



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107592811 A

(43)申请公布日 2018.01.16

(21)申请号 201680010849.4

U·伦贝格尔 M·特曼斯

(22)申请日 2016.01.27

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

(30)优先权数据

代理人 江侧燕

15152665.4 2015.01.27 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2017.08.17

A61K 31/5585(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/5578(2006.01)

PCT/EP2016/051675 2016.01.27

A61K 31/5575(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61K 31/192(2006.01)

W02016/120311 EN 2016.08.04

A61P 1/16(2006.01)

(71)申请人 塞法姆公司

地址 卢森堡卢森堡市

(72)发明人 M·弗赖斯穆特

E-M·泽贝丁-布兰德尔

Z·卡齐米 C·奥斯特赖歇尔

权利要求书1页 说明书13页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗肝静脉闭塞病的组合物

(57)摘要

本发明提供一种组合物,其包含前列环素类似物、衍生物或其药学上可接受的盐,用于预防或治疗窦性阻塞综合症和/或肝静脉闭塞病(VOD)及其治疗方案。

1. 包含前列环素类似物、衍生物或其药学上可接受的盐的组合物,所述组合物用于预防或治疗窦性阻塞综合症和/或肝静脉闭塞病(VOD)。

2. 根据权利要求1使用的组合物,其中所述前列环素类似物选自由曲前列环素、伊洛前列素、西卡前列素或贝前列素、其衍生物或药学上可接受的盐组成的组。

3. 根据权利要求1或2使用的组合物,其中所述衍生物选自由曲前列环素的酸衍生物、曲前列环素的前药、曲前列环素的缓释形式、曲前列环素的吸入形式、曲前列环素的口服形式、曲前列环素的多晶型物或曲前列环素的异构体组成的组。

4. 根据权利要求1-3中任一项使用的组合物,所述组合物用于全身给药,优选通过静脉内或皮下输注。

5. 根据权利要求1-3中任一项使用的组合物,所述组合物用于局部给药,优选用于吸入。

6. 根据权利要求1-3中任一项使用的组合物,其中所述组合物为口服可用的形式,选自由片剂或胶囊组成的组。

7. 根据权利要求1-6中任一项使用的组合物,其中曲前列环素或其衍生物或其药学上可接受的盐以0.1ng/kg/min-100ng/kg/min范围的有效量给药。

8. 根据权利要求1-7中任一项使用的组合物,其中以改善患者的肝功能和/或使凝血时间正常化的剂量将曲前列环素施用于具有VOD风险或患有VOD的患者。

9. 根据权利要求1-8中任一项使用的组合物,其中将所述组合物施用于患有轻度至中度VOD的患者。

10. 根据权利要求1-9中任一项使用的组合物,其中将所述组合物施用于具有VOD风险的患者,优选在用化疗剂、放射、抗CD33靶向免疫毒素或造血干细胞(HES)移植治疗后。

11. 根据权利要求10使用的组合物,其中所述患者患有骨髓疾病,优选进行HES移植的患者。

12. 根据权利要求1-11中任一项使用的组合物,其中用所述组合物连续地治疗患者至少1个月的时间,优选至少2个月,更优选至少3个月。

13. 根据权利要求12使用的组合物,其中以0.1-10mg日剂量的曲前列环素治疗所述患者,优选通过连续皮下输注。

14. 用于预防或治疗窦性阻塞综合症和/或肝静脉闭塞病(VOD)的方法,通过向主体施用包含前列环素类似物或其衍生物或其药学上可接受的盐的组合物。

用于治疗肝静脉闭塞病的组合物

技术领域

[0001] 本发明提供了包含前列环素或前列环素类似物或其药学上可接受的盐的组合物，用于预防或治疗窦性阻塞综合症和/或肝静脉闭塞病(VOD)。

背景技术

[0002] 造血细胞移植(HCT)的肝并发症已经成为发病和死亡的常见原因。肝静脉闭塞病(VOD)是在同种异体/自体干细胞移植(SCT)中使用的强化化疗方案的危及生命的并发症。如果化疗和/或骨髓移植导致VOD发生,则通常使用名称窦性阻塞综合症。

[0003] VOD通常在SCT+35天后发作。VOD是器官损伤综合症的一部分,发生在大剂量化疗后,无论有无放射和SCT,包括特发性肺炎、弥漫性肺泡出血、血栓性微血管病和毛细血管渗漏综合症(Wadleigh M.等人,2003,Curr.Opin.Hematol.10,451-462)。

[0004] 多系统器官功能衰竭(MOF)导致的重度VOD仍然是几乎都是致命的。临床综合症的特征在于疼痛性肝肿大、黄疸、腹水和液体滞留(不明原因的体重增加),其在10-60%接受高剂量化疗和SCT的患者中发生。病情严重程度从轻度可逆性疾病到导致多器官衰竭(MOF)和死亡的重度疾病(Richardson P.等人,2002,Blood,4337-4342;Jones等人,1987,Transplant,44,778-783)。

[0005] VOD的病因尚不清楚,但移植前危险因素和移植相关病症的结合被认为会引发根本上(primarily)的肝窦性损伤。肝窦性损伤可以迅速扩展到肝细胞性和泛血管性(panvasculitic)疾病,然后是与大量死亡相关的多器官衰竭。病理生理事件的启动促使提出这样的建议:这种形式的肝脏疾病被重新命名为窦性阻塞综合症(SOS)。

[0006] 儿童群体中静脉闭塞病的风险并不限于明确定义的接受移植的高危患者的组。该疾病常在该组之外发生。例如,治疗实体瘤(例如,肾母细胞瘤、神经母细胞瘤和横纹肌肉瘤)的患者处于发生VOD的高风险中。

[0007] 供体的单核苷酸多态性也可能是接受同种异体移植的儿童中VOD发作的一个因素。

[0008] VOD的病理生理学尚不清楚。肝小静脉的损伤被认为是VOD的第一个组织学变化。VOD被认为是源于围绕中央静脉的肝脏第3区的窦状内皮细胞和肝细胞的损伤。早期变化包括纤维蛋白原、因子VIII和纤维蛋白沉积在静脉壁和窦内。皮下水肿、胶原沉积、硬化症和外膜(abluminar)静脉区纤维化域随之而来,而星状细胞增殖和胶原化有助于基质沉积。随着静脉微血栓形成、纤维蛋白沉积、缺血和纤维发生进程的发展,广泛的纬向中断导致门静脉高压、肝肾综合症、MOF和死亡(Shulman等人,1987,Am.J.Pathol.,127,549-558;1994,Hepatology,19,1171-1181)。在此期间,存在促凝血状态以及低血浆水平的抗凝血酶III和蛋白C、因子VII的消耗和纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)的水平增加(Salat等人,1997,Blood,89,2184-2188)。血管性血友病因子(vWF)多聚体水平升高、血小板粘附性增加以及血小板输注的不适应(refractoriness)表明正在经历内皮细胞损伤(Palomo M等人,Biol Blood Marrow Transplant 16(7):985-93,2010)。

[0009] 肝窦性阻塞综合症 (HSOS) 是肝脏VOD的新名称,因为VOD可以在没有静脉介入的情况下发展。在野百合碱诱导VOD大鼠的实验研究中,已经显示阻塞起源于窦状内皮细胞 (SEC),而不是来自肝细胞。内皮细胞损伤的早期迹象在单次灌胃野百合碱24小时后是明显的。该病最终呈现为末端肝静脉闭塞性静脉炎 (DeLeve LD, AmJPhysiolGastrointestLiverPhysiol 284:G1045-G1052,2003)。

[0010] 有趣的是,最近已经认识到这种病理状况可能不限于肝脏。肺被认为是VOD潜在“场所”:在极少数情况下,VOD可能在肺动脉高压 (PAH) 发生之前存在,特别是在丝裂霉素诱导的内皮损伤后 (Masters K等人, BMJ Case Rep, bcr2012007752, 2013)。与在SCT后发生的VOD相似,VOD出现在暴露于吉妥单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamizine) (Mylotarg) (抗CD33免疫毒素) 后,其特征还在于明显的窦性阻塞和强烈的纤维化 (Wadleigh, 2003)。用于SCT的细胞毒性药物,如白消安或环磷酰胺的代谢物,例如丙烯醛或4-羟基环磷酰胺,也与VOD风险的增加有关。

[0011] 由于与重度VOD相关的死亡率高,对具有重度疾病的高风险患者的早期鉴定是重要的。

[0012] VOD的严重程度分为以下三类:

[0013] 轻度疾病

[0014] 无静脉阻塞疾病的不良反应

[0015] 无需治疗

[0016] 自限性

[0017] 中度疾病

[0018] 无静脉阻塞疾病的不良反应

[0019] 需要治疗 (止痛药、利尿剂、其他支持护理)

[0020] 重度疾病

[0021] 干细胞移植后100天静脉阻塞疾病的未解决体征和症状

[0022] 由直接归因于静脉阻塞疾病的并发症造成的死亡。

[0023] 除了静脉闭塞病之外,基于多器官衰竭的存在,更准确地定义了重度静脉闭塞病。多器官衰竭的特征在于需氧量 (室内空气中氧饱和度 $<90\%$,呼吸机依赖性 or 两者兼有)、肾功能障碍 (定义为基线肌酐水平翻倍、透析依赖性 or 两者) 和/或脑病 (Harper J.L., emedicine.medscape.com, Veno-occlusive hepatic disease, 2012)。

[0024] VOD中内皮损伤的标志包括血浆血栓调节素、P-选择蛋白和纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI)、组织因子途径抑制剂、可溶性组织因子、血栓调节素和P-和E-选择蛋白以及激活的肝星状窦周细胞。肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6, IL-8和IL-1 β 可能有助于最初的内皮损伤。在VOD中已经观察到转化生长因子 β 、胶原前肽、透明质酸和3型前胶原的免疫肽 (PIIINP) 升高 (Wadleigh, 2003)。

[0025] VOD的临床诊断基于体重增加、疼痛肝肿大和黄疸。经静脉肝活检和楔形肝静脉压梯度测量 (WHVPG) 仍然是VOD病理诊断的黄金标准。

[0026] 尽管采用治疗性干预措施,包括使用抗血栓剂和溶栓剂,例如前列腺素E1和组织纤溶酶原激活剂 (t-PA),有或没有同时使用肝素,但在治疗重度VOD时几乎没有成功 (Richardson P. 等人, 2001, Acta Haematol., 106, 57-68; Baglin TP. 等人, 1990, Bone

Marrow Transplant,5,439-441)。总而言之,尽管采用多种干预和强化治疗,100天后重度VOD的死亡率仍超过90%(Richardson P.等人,2001,2002,Carreras E.等人,1998,Blood,92,3599-3604)。

[0027] Senzolo M.等人描述了VOD的临床治疗方案。据报道,将前列腺素E2与肝素组合使用显示出较低的VOD发生率,而单独使用PGE1则没有显示出任何优势(2007 World J.Gastroenterol.,13(29),3918-3924)。

[0028] W02004019952A1描述了将前列环素类似物用于改善静脉流。

[0029] Witt W.等人描述了将伊洛前列素用于治疗血栓性疾病患者(1985, Antithrombotic profile of iloprost in experimental models of arterial and venous thrombosis, Springer Verlag, 81-90)。

[0030] CA2306567A1报道了纤溶酶原激活物抑制剂1,其含有cAMP增强剂,例如毛喉素或腺苷酸环化酶。

[0031] Alliot C等人(Presse Médicale,1994,23卷,40期,1878页)公开了在单个患者中使用5-8ng/kg/天最大耐受剂量的前列环素Flolan治疗VOD。

[0032] 目前,没有可用的治疗来显著改进治疗方案,并且仍然有必要提供治疗VOD的疗法。VOD是几种化疗药物的剂量限制性毒性并限制患者资格。VOD的预防性治疗将对使用高剂量化疗的能力产生重大影响。开发发病后治疗VOD的疗法在化疗诱发的肝脏疾病的意外情况中也是有价值的。

[0033] 因此,本发明的目的是提供用于改善患者治疗的组合物,患者患有或有由化疗引起的VOD或窦性阻塞综合症风险。

发明内容

[0034] 本发明的目的尤其是通过所要求保护的主题来解决的。

[0035] 根据本发明,提供了包含活性剂的组合物,活性剂选自由前列环素、前列环素类似物、衍生物或其药学上可接受的盐组成的组,用于预防或治疗肝静脉闭塞病(VOD),或具体地,窦性阻塞综合症。

[0036] 根据优选的实施例,组合物包含前列环素类似物、衍生物或其药学上可接受的盐。具体地,所述前列环素类似物选择性地刺激EP₂和EP₄受体,任选地除了I前列腺素受体(IP)外还刺激EP₂和EP₄受体,但是是抑制G_i结合的EP₃受体的低亲和力激动剂。

[0037] 特别地,所述前列环素类似物选自由曲前列环素、伊洛前列素、西卡前列素或贝前列素、其衍生物或药学上可接受的盐组成的组。

[0038] 特别地,所述衍生物选自由曲前列环素的酸衍生物、曲前列环素的前药、曲前列环素的缓释形式、曲前列环素的吸入形式、曲前列环素的口服形式、曲前列环素的多晶型物或曲前列环素的异构体组成的组。

[0039] 根据具体的方面,提供的组合物用于全身给药,优选通过静脉内或皮下输注。设想在长时间内持续输注,例如,至少1小时,优选地至少2小时,优选地至少5小时,更优选地至少24小时,优选地至少7天,特别是长达365天。

[0040] 根据另一个具体的方面,提供的组合物用于局部给药,优选用于吸入。因此,提供了适当的吸入器,其提供有效量的药物给药。

[0041] 根据另一个具体的方面,提供的组合物用于口服治疗,例如,其中所述组合物是口服可用的形式,选自由片剂或胶囊组成的组。

[0042] 具体地,组合物是药物组合物,优选包含一种或多种药学上可接受的载体和/或添加剂。

[0043] 本发明的组合物中活性剂的剂量取决于不同的参数,例如待施用活性化合物的患者,特别是患者的体重和年龄、患者的个人情况、疾病和疾病的严重程度、以及给药的途径和频率。活性化合物可以例如,以0.1-1000mg/kg/天的剂量口服给药,优选5-700mg/kg,优选5-500mg/kg/天,给药剂量可以分成几个,例如,1、2、3或更多剂。对于吸入给药,每次吸入的活性化合物的优选剂量为100pg-1000mg/kg/天。

[0044] 根据可代替的实施例,提供了用于反复吸入给药的剂量容器,其中所述容器含有约20mg,特别是19、18、17、16、15mg活性化合物,特别是曲前列环素。

[0045] 根据另一个实施例,对肺中发生的VOD,吸入给药对VOD的治疗特别有用。

[0046] 如果需要,每天可以连续地和/或多次施用若干这样的剂量。

[0047] 具体地,组合物是药物组合物,该药物组合物提供了有效量的曲前列环素或其衍生物或其药学上可接受的盐,其范围为约0.1-100ng/kg/min,优选地日剂量约1-50ng/kg/min,优选地为约10-45ng/kg/min,更优选地为约20-40ng/kg/min。

[0048] 优选的组合物提供了有效量吸入的曲前列环素,范围在10-200μg/kg之间,具体地在25-150μg/kg之间,更具体地在50-100μg/kg之间,甚至更具体地在约50-60μg/kg之间,优选每天施用2-6次治疗,例如2、3、4或更多单独治疗期,一天内平均间隔开。通常每个治疗期施用5-150μg/kg曲前列环素,例如,10-100μg/kg,优选地以10-30μg/kg的低剂量开始,随后为40-100μg/kg的高剂量,优选地约40-70μg/kg。

[0049] 优选地,使用产生制剂脉冲气溶胶云的喷雾器。每个脉冲递送来自喷雾器嘴部,如5-10μg/kg,例如6μg/kg的曲前列环素。

[0050] 根据本发明的一个实施例,可使用计量吸入器给药,其可以是能够将定量或推注剂量的本发明的前列环素类似物或衍生物递送至VOD患者的肺的装置。它可以是例如加压计量吸入器(pMDI),即从前列环素类似物或衍生物的溶液或悬浮液产生用于吸入的气溶胶云的装置。

[0051] 吸入装置也可以是干粉吸入器(DPI),其中前列环素类似物或衍生物以固体制剂存在。

[0052] 作为替代方案,计量剂量吸入器可以是软雾吸入器,其中使溶液通过喷嘴或一系列喷嘴可以产生气溶胶云。所述吸入器的实例是Respimat[®]吸入器(Boehringer Ingelheim)、AERx[®]吸入器(Aradigm Corp.)、Mystic[™]吸入器(Ventaira Pharmaceuticals, Inc)或Aira[™]吸入器(Chrysalis Technologies Inc.)。

[0053] 优选地,曲前列环素也可以通过输注给药,例如,其量至少为0.1ng/kg体重/分钟,优选地为0.5ng/kg-1mg/kg/min,优选地为1ng/kg/min-0.5mg/kg/min,优选地为10ng/kg/min-100ng/kg/min。

[0054] 可以使用本发明的组合物给药至少一个月的时间,优选地至少两个月,更优选地至少三个月。

[0055] 根据具体的方面,进行治疗的患者患有轻度VOD。

[0056] 根据具体的方面,进行治疗的患者患有中度VOD。特别地,将组合物施用于有VOD风险的患者,优选在化疗剂、放射、抗CD33靶向免疫毒素治疗后、硫唑嘌呤长期免疫抑制后的肾脏或肝移植或造血干细胞(HES)移植中。

[0057] 已知诱导VOD的化疗剂是例如但不限于单独的长春新碱、更生霉素(放线菌素D)、阿霉素、环磷酰胺、依托泊苷、达卡巴嗪、阿糖胞苷、光辉霉素(普卡霉素)、6-硫鸟嘌呤、氨基甲酸酯和大尾摇碱N-氧化物。由化疗导致的较轻度肝病,其共有窦状内皮细胞损伤的关键方面,包括结节性再生增生,窦扩张和肝紫癜症。

[0058] 化疗剂,例如长春新碱、更生霉素(放线菌素D)、阿霉素和环磷酰胺特别地用于治疗Wilm's肿瘤和其他儿童肾肿瘤。例如,用更生霉素和腹部放射治疗肾母细胞瘤(Wilm's肿瘤)导致VOD。

[0059] 放射和化疗的结合也导致了VOD的发展。

[0060] 尽管临床表现、组织学和时间过程存在差异,但放射诱导的肝脏疾病具有VOD的一些特征。

[0061] 成人中放射剂量超过35Gy时,可观察到放射引发的肝脏疾病。

[0062] 更特别地,患有肝脏VOD的患者主要患有骨髓疾病,优选地,患者经历了HES移植。

[0063] 本文中的患者特别地理解为人。

[0064] 特别地,患者患有任何肝脏VOD或窦性阻塞综合症。

[0065] 此外,根据本发明,提供了试剂盒,用于治疗或预防患者的肝脏VOD和/或窦性阻塞综合症,其包括

[0066] (i)有效量的前列环素或前列环素类似物或衍生物或其药学上可接受的盐,特别是曲前列环素药学上可接受的盐;

[0067] (ii)一种或多种药学上可接受的载体和/或添加剂;和

[0068] (iii)用于治疗VOD的说明书。

[0069] 本发明还提供了用于预防或治疗窦性阻塞综合症和/或肝静脉闭塞病(VOD)的方法,通过向主体施用包含前列环素类似物或衍生物或其药学上可接受的盐的组合物来进行。

附图说明

[0070] 图1:通过肝细胞定量编码前列腺素受体的mRNA;

[0071] 图2:白消安诱导的TSEC死亡的浓度响应曲线;

[0072] 图3:曲前列环素减弱在TSEC中的白消安诱导的细胞死亡;

[0073] 图4:TSEC中白消安诱导的细胞死亡的衰减-滴定曲前列环素;

[0074] 图5:孵育时间和白消安浓度对来自TSEC的mRNA产量的影响;

[0075] 图6:刺激TSEC中cAMP积累:在 1×10^6 的TSEC中评估cAMP积累,用TSEC铺板,一式两份,并用曲前列环素或其与毛喉素的结合以指定浓度处理1小时。对照细胞在标准培养基中孵育。

具体实施方式

[0076] 发明人意外地发现,前列环素或前列环素类似物或衍生物或其药学上可接受的盐

可用于治疗肝脏VOD和/或窦性阻塞综合症。

[0077] 窦性阻塞综合症是肝脏VOD的新名称,因为VOD可以在没有静脉介入的情况下发展。

[0078] VOD的病理生理学非常复杂并涉及多个因素。从细胞生物学的角度来看,疾病的复杂性牵涉到多种信号通路的参与。因此理想地,治疗理念应该同时针对信号网络中的对VOD发展重要的几个点。

[0079] 已知细胞内cAMP会影响许多基因的调节,包括建立炎症响应和抵挡激活的凝血因子和激活的血小板所需的那些基因。此外,cAMP依赖性磷酸化会调节凋亡途径的活性(例如,通过灭活促凋亡蛋白BAD)。因此,cAMP是治疗VOD有趣的下游目标,因为它允许解决与VOD相关的若干响应。有许多受体,它们与G_s耦合,因此与cAMP升高相关。前列环素类似物是特别有利的,因为所述化合物能够预防严重的并发症VOD并且还能够改善造血干细胞移植的结果。曲前列环素的安全性是众所周知的,这进一步证明了其在预防环境中的应用。最后但并非最不重要的,曲前列环素是一种稳定和明确的化合物,而其他化合物如Flolan不稳定,具有非常短的血清半衰期,因此有效期短。此外,Flolan刺激前列腺素IP受体,而前列腺素IP受体在窦状内皮细胞中的表达非常少。

[0080] 合成的前列环素类似物可以是例如但不限于,曲前列环素、伊洛前列素、西卡前列素或贝前列素,优选使用曲前列环素。

[0081] 合成的前列环素I₂ (PGI₂) 类似物,例如曲前列环素、伊洛前列素、贝前列素和西卡前列素,能够增加细胞中的cAMP水平。具体地,曲前列环素是前列环素/PGI₂稳定的类似物,其还选择性地刺激EP₂-和EP₄-受体,但对EP₃受体的亲和力低。因此,其具有刺激多种G_s-结合受体的潜力,而不参与抑制(即G_i-结合的)EP₃受体,该受体抑制cAMP的积累。对于后者,二甲基-PGE₂是完全激动剂。相比之下,曲前列环素仅是EP₃受体的低亲和力激动剂。

[0082] 因为它们比天然的前列环素代谢更稳定,所以曲前列环素、伊洛前列素、贝前列素和西卡前列素能产生持久的效果并且长久的/重复的施用前列环素类似物,特别是曲前列环素、伊洛前列素、贝前列素和西卡前列素,均能耐受性良好。

[0083] 合适的前列环素衍生物包括但不限于酸衍生物、前药、缓释形式、吸入形式和口服形式的曲前列环素、伊洛前列素、西卡前列素或贝前列素。

[0084] 本发明的前列环素或前列环素类似物的药学上可接受的盐可以在酸和化合物的碱性基团(例如氨基官能团)之间形成,或在碱和化合物的酸性基团(如羧基官能团)之间形成。根据另一个实施例,该化合物是药学上可接受的酸加成盐。

[0085] 具体地,根据本发明,曲前列环素或其衍生物是有用的。曲前列环素可以成功增强囊性纤维化患者肺部上皮细胞的氯离子通道功能。具体地,活性剂,例如曲前列环素,在轻度至中度VOD病例中用于长期治疗。

[0086] 曲前列环素是前列环素的合成类似物。曲前列环素以RemodulinTM被销售。曲前列环素是(1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-六氢-2-羟基-1-[(3S)-3-羟基辛基]-1H-苯并[f]茚-5-基]氧基]乙酸单钠盐。

[0087] 伊洛前列素以“Ilomedine”被销售,是5-{(E)-(1S,5S,6R,7R)-7-羟基-6[(E)-(3S,4RS)-3-羟基-4-甲基-1-辛烯-6-壬酰基(inyl)]-双-环[3.3.0]辛-3-亚基)戊酸。

[0088] 贝前列素是2,3,3a,8b-四氢-2-羟基-1-(3-羟基-4-甲基-1-辛烯-6-炔基)-1H-环

戊二烯(b)苯并呋喃-5-丁酸。

[0089] 西卡前列素是2-[(2E)-2-[(3aS,4S,5R,6aS)-5-羟基-4-[(3S,4S)-3-羟基-4-甲基壬-1,6-二炔基]-3,3a,4,5,6,6a-六氢-1H-并环戊二烯-2-亚基]乙氧基]乙酸。

[0090] 根据具体的实施例,可以使用至少两种,特别是至少三种、四种、五种或六种,甚至更多不同的前列环素类似物。本发明的组合物还可以包含曲前列环素,以及伊洛前列素、西卡前列素或贝前列素中的一种或多种。或者,组合物可以包含伊洛前列素,以及曲前列环素、西卡前列素或贝前列素或其药学上可接受的盐中的一种或多种。或者,组合物可以包含贝前列素,以及曲前列环素、西卡前列素或伊洛前列素或其药学上可接受的盐中的一种或多种。或者,组合物可以包含西卡前列素,以及曲前列环素、贝前列素或伊洛前列素或其药学上可接受的盐中的一种或多种。

[0091] 关于前列环素类似物,根据本发明,术语“前列环素类似物”包括所述物质的衍生物和类似物。

[0092] 术语“类似物”或“衍生物”涉及在结构和功能上与另一种化学物质相似的化学分子,通常结构上只有一个元素或基团的不同,其可以通过多于一个基团(例如2、3或4个基团)的修饰而不同,如果它保持与母体化学物质相同的功能。这样的修饰对技术人员来说是常规的,并且包括,例如增加或取代的化学部分(moiety),例如酸的酯或酰胺、保护基团例如苄基(用于醇或硫醇)以及叔丁氧基羰基(用于胺)。还包括对烷基侧链的修饰,例如烷基取代(例如甲基、二甲基、乙基等)、侧链饱和度或不饱和度的修饰、以及增加修饰基团如取代的苯基和苯氧基。衍生物还可以包括结合物(例如生物素或亲和素部分)、酶(如辣根过氧化物酶等)、以及放射性标记、生物发光、化学发光或荧光部分。此外,可以将这些部分加入到本文所述的试剂中以改变其药物代谢动力学性质,例如增加体内或离体的半衰期,或增加其细胞穿透性质等其它所需的性质。还包括已知增强药物的许多所需性质(例如溶解度、生物利用度、制造等)的前药。

[0093] 术语“衍生物”还包括在其范围内对母体序列进行的改变,包括添加、缺失和/或取代,以提供功能等同或功能改进的分子。

[0094] 根据本发明,术语“约”包括数值最大10%的偏差,具体地,最大5%,更具体地最大1%。

[0095] 根据本发明的具体实施例,曲前列环素衍生物选自由曲前列环素的酸衍生物、曲前列环素的前药、曲前列环素的多晶型物或曲前列环素的异构体组成的组。

[0096] 类似地,伊洛前列素、西卡前列素或贝前列素可以来自它们的酸衍生物、前药、多晶型物或异构体的组。

[0097] 具体地,曲前列环素生理上可接受的盐包括衍生自碱的盐。碱盐包括铵盐(如季铵盐)、碱金属盐(如钠和钾盐)、碱土金属盐(如钙和镁盐)、有机碱盐(如二环己基胺和N-甲基-D-葡萄糖胺)、以及氨基酸如精氨酸和赖氨酸的盐。

[0098] 曲前列环素是前列环素(PGI₂)的稳定的类似物,除了前列腺素I受体外,其还刺激EP₂-和EP₄-受体(Whittle等人,2012)。因此,在VOD中任何直接治疗效果可以依赖于患病肝脏靶细胞中G_s-结合受体的表达和参与。

[0099] 曲前列环素具有高代谢稳定性,特别允许通过各种途径给药。

[0100] 根据本发明,曲前列环素的衍生物可以是,例如曲前列环素的酸衍生物、曲前列环

素的前药、曲前列环素的缓释形式、曲前列环素的吸入形式、曲前列环素的口服形式、曲前列环素的多晶型物或曲前列环素的异构体。

[0101] 本发明的组合物能够以可用于给药的任何形式存在,特别是作为药物制剂。

[0102] 例如,本发明的组合物可以液体或粉末给药。它可以局部、静脉内、皮下、吸入(例如施用喷雾剂,或通过使用喷雾器)、或以口服形式(如片剂或胶囊)给药。由于某些前列环素类似物(如曲前列环素)的代谢稳定性高,或者如果以前列环素或前列环素类似物基于脂质或聚乙二醇化的形式提供,则该物质也可以以药性持久(depot)的药物施用。

[0103] 前列环素类似物的雾化递送可导致药剂在肺中更均匀的分布,从而获得深肺输送。因此,施用的剂量可能减少到药剂在肺的作用部位上持续存在的量。

[0104] 组合物可以与本领域已知的任何药学上可接受的物质或载体或赋形剂一起施用。这些可以是,例如但不限于水、中和剂(如NaOH、KOH)、稳定剂、DMSO、盐水、甜菜碱、牛磺酸等。

[0105] 术语“药学上可接受的”指被联邦或州政府的管理机构批准或在美国上市。

[0106] 术语“载体”是指与药物组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。盐溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射的溶液。合适的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、干脱脂乳、甘油、丙二醇、乙二醇、水、乙醇等。合适的药物载体的实例由E.W.Martin描述在“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。制剂应根据给药模式进行选择。

[0107] 任何技术人员都可以选择本发明组合物中活性药物的量,优选一定量的前列环素或前列环素类似物或其药学上可接受的盐,特别是曲前列环素,其范围为0.1ng/kg-0.5mg/kg体重/分钟,具体地,其可以>0.5mg/kg体重/分钟。

[0108] 根据本发明的曲前列环素或任何其他前列环素类似物以有效量施用。本领域的技术人员可以确定所述有效量,即通过衡量对VOD症状的治疗效果以及由于过量给予化合物而可能发生的副作用。

[0109] 根据一个实施例,以0.1-10mg日剂量的曲前列环素治疗患者,优选通过连续皮下输注。

[0110] 在一个实施例中,将前列环素类似物,特别是曲前列环素,以一定剂量施用于有肝脏VOD风险或患有肝脏VOD的患者,以改善患者的肝功能和/或使凝血时间正常化。

[0111] 根据另一个实施例,将组合物施用于患有轻度至中度肝脏VOD的患者。

[0112] 根据本发明的实施例,具有轻度VOD的患者的特征在于,在第20天之前高达5%,特别是高达10%的体重增加和/或最高总血清胆红素高达7mg/dl,和/或到第20天具有高达25%的外周水肿的风险,特别是高达50%,和/或高达50%的血小板输血需求。

[0113] 根据本发明的实施例,具有中度VOD的患者的特征在于,在第20天之前高达10%,特别是高达15%的体重增加和/或最高总血清胆红素高达7%,特别是高达10mg/dl,特别是高达20%,特别是高达25mg/dl,和/或到第20天具有高达25%的外周水肿的风险,特别是高达50%,和/或高达80%,特别是高达90%,特别是高达100%的血小板输血需求。

[0114] VOD干预的目标之一可能是血栓形成事件。与在临床研究中已经测试的用于治疗VOD的前列腺素E₁(PGE₁)相比,根据本发明的前列环素、前列环素类似物、其衍生物或药学上

可接受的盐,特别是曲前列环素,在治疗肝脏VOD中可以提供有利的效果;前列腺素E₁还与肝素结合,但不能显示出任何有益效果,并且PGE₁的施用由于明显的毒性而复杂化。

[0115] 如本文所用,待治疗的患者可以是任何哺乳动物,但优选的哺乳动物是人、非人灵长类、啮齿目动物、牛、马、绵羊或猪。根据本发明也可以治疗其他哺乳动物。

[0116] 本发明还提供了试剂盒,用于治疗或预防主体中与肝脏VOD或窦性阻塞综合症有关的病症,其包含(i)有效量的前列环素或前列环素类似物或其衍生物或其药学上可接受的盐,(ii)一种或更多的药学上可接受的载体和/或添加剂,和(iii)用于治疗或预防VOD的说明书。

[0117] 根据本发明的具体实施例,试剂盒包含(i)有效量的前列环素或前列环素类似物或其药学上可接受的盐,(ii)一种或多种药学上可接受的载体和/或添加剂,以及(iii)提供用于治疗或预防肝脏OD或窦性阻塞综合症的说明书,该试剂盒提供来用于治疗或预防患者的VOD或窦性阻塞综合症。

[0118] 所述组分(i)可以是适于静脉内给药、吸入或口服给药的形式。

[0119] 更特别地,本发明提供了试剂盒的用途,其中活性剂或成分是曲前列环素或其药学上可接受的盐。特别地,组分(i)包含曲前列环素药学上可接受的盐。

[0120] 可以进行临床试验以确定人体中适合的剂量/治疗方案。

[0121] 设想的是,使用根据本发明的组合物的治疗可以在化疗剂、放射、抗CD33靶向免疫毒素或造血干细胞(HES)移植的治疗之后。

[0122] 此外,患者可能患有骨髓疾病,优选正在进行HES移植并在移植后发展出该疾病的患者。

[0123] 在本发明的实施例中,用组合物连续地治疗患者至少数天的时间,优选地至少1个月,优选地至少2个月,更优选地至少3个月。

[0124] 本文描述的实例是对本发明的说明,并不意图对本发明进行限制。根据本发明已经描述了本发明的不同实施例。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对本文描述和示出的技术进行许多修改和变化。因此,应当理解,这些实例仅用作说明,而不是对本发明范围的限制。

[0125] 实例

[0126] 实例1

[0127] 肝细胞表达编码前列腺素受体的mRNA

[0128] 肝窦内皮细胞(HSEC)是一种独特的有孔内皮细胞亚群,衬于肝窦状细胞,并且包括肝内大部分的内皮细胞。从小鼠肝脏分离原代窦状内皮细胞是耗时的,它们数量有限并在细胞培养条件下难以维持在分化状态。Huebert RC等人(Lab Invest 90(12):1770-81, 2010)形成了源自肝窦内皮细胞(HSEC)的永生化细胞系,其保留内皮表型,但也模拟病理脉管系统。用SV40大T抗原通过永生化形成了这种转化的窦内皮细胞(TSEC)的细胞系。TSEC适合于研究VOD:1)尽管它们具有永生化的性质,但它们保留了许多关键的内皮特征,包括响应血管生成因子的迁移、血管形成、内吞作用和细胞外基质重塑,2)它们的表型类似于与慢性肝病有关的若干病理特征,也与VOD相关,其中细胞成为激活的、增殖的、失窗孔的和血管原性的。因此,TSEC的一些形态学特征在VOD患者的肝脏中也是明显的。

[0129] 曲前列环素是前列环素(PGI₂)稳定的类似物,除了前列腺素I受体外,其还刺激

EP₂-和EP₄-受体(Whittle等人,2012)。因此,VOD中任何直接治疗效果将依赖于在患病肝脏靶细胞中Gs-耦合受体的表达和参与。因此,我们首先在我们的模型细胞系中验证了目标受体的表达。从永生化的肝窦内皮细胞系(TSEC,图1的B部分)中分离了RNA。我们在本实验中包括原代鼠肝细胞和窦状内皮细胞(图1的A部分)。产生了互补DNA(cDNA),并通过qPCR(定量聚合酶链反应)评估了编码前列腺素受体(EP₁、EP₂、EP₃、EP₄和IP)的转录水平。如图1所示,在TSEC模型细胞系以及鼠原代窦状内皮细胞中都检测到了所有受体的扩增子。因此,TSEC可用于研究曲前列环素的作用。此外,由于EP₁和EP₄受体在原代鼠窦状内皮细胞中表达,应该可以进行桥接实验,其中在人TSEC中观察到的实验结果在体外的原代鼠细胞中重现,并与鼠体内模型相关。

[0130] 按照制造商的说明使用TRI[®] Reagent的RNA分离试剂(Sigma Aldrich,奥地利)或来自Machery-Nagel的NucleoSpin RNA II试剂盒,从鼠原代肝细胞,即肝细胞和窦状内皮细胞(LSEC;A部分),以及具有SV40大T抗原的稳定表达(B部分)的永生肝窦内皮细胞系(TSEC)中分离出了RNA。按照制造商的说明,使用大容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)产生互补的DNA(cDNA)。在20μL最终反应体积中使用5μL的cDNA,通过qPCR(定量聚合酶链式反应)评价了编码前列腺素受体(EP₁、EP₂、EP₃、EP₄和IP)的转录本水平。在所有分析的细胞类型中检测到所有受体的扩增子。在A部分中为了进行比较,将原代鼠肝细胞中的每种转录本水平设置为1,并将窦状细胞中的水平归一化为这些水平。该比较突出了EP₄的mRNA水平,其是曲前列环素靶向受体,与肝细胞相比,其在LSEC中以更高的水平表达(A部分)。以LSEC中的水平作为参照,B部分比较了原代LSEC和TSEC之间不同前列腺素受体的mRNA表达,其具有SV40大T抗原的稳定表达。与LSEC相比,TSEC中编码前列腺素受体EP₁₋₄的mRNA水平更高。该观察证实了在VOD中TSEC是研究曲前列环素的潜在保护作用 and/或疗效的合适的模型系统。

[0131] 数据如图1所示。

[0132] 实例2

[0133] 白消安诱导的TSEC死亡的浓度-响应曲线。

[0134] 在临床实践中,基于高剂量白消安的调节机制与增加的VOD风险相关,增加的VOD风险与白消安的毒性有关(Cheuk DK等人,Bone Marrow transplant 40:935-944,2007)。我们测试了白消安的毒性是否经得起TSEC体外研究的检验。因此,我们确定了白消安诱导的TSEC死亡的浓度-响应曲线。与Raimer J等人(EurJ Clin Pharmacol 68:932-935,2012)类似,他们使用了ECV304细胞,我们将TSEC铺在胶原涂覆的塑料盘(5×10³细胞/24孔板)上。24小时后,以增加的浓度(10μM-1mM)加入白消安。浓度范围基于文献报道以及在进行骨髓性化疗患者中观察到的血清水平。在24、48和72小时后评估细胞的存活率。24h后没有观察到明显的细胞死亡。72小时后,在较低浓度下也观察到几乎全部的细胞死亡。

[0135] 这个实验至少解决了问题:白消安本身是否可以诱导TESC的损伤,或者肝细胞的存在,例如在共同培养中,是否会产生有毒的中间体。如果是后者的情况,则白消安和代谢物1,4-二碘丁烷的谷胱甘肽结合物会是可得的(Marchand DH等人,Drug Metab Dispos 16(1):85-92,1988)。然而,从图2可以看出,在TESC中白消安本身以浓度依赖的方式诱导细胞死亡。因此,这一观察结果表明,在没有肝细胞的情况下可以研究白消安的作用。这降低了体外模型的复杂性。

[0136] 将TSEC铺在胶原涂覆的塑料盘 (5×10^3 细胞/24孔板) 上。24小时后, 以增加的浓度 ($10 \mu\text{M}$ – 1mM) 加入白消安; 白消安是一种细胞周期非特异性烷化抗肿瘤剂, 属于烷基磺酸盐类, 化学名称为1,4-丁二醇二甲磺酸酯, 用作化疗药物, 已知可诱导VOD。浓度范围基于文献报道以及在进行骨髓性化疗患者中观察到的血清水平。在24、48和72小时后评估细胞的存活率。为此, 细胞用PBS洗涤两次, 胰蛋白酶处理, 与台盼蓝 (1:1体积) 混合, 并使用血细胞计数器计数。24小时后没有观察到明显的细胞死亡。显示的数据 (平均值 $\pm$ 标准偏差) 表示48小时后的细胞死亡。72小时后, 在较低浓度下也观察到几乎全部的细胞死亡。

[0137] 数据如图2所示。

[0138] 实例3

[0139] 在具有曲前列环素的TSEC中白消安诱导的细胞死亡的衰减。

[0140] 用曲前列环素 ($10 \mu\text{M}$) 预处理TSEC 1小时, 在曲前列环素的连续存在下用125和250 μM 以及500 μM 白消安 (BU) 挑战TSEC来检验是否这样做能够防范白消安诱导的细胞死亡。24小时后, 通过在血细胞计数器中计数分离的细胞以及确定台盼蓝阳性 (= 死亡) 和台盼蓝排除 (= 活着) 细胞的数量来确定细胞存活率。如图3所示, $10 \mu\text{M}$ 曲前列环素减弱了BU诱导的毒性。在三个独立实验中观察到这种效果。

[0141] 将TSEC铺在胶原涂覆的塑料盘 (5×10^3 细胞/24孔板) 上。24小时后, 以 $10 \mu\text{M}$ 的浓度加入曲前列环素。1小时后, 以增加的浓度加入白消安。48小时后评估细胞存活率。如果细胞在125和250 μM 浓度的白消安中暴露48小时, 则曲前列环素处理与增加的存活率相关。

[0142] 数据如图3所示。

[0143] 实例4

[0144] 在TSEC中白消安诱导细胞死亡的衰减-滴定曲前列环素

[0145] 我们检验了浓度范围, 其中曲前列环素保护TSEC免受白消安诱导的细胞死亡。将TSEC铺在胶原涂覆的塑料盘上, 24小时后加入浓度为5、10和20 μM 的曲前列环素。1小时后, 加入浓度为125和250 μM 的白消安。48小时后评估细胞存活率。即使低浓度的曲前列环素 (5 μM) 也减弱了白消安诱导的细胞死亡。白消安 ($p < 0.001$) 和曲前列环素 ($p = 0.0112$) 均对细胞存活率有显著影响。使用双因素方差 (2way ANOVA) 分析数据。检验的浓度范围不足以定义浓度-响应关系, 因为该方法对浓度响应关系的结合声明不够灵敏, 然而, 观察结果足以证明浓度 $10 \mu\text{M}$ 的曲前列环素是接近饱和的。

[0146] 将TSEC铺在胶原涂覆的塑料盘 (5×10^3 细胞/24孔板) 上。24小时后, 加入浓度为5、10和20 μM 的曲前列环素。1小时后, 加入浓度为125和250 μM 的白消安。48小时后评估细胞存活率。即使低浓度的曲前列环素 (5 μM) 也减弱了白消安诱导的细胞死亡。由于测量方法的灵敏度, 这种有益效果在较高浓度下也没有增强。通过双因素方差分析数据。进行Bonferroni事后检验, 以测试各个治疗组之间的差异。白消安 ($p < 0.001$) 和曲前列环素 ($p = 0.0112$) 均对细胞存活率有显著影响。

[0147] 数据如图4所示。

[0148] 实验旨在检验白消安和曲前列环素对参与血液凝固的靶基因的介导作用:

[0149] 实例5

[0150] 白消安对与凝血相关的基因转录本的影响

[0151] 在EC340细胞中, 白消安改变了几种基因的表达, 已知这几种基因在VOD中是解除

调节的。环AMP涉及某些这些基因的调节,特别是在PAI-1的调节中(例如DiBattista JA等人, *Mol Cell Endocrinol* 103 (1-2):139-48,1994,Sunagawa M等人, *Endothelium* 13 (5):325-33,2006)。因此,我们的目标是测试曲前列环素是否会抵消白消安对基因表达的某些作用。然而,PAI-1表达也受生长因子和细胞因子的调节(例如Heaton JH等人, *JBC* 5;273 (23):14261-8,1998,总结于Heaton JH,Dlakic WM,Gelehrter TD *Thromb Haemost* 89 (6):959-66,2003)。

[0152] 我们首先限定了白消安的浓度范围,该范围引发了表达谱的变化,但尚未杀死细胞。在EC340细胞中,对高达300 μ M浓度的耐受为96小时,并允许用白消安处理来研究靶基因表达和调节。在TSEC中该浓度与mRNA的提取不相容:mRNA的数量、质量和稳定性受剂量和时间依赖性的影响(图5和数据未显示)。用125 μ M的白消安预处理TSECS48小时是最高时间*浓度结果,其允许获得品质足够的mRNA,用于可靠且可重复地评估qPCR的基因调控(图5)。基于EC340细胞中基因调节的时间过程,我们测试了最少12小时和最多96小时之间的治疗持续时间(数据未显示)。

[0153] 图5显示了孵育时间和白消安浓度对TSEC产生的mRNA产量的影响:每孔接种 1.6×10^5 TSECS。用125 μ M、250 μ M或300 μ M的BU、这些浓度的BU与曲前列环素(10 μ M)的结合或单独的曲前列环素(10 μ M)处理细胞,或将细胞保持在标准培养基[内皮细胞培养基,ECM Science11™,美国,TSEC含有5%胎牛血清、1%内皮细胞生长补充剂(EGCS)和1%青霉素/链霉素,在37℃和5%CO₂条件下]中。a)根据制造商的方案,通过Trizol® (lifetechnologies)提取总的RNA。用Nanodrop 2000®测定RNA浓度(ng/ μ l)和纯度。如果每孔接种等量的细胞(1.6×10^5),则用250和300 μ M的BU处理诱导细胞死亡,在处理48小时后,不可再重现和有效产生绝对RNA含量。b)在已经在标准培养基(未处理)中培养的细胞和已用BU(125或250 μ M的BU)加曲前列环素(10 μ M Trep)处理的细胞或单独使用曲前列环素的细胞之间比较RNA制备物(μ g/ μ l)的绝对产量。

[0154] 图5a举例说明了这些初步实验的结果。每孔接种等量的细胞(1.6×10^5)。如预期,用白消安处理对细胞有毒性。更重要的是,显而易见的,使用浓度为300 μ M和250 μ M的白消安处理可以阻止以可接受的产率分离RNA并且阻止了处理48小时后可接受的质量。即使125 μ M的BU也降低了每个孔的RNA制备物的产量,然而随后cDNA的产生可以以可重复的方式进行。

[0155] 因此,对于进一步的实验,选择以下处理方案:用10 μ M曲前列环素预处理细胞1小时,然后用10 μ M曲前列环素和125 μ M BU共培养细胞24小时。

[0156] 我们注意到,用曲前列环素处理可防止白消安诱导的RNA量的减少:如图5b所示,与未处理的细胞(100%RNA产量)相比,用125 μ M和250 μ M白消安处理48小时后,RNA的产量分别降低至85%和74%。然而,如果预处理(1小时)并用10 μ M曲前列环素共孵育(24小时),则该损失至少在一定程度上降低:RNA产量的损失降低至11%。有趣的是,与对照细胞相比,如果单独用曲前列环素处理细胞,RNA的含量增加至111%。该发现在5个独立的RNA制备物中重复。

[0157] 实例6

[0158] 鉴定由白消安和曲前列环素调节的TSEC中的合适的候选靶基因

[0159] 检验了候选靶基因的表达,以监测白消安的有害作用和曲前列环素的保护作用。

[0160] 在用10 μ M曲前列环素预处理TESC 1小时后,用10 μ M曲前列环素和125 μ M BU共培养

细胞24小时。通过使用PARIS试剂盒 (life technologies) 提取总RNA。通过大容量逆转录试剂盒 (Applied Biosystems) 进行cDNA合成;通过qPCR (StepOnePlus实时PCR系统®, Applied Biosystems) 分析得到的cDNA (相当于50ng RNA/反应)。18s rRNA用作参考基因。

[0161] 基于初步实验,我们确定了纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1)、组织因子 (TF)、组织因子途径抑制剂 (TFPI) 和血栓调节蛋白 (TM) 是合适的基因,以研究TSEC中曲前列环素抵消白消安诱导结果的潜力。我们还测试了是否10 μ M曲前列环素能抵消白消安介导的作用。将总的 1.5×10^5 TESC铺在6孔板中。一旦达到90%的融合,则用曲前列环素预处理细胞1小时,然后将细胞在含有BU和曲前列环素的标准培养基中孵育24小时。此后,清洗细胞并制备mRNA。曲前列环素抵消了白消安引起的促凝因子的增加表达,如PAI-1和TF (数据未显示)。这些实验记录了白消安诱导了有利于血液凝固的因子 (即PAI-1和TF) 的表达,并因此允许VOD的发展。类似地,白消安降低了抗凝血因子血栓调节素 (TM) 的表达而曲前列环素缓解了白消安的作用 (数据未显示)。这些观察证明可以使用TSEC作为体外模型系统来研究替代参数,这些参数预示着体内VOD的风险增加。

[0162] 有趣的是,在调查的候选基因中,发现白消安和曲前列环素都诱导TFPI的表达。

[0163] 如图6的图例所示处理TESC。在加入白消安之前1小时开始曲前列环素处理。24小时后收集细胞。通过PCR定量mRNA的表达水平,并将其归一化为18s RNA水平。a) 曲前列环素抵消了白消安诱导的促凝血因子PAI-1和TF表达的增加,以及白消安诱导的纤维蛋白溶解TM的降低。b) 在TESC中,曲前列环素以浓度依赖性方式调节TFPI的mRNA表达。

[0164] 因此,选择TFPI来研究曲前列环素的浓度-响应曲线。该实验证实10-20 μ M的浓度范围最为有效 (数据未显示)。

[0165] 实例7

[0166] TESC中曲前列环素诱导的cAMP水平

[0167] 希望了解这种机制,该机制允许曲前列环素调节白消安诱导的基因表达,因为这允许寻找额外的靶基因。据假定,曲前列环素的作用是由cAMP的积累增加来调节。然而,令人惊讶的,单独加入曲前列环素不足以增加TSEC中细胞内cAMP的水平 (图6)。然而,如果细胞用毛喉素敏化,则曲前列环素 (10 μ M) 进一步增加了TESC中细胞内cAMP的水平。在存在30 μ M毛喉素 (图8, 左边部分) 和如果毛喉素的浓度被滴定在1和30 μ M之间 (图6, 中间和右边部分), 都看到了这一点。无论 $[^3\text{H}]$ cAMP是低 (图6, 中间部分) 还是高 (图6, 右边部分), 也可以看到。

[0168] 图6显示了刺激TSEC中cAMP积累: 在 1×10^6 的TSEC中评估cAMP积累, TSEC以一式两份的方式铺板并用曲前列环素或其与毛喉素的组合以指定浓度处理1小时。对照细胞在标准培养基中孵育。为了比较,在用dmPGE2孵育后也评估了cAMP积累。在第一和第二个实验中的响应是相当的。在第三个实验中,响应较高,推测是由于腺嘌呤核苷酸库的更广泛的标记。然而,没有一项实验测试表明单独的曲前列环素足以将细胞内的cAMP水平增加至超过未处理的对照细胞中所见的水平。

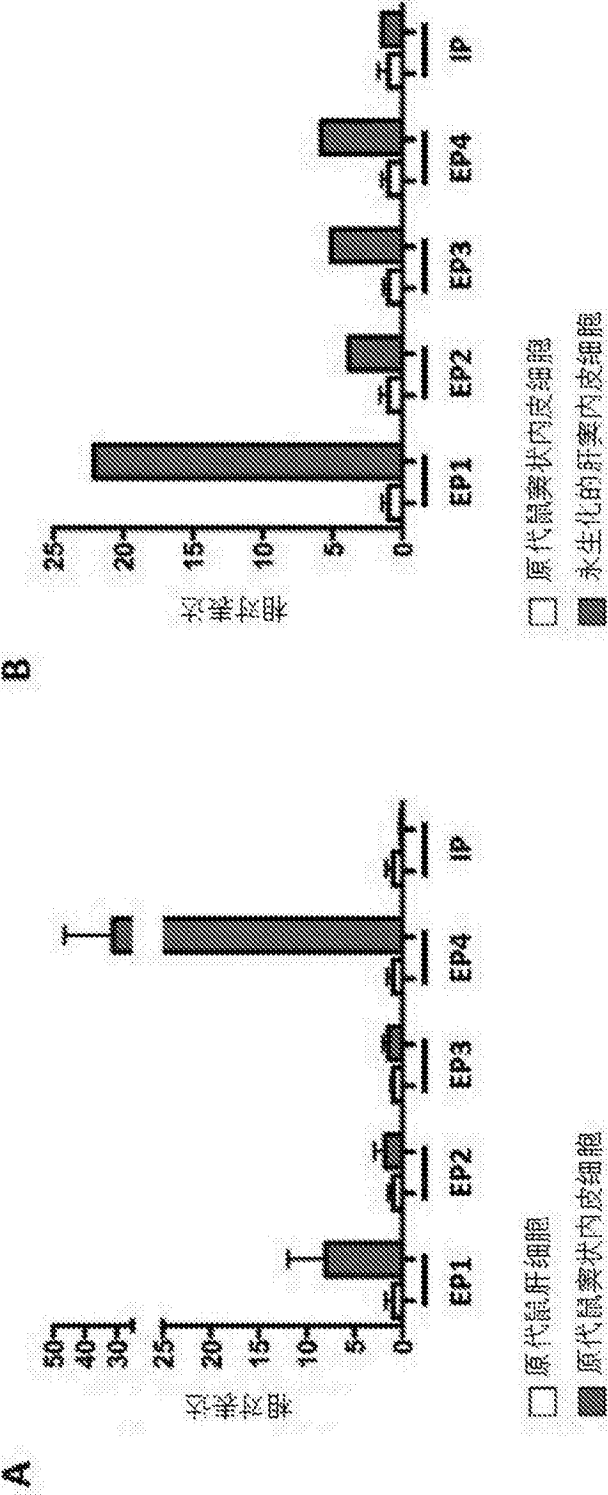


图1

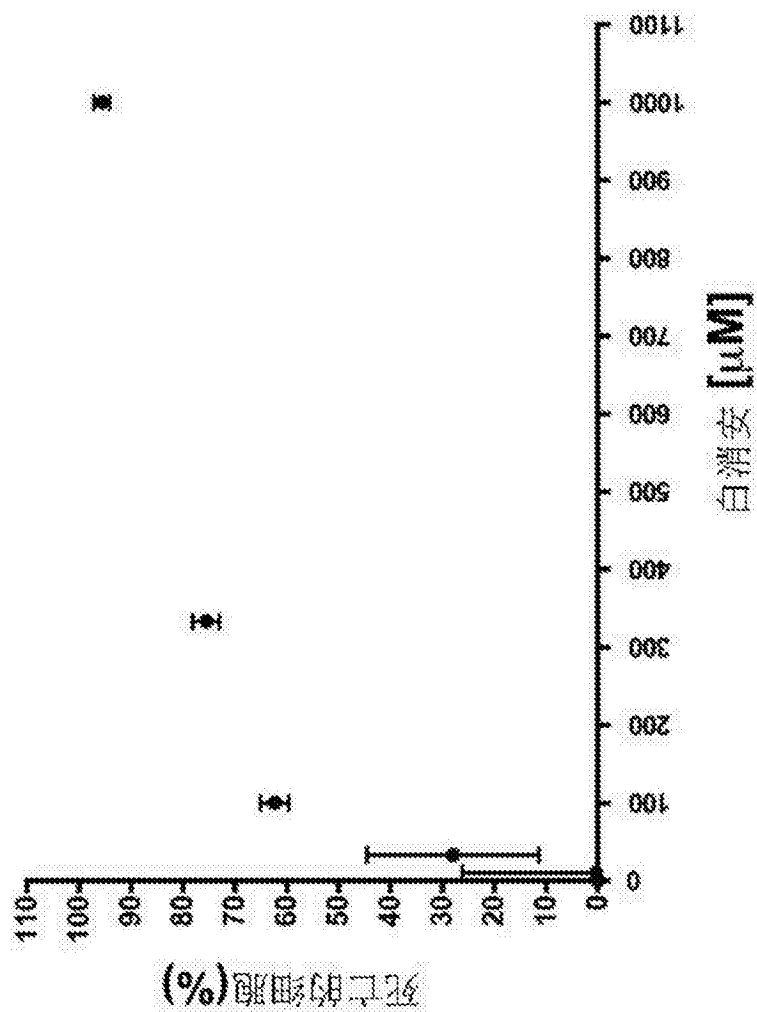


图2

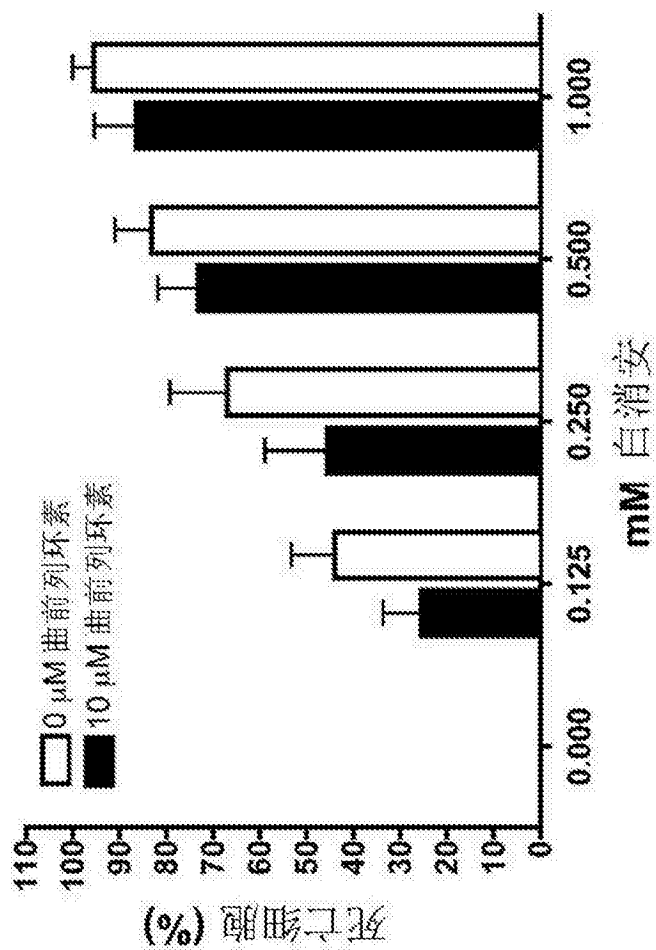


图3

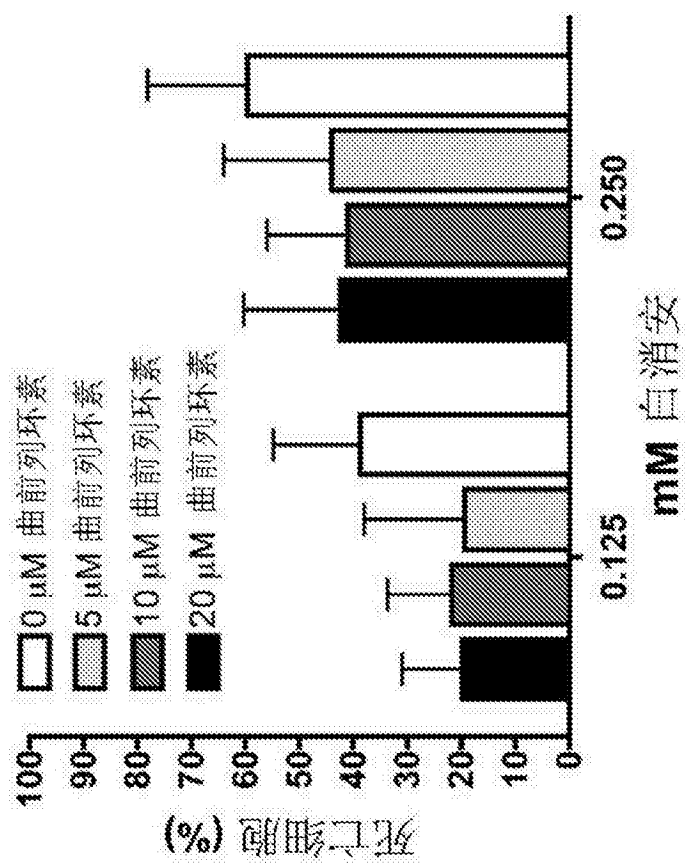


图4

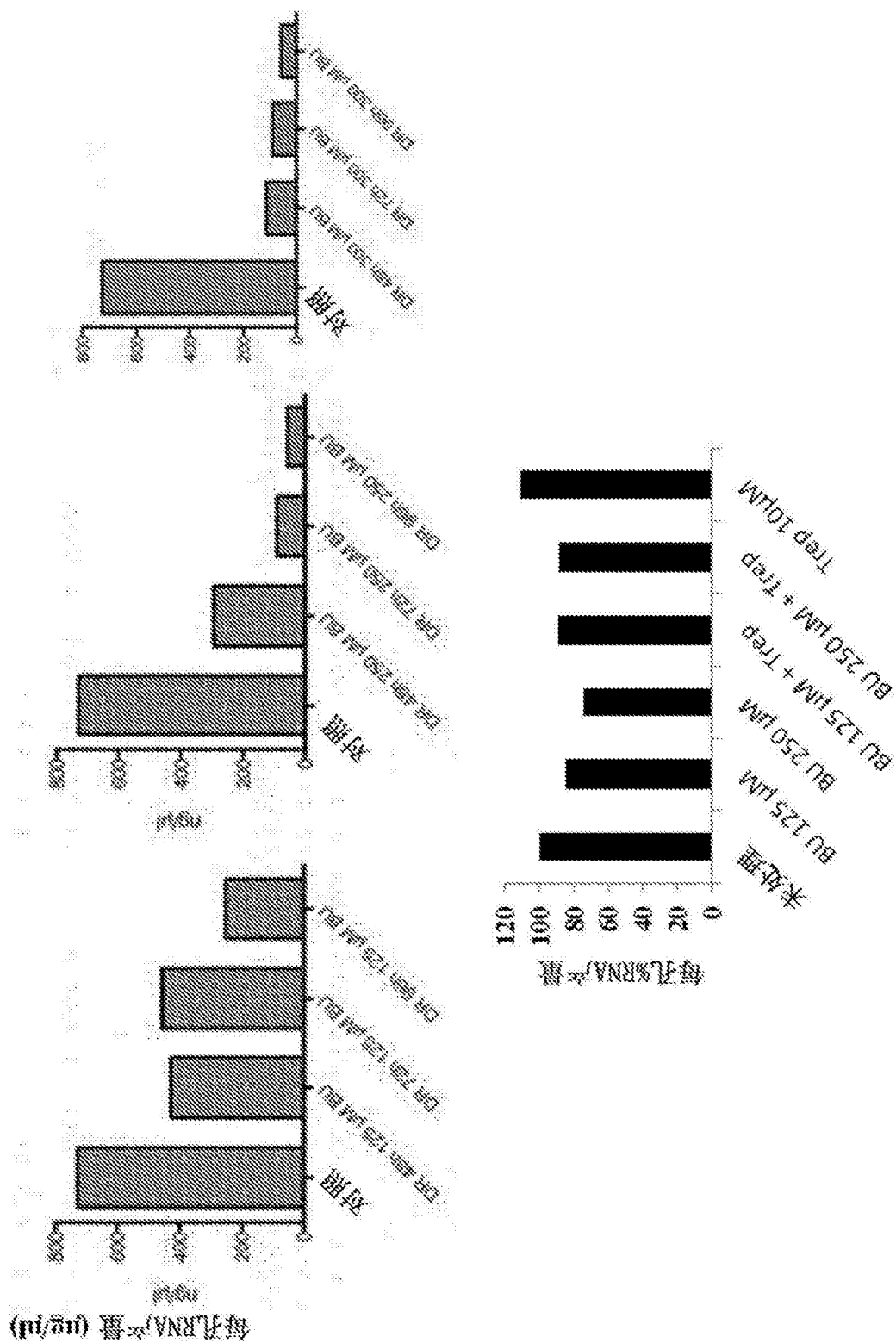


图5

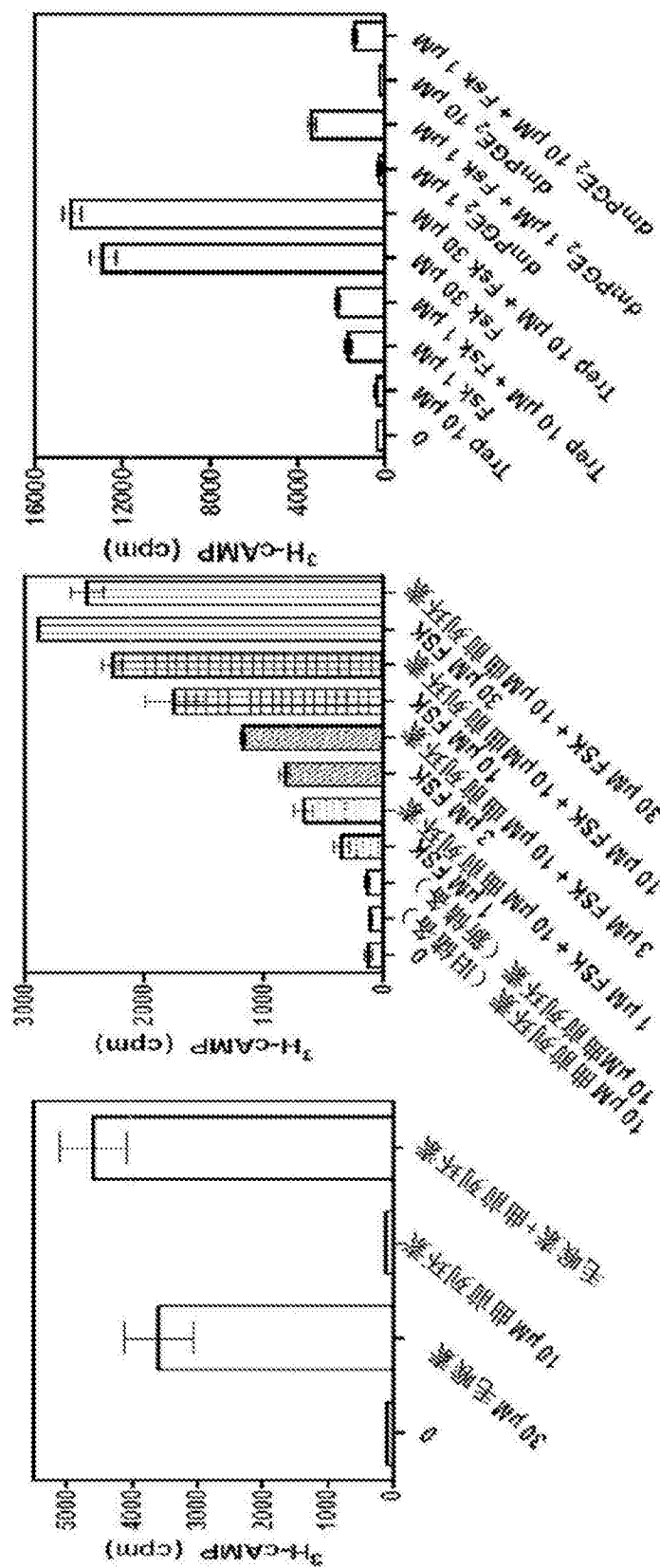


图6