



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104768543 A

(43) 申请公布日 2015.07.08

(21) 申请号 201280074486.2

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2012.11.14

A61P 35/04(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 17/12(2006.01)

13/466,827 2012.05.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/064993 2012. 11. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/169291 EN 2013. 11. 14

(71) 申请人 可劳迈戴斯有限公司

地址 美国加利福尼亚

申请人 加利福尼亚大学董事会

(72)发明人 J·巴托斯 瑞安·德林杰

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 浦彩华 武晨燕

(51) Int. Cl.

A61K 31/09(2006.01)

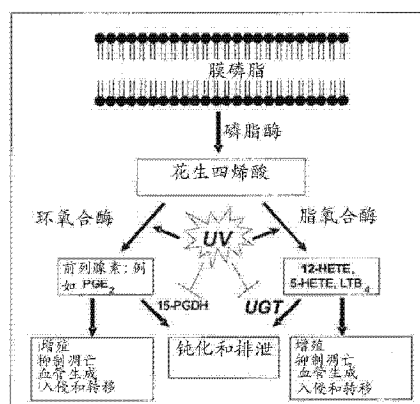
权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

用于使用蝶芪诱导 UDP-葡萄糖醛酸转移酶活性的方法

(57) 摘要

提供了一种方法,用于针对细胞增生性紊乱对个体进行治疗,该方法包括给予需要此类治疗的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪,其中UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UGT)活性被增加。在一个实施例中,可以通过给予蝶芪降低12-HETE水平。



1. 一种针对细胞增生性紊乱对个体进行治疗的方法,该方法包括给予需要此类治疗的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪,其中 UDP- 葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性被增加。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中通过诱导 UGT 表达来增加该 UGT 活性。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其中该个体是人类。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中以包含药学上或营养学上可接受的载体的组合物的形式提供该蝶芪化合物。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中针对一个总剂量,蝶芪的治疗有效量是基于该组合物的总重量在按重量计约 0.1%至按重量计约 10%的一个范围中。
6. 如权利要求 4 所述的方法,其中针对一个总剂量,蝶芪的治疗有效量是基于该组合物的总重量在按重量计约 0.1%至按重量计约 0.5%的一个范围中。
7. 如权利要求 4 所述的方法,其中针对一个总日剂量,蝶芪的治疗有效量是在约 5mg 至约 1000mg 的一个范围中。
8. 如权利要求 4 所述的方法,其中针对一个总日剂量,蝶芪的治疗有效量是在约 50mg 至约 250mg 的一个范围中。
9. 如权利要求 7 所述的方法,其中该化合物的给予途径选自下组,该组由以下各项组成:口服、局部、真皮内、经皮、以及皮下。
10. 如权利要求 7 所述的方法,其中该细胞增生性紊乱是皮肤癌。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中该皮肤癌选自下组,该组由以下各项组成:基底细胞癌、鳞状细胞癌、恶性黑色素瘤、卡波氏肉瘤、梅克尔细胞癌、和皮肤淋巴瘤。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其中该恶性黑色素瘤是转移性的。
13. 如权利要求 7 所述的方法,其中该细胞增生性紊乱选自下组,该组由以下各项组成:光化角化病和发育不良痣。
14. 如权利要求 1 所述的方法,进一步地,其中 12-HETE 水平被降低。
15. 一种防止或抑制个体中 UV- 诱导的 UDP- 葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性损失的方法,该方法包括给予需要此类治疗的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪,其中 UDP- 葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性被增加。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其中通过诱导 UGT 表达来增加该 UGT 活性。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其中该个体患有一种细胞增生性紊乱。
18. 如权利要求 17 所述的方法,其中该个体是人类。
19. 如权利要求 18 所述的方法,其中以包含药学上或营养学上可接受的载体的组合物的形式提供该蝶芪化合物。
20. 如权利要求 19 所述的方法,其中针对一个总剂量,蝶芪的治疗有效量是基于该组合物的总重量在按重量计约 0.1%至按重量计约 10%的一个范围中。
21. 如权利要求 19 所述的方法,其中针对一个总剂量,蝶芪的治疗有效量是基于该组合物的总重量在按重量计约 0.1%至按重量计约 0.5%的一个范围中。
22. 如权利要求 19 所述的方法,其中针对一个总日剂量,蝶芪的治疗有效量是在约 5mg 至约 1000mg 的一个范围中。
23. 如权利要求 19 所述的方法,其中针对一个总日剂量,蝶芪的治疗有效量是在约 50mg 至约 250mg 的一个范围中。

24. 如权利要求 22 所述的方法, 其中该化合物的给予途径选自下组, 该组由以下各项组成: 口服、局部、真皮内、经皮、以及皮下。

25. 如权利要求 22 所述的方法, 其中该细胞增生性紊乱是皮肤癌。

26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中该皮肤癌选自下组, 该组由以下各项组成: 基底细胞癌、鳞状细胞癌、恶性黑色素瘤、卡波氏肉瘤、梅克尔细胞癌、和皮肤淋巴瘤。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其中该恶性黑色素瘤是转移性的。

28. 如权利要求 22 所述的方法, 其中该细胞增生性紊乱选自下组, 该组由以下各项组成: 光化角化病和发育不良痣。

29. 如权利要求 22 所述的方法, 其中该细胞增生性紊乱是选自下组的一种癌症, 该组由以下各项组成: 乳癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠直肠癌、肺癌、肾癌、肝癌、脑癌、胃癌、支气管癌、胰腺癌、膀胱癌、以及骨癌。

30. 如权利要求 15 所述的方法, 进一步地, 其中 12-HETE 水平被降低。

用于使用蝶芪诱导 UDP- 葡萄糖醛酸转移酶活性的方法

技术领域

[0001] 结合用于细胞增生性紊乱的治疗的方法,描述了用于使用有效量的蝶芪增加或诱导 UDP- 葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性的过程。描述了包含蝶芪的药物的和营养的配制品,适合对一个个体给予这些配制品,以便诱导 UDP- 葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性。

背景技术

[0002] 在 II 相代谢期间,通过内源分子的共价附接,致使内源的或外源的底物更亲水。II 相代谢还称为共轭代谢,因为可以形成共轭部分,例如磺酸盐、葡萄糖醛酸盐、谷胱甘肽、甘氨酸盐、乙酸盐、和甲基化物。通常,身体使用 II 相代谢来增加底物分子的亲水性,这协助运输和消除共轭产物。

[0003] 由 UDP- 葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 家族的酶催化 II 相葡萄糖醛酸化反应。葡萄糖醛酸化反应的组成为:将葡萄糖醛酸基团从尿苷 5'-二磷酸-葡萄糖醛酸 (UDP-GA) 转移至包含氧、氮、硫或羧基官能团的底物分子。UGT 酶代表针对致癌物的致突变性以及异生物质与内源代谢中间物这二者的毒性的高反应性防御系统。而且,在代谢活跃组织中,某些转录因子,例如过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 在调节 UGT 基因表达和活性中扮演了活跃角色。参见 Runge (朗格)-Morris (莫里斯) 等人,PPAR Res. (PPAR 研究) (2009),文章编号 728941,14 页,“Regulation of Sulfotransferase and UDP-Glucuronosyltransferase Gene Expression by the PPARs (由 PPAR 调节磺基转移酶和 UDP-葡萄糖醛酸转移酶基因表达)” (Hindawi Publ. Co. (Hindawi 出版公司),纽约)。

[0004] 在生物活性的内源激素和代谢中间物的调节中,葡萄糖醛酸化发挥生理学作用。一种重要的内源 UGT 底物是胆红素,它的代谢是由 UGT1A1 严密控制的,因此形成了消去产物胆红素双葡萄糖醛酸酯。另一种亚型,UGT2B4,已知为人肝脏中的主要胆汁酸共轭 UGT 酶,催化脱氧猪胆酸的葡萄糖醛酸化。另外,已经观察到,不同亚型的 UGT 是可诱导的,并且它们的活性的调节会是药物解毒和消除的重要决定因素。例如,PPAR 在 UGT 的调节中起到重要作用 (Barbier (巴比尔) 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) (2003) 278:32852-32860)。

[0005] PPAR 核受体网络代表细胞能量平衡的中心决定因素。在与类视黄醇 X 受体 (RXR) 的异二聚体合作关系中,PPAR 形成了能够整合细胞脂质代谢作用、能量稳态、和炎症中涉及的宽泛范围的靶基因 (包括 UGT) 的表达的配体激活的核受体转录因子。PPAR- α 亚型表达在肝脏、肾脏、和心脏中是最突出的,在这些器官中,它参与调节脂肪酸氧化。PPAR- α 还可以介导生物转化酶的诱导。使用钥匙-锁类比,用于酶受体激活结合,脂肪酸代表细胞能量的主要来源并且是 PPAR- α 的重要生理学活化剂。上述 PPAR-RXR 异二聚体,与其他助激活剂相关联,结合至靶基因的调节区中的称为过氧化物酶体增殖因子应答元件 (PPRE) 的 DNA 序列上,启动酶 (例如 UGT 等) 的转录和翻译。

[0006] 因此,为了调节 UGT 的表达和激活,必须提供适当的并且是选择的酶诱导物。在人体中某些 UGT 诱导物是已知的,例如氯贝特,它是 PPAR- α 激动剂 (Barbier (巴比尔), 已引证)。在大鼠中,UGT1A1 是 PPAR- α 靶基因,并且暴露于某些诱导物,例如 PPAR- α 激

动剂可以增加在肝脏中这一 UGT 的 mRNA 表达 (Shelby (谢尔比) 等人, Drug Metab. and Disposition (药物代谢与处置) (2006) 34:1772-1778)。

[0007] 此外, UGT 已经示出使 12-羟基二十碳四烯酸或 12(S)-HETE (“12-HETE”) 葡萄糖醛酸化和钝化。参见 Turgeon (特金) 等人, J. Lipid Res. (脂质研究杂志) (2003) 44:1182-1191。作为对某些炎症性过程、以及还有 UV-诱导的损伤和/或皮肤癌发生的响应, 由脂氧合酶 (LOX) 将花生四烯酸 (“AA”) (在膜磷脂中天然存在的一种脂肪酸) 代谢为多种活性类花生酸。AA 的 LOX 代谢导致产生白细胞三烯和羟基二十碳四烯酸 (HETE)。5-LOX 负责产生白细胞三烯和 5-HETE, 而 12-LOX 产生 12-HETE。确切地, 脂氧合酶将 AA 转化为不稳定的过氧化氢-二十碳四烯酸 (HPETE), 然后由过氧化酶将它水解为 HETE。越来越多的证据已经示出, 5-LOX 和 12-LOX 代谢物二者通过对凋亡的抗性连同增加的增殖、血管生成和细胞迁移, 促进了癌发生。在正常上皮很大程度上不存在的 5-LOX 和 12-LOX 二者, 通常在不同上皮癌中组成性地表达。

[0008] 升高水平的 12-LOX mRNA 已经关联至晚期癌症和预后不良。另外地, 已经证明, 在小鼠模型中, 12-LOX 在皮肤癌发生中起到直接作用, 并且与小鼠中的正常皮肤相比, 已经在皮肤肿瘤中检测到 12-HETE 处于升高水平。确切地, 与来自同一小鼠的正常皮肤相比, 在乳头状瘤和鳞状细胞癌中的 12-HETE 水平高 50 倍 (Virmani, J. (维尔马尼) 等人, Cancer Lett. (癌症快报) (2001) 162 (2):161-165; Krieg, P. (克里格) 等人, Mol. Carcinog. (分子癌发生) (1995) 14 (2):118-129)。另一小鼠模型证明, 使用特异性 12-LOX 抑制剂 (黄芩苷) 保护对抗皮肤中 UVB-诱导的 DNA 损伤 (Bing-Rong, Z. (冰蓉) 等人, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. (皮肤光老化的研究及防护) (2008) 24 (4):175-182)。这一结果进一步强调了 12-HETE 在皮肤癌进展中的重要性。因此, 不打算受理论束缚, 假设通过直接抑制 12-LOX, 或通过抑制 12-LOX 信号转导, 即通过降低 12-HETE 水平, 可以治疗或预防人类皮肤癌。如以上讨论, UGT 可以葡萄糖醛酸化, 并且因此钝化 12-HETE, 导致由身体将其消除。然而, 通过 UV 辐射可以下调皮肤中表达的 UGT, UV 辐射是皮肤癌和其他增生性紊乱中的主要可疑致病物。

[0009] 鉴于以上内容, 将希望提供可以通过给予所述诱导物至个体、动物或人类激活或诱导 UGT 表达的酶诱导物或激动剂。另外, 预期可以激活或诱导 UGT 表达的诱导物或激动剂还可以降低 12-HETE 水平, 这将用作对本技术的有用贡献。

[0010] 此外, 使用酶诱导物或激动剂用于针对细胞增生性紊乱 (包括皮肤癌) 对个体进行治疗, 包括给予需要此类治疗的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪 (其中 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性被增加), 将代表对本技术的有用贡献。

发明内容

[0011] 提供了一种针对细胞增生性紊乱对个体进行治疗的方法, 该方法包括给予需要此类治疗的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪, 其中 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性被增加。

[0012] 在一个替代性实施例中, 提供了在个体中 (例如患有细胞增生性紊乱的个体) 防止或抑制 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性的 UV-诱导损失的方法, 该方法包括给予对此类治疗有需要的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪, 其中 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活

性被增加。

[0013] 在另一个实施例中,可以通过给予蝶芪降低癌前期光化角化物 (AK) 病变中的 12-HETE 水平。

[0014] 仍在另一个实施例中,可以通过给予蝶芪降低癌前期的、增生细胞、或恶性细胞中的 12-LOX 表达水平。

附图说明

[0015] 图 1 描述了一个在本发明的实施例中的、所提出的代谢途径,其中 UGT 可以钝化 12-HETE。

[0016] 图 2 描绘了在暴露于单次剂量的处于 $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ 的 UV-B 的正常人类黑素细胞中,UGT 的 UV-B 下调。实心柱:未经处理的细胞;加斜线的柱:从左至右,分别处于 4 小时和 24 小时的 UV-B 处理的细胞。

[0017] 图 3 描绘了在一个实施例中,在正常人类黑素细胞中,UGT2 亚型的 UV-B 诱导的损失,以及用蝶芪 (Ptero) 防止了所述损失。UV-B 剂量: $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ 。实心柱:未经处理的细胞;加斜线的柱:UV-B 处理的细胞;加竖线的柱:用 UV-B 处理的并且用蝶芪处理的 (100nM)。

[0018] 图 4 描绘了在另一个实施例中,通过对 UGT 亚型家族成员的总 mRNA 的 RT-PCR 分析,在原代培养正常人类角质化细胞中的 UGT mRNA 表达 (GAPDH 作为阳性对照)。

[0019] 图 5 描绘了在另一个实施例中,在正常人类角质化细胞中,UGT2B17 亚型的 UV-B 诱导的损失,以及用蝶芪防止了所述损失。UV-B 剂量: $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ 。实心柱:未经处理的细胞;加斜线的柱:UV-B 处理的细胞;加竖线的柱:用 UV-B 处理的并且用蝶芪处理的 (100nM)。

[0020] 图 6 描绘了在另一个实施例中,在用处于 $50\text{ }\mu\text{M}$ 的蝶芪 (Ptero) 或白藜芦醇 (Res) 处理 SKme128 人类黑色素瘤细胞后,用蛋白质印迹的 12-LOX 表达 (B-肌动蛋白作为上样对照)。

[0021] 图 7 描绘了在正常皮肤和来自同一人类患者的 AK 中,12-HETE 的测量水平 ($n = 6$)。

具体实施方式

[0022] 已经提供了包含蝶芪的安全并且有效的食用增补剂,可以将它按治疗有效量给予个体,用于治疗细胞增生性紊乱。在一个实施例中,一种针对细胞增生性紊乱对个体进行治疗的方法包括给予需要此类治疗的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪的步骤,其中 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性被增加。

[0023] 在一个实施例中,所述包含蝶芪的安全并且有效的食用增补剂将引起光化角化物 (AK)、以及与 UV- 诱导的皮肤的光损伤有关的其他癌前变化的复原。此外,所述包含蝶芪的食用增补剂将用于治疗、抑制和 / 或预防非黑色素瘤皮肤癌 (NMSC)。

[0024] 在另一个实施例中,一种抑制患有细胞增生性紊乱的个体中 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 的损失的方法包括给予需要此类治疗的个体一个治疗有效量的化合物蝶芪的步骤,其中 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 活性被增加。

[0025] UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 催化葡萄糖醛酸从高能辅因子 (UDP-葡萄糖醛酸) 向包含可供使用的反应性的或亲核的中心 (例如羟基、羧基、氨基、或硫醇基) 的异生物质、药

物、或内源底物转移。UGT 和 II 期生物转化酶类主要在肝脏和肠中表达,并且是位于内质网腔表面上的膜合酶类。相对于亲本底物,葡萄糖醛酸化的终产物典型地更具极性并且更适于经由尿液或胆汁被排泄并消除。

[0026] 内源 UGT 底物包括胆红素、中性类固醇、胆汁酸、脂肪酸、以及类视黄醇。异生性 UGT 底物范围从环境毒物(例如苯并[a]芘)到常见的药物制剂(例如扑热息痛以及其他 NSAID)。单独的 UGT 亚型展示出不同模式的底物特异性和可诱导的调节。不同 UGT 以物种特异性方式和组织特异性方式被表达。主要的两个 UGT 基因家族是 UGT1 和 UGT2。

[0027] 已知在 UGT 的调节中涉及 PPAR。具体地,UGT 是 PPAR- α 的靶标,如与 PPAR- γ 相反。白藜芦醇,一种已知的 PPAR- γ 激活剂,已经示出对 UGT 的一定诱导,但不是一种 PPAR- α 激活剂。在一组类似的芪的一个研究中,只有蝶芪以一种类似于环丙贝特的方式激活 PPAR- α (Rimando(里曼多)等人, J. Agric. Food Chem. (农业化学与食品化学杂志 (2005) 53:3403-3407)。不认为蝶芪是一种 PPAR- γ 激活剂。认为这一子类型选择性在用于使用蝶芪激活或诱导 UGT 的表达的当前方法中是有利的。

[0028] 例如,UGT 已经示出使 UV- 诱导的皮肤癌发生的过程期间由酶 12-LOX 产生的 12-羟基二十碳四烯酸(12-HETE)葡萄糖醛酸化和钝化。已经发现,蝶芪及其营养配制品可以诱导 UGT 活性,由此降低皮肤中的 12-HETE 水平。

[0029] 图 1 示出了花生四烯酸(AA)代谢和 UGT 共轭代谢的一个模型。环氧合酶还可以在炎症性过程中发挥作用,但是将不在此讨论。总之,图 1 示出了在 UV- 诱导的皮肤癌进展(或其他类型的 UV- 诱导的皮肤损伤,例如晒斑)中 AA 代谢的所提出的作用,包括 12-HETE 的产生和代谢。

[0030] 到目前为止,非黑色素瘤皮肤癌(NMSC)是危害人类的最常见癌症。NMSC 的发病率几乎与所有其他形式的癌症相加一样大。2007 年,美国癌症协会估计,在美国诊断出非黑色素瘤皮肤癌的多于一百万个新病例,并且大致 2700 例死亡涉及非黑色素瘤皮肤癌。然而,这些估计是偏低的,考虑到皮肤的鳞状细胞癌和基底细胞癌不需要报告,因此,每年实际病例数很可能超过三百万。存在两种主要类型的 NMSC:基底细胞癌占大约 80% 的病例,而鳞状细胞癌占大约 20%。由 NMSC 导致的主要死亡是由鳞状细胞癌引起的。多数 NMSC,包括鳞状细胞癌,是由结果是光致癌作用的日晒引起的。用于 NMSC 的治疗是外科手术,通常导致瘢痕和其他病态。

[0031] 光化角化物(AK)是癌前期的皮肤赘生物,它可以引起鳞状细胞癌。它们的出现是因为长期日晒。AK 和 NMSC 的其他病因是来自晒黑罩(tanning booth)或电弧焊接的 UV 光、x- 辐射、或暴露于某些化学药品。AK 是极其常见的病变,并且存在于多于 1 千万的美国人中。在澳大利亚,平均风险的人中 AK 的每年进展速率是在每 10,000 人中 8 个和 24 个之间。高风险个体(患有多发性 AK 的那些)具有高至 3 年 12% -30% 的进展速率。百分之二的源自 AK 的鳞状细胞癌症可能转移,并且 7% 是局部复发的。最常见地是用液氮或局部化学疗法,例如像 5- 氟尿嘧啶,来治疗光化角化物。较不常见地是用其他局部药剂(双氯芬酸和咪喹莫特)、光动力学疗法、化学换肤或非分级的或分级的剥离性激光磨皮来治疗他们。

[0032] 在本说明书中,将理解“光化角化病”是产生 AK 的增生性紊乱。

[0033] 虽然一些治疗是已知的,将希望主动预防或抑制光化角化病和皮肤癌的形成,以

降低治疗成本、发病率、和死亡率。一生的日晒防护是用于最小化光化角化病和非黑色素瘤皮肤癌的发展风险的杰出方法。然而,高比例的患者已经具有广泛的光损伤,并且已经证明,难以改变日晒防御行为。

[0034] 理想的化学预防剂可以达到癌前变化的复原,防止 NMSC 发展,并且最小化紫外光有关的损伤,具有最小的或不具有副作用。如以上所指出,存在可以移除光化角化物的局部药剂,但是它们通常导致在治疗部位的显著炎症。需要新途径。

[0035] 人类皮肤包括顶部表皮层(表皮),它位于下面的真皮层(真皮)上。表皮主要由角质化细胞组成,角质化细胞在底部发育,朝向顶部移动,并且不断地更换。随着老的死细胞脱落,它们被更换,所以这一层不断自我更新。表皮还包含黑素细胞,一般位于该层的底部附近,它产生黑色素,有助于皮肤颜色,并且还提供 UV- 保护。表皮还包含参与免疫系统的树突状细胞(朗格汉斯细胞),以及在该层的底部发现的底层细胞。表皮还包括鳞状细胞。表皮层和真皮层还包含干细胞和毛囊。在哺乳动物中,除了其他组织外,黑素细胞还分布在脑、眼睛、耳朵、以及心脏中。

[0036] 如所述的皮肤细胞还易于发生 UV 光诱导的损伤、DNA 损伤、以及癌发生。

[0037] 蝶芪(3,5-二甲氧基-4'-羟基-反式-芪)是一种可口服生物利用的化合物,它在血液中的半衰期 $t_{1/2}$ 是约 105 分钟。相比之下,白藜芦醇具有差的生物利用度,并且容易被 UGT 代谢,导致远远更短的半衰期(在血液中的 $t_{1/2}$ 约 14 分钟),这阻碍了它作为化学预防剂的有效性。

[0038] 若干研究已经示出,当口服给予或局部应用时,白藜芦醇防止了小鼠皮肤中 UV-B 介导的细胞损伤(Afaq, F. (阿帕克)等人,“revention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1hairless mice(在 SKH-1 无毛小鼠中,白藜芦醇防止短期紫外线 B 辐射介导的损伤)”, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (毒理学和应用药理学), (2003) 186(1):28-37; Reagan-Shaw, S. (里根-肖)等人,“modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1hairless mouse skin(在 SKH-1 无毛小鼠皮肤中,在紫外线 B 介导的反应的化学预防期间,白藜芦醇调节关键细胞周期调控事件)”, *Oncogene* (致癌基因) (2004) 23(30):5151-60; 以及 Aziz, M. H. (阿齐兹)等人,“Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin(经由生存素的调节,通过白藜芦醇介导小鼠皮肤中的紫外线 B 辐射的预防)”, *Photochem. Photobiol.* (光化学与光生物学) (2005) 81(1):25-31)。已经示出白藜芦醇诱导 UGT 活性(Chow, H. H. (周)等人,“Resveratrol modulates drug-and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study(在健康志愿者研究中,白藜芦醇调节药物和致癌物代谢酶)”, *Cancer Prev. Res.* (癌症预防研究)(费城,宾夕法尼亚州), (2010) 3(9):1168-75)。然而,由于差的生物利用度,在人类中,它作为一种化学预防剂的用途似乎是不可能的(至少是作为一种单一的药剂是不可能的)。人类能很好地耐受白藜芦醇,但是它易于代谢(具有讽刺意味地是由 UGT 代谢),导致一个短半衰期,这阻碍了它作为化学预防剂的有效性。

[0039] 在葡萄和浆果类中发现了蝶芪。它是白藜芦醇的天然存在的二甲基化类似物,但是最可能归因于可以急剧减少它被 UGT 代谢的甲基,它具有更长的半衰期(Hougee, S. (胡

吉)“Selective COX-2inhibition by a Pterocarpus marsupium extract characterized by pterostilbene, and its activity in healthy human volunteers(特征在于蝶芪的花榈木提取物的选择性 COX-2 抑制,及其在健康人类志愿者中的活性)”, *Planta Med.* (药用植物) (2005) 71(5):387-92)。在小鼠中的若干生物测定中,与白藜芦醇相比,蝶芪已经示出是同等或显著更加有效的,这些测定包括抑制小鼠皮肤中的 NF- κ B、AP-1 和 iNOS 激活 (Cichocki, M. (齐霍茨基), 等人, “Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NF κ B, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis(在抑制小鼠表皮中的 12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯激活的 NF κ B、AP-1、COX-2 和 iNOS 方面,蝶芪与白藜芦醇同等有效)”, *Mol. Nutr. Food Res* (分子营养与食品研究) (2008) 52 增刊 1:S62-70)。

[0040] 据信,包含蝶芪或其衍生物的营养配制品可以有利地用来增加 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 的活性,或诱导其体内表达。UGT 的这一上调可以抑制或防止由某些因素引起的 UGT 损失,这些损失包括例如在人类角质化细胞或黑素细胞中观察到的响应 UV 辐射的下调。参见图 1。

[0041] 在人类个体中,蝶芪的有用治疗剂量范围可以是(但不局限于)从约 5mg 至约 1000mg。另一个适合的剂量范围是从约 20mg 至约 250mg。可以将蝶芪配制为药物的或营养的组合物,分别包括一种药学上或营养学上可接受的载体。在包含蝶芪的药物组合物中的一个实施例中,基于组合物的总重量,蝶芪的适合水平的范围可以是按重量计约 0.1% 至按重量计约 10%。

[0042] 本发明的这些营养组合物可以与一种营养上可接受的载体组合给予。在此类配制品中可以包括从按重量计 1% 至按重量计 99%、或可替代地按重量计 0.1% 至按重量计 99.9% 的活性成分。“营养上可接受的载体”是指与该配制品中的其他成分兼容并且对使用者无害的任何载体、稀释剂或赋形剂。有用的赋形剂包括微晶纤维素、硬脂酸镁、硬脂酸钙、任何可接受的糖(例如,甘露醇、木糖醇),并且针对美容使用,基于油的赋形剂(oil-base)是优选的。

[0043] 本发明的这些药物组合物可以与一种药学上可接受的载体组合给予。在此类配制品中可以包括从按重量计 1% 至按重量计 99%、或可替代地按重量计 0.1% 至按重量计 99.9% 的活性成分。一种“药学上可接受的载体”是指与该配制品中的其他成分兼容并且对使用者无害的任何载体、稀释剂或赋形剂。

[0044] 例如,在人类患者中,可以按从约 50mg 至约 250mg 的每日剂量提供蝶芪。另一个适合的剂量范围是每日从约 50mg 至约 150mg。另一个适合的剂量范围是每日从约 50mg 至约 100mg。一个特别适合的剂量是每日给予约 100mg。

[0045] 当皮肤被用作靶器官时,可以在接受蝶芪补充之前和之后,确定 AK 病变中的 12-HETE 水平,来评价个体中的 UGT 表达的诱导。以下是针对 II 期临床试验的总体研究设计,用来在其他可测量终点中,评价蝶芪诱导 UGT 表达和/或增加其活性、以及降低 12-HETE 水平和/或抑制 12-LOX 表达的功效。

[0046] 研究群体

[0047] 具有鳞状细胞癌病史并且当前具有光化角化物的三十四至四十个受试者将完成该试验。测试了处于 NMSC 高风险的个体,并且他们都大于 18 岁。确切地,受试者在最近

5 年内将已经患有至少一种鳞状细胞癌,并且现在,在他们的前臂上,具有至少 10 个光化角化物 (AK)。

[0048] 研究设计

[0049] 该研究提供了评估一种用于抑制或预防 NMSC 的新颖方法的机会。它利用了多个终点,从分子标记的分析至当今技术水平的成分成像的标准临床评价。这一设计允许用相关的关键终点生物标记物的投入的经济性、首次临床地测试假定的试剂,针对这些生物标记物可以获得有价值的验证数据。

[0050] 合格受试者可以按约 50mg 至约 250mg 的一个范围中的剂量口服接受蝶芪。在一个实施例中,患者将每日口服接受 100mg 的蝶芪。可以按一个适当的营养配制品提供蝶芪,与营养学上可接受的载体组合或共给予。可替代地,可以按一个适当的药物配制品提供蝶芪,与药学上可接受的载体组合或共给予。

[0051] 治疗的持续时间可以高达约 12 周。将在研究性治疗的第 4、8、和 12 周,并且然后在该研究治疗后第 16 和 20 周,评估受试者。

[0052] 可以使用宽视野功能成像 (WiFi) 技术进行 AK 病变的成像,用来例如在接受蝶芪补充之前和之后,测量血流、脂肪的和含水量的变化。宽视野功能成像 (WiFi) 是以下两种宽视野成像形式的整合:空间调制的反射/荧光成像 (MI) 和激光散斑成像 (LSI)。WiFi 可以同时测量浑浊组织中的组织血流和生物化学组成(即氧化的和脱氧的血红蛋白、水的和脂质的含量)。它拥有足够的空间-时间分辨率,用来在厚的组织中,在若干毫米的深度研究快的(即毫秒时标)并且局部的(即数十 μm 至 mm) 事件。受试者将具有在每次受访时进行的这些安全的(类似于标准数码摄影,但是使用投射在皮肤上的红光和近红外光完成)、快速的(10 分钟或更短)的非侵入式测量。在加利福尼亚大学欧文分校 (University of California, Irvine) 的 Beckman (贝克曼) 激光中心可进行这些测试。在每次临床受访时,将进行包含至少 3 个 AK 的日光损伤皮肤的 8cm^2 截面的 WiFi。我们预期与处理前相比,将在 12 周时在 AK 中观察到降低的血流。

[0053] 因此,将通过非侵入式 WiFi 成像检查血流,也检查了绘图的 AK 的脂肪和含水量。因为 12-HETE 能够通过激活血管内皮生长因子 (VEGF) 刺激血管发生,所以我们预期将在蝶芪补充后观察到针对 AK 病变的降低的血流

[0054] 研究安排

[0055] 对每个患者进行初始筛选访问,包括但不限于皮肤病学检查,即针对 AK 和/或日光损伤,胳膊、腿、和其他皮肤区域的完整皮肤检查。还可以进行以下测试:血液测试(具有差示的 CBC),综合性代谢功能全套试验、脂质全套试验、和尿液分析。

[0056] 在筛选访问的 4 周内,检查实验室和血液测试。进行拍照并且计数双侧前臂上的 AK。然后在患者的皮肤上选择一个研究区域 ($8\text{cm} \times 8\text{cm}$),并且在透明纸上标出并且绘图。选择的绘图区域将具有至少三个 AK,并且可以在右臂抑或左臂上。进行活组织检查之前和之后区域,连同成像部位的标绘。收集疑似 NMSC 的活组织检查标本。可以在这个阶段进行非侵入式成像(即 WiFi)。

[0057] 在一个实施例中,可以将皮肤活组织检查部位标绘为处理前的 AK (pre-AK)。如果活组织检查结果揭示没有 AK,但是有畸形细胞结构,那么对受试者继续进行处理并且监测。

[0058] 贯穿临床研究的稍后时段,例如在第 4、8 和 12 周,对皮肤研究区域进行监测和检

查、拍照和 / 或成像。针对不良事件对患者进行监测。

[0059] 在 12 周结束时,将对皮肤研究区域进行检查、拍照、和成像。确切地,对每个患者的一侧或双侧前臂上的 AK 进行拍照和计数。然后伴随如以上的血液的和尿液的测试,收集和分析疑似 NMSC 和处理后的 AK 部位 (处理后 -AK) 的处理后活组织检查标本。

[0060] 在一个实施例中,在处理后的 16 和 20 周 (或在之前或之后的某一其他安排的时间点),将如以上所述的对皮肤研究区域进行绘图、检查、拍照、和成像。

[0061] 组织样品和生物标记物评估

[0062] 从每个患者获得在开始 (处理前) 和处理后 (12 周) 时的 4mm AK 活组织检查物。活组织检查物将被切成两半。按照临床活组织检查程序,立即将样品切片,并且一半将被送于组织病理学分析,而剩余样品将被送至实验室,用于生物标记物分析。在完成处理后,将对 4 个患者分批进行所有生物标记物分析,所以可以一起分析成对样品。

[0063] 按照建立的实验方案,使用连接至三重四重质谱仪 (LC/MS/MS) 的液相色谱,将从光化角化物处理前确定花生四烯酸代谢物 (12-HETE 和 PGE_2) 水平 (pg/mg 蛋白),并且然后与处理后的水平进行比较。测定需要组织提取、声处理、离心和蛋白含量确定,用来制备样品,随后是 LC/MS/MS。预期在蝶芪处理或蝶芪补充后,AK 中的 12-HETE 和 PGE_2 水平将显著降低。

[0064] 将按照建立的实验方案,通过归一化为肌动蛋白的蛋白质印迹,半定量地测量 COX-2、12-LOX、UGT 和 15-PGDH 的蛋白水平。按照光密度测定法,蝶芪处理后的来自 AK 的表达水平的变化将与处理前的水平进行比较,并且报告为倍数变化。预期在蝶芪处理后,COX-2 和 12-LOX 表达将显著降低。相反,预期在蝶芪补充后,在 AK 中,UGT 和 15-PGDH 蛋白水平将显著提高。

[0065] 临床试验终点

[0066] 以上研究描述了未随机化并且无对照组的单臂试验。该研究的主要目标是,在接受蝶芪补充之前和之后,在来自受试者的癌前期光化角化物 (AK) 病变中,评估生物活性脂质 12-羟基二十碳四烯酸 (12-HETE) 的水平。不打算受理论束缚,假设是,该研究治疗将被证明是将引起癌前期光化角化物的复原并且逆转与皮肤的光损伤有关的其他癌前变化的安全并且有效的营养保健食品。证明对所有剂量的指定的研究药剂具有 $\geq 80\%$ 顺应性的受试者将被认为是可用于对主要终点,12-HETE (pg/mg 蛋白) 的评估。次要终点包括 PGE_2 (pg/mg 蛋白) 以及 UGT、COX-2、15-PGDH、和 12-LOX 的酶蛋白水平。另外的次要端点包括在 AK 病变中测量的血流、脂肪的和含水量、原始 AK 病变的数目、新 AK 病变的数目、以及非黑色素瘤皮肤癌 (NMSC) 的数目。

[0067] 递送系统

[0068] 适合的剂型包括片剂、胶囊剂、溶液、混悬剂、粉剂、胶质、以及糖果。舌下递送系统包括,但不局限于,舌头下和舌头上可溶的药片、液滴、以及饮料。可以使用可食用膜、亲水性聚合物、口服可溶的膜或口服可溶的条。其他有用的递送系统包括口腔喷雾或鼻腔喷雾或吸入器、等。

[0069] 对于口服给予而言,可以将蝶芪与一种或多种固体的无活性成分进行合并以用于片剂、胶囊、丸剂、粉剂、颗粒或其他适合剂型的制备。例如,可以将该活性剂与至少一种赋形剂进行组合,这些赋形剂是例如填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、溶液阻滞剂、吸收促进

剂、润湿剂、吸收剂、或润滑剂。其他有用的赋形剂包括硬脂酸镁、硬脂酸钙、甘露醇、木糖醇、甜味剂、淀粉、羧甲基纤维素、微晶纤维素、硅石、明胶、二氧化硅、等。

[0070] 给予途径

[0071] 这些化合物可以通过任何途径来给予,包括但不限于,口服、舌下、口腔、眼睛、肺部、直肠、以及非消化道给予,或作为口腔喷雾或鼻腔喷雾(例如喷雾状的蒸汽、液滴或固体微粒的吸入)。非消化道给予包括,例如,静脉内、肌内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、膀胱内(例如,向膀胱)、真皮内、经皮、局部、或皮下给予。还考虑在本发明的范围内的是将蝶芪以控制的配制品的形式滴注至患者的体内,其中该药物的全身性或局部释放在稍晚的时间发生。例如,该药物可以被定位于一个储存处用于至循环的控释,或用于释放至一个肿瘤生长的局部位点。

[0072] 这种治疗可以按单一的、连续的一段时间或者以不连续的一段时间进行一个必要长的时期。基于患者的反应,治疗医生将知道如何增加、减少或中断治疗。根据一个实施例,治疗可以进行从约四天至约十二天。可以根据需要重复该治疗计划。

[0073] 认为蝶芪及其营养配制品针对一个范围的癌症和肿瘤类型是有效的,这些癌症和肿瘤类型包括皮肤癌,包括但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌、恶性黑色素瘤、卡波氏肉瘤、梅克尔细胞癌、皮肤淋巴细胞瘤、痣、发育不良痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕瘤、以及银屑病。

[0074] 皮肤癌可以是实体瘤(可能是或可能不是转移性的)。因此,如在此提供的,术语“肿瘤细胞”包括受以上鉴定的紊乱中的任一种困扰的细胞。

[0075] 易于用在此描述的蝶芪配制品治疗的其他细胞增生性紊乱包括但不限于选自下组的癌症,该组由以下各项组成:乳癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠直肠癌、肺癌、肾癌、肝癌、脑癌、胃癌、支气管癌、胰腺癌、膀胱癌、以及骨癌。

[0076] 还认为蝶芪及其营养配制品在治疗非癌症细胞增生性紊乱,即特征在于良性适应症的细胞增生性紊乱中是有用的。此类紊乱还可以称为细胞增生性的或超增生性的,其中机体以非典型性升高的速率制造细胞。认为可由蝶芪配制品治疗的非癌症细胞增生性紊乱包括光化角化物(AK)和其他癌前期病变。

[0077] 用于 UV-B 辐射处理的材料和方法部分

[0078] 试剂和细胞培养

[0079] 根据加利福尼亚大学欧文分校的内部审查委员会核准的实验方案,从来自包皮环切手术的去识别的新生儿包皮中分离正常人类黑素细胞。如先前描述分离黑素细胞(Eisinger(艾辛格)等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院刊)(1982)79(6):2018-22;以及Liu(刘)等人,J.Invest.Dermatol.(研究性皮肤病学杂志)(2009)129(2):422-31),并且培养在补充有以下项的MCDB153培养基中:2%胎牛血清、10ng/ml的12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯和0.15%牛垂体提取物。从ChromaDex, Inc.公司(欧文,加利福尼亚州)获得蝶芪。

[0080] 黑素细胞的 UV-B 辐射处理

[0081] 如先前描述进行 UV-B 照射(Liu,F.(刘)等人,“Mitf links Erk1/2kinase and p21CIP1/WAF1 activation after UVC radiation in normal human melanocytes and melanoma cells”(在正常人类黑素细胞和黑色素瘤细胞中,在 UVC 辐射后, Mitf 联系

Erk1/2 激酶和 p21CIP1/WAF1 激活)”, Mol. Cancer (分子癌症) (2010) 9:214)。将细胞生长至 70% 融合, 并且完全移除培养基, 用于 UV-B 辐射处理。在 Stratalinker UV 交联剂装置 (Stratagene 公司, La Jolla (拉荷亚), 加利福尼亚州) 中进行 UVB 照射, 其中峰值波长是在 312nm。由具有适当探头的放射计测量 UV 强度。在辐射处理后立即更换培养基, 并且将细胞返回至 37°C 培养箱中以恢复。对于慢性暴露, 每小时重复这一过程, 持续总计五次暴露。在此指示的时间总是反映了第一次暴露后的时间。

[0082] 总 RNA 分离、逆转录和实时 PCR

[0083] 根据标准制造商的实验方案, 使用 Arum 总 RNA 微型试剂盒 (BioRad (伯乐) 公司, Hercules (赫拉克勒斯), 加利福尼亚州), 从细胞分离总 RNA。使用 NanoDrop 1000 (Thermo/Fisher (赛默飞世尔) 公司, Wilmington (威明顿), 特拉华州) 定量 RNA, 然后根据标准实验方案, 使用 iScript 逆转录酶试剂盒 (伯乐公司), 从 1.0 μ g 的 RNA 制造 cDNA。为了分析黑素细胞中的 UGT mRNA 表达水平, 如先前描述进行实时 PCR (Chen, G. (陈) 等人, “Identification of a prevalent functional missense polymorphism in the UGT2B10 gene and its association with UGT2B10 inactivation against tobacco-specific nitrosamines (在 UGT2B10 基因中普遍功能性错义多态性的鉴定和它与针对烟草特异性亚硝胺的 UGT2B10 钝化的关联)”, Pharmacogenet. Genomics (药物基因组学) (2008) 18(3):181-91; 以及 Dellinger, R. W. (道林格) 等人, “Glucuronidation of PhIP and N-OH-PhIP by UDP-glucuronosyltransferase 1A10 (通过 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 1A10 的 PhIP 和 N-OH-PhIP 的葡萄糖醛酸化)”, Carcinogenesis (癌发生) (2007) 28(11):2412-8)。因此, 根据标准制造商的实验方案, 使用预先设计的 TaqMan 基因表达测定 (Applied Biosystems (应用生物系统) 公司, Carlsbad (卡尔斯巴德), 加利福尼亚州) (ID 是 Hs00426592_m1, 针对 UGT2B7; Hs02556282_s1, 针对 UGT2B10; Hs03008769_g1, 针对 UGT2B15; Hs0016857_m1, 针对 NQ01; 以及 Hs99999905_m1, 针对 GAPDH)。使用 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为归一化的‘管家’基因和阳性对照, 使用包含 50ng 的 cDNA 的 20 μ l 总体积进行实时 PCR。在 CFX96 实时 PCR 机 (伯乐公司) 上进行实时 PCR。报告的 mRNA 表达值是带有标准差的至少 3 次独立实验的平均值。

[0084] 可以与以下实例相联系来进一步理解以上描述的方法。

[0085] 实例 A

[0086] 在急性 UV-B 暴露后, 在正常人类黑素细胞中, UGT 表达下调。

[0087] 在从去识别的新生儿包皮分离的人类黑素细胞中发现 UGT2B7、UGT2B10 和 UGT2B15 的表达。另外, 在检查的 5 个黑色素瘤细胞系中的 4 个中, 观察到无 UGT 表达。这提出了有趣的可能性, UGT 表达的损失是黑色素瘤病因学的一部分。为了确定 UV-B 是否可以调节黑素细胞中的 UGT 表达, 再次从去识别的新生儿包皮分离黑素细胞并且培养。然后将这些细胞暴露于单次剂量的处于 25mJ/cm² 的 UV-B, 该剂量大致等价于晒斑剂量。随后在照射后 0 小时、4 小时和 24 小时收集细胞, 并且如在以上材料和方法中所述, 使用归一化为 GAPDH 表达的实时 PCR 测定 UGT 表达。如图 2 中所示, 响应急性 UV-B 剂量, UGT2B7、UGT2B10 和 UGT2B15 的表达水平都下降。确切地, 在照射后 4 小时, UGT2B7 表达不可检测, 虽然它的表达在暴露后 24 小时返回至升高的水平。在处理 4 小时, UGT2B10 表达损失, 并且在处理后 24 小时的时候仍不可检测, 而 UGT2B15 表达水平在照射后 4 小时未变化, 但是在照

射后 24 小时处不可检测。将 NADPH 脱氢酶醌 1 (NQO1) 用作对照,因为它的表达在 UV-B 暴露后并不改变。这第一次证明了可以由 UV-B 暴露调节 UGT 表达,并且与急性 UV 暴露有关的黑色素瘤增加的风险一致。

[0088] 实例 B

[0089] 在人类黑素细胞中,在 UV-B 诱导的 UGT 表达损失之后,进行蝶芪处理。

[0090] 在此检查了蝶芪是否可以防止响应处于晒斑剂量 ($25\text{mJ}/\text{cm}^2$) 的急性 UV-B 暴露的 UGT 损失。将上述高加索裔的 / 西班牙裔的黑素细胞系保持未处理或用 100nM 蝶芪处理 1 小时。然后如以上所述照射细胞,并且在照射后,与细胞培养基一起更换 100nM 蝶芪。如图 3 中所示,在照射后 4 小时和 24 小时,蝶芪防止了 UGT2B7、UGT2B10 和 UGT2B15 的损失,其中唯一例外是在 4 小时时的 UGT2B15 表达。在用蝶芪处理后 24 小时,发现所有三种 UGT 都处于升高水平 (高达 8 倍)。

[0091] 因此,已经证明,在人类黑素细胞中,天然产物蝶芪可以防止 UV-B 诱导的 UGT 表达损失,或减小 UGT 表达损失的风险。应注意,可以使用人类角质化细胞进行相同程序。

[0092] 实例 C

[0093] 在正常人类角质化细胞中的 UGT 表达。

[0094] 角质化细胞是表皮中的优势类型的细胞 (在表皮中约 95% 的细胞)。NMSC 可以起源于这些细胞。为了查明这些重要的皮肤细胞是否表达 UGT,进行 RT-PCR。如图 4 中所示,示出在分离自新生儿包皮的原代培养人类角质化细胞 (正常) 中表达 UGT1A4、UGT1A6 和 UGT2B17。切下预期大小的条带并且使用标准方法测序,以确认它们的身份为所指出的 UGT。这是人类角质化细胞中 UGT 表达的第一表征。

[0095] 图 4 示出在原代培养人类角质化细胞中的 UGT mRNA 表达。进行用于指示的 UGT 家族成员的、来自人类角质化细胞的总 mRNA 的 RT-PCR 分析。将 GAPDH 引物用作阳性对照 (+)。未检测到其他 UGT 家族成员。

[0096] 实例 D

[0097] 在人类角质化细胞中,在 UV-B 诱导的 UGT2B17 表达损失之后,进行蝶芪处理。

[0098] 在此检查了是否可以由 UV-B 辐射调节 UGT2B17 表达,以及蝶芪是否可以防止该损失。在蝶芪 (100nM) 存在或不存在下,将人类角质化细胞暴露于 $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ UV-B 辐射,并且在照射后 0 小时、2 小时、4 小时、8 小时、和 24 小时进行收集。然后使用特异性针对 UGT2B17 的 TaqMan 测定进行实时 PCR。如图 5 中所示,在 UV-B 暴露后仅仅 4 小时,UGT2B17mRNA 表达显著下调,并且一直保持低水平至少 24 小时。重要地,如以上所述的蝶芪处理 (100nM) 消除了 UV-B 介导的 UGT2B17 损失。

[0099] 如图 5 中所示,在照射后 4 小时、8 小时、和 24 小时,蝶芪防止了 UGT2B17 损失。示出归一化为 GAPDH 的 UGT2B17 的相对 mRNA 表达,其中任意地将 0 小时设置为 1.0。

[0100] 因此,已经证明,在人类角质化细胞中,天然产物蝶芪可以防止 UV-B 诱导的 UGT 表达损失,或减小 UGT 表达损失的风险。

[0101] 实例 E

[0102] 在人类黑色素瘤细胞中,由蝶芪 (Ptero) 抑制 12-LOX 表达。

[0103] 如图 6 中所示,在体外,通过已知方法测试,蝶芪 ($50\text{ }\mu\text{M}$) 基本上阻断了 12-LOX 活性。如指示的,保持未处理的 (UN) 或用 $50\text{ }\mu\text{M}$ 蝶芪 (Ptero) 或白藜芦醇 (Res) 处理的、来

自 SKme128 人类黑色素瘤细胞的 12-LOX 的蛋白质印迹。B- 肌动蛋白用作上样对照。观察到在体内, 蝶芪抑制 12-LOX 表达要优于白藜芦醇。

[0104] 实例 F

[0105] 正常皮肤和人类 AK 中的 12-HETE 活性。

[0106] 使用标准方法, 从正常皮肤或来自同一患者的 AK 的 3mm 皮肤钻孔活组织检查物提取脂质部分, 并且通过 LC/MS/MS 标准方法进行分析, 来确定 12-HETE 浓度 ($n = 6$ 个患者, 自每一个患者取正常的和 AK 的样品)。如图 7 中所示, 如与来自同一个体的正常皮肤进行比较, 在化光化角化病 (AK) 中, 12-HETE 水平是 3 倍更高。

[0107] 这是新颖的数据, 因为先前并未报告 AK 中的 12-HETE 水平。而且, 为了使用 12-HETE 作为在如所述的临床试验中的临床终点, 这些数据是必需的。这些数据很好地关联示出 12-HETE 下调的小鼠研究 (Krieg, P. (克里格) 等人, “12-Lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development (在小鼠皮肤肿瘤发展中的 12- 脂氧合酶同工酶)”, Mol. Carcinog. (分子癌发生) (1995) 14 (2): 118-129)。

[0108] 因为 12-LOX 产生 12-HETE, 预期在增生的或癌前期的细胞中, 由蝶芪减少 12-LOX 表达将防止或减少 12-HETE 形成和 / 或对于在受损伤的皮肤中, 蝶芪将有效于将 12-HETE 恢复至正常水平 (这二者都是通过抑制 12-LOX 或通过上调 UGT)。进一步预期增生的或癌前期的细胞的处理将导致 AK (以及任选地 NMSC) 的复原或逆转。

[0109] 实例 1

[0110] 根据一个实施例, 使用在可接受的营养载体中配制的 100mg 蝶芪的每日剂量治疗患者 (或患者群的每个成员), 如以下所述口服给予。将 100mg 蝶芪和 150mg 微晶纤维素合并在一种植物胶囊中。在从患者的前臂上的皮肤测试区域 (8cm^2) 鉴定 AK (以及任选地 NMSC), 并且进行病变的绘图、拍照、成像、和取活组织检查之后, 如以上所述进行临床研究。研究监测的 12 周之后, 预期个体人类受试者将在皮肤测试区域中展示经鉴定的 AK 的复原。

[0111] 实例 1A

[0112] 根据一个实施例, 使用在可接受的营养载体中配制的 100mg 蝶芪的每日剂量治疗患者 (或患者群的每个成员), 口服给予。在从患者的前臂上的皮肤测试区域 (8cm^2) 鉴定 AK (以及任选地 NMSC), 并且进行病变的绘图、拍照、成像、和取活组织检查之后, 如以上所述进行临床研究。预期在历时 12 周的一个研究过程中, 取决于 mRNA 或蛋白的癌前期组织样品中的 UGT 表达将显著增加。

[0113] 实例 1B

[0114] 根据一个实施例, 使用在可接受的营养载体中配制的 100mg 蝶芪的每日剂量治疗患者 (或患者群的每个成员), 口服给予。在从患者的前臂上的皮肤测试区域 (8cm^2) 鉴定 AK (以及任选地 NMSC), 并且进行病变的绘图、拍照、成像、和取活组织检查之后, 如以上所述进行临床研究。预期在历时 12 周的一个研究过程中, 癌前期组织样品中的 12-HETE 水平将显著降低。

[0115] 实例 2

[0116] 根据一个实施例, 使用在可接受的营养载体中配制的 100mg 蝶芪的每日剂量治疗患者 (或患者群的每个成员), 如以下所述口服给予。将 100mg 蝶芪和 150mg 微晶纤维素合并在一种植物胶囊中。在从患者的前臂上的皮肤测试区域 (8cm^2) 鉴定 AK (以及任选地

NMSC), 并且进行病变的绘图、拍照、成像、和取活组织检查之后, 如以上所述进行临床研究。在 12 周的研究监测后, 预期治疗将防止在皮肤测试区域中鉴定的癌前期 AK 进展为 NMSC, 和 / 或抑制个体人类受试者中的新 NMSC 形成。

[0117] 尽管在前述说明书中, 已经就本发明的某些实施例对其进行了描述, 并且为了说明的目的已经提出了许多细节, 但是对本领域普通技术人员显而易见的是本发明易受另外的实施例的影响并且在此所描述得某些细节可以在不偏离本发明的基本原则下进行相当大的改变。

[0118] 在此所引用的所有参考文件通过引用以其全文被结合。在不偏离本发明的精神或基本属性下, 可以将其体现为其他特定形式, 并且因此应该参考指明本发明的范围的所附权利要求书, 而非参考前述说明书。

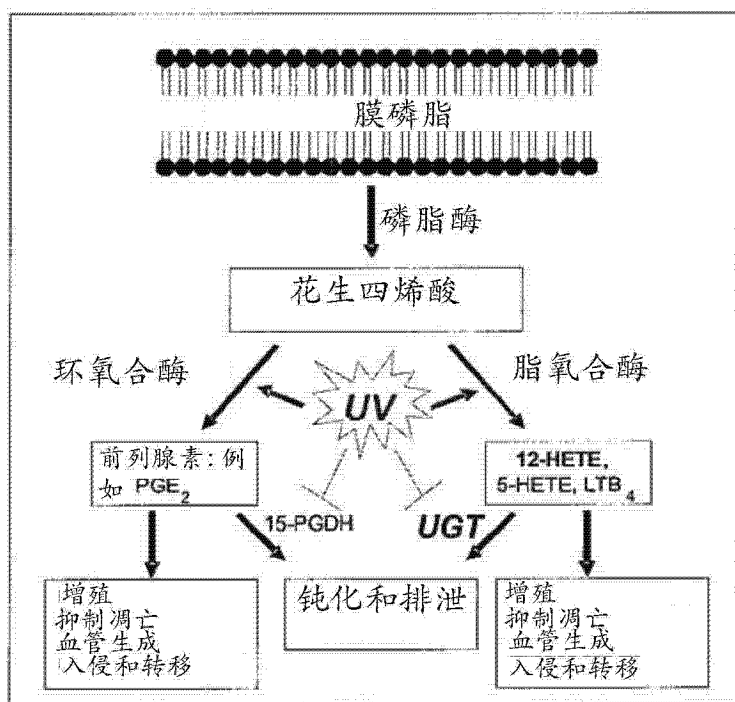


图 1

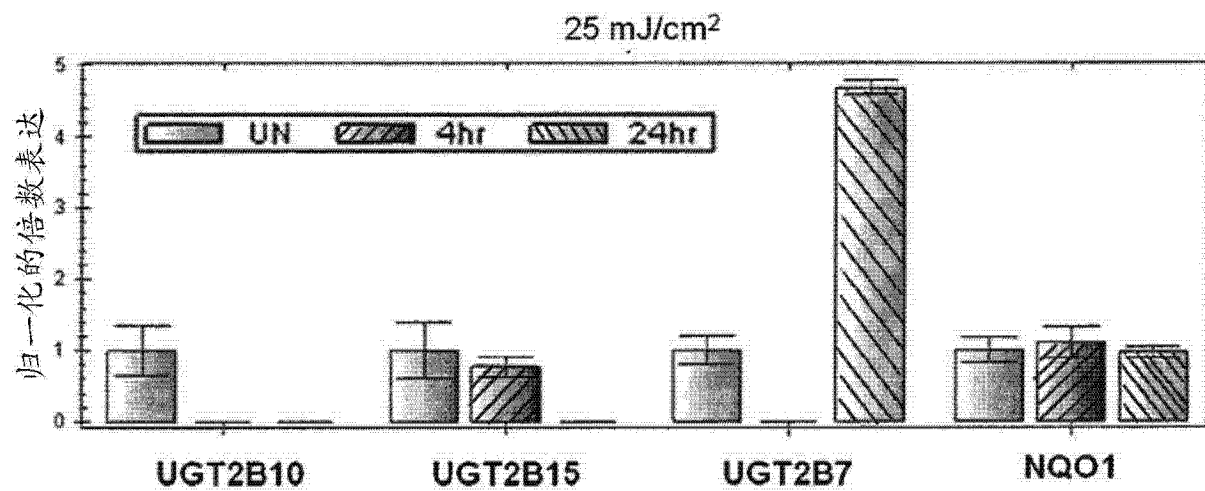


图 2

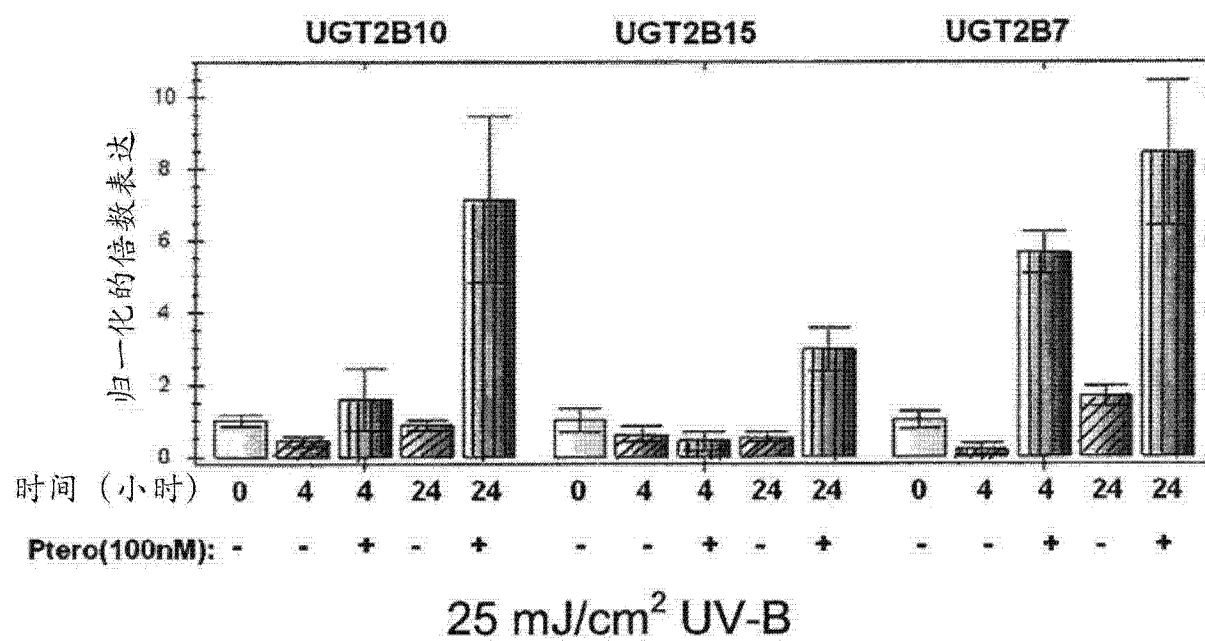


图 3



图 4

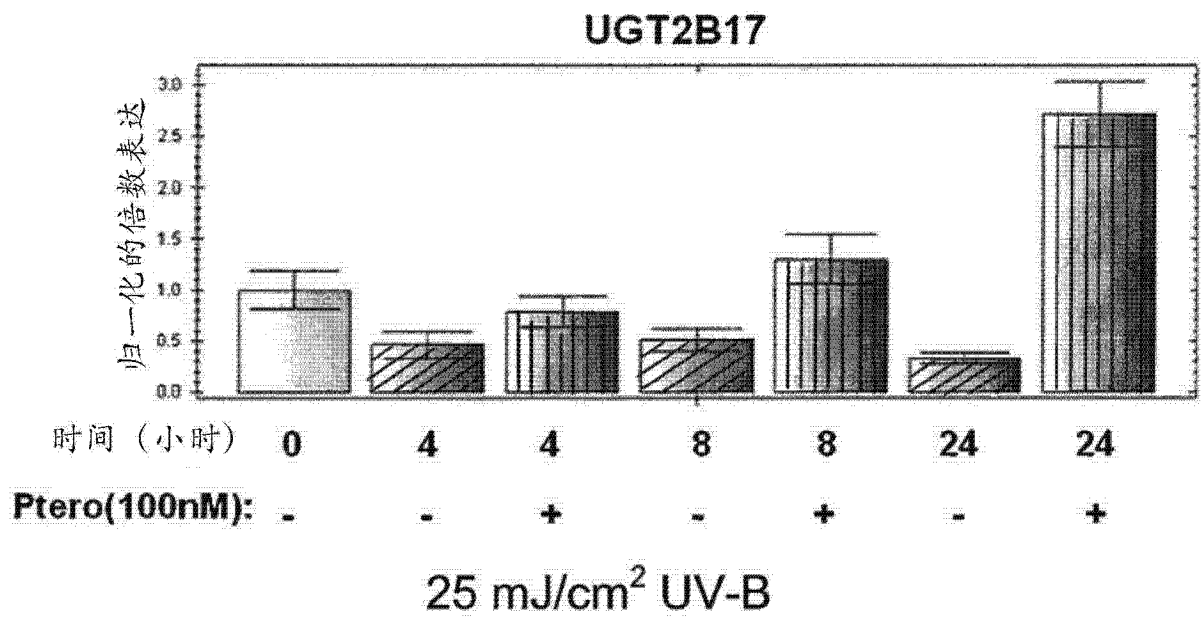


图 5

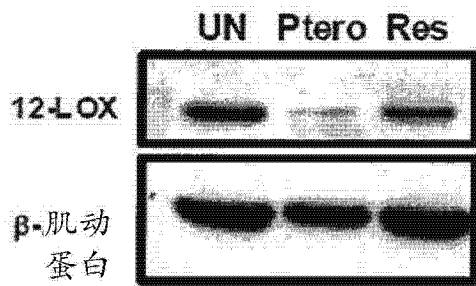


图 6

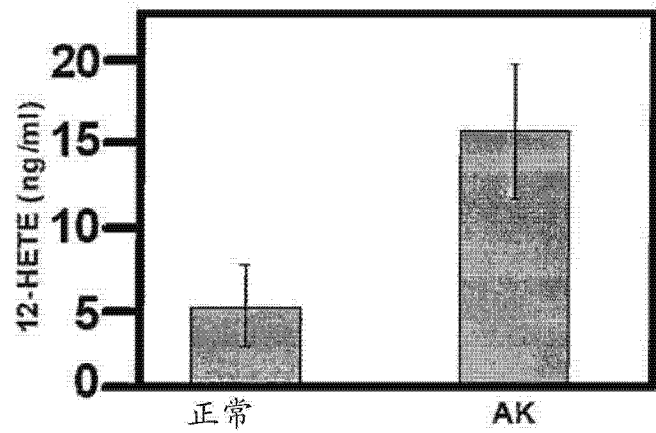


图 7