

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048135**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.28

(21) Номер заявки
202290498

(22) Дата подачи заявки
2020.08.05

(51) Int. Cl. **A61K 31/519** (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СЕПИАПТЕРИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАДИАЦИОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

(31) 62/882,937

(32) 2019.08.05

(33) US

(43) 2022.04.20

(86) PCT/US2020/045026

(87) WO 2021/026247 2021.02.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПиТиСи ТЕРАПЬЮТИКС
ЭмПи, ИНК.; ВИРДЖИНИЯ
КОММОНВЕЛТ ЮНИВЕРСИТИ
(US)**

(72) Изобретатель:
**Меццарома Элеонора, Рабендер
Кристофер, Миккельсен Росс,
Яковлев Василий, Смит Нил (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) Maaïke Berbée ET AL: "Novel Strategies to Ameliorate Radiation Injury: A Possible Role for Tetrahydrobiopterin", 1 January 2010 (2010-01-01), pages 1366-1374, XP55737613, DOI: 10.2174/1389450111009011366 Retrieved from the Internet: URL:https://www.eurekaselect.com/72533/article [retrieved on 2020-10-07] the whole document abstract page 1366, right-hand column, last paragraph - page 1367, left-hand column, paragraph 1 page 1367, left-hand column, paragraph 5 page 1367, right-hand column, paragraph 2 page 1369, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 1 page 1369, right-hand column, paragraph 6 - paragraph 8 page 1371, left-hand column, paragraph 4 - paragraph 7
Zheng-Yi Zhang: "Tetrahydrobiopterin Protects against Radiation-induced Growth Inhibition in H9c2 Cardiomyocytes", Chinese Medical Journal November, 1 January 2016 (2016-01-01), page 22, XP55737390, DOI: 10.4103/0366-6999.193455 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126166/pdf/CMJ-129-2733.pdf [retrieved on 2020-10-07] the whole document abstract page 2733, left-hand column, paragraph 1 - page 2734, right-hand column, paragraph 1 page 2734, left-hand column, paragraph 3 page 2737, left-hand column, last paragraph - page 2739, right-hand column, paragraph 4

TAO YAN ET AL: "Ionizing radiation induces BH4 deficiency by downregulating GTP-cyclohydrolase 1, a novel target for preventing and treating radiation enteritis", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 180, 17 June 2020 (2020-06-17), page 114102, XP55737399, US ISSN: 0006-2952, DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114102 the whole document
CN-A-110354133

(57) Изобретение относится к способам лечения радиационного облучения субъекта путем введения сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина.

048135 B1

048135 B1

Заявление о исследовании, финансируемом из федерального бюджета

Это изобретение было сделано при поддержке правительства в рамках гранта № R01 AI133595, присужденного National Institutes of Health (NIH). Правительство имеет определенные права на изобретение.

Уровень техники

Будь то террористический акт или ядерная авария, угроза радиологической катастрофы представляет собой потенциально катастрофическую чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, что подчеркивает необходимость разработки медицинских контрмер для снижения общего радиационного поражения тела и смертности. Начальным последствием для здоровья при тотальном облучении тела (TBI) является острый лучевой синдром (ARS) в наиболее радиочувствительных органах, при этом выживаемость при таком облучении определяется степенью повреждения стволовых клеток и клеток-предшественников в гемопоэтической системе, а также эпителия в желудочно-кишечном тракте. Гемопоэтические факторы роста, электролиты и жидкости, переливание крови и антибиотики, все они являются достижениями в терапии ARS, которые привели к значительному улучшению выживаемости. Однако, как видно из выживших в Чернобыле, пациенты, перенесшие ARS гемопоэтической и ЖК систем, часто умирают от поздних поврежденных легких и сердца.

Соответственно, существует потребность в лечении, которое улучшает показатели смертности и функции органов у пациентов, подвергшихся облучению.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлены способы лечения пациентов с радиационным облучением. Например, в настоящем изобретении используется сепиаптерин (SP) для снижения токсичности для сердца, желудочно-кишечного тракта и/или легких пациента.

В одном аспекте, изобретение относится к способу лечения субъекта, подвергшегося облучению, путем введения субъекту эффективного количества сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина или их фармацевтически приемлемой соли или сокристалла.

В некоторых вариантах осуществления, введение уменьшает или ингибирует повреждение тканей и/или органов у субъекта; снижает или ингибирует сердечную, желудочно-кишечную и/или легочную токсичность у субъекта; уменьшает гибель эндотелиальных клеток желудочно-кишечного тракта, сердца и/или легких у субъекта; и/или уменьшает индуцированное облучением воспаление в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта, сердца и/или легких у субъекта.

Эффективное количество составляет, например, от примерно 0,1 до примерно 200 мг/кг/сутки, например, от примерно 5 мг/кг/сутки до примерно 35 мг/кг/сутки.

В вариантах осуществления, у субъекта имеется острый радиационный синдром, например, при введении препарата в течение 24 ч после облучения. В вариантах осуществления, субъект имеет хронический лучевой синдром. В вариантах осуществления, субъект страдает кожным лучевым синдромом. В вариантах осуществления, субъект подвергается воздействию, по меньшей мере, 0,3 Гр менее чем за один день. В вариантах осуществления, субъект подвергается воздействию по меньшей мере 0,7 Гр в течение периода более одного дня.

В вариантах осуществления, введение происходит по меньшей мере один раз в сутки в течение по меньшей мере шести дней, например, по меньшей мере одной недели, по меньшей мере 10 дней (например, по меньшей мере 14 дней), по меньшей мере примерно одного месяца, по меньшей мере примерно трех месяцев, по меньшей мере примерно шести месяцев, по крайней мере примерно девяти месяцев или, по крайней мере примерно одного года.

В вариантах осуществления, введение увеличивает экспрессию miR-15b-3p, miR-106a-5p, miR-133b, miR-136-5p, miR-451a, miR-1, miR-335-3p, let-7d-3p и/или let-7c-5p, например, сывороточных экзосомальных (например, при введении ВН4), и/или снижает экспрессию IL-1 β , IL-6, IL-17A, Spp2 и/или TGF- β 1 в эпителиальных клетках легких (например, при введении SP). В вариантах осуществления, введение увеличивает экспрессию let-7a-5p, miR-1, miR-106b-3p, miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-181a-5p, miR-335-3p и/или miR-335-5p и/или снижает экспрессию let-7g-5p, let-7i-5p и/или miR-16-5p, например, сывороточных экзосомальных (например, при введении SP).

В одном аспекте, изобретение относится к способу уменьшения или ингибирования повреждения тканей и/или органов у субъекта, подвергшегося облучению, путем введения субъекту эффективного количества сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте, изобретение относится к способу снижения или ингибирования сердечной и/или легочной токсичности у субъекта, подвергшегося облучению, путем введения субъекту эффективного количества сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте, изобретение относится к способу снижения гибели эндотелиальных клеток сердца и/или легких у субъекта, подвергшегося облучению, путем введения субъекту эффективного количества сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте изобретение относится к способу уменьшения индуцированного облучением воспаления в эпителиальных клетках сердца и/или легких у субъекта путем введения субъекту эффективного количества сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления предыдущих четырех аспектов, эффективное количество сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли составляет менее 1 мг/кг.

В другом варианте осуществления предыдущих четырех аспектов, сепиаптерин или его фармацевтически приемлемую соль вводят примерно через 24 ч после облучения.

В другом варианте осуществления предыдущих четырех аспектов, способ включает введение сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли в виде нескольких доз.

В другом варианте осуществления предыдущих четырех аспектов, способ включает введение сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли ежедневно в течение по меньшей мере шести дней.

В другом варианте осуществления предыдущих четырех аспектов, эффективное количество сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли приводит к увеличению экспрессии miR-15b-3p, miR-106a-5p, miR-133b, miR-136-5p, miR-451a, miR-1, miR-335-3p, let-7d-3p и/или let-7c-5p.

Определения.

В настоящем изобретении, если иное не ясно из контекста, (i) единственное число может пониматься как означающий "по меньшей мере, один"; (ii) термин "или" может пониматься как означающий "и/или"; (iii) термины "содержащий" и "включающий" могут пониматься как охватывающие детализированные компоненты или стадии, независимо от того, представлены ли они сами по себе или вместе с одним или несколькими дополнительными компонентами или стадиями; и (iv) термины "примерно" и "приблизительно" могут пониматься как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники; и (v) там, где указаны диапазоны, конечные точки включены.

В некоторых вариантах осуществления, термин "примерно", используемый в настоящем документе, означает $\pm 10\%$ от указанного значения.

Ссылка на "примерно" или "приблизительно" значение или параметр в настоящем документе включает (и описывает) варианты, которые направлены на это значение или параметр как таковой. Например, описание, относящееся к "примерно X", включает в себя описание "X".

Используемый в настоящем документе термин "введение" относится к введению композиции субъекту. Введение животному (например, человеку) может осуществляться любым подходящим путем. Например, в некоторых вариантах осуществления, введение может быть бронхиальным (в том числе путем инстилляций бронхов), буккальным, энтеральным, интердермальным, внутриаартериальным, интрадермальным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, внутрибрюшинным, подоболочечным, внутривенным, внутрижелудочковым, мукозальным, назальным, пероральным, ректальным, подкожным, сублингвальным, местным, трахеальным (в том числе путем интратрахеальной инстилляций), чрескожным, вагинальным или витреальным.

"Эффективное количество" соединения может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, и способности соединения вызывать желаемый ответ. Терапевтически эффективное количество включает количество, при котором любые токсические или вредные эффекты соединения перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Терапевтически эффективное количество также включает количество, достаточное для получения пользы, например, клинической пользы.

Под "уровнем" подразумевается уровень соединения по сравнению с эталоном. Эталоном может быть любой полезный эталон, как определено в настоящем документе. Под "пониженным уровнем" или "повышенным уровнем" соединения подразумевается снижение или увеличение уровня соединения по сравнению с эталоном (например, снижение или увеличение по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, при по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 100%, по меньшей мере примерно 150%, по меньшей мере примерно 200%, по меньшей мере примерно 300%, по меньшей мере примерно 400%, по меньшей мере примерно 500% или более; уменьшение или увеличение менее чем примерно в 0,01 раза, менее чем примерно в 0,02 раза, менее чем примерно в 0,1 раза, менее чем примерно в 0,3 раза, менее чем примерно в 0,5 раза, менее чем примерно в 0,8 раза или менее; или увеличение более чем примерно в 1,2 раза, более чем примерно в 1,4 раза, более чем примерно в 1,5 раза, более чем примерно в 1,8 раза, более чем примерно в 2,0 раза, более чем примерно в 3,0 раза, более чем примерно в 3,5 раза, более чем примерно в 4,5 раза, более чем примерно в 5,0 раз, более чем примерно в 10 раз, более чем примерно в 15 раз, более чем примерно в 20 раз, более чем примерно в 30 раз, более чем примерно в 40 раз, более чем примерно в 50 раз, более чем примерно в 100 раз, более чем примерно в 1000 раз или более). Уровень соединения может быть выражен в массе/объеме (например, г/дл, мг/мл, мкг/мл, нг/мл) или в процентах по отношению к общему количеству соединения в образце.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтическая композиция" представляет композицию, содержащую соединение, описанное в настоящем документе, в составе с фармацевтически приемлемым эксципиентом. Фармацевтическая композиция может производиться или продаваться с

одобрения государственного регулирующего органа как часть терапевтической схемы лечения заболевания у млекопитающего. Фармацевтические композиции могут быть составлены, например, для перорального введения в стандартной дозированной форме (например, таблетке, капсуле, каплете, гелевой капсуле, порошке для приготовления суспензии, суспензии, растворе или сиропе); для местного применения (например, в виде крема, геля, лосьона или мази); для внутривенного введения (например, в виде стерильного раствора, не содержащего частиц эмбол, и в системе растворителей, пригодной для внутривенного введения); или в любом другом фармацевтически приемлемом составе.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемая соль" означает любую фармацевтически приемлемую соль сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина. Фармацевтически приемлемые соли включают ионные пары сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина в твердом состоянии и/или в растворе. Фармацевтически приемлемый сокристалл включает свободное основание сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина и кислоту в твердом состоянии. Смесь солевой формы и сокристаллической формы может присутствовать в одной и той же композиции. Например, фармацевтически приемлемые соли сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина включают такие, которые, в рамках здорового медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, фармацевтически приемлемые соли описаны в: Remington (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (22nd ed.) ed. L.V. Allen, Jr., 2013, Pharmaceutical Press, Philadelphia, PA). Соли могут быть получены *in situ* во время окончательного выделения и очистки соединений, описанных в настоящем документе, или отдельно путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой. Типичные кислотные аддитивные соли включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, полусульфат, гептонат, гексанат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат и валерат.

Под "эталонном" подразумевается любой полезный эталон, используемый для сравнения уровней соединения или других симптомов, например, повреждения ткани и/или органа, клеточной токсичности, смерти или воспаления. Эталонном может быть любой образец, стандарт, стандартная кривая или уровень, которые используют для целей сравнения. Эталонном может быть обычный эталонный образец или эталонный стандарт или уровень. "Эталонный образец" может быть, например, контролем, например, заранее определенным значением отрицательного контроля, таким как "нормальный контроль" или предыдущий образец, взятый у того же субъекта; образец от нормального здорового субъекта, такой как нормальная клетка или нормальная ткань; образец (например, клетки или ткани) от субъекта, не имеющего заболевания; образец от субъекта, у которого диагностировано заболевание, но которого еще не лечили соединением по изобретению; образец от субъекта, которого лечили соединением по изобретению; или образец очищенного соединения (например, любого из описанных в настоящем документе) в известной нормальной концентрации. Под "эталонным стандартом или уровнем" подразумевается значение или число, полученное из эталонного образца. "Нормальным контрольным значением" является предварительно определенное значение, указывающее на отсутствие болезненного состояния, например, значение, ожидаемое у здорового контрольного субъекта. Как правило, нормальное контрольное значение выражается в виде диапазона ("между X и Y"), высокого порога ("не выше X") или низкого порога ("не ниже X"). Субъект, имеющий измеренное значение в пределах нормального контрольного значения для конкретного биомаркера, обычно считается находящимся "в пределах нормы" для этого биомаркера. Нормальный эталонный стандарт или уровень может быть значением или числом, полученным от нормального субъекта, не имеющего заболевания или расстройства (например, ARS). В предпочтительных вариантах осуществления, эталонный образец, стандарт или уровень соответствуют рассматриваемому образцу, по меньшей мере, по одному из следующих критериев: возраст, масса тела, пол, стадия заболевания и общее состояние здоровья. Стандартная кривая уровней очищенного соединения, например, любого из описанных в настоящем документе, в пределах нормального эталонного диапазона также может быть использована в качестве эталона.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" или "пациент" относится к любому организму, которому может быть введена композиция в соответствии с изобретением, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целях. Типовые субъекты включают любое животное (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, не являющиеся человеком приматы и люди). Субъект может искать или нуждаться в лечении, требовать лечения, получать лечение, получать лечение в будущем или быть человеком или животным, находящимся под наблюдением квалифицированного специалиста по поводу конкретного заболевания или состояния.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "леченный" или "лечение" означают как

терапевтическое лечение, так и профилактические или предупредительные меры, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, или получение полезных или желаемых клинических результатов. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничены ими, облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания; стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние, нарушение или заболевание; задержку начала или замедления состояния, нарушения или прогрессирования заболевания; улучшение состояния, нарушения или болезненного состояния или ремиссии (частичной или полной), поддающееся обнаружению или не поддающееся обнаружению; улучшение, по меньшей мере, одного измеримого физического параметра, не обязательно различимого пациентом; или укрепление или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение включает получение клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также включает увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Следует понимать, что описание соединений, композиций, составов и способов лечения, описанных в настоящем документе, включает "включающие", "состоящие из" и "состоящие по существу из" варианты осуществления. В некоторых вариантах осуществления, для всех композиций, описанных в настоящем документе, и всех способов с использованием композиции, описанной в настоящем документе, композиции могут либо содержать перечисленные компоненты или стадии, либо могут "состоять по существу из" перечисленных компонентов или стадий. Когда композиция описывается как "состоящая по существу из" перечисленных компонентов, композиция содержит перечисленные компоненты и может содержать другие компоненты, которые существенно не влияют на излечиваемое состояние, но не содержит каких-либо других компонентов, которые существенно влияют на излечиваемое состояние, отличные от компонентов, перечисленных в явном виде; или, если композиция содержит дополнительные компоненты, отличные от перечисленных, которые существенно влияют на излечиваемое состояние, композиция не содержит достаточную концентрацию или количество дополнительных компонентов, чтобы существенно повлиять на излечиваемое состояние. Когда способ описывается как "состоящий по существу из" перечисленных стадий, способ включает перечисленные стадии и может включать другие стадии, которые существенно не влияют на излечиваемое состояние, но способ не содержит каких-либо других стадий, которые существенно влияют на излечиваемое состояние, отличных от стадий, которые явно перечислены. В качестве неограничивающего конкретного примера, когда композиция описывается как "состоящая по существу из" компонента, композиция может дополнительно содержать любое количество фармацевтически приемлемых носителей, носителей или разбавителей и других подобных компонентов, которые существенно не влияют на излечиваемое состояние.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Способы и материалы описаны в настоящем документе для использования в настоящем описании; также могут быть использованы другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки. В случае конфликта, настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления изобретения изложены в описании ниже. Другие признаки, цели и преимущества изобретения будут очевидны из описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан экспериментальный протокол, используемый в настоящем изобретении. Экспериментальные группы облучают с последующим введением тетрагидробиооптерина (ВН4), сепиаптерина (SP) или носителя и оценивают через 10, 30, 60, 90 и 180 дней после облучения.

На фиг. 2 показан ответ изопротеренола в группах, подвергшихся облучению, для групп, получавших носитель, ВН4 и SP. Оценку сократительного резерва проводят через 10, 30, 60, 90 и 180 дней.

На фиг. 3 показан индекс производительности миокарда в группах, подвергшихся облучению, для групп, получавших носитель, ВН4 и SP. Оценку индекса производительности миокарда проводят через 10, 30, 60, 90 и 180 дней.

На фиг. 4 показана выживаемость экспериментальных групп, подвергшихся облучению с последующим введением носителя или SP.

На фиг. 5 показана частота дыхания экспериментальных групп, подвергшихся облучению, по сравнению с контрольными группами.

Фиг. 6А-6С иллюстрируют относительную экспрессию экзосомальных miРНК в сыворотке после облучения, нормализованную по отношению к не леченной контрольной группе. Представлены данные по экспериментальным группам, подвергшимся облучению, ВН4, или и то, и другое (6А), и облучение, сепиаптерин, или то и другое (6В (ингибированная экспрессия) и 6С (индуцированная экспрессия)).

Фиг. 7 иллюстрирует ответ изопротеренола в группах, подвергшихся облучению, для групп, полу-

чавших носитель или SP. Оценку сократительного резерва проводят через 0, 30, 60, 90 и 180 дней. Облучение вызывает снижение сократительного резерва в облученной группе, получавшей носитель, по сравнению с исходным уровнем (* $p < 0,05$ к исходному уровню) через 10, 30, 60, 90 и 180 дней после облучения. Введение SP в течение 6 дней притупляет падение сократительного резерва во все моменты времени ($\#p < 0,05$ к носителю в тот же момент времени). Данные представлены как среднее \pm СОС.

На фиг. 8 показаны систолическая и диастолическая функции в группах, получавших носитель или SP, через 10, 30, 60, 90 и 180 дней после облучения. Данные представлены в виде индекса Te_i и времени изоволюмического расслабления (IRT). Сепиаптерин смягчает индуцированное облучением ингибирование систолической (индекс Te_i) и диастолической (индекс Te_i и IRT) функций. У облученных мышей, получавших носитель, наблюдается значительное прогрессирующее увеличение (* $P < 0,05$ к исходному уровню) Te_i и IRT, начиная с 10 дней и вплоть до 180 дней. Введение SP в течение 6 дней притупляет увеличение индекса Te_i и IRT во всех временных точках ($\#p < 0,05$ к носителю в тот же момент времени). Данные представлены как среднее \pm СОС.

Фиг. 9 иллюстрирует функцию легких для облученных экспериментальных групп, получавших носитель или SP. Частоту дыхания регистрируют в течение 5 мин каждые 2 недели. У мышей, получавших SP, значительно улучшается функция легких во всех измеренных точках. $n=7-12$ для облученных+носитель и $n=8-14$ для облученных+SP. * $p < 0,05$

На фиг. 10 показаны изменения экспрессии мРНК цитокинов в тканях сердца и легких. Представленные данные представляют облученные экспериментальные группы, получавшие носитель или SP. Изменения после облучения экспрессии мРНК цитокинов в ткани легких и сердца животных, получавших носитель или SP. Ткани легких и сердца собирают у животных в разные сроки после облучения. Полную РНК экстрагируют из всех образцов тканей, и для мРНК цитокинов проводят кПЦР. Данные представлены в виде среднего \pm СО для 5-6 животных в каждой группе. Значение P рассчитывают с помощью t -критерия Стьюдента и показывают как: ** - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$.

Фиг. 11А-11С иллюстрируют иммуногистохимический (ИНС) (11А-11В) и гидроксипролиновый (11С) анализы контрольных групп вместе с облученными экспериментальными группами, получавшими носитель или SP, измеренные через 16 недель.

На фиг. 12 показана корреляция Спирмена между фиброзом и относительной экспрессией мРНК цитокинов в легких мышей, получавших носитель или SP, через 16 недель после облучения. График распределения значимой корреляции Спирмена между фиброзом и относительной экспрессией мРНК цитокинов в легких мышей, получавших носитель или SP, через 16 недель после облучения. Самые темные оттенки представляют мышей с более сильным воспалением/фиброзом. IL=интерлейкин, Ccl2=хемокиновый лиганд 2 с мотивом C-C, Runx2=Runt-родственный фактор транскрипции 2, Ccl2=хемокиновый лиганд 2 с мотивом C-C, Runx2=Runt-родственный фактор транскрипции 2, Ctgf=фактор роста соединительной ткани, Spp2=секретируемый фосфопротеин 2, TGF-бета 1=фактор роста ткани-бета 1, BMP2=костный морфогенетический белок 2, Tgm72=трехраздельный мотив, содержащий 72, IR=облучение, M=мужчина, F=женщина, r =коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Фиг. 13А-13D иллюстрируют измеренные ELISA белки, которые являются потенциальными биомаркерами: CRP (13А), фибриноген (13В), IL-6 (13С) и эластаза нейтрофилов (13D). Измерения облученных экспериментальных групп, получавших носитель или SP, проводят через 4 дня, 8 дней, 16 недель и 180 дней и сравнивают с контрольной группой.

Фиг. 14А-14В иллюстрируют действие носителя (14А) и SP (14В) на систолическую функцию после облучения, оцениваемую по полу.

Фиг. 15А-15В иллюстрируют действие носителя (15А) и SP (15В) на диастолическую функцию после облучения, оцениваемую по полу.

Фиг. 16А-16В иллюстрируют действие носителя (16А) и SP (16В) на сократительный резерв, оцениваемый по полу.

Подробное описание изобретения

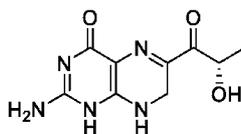
В настоящем изобретении представлены способы применения сепиаптерина, тетрагидробиоптерина, дигидробиоптерина или их фармацевтически приемлемой соли или сокристалла для лечения субъектов, подвергшихся облучению. Не желая быть связанными какой-либо теорией, мы считаем, что индуцированная облучением поздняя токсичность легких, желудочно-кишечного тракта и сердца является следствием эндотелиальной дисфункции, определяемой как несвязанная активность NOS и снижение биодоступности NO, приводящее к состоянию хронического воспаления, приводящему к стойкому профиброзному процессу, ассоциированному с аномальным заживлением ран и поздним повреждением нормальных тканей. На мышинной модели с такой же радиочувствительностью, как и у людей, мы показываем, что сепиаптерин и его метаболиты, такие как тетрагидробиоптерин и дигидробиоптерин, можно использовать в качестве противорадиационной контрмеры для смягчения индуцированного облучением поражения сердца и легких и улучшения выживаемости.

Активные соединения.

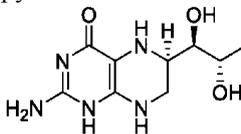
В способах по изобретению используется сепиаптерин, тетрагидробиоптерин или дигидробиопте-

рин или их соли и/или сокристаллы. Сепиаптерин может превращаться в дигидробиоптерин и тетрагидробиоптерин *in vivo*, и дигидробиоптерин и тетрагидробиоптерин взаимопревращаться *in vivo*.

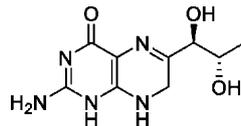
Сепиаптерин имеет структуру:



Тетрагидробиоптерин имеет структуру:



Дигидробиоптерин имеет структуру:



Активное соединение можно использовать в любой подходящей форме, например, в виде свободного основания, соли или сокристалла. Типичные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, гентизат, глюкогептонат, глицерофосфат, гликолят, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеcanoат и валерат. В некоторых вариантах осуществления, активное соединение или его соль находятся в кристаллической форме.

Примеры солей, сокристаллов и кристаллических форм сепиаптерина описаны в WO 2018/102314, WO 2018/102315, WO 2019/046849 и WO 2019/232120, например, любая из кристаллических форм А, В, С, D, E, F или G, описанные в WO 2018/102314 или WO 2018/102315. Другие соли или кристаллические формы сепиаптерина, дигидробиоптерина и/или тетрагидробиоптерина известны в данной области техники.

Способы лечения.

Изобретение представляет способы лечения субъекта после радиационного облучения, например, лечения острого лучевого синдрома (ОЛС), кожного лучевого синдрома или хронического лучевого синдрома. В частности, изобретение представляет способы лечения облучения пациента дозой по меньшей мере примерно 0,05 Гр за период менее 24 ч. Например, пациент может подвергаться воздействию по меньшей мере примерно 0,3, по меньшей мере примерно 0,7, по меньшей мере примерно 1, по меньшей мере примерно 3, по меньшей мере примерно 5, по меньшей мере примерно 6, по меньшей мере примерно 8, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 30 или по меньшей мере примерно 50 Гр, например, от примерно 0,3 до примерно 6, от примерно 0,7 до примерно 6, от примерно 1 до примерно 2, от примерно 2 до примерно 6, от примерно 6 до примерно 20, от примерно 6 до примерно 10, от примерно 6 до примерно 8, от примерно 10 до примерно 20, от примерно 8 до примерно 12 или от примерно 20 до примерно 50 Гр, и период воздействия может составлять менее примерно 18 часов, например, менее примерно 12, менее примерно 6, менее примерно 3, менее примерно 1, менее примерно 0,5 или менее примерно 0,1 ч или менее примерно 5, менее примерно 3, менее примерно 2 или менее примерно 1 мин. Альтернативно, изобретение представляет способы лечения облучения пациента дозой по меньшей мере примерно 0,7 Гр в течение периода более 24 ч. Например, пациент мог подвергаться воздействию по меньшей мере примерно 0,7, по меньшей мере примерно 1, по меньшей мере примерно 2, по меньшей мере примерно 3, по меньшей мере примерно 4, по меньшей мере примерно 5, по меньшей мере примерно 6, по меньшей мере примерно 7, или по меньшей мере примерно 8 Гр, и период облучения может составлять по меньшей мере примерно одну неделю, по меньшей мере примерно один месяц, по меньшей мере примерно три месяца, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере примерно 1 год, по меньшей мере примерно 2 года, по меньшей мере примерно 3 года или более, например, от примерно 1 недели до 3 лет, от примерно 1 недели до 1 года, от примерно 1 недели до 1 месяца, от примерно 1 месяца до 2 лет, от примерно 1 месяца до 1 года, от примерно 6 месяцев до 2 лет, от примерно 9 месяцев до 2 лет или от примерно 9 месяцев до 15 месяцев. Радиационное облучение может быть на все тело или локализовано, например на кожу. В некоторых вариантах осуществления, излучение не является результатом радиационной терапии.

Лечение по изобретению может привести к уменьшению или ингибированию повреждения тканей

и/или органов у субъекта, подвергнувшегося облучению; снижению или ингибированию токсичности тканей или органов, например, легких, сердца или желудочно-кишечного тракта, например, легких или сердца, у субъекта, подвергнувшегося облучению; уменьшению гибели эндотелиальных клеток, например, легких, сердца или желудочно-кишечного тракта, например, легких или сердца, у субъекта, подвергнувшегося облучению; уменьшению индуцированного облучением воспаления в эпителиальных клетках, например, легкого, сердца или желудочно-кишечного тракта, например, легкого или сердца, у субъекта; увеличению экспрессии miR-15b-3p, miR-106a-5p, miR-133b, miR-136-5p, miR-451a, miR-1, miR-335-3p, let-7d-3p и/или let-7c-5p; снижению экспрессии IL-1 β , IL-6, IL-17A, Spp2 и/или TGF- β 1, например, в эпителиальных клетках легких; увеличению экспрессии let-7a-5p, miR-1, miR-106b-3p, miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-181a-5p, miR-335-3p и/или miR-335-5p; и/или снижению экспрессии let-7g-5p, let-7i-5p и/или miR-16-5p. Уменьшение симптомов или цитокинов может быть по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или по меньшей мере примерно на 95%, например, относительно эталона. Увеличение экспрессии олигонуклеотидов может быть по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 100%, по меньшей мере примерно на 200%, по меньшей мере примерно на 300% или по меньшей мере примерно на 500%, например, относительно эталона.

Активное соединение можно вводить в любой подходящей дозе. Фактическое количество дозы композиции по настоящему изобретению, вводимой пациенту, может определяться физическими и физиологическими факторами, такими как масса тела, тяжесть состояния, предшествующие или сопутствующие терапевтические вмешательства, индивидуальные особенности пациента и путь введения. В зависимости от дозировки и пути введения, количество введений предпочтительной дозы и/или эффективного количества может варьироваться в зависимости от ответа субъекта. Практикующий врач, ответственный за введение, в любом случае будет определять концентрацию активного ингредиента(ов) в композиции и соответствующую дозу(ы) для отдельного субъекта. Терапевтически эффективное количество может составлять от примерно 0,1 мг/кг/сутки до примерно 200 мг/кг/сутки, например, от примерно 0,1 до примерно 150 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 125 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 100 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 80 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 60 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 40 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 25 мг/кг/сутки день, от примерно 0,1 до примерно 20 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 15 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 10 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 5 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 2,5 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 1 мг/кг/сутки, от примерно 0,1 до примерно 0,5 мг/кг/сутки, от примерно 0,5 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 1 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 2,5 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 5 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 10 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 15 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 20 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 25 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 40 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 60 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 80 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 100 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 120 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 140 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 160 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 180 до примерно 200 мг/кг/сутки, от примерно 5 до 1 примерно 80 мг/кг/сутки, от примерно 10 до примерно 160 мг/сутки кг/сутки, от примерно 20 до примерно 140 мг/кг/сутки, от примерно 40 до примерно 120 мг/кг/сутки, от примерно 60 до примерно 100 мг/кг/сутки, от примерно 5 до примерно 50 мг/кг/сутки или от примерно 10 до примерно 20 мг/кг/сутки активного соединения. Введение может происходить любое подходящее количество раз, например, один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки во время лечения. Введение может продолжаться столько времени, сколько необходимо, например, от одного дня до примерно одного года или по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере примерно одну неделю, по меньшей мере примерно две недели, по меньшей мере примерно один месяц, по меньшей мере примерно три месяца, по меньшей мере примерно шесть месяцев или по меньшей мере примерно девять месяцев.

Активное соединение можно первый раз ввести в любое подходящее время, например, в течение примерно 1 ч, в течение примерно 2 ч, в течение примерно 6 ч, в течение примерно 12 ч или в течение примерно 18 ч, в течение примерно 24 ч, в течение примерно 2 дней, или в течение примерно 1 недели после радиационного облучения.

Составы.

Активное соединение может быть составлено в фармацевтическую композицию, как это известно в данной области техники. Такие композиции могут включать различные компоненты, известные в данной области техники, например, см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (22nd ed.) ed. L.V. Allen, Jr., 2013, Pharmaceutical Press, Philadelphia, PA.

Композиция может включать фармацевтически приемлемый носитель, например, любой из обычно используемых, и ограничивается только химико-физическими соображениями, такими как растворимость и отсутствие реакционной способности к соединению, и путем введения. Описанные в настоящем документе фармацевтически приемлемые носители, например, носители, адьюванты, эксципиенты или разбавители, хорошо известны специалистам в данной области техники и широко доступны. Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель был химически инертным по отношению к активным соединениям и не обладал вредными побочными эффектами или токсичностью в условиях применения.

Антиоксиданты.

Фармацевтические композиции, используемые в способах, могут включать или не включать антиоксидант. Антиоксидант может минимизировать окислительную деградацию активного соединения. Примеры антиоксидантов включают, но не ограничены ими, 4-хлор-2,6-ди-трет-бутилфенол, токоферол, альфа-токоферол, алкилированные дифениламины, аскорбиновую кислоту, аскорбилмирилат, аскорбилпальмитат, аскорбилстеарат, бета-каротин, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лимонную кислоту, цистеин, сукцинат D-альфа-токоферила полиэтиленгликоля 1000, метансульфонат дефероксамина, додецилгаллат, этилпарабен, фолиевую кислоту, fumarовую кислоту, галловую кислоту, глутатион, лецитин, яблочную кислоту, метилпарабен, монотиоглицерин, N-ацетилцистеин, нордигидрогваяретовую кислоту, октилгаллат, п-фенилендиамин, аскорбат калия, метабисульфит калия, сорбат калия, пропионовую кислоту, пропилгаллат, ретинол, сорбиновую кислоту, аскорбат натрия, бисульфит натрия, гидросульфит натрия, изоаскорбат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия, тиосульфат натрия, винную кислоту, трет-бутилгидрохинон, токоферилацетат, витамин А, витамин В6, витамин В12 или витамин Е. В некоторых вариантах осуществления, способы по изобретению могут использовать фармацевтическую композицию, содержащую аскорбиновую кислоту, токоферол, ретинол, аскорбилпальмитат, N-ацетилцистеин, глутатион, бутилгидрокситолуол и/или бутилгидроксианизол в качестве антиоксиданта.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает фармацевтическую композицию, которая содержит менее примерно 10% антиоксиданта по массе, например, менее примерно 9%, менее примерно 8%, менее примерно 7%, менее примерно 6%, менее примерно 5%, менее примерно 4%, менее примерно 3%, менее примерно 2% или менее примерно 1%. В некоторых вариантах осуществления, в способе используют фармацевтическую композицию, которая содержит примерно 2-9% антиоксиданта от общей массы, например, примерно 2-4%, примерно 3-5%, примерно 4-6%, примерно 5-7%, примерно 6%-8% или примерно 7-9%. В некоторых вариантах осуществления, в способе используют фармацевтическую композицию, содержащую примерно 5-100% максимальной суточной дозы антиоксиданта по USP, например, в некоторых вариантах осуществления, в способе используют фармацевтическую композицию, содержащую примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90% или примерно 100% максимальной суточной дозы антиоксиданта по USP. В некоторых вариантах осуществления, отношение сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина или их фармацевтически приемлемой соли и/или сокристалла к антиоксиданту составляет, по меньшей мере, примерно 1:1, например, по меньшей мере, примерно 2:1, по меньшей мере, примерно 3:1, по меньшей мере, примерно 4:1, по меньшей мере, примерно 5:1, по меньшей мере, примерно 6:1, по меньшей мере, примерно 7:1, по меньшей мере, примерно 8:1, по меньшей мере, примерно 9:1 или, по меньшей мере, примерно 10:1 масс./масс. В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в настоящем документе, композиция включает антиоксидант (например, аскорбиновую кислоту), где отношение фармацевтически приемлемой соли и/или сокристалла сепиаптерина, тетрагидробиоптерина или дигидробиоптерина к антиоксиданту составляет более примерно 4:1 (например, более примерно 5:1, более примерно 6:1, более примерно 7:1, более примерно 8:1, более примерно 9:1, более примерно 10:1, более примерно 15:1 или более примерно 20:1) по массе (например, массе соли к антиоксиданту).

Диспергирующие агенты.

В некоторых вариантах осуществления, в способе используют фармацевтическую композицию, включающую по меньшей мере один диспергирующий агент. Диспергирующий агент может вызывать разделение частиц в составе например, высвобождение лекарственных веществ при контакте с влагой. Примеры диспергирующих агентов включают, но не ограничены ими, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу (например, соль кроскармеллозы, например, кроскармеллозу натрия), крахмал (например, гликолят крахмала натрия) или альгиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, диспергирующим агентом в фармацевтической композиции является карбоксиметилцеллюлоза, такая как фармацевтически приемлемая соль кроскармеллозы. В некоторых вариантах осуществления, в способе используют фармацевтическую композицию, которая может содержать примерно 0,1-1,5% диспергирующего агента от общей массы, например, примерно 0,1%, примерно 0,5%, примерно 1% или примерно 1,5%. В некоторых вариантах осуществления, в способе используют фармацевтическую композицию, содержащую менее примерно 1,5% диспергирующего агента, например, менее примерно 1%, менее примерно 0,5% или менее примерно 0,1%.

Антикомкователи.

Антикомкователи часто добавляют в фармацевтические композиции для предотвращения образования комков, например, в растворах. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, используемые в способах по изобретению, включают по меньшей мере один антикомкователь. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, используемые в способах по изобретению, включают по меньшей мере два антикомкователя. Примеры антикомкователей включают коллоидный диоксид кремния, микрокристаллическую целлюлозу, трикальцийфосфат, микрокристаллическую целлюлозу, стеарат магния, бикарбонат натрия, ферроцианид натрия, ферроцианид калия, ферроцианид кальция, фосфат кальция, силикат натрия, коллоидный диоксид кремния, силикат кальция, трисиликат магния, тальк, алюмосиликат натрия, алюмосиликат калия, алюмосиликат кальция, бентонит, силикат алюминия, стеариновую кислоту и полидиметилсилоксан. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один антикомкователь является коллоидным диоксидом кремния или микрокристаллической целлюлозой. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, используемая в способах по изобретению, может включать примерно 65-75% антикомкователя от общей массы, например, примерно 65%, примерно 67%, примерно 70%, примерно 73% или примерно 75%. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, используемая в способах по изобретению, включает как коллоидный диоксид кремния, так и микрокристаллическую целлюлозу. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, используемая в способах по изобретению, включает примерно 60-65% микрокристаллической целлюлозы к общей массе и примерно 5-7% коллоидного диоксида кремния к общей массе.

Носитель.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию, используемую в способах по изобретению, перед введением комбинируют с носителем. В некоторых вариантах осуществления, композицию можно вводить в носитель с вязкостью примерно 50-1750 сантипуаз (сП), например, для облегчения суспендирования и дозирования фармацевтической композиции. Один тип суспендирующего агента, который может применяться, представляет собой комбинацию глицерина и сахарозы в воде (например, пероральная смесь MEDISCA® с 2,5% глицерина и 27% сахарозы в воде). Соответствующее количество композиции может быть добавлено к смеси носителя и перемешано, чтобы суспендировать композицию непосредственно перед введением.

Другие суспендирующие агенты также могут быть использованы в качестве носителя. Примеры суспендирующих агентов включают воду, агар, альгиновую кислоту, карбоксиметилцеллюлозу натрия, каррагинан, декстрин, желатин, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гипромеллозу, метилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, повидон, трагакант, ксантановую камедь или другие суспендирующие агенты, известные в данной области техники.

Пути введения.

Существует множество подходящих составов для использования в настоящем изобретении. Следующие составы для перорального, аэрозольного, парентерального, подкожного, внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, внутрибрюшинного, подбололочечного, ректального и вагинального введения являются только иллюстративными и никоим образом не ограничивающими.

Фармацевтической композицией может быть жидкий состав, например, в форме раствора, суспензии или эмульсии. Составы, подходящие для перорального введения, могут состоять из (а) капсул, саше, таблеток, пастилок и троше, каждая из которых содержит заранее определенное количество активного ингредиента в виде твердых веществ или гранул; (b) порошка; (c) жидких растворов, таких как эффективное количество соединения, растворенное в разбавителях, таких как вода, солевой раствор или апельсиновый сок; (d) суспензий в подходящей жидкости; и (e) подходящих эмульсий. Предпочтительными являются твердые пероральные дозированные формы, такие как капсулы, таблетки и порошки. Капсулы могут быть обычными твердыми или мягкими желатиновыми капсулами, содержащими, например, поверхностно-активные вещества, смазывающие агенты и инертные наполнители, такие как лактоза, сахароза, фосфат кальция и кукурузный крахмал. Таблетированные формы могут включать лактозу, сахарозу, маннит, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, микрокристаллическую целлюлозу, аравийскую камедь, желатин, гуаровую камедь, коллоидный диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, тальк, стеарат магния, стеарат кальция, стеарат цинка, стеариновую кислоту и другие эксципиенты, красители, разбавители, буферные агенты, разрыхлители, увлажняющие агенты, консерванты, ароматизаторы и фармакологически совместимые носители. Формы для рассасывания могут содержать активный ингредиент во вкусовой добавке, обычно сахарозе, и аравийской камеди или трагаканте, а также пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахароза и аравийская камедь, эмульсии, гели и подобные, содержащие, в дополнение к активному ингредиенту, такие носители, которые известны в данной области техники.

Составы, подходящие для перорального и/или парентерального введения, включают водные и не водные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и/или растворенные вещества, которые делают состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого реципиента, и водные и не водные стерильные суспензии, которые мо-

гут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и/или консерванты. Соединение можно вводить в физиологически приемлемом разбавителе в фармацевтическом носителе, таком как стерильная жидкость или смесь жидкостей, включая воду, солевой раствор, водную декстрозу и родственные растворы сахаров, спирт, такой как этанол, бензиловый спирт или гексадециловый спирт, гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, и другие полиэтиленовые спирты, кетали глицерина, такие как 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол, простые эфиры, такие как поли(этиленгликоль) 400, масло, жирную кислоту, сложный эфир жирной кислоты или глицерид, или ацелированный глицерид жирной кислоты с или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло или детергент, суспендирующие агенты, такие как пектин, карбомеры, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу или карбоксиметилцеллюлозу, или эмульгаторы и другие фармацевтические адьюванты.

Масла, которые можно использовать в составах для парентерального введения, включают нефтяные, животные, растительные или синтетические масла. Конкретные примеры масел включают арахисовое, соевое, кунжутное, хлопковое, кукурузное, оливковое, вазелиновое и минеральное. Подходящие жирные кислоты для использования в парентеральных составах включают олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Этилолеат и изопропилмиристат являются примерами подходящих сложных эфиров жирных кислот. Подходящие мыла для использования в парентеральных составах включают соли жирных щелочных металлов, аммония и триэтаноламина, и подходящие детергенты включают (а) катионные детергенты, такие как, например, галогениды диметилдиалкиламмония и галогениды алкилпиридиния, (b) анионные детергенты, такие как, например, алкил-, арил- и олефинсульфонаты, алкил, олефин, простой эфир, и моноглицеридсульфаты и сульфосукцинаты, (с) неионные детергенты, такие как, например, оксиды жирного амина, алканоламида жирной кислоты и сополимеры полиоксипропилена и полипропилена, (d) амфотерные детергенты, такие как, например, алкил-бета-аминопропионаты и соли четвертичного аммония 2-алкилимидазопина и (3) их смеси.

Парентеральные составы обычно содержат от примерно 20 до примерно 30 мас.% активного соединения в растворе. В таких составах могут применяться подходящие консерванты и буферы. Чтобы свести к минимуму или устранить раздражение в месте инъекции, такие композиции могут содержать одно или несколько неионных поверхностно-активных веществ, имеющих гидрофильно-липофильный баланс (HLB) от примерно 12 до примерно 17. Количество поверхностно-активного вещества в таких композициях составляет от примерно 5 до примерно 15 мас.%. Подходящие поверхностно-активные вещества включают сложные эфиры полиэтиленсорбитана и жирной кислоты, такие как моноолеат сорбитана, и высокомолекулярные аддукты этиленоксида с гидрофобным основанием, образованные конденсацией пропиленоксида с пропиленгликолем. Парентеральные составы могут быть представлены в однодозовых или многодозовых герметичных контейнерах, таких как ампулы и флаконы, и могут храниться в высушенном вымораживании (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Растворы для инъекций и суспензии для немедленного приема могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее.

Фармацевтической композицией может быть состав для инъекций. Требования к эффективным фармацевтическим носителям для инъекционных композиций хорошо известны специалистам в данной области техники. См. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (22nd ed.) ed. L.V. Allen, Jr., 2013, Pharmaceutical Press, Philadelphia, PA.

Составы для местного применения, в том числе те, которые пригодны для чрескожного высвобождения лекарственного средства, хорошо известны специалистам в данной области техники и подходят в контексте изобретения для нанесения на кожу. Композиции для местного применения обычно имеют форму жидкостей, кремов, паст, лосьонов и гелей. Местное введение включает нанесение на слизистую оболочку полости рта, которая включает полость рта, эпителий рта, небо, десны, и слизистую оболочку носа. В некоторых вариантах осуществления, композиция, используемая в способах по настоящему изобретению, содержит сепиаптерин, тетрагидробиоптерин или дигидробиоптерин и подходящий носитель или носитель. Он также может содержать другие компоненты, которые не вызывают раздражения. Носитель может быть жидким, твердым или полутвердым. В некоторых вариантах осуществления, композицией является водный раствор. Альтернативно, композицией может быть дисперсия, эмульсия, гель, лосьон или крем-носитель для различных компонентов. В одном варианте осуществления, первичным носителем является вода или биосовместимый растворитель, который является по существу нейтральным или который стал по существу нейтральным. Жидкий носитель может включать другие материалы, такие как буферы, спирты, глицерин и минеральные масла, с различными эмульгаторами или диспергирующими агентами, известными в данной области техники, для получения желаемого pH, консистенции и вязкости. Возможно, что композиции могут быть получены в виде твердых веществ, таких как порошки или гранулы. Твердые вещества можно наносить непосредственно или растворять в воде или биосовместимом растворителе перед использованием с образованием раствора, который является по существу нейтральным или который был сделан по существу нейтральным, и который затем можно наносить на место-мишень. В вариантах осуществления изобретения, носитель для местного нанесения на кожу может

включать воду, буферные растворы, различные спирты, гликоли, такие как глицерин, липидные материалы, такие как жирные кислоты, минеральные масла, фосфоглицериды, коллаген, желатин и материалы на основе силикона.

Фармацевтической композицией может быть аэрозольный состав для введения посредством ингаляции. Такие аэрозольные составы могут быть помещены в приемлемые газы-вытеснители под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и подобные. Они также могут быть составлены в виде фармацевтических препаратов для препаратов без давления, таких как небулайзер или распылитель.

Дополнительно, фармацевтической композицией может быть суппозиторий. Составы, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих, в дополнение к активному ингредиенту, такие носители, которые известны в данной области техники как подходящие.

Твердая дозированная форма для перорального введения.

Составы для перорального введения включают частицы, содержащие активное соединение в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми эксципиентами, и такие составы известны специалистам в данной области техники (например, патенты США №: 5,817,307, 5,824,300, 5,830,456, 5,846,526, 5,882,640, 5,910,304, 6,036,949, 6,036,949, 6,372,218, включенные в настоящий документ посредством ссылки). Эксципиентами могут быть, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахара, сорбит, сахар, маннит, микрокристаллическая целлюлоза, крахмалы, включая картофельный крахмал, карбонат кальция, хлорид натрия, лактоза, фосфат кальция, сульфат кальция или фосфат натрия); гранулирующие и разрыхляющие агенты (например, производные целлюлозы, включая микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, кроскармеллоза натрия, альгинаты или альгиновая кислота); связующие агенты (например, сахароза, глюкоза, сорбит, аравийская камедь, альгиновая кислота, альгинат натрия, желатин, крахмал, прежелатинизированный крахмал, микрокристаллическая целлюлоза, алюмосиликат магния, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль); и смазывающие агенты, глиданты, антиадгезивы (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксиды кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк) и антикомкователи (например, коллоидный диоксид кремния, микрокристаллическая целлюлоза, трикальцийфосфат, микрокристаллическая целлюлоза, стеарат магния, бикарбонат натрия, ферроцианид натрия, ферроцианид калия, ферроцианид кальция, фосфат кальция, силикат натрия, коллоидный диоксид кремния, силикат кальция, трисиликат магния, тальк, алюмосиликат натрия, алюмосиликат калия, алюмосиликат кальция, бентонит, силикат алюминия стеариновая кислота, полидиметилсилоксан). Другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами могут быть красители, ароматизаторы, пластификаторы, увлажнители и буферные агенты. В некоторых вариантах осуществления, эксципиенты (например, ароматизаторы) упакованы вместе с композицией. В некоторых вариантах осуществления, эксципиенты (например, ароматизаторы) упакованы отдельно от композиции (например, объединяют с композицией перед введением).

Твердые композиции, используемые в способах по изобретению, могут включать покрытие, предназначенное для защиты композиции от нежелательных химических изменений (например, химического разложения перед высвобождением активных веществ). Покрытие может быть нанесено на твердую дозированную форму способом, аналогичным описанному в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (22nd ed.) ed. L.V. Allen, Jr., 2013, Pharmaceutical Press, Philadelphia, PA.

Порошки и грануляты могут быть приготовлены с использованием упомянутых выше ингредиентов обычным способом с использованием, например, смесителя, аппарата с псевдооживленным слоем, аппарата для отверждения расплава, роторного гранулятора, экструдера/сферонизатора или оборудования для сушки распылением.

Примеры

Хотя некоторые признаки изобретения были проиллюстрированы и описаны в настоящем документе, многие модификации, замены, изменения и эквиваленты теперь очевидны специалистам в данной области техники. Таким образом, следует понимать, что прилагаемая формула изобретения предназначена для охвата всех таких модификаций и изменений, которые соответствуют истинной сущности изобретения. Как таковые, следующие примеры представлены для изучения различных аспектов настоящего изобретения. Эти примеры представляют собой отдельные варианты осуществления аспектов настоящего изобретения, и специалист в данной области техники поймет, что могут быть созданы дополнительные примеры, чтобы в равной степени разъяснить аспекты настоящего изобретения.

Пример 1. Лечение групп мышей C57L/J.

Животные.

И самцов, и самок мышей C57L/J дикого типа в возрасте 6-8 недель приобретают в Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Мышей содержат по схеме 12:12 ч свет-темнота и с доступом к воде и пище *ad libitum*. Эксперименты проводят в соответствии с рекомендациями для лабораторных животных для биомедицинских исследований, опубликованными National Institutes of Health (rev. 2011). Протокол исследования одобрен Institutional Animal Care and Use Committee of Virginia Commonwealth University.

Экспериментальный план лечения.

В каждую группу распределяют равное количество самцов и самок мышей. Под анестезией кетамин/ксилазином (100 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно) мыши получают ей 5 Гр облучение всего тела (ТВИ), с немедленным последующим введением дозы 6,5 Гр в грудь, до достижения общей торакальной дозы 11,5 Гр с использованием Varian 21EX LINAC (Palo Alto, CA). Через двадцать четыре часа после облучения мышей лечат один раз в сутки в течение 6 дней с помощью перорального зонда 1 мг/кг сепиаптерина или 5 мг/кг ВН4, растворенного в воде (фиг. 1).

Пример 2. Оценка сердечной функции.

Эхокардиография.

Всем мышам проводят трансторакальную эхокардиографию на исходном уровне (до облучения (IR)), через 8, 30, 60, 90 и 180 дней под легкой анестезией (30 мг/кг пентобарбитала натрия). Эхокардиографию выполняют с помощью системы визуализации Vevo770 (VisualSonics, Toronto, Ontario, Canada) и датчика с частотой 30 МГц. Сердце визуализируют в В-режиме из парастернальной короткой оси и апикальной проекции. Конечнодиастолический размер (EDD) левого желудочка (LV), конечносистолический размер LV (ESD), конечнодиастолический размер передней стенки LV (AWDT) и конечнодиастолический размер задней стенки LV (PWDT), конечносистолический размер передней стенки LV (AWST) и конечносистолический размер задней стенки LV (PWST) измеряют в М-режиме в соответствии с рекомендациями American Society of Echocardiography. Фракцию выброса LV (EF) и массу LV рассчитывают на основании измерений толщины стенок и диаметров камер. LVEF рассчитывают по формуле Тейхольца ($LVEF = [LVEDD3 - LVESD3] / LVEDD3$), как описано ранее. Допплеровские спектры выводного тракта трансмитрального LV (E, A, ET) регистрируют из апикальной четырехкамерной проекции, и индекс производительности миокарда (MPI) рассчитывают как отношение времени изоволюметрического сокращения (ICT) и времени изоволюметрического расслабления (IRT), деленное на время выброса (ET). Исследователи, делающие и расшифровывающие эхокардиограммы заслеплены относительно распределения лечения. Бета-адренергический агонист изопротеренол (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) в дозе 20 нг/мышь используют для оценки сердечной сократимости у облученных мышей без лечения SP. Сократительную способность сердца (сократительный резерв) выражают в виде доли изменения LVEF, измеренной в покое (LVEF_р) и через 3 мин после инъекции изопротеренола (LVEF_и) и рассчитывают как $[(LVEF_i - LVEF_r) / LVEF_r] * 100$. Проводят измерения сократительного резерва на исходном уровне, через 8, 30, 60, 90 и 180 дней после IR. Оценку эхокардиограммы проводит оператором, заслепленный относительно распределения лечения.

Влияние сепиаптерина на IR-индуцированную кардиомиопатию.

Сердечную деятельность оценивают на исходном уровне у всех мышей до получения IR и перед началом лечения SP. Затем мышей случайным образом распределяют по группам лечения (носитель или SP) после получения IR. Влияние нашей модели ТВИ оценивают с помощью введенной торакальной дозы на систолическую и диастолическую функцию, а также на сократительный резерв в ответ на изопротеренол. Облучение вызывает притупленный ответ на изопротеренол (фиг. 2 и 7), а также увеличение индекса производительности миокарда (фиг. 3 и 8) и времени изоволюметрического расслабления. Ежедневное пероральное введение SP в течение 6 дней после IR способно восстановить ответ на бета-адренергическую стимуляцию изопротеренолом. Кроме того, лечение SP уменьшает прогрессирование систолической и диастолической дисфункции, улучшая прогрессивное увеличение индекса производительности миокарда и IRT. Эти результаты далее оценивают в зависимости от пола животного. С точки зрения систолической и диастолической функции не было никаких существенных различий в реакции сердечной функции на облучение или 1 мг/кг SP (фиг. 14A-14B и 15A-15B). Однако у самцов наблюдается дополнительная значительная потеря сократительного резерва через 90 и 180 дней после IR по сравнению с самками мышей (фиг. 16A-16B). Важно отметить, что у представителей обоих полов SP был одинаково эффективен в смягчении такой потери сократительного резерва.

Пример 3. Оценка легочной функции.

Оценка повреждения легких по частоте дыхания.

Частоту дыхания измеряют каждые две недели, начиная с 6-й недели, с использованием системы Mouse Oх (STARR Life Sciences Corp., Allison Park, PA). Животное помещают под анестезию кетамин/ксилазином и выбривают область анализа. Через 10 мин после инъекции животное помещают в положение лежа на спине с прикрепленным к верхней части бедра датчиком. Частоту дыхания регистрируют в течение 3 мин. Частоту дыхания рассчитывают с помощью алгоритма в программе Mouse Oх.

SP и ВН4 снижают индуцированную облучением потерю легочной функции.

С помощью системы MouseOх у мышей измеряют частоту дыхания как меру дыхательной функции у облученных, облученных с SP (фиг. 9) и облученных с ВН4 (фиг. 5) мышей. У мышей, получающих 1 мг/кг/сутки SP или 5 мг/кг ВН4 в течение 6 дней, наблюдается значительная задержка развития повреждения легких, 14 недель с SP и 10 недель с носителем, и значительно уменьшается нарушение легочной функции по всем точкам измерения, по сравнению с мышами, получающими носитель.

Пример 4. Оценка выживаемости групп мышей.

SP улучшает выживаемость после облучения.

Чтобы определить, повлияло ли улучшение сердечно-легочной функции на общую выживаемость,

за мышами наблюдают в течение 180 дней после ИР. На фиг. 4 показан график выживаемости Каплана-Мейера для мышей C57L/J после общей дозы 11,5 Гр в грудную клетку (5 Гр ТВИ, затем 6,5 Гр в грудную клетку) с и без 1 мг/кг/сутки SP в течение 6 дней. Мыши, облученные без лечения, показывают значительное снижение выживаемости со средней выживаемостью 137 дней и 40% выживаемостью в конце исследования. Напротив, у мышей, получающих 1 мг/кг/сутки SP в течение 6 дней, выживаемость значительно замедлилась и в целом улучшилась: 71% мышей выжили через 180 дней, т.е. в конце исследования.

Пример 5. Экспрессия экзосомальной микроРНК в сыворотке.

Кровь собирают пункцией сердца с использованием флаконов с ЭДТК. Образцы крови центрифугируют при 3000 g в течение 25 мин, и фракцию плазмы аликвотируют и хранят в паровой фазе жидкого азота. Экзосомы выделяют из плазмы мышей в моменты времени, показанные на фиг. 6А-6С с использованием набора для выделения экзосом от 101Bio. Концентрации экзосом определяют количественно с помощью набора EXOCET Exosome Quantitation Kit (System Biosciences). Равное количество экзосом от 5 животных объединяют для каждой временной точки и экстрагируют общую экзосомальную РНК с использованием набора miRNeasy Micro Kit (QIAGEN). Для определения профиля экспрессии miРНК используют анализ miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (QIAGEN) и смесь ExiLent SYBR® Green Maser Mix (QIAGEN). Первоначальную оценку экспрессии экзосомальной miРНК выполняют с использованием Serum/Plasma LNA™ miRNA PCR Panel (Кат. № YAHS-106Y, QIAGEN) на машине QuantStudio 5 RT-PCR (Applied Biosystems).

Пороговые значения цикла (значения Ct), показанные на фиг. 6В-6С являются средними значениями для 5 мышей на группу и нормализованы к hsa-miR-145-5p и hsa-miR-221-3p, которые, как продемонстрировано экспериментально, являются высококачественными контролями нормализации. Выявляют две разные группы экзосомальных miРНК, демонстрирующие значительную разницу между животными, получавшими носитель, и животными, получавшими SP, через 30 дней после ИР. Первая группа включает let-7a-5p, miR-1, miR-106b-3p, miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-181a-5p, miR-335-3p и miR-335-5p. Экспрессия miРНК в этой группе значительно ниже у животных, получавших носитель, по сравнению с животными, получавшими SP. Во второй группе, экспрессия miРНК значительно выше у животных, получавших носитель, по сравнению с животными, получавшими SP. Вторая группа включает let-7g-5p, let-7i-5p и miR-16-5p. Нет никаких существенных различий между самцами и самками как в отношении экспрессии экзосомальной miРНК, измененной ИР, так и в отношении действия сепиаптерина на экспрессию miРНК. miРНК, которые демонстрируют значительные изменения в экспрессии из-за облучения и модулируются сепиаптеринном, участвуют в воспалительных процессах (например, let-7a-5p, miR-106b-3p, miR-181a-5p, let-7i-5p), ангиогенезе и целостности сосудов (miR-106b-3p, miR-126-3p), воспалении и фиброзе сердца (miR-335-5p, let-7i-5p, miR-126-3p, miR-16-5p). miR-16-5p ингибирует передачу сигналов TGF-бета/VEGF. Лечение ВН4 (фиг. 6А) показывает увеличение экспрессии miR-15b-3p, miR-106a-5p, miR-133b, miR-136-5p, miR-451a, miR-1, miR-335-3p, let-7d-3p и/или let-7c-5p.

Пример 6. Экспрессия mРНК цитокинов в тканях сердца и легких.

Выделение РНК и РВ-ПЦР.

Общую РНК выделяют из образцов тканей легких и сердца в соответствии с инструкциями производителя с помощью набора RNeasy Mini (Qiagen). Концентрацию РНК оценивают с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Чистоту РНК оценивают по соотношениям A260/A280 и A260/A230. Целостность РНК оценивают по соотношению 28S/18S рибосомной РНК (rРНК) и числу целостности РНК (RIN) с использованием Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies). Синтез cДНК и элиминацию геномной ДНК проводят с использованием набора RT2 First Strand Kit (QIAGEN). Образцы амплифицируют с использованием зондов RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix от QIAGEN на машине QuantStudio 5 RT-PCR (Applied Biosystems). Используют следующие RT2 qPCR Primer Assays (QIAGEN): актин-β мыши (NM_007393), Bmp2 мыши (NM_007553), Ccl2 мыши (NM_011333), Ctgf мыши (NM_010217), IL-1β мыши (NM_008361), IL-6 мыши (NM_031168), IL-10 мыши (NM_010548), IL-17α мыши (NM_010552), Runx2 мыши (NM_001145920), Spp1 мыши (NM_001204201), TGF-β1 мыши (NM_011577), Trim72 мыши (NM_001079932).

Изменения экспрессии mРНК цитокинов после облучения.

Оценивают экспрессию различных цитокинов (Bmp2, Ccl2, Ctgf, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-33, Runx2, Spp2, TGF-β1 и Trim72) в тканях легких и сердца после облучения животных и лечения через 24 ч в течение 6 дней SP или водой. Экспрессию mРНК в образцах тканей тестируют в три разных момента времени после ИР (8 дней, 30 дней, 16 недель) и сравнивают экспрессию mРНК у не леченных не облученных контрольных животных (фиг. 10). Все оцененные цитокины не показывают существенной разницы в экспрессии между группами животных, получавших носитель, и получавшими SP, в тканях сердца. В легочной ткани цитокины IL-1β, IL-6, IL-17A, Spp2 и TGF-β1 демонстрируют значительную разницу в экспрессии между группами животных, получавших носитель, и получавших SP, в разные моменты времени после ИР. Группа животных, получавших носитель, демонстрирует значительно более высокую относительную экспрессию IL-1β в легочной ткани по сравнению с группой, получавшей SP, через 8 дней и 30 дней (2,9±0,649 к 1,54±0,825 и 3,39±0,532 к 1,66±0,51 соответственно). Относительная экспрессия

IL-6 значительно выше в группе, получавшей носитель, по сравнению с группой, получавшей SP, во всех временных точках после IR (8 дней: $16,88 \pm 4,91$ к $1,36 \pm 0,509$; 30 дней: $9,09 \pm 0,533$ к $4,96 \pm 0,905$; 16 недель: $28,85 \pm 5,987$ к $17,05 \pm 4,12$). Наряду с IL-6, цитокин IL-17A также демонстрирует значительно более высокую экспрессию в группе, получавшей носитель, по сравнению с группой, получавшей SP, во все моменты времени после IR (8 дней: $9,19 \pm 2,783$ к $2,71 \pm 1,874$; 30 дней: $5,65 \pm 2,263$ к $1,49 \pm 0,379$; 16 недель: $4,5 \pm 0,824$ к $2,12 \pm 1,173$). Цитокины Spp2 и TGF- β 1 демонстрируют значительно более высокую экспрессию в легочной ткани в группе, получавшей носитель, по сравнению с группой, получавшей SP, через 16 недель после IR ($4,25 \pm 0,537$ к $2,38 \pm 0,211$ и $3,26 \pm 0,339$ к $1,53 \pm 0,367$). Цитокин Ccl2 демонстрирует значительное увеличение относительной экспрессии в легочной ткани через 30 дней для всех животных без существенных различий между группами животных, получавших носитель, и получавших SP.

Пример 7. ИHC анализ ткани сердца и легких.

ИHC анализ.

Через шестнадцать недель после IR, сердца и правые легкие собирают для гистологического анализа (фиг. 11A-11C). Сердца собирают в формалине, заливают в парафин и нарезают на срезы толщиной 5 мм. Правое легкое перфузируют с помощью OCT и нарезают на срезы по 6 мм. Трихромное окрашивание по Массону выполняют для выявления коллагеновых волокон в соответствии с инструкциями поставщика (трихромный набор Richard-Allan Scientific Masson, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Площадь миокардиального и легочного фиброза рассчитывают как долю площади коллагена от общей площади ткани с использованием компьютерного морфометрического анализа (программное обеспечение Image ProPlus 6.0, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Воспаление, ангиогенез и дифференциацию гладкомышечных клеток измеряют при окрашивании сердца и правого легкого следующими антителами: Ly-6G/Ly-6C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), F40/80 и альфа-sma (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), CD-31 (BD Pharmigen, San Jose, CA, USA). Первичные антитела выявляют с помощью вторичных антител с последующим окрашиванием Новаредом (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) для обнаружения антител. Оценку окрашивания проводят два исследователя, заслепленные относительно распределения лечения на дикотомной (положительный/отрицательный) основе, и положительные результаты впоследствии ранжируют как слабое (1), умеренное (2) или интенсивное (3) окрашивание в зависимости от интенсивности и экстенсивности окрашивания.

Гидроксипролин.

Содержание гидроксипролина измеряют в левой верхней доле легкого с использованием набора для анализа гидроксипролина от Sigma Aldrich (St. Louis, MO), как описано выше.

Пример 8. Белки, измеренные ELISA.

Анализ плазмы.

Во время умерщвления кровь получают пункцией сердца в пробирки, содержащие ЭДТК, и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 25 мин для выделения плазмы. Для анализа используют следующие планшеты ELISA от Abcam: фибриноген (ab213478), нейтрофильная эластаза (ab252356), С-реактивный белок (ab157712) и IL-6 (ab100713). Образцы плазмы обрабатывают и наборы ELISA запускают в соответствии с рекомендациями производителя. Все цитокины представлены в абсолютных единицах. Ключевые молекулярные участники каскада коагуляции, такие как фактор ткани, тромбин и фибриноген, эпидемиологически и механистически связаны с воспалительным компонентом. Генетические и фармакологические исследования выявили ключевую роль фибриногена в определении степени локального или системного воспаления. Нейтрофильная эластаза, серинпротеаза, присутствующая в азурофильных гранулах нейтрофилов, высвобождается при воспалении и разрушает внеклеточный матрикс из-за своей низкой субстратной специфичности, что приводит к повреждению тканей. Нейтрофильная эластаза является одним из самых разрушительных ферментов в организме. Будучи нерегулируемым, этот фермент нарушает функцию барьера проницаемости легких и индуцирует высвобождение провоспалительных цитокинов при стимулировании острого повреждения легких. Воспалительный цитокин IL-6 может активироваться уже через 6 часов после облучения в легочной ткани и крови. Высокий уровень IL-6 в плазме крови может усугубить воспалительную реакцию в легочной ткани, что в конечном итоге вызывает утечку IL-6 в бронхоальвеолы и дальнейшее повреждение легких. Высокие уровни IL-6 в легочной ткани могут привлекать больше воспалительных клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги, к поврежденному локальному легкому, что в конечном итоге вызывает серьезное повреждение легкого и приводит к хроническому фиброзу. Резкий подъем IL-6 в плазме может привести к увеличению С-реактивного белка (CRP). С-реактивный белок (CRP) вырабатывается печенью и является биомаркером общей стрессовой реакции на воспаление или инфекционные агенты. Было показано, что уровень CRP в сыворотке может быть эффективным индикатором для прогнозирования возникновения радиационного пневмонита и ценным фактором для оценки степени индуцированного облучением поражения легких.

Изменения концентрации цитокинов в плазме после IR.

Группа животных, получавших носитель, демонстрирует значительно более высокие уровни IL-6 в плазме по сравнению с группой, получавшей SP, через 4 дня, 8 дней и 180 дней после IR ($304,05 \pm 153,23$

пг/мл к $97,00 \pm 45,71$ пг/мл ($p=0,02$); $606,09 \pm 72,72$ пг/мл к $49,85 \pm 39,36$ пг/мл ($p < 0,001$); и $197,22 \pm 55,55$ пг/мл к $40,06 \pm 43,26$ пг/мл ($p=0,018$), соответственно) (фиг. 13С). Группа животных, получавших носитель, демонстрирует значительно более высокие уровни фибриногена в плазме по сравнению с группой, получавшей SP, через 8 дней после IR ($948,77 \pm 98,54$ мкг/мл к $332,38 \pm 109,02$ мкг/мл ($p < 0,001$)) (фиг. 13В). Группа животных, получавших носитель, демонстрирует значительно более высокие уровни нейтрофильной эластазы в плазме по сравнению с группой, получавшей SP, через 180 дней после IR ($25,21 \pm 6,54$ нг/мл к $12,15 \pm 2,87$ нг/мл ($p=0,034$)) (фиг. 13 D). С-реактивный белок не продемонстрировал существенной разницы между группами животных, получавших носитель, и получавших SP в любых временных точках после IR (фиг. 13А).

Пример 9. Корреляция Спирмена между фиброзом и экспрессией мРНК цитокинов.

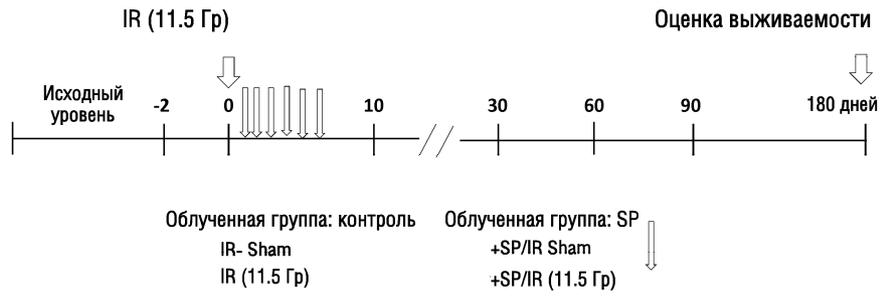
Статистический анализ.

Двусторонний Т-критерий Стьюдента используют для проверки статистической значимости в группах с одной независимой переменной. $P < 0,05$ считается значимым. Ранговую корреляцию Спирмена используют для оценки взаимосвязи между экспрессией специфической мРНК и степенью фиброза легких (фиг. 12). Для сравнения выживаемости между группами используют лог-ранговый анализ.

Вывод. Пероральное введение ВН4 или его метаболического предшественника, SP, начиная через 24 ч после радиационного облучения, улучшает функцию легких и сердца, о чем свидетельствует снижение частоты дыхания, усиление сократительного резерва, улучшение систолической и диастолической функции и увеличение выживаемости.

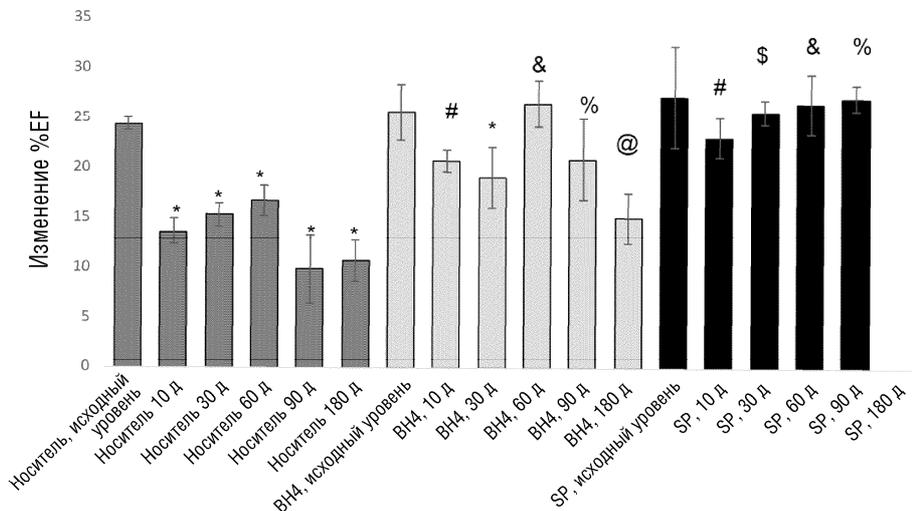
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, подвергнутого облучению, включающий введение субъекту эффективного количества сепиаптерина или его фармацевтически приемлемой соли, где
 - a) введение уменьшает или ингибирует повреждение тканей и/или органов у субъекта;
 - b) введение уменьшает или ингибирует сердечную и/или легочную токсичность у субъекта;
 - c) введение уменьшает гибель эндотелиальных клеток желудочно-кишечного тракта, сердца и/или легких у субъекта; или
 - d) введение уменьшает индуцированное облучением воспаление в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта, сердца и/или легких у субъекта.
2. Способ по п.1, где введение уменьшает или ингибирует повреждение тканей и/или органов у субъекта.
3. Способ по п.1, где введение уменьшает или ингибирует сердечную и/или легочную токсичность у субъекта.
4. Способ по п.1, где введение уменьшает гибель эндотелиальных клеток желудочно-кишечного тракта, сердца и/или легких у субъекта.
5. Способ по п.1, где введение уменьшает индуцированное облучением воспаление в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта, сердца и/или легких у субъекта.
6. Способ по любому из пп.1-5, где эффективное количество составляет от 0,1 до 200 мг/кг/сутки.
7. Способ по любому из пп.1-6, где у субъекта имеется острый лучевой синдром.
8. Способ по п.7, где введение происходит в течение 24 ч после облучения.
9. Способ по п.7, где введение проводят по меньшей мере через 24 ч после облучения.
10. Способ по любому из пп.1-6, где у субъекта имеется хронический лучевой синдром.
11. Способ по любому из пп.1-6, где у субъекта имеется кожный лучевой синдром.
12. Способ по любому из пп.1-6, где субъект подвергается воздействию по меньшей мере 0,3 Гр менее одного дня.
13. Способ по любому из пп.1-6, где субъект подвергается воздействию по меньшей мере 0,7 Гр в течение периода более одного дня.
14. Способ по любому из пп.1-13, где введение осуществляют по меньшей мере один раз в день в течение по меньшей мере шести дней.
15. Способ по любому из пп.1-14, где введение повышает экспрессию miR-15b-3p, miR-106a-5p, miR-133b, miR-136-5p, miR-451a, miR-1, miR-335-3p, let-7d-3p и/или let-7c-5p.
16. Способ по любому из пп.1-15, где введение снижает экспрессию IL-1 β , IL-6, IL-17A, Spp2 и/или TGF- β 1 в эпителиальных клетках легкого.
17. Способ по любому из пп.1-16, где введение повышает экспрессию let-7a-5p, miR-1, miR-106b-3p, miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-181a-5p, miR-335-3p и/или miR-335-5p.
18. Способ по любому из пп.1-17, где введение снижает экспрессию let-7g-5p, let-7i-5p и/или miR-16-5p.
19. Способ по любому из пп.1-18, где введение осуществляют по меньшей мере ежедневно в течение по меньшей мере 14 дней.



- Не инвазивные измерения: эхокардиография, частота дыхания, масса тела, КТ на исходном уровне и через 10, 30, 90, 180 дней после RT, n=15/группу в каждый момент времени.
- Молекулярный и иммуногистохимический анализ: исходный уровень и через 10, 30, 90, 180 дней после RT

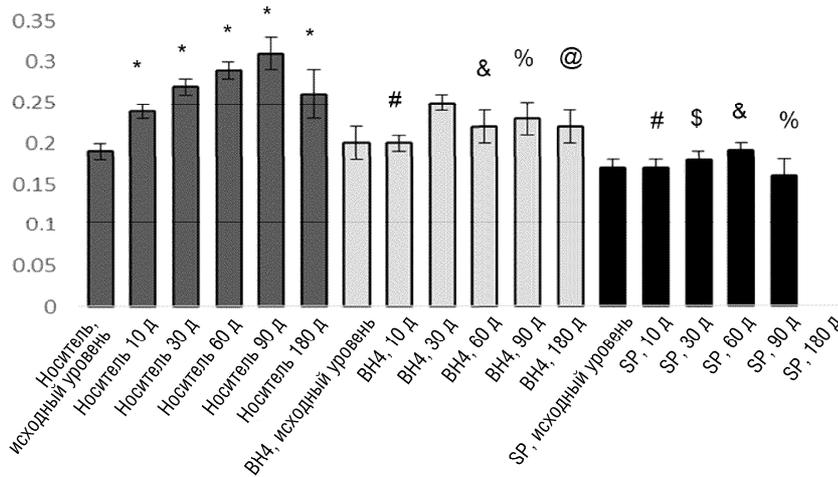
Фиг. 1



*p<0.05 к исходному уровню

#p<0.05 к носителю 10 д, p<0.05 к носителю 30 д, p<0.05 к носителю 60 д, p<0.05 к носителю 90 д, @p<0.05 к носителю.

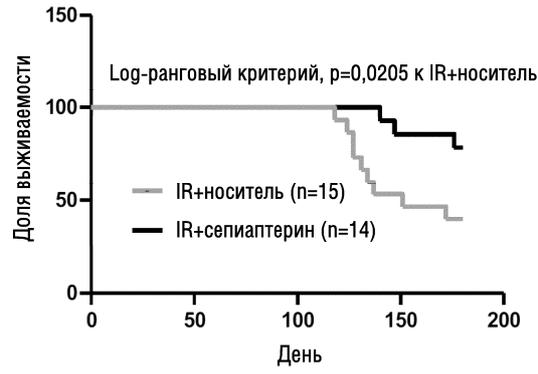
Фиг. 2



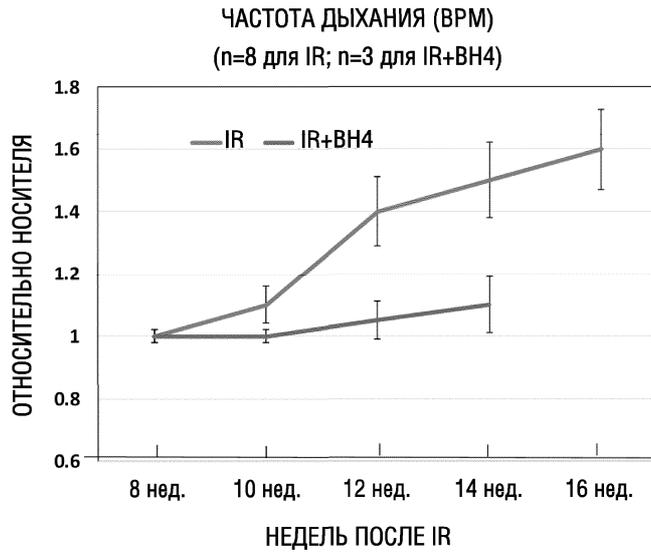
*p<0.05 к исходному уровню

#p<0.05 к носителю 10 д, p<0.05 к носителю 30 д, p<0.05 к носителю 60 д, p<0.05 к носителю 90 д, @p<0.05 к носителю.

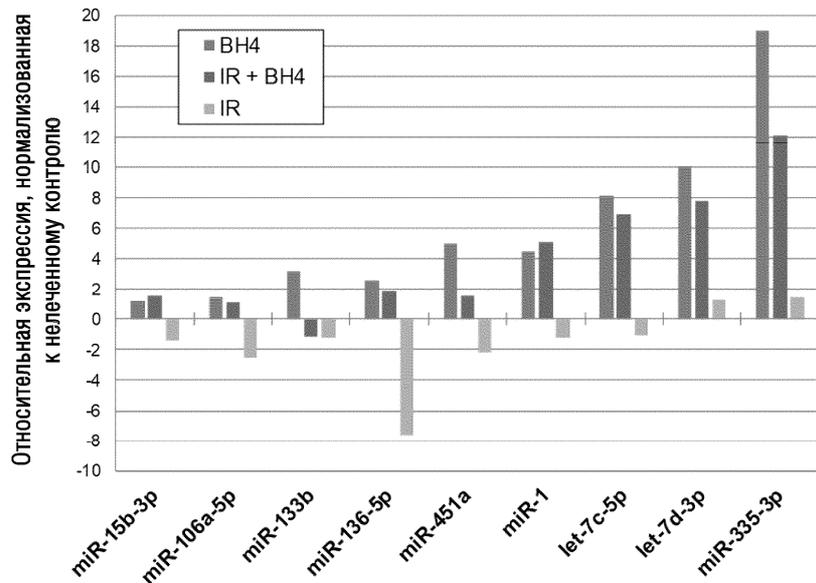
Фиг. 3



Фиг. 4



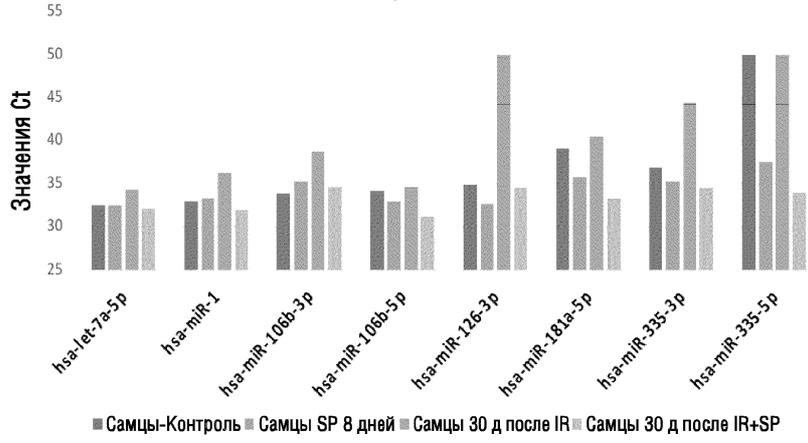
Фиг. 5



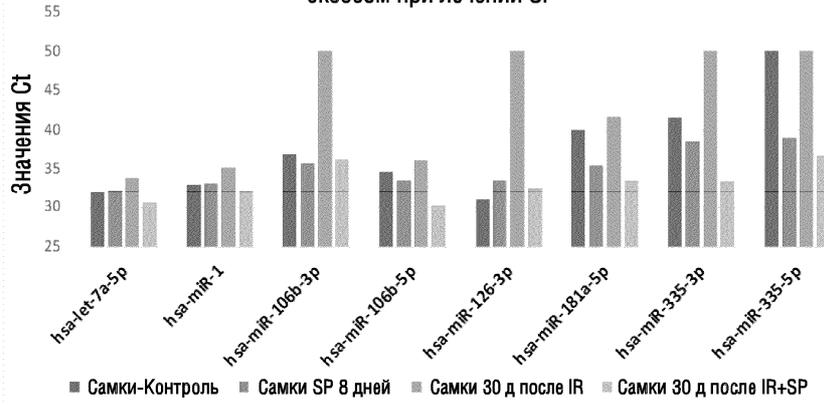
Фиг. 6А

Ингибированная IR miРНК экзосом

Самцы: восстановление ингибированной IR экспрессии miРНК экзосом при лечении SP

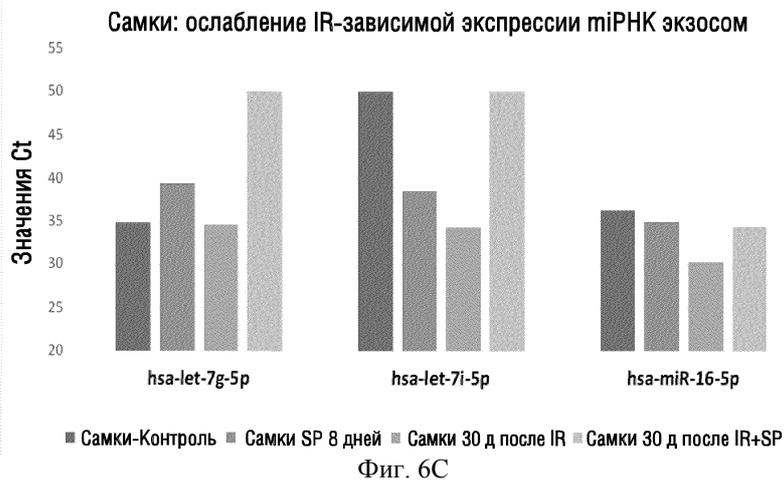
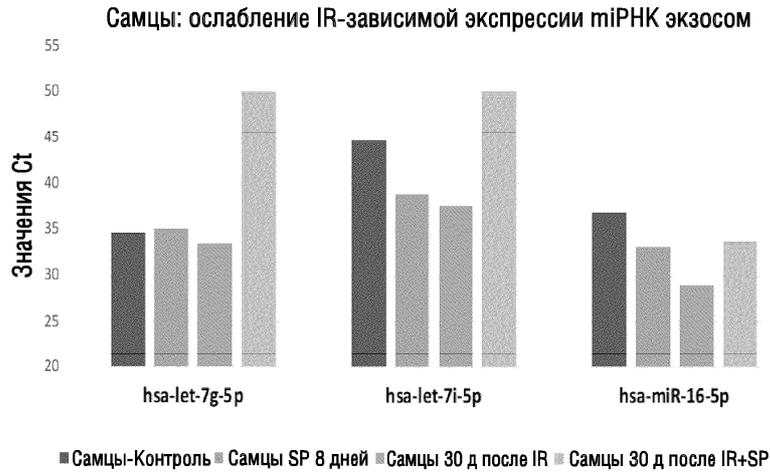


Самки: восстановление ингибированной IR экспрессии miРНК экзосом при лечении SP

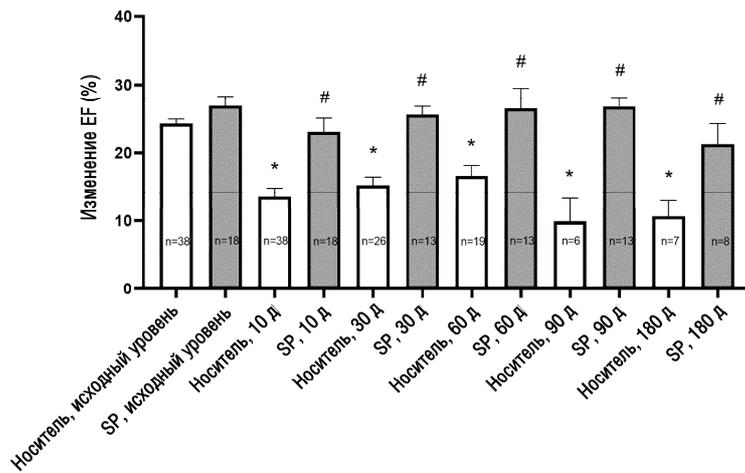


Фиг. 6В

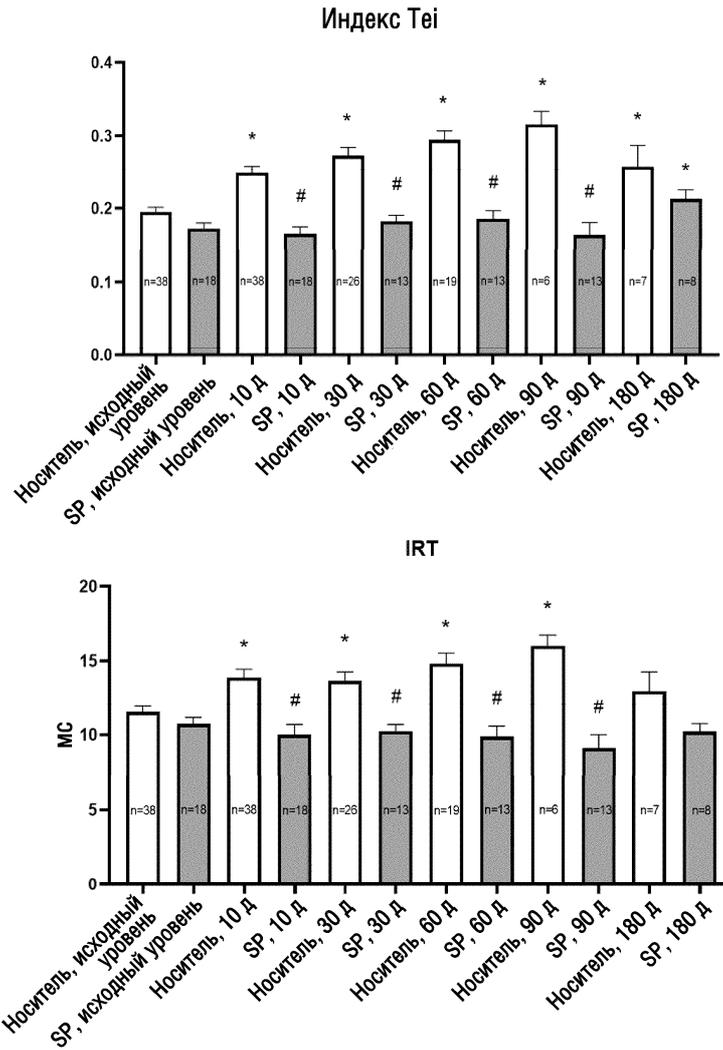
Индукцированная IR miРНК экзосом



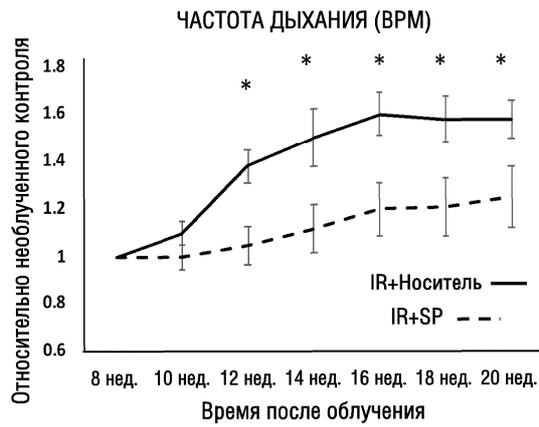
Фиг. 6С



Фиг. 7

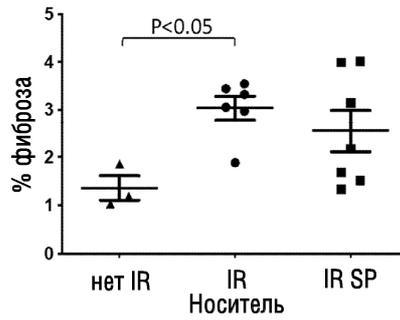


Фиг. 8



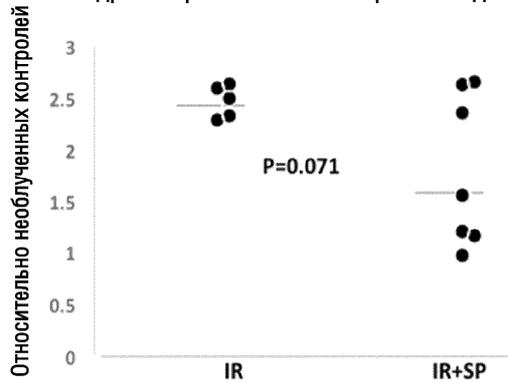
Фиг. 9

Фиброз легких 16 недель



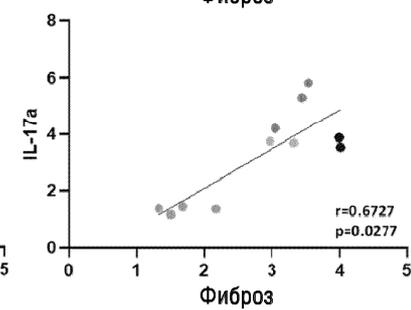
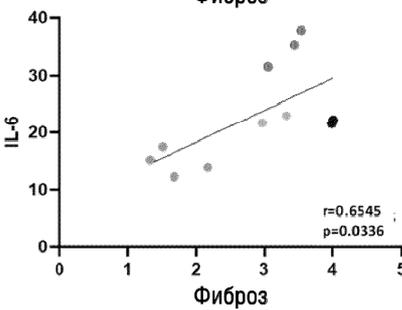
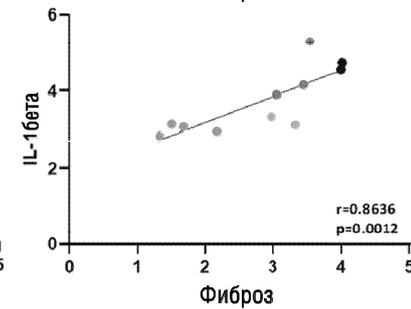
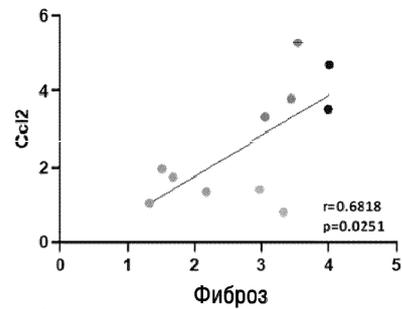
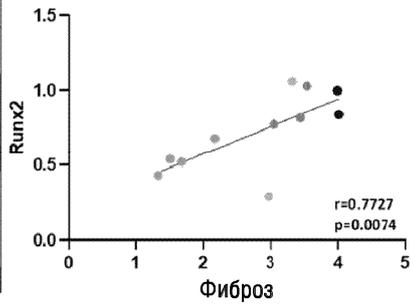
Фиг. 11В

Гидроксипролин в легких через 16 недель

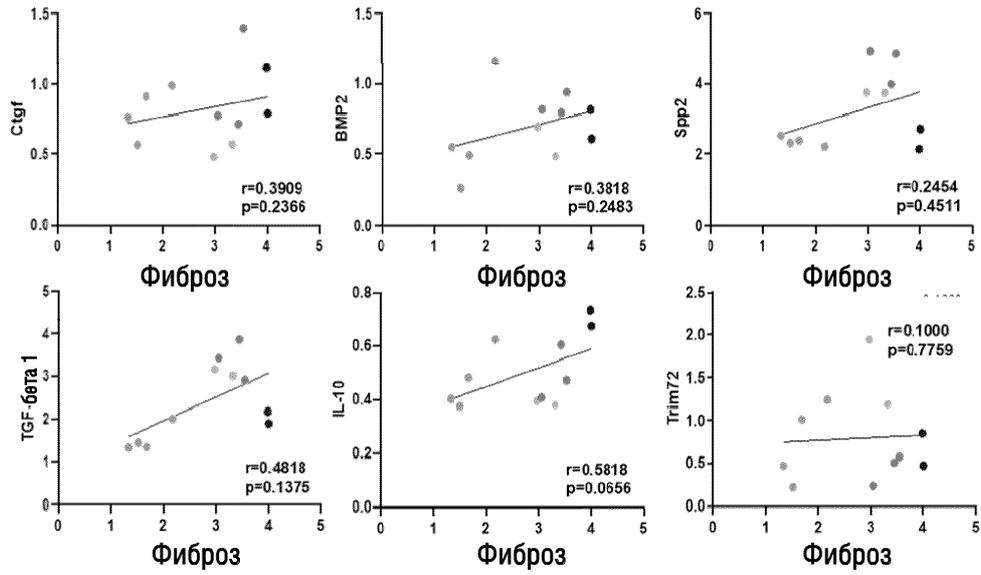


Фиг. 11С

группа	#	Фиброз	Относительная экспрессия				
			Ccl2	Runx2	IL-1β	IL-6	IL-17a
IR + Носитель	M1	2.97	1.43	0.29	3.32	21.65	3.74
	M2	3.32	0.83	1.06	3.10	22.98	3.68
	M3	3.44	3.79	0.82	4.16	35.26	5.29
	M4	3.54	5.28	1.03	5.28	37.74	5.82
	F1	3.05	3.31	0.78	3.90	31.45	4.20
IR + SP	M1	4.01	4.69	0.84	4.74	22.19	3.53
	M2	2.17	1.37	0.68	2.93	13.80	1.36
	M3	1.33	1.06	0.43	2.81	15.10	1.37
	M5	1.68	1.75	0.52	3.06	12.17	1.44
	F1	1.51	1.97	0.54	3.13	17.50	1.16
	F2	3.99	3.51	1.00	4.65	21.53	3.87

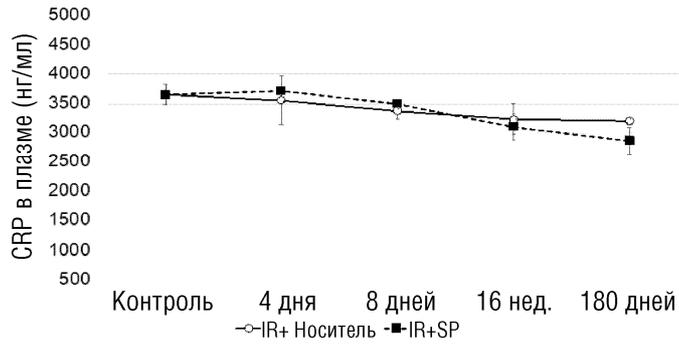


группа	#	Фиброз	Относительная экспрессия					
			Ctgf	BMP2	Spp2	TGF-бета 1	IL-10	Trim72
IR + Носитель	M1	2.97	0.48	0.69	3.74	3.16	0.39	1.94
	M2	3.32	0.57	0.48	3.73	3.00	0.38	1.19
	M3	3.44	0.71	0.79	3.97	3.85	0.60	0.51
	M4	3.54	1.40	0.94	4.86	2.91	0.47	0.57
	F1	3.05	0.77	0.82	4.93	3.42	0.41	0.24
IR + SP	M1	4.01	0.79	0.61	2.71	1.88	0.67	0.47
	M2	2.17	0.99	1.16	2.21	1.99	0.62	1.24
	M3	1.33	0.76	0.55	2.52	1.32	0.40	0.47
	M5	1.68	0.91	0.49	2.38	1.34	0.48	1.01
	F1	1.51	0.57	0.26	2.31	1.44	0.38	0.22
	F2	3.99	1.11	0.81	2.14	2.17	0.74	0.85

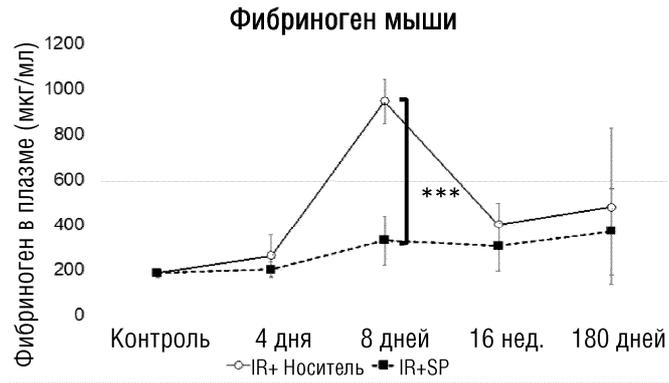


Фиг. 12

CRP мыши

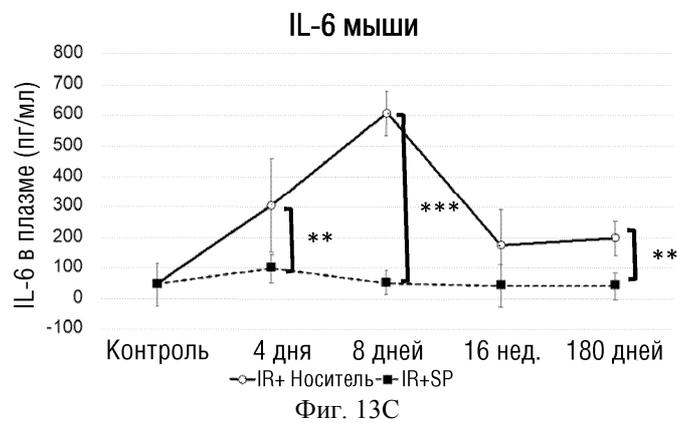


Фиг. 13А

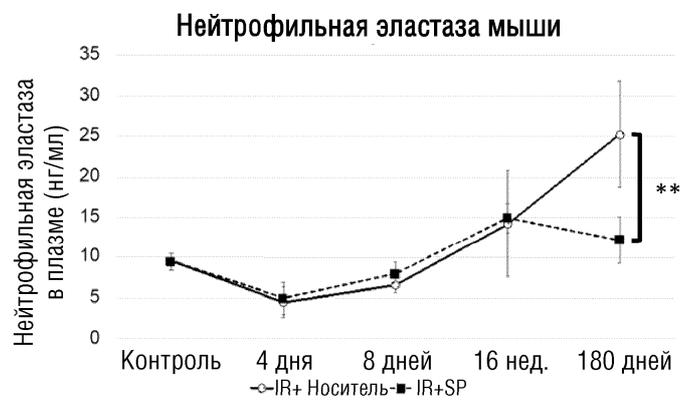


** - р-значение < 0.05; *** - р-значение < 0.001

Фиг. 13В

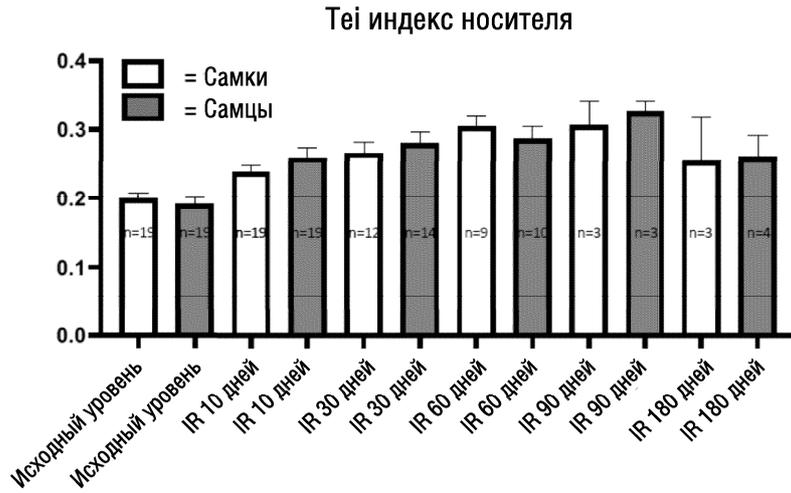


Фиг. 13С

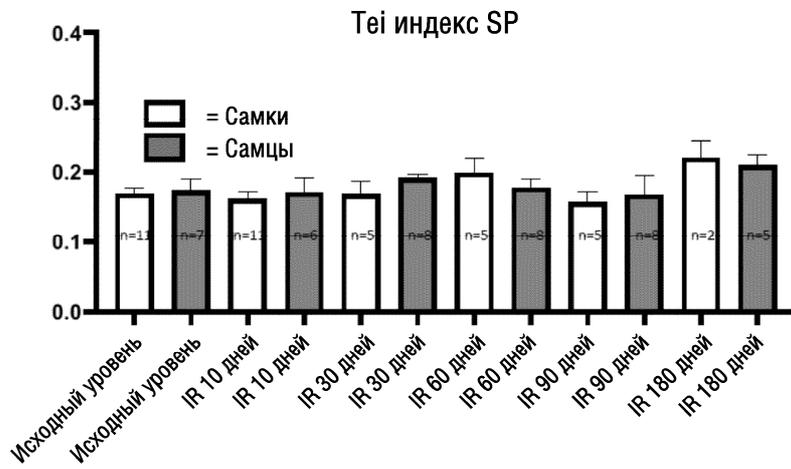


** - р-значение < 0.05; *** - р-значение < 0.001

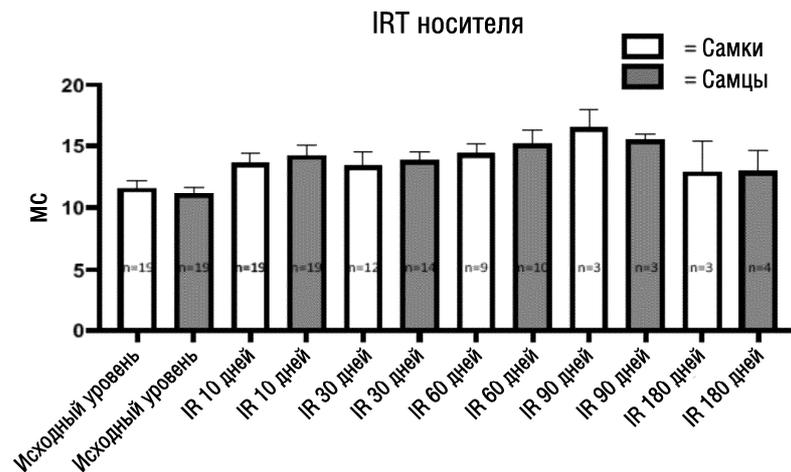
Фиг. 13D



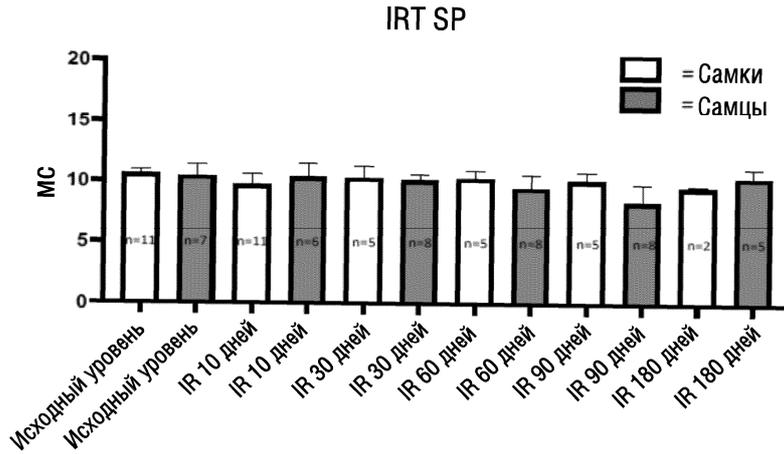
Фиг. 14А



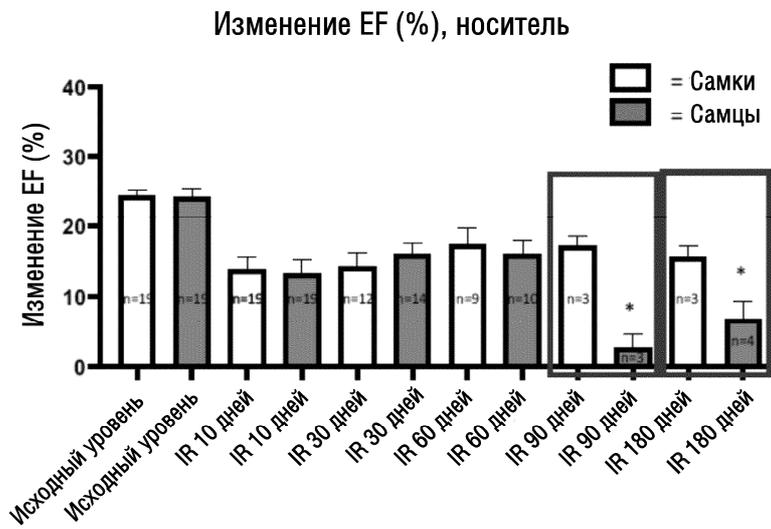
Фиг. 14В



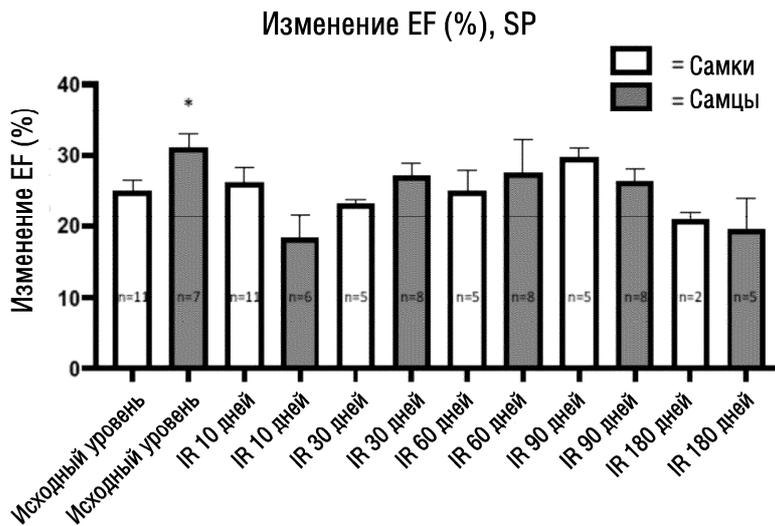
Фиг. 15А



Фиг. 15В



Фиг. 16А



Фиг. 16В

