



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102307466 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 04

(21) 申请号 200980156282. 1

A61K 31/21 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 12. 08

(30) 优先权数据

61/120, 785 2008. 12. 08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/067199 2009. 12. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02010/077681 EN 2010. 07. 08

(71) 申请人 索利吉尼克斯公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 R·N·布雷 G·B·麦克唐纳

C·赛博

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 张全信

(51) Int. Cl.

A01N 37/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 13 页

(54) 发明名称

用于辐射伤和化学治疗伤的局部活性类固醇

(57) 摘要

本发明展示与局部有效的治疗药剂一起递送皮质类固醇或其代谢物的方法, 以治疗和预防由急性辐射伤在胃肠道中造成的组织损伤。

1. 治疗暴露于致损量辐射或化学治疗药剂的对象中由于上皮细胞毒性造成的细胞和组织损伤严重性的方法,包括向该患者给予有效量的局部活性皮质类固醇,足以向受损的上皮细胞暴露其代谢物。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述局部活性皮质类固醇是二丙酸氯地米松。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述代谢物是一丙酸 17- 氯地米松。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述局部活性皮质类固醇的有效量是 8mg/ 天。

5. 药物组合物通过给予有效量的局部活性皮质类固醇或其代谢物预防、减轻和 / 或治疗患者消化道内层损伤的用途,其中所述损伤是由于所述患者暴露于化学治疗和 / 或辐射的结果。

6. 权利要求 5 所述的用途,其中所述局部活性皮质类固醇与用于治疗组织损伤的另一个细胞方面的第二种化合物组合给药,所述第二种化合物包括生长因子,调节分子,抗炎分子——包括角质化细胞生长因子 (KGF)、R-spondin-1 及其类似物和同源物,激素——包括生长抑素、奥曲肽、促胃液素、葛瑞林,环-氧化酶-2 抑制剂,抗氧化剂,维生素 E, 硫糖铝,溶血磷脂酸类似物以及 LPA-2 受体的激动剂或拮抗剂,氨磷汀和其他辐射保护或辐射缓和药物。

7. 权利要求 5 所述的用途,其中所述局部活性皮质类固醇是二丙酸氯地米松。

8. 权利要求 5 所述的用途,其中所述代谢物是一丙酸 17- 氯地米松。

9. 权利要求 5 所述的用途,其中所述局部活性皮质类固醇的有效量是 8mg/ 天。

10. 通过向患者给予口服剂型的局部活性皮质类固醇或其代谢物局部治疗上皮组织的方法,其中所述口服剂型对于局部或局部性治疗所述患者的胃肠道和口腔有效,并且进一步其中所述患者表现出由辐射或化疗治疗造成的组织损伤引起的炎症症状。

11. 权利要求 10 所述的方法,其中所述局部活性皮质类固醇是二丙酸氯地米松。

12. 权利要求 10 所述的方法,其中所述代谢物是一丙酸 17- 氯地米松。

13. 权利要求 10 所述的方法,其中所述局部活性皮质类固醇的有效量是 8mg/ 天。

14. 权利要求 10 所述的方法,其中所述口服剂型在小肠中释放所述局部活性皮质类固醇。

15. 权利要求 10 所述的方法,其中所述局部活性皮质类固醇与有效剂量的 KGF 联合给药。

16. 权利要求 10 所述的方法,其中所述局部活性皮质类固醇与有效剂量的碳酸锂联合给药。

17. 权利要求 10 所述的方法,其中所述局部活性皮质类固醇与有效剂量的 R-spondin-1 联合给药。

18. 权利要求 10 所述的方法,其中治疗除了在化学治疗或辐射治疗后给药外还在化学治疗或辐射治疗前给药 1-2 次。

## 用于辐射伤和化学治疗伤的局部活性类固醇

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 12 月 8 日提交的美国临时申请号 61/120,785 的优先权,因此其内容通过引用并入本文。

[0003] 发明技术领域

[0004] 用局部有效的治疗药剂治疗和预防由于胃肠道急性辐射伤造成的组织损伤。

[0005] 发明背景

[0006] 在根除恶性癌细胞时,经常组合使用辐射治疗和化学治疗。暴露于辐射或化学治疗药剂通常导致正常组织,特别是胃肠道中的造血细胞和上皮细胞的破坏。此外,环境辐射源也能导致正常组织损伤,包括偶然暴露于辐射,或者与放射性核素接触,例如核事故或恐怖袭击中“脏弹”的故意使用后导致的放射性物质释放中的放射性核素。

[0007] 尽管辐射本身或者它与化学治疗的结合在靶向恶性细胞或治疗其他疾病中有效,但这些用途通常与正常细胞和组织的损伤相关。这种损伤可以包括纤维化,血管损伤,异常血管发生,肺炎,动脉粥样化形成,骨坏死,免疫抑制和胃肠道、肺、肾和其他器官的功能损伤。上下胃肠道的上皮细胞特别容易被用于癌症的辐射和化学治疗药剂损伤,以及类推地,特别容易受到环境暴露于放射性核素形式的辐射或偶然或有意暴露的高剂量辐射。对上皮组织的直接和间接的损伤可导致胃肠症状和慢性症状,包括粘膜炎、肠炎和直肠炎。

[0008] 口和食道上皮组织对化学治疗和辐射特别敏感。例如,在对头部和颈部癌症进行辐射治疗后,具有粘膜炎特征的口腔溃疡是导致相当大的疼痛、增加对感染的易感性和无法进食的主要临床问题。用辐射治疗腹部或骨盆癌症引起放射性肠炎,对肠道内层的损伤通常发生在小肠,较少地发生在大肠。在辐射治疗位于骨盆或腹部的癌症例如卵巢癌的情况下,放射性肠炎是最难治疗的腹部和骨盆辐射的并发症之一。认为,例如,辐射治疗或暴露引起上皮细胞的消耗,每次连续剂量的骨盆辐射和 / 或化学治疗导致临床观察到的急性胃肠症状。由于当前结合高剂量化学治疗和高剂量辐射的趋势,放射性肠炎的发病率在增加。通过相同的过程,对前列腺癌的局部辐射治疗导致下直肠炎。使用某些化学治疗药剂可以产生几乎相同的肠和上皮损伤过程,所述化学治疗药剂例如 5- 氟尿嘧啶,顺铂,甲氨蝶呤,链霉素,羟基脲,阿拉伯糖胞嘧啶和伊立替康 (irinotecan)。辐射治疗、化学治疗或偶然暴露于电离辐射后造成的胃肠道损伤导致肠炎、粘膜炎或直肠炎,对患者存活或死亡以及生活质量有重要作用。

[0009] 粘膜炎、直肠炎或肠炎以多种机制发生,并且代表所导致的溃疡和症状的多因素病因,包括由抗癌药物或辐射对上皮造成的直接损伤。间接地,在长期辐射暴露或暴露于化学治疗药剂期间,增加的上皮损伤是炎症反应的结果,炎症反应是由浸润淋巴细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞、以及伴随的促炎细胞因子和其他细胞效应物分子的分泌引起的。辐射暴露后立即伴随着持续升高水平的促炎细胞因子例如 TGF- $\beta$  和趋化因子例如 RANTES、MCP-1 和 IL-10。趋化因子是趋化性肽,其特异地在细胞损伤后募集炎症细胞。特异性趋化因子的长期升高可以解释在损伤的纤维化期单核细胞的持续。长期来说,损伤可以导致纤维化和多种器官衰竭。在辐射或化学治疗暴露后的短期内,细胞损伤是明显的。在胃肠道

中,细胞变化的典型情况是程序性细胞死亡(细胞凋亡)的过程。这些细胞变化作为辐射和/或化学治疗诱导的细胞凋亡的结果,包括绒毛顶端变短;上皮总表面积的减少;多糖-蛋白质复合物(细胞被膜)的减少或消失以及多潜能细胞的损失。肠绒毛的细胞凋亡和其来自干细胞区室的补充减少导致肠上皮破裂。

[0010] 由于造血细胞和上皮细胞对辐射伤高度敏感,它们在辐射暴露或使用化学疗法后的减少由于多种原因通常导致致命性感染。对肠道的直接损伤导致上皮屏障破裂,允许病原体进入。电离辐射对肠粘膜的急性影响通常归因于抑制隐窝中的上皮细胞有丝分裂。与造血系统类似,肠上皮屏障的更新依赖于活跃的干细胞区室,并且肠干细胞对电离辐射暴露极为敏感。随着辐射剂量增加,肠干细胞不能产生足够的细胞以再生(repopulate)绒毛,这导致绒毛高度平端和减小和最终的功能丧失。这导致营养物质吸收减少和屏障功能降低,使得细菌易位穿过肠屏障。

[0011] 对上皮细胞的直接损伤也导致肠血流灌注不足,即流体和电解质损失。持续的肠血流灌注不足是全身性炎症反应综合症和多器官衰竭(MOF)发生的重要诱因。在辐射后早期观察到肠血管渗透性增加和毛细血管渗漏,伴随多种辐射后病变,包括小动脉血管中度至显著的扩张、变短和扭曲,血管数量和/或长度的减少,以及后来发生的出血方式。内皮细胞层也受到影响。内皮细胞凋亡在肠粘膜损失和存活中也起到关键作用。

[0012] 辐射也影响免疫系统的循环细胞。血液中涉及天然和获得性免疫反应的细胞的破坏导致嗜中性粒细胞减少症,即此类患者处于免疫系统缺乏抵抗力的状态。因此,任何引起显著的嗜中性粒细胞减少症的药物或治疗可能导致肠炎或粘膜炎。

[0013] 急性辐射和/或化学治疗引起的肠炎损伤的症状包括肠损伤,该肠损伤导致瘘管、狭窄、溃疡、穿孔和慢性吸收不良。也可能出现恶心、呕吐和厌食症的症状,这些症状造成总体营养浪费,导致严重腹泻和疼痛。这些症状是潜在致命的并发症,对患者的生活质量有影响。可能会引发恶病质和死亡。

[0014] 由骨盆辐射和/或化学治疗引起的小肠功能病变包括脂肪、碳水化合物、蛋白质和胆汁盐的吸收不良,临床表现为腹泻。受骨盆辐射影响最大的小肠片段是回肠,这是由于它位于骨盆中、直接处于辐射束的范围内。放射性肠炎的特征为弥散的胶原蛋白分布和渐进性闭合性血管炎。血管炎和纤维化随时间发展,导致肠道腔变窄,伴随靠近该狭窄的肠膨胀。长期的辐射暴露导致组织纤维化,这取决于辐射伤的位置。纤维化过程是渐进的,导致临床症状的恶化。受影响(患病)的肠和浆膜片段变厚。在肠损伤的情况下,受影响的区域通常被手术切除。尽管如此,虽然手术移除了受影响区域,但是纤维化过程可能会随时间继续。肠壁会发生溃疡、坏死和偶然的穿孔。乙状结肠由于其位于骨盆,也受到骨盆辐射治疗的影响。慢性骨盆辐射伤的发作可能延迟几个月到几年。晚期肠损伤的医学控制很困难,这些辐射治疗的晚期并发症可能对宿主的营养状况有不利的影响。胃肠道中由化学治疗引发的慢性损伤也存在同样情况。

[0015] 快速增殖的组织,例如小肠隐窝细胞,对辐射和同时的化学治疗给药非常敏感。辐射不抑制上皮细胞从隐窝中迁移到绒毛,即再生过程本身。相反,这些细胞进行凋亡并从肠绒毛上脱落。肠上皮隐窝细胞暴露于辐射之后,有丝分裂停滞导致不成熟分泌隐窝细胞与成熟绒毛肠上皮细胞的比值增加。吸收细胞和分泌细胞数量平衡的改变以及与碳水化合物、脂肪、蛋白质和胆汁盐末端消化有关的刷状缘酶的破坏,导致流体和电解质不正常的吸

收和分泌。在正常生理条件下,小肠和结肠上皮都进行低速率的自发性细胞凋亡。当动物暴露于低剂量辐射(1-5 厘戈瑞(cGy))时,肠隐窝的细胞凋亡速率迅速增加。细胞凋亡通常主要在隐窝的干细胞中观察到。细胞凋亡速率是剂量依赖的,在 1 戈瑞(Gy)时达到稳定值。在细胞凋亡速率增加的同时,干细胞区中抑癌基因 p53 的表达也增加。由辐射诱导的细胞凋亡依赖于 p53 的存在。小肠干细胞与结肠和直肠中的干细胞相比,对辐射更敏感,这是由于后者中存在 bcl-2。

[0016] 已尝试用多种治疗分子治疗上皮损伤和相关的粘膜炎、肠炎和直肠炎,但没有一种治疗分子显示单独或与其他化合物共同治疗由辐射伤造成的症状是完全有效的。在辐射或化学治疗引发的肠炎的情况下,最常见的治疗方法是使用非特异性药剂。目前常见实践中使用数种药剂,包括止痛剂、苯乙哌啶和阿托品、以及洛哌丁胺。使用这些药剂的目的是减轻腹泻症状,而不是针对上皮损伤和炎症的潜在原因。尽管对改善症状部分地有效,但不认为使用这些药剂能控制更严重的症状,而仅仅是缓和性的。其他临床研究使用的药剂包括例如非类固醇抗炎剂、碱式水杨酸铋、消胆胺。在动物实验和临床中也采用了其他治疗和预防措施。例如,生长抑素类似物奥曲肽被证明在减轻放射性肠炎的腹泻症状中具有一些益处,因为它对氯化物分泌有直接影响,但可能对防止直接由辐射和间接由炎症造成的上皮细胞损伤具有极小的作用。例如,认为奥曲肽减轻小肠辐射后的急性粘膜病变,因为它抑制胃肠激素,而胃肠激素影响运动性、血液流动和上皮细胞增殖。胃激素促胃液素的上调与较高级别的辐射防护有关。其他用于治疗辐射伤的后果的治疗措施的例子包括抗氧化剂,例如维生素 E,单独或与己酮可可碱(pentoxifylline)结合,用高压氧治疗,改变饮食,包括使用益生菌与肠病原体竞争,环氧合酶-2(Cox-2)抑制剂例如罗非昔布(Rofecoxib)(Celebrex®),LPA2 受体抑制剂,阿米斯丁(羟乙基),以及药物制剂例如微粒化的硫糖铝。

[0017] 正在成为治疗辐射伤的目前常规手段和方法特别地包含支持疗法的理念,以通过用 GM-CSF 治疗患者,支持嗜中性粒细胞的补充,从而抵消嗜中性粒细胞减少症的影响,或者用抗生素抵消细菌性病原的影响。此外,支持疗法是用自身的或异源的骨髓重新构成血液区室的多种方法的应用。如本文所述的支持疗法不直接治疗炎症,也不意欲治疗原发性损伤造成的上皮损伤。

[0018] 日益明显的是,需要特定的治疗介入以应对损伤原因的多因素性质;这包括减轻对上皮本身的损伤的措施,这通过使用意图用于增长上皮细胞再生过程的调节分子,用于减少单核细胞、嗜中性粒细胞浸润以及因此的促炎症细胞因子和趋化因子的分泌,或减轻微生物破裂上皮屏障的促炎作用的抗炎药剂。对用于治疗辐射暴露的后果的改进疗法仍有需求,该辐射暴露是受控制的测量的辐射治疗或辐射形式,或许是由于偶然暴露于辐射源,或由于脏弹或核事故造成的暴露造成的高剂量暴露。

[0019] 可以考虑其他治疗介入以治疗或预防由于过量辐射或化学治疗造成的上皮损伤。例如,角质化细胞生长因子(KGF)被证明是针对化学放射治疗毒性的细胞保护剂。KGF 与被称为 KGF 受体(KGFR)的一种纤维原细胞生长因子受体 2(FGF-2)的剪接变体结合。上皮组织是唯一的已知表达 KGFR 的组织类型。在口腔粘膜中,当 KGF 与 KGFR 结合时,它通过酪氨酸激酶介导的信号通路发挥功能,以增强细胞增殖。在鼠科模型中,KGF 也能改善同种异体骨髓移植(BMT)后的 GVHD 和原发性肺炎。KGF 减少了受损的上皮组织中免疫介导的损伤。KGF 对上皮细胞有增殖效果,保护上皮细胞免受由化学治疗、辐射和氧化应激引起的损伤。

KGF 保护胸腺上皮细胞免受辐射伤。在 TBI 和同种异体 BMT 之前, BMT 受体小鼠被给予 KGF 或安慰剂。KGF 预处理增加了胸腺产生源自供体的胸腺细胞的能力, 增加了外周血中幼稚 T 细胞的数量, 增强了对新抗原的免疫应答。KGF 处理增加了胸腺内 IL-7 的产生。KGF 预防了 BMT 受体中胸腺损伤和延长的免疫缺乏。KGF 也增强了恒河猴在自体 HCT 后的免疫重构。

[0020] KGF 用于预防高剂量辐射后口腔粘膜炎的临床试验证明, 与安慰剂相比, 在 12Gy 分次 TBI 调节治疗前 3 天和自体外周血干细胞 (PBSC) 注入后 3 天得到 60  $\mu$ g/kg/ 天的 rhKGF 的患者, 粘膜炎严重程度和粘膜炎持续时间都有明显减少, 为 3.4 天对 10.4 天,  $p < 0.001$ 。发热性嗜中性粒细胞减少症的发病率是 KGF 26%, 安慰剂 46%, 发热性嗜中性粒细胞减少症的平均天数是 KGF 2.6 天, 安慰剂 4.6 天。KGF 目前在整个美国被用于患者, 以预防化学辐射诱导的粘膜炎。KGF 安全, 对健康的志愿者没有明显的危险, 且具有可预测的药物动力学。然而, KGF 在辐射诱导的肠炎或损伤中的效果未被证明。

[0021] 锂, 一种简单的阳离子被用于治疗双相性精神障碍, 但也已知对早期发育中形态发生有影响。例如, 锂有效并特异地抑制胰高血糖素合成酶激酶 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 活性, GSK-3 $\beta$  通过 wnt/ $\beta$  连环蛋白信号通路激活肠干细胞增殖, 在肠干细胞增殖和发育中有决定性作用。通过抑制 GSK-3 $\beta$ , 锂允许上调 wnt/ $\beta$ -连环蛋白, wnt/ $\beta$ -连环蛋白促进肠隐窝干细胞增殖。锂被给药于灰柯利牧羊犬, 成功治疗了周期性嗜中性粒细胞减少症。锂也增强了该狗中粒细胞恢复并减少了环磷酸腺苷诱导的肠损伤。用锂治疗小鼠导致隐窝增大, 然而锂对辐射诱导的上皮损伤的效果未知。

[0022] 关于 Wnt 信号通路, 其他调节性肽和激素可以用于治疗辐射诱导的损伤。例如, R-spondin 1 介导损伤肠上皮的恢复, 最可能通过 Wnt 通路。R-Spondin (RSpo) 家族的分泌型配体, 与标准的 Wnt 家族成员类似, 活化  $\beta$  连环蛋白信号。R-spondin 蛋白家族包括四个人类旁系同源体 (R-spondin 1-4), 每个包含一个引导信号肽、两个富含半胱氨酸的类弗林蛋白酶域和一个血小板反应蛋白类型 1 域。Wnt 家族分泌性蛋白在肠上皮细胞的发育、分化和增殖中具有决定性作用。Wnt 信号传导通过调节胞质中  $\beta$  连环蛋白的水平诱导下游细胞反应。没有 Wnt 时, 胞质  $\beta$  连环蛋白被磷酸化并被蛋白酶体作为迅速降解的目标。Wnt 诱导 LRP6 的胞质尾部的 PPPSP 基序被 GSK3 和酪蛋白激酶 I 连续磷酸化, 随后募集支架蛋白 Axin。

[0023] 局部作用的抗炎药物, 其主要药理学活动局部发生在消化道上皮组织, 可以减少免疫活化和炎症反应的局部效果。这在克罗恩氏病的情况中用布地缩松 (Entocort<sup>®</sup>) 得到证明, 对诱导克罗恩氏病缓解部分有效, 以及在使用二丙酸氯地米松 (BDP) 的肠移植与宿主疾病中。连同布地缩松和类似的局部作用皮质类固醇药物 (TACs) 一起, BDP 是有效的局部作用皮质类固醇。例如, BDP 及其代谢物单 17-丙酸倍氯米松 (17-BMP) 的抗炎和免疫抑制效果被认为是其主要药理学活性代谢物。BDP 的抗炎活性源自其染色体组效果 (抑制转录因子, 导致促炎症细胞因子合成减少, 抑制粘着分子表达, 以及 T 细胞凋亡), 以及有效的非染色体组效果 (免疫抑制, T 细胞凋亡), 以及细胞内全局调节分子例如 NF- $\kappa$ B。

[0024] BDP 在人血浆中的主要降解途径被认为是由 BDP 到 17-BMP 和 21-BMP (这两种代谢物之间有相互转变), 然后到倍氯米松 (BOH)。BDP 的代谢物 17-BMP 比 BDP 本身效力高约 25 倍, 与糖皮质激素受体结合的亲和力比地塞米松高 13 倍。BDP 和 BOH 与糖皮质激素受体结合的结合亲和力分别是地塞米松的约一半和约四分之三, 21-BMP 对该受体没有表现出表观

(apparent) 亲和力。除了对糖皮质激素受体有更高的结合亲和力, 17-BMP 比其他代谢物具有更高的表观变化性 (apparent variability)。在口服给药  $^3\text{H}$ -BDP 后, 大鼠血浆中没有检测到未改变的 BDP。大鼠血浆中发现了初级代谢物 (17-BMP), 说明在肠、血浆或二者中进行了由源物质向代谢物的快速转换。静脉给药  $^3\text{H}$ -BDP 导致未改变 BDP 的短暂出现, 半衰期为 3-4 分钟, 而立即出现高浓度的 17-BMP 说明血浆内由源物质向代谢物的快速转换。BDP 水解生成 17-BMP 也可能在肠内快速进行, 17-BMP 以极低的速率进一步水解生成 BOH。BDP 和 17-BMP 在模拟肠液中的半衰期分别是 2.1 分钟和 12 小时。BDP 水解成 17-BMP 可以在肠液或粘膜上皮细胞内进行。极强的糖皮质激素受体结合亲和性、高组织浓度、在胃肠道粘膜中延长的存在时间以及 17-BMP 的肠肝循环的组合说明口服 BDP 提供了在胃肠道粘膜中显著的局部活性。此外, 在 BDP 给药后相对低的 17-BMP 绝对口腔生物利用率估计为 21-41%, 具有高清除率, 限制了全身暴露。局部 BDP 被用于减少胸部辐射后的皮肤脱屑, 吸入的 BDP 被用于减少胸部辐射后的肺炎。BDP 灌肠剂被成功地用于治疗末端溃疡性结肠炎。其他有效的被用作局部药剂的皮质类固醇成功地用于治疗急性辐射性皮肤炎。然而, 未知的是, 局部应用于消化道上皮组织的 BDP 或其他局部类固醇或抗炎症药物单独地或与在该多因素过程的其他位点起作用的药物和分子一起治疗或预防由辐射伤引起的炎症上皮损伤。

[0025] 尽管在辐射伤过程中支持疗法治疗方面取得了显著的进步, 但本领域仍然需要改进的方法, 由于通过控制下面组织损伤的多因素原因治疗辐射伤。本发明令人惊奇的发现是局部活性的皮质类固醇药物 (TACs) 例如 BDP 能单独减轻炎症级联和高剂量辐射伤的症状, 并可以用于治疗和预防辐射肠炎、粘膜炎和由于局部使用造成的上皮组织的辐射伤。此外, 本发明的令人惊奇的未预料到的发现是 TACs 能与生长因子和细胞因子协同作用, 以进一步减少由辐射或化学治疗诱导的消化道上皮组织损伤造成的症状的持续时间和强度, 并且如果在暴露前给药, 能避免溃疡发展和组织损伤, 起到保护作用。本发明的另一令人惊奇的发现是锂, 最可能通过活化 Wnt 信号通路, 可以治疗由辐射和化学治疗诱导的肠上皮损伤, BDP 和锂能可叠加地或协同地作用, 以减少症状的严重程度、发生和持续时间。

[0026] 根据本发明, 除了意在补充嗜中性粒细胞 (例如 GM-CSF) 和预防细菌 (抗生素) 的支持疗法, 辐射伤还可以用局部活性皮质类固醇在肠腔中治疗或预防, 作为单一疗法或者与生长因子例如 KGF 或 Rspodin-1 协同作用。局部 BDP 可以减少由辐射伤的胃肠道引起的炎症细胞因子爆发 (storm)。由辐射造成的肠损伤与上皮细胞损伤和肠血流灌注不足有关。这又刺激了全身性炎症反应。BDP 及其代谢物 17-BMP 在肠粘膜内能抑制扩大粘膜损伤的细胞和天然免疫机制。

#### [0027] 发明概述

[0028] 本发明提供了新的方法, 以预防或减少暴露于损伤剂量的辐射或化学治疗药剂的对象中由于上皮细胞毒性造成的细胞和组织损伤的严重程度, 其是通过向此类患者单独地或其他作用于辐射和化学治疗诱导的上皮和组织损伤通路的不同位点的治疗分子一起给予有效量的局部活性皮质类固醇。本发明的一个目标是克服或至少减轻与现有技术有关的一种或多种困难或不足。

[0029] 在第一个方面, 本发明提供了预防、减轻和 / 或治疗由于化学治疗和 / 或辐射造成的消化道内层损伤的方法, 所述方法包括向需要其的患者给予有效量的局部活性皮质类固醇, 以减轻上皮损伤的炎症成分。

[0030] 在第二个方面,本发明提供了用于预防、减轻和 / 或治疗由于化学治疗和 / 或辐射造成的消化道内层损伤的药物组合物,所述组合物包含有效量的局部活性皮质类固醇。

[0031] 在第三个方面,本发明提供了预防、减轻和 / 或治疗由于化学治疗和 / 或辐射造成的消化道内层损伤的方法,所述方法包括与第二个化合物组合向需要其的患者给予有效量的局部活性皮质类固醇,该第二个化合物用于治疗组织损伤的另一细胞方面,包括生长因子,调节分子,抗炎分子——例如包括角质化细胞生长因子 (KGF)、R-spondin-1 及其类似物和同源物,激素例如生长抑素、奥曲肽、促胃液素、葛瑞林 (Ghrelin, 一种生长激素释放肽), 环 - 氧化酶 -2 抑制剂,抗氧化剂,维生素 E, 硫糖铝,溶血磷脂酸类似物以及 LPA-2 受体的激动剂或拮抗剂,氨磷汀 (amifostine) 和其他辐射保护或辐射缓和药物。

[0032] 在第四方面,本发明提供了包含用 TAC 口服制剂单独或与生长因子和其他药物联合,局部治疗受影响的上皮组织的方法的制剂。本发明基于以下发现,某些 TAC,特别是二丙酸氯地米松 (BDP) 可以以口服形式给药于患者,剂量为局部或局部性 (即腔内或粘膜) 治疗上下胃肠道和口腔的有效量,以减轻由于辐射或化学治疗造成的组织损伤造成的炎症症状,而该药物没有显著地进入体循环以造成与全身类固醇例如强的松相关的常见副作用。

[0033] 本发明也基于以下发现,这种口服给药制剂中的 TAC 与生长因子和其他具有修复上皮损伤功能的治疗分子协同或叠加地作用,减轻由辐射引起或化学治疗引起的胃肠道或口腔损伤的症状。这些化合物和药物包括角质化细胞生长因子 (KGF), R-spondin-1 及其类似物和同源物,激素例如生长抑素,奥曲肽,促胃液素,葛瑞林 (Ghrelin), 环 - 氧化酶 -2 抑制剂,抗氧化剂,维生素 E, 硫糖铝,溶血磷脂酸类似物以及 LPA-2 受体的激动剂或拮抗剂,氨磷汀和其他辐射保护或辐射缓和药物。

[0034] 有效量的所选局部活性皮质类固醇药物可以作为口服药剂被引入口腔或胃肠道,只有一部分剂量被吸收入体循环,被吸收的部分提供有限的全身暴露并被快速清除。所述皮质类固醇药物有效的抗炎活性特异地集中于口腔或胃肠道的受影响区域。通常由全身性类固醇造成的副作用因而在控制组织炎症和溃疡的同时被最小化。从小肠和大肠流出的静脉血最终通过门静脉进入肝脏。只要所选类固醇药物的所用剂量不过量,肝脏就能在体循环中积累足够量药物之前使它获得的药物失活。

[0035] 因此根据本发明,提供了用于作为局部治疗胃肠道或口腔出现的、由辐射或化学治疗引起的损伤的患者而给药的口服组合物。在本发明的一种优选的实施方式中,所述 TAC 是口服制剂,在上胃肠道,特别是小肠内局部释放药物。所述口服组合物包括: TAC 类固醇作为活性成分,其有效量范围为约 0.1mg 至约 8mg 的高度局部活性类固醇药物,以及通过口服给药治疗对象的方法。

[0036] 发明详述

[0037] 定义:

[0038] “有效量”指局部活性皮质类固醇的这种量,其在单次或多次给药于患者后,有效地预防、减轻和 / 或治疗由于化学治疗和 / 或辐射造成的消化道内层损伤。

[0039] “防止、减轻和 / 或治疗”指与不给予皮质类固醇时会发生的损伤相比,随后的损伤减少或消除;当皮质类固醇在损伤发生后给药时,该损伤减少或消除。

[0040] “损伤”指任何正常结构或功能的改变。该损伤包括粘膜炎症 - 粘膜炎症和肠炎,以及粘膜隐窝面积和 / 或粘膜绒毛长度的部分损失,或细菌易位通过消化道增加。

[0041] 本文所用的术语“消化道”指任何动物中从口到肛门的消化通道,包括口、食道、胃和肠(包括小肠和大肠)。在一个优选的方面,本发明特别适用于小肠。

[0042] “内层(lining)”指这样的任意生物物质,其覆盖表面或内衬于腔等,且发挥保护、阻隔和/或其他功能。消化道内层包括口腔、食道和胃肠道的上皮。

[0043] “局部活性”指化合物穿过药物所处位置附近的组织具有其主要药物作用。在 TAC 的情况,在胃肠道上皮中有活性, TAC 药物被肠上皮组织吸收并主要作用于上皮细胞,而 TAC 通过有限的吸收,具有有限的全身暴露,通过肝脏和/或肠、肝肠再循环、蛋白结合或快速消除及其任意组合进行初次代谢。

[0044] “体循环”指远离类固醇药物代谢位点的循环部分,在其中该药物在循环中达到稳态水平。

[0045] “药学上可接受的载体或赋形剂”指与组合物的其他成分相容,并对患者无害的载体或赋形剂。

[0046] 术语“有效量”指引起组织、系统、动物或人的研究人员或临床医生寻求的生物或医学反应的药物或药剂的量。

[0047] 术语“治疗有效量”指与没有得到该量的相应对象相比,导致对疾病或症状的改进的治疗、治愈、预防或减轻,或疾病或症状发展速度减小的任意量,也包括有效地增强正常生理功能的量。

[0048] “支持疗法”指用于抵消嗜中性粒细胞减少症影响/通过用 GM-CSF 治疗患者以支持嗜中性粒细胞的补充,或用抗生素抵消细菌的致病作用的疗法。此外,支持疗法是使用自体或异体骨髓重新构成血液区室的方法。

[0049] 尽管优选地在本发明的实践中用 TAC 药物治疗患者通过口服给药以治疗/预防/减少由于化学治疗和/或辐射治疗或辐射伤引起的肠炎的严重程度,以及通过漱口药剂或锭剂以预防/减少由于化学治疗和/或辐射治疗引起的粘膜炎的严重程度,但本发明实践中的局部活性皮质类固醇也可以以例如片剂、胶囊(每个包括定时释放和持续释放制剂)、药丸、粉末、颗粒、酞剂、酞剂、悬液、糖浆和乳剂的含服和舌下剂型进行其他方式给药。

[0050] 类似地, TAC 药物也可以通过鼻、眼、耳、直肠、静脉内(推注和输注)、腹腔内、关节内、皮下或者肌肉内吸入或吹入的形式给药,药物学领域普通技术人员熟知所有使用的形式。

[0051] 使用本发明的化合物的剂量方案根据多个因素选择,包括患者的类型、种族、年龄、身高、性别和医学状况;要治疗的症状的严重程度;给药途径;患者的肾和肝功能;以及所采用的具体化合物或其盐。普通技术医师能容易确定需要用于对抗肠炎和/或粘膜炎症状的该药物的有效量并开处方。

[0052] 当用于获得所述效果时,本发明实践中的口服剂量范围为每天约 0.01 至约 100mg/kg 体重的 TAC,特别是每天约 0.1 至 10mg/kg 体重。口服剂量单位通常以 0.1 至约 250mg 给药,更优选地约 1 至约 16mg。70kg 人的日剂量为 1mg 至 16mg。

[0053] 在组合治疗时,如上所述, TAC 优选地以口服剂量的形式给药,而联合药物与 TAC 直接组合口服给药,或者作为静脉制剂与口服 TAC 同时给药。在一种优选的实施方式中,组合治疗由口服剂型的 TAC 和静脉有效剂量的 R-spondin-1 组成。R-spondin-1 的优选剂量为 5 至约 1000 微克/kg 体重,特别是约 10 至约 100 微克/kg 体重。

[0054] 在组合治疗的另一种优选实施方式中,组合治疗由口服剂型的 TAC 和静脉剂量的 KGF 组成。KGF 的优选剂量是 0.1 微克/kg 体重至约 1mg;在本发明的更优选的实施方式中,KGF 的剂量范围是 1 至约 60 微克/kg 体重。

[0055] 给药的剂量基于常规条件例如患者的身体条件、年龄、体重、既往病史、给药途径、病症的严重程度及类似的考虑因素。在一些情况下,相对低的剂量即足够,在一些情况下,相对高的剂量或增加的剂量次数可能是需要的。口服给药可以是每天一次或多于一次,取决于化学治疗和/或辐射治疗的疗程。有利地,本发明的化合物可以以每日单次剂量给药,或者每日总剂量可以分为每日两次、三次或四次的剂量给药。根据本发明使用的化合物可以制备为适当溶剂的约 0.1 至约 5mg/ml 的浓度范围,用于局部使用。优选的口服给药体积是递送到患者约 0.2 至约 100mg 的有效剂量。

[0056] 为预防化学治疗或辐射诱导的组织损伤,优选地在化学治疗或辐射治疗前给药 1 到 2 次,如果需要,在治疗前给予额外的应用。对暴露辐射后治疗,需要给药。此外,本发明优选的化合物可以以鼻内形式通过局部使用适当的鼻内载体、或通过透皮途径给药,使用本领域普通技术人员熟知的那些透皮皮肤贴剂形式。

[0057] 在本发明的方法中,本文详述的化合物可以形成活性成分,并通常与适当的药物稀释剂、赋形剂或载体(本文统称为“载体”材料)混合后给药,这些载体材料根据计划的给药形式,即口服片剂、胶囊、酏剂、糖浆等适当地选择,并符合常规的药学实践。

[0058] 例如,对于以片剂或胶囊形式口服给药,活性药物成分可以与口服、无毒性的药学上可接受的惰性载体混合,例如酒精、甘油、水等。粉末是通过将该化合物研磨成适当精细的大小并与类似地研磨的药学载体例如可食用碳水化合物诸如淀粉或甘露醇进行混合而制备。也可以有调味剂、防腐剂、分散剂和着色剂。

[0059] 胶囊是通过制备如上所述的粉末混合物,并装入成型的凝胶外壳中制成的。在装入操作前,可以加入助流剂和润滑剂例如硅胶、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙或固体聚乙二醇到粉末混合物中。也可以加入崩解剂或增溶剂例如琼脂、碳酸钙或碳酸钠,以增加胶囊被咽下后药物的可利用性。

[0060] 除了 TAC,还可以使用可接受的载体和/或稀释剂,本领域技术人员熟知这些载体和/或稀释剂。除了一种或多种 TAC、稀释剂、分散剂和表面活性剂,药丸、胶囊、微球体、颗粒或片剂形式的制剂可以包含粘合剂和润滑剂。本领域技术人员可以用适当方法和根据习惯做法进一步配制 TAC,例如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990(通过引用并入本文)中公布的。此外,在期望或需要时,也可以在混合物中加入适用的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂。适用的粘合剂包括淀粉,凝胶,天然糖类例如葡萄糖或  $\beta$ -乳糖,玉米甜味剂,天然和合成的胶如金合欢、黄蓍胶或藻酸钠,羧甲基纤维素,聚乙二醇,蜡等。在这些药剂形式中使用的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯酸钠、醋酸钠、氯化钠等。崩解剂包括但不限于淀粉、甲基纤维素、琼脂、斑脱土、黄原胶等。片剂是例如通过制备粉末混合物,粒化或块化,加入润滑剂和崩解剂和压制成片制备的。粉末混合物是通过将该化合物与如上所述的稀释剂或基质混合、适当研磨制备的,任选地加入粘合剂例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶或聚乙烯吡咯烷酮,溶液阻滞剂例如石蜡,再吸收促进剂例如季盐和/或吸收剂例如斑脱土、高岭土或磷酸二钙。该粉末混合物可以通过与粘合剂一起湿润并强制通过筛而粒化,所述粘合剂例如糖

浆 (symp)、浆糊、金合欢胶水或纤维素或聚合物材料的溶液。作为粒化的替代,粉末混合物可以通过压片机,得到成型不完美的破碎为颗粒的小块。该颗粒可以通过加入硬脂酸、硬脂酸盐、滑石或矿物油润滑,以防止粘附于压片模具。润滑后的混合物然后被压成片剂。本发明的化合物也可以与自由流动的惰性载体结合并直接压制成片剂,而不用进行粒化或块化步骤。可以提供透明或不透明的保护性包衣,该包衣由紫胶密封包衣、糖或聚合物材料包衣和蜡的抛光包衣组成。可以在这些包衣中加入染料以区分不同单位剂量。

[0061] 可以制备剂量单位形式的口服液体例如溶液糖浆和酏剂,使得给定的量含有预先确定量的该化合物。糖浆可以通过将该化合物溶于适当调味过的水溶液中制备,而酏剂可以通过使用无毒性醇载体制备。可以通过将化合物分散于无毒性载体中制备悬液。也可以加入增溶剂和乳化剂例如乙氧基化的异硬脂醇和聚氧乙烯山梨糖醇醚、防腐剂、调味添加剂例如薄荷油或天然增甜剂或糖精或其他人工甜味剂等。

[0062] 适当时,用于口服给药的剂量单位制剂可以装入微胶囊。该制剂也可以制备为例如通过将微粒材料包衣或嵌入聚合物、蜡等中以延长或保持释药。

[0063] 根据本发明使用的化合物也可以通过脂质体递送系统的形式例如小单层脂质体、大单层脂质体和多层脂质体给药。脂质体可以由多种磷脂形成,例如胆固醇、硬脂胺或卵磷脂。

[0064] 化合物也可以与作为赋形剂或药物载体的可溶聚合物共同给药。这些聚合物可以包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚羟乙基天冬酰胺、或棕榈酰残基取代的聚环氧乙烷聚赖氨酸。此外,化合物可以与一类用于实现药物控释的生物可降解聚合物混合,例如聚乳酸、聚  $\epsilon$ -己内酯、多羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯和水凝胶的交联或两性嵌段共聚物。

[0065] 肠胃外给药可以通过使用液体剂量单位形式例如用于皮下肌肉内或静脉内注射的无菌溶液和悬液实现。这些是通过将测定量的化合物溶解或悬浮于适于注射的无毒性液体载体例如水油性介质,并将该悬液或溶液灭菌制备的。

[0066] 可选地,将测定量的化合物置于小瓶中,小瓶及其内容物被灭菌并密封。可以提供伴随小瓶或载体,用于给药前的混合。可以加入无毒的盐和盐溶液以提供注射等渗压。也可以加入稳定剂、防腐剂和乳化剂。

[0067] 直肠给药可以通过使用栓剂实现,在该栓剂中,该化合物与低熔点、可溶或不可溶于水的固体如聚乙二醇、可可油、高碳酯混合,作为例如已调味的水溶液,而酏剂是用十四烷基棕榈酸盐或其混合物制备的。

[0068] 本发明的局部制剂可以呈现为例如软膏、乳膏或洗液、眼膏和眼或耳滴剂、浸透敷料和气雾剂,并且可以包含适当的常规添加剂例如防腐剂、用于帮助药物渗透的溶剂以及软膏和乳膏中的软化剂。该制剂也可以包含相容的常规载体,例如乳膏或软膏基质和用于洗液的乙醇或油醇。这些载体可以占制剂的约 1% 到约 98%。更常见地,它们占制剂的约 80%。

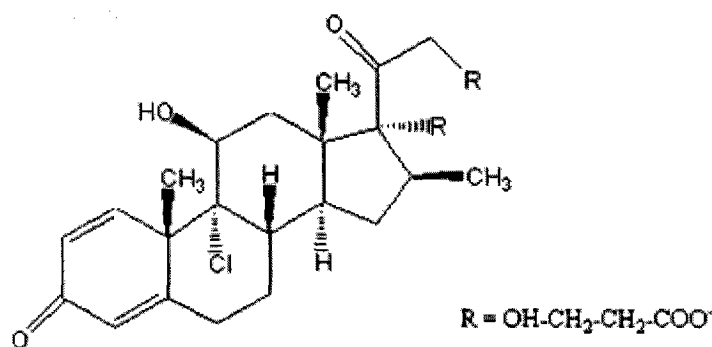
[0069] 对于吸入给药,根据本发明使用的化合物从加压包或喷雾器中以气雾剂喷雾的形式呈送的形式方便地递送,使用适当的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、四氟乙烷、七氟丙烷,二氧化碳或其他适用的气体。在加压气雾剂的情况,剂量单位可以通过提供阀确定以递送计量的量。用于吸入器或吹药器的例如凝胶的胶囊和盒可以配制

为含有本发明的化合物和适当的粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0070] 优选的用于本发明组合物的药物是二丙酸氯地米松和 17-戊酸倍他米松。然而,本发明不限于此,而是涉及用于有效治疗的任意局部活性的皮质类固醇药物。代表性的局部活性皮质类固醇包括但不限于 17,21-二丙酸氯地米松、二丙酸阿氯米松、布地缩松、22S 布地缩松、22R 布地缩松、一丙酸 17-氯地米松、丙酸氯倍他索、双醋二氟拉松、氟尼缩松、氟氢缩松、丙酸氟替卡松、丙酸卤倍他索、哈西奈德、糠酸莫米松和丙酮缩去炎松。可用于本发明实践的适当的 TAC 是具有以下特征的任一种:在肠和肝脏中快速第一次代谢、低全身生物利用率、高局部活性和快速排泄(参见,例如 Thiesen 等, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 10:487-496,1996)(通过引用合并于此)。

[0071] 最优选的药物是二丙酸氯地米松(BDP),这是由于其极高的局部抗炎活性。该药物因而可以以非常小的剂量有效地用在本发明的组合中,它不以任何显著的程度进入体循环。其他类固醇药物(例如 17-戊酸倍他米松)也是有用的。BDP 是这样的化合物,其可以从多个商业来源例如 Schering-Plough Corporation(Kenilworth, N. J.) 以块状晶体形式得到,具有如下结构(即 17,21-二丙酸氯地米松):

[0072]



[0073] 患者通过口服给药获得治疗可接受量的 TAC。适当的胶囊或药丸通常含有 0.1mg 至 8mg 的 TAC,通常约 1mg TAC,加上可选的填料,例如乳糖,并且可以用多种材料包衣,例如邻苯二甲酸醋酸纤维素。这一剂量可以由本领域技术人员通过众所周知的剂量-反应研究容易确定,通常为 0.1mg/天至 8mg/天,更通常地从 2mg/天到 4mg/天。

[0074] 在由应用辐射或化学治疗引起炎症的情形下,TAC 的治疗给药可以开始于较大剂量的 TAC 类固醇,然后在炎症被控制后,可以逐渐减小到维持剂量的 TAC。在严重的情况下,可以使用更有效的全身性类固醇以控制炎症,然后该患者可以迅速减小到 TAC 类固醇,或与上皮生长因子或细胞因子形式混合使用。

[0075] 本发明的一个重要方面是 TAC 是口服给药的,使得它被局部给药到肠或口腔组织。因此,如本文所述的术语口服给药,不意图包含全身给药,例如通过静脉注射。相反,该 TAC 具有很小(如果有)的全身利用率,但对肠和/或肝脏组织具有高局部活性。该高局部活性是通过本领域熟知的多种将 TAC 的分布限制在肠粘膜的方法中的任意一种实现的。例如,该 TAC 可以被配制以使以高局部浓度的 TAC 覆盖肠粘膜表面,或者配制以抑制药物通过肠粘膜进入体循环。这种限制的分布导致较少的副作用,这是本发明的显著优势。

[0076] 在治疗中,目标是抑制多种多样的已经导致组织损伤的生物事件,例如炎症细胞因子的产生,额外的炎症细胞募集到损伤部位,肠粘膜(内层)屏障功能的破坏,细菌和毒

素通过损坏的肠粘膜,对细菌和内毒素的生物反应的上调,以及对这些事件的广泛传布的器官反应。

[0077] 通过 TAC 的适当制剂,TAC 可以以高剂量递送到整个肠的整个粘膜表面。因此,TAC 可以在这种初始炎症免疫反应发生的肠粘膜或口腔粘膜中达到高浓度。

[0078] 应该理解,尽管本文为说明的目的描述了本发明的具体实施方式,但是可以在不背离本发明的精神和范围的条件下做出多种修改。

## 实施例

[0079] 实施例 1 狗辐射后使用抗生素治疗的支持疗法和对造血区室的治疗

[0080] 狗是研究辐射对上皮组织损伤的特别合适的动物模型。以高剂量率 (0.4 或 0.7Gy/min) 给予骨髓破坏性未分份全身辐射 (TBI) 的狗中观察到了由于胃肠 (GI) 辐射综合症造成的死亡。为评估对以 0.4Gy/min 或 0.7Gy/min 的高剂量率给予的 TBI 的反应,对治疗组给予单份 6、7、8 或 10Gy 的 TBI,并在 TBI 完成后给予早先冷冻保存的自体骨髓注入 (输注) 和标准支持疗法。在低于 8Gy 的 TBI 剂量时,所有狗存活。在 8Gy 的 TBI 后,9 只狗中有 5 只死亡,10Gy 的 TBI 后,9 只狗全部死于胃肠辐射综合症。所有死亡发生在 10Gy 的 TBI 后 4 至 6 天。所有死亡归因于胃肠辐射毒性和严重的肠溶血和肠隐窝损伤,以及肠上皮剥离和肠局灶性坏死。尽管进行了抗生素治疗,在 4 只狗死亡时间附近获得的血液培养物对革兰氏阴性生物为阳性,与病原体进入胃肠道一致。在 8Gy TBI 后存活的 4 只狗中,所有狗的血细胞计数减少,但造血功能恢复 (这是由于它们被注入了自体骨髓),嗜中性粒细胞计数在 TBI 后 9-10 天恢复,血小板计数在 TBI 后 16-20 天恢复。0.4 和 0.7Gy/min 组的结果没有区别。当 TBI 剂量率减少至 0.05Gy/min 或 0.02Gy/min 时,狗耐受至 14 和 16Gy 的单份 TBI 剂量而没有任何胃肠毒性。分次 TBI 也避免了胃肠辐射综合症和死亡。

[0081] 为确定对辐射恐怖袭击或辐射治疗受害者的有效治疗,在急性辐射后造血综合症背景下考虑胃肠综合症很重要。以高剂量率给予 10Gy 的 TBI 然后给予自体骨髓支持的狗模型允许该实验系统检测辐射伤的胃肠综合症成分。自体骨髓注入导致嗜中性粒细胞和血小板计数更快恢复。通过用自体骨髓注入最小化造血综合症的影响,可以研究能直接治疗胃肠辐射综合症的药物。高剂量的 TBI 给药以产生胃肠辐射综合症比起胃肠道的局灶性辐射是模拟对辐射恐怖袭击的全身生物反应的更现实的方案。

[0082] 支持疗法对辐射后的生存至关重要,在 7Gy TBI 甚至 8Gy TBI 后,组合给予的细胞因子粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和 flt-3 配体 (FL) 导致明显改善的和快速的造血功能的恢复。与二十世纪 80 年代和 90 年代早期的 TBI 存活研究的历史结果相比,辐射后给予支持疗法的重要性显而易见。历史结果表明,在 4Gy TBI (0.07Gy/min, 单份) 和支持疗法后,28 只狗中只有 1 只存活,恢复了造血功能。

[0083] 支持疗法由以下组成:(a) 给予静脉内抗生素、氨苄霉素和丁胺卡那霉素和口服的不可重吸收的多粘菌素 (polymixin) / 新霉素,用药法不变,直到恢复绝对嗜中性粒细胞计数 (ANC) > 1000 个 /  $\mu$ L;(b) 如果血小板计数低于 10000 个 /  $\mu$ L,用辐射的全血 (每次输血 50mL 血液) 输血;和 (c) 在 TBI 后前 5 天给予每天 20ml/kg 的皮下液体。

[0084] 在 TBI 暴露后,用口服氟喹诺酮、恩氟沙星治疗所有狗。每天测量两次体中心温度 (中心体温, core body temperature)。如果发烧或 ANC 低于 100 个 /  $\mu$ L,根据经验,用静

脉内第三代头孢霉素（头孢他啶）和氨基糖苷类丁胺卡那霉素的组合进行治疗。当狗发烧时采集血液培养物并根据血液培养结果调整抗生素治疗。如果血液培养物阴性嗜中性粒细胞减少性发烧持续超过 48 小时，或临床病况客观地恶化，加入额外的经验性的甲硝唑和万古霉素抗生素治疗。尽管与过去的治疗相比，新的抗生素疗法更加复杂，但它反映了对革兰氏阴性、革兰氏阳性和厌氧病原体的改善的广谱覆盖。此外，输血支持现在更强，全血输血量更大，根据体重，达到 10–15ml 血液 /kg/ 输血。静脉液体支持（10–30ml/kg/ 天乳酸钠林格（Lactated Ringers）溶液）的使用再延长至少 14 天，直到口进食完全恢复。

[0085] 新的支持疗法措施显示了 TBI 后存活率的显著提高。在 4Gy TBI (0.07Gy/min, Varian Clinac 4/80 线性加速器来源) 后, 4 只狗全部存活, 恢复了造血功能, ANC 和血小板恢复的中数时间 (median time) 分别是 27 天和 41 天。ANC 恢复定义为持续的嗜中性粒细胞计数  $> 500$  个 /  $\mu\text{L}$  的第一天, 血小板恢复定义为独立于输血的持续恢复到  $> 40000$  个 /  $\mu\text{L}$  的第一天。在 5Gy TBI 后, 6 只狗中有 3 只在仅支持疗法下存活。死亡分别发生在 TBI 后第 14、15 和 21 天, 死于嗜中性粒细胞减少性败血症或肺炎, 而不是胃肠辐射综合症。在存活的狗中, ANC 和血小板恢复的中数时间分别是 29 天和 44 天。在 6Gy TBI 后, 6 只狗中有 5 只在仅支持疗法下存活。一只死亡发生在第 22 天, 死于嗜中性粒细胞减少性败血症。ANC 和血小板恢复的中数时间分别是 34 天和 74 天。在 7Gy TBI 后, 仅支持疗法下, 6 只狗中有 5 只存活, 一只在第 22 天死于嗜中性粒细胞减少性败血症。ANC 恢复的中数时间是 43 天, 有两只狗分别在第 53 和 62 天实现了血小板恢复。到 2007 年 4 月 18 日, 本组中其余的三只狗在 TBI 后 66 至 95 天, 继续依赖于输血。这些初步结果表明在嗜中性粒细胞减少症中密集的支持疗法和多种经验性广谱抗生素、持续的输血支持、以及积极的早期静脉液体支持对 TBI 后的存活至关重要。由于在当前的 AI-066498 研究中狗在 TBI 后给予最佳支持疗法的存活率的提高, 我们未能达到 TBI 的 99% 致死剂量阈值。

[0086] 尽管没有细胞因子支持的支持疗法导致了存活率提高, 但在 TBI 后以恢复造血系统为目标的细胞因子治疗也改善了结果, 并减少了对长期、密集（并昂贵）的支持疗法的需求。我们的研究组进行的狗模型的历史结果包括了这样的研究, 其证明在致死剂量的 4Gy TBI 后给予重组犬 (rc) 和重组人 (rh)G-CSF 都能预防由于辐射诱导的细胞减少导致的死亡。在二十世纪 80 年代和 90 年代, 在仅 4Gy TBI 后和支持疗法后, 28 只狗中只有 1 只存活并恢复了造血功能。与之相比, 在 4Gy TBI 后 21 天内每天给予 G-CSF 时, 10 只狗中有 8 只存活。在 5GyTBI 后, G-CSF 治疗导致 10 只狗中 3 只存活。这些研究帮助建立了目前的治疗辐射事故中受害者的临床指南。

[0087] 与只进行支持疗法相比, 在 TBI 后给予的 G-CSF 和 FL 显示了改善的和更迅速的 ANC 和血小板计数恢复。在 5Gy TBI 和辐射完成 2 小时后开始的每日 G-CSF (10  $\mu\text{g/kg/天}$ ) 治疗后, 6 只狗全部存活。ANC 和血小板恢复的中数时间分别是 20 天和 44 天, 说明与只进行支持疗法相比, G-CSF 促进了嗜中性粒细胞的更快速的恢复。在 6Gy TBI 和 G-CSF 治疗后, 6 只狗中有 5 只存活, ANC 和血小板恢复的中数时间分别是 26 天和 61 天。一只狗在第 77 天由于不能恢复 ANC  $> 500$  个 /  $\mu\text{L}$ , 被安乐死。在 6Gy TBI 以及从 TBI 后两小时开始直到 ANC 恢复到  $> 1000$  个 /  $\mu\text{L}$  的 G-CSF (10  $\mu\text{g/kg/天}$ ) 和 FL (100  $\mu\text{g/kg/天}$ ) 联合治疗后, 5 只狗全部存活。ANC 和血小板恢复的中数时间分别是 20 天和 47 天。与只进行支持疗法相比, 用 G-CSF 和 FL 的治疗显示了明显改善的嗜中性粒细胞和血小板恢复。在 7Gy TBI 和

G-CSF 加 FL 后,6 只狗全部存活,ANC 和血小板恢复的中数时间分别是 20 天和 56 天。与在高剂量的 7Gy TBI 后只进行支持疗法相比,用 G-CSF 和 FL 的治疗显示了更显著的嗜中性粒细胞和血小板恢复。在中断 G-CSF 和 FL 后,外周血计数维持稳定并继续回到正常水平。对狗持续跟踪到 TBI 后 6 个月并评估免疫功能恢复。到目前为止,在 TBI 后 6 个月,狗恢复了正常的基于 T 和 B 细胞的在体外和体内对新抗原应答的免疫功能。

[0088] 实施例 2 用 KGF 治疗辐射伤

[0089] 犬 KGF 基因被克隆和测序。RhKGF 与犬 KGF 有 97.4% 的氨基酸序列同源性。鼠科 KGF 蛋白与 rhKGF 有 94% 同源性。此外,KGF 受体 (KGFR2IIIb) 在三个物种中有 98% 的同源性。RhKGF 被用于上述的全部体内鼠科研究。RhKGF 在狗中有相当的生物活性。RhKGF 在狗中有肠上皮细胞保护活性。KGF 治疗减少了由于辐射造成的肠、胸腺和骨髓基质上皮损伤,从而改善 TBI 诱导的胃肠毒性和全血细胞减少症后的存活率,并具有更快的肠上皮恢复和免疫重建。

[0090] 分别向三只未被辐射的狗给药 rhKGF 100  $\mu$ g/kg/ 天持续 7、14 和 21 天。在最后的 KGF 给药后 24 小时,将狗安乐死并进行完全尸检。在接受 14 和 21 天 rhKGF 的狗中,回肠中派伊尔淋巴集结的大小和细胞构成有显著的增加,以及空肠中绒毛的大小有显著的增加。

[0091] 为评估 KGF 对抗高剂量全身辐射 (TBI) 的保护能力,从 TBI 后两小时开始以 100  $\mu$ g/kg/ 天的剂量静脉内给药 KGF, TBI 剂量为导致 > 80% 的死亡率,并每天持续给药,直到胃肠道功能完全临床恢复。在 TBI 开始后,监测狗生存直到 30 天 (该实验的主要指标)。此剂量的 KGF 提供了在 TBI 剂量后  $\geq 70\%$  的存活。每三只狗为一组评估,以鉴定显著改善 TBI 后的存活的药物治疗,然后继续以每种治疗组 12 只狗的更大组进一步评估与同时的对照组 30 天时存活率相比的统计显著性。第二终点包括胃肠道恢复的组织学和生理学证据的时间。一部分狗进行了内视镜检查以通过组织学和分子评估 wnt/b 连环蛋白以及 Notch 信号传导,评估药物治疗效果。接着每天也用 CBC 治疗狗,直到恢复并评估免疫功能恢复。在评估 KGF 和 BDP 的组合同时给予支持疗法措施和自体骨髓注入。

[0092] 实施例 3 用 BDP 治疗辐射伤

[0093] 与实施例 2 类似,以 4mg/ 天的剂量,从 TBI 后两小时开始给药 BDP,直到胃肠恢复,并监测相同的实验终点。BDP 提供了大于 70% 的存活。

[0094] 实施例 4 用 KGF 和 BDP 共同治疗辐射伤

[0095] 在评估 KGF 和 BDP 的组合同时给予支持疗法措施和自体骨髓注入。从 TBI 后两小时开始,以 4mg/ 天的剂量给予口服 BDP (orBee),同时以 100  $\mu$ g/kg/ 天的剂量静脉内给予 KGF, TBI 剂量为从 TBI 后 2 小时直到胃肠恢复导致 > 80% 死亡率。监测狗的肾上腺抑制。

[0096] 实施例 5 用碳酸锂治疗辐射伤

[0097] 以 300mg/ 天的剂量给药碳酸锂直到达到 0.7-1.4mEq/L[34] 的稳态血清治疗水平,并每周监测该水平。在锂达到稳态后开始 TBI,如实施例 1 所述监测狗的存活和其他终点。

[0098] 实施例 6 用碳酸锂和 BDP 共同治疗辐射伤

[0099] 以 300mg/ 天的剂量给药碳酸锂直到达到 0.7-1.4mEq/L[34] 的稳态血清治疗水平,并每周监测该水平。同时以 4mg/ 天的剂量给予 BDP。在锂达到稳态后开始 TBI,如实施例 1 所述监测狗的存活和其他终点。