



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115645388 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 10

(21) 申请号 202211258479.X

(22) 申请日 2017.10.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115645388 A

(43) 申请公布日 2023.01.31

(30) 优先权数据
62/403,965 2016.10.04 US
62/421,443 2016.11.14 US

(62) 分案原申请数据
201780074351.9 2017.10.04

(73) 专利权人 佛罗里达大学研究基金会公司
地址 美国佛罗里达州
专利权人 恩特林斯科有限责任公司

(72) 发明人 S·维德亚瑟格 R·古普塔
L·尹 A·格罗舍

P·G·奥库尼夫 S·加托
D·丹尼森

(74) 专利代理机构 北京市联德律师事务所
11361

专利代理师 黄大正 张来光

(51) Int.Cl.
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105120856 A, 2015.12.02

审查员 邓丽娟

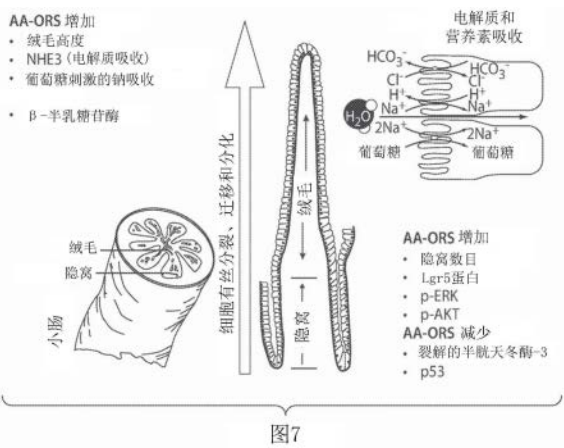
权利要求书2页 说明书41页 附图29页

(54) 发明名称

氨基酸组合物及其用途

(57) 摘要

本公开提供了用于促进干细胞和/或祖细胞增殖和/或分化的组合物和方法。提供的组合物可用于治疗有需要的受试者中与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),与改善粘膜屏障功能相关的病症和/或治疗GI粘膜损伤。本公开还提供了通过施用组合物促进需要这种治疗的受试者中干细胞和/或祖细胞的增殖和/或分化的方法。在体内、离体和/或体外刺激干细胞和/或祖细胞的增殖和/或分化的能力提供了巨大的益处。本公开可用于在体内、离体和/或体外增加干细胞群。干细胞移植提供对许多疾病状态、退化和/或损伤的治疗和/或治愈。



1. 一种制剂,其中所述制剂包含:
治疗有效的游离氨基酸组合,其中所述治疗有效的游离氨基酸组合由如下组成:
治疗有效量的苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、丝氨酸和天冬氨酸的游离氨基酸;
其中所述制剂被制备用于口服施用。
2. 一种制剂,其中所述制剂包含:
治疗有效的游离氨基酸组合,其中所述治疗有效的游离氨基酸组合由治疗有效量的苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、丝氨酸和色氨酸的游离氨基酸组成:
其中所述制剂被制备用于吸入疗法。
3. 根据权利要求1或2所述的制剂,其中
 - (i) 所述治疗有效量的苏氨酸的浓度范围是0.4g/L至1.5g/L或0.7g/L至1.3g/L;
 - (ii) 所述治疗有效量的缬氨酸的浓度范围是0.7g/L至1.7g/L或0.9g/L至1.5g/L;
 - (iii) 所述治疗有效量的酪氨酸的浓度范围是0.05g/L至0.4g/L;
 - (iv) 所述治疗有效量的丝氨酸的浓度范围是0.6g/L至1.6g/L或0.8g/L至1.4g/L;
 - (v) 当存在时,所述治疗有效量的色氨酸的浓度范围是1.1g/L至2.1g/L或1.3g/L至1.9g/L;或
 - (i) 至 (v) 的任意组合。
4. 根据权利要求1或2所述的制剂,其中
 - (i) 所述治疗有效量的苏氨酸的浓度范围是0.9g/L至1.1g/L;
 - (ii) 所述治疗有效量的缬氨酸的浓度范围是1.1g/L至1.3g/L;
 - (iii) 所述治疗有效量的酪氨酸的浓度范围是0.1g/L至0.3g/L;
 - (iv) 所述治疗有效量的丝氨酸的浓度范围是1.0g/L至1.2g/L;
 - (v) 当存在时,所述治疗有效量的色氨酸的浓度范围是1.5g/L至1.7g/L;或
 - (i) 至 (v) 的任意组合。
5. 根据权利要求1或2所述的制剂,其中
 - (i) 所述治疗有效量的苏氨酸的浓度范围是1.0g/L;
 - (ii) 所述治疗有效量的缬氨酸的浓度范围是1.2g/L;
 - (iii) 所述治疗有效量的酪氨酸的浓度范围是0.2g/L;或
 - (iv) 当存在时,所述治疗有效量的色氨酸的浓度范围是1.6g/L;或
 - (i) 至 (iv) 的任意组合。
6. 根据权利要求1或2所述的制剂,其中
所述治疗有效量的苏氨酸是8mM,
所述治疗有效量的缬氨酸是10mM,
所述治疗有效量的酪氨酸是1.2mM,
当存在时,所述治疗有效量的色氨酸是8mM,
当存在时,所述治疗有效量的天冬氨酸是8mM,并且
所述治疗有效量的丝氨酸是10mM。
7. 根据权利要求1或2所述的制剂,其中
所述游离氨基酸中的至少一种或所述游离氨基酸中的每种是L型氨基酸。
8. 根据权利要求1或2所述的制剂,其中

所述制剂还包含药学上可接受的载体、缓冲剂、佐剂或赋形剂。

9. 根据权利要求1或2所述的制剂, 其中
所述制剂还包含水。

10. 根据权利要求1或2所述的制剂, 其中
所述制剂是无菌的。

11. 根据权利要求1或2所述的制剂, 其中
所述制剂是药物制剂。

12. 根据权利要求2所述的制剂, 其中
所述制剂被配制用于肺部施用。

13. 根据权利要求2所述的制剂, 其中
所述制剂被配制用于鼻内施用。

14. 根据权利要求1或2所述的制剂, 其中
所述制剂用于治疗有需要的受试者的哮喘, 并且所述受试者是哺乳动物。

15. 根据权利要求14所述的制剂, 其中
所述受试者是人、猫、狗、猪、马、牛、绵羊或山羊。

氨基酸组合物及其用途

[0001] 分案信息

[0002] 本申请是2017年10月4日递交的申请号为201780074351.9、发明名称为“氨基酸组合物及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请要求2016年10月4日提交的美国临时申请U.S.S.N.62/403,965和2016年11月14日提交的美国临时申请U.S.S.N.62/421,443的35U.S.C.§119(e)下的优先权,其中的每一个都通过引用并入本文。

背景技术

[0005] 人肠上皮细胞由功能性地位于肠隐窝下部中的固定干细胞群生成,所述固定干细胞群在小鼠中包括快速循环的隐窝基底柱状细胞(CBC)和潘氏细胞上方的更静止的“+4”细胞。¹⁴⁻¹⁶这些干细胞产生吸收性肠细胞(enterocyte)、粘液细胞、潘氏细胞和肠内分泌细胞。¹⁷当细胞向上移动至绒毛(吸收性细胞、粘液细胞和内分泌细胞)或向下集中在隐窝底部处(潘氏细胞)时发生每种细胞类型的分化。与这些复杂事件有关的多种机制尚未完全了解。

[0006] 辐射和/或化疗可对胃肠(GI)道的衬里(lining)造成严重损害。中等至高剂量的辐射和/或化疗导致具有克隆形成潜力(clonogenic potential)的细胞的破坏,所述细胞对于在正常增殖、成熟和分化过程中从绒毛顶部脱落的细胞的连续替换是必需的。

[0007] 辐射暴露和/或化疗对胃肠道系统的毒性作用引起症状,比如恶心、呕吐、腹泻、电解质紊乱和脱水,并且在癌症治疗过程中对患者的健康产生不利影响。辐射暴露影响在粘膜下隐窝中经历快速有丝分裂的肠上皮细胞。在治疗性辐射暴露中,胃肠毒性往往成为治疗的剂量限制因素并且可能影响患者的生活质量。治疗性化合物和支持性护理通常用于最小化毒性,但这些方法并不完全有效。

[0008] 人们越来越关注研发针对在癌症患者和辐射灾难的受害者中的短期和长期GI毒性的缓解剂。^{5, 15, 34, 37}只有两种FDA批准的药剂; **Neupogen®** (优保津®)和 **Pegfilgrastim** (培非格司亭,粒细胞集落刺激因子)是目前可用于治疗辐射综合征的两种FDA批准的医疗对策。两者都用于提高暴露于骨髓抑制剂量的辐射的患者的存活。然而,没有专门解决胃肠毒性的药剂。GI毒性的治疗主要是针对症状的,其中止泻药用于防止液体损失,蒙脱石用于吸收胆盐,阿片类药物用于缓解胃或直肠疼痛,类固醇用于缓解炎症,并且在极端情况下肠胃外饲法(parenteral feeding)用于纠正营养素和电解质的吸收不良。可以潜在地用于缓解GI毒性的其他药剂是:1)他汀类药物和/或血管紧张素转换酶,这些药剂已经被发现当在根治性(radical)盆腔放疗期间使用时通过其抗炎、抗纤维化和抗血栓形成作用而有效;2)抗氧化剂比如维生素E和/或硒;3)替度鲁肽(teduglutide),它是一种必须在辐射之前给予的胰高血糖素样肽-2类似物;4)硫糖铝,它是有助于上皮愈合但尚未证实对辐射诱发的GI毒性有用的高度硫酸化的聚阴离子二糖;5)氮氧自由基(nitroxide)比如羟胺(tempol),它通过其抗氧化剂特性起作用;6)二硫醇硫酮(dithiolthione) (奥替普拉(Oltipraz)),其通过增加细胞中的巯基起作用;7)异黄酮(染料木素(genistein)),它

是一种酪氨酸激酶抑制剂和抗氧化剂;8)Cox抑制剂(塞来昔布(celecoxib),阿司匹林),其通过增加Cox2活性和前列腺素合成起作用;和8) 益生菌,它是一种含有大量活的且轮廓分明的(well defined)微生物的制剂,其用于改变宿主微生物区系并且可能对辐射诱发的GI毒性具有一些作用,⁵(Stacey,R.& Green,J.T.Radiation-induced small bowel disease:latest developments and clinical guidance.Ther.Adv.Chronic Disease,5, 15-29,doi:10.1177/2040622313510730(2014))。

[0009] 隐窝到绒毛的迁移需要5-7天。因此,胃肠毒性在辐射暴露和/或化疗后第一周表现出来,并且是癌症治疗中最重要的剂量限制因素。即使在低剂量下,在辐照和/或化疗后几天内也观察到小肠的绒毛和刷状缘的连续丧失。虽然隐窝细胞可以在轻度至中等剂量的辐照和/或化疗后快速重建(repopulate)该区域,但是在高剂量下的辐照和/或化疗后它们以对数速率损失。

[0010] 辐照和/或化疗对进行营养素和电解质吸收的绒毛上皮特别具有破坏性。绒毛上皮经历连续的细胞损失和再生过程,其中不断供应的起源自位于李氏隐窝(crypt of Lieberkuhn)的下极(lower pole)内的祖细胞的不成熟肠细胞从隐窝基底处的增殖隔室中迁移出至绒毛的顶部。在它们短暂的寿命中,这些肠细胞沿着隐窝-绒毛轴(crypt villous axis)逐步成熟为绒毛细胞。辐射和/或化疗不仅破坏已有的绒毛细胞,而且破坏形成新绒毛细胞的干细胞和/或祖细胞,因此即使在中等剂量下也可以耗尽(deplete)几乎整个绒毛上皮。

[0011] 成熟和分化的绒毛细胞参与继发于钠、氯(chloride)和营养素吸收的液体吸收,而位于隐窝中的分化程度较低的未成熟上皮细胞主要参与氯(Cl⁻)分泌和液体损失。缺乏吸收性绒毛上皮细胞导致吸收不良状态,其中未吸收的营养素、电解质和水被倾倒至GI道的远段,从而导致恶心、呕吐和腹泻。

[0012] 通过原位细胞的增殖和/或经由祖细胞的循环从远端位点潜在迁移至组织中而进行的干细胞介导的绒毛细胞的重建与在组织水平上从急性辐照和/或化疗作用恢复有关。¹¹⁻¹³因此,隐窝干细胞或绒毛内皮细胞的损失被认为与辐射和/或化疗诱发的肠损害有关。

[0013] 对GI道的损害不仅导致吸收不良以及营养素、矿物质和液体的损失,而且还破坏肠屏障功能。肠漏症允许病原体和其他抗原物质从食物容易地进入全身隔室,穿过粘膜屏障,从而导致炎症、菌血症和内毒素血症。例如,即使剂量低至5-12Gy(辐射的常规分级过程使用每级分1.8-2Gy),可在辐照后几天内发展出急性放射性肠炎、腹泻和腹痛,但是GI毒性通常发生在更高剂量。可在放疗后18个月和6年之间,然而甚至可能在15年后发展出慢性放射性肠炎。²⁷⁻²⁹

[0014] 放射性和/或化疗性肠炎的治疗选择是有限的。常规治疗方案包括施用止泻药以防止液体损失,施用蒙脱石作为胆盐吸附剂,施用阿片类药物以缓解胃或直肠疼痛和施用类固醇以缓解炎症。

[0015] 放射性和/或化疗性肠炎的治疗中的常用方法是使用完全肠胃外营养(TPN)来提供肠道休息;然而,肠胃外营养是否满足患者的营养需求,或实际上对辐射和/或化疗诱发的肠炎是否具有治疗作用仍有待确定。虽然TPN可以纠正某些患者的营养不平衡,但仍可能发展出重度的辐射和/或化疗诱发的肠炎。³⁷TPN也会导致肠萎缩,通常在施用的48小时内发生。TPN还削弱了机械和免疫屏障。³⁸

[0016] 美国专利号8,993,522中使用的制剂通过如下方式起作用:经由氨基酸偶联的钠转运纠正再水化,通过选择具有抗分泌特性的一组氨基酸减少来自隐窝的阴离子分泌,并且通过使用被证明能收紧粘膜屏障的氨基酸收紧粘膜。

[0017] 需要改进的组合物,其用于治疗继发于增殖干细胞和/或祖细胞的损失的辐照和/或化疗诱发的GI损伤。还需要如下组合物,其用于在有需要的受试者中治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤。

发明内容

[0018] 本文描述了用于治疗GI、肺和皮肤障碍的氨基酸组合物。在一个方面,本公开提供了用于促进细胞存活、增殖、迁移、成熟和/或细胞分化的组合物和方法。在某些实施方案中,本公开提供了用于促进干细胞和/或祖细胞存活、增殖和/或发育的组合物和方法。细胞发育可包括例如迁移、成熟和/或分化。本公开还提供了用于在有需要的受试者中治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤的组合物和方法。

[0019] 该细胞增殖和/或发育可用于改善位于体内各种器官系统和部位的干细胞和祖细胞的增殖和功能。干细胞和/或祖细胞可以例如在小肠中或来自其他组织,包括但不限于皮肤、骨髓、肺、神经元、胰腺、肌肉、骨骼组织、血管内皮细胞和角膜上皮细胞。干细胞和/或祖细胞可以是成体干细胞、胚胎干细胞或肿瘤干细胞。在一个实施方案中,可用于治疗本文所述病症的组合物包含选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的一种或多种游离氨基酸;和任选地可接受的载体。

[0020] 在某些实施方案中,本公开的组合物不包含选自由赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺组成的组的一种或多种氨基酸。在某些实施方案中,该组合物不包含赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在另一个特定的实施方案中,该组合物不包含或仅包含可忽略量的丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,该组合物不包含谷氨酰胺和/或甲硫氨酸;和可以水解成谷氨酰胺和/或甲硫氨酸的任何二肽、寡肽或多肽或蛋白质。在某些实施方案中,该组合物不包含甲硫氨酸。

[0021] 或者,在某些实施方案中,即使这些氨基酸存在于组合物中,它们也是以不会抑制干细胞和/或祖细胞存活、增殖和/或发育的量存在。在一些实施方案中,该组合物不包含丝氨酸。在一些实施方案中,该组合物不包含半胱氨酸。在某些实施方案中,即使这些氨基酸存在于该组合物中,它们的存在量不会影响治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤。

[0022] 如果存在于组合物中,这些氨基酸可以例如以下列浓度存在:苏氨酸为约0.4至约1.5、约0.7至约1.3、或约0.9至约1.1克/升;缬氨酸为约0.7至约1.7、约0.9至约1.5、或约1.1至约1.3克/升;丝氨酸为约0.6至约1.6、约0.8至约1.4、约1.0至约1.2克/升;酪氨酸为约0.05至约0.4、或约0.1至约0.3克/升;并且色氨酸为约1.1至约2.1、约1.3至约1.9、或约1.5至约1.7克/升。在某些实施方案中,该浓度是克氨基酸/升溶液。在某些实施方案中,该

溶液包含水。在某种实施方案中,该治疗性组合物包含苏氨酸(约1.0g/L)、缬氨酸(约1.2g/L)、丝氨酸(约1.1g/L)、酪氨酸(约0.2g/L)和色氨酸(约1.6g/L)。在一个实施方案中,该组合物不包含丝氨酸。在一些实施方案中,该组合物不包含甲硫氨酸。在一些实施方案中,该组合物不包含半胱氨酸。

[0023] 在某些实施方案中,该组合物的总摩尔渗透压浓度为约100mosm至约280mosm或约150至约280mosm。

[0024] 该组合物可具有例如约2.5至约8.5的pH。在某些实施方案中,该组合物的pH为约2.5至约6.5、约3.0至约6.0、约3.5至约5.5、约3.9至约5.0或约4.2至约4.6。在其他实施方案中,pH为约6.5至约8.5、约7.0至约8.0或约7.2至约7.8。

[0025] 在某些实施方案中,该组合物以溶液或饮料、粉末、丸剂、凝胶、乳膏、软膏的形式、作为基质的一部分施用或在绷带上施用。在某些实施方案中,该组合物作为基质递送系统的一部分施用。

[0026] 该组合物可以全身或局部施用。在某些实施方案中,该组合物用于促进离体或体外细胞存活、增殖和/或发育。在某些实施方案中,该组合物用于治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤。

[0027] 在某些实施方案中,该组合物还包含添加剂(例如,营养素、电解质、维生素、矿物质等)。

[0028] 不希望受任何特定理论的束缚,认为该组合物和方法可预防DNA损害,并且因此可用于预防对DNA的损害和/或修复受损DNA。在另一个实施方案中,该组合物和方法通过预防对DNA的损害和/或修复受损DNA来促进干细胞的存活、增殖和发育。

[0029] 在另一个方面,本公开提供了治疗有需要的受试者中的肺障碍的方法。在另一个方面,本公开提供了用于在有需要的受试者中改善肺愈合、减少肺炎、降低气道阻力和/或改善肺功能的组合物和方法。在某些实施方案中,肺病症是肺损伤、肺炎或哮喘。在某些实施方案中,肺病症与增加的气道阻力有关。在某些实施方案中,肺病症与降低的屏障功能有关。在某些实施方案中,该组合物全身施用或经由吸入施用。在某些实施方案中,该组合物和方法可用于例如在辐射暴露和/或化疗后改善肺愈合、减少肺炎、降低气道阻力和改善肺功能。

[0030] 在另一个实施方案中,本公开的组合物和方法用于治疗例如由药物、病毒、细菌、毒素、化学物质或维生素缺乏引起的骨髓抑制。例如,在某些实施方案中,该组合物和方法用于治疗患有例如由登革热病毒感染引起的低血小板计数(血小板减少症)的患者。

[0031] 在另一个方面,本公开提供了治疗GI障碍或GI道障碍(例如,辐射损伤、缺血性结肠炎、感染、创伤)或与粘膜屏障功能和/或完整性有关的任何其他病症的方法。在某些实施方案中,提供了治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症的方法。在某些实施方案中,与粘膜屏障功能相关的疾病或病症是粘膜屏障的功能障碍。在某些实施方案中,与粘膜屏障功能相关的疾病或病症的治疗是在有需要的受试者中的伤口愈合、治疗GI粘膜的损伤。在某些实施方案中,提供了治疗有需要的受试者中的GI粘膜损伤的方法。在某些实施方案中,GI粘膜是小肠粘膜。在某些实施方案中,该组合物用于手术(例如,肠手术)后的治疗。在某些实施方案中,该组合物用于治疗将导致肠缺血的任何疾病或病症,包括例如低血压、休克、血

栓形成、肠梗阻等。

[0032] 可用于治疗放射性肠炎的一种组合物是美国专利号8,993,522中描述的基于氨基酸的口服再水化溶液(AA-ORS),其通过引用并入本文。AA-ORS是用于改善小肠健康的组合物,其中该组合物被配制用于肠内施用并且包含作为游离氨基酸的苏氨酸、缬氨酸、色氨酸、丝氨酸和酪氨酸;和水;其中该组合物不包含游离氨基酸谷氨酰胺或含谷氨酰胺的二肽,或者如果存在游离氨基酸谷氨酰胺和/或含谷氨酰胺的二肽,则该游离氨基酸谷氨酰胺和该含谷氨酰胺的二肽的总浓度小于50mg/L;其中该组合物不包含葡萄糖,或者如果存在葡萄糖,则葡萄糖的浓度小于1g/L;并且其中该组合物不包含游离氨基酸甲硫氨酸或含甲硫氨酸的肽、任选的赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和/或异亮氨酸,和任选地电解质、维生素、矿物质和/或调味剂。

[0033] 在另一个方面,本公开提供了治疗有需要的受试者中的皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病或与皮肤老化有关的病症)的方法,该方法包括向该受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,该皮肤病症是特应性皮炎、银屑病、皮肤老化、与皮肤老化有关的病症或褥疮。在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于美容应用,其中例如需要使皮肤各层和/或下层组织复壮。

[0034] 定义

[0035] 术语“改善皮肤病症”或“治疗皮肤病症”包括预防性地防止或治疗性地治疗皮肤病症,并且可以涉及以下一种或多种益处:皮肤增厚、防止皮肤弹性丧失和减少线条或皱纹。

[0036] 如本文所用,术语“表皮”或“表皮的”是指皮肤的最外层。

[0037] 如本文所用,术语“外部施加”意指将本发明的组合物施加或涂抹在表皮组织的表面上。

[0038] 如本文所用,术语“皮肤病学上可接受的”意指如此描述的组合物或其组分适合用于与哺乳动物表皮组织接触而没有过度毒性、不相容性、不稳定性、过敏反应等。

[0039] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指足以诱发积极益处的化合物或组合物的量,优选积极的(positive)皮肤外观和/或感觉。根据本公开,该治疗有效量是调节和/或改善皮肤的单独的或与其他药剂组合的氨基酸的量。

[0040] 如本文所用,术语“改善”或其任何语法变体(例如,“ameliorate”、“ameliorating”和“amelioration”等)包括但不限于延迟疾病或病症的发作或降低疾病或病症的严重程度。如本文所用,改善不需要完全没有症状。

[0041] 如本文所用,术语“有效量”或“显著量”是指能够治疗或改善疾病或病症或以其他方式能够产生预期治疗效果的量。

[0042] 术语“健康功能性食品”是指使用具有对人体有用功能的原料或成分制备或加工成片剂、胶囊、粉末、颗粒、液体、丸剂或任何其他形式的食品。

[0043] 术语“功能性”意指对人类健康的有用效果,比如营养素的结构或功能调节、免疫系统、炎症、液体平衡、生理作用等。

[0044] 术语“载体”是指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。合适的药物载体的例子描述于E.W.Martin的“雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”中。

[0045] 如本文所用,术语“治疗”或其任何语法变体(例如,“treat”、“treating”和“treatment”等)包括但不限于减轻疾病或病症的症状;和/或减少、压制、抑制、减轻或影响疾病或病症的进展、严重程度和/或范围。

[0046] 如本文所用,术语“基本上由……组成”将成分和步骤的范围限制于指定的材料或步骤和那些不会实质上影响本发明的一种或多种基本和新颖特征(即,用于促进干细胞发育的组合物和方法)的材料或步骤。

附图说明

[0047] 图1A至图1B示出了辐照后AA-ORS增加的隐窝计数和绒毛长度。生理盐水(盐水)用作对照;通过胃饲给予盐水和AA-ORS。每个治疗或未治疗的辐射组中6只小鼠(0、1、3、5、6、7、9、13和15Gy)。图1A示出了显示AA-ORS对隐窝计数的影响的半对数存活曲线。AA-ORS使图形向左移位。使用单命中(single-hit)多靶点(multiple-target)细胞存活模型对隐窝存活曲线建模以评估生物效应。使用方程式 $[S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n]$ 计算辐射后隐窝中有丝分裂细胞的存活概率。 S 表示在每种辐射剂量中存活的隐窝中的有丝分裂细胞的分数的, D 表示辐射剂量; D_0 表示隐窝生殖单位的固有辐射抗性的量度。经盐水治疗的小鼠和经AA-ORS治疗的小鼠的 D_q 值分别用黑色箭头和灰色箭头表示。 D_q 由公式 $D_q = D_0 \ln n$ 计算。在不限定恒定细胞敏感性的情况下, N 值为 10.4 ± 0.2 和 5.3 ± 0.1 ($P < 0.001$),这表明与对照相比每个圆周(circumference)的祖细胞单位(progenitor unit)几乎加倍。当限制恒定的 D_0 (4.8 ± 0.1 Gy)时,在 8.8 ± 0.4 至 6.1 ± 0.3 时差异仍然显著 ($P < 0.001$)。图1B示出了在经辐照的小鼠中使用盐水和AA-ORS治疗后的绒毛高度。与接受盐水作为治疗的小鼠相比,经AA-ORS治疗的小鼠的绒毛高度显著增加。计算每个圆周的隐窝,并由从回肠获得的10个切片测量绒毛长度。示出了每组6只小鼠的平均值 $\pm$ S.E.M数据。*表示统计上显著的差异 ($P < 0.01$)。使用生理盐水(盐水)作为对照,并通过胃饲给予盐水和AA-ORS二者。

[0048] 图2A示出了纵向回肠切片的共聚焦显微镜检查,其中沿着绒毛长度具有显著染色的上皮细胞。使用5- μ m厚的石蜡包埋组织。将细胞核用DAPI(深灰色)染色,并且将Edu阳性上皮细胞染成浅灰色。使用Image Pro Plus软件测量Edu阳性细胞沿着绒毛高度迁移的距离。条(bar)-50 μ m。计数每个组织切片的至少五个取向良好的绒毛,并将结果取平均值。在5Gy辐照的组织中看到Edu阳性细胞一直到绒毛的尖端,但在经AA-ORS治疗的小鼠中没有看到。

[0049] 图2B示出了在72小时测量的Edu阳性细胞迁移距离。与0Gy相比,5Gy辐照的经盐水治疗的小鼠具有显著降低的细胞迁移距离(黑色条);当与未辐照和辐照的经盐水治疗的小鼠相比时,经AA-ORS治疗的小鼠具有增加的迁移距离。值为每组6只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0050] 图3A至图3B示出了使用 ^{22}Na 和 ^{36}Cl 的尤斯室(Ussing chamber)通量研究,其显示了AA-ORS对钠和氯吸收的影响。AA-ORS在0Gy和5Gy辐照组织($n=8$)中增加净钠($J_{\text{net}}\text{Na}$)和氯($J_{\text{net}}\text{Cl}$)吸收。

[0051] 图3C是免疫组织化学,其显示沿着绒毛上皮细胞的刷状缘膜(BBM)(白色箭头)的NHE3表达(浅灰色)的放大视图。使用5- μ m厚的石蜡包埋组织。将细胞核用DAPI(深灰色)染色。使用至少五个取向良好的绒毛。

[0052] 图3D示出了NHE3蛋白的蛋白质印迹分析。

[0053] 图3E示出了在0或5Gy辐照后经盐水(黑色条)或AA-ORS(阴影条)治疗的小鼠的肠组织中的NHE3蛋白密度的图示。免疫印迹重复四次。值为来自 $n=4$ 的平均值 $\pm$ SEM;*表示与经盐水治疗的动物相比的统计上显著差异($P<0.05$)。

[0054] 图3F示出了在0或5Gy辐照后经盐水(黑色条)或AA-ORS(阴影条)治疗的小鼠的肠组织中的NHE3转录物水平。值为来自 $n=6$ 的平均值 $\pm$ SEM;*表示与经盐水治疗的动物相比统计上的显著差异($P<0.05$)。给予盐水或AA-ORS持续6天。

[0055] 图4A至图4D示出了葡萄糖刺激的钠吸收和SGLT1蛋白水平:(4A)使用 ^{22}Na 的室通量研究,其显示AA-ORS对葡萄糖偶联的钠吸收的影响。AA-ORS治疗增加5Gy辐照组织中的JnetNa吸收($n=8$)。(4B)对于SGLT1蛋白和 β -半乳糖苷酶的蛋白质印迹分析显示在0Gy和5Gy小鼠的绒毛细胞中用AA-ORS治疗增加蛋白质水平。免疫印迹重复四次。(4C)对于蛋白质印记分析的归一化SGLT1蛋白水平。与5Gy小鼠相比,在用AA-ORS治疗的5Gy辐照小鼠中观察到SGLT1蛋白水平的显著差异。(4D)在0或5Gy辐照后经盐水(黑色条)或AA-ORS(阴影条)治疗的小鼠的肠组织中的SGLT1转录物水平。值为来自 $n=6$ 的平均值 $\pm$ SEM;*表示与经盐水治疗的动物相比的统计上显著差异($P<0.05$)。给予盐水或AA-ORS持续6天。

[0056] 图5A至图5G示出了0和5Gy辐照后经生理盐水和AA-ORS治疗的小鼠的绒毛上皮细胞中Lgr5、BMI1、p-AKT、AKT、p-ERK和ERK的蛋白质水平和mRNA表达。图5H示出了Lgr5、BMI1、p-AKT、AKT、p-ERK和ERK的蛋白质印迹分析。免疫印迹重复至少四次,并且q-PCR重复至少6次。(5A)干细胞和增殖标志物(Lgr5、BMI1、p-AKT、AKT、p-ERK、ERK和PCNA)的蛋白质印迹分析。使用考马斯蓝着色剂将感兴趣的蛋白质条带归一化为每个泳道中蛋白质的总量。(5B)凋亡蛋白(Bcl2、Bax、裂解的半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-3和p53)的蛋白质印迹分析。(5C)经盐水或AA-ORS治疗和0Gy或5Gy辐照的小鼠中的Lgr5 mRNA水平。(5D)经盐水或AA-ORS治疗和0Gy或5Gy辐照的小鼠中BMI1 mRNA水平的变化。(5E)经盐水或AA-ORS治疗和0Gy或5Gy辐照的小鼠中ERK mRNA水平的变化。(5F)经盐水或AA-ORS治疗和0Gy或5Gy辐照的小鼠中AKT mRNA水平的变化。(5G)半胱天冬酶-3的mRNA表达。值为来自一式三份重复的 $n=6$ 个不同小鼠的平均值 $\pm$ SEM。与盐水对照相比, # $P<0.05$ 并且* $P<0.001$ 。(5H) Lgr5、BMI1、p-AKT、AKT、p-ERK和ERK的蛋白质印迹分析。使用丽春红S(Ponsceau S)着色剂将感兴趣的蛋白质条带归一化为每个泳道中蛋白质的总量。

[0057] 图6A至图6G示出了在用盐水(顶部)或AA-ORS(底部)治疗后0Gy(左)和5Gy(右)的回肠粘膜内Lgr5⁺、Ki-67⁺和PCNA⁺细胞分布的代表性显微照片。(6A) Lgr5的免疫染色:在隐窝的下部1/3处观察到Lgr5⁺细胞。用5Gy辐照的小鼠导致回肠隐窝中Lgr5⁺干细胞显著减少,并且AA-ORS增加Lgr5⁺干细胞。比例尺表示25 μm 。(6B) 隐窝中表示的平均Lgr5⁺平均数目。误差条表示S.E.M.。(6C) Ki-67的免疫染色:当与经盐水治疗的组相比时,在用AA-ORS治疗的0Gy辐射小鼠中表达Ki-67的细胞(增殖标志物)的数目没有显示出显著差异。在采用AA-ORS治疗的情况下,5Gy辐照小鼠显示出Ki-67⁺细胞的显著增加。比例尺表示100 μm 。(6D) 隐窝和/或绒毛细胞中表达Ki-67的细胞的平均数目。误差条表示S.E.M.。(6E) PCNA的免疫染色:PCNA⁺细胞的数目和分布。5Gy辐照后小鼠中PCNA⁺细胞减少,但在AA-ORS治疗的情况下增加。比例尺表示100 μm 。(6F) 隐窝和/或绒毛细胞中表达PCNA的细胞的平均数目。误差条表示S.E.M.。(6G) 在0和5Gy辐照小鼠后,用生理盐水和AA-ORS治疗的小鼠的绒毛上皮细胞中裂解的半胱天冬酶3、总半胱天冬酶3和p53的蛋白质水平和mRNA表达。免疫印迹重复至少四次

并且q-PCR重复至少6次。对裂解的半胱天冬酶3、总半胱天冬酶3和p53进行蛋白质印迹分析。使用丽春红S着色剂和 β 肌动蛋白将感兴趣的蛋白质条带针对每个泳道中蛋白质的总量归一化。

[0058] 图7示出了小肠绒毛和肠细胞的示意图:AA-ORS治疗迅速增加了Lgr5阳性的分裂干细胞,以及增殖标志物p-ERK、p-AKT和PCNA。该治疗还增加了裂解的半胱天冬酶3、p53和Bcl-2。AA-ORS治疗增加了绒毛高度,增加了NHE3、SGLT1和 β -半乳糖苷酶的表达,从而分别增加了电解质吸收、钠偶联的葡萄糖吸收和刷状缘膜处的二糖分解。右上方的肠上皮细胞卡通图像示出了在AA-ORS的情况下NHE3介导的 Na^+ 吸收和葡萄糖偶联的钠转运的功能性改善。

[0059] 图8示出了蛋白质密度。将蛋白质密度归一化为 β -肌动蛋白。在0或5Gy辐照之后,用盐水治疗的小鼠显示为黑色条,并且用AA-ORS治疗的小鼠显示为阴影条。值为来自一式三份重复的 $n=4$ 个不同小鼠的平均值 $\pm$ SEM。与盐水对照相比, $\#P<0.05$ 。(图8A) Lgr5蛋白;(8B) Bmi1蛋白;(8C) p-ERK蛋白;(8D) p-AKT蛋白;(8E) AKT蛋白;(8F) 半胱天冬酶-3蛋白(归一化为 β -肌动蛋白)。

[0060] 图9A示出了蛋白质印记分析结果,其显示使用缬氨酸的胃饲增加0Gy辐照小鼠和5Gy辐照小鼠中的Lgr5蛋白水平。图9B示出了用缬氨酸治疗6天时间的小鼠中Lgr5蛋白的蛋白质水平的图示。对于图9至图13,数据来自用单独氨基酸(图9(缬氨酸);图10(色氨酸);图11(丝氨酸);图12(酪氨酸);图13(苏氨酸))治疗(如通过胃饲(300 μ l 0D)持续6天时间)的雄性NIH Swiss小鼠(8周)。在第6天通过CO₂安乐死处死动物,收集组织用于通过蛋白质印记分析解析蛋白质。Lgr5(100KD)用作隐窝干细胞增殖的标志物。这些实验从4只不同的小鼠重复至少4次(所示数据)。

[0061] 图10A示出了在色氨酸治疗6天时间的情况下Lgr5蛋白水平的变化。图10B示出了在用色氨酸治疗6天时间的小鼠中Lgr5蛋白水平的图示。

[0062] 图11A示出了在丝氨酸治疗6天时间的情况下Lgr5蛋白水平的变化。图11B示出了在用丝氨酸治疗6天时间的小鼠中Lgr5蛋白水平的图示。

[0063] 图12A示出了在酪氨酸治疗6天时间的情况下Lgr5蛋白水平的变化。图12B示出了在用酪氨酸治疗6天时间的小鼠中Lgr5蛋白水平的图示。

[0064] 图13示出了在苏氨酸治疗6天时间的情况下Lgr5蛋白水平的变化。

[0065] 图14至图20示出了在绵羊模型中采用氨基酸制剂的治疗的过敏性哮喘和抗炎性气道功能的结果。在该研究中,动物将显示出对于用猪蛔虫抗原的吸入刺激的早期和晚期气道反应。可以从颈外静脉获得静脉血样(约3ml)用于药代动力学数据。气道力学的测量:未镇静处理的绵羊以俯卧位被限制在车(cart)中,头部固定。在用2%利多卡因溶液进行鼻道的局部麻醉后,气囊导管将通过一个鼻孔进入食管下段。用带套囊的(cuffed)气管内导管穿过动物的另一个鼻孔。(气管内导管的套囊将仅被充气用于气道力学测量并且在气溶胶刺激期间充气以防止过度不适。该过程对气道力学没有影响)。用食管气囊导管(填充1ml空气)估计胸膜压,该食管气囊导管将位于胃食管连接部5-10cm处。在该位置处,呼气末胸膜压在-2与-5cm H₂O之间。一旦放置气囊,它将被固定,使得其在实验期间保持在适当位置。气管中的侧压将采用侧孔导管(内部尺寸,2.5mm)测量,该侧孔导管穿过气管内导管尖端并位于其远端。跨肺压即气管与胸膜压之间的差,将用差压传感器导管系统测量。对于肺

阻力(RL)的测量,气管内导管的近端将连接至呼吸速度描记器(pneumotachograph)。流量和跨肺压的信号将记录在示波器记录仪上,该示波器记录仪连接至计算机,用于从跨肺压、呼吸量(通过数字积分获得)和流量在线计算RL。5-10次呼吸的分析将用于以L x cm H₂O/L/S测定RL。

[0066] 对抗原诱发的气道反应的影响:在抗原刺激前1-3天获得气溶胶卡巴胆碱的基线剂量反应曲线。在刺激当天,获得肺阻力(RL)的基线值,然后用猪蛔虫抗原刺激绵羊。在刺激后立即、在刺激后1-6h每小时和在刺激后6.5-8h每半小时获得RL的测量。在刺激后24小时获得RL的测量,接着获得刺激后24小时剂量反应曲线。在图14至图19中,对于显示气道反应性(PC400)的图,BSL是基线,并且PASC是抗原刺激后。

[0067] 对于初步研究,在抗原刺激前30分钟、抗原刺激前1小时、抗原刺激后30分钟后或抗原刺激后2小时使用上述雾化系统使绵羊接受雾化化合物,该雾化化合物是由酪氨酸(1.2mM)、苏氨酸(8mM)、缬氨酸(10mM)、丝氨酸(10mM)和色氨酸(8mM)组成的氨基酸制剂,其中施用4mL的氨基酸制剂溶液。治疗后重复RL的测量。此后,接下来的研究将评估口服提供化合物后的效果。在口服研究中,绵羊接受由酪氨酸(1.2mM)、天冬氨酸(8mM)、苏氨酸(8mM)、缬氨酸(10mM)、丝氨酸(10mM)组成的氨基酸制剂,其中口服施用8oz的氨基酸制剂溶液,并如上所述进行RL和气道反应性(PC400)的测量。

[0068] 图14示出了与对照相比,在抗原刺激前一小时接受雾化化合物的绵羊的肺阻力(RL)和PC 400(呼吸单位)的结果。

[0069] 图15示出了与对照相比,在抗原刺激后两小时用雾化化合物治疗的绵羊的肺阻力(RL)和PC 400(呼吸单位)的结果。

[0070] 图16示出了与对照相比,在抗原刺激前30分钟用雾化化合物治疗的绵羊的肺阻力(RL)和PC 400(呼吸单位)的结果。

[0071] 图17示出了与对照相比,在抗原刺激后30分钟接受雾化化合物的绵羊的肺阻力(RL)和PC 400(呼吸单位)的结果。

[0072] 图18示出了与对照相比,在抗原刺激后30分钟被口服提供化合物制剂的绵羊的肺阻力(RL)和PC 400(呼吸单位)的结果。

[0073] 图19示出了与对照相比,在抗原刺激后两小时被口服提供制剂的绵羊的肺阻力(RL)和PC 400(呼吸单位)的结果。

[0074] 图20示出了针对抗炎性改善的气道功能在绵羊中进行的哮喘研究结果的总结,包括对照和用雾化化合物治疗(5-8小时)或在气溶胶抗原刺激之前和之后被口服提供氨基酸制剂的绵羊的平均晚期气道反应(“LAR”)和气道高反应性(“AHR”)。“*”表示平均晚期气道反应(5-8小时)。“+”表示刺激后/刺激前PC 400。比值接近1表示没有气道高反应性(AHR)。

[0075] 图21示出了伤口愈合研究的结果:将选择用于手术的小鼠的背侧表面剃毛以去除毛发。所有手术程序均使用氧气中5%异氟烷在麻醉下进行,并使用1%-3%异氟烷维持麻醉的手术平面。在8周龄NIH Swiss小鼠的背部进行3mm大小的穿孔活检。小鼠伤口模型可能由于存在皮下肌层(即人体中不存在的层)而受到伤口收缩的影响。为了防止伤口收缩,使用硅O形环作为夹板并通过间断缝合固定在适当位置。AA-ORS或盐水用于伤口的透明封闭敷料中。每天在使用卡尺测量伤口面积后更换敷料。因此,该程序测量再上皮化(re-epithelialization)并模拟人体的伤口愈合。结果示于图中。数据来自每组n=6只小鼠。

具体实施方式

[0076] 本文描述了用于治疗GI、肺和皮肤障碍的氨基酸组合物。在一个方面中,本文描述了用于促进细胞增殖和/或发育的组合物和方法。在某个实施方案中,细胞是干细胞和/或祖细胞。如本文所用,对“发育”的提及可包括例如细胞的迁移、成熟和/或分化。本公开还提供用于治疗伤口、皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮、与皮肤老化有关的病症、美容病症)、肺障碍(例如,肺损伤、肺炎或哮喘)、GI障碍(例如,辐射损伤、缺血性结肠炎、感染、创伤)或与粘膜屏障功能和/或完整性相关的任何其他病症的组合物和方法。

[0077] 该组合物和方法可用于体内、离体和/或体外增强干细胞和/或祖细胞群。这些细胞可用于治疗许多疾病状态、变性和损伤。

[0078] 在一个实施方案中,本文提供了通过向受试者施用本公开的组合物来促进需要这种治疗的受试者中干细胞和/或祖细胞的增殖和/或发育的方法。

[0079] 受试者可以是需要促进干细胞和/或祖细胞的增殖和/或发育的患者。由于例如吸收不良、辐射或化学疗法诱发的胃肠道毒性,或继发于感染、癌症或癌症治疗,患者可能具有这种需要。在一个实施方案中,患者无症状。受试者可以是任何动物,包括例如人类。除人类外,动物可以例如是哺乳动物,例如牛、马、绵羊、猪、山羊、狗和猫。动物也可以例如是鸡、火鸡或鱼。

[0080] 在某些实施方案中,组合物包含一种或多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含一种或多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、丝氨酸及其衍生物组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含一种或多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸组成的组的游离氨基酸。组合物优选包含一种或多种选自由苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸和色氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含两种或更多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含三种或更多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含四种或更多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸。在某些实施方案中,组合物包含苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和丝氨酸的游离氨基酸。

[0081] 在一个实施方案中,治疗性组合物包含以下各项,基本上由其组成或由其组成:一种或多种选自由以下组成的组的游离氨基酸:苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸、天冬氨酸及其衍生物;和任选地,例如,药学上可接受的载体、佐剂和其他活性剂。在某些实施方案中,组合物包含一种或多种选自由以下组成的组的游离氨基酸:苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸和天冬氨酸;和任选地,例如,药学上可接受的载体、佐剂、其他活性剂和添加剂(例如,糖、电解质、维生素、矿物质等)。

[0082] 在一个方面中,本文所述的组合物包含一种或多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸或丝氨酸组成的组的游离氨基酸。

[0083] 在一些特定的实施方案中,组合物不包括一种或多种选自由赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺组成的组的氨基酸。在某些实施方案中,组合物不包括赖氨酸。在某些实施方案中,组合物不包括甘氨酸。在某些实施方案中,组合物不包括异亮氨酸。在某些实施方

案中,组合物不包括天冬酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括赖氨酸和甘氨酸。在某些实施方案中,组合物不包括赖氨酸和异亮氨酸。在某些实施方案中,组合物不包括赖氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括赖氨酸、甘氨酸和异亮氨酸。在某些实施方案中,组合物不包括赖氨酸、甘氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括甘氨酸和异亮氨酸。在某些实施方案中,组合物不包括甘氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括异亮氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,该组合物不包含赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在另一个特定的实施方案中,组合物不包括丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺,或仅包括可忽略量的丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括谷氨酰胺和/或甲硫氨酸;和任何可以水解成谷氨酰胺和/或甲硫氨酸的二肽、寡肽或多肽或蛋白质。

[0084] 或者,在某些实施方案中,即使这些氨基酸存在于组合物中,它们也是以不会抑制干细胞和/或祖细胞存活、增殖和/或发育的量存在。在一些实施方案中,组合物不具有丝氨酸,或者具有的丝氨酸的量可忽略。“可忽略”是指存在的丝氨酸对干细胞存活、增殖和/或发育没有影响。“可忽略”是指存在的丝氨酸对有需要的受试者中与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合、皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症)、肺障碍(例如,哮喘)、粘膜屏障功能和/或GI粘膜损伤没有影响。

[0085] 如果存在于组合物中,这些氨基酸可以例如以下列浓度存在:苏氨酸为约0.4至约1.5、约0.7至约1.3、或约0.9至约1.1克/升;缬氨酸为约0.7至约1.7、约0.9至约1.5、或约1.1至约1.3克/升;丝氨酸为约0.6至约1.6、约0.8至约1.4、约1.0至约1.2克/升;酪氨酸为约0.05至约0.4、或约0.1至约0.3克/升;并且色氨酸为约1.1至约2.1、约1.3至约1.9、或约1.5至约1.7克/升。在某个实施方案中,组合物包含苏氨酸(约1.0克/升)、缬氨酸(约1.2克/升)、丝氨酸(约1.1克/升)、酪氨酸(约0.2克/升)、色氨酸(约1.6克/升)和天冬氨酸(约0.4至3.6克/升)。在某些实施方案中,组合物不具有丝氨酸或具有可忽略的丝氨酸。在某些实施方案中,浓度是克氨基酸/升溶液。在某些实施方案中,该溶液包含水。

[0086] 在一个实施方案中,组合物的总摩尔渗透压浓度为约100mosm至约280mosm,或优选为约150至约260mosm。

[0087] 组合物的pH可以为约2.5至约8.5。在某些实施方案中,组合物的pH范围为约2.5至约6.5、约3.0至约6.0、约3.5至约5.5、约3.9至约5.0、或约4.2至约4.6。在其他实施方案中,组合物的pH范围为约6.5至约8.5、约7.0至约8.0、或约7.2至约7.8。

[0088] 在某些实施方案中,组合物的pH例如为约2.5至约8.5。在某些实施方案中,组合物的pH为约2.5至约6.5、约2.5至约6.0、约3.0至约6.0、约3.5至约6.0、约3.9至约6.0、约4.2至约6.0、约3.5至约5.5、约3.9至约5.0、或约4.2至约4.6。在其他实施方案中,pH为约6.5至约8.5、约7.0至约8.5、约7.0至约8.0、约7.2至约8.0、或约7.2至约7.8。

[0089] 在一些实施方案中,组合物是全身或局部施用。在某些实施方案中,组合物用于离体或体外促进细胞存活、增殖和/或发育。在某些实施方案中,组合物用于治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤。

治疗性组合物可以通过肠内途径或胃肠外或外部施用或通过吸入施用。在某些实施方案中,组合物是治疗性组合物、美容组合物或营养组合物。

[0090] 在一些实施方案中,本文所述的组合物(例如,基于氨基酸的口服再水化溶液(AA-ORS))通过纠正辐射后在GI粘膜上发生的功能变化起作用。在某些实施方案中,组合物是溶液。在某些实施方案中,溶液是基于氨基酸的口服再水化溶液(AA-ORS)。选择氨基酸以抵抗辐射后增加的细胞旁渗透性、增加的Cl⁻分泌和减少的电解质吸收。由于本文描述的组合物(例如,AA-ORS)纠正GI粘膜中的功能改变,因此认为其作用在途径(pipeline)中处于当前药剂的上游。组合物可以与其他治疗剂一起施用。最近发现,在辐照后,电解质、葡萄糖和一些氨基酸在胃肠道中吸收很差。此外,观察到葡萄糖和一些氨基酸可以刺激除Na⁺吸收之外的生电性Cl⁻分泌并且可以增加细胞旁渗透性,这进一步使辐射诱发的腹泻和增加的肠道渗透性复杂化。^{51,52}已知增加的细胞旁渗透性增加抗原物质从肠腔易位至全身隔室中,引起促炎细胞因子的增加。⁵¹

[0091] 在一个实施方案中,本公开的组合物不包括大量葡萄糖、谷氨酰胺、甲硫氨酸和/或乳糖。在某些实施方案中,组合物不包括大量葡萄糖。在某些实施方案中,组合物不包括大量谷氨酰胺。在某些实施方案中,组合物不包括大量甲硫氨酸。在某些实施方案中,该组合物不包含甲硫氨酸。在某些实施方案中,组合物不包括大量乳糖。

[0092] 在一个实施方案中,本文所述的组合物用作培养细胞的组合物,用于促进干细胞和/或祖细胞的存活、发育和/或增殖。用于培养细胞的组合物可用于以增加的量获得干细胞和/或祖细胞以治疗各种疾病。组合物也可以在即将移植之前和/或移植之后立即施加于干细胞和/或祖细胞。组合物还可用于增加存在于身体各部位的天然干细胞的增殖。

[0093] 在一个实施方案中,本公开提供了一种改善植入的干细胞和/或祖细胞的治疗结果的方法,其包含与干细胞和/或祖细胞植入一起施用组合物,或在例如骨髓或肝移植之后作为维持或支持疗法施用组合物。在某些实施方案中,本文提供在例如骨髓或肝移植后的维持或支持疗法。组合物的施用可以在人类或非人类动物中的靶标干细胞和/或祖细胞植入位点处或附近进行。在可选的实施方案中,可以通过提供影响因子或通过清洁环境中可能以不希望的方式影响所施用的干细胞和/或祖细胞的不需要的或有毒的试剂来进一步改变环境。

[0094] 施用的细胞可以是未修饰的,或者可以是工程化的以偏好于(bias)靶标分化终点。美国专利公开号2006/0134789和2006/0110440通过引用整体并入本文,以提供预期与本文教导的方法一起使用的针对负向(negative)和正向(positive)分化偏好进行工程化的干细胞的例子。

[0095] 当将组合物施加至培养中或原位的干细胞和/或祖细胞时,分泌蛋白(例如细胞存活相关因子和细胞增殖相关因子)和转录因子发生变化。结果,改变了细胞活性,并且具体而言,增强了细胞增殖存活和/或发育。因此,借助于本发明的组合物以增强的规模产生的干细胞和/或祖细胞可以作为细胞治疗剂移植到疾病或其他部位中,以促进细胞的再生并有效地治疗各种病症。

[0096] 在一个实施方案中,本文所述的组合物刺激干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育,如以下中的一项或多项所证明:1)增殖标志物(例如p-ERK和p-AKT)在mRNA和/或蛋白质水平上的增加,2)干细胞标志物(例如BMI1和Lgr5)在mRNA和/或蛋白质水平上的增加,

3) 蛋白质激酶(例如MEK和ERK)的激活;4) 细胞凋亡标志物(例如裂解的半胱天冬酶3)的减少。

[0097] ERK是已知将细胞表面信号传递给细胞核,用于介导实现增殖所需的转录和翻译变化的蛋白质。ERK1和ERK2是44kDa和42kDa蛋白质,是通过下调促凋亡分子和上调抗凋亡分子来控制众多细胞活性和生理过程(包括细胞增殖和分化)的蛋白激酶的重要亚家族。MEK1/2的激活导致ERK1和ERK2的磷酸化。刺激后,ERK1/2在苏氨酸和酪氨酸残基上被磷酸化,并且所述酪氨酸残基上的磷酸化导致ERK1/2从MEK1/2解离。然后ERK1/2易位至细胞核。在一个实施方案中,本文所述的组合物有助于维持促有丝分裂刺激直至G1晚期,以使得成功进入S期。

[0098] AKT是丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,其在细胞增殖和存活中起作用并抑制细胞凋亡和代谢。AKT的磷酸化激活AKT。与pERK一样,也已知AKT在细胞周期中起作用。AKT还可以促进生长因子介导的细胞存活。各种研究已经记载Akt途径在预防凋亡细胞死亡中的关键作用。⁹PCNA是与DNA复制相关的独特蛋白质,其因此用作增殖标志物,用AA-ORS或盐水治疗来测量PCNA。AA-ORS在0Gy和5Gy辐照的小鼠中增加PCNA,但在盐水治疗的小鼠中不增加PCNA。PCNA的增加是小肠上皮增殖的早期迹象。这些研究共同表明使用AA-ORS的治疗促进增殖。

[0099] 半胱天冬酶-3是细胞凋亡的 executor 或效应物,因为细胞内蛋白质底物的裂解导致与细胞凋亡相关的形态学变化,包括DNA降解和染色质凝聚,以及膜起泡以触发凋亡过程。通过蛋白水解裂解激活该无活性的前酶。^{7,46}该研究显示,辐射增加半胱天冬酶-3,并且AA-ORS治疗减少0Gy和5Gy小鼠的绒毛上皮细胞中的裂解的半胱天冬酶-3。已知Erk1/2的下游靶标Bcl-2在内在促细胞凋亡途径中抑制Bax。在AA-ORS的情况下增加Bcl-2蛋白水平暗示预防细胞凋亡的保护机制。然而,来自经辐照小鼠的组织中增加的Bcl-2蛋白水平可暗示辐射保护机制。辐照后Bcl-2蛋白水平的类似增加已有报道,并与之前的研究结果一致(Ezekwudo,D.et al.Inhibition of expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and induction of cell death in radioresistant human prostate adenocarcinoma cell line (PC-3) by methyl jasmonate.Cancer Lett 270,277-285,doi:10.1016/j.canlet.2008.05.022(2008))。然而,Bax蛋白在辐射或治疗中未显示出显著变化,表明在Bax26上游步骤中的AA-ORS对细胞凋亡的效应。AA-ORS治疗的小鼠中增加的p-Akt表明其作用可能是通过激活增殖或抑制细胞凋亡来实现(图5)。结合在半胱天冬酶-3和Bcl-2上所见的效应,这些结果可以解释在AA-ORS治疗的情况下观察到的促存活效应和增加的增殖。然而,需要进一步的研究来表征AA-ORS激活Erk1/2和Akt、PCNA半胱天冬酶-3、Bcl-2或Bax的机制。

[0100] p53

[0101] 由于Akt还可以在恶性转化中发挥突出作用,¹⁰因此用AA-ORS研究已知肿瘤抑制蛋白p53的作用。p53蛋白的变化可表明AA-ORS具有肿瘤抑制作用。p53(肿瘤抑制物53基因)中的突变是人类癌症中最常见的遗传病变。无效等位基因纯合的小鼠看起来正常,但容易自发发展出各种肿瘤。¹¹也已显示p53在辐射反应中起重要作用;事实上,响应辐照的p53积累水平主要源自DNA损伤的强度。¹²研究已显示干细胞损失在辐射诱发的急性肠损伤和致死中起重要作用,并受p53途径及其转录靶标PUMA和p21调控。^{23,34,37}PUMA依赖性细胞凋亡在高剂

量辐照后数小时内迅速减少肠干细胞 (ISC) 及其祖细胞, 并且PUMA缺乏通过增强p21依赖性DNA修复而导致改善动物存活和隐窝再生, 并且对于辐射诱发的肠损伤至关重要。^{24, 38}与Lgr5、p-Erk和p-Akt一起, 裂解的半胱天冬酶-3的变化表明AA-ORS不仅通过增殖而且还通过减少细胞凋亡和增加细胞存活来增加未经辐照和经辐照小鼠肠组织中的绒毛高度。为了评估源自增加的增殖和减少的凋亡的绒毛上皮细胞是否成熟、已分化和具有功能活性, 测量Na⁺吸收能力和葡萄糖刺激的Na⁺吸收。NHE3 (小肠中Na⁺吸收的主要转运蛋白) 和SGLT1 (钠偶联葡萄糖吸收的转运蛋白) 二者仅在成熟和分化的绒毛细胞中发现; 其具有增强的功能 (图3和4) 以及提高的mRNA和蛋白质水平。这些研究表明辐照后的AA-ORS治疗增加了电解质和葡萄糖吸收 (图3、4和7)。

[0102] 在一个实施方案中, 本文所述的组合物可用于预防DNA损伤和/或修复受损DNA。在另一个实施方案中, 组合物通过预防或减少对DNA的损伤和/或修复受损的DNA来促进干细胞和/或祖细胞的增殖和/或发育。

[0103] 辐照、隐窝计数、绒毛长度和免疫组织化学

[0104] 发现增加的体重增加和存活可能继发于隐窝数目和绒毛高度的增加, 其继而增加吸收的表面积。结果表明隐窝数目和绒毛高度随着辐照后6天开始的AA-ORS治疗而增加。使用用于隐窝存活的单命中多靶点模型发现, 每个回肠圆周的隐窝祖细胞单位数目 (N) 显著增加 ($P < 0.001$), 而D0没有变化 ($4.8 \pm 0.1\text{Gy}$) (图1A)。在使用AA-ORS治疗的情况下, Dq值将当量改善为1.7Gy的辐射耐受性增加, 这表明改善的隐窝存活。隐窝存活研究表明每个隐窝的祖细胞单位或干细胞增加。因此, 使用肠干细胞标志物特异性抗体和通过EdU掺入将子细胞迁移到增殖继发的绒毛中来检查辐照和AA-ORS对干细胞数目的效应。^{2, 4, 36}假定至少三种不同的隐窝细胞类型表示肠干细胞 (ISC)。²群体中的每个成员都具有不同的增殖动力学和对辐射的敏感性; 因此, 认为每一成员具有独特的功能。³¹认为其可以响应由细胞因子、激素或生长因子引起的抑制和刺激信号, 从一种类型动态地转换为另一种类型。²⁵相比之下, 在“+4隐窝位置”的缓慢循环的肠上皮干细胞 (IESC) [标记滞留细胞 (label-retaining cell, LRC)] 有助于稳态再生能力, 特别是在从损伤恢复期间。³³这些LRC表达各种标志物, 例如Bmi1、HopX、Lrig1和/或Dclk1, 并且可响应损伤改变为快速循环的IESC。³⁴Lgr5可以标记两种细胞, 而据报道Bmi1和HopX优先标记+4细胞。¹⁵Lgr5+ISC是辐射损伤后肠再生所必需的。³⁵Lgr5-和Bmi1被认为是储备细胞, 其在损伤或辐射诱发的损伤后发动再生反应。研究已显示, 由于表达Bmi1的干细胞库 (stem cell pool) 的激活, 可容忍Lgr5+细胞的损失。^{2, 30}

[0105] 增加绒毛高度的氨基酸制剂AA-ORS对于除辐射或化学疗法诱发的毒性以外的多种疾病病症具有重要意义, 所述疾病 (例如克罗恩病、乳糜泻、营养不良和环境性肠病) 的特征为绒毛高度降低。这项研究表明, 基于营养素对胃肠功能的有益作用对某些营养素的系统选择有助于改善原位肠干细胞增殖、成熟和分化, 从而导致功能和高度最初由于辐照而受损的长绒毛上皮细胞的功能活跃 (图7)。该研究还支持Leibowitz等人的观察, 即在高剂量辐射后, 骨髓衍生的干细胞对肠粘膜的重建没有显著作用 (Leibowitz, B. J. et al. Ionizing irradiation induces acute haematopoietic syndrome and gastrointestinal syndrome independently in mice. Nat Commun 5, 3494, doi: 10.1038/ncomms4494 (2014))。未来的研究应该寻求确定这些氨基酸增加干细胞群、促进其增殖和减少细胞凋亡以及排除恶性转化的机制。该工作强调了仔细选择不同营养素或个别

氨基酸以影响各种干细胞群(包括造血干细胞)的重要性。

[0106] 干细胞和/或祖细胞

[0107] 本文所述的组合物和方法可用于增加干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育。细胞可以例如是胚胎细胞、多能细胞或全能细胞,并且可以是体内或体外细胞。

[0108] 干细胞通常能够分化为外胚层、中胚层和内胚层细胞。多能干细胞是未分化细胞,其具有分化成多种细胞类型的能力。全能干细胞是未分化细胞,具有分化成所有细胞类型的能力,并且根据定义(by definition)暗示种系传递。

[0109] 在一个实施方案中,干细胞是间充质干细胞,其具有例如分化成以下细胞的潜力:成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、基质细胞、肌腱细胞、上皮细胞、神经细胞和血管内皮细胞。

[0110] 在一个实施方案中,细胞是胚胎干(ES)细胞,其可以在未分化状态下无限增殖。此外,ES细胞是全能细胞,这意味着它们可以生成体内存在的所有细胞(骨骼、肌肉、脑细胞等)。已从发育中的鼠类胚泡的内细胞团(ICM)中分离出ES细胞(Evans et al., Nature 292:154-156, 1981; Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:7634-7636, 1981; Robertson et al., Nature 323:445-448, 1986)。另外,已经从内胚泡细胞团(Thomson et al., Science 282:1145-1147, 1998)和发育中的生殖细胞(Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726-13731, 1998)中分离出具有ES性质的人类细胞。已经生产了人类和非人灵长类胚胎干细胞(参见美国专利第6,200,806号,其通过引用并入本文中)。

[0111] 在一个实施方案中,细胞是成体干细胞,其自我更新并生成已分化细胞。成体干细胞也称为体干细胞,是维持和修复其所在组织的干细胞。这些细胞可以例如是骨髓干细胞。

[0112] 体前体细胞(precursor cell)也可以与本文公开的方法一起使用。可以使用本领域技术人员已知的方法从各种来源分离体前体细胞。体前体细胞可以是外胚层、中胚层或内胚层起源。可以根据本方法使用可以在体外获得并维持的任何体前体细胞。所述细胞包括上皮组织(例如皮肤和肠衬里)的细胞、胚胎心肌细胞和神经前体细胞(Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985)。所述细胞还包括胰腺干细胞、脐带血干细胞、外周血干细胞和源自脂肪组织的干细胞。

[0113] 在一个实施方案中,干细胞还包括通过重编程体细胞获得的多能干细胞。体细胞重编程是将已分化体细胞的表观遗传状态转变为能够产生任何细胞类型的多能状态的过程。体细胞重编程可以例如通过将体细胞核转移到供体卵母细胞中来实现,其被称为体细胞核转移(SCNT)。体细胞重编程也可以通过直接重编程实现,称为诱导多能干细胞(iPSC),例如通过四种转录因子Oct4、Sox2、Klf4和C-myc的同时逆转录病毒表达来实现。这些iPSC享有ES细胞的所有关键特征。

[0114] 在另一个实施方案中,可以从妊娠后第12周开始从胎儿肝脏、围产期脐带血(UCB)、人骨髓或G-CSF刺激的外周血中获得其他胚胎后干细胞。

[0115] 在某些实施方案中,干细胞是神经干细胞(NSC)、皮肤干细胞、造血干细胞(HSC)、间充质干细胞(MSC)、组织干细胞(例如肌肉干细胞)、中胚层干细胞、器官干细胞(例如,胰腺干细胞和肝干细胞)或肠干细胞。在某些实施方案中,干细胞是成体干细胞、胚胎干细胞、癌症干细胞、神经干细胞(NSC)、皮肤干细胞、造血干细胞(HSC)、间充质干细胞(MSC)、组织

干细胞(例如,肌肉干细胞)、中胚层干细胞、器官干细胞(例如,胰腺干细胞和肝干细胞)或肠干细胞。

[0116] 在一个实施方案中,细胞是神经元干细胞。在非限制性例子中,细胞是神经元前体细胞和/或神经胶质前体细胞。未分化的神经干细胞分化为成神经细胞和成胶质细胞,其产生神经元和神经胶质细胞。

[0117] 神经干细胞和祖细胞可以参与正常发育的各个方面,包括沿着已确立的迁移路径迁移到播散性CNS区域,响应微环境信号分化为多种发育适当的和区域适当的细胞类型,以及与宿主祖细胞及其后代的非破坏性、非致癌性散布。

[0118] 人类NSC能够在这些播散性位置体内表达外源转基因。因此,这些细胞可用于治疗各种病症,包括脊髓、脑和外周神经系统的创伤性损伤;治疗退行性障碍,包括阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病;情感障碍,包括严重抑郁症;中风等等。

[0119] 在一个实施方案中,干细胞是肌肉干细胞。成年脊椎动物的肌肉组织由称为卫星细胞的储备成肌细胞中再生。卫星细胞分布在整个肌肉组织中,并且在没有受伤或疾病的情况下是有丝分裂静止的。在从因受伤或疾病造成的损伤或响应于生长或过度生长(hypertrophy)的刺激而复原后,卫星细胞重新进入细胞周期,增殖并分化成多核肌管,形成新的肌纤维。成肌细胞最终产生替代性肌纤维或融合到已有的肌纤维中,从而通过合成可收缩器官组件来增加纤维周长。肌原性的标准包括肌原性蛋白(包括中间丝蛋白结蛋白)和肌原性转录因子MyoD、Myf-5和Pax-7的表达。

[0120] 在一个实施方案中,干细胞是毛囊干细胞。毛囊凸起区域是活跃生长的多能成体干细胞的丰富的易获取来源。巢蛋白是神经干细胞的蛋白质标志物,也在毛囊干细胞以及其直接分化后代中表达。表达巢蛋白的毛囊干细胞在体外分化成例如神经元、神经胶质细胞、角质形成细胞和平滑肌细胞。

[0121] 在一个实施方案中,干细胞是胰腺干细胞和胰腺多能祖(PMP)细胞。这些细胞可以从胰岛和胰管衍生的组织中分离,并进一步发育成例如其他PMP细胞或神经或胰腺细胞。胰腺细胞任选地包括 α 细胞、 δ 细胞、 β 细胞、胰腺外分泌细胞和胰腺星状细胞。 α 细胞是成熟的产生胰高血糖素的细胞。在体内,这些细胞存在于朗格汉斯(Langerhans)胰岛中。 β 细胞是成熟的产生胰岛素细胞。在体内,这些细胞也存在于朗格汉斯胰岛中。胰腺干细胞在糖尿病具体而言I型糖尿病的治疗中非常重要,可用于提供 β 细胞。

[0122] 在一个实施方案中,干细胞是骨髓干细胞。骨髓干细胞是在骨髓中生成的细胞,其可以分化成各种身体组织的细胞。骨髓干细胞还能够通过在分化诱导剂的影响下分化成组织细胞来恢复组织丧失的功能。骨髓干细胞的例子包括能够例如分化成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、肌腱细胞或骨髓基质细胞的骨髓间充质干细胞,以及能够分化成血细胞(例如红细胞和白细胞)的造血干细胞。

[0123] 在一个实施方案中,干细胞是胃肠道干细胞。上皮细胞内衬于胃肠道内。在正常体内平衡下这些细胞的周转是恒定过程,并且在损伤后增加。多能干细胞通过生成所有胃肠道上皮细胞谱系以及甚至整个肠隐窝和胃腺来调节这一过程。这些干细胞位于肠隐窝的下部,在哺乳动物中包括快速循环的隐窝基底柱状细胞(CBC)和潘氏细胞上方的更静止的“+4”细胞。

[0124] 假定至少三种不同的隐窝细胞类型代表肠干细胞(ISC)。群体中的每个成员都具

有不同的增殖动力学和对辐射的敏感性;因此,每个成员都被认为具有独特的功能。认为其响应由细胞因子、激素或生长因子引起的抑制和刺激信号,从一种类型动态地转变到另一种类型。相比之下,在“+4隐窝位置”的缓慢循环的肠上皮干细胞(IESC)[标记滞留细胞(LRC)]有助于稳态再生能力,特别是在从损伤恢复期间。这些LRC表达各种标志物,例如BMI1、HOPX、LRIG1和/或DCLK1,并且可以响应损伤而改变为快速循环的IESC。Lgr5可以标记两种细胞,而据报道Bmi1和HopX优先标记+4细胞。Lgr5⁺ISC是辐射和/或化学疗法诱发的胃肠损伤后肠再生所必需的。Lgr5⁺和BMI1被认为是储备细胞,其在损伤或辐射诱发的损伤后发动再生反应。类似地,该制剂可用于亚临床疾病状况,例如与肠道渗透性增加、局部和全身炎症增加以及绒毛高度降低相关的环境性肠病。患有环境性肠病的受试者经历继发于营养素和矿物质吸收不良的慢性营养不良。

[0125] 用于促进干细胞和/或祖细胞的增殖和/或发育,以及用于伤口愈合,治疗皮肤病症、肺障碍、粘膜屏障病症和与粘膜屏障功能相关的疾病或病症和治疗GI粘膜损伤的组合物

[0126] 在一个方面中,本文提供了用于促进干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育的治疗性组合物。本文描述了组合物和方法,其用于治疗有需要的受试者中与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤。

[0127] 在一个实施方案中,治疗性组合物包含以下各项,基本上由其组成或由其组成:一种或多种选自自由以下组成的组的游离氨基酸:苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、丝氨酸及其衍生物;和任选地药学上可接受的载体、佐剂和/或其他活性成分。在一个实施方案中,治疗性组合物包含以下各项,基本上由其组成或由其组成:一种或多种选自自由以下组成的组的游离氨基酸:苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸;和任选地药学上可接受的载体、佐剂和/或其他活性成分。在某些实施方案中,组合物是无菌的。

[0128] 在一个实施方案中,组合物的总摩尔渗透压浓度为约100mosm至约280mosm,或其间的任何值。优选地,总摩尔渗透压浓度为约150至约260mosm。在另一个实施方案中,组合物的总摩尔渗透压浓度是低于约280mosm的任何值。

[0129] 组合物可具有例如2.5至8.5的pH。在某些实施方案中,该组合物的pH为约2.5至约6.5、约3.0至约6.0、约3.5至约5.5、约3.9至约5.0或约4.2至约4.6。在其他实施方案中,pH为约6.5至约8.5、约7.0至约8.0或约7.2至约7.8。

[0130] 在某些实施方案中,组合物包含一种或多种选自自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含一种或多种选自自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、丝氨酸及其衍生物组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含一种或多种选自自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸组成的组的游离氨基酸。组合物优选包含一种或多种选自自由苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸和色氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含两种或更多种选自自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含三种或更多种选自自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案中,组合物包含四种或更多种选自自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸。在某些实施方案

中,组合物包含苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸。在某些实施方案中,组合物包含苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和丝氨酸的游离氨基酸。

[0131] 如果存在于组合物中,这些氨基酸可以例如以下列浓度存在:苏氨酸为约0.4至约1.5、约0.7至约1.3、或约0.9至约1.1克/升;缬氨酸为约0.7至约1.7、约0.9至约1.5、或约1.1至约1.3克/升;丝氨酸为约0.6至约1.6、约0.8至约1.4、约1.0至约1.2克/升;酪氨酸为约0.05至约0.4、或约0.1至约0.3克/升;并且色氨酸为约1.1至约2.1、约1.3至约1.9、或约1.5至约1.7克/升。在某个实施方案中,治疗性组合物包括苏氨酸(约1.0克/升)、缬氨酸(约1.2克/升)、丝氨酸(约1.1克/升)、酪氨酸(约0.2克/升)和色氨酸(约1.6克/升)。在一个实施方案中,组合物不包括丝氨酸。

[0132] 在另一个实施方案中,组合物包含仅一种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸和色氨酸和/或其衍生物组成的组的游离氨基酸,或基本上由仅一种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸和色氨酸和/或其衍生物组成的组的游离氨基酸组成。在另一个实施方案中,治疗性组合物包含作为游离氨基酸的苏氨酸,或基本上由作为游离氨基酸的苏氨酸组成。治疗性组合物还可以包含作为游离氨基酸的缬氨酸,或基本上由作为游离氨基酸的缬氨酸组成。此外,治疗性组合物包含作为游离氨基酸的酪氨酸,或基本上由作为游离氨基酸的酪氨酸组成。治疗性组合物包含作为游离氨基酸的色氨酸,或基本上由作为游离氨基酸的色氨酸组成。此外,治疗性组合物包含作为游离氨基酸的天冬氨酸,或基本上由作为游离氨基酸的天冬氨酸组成。在某些实施方案中,组合物包含作为游离氨基酸的丝氨酸。

[0133] 在另一个实施方案中,组合物还可以包含两种选自由以下组成的组的游离氨基酸或基本上由两种选自由以下组成的组的游离氨基酸组成:苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸,包括苏氨酸和缬氨酸的组合、苏氨酸和丝氨酸的组合、苏氨酸和酪氨酸的组合、苏氨酸和色氨酸的组合、缬氨酸和丝氨酸的组合、缬氨酸和酪氨酸的组合、缬氨酸和色氨酸的组合、丝氨酸和酪氨酸的组合、丝氨酸和色氨酸的组合、酪氨酸和天冬氨酸的组合、丝氨酸和天冬氨酸的组合、缬氨酸和天冬氨酸的组合、苏氨酸和天冬氨酸的组合、色氨酸和天冬氨酸的组合以及酪氨酸和色氨酸的组合。

[0134] 在另一个实施方案中,组合物可以包含三种选自由以下组成的组的游离氨基酸或基本上由三种选自由以下组成的组的游离氨基酸组成:苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸,包括苏氨酸、缬氨酸和丝氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸和酪氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸和色氨酸的组合;苏氨酸、丝氨酸和酪氨酸的组合;苏氨酸、丝氨酸和色氨酸的组合;苏氨酸、酪氨酸和色氨酸的组合;缬氨酸、丝氨酸和酪氨酸的组合;缬氨酸、丝氨酸和色氨酸的组合;缬氨酸、酪氨酸和色氨酸的组合;和丝氨酸、酪氨酸和色氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、丝氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、酪氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;缬氨酸、丝氨酸和天冬氨酸的组合;缬氨酸、酪氨酸和天冬氨酸的组合;缬氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;丝氨酸、酪氨酸和天冬氨酸的组合;丝氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合。

[0135] 在另一个实施方案中,组合物可以包含四种选自由以下组成的组的游离氨基酸或基本上由四种选自由以下组成的组的游离氨基酸组成:苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸,包括苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸和酪氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸和色氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸和色氨酸的组合;苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸和色氨酸

的组合;和缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸和色氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、丝氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸和天冬氨酸的组合;缬氨酸、丝氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合。

[0136] 在另一个实施方案中,组合物可以包含五种选自由以下组成的组的游离氨基酸或基本上由五种选自由以下组成的组的游离氨基酸组成:苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸,包括苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸和色氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合;苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸的组合。

[0137] 在另一个实施方案中,组合物可以包含作为游离氨基酸的苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸,或基本上由作为游离氨基酸的苏氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸和天冬氨酸组成。

[0138] 在某些实施方案中,组合物可以包含天然氨基酸或其衍生物,所述衍生物在增强干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育方面保持基本相同或更好的活性。在某些实施方案中,组合物可以包含天然氨基酸或其衍生物,所述衍生物在以下方面保持基本上相同或更好的活性:有需要的受试者中的伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化有关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤。衍生物可以例如是对映体,并且包括氨基酸的D和L形式。衍生物可以例如是碘酪氨酸或正缬氨酸。其他氨基酸衍生物包括例如正亮氨酸,鸟氨酸,青霉胺,焦谷氨酰胺衍生物,或丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸或缬氨酸的其他衍生物。在某些实施方案中,氨基酸衍生物是苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸或丝氨酸的衍生物。其他氨基酸衍生物包括但不限于通过例如氨基酸的酰化、甲基化和/或卤化合成的那些衍生物。这些衍生物包括例如 β -甲基氨基酸、C-甲基氨基酸和N-甲基氨基酸。

[0139] 在一些特定的实施方案中,本公开的组合物不包括一种或多种选自由丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺组成的组的氨基酸。或者,在某些实施方案中,即使这些氨基酸存在于该组合物中,它们存在的量不会抑制干细胞和/或祖细胞增殖和/或发育。

[0140] 在某些特定的实施方案中,本公开的组合物不包括选自由丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺组成的组之一的游离氨基酸,或仅包含可忽略量的选自由丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺组成的组之一的游离氨基酸。在其他实施方案中,治疗性组合物不包括作为游离氨基酸的赖氨酸,或治疗性组合物不包括作为游离氨基酸的甘氨酸;或治疗性组合物不包括作为游离氨基酸的天冬氨酸;或治疗性组合物不包括作为游离氨基酸的异亮氨酸;或治疗性组合物不包括作为游离氨基酸的天冬酰胺。

[0141] 在一些实施方案中,治疗性组合物不包括任意两种选自由以下组成的组的游离氨基酸:丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺,包括赖氨酸和甘氨酸的组合、赖氨酸和天冬氨酸的组合、赖氨酸和异亮氨酸的组合、赖氨酸和天冬酰胺的组合、甘氨酸和天冬氨酸

酸的组合、甘氨酸和异亮氨酸的组合、甘氨酸和天冬酰胺的组合、天冬氨酸和异亮氨酸的组合、天冬氨酸和天冬酰胺的组合,以及异亮氨酸和天冬酰胺的组合。

[0142] 在其他实施方案中,组合物不包括任意三种选自由以下组成的组的游离氨基酸:丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺,包括赖氨酸、甘氨酸和天冬氨酸的组合;赖氨酸、甘氨酸和异亮氨酸的组合;赖氨酸、甘氨酸和天冬酰胺的组合;赖氨酸、天冬氨酸和异亮氨酸的组合;赖氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺的组合;赖氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺的组合;甘氨酸、天冬氨酸和异亮氨酸的组合;甘氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺的组合;甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺的组合;以及天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺的组合。

[0143] 在进一步的实施方案中,组合物不包括任意四种选自由以下组成的组的游离氨基酸:丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺,包括赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和异亮氨酸的组合;赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺的组合;赖氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺的组合;赖氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺的组合;以及甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺的组合。

[0144] 在特定的实施方案中,本公开的组合物不包括赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在另一个特定的实施方案中,组合物不包括丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺,或仅包括可忽略量的丝氨酸、赖氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺。在一个实施方案中,组合物不包括谷氨酰胺和/或甲硫氨酸;和任何可以水解成谷氨酰胺和/或甲硫氨酸的二肽、寡肽或多肽或蛋白质。

[0145] 在某些特定的实施方案中,治疗性组合物可以包含赖氨酸,其中赖氨酸的总浓度小于300mg/l、100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。治疗性组合物也可以包含天冬氨酸,其中天冬氨酸的总浓度小于300mg/l、100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。治疗性组合物也可以包含甘氨酸,其中甘氨酸的总浓度小于300mg/l、100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。治疗性组合物可进一步包括异亮氨酸,其中异亮氨酸的总浓度小于300mg/l、100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。治疗性组合物还可以包含天冬酰胺,其中天冬酰胺的总浓度小于10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。

[0146] 在可选的实施方案中,组合物可以包含游离氨基酸谷氨酰胺,和任选地一种或多种含有谷氨酰胺的二肽,其中游离氨基酸谷氨酰胺和含有谷氨酰胺的二肽的总浓度为小于300mg/l,或任何低于300mg/l的浓度,例如100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。在某些实施方案中,组合物可以包含游离氨基酸谷氨酰胺,和任选地一种或多种含有谷氨酰胺的肽,其中游离氨基酸谷氨酰胺和含有谷氨酰胺的肽的总浓度为小于300mg/l,或任何低于300mg/l的浓度,例如100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。

[0147] 在另一可选的实施方案中,治疗性组合物可以包含游离氨基酸甲硫氨酸,和任选地一种或多种含有甲硫氨酸的二肽,其中游离氨基酸甲硫氨酸和含有甲硫氨酸的二肽的总浓度为小于300mg/l,或任何低于300mg/l的浓度,如100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l、0.5mg/l或0.01mg/l。在某些实施方案中,组合物可以包含游离氨基酸甲硫氨酸,和任选地一种或多种含有甲硫氨酸的二肽,其中游离氨基酸甲硫氨酸和含有甲硫氨酸的肽的总浓度为小于300mg/l,或低于300mg/l的任何浓度,例如100mg/l、50mg/l、10mg/l、5mg/l、1mg/l

1、0.5mg/l或0.01mg/l。

[0148] 在某些实施方案中,组合物还包含添加剂(例如营养素、电解质、维生素、矿物质等)。在某些实施方案中,组合物包含铁或锌。在某些实施方案中,治疗性组合物包括一种或多种选自以下各项的电解质:例如 Na^+ ; K^+ ; HCO_3^- ; CO_3^{2-} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; Fe^{2+} ; Cl^- ; 磷酸根离子,例如 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} ; 锌; 碘; 铜; 铁; 硒; 铬; 和钼。在可选的实施方案中,组合物不含 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 。在另一可选的实施方案中,组合物以小于5mg/l的总浓度或低于5mg/l的浓度包含 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 。在某些实施方案中,组合物不含电解质。例如,在某些实施方案中,组合物不包括以下各项中的一种或多种或任一种: Na^+ ; K^+ ; HCO_3^- ; CO_3^{2-} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; Fe^{2+} ; Cl^- ; 磷酸根离子,例如 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} ; 锌; 碘; 铜; 铁; 硒; 铬; 和钼。

[0149] 在某些实施方案中,组合物不含一种或多种选自以下的成分:寡糖、多糖和碳水化合物;寡肽或多肽或蛋白质;脂质;短链、中链和/或长链脂肪酸;和/或含有一种或多种上述营养素的食物。在某些实施方案中,组合物不包括葡萄糖或蔗糖。

[0150] 在一个实施方案中,磷酸根离子例如 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 用于缓冲本公开的组合物。在一个实施方案中,治疗性组合物使用 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 作为缓冲剂。在另一个实施方案中,治疗性组合物不使用 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 作为缓冲剂。

[0151] 在某些实施方案中,组合物包含:缬氨酸、苏氨酸、酪氨酸、电解质、 Na^+ (约10mmol至60mmol)和 K^+ (约1mmol至20mmol)。在某些实施方案中,组合物包括缓冲剂。

[0152] 干细胞和/或祖细胞疗法和用于伤口愈合、治疗皮肤病症、肺障碍、改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤的疗法

[0153] 本文描述了作为治疗GI、肺和皮肤障碍的疗法的氨基酸组合物。本公开提供了增强干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育的组合物和方法。本公开提供了组合物和方法,用于治疗有需要的受试者中与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤。可以通过增加干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育来增加所述细胞的数目。在一个实施方案中,该方法包括将干细胞和/或祖细胞暴露于本公开的组合物。干细胞和/或祖细胞可以在培养中、离体、原位或在体内暴露于组合物,包括在施用、植入/或递送到受试者中之后暴露。

[0154] 受试者可以是,例如,需要促进干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育的人类。受试者可以是,例如,患有需要治疗的疾病或病症的人类受试者。除人类外,动物可以是任何物种,包括但不限于哺乳动物物种,包括但不限于家养和实验动物,比如狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠;牲畜,比如马、牛、猪、绵羊、山羊、鸭、鹅和鸡;其他灵长类动物,比如猿、黑猩猩、猩猩和猴;鱼;两栖动物,比如青蛙和蝾螈;爬行动物,比如蛇和蜥蜴;以及其他动物,比如狐狸、骆驼、熊、羚羊、美洲驼、黄鼠狼、兔、水貂、海狸、貂、水獭、黑貂、海豹、丛林狼、毛丝鼠、鹿、麝鼠和负鼠。

[0155] 在一个实施方案中,该方法导致干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育的增加。在某些实施方案中,该方法导致受试者的状况改善,所述受试者患有与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口、皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症)、肺障碍(例如,哮喘)、粘膜屏障功能和/或GI粘膜损伤。

[0156] 在一个实施方案中,该方法包括将根据本发明的组合物引入培养中的干细胞和/

或祖细胞以促进存活、增殖和/或发育。因此,组合物可用于获得增加数量的细胞,用于治疗各种疾病和病症。

[0157] 在一个实施方案中,本公开提供了改善所植入干细胞的治疗结果的方法,该方法包括结合干细胞植入施用本公开的组合物。组合物的施用可以在人类或非人动物中的靶标干细胞植入部位处或附近。在某些实施方案中,本文提供了方法,该方法用于治疗有需要的受试者的与粘膜屏障功能有关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化有关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜的损伤,该方法包括向该有需要的受试者施用本文所述的组合物。

[0158] 在一个实施方案中,可以通过使用免疫抑制药物如环孢菌素,或通过使用局部施加的免疫抑制剂实施局部免疫抑制策略,对施用干细胞和/或祖细胞的接受者进行免疫抑制,但这种免疫抑制在某些免疫豁免组织(例如脑和眼组织)中不一定是先决条件。

[0159] 在某些实施方案中,施用的干细胞和/或祖细胞本质上是自体的,即从接受者自身组织制备。在这种情况下,干细胞的后代可以从解离的或分离的组织生成,并使用本公开的组合物在体外增殖。在适当扩增细胞数目后,可以收获细胞并准备施用到接受者的受影响组织中。

[0160] 在一个实施方案中,本公开提供了促进有所述需要的受试者中干细胞增殖和分化的方法,其中所述方法包括:鉴定有所述需要的受试者,并向该受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含以下各项,或基本上由其组成或由其组成:一种或多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸;和任选地,一种或多种药学上可接受的载体、佐剂和/或其他活性剂,其中该组合物具有约100至约280mosm的总摩尔渗透压浓度和约2.5至约6.5的pH。在某些实施方案中,本文提供了方法,该方法用于治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化相关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘),改善粘膜屏障功能和/或治疗GI粘膜损伤,其中所述方法包括:鉴定有所述需要的受试者,并向该受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含以下各项,基本上由其组成或由其组成:一种或多种选自由苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的组的游离氨基酸;和任选地,一种或多种药学上可接受的载体、佐剂和/或其他活性剂,其中该组合物具有约100至约280mosm的总摩尔渗透压浓度和约2.5至约6.5的pH。

[0161] 在另一个实施方案中,本公开的组合物和方法可用于克服继发于药物、化学品以及原因不明的病毒或细菌感染的骨髓抑制。

[0162] 在某些实施方案中,本公开可用于促进疾病和病症中的干细胞和/或祖细胞的增殖和发育,所述疾病和病症包括但不限于恶性肿瘤;潘氏细胞缺乏;垂体功能减退症;腹腔疾病,比如对无麸质饮食无反应的腹腔疾病;热带口炎性腹泻;与辐射相关的局部缺血;药物诱发的绒毛萎缩,如新霉素和硫唑嘌呤诱发的绒毛萎缩,严重的食物不耐受;先天性克罗恩病;自身免疫性肠病;小肠结肠炎;肝炎;肠癌;肠淋巴瘤;1型糖尿病;过敏;眼部病症,比如角膜撕裂;嗜酸细胞性胃肠炎;病毒性胃肠炎和免疫缺陷综合征。

[0163] 在一些实施方案中,本公开可用于促进病毒、真菌或细菌感染诱发的病症和疾病中的干细胞的增殖和分化,所述病症和疾病例如病毒、真菌或细菌感染诱发的骨髓抑制。例如,该组合物和方法可用于治疗患有例如由登革热(Dengue)病毒引起的低血小板计数的患

者。

[0164] 本文所述的组合物还可用于治疗或改善例如由以下疾病引起的缺陷的症状：神经变性疾病、创伤性损伤、神经毒性损伤、局部缺血、发育障碍、影响视力的障碍、脊椎损伤或疾病、脱髓鞘疾病、自身免疫疾病、感染、炎症性疾病或躯干 (corporal) 疾病。

[0165] 在某些实施方案中，植入的干细胞能够增殖、迁移到组织损伤区域，和/或以组织特异性方式分化并以减少缺陷的方式起作用。

[0166] 在一个实施方案中，根据本公开的方法和组合物特别可用于暴露于辐射或接受辐射、化学疗法和/或质子疗法的患者。

[0167] 在另一方面中，本公开提供了治疗有需要的受试者的胃肠道 (例如，小肠粘膜、食道、胃、大肠等)、泌尿生殖道或具有粘膜衬里的器官的损伤的方法，该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在另一方面中，本公开提供了治疗有需要的受试者中与粘膜屏障相关的病症的方法，该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。

[0168] 本公开的组合物可用于治疗或改善需要干细胞和/或祖细胞的增殖和/或发育的任何疾病或病症。在特定的实施方案中，本公开的组合物和方法可用于通过促进干细胞的增殖来治疗或改善辐射诱发的小肠损伤。在另一特定的实施方案中，本公开可用于治疗或改善由辐射疗法、特别是盆腔和腹部辐射疗法引起的小肠损伤。在特定的实施方案中，辐射疗法用于癌症治疗。

[0169] 另外，本公开可用于促进干细胞的增殖，以治疗或改善由化学治疗剂引起的小肠损伤，所述化学治疗剂包括但不限于顺铂、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、羟基脲、依托泊苷、阿拉伯糖苷、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、氟达拉滨、甲氨蝶呤、类固醇和/或其组合。示例性化学治疗剂包括但不限于抗雌激素 (例如他莫昔芬，雷洛昔芬和甲地孕酮)、LHRH激动剂 (例如戈舍瑞林 (goserelin) 和亮丙瑞林)、抗雄激素 (例如氟他胺和比卡鲁胺)、光动力学疗法 (例如维替泊芬 (BPD-MA)、酞菁、光敏剂Pc4和去甲氧基竹红菌甲素 (demethoxy-hypocrellin A, 2BA-2-DMHA))、氮芥 (例如环磷酰胺、异环磷酰胺、曲磷胺、苯丁酸氮芥、雌莫司汀和美法仑)、亚硝基脲 (例如卡莫司汀 (BCNU) 和洛莫司汀 (CCNU))、烷基磺酸酯 (例如白消安和曲奥舒凡)、三氮烯 (例如达卡巴嗪、替莫唑胺)、含铂化合物 (例如顺铂、卡铂、奥沙利铂)、长春花生物碱 (例如长春新碱、长春花碱 (vinblastine)、长春地辛和长春瑞滨)、紫杉烷 (例如紫杉醇或紫杉醇等效物，例如纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇 (ABRAXANE)、二十二碳六烯酸结合的紫杉醇 (DHA-紫杉醇, Taxoprexin)、聚谷氨酸结合的紫杉醇 (PG-紫杉醇, 紫杉醇 poliglumex, CT-2103, XYOTAX)、肿瘤激活的前药 (TAP) ANG1005 (结合到三个紫杉醇分子的靶向血管性肽素-2 (Angiopep-2))、紫杉醇-EC-1 (结合到erbB2识别肽EC-1的紫杉醇) 以及葡萄糖偶联的紫杉醇，例如，2-吡喃葡萄糖基琥珀酸2'-紫杉醇甲基酯；多西他赛、泰素 (taxol))、表鬼臼素 (epipodophyllin) (例如依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷、托泊替康、9-氨基喜树碱、喜树碱伊立替康 (camptothecin)、伊立替康、克立那托 (crisnatol)、丝裂霉素C)、抗代谢物、DHFR抑制剂 (例如氨甲喋呤、二氯氨甲喋呤、三甲曲沙、依达曲沙)、IMP脱氢酶抑制剂 (例如霉酚酸、噻唑呋啉 (tiazofurin)、利巴韦林和EICAR)、核糖核苷酸还原酶抑制剂 (例如羟基脲和去铁胺)、尿嘧啶类似物 (例如5-氟尿嘧啶 (5-FU)、氟尿苷、去氧氟尿苷、雷替曲塞 (ratitrexed)、替加氟-尿嘧啶、卡培他滨)、胞嘧啶类似物 (例如阿糖胞苷 (ara C)、胞嘧啶阿糖核苷和氟达拉滨)、嘌呤类似物 (例如巯嘌呤和硫鸟嘌呤)、维生素D3类似物 (例如EB

1089、CB 1093和KH 1060)、异戊烯化抑制剂(例如洛伐他汀)、多巴胺能神经毒素(例如1-甲基-4-苯基吡啶鎓离子(1-methyl-4-phenylpyridinium ion))、细胞周期抑制剂(例如星形孢菌素(staurosporine))、放线菌素(例如放线菌素D、更生霉素)、博来霉素(例如博来霉素A2、博来霉素B2、培洛霉素)、蒽环类抗生素(例如柔红霉素、多柔比星、聚乙二醇化脂质体多柔比星、伊达比星、表柔比星、吡柔比星、佐柔比星、米托蒽醌)、MDR抑制剂(例如维拉帕米)、Ca²⁺ATP酶抑制剂(例如毒胡萝卜内酯(thapsigargin))、伊马替尼、沙利度胺、来那度胺、酪氨酸激酶抑制剂(例如,阿西替尼(AG013736)、博舒替尼(SKI-606)、西地尼布(cediranib, RECENTINTM, AZD2171)、达沙替尼(**SPRYCEL®**, BMS-354825)、厄洛替尼(**TARCEVA®**)、吉非替尼(**IRESSAC®**)、伊马替尼(**Gleevec®**, CGP57148B, STI-571)、拉帕替尼(**TYKERB®**, **TYVERB®**)、来他替尼(CEP-701)、来那替尼(HKI-272)、尼罗替尼(**TASIGNA®**)、塞马西尼(semaxinib, SU5416)、舒尼替尼(**SUTENT®**, SU11248)、托赛拉尼(toceranib, **PALLADIA®**)、凡德他尼(**ZACTIMA®**, ZD6474)、瓦他拉尼(PTK787, PTK/ZK)、曲妥珠单抗(**HERCEPTIN®**)、贝伐珠单抗(**AVASTIN®**)、利妥昔单抗(**RITUXAN®**)、西妥昔单抗(**ERBITUX®**)、帕尼单抗(**VECTIBIX®**)、兰尼单抗(ranibizumab, **Lucentis®**)、尼洛替尼(**TASIGNA®**)、索拉非尼(NEXAVAR)、依维莫司(**AFINITOR®**)、阿仑珠单抗(**CAMPATH®**)、吉妥珠单抗奥佐米星(**MYLOTARG®**)、替西罗莫司(temsirolimus, **TORISEL®**)、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、乳酸多韦替尼(TKI258, CHIR-258)、BIBW 2992(TOVOKTM)、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF 1120(**VARGATEF®**)、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、替沃扎尼(tivozanib, AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647和/或XL228)、蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米(VELCADE))、mTOR抑制剂(例如,雷帕霉素、替西罗莫司(CCI-779)、依维莫司(RAD-001)、瑞达莫司(ridaforolimus)、AP23573(Ariad)、AZD8055(AstraZeneca)、BEZ235(Novartis)、BGT226(Novartis)、XL765(Sanofi Aventis)、PF-4691502(Pfizer)、GDC0980(Genentech)、SF1126(Semafoe)和OSI-027(OSI))、奥利默森(oblimersen)、吉西他滨、洋红霉素、醛氢叶酸(leucovorin)、培美曲塞、环磷酰胺、达卡巴嗪、甲基苄肼(procarbazine)、泼尼松龙、地塞米松、喜树碱、普卡霉素(plicamycin)、天冬酰胺酶、氨基蝶呤、甲基叶酸(methopterin)、泊非霉素、美法仑、异长春碱、环氧长春碱(leurosine)、苯丁酸氮芥、曲贝替定、丙卡巴肼、圆皮海绵内酯(discodermolide)、洋红霉素、氨基蝶呤和六甲三聚氰胺。

[0170] 在某些实施方案中,本公开可用于促进干细胞的存活和增殖,以治疗或改善涉及小肠损伤的疾病,包括但不限于炎症性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎、十二指肠溃疡、克罗恩病和/或腹部疾病(也称为乳糜泻)。本公开可用于治疗或改善由于病原性感染例如病毒、细菌、真菌或其他微生物感染引起的小肠损伤。

[0171] 在一个实施方案中,干细胞和/或祖细胞在用本公开的组合物处理之前已经历辐

射。在另一个实施方案中,干细胞和/或祖细胞将在用本公开的组合物处理后经历辐射。可以例如在用本文所述的组合物处理细胞之前或之后1分钟、5分钟、30分钟、1小时、6小时、12小时、1天、5天、7天、14天、30天、60天、3个月、6个月、1年、2年或3年或更长时间,将辐射施用到细胞。辐射的剂量可以是,例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100、120或150Gy。

[0172] 在一个实施方案中,本公开可用于骨髓移植情况下。骨髓干细胞和/或祖细胞可以用本公开的组合物在体内或离体处理。所述处理增强细胞的存活、增殖和/或发育。

[0173] 在另一个实施方案中,本公开可用于Prochymal情况下,Prochymal用于管控儿童的急性移植物抗宿主病。其为基于源自成人供体骨髓的间充质干细胞(MSC)的同种异体干细胞疗法。MSC的存活、增殖和/或发育可以通过使其在体内或离体与本公开的组合物接触来增强。

[0174] 在另一个实施方案中,本公开的组合物和方法可用于心脏治疗。用于治疗心肌梗塞的干细胞疗法通常利用自体骨髓干细胞;然而,可以使用其他类型的成体干细胞,例如脂肪组织源干细胞。在一个实施方案中,干细胞治疗的使用导致心脏组织再生以逆转心脏损伤后导致心力衰竭发展的组织损失。

[0175] 在另一个实施方案中,本公开的组合物和方法可用于血细胞形成和扩增。完全成熟的人类红细胞可以由作为红细胞前体的造血干细胞(HSC)离体产生。在这个过程中,HSC可以与基质细胞一起生长,产生模拟骨髓(红细胞的自然生长位点)条件的环境。除了使用本公开的组合物之外,还可以加入生长因子促红细胞生成素,诱导干细胞完成终末分化成红细胞。该组合物和方法还可用于扩增红细胞、白细胞和/或血小板的群体,以改善例如携氧能力(例如对于运动员)、免疫系统(包括用于治疗免疫受损的受试者),以及用于改善凝血。

[0176] 在另一个实施方案中,可以使用用本公开的组合物处理的胚胎干细胞使耳蜗毛发重新生长。

[0177] 在另一个实施方案中,根据本公开处理的干细胞可用于治疗失明和视力障碍。在特定的实施方案中,组合物和方法用于治疗角膜撕裂伤。

[0178] 在另一个实施方案中,本公开可用于增进组织移植成功的情况,包括产生胰岛素的胰腺 β 细胞的移植。这些细胞可以例如从胚胎干细胞制备,已经引起所述胚胎干细胞分化成 β 细胞。这些细胞可以用本公开的组合物在体内或离体处理。

[0179] 在另一个方面中,本公开提供了在有需要的受试者中治疗伤口和/或促进伤口愈合的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,本公开提供了治疗有需要的受试者的伤口的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,本公开提供了治疗有需要的受试者的伤口或烧伤的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,本公开提供了治疗有需要的受试者的烧伤的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,伤口是部分厚度伤口或全厚度伤口。在某些实施方案中,烧伤是部分厚度烧伤或全厚度烧伤。

[0180] 本公开也可以用于伤口愈合的情况下。在成年人中,受伤的组织最常被瘢痕组织取代,瘢痕组织的特征在于无序的胶原蛋白结构、毛囊缺失和不规则的脉管结构。在一个实施方案中,将干细胞“种子”放置在伤口床(wound bed)中的组织床(tissue bed)内,并允许

干细胞刺激组织床细胞中的分化。可通过使伤口(添加或未添加干细胞)与本公开的组合物接触来显著增强这种方法。在某些实施方案中,将组合物施加到皮肤。在某些实施方案中,将组合物施加到干细胞和/或祖细胞。

[0181] 在其他实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于美容应用,所述应用例如需要使皮肤各层和/或下方的组织复壮。这种复壮可通过例如增强的干细胞和/或祖细胞的存活、增殖和/或发育来辅助。例如,这种复壮可通过例如治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口、皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化有关的病症)、肺障碍(例如,哮喘)、粘膜屏障功能和/或GI粘膜损伤来辅助。

[0182] 在这个实施方案中,本公开的方法通常包括将组合物局部施加至需要这种治疗的患者的皮肤(例如表皮)的步骤,其中施加治疗有效量的这种组合物。在一个实施方案中,将组合物施加至面部。

[0183] 有利地,本发明提供了对抗皮肤老化的组合物和方法,其中对抗皮肤老化可以包括,例如,治疗皱纹、细纹和其他形式的不良皮肤纹理的外观。通过将组合物呈递到皮肤的真皮和/或表皮层,增强了皮肤的形式、强度和功能。在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于美容应用,所述应用例如需要使皮肤各层和/或下方的组织复壮。

[0184] 在另一方面中,本公开提供了治疗和/或预防有需要的受试者的皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病或与皮肤老化有关的病症)的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,皮肤病症是特应性皮炎、银屑病、皮肤老化、与皮肤老化相关的病症或褥疮。在一些实施方案中,皮肤病症是瘙痒(疥疮)、银屑病、湿疹、烧伤或皮炎。在某些实施方案中,皮肤病症是银屑病。在某些实施方案中,皮肤病症是瘙痒。

[0185] 在某些实施方案中,除了氨基酸之外,本公开的组合物包含可用于延迟、最小化或消除皮肤老化、皱纹和/或通常与内在条件(例如老化、绝经、痤疮等)和外在此条件(如环境污染、风、热、阳光、辐射、低湿度、刺激性表面活性剂等)相关的其他组织学变化。

[0186] 本发明可用于治疗性和/或预防性改善皮肤中的可见和/或触觉特征。例如,在一个实施方案中,细纹和/或皱纹的长度、深度和/或其他尺寸减小。

[0187] 在另一个方面中,本公开提供了治疗有需要的受试者的肺障碍的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,该组合物全身施用或经由吸入施用。在另一个方面中,本公开提供了在有需要的受试者中改善肺功能、肺愈合、减少肺炎、降低气道阻力和/或改善肺功能的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物。在某些实施方案中,肺部病症是肺损伤、肺炎、与气道阻力相关的病症、哮喘或肺的炎性病症。在某些实施方案中,该组合物全身施用或经由吸入施用。

[0188] 在一个实施方案中,施加至皮肤或其他组织的组合物可以进一步包含胶原蛋白和/或透明质酸(HA)。在一个实施方案中,HA是交联的HA。组合物可以进一步包含例如但不限于以下组分:皮肤病学上可接受的载体、脱屑剂、抗痤疮剂、抗皱剂/抗萎缩剂、维生素B₃化合物、类维生素A、羧基酸、抗氧化剂/自由基清除剂、螯合剂、黄酮类化合物、抗炎剂、消脂剂(anti-cellulite agent)、表面麻醉剂、鞣剂、皮肤美白剂、润肤剂(skin soothing agent)和皮肤修复剂、抗微生物剂和抗真菌剂、防晒剂、调理剂、结构剂(structuring agent)、增稠剂(包括稠化剂和胶凝剂)、合成制剂(composition preparation)和防腐剂。在这方面,国际PCT申请出版物WO 2008/089408通过引用整体并入本文。

[0189] 本公开的组合物也可以在手术部位施用,包括在微创手术部位,以改善愈合和手术结果。

[0190] 也可以根据本公开使用干细胞来治疗不育症。在某些实施方案中,首先诊断出患有如下病症的人:对其而言干细胞的存活、增殖和/或发育将是有益的。例如,受试者可以被诊断为患有该病症,并且随后通过导致干细胞存活、增殖和/或发育的途径和量来施用本申请的组合物。优选地,然后所述施用导致该病症的治疗(例如,改善)。

[0191] 使用组合物促进肠干细胞和/或祖细胞增殖和/或发育,以及治疗与粘膜屏障功能相关的疾病或病症、皮肤病症、肺障碍,改善粘膜屏障功能和GI粘膜损伤

[0192] 本文描述了氨基酸组合物用于治疗GI、肺和皮肤障碍的用途。在特定的实施方案中,本发明的组合物可用于诱导肠上皮细胞增殖,这导致绒毛高度增加,其中绒毛包括成熟的分化的上皮细胞,这些上皮细胞导致电解质和营养吸收增加。在一个实施方案中,根据本公开的组合物刺激干细胞和/或祖细胞的增殖和分化,如通过增加刷状缘膜中NHE3和SGLT1的表达水平所证明的。因此,组合物增加了绒毛高度,并且还增加了电解质和营养吸收的关键转运蛋白的表达。

[0193] 因此,在一个实施方案中,本公开提供药物组合物,其用于通过促进干细胞的分化或增殖来预防或治疗特别是在绒毛区和刷状缘的与小肠上皮细胞损失相关的胃肠损伤,和/或治疗或改善与小肠吸收能力的改变相关的疾病或病症。这些干细胞位于肠隐窝的下部,在哺乳动物中包括快速循环的隐窝基底柱状细胞(CBC)和潘氏细胞上方的更静止的“+4”细胞。

[0194] 本公开还提供了方法,该方法用于通过促进干细胞的分化和增殖来治疗或改善特别是在绒毛区和刷状缘中的与小肠上皮细胞损失相关的疾病或病症,以及与小肠上皮中转运蛋白功能的改变相关的疾病或病症。该方法包括向需要这种治疗的受试者施用有效量的本公开的组合物。在另一方面中,本公开提供了方法,该方法用于治疗有需要的受试者的与粘膜屏障功能相关的疾病或病症例如伤口愈合,治疗皮肤病症(例如,特应性皮炎、银屑病、褥疮或与皮肤老化有关的病症),治疗肺障碍(例如,哮喘)、与改善粘膜屏障功能有关的病症,和/或治疗GI粘膜损伤。

[0195] 制剂和试剂盒

[0196] 本公开提供治疗或药物组合物,其包含治疗有效量的主题组合物和任选地一种或多种药学上可接受的载体。本公开提供治疗、药物、美容或营养组合物,其包含治疗有效量的主题组合物和任选地一种或多种药学上可接受的载体。这种药物载体可以是液体,例如水。治疗性组合物还可以包含赋形剂、佐剂、调味剂等,其有助于将活性化合物加工成可以在药学上使用的制剂。适当的制剂取决于所选施用途。在实施方案中,治疗性组合物和其中所含的所有成分都是无菌的。合适的药物载体的例子描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。此类组合物含有治疗有效量的治疗性组合物,以及合适量的载体,以便为患者提供适于施用的形式。制剂应适合于肠内施用模式。

[0197] 在一个实施方案中,组合物的施用可以是全身的。经口、静脉内、动脉内、皮下、腹膜内、肌内、心室内、鼻内、经粘膜、皮下、外部、经直肠和其他施用模式都有所预期。

[0198] 在一个实施方案中,对于注射,可以将活性成分配制于水溶液中,优选地配制于生理上相容的缓冲剂中。对于经粘膜施用,在制剂中使用适合于要渗透的屏障的渗透剂。这种

渗透剂通常是本领域已知的。对于口服施用,活性成分可以与适合包括在片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等中的载体组合。制剂还可以经制备用于吸入疗法。对于通过吸入施用,组合物可以使用合适的推进剂,以气溶胶喷雾呈递形式从加压包装或雾化器递送。组合物也可以作为粉末通过吸入或其他途径施用。

[0199] 目前描述的组合物的治疗有效剂量可以由本领域技术人员确定,目标是获得所需数目的干细胞和/或前体细胞。可以使用这些细胞的标志物或通过确定这些细胞的分化后代数目的增加来评估干细胞和前体细胞数目的增加。用于测量分化细胞的增加数目的方法是本领域已知的。例如,也可以使用免疫组织化学、行为评估或电生理学技术。本领域技术人员可以容易地检测特定表型的细胞数目的增加。

[0200] 在具体实施方案中,根据本公开的方法包括通过持续释放系统施用治疗性组合物。持续释放系统的合适例子包括合适的聚合物材料(例如呈成形制品形式的半透性聚合物基质,例如薄膜或微胶囊)、合适的疏水性材料(例如作为可接受的油中的乳液)或离子交换树脂和微溶衍生物(例如,微溶盐)。持续释放组合物可以口服、胃肠外、脑池内、腹膜内、外部施用(如通过粉末、软膏、凝胶、滴剂或透皮贴剂),或作为口服或鼻喷雾施用。持续释放基质包括聚交酯(美国专利第3,773,919号、EP 58,481)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman et al., Biopolymers 22:547-556, 1983, 聚(2-羟基乙基甲基丙烯酸酯)); (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982, 乙烯乙酸乙烯酯(Langer et al., Id.)或聚-D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988))。

[0201] 在一个实施方案中,可植入药物输注装置可用于为患者提供恒定长期剂量或输注治疗性组合物。这种设备可以分为主动式或被动式。

[0202] 在一个实施方案中,聚合物可用于离子控制释放。用于受控药物递送的各种可降解和不可降解的聚合基质是本领域已知的(Langer, Accounts Chem. Res. 26:537, 1993)。例如,嵌段共聚物、泊洛沙姆407、羟基磷灰石和脂质体。

[0203] 本发明的药物组合物可以单独使用或与一种或多种已知有效治疗疾病的药物组合使用。组合物还可以与至少一种其他试剂组合配制,例如稳定或缓冲化合物,其可以在任何无菌的生物相容的药物载体(包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖和水)中施用。除了本文讨论的组合物中的关键组分细胞或影响因子外,组合物还可含有合适的药学上可接受的载体,包含赋形剂和助剂,其有助于将活性化合物加工成可在药学上使用的制剂。组合物可以使用药学上可接受的载体或赋形剂制备成单一剂型,或者可以含于多剂量容器中。

[0204] 在一个实施方案中,组合物可以进一步含有其他增殖和/或分化诱导剂。增殖或分化诱导剂可以是任何一种已知作为增殖或分化诱导剂的试剂。例子包括成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)和视黄酸。

[0205] 组合物可以进一步含有其他常用添加剂,例如抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂等,并且可以通过进一步添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂、润滑剂等配制成可注射制剂(例如水溶液、悬浮液、乳液等)、药丸、胶囊、颗粒剂、片剂等。

[0206] 本发明的食物组合物可以含于保健功能食物中。

[0207] 本发明的保健功能食物可以根据本领域常用的方法制备,并且在制备该保健功能食物时可以加入常用的原料和成分。

[0208] 当本发明的组合物包括在保健功能食物中时,该组合物可以根据常用的方法单独

添加或与另一保健功能食物或其他食物成分一起添加。活性成分的量可以根据使用目的(例如,预防、健康改善或治疗干预)适当地确定。食物组合物可以进一步包含例如前生物(pre-biotic)或益生菌(pro-biotic)物质。

[0209] 食物种类不限。可以添加组合物的食物的例子包括肉、香肠、面包、巧克力、糖果、点心、糕饼、比萨饼、拉面、其他面条、口香糖、包括冰淇淋的乳制品、汤、饮料、茶、饮品、酒精饮料、维生素复合物等。

[0210] 本公开还涵盖试剂盒(例如,药物包(pack)、治疗包、美容包或营养包)。所提供的试剂盒可以包含本文所述的药物组合物或化合物和容器(例如,小瓶、安瓿、瓶、注射器和/或分配器包装,或其他合适的容器)。在一些实施方案中,提供的试剂盒可任选地进一步包括第二容器,其包含用于稀释或悬浮本文所述的药物组合物或化合物的药物赋形剂。在一些实施方案中,组合在第一容器和第二容器中提供的本文所述的药物组合物或化合物组合以形成一个单位剂型。

[0211] 因此,在一个方面中,提供了包括第一容器的试剂盒,所述第一容器包含本文所述的组合物。在某些实施方案中,试剂盒可用于治疗有需要的受试者的障碍(例如,GI、肺和皮肤障碍)。在某些实施方案中,试剂盒可用于预防有需要的受试者的障碍(例如,GI、肺和皮肤障碍)。

[0212] 在某些实施方案中,本文描述的试剂盒还包括使用试剂盒中所包括的组合物的说明书。本文描述的试剂盒还可以包括管理机构(例如美国食品和药物管理局(FDA))所要求的信息。在某些实施方案中,试剂盒中包括的信息是处方信息。在某些实施方案中,试剂盒和说明书提供用于治疗 and/或预防有需要的受试者的障碍(例如,GI、肺和皮肤障碍)。本文描述的试剂盒可以包括作为单独组合物的一种或多种额外的本文描述的的药物试剂或其他药剂。

[0213] 给药方法

[0214] 在一个实施方案中,本公开涉及将根据本公开的组合物施用给受试者,以及进一步向该受试者施用干细胞和/或祖细胞。组合物在所述受试者的一个部位处施用,以允许与细胞接触。这个部位可以与干细胞施用位置处于相同位置,靠近干细胞施用位置或远离干细胞施用位置。

[0215] 干细胞和/或祖细胞可以通过例如用注射器注射一个或多个细胞、用导管插入干细胞或通过手术植入干细胞来施用。在某些实施方案中,将干细胞施用到与靶标组织流体连接的体腔中。在某些优选实施方案中,该体腔是脑室。在其他实施方案中,使用注射器或导管插入细胞,或直接在靶标组织部位通过手术植入。在其他实施方案中,干细胞和/或祖细胞是胃肠外施用的。胃肠外施用定义为通过绕过胃肠道的途径来施用。胃肠外施用包括心室内施用。

[0216] 通常,组合物可以通过多种途径中的任何一种施用,包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透皮、皮下、腹膜内、鼻内、胃肠外、外部、舌下或经直肠方式。各种因子可以在与施用干细胞相同的位置施用。影响因子和干细胞的施用可以同时进行,或者先后进行,并且在相同或不同的位置进行,只要相对位置和时序允许所述因子影响干细胞和/或祖细胞即可。

[0217] 例如,通过使用“基本上由……组成”,治疗性组合物不含任何未指明的成分,该成

分包括但不限于对促进干细胞发育具有直接有益或不利的治疗作用的游离氨基酸、二肽、寡肽或多肽或蛋白质;以及单糖、二糖、寡糖、多糖和碳水化合物。此外,通过使用术语“基本上由……组成”,组合物可以包含对促进干细胞发育没有治疗作用的物质;这些成分包括不影响干细胞的促进和/或发育的载体、赋形剂、佐剂、调味剂等。

[0218] 应当理解,本文描述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且本领域技术人员可根据所述实施例和实施方案提出各种修改或改变,并且所述修改或改变应包括在本申请的精神和范围内。

[0219] 实施例

[0220] 材料和方法

[0221] 动物模型:给8周龄雄性NIH Swiss小鼠喂食正常饮食,并且每笼饲养4只小鼠。使用以平行且相对的几何形状容纳两个铯-137源的Gammacell 40 Exactor低剂量研究辐照器(Best Theratronics,Ottawa,Ontario)辐照小鼠,以 $\pm 3\%$ 内的剂量均匀性提供各向同性的(isotropic)辐照。小鼠以0.9Gy/分钟的剂量速率接受TBI的单个级分。用塑料夹具将小鼠固定在辐照室的中间,该辐照室允许5只小鼠同时被辐照。将用该制剂处理的小鼠通过胃饲每天一次给予AA-ORS(每只小鼠0.3ml)。向对照组给予生理盐水。该氨基酸制剂作为支持疗法给予,并且不是替代疗法的一部分。小鼠在强饲前禁食8小时。在辐照后6天发生阴离子分泌峰值时,通过CO₂吸入接着颈脱位(根据AVMA动物安乐死指南)将动物人道地安乐死。毒性主要归因于急性GI综合征并且仅受骨髓综合征的最小干扰。¹⁸在放血之后,如前所述获得回肠粘膜。^{18,20}所有实验均由佛罗里达大学动物保护与利用机构委员会(University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)批准并根据IACUC协议#3875进行。

[0222] 隐窝计数和绒毛长度测量:从肠段获得石蜡切片(5 μ m),该肠段的取向使得该切片垂直于肠的长轴进行切割。计算每个圆周的隐窝,并从回肠获得的10个切片来计算绒毛长度。为了确定细胞存活曲线参数,将隐窝计数归一化并使用经典方法分析。²¹给予AA-ORS治疗持续6天时间。使用生理盐水作为对照。

[0223] 细胞增殖和隐窝至绒毛迁移测定:将5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU,胸苷类似物)掺入细胞DNA中,并且EdU与荧光叠氮化物在铜催化的反应中的后续反应被用来研究隐窝细胞区域中的细胞增殖。给小鼠注射在150ml PBS中的0.5mg EdU(16.7mg/Kg)以评估隐窝细胞中的有丝分裂活性(这些研究揭示隐窝中的S期)并在注射后24、48和72小时进行安乐死。制备来自小鼠回肠的石蜡切片,并按照制造商的说明书(Alexa 647成像试剂盒,目录号C10340)将掺入的EdU(Thermo Fisher Scientific目录号A10044)可视化。然后将切片封片(mount)在具有DAPI(VectaShield,目录号H-1200)的抗荧光淬灭封片剂(fluorescent mounting media)中。按照整个隐窝和绒毛单位对细胞进行评分。每只小鼠分析至少60个隐窝和相应的绒毛。将EdU标记的细胞归一化为每个隐窝或绒毛的总细胞数目。阳性染色的肠细胞显示从隐窝的基底迁移至绒毛的尖端。

[0224] 钠和氯吸收的通量研究:将剥离的回肠片(ileal sheet)安装在具有0.3cm²暴露表面积 of 尤斯室(P2304,Physiologic Instruments,San Diego,CA,USA)的两半之间。将含有(mmol⁻¹)Na⁺140、Cl⁻119.8、K⁺5.2、HPO₄⁻2.4、H₂PO₄⁻0.4、Mg²⁺1.2、Ca²⁺1.2和HCO₃⁻25的林格溶液用95% O₂和5% CO₂双边鼓泡,并维持在37℃下。在使组织稳定45分钟后,如先前所述

使用计算机控制的电压/电流钳装置 (VCC MC-8, Physiologic Instruments) 记录表示为 $\mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的基础 (basal) 短路电流 (I_{sc}) 和表示为 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的电导率 (G)。^{18,20} 对于通量研究, 如先前所述使用钠 (^{22}Na) 和氯 (^{36}Cl) 的放射性同位素研究穿过回肠粘膜的钠和氯通量。^{18,20} ^{22}Na 活性使用 γ 计数器 (Wizard 2, 2480 自动伽马粒子计数器, Perkin Elmer, USA) 测量, 而 ^{36}Cl 使用液体闪烁计数器 (LS 6500 多用途闪烁计数器, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) 测量。

[0225] 实时定量聚合酶链反应 (PCR): 使用 TRIZOL 方法从未辐照和辐照的小鼠 (0Gy、5Gy 和 7Gy) 的肠组织样品中提取 RNA。使用 c-DNA 试剂盒 (iScript™ Select cDNA 合成试剂盒, Bio-Rad, Hercules, CA) 制备 C-DNA; 使用半胱天冬酶 3、Lgr5、sglt1 和 BMI1 的特异性寡核苷酸引物进行半定量和实时 PCR。将 c-DNA (2 μL) 添加至 25 μL 的 PCR 混合物中进行半定量 PCR, 并且添加 20 μL 的 SyBr 绿色混合物进行定量 PCR; 进行 30 个 PCR 循环 (或更多, 如结果中所示), 使用 Veriti 热循环仪 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 用于半定量 PCR 并且使用 CFX Connect 实时系统循环仪 (Bio-Rad) 用于实时 PCR。一个循环由 94°C 下变性 30sec, 退火 60sec 和 72°C 下延伸 90sec 组成。通过琼脂糖凝胶电泳解析扩增子, 并通过溴化乙锭染色检测。使用 CFX Manager™ 软件 (Bio-Rad) 进行实时分析。标准化使用 $\Delta - \Delta\text{Ct}$ ($\Delta\Delta\text{Ct}$) 方法。简而言之, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (靶基因处理的) - Ct (参考基因处理的) 并且 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (靶基因对照) - Ct (参考基因对照)。因此, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (处理的) - Ct (对照)。从公式 $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ 计算倍数变化。

[0226] 蛋白质印迹: 在冰冷的 RIPA 缓冲剂 [50mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、150mmol/L NaCl、1% IGEP AL、1mmol/L EDTA、0.25% 脱氧胆酸钠、1mmol/L 氟化钠、1mmol/L 原钒酸钠、0.5mmol/L PMSF、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑肽酶、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮抑肽酶] 中制备来自未辐照和辐照的经 AA-ORS 治疗或经盐水治疗的小鼠的总细胞裂解物。通过 BCA 测定 (Sigma, St. Louis, MO) 来测定每种提取物中的蛋白质浓度。将细胞提取物进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE); 将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 并用检测 Lgr5、SGL T1、Bmi 1、半胱天冬酶 3、p-ERK 和总 ERK 的第一抗体进行探测。用来自 LI-COR 的 Odyssey CLX 检测信号。根据制造商的说明书, 使用可逆的丽春红 S 染色剂 (目录号 786-575, G Biosciences) 来检查相等的凝胶负载量。将感兴趣的蛋白质的丰度归一化为每个泳道中蛋白质的总量。该技术使得与将蛋白质密度与单一蛋白质进行比较相关的变化最小化。

[0227] 使用多克隆兔抗小鼠 GPCR (Lgr5) (Abcam 目录号 ab75732)、Ki-67 (Abcam 目录号 ab15580) 和 PCNA (Abcam 目录号 ab18197) 抗体对核蛋白 PCNA 和 Ki-67 以及干细胞特异性膜蛋白 Lgr5 进行免疫组织化学鉴定。根据制造商的说明书使用兔特异性 ABC 检测试剂盒 (Abcam 目录号 ab64261) 将蛋白质的表达可视化。简而言之, 将福尔马林固定的、石蜡包埋的全厚度回肠样品切成 4 μm 厚的横截面, 安装在 Superfrost Plus 载玻片上, 脱石蜡并再水化。对于抗原修复 (antigen retrieval), 使用高压锅 (125°C 持续 30sec, 并且 90°C 持续 10sec) 和修复缓冲剂——pH 6.0 的 DeLoaker RTU 缓冲剂 (Biocare Medical 目录号 RV1000MMRTU)——进行热预处理。在淬灭内源性过氧化物酶并阻断非特异性结合后, 将切片与在 PBS 中稀释的第一抗体一起孵育 (Lgr5-1:100, Ki-67-1:1000, PCNA-1:4000, 分别在室温下持续 2 小时; 15min; 和 2 小时)。PBS 用作阴性对照。然后将组织与生物素化的山羊抗兔第二抗体一起孵育 10 分钟。在与链霉亲和素过氧化物酶一起孵育后, 通过在显微镜下可视化, 用二氨基联苯胺获得所需的染色强度。将切片用 Mayer 的苏木精 (Electron

Microscopic Sciences (EMS) 目录号26043-05) 复染,脱水并封片在Permount封固剂 (Fisher Scientific目录号SP15-100) 中。通过光学显微镜使用20x物镜评估PCNA和Ki-67的载玻片,并且对于Lgr5用油浸法使用40x物镜进行评估。从每组50个隐窝计数阳性棕色细胞的数目并进行分析。

[0228] 统计:结果表示为平均值±平均值的标准误差(S.E.M.)。统计分析分2个步骤进行:1) 使用方差分析(ANOVA) (或其非参数等效Kruskal-Wallis) 测试整体差异;2) 对所有成对比较计算Bonferroni调整的P值。

[0229] 实施例1-AA-ORS增加来自辐照小鼠的肠组织中的隐窝计数和绒毛长度

[0230] 用AA-ORS治疗的辐照小鼠(5-15Gy)的肠组织显示出每个圆周的隐窝计数(N)的显著增加。由于隐窝由再生单位形成,因此这些结果表明上皮祖细胞数目增加。类似地,与盐水治疗相比,AA-ORS治疗的所有辐射剂量下的绒毛长度显著增加(图1B)。这与在自然脱落之前增加的祖细胞增殖和/或更长的上皮细胞存活一致。

[0231] 使用单命中多靶点细胞存活模型对隐窝存活曲线建模以评估生物效应。在不限制恒定细胞敏感性的情况下,N值为 10.4 ± 0.2 和 5.3 ± 0.1 ($P < 0.001$),这表明与对照相比每个圆周的祖细胞单位几乎加倍。当限制恒定的 D_0 (4.8 ± 0.1 Gy) 时,在 8.8 ± 0.4 至 6.1 ± 0.3 时差异仍然显著($P < 0.001$)。准阈值剂量(D_q)值是隐窝辐射耐受性的综合量度,对于经AA-ORS治疗的小鼠其为 10.5 ± 0.5 Gy,对于经盐水治疗的小鼠其为 8.8 ± 0.4 Gy ($P < 0.01$)。

[0232] 与生理盐水组相比,AA-ORS组在低辐射剂量区域具有“宽肩(broad shoulder)”,这表明每个肠圆周的祖细胞数目增加(衰老较少)(图1A)。

[0233] 正如所预期,末端部分遵循指数关系。由于5Gy是最低辐射剂量,在该剂量下隐窝计数和绒毛高度均显著增加,所有后续研究均在0和5Gy辐照小鼠中进行。

[0234] 发现增加的体重增加和存活可能继发于隐窝数目和绒毛高度的增加,其继而增加吸收的表面积。已经表明隐窝数和绒毛高度随着辐照后6天开始的AA-ORS治疗而增加。使用用于隐窝存活的单命中多靶点模型发现,每个回肠圆周的隐窝祖细胞单位数目(N)显著增加($P < 0.001$),而 D_0 没有变化(4.8 ± 0.1 Gy)(图1A)。在使用AA-ORS治疗的情况下, D_q 值将当量改善为1.7Gy的辐射耐受性增加,这表明改善的隐窝存活。隐窝存活研究表明祖细胞单位或干细胞/隐窝增加。因此,使用肠干细胞标志物特异性抗体和通过EdU掺入将子细胞迁移到增殖继发的绒毛中来检查辐照和AA-ORS对干细胞数目的影响。¹⁴⁻¹⁶

[0235] 实施例2-AA-ORS促进肠上皮细胞迁移

[0236] 用AA-ORS治疗的辐照小鼠的回肠切片显示隐窝计数增加。随着绒毛上皮细胞的不断更新,细胞也沿着隐窝-绒毛轴连续迁移。²³随着细胞沿着绒毛移动,上皮细胞经历进一步成熟和分化,然后迁移至绒毛的尖端,在绒毛尖端中它们通过失巢凋亡现象(anoikis)脱落。²⁴使用EdU掺入研究细胞增殖。

[0237] 发现细胞在约72小时内从隐窝基底迁移至绒毛尖端。来自未辐照小鼠的回肠切片显示细胞(掺入EdU)在不同时间(75 ± 0.9 小时; $n = 10$ 只小鼠)到达绒毛尖端,平均为76.5小时。AA-ORS治疗持续6天不会导致0和5Gy辐照小鼠之间迁移细胞所覆盖的长度的显著差异(153.5 ± 6 mm与 158.1 ± 7 mm; $n = 10$ 只小鼠)。然而,AA-ORS治疗持续6天导致5Gy辐照小鼠中的显著差异(158.1 ± 7 mm vs 183.1 ± 4 mm; $p < 0.01$, $n = 10$ 只小鼠)(图2A和图2B)。这些研究表明AA-ORS增加了增殖并且与所覆盖的长度有关。

[0238] 实施例3-AA-ORS增加钠和氯吸收

[0239] AA-ORS增加隐窝细胞区域中的绒毛高度和增殖。为了确定增加的绒毛高度是否导致功能上成熟和分化的绒毛上皮细胞,进行同位素通量研究以测定钠和氯吸收。

[0240] 未辐照小鼠具有 $1.9 \pm 0.6 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ 的净钠吸收($J_{\text{Net}} \text{Na}$)和 $1.9 \pm 0.4 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ 的净氯吸收($J_{\text{Net}} \text{Cl}$) (图3A至图3B)。5Gy辐照小鼠的回肠的 $J_{\text{Net}} \text{Na}$ ($1.9 \pm 0.6 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ 相对于 $0.1 \pm 0.0 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $P < 0.001$, $n = 8$)和 $J_{\text{Net}} \text{Cl}$ ($1.9 \pm 0.4 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ 相对于 $-0.9 \pm 0.4 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)降低。AA-ORS治疗导致0Gy ($3.9 \pm 0.7 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $p < 0.05$, $n = 8$)和5Gy ($3.4 \pm 0.7 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $p < 0.001$, $n = 8$)小鼠的回肠中的净钠吸收显著增加(图3A)。类似地,AA-ORS治疗导致0Gy ($4.1 \pm 0.6 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $p < 0.05$, $n = 8$)和5Gy ($3.6 \pm 0.6 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $p < 0.001$, $n = 8$)小鼠的回肠中增加的氯吸收(图3B)。

[0241] 这些研究通过显示电解质吸收能力和钠偶联的葡萄糖吸收增加(这是成熟和分化的绒毛上皮细胞的功能),表明AA-ORS诱导的绒毛高度增加是功能性的。

[0242] NHE3蛋白的免疫组织化学显示了沿绒毛上皮细胞的刷状缘区域的NHE3抗体识别(图3C)。来自5Gy辐照动物的绒毛细胞显示沿刷状缘膜具有很少或没有表达。用AA-ORS治疗增加沿0Gy和5Gy辐照小鼠的上皮细胞中边缘区域的NHE蛋白表达(图3C)。蛋白质印迹分析显示,与经盐水治疗的辐照小鼠相比,以0Gy(3.5倍)和5Gy(15.5倍)辐照的经AA-ORS治疗的小鼠的肠组织中增加的NHE3蛋白表达(图3D至图3E)。这些研究表明绒毛上皮细胞的刷状缘膜中NHE3蛋白的增加。为了确定NHE3蛋白的增加是否由NHE3mRNA的增加引起,使用qPCR测定其在肠组织中的水平(图3F)。与NHE3蛋白水平不同,当与经盐水治疗的5Gy辐照小鼠相比时,NHE3 mRNA水平仅在5Gy下显著不同。蛋白质水平与NHE3 mRNA水平的变化不相关,并且先前已报道过类似的观察结果。

[0243] 实施例4-AA-ORS增加葡萄糖刺激的钠吸收

[0244] 葡萄糖经由位于绒毛中的成熟和分化的上皮细胞的顶膜(apical membrane)中的特异性转运蛋白刺激钠吸收。为了确定AA-ORS诱导的绒毛高度增加是否导致改善的葡萄糖吸收,使用 ^{22}Na 通量研究评估葡萄糖刺激的钠吸收。

[0245] 来自5Gy辐照小鼠的回肠组织显示葡萄糖刺激的钠吸收的显著降低($4.8 \pm 0.5 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ 相对于 $0.3 \pm 0.1 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $p < 0.001$, $n = 6$)。来自经AA-ORS治疗的5Gy辐照小鼠的回肠组织显示葡萄糖刺激的钠吸收的显著增加($0.3 \pm 0.1 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ 相对于 $3.1 \pm 0.3 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $p < 0.001$, $n = 6$),而0Gy辐照小鼠没有显示出这种增加($4.8 \pm 0.5 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ 相对于 $5.9 \pm 0.7 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $p = \text{ns}$, $n = 6$) (图4A)。与经盐水治疗的小鼠相比,在0Gy和5Gy辐照小鼠中AA-ORS治疗在转录和翻译水平上增强SGLT1表达(图4B至图4D)。这些研究通过显示消化间期(NHE3-介导的 Na^+ 吸收)和消化期(葡萄糖刺激的 Na^+ 吸收)中的电解质吸收能力增加(这两者都是成熟和分化的绒毛上皮细胞的功能),表明AA-ORS诱导的绒毛高度增加是功能性的。

[0246] 使用蛋白质印迹分析测量分离的绒毛细胞中的 β -半乳糖苷酶(乳糖蛋白)水平。主要地, β -半乳糖苷酶表达发生在成熟和分化的绒毛上皮细胞中。AA-ORS治疗增加0Gy和5Gy辐照小鼠的绒毛细胞中的 β -半乳糖苷酶蛋白水平(图4B)。

[0247] 实施例5-AA-ORS对肠干细胞和增殖标志物的影响

[0248] 假定至少三种不同的隐窝细胞类型代表肠干细胞(ISC)。 14 群体中的每个成员都具

有不同的增殖动力学和对辐射的敏感性;因此,每个成员都被认为具有独特的功能。²⁸据信其响应由细胞因子、激素或生长因子引起的抑制和刺激信号,从一种类型动态地转变到另一种类型。²⁹相比之下,在“+4隐窝位置”的缓慢循环的肠上皮干细胞(IESC)[标记滞留细胞(LRC)]有助于稳态再生能力,特别是在从损伤恢复期间。³⁰这些LRC表达各种标志物,例如BMI1、HOPX、LRIG1和/或DCLK1,并且可以响应损伤而改变为快速循环的IESC。³¹Lgr5可以标记两种细胞,而据报道Bmi1和HopX优先标记+4细胞。¹⁴Lgr5⁺ISC是辐射损伤后肠再生所必需的。³²Lgr5⁺和BMI1被认为是储备细胞,其在损伤或辐射诱发的损伤后发动再生反应。研究已表明,由于表达BMI1的干细胞库的激活,Lgr5⁺细胞的损失是耐受的。^{14,32}

[0249] 为了确定干细胞数目和增殖的增加是否与对于AA-ORS所观察到的增加的绒毛高度有关,研究了AA-ORS对干细胞标志物和增殖的影响。

[0250] 辐射导致Lgr5蛋白水平显著降低(图5A)。与经盐水治疗的对照组相比,AA-ORS在0Gy和5Gy辐照小鼠中增加Lgr5蛋白水平。然而,当与0Gy相比时,来自5Gy辐照小鼠的肠组织显示BMI1蛋白水平没有显著变化。类似地,AA-ORS在0Gy和5Gy辐照小鼠中没有引起BMI1蛋白水平的变化(图5A)。在经AA-ORS治疗的0Gy和5Gy小鼠中,Lgr5转录物水平而不是BMI1水平显著增加(图5C至图5D)。

[0251] 发现当与0Gy相比时,5Gy导致Lgr5转录物和蛋白质水平显著降低,而Bmi1水平没有太大变化。发现在AA-ORS治疗的情况下Lgr5mRNA和蛋白质水平显著增强,而Bmi1没有太大变化,这表明Lgr5阳性干细胞增加。这些结果还显示,当与经盐水治疗的小鼠相比时,经AA-ORS-治疗的辐照小鼠的肠切片中被迁移细胞覆盖的长度显著更大。由于转录在经历凋亡的细胞中停止,因此增加的细胞存活优先地提高短寿命转录物如Lgr5,而不是长寿命转录物。肠组织中的BMI1蛋白水平没有响应于辐射或AA-ORS而变化,这表明在所研究的辐射剂量下ISC的储备群体未受影响。此外,Lgr5蛋白水平在AA-ORS的情况下的增加支持在隐窝计数研究中的这些观察结果,即当适合作为单命中多靶点模型时,增加辐射剂量后的AA-ORS治疗导致ISC数目的增加。

[0252] 使用全细胞级分研究ERK1/2和pERK1/2的蛋白质印迹分析以评估辐射和AA-ORS对增殖的影响。为了测定ERK和AKT的转录物水平,在不存在和存在治疗的情况下,在从0Gy和5Gy辐照的组织分离的上皮细胞中进行qPCR研究。ERK1/2和AKT在激活时被磷酸化。蛋白质印迹分析显示0Gy和5Gy下p-ERK蛋白水平的显著差异(图5A)。在0Gy或5Gy下经AA-ORS治疗和经盐水治疗的小鼠中,总ERK蛋白水平没有显著差异。类似地,在ERK的情况下,用AA-ORS治疗的0和5Gy小鼠在AKT水平上没有显示出显著差异,而当与相应的经盐水治疗的辐照组相比时,它们确实显示出p-AKT蛋白水平的增加。与0Gy小鼠相比,来自5Gy小鼠的肠组织显示p-AKT显著降低。

[0253] 这些研究表明,在AA-ORS治疗的情况下蛋白质的磷酸化水平增加而总蛋白表达没有变化。由于MAPK的作用依赖于其下游效应物——激活转录因子4(Atf4),因此使用蛋白质印迹分析测量Atf4蛋白水平。5Gy辐照降低了Atf4的蛋白水平,但AA-ORS治疗增加了0Gy和5Gy辐照小鼠中的Atf4蛋白水平。使用qPCR研究ERK和AKT转录物水平表明,与0Gy相比,5Gy辐照导致mRNA水平显著降低。与0Gy和5Gy下经盐水治疗的小鼠相比,AA-ORS治疗导致显著增加(图5E至图5F)。肠道内正常细胞增殖的早期变化充当偏离正常胃肠功能的指示。增殖细胞核抗原(PCNA)(一种36kD蛋白质)的表达的变化被认为是肠道变化的一种标志物。AA-

ORS增加0Gy和5Gy辐照小鼠中PCNA蛋白水平(图5A)。

[0254] 还研究了AA-ORS对B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)的影响,该B细胞淋巴瘤-2蛋白是Erk1/2的下游靶标。Bcl-2通过调节固有半胱天冬酶级联中促凋亡Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达水平来防止细胞死亡而不是促进细胞增殖。在0Gy小鼠中,在AA-ORS治疗的情况下Bcl-2水平增加。辐照导致Bcl-2蛋白水平显著增加。使用AA-ORS的治疗未显示5Gy辐照小鼠中Bcl2蛋白水平的进一步增加(图5B)。随着辐照Bcl-2蛋白水平增加可能表明预防凋亡的保护机制。然而,使用Bax特异性抗体的蛋白质印迹分析未显示蛋白质水平的显著差异(图5B)。这些研究与先前的观察结果一致,即针对Bcl-2的干预措施不一定会改变Bax4的蛋白质水平。

[0255] 由于AA-ORS增加了p-ERK,因此这项研究表明氨基酸有助于维持促有丝分裂刺激直到晚期G1,以便于成功进入S期。³⁸

[0256] 该研究显示辐射增加半胱天冬酶-3并且AA-ORS治疗减少0Gy和5Gy小鼠的绒毛上皮细胞中的裂解的半胱天冬酶-3。经AA-ORS治疗的小鼠中pAKT增加表明其作用可能是通过激活增殖或抑制凋亡(图5)。结合在半胱天冬酶-3上所见的效应,这些结果可以解释在AA-ORS治疗的情况下观察到的促存活效应和增加的增殖。然而,进一步的研究对于表征AA-ORS激活ERK1/2和AKT或半胱天冬酶-3的机制至关重要。

[0257] 实施例6-AA-ORS降低裂解的半胱天冬酶-3和半胱天冬酶-3转录物水平

[0258] 半胱天冬酶-3的激活导致形成19kD裂解的半胱天冬酶-3。裂解的半胱天冬酶-3随着凋亡而增加。蛋白质印迹分析显示,与对照相比,辐照和治疗后总半胱天冬酶-3没有显著差异。与来自0Gy小鼠的组织相比,来自5Gy小鼠的肠组织显示裂解的半胱天冬酶-3显著增加。然而,当与相应的辐照对照相比时,在AA-ORS的情况下裂解的半胱天冬酶-3降低(图5B)。使用qPCR测量的半胱天冬酶3mRNA水平显示当与0Gy相比时5Gy辐照后半胱天冬酶3转录物水平显著增加。使用AA-ORS的治疗导致来自0Gy和5Gy辐照小鼠的肠组织中半胱天冬酶3转录物水平显著降低(图5G)。

[0259] 结合Lgr5、p-ERK和p-AKT,裂解的半胱天冬酶-3的变化表明AA-ORS不仅通过增殖而且通过减少的凋亡和增加的细胞存活来增加未辐照和辐照的小鼠的肠组织中的绒毛高度。

[0260] 为了评估由增加的增殖和/或减少的凋亡引起的绒毛上皮细胞是否成熟、分化和具有功能活性,测量钠吸收能力和葡萄糖刺激的钠吸收。NHE3(小肠中钠吸收的主要转运蛋白)和SGLT1(钠偶联的钠吸收的转运蛋白)仅在成熟和分化的绒毛细胞中发生,并且显示具有增加的功能(图3A至图3F和图4A至图4D)、mRNA和蛋白质水平。因此,这些研究表明,辐照后用AA-ORS治疗增加了电解质和葡萄糖吸收(图5A至图5G)。

[0261] 实施例7-总p53的蛋白质印迹分析

[0262] p53是一种肿瘤抑制蛋白,并且其活性阻止肿瘤的形成。p53肿瘤抑制基因的突变是人类癌症中最常见的遗传病变。无效等位基因纯合的小鼠看起来正常但易于自发发展各种肿瘤。已经证明p53在辐照的反应中发挥重要作用。响应于辐照的p53积累水平主要来源于DNA损害的强度。已经证明干细胞的损失在辐射诱发的急性肠损伤和致死率中发挥重要作用,并且受p53途径及其转录靶标PUMA和p21的调控。PUMA依赖性凋亡在高剂量辐射后数小时内迅速减少ISC及其祖细胞,并且PUMA的缺乏通过增强p21依赖性DNA修复导致改善的

动物存活和隐窝再生,并且对于辐射诱发的肠损害是至关重要的。

[0263] 蛋白质印迹分析显示0Gy和5Gy小鼠的肠组织中p53(肿瘤抑制蛋白)水平没有显著差异。AA-ORS显示p53蛋白水平的小但一致的增加(图5B)。

[0264] 这些研究表明,与AA-ORS相关的增殖作用可能与肿瘤发生无关。

[0265] 实施例8.免疫组织化学

[0266] 使用抗Lgr5+的多克隆抗体,肠干细胞的亲和素-生物素检测方法显示在辐射的情况下Lgr5+细胞减少(3.0 ± 0.2 相对于 1.6 ± 0.2 ; $P < 0.001$, $n = 50$ 个隐窝)。使用AA-ORS的治疗在0Gy辐照小鼠中没有显示Lgr5+的显著差异。然而,在5Gy辐照小鼠中,AA-ORS增加Lgr5+细胞(1.6 ± 0.2 相对于 3.4 ± 0.3 ; $P < 0.001$, $n = 50$ 个隐窝)(图6A至图6B)。

[0267] Ki-67是一种核蛋白,其是增殖的细胞标志物并且与核糖体RNA转录有关。在细胞周期的所有活跃期(G_1 、 S 、 G_2 和有丝分裂)中,Ki-67也存在于细胞中,但不存在于静息细胞(G_0)中。回肠切片显示沿着隐窝(除了其下极)的Ki-67表达,并且表达延伸至绒毛的下部1/3。在辐射的情况下,Ki-67表达没有显著差异,但使用AA-ORS治疗导致表达Ki-67的细胞显著增加(50.7 ± 1.3 相对于 54.6 ± 1.4 ; $P < 0.05$, $n = 50$ 个隐窝)(图6C至图6D)。

[0268] 回肠切片中PCNA的免疫染色显示其沿着隐窝(除了其下极)表达。辐照导致隐窝和绒毛下部区域中的PCNA表达显著降低(31.1 ± 0.8 相对于 26.6 ± 0.6 ; $P < 0.001$, $n = 50$ 个隐窝)。使用AA-ORS治疗显示5Gy小鼠中的显著增加(26.6 ± 0.6 相对于 34.2 ± 0.5 ; $P < 0.001$, $n = 50$ 个隐窝),而在0Gy辐照小鼠中没有(图6E至图6F)。

[0269] 蛋白质印迹分析显示,与0Gy相比,来自5Gy辐照的小鼠小肠的细胞匀浆显示显著增加。用AA-ORS治疗的小鼠在0Gy时增加Ki67蛋白水平,但在5Gy时没有进一步增加。这些研究表明,在0Gy下而不是在5Gy下,AA-ORS诱导的上皮细胞增殖是经由Ki67介导的。

[0270] 这项研究表明,某些营养素根据其对GI功能的有益作用而进行的系统选择有助于改善肠干细胞增殖、成熟和分化,从而导致功能活性的长绒毛上皮细胞,所述细胞的功能和高度最初受到辐照的损害(图7)。

[0271] 实施例9-AA-ORS改善小鼠的胃肠功能

[0272] 使用电生理学技术显示辐射诱导的C1-分泌可以在太低而不会引起明显的组织病理学变化的辐射剂量下发生。⁵⁵辐射诱发的肠功能障碍的特征在于:(1)增加的C1-分泌,其与增加的液体分泌有关;(2)降低的Na⁺吸收,其导致减少的液体吸收;以及(3)增加的细胞旁渗透性,其导致增加腔内抗原物质易位至全身隔室,从而产生局部和全身免疫反应。腔内容物增加地渗透至全身隔室中增加了血浆内毒素和促炎细胞因子(例如,IL1 β)。⁵¹

[0273] 如先前的研究所概述,先前开发了基于氨基酸的口服再水化溶液(AA-ORS)。⁵¹根据在辐照小鼠的肠组织中的以下发现选择特定氨基酸:选择的氨基酸:(1)经由氨基酸偶联的Na⁺吸收增加Na⁺吸收;(2)不刺激C1-分泌并且因此不刺激液体分泌;以及(3)降低细胞旁渗透性或收紧粘膜屏障。用AA-ORS治疗14天时间改善电解质吸收、降低细胞旁渗透性以及血浆内毒素和促炎细胞因子水平,更好地保持体重,并改善暴露于其他致死剂量的全身辐照(8.5Gy TBI)的小鼠的存活⁵¹。随后的研究表明,这些改善最早发生在AA-ORS治疗后7天;然而,这些作用的确切机制尚不清楚。

[0274] 总之,通过在肠干细胞和祖细胞中选择性增强干细胞标志物如Lgr5和BMI1以及通过阻断半胱天冬酶-3介导的凋亡,将包含选择的一组氨基酸的AA-ORS鉴定为小鼠的肠放射

缓解剂。因此,该研究表明简单(simple)氨基酸对肠干细胞增殖、成熟和分化的作用导致功能活性的长绒毛上皮细胞,所述细胞的功能和高度受到辐照的损害。

[0275] 本文描述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且暗示本领域技术人员在其启发下可对其进行各种修改或改变,并且这些修改或改变包含在本申请的精神和范围内。此外,本文公开的任何发明或其实施方案的任何要素或限制可以与本文公开的任何和/或所有其他要素或限制(单独地或在任何组合中)或任何其他发明或实施方案组合,并且所有此类组合是本发明的范围所预期的,但不限于此。

[0276] 参考文献

[0277] 1.Adams,P.D.et al.Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors.Mol Cell Biol 16,6623-6633(1996) .

[0278] 2.Barker,N.,van Oudenaarden,A.& Clevers,H.Identifying the stem cell of the intestinal crypt:strategies and pitfalls.Cell Stem Cell 11,452-460, doi:10.1016/j.stem.2012.09.009(2012) .

[0279] 3.Bullwinkel J,Baron-Luhr B,Ludemann A,et al.Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells.J Cell Physiol 2006;206:624-35.

[0280] 4.Cheng,H.& Leblond,C.P.Origin,differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine.V.Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types.Am J Anat 141,537-561 (1974) .

[0281] 5.Citrin,D.et al.Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury.

[0282] 6.Crosnier,C.,Stamataki,D.& Lewis,J.Organizing cell renewal in the intestine:stem cells,signals and combinatorial control.Nat Rev Genet 7,349-359,doi:10.1038/nrg1840(2006) .

[0283] 7.Cryns,V.& Yuan,J.Proteases to die for.Genes Dev 12,1551-1570(1998) .

[0284] 8.Danial,N.N.& Korsmeyer,S.J.Cell death:critical control points.Cell 116,205-219(2004) .

[0285] 9.Datta,S.R.,Brunet,A.& Greenberg,M.E.Cellular survival:a play in three Akts.Genes Dev 13,2905-2927(1999) .

[0286] 10.Davis,N.M.et al.Deregulation of the EGFR/PBK/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer:possibilities for therapeutic intervention.Oncotarget 5,4603-4650,doi:10.18632/oncotarget.2209(2014) .

[0287] 11.Donehower,L.A.et al.Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours.Nature 356,215-221,doi:10.1038/356215a0(1992) .

[0288] 12.Fei,P.& El-Deiry,W.S.P53 and radiation responses.Oncogene 22,5774-5783,doi:10.1038/sj.onc.1206677(2003) .

- [0289] 13.Fukuda,M.,Gotoh,Y.& Nishida,E.Interaction of MAP kinase with MAP kinase:its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase.EMBOJ16,1901-1908,doi:10.1093/emboj/16.8.1901(1997) .
- [0290] 14.Gopal,R.et al.The relationship between local dose and loss of function for irradiated lung.Int J Radiat Oncol Biol Phys 56,106-113(2003) .
- [0291] 15.Greenberger,J.S.Radioprotection.In Vivo23,323-336(2009) .
- [0292] 16.Hahn,S.M.et al.Identification of nitroxide radioprotectors.Radiat Res 132,87-93(1992) .
- [0293] 17.Hall,P.A.& Lane,D.P.Tumor suppressors:a developing role for p53? Curr Biol 7,R1 44-14 7(1997) .
- [0294] 18.Hauer-Jensen,M.,Wang,J.& Denham,J.W.Bowel injury:current and evolving management strategies.Semin Radiat Oncol 13,357-371(2003) .Health Phys 106,734-744,doi:10.1097/HP.0000000000000117(2014) .
- [0295] 19.Houghton,J.et al.Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells.Science 306,1568-1571,doi:10.1126/science.1099513(2004) .
- [0296] 20.Kahan,C.,Seuwen,K.,Meloche,S.& Pouyssegur,J.Coordinate,biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts.Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition.J Biol Chem 267,13369-13375(1992) .
- [0297] 21.Kandel,E.S.et al.Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G2/M cell cycle checkpoint induced by DNA damage.Mol Cell Biol 22,7831-7841 (2002) .
- [0298] 22.Karam,S.M.Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut.Front Biosci 4,D286-298(1999) .
- [0299] 23.Komarova,E.A.et al.Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo:p53 promotes hematopoietic injury,but protects from gastro-intestinal syndrome in mice.Oncogene 23,3265-3271,doi:10.1038/sj.onc.1207494(2004) .
- [0300] 24.Leibowitz,B.J.et al.Uncoupling p53 functions in radiation-induced intestinal damage via PUMA and p21.Mol Cancer Res 9,616-625,doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0052(2011) .
- [0301] 25.Li L,Clevers H.Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals.Science 2010;327:542-5.
- [0302] 26.Li,X.M.,Hu,Z.,Jorgenson,M.L.,Wingard,J.R.& Slayton,W.B.Bone marrow sinusoidal endothelial cells undergo nonapoptotic cell death and are replaced by proliferating sinusoidal cells in situ to maintain the vascular niche following lethal irradiation.Exp Hematol 36,1143-1156,doi:10.1016/j.exphem.2008.06.009(2008) .
- [0303] 27.Lu,Z.& Xu,S.ERK1/2 MAP kinases in cell survival and

apoptosis.IUBMB Life 58,621-631,doi:10.1080/15216540600957438(2006) .

[0304] 28.Marks,L.B.Dosimetric predictors of radiation-induced lung injury.Int J Radiat Oncol Biol Phys 54,313-316(2002) .

[0305] 29.Meloche,S.Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G 1 phase and their inactivation at the G1/S transition.JCell Physiol 163,577-588,doi:10.1002/jcp.1041630319(1995) .

[0306] 30.Metcalfe,C.,Kljamin,N.M.,Ybarra,R.& de Sauvage,F.J.Lgr5+stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration.Cell Stem Cell 14,149-159,doi:10.1016/j.stem.2013.11.008(2014) .

[0307] 31.Nair,C.K.,Parida,D.K.& Nomura,T.Radioprotectors in radiotherapy.J Radiat Res 42,21-37(2001) .

[0308] 32.Niu,Y.et al.Intraesophageal MnSOD-plasmid liposome enhances engraftment and selfrenewal of bone marrow derived progenitors of esophageal squamous epithelium.Gene Ther 15,347-356,doi:10.1038/sj.gt.3303089(2008) .Oncologist 15,360-371,doi:10.1634/theoncologist.2009-S 104(2010) .

[0309] 33.Pageot,L.P.et al.Human cell models to study small intestinal functions:recapitulation of the crypt-villus axis.Microsc Res Tech 49,394-406,doi:10.1002/(SICI) 1097-0029 (20000515) 49:4<394::AID-JEMT8>3.0.CO;2-K (2000) .

[0310] 34.Potten,C.S.A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine.Int J Radiat Biol 58,925-973,doi: 7AQN1HHQNKSERATM[pil](1990) .

[0311] 35.Potten,C.S.Radiation,the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine.Radiat Res 161,123-136 (2004) .

[0312] 36.Potten,C.S.,Booth,C.& Pritchard,D.M.The intestinal epithelial stem cell:the mucosal governor.Int J Exp Pathol 78,219-243(1997) .

[0313] 37.Pritchard,D.M.,Potten,C.S.,Korsmeyer,S.J.,Roberts,S.& Hickman, J.A.damageinduced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice:investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo.Oncogene 18,7287-7293,doi:10.1038/sj.onc.1203150(1999) .

[0314] 38.Qiu,W.et al.PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome.Cell Stem Cell 2,576-583,doi: 10.1016/j.stem.2008.03.009(2008) .

[0315] 39.Ramaswamy,S.et al.Regulation of G 1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.Proc Natl Acad Sci USA 96,2110-2115(1999) .

[0316] 40.Reszka,A.A.,Seeger,R.,Diltz,C.D.,Krebs,E.G.& Fischer,

E.H.Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton.Proc Natl Acad Sci USA 92,8881-8885(1995) .

[0317] 41.Rubin,P.& Casarett,G.W.Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy.Cancer22,767-778(1968) .

[0318] 42.Sarbassov,D.D.,Guertin,D.A.,Ali,S.M.& Sabatini,D.M.Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.Science 307,1098-1101, doi:10.1126/science.1106148(2005) .Science 327,542-545,doi:10.1126/science.1180794(2010) .

[0319] 43.Shivdasani,R.A.Radiation redux:reserve intestinal stem cells miss the call to duty.Cell Stem Cell 14,135-136,doi:10.1016/j.stem.2014.01.015(2014) .

[0320] 44.Stephens,L.et al.Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.Science 279,710-714(1998) .

[0321] 45.Takeda,N.et al.Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches.Science 334,1420-1424,doi:10.1126/science.1213214(2011) .

[0322] 46.Thornberry,N.A.& Lazebnik,Y.Caspases:enemies within.Science 281,1312-1316(1998) .

[0323] 47.Tucker,S.L.,Withers,H.R.,Mason,K.A.& Thames,H.D.,Jr.A dose-surviving fraction curve for mouse colonic mucosa.Eur J Cancer Clin Oncol 19,433-437(1983) .

[0324] 48.Vidyasagar,S.,Barmeyer,C.,Geibel,J.,Binder,H.J.& Rajendran,V.M.Role of shortchain fatty acids in colonic HCO₃-secretion.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288,G 1217-1226(2005) .

[0325] 49.Yamamoto,T.et al.Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G 1 phase to allow cell-cycle progression.Curr Biol 16,1171-1182,doi:10.1016/j.cub.2006.04.044(2006) .

[0326] 50.Yan,K.S.et al.The intestinal stem cell markers Bmi 1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations.Proc Natl Acad Sci U S A 109,466-471,doi:10.1073/pnas.1118857109(2012) .

[0327] 51.Yin L,Vijaygopal P,Menon R,et al.An amino acid mixture mitigates radiation-induced gastrointestinal toxicity.Health Phys 2014;106:734-44.

[0328] 52.Yin,L.et al.Glucose stimulates calcium-activated chloride secretion in small intestinal cells.Am J Physiol Cell Physiol 306,C687-696, doi:10.1152/ajpcell.00174.2013(2014) .

[0329] 53.Yu,J.Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy.Transl Cancer Res 2,384-396(2013) .

[0330] 54.Zhang,H.,Ameen,N.,Melvin,J.E.& Vidyasagar,S.Acute inflammation

alters bicarbonate transport in mouse ileum. *J Physiol* 581,1221-1233,doi:10.1113/jphysiol.2007.129262(2007).

[0331] 55.Zhang,K.et al.Radiation decreases murine small intestinal HCO_3^- secretion. *Int J Radiat Biol* 87,878-888,doi:10.3109/09553002.2011.583314(2011).

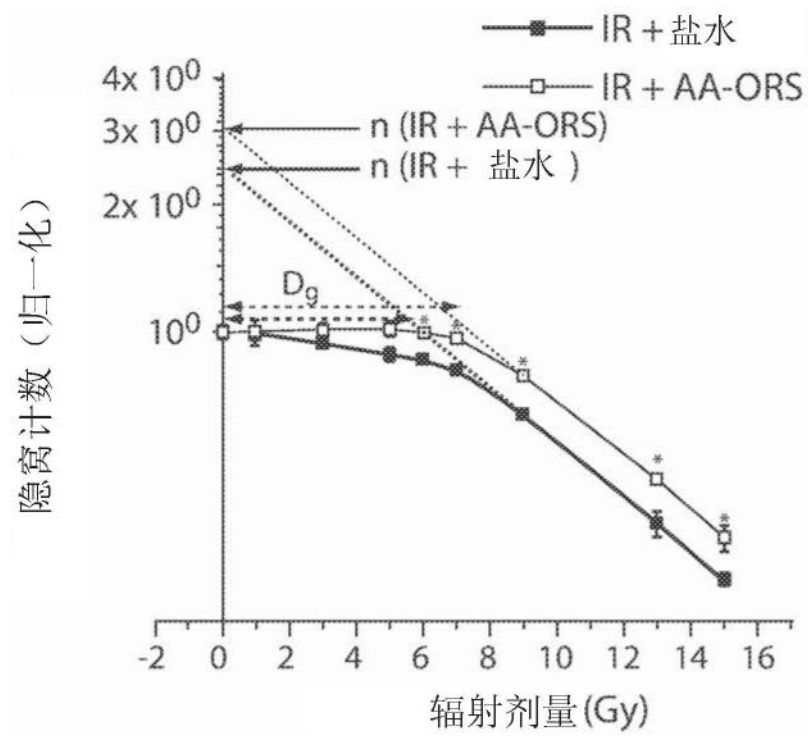


图1A

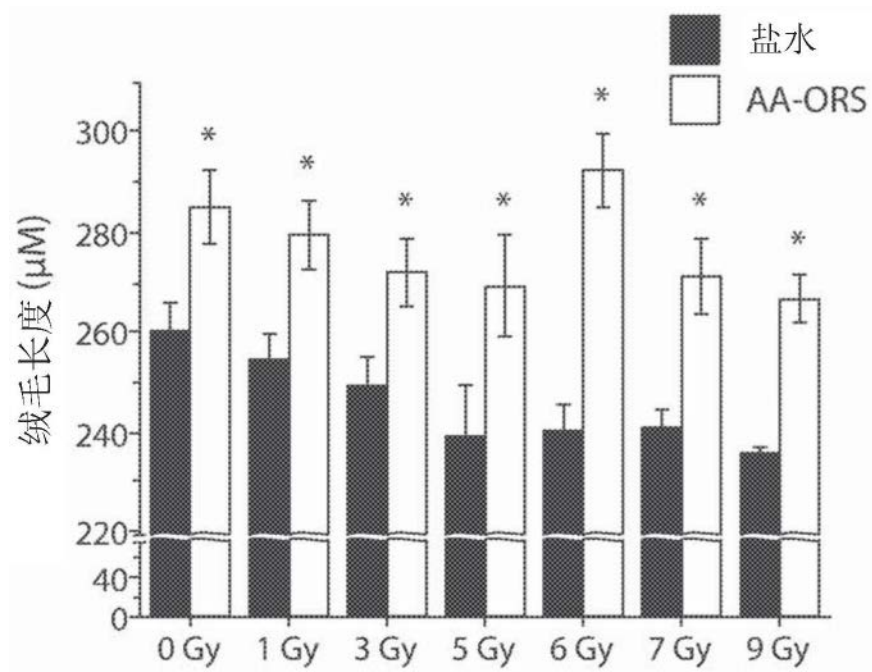


图1B

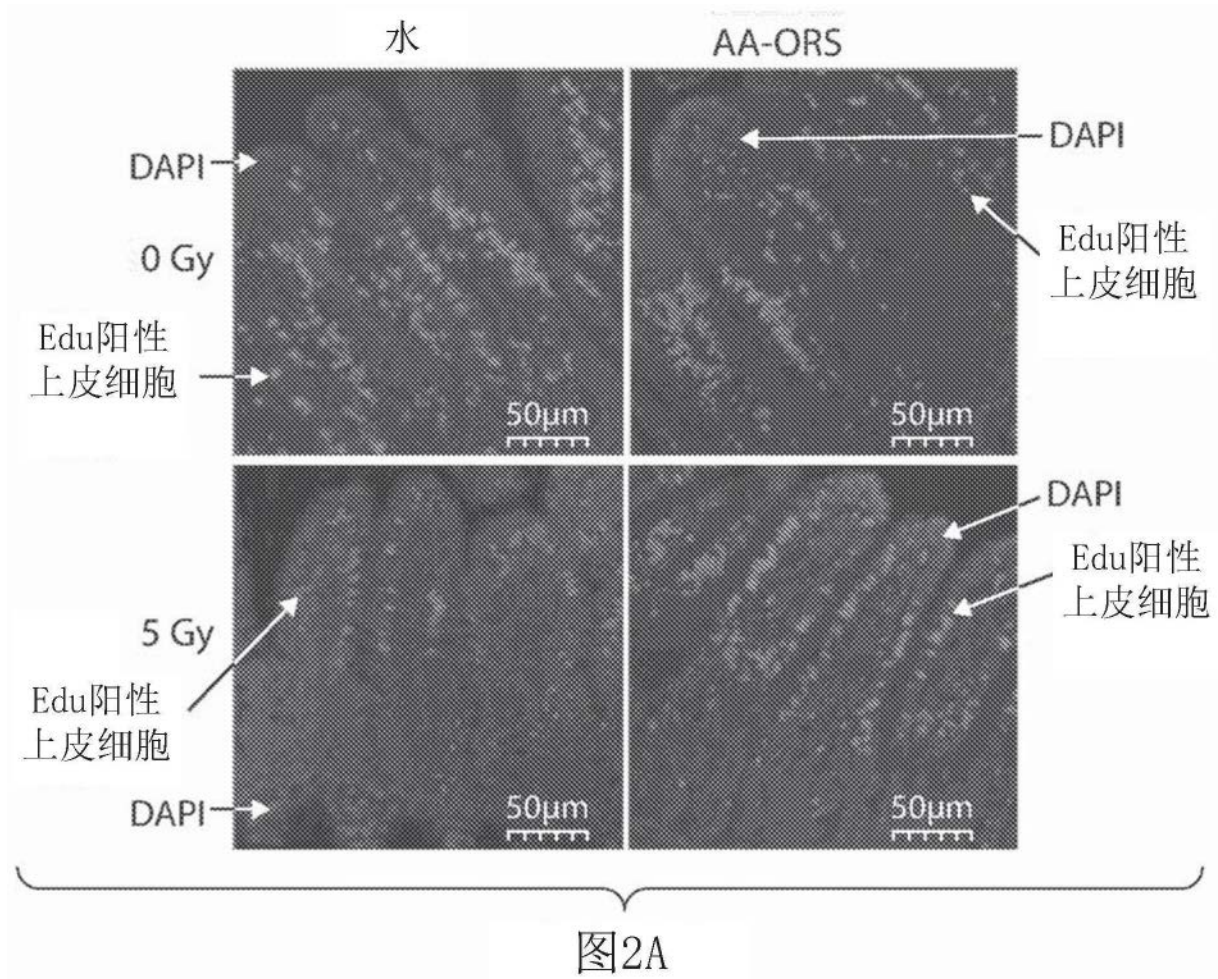


图2A

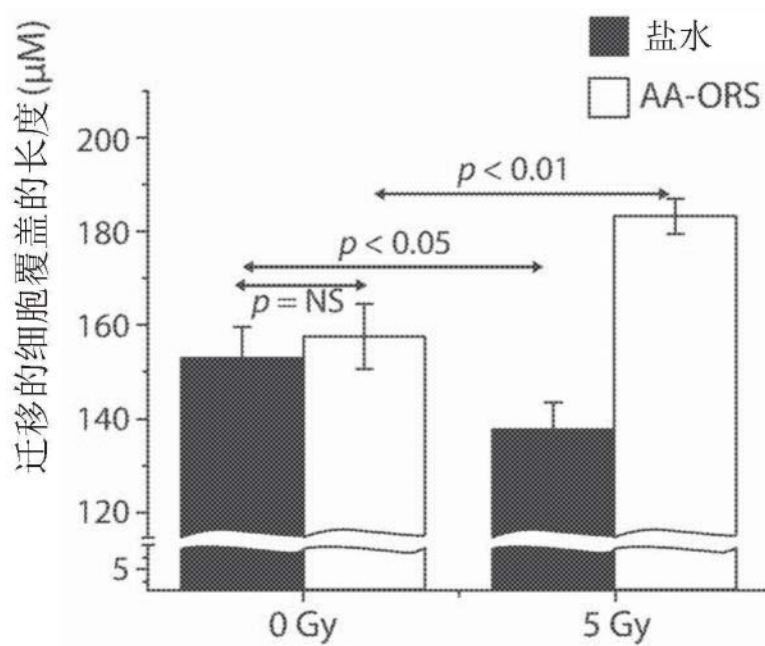


图2B

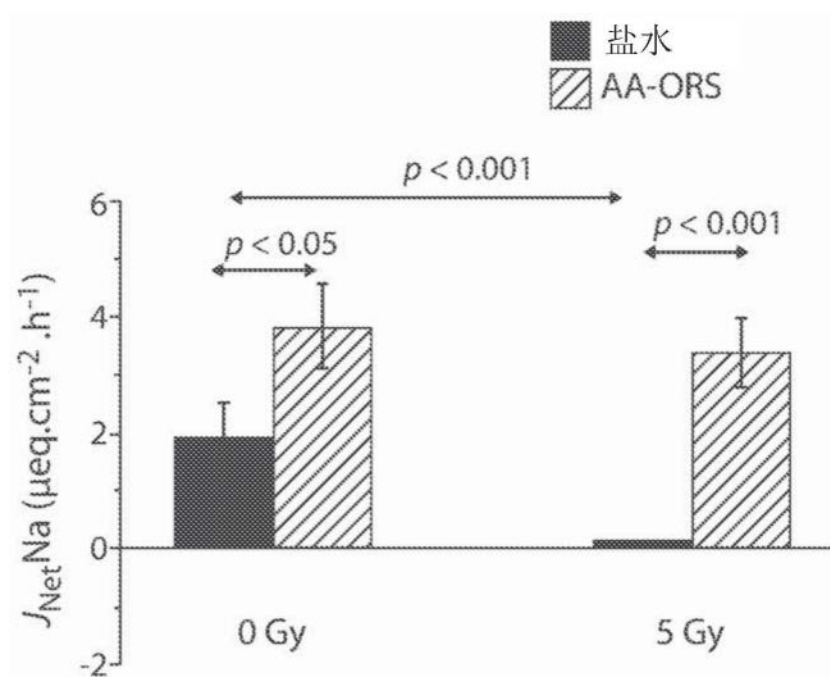


图3A

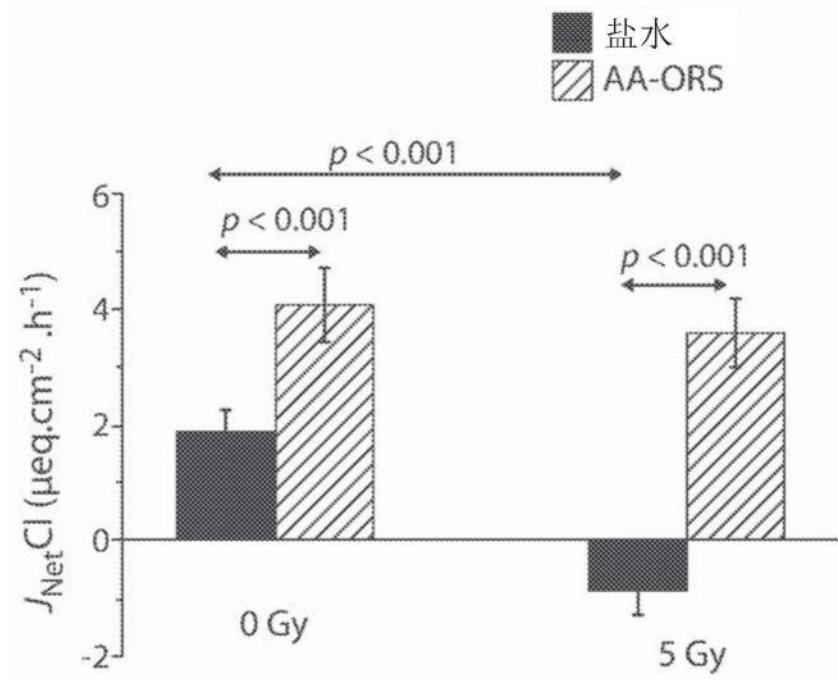


图3B

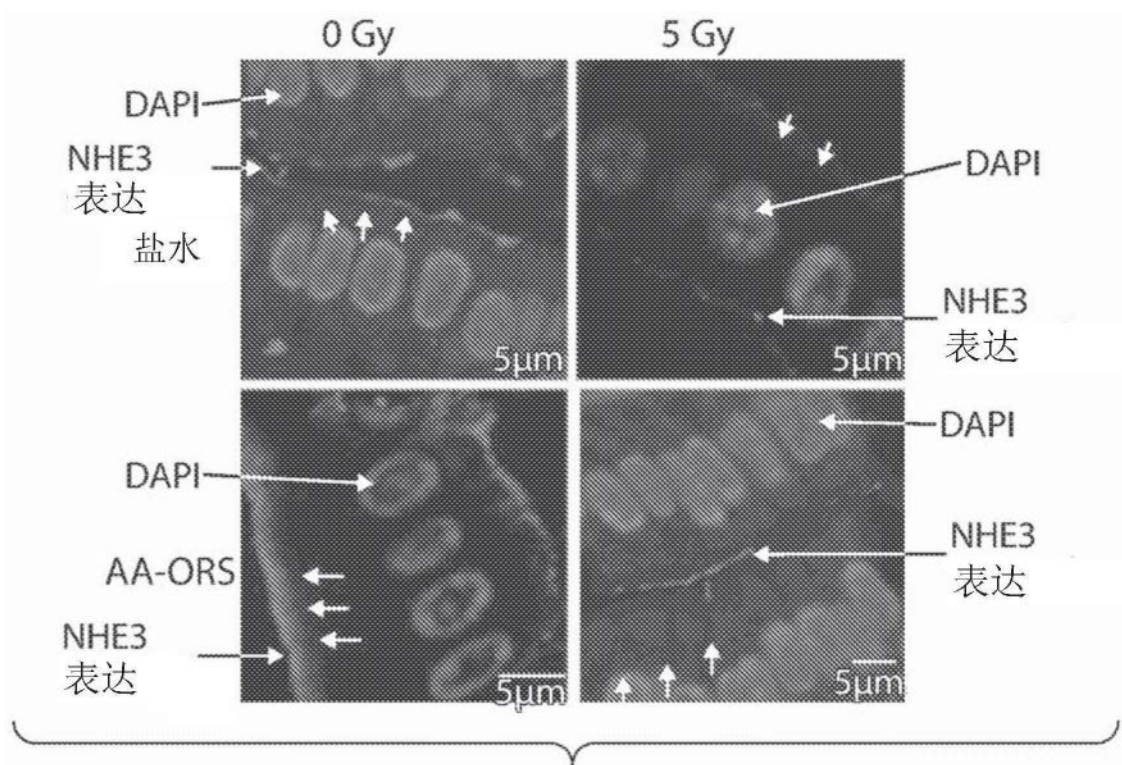


图3C

图3C

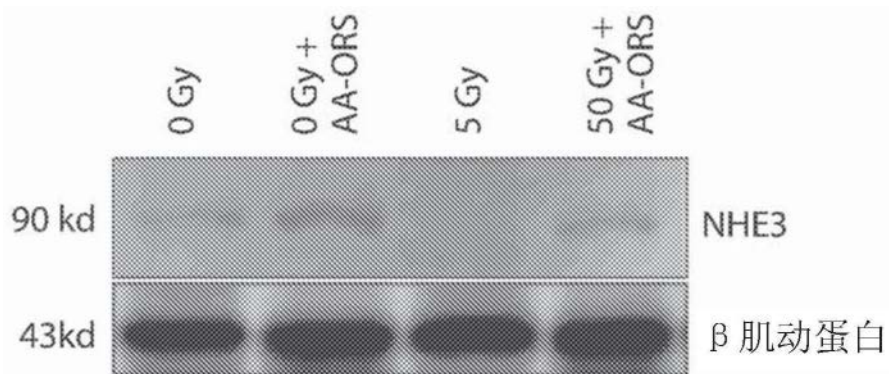


图3D

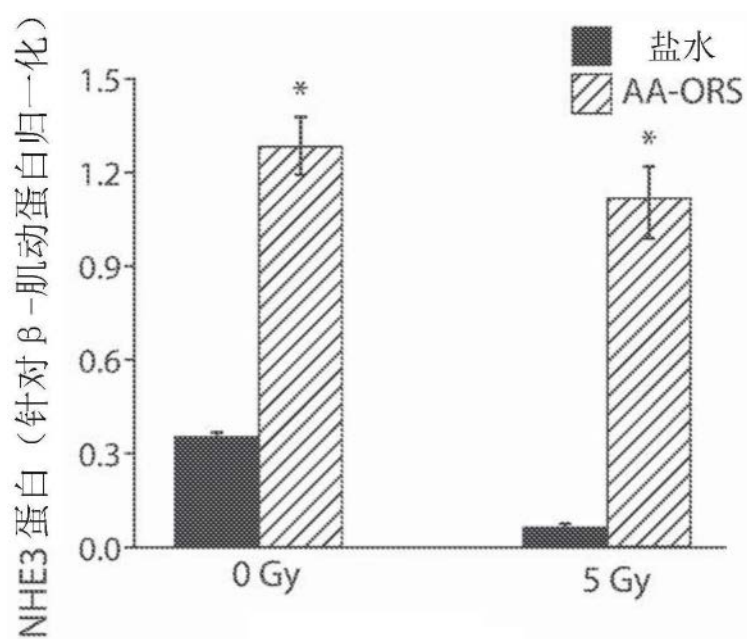


图3E

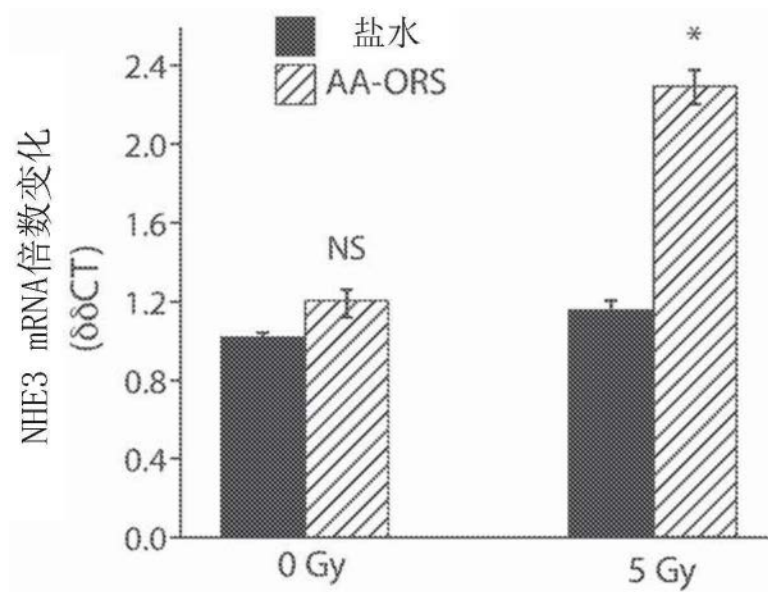


图3F

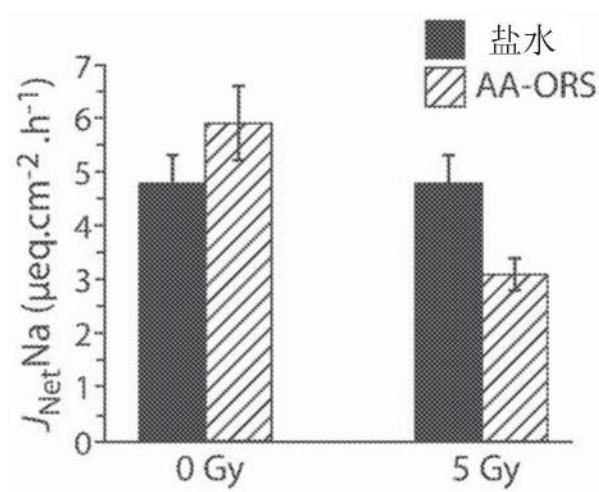


图4A

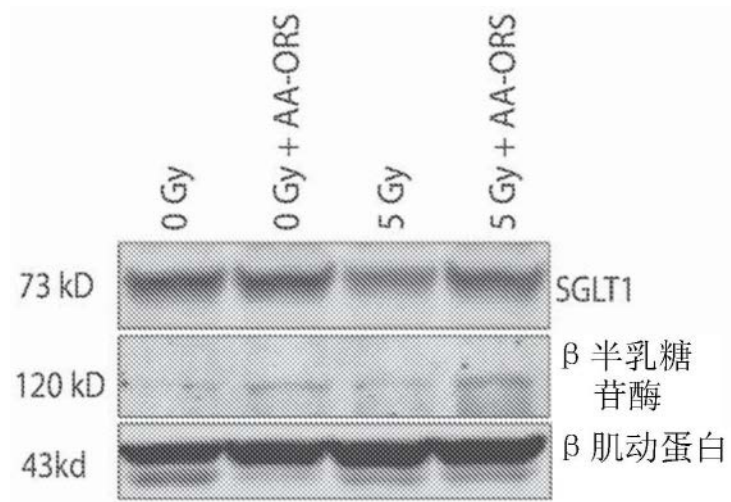


图4B

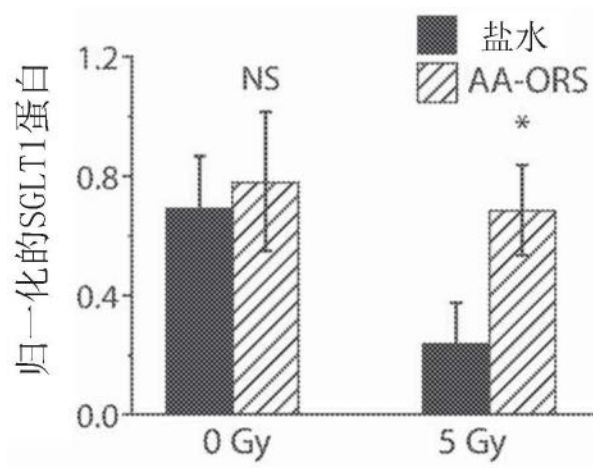


图4C

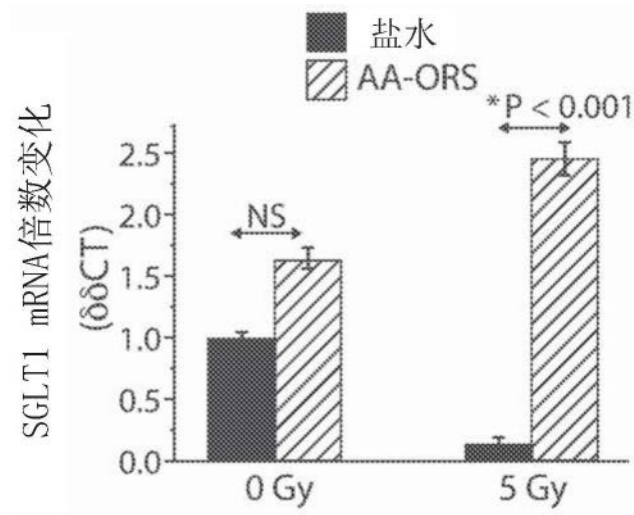


图4D

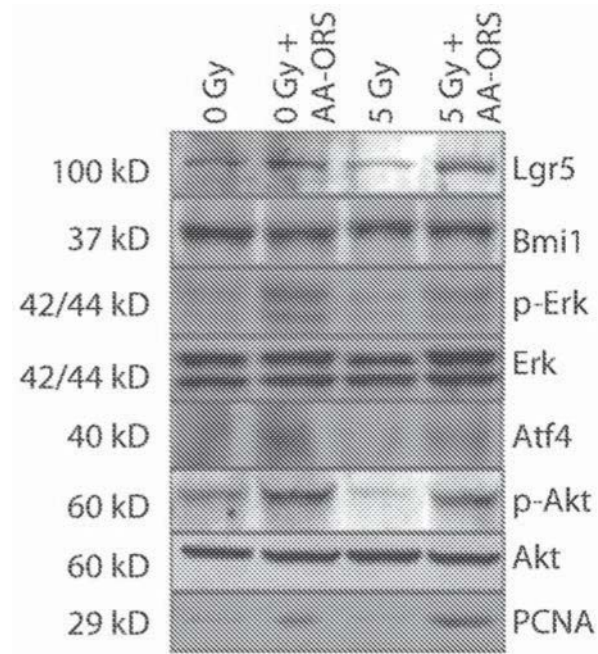


图5A

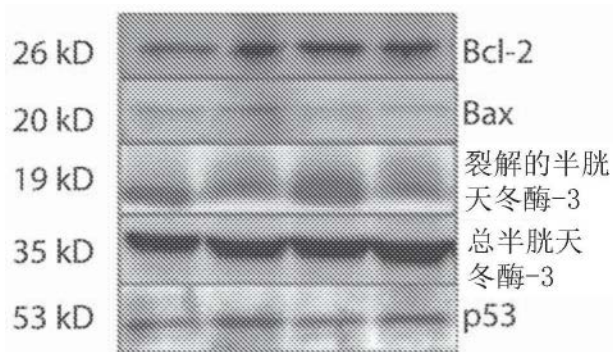


图5B

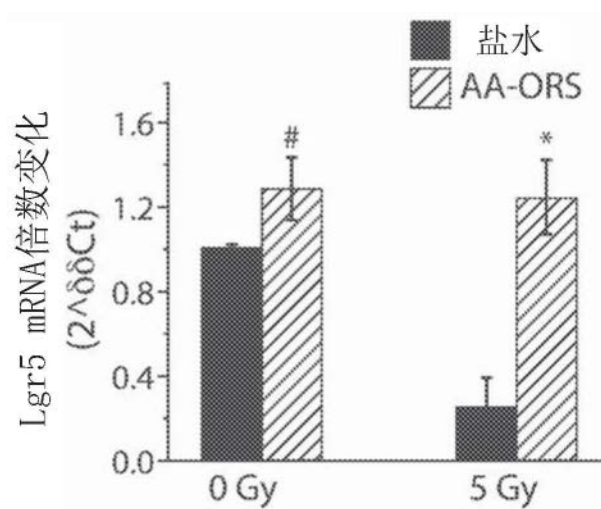


图5C

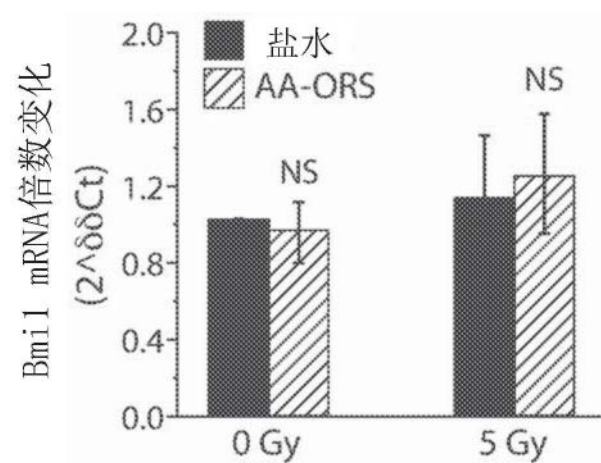


图5D

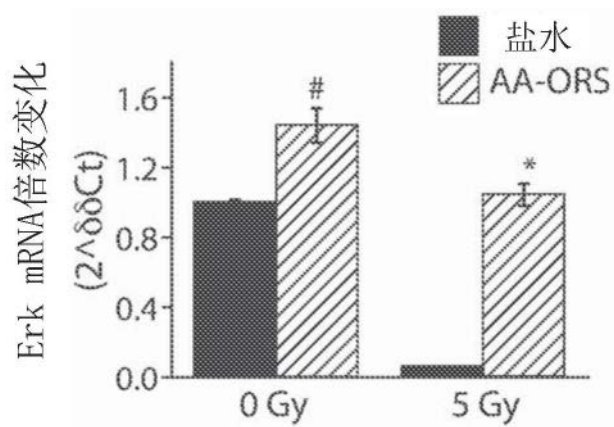


图5E

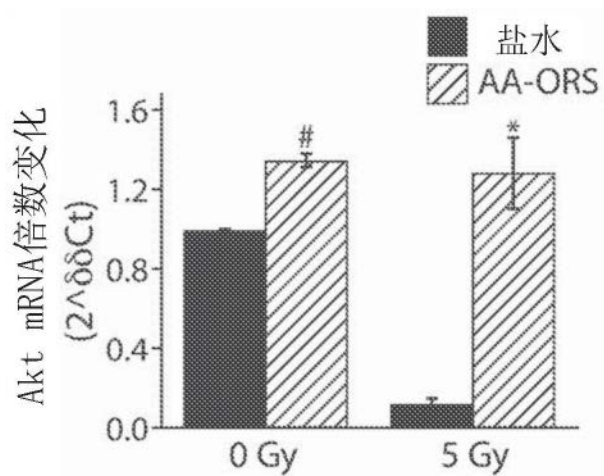


图5F

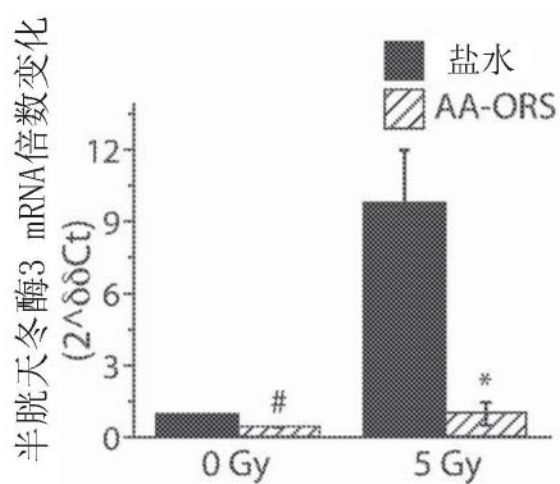


图5G

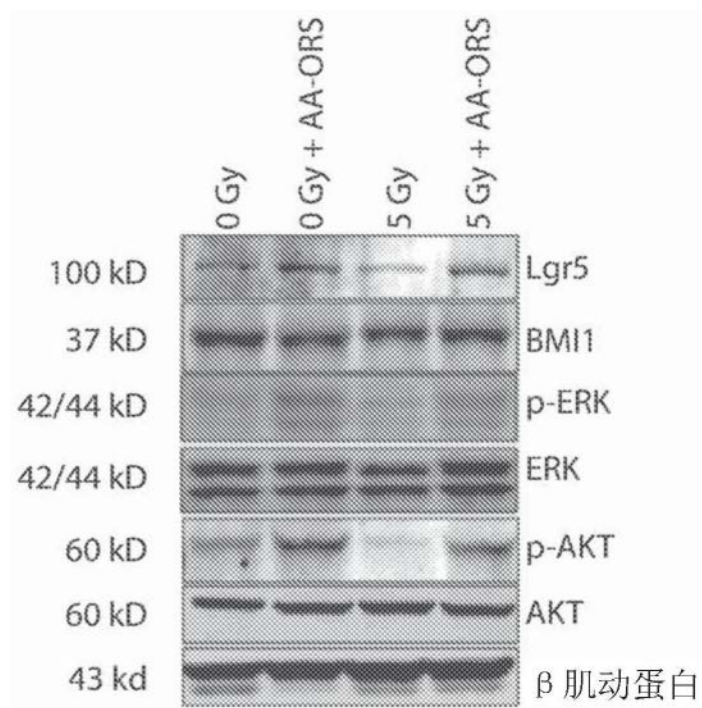


图5H

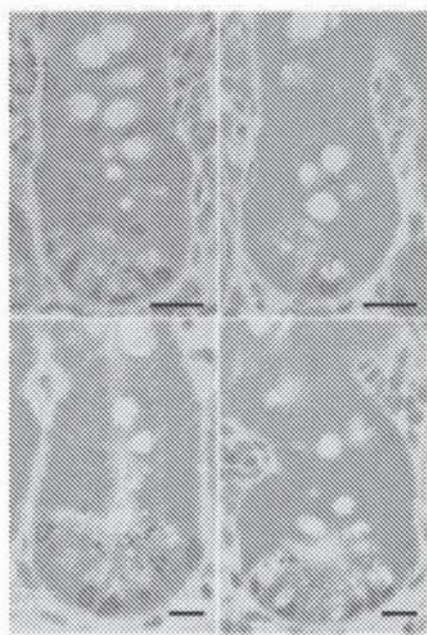


图6A

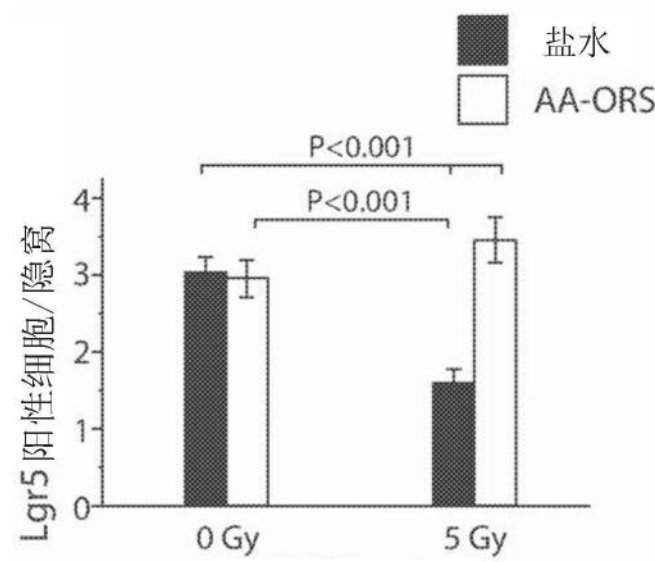


图6B

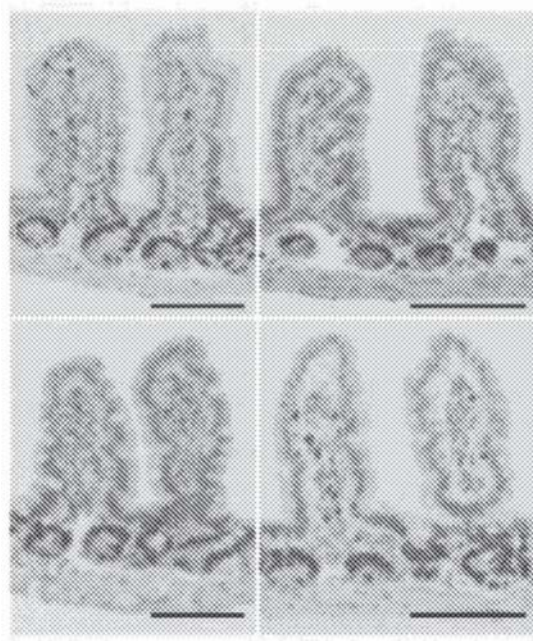


图6C

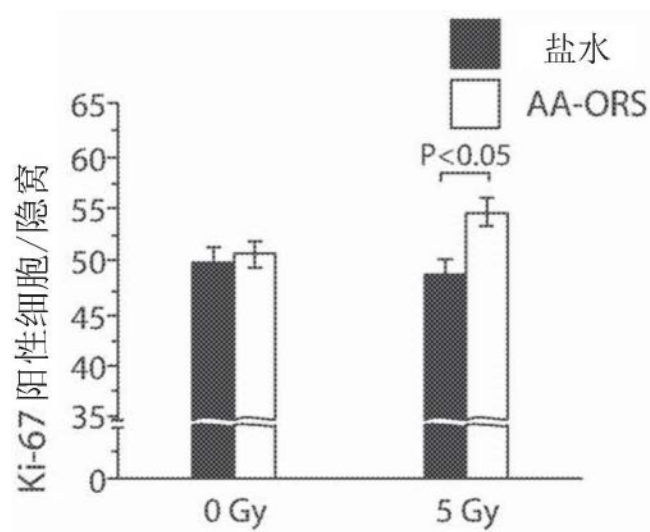


图6D

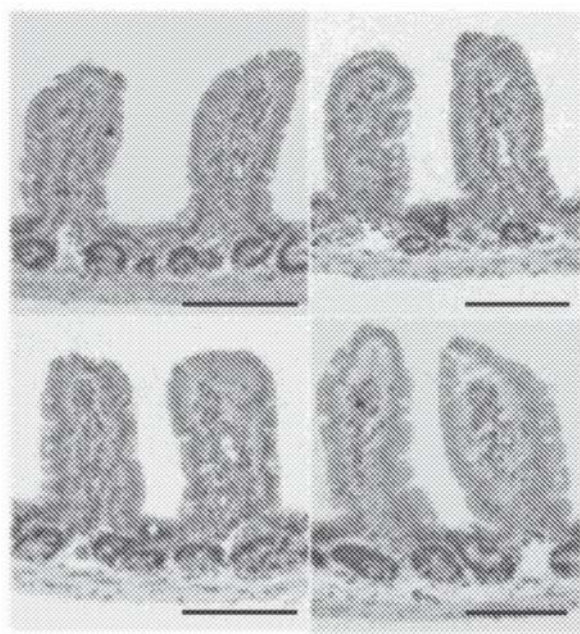


图6E

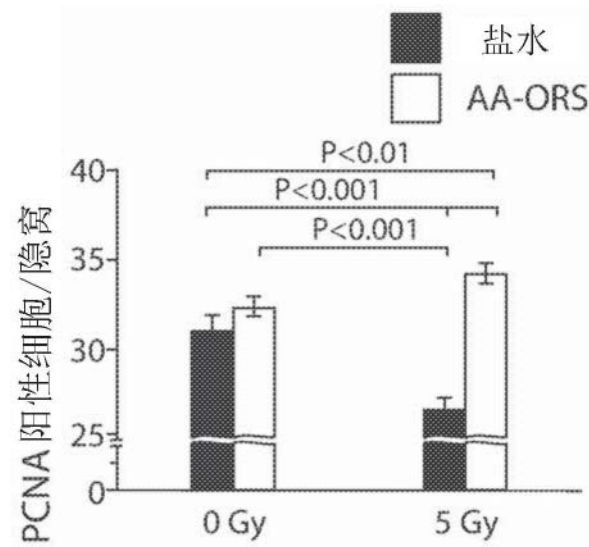


图6F

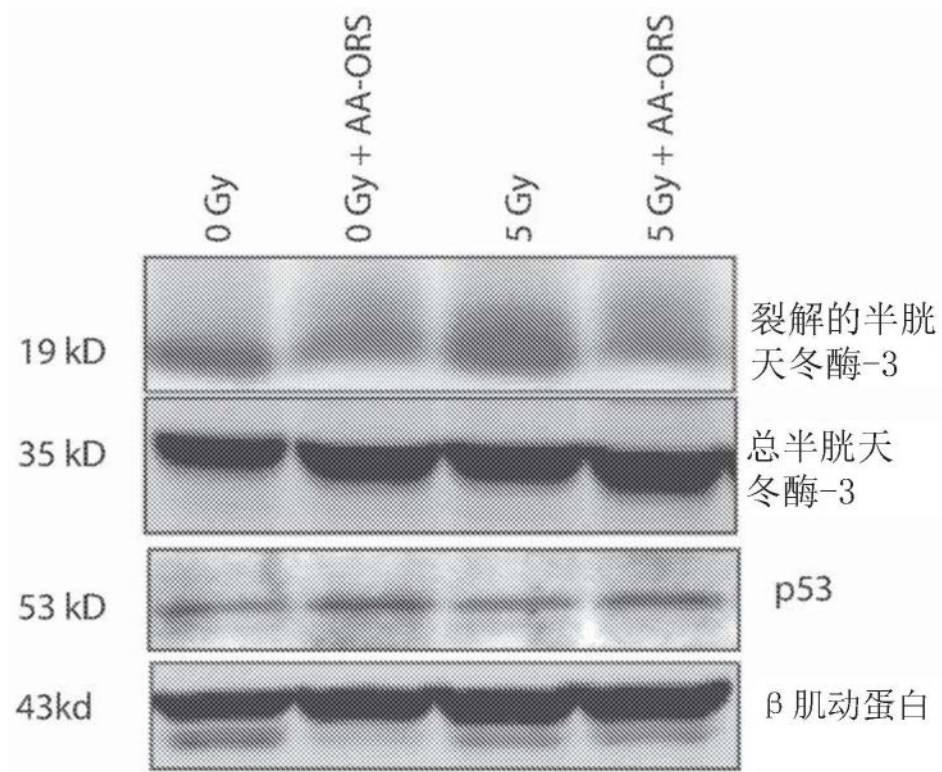


图6G

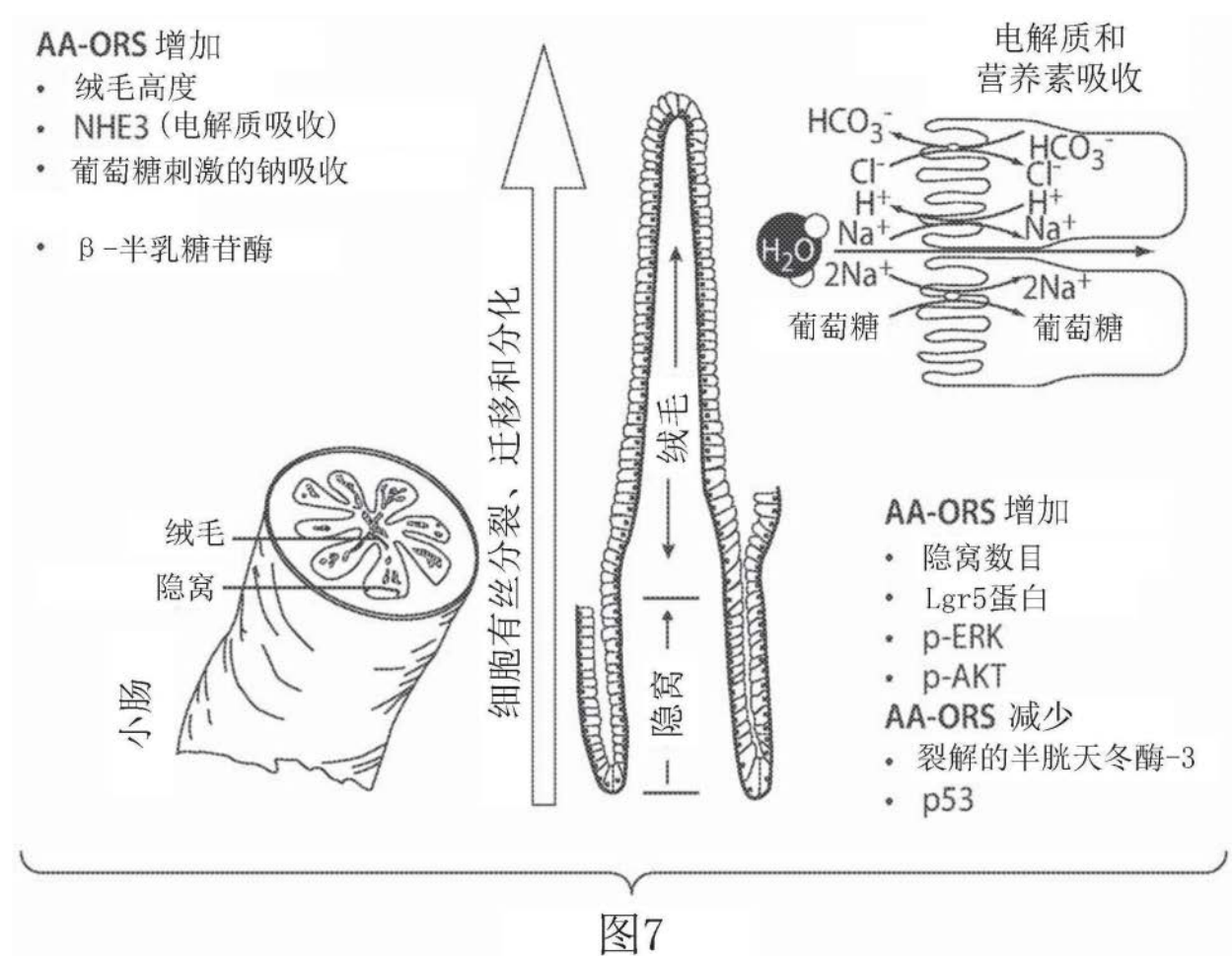


图7

图7

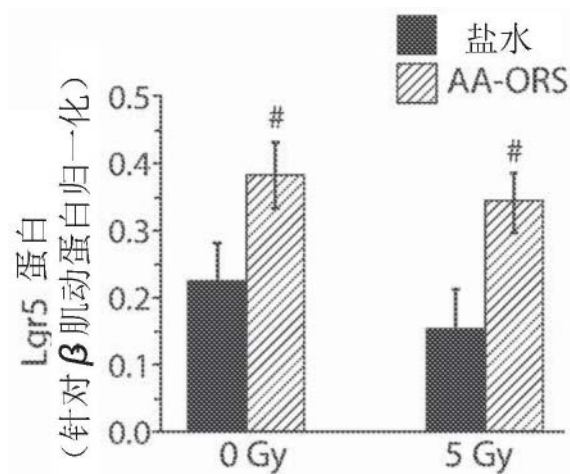


图8A

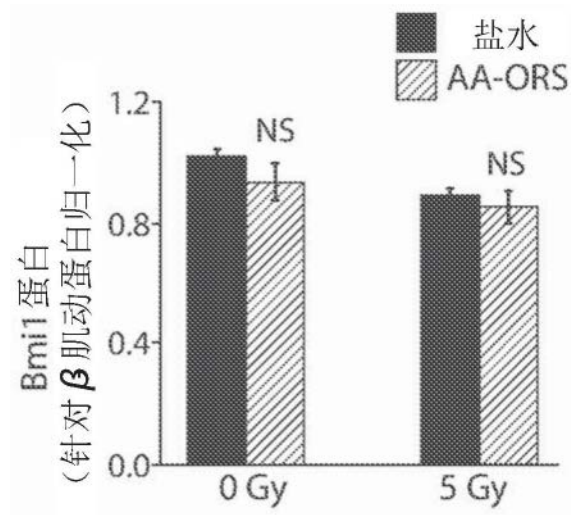


图8B

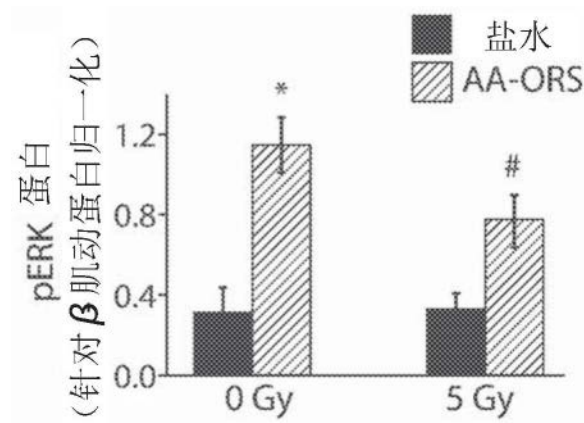


图8C

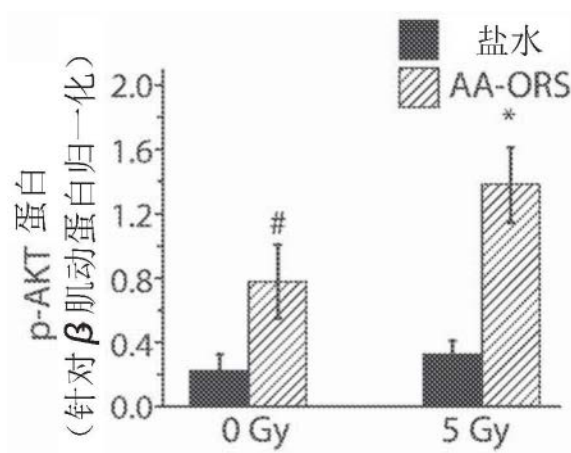


图8D

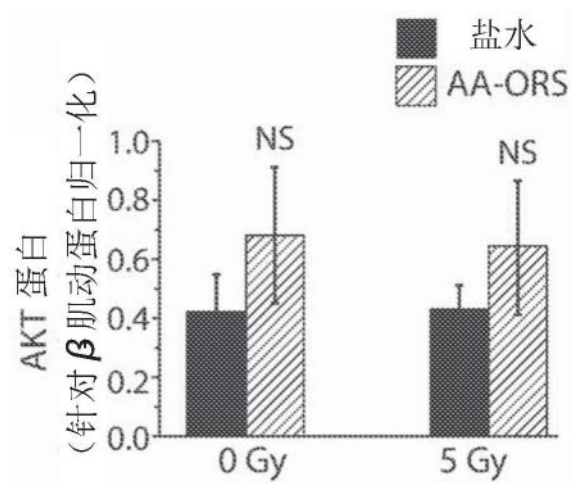


图8E

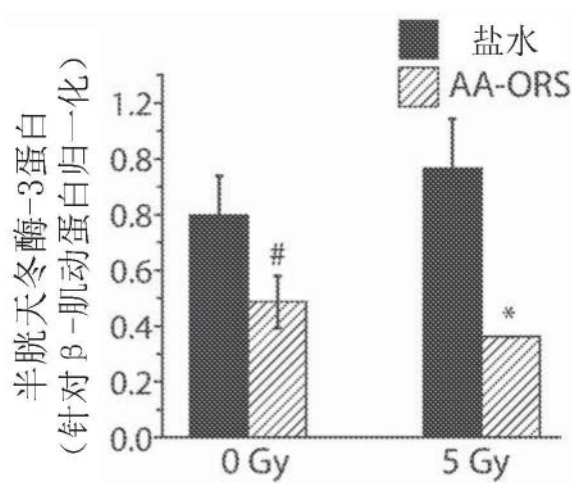


图8F

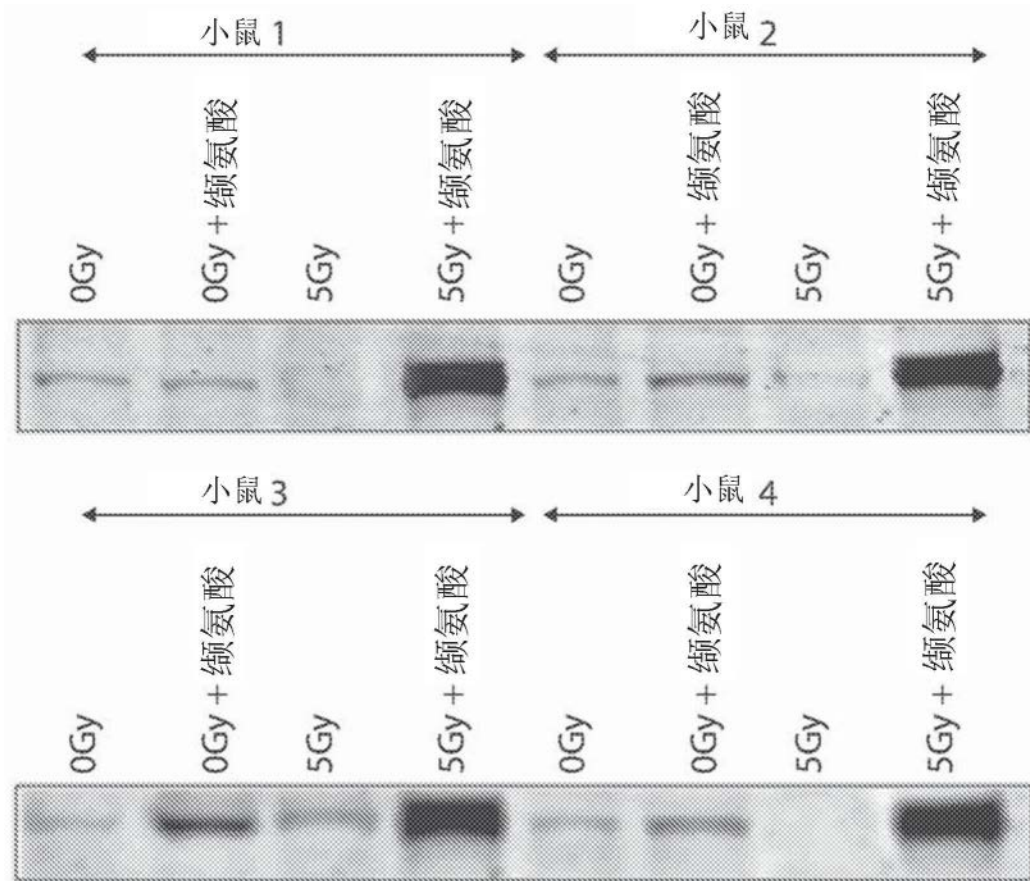


图9A

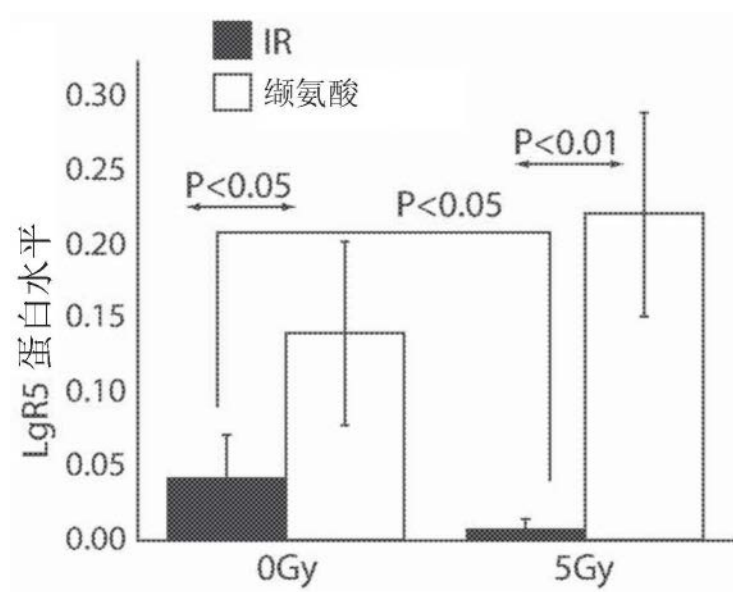


图9B

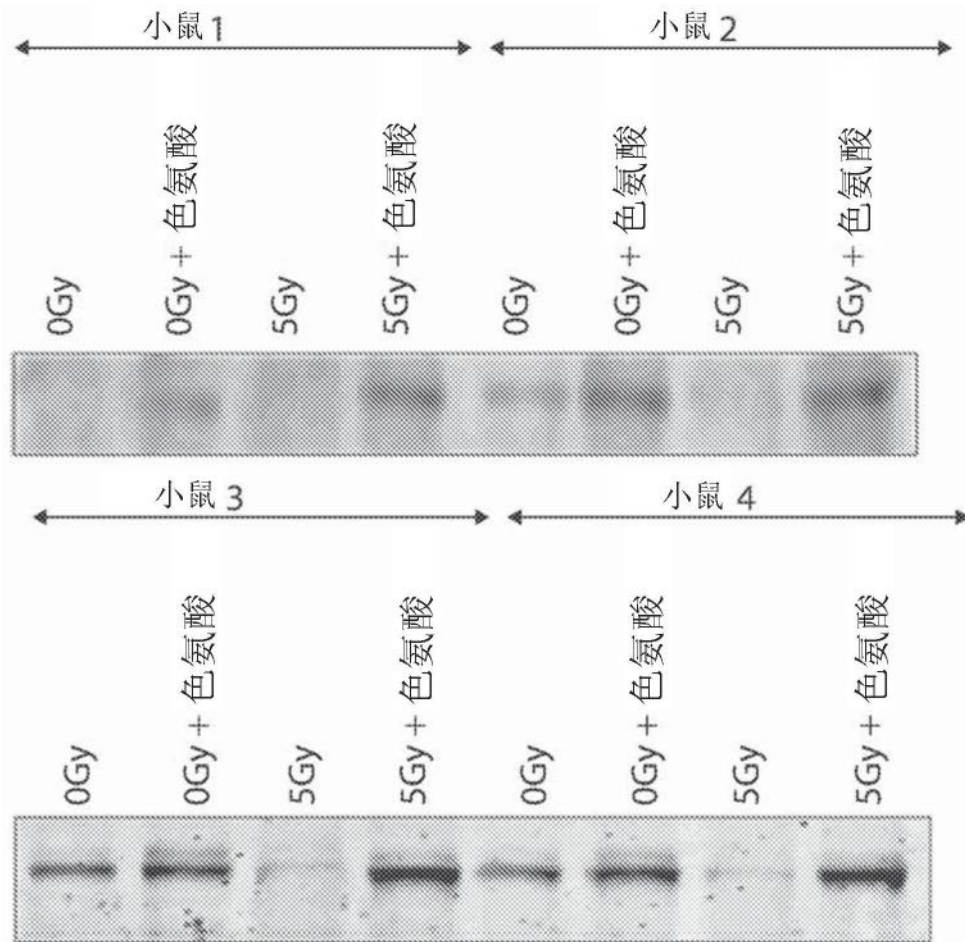


图10A

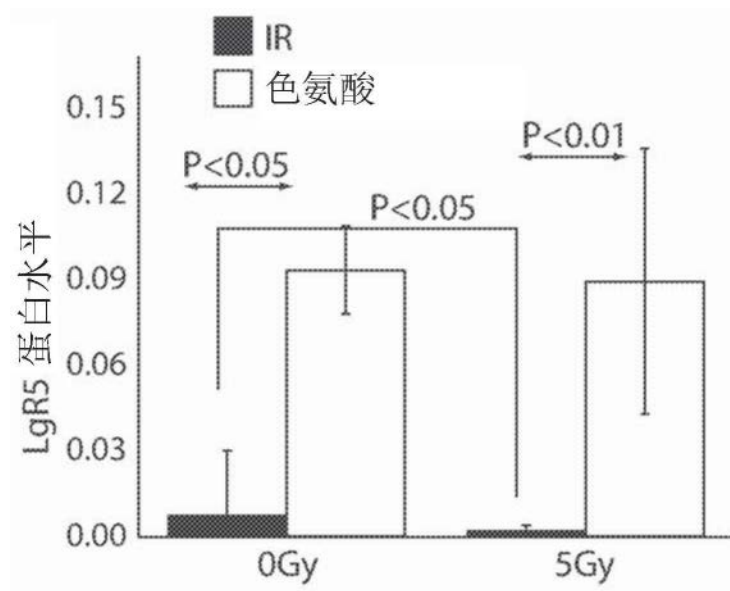


图10B

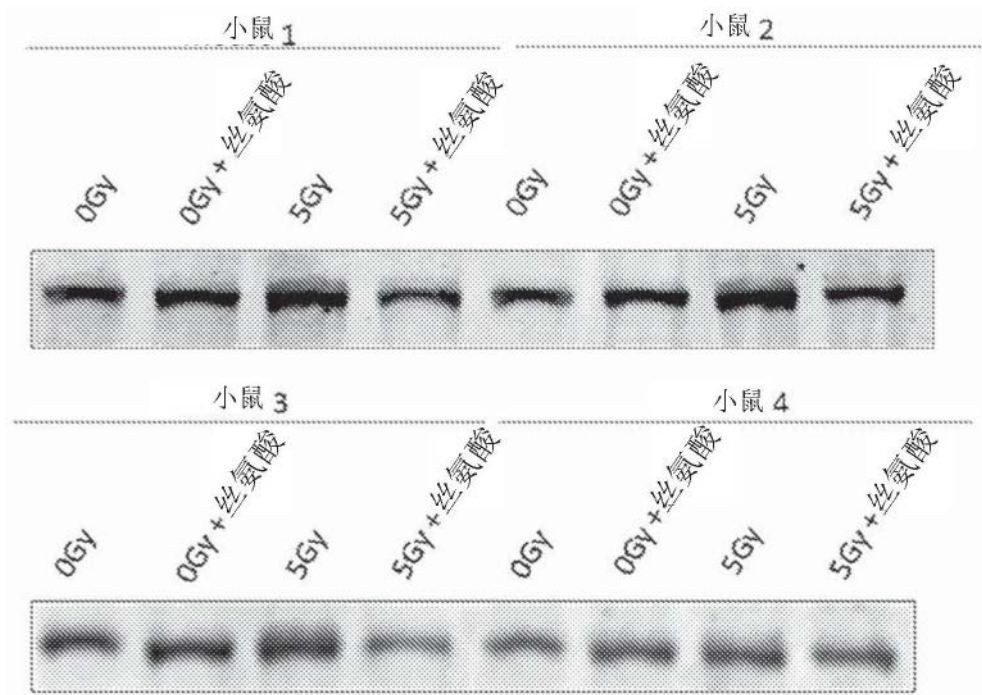


图11A

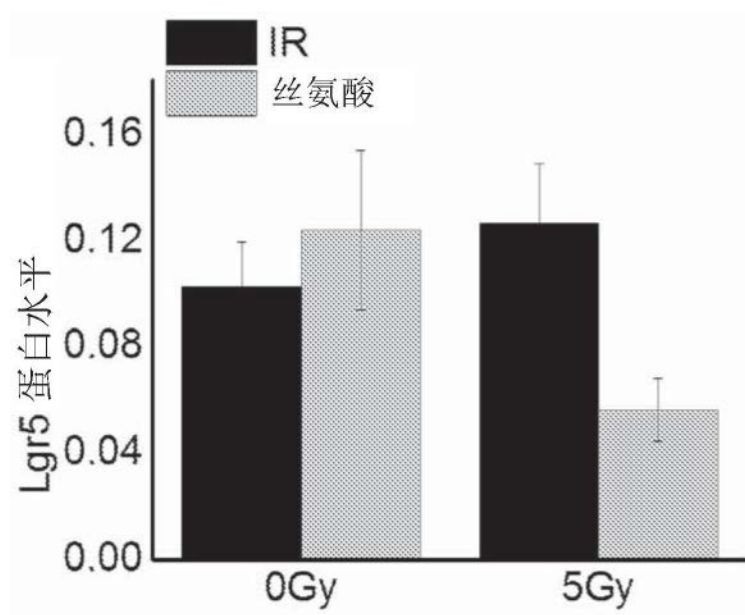


图11B

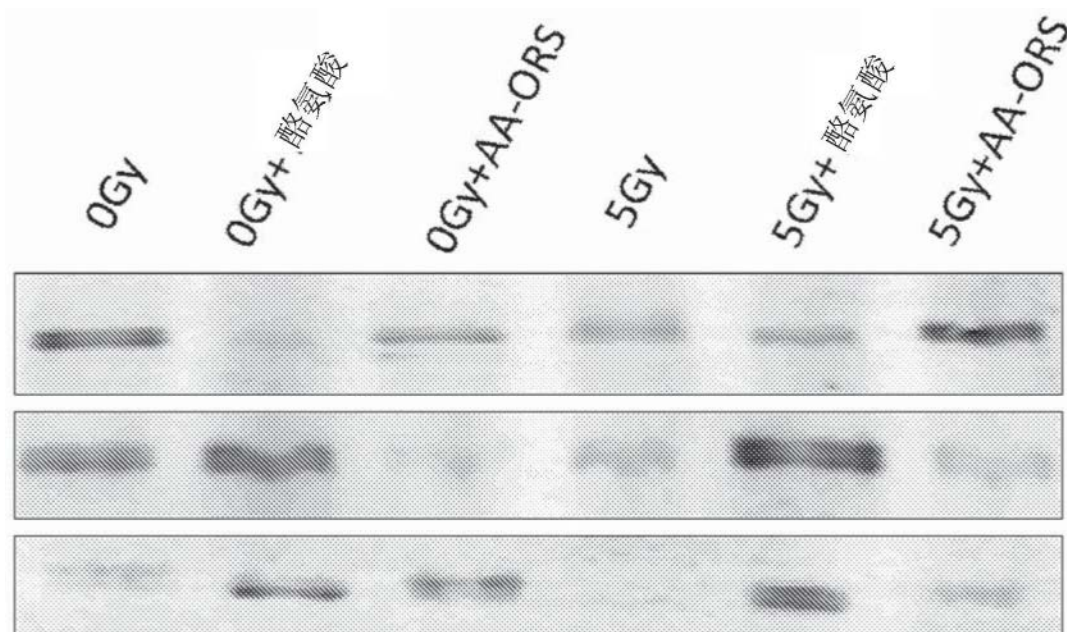


图12A

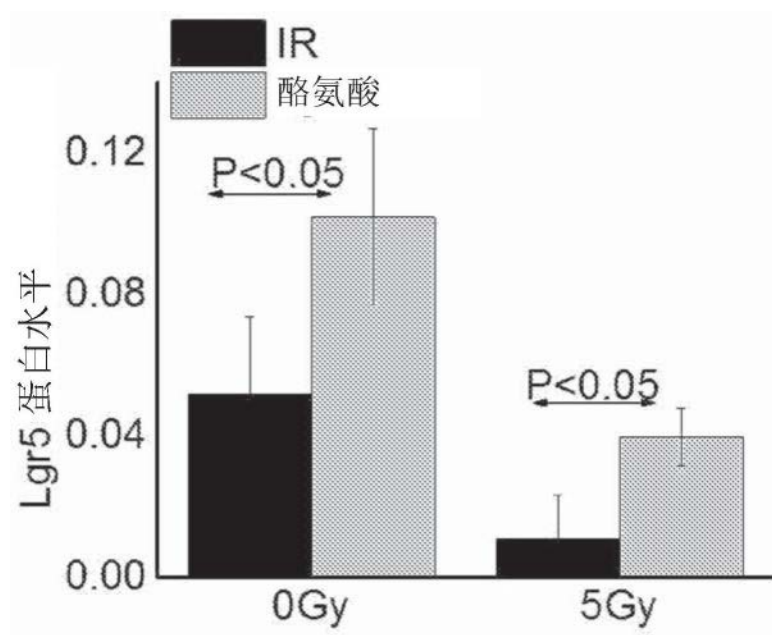


图12B

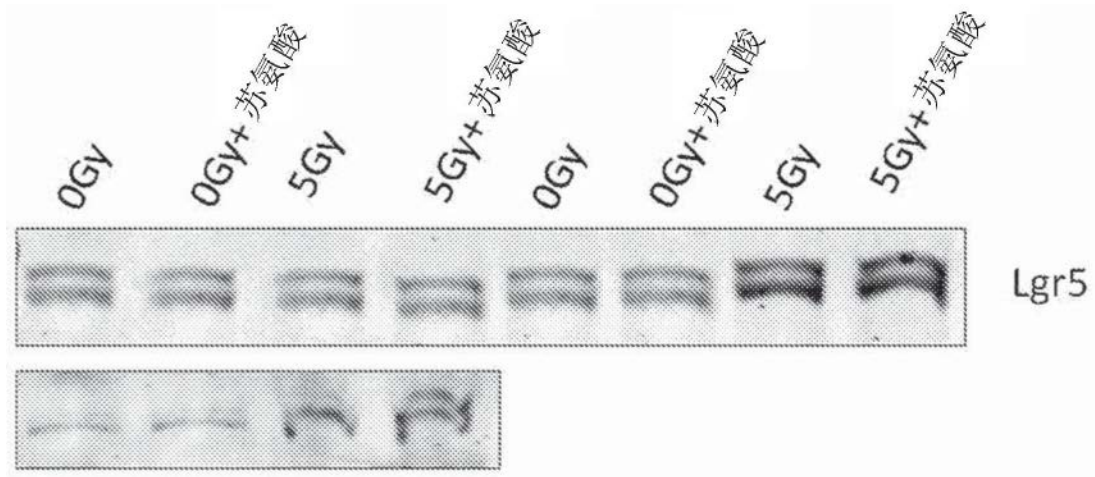


图13

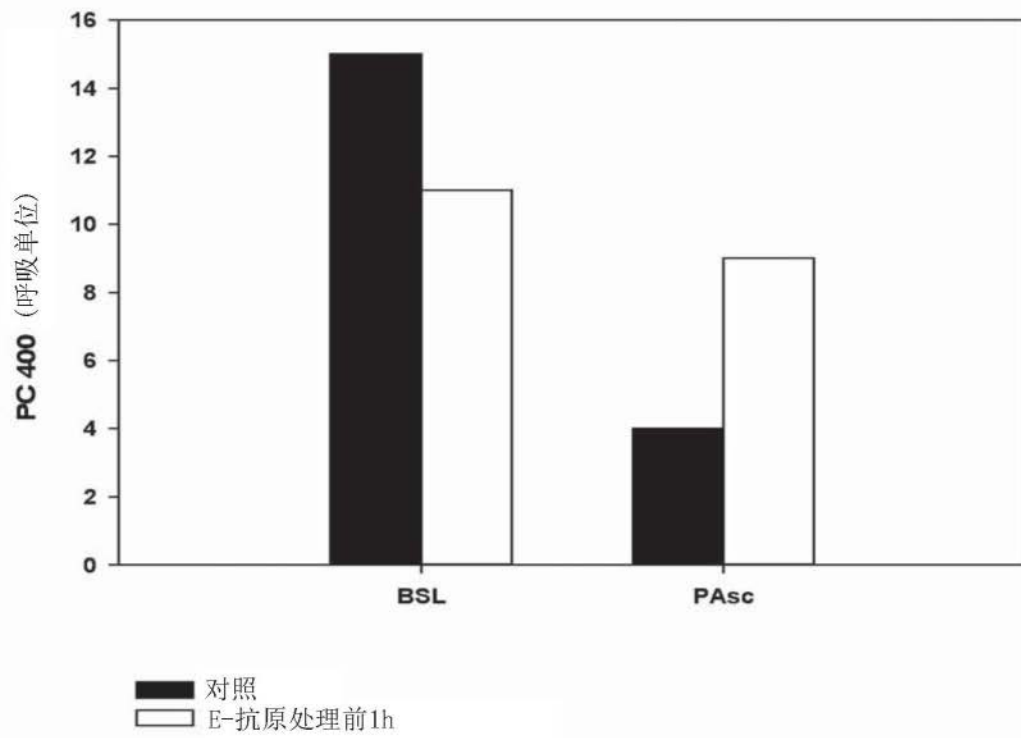
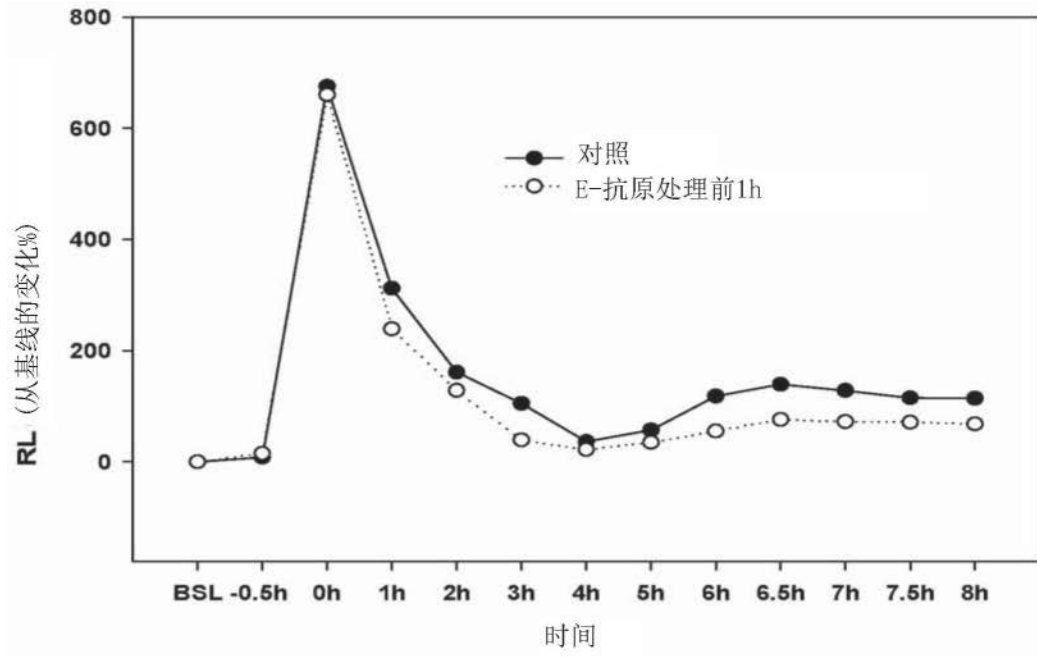


图14

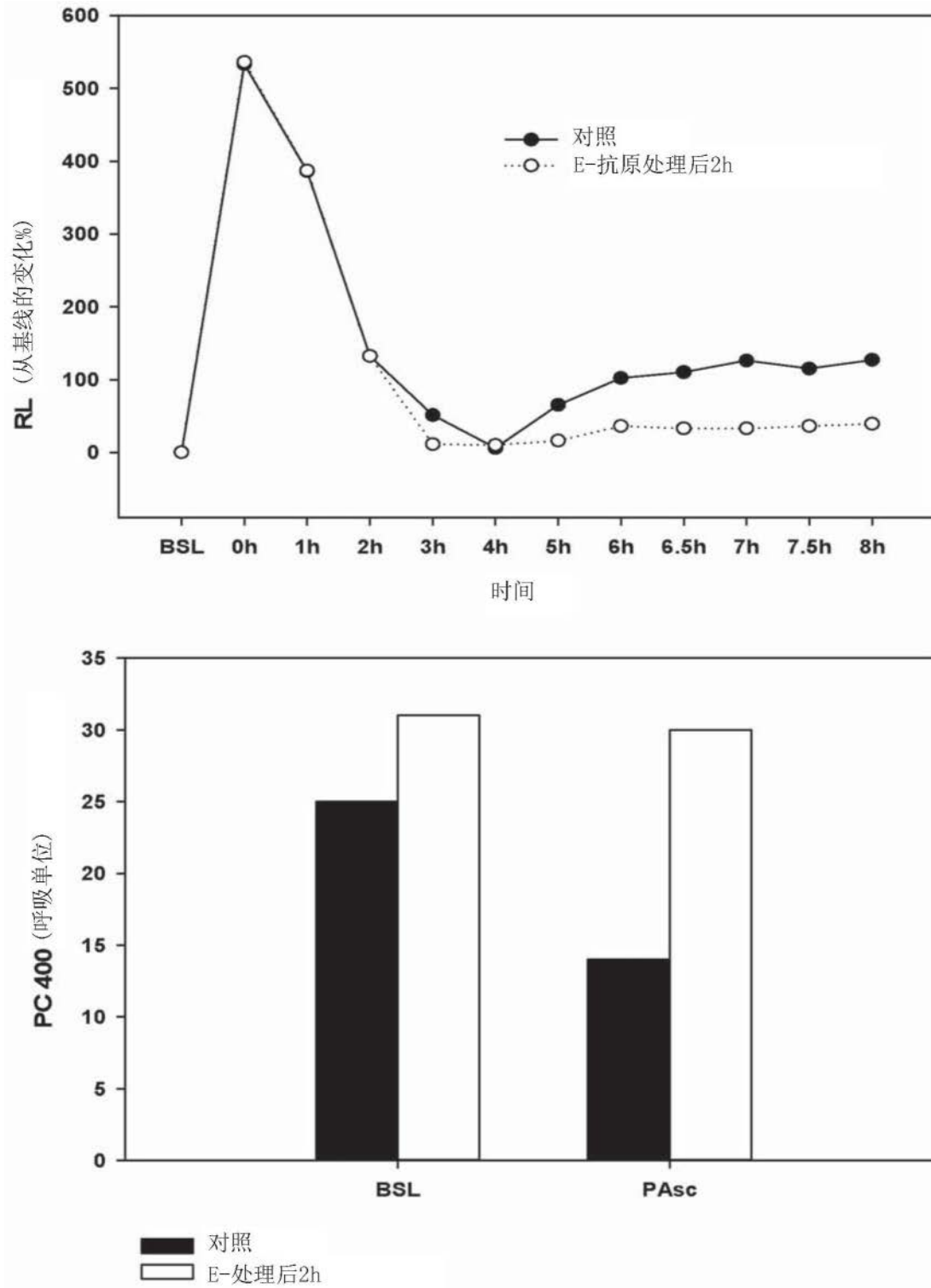


图15

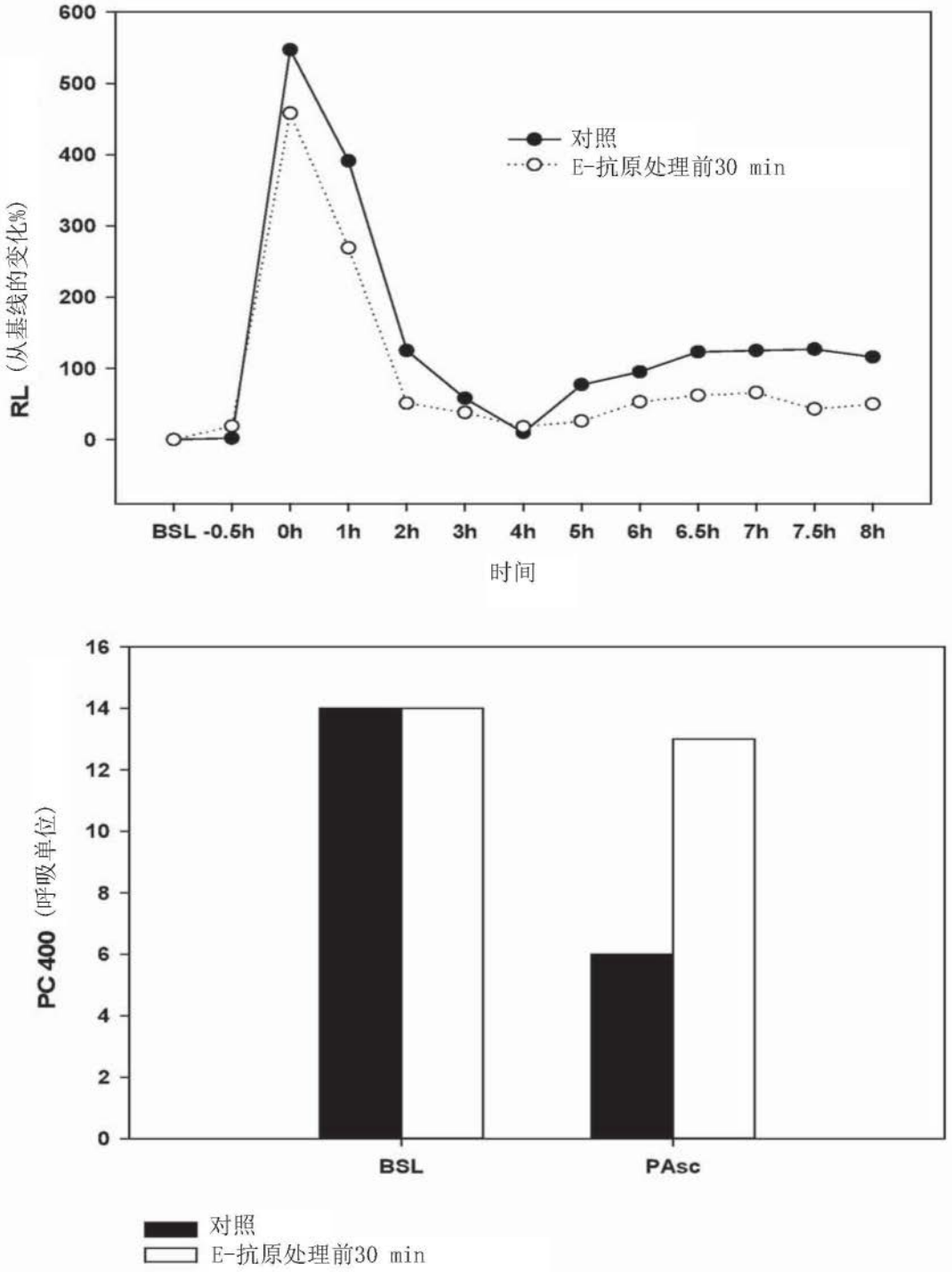


图16

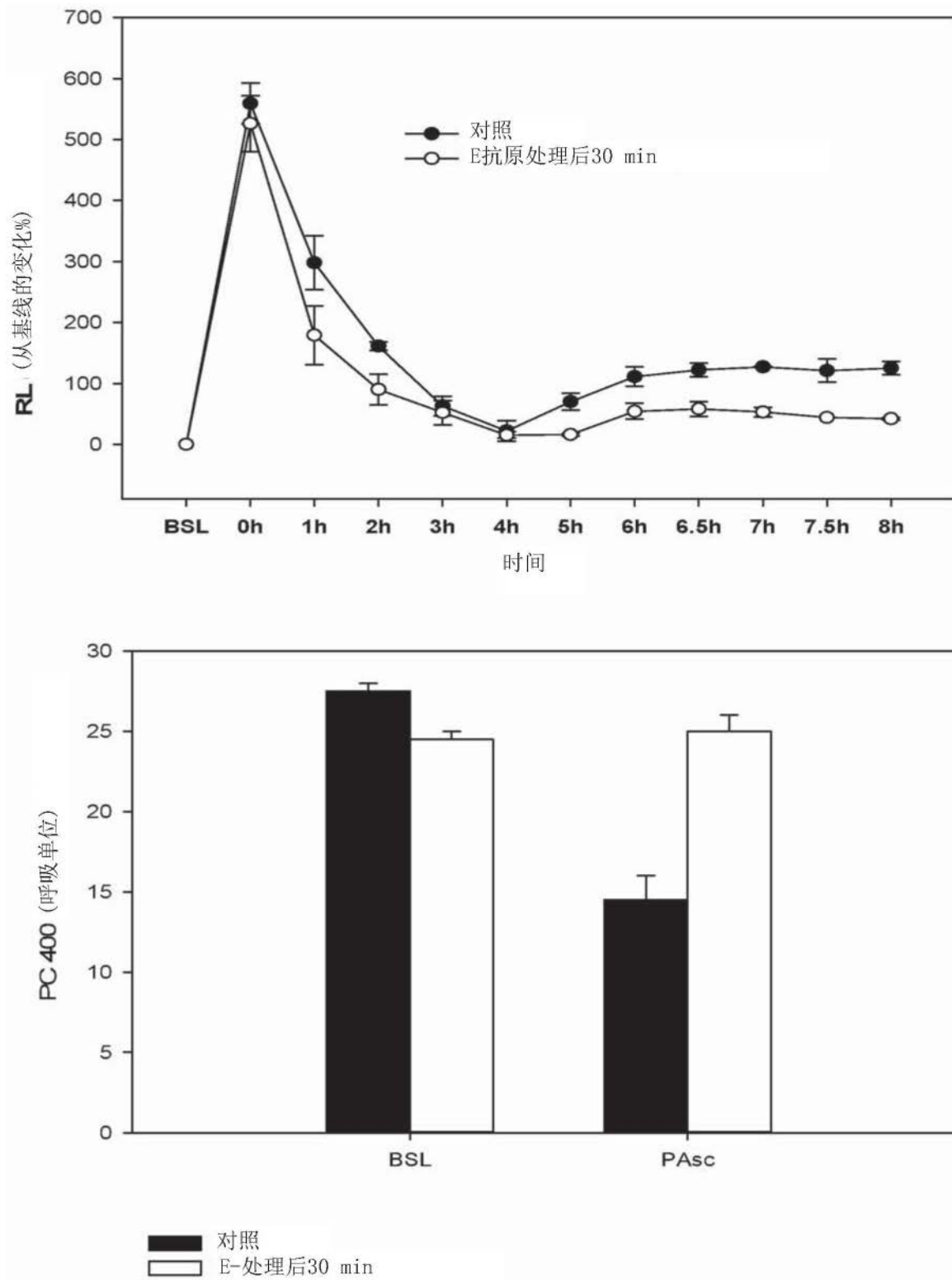


图17

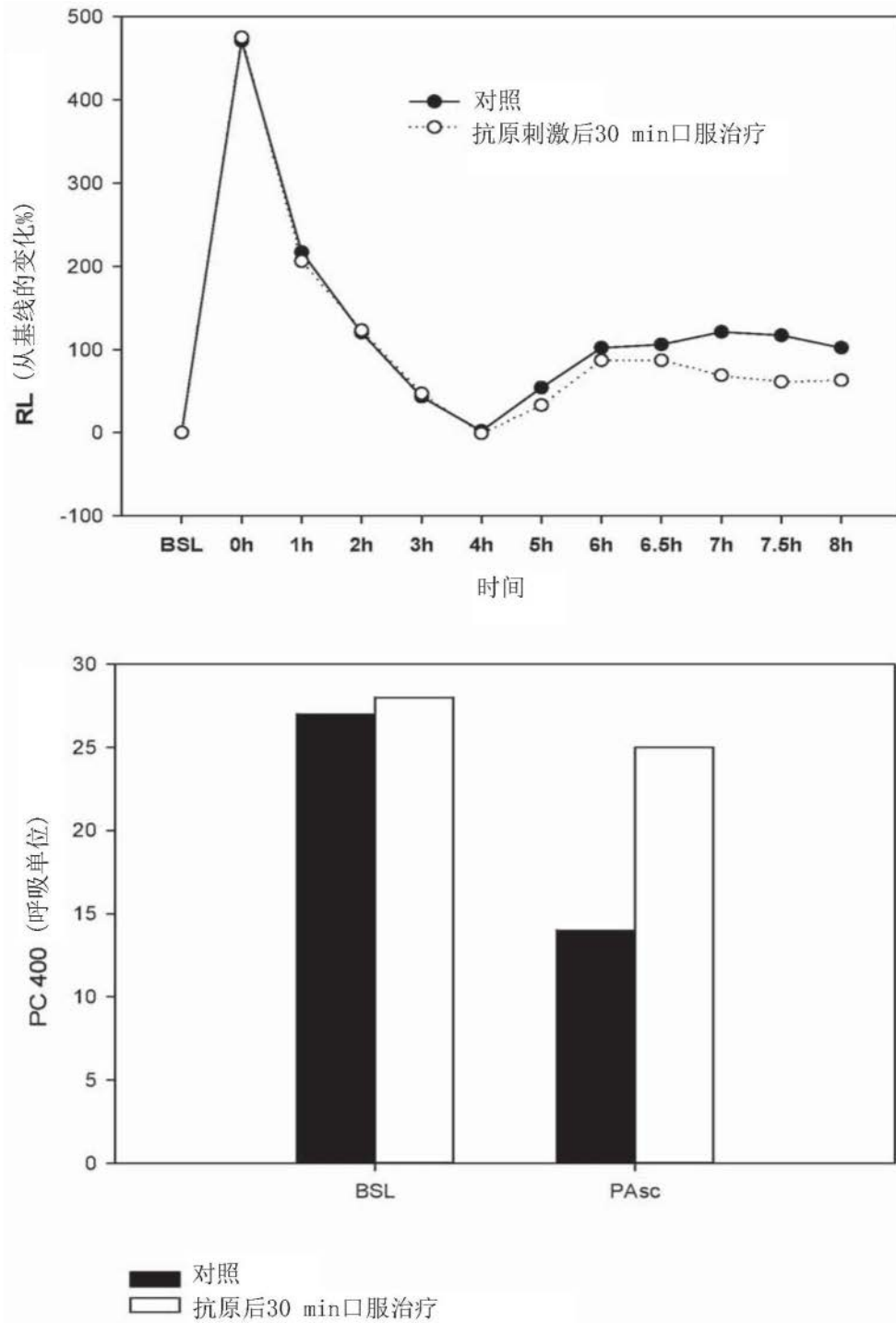


图18

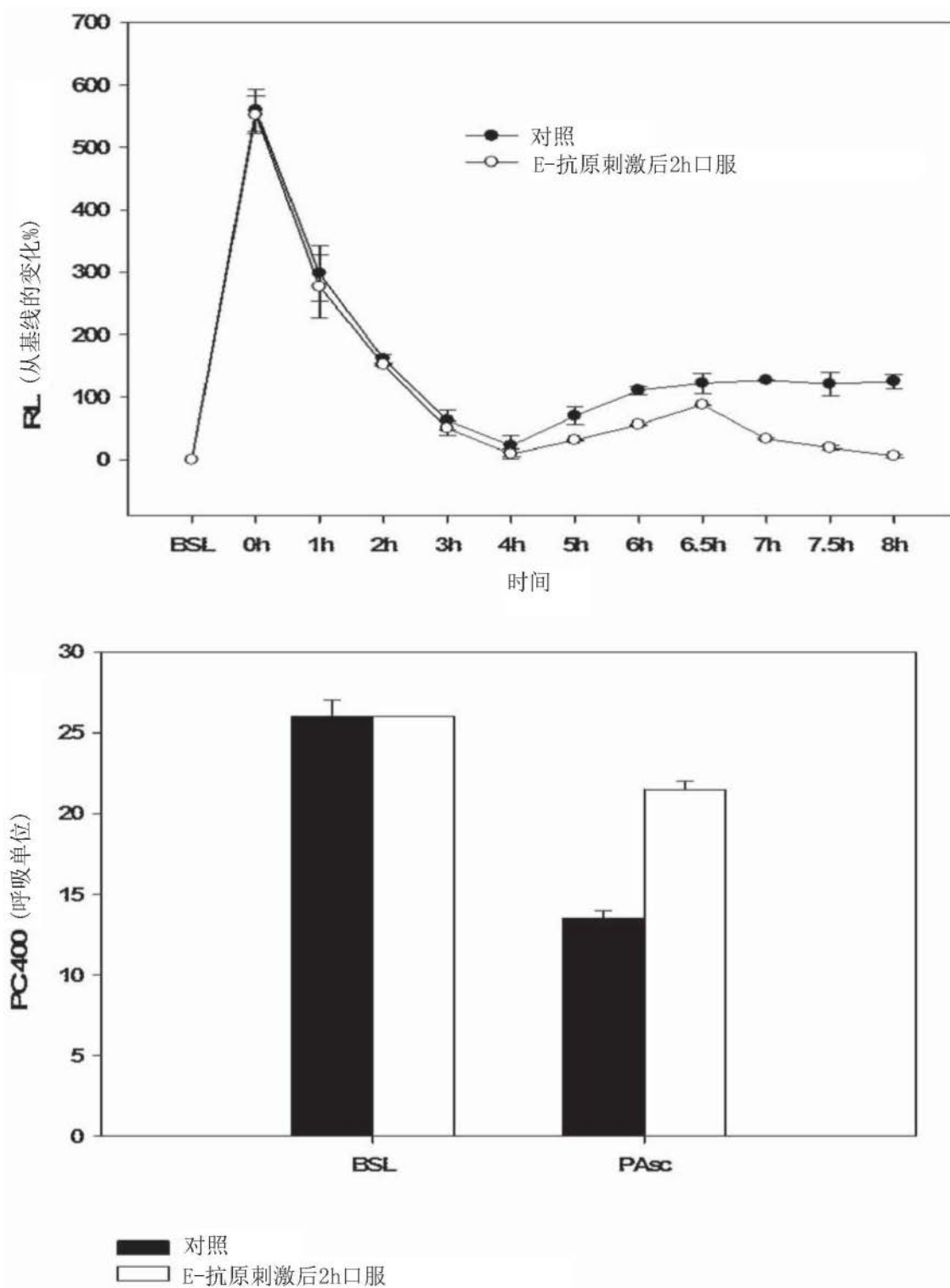


图19

测试	LAR (对照)*	LAR (治疗)	AHR (对照)+	AHR (治疗)
气溶胶前1h	111.8±11.6	62.8±6.2	0.27	0.82
气溶胶前30 min	110.5±8.3	50.0±5.9	0.42	0.92
气溶胶后30 min	113.0±8.8	44.5±6.2	0.53	1.02
气溶胶后2h	107.5±9.3	32.2±3.4	0.56	0.97
口服后2h	112.7±8.8	38.8±11.9	0.52	0.83
口服后30 min	100.3±9.8	66.7±8.2	0.52	0.89

图20

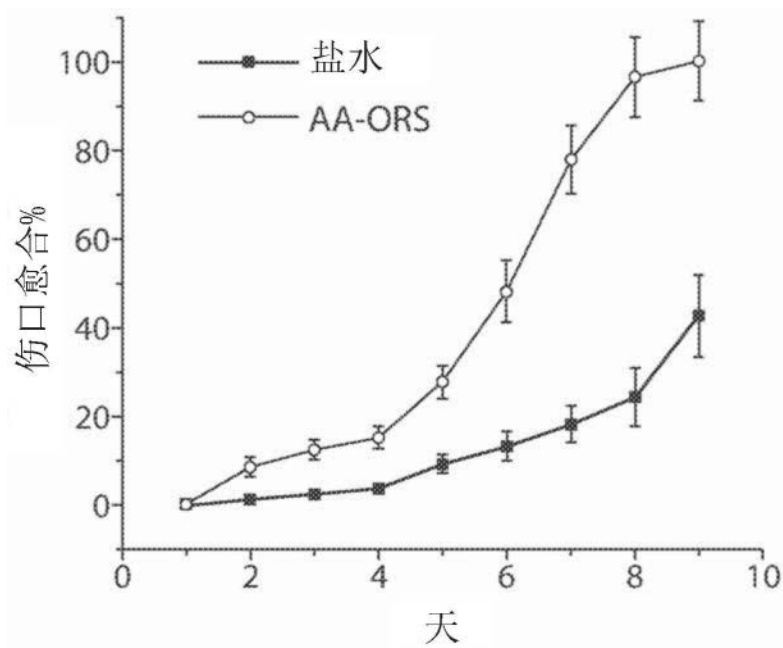


图21