



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112156097 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(21) 申请号 202010845593.7

A61K 9/12 (2006.01)

(22) 申请日 2014.05.29

A61P 17/14 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/828,448 2013.05.29 US

(62) 分案原申请数据

201480042529.8 2014.05.29

(71) 申请人 博格有限责任公司

地址 美国田纳西州

(72) 发明人 N·R·纳莱恩 J·P·麦库克

J·J·吉梅内兹

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 侯宝光

(51) Int.Cl.

A61K 31/59 (2006.01)

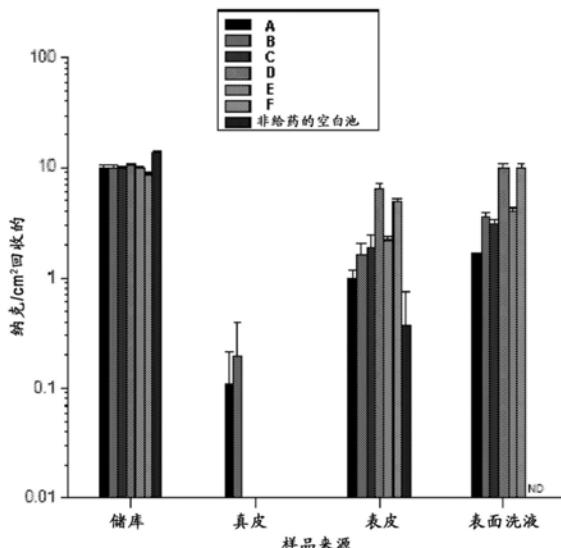
权利要求书4页 说明书89页 附图41页

(54) 发明名称

使用维生素D预防或减轻化疗诱发的脱发

(57) 摘要

本发明提供了用于预防或减轻化疗诱发的脱发 (CIA) 的方法和药物组合物。本发明的药物组合物在局部制剂中包含有效量的维生素D化合物。本发明在诱发脱发的化疗中具有广泛应用，例如，用于宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、软组织肉瘤或骨肉瘤的基于紫杉烷的化疗。本发明的药物组合物可以有利地在化疗前施用和/或同时施用。



1. 一种预防或减轻人受试者中化疗诱发的脱发的方法,包括步骤:
 - (1) 选择患有癌症并且预定接受或正接受化疗的人受试者;和
 - (2) 将包含治疗有效量的维生素D化合物的药物组合物局部给药于受试者的头皮,其中步骤(2)在化疗之前进行和/或与化疗同时进行,由此预防或减轻受试者中化疗诱发的脱发。
2. 权利要求1的方法,其中在化疗开始前进行步骤(2)。
3. 权利要求1或2的方法,其中在化疗开始前进行步骤(2)足够的时间,使得在受试者的治疗区域中诱导毛囊的生长中期阶段。
4. 权利要求3的方法,其中在化疗开始前至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天进行步骤(2)。
5. 权利要求4的方法,其中在化疗开始前至少两周进行步骤(2)。
6. 权利要求1-5任一项的方法,其中以约10-40 μ g维生素D化合物的总日剂量来给药所述药物组合物。
7. 权利要求6的方法,其中以约20 μ g或约40 μ g维生素D化合物的总日剂量来给药所述药物组合物。
8. 权利要求1-7任一项的方法,其中以约1.0mL剂量来给药所述药物组合物。
9. 权利要求8的方法,其中将约0.25mL给药于头皮四个象限中的每一个。
10. 权利要求1-9任一项的方法,其中所述药物组合物包含约5、10或20 μ g/mL浓度的维生素D化合物。
11. 权利要求1-10任一项的方法,其中每日两次进行步骤(2)。
12. 权利要求11的方法,其中所述每日两次施用间隔约10-14小时。
13. 权利要求1-12任一项的方法,其中所述受试者患有实体肿瘤。
14. 权利要求13的方法,其中所述受试者具有晚期或复发的癌症。
15. 权利要求13或14的方法,其中所述受试者患有宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、软组织肉瘤或骨肉瘤。
16. 权利要求13或14的方法,其中所述受试者患有乳腺癌。
17. 权利要求1-16任一项的方法,其中基于一个或多个以下的附加标准来选择所述受试者:
 - 所述受试者是至少18岁的人类;
 - 所述受试者没有脱发迹象或轻度脱发;
 - 所述受试者具有非凋亡的毛囊;
 - 所述受试者在开始局部给药前14天内具有0或1的东部肿瘤协作组(ECOG)性能评分;
 - 所述受试者在开始局部给药前72小时内具有高于1500细胞/mm³的基线嗜中性粒细胞计数;和
 - 所述受试者在开始局部给药前72小时内具有低于或等于正常值上限(ULN)的血清钙水平。
18. 权利要求1-16任一项的方法,其中基于一个或多个以下的附加标准来选择所述受试者:
 - 所述受试者在开始局部给药的4周内没有接受降钙治疗或可能影响钙水平的药物,除

非所述受试者在开始局部给药前用双膦酸盐或降钙治疗控制3个月或更长时间且已经显示了钙代谢稳定性的证据；

所述受试者在开始局部给药的30天内没有高血钙或维生素D毒性的病史；

所述受试者在开始局部给药30天内没有住院治疗心绞痛、心肌梗塞或充血性心力衰竭或者精神病的病史；

所述受试者在局部给药过程中没有服用维生素D补充剂，除非所述受试者在局部给药开始前已经服用维生素D补充剂30天或更长时间并在整个局部给药过程中维持相同剂量；

所述受试者在开始局部给药的4周内没有用已知影响钙水平的药物进行治疗，稳定治疗超过6个月的受试者除外；

所述受试者没有接受噻嗪或呋塞米利尿剂，具有稳定剂量并且治疗超过6个月的受试者除外；

所述受试者不具有高血钙或肾结石；和

所述受试者不具有按照美国国立癌症研究所针对不良事件的通用技术标准 (NCI-CTCAE) v4.0的2级或更高级别的脱发，或者显著掉发或头发断裂。

19. 权利要求1-18任一项的方法，其中在化疗开始后步骤(2)进行至少三个月。

20. 权利要求1-18任一项的方法，其中在化疗完成后步骤(2)进行至少三个月。

21. 权利要求1-18任一项的方法，其中步骤(2)在化疗持续期间进行。

22. 权利要求1-21任一项的方法，其中所述药物组合物配制为使得所述维生素D化合物递送至表皮而基本上避免了真皮递送。

23. 权利要求1-22任一项的方法，其中所述药物组合物是无水的。

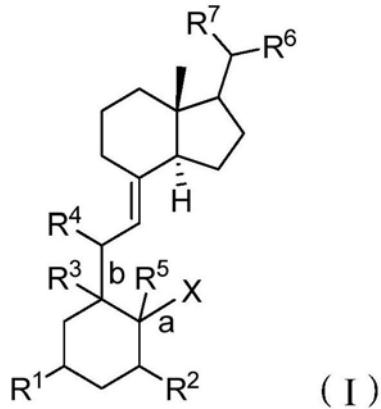
24. 权利要求23的方法，其中所述药物组合物包含约40% (w/w) 丙二醇和约60% (w/w) 无水乙醇的溶媒。

25. 权利要求23的方法，其中所述药物组合物包含约30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙氧基二甘醇或卡必醇和约60% (w/w) 无水纯乙醇 (200标准强度, U.S.) 的溶媒。

26. 权利要求1-25任一项的方法，其中进行步骤(2)基本上不降低化疗的功效。

27. 权利要求1-26任一项的方法，其中所述维生素D化合物是钙三醇。

28. 权利要求1-26任一项的方法，其中所述维生素D化合物由通式(I)表示：



其中

a和b各自独立地是单键或双键；

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；

R^1 是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR'$ R'' 部分取代;

R^2 是氢、羟基、-0-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或烯基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR'$ R'' 部分取代;

当b是双键时, R^3 不存在,或当b是单键时, R^3 是氢、羟基或烷基,或 R^3 和 R^1 与其连接的碳原子一起可以连接形成5-7元碳环;

当b是双键时, R^4 不存在,或当b是单键时, R^4 是氢、卤素或羟基;

当a是双键时, R^5 不存在,或当a是单键时, R^5 是氢、卤素或羟基;

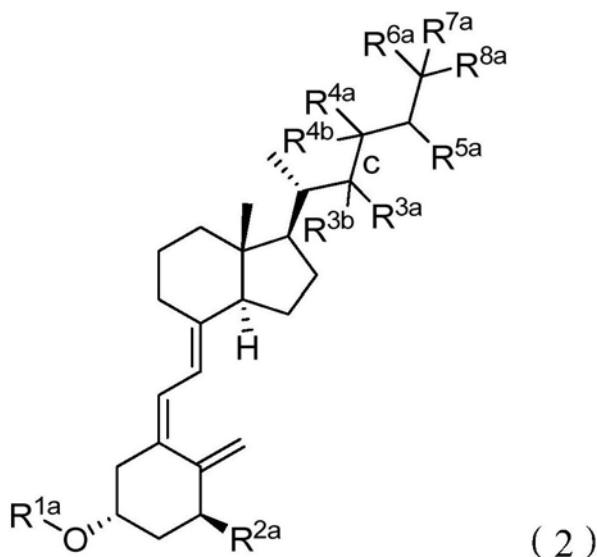
R^6 是任选被一个至五个羟基、氧、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或 $-NR'$ R'' 部分取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-0-烷基、烷基-CO₂-烷基;

R^7 是任选被一个至三个羟基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或 $-NR'$ R'' 部分取代的烷基;和

R' 和 R'' 各自独立地是氢、羟基、卤素、烷基或烷氧基,

及其药物学上可接受的盐。

29. 权利要求28的方法,其中所述维生素D化合物由通式(2)表示:



其中

c是单键或双键;

R^{1a} 是氢、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR'$ R'' 部分取代;

R^{2a} 是氢、羟基、-0-三烷基-甲硅烷基,或烷基、烷氧基或烯基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR'$ R'' 部分取代;

当c是双键时, R^{3a} 、 R^{4a} 不存在,或当c是单键时, R^{3a} 、 R^{4a} 各自独立地是氢、羟基、卤素、或任选被一至三个羟基或卤素部分取代的烷氧基或烷基;

R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5a} 、 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 各自独立地是氢、羟基、卤素、或任选被一个至三个羟基或卤素部分取代烷氧基或烷基,或 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 中的任何两个可以连接形成3-7元碳环,

及其药物学上可接受的盐。

30. 权利要求1-26任一项的方法,其中所述维生素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MC 903。

31. 权利要求1-26任一项的方法,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MC 903。

32. 权利要求1-31任一项的方法,其中使用计量喷雾装置来给药所述药物组合物。

33. 一种适用于局部给药并且包含治疗有效量的维生素D化合物的用于根据权利要求1-32任一项预防或减轻化疗诱发的脱发的药物组合物。

34. 一种包含药物组合物和说明书的药盒,所述药物组合物适用于局部给药并且包含对于预防或减轻化疗诱发的脱发有效量的维生素D化合物;所述说明书用于说明进行根据权利要求1-32任一项的预防或减轻化疗诱发的脱发的方法。

35. 一种包含药物组合物的计量喷雾装置,所述药物组合物包含0.1-400 μ g/mL浓度的维生素D化合物。

36. 权利要求35的计量喷雾装置,其中所述计量喷雾装置设计为分配约0.25ml剂量四次中的一次或多次。

37. 权利要求36的计量喷雾装置,其中所述计量喷雾装置设计为分配约0.25ml剂量112次。

使用维生素D预防或减轻化疗诱发的脱发

[0001] 本申请为国际申请PCT/US2014/040084进入中国国家阶段的中国专利申请(申请号为201480042529.8,申请日为2014年5月29日,发明名称为“使用维生素D预防或减轻化疗诱发的脱发”)的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2013年5月29日提交的发明名称为“Preventing or Mitigating Chemotherapy Induced Alopecia Using Vitamin D(使用维生素D预防或减轻化疗诱发的脱发)”的美国临时申请系列No. 61/828,448的优先权,将其完整内容在此专门按引用并入本文中。

背景技术

[0004] 脱发是许多化疗剂常见的且使人痛苦的副作用,并且对此目前几乎没有有效的预防措施。在最近的研究中,四十六名正接受化疗的患者中的三十五名将脱发归为比呕吐更令人烦扰的副作用(Tierney等, B.J.Cancer, 62:527-528, 1990)。

[0005] 目前,遭受脱发的那些患者只能尝试通过重复施用局部类固醇来重新生长脱落的头发或尝试通过局部施用米诺地尔(minoxidil)来维持头发生长。此外,目前不存在批准的具有预防或减轻作为化疗治疗过程中的副作用发生的脱发的能力的治疗剂,尽管已经存在一些有希望的研究。例如,使用幼大鼠模型,已经证明了ImuVert,一种从细菌粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)制得的生物反应调节剂,保护动物免受由阿糖胞苷或阿霉素诱发的脱发(Hussein等, Science 249: 1564-1566, 1990)。在随后的研究中,从重组白细胞介素(IL-1)β观察到对ARA-C-诱发的脱发的相似保护作用(Jimenez等, FASEB J. 1991)。尽管存在这些有希望的研究,但仍然需要安全且有效的治疗遭受这种病症的那些患者的脱发并且进一步预防正接受癌症治疗的那些患者中化疗诱发的脱发的治疗剂。

发明内容

[0006] 本发明涉及维生素D化合物(如维生素D3或钙三醇及其类似物或其代谢物)用于预防或减轻化疗诱发的脱发(CIA)的局部应用、其剂量和制剂。特别地,本发明提供了用于预防或减轻化疗诱发的脱发(CIA)的方法和药物组合物。本发明的药物组合物包括局部制剂中的有效量的维生素D化合物。本发明在用于实体肿瘤如宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、卵管癌、原发性腹膜癌、软组织肉瘤或骨肉瘤的治疗的诱发脱发的化疗(例如,基于紫杉烷的化疗)中具有宽泛的应用。本发明的药物组合物可以有利地在化疗之前给药和/或与化疗同时给药。

[0007] 因此,在一个方面中,本发明提供了一种预防或减轻人受试者中化疗诱发的脱发的方法,包括步骤:(1)选择患有癌症并且预定接受或正接受化疗的人受试者;和(2)将包含治疗有效量的维生素D化合物的药物组合物局部给药于受试者的头皮,其中步骤(2)在化疗之前和/或与化疗同时进行,由此预防或减轻受试者中化疗诱发的脱发。

[0008] 在一些实施方案中,上述方法中的步骤(2)在化疗开始前进行。在一个实施方案

中,在化疗开始前进行步骤(2)足够的时间,以使得在受试者的治疗区域诱导毛囊的生长中期阶段(catagen stage)。优选地,在化疗开始前至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天进行步骤(2)。更优选,在化疗开始前至少两周进行步骤(2)。

[0009] 在一个实施方案中,上述方法或其实实施方案中使用的药物组合物 以约10-40 μ g维生素D化合物的总日剂量给药。优选,总日剂量为约 20 μ g或约40 μ g。

[0010] 在一些实施方案中,上述方法或其实实施方案中使用的药物组合物 以约1.0mL剂量给药。优选,将约0.25mL给药于头皮四个象限中的 每一个。

[0011] 在一些实施方案中,上述方法或其实实施方案中使用的药物组合物 包括浓度为约5、10或20 μ g/mL的维生素D化合物。

[0012] 在一些实施方案中,上述方法或其实实施方案中的步骤(2)每日 进行两次。在一个实施方案中,每日两次给药间隔约10-14小时。

[0013] 在一些实施方案中,受试者患有实体肿瘤。在一个实施方案中,受试者患有晚期或复发的癌症。在一个实施方案中,受试者患有宫颈 癌、子宫内膜癌、卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、软组织肉瘤或骨 肉瘤。在一个实施方案中,受试者患有乳腺癌。

[0014] 在一些实施方案中,基于一个或多个以下的附加标准来选择受试 者:受试者是至少18岁的人类;受试者没有脱发迹象或轻度脱发; 受试者具有非凋亡的毛囊;受试者在开始局部给药前14天内具有0 或1的东部肿瘤协作组 (ECOG) 性能评分;受试者在开始局部给药 前72小时内具有高于1500细胞/mm³的基线嗜中性粒细胞计数;和 受试者在开始局部给药前72小时内具有低于或等于正常值上限 (ULN) 的血清钙水平。

[0015] 在一些实施方案中,基于一个或多个以下的附加标准来选择受试 者:受试者在开始局部给药的4周内没有接受降钙治疗或可能影响钙 水平的药物,除非受试者在开始局部给药前用双膦酸盐或降钙治疗控 制3个月或更长时间且已经表现了钙代谢稳定性的证据;受试者在开 始局部给药的30天内没有高血钙或维生素D毒性的病史;受试者在 开始局部给药30天内没有住院治疗心绞痛、心肌梗塞或充血性心力 衰竭或者精神病的病史;受试者在局部给药过程中没有服用维生素D 补充剂,除非受试者在局部给药开始前已经服用维生 素D补充剂30 天或更长时间并在整个局部给药过程中维持相同剂量;受试者在开始 局部给药的4周内没有用已知影响钙水平的药物治疗,稳定治疗超过 6个月的受试者除外;受试者没有接受噻嗪或呋塞米利尿剂,具有稳 定剂量并且治疗超过6个月的受试者除外;受试者不具有高血钙或肾 结石;和受试者不具有按照美国国立癌症研究所针对不良事件的通用 技术标准 (NCI-CTCAE) v4.0的2级或更高级别的脱发,或者显著 的掉发或头发断裂。

[0016] 在一些实施方案中,上述方法或其实实施方案中预定的化疗包括基 于紫杉烷的癌 症化疗。在一个实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包 括一种或多种选自紫杉醇、纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇和多西紫杉 醇癌症化疗的紫杉烷化疗剂。在一个实施方案中,基于紫杉烷的癌症 化疗包括一种或多种选自紫杉醇、多西紫杉醇、结合聚谷氨酸聚合物 的紫 杉醇、结合二十二碳六烯酸的紫杉醇、肿瘤激活的紫杉酚前药、紫杉醇-Angiopep-2缀合物 (ANG1005)、多聚谷氨酸紫杉醇、共聚 物组合紫杉醇、脂质体包封的紫杉醇、维生素E乳液中的紫杉酚及其 等价物的紫杉烷化疗剂。在一个实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗 包括一种或多种选自蒽环类(亚德里亚霉素/阿霉素、道诺霉素、表柔 比星、去甲氧基柔红霉素、 戊柔比星)、5-FU、他莫昔芬、伊立替康、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、十字孢碱、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、更生霉素、六甲三聚氰胺 (Hexamethalamine) (HMM, 六甲蜜胺)、异环磷酰胺、博来霉素、氨甲喋呤、长春地辛、长春瑞滨、拓扑替康、安吖啶、阿糖胞苷、白 消安、美法仑、长春花碱、洛莫司汀 (CCNU)、噻替派、吉西他滨、卡氮芥 (BCNU)、米托蒽醌、丝裂霉素 C、甲基苄肼、6-巯基嘌呤、链脲霉素 (Streptozotocin)、氟达拉滨、雷替曲塞 (Raltitrexate) (Tomudex)、卡培他滨及其等价物的其他治疗剂。

[0017] 在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗不是紫杉醇或多西紫 杉醇。在一个实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗不是紫杉醇。在另一个实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗不是多西紫杉醇。

[0018] 在一些实施方案中,癌症包括转移性乳腺癌且化疗包括基于紫杉 醇的、基于nab-紫杉醇(即,白蛋白结合的紫杉醇)或多西紫杉醇的 化疗,各自任选地与卡铂组合。

[0019] 在一些实施方案中,癌症包括卵巢癌且化疗包括基于紫杉醇和/ 或多西紫杉醇的化疗,任选地与卡铂组合。

[0020] 在一些实施方案中,癌症包括子宫癌和化疗包括基于多西紫杉醇 的化疗,任选地与吉西他滨组合。

[0021] 在一些实施方案中,癌症包括宫颈癌和化疗包括基于紫杉醇的化 疗,任选地与顺铂和/或拓扑替康组合。

[0022] 在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤和化疗包括吉西他滨、5- 氟尿嘧啶 (5-FU) 和多西紫杉醇。在一个实施方案中,癌症是实体肿 瘤和化疗是5-FU和甲酰四氢叶酸的组合。

[0023] 在一些实施方案中,上述方法或其实实施方案中的步骤 (2) 在化 疗开始后进行至少 3 个月。在一些实施方案中,上述方法或其实实施方案中的步骤 (2) 在化疗完成后进行至少 3 个月。在一些实施方案中, 上述方法或其实实施方案中的步骤 (2) 在化疗的持续时间内进 行。

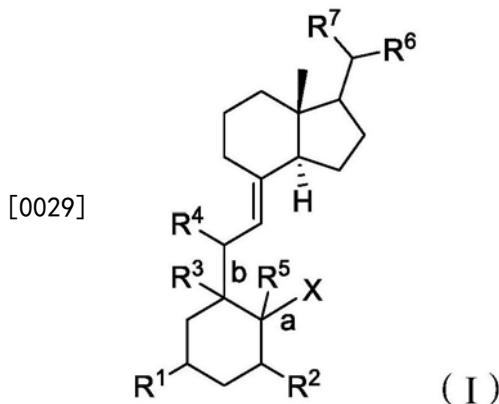
[0024] 在一些实施方案中,药物组合物配制为使得将维生素D化合物 递送至表皮而基本上避免真皮递送。

[0025] 在一些实施方案中,药物组合物是无水的。在一个实施方案中, 药物组合物包括 约 40% (w/w) 丙二醇和约 60% (w/w) 无水乙醇的 溶媒。在一些实施方案中,药物组合物包括 约 30% (w/w) 丙二醇、约 10% (w/w) 乙氧基二甘醇或卡必醇 (transcutol) 和约 60% (w/w) 无水绝对乙醇 (200 标准强度, U.S.) 的溶媒。

[0026] 在一些实施方案中,进行上述方法或其实实施方案中的步骤 (2) 基本上没有降低化 疗的功效。

[0027] 在一些实施方案中,维生素D化合物是钙三醇。

[0028] 在一些实施方案中,维生素D化合物由通式 (I) 来表示:



[0030] 其中

[0031] a和b各自独立地是单键或双键；

[0032] 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；

[0033] R¹是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基，任选被一至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代；

[0034] R²是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或烯基，任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代；

[0035] 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与其连接的碳原子一起可以连接形成5-7元碳环；

[0036] 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；

[0037] 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；

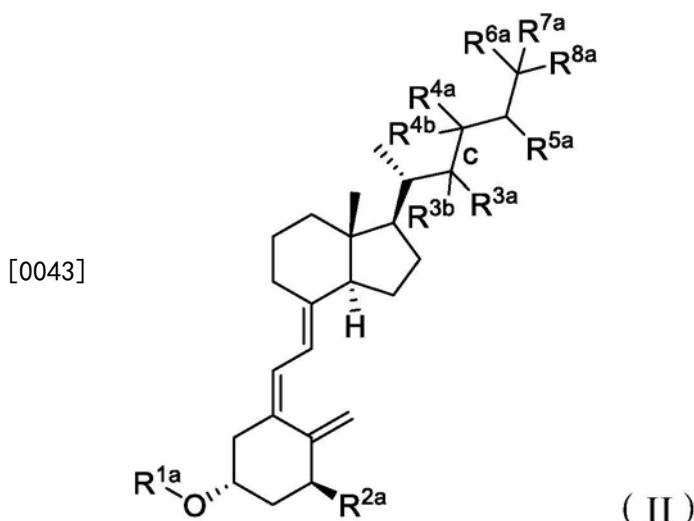
[0038] R⁶是任选被一个至五个羟基、氧、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R"部分取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-O-烷基、烷基-CO₂-烷基；

[0039] R⁷是任选被一个至三个羟基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R"部分取代的烷基；和

[0040] R' 和R"各自独立地是氢、羟基、卤素、烷基或烷氧基，

[0041] 及其药物学上可接受的盐。

[0042] 在一些实施方案中，维生素D化合物由通式(II)来表示：



[0044] 其中

[0045] c是单键或双键；

[0046] R^{1a}是氢、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代；

[0047] R^{2a}是氢、羟基、-0-三烷基-甲硅烷基,或烷基、烷氧基或烯基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代；

[0048] 当c是双键时,R^{3a}、R^{4a}不存在,或当c是单键时,R^{3a}、R^{4a}各自独立地是氢、羟基、卤素、或任选被一至三个羟基或卤素部分取代的烷氧基或烷基；

[0049] R^{3b}、R^{4b}、R^{5a}、R^{6a}、R^{7a}和R^{8a}各自独立地是氢、羟基、卤素、或任选被一个至三个羟基或卤素部分取代的烷氧基或烷基,或R^{6a}、R^{7a}和R^{8a}中的任何两个可以连接形成3-7元碳环,

[0050] 及其药物学上可接受的盐。

[0051] 在一些实施方案中,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MC 903。

[0052] 在一些实施方案中,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MC 903。

[0053] 在一些实施方案中,使用计量喷雾装置来给药药物组合物。

[0054] 在本发明的另一个方面中,本发明包括用于上述方法或其实实施方案中的适用于局部给药并包括治疗有效量的维生素D化合物的药物组合物。

[0055] 在本发明的再另一个方面中,本发明包括包含药物组合物和说明书的试剂盒,所述药物组合物适用于局部给药并包含用于预防或减轻化疗诱发的脱发的治疗有效量的维生素D化合物,所述说明书用于说明进行任何一种上述方法或其实实施方案。

[0056] 在本发明的再另一个方面中,本发明包括包含药物组合物的计量喷雾装置,所述药物组合物包含0.1-400 μ g/mL浓度的维生素D化合物。在一个实施方案中,计量喷雾装置设计成分配约0.25mL剂量四次中的一次或多次。在另一个实施方案中,剂量喷雾装置设计成分配约0.25mL剂量112次。

[0057] 在另一个方面中,本发明提供了一种预防或减轻受试者中化疗诱发的脱发的方法,其通过(1)选择预定接受或正接受化疗的受试者; 和(2)在化疗之前和/或同时,将包含治疗有效量的维生素D化合物的药物组合物局部给药于受试者的头皮,由此预防或减轻受试者中化疗诱发的脱发。

[0058] 在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、卵管癌、原发性腹膜癌、软组织肉瘤或骨肉瘤的受试者。

[0059] 在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有乳腺癌的受试者。或者,选择受试者可以包括选择未患乳腺癌的受试者。

[0060] 在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有晚期或复发的癌症的受试者。在一些实施方案中,癌症可以是转移性的、局部晚期的或不可切除的。在一些实施方案中,可以按照分期来选择癌症(例如,可以针对特定分期或分期范围的特定癌症来选择受试者)。

[0061] 在一些实施方案中,选择受试者包括以下的一种或多种:选择至少18岁的人类女性的受试者;选择没有脱发迹象或轻度脱发的受试者;选择具有非凋亡的毛囊的受试者;

选择在开始局部给药前14天 内具有0或1的东部肿瘤协作组 (ECOG) 性能评分的受试者;选择 在开始局部给药前72小时内具有高于1500细胞/mm³的基线嗜中性 粒细胞计数的受试者;和选择在开始局部给药前72小时内具有低于 或等于正常值上限 (ULN) 的血清钙水平的受试者。

[0062] 在一些实施方案中,选择受试者包括以下的一种或多种:选择在 开始局部给药的4周内没有接受降钙治疗或可能影响钙水平的药物的 受试者,除非受试者在开始局部给药前用双膦酸盐或降钙治疗控制3 个月或更长时间且已经表现钙代谢稳定性的证据;选择在开始局部给 药的30天内没有高血钙或维生素D毒性病史的受试者;选择在开始 局部给药30天内没有住院治疗心绞痛、心肌梗塞或充血性心力衰竭 或者精神病的病史的受试者;选择在局部给药过程中没有服用维生素 D补充剂的受试者,除非受试者在局部给药开始前已经服用维生素D 补充剂30天或更长时间并在整个局部给药过程中维持相同剂量;选 择在开始局部给药的4周内没有用已知影响钙水平的药物治疗的受试 者,稳定治疗超过6个月的受试者除外;选择没有接受噻嗪或呋塞米 利尿剂的受试者,具有稳定剂量并且治疗超过 6个月的受试者除外; 选择不具有高血钙或肾结石的受试者;和选择不具有按照美国国立癌 症研究所针对不良事件的通用技术标准 (NCI-CTCAE) v4.0的2级 或更高级别的脱发或者显著掉发或头发断裂的受试者。

[0063] 在一些实施方案中,化疗包括一种或多种选自基于紫杉烷的癌症 化疗的紫杉烷化疗剂。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗可 以包括紫杉醇、纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇和/或多西紫杉醇癌症化 疗。

[0064] 在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括一种或多种选自 紫杉醇、多西紫 杉醇、结合聚谷氨酸聚合物的紫杉醇、结合二十二碳 六烯酸的紫杉醇、肿瘤激活的紫杉酚前药、紫杉醇-Angiopep-2缀合 物(ANG1005)、多聚谷氨酸紫杉醇、共聚物组合紫杉醇、脂质体包 裹的紫杉醇、维生素E乳液中的紫杉酚及其等价物的紫杉烷化疗剂。

[0065] 在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括一种或多种选自 葱环类(亚德里 亚霉素/阿霉素、道诺霉素、表柔比星、去甲氧基柔红 霉素、戊柔比星)、5-FU、他莫昔芬、伊 立替康、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、十字孢 碱、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、更生霉素、六 甲三聚氰胺(HMM,六甲蜜胺)、异环磷 酰胺、博来霉素、氨甲喋呤、长春地辛、长春瑞滨、拓 扑替康、安吖 呤、阿糖胞苷、白消安、美法仑、长春花碱、洛莫司汀(CCNU)、 噻替派、吉西他滨、 卡氮芥(BCNU)、米托蒽醌、丝裂霉素C、甲 基苄肼、6-巯基嘌呤、链脲霉素、氟达拉滨、雷替曲 塞(Tomudex)、卡培他滨及其等价物的其他化疗剂。

[0066] 在一些实施方案中,癌症包括转移性乳腺癌和化疗包括基于紫杉 醇的、基于nab- 紫杉醇(即,白蛋白结合的紫杉醇)或多西紫杉醇的 化疗,其各自任选地与卡铂组合。

[0067] 在一些实施方案中,癌症包括卵巢癌和化疗包括基于紫杉醇和/ 或多西紫杉醇的 化疗,任选地与卡铂组合。

[0068] 在一些实施方案中,癌症包括子宫癌和化疗包括基于多西紫杉醇 的化疗,任选地 与吉西他滨组合。

[0069] 在一些实施方案中,癌症包括宫颈癌和化疗包括基于紫杉醇的化 疗,任选地与顺 铂和/或拓扑替康组合。

[0070] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗之前和/或 与化疗同时将药物组合物给药于受试者。

[0071] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药 药物组合物4-7天。

[0072] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药 药物组合物至少两周(即,14天)。

[0073] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗持续时间内 给药药物组合物。

[0074] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在开始或完成化疗 后给药药物组合物至少三个月。

[0075] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始后,但 在化疗诱发的脱发开始前,将药物组合物给药于受试者。

[0076] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括每日两次给药药物 组合物。在一些实施方案中,每日两次给药间隔约10-14小时。

[0077] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括使用计量喷雾装置 给药1.0mL剂量的药物组合物,0.25mL用于头皮四个象限中的每一个。

[0078] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括给药药物组合物中 浓度为5、10或 20 μ g/mL的维生素D化合物。

[0079] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约10-40 μ g 维生素D化合物给药于头皮。

[0080] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括基本上避免维生素 D化合物的真皮递送。

[0081] 在一些实施方案中,药物组合物不是在水基制剂中。

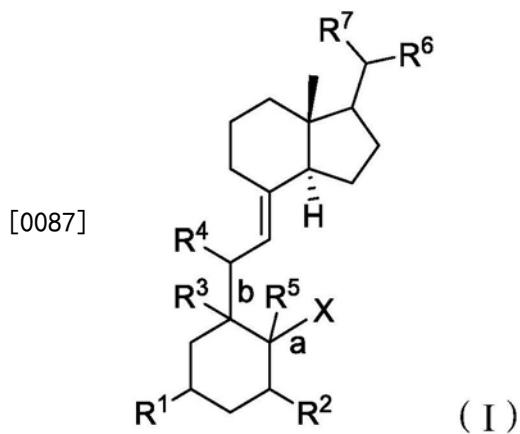
[0082] 在一些实施方案中,药物组合物包括约40% (w/w) 丙二醇和约 60% (w/w) 无水乙醇的溶媒中的维生素D化合物。

[0083] 在一些实施方案中,药物组合物包括约40% (w/w) 丙二醇和约 60% (w/w) 无水绝对乙醇(200标准强度,U.S.) ;或约30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙氧基二甘醇或卡必醇和约60% (w/w) 无 水绝对乙醇(200标准强度,U.S.) 的溶媒中的维生素D化合物。

[0084] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物基本上没有降低化疗的 功效。

[0085] 在一些实施方案中,维生素D化合物是钙三醇。

[0086] 在一些实施方案中,维生素D化合物由通式 (I) 来表示:



[0088] 其中

[0089] a和b各自独立地是单键或双键

[0090] 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;

[0091] R¹是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代;

[0092] R²是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或烯基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代;

[0093] 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与其连接的碳原子一起可以连接形成5-7元碳环;

[0094] 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;

[0095] 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;

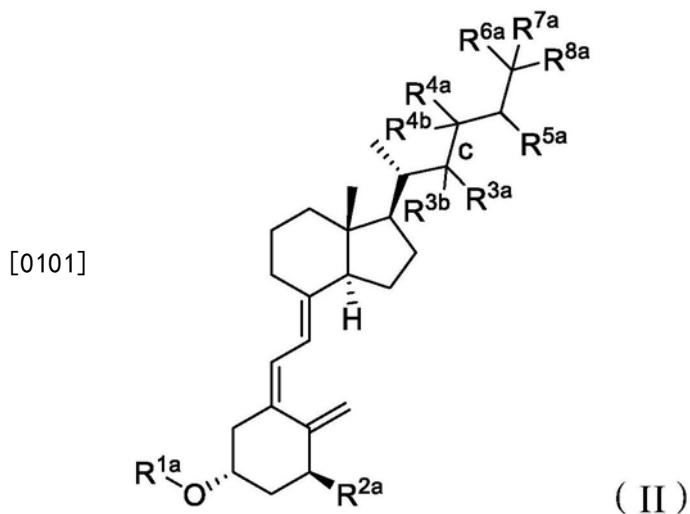
[0096] R⁶是任选被一个至五个羟基、氧、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R"部分取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-O-烷基、烷基-CO₂-烷基;

[0097] R⁷是任选被一个至三个羟基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R"部分取代的烷基;和

[0098] R' 和R"各自独立地是氢、羟基、卤素、烷基或烷氧基,

[0099] 及其药物学上可接受的盐。

[0100] 在一些实施方案中,维生素D化合物由通式(II)来表示:



- [0102] 其中
- [0103] c是单键或双键；
- [0104] R^{1a} 是氢、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR' R''$ 部分取代；
- [0105] R^{2a} 是氢、羟基、-0-三烷基-甲硅烷基,或烷基、烷氧基或烯基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR' R''$ 部分取代；
- [0106] 当c是双键时, R^{3a} 、 R^{4a} 不存在,或当c是单键时, R^{3a} 、 R^{4a} 各自独立地是氢、羟基、卤素或任选被一至三个羟基或卤素部分取代的 烷氧基或烷基；
- [0107] R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5a} 、 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 各自独立地是氢、羟基、卤素、或任选被一个至三个羟基或卤素部分取代的烷氧基或烷基,或者 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 中的任何两个可以连接形成3-7元碳环,
- [0108] 及其药物学上可接受的盐。
- [0109] 在一些实施方案中,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MC 903。
- [0110] 在一些实施方案中,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MC 903。
- [0111] 在一个方面中,本发明提供了根据以上任一个或多个方面和实施 方案用于预防或减轻化疗诱发的脱发的适用于局部给药并包括治疗 有效量的维生素D化合物的药物组合物。
- [0112] 在一个方面中,本发明提供了包含药物组合物和说明书的试剂 盒,所述药物组合物适用于局部给药并包含用于预防或减轻化疗诱发 的脱发的治疗有效量的维生素D化合物,所述说明书用于说明进行根 据以上任一个或多个方面和实施方案的预防或减轻化疗诱发的脱发 的方法。
- [0113] 应当注意到本文中所述的全部实施方案(以上和以下的)预期能 够在合适的情况下结合任何其他实施方案,包括只在本发明的一个方 面下描述的实施方案和在不同方面下描述的实施方案。

附图说明

- [0114] 图1显示了三名皮肤供体的总吸收和质量平衡结果,和单次施用 48小时内从完整人尸体皮肤的钙三醇的分布。结果以对数标尺显示为 作为总质量的平均值 \pm SE (ng/cm^2)。
- [0115] 图2显示了生长培养基中存在的不同浓度钙三醇下HEKa细胞的 示例性生长曲线。注意钙三醇浓度的对数标尺。
- [0116] 图3显示了胰腺癌细胞系PaCa2的示例性生长曲线,该生长曲 线对0.1 $\mu g/mL$ 钙三 醇的存在没有反应。
- [0117] 图4A和4B分别显示了在递增浓度的钙三醇存在下Hep-G2细 胞和MCF-7细胞的生长。
- [0118] 图5显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1 $\mu g/mL$ 钙三醇下,厄 洛替尼(特罗凯) (一

种EGFR Tyr激酶抑制剂)的给药曲线。

[0119] 图6显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下吉非 替尼(易瑞沙)(另一种EGFR Tyr激酶抑制剂)的给药曲线。

[0120] 图7显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下索拉 非尼的给药曲线。已知索拉非尼抑制几种激酶(Raf、VEGF-R2、c-kit、PDGR-R)。

[0121] 图8显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下达沙 替尼的给药曲线。达沙替尼抑制BCR/ABL Tyr激酶。

[0122] 图9显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下十字 孢碱的给药曲线。十字孢碱是相对非特异性的激酶抑制剂。

[0123] 图10显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下顺铂 的给药曲线。顺铂是DNA烷化剂。

[0124] 图11显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下卡铂 的给药曲线。卡铂也是DNA烷化剂。

[0125] 图12显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下伊立 替康的给药曲线。

[0126] 图13显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下紫杉 醇的给药曲线。

[0127] 图14显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下5-FU 的给药曲线。

[0128] 图15显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下吉西 他滨的给药曲线。

[0129] 图16显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下阿霉 素的给药曲线。

[0130] 图17显示了在不存在(◆)或存在(×)0.1μg/mL钙三醇下他莫 昔芬的给药曲线。

[0131] 图18显示0.1μg/mL钙三醇保护正常角化细胞HEKa对抗5-FU, 同时没有明显地影响5-FU对抗癌细胞的ED₅₀值。

[0132] 图19显示钙三醇没有明显地改变阿霉素对抗癌细胞系SkBr-3的 细胞毒性作用。

[0133] 图20A显示,在接受依托泊昔的Sprague Dawley大鼠中,钙三 醇的局部制剂以剂量依赖性方式提供针对化疗诱发的脱发(CIA)的 保护。左图:只接受依托泊昔的大鼠;中图:接受依托泊昔和局部制 剂中0.1μg钙三醇的局部施用的大鼠;右图:接受依托泊昔和局部制 剂中0.3mg钙三醇的局部施用的大鼠。图20B显示了涂色的Long Evans大鼠中相似的结果。

[0134] 图21显示钙三醇局部制剂(0.2μg总剂量)保护Long Evans大 鼠免受环磷酰胺(CTX)诱发的脱发。

[0135] 图22A显示钙三醇局部制剂(0.2μg总剂量)保护Long Evans 大鼠免受环CTX-阿霉 素联合治疗诱发的脱发。图22B显示了钙三醇 局部制剂钙三醇在治疗的大鼠中对于阿胞糖昔-阿霉素联合治疗诱发 的脱发的相似保护结果。阿胞糖昔单独治疗的大鼠中钙三醇局部 制剂 的保护作用显示于图22C中。

[0136] 图23显示局部钙三醇制剂(0.2μg总剂量)保护注射了MIAC51 (绿色瘤细胞)的 Long Evans大鼠免受CTX-诱发的脱发。

[0137] 图24显示,在对注射MIAC51 (绿色瘤细胞)的Long Evans大 鼠进行的体内实验中, 钙三醇局部制剂没有使癌细胞免受化疗影响。

[0138] 图25A和25B显示了小型猪表皮的角质层和表皮剩余部分估算 的回收钙三醇的水 平(ng/mg)。将量表示为回收的钙三醇的平均值 ±SD。nd=未检测到,na=不可用。

[0139] 图26显示了施用的钙三醇剂量与表皮中回收钙三醇组织水平之间的近线性相关性,施用3至100 μ g/mL的钙三醇浓度范围。

[0140] 图27说明了钙三醇对接受环磷酰胺的绿色瘤(chloroleukemic)大鼠的第一毛发生长初期的作用。图27A描绘了接受单独的环磷酰胺的大鼠,图27B描绘了接受环磷酰胺和媒介的大鼠,而图27C描绘了接受环磷酰胺和钙三醇的大鼠。

[0141] 图28描绘了钙三醇对接受环磷酰胺的绿色瘤大鼠的第二毛发生长初期的作用。从左至右,用单独的环磷酰胺治疗的大鼠,用环磷酰胺和媒介治疗的大鼠以及用环磷酰胺和钙三醇治疗的大鼠。

[0142] 图29说明了钙三醇对接受结合阿霉素的环磷酰胺的绿色瘤大鼠的第一毛发生长初期的作用。图29A描绘了接受单独的环磷酰胺和阿霉素的大鼠,图29B描绘了接受环磷酰胺、阿霉素和媒介的大鼠,同时图29C描绘了接受环磷酰胺、阿霉素和钙三醇的大鼠。

[0143] 图30说明了钙三醇对接受结合阿霉素的环磷酰胺的绿色瘤大鼠的第二毛发生长初期的作用。从左至右,用单独的环磷酰胺和阿霉素治疗的大鼠,用环磷酰胺、阿霉素和媒介治疗的大鼠以及用环磷酰胺、阿霉素和钙三醇治疗的大鼠。

[0144] 图31说明了钙三醇对接受结合阿霉素和阿胞糖昔的环磷酰胺的绿色瘤大鼠的第一毛发生长初期的作用。图31A描绘了接受单独的环磷酰胺、阿霉素和阿胞糖昔的大鼠,图31B描绘了接受环磷酰胺、阿霉素、阿胞糖昔和媒介的大鼠,同时图31C描绘了接受环磷酰胺、阿霉素、阿胞糖昔和钙三醇的大鼠。

[0145] 图32说明了钙三醇对接受结合阿霉素和阿胞糖昔的环磷酰胺的绿色瘤大鼠的第二毛发生长初期的作用。从左至右,用单独的环磷酰胺、阿霉素和阿胞糖昔治疗的大鼠,用环磷酰胺、阿霉素、阿胞糖昔和媒介治疗的大鼠以及用环磷酰胺、阿霉素、阿胞糖昔和钙三醇治疗的大鼠。

[0146] 图33说明了钙三醇对接受结合紫杉醇和依托泊昔的环磷酰胺的绿色瘤大鼠的第一毛发生长初期的作用。图33A描绘了接受单独的环磷酰胺、紫杉醇和依托泊昔的大鼠,图33B描绘了接受环磷酰胺、紫杉醇、依托泊昔和媒介的大鼠,同时图33C描绘了接受环磷酰胺、紫杉醇、依托泊昔和钙三醇的大鼠。

[0147] 图34说明了钙三醇对接受结合紫杉醇和依托泊昔的环磷酰胺的绿色瘤大鼠的第二毛发生长初期的作用。从左至右,用单独的环磷酰胺、紫杉醇和依托泊昔治疗的大鼠,用环磷酰胺、紫杉醇、依托泊昔和媒介治疗的大鼠以及用环磷酰胺、紫杉醇、依托泊昔和钙三醇治疗的大鼠。

[0148] 图35说明了钙三醇对接受结合紫杉醇和依托泊昔的阿霉素的绿色瘤大鼠的第一毛发生长初期的作用。图35A描绘了接受单独的阿霉素、紫杉醇和依托泊昔的大鼠,图35B描绘了接受阿霉素、紫杉醇、依托泊昔和媒介的大鼠,同时图35C描绘了接受阿霉素、紫杉醇、依托泊昔和钙三醇的大鼠。

[0149] 图36说明了钙三醇对接受结合紫杉醇和依托泊昔的阿霉素的绿色瘤大鼠的第二毛发生长初期的作用。从左至右,用单独的阿霉素、紫杉醇和依托泊昔治疗的大鼠,用阿霉素、紫杉醇、依托泊昔和媒介治疗的大鼠以及用阿霉素、紫杉醇、依托泊昔和钙三醇治疗的大鼠。

具体实施方式

[0150] 本文中描述的发明部分地基于可以预防或减轻化疗诱发的脱发的维生素D化合物的局部制剂的发现。在一些实施方案中,制剂可以选择性地递送至皮肤的表皮层或在皮肤的表皮层中累积,同时基本上避免递送至更深的真皮层和/或在更深的真皮层中累积。这在经受化疗的某些患者中可能是有利的,其中维生素D化合物的更深累积可能导致化疗方案功效的降低。这样的局部制剂在患有可能受到过量维生素D化合物的存在的负面影响的医学病症的患者中也可能是有利的,如患有肾结石的患者,以及其病症可能通过经由特定维生素D化合物的钙代谢时恶化的患者。因此,在这样的患者中,维生素D化合物的理想递送应当是最小有效剂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。

[0151] 本发明还部分地基于维生素D化合物在相对低的浓度/剂量下呈现出对正常角化细胞的温和生长刺激作用而在相对高浓度/剂量下呈现出对相同细胞的生长抑制作用的发现。因此,本发明提供了呈现最佳的对抗脱发的保护作用而没有引起不合需要的生长抑制作用的方法和药物组合物。因此,在各种不同的实施方案中,本发明包括在化疗之前和/或同时局部给药提供最佳的对抗脱发的保护作用而不引起不合需要的生长抑制作用的剂量的维生素D化合物。

[0152] 本发明还基于维生素D化合物激活或抑制正常角化细胞中的多个靶基因的表达,因此提供选择用于特定治疗应用的最合适维生素D化合物和鉴别具有相似生物活性的其他维生素D类似物的基础的发现。因此,在各种不同的实施方案中,本发明包括在化疗之前和/或同时局部给药维生素D化合物。

[0153] 尽管不希望受到任何特定理论的束缚,就最小化对化疗剂的药物干扰而言,本发明的制剂可能是有利的。皮肤的真皮层富含血管,并且渗透该层的局部药物可能引起对全身递送的化疗剂的干扰,导致不利的对癌细胞的保护作用。

[0154] 因此,在一个方面中,本发明提供了预防或减轻受试者中化疗诱发的脱发的方法,其是通过(1)选择预定接受或正接受化疗的受试者;和(2)在化疗之前和/或同时,将包含治疗有效量的维生素D化合物的药物组合物局部给药于受试者的头皮,由此预防或减轻受试者中化疗诱发的脱发。

[0155] 术语“脱发”包括个体头部或身体的非自愿的完全或部分毛发丢失,并且包括斑秃(AA)、全秃(AT)、普秃(AU)或化疗诱发的脱发(CIA)。斑秃可以包括弥漫性斑秃、单块性斑秃(*alopecia areata monolocularis*)、多块性斑秃(*alopecia areata multilocularis*)和须部斑秃(*alopecia areata barbae*)。在一些实施方案中,脱发不包括雄激素性脱发(雄性秃,或男性型脱发)或化疗后脱发(PCA)。

[0156] 脱发是毛发从头部或身体丢失的医学描述,有时候达到光秃的程度。与常见的体毛的美容脱毛不同,脱发倾向于是非自愿的并且是不受欢迎的,例如,雄激素性脱发。然而,它还可能由心理强迫引起而拔出自己的毛发(拔毛发癖)或自愿的发型设计途径的意外结果(来自过分紧的马尾辫或编织辫的机械“牵引性脱发”,或苛性头发膨松剂溶液或热的烫发器对头皮的烧灼)。在一些情况中,脱发是基础性医学问题(如缺铁)的指示。

[0157] 当毛发丢失只发生在一个部分中时,称为“斑秃”。在人斑秃中,从身体的一些或全部区域,通常从头皮丢失。因为引起头皮上的秃斑(spot),尤其是在第一阶段中,其有时候称为斑秃(spot baldness)。在1%-2%的病例中,状况可以扩散至整个头皮(全秃)或整

个表皮(普秃)。

[0158] 类似AA并具有相似诱因的病症也发生在其他物种中。最常见类型的斑秃涉及头皮上一个或多个圆形位点中的头发丢失。头发也可以更弥散地在整个头皮上丢失,在这种情况下,将病症称为弥散性斑秃。单块性斑秃描述了只在可能存在于头上任何区域中的一个位点中的秃发。多块性斑秃是指多个区域的头发丢失。该疾病可以仅限于胡须,在这种情况下,称为须部斑秃。如果个体失去其头皮上的全部头发,则将疾病称为全斑秃。

[0159] “普秃”是发生身体上完全毛发丢失时,其有时候化疗相关的毛发如何影响整个身体相似。

[0160] “雄激素性脱发”(也称为雄激素性秃发或雄性秃)是女性和男性人类、黑猩猩和猩猩中常见的头发丢失形式。特别地,在男性人类中,这种病症通常也称为男性型秃。头发以充分限定的模式丢失,从两个鬓角上开始。随着时间,发际线后退以形成特征性“M”形。在头冠部的头发也变薄。常常剩下围绕头侧部和后部的头发边缘,或病症可能进展成全秃。女性中头发丢失的模式不同于男性型秃发。在女性中,头发在整个头部变得更薄,并且发际线没有退后。女性中的雄激素性脱发仅导致全秃。

[0161] 表述“预防脱发”包括在发生前停止或抑制与脱发相关的头发丢失。

[0162] 表述“减轻脱发”或“治疗脱发”包括降低与脱发相关的头发丢失的严重程度,或降低与脱发相关的头发丢失的程度。在一些实施方案中,减轻或治疗脱发包括脱发的改善。

[0163] 术语“给药”包括以有效预防或治疗脱发的量给个体提供一剂或多剂维生素D化合物。对于给定的维生素D化合物的给药方案,可以由本领域技术人员使用关于利用的特定化合物、配制的特定组合物、施用方式、特定的给药部位等进行的常规剂量测定试验来确定最佳给药率。

[0164] 表述“局部给药”包括以有效治疗或预防脱发的量将一剂或多剂维生素D化合物递送至个体的皮肤。

[0165] 皮肤含有许多特化的细胞和结构,并且具有各种重要的功能,如作为接触环境的保护屏障、帮助维持适当的体温、从环境搜集感官信息以及在免疫系统中起着积极作用。

[0166] 皮肤具有三层-表皮、真皮和皮下组织。表皮是皮肤的外层。其厚度在不同类型的皮肤中不同。眼睑上最薄,为约0.05mm,手掌和脚底最厚,为约1.5mm。从底部到顶部,表皮含有五层:基底层、棘层、颗粒层、透明层(在一些皮肤中是任选的)和角质层。

[0167] 基底层是表皮中角化细胞的底层,并且负责不断地更新表皮细胞。这一层仅含有一排非常频繁地分裂的未分化柱状干细胞。一半细胞分化并移动至下一层以开始成熟过程。另一半停留在基底层中并且重复分裂以补充基底层。移入棘层(也称为棘细胞层)中的细胞从柱状变成多边形。在这一层中,细胞开始合成角蛋白。颗粒层或粒层(granular layer)中的细胞已经失去它们的细胞核并且特征在于细胞质物质的暗色团块。在这一层中存在多种活动,其中角蛋白和防水脂质正在产生和组织化。透明层只存在于厚的皮肤中,其在此帮助降低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细胞。这些细胞已经变平并且主要由角蛋白组成,其给所述层提供强度,但也允许水的吸收。角质层的结构看上去简单,但该层负责维持皮肤的完整性和水合-一种非常重要的功能。

[0168] 真皮的厚度也根据皮肤的位置而不同。眼睑上为约0.3mm,和在背部为约3.0mm。

真皮由整体而不是分层存在的三种类型的组织组成: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。上层乳头层含有薄的胶原纤维的排列。下层网状层较厚并且由与皮肤表面平行排列的厚胶原蛋白纤维形成。真皮含有许多特化的细胞和结构。例如,血管和神经穿过这层。毛囊也位于这一层中,具有连接每一个毛囊的竖毛肌。毛囊的一部分也含有能够再生长受损表皮的干细胞。干细胞可以存在于真皮-表皮连接(DEJ)处。皮脂(油)腺和顶泌(臭)腺与毛囊相关联。这一层也含有外分泌(汗)腺,但它们不与毛囊相关联。皮下组织是容纳较大血管和神经的脂肪和结缔组织的层。这一层在皮肤自身和身体的温度调节中是重要的。这一层的大小在整个身体中以及在人与人之间是不同的。

[0169] 因此,如本文中使用的,“表皮”包括其全部五层(存在时),包括表皮和真皮之间的连接层(例如,真皮-表皮连接或DEJ),以及再生表皮层的干细胞(例如,毛囊干细胞和表皮干细胞)。

[0170] 如本文中使用的,短语“选择预定接受或正接受化疗的受试者”包括选择已经由医生开出化疗方的患者或在医生护理下正接受化疗的患者,并且可以进一步包括选择满足一个或多个本文中所述标准的患者。

[0171] 在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有实体肿瘤的受试者。在一些实施方案中,实体肿瘤选自癌瘤、黑素瘤、肉瘤和淋巴瘤。在特定的实施方案中,实体肿瘤选自乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、卵管癌、原发性腹膜癌、肾(肾细胞)癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、骨癌、脑癌、宫颈癌、肝癌、胃癌、口腔和口癌、成神经细胞瘤、睾丸癌、子宫癌、软组织肉瘤、骨肉瘤和外阴癌。在特定的实施方案中,实体肿瘤是乳腺癌,包括三阴性乳腺癌。在特定的实施方案中,实体肿瘤是选自黑素瘤、鳞状细胞癌、基细胞癌和皮肤T-细胞淋巴瘤(CTCL)的皮肤癌。在一个实施方案中,实体肿瘤选自宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、卵管癌、原发性腹膜癌、软组织肉瘤和骨肉瘤。

[0172] 在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有乳腺癌的受试者。或者,选择受试者可以包括选择未患有乳腺癌的受试者。

[0173] 在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有宫颈癌的受试者。在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有子宫内膜癌的受试者。在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有卵巢癌的受试者。在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有卵管癌的受试者。在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有原发性腹膜癌的受试者。在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有软组织肉瘤的受试者。在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有骨肉瘤的受试者。

[0174] 在一些实施方案中,选择受试者包括选择患有晚期或复发的癌症的受试者。在一些实施方案中,癌症,例如,晚期癌症,可以是转移性的、局部晚期的或不可切除的。在一些实施方案中,可以通过分期来选择癌症(例如,可以针对特定分期或分期范围的特定癌症来选择受试者)。

[0175] 在一些实施方案中,可以通过罗马数字将癌症分期,例如,0期:原位癌;I期:癌症位于身体的一个部分(如果足够小,I期癌症可以通过外科手术除去);II期:癌症是局部晚期的(可以通过化疗、放疗或外科手术来治疗II期癌症);III期:癌症也是局部晚期的(是否将癌症命名为II期或III期可以取决于癌症的特定类型;例如,在霍奇金疾病中,II期表示受影响的淋巴结只在横膈膜一侧,而III期表示受影响的淋巴结在横膈膜上方和下方)。

对于II期和III期的特定 标准因此根据诊断而不同。III期可以通过化疗、放疗或外科手术来治疗);IV期:癌症常常已经转移,或扩散至其他器官或全身(IV期 癌症可以通过化疗、放疗、外科手术或临床试验来治疗)。

[0176] 在一些实施方案中,癌症可以通过TNM(肿瘤、结节、转移) 来分期,如国际抗癌联盟(UICC) 和美国癌症联合会(AJCC) 所接受的。TNM系统是基于原发性肿瘤的大小和/或程度(范围) (T) , 扩散至附近淋巴结的量 (N) 和转移的存在 (M) 或通过癌细胞扩散 至身体其他部分形成的继发性肿瘤。将数字添加至每个字母来表示原发性肿瘤的大小和/或程度以及癌症扩散的程度。原发性肿瘤 (T) -TX: 原发性肿瘤不能被评价;T0:没有原发性肿瘤的迹象;Tis:原位癌 (CIS;存在异常细胞,但没有扩散至邻近组织;尽管不是癌症,CIS 可以变成癌症并且有时候称为侵袭前癌症);T1、T2、T3、T4:原发性肿瘤的大小和/或程度。区域性淋巴结 (N) -NX:区域性淋巴结 不能被评价;N0:未牵涉区域性淋巴结;N1、N2、N3:涉及的区域性淋巴结的程度(淋巴结的数量和位置)。远距离转移 (M) -MX: 远距离转移不能被评价;M0:无远距离转移;M1:存在远距离转移。

[0177] 在一些实施方案中,选择受试者包括以下的一种或多种:选择至少18岁的人类受试者;选择没有脱发迹象或轻度脱发的受试者;选择具有非凋亡的毛囊的受试者;选择在开始局部给药前14天内具有0 或1的东部肿瘤协作组(ECOG) 性能评分的受试者;选择在开始局部给药前72小时内具有高于1500细胞/mm³的基线嗜中性粒细胞计 数的受试者;和选择在开始局部给药前72小时内具有低于或等于正常值上限(ULN) 的血清钙水平的受试者。

[0178] 在一些实施方案中,选择受试者包括以下的一种或多种:选择在 开始局部给药的4周内没有接受降钙治疗或可能影响钙水平的药物的 受试者,除非受试者在开始局部给药前用双膦酸盐或降钙治疗控制3 个月或更长时间且已经显示了钙代谢稳定性的证据;选择在开始局部 给药的30天内没有高血钙或维生素D毒性病史,或者住院治疗心绞 痛、心肌梗塞或充血性心力衰竭或者精神病的病史的受试者;选择在 局部给药过程中没有服用维生素D补充剂的受试者,除非受试者在局 部给药开始前已经服用维生素D补充剂30天或更长时间并在整个局 部给药过程中维持相同剂量;选择在开始局部给药的4周内没有用已 知影响钙水平的药物治疗的受试者,稳定治疗超过6个月的受试者除 外;选择没有接受噻嗪 或呋塞米利尿剂的受试者,具有稳定剂量并且 治疗超过6个月的受试者除外;选择不具有高血钙或肾结石的受试者; 和选择不具有按照美国国立癌症研究所针对不良事件的通用技术标准(NCI-CTCAE) v4.0的2级或更高级别的脱发或者显著掉发或头 发断裂的受试者。

[0179] 在一个实施方案中,受试者是至少18岁的人类。在一个实施方案中,受试者没有脱发迹象或轻度脱发。在一个实施方案中,受试者 具有非凋亡的毛囊。在一个实施方案中,受试者在开始局部给药前14 天内具有0或1的东部肿瘤协作组(ECOG) 性能评分。在一个实施方案中,受试者在开始局部给药前72小时内具有高于1500细胞/mm³的基线嗜中性粒细胞计数。在一个实施方案中,受试者在开始局部给 药前72小时内具有低于或等于正常值上限(ULN) 的血清钙水平。在一个实施方案中,受试者在开始局部给药的4周内没有接受降钙 治疗或可能影响钙水平的药物,除非受试者在开始局部给药前用双膦酸 盐或降钙治疗控制3个月或更长时间且已经显示了钙代谢稳定性的证 据。在一个实施方案中,受试者不具有在开始局部给药的30天内高 血钙或维生素D毒性的病史。在一个实施方案中,受试者不具有在开 始局部给药的30天内住院治疗心绞痛、心肌梗塞或充血性心力衰竭 或者精神病

的病史。在一个实施方案中,受试者在局部给药过程中没有服用维生素D补充剂,除非受试者在局部给药开始前已经服用维生素D补充剂30天或更长时间并在整个局部给药过程中维持相同剂量。在一个实施方案中,受试者没有在开始局部给药的4周内用已知影响钙水平的药物治疗,稳定治疗超过6个月的受试者除外。在一个实施方案中,受试者没有接受噻嗪或呋塞米利尿剂,具有稳定剂量并且治疗超过6个月的受试者除外。在一个实施方案中,受试者不具有高血钙或肾结石。在一个实施方案中,受试者不具有按照美国国立癌症研究所针对不良事件的通用技术标准(NCI-CTCAE) v4.0的2级或更高级别的脱发或者显著掉发或头发断裂。

[0180] 在一个实施方案中,基于以上所列的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个或十四个标准的任意组合来选择受试者。

[0181] 术语“个体”或“受试者”包括可以呈现脱发的那些动物。在一个实施方案中,个体是哺乳动物,例如,猫、狗、灵长类、小鼠、大鼠、兔子、牛、马、山羊、绵羊、猪等。在一些实施方案中,哺乳动物是灵长类,例如,黑猩猩、人类、大猩猩、倭黑猩猩、猩猩、猴子等。在再另一个实施方案中,哺乳动物是人类。可以通过性别和/或年龄将个体或受试者进一步分类。

[0182] 如本文中使用的,术语“化疗”包括通过化学方式的治疗性处理。化疗可以包括基本上任一种可能引起脱发的化疗,或其特定类别、种类、类型、亚型或变体。在不同的实施方案中,化疗是癌症化疗。

[0183] 在一些实施方案中,化疗包括基于紫杉烷的癌症化疗。“基于紫杉烷的化疗”可以包括紫杉烷治疗剂、使用特定媒介的紫杉烷治疗剂、两种或多种紫杉烷治疗剂的组合以及紫杉烷治疗剂和其他治疗剂的组合等。同样,如“基于紫杉醇的化疗”、“基于nab-紫杉醇的化疗”和“基于多西紫杉醇的化疗”可以用于表示紫杉醇/nab-紫杉醇/多西紫杉醇治疗剂、使用特定媒介的紫杉醇/nab-紫杉醇/多西紫杉醇治疗剂、两种或多种紫杉醇/nab-紫杉醇/多西紫杉醇治疗剂的组合以及紫杉醇/nab-紫杉醇/多西紫杉醇治疗剂和其他治疗剂的组合等。

[0184] 在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗可以包括紫杉醇、纳米颗粒白蛋白结合的(“nab”)紫杉醇和/或多西紫杉醇癌症化疗。在一个实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗是紫杉烷治疗剂(例如,癌症化疗)和其他治疗剂(例如,癌症化疗)的组合。

[0185] 在一个实施方案中,基于紫杉烷的化疗不包括紫杉醇。在一个实施方案中,基于紫杉烷的化疗不包括多西紫杉醇。在一个实施方案中,基于紫杉烷的化疗不包括紫杉醇或多西紫杉醇。

[0186] 在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括紫杉烷治疗剂,其中紫杉烷治疗剂包括以下的一种或多种:紫杉醇、多西紫杉醇、纳米颗粒白蛋白结合的nab紫杉醇、结合聚谷氨酸聚合物的紫杉醇、结合二十二碳六烯酸的紫杉醇、肿瘤激活的紫杉酚前药、紫杉醇-Angiopep-2缀合物(ANG1005)、多聚谷氨酸紫杉醇、共聚物组合紫杉醇、脂质体包封的紫杉醇、维生素E乳液中的紫杉酚及其等价物。

[0187] 在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括多西紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括纳米颗粒白蛋白结合的nab紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括结合聚谷氨酸聚合物的紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括结合二十二碳

六烯酸的紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括肿瘤激活的紫杉酚前药。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括紫杉醇-Angiopep-2缀合物(ANG1005)。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括多聚谷氨酸紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括共聚物组合紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括脂质体包封的紫杉醇。在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括维生素E乳液中的紫杉酚及其等价物。

[0188] 在一些实施方案中,基于紫杉烷的癌症化疗包括其他化疗剂。例如,其他化疗剂可以包括以下一种或多种:蒽环类(亚德里亚霉素/阿霉素、道诺霉素、表柔比星、去甲氧基柔红霉素、戊柔比星)、5-FU、他莫昔芬、伊立替康、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、十字孢碱、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、更生霉素、六甲三聚氰胺(HMM,六甲蜜胺)、异环磷酰胺、博来霉素、氨甲喋呤、长春地辛、长春瑞滨、拓扑替康、安吖啶、阿糖胞苷、白消安、美法仑、长春花碱、洛莫司汀(CCNU)、噻替派、吉西他滨、卡氮芥(BCNU)、米托蒽醌、丝裂霉素C、甲基苄肼、6-巯基嘌呤、链脲霉素、氟达拉滨、雷替曲塞(Tomudex)、卡培他滨及其等价物。

[0189] 在一些实施方案中,癌症包括转移性乳腺癌和化疗包括基于紫杉醇、nab-紫杉醇或基于多西紫杉醇的化疗,各自任选结合卡铂。

[0190] 在一些实施方案中,癌症包括卵巢癌和化疗包括基于紫杉醇和/或多西紫杉醇的化疗,任选结合卡铂。

[0191] 在一些实施方案中,癌症包括子宫癌和化疗包括基于多西紫杉醇的化疗,任选结合吉西他滨。

[0192] 在一些实施方案中,癌症包括宫颈癌和化疗包括基于紫杉醇的化疗,任选结合顺铂和/或拓扑替康。

[0193] 在一些实施方案中,本发明的方法和药物组合物基本上没有降低化疗的功效,尤其是全身性化疗。在其他实施方案中,本发明的方法和药物组合物增强了化疗的功效。表述“没有干扰共同给药的化疗剂的功效”包括其中在维生素D化合物与一种或多种化疗剂一起给药时没有破坏该一种或多种化疗剂的生物或治疗活性或阻止一种或多种化疗剂进行其所需的生物或治疗活性的情况。表述“没有降低共同给药的化疗剂的功效”包括其中在维生素D化合物与一种或多种化疗剂共同给药时没有降低该一种或多种化疗剂的生物或治疗活性的情况。

[0194] 本发明的方法和药物组合物可以与对毛囊或真皮乳头具有细胞毒性作用,或另外地能够诱发脱发的任何化疗剂或化疗剂的组合一起使用。表述“化疗剂”、“化疗”和“化疗方案”包括蒽环类(亚德里亚霉素/阿霉素、道诺霉素、表柔比星、去甲氧基柔红霉素、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、十字孢碱、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、更生霉素、六甲三聚氰胺(HMM,六甲蜜胺)、异环磷酰胺、博来霉素、氨甲喋呤、多西紫杉醇(泰索帝)、长春地辛、长春瑞滨、拓扑替康、安吖啶、阿糖胞苷、白消安、美法仑、长春花碱、洛莫司汀(CCNU)、噻替派、吉西他滨、卡氮芥(BCNU)、米托蒽醌、丝裂霉素C、甲基苄肼、6-巯基嘌呤、链脲霉素、氟达拉滨、雷替曲塞(Tomudex)、卡培他滨及其等价物。

[0195] 在一些实施方案中,化疗是全身性化疗。

[0196] 本发明的方法和药物组合物优选基本上没有降低化疗的功效,尤其是全身性化疗。优选,本发明的方法和药物组合物增强化疗的功效。

[0197] 本发明的方法和药物组合物还可以与可能引起头发变薄的任何 化疗激素治疗或生物治疗一起使用。

[0198] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始之前将 药物组合物给药于受试者。在一些实施方案中,局部给药药物组合物 包括与化疗同时将药物组合物给药于受试者。在一些实施方案中,在 化疗开始前和化疗的同时,将药物组合物给药于受试者。

[0199] 在一些实施方案中,将维生素D化合物与化疗剂共同给药。表 述“与化疗剂共同给药”包括与化疗剂基本上同时给药维生素D化合 物。例如,维生素D化合物可以与化疗剂共同给药;维生素D可以 首先给药,并且立即跟着化疗剂的给药,或化疗剂可以首先给药,并且立即跟着维生素D化合物的给药。

[0200] 在一些其他实施方案中,在脱发发生前(例如,在头发丢失之前), 将维生素D化合物给药于个体。在特定的实施方案中,在化疗开始后, 但在脱发开始前,将维生素D化合物给药于个体。在其他实施方案中, 个体尚未产生脱发症状(例如,脱发尚未开始)。表述“治疗有效量” 包括预防或治疗个体的脱发所需或足够的维生素D化合物的量。有效 量可以根据如受试者的体型和体重、疾病的类型等这样的因素而改 变。本领域普通技术人员将能够研究上述因素并对于维生素D化合物 的有效量作出决定而不需要过度实验。

[0201] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始(即, 起始)前给药药物组合物4-7天。局部给药药物组合物可以包括在化 疗开始前给药药物组合物1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28、35、40或52天。局部给药药物组合物可以包括在 化疗开始前给药药物组合物至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28、35、40或52天。

[0202] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药 药物组合物5± 2天,即,3-7天。在一些实施方案中,局部给药药物 组合物包括在化疗开始前给药药物组合物7±2天,即5-9天。在一 些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合 物7-14天。在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开 始前给药药物组合物8-14天。在一些实施方案中,局部给药药物组 合物包括在化疗开始前给药药物组合物9-14天。在一些实施方案中, 局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物10- 14天。在 一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组 合物11-14天。在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗 开始前给药药物组合物12-14天。在一些实施方案中,局部给药药物 组合物包括在化疗开始前给药药物组合物13-14天。

[0203] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药 药物组合物至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天。例如, 在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物 组合物至少4天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化 疗开始前给药药物组合物至少5天。在一个实施方案中,局部给药药 物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少6天。在一个实施方 案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少7 天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药 药物组合物至少8天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括 在化疗开始前给药药物组合物至少9天。在一个实施方案中,局部给 药药物组合物包括在化疗开始前

给药药物组合物至少10天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少11天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少12天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少13天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少14天。

[0204] 例如,在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少15天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少16天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少17天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少18天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少19天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少20天。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少21天。

[0205] 在一个实施方案中,在化疗开始前,将药物组合物局部给药3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。在一个实施方案中,在化疗开始前,将药物组合物局部给药9天。在一个实施方案中,在化疗开始前,将药物组合物局部给药18天。在一个实施方案中,在化疗开始前,将药物组合物局部给药11天。在一个实施方案中,在化疗开始前,将药物组合物局部给药12天。在一个实施方案中,在化疗开始前,将药物组合物局部给药13天。在一个实施方案中,在化疗开始前,将药物组合物局部给药14天。

[0206] 尽管不希望受到任何特定理论的束缚,据信将维生素D施用于头皮或具有毛发的皮肤的任何其他区域诱导毛囊的分化,这是毛发从生长初级阶段到内旋生长中期阶段的阶段转换所需的。申请人在动物模型(例如,大鼠)中进行的实验中发现了使用钙三醇的最小治疗时间是完成所需的头皮毛囊分化和生长中期转换所必需的,这随后使它们抵抗化疗的细胞毒性。特别地,申请人使用大鼠模型发现,需要在化疗开始前至少四天每天使用钙三醇以观察到任何保护性作用,以5天时间看到适度的保护,并且保护作用提高直至化疗前一周的治疗。在人类中,头皮的毛囊具有比动物长得更多的生长初期阶段。实际上,在任何时间,人头皮中的至少90%的毛囊处于生长初期。据认为短的治疗时间不足以诱导头皮毛囊中的生长中期阶段,这随后使它们对化疗的细胞毒性更易感。为了确保毛发生长初期到生长中期的阶段转换的完成和充分预防化疗诱发的脱发,在化疗开始前至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天,并且优选至少两周或更长时间,开始根据本发明施用局部钙三醇,其将诱导毛发生长中期并由此提供对抗CIA的保护。以每日为基础的持续施用确保毛发生长中期阶段的维持以及在多剂量化疗(例如,含紫杉烷)方案的整个施用过程中的延长保护。

[0207] 因此,在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始前给药药物组合物至少两周。局部给药药物组合物可以包括在化疗开始前给药药物组合物至少5-7天。局部给药药物组合物可以包括在化疗开始前给药药物组合物至少1、2、3、4、5、6、7或8周。

[0208] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗持续期间给药药物组合物。

[0209] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在开始或完成化疗后给药药物组合物至少三个月。局部给药药物组合物可以包括在开始或完成化疗后给药药物组合物至

少1、2、3、4、5或6个月。

[0210] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括在化疗开始后,但在化疗诱发的脱发开始前,将药物组合物给药于受试者。

[0211] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括每日两次给药药物组合物。在一些实施方案中,每日两次给药间隔约10-14小时。在一些实施方案中,每日两次给药间隔约8、9、10、11、12、13、14、15或16小时。

[0212] 在特定实施方案中,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个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月或约一年的时间段内,将本发明的维生素D化合物给药于个体。在一些实施方案中,可以在治疗期间每天、隔一天或每三天给药本发明的维生素D化合物。

[0213] 在特定的实施方案中,本发明的维生素D化合物在每个治疗日每日一次、每日两次或每日三次给药。

[0214] 在特定的实施方案中,本发明的维生素D化合物的每次给药施用于相同位置,或施用于个体的几个不同位置。当施用于不同位置时,每个位置的剂量可以相同,或基于如皮肤厚度和药物渗透的不同(如果存在)的因素来调整。

[0215] 在特定的实施方案中,在化疗开始前,将本发明的维生素D化合物每天局部给药于头皮,每日两次,连续两周,以防止或降低在化疗开始时可能发生的任何CIA的严重程度。

[0216] 在一些实施方案中,上述方法中给药的药物组合物的体积为0.5-1.5mL或0.5-2mL。在一个实施方案中,体积为0.5、1.0、1.5或2mL。在一个实施方案中,体积为1mL。

[0217] 在一些实施方案中,使用计量喷雾装置来给药药物组合物。

[0218] 在一些实施方案中,局部制剂中的维生素D化合物的浓度选自0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200或400 μ g/mL。在特定的实施方案中,局部制剂中的维生素D化合物的浓度为约0.1-25、0.1-15、0.1-10、1-50、1-45、1-35、1-30、1-25、1-10、5-20、5-15、15-25、25-35或35-45 μ g/mL。在一个实施方案中,局部制剂中的维生素D化合物的浓度为约1-20 μ g/mL。在一个实施方案中,局部制剂中的维生素D化合物的浓度为约5 μ g/mL。在一个实施方案中,局部制剂中的维生素D化合物的浓度为约10 μ g/mL。在一个实施方案中,局部制剂中的维生素D化合物的浓度为约20 μ g/mL。

[0219] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括使用计量喷雾装置给药1.0mL剂量的药物组合物。在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括使用计量喷雾装置给药1.0mL剂量的药物组合物,将约0.25mL给药于头皮四个象限中的每一个。

[0220] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括给药药物组合物中浓度为5、10或20 μ g/mL的维生素D化合物。局部给药药物组合物可以包括给药药物组合物中浓度为0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200或400 μ g/mL的维生素D化合物。

[0221] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约10-40 μ g总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物可以包括每天将约1、5、10、20、30、40、50、60、75、80、100、1-100、10-20、10-30、10-50、20-30、20-40、20-50或40-50

μg 总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物可以包括每天将约1-100、10-90、20-80、30-70、1-20、10-20、10-30、10-40、10-50、10-60、20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、30-40、30-50、30-60、40-50、40-60、40-70、40-80、50-60、50-70、50-80、50-90、60-70、60-80、60-90、60-100、70-80、70-90 或70-100μg总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物可以包括每天将约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100μg 总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约10μg总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约20μg 总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约40μg总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约60μg 总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约80μg总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。在一个实施方案中,局部给药药物组合物包括每天将约100μg 总日剂量的维生素D化合物给药于头皮。

[0222] 在一个实施方案中,总日剂量以单一剂量给药。在一个实施方案中,总日剂量以两个单独的剂量给药。在一个实施方案中,以三个单独的剂量给药总日剂量。在一个实施方案中,以四个单独的剂量给药 总日剂量。

[0223] 在一个实施方案中,对于10-40μg总日剂量的维生素D化合物,每日两次给药药物组合物,其中每天2个单独剂量中的每一个为 5-20μg。在一个实施方案中,对于10μg总日剂量的维生素D化合物,每日两次给药药物组合物,其中每天2个单独剂量中的每一个为5μg。在一个实施方案中,对于20μg总日剂量的维生素D化合物,每日两次给药药物组合物,其中每天2个单独剂量中的每一个为10μg。在一个实施方案中,对于40μg总日剂量的维生素D化合物,每日两次给药药物组合物,其中每天2个单独剂量中的每一个为20μg。在一个实施方案中,对于60μg总日剂量的维生素D化合物,每日两次给药药物组合物,其中每天2个单独剂量中的每一个为30μg。在一个实施方案中,对于80μg总日剂量的维生素D化合物,每日两次给药药物组合物,其中每天2个单独剂量中的每一个为40μg。在一个实施方案中,对于100μg总日剂量的维生素D化合物,每日两次给药药物组合物,其中每天2个单独剂量中的每一个为50μg。

[0224] 本发明的维生素D化合物可以以等同于约0.001μg-5μg钙三醇 /cm²的剂量体积局部给药于需要的个体。在特定的实施方案中,范围 为约0.01μg-0.5μg钙三醇/cm²,或约0.1 μg-0.5μg钙三醇/cm²。

[0225] 表述“等同于钙三醇的剂量体积”包括具有与0.001μg-5μg钙三 醇/cm²的生物和/或治疗活性基本上相似的生物和/或治疗活性的维生素D化合物的量。

[0226] 表述“有效浓度”包括局部制剂中预防或治疗个体中脱发需要或 足够的维生素D化合物的浓度。在特定实施方案中,局部制剂中维生素D化合物的浓度为约0.1、0.2、0.5、1.0、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200或400μg/mL。在特定的实施方案中,局部制剂中维生素D化合物的浓度为约0.1-25、0.1-15、0.1-10、1-50、1-45、1-35、1-30、1-25、1-10、5-20、5-15、15-25、25-35或35-45μg/mL。在一个实施方案中,局部制剂中维生素 D化合物的浓度为约1-20μg/mL。在一个实施方案中,局部制剂中维 生素D

化合物的浓度为约5 μ g/mL。在一个实施方案中,局部制剂中 维生素D化合物的浓度为约10 μ g/mL。在一个实施方案中,局部制剂 中维生素D化合物的浓度为约20 μ g/mL。

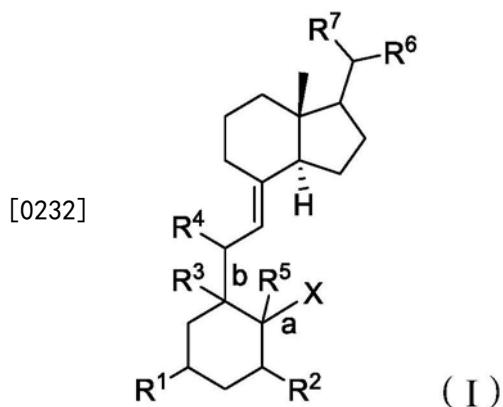
[0227] 在特定的实施方案中,维生素D化合物的总剂量等同于约 0.025-400 μ g钙三醇/75kg体重。在特定的实施方案中,范围为约 0.1-100 μ g钙三醇/75kg体重;约0.4-25 μ g钙三醇/75kg体重;或约1、2、3、5或10 μ g钙三醇/75kg体重。在特定的实施方案中,总剂量的 较低范围等同于约0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、1、2、5、10、15或20 μ g钙三醇/75kg体重。在特定的实施方案中,总剂量的高范 围等同于约400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、25、10、5、4或3、2或1 μ g钙三醇/75kg体重。在特定的实施方案中,钙三 醇的总剂量为约11-24 μ g/75kg体重、26-49 μ g/75kg体重、51-74 μ g/75kg 体重或76-99 μ g/75kg体重。在一个实施方案中,钙三醇的总剂量为约 15-25 μ g/75kg体重、16-24 μ g/75kg体重、17-23 μ g/75kg体重、18-22 μ g/75kg体重、19-21 μ g/75kg体重、31-49 μ g/75kg体重、 32-48 μ g/75kg体重、33-47 μ g/75kg体重、34-46 μ g/75kg体重、35-45 μ g/75kg体重、36-44 μ g/75kg体重、37-43 μ g/75kg体重、38-42 μ g/75kg体重、39-41 μ g/75kg体重、51-69 μ g/75kg体重、 52-68 μ g/75kg体重、53-67 μ g/75kg体重、54-66 μ g/75kg体重、 55-65 μ g/75kg体重、56-64 μ g/75kg体重、57-63 μ g/75kg体重、 58-62 μ g/75kg体重、59-61 μ g/75kg体重、65-74 μ g/75kg体重、 66-73 μ g/75kg体重、67-72 μ g/75kg体重、68-71 μ g/75kg体重、 69-70 μ g/75kg体重、76-85 μ g/75kg体重、77-84 μ g/75kg体重、 78-83 μ g/75kg体重、79-82 μ g/75kg体重、80-81 μ g/75kg体重、 81-99 μ g/75kg体重、82-98 μ g/75kg体重、83-97 μ g/75kg体重、 84-96 μ g/75kg体重、85-95 μ g/75kg体重、86-94 μ g/75kg体重、 87-93 μ g/75kg体重、88-92 μ g/75kg体重或89-91 μ g/75kg体重。在再另 一个方面中,本发明提供通过将包含治疗有效量的维生素D化合物的 药物组合物局部给药于 个体来预防或治疗个体中的脱发的方法,其中 所述维生素D化合物,以:(1) 约50 μ g/mL的有效浓度局部给药于 个体时,在至少连续约25天药物给药后没有引起毒性;或(2) 约 100 μ g/mL的有效浓度局部给药于个体时,在至少连续约7天药物给 药后没有引起毒性。

[0228] 在一些实施方案中,局部给药药物组合物包括基本上避免维生素 D化合物的真皮递送。在一些实施方案中,维生素D化合物局部递送 至表皮和/或在表皮中累积,同时基本上避免真皮中的递送和/或累积。

[0229] 如本文中使用的,表述“基本上避免真皮递送和/或累积”包括 与维生素D化合物至表皮的递送和/或累积相比,真皮的递送和/或累 积低于约25%的维生素D化合物,例如,与递送至表皮的量相比时, 低于维生素D化合物的约20%,低于约15%,低于约10%,低于 约 5%,低于约1%或没有维生素D化合物至真皮的递送或累积。在一些 实施方案中,与表 皮的递送和/或累积相比,约1%至25%的维生素D 化合物递送和/或累积至真皮,例如,约 1%至约20%,约1%至约15%, 约1%至约10%或约1%至约5%。在一些实施方案中,维 生素D化 合物没有在真皮中递送和/或累积。在一些实施方案中,递送至真皮或在 真皮中累 积的维生素D化合物的量低于约0.3ng/cm²,低于约 0.2ng/cm²或低于约0.1ng/cm²。

[0230] 在一些实施方案中,维生素D化合物配制成递送至人表皮/在人 表皮中累积,尤其是头皮或颈部的表皮,同时基本上避免递送至真皮 /在真皮中累积。本领域技术人员将能够使用实施例1容易地测定递送 至真皮和/或表皮/在真皮和/或表皮中累积的维生素D化合物的含量, 或其不存在。

[0231] 表述“维生素D化合物”包括通式I的化合物:



[0233] 其中

[0234] a和b各自独立地是单键或双键；

[0235] 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；

[0236] R¹是氢、羟基、烷氧基、三烷基甲硅烷基或烷基，任选被一至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代；

[0237] R²是氢、羟基、-O-三烷基甲硅烷基或烷基、烷氧基或烯基，任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或-NR' R"部分取代；

[0238] 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与其连接的碳原子一起可以连接形成5-7元碳环；

[0239] 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；

[0240] 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；

[0241] R⁶是任选被一个至五个羟基、氧、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R"部分取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、烷基-O-烷基、烷基-CO₂-烷基；

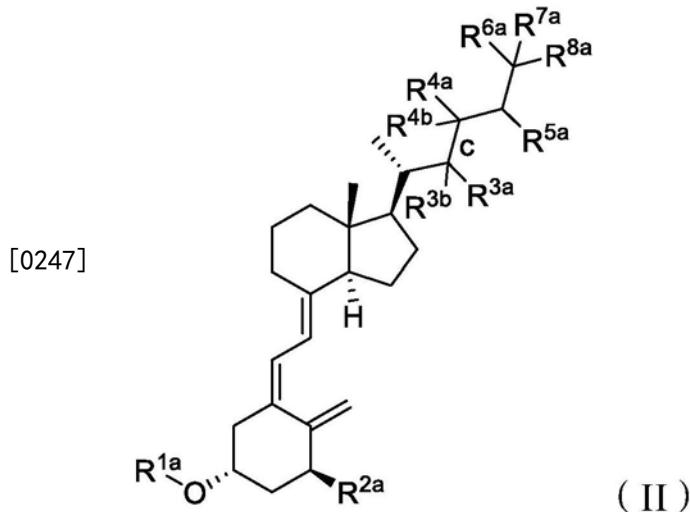
[0242] R⁷是任选被一个至三个羟基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、氰基、硝基或-NR' R"部分取代的烷基；和

[0243] R' 和R"各自独立地是氢、羟基、卤素、烷基或烷氧基，

[0244] 及其药物学上可接受的盐。

[0245] 在一些实施方案中，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），并且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，如-(CH₂)₃CH(CH₃)₂或-(CH₂)₃COH(CH₃)₂或烯基（例如，-CH=CHCH(CH₃)CH(CH₃)₂）。

[0246] 在特定的实施方案中，维生素D化合物由通式(II)来表示



[0248] 其中

[0249] c是单键或双键；

[0250] R^{1a} 是氢、三烷基甲硅烷基或烷基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR' R''$ 部分取代；

[0251] R^{2a} 是氢、羟基、-0-三烷基-甲硅烷基,或烷基、烷氧基或烯基,任选被一个至三个卤素、羟基、氰基或 $-NR' R''$ 部分取代；

[0252] 当c是双键时, R^{3a} 和 R^{4a} 不存在,或当c是单键时, R^{3a} 和 R^{4a} 各自独立地是氢、羟基、卤素、或任选被一至三个羟基或卤素部分取代的烷氧基或烷基；

[0253] R^{3b} 、 R^{4b} 、 R^{5a} 、 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 各自独立地是氢、羟基、卤素、或任选被一个至三个羟基或卤素部分取代的烷氧基或烷基,或 R^{6a} 、 R^{7a} 和 R^{8a} 中的任何两个可以连接形成3-7元碳环,

[0254] 及其药物学上可接受的盐。

[0255] 在一个实施方案中,化合物由通式(II)来表示,其中 R^{1a} 、 R^{3a} 和 R^{4a} 各自是氢。

[0256] 在另一个实施方案中,化合物通过通式(II)来表示,其中c表示单键。

[0257] 在再另一个实施方案中,化合物通过通式(II)来表示,其中 R^{6a} 和 R^{8a} 都是甲基。

[0258] 在一个实施方案中,化合物通过通式(II)来表示,其中 R^{1a} 是氢。

[0259] 在另一个实施方案中,化合物通过通式(II)来表示,其中 R^{2a} 是羟基。

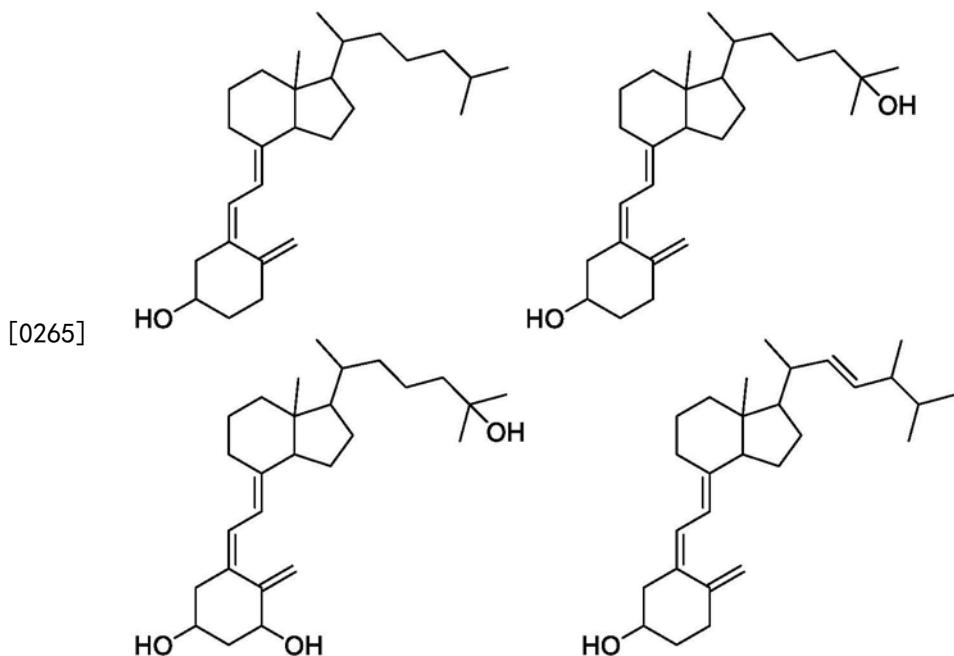
[0260] 在另一个实施方案中,化合物通过通式(II)来表示,其中 R^{7a} 是羟基。

[0261] 在再另一个实施方案中,化合物通过通式(II)来表示,其中 R^{5a} 是羟基。

[0262] 在一个实施方案中, 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)和 R^{8a} 是氢或羟基。

[0263] 在另一个实施方案中, 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。

[0264] 在一个实施方案中,维生素D化合物选自以下结构,或其立体异构体或药物学上可接受的盐:



[0266] 在特定的实施方案中,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MC 903。

[0267] 在其它实施方案中,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MC 903。

[0268] 在一些实施方案中,维生素D化合物是钙三醇。

[0269] 其他合适的维生素D化合物的类似物、代谢物、衍生物和/或模拟物包括,例如,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,如以下专利中描述的那些,将其中每篇以其整体按引用并入:美国专利No. 4,391,802(1 α -羟基维生素D衍生物);4,717,721(1 α -羟基衍生物,具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、烯基和烷基侧链的维生素D3类似物);5,120,722(三羟基钙化醇);5,547,947(氟-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-正-维生素D化合物);4,857,518(羟基化24-同型-维生素D衍生物)。其他合适的实例包括ROCAL TROL (Roche Laboratories); CALCIJEX可注射钙三醇;来自Leo Pharmaceuticals的研究药物,包括EB1089(24a,26a,27a,三同型-22,24-二烯-1 α ,25-(OH)2-D3,KH 1060(20-表-22-氧杂-24a,26a,27a-trihomola,25-(OH)2-D3),MC 1288(1,25-(OH)2-20-表-D3)和MC 903(钙三醇,1a,24s(OH)2-22-烯-26,27-脱氢-D3),Roche Pharmaceuticals药物,其包括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;Chugai Pharmaceuticals 22-氧杂钙三醇(22-氧杂-1 α ,25-(OH)2-D3;来自伊利诺伊大学的1 α -(OH)-D5;和来自Institute of Medical Chemistry-Schering AG的药物,其包括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\alpha, 25-(OH)2-26, 27-d6-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-22-\text{烯}-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-D2; 1\alpha, 25-(OH)2-D4; 1\alpha, 24, 25-(OH)3-D3; 1\alpha, 24, 25-(OH)3-D2; 1\alpha, 24, 25-(OH)3-D4; 1\alpha-(OH)-25-FD3; 1\alpha-(OH)-25-FD4; 1\alpha-(OH)-25-FD2; 1\alpha, 24-(OH)2-D4; 1\alpha, 24-(OH)2-D3; 1\alpha, 24-(OH)2-D2; 1\alpha, 24-(OH)2-25-FD4; 1\alpha, 24-(OH)2-25-FD3; 1\alpha, 24-(OH)2-25-FD2; 1\alpha, 25-(OH)2-26, 27-F6-22-\text{烯}-D3; 1\alpha, 25(OH)2-26, 27-F6-D3; 1\alpha, 25S-(OH)2-26-F3-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-24-F2-D3; 1\alpha, 25S, 26-(OH)2-22-\text{烯}-D3; 1\alpha, 25R, 26-(OH)2-22-\text{烯}-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-D2; 1\alpha, 25-(OH)2-24-\text{表}-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-23-\text{炔}-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-24R-F-D3; 1\alpha, 25S, 26-(OH)2-D3; 1\alpha, 24R-(OH)2-25F-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-26, 27-F6-23-\text{炔}-D3; 1\alpha, 25R-(OH)2-26-F3-D3; 1\alpha, 25, 28-(OH)3-D2; 1\alpha, 25-(OH)2-16-\text{烯}-23-\text{炔}-D3; 1\alpha, 24R, 25-(OH)3-D3; 1\alpha, 25-(OH)2-26, 27-F6-23-\text{烯}-D3; 1\alpha, 25R-(OH)2-22-\text{烯}-26-F3-D3; 1\alpha, 25S-(OH)2-22-\text{烯}-26-F3-D3; 1\alpha, 25R-(OH)2-D3-26, 26, 26-d3; 1\alpha, 25S-(OH)2-D3-26, 26, 26-d3和 1\alpha, 25R-(OH)2-22-\text{烯}-D3-26, 26, 26-d3。还有的其他实例可以在美国专利No. 6,521,608中找到, 将其完整内容按引用并入本文中。还参见, 例如, S.S. 专利No. 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,将每篇的完整内容按引用并入。$

[0270] 可以利用的再其它的化合物包括维生素D模拟物, 如美国专利 No. 6,218,430和W0公开2005/037755公开的双-芳基衍生物, 将每篇 的完整内容按引用并入本文中。适用于本发明的闭联甾族 (secosteroidal) 维生素D模拟化合物的其他实例可以在美国专利No. 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中找到, 将每篇的完整公开内容按 引用并入本文中。

[0271] 可以利用的再其它的合适维生素D3类似物、代谢物和/或衍生物 包括美国专利申请公开No.2006/0177374中鉴别的那些, 将其完整公 开内容按引用并入本文中。

[0272] 表述“维生素D类似物”包括结构和功能上与维生素D相似的 化合物。在一个实施

方案中,维生素D类似物是维生素D3类似物(例如,结构和功能上与维生素D3相似的化合物)。

[0273] 表述“维生素D代谢物”包括是维生素D代谢中涉及的中间体 和产物的化合物。在一个实施方案中,维生素D代谢物是维生素D3 代谢物(例如,作为维生素D3代谢中涉及的中间体或产物的化合物)。

[0274] 表述“维生素D衍生物”包括可以通过用另一个原子或原子团 替代一个原子而从亲本化合物(例如,维生素D)产生的化合物。在一个实施方案中,维生素D衍生物是维生素D3衍生物(例如,可以 通过用另一个原子或原子团替代一个原子而从维生素D3产生的化合物)。

[0275] 表述“维生素D模拟物”包括在生物过程中可以化学地模拟维 生素D的化合物。在一个实施方案中,维生素D模拟物是维生素D3 模拟物(例如,在生物过程中可以化学地模拟维生素D3的化合物)。

[0276] 维生素D3在摄入鱼肝油或照射的酵母后吸收。植物和动物源只 含有无活性的维生素D前体,7-脱氢胆固醇或麦角固醇。7-脱氢胆固醇存储在皮肤中并且可以通过日光转化成维生素D3。然而,不管是 摄入的或是皮肤中通过紫外线照射形成的,维生素D必须转化成活性 代谢物。维生素D3通过肝酶转化成25-羟基胆钙化醇。然后在肾脏中, 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吸收钙、骨沉积和骨再吸收中起着重要作 用。

[0277] 本发明的维生素D化合物共有特定的共同生物活性,如预防角 化细胞中细胞凋亡的能力,部分地通过其上调或下调例如正常角化细 胞(例如,HEKa)中特定靶基因的表达的能力。因此,在特定的实 施方案中,本发明的维生素D化合物可以呈现与例如正常角化细胞(例如,HEKa)中等同量的钙三醇相似或相同的基因调节特征。

[0278] 如本文中使用的,如果维生素D化合物以基本上相同的摩尔量 具有基本上相同或相等的生物或治疗活性,则“等同量”包括相同的 摩尔量。然而,当不同的维生素D化合物的生物或治疗活性基本上不 同或不相等时,表述“等同量”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或治疗活性的维生素D化合物 的量。

[0279] 表述“基因调节特征”包括与合适的对照相比时统计学上显著(例 如, $p < 0.05$) 调节(例如,上调或下调)的基因的列表或谱。例如, 在将细胞接触维生素D化合物预定的时间段(例如,24小时)时, 靶细胞可以呈现出其mRNA或蛋白质表达水平与模拟物/媒介处理对照相比受到调节(例如,上调或下调)的基因谱。检测时受到调节(例 如,上调或下调)的基因的列表构成该特定时刻时细胞的基因表达谱 的瞬像。

[0280] 表述“相似的基因调节特征”包括其中超过检查的靶基因总量的 50%、60%、 70%、80%、90%或更多呈现出基本上相同的基因表达方 向(例如,都是上调或都是下调, 尽管每个基因中上调或下调的幅度 或程度可能不同)的情况。

[0281] 表述“相同的基因调节特征”包括其中几乎全部检查的靶基因呈 现出相同的基因表达方向(例如,都是上调或都是下调,尽管每个基 因中上调或下调的幅度或程度可能不同)的情况。

[0282] 在一个实施方案中,本发明的维生素D化合物促进一个或多个 靶基因的表达,所 述靶基因的表达水平受到等同量的参照维生素D化 合物(例如,钙三醇)促进。在其他实施

方案中,本发明的维生素D 化合物抑制一个或多个基因的表达,所述基因的表达水平受到等同量 的参照维生素D化合物(例如,钙三醇)的抑制。

[0283] 在特定的实施方案中,本发明的维生素D化合物可以调节正常 角化细胞中的蛋白 质的表达。表述“调节蛋白质的表达”包括正常角 化细胞中蛋白质的上调和下调。在一些实 施方案中,维生素D化合物 调节HSPA2、HSF4 mRNA、HSPB1或DNAJC6 mRNA的表达。例如,在 一些实施方案中,维生素D化合物上调正常角化细胞(例如,HEKa) 中HSPA2或HSF4 mRNA的 表达,和/或下调HSPB1或DNAJC6 mRNA的表达。

[0284] 在特定的实施方案中,本发明的维生素D化合物调节正常角化 细胞中的SLC1A1、 KCNB2、KCNN4蛋白质或SLC1A3蛋白质的表 达。在一些实施方案中,维生素D化合物可以上调正常角化细胞(例 如,HEKa) 中SLC1A1、KCNB2或KCNN4蛋白质的表达,和/或下 调SLC1A3蛋 白质的表达。

[0285] 在特定的实施方案中,本发明的维生素D化合物可以调节表3-1 和表3-2中的一种 或多种蛋白质。例如,在一个实施方案中,维生素 D化合物可以将例如正常角化细胞(例如, HEKa) 中表3-1中的一种 或多种蛋白质的表达上调至少约2-倍,和/或将表3-2中的一种或 多种 蛋白质的表达下调至少约2-倍。

[0286] 在特定的实施方案中,将正常角化细胞(例如,HEKa) 暴露于 维生素D化合物约24 小时后,本发明的维生素D化合物可以诱导表 3-3、3-4、3-5或3-6任一个中的一种或多种蛋 白质的超表达。

[0287] 在特定的实施方案中,本发明的维生素D化合物可以诱导正常 角化细胞(例如, HEKa) 中GST、角蛋白1、角蛋白17、半乳凝素 1、S100 A9(钙卫蛋白) 或S100 A13中一种或 多种的超表达。

[0288] 如本文中使用的,术语“烷基”包括完全饱和的分支或未分支(例 如,直链或线性) 烃部分,包含1至20个碳原子,例如,1至7个碳 原子,或1至4个碳原子。烷基部分的代表性实 例包括甲基、乙基、n-丙基、异-丙基、n-丁基、仲-丁基、异-丁基、叔-丁基、n-戊基、异 戊基、新戊基、n-己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊 基、n-庚基。

[0289] 此外,术语“烷基”包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”。用于烷基部分的取代基 的代表性实例是羟基、氢、氰基、硝基、环烷 基、烯基、炔基、烷氧基、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)。

[0290] 如本文中使用的,术语“烷氧基”包括烷基-0-,其中烷基如上文 中限定的。烷氧基部分的代表性实例包括,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。在一些实施方案中,烷氧基基团具有约1-7 个 碳,例如1-4个碳。术语烷氧基包括取代的烷氧基。取代的烷氧基基 团的实例包括卤代 烷氧基基团。卤素取代烷氧基基团的实例是氟甲氧 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。

[0291] 术语“烷氧基烷基”包括如上限定的烷基基团,其中烷基基团被 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”。用于烷氧基烷 基的取代基的代表性实例包 括,但不限于,羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、烯基、炔 基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、卤素或氨基(包括烷基烷基、二-烷 基氨基、芳基氨基、二-芳基氨基)。

[0292] 术语“烯基”包括具有至少一个碳-碳双键的分支或未分支的烃。烯基部分的代表性实例包括,但不限于,乙烯基、丙-1-烯基、烯丙基、丁烯基、异丙烯基或异丁烯基。此外,术语“烯基”包括“未取代的 烯基”和“取代的烯基”。用于烯基部分的取代基的代表性实例包括,但不限于,羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氨基、烯氨基、炔氨基、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)。

[0293] 术语“炔基”包括具有至少一个碳-碳三键的分支或未分支的烃。炔基部分的代表性实例包括,但不限于,乙炔基、丙-1-炔基(炔丙基)、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”。用于炔基部分的取代基的代表性实例包括,但不限于,羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氨基、烯氨基、炔氨基、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)。

[0294] 如本文中使用的,术语“环烷基”包括3-12个碳原子(例如,3-8或3-7个碳原子)的饱和或不饱和的单环、双环或三环烃基团。示例性单环烃基团包括,例如,环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基和环己烯基。示例性双环烃基团包括,例如,冰片基、吲哚基、六氢吲哚基(hexahydroindyl)、四氢萘基、十氢萘基、双环[2.1.1]己基、双环[2.2.1]庚基、双环[2.2.1]庚烯基、6,6-二甲基双环[3.1.1]庚基和2,6,6-三甲基双环[3.1.1]庚基、双环[2.2.2]辛基。三环烃基团的实例包括,例如,金刚烷基。

[0295] 术语“环烷基”包括“未取代的环烷基”和“取代的环烷基”。用于环烷基的取代基的代表性实例包括,但不限于,羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氨基、烯氨基、炔氨基、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)。

[0296] 术语“芳基”包括在环部分中具有6-20个碳原子的单环或双环 芳香族烃基团。芳基部分的代表性实例包括,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”。用于芳基部分的取代基的代表性实例包括,但不限于,羟基、卤素、氰基、硝基、烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氨基、烯氨基、炔氨基、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)。

[0297] 术语“杂芳基”包括单环或双环杂芳基部分,含有5-10个选自 碳原子和1-5个杂原子的环原子,杂原子选自O、N或S。杂芳基基团的实例包括,但不限于,噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑基、氧杂-2,3-二唑基、氧杂-2,4-二唑基、氧杂-2,5-二唑基、氧杂-3,4-二唑基、硫杂-2,3-二唑基、硫杂-2,4-二唑基、硫杂-2,5-二唑基、硫杂-3,4-二唑基、3-、4-或5-异噻唑基、2-、4-或5-噁唑基、3-、4-或5-异噁唑基、3-或5-1,2,4-三唑基、4-或5-1,2,3-三唑基、四唑基、2-、3-或4-吡啶基、3-或4-哒嗪基、3-、4-或5-吡嗪基、2-吡嗪基、2-、4-或5-嘧啶基。杂芳基基团可以是单-、双-、三-或多 环的。

[0298] 术语“杂芳基”进一步包括其中杂芳香环与一个或多个芳基环、环脂肪环或杂环环稠合的基团,其中连接的基团或点在杂芳香环上或 在稠合芳基环上。这样的杂芳基部分的代表性实例包括,但不限于,吲哚基、异吲哚基、吲唑基、吲嗪基(indolizinyl)、嘌呤基、喹嗪基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、酞嗪基、萘啶基、喹唑啉基、喹喔啉基、菲啶基、菲罗啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、苯并异喹啉基、噻吩并[2,3-b]呋喃基、呋喃并[3,2-b]-吡喃基、5H-吡啶并[2,3-d]-o-噁唑基、1H-吡唑并[4,3-d]-噁唑基、4H-咪唑并[4,5-d]噻唑基、吡嗪并[2,3-d]哒嗪基、咪唑并[2,1-b]噻唑基、咪唑并[1,2-b][1,2,4]三嗪基、7-苯并[b]噻吩基、苯并噁唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、benzoxapinyl、苯并噁嗪基、1H-吡

咯并[1,2-b][2]苯并氮杂草基、苯并呋喃基、苯并 嘻吩基、苯并三唑基、吡咯并[2,3-b]吡啶基、吡咯并[3,2-c]吡啶基、吡咯并[3,2-c]吡啶基、吡咯并[3,2-b]吡啶基、咪唑并[4,5-b]吡啶基、咪 咪并[4,5-c]吡啶基、吡唑并[4,3-d]吡啶基、吡唑并[4,3-c]吡啶基、吡唑 并[3,4-c]吡啶基、吡唑并[3,4-d]吡啶基、吡唑并[3,4-b]吡啶基、咪唑并 [1,2-a]吡啶基、吡唑并[1,5-a]吡啶基、吡咯并[1,2-b]哒嗪基、咪唑并 [1,2-c]嘧啶基、吡啶并[3,2-d]嘧啶基、吡啶并[4,3-d]嘧啶基、吡啶并 [3,4-b]嘧啶基、吡啶并[5,4-d]嘧啶基、吡嗪并[2,3-b]吡嗪基或嘧啶并 [4,5-d]嘧啶基。此外，术语“杂芳基”包括“未取代的杂芳基”和“取 代的杂芳基”。

[0299] “芳基”或“杂芳基”基团的芳香环可以是未取代的或在一个或 多个环位置被取代基取代的，所述取代基包括，例如，卤素、羟基、氰基、硝基、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环、烷 氧基、环烷氧基、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、烯基羰基、炔基羰基、芳 酰基、芳烷基羰基、杂芳基羰基、杂环羰基)、酯类(包括烷氧基羰基、环烷氧基羰基、芳氧基 羰基、杂芳基羰 氧基、杂环基羰 氧基)、碳酸酯类(包括烷氧基羰 氧 基、芳氧基羰 氧基、杂芳氧基羰 氧基)、氨基甲酸酯类(包括烷氧基 羧基氨基、芳氧基羰基氨基、烯氧基羰基氨基、炔氧基氨基羰基、芳 氧基羰基氨基、氨基羰 氧基、烷基氨基羰 氧基、二-烷基氨基羰 氧基、芳基氨基羰 氧基)、氨基甲酰基(包括烷基氨基羰基、二-烷基氨基 羰基、芳基氨基羰基、芳烷基氨基羰基、烯基氨基 羰基)、酰胺基(包 括烷基羰基氨基、烷基羰基烷基烷基、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-芳基氨基和烷基芳基氨基)、磺酰基(包括 烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基、杂芳基磺酰基、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、膦酸酯、亚膦酸酯、硫醚(包 括烷基硫醇、芳基硫醇、杂芳基硫 醇)、脲基、亚氨基、脒基、硫代 羧基(包括烷基硫代羰基、芳基硫代羰基)、亚磺酰基(包括烷基亚 磺酰基、芳基亚磺酰基)、羧基，其中上述烃基团中的每一个可以任 选被一个或多个烷基、烯基、炔基、环烷基、卤素、羟基或烷氧基基 团取代。

[0300] 如本文中使用的，术语“杂环基”或“杂环”包括未取代的或取 代的、饱和的或不饱和的非芳香环或环系统，例如，其是4-、5-、6- 或7-元单环，7-、8-、9-、10-、11-或12-元双环或10-、11-、12-、13-、14-或15-元三环系统并且含有至少一个选自O、S和N的杂原子，其中 N和S还可以任选氧化成各种氧化态。在一个实施方案中，杂环基 部分表示含有5-7个环原子和任选含有选自O、S或N的另外的杂原 子的饱和单环。杂环基团可以在杂原子或碳原子处连接。杂环基可以 包括稠合或桥接的环以及螺旋环。杂环基部分的实例包括，例如，二 氢呋喃基、二氧杂环戊烷基、二氧杂环己烷基、二噻烷基、哌嗪基、吡咯烷、二氢吡喃基、草 酰四氢噻吩基(oxathiolanyl)、二噻茂烷、氧 硫杂环己基、硫代吗啉基、环氧乙烷基、氮丙 呤基、氧杂环丁烷基 (oxetanyl)、环氧己烷基(oxepanyl)、吖丁啶基、四氢呋喃基、四氢噻 吩基、吡咯烷基、四氢吡喃基、哌啶基、吗啉基、哌嗪基、吖庚因基 (azepinyl)、oxapinyl、氧 杂氮杂烷基(oxaazepany1)、氧硫杂环己烷基 (oxathianyl)、azepany1、二氧杂环庚烷基 (dioxepanyl) 和二氮杂环庚烷 基(diazepanyl)。

[0301] 术语“杂环基”包括本文中限定的可以被1、2或3个取代基取 代的杂环基团，所述

取代基如=0、=S、卤素、羟基、氰基、硝基、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环基、烷氧基、环烷 氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、杂芳氧基、杂环氧基、芳基烷氧基、杂芳基烷氧基、杂环基烷氧基、酮类(包括烷基羰基、环烷基羰基、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、杂环基羰基)、碳酸酯类(包括烷氧基羰基、芳 氧基羰基、杂芳氧基羰基)、氨基甲酸酯类(包括烷氧基羧基氨基、芳氧基羧基氨基、烯氧基羧基氨基、炔氧基氨基羧基、芳氧基羧基氨基、氨基羧基氨基、氨基羧基、烷基氨基羧基、二烷基氨基羧基、芳基氨基羧基)、氨基甲酰基(包括烷基氨基羧基、二烷基氨基羧基、芳 基氨基羧基、芳烷基氨基羧基、烯基氨基羧基)、酰胺(包括烷基羧 基氨基、烷基羧基烷基氨基、芳基羧基氨基、杂芳基羧基氨基)、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基氨基)、磺酰基(包括烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基、杂芳基磺酰基、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、磷酸酯、亚磷酸酯、硫醚(包括烷基硫醇、芳基硫醇、杂芳基硫醇)、脲基、亚氨基、脒基、硫代羧基(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,其中上述烃基团中的每一个可以任选被一个或多 个烷基、烯基、炔基、环烷基、卤素、羟基或烷氧基基团取代。

[0302] 术语“杂环基烷基”是被杂环基取代的烷基。该术语包括未取代 的和取代的杂环基烷基部分,其可以是被一个或多个烷基、烯基、炔 基、环烷基、卤素、羟基或烷氧基基团取代的。

[0303] 术语“羰基”或“羧基”包括含有以双键连接氧原子的碳(C=O) 的化合物和部分。羰基可以进一步被允许本发明的化合物执行其预定 功能的任何部分取代。例如,羰基部分可以被烷基、烯基、炔基、芳 基、烷氧基、氨基等取代。含有羰基的部分的实例包括醛类、酮类、羧酸类、酰胺类、酯类、脲、酸酐类等。

[0304] 术语“羟”或“羟基”包括具有-OH或-O⁻的基团。

[0305] 术语“卤素”包括氟、溴、氯、碘等。

[0306] 术语“全卤代”包括其中所有氢被卤素原子替代的部分。

[0307] 本发明的维生素D化合物,或其药物学上可接受的盐、溶剂化 物或前药,可以含有一个或多个不对称中心并且因此可以产生对映异 构体、非对映异构体和其他立体异构形式,其就立体化学而言,对于 氨基酸可以限定为(R)-或(S)-,或(D)-或(L)-。本发明打算包括所有这 样的可能的异构体,及其外消旋和光学纯形式。光学活性(+) 和(-)、(R)- 和(S)-,或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂制备,或 使用常规技术拆分,如使用手性柱的HPLC。当本文中描述的化合物 含有烯属双键或几何不对称的其他中心时,并且除非另外指出,化合 物旨在包括E和Z几何异构体。同样,还批在包括全部互变异构形式。

[0308] 术语“立体异构体”包括由通过相同键结合的相同原子构成,但 具有不同的三维结构的化合物,其不能互换。本发明包括各种立体异 构体及其混合物,并且包括对映异构体,其是指其分子是彼此的非可 重叠镜像的两个立体异构体。

[0309] 本发明包括所有药物学上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在自然界发现的原子数或质量数的原子替代。

[0310] 适用于包含在本发明化合物中的同位素的实例包括氢的同位素，如²H和³H，碳，如¹¹C、¹³C和¹⁴C，氯，如³⁶Cl，氟，如¹⁸F，碘，如¹²³I和¹²⁵I，氮，如¹³N和¹⁵N，氧，如¹⁵O、¹⁷O和¹⁸O，磷，如³²P，以及硫，如³⁵S。较重同位素(如氘，即，²H)的取代可以获得由更高代谢稳定性产生的治疗优势，例如，提高的体内半衰期或降低的剂量需求。同位素标记的维生素D化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术使用合适的同位素标记的试剂替代之前所用的非标记的试剂来制得。

[0311] 术语“前药”包括可以在生理条件下转化或通过溶剂分解转化成本发明的生物活性化合物的化合物。因此，术语“前药”是指药学上可接受的本发明化合物的代谢前体。在给药于需要的受试者时，前药可以是无活性的，但在体内转化成本发明的活性化合物。前药在体内通常快速转化以，例如，通过血液中的水解或肠道或肝脏中的转化产生本发明的母体化合物。前药化合物常常赋予哺乳动物生物体中的溶解性、组织相容性或延迟释放的优势(参见，Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), pp. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam))。

[0312] Higuchi, T. 等，“Pro-drugs as Novel Delivery Systems,” A.C.S. Symposium Series, Vol. 14 和 Bioreversible Carriers in Drug Design, 编者 Edward B. Roche, Anglican Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987 中提供了前药的讨论。

[0313] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。“药学上可接受的酸加成盐”是指保持游离碱的生物有效性和特性的那些盐，其在生物学上或其他方面并不是不合需要的且与无机酸和有机酸形成，所述无机酸如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等，而有机酸如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、褐藻酸、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、环己氨基磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、2-羟基乙烷磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡萄糖酸、葡萄糖、葡萄糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、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、p-甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等。

[0314] “药学上可接受的碱加成盐”是指保持游离酸的生物有效性和特性的那些盐，其在生物学上或其他方面不是不合需要的。这些盐从无机碱或有机碱添加至游离酸制得。源自无机碱的盐包括，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。源自有机碱的盐包括，但不限于，伯胺、仲胺和叔胺的盐，取代的胺(包括天然产生的取代的胺)、环胺和碱性离子交换树脂，如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、二甲基乙醇胺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、哈胺、胆碱、甜菜碱、苯乙胺、苄星、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、三乙醇胺、缓血酸胺、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。

[0315] 结晶常常产生本发明化合物的溶剂化物。如本文中使用的,术语“溶剂化物”是指包含一个或多个本发明化合物分子与一个或多个溶剂分子的聚集物。溶剂可以是水,在该情况下,溶剂化物可以是水合物。或者,溶剂可以是有机溶剂。因此,本发明的化合物可以作为水合物存在,包括单水合物、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。本发明的化合物可以是真溶剂化物,而在其他情况下,本发明的化合物可以只保留偶然外来的水或可以是水加一些偶然外来溶剂的混合物。

[0316] 在一个方面中,根据本发明的一个或多个方面和实施方案,本发明提供了适用于局部给药并包含治疗有效量的维生素D化合物的用于预防或减轻化疗诱发的脱发的药物组合物。

[0317] 表述“药物组合物”包括本发明化合物(例如,维生素D化合物)的制剂和本领域通常公认的介质,其用于将维生素D化合物递送至个体。这样的介质包括所有药物学上可接受的载体、稀释剂或其赋形剂。

[0318] 在一些实施方案中,本发明的组合物可以局部给药于任何上皮表面。“上皮表面”包括覆盖身体外表面或内衬中空结构的组织区域,包括,但不限于,皮肤和粘膜表面。这样的上皮表面包括口腔、咽、食道、肺、眼、耳、鼻、颊、舌、阴道、子宫颈、泌尿生殖器、消化道和肛门直肠表面。

[0319] 可以以用于局部给药的各种常规形式来配制组合物。这些包括,例如,半固体和液体剂型,如液体溶液或悬浮液、凝胶、霜剂、乳液、洗液、浆液、粉剂、喷雾、泡沫、糊剂、膏剂、药膏、香膏或滴剂。

[0320] 常规用于局部施用的载体包括果胶、明胶及其衍生物、聚乳酸或聚乙醇酸聚合物或其共聚物,纤维素衍生物,如甲基纤维素、羧甲基纤维素或氧化的纤维素,瓜尔豆胶、阿拉伯胶、刺梧桐树胶、黄蓍胶、斑脱土、琼脂、卡波姆、墨角藻、长角豆、葡聚糖及其衍生物、印度树胶、锂蒙脱石、卵叶车前果壳、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(甘醇类、醇类)、非挥发油、钠、钾、铝、镁或钙盐(如氯化物、碳酸盐、碳酸氢盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐、乳酸盐、乙酸盐、葡庚糖酸盐或酒石酸盐)。

[0321] 为了增强药物的持久性和保留时间,以及提高所获得的预防效果,用于局部试剂的标准组合物策略可以用于维生素D化合物。

[0322] 还可以使用局部经皮贴剂。经皮贴剂具有增加的提供本发明的组合物受控递送至身体的优势。这样的剂型可以通过将药剂溶解或分散于合适的介质中制得。

[0323] 除了维生素D化合物外,粉剂和喷雾剂可以含有载体,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。喷雾剂可以另外含有常规的推进剂,如氯氟烃和挥发性的非取代烃,如丁烷和丙烷。可以通过使用计量的喷雾瓶来储存、销售和/或给药喷雾剂。

[0324] 通常,通过与常规药物学上可接受的载体和稳定剂一起配制维生素D化合物的水溶液或悬浮液来制得含水性气溶胶。载体和稳定剂根据特定化合物的需求而变化,但通常包括非离子表面活性剂(例如,吐温、普郎尼克类、聚乙二醇等)、蛋白质(如血清白蛋白)、山梨聚糖酯、油酸、卵磷脂、氨基酸(如甘氨酸)、缓冲剂、盐类、糖类或糖醇类。通常从等渗溶液制得气溶胶。可以通过本领域已知的任一种方法来完成气溶胶的产生或本发明的任

何其他递送方式。例如,在 气溶胶递送的情况下,化合物与含有推进剂的任何合适载体一起以微 细分散的形式提供。

[0325] 液化的推进剂通常在环境条件下为气体并且在压力下凝结。推进 剂可以是任何可接受的和本领域已知的,包括丙烷和丁烷,或其他低 级烷烃,如多达5个碳原子的那些。将组合物容纳在具有合适推进剂 和阀的容器内,并且维持在升高的压力下直至通过阀的活动释放。

[0326] 在一个实施方案中,可以预防性地给药维生素D化合物。对于 预防性应用,可以在潜在脱发前施用维生素D化合物。可以优化施用 的时机以最大化维生素D化合物的预防效力。施用的时机将根据给药 模式、剂量、组合物的稳定性和有效性、给药频率(例如,单次施用 或多剂量)而改变。本领域技术人员将能够确定最大化维生素D化合 物的预防效力需要的最适时间间隔。

[0327] 存在于组合物中时,维生素D化合物通常将以总重量的约 0.000001%至约100%的量存在,更优选约0.001%至约50%,并且最 优选约0.01%至约25%。

[0328] 对于本发明的包含载体的组合物,组合物包含,例如,约1%至 约99%,优选约 50%至约99%,和最优选约75%至约99%重量的至 少一种载体。

[0329] 此外,本发明的组合物的单独组分可以根据预定剂量预共混或可 以将每种组分分开地加入相同的环境中用于获得所需浓度水平的治 疗组分的目的并且只要组分最终彼此形成紧密的混合物。此外,本发 明可以以连续或间歇地给药或递送。

[0330] 在一些实施方案中,药物组合物不是在水基制剂中。

[0331] 在一些实施方案中,药物组合物包括在约40% (w/w) 丙二醇和 约60% (w/w) 无水乙醇的媒介中的维生素D化合物。

[0332] 在一些实施方案中,药物组合物包括在约40% (w/w) 丙二醇和 约60% (w/w) 无水绝对乙醇(200标准强度,U.S.)的媒介;或约 30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙氧基二甘醇或卡必醇和约60% (w/w) 无水绝对乙醇(200标准强度,U.S.)的媒介中的维生素D 化合物。

[0333] 在一个实施方案中,制剂包括维生素D活性成分,在约40% (w/w) 丙二醇和约60% (w/w) 无水绝对乙醇(200标准强度,U.S.) 中配制,任选含有其他少量药物学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂,如约0.4% (w/v) Phospholipon 90G。在另一个实施方案中,制剂包括维生素D活性成分,在约30% (w/w) 丙二醇、约10% (w/w) 乙 氧基二甘醇或卡必醇和约 60% (w/w) 无水绝对乙醇(200标准强度, US) 中配制,任选含有其他少量药物学上可接受的赋形剂、载体或稀 释剂,如约0.4% (w/v) Phospholipon 90G。在一些实施方案中,乙 醇是 无水绝对200标准强度(U.S.)的未改性乙醇(USP)。本文中 所述的制剂提供了活性维生素D 化合物的真皮渗透和递送的水平,并 且提供了有效的方式来预防脱发,或降低脱发的严重程度,尤其是化 疗诱发的脱发(CIA)。

[0334] 在特定的实施方案中,药物组合物包含约40% (w/w) 丙二醇 (USP 级) 和约60% (w/ w) 无水绝对乙醇(200标准强度,US),未改性 USP。

[0335] 在一些实施方案中,药物组合物包含约40% (w/w) 丙二醇(例 如,USP级或更高) 和约60% (w/w) 无水绝对乙醇(200标准强度, US),未改性的(例如,USP级或更高)。

[0336] 在其他实施方案中,药物组合物包含约30% (w/w) 丙二醇,约 10% (w/w) 乙氧基二甘醇或卡必醇和约60% (w/w) 无水绝对乙醇 (200标准强度,U.S.)。

[0337] 在再其他实施方案中,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%Phospholipon,如Phospholipon 90G。

[0338] 在其他实施方案中,丙二醇和/或无水绝对乙醇的精确百分比 (w/w) 可以基于40%:60%比例而改变。例如,丙二醇与无水绝对乙 醇的%比率可以为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。使用本领域已知技术,如实施例I中描述的程序,可以验证这样的其他制剂的有效性。

[0339] 在特定的实施方案中,制剂中的无水绝对乙醇可以用95%乙醇、96%乙醇、97%乙醇、98%乙醇或99%乙醇来替代。

[0340] 在特定的实施方案中,药物组合物还可以包括痕量的其他非活性 的成分、赋形剂或组分。这样的成分的存在基本上不会影响维生素D 化合物的有效性或其真皮渗透/累积性能。

[0341] 配制本发明的维生素D化合物用于递送至表皮而基本上不具有 真皮层的渗透。之前由Roche Dermatology研发的不同制剂以每次应 用约500-1000 μ g的剂量使用时对于抗 CIA的保护是无效的,并且在 I期研究中引起大部分人类受试者的皮炎。相同的Roche制剂在大鼠 绿色瘤模型中也未能起到作用(下文)。

[0342] 根据以下(非限制性)程序制备本发明的示例性制剂之一:

[0343] 配方II:5、10和20 μ g/g的钙三醇

[0344] 按照以下实施例17,4.0节治疗剂/诊断剂中所列的实验方案制 备配方II。

[0345] 配方III:1.2 μ g/g (12ppm) 的钙三醇

| [0346] | 成分 | % w/w |
|--------|----------------|-------|
| | 100 ppm 钙三醇浓缩物 | 1.2 |
| [0347] | 200 标准强度乙醇 | 58.8 |
| | 丙二醇 | 40 |
| | 总计 | 100 |

[0348] 如下制备配方III:将钙三醇溶解于乙醇中;然后加入丙二醇并 混合直至所得到的溶液外观清澈和均匀。以上制剂的比重大约为 0.875g/mL。以w/v表示的以上配方的目标浓度为1.05 μ g/mL。

[0349] 配方IV:3.6 μ g/g (3.6ppm) 的钙三醇

| [0350] | 成分 | % w/w |
|--------|--------------|-------|
| | 100ppm钙三醇浓缩物 | 3.6 |
| | 200标准强度乙醇 | 56.4 |
| | 丙二醇 | 40 |
| | 总计 | 100 |

[0351] 如下制备配方IV:将钙三醇溶解于乙醇中;然后加入丙二醇并 混合,直至所得到的溶液外观清澈和均匀。以上制剂的比重大约为 0.875g/mL。以w/v表示的以上配方的目标浓度为3.15 μ g/mL。

[0352] 所用的试剂全部是USP级试剂(满足U.S.药典的要求)。

[0353] 使用本发明的制剂,约0.2 μ g的剂量(作为100 μ L的2 μ g/mL局部溶液给药)在新生大鼠中对于CIA是保护性的。基于这个信息,本领域技术人员可以基于待治疗的哺乳动物的平均体重容易地调节合适的剂量水平。例如,在人类受试者中,可以使用约2.5 μ g、5 μ g、10 μ g、20 μ g、25 μ g、40 μ g、50 μ g、60 μ g、70 μ g、75 μ g、80 μ g、90 μ g或100 μ g总剂量的钙三醇(或其他等同量的维生素D化合物)。在一个实施方案中,钙三醇的总剂量为约11-24 μ g、26-49 μ g、51-74 μ g或76-99 μ g。在可选的实施方案中,钙三醇的总剂量为约15-25、16-24 μ g、17-23 μ g、18-22 μ g、19-21 μ g、31-49 μ g、32-48 μ g、33-47 μ g、34-46 μ g、35-45 μ g、36-44 μ g、37-43 μ g、38-42 μ g、39-41 μ g、51-69 μ g、52-68 μ g、53-67 μ g、54-66 μ g、55-65 μ g、56-64 μ g、57-63 μ g、58-62 μ g、59-61 μ g、65-74 μ g、66-73 μ g、67-72 μ g、68-71 μ g、69-70 μ g、76-85 μ g、77-84 μ g、78-83 μ g、79-82 μ g、80-81 μ g、81-99 μ g、82-98 μ g、83-97 μ g、84-96 μ g、85-95 μ g、86-94 μ g、87-93 μ g、88-92 μ g或89-91 μ g。初步动物毒理学研究显示出约100 μ g的剂量没有引起真皮刺激,并且呈现出极好的表皮渗透而基本上没有真皮渗透(例如,非常低的对真皮的渗透)。对于其他剂量信息,参见以上的描述。

[0354] 在一个方面中,本发明提供了一种用于预防或减轻化疗诱发的脱发的试剂盒,其包括适用于局部给药并包含治疗有效量的维生素D化合物的药物组合物;和用于进行根据本发明的任一个或多个方面和实施方案的预防或减轻化疗诱发的脱发的方法的说明书。

[0355] 可以以书写或口头形式提供说明书,例如,在纸上或通过电子介质由健康护理提供者或商业实体提供。说明书可以包括批准的(例如, FDA或其他管理机构批准)基准或处方信息,及其重点或概述。说明书还可以包括专著、教科书和教科书章节/部分、小册子、药物标签和标签补充、临床研究实验方案,包括关于标注或非标注用途的那些。

[0356] 实施例

[0357] 以下实施例说明了本发明的特定方面,并不是在任何方面中进行限制。尽管为了清楚和说明的目的已经相当详细地描述了实施例,但本领域技术人员将认识到可以进行形式和细节的各种改变而没有脱离本发明的真实范围。正如本发明的各个不同方面可以包括以上提供的任一个或多个实施方案和特征,它们也可以结合以下实施例中提供的任一个或多个实施方案和特征。

[0358] 实施例1. 使用Franz人皮肤有限剂量模型在体外评价钙三醇的经皮吸收

[0359] 该实施例设计来评价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,在体外测量人尸体皮肤的吸收。已经证明了体外人尸体皮肤模型是用于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。该模型使用了安装在允许皮肤保持在匹配典型体内条件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并且通过监控其在浸浴皮肤内表面的接收器溶液中出现的速率来测量药物吸收。然后在该模型中准确地测定限总吸收、吸收速率以及皮肤含量的数据。对于准确地预测体内经皮吸收动力学,该方法具有历史先例。因此,人皮肤上的体外有限剂量模型容许表征维生素D化合物(如钙三醇)的经皮吸收药代动力学。

[0360] 在这个实验中,含有钙三醇的六个制剂在三个不同尸体皮肤供体的每一个上测试48小时时间段内持续钙三醇的经皮吸收,每个制剂三个重复皮肤切片。在剂量应用后预

先选定的时间,将真皮接收器溶液完全去除,用新鲜接收器溶液替代,并且保留等份试样用于随后分析。此外,收集角质层、表皮和真皮,并评价药物含量。通过高效液相色谱(HPLC)分析样品的钙三醇含量。以下提供了本文中使用的实验方案的简述。

[0361] 在该研究中使用了没有明显皮肤疾病迹象的在死亡24-48小时内获得的人尸体躯干皮肤。将皮肤取皮(dermatome)、低温保存并密封在不透水的塑料袋中,并储存在<-70°C直至实验那天。在使用前,将皮肤在~37°C水中解冻,然后在自来水中冲洗以从表面除去任何粘附的血液或其他物质。将来自单个供体的皮肤切成多个较小的块,其足够大以配合在静止的2.0cm² Franz扩散池上。对于每个制剂,测试每个供体的三个重复。真皮室装满磷酸盐缓冲等渗盐水(PBS),pH 7.4±0.1,至最大容量,并且使表皮室敞开在周围实验室环境中。可以将Volpo(01eth-20)加入PBS中,已知Volpo是一种提高水溶性差的化合物的水溶性的非离子型表面活性剂。储库溶液中的Volpo确保经皮吸收过程中的扩散槽条件,并且已知不影响测试皮肤的屏障特性。然后将细胞放入扩散装置中,其中以~600RPM通过磁力搅拌真皮储库溶液并且维持其温度以获得32.0±1.0°C的皮肤表面温度。

[0362] 为了确保每个皮肤块的完整性,在施用测试产物前测定其对氯化水的渗透性。短暂(0.5-1小时)平衡期后,³H₂O(NEN, Boston, MA, sp. Act. ~0.5μCi/mL)通过滴管在皮肤顶部成层,使得整个暴露的表面被覆盖(大约250-500μL)。5分钟后,除去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。其中³H₂O的吸收低于1.56μL-equ/cm²的皮肤样本认为是可接受的。使用的所有皮肤样品具有低于约0.50μL-equ/cm²的³H₂O吸收(结果未显示)。

[0363] 剂量给药和样品收集:紧接着在给药前,获取给药前的样品并且用含有0.2%Volpo(也称为01eth-20,用于确保药物在水溶液中的混溶性的非离子型表面活性剂)的0.1×PBS的新鲜溶液替代储库溶液。从Franz池中取出烟道(chimney)以使其完全达到皮肤的表皮表面。然后将所有制剂使用设定来递送10μL制剂/cm²的正排量移液管施加于皮肤块。使用移液管的特氟龙尖端将药剂分布在表面上。施用后五至十分钟,替换Franz池的烟道部分。在给药后的预先选定时间(6、12、24和48小时),将储库溶液整体取出,用新鲜储库溶液替代,并保存预定体积的等份试样用于随后的分析。

[0364] 将来自每个供体的单个皮肤块安装在池上,其没有给药但用于评价从皮肤扩散出来的物质的出现,其可以表示内源性钙三醇。收集最后一个样品后,用80:20乙醇:水洗涤皮肤表面两次(每次1.0mL体积)以从皮肤表面收集未吸收的制剂。洗涤后,从室中取出皮肤并分割成表皮和真皮。每层在80:20乙醇:水中提取过夜。

[0365] 通过高效液相色谱(HPLC)进行钙三醇的定量。简而言之,在具有Agilent 1100 Series LC/MSD的Hewlett-Packard 1100 Series HPLC系统上进行HPLC。将由A)水中的0.1%醋酸铵和B)甲醇中的0.1%醋酸铵组成的溶剂系统以0.550mL/min的流速通过Phenomenex Luna C18(2)柱(100A, 3μ100×4.6mm)运行。使用每日从纯净标准品制得的外部标准曲线将峰面积定量至浓度。将收集那天未测试的样品储存在-20°C或低于-20°C下。

[0366] 在前导研究中,将来自所述组的单个制剂以单个供体上约5μL/cm²剂量给药至六个室。在0、2、4、8、12、24、32和48小时时收集接收器溶液。在最后的接收器溶液样品后,洗涤表面并收集皮肤用于按照之前所述的分析。所有样品进行处理并分析钙三醇含量。

[0367] 关键性研究的最终设计是基于前导研究中观察到的结果,特别地,基于所用的剂

量、接收器溶液取样时间表和样品处理方法。进行这些改变以优化关键性研究样品中钙三醇的检测和定量。例如,尽管前导实验方案陈述了在2、4、8、12、24、32和48小时时获取储库样品,但在前导研究后确定储库样品在6、12、24和48小时时获取有助于更好地检测储库样品中的钙三醇水平。另外,在前导研究后确定,用20 μ L给药于2cm²(则给药量为10 μ L/cm²)将改善储库溶液样品中钙三醇的检测。然而,非给药室保持在1cm²。计算了以下参数: a) 总吸收(所有储库溶液的总和); b) 整个研究期间的渗透速率和程度; 和c) 所施用剂量的质量平衡。对于数据评价,a) 如果任何样品<LLQ(定量下限),那么可以将该样品处理为非数据值。对于放射性样品(例如,水完整性测试),将LLQ限定为空白样品的预定平均背景。在研究者的判断下,所有<LLQ的值陈述为零值或针对计算关键参数的目的测量的实际值;b) 如果其大于来自该组的剩余重复室的相同值的平均值±3SD的范围,或如通过Dean and Dixon离群值测试来确定,则确定为怀疑的离群值。在研究者的判断下,从数据的整体总和中除去陈述为离群值的值(但在文本或数据表中原样注明);c) 在室内,如果给定的时间点的值已经陈述为非数据值,或由于其他原因错失了,则用内插值替换时间点值来计算相关参数。如下,在连接邻近值的线上计算内插值:

[0368] ■给出3点:(T1,A)、(T2,B)和(T3,C),(B)缺失,

[0369] ■其中T=时间和A-C=测量的数据值

[0370] ■估算的B=A-[((A-C)/|T1-T3|) x (|T1-T2|)]

[0371] 对于统计学评价,将供体内的重复进行平均并且针对每个关键参数计算标准偏差。然后校准供体内的平均值并且计算跨供体群体的平均值和标准误差。使用Student's t-检验评价测试品之间的差异。

[0372] 使用这个实验方案,评价了以下测试制剂:

[0373] ■A:(1ppm):将0.2mL(1%(w/v))的100ppm钙三醇浓缩物(以下,批号H)溶解于19.8mL(99%(w/v))的200标准强度乙醇中(1 μ g/mL)。

[0374] ■B(1ppm):首先,将0.2mL(1%(w/v))的100ppm钙三醇浓缩物(以下,批号H)溶解于11.8mL(59%(w/v))的200标准强度乙醇(1 μ g/mL)中;然后加入8mL(40%(w/v))的丙二醇,并混合直至澄清和均匀(1 μ g/mL)。

[0375] ■C(1ppm):首先,将0.2mL(1%(w/v))的100ppm钙三醇浓缩物(以下,批号H)溶解于11.8mL(59%(w/v))的200标准强度乙醇(1 μ g/mL)中;然后加入6mL(60%(w/v))的丙二醇和2mL(10%(w/v))的乙氧基二甘醇,并混合直至澄清和均匀(1 μ g/mL)。

[0376] ■D(3ppm):首先,将0.6mL(3%(w/v))的100ppm钙三醇浓缩物(以下,批号H)溶解于11.4mL(57%(w/v))的200标准强度乙醇(1 μ g/mL)中;然后加入6mL(30%(w/v))的丙二醇,并混合直至澄清和均匀;最终加入2mL(10%(w/v))的乙氧基二甘醇,并混合直至澄清和均匀(3 μ g/mL)。

[0377] ■E(1ppm):首先,将0.2mL(1%(w/v))的100ppm钙三醇浓缩物(以下,批号H)溶解于11.72mL(58.6%(w/v))的200标准强度乙醇(DP-04-099)中;然后加入6mL(30%(w/v))的丙二醇,并混合直至澄清和均匀;然后加入2mL(10%(w/v))的Transcutol P,并混合直至澄清和均匀;最终,加入0.08mL(0.4%(w/v))的Phospholipon 90G浓缩物(以下,批号G)并分散至溶液中,混合直至澄清和均匀(1 μ g/mL)。

[0378] ■F(3ppm):首先,将0.6mL(3%(w/v))的100ppm钙三醇浓缩物(以下,批号H)溶解

于11.32mL (56.6% (w/v)) 的200标准强度 乙醇中;然后加入6mL (30% (w/v)) 的丙二醇,并混合直至澄清 和均匀;然后加入2mL (10% (w/v)) 的Transcutol P,并混合直至 澄清和均匀;最终,加入0.08mL (0.4% (w/v)) 的Phospholipon 90G浓缩物(以下,批号G) 并分散至溶液中,混合直至澄清和 均匀(31 μ g/mL)。

[0379] ■ G: 混合50g (50% (w/v)) 的200标准强度乙醇和50g (50% (w/v)) 的Phospholipon 90G,并混合直至澄清和均匀。

[0380] ■ H:在100mL (99.99% (w/v)) 的200标准强度乙醇中完全溶解 0.01mg 钙三醇 (0.01% (w/v))。

[0381] 这个研究中使用的所有试剂是分析试剂级或更好。独特试剂的来 源将在最后报告的正文内每种化学品第一次提及后标注。

[0382] 这个研究的结果概括于以下的汇总表中:

[0383] 汇总表:使用人尸体皮肤从单次施用的48小时内针对钙三醇的 表皮、真皮以及总吸收的经皮吸收中钙三醇含量的跨供体平均结果。作为总质量(ng)的平均值 \pm SE

[0384]

| 测试物质 | 表皮 (ng/cm ²) | 真皮 (ng/cm ²) | 总吸收 (ng/cm ²) |
|---------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 批号A | 0.98 \pm 0.19 | 0.11 \pm 0.11 | 9.85 \pm 0.62 |
| 批号B | 1.63 \pm 0.44 | 0.19 \pm 0.19 | 9.84 \pm 0.67 |
| 批号C | 1.89 \pm 0.54 | 0.00 \pm 0.00* | 9.74 \pm 0.43 |
| 批号D | 6.44 \pm 0.74 | 0.00 \pm 0.00 | 10.51 \pm 0.10 |
| 批号E | 2.19 \pm 0.14 | 0.00 \pm 0.00 | 9.96 \pm 0.32 |
| 批号F | 4.83 \pm 0.42 | 0.00 \pm 0.00 | 8.80 \pm 0.25 |
| 未给药的空白池 | 0.37 \pm 0.37 | 0.00 \pm 0.00 | 13.75 \pm 0.59** |

[0385] *零值表示低于检测下限的结果。

[0386] **假定是从皮肤释放的内源性钙三醇

[0387] 数据表明钙三醇在体外从评价的测试制剂渗入人尸体皮肤中,但 不必定通过人尸体皮肤。来自每个供体的空白的、未给药的皮肤块证 明了与内源性钙三醇一致的HPLC/MS共洗脱峰。储库溶液中存在的 量(在所有测试制剂中基本上相同,并且与未给药的皮肤块相似)最 可能内源性钙三醇的扩散是从皮肤块释放。因为在测试制剂和未给药 室之间看到很小的差异,因此储库溶液中看到的量不太可能表示来自 局部施用的测试制剂的钙三醇。

[0388] 观察到了钙三醇吸收的证据,因为给药两种制剂(A和B)的那 些皮肤块中的真皮含量显示于图1中。因为从未给药的皮肤块未看到 真皮皮肤层中可测量的水平,因此来自这两种测试制剂的可测量真皮 水平解释为表示从施用的剂量的吸收。此外,所有给药测试制剂的表 皮样品证明了大于未给药的皮肤块的钙三醇水平(~3 \times 至~17 \times)。基 于表皮 钙三醇含量的等级顺序将测试制剂排列如下:

[0389] D>F>E>C>B>A>>>未给药的皮肤

[0390] 与该等级顺序一致的是显示了较高表皮含量的测试制剂是含有 较高浓度钙三醇的那些(3 μ g/mL vs. 1 μ g/mL) (D和F)。在表面洗 涤结果中观察到非常相似的等级顺序(从皮 肤表面回收残余的测试物 质)。在未给药的空白皮肤块的表面洗涤中未发现钙三醇。

[0391] 实施例2.涉及表皮细胞培养物对钙三醇的反应的关键蛋白质的鉴别-实时PCR

(RT-PCR)

[0392] 这个和以下的几个实施例提供了关于钙三醇的激活途径中蛋白 质或基因身份的其他信息。这些实验允许鉴别涉及表皮细胞对维生素 D化合物的细胞反应中的作用机理和关键蛋白质/基因。

[0393] 具体地,发现了将角化细胞系HEKa暴露于钙三醇引起了对细胞 过程的显著影响。本文中所述的实验聚焦于涉及钙通道转运的钙三醇 诱导的变化和热休克蛋白调节的变化的关键蛋白质/基因的鉴别。在 这 个实施例中使用了实时聚合酶链式反应(RT-PCR)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。

[0394] 使用PCR阵列作为筛选工具,评价可能给予对于细胞内钙三醇 的生物作用模式的深入理解的分子靶标的谱。使用实时PCR定量评 价了mRNA水平的变化以评价含有80个途径特异性靶标(参见附录) 的预先选择的子集的mRNA水平。PCR阵列分析利用了两组基因-与热休克蛋白相关的那些(SABiosciences) 和与神经科学离子通道和转 运蛋白相关的那些(SABioscience)。

[0395] 细胞培养物:将原代人表皮角化细胞(HEKa) 与人角化细胞生 长补充剂(Cascade Biologics, Inc., Portland OR)一起维持于Epilife 培养基(Cascade Biologics, Inc., Portland OR) 中。将细胞在5%CO₂下在37°C下生长。

[0396] HEKa细胞的D3处理:用0.1μg/mL的钙三醇或对照媒介处理 HEKa细胞。为了获得0.1μg/mL终浓度的钙三醇,将1mg的钙三醇 溶解于2mL的乙醇中,并且将1μL的所得储液加入5mL的培养基中。用5mL含有1μL乙醇的培养基处理细胞的媒介对照组。在处理开始 后的3、6、16、24、48或72小时收集细胞。

[0397] RNA分离:按照制造商的说明使用Rneasy Mini试剂盒(Qiagen, Inc., Valencia CA) 在不同的处理时间裂解细胞用于RNA分离。通 过测量260nm处的光密度来定量RNA。第一链合成:按照制造商的 推荐,使用RT2第一链合成试剂盒(SABiosciences, Frederick MD) 从1μg总RNA合成了第一链cDNA。

[0398] 实时 PCR:用水稀释来自第一链合成的产物,并与SYBR 绿色 主混合物(SABiosciences, Frederick MD) 混合,并加载至PCR阵列 上。在Biorad CFX96上的PCR阵列(热休克蛋白阵列,以及神经科 学和离子通道阵列) (SABiosciences, Frederick MD) 上运行实时PCR。使用SABiosciences网站上可获得的PCR阵列数据分析软件进行了数 据分析。

[0399] 以下的表2-1显示了热休克蛋白质基因阵列上钙三醇处理后 HEKa细胞中受到调节的基因。结果只显示了在两个独立实验中受到 调节的那些基因。

[0400] 表2-1热休克蛋白阵列中受到维生素D3处理调节的基因

| | 基因符号 | 蛋白质 | 调节模式 |
|--------|--------|------------------------------|----------|
| [0401] | HSPB1 | 热休克 27 kDa 蛋白 1 | 48 小时时下调 |
| [0402] | DNAJC6 | DnaJ (Hsp40)同源物, 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 |

[0403] HEKa细胞中在mRNA水平受到钙三醇处理调节的基因中的两 个是HSPB1和HSPA2。

HSPB1是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的27kDa蛋白。HSPA2是存在于细胞膜和核中的70kDa蛋白,并且受到HSF1的调节。HSPB1和HSPA2 均涉及细胞凋亡。HSF4受到视黄酸的调节,并且涉及细胞分化。DNAJC6属于蛋白质的HSP40组。其存在于网格蛋白覆盖的囊泡和细胞质中。

[0404] 相似地,与来自三个独立实验一致的获自神经科学和离子通道阵 列的结果概括于以下的表2-2中。

[0405] 表2-2维生素D3处理调控的神经科学和离子通道阵列中的基因

| 基因符号 | 基因 | 调控模式 |
|--------|--------|--|
| [0406] | SLC1A1 | 溶质载体家族 1 (神经元/表皮高亲和性谷氨酸转运蛋白, 系统 Xag, 成员 1) |
| | KCNB2 | 钾电压-门控通道, Shab-相关亚家族, 成员 2 |
| | KCNN4 | 钾中间体/小电导率钙激活通道, 亚家族 N, 成员 4 |
| | SLC1A3 | 溶质载体家族 1 (神经胶质高亲和性谷氨酸转运蛋白), 成员 3 |

[0407] 一致地观察到谷氨酸转运蛋白和钾通道的变化。已知SLC1A1 (也称为EAAC1或EAAT3) 主要负责刺激性神经递质谷氨酸穿过膜 的转运。已经在如心脏和皮肤这样的组织中的神经系统外发现了这种 溶质载体蛋白。在大鼠角化细胞中,存在的证据表明谷氨酸信号传导 和SLC1A1参与伤口愈合 (Genever等,1999)。SLC1A1受到Riluzole (一种目前在临床试验中用于黑素瘤的药物) 的抑制 (Clinical Trials.gov, Mosby' s Drug Consult, 第13 版) 表明SLC1A1在皮肤细 胞中的生物作用。假定SLC1A1涉及受损运动神经元中的抗细胞凋亡 机制 (Kiryu-Seo等,2006) ,这个实验中HEKa细胞的SLC1A1受 到D3处理上调的观察表明潜在的保护性机制途径关联。

[0408] 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转运。通常在脑的胶质细胞中发现,这种 转运蛋白参与净化谷氨酸的突触空间,由此防止突触后神经元延长的 去极化。已知SLC1A3与神经胶质源神经营养因子 (GDNF) 和磷酸二酯酶6B (PDE6B) 相互作用。可能是SCL1A3涉及降低的细胞毒 性。

[0409] KCNN4是钾中间体/小电导率钙激活通道, 亚家族N, 成员4。其激活后,细胞膜超极化并且存在提高的细胞钙内流。这种钾通道位 于神经系统外的许多组织中。

[0410] 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是重要的。

[0411] 尽管钙三醇用于这些实验中,但本领域技术人员将容易理解本发明的其他维生素D化合物(如上文中描述的那些)也可以在调控靶基 因表达中呈现出相似的活性。在特定的实施方案中,预期本发明的维 生素D化合物呈现出与这些实验中的钙三醇相似或相同的基因调节 特征,例如,受到钙三醇相似上调的一种或多种靶基因的表达(mRNA 和/或蛋白

质)的上调,或受到钙三醇相似下调的一种或多种靶基因的 表达(mRNA和/或蛋白质)的下调。

[0412] 实施例3.参与表皮细胞培养物对钙三醇的反应的关键蛋白质的鉴别-抗体阵列

[0413] 还通过利用抗体微阵列评价了钙三醇刺激时的蛋白质变化,所述 微阵列能够筛选超过700种潜在靶蛋白的变化。

[0414] 在这个实验中,利用包括抗超过700种靶蛋白的抗体的抗体微阵列(Panorama XP725 Antibody Array, Sigma)来评价用钙三醇分别处理3、6或24小时的HEKa细胞中的蛋白质浓度/水平的变化。简而言 之,首先收集处理的HEKa细胞,然后提取以获得可溶性蛋白 质上清 液。用荧光染料(分别为Cy3和Cy5)各自标记从每个样品(1mg/mL) 提取的蛋白质样 品(总的~1mg)的两个部分。从蛋白质样品除去过 量的染料,并且将所得到的标记的蛋白 质样品用于微阵列孵育。

[0415] 为了测定较晚时间点(例如,在第6或24小时)相对于早些时 间点(例如,第3小时)特定靶蛋白的表达水平,通过不同的标记来 标记样品(例如,用Cy3标记3-小时提取物,用 Cy5标记6-小时或 24-小时提取物)。然后将含有等量总蛋白的两种标记的样品混合(例 如,将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 片孵育后(根据制造商推荐的实验方案),洗 涤芯片并干燥。然后用荧光激光扫描仪扫描微 阵列以测量Cy3和Cy5 染料的相对荧光强度。

[0416] 如果特定类型的靶蛋白的量随着时间提高(或降低),微阵列将 保留与较晚时间 点相关的更多(或更少)染料(例如,Cy5)。例如, 在这个实验中,将最早时间点(例如,3-小 时)用作基线来测定两个 较晚时间点(例如,6-小时vs.24-小时)的相对蛋白质表达水平。如 果在6-24小时之间通过阵列保留更多Cy5,靶蛋白的表达水平在该时 间段内提高。相 反,如果在6小时至24小时之间存在保留的Cy5的 降低,则靶蛋白表达水平降低。

[0417] 使用这种方法的初始分析聚焦于呈现出相对表达水平变化>2倍 (提高或降低) 的那些靶蛋白。整体上,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响 应于维生素钙三醇具有显 著改变的表达水平的靶蛋白(表3-1和3-2中)。

[0418] 表3-1. 钙三醇处理后具有提高(>2-倍)的蛋白质水平的靶蛋白

[0419]

| | |
|--------------------|-----------------------|
| 淀粉样前体蛋白 | HDAC2 |
| ARTS | HDAC6 |
| ASAP1 Centaurin b4 | ILK |
| BACH1 | MAP激酶激活的蛋白激酶2MAPKAPK2 |
| Bclx | MAP激酶ERK1 |
| BclxL | 黑皮质素3受体 |
| BID | 肌球蛋白IX Myr5 |
| Bmf | 神经丝200 |
| CENPE | 一氧化氮合酶bNOS |
| cMyc | p120ctn |
| 丝切蛋白 | PAD14 |
| 连接蛋白32 | Par4前列腺细胞凋亡应答4 |
| Csk | 早老素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 |
| ERK5 BIG MAPKBMK1 | SHPTP2 |
| 雌激素受体 | Sin3A |
| FKHRL1 FOXO3a | 底物P受体 |
| 粘着斑激酶pp125FAK | 突触极蛋白 |
| FOXP2 | 肿瘤坏死因子a |
| 谷氨酸脱羧酶65 | 泛素末端水解酶L1 |
| 谷氨酸脱羧酶GAD65 67 | Uvomorulin ECadherin |
| gTubulin | 玻璃粘连蛋白 |

[0420] 表3-2. 钙三醇处理后具有降低(>2-倍)的蛋白质水平的靶蛋白

[0421] Crk II

| |
|----------------|
| 生长因子独立 1 |
| 丝氨酸苏氨酸蛋白磷酸酶 1b |
| 组织蛋白酶 D |
| 泛转化生长因子 b |
| WAVE |
| 蛋白酪氨酸磷酸酶 PEST |
| CD40 |

[0422] [0423] 使用相同蛋白质抗体阵列方法评价24-小时时钙三醇处理的 HEKa细胞鉴别出约五十个显著上调的蛋白质。这些蛋白质通常落入 四种类别中: (i) 转录和细胞周期控制(表3-3) ; (ii) 结构、细 胞骨架和粘附蛋白(表3-4) ; (iii) 细胞凋亡调控蛋白(表3-5) ; 和(iv) 神经细胞分化和阿尔茨海默氏病(表3-6) 。

[0424] 表3-3. 与细胞周期和转录控制相关的超表达蛋白质(钙三醇处 理24小时后)

[0425]

| 蛋白质 | 功能 |
|--------------------|---------------------------|
| BACH1 | 转录因子(阿尔茨海默氏病) |
| CENPE | 在细胞周期的 G2 期中累积的着丝粒蛋白 |
| cMyc | 转录因子(致癌基因) |
| C-src 酪氨酸激酶(Csk) | 细胞生长(癌症) |
| CtBP1 | 转录抑制剂 |
| 二甲基组蛋白 H3 diMeLys4 | 转录调控 |
| 二甲基组蛋白 H3 diMeLys9 | 转录调控 |
| 雌激素受体 | 配体依赖性核受体 |
| FKHRL1 FOXO3a | 转录因子, 连接 ROCK 激酶和 NO 信号传导 |

[0426]

| | |
|-------------------------|---|
| FOXP2 | 大脑、肺、消化道发育中的转录调节剂 |
| HDAC2 | 调节基因表达 |
| MAP 激酶激活蛋白激酶 2 MAPKAPK2 | 涉及许多细胞过程(应激和炎性应答, 核输出, 基因表达调节和细胞增殖)的激酶。热休克蛋白 HSP27 显示是底物之一。 |
| MAP 激酶 ERK1 | 响应于各种胞外信号在调节各种细胞过程如增殖、分化和的细胞周期进展的信号传导级联中起作用, 磷酸化核蛋白 |
| 黑皮质素 3 受体 | 激素受体 |
| 增殖细胞蛋白 Ki67 | 增殖标志物 |
| S100 | 涉及多个细胞过程调节的钙调蛋白-样钙结合蛋白 |
| SHPTP2 | 在各种细胞信号传导事件中起调控作用的激酶 |
| Sin3A | 转录调控蛋白 |

[0427] 表3-4. 关于结构、细胞骨架和粘附的超表达蛋白质(钙三醇处理 24小时后)

| 蛋白质 | 功能 |
|--------------------|--------------|
| ARTS | 调节细胞骨架组织化 |
| ASAP1 Centaurin b4 | 调节肌动蛋白细胞骨架 |
| 丝切蛋白 | 解组肌动蛋白丝 |
| 连接蛋白 32 | 外周髓磷脂的主要成分 |
| 抗肌萎缩蛋白 | 用于细胞骨架连接的大蛋白 |

| | |
|----------------------|--|
| 粘着斑激酶 pp125FAK | 粘着斑激酶的磷酸化在诱导迁移的角化细胞中提高 |
| gTubulin | 微管, 纺锤体极 |
| 肌球蛋白 IX Myr5 | 运动蛋白 |
| 神经丝 200 | 神经细胞相关的结构蛋白 |
| p120ctn | 粘附和信号转导 |
| PAD14 | 将精氨酸残基转化成瓜氨酸残基; 可以调节经历退化过程的细胞中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 |
| Uvomorulin ECadherin | Ca-依赖性细胞粘附分子, 用来调节表皮细胞识别和粘附的跨膜糖蛋白 |
| 玻璃粘连蛋白 | 促进细胞粘附和散布 |

[0430] 表3-5. 与细胞凋亡控制相关的超表达蛋白质(钙三醇处理24小时 后)

| 蛋白质 | 功能 |
|-------------------|---|
| Bclx | 细胞凋亡调控 |
| BclxL | 细胞凋亡调控 |
| BID | 细胞凋亡调控 |
| Bmf | 细胞凋亡调控 |
| DcR2 | 受体含有胞外 TRAIL-结合结构域、跨膜结构域和平截的细胞质死亡结构域。这种受体不诱导细胞凋亡，并且已经显示出在 TRAIL-诱导的细胞凋亡中起着抑制作用。 |
| ERK5 BIG MAPKBMK1 | 通过 Bad 的磷酸化保护内皮细胞免受细胞凋亡 |
| 整联蛋白连接激酶(ILK) | 调节整联蛋白-介导的信号转导，可以防止与 PKB/Akt 途径相关的细胞凋亡 |

| 蛋白质 | 功能 |
|-----------|---------------------|
| 蛋白激酶 Ba | (Akt)涉及细胞存活和细胞凋亡的抑制 |
| PUMA bbc3 | 细胞凋亡调节剂 |

[0431] 表3-6. 与神经细胞分化和阿尔茨海默氏病相关的超表达蛋白质 (钙三醇处理24小时后)

| 蛋白质 | 功能 |
|-----------------|---|
| 淀粉样前体蛋白 | 淀粉样前体蛋白 (APP) 是在许多组织中表达的膜内在蛋白，并且在神经元的突触中浓缩。其主要功能是未知的，尽管已经暗示为突触形成[2]和神经元塑性[3]的调节剂。 |
| BACH1 | 转录因子 (阿尔茨海默氏病) |
| 早老素 1 | 负责切割 APP (在阿尔茨海默氏病中观察到突变) 的 γ 分泌酶的子组分 |
| 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 | 神经细胞相关的结构蛋白 |
| 氧化氮合酶 bNOS | 可诱导的，细胞信号传导，免疫系统 |
| 物质 P 受体 | 神经肽受体 |
| 突触极蛋白 | 肌动蛋白结合蛋白，涉及神经元中的棘器形成 |
| 连接蛋白 32 | 外周髓磷脂的主要成分 |
| 肿瘤坏死因子 a | 免疫细胞的调控 |
| 泛素末端水解酶 L1 | 神经元特异性 (阿尔茨海默氏病和帕金森病) |

[0434] [0435] 实施例4. 参与表皮细胞培养物对钙三醇的反应的关键蛋白质的鉴别-蛋白质组学分析

[0436] 用钙三醇处理一系列HEKa培养物，并且在钙三醇3暴露后3、6和24小时时收集细胞沉淀物。然后使用蛋白质组学方法如2-D凝胶 和Western印迹分析来分析细胞沉淀物。在以下所述的实验中，用 0.1 μ g/mL钙三醇处理HEKa细胞，并且通过2-D凝胶电泳和相关的比较分析处理在3-、6-和24-小时时获得的样品(结果未显示)。

[0437] 总之，在比较研究中进行了约458个蛋白质斑点的分析，将对照 样品与3-、6-和24-小时处理样品进行比较。鉴别了显示出统计学上 显著差异变化的六个斑点。切除这些斑点，并通过胰蛋白酶消化和质 谱表征将其蛋白质含量接受序列鉴别。

[0438] 结果(表4-1)显示出与作为常见杂质常常观察到的角蛋白相反，来自HEKa角化细胞样品的六个斑点的集合含有纯的内源性角蛋白。将两个S100蛋白鉴别为受到强烈调控的，与谷胱甘肽S-转移酶和 Galectin 1一起。存在Galectin 1被糖基化的证据。

[0439] 表4-1基于2-D凝胶电泳研究，鉴别为钙三醇强调控的蛋白质

| 斑点 | 鉴别的蛋白质 | 名称 | 应答 | 功能 | 细胞位置 |
|--------|-------------------|---------|---------------------|--------------------|------|
| [0440] | 4 谷胱甘肽 S-转移酶 | GST | 在 3、6 和 24 小时上调 | GST 转移 | 细胞质 |
| | 2 角蛋白 1 | KRT1 | 在 6 小时上调，而在 24 小时下调 | 中间丝 | 细胞质 |
| | 8 角蛋白 17 | KR17 | 在 24 小时下调 | 中间丝 | 细胞质 |
| | 10 S100 A9 (钙卫蛋白) | S100A9 | 在 6 和 24 小时下调 | 钙结合蛋白 | 细胞质 |
| | 14 S100 A13 | S100A13 | 在 6 和 24 小时上调 | 钙结合蛋白 | 细胞质 |
| [0441] | 27 半乳凝集素 1 | LGALS1 | 在 6 和 24 小时上调 | β -半乳糖苷 - 结合 | 胞外 |
| | | | | 蛋白 | |

[0442] 两个S100蛋白 (A9和A13) 属于蛋白质的钙卫蛋白家族。在家族中存在21种不同类型的这些低分子量蛋白。这些S100蛋白结合钙 (EF-手基序), 并且每种类型以细胞特异性方式并且以依赖于环境因素的水平表达。各种疾病与改变的S100蛋白水平相关(心肌病、神经退行性和炎性失调, 以及癌症)。注意到在抗体阵列结果中也鉴别S100蛋白为在接触钙三醇时上调。

[0443] 实施例5. 钙三醇对角化细胞生长的作用

[0444] 用不同浓度的钙三醇处理了一系列HEKa培养物, 并且在预定生长期后分析了HEKa细胞的生长行为。所有实验在96-孔平板形式中进行。每个孔在约100 μ L培养基中含有相同量的HEKa细胞(通常为 2,000-5,000细胞/孔)。将钙三醇溶解于乙醇中以制备储液。将储液在生长培养基中1:2连续稀释, 涵盖4.0 μ g/mL至约15.5ng/mL的范围(9个测试浓度)。将约100 μ L的每种测试浓度的钙三醇加入相应的测试孔中, 得到约200 μ L/孔的终体积。测试的钙三醇浓度在 2.0-0.008 μ g/mL的范围内(例如, 对应于96-孔平板中的第2列至第10列)。第11列用作阴性对照(没有钙三醇)。所有实验重复进行两次。

[0445] 如图2中所示, 将约0.008-2.0 μ g/mL浓度范围的钙三醇滴定至 HEKa细胞中。最低水平的钙三醇在HEKa细胞中充分耐受, 并且钙三醇显示出适度刺激HEKa细胞生长(\sim 10-20%)。然而, 在约 1.0 μ g/mL或更高的钙三醇浓度下, 细胞生长被抑制。HEKa细胞对钙三醇的整体剂量反应在约六周的时间段内在一系列的十九个独立实验中是一致的(数据未显示)。

[0446] 实施例6. 钙三醇对癌细胞生长的作用

[0447] 与在正常角化细胞HEKa中观察到的不同, 对于测试的大部分癌症或永生化细胞

系,包括SkBr-3(乳腺腺癌,Her2超表达的)、SKMEL-28(黑素瘤)、PaCa2(胰腺癌)、NCI-ES-0808和NIH-3T3(永生化成纤维细胞),没有观察到明显的生长促进或生长抑制作用。通过这样的癌症/永生化细胞系呈现的一个示例性生长曲线针对胰腺癌细胞系PaCa2显示于图3中。注意到PaCa2的生长在宽范围的钙三醇浓度中没有受到影响。

[0448] 测试的癌细胞系中的两个,MCF-7(具有p53突变的乳腺癌)和HepG2(肝癌),在低维生素D3浓度(0.05-0.25μg/mL)下相似地响应于钙三醇刺激,而在高钙三醇浓度(>0.5μg/mL)下响应于钙三醇抑制。参见图4。

[0449] 这些数据表明受试维生素D化合物施用于正常角化细胞(如HEKa)至特定浓度限制时,可能促进这些正常角化细胞的生长,而同时没有促进癌细胞生长。超出浓度限制,维生素D化合物实际上可能抑制正常角化细胞的生长。

[0450] 实施例7.钙三醇对HEKa细胞对抗各种化疗药物的保护性作用

[0451] 这个实施例证明了本发明的维生素D化合物可以保护正常角化细胞(如HEKa)对抗大多数类型的前线化疗药物的细胞毒性作用,具有少数例外。具体地,测试了十七种抗癌药物来评价钙三醇对这些药物的细胞毒性作用的影响。药物名称及其各自的作用机理列于下表中。

[0452] 表7-1针对钙三醇在HEKa细胞中的化学保护活性测试的药物

| 测试的药物 | 机理 |
|-------|-----------|
| 阿霉素 | 细胞毒性 |
| 5-FU | 嘧啶抗代谢物 |
| 他莫昔芬 | 结合雌激素受体 |
| 伊立替康 | 拓扑异构酶1抑制剂 |
| 紫杉醇 | 有丝分裂抑制剂 |

[0453]

| | | |
|--------|------------|-------------------------------------|
| [0454] | 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 |
| | 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 |
| | 十字孢碱 | 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) |

[0455] 在第一系列的实验中,在设计来评价0.1 μ g/mL钙三醇提供对 HEKa细胞的保护作用的能力的试验中使用了多种基于激酶抑制剂的 药物。这些包括:厄洛替尼(特罗凯)、EGFR Tyr激酶抑制剂;吉 非替尼(易瑞沙),EGFR Tyr激酶抑制剂;索拉非尼,几种Tyr激 酶(Raf、VEGF-R2、c-kit、PDGF-R)的抑制剂;达沙替尼,BCR/ABL Tyr 激酶抑制剂;和十字孢碱,相对非特异性的激酶抑制剂。

[0456] 这些实验中获得的给药曲线显示出一般的趋势:在低药物剂量水 平下(与影响正经历全身性递送的化疗的患者的皮肤的那些不同), 钙三醇提供了特定的生长刺激并保护 HEKa细胞(参见图5-9)。此 外,与较非特异性的激酶抑制剂相比,钙三醇表现为对于更特异性的 激酶抑制剂具有更明显的保护作用。

[0457] 相似地,钙三醇还呈现出适度的对低剂量水平的烷化剂(如顺铂 和卡铂)的保护水平(参见图10和11)。

[0458] 伊立替康可能通过与拓扑异构酶I的相互作用来抑制细胞生长。在钙三醇存在下,也观察到了对抗伊立替康的积极保护作用(图12)。

[0459] 紫杉醇是有丝分裂抑制剂。0.1 μ g/mL钙三醇的存在确实提供了一些对抗紫杉醇的保护作用(图13)。

[0460] 基于嘧啶抗代谢物的药物(如5-氟尿嘧啶(5-FU))以几种方 式起作用,但主要作为胸昔合成酶抑制剂。5-FU阻断胸昔的合成, 胸昔是DNA复制所需的。因此,5-氟尿嘧啶已经局部用于治疗光化 性(日光)角化病和一些类型的皮肤基底细胞癌。存在0.1 μ g/mL钙 三醇时,至少看到了一些温和的对抗5-FU的保护作用(图14)。

[0461] 吉西他滨是核昔类似物,其中脱氧胞昔的2' 碳上的氢原子被氟 原子替代。与氟尿 嘘啶和嘧啶的其他类似物相似,吉西他滨在DNA 复制过程中替代核酸的一种构件块(在这种情况下,为胞昔)。吉西 他滨用于各种癌症的治疗中:非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌和乳

腺 瘤。图15显示了存在0.1 μ g/mL钙三醇时,至少看到了温和的对抗吉 西他滨的保护作用。

[0462] 另一方面,钙三醇没有显示出提供明显的对抗阿霉素的细胞毒性 效应的保护作用(图16)。此外,对抗他莫昔芬的任何保护作用是弱 的(图17)。他莫昔芬竞争性地结合肿瘤和其他组织靶标上的雌激素 受体,产生降低DNA合成并抑制雌激素作用的核复合物。

[0463] 与以上的数据一致,图18中的数据显示了HEKa角化细胞通过 钙三醇刺激了生长,并且在HEKa细胞中观察到了一定水平的对抗 5-FU的保护。令人感兴趣的是,在三个测试的癌细胞系Hep-G2、PaCa-2和SEMEL-28中,5-FU治疗的ED₅₀曲线与还具有0.1 μ g/mL 钙三醇补充的那些没有显著区别。注意到Hep-G2细胞受到钙三醇处 理的温和刺激,而其5-FU ED₅₀曲线甚至在钙三醇的存在下也没有显 著变化。

[0464] 相似地,将以下4个测试的癌细胞系:Hep-G2、MCF-7、PC-3 和PaCa-2暴露于0.1 μ g/mL钙三醇两个世代没有改变这些细胞对其他 药物(例如,阿霉素、顺铂和厄洛替尼)的反 应。

[0465] 以上的这些结果表明钙三醇可以在(例如,使用5-FU)的化 疗 过程中保护正常角 化细胞(如HEKa)而不拮抗化疗对抗癌细胞的效 力。

[0466] 与HEKa细胞中观察到的很像,钙三醇没有显示出明显改变阿霉 素抗癌细胞/永生 细胞(如SkBr-3、SKMEL-28、PaCa-2、MCF-7、NCI-ES-0808、Hep-G2和NIH-3T3)的细胞毒性作 用(参见图19)。

[0467] 此外,还研究了商业药物与钙三醇可能的协同作用。在这些实验 中,将选定的商业 药物连续稀释,从高于用于细胞孵育的最终所需浓 度4-倍的浓度开始。同时,制备0.4 μ g/mL钙三醇的储液,并随后与 连续稀释的药物混合(以1:1的比例)。然后将药物/钙三醇混 合物孵 育至少15分钟,并加入细胞培养基中(以100 μ L至100 μ L的比例)。因此,最终的钙三 醇浓度为0.1 μ g/mL。

[0468] 药物处理时间段通常为三天。在三天结束时,在将20 μ L“Substrate Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent”(Promega)加入每个孔 之前,在280nm下阅读96-孔平 板的背景OD。将平板返回37°C培 养 箱,并且每小时阅读490nm下的OD,直至达到大约1.5的 OD。通 过减去底物前OD读数来计算净OD增加。

[0469] 通过相对于对照孔(不含药物)的OD比较不同浓度下的OD来 计算药物对细胞的影 响。将作为药物浓度的函数的净OD的结果绘图 并用于测定ED₅₀值。

[0470] HEKa细胞分析的结果表明钙三醇和测试的大部分药物之间不 存在相互作用,所述 药物包括5-FU、阿霉素、他莫昔芬、伊立替康、紫杉醇、卡铂、十字孢碱、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。将药物组合在其他细胞 上测试时,也获得了相同的结果。因此,尽管不希望受到任何特定理 论的束缚,显示出钙三 醇和以上药物的作用机制是不同的。

[0471] 实施例8.用钙三醇预处理细胞:在化疗药物存在和不存在下,钙三醇的基于细胞 的分析测试

[0472] 将以上用于评价细胞存活力的基于细胞的试验用于该实施例中 来评估钙三醇对 抗选定的化疗药物的作用的潜在保护作用。允许每个 细胞系在0.1 μ g/mL钙三醇存在下生 长两个细胞世代。然后将这些预 处理的细胞用于建立基于细胞的试验。此外,未处理的细 胞用于建立 重复药物/钙三醇浓度下的平行实验。这允许在化疗药物给药前延长的 钙三

醇暴露的潜在作用的并列比较。

[0473] 在五个细胞系各自在0.1 μ g/mL钙三醇存在下生长两个细胞世代 后,只有HEKa细胞在其整体生长和形态学中受到显著影响。四个癌 细胞系持续生长并且其一般形态学外观没有改变。然而,HEKa细胞 在延长的钙三醇暴露后停止了生长,并且其形态变成在一个方向延 长,如与钙三醇处理之前更多分支的外观相反的。对于这个细胞系,开始了新的一批细胞,并在化疗药物存在下测试前,在钙三醇存在下 只暴露一个世代。

[0474] 选择三种常用的化疗药物(阿霉素、顺铂和厄洛替尼)来评价钙 三醇处理的细胞。研究了商业药物与钙三醇可能的协同或保护作用。在这些实验中,将商业药物连续稀释,从高于用于细胞孵育的最终所 需浓度4-倍的浓度开始。制备0.4 μ g/mL钙三醇的储液,并随后加入 连续稀释的药物中(以1:1的比例)。将药物和钙三醇的混合物孵育 至少15分钟,并加入细胞中(以100 μ L至100 μ L的比例)。因此,最终的钙三醇浓度为0.1 μ g/mL。

[0475] 根据之前所述的方法进行了试验以提供一致性并允许直接比较。结果是基于活细胞总数的测量。结果(未显示)表明对于细胞培养物 的化疗保护作用,钙三醇预处理不是必需的。结果在预处理组和同时 处理组之间接近相同。因此,钙三醇的局部施用可以在化疗的全身性 递送的同时进行。不需要分阶段的施用。

[0476] 实施例9.通过新的钙三醇制剂保护免受化疗诱发的脱发 (CIA)

[0477] 脱发是化疗最令人烦恼的副作用之一,对其不存在通用的治疗干 预。新生大鼠已经证明了是极好的用来研究化疗诱发的脱发 (CIA) 的模型,因为生长初期的毛囊模式与人的相似。

[0478] 在本研究中,在局部制剂(40% (w/w) 丙二醇,USP; 和60% (w/w) 脱水醇,200标准强度,未改性USP) 中以剂量和时间依赖 性方式递送闭联甾族钙三醇 (USP级) 来治疗/预防 CIA。

[0479] 具体地,带有幼崽的Longs Evans和Sprague Dawley大鼠购自 Harlan Laboratories, Inc。根据适用的动物操作规则和规章来圈养和 饲喂。允许幼崽在开始实验前适应48小时。在第5天开始,每日在 头颈区域局部施用闭联甾族钙三醇制剂(上文)或媒介对照(无钙三 醇),连续6天。将大鼠与其同窝出生的幼崽和母亲分离6小时的时 间段。随后,处理的区域用肥皂和水清洗,并将幼崽返回窝中。在第 13天,大鼠接受依托泊昔(每日 1.5mg/kg,持续3天)或环磷酰胺 (CTX) (一次37.5mg/kg) 或环磷酰胺 (一次35mg/kg) 和阿霉素 (每日2.5mg/kg,持续3天) 的组合。所有化疗剂购自Sigma并且以 0.1mL的总体积腹膜内 给予。在最后一剂化疗后10天记录脱发。

[0480] 对于其中大鼠移植了绿色瘤白血病的实验,在出生后第5天,将 大鼠随机分成三组,每组45只。所有大鼠接受了0.1mL无血清 (SF) RPMI中 1×10^5 绿色瘤细胞系MIAC5 (i.p.)。将MIAC5在补充了L- 谷氨酰胺和10%胎牛血清的RPMI 1640中在37℃下5%CO₂, 100% 湿度的培养箱中培养。将细胞生长至50%汇合 (1.5×10^6 mL), 收集 于50mL圆锥管中,在室温下以600g×10min离心,并以 1×10^6 /mL的 浓度重悬浮于SF-RPMI中。组1大鼠没有接受进一步的治疗。组2 大鼠在第13天接受了局部媒介和CTX。组3大鼠在第13天接受了局 部钙三醇制剂(0.1 μ g) 和CTX。局部施用按照以上所述的进行。

[0481] 在出生后第23天,从所有大鼠获取血样并进行区分。将患有白 血病的大鼠处死,保留未患白血病的大鼠,并且在第31天进行第二 次区分,如果在任何点检测到白血病,通

过CO₂窒息处死动物。

[0482] 结果证明了在接受了依托泊昔的组中观察到了全身脱毛。相反，在用0.1μg钙三醇治疗6小时的大鼠中，在所有动物中观察到了部分的局部保护。在接受0.3μg钙三醇的组中，获得了全身保护。参见图20A和20B。

[0483] 在接受了环磷酰胺的组中，对照大鼠变成完全脱毛，而接受了0.1μg钙三醇的大鼠实现了如使用依托泊昔观察到的相似的保护。同样，给药0.3μg钙三醇在环磷酰胺处理的大鼠中获得了全身保护。参见图21。使用其他化疗或联合化疗方案的相似结果显示于图22A、22B、22C和23中。

[0484] 在其中大鼠移植了绿色瘤的单独实验中，初步结果尚未显示出通过局部施用钙三醇保护癌细胞免受环磷酰胺的作用。

[0485] 总之，在受试者制剂使用钙三醇预处理给予了对抗CIA的保护而没有保护癌细胞。局部钙三醇以剂量依赖性的方式防止了由单独以及组合化疗诱发的CIA。此外，局部钙三醇防止了CIA而同时不保护癌细胞免受化疗的细胞毒性作用。

[0486] 实施例10. 接受多重化疗方案的绿色白血病大鼠中通过局部钙三醇的CIA的保护

[0487] 这个研究验证了局部钙三醇溶液在多疗程化疗诱发的脱发的动物模型中的保护作用。该研究中使用的大鼠带有MIAC51，其是通过胃灌输20-甲基胆蒽(methylcolanthrene)和随后将绿色瘤细胞注入新生大鼠中来产生的大鼠绿色瘤细胞系。MIAC51细胞系引起恶性骨髓性白血病，具有人绿色瘤的特征(白血病、白血病腹水和绿色瘤形成)。参见Jimenez等，Science 238:1278-1280(1987)。

[0488] 迄今为止，不存在有效的体外或非脊椎动物模型来测试化疗诱发的脱发(CIA)。在最常用的模型中，由Jimenez等开发的新生大鼠已经证明了与人的直接关联(Int J Cancer 1996;65:97-103，按引用并入)。随后，研发了其中可以通过剪短毛发诱导第二生长初期阶段并由此允许测试多过程化疗的大鼠模型。该模型可以用于测试常常使用的脱发化疗剂，包括环磷酰胺、阿霉素、紫杉醇、依托泊昔和阿糖胞昔，及其组合。

[0489] 测试用于化疗诱发的脱发的保护剂时，最重要的是确定测试物质是否将保护毛囊并且是否还保护癌细胞免受化疗的作用和/或是否干扰治疗。由Jimenez等研发的白血病的新生大鼠模型提供了同时测试维生素D化合物对白血病的发展、白血病的治疗的任何作用，与化疗剂的潜在相互作用以及维生素D化合物对预防化疗诱发的脱发的作用的机会。该模型还解答了测试剂在相同动物中的多个循环是否将导致保护毛囊多次的问题。此外，通过使用有色的Long Evans大鼠，研究还允许确定测试剂是否保护毛色。

[0490] 钙三醇制剂是在含有USP-级丙二醇(40% w/w)和无水绝对乙醇，200标准强度(60% w/w)的媒介中含有USP-级钙三醇的澄清的、无水液体。这些研究中的钙三醇浓度为~0.2μg/100μL(2μg/mL)。在冰上接收测试物质，并且在到达时立即储存在4-5°C下。然后将这批再细分入4.5mL试管中，同时保持在冰上。由于动物组将不小于40只/变量，将每4.5mL单位的测试物质包装在4-5°C的聚丙烯管中，标上批号。将测试物质的4.5mL试管保持在暗盒中并且只从冰箱中取出每个实验需要的量。以规律的时间间隔测试4.5mL试管中包装的测试物质样品以测定钙三醇水平。在实验时，将试管保持在冰上，同时处理大鼠。

[0491] 媒介由USP-级丙二醇(40% w/w)以及USP-级无水和未改性绝对乙醇，200标准强度(60% w/w)组成。在实验时，与测试物质一样精确操作对照媒介。

[0492] 测试了测试物质以及媒介自身。每个测试组由40只动物组成，其对于这个研究是统计学显著的。这个数字包括模型损耗，并且考虑了减少动物数量的任何可能的事件。在5天龄时，所有动物注射了 MIAC51。测试了五(5)个化疗方案：环磷酰胺、环磷酰胺/阿霉素、环磷酰胺/阿霉素/阿糖胞苷、环磷酰胺/紫杉醇/依托泊苷和阿霉素/紫杉醇/依托泊苷。测试组是：无化疗、单独的化疗、化疗+媒介、化疗+测试物质=160只动物/化疗方案。因此，最终估算的使用动物数如下：5个联合化疗方案×160只动物=800只幼崽/大鼠。对于使用第二生长初期成年大鼠模型的实验，只使用了无癌症的动物(例如，从化疗中存活的那些)，同时将显示出白血病早期征兆的动物安乐死。

[0493] Shay's 绿色瘤MIAC51细胞系的培养：按照之前所述的(Science 1987;238:1278-80)，在37°C, 100%湿度下，在5%CO₂培养箱中培养MIAC51。将细胞生长于非组织培养物处理的烧瓶(Falcon)中 补充了L-谷氨酰胺和10%胎牛血清(Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA)的RPMI 1640培养基中(Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA)。在将细胞注入动物之前，将其生长至50%汇合并收集在圆锥管中。然后将细胞在室温下在600g下离心10分钟，并且以 1×10^6 浓度重悬浮于不含胎牛血清的RPMI 1640中。然后在无菌条件下将细胞悬浮液转移至29号(ga)的1/2cc胰岛素注射器中。

[0494] MIAC51的注射：所有幼崽在五天龄时注射了MIAC51并且手动约束、温和地拉住右腿并且用酒精棉签清洁该部位。然后腹膜内注射 MIAC51。针、通道和注射器中的细胞是无菌的，并且每次注射使用新注射器。通常在第21-33天期间观察到白血病的早期征兆的产生。因此，在第23和31天进行血流涂片。在第31天只给无癌症的动物剃毛，同时将剩余的安乐死。

[0495] 新生大鼠中第一毛发生长初期阶段中的测试物质和对照物质给药：给每窝动物在头颈部大约2cm²的区域上局部给药媒介或测试物质。对于5-或6-天龄的大鼠，针对其较小的尺寸，以4等份的25μL 分4次施用100μL。使用200μL无菌尖端，用校准的微量移液管施用 测试物质或媒介。一旦测试物质或媒介在头部的表面上，用戴手套的手指摩擦直至完全吸收。此后立即将另一等份施用于头部，并且重复 该过程直至施用100μL总测试物质或媒介。在7-、8-、9-和10-天龄 的动物上，施用两次50μL等份。在较老的动物中，可以以一剂施用 100μL。将测试物质施用于头部和颈部，用右手食指戴上抗溶剂腈手套摩擦10秒。这种施用方案背后的基本原理在于在不同年龄，饱和速率可能不同，并且测试物质或媒介的递送也可能不同。一旦溶液已经完全渗透皮肤，幼崽将在具有特意设计的分开区隔的笼子中保持分 开6小时。然后用温和的实验室洗手皂(Soft-Cide EC, VWR international)洗涤幼崽，并用纸巾小心干燥。

[0496] 新生大鼠中第一毛发生长初期阶段中化疗的给予：四十只幼崽接受各种化疗方案，40只接受各种化疗方案和测试物质和40只接受各 种化疗方案和媒介。作为对照，40只动物没有接受化疗。获得每窝幼 崇的平均重量并且用于准备合适的化疗浓度。根据动物的重量，使用 29ga.1/2cc胰岛素注射器以大约100μL的体积腹膜内注射化疗剂。注射时，温和地拉住每只幼崽的右腿并且用酒精棉签清洁该部位。

[0497] 成年大鼠的第二毛发生长初期的测试物质和对照物质给药：将根据血涂片的血液学分析已经证明了在第31天无癌症的存活者用手约束并在头颈区域剃毛(2-3cm²)。九天后，当大鼠40天龄至45天龄 (包括)时，将媒介或测试物质施用于头颈区域。在一剂中，将

100 μ L 量施用于头颈部,并且用右手食指戴上抗溶剂腈手套按摩10秒钟。一旦溶液完全渗透皮肤,将单只大鼠分开保持在笼子中。然后用温和 的实验室洗手皂(Soft-Cide EC, VWR international)洗涤大鼠,并用 纸巾小心干燥。

[0498] 第二毛发生长初期阶段成年大鼠中化疗的给予:每组接受了5 个不同的化疗方案中的1个,对于接受联合阿糖胞昔的那些,在第47 天开始并且在第53天结束。获得平均重量并用于准备合适浓度的化 疗。根据动物的重量,使用29ga. 1/2cc胰岛素注射器以大约100 μ L 的体积腹膜内注射化疗剂。对于给予化疗,不使用麻醉的用手约束大 鼠。用酒精棉签清洁注射部位。

[0499] 给药途径:通过皮肤施用测试物质和媒介。腹膜内注射化疗剂。

[0500] 给药的频率和持续时间以及剂量水平和体积:对于第一和第二毛 发生长初期周期,每日给药测试物质和媒介,持续6天。测试物质在 丙二醇/乙醇中含有2 μ g/mL浓度的钙三醇,而媒介只含有丙二醇/乙醇 载体。基于重量在大约100 μ L体积中通过腹膜内给予化疗剂。

[0501] 脱毛的目测和分级:使用以下评分将总的(头颈部)或全身脱毛 分级:0=无脱毛; 1+=0-25%脱毛;2+=25-50%脱毛;3+=50-75%脱毛; 4+=75-100%脱毛。每日使用目测评分来将脱毛分级,同时进行常规笼 观察。此外,一旦整窝幼崽或成年大鼠失去了毛发,这种评分补充了 照片证明。

[0502] 实施例11.GottingenMinipigs中钙三醇溶液的局部施用和猪皮中的活体外钙三醇定量

[0503] 猪常常用于涉及皮肤递送途径的毒性研究中,因为猪皮与人的非 常相似。因此,在这个研究中使用猪来评价皮肤给药7天后,Gottingen Minipigs® 中的钙三醇局部制剂的皮肤耐受性和皮肤渗透。

[0504] 给三头公和三头母Gottingen Minipigs® 的一个处理组通过皮肤 将测试物质或安慰剂物质以0 (安慰剂)、1、3、10和30 μ g/mL的剂 量浓度施用于五个分开的给药部位。一只雄性小型猪的另一个处理组 通过皮肤将测试物质或安慰剂物质分别以0 (安慰剂) 和100 μ g/mL 的剂量浓度施用于两个分开的给药部位。以每个施用部位4mg/cm²的 施用速率(等于6cm×6cm测试区域中的144mg,或166 μ L测试溶液) 来对两组给药安慰剂或测试物质,其含有各种不同浓度的活性成分和 媒介,每日施用两次,间隔大约6小时,在研究期间持续7 天。

[0505] 对于所有动物,每日进行两次针对发病率、死亡率、受伤以及食 物和水的利用性的观察。每日进行临床观察。测试前进行皮肤反应的 评价,并且在给药前每日进行。测试前和结束时 (第7天),测量体 重并记录。在测试前进行了身体检查。在研究结束时,进行尸检,并 且收集和保存处理和未处理的皮肤切片。进行了每个皮肤部位,以及 处理部位附近的未处理皮肤部位的显微镜检查。

[0506] 结果表明将0、1、3、10、30和100 μ g/mL浓度的钙三醇局部制 剂通过皮肤给药于 Gottingen minipigs® 是良好耐受的。没有看到处理 对的存活、临床发现、皮肤刺激、体重、任一个处理部位的皮肤目测 或显微镜检查有影响(数据未显示)。来自组织分布研究的数据表明 在表皮样品的大部分角质层和其他部分中,钙三醇是可测量的,但真 皮样品中

不可测量(单个例外是100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量施用至单只雄性小型猪)。在这组实验中,公猪似乎表现比母猪更高的钙三醇组织水平。在表皮中观察到了最明显的施用剂量与组织水平的相关性,随着从3递增至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,钙三醇浓度具有近线性增加。

[0507] 具体地,以1、3、10、30和100 $\mu\text{g}/\text{g}$ 预配制的浓度使用了安慰剂(丙二醇(USP)和乙醇(未变性)无水,200标准强度-U.S.,USP的40/60混合物)和钙三醇局部制剂。测试物质以纯形式(未稀释)给药。针对每个需要的浓度分配安慰剂和测试物质的制剂,每日使用一次,并且储存在室温下。

[0508] 从Marshall BioResources, North Rose, New York接收了总共三头公和三头母的实验上天然的(*naïve*)Gottingen minipigs[®](大约4至5个月大)。另外的公猪(接收时大约4.5个月大)之后从储备群体中转移过来。使用简单随机化程序,将四头雄性和三头雌性动物(随机化时,重量分别为11.75至15.55kg和14.50至16.65kg)分配给安慰剂和处理组。每日两次通过皮肤给药安慰剂和测试物质,间隔大约6小时,在研究过程中持续7天。剂量浓度为0、1、3、10、30和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并且以4 mg/cm^2 的施用速率(等于144 mg 或166 μL 测试溶液)来给药。在开始给药前(对于组1和组2,分别为第4天和第5天),使用电动剪毛机将施用部位的毛剪掉。小心进行以避免擦伤皮肤。对于组1,将每只动物的背部表面分成五个施用部位,而对于组2,分成两个施用部位。每个施用部位大约为6×6cm,每个部位之间至少有2cm间隙。用玻璃搅拌棒或合适的工具,将安慰剂和测试物质制剂均匀地施用于指定的施用部位上。在给药前,使用用自来水润湿的软纸巾(即,WyPall[®])温和地除去之前给药残留的测试物质。

[0509] 在研究结束时,从腹部中线切口反转皮肤,并且收集和保存处理和未处理皮肤的切片。首先用温和的皂和水混合物(例如,水中1% Ivory皂或等同物)彻底表面洗涤每个6×6cm给药部位的切片以除去任何残留的局部测试制剂。然后用乙醇擦拭清洁过的皮肤切片,并且切下并包括脂肪层。如果切除的区域大于给药的区域,用擦不掉的墨水区分给药的区域以描画出给药的皮肤区域。将1.5cm×1.5cm的切片摊平,用两层萨纶包装(或等同)包裹并在液氮中快速冷冻。将样品储存在-70°C,并且通过隔夜快递在干冰上运输用于分析。按照合适的情况(例如,动物鉴别、研究编号、日期等)来鉴别每个皮肤切片。

[0510] 在到达分析地点时,将皮肤切片放在防水塑料袋中并且通过浸在温水(~30°C-35°C)中解冻。用蒸馏去离子水温和地冲洗每个皮肤切片以除去任何残留的测试物质和血液。通过手工解剖刀切除所有皮下组织(例如,脂肪)。在给药区域的中心区域内,划出四个单独的1 cm^2 圆圈(重复),并且随后鉴别每个部位并记录实际区域。然后使用1 cm^2 冲压机从皮肤片切除重复的测试部位。将皮肤切片称重并记录重量。每个重复划出的区域用胶带剥离(TrnsporeTM,3M)足够次数(~10~20次),直至大约10%-25%的区域表面显示闪光。这个过程除去了角质层和任何残余的表面剂量。

[0511] 胶带剥离后,通过热暴露于60°C约1-1.5分钟将皮肤分成表皮(无角质层,在下文中简单称为“表皮”)和真皮。然后使用细尖镊子或解剖刀将皮肤层拨开。将表皮和真皮称重,并记录重量。

[0512] 对于提取,将所有皮肤样品在1mL绝对乙醇(Sigma-Aldrich, USP/NF级)中提取。将胶带在5mL乙腈(EMD,HPLC级)中提取。所有提取在室温下进行大约24小时。通过真空离

心干燥500 μ L量的 胶带提取物并重构于100 μ L绝对乙腈中。表皮提取物也干燥并重构于100 μ L 80:20乙醇:水中。

[0513] 通过具有紫外线和质谱检测器的反向高效液相色谱 (HPLC) 进 行钙三醇的定量。估算检测的下限为0.4ng/mL。

[0514] 角质层(胶带)、表皮和真皮的钙三醇的定量结果概括于表11-1 至11-4中。图25A 和25B分别说明了角质层和表皮中的水平,而图 26说明了仅仅公猪中的表皮水平。以两个不同的单位,ng/cm²和作为 估算的 μ g/mg组织,提供了角质层数据,ng/cm²反映出作为样品 面积 的函数的胶带剥离样品中收集的钙三醇量。然而,通过层分离前的差 异样品重量减去该样品的表皮和真皮重量来确定作为 μ g/mg记录的 浓度(由于粘附于胶带,而不是通过实际重量来确定)。使用从样品 除以皮肤层的实际净重测量的量,作为组织浓度(ng/mg) 记录了表 皮和真皮样品。

[0515] 表11-1回收的角质层的钙三醇 (ng/cm²) 平均值±SD (n=动物 的数量[4个重复/动物])

| [0516] | 处理 | 雄性小型猪 | 雌性小型猪 |
|--------|----------------|----------------|---------------|
| | 未处理的 | 0±0*(1) | Na |
| | 安慰剂 | 30.2±35.0 (4) | 0±0 (3) |
| | 1 μ g/mL | 56.1±17.4 (3) | 0.76±1.3 (3) |
| | 3 μ g/mL | 62.4±7.91 (3) | 1.12±1.49 (3) |
| | 10 μ g/mL | 59.6±14.1 (3) | 1.65±1.80 (3) |
| | 30 μ g/mL | 54.6±32.5 (3) | 20.2±11.7 (3) |
| | 100 μ g/mL | 118.1±11.4 (1) | na |

[0517] *零表示低于检测下限的结果

[0518] *na=不适用

[0519] 表11-2估算的收集的角质层钙三醇 (ng/mg) 平均值±SD (n=动 物的数量[4个重 复/动物])

| [0520] | 处理 | 雄性小型猪 | 雌性小型猪 |
|--------|----------------|---------------|---------------|
| | 未处理的 | 0±0*(1) | Na |
| | 安慰剂 | 0.92±1.07 (4) | 0±0 (3) |
| | 1 μ g/mL | 1.54±0.79 (3) | 0.03±0.05 (3) |
| | 3 μ g/mL | 1.63±0.25 (3) | 0.04±0.06 (3) |
| | 10 μ g/mL | 2.02±0.39 (3) | 0.05±0.04 (3) |
| | 30 μ g/mL | 1.51±0.89 (3) | 0.64±0.37 (3) |
| | 100 μ g/mL | 4.52±1.21 (1) | Na |

[0521] *零表示低于检测下限的结果

[0522] *na=不适用

[0523] 表11-3回收的表皮钙三醇 (ng/mg) 平均值±SD (n=动物的数量 [4个重复/动物])

| [0524] | 处理 | 雄性小型猪 | 雌性小型猪 |
|--------|------|---------|-------|
| | 未处理的 | 0±0*(1) | Na |

| | | |
|----------------|---------------|---------------|
| 安慰剂 | 0.12±0.23 (4) | 0±0 (3) |
| 1 μ g/mL | 0.16±0.28 (3) | 0±0 (3) |
| 3 μ g/mL | 0.14±0.23 (3) | 0±0 (3) |
| 10 μ g/mL | 0.23±0.20 (3) | 0.02±0.04 (3) |
| 30 μ g/mL | 0.38±0.33 (3) | 0.34±0.24 (3) |
| 100 μ g/mL | 2.09±1.0 (1) | na |

[0525] *零表示低于检测下限的结果

[0526] *na=不适用

[0527] 表11-4回收的真皮钙三醇 (ng/mg) 平均值±SD (n=动物的数量 [4个重复/动物])

| 处理 | 雄性小型猪 | 雌性小型猪 |
|----------------|---------------|----------|
| 未处理的 | 0.08±0.01 (1) | Na |
| 安慰剂 | 0.02±0.03 (4) | 0±0* (3) |
| 1 μ g/mL | 0±0 (3) | 0±0 (3) |
| 3 μ g/mL | 0±0 (3) | 0±0 (3) |
| 10 μ g/mL | 0±0 (3) | 0±0 (3) |
| 30 μ g/mL | 0±0 (3) | 0±0 (3) |
| 100 μ g/mL | 0.13±0.04 (1) | na |

[0529] *零表示低于检测下限的结果

[0530] *na=不适用

[0531] 数据表明在大部分角质层和表皮样品中,钙三醇是可测量的,但 在真皮样品中不可测量(单个例外是100 μ g/mL剂量施用于单头雄性 小型猪)。这与以上实施例1中所述的Franze人皮肤有限剂量模型中 获得的结果一致。

[0532] 在评价的组织样品中,雄性小型猪表现为一般比雌性小型猪显示 更高的雌三醇组织水平。

[0533] 在角质层中观察到了最高的钙三醇浓度。尽管角质层含量是估算 值,但其较高的浓度可以反映出皮肤孔中深处钙三醇的存在,其未通 过表面洗涤处理除去,或可以归因于钙三醇在角质层的非常亲脂的基 质中的溶解性。

[0534] 然而,在表皮中观察到了最明显的施用剂量与组织水平的相关 性,从3至100 μ g/mL施用具有钙三醇浓度的近线性增加。

[0535] 实施例12. 接受多疗程化疗的绿色瘤大鼠中的局部溶液研究

[0536] Long Evans大鼠 (Harlan Laboratories, Inc) 到达时3天龄。使用 电子秤 (American Scientific Products TL 410s) 在到达时以及直至实 验结束每一天获得动物的重量。在实验开始前,将大鼠圈养两天。然 后将动物随机分成四组。如下所述,所有大鼠接受了MIAC51。

[0537] ■组1 (n=27) 没有接受进一步的处理

[0538] ■组2 (n=40) 只接受了化疗

[0539] ■组3 (n=40) 接受了化疗和以下所述的局部媒介

[0540] ■组4 (n=40) 接受了化疗和局部钙三醇

[0541] 处理在出生后第6天开始。将0.1mL量的局部钙三醇局部施用 于大鼠的头和颈的

顶部。对于第一毛发生长初期周期,在第6天和第 7天,以25 μ L的体积施用了媒介或钙三醇四次以避免饱和。在第8、9、10和11天,将50 μ L体积施用两次。对于第二毛发生长初期周期,在第40至45天,每日用0.1mL媒介或钙三醇处理大鼠。每次施用必需用戴上腈测试手套的右手食指摩擦2cm²的区域10秒钟。处理完成后,每只大鼠单独分开6小时。随后,用温和的洗手皂(来自VWR International)和蒸馏水洗涤每只大鼠的头和背部。然后将幼崽放回它们的母亲那并放回动物室。对于第二毛发生长初期周期,将成年大鼠 与其同窝出生幼崽一起放回其笼子,并放回动物室。

[0542] 在出生后第5天,所有大鼠通过腹膜内接受了0.1mL无血清(SF) RPMI中的1 \times 10⁵MIAC51。将MIAC51在补充了L-谷氨酰胺和10% 胎牛血清的RPMI中,在37°C下,在5%CO₂,100%湿度培养箱中培养。将细胞生长至50%汇合(1.5 \times 10⁶mL),收集于50mL锥形管中,在600g下在室温下离心10分钟并在注射前以1 \times 10⁶/mL的浓度重悬 浮于SF-RPMI中。

[0543] 在出生后第23天,从所有大鼠获取血样并进行了区分。将具有 白血病的大鼠牺牲,同时将没有白血病的大鼠用于进一步的实验。在 第31天进行第二次区分,并且将白血病动物牺牲。在给药第二组媒介或钙三醇处理前,将存活动物剃去2cm²区域的毛,并且在15天后 给予第二个疗程的化疗。在第二和第一毛发生长初期中,在化疗处理 后十天记录脱毛。

[0544] 通过以下评分确定每只大鼠的脱毛程度:

[0545] 0=无脱毛

[0546] 1+=0-25%脱毛

[0547] 2+=25-50%脱毛

[0548] 3+=50-75%脱毛

[0549] 4+=75-100%脱毛

[0550] 实验化合物

[0551] 用媒介(40%重量丙二醇和60%重量无水200标准强度乙醇)将 2.3 μ g/g钙三醇制剂稀释至2 μ g/mL的终浓度。将1mL的小瓶细分并 保持在4°C的冰箱中。对于每个实验,取出一小瓶的2.3 μ g/g钙三醇 和媒介并在实验程序过程中放在冰上。将未使用的制备物丢弃。

[0552] A.单独的环磷酰胺

[0553] 化疗的给予

[0554] 幼年大鼠:在第13天,使用1/2cc胰岛素注射器29G 1/2" (B-D) , 在0.1mL的H₂O/甘露醇混合物的总体积中,所有大鼠腹膜内接受了 37.5mg/kg环磷酰胺(CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131)。

[0555] 成年大鼠:对于第二疗程的化疗,使用1/2cc胰岛素注射器29G 1/2" (B-D) , 在0.1mL的H₂O/甘露醇混合物的总体积中,将150mg/kg 环磷酰胺通过腹膜内给药于47-天龄的麻醉的(50mg/kg氯胺酮 /5mg/kg甲苯噻嗪)大鼠。

[0556] 结果显示于表12-1和12-2中。具体地,在第一轮化疗后(表12-1 和图27),所有接受单独的环磷酰胺或环磷酰胺结合媒介的大鼠具有 严重的脱毛(+4)。相反,所有接受了环磷酰胺结合钙三醇的大鼠没 有呈现出任何脱毛的迹象,与对照组相似。在第二轮化疗后,获得了 相似的结果,如表12-2中所示(还可以参见图28)。

[0557] 表12-1.第一轮化疗后用环磷酰胺(CTX)治疗的大鼠中的脱 毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. | 组/Prob. |
|---------------|----|----|----|----|----|----|-----------------------------|---------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | | |
| 1. 对照 (无化疗) | 27 | | | | | 27 | 1 vs 2 p 2 vs 3 < 0.01 | p=1.000 |
| [0558] 2. CTX | | 40 | 40 | | | | 1 vs 3 p 2 vs 4 p < 0.01 | < 0.01 |
| 3. CTX+媒介 | | 40 | 40 | | | | 1 vs 4 3 vs 4 p p=1.000 | < 0.01 |
| 4. CTX+钙三醇 | 40 | | | | | 40 | | |

[0559] 表12-2. 第二轮化疗后用环磷酰胺(CTX)治疗的大鼠中的脱毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. |
|------------------|----|----|----|----|----|----|--------------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | |
| 2. 单独的 CTX | | | 8 | 8 | | 16 | 2 vs 3 p=1.000 |
| [0560] 3. CTX+媒介 | | | 9 | 9 | | 18 | 2 vs 4 p < 0.01 |
| 4. CTX+钙三醇 | 10 | | | | | 10 | 3 vs 4 p < 0.01 |

[0562] 此外,这个实验表明了接受钙三醇局部制剂的大鼠的存活率与接受单独的化疗或结合媒介的化疗的那些大鼠基本上相似。如表12-3 中所示,用环磷酰胺和钙三醇局部制剂处理的那些动物的存活率 (25%) 与用单独的环磷酰胺处理的那些大鼠 (20%) 以及用环磷酰胺和媒介处理的那些大鼠 (23%) 相似。

[0563] 表12-3. 两轮化疗后用环磷酰胺(CTX)处理的大鼠的存活率 组

| | 治 愈 的 | % | 总 计 | 组/Prob. | 组/Prob. |
|-------------|-------------|----|--------|-----------------|-----------------|
| 1. 对照 (无化疗) | 0 | 0 | 27 | | |
| 2. CTX | 8 | 20 | 40 | 1 vs 2 p < 0.01 | 2 vs 3 p=0.7846 |
| [0564] | | | | | |
| 3. CTX+媒介 | 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 | | |

[0565] 总之,在环磷酰胺组中,钙三醇在两个周期中给予了对于CIA 的100%保护并且没有干扰20-25%范围内的治愈率。

[0566] B.环磷酰胺和阿霉素

[0567] 化疗的给予

[0568] 幼年大鼠:在第13天,使用1/2cc胰岛素注射器29G 1/2”(B-D), 在0.1mL的H₂O/甘露醇混合物的总体积中,所有大鼠通过腹膜内接受了37.5mg/kg环磷酰胺(CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131)。在第13、14和15天,大鼠通过I.P.接受了0.1mL蒸馏水中的2.5mg/kg 盐酸阿霉素(Sigma Aldrich, Lot#038k1349) (ADM)。

[0569] 成年大鼠:对于第二疗程的化疗,在第47天使用1/2cc胰岛素 注射器29G 1/2”(B-D),在0.1mL的H₂O/甘露醇混合物的总体积 中,将150mg/kg环磷酰胺通过腹膜内给药麻醉的(50mg/kg氯胺酮 /5mg/kg甲苯噻嗪)大鼠。对于第二疗程的化疗,如上所述,大鼠在 第47至49天接受了20mg/kg ADM。

[0570] 结果显示于表12-4和12-5中。具体地,在第一轮化疗后(表12-4 和图29),所有接受单独的环磷酰胺和阿霉素或与媒介结合的大鼠具有严重的脱毛(+4)。相反,所有接受了环磷酰胺和阿霉素结合钙三 醇的大鼠没有呈现出任何脱毛的迹象,与对照组相似。在第二轮化疔 后,获得了相似的结果,如表12-5中所示(还可以参见图30)。

[0571] 表12-4.第一轮化疗后用环磷酰胺(CTX) 和阿霉素(ADM) 处理的大鼠中的脱毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. | 组/Prob. |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|-----------------|-----------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | | |
| 1. 对照 (无化疗) | 40 | | | | | 40 | 1 vs 2 p < 0.01 | 2 vs 3 p=1.000 |
| [0572] 2. CTX+ADM | | 40 | 40 | | | | 1 vs 3 p < 0.01 | 2 vs 4 p < 0.01 |
| 3. CTX+ADM+媒介 Car | | | 40 | 40 | | | 1 vs 4 p=1.000 | 3 vs 4 p < 0.01 |
| 4. CTX+ADM+钙三醇 | 40 | | | | | 40 | | |

[0573] 表12-5. 第二轮化疗后用环磷酰胺 (CTX) 和阿霉素 (ADM) 处理 的大鼠中的脱毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|-----------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | |
| 2. CTX+ADM | | | | 21 | 21 | | 2 vs p=1.000 |
| [0574] 3. CTX+ADM+媒介 | | | | 22 | 22 | | 2 vs 4 p < 0.01 |
| 4. CTX+ADM+钙三醇 | 20 | | | | | 20 | 3 vs 4 p < 0.01 |

[0575] 此外,这个实验表明了接受钙三醇局部制剂的大鼠的存活率与接 受单独的化疗或结合媒介的化疗的那些大鼠基本上相似。如表12-6 中所示,用环磷酰胺和阿霉素结合钙三醇局部制剂处理的那些动物的 存活率 (50%) 与用单独的化疗处理的那些大鼠 (53%) 以及用化疗 和媒介处理的那些大鼠 (55%) 相似。

[0576] 表12-6. 两轮化疗后用环磷酰胺 (CTX) 和阿霉素 (ADM) 处 理的大鼠的存活率

组

| | 治愈的 | % 总计 | | 组/Prob. 组/Prob. | |
|--------|----------------|------|----|-----------------|-----------------|
| | | 0 | 40 | 1 vs 2 p < 0.01 | 2 vs 3 p=0.8225 |
| [0577] | 1. 对照 (无化疗) | 0 | 0 | 40 | |
| | 2. CTX+ADM | 21 | 53 | 40 | 1 vs 3 p < 0.01 |
| | 3. CTX+ADM+媒介 | 22 | 55 | 40 | 2 vs 4 p < 0.01 |
| | 4. CTX+ADM+钙三醇 | 20 | 50 | 40 | 3 vs 4 p < 0.01 |
| [0578] | 总计 | 63 | 39 | 160 | p=0.9336 |

[0579] 总之,在环磷酰胺和阿霉素组中,钙三醇在两个周期中给予了对于CIA的100%保护并且没有干扰50-55%范围内的治愈率。

[0580] C.环磷酰胺、阿霉素和阿糖胞苷

[0581] 化疗的给予

[0582] 幼年大鼠:在第13天,使用1/2cc胰岛素注射器29G 1/2" (B-D), 在0.1mL的H₂O/甘露醇混合物的总体积中,所有大鼠通过腹膜内接受了30mg/kg环磷酰胺(CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131)。在第13、14和15天,大鼠通过腹膜内接受了0.1mL蒸馏水中的2.0mg/kg盐酸阿霉素(Sigma Aldrich, Lot#038k1349) (ADM), 并且在第13-19天,大鼠接受了50mg/kg阿糖胞苷。

[0583] 成年大鼠:对于第二疗程的化疗,将100mg/kg环磷酰胺给药于麻醉的大鼠(50mg/kg氯胺酮/5mg/kg甲苯噻嗪)一天,20mg/kg阿霉素三天和100mg/kg阿糖胞苷七天。

[0584] 结果显示于表12-7和12-8中。具体地,在第一轮化疗后(表12-7 和图31),所有接受单独的环磷酰胺、阿霉素和阿糖胞苷或环磷酰胺、阿霉素和阿糖胞苷结合媒介的大鼠具有严重的脱毛(+4)。相反,所有接受了环磷酰胺、阿霉素和阿糖胞苷结合钙三醇的大鼠没有呈现出任何脱毛的迹象,与对照组相似。在第二轮化疗后,获得了相似的结果,如表12-8中所示(还可以参见图32)。

[0585] 表12-7. 在第一轮化疗后用环磷酰胺(CTX)、阿霉素(ADM) 和阿糖胞苷(ARA-C) 处理的大鼠中的脱毛程度

| | 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. 组/Prob. | |
|--------|---|----|----|----|----|----|----|-----------------|--|
| | | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | | |
| [0586] | | | | | | | | | |

| | | | | |
|--------|-----------------------|----|----|------------------------------------|
| [0587] | 1. 对照 (无化疗) | 40 | 40 | 1 vs 2 p 2 vs 3 < 0.01 p=1.000 |
| | 2. | 40 | 40 | 1 vs 3 p 2 vs 4 p < 0.01 < 0.01 |
| | CTX+ADM+ARA-C | | | |
| | 3. | 40 | 40 | 1 vs 4 3 vs 4 p p=1.000 < 0.01 |
| | CTX+ADM+ARA-C +媒介 | | | |
| | 4. | 40 | 40 | |
| | CTX+ADM+ARA-C +钙三醇 | | | |

[0588] 表12-8. 在第二轮化疗后用环磷酰胺(CTX)、阿霉素(ADM)和阿糖胞苷(ARA-C)处理的大鼠中的脱毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | 组/Prob. |
|--------------------------|----|----|----|----|----|--------------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | |
| 2. CTX+ADM+ARA-C | | | 32 | 32 | | 2 vs 3 p=1.000 |
| 3. CTX+ADM+ARA-C + 媒介 | | | 30 | 30 | | 2 vs 4 p < 0.01 |
| 4. CTX+ADM+ARA-C + 钙三醇 | | | 31 | | | 3 vs 4 p < 0.01 |

[0590] 此外,这个实验表明了接受钙三醇局部制剂的大鼠的存活率与接受单独的化疗或结合媒介的那些大鼠基本上相似。如表12-9中所示,用环磷酰胺、阿霉素和阿糖胞苷结合钙三醇局部制剂处理的那些动物的存活率(78%)与用单独的化疗处理的那些大鼠(80%)以及用化疗和媒介处理的那些大鼠(75%)相似。

[0591] 表12-9. 两轮化疗后用环磷酰胺(CTX)、阿霉素(ADM)和阿糖胞苷(ARA-C)处理的大鼠的存活率

| 组 | 治愈的 | | | 总 计 | 组/Prob. | 组/Prob. |
|--------|----------------------|----|--------|--------|-----------------|-----------------|
| | 治 愈 的 | % | 总 计 | | | |
| [0592] | 1. 对照 (无化疗) | 0 | 0 | 40 | | |
| | 2. CTX+ADM | 32 | 80 | 40 | 1 vs 2 p < 0.01 | 2 vs 3 p=0.5923 |
| | 3. CTX+ADM+ARA-C+媒介 | 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 | | |

[0593] 总之,在环磷酰胺、阿霉素和阿糖胞苷组中,钙三醇在两个周期 中给予了100%的 CIA保护并且没有干扰75-80%范围内的治愈率。

[0594] D. 环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷

[0595] 化疗的给予

[0596] 幼年大鼠:在第13天,使用1/2cc胰岛素注射器29G 1/2" (B-D), 在0.1mL的H₂O/甘露醇混合物的总体积中,所有大鼠通过腹膜内接 受了37.5mg/kg环磷酰胺(CTX) (Sigma Aldrich, Lot#068k1131)。在第11至13天,大鼠伴随地接受了0.1mL二甲亚砜中的2.5mg/kg 紫杉醇(Taxol) (Sigma Aldrich, Lot#078K1428) 以及稀释于特定 溶剂(参见标准操作程序) 和HBSS中的1.5mg/kg依托泊苷(VP-16) (Sigma Aldrich, Lot#047K1162)。

[0597] 成年大鼠:对于第二疗程的化疗,在第47天,使用1/2cc胰岛 素注射器29G 1/2" (B-D),在0.1mL的H₂O/甘露醇混合物的总体 积中,将150mg/kg环磷酰胺通过腹膜内给药于 麻醉的(50mg/kg氯 胺酮/5mg/kg甲苯噻嗪)大鼠。对于第二疗程的化疗,如上所述,在 第45天至第48天,大鼠接受了10mg/kg Taxol和15mg/kg VP-16。

[0598] 结果显示于表12-10和12-11中。具体地,在第一轮化疗后(表 12-10和图33),所有接受单独的环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷或环 磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷结合媒介的大鼠 具有严重的脱毛(+4)。相反,所有接受了环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷结合钙三醇的大鼠没 有呈现出任何脱毛的迹象,与对照组相似。在第二轮化疗后,获得了 相似的结果,如表 12-11中所示(还可以参见图34)。

[0599] 表12-10. 第一轮化疗后用环磷酰胺(CTX)、紫杉醇和依托泊 苷处理的大鼠中的脱 毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. | 组/Prob. |
|------------------------|----|----|----|----|----|----|-----------------|-----------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | | |
| 1. 对照 (无化疗) | 40 | | | | | 40 | 1 vs 2 p < 0.01 | 2 vs 3 p=1.000 |
| [0600] 2. CTX+紫杉醇+依托泊昔 | | 40 | 40 | | | | 1 vs 3 p < 0.01 | 2 vs 4 p < 0.01 |
| 3. CTX+紫杉醇+依托泊昔+媒介 | | 40 | 40 | | | | 1 vs 4 p=1.000 | 3 vs 4 p < 0.01 |
| 4. CTX+紫杉醇+依托泊昔+钙三醇 | 40 | | | | | 40 | | |

[0601] 表12-11. 第二轮化疗后用环磷酰胺(CTX)、紫杉醇和依托泊昔处理的大鼠中的脱毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----|-----------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | |
| [0602] 2. CTX+紫杉醇+依托泊昔 | | | | 33 | 33 | 2 | vs 3 p=1.000 |
| [0603] 3. CTX+紫杉醇+依托泊昔+媒介 | | | | 31 | 31 | 2 | vs 4 p < 0.01 |
| 4. CTX+紫杉醇+依托泊昔+钙三醇 | 33 | | | | | 33 | 3 vs 4 p < 0.01 |

[0604] 此外,这个实验表明了接受钙三醇局部制剂的大鼠的存活率与接受单独的化疗或结合媒介的那些大鼠基本上相似。如表12-12中所示,用环磷酰胺、紫杉醇和依托泊昔结合钙三醇局部制剂处理的那些动物的存活率(83%)与用单独的化疗处理的那些大鼠(83%)以及用化疗和媒介处理的那些大鼠(78%)相似。

[0605] 表12-12. 两轮化疗后用环磷酰胺(CTX)、紫杉醇和依托泊昔处理的大鼠的存活率

组

| | 治愈的 | 治 % 总 | | | 组/Prob. | |
|------------------------|-----|-------|----|------------------------------------|---------|---------|
| | | | | 计 | | 组/Prob. |
| 1. 钙三醇 (无化疗) | 0 | 0 | 40 | | | |
| [0606] 2. CTX+紫杉醇+依托泊昔 | 33 | 83 | 40 | 1 vs 2 p 2 vs 3 < 0.01 p=0.5762 | | |
| 3. CTX+紫杉醇+依托泊昔+媒介 | 31 | 78 | 40 | 1 vs 3 p 2 vs 4 < 0.01 p=1.000 | | |
| 4. CTX+紫杉醇+依托泊昔+钙三醇 | 33 | 83 | 40 | 1 vs 4 p 3 vs 4 < 0.01 p=0.5762 | | |

[0607] 总之,在环磷酰胺、紫杉醇和依托泊昔组中,钙三醇在两个周期 中给予了100%的 CIA保护并且没有干扰78-83%范围内的治愈率。

[0608] E.阿霉素、紫杉醇和依托泊昔

[0609] 化疗的给予

[0610] 幼年大鼠:在第13天至第15天,使用1/2cc胰岛素注射器29G 1/2" (B-D) ,所有大鼠通过腹膜内接受了0.1mL蒸馏水中的2.5mg/kg 盐酸阿霉素 (Sigma Aldrich, Lot# 038k1349)。伴随地,大鼠接受了 2.5mg/kg紫杉醇 (Taxol) (Sigma Aldrich, Lot#078k1428) 和1.5mg/kg 依托泊昔 (VP-16) (Sigma Aldrich, Lot#047k1162)。

[0611] 成年大鼠:对于第二疗程的化疗,以上化疗在第47天至第49 天对麻醉的(50mg/kg 氯胺酮/5mg/kg甲苯噻嗪)大鼠开始,使用1/2 cc胰岛素注射器29G 1/2" (B-D) ,在0.1mL的总体积中通过腹膜内 进行。用于第二疗程的剂量如下:20mg/kg ADM、10mg/kg Taxol和 15mg/kg VP-16。

[0612] 结果显示于表12-12和12-14中。具体地,在第一轮化疗后(表 12-13和图35),所有接受单独的阿霉素、紫杉醇和依托泊昔或阿霉素、紫杉醇和依托泊昔结合媒介的大鼠具有严重的脱毛(+4)。相反,所有接受了阿霉素、紫杉醇和依托泊昔结合钙三醇的大鼠没有呈现出 任何脱毛的迹象,与对照组相似。在第二轮化疗后,获得了相似的结果,如表12-14中所示(还参见图36)。

[0613] 表12-13.第一轮化疗后用阿霉素(ADM)、紫杉醇和依托泊昔处理的大鼠中的脱毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. | 组/Prob. |
|--------|---------------------|----|----|----|----|----|-----------------|-----------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | | |
| [0614] | 对照 (无化疗) | 40 | | | | 40 | 1 vs 2 p < 0.01 | 2 vs 3 p=1.000 |
| | 2. ADM+紫杉醇+依托泊昔 | | 40 | 40 | | | 1 vs 3 p < 0.01 | 2 vs 4 p < 0.01 |
| | 3. ADM+紫杉醇+依托泊昔+媒介 | | 40 | 40 | | | 1 vs 4 p=1.000 | 3 vs 4 p < 0.01 |
| [0615] | 4. ADM+紫杉醇+依托泊昔+钙三醇 | 40 | | | | 40 | | |

[0616] 表12-14. 第二轮化疗后用阿霉素(ADM)、紫杉醇和依托泊昔处理的大鼠中的脱毛程度

| 组 | 脱毛 | | | | | | 组/Prob. |
|--------|---------------------|----|----|----|----|----|-----------------|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 总计 | |
| [0617] | 2. ADM+紫杉醇+依托泊昔 | | | 32 | 32 | 32 | 2 vs 3 p=1.000 |
| | 3. ADM+紫杉醇+依托泊昔+媒介 | | | 33 | 33 | 33 | 2 vs 4 p < 0.01 |
| | 4. ADM+紫杉醇+依托泊昔+钙三醇 | 32 | | | | 32 | 3 vs 4 p < 0.01 |

[0618] 此外,这个实验表明了接受钙三醇局部制剂的大鼠的存活率与接受单独的化疗或结合媒介的那些大鼠基本上相似。如表12-15中所示,用阿霉素、紫杉醇和依托泊昔结合钙三醇局部制剂处理的那些动物的存活率(80%)与用单独的化疗处理的那些大鼠(80%)以及用化疗和媒介处理的那些大鼠(83%)相似。

[0619] 表12-15. 两轮化疗后用阿霉素(ADM)、紫杉醇和依托泊昔处理的大鼠的存活率

| 组 | 治 愈 的 | % | 总 计 | 组/Prob. | 组/Prob. |
|--------|-------------|---|--------|---------|---------|
| | | | | | |
| [0620] | 1. 对照 (无化疗) | 0 | 0 | 40 | |

| | | | | | |
|--------|-------------------------|----|----|----|------------------------------------|
| [0621] | 2. ADM+紫杉醇+依托泊昔 | 32 | 80 | 40 | 1 vs 2 p 2 vs 3 < 0.01 p=0.7745 |
| | 3. ADM+紫杉醇+依托泊昔+媒 介 | 33 | 83 | 40 | 1 vs 3 p 2 vs 4 < 0.01 p=0.1000 |
| | 4. ADM+紫杉醇+依托泊昔+钙 三醇 | 32 | 80 | 40 | 1 vs 4 p 3 vs 4 < 0.01 p=0.7745 |
| | | | | | |

[0622] 总之,在阿霉素、紫杉醇和依托泊昔组中,钙三醇在两个周期中 给予了100%的CIA保护并且没有干扰80-83%范围内的治愈率。

[0623] 实施例13.Göttingen Minipigs®中局部钙三醇的4-周真皮毒性研究

[0624] 对照、媒介和测试物质制备:将新鲜对照物质,0.9%注射用氯化钠,USP,分配用于每周的研究并且冷藏储存。媒介,40/60重量 (w/w)的丙二醇,USP和乙醇(未改性的,无水)200标准强度USP 混合物,以及测试物质(含有钙三醇,USP,具有0.875的比重),按照接收的来使用并且纯度没有调整。以5.07、10.31和55.34 μ g/mL 的浓度接收测试物质。将测试物质纯净地给药(未稀释)。将媒介和 测试物质分配用于每周研究并冷藏储存。有时,在研究过程中,按照 需要分配另外的测试物质。

[0625] 给药:在给药前,从动物背部把毛剪掉。对照动物具有两个测试 部位:用媒介处理部位1,而用盐水处理部位2。每个部位为450cm², 通过脊骨两侧分开,并且用不能消除的记号笔在角落做上标记。对照 组的两个测试部位均分。按照需要,进行重复的剪毛。小心进行以避 免擦伤皮肤。在通过皮肤的研究过程中,对照物质、媒介和测试物质 每天给药两次,间隔大约6小时,持续4周(连续29天)。用玻璃 搅拌棒或合适的工具,将制剂均匀地施用于施用部位上。在下一剂之 前,用自来水润湿的Wypall温和地除去任何残余的测试物质。如果 需要,用干净的干Wypall擦干部位。给药于所有动物的剂量均为1800mg的合适制剂。剂量浓度为5.07、10.31和55.34 μ g/mL并且以 2.1mL的剂量体积来给药。以与处理组相同的方式,将对照物质和媒 介给药于对照组。对照动物的给药体积为1.0mL媒介和0.9mL盐水。由于观察到的临床体征的严重性,在第23天,55.34 μ g/mL的所有动 物没有给药。所有动物在第24天恢复给药。

[0626] 结果:为了评价通过皮肤施用每日给药两次持续4周时,钙三醇 局部溶液可能的亚慢性毒性进行了这个研究。Göttingen Minipig®的四 只动物/性别/组的三个处理组以相应5.07、10.31和55.34 μ g/mL的剂 量浓度给药钙三醇局部溶液。一个另外的四只动物/性别的组用作对照 并接受了媒介,40/60重量 (w/w)的丙二醇,USP和乙醇(未改性 的,无水)200标准强度USP的混合物,和对照物质,0.9%注射用 氯化钠,USP。将钙三醇局部溶液 或媒介,以4mg/cm²的剂量体积, 在450cm²测试部位上,通过皮肤施用给药于所有组,一天两 次,连 续29天。

[0627] 对于所有动物,每日进行两次发病率、死亡率、受伤以及食品和 水的利用性的观察。每周进行临床观察。每周测量体重并记录。在第 1周期间,每剂后进行皮肤刺激评分,然后在第2周至第4周期间, 针对施用部位的变化每周两次评分(在第二剂后)。测试前以及最 终 尸检前的所有存活者进行了检眼镜检查。测试前进行了身体检查。测 试前、给药前、第1

天第一剂后1至2小时以及在最后一周给药期间 进行了心电图检查。测试前和最终尸检前,从所有动物收集了用于临 床病理学评价的血样和尿样。在第1天和第27天指定的时间点,从 所有存活动物收集了用于测定测试物质的血浆浓度的血样。从测试种 类的浓度-时间数据,确定了测试物质的毒理动力学 (TK) 参数。在 研究结束时,进行了尸检检验,记录器官重量,并通过显微镜检查选 定的组织。

[0628] 在研究的第28天,在弥留之际将55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的一只公猪安 乐死。在安乐死之前,观察到这只动物具有减少的活动、食欲不振和 颤动。认为这只动物的发病原因是接近致死水平的高钙血水平。所有 剩余的小型猪存活至研究第30天的按照时间表的结束。在研究的第3 周和第4周期间,在55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的大部分小型猪中观察到了减 少的活动、食欲不振、呕吐和颤动。在研究的最后一周或两周期间, 在55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的公猪和母猪中观察到了轻度刺激。5.07和 10.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的处理公猪和母猪的平均体重和体重增加与对照相当。55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的所有公猪和母猪在研究的最后2周中失去了相当 大量的体重,并且在这个时间段期间,母猪和公猪的平均体重显著较 低。

[0629] 在测试前和最终检眼镜时,没有任何一只动物观察到检眼镜异 常。钙三醇局部溶液没有引起定性的心电图异常,但在末端给药前和 给药后间隔时存在组平均心率的轻微提高。心率的这种提高无疑与研 究期间这些小型猪中的钙水平的明显提高相关。对定量心电图参数不 存在其他剂量相关的钙三醇局部溶液的作用。在最终评价时,在公猪 或母猪中没有观察到钙三醇局部溶液相关的血液学、凝血或尿分析改 变。在55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下看到了一些临床化学改变,最显著的是观 察到的接近致死水平的高钙水平。看到的其他改变是较低的氯化物 值,以及较高的胆固醇、葡萄糖、尿素氮和甘油三酯值。

[0630] 钙三醇局部溶液相关的肉眼病理学发现限于55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 一头公猪的胃粘 膜,由轻度的、不规则表面组成。与对照相比,在 55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的两个性别中都看到了肾脏重量的绝对和相对增加 以及胸腺重量的降低。在骨、肾脏、心脏、处理的皮肤、胸腺和甲状 腺中存在直接的钙三醇局部溶液相关的显微镜发现。此外,直接的钙 三醇局部溶液相关的发现包括多中心脉管变化和多中心粘膜矿化。在 胰腺中注意到了间接的测试物质相关的显微镜发现。这些显微镜变化 在两个性别中都存在,并且限于以55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度给药 的动物。

[0631] 股骨、胸骨和肋骨的显微镜变化限于骨干的密质骨和骨腔。它们 的特征在于骨营 养不良和嗜碱基质的沉积。肾显微镜观察的特征在于 矿化、管状退化/再生和亚急性炎症。心肌的显微镜观察是肌纤维矿化、 亚急性炎症和脉管变化。此外,一头公猪和一头母猪具 有心脏内矿化。在胃粘膜、肺、喉、气管、前列腺、唾液下颌腺内和膀胱内,以降序 观察到了 多中心粘膜/上皮矿化。钙三醇局部溶液相关的脉管变化广泛 分布并且主要影响小至中等 大小的血管。它们主要在心脏和骨腔内观 察到并且零星地在不同的器官/系统中看到。处理皮肤的显微镜变化的 特征在于表皮增生和角化过度以及真皮上层血管周围的混合细胞炎 症。胸腺、甲状腺和胰腺的显微镜变化的特征分别在于淋巴耗尽、卵 泡细胞肥大和增生 以及单细胞坏死。

[0632] 基于这个研究的结果,基于在55.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下看到的临床化 学和显微镜变化,认为无明显副作用水平 (NOAEL) 为10.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0633] 实施例14. 临床前研究:大鼠和小鼠实验

[0634] 新生大鼠模型和PCA模型。Sprague Dawley大鼠购自Charles River实验室(Wilmington, MA)。C3H/HeJ小鼠购自Jackson实验室(Bar Harbour, ME)。根据NIH指导来圈养和饲喂啮齿动物。对于涉及化疗的实验,环磷酰胺购自Mead Johnson(Evansville, IN),而依托泊苷获自Bristol-Myers(Evansville, IN)。1,25(OH)2D3粉是来自Dr. Uskokovic(Hoffman-La Roche, Nutley, NJ)的礼物。对于涉及C3H/HeJ小鼠的实验,1,25(OH)2D3购自Sigma(St. Louis, MO)。

[0635] 1,25(OH)2D3的局部施用。将1,25(OH)2D3溶解于绝对乙醇中并且使用敷药器局部施用。对照动物仅用媒介相似地处理。然后将动物分离3小时的时间段,此后用肥皂和水清洗处理区域并干燥。对于CIA实验,在出生后第5天开始,每日给予1,25(OH)2D3,并且在第10天结束。对于PCA实验,在第22天动物完全脱毛时开始,每日给予1,25(OH)2D3,并且在第35天结束。对于CIA和PCA,用150μL绝对乙醇中的0.2μg 1,25(OH)2D3局部施用于头颈部来处理实验组。在两种情况中,对照组只接受乙醇媒介。环磷酰胺(35mg/kg)只通过腹膜内给予一天。依托泊苷(1.5mg/kg)腹膜内给予3天。两种化疗都在11天龄时开始。在第一剂化疗后第十天记录脱毛。

[0636] 在第一个实验中,检查了对于环磷酰胺-诱发的脱毛的保护以评价1,25(OH)2D3的功效。将大鼠随机分成两组,每组十只大鼠。一组接受了媒介对照,而另一组接受了0.2μg 1,25(OH)2D3。对照组中所有10只大鼠在化疗后第10天变成完全脱毛。相反,用1,25(OH)2D3预处理的所有动物没有产生脱毛。在第二个实验中,将通过之前给药的环磷酰胺诱发的全身脱毛(普秃)的20只22天大的大鼠随机分成2组,每组10只。此外,具有通过依托泊苷给药诱发的普秃的20只22天大的大鼠也随机分成2组,每组10只动物。环磷酰胺-和依托泊苷-诱发脱毛的一组接受了1,25(OH)2D3,而一组接受了媒介对照。观察动物,直至获得完全毛发再生长。在两个对照组中,100%的动物在第42天呈现出完全毛发再生长。相反,用1,25(OH)2D3处理的大鼠中,全身毛发再生长延迟至第50天。

[0637] 斑秃的C3H/HeJ模型。每日观察退休的种畜(8个月大)的AA损伤的产生。在10个月大时,选择一组6只在背部区域呈现出局部脱毛病灶的动物并随机分成两组,每组3只动物。一组接受了乙醇媒介对照,而另一组在脱毛损伤处接受了0.2μg 1,25(OH)2D3 15天。观察动物总共30天。在对照或实验组中没有观察到毛发再生长。

[0638] 单次腹膜内(IP)注射MIAC51细胞(大鼠绿色瘤细胞系)后,在5天大的Long Evans大鼠中诱发了绿色瘤。在新生动物(在第6至11天暴露)以及成年动物(在第40至45天暴露)中评价了钙三醇(2μg/mL)对毛发生长的作用。局部施用钙三醇后,然后给两个年龄组的动物给药各种化疗剂(环磷酰胺;环磷酰胺和阿霉素;环磷酰胺、阿霉素和胞嘧啶β-D arabinofurosamine;环磷酰胺、紫杉醇和依托泊苷;以及阿霉素、紫杉醇和依托泊苷)。在每个实验中,在第一个和第二个化疗周期后(即,在新生大鼠以及成年动物中),钙三醇都产生了对于CIA的100%保护。在未用钙三醇处理的其他组中(绿色瘤对照、单独的化疗剂、化疗剂加媒介),CIA未受影响。还观察到钙三醇没有影响化疗剂的功效-无白血病的动物数量在单独的化疗组、化疗组加媒介和化疗组加钙三醇局部溶液中相似。

[0639] 在5天大的Sprague-Dawley或Long Evans大鼠中进行了第二个研究,并评价了钙三醇保护对抗CIA的能力。在第5至10天,以1、2或3μg/mL的浓度局部施用CIA,接着给药各种化疗剂(依托泊苷;环磷酰胺;阿霉素和环磷酰胺;胞嘧啶β-D arabinofurosamine;胞嘧

啶 β -D arabinofurosamine和阿霉素;以及紫杉醇)。在一个实验中,在第5天给予MIAC51细胞以产生绿色瘤,然后给予动物钙三醇加环磷酰胺。对于CIA的保护是时间依赖性的:1.5小时暴露后没有出现保护,但在6-小时暴露后观察到了完全保护。施用6小时,所有测试浓度(即,1至3 μ g/mL)的钙三醇提供了对于由测试的全部化疗剂诱发的CIA的100%保护。此外,注意到了在1 μ g/mL下的毛发生长限于处理的区域(头和颈),而在3 μ g/mL下,在动物的背部区域(未处理区域)也观察到了毛发生长。最后,诱导绿色瘤时,钙三醇的给药没有影响与环磷酰胺相关的治愈率(或无白血病动物的数量)。

[0640] 钙三醇的次要药效学作用也得到了充分理解,并且包括骨、肠、免疫系统和甲状腺的变化。

[0641] 结论。本文中呈现的结果强烈地表明1,25(OH)2D3发挥了对抗化疗诱发的脱毛的保护作用,但没有治疗脱毛本身。1,25(OH)2D3在CIA中的保护作用背后的基本原理是可以控制(arrest)健康毛囊并因此赋予对化疗的抗性。然而,在已经脱毛的毛囊中,用1,25(OH)2D3处理没有给予任何益处。

[0642] 另一个动物研究中的发现证明了施用局部钙三醇可以减少CIA的发病率的潜在机理。使用钙三醇的局部处理证明了显著降低了C57BL/6小鼠中由环磷酰胺诱发的毛囊凋亡的程度。另一个使用BALB/c小鼠(允许研究第一成年毛发生长初期中的毛囊并且评价性别差异的动物模型)进行的实验证明了在腹膜内给药环磷酰胺之前局部施用钙三醇5天以剂量依赖性方式显著降低了雄性小鼠31中的CIA的程度。在注射了EMT-6鼠乳腺肿瘤细胞的带肿瘤雄性小鼠中降低了局部钙三醇的保护作用。相反,与不带肿瘤的雌性小鼠及其带肿瘤的雄性对应小鼠相比,在注射了EMT-6鼠乳腺肿瘤细胞的带肿瘤雌性小鼠中用局部钙三醇预处理具有更有效的对抗环磷酰胺诱发的脱毛的保护作用。死后皮肤的组织病理学检查证明了毛囊中由环磷酰胺诱发的形态学改变的显著降低和免受环磷酰胺诱发的毛囊损伤的保护作用。然而,在这个模型中,在用局部钙三醇处理的小鼠和没有暴露于溶液的那些之间,注意到细胞凋亡染色模式没有显著差异。

[0643] 另一方面,使用雌性C57BL/6青年小鼠替代新生大鼠模型的另一个动物研究未能证明局部钙三醇在预防环磷酰胺诱发的脱毛中的功效。然而,令人感兴趣地,有色毛干的再生长明显加快、增强和数量上提高。组织病理学研究表明了这可能是由于毛囊偏向于应答化学损伤的“营养不良的毛发生长中期途径”:毛囊修复策略允许新的、未受损伤的毛发生长初期发根不寻常地快速重建。

[0644] 多个体内动物研究未能证明钙三醇对化疗对癌细胞的细胞毒性 的潜在保护作用。在用0.2 μ g 1,25(OH)2D3预处理的移植绿色瘤C51细胞的Sprague Dawley大鼠与环磷酰胺处理之前用乙醇媒介预处理的那些之间没有看到存活率的统计学显著差异。更重要地,在腹膜内给药环磷酰胺之前带有EMT-6乳腺肿瘤的雄性小鼠的局部钙三醇预处理导致了与用任一种单独的药剂处理的小鼠相比,肿瘤生长速率的更大降低,表明钙三醇潜在的抗肿瘤作用。相似地,每日用3剂2.5 μ g 钙三醇预处理,持续3天,接着给带有鳞状上皮细胞癌和人前列腺细胞癌的小鼠给药各种剂量的紫杉醇导致显著的肿瘤消退。

[0645] 实施例15.豚鼠中钙三醇的皮肤敏化研究

[0646] 诱导期。单组10只雄性和10只雌性豚鼠通过局部贴剂施用6小时接受了测试物质的诱导暴露(在范围-发现筛选中确定的充分耐受的最高浓度下)。在相同的皮肤部位重复

诱导暴露一周一次,持续 2周。媒介和阳性对照组由5只雄性和5只雌性豚鼠组成,各自以处理组相同的方式分别暴露于丙二醇/无水乙醇或己基肉桂醛(一种已知 的温和至中等的皮肤敏化剂)。在诱导期期间贴剂除去后大约24小时,将皮肤反应评分并记录。在最后诱导暴露后,在激发暴露之前,将动物保持未处理两周。

[0647] 激发期。在最终局部诱导后两周进行了激发暴露。将测试物质以 在刺激筛选中确定为非刺激的浓度局部施用于媒介对照和测试组。还 用媒介激发了媒介对照组。阳性对照组接受了阳性对照物质。在贴剂 除去后大约24和48小时,对激发施用部位评分。在这个研究的条件 下,5.7 μ g/g的钙三醇没有确定为是敏化剂。

[0648] 实施例16.兔子中钙三醇局部溶液眼睛刺激研究

[0649] 进行了这个研究来评价钙三醇局部溶液的潜在眼刺激和/或腐蚀 作用。将三只雄性新西兰白色Hra: (NZW) SPF兔子的一个处理组在第 1天通过右眼以各自0.1mL/动物的剂量水平给药测试物质一次。左眼 保持未处理并且用作对照。

[0650] 对于所有动物,每日进行两次发病率、死亡率、受伤以及食物和 水的利用性的观察。在给药后1、24、48和72小时以及第5、8、10 和15天,进行了眼睛观察和刺激评分。给药后 24小时评价后,对每 只眼睛进行了微温水冲洗。在给药前测量并记录了体重。研究结束后,将所有动物安乐死而没有进一步评价。

[0651] 刺激评分进行直至第10天。最严重的评分通常限于给药后1小时 的观察。眼睛刺激的迹象在给药后24小时仍然存在,但通常比 给药后1小时的观察的严重性低。到第3天,所有评分返回零,除了 发红。至第10天观察到了1的评分(一些血管明确是充血的)。眼睛刺激的所有迹象在第15天得到解决。基于该研究的结果,钙三醇 局部溶液引起了大部分在第3天得到解决并且在第15天得到完全解 决的温和的眼睛刺激。

[0652] 动物研究的总结。进行以上,例如,实施例1、9、10、11、13、 14、15和16中呈现的动物研究来表征维生素D化合物在脱毛中的作 用,并且在本发明的情况下,来评价维生素D化合物预防或减轻CIA 的适用性。

[0653] 由于紧密地模拟人疾病的动物模型的可用性,广泛地研究了CIA 和斑秃 (AA)。在这一点上,之前证明了脱毛化疗(阿糖胞苷、环 磷酰胺、阿霉素、阿霉素/环磷酰胺、依托泊苷)在新生大鼠模型 (Sprague Dawley大鼠)中诱发了脱毛。在这个模型中,给8至11 天大小的大鼠腹膜内注射化疗剂。5-7天后,相继发生脱毛,并且根 据观察到的脱毛进行分级。在出生后第5天给予保护性化合物,持续 6天。因为这个阶段的毛囊是100%毛发生长初期的,这使得它们易 受化疗毒性影响并与人的情况相当,因此将该模型用于研究CIA。这 是非常有效和可重复的模型,并且可以用于研究对抗CIA的保护性制 剂。这种模型的缺点之一是毛囊在出生后的第一毛发生长周期中,并 且大鼠具有白毛并没有着色。相反,使用新生Long Evans大鼠的使 用允许研究有色的毛。广泛用于研究化疗影响的另一个模型是成年 C57BL/6小鼠模型。这个模型中的毛囊已经经历了几个出生后生长周 期并且毛干是有色的,与人头皮相似。这个特别模型中的毛发生长初 期周期通过脱毛来诱导并且在该程序后8至9天观察到。使用这个模 型和环磷酰胺,已经证明了作为对化疗细胞毒性的反应,毛囊利用两 个途径:营养不良的毛发生长初期或营养不良的毛发生长中期,这决 定了化疗诱发的脱发的发作和毛发再生长的模式。已经用于研究CIA 的新模型是成年Long Evans大鼠模型,其允许研究经历了几个周期 的毛囊并且大鼠同时具有有色和无色的毛。另外,通

过用理发剪剃毛 来进行毛发生长初期的诱导,这是可以避免由脱毛诱发的毛囊外伤的 方法。另一种研究脱毛(更具体地,AA)的极好模型是C3H/HeJ小 鼠模型26。在这个模型中, 20%的动物在18个月大时成簇或全身(普 脱)自发发生脱毛。脱毛模式和组织病理学分析已经显示出这种动物 中的病理学几乎与人的相同。

[0654] 1,25-二羟基维生素D3通过调节毛囊角化细胞的分化来起到保 护作用,从而赋予其对化疗的毒性代谢物的抗性。

[0655] 实施例17.I期剂量-递增研究,评价接受用于治疗晚期或复发疾病的基于紫杉烷化疗方案的成年癌症患者的局部钙三醇的安全性、耐受性和药代动力学

[0656] 1.0.概述

[0657] 这将是剂量递增研究以确定患有转移性或复发性乳腺癌、宫颈 癌、子宫内膜癌、卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌或软组织和骨肉 瘤的患者中局部钙三醇的最大耐受剂量 (MTD) 以及整体安全性和耐 受性,所述患者正经受使用基于紫杉烷(紫杉醇/纳米颗粒白蛋白结合 的紫杉醇/多西紫杉醇)方案的化疗。将使用标准3+3剂量递增设计, 每个剂量水平使用3-6名患者。符合条件的患者>18岁并预定接受基 于紫杉烷的方案,按照医嘱进行治疗间歇,在开始化疗前两周在每个 群组剂量水平开始一天施用两次局部溶液,然后每日两次持续3个月 或直至化疗结束。如果通过照相评价和患者自我评价发现局部钙三醇 在预防和/或减轻紫杉烷化疗诱发的脱发中是有效的,假定没有观察到 与局部药剂相关的剂量限制毒性 (DLT),将允许患者在化疗期间持 续局部施用。由研究临床医师,医生或护士,在局部治疗的头28天 过程中以每周为基础评估局部钙三醇的毒性,此后每四周评估。对于 药代动力学研究 (PK) 的目的,在局部处理第1天的以下时间点收集 血样:给药前,在第1天早晨单次施用后2小时 (+/-30分钟)、4 小时 (+/-30分钟) 和8小时 (+/-给药后1小时)。药品的第二次施 用将在初始施用后10-14小时和8小时PK样品后施用。此后,局部 施用频率将为 每日两次,早晨和晚上。随后,在每28天处理的最后一 剂后12小时 (+/-2小时),在下一个28 天处理周期的第1天的第 一次施用前,获取PK样品。这个时间表将持续三个连续28天局部处 理周期。(PK将在第1、5、9和13周抽取。此外,如果患者仍然在 研究中,还将在第54周抽 取PK)。

[0658] 作为次要目的,将通过照相评价来评估局部钙三醇的潜在功效。将使用Canon Power Shot G12相机系统来进行照相评价以确保所有登 记的患者之间的标准化和均一性。在每次照相评价时获得以下五个视 角:头/头皮视角的双侧,头/脸视角的前面,头/头 皮视角的背面和头 /头皮视角的顶部。另外,在相同的时间点将获得特写照片。它们将包括从上视角和顶视角的头皮的中间模式,将头发从中间分开并梳至远 离中心部分。将针对 照明、相机角度以及到参与者头部的位置将照片 标准化。这些评价将在以下时间点进行: 基线、第7、15、27和54 周。在至少3名患者已经完成了15周处理后,将针对表示基线以及 处理第7周和第15周的每个群组中的患者的照片盲呈给研究的主要 研究人员。在研究第27周 和第54周,还将获取照片,但将作为次要 信息包括在最终照相评价中。此外,将要求所有患者在整个处理过程 中保持记录施用日志以确保依从性。另外,患者将保持记录自我评价 日记,其需要基于类似10点评分来评价头发厚度、头发完整性、头 发断裂和头发美观品质 (易于成型等),以评估患者报告的功效。将 使用主要研究人员的基线、第7周和第15周照相的临床评估与患者 日记信息一起用于脱发的主要评估。预期研究将在大约12个月的时 间

段中进行,包括筛选期。

[0659] 2.0. 目的和科学目标

[0660] 主要目的:测定正接受基于紫杉烷的化疗方案的成年癌症患者中 局部钙三醇的最大耐受剂量 (MTD) 以及整体安全性和耐受性。

[0661] 次要目的:测定不同剂量水平下钙三醇的单剂和多剂药代动力学;和评价钙三醇局部溶液用于预防化疗诱发的脱发的初步功效。

[0662] 3.0. 研究设计/干预的概述

[0663] 可能短期处理不足以诱导头皮毛囊的毛发生长中期阶段(这随后 使其更易于收到化疗的细胞毒性的影响)。为了解决这一问题,将在 化疗开始前至少5-7天(例如,优选至少两周)开始施用局部钙三醇,以尝试诱导预期给予对抗CIA的保护的毛发生长中期阶段。以每日为基础的持续施用将确保毛发生长中期阶段的维持和多剂量含紫杉烷 方案的整个给药期间的延长保护。

[0664] 3.1设计

[0665] 这是一个单臂、剂量递增的I期研究。符合资格的患者将在第一 剂化疗前两周开始每日给头皮施用两次局部钙三醇制剂,并且持续每 日施用两次直至化疗结束。在不存在由于局部钙三醇的3级或更高毒 性的情况下,以紧接前一个剂量组的逐步增量来进行剂量的递增以测 定这种药剂的MTD。如通过参与的研究者最佳确定的,剂量限制毒 性(DLT) 将需要可能、大概或确定地(9.2节中限定的)与局部钙 三醇相关,并且不与基于紫杉烷的方案相关。相似地,根据预先限定 的指导(9.2.2-9.2.7节中限定的)和通用的护理标准,开始化疗方案 的合适剂量改变或治疗中断。在局部制剂施用的头28天过程中,进 行了局部钙 三醇制剂的DLT的测定。将以合适的安全性监控来管理 受试者,并且还进行实时PK分析以确定暴露水平。在进行到每下一 个组前进行PK分析。对于药代动力学研究 (PK) 的目的,在局部处 理第1天的以下时间点收集血样:给药前,在第1天早晨单次施用后 2小时 (+/-30分钟)、4小时 (+/-30分钟) 和8小时 (+/-给药后1 小时)。药品的第二次施用将在初始施用后 10-14小时和8小时PK 样品后施用。此后,局部施用频率将为每日两次,早晨和晚上。随后,在每28天处理的最后一剂后12小时 (+/-2小时),在下一个28天 处理周期的第1天的第一次施用前,获取PK样品。这个时间表将持 续三个连续28天局部处理周期。(PK将在第1、5、9和 13周抽取。此外,如果患者仍然在研究中,还将在第54周抽取PK)。

[0666] 3.2干预。诊断为患转移性或复发性乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜 癌、卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌或软组织和骨肉瘤的,预定接 受使用基于紫杉烷(紫杉醇/纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇/多西紫杉 醇) 方案的化疗的患者将被筛选为符合条件来参与。所有符合 条件的 患者将开始施用0.25mL的钙三醇至头皮四个象限中的每一个-右前、左前、右后、左后,在化疗前用计量泵喷雾装置一天施用两次,至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天(例如,优选至少两周), 并随后持续每日两次直至化疗结束。如果如通过照相评价和患者 自我 报告确定的,发现局部钙三醇在预防和/或减轻基于紫杉烷的化疗诱发 的脱发中是有效的,假定没有观察到与局部制剂相关的DLT,则允许 患者在其化疗期间继续每日两次局部施用。选择在化疗前或化疗中剃 发的患者将从试验中排除。将局部溶液施用于头皮。头发和头皮应该 是干的,或,如果在洗头后立即施用,通过在施用局部溶液前首先毛 巾干燥头发和头皮使得在触摸时头发和头皮应当潮湿的(damp),而 不是润湿的(wet)。每次施

用后,头发和头皮至少8小时不能清洗 或用洗发水洗。将建议患者在清洗或用洗发水洗之前不施用超过两个 连续剂量的钙三醇。处理诱导头发周期的毛发生长初期,其将在最后施用后持续2-3周。药物的施用将确保这种毛发生长中期的保护持续 多次化疗。

[0667] 4.0. 治疗剂/诊断剂

[0668] 研究产品: (钙三醇,USP) 局部溶液

[0669] 化学名称: (5Z,7E)-9,10-断胆甾基-5,7,10(19H)-三醇

[0670] IUPAC名称: (1a,3B,5Z,7E)-9,10-断胆甾基-5,7,10(19)-三烯 -1,3,25-三醇

[0671] 可替换的名称:钙三醇也称为:1a,25-胆钙化甾醇、1a,25-二羟 基维生素D3、1(S),25-二羟基维生素D3、1,25-DHCC、1,25-(OH)2D3

[0672] 分子式:C27H44O3:

[0673] CAS编号:32222-06-3

[0674] 分子量:416.6

[0675] 熔点:129-131°C

[0676] 化学稳定性:室温下稳定

[0677] 给药途径:局部

[0678] 怎样提供:33mL琥珀玻璃瓶 (III型玻璃),具有18mm带有 LDPE衬垫的黑色酚醛螺旋盖。Pfeiffer局部喷雾泵 (0.25mL) (白色) 分开包装(只用于In-Use研究)。

[0679] 临床试验制剂:所提议的用于钙三醇局部溶液的临床试验制剂在 40/60重量丙二醇/酒精比例的丙二醇,USP和无水200标准强度,未 改性酒精,USP中含有钙三醇,USP。基于非临床毒理学的完成,确 定了用于人研究的局部溶液媒介中的钙三醇浓度。所提议的I期研究 将利用5、10和20μg/mL浓度的钙三醇。

[0680] 包装:确定将所提议的I期临床药品包装在33mL容量的配备有 黑色酚醛螺旋盖的 III型琥珀玻璃瓶中。所提议的药品还将包括分开 包装的能够每次施用压缩均匀分配 0.25mL的计量分配施用系统。药 品的总剂量计划为1.0mL,或四次重复计量单位施用。每日两次施用 总的1.0mL药品,早晨和晚上,施用之间间隔10-14小时。

[0681] 给患者供应单个琥珀玻璃瓶的钙三醇局部溶液,其含有大约 31.5mL药品的足以分配28mL药品 (0.25mL×4次应用×2次/天×14天 =28mL) 的局部溶液。玻璃瓶装置将适当地用使用说明书、使用警告 以及用于由临床现场分配的患者ID的位置来标记。每个装置用 覆盖 瓶盖和瓶顶的塑料安全封口密封。将给患者提供施用日志,其中包含 怎样施用钙三醇以及记录每次施用的日期和时间的说明。研究人员将 通过要求患者每次就诊时携带他们用过的玻璃瓶、施用日志和自我评 价日记来监控顺从性。研究人员将检查瓶子和施用日志,以确保局部 处理给药的顺从性并通过记录每次检查的评论、姓名缩写和日期来证 明其监督。

[0682] 在使用时,患者将撕去安全封口并除去瓶盖,将专门设计的泵喷 雾装置插入瓶中,并确保处于瓶上的合适位置中。将指示患者通过按 压泵三次来装填泵,然后喷出 0.25mL药品四次至头皮的每个象限,接着按摩头皮来确保产品的均匀分布,由此来分配产品。在化疗开始 前,这一定量给药方案将每日重复两次,早晨和晚上,连续14天, 并且随后以每日为基础两次。临床样品供应将储存在冷藏温度下 (5-8°C),直至给予患者使用。在使 用过程中,患者将药品储存在 室温下。

[0683] 储存:将针对所提议的IND临床1期批次评价的稳定性储存条件描述于下表中:

[0684] 所提议的用于临床I期的稳定性储存条件

| | | |
|--------|--------|--|
| [0685] | 储存条件: | 长期储存: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ 加速储存: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ 控制储存 $2-8^{\circ}\text{C}$ |
| | 储存位置 | 水平 |
| [0686] | 强度: | $5 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$, $20 \mu\text{g/mL}$ |
| | 包装: | 1. 33 mL 琥珀玻璃瓶 (III型玻璃), 具有包含 LDPE 内衬的 18 mm 黑色酚醛螺旋盖 2. Pfeiffer 局部喷雾泵 (0.25 mL) (白色) (分开包装) (仅用于 In-Use 研究) |
| | 计划的剂量: | $5 \mu\text{g/mL} - 1.25 \mu\text{g}/\text{启动}$ $10 \mu\text{g/mL} - 2.5 \mu\text{g}/\text{启动}$ $20 \mu\text{g/mL} - 5 \mu\text{g}/\text{启动}$ |

[0687] 给药基本原理:非临床动物研究中的NOAEL(无明显副作用水平)为 $10.31 \mu\text{g/mL}$ 。为了比较钙三醇的动物和人剂量,在4-周小型猪研究中使用NOAEL剂量和在即将到来的临床试验中使用初始剂量计算了安全边际(MOS)。在小型猪中,NOAEL, $10.31 \mu\text{g/mL}$ 等于 $3.33 \mu\text{g/kg}$ 的剂量($10.31 \mu\text{g/mL} \times 2.1 \text{ mL}$ (给药体积) $\times 2 \times / \text{天} \times 13 \text{ kg}$ [第4周中小型猪的平均体重])。在人类中, $5 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL} \times 2 \times / \text{天} \times 60 \text{ kg}$)。基于这些剂量,MOS是20,其是超过初始临床剂量的合适边际。如果初始剂量引起毒性,患者将从研究中排除。

[0688] 5.0. 用于受试者符合标准

[0689] 该研究将在诊断为局部晚期不可切除的和/或转移性的乳腺、子宫颈、子宫内膜、卵巢、输卵管癌症、原发性腹膜癌或软组织和骨肉瘤,按照医生的判断预定接受使用基于紫杉烷(紫杉醇/纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇/多西紫杉醇)的化疗方案的患者中进行。

[0690] 5.1 患者入组标准:

[0691] • 至少18岁的成年患者。

[0692] • 能够完全理解和参与知情同意过程。

[0693] • 病理学证实了局部晚期不可切除的和/或转移性的乳腺、子宫颈、子宫内膜、卵巢、输卵管癌症、原发性腹膜癌或软组织和骨肉瘤的历史。

[0694] • 按照医生的判断,预定接受使用基于紫杉烷(紫杉醇/纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇/多西紫杉醇)的方案。

[0695] • 没有脱发或轻度脱发的证据(对于远距离不明显仅在近处观察时的个体,NCI CTCAE 1级脱发限定为<50%正常的脱发;可能需要不同的发型来遮盖脱发但不需要假发或发片来掩饰)。

[0696] 如果依据NCI-CTCAE V.4.0不高于1级,女性/男性-模式秃头或年龄相关的脱发

是允许的。如果目前具有0或1级脱发,之前失去头发的受试者可以登记。

[0697] • 登记前14天内0或1的ECOG性能评分。

[0698] • 在登记前72小时内具有>1500细胞/mm³的基线嗜中性粒细胞计数。

[0699] • 在登记前72小时内具有≤ULN(对于具有低于3.0的白蛋白的患者,校正的钙血清钙=血清钙+[0.8][3.5-血清白蛋白])的血清钙。

[0700] 5.2受试者排除标准:

[0701] • 在局部钙三醇开始的4周内正接受降钙治疗或可能影响钙水平的药物(例如,降钙素、光神霉素、磷酸盐、狄诺塞麦)的患者。在试验开始前已经用双膦酸盐或降钙治疗控制3个月或更长时间并且已经显示了钙代谢的稳定性的证据对于参与试验是符合条件的患者。

[0702] • 按照研究者确定的,在研究登记的1年内,具有药物或酒精滥用史。

[0703] • 在化疗开始前选择剃发或计划在化疗过程中这么做的患者。

[0704] • 研究者意见中将影响研究药物吸收的任何皮肤病症,例如,特异性皮炎等。

[0705] • 在研究开始前30天内或其六个生物活性半衰期(看哪个更长)内已经用研究药剂处理(患者不能同时登记另一个临床试验或同时用另一种研究药剂处理)。

[0706] • 如研究者确定的,目前或研究登记的30天内,具有高血钙或维生素D毒性的历史,或住院治疗心绞痛、心肌梗塞或充血性心力衰竭或精神病的患者。

[0707] • 如研究者确定的,对钙三醇具有明显过敏的历史。

[0708] • 具有任何干扰受试者理解或遵照研究要求的能力的任何病症。

[0709] • 在研究过程中服用维生素D补充剂的患者,除非他们已经在研究开始前服用维生素D补充剂30天或更长时间,并且维生素D补充剂的剂量在研究过程中保持相同。

[0710] • 在局部治疗开始的4周内用已知影响钙水平的药物治疗的患者(>500IU维生素A、钙补充剂、氟化物、抗癫痫药),稳定治疗超过六个月的受试者除外。

[0711] • 正接受噻嗪或速尿灵利尿剂的患者,具有稳定剂量并已经治疗超过六个月的受试者除外。

[0712] • 具有高血钙或肾结石的患者。

[0713] • 表明具有明显的头发断裂或头发损伤以及在最近30天内由于过氧化物施用、永久性染发、漂白、挑染、烫发、拉直和/或氧化性染发剂的处理相关的脱发的患者。

[0714] • 按照NCI-CTCAE v4.0的2级或更高级别的脱发,或明显的脱发或头发断裂。

[0715] • 之前有头颅放疗。

[0716] • 怀孕或哺乳。

[0717] 6.0.招募计划

[0718] 如果满足参加试验的标准,将给予患者机会参与。没有对少数民族的歧视。将从患者获得知情同意书。通过授权获得同意书的研究者来获得同意书。患者将不接受任何因为参与这个研究的报酬。

[0719] 7.0.预处理评价

[0720] 在开始钙三醇前,以下需要至少5-9天(例如,至少4天,5天,至少6天,至少7天,至少8天,至少9天或至少2周):

[0721] • 完成医疗史或身体检查,包括伴随的医疗。

[0722] • CBC区分 (CBC with differential)、血生化检查 (Comprehensive chemistry panel)、血清磷水平和尿分析。

[0723] • 血清1,25二羟基维生素D。

[0724] • 怀孕测试 (此处列出的怀孕测试只针对生育可能的女性 (WCBP))。请排除所有不满足WCBP标准和满足无生育可能女性标准的女性。生育可能的女性限定了:已经经历了初潮 并且不满足“无生育可能女性”的标准的任何女性。无生育可能 的女性限定了:永久性不育的女性(例如,输卵管闭塞、子宫 切除、双侧输卵管切除、双侧卵巢切除);>45岁的女性,没 有使用激素替代治疗和经历了总的停经至少1年,或其具有>40mIU/mL的促卵泡激素 (FSH值) 和<40pg/mL (140pmol/L) 的雌二醇值;和>45岁的女性,使用雌激素替代治疗并且经历 了总的停经至少1年,或其在开始激素替代治疗之前,基于 FSH>40mIU/mL和雌二醇 <40pg/mL已经证明了停经的证据。

[0725] • 化疗前头发和头皮的照相记录。(将用作研究的基线评价)。

[0726] • 头发状况的患者自我评价。

8.0. 处理/干预计划

[0728] 在开始化疗处理之前,将指导符合资格的患者使用提供的计量泵 喷雾装置,将 0.25mL的局部钙三醇施用于至头皮四个象限中的每一个-右前、左前、右后、左后,一天两次,至少5-9天(例如,优选至 少5天,至少6天,至少7天,至少8天,至少9天或至少两周)。随后,施用将持续每日两次,持续三个月或直至化疗结束。局部溶液 将施用于头皮。头发或头皮应当是干燥的,或如果在洗头后立即施用,在施用局部溶液前通过首先毛巾干燥头发和头皮使得触摸时头发和 头皮应当潮湿的而不是润湿的。每次施用后,头皮至少8小时不能清 洗或用洗发水洗。将建议患者在清洗或用洗发水洗之前不施用超过两 个连续剂量的钙 三醇。即,他们必须在每另一次施用钙三醇后清洗头 发。患者将在整个研究过程中自己给药局部溶液;除了第一剂和将进 行药物动力学研究时的那些天,其中局部钙三醇的病例施用将由研究 人员来进行。

[0729] 8.0.1基于紫杉烷(紫杉醇/纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇/多西紫杉醇)化疗给药。

[0730] 按照制度指引,所有患者在给药化疗剂前应当预先用药物治疗以 防止严重的超 敏反应。

[0731] 用于乳腺癌患者的推荐方案的实例:

[0732] 1.对于转移性乳腺癌的治疗,推荐的方案是基于紫杉醇/nab-紫 杉醇/多西紫杉 醇或结合卡铂。

[0733] 用于妇科癌症患者的推荐方案的实例:

[0734] 1.对于卵巢癌的治疗,推荐的方案是基于紫杉醇/多西紫杉醇或 结合卡铂。

[0735] 2.对于子宫内膜癌的治疗,推荐的方案是基于紫杉醇或结合卡 铂。

[0736] 3.对于子宫癌的治疗,推荐的方案是基于多西紫杉醇或结合吉 西他滨。

[0737] 4.对于宫颈癌的治疗,推荐的方案是基于紫杉醇或结合顺铂/ 拓扑替康。

[0738] 用于肉瘤患者的推荐方案的实例:

[0739] 1.对于软组织或骨肉瘤的治疗,推荐的方案是基于紫杉醇/多西 紫杉醇或结合吉 西他滨。

[0740] 8.1剂量递增。从剂量水平1 ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) 开始, 在三至六人大小的群中, 用局部钙三醇治疗患者。如果表明临床毒性是可接受的(参见下文), 将逐步增加剂量。将考虑两个剂量水平用于递增(10和 $20\mu\text{g}/\text{mL}$)。在局部治疗的头28天期间, 进行了剂量限制毒性(DLT, 在8.2节中限定)的确定。没有进行患者内剂量递增。DLT需要可能、大概或确定地(在8.2节中限定)与局部钙三醇相关, 并且与化疗方案无关, 如通过参与的研究者最佳确定的。剂量递增方案(表8.1) 将如下进行:

[0741] 将进行一个28天的治疗周期, 并且在增加至下一个剂量水平前 进行PK数据的评价。

[0742] 如果群中初始的三名患者没有一人经历剂量限制毒性(DLT), 那么将在下一个较高剂量水平下处理三名患者的新群。

[0743] 如果群中的三名患者中的一人经历了DLT, 则以相同的剂量水平处理最多三名另外的患者。如果六名患者中仅有一名经历了DLT, 则递增继续。

[0744] 如果群中的两名或更多患者经历DLT, 则已经超过最大耐受剂量(MTD) 并且不再进行进一步的剂量递增。之前的剂量水平将认为是MTD。

[0745] 如果只有三名患者在认为是MTD的剂量水平下受到处理, 那么 最多另外三名患者接受该剂量水平。如果六名患者中不超过一人在该 剂量水平下经历了DLT, 则将确认该剂量水平为MTD。如果该群中 两名或更多患者经历DLT, 那么将以相同的方式研究之前的剂量水平。

[0746] 将MTD限定为在低于2/3或2/6受试者经历DLT的剂量下头28 天期间0/3或1/6受试者经历DLT的剂量水平。因此, 当任何剂量水平下 $>30\%$ (2/3或2/6) 的受试者产生DLT时, 已经超过了MTD。如果在完成三个群的增加剂量后, 尚未确定MTD, 则研究发起人将 给FDA皮肤学部门审查研究发现, 寻求指导来修正研究方案以增加 另外的剂量递增群。

[0747] 群审查委员会(CRC) 将全面了解临床和实验室数据, 并且必需 同意剂量增加至下一个群是否合适。来自每个处理组的药代动力学数据也将受到CRC的审查并且在剂量增加的任何决定中考虑。可用时 (至少每月), 将来自处理延长阶段的不良事件数据呈给CRC。将针对剂量增加决定来考虑这些数据。在已经处理三个群后尚未达到 MTD的情况下, 任何进一步的剂量增加将需要方案修正。

[0748] CRC将审查来自之前群的可用数据以确保以这种方式确定的 实际剂量增加没有将受试者暴露于不合理的风险中。CRC可以出于任何 原因(例如, 非线性PK的观察, 接受超过一剂的钙三醇局部溶液的 受试者中的AE) 来降低或停止剂量增加。继续进行下一个群的决定 将需要CRC成员一致通过的同意。

[0749] 已经评价了非临床毒理学并且群1药物浓度为基于非临床研究 预期的MTD的大约 1/20或更低。因为在I期实验方案中详述的群1 给药下没有预想的剂量限制毒性风险, 已经确定了将不存在-1给药 群。如果在初始钙三醇剂量下有两名或更多初始患者经历不可接受的 毒性,CRC将审查所有可用数据并且可以选择中止研究。

[0750] 表8.1

| | | |
|---|------------------------|--|
| [0751] | 在处理过程中每个群具有 DLT 的受试者数量 | 剂量增加决定规则: |
| | 3 名中无 | 3 名受试者参与下一个剂量水平 |
| | 3 名中 1 名 | <p>在这个剂量水平进入至少 3 名或更多受试者</p> <ul style="list-style-type: none"> 如果 3 名另外的受试者中没有一名具有 DLT, 继续下一个剂量水平。 如果 3 名另外的受试者中的 1 名或更多具有 DLT, 那么剂量增加停止, 并且将这个剂量宣称为最大给药剂量 (MAD)。如果在该剂量之前只处理了 3 名受试者, 三名另外的受试者将参与下一个最低剂量水平。 |
| | 2 | 剂量增加将停止。将这个剂量水平宣称为 MAD (给药的最高剂量)。如果在该剂量之前只处理了 3 名受试者, 三名另外的受试者将参与下一个最低剂量水平。 |
| [0752] <u>药代动力学(所有患者)</u> 。为了药代动力学研究 (PK) 的目的, 在局部处理第一天的以下时间点收集血样:给药前, 在第1天早晨单 次施用后2小时 (+/-30分钟)、4小时 (+/-30分钟) 和8小时 (给 药后+/-1小时)。药品的第二次施用将在初始施用后10-14小时和8 小时 PK 样品后施用。此后, 局部施用频率将为每日两次, 早晨和晚 上。随后, 在每28天处理的最后一剂后12小时 (+/-2小时), 在下 一个28天处理周期的第1天的第一次施用前, 获取PK 样品。这个时 间表将持续三个连续28天局部处理周期。(PK将在第1、5、9和13 周抽取。此外, 如果患者仍然在研究中, 还将在第54周抽取PK)。在每次血液收集前大约5分钟获得生命指征, 并且将记录实际收集时 间。 | | |
| [0753] 在每次收集时, 通过血清分离管中的静脉穿刺来收集血液。在 1200RCF下离心10 ±5分钟, 并且将等份1.5mL血清各自加入2个外 部标记螺纹的低温小瓶中并立即冷冻。从每个群收集的样品将在干冰 上冷冻运输至实验室用于血清中钙三醇浓度的分析测定。血清样品将 用足量的干冰来运送以保持样品冷冻直至到达。 | | |
| [0754] 从接受钙三醇的所有受试者收集的血清计算钙三醇的血清PK。将使用非区室分析计算以下的血清PK参数: | | |
| [0755] UC_{0-t} :浓度-时间曲线下面积, 直至通过梯形法则计算的最后可 测量的浓度, 并且以浓度-时间的单位来表示。 | | |

[0756] $AUC_{0-\infty}$: 血清浓度-时间曲线下面积, 从给药的时间至无限, 通过将最后可定量的浓度除以 Ke_{∞} 并将所得到的结果加到 AUC_{0-t} 来计算, 以浓度-时间的单位来表示。

[0757] C_{max} : 从没有内插的实验数据直接获得的所观察到的峰药物浓度, 以浓度单位来表示。

[0758] T_{max} : 从没有内插的实验数据直接获得的达到峰药物浓度的观察时间, 以时间单位(小时)来表示。

[0759] Ke_{∞} : 表观消除速率常数, 通过血清浓度-时间曲线的log-线性区段的回归分析来确定, 以时间-1单位(1/小时)来表示。

[0760] $T_{1/2}$: 终末半衰期, 计算为 $-\ln 2/Ke_{\infty}$, 以时间单位(小时)来表示。

[0761] CL : 计算为药物剂量/ $AUC_{0-\infty}$ 的清除率, 以流速的单位(L/小时)来表示。

[0762] V_d : 计算为 CL 除以 Ke_{∞} 的分布体积, 并以体积单位(L)来表示。

[0763] 用于PK参数的描述性统计学(包括数量、平均、中值、标准偏差和范围)将通过剂量水平制成表格。估算的肾消除率将通过剂量水平制成表格。

[0764] 8.2剂量-限制毒性(DLT)的限定和处理改变。

[0765] 将根据针对不良事件的通用技术标准(CTCAE v 4.0)将毒性分级。

[0766] 8.2.1与局部钙三醇相关的剂量限制毒性。剂量限制毒性限定为局部药剂施用的头28-天处理过程中发生的临幊上明显的3或4级非血液学毒性, 并且需要与钙三醇可能、大概、确定地相关(并且与化疔方案无关), 如通过研究者最佳确定的。钙三醇的过量剂量诱发高血钙, 并且在一些情况中, 诱发高钙尿症。如果患者呈现了高血钙的症状, 应当测定血清钙, 并且应当立即停止处理。使用CTCAE版本4.0等级3(或更高)限定高血钙, 其限定为血清钙 $>12.5-13.5\text{mg/dL}$; $>3.1-3.4\text{mmol/L}$ 或离子化钙 $>1.6-1.8\text{mmol/L}$ 并且指示住院治疗。对于患有通过升高的血清钙确定的无症状高血钙的患者, 首先检查他们的离子钙水平。如果离子钙水平实际上升高了, 将停止研究药物。如果离子钙水平正常, 患者将保持继续研究并且将追踪离子钙而不是血清钙。如果出于该原因必须停止使用钙三醇, 将在测试中心每日抽血检查血清钙和磷酸盐水平, 直至持续两天是正常的。

[0767] 8.2.2剂量限制毒性。

[0768] 如果患者产生与其化疔方案相关的毒性, 那么按照制度指引, 接着将是剂量降低。在化疔方案改变的过程中, 钙三醇剂量将保持稳定, 除非研究者认为真正需要改变。

[0769] 9.0.处理/干预过程中的评价

[0770] 临床。按照下表中详细描述的进行病史和身体检查。在化疔开始前, 局部钙三醇施用开始至少5-7天(例如, 至少2周)后, 研究者将在第1、2、3、5、7、11、15、27和54周, 观察患者的临时病史, 伴随的药物治疗, 身体检查, 包括体重、生命指征(血压、温度、呼吸速率、心率)和不良事件。

[0771] 实验室。按照下表中描述的进行实验室评价。

[0772] 研究评价时间表部分A-基础信息

[0773] 所有研究评价将在排定日期的 $+/-72$ 小时进行, 除非另外指出。

[0774]

| 基础 信息 | 化 疗 周 | 签 署 知 情 同 意 书 | 人 口 统 计 学 | 医 疗 史 | 伴 随 药 物 | 身 体 检 查 | 怀 孕 测 试 | 体 重 | 生 命 指 征 | 不 良 事 件 评 价 |
|--------------------------------------|-------------|---------------------------------|-----------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|--------|------------------|----------------------------|
| 研究前 | - | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 第 1 周 (化 疗 前 的 局 部 施 用) | - | | | * | * | * | | * | * | * |
| 第 2 周++ (化 疗 前 的 局 部 施 用) | - | | | * | * | * | | * | * | * |
| 第 3 周 (开 始 化 疗) | 1 | | | * | * | * | | * | * | * |
| 第 4 周 | 2 | | | | | | | | | |
| 第 5 周 | 3 | | | * | * | * | | * | * | * |
| 第 6 周 ++++ | 4 | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|--------|--------|----|--|--|---|---|---|--|---|---|---|
| [0775] | 第 7 周 | 5 | | | * | * | * | | * | * | * |
| | 第 8 周 | 6 | | | | | | | | | |
| | 第 9 周 | 7 | | | | | | | | | |
| | 第 10 周 | 8 | | | | | | | | | |
| | ++++ | | | | | | | | | | |
| | 第 11 周 | 9 | | | * | * | * | | * | * | * |
| | 第 12 周 | 10 | | | | | | | | | |
| | 第 13 周 | 11 | | | | | | | | | |
| | 第 14 周 | 12 | | | | | | | | | |
| | ++++ | | | | | | | | | | |
| | 第 15 周 | 13 | | | * | * | * | | * | * | * |
| | 第 27 周 | | | | * | * | * | | * | * | * |
| | ++++++ | | | | | | | | | | |
| | 第 54 周 | | | | * | * | * | | * | * | * |
| | ++++++ | | | | | | | | | | |

[0776] 研究评价进度表部分B-测试和研究药物施用

| 测试和研究 药物施用 | 化 疗 周 | PK 血 样+ | C31543 (钙 三 醇)的施 用 | CBC 区分 | 血 生 化 检 查 | 头 发 和 皮 化 检 查 | 头 发 和 皮 的 照 相 | 血 磷 和 头 皮 的 照 相 | 清 和 维 生 素 D | 患 者 自 我 评 价 日 记 |
|-----------------------------|-------------|---------------|-------------------------------|-----------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 研究前 | - | | | * | * | * | | * | | * |
| 第 1 周 (化疗前的 局部施用) | - | * | * | * | * | | | * | | * |
| 第 2 周++ (化疗前的 局部施用) | - | | * | | | | | | | * |

| | | | | | | | | | |
|--------|--------------|----|---|---|---|---|---|---|---|
| [0778] | 第 3 周 (开始化疗) | 1 | | * | * | * | | * | * |
| | 第 4 周 | 2 | | * | | | | | * |
| | 第 5 周 | 3 | * | * | * | * | | * | * |
| | 第 6 周 +++++ | 4 | | * | | | | | * |
| | 第 7 周 | 5 | | * | * | * | * | * | * |
| | 第 8 周 | 6 | | * | | | | | * |
| | 第 9 周 | 7 | * | * | | | | | * |
| | 第 10 周 | 8 | | * | | | | | * |
| | +++++ | | | | | | | | |
| | 第 11 周 | 9 | | * | * | * | | * | * |
| | 第 12 周 | 10 | | * | | | | | * |
| | 第 13 周 | 11 | * | * | | | | | * |
| | 第 14 周 | 12 | | * | | | | | * |
| | +++++ | | | | | | | | |
| | 第 15 周 | 13 | | * | * | * | * | * | * |
| | ++++++ | | | | | | | | |
| | 第 19 周 | | | | | | | | * |
| | ++++++ | | | | | | | | |
| | 第 27 周 | | | * | * | * | * | * | * |
| | ++++++ | | | | | | | | |
| | 第 54 周 | | * | * | * | * | * | * | |
| | ++++++ | | | | | | | | |

[0779] +PK将以以下方式来收集:

[0780] 在局部处理的第1天:将在给药前(第一剂前),以及2小时(+/-30分钟)、4小时(+/-30分钟)和8小时(给药后+/-1小时)收集PK。

[0781] 对于第5、9、13和54周的钙三醇研究,在给药前第1天收集PK。这应当是最后一次局部钙三醇施用后的12小时(+/-2小时)。

[0782] +对于第2周就诊,患者将在这周的周一、周三或周四由皮肤科 诊室的皮肤科医生来观察。

[0783] +要求所有患者维持自我评价日记,从研究药物的最初施用直至大约6个月。日记在开始钙三醇后的头15周将每周填写,以及在第19、23和27周填写。

[0784] +注意患者可能安排在3周给药一周休息的方案中。所示的周将是无化疗周。

[0785] + + + + + 在至少3名患者已经完成了15周处理后,将表示基线以及第7和15周处理的每个群中的患者的照片盲呈给研究PI。在研究的第27周和第54周,还将拍摄照片,但将作为次要信息包括在最终照片评价中。将基线以及第7和15周照片的PI临床评价与患者自我评价日记信息一起用于脱发的初步评价。

[0786] + + + + + 如果处理持续超过第15周,这周需要患者自我评价。

[0787] + + + + + + + 从排定日期的+/-7天进行研究评价。

[0788] 头发和头皮的照相记录。脱发限定为任何头发丢失。在这个研究中,使用Canfield临床照相评价图像来进行全面照片审查,所述图像由研究护士获取,以确保在所有登记的患者间的标准化和统一性。在每个照片评价获得以下五个视图:头/头皮视角的双侧,头/脸视角的前面,头/头皮视角的背面和头/头皮视角的顶部。另外,在相同的时间点将获得特写照片。它们将包括从上视角和顶视角的头皮的中间模式,将头发从中间分开并梳至远离中心部分。将针对照明、相机角度以及到参与者头部的位置将照片标准化。全面照片评价将由一名皮肤科医生评论员来进行并且将使用针对头发体积的7-点评价尺度来评价照片(-3=很大程度的降低,-2=中等降低,-1=略有降低,0=无变化,+1=略有增加,+2=中等增加,+3=很大程度的增加)。评论员将比较在基线化疗、化疗1个月后和化疗处理3个月后获得的照片。给照片评分的皮肤科医生评论员是不知道照片的时间顺序的,除了将与所有其他照片进行比较的基线照片。

[0789] 头发和头皮的主观记录。还将通过患者自我记录的日记主观地记录脱发。要求所有患者在整个处理过程中每周完成这个自我评价日记,这需要基于类似10点评分来评价头发厚度、头发完整性、头发断裂和头发美观品质(易于成型等),以评估患者报告的研究药物的功效。这些将每周完成并在钙三醇处理过程中每次就诊时返回给研究人员。预期研究将在大约12个月的时间段中进行,包括筛选期。

[0790] 10.0. 处理后评价

[0791] 将通过研究人员进行处理后身体检查并在研究处理日期完成后12周进行。检查将包括:体重测量、生命指征、血样抽取(全血细胞计数、血生化检查、血清磷和血清维生素D)和不良事件评价。

[0792] 11.0. 毒性/副作用

[0793] 将使用NCI CTCAE版本4.0来将所有毒性分级。以下是可以观察到的一些副作用:

[0794] 常见副作用(20-30%)

[0795] • 瘙痒

[0796] • 皮肤不适

[0797] • 皮肤刺痛或灼烧

[0798] • 眼睛刺激或刺痛

[0799] 不太常见的副作用(<20%)

[0800] • 头皮干燥和剥离

[0801] • 红斑

[0802] • 刺激性皮炎

[0803] 罕见但严重的副作用(1-5%)

[0804] • 高血钙

[0805] • 高钙尿症

[0806] • 肾结石

[0807] • 增加的口渴

[0808] • 增加的排尿频率

[0809] • 脉搏变化

[0810] • 虚弱

[0811] • 瞌睡

[0812] • 骨痛

[0813] • 肾机能不全

[0814] 12.0. 用于治疗反应/结果评估的标准

[0815] 这个试验是I期研究并且因此主要是患有转移性或复发性乳腺 瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌或软组织和骨肉瘤的正经历使用基于紫杉烷(紫杉醇/纳米颗粒白蛋白结合的 紫杉醇/多西紫杉醇)方案的化疗的患者中钙三醇局部溶液的安全性研究。这个研究将聚焦于确定钙三醇局部溶液的MTD和治疗反应。

[0816] 13.0. 从研究中排除的标准

[0817] 所有患者可以持续治疗,除非证明了DLT。在死亡的情况下,应当注明死亡的原因。如果毒性不是剂量限制的,而将患者排除于继续 处理,将病例报告给IRB,并且对于每个病例,将决定患者的毒性是否应当限定为DLT或患者是否应当认为是不可用的并且由相同剂量 水平登记的另一名患者替代。

[0818] 认为以下事件是对于中止用研究药物处理的充分理由:

[0819] • 由于根据NCI针对不良事件的通用技术标准v4.0分级的研究 药物的严重毒性。

[0820] • 需要实验方案不允许的治疗干预的状况。

[0821] • 在患者或研究者看来不可接受的毒性,即使在别处没有特意限 定。

[0822] • 出于任何原因的患者的个人选择。

[0823] • 不依从限定处理计划的受试者。

[0824] • 医学或精神疾病,任何其他情况,其中在研究者看来,继续参 与研究将不是患者的最佳选择或不可能进一步治疗。

[0825] • 怀孕。

[0826] • 在头三个局部钙三醇施用周期后,失去了患者的全部头发。

[0827] 受试者可以在任何时间撤回他们参与研究的同意书而不受歧视。如果依据其临床判断,退出是受试者的最佳选择或如果受试者不能顺 从实验方案,研究者可以撤出受试者。可能时,应当进行针对终止就 诊列出的测试和评价。如果受试者未能返回实验方案限定的就诊,必 须尝试来确定原因。如果未能通过电话联系到受试者,至少应当将要 求与诊所联系的挂号信发送给受试者(或受试者的法定监护人)。这 种信息应当记录在CRF中。

[0828] 研究者还将按照赞助者的要求或如果赞助者选择终止研究而撤 出受试者。在严 重或不可耐受的副作用发生时,主要的研究者将与赞 助者协商。如果由于副作用受试者中 止,将追踪该事件直至解决,或 如果在合理时间内未解决(大约30天),直至可以合理地解 释其临 床相关性和病因。受试者可以在研究过程中的任何时间撤回其同意 书。

[0829] 如果受试者按照其要求或主要研究者的决定在任何时间撤出研 究,撤出的原因

将记录在CRF中。如果可能,从研究中过早地撤出的所有受试者将经历所有研究结束的评价。

[0830] 必须进行所有努力来进行实验方案指定的安全性随访程序。

[0831] 14.0.生物统计学

[0832] 这是设计来确定CIA患者中局部钙三醇的最大耐受剂量(MTD) 的I期研究。三个提出的局部钙三醇的剂量为5 μ g/mL、10 μ g/mL和 20 μ g/mL。

[0833] 将在三至六人大小的群中处理患者并且如果临床毒性是可接受的,将增加剂量。如果完成了头一个月的局部药剂施用而没有经历剂量限制毒性(DLT),则对于试验目的,认为患者是无毒性的。如果在头一个月的过程中,出于毒性以外的其他原因中止了局部药剂,可以在相同水平登记另外的患者以确保毒性的充分评价。没有在患者内进行剂量增加。在所有病例中,包括局部处理持续后4周时的那些, MTD评价将只基于该月期间记录的DLT。将考虑两个剂量水平用于增加。在8.2节中限定了DLT,并且进行该设计来最小化在DLT的可能性高时增加剂量的机会,以及最大化在DLT的可能性低时增加剂量的机会。剂量增加方案如下:

[0834] 1. 如果在给定的剂量水平下初始的三名患者没人经历DLT,将研究下一个剂量水平。

[0835] 2. 如果在给定的剂量水平下初始的三名患者有一人经历DLT,将在相同的剂量水平下处理三名另外的患者。只在如果没有观察到另外的DLT的情况下才继续增加。

[0836] 3. 如果在给定的剂量水平下两名或更多患者经历DLT,将之前的剂量宣称为MTD。

[0837] 4. 如果只有三名患者在认为MTD的剂量下处理,将在该水平下处理另外三名患者以证实之前的结果。在MTD确定过程中任何阶段发生剂量增加的可能性是当前剂量水平下基础DLT率的函数。这种可能性可以计算为以下允许发生增加的两个结果的二项式概率的总和:(1)在头三名患者中没有观察到DLT。(2)在头三名患者中观察到一名DLT,接着在相同剂量水平下的三名另外的患者中没有观察到DLT。

[0838] 预期真实的毒性风险在10%-50%的范围内。下表显示了相应的剂量增加的概率:

| | | | | | | |
|--------|---------|------|------|------|------|------|
| [0839] | 真实的毒性风险 | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.50 |
| | 增加的概率 | 0.91 | 0.71 | 0.49 | 0.31 | 0.17 |

[0840] 这些数字表明基础真实毒性率小时,增加至下一个剂量水平的概率大,而随着真实毒性率增加,增加的概率适当地相应降低。

[0841] 安全性分析。通过频率和等级,通过周期和在全部周期,来描述如通过NCI针对不良事件的通用技术标准(CTCAE Version 4.0)测量的选定的非血液学和血液学毒性,将全部周期的最大等级用作每位患者的概括性量度。

[0842] 使用管理活动医学词典(medical dictionary for regulatory activities),将CRF上记录的不良事件项映射于优选的项。根据全身器官类别和优选的项,针对总体发生率和每个剂量群的发生率、记录的最高严重性以及与研究处理的关联,将所有不良事件(AE)列出或制表。将相似地概括严重的不良事件(SAE)。还将提供导致研究处理早期终止,或从试验过早退出的死亡、SAE、DLT和AE的列表。

[0843] 使用针对每个剂量群从基线至各个不同时间点的值的平均变化来检查实验室变

量。实验室值也将根据CTCAE v4.0来归类;将通过 最高研究毒性分级、剂量群和相关性将列表或表格归类。将呈现移动 表来显示在基线和最后评价时具有高、正常和低(或正常/异常)实验 室结果的受试者的数量和百分比。

[0844] 将针对所有受试者概括伴随的药物,包括按剂量群的概述。

[0845] 显著性水平。综合照片评价和患者自我报告的日记将用于预备性 统计学分析。分析将着眼于局部钙三醇的功效。这对于更密切地寻求 局部钙三醇功效的进一步研究是有帮助的。尽管对于这个研究没有计 划正式的统计学检验,可以针对选定的安全性变量计算百分之九十五 的置信区间。这个I期试验只积累三名患者/群,这不是统计学上显著 的患者数量,也不是提供足以用于功效验证的客观统计学数据的适当 试验设计。

[0846] 试探性分析。将针对每位受试者评估试探性变量,并且将针对受 试者通过剂量水平计算描述性统计学(包括数量、平均、中值、标准 偏差和范围)。

[0847] 临时分析。没有计划临时分析。

[0848] 样品大小/累计率。每个剂量水平处理3-6名患者的研究的I期部 分。假定至少3个剂量水平,这个试验将需要最少2名和最多18名 患者。这个临床试验只在单一临床现场进行。因为预期每个处理群大 约3-6名符合条件的患者的累积极率,因此预期该试验的I期部分将在 短于1年的时间内进行。这允许每个3-名患者群观察28天,这是在 增加其他患者前, 使用一个治疗周期处理的时间长度。

[0849] 参考文献:

[0850] 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.2003 Dec;1010:350-3.

[0851] (ClinicalTrials.gov,Mosby's Drug Consult,13th Edition) .

[0852] 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.

[0853] Kiryu-Seo S,Gamo K,Tachibana T,Tanaka K,Kiyama H.Unique anti apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons.The EMBO Journal (2006) 25,3411-3421.

[0854] 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.

[0855] Rocchi P,Jugpal P,SoA,Sinneman S,Ettinger S,Fazli L,Nelson C, Gleave M.Small interence RNA targeting heat shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase 3activation in vitro BJU Int 2006.

[0856] Marenholz I,Heizmann CW,Fritz G(2004) .S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) .Biochem.Biophys.Res.Commun.322 (4) : 1111-22.

[0857] 本文中引用的所有参考文献按引用并入。

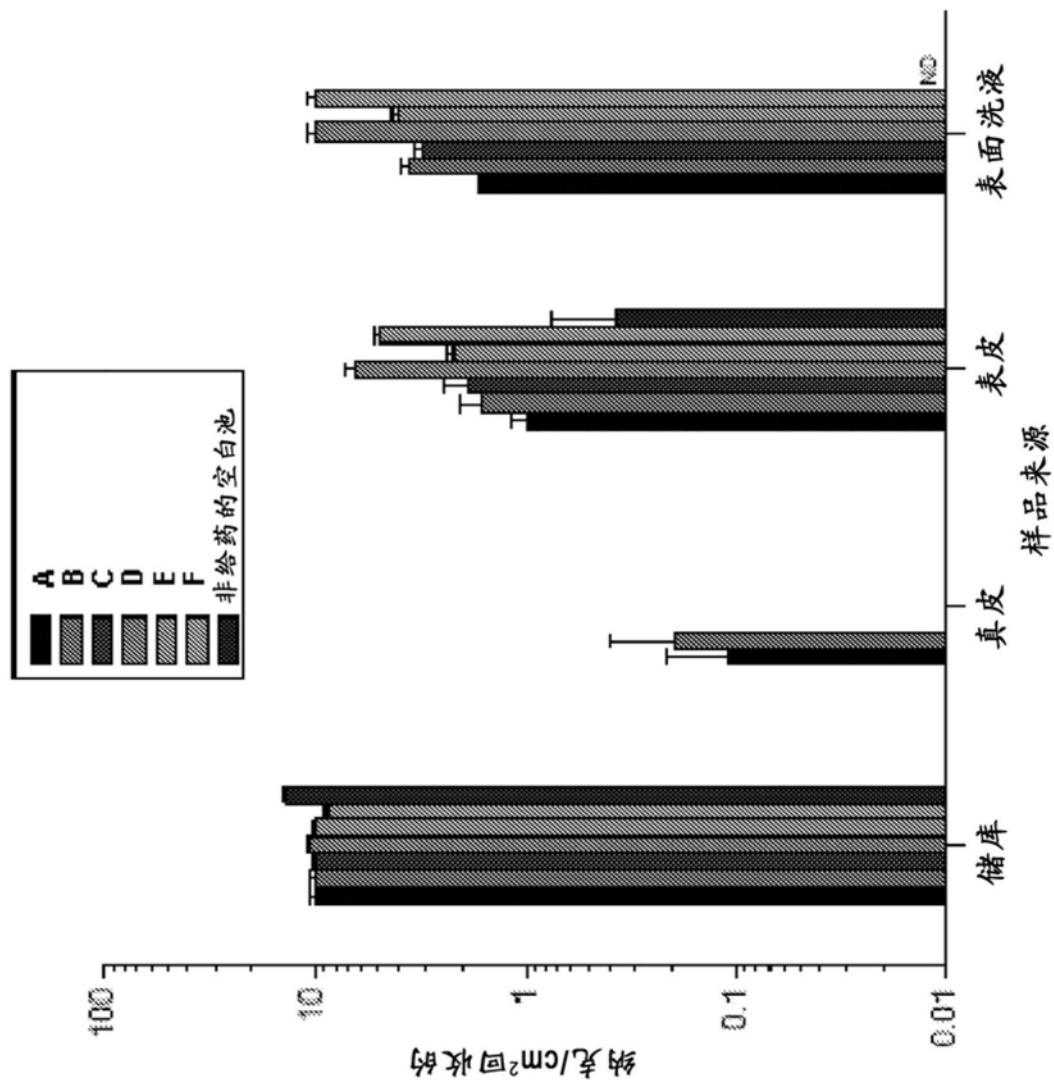


图1

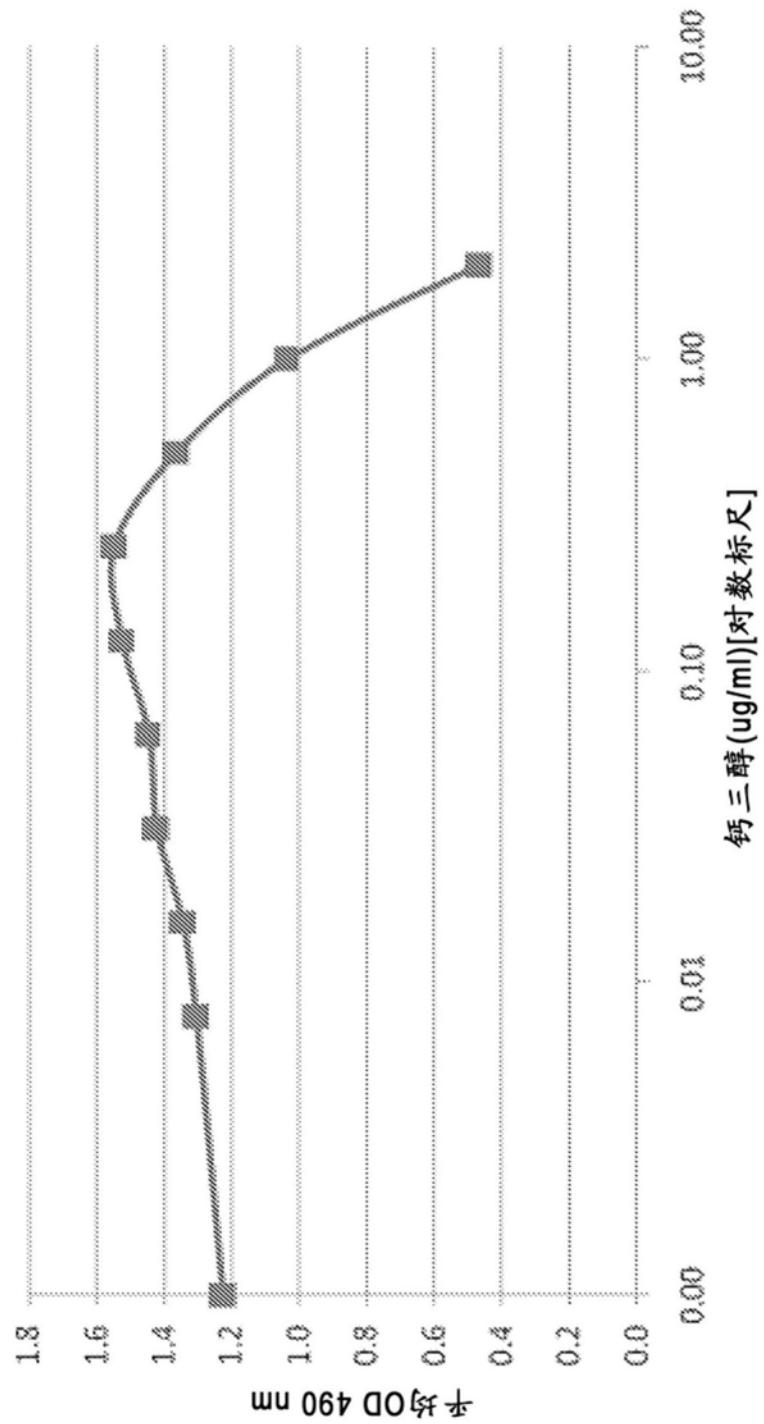


图2

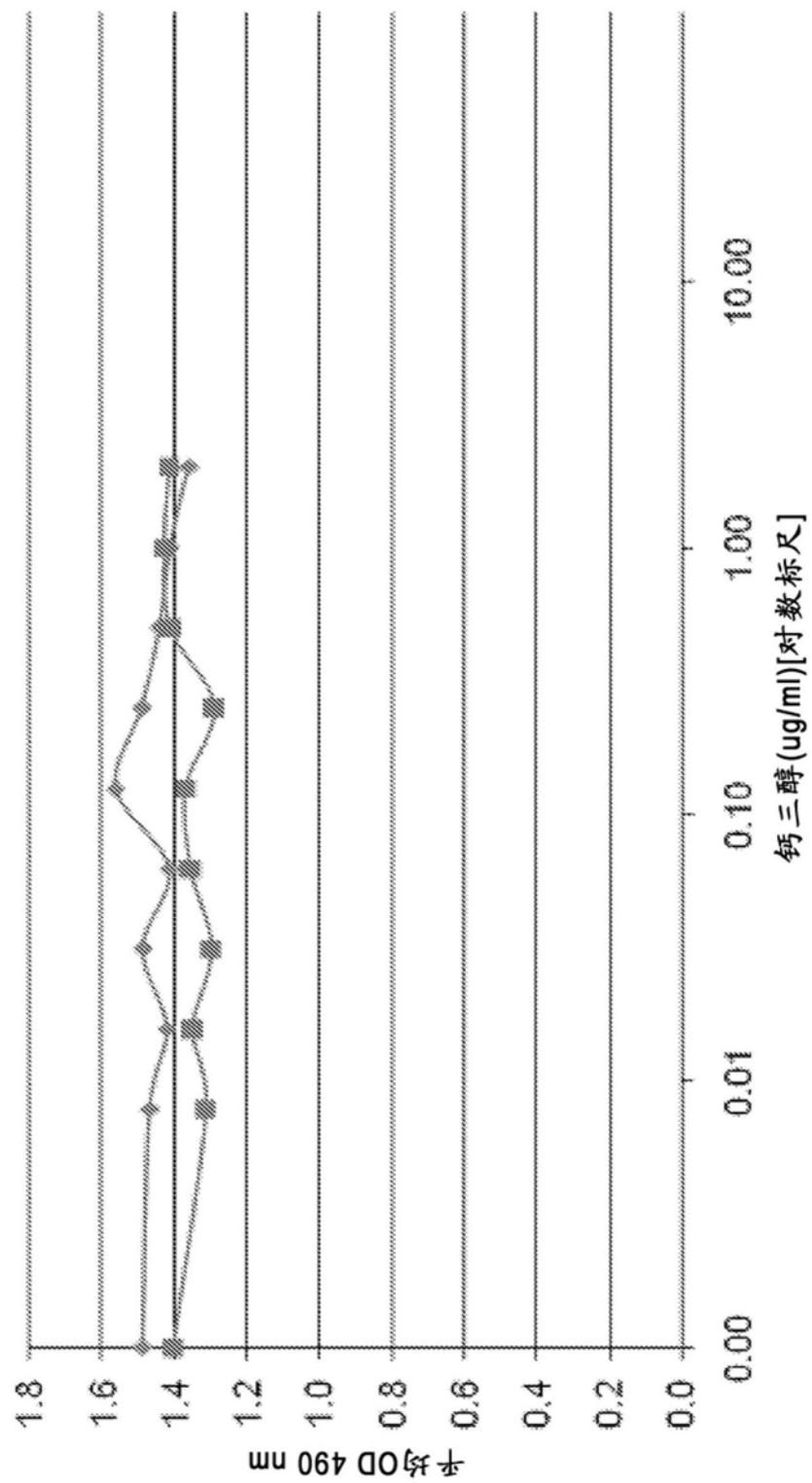
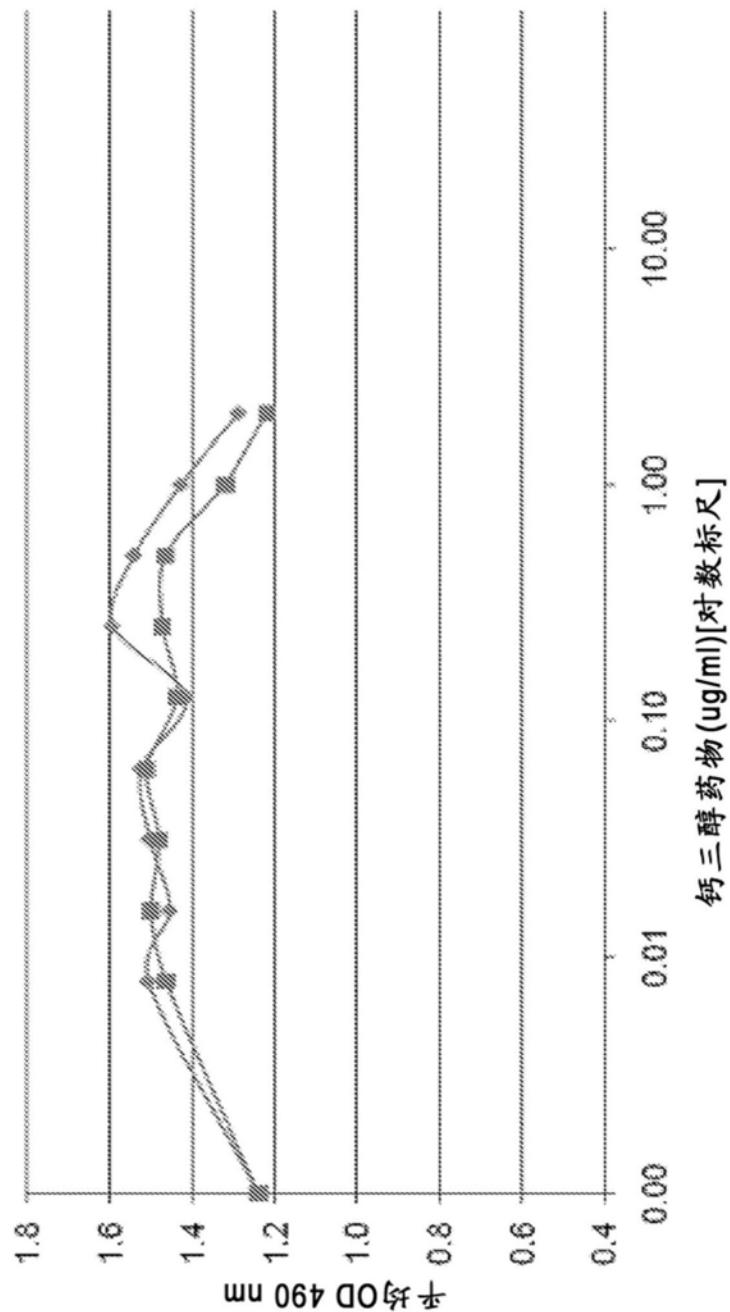
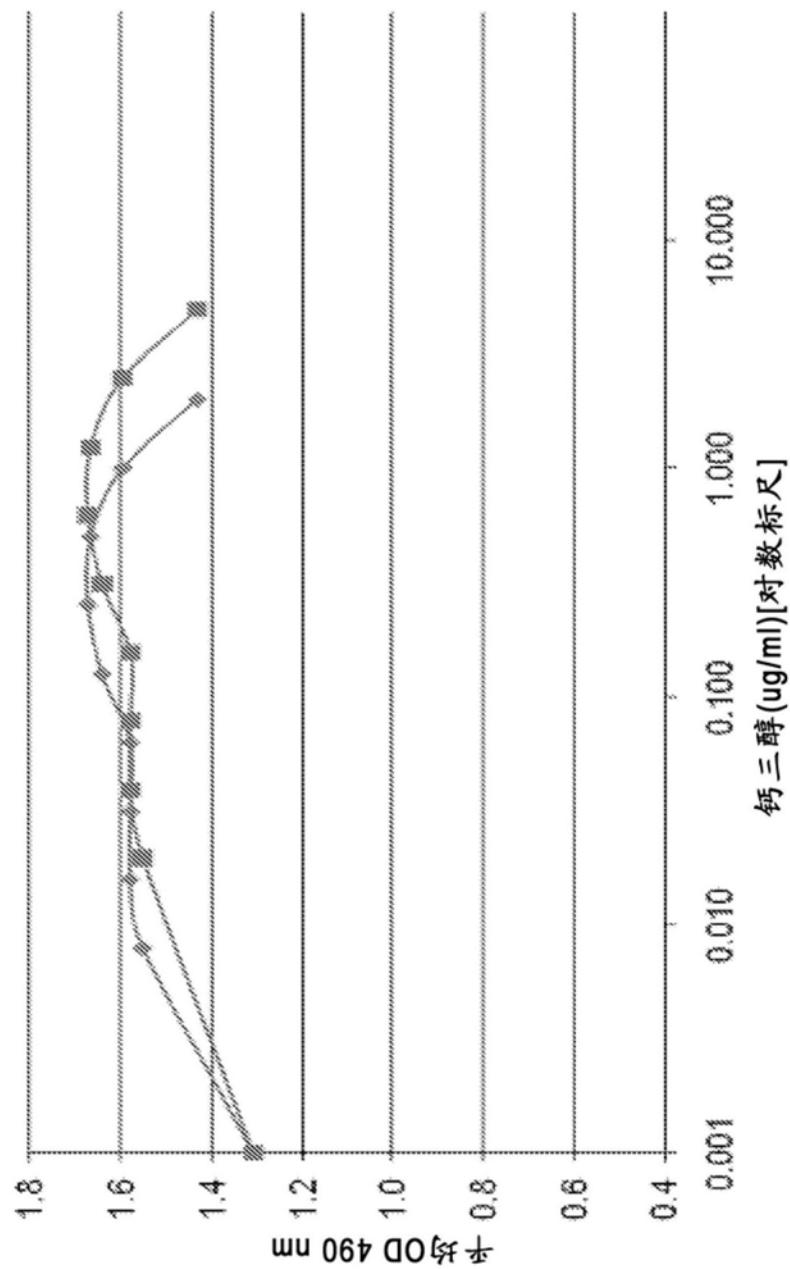


图3





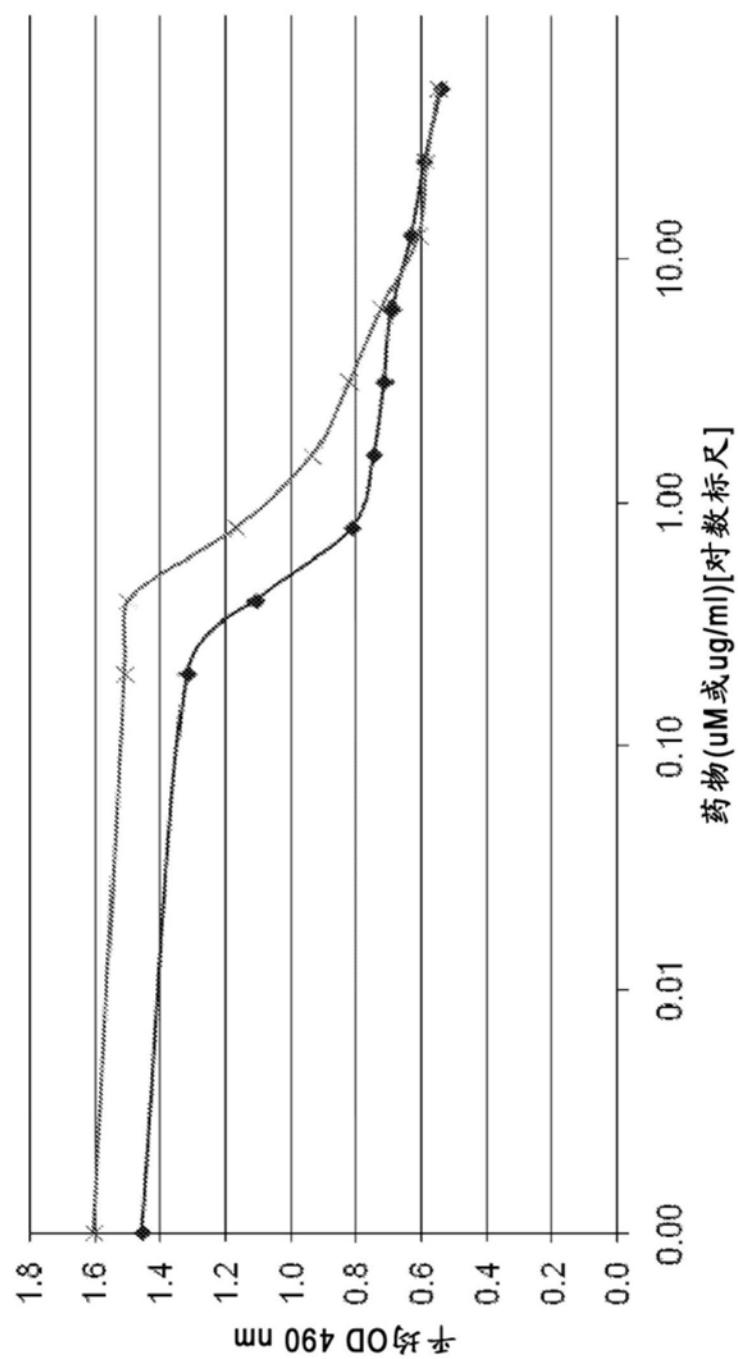


图5

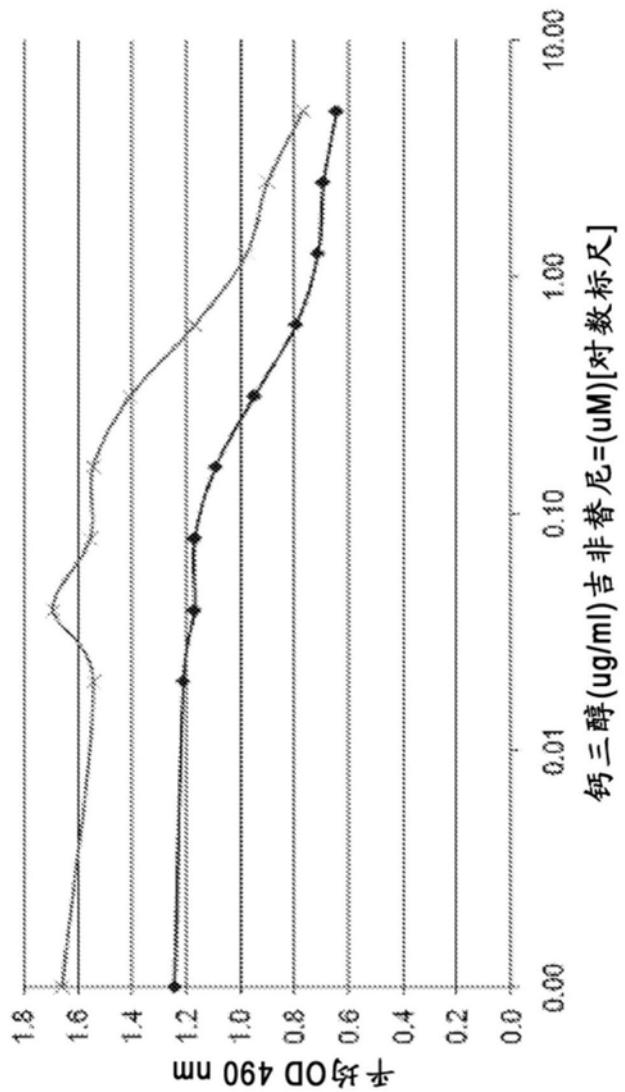


图6

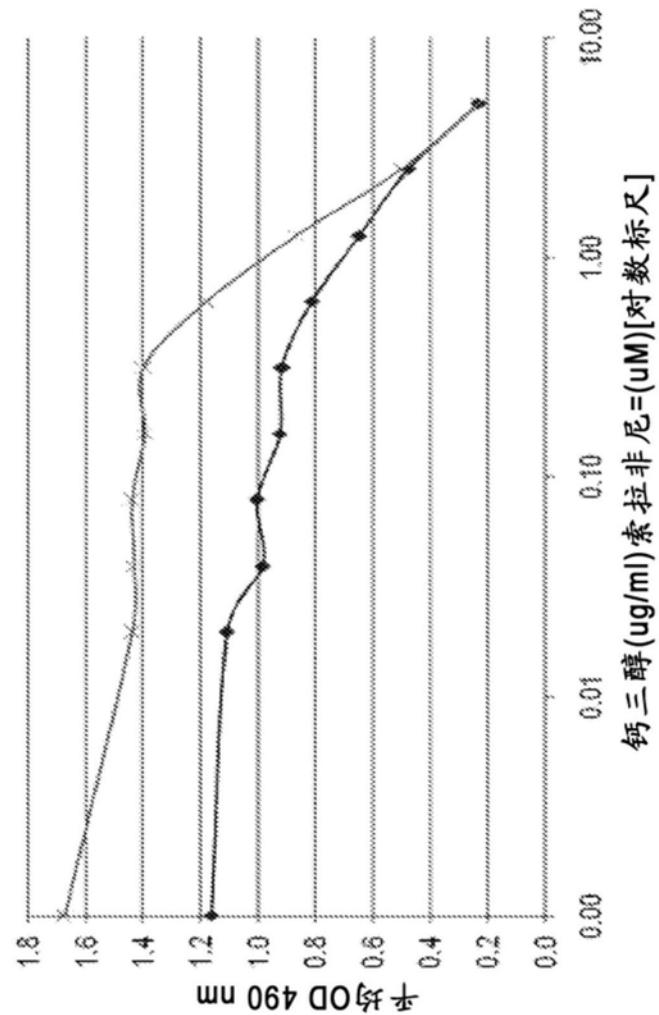
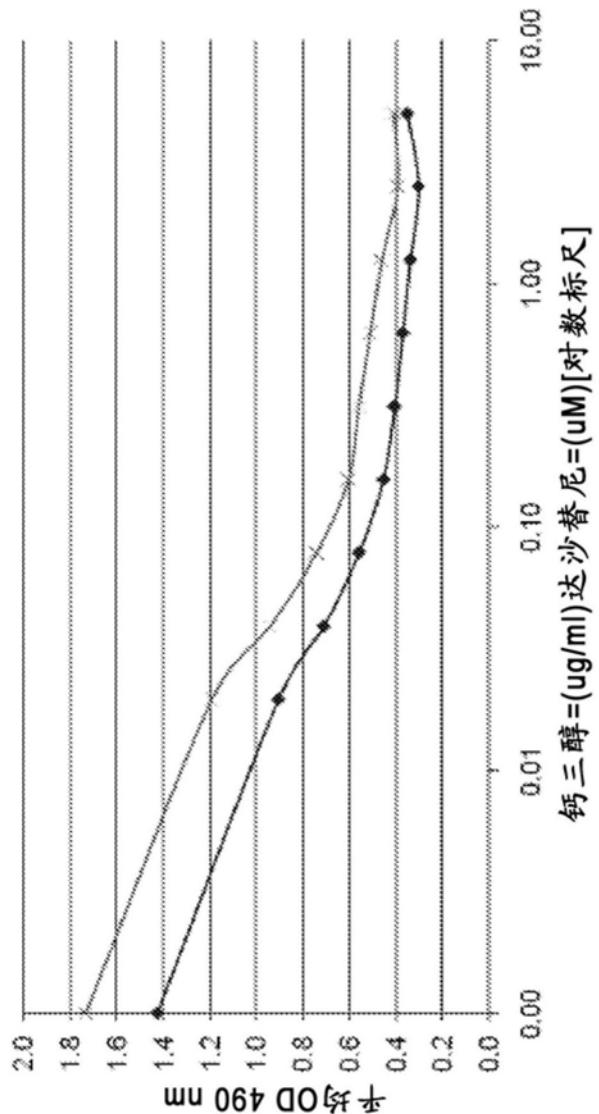
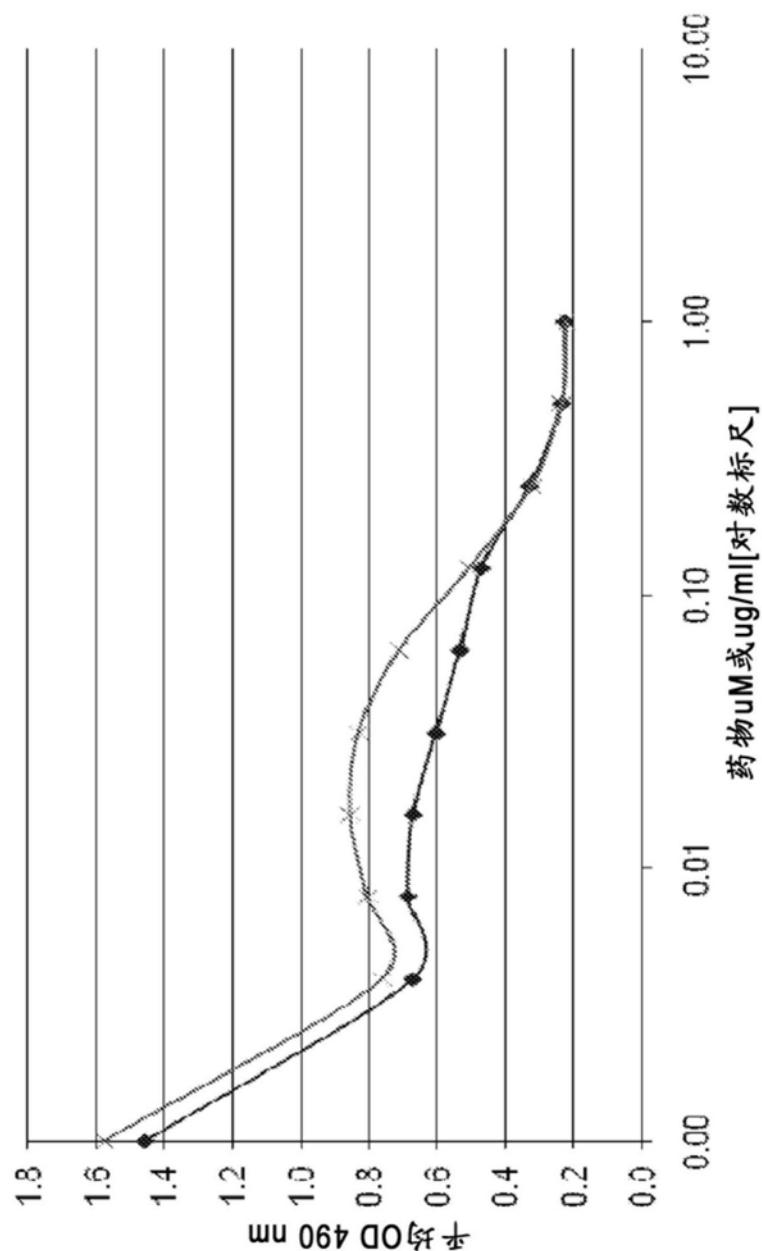
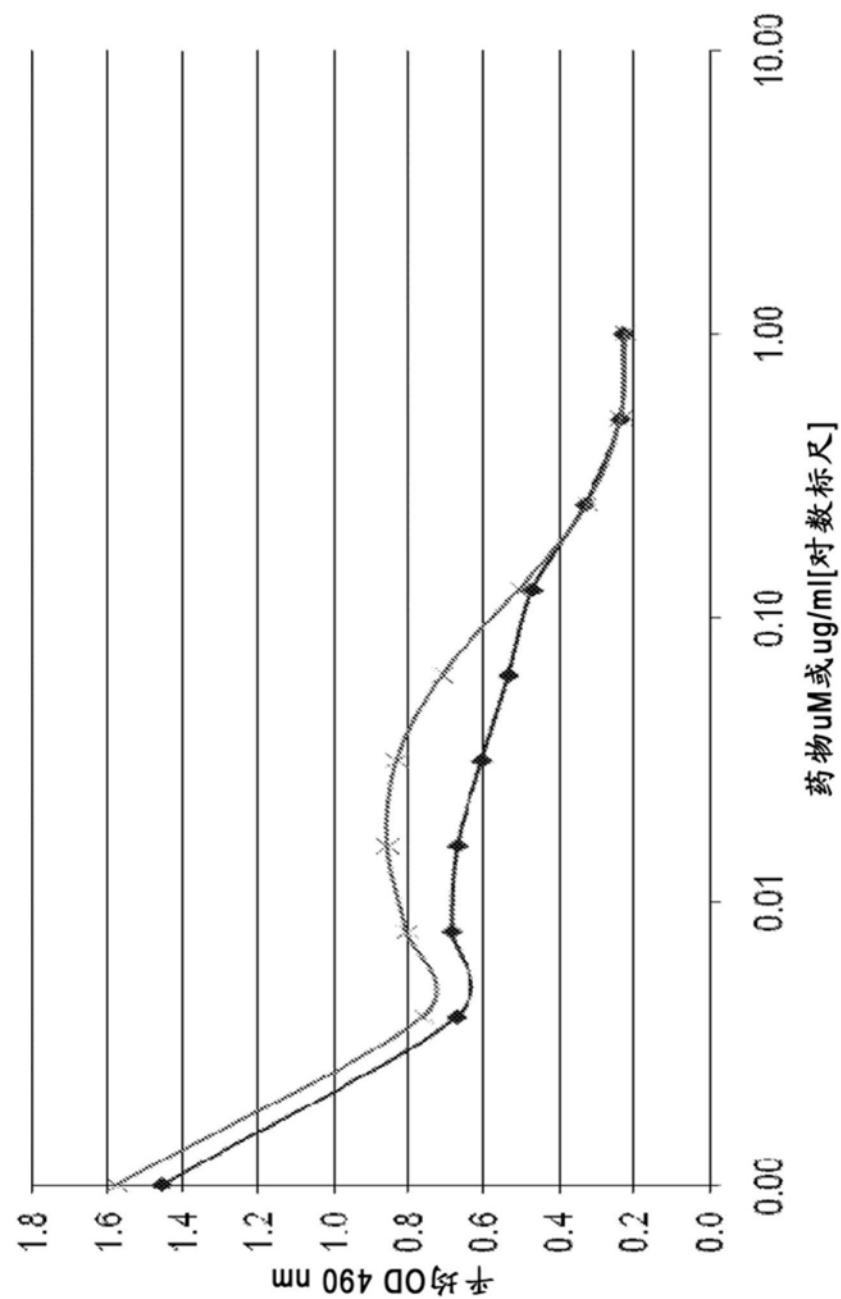


图7







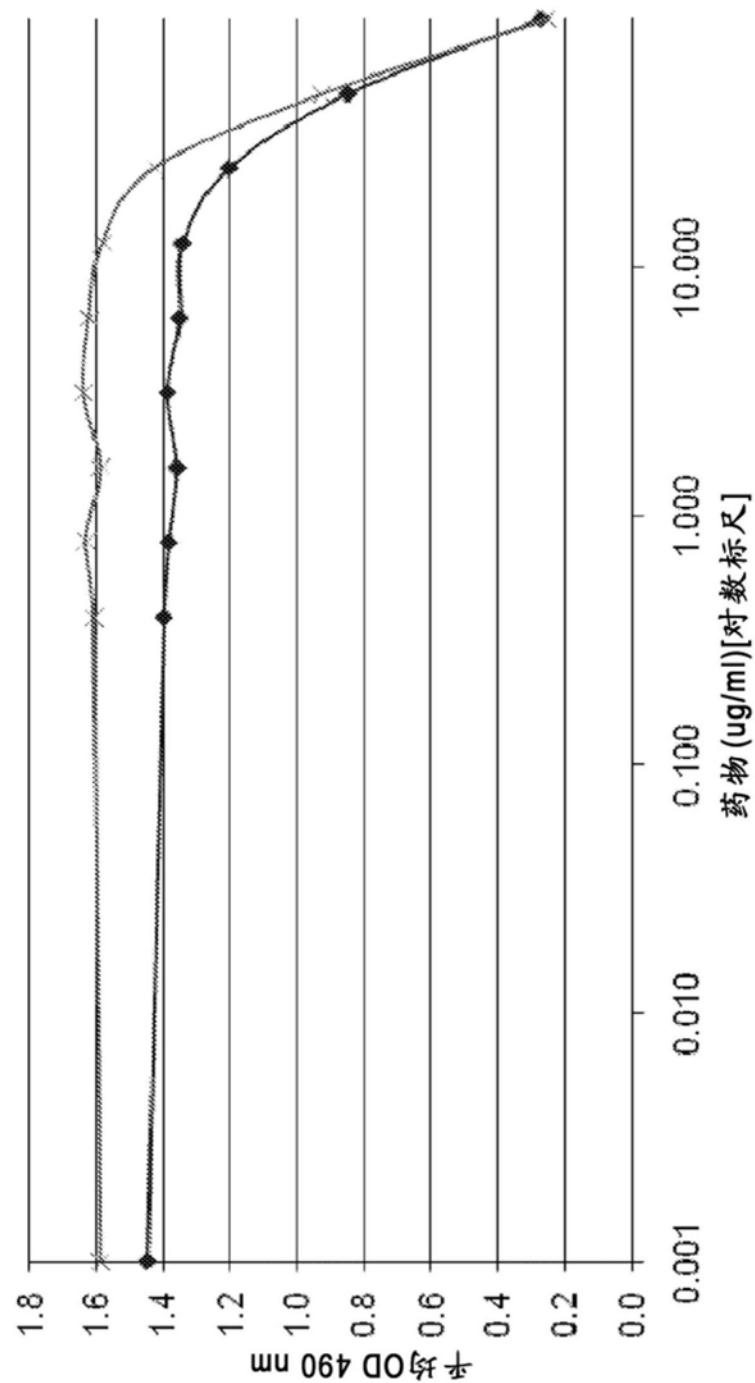


图11

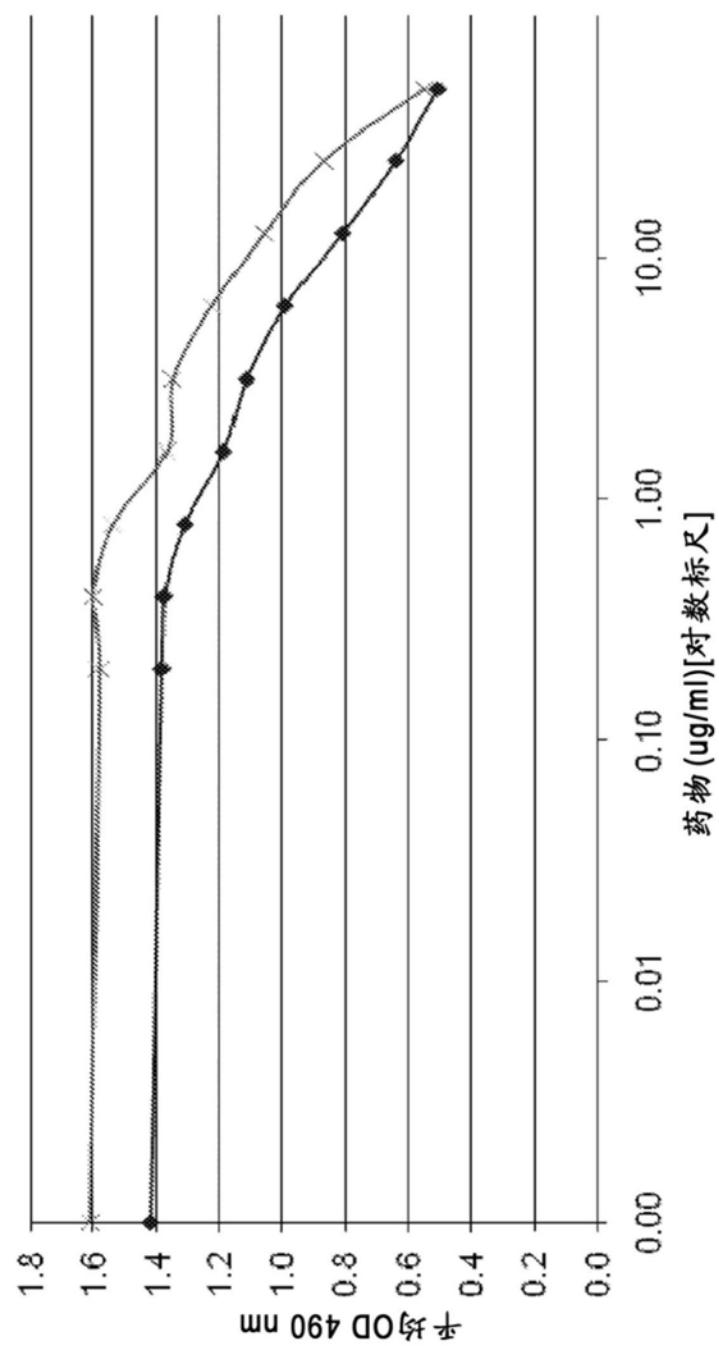


图12

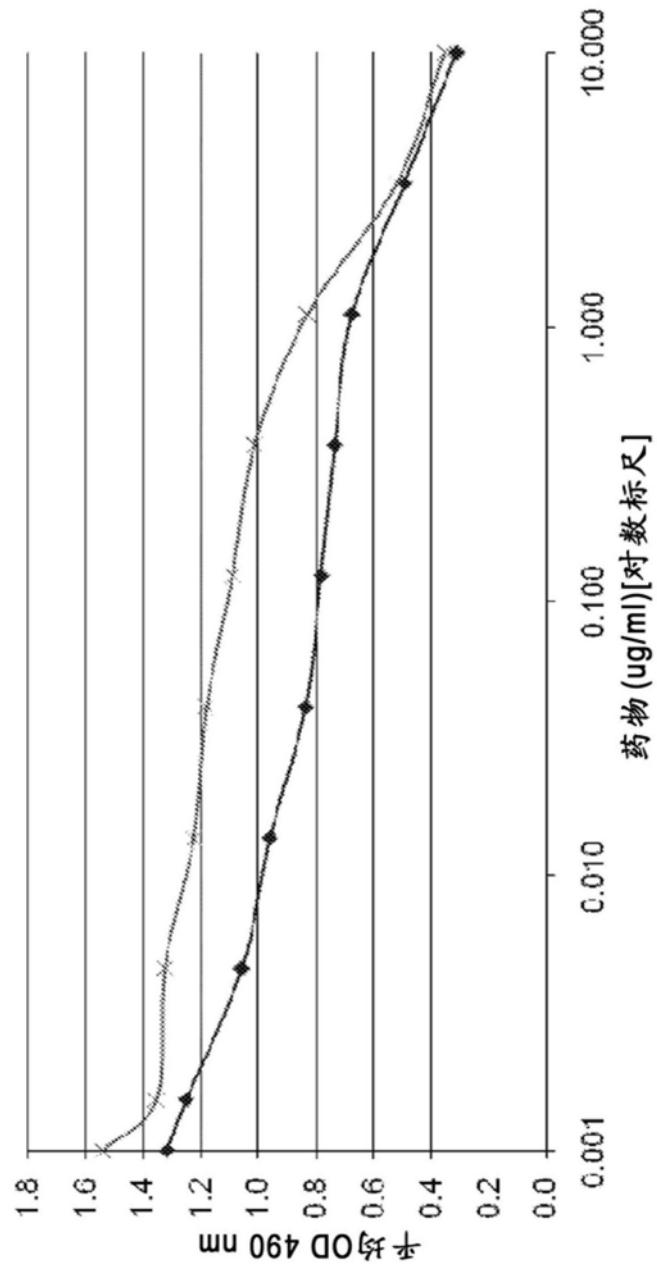


图13

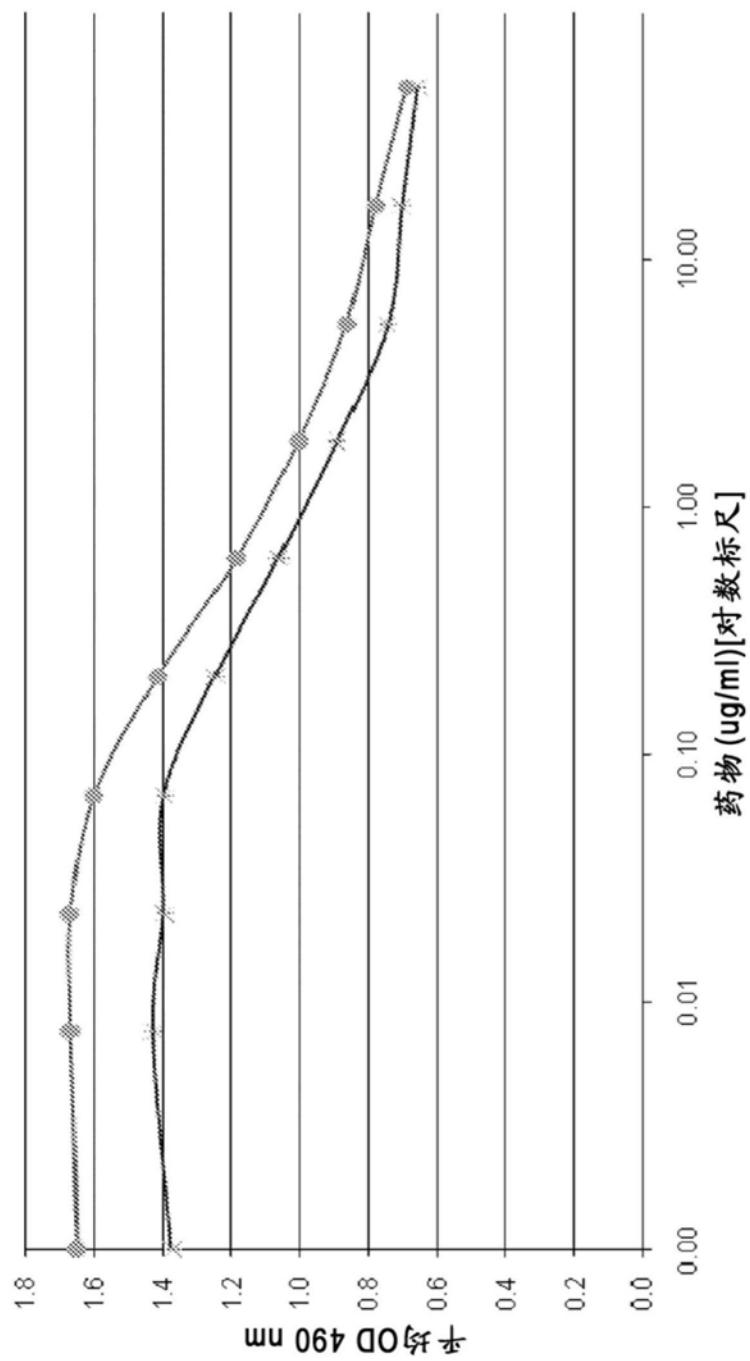


图14

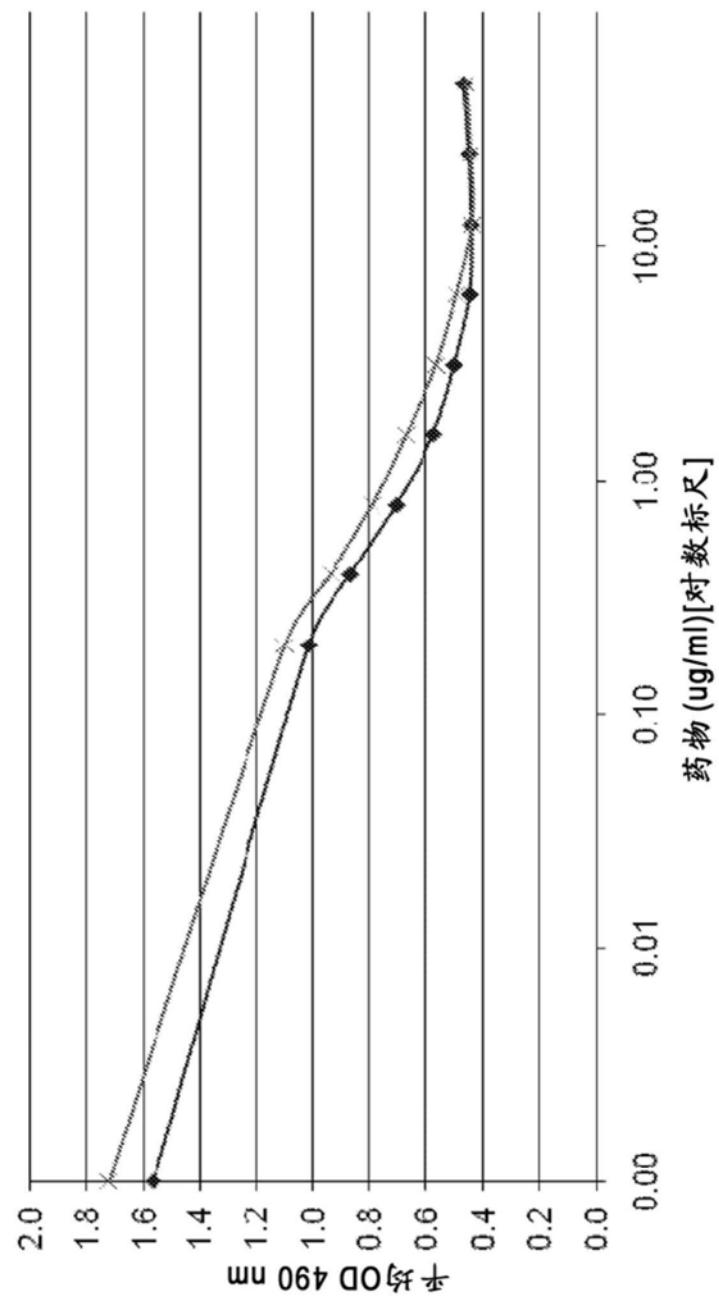


图15

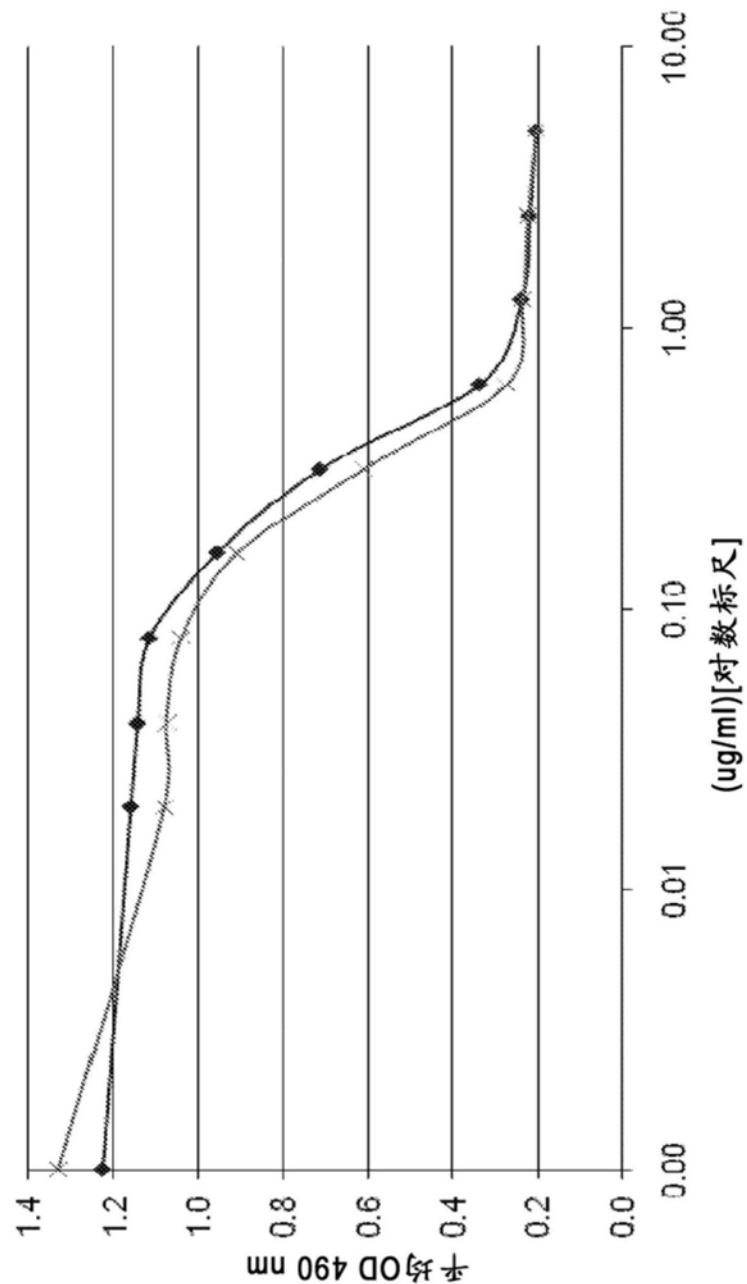
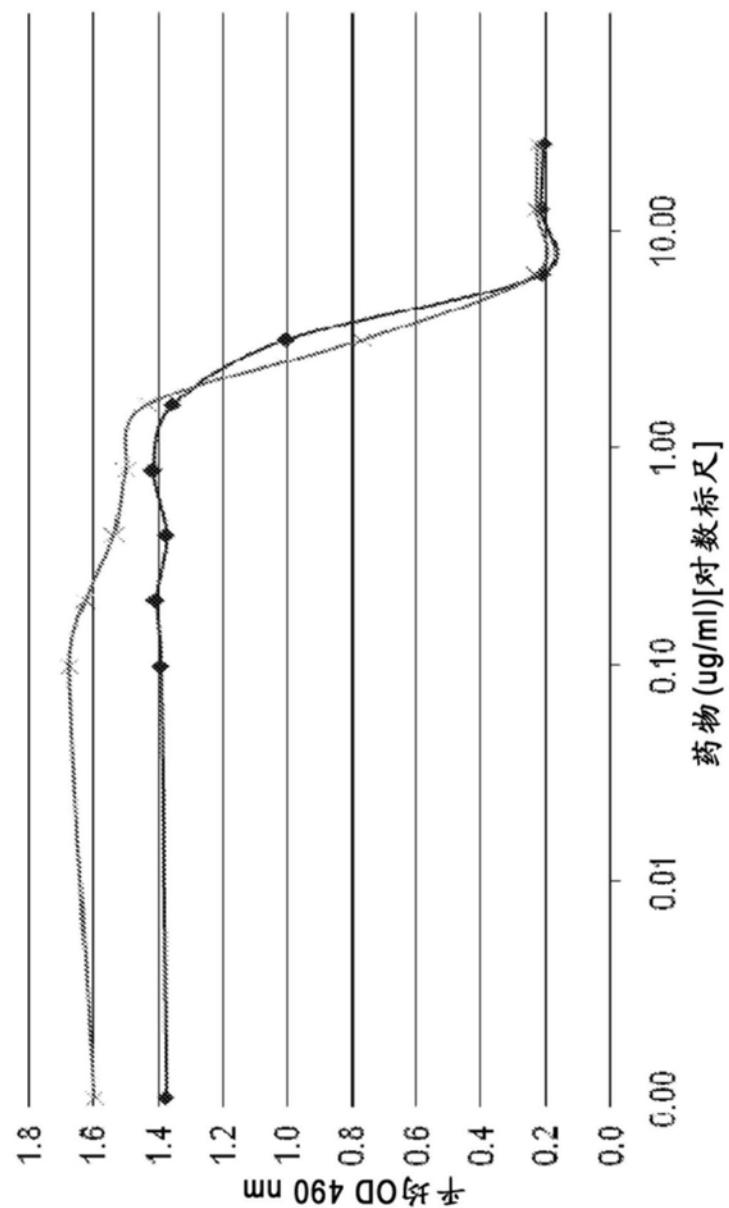


图16



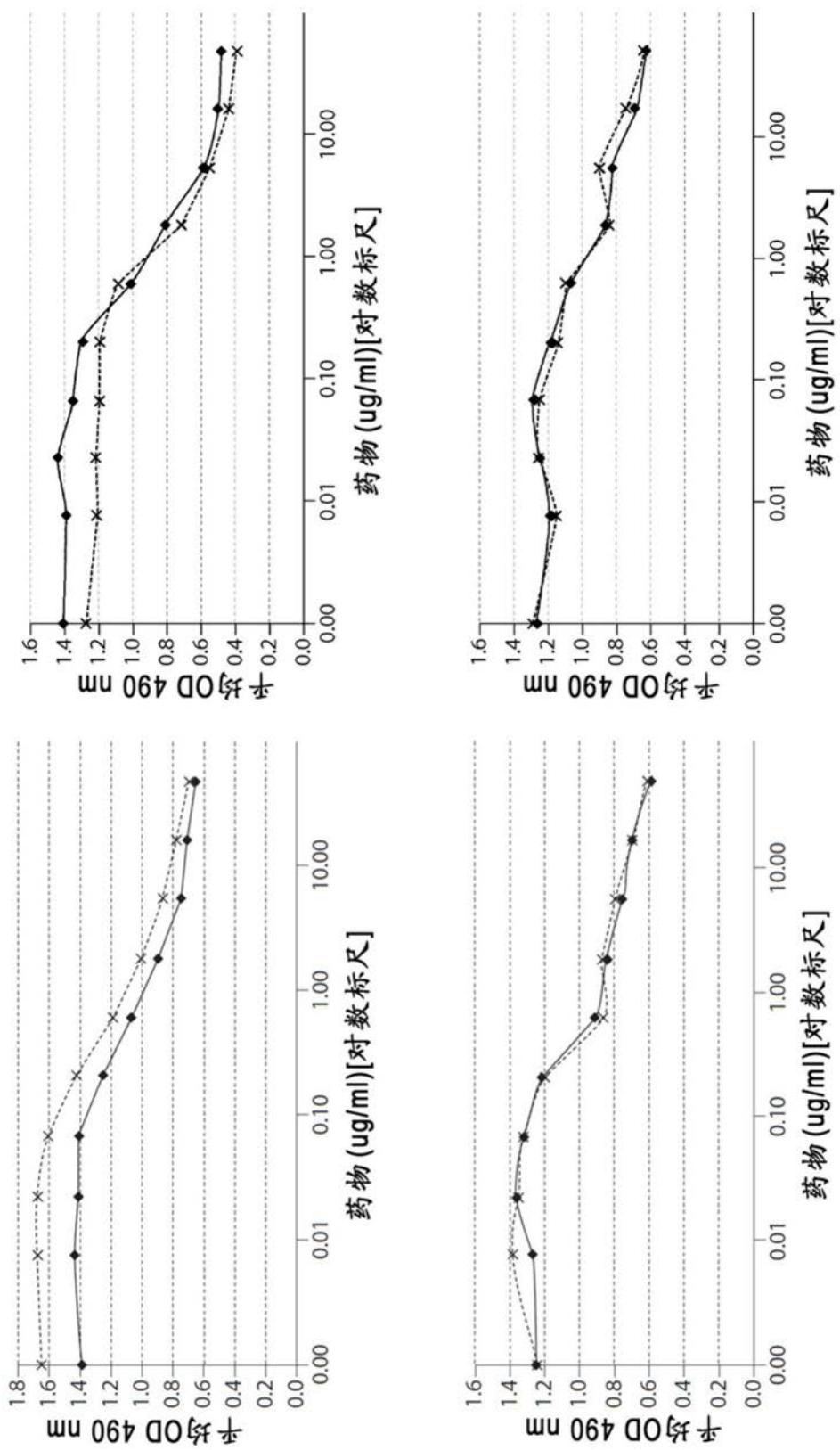


图18

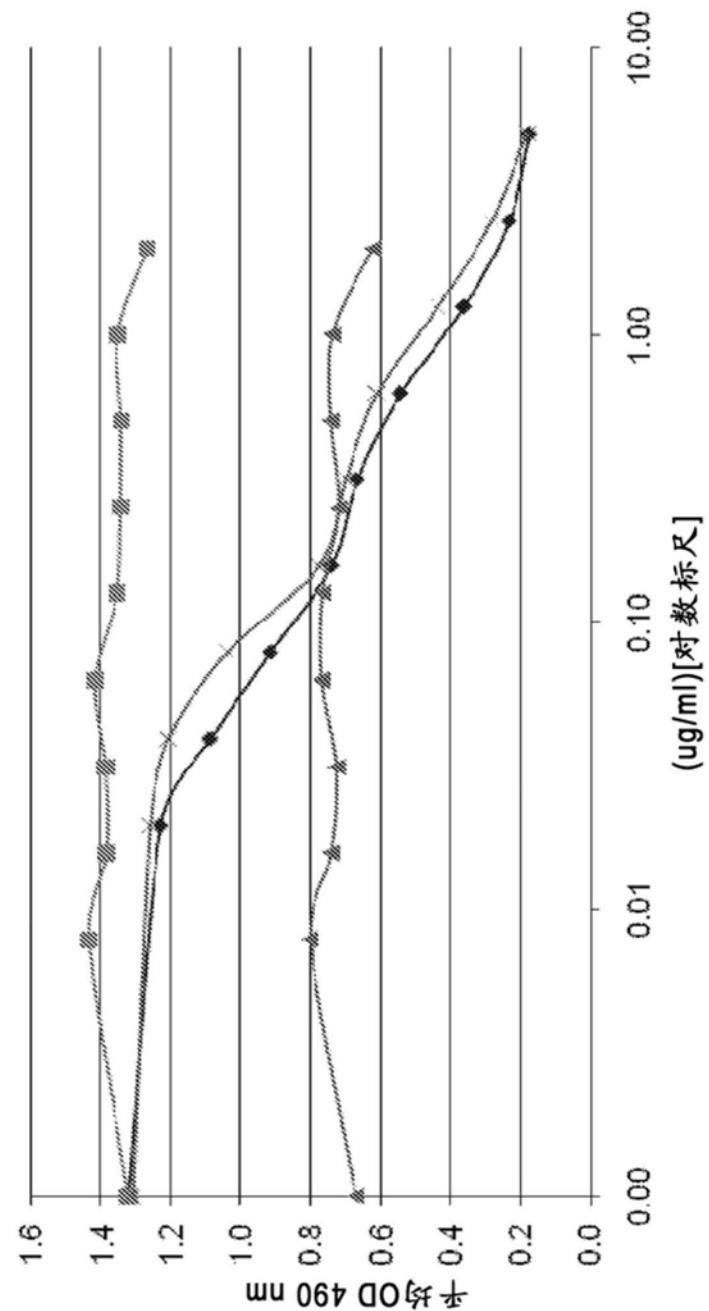


图19

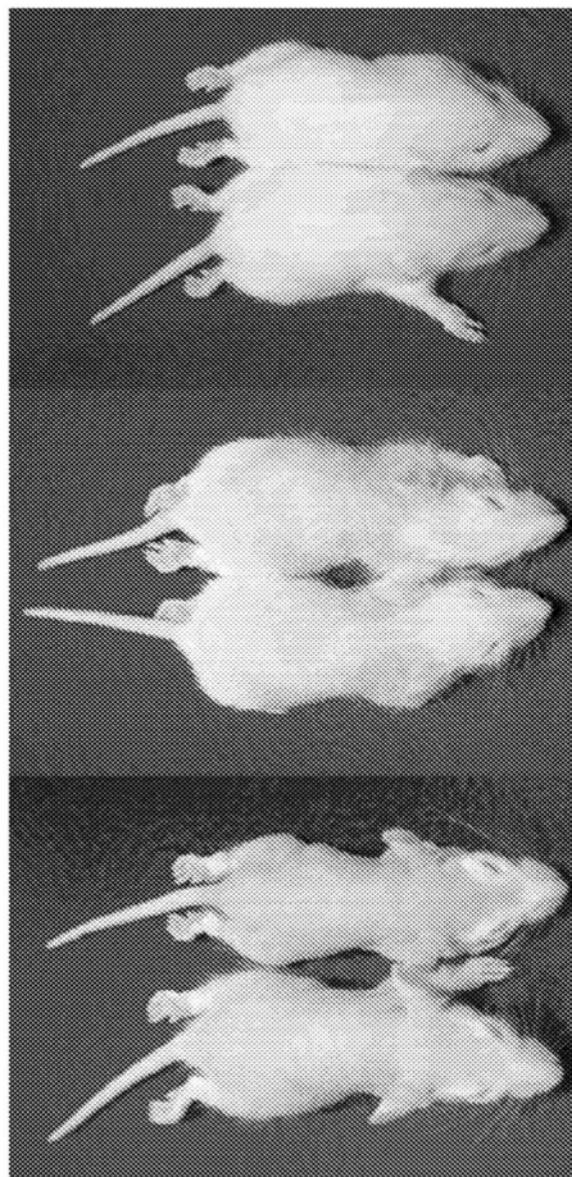


图20A

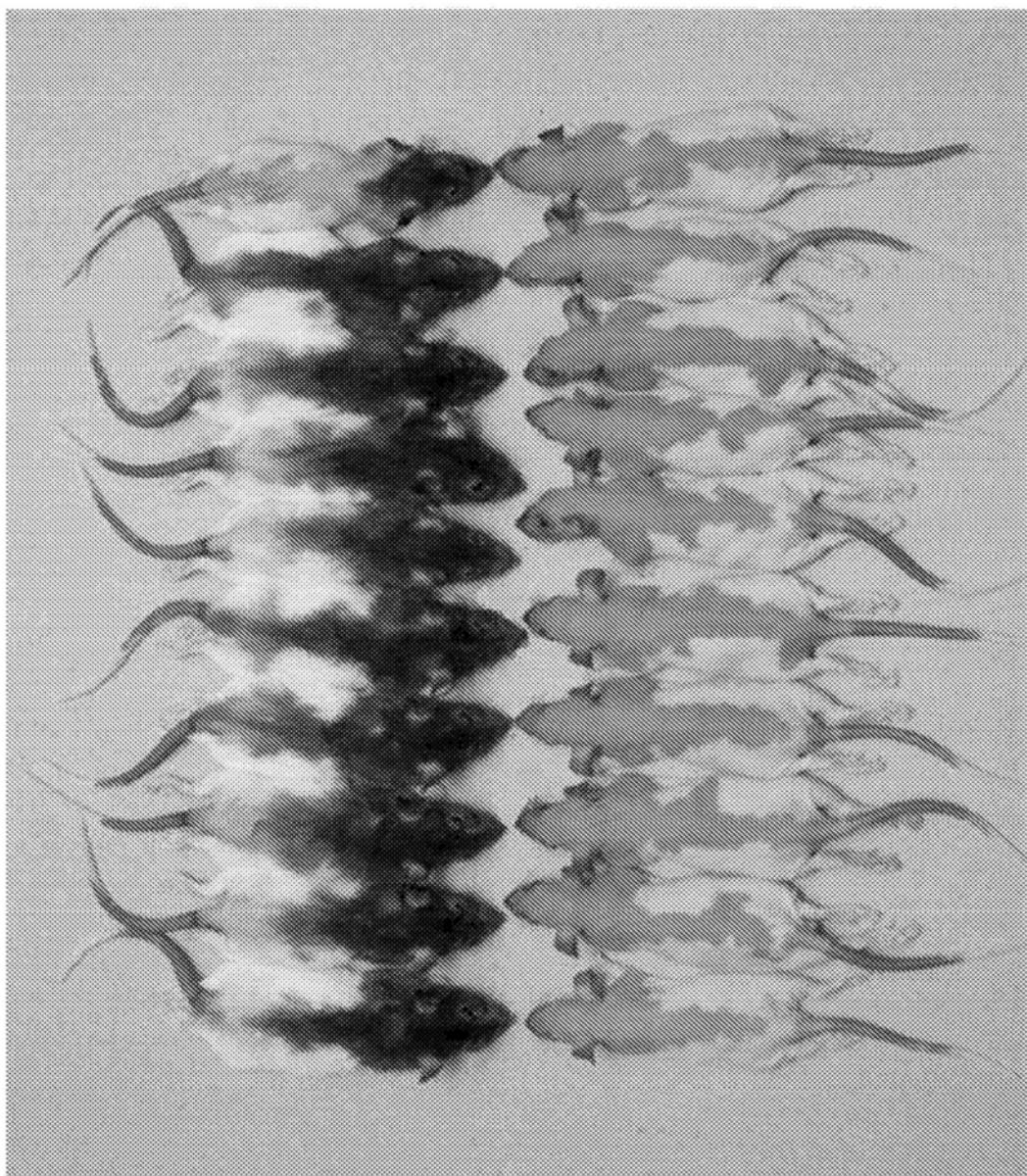


图20B

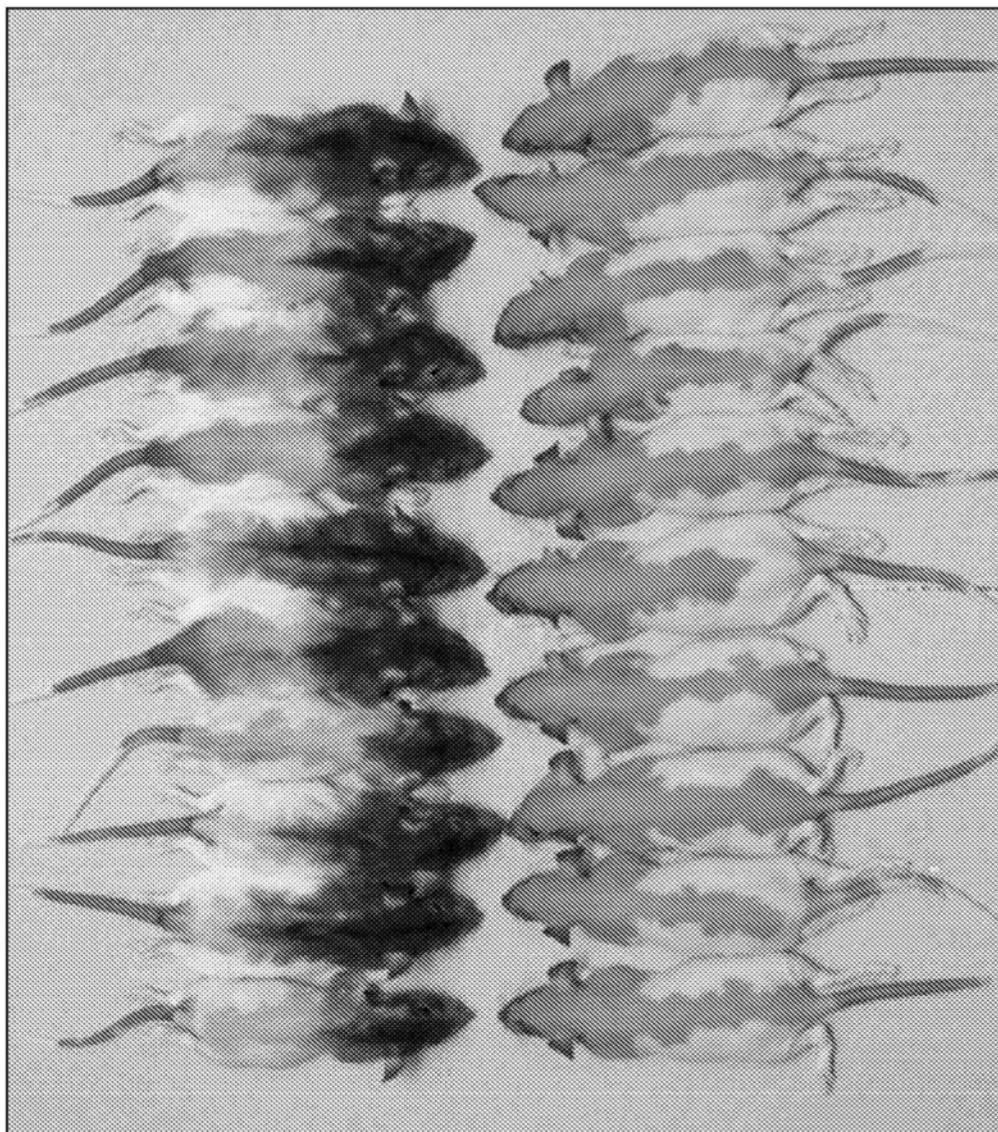


图21

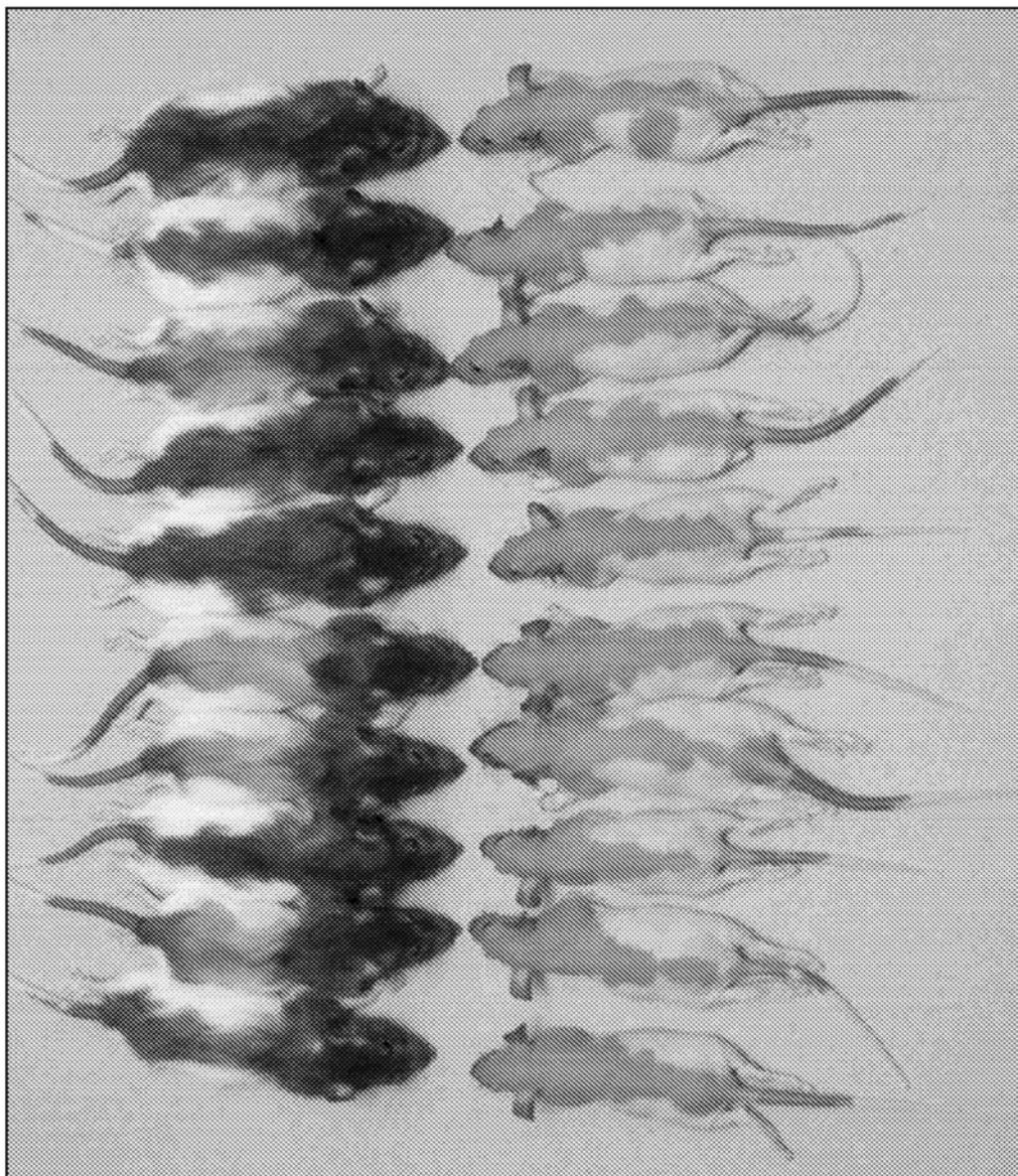


图22A

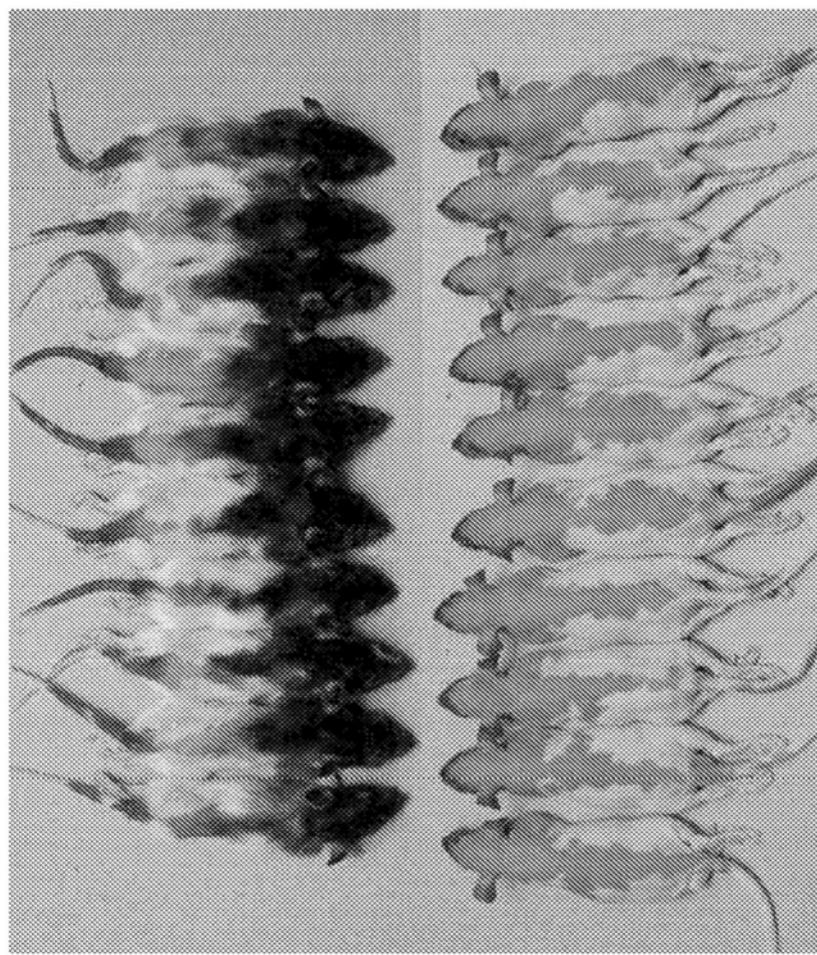


图22B

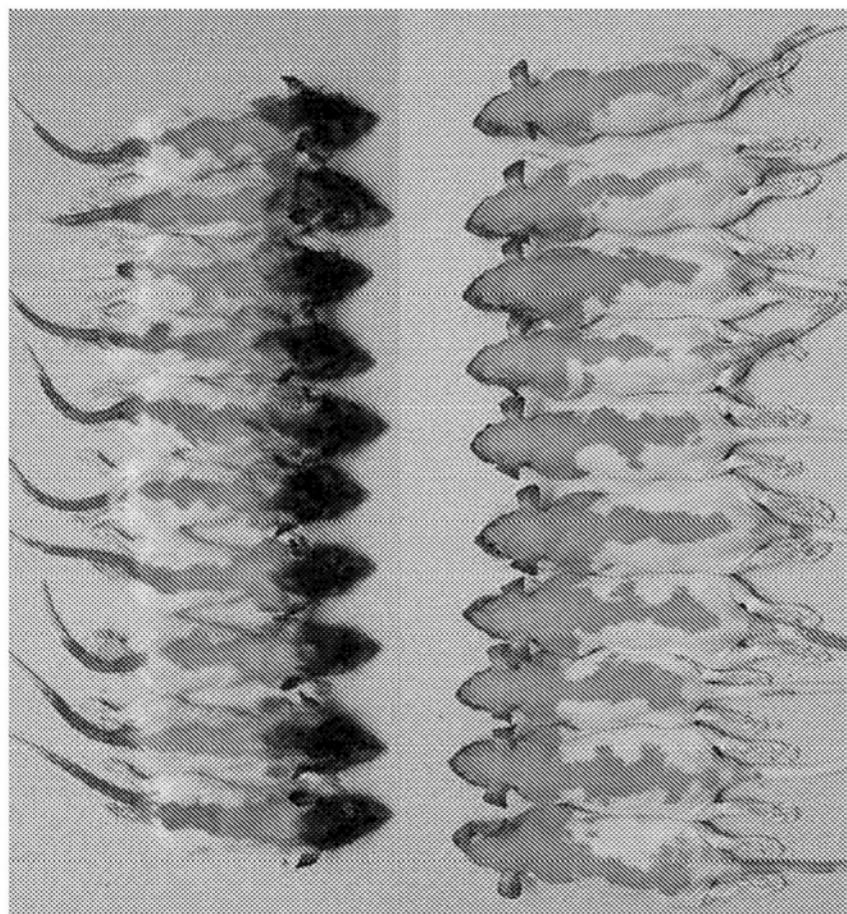


图22C

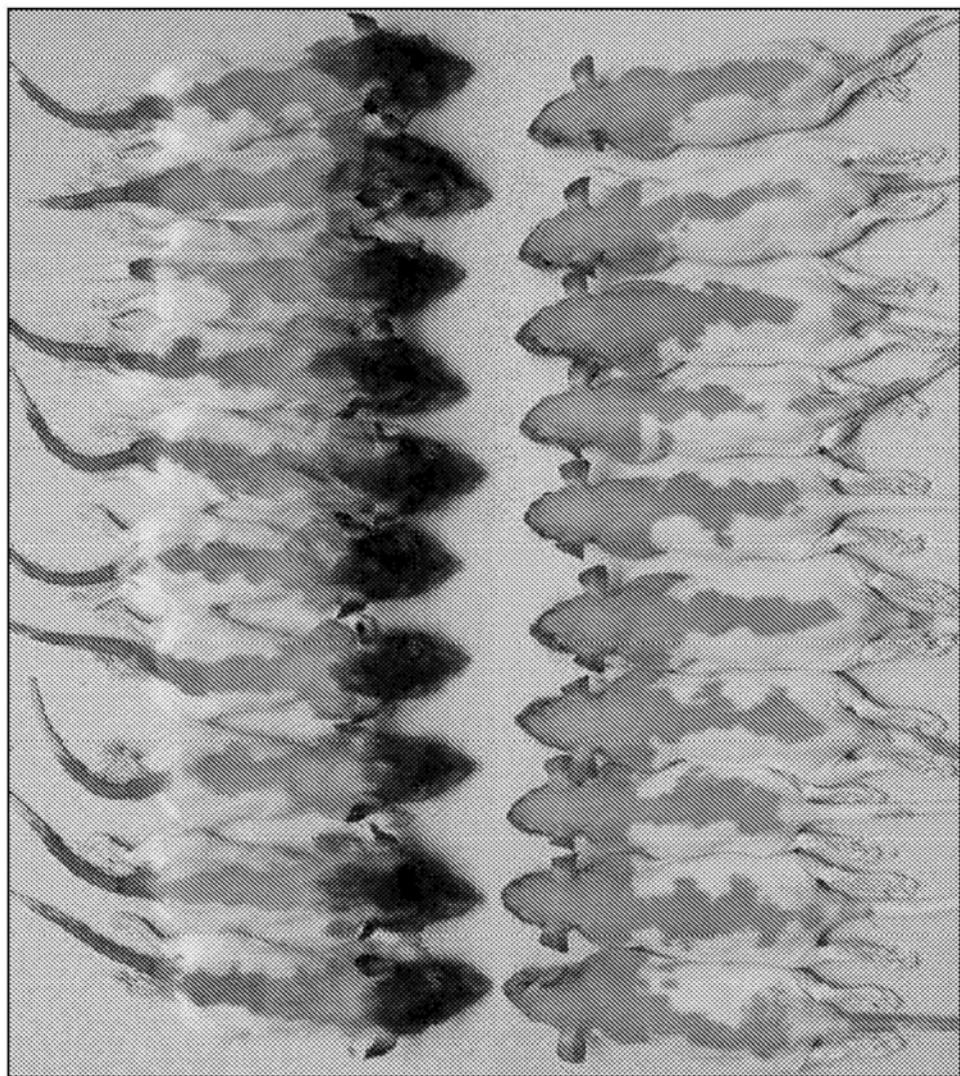


图23

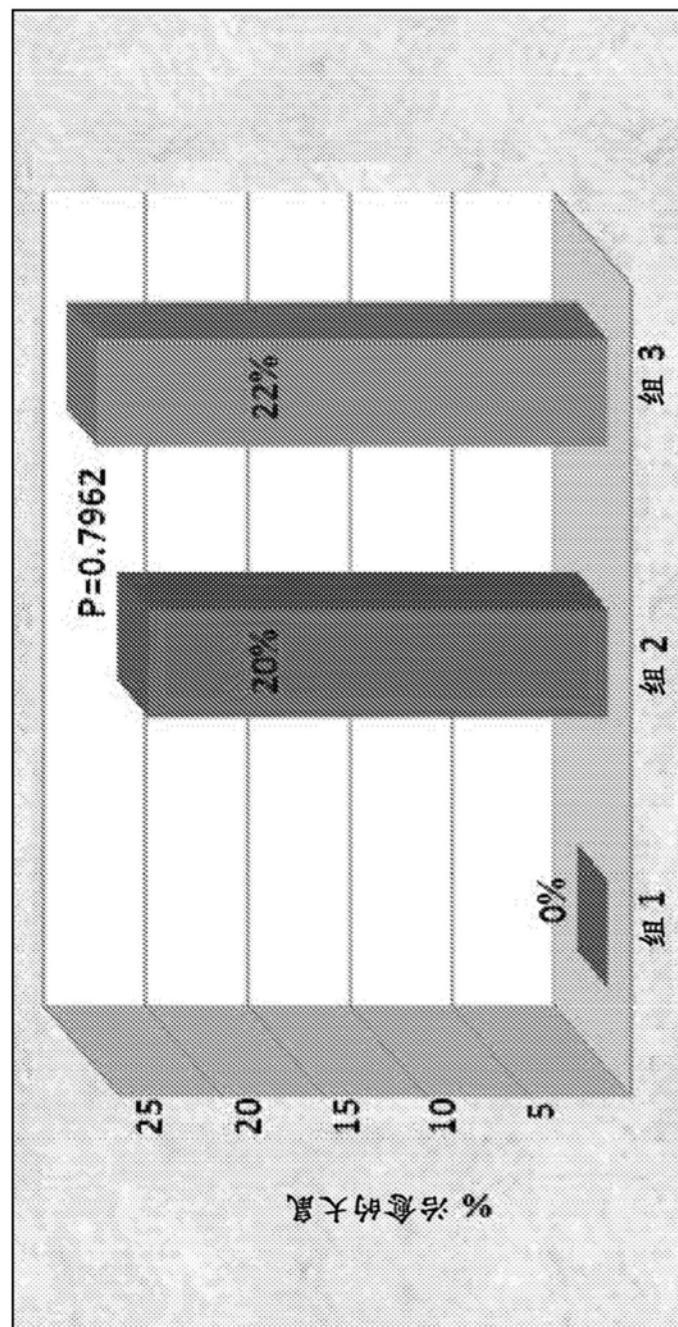


图24

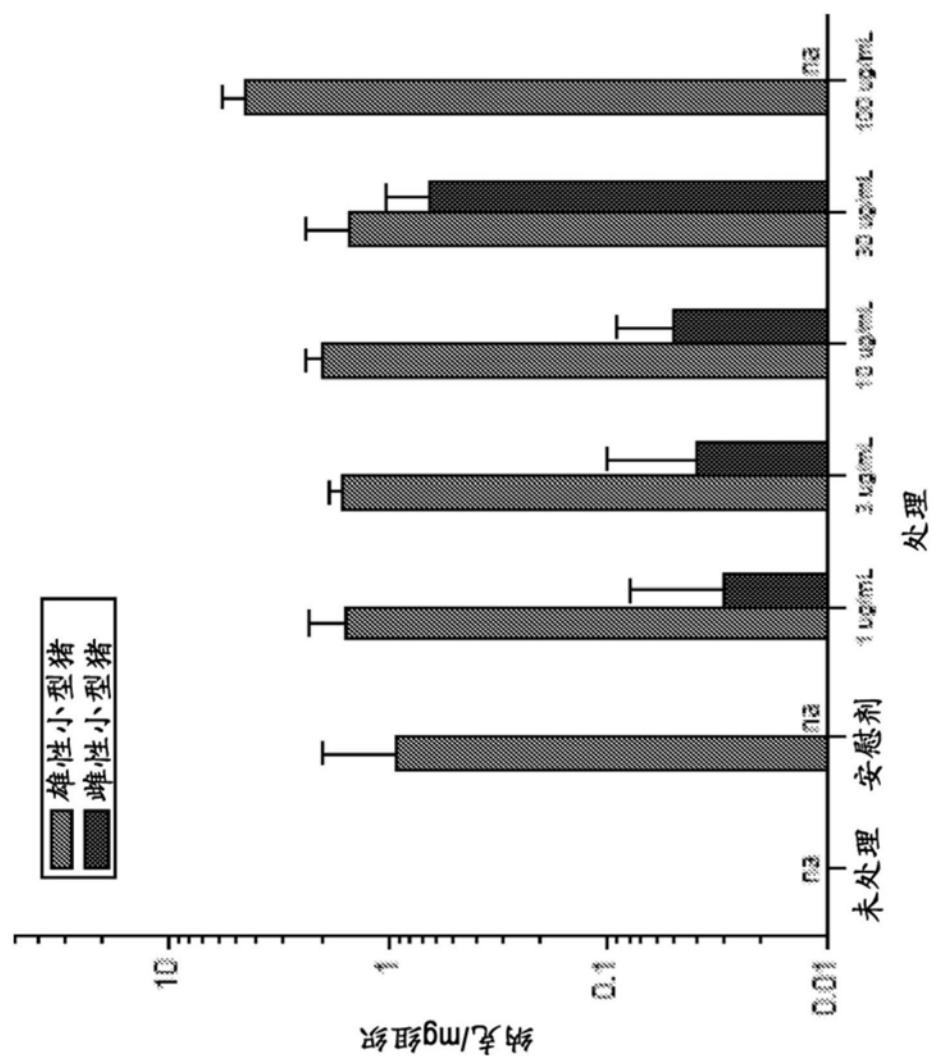
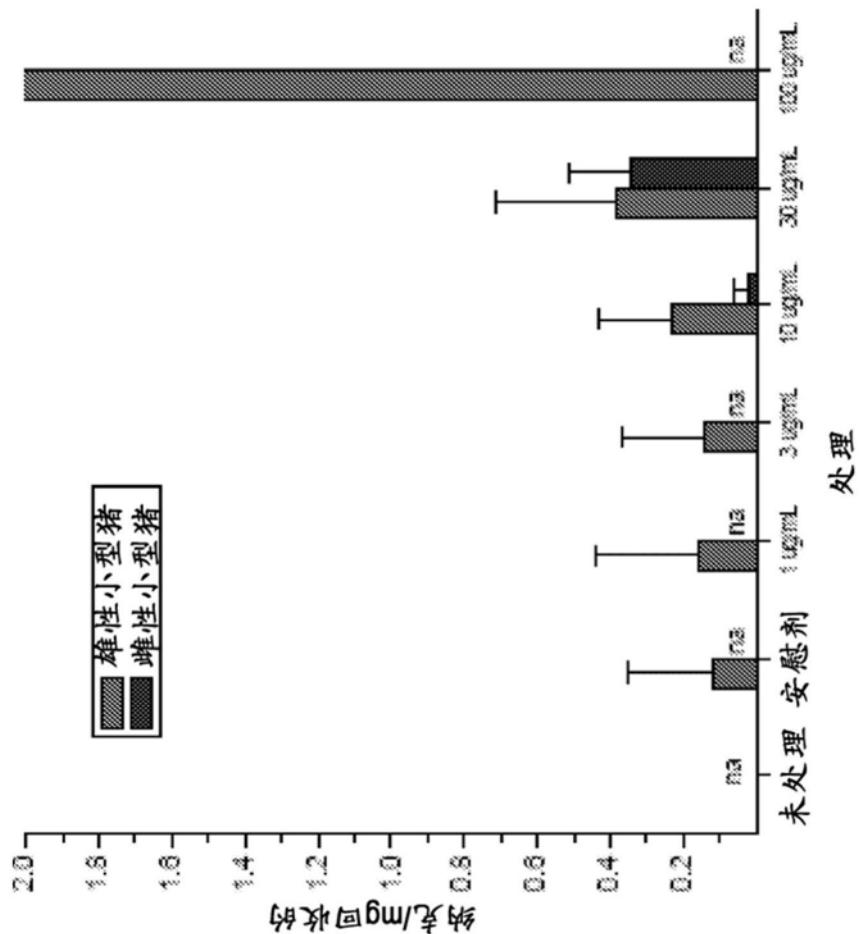
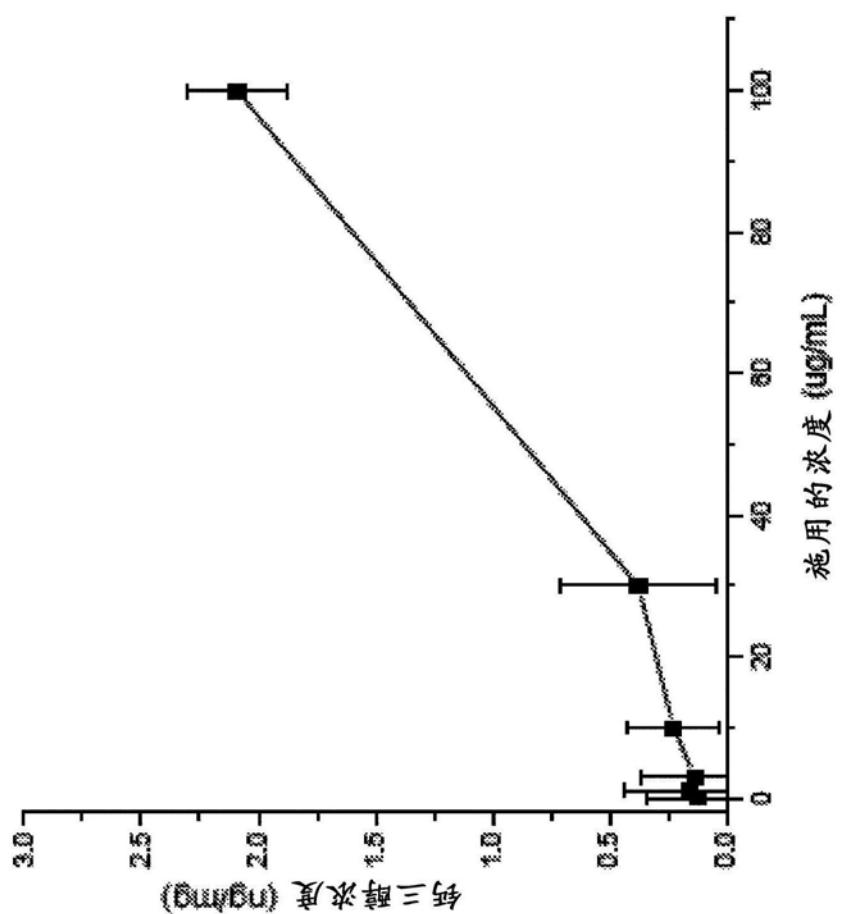


图25A





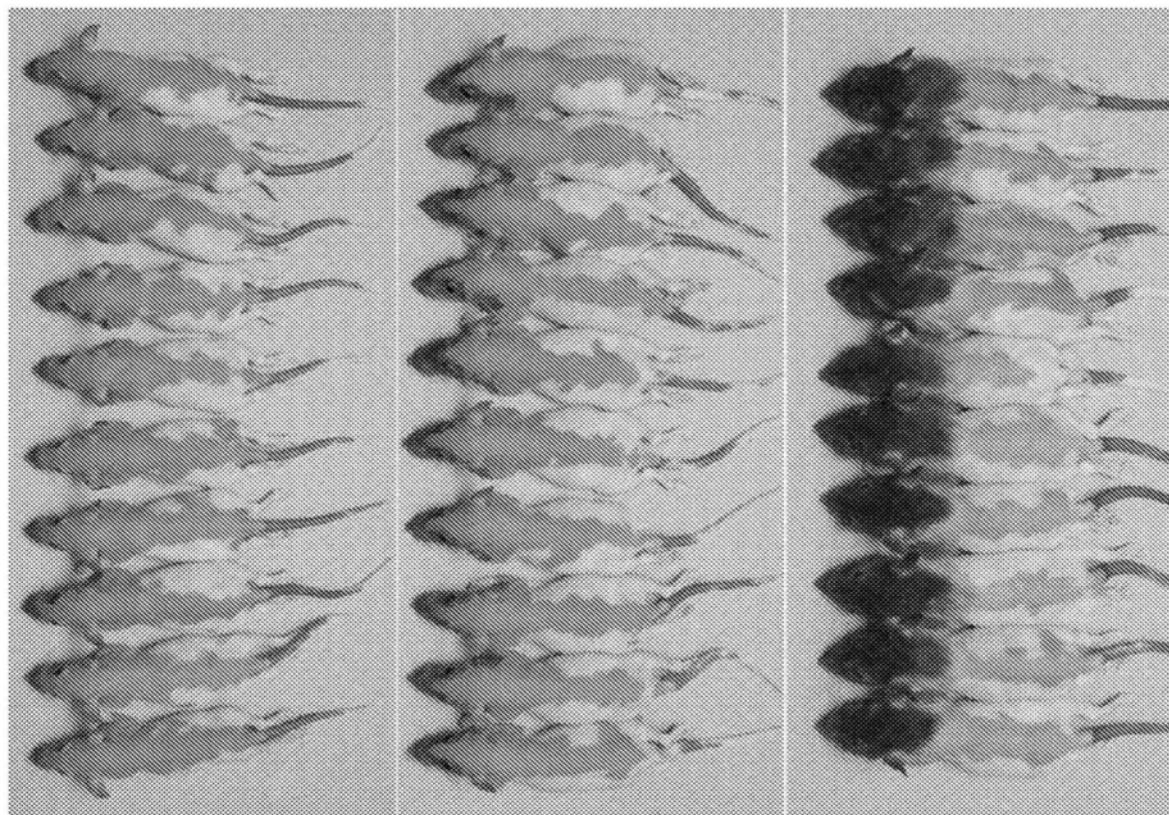


图27

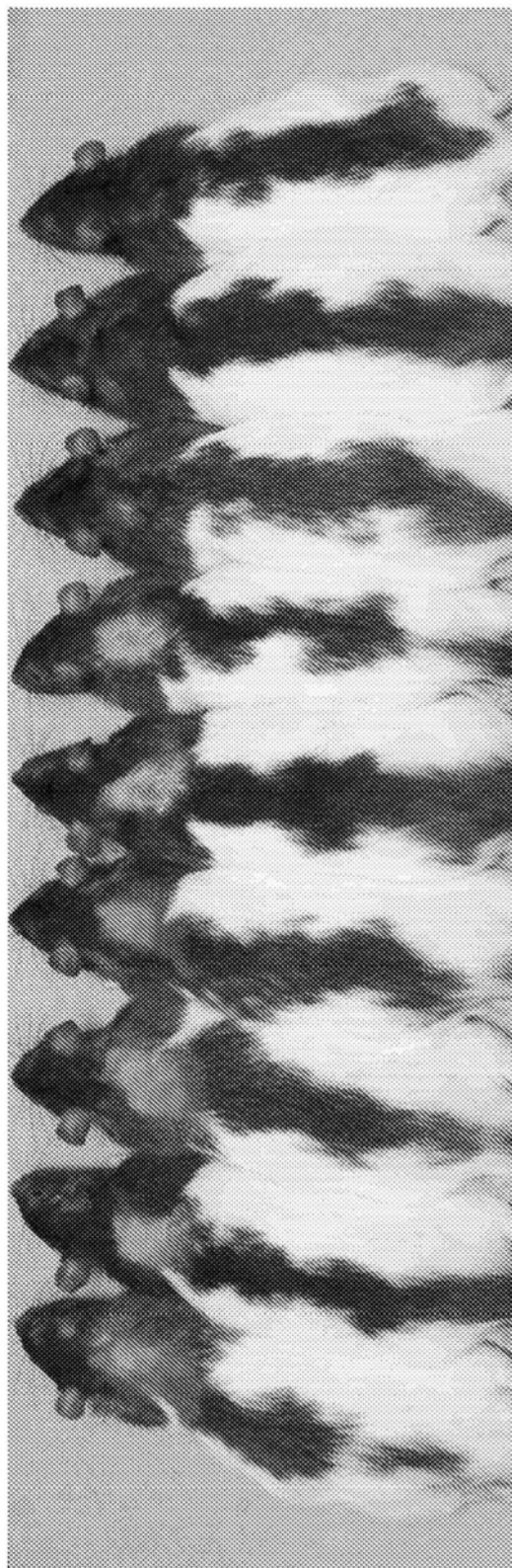
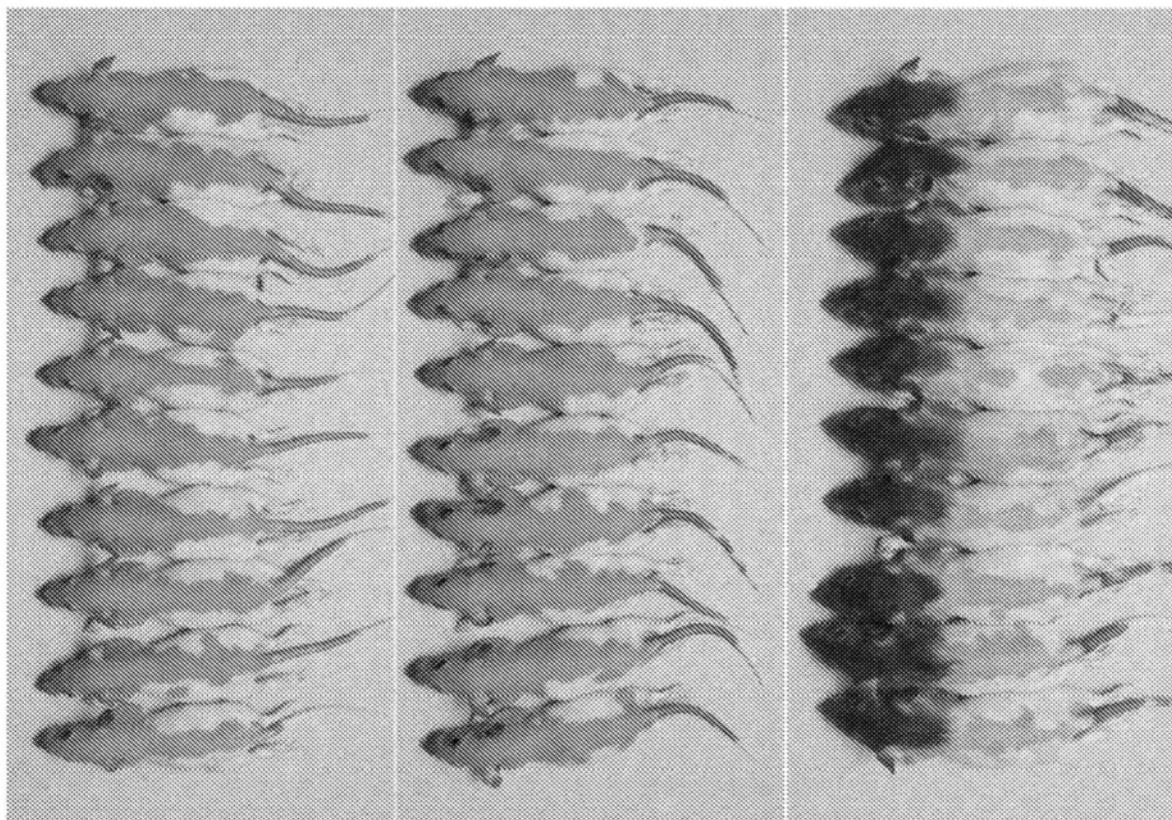


图28



A

B

C

图29

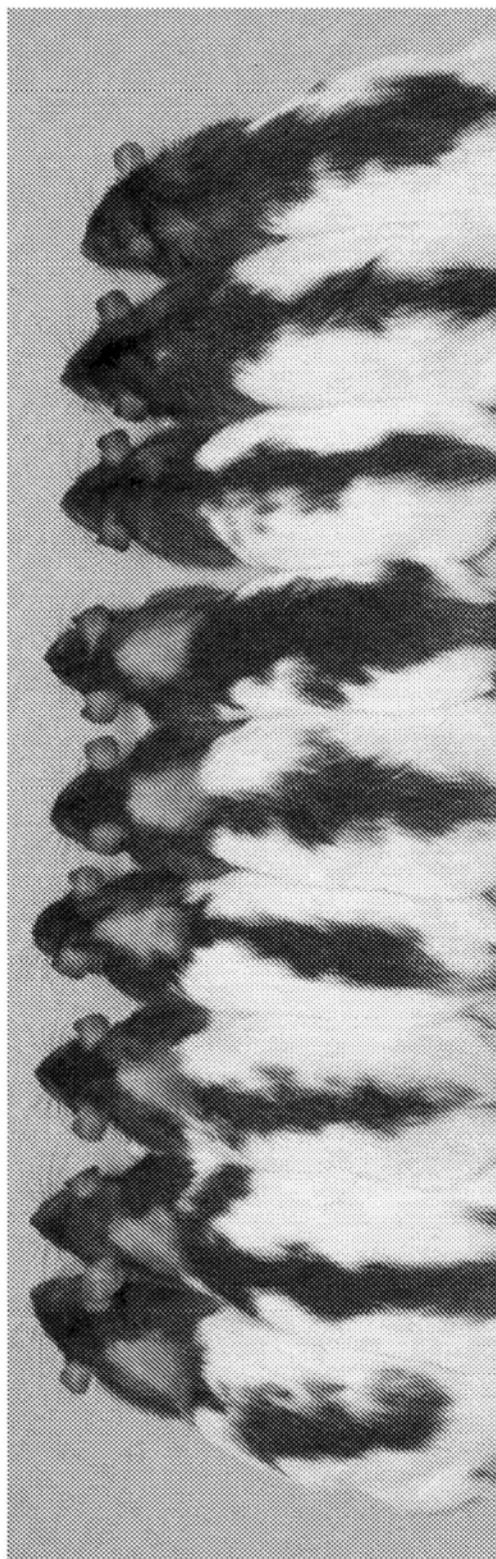
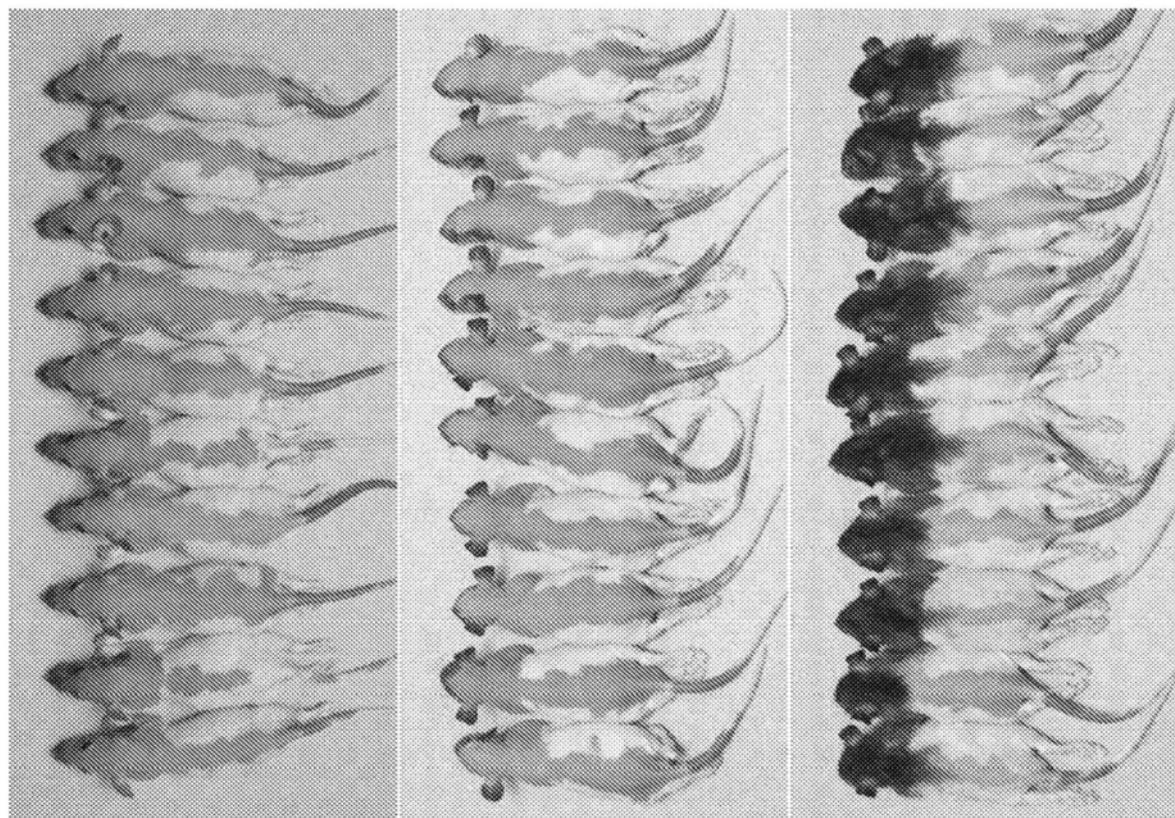


图30



A

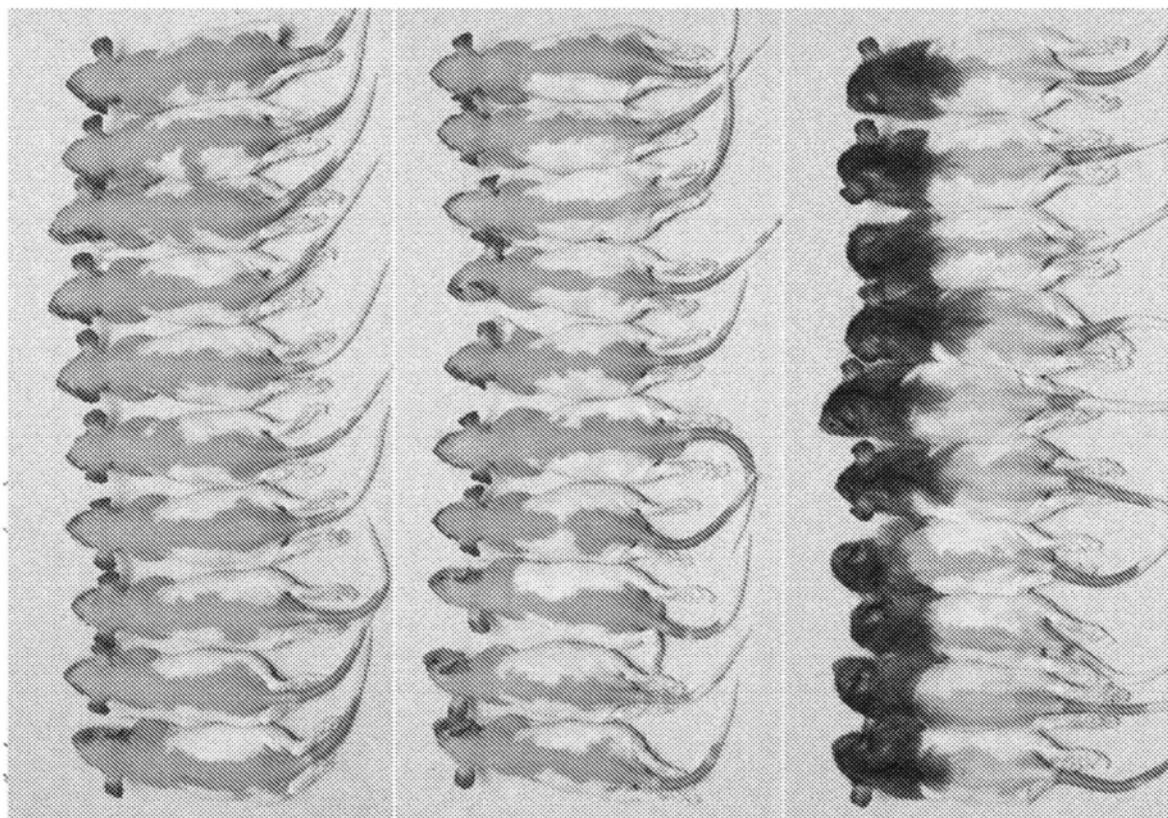
B

C

图31



图32



A

B

C

图33

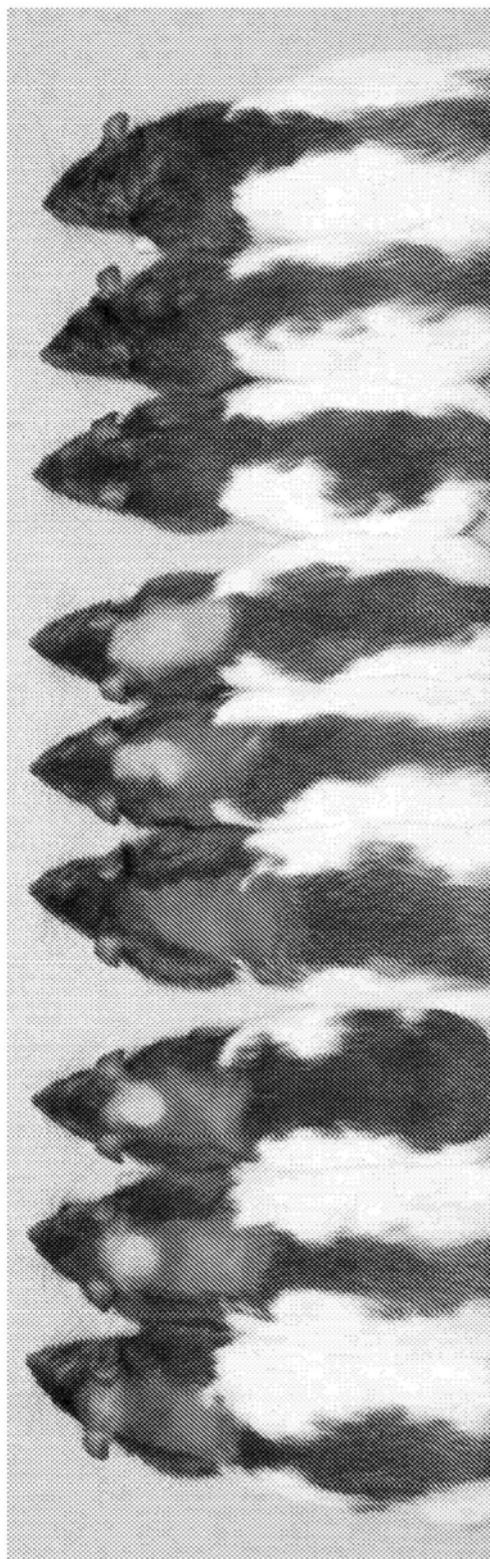
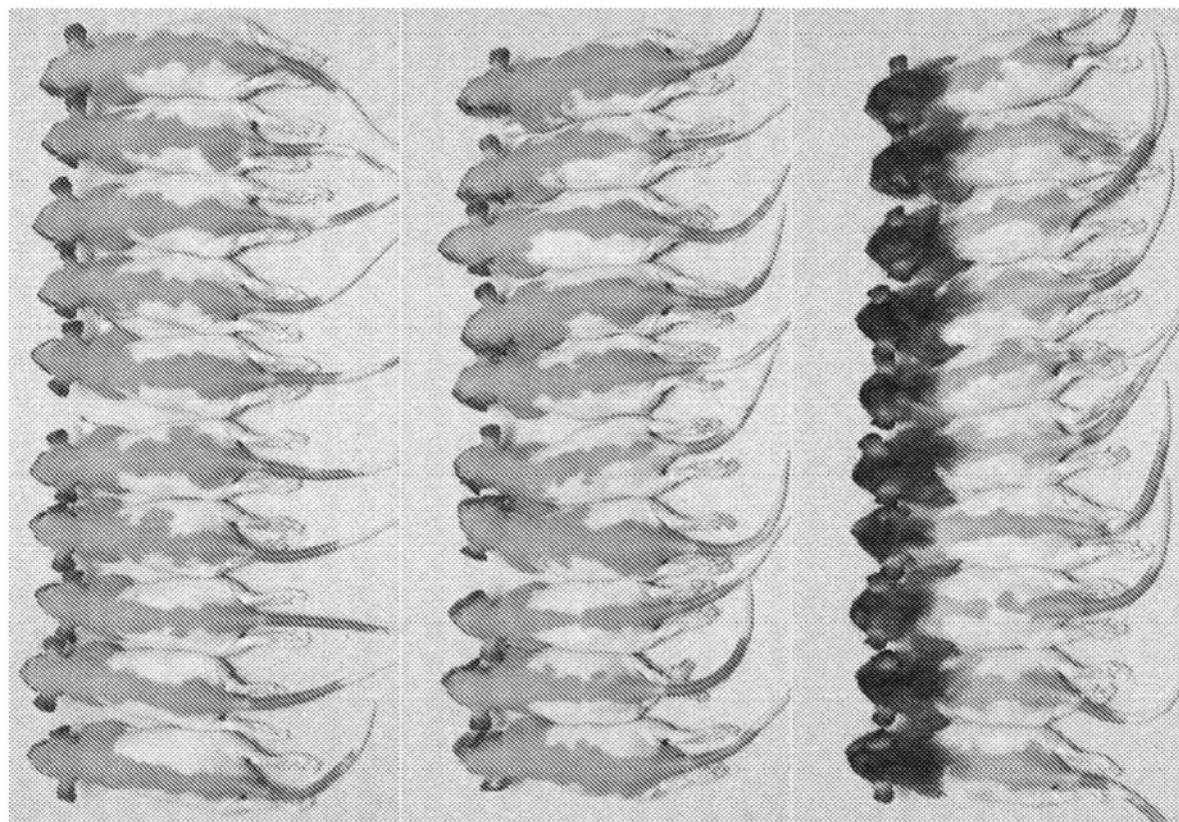


图34



A

B

C

图35

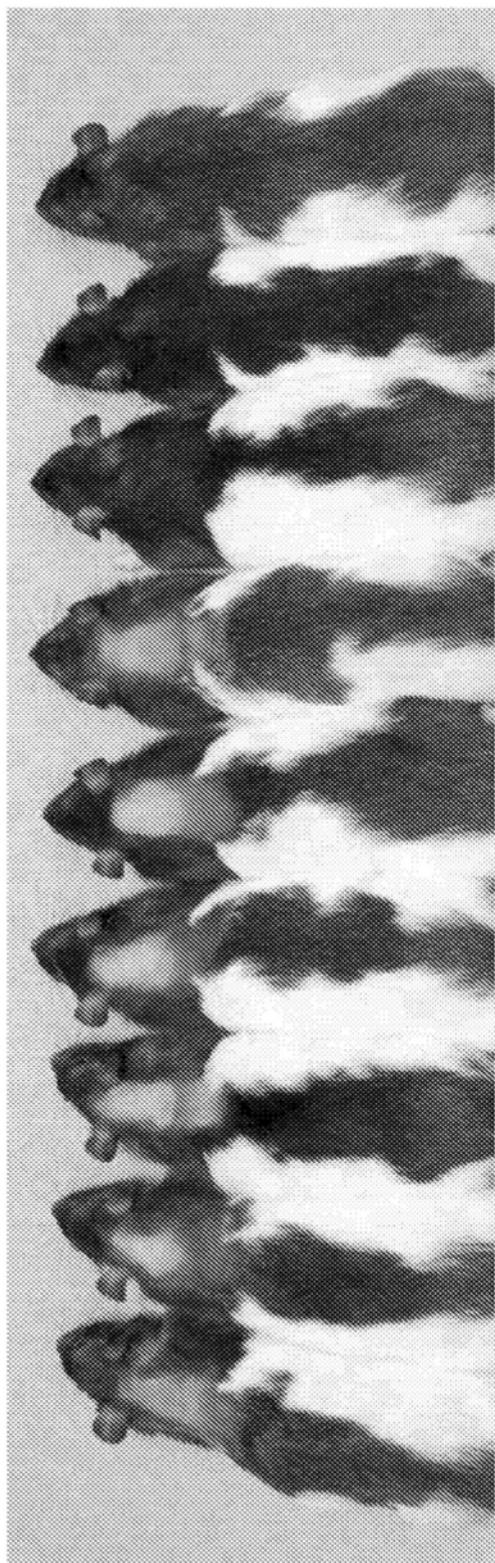


图36