



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105663146 B

(45)授权公告日 2020.09.11

(21)申请号 201610084077.0

(22)申请日 2010.08.06

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105663146 A

(43)申请公布日 2016.06.15

(30)优先权数据

61/234,178 2009.08.14 US

(62)分案原申请数据

201080046231.6 2010.08.06

(73)专利权人 博格有限责任公司

地址 美国田纳西州

(72)发明人 J·J·杰梅尼兹 N·R·纳莱恩

J·P·麦库克

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 马慧

(51)Int.Cl.

A61K 31/593(2006.01)

A61K 31/592(2006.01)

A61K 31/59(2006.01)

A61P 17/14(2006.01)

(56)对比文件

US 2002/0103173 A1,2002.08.01,

CN 1549803 A,2004.11.24,

CN 1705643 A,2005.12.07,

US 2004/0053895 A1,2004.03.18,

US 2002/0035097 A1,2002.03.21,

审查员 陈红霞

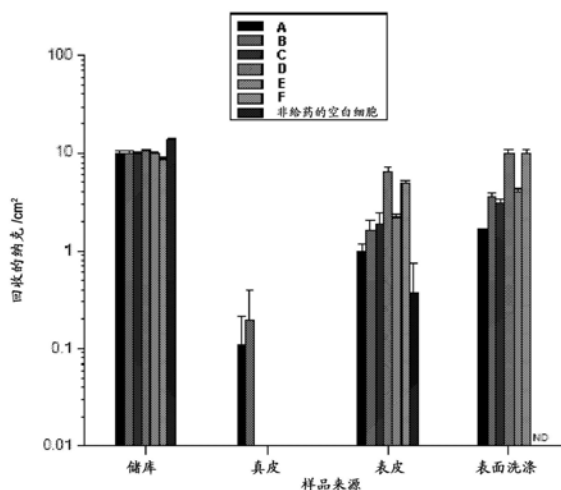
权利要求书2页 说明书59页 附图41页

(54)发明名称

用于治疗脱发的维生素D3及其类似物

(57)摘要

本发明提供用于预防或治疗脱发(例如化疗引起的脱发(CIA))的方法和药物组合物。本发明药物组合物的制剂包含有效量的维生素D化合物,其将维生素D化合物局部递送至表皮层,但基本上避免递送至真皮层。在化疗患者中,本发明药物组合物可在化疗药物之前施用或与化疗药物同时施用。



1. 局部施用药物组合物,其包含治疗有效量的钙三醇以及载体,其配制为递送至个体表皮而基本上避免真皮递送,其中所述载体包含无水乙醇和丙二醇,其中丙二醇与无水乙醇的百分比之比选自35:65、36:64、37:63、38:62、39:61、40:60、41:59、42:58、43:57、44:56和45:55;或者所述载体包含30% (w/w) 丙二醇、10% (w/w) 乙氧基二甘醇或二乙二醇单乙基醚和60% (w/w) 无水乙醇。

2. 如权利要求1所述的局部施用药物组合物,其中所述局部施用药物组合物包含有效浓度3-100 μ g/ml的钙三醇。

3. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述载体包含40% (w/w) 丙二醇和60% (w/w) 无水乙醇。

4. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述载体包含30% (w/w) 丙二醇、10% (w/w) 乙氧基二甘醇,和60% (w/w) 无水乙醇。

5. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述载体包含30% (w/w) 丙二醇、10% (w/w) 二乙二醇单乙基醚,和60% (w/w) 无水乙醇。

6. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述个体是灵长类。

7. 如权利要求6所述的局部施用药物组合物,其中所述个体是人。

8. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述药物组合物用于以0.1 μ g/cm²的剂量将钙三醇局部施用于所述个体。

9. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述药物组合物用于以2-100 μ g/75kg体重的总剂量将钙三醇局部施用于所述个体。

10. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述钙三醇当以如下有效浓度局部施用于个体时:

(1) 50 μ g/mL,在给药至少连续25天后不引起毒性;或

(2) 100 μ g/mL,在给药至少连续7天后不引起毒性。

11. 如权利要求1或2所述的局部施用药物组合物,其中所述治疗有效量的钙三醇基本上不干扰共施用的化疗剂的功效。

12. 局部施用的药物组合物,包含治疗有效量的钙三醇,以及载体丙二醇和无水乙醇,其中丙二醇与无水乙醇的百分比之比 (w/w) 为40:60。

13. 权利要求12的局部施用药物组合物,其中所述药物组合物用于将钙三醇以0.1 μ g/cm³的剂量施用至个体。

14. 权利要求12的局部施用药物组合物,其中所述药物组合物用于将钙三醇以2-100 μ g/75kg体重的总剂量局部施用。

15. 权利要求1和3-11中任一项所述的局部施用药物组合物在制备用于预防或治疗化疗引起的个体脱发的药物中的用途。

16. 局部施用的药物组合物在制备用于预防或治疗化疗引起的个体脱发的药物中的用途,其中所述局部施用的药物组合物包含治疗有效量的钙三醇,以及载体丙二醇和无水乙醇,其中丙二醇与无水乙醇的百分比 (w/w) 之比为40:60。

17. 权利要求15或16所述的用途,其中所述个体还未开始脱发。

18. 权利要求15或16所述的用途,其中所述个体正在经历或将要经历化疗。

19. 权利要求18的用途,其中在化疗之前或在化疗的同时将所述药物组合物施用于个

体。

20. 如权利要求18所述的用途, 其中在化疗开始后但在脱发开始前将所述药物组合物施用于个体。

21. 如权利要求15或16所述的用途, 其中化疗是全身化疗。

22. 如权利要求15或16所述的用途, 其中化疗包括以下一种或多种: 蒽环类、5-FU、他莫昔芬、伊立替康、紫杉醇、卡铂、依托泊苷、癌得星、顺铂、厄洛替尼、吉西他滨、星形孢菌素、长春新碱、伊马替尼、吉非替尼、索拉非尼、达沙替尼、放线菌素D、六甲蜜胺、异环磷酰胺、博来霉素、甲氨蝶呤、多西他赛、长春地辛、长春瑞滨、拓扑替康、安吡啶、阿糖胞苷、白消安、美法仑、长春碱、洛莫司汀、塞替派、吉西他滨、卡氮芥、米托蒽醌、丝裂霉素C、甲基苄肼、6-巯嘌呤、链脲佐菌素、氟达拉滨、雷替曲塞、和卡培他滨。

23. 如权利要求22所述的用途, 其中所述蒽环类选自多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、和戊柔比星。

用于治疗脱发的维生素D3及其类似物

[0001] 本申请是申请日为2010年8月6日、申请号为201080046231.6、发明名称为“用于治疗脱发的维生素D3及其类似物”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2009年8月14日提交的美国临时专利申请61/234,178的优先权。上述申请的内容以引用方式合并于此。

背景技术

[0004] 脱发是许多化疗剂常见且使人痛苦的副作用，目前对此几乎没有有效的预防措施。在最近的研究中，接受化疗的四十六名患者中的三十五名认为脱发比呕吐为更大的令人不安的副作用(Tierney等,B.J.Cancer,62:527-528,1990)。

[0005] 目前，患有脱发的人只能通过重复局部施用类固醇来试图再生脱落的毛发，或能通过局部施用米诺地尔来试图维持毛发生长。此外，尽管有着一些有前途的研究，目前没有批准的能够在化疗治疗期间防止脱发副作用发生的治疗剂。例如，使用幼年大鼠模型，已表明ImuVert(由细菌粘质沙雷氏菌产生的生物应答调节剂)保护动物免受由阿糖胞苷或阿霉素引起的脱发(Hussein等,Science 249:1564-1566,1990)。在随后的研究中，也观察到重组白细胞介素-1(IL-1) β 有着免受ARA-C-引起的脱发的类似的保护作用(Jimenez等,FASEB J.1991)。尽管有着这些有前途的结果，仍然需要能治疗患有这种疾病的患者，还能预防接受癌症治疗的患者的化疗引起的脱发的安全且有效的治疗剂。

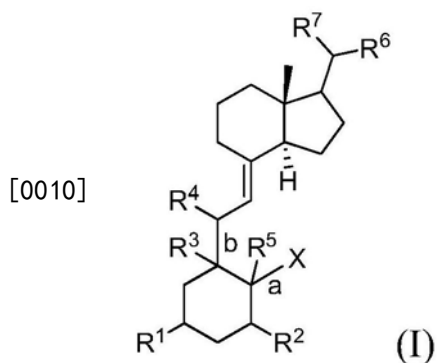
发明内容

[0006] 本发明涉及维生素D化合物(例如维生素D3或钙三醇及其类似物或其代谢物)、其剂型和制剂在预防或治疗脱发(例如，化疗引起的脱发(CIA))中的用途。

[0007] 因此，一方面，本发明提供通过将药物组合物局部施用于个体来预防或治疗个体脱发的方法，所述药物组合物包含配制成递送至表皮同时基本上避免真皮递送的治疗有效量的维生素D化合物。

[0008] 在一些实施方式中，所述药物组合物包含约40% (w/w) 丙二醇和约60% (w/w) 无水乙醇(200proof,U.S.)；或约30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙氧基二甘醇或二乙二醇单乙基醚(transcutol)和约60% (w/w) 无水乙醇(200proof,U.S.)。

[0009] 在其他实施方式中，所述维生素D化合物由式(I)及其药学可接受的盐表示：



[0011] 其中

[0012] a和b各自独立为单键或双键；

[0013] 当a是双键时，X是-CH₂；或当a是单键时，X是氢或羟基取代的烷基；

[0014] R¹是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基，任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代；

[0015] R²是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或链烯基，任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代；

[0016] 当b是双键时，R³不存在，或当b是单键时，R³是氢、羟基或烷基，或R³和R¹连同它们所连接的碳原子可连接形成5-7元碳环；

[0017] 当b是双键时，R⁴不存在，或当b是单键时，R⁴是氢、卤素或羟基；

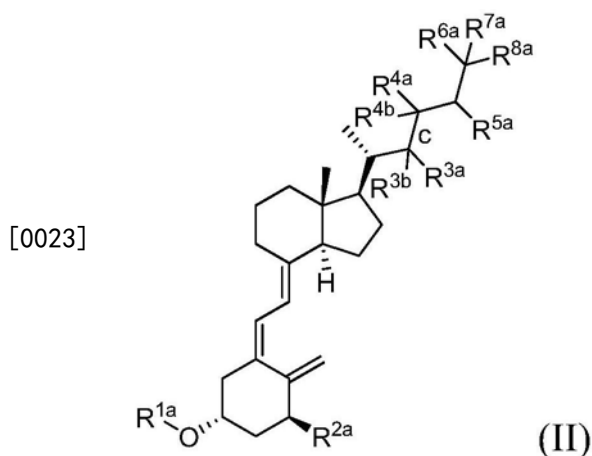
[0018] 当a是双键时，R⁵不存在，或当a是单键时，R⁵是氢、卤素或羟基；

[0019] R⁶是烷基、链烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-O-烷基、烷基-CO₂-烷基，任选被一到五个羟基、氧代、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R''基团取代；

[0020] R⁷是烷基，任选被一到三个羟基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R''基团取代；和

[0021] R' 和R''各自独立为氢、羟基、卤素、烷基或烷氧基。

[0022] 在一些其他实施方式中，所述维生素D化合物由式 (II) 及其药学可接受的盐表示：



[0024] 其中

[0025] c是单键或双键；

[0026] R^{1a}是氢、三烷基甲硅烷基或烷基，任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代；

[0027] R^{2a} 是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基、或烷基、烷氧基或链烯基,任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR'R''基团取代;

[0028] 当c是双键时, R^{3a} 、 R^{4a} 不存在,或当c是单键时, R^{3a} 、 R^{4a} 各自独立为氢、羟基、卤素、烷氧基或烷基,任选被一到三个羟基或卤素基团取代;

[0029] R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5a} 、 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 各自独立为氢、羟基、卤素、烷氧基或烷基,任选被一到三个羟基或卤素基团取代;或 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 中的任何两个可连接形成3-7元碳环。

[0030] 在又一个实施方式中,所述维生素D化合物是1,25-二羟基维生素D3、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇、1,25-二羟基-16-烯-炔-胆钙化醇、 1α -羟基维生素D3、 1α ,24-二羟基维生素D3或MC903。

[0031] 在其他实施方式中,所述维生素D化合物不是1,25-二羟基维生素D3、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇、1,25-二羟基-16-烯-炔-胆钙化醇、 1α -羟基维生素D3、 1α ,24-二羟基维生素D3或MC903。

[0032] 在其他实施方式中,所述维生素D化合物和等量钙三醇在正常角质形成细胞中具有类似或相同的基因调节特征。

[0033] 在一些实施方式中,所述维生素D化合物调节其表达水平由等量的钙三醇调节的一个或多个基因的表达。

[0034] 在其他实施方式中,所述维生素D化合物调节正常角质形成细胞中HSPA2或HSF4mRNA、HSPB1或DNAJC6mRNA的表达。

[0035] 在另一个实施方式中,所述维生素D化合物调节正常角质形成细胞中SLC1A1、KCNB2、KCNN4或SLC1A3蛋白的表达。

[0036] 在其他实施方式中,所述维生素D化合物调节表3-1和表3-2中一种或多种蛋白的表达至少约2倍。

[0037] 在其他实施方式中,在正常角质形成细胞与所述维生素D化合物接触约24小时后,所述维生素D化合物诱导表3-3、3-4、3-5或3-6中的一种或多种蛋白的过度表达。

[0038] 在其他实施方式中,所述维生素D化合物诱导正常角质形成细胞中GST、角蛋白1、角蛋白17、半乳凝集素1、S100A9(钙卫蛋白)或S100A13的一种或多种的过度表达。

[0039] 在一些实施方式中,所述脱发是斑秃(AA)、全秃(AT)、普秃(AU)或化疗引起的脱发(CIA)。

[0040] 在一些其他实施方式中,所述斑秃包括弥散性斑秃、单一部位斑秃(alopecia areata monolocularis)、多个部位斑秃(alopecia areata multilocularis)和须部斑秃(alopecia areata barbae)。

[0041] 在又一个实施方式中,所述脱发不包括雄激素性脱发(雄性脱发)或化疗后脱发(PCA)。

[0042] 在一些实施方式中,所述个体是灵长类。

[0043] 在其他实施方式中,所述个体是人。

[0044] 在其他实施方式中,所述个体还未开始脱发。

[0045] 在又一个实施方式中,个体正在经历或将要经历化疗。

[0046] 在一些其他实施方式中,在化疗之前或在化疗的同时将所述药物组合物施用于个体。

[0047] 在又一个实施方式中,在化疗开始后但在脱发开始前将所述药物组合物施用于个体。

[0048] 在一些实施方式中,所述药物组合物基本上不降低化疗功效。

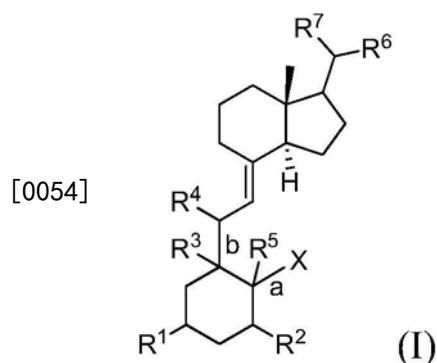
[0049] 在其他实施方式中,所述化疗是全身化疗。

[0050] 在一些实施方式中,所述化疗包括以下一种或多种:蒽环类(阿霉素/多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、戊柔比星)、5-FU、贝伐单抗、他莫昔芬、伊立替康、紫杉醇(Taxol)、卡铂、依托泊苷、癌得星/环磷酰胺、顺铂、厄洛替尼(特罗凯)、吉西他滨、星形孢菌素、长春新碱、伊马替尼(格列卫)、吉非替尼(易瑞沙)、索拉非尼、达沙替尼、放线菌素D、六甲蜜胺(HMM,六甲基蜜胺)、异环磷酰胺、博来霉素、甲氨蝶呤、多西他赛(泰索帝)、长春地辛、长春瑞滨、拓扑替康、安吡啶、阿糖胞苷、白消安、美法仑、长春碱、洛莫司汀(CCNU)、塞替派、吉西他滨、卡氮芥(BCNU)、米托蒽醌、丝裂霉素C、甲基苄肼、6-巯嘌呤、链脲佐菌素、氟达拉滨、雷替曲塞(拓优得)、卡培他滨及其等效物。

[0051] 在其他实施方式中,所述维生素D化合物以相当于约0.1 μ g钙三醇/ cm^2 的剂量体积局部施用于个体。

[0052] 在其他实施方式中,总剂量相当于约2-100 μ g钙三醇/75kg体重。

[0053] 在另一方面,本发明提供预防或治疗个体脱发的方法,包括将含有治疗有效量维生素D化合物的药物组合物局部施用于个体,所述维生素D化合物由式(I)及其药学可接受的盐表示:



[0055] 其中

[0056] a和b各自独立为单键或双键;

[0057] 当a是双键时,X是-CH₂;或当a是单键时,X是氢或羟基取代的烷基;

[0058] R¹是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代;

[0059] R²是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或链烯基,任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代;

[0060] 当b是双键时,R³不存在,或当b是单键时,R³是氢、羟基或烷基,或R³和R¹连同它们所连接的碳原子可连接形成5-7元碳环;

[0061] 当b是双键时,R⁴不存在,或当b是单键时,R⁴是氢、卤素或羟基;

[0062] 当a是双键时,R⁵不存在,或当a是单键时,R⁵是氢、卤素或羟基;

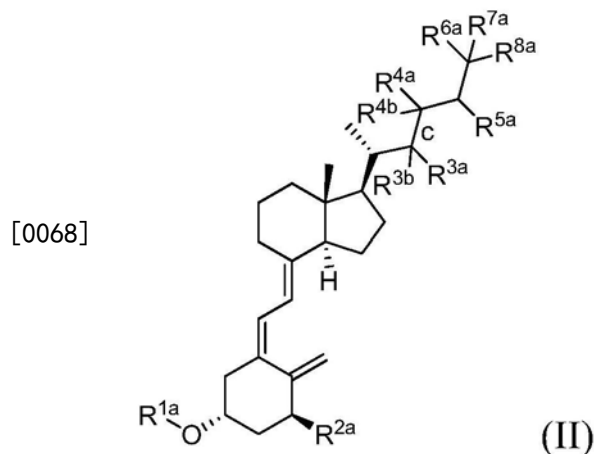
[0063] R⁶是烷基、链烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-O-烷基、烷基-CO₂-烷基,任选被一到五个羟基、氧代、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R''基团取代;

[0064] R^7 是烷基,任选被一到三个羟基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或 $-NR'R''$ 基团取代;和

[0065] R' 和 R'' 各自独立为氢、羟基、卤素、烷基或烷氧基。

[0066] 其中所述维生素D化合物不是1,25-二羟基维生素D3、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇、1,25-二羟基-16-烯-炔-胆钙化醇、 1α -羟基维生素D3、 1α ,24-二羟基维生素D3或MC903。

[0067] 在一些实施方式中,所述维生素D化合物由式(II)及其药学可接受的盐表示:



[0069] 其中

[0070] c 是单键或双键;

[0071] R^{1a} 是氢、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一到三个卤素、羟基、氰基或 $-NR'R''$ 基团取代;

[0072] R^{2a} 是氢、羟基、 $-O$ -三烷基甲硅烷基、或烷基、烷氧基或链烯基,任选被一到三个卤素、羟基、氰基或 $-NR'R''$ 基团取代;

[0073] 当 c 是双键时, R^{3a} 、 R^{4a} 不存在,或当 c 是单键时, R^{3a} 、 R^{4a} 各自独立为氢、羟基、卤素、烷氧基或烷基,任选被一到三个羟基或卤素基团取代;

[0074] R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5a} 、 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 各自独立为氢、羟基、卤素、烷氧基或烷基,任选被一到三个羟基或卤素基团取代;或 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 中的任何两个可连接形成3-7元碳环。

[0075] 另一方面,本发明提供预防或治疗个体脱发的方法,包括将含有治疗有效量维生素D化合物的药物组合物局部施用于个体,其中所述维生素D化合物,当以如下有效浓度局部施用于个体时:(1)约50 μ g/mL,在给药至少约连续25天后不引起毒性;或(2)约100 μ g/mL,在给药至少约连续7天后不引起毒性。

[0076] 又一方面,本发明提供预防或治疗个体脱发的方法,包括将含有用于预防或治疗个体脱发的治疗有效量维生素D化合物的药物组合物局部施用于个体,而基本上不干扰共施用的化疗剂的功效。

[0077] 一方面,本发明提供预防或治疗个体脱发的方法,包括将含有治疗有效量维生素D化合物的药物组合物局部施用于个体,所述维生素D化合物:

[0078] (1)在正常角质形成细胞中具有与等量钙三醇类似或相同的基因调节特征;

[0079] (2)调节其表达水平由等量的钙三醇调节的一个或多个基因的表达;

[0080] (3)调节正常角质形成细胞中HSPA2或HSF4mRNA、HSPB1或DNAJC6mRNA的表达;

[0081] (4) 调节正常角质形成细胞中SLC1A1、KCNB2、KCNN4或SLC1A3蛋白的表达;

[0082] (5) 调节表3-1和表3-2中一种或多种蛋白的表达至少约2倍;

[0083] (6) 在正常角质形成细胞与所述维生素D化合物接触约24小时后,诱导表3-3、3-4、3-5或3-6中的一种或多种蛋白的过度表达;或

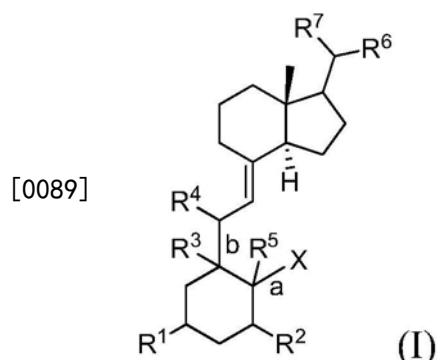
[0084] (7) 诱导正常角质形成细胞中GST、角蛋白1、角蛋白17、半乳凝集素1、S100A9 (钙卫蛋白) 或S100A13的一种或多种的过度表达。

[0085] 其中所述维生素D化合物不是1,25-二羟基维生素D3、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇、1,25-二羟基-16-烯-炔-胆钙化醇、1 α -羟基维生素D3、1 α ,24-二羟基维生素D3或MC903。

[0086] 又一方面,本发明提供用于局部施用的药物组合物,包含用于预防或治疗脱发的治疗有效量的维生素D化合物,其中所述维生素D化合物配制成递送至表皮同时基本上避免真皮递送。

[0087] 在一些方面,所述药物组合物包含约40% (w/w) 丙二醇和约60% (w/w) 无水乙醇(200proof, U.S.), 未变性的; 或约30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙氧基二甘醇或二乙二醇单乙基醚和约60% (w/w) 无水乙醇(200proof, U.S.), 未变性的。

[0088] 在一些方面,本发明提供用于局部施用的药物组合物,包含用于预防或治疗脱发的治疗有效量的维生素D化合物,其中所述维生素D化合物由式(I) 及其药学可接受的盐表示:



[0090] 其中

[0091] a和b各自独立为单键或双键;

[0092] 当a是双键时,X是-CH₂;或当a是单键时,X是氢或羟基取代的烷基;

[0093] R¹是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代;

[0094] R²是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或链烯基,任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代;

[0095] 当b是双键时,R³不存在,或当b是单键时,R³是氢、羟基或烷基,或R³和R¹连同它们所连接的碳原子可连接形成5-7元碳环;

[0096] 当b是双键时,R⁴不存在,或当b是单键时,R⁴是氢、卤素或羟基;

[0097] 当a是双键时,R⁵不存在,或当a是单键时,R⁵是氢、卤素或羟基;

[0098] R⁶是烷基、链烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-O-烷基、烷基-CO₂-烷基,任选被一到五个羟基、氧代、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R''基团取代;

- [0117] (3) 调节正常角质形成细胞中HSPA2或HSF4mRNA、HSPB1或DNAJC6mRNA的表达;
- [0118] (4) 调节正常角质形成细胞中SLC1A1、KCNB2、KCNN4或SLC1A3蛋白的表达;
- [0119] (5) 调节表3-1和表3-2中一种或多种蛋白的表达至少约2倍;
- [0120] (6) 在正常角质形成细胞与所述维生素D化合物接触约24小时后,诱导表3-3、3-4、3-5或3-6中的一种或多种蛋白的过度表达;或
- [0121] (7) 诱导正常角质形成细胞中GST、角蛋白1、角蛋白17、半乳凝集素1、S100A9 (钙卫蛋白) 或S100A13的一种或多种的过度表达。
- [0122] 其中所述维生素D化合物不是1,25-二羟基维生素D3、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇、1,25-二羟基-16-烯-炔-胆钙化醇、1 α -羟基维生素D3、1 α ,24-二羟基维生素D3或MC903。
- [0123] 应注意,适用时,预期本发明(上文和下文)描述的所有实施方式能与任何其他一种或多种实施方式组合,包括仅在本发明的一个方面中描述的实施方式,和在本发明不同方面中描述的实施方式。

附图说明

- [0124] 图1显示三种皮肤供体的总吸收量和质量平衡结果,以及单次施用经48小时的来自完整的人尸体皮肤的钙三醇的分配。结果以平均值 \pm SE作为总质量(ng/cm^2)的对数标尺显示。
- [0125] 图2显示HEKa细胞相对于生长介质中存在的不同浓度钙三醇的典型生长曲线。注意钙三醇浓度的对数标尺。
- [0126] 图3显示胰腺癌细胞系PaCa2的典型生长曲线,所述生长曲线对0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇的存在没有反应。
- [0127] 图4A和4B分别显示在浓度增加的钙三醇的存在下Hep-G2细胞和MCF-7细胞的生长。
- [0128] 图5显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,厄洛替尼(特罗凯)——一种EGFR Tyr激酶抑制剂的剂量曲线。
- [0129] 图6显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,吉非替尼(易瑞沙)——另一种EGFR Tyr激酶抑制剂的剂量曲线。
- [0130] 图7显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,索拉非尼的剂量曲线。已知索拉非尼抑制若干激酶(Raf、VEGF-R2、c-kit、PDGR-R)。
- [0131] 图8显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,达沙替尼的剂量曲线。达沙替尼抑制BCR/ABL Tyr激酶。
- [0132] 图9显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,星形孢菌素的剂量曲线。星形孢菌素是相对非特异性的激酶抑制剂。
- [0133] 图10显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,顺铂的剂量曲线。顺铂是DNA烷化剂。
- [0134] 图11显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,卡铂的剂量曲线。卡铂也是DNA烷化剂。
- [0135] 图12显示在不存在(◆)或存在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钙三醇(×)时,伊立替康的剂量曲线。

- [0136] 图13显示在不存在(◆)或存在0.1μg/mL钙三醇(×)时,紫杉醇的剂量曲线。
- [0137] 图14显示在不存在(◆)或存在0.1μg/mL钙三醇(×)时,5-FU的剂量曲线。
- [0138] 图15显示在不存在(◆)或存在0.1μg/mL钙三醇(×)时,吉西他滨的剂量曲线。
- [0139] 图16显示在不存在(◆)或存在0.1μg/mL钙三醇(×)时,多柔比星的剂量曲线。
- [0140] 图17显示在不存在(◆)或存在0.1μg/mL钙三醇(×)时,他莫昔芬的剂量曲线。
- [0141] 图18显示0.1μg/mL钙三醇保护正常角质形成细胞HEKa对抗5-FU,而几乎不影响5-FU对抗癌细胞的ED₅₀值。
- [0142] 图19显示钙三醇几乎不改变多柔比星对抗癌细胞系SkBr-3的细胞毒效果。
- [0143] 图20A显示在接受依托泊苷的Sprague Dawley大鼠中,钙三醇局部制剂以剂量依赖性方式保护化疗引起的脱发(CIA)。左图:仅接受依托泊苷的大鼠;中图:接受依托泊苷和局部施用局部制剂中0.1μg的钙三醇的大鼠;右图:接受依托泊苷和局部施用局部制剂中0.3mg的钙三醇的大鼠。图20B显示涂上颜色的Long Evans大鼠中的类似结果。
- [0144] 图21显示钙三醇局部制剂(总剂量0.2μg)保护Long Evans大鼠免受环磷酰胺(CTX)引起的脱发。
- [0145] 图22A显示钙三醇局部制剂(总剂量0.2μg)保护Long Evans大鼠免受CTX-多柔比星联合化疗引起的脱发。图22B显示钙三醇局部制剂在由阿糖胞苷-多柔比星联合化疗治疗的大鼠中对脱发的类似的保护结果。钙三醇局部制剂在仅由阿糖胞苷治疗的大鼠中的保护效果显示于图形22C中。
- [0146] 图23显示钙三醇局部制剂(总剂量0.2μg)保护用MIAC51(绿色白血病细胞)注射的Long Evans大鼠免受CTX引起的脱发。
- [0147] 图24显示,在用MIAC51(绿色白血病细胞)注射的Long Evans大鼠上进行的体内实验中,钙三醇局部制剂不保护癌细胞免受化疗。
- [0148] 图25A和25B显示从小型猪表皮的角质层和表皮其余部分中回收的钙三醇的估计水平(ng/mg)。量表示为回收的钙三醇的平均值±SD.nd=未检测,na=不适用。
- [0149] 图26显示施用的钙三醇剂量与表皮中回收的钙三醇组织水平之间几乎线性的相关性,其中施用的钙三醇浓度为3到100μg/mL。
- [0150] 图27说明钙三醇对接受环磷酰胺的绿色白血病大鼠的第一次毛发生长过程的影响。图27A描绘仅接受环磷酰胺的大鼠,图27B描绘接收环磷酰胺和载体的大鼠,而图27C描绘接受环磷酰胺和钙三醇的大鼠。
- [0151] 图28说明钙三醇对接受环磷酰胺的绿色白血病大鼠的第二次毛发生长过程的影响。从左到右为仅用环磷酰胺治疗的大鼠、用环磷酰胺和载体治疗的大鼠以及用环磷酰胺和钙三醇治疗的大鼠。
- [0152] 图29说明钙三醇对接受环磷酰胺联合多柔比星的绿色白血病大鼠的第一次毛发生长过程的影响。图29A描绘仅接受环磷酰胺和多柔比星的大鼠,图29B描绘接收环磷酰胺、多柔比星和载体的大鼠,而图29C描绘接受环磷酰胺、多柔比星和钙三醇的大鼠。
- [0153] 图30说明钙三醇对接受环磷酰胺联合多柔比星的绿色白血病大鼠的第二次毛发生长过程的影响。从左到右为仅用环磷酰胺和多柔比星治疗的大鼠,用环磷酰胺、多柔比星和载体治疗的大鼠以及用环磷酰胺、多柔比星和钙三醇治疗的大鼠。
- [0154] 图31说明钙三醇对接受环磷酰胺联合多柔比星和阿糖胞苷的绿色白血病大鼠的

第一次毛发生长过程的影响。图31A描绘仅接受环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷的大鼠，图31B描绘接收环磷酰胺、多柔比星、阿糖胞苷和载体的大鼠，而图31C描绘接受环磷酰胺、多柔比星、阿糖胞苷和钙三醇的大鼠。

[0155] 图32说明钙三醇对接受环磷酰胺联合多柔比星和阿糖胞苷的绿色白血病大鼠的第二次毛发生长过程的影响。从左到右为仅用环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷治疗的大鼠，用环磷酰胺、多柔比星、阿糖胞苷和载体治疗的大鼠以及用环磷酰胺、多柔比星、阿糖胞苷和钙三醇治疗的大鼠。

[0156] 图33说明钙三醇对接受环磷酰胺联合紫杉醇和依托泊苷的绿色白血病大鼠的第一次毛发生长过程的影响。图33A描绘仅接受环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷的大鼠，图33B描绘接收环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷和载体的大鼠，而图33C描绘接受环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷和钙三醇的大鼠。

[0157] 图34说明钙三醇对接受环磷酰胺联合紫杉醇和依托泊苷的绿色白血病大鼠的第二次毛发生长过程的影响。从左到右为仅用环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷治疗的大鼠，用环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷和载体治疗的大鼠以及用环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷和钙三醇治疗的大鼠。

[0158] 图35说明钙三醇对接受多柔比星联合紫杉醇和依托泊苷的绿色白血病大鼠的第一次毛发生长过程的影响。图35A描绘仅接受多柔比星、紫杉醇和依托泊苷的大鼠，图35B描绘接收多柔比星、紫杉醇、依托泊苷和载体的大鼠，而图35C描绘接受多柔比星、紫杉醇、依托泊苷和钙三醇的大鼠。

[0159] 图36说明钙三醇对接受多柔比星联合紫杉醇和依托泊苷的绿色白血病大鼠的第二次毛发生长过程的影响。从左到右为仅用多柔比星、紫杉醇、依托泊苷治疗的大鼠，用多柔比星、紫杉醇、依托泊苷和载体治疗的大鼠以及用多柔比星、紫杉醇、依托泊苷和钙三醇治疗的大鼠。

[0160] 发明详述

[0161] 此处描述的发明部分基于以下发现：可预防或治疗脱发（例如，化疗引起的脱发）的维生素D化合物的局部制剂可选择性地递送至或积聚在皮肤的表皮层而基本上避免递送至和/或积聚在较深的真皮层。这可能对经历化疗治疗的某些患者有利，其中维生素D化合物的较深积聚可导致化疗法功效的降低。这种局部制剂也可能对具有可由过量存在的维生素D化合物负面影响的医学病症的患者有利，例如患有肾结石的患者，且其病症可能一旦经历通过某种维生素D化合物的钙动员就恶化。因此，在这种患者中，维生素D化合物的理想递送应该是将最小有效量局部递送至皮肤的表皮层，而不是递送至富含血管的真皮层。

[0162] 本发明也部分基于以下发现：维生素D化合物在相对低的浓度/剂量时对正常角质形成细胞具有温和的生长刺激效果，而在相对高的浓度/剂量时对相同细胞具有生长抑制效果。因此，本发明提供具有对抗脱发的最佳保护效应，而不引起不合需要的生长抑制效果的方法和药物组合物。

[0163] 本发明还基于以下发现：维生素D化合物激活或抑制正常角质形成细胞中多个靶基因的表达，因此提供了选择最合适的维生素D化合物用于特定治疗用途，以及鉴定具有类似生物活性的其他维生素D类似物的基础。

[0164] 尽管不希望被任何特定理论束缚，本发明制剂可能在最小化药物对化疗剂的干扰

方面是有利的。皮肤的真皮层富含血管,局部药物渗透该层可以引起药物干扰全身递送的化疗剂,导致对癌细胞的不利的保护作用。

[0165] 因此,一方面,本发明提供一种预防或治疗个体脱发的方法,包括将药物组合物局部施用于个体,所述药物组合物包含配制成递送至表皮而基本上避免真皮递送和/或积聚的治疗有效量的维生素D化合物。

[0166] 术语“基本上避免真皮递送和/或积聚”包括与递送和/或积聚至表皮的维生素D化合物相比,小于约25%的维生素D化合物递送和/或积聚至真皮,例如当与递送至表皮的量相比,小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约1%或不递送和/或积聚维生素D化合物至真皮。在一些实施方式中,约1%到25%的维生素D化合物被递送和/或积聚至真皮,例如,与递送和/或积聚至表皮相比,约1%到约20%、约1%到约15%、约1%到约10%或约1%到约5%被递送和/或积聚至真皮。在一些实施方式中,维生素D化合物不递送至和/或积聚在真皮。在一些实施方式中,递送至或积聚在真皮中的维生素D化合物的量小于约0.3ng/cm²、小于约0.2ng/cm²或小于约0.1ng/cm²。

[0167] 术语“脱发”包括完全或部分毛发非故意地从个体的头或身体脱落,且包括斑秃(AA)、全秃(AT)、普秃(AU)或化疗引起的脱发(CIA)。斑秃可以包括弥散性斑秃、单一部位斑秃、多个部位斑秃和须部斑秃。在一些实施方式中,脱发不包括雄激素性脱发(雄性脱发或男性秃)或化疗后脱发(PCA)。

[0168] 脱发是毛发从头或身体的脱落的医学描述,有时指秃顶的程度。与身体毛发的通常美学的脱毛不同,脱发倾向于非故意和不受欢迎的,例如,雄激素性脱发。然而,它也可以由拔除一个人自己的毛发的心理强迫症(拔毛癖)所引起或自愿的日常发型的无法预料的结果(从过紧的马尾辫或辫子的机械的“牵拉性脱发”,或由苛性毛发松弛剂(hair relaxer)溶液或热的烫发器(hair irons)引起的头皮烧伤)。在一些情况下,脱发指示基础医学病症,例如缺铁症。

[0169] 当毛发仅在一个部分脱落时,它称为“斑秃”。在人类斑秃中,毛发从身体的一些或所有区域脱落,通常从头皮脱落。由于它引起头皮上的秃斑(特别是在第一阶段),因此它有时被称为斑秃。在1%-2%的病例中,所述病症可蔓延到整个头皮(全秃)或蔓延到整个表皮(普秃)。

[0170] 具有相似病因的类似于AA的病症也发生在其他物种中。斑秃的最常见种类包括头皮上一个或多个圆点的毛发脱落。毛发也可以在整個头皮内更弥散地脱落,在这种情况下该病症称为弥散性斑秃。单一部位斑秃描述仅一个点处的秃发,其可发生在头上任何地方。多个部位斑秃是指多个区域的毛发脱落。该疾病可能仅限于胡须,在这种情况下其称为须部斑秃。如果个体头皮上所有毛发都脱落,则该疾病称为全秃。

[0171] “普秃”是身体上所有毛发均脱落,类似于与有时影响全身的化疗有关的毛发脱落。

[0172] “雄激素性脱发”(也称为雄性脱发或雄性秃)是雌性和雄性人类、黑猩猩和猩猩中毛发脱落的普遍形式。尤其在男性人类中,该病症也常称为男性型秃发。从两边太阳穴以上开始,毛发以界限分明的形式脱落。随着时间过去,发际后退而形成特征性“M”型。头冠处的毛发也变薄。通常仅留下围绕头的侧面和后面的发缘,或该病症可发展至全秃。女性的毛发脱落的形式与男性型秃发不同。女性中,头皮内全部毛发变得越来越薄,但发际不后退。女

性中的雄激素性脱发极少导致全秃。

[0173] 术语“预防脱发”包括在其发生之前阻止或抑制与脱发有关的毛发脱落。

[0174] 术语“治疗脱发”包括降低与脱发有关的毛发脱落的严重性或降低与脱发有关的毛发脱落的程度。在一些实施方式中,治疗脱发包括改善脱发。

[0175] 术语“施用”包括将有效量的一种或多种剂量的维生素D化合物提供给个体来预防或治疗脱发。施用维生素D化合物的给定方案的最佳施用率可由本领域技术人员用根据所用的具体化合物、所配制的具体组合物、施用方式、施用的具体位点等而进行的常用剂量测定测试来确定。

[0176] 术语“局部施用”包括将有效量的一个或多个剂量的维生素D化合物递送至个体皮肤来治疗或预防脱发。

[0177] 皮肤包含许多特化细胞和结构,且具有各种重要的功能,例如作为与环境接触的保护性屏障、有助于维持正常体温、从环境集合感觉信息和在免疫系统中其活性作用。

[0178] 皮肤具有三层:表皮、真皮和皮下组织。表皮是皮肤的外层。不同种类皮肤中表皮的厚度是变化的。其在眼睑处最薄,为约0.05mm,在手掌和脚底处最厚,为约1.5mm。从下到上,表皮包含五层:基底层、棘层、颗粒层、透明层(一些皮肤中有)和角质层。

[0179] 基底层是表皮角质形成细胞的底层,其通常负责更新表皮细胞。该层仅包含分裂非常频繁的一行未分化柱形干细胞。一半细胞分化并迁移到下一层,从而开始成熟过程。另一半留在基底层并反复分裂来补充基底层。迁移到棘层(也称为棘细胞层)的细胞从柱形变成多边形。在该层,细胞开始合成角蛋白。颗粒层或粒层中的细胞失去其细胞核,其特征为暗簇形细胞质物质。由于角蛋白和防水脂质被产生并有机化,该层有着许多活性。透明层仅存在于厚皮肤中,其有助于减少角质层和颗粒层之间的摩擦力和剪切力。角质层中的细胞称为角质层细胞。这些细胞变平且主要由为该层提供强度且允许吸收水分的角蛋白组成。角质层的结构简单,但该层负责保持皮肤的完整性和水合作用,这是非常重要的功能。

[0180] 根据皮肤的位置,真皮的厚度也是变化的。其在眼睑处为约0.3mm且在背部为约3.0mm。真皮由始终存在但不以层形式存在的三种组织组成:胶原蛋白、弹性组织和网状纤维。真皮的两层是乳头层和网状层。上面的乳头层包含胶原纤维的薄层排列。下面的网状层较厚,其由与皮肤表面平行排列的厚胶原纤维组成。真皮包含许多特化细胞和结构。例如,血管和神经流过该层。毛囊也位于该层,其中立毛肌与各毛囊连接。一部分毛囊也包含能够再生受损表皮的干细胞。干细胞可存在于真皮-表皮连接点(DEJ)。脂肪质(油)腺和顶泌(气味)腺与毛囊连接。该层也包含分泌(汗)腺,但它们不与毛囊连接。皮下组织是容纳大量血管和神经的脂肪组织和结缔组织。该层对于调节皮肤本身和身体的温度非常重要。该层的尺寸在整个身体以及人和人之间是变化的。

[0181] 因此,如此处所使用,“表皮”包括其所有五层(如果存在),包括表皮和真皮之间的连接层(例如,真皮-表皮连接点或DEJ),以及再生表皮层的干细胞(例如,滤泡干细胞和表皮干细胞)。

[0182] 在一些实施方式中,维生素D化合物被局部递送至和/或积聚在表皮,而基本上避免递送至和/或积聚在真皮。如此处所使用,术语“基本上避免真皮递送和/或积聚”包括不大于约20%、约15%、约10%、约5%或约0%的维生素D化合物递送至和/或积聚在真皮。在优选的实施方式中,没有可检测的维生素D化合物递送至和/或积聚在真皮。

[0183] 在某些实施方式中,本发明的维生素D化合物在约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约2周、约3周、约4周、约6周、约8周、约3月、约4月、约5月、约6月、约7月、约8月、约9月、约10月、约11月或约1年的时期内施用于个体。在一些实施方式中,在治疗期间每天、在选择性天数或每三天一次施用本发明的维生素D化合物。

[0184] 在某些实施方式中,本发明的维生素D化合物在各治疗天内一天一次、一天两次或一天三次施用。

[0185] 在某些实施方式中,本发明维生素D化合物的每次给药施用在个体的相同位置,或施用在若干不同位置。当施用在不同位置时,各位置的剂量可以相同,或基于如皮肤厚度和药物渗透差异等因素(如果有)来调节。

[0186] 在某些实施方式中,在开始化疗前,将本发明维生素D化合物一天两次局部施用于头皮,连续施用两周,来预防或降低化疗开始时可能发生的任何CIA的严重程度。

[0187] 术语“个体”包括能够患有脱发的那些动物。在一个实施方式中,所述个体是哺乳动物,例如,猫、狗、灵长类、小鼠、大鼠、兔、牛、马、山羊、绵羊、猪等。在一些实施方式中,所述哺乳动物是灵长类,例如,黑猩猩、人、大猩猩、倭黑猩猩、猩猩、猴等。在又一个实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0188] 在一些实施方式中,所述个体正在经历或将要经历化疗治疗。在一个实施方式中,所述个体还没有发展脱发症状,或在施用之前脱发还没有开始。在一些其他实施方式中,所述个体患有癌症。

[0189] 在另一方面,本发明提供一种通过将药物组合物局部施用于个体来预防或治疗个体脱发的方法,所述药物组合物包含用于预防或治疗所述个体脱发的治疗有效量的维生素D化合物,其基本上不干扰或降低共施用的化疗剂的功效。

[0190] 在一些实施方式中,本发明方法和药物组合物基本上不降低化疗、特别是全身化疗的功效。在其他实施方式中,本发明方法和药物组合物增强化疗功效。术语“不干扰共施用的化疗剂的功效”包括当维生素D化合物与一种或多种化疗剂共施用时,其不妨碍一种或多种化疗剂的生物学或治疗学活性或阻止一种或多种化疗剂实施所需生物学或治疗学活性的情况。术语“不降低共施用的化疗剂的功效”包括当维生素D化合物与一种或多种化疗剂共施用时,其不降低一种或多种化疗剂的生物学或治疗学活性的情况。

[0191] 本发明方法和药物组合物可以和对毛囊或真皮乳头具有细胞毒效应或能够减少脱发的任何化疗剂一起使用或联合使用。术语“化疗剂”、“化疗”和“化学疗法”包括蒽环类(阿霉素/多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、戊柔比星)、5-FU、他莫昔芬、伊立替康、紫杉醇(Taxol)、卡铂、依托泊苷、癌得星/环磷酰胺、顺铂、厄洛替尼(特罗凯)、贝伐单抗、吉西他滨、星形孢菌素、长春新碱、伊马替尼(格列卫)、吉非替尼(易瑞沙)、索拉非尼、达沙替尼、放线菌素D、六甲蜜胺(HMM,六甲基蜜胺)、异环磷酰胺、博来霉素、甲氨蝶呤、多西他赛(泰索帝)、长春地辛、长春瑞滨、拓扑替康、安吡啶、阿糖胞苷、白消安、美法仑、长春碱、洛莫司汀(CCNU)、塞替派、吉西他滨、卡氮芥(BCNU)、米托蒽醌、丝裂霉素C、甲基苄肼、6-巯嘌呤、链脲佐菌素、氟达拉滨、雷替曲塞(拓优得)、卡培他滨及其等效物。

[0192] 在一些实施方式中,所述化疗是全身化疗。

[0193] 本发明方法和药物组合物优选基本上不降低化疗、特别是全身化疗的功效。优选

地,本发明方法和药物组合物增强化疗功效。

[0194] 本发明方法和药物组合物也可以和可引起毛发变稀的任何激素疗法或生物疗法一起使用。

[0195] 在一些实施方式中,维生素D化合物与化疗剂共施用。术语“与化疗剂共施用”包括基本上与化疗剂的同时施用维生素D化合物。例如,维生素D化合物可和化疗剂共施用;可首先施用维生素D化合物,然后立即施用化疗剂,或首先施用化疗剂,然后立即施用维生素D化合物。

[0196] 在一些其他实施方式中,在脱发发生前(例如,在毛发脱落之前)将维生素D化合物施用于个体。在某些实施方式中,在开始化疗后但在脱发开始前将维生素D化合物施用于个体。在其他实施方式中,个体尚未发展脱发症状(例如,脱发还未开始)。可在化疗之前或和化疗同时将维生素D化合物施用于个体。

[0197] 术语“治疗有效量”包括必要的或足以预防或治疗个体脱发的维生素D化合物的量。所述有效量可根据受试者的尺寸和体重、疾病种类等因素而改变。本领域技术人员将能够研究上述因素并在不需要过度试验的情况下进行维生素D化合物的有效量的测定。

[0198] 本发明维生素D化合物可以以相当于约0.001 μ g-5 μ g钙三醇/ cm^2 的剂量体积局部施用于需要治疗的个体。在某些实施方式中,该范围为约0.01 μ g-0.5 μ g钙三醇/ cm^2 ,或约0.1 μ g-0.5 μ g钙三醇/ cm^2 。

[0199] 术语“相当于钙三醇的剂量体积”包括与0.001 μ g-5 μ g钙三醇/ cm^2 具有基本上类似的生物学和/或治疗学活性的维生素D化合物的量。

[0200] 术语“有效浓度”包括必要的或足以预防或治疗个体脱发的局部制剂中维生素D化合物的浓度。在某些实施方式中,局部制剂中维生素D化合物的浓度是约0.1、0.2、0.5、1.0、2、3、5、10、20、30、50、75、100、150、200或400 μ g/mL。

[0201] 在某些实施方式中,维生素D化合物的总剂量相当于约0.025-400 μ g钙三醇/75kg体重。在某些实施方式中,该范围为约0.1-100 μ g钙三醇/75kg体重;约0.4-25 μ g钙三醇/75kg体重或约1、2、3、5或10 μ g钙三醇/75kg体重。在某些实施方式中,总剂量的较低范围为约0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1或2 μ g钙三醇/75kg体重。在某些实施方式中,总剂量的高范围为约400、200、100、50、25、10、5、2或1 μ g钙三醇/75kg体重。

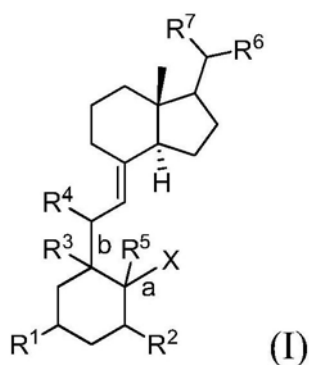
[0202] 又一方面,本发明提供一种预防或治疗个体脱发的方法,通过将含有治疗有效量维生素D化合物的药物组合物局部施用于个体,其中局部施用于个体的所述维生素D化合物的有效浓度为:(1)约50 μ g/mL,在给药至少约连续25天后不引起毒性;或(2)约100 μ g/mL,在给药至少约连续7天后不引起毒性。

[0203] 由施用维生素D化合物所引起的可能的毒副作用例如可以包括高钙血症,其具有包括厌食、骨痛、疲劳、呕吐、腹泻、便秘、聚脲、瘙痒、肾衰竭、口中金属味、蛋白尿、尿管型、azoteri或转移性钙化的症状。

[0204] 在一些实施方式中,所述维生素D化合物配制成递送至/积聚在人表皮中,特别是头皮或颈区表皮,而基本上避免递送至/积聚在真皮。本领域技术人员能够用实施例1容易地确定递送至/积聚在真皮和/或表皮的维生素D化合物或其盐的量。

[0205] 术语“维生素D化合物”包括式I化合物及其药学可接受的盐:

[0206]



[0207] 其中

[0208] a和b各自独立为单键或双键；

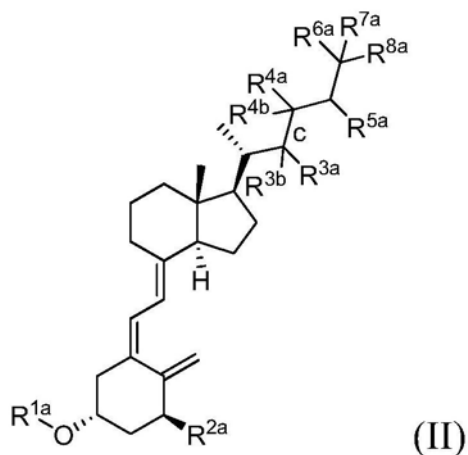
[0209] 当a是双键时，X是-CH₂；或当a是单键时，X是氢或羟基取代的烷基；[0210] R¹是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基，任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代；[0211] R²是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或链烯基，任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R''基团取代；[0212] 当b是双键时，R³不存在，或当b是单键时，R³是氢、羟基或烷基，或R³和R¹连同它们所连接的碳原子可连接形成5-7元碳环；[0213] 当b是双键时，R⁴不存在，或当b是单键时，R⁴是氢、卤素或羟基；[0214] 当a是双键时，R⁵不存在，或当a是单键时，R⁵是氢、卤素或羟基；[0215] R⁶是烷基、链烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-O-烷基、烷基-CO₂-烷基，任选被一到五个羟基、氧代、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R''基团取代；[0216] R⁷是烷基，任选被一到三个羟基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R''基团取代；

[0217] R' 和R''各自独立为氢、羟基、卤素、烷基或烷氧基。

[0218] 在一些实施方式中，R¹是羟基，R²是氢或羟基，a是双键，R⁵不存在，X是-CH₂，b是双键，R³和R⁴不存在，R⁶是烷基（例如甲基），且R⁷是烷基（例如，取代或未取代的烷基，例如，羟基取代的烷基或环烷基取代的烷基，例如-(CH₂)₃CH(CH₃)₂或-(CH₂)₃COH(CH₃)₂或链烯基（例如-CH=CHCH(CH₃)CH(CH₃)₂）。

[0219] 在某些实施方式中，所述维生素D化合物由式(II)及其药学可接受的盐表示：

[0220]



[0221] 其中

[0222] c是单键或双键；

[0223] R^{1a} 是氢、三烷基甲硅烷基或烷基，任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"基团取代；

[0224] R^{2a} 是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基、或烷基、烷氧基或链烯基，任选被一到三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"基团取代；

[0225] 当c是双键时， R^{3a} 、 R^{4a} 不存在，或当c是单键时， R^{3a} 、 R^{4a} 各自独立为氢、羟基、卤素、烷氧基或烷基，任选被一到三个羟基或卤素基团取代；

[0226] R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5a} 、 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 各自独立为氢、羟基、卤素、烷氧基或烷基，任选被一到三个羟基或卤素基团取代；或 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 中的任何两个可连接形成3-7元碳环。

[0227] 在一个实施方式中，所述化合物由式(II)表示，其中 R^{1a} 、 R^{3a} 和 R^{4a} 各自是氢。

[0228] 在另一个实施方式中，所述化合物由式(II)表示，其中c表示单键。

[0229] 在又一个实施方式中，所述化合物由式(II)表示，其中 R^{6a} 和 R^{8a} 都是甲基。

[0230] 在一个实施方式中，所述化合物由式(II)表示，其中 R^{1a} 是氢。

[0231] 在另一个实施方式中，所述化合物由式(II)表示，其中 R^{2a} 是羟基。

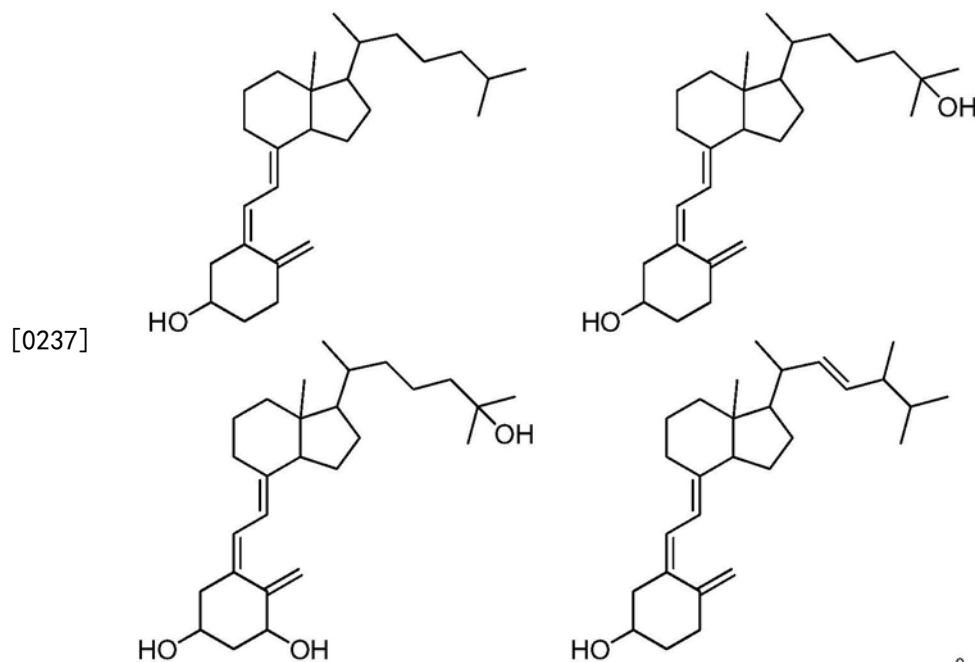
[0232] 在另一个实施方式中，所述化合物由式(II)表示，其中 R^{7a} 是羟基。

[0233] 在又一个实施方式中，所述化合物由式(II)表示，其中 R^{5a} 是羟基。

[0234] 在一个实施方式中， R^{1a} 是氢， R^{2a} 是氢或羟基，c是单键， R^{3a} 、 R^{3b} 、 R^{4a} 、 R^{4b} 和 R^{5a} 各自是氢， R^{6a} 和 R^{7a} 各自是烷基(例如甲基)，且 R^{8a} 是氢或羟基。

[0235] 在另一个实施方式中， R^{1a} 是氢， R^{2a} 是氢或羟基，c是双键， R^{3a} 和 R^{4a} 不存在， R^{3b} 和 R^{4b} 是氢， R^{5a} 是烷基(例如甲基)， R^{6a} 和 R^{7a} 各自是烷基(例如甲基)，且 R^{8a} 是氢或羟基。

[0236] 在一个实施方式中，所述维生素D化合物选自以下结构，或其立体异构体或药学可接受的盐：



[0238] 在某些实施方式中，所述维生素D化合物是1,25-二羟基维生素D3、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇、1,25-二羟基-16-烯-炔-胆钙化醇、1 α -羟基维生素D3、1 α ,24-二羟

基维生素D3或MC903。

[0239] 在其他实施方式中,所述维生素D化合物不是1,25-二羟基维生素D3、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇、1,25-二羟基-16-烯-炔-胆钙化醇、1 α -羟基维生素D3、1 α ,24-二羟基维生素D3或MC903。

[0240] 维生素D化合物的其他适当的类似物、代谢物、衍生物和/或模拟物例如包括,1,25-二羟基维生素D3(也称为钙三醇)、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-胆钙化醇,以及例如以下专利中所描述的维生素D化合物的其他维生素D类似物、同系物、模拟物和衍生物,每个专利以引用方式全部合并于此:美国专利4,391,802(1 α -羟基维生素D衍生物);4,717,721(1 α -羟基衍生物,带有长度大于胆固醇或麦角固醇侧链的17侧链);4,851,401(环戊并-维生素D类似物);4,866,048和5,145,846(具有炔基、链烯基和烷基(alkanyl)侧链的维生素D3类似物);5,120,722(三羟基钙化醇);5,547,947(氟代-胆钙化醇化合物);5,446,035(甲基取代的维生素D);5,411,949(23-氧杂-衍生物);5,237,110(19-降-维生素D化合物);4,857,518(羟基化的24-同维生素D衍生物)。其他适当的实例包括ROCALTRON(罗氏实验室);CALCIJEX可注射钙三醇;来自Leo医药的研究药物,包括EB 1089(24a,26a,27a,三同-22,24-二烯-1 α ,25-(OH)2-D3、KH 1060(20-表-22-氧杂-24a,26a,27a-三同-1 α ,25-(OH)2-D3)、MC 1288(1,25-(OH)2-20-表-D3)和MC 903(卡泊三醇,1 α ,24s(OH)2-22-烯-26,27-脱氢-D3);包括1,25-(OH)2-16-烯-D3、1,25-(OH)2-16-烯-23-炔-D3和25-(OH)2-16-烯-23-炔-D3的罗氏医药药物;Chugai Pharmaceuticals的22-氧杂钙三醇(22-氧杂-1 α ,25-(OH)2-D3;来自伊利诺州大学的1 α -(OH)-D5;以及来自Institute of Medical Chemistry-Schering AG的药物,包括ZK 161422(20-甲基-1,25-(OH)2-D3)和ZK 157202(20-甲基-23-烯-1,25-(OH)2-D3),1 α -(OH)-D2,1 α -(OH)-D3,1 α -(OH)-D4,25-(OH)-D2,25-(OH)-D3和25-(OH)-D4。其他实例包括1 α ,25-(OH)2-26,27-d6-D3、1 α ,25-(OH)2-22-烯-D3、1 α ,25-(OH)2-D3、1 α ,25-(OH)2-D2、1 α ,25-(OH)2-D4、1 α ,24,25-(OH)3-D3、1 α ,24,25-(OH)3-D2、1 α ,24,25-(OH)3-D4、1 α -(OH)-25-FD3、1 α -(OH)-25-FD4、1 α -(OH)-25-FD2、1 α ,24-(OH)2-D4、1 α ,24-(OH)2-D3、1 α ,24-(OH)2-D2、1 α ,24-(OH)2-25-FD4、1 α ,24-(OH)2-25-FD3、1 α ,24-(OH)2-25-FD2、1 α ,25-(OH)2-26,27-F6-22-烯-D3、1 α ,25(OH)2-26,27-F6-D3、1 α ,25S-(OH)2-26-F3-D3、1 α ,25-(OH)2-24-F2-D3、1 α ,25S,26-(OH)2-22-烯-D3、1 α ,25R,26-(OH)2-22-烯-D3、1 α ,25-(OH)2-D2、1 α ,25-(OH)2-24-表-D3、1 α ,25-(OH)2-23-炔-D3、1 α ,25-(OH)2-24R-F-D3、1 α ,25S,26-(OH)2-D3、1 α ,24R-(OH)2-25F-D3、1 α ,25-(OH)2-26,27-F6-23-炔-D3、1 α ,25R-(OH)2-26-F3-D3、1 α ,25,28-(OH)3-D2、1 α ,25-(OH)2-16-烯-23-炔-D3、1 α ,24R,25-(OH)3-D3、1 α ,25-(OH)2-26,27-F6-23-烯-D3、1 α ,25R-(OH)2-22-烯-26-F3-D3、1 α ,25S-(OH)2-22-烯-26-F3-D3、1 α ,25R-(OH)2-D3-26,26,26-d3、1 α ,25S-(OH)2-D3-26,26,26-d3和1 α ,25R-(OH)2-22-烯-D3-26,26,26-d3。其他实例可在美国专利6,521,608中找到,其全部内容以引用方式合并于此。例如也可参见以下专利号:6,503,893、6,482,812、6,441,207、6,410,523、6,399,797、6,392,071、6,376,480、6,372,926、6,372,731、6,359,152、6,329,357、6,326,503、6,310,226、6,288,249、6,281,249、6,277,837、6,218,430、6,207,656、6,197,982、6,127,559、6,103,709、6,080,878、6,075,015、6,072,062、6,043,385、6,017,908、6,017,907、6,013,814、5,994,332、5,976,784、5,972,917、5,945,410、5,939,406、5,936,105、5,932,565、5,929,056、5,919,986、5,905,074、5,883,271、5,880,113、5,877,168、5,872,140、5,

847,173、5,843,927、5,840,938、5,830,885、5,824,811、5,811,562、5,786,347、5,767,111、5,756,733、5,716,945、5,710,142、5,700,791、5,665,716、5,663,157、5,637,742、5,612,325、5,589,471、5,585,368、5,583,125、5,565,589、5,565,442、5,554,599、5,545,633、5,532,228、5,508,392、5,508,274、5,478,955、5,457,217、5,447,924、5,446,034、5,414,098、5,403,940、5,384,313、5,374,629、5,373,004、5,371,249、5,430,196、5,260,290、5,393,749、5,395,830、5,250,523、5,247,104、5,397,775、5,194,431、5,281,731、5,254,538、5,232,836、5,185,150、5,321,018、5,086,191、5,036,061、5,030,772、5,246,925、4,973,584、5,354,744、4,927,815、4,804,502、4,857,518、4,851,401、4,851,400、4,847,012、4,755,329、4,940,700、4,619,920、4,594,192、4,588,716、4,564,474、4,552,698、4,588,528、4,719,204、4,719,205、4,689,180、4,505,906、4,769,181、4,502,991、4,481,198、4,448,726、4,448,721、4,428,946、4,411,833、4,367,177、4,336,193、4,360,472、4,360,471、4,307,231、4,307,025、4,358,406、4,305,880、4,279,826和4,248,791,各专利的全部内容以引用方式合并于此。

[0241] 可使用的其他化合物包括维生素D模拟物,例如美国专利6,218,430和W0公布2005/037755公开的二芳基衍生物,每个专利的全部内容以引用方式合并于此。适于本发明的非开环甾体类维生素D模拟化合物的其他实例可在美国专利6,831,106、6,706,725、6,689,922、6,548,715、6,288,249、6,184,422、6,017,907、6,858,595和6,358,939中发现,每个专利的全部内容以引用方式合并于此。

[0242] 可以利用的其他适当的维生素D3类似物、代谢物和/或衍生物包括美国专利申请公布2006/0177374中鉴定的那些,其全部内容以引用方式合并于此。

[0243] 术语“维生素D类似物”包括结构和功能类似于维生素D的化合物。在一个实施方式中,所述维生素D类似物是维生素D3类似物(例如,结构和功能类似于维生素D3的化合物)。

[0244] 术语“维生素D代谢物”包括维生素D的代谢所涉及的中间体和产物的化合物。在一个实施方式中,所述维生素D代谢物是维生素D3代谢物(例如,为维生素D3的代谢所涉及的中间体和产物的化合物)。

[0245] 术语“维生素D衍生物”包括可以由母体化合物(例如,维生素D)通过用另一个原子或原子团替代一个原子而产生的化合物。在一个实施方式中,所述维生素D衍生物是维生素D3衍生物(例如,可以由维生素D3通过用另一个原子或原子团替代一个原子而产生的化合物)。

[0246] 术语“维生素D模拟物”包括可以在生物学过程中化学模拟维生素D的化合物。在一个实施方式中,所述维生素D模拟物是维生素D3模拟物(例如,可以在生物学过程中化学模拟维生素D3的化合物)。

[0247] 在摄取鱼肝油或照射酵母后吸收维生素D3。植物和动物来源仅包含非活性维生素D前体,即7-脱氢胆固醇或麦角固醇。7-脱氢胆固醇储存在皮肤中并可以由阳光转化为维生素D3。然而,不管通过摄取或由紫外线照射皮肤而形成,维生素D必须转化为活性代谢物。维生素D3通过肝酶转化为25-羟基胆钙化醇。然后在肾脏形成两种化合物1,25-二羟基胆钙化醇和24,25-二羟基胆钙化醇。维生素D活性代谢物在从肠道、骨沉积和骨重吸收中吸收钙方面起重要作用。

[0248] 本发明维生素D化合物共有某些共同的生物活性,例如部分地通过其上调或下调

例如正常角质形成细胞(例如HEKa)中某些靶基因表达的能力而预防角质形成细胞的细胞凋亡的能力。因此,在某些实施方式中,例如,本发明维生素D化合物在正常角质形成细胞(例如HEKa)中可具有与等量钙三醇类似或相同的基因调节特征。

[0249] 如此处所使用,如果基本上相同摩尔量的维生素D化合物具有基本上相同或同等的生物学或治疗学活性,“等量”包括相同的摩尔量。然而,当不同维生素D化合物的生物学或治疗学活性不基本上相同或同等时,术语“等量”包括与参照维生素D化合物(例如钙三醇)相比产生基本上相同量的生物学或治疗学活性的维生素D化合物的量。

[0250] 术语“基因调节特征”包括当与适当的对照相比统计学上显著(例如 $p < 0.05$)调节(例如,上调或下调)的基因目录或基因谱。例如,一旦使细胞与维生素D化合物接触一段预定时间(例如24小时),与模拟品/载体处理的对照相比,靶细胞可显示其mRNA或蛋白表达水平被调节(例如上调或下调)的基因谱。在检测时调节(例如上调或下调)的基因目录构成该特定时刻细胞的基因表达谱的瞬态图。

[0251] 术语“类似的基因调节特征”包括大于50%、60%、70%、80%、90%或更多的所检测的靶基因总数具有基本上相同的基因表达方向的情况(例如,都是上调或都是下调,尽管各基因的上调和下调的大小或程度可以不同)。

[0252] 术语“相同的基因调节特征”包括几乎所有的所检测的靶基因具有相同的基因表达方向的情况(例如,都是上调或都是下调,尽管各基因的上调和下调的大小或程度可以不同)。

[0253] 在一个实施方式中,本发明维生素D化合物促进其表达水平被等量的参照维生素D化合物(例如钙三醇)促进的一个或多个靶基因的表达。在其他实施方式中,本发明维生素D化合物抑制其表达水平被等量的参照维生素D化合物(例如钙三醇)抑制的一个或多个靶基因的表达。

[0254] 在某些实施方式中,本发明维生素D化合物可以调节正常角质形成细胞中蛋白的表达。术语“调节蛋白表达”包括上调和下调正常角质形成细胞中的蛋白。在一些实施方式中,维生素D化合物调节HSPA2、HSF4mRNA、HSPB1或DNAJC6mRNA的表达。例如,在一些实施方式中,维生素D化合物上调正常角质形成细胞(例如HEKa)中HSPA2或HSF4mRNA的表达,和/或下调HSPB1或DNAJC6mRNA的表达。

[0255] 在某些实施方式中,本发明维生素D化合物调节正常角质形成细胞中SLC1A1、KCNB2、KCNN4蛋白或SLC1A3蛋白的表达。在一些实施方式中,维生素D化合物可以上调正常角质形成细胞(例如HEKa)中SLC1A1、KCNB2或KCNN4的表达,和/或下调SLC1A3蛋白的表达。

[0256] 在某些实施方式中,本发明维生素D化合物可以调节表3-1和表3-2中的一种或多种蛋白。例如,在一个实施方式中,维生素D化合物可以使例如正常角质形成细胞(例如HEKa)中的表3-1中的一种或多种蛋白的表达上调至少约2倍,和/或使表3-2中一种或多种蛋白的表达下调至少约2倍。

[0257] 在某些实施方式中,在正常角质形成细胞(例如HEKa)与维生素D化合物接触约24小时后,本发明维生素D化合物可以诱导表3-3、3-4、3-5或3-6的任何中的一种或多种蛋白的过度表达。

[0258] 在某些实施方式中,本发明维生素D化合物可以诱导正常角质形成细胞(例如HEKa)中GST、角蛋白1、角蛋白17、半乳凝集素1、S100A9(钙卫蛋白)或S100A13的一种或多种

的过度表达。

[0259] 如此处所使用,术语“烷基”包括完全饱和的支链或无支链(例如,直链或线性)的烃部分,包含1到20个碳原子,例如,1到7个碳原子,或1到4个碳原子。烷基部分的典型实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基。

[0260] 此外,术语“烷基”包括“未取代烷基”和“取代烷基”。烷基部分的取代基的典型实例是羟基、卤素、氰基、硝基、环烷基、链烯基、炔基、烷氧基、链烯氧基、炔氧基、卤素或氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基)。

[0261] 如此处所使用,术语“烷氧基”包括烷基-0-,其中烷基如上述所定义。烷氧基部分的典型实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基、环丙氧基、环己氧基等。在一些实施方式中,烷氧基具有约1-7个碳,例如1-4个碳。术语烷氧基包括取代的烷氧基。取代的烷氧基的实例包括卤化烷氧基。卤素取代的烷氧基的实例是氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、氯甲氧基、二氯甲氧基和三氯甲氧基。

[0262] 术语“烷氧基烷基”包括如上述定义的烷基,其中所述烷基被烷氧基取代。此外,术语“烷氧基烷基”包括“未取代的烷氧基烷基”和“取代的烷氧基烷基”。烷氧基烷基部分的取代基的典型实例包括但不限于羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、链烯基、炔基、烷氧基、链烯氧基、炔氧基、卤素或氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基)。

[0263] 术语“链烯基”包括具有至少一个碳碳双键的支链或无支链的烃。链烯基部分的典型实例包括但不限于乙烯基、丙烯-1-基、烯丙基、丁烯基、异丙烯基或异丁烯基。此外,术语“链烯基”包括“未取代的链烯基”和“取代的链烯基”。链烯基部分的取代基的典型实例包括但不限于羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、链烯基、炔基、烷氧基、链烯氧基、炔氧基、卤素或氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基)。

[0264] 术语“炔基”包括具有至少一个碳碳三键的支链或无支链的烃。炔基部分的典型实例包括但不限于乙炔基、丙炔-1-基(丙炔基)、丁炔基、异丙炔基或异丁炔基。此外,术语“炔基”包括“未取代的炔基”和“取代的炔基”。炔基部分的取代基的典型实例包括但不限于羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、链烯基、炔基、烷氧基、链烯氧基、炔氧基、卤素或氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基)。

[0265] 如此处所使用,术语“环烷基”包括具有3-12个碳原子、例如3-8个或3-7个碳原子的饱和或不饱和单环、二环或三环烃基。典型单环烃基例如包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基和环己烯基。典型的二环烃基例如包括冰片基、吲哚基、六氢吲哚基、四氢萘基、十氢萘基、二环[2.1.1]己基、二环[2.2.1]庚基、二环[2.2.1]庚烯基、6,6-二甲基二环[3.1.1]庚基和2,6,6-三甲基二环[3.1.1]庚基、二环[2.2.2]辛基。三环烃基的实例例如包括金刚烷基。

[0266] 术语“环烷基”包括“未取代的环烷基”和“取代的环烷基”。环烷基部分的取代基的典型实例包括但不限于羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、链烯基、炔基、烷氧基、链烯氧基、炔氧基、卤素或氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基)。

[0267] 术语“芳基”包括环部分具有6-20个碳原子的单环或二环芳族烃基。芳基部分的典型实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基、菲基或四氢萘基。此外,术语芳基包括“未取代的芳基”和“取代的芳基”。芳基部分的取代基的典型实例包括但不限于羟基、卤素、氰基、硝基、

基)、氨磺酰基、亚磺酰氨基、磷酸酯基、膦酸酯基、次膦酸酯基(phosphinato)、硫醚(包括烷基硫、芳基硫、杂芳基硫)、脒基、亚氨基、脒基、硫羧基(包括烷基硫代羧基、芳基硫代羧基)、亚磺酰基(包括烷基亚磺酰基、芳基亚磺酰基)、羧基,其中前面提到的每一个烃基可任选被一个或多个烷基、链烯基、炔基、环烷基、卤素、羟基或烷氧基取代。

[0271] 如此处所使用,术语“杂环基”或“杂环”包括未取代或取代、饱和或不饱和的非芳环或环体系,例如,其是4-、5-、6-或7-元单环的、7-、8-、9-、10-、11-或12-元二环的或10-、11-、12-、13-、14-或15-元三环体系,且包含至少一个选自O、S和N的杂原子,其中所述N和S可任选被氧化为各种氧化态。在一个实施方式中,杂环基部分代表饱和单环,其含有5-7个环原子,且还任选包含选自O、S或N的杂原子。杂环基可连接在杂原子或碳原子。杂环基可以包括稠合或桥接环以及螺环。杂环基部分的实例例如包括二氢呋喃基、二氧戊环基、二氧杂环己基、二噻烷基、哌嗪基、吡咯烷、二氢吡喃基、氧硫杂环戊基、二硫戊环、氧硫杂环己基、硫代吗啉代、环氧乙基、氮丙啶基、氧杂环丁基、氧杂环庚烷基(oxepanyl)、氮杂环丁基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、吡咯烷基、四氢吡喃基、哌啶基、吗啉代、哌嗪基、氮杂环庚三烯基(azepinyl)、氧杂环庚三烯基(oxapinyl)、氧氮杂环庚烷基、氧硫杂环己烷基、硫杂环庚烷基(thiepanyl)、氮杂环庚烷基、二氧杂环庚烷基和二氮杂环庚烷基。

[0272] 术语“杂环基”包括如此处定义的杂环基团,其可被1、2或3个取代基取代,例如=O、=S、卤素、羟基、氰基、硝基、烷基、环烷基、链烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环基、烷氧基、环烷氧基、链烯氧基、炔氧基、芳氧基、杂芳氧基、杂环氧基、芳烷氧基、杂芳烷氧基、杂环基烷氧基、酮类(包括烷基羰基、环烷基羰基、链烯基羰基、炔基羰基、芳酰基、芳烷基羰基、杂芳基羰基、杂环基羰基)、酯类(包括烷氧基羰基、环烷氧基羰基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基、杂环基氧基羰基、烷基羰基氧基、环烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、杂芳基羰基氧基、杂环基羰基氧基)、碳酸酯类(包括烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、杂芳基氧基羰基氧基)、氨基甲酸酯类(包括烷氧基羰基氨基、芳氧基羰基氨基、链烯氧基羰基氨基、炔氧基羰基氨基、芳氧基羰基氨基、氨基羰基氧基、烷基氨基羰基氧基、二烷基氨基羰基氧基、芳氨基羰基氧基)、氨甲酰基(包括烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、芳氨基羰基、芳基烷基氨基羰基、链烯氨基羰基)、酰氨基(包括烷基羰基氨基、烷基羰基烷基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基)、芳烷基、杂芳烷基、杂环烷基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳氨基)、磺酰基(包括烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基、杂芳磺酰基、烷氧基磺酰基、芳氧基磺酰基、杂芳氧基磺酰基、环烷基磺酰基、杂环基磺酰基)、氨磺酰基、亚磺酰氨基、磷酸酯基、膦酸酯基、次膦酸酯基、硫醚(包括烷基硫、芳基硫、杂芳基硫)、脒基、亚氨基、脒基、硫羧基(包括烷基硫代羧基、芳基硫代羧基)、亚磺酰基(包括烷基亚磺酰基、芳基亚磺酰基)、羧基,其中前面提到的每一个烃基可任选被一个或多个烷基、链烯基、炔基、环烷基、卤素、羟基或烷氧基取代。

[0273] 术语“杂环烷基”为被杂环基取代的烷基。该术语包括未取代的和取代的杂环烷基部分,其可以被一个或多个烷基、链烯基、炔基、环烷基、卤素、羟基或烷氧基取代。

[0274] 术语“羰基”或“羧基”包括通过双键与氧原子连接的碳($C=O$)的化合物或部分。羰基还可以被允许本发明化合物实施其预期功能的任何部分取代。例如,羰基部分可被烷基、链烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基等取代。含羰基的部分的实例包括醛类、酮类、羧酸类、酰胺类、酯类、脒类、酞类等。

[0275] 术语“羟基”或“氢氧基”包括具有-OH或-O⁻的基团。

[0276] 术语“卤素”包括氟、溴、氯、碘等。

[0277] 术语“全卤化”包括其中所有氢被卤素原子取代的部分。

[0278] 本发明维生素D化合物或其药学可接受的盐、溶剂合物或前药可以含有一个或多个不对称中心,因此可产生对映体、非对映体和其他立体异构形式,其可根据绝对立体化学定义为(R)-或(S)-或者对于氨基酸而言定义为(D)-或(L)。本发明意味着包括所有这些可能的异构体,以及其外消旋和光学纯形式。光学活性的(+)和(-)、(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体可通过使用手性合成单体或手性试剂来制备,或通过使用常规方法(例如用手性柱的HPLC)来拆分。当本发明描述的化合物包含烯属双键或其他几何不对称性中心时,除非另有说明,所述化合物旨在包括E和Z两种几何异构体。同样地,也旨在包括所有的互变异构形式。

[0279] 术语“立体异构体”包括由通过相同的键结合、但具有不同的三维结构的相同原子组成的化合物,其是不可互换的。本发明预期各种立体异构体及其混合物,且包括对映体,对映体是指其分子互相是非重叠镜象的两种立体异构体。

[0280] 本发明包括所有的药学可接受的同位素标记的维生素D化合物,其中一个或多个原子被具有相同原子序数、但原子质量或质量数不同于通常天然发现的原子质量或质量数的原子替代。

[0281] 适于包含在本发明化合物中的同位素的实例包含氢的同位素,例如²H和³H,碳的同位素,例如¹¹C、¹³C和¹⁴C,氯的同位素,例如³⁶Cl,氟的同位素,例如¹⁸F,碘的同位素,例如¹²³I和¹²⁵I,氮的同位素,¹³N和¹⁵N,氧的同位素,例如¹⁵O、¹⁷O和¹⁸O,磷的同位素,例如³²P,和硫的同位素,例如³⁵S。用重同位素例如氘(即²H)取代可赋予由较高的代谢稳定性所产生的某些治疗学优点,例如,体内半衰期增加或剂量要求降低。同位素标记的维生素D化合物通常可由本领域技术人员通过常规技术用同位素标记的试剂替代之前使用的非标记试剂来制备。

[0282] 术语“前药”包括可在生理条件下或通过溶剂分解转化为本发明的生物活性化合物的化合物。因此,术语“前药”是指药学可接受的本发明化合物的代谢前体。当施用于需要其的受试者时,前药可能是非活性的,但其在体内转化为本发明活性化合物。通常前药在体内例如通过在血液中水解或在内脏或肝脏中转化从而快速转化以产生本发明母体化合物。前药化合物通常在哺乳动物有机体中提供溶解性、组织相容性或延迟释放的优点(参见Bundgard,H.,Design of Prodrugs(1985),pp.7-9,21-24(Elsevier,Amsterdam))。

[0283] 前药的讨论在Higuchi,T.等的“Pro-drugs as Novel Delivery Systems,”A.C.S.Symposium Series,Vol.14和在Bioreversible Carriers in Drug Design,ed.Edward B.Roche,Anglican Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987中提供。

[0284] “药学可接受的盐”包括酸和碱加成盐。“药学可接受的酸加成盐”是指保持游离碱的生物有效性和性质的那些盐,其不是生物上或其他方面不合需要的,且其与无机酸和有机酸一起形成,所述无机酸例如但不限于,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,所述有机酸例如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、

葡庚糖酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、羟基乙酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一烯酸等。

[0285] “药学可接受的碱加成盐”是指保持游离酸的生物有效性和性质的那些盐,其不是生物上或其他方面不合需要的。这些盐由无机碱或有机碱与游离酸的加成来制备。来源于无机碱的盐包括但不限于钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等。优选的无机盐是铵、钠、钾、钙和镁盐。来源于有机碱的盐包括但不限于伯胺、仲胺和叔胺、取代胺(包括天然存在的取代胺)、环胺和碱性离子交换树脂的盐,例如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、二甲乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、苯乙苄胺(benethamine)、苜星(benzathine)、乙二胺、葡糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨基丁三醇、嘌呤、嘧啶、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。

[0286] 通常结晶作用产生本发明化合物的溶剂合物。如此处所使用,术语“溶剂合物”是指含有一个或多个本发明化合物分子和一个或多个溶剂分子的集合体。所述溶剂可以是水,在这种情况下所述溶剂合物可以是水合物。或者,所述溶剂可以是有机溶剂。因此,本发明化合物可以以水合物存在,包括一水合物、二水合物、半水合物、倍半水合物、三水合物、四水合物等,以及相应的溶剂化形式。本发明化合物可以是真实的溶剂合物,尽管在其它情况下,本发明化合物可仅保留不定水(adventitious water)或者是水加上一些不定溶剂的混合物。

[0287] 术语“药物组合物”包括本发明化合物(例如维生素D化合物)和用于将维生素D化合物递送给个体的本领域普遍接受的介质的制剂。这种介质包括所有药学可接受的载体、其稀释剂或赋形剂。

[0288] 在一些实施方式中,本发明组合物可以局部施用于任何上皮表面。“上皮表面”包括覆盖在身体外表面的组织区域,或其限定的中空结构,包括但不限于皮肤和粘膜表面。这种上皮表面包括口、咽、食道、肺、眼、耳、鼻、颊、舌、阴道、颈、泌尿生殖器、消化和肛门直肠表面。

[0289] 组合物可配制成用于局部施用的各种常用形式。例如,这些形式包括半固体和液体剂型(例如液体溶液或悬浮液)、凝胶、霜剂、乳剂、洗液、浆料、粉剂、喷雾剂、泡沫、糊剂、膏剂、油膏、香膏或滴剂。

[0290] 用于局部施用的常用载体包括胶质、凝胶及其衍生物、聚乳酸或聚乙醇酸聚合物或其共聚物、纤维素衍生物(例如甲基纤维素、羧甲基纤维素或氧化纤维素)、胍尔豆胶、金合欢胶、刺梧桐树胶、黄蓍胶、膨润土、琼脂、卡波姆、墨角藻、长角豆、右旋糖酐及其衍生物、印度树胶(ghatti gum)、锂蒙脱石、卵叶车前果壳(ispaghula husk)、聚乙烯吡咯烷酮、二氧化硅及其衍生物、黄原胶、高岭土、滑石、淀粉及其衍生物、石蜡、水、植物油和动物油、聚乙烯、聚环氧乙烷、聚乙二醇、聚丙二醇、甘油、乙醇、丙醇、丙二醇(糖醇,醇类)、不挥发性油、钠、钾、铝、镁或钙盐(例如氯化物、碳酸盐、重碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、乳酸盐、醋酸盐、葡庚糖酸盐或酒石酸盐)。

[0291] 用于局部制剂的标准组合物策略可用于维生素D化合物,从而提高药物的持续和停留时间,并改善所实现的预防功效。

[0292] 也可以使用局部透皮贴剂。透皮贴剂具有将本发明组合物控制递送至身体的额外优点。这种剂型可通过将试剂溶解或分散在合适介质中来制备。

[0293] 除维生素D化合物之外,粉末和喷雾剂还可以包含载体,例如乳糖、滑石、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂还可以包含常用推进剂,例如氯氟烃和易挥发未取代烃,例如丁烷和丙烷。

[0294] 通常,水性气雾剂通过配制维生素D化合物和常用药学可接受的载体和稳定剂的水溶液或悬浮液来制备。所述载体和稳定剂根据具体化合物的要求变化,但通常包括非离子型表面活性剂(例如,吐温、普卢兰尼克(Pluronic)、聚乙二醇等)、蛋白样血清白蛋白、山梨聚糖酯、油酸、卵磷脂、氨基酸(例如甘氨酸)、缓冲液、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备。本发明气雾剂或任何其他递送手段的产生可通过本领域已知的任何方法完成。例如,就气雾剂递送而言,所述化合物以精细粉碎的形式和含有推进剂的任何适当的载体提供。

[0295] 液化推进剂通常在环境条件下是气体并在压力下压缩。所述推进剂可以是本领域任何可接受和已知的推进剂,包括丙烷和丁烷,或其他低级烷烃,例如最多5个碳的烷烃。将所述组合物容纳在含有适当的推进剂和阀的容器中,并保持在高压下直到通过阀的作用释放。

[0296] 在一个实施方式中,所述维生素D化合物可以预防性施用。对于预防性施用,维生素D化合物可以在可能的脱发之前施用。可以最佳化施用时机,从而使维生素D化合物的预防功效最大化。施用时机将根据施用方式、剂量、组合物的稳定性和功效、剂量频率(例如单次施用或多次剂量)而改变。本领域技术人员能够确定所需的最合适的时间间隔,从而使维生素D化合物的预防功效最大化。

[0297] 当存在于组合物中,所述维生素D化合物通常以总重量的约0.000001%到约100%、更优选约0.001%到约50%、最优选约0.01%到约25%的量存在。

[0298] 对于含有载体的本发明组合物,所述组合物例如包含约1%到约99%、优选约50%到约99%、最优选约75%到约99%重量的至少一种载体。

[0299] 此外,本发明组合物的单个组分可以预混合,或各组分可以单独添加至根据预定剂量的相同环境中,从而实现处理组分的所需浓度水平,只要所述组分最终互相紧密混合。而且,本发明可以基于连续或间断方式进行施用或递送。

[0300] 在一个实施方式中,所述制剂包含维生素D活性成分,其配制在约40% (w/w) 丙二醇和约60% (w/w) 无水乙醇(200proof,US)以及任选的其他少量药学可接受的赋形剂、载体或稀释剂,例如约0.4% (w/v)的Phospholipon 90G中。在另一个实施方式中,所述制剂包含维生素D活性成分,其配制在约30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙氧基二甘醇或二乙二醇单乙基醚和约60% (w/w) 无水乙醇(200proof,US)以及任选的其他少量药学可接受的赋形剂、载体或稀释剂,例如约0.4% (w/v)的Phospholipon 90G中。在一些实施方式中,乙醇是无水200proof (U.S.) 未变性乙醇(USP)。此处描述的制剂提供活性维生素D化合物的真皮渗透和递送水平,并提供预防脱发或降低脱发(特别是化疗引起的脱发(CIA))严重程度的有效手段。

[0301] 在某些实施方式中,所述药物组合物包含约40% (w/w) 丙二醇 (USP级) 和约60% (w/w) 无水乙醇 (200proof,US),未变性USP。

[0302] 在一些实施方式中,所述药物组合物包含约40% (w/w) 丙二醇 (即,USP级或更高) 和约60% (w/w) 无水乙醇 (200proof,US),未变性 (即,USP级或更高)。

[0303] 在其他实施方式中,所述药物组合物包含约30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙氧基二甘醇或二乙二醇单乙基醚和约60% (w/w) 无水乙醇 (200proof,US)。

[0304] 在再其他实施方式中,所述药物组合物包含约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1%的Phospholipon,例如Phospholipon 90G。

[0305] 在其他实施方式中,丙二醇和/或无水乙醇的精确百分比 (w/w) 可基于40%:60%的比率改变。例如。丙二醇与无水乙醇的%比可以是20:80;25:75;30:70;35:65;36:64;37:63;38:62;39:61;41:59;42:58;43:57;44:56;45:55等。这种其他制剂的功效可使用本领域认可的技术来验证,例如实施例I描述的方法。

[0306] 在某些实施方式中,制剂中的无水乙醇可由95%乙醇、96%乙醇、97%乙醇、98%乙醇或99%乙醇替代。

[0307] 在某些实施方式中,所述药物组合物也可以包括痕量的其他非活性成分、赋形剂或组分。这种成分的存在基本上不影响维生素D化合物的功效或其真皮渗透/积聚性能。

[0308] 本发明维生素D化合物配制成用于递送至表皮而基本上不渗透至真皮层。之前由Roche Dermatology开发的不同制剂在以每次施用约500-1000 μ g的剂量使用时对于对抗CIA无效,并引起I期研究中大多数人受试者的皮炎。同样的Roche制剂在大鼠绿色白血病模型 (下文) 中也没有效果。

[0309] 本发明的一种典型制剂可根据以下 (非限制性) 过程制备:

[0310] 配方I:1.2 μ g/g (1.2ppm) 的钙三醇

[0311]	组分	% w/w
	100ppm钙三醇浓缩物	1.2
	200Proof乙醇	58.8
	丙二醇	40
	总计	100

[0312] 配方I按照如下步骤制备:将钙三醇溶解在乙醇中;然后添加丙二醇并混合直到所得溶液的外观透明且均匀。以上制剂的比重为约0.875g/mL。以w/v表示的以上配方的目标浓度是1.05 μ g/mL。

[0313] 配方II:3.6 μ g/g (3.6ppm) 的钙三醇

[0314]	组分	% w/w
	100ppm钙三醇浓缩物	3.6
	200Proof乙醇	56.4
	丙二醇	40
	总计	100

[0315] 配方II按照如下步骤制备:将钙三醇溶解在乙醇中;然后添加丙二醇并混合直到所得溶液的外观透明且均匀。以上制剂的比重为约0.875g/mL。以w/v表示的以上配方的目标浓度是3.15 μ g/mL。

[0316] 所使用试剂都是USP级试剂(满足美国药典的要求)。

[0317] 使用本发明制剂,约0.2 μ g(以100 μ L的2 μ g/mL局部溶液施用)能够保护新生大鼠对抗CIA。基于该信息,本领域技术人员可以容易地调节基于待治疗哺乳动物的平均体重的适当剂量水平。例如,人受试者中,可使用约2.5 μ g、5 μ g、10 μ g、25 μ g、50 μ g、75 μ g或100 μ g的钙三醇(或其他等量的维生素D化合物)的总剂量。初步动物毒理学研究显示,约100 μ g的剂量不引起真皮刺激,并显示优异的表皮渗透而基本上没有真皮渗透(例如,极少量渗透至真皮)。参见其他剂量信息的描述。

实施例

[0318] 以下实施例说明本发明的某些方面,但不限于任何方面。尽管为了澄清和说明,所述实施例已经相当详细地描述,本领域技术人员应理解在不离开本发明的真实范围的情况下,可进行形式和细节上的多种变化。

[0319] 实施例1:使用Franz人皮肤有限剂量模型体外经皮吸收钙三醇的评估

[0320] 设计该实施例来评估各种钙三醇制剂的经皮吸收药代动力学。使用有限剂量技术和Franz扩散池进行体外人尸体皮肤测定吸收。证实体外人尸体皮肤模型是研究经皮吸收和测定局部施用药物的药代动力学的有价值的工具。该模型使用固定在使皮肤保持在与体内通常条件匹配的温度和湿度下的特别设计的扩散池中的人尸体皮肤。将有限剂量(例如4-7mg/cm²)的制剂施用于皮肤的外表面,通过监测接触皮肤内表面的接受室溶液中制剂的出现率来测定药物吸收。然后准确测定该模型中定义总吸收量、吸收率和皮肤含量的数据。该方法具有准确预计体内经皮吸收动力学的历史性先例。因此,人皮肤的体外有限剂量模型可以表征维生素D化合物(例如钙三醇)的经皮吸收药代动力学。

[0321] 在该实验中,在三块相同的皮肤切面上测试六种含有钙三醇的制剂,每一制剂施用于三块不同的尸体皮肤供体中的一块,用于在48小时剂量周期内测定钙三醇的经皮吸收。在施用剂量后的预先选定时间,移去全部真皮接受室溶液,用新鲜接受室溶液替换,并保存等分试样用于随后的分析。另外,回收角质层、表皮和真皮并评估药物含量。通过高效液相色谱(HPLC)分析样品的钙三醇含量。以下提供此处所使用方法的简要描述。

[0322] 死亡24-48小时内获得的没有明显皮肤病迹象的人尸体躯干皮肤用于该研究。取皮、冷冻保存并密封在不透水的塑料袋中,储存在<-70℃直到实验当天。使用前,在约37℃水中融化皮肤,然后用自来水冲洗以去除来自表面的任何附着的血和其他物质。来自单个供体的皮肤切成多块较小的切面,但其足够大从而固定在静态2.0cm²的Franz扩散池中。在每一供体的三块相同的样品上测试各制剂。真皮室装满pH为7.4 \pm 0.1的磷酸盐缓冲等渗盐水(PBS)的储库溶液,使表皮室面向周围实验室环境。可以将Volpo (Oleth-20)——已知增加水溶性极差化合物的水溶性的非离子型表面活性剂添加到PBS中。储库溶液中的Volpo确保经皮吸收期间的扩散漏槽条件(diffusion sink conditions),且已知不影响测试皮肤的屏障性能。然后将细胞放入扩散器中,其中以约600RPM的速度磁性搅拌真皮储库溶液,且其温度保持在使皮肤表面温度达到32.0 \pm 1.0℃。

[0323] 为确保各皮肤切面的完整性,在施用测试产品之前测定其对氘化水的渗透性。在短暂(0.5-1小时)的平衡期后,通过滴管将³H₂O(NEN, Boston, MA, sp. Act. ~0.5 μ Ci/mL)滴在皮肤上部,以覆盖完全暴露的表面(大约250-500 μ L)。5分钟后,去除³H₂O水层。30分钟时,收

集储库溶液并通过液体闪烁计数分析放射性含量。认为 $^3\text{H}_2\text{O}$ 吸收小于 $1.56\mu\text{L-equ}/\text{cm}^2$ 的皮肤样品是可接受的。所使用的所有皮肤样品的 $^3\text{H}_2\text{O}$ 吸收小于约 $0.50\mu\text{L-equ}/\text{cm}^2$ (结果未显示)。

[0324] 剂量施用和样品收集:就在给药前,取前剂量样品,并用含0.2%Volpo (也称为Oleth-20,用于确保水溶液中药物的可混和性的非离子型表面活性剂)的 $0.1\times\text{PBS}$ 的新鲜溶液替换储库溶液。从Franz池中移去柱状物(chimney),使其完全接触皮肤的表皮表面。然后用正压分注移液管(positive displacement pipette)将所有制剂施用于皮肤切面上,以递送 $10\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。用移液管的特氟纶尖端将剂量在表面上涂开。施用后五到十分钟,替换Franz池的柱状物部分。在给药后的预先选定时间(6、12、24和48小时),将储库溶液全部除去,用新鲜储库溶液替换,并保留预定体积的等分试样用于随后的分析。

[0325] 将来自各供体的单块皮肤切面固定在池上,其不给药,但用于评估从皮肤中扩散出来的物质的出现,这可表示内源钙三醇。收集最后的样品之后,用80:20的乙醇:水洗涤皮肤表面两次(每次体积1.0mL),来收集来自皮肤表面的未吸收制剂。洗涤后,从腔室中去除皮肤并分成表皮和真皮。在80:20的乙醇:水中提取各层过夜。

[0326] 通过高效液相色谱(HPLC)来定量钙三醇。简言之,在具有Agilent 1100Series LC/MSD的Hewlett-Packard 1100Series HPLC系统中进行HPLC。由A)水中的0.1%乙酸铵和B)甲醇中的0.1%乙酸铵组成的溶剂系统以 $0.550\text{mL}/\text{min}$ 的流速流过Phenomenex Luna C18 (2)柱($100\text{A}, 3\mu\text{m} 100\times 4.6\text{mm}$)。用由纯标准品每日制得的外标曲线将峰面积量化至浓度。收集当天不测试的样品储存在 -20°C 或以下。

[0327] 在预试研究中,来自各组的单个制剂以单个供体约 $5\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 剂量给药于六个腔室中。在0、2、4、8、12、24、32和48小时收集接受室溶液。收集最后一批接受室溶液样品后,如之前所述洗涤表面并收集皮肤用于分析。处理并分析所有样品的钙三醇含量。

[0328] 关键研究的最终设计基于预试研究中观察到的结果。尤其是,施用剂量、接受室溶液取样时间表和取样处理方法。进行这些修正以优化关键研究样品中钙三醇的检测和定量。例如,尽管预试方法描述储库样品在2、4、8、12、24、32和48小时采集,预试研究后确定,储库样品将在6、12、24和48小时采集,以利于更好地检测储库样品中钙三醇的水平。另外,预试研究后,确定 2cm^2 施用 $20\mu\text{L}$ (剂量为 $10\mu\text{L}/\text{cm}^2$) 将改善储库溶液样品中钙三醇的检测。然而,未给药的腔室保持为 1cm^2 。计算以下参数:a)总吸收量(所有储库溶液的总和);b)研究期间内渗透的速率和程度;和c)所施用剂量的质量平衡。对于数据评估,a)如果任何样品 $<\text{LLQ}$ (量化下限),则该样品可作为非数据值处理。对于放射性样品(例如,水完整性测试),LLQ定义为空白样品的预定平均背底。出于研究者的判断,声明所有 $<\text{LLQ}$ 的值是为了计算关键参数而测量的零值或实际值;b)如果值大于来自其余相同腔室集的相同值的平均 $\pm 3\text{SD}$ 范围,或如Dean和Dixon异常值测试所测定,则确认其为可疑的异常值。出于研究者的判断,将声称异常值的值从数据的全部总和中去除(但在文中或数据表中同样地进行标注);c)在腔室内,如果已经声明给定的时间点值是非数据值,或由于其他理由丢失了,用内插值替换该时间点值以计算相关参数。该内插值在连接如下相邻值的线上计算:

[0329] -假定3点: (T_1, A) 、 (T_2, B) 和 (T_3, C) , 其中 (B) 丢失,

[0330] -其中 T = 时间且 $A-C$ = 测得的数据值

[0331] -估计的 $B = A - [((A-C)/|T_1-T_3|) \times (|T_1-T_2|)]$

[0332] 对于统计学评估,计算供体内相同样品的平均值并计算各关键参数的标准差。然后校对供体内平均值并计算供体间总平均值和标准误差。用Student的t检验评估测试制品之间的差异。

[0333] 使用该方法评估以下测试制剂:

[0334] -A: (1ppm): 将0.2mL (1% (w/v)) 的100ppm钙三醇浓缩物 (批号H, 见下文) 溶解到19.8mL (99% (w/v)) 的200proof乙醇 (1 μ g/mL) 中。

[0335] -B (1ppm): 首先, 将0.2mL (1% (w/v)) 的100ppm钙三醇浓缩物 (批号H, 见下文) 溶解到11.8mL (59% (w/v)) 的200proof乙醇中; 然后添加8mL (40% (w/v)) 的丙二醇, 并混合直到透明且均匀 (1 μ g/mL)。

[0336] -C (1ppm): 首先将0.2mL (1% (w/v)) 的100ppm钙三醇浓缩物 (批号H, 见下文) 溶解到11.8mL (59% (w/v)) 的200proof乙醇中; 然后添加6mL (30% (w/v)) 的丙二醇和2mL (10% (w/v)) 的乙氧基二甘醇, 并混合直到透明且均匀 (1 μ g/mL)。

[0337] -D (3ppm): 首先, 将0.6mL (3% (w/v)) 的100ppm钙三醇浓缩物 (批号H, 见下文) 溶解到11.4mL (57% (w/v)) 的200proof乙醇中; 然后添加6mL (30% (w/v)) 的丙二醇并混合直到透明且均匀; 最后添加2mL (10% (w/v)) 的乙氧基二甘醇并混合直到透明且均匀 (3 μ g/mL)。

[0338] -E (1ppm): 首先将0.2mL (1% (w/v)) 的100ppm钙三醇浓缩物 (批号H, 见下文) 溶解到11.72mL (58.6% (w/v)) 的200proof乙醇 (DP-04-099) 中; 然后添加6mL (30% (w/v)) 的丙二醇并混合直到透明且均匀; 然后添加2mL (10% (w/v)) 的二乙二醇单乙基醚P并混合直到透明且均匀; 最后添加0.08mL (0.4% (w/v)) 的Phospholipon 90G浓缩物 (批号G, 见下文) 并分散入溶液中, 混合直到透明且均匀 (1 μ g/mL)。

[0339] -F (3ppm): 首先将0.6mL (3% (w/v)) 的100ppm钙三醇浓缩物 (批号H, 见下文) 溶解到11.32mL (56.6% (w/v)) 的200proof乙醇中; 然后添加6mL (30% (w/v)) 的丙二醇并混合直到透明且均匀; 然后添加2mL (10% (w/v)) 的二乙二醇单乙基醚P并混合直到透明且均匀; 最后添加0.08mL (0.4% (w/v)) 的Phospholipon 90G浓缩物 (批号G, 见下文) 并分散入溶液中, 混合直到透明且均匀 (31 μ g/mL)。

[0340] -G: 混合50g (50% (w/v)) 的200proof乙醇和50g (50% (w/v)) 的Phospholipon 90G, 并混合直到透明且均匀。

[0341] -H: 将0.01mg (0.01% (w/v)) 的钙三醇完全溶解在100mL (99.99% (w/v)) 的200proof乙醇中。

[0342] 用于该研究的所有试剂都是分析纯试剂等级或更高。特定试剂的来源将在最终报告正文内首次提及各化学品后标注。

[0343] 该研究的结果概括在以下摘要表中:

[0344] 摘要表: 使用人尸体皮肤单次施用48小时内钙三醇的表皮、真皮和总吸收量经皮吸收中钙三醇含量的供体间平均结果。平均值 \pm SE作为总质量 (ng)

[0345]	测试制品	表皮 (ng/cm ²)	真皮 (ng/cm ²)	总吸收量 (ng/cm ²)
	批次 A	0.98 ± 0.19	0.11 ± 0.11	9.85 ± 0.62
	批次 B	1.63 ± 0.44	0.19 ± 0.19	9.84 ± 0.67
	批次 C	1.89 ± 0.54	0.00 ±	9.74 ± 0.43
[0346]			0.00*	
	批次 D	6.44 ± 0.74	0.00 ± 0.00	10.51 ± 0.10
	批次 E	2.19 ± 0.14	0.00 ± 0.00	9.96 ± 0.32
	批次 F	4.83 ± 0.42	0.00 ± 0.00	8.80 ± 0.25
	未给药的空白 细胞	0.37 ± 0.37	0.00 ± 0.00	13.75 ± 0.59**

[0347] *零值是指低于检测下限的结果。

[0348] **推测从皮肤释放出内源钙三醇

[0349] 数据显示钙三醇确实从所评估的测试制剂中渗入(但并非必定透过)体外人尸体皮肤。来自各供体的未给药的空白皮肤切面显示与内源钙三醇一致的HPLC/MS共洗脱峰。所有测试制剂中基本上相等的且类似于非给药的皮肤切面的存在于储库溶液中的量很可能是从皮肤切面中释放出来的内源钙三醇的扩散。由于在测试制剂和非给药腔室中几乎观察不到差异,因此储库溶液中观察到的量不可能代表从局部施用的测试制剂中释放出来的钙三醇。

[0350] 如图1所示,在施用两种制剂(A和B)的皮肤切面中观察到作为真皮含量的钙三醇吸收。未给药皮肤切面的真皮皮层没有观察到可测量的水平,因此,这两种测试制剂的可测量的真皮水平解释为代表从施用剂量的吸收。另外,施用测试制剂的所有表皮样品的钙三醇水平大于未给药的皮肤切面(约3×到约17×)。基于表皮钙三醇含量的等级次序将测试制剂排列如下:

[0351] D>F>E>C>B>A>>>未给药的皮肤

[0352] 与该等级次序一致的是包含较高浓度(3μg/mL对1μg/mL)的钙三醇的测试制剂(D和F)显示较高的表皮含量。在表面洗涤结果(来自皮肤表面的其余测试制品的回收率)中观

察到类似的等级次序。未给药的空白皮肤切面的表面洗涤中没有发现钙三醇。

[0353] 实施例2:涉及响应钙三醇的表皮细胞培养物的关键蛋白的鉴别-实时PCR (RTPCR)

[0354] 本实施例和以下几个实施例提供关于钙三醇的活化通道中的蛋白或基因的同一性的附加信息。这些实验允许鉴别表皮细胞对维生素D化合物的细胞响应涉及的作用机制以及关键蛋白/基因。

[0355] 尤其是,发现使角质形成细胞细胞系HEKa与钙三醇接触引起细胞过程的显著影响。此处描述的实验集中在钙三醇诱导的钙通道转运的变化和调节热休克蛋白的变化所涉及的关键蛋白/基因的鉴别。实时聚合酶链反应 (RTPCR) 方法用于该实施例来鉴别离子通道、转运蛋白和热休克蛋白涉及的基因的mRNA水平的变化。

[0356] 使用PCR阵列作为筛选工具,评估了可能提供对细胞内钙三醇的生物作用模式的理解的分子靶谱。用实时PCR量化评估mRNA水平的变化,从而评估含有80个通道特异性靶标(参见附件)的预选子集中的mRNA水平。PCR阵列分析利用两组基因,即与热休克蛋白有关的基因(SABiosciences)和与神经科学离子通道和转运蛋白有关的基因(SABioscience)。

[0357] 细胞培养:使初级人表皮角质形成细胞(HEKa)保持在Epilife培养基(Cascade Biologics, Inc., Portland OR)连同角质形成细胞生长补充剂(Cascade Biologics, Inc., Portland OR)中。细胞在37°C下在含有5%CO₂的条件下生长。

[0358] HEKa细胞的D3处理:用0.1μg/mL的钙三醇或对照载体处理HEKa细胞。为产生0.1μg/mL的钙三醇的最终浓度,将1mg钙三醇溶解在2mL乙醇中,并将1μL的所得原液添加到5mL培养基中。用含有1μL乙醇的5mL培养基处理载体对照组的细胞。处理开始后3、6、16、24、48或72小时收获细胞。

[0359] RNA分离:在不同处理时间用RNeasy微型试剂盒(Qiagen, Inc., Valencia CA)根据厂商说明书溶解细胞从而分离RNA。在260nm处测定光密度来量化RNA。第一链合成:使用RT2第一链合成试剂盒(SABiosciences., Frederick MD)根据厂商建议由1μg总RNA合成第一链cDNA。

[0360] 实时PCR:用水稀释来自第一链合成的产物,与SYBR绿色主要混合物(green master mix)(SABiosciences., Frederick MD)混合并装载到PCR阵列上。在Biorad CFX 96上在PCR阵列(热休克蛋白阵列和神经科学和离子通道阵列)(SABiosciences, Frederick MD)上进行实时PCR。使用可在SABiosciences网址上获得的PCR阵列数据分析软件进行数据分析。

[0361] 下表2-1显示钙三醇处理后在HEKa细胞中调节的热休克蛋白基因阵列上的基因。结果仅显示在两个独立实验中调节的那些基因。

[0362] 表2-1:由维生素D3处理调节的热休克蛋白阵列的基因

[0363]	基因符号	蛋白	调节模式
	HSPB1	热休克 27 kDa 蛋白 1	48 小时时下调
	DNAJC6	DnaJ (Hsp40)同系物, 亚家族 C, 成员 6	下调
	HSPA2	热休克 70kDa 蛋白 2	48 小时时上调
	HSF4	热休克转录因子 4	48 小时时上调

[0364] HEKa细胞中mRNA水平通过钙三醇处理调节的两个基因是HSPB1和HSPA2。HSPB1是27kDa蛋白,其不仅在细胞膜中表达,而且在细胞溶质、线粒体和高尔基体中表达。HSPA2是存在于细胞膜和细胞核中的70kDa蛋白,且其通过HSF1调节。HSPB1和HSPA2都涉及细胞凋亡。HSF4由视黄酸调节且涉及细胞分化。DNAJC6属于HSP40组蛋白。它存在于网格蛋白包被的囊泡和细胞质中。

[0365] 类似地,由三个独立实验获得的神经科学和离子通道阵列结果概括于表2-2中。

[0366] 表2-2:由维生素D3处理调节的神经科学和离子通道阵列中的基因

[0367]	基因符号	基因	调节模式
	SLC1A1	溶质载体家族 1(神经元/上皮高亲合性谷氨酸转运蛋白, 系统 Xag), 成员 1)	16 小时时上调
[0368]	KCNB2	钾电压门控通道, Shab 相关亚家族, 成员 2	24 小时时上调
	KCNN4	钾中间体/小电导钙激活通道, 亚家族 N, 成员 4	48 小时时上调
	SLC1A3	溶质载体家族 1(神经胶质高亲合性谷氨酸转运蛋白), 成员 3	48 小时时下调

[0369] 一致地观察到谷氨酸转运蛋白和钾通道中的变化。已知SLC1A1 (也称为EAAC1或EAAT3) 主要负责将刺激性神经递质谷氨酸转运通过膜。已经在神经系统外的组织 (例如心脏和皮肤) 中发现该溶质载体蛋白。在大鼠角质形成细胞中,有证据显示伤口愈合中涉及谷氨酸信号和SLC1A1 (Genever等., 1999)。SLC1A1被利鲁唑 (Riluzole, 一种目前用于黑素瘤临床试验的药物) (Clinical Trials.gov, Mosby' s Drug Consult, 第13版) 抑制表明SLC1A1在皮肤细胞中的生物作用。假设SLC1A1与受损运动神经元中的抗凋亡机制 (Kiryu-Seo等, 2006) 有关, 该实验中观察到的HEKa细胞中的SLC1A1被D3处理上调提示潜在的保护性机制通道连接。

[0370] SLC1A3 (也称为EAAT1或EA6) 是另一种溶质载体,其允许钠依赖性谷氨酸和天冬氨酸的转运。通常在脑的胶质细胞中发现,这种转运蛋白涉及清理谷氨酸的突触间隙,从而阻止后突触神经元的延长的去极化作用。已知SLC1A3能与胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和磷酸二酯6B(PDE6B)相互作用。有可能SCL1A3涉及降低细胞毒性。

[0371] KCNN4是钾中间体/小电导钙激活通道,亚家族N,成员4。其活化后,细胞膜被超极化,流入细胞中的钙增加。这种钾通道局限于神经系统之外的许多组织中。

[0372] KCNB2,钾电压门控通道,Shab相关亚家族,成员2,在钙三醇处理后约24小时上调。这种钾通道在调节神经递质释放、胰岛素分泌和平滑肌收缩中很重要。

[0373] 尽管钙三醇用于这些实验,本领域技术人员将易于理解本发明其他维生素D化合物(例如上文描述的那些)也可以在调节靶基因表达中显示类似活性。在某些实施方式中,预期本发明维生素D化合物显示与这些实验中的钙三醇类似或相同的基因调节作用,例如,上调由钙三醇类似地上调的一个或多个靶基因的表达(mRNA和/或蛋白),或下调由钙三醇类似地下调的一个或多个靶基因的表达(mRNA和/或蛋白)。

[0374] 实施例3:涉及响应钙三醇的表皮细胞培养物的关键蛋白的鉴别-抗体阵列

[0375] 也通过利用能够筛选超过700种潜在靶蛋白的变化的抗体微阵列来评估经钙三醇刺激的蛋白变化的评价。

[0376] 在该实验中,采用含有对抗超过700种靶蛋白的抗体的抗体微阵列(Panorama XP725抗体阵列,Sigma)来评估用钙三醇分别处理约3、6或24小时的HEKa细胞中蛋白浓度/水平的变化。简言之,首先收获经处理的HEKa细胞,然后提取以获得可溶解的蛋白上清液。来自各样品(1mg/mL)的两部分所提取的蛋白样品(总共约1mg)各自用荧光染料(分别是Cy3和Cy5)标记。从蛋白样品中去除过量染料,所得标记样品用于微阵列培养。

[0377] 为测定相对于较早时间点(例如,在第3小时)而言较晚的时间点(例如,在第6或第24小时)的特定靶蛋白的表达水平,用不同的标签来标记样品(例如,3小时提取物用Cy3标记,6小时或24小时提取物用Cy5标记)。然后混合包含等量总蛋白的两种标记的样品(例如,Cy3标记的3小时样品分别与Cy5标记的6小时或24小时样品混合)。用微阵列芯片(根据厂商推荐的方案)培养后,芯片经洗涤并干燥。然后用荧光激光扫描器扫描微阵列来测定Cy3和Cy5染料的相对荧光强度。

[0378] 如果特定种类的靶蛋白的量随着时间增加(或减少),微阵列将保留与较晚时间点(例如,Cy5)有关的较多(或较少)染料。例如,在该实验中,最早时间点(例如,3小时)用作基线来测定两个较晚时间点(例如,6小时对24小时)时相对的蛋白表达水平。如果6-24小时之间阵列保留较多的Cy5,则所述时间期间内靶蛋白的表达水平增加。相反,如果第6小时至第24小时保留的Cy5降低,则靶蛋白表达水平降低。

[0379] 使用该方法的初次分析集中在相对的表达水平变化>2倍(增加或降低)的那些靶蛋白上。总的说来,使用钙三醇处理(24小时)的HEKa细胞的抗体阵列实验鉴别了以下靶蛋白(表3-1和3-2),其响应维生素钙三醇而明显改变表达水平:

[0380] 表3-1:钙三醇处理后蛋白水平增加(>2倍)的靶蛋白

[0381]

淀粉样蛋白前体蛋白	HDAC2
ARTS	HDAC6
ASAP1 Centaurin b4	ILK
BACH1	MAP 激酶活化的蛋白激酶 2 MAPKAPK2
Bclx	MAP 激酶 ERK1
BclxL	黑素皮质素 3 受体
BID	肌球蛋白 IX Myr5
Bmf	神经丝 200
CENPE	氧化氮合酶 bNOS
cMyc	p120ctn
肌动蛋白丝切蛋白 (Cofilin)	PAD14
连接蛋白 (Connexin) 32	Par4 前列腺细胞凋亡响应 4
Csk	早老蛋白 1
CtBP1	增殖细胞蛋白 Ki67
DcR2	蛋白激酶 Ba
二甲基组蛋白 H3 diMeLys4	PUMA bbc3
二甲基组蛋白 H3 diMeLys9	ROCK1
抗肌萎缩蛋白	S100

[0382]

ERK5 BIG	
MAPKBMK1	SHPTP2
雌激素受体	Sin3A
FKHRL1 FOXO3a	P 物质受体
局部粘着斑激酶	
pp125FAK	突触足蛋白
FOXP2	肿瘤坏死因子 a
谷氨酸脱羧酶 65	泛激素 C 端水解酶 L1
谷氨酸脱羧酶 GAD65	
67	桑椹粘着蛋白 E 钙粘蛋白
g 微管蛋白	玻连蛋白

[0383] 表3-2:钙三醇处理后蛋白水平降低(>2倍)的靶蛋白

[0384]

Crk II
独立生长因子1
丝氨酸苏氨酸蛋白磷酸酶1b
组织蛋白酶D
转化生长因子b pan
WAVE
蛋白酪氨酸磷酸酶PEST
CD40

[0385] 24小时钙三醇处理的HEKa细胞的评估和相同的蛋白抗体阵列法鉴别了明显上调的大约五十种蛋白。这些蛋白通常属于四类:(i) 转录和细胞周期控制(表3-3);(ii) 结构、细胞骨架和粘着蛋白(表3-4);(iii) 细胞凋亡调节蛋白(表3-5);和(iv) 神经细胞分化和阿尔茨海默病(表3-6)。

[0386] 表3-3:与细胞周期和转录控制有关的过表达蛋白(钙三醇处理24小时后)

[0387]

蛋白	功能
BACH1	转录因子(阿尔茨海默)
CENPE	在细胞周期的 G2 期积聚的着丝粒蛋白
cMyc	转录因子(癌症致癌基因)
C-src 酪氨酸激酶(Csk)	细胞生长(癌症)
CtBP1	转录抑制因子
二甲基组蛋白 H3 diMeLys4	转录调节
二甲基组蛋白 H3 diMeLys9	转录调节
雌激素受体	配体依赖性核受体
FKHRL1 FOXO3a	转录因子, 与 ROCK 激酶和 NO 信号连接
FOXP2	转录调节因子, 在脑、肺、内脏中形成
HDAC2	调节基因表达
MAP 激酶活化的蛋白 激酶 2 MAPKAPK2	涉及许多细胞过程(应激和炎症响应、核输出、基因表达调节和细胞增殖)的激酶。热休克蛋白 HSP27 显示为底物之一。
MAP 激酶 ERK1	在调节响应多种胞外信号的多种细胞过程例如增殖、分化和细胞周期进程的信号级

[0388]		联中起作用，磷酸化核内蛋白
	黑素皮质素 3 受体	激素受体
	增殖细胞蛋白 Ki67	增殖标志物
	S100	涉及调节多种细胞过程的钙调素样钙结合蛋白
	SHPTP2	在多种细胞信号事件中起调节作用的激酶
	Sin3A	转录调节蛋白

[0389] 表3-4: 与结构、细胞骨架和粘着有关的过表达蛋白 (钙三醇处理后24小时)

[0390]	蛋白	功能
	ARTS	调节细胞骨架组织
	ASAP1 Centaurin b4	调节肌动蛋白细胞骨架
	肌动蛋白丝切蛋白	掩饰肌动蛋白微丝
	连接蛋白 32	外周髓磷脂的主要组分
	抗肌萎缩蛋白	细胞骨架连接的大蛋白
	局部粘着斑激酶 pp125FAK	被诱导迁移的角质形成细胞中局部粘着斑激酶的磷酸化增加

[0391]

g 微管蛋白	微管的、纺锤极
肌球蛋白 IX Myr5	发动蛋白
神经丝 200	神经细胞相关的结构蛋白
p120ctn	粘着和信号转导
PAD14	将精氨酸残基转化为瓜氨酸残基，可以调节经历退化过程的细胞的中间丝蛋白和中间丝相关蛋白
ROCK1	激酶，有助于肌动蛋白稳定性
桑椹粘着蛋白 E 钙粘蛋白	具有调节上皮细胞识别和粘着功能的 Ca-依赖性细胞粘着分子，跨膜糖蛋白
玻连蛋白	促进细胞粘着和伸展

[0392] 表3-5: 与细胞凋亡控制有关的过表达蛋白 (钙三醇处理后24小时)

[0393]

蛋白	功能
Bclx	细胞凋亡调节
BclxL	细胞凋亡调节
BID	细胞凋亡调节
Bmf	细胞凋亡调节
DcR2	受体包含胞外 TRAIL 结合域、跨膜结构域和截断细胞质死亡结构域。该受体不诱导细胞凋亡，已显示在 TRAIL 诱导的细胞

[0394]		凋亡中起抑制作用。
	ERK5 BIG MAPKBMK1	保护内皮细胞不受 Bad 磷酸化的细胞凋亡
	整联蛋白连接激酶 (ILK)	调节整联蛋白介导的信号 转导, 可阻止与 PKB/Akt 通道有关的细 胞凋亡
	蛋白激酶 Ba	(Akt)涉及细胞存活并抑 制细胞凋亡
	PUMA bbc3	细胞凋亡调节因子

[0395] 表3-6: 与神经细胞分化和阿尔茨海默病有关的过表达蛋白 (钙三醇处理后24小时)

[0396]	蛋白	功能
	淀粉样蛋白前体蛋白	淀粉样蛋白前体蛋白 (APP)是在许多组织中表 达并在神经元突触中集中 的膜内在蛋白。其主要功 能未知, 但其涉及作为突 触形成[2]和神经塑性[3]的 调节因子。
	BACH1	转录因子(阿尔茨海默)

[0397]	早老蛋白 1	负责剪切 APP(阿尔茨海默中观察到的突变体)的 γ 分泌酶的亚组分
	谷氨酸脱羧酶 65	神经递质产生(精神分裂症)
	谷氨酸脱羧酶 GAD65 67	神经递质产生(精神分裂症)
	神经丝 200	神经元相关的结构蛋白
	氧化氮合酶 bNOS	可诱导的, 细胞信号, 免疫系统
	P 物质受体	神经肽受体
	突足蛋白	肌动蛋白结合蛋白, 涉及神经元的棘器形成
	连接蛋白 32	外周髓磷脂的主要组分
	肿瘤坏死因子 α	调节免疫细胞
	泛激素 C 端水解酶 L1	神经元特异性(阿尔茨海默和帕金森)

[0398] 实施例4:涉及响应钙三醇的表皮细胞培养基的关键蛋白的鉴别-蛋白质组分析

[0399] 用钙三醇处理一系列HEKa培养物,在与钙三醇3接触3、6和24小时后收获细胞沉淀。然后用蛋白质组学方法(例如2-D凝胶和Western印迹分析)分析细胞沉淀。在如下所述的该实验中,用0.1 μ g/mL的钙三醇处理HEKa细胞,并用2-D凝胶电泳和相关的比较分析来处理3、6和24小时获得的样品(结果未显示)。

[0400] 比较研究中总共进行大约458个蛋白斑点的分析,比较对照样品和处理3、6和24小时的处理样品。鉴别显示统计学显著的差异变化的六个斑点。切除这些斑点,其蛋白含量通过胰岛素消化以及质谱表征来进行序列鉴定。

[0401] 结果(表4-1)显示,来自HEKa异常增生上皮细胞(keritinocyte)样品的六组斑点包含纯的内源角蛋白,这与角蛋白通常作为常见污染物观察到相反。鉴定出两种S100蛋白与谷胱甘肽S-转移酶和半乳凝集素1一起正被强烈地调节。有证据证明半乳凝集素1是糖基化的。

[0402] 表4-1基于2-D凝胶电泳研究鉴定的正被钙三醇强烈调节的蛋白

斑点	鉴定的蛋白	名称	响应	功能	细胞定位
4	谷胱甘肽 S-转移酶	GST	3、6 和 24 小时上调	GST 转运	细胞质
2	角蛋白 1	KRT1	6 小时上调且 24 小时下调	中间丝	细胞质
8	角蛋白 17	KR17	24 小时下调	中间丝	细胞质
[0403] 10	S100 A9 (钙防卫蛋白)	S100A9	6 小时下调且 24 小时上调	钙结合蛋白	细胞质
14	S100 A13	S100A13	6 和 24 小时上调	钙结合蛋白	细胞质
27	半乳凝集素 1	LGALS1	6 和 24 小时上调	β -半乳糖苷-结合蛋白	胞外

[0404] 这两种S100蛋白 (A9和A13) 属于钙防卫蛋白家族蛋白。该家族中有着21种不同类型的低分子量蛋白。这些S100蛋白结合钙 (EF-手性基序), 且各类型以细胞特异性方式和依赖于环境因素的水平表达。多种疾病与S100蛋白水平的改变有关 (心肌病、神经变性和炎症性疾病以及癌症)。注意到S100蛋白也在抗体阵列结果中鉴别, 因为其一经与钙三醇接触就上调。

[0405] 实施例5: 钙三醇对角质形成细胞生长的影响

[0406] 用不同浓度的钙三醇处理一系列HEKa培养物, 并在预定生长时期后分析HEKa细胞的生长行为。所有实验在96孔板形式中进行。各孔包含于约100 μ L介质中的相同量的HEKa细胞 (通常为2,000–5,000细胞/孔)。将钙三醇溶解在乙醇中制成原液。用生长介质以1:2连续稀释原液, 覆盖4.0 μ g/mL到约15.5ng/mL的范围 (9个测试浓度)。将约100 μ L的各测试浓度的钙三醇加入相应测试孔中, 使得最终体积为约200 μ L/孔。该测试的钙三醇浓度为2.0–0.008 μ g/mL (例如, 对应于96孔板的第2栏到第10栏)。第11栏用作阴性对照 (不含钙三醇)。所有实验进行两次。

[0407] 如图2所示, 将钙三醇以约0.008–2.0 μ g/mL的浓度范围滴定到HEKa细胞中。HEKa细胞能很好地耐受最低水平的钙三醇, 且钙三醇似乎能适度刺激HEKa细胞生长 (约10–20%)。然而, 当钙三醇浓度为约1.0 μ g/mL或更高时, 细胞生长被抑制。HEKa细胞对钙三醇的总体剂量反应在大约六周时期内的一系列十九个独立实验中是一致的 (数据未显示)。

[0408] 实施例6: 钙三醇对癌细胞生长的效应

[0409] 与正常角质形成细胞HEKa中观察到的不同, 没有观察到所测试的大部分癌细胞系或永生化细胞系的明显的生长刺激或生长抑制作用, 所述细胞系包括SkBr-3 (乳腺癌, Her2过表达)、SKMEL-28 (黑素瘤)、PaCa2 (胰腺癌)、NCI-ES-0808和NIH-3T3 (永生化成纤维细胞)。这种癌细胞系/永生细胞系所显示的一种典型的生长曲线显示于图3, 为胰腺癌细胞系

PaCa2的生长曲线。注意到PaCa2的生长在很宽的钙三醇浓度范围内不受影响。

[0410] 类似地,两种测试癌细胞系MCF-7(含p53突变体的乳腺癌)和HepG2(肝癌),在低维生素D3浓度(0.05-0.25 μ g/mL)下响应钙三醇刺激,且在高钙三醇浓度(>0.5 μ g/mL)下响应钙三醇抑制。参见图4。

[0411] 这些数据表明当所述主题维生素D化合物施用于正常角质形成细胞(例如HEKa)直到某一浓度极限时,也许能促进这些正常角质形成细胞的生长,同时不促进癌细胞生长。超过该浓度极限,维生素D化合物事实上可抑制正常角质形成细胞的生长。

[0412] 实施例7:钙三醇对HEKa细胞对抗各种化疗药物的保护效应

[0413] 该实施例显示,极少例外地,本发明维生素D化合物可保护正常角质形成细胞(例如HEKa)对抗大多数类型的一线化疗药物的细胞毒作用。尤其是,测试了十七种抗癌药来评价钙三醇对这些药物的细胞毒作用的效应。药物名称及其各自的作用机制列于下表中。

[0414] 表7-1:HEKa细胞中钙三醇的化学保护活性的测试药物

[0415]

测试药物	机制
多柔比星	细胞毒
5-FU	嘧啶抗代谢物
他莫昔芬	与雌激素受体结合
伊立替康	拓扑异构酶 1 抑制剂
紫杉醇	有丝分裂抑制剂
卡铂	DNA 烷化剂
依托泊苷	拓扑异构酶 2 抑制剂
环磷酰胺	烷化剂
顺铂	DNA 烷化剂

[0416]	厄洛替尼(特罗凯)	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂
	吉西他滨	嘧啶抗代谢物
	星形孢菌素	非特异性激酶抑制剂
	长春新碱	微管抑制剂
	伊马替尼(格列卫)	酪氨酸激酶抑制剂(abl, c-kit, PDGF-R)
	吉非替尼(易瑞沙)	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂
	索拉非尼	酪氨酸激酶抑制剂(Raf, VEGF-R2, c-kit, PDGF-R)
	达沙替尼	酪氨酸激酶抑制剂(BCR/ABL)

[0417] 在第一系列的实验中,许多基于激酶抑制剂的药物在分析中用于设计来评估0.1μg/mL钙三醇为HEKa细胞提供保护作用的能力。这些药物包括:厄洛替尼(特罗凯),一种EGFR Tyr激酶抑制剂;吉非替尼(易瑞沙),一种EGFR Tyr激酶抑制剂;索拉非尼,若干Tyr激酶的抑制剂(Raf, VEGF-R2, c-kit, PDGR-R);达沙替尼,一种BCR/ABL Tyr激酶抑制剂;和星形孢菌素,一种相对非特异性的激酶抑制剂。

[0418] 这些实验中获得剂量曲线显示的总趋势为,在低药物剂量水平(与影响进行全身递送化疗的患者皮肤的剂量不同),钙三醇提供某种生长刺激并保护HEKa细胞(参见图5-9)。另外,似乎与更非特异性激酶抑制剂相比,钙三醇具有对抗较特异性激酶抑制剂的更明显的保护作用。

[0419] 类似地,钙三醇也具有对抗低剂量水平的烷化剂(例如顺铂和卡铂)的中等保护水平(参见图10和11)。

[0420] 伊立替康可能通过与拓扑异构酶I相互作用而抑制细胞生长。在存在钙三醇的情况下也观察到对抗伊立替康的正性保护作用(图12)。

[0421] 紫杉醇是有丝分裂的抑制剂。0.1μg/mL钙三醇的存在确实提供对抗紫杉醇的某些保护作用(图13)。

[0422] 嘧啶抗代谢物基的药物,例如5-氟尿嘧啶(5-FU),以若干方式起作用,但主要作为胸苷酸合酶抑制剂。5-FU阻断DNA复制所需的胸腺嘧啶脱氧核苷的合成。因此已经局部使用5-氟尿嘧啶来治疗光化学(日光)角质物质和一些类型的皮肤基底细胞癌。当存在0.1μg/mL的钙三醇时,至少观察到对抗5-FU的轻微保护作用(图14)。

[0423] 吉西他滨是脱氧胞苷的2' 碳上的氢原子被氟原子取代的核苷类似物。类似于氟尿嘧啶和其他嘧啶类似物,在DNA复制期间吉西他滨取代了核酸的这种结构块(building blocks)之一(在这种情况下是胞嘧啶核苷)。吉西他滨用于治疗多种癌:非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌和乳腺癌。图15显示当存在0.1μg/mL钙三醇时,至少观察到对抗吉西他滨的轻

微保护作用。

[0424] 另一方面,钙三醇似乎不提供对抗多柔比星的细胞毒作用的明显保护作用(图16)。另外,对抗他莫昔芬的任何保护作用弱(图17)。他莫昔芬竞争性结合至肿瘤及其他组织靶的雌激素受体上,产生降低DNA合成和抑制雌激素作用的核复合物。

[0425] 与上述数据一致,图18的数据表明HEKa角质细胞的生长受钙三醇刺激,且在HEKa细胞中观察到对抗5-FU的一些保护水平。有趣的是,在三种测试的癌细胞系Hep-G2、PaCa-2和SKMEL-28中,5-FU处理的ED₅₀曲线明显不同于也含有0.1μg/mL钙三醇补充剂的那些。注意到Hep-G2细胞被钙三醇处理轻微刺激,然而甚至在存在钙三醇的情况下,其5-FU ED₅₀曲线没有明显变化。

[0426] 类似地,使以下4种测试癌细胞系:Hep-G2、MCF-7、PC-3和PaCa-2与2-至0.1μg/mL的钙三醇接触两代不改变这些细胞对其他药物(例如,阿霉素、顺铂和厄洛替尼)的响应。

[0427] 以上这些结果表明,钙三醇可以在化疗(例如使用5-FU)期间保护正常角质形成细胞(例如HEKa),不对抗抗癌细胞的化疗的功效。

[0428] 与在HEKa细胞中观察到的非常类似,钙三醇似乎几乎不改变多柔比星对抗癌症/永生细胞(例如SkBr-3、SKMEL-28、PaCa-2、MCF-7、NCI-ES-0808、Hep-G2和NIH-3T3)的细胞毒作用(参见图19)。

[0429] 另外,也研究商业药物和钙三醇的可能的协同作用。在这些实验中,从比细胞培养的最终所需浓度高4倍的浓度开始,连续稀释所选的商业药物。同时,制备0.4μg/mL的钙三醇原液,然后与连续稀释的药物混合(以1:1比率)。然后药物/钙三醇混合物经培养至少15分钟,然后加入细胞培养基中(比率为100μL比100μL)。因此,钙三醇的最终浓度为0.1μg/mL。

[0430] 药物治疗周期通常为三天。在三天结束时,在280nm处读出96孔板的背底,然后向各孔加入20μL的“Substrate Cell Titer 96Aqueous One Solution Reagent”(Promega)。将平板返回到37℃孵化器中,每小时读出490nm处的其OD,直到OD到达约1.5。减去预底物OD读数计算出净OD增加。

[0431] 通过比较不同浓度的OD相对于对照孔(不含药物)的OD来计算药物对细胞的影响。绘制净OD的结果随药物浓度的变化并用于确定ED₅₀值。

[0432] HEKa细胞结果的分析表明钙三醇和大多数测试药物之间没有相互作用,所述测试药物包括5-FU、多柔比星、他莫昔芬、伊立替康、紫杉醇、卡铂、星形孢菌素、长春新碱、顺铂、厄洛替尼、吉西他滨、伊马替尼、吉非替尼、索拉非尼和达沙替尼。当在其他细胞上测试药物组合时,也获得相同结果。因此,不希望束缚于任何具体理论,似乎钙三醇和以上药物的作用机制是不同的。

[0433] 实施例8:用钙三醇预处理细胞:存在和不存在化疗药物的情况下钙三醇的细胞基测定试验

[0434] 用于评估细胞活力的上述细胞基试验用于该实施例来评估钙三醇对抗所选化疗药物的作用的潜在保护作用。使各细胞系在0.1μg/mL钙三醇存在下生长两代细胞。然后这些预处理细胞用于建立细胞基试验。另外,未经处理的细胞用于在相同药物/钙三醇浓度下建立平行实验。这允许并列比较在施用化疗药物之前与钙三醇长时间接触的潜在作用。

[0435] 五种细胞系的每一种在0.1μg/mL钙三醇的存在下生长两代细胞后,仅HEKa细胞明

显影响其总体生长和形态。四种癌细胞系继续生长,且不改变其总体形态外观。然而,与钙三醇长时间接触后,HEKa细胞停止生长,且其形态变成以一个方向伸长,与钙三醇处理前较多的支化外观相反。对于该细胞系,一批新的细胞开始生长并在钙三醇存在下仅与单代接触,然后在化疗药物存在下进行测试。

[0436] 选择三种常用化疗药物(多柔比星、顺铂和厄洛替尼)来评估钙三醇处理的细胞。检测到商业药物和钙三醇的可能的协同或保护作用。在这些实验中,从比细胞培养的最终所需浓度高4倍的浓度开始,连续稀释所选的商业药物。制备0.4 μ g/mL的钙三醇原液,然后加入连续稀释的药物(以1:1比率)。然后药物和钙三醇的混合物培养至少15分钟,然后加入细胞中(比例为100 μ L比100 μ L)。因此,钙三醇的最终浓度为0.1 μ g/mL。

[0437] 根据之前描述的办法进行试验,从而提供一致性并允许直接比较。结果基于测定活细胞的总数。结果(未显示)表明钙三醇预处理对于细胞培养物的化学保护作用而言不是必需的。预处理组和同时处理组之间的结果几乎相同。因此,局部施用钙三醇可以与化疗的全身递送同时施用。不要求分阶段施用。

[0438] 实施例9:通过新颖的钙三醇制剂保护免受化疗引起的脱发(CIA)

[0439] 脱发是化疗的最令人烦恼的副作用之一,目前还没有治疗学干预。显示新生大鼠是研究化疗引起的脱发(CIA)的优异模型,因为生长期毛囊模式与人类类似。

[0440] 在本研究中,以剂量和时间依赖性方式,以局部制剂(40% (w/w) 丙二醇,USP;和60% (w/w) 无水酒精,200proof,未变性USP)递送开环甾体化合物钙三醇(USP等级)来治疗/预防CIA。

[0441] 具体地,从Harlan Laboratories, Inc购买Long Evans和Sprague Dawley大鼠和幼仔。根据适用的动物处理规章制度来收容并喂养大鼠。开始实验之前使幼仔驯化48小时。每天将开环甾体化合物钙三醇制剂(见上文)或载体对照(不含钙三醇)局部施用在头和颈部区域,从第5天开始,连续施用6天。将大鼠与其同窝仔畜和鼠妈妈分离6小时。随后,用肥皂和水洗净经治疗区域,使幼仔返回其窝。在第13天,大鼠接受依托泊苷(1.5mg/kg每天,施用3天)或环磷酰胺(CTX) (37.5mg/kg施用一次)或环磷酰胺(35mg/kg,施用一次)和多柔比星(2.5mg/kg每天,施用3天)的组合。所有化疗剂从Sigma购买并且以总体积0.1mL腹膜内(i.p.)施用。最后化疗剂量后10天记录脱发。

[0442] 对于移植绿色白血病的大鼠的实验,出生后第5天,将大鼠任意分成三组,每组45只。所有大鼠接受0.1mL不含血清(SF)RPMI中的 1×10^5 绿色白血病细胞系MIAC51(i.p.)。在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂,100%湿度孵化器中在添加L-谷氨酰胺和10%胎牛血清的RPMI1640中培养MIAC51。细胞生长到50%融合时(1.5×10^6 mL),将其收集在50mL锥形管中,在室温下以600g \times 10min离心并以 1×10^6 /mL的浓度再悬浮在SF-RPMI中。第1组大鼠不再接受进一步治疗。第2组大鼠接受局部载体并在第13天接受CTX。第3组大鼠接受局部钙三醇制剂(0.1 μ g)并在第13天接受CTX。如同上述进行局部施用。

[0443] 出生后第23天,从所有大鼠中采集血样并进行差别处理。处死患白血病的大鼠,保留没有白血病的大鼠并在第31天进行第二次差别处理,在任何时间点如果发现白血病,通过CO₂窒息处死动物。

[0444] 结果表明接受依托泊苷的组中观察到全身脱毛。相反,在用0.1 μ g钙三醇治疗6小时的大鼠中,所有动物中观察到部分局部保护。在接受0.3 μ g钙三醇的组中,实现全身保护。

参见图20A和20B。

[0445] 在接受环磷酰胺的大鼠中,对照大鼠变得完全脱毛,而接受0.1 μ g钙三醇的大鼠获得与依托泊苷组观察到的类似保护。类似地,施用0.3 μ g钙三醇导致环磷酰胺治疗大鼠的全身保护。参见图21。采用其他化疗或联合化疗法的类似结果显示于图22A、22B、22C和23中。

[0446] 在移植绿色白血病的大鼠的单独实验中,初步结果显示局部施用钙三醇不保护癌细胞免受环磷酰胺的作用。参见图24。

[0447] 总之,用主题制剂中的钙三醇预处理提供对抗CIA的保护而不保护癌细胞。局部钙三醇以剂量依赖性方式预防由单一化疗以及联合化疗引起的CIA。另外,局部钙三醇预防CIA,而不保护癌细胞免受化疗的细胞毒作用。

[0448] 实施例10:接受多种化疗法的绿色白血病大鼠中局部钙三醇的CIA保护

[0449] 该研究验证局部钙三醇溶液对多进程化疗引起脱发的动物模型的保护作用。用于该研究的大鼠携带MIAC51,一种由胃灌注20-甲基胆蒎然后将绿色白血病细胞注射入大鼠幼仔而发展的大鼠绿色白血病细胞系。MIAC51细胞系引起恶性粒细胞性白血病,具有人绿色白血病的特征(白血病、白血病腹水和绿色白血病形成)。参见Jimenez等,Science238:1278-1280(1987)。

[0450] 迄今为止,还没有有效的体外或非脊椎动物模型来测试化疗引起的脱发(CIA)。在最常用的模型中,由Jimenez等开发的新生大鼠显示与人的直接相关性(Int J Cancer 1996;65:97-103,以引用方式合并于此)。随后,开发了第二生长期阶段可通过修剪毛发诱导的大鼠模型,从而可测试多进程化疗。该模型可用于测试频繁使用的脱发化疗,包括环磷酰胺、多柔比星、紫杉醇、依托泊苷和阿糖胞苷及其组合。

[0451] 当测试化疗引起的脱发的保护剂时,首先确定测试制品是否将保护毛囊以及保护癌细胞免受化疗和/或干扰治疗。由Jimenez等开发的白血病的新生大鼠模型提供同时测试维生素D化合物对白血病的发展、治疗白血病、与化疗剂潜在的相互作用的任何效应,以及维生素D化合物对预防化疗引起的脱发的效应的时机。该模型也回答了测试试剂在同一动物中的多次循环是否会导致多次保护毛囊。另外,通过采用加颜色的Long Evans大鼠,该研究也允许确定测试试剂是否保护毛色。

[0452] 钙三醇制剂是透明无水液体,其在包含USP级丙二醇(40%w/)和无水乙醇,200proof(60%w/w)的载体中含有USP级钙三醇。这些研究中的钙三醇的浓度为约0.2 μ g/100 μ L(2 μ g/mL)。在冰上接受测试制品,并一经获得立即储存在4-5 $^{\circ}$ C。然后将批次再分成4.5mL试管,同时保持在冰上。因为动物组不会小于40/变量,各4.5mL单位的测试制品将在4-5 $^{\circ}$ C下包装在聚丙烯管中,加上批号。测试制品的4.5mL试管将保持在暗箱中,仅从冰箱中取出每一实验所需的量。包装在4.5mL试管中的测试制品的样品将以定时间隔测试,以确定钙三醇水平。在实验时,试管将保持在冰上,同时治疗大鼠。

[0453] 载体由USP级丙二醇(40%w/w)和USP级无水和未变性无水乙醇,200proof(60%w/w)组成。在实验时,如同测试制品一样准确处理对照载体。

[0454] 测定测试制品和载体本身。各测试组由该研究统计学显著的40只动物组成。该数目包括模型损耗,并考虑减少动物数目的任何不测事件。当动物5天大时,用MIAC51注射所有动物。测试五(5)次化疗法:环磷酰胺、环磷酰胺/多柔比星、环磷酰胺/多柔比星/阿糖胞苷、环磷酰胺/紫杉醇/依托泊苷和多柔比星//紫杉醇/依托泊苷。测试组是:不进行化疗、单

独化疗、化疗+载体、化疗+测试制品=160只动物/每次化疗法。因此,所使用动物的最终估计数目如下:5种联合化疗法×160只动物=800幼仔/大鼠。对于采用第二生长期阶段成年大鼠模型的实验,仅使用没有癌症的动物(例如,在化疗后存活的那些),而处死有着早期白血病迹象的动物。

[0455] Shay's绿色白血病MIAC51细胞系的培养:如之前所述,在37℃下在具有100%湿度的5%CO₂孵化器中培养MIAC51(Science 1987;238:1278-80)。细胞在非组织培养物处理的烧瓶(Falcon)中在添加L-谷氨酰胺和10%胎牛血清(Gibco Invitrogen,Carlsbad,CA)的RPMI1640培养基(Gibco Invitrogen,Carlsbad,CA)中生长。将细胞注入动物之前,使它们生长至50%融合并收集在锥形管中。然后在室温下以600g离心细胞10分钟,并以不含胎牛血清的RPMI 1640中 1×10^6 的浓度再悬浮。然后在无菌条件下将细胞悬液转移到29量规(ga).1/2cc胰岛素注射器中。

[0456] 注射MIAC51:注射MIAC51时所有幼仔都是五天大,并用手控制住。轻轻拉出右腿,用酒精药签清洁该区域。然后腹膜内注入MIAC51。注射器中的针头、针筒和细胞是无菌的,且新的注射器用于各次注射。白血病的早期迹象的发展通常在第21-33天观察到。因此,在第23和31天进行血涂片。在第31天仅剃去没有癌症的动物的毛发,而处死其余动物。

[0457] 在新生大鼠的第一生长期阶段施用测试制品和对照制品:在各窝大鼠的约2cm²的头和颈部区域局部施用载体或测试制品。对于5和6天大的大鼠,以4等分的25μL分四次施用100μL,以考虑其较小尺寸。以校准的微量移液管用200μL的无菌尖端施用测试制品或载体。一旦测试制品或载体滴在头的表面上,用戴手套的手指将其擦入直到全部吸收。然后立即将另一等分试样施用在头上,重复该过程,直到施用完100μL总测试制品或载体。对于7、8、9和10天大的动物,施用50μL的等分试样,施用两次。在年龄较大的动物中,可以以一次剂量施用100μL。测试制品的施用施加在头和颈部,并用耐溶剂的腈手套用右食指擦入10秒。该施用法的原理是对于不同年龄,饱和速率可能不同,且测试制品或载体的递送也可能不同。一旦溶液完全渗透入皮肤,将幼仔单独装在专门设计有单独小室的笼中6小时。然后用温和的实验室洗手皂(Soft-Cide EC,VWR international)洗涤幼仔,并用纸巾小心擦干。

[0458] 在新生大鼠的第一生长期阶段施用化疗剂:四十只幼仔各自接受化疗法,40只各自接受化疗法和测试制品,40只各自接受化疗法和载体。作为对照,40只动物不接受化疗。获得各窝的平均重量并用于制备适当浓度的化疗剂。采用29ga.1/2cc胰岛素注射器根据动物重量以约100μL的体积腹膜内注入化疗剂。当注射时,轻轻拉出各幼仔的右腿并用酒精药签清洁该区域。

[0459] 在成年大鼠的第二生长期阶段施用测试制品和对照制品:用手控制在第31天根据血涂片的血液学分析证实没有患上癌症的存活大鼠,并剃去头和颈部区域的毛发(2-3cm²)。九天后,当大鼠为40天大到45天大(包括端点)时,将载体或测试制品施用于头和颈部区域。以一次剂量将100μL的量施用于头和颈部,并用耐溶剂的腈手套用右食指擦入10秒。一旦溶液完全渗透入皮肤,将单个大鼠单独装在笼中。然后用温和的实验室洗手皂(Soft-Cide EC,VWR international)洗涤大鼠,并用纸巾小心擦干。

[0460] 在成年大鼠的第二生长期阶段施用化疗剂:各组接受5种不同的化疗法中的一种,对于接受联合阿糖胞苷的组别在第47天开始并在第53天结束。获得平均重量并用于制备适当浓度的化疗剂。采用29ga.1/2cc胰岛素注射器根据动物重量以约100μL的体积腹膜内注

入化疗剂。对于施用化疗剂,用手控制大鼠,不使用麻醉。用酒精药签清洁注射区域。

[0461] 施用途径:测试制品和载体经皮施用。化疗剂腹膜内注射。

[0462] 施用的频率和持续时间以及剂量水平和体积:对于第一和第二生长期周期,每天施用测试制品和载体,施用6天。测试制品在丙二醇/乙醇中含有浓度为2 μ g/mL的钙三醇,载体仅含有丙二醇/乙醇载体。基于重量以约100 μ L的体积腹膜内施用化疗剂。

[0463] 目视观察和脱发等级:总(头和颈)或全身脱发采用以下等级分级:0=没有脱发;1+=0-25%脱发;2+=25-50%脱发;3+=50-75%脱发;4+=75-100%脱发。每天采用目视观察等级来分级脱发,同时进行常规笼子观察。另外,一旦全部窝或成年大鼠脱落毛发,该规模补充了摄像文件。

[0464] 实施例11:真皮吸收研究:在Gottingen微型猪®中局部施用钙三醇溶液并体外量化猪皮肤中的钙三醇

[0465] 猪经常用于涉及经皮途径递送的毒性研究,因为猪皮肤非常类似于人皮肤。因此,该研究中采用猪来评估经皮施用7天后钙三醇局部制剂在Gottingen微型猪®中的真皮耐受性和真皮渗透性。

[0466] 以0(安慰剂)、1、3、10和30 μ g/mL的剂量浓度在五个单独的施用部位将测试制品和安慰剂制品施用于三只雌性和三只雌性Gottingen微型猪®的一个治疗组。分别以0(安慰剂)和100 μ g/mL的剂量浓度在两个单独的使用部位将测试制品或安慰剂制品施用于一只雄性微型猪的额外治疗组。以4mg/cm²的施用量(相当于6cm \times 6cm测试区域144mg,或166 μ L的测试溶液,其含有各种浓度的活性成分和载体)施用安慰剂制品或测试制品,两组的每一施用部位每天施用两次,相隔约6小时,在研究期间持续7天。

[0467] 对所有动物每天进行两次关于发病率、死亡、损伤以及食物和水的利用度的观察。每天进行临床观察。测试前以及给药后每天进行皮肤反应的评估。测试前和结束时(第7天)测量并记录体重。测试前进行体检。在研究结束时,进行尸检并收集并保存经治疗和未经治疗的皮肤切面。进行每一皮肤部位,以及靠近经治疗部位的未经治疗的皮肤部位的显微镜检查。

[0468] 结果表明以0、1、3、10、30和100 μ g/mL的浓度将钙三醇局部制剂经皮施用于Gottingen微型猪®可以很好耐受。在存活率、临床表现、真皮刺激、体重、任何治疗部位皮肤的目视检查或显微镜检查上均没有观察到治疗的效应(数据未显示)。来自组织分布研究的数据表明在大部分角质层和表皮样品的其他部分中可检测到钙三醇,但在真皮样品中检测不到(其中有一例例外:单只雄性微型猪中施用100 μ g/mL剂量)。在该组实验中,雄性的钙三醇组织水平似乎高于雌性。在表皮中观察到最清晰的施用剂量与组织水平的相关性,其中随着钙三醇浓度从3 μ g/mL增加到100 μ g/mL,组织水平几乎线性增加。

[0469] 尤其是,以1、3、10、30和100 μ g/g的预配制浓度使用安慰剂(丙二醇(USP)和无水乙醇(未变性),200proof-U.S.,USP的40/60混合物(w/w))和钙三醇局部制剂。测试制品以纯品施用(不稀释)。安慰剂和测试制品的制剂以各自所要求的浓度分配,一天施用一次,并储存在室温下。

[0470] 总共三只雄性和三只雌性实验性naïve Gottingen微型猪®(约4到5个月大)来

源于Marshall BioResources, North Rose, New York。随后从原集群(stock colony)中运来一只额外的雄性(收到时约4.5个月大)。采用简单的随机化过程,将四只雄性和三只雌性动物(体重分别为11.75到15.55kg, 14.50到16.65kg, 随机性)分配至安慰剂组和治疗组。每天真皮施用两次安慰剂和测试制品,相隔约6小时,在研究期间持续7天。剂量浓度为0、1、3、10、30和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以4mg/cm²的施用量(相当于144mg或166 μL 的测试溶液)施用。在开始施用前(对于第1组和第2组分别为第4和第5天),采用电动剪毛机修剪施用部位的毛发。注意避免擦伤皮肤。各动物的背面被分成第1组五处施用部位和第2组两处施用部位。各施用部位约为6 \times 6cm,各部位间距至少为2cm。用玻璃搅拌棒或适当的仪器将安慰剂和测试制品制剂均匀施用在指定施用部位。在给药之前,用自来水润湿的软纸巾(即WyPall®)轻轻去除来自之前剂量的剩余测试制品。

[0471] 研究结束时,从腹部正中切口体现皮肤,收集并保存经治疗和未经治疗的皮肤切面。首先各6 \times 6cm给药部位的切面用温和的肥皂和水混合物(例如,水或等效物中的1%象牙皂)进行彻底的表面洗涤,来去除任何残余的局部测试制剂。然后用乙醇擦净经洗涤皮肤切面,并切除至(包括)脂肪层。如果待切除面积大于给药面积,则给药面积用消不去的墨水区分以描绘给药的皮肤区域。平放1.5cm \times 1.5cm切面,包在双层莎伦包装膜(或等效物)中并在液氮中快速冷冻。样品储存在-70 $^{\circ}\text{C}$ 并由快递在干冰上连夜运送,用于分析。视情况而定鉴定各皮肤切面(例如,动物鉴定、研究数目、日期等)。

[0472] 一旦到达分析场所,将皮肤切面置于不透水的塑料袋中并浮在温水(约30 $^{\circ}\text{C}$ -35 $^{\circ}\text{C}$)中融化。用蒸馏去离子水轻轻冲洗各皮肤切面以去除任何残留的测试制品和血。通过人工手术刀消融去除所有皮下组织(例如,脂肪)。在给药区域的中部内,划出四块单个1cm²圆(相同),随后鉴定各部位并记录实际面积。然后用1cm²冲头从皮肤片上切除相同的测试部位。称重皮肤切面并记录重量。剥离各相同的划界区域的角质层(Transpore™, 3M)足够多的次数(~10~20)直到大约10%-25%的区域表面显示反光。该过程去除角质层和任何残留的表面剂量。

[0473] 剥离角质层后,通过在60 $^{\circ}\text{C}$ 下加热约1-1.5分钟将皮肤分成表皮(无角质层,简称为“表皮”)和真皮。然后用精尖镊子或手术刀拨开皮肤层。称重表皮和真皮并记录重量。

[0474] 对于提取,在1mL无水乙醇(Sigma-Aldrich, USP/NF级别)中提取所有皮肤样品。在5mL乙腈(EMD, HPLC级别)中提取剥离的条带。所有提取在室温下进行约24小时。通过真空离心干燥500 μL 量的剥离的条带提取物并在100 μL 无水乙腈中重构。也干燥表皮提取物并在100 μL 的80:20乙醇:水中重构。

[0475] 通过反向高效液相色谱(HPLC)和紫外和质谱检测仪量化钙三醇。检测下限估计为0.4ng/mL。

[0476] 从角质层(剥离的条带)、表皮和真皮中量化的钙三醇的结果概括在表11-1到11-4。图25A和25B分别说明角质层和表皮中的水平,图26说明仅雄性中的表皮水平。角质层数据以两种不同的单位提供,用ng/cm²来反映随样品面积变化的剥离的角质层样品中回收的钙三醇的量,并以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 组织来估计。然而,以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 报告的浓度通过分离层之前的差别的总样品重量减去样品的表皮和真皮的重量(而不是实际重量,由于其粘至剥离的角质层上)来确定。表皮和真皮样品以组织浓度(ng/mg)报告,采用样品除以表层的实际湿重测定的量。

[0477] 表11-1动物的回收的钙三醇的角质层(ng/cm²)平均值 \pm SD(n=动物数[重复4次/

动物))

[0478]

治疗	雄性微型猪	雌性微型猪
未经治疗	0±0* (1)	na
安慰剂	30.2±35.0 (4)	0±0 (3)
1μg/mL	56.1±17.4 (3)	0.76±1.3 (3)
3μg/mL	62.4±7.91 (3)	1.12±1.49 (3)
10μg/mL	59.6±14.1 (3)	1.65±1.80 (3)
30μg/mL	54.6±32.5 (3)	20.2±11.7 (3)
100μg/mL	118.1±11.4 (1)	na

[0479]

• 0表示结果低于检测限

[0480]

• na=不适用

[0481]

表11-2估计的回收的钙三醇的角质层 (ng/mg) 平均值±SD (n=动物数[重复4次/动物))

[0482]

治疗	雄性微型猪	雌性微型猪
未经治疗	0±0* (1)	na
安慰剂	0.92±1.07 (4)	0±0 (3)
1μg/mL	1.54±0.79 (3)	0.03±0.05 (3)
3μg/mL	1.63±0.25 (3)	0.04±0.06 (3)
10μg/mL	2.02±0.39 (3)	0.05±0.04 (3)
30μg/mL	1.51±0.89 (3)	0.64±0.37 (3)
100μg/mL	4.52±1.21 (1)	na

[0483]

• 0表示结果低于检测限

[0484]

• na=不适用

[0485]

表11-3回收的钙三醇的表皮 (ng/mg) 平均值±SD (n=动物数[重复4次/动物))

[0486]

治疗	雄性微型猪	雌性微型猪
未经治疗	0±0* (1)	na
安慰剂	0.12±0.23 (4)	0±0 (3)
1μg/mL	0.16±0.28 (3)	0±0 (3)
3μg/mL	0.14±0.23 (3)	0±0 (3)
10μg/mL	0.23±0.20 (3)	0.02±0.04 (3)
30μg/mL	0.38±0.33 (3)	0.34±0.24 (3)
100μg/mL	2.09±1.0 (1)	na

[0487]

• 0表示结果低于检测限

[0488]

• na=不适用

[0489]

表11-4回收的钙三醇的真皮 (ng/mg) 平均值±SD (n=动物数[重复4次/动物))

[0490]

治疗	雄性微型猪	雌性微型猪
未经治疗	0.08±0.01 (1)	na
安慰剂	0.02±0.03 (4)	0±0* (3)

1μg/mL	0±0 (3)	0±0 (3)
3μg/mL	0±0 (3)	0±0 (3)
10μg/mL	0±0 (3)	0±0 (3)
30μg/mL	0±0 (3)	0±0 (3)
100μg/mL	0.13±0.04 (1)	na

[0491] • 0表示结果低于检测限

[0492] • na=不适用

[0493] 数据表明,在大部分角质层和表皮样品中可检测到钙三醇,但在真皮样品中检测不到(其中有一例例外:单只雄性微型猪中施用100μg/mL剂量)。这与实施例1中描述的Franz人皮肤有限模型获得的结果一致。

[0494] 所评估的组织样品之中,通常,雄性微型猪的钙三醇组织水平似乎大于雌性微型猪。

[0495] 在角质层中观察到钙三醇的最高浓度。尽管角质层含量是估计值,其较高浓度可以反映钙三醇深入皮肤气孔的存在,其不能被表面洗涤过程去除,或可归因于钙三醇在亲脂性极强的角质层基质中的溶解性。

[0496] 然而,在表皮中观察到最清晰的施用剂量与组织水平的相关性,其中随着钙三醇浓度从3μg/mL增加到100μg/mL,组织水平几乎线性增加。

[0497] 实施例12:接受多进程化疗的绿色白血病大鼠中的局部溶液研究

[0498] 收到时Long Evans大鼠(Harlan Laboratories, Inc)为3天大。收到时和每天用电子秤(American Scientific Products TL 410s)获得动物重量,直到实验结束。实验开始之前收容大鼠两天。然后随机将动物分成四组。所有大鼠接受如下所述的MIAC51。

[0499] 第1组(n=27)不接受进一步治疗。

[0500] 第2组(n=40)仅接受化疗剂。

[0501] 第3组(n=40)接受化疗剂和如下描述的局部载体。

[0502] 第4组(n=40)接受化疗剂和局部钙三醇。

[0503] 治疗从出生后第6天开始。将0.1mL量的局部钙三醇施用于大鼠的头和颈上。对于第一生长期周期,在第6和7天,以25μl体积施用载体或钙三醇四次,以避免饱和。在第8、9、10和11天施用50μl体积两次。对于第二生长期周期,在第40到45天用0.1mL的载体或钙三醇每天治疗大鼠。对于每次施用,需要在2cm²区域中用腓检查手套覆盖的右食指擦入10秒。治疗完成后,各大鼠各自分开6小时。随后用温和洗手皂(Soft CIDE-EC from VWR International)和蒸馏水洗涤各大鼠的头和颈。然后将幼仔放回它们的母亲身边并送回动物室。对于第二生长期周期,将成年大鼠放回装有它们的同窝幼仔的笼中并送回动物室。

[0504] 出生后第5天所有大鼠腹膜内接受0.1ml不含血清(SF)RPMI中的1x10⁵MIAC51。在37℃下在5%CO₂,100%湿度孵化器中在添加L-谷氨酰胺和10%胎牛血清的RPMI1640中培养MIAC51。当细胞生长到50%融合时(1.5×10⁶mL),将其收集在50mL锥形管中,在室温下以600g离心10min并在注射前以1×10⁶/mL的浓度再悬浮在SF-RPMI中。

[0505] 出生后第23天,从所述大鼠中采集血样并进行差别处理。处死患上白血病的大鼠,没有白血病的大鼠用于下一步实验。在第31天进行第二次差别处理,处死白血病动物。存活动物剃去2cm²区域,然后施用第二组载体或钙三醇治疗,并在15天后施用第二进程的化疗。

在第二和第一生长期阶段,化疗剂治疗后十天记录脱发。

[0506] 各大鼠脱发程度通过以下等级来确定:

[0507] 0=没有脱发;

[0508] 1+=0-25%脱发;

[0509] 2+=25-50%脱发;

[0510] 3+=50-75%脱发;

[0511] 4+=75-100%脱发。

[0512] 实验化合物:

[0513] 用载体(40%重量的丙二醇和60%重量的无水200proof乙醇)将2.3 μ g/g的钙三醇稀释到2 μ g/ml的最终浓度。再分1mL的小瓶并保存在4℃的冰箱中。对于各实验,在实验过程期间取出一瓶2.3 μ g/g钙三醇和载体并放置在冰上。去掉不用的制剂。

[0514] A. 仅环磷酰胺

[0515] 施用化疗剂

[0516] 幼年大鼠:第13天,用 $\frac{1}{2}$ cc胰岛素注射器29G $\frac{1}{2}$ " (B-D)使所有大鼠腹膜内接受总体积为0.1mL的H₂O/甘露醇混合物中的环磷酰胺(CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131) 37.5mg/kg。

[0517] 成年大鼠:对于化疗的第二进程,用 $\frac{1}{2}$ cc胰岛素注射器29G $\frac{1}{2}$ " (B-D)将总体积为0.1mL的H₂O/甘露醇混合物中的150mg/kg环磷酰胺腹膜内施用于47天大的麻醉大鼠(50mg/kg氯胺酮/5mg/kg赛拉嗪)。

[0518] 结果见表12-1和12-2。具体地,在第一轮化疗后(表12-1和图27),仅接受环磷酰胺或环磷酰胺加载体的所有大鼠具有严重脱发(+4)。相反,接受环磷酰胺加钙三醇的所有大鼠不显示任何脱发迹象,与对照组类似。在第二轮化疗后获得类似结果,如表12-2所示(也参见图28)。

[0519] 表12-1:用环磷酰胺(CTX)治疗的大鼠在第一轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别 p 值	
	0	1+	2+	3+	4+	总计		
[0520] 1. 对照 (不含化疗剂)	27					27	1 vs 2	p<0.01
2. CTX					40	40	1 vs 3	p<0.01
3. CTX + 载体					40	40	1 vs 4	p=1.000
4. CTX + 钙三醇	40					40	3 vs 4	p<0.01

[0521] 表12-2:用环磷酰胺(CTX)治疗的大鼠在第二轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别 p 值	
	0	1+	2+	3+	4+	总计		
[0522] 2. 仅 CTX					8	8	2 vs 3	p=1.000
3. CTX + 载体					9	9	2 vs 4	p<0.01
4. CTX + 钙三醇		10				10	3 vs 4	p<0.01

[0523] 此外,该实验表明接受钙三醇的局部制剂的大鼠的存活率基本上类似于仅接受化疗或化疗加载体的大鼠。如表12-3所示,用环磷酰胺和钙三醇的局部制剂治疗的动物的存活率(25%)类似于仅用环磷酰胺治疗的大鼠(20%)和用环磷酰胺和载体治疗的大鼠(23%)。

[0524] 表12-3:用环磷酰胺 (CTX) 治疗的大鼠在两轮化疗后的存活率

组别				组别 /p 值	
	治愈	%	总计		
1. 对照 (不含化疗剂)	0	0	27		
[0525] 2. CTX	8	20	40	1 vs 2 p < 0.01	2 vs 3 p = 0.7846
3. CTX + 载体	9	23	40	1 vs 3 p < 0.01	2 vs 4 p = 0.5923
4. CTX + 钙三醇	10	25	40	1 vs 4 p < 0.01	3 vs 4 p = 0.7927
总计	27	18	147		

[0526] 总之,在环磷酰胺组中,钙三醇在两个周期中均提供100%的CIA保护,且干扰20-25%范围内的治愈率。

[0527] B. 环磷酰胺和多柔比星

[0528] 施用化疗剂

[0529] 幼年大鼠:第13天,用1/2cc胰岛素注射器29G1/2" (B-D) 使所有大鼠腹膜内接受总体积为0.1mL的H₂O/甘露醇混合物中的环磷酰胺 (CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131) 37.5mg/kg。第13、14和15天,大鼠I.P.接受0.1mL蒸馏水中的2.5mg/kg盐酸多柔比星 (Sigma Aldrich, Lot#038k1349) (ADM)。

[0530] 成年大鼠:对于化疗的第二进程,在第47天用1/2cc胰岛素注射器29G1/2" (B-D) 将总体积为0.1mL的H₂O/甘露醇混合物中的150mg/kg环磷酰胺腹膜内施用于麻醉大鼠 (50mg/kg氯胺酮/5mg/kg赛拉嗪)。对于化疗的第二进程,如上所述,第47到49天大鼠接受20mg/kg ADM。

[0531] 结果见表12-4和12-5。具体地,在第一轮化疗后 (表12-4和图29),仅接受环磷酰胺和多柔比星或环磷酰胺和多柔比星加载体的所有大鼠具有严重脱发 (+4)。相反,接受环磷酰胺和多柔比星加钙三醇的所有大鼠不显示任何脱发迹象,与对照组类似。在第二轮化疗后获得类似结果,如表12-5所示 (也参见图30)。

[0532] 表12-4:用环磷酰胺 (CTX) 和多柔比星 (ADM) 治疗的大鼠在第一轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别 /p 值	
	0	1+	2+	3+	4+	总计		
1. 对照 (不含化疗剂)	40					40	1 vs 2 p < 0.01	2 vs 3 p = 1.000
[0533] 2. CTX + ADM					40	40	1 vs 3 p < 0.01	2 vs 4 p < 0.01
3. CTX + ADM + 载体 Car					40	40	1 vs 4 p = 1.000	3 vs 4 p < 0.01
4. CTX + ADM + 钙三醇	40					40		

[0534] 表12-5:用环磷酰胺 (CTX) 和多柔比星 (ADM) 治疗的大鼠在第二轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别 /p 值	
	0	1+	2+	3+	4+	总计		
[0535] 2. CTX + ADM					21	21	2 vs 3 p = 1.000	
3. CTX + ADM + 载体					22	22	2 vs 4 p < 0.01	
4. CTX + ADM + 钙三醇	20					20	3 vs 4 p < 0.01	

[0536] 此外,该实验表明接受钙三醇的局部制剂的大鼠的存活率基本上类似于仅接受化

疗或化疗加载体的大鼠。如表12-6所示,用环磷酰胺和多柔比星加钙三醇的局部制剂治疗的动物的存活率(50%)类似于仅用化疗治疗的大鼠(53%)和用化疗加载体治疗的大鼠(55%)。

[0537] 表12-6:用环磷酰胺 (CTX) 和多柔比星 (ADM) 治疗的大鼠在两轮化疗后的存活率

组别				组别 /p 值	
	治愈	%	总计		
1. 对照 (不含化疗剂)	0	0	40		
[0538] 2. CTX + ADM	21	53	40	1 vs 2 p < 0.01	2 vs 3 p = 0.8225
3. CTX + ADM + 载体	22	55	40	1 vs 3 p < 0.01	2 vs 4 p = 0.8230
4. CTX + ADM + 钙三醇	20	50	40	1 vs 4 p < 0.01	3 vs 4 p = 0.9336
总计	63	39	160		

[0539] 总之,在环磷酰胺和多柔比星组中,钙三醇在两个周期中均提供100%的CIA保护,且干扰50-55%范围内的治愈率。

[0540] C.环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷

[0541] 施用化疗剂

[0542] 幼年大鼠:第13天,用1/2cc胰岛素注射器29G1/2” (B-D) 使所有大鼠腹膜内接受总体积为0.1mL的H₂O/甘露醇混合物中的环磷酰胺 (CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131) 30mg/kg。第13、14和15天,大鼠腹膜内接受0.1mL蒸馏水中的2.0mg/kg盐酸多柔比星 (Sigma Aldrich, Lot#038k1349) (ADM),第13-19天,大鼠接受50mg/kg阿糖胞苷。

[0543] 成年大鼠:对于化疗的第二进程,将100mg/kg环磷酰胺施用于麻醉大鼠 (50mg/kg氯胺酮/5mg/kg赛拉唑) 持续1天,施用20mg/kg多柔比星持续3天且施用100mg/kg阿糖胞苷持续7天。

[0544] 结果见表12-7和12-8。具体地,在第一轮化疗后(表12-7和图31),仅接受环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷或环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷加载体的所有大鼠具有严重脱发(+4)。相反,接受环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷加钙三醇的所有大鼠不显示任何脱发迹象,与对照组类似。在第二轮化疗后获得类似结果,如表12-8所示(也参见图32)。

[0545] 表12-7:用环磷酰胺 (CTX)、多柔比星 (ADM) 和阿糖胞苷 (ARA-C) 治疗的大鼠在第一轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别 /p 值	
	0	1+	2+	3+	4+	总计		
1. 对照 (不含化疗剂)	40					40	1 vs 2 p < 0.01	2 vs 3 p = 1.000
[0546] 2. CTX + ADM + ARA-C					40	40	1 vs 3 p < 0.01	2 vs 4 p < 0.01
3. CTX + ADM + ARA-C + 载体					40	40	1 vs 4 p = 1.000	3 vs 4 p < 0.01
4. CTX + ADM + ARA-C + 钙三醇	40					40		

[0547] 表12-8:用环磷酰胺 (CTX)、多柔比星 (ADM) 和阿糖胞苷 (ARA-C) 治疗的大鼠在第二轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别 /p 值
	0	1+	2+	3+	4+	总计	
[0548] 2. CTX + ADM + ARA-C					32	32	2 vs 3 p= 1.0000
3. CTX + ADM + ARA-C + 载体					30	30	2 vs 4 p<0.01
4. CTX + ADM + ARA-C + 钙三醇	31					31	3 vs 4 p<0.01

[0549] 此外,该实验表明接受钙三醇的局部制剂的大鼠的存活率基本上类似于仅接受化疗或化疗加载体的大鼠。如表12-9所示,用环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷加钙三醇的局部制剂治疗的动物的存活率(78%)类似于仅用化疗治疗的大鼠(80%)和用化疗加载体治疗的大鼠(75%)。

[0550] 表12-9:用环磷酰胺(CTX)、多柔比星(ADM)和阿糖胞苷(ARA-C)治疗的大鼠在两轮化疗后的存活率

组别	治愈 % 总计			组别 /p 值	
	治愈	%	总计	组别 /p 值	组别 /p 值
1. 对照 (不含化疗剂)	0	0	40		
[0551] 2. CTX + ADM + ARA-C	32	80	40	1 vs 2 p < 0.01	2 vs 3 p= 0.5923
3. CTX + ADM + ARA-C + 载体	30	75	40	1 vs 3 p < 0.01	2 vs 4 p= 0.5501
4. CTX + ADM + ARA-C + 钙三醇	31	78	40	1 vs 4 p < 0.01	3 vs 4 p= 0.7927
总计	93	58	160		

[0552] 总之,在环磷酰胺、多柔比星和阿糖胞苷组中,钙三醇在两个周期中均提供100%的CIA保护,且干扰75-80%范围内的治愈率。

[0553] D. 环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷

[0554] 施用化疗剂

[0555] 幼年大鼠:第13天,用1/2cc胰岛素注射器29G1/2" (B-D) 使所有大鼠腹膜内接受总体积为0.1mL的H₂O/甘露醇混合物中的环磷酰胺(CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131) 37.5mg/kg。第11-13天,大鼠同时接受0.1mL二甲亚砜(Sigma Aldrich, Lot#078K1428) 中的2.5mg/kg紫杉醇(Taxol) 和在特定溶剂(参见标准操作程序) 和HBSS中稀释的1.5mg/kg依托泊苷(VP-16) (Sigma Aldrich, Lot#047K1162)。

[0556] 成年大鼠:对于化疗的第二进程,在第47天用1/2cc胰岛素注射器29G1/2" (B-D) 将总体积为0.1mL的H₂O/甘露醇混合物中的150mg/kg环磷酰胺腹膜内施用于麻醉大鼠(50mg/kg氯胺酮/5mg/kg赛拉嗪)。对于化疗的第二进程,如上所述,第45到48天大鼠接受10mg/kg紫杉醇和15mg/kg VP-16。

[0557] 结果见表12-10和12-11。具体地,在第一轮化疗后(表12-10和图33),仅接受环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷或环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷加载体的所有大鼠具有严重脱发(+4)。相反,接受环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷加钙三醇的所有大鼠不显示任何脱发迹象,与对照组类似。在第二轮化疗后获得类似结果,如表12-11所示(也参见图34)。

[0558] 表12-10:用环磷酰胺(CTX)、紫杉醇和依托泊苷治疗的大鼠在第一轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别/p 值	组别/p 值
	0	1+	2+	3+	4+	总计		
[0559] 1. 对照 (不含化疗剂)	40					40	1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p=1.000
2. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷					40	40	1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p<0.01
3. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷+ 载体					40	40	1 vs 4 p=1.000	3 vs 4 p<0.01
4. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷+ 钙三醇	40					40		

[0560] 表12-11:用环磷酰胺 (CTX)、紫杉醇和依托泊苷治疗的大鼠在第二轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别/p 值
	0	1+	2+	3+	4+	总计	
[0561] 2. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷						33	2 vs 3 p=1.0000
3. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷+ 载体						31	2 vs 4 p<0.01
4. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷+ 钙三醇						33	3 vs 4 p<0.01

[0562] 此外,该实验表明接受钙三醇的局部制剂的大鼠的存活率基本上类似于仅接受化疗或化疗加载体的大鼠。如表12-12所示,用环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷加钙三醇的局部制剂治疗的动物的存活率 (83%) 类似于仅用化疗治疗的大鼠 (83%) 和用化疗加载体治疗的大鼠 (78%)。

[0563] 表12-12:用环磷酰胺 (CTX)、紫杉醇和依托泊苷治疗的大鼠在两轮化疗后的存活率

组别	治愈 %			总计	组别/p 值	组别/p 值
	治愈	%				
[0564] 1. 对照 (不含化疗剂)	0	0		40		
2. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷	33	83		40	1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p=0.5762
3. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷+ 载体	31	78		40	1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p=1.000
4. CTX+ 紫杉醇+ 依托泊苷+ 钙三醇	33	83		40	1 vs 4 p<0.01	3 vs 4 p=0.5762

[0565] 总之,在环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷组中,钙三醇在两个周期中均提供100%的CIA保护,且干扰78-83%范围内的治愈率。

[0566] E. 多柔比星、紫杉醇和依托泊苷

[0567] 施用化疗剂

[0568] 幼年大鼠:第13-15天,用1/2cc胰岛素注射器29G1/2" (B-D) 使所有大鼠腹膜内接受总体积为0.1mL的蒸馏水中的盐酸多柔比星 (Sigma Aldrich, Lot#038k1349) (ADM) 2.5mg/kg。同时,大鼠接受2.5mg/kg紫杉醇 (Taxol) (Sigma Aldrich, Lot#078k1428) 和1.5mg/kg依托泊苷 (VP-16) (Sigma Aldrich, Lot#047K1162)。

[0569] 成年大鼠:对于化疗的第二进程,在第47-49天用1/2cc胰岛素注射器29G1/2" (B-D) 将总体积为0.1mL的上述化疗剂腹膜内施用于麻醉大鼠 (50mg/kg氯胺酮/5mg/kg赛拉嗪)。第二进程的剂量如下:20mg/kg ADM, 10mg/kg紫杉醇和15mg/kg VP-16。

[0570] 结果见表12-12和12-14。具体地,在第一轮化疗后 (表12-13和图35), 仅接受多柔比星、紫杉醇和依托泊苷或多柔比星、紫杉醇和依托泊苷加载体的所有大鼠具有严重脱发 (+4)。相反,接受多柔比星、紫杉醇和依托泊苷加钙三醇的所有大鼠不显示任何脱发迹象,与对照组类似。在第二轮化疗后获得类似结果,如表12-14所示 (也参见图36)。

[0571] 表12-13:用多柔比星 (ADM)、紫杉醇和依托泊苷治疗的大鼠在第一轮化疗后的脱

发程度

组别	脱发						组别 /p 值	组别 /p 值
	0	1+	2+	3+	4+	总计		
1. 对照（不含化疗剂）	40					40	1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p= 1.000
2. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷					40	40	1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p<0.01
3. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷 + 载体					40	40	1 vs 4 p= 1.000	3 vs 4 p<0.01
4. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷 + 钙三醇	40					40		

[0573] 表12-14：用多柔比星 (ADM)、紫杉醇和依托泊苷治疗的大鼠在第二轮化疗后的脱发程度

组别	脱发						组别 /p 值
	0	1+	2+	3+	4+	总计	
2. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷						32 32	2 vs 3 p= 1.0000
3. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷 + 载体						33 33	2 vs 4 p<0.01
4. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷 + 钙三醇					32	32	3 vs 4 p<0.01

[0575] 此外,该实验表明接受钙三醇的局部制剂的大鼠的存活率基本上类似于仅接受化疗或化疗加载体的大鼠。如表12-15所示,用多柔比星、紫杉醇和依托泊苷加钙三醇的局部制剂治疗的动物的存活率 (80%) 类似于仅用化疗治疗的大鼠 (80%) 和用化疗加载体治疗的大鼠 (83%)。

[0576] 表12-15：用多柔比星 (ADM)、紫杉醇和依托泊苷治疗的大鼠在两轮化疗后的存活率

组别	治愈 %			总计	组别 /p 值	组别 /p 值
	0	1	2			
1. 对照（不含化疗剂）	0	0		40		
2. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷	32	80		40	1 vs 2 p < 0.01	2 vs 3 p= 0.7745
3. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷 + 载体	33	83		40	1 vs 3 p < 0.01	2 vs 4 p= 0.1000
4. ADM + 紫杉醇 + 依托泊苷 + 钙三醇	32	80		40	1 vs 4 p < 0.01	3 vs 4 p= 0.7745

[0578] 总之,在多柔比星、紫杉醇和依托泊苷组中,钙三醇在两个周期中均提供100%的CIA保护,且干扰80-83%范围内的治愈率。

[0579] 实施例13:Gottingen微型猪®中局部钙三醇的4周经皮毒性研究

[0580] 对照、载体和测试制品的制备:新鲜对照制品:分配USP注射用0.9%氯化钠用于每周研究并冷藏。载体,即丙二醇的40/60重量混合物 (w/w), USP和乙醇 (未变性,无水) 200Proof USP,和包含比重为0.875的钙三醇 (USP) 的测试制品按收到的原样使用,不调节纯度。所收到的测试制品的浓度为5.07、10.31和55.34μg/mL。测试制品以纯品施用 (不稀释)。分配载体和测试制品用于每周研究并冷藏。有时,在研究期间根据需要分配额外的测试物质。

[0581] 施用:施用前,从动物背后夹住毛发。对照动物具有两个测试部位:部位1用载体治疗,部位2用盐水治疗。各部位为450cm²,以脊柱两边分开,并用去不掉的标记在角落进行标记。平均分开对照组的两个测试部位。如有必要,再次夹住毛发。注意避免擦伤皮肤。皮肤研究期间,每天两次施用对照制品、载体和测试制品,相隔约6小时,持续4周 (连续29天)。用玻璃搅拌棒或适当的仪器将制剂均匀地施加在施用部位。在下一次给药前用自来水润湿的Wypall轻轻去除任何残留的测试物质。如有必要,用干净的干燥Wypall擦干部位。施用于所

有动物的剂量是1800mg的适当制剂。剂量浓度是5.07、10.31和55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 并以2.1mL的剂量体积施用。以与治疗组相同的方式将对照制品和载体施用于对照组。对照动物的给药体积是1.0mL载体和0.9mL盐水。由于所观察到的临床征象的严重性,接受55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的所有动物在第23天不给药。第24天所有动物恢复给药。

[0582] 结果:进行该研究来评估当每天两次经皮施用钙三醇局部溶液、持续4周时的潜在亚慢性毒性。四只动物/性别/组别的Göttingen微型猪®中的三个试验组分别以5.07、10.31和55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量浓度施用钙三醇局部溶液。四只动物/性别的一个另外组作为对照,接受载体,即丙二醇的40/60重量混合物(w/w),USP和乙醇(未变性,无水)200Proof USP,和对照制品,即USP注射用0.9%氯化钠。以450 cm^2 测试部位内4 mg/cm^2 的剂量将钙三醇局部溶液或载体经皮施用至所有组别中,一天两次,连续29天。

[0583] 对所有动物每天进行两次关于发病率、死亡、损伤以及食物和水的利用度的观察。每周进行临床观察。每周测量并记录体重。在第1周期间每次给药后进行皮肤刺激得分,然后在第2到第4周期间每周两次(第二次剂量后)进行皮肤刺激得分,记录施用部位的变化。测试前以及在最终尸检前的所有存活动物中进行眼底检查。测试前进行体检。测试前、给药前、第1天第一次给药后和最后一周给药期间进行心电图检查、测试前以及最终尸检前从所有动物中收集血样和尿样,用于临床病理学评价。在指定时间点在第1天和第27天从所有存活动物中收集血样,用于测定测试制品的血浆浓度。从测试种类的浓度-时间数据中测定测试制品的毒理动力学(TK)参数。在研究结束时进行尸检,记录器官重量并用显微镜检查选定的组织。

[0584] 在研究的第28天,处死接受55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的一只濒死雄性动物。处死前观察到该动物具有活动减少、食欲不振和震颤。该动物的发病原因被认为是接近于致死水平的高钙血水平。所有剩余的微型猪存活到研究第30天的预定结束时间。在研究的第3和第4周期间,接受55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的大部分微型猪中观察到活动减少、食欲不振、呕吐和震颤。在研究的最后一周或最后两周期间,接受55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的雄性和雌性动物中观察到轻微刺激。接受5.07和10.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 治疗的雄性和雌性动物的平均体重和体重增加与对照相当。接受55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的所有雄性和雌性动物在研究的最后两周期间失去大量体重,且该周期内雄性和雌性动物的平均体重明显降低。

[0585] 测试前和最终眼底检查时没有观察到任何动物中的眼底异常。钙三醇局部溶液不引起定性心电图异常,但在最终的给药前和给药后时间间隔内组平均心率有着轻微增加。毫无疑问,心率增加与研究期间这些微型猪的钙水平明显增加有关。定量心电图参数上没有观察到钙三醇局部溶液的其他剂量相关作用。在最终评价时雄性或雌性动物中没有观察到钙三醇局部溶液相关的血液病学、凝固或尿分析变化。在55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度观察到以下临床化学变化,最显著的是所观察到的接近致死水平的高钙水平。所观察到的另一个变化是低的氯化物值,和高胆固醇、葡萄糖、尿素氮和三酸甘油酯值。

[0586] 钙三醇局部溶液相关的宏观病理学发现局限于接受55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的一只雌性动物的胃黏膜,其由轻微的不规则表面组成。与对照相比,观察到接受55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的两种性别的动物的肾脏重量的绝对和相对增加以及胸腺重量的减少。直接的钙三醇局部溶液相关的微观发现存在于骨、肾脏、心脏、经治疗的皮肤、胸腺和甲状腺。另外,直接的钙三醇局部溶液相关的发现包括多中心的血管变化和多中心的粘膜矿化。间接的测试制品相关的

微观发现存在于胰腺。这些微观变化存在于两种性别动物中,且限于接受55.34 μ g/mL浓度剂量的动物。

[0587] 股骨、胸骨和肋骨的微观变化限于骨干皮层质骨和骨腔。它们的特征为骨营养不良和嗜碱性基质的沉淀。肾微观观察的特征为矿化、管状变性/再生和亚急性炎症。心肌层的微观观察是肌纤维矿化、亚急性炎症和血管变化。另外,一只雄性动物和一只雌性动物具有心脏矿化。观察到多中心的粘膜/上皮矿化,严重程度按照以下顺序降低:胃黏膜、肺、喉、气管、前列腺、唾液颌下腺内和膀胱内。钙三醇局部溶液相关的血管变化是普遍的,且主要影响小到中等大小的血管。它们主要在心脏和骨腔内观察到,偶尔在不同器官/体系中观察到。经治疗皮肤的微观变化的特征为表皮增生和角化过度以及真皮的血管周混合细胞炎症。胸腺、甲状腺和胰腺的微观变化的特征分别为淋巴贫化、滤泡细胞过度生长和增生以及单细胞坏死。

[0588] 在该研究基础上,以55.34 μ g/mL浓度观察到的临床化学和微观变化为基础,认为没有观察到不良反应的水平(NOEL)是10.31 μ g/mL。

[0589] 参考文献:

[0590] Diker-Cohen T,Koren R,Liberman UA,Ravid A Vitamin D protects keratinocytes from apoptosis induced by osmotic shock,oxidative stress,and tumor necrosis factor.”Ann N Y Acad Sci.2003Dec;1010:350-3.

[0591] (ClinicalTrials.gov,Mosby’s Drug Consult,第13版)。

[0592] Genever PG,Maxfield,SJ,Kennovin GD,Maltman J,Bowgen CH,Raxworthy MJ,Skerry TM.Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes.J Invest Dermatol.1999Mar;112(3):337-42.

[0593] Kiryu-Seo S,Gamo K,Tachibana T,Tanaka K,Kiyama H.Unique anti apoptotic activity of EAAClin injured motor neurons.The EMBO Journal (2006) 25, 3411-3421.

[0594] Nollen EA,Bruntsing JF,Roelofsen H,Weber La,Kampinga HH.In vivo chaperon activity of heat shock protein 70and thermotolerance.Mol Cell Biol 1999;19:2069-79.

[0595] Rocchi P,Jugpal P,SoA,Sinneman S,Ettinger S,Fazli L,Nelson C,Gleave M.Small interference RNA targeting heat shock protein 27inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase 3activation in vitro BJU Int 2006.

[0596] Marenholz I,Heizmann CW,Fritz G(2004).S100proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology(including an update of the nomenclature).Biochem.Biophys.Res.Commun.322(4):1111-22.

[0597] 所有引用的参考文献以引用方式合并。

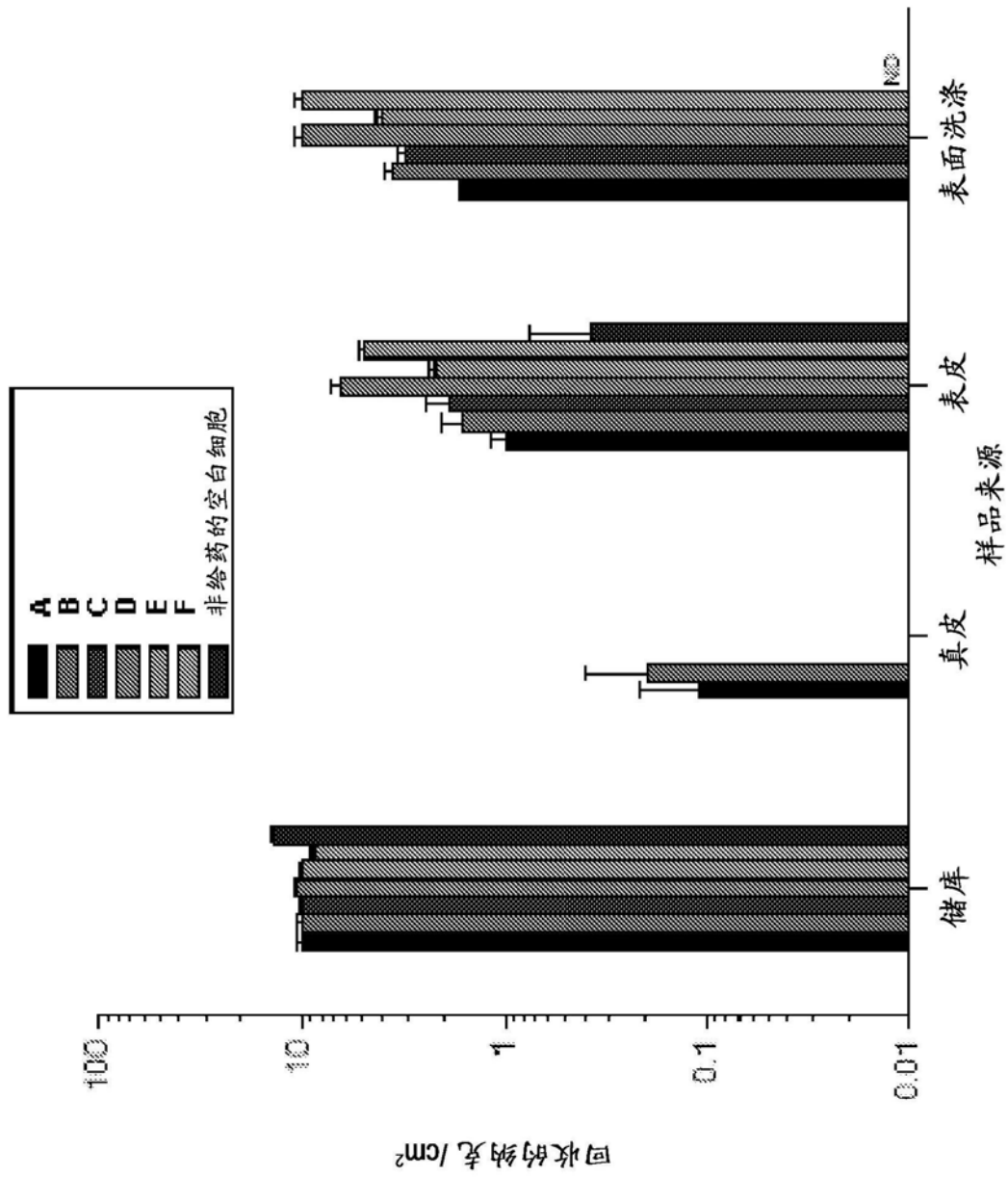


图1

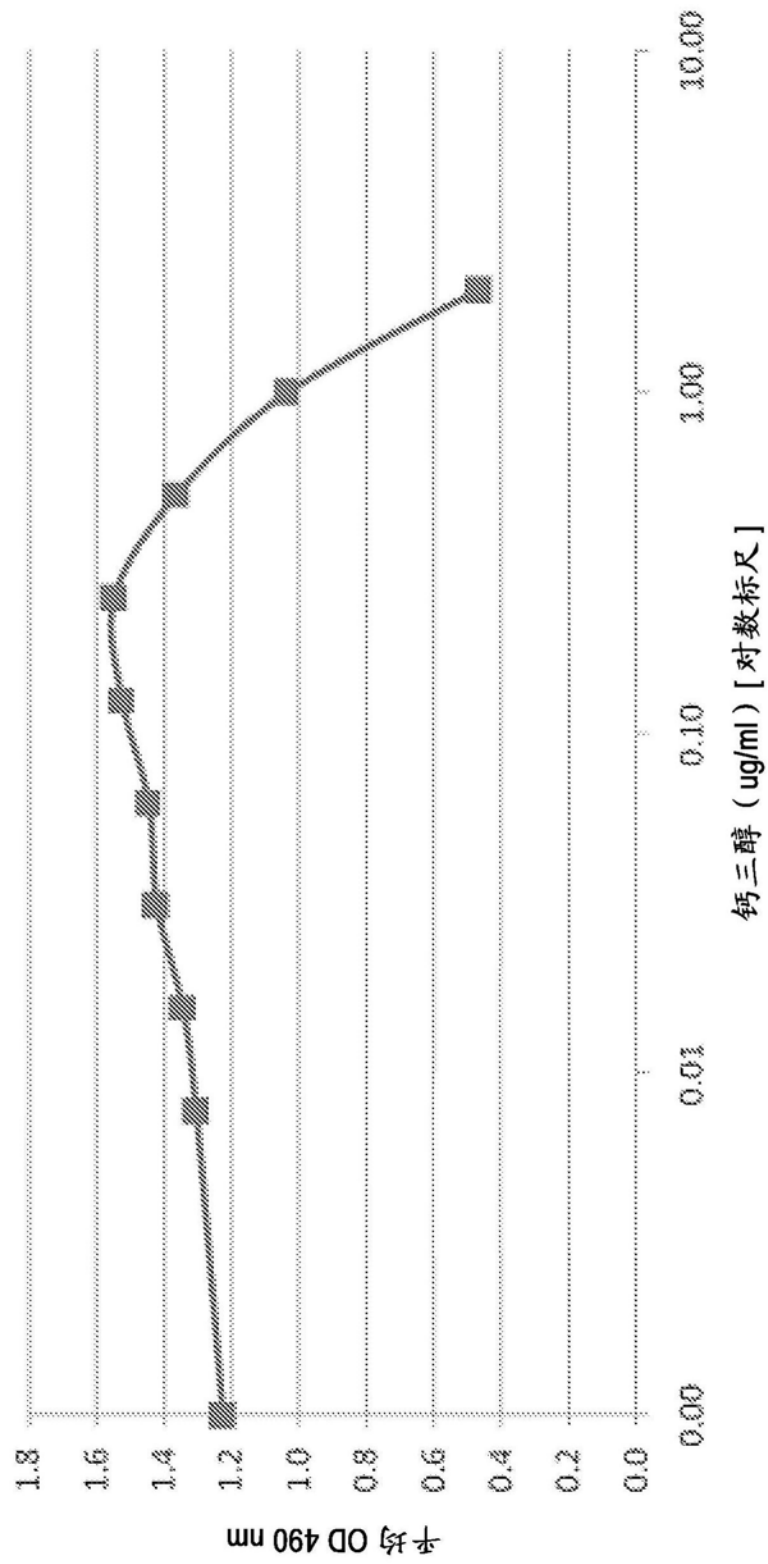


图2

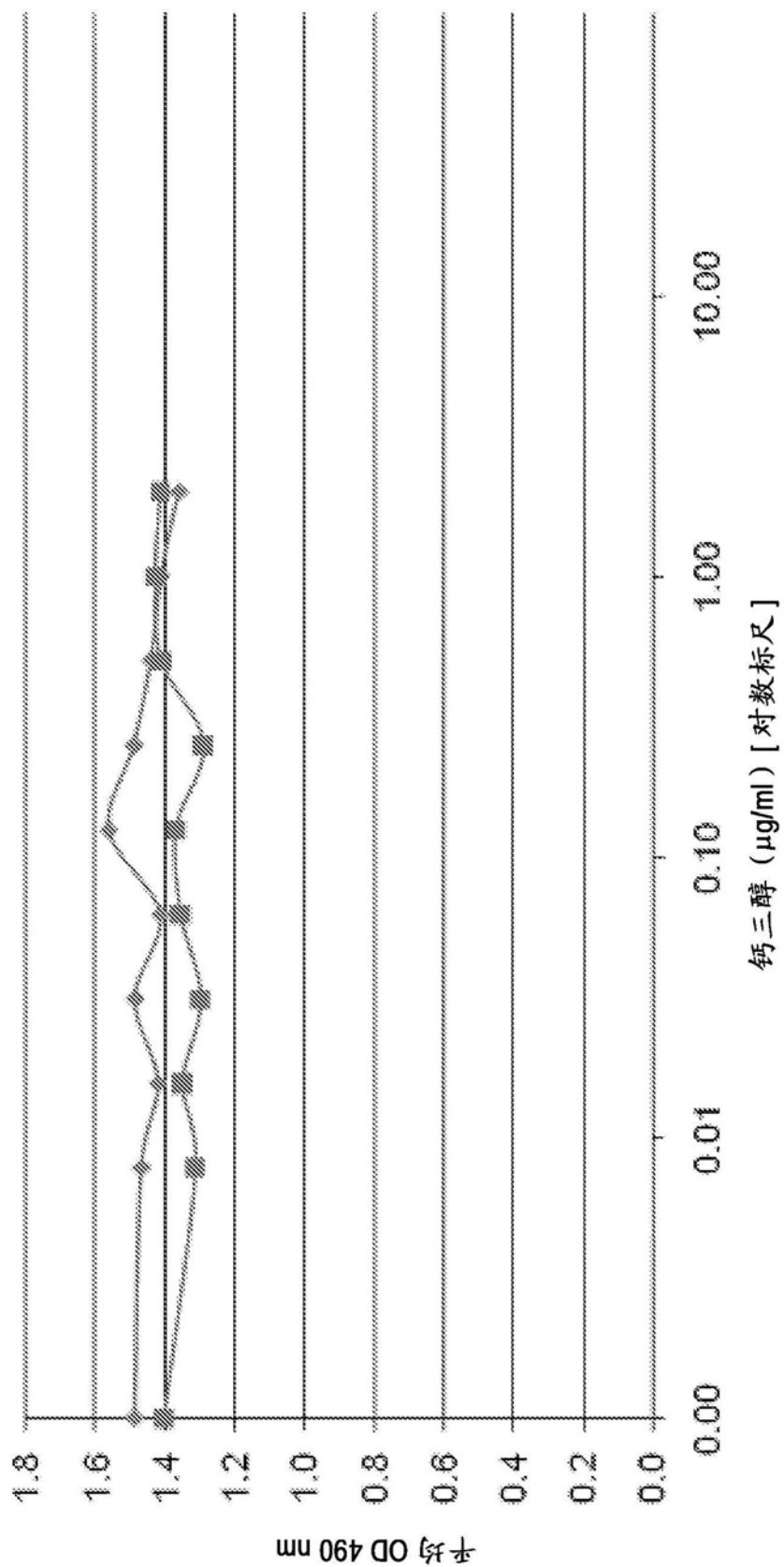


图3

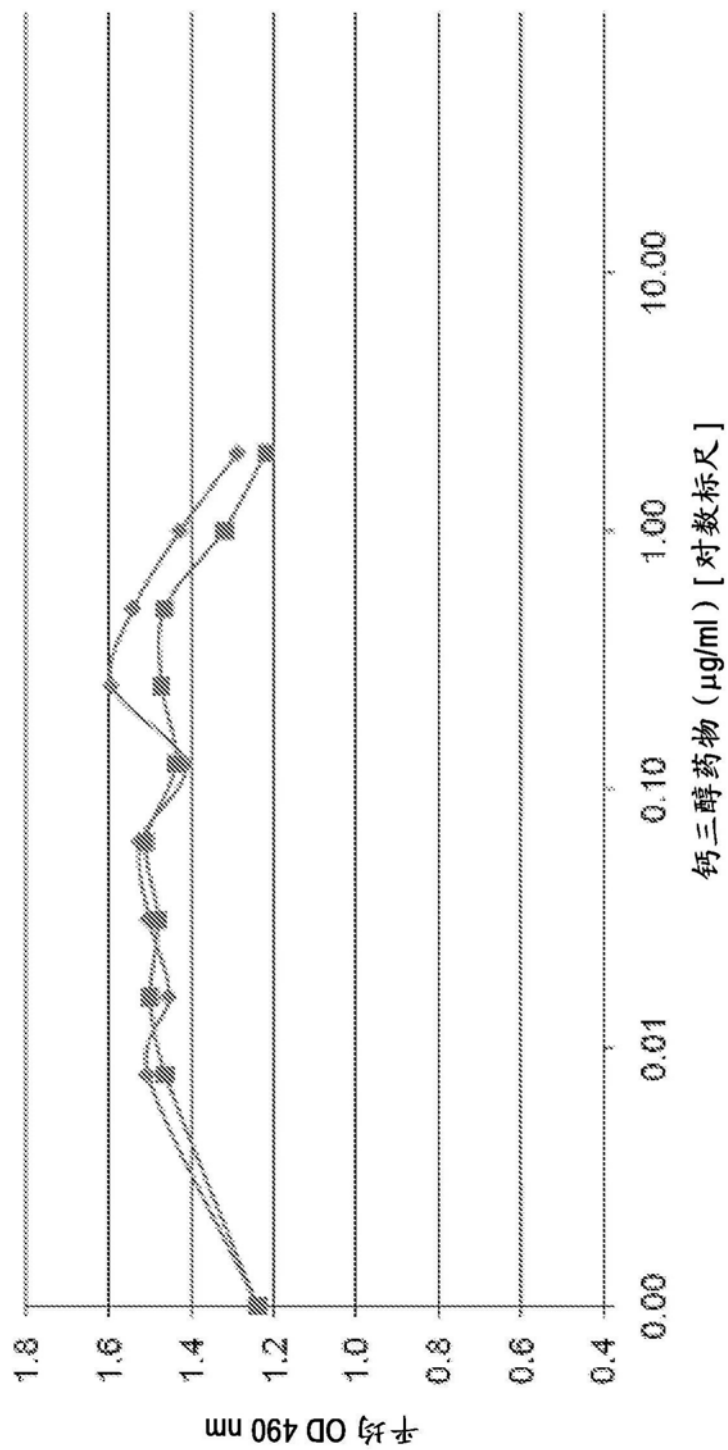


图4A

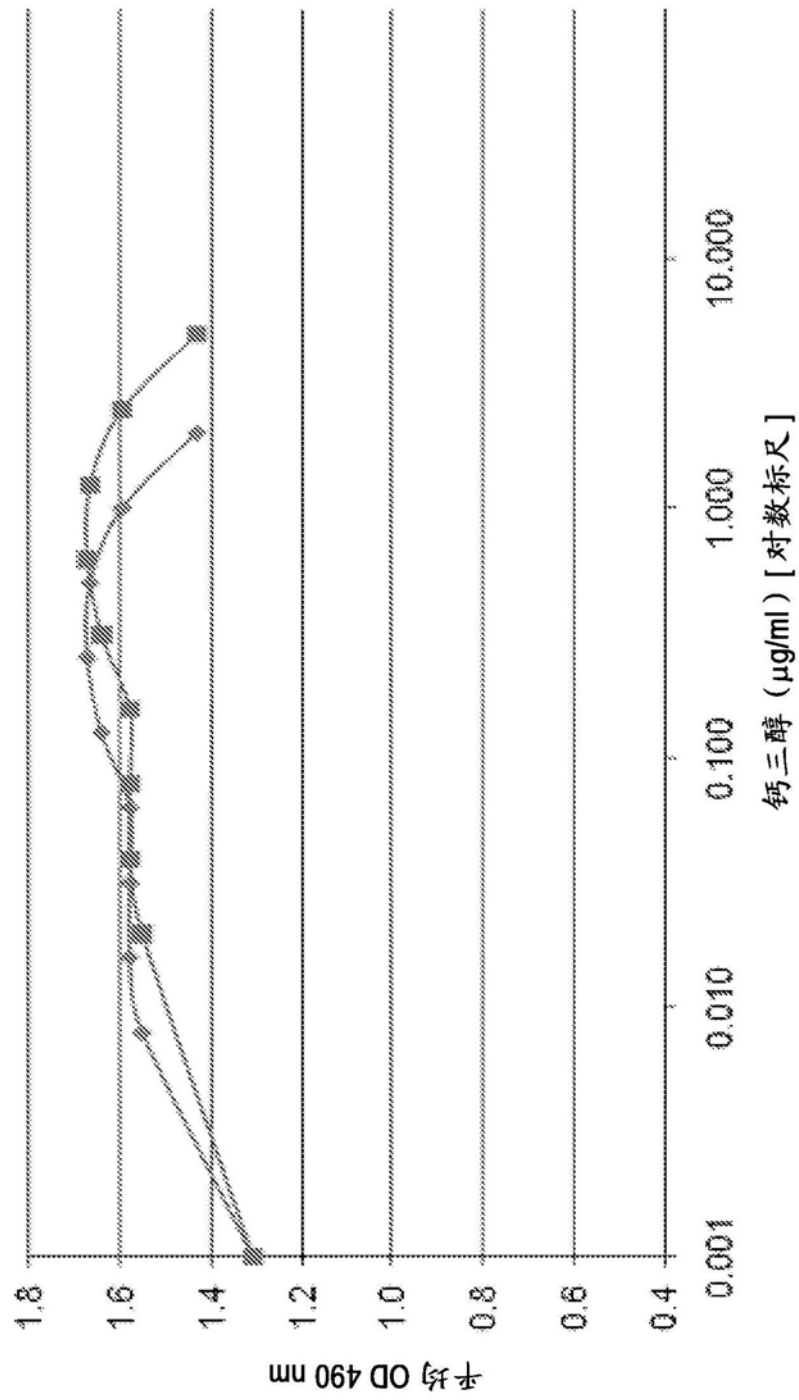


图4B

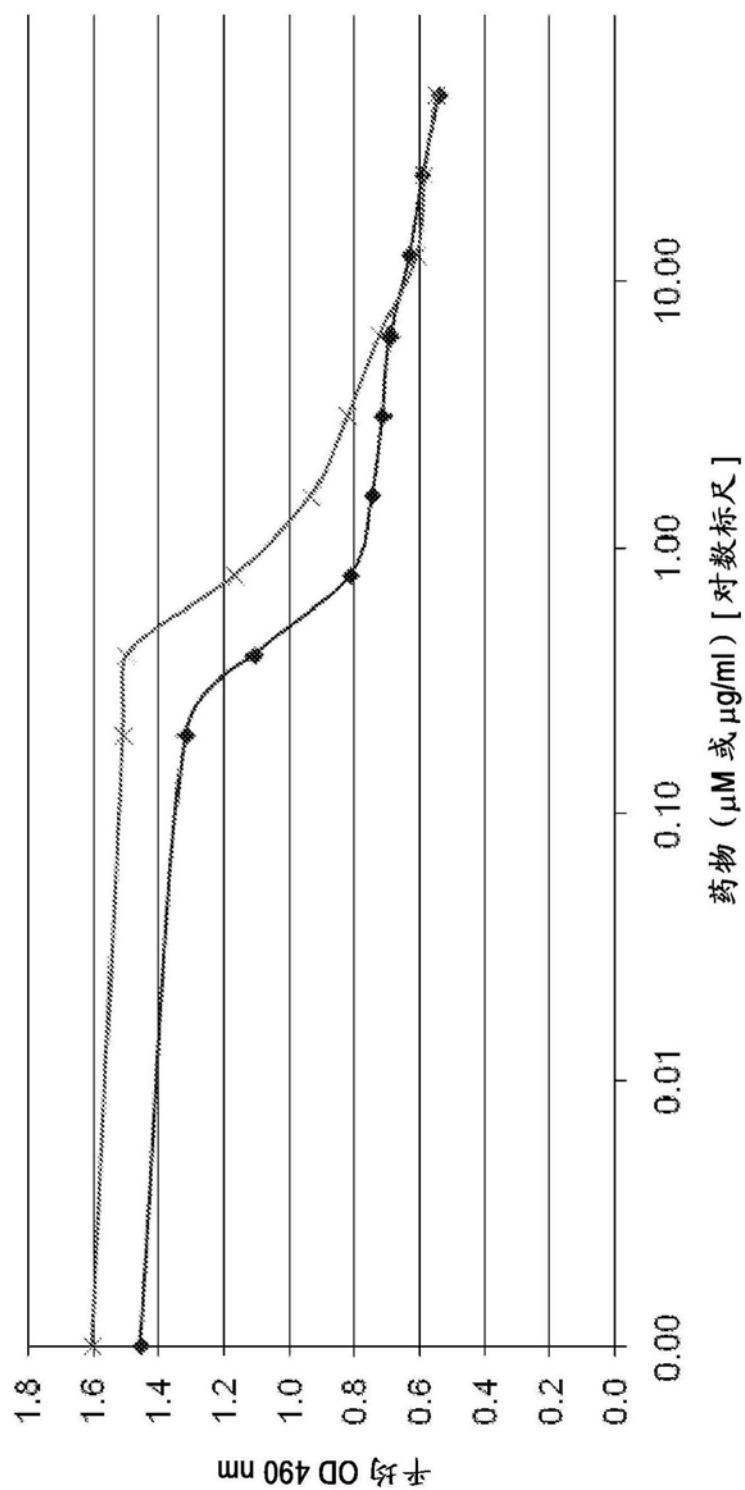


图5

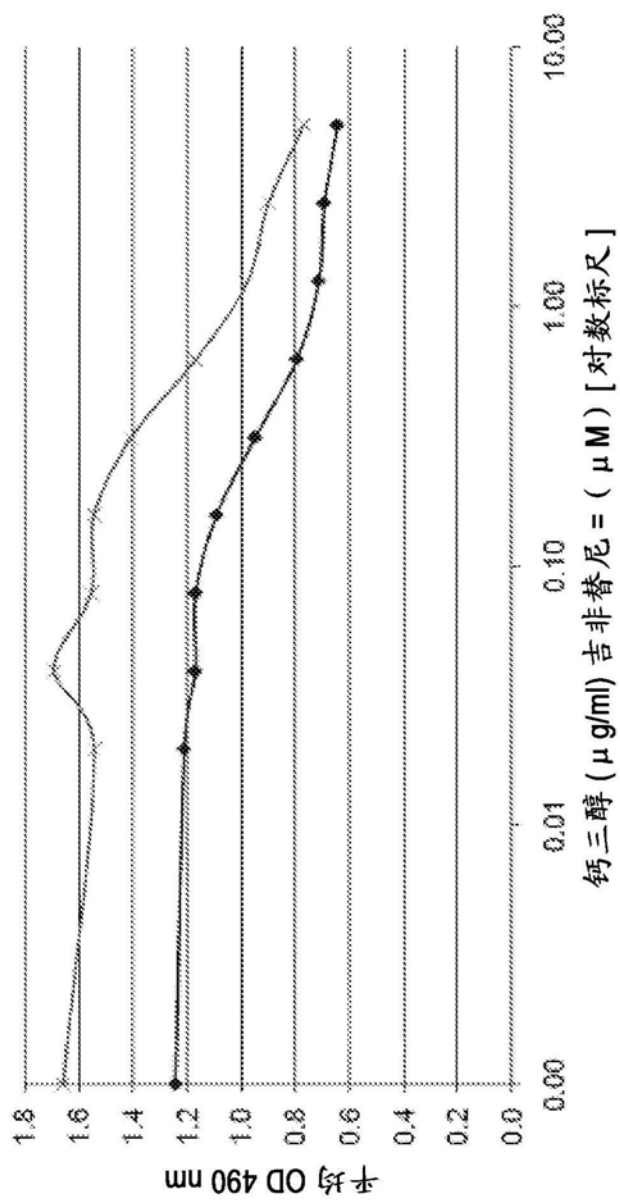


图9

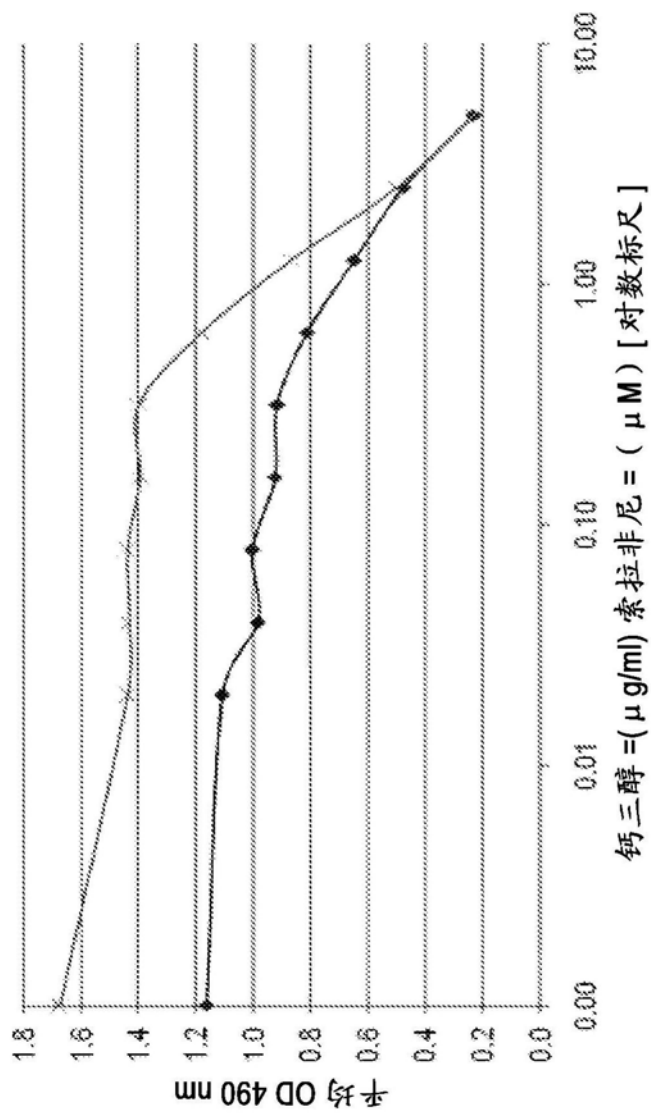


图7

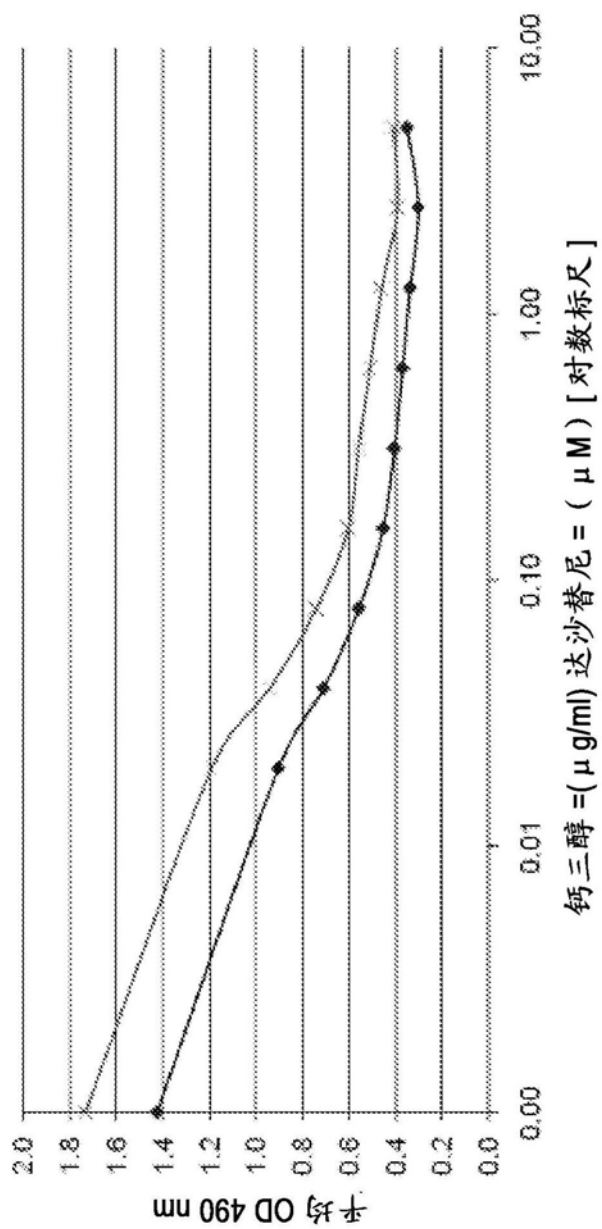


图8

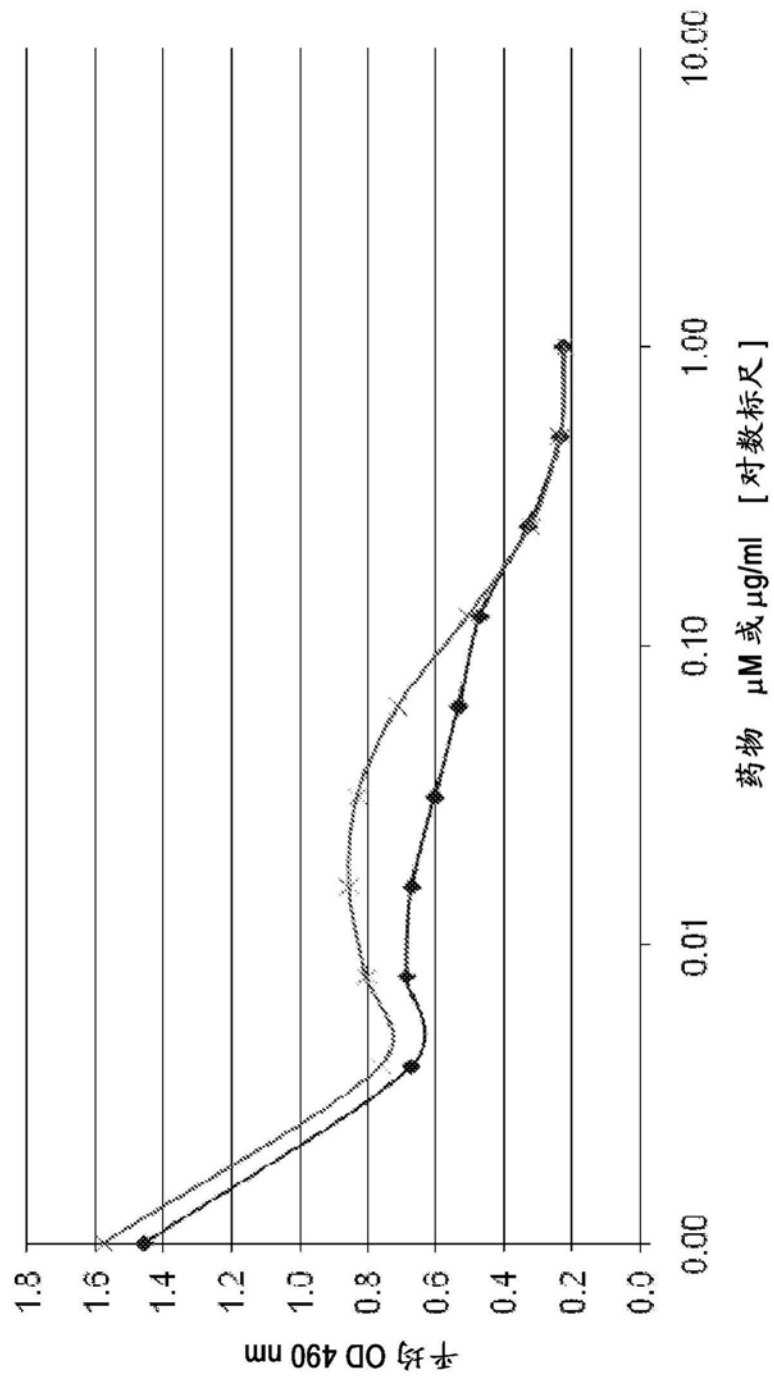


图6

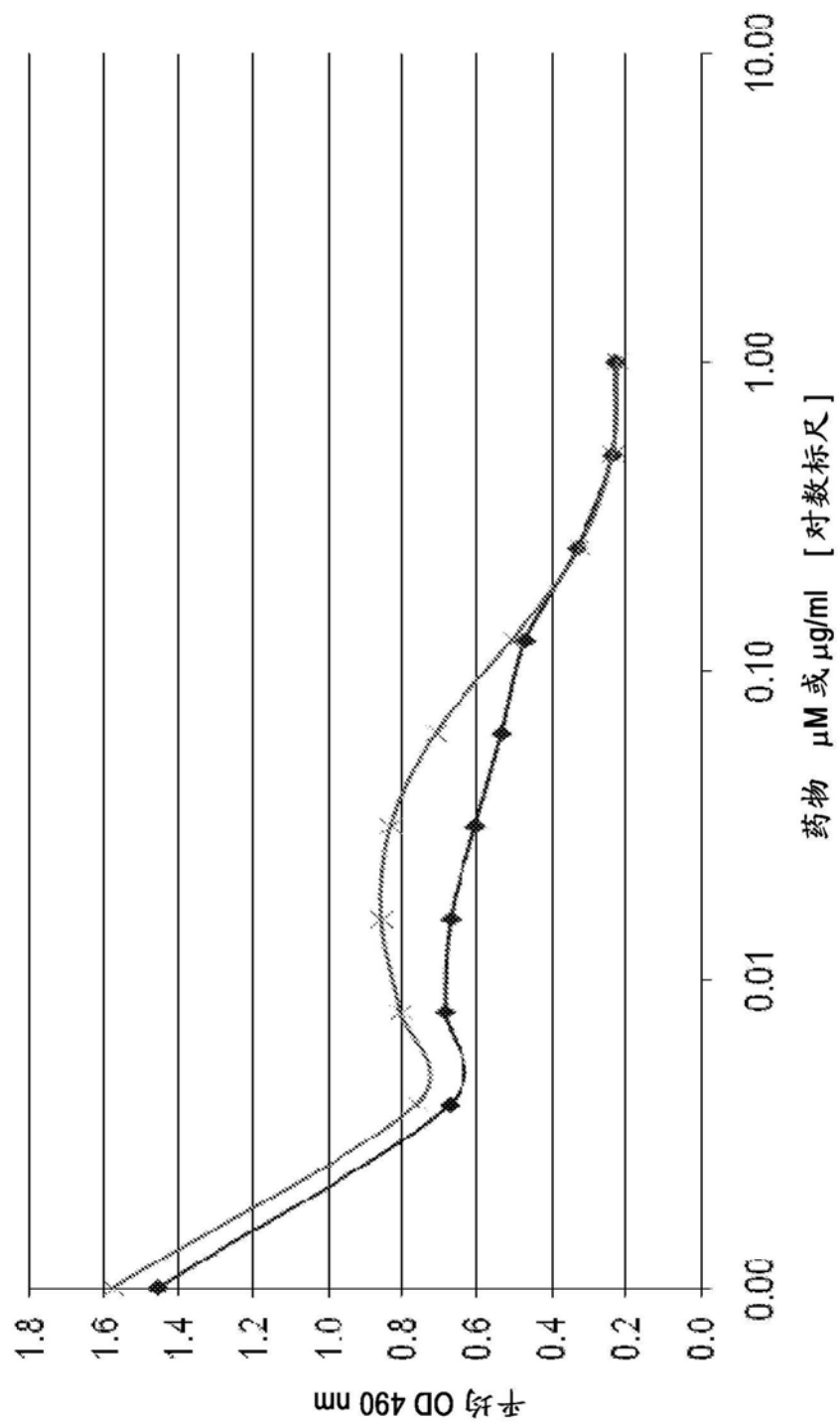


图10

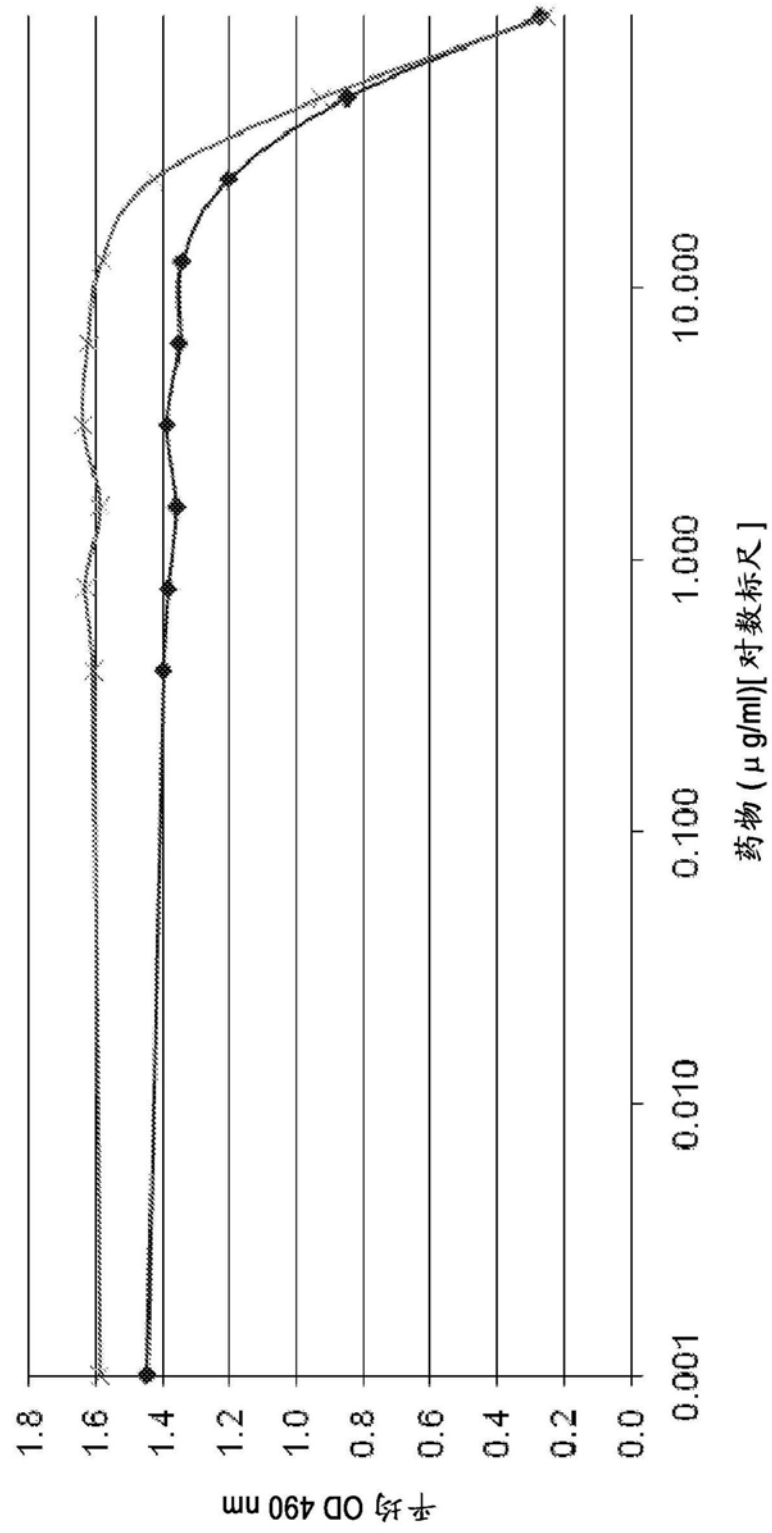


图11

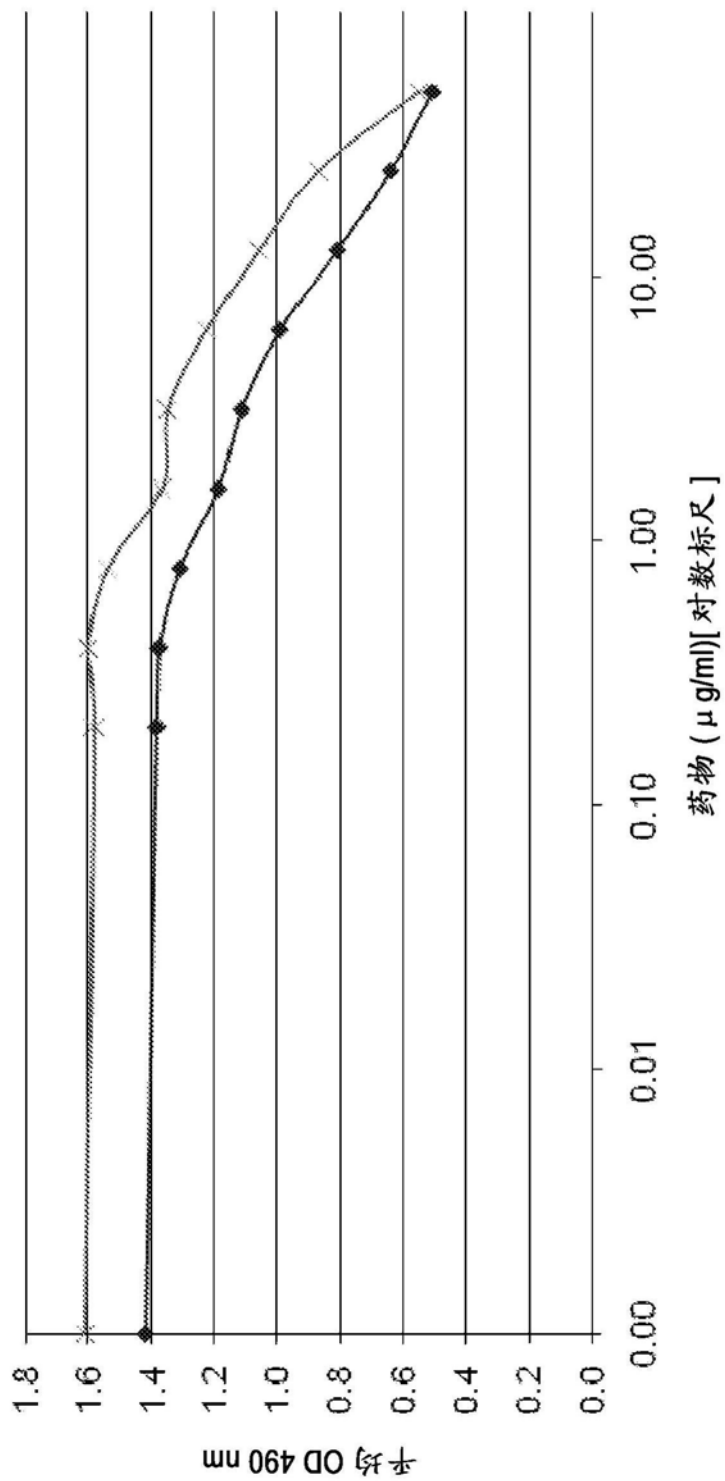


图12

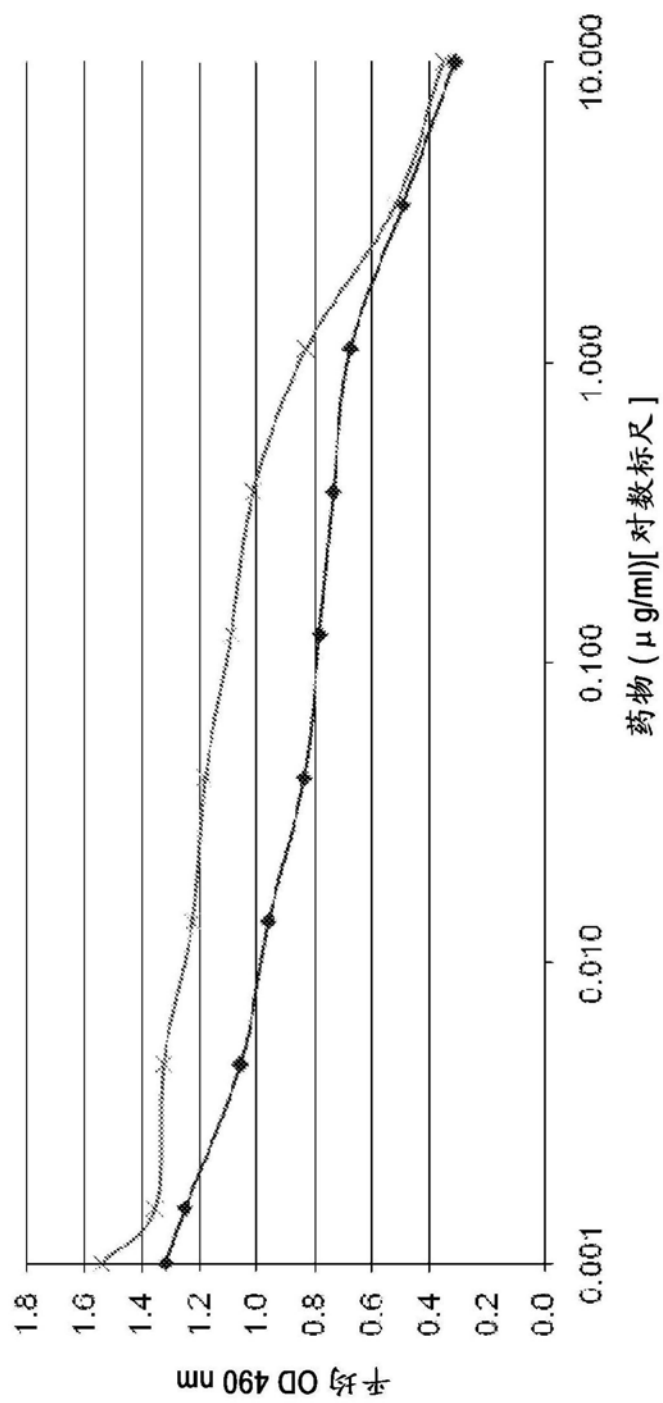


图13

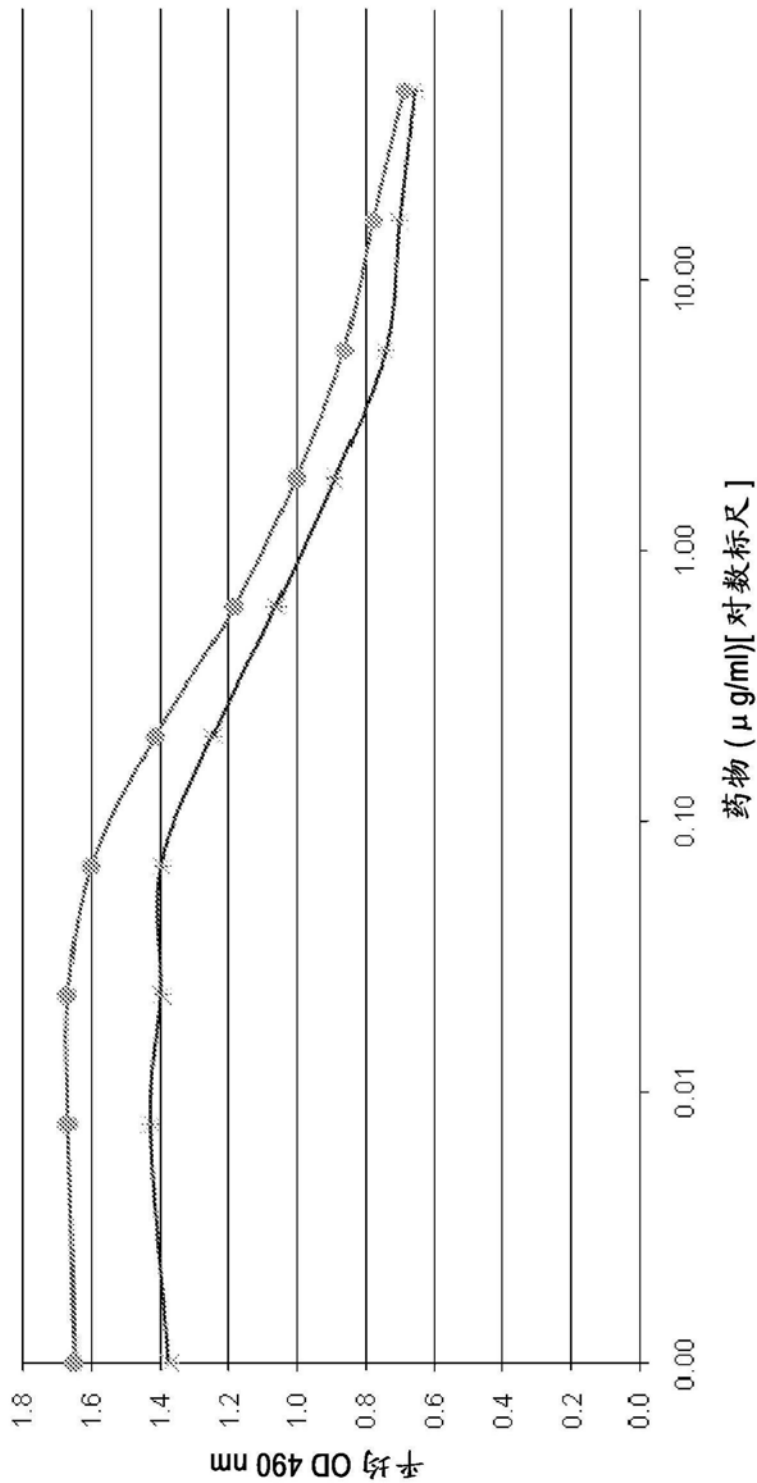


图14

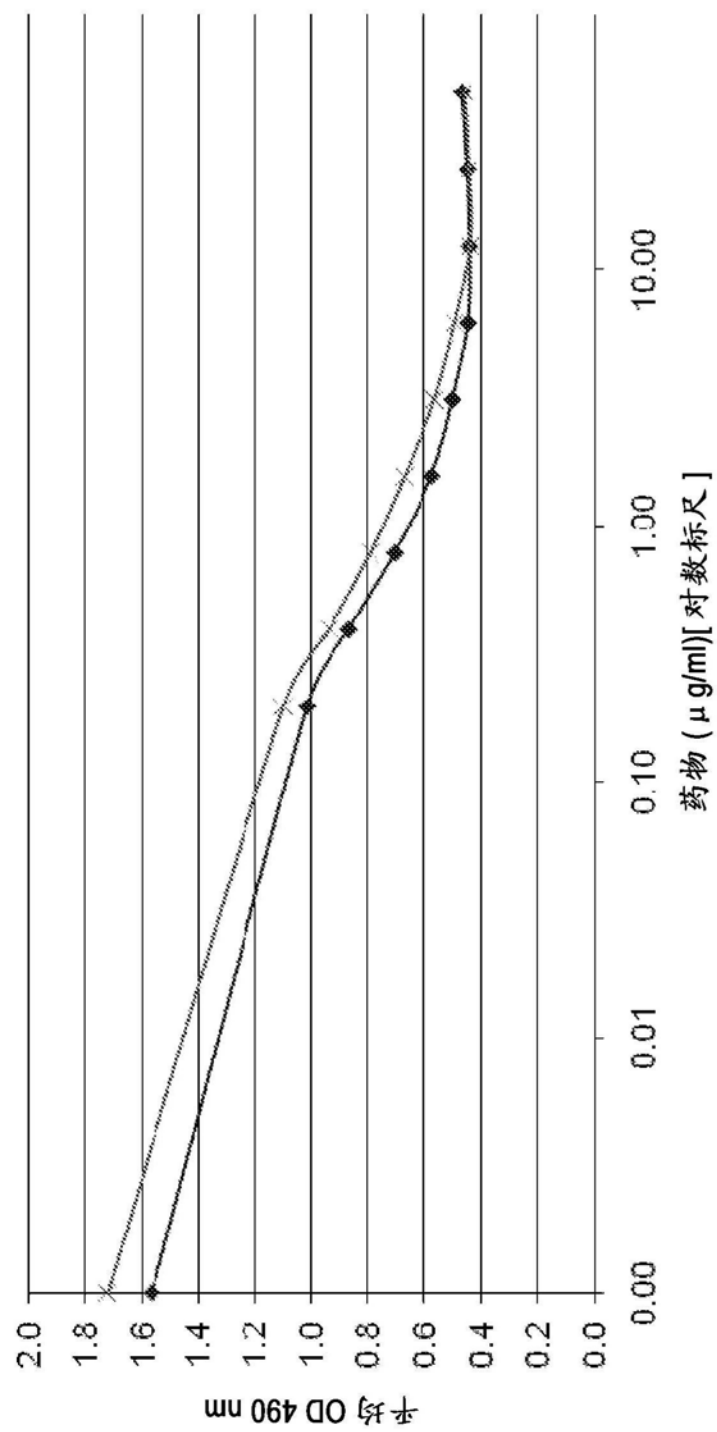


图15

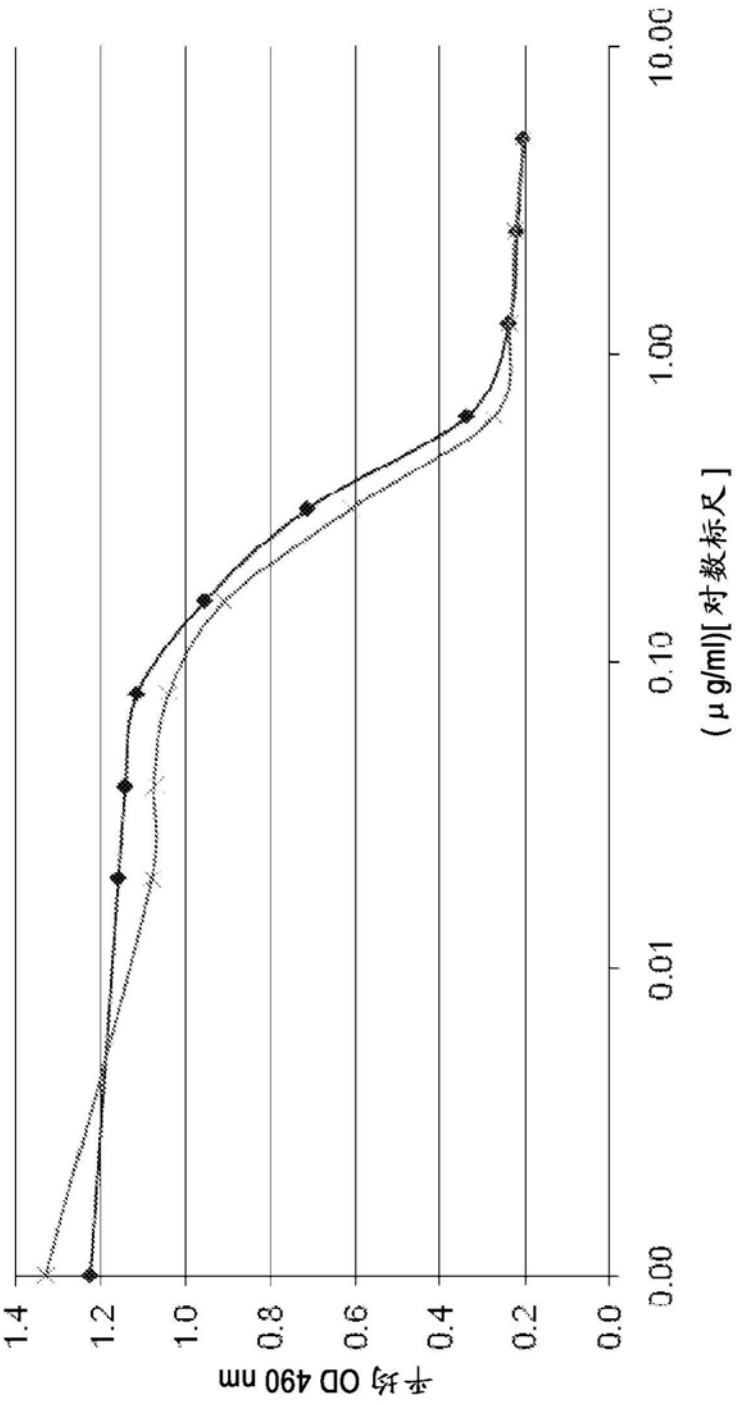


图16

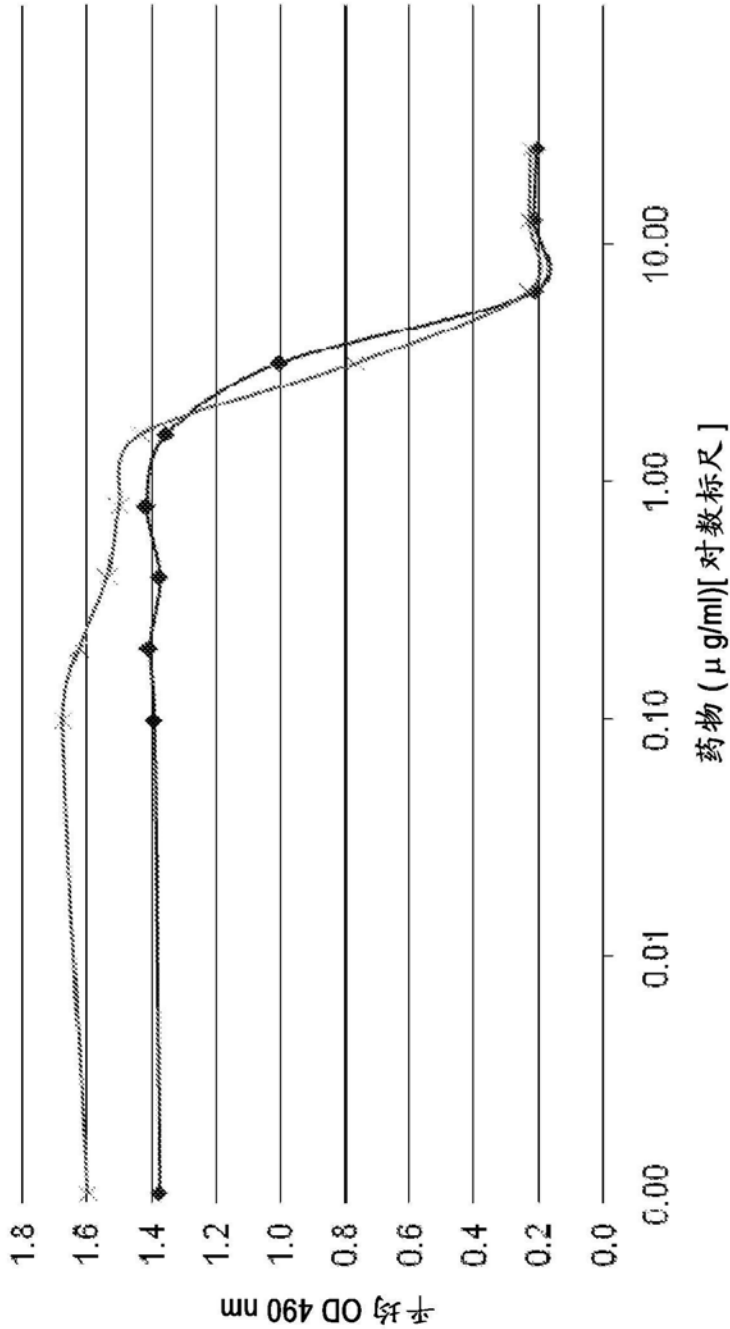


图17

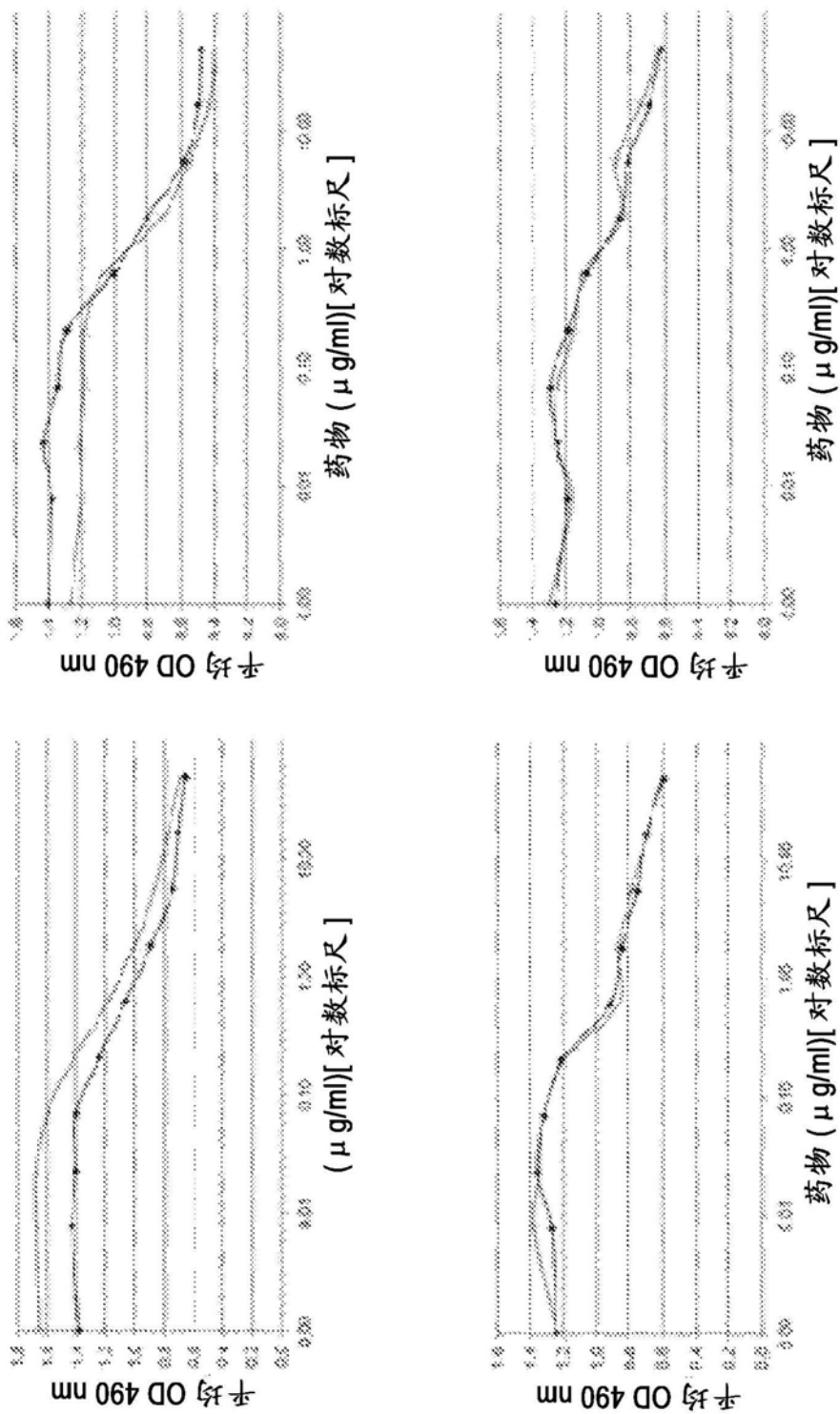


图18

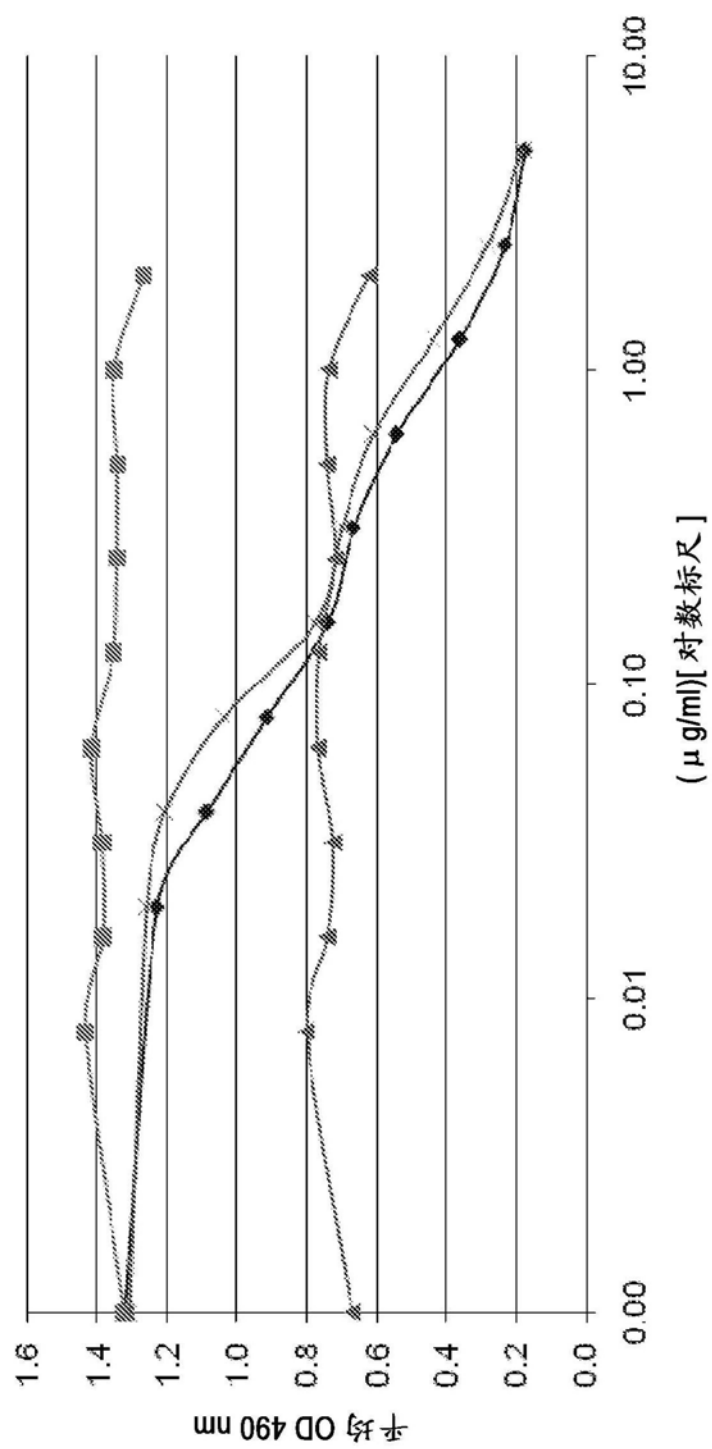


图19

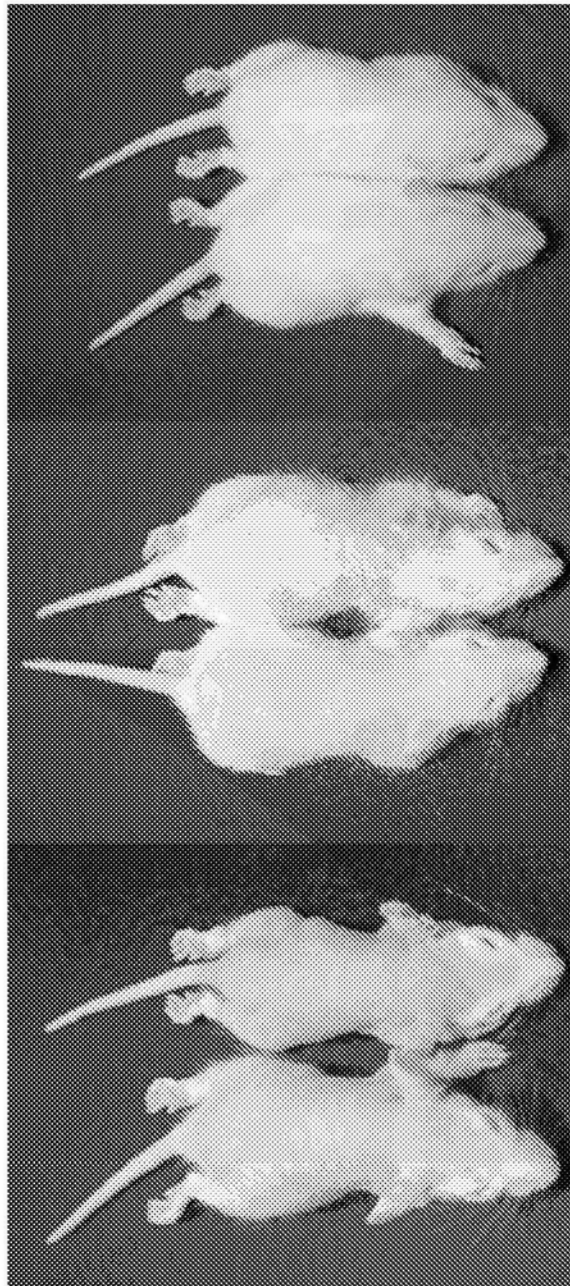


图20A

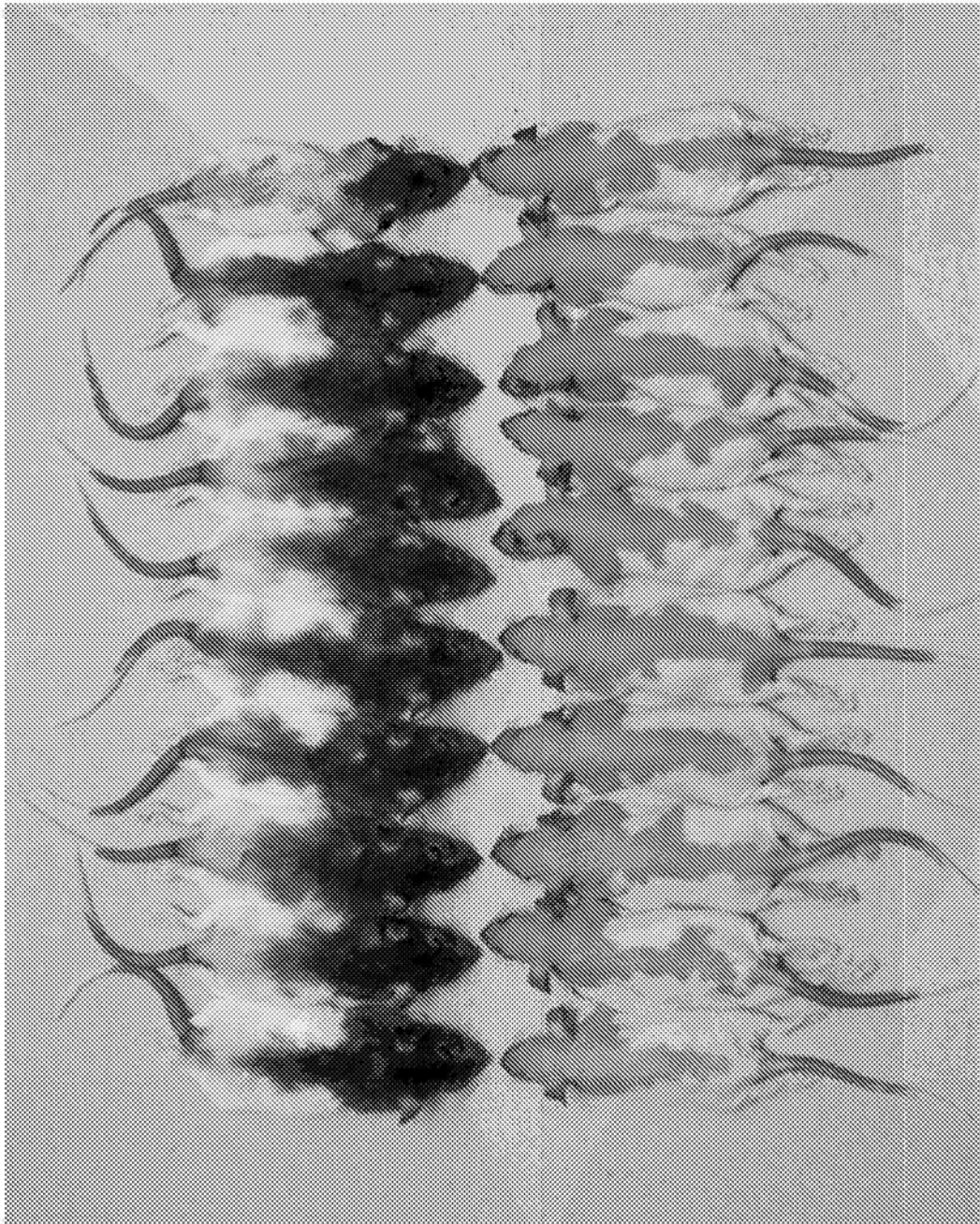


图20B



图21

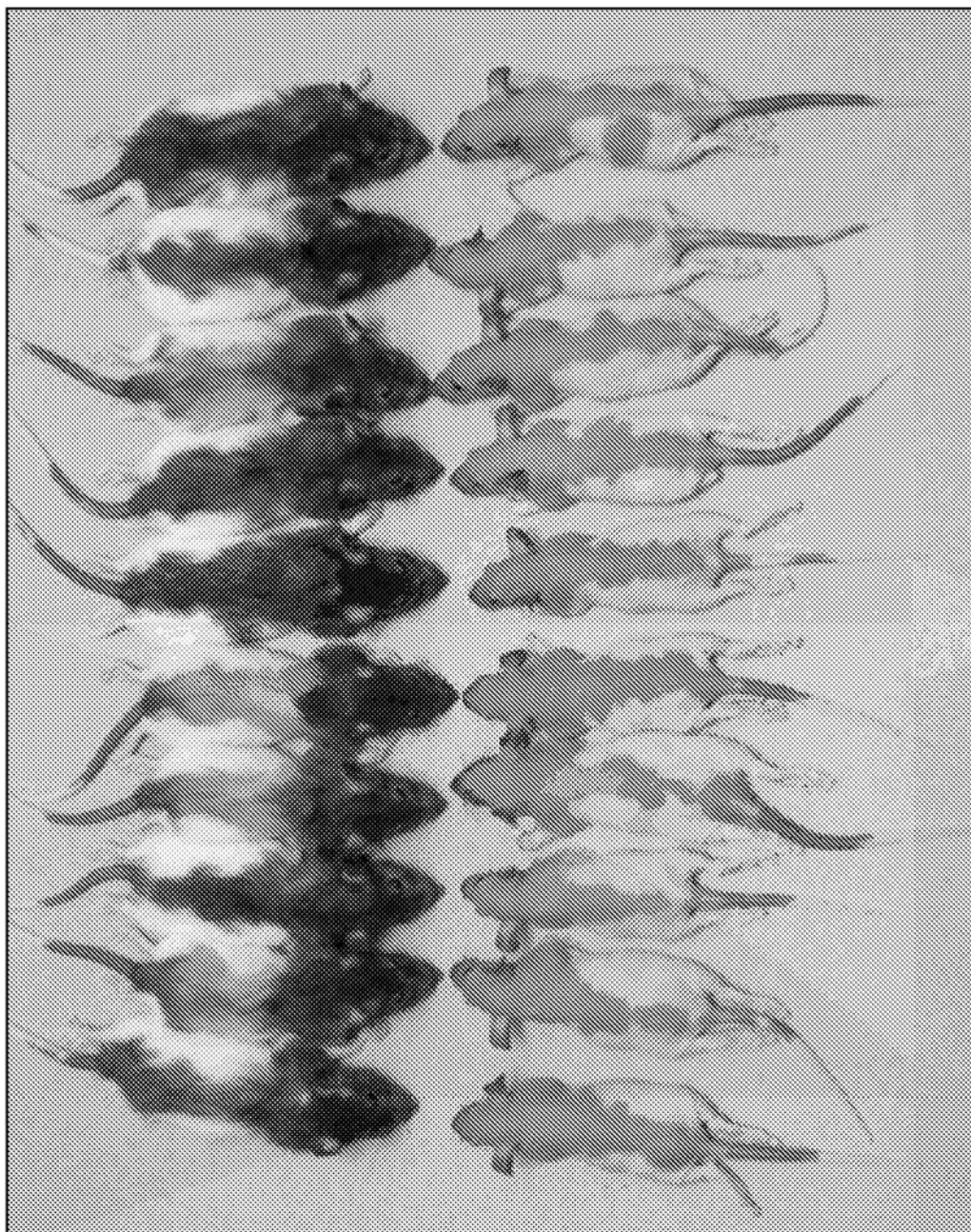


图22A

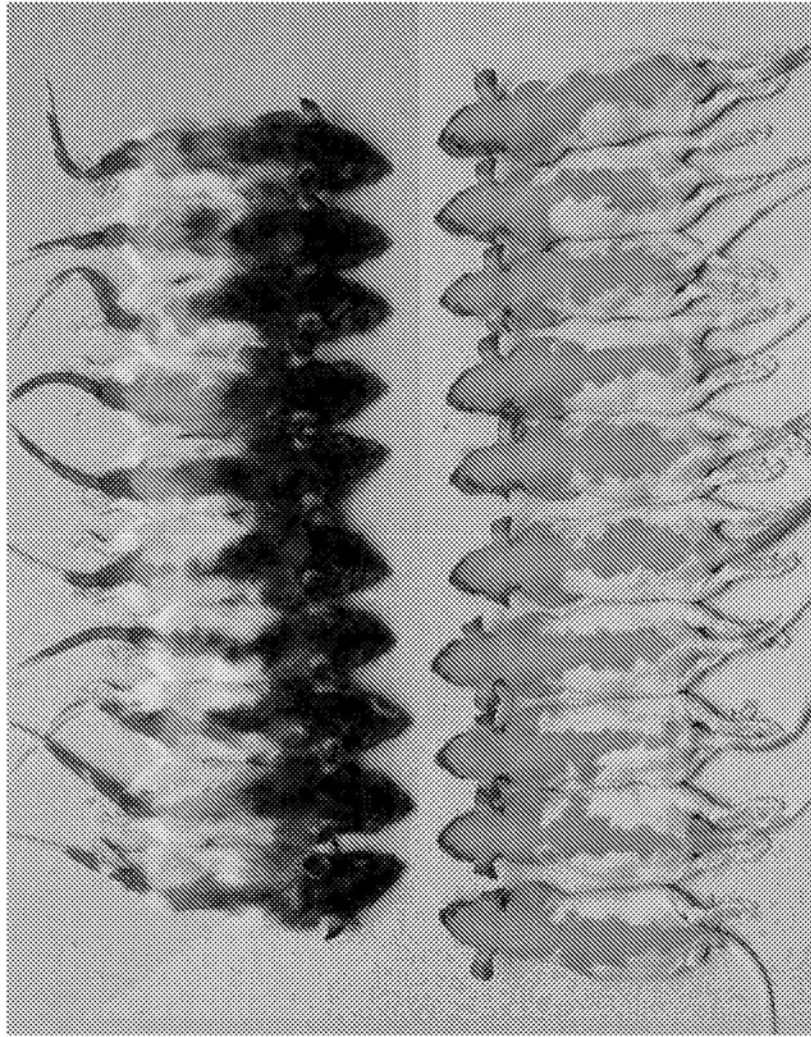


图22B

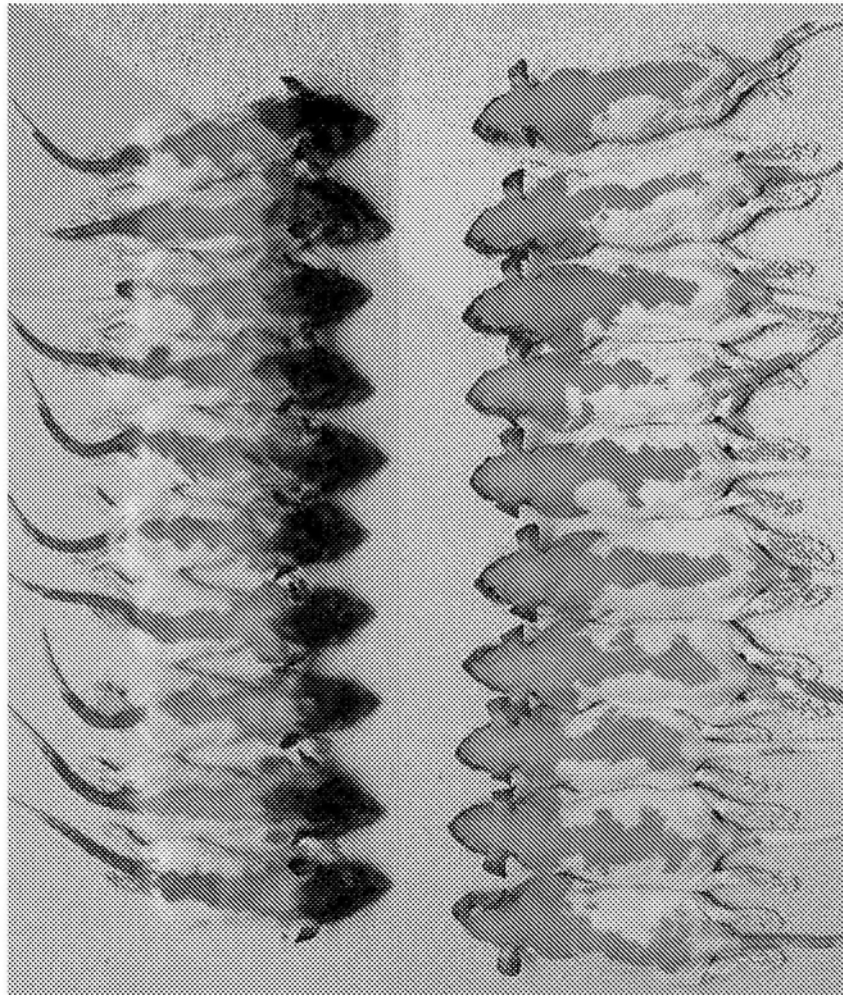


图22C

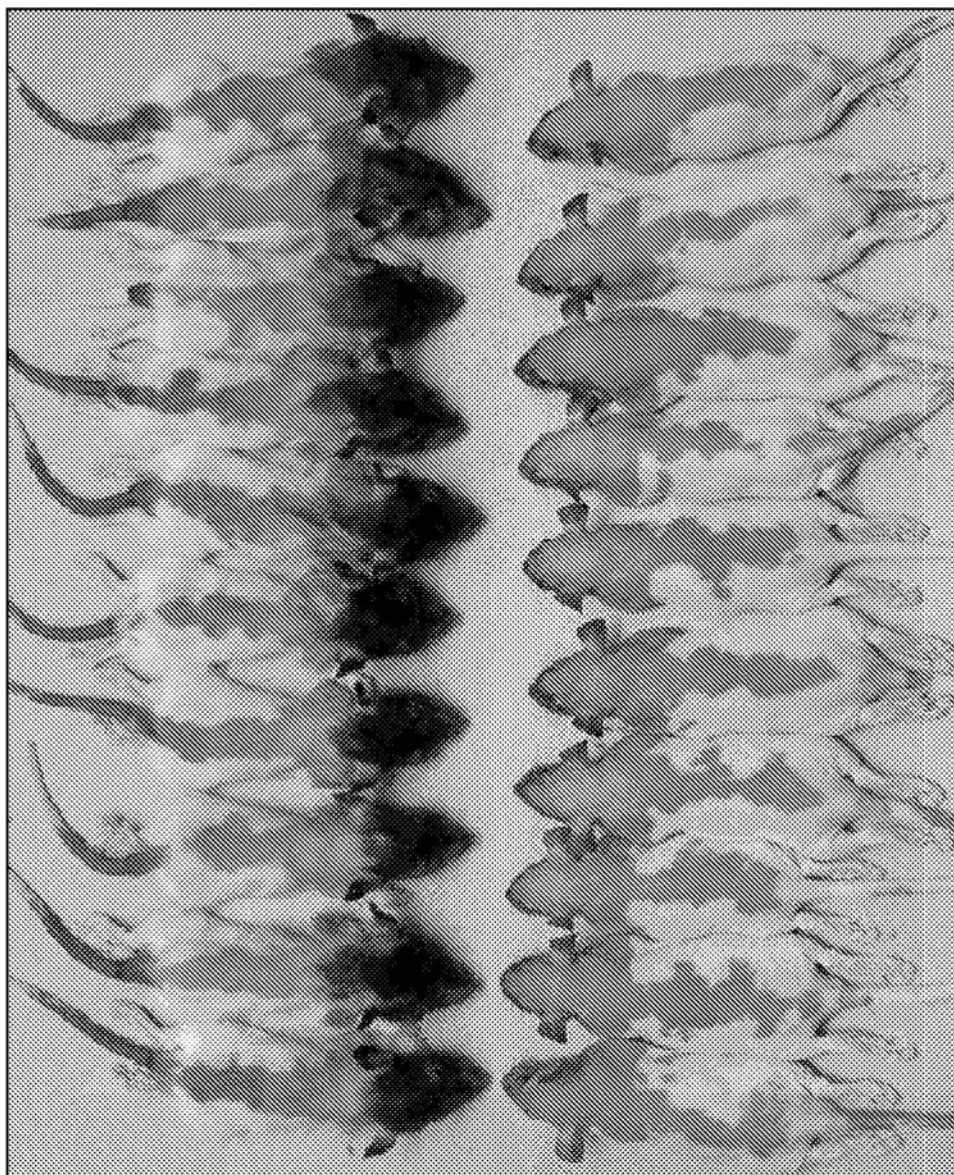


图23

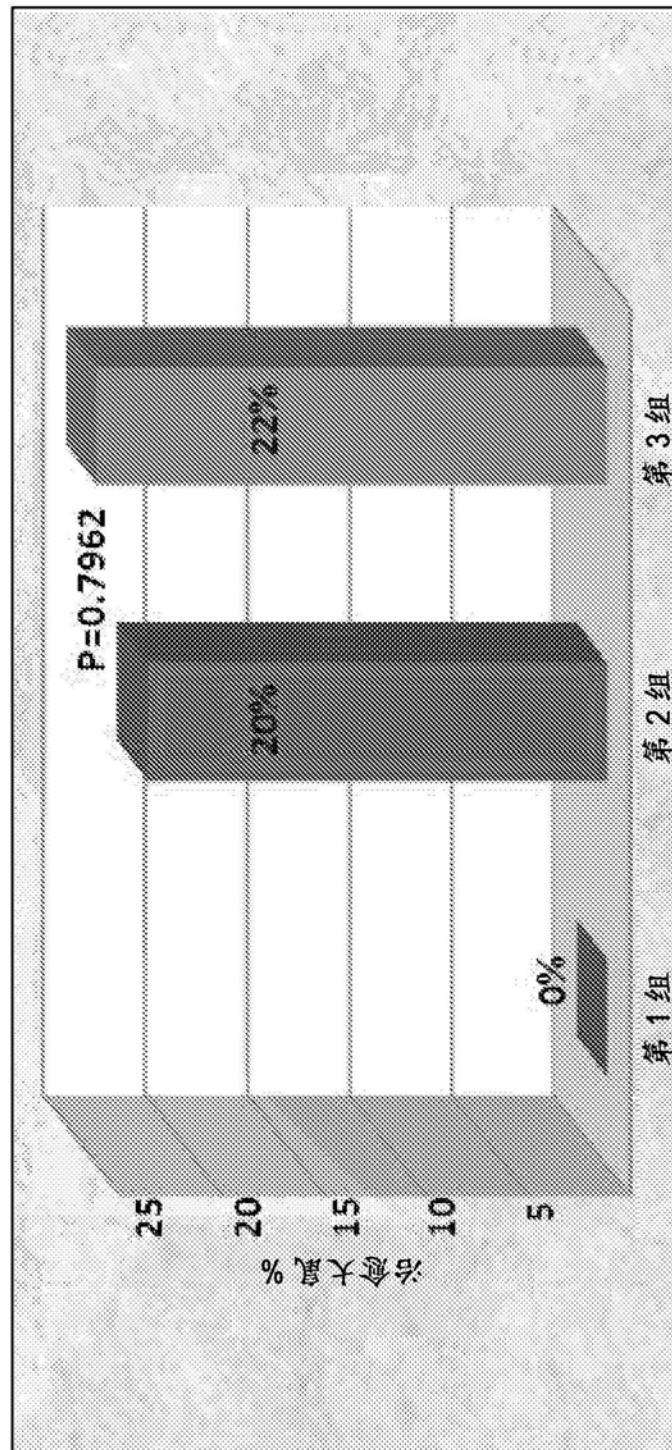


图24

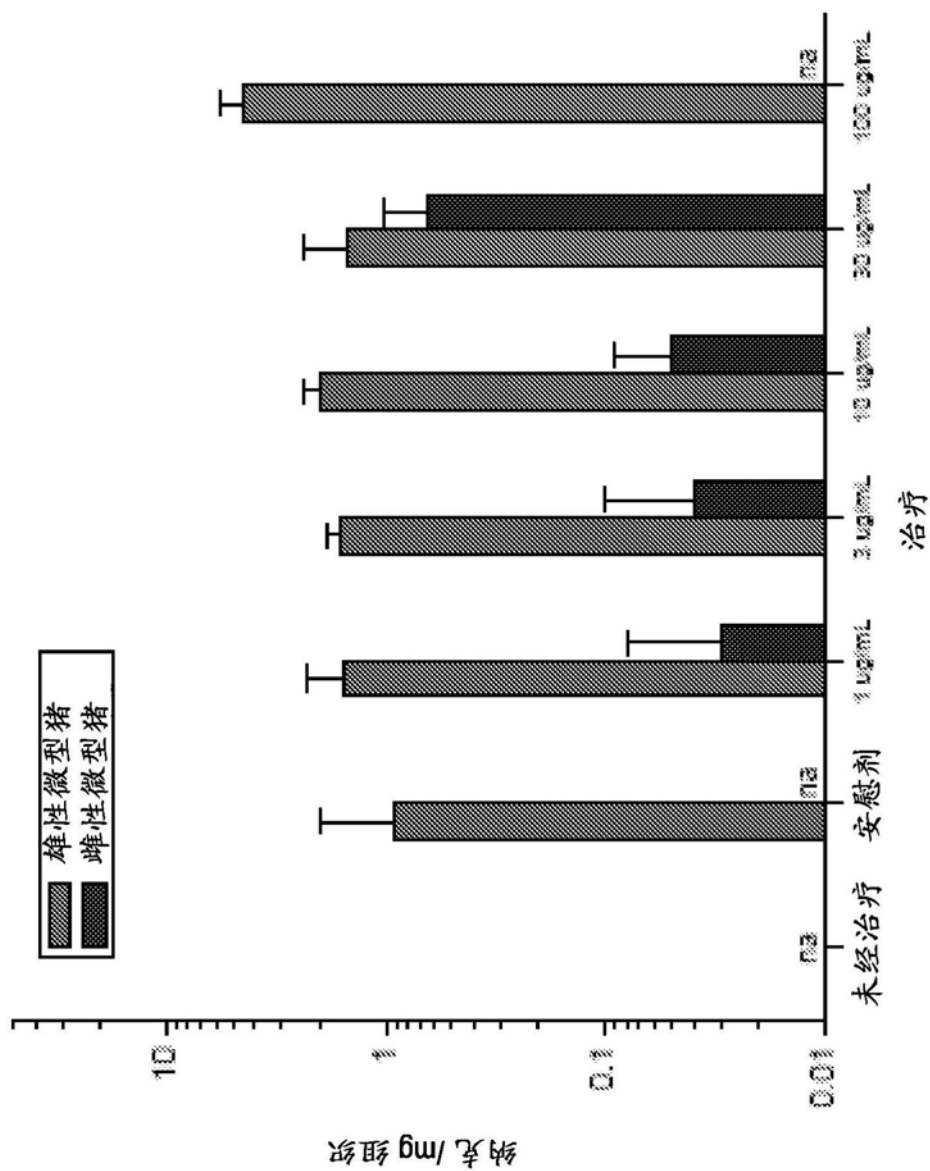


图25A

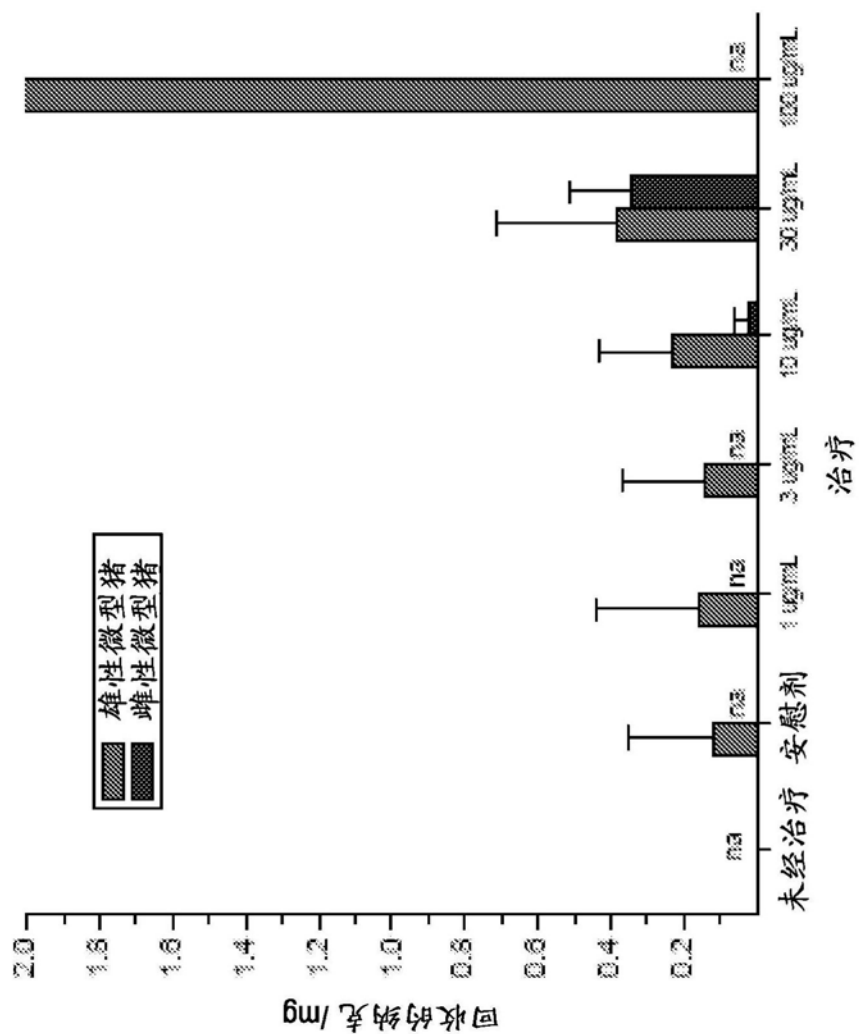


图25B

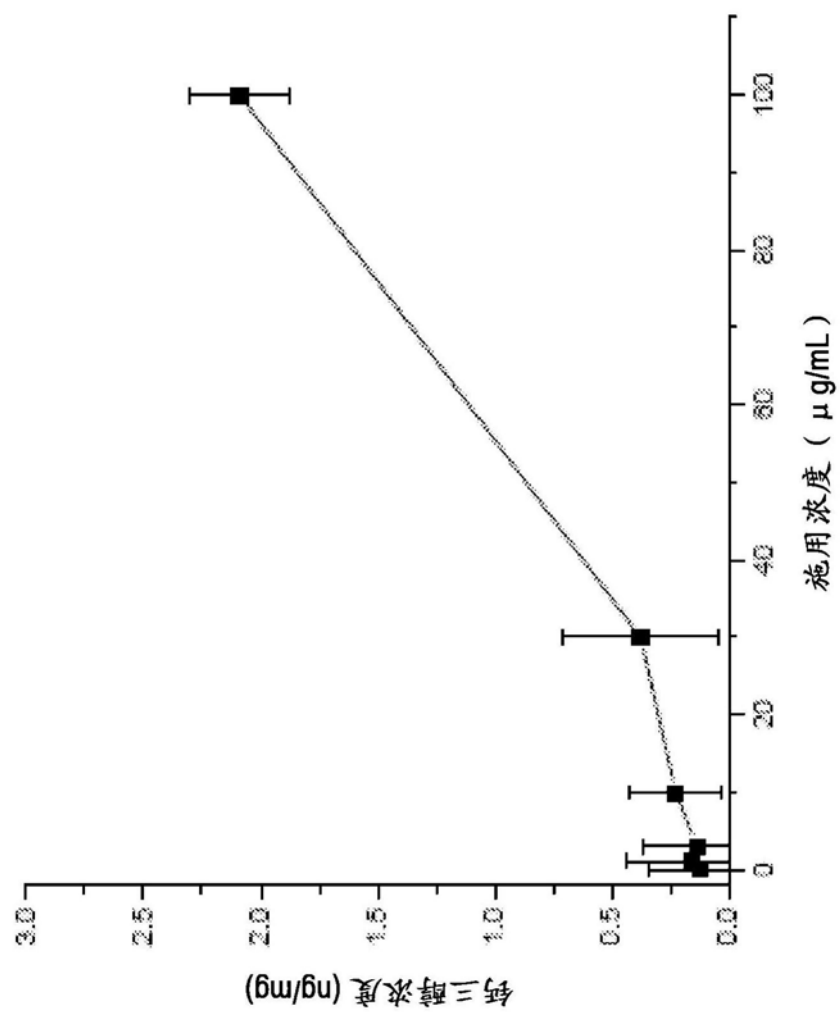
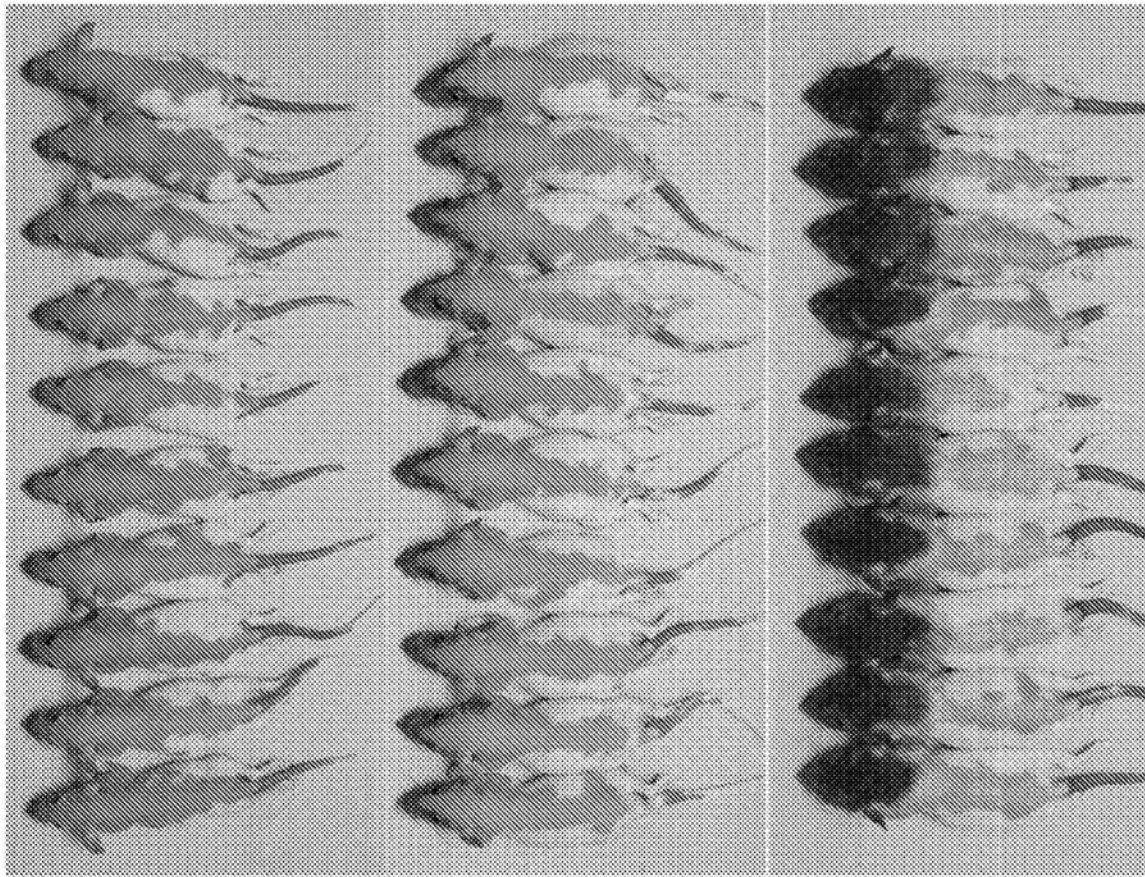


图26



A

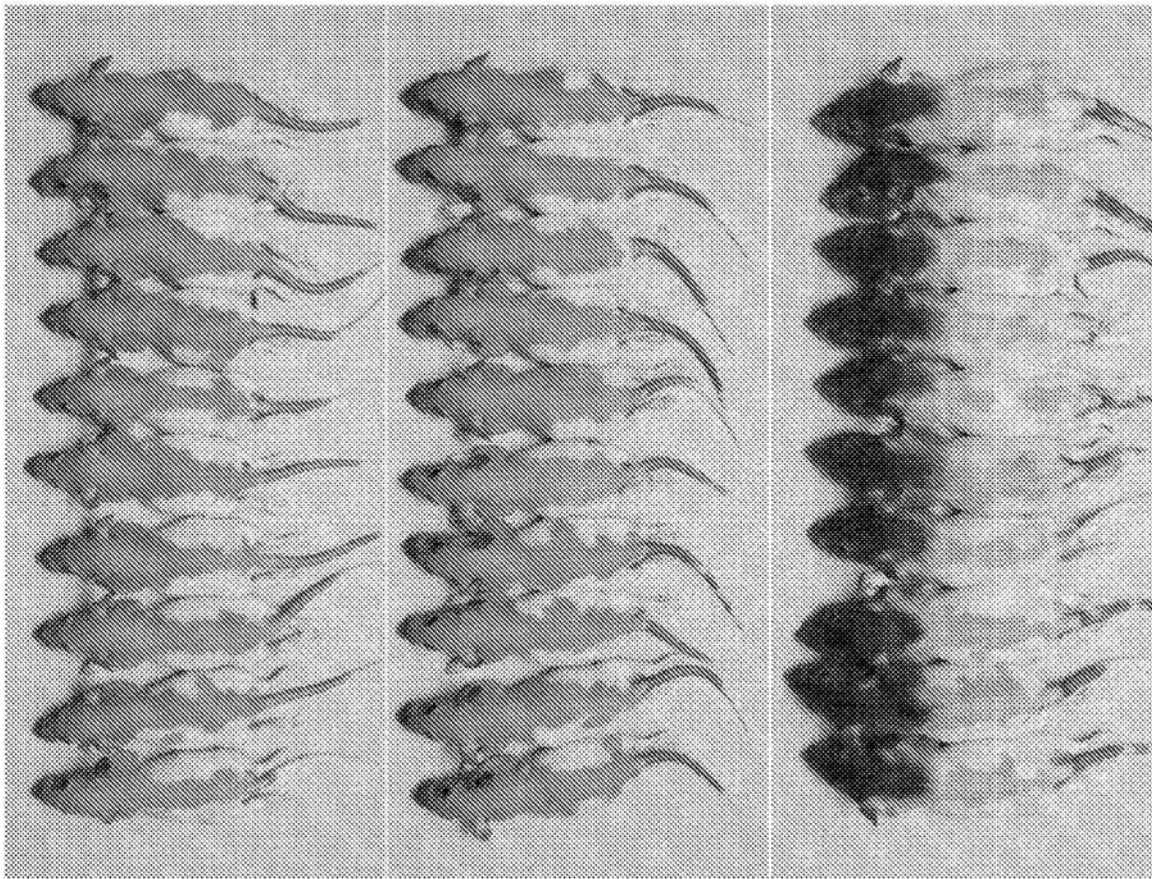
B

C

图27



图28



A

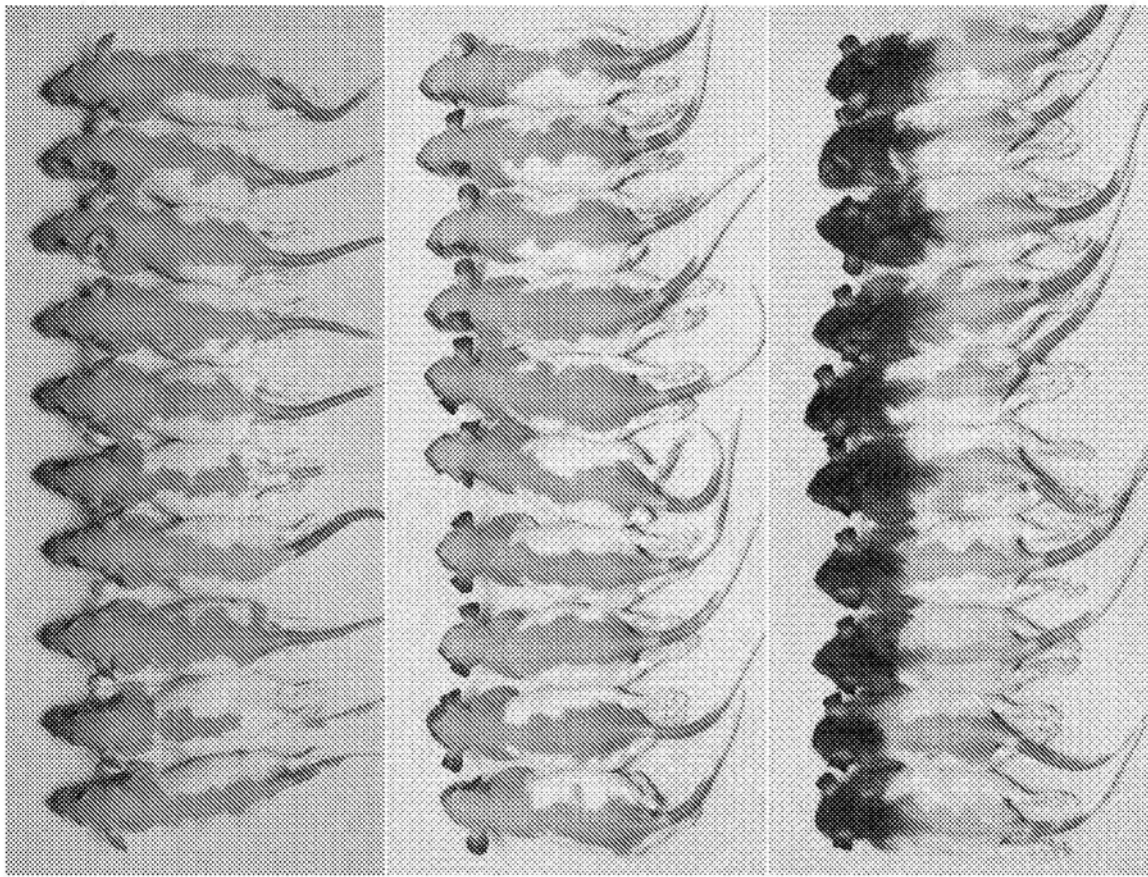
B

C

图29



图30



A

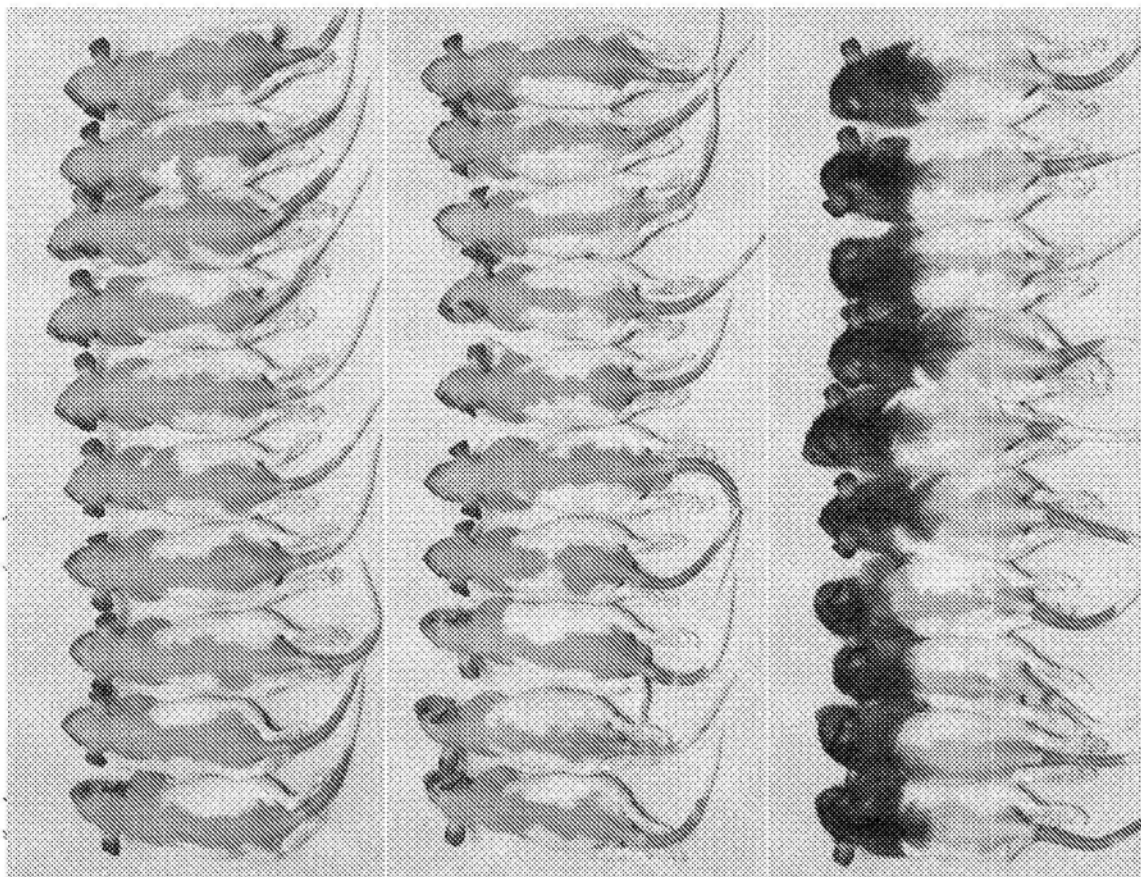
B

C

图31



图32



A

B

C

图33

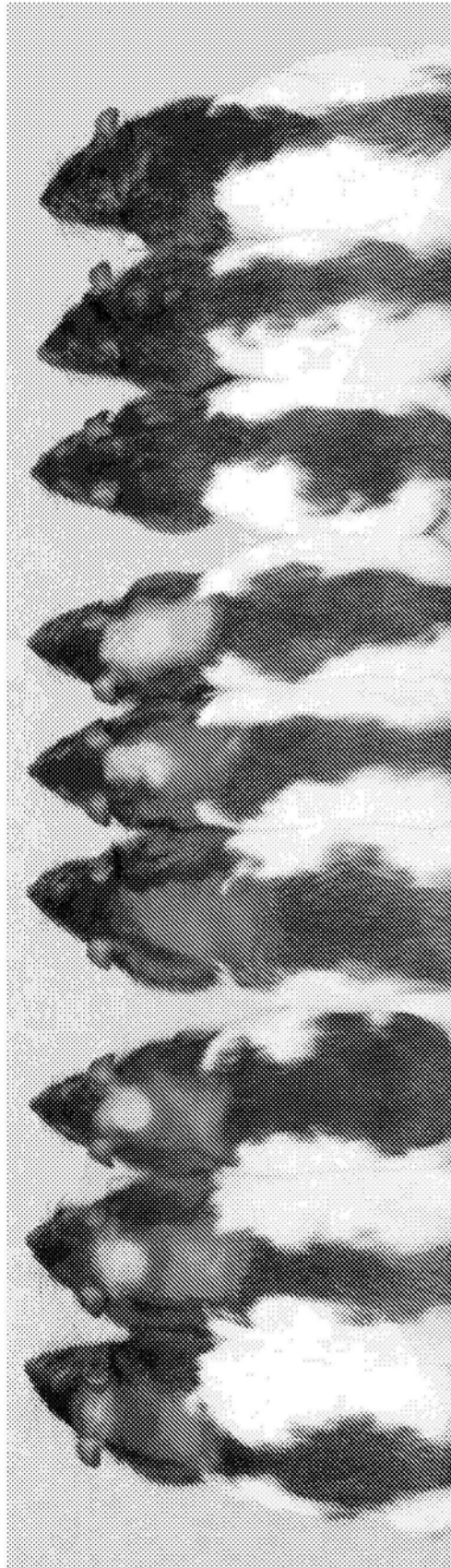
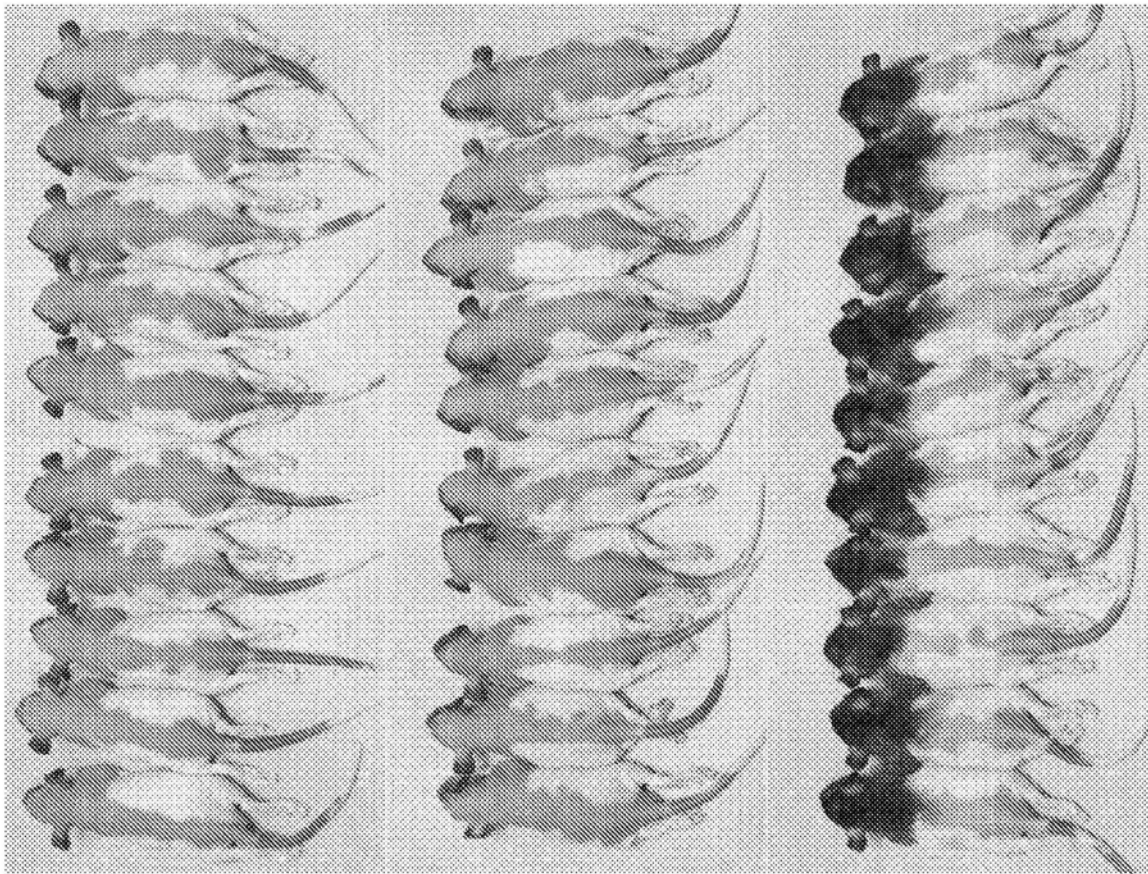


图34



A

B

C

图35

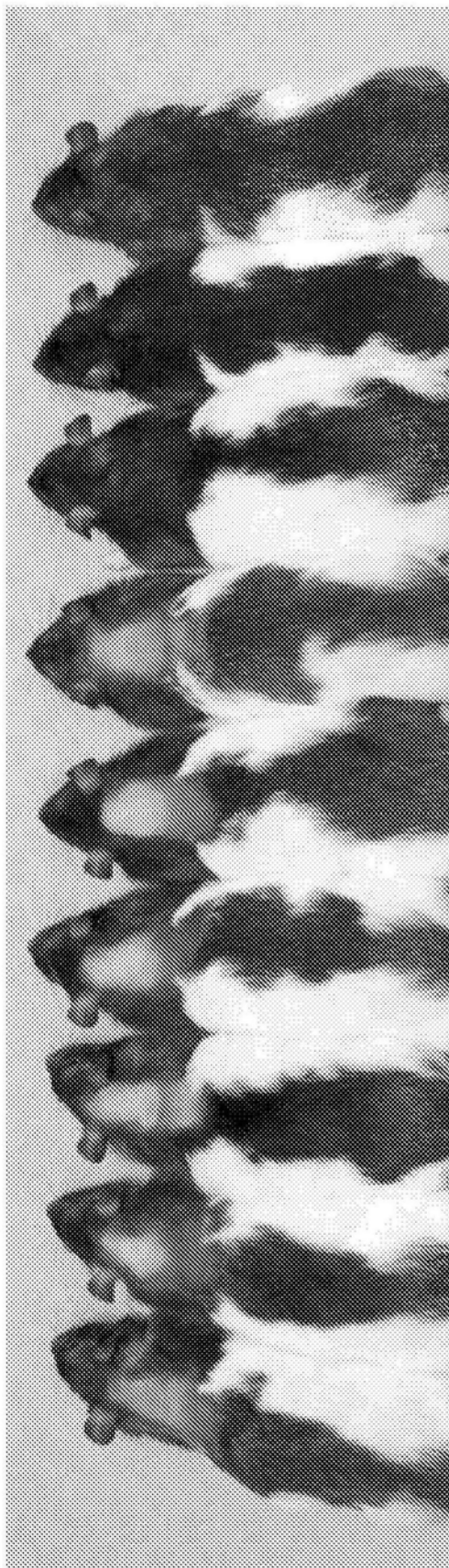


图36