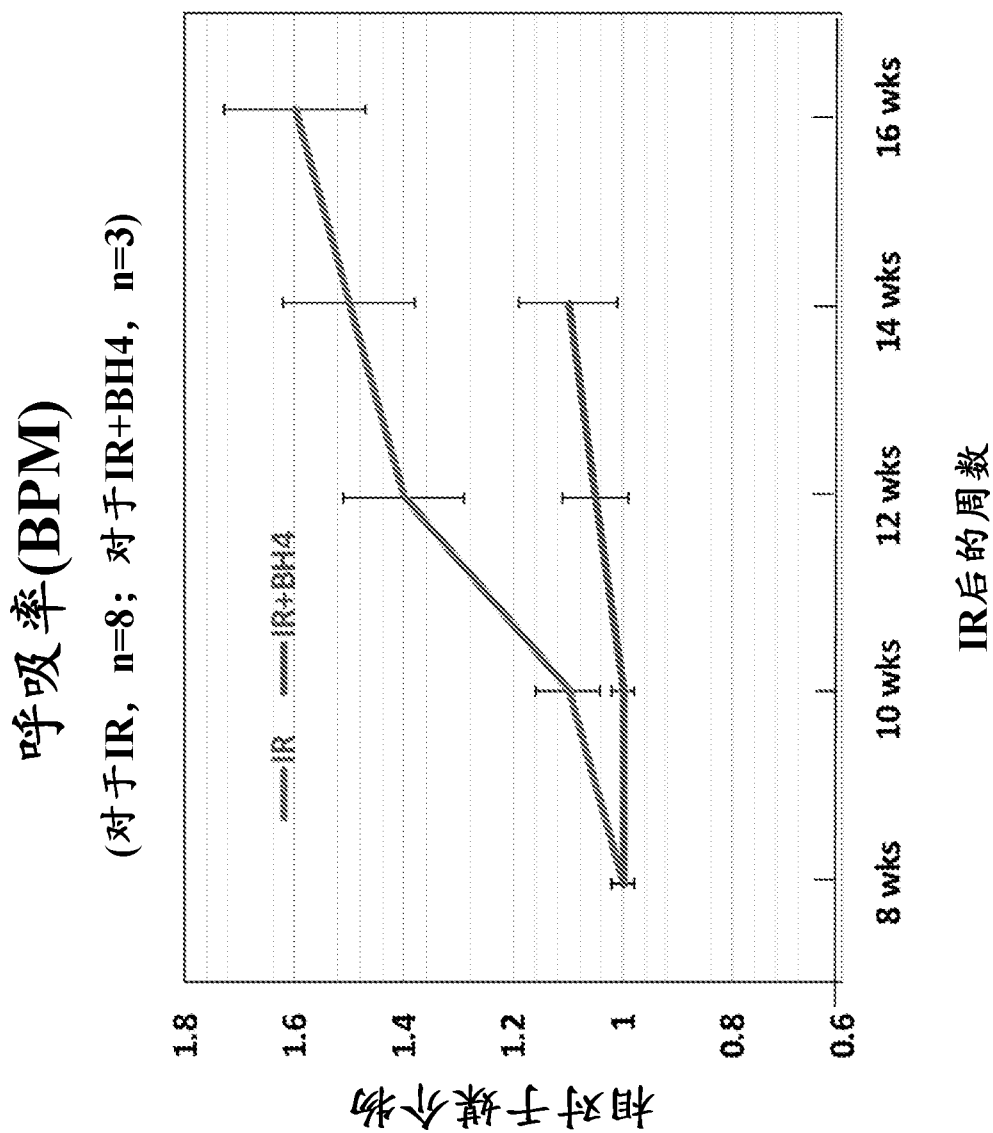


图 5

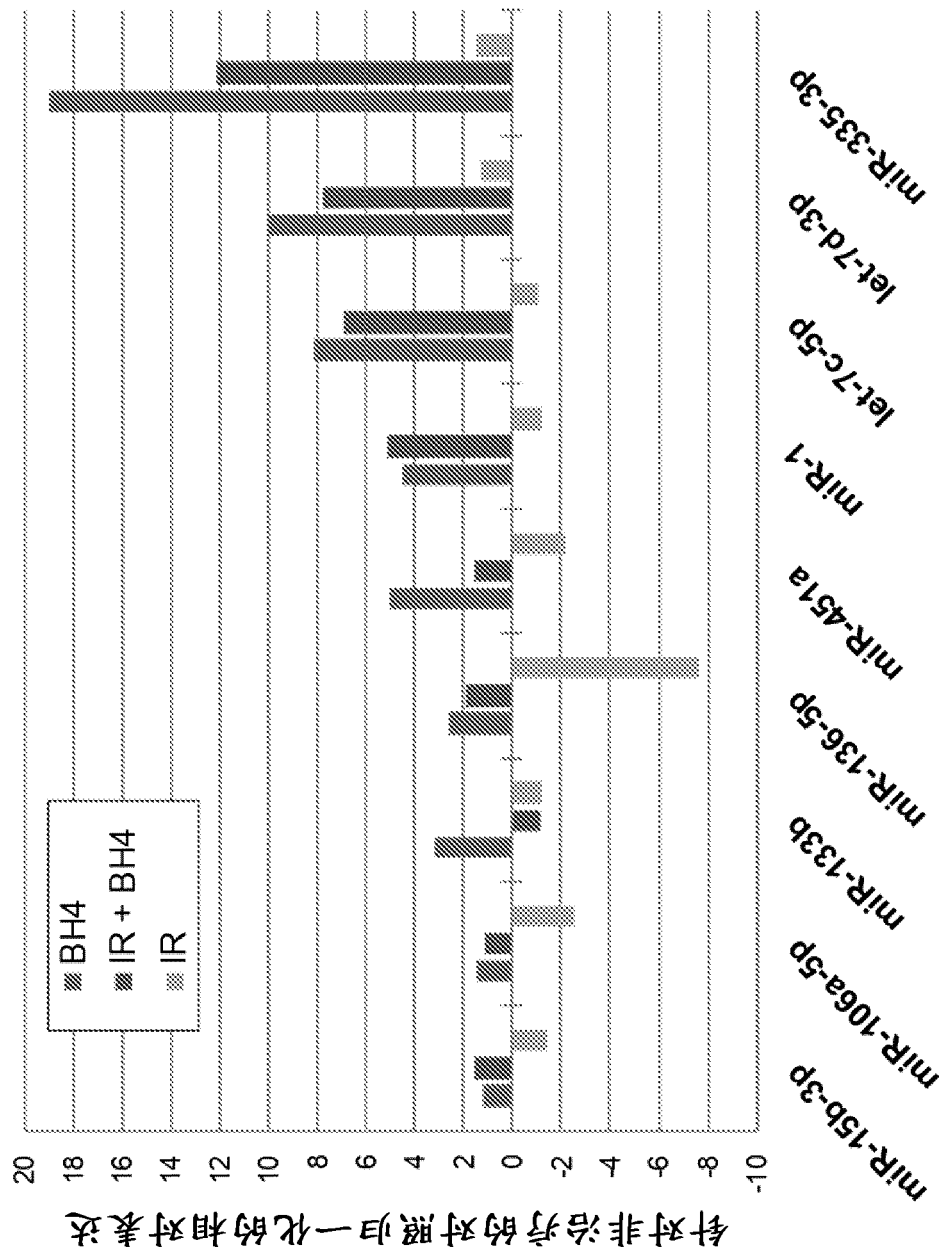
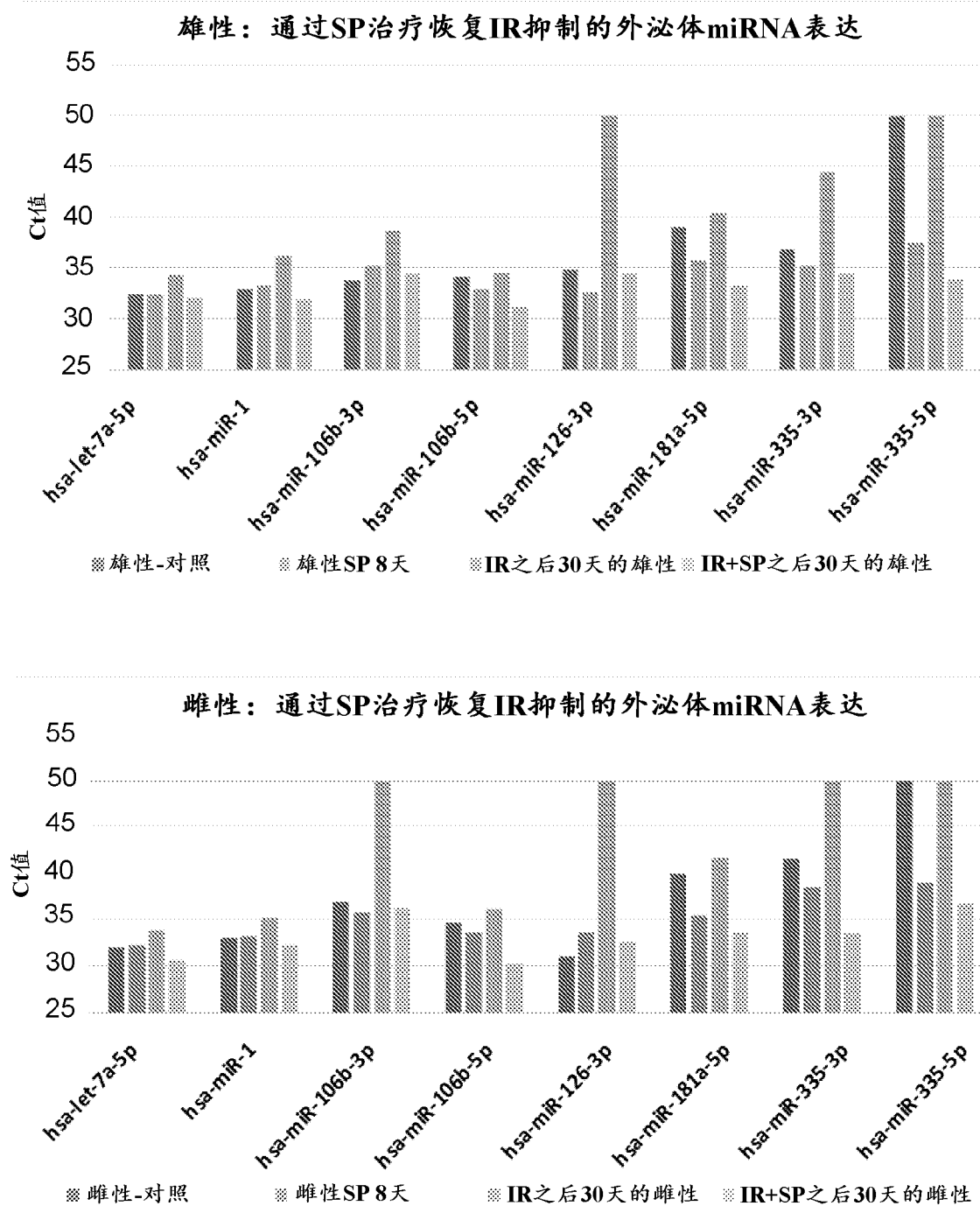


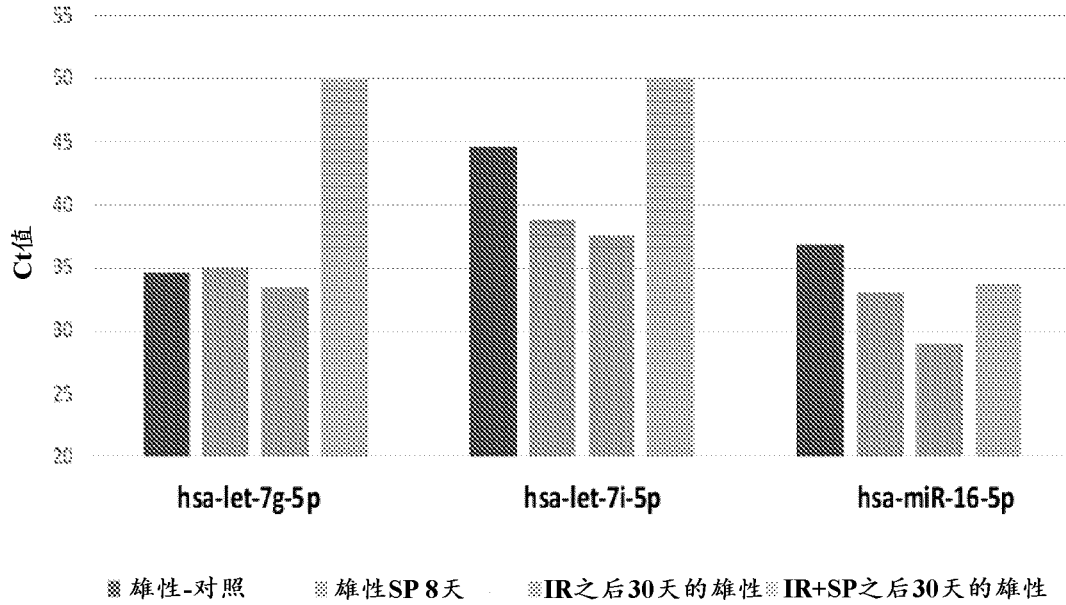
图 6A

IR抑制的外泌体miRNA



IR诱导的外泌体miRNA

雄性：IR依赖性外泌体miRNA表达减弱



雌性：IR依赖性外泌体miRNA表达减弱

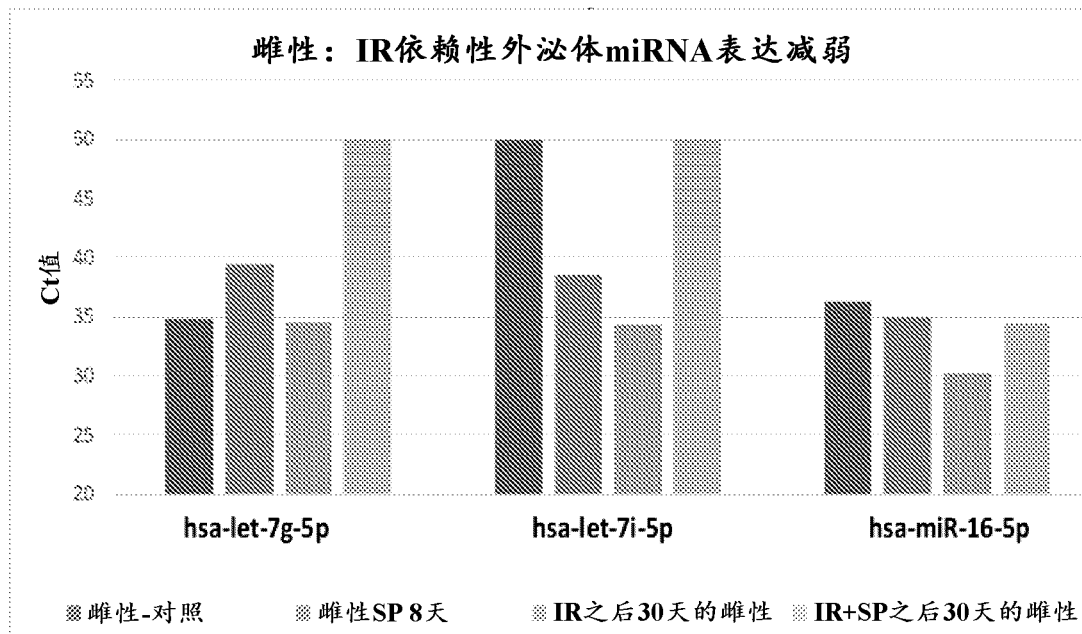


图 6C

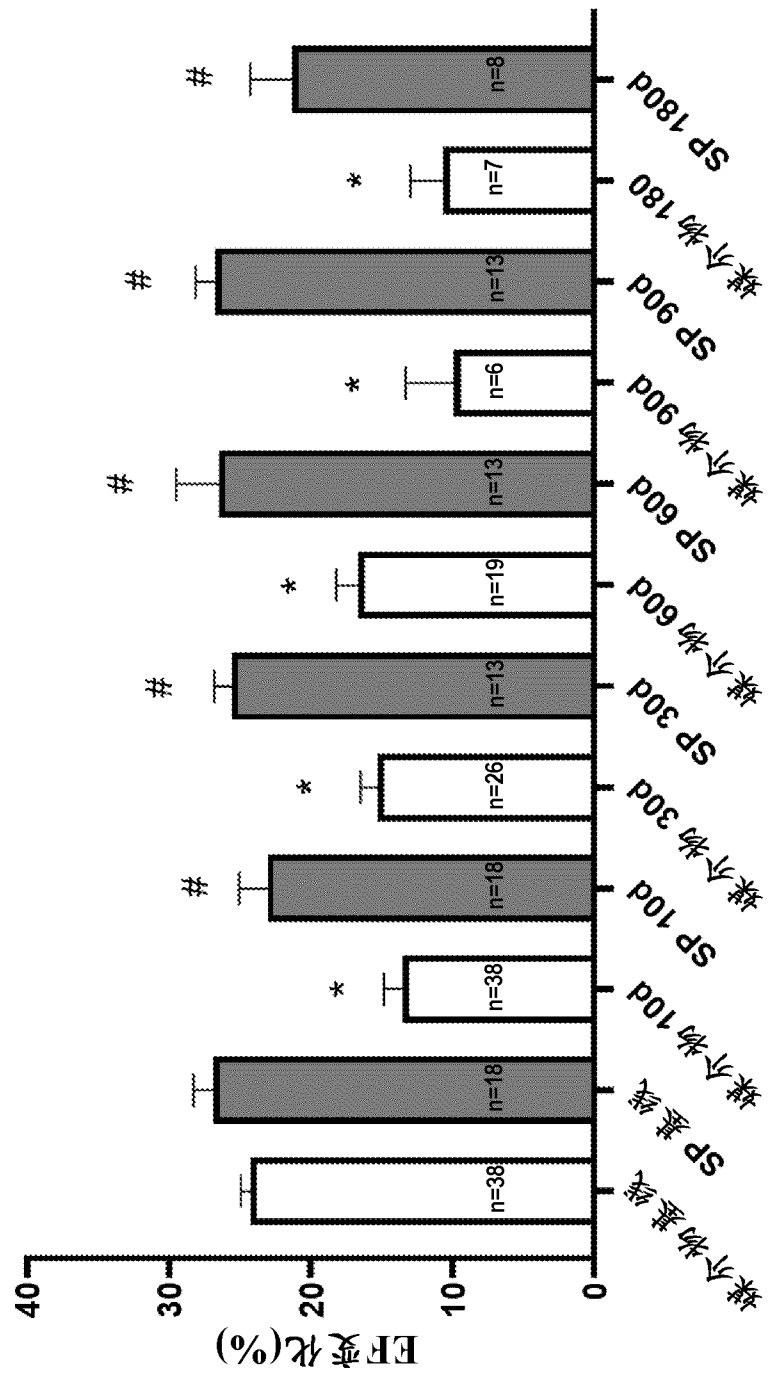


图 7

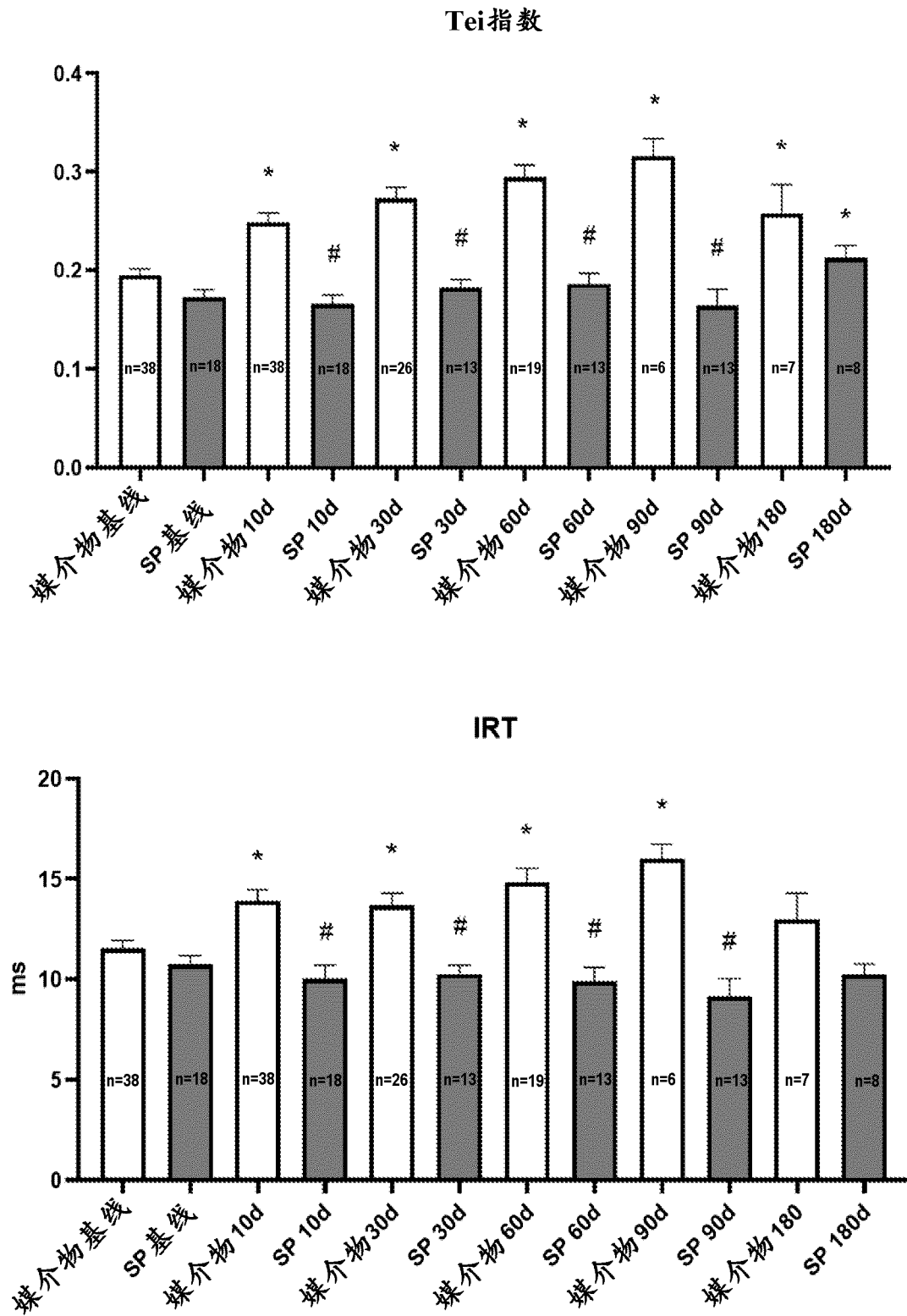


图 8

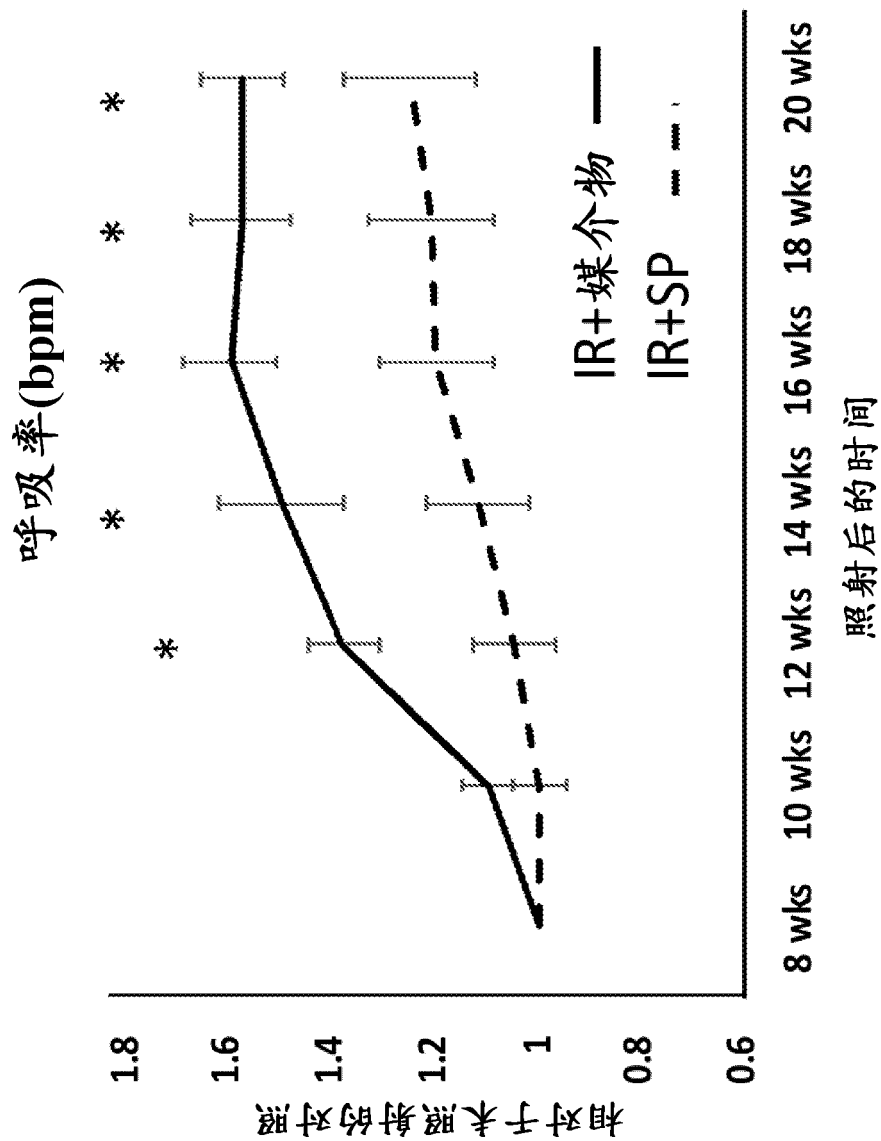


图 9

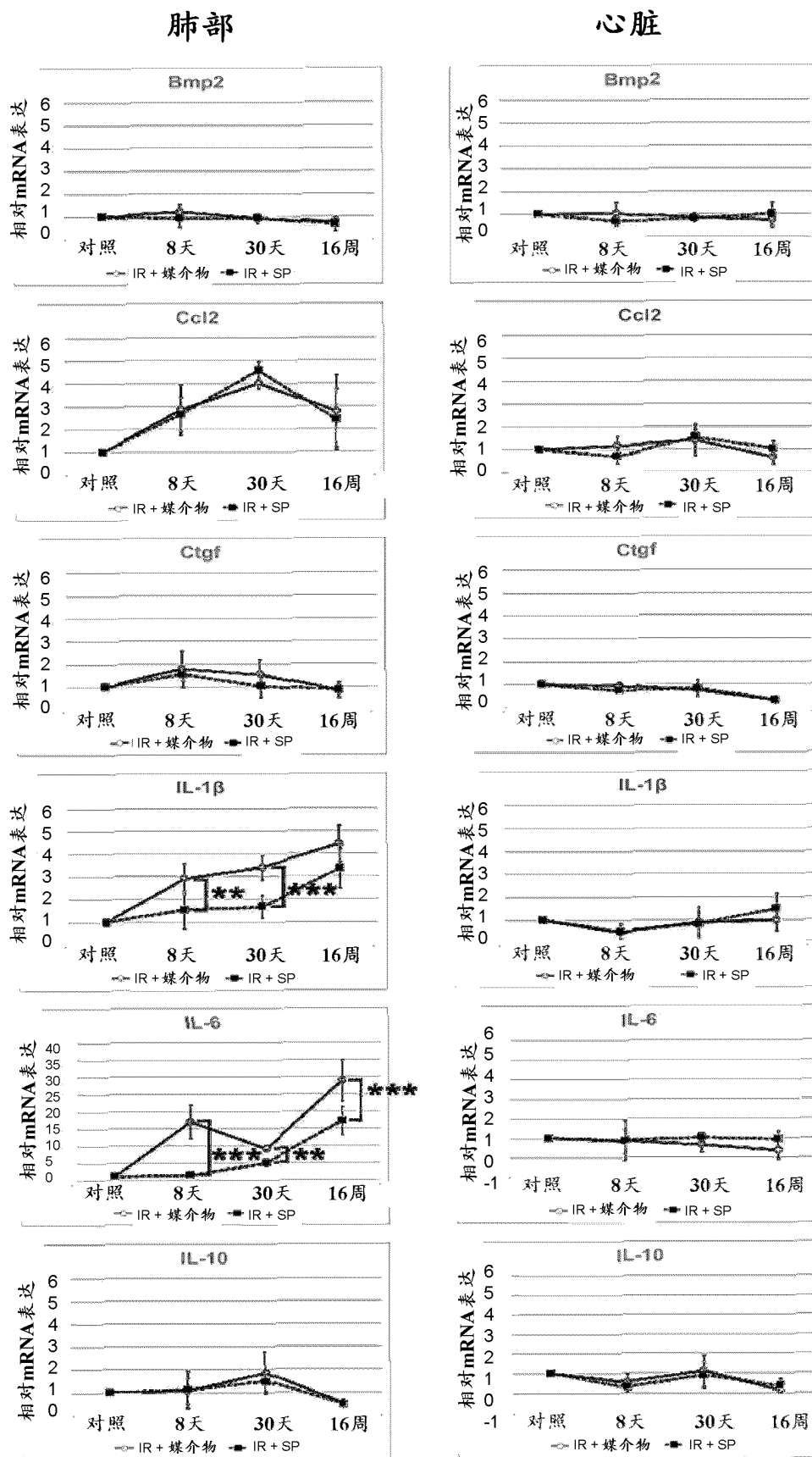


图 10

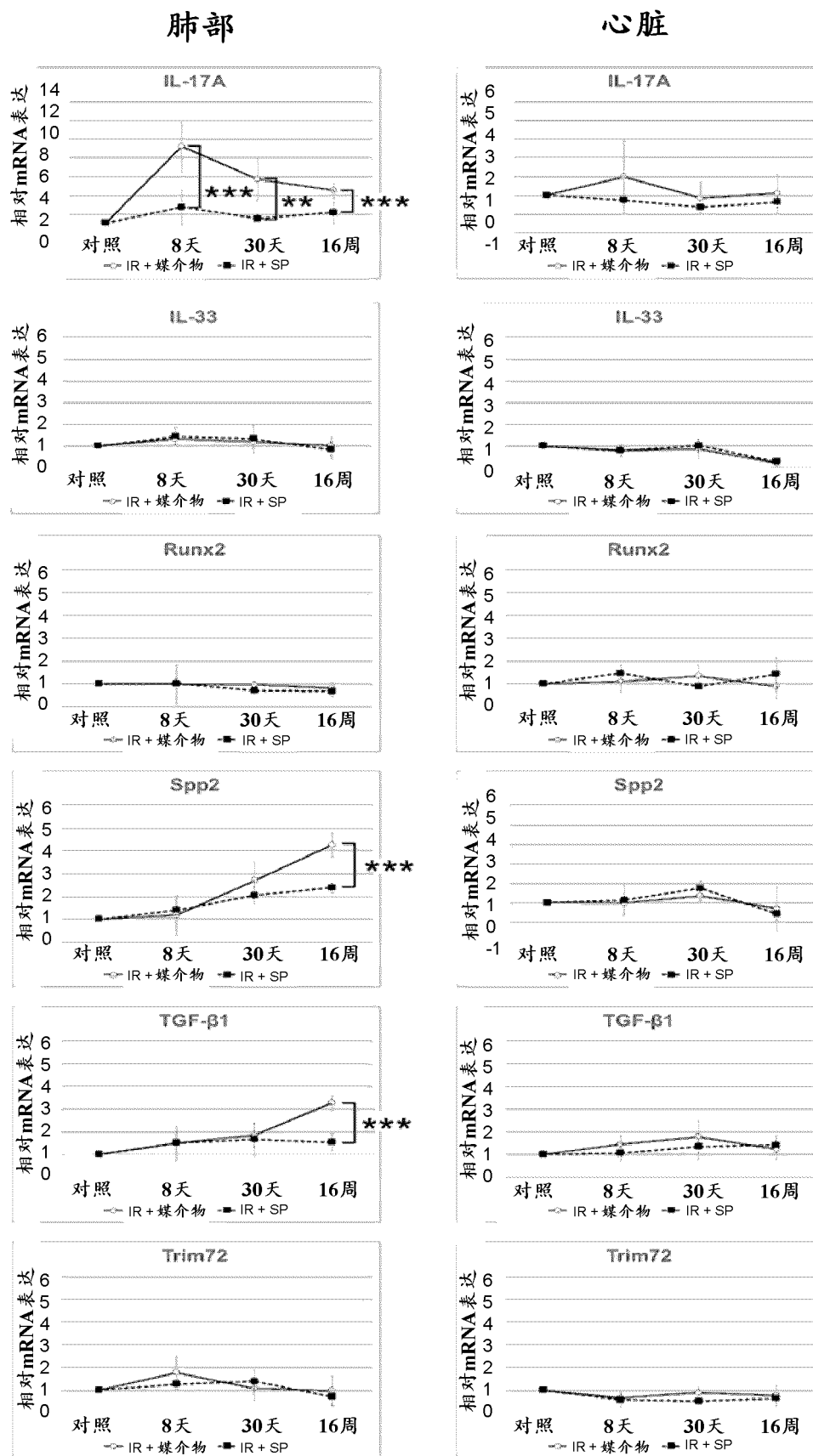


图 10(续)

心脏纤维化16周

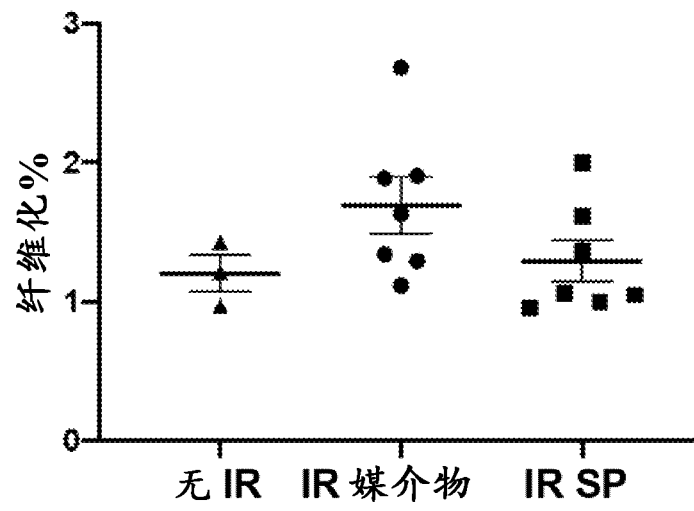


图 11A

肺部纤维化16周

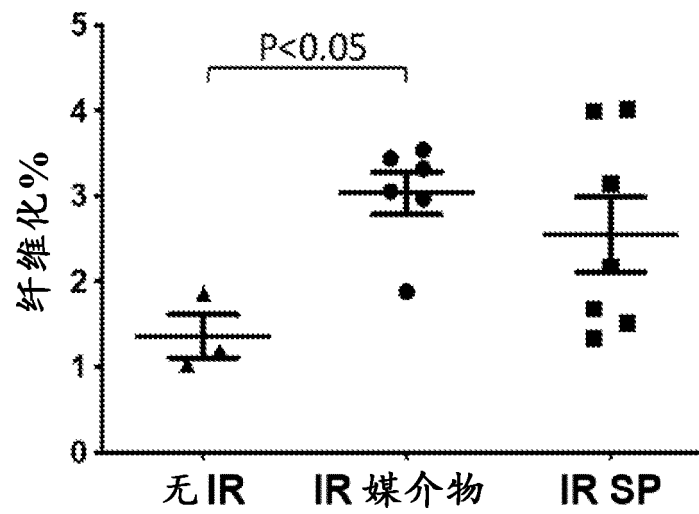


图 11B

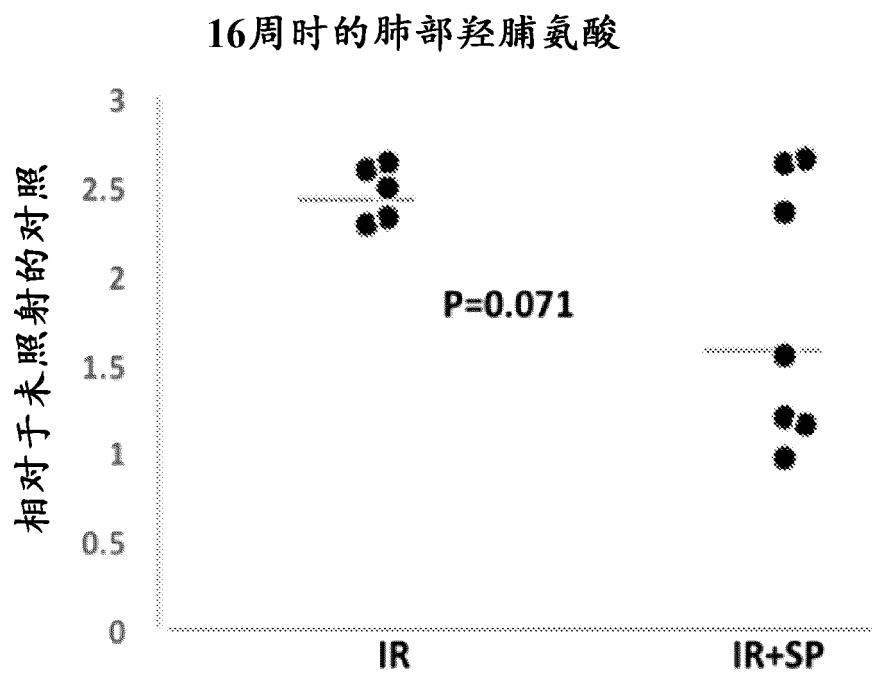


图 11C

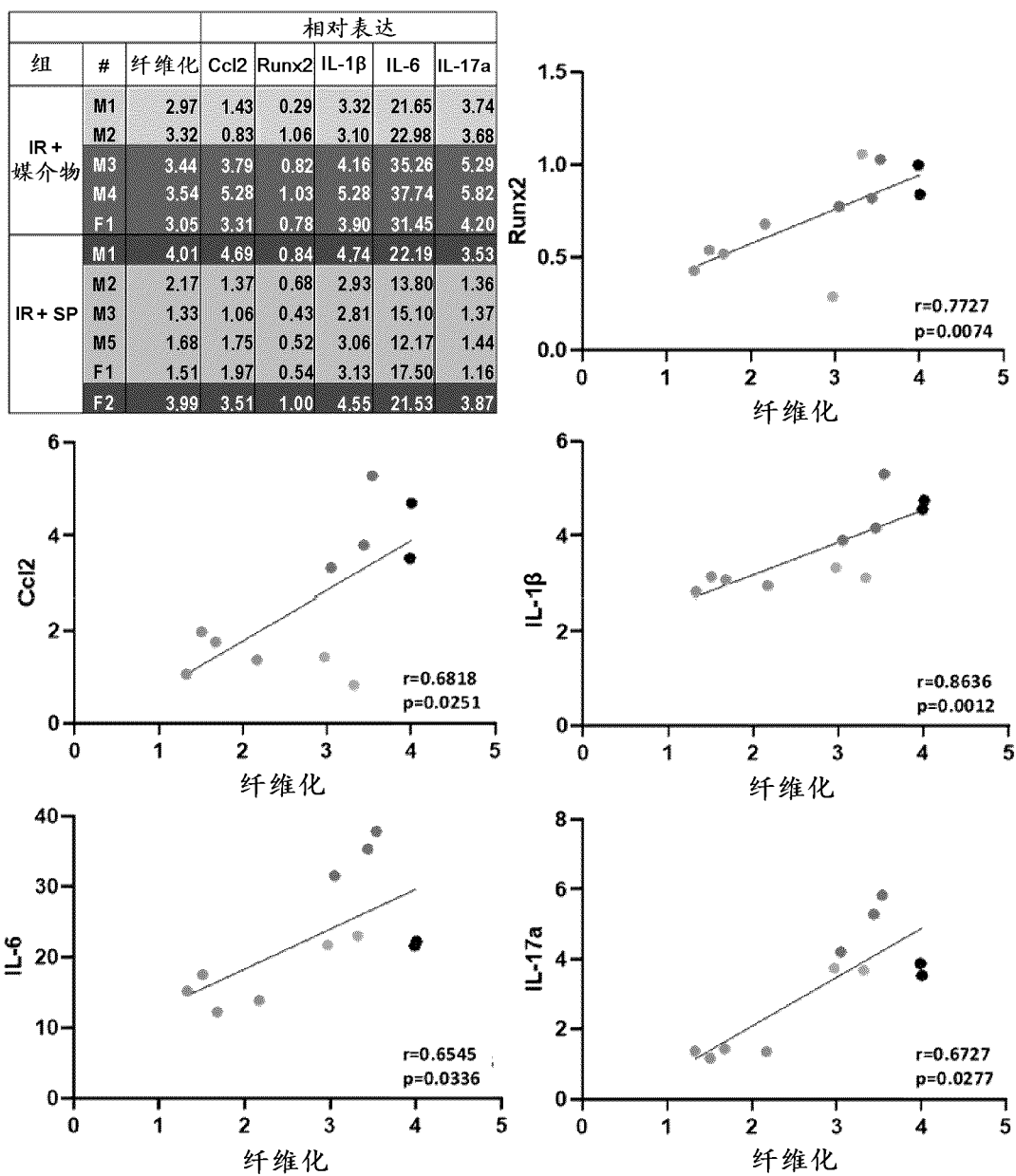


图 12

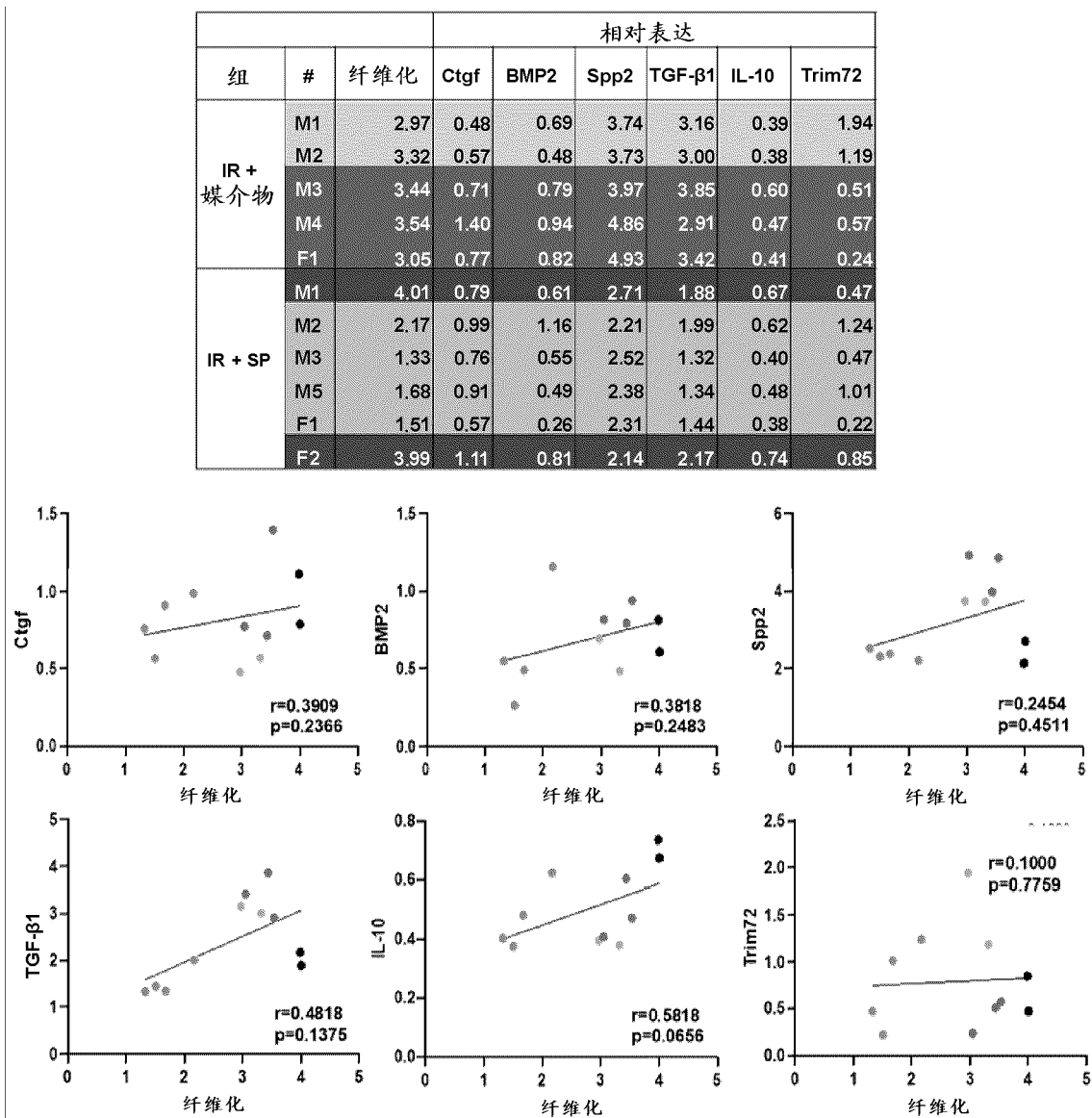


图 12(续)

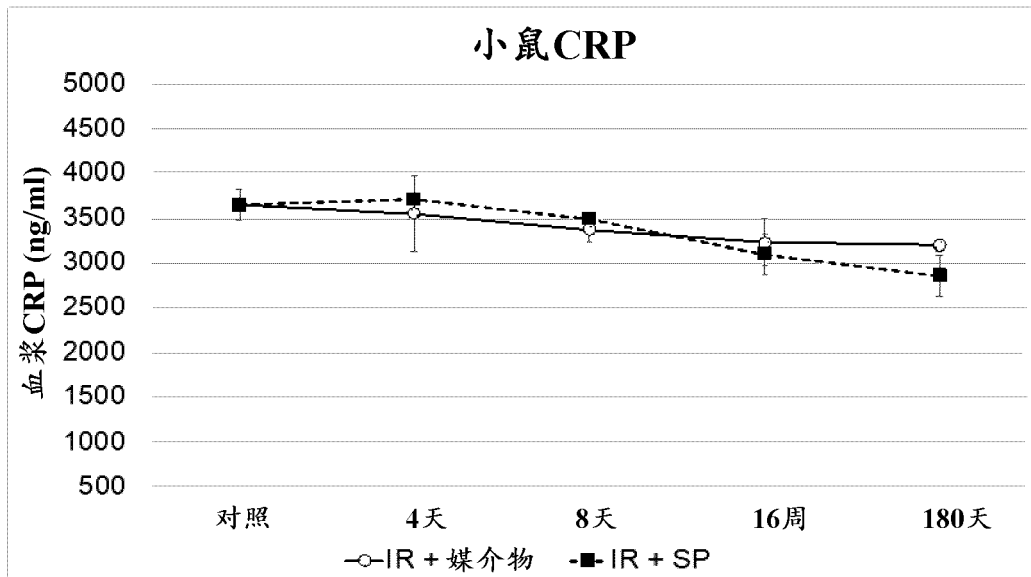
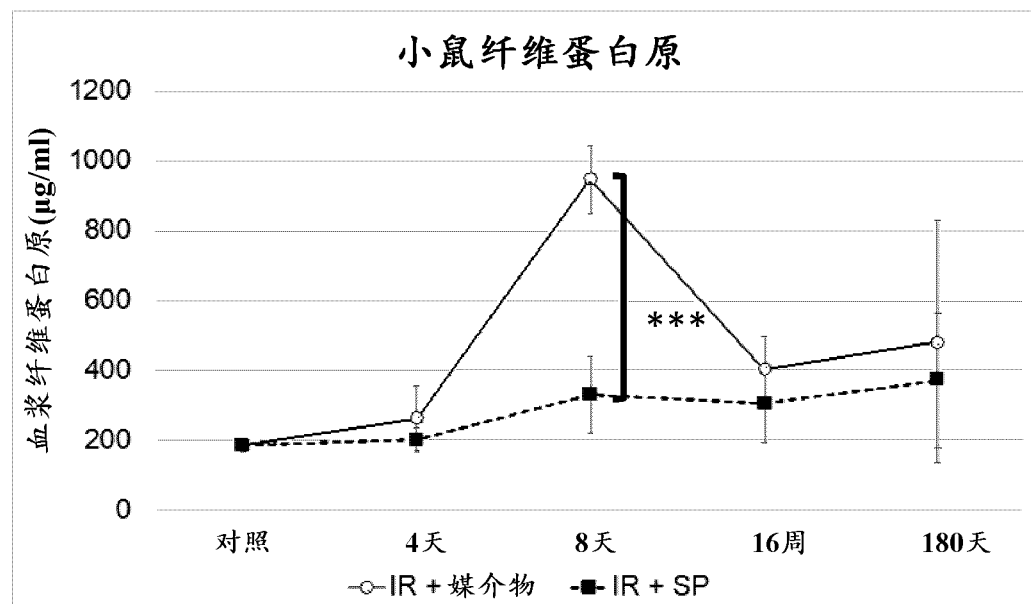


图 13A



** - p值 < 0.05 ; *** - p值 < 0.001

图 13B

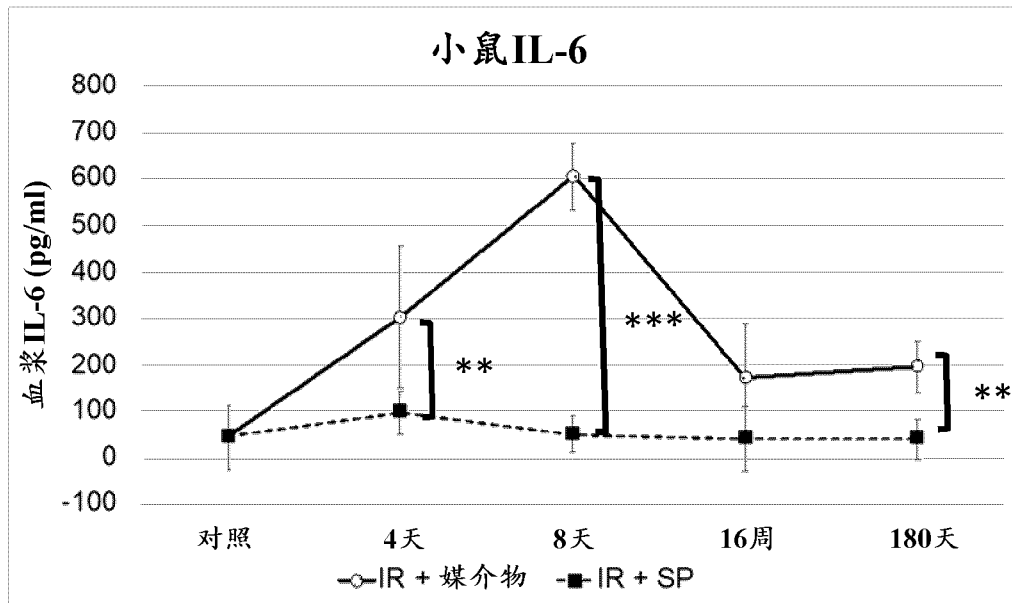
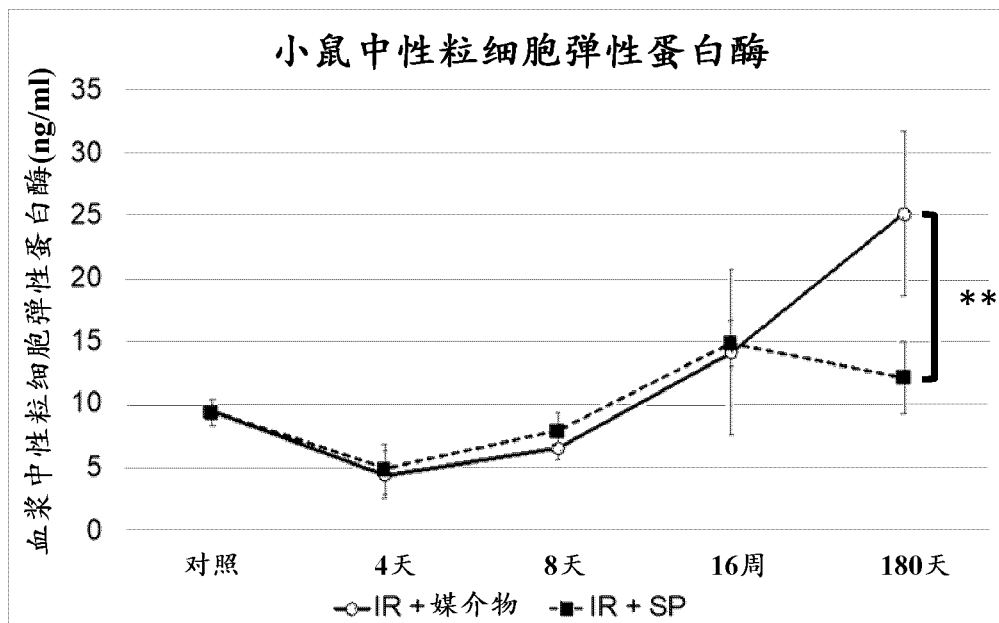


图 13C



** - p 值 < 0.05 ; *** - p 值 < 0.001

图 13D

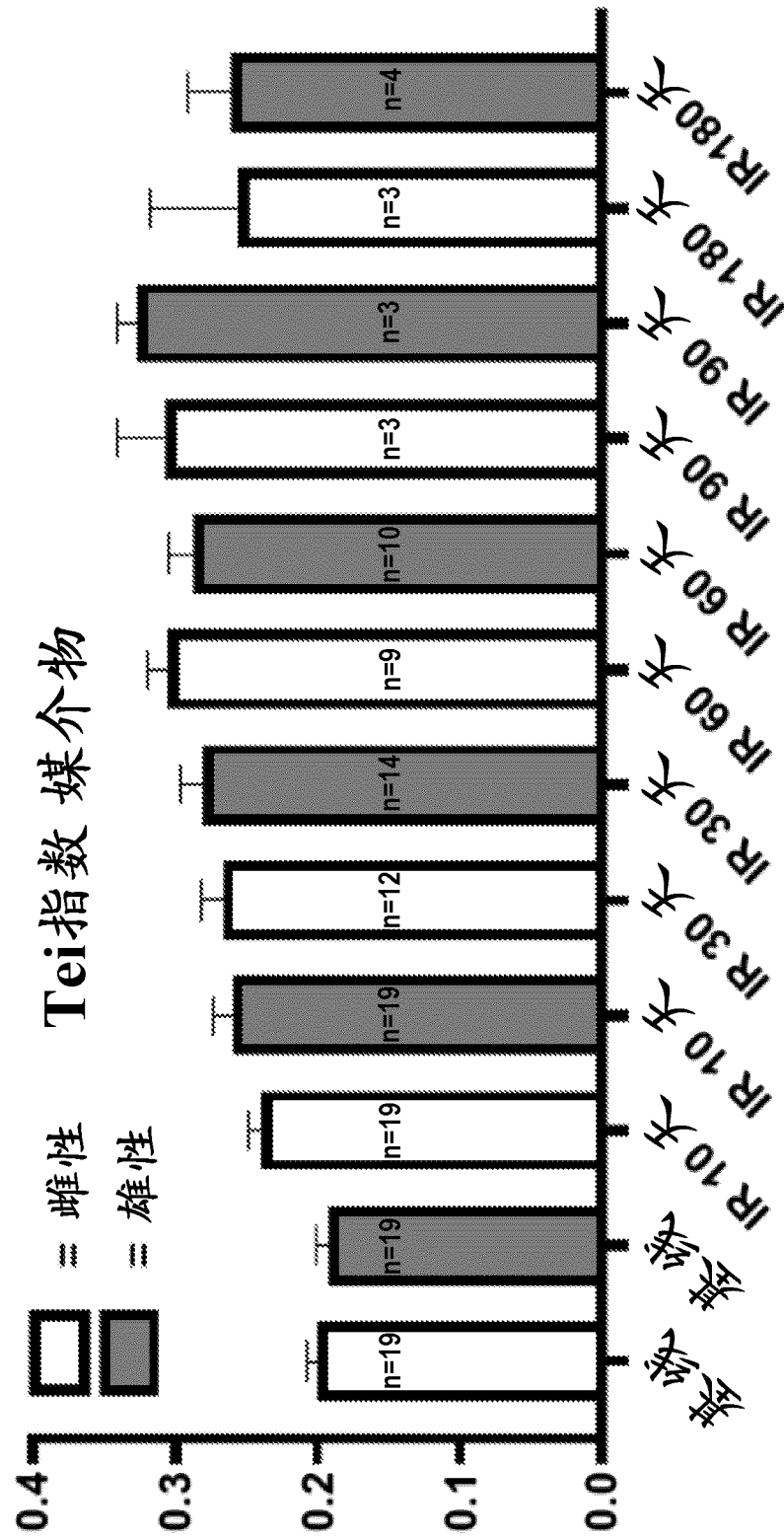


图 14A

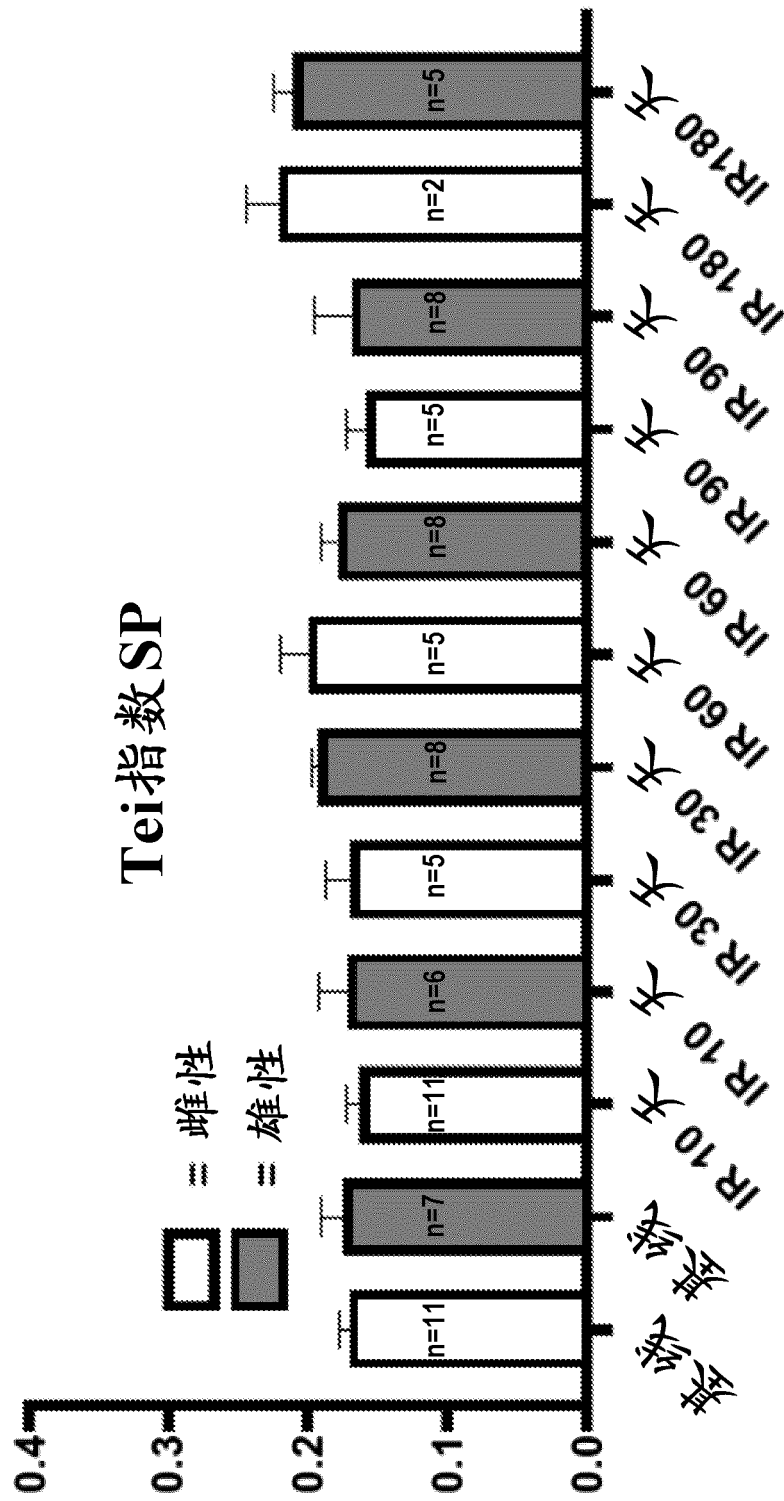


图 14B

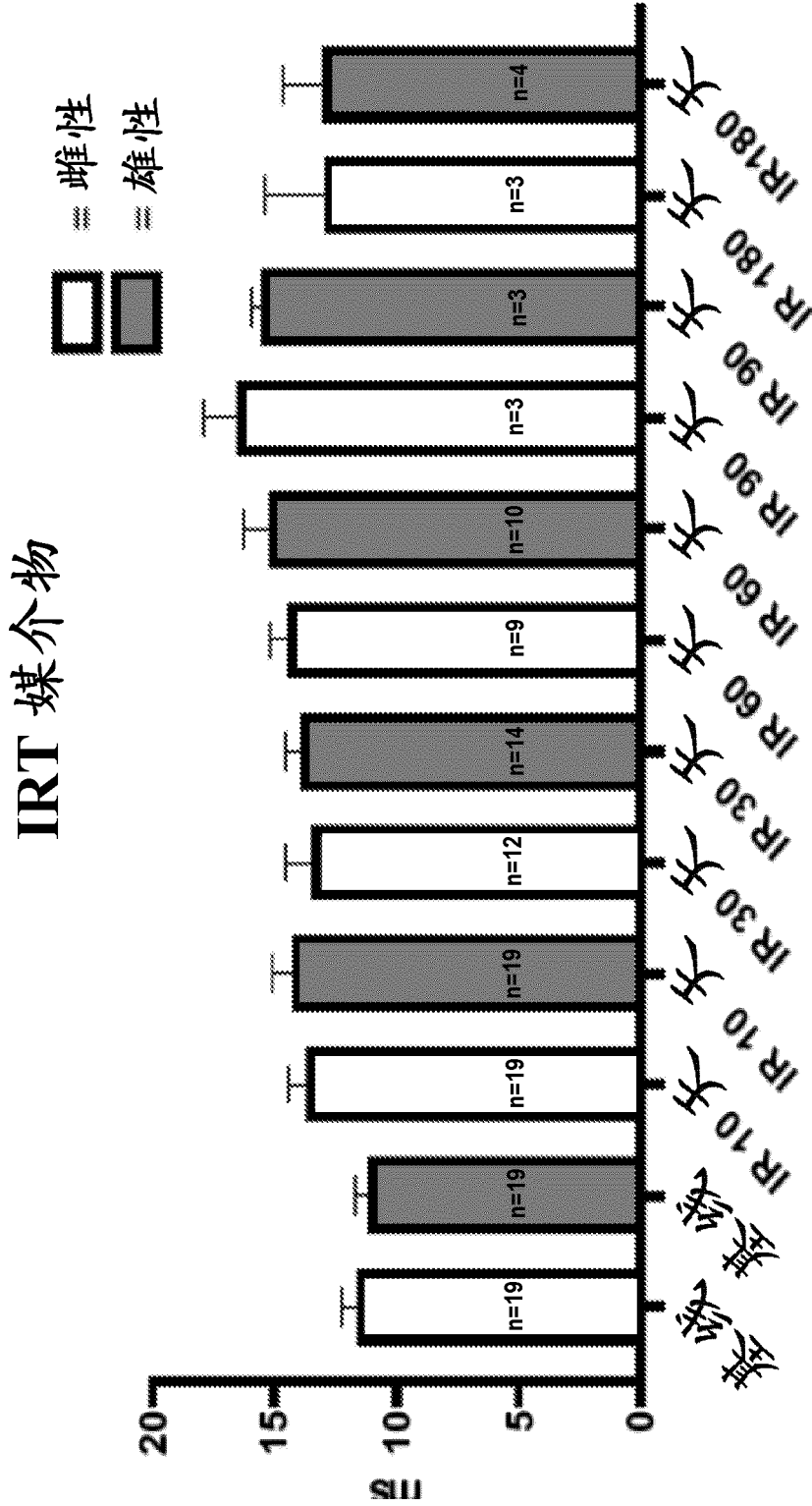


图 15A

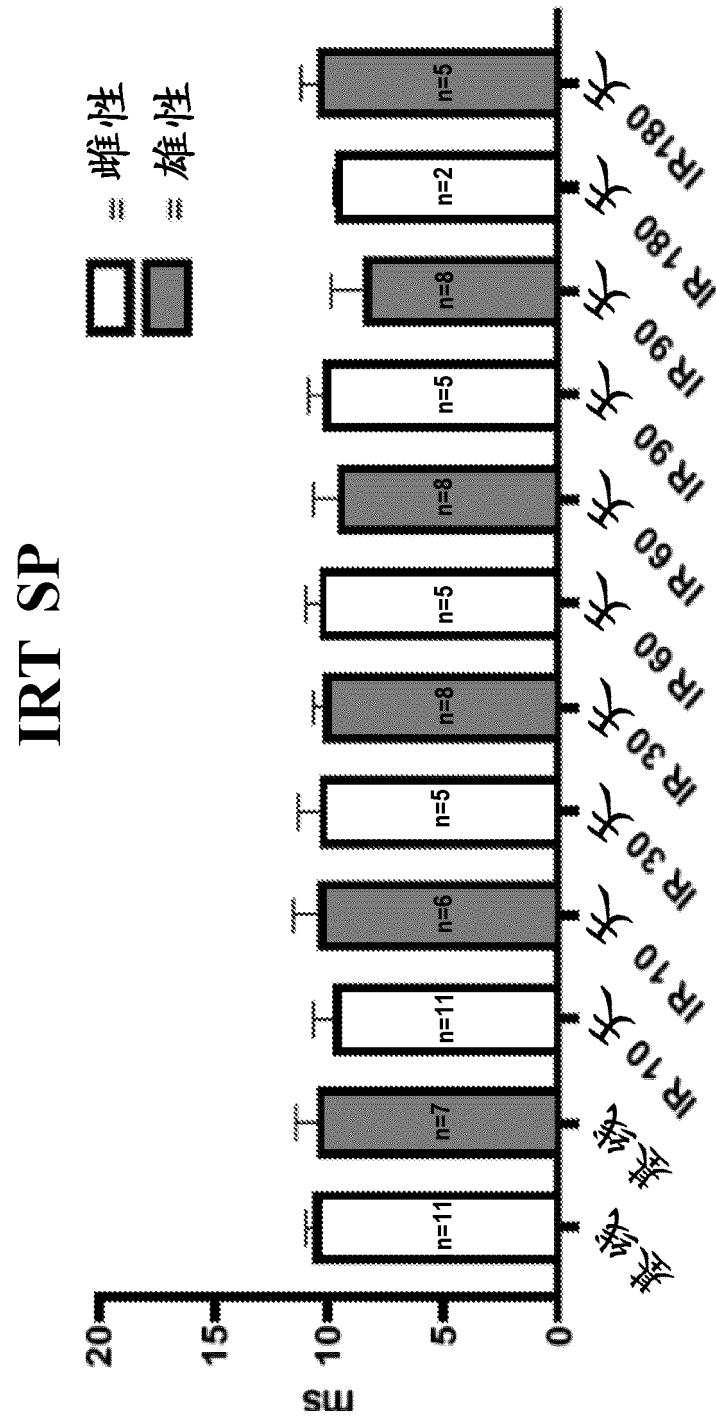


图 15B

EF变化(%) 媒介物

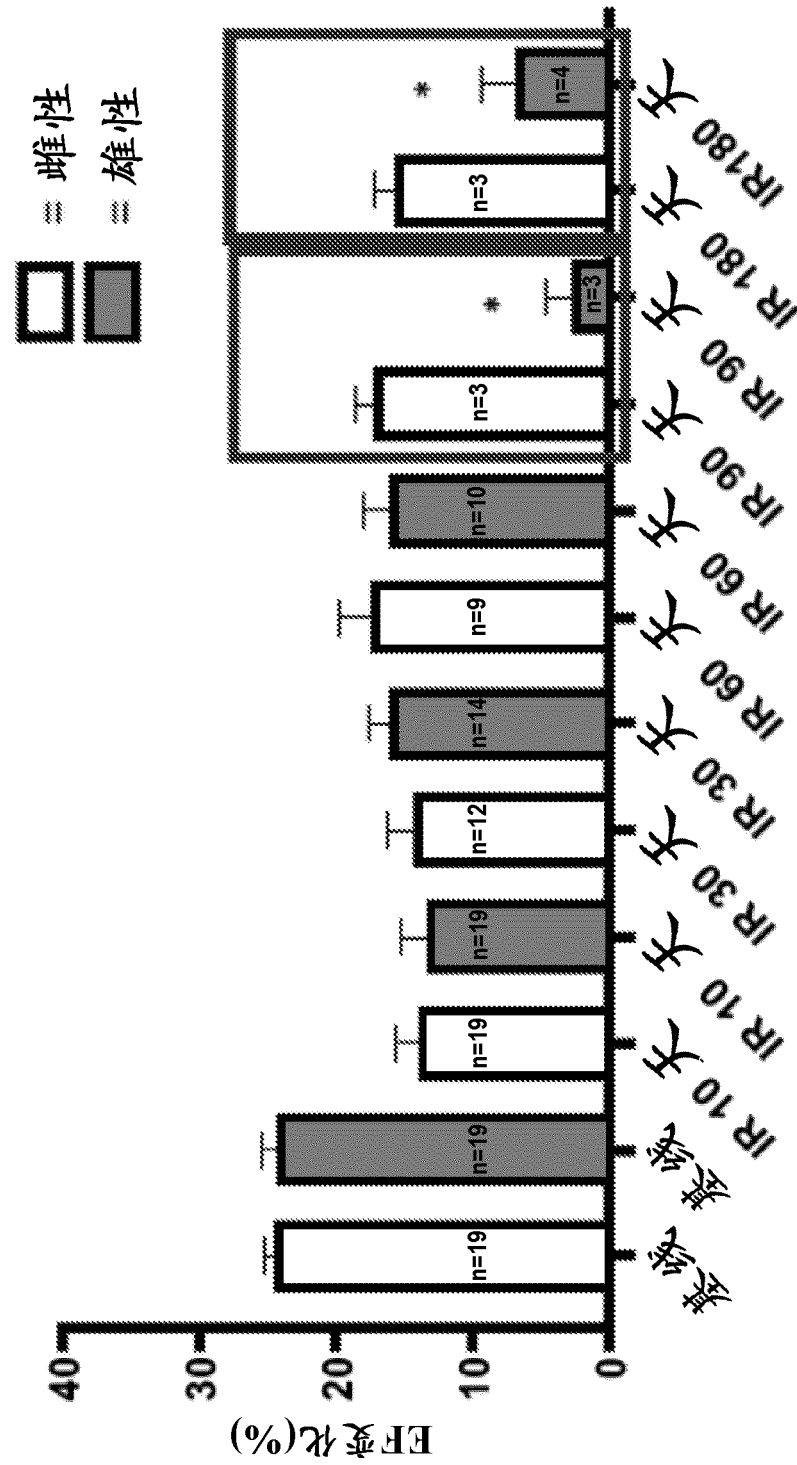


图 16A

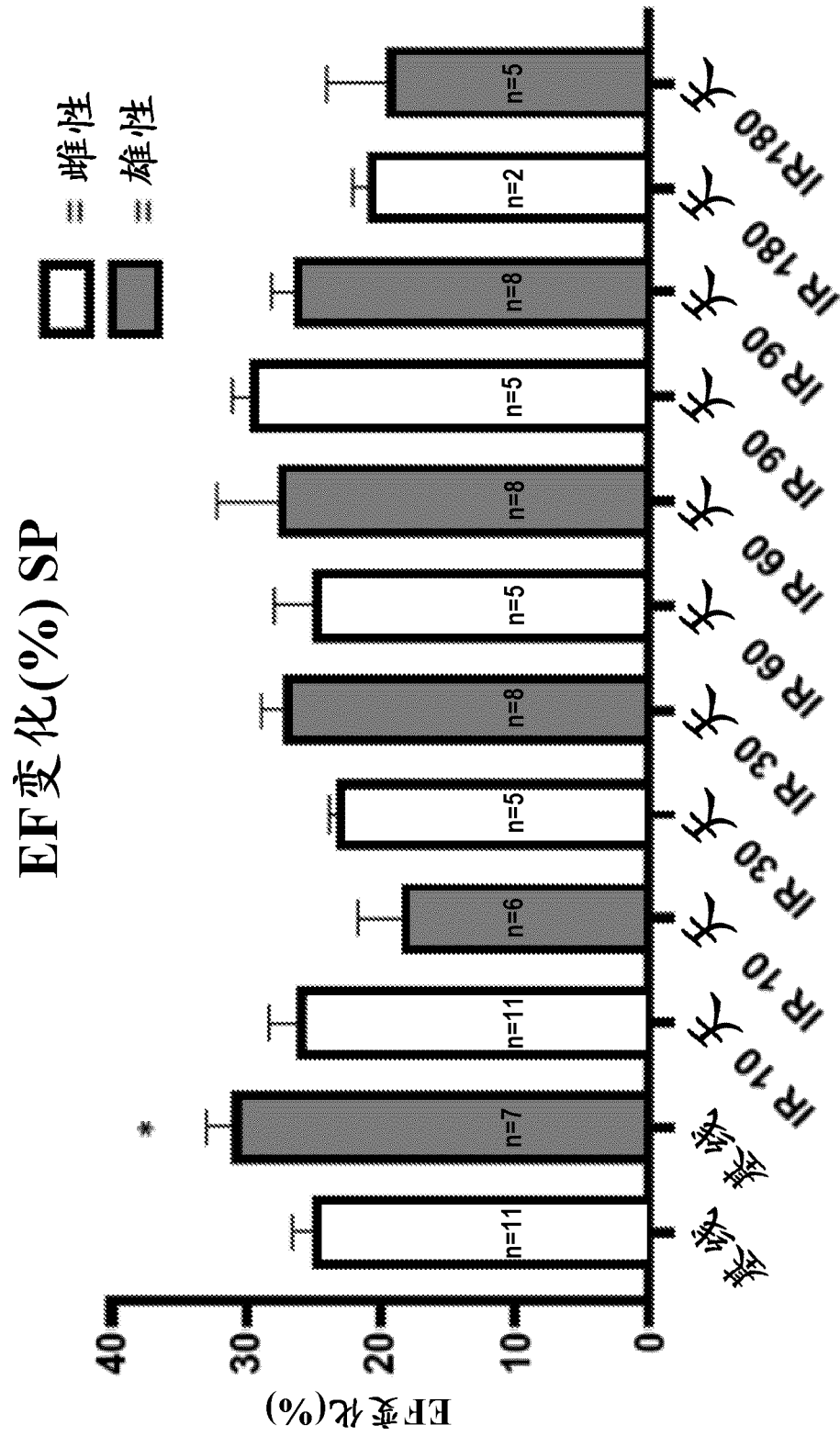


图 16B