

## 发明名称: 化合物在预防或治疗放射性脑损伤中的应用

### 技术领域

[0001] 本公开涉及 $5\alpha$ -雄甾- $3\beta$ , $5,6\beta$ -三醇及其衍生物在预防或治疗放射性脑损伤中的应用。

### 背景技术

[0002] 放射治疗是头颈部原发及转移肿瘤的重要治疗方法。头颈部肿瘤患者在放射治疗后产生中枢神经系统损害症状的疾病，是肿瘤患者放疗后的严重并发症。立体定向放射治疗脑膜瘤后放射性脑损伤(RBI)的发生率为28~50%，鼻咽癌放疗后放射性脑损伤的4年累计发生率为1.9~5%，低分化胶质瘤放疗后放射性脑损伤的4年累计发生率为1~24%，脑转移瘤放疗后放射性脑损伤的1年累计发生率为8~20%，鼻咽癌为首发疾病的放射性脑损伤中，33%患者最终发展为双侧颞叶放射性脑损伤。脑组织能耐受的累积放疗总剂量为50~60Gy，在此范围以外，放射性脑损伤的发生率随着累积放疗总剂量的增加而明显升高。在接受再程放疗的患者中，放射性脑损伤的5年累计发生率可达20%以上。在患者生活质量已成为仅次于生存率评价放射治疗疗效的今天，放射性损伤愈来愈受到关注。

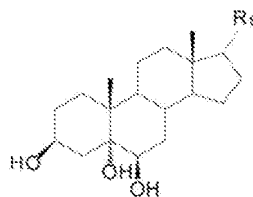
[0003] 放射性脑损伤(RBI)根据出现时间分为急性型、早迟发反应型、晚迟发反应型。急性型放射性脑损伤常为急性放射综合征(acute radiation syndrome, ARS)中多器官损伤的一部分。症状常发生于放疗过程中或照射后数天至1个月，多数在照射初期表现为头痛、恶心、呕吐、记忆力减退等症状。严重者可迅速进展至意识障碍、定向障碍、共济失调，部分可在数日内出现昏迷并死亡。早迟发反应型常发生于照射后1-6个月，表现为嗜睡、恶心、呕吐、易怒、记忆力减退等，也可表现为一过性的疲劳感或局部神经系统症状的恶化，可见嗜睡综合征、脑干脑炎、肿瘤假性进展等临床亚型。晚迟发反应型出现于照射结束6个月以后，是放射性脑损伤最常见的临床类型，又称晚发性放射性脑损伤，常见于脑部照射剂量大于50Gy者。

[0004] 放射性脑损伤的传统治疗方案是糖皮质激素，但糖皮质激素对放射性脑损伤的治疗多基于临床经验、病例报道和回顾性分析结果，目前仍缺少大型的临床随机对照研究。2011年一项随机双盲安慰剂对照研究显示，使用贝伐珠单抗的患者脑损伤病灶均有不同程度缩小，神经功能明显改善，且在后续10个月的随访中，仅有2例患者出现放射性脑损伤复发。研究报道，注射用鼠神经生长因子有减轻动物血脑屏障受损、修复微血管等作用，提示其能促进放射性脑损伤恢复。此外，脱水药物的使用并不是放射性脑损伤的常规对症支持方法，建议仅在放射性脑损伤患者出现病情急速进展，且影像学证实放射性脑损伤病灶存在急性占位效应时短期应用，疗程在5~7天以内。

[0005] 目前临床上仍然急需针对放射性脑损伤的药物。

[0006] 发明内容

[0007] 本发明的一个方面提供式I的化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗放射性脑损伤的药物中的应用，



(式I)

[0008] 其中R<sub>1</sub>选自H、-CN、氟、氯、C<sub>1-10</sub>烷基、氟或氯取代的C<sub>1-10</sub>烷基、C<sub>1-10</sub>烷氧基、氟或氯取代的C<sub>1-10</sub>烷氧基和C<sub>3-10</sub>环烷基。

[0009] 本发明的另一个方面提供一种预防或治疗放射性脑损伤的方法，所述方法包括向经受放射性治疗的对象施用式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0010] 本发明的再一个方面提供用于预防或治疗放射性脑损伤的式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0011] 在上述任一个方面，在一些实施方式中，其中放射性脑损伤的照射剂量为50Gy或以上。

- [0012] 在上述任一个方面，在一些实施方式中，其中放射性脑损伤是伽马射线放射性脑损伤。
- [0013] 在上述任一个方面，在一些实施方式中，其中所述放射性脑损伤是早迟发反应型或晚迟发反应型放射性脑损伤。
- [0014] 在上述任一个方面，在一些实施方式中，其中所述放射性脑损伤是晚迟发反应型放射性脑损伤的水肿期或坏死期。
- [0015] 在上述任一个方面，在一些实施方式中，其中 $R_1$ 是H、 $-CHCH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_2)_3CH_3$ 或 $-CH(CH_3)(CH_2)_3CH(CH_3)_2$ ，优选 $R_1$ 是H。
- [0016] 本发明提供的化合物减轻伽马射线辐射对脑组织造成的损伤，对RBI具有良好的预防或治疗作用。

## 附图说明

- [0017] 图1：YC-6在伽马刀照射诱导C57BL/6小鼠局灶性放射性脑损伤中作用评价的试验流程图。
- [0018] 图2：YC-6显著减少伽马射线诱导的放射性脑损伤体积。A图：动物MRI影像代表图，每一列5张脑图代表一只动物的脑组织，白色信号区为损伤病灶区。B图：减轻伽马射线辐照对脑组织造成的损伤。与RBI+Saline模型组比较，★表示 $P<0.05$ 。
- [0019] 图3：YC-6抑制放射性脑损伤后星形胶质细胞的活化。A图：脑病灶丘脑部位GFAP免疫荧光染色，白色标尺指示 $200\mu m$ 。B图：对A图GFAP阳性细胞进行计数，即随机选取脑片损伤病变区域的3个视野采用Image J软件对所选视野进行GFAP的阳性细胞进行计数为单位面积下GFAP的阳性细胞数，取平均值。\*\*\*\*表示 $P<0.0001$ ， $n=5$ 。
- [0020] 图4：YC-6抑制少突胶质细胞的减少和恢复MAG水平。A图：脑病灶丘脑部位CC1和MAG免疫荧光染色，白色标尺指示 $200\mu m$ 。B图：对A图CC1阳性细胞进行计数，即随机选取脑片损伤病变区域的3个视野采用Image J软件对所选视野进行CC1的阳性细胞进行计数为单位面积下CC1的阳性细胞数，取平均值。C图：对A图MAG免疫荧光强度的统计，即随机选取脑片损伤病变区域的3个视野采用

Image J软件对所选视野进行MAG的荧光信号强度定量为单位像素面积下MAG的荧光强度，取平均值。\*\*\*\*表示 $P < 0.0001$ ， $n = 5$ 。

## 具体实施方式

[0021] 定义

[0022] 如本文所用，术语“组合物”指适于给预期动物对象施用以达到治疗目的的制剂，其含有至少一种药物活性组分，例如化合物。任选地，所述组合物还含有至少一种药物学上可接受的载体或赋形剂。

[0023] 术语“药学上可接受的”表示所述物质不具有这样的特性，即考虑到将被治疗的疾病或病症以及各自的施用途径，该特性将会使理性谨慎的医学从业者避免给患者服用该物质。例如，对于可注射物来说，通常要求这样的物质是基本无菌的。

[0024] 在本文中，术语“预防有效量”和“治疗有效量”表示所述物质和物质的量对于预防、减轻或改善疾病或病症的一种或多种症状，和/或延长接受治疗的对象的存活是有效的。

[0025] 本文使用的“治疗”包括给予本申请的化合物或其药学上可接受的盐，以减轻疾病或病症的症状或并发症，或消除疾病或病症。本文使用的术语“减轻”用于描述病症的迹象或症状的严重性降低的过程。症状可减轻而没有消除。在一种实施方案中，给予本申请的药物组合物导致消除迹象或症状。

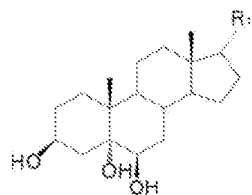
[0026] 本文使用的“预防”包括给予本申请的化合物或其药学上可接受的盐，以防止产生特定疾病、症状或并发症。

[0027] 本文使用的术语“ $C_{1-10}$ ”或“ $C_{3-10}$ ”或类似表达是指具有1至10个或3至10个碳原子。例如 $C_{1-10}$ 烷基是指具有1至10个碳原子的烷基，如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、癸基等。

[0028] 化合物及其药学上可接受的盐

[0029] 可用于本发明的方法或应用的化合物包括式I的化合物或其药学上可接受的盐

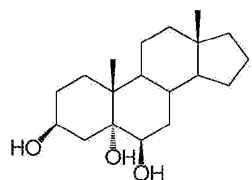
,



(式 I)

[0030] 其中 $R_1$ 选自H、-CN、氟、氯、 $C_{1-10}$ 烷基、氟或氯取代的 $C_{1-10}$ 烷基、 $C_{1-10}$ 烷氧基、氟或氯取代的 $C_{1-10}$ 烷氧基和 $C_{3-10}$ 环烷基。式I的化合物或其药学上可接受的盐在本文也称为“本发明的化合物”。

[0031] 在一种实施方式中, 其中 $R_1$ 为H, 即所述化合物为 $5\alpha$ -雄甾- $3\beta, 5, 6\beta$ -三醇(在本发明中有时以代号“YC-6”表示), 其结构式如式(II)所示。



(式 II)

[0032] 在一个实施方式中,  $R_1$ 为 $-\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ , 所述化合物是17-亚丙基-雄甾- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -三醇。在一个实施方式中,  $R_1$ 为 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 所述化合物是17-异丙基-雄甾- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -三醇。在一个实施方式中,  $R_1$ 为 $-\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , 所述化合物是17-丁基-雄甾- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -三醇。在一个实施方式中,  $R_1$ 为 $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 所述化合物是胆甾烷- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$ -三醇。

[0033] 本发明的化合物可以被配制为药学上可接受盐的形式。预期的药学上可接受的盐形式包括, 但不限于, 单盐、双盐、三盐、四盐等。药学上可接受盐在它们被施用的量和浓度下是无毒的。在不阻止其发挥生理效应的情况下, 通过改变化合物的物理特性, 这样的盐的制备可以便于药理学应用。在物理性质上有用的改变包括降低熔点以便经粘膜给药, 以及增加溶解度以便施用更高浓度的药物。

[0034] 药学上可接受的盐包括酸加成盐, 例如那些含硫酸盐、氯化物、氢氯化物、延胡索酸盐、马来酸盐、磷酸盐、氨基磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己氨基磺酸盐和奎尼酸盐的盐。药学上可接受的盐可以从酸获得, 所述酸例如盐酸、马来酸、

硫酸、磷酸、氨基磺酸、乙酸、柠檬酸、乳酸、酒石酸、丙二酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、环己氨基磺酸、延胡索酸和奎尼酸。

- [0035] 当酸性官能团例如羧酸或酚存在时，药学上可接受的盐也包括碱加成盐，例如那些含有苄星青霉素、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙醇胺、叔丁胺、乙二胺、葡甲胺、普鲁卡因、铝、钙、锂、镁、钾、钠、铵、烷基胺和锌的盐。使用合适的相应的碱可以制备此类盐。
- [0036] 通过标准技术，可以制备药学上可接受的盐。例如，将游离碱形式的化合物溶解在合适的溶剂中，例如含有适宜酸的水性溶液或水-醇溶液中，然后蒸发溶液进行分离。在另一个实例中，通过使游离碱和酸在有机溶剂中反应来制备盐。
- [0037] 例如，如果特定化合物是碱，则可以通过本领域可得到的任何合适方法制备所需的药学上可接受的盐，例如，用无机酸或有机酸处理游离碱，所述无机酸例如是盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸和类似酸，所述有机酸例如是乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖苷酸(pyranosidyl acid)(如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 $\alpha$ -羟基酸(如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(如天冬氨酸或谷氨酸)、芳香酸(如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(如对甲苯磺酸或乙磺酸)或类似物。
- [0038] 同样，如果特定化合物是酸，则可以通过任何合适方法制备所需的药学上可接受的盐，例如，用无机碱或有机碱处理游离酸，所述无机碱或有机碱例如是胺(伯胺、仲胺或叔胺)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物或类似物。合适的盐的示范性例子包括有机盐，其衍生自氨基酸(如L-甘氨酸、L-赖氨酸和L-精氨酸)、氨、伯胺、仲胺和叔胺，以及环胺(如羟乙基吡咯烷、哌啶、吗啉和哌嗪)，以及无机盐，其衍生自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂。
- [0039] 化合物的药学上可接受的盐可以作为络合物存在。络合物的例子包括8-氯茶碱络合物(例如，茶苯海明：苯海拉明8-氯茶碱(1:1)络合物；晕海宁)和各种包含环糊精的络合物。
- [0040] 药物组合物
- [0041] 本发明另一方面提供一种药物组合物，其包含治疗或预防有效量的式I的化合物(例如YC-6)或药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体。

- [0042] 在本发明中，“药物组合物”是指包含式I化合物和药学上可接受的载体的组合物，其中化合物和药学上可接受的载体以混合形式存在于组合物中。所述组合物一般将被用于人类对象的治疗。然而，它们也可以被用于治疗在其它动物对象中的相似的或相同的病症。在本文中，术语“对象”、“动物对象”和类似术语指人和非人类脊椎动物，例如哺乳动物，如非人类灵长类，竞技动物和商业动物，例如马、牛、猪、绵羊、啮齿类动物，和宠物(如狗和猫)。
- [0043] 合适的剂型，部分地取决于用途或给药的途径，例如经口、经皮、经粘膜、吸入或通过注射(肠胃外)。此类剂型应当使该化合物能够到达靶细胞。其它因素在本领域中是熟知的，包括需要考虑的事项，诸如毒性和延迟化合物或组合物发挥其效应的剂型。
- [0044] 载体或赋形剂可以被用于生产组合物。所述载体或赋形剂可以被选择为促进化合物的给药。载体的例子包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖(例如乳糖、葡萄糖或蔗糖)、或淀粉类型、纤维素衍生物、明胶、植物油、聚乙二醇和生理相容性溶剂。生理上相容性溶剂的例子包括注射用水(WFI)无菌溶液、盐溶液和葡萄糖。
- [0045] 可以通过不同的路径施用组合物或组合物的组分，包括静脉内、腹膜内、皮下、肌内、经口、经粘膜、直肠、经皮或吸入。在一些实施方式中，优选注射剂或冻干粉针剂。对口服而言，例如，化合物可以被配制为常规口服剂型，例如胶囊、片剂，以及液体制剂，例如糖浆、酏剂和浓缩滴剂。
- [0046] 可以获得口服用途的药物制剂，例如通过将组合物或其组分与固体赋形剂组合，任选研磨所形成的混合物，以及在加入合适的辅剂之后(如需要)加工颗粒的混合物，从而获得片剂或糖衣丸。合适的赋形剂特别是填料，如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨醇；纤维素制剂，例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠(CMC)和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP：聚维酮(povidone))。如果需要，可以加入崩解剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或它们的盐，例如藻酸钠。
- [0047] 作为选择，可以使用注射(肠胃外给药)，例如肌内的、静脉内的、腹膜内的和/或皮下的。对于注射而言，本发明的组合物或其组分被配制为无菌液体溶液，

优选在生理相容的缓冲液或溶液中，例如盐水溶液、Hank溶液或Ringer溶液。

另外，组合物或其组分可以被配制为固体形式，并在使用之前一刻被再溶解或悬浮。也可以生产冻干粉形式。

[0048] 给药也可以通过经粘膜、局部或经皮方式。对于经粘膜、局部或经皮给药，在配方中使用适合待穿透的屏障的穿透剂。这样的穿透剂在本领域中是普遍已知的，包括，例如，对于经粘膜给药，胆汁盐和梭链孢酸衍生物。另外，去垢剂可以用于促进穿透。经粘膜给药，例如，可以通过鼻喷雾或栓剂。

[0049] 通过标准程序可以确定待施用的各种组分的有效量，考虑的因素例如所述化合物 $IC_{50}$ 、所述化合物的生物半衰期、对象的年龄、大小和体重以及与对象有关的病症。这些因素和其它因素的重要性对本领域普通技术人员而言是熟知的。一般而言，剂量将在被治疗的对象的大约0.01mg/kg至50mg/kg之间，优选在0.1mg/kg至20mg/kg之间。可以使用多次剂量。

[0050] 本发明的组合物或其组分还可以与治疗相同疾病的其他治疗剂结合使用。这种结合使用包括在不同时间施用这些化合物以及一种或多种其他治疗剂，或同时使用这种化合物和一种或多种其他治疗剂。在一些实施方式中，可对本发明的一种或多种化合物或结合使用的其他治疗剂的剂量进行修改，例如，通过本领域技术人员已知的方法降低相对于单独使用的化合物或治疗剂的剂量。

[0051] 要理解的是，结合使用或联用包括与其他疗法、药物、医学程序等一起使用，其中该其他疗法或程序可在不同于本发明的组合物或其组分的时间(例如，在短期内(如几个小时，如1、2、3、4-24小时)或在较长时间内(如1-2天、2-4天、4-7天、1-4周))(或在与本发明的组合物或其组分相同的时间被施用。结合使用还包括与一次或不频繁施用的疗法或医学程序(如手术)一起使用，并伴随本发明的组合物或其组分在该其他疗法或程序之前或之后的短期或较长时间段内的施用。在一些实施方式中，本发明用于递送本发明的组合物或其组分和一种或多种其他药物治疗剂，它们通过相同或不同给药途径递送。

[0052] 任何给药途径的结合施用包括通过相同给药途径将本发明的组合物或其组分和一种或多种其他药物治疗剂以任何制剂形式一起递送，包括两种化合物化学地相连且它们在施用时保持各自治疗活性的制剂。在一个方面，该其他药物疗

法可与本发明的组合物或其组分共同施用。通过共同施用的结合使用包括施用共制剂(co-formulation)或化学上连接的化合物的制剂，或在短期内(例如，1小时内、2小时内、3小时内、直至24小时内)施用两种或多种独立制剂形式的化合物，它们以相同或不同的途径给药。

- [0053] 独立制剂的共同施用包括经由一个装置的递送的共同施用，例如相同吸入装置、相同注射器等，或相对彼此短期内由不同装置施用。通过相同给药途径递送的本发明的化合物和一种或多种额外的药物疗法的共制剂包括将材料一起制备从而它们可通过一个装置被施用，包括不同化合物组合在一种制剂中，或化合物被修饰从而使得它们在化学上连接在一起但仍保持各自的生物学活性。这种化学上连接的化合物可包括将两个活性成分分开的连接体，该连接体在体内基本维持，或在体内可能降解。
- [0054] 医药用途及治疗方法
- [0055] 在一个方面，本发明提供式I的任一化合物或药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗对象的放射性脑损伤的药物中的应用。
- [0056] 在另一个方面，本发明提供预防或治疗对象的放射性脑损伤的方法，包括向有需要的对象施用治疗有效量的式I的任一化合物或药学上可接受的盐，或包含式I的任一化合物或药学上可接受的盐的药物组合物。
- [0057] 在另一个方面，本发明提供用于预防或治疗放射性脑损伤的本发明式I的任一化合物或药学上可接受的盐或包含式I的任一化合物或药学上可接受的盐的药物组合物。
- [0058] 在上述任一方面，在优选的实施方式中，所述化合物是YC-6。
- [0059] 在上述任一方面，在优选的实施方式中，所述放射性脑损伤的照射剂量为50Gy或以上，例如是50Gy至100Gy，例如50Gy至90Gy，50Gy至80Gy，50Gy至70Gy，50Gy至60Gy，60Gy至100Gy，60Gy至90Gy，60Gy至80Gy，60Gy至70Gy，70Gy至100Gy，70Gy至90Gy，70Gy至80Gy，80Gy至100Gy，80Gy至90Gy或90Gy至100Gy。在上述任一方面，在优选的实施方式中，所述放射性脑损伤的照射剂量为100Gy以下。例如，放射性脑损伤的照射剂量为50Gy、55Gy、60Gy、65Gy、70Gy、75Gy、80Gy、85Gy、90Gy、95Gy或1

00Gy。在其他实施方式中，所述放射性脑损伤的照射剂量低于50Gy。在其他实施方式中，所述放射性脑损伤的照射剂量高于100Gy。

[0060] 在上述任一方面，在优选的实施方式中，所述放射性脑损伤是伽马射线放射性脑损伤，如钴-60伽马射线。在上述任一方面，在其他实施方式中，所述放射性脑损伤是 $\alpha$ 射线、 $\beta$ 射线、 $\gamma$ 射线、x射线、中子、电子线、质子束、粒子束和其组合的放射性脑损伤。普通X线机用于治疗表浅肿瘤。各种加速器产生的高能X可以治疗任何部位的肿瘤，尤其对较深部的肿瘤治疗效果较好。

[0061] 在上述任一方面，放射性脑损伤是急性型、早迟发反应型或晚迟发反应型放射性脑损伤，更优选是晚迟发反应型放射性脑损伤。根据影像学表现和特点，晚迟发反应型可分为无病灶期、水肿期、坏死期、囊变期，各期表现可能同时或先后出现在同一患者脑部的不同部位。(1)无病灶期：患者在影像学上无可见病灶，但具有脑损伤的临床表现，包括头痛、认知功能障碍、癫痫发作、神经功能障碍(如肢体麻木)等放疗后新发脑损伤症状。(2)水肿期：头颅影像学检查发现脑损伤病灶以脑白质水肿为主要特点，边界模糊。(3)坏死期：脑组织病灶局部出现坏死，可伴有出血或渗血，头颅MRI显示信号不均，增强扫描可见强化。(4)囊变期：患者头颅MRI显示放射性脑损伤病灶边界清晰并囊性变，信号接近游离水信号，有或无占位效应。囊变期病灶可较长时间稳定，但也可能急性增大，引起脑疝，患者出现意识水平下降，昏迷甚至死亡。在优选的实施方式中，所述放射性脑损伤是晚迟发反应型放射性脑损伤的水肿期或坏死期。

[0062] 因此，在本发明的一些优选实施方式中，所述放射性脑损伤是50Gy或以上的伽马射线放射性脑损伤，例如是50Gy或60Gy的伽马射线放射性脑损伤。在本发明的一些优选实施方式中，放射性脑损伤是伽马射线早迟发反应型或晚迟发反应型放射性脑损伤，例如是伽马射线晚迟发反应型放射性脑损伤。在本发明的一些优选实施方式中，放射性脑损伤是伽马射线晚迟发反应型放射性脑损伤的水肿期或坏死期。

[0063] 在上述任一方面，所述对象患有肿瘤，例如神经系统肿瘤(例如脑瘤、髓母细胞瘤、神经母细胞瘤和垂体瘤)或头颈部肿瘤。术语“头颈部肿瘤”，依据不同部位，包括颈部肿瘤、耳鼻喉科肿瘤以及口腔颌面部肿瘤三大部分。颈部肿瘤

包括例如甲状腺肿瘤；耳鼻喉科肿瘤包括例如鼻咽癌、喉癌、副鼻窦癌等；口腔颌面部肿瘤包括例如口腔癌，如舌癌、牙龈癌、颊癌、上颌窦癌和扁桃体癌等。

- [0064] 在一些实施方式中，本发明提供一种预防或治疗放射性脑损伤，特别是早迟发反应型或晚迟发反应型放射性脑损伤的方法，该方法包括向经受放射性治疗的对象施用式I的任一化合物或其药学上可接受的盐，所述施用在放射性治疗之后立即进行并在放射性脑损伤发生之前结束。
- [0065] 在一些实施方式中，本发明提供一种预防或治疗急性型放射性脑损伤的方法，该方法包括向经受放射性治疗的对象施用本发明的式I的化合物(例如YC-6)或其药学上可接受的盐，所述施用在放射性治疗之后立即进行并在急性型放射性脑损伤发生之前结束。例如，所述施用在放射性治疗之后立即进行并持续不超过10天。例如，所述施用在放射性治疗之后的当天开始进行并持续1至10天，例如1至7天，1至5天，1至3天，3至10天，3至7天，3至5天，5至10天或5至7天。例如，所述施用在放射性治疗之后的当天开始进行并持续1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天。
- [0066] 在一些实施方式中，本发明提供一种预防或治疗早迟发反应型放射性脑损伤的方法，该方法包括向经受放射性治疗的对象施用本发明的式I的化合物(例如YC-6)或其药学上可接受的盐，所述施用在放射性治疗之后立即进行并在早迟发反应型放射性脑损伤发生之前结束。例如，所述施用在放射性治疗之后立即进行并持续少于1个月。例如，所述施用在放射性治疗之后的当天开始进行并持续1至30天，例如5至30天，10至30天，10至25天，5至25天，5至20天，10至15天，15至20天或10至20天。例如，所述施用在放射性治疗之后的当天开始进行并持续1、3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天。
- [0067] 在一些实施方式中，本发明提供一种预防或治疗晚迟发反应型放射性脑损伤的方法，该方法包括向经受放射性治疗的对象施用本发明的式I的化合物(例如YC-6)或其药学上可接受的盐，所述施用在放射性治疗之后立即进行并在晚迟发反应型放射性脑损伤发生之前结束。例如，所述施用在放射性治疗之

后立即进行并持续少于6个月。例如，所述施用在放射性治疗之后的当天开始进行并持续5至180天，例如5至150天，5至120天，5至90天，5至60天，5至30天，10至150天，10至120天，10至90天，10至60天，10至30天，15至150天，15至120天，15至90天，15至60天，15至30天，20至150天，20至120天，20至90天，20至60天，20至30天，5至30天，10至30天，10至25天，5至25天，5至20天，10至15天，15至20天或10至20天。例如，所述施用在放射性治疗之后的当天开始进行并持续1、3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、45、60、75、90、105、120、150或180天。

[0068] 实施例

[0069] 以伽马刀照射诱导C57BL/6小鼠局灶性放射性脑损伤为模型，在动物水平上研究YC-6对于BRI的预防或治疗作用。试验结果显示60mg/kg/d的YC-6预防性给药2周后停药至第8周，显著降低脑病灶体积，提示YC-6短期给药具有“后保护”效应，而全程8周的YC-6给药具有进一步降低脑病灶体积的趋势，减轻伽马射线辐射对脑组织造成的损伤，而对体重无影响。YC-6降低RBI病灶体积，减轻伽马射线辐射对脑组织造成的损伤，对RBI具有良好的预防或治疗作用。

[0070] 实验方法

[0071] 动物分组：动物按体重随机分为4组，见表1。试验流程见图1。

[0072] 表1.动物分组及处理方式

| 实验组别                                   | n | 处理方式                                                                                                         |
|----------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 正常对照组<br>Control+Saline                | 5 | 不进行伽马射线辐射，腹腔注射生理盐水，每天两次，间隔 6~8 小时，连续 8 周，给药体积为 10ml/kg；                                                      |
| 放射性脑损伤模型组<br>RBI+Saline                | 5 | 伽马射线辐射造模，腹腔注射生理盐水，每天两次，间隔 6~8 小时，连续 8 周，给药体积为 10ml/kg；                                                       |
| YC-6 治疗 2 周组<br>RBI+YC-6(60mg/kg/d-2W) | 5 | 伽马射线辐射造模后 10 分钟内尾静脉注射 6mg/ml 的 YC-6，第二天起尾静脉注射 3mg/ml 的 YC-6，每天两次，间隔 6~8 小时，连续给药 2 周后，停药观察 6 周，给药体积为 10ml/kg； |

|                                        |   |                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| YC-6 治疗 8 周组<br>RBI+YC-6(60mg/kg/d-8W) | 5 | 伽马射线辐射造模后 10 分钟内尾静脉注射 6mg/ml 的 YC-6，第二天起尾静脉注射 3mg/ml 的 YC-6，每天两次，间隔 6~8 小时，连续给药 2 周后，改为腹腔注射 3mg/ml 的 YC-6 30mg/kg，每天两次，间隔 6~8 小时，连续给药 6 周，给药体积为 10ml/kg。 |
|----------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

- [0073]伽马射线辐射致局灶性放射性脑损伤的造模方法
- [0074]伽马射线辐射致局灶性放射性脑损伤的造模方法，在已报道文献的基础进行了修改，小鼠腹腔注射0.1%戊巴比妥钠溶液麻醉后，将身体固定于定制设计的平台上，通过X射线计算机断层扫描仪扫描小鼠颅部进行成像处理(射线能量为80kV，成像范围250mm，层厚和层间距为0.625mm，像素尺寸为0.49\*0.49mm)，根据扫描成像结果确定动物照射位置及伽马刀照射深度，将小鼠和定制平台放入立体定向伽玛射线放射系统中进行照射，照射部位为小鼠左侧丘脑区，照射中心定位点的坐标为前囟后(AP)2mm，中线左侧旁开(L)2mm，颅骨硬脑膜向下(背腹侧DV)2mm，照射剂量为50%等剂量线处50Gy，照射速率约为1.7Gy/min。给药组造模后10分钟内尾静脉注射6mg/ml的YC-6，给药体积为10ml/kg。
- [0075]动物体重
- [0076]伽马射线辐射造模前，及造模后每周称重一次，持续8周。

- [0077] 核磁共振成像(MRI)定量分析脑病灶体积
- [0078] 小鼠在伽马射线辐射造模8周后,使用3%的异氟烷诱导快速麻醉,2%的异氟烷维持麻醉,每只小鼠检测前注射200  $\mu$ l造影剂溶液,浓度约为48mg/ml,然后通过7T的布鲁克小动物磁共振成像仪(MRI)对小鼠脑部进行T1加权序列扫描,T1序列扫描图中高信号区域代表脑水肿病变区域。将获得的T1加权序列dicom格式图片,导入ITK-SNAP软件,按照软件的使用说明,从整个大脑中提取伽马刀照射区域的所有高信号聚焦区,特别是几个连续图像切片中的左(辐射)半球。通过快速、精细的对比度调整(逐步调整阈值)和逐步加载分割图像文件,对所有脑坏死体积的数据进行记录和分析,计算病灶的体积大小。
- [0079] 动物脑组织取材及包埋切片
- [0080] 动物在MRI影像学检测后,使用3%的异氟烷快速诱导麻醉,放置于解剖台上,呈仰卧位,剪开皮肤,暴露胸腔,于心脏灌注生理盐水约30ml/只,冲洗除去血管中的血液,断头取出完整的脑组织,放入4%的多聚甲醛溶液中固定,固定24小时后,采用30%蔗糖脱水48小时,除去小脑、嗅球及部分前脑,选取剩余脑组织进行OTC包埋,冰冻切片,脑组织切片厚度为20  $\mu$ m,用于后续免疫荧光染色。
- [0081] 脑切片GFAP、CC1和MAG蛋白免疫荧光染色
- [0082] 将脑组织切片室温放置15分钟,待恢复室温后,用PBS浸泡10分钟以去除切片上的OCT,用组化油笔沿待染脑组织画圈;
- [0083] 用1%BSA和0.25%Triton X-100组成的封闭液室温下封闭脑片1小时后,将脑片与一抗在4℃冰箱孵育过夜,MAP2抗体稀释比为1:500,GFAP抗体稀释比为1:500,Iba1抗体稀释比为1:1000,CD68抗体稀释比为1:100,CC1抗体稀释比为1:1000,MAG抗体稀释比为1:500;
- [0084] 脑片用PBS洗涤三次,每次10分钟;
- [0085] 加入相应种属的荧光二抗,37℃避光孵育1小时,荧光二抗的稀释比为1:1000;
- [0086] 用PBS洗涤三次,每次10分钟;
- [0087] 加入DAPI进行复染,室温避光孵育3~5分钟;
- [0088] 用PBS洗涤三次,每次10分钟,用封片剂进行封片处理。

[0089] 免疫荧光染色后的脑切片用激光共聚焦显微镜进行图像采集，每个脑片拍摄大小相同的图片；使用Image J软件对图像进行分析，图像经过背景减影后，对所有图像都采用相同的阈值设置。选取脑片损伤病变区域的视野，通过Image J中Analyze Particles功能分析单位面积下的GFAP阳性细胞数、CC-1阳性细胞数及单位面积下MAG的荧光强度。

[0090] 数据统计方法

[0091] 数据以均值±标准误显示(Mean±SEM)表示。应用Graphpad Prism 7.0软件对数据进行统计分析和作图。若数据满足正态性和方差齐，采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，组间比较采用Tukey's法。若数据不满足正态性或方差齐性，则采用非参数检验(Kruskal-Wallis秩和检验)，组间比较采用Uncorrected Dunn's test法。各组动物在不同时间点的体重数据变化分析采用双因素方差分析(Two-Way ANOVA)，组间比较采用Tukey's multiple comparisons test。

[0092] 实施例1.YC-6显著减少伽马射线诱导的放射性脑损伤体积

[0093] 本研究观察到伽马射线辐射造模8周后，小鼠脑部MRI影像结果显示，伽马刀照射区域脑组织出现严重的病灶(白色信号区)。从伽玛刀辐射造模当天预防性给予YC-6，MRI影像结果显示，YC-6仅给药2周后停药至第8周，显著降低病灶体积，提示YC-6短期给药具有“后保护”效应。而YC-6进行全程8周的给药对病灶体积的降低作用具有优于YC-6短期给药的趋势，提示YC-6可以减轻伽马射线辐照对脑组织造成的损伤，结果见表2和图2A、2B。

[0094] 表2.YC-6显著减少脑病灶体积(Mean±SEM)

| 组别                      | n | 病灶体积 (mm <sup>3</sup> ) |
|-------------------------|---|-------------------------|
| RBI+Saline 模型组          | 5 | 15.28±0.98              |
| RBI+YC-6(60mg/kg/d-2W)组 | 5 | 12.28±0.63 <sup>#</sup> |
| RBI+YC-6(60mg/kg/d-8W)组 | 5 | 10.27±1.50 <sup>#</sup> |

[0095] 注：与RBI+Saline模型组比较，<sup>#</sup>表示P<0.05。

[0096] 实施例2.YC-6抑制放射性脑损伤后星形胶质细胞的活化

[0097] 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)，是星形胶质细胞活化的标志物；星形胶质细胞增生往往伴随GFAP表达增加，因此GFAP常作为星形胶质细胞增生的生物标志物。当中枢神经系统受到损伤时，星形胶质细胞会处于一种“激活”的状态，其形态、数量及生物学功能发生改变，由良性“静息星形细胞”转变为“反应性星形细胞”。

[0098] 本研究发现伽马刀辐射8周后，病灶丘脑部位星形胶质细胞显著激活，表现为GFAP表达上调，星形胶质细胞数量增加，细胞肥大，从胞体发出许多长而分支的突起。YC-6给药8周显著抑制星形胶质细胞的活化，结果见表3和图3A、3B。

[0099] 表3.GFAP阳性星形胶质细胞数量(Mean ± SEM)

| 组别                       | n | 星形胶质细胞数量<br>(Astrocytes/mm <sup>2</sup> ) |
|--------------------------|---|-------------------------------------------|
| Control+ Saline 正常组      | 5 | 57.80 ± 2.69                              |
| RBI + Saline 模型组         | 5 | 558.20 ± 10.07****                        |
| RBI+YC-6 (60mg/kg/d-8W)组 | 5 | 357.00 ± 10.61####                        |

[0100] 注：Control+Saline正常组比较，\*\*\*\*表示P<0.0001；与RBI+Saline模型组比较，####表示P<0.0001。

[0101] 实施例3.YC-6抑制少突胶质细胞的减少和恢复MAG水平

[0102] 少突胶质细胞由少突胶质细胞前体细胞增殖分化而成，其主要功能是包绕神经元的轴突，形成绝缘的髓鞘结构，协助生物电信号的快速传递并维持和保护神经元的正常功能，其增殖和分化的中断将导致中枢神经系统损伤。CC-1(APC)是成熟少突胶质细胞的标志物。髓鞘相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein,MAG)由少突胶质细胞和外周神经系统的施万细胞表达，定位于直接和轴突相接触的髓鞘膜的最里层，它通过介导胶质细胞与轴突的相互作用参与髓鞘的形成及其完整性的维持。

[0103] 伽马刀辐射8周后，病灶丘脑部位成熟的少突胶质细胞的数量显著减少，表现为CC1免疫荧光染色信号减少，同时MAG的水平下降，提示BRI后轴突髓鞘结

构发生病变。YC-6给药8周显著抑制少突胶质细胞的减少和恢复MAG水平，保护髓鞘，结果见表4、5和图4A、4B。

[0104] 表4.CC1阳性少突胶质细胞数量(Mean ± SEM)

| 组别                       | n | 成熟少突胶质细胞数量<br>(Oligodendrocytes/mm <sup>2</sup> ) |
|--------------------------|---|---------------------------------------------------|
| Control+ Saline 正常组      | 5 | 1608.00±47.92                                     |
| RBI + Saline 模型组         | 5 | 200.60±21.47 <sup>****</sup>                      |
| RBI+YC-6 (60mg/kg/d-8W)组 | 5 | 506.40±30.48 <sup>####</sup>                      |

[0105] 注：Control+Saline正常组比较，\*\*\*\*表示P<0.0001；与RBI+Saline模型组比较，####表示P<0.0001。

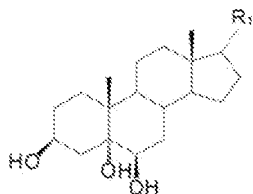
[0106] 表5.MAG荧光信号强度(Mean ± SEM)

| 组别                        | n | MAG 荧光信号强度                 |
|---------------------------|---|----------------------------|
| Control+ Saline 组         | 5 | 1.04±0.047                 |
| RBI + Saline 组            | 5 | 0.31±0.018 <sup>****</sup> |
| RBI+YC-6 (60mg/kg/dg-8W)组 | 5 | 0.44±0.018 <sup>####</sup> |

[0107] 注：Control+Saline正常组比较，\*\*\*\*表示P<0.0001；与RBI+Saline模型组比较，####表示P<0.0001。

## 权利要求书

[权利要求 1] 式I的化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗放射性脑损伤的药物中的应用，



(式 I)

其中R<sub>1</sub>选自H、-CN、氟、氯、C<sub>1-10</sub>烷基、氟或氯取代的C<sub>1-10</sub>烷基、C<sub>1-10</sub>烷氧基、氟或氯取代的C<sub>1-10</sub>烷氧基和C<sub>3-10</sub>环烷基。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的应用，其中放射性脑损伤的照射剂量为50Gy或以上。

[权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的应用，其中放射性脑损伤是伽马射线放射性脑损伤。

[权利要求 4] 根据权利要求1至3任一项所述的应用，其中所述放射性脑损伤是早迟发反应型或晚迟发反应型放射性脑损伤。

[权利要求 5] 根据权利要求1至3任一项所述的应用，其中所述放射性脑损伤是晚迟发反应型放射性脑损伤的水肿期或坏死期。

[权利要求 6] 根据权利要求1所述的应用，其中R<sub>1</sub>是H、-CHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>或-CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[权利要求 7] 根据权利要求1所述的应用，其中R<sub>1</sub>是H。