



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111110850 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201910892185.4

A61P 11/00(2006.01)

(22)申请日 2012.04.12

A61P 29/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/474370 2011.04.12 US

(62)分案原申请数据

201280027012.2 2012.04.12

(71)申请人 莫伊莱麦屈克斯公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 辛西娅.兰德 科琳.布罗菲

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 罗文锋 黄登高

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

权利要求书2页 说明书97页

序列表7页 附图16页

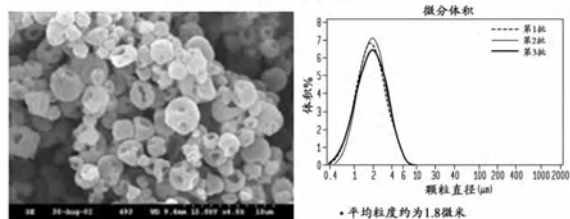
(54)发明名称

用于预防或治疗以成纤维细胞异常增殖及细胞外基质沉积为特征的疾病的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及用于预防或治疗以成纤维细胞异常增殖及细胞外基质沉积为特征的疾病的组合物和方法。本发明提供了用于预防或治疗以在受治疗者的组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病理过程的组合物和方法。该方法包括施用治疗量的包括具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等同物,和药学上可接受的载体的药物组合物。

纯净的喷雾干燥胰岛素



1. 一种药物组合物在制造药物中的用途,所述药物被配制成通过吸入递送至受试者的肺组织以用于治疗发展为肺功能丧失的肺组织损伤,肺损伤包括以下中的一者或多者:与正常健康对照受试者相比,在肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积,其中,所述细胞外基质蛋白是胶原蛋白;在所述肺中异常促进成纤维细胞增殖;在所述肺中异常诱导肌成纤维细胞分化,和/或异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质,

其中,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等同物,和其药学上可接受的载体,

其中,所述功能等同物为氨基酸序列为FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)的多肽;或氨基酸序列为KFAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)的多肽;或氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)的多肽;或氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)的多肽;或氨基酸序列为HRRKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)的多肽,并且

其中,与对照赋形剂相比,所述治疗量对减少以下中的一者或多者是有效的:

(1) 所述肺中纤维化病灶的形成;

(2) 所述肺中胶原蛋白积累;或

(3) 所述肺中胶原蛋白沉积的发展。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述肺损伤是辐射诱导的纤维化。

3. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述肺损伤是特发性肺纤维化。

4. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述肺损伤由施用博莱霉素引起。

5. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述肺损伤由变态反应、环境颗粒物吸入、吸烟、细菌性感染、病毒性感染、对受治疗者肺部的机械损伤、肺移植排斥、自体免疫性疾病、遗传性疾病或其组合引起。

6. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述肺损伤包括所述肺组织中的炎症。

7. 根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述炎症是急性炎症或慢性炎症。

8. 根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述炎症由选自肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的至少一种细胞因子介导。

9. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述肺损伤包括与正常健康对照受试者的组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 或促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的活性相比所述组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 或促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的异常活性。

10. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述药物组合物进一步包括至少一种额外的治疗剂。

11. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于,所述额外的治疗剂是选自纯化牛V型胶原蛋白、IL-13受体拮抗剂、蛋白酪氨酸激酶抑制剂、内皮素受体拮抗剂、双重内皮素受体拮抗剂、前列环素类似物、抗CTGF单克隆抗体、内皮素受体拮抗剂、AB0024、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2) 单克隆抗体、c-Jun氨基末端激酶 (JNK) 抑制剂、吡非尼酮、IFN- γ 1b、抗全部三种TGF- β 亚型的泛中和性IgG4人抗体、TGF- β 活化抑制剂、重组人Pentraxin-2蛋白质 (rhPTX-2)、双特异性IL-4/IL-13抗体、靶向整合素 α v β 6的人源化单克隆抗体、N-乙酰半胱氨酸、西地那非、肿瘤坏死因子 (TNF) 拮抗剂和其组合所组成的组。

12. 根据权利要求10所述的用途, 其特征在于, 所述额外的治疗剂是选自由泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松、氟替卡松糠酸酯和其组合所组成的组的糖皮质激素。

13. 根据权利要求10所述的用途, 其特征在于, 所述额外的治疗剂是选自由白三烯修饰剂、抗胆碱能支气管扩张剂、短效 β_2 -激动剂和长效 β_2 -激动剂和其组合所组成的组的支气管扩张剂。

14. 根据权利要求10所述的用途, 其特征在于, 所述额外的治疗剂是镇痛剂。

15. 根据权利要求10所述的用途, 其特征在于, 所述额外的治疗剂是抗感染剂。

16. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述药学上可接受的载体是选自由控释载体、延迟释放载体、持续释放载体和长期释放载体所组成的组。

17. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述药物组合物呈干燥粉末的形式。

18. 根据权利要求17所述的用途, 其特征在于, 所述干燥粉末包括质量中值空气动力学直径 (MMAD) 为1至5微米的微粒。

19. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述治疗量的药物组合物被配制通过吸入装置施用, 所述吸入装置选自雾化器、计量剂量吸入器 (MDI)、干粉吸入器 (DPI) 或干粉雾化器。

20. 根据权利要求5所述的用途, 其特征在于, 所述机械损伤是肺上皮细胞损伤。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物, 其特征在于, 所述肺上皮细胞损伤是以细胞外基质蛋白的异常沉积、异常促进成纤维细胞增殖、异常诱导成纤维细胞群分化成肌成纤维细胞群、异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质或它们的组合为特征。

用于预防或治疗以成纤维细胞异常增殖及细胞外基质沉积为特征的疾病的组合物和方法

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2012年4月12日,申请号为201280027012.2 (PCT/US2012/033368),发明名称为“用于预防或治疗以成纤维细胞异常增殖及细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病程的组合物和方法”。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求题为“用于治疗或预防气道或肺组织疾病的组合物和方法”的美国临时申请No.61/474,370 (2011年4月12日提交)的优先权权益,该申请的内容通过引用全部并入本文。

[0004] 政府资助的声明

[0005] 本发明是在给予莫伊莱麦屈克斯公司 (Moerae Matrix, LLC) 小型企业创新研究 (SBIR) 资助的政府支持下完成的。政府在本发明中享有一定的权利。

技术领域

[0006] 本发明属于细胞和分子生物学、多肽和治疗方法的使用领域。

背景技术

[0007] 1. 伤口愈合和纤维化的机制

[0008] 术语“伤口愈合”是指身体修复其任何组织的损伤的过程,特别是那些由物理方法和连续性中断引起的创伤。

[0009] 伤口愈合的响应经常被描述为具有三个不同的阶段——损伤、炎症和修复。一般来说,身体对损伤的炎症反应对于维持生物体的健康和完整性至关重要。如果其发生错误,它可以导致组织的破坏。

[0010] 阶段I: 损伤

[0011] 由包括但不限于自身免疫性或变态反应、环境颗粒物、感染或机械损伤的因素造成的损伤通常导致正常组织结构的中断、启动愈合反应。受损的上皮细胞和内皮细胞必须更换以分别地维持屏障功能和完整性并防止血液流失。对内皮细胞的急性损伤导致炎性介质的释放和抗纤溶凝血级联的开始,以血小板和富含纤维蛋白质的凝块暂时堵塞受损的血管。例如,与慢性阻塞性肺病 (COPD) 患者和对照患者相比,特发性肺纤维化 (IPF) 患者的肺组织匀浆、上皮细胞或支气管肺泡灌洗液中含有更高水平的血小板分化因子, X盒结合蛋白质-1, 这表明凝块形成反应被持续激活。此外,凝血酶 (转换纤维蛋白原为纤维蛋白所需的丝氨酸蛋白酶) 也在几个肺纤维化病状的肺和肺泡内腔隙很容易地检测到,进一步证实凝血途径的激活。凝血酶也可以直接激活成纤维细胞,增加增殖和促进成纤维细胞分化为胶原蛋白产生肌成纤维细胞。对气道上皮细胞特别是肺泡细胞的损伤,可以引起类似的抗纤溶级联并导致间质水肿、急性炎症的区域和上皮细胞从基底膜的分离。

[0012] 血小板召集、脱粒和凝块的形成迅速进展为伴随通透性增加的血管收缩的阶段,使白细胞外渗 (白细胞从毛细血管移动到其周围的组织) 并直接召集到受损部位。形成实质

组织的位于上皮细胞和内皮细胞下的细胞外基质的基底膜,阻止直接进入受损的组织。为了破坏这一物理屏障,锌依赖的肽链内切酶,也被称为基质金属蛋白酶(MMP),劈开一种或多种细胞外基质成分以允许细胞的溢出物进入和离开受损部位。具体来说,MMP-2(明胶酶A,N型胶原酶)和MMP-9(明胶酶B,IV型胶原酶)把基底膜的两种重要成分N型胶原蛋白和明胶劈开。最近的研究发现,MMP-2和MMP-9上调,突显出在纤维化病状中组织破坏和再生过程是常见的。MMP的活性受包括转录调节、酶原调节和MMP的特定组织抑制剂的多种机制控制。MMP和各种抑制机制之间的平衡可以调节炎症并确定愈合反应过程中胶原蛋白沉积的净额。

[0013] 使用MMP-2^{-/-}、MMP-9^{-/-}和MMP-2^{-/-}MMP-9^{-/-}双基因敲除小鼠的过敏性气道炎症和重塑模型的先前研究表明MMP-2和MMP-9对于炎性细胞的成功外出和清除出发炎的组织并进入空域是需要的。在缺失这些MMP的情况下,细胞被困在的肺实质内而不能移动到空域,而导致致命的窒息。

[0014] 阶段II:发炎

[0015] 一旦接近组织损伤的部位已经实现,趋化因子梯度就召集炎症细胞。在具有细胞碎片的急性损伤部位和被吞噬细胞清除的坏死区域观察到嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞。

[0016] 早期召集嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞提供炎症细胞因子和趋化因子可以有助于局部TGF-β与IL-13的积累。继最初的炎症细胞的刺激和波动,炎症细胞的晚期召集可以协助吞噬作用、清除细胞碎片以及控制过度的细胞增殖,这些合起来可以有助于正常的愈合。晚期的炎症可以起抗纤维化作用,并可能对于成功消退伤口愈合反应是需要的。例如,晚期的富含吞噬性巨噬细胞的炎症谱协助清除成纤维细胞,除了IL-10的分泌调节性T细胞,抑制局部趋化因子的产生和TGF-β,可以防止过度的成纤维细胞活化。

[0017] 刺激或病原体的性质往往决定了随之而来的炎症反应的特征。例如,像病原体相关分子模式(PAMP)的外源性刺激由病原体识别受体(如Toll样受体和NOD样受体(在调节炎症和细胞凋亡反应上具有多种功能的胞质蛋白))识别,并影响天然细胞对入侵的病原体的反应。内源性危险信号也可以影响局部的天然细胞并协调炎症级联反应。

[0018] 炎症反应的性质极大地影响常驻性组织细胞和随后的炎症细胞。炎症细胞本身也通过分泌趋化因子、细胞因子和生长因子进一步传播炎症。许多细胞因子参与整个伤口愈合和纤维化反应,具有在各种条件下激活的特定群体的基因。例如,哮喘患者中的慢性过敏性气道疾病通常与升高的2型辅助性T细胞(Th₂)的相关的细胞因子(包括但不限于,白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-13(IL-13)、和白细胞介素-9(IL-9))相关联,而慢性阻塞性肺病和肺纤维化疾病(如特发性肺纤维化)患者更常出现促炎性细胞因子谱(包括但不限于,白细胞介素-1α(IL-1α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、转化生长因子-β(TGF-β)和血小板衍生生长因子(PDGF))。这些细胞因子已被证明具有显著的促纤维化作用,通过募集、活化和增殖成纤维细胞、巨噬细胞和肌成纤维细胞发挥作用。

[0019] 阶段III:组织修复和收缩

[0020] 伤口愈合的闭合阶段由富含纤维蛋白(纤维状蛋白质聚合以形成在伤口部位形成

凝块的“网格”)的支架形成引导的协调安排的细胞重组、伤口收缩、闭合和再上皮化组成。阐明在该创伤修复阶段涉及的过程的大多数研究来自皮肤创面的研究和体外系统。

[0021] 来源于肌成纤维细胞的胶原蛋白及平滑肌肌动蛋白(α -SMA)形成临时性细胞外基质,与巨噬细胞、血小板和来源于成纤维细胞的纤维连接蛋白形成纤维蛋白支架。总的来说,这些结构通常被称为肉芽组织。从特发性肺纤维化患者分离的初级成纤维细胞或肺泡巨噬细胞比对照成纤维细胞产生显著更多的纤维连接蛋白和 α -SMA,表明升高的成纤维细胞的活化状态。据报道,接受类固醇治疗的IPF患者与未接受治疗的IPF患者具有相似的来源于巨噬细胞的纤维连接蛋白水平升高。因此,类似于类固醇的抗IL-13介导的肌成纤维细胞分化,来源于巨噬细胞的纤维连接蛋白的释放也似乎抵抗类固醇治疗,提供了类固醇治疗可以无效的另一种原因。从动物模型看,由于在博莱霉素施用之后与它们的野生型对应物相比,具有特定纤维连接蛋白(EDA)的额外III型结构域缺失的小鼠出现显著减少的纤维化,所以纤维连接蛋白似乎是肺纤维化的发展所需要的。

[0022] 除纤维连接蛋白之外,临时性细胞外基质由糖蛋白(如PDGF)、粘多糖(如透明质酸)、蛋白多糖和弹性蛋白组成。生长因子和TGF- β 活化的成纤维细胞沿着细胞外基质网络迁移并修复伤口。在皮肤伤口内,TGF- β 也诱导收缩反应,调节胶原纤维的取向。成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化,如上面所讨论的,也会产生应力纤维和 α -SMA的新表达,这些都赋予肌成纤维细胞内的高收缩性。肌成纤维细胞在特定部位附着于细胞外基质称为“纤维融合膜”或“超成熟灶性粘附”把伤口拉在一起,在收缩阶段减小损伤的大小。细胞外基质铺设的程度和激活的肌成纤维细胞的数量决定胶原沉积量。为此,基质金属蛋白酶(MMP)对金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)和胶原蛋白对胶原酶的平衡在整个响应中变化,从前合成和增加的胶原沉积向控制的平衡转变,没有净增加胶原蛋白。对于成功的伤口愈合,这种平衡往往发生在成纤维细胞发生凋亡、炎症开始消退以及肉芽组织退去时,留下富含胶原蛋白的病灶。炎症细胞,以及特别是 α -SMA阳性肌成纤维细胞的去除,对于终止胶原沉积是必要的。有趣的是,在特发性肺纤维化患者中,尽管观察到促细胞凋亡与FAS-信号分子水平升高,成纤维细胞的去除可以被抵抗凋亡信号的细胞推迟。这种相对的对细胞凋亡的抗性可能是这种纤维化疾病的基础。然而,几项研究还观察到在特发性肺纤维化中分泌胶原蛋白的成纤维细胞以及上皮细胞凋亡的比率增加,这表明另一个平衡需要监测成纤维细胞凋亡和成纤维细胞增殖。来自皮肤的研究,伤口部位的再表皮化重新建立屏障功能,并允许包裹的细胞重新组织。使用胶原蛋白基质上培养的人或大鼠的上皮细胞或体内气管伤口的几个体外和体内模型已被用来识别细胞迁移、增殖和细胞扩散的重要阶段。快速和动态的运动和增殖,伴随从剥落区域的边缘的上皮重塑,发生在最初的创伤的几个小时内。此外,上皮细胞的滑片可以迁移到损伤区域上协助伤口的覆盖。有几个因素已被证明是调节再表皮化的,包括来源于血清的转化生长因子- α (TGF- α)和基质金属蛋白酶-7(MMP-7)(它本身是受TIMP-1调节的)。

[0023] 总的来说,炎症、血管生成的程度和细胞外基质的沉积量都有助于纤维化病变的最终发展。因此,干扰成纤维细胞活化、增殖或凋亡的治疗性干预需要透彻的理解和鉴别创伤修复的所有阶段。虽然这三个阶段经常顺序地出现,但是在慢性或反复损伤中这些进程并行地起作用,对调控机制提出显著的需求。(Wilson和Wynn, *Mucosal Immunol.*, 2009, 3(2):103-121)。

[0024] 2.纤维化的病理学

[0025] 纤维化是指在器官或组织中过多的纤维结缔组织的形成或发展,这是导致瘢痕的正常或异常/对抗性无功能的伤口愈合反应形成的结果。纤维化的特点是,例如,但不限于,细胞外基质蛋白的异常沉积、异常促进成纤维细胞增殖、异常诱导成纤维细胞群分化成肌成纤维细胞群、异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质附着或它们的组合。

[0026] 促炎性介质

[0027] 越来越多的证据表明,被称为细胞因子(包括各种淋巴因子、白细胞介素和趋化因子)的多肽介质,对于纤维化中胶原蛋白的沉积是重要的刺激。由常驻性组织细胞和召集的炎症细胞释放的细胞因子被认为刺激成纤维细胞增殖和促进细胞外基质蛋白(包括胶原蛋白)合成的增加。例如,在特发性肺纤维化的发病机制中早期特征是肺泡上皮细胞和/或毛细血管细胞的损伤。这促进了循环免疫细胞,(如单核细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞)召集到肺中。然后这些效应细胞连同常驻性肺细胞(如巨噬细胞、肺泡上皮细胞和肺泡内皮细胞)释放细胞因子,所述细胞因子刺激靶细胞(典型的成纤维细胞)复制和合成增加量的胶原蛋白。细胞外基质蛋白的分解也可能会受到抑制,从而促进纤维化进程。(Coker和Laurent, Eur Respir J, 1998, 11:1218-1221)。

[0028] 众多的细胞因子已涉及到纤维化的发病机制中,包括但不限于,转化生长因子- β (TGF- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、内皮素-1 (ET-1)和白细胞介素、白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8)、和白细胞介素-17 (IL-17)。趋化因子白细胞趋化剂,包括活化调节正常T细胞表达和分泌的因子(RANTES),也被认为发挥了重要的作用。已发现在外周血中诸如白细胞介素-8 (IL-8)的促炎性细胞因子、以及诸如细胞间粘附分子-1 (ICAM-1)和血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1)的相关下游细胞粘附分子(CAM)、诸如基质金属蛋白酶-7 (MMP-7)的基质金属蛋白酶和诸如S100钙结合蛋白A12 (S100A12,也被称为钙粒蛋白C)的信号分子的水平升高与特发性肺纤维化患者的死亡率、无肺移植存活及疾病进展相关(Richards等人, Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185:67-76)。

[0029] 蛋白质的TGF- β 家族对细胞外基质沉积具有强的刺激作用,并且在事实上已通过基因转移在构建诱导的纤维化动物模型中应用。体外研究表明,作为潜在的前体分泌的TGF- β 1促进成纤维细胞胶原基因表达及蛋白质合成。这些数据表明,其他哺乳动物亚型TGF- β 2和TGF- β 3,也刺激人的肺成纤维细胞的胶原蛋白合成并减少在体外的降解。在肺纤维化的动物模型中,增强的TGF- β 1基因表达在时间上和空间上与增加的胶原蛋白基因表达和蛋白质沉积有关。TGF- β 1抗体降低了博来霉素诱导的肺纤维化鼠的胶原蛋白沉积,并且人类的纤维化肺组织显示了增强的TGF- β 1基因和蛋白质表达。

[0030] TNF- α 可刺激体外成纤维细胞的复制和胶原蛋白的合成,并且在施用博来霉素后小鼠的肺TNF- α 基因表达升高。可溶性TNF- α 受体在鼠模型中减少肺纤维化,并且在转基因小鼠中TNF- α 的肺过度表达的特征是肺纤维化。与对照相比,在IPF或石棉肺患者(由石棉纤维的吸入和滞留造成的影响肺实质组织的慢性炎症和纤维化的医学病状)中,支气管肺泡灌洗液源的巨噬细胞TNF- α 的释放量增加。

[0031] 内皮素(ET-1)也符合促纤维化细胞因子的标准。这种分子促进成纤维细胞增殖和趋化,并刺激原骨胶原蛋白的产生。它存在于肺纤维化患者的肺中,并且最近的报道表明,

当ET-1受体拮抗剂波生坦施用于实验动物时,可改善肺纤维化。

[0032] 未受抑制的肌成纤维细胞增殖/激活和纤维化病灶形成

[0033] 成纤维细胞分化为肌成纤维细胞一直被认为是在许多病状中的重要事件,包括伤口修复和纤维化。例如,据报道,肌成纤维细胞发生在活性的纤维化区域中,并且是肺纤维化中细胞外基质(ECM)蛋白质产生和沉积的原因。(Liu,T.等人,Am J Respir Cell Mol Biol,2007,37:507-517)。

[0034] 对特发性肺纤维化的原因的一种假说认为仍然不明的刺激产生反复发作的急性肺损伤。在这些损伤部位的伤口愈合最终导致肝纤维化,伴随肺功能的丧失。成纤维细胞灶(特发性肺纤维化的病变的标志)以间充质细胞的旺盛复制和新鲜细胞外基质的大量沉积为特征。这种病灶是肺泡上皮细胞损伤的特点,伴随腔内血浆渗出和远端的空腔塌缩。通常与伤口愈合相关的介质,如转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和结缔组织生长因子,也在这些部位表达。这种局灶性急性肺损伤和创伤修复的驱动力是未知的。

[0035] 3.纤维化在疾病或病状中所起的作用

[0036] 纤维化已涉及于大量的异质性疾病或病状,包括但不限于,间质性肺病(如特发性肺纤维化)、急性肺损伤(ALI)、辐射诱导的纤维化和移植排斥。

[0037] 3.1.特发性肺纤维化(IPF)

[0038] 特发性肺纤维化(IPF,也被称为隐源性致纤维化肺泡炎,CFA,或特发性纤维化间质性肺炎)被定义为主要发生在老年人中的病因不明的慢性、进行性纤维化间质性肺炎的具体形式,限于肺部,并与普通型间质性肺炎(UIP)的放射学和组织学模式相关(Raghu G.等人,Am J Respir Crit Care Med.,183(6):788-824,2011;Thannickal,V.等人,Proc Am Thorac Soc.,3(4):350-356,2006)。它的特征可能是纤维化的组织在肺间质中的异常和过度沉积。在高分辨率的计算机断层扫描(HRCT)图像上,UIP的特征是存在通常与牵引性支气管扩张相关联的网状阴影。当IPF进展时,蜂窝现象变得更加突出(Neinerger A.等人,J Biol Chem.,277(5):3065-8,2002)。肺功能检查通常显示限制性的通气障碍和降低的一氧化碳弥散能力(Thomas,T.等人,J Neurochem.,105(5):2039-52,2008)。研究报道了在患有特发性肺纤维化(IPF)的患者中TNF- α 和IL-6的释放显著增加(Zhang,Y.等人,J Immunol.150(9):4188-4196,1993),这已被归因于IL-1 β 的表达水平(Kolb,M.等人,J Clin Invest,107(12):1529-1536,2001)。IPF症状的发作、呼吸急促和咳嗽通常是隐伏的但是逐渐进展,在患者的70%中死亡发生在诊断后的五年内。这种严峻的预后与每年死于乳腺癌的人数类似(Raghu G.等人,Am J Respir Crit Care Med.,183(6):788-824,2011)。

[0039] 在美国有近130,000的患者患有IPF,全世界每年约有50,000个新患者和近40,000人死亡(Raghu G.等人,Am J Respir Crit Care Med.,183(6):788-824,2011)。虽然这些数据是值得注意的,但是最近的研究报道,IPF可以比以前认为的更为普遍5-10倍,可能是由于患病率增加或诊断能力增强(Thannickal,V.等人,Proc Am Thorac Soc.,3(4):350-356,2006)。肺移植被认为是对IPF的权威的治疗,但肺移植后的五年存活率低于50%。因此,即使肺移植也不能被认为是对IPF的“治愈”。除了对于患者身体和情感的代价,IPF的治疗和护理是极其昂贵的,每年对每100,000名患者国家的医疗保健费用在28亿美元范围内。

[0040] 此外,以往的研究表明,叠加的环境危害在特发性肺纤维化的发病机制中可能是

重要的。在大多数报道的病例系列中,指数高达75%的具有特发性肺纤维化的患者是当前或曾经的吸烟者。在大型的流行病学研究中,吸烟已与特发性肺纤维化密切相关。此外,许多特发性肺纤维化的炎症特征更密切地与吸烟状况而不是基本的肺部疾病相关联。因此,吸烟可能是特发性肺纤维化的独立危险因素。潜伏性病毒性感染,尤其是那些疱疹病毒家族,也被报道与特发性肺纤维化相关。

[0041] 由于没有已知的对IPF的有效治疗(包括肺移植),仍然迫切需要发展新的治疗方法。目前正在研究的有多种治疗方法,包括可以延缓或抑制身体产生瘢痕或纤维化组织的能力的抗纤维化治疗和增加在肺中用于气体交换的组织区域的肺血管扩张剂。除了肺移植,潜在的IPF治疗方法包括糖皮质激素、硫唑嘌呤、环磷酰胺、抗凝血剂和N-乙酰半胱氨酸(Raghu G.等人,Am J Respir Crit Care Med.,183(6):788-824,2011)。此外,支持疗法如氧疗和肺康复常规地采用。然而,这些都没有绝对地影响IPF患者的长期生存,这进一步凸显了对IPF的治疗尚未满足医疗的需求。作为一个例子,尽管是混合的临床方案的结果,InterMune公司的口服的小分子**Esbriet®**(吡非尼酮)收到了欧洲和日本用于IPF患者的批准。**Esbriet®**因此成为第一个明确指明用于治疗IPF的药物;由于模棱两可的试验结果和药物的副作用,该药物的效用在美国被持以怀疑的观点,并且基于当时提交的数据没有得到FDA的批准。因此,一个大的3期临床试验正在进行,以确定其疗效从而支持在美国的新药物申请。

[0042] 从组织病理学来说,IPF可以被描述为激活的肌成纤维细胞(或间质细胞)在成纤维细胞灶中的积累(Thannickal,V.等人,Proc Am Thorac Soc.,3(4):350-356,2006)。肌成纤维细胞的受损凋亡可能会导致持续的和失调的修复过程在组织纤维化中达到高潮。可以说,炎症可以通过循环急性刺激成纤维细胞在IPF中也起着至关重要的作用。这些调查结果指出了治疗干预的潜在靶标。

[0043] 3.1.1.特发性肺纤维化(IPF)的发病机理

[0044] 虽然致病的机制尚不完全清楚,目前公认的范例提出,肺泡上皮损伤之后接着突然出现引起与正常的组织修复相关反应的促炎性和纤维增生性介质。由于原因尚不清楚,这些修复过程没有解决并且进行性纤维化随之而来。(Selman M.等人,Ann Intern Med,134(2):136-151,2001;Noble,P.和Homer R.,Clin Chest Med,25(4):749-58,2004;Strieter,R.,Chest,128(5增刊):526S-532S,2005)。

[0045] 3.1.2.肺纤维化的博莱霉素小鼠模型

[0046] 虽然存在许多动物模型,并且可能是有用的(例如,TGF- β 腺病毒转导模型或辐射诱导的纤维化模型),但是博莱霉素模型是目前使用的以证明在炎症后/纤维化前/纤维预防阶段中特定的药物或蛋白激酶抑制剂的疗效的充分证据和最有特征性的鼠模型(Vittal,R.等人,J Pharmacol Exp Ther.,321(1):35-44,2007;Vittal,R.等人,Am J Pathol.,166(2):367-75,2005;Hecker L.等人,Nat Med.,15(9):1077-81,2009)。

[0047] 抗生素博莱霉素最初从轮枝链霉菌分离出(Umezawa,H.等人,Cancer 20:891-895,1967)。后来发现这种抗生素对鳞状细胞癌和皮肤肿瘤是有效的(Umezawa,H.,Fed Proc,33:2296-2302,1974);然而,由于导致纤维化的剂量依赖性肺毒性,其作为抗肿瘤剂的用途是有限的(Muggia,F.等人,Cancer Treat Rev,10:221-243,1983)。博莱霉素通过气管内途径的递送(一般为1.25-4U/kg,取决于源)具有在啮齿类动物中单次注射药物产生肺

损伤和所得到的纤维化的优势 (Phan, S. 等人, *Am Rev Respir Dis* 121:501-506, 1980; Snider, G. 等人, *Am Rev Respir Dis* 117:289-297, 1978; Thrall, R. 等人, *Am J Pathol*, 95:117-130, 1979)。气管内递送该药物到啮齿类动物最初导致对肺泡上皮细胞的直接损伤。此事件后是在第一周内的嗜中性粒细胞和淋巴细胞泛肺炎的发展 (Janick-Buckner, D. 等人, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 100 (3):465-73, 1989)。随后, 肺炎性细胞被清除, 成纤维细胞增殖显著, 并且细胞外基质被合成 (Schrier D. 等人, *Am Rev Respir Dis.*, 127 (1):63-6, 1983)。在第14日, 在这个模型中可以看出在生物化学上和组织学上纤维化的发展, 伴随一般在大约第21-28日显著的最大反应 (Izbicki G. 等人, *Int J Exp Pathol.*, 83 (3):111-9, 2002; Phan, S. 等人, *Chest.*, 83 (5增刊):44S-45S, 1983)。然而, 超过28日对博莱霉素的反应是更易变的。最初的报告表明, 气管内递送博莱霉素可能会引起进展或持续60-90日的纤维化 (Thrall R. 等人, *Am J Pathol.*, 95 (1):117-30, 1979; Goldstein R. 等人, *Am Rev Respir Dis.*, 120 (1):67-73, 1979; Starcher B. 等人, *Am Rev Respir Dis.*, 117 (2):299-305, 1978); 然而, 其他报告显示了在这一时期后开始消退的自限性反应 (Thrall R. 等人, *Am J Pathol.*, 95 (1):117-30, 1979; Phan, S. 等人, *Chest*, 83 (5增刊):44S-45S, 1983; Lawson W. 等人, *Am J Pathol.* 2005; 167 (5):1267-1277)。虽然这种模型的消退性质不模仿人类疾病, 但是这方面的模型提供了用于研究在这些稍后的时间点纤维化消退的机会。

[0048] 3.2. 急性肺损伤 (ALI)

[0049] 急性肺损伤 (ALI) 和更严重的形式、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是由急性肺水肿和炎症引起的急性呼吸衰竭综合征。ALI/ARDS是由于各种临床疾病发生在所有年龄的患者的急性呼吸衰竭的原因, 这些疾病包括败血症 (肺和肺外)、肺炎 (细菌、病毒和真菌), 吸入胃和口咽内容物、重大创伤以及一些其他临床疾病, 包括重症急性胰腺炎、超剂量用药和血液制品 (Ware, L. 和 Matthay, M., *N Engl J Med*, 342:1334-1349, 2000)。大多数患者需要正压辅助通气。主要的生理异常是严重的低氧血症以及继发于肺的死腔分数急剧增加的每分钟通气量明显增加。ALI/ARDS患者发生由液体渗出物进入肺的间质和继发于屏障通透性增加的空域隔室引起的富含蛋白质的肺水肿。额外的病理变化表明, 肺水肿所涉及的机制是复杂的, 水肿只是在ALI/ARDS中的病理生理事件之一。一个生理后果是肺顺应性显著降低, 从而导致呼吸功增加 (Nuckton T. 等人, *N Engl J Med*, 346:1281-1286, 2002), 这是为什么大多数患者需要辅助通气支持的原因之一。

[0050] 有人认为ALI治疗的支柱——机械通气 (MV) 通过对呼吸系统的各个部分施加引起呼吸机相关性肺损伤的机械应力 (VALI) 而潜在地影响和恶化渗透性 (Fan, E. 等人, *JAMA*, 294:2889-2896, 2005; MacIntyre N., *Chest*, 128:561S-567, 2005)。最近的试验表明, 低潮气量 (LV_T) 通气的患者与高潮气量 (HV_T) 患者相比在生存上显著改善 (急性呼吸窘迫综合征, N. 与用于急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的传统潮气量比较, 具有较低潮气量的通气。N *Engl J Med*; 342:1301-1308, 2000)。除了可以施加较低机械应力的较低潮气量通风, 有很少对病理生理学的机理性理解和对于VALI无定向治疗。

[0051] 有人认为高潮气量 (HV_T) 机械通气 (MV) 导致p38 MAP激酶的磷酸化、MK2的激活和HSPB1的磷酸化——一个引起肌动蛋白脱离HSPB1和聚合形成应力纤维的过程, 最终导致细胞间间隙和血管通透性增加。此外, 表明了抑制p38MAP激酶或其下游效应物MK2防止了HSPB1的磷酸化并通过消除肌动蛋白应力纤维的形成和细胞骨架的重排保护血管通透性,

这表明MK2的靶向抑制可能是用于治疗急性肺损伤的一种潜在的治疗策略 (Damarla,M.等人, PLoS ONE, 4 (2) :E4600, 2009)。

[0052] 此外,有研究表明,肺纤维化也可能由ALI导致。ALI可以完全消退或进展为纤维化肺炎,伴随血液中的持续性低氧(血氧不足)和每次呼吸肺扩张能力的下降(肺顺应性降低)。有人认为虽然损伤引起的肺纤维化的病因与特发性肺纤维化的不同,但是这两种疾病有共同的病理机制,即,成纤维细胞浸润到肺的空域中 (Tager等人, Nat. Med. 14:45-54, 2008; Ley, K. 和 Zarbock, A., Nat. Med. 14:20-21; 2008)。

[0053] 3.3. 辐射诱导的纤维化

[0054] 纤维化是治疗癌症的放疗和辐射事故的常见后遗症。放疗后的纤维化病变已在许多组织中发现,包括皮肤 (Bentzen, S. 等人, Radiother. Oncol. 15:261-214, 1989; Brocheriou, C. 等人, Br. J. Radiol. 增刊19:101-108, 1986)、肺 (LopezCardozo, B. 等人, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 11:907-914, 1985)、心脏 (Fajardo, L. 和 Stewart, J., Lab. Invest., 29:244-257, 1973) 和肝脏 (Ingold, J. 等人, Am. J. Roentgenol., 93:200-208, 1965)。

[0055] 在肺(晚期反应组织)中,可能会发生两种辐射毒性综合征、放射性肺炎及肺纤维化。肺炎在放疗完成后的2-3个月出现。在病理上,肺炎的特征是间质水肿、间质及肺泡存在炎性细胞和Ⅱ型肺细胞的数量增加 (Gross, N. 等人, Radiat. Res., 111:143-50, 1981; Guerry-Force, M. 等人, Radiat. Res. 114:138-53, 1988)。在肺炎中,对组织的主要损伤很可能由实质细胞耗竭引起 (Hendry, J., Radiat. Oncol. Vol. 4, 2:123-132, 1994; Rosiello, R. 等人, Am. Rev. Respir. Dis., 148:1671-1676, 1993; Travis, E. 和 Terry, N., Front. Radiat. Ther. Oncol., 23:41-59, 1989)。

[0056] 纤维化反应的特征为增加的间质胶原蛋白沉积、增厚的血管壁和血管闭塞 (Vergava, J. 等人, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2:723-732, 1987)。纤维化病变的组织学检查表明,纤维化组织包含浸润的炎症细胞、成纤维细胞和大量的各种细胞外基质成分。在纤维化组织中,间质胶原蛋白、纤维连接蛋白和蛋白聚糖的增加的合成和沉积已被描述 (Maasiha, P. 等人, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 20:973-980, 1991), 这被解释为成纤维细胞系统的辐射诱发的调制的结果 (Remy, J. 等人, Radiat. Res. 125:14-19, 1991)。

[0057] 辐射诱导的纤维化,特别是肺,被认为是由于参与纤维化反应的几个细胞系统之间的细胞和分子事件的相互作用。单独照射能诱发成纤维细胞/成纤维细胞系统的过早的终末分化过程,该过程导致有丝分裂后的成纤维细胞的积累增强,其特征是在间质胶原蛋白的合成中数倍增加。随之而来,伴随着实质细胞类型(如肺泡巨噬细胞和肺泡Ⅱ型肺泡上皮细胞)的照射,诱发特定细胞因子的直接合成,如TGF- β 1,然后这些细胞因子改变实质细胞与成纤维细胞系统相互作用。TGF- β 1,作为与纤维化反应有关的主要的细胞因子,通过祖成纤维细胞类型的扩展以及祖成纤维细胞的过早的终末分化为有丝分裂后的成纤维细胞诱发成纤维细胞增殖。由于祖成纤维细胞和有丝分裂后的成纤维细胞的很均衡的细胞类型比率的扰乱,这导致有丝分裂后的成纤维细胞积聚。有人提出,照射后的病理生理组织反应由多细胞的细胞系统的改变的细胞因子和生长因子介导的相互作用引起,所述改变的细胞因子和生长因子介导的相互作用导致间质成纤维细胞/成纤维细胞系统的很均衡的细胞类型比率的扰乱。(Rodemann, H. 和 Bamberg, M., Radiotherapy and Oncology, 35, 83-90,

1995)。

[0058] 3.4. 移植排斥

[0059] 移植是将细胞、组织或器官从一个部位转移到另一个部位的行为。器官系统的故障可通过从供体移植的器官(例如,肾脏、肝脏、心脏、肺或胰脏)矫正。然而,免疫系统仍然是作为一种常规医学治疗的移植的最大障碍,并且这些器官的排斥通常对应于在移植器官中的纤维化表型。免疫系统已经发展了精细和有效的机制来对抗外来的制剂。这些机制也参与了移植器官的排斥,移植器官被宿主的免疫系统辩认为外来物。

[0060] 对移植物的免疫反应的程度部分地取决于移植器官和宿主之间的遗传差异程度。异种移植是不同的物种成员之间的移植,其具有最大的差异并引起最大的免疫反应,发生迅速的排斥。自体移植是从身体的一部分到另一部分的移植(例如,皮肤移植),其并不是外来的组织,因此,不会引起排斥。同系移植是基因完全相同的个体之间的移植(例如,同卵双胞胎),也不会发生排斥。

[0061] 同种异体移植是同一物种的不同基因成员间的移植。这是最常见的移植形式。同种异体移植发生何种程度的排斥部分地取决于供体和宿主之间的相似程度或组织相容程度。

[0062] 反应的程度和类型也随移植的类型而不同。一些部位,如眼睛和大脑,具有免疫特权(即,它们具有很少或没有免疫系统细胞,可以容忍甚至不匹配的移植)。皮肤移植最初是没有形成血管的,所以直到血液供应的发展没有表现出排斥。肺、心脏、肾脏和肝脏是富含血管的器官,往往会在宿主中导致活跃的细胞介导的反应,需要免疫抑制治疗。

[0063] 缩窄性细支气管炎(CB),在肺移植患者中也被称为闭塞性细支气管炎,是主要发生在膜和呼吸性细支气管的壁和相邻组织中的炎症和纤维化,伴随因而导致的细支气管管腔的缩小。CB是在各种环境中发现,最常见的是肺和心-肺移植(影响34%至39%的患者,通常在移植后的第一个2年中)和骨髓移植的并发症,而且在类风湿性关节炎中、吸入如二氧化氮的有毒物质后、服用如青霉胺的某些药物后和摄入东亚植物守宫木(*Sauropus androgynous*)后发现,并且是腺病毒、A型流感、麻疹和小儿肺炎支原体感染的一种罕见的并发症。在肺移植,CB是其后导致死亡的单一的最重要的因素。在一项研究中,总的死亡率为25%。然而,同时,87%的无症状和完全由支气管活检诊断的患者病情消除或稳定。在FEV₁中从基线的降低可以用于临床支持移植患者中的CB;长期闭塞性细支气管炎综合征用来表示这种临床功能障碍,并且已经为其建立了一种目前广泛在文献中使用的分级系统。在肺移植中CB发展的重要的危险因素包括抗原依赖性和独立性机制。在前一组是在A位点的迟发的急性排斥和HLA不匹配;在后者是由移植手术和巨细胞病毒性感染引起的对气道的缺血/再灌注损伤(Schlesinger C.等人,Curr Opin Pulm.Med.,4(5):288-93,1998)。

[0064] 排斥的机制

[0065] 对移植器官的免疫反应由细胞(淋巴细胞介导的)和体液(抗体介导的)机制组成。虽然其他类型的细胞也参与其中,但是T细胞在移植的排斥中是主要的。排斥反应由致敏阶段和效应阶段组成。

[0066] 致敏阶段

[0067] 在这一阶段,CD4和CD8 T细胞通过它们的T细胞受体识别表达在外来移植物的细胞上的抗原。抗原的识别需要两个信号;第一个是由T细胞受体与MHC分子递呈的抗原的相

互作用提供的,第二个由在T细胞/APC表面上的共刺激受体/配体的相互作用提供。在众多的共刺激通路中,T细胞表面上的CD28与其APC表面配体的相互作用,B7-1或B7-2(分别地通称为CD80或CD86)被研究得最多(Clarkson,M.和Sayegh,M.,Transplantation;80(5):555-563,2005)。此外,细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)也结合到这些配体并提供了一种抑制信号。其他共刺激分子包括CD40及其配体CD40L(CD 154)。通常,MHC分子的螺旋形成肽结合槽并由来自正常细胞的蛋白质的肽占用。胸腺或中枢耐受机制(克隆缺失)和外周耐受机制(例如,无反应力)确保这些自肽MHC复合物不是由T细胞识别,从而防止自身免疫反应。

[0068] 效应阶段

[0069] 抗原性依赖和独立性因素有助于效应机制。最初,非免疫“损伤反应”(缺血)诱发非特异性炎症反应。正因为如此,由于粘附分子、MHCII类分子、趋化因子和细胞因子的表达上调,提呈到T细胞的抗原增加。它还促进完整的、可溶性MHC分子脱落,这可以激活间接的同种异体识别通路。激活后,CD4阳性T细胞启动巨噬细胞介导的迟发型超敏反应(DTH)并提供帮助至B细胞用于产生抗体。

[0070] 各种T细胞和T细胞衍生的细胞因子,如IL-2、IFN- γ 在移植后早期上调。后来, β -趋化因子如RANTES(活化调节正常T细胞表达和分泌)、IP-10和MCP-1被表达,并且这促进了同种异体移植物的强烈的巨噬细胞浸润。IL-6、TNF- α 、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和生长因子在这一过程中也发挥了作用。包括TGF- β 和内皮素的生长因子引起平滑肌增殖、内膜增厚、间质纤维化和对于肾的肾小球硬化。

[0071] 由T细胞产生的细胞因子激活的内皮细胞和巨噬细胞表达MHC II类分子、粘附分子和共刺激分子。这些可以递呈抗原并从而召集更多的T细胞,放大排斥过程。CD8阳性T细胞或者通过提供一个“致命的打击”,或者另外通过诱发细胞凋亡介导细胞介导的细胞毒性反应。

[0072] 此外,新兴的研究表明在器官移植的慢性移植排斥中纤维化过程的参与。例如,表明的是,慢性的肺同种异体移植排斥是由同种异体内皮细胞衍生的HIF-1 α 的相对缺乏介导的,从而导致移植的器官纤维化重构(Wilkes,D.,J Clin Invest.,121(6):2155-2157,2011;Jiang,X.等人,J Clin Invest.,121(6):2336-2349,2011)。

[0073] 3.5.慢性阻塞性肺病(COPD)

[0074] 慢性阻塞性肺病(COPD)是对由慢性阻塞性支气管炎、肺气肿和/或慢性哮喘的若干组合引起的、以慢性和相对不可逆的呼气气流功能障碍为代表的肺部疾病的总体描述。COPD-是由一系列的环境和遗传性危险因素造成的,包括导致该疾病的吸烟。

[0075] COPD的患病率正在世界范围内不断增加,并且在美国COPD已成为死亡的第四大原因。在美国,尽管在近几十年来吸烟减少,但是COPD的患病率和与此相关的死亡率增加,并且预计将继续增加一些年。此外,COPD是昂贵的,并且在中度或更严重的COPD的患者中大约一年一次发生的急性加重构成了最昂贵的部分。

[0076] 在COPD中,气流阻塞可以在肺中的两个非常不同的病理生理过程的基础上发生:1)实质组织的炎症导致肺实质组织的蛋白质水解和肺弹性的损失(肺气肿);和2)小气道的炎症、结疤和缩小(“小气道疾病”)。在个别的病人中,可能由不同的遗传因素的控制的这些过程之一可能占主导地位,但通常都共同存在。最终,这两个过程产生类似的功能障碍的模式:呼气流降低、充气过度和气体交换异常。

[0077] 在慢性阻塞性肺病的早期阶段,在COPD患者的肺部发现下列症状:1) 气道上皮细胞被有破坏性的气雾剂破坏,2) 炎性粘膜分泌物的积累,3) 气道壁被炎性免疫细胞浸润,4) 气道重塑/气道壁的增厚侵占腔空间,和5) 对气流增加的阻力。在这个早期阶段,平滑肌收缩和高反应性也增加了阻力,但增加的阻力被支气管扩张剂缓解。

[0078] 在高级的阶段,COPD患者在围绕气道壁的上皮下和外膜间室中特征性地发生纤维结缔组织的沉积。这样的细支气管周围纤维化通过限制伴随肺膨胀发生的气道口径扩大引起固定的气道梗阻。

[0079] 3.5.1. 慢性支气管炎

[0080] 慢性支气管炎定义为在没有公认的引起痰产生的其他疾病时,在连续两年的持续至少三个月存在慢性咳嗽和痰产生。在流行病学上,在慢性支气管炎中支气管上皮细胞变成伴随粘液腺肥大和杯状细胞数量增加的慢性发炎。纤毛被毁坏并且粘膜纤毛活动梯的效率大大受损。粘液粘度和粘液产生增加,导致咳痰困难。粘液的汇集导致对感染的易感性增加。

[0081] 在镜下气道壁具有炎性细胞的浸润。炎症伴随使得壁变厚的结疤和重塑并且也导致气道变窄。因为慢性支气管炎进展,产生鳞片状转化(内衬气道内部的组织中的异常变化)和纤维化(气道壁进一步增厚和结疤)。这些变化的结果是气流的限制。随着较小的外周气道的变窄和扭曲,随着时间的反复感染和炎症导致对气道壁的不可逆转的结构损伤和结疤。

[0082] 3.5.2. 肺气肿

[0083] 肺气肿根据其病理特点定义,其特征为随着它们的壁的破坏和肺弹性的损失,终端细支气管远端的终端空气空间的异常扩张。如果肺气肿区域在直径上大于1厘米,由于过度膨胀可能会产生大疱(大于1厘米宽的水疱)。异常的空气空间分布允许对肺气肿的两种主要模式的分类:全肺泡性(全小叶性)肺气肿,导致肺泡整体的膨胀和破坏,特别是肺的下半部分。肺泡中央性(小叶中央性)肺气肿包括影响肺的上部叶和下部叶的上部的呼吸性细支气管周围的损伤。肺气肿的某些形式还已知与纤维化有关。

[0084] 肺气肿的破坏性的过程主要与吸烟有关。香烟烟雾是刺激物并导致气道和肺泡的低度炎症。已知的是,香烟含有超过4,000种有毒的化学物质,这些化学物质影响肺部内抗蛋白酶和蛋白酶之间的平衡,造成永久性损伤。炎性细胞(巨噬细胞和嗜中性粒细胞)产生一种被称为弹性蛋白酶的蛋白质水解酶,其破坏弹性蛋白质,它是肺组织中的一个重要组成部分。

[0085] 肺泡或肺气肿含有弹性组织,其支持和维持肺内气道的效力。肺泡壁的破坏可通过松开有助于保持气道开放的牵绳使小气道变窄。在正常的吸气过程中,横隔膜向下移动而胸腔向外移动,并且通过产生的负压使空气吸入肺部。在呼气的时候,因为胸腔和横隔膜放松,肺实质的弹性回缩推动空气向上和向外。随着导致松弛肺和肺泡牵绳的损失,肺实质的破坏,小气道塌陷并且空气滞留的发生,导致肺部膨胀过度。膨胀过度使横隔膜变平,从而导致有效的收缩减少和肺泡的效率降低,这反过来又导致进一步的空气滞留。随着时间的推移,所描述的机制导致严重的气流阻塞,造成不足的呼气以允许在下次吸气之前肺部充分地缩小。

[0086] 3.5.3. 慢性哮喘

[0087] 哮喘被定义为气道的一种慢性炎症症状,导致广泛的和可变的气道阻塞,它是自发地或伴随治疗可逆的。在一些慢性哮喘患者中,疾病进展导致不可逆的气道阻塞,特别地如果哮喘是未经治疗的,或者因为它没有被诊断或处置不当,或者如果它是特别严重的。患有哮喘的儿童有十分之一的机会发展不可逆转的哮喘,而成年哮喘发病的风险是四分之一。研究还发现,在儿童和成人中,如果它们的哮喘没有适当地治疗,特别是糖皮质激素治疗,哮喘可以导致肺功能不可逆的恶化。

[0088] 在哮喘时气道炎症可以通过平滑肌增加、表面上皮破坏、胶原沉积增加和基底膜增厚导致气道重塑。

[0089] 3.6.纤维化的其他类型

[0090] 纤维化的其他类型包括但不限于,胰腺和肺的囊性纤维化、注射纤维化、心内膜心肌纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化、腹腔后纤维化和肾源性系统性纤维化。

[0091] 囊性纤维化(CF,囊性纤维化,粘液粘稠病)是一种常染色体隐性遗传疾病。它是美国最常见的致命的遗传疾病之一,影响约30,000人,并在白种人中是最常见的,在每3,300个活产婴儿中发生一例。在1989年确定的参与在囊性纤维化中的基因编码一种称为囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)的蛋白质。CFTR通常是由外分泌腺上皮细胞在整个身体表达并调节氯离子的运动、碳酸氢根离子和谷胱甘肽进出细胞。在囊性纤维化患者中,CFTR基因突变导致CFTR蛋白质功能的改变或完全丧失,导致渗透压、pH和外分泌物的氧化还原性能的缺陷。在肺部中,CF通过阻塞气道的稠的粘液分泌物的存在证明了它本身。在其他外分泌器官,如汗腺,CF可能不是通过阻塞性表型,而是通过分泌物的异常盐组分(因此通过临床汗水渗透压测试来检测CF患者)证明其本身。在囊性纤维化患者中疾病和死亡的最主要原因是进行性肺病。阻止气道通道的CF粘液的浓度被认为源于分泌物渗透压的异常,以及大量的DNA、肌动蛋白、蛋白酶和源于炎性细胞(称为嗜中性粒细胞)的一个子集的促氧化酶的存在。事实上,CF肺部疾病的特点是早期的对病毒和细菌病原体的极度活跃的嗜中性粒细胞介导的炎症反应。CF肺部高炎症综合征有一些基础,其中在促炎症趋化因子,主要是IL-8和抗炎细胞因子,主要是IL-10之间的失衡已被报道发挥主要作用。参看Chmielek等人, Clin Rev Allergy Immunol.3(1):5-27(2002)。有研究报道,TNF- α , IL-6和IL-1 β 的水平在囊性纤维化患者的支气管肺泡灌洗液中比在健康对照支气管肺泡灌洗液中高(Bondfield, T.L.等人, Am.J.Resp.Crit.Care Med.152(1):2111-2118,1995)。

[0092] 注射纤维化(IF)是经常发生在婴儿和儿童的四头肌、三头肌和臀肌肌肉的肌肉注射的并发症,其中受治疗者无法完全收缩受影响的肌肉。它通常是无痛的,但是进行性的。有研究报道,糖蛋白骨桥蛋白(OPN)在组织重塑中发挥作用(Liaw,L.等人, J.Clin.Invest, 101(7):1469-1478,1998),而且这种促炎性介质诱导IL-1 β 在人类单核细胞中上调并伴随TNF- α 和IL-6的产生增强(Naldini,A.等人, J.Immunol.177:4267-4270,2006;Weber,G.F.和Cantor,H.Cytokine Growth Factor Reviews.7(3):241-248,1996)。

[0093] 心内膜心肌病(嗜酸性粒细胞综合征(HS))是一种疾病过程,其特征在于血液中持续升高的嗜酸性粒细胞计数(1500嗜酸性粒细胞/ mm^3)。HS同时影响许多器官。有研究报道,在病毒性心肌炎患者中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 以高水平表达(Satoh,M.等人, Virchows Archiv.427(5):503-509,1996)。症状可能包括心肌病、皮肤损伤、血栓栓塞性疾病、肺部疾病、神经病变、肝脾肿大(肝脏和脾脏的同时肿大)和减少的心室大小。治疗方法可能包括使

用糖皮质激素以减少嗜酸性粒细胞水平。

[0094] 纵隔纤维化(MF)的特点是阻塞脉管和气道的以淋巴节点为中心的侵袭性、钙化纤维化。MF是组织胞浆菌病的晚期并发症。在纤维化小鼠模型中的研究报道,IL-10和TNF- α 显著升高(Ebrahimi,B等人,Am.J.Pathol.158:2117-2125,2001)。

[0095] 骨髓纤维化(髓样化生、慢性特发性骨髓纤维化、原发性骨髓纤维化)是一种骨髓发生纤维化的骨髓疾病。骨髓纤维化导致进行性骨髓衰竭。平均生存期为五年,并且死亡原因包括感染、出血、器官衰竭、门静脉高压和白血病转化。据报道,TNF- α 和IL-6水平在病毒诱导的骨髓纤维化的动物模型中升高(Bousse-Kerdiles,M.等人,Ann.Hematol.78:434-444,1999)。

[0096] 腹腔后纤维化(奥蒙德病)是一种以腹腔后纤维组织增生为特征的疾病。腹腔后是包含肾、主动脉、肾道和其他结构的体隔室。据报道,IL-1、IL-6和TNF- α 在腹腔后纤维化的发病机制中具有关键的作用(Demko,T.等人,J.Am.Soc.Nephrol.8:684-688,1997)。腹腔后纤维化的症状可能包括但不限于,腰痛、肾功能衰竭、高血压和深静脉血栓形成。

[0097] 肾源性系统性纤维化(NSF,肾纤维化皮肤病)包括皮肤、关节、眼睛和内脏的纤维化。NSF可能与暴露于钆有关。患者发生伴随纤维化结节和斑块的大面积的皮肤硬化。伴随运动范围的限制的屈曲挛缩也可能发生。NSF呈现皮肤的成纤维细胞和树突状细胞增殖、胶原束增厚、弹性纤维增加以及粘蛋白沉积。一些报道表明,促炎性状态提供了引起肾源性系统性纤维化的诱发因素(Saxena,S.等人,Int.Urol.Nephrol.40:715-724,2008),以及TNF- α 水平在肾源性系统性纤维化的动物模型中升高(Steger-Hartmann,T.等人,Exper.Tox.Pathol.61(6):537-552,2009)。

[0098] 4.风险因素

[0099] 4.1.主要危险因素

[0100] 4.1.1.吸烟

[0101] 虽然纤维化气道疾病的许多风险因素已被确定(其中一些在它们的原因中可能发挥作用),吸烟仍是COPD的主要的和最重要的原因。吸烟数量越大,发生纤维化气道疾病的风险越大。绝大多数发生纤维化气道疾病的人是吸烟者,他们的肺功能下降比不吸烟者更快。

[0102] 最有效的干预是停止吸烟,最好是在早期阶段。戒烟者将无法恢复失去的肺功能,但衰退的速度可能恢复到非吸烟者的衰退的速度。不管需要多少次尝试戒掉,在早期阶段的戒烟改善了预后。个体对于吸烟而发生纤维化气道疾病的易感性不同。大约15%的吸烟者会发生临床上显著的COPD,而大约有50%的吸烟者永远不会出现任何症状。肺功能的衰退是渐进的,并且由于患者可能适应呼吸短促的症状或可能没有注意到症状,疾病通常诊断太晚。有研究表明,根据每日吸烟的数量,24-47%的吸烟者发生气流阻塞。被动吸烟增加对疾病的易感性。

[0103] 4.1.2. α -1抗胰蛋白酶缺乏症

[0104] 这种罕见的遗传性疾病导致肺中关键的抗蛋白酶保护系统之一完全缺乏。这是影响1:4000人口的隐性疾病。患有 α -1抗胰蛋白酶缺乏症的患者处于在20岁和40岁之间的年龄的早期年龄发生肺气肿的风险,并且往往具有强大的家族病史。患有缺乏症和肺气肿的患者继承来自各自父母的一个异常基因;也就是说,父母是该基因的携带者。这样的父母在

血液中会有一半的正常水平的抗胰蛋白酶,这可能足以保护他们不患肺气肿。同样地, α -1抗胰蛋白酶缺乏患者的所有的孩子将携带一个异常基因,但不会受到影响。两种常见的 α -1抗胰蛋白酶缺乏症的形式由用于 α -1抗胰蛋白酶编码的基因中的点突变引起。

[0105] 4.2. 相关风险因素

[0106] 4.2.1. 环境污染

[0107] 有强有力的证据表明,纤维化气道疾病可能由空气污染加重,但与吸烟相比在纤维化气道疾病的病因学中污染的作用很小。由煤和石油化石燃料的燃烧所产生的重颗粒物、碳和二氧化硫造成的空气污染在纤维化气道疾病的发生中是重要的原因或辅助因子。这些主要来源于汽车尾气排放,并且特别归咎于如臭氧的光化学污染物。在发展中国家,特别是对于妇女,由于在通风不良的住宅中用于做饭和加热的生物质燃料的燃烧产生的室内空气污染可能是纤维化气道疾病,如COPD的重要风险因素。

[0108] 4.2.2. 职业因素

[0109] 一些工人暴露于煤炭、硅石和阳离子的职业,如矿工、纺织工人和水泥工人,与增加的纤维化气道疾病风险相关。自20世纪50年代以来,暴露于镉(一种重金属)及焊接烟尘已被确认为肺气肿的原因。

[0110] 许多粉尘职业比暴露于气体或烟雾更加危险,并与慢性支气管炎和各种形式的气道阻塞性疾病的发生有关。也已知船厂焊接工和填缝工以及在那些暴露于水泥粉尘的建筑行业中的那些人具有增加的发生纤维化气道疾病的风险。

[0111] 4.2.3 儿童呼吸道感染

[0112] 在生命的第一年的诸如肺炎和细支气管炎的胸部感染,可能导致在以后的生命中COPD的发生。这可能是在出生直到成年早期肺的生长结束的结果或呼吸系统的发育不完善。如果发生肺损伤,最大的潜在肺功能将无法实现,在早期的年龄会产生COPD的症状。

[0113] 4.3. 其他风险因素

[0114] 其他可能在引起和/或对纤维化气道疾病的诸如肺纤维化的早期症状起作用的风险因素,包括过敏性肺炎(最常见的是由吸入被细菌、真菌或动物制品污染的灰尘导致)、一些典型的结缔组织疾病(如类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮(SLE)和硬皮病)、其他涉及结缔组织的疾病(如结节病、韦格纳肉芽肿)、感染、某些药物治疗(如胺碘酮、博来霉素、白消安、氨甲喋呤和呋喃妥因)和放射治疗胸部。

[0115] 5. 现有的和新兴的用于治疗纤维化疾病或病状的治疗方法

[0116] 目前用于治疗纤维化疾病的治疗剂公开于Datta等人,British Journal of Pharmacology,163:141-172,2011;作为参考并入本文。这种治疗剂的非限制性实施方案包括但不限于,纯化的牛V型胶原蛋白(例如,IW-001;Immune Works;United Therapeutics)、IL-13受体拮抗剂(例如,QAX576;Novartis)、蛋白酪氨酸激酶抑制剂(例如,伊马替尼(**Gleevec®**); Craig Daniels/Novartis)、内皮素受体拮抗剂(例如,ACT-064992(马西替坦);Actelion)、双重内皮素受体拮抗剂(例如,波生坦(**Tracleer®**); Actelion)、前列环素类似物(吸入的伊洛前列素(例如,**Ventavis®**); Actelion)、抗结缔组织生长因子单克隆抗体(例如,FG-3019)、内皮素受体拮抗剂(A选择性)(例如,安贝生坦(**Letairis®**), Gilead)、AB0024 (Arresto)、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2) 单克隆抗体(例如,GS-6624 (前身为

AB0024); Gilead)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂(例如,CC-930; Celgene)、吡非尼酮(例如, **Esbriet®** (InterMune), **Pirespa®** (Shionogi))、IFN- γ 1b(例如, **Actimmune®**; InterMune)、对所有三种TGF- β 亚型的泛中和IgG4人类抗体(例如,GC1008; Genzyme)、TGF- β 活化抑制剂(例如,Stromedix (STX-100))、重组人Pentraxin-2蛋白(rhPTX-2)(例如,PRM151; Promedior)、IL4/IL13双特异性抗体(例如,SAR156597; Sanofi)、靶向整合素 $\alpha v \beta 6$ 的人源化单克隆抗体(BIBF 1120; Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸(Zambon SpA)、西地那非(**Viagra®**)、TNF拮抗剂(例如,依那西普(**Enbrel®**); Pfizer)、糖皮质激素(例如,泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松和糠酸氟替卡松)、支气管扩张剂(例如,白三烯调节剂(例如,孟鲁司特(**SINGUAIR®**))、抗胆碱支气管扩张剂(例如,异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 β_2 激动剂(例如,甲磺酸乙基异丙肾上腺素(**Bronkometer®**))、肾上腺素、salbutamol/沙丁胺醇和特布他林)、长效 β_2 激动剂(例如,沙美特罗、福莫特罗、茚达特罗(**Onbrez®**)),和组合支气管扩张剂包括但不限于,**SYMBICORT®** (同时含有布地奈德和福莫特罗)、糖皮质激素(例如,泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松)、甲基黄嘌呤及其衍生物(例如,咖啡因、氨茶碱、IBMX、副黄嘌呤、己酮可可碱、可可碱和茶碱)、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂(例如,ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616和TEI-8362,以及过渡态抑制剂,例如ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892和ZD-8321)、磷酸二酯酶抑制剂(例如,罗氟司特(**DAXAS®**; **Daliresp®**)和西洛司特(**Ariflo®**, SB-207499))。

[0117] 5.1. 激酶和磷酸化

[0118] 激酶是催化从磷酸供体(通常是腺苷-5'-三磷酸(ATP))到受体底物的磷酸基转移反应的酶的一种普遍存在的基团。虽然所有的激酶在本质上催化相同的磷酸基转移反应,但是在它们的底物特异性、结构和它们所参与的途径上,它们显示显著的多样性。最近的所有可用的激酶序列(大约60,000个序列)的分类表明激酶可以分为25个同源(意思是来自共同的原种)蛋白质家族。基于结构折叠的相似性这些激酶家族被分配成12个折叠组。此外,25个科中的22个(所有序列的约98.8%)属于10个结构折叠已知的折叠组。其他的3个科中,多聚磷酸激酶形成一个独特的折叠组,以及剩下的2个家族都是完整的膜激酶并包括最后的折叠组。这些折叠组不仅包括一些最广泛分布的蛋白质折叠,例如罗斯曼样(Rossmann-like)折叠(由两个 α 螺旋连接的处于拓扑顺序 β - α - β - α - β 的三个或更多个平行的 β 链)、铁氧化还原蛋白样折叠(一种具有沿其骨干的标识 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构的常见的 $\alpha+\beta$ 蛋白质折叠)、TIM-桶折叠(意思是由八个 α 螺旋和八个平行的 β 链沿着蛋白质骨干交替组成的保守的蛋白质折叠)和反平行的 β 桶折叠(β 桶是扭曲和盘绕以形成封闭结构的大的 β 片,其中第一条链是键合到最后的氢),而且也包括蛋白质结构的所有大类(所有 α 、所有 β 、 $\alpha+\beta$ 、 α/β)。在折叠组内,每个家族的核苷酸结合结构域的核心具有相同的结构,并且蛋白质核心的拓扑通过循环排列是或者相同或者相关的。折叠组内的家族之间的同源性是未提示的。

[0119] I组(23,124序列)激酶包含蛋白S/T-Y激酶、非典型蛋白激酶、脂质激酶、和ATP抓酶(grasp enzyme)并进一步包括蛋白S/T-Y激酶、和非典型蛋白激酶家族(22,074序列)。这些激酶包括:胆碱激酶(EC 2.7.1.32);蛋白激酶(EC 2.7.137);磷酸化酶激酶(EC

2.7.1.38);高丝氨酸激酶(EC 2.7.1.39);1-磷脂酰肌醇4-激酶(EC 2.7.1.67);链霉素6-激酶(EC 2.7.1.72);乙醇胺激酶(EC 2.7.1.82);链霉素3'-激酶(EC 2.7.1.87);卡那霉素激酶(EC 2.7.1.95);5-甲基硫核糖激酶(EC 2.7.1.100);紫霉素激酶(EC 2.7.1.103);[羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(NADPH₂)]激酶(EC 2.7.1.109);蛋白酪氨酸激酶(EC 2.7.1.112);[异柠檬酸脱氢酶(NADP⁺)]激酶(EC 2.7.1.116);[肌球蛋白轻链]激酶(EC 2.7.1.117);潮霉素-B激酶(EC 2.7.1.119);钙/钙调蛋白依赖蛋白激酶(EC 2.7.1.123);视紫红质激酶(EC 2.7.1.125);[β-肾上腺素能受体]激酶(EC 2.7.1.126);[肌球蛋白重链]激酶(EC 2.7.1.129);[Tau蛋白]激酶(EC 2.7.1.135);大环内酯2'-激酶(EC 2.7.1.136);1-磷脂酰肌醇3-激酶(EC 2.7.1.137);[RNA聚合酶]亚基激酶(EC 2.7.1.141);磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶(EC 2.7.1.153);和磷脂酰肌醇-4-磷酸3-激酶(EC 2.7.1.154)。I组进一步包括脂质激酶家族(321序列)。这些激酶包括:1-磷脂酰肌醇-4-磷酸5-激酶(EC 2.7.1.68);ID-myo-肌醇-三磷酸3-激酶(EC 2.7.1.127);肌醇四磷酸(tetrakisphosphate)5-激酶(EC 2.7.1.140);1-磷脂酰肌醇-5-磷酸4-激酶(EC 2.7.1.149);1-磷脂酰肌醇-3-磷酸5-激酶(EC 2.7.1.150);肌醇多磷酸多激酶(EC 2.7.1.151);和肌醇六磷酸(hexakisphosphate)激酶(EC 2.7.4.21)。I组还包括ATP抓激酶(729序列),其包括肌醇四磷酸(tetrakisphosphate)1-激酶(EC 2.7.1.134);丙酮酸,磷酸二激酶(EC 2.7.9.1);和丙酮酸水二激酶(EC 2.7.9.2)。

[0120] II组(17,071序列)激酶包含罗斯曼样(Rossmann-like)激酶。II组包括P-环激酶科(7,732序列)。这些包括葡萄糖激酶(EC 2.7.1.12);磷酸核酮糖激酶(EC 2.7.1.19);胸苷激酶(EC 2.7.1.21);核糖基烟酰胺激酶(EC 2.7.1.22);脱磷酸辅酶A激酶(EC 2.7.1.24);腺苷酰硫酸激酶(EC 2.7.1.25);泛酸激酶(EC 2.7.1.33);蛋白激酶(细菌的)(EC 2.7.1.37);尿苷激酶(EC 2.7.1.48);莽草酸激酶(EC 2.7.1.71);脱氧胞苷激酶(EC 2.7.1.74);脱氧腺苷激酶(EC 2.7.1.76);多聚核苷酸5'-羟基激酶(EC 2.7.1.78);6-磷酸果糖-2-激酶(EC 2.7.1.105);脱氧鸟苷激酶(EC 2.7.1.113);四酰二糖(tetraacyldisaccharide)4'-激酶(EC 2.7.1.130);脱氧核苷激酶(EC 2.7.1.145);腺苷钴啉醇酰胺(adenosylcobinamide)激酶(EC 2.7.1.156);聚磷酸激酶(EC 2.7.4.1);磷酸甲羟戊酸(phosphomevalonate)激酶(EC 2.7.4.2);腺苷酸激酶(EC 2.7.4.3);核苷磷酸激酶(EC 2.7.4.4);鸟苷酸激酶(EC 2.7.4.8);胸苷酸激酶(EC 2.7.4.9);核苷三磷酸腺苷酸激酶(EC 2.7.4.10);(脱氧)核苷磷酸激酶(EC 2.7.4.13);胞苷酸激酶(EC 2.7.4.14);和尿苷酸激酶(EC 2.7.4.22)。II组进一步包括磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶家族(815序列)。这些酶包括蛋白激酶(HPr激酶/磷酸酶)(EC 2.7.1.37);磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(GTP)(EC 4.1.1.32);和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(ATP)(EC 4.1.1.49)。II组还包括磷酸甘油酸激酶(1,351序列)家族。这些酶包括磷酸甘油酸激酶(EC 2.7.2.3)和磷酸甘油酸激酶(GTP)(EC 2.7.2.10)。II组还包括天冬氨酸激酶家族(2,171序列)。这些酶包括氨基甲酸激酶(EC 2.7.2.2);天冬氨酸激酶(EC 2.7.2.4);乙酰谷氨酸激酶(EC 2.7.2.81);谷氨酸5-激酶(EC 2.7.2.1)和尿苷酸激酶(EC 2.7.4.)。II组还包括磷酸果糖激酶样激酶家族(1,998序列)。这些酶包括6-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.11);NAD(+)激酶(EC 2.7.1.23);1-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.56);二磷酸果糖-6-磷酸1-磷酸转移酶(EC 2.7.1.90);鞘氨醇激酶(EC 2.7.1.91);甘油二酯激酶(EC 2.7.1.107);和神经酰胺激酶(EC 2.7.1.138)。II组还包括

核糖激酶样家族(2,722序列)。这些酶包括:葡萄糖激酶(EC 2.7.1.2);己酮糖激酶(ketohexokinase)(EC 2.7.1.3);果糖激酶(EC 2.7.1.4);6-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.11);核糖激酶(EC 2.7.1.15);腺苷激酶(EC 2.7.1.20);吡哆醛激酶(EC 2.7.1.35);2-脱氢-3-脱氧葡萄糖酸激酶(EC 2.7.1.45);羟甲基嘧啶激酶(EC 2.7.1.49);羟乙基噻唑激酶(EC 2.7.1.50);1-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.56);肌苷激酶(EC 2.7.1.73);5-脱氢-2-脱氧葡萄糖酸激酶(EC 2.7.1.92);塔格糖-6-磷酸激酶(EC 2.7.1.144);ADP依赖磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.146);ADP依赖葡萄糖激酶(EC 2.7.1.147);和磷酸甲基嘧啶激酶(EC 2.7.4.7)。II组还包括硫胺素焦磷酸激酶家族(175序列),其包括硫胺素焦磷酸激酶(EC 2.7.6.2)。II组还包括甘油激酶家族(107序列),其包括甘油激酶(EC 2.7.1.31)。

[0121] III组激酶(10,973序列)包括铁氧化还原蛋白样折叠激酶。III组进一步包括核苷二磷酸激酶家族(923序列)。这些酶包括核苷二磷酸激酶(EC 2.7.4.6)。III组还包括HPPK激酶家族(609序列)。这些酶包括2-氨基-4-羟基-6-羟甲基二氢喋啶焦磷酸激酶(EC 2.7.6.3)。III组还包括胍基激酶家族(324序列)。这些酶包括胍基乙酸激酶(EC 2.7.3.1);肌酸激酶(EC 2.7.3.2);精氨酸激酶(EC 2.7.3.3);和蚯蚓磷脂激酶(EC 2.7.3.5)。III组还包括组氨酸激酶家族(9,117序列)。这些酶包括蛋白激酶(组氨酸激酶)(EC 2.7.1.37);[丙酮酸脱氢酶(硫辛酰胺)]激酶(EC 2.7.1.99);和[3-甲基-2-氧化丁酸乙酯(oxybutanoate)脱氢酶(硫辛酰胺)]激酶(EC 2.7.1.115)。

[0122] IV组激酶(2,768序列)包含核糖核酸酶H样激酶。这些酶包括己糖激酶(EC 2.7.1.1);葡萄糖激酶(EC 2.7.1.2);果糖激酶(EC 2.7.1.4);鼠李糖激酶(EC 2.7.1.5);甘露糖激酶(EC 2.7.1.7);葡萄糖酸激酶(EC 2.7.1.12);L-核酮糖激酶(EC 2.7.1.16);木酮糖激酶(EC 2.7.1.17);赤藓糖醇激酶(EC 2.7.1.27);甘油激酶(EC 2.7.1.30);泛酸激酶(EC 2.7.1.33);D-核酮糖激酶(EC 2.7.1.47);1-岩藻糖激酶(EC 2.7.1.51);L-木酮糖激酶(EC 2.7.1.53);阿洛糖激酶(EC 2.7.1.55);2-脱氢-3-脱氧半乳糖酸激酶(EC 2.7.1.58);N-乙酰氨基葡萄糖激酶(EC 2.7.1.59);N-酰基甘露糖胺激酶(EC 2.7.1.60);多聚磷酸葡萄糖磷酸转移酶(EC 2.7.1.63); β -葡萄糖苷激酶(EC 2.7.1.85);乙酸激酶(EC 2.7.2.1);丁酸激酶(EC 2.7.2.7);支链脂肪酸激酶(EC 2.7.2.14);和丙酸激酶(EC 2.7.2.15)。

[0123] V组激酶(1,119序列)包含TIM β -桶激酶。这些酶包括丙酮酸激酶(EC 2.7.1.40)。

[0124] VI组激酶(885序列)包含GHMP激酶。这些酶包括半乳糖激酶(EC 2.7.1.6);甲羟戊酸激酶(EC 2.7.1.36);高丝氨酸激酶(EC 2.7.1.39);L-阿拉伯糖激酶(EC 2.7.1.46);岩藻糖激酶(EC 2.7.1.52);莽草酸激酶(EC 2.7.1.71);4-胞苷(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇(erythriol)激酶(EC 2.7.1.148);磷酸甲羟戊酸激酶(EC 2.7.4.2)。

[0125] VII组激酶(1,843序列)包含AIR合成酶激酶。这些酶包括硫胺素磷酸激酶(EC 2.7.4.16)和硒水二激酶(EC 2.7.9.3)。

[0126] VIII组激酶(565序列)包含核黄素激酶(565序列)。这些酶包括核黄素激酶(EC 2.7.1.26)。

[0127] IX组激酶(197序列)包含二羟基丙酮激酶。这些酶包括甘油酮激酶(EC 2.7.1.29)。

[0128] X组激酶(148序列)包含推定的甘油酸激酶。这些酶包括甘油酸激酶(EC

2.7.1.31)。

[0129] XI组激酶(446序列)包含多聚磷酸激酶。这些酶包括聚磷酸激酶(EC 2.7.4.1)。

[0130] XII组激酶(263序列)包含完整的膜激酶。XII组包括多萜醇激酶家族。这些酶包括多萜醇激酶(EC 2.7.1.108)。XII组进一步包括十一萜醇激酶家族。这些酶包括十一萜醇激酶(EC 2.7.1.66)。

[0131] 激酶在许多细胞代谢和信号通路中发挥着不可或缺的作用,并且在结构层面、生化水平、细胞水平上它们是研究最透彻的酶之一。尽管事实上所有的激酶使用相同的磷酸供体(在大多数情况下,ATP)并且表面上催化相同的磷酸基转移反应,但是在它们的结构折叠和底物识别机制上它们显示显著的多样性。这可能主要由于它们的底物的结构和性能的非凡的多样性。

[0132] 5.1.1.促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶(MK2和MK3)

[0133] 已经限定了促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)下游的不同组的MAPK活化的蛋白激酶(MAP-KAPK)。这些酶将信号转导到不是MAPK的直接底物的靶蛋白质,并且因此,起到用MAPK级联将磷酸化依赖性信号传递到不同的细胞功能的作用。这些组中的一组是由三种MAPKAPK:MK2,MK3(也称为3pk),和MK5(也指定PRAK)形成。促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(也被称为“MAPKAPK2”、“MAPKAP-K2”或“MK2”)是一种丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶家族的激酶。MK2与MK3是高度同源的(约75%的氨基酸一致)。MK2和MK3的激酶结构域与钙/钙调蛋白依赖蛋白激酶(CaMK)、磷酸化酶b激酶和核糖体S6激酶(RSK)亚型的C-末端激酶结构域(CTKD)是最相似的(约35%至40%的一致性)。MK2基因编码370个氨基酸(MK2A)和400个氨基酸(MK2B)的两个选择性接合转录物。MK3基因编码382个氨基酸的一个转录物。虽然MK2和MK3蛋白质是高度同源的,但是MK2A具有较短的C-末端区域。MK2B的C-末端包含短MK2A亚型中不存在的功能性双向细胞核定位序列(NLS)(Lys-Lys-Xaa₁₀-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys;0);鞘氨醇激酶(EC 2.7.1.91);甘油二酯激酶(EC 2.7.1.107);和神经酰胺激酶(EC 2.7.1.138)。II组还包括核糖激酶样家族(2,722序列)。这些酶包括:葡萄糖激酶(EC 2.7.1.2);己酮糖激酶(ketohexokinase)(EC 2.7.1.3);果糖激酶(EC 2.7.1.4);6-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.11);核糖激酶(EC 2.7.1.15);腺苷激酶(EC 2.7.1.20);吡哆醛激酶(EC 2.7.1.35);2-脱氢-3-脱氧葡萄糖酸激酶(EC 2.7.1.45);羟甲基嘧啶激酶(EC 2.7.1.49);羟乙基嘧啶激酶(EC 2.7.1.50);1-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.56);肌苷激酶(EC 2.7.1.73);5-脱氢-2-脱氧葡萄糖酸激酶(EC 2.7.1.92);塔格糖-6-磷酸激酶(EC 2.7.1.144);ADP依赖磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.146);ADP依赖葡萄糖激酶(EC 2.7.1.147);和磷酸甲基嘧啶激酶(EC 2.7.4.7)。II组还包括硫胺素焦磷酸激酶家族(175序列),其包括硫胺素焦磷酸激酶(EC 2.7.6.2)。II组还包括甘油激酶家族(107序列),其包括甘油激酶(EC 2.7.1.31)。

[0134] MK2B和MK3主要位于静止细胞的细胞核中而MK2A存在于细胞质中。在压力刺激下,MK2B和MK3两者经由染色体区域维持蛋白(CRM1)依赖机制迅速地输出到细胞质。因为激酶的活化环内的Thr334的磷酸化突变增强了MK2B的细胞质定位,MK2B的细胞核输出似乎是由激酶的活化介导。不受理论的限制,认为MK2B和MK3可能含有本质上活性的NLS和磷酸化调节的NES。

[0135] MK2和MK3似乎是主要表达在心脏、骨骼肌和肾组织中的广泛表达。

[0136] 5.1.2. 活化

[0137] p38 α 和p38 β 的各种活化剂强效刺激MK2和MK3的活性。p38介导体外和体内在四个脯氨酸定向的位点: Thr25、Thr222、Ser272和Thr334上的MK2的磷酸化。这些位点中, 只有Thr25不是保存在MK3中。不受理论的限制, 虽然磷酸化的Thr25的功能是未知的, 但是在两个SH3结构域结合位点之间的它的位置表明, 它可能调节蛋白质-蛋白质相互作用。MK2中的Thr222 (MK3中的Thr201) 位于激酶结构域的活化环并且已表明对于MK2和MK3的激酶活性是必不可少的。MK2中的Thr334 (MK3中的Thr313) 位于C-末端到催化的结构域并且对激酶活性是必不可少的。MK2的晶体结构已被解开, 并且不受理论的限制, 认为Thr334磷酸化可以作为用于MK2细胞核输入和输出的开关。Thr334的磷酸化也可能削弱或中断MK2的C末端到催化的结构域的结合, 暴露NES并促进细胞核输出。

[0138] 有研究表明, 虽然p38能够活化细胞核中的MK2和MK3, 但是实验证据表明, MK2和MK3的活化和细胞核输出由同样决定p38的稳定性和定位的磷酸化依赖的构象开关耦合, 并且p38本身的细胞定位受MK2和可能的MK3控制。另外有研究表明, 在磷酸化和MK2的活化后细胞核p38在具有MK2的复合物中输出到细胞质。p38和MK2之间的相互作用对于p38的稳定性可能是重要的, 因为研究表明, 在MK2缺陷的细胞中p38的水平是低的以及催化非活性的MK2蛋白质的表达恢复p38的水平。

[0139] 5.1.3. 底物和功能

[0140] 进一步的研究表明, 小的热休克蛋白HSPB1 (也被称为热休克蛋白27或HSP27)、淋巴细胞特异性蛋白LSP-1和波形蛋白由MK2磷酸化。HSPB1是特别感兴趣的, 因为它形成大量的可以作为分子伴侣并保护细胞免受热冲击和氧化应激的低聚物。在磷酸化后, HSPB1失去形成大量的低聚物的能力并且无法阻止肌动蛋白聚合, 表明MK2介导的HSPB1的磷酸化提供旨在调节肌动蛋白动力学的自我平衡的功能, 否则将在压力下不稳定。

[0141] MK3也被示出在体外和体内磷酸化HSPB1, 但其在压力条件下的作用尚未阐明。MK2与MK3共享许多底物。这两种酶具有相当的底物选择机会并且磷酸化肽底物具有相似的动力学常数。MK2的有效的磷酸化所需的最小的序列被发现是Hyd-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-pSer/Thr (SEQ ID编号: 25), 其中Hyd是大的疏水性残基。

[0142] 实验证据支持p38在调节细胞因子的生物合成和细胞迁移中的作用。在小鼠中MK2基因的有针对性的缺失表明, 尽管p38介导了许多类似的激酶的活化, 但是MK2似乎是负责这些p38依赖的生物过程的关键激酶。MK2的损失导致(i) 在诸如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 的细胞因子的脂多糖 (LPS) 诱导的合成中的缺陷, 以及(ii) 在小鼠胚胎成纤维细胞、平滑肌细胞和嗜中性粒细胞的迁移中的变化。

[0143] 与MK2在炎症反应中的作用一致, MK2缺陷的小鼠表现出对Listeria单胞质基因感染增加的易感性和减少的炎症介导的局灶性脑缺血后神经元的死亡。因为p38蛋白质的水平也在MK2缺陷的细胞中明显减少, 但是区分这些表型是否由于单独的MK2的损失是必要的。为了实现这一目标, MK2突变体在MK2缺陷的细胞中表达, 并且结果表明MK2的催化活性对于恢复p38的水平是没有必要的, 但对于调节细胞因子的生物合成是需要的。

[0144] MK2的基因敲除或击倒研究提供了有力的支持, 活化的MK2通过与IL-6 mRNA的富含AU的3'非翻译区相互作用的蛋白质的磷酸化增强了IL-6 mRNA的稳定性。特别地, 已经表明的是, MK2主要负责hnRNP A0的磷酸化, mRNA结合蛋白稳定IL-6 RNA。此外, 一些另外的调查

不同的炎症性疾病的研究发现,诸如IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和IL-8的促炎症细胞因子的水平在从患有稳定的慢性阻塞性肺疾病(COPD)的患者或从吸烟者的肺泡巨噬细胞诱导的痰中增加(Keatings V.等人,Am J Resp Crit Care Med,1996,153:530-534;Lim,S.等人,J Respir Crit Care Med,2000,162:1355-1360)。升高的诸如白细胞介素-8(IL-8)和白细胞介素-6(IL-6)的促炎症细胞因子的水平,以及相关的诸如细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)的下游细胞粘附分子(CAMs)、诸如基质金属蛋白酶-7(MMP-7)的基质金属蛋白酶和诸如S100钙结合蛋白A12(S100A12,也被称为钙粒蛋白C)的信号分子,在外周血中已被发现与死亡率、肺移植无病生存和患有特发性肺纤维化患者的疾病进展有关(Richards等人,Am J Respir Crit Care Med,2012,185:67-76;Richards,T.等人,Am J Respir Crit Care Med,181:A1 120,2010;Moodley,Y.等人,Am J Respir Cell Mol Biol.,29(4):490-498,2003)。总之,这些研究表明,升高的由MK2活化诱导的炎症细胞因子的水平可能参与气道或肺组织疾病的发病机制;并表明了用于治疗诸如特发性肺纤维化和慢性阻塞性肺疾病(COPD)的气道或肺组织的疾病的抗细胞因子疗法的潜力,(Chung,K.,Eur Respir J,2001,18:增刊34:50-59)。

[0145] 5.1.4.mRNA翻译的调节

[0146] 使用MK2基因敲除小鼠或MK2缺陷细胞的以前的研究表明,通过增加其mRNA的翻译速率MK2增加了包括TNF- α 、IL-1和IL-6的炎性细胞因子的产生。在MK2缺陷小鼠中未能检测到TNF- α 的转录、加工和释放的显著减少。已知p38通路在调节mRNA的稳定性中发挥重要的作用,并且MK2代表由p38介导此功能的可能靶标。利用MK2缺陷小鼠的研究表明,MK2的催化活性对于其对细胞因子的产生和迁移的影响是必要的,这表明不受理论的限制,MK2磷酸化参与mRNA稳定性的靶标。与此相一致,MK2已显示出绑定和/或磷酸化核内不均一核糖核蛋白(hnRNP) A0、锌指蛋白、多聚(A)结合蛋白PABP1和HuR(一种广泛表达的RNA结合蛋白的elav(在黑腹果蝇中的胚胎致死视觉异常)家族成员)。已知这些底物与在3'非翻译区中包含富含AU元件的mRNA结合或共纯化,这表明MK2可调节诸如TNF- α 的富含AU的mRNA的稳定性。MK3是否具有类似的功能目前是未知的,但MK2缺陷的成纤维细胞的LPS处理彻底废除了hnRNP A0的磷酸化,这表明MK3不能够弥补MK2的损失。

[0147] MK3与MK2参与真核延伸因子2(eEF2)激酶的磷酸化。eEF2激酶磷酸化并灭活eEF2。在翻译过程中eEF2活性对于mRNA的伸长是至关重要的,并且在Thr56上eEF2的磷酸化导致mRNA翻译的终止。在Ser377上eEF2激酶的MK2和MK3磷酸化表明这些酶可以调节eEF2激酶的活性,并且从而调节mRNA翻译延伸。

[0148] 5.1.5.MK2和MK3的转录调控

[0149] 类似于许多MK,核MK2有助于cAMP反应元件结合蛋白(CREB)、血清反应因子(SRF)和转录因子ER81的磷酸化。野生型和MK2缺陷细胞的比较显示,MK2是由应激诱导的主要SRF激酶,表明了MK2在应激介导的立即早期反应中的作用。MK2和MK3两者均在体内与碱性螺旋-环-螺旋转录因子E47相互作用并在体外磷酸化E47。发现MK2介导的E47的磷酸化抑制E47的转录活性,从而抑制E47依赖性基因表达,这表明MK2和MK3可以调节组织特异性基因表达和细胞分化。

[0150] 5.1.6.MK2和MK3的其他靶标

[0151] MK2和MK3的其他几种底物也已确定,在多种生物学过程中反映MK2和MK3的不同的

功能。脚手架蛋白14-3-3 ζ 是一种生理性MK2底物。研究表明,14-3-3 ζ 与多个细胞信号通路的组成部分相互作用,包括蛋白激酶、磷酸酶和转录因子。进一步的研究表明,MK2介导的Ser58上的14-3-3 ζ 磷酸化危及其结合活性,这表明MK2可能影响几种通常由14-3-3 ζ 调节的信号分子的调节。

[0152] 另外的研究表明,MK2也与七元Arp2和Arp3复合物(p16-Arc)的p16亚基相互作用有并在Ser77上使其磷酸化。p16-Arc具有调节肌动蛋白细胞骨架的作用,这表明MK2可能参与这一过程。

[0153] MK2和MK3也可以磷酸化5-脂氧合酶。5-脂氧合酶催化炎性介质白三烯形成中的初始步骤。也显示酪氨酸羟化酶、糖原合成酶和Akt由MK2磷酸化。最后,MK2在Ser1210上磷酸化肿瘤抑制蛋白马铃薯球蛋白,形成14-3-3 ζ 的停靠位点。马铃薯球蛋白和错构瘤蛋白通常形成功能复合物,其通过拮抗mTOR依赖性信号转导负调节细胞生长,这表明p38介导的MK2的活化可通过增强14-3-3 ζ 与马铃薯球蛋白的结合来调节细胞生长。

[0154] 5.2. 激酶抑制

[0155] 真核蛋白激酶构成通过其催化结构域相关联的同源蛋白超级家族之一。最相关的蛋白激酶针对或者丝氨酸/苏氨酸或者酪氨酸磷酸化是特异性的。蛋白激酶在对细胞外刺激的细胞反应中发挥不可或缺的作用。因此,蛋白激酶的刺激被认为是信号转导系统中最常见的活化机制之一。已知许多底物通过多种蛋白激酶进行磷酸化,并且相当数量的关于各种蛋白激酶的催化结构域的一级序列的信息已经公布。这些序列共享大量的参与ATP结合、催化和结构完整性的维持的残基。大多数的蛋白激酶具有非常保守的30-32kDa的催化结构域。

[0156] 研究试图确定和利用蛋白激酶的调控元件。这些调控元件包括抑制剂、抗体和阻断肽。

[0157] 5.2.1. 抑制剂

[0158] 酶抑制剂是结合到酶从而降低酶的活性的分子。抑制剂的结合可阻止底物进入酶的活性位点和/或阻碍酶的催化其反应。抑制剂结合是可逆的或不可逆的。不可逆的抑制剂通常与酶发生反应并在化学上使其改变(例如,通过修饰酶活性所需的关键氨基酸残基),从而使它不再能够催化其反应。与此相反,可逆的抑制剂非共价键地结合并且取决于这些抑制剂是否结合酶、酶-底物复合物、或两者而产生不同类型的抑制。

[0159] 酶抑制剂往往是由它们的特异性和效能评估。术语“特异性”用在这里是指抑制剂选择性连接至其他蛋白质或它选择性不连接至其他蛋白质。术语“效能”用在这里是指抑制剂的解离常数,这表明抑制酶所需要的抑制剂的浓度。

[0160] 已研究了将蛋白激酶抑制剂用作蛋白激酶活性调节的工具。已研究了将抑制剂用于,例如,细胞周期蛋白依赖性(Cdk)激酶、MAP激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶、Src家族蛋白酪氨酸激酶、酪氨酸激酶、钙调蛋白(CaM)激酶、酪蛋白激酶、检查点激酶(Chk1)、糖原合酶激酶3(GSK-3)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、促分裂原活化蛋白激酶1(MEK)、肌球蛋白轻链激酶(MLCK)、蛋白激酶A、Akt(蛋白激酶B)、蛋白激酶C、蛋白激酶G、蛋白酪氨酸激酶、Raf激酶和Rho激酶。

[0161] 5.2.2. 阻断肽

[0162] 肽是由两个或两个以上氨基酸的链组成的化合物,在链中一个氨基酸的羧基通过

肽键连接到另外一个的氨基。肽已被特别地用于蛋白质结构和功能的研究。合成肽尤其可以用作探针来观察蛋白-肽相互作用发生的位置。抑制肽尤其可以用于临床研究以研究肽对蛋白激酶、癌蛋白和其他疾病的抑制的作用。

[0163] 已研究了几种阻断肽的应用。例如,细胞外信号调节激酶(ERK)、MAPK蛋白激酶,对细胞的增殖和分化是必不可少的。MAPK的活化需要级联机制,其中MAPK由上游MAPK(MEK)磷酸化,然后,上游MAPK(MEK)反过来被第三激酶MAPKKK(MEKK)磷酸化。ERK抑制肽通过结合到ERK发挥MEK诱饵的功能。

[0164] 其他阻断肽包括autocamtide-2相关的抑制肽(AIP)。该合成肽是钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 的高度特异的和有效的抑制剂。AIP是autocamtide-2的非磷酸化类似物(一种CaMK II 的高度选择性的肽底物。AIP以100nM的IC₅₀(IC₅₀是需要获得50%抑制的抑制剂的浓度)抑制CaMK II。AIP抑制对于syntide-2(CaMK II 的肽底物)和ATP是非竞争性的,但对于autocamtide-2是竞争性的。这种抑制不受钙/钙调蛋白的存在或不存在的影响。CaMK II 的活性完全由AIP(1μM)抑制,而PKA、PKC和CaMKIV不受影响。

[0165] 其他阻断肽包括细胞分裂蛋白激酶5(Cdk5)抑制肽(CIP)。当与P25缔合时,Cdk5在阿尔茨海默氏病特异性磷酸化表位处磷酸化tau微管蛋白。p25是截短的活化剂,它由生理Cdk5活化剂p35暴露于淀粉样β肽产生。当神经元感染CIP后,CIP选择性抑制p25/Cdk5的活性并抑制大脑皮层神经元中的异常tau蛋白磷酸化。CIP所表现的特异性的原因尚不完全清楚。

[0166] 已经研究了另外的阻断肽用于:细胞外调节激酶2(ERK2)、ERK3、p38/HOG1、蛋白激酶C、酪蛋白激酶 II、钙/钙调蛋白激酶IV、酪蛋白激酶 II、Cdk4、Cdk5、DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶PAK3、磷酸肌醇(PI)-3激酶、PI-5激酶、PSTAIR(cdk高度保守的序列)、核糖体S6激酶、GSK-4、生发中心激酶(GCK)、SAPK(应激活化蛋白激酶)、SEK1(应激信号转导激酶)和粘着斑激酶(FAK)。

[0167] 5.3. 细胞渗透肽(CPP)

[0168] 细胞渗透肽(CPP)是可以穿透哺乳动物细胞质膜和运输穿过膜的许多类型和分子量的化合物的一类肽。这些化合物包括诸如蛋白质、DNA、缀合肽、寡核苷酸的效应分子和诸如脂质体的小颗粒。当CPP化学连接或融合到其他蛋白质时,得到的融合蛋白质仍然能够进入细胞。虽然转导的确切机制尚不清楚,但是不认为这些蛋白质的内化是受体介导的或转运体介导的。CPP通常是10-16个氨基酸的长度,并且可以根据它们的组成分组,例如,富含精氨酸和/或赖氨酸的肽。

[0169] 因为它们促进货物分子(cargo molecule)的细胞摄取,能够将效应分子转运进细胞的CPP在药物的设计中的应用变得越来越有吸引力。这些通常取决于其序列分为两亲性(意思是具有极性和非极性端两者)或阳离子性(意思是对于或关于含有净正电荷的原子)的细胞渗透肽,提供了一种用于大分子非侵入性递送技术。CPP通常被称为“特洛伊(Trojan)肽”、“膜转位序列”、“蛋白转导结构域(PTD)”或“细胞渗透性蛋白(CPP)”。CPP也可以用来帮助新的HSPB1激酶抑制剂穿透细胞膜。(参见于2008年1月10日提交的题为“HSPB1激酶的多肽抑制剂及其用途,”序列号为11/972,459以及于2008年8月7日提交的题为“激酶抑制剂及其用途,”序列号为12/188,109的美国申请,每份申请的全部内容通过引用并入本文)。

[0170] 5.3.1. 含有病毒CPP的蛋白

[0171] 第一种被描述为具有转导性能的蛋白质具有病毒起源。这些蛋白质仍然是用于CPP作用的最普遍接受的模型。在细胞渗透肽中,包括但不限于TAT肽的富含精氨酸的细胞渗透肽已被最广泛地研究(EI-Sayed, A. 等人, AAPS J. 11, 13-22, 2009; Wender, P. 等人, Adv. Drug Deliv. Rev. 60, 452-472, 2008)。

[0172] TAT (HIV-1反式活化基因产物)是一种86个氨基酸的多肽,其作为整合的HIV-1基因组的强大转录因子起作用。在潜伏感染的细胞中TAT作用于病毒基因组,刺激潜伏感染的细胞中的病毒复制。TAT蛋白的转位性能使其活化静态感染的细胞,并且通过调节包括细胞因子的许多细胞基因它可参与启动未感染细胞的后续感染。TAT的最小CPP是9个氨基酸的蛋白质序列RKKRRQRRR (TAT49-57; SEQ ID NO: 20)。利用较长TAT片段的研究表明了高达120kDa的融合蛋白的成功转导。增加多TAT-CPP以及合成TAT衍生物已被证明介导膜转位。已经在涉及癌症、转运死亡蛋白质到细胞中和神经变性疾病的疾病模型的实验中将包含融合蛋白的TAT-CPP用作治疗部分。

[0173] VP22是HSV-1间层蛋白, HSV病毒粒子的结构部分。VP22能够不依赖受体转位并在细胞核中积累。VP22的此种性能将蛋白质归类为包含肽的CPP。包括全长VP22的融合蛋白已被有效地跨质膜转位。

[0174] 5.3.2. 具有细胞间转位性能的同源异型蛋白

[0175] 同源异型蛋白是参与形态过程的高度保守的反式激活转录因子。它们通过60个氨基酸的特定序列结合到DNA。DNA结合同源结构域是高度保守的同源异型蛋白的序列。几个同源异型蛋白已经被描述表现出CPP样活性;它们能够在不具有细胞类型特异性的情况下以能量非依赖性和内吞作用非依赖性的方式有效的跨细胞膜转位。

[0176] 触角足蛋白 (Antp) 是能够跨细胞膜转位的反式活化因子;能够转位的最小序列是对应于蛋白质的同源结构域 (HD) 的第三个螺旋的16个氨基酸的肽。该螺旋的内化发生在4℃处,这表明这个过程不是内吞作用依赖性的。作为具有AntpHD的融合蛋白产生的高达100个氨基酸的肽穿透细胞膜。

[0177] 其他能够转位的同源结构域包括Fushi tarazu (Ftz) 和Engrailed (En) 同源结构域。许多同源结构域共享高度保守的第三螺旋。

[0178] 5.3.3. 人CPP

[0179] 在引入人患者时,人CPP可以规避潜在的免疫原性问题。具有CPP序列的肽包括:Hoxa-5、Hox-A4、Hox-B5、Hox-B6、Hox-B7、Hox-D3、GAX、MOX-2和FtzCPP。所有这些蛋白质共享在AntpCPP中发现的序列。其他CPP包括Islet-1、白细胞介素-1、肿瘤坏死因子和来自卡波西 (Kaposi) -成纤维细胞生长因子或FGF-4信号肽的疏水性序列,其能够不依赖能量、受体和内吞作用转位。未经证实的CPP包括成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族的成员。

[0180] 6. MK2抑制剂和纤维化疾病或病状的治疗

[0181] 促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MAPKAPK2或MK2), 一种p38MAPK下游的丝氨酸/苏氨酸激酶底物, 已涉及在许多由瘢痕和纤维化加重的炎症性疾病中 (Lopes, L. 等人, Biochem Biophys Res Commun., 382 (3): 535-9, 2009)。这些包括但不限于, 癌症、内膜增生、器官纤维化、腹腔粘连、炎症肠疾病和类风湿性关节炎。除了特发性肺纤维化 (IPF) 之外, 涉及炎症和纤维化并影响肺的其他疾病包括急性肺损伤 (ALI)、器官移植排斥 (由于肺

移植也用于IPF的后期治疗)、继发于败血症的器官衰竭、急性肺衰竭、诸如硬皮病的自体免疫性疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)。

[0182] 已知纤维化的发展需要炎症、成纤维细胞的增殖和召集,这产生具有肌成纤维细胞表型的细胞(Horowitz J.等人,Sernin Respir Crit Care Med.,27(6):600-612,2006)。MK2已被证明在转录和转录后水平控制基因表达(Neininger A.等人,J Biol Chem.2002;277(5):3065-8,Thomas T.等人,JNeurochem.,105(5):2039-52,2008;Johansen C.等人,J Immunol.,176(3):1431-8,2006;Rousseau S.等人,EMBO J.21(23):6505-14,2002)以及细胞骨架结构(Lopes,L.等人,Biochem Biophys Res Commun.,382(3):535-9,2009)。此外,已经显示了活化的MK2增加翻译和炎性细胞因子mRNA的稳定性并导致肌动蛋白重组;并且MK2的抑制与降低的炎症(Ward,B.等人,J Surg Res.,169(1):e27-36,2011)和肌成纤维细胞分化(Lopes,L.等人,Biochem Biophys Res Commun.,382(3):535-9,2009)相关。

[0183] 综合起来,这些数据表明,MK2的抑制可以给患有纤维化疾病或病状的患者提供治疗益处,例如,特发性肺纤维化(IPF)、急性肺损伤(ALI)和移植排斥。在这方面,本发明提供了一种使用MK2的细胞穿透、肽基抑制剂来干预炎症和纤维化过程的方法。

发明内容

[0184] 根据一个方面,本发明提供了一种用于治疗以受治疗者的组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病理过程的方法,该方法包括:对受治疗者施用包括治疗量的氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等同物的药物组合物,和其药学上可接受的载体,其中,该治疗量对减少受治疗者的组织中的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0185] 根据本发明方法的一个实施方案,该疾病或病状是急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。根据另一个实施方案,该疾病或病状是辐射诱导的纤维化。根据另一个实施方案,该疾病或病状是移植排斥。根据另一个实施方案,该组织是肺组织。根据另一个实施方案,该疾病或病状是间质性肺病。根据另一个实施方案,该疾病或病状是肺纤维化。根据另一个实施方案,该肺纤维化是特发性肺纤维化。根据另一个实施方案,该肺纤维化由施用博莱霉素引起。根据另一个实施方案,该肺纤维化由变态反应、环境颗粒物吸入、吸烟、细菌性感染、病毒性感染、对受治疗者肺部的机械损伤、肺移植排斥、自体免疫性疾病、遗传性疾病或它们的组合。根据另一个实施方案,该疾病或病状进一步以所述组织中的炎症为特征。根据另一个实施方案,该炎症是急性或慢性炎症。根据另一个实施方案,该炎症由选自由肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 所组成的组的至少一种细胞因子介导。根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积以与正常健康对照受试者的组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的活性相比所述组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的异常活性为特征。根据另一个实施方案,所述肺纤维化是以与正常健康对照受试者相比选自由肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到胞外基质所组成的组的至少一种病变为特征。根据另一个实施方案,所述施用步骤气管内地(包括通过肺吸入)、胃肠外地、静脉内地或腹腔内地发生。根据另一个实施方案,所述施用步骤气管内地(包括通过肺吸入)发生。根据另一个实

施方案,所述施用步骤是以单剂量发生一次。根据另一个实施方案,所述施用步骤是以多个剂量在一段时间内进行。根据另一个实施方案,该一段时间是一日、一周、一个月、一个月、一年,或其倍数。根据另一个实施方案,所述施用步骤至少每月一次、至少每周一次或至少每日一次地进行。根据另一个实施方案,该药物组合物进一步包括至少一种额外的治疗剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂选自由纯化的牛V型胶原蛋白、IL-13受体拮抗剂、蛋白酪氨酸激酶抑制剂、内皮素受体拮抗剂、双重内皮素受体拮抗剂、前列环素类似物、抗CTGF单克隆抗体、内皮素受体拮抗剂(A选择性的)、AB0024、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2) 单克隆抗体、c-Jun氨基端激酶 (JNK) 抑制剂、吡非尼酮、IFN- γ 1b、抗所有三种TGF- β 亚型的泛中和IgG4人抗体、TGF- β 活化抑制剂、重组人Pentraxin-2蛋白 (rhPTX-2)、双特异性IL-4/IL-13抗体、靶向整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的人源化的单克隆抗体、N-乙酰半胱氨酸、西地那非、肿瘤坏死因子 (TNF) 拮抗剂 (依那西普), 和它们的组合组成的组。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是选自由泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松、糠酸氟替卡松,和它们的组合组成的组的糖皮质激素。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是选自由白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、短效 β_2 激动剂、长效 β_2 激动剂,和它们的组合组成的组的支气管扩张剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是镇痛剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少85%的序列同一性。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11), 并且所述第二多肽包括序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有基本同一性的治疗性结构域。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少70%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少80%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少90%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少95%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLAVA (SEQ ID NO:8) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVA (SEQ ID NO:9) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10) 的多肽。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物

是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽包括功能上与 YARAAARQARA (SEQ ID NO:11) 等价的细胞渗透肽,并且所述第二多肽具有氨基酸序列 KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为 WLRRKAWLRRKA (SEQ ID NO:12) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为 WLRRKA (SEQ ID NO:13) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为 WLRRKAWLRRRI (SEQ ID NO:15) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为 FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为 KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为 HRRKAWLKKI (SEQ ID NO:18) 的多肽。根据另一个实施方案,所述载体选自自由控释载体、延迟释放载体、持续释放载体和长期释放载体组成的组。根据另一个实施方案,该药物组合物呈干燥的粉末形式。根据另一个实施方案,该干燥的粉末包括具有1至5微米的质量中值空气动力学直径 (MMAD) 的微粒。根据另一个实施方案,通过吸入装置施用所述治疗量的所述药物组合物。根据另一个实施方案,该吸入装置是雾化器。根据另一个实施方案,该吸入装置是计量剂量吸入器 (MDI)。根据另一个实施方案,该吸入装置是干粉吸入器 (DPI)。根据另一个实施方案,该吸入装置是干粉雾化器。

[0186] 根据另一个方面,本发明提供了一种用于治疗以受治疗者的组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病理过程的药物组合物,其中,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的多肽或其功能等同物,以及其药学上可接受的载体,并且其中该治疗量对减少受治疗者组织中成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0187] 根据本发明方法的一个实施方案,该疾病或病状是急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。根据另一个实施方案,该疾病或病状是辐射诱导的纤维化。根据另一个实施方案,该疾病或病状是移植排斥。根据另一个实施方案,该组织是肺组织。根据另一个实施方案,该疾病或病状是间质性肺病。根据另一个实施方案,该疾病或病状是肺纤维化。根据另一个实施方案,该肺纤维化是特发性肺纤维化。根据另一个实施方案,该肺纤维化由施用博来霉素引起。根据另一个实施方案,该肺纤维化由变态反应、环境颗粒物的吸入、吸烟、细菌性感染、病毒性感染、对受治疗者的肺部的机械损伤、肺移植排斥、自体免疫性疾病、遗传性疾病或它们的组合。根据另一个实施方案,该疾病或病状进一步以所述组织中的炎症为特征。根据另一个实施方案,该炎症是急性或慢性炎症。根据另一个实施方案,该炎症由至少一种选自肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的细胞因子介导。根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积以与正常健康对照受试者的组织中促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的活性相比所述组织中促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的异常活性为特征。根据另一个实施方案,该肺纤维化以与正常健康对照受试者相比选自肺间质中细胞外基质蛋白质的异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质组成的组的至少一种病变为特征。根据另一个实施方案,所述施用步骤气管内地 (包括通过肺吸入)、胃肠外地、静脉内地或腹腔内地发生。根据另一个实施方案,所述施用步骤气管内地 (包括通过肺吸入) 发生。根据另一个实施方

案,所述施用步骤是以单剂量发生一次。根据另一个实施方案,所述施用步骤是以多个剂量在一段时间内进行。根据另一个实施方案,该一段时间是一日、一周、一个月、一个月、一年,或其倍数。根据另一个实施方案,所述施用步骤至少每月一次、至少每周一次或至少每日一次地进行。根据另一个实施方案,该药物组合物进一步包括至少一种额外的治疗剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂选自由纯化的牛V型胶原蛋白、IL-13受体拮抗剂、蛋白酪氨酸激酶抑制剂、内皮素受体拮抗剂、双重内皮素受体拮抗剂、前列环素类似物、抗CTGF单克隆抗体、内皮素受体拮抗剂(A选择性的)、AB0024、赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)单克隆抗体、c-Jun氨基端激酶(JNK)抑制剂、吡非尼酮、IFN- γ 1b、抗所有三种TGF- β 亚型的泛中和IgG4人抗体、TGF- β 活化抑制剂、重组人Pentraxin-2蛋白(rhPTX-2)、双特异性IL-4/IL-13抗体、靶向整合素 α v β 6的人源化单克隆抗体、N-乙酰半胱氨酸、西地那非、肿瘤坏死因子(TNF)拮抗剂(依那西普),和它们的组合组成的组。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是选自由泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松、糠酸氟替卡松,和它们的组合组成的组的糖皮质激素。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是选自由白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、短效 β 2激动剂、长效 β 2激动剂,和它们的组合组成的组的支气管扩张剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是镇痛剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少85%的序列同一性。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),以及第二多肽包括序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有基本同一性的治疗性结构域。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少70%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少80%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少90%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少95%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)的多肽。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVA (SEQ ID NO:9)的多肽。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10)的多肽。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物是包括有效连接到

第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,该第一多肽包括功能上与YARAAARQARA (SEQ ID NO:11) 等等的细胞渗透肽,并且所述第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。根据另一个实施方案,该第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRRRIKA (SEQ ID NO:12) 的多肽。根据另一个实施方案,该第一多肽是氨基酸序列为WLRRRIKA (SEQ ID NO:13) 的多肽。根据另一个实施方案,该第一多肽是氨基酸序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14) 的多肽。根据另一个实施方案,该第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRRRI (SEQ ID NO:15) 的多肽。根据另一个实施方案,该第一多肽是氨基酸序列为FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16) 的多肽。根据另一个实施方案,该第一多肽是氨基酸序列为KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17) 的多肽。根据另一个实施方案,该第一多肽是氨基酸序列为HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18) 的多肽。根据另一个实施方案,所述载体选自由控释载体、延迟释放载体、持续释放载体和长期释放载体组成的组。根据另一个实施方案,该药物组合物呈干燥的粉末形式。根据另一个实施方案,该干燥的粉末包括具有1至5微米的质量中值空气动力学直径 (MMAD) 的微粒。根据另一个实施方案,通过吸入装置施用所述治疗量的所述药物组合物。根据另一个实施方案,该吸入装置是雾化器。根据另一个实施方案,该吸入装置是计量剂量吸入器 (MDI)。根据另一个实施方案,该吸入装置是干粉吸入器 (DPI)。

[0188] 根据另一个方面,本发明提供了一种药物组合物在制造用于治疗以受治疗者的组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病理过程的药物中的用途,其中,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的多肽或其功能等同物,以及其药学上可接受的载体,并且其中该治疗量对于减少受治疗者组织中成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0189] 根据本发明方法的一个实施方案,该疾病或病状是急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。根据另一个实施方案,该疾病或病状是辐射诱导的纤维化。根据另一个实施方案,该疾病或病状是移植排斥。根据另一个实施方案,该组织是肺组织。根据另一个实施方案,该疾病或病状是间质性肺病。根据另一个实施方案,该疾病或病状是肺纤维化。根据另一个实施方案,该肺纤维化是特发性肺纤维化。根据另一个实施方案,该肺纤维化由施用博莱霉素引起。根据另一个实施方案,该肺纤维化由变态反应、环境颗粒物吸入、吸烟、细菌性感染、病毒性感染、对受治疗者肺部的机械损伤、肺移植排斥、自体免疫性疾病、遗传性疾病或它们的组合。根据另一实施方案,该疾病或病状进一步以所述组织中的炎症为特征。根据另一个实施方案,该炎症是急性或慢性炎症。根据另一个实施方案,该炎症由选自肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的至少一种细胞因子介导。根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积以与正常健康对照受试者的组织中促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的活性相比所述组织中促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的异常活性为特征。根据另一个实施方案,该肺纤维化以与正常健康对照受试者相比选自肺间质中细胞外基质蛋白质的异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质所组成的组的至少一种病变为特征。根据另一个实施方案,所述施用步骤气管内地 (包括通过肺吸入)、胃肠外地、静脉内地或腹腔内地发生。根据另一个实施方案,所述施用步骤气管内地 (包括通过肺吸入) 发生。根据另一个实施方案,所述施用步骤是以单剂量发生一次。根据另一个实施方案,所述施用步骤是以多个剂量在一段时

间内进行。根据另一个实施方案,该一段时间是一日、一周、一个月、一个月、一年,或其倍数。根据另一个实施方案,所述施用步骤至少每月一次、至少每周一次或至少每日一次地进行。根据另一个实施方案,该药物组合物进一步包括至少一种额外的治疗剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂选自由纯化的牛V型胶原蛋白、IL-13受体拮抗剂、蛋白酪氨酸激酶抑制剂、内皮素受体拮抗剂、双重内皮素受体拮抗剂、前列环素类似物、抗CTGF单克隆抗体、内皮素受体拮抗剂(A选择性的)、AB0024、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2) 单克隆抗体、c-Jun氨基端激酶 (JNK) 抑制剂、吡非尼酮、IFN- γ 1b、抗所有三种TGF- β 亚型的泛中和IgG4人抗体、TGF- β 活化抑制剂、重组人Pentraxin-2蛋白 (rhPTX-2)、双特异性IL-4/IL-13抗体、靶向整合素 α v β 6的人源化单克隆抗体、N-乙酰半胱氨酸、西地那非、肿瘤坏死因子 (TNF) 拮抗剂(依那西普),和它们的组合组成的组。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是选自由泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松、糠酸氟替卡松,和它们的组合组成的组的糖皮质激素。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是选自由白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、短效 β 2激动剂、长效 β 2激动剂,和它们的组合组成的组的支气管扩张剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是镇痛剂。根据另一个实施方案,该额外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少85%的序列同一性。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),并且所述第二多肽包括序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有基本同一性的治疗性结构域。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少70%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少80%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少90%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少95%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLAVA (SEQ ID NO:8) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVA (SEQ ID NO:9) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10) 的多肽。根据另一个实施方案,该多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,该第一多肽包括功能与YARAAARQARA (SEQ ID NO:11) 等同的细胞渗透肽,并且该第二多肽具有氨基酸序列

KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12)的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRIKA (SEQ ID NO:13)的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRIKAWLRRI (SEQ ID NO:15)的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为HRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。根据另一个实施方案,所述载体选自控释载体、延迟释放载体、持续释放载体和长期释放载体组成的组。根据另一个实施方案,该药物组合物呈干燥的粉末形式。根据另一个实施方案,该干燥的粉末包括具有1至5微米的质量中值空气动力学直径(MMAD)的微粒。根据另一个实施方案,通过吸入装置施用所述治疗量的所述药物组合物。根据另一个实施方案,该吸入装置是雾化器。根据另一个实施方案,该吸入装置是计量剂量吸入器(MDI)。根据另一个实施方案,该吸入装置是干粉吸入器(DPI)。根据另一个实施方案,该吸入装置是干粉雾化器。

附图说明

[0190] 图1示出了纯的喷雾干燥胰岛素的递送性能。

[0191] 图2示出了由安德森级联冲击(ACI)测定的喷雾干燥胰岛素的粒度分布。

[0192] 图3示出了微剂量干粉吸入器(DPI)与两种市售的“被动”干粉吸入器(DPI)的效率和流速的比较。

[0193] 图4示出了喷雾干燥的纯肽的流速非依赖性。

[0194] 图5示出了喷雾干燥的肽的代表性显微镜照片(不是胰岛素)。

[0195] 图6示出了喷雾干燥的肽的粒度分布(不是胰岛素)。

[0196] 图7示出了由新一代撞击器(NGI)测定的微粉化的/乳糖混合组合物的粒度分布。

[0197] 图8示出了微粉化的小分子的递送性能(长效毒蕈碱剂(LAMA)/乳糖混合物)。

[0198] 图9示出了石蜡包埋的人特发性肺纤维化IPF肺的免疫组织化学分析,示出了在成纤维细胞病灶处的活化的MK2(即,磷酸化-Thr³³⁴-MAPKAPK2)的核定位。正常的肺(左小图);IPF肺组织活检切片(右小图)。插图示出了对于活化的MK2在细胞染色阳性(深灰色)的病灶处上皮内层的破坏。图9所示的缩写如下:NL(具有肺泡囊的正常肺结构);AW(气道);FF(来自具有IPF的肺组织外植体的成纤维细胞病灶)。

[0199] 图10示出了用于在博莱霉素肺纤维化小鼠模型(特发性肺纤维化(IPF)预防模型)中测试化合物对抑制纤维化的发展的能力的示意图。或者通过雾化吸入或者通过腹腔内注射每日施用磷酸盐缓冲盐水(PBS)或MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1),在博莱霉素递送后的第7日当炎症消退和纤维化机制被激活时开始,直到博莱霉素递送后的第21日当观察到显著的纤维化时。

[0200] 图11示出了MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的吸入疗法和全身施用防止博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化。上小图:在第21日代表性的小鼠肺组织的苏木精和伊红染色(H&E)。下小图:相同区域的马松蓝三色染色显示广泛的胶原蛋白沉积(箭头)与博莱霉素损伤。缩写:AW:气道;NL:正常肺组织结构;FF:纤维化病灶,V:静脉。

[0201] 图12示出了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 防止由博莱霉素损伤引起的显著胶原蛋白沉积。数值代表平均值±标准误 (SEM)。n=每组5只动物。' * ' P < 0.05; ' ** ' P < 0.01; ' *** ' P < 0.001。胶原蛋白指数=对于胶原蛋白的常数因子7.5×羟脯氨酸浓度。

[0202] 图13示出了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 以剂量依赖性方式防止由博莱霉素损伤引起的纤维化。博莱霉素小鼠的肺切片的马松蓝三色染色。(A) MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1), (B) MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEQ ID NO:19)。

[0203] 图14示出了全身施用的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 消除由博莱霉素损伤引起的全身性T细胞活化。数值代表平均值±标准误。' P ' 值 < 0.01。n=4只动物/组。图14中所示的缩写如下: (i) 用PBS处理的野生型小鼠 (PBS); (ii) 用PBS处理的博莱霉素小鼠 (BLEO); (iii) 用雾化的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠 (BLEO+MMI-0100 (NEB)); 以及 (iv) 用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠 (BLEO+MMI-0100 (IP))。

[0204] 图15示出了用于在特发性肺纤维化的博莱霉素模型 (IPF治疗模型) 中测试MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 消除纤维化进展的能力的示意图。通过雾化吸入或腹腔内注射以每日50μg/kg的剂量施用PBS或MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)), 在博莱霉素递送后的第14日开始至博莱霉素递送后的第28日。

[0205] 图16示出了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的全身性 (IP) 或雾化 (NEB) 施用改善了博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化。上半图: 苏木精和伊红 (H&E) 染色, 下小图: 相同区域的马松蓝三色染色。图16中所示的缩写如下: PBS (用PBS处理的野生型小鼠); BLEO (用PBS处理的博莱霉素小鼠); MMI-0100 (NEB) (用雾化的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠); MMI-0100 (IP) (用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠); NL (具有肺泡囊的正常肺组织结构); AW (气道); FF (来自具有IPF的肺组织外植体的成纤维细胞病灶)。

[0206] 图17示出了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 抑制由博莱霉素损伤引起的显著胶原蛋白沉积。图17中所示的缩写如下: PBS (用PBS处理的野生型小鼠); BLEO (用PBS处理的博莱霉素小鼠); BLEO+MMI-0100 (NEB) (用雾化的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠); BLEO+MMI-0100 (IP) (用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠); 数值代表平均值±标准误。n=每组5只动物。胶原蛋白指数=对于胶原蛋白的常数因子7.5×羟脯氨酸浓度。

[0207] 图18示出了来自 (i) 用PBS处理的野生型小鼠 (PBS); (ii) 用PBS处理的博莱霉素小鼠 (BLEO); (iii) 用雾化的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠 (BLEO+MMI-0100 (NEB)); 以及 (iv) 用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 处理的博莱霉素小鼠 (BLEO+MMI-0100 (IP)) 的肺切片 (在博莱霉素损伤后的第28日) 的抗磷酸化Thr³³⁴-MAPKAPK2 (MK2的活化形式) 染色的代表性显微照片。在第0日, C57-BL/6小鼠进行博莱霉素损伤。在第14日, 该小鼠每日通过腹腔内 (IP) 注射或雾化器 (NEB) 施用50μg/kg的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAASEQ ID

NO:1),直到博莱霉素损伤后的第28日。原始的放大倍数:20X。

[0208] 图19示出了参与TGF- β 介导的炎症和纤维化途径的关键的信号分子。

[0209] 图20示出了,在最后施用后的24小时,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 下调特发性肺纤维化的博莱霉素小鼠模型(治疗模型)中循环炎性细胞因子的水平。

[0210] 图21示出了在特发性肺纤维化的治疗模型中,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 抑制肌成纤维细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的活化。在第0日,C57-BL/6小鼠进行博莱霉素损伤。在第14日至第28日,通过腹腔内(IP)注射或雾化器(NEB)给小鼠施用50 μ g/kg/日的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)。将福尔马林固定的肺组织切片针对 α -SMA进行免疫染色。对照染色采用生物素标记的二级IgG抗体。链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶与3,3'-二氨基联苯胺一起作为底物使用并且细胞核用苏木精复染。原始的放大倍数:20X。

[0211] 图22示出了在正常的人胎儿肺成纤维细胞(IMR-90)中TGF- β 诱导的肌成纤维细胞活化的由MK2肽抑制剂调制。IMR-90细胞用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19) 以所指示的剂量预先处理1小时,然后在存在或不存在TGF- β 1 (2ng/ml) 的情况下培养48小时。采用针对 α -SMA (肌成纤维细胞活化的标记) 和GAPDH (内参照) 抗体对细胞裂解物进行免疫印迹。

[0212] 图23示出了在人胎儿肺成纤维细胞(IMR-90)中TGF- β 介导的纤维连接蛋白表达的调制。IMR-90细胞用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19) 以所指示的剂量预先处理1小时,然后在存在或不存在TGF- β 1 (2ng/ml) 的情况下培养72小时。在条件培养基中作为分泌的片段测定纤维连接蛋白。来自条件培养基的等量的总蛋白(14 μ g) 被装在每条泳道中。

[0213] 图24示出了参与纤维连接蛋白通过 α 5 β 1整合素介导的PDGFR- β 活化调节间充质干细胞迁移的关键信号分子(Veevers-Lowe J等人,J Cell Sci,124:1288-1300,2011)。

[0214] 图25示出了IPF患者中MK2激酶的活化形式的水平的增加。(A) 在正常的和IPF组织中磷酸化的Thr³³⁴水平的定量分析;(C) 肺功能和MK2活化之间的相关性。

具体实施方式

[0215] 本发明提供了一种用于在需要其的受治疗者中治疗肺纤维化的组合物和方法,该方法包括施用治疗量的包括具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100;SEQ ID NO:1) 的多肽或其功能等同物的组合物。

[0216] 术语表

[0217] 本文所用的术语“气道”是指空气通过其进入和离开身体的通道。肺气道包括在呼吸期间空气通过的呼吸道的那些部分。

[0218] 本文所用的术语“气道阻塞”是指气流的任何异常减少。气流阻力可以发生在气道中的从上部气道到末端支气管的任何地方。

[0219] 本文所用的术语“气道疾病”是指影响携带氧气和其他气体流入和流出肺的管道(气道)的疾病。气道疾病包括但不限于,包括哮喘、肺气肿、慢性支气管炎的慢性阻塞性肺病(COPD)。

[0220] 本文所用的术语“肺组织疾病”是指影响肺组织(例如,肺间质)的结构的疾病。肺组织的瘢痕或炎症使肺不能充分地扩张(“限制性肺病”)。它还使肺摄取氧(处理氧)和释放二氧化碳的能力较差。肺组织疾病的例子包括但不限于,特发性肺纤维化(IPF)、急性肺损伤(ALI)、辐射诱导的肺纤维化以及与肺移植相关的纤维化病状。结节病是肿胀(炎症)发生在淋巴结、肺、肝脏、眼睛、皮肤或其他组织中的疾病。

[0221] 本文所交替使用的术语“肺间质”或“肺部间质”是指在肺中位于空域上皮和胸膜间皮之间的区域。基质蛋白、胶原蛋白和弹性蛋白的纤维是肺部间质的主要成分。这些纤维的主要功能是在通气过程中形成维持结构完整性的机械支架。

[0222] 本文所用的术语“可接触的表面面积”或“ASA”是指暴露于溶剂的生物分子的表面面积。本文所用的术语“溶剂可接触的表面”或“SAS”是指可接触到溶剂的特定残基的表面面积的百分比。其计算为三维结构中残基的ASA和其伸展的肽构象的最大ASA之间的比率。

[0223] 本文所交替使用的术语“氨基酸残基”或“氨基酸”或“残基”是指纳入蛋白质、多肽或肽的氨基酸,其包括但不限于,天然存在的氨基酸和可以以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥功能的天然氨基酸的已知类似物。氨基酸可能是L-或D-氨基酸。氨基酸可能被合成的氨基酸置换,其被改变以增加肽的半衰期、增加肽的效力或增加肽的生物利用度。

[0224] 本文主要用单字母符号标识氨基酸。本领域技术人员众所周知,这样的单字母标识如下:

[0225] A为丙氨酸;C为半胱氨酸;D为天冬氨酸;E为谷氨酸;F为苯丙氨酸;G为甘氨酸;H为组氨酸;I为异亮氨酸;K为赖氨酸;L为亮氨酸;M为蛋氨酸;N为天冬酰胺;P为脯氨酸;Q为谷氨酰胺;R为精氨酸;S为丝氨酸;T为苏氨酸;V为缬氨酸;W为色氨酸;以及Y为酪氨酸。

[0226] 以下表示彼此为保守性置换的氨基酸组:1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);和6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0227] 本文所用的单数形式“一种”(a)、“一种”(an)和“该”(the)包括复数个对象,除非上下文中另外明确指明。例如,提及一种“多肽”是指一个或更多个多肽。

[0228] 本文所用的术语“增加”是指一个或多个碱基,或一个或多个氨基酸插入序列。

[0229] 本文所用的术语“施用”是指配、供给、施用、给予、分配或提供。术语“施用”(administering)或“施用”(administration)交替使用并且包括在体内施用,以及直接对体外的组织施用。通常,组合物可以通过口服、颊服、胃肠外给药、局部给药、通过吸入或吹入(例如,经口或经鼻)全身性给药,或以含有所需的常规无毒药理学上可接受的载体、佐剂和赋形剂的剂量单位药剂直肠给药,或者可以是通过诸如但不限于,注射、植入、移植、局部施用或胃肠外给药的方式局部施用。额外的施用可以例如,静脉内地、围心地、口服地、通过植入、经粘膜地、经皮地、局部地、肌肉地、皮下地、腹腔内地、鞘内地、淋巴内地或硬膜外地进行。施用可以在例如,一次、多次地和/或在一个或多个扩展周期内进行。

[0230] 本文所用的术语“过敏反应”是指免疫系统的变态反应。过敏反应对于通常无害的环境物质(称为过敏原)出现;这些反应是后天的、可预见的和快速的。过敏反应的特征是称为IgE的一类抗体过度活化称为肥大细胞和嗜碱性粒细胞的某些白细胞,导致极端的炎症反应。常见的过敏反应包括湿疹、荨麻疹、花粉热、哮喘发作、食物敏感症,和对有刺的昆虫如蜜蜂和黄蜂的毒液的反应。

[0231] 本文所用的术语“ α -平滑肌肌动蛋白”或“ α -SMA”是指一种肌动蛋白,即,在血管平滑肌细胞中首次分离的 α -肌动蛋白2 (ACTA2; 也称为肌动蛋白或主动脉平滑肌肌动蛋白)。肌动蛋白是在所有真核细胞中表达的高度保守的蛋白。肌动蛋白细丝形成部分细胞骨架并在调节细胞的形状和运动中发挥重要的作用。在哺乳动物细胞中已经鉴定六种不同的肌动蛋白亚型。每种由单独的基因编码并以发育调节方式和组织特异性方式表达。 α 和 β 细胞质肌动蛋白在许多种细胞中表达,而 α 骨骼肌肌动蛋白、 α 心脏肌动蛋白、 α 血管肌动蛋白和 γ 肠肌动蛋白的表达更多地受特定的肌肉细胞类型限制。 α -平滑肌肌动蛋白基因是几个表达相对受血管平滑肌细胞限制的基因之一,但它现在是最常用的肌成纤维细胞形成的标记。 α -平滑肌肌动蛋白的表达通过激素和细胞增殖调节,并由包括致癌性转化和动脉硬化的病理条件改变。

[0232] 本文所用的术语“肺泡”(alveolus)或“肺泡”(alveoli)是指具有空腔形态的解剖结构。在肺中发现,肺泡是与血液进行气体交换的呼吸位点的球形露头。肺泡含有一些胶原蛋白和弹性纤维。当吸进时它们充满空气,弹性纤维使肺泡舒展。然后当呼出时它们回弹以排出富含二氧化碳的空气。

[0233] 本文所用的术语“博莱霉素”是指一种由细菌轮丝链霉菌产生的糖肽类抗生素。它通过诱导DNA链断裂和抑制胸腺嘧啶脱氧核苷掺入DNA链发挥作用。博莱霉素的最严重的并发症是肺纤维化和肺功能受损。

[0234] 本文所用的术语“支气管肺泡灌洗”或“BAL”是指支气管镜通过口或鼻进入肺部并且液体喷入肺的一小部分然后被收集用于检查的医疗程序。BAL通常为诊断肺部疾病而进行。BAL通常用于诊断免疫系统有问题的人的感染、呼吸机上的人的肺炎、几种类型的肺癌和肺瘢痕(间质性肺病)。BAL是抽取上皮细胞衬液(ELF)成分的样品和确定肺气道的蛋白质组成的最常见的方式,并且作为在肺中抽取细胞或病原体水平的样品的一种手段常被用在免疫学研究中。

[0235] 本文所用的术语“载体”和“药用载体”是指用于递送一种或多种活性剂到受治疗者的药学上可接受的惰性剂或运载体,并经常被称为“赋形剂。”(药用)载体必须具有足够高的纯度和足够低的毒性以使其适和用于施用到正在治疗的受治疗者。(药用)载体还应保持活性剂(例如,本发明的多肽)的稳定性和生物利用度。当与给定的组合物的活性剂和其他成分结合时,(药用)载体可以是液体或固体并且考虑头脑中计划的施用方式进行选择以提供所需的体积、浓度等。(药物)载体可能是,但不限于,粘合剂(例如,预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素,等)、填料(例如,乳糖和其他糖类、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯、磷酸氢钙,等)、润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、硅石、胶状二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠,等)、崩解剂(例如,淀粉、羧基乙酸淀粉钠,等)或润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠,等)。其他用于本发明的组合物的合适的(药用)载体包括,但不限于,水、盐溶液、醇类、聚乙二醇、明胶、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等等。本发明的用于肠胃外施用的多肽组合物可以包括诸如无菌水溶液、在常用溶剂如醇类中的非水溶液或在液体油基中的多肽的溶液的(药用)载体。

[0236] 本文所用的术语“胶原蛋白”是指在哺乳动物的肉体 and 结缔组织中发现的一组天然存在的蛋白质。其是结缔组织的主要成分,并在哺乳动物中是最丰富的蛋白质,约占整个

机体蛋白质含量的25%至35%。长纤丝形式的胶原蛋白主要存在于诸如肌腱、韧带和皮肤的纤维性组织中,在角膜、软骨、骨、血管、肠道和椎间盘中也很丰富。到目前为止,已确定29个类型的胶原蛋白并且在体内大于90%的胶原蛋白是I型(皮肤、肌腱、血管、结扎线、器官、骨)、II型(软骨)、III型(网状组织(网状纤维的主要成分)和IV型(形成细胞基底膜的基础)。

[0237] 本文所用的术语“病状”是指各种健康状态并且是指包括由任何潜在的机制、病症或损伤引起的病症或疾病。

[0238] 术语“细胞因子”是指由细胞分泌的并对其他细胞有各种各样的影响的小的可溶性蛋白质物质,其一般用来指包括但不限于,淋巴因子、白细胞介素和趋化因子的许多信号分子。细胞因子介导包括生长、发育、伤口愈合和免疫反应的许多重要的生理功能。它们通过结合到其位于细胞膜中的细胞特异性受体发挥作用,所述受体允许不同的信号转导级联在细胞中开始,这最终将导致在靶细胞中的生物化学和表型的变化。一般来说,细胞因子局部地发挥作用,虽然发现有些细胞因子具有全身性免疫调节作用,伴随类似激素的多效性自分泌、旁分泌和内分泌作用。它们包括I型细胞因子,其包含许多白细胞介素,以及几种造血生长因子;II型细胞因子,包括干扰素和白细胞介素-10;肿瘤坏死因子(“TNF”)相关的分子,包括TNF- α 和淋巴毒素;免疫球蛋白超家族成员,包括白细胞介素1(“IL-1”);以及趋化因子,一种在多种免疫和炎症功能中发挥至关重要的作用的分子的家族。同样的细胞因子可以对细胞具有不同的作用,这取决于细胞的状态。细胞因子通常调节其他细胞因子的表达并触发级联。

[0239] 本文所用的术语“疾病”或“病症”是指不论其原因(是否遗传的、环境的、饮食的、因外伤引起的感染、或其他原因)的健康损害或异常机能的病状。病症可以包括,例如但不限于,炎症和纤维化疾病、纤维化、急性肺损伤、辐射诱导的纤维化、移植排斥、慢性阻塞性肺病(COPD)、内毒素休克、局部的炎性疾病、动脉粥样硬化性心血管疾病、阿尔茨海默氏病、肿瘤疾病、神经缺血、结缔组织和全身性自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、克罗恩氏病、炎性肠病、系统性红斑狼疮(SLE)、干燥综合征、硬皮病、血管炎、血管内膜增生、管腔狭窄、管腔再狭窄、动脉粥样硬化、平滑肌细胞瘤及转移、平滑肌痉挛、心绞痛、变异型心绞痛、心肌缺血、中风、心动过缓、高血压、心脏肥大、肾功能衰竭、中风、肺高血压、哮喘、妊娠血毒症、早产、子痫、惊厥、雷诺氏病或现象、溶血性尿毒症、肛裂、贲门失弛缓症、阳痿、偏头痛、缺血性肌肉损伤相关的平滑肌痉挛、血管病变、缓慢性心律失常、充血性心脏衰竭、心肌缺血、肺高血压、舒张功能障碍、神经胶质过多症(星形胶质细胞增殖,并可以包括细胞外基质(ECM)沉积在中枢神经系统的受损区域的沉积)、慢性阻塞性肺病(即,特征为气流受阻或受限的呼吸道疾病;包括但不限于,慢性支气管炎、肺气肿、慢性哮喘)、骨质疏松、血管内皮功能障碍、炎症、退行性关节炎、强直性脊柱炎,格林-巴利疾病、传染病、败血症、内毒素休克、牛皮癣、放射性肠炎、肝硬化、间质纤维化、肺纤维化(包括特发性肺纤维化)、肠炎、阑尾炎、胃炎、喉炎、脑膜炎、胰腺炎、中耳炎、再灌注损伤、脑外伤、脊髓损伤、周围神经病变、多发性硬化症、过敏、心脏病、肥胖、II型糖尿病、I型糖尿病和NASH/肝硬化。

[0240] 本文所用的术语“结构域”是指具有特征性的三级结构和功能的蛋白质并且指蛋白质中共同构成其三级结构的任何三维亚基,所述三级结构通过折叠该蛋白质的线性肽链形成。

[0241] 本文所用的术语“治疗性结构域”(也被称为“TD”)是指与肽KALARQLGVAA(SEQ ID

NO:2) 或其片段具有基本同一性的肽、肽段或变体、或其衍生物。治疗性结构域本身一般不能够穿透哺乳动物细胞的质膜。一旦进入细胞,治疗性结构域可以抑制特定组的激酶的激酶活性。

[0242] 本文所用的术语“细胞渗透肽(也被称为“CPP”、“蛋白质转导结构域”、“PTD”、“特洛伊肽”、“膜转位序列”和“细胞渗透性蛋白质”)是指一类通常能够穿透哺乳动物细胞的质膜的肽。它也指与肽YARAAARQARA (SEQ ID NO:11) 或其功能片段具有基本同一性的肽、肽段、或变体或其衍生物,以及在功能上与SEQ ID NO:11相同的肽、肽段、或变体或其衍生物。CPP通常具有10-16个氨基酸的长度,并能够跨过哺乳动物细胞转运许多类型和分子量的化合物。这些化合物包括但不限于,诸如蛋白质、DNA、缀合肽、寡核苷酸的效应分子和诸如脂质体的小颗粒。化学地连接或融合到蛋白质(“融合蛋白”)的CPP仍然能够穿透质膜并进入细胞。

[0243] 本文所用的术语“细胞外基质”是指细胞的外部环境中通过特定的细胞表面受体与细胞相互作用的支架。细胞外基质由纤维蛋白的联锁网络和糖胺聚糖(GAG)组成。在细胞外基质中发现的纤维蛋白的例子包括但不限于,胶原蛋白、弹性蛋白、纤维连接蛋白和层粘连蛋白。在细胞外基质中发现的GAG的例子包括但不限于,蛋白多糖(例如,硫酸肝素)、硫酸软骨素、硫酸角质素和非蛋白多糖聚糖(例如,透明质酸)。术语“蛋白多糖”是指包含连接一个或多个糖胺聚糖的核心蛋白的一组糖蛋白。细胞外基质提供许多功能,包括但不限于,提供对于细胞的支持和锚固、从另一个组织中分离一个组织、调节细胞内的通信。

[0244] 本文交替使用的术语“功能等同”或“功能地等同”是指具有相似或相同的作用或用途物质、分子、多核苷酸、蛋白质、肽或的多肽。例如,与多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 功能等同的多肽可以具有诸如抑制活性、动力学参数、盐抑制、辅因子依赖活性的生物活性,和/或与SEQ ID NO:1的表达式多肽实质上相似或相同的功能单元大小。

[0245] 与YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 功能等同的多肽的例子包括但不限于,氨基酸序列为FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3) 的多肽、氨基酸序列为KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4) 的多肽、氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5) 的多肽、氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6) 的多肽和氨基酸序列为HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7) 的多肽。

[0246] 本发明所述的氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 肽包括融合蛋白,其中细胞渗透肽(CPP; YARAAARQARA;SEQ ID NO:11) 有效连接到治疗性结构域(KALARQLGVAA;SEQ ID NO:2) 以提高治疗功效。

[0247] 与多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的治疗性结构域(TD; KALARQLGVAA;SEQ ID NO:2) 功能等同的多肽的例子包括但不限于,氨基酸序列为KALARQLAVA (SEQ ID NO:8) 的多肽、氨基酸序列为KALARQLGVA (SEQ ID NO:9) 的多肽和氨基酸序列为KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10) 的多肽。

[0248] 与多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的细胞渗透肽(CPP; YARAAARQARA;SEQ ID NO:11) 功能等同的多肽的例子包括但不限于,氨基酸序列为WLRRKAWLRRRIKA (SEQ ID NO:12) 的多肽、氨基酸序列为WLRRRIKA (SEQ ID NO:13) 的多肽、氨基酸序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14) 的多肽、氨基酸序列为WLRRKAWLRRI (SEQ ID NO:

15)的多肽、氨基酸序列为FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽、氨基酸序列为KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多肽和氨基酸序列为HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。

[0249] 本文所用的术语“内源性”是指从内部生长或起源,或来自内部。

[0250] 本文所用的术语“内皮”是指排列于血管内表面的薄层细胞,在管腔内的循环血液和血管壁的其余部分之间形成界面。内皮细胞将排列从心脏到最小的毛细血管的整个循环系统。这些细胞减少血流的紊乱并允许流体泵送得更远。

[0251] 本文所用的术语“嗜酸性细胞”或“嗜酸性粒细胞”是指在脊椎动物中负责抗击多细胞寄生虫和某些感染的白细胞。它们是在迁移到血液之前在骨髓内造血期间发育的粒细胞。它们也与肥大细胞一起控制与过敏和哮喘相关的机制。活化后,嗜酸性细胞发挥不同的功能,包括(1)产生阳离子颗粒蛋白和通过脱颗粒释放它们,(2)产生诸如超氧化物、过氧化物和次溴酸盐(由嗜酸性细胞过氧化物酶优先产生的次溴酸)活性氧种类,(3)产生诸如来自白三烯和前列腺素家族的类二十烷酸的脂质介体,(4)产生诸如转化生长因子(TGF- β)、血管内皮生长因子(VEGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)的生长因子,和(5)产生诸如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13和TNF- α 的细胞因子。

[0252] 本文所用的术语“上皮”是指由排列在腔体和整个身体结构的表面的细胞组成的组织。上皮的基底表面朝向下面的结缔组织,并且这两层由基底膜分离。

[0253] 本文所用的术语“外溢”是指血细胞成分从毛细血管移动到围绕其的组织(血球渗出)。在恶性肿瘤转移的情况下,它是指癌细胞离开毛细血管并进入器官。

[0254] 本文所用的术语“渗出”是指液体从循环系统穿过血管壁进入病灶或炎症区域的过程。血液流出物包含一些或所有的血浆蛋白、白细胞、血小板和红细胞。

[0255] 本文所用的术语“纤维蛋白”是指参与血液凝固的纤维蛋白。它是聚合以形成在伤口部位形成止血栓子或血块(与血小板结合)的“网格”的纤维状蛋白。纤维蛋白参与信号转导、血液凝固、血小板活化和蛋白质聚合。

[0256] 本文所用的术语“成纤维细胞”是指制造并分泌包括但不限于胶原蛋白的细胞外基质蛋白的结缔组织细胞。成纤维细胞是在结缔组织中发现的最常见的细胞类型,其在伤口愈合中发挥重要的作用。像其他的结缔组织细胞,成纤维细胞源自于原始间充质(一种源自所有三个胚层并位于胚胎中的疏松结缔组织)。在某些情况下,上皮细胞能分化为成纤维细胞,这一过程称为上皮-间充质转化。成纤维细胞和纤维细胞是相同细胞的两种状态,就维持和组织代谢而言,前者为活化的状态,后者为较不活跃的状态,这两个术语有时可以互换使用。

[0257] 本文所用的术语“肌成纤维细胞”是指在伤口区域具有平滑肌的一些诸如收缩性能和纤维的特点的成纤维细胞,并被认为是暂时地产生Ⅲ型胶原蛋白。虽然有许多可能的肌成纤维细胞发育方式,但是肌成纤维细胞是在分化方面处于成纤维细胞和平滑肌细胞之间的细胞。在诸如肝、肺、肾的许多器官中,它们主要参与纤维化。在伤口组织中,它们涉及伤口加强(通过细胞外胶原纤维沉积)以及随后的伤口收缩(通过细胞内收缩和随之而来的通过整合素介导牵引到胶原纤维束使胶原纤维对齐)。

[0258] 本文所用的术语“纤维连接蛋白”是指结合到跨膜细胞表面基质受体蛋白质(“整合素”)的高分子量(约440kDa)的细胞外基质糖蛋白和诸如胶原蛋白、纤维蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白多糖(如多配体聚糖)的细胞外基质成分。纤维连接蛋白以二聚体形式存在,由两

个几乎相同的单体通过一对二硫键连接。纤维连接蛋白有多种亚型。血浆纤维连接蛋白是可溶性并在血液和其他体液中循环,其中它被认为能够增强血液凝固、伤口愈合和吞噬。其他的亚型在细胞表面聚集并在细胞外基质中以高度不溶性的纤维连接蛋白原纤丝沉积。在成纤维细胞表面上或附近形成的纤维连接蛋白纤丝通常与相邻的细胞内肌动蛋白应力纤维对齐,这促进分泌的纤维连接蛋白分子组装成纤丝并影响纤丝的取向。纤维连接蛋白在细胞粘附、细胞生长、细胞迁移和细胞分化中起重要作用,并且它对于诸如伤口愈合和胚胎发育的过程是重要的。

[0259] 本文所用的术语“纤维化”是指由损伤或一部分的炎症,或干扰其血液供应引起的器官或组织中过度的纤维性结缔组织的形成或发育。它可能是导致瘢痕的正常愈合反应、异常的抗性过程、或未知或已知原因的结果。

[0260] 本文所用的术语“吸入”是指伴随呼吸吸入含药蒸汽的行为。

[0261] 本文所用的术语“吹入”是指在压力下递送空气、气体或粉末到身体的腔体或腔室的行为。例如,与在压力下递送空气、气体或粉末通过鼻部的行为相关的鼻吹入。

[0262] 本文所用的术语“吸入递送装置”是指从液体或干粉气雾剂制剂产生小液滴或气雾剂的机器/设备或部件,并用于通过嘴施用以实现诸如溶液、粉末等药物的肺部施用。吸入递送装置的例子包括但不限于,雾化器、计量剂量吸入器和干粉吸入器(DPI)。

[0263] 本文所用的术语“雾化器”是指用于以吸入肺部的雾气的形式施用液体药物的装置。

[0264] 本文所用的术语“计量剂量吸入器”、“MDI”,或“吹气箱(puffer)”是指使用推进剂以递送特定量的药物(“计量剂量”)到患者的肺的加压的手持设备。本文所用的术语“推进剂”是指用于通常经由气体压力通过敛散喷管将物质排出的材料。压力可能来自压缩气体,或通过化学反应产生的气体。排出材料可以是气体、液体、等离子体,或,在化学反应之前,可以是固体、液体或凝胶。用于加压计量剂量吸入器的推进剂是液化气体,传统上是氯氟烃(CFC)并且越来越多地是氢氟烷烃(HFA)。合适的推进剂包括,例如,诸如三氯氟甲烷(也被称为推进剂11)、二氯二氟甲烷(也被称为推进剂12)和1,2-二氯-1,1,2,2-四氟乙烷(也被称为推进剂114)的氯氟烃(CFC)、氢氯氟烃、诸如1,1,1,2-四氟乙烷(也被称为推进剂134a、HFC-134a或HFA-134a)和1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(也被称为推进剂227、HFC-227或HFA-227)的氢氟烃(HFC)、二氧化碳、二甲醚、丁烷、丙烷、或它们的混合物。在其它实施方案中,推进剂包括氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烃、或它们的混合物。在其它实施方案中,氢氟烃用作推进剂。在其它实施方案中,HFC-227和/或HFC-134a用作推进剂。

[0265] 本文所用的术语“干粉吸入器”或“DPI”是指类似于计量剂量吸入器的装置,但其中的药物是粉末形式。患者呼出充分的呼吸,把嘴唇放在吹口的周围,然后迅速吸入粉末。干粉吸入器不需要MDI所必要的定时和协调。

[0266] 本文所用的术语“粒子”是指包含在本发明所述的组合物中或上的非常小的组分(例如,纳米微粒、微粒、或在某些情况下较大的)。

[0267] 本发明所用的术语“肺纤维化”、“特发性肺纤维化”以及“隐源性纤维性肺泡炎”是指特征为成纤维细胞增殖异常和重塑正常的肺组织结构和损害其功能的细胞外基质蛋白质沉积的间质性肺病的主要组成部分。特发性肺纤维化的标志性病灶是成纤维细胞病灶。这些位点的特征是间充质细胞的旺盛复制和新鲜细胞外基质的过度沉积。

[0268] 本文交替使用的术语“纤维化位点”或“纤维化病灶”是指在组织中由过度的纤维化组织形成或发育的特定位置。

[0269] 本文所用的术语“融合蛋白”是指为了形成来自每个初始蛋白质或多肽的具有功能特性的单一多肽或蛋白质的目的,由结合多个蛋白质结构域或多肽构造的蛋白质或多肽。融合蛋白的形成可以通过重组DNA技术有效连结或连接编码每个蛋白质结构域或多肽的两个不同核苷酸序列来实现,从而形成用于编码所需的融合蛋白的新的多核苷酸序列。另外,融合蛋白可以通过化学连接所需的蛋白质结构域形成。

[0270] 本文所用的术语“特发性”意指自发地或来自模糊的或未知的原因产生。

[0271] 本文所用的术语“炎症”是指由血管化组织对损伤的响应的生理过程。参见,例如, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 第四版, William E. Paul 主编, Lippincott-Raven Publishers, 费城 (1999) 1051-1053, 通过引用并入本文。在炎症过程中, 参与解毒与修复的细胞由炎症介质动员到受损部位。炎症的特点往往是在炎症部位白细胞尤其是嗜中性粒细胞 (多形核细胞) 的强浸润。这些细胞通过在血管壁处或在未损伤组织中释放有毒物质促进组织损伤。传统上, 炎症被分为急性和慢性响应。

[0272] 本文所用的术语“急性炎症”是指对特征为液体、血浆蛋白和嗜中性白细胞的积累的急性损伤的快速的、短暂的 (几分钟到几日)、相对均匀的响应。引起急性炎症的有害物质的例子包括但不限于, 病原体 (例如, 细菌、病毒、寄生虫), 外源性的 (例如, 石棉) 或内源性的 (例如, 尿酸盐结晶、免疫复合物) 异物、源、以及物理 (例如, 烧伤) 或化学 (例如, 腐蚀性的) 物质。

[0273] 本文所用的术语“慢性炎症”是指持续时间较长并具有模糊性和不确定性终止的炎症。当急性炎症持续时慢性炎症或通过不完全清除最初的致炎因子 (例如, 吸烟) 或作为发生在同一部位的多发性急性事件的结果接替。包括淋巴细胞、巨噬细胞的涌入和成纤维细胞生长的慢性炎症可能导致在长期或反复的抗炎活性部位的组织瘢痕。

[0274] 本文所用的术语“炎性介质”是指炎症和免疫过程的分子介质。这些水溶性的、扩散性的分子既在组织损伤和感染部位局部地起作用又在更远的部位起作用。一些炎症介质被炎症过程活化, 而其他的从细胞源合成和/或释放以响应急性炎症或由可溶性的其他炎症介质合成和/或释放; 还有一些表现出抗炎的特性。炎症响应的炎性介质的例子包括但不限于, 血浆蛋白酶、补体、激肽、凝血和纤维溶解蛋白、脂质介质、前列腺素、白三烯、血小板活化因子 (PAF)、肽、激素 (包括诸如糖皮质激素的类固醇激素) 和包括但不限于, 组胺、血清素和神经肽的胺、包括但不限于, 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素 (IF- γ)、白细胞介素-12 (IL-12) 和白细胞介素-17 (IL-17) 的促炎性细胞因子。

[0275] 在促炎性介质中, IL-1、IL-6 和 TNF- α 是已知的在急性期反应中活化肝细胞以合成活化补体的急性期蛋白。补体是与病原体相互作用以标记它们被吞噬细胞破坏的血浆蛋白质的系统。补体蛋白质可以直接地由病原体或间接地由病原体结合的抗体活化, 导致发生在病原体表面上并产生具有多种效应功能的活性成分的级联反应。IL-1、IL-6 和 TNF- α 也活化骨髓内皮细胞以动员嗜中性粒细胞, 并以内源性热原发挥功能来升高体温, 这有助于从体内消除感染。细胞因子的主要作用是作用于下丘脑以改变人体的温度调节, 并作用于肌肉和脂肪细胞以刺激肌肉和脂肪细胞的代谢来提高体温。在升高的温度下, 细菌和病毒的

复制减少,而适应性免疫系统更有效地运行。

[0276] 本文所用的术语“肿瘤坏死因子”是指由白细胞制造以响应抗原或感染的细胞因子,其引起肿瘤细胞的坏死(死亡)并具有广泛的促炎性作用。肿瘤坏死因子也是影响脂质代谢、凝血、胰岛素抵抗和排列于血管的内皮细胞的功能的多功能细胞因子。

[0277] 本文所用的术语“白细胞介素(IL)”是指来自一类首次观察到由白细胞分泌并作用于白细胞的同源相关的蛋白质的细胞因子。后来已发现白细胞介素由各种各样的体细胞生产。白细胞介素调节细胞生长、分化和运动,并刺激诸如炎症的免疫响应。白细胞介素的例子包括,白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-12(IL-12)和白细胞介素-17(IL-17)。

[0278] 本文所用的术语“抑制”(inhibiting)、“抑制”(inhibit)或“抑制”(inhibition)是指减少病程的数量或速率以完全地停止病程,或减少、限制或阻断其作用或功能。抑制可以包括数量、速率、作用功能的减少或减小,或物质的病程减少或减小至少5%,至少10%,至少15%,至少20%,至少25%,至少30%,至少40%,至少45%,至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%,或至少99%。

[0279] 本文所用的术语“抑制剂”是指结合到第一分子从而降低第一分子活性的第二分子。酶抑制剂是结合到酶从而降低酶的活性的分子。抑制剂的结合可以停止底物进入酶的活性位点和/或阻碍酶的催化反应。抑制剂的结合是可逆的或不可逆的。不可逆的抑制剂通常与酶发生反应并改变它的化学性质,例如,通过修饰酶活性所需的关键氨基酸残基。相反,可逆的抑制剂非共价地结合并产生不同类型的抑制作用,这取决于这些抑制剂是否与酶、酶-底物复合物、或两者结合。酶抑制剂往往是由它们的特异性和效能评估。

[0280] 本文所用的术语“损伤”是指由外部因素或可能是物理的或化学的力所造成的对身体的结构或功能的损害或伤害。

[0281] 本文所用的术语“分离的”是指例如但不限于,核酸、肽、多肽或蛋白质的材料,其(1)基本上或本质上不含在它的自然存在的环境中发现的与其通常伴随或相互作用的组分。本文所用的术语“基本上不含”或“本质上不含”是指明显或显著地不含或超过95%,或超过99%的这样的组分。分离的物质任选地包括在其天然环境中具有的物质中没有发现的物质;或(2)如果这种物质是在天然环境中,则这种物质已被通过有意人为干预合成地(非天然地)改变为组合物和/或放置在细胞中相对于在这种环境中发现的物质而言不是天然的位置(例如,基因组或亚细胞器)。为产生合成物质的改变可以对处于其天然状态的或在离开其天然状态的物质进行。例如,通过在其起源的细胞内进行人为干预,如果其被改变,或如果它是从已被改变的DNA转录,天然存在的核酸会成为分离的核酸。参见,例如,用于真核细胞中定点突变的化合物和方法,Kmiec,美国专利号5,565,350;真核细胞中的体内同源序列靶向;Zarling等人,PCT/US93/03868,每篇文献以引用的方式全部纳入本文。同样地,如果其以非天然存在的方式引入对该核酸不是天然的位点,该天然存在的核酸(例如,启动子)会变成分离的。本文所限定的“分离的”核酸也被称为“异质的”核酸。

[0282] 本文所用的术语“激酶”是指转移来自高能供体分子的磷酸基团到特异性靶分子或底物的一种酶。高能供体组可以包括但不限于ATP。

[0283] 本文所用的术语“白细胞”或“白血细胞(WBC)”是指一种免疫细胞。大多数白细胞

在骨髓中产生,并在血液和淋巴组织中发现。白细胞帮助身体抵抗感染和其他疾病。粒细胞、单核细胞和淋巴细胞是白细胞。

[0284] 本文所用的术语“淋巴细胞”是指在支持机体抵抗疾病中发挥很大作用的的小的白血细胞(白细胞)。有两种主要类型的淋巴细胞:B细胞和T细胞。B细胞产生对抗细菌和毒素的抗体,而T细胞本身对抗已被病毒影响或已成为癌变的体细胞。淋巴细胞分泌调节许多其他类型细胞的功能活性的产物(淋巴因子),并且往往存在于慢性炎症部位。

[0285] 本文所用的术语“巨噬细胞”是指一种包围并杀死微生物、去除死细胞并刺激其他免疫系统细胞的作用的白血细胞。在消化病原体后,巨噬细胞把病原体的抗原(一种分子,在病原体的表面发现的最常见的蛋白质,由免疫系统使用用于识别)呈递给相应的辅助性T细胞。通过将该抗原整合到细胞膜并使其展示成与MHC II类分子连接完成呈递,对其他白血细胞指示巨噬细胞不是病原体,尽管在其表面上具有抗原。最终,抗原呈递导致与病原体的抗原结合的抗体产生,这使得巨噬细胞更容易用其细胞膜粘附于病原体并吞噬它们。

[0286] 本文所用的术语“间充质细胞”或“间充质”是指来自所有三种可以发育成结缔组织、骨、软骨、淋巴系统和循环系统的胚层的细胞。

[0287] 本文所用的术语“MK2激酶”或“MK2”是指促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶2(也被称为“MAPKAPK2”、“MAPKAP-K2”、“MK2”),其是丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶家族的成员。

[0288] 本文所用的术语“质量中值空气动力学直径”或“MMAD”是指对于空气动力学直径的空气中的颗粒质量分布的中位数。MMAD通常伴随着几何标准偏差(g或 Σ g),其表征粒度分布的可变性特点。

[0289] 本文所用的术语“调节”是指控制、改变、适应于、或调整到一定程度或比例。

[0290] 本文所用的术语“单核细胞”是指一种在骨髓中产生并通过血液输送到身体里的组织的免疫细胞,在那里其变成巨噬细胞。单核细胞是一种白血细胞和一种吞噬细胞。

[0291] 本文所用的术语“嗜中性粒细胞”或“多形核嗜中性粒细胞(PMN)”是指在哺乳动物中最丰富的类型的白血细胞中,其形成先天免疫系统的重要组成部分。它们与嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞一起形成部分的多形核细胞家族(PMN)。嗜中性粒细胞通常在血液中发现。在炎症的开始(急性)阶段,特别是由于细菌性感染和某些癌症,嗜中性粒细胞是向炎症部位迁移的炎症细胞的第一批响应物之一。它们迁移通过血管,然后通过间质组织,在称为趋化性的过程中跟踪诸如白细胞介素-8(IL-8)和C5a的化学信号,所述趋化性是游动细胞或其部分沿着化学浓度梯度朝向它认为有吸引的环境条件和/或远离其发现排斥的周围环境定向运动。

[0292] 本文所用的术语“正常健康对照受试者”是指没有气道或肺组织疾病的症状或其他的临床证据的受试者。

[0293] 本文所用的术语“核酸”是指处于或者单链或者双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,除非另有限定,包括已知的具有天然核苷酸的基本性质的类似物,由于它们以与天然存在的核苷酸(例如,肽核酸)类似的方式杂交为单链核酸。

[0294] 本文所用的术语“核苷酸”是指由杂环碱基、糖和一个或多个磷酸基团组成的化合物。在最常见的核苷酸中,碱基是嘌呤或嘧啶的衍生物,以及糖是戊糖脱氧核糖或核糖。核苷酸是核酸的单体,用三个或更多个键合在一起以形成核酸。核苷酸是RNA、DNA和几种辅因

子的结构单元,其包括但不限于,CoA、FAD、DMN、NAD和NADP。嘌呤包括腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G);嘧啶包括胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。

[0295] 本文所用的下列术语用来描述两个或两个以上的核酸或多核苷酸之间的序列关系:(a)“参考序列”、(b)“比较窗口”、(c)“序列同一性”、(d)“序列同一性百分比”和(e)“基本同一性。”

[0296] (a) 术语“参考序列”是指用于作为序列比较基础的序列。参考序列可以是指定序列的子集或全部;例如,作为全长的cDNA或基因序列的片段,或完整的cDNA或基因序列。

[0297] (b) 术语“比较窗口”是指多核苷酸序列的连续的和特定的片段,其中该多核苷酸序列可以与参考序列进行比较并且在比较窗口中的该多核苷酸序列的部分可以包括与参考序列(其中不包括增加或缺失)相比的增加或缺失(即,空位)用于该两个序列的最佳比对。一般来说,比较窗口是至少20个连续核苷酸的长度,并任选地可以是至少30个连续核苷酸的长度,至少40个连续核苷酸的长度,至少50个连续核苷酸的长度,至少100个连续核苷酸的长度,或更长。本领域技术人员理解的是,为了避免由于多核苷酸序列中包含空位而与参考序列的高相似性,通常引入空位罚分并从匹配的数目中减去。

[0298] 用于比较的序列比对方法在本领域是众所周知的。用于比较的序列最佳比对可以由以下方法进行:Smith和Waterman的局部同源性算法,Adv. Appl. Math. 2:482 (1981);由Needleman和Wunsch的同源性比对算法,J. Mol. Biol. 48:443 (1970);由Pearson和Lipman的相似性搜索方法,Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444 (1988);这些算法的计算机化实现,包括但不限于:在Intelligenetics, Mountain View,加利福尼亚的PC/基因程序中的CLUSTAL;威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA,遗传学计算机小组(GCG), 575科学博士,麦迪逊,威斯康星,美国;在Higgins和Sharp, Gene 73:237-244 (1988); Higgins和Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989); Corpet等人, Nucleic Acids Research 16:10881-90 (1988); Huang等人, Computer Applications in the Biosciences, 8:155-65 (1992) 和 Pearson等人, Methods in Molecular Biology, 24:307-331 (1994) 中充分地描述了CLUSTAL程序。可用于数据库相似性搜索的程序的BLAST族包括:针对核苷酸的数据库序列的用于核苷酸查询序列的BLASTN;针对蛋白质数据库序列用于核苷酸查询序列的BLASTX;针对蛋白质数据库序列用于蛋白质查询序列的BLASTP;针对核苷酸数据库序列用于蛋白质查询序列的TBLASTN和针对核苷酸数据库序列用于核苷酸查询序列的TBLASTX。参见Current Protocols in Molecular Biology, 第19章, Ausubel等人, 编辑, Greene Publishing and Wiley-Interscience, 纽约(1995)。

[0299] 除非另有说明,本文提供的序列同一性/相似性值是指利用BLAST 2.0程序包、使用默认参数得到的值。Altschul等人, 25:3389-3402 Nucleic Acids Res. (1997)。执行BLAST分析的软件是公开地获得的,例如,通过国家生物技术信息中心。该算法首先包括通过在查询序列中识别长度W的短字来识别高得分序列对(HSP), 当与数据库序列中的相同长度的字对比时,所述短字或者符合或者满足一些正值的阈值分数T。T被称为邻域字得分阈值(Altschul等人, 同上文)。这些初始的邻域字命中作为用于启动搜索以找到含有它们的较长HSP的的种子。然后字命中沿每个序列的两个方向延伸直到可以增加累积的比对得分。对于核苷酸序列的累积得分使用参数M(对一对匹配的残基的奖励得分;总是>0)和N(用于不匹配的残基的处罚得分;总是<0)计算。对于氨基酸序列,得分矩阵被用于计算累积得

分。在每个方向上字命中的延伸停止当：累积比对得分从其最大的取得值下降数量X；由于一个或多个负得分残基比对的累积，累积得分变为零或以下；或到达任一序列的终点。BLAST算法的参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(核苷酸序列)使用字长度(W) 11、期望值(E)为10、截断值为100, M=5, N=4和两个链的比较作为默认值。对于氨基酸序列, BLASTP程序使用字长度(W)为3、期望值(E)为10和BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff和Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915)作为默认值。

[0300] 除了计算序列同一性百分比, BLAST算法也执行两个序列之间的相似性的统计分析(参见, 例如, Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993))。BLAST算法提供的相似性的一个量度标准是最小和概率(P(N)), 它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配偶然发生的概率的指示。BLAST搜索假定蛋白质可以作为随机的序列建模。然而, 许多实际的蛋白质包括可以是均聚束、短周期重复的非随机序列的区域, 或富含一个或多个氨基酸的区域。这样低复杂度的区域可以在不相关的蛋白质之间对比, 即使蛋白质的其他区域是完全不同的。许多低复杂度的过滤程序可以用于减少这样的低复杂度的对比。例如, SEG (Wooten和Federhen, Comput. Chem., 17:149-163 (1993)) 和XNU (Claverie和States, Comput. Chem., 17:191-201 (1993)) 低复杂度过滤器可以单独或组合使用。

[0301] (c) 在两个核酸或多肽序列的语境下, 本文所用的术语“序列同一性”或“同一性”是指当在特定的比较窗口上比对最大对应时在两个序列中相同的残基。当序列同一性百分比用于提及蛋白质时, 公认的是不相同的残基位置往往保守性氨基酸置换不同, 即, 在那里氨基酸残基被其他具有相似的化学性质(如电荷或疏水性)的氨基酸残基置换, 并且因此不改变分子的功能特性。序列在保守性置换上不同时, 序列同一性百分比可以向上调整以校正置换的保守性本性。在保守性置换上不同的序列可以说具有“序列相似性”或“相似性”。用于做出这种调整的手段对于本领域技术人员是众所周知的。这通常涉及将保守性置换评定为部分错配而不是完全错配, 从而增加序列同一性百分比。因此, 例如, 在给予相同氨基酸得分1且给予非保守性置换得分0的情况下, 给予保守性置换在0和1之间的得分。计算保守性置换的得分, 例如, 根据Meyers和Miller Computer Applic. Biol. Sci., 4:11-17 (1988) 的算法, 例如, 在程序PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, 加利福尼亚, 美国) 中实现。

[0302] (d) 本文所用的术语“序列同一性百分比”是指通过比较窗口上比较两个最佳比对序列所确定的值, 其中与参考序列(不包括增加或缺失)比较时, 为了两个序列的最佳比对, 在比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包括增加或缺失(即, 空位)。通过如下步骤计算该百分比, 即, 确定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数以得到匹配位置数, 将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数, 并且将结果乘以100以得到序列同一性百分比。

[0303] (e) 术语多核苷酸序列的“基本同一性”是指使用采用标准参数的上述比对程序之一, 与参考序列对比时, 多核苷酸包括具有至少70%的序列同一性, 至少80%的序列同一性, 至少90%的序列同一性和至少95%的序列同一性的序列。本领域技术人员会认识到, 通过考虑密码子的简并性、氨基酸的相似性、阅读框定位等, 可以适当调整这些值以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。为了这些目的的氨基酸序列的基本同一性通常意味着至少60%, 或至少70%, 至少80%, 至少90%, 或至少95%的同一性。核苷酸序列基本

上相同的另一个指标是两个分子是否在严格的条件彼此杂交。然而,如果它们编码的多肽是基本上相同的,在严格的条件下没有彼此杂交的核酸仍然是基本上相同的。这是可能发生的,例如,当核酸的副本是使用由遗传密码允许的最大密码子简并形成时。两个核酸序列基本上相同的一个指标是,第一核酸编码的多肽是与第二核酸编码的多肽免疫交叉反应的。

[0304] 本文所用的术语“有效连接”是指两个或两个以上的蛋白质结构域或多肽通过重组DNA技术和化学反应连接或结合以便获得的融合蛋白的每个蛋白质结构域或多肽保留其原有的功能的连接。例如,SEQ ID NO:1是由有效连接细胞渗透肽(SEQ ID NO:11)与治疗性结构域(SEQ ID NO:2)构建的,从而形成了既具有SEQ ID NO:11的细胞穿透功能又具有SEQ ID NO:2的激酶抑制剂功能的融合肽。

[0305] 本文所用的术语“实质”是指与结缔组织或血管相比组成器官的实质部分的动物组织。“实质的”是指属于器官的实质。

[0306] 本文所用的术语“肠胃外的”是指通过注射(即,通过注射施用)的方式引入体内,包括,例如,皮下地(即,在皮肤之下注射)、肌肉地(即,注射入肌肉)、静脉内地(即,注射入静脉)、鞘内地(即,注射入脊髓周围腔隙的或脑的蛛网膜下腔)、胸骨内注射或输注技术,包括腹腔内注射或输注入体腔(例如腹腔)。肠胃外施用的组合物是用诸如外科针的针或其他身体接入设备递送的。本文所用的术语“外科针”是指适用于递送流体(即,能流动)组合物进入选定的解剖结构的任何接入设备。诸如注射用无菌水或油性悬液的可注射制剂可以根据已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。

[0307] 本文所用的术语“颗粒”是指悬浮在气体或液体中的固体或液体物质的细粒子。

[0308] 本文所使用的术语“药学上可接受的载体”是指任何基本无毒的通常用于药物施用的载体,其中本发明的分离的多肽将保持稳定的和生物可利用的。药学上可接受的载体必须具有足够高的纯度和足够低的毒性,以使其适用于施用到将被治疗的哺乳动物。它还应当保持活性剂的稳定性和生物利用度。当与给定的组合物的活性剂和其他成分结合时,药学上可接受的载体可以是液体或固体并根据头脑中计划的施用方式进行选择以提供所需的体积、浓度等。

[0309] 术语“药学上可接受的盐”是指在合理的医疗判断范围之内,适合于与人类和低等动物的组织接触而无不适当的毒性、刺激性、变态反应等,并与合理的利益/风险比相称的那些盐。

[0310] 本文交替使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指氨基酸残基的聚合物。该术语应用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人造化学类似物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。天然存在的氨基酸的这些类似物的本质是,当掺入蛋白质时,该蛋白质特异性地与相同种但完全由天然存在氨基酸组成的蛋白质所激发的抗体反应。

[0311] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文也是在其最广泛的意义上使用,以指亚基氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物的序列。除非另有说明,亚基由肽键连接。在此描述的多肽可能是化学合成的或重组表达的。本发明的多肽也可以是化学合成的。使用众所周知的固相、液相技术,或肽缩合技术,或它们的任意组合制备的合成的多肽可包括天然的和非天然的氨基酸。用于肽合成的氨基酸可以是利用原始的Merrifield固相法程序的标准脱保护、中和、

耦联和洗涤方案的标准的Boc (N- α -氨基受保护的N- α -特丁氧羰基) 氨基酸树脂(1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154), 或是被Carpino和Han首次描述的碱基不稳定的N- α -氨基受保护的9-芴甲氧羰基(Fmoc) 氨基酸(1972, J. Org. Chem. 37:3403-3409)。Fmoc和Boc N- α -氨基保护的氨基酸的Fmoc和Boc均两者可以从Sigma、Cambridge Research Biochemical、或本领域技术人员熟悉的其他化学品公司得到。此外, 该多肽可以用本领域技术人员熟悉的其他N- α -保护的基团合成。固相肽合成可能通过那些在本领域中熟知的和提供的技术, 例如, Stewart和Young, 1984, Solid Phase Synthesis, 第二版, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields和Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214, 或使用自动合成器完成。本发明的多肽可能包括D-氨基酸(在体内抵抗L-氨基酸的特异蛋白酶)、D-和L-氨基酸的组合和各种各样的“人造”氨基酸(例如, β -甲基氨基酸、C- α -甲基氨基酸和N- α -甲基氨基酸, 等)以传达特殊性能。合成的氨基酸包括针对赖氨酸的鸟氨酸和针对亮氨酸或异亮氨酸的正亮氨酸。此外, 该多肽可以具有诸如酯键的肽缩氨酸模拟键以制备具有新颖功能的肽。例如, 可以形成包含还原肽键的肽, 即R1-CH₂-NH-R2, 其中R1和R2是氨基酸残基或序列。还原肽键可能作为二肽亚基引入。这种多肽将抵抗蛋白酶的活性, 并将具有延长的体内半衰期。这些术语应用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人造化学类似物的氨基酸聚合物, 以及天然存在的氨基酸聚合物。天然存在的氨基酸的这些类似物的本质是, 当掺入蛋白质时, 该蛋白质特异性地与相同种但完全由天然存在氨基酸组成的蛋白质所激发的抗体反应。

[0312] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”也包含包括但不限于, 糖基化、脂质附着、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟基化和ADP-核糖基化的修饰。将理解的是, 如众所周知并如上所述的, 多肽可以不是完全线性的。例如, 由于泛素化多肽可以是分枝的, 并且通常是由于翻译后事件而导致它们可以是具有或不具有分枝的环形, 所述翻译后事件包括天然加工事件和不会自然地发生的由人类操纵而引起的事件。环形的、分支的和分支环形的多肽可以是由非翻译的自然过程和完全合成的方法合成的。在一些实施方案中, 该肽具有任何长度或尺寸。

[0313] 本文所用的术语“酶原”(proenzyme)或“酶原”(zymogen)是指非活性的酶前体。为了变成活性的酶, 酶原需要生物化学变化(如暴露活性位点的水解反应, 或改变配置以暴露活性位点)。生物化学变化通常发生在溶酶体中, 其中酶前体的特定部分被切割以活化它。活化后释放的氨基酸链被称为活化肽。

[0314] 本文所用的术语“增殖”是指由单细胞不断分裂成相同的子细胞的细胞群的扩展。

[0315] 本文所用的术语“肺间质”是指肺部气囊周围的组织与腔隙。

[0316] 本文所用的术语“肺泡”是指具有中空腔体的形状的解剖结构。肺泡位于肺的呼吸区域, 在肺泡管和心房的远端, 形成呼吸道的终止点。肺泡是与血液进行气体交换的呼吸部位的球形露头, 并且只存在于哺乳动物的肺。肺泡膜是气体交换的表面。血液将二氧化碳从身体的其他部分携带以释放入肺泡, 并且肺泡内的氧气由血液带入肺泡血管, 以被运送到人体内的所有的细胞。肺泡内含有一些胶原蛋白和弹性纤维。当吸进时它们充满空气, 该弹性纤维使肺泡舒展。然后在呼出过程中它们弹回, 以排出富含二氧化碳的空气。在肺泡壁中有三种主要的肺泡细胞类型, (1) 形成肺泡壁的结构鳞状肺泡细胞, (2) 分泌肺表面活性剂以降低水的表面张力并使膜分离, 从而提高气体交换能力的大肺泡细胞(3) 摧毁诸如细

菌的外来病原体的巨噬细胞。

[0317] 与术语类似的、可比的或类似于交替使用的术语“相似的”是指具有共同的特性或特点。

[0318] 本文所用的术语“溶液”是指两种或更多种物质的均匀混合物。虽然不一定,但是常见的是液体。在溶液中,溶质的分子(或溶解的物质)均匀地分布在那些溶剂之间。

[0319] 术语“可溶的”和“溶解性”是指容易地被溶解在特指定的流体(溶剂)中的性能。术语“不溶的”是指在特定的溶剂中具有极小的或有限的溶解性的物质的性能。在溶液中,溶质(或溶解的物质)的分子被均匀地分布在那些溶剂之间。

[0320] 本文所用的术语“应力纤维”是指在由肌动蛋白细丝、交联蛋白(将结合两种或两种以上的细丝纤维结合在一起的蛋白质)和肌球蛋白 II 运动原组成的细胞中的高阶结构。肌动蛋白是一种球状蛋白质(约43kDa)聚合,其聚合并形成有序的细丝结构,所述细丝结构具有两个彼此缠绕的原丝,以形成单一的也称为“微丝”的“肌动蛋白丝”的细丝结构。在应力纤维中的肌球蛋白运动原运动,滑动肌动蛋白丝彼此越过,以使纤维可收缩。为了收缩以产生的力,纤维必须被锚定到某物。应力纤维可以锚定到细胞膜,并经常地该锚定发生的位点也连接到细胞的外部结构(基质或一些其他底物)。这些连接的位点称为局灶性粘附。为了产生和维持适当的局灶性粘附,需要许多蛋白质。允许由肌球蛋白运动原和细丝生长及重排所产生的力移动并重塑细胞的正是对抗这些固定的外部底物的收缩。

[0321] 本文所用的术语“悬浮液”是指分散液(混合物),其中精细分离的物种与另一个物种结合,前者非常细地分开并混合以使它没有迅速沉淀出来。在日常生活中,最常见的悬浮液是固体在液体中的那些。

[0322] 本文互换使用的术语“受治疗者”或“个体”或“患者”是指哺乳动物起源的动物物种的成员,包括但不限于,小鼠、大鼠、猫、山羊、绵羊、马、仓鼠、雪貂、鸭嘴兽、猪、狗、豚鼠、兔和灵长类动物,如,例如,猴子、猿或人类。

[0323] 本文所用的术语“需要这种治疗的受治疗者”是指患有疾病、病症、病状或病理过程的患者。在一些实施方案中,本文所用的术语“需要这种治疗的患者”也指(i)将被施用本发明的至少一种多肽;(ii)正接受本发明的至少一种多肽;或(iii)已接受本发明的至少一种多肽的患者,除非该术语的上下文和使用另有指明。

[0324] 本文所用的术语“置换”是指DNA序列中的一个碱基或一些碱基交换成另一个碱基或另一些碱基的情况。置换可能是同义置换和非同义置换。本文所用的“同义置换”是指在编码蛋白质的基因的外显子中将一个碱基置换为另一个碱基,这样产生的氨基酸序列没有被修改。本文所用的术语“非同义置换”是指在编码蛋白质的基因的外显子中将一个碱基置换为另一个碱基,这样产生的氨基酸序列是被修改的。

[0325] 本文交替使用的术语活性剂的“治疗量”、“有效量”或“药学上的有效量”是指足以提供预期的治疗益处的量。例如,本发明的激酶抑制组合物的“治疗量”包括但不限于,足够的量:(1)以去除至少一个纤维化病灶,或减小其尺寸,或(2)以减少包括胶原蛋白和纤维连接蛋白的细胞外基质在肺纤维化患者的肺间质沉积的速度。该术语也包括抑制或减轻肺纤维化患者的至少一种症状的足够的量,其中,所述症状包括但不限于,血氧饱和度、呼吸困难(困难的呼吸)、干咳(意思是可能由刺激或炎症引起的并不从呼吸道清除痰的来自肺的突然的、嘈杂的排出)、杵状指(手指畸形变成球根状的外观)和尖锐的肺泡音(在吸

入过程中肺的尖锐的肺泡音,有时称为湿罗音或捻发音)。

[0326] 根据本发明的可应用的活性剂的有效量的范围一般从约0.001mg/kg体重到约10g/kg体重。然而,剂量水平基于各种因素,包括损伤的类型、年龄、体重、性别、患者的医疗病状,病状的严重程度、施用的途径和频率和特定的活性剂的应用。因此,给药方案可以有很大的不同,但可以由医师使用标准的方法常规地确定。

[0327] 术语“治疗”(treat)或“治疗”(treating)包括消除、充分地抑制、减缓或逆转疾病、病状或病症的进展,充分地改善病状的临床的或美学的症状,充分地防止疾病、病状或病症的临床的或美学的外观和防止有害或恼人的症状。治疗进一步是指完成以下中的一个或多个:(a)降低病症的严重程度;(b)限制被处理的病症的症状特征的发展;(c)限制被治疗的病症的症状特征的恶化;(d)限制以前患有该病症的患者的该病症的复发;和(e)限制以前无症状的该病症患者的症状的复发。

[0328] 本文所用的术语“变体”、“突变体”和“衍生物”是指与参考核苷酸或多肽序列基本相同的核苷酸或多肽序列。序列中的差异可能是或是自然的或是通过设计在序列或结构上的变化的结果。自然的变化可能出现在正常复制或基本上特定的核酸序列的复制的过程中。设计的变化可以是特定目的专门地设计和引入序列的。这种特定的变化可在体外采用多种诱变技术进行。这种特定地产生的序列变体可称为原始序列的“突变体”或“衍生物”。

[0329] 本领域技术人员同样能够生产具有一个或多个氨基酸取代、缺失、增加或置换但是功能上与SEQ ID NO:1等同的多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的多肽变体。具有一个或者多个氨基酸取代、缺失、增加或者置换的多肽变体。这些变体可以还包括:(a)其中一个或者多个氨基酸残基被保守或非保守的氨基酸取代的变体;(b)其中增加一个或者多个氨基酸的变体;(c)其中至少一个氨基酸包含取代基的变体;(d)其中来自一个物种的氨基酸残基在保守或者非保守位置被另一物种中的对应残基取代的变体;以及(e)其中靶蛋白与另一种诸如融合配偶体、蛋白质标记物或者可以赋予该靶蛋白有用特性的诸如用于抗体的抗原决定基的其他化学部分的肽或者多肽融合的变体。用于获得此类变体的包括但不限于基因的(抑制、缺失、突变等)、化学的和酶的技术是本领域技术人员已知的。本文所用的术语“突变”是指在生物体的基因或染色体DNA序列的变化导致在亲代型中没有发现的新特征或性状的产生,或者指这种变化或者通过用于编码基因的DNA的核苷酸序列中的改变或者通过染色体的物理排列中的改变而在染色体中发生的过程。三种突变的机理包括取代(一个碱基对被另一个交换)、增加(一个或者多个碱基插入序列中)和缺失(一个或者多个碱基对的丢失)。

[0330] 本文所用的术语“溶媒”是指使药物或与其混合的其他材料易于使用的物质。

[0331] 本文所用的术语“伤口愈合”或“伤口修复”通常指在创伤后身体的修复组织的自然过程。当个体受伤时,一组复杂的生物化学事件发生以修复损伤,包括止血、炎症、增殖和重塑。

[0332] I.组合物:用于预防或治疗以异常成纤维细胞增殖和胶原蛋白沉积为特征的疾病的治疗性肽

[0333] 根据一个方面,本发明提供了一种用于治疗以受治疗者的组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病程的药物组合物,

[0334] 其中,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等同物,和其药学上可接受的载体,并且

[0335] 其中,所述治疗量对减少受治疗者的组织中成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0336] 根据一个实施方案,所述疾病或病状是急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0337] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是辐射诱导的纤维化。

[0338] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是移植排斥。

[0339] 根据另一个实施方案,所述组织是肺组织。

[0340] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是间质性肺病。

[0341] 根据另一个实施方案,其中所述疾病或病状是肺纤维化。

[0342] 根据另一个实施方案,其中所述肺纤维化是特发性肺纤维化。

[0343] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化由施用博莱霉素引起。

[0344] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化由变态反应、环境颗粒物吸入、吸烟、细菌性感染、病毒性感染、对受治疗者肺部的机械损伤、肺移植排斥、自体免疫性疾病、遗传性疾病或其组合引起。

[0345] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状进一步以所述组织中的炎症为特征。

[0346] 根据另一个实施方案,所述炎症是急性或慢性炎症。

[0347] 根据另一个实施方案,所述炎症由选自肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)所组成的组的至少一种细胞因子介导。

[0348] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化是以与正常健康对照受试者相比选自肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质所组成的组的至少一种病变为特征。

[0349] 根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积以与正常健康对照受试者的组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2)的活性相比所述组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2)的异常活性为特征。

[0350] 根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由与正常健康对照受试者的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2)的量或分布相比所述组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2)的异常量或分布证明。

[0351] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制选自本文表1中所列出的组的激酶的激酶活性。

[0352] 根据另一个实施方案,这种抑制可以,例如,对减少所述受治疗者的组织中成纤维细胞增殖、细胞外基质沉积或其组合是有效的。

[0353] 根据另一个实施方案,这种抑制可以,例如,对减少与正常健康对照受试者相比选自肺间质中的细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质所组成的组的至少一种病变是有效的。

[0354] 根据一些实施方案,MMI抑制剂的体内抑制性取决于剂量、施用途径和响应于该抑

制剂的细胞类型。

[0355] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少50%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少75%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少80%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少85%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少90%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少95%的所述激酶的激酶活性。

[0356] 根据一些实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2激酶)的激酶活性。根据一些其他实施方案,所述药物组合物抑制至少50%的MK2激酶的激酶活性。根据一些其他实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少75%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少80%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少85%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少90%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少95%的MK2激酶的激酶活性。

[0357] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3激酶)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少50%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少70%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少75%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少80%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少85%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少90%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少95%的MK3激酶的激酶活性。

[0358] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少80%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少85%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少90%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少95%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。

[0359] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的BDNF/NT-3生长因子

受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的 BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的 BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的 BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0360] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0361] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0362] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0363] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0364] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0365] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性。

[0366] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0367] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0368] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的 BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0369] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0370] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0371] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和至少65%的 BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0372] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性、至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性和至少65%的 BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0373] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制选自MK2、MK3、CaMKI、TrkB的组的至少一种激酶的激酶活性,而基本上不抑制来自本文表1中列出的余下组的一种或多种其他选

择的激酶的活性。

[0374] 根据一些实施方案,MMI抑制剂的体内抑制性取决于剂量、施用途和响应于该抑制剂的细胞类型。

[0375] 根据此类实施方案,所述药物组合物抑制小于50%的其他选择的激酶的激酶活性。根据此类实施方案,所述药物组合物抑制小于65%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于50%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于40%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于20%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于15%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于10%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于5%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物增加其他选择的激酶的激酶活性。

[0376] 根据前述段落的实施方案,基本上不被抑制的一种或多种其他选择的激酶选自由 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CAMK II, 包括其亚基CaMK II δ)、原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (PIM-1)、细胞肉瘤 (c-SRC)、脾酪氨酸激酶 (SYK)、C-src酪氨酸激酶 (CSK) 和胰岛素样生长因子1受体 (IGF-1R) 所组成的组。

[0377] 根据一些实施方案,所述药物组合物进一步包括至少一种额外的治疗剂。

[0378] 根据一些这类实施方案,所述额外的治疗剂选自由纯化的牛V型胶原蛋白 (例如, IW-001; Immune Works; United Therapeutics)、IL-13受体拮抗剂 (例如, QAX576; Novartis)、蛋白酪氨酸激酶抑制剂 (例如, 伊马替尼(**Gleevec®**); Craig Daniels/Novartis)、内皮素受体拮抗剂 (例如, ACT-064992 (马西替坦); Actelion)、双重内皮素受体拮抗剂 (例如, 波生坦(**Tracleer®**); Actelion)、前列环素类似物 (吸入的伊洛前列素 (例如, **Ventavis®**); Actelion)、抗CTGF单克隆抗体 (例如, FG-3019)、内皮素受体拮抗剂 (A-选择性) (例如, 安贝生坦(**Letairis®**), Gilead)、AB0024 (Arresto)、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2) 单克隆抗体 (例如, GS-6624 (前身为AB0024); Gilead)、c-Jun氨基末端激酶 (JNK) 抑制剂 (例如, CC-930; Celgene)、吡非尼酮 (例如, **Esbriet®** (InterMune)、**Pirespa®** (Shionogi))、IFN- γ 1b (例如, **Actimmune®**; InterMune)、抗所有三种TGF- β 亚型的泛中和IgG4人类抗体 (例如, GC1008; Genzyme)、TGF- β 活化抑制剂 (例如, Stromedix (STX-100))、重组人Pentraxin-2蛋白 (rhPTX-2) (例如, PRM151; Promedior)、IL4/IL13双特异性抗体 (例如, SAR156597; Sanofi)、靶向整合素 $\alpha_v\beta_6$ 的人源化单克隆抗体 (BIBF1120; Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸 (Zambon SpA)、西地那非(**Viagra®**;)、TNF拮抗剂 (例如, 依那西普(**Enbrel®**); Pfizer)、糖皮质激素 (例如, 泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松和糠酸氟替卡松)、支气管扩张剂 (例如, 白三烯调节剂 (例如, 孟鲁司特(**SINGUAIR®**))、抗胆碱能支气管扩张剂 (例如, 异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 β_2 -激动剂 (例如, 甲磺酸乙基异丙肾上腺素(**Bronkometer®**))、肾上腺素、salbutamol/沙丁胺醇和特布他林)、长效 β_2 -激动剂 (例如, 沙美特罗、福莫特罗、indacaterol(**Onbrez®**)和其组

合。

[0379] 根据一些其他实施方案,所述额外的治疗剂包括支气管扩张剂,包括但不限于白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、 β_2 -激动剂或其组合。

[0380] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括皮质类固醇,包括但不限于泼尼松、布地奈德、莫米松、丙酸倍氯松或其组合。

[0381] 根据一些其他实施方案,所述额外的治疗剂是抗炎剂。

[0382] 根据一些这类实施方案,所述抗炎药是非甾体类抗炎剂。本文所用的术语“非甾体抗炎剂”指一大组作用类似阿司匹林的药剂,包括但不限于布洛芬(Advil®)、萘普生钠(Aleve®)和对乙酰氨基酚(Tylenol®)。可用于本发明的上下文的非甾体抗炎剂的额外实例包括但不限于昔康类,如吡罗昔康、伊索昔康、替诺昔康、舒多昔康和CP-14,304;双水杨酸酯、扑炎痛、三水杨酸胆碱镁、痛热宁(safapryn)、阿司匹林(solprin)、二氟尼柳和芬度柳;醋酸衍生物,如双氯芬酸、芬氯酸、吲哚美辛、舒林酸、托美丁、伊索克酸、呋罗芬酸、硫平酸、齐多美辛、阿西美辛(acematacin)、芬替酸、佐美酸、clindanac、奥昔平酸、联苯乙酸和酮咯酸;芬那酸类,如甲芬那酸、甲氯芬那酸、氟芬那酸、尼氟酸和托芬那酸;丙酸衍生物,如苯噁洛芬、氟吡洛芬、酮洛芬、非诺洛芬、芬布芬、吲哚布洛芬、吡洛芬、卡洛芬、奥沙普秦、普拉洛芬、咪洛芬、硫噁洛芬、舒洛芬、阿明洛芬和噻洛芬酸;吡唑类,如保泰松、羟布宗、非普拉宗、阿扎丙宗和三甲保泰松(trimethazone)。也可以使用这些非甾体抗炎剂的混合物,以及皮肤病学上可接受的盐和这些物质的酯类。例如,依托芬那酯,一种氟芬那酸衍生物,对局部施用特别有用。

[0383] 根据另一个实施方案,所述非甾体类抗炎剂包括转化生长因子- β_3 (TGF- β_3)、抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 剂或其组合。

[0384] 根据另一个实施方案,所述抗炎剂是甾体抗炎剂。本文所用的术语“甾体抗炎剂”指含有17-碳-4-环系统的许多化合物中的任一种化合物并且包括固醇、各种激素(例如合成代谢类固醇)和糖苷。甾体抗炎药代表性的实例包括但不限于皮质类固醇,如氢化可的松、羟基曲安西龙、 α -甲基地塞米松、地塞米松磷酸盐、二丙酸倍氯米松、戊酸氯倍他索(clobetasol valerate)、地奈德、去羟米松、醋酸去氧皮质酮、地塞米松、二氯松、双氟可龙戊酸酯、氟氢缩松(fludrenolone)、氟氯奈德、双氟美松叔戊酸酯、氟轻松(flusinolone acetone)、醋酸氟轻松、氟可丁酯(flucortine butylester)、氟可龙、醋酸氟泼尼定(fluprednylidene)、氟氢缩松(flurandrenolone)、哈西奈德、醋酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、甲泼尼龙、曲安奈德、可的松、可托多松、醋酸氟轻松(flucetone)、氟氢可的松、双醋酸双氟拉松(difluorosone diacetate)、氟雄诺龙(fluradrenolone)、氟氢可的松、双醋酸双氟拉松(diflorosone diacetate)、丙酮化氟雄诺龙(fluradrenolone acetone)、甲羟松、安西缩松(amcinafel)、安西非特(amcinafide)、倍他米松及其酯的平衡、氯泼尼松、醋酸氯泼尼松、氯可特龙(clocortelone)、克轻松(clescinsolone)、二氯松(dichlorisone)、二氟泼尼酯(diflurprednate)、氟氯奈德、氟尼缩松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼龙、戊酸氢化可的松、环戊丙酸氢化可的松、氢可他酯、甲泼尼松、帕拉米松、泼尼松龙、强的松、二丙酸倍氯米松、曲安西龙、以及它们的混合物。

[0385] 根据另一个实施方案,所述甾体抗炎剂包括选自由强的松、布地奈德、莫米松、倍

氯米松和其组合所组成的组的至少一种皮质类固醇。

[0386] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括黄嘌呤或黄嘌呤衍生物,如甲基黄嘌呤。

[0387] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂。

[0388] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是至少一种中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂,包括但不限于ICI 200355、ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616、TEI-8362、ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892、ZD-8321和其组合。

[0389] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括至少一种磷酸二酯酶抑制剂,包括但不限于磷酸二酯酶4抑制剂。磷酸二酯酶4抑制剂的实例包括但不限于罗氟司特、西洛司特或其组合。

[0390] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是镇痛剂。根据一些实施方案,所述镇痛剂通过提高疼痛阈值减轻疼痛,而不干扰意识或改变其他感觉形态。根据一些这类实施方案,所述镇痛剂是非阿片类镇痛剂。“非阿片类镇痛剂”是减少疼痛但是不是阿片类镇痛剂的天然或合成物质。非阿片类镇痛剂的实例包括但不限于依托度酸、吲哚美辛、舒林酸、托美丁、萘丁美酮、吡罗昔康、对乙酰氨基酚、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、酮洛芬、萘普生、萘普生钠、奥沙普秦、阿司匹林、三水杨酸胆碱镁、二氟尼柳、甲氯芬那酸、甲芬那酸和保泰松。根据一些其他实施方案,所述镇痛药是阿片类镇痛剂。“阿片类镇痛剂”、“阿片类物质”、或“麻醉性镇痛剂”是与中枢神经系统中的阿片类受体结合产生激动作用的天然或合成的物质。阿片类镇痛剂的实例包括但不限于可待因、芬太尼、氢化吗啡酮、左啡诺、哌替啶、美沙酮、吗啡、羟考酮、羟吗啡酮、右丙氧芬、丁丙诺啡(buprenorphine)、布托啡诺、地佐辛、纳布啡和喷他佐辛。

[0391] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方案,所述抗感染剂是抗生素剂。本文所用的术语“抗生素剂”指具有抑制细菌和其他微生物生长或将它们摧毁的能力的任何一组化学物质,主要用于治疗感染性疾病。抗生素剂的例子包括但不限于青霉素G;甲氧西林;萘夫西林;苯唑西林;氯唑西林;双氯西林;氨苄西林;阿莫西林;替卡西林;羧苄西林;美洛西林;阿洛西林;哌拉西林;亚胺培南;氨曲南;先锋霉素;头孢克洛;头孢西丁;头孢呋辛;头孢尼西;头孢美唑;头孢替坦;头孢丙烯;氯碳头孢;头孢他美;头孢哌酮;头孢噻肟;头孢唑肟;头孢三嗪;头孢他啶;头孢吡肟;头孢克肟;头孢泊肟;头孢磺啶;氟罗沙星;萘啶酸;诺氟沙星;环丙沙星;氧氟沙星;依诺沙星;洛美沙星;西诺沙星;多西环素;米诺环素;四环素;阿米卡星;庆大霉素;卡那霉素;奈替米星;妥布霉素;链霉素;阿奇霉素;克拉霉素;红霉素;依托红霉素;琥乙红霉素;葡萄糖酸红霉素;乳糖酸红霉素;硬脂酸红霉素;万古霉素;替考拉宁;氯霉素;克林霉素;甲氧苄啶;磺胺甲基异噁唑;呋喃妥因;利福平;莫匹罗星;甲硝唑;头孢氨苄;罗红霉素;阿莫西林-克拉维酸盐组合(Comoxiclavuanate);哌拉西林和他唑巴坦的组合;以及它们的各种盐、酸、碱和其他衍生物。抗菌抗生素剂包括但不限于青霉素类、头孢菌素类、碳头孢烯类、头霉素类、碳青霉烯类、单环内酰胺类、氨基糖甙类、糖肽类、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类和氟喹诺酮类。

[0392] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制在受治疗者的肺中出现的炎症。根据另一个实施方案,所述炎症是急性炎症。根据另一个实施方案,所述炎症是慢性炎症。根据另一个实施方案,所述炎症由肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 介导。根据另一个实施方案,所述炎

症由白细胞介素-6 (IL-6) 介导。根据另一个实施方案,所述炎症由白细胞介素-1 β (IL-1 β) 介导。

[0393] 根据另一个实施方案,与对照相比,所述药物组合物调节肺中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的量。根据另一个实施方案,与对照相比,所述药物组合物调节肺中白细胞介素-6 (IL-6) 的量。根据另一个实施方案,与对照相比,所述药物组合物调节肺中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的量。

[0394] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制热休克27kDa蛋白质1 (HSPB1) 的活性。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是异常诱导成纤维细胞增殖。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是异常诱导肌成纤维细胞分化。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是细胞外基质蛋白沉积至肺间质中。根据另一个实施方案,所述细胞外基质蛋白是胶原蛋白。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是促进纤维化病灶形成。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是增加肌成纤维细胞收缩性。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质。

[0395] 根据一些实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有基本的序列同一性。

[0396] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%的序列同一性。

[0397] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。

[0398] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。

[0399] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。

[0400] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。

[0401] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。

[0402] 根据一些其他实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),并且所述第二多肽包括序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有基本同一性的治疗性结构域。

[0403] 根据一些这类实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)

具有至少70%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少80%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少90%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少95%的序列同一性。

[0404] 根据一些实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLAVA (SEQ ID NO:8) 的多肽。

[0405] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVA (SEQ ID NO:9) 的多肽。

[0406] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10) 的多肽。

[0407] 根据一些其他实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽包括功能上与YARAAARQARA (SEQ ID NO:11) 等同的细胞渗透肽,并且所述第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。

[0408] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKA (SEQ ID NO:13) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRRRI (SEQ ID NO:15) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17) 的多肽。根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18) 的多肽。

[0409] 根据另一个方面,本发明还提供了一种分离的核酸,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其他实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其他实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0410] 根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.00001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.0001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.001mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.01mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.1mg/kg (或100ug/kg) 体重至约10mg/kg体重的量。根据另

[illegible]

[0411] 根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从1μg/kg/日至25μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从1μg/kg/日至2μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从2μg/kg/日至3μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从3μg/kg/日至4μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从4μg/kg/日至5μg/kg/日。根据一些其

他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $6\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $6\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $7\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $7\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $8\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $8\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $9\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $9\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $15\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $15\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $25\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $30\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $30\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $35\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $35\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $40\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $40\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $45\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $45\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $55\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $55\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $60\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $60\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $65\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $65\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $70\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $70\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $75\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $80\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $85\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $85\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $90\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $90\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $95\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从 $95\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 至 $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。

[0412] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。

[0413] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是 $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。

[0414] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。

[0415] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 。

[0416] 根据一些实施方案,本发明的多肽包括D-氨基酸(其在体内抵抗L-氨基酸特异性蛋白酶)、D-氨基酸和L-氨基酸的组合以及各种“人造”氨基酸(例如, β -甲基氨基酸、C- α -甲基氨基酸和N- α -甲基氨基酸等)以传达特殊的性能。合成氨基酸取代的实例包括针对赖氨酸的鸟氨酸和针对亮氨酸或者异亮氨酸的正亮氨酸。

[0417] 根据一些实施方案,所述多肽可以连接到其他如聚乙二醇或葡聚糖的化合物,以促进体内半衰期的增加。如本领域技术人员所理解的,这种连接可以是共价的或者非共价的。根据一些其他实施方案,所述多肽可以包裹于胶束如由聚(乙二醇)-嵌段-聚丙二醇或

聚(乙二醇)-嵌段-聚丙交酯制成的胶束中。根据一些其他实施方案,所述多肽可以包裹于由可降解的包括但不限于聚乳酸、聚乙交酯和聚己内酯的聚酯组成的可降解的纳米粒子或微粒中。

[0418] 根据另一个实施方案,所述多肽可以制备成固体形式(包括颗粒、粉末或栓剂)或液体形式(例如,溶液、悬液或乳液)。

[0419] 根据另一个实施方案,本发明的组合物可以通过吸入或吹入(分别地或者通过口或者通过鼻)递送的可分散干燥粉末的形式。干燥粉末组合物可以采用本领域已知的工艺制备,如在国际专利No. WO 91/16038和美国专利No. 6,921,527中披露的冻干法和射流粉碎法,这些文献中所公开的内容通过引用的方式并入本文。本发明的组合物以足够为受治疗者提供单位剂量治疗的量装在合适的剂量容器中。剂量容器为装配在合适的吸入装置中的剂量容器,以允许干燥粉末组合物通过分散到气流中而雾化,形成气溶胶,随后将这样产生的气溶胶捕集在具有吹嘴的腔室内,所装的吹嘴用于由需要治疗的受治疗者随后的吸入。这种剂量容器包括本领域已知的任何盛装组合物的容器,例如,带有允许将气流(例如,空气流)引导到容器中以分散干燥粉末组合物的可拆卸部分的明胶或塑料胶囊。这类容器在美国专利No. 4,227,522;美国专利No. 4,192,309;以及美国专利No. 4,105,027中被举例说明。合适的容器也包括与Glaxo's **Ventolin®** Rotohaler牌粉末吸入器或Fison's **Spinhaler®**牌粉末吸入器组合使用的那些容器。另一种提供优异的防潮屏障的合适的单位剂量容器由铝箔塑料层压材料制成。药物基粉末按重量或体积计装入用可成形箔形成的凹窝中,并用箔-塑料层压材料覆盖物气密地密封。这种与粉末吸入装置配合使用的容器在美国专利No. 4,778,054中披露,并与Glaxo's **Diskhaler®** (美国专利Nos. 4,627,432、4,811,73和5,035,237)结合使用。所有这些文献都通过引用的方式全部并入本文。

[0420] 根据另一个实施方案,本发明组合物的载体包括释放剂,例如持续释放或者延迟释放载体。在这类实施方案中,载体可以是任何能够持续释放或者延迟释放所述多肽的物质,以提供更高效的施用,例如,导致化合物的施用频率更低和/或剂量减少,改善处理的方便性,以及扩展或者延迟对正在接受治疗、预防或改善的疾病、病症、病状、综合征等的效果。此类载体的非限制性例子包括天然和合成的聚合物的脂质体、微海绵体、微球体或者微胶囊等。脂质体可以由各种包括但不限于胆固醇、硬脂胺或者磷脂酰胆碱的磷脂形成。

[0421] 用于合成和制备小肽的方法是本领域公知的并且在例如,美国专利Nos. 5,352,461; 5,503,852; 6,071,497; 6,331,318; 6,428,771和美国公开No. 0060040953中被披露。美国专利Nos. 6,444,226和6,652,885描述了制备和提供水质悬液中的二酮哌嗪微粒,在该悬液中加入活性剂的溶液以使活性物质结合到粒子上。这些专利进一步描述了通过冻干除去液体介质以产生包含活性剂的微粒的方法。改变这类悬液的溶剂条件以促进活性剂结合到粒子上在美国申请Nos. 60/717,524; 11/532,063; 和11/532,065; 美国专利No. 6,440,463; 和美国申请Nos. 11/210,709和11/208,087中被披露。这些专利和专利申请的每一份通过引用的方式并入本文。

[0422] 在一些实施方案中,本发明的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 和其功能等同物可以通过如美国申请No. 11/678,046 (通过引用的方式并入本文) 中披露的喷雾干燥法干燥。

[0423] 在又一个实施方案中,本发明的多肽可以应用在多种溶液中。合适的制剂是无菌的,溶解了足够量的多肽,并且对提出的应用是无害的。例如,本发明的组合物可以配制为水质悬液,其中活性成分与适于水质悬液制造的赋形剂混合。

[0424] 这类赋形剂包括但不限于助悬剂(例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿位伯树胶),分散剂或润湿剂包括天然存在的磷脂(例如卵磷脂),或环氧烷烃与脂肪酸的缩聚产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯),或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩聚产物(例如,十七烷基-十六烷氧烯醇(heptadecaethyleneoxycetanol)),或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇获得的偏酯的缩聚产物(例如,聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇酐获得的偏酯的缩聚产物(例如,聚乙烯失水山梨糖醇酐单油酸酯)。

[0425] 可以通过将活性成分混悬在植物油中(例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油中(例如液体石蜡)将本发明的组合物配制为油性悬液。油性悬液可以含有增稠剂(例如,蜂蜡、硬石蜡或十六醇)。

[0426] 本发明的组合物也可以配制成适于通过加入水制成水质悬液的可分散粉末和颗粒的形式。这类粉末和颗粒中的活性成分以与分散剂或润湿剂、助悬剂及一种或多种防腐剂混合的方式提供。合适的分散剂或润湿剂和助悬剂用上面已经提到的那些进行了举例说明。也可以包含另外的赋形剂。

[0427] 根据一些实施方案,所述干燥粉末由喷雾干燥法生产。

[0428] 根据一些其他实施方案,所述干燥粉末由微粉化生产。

[0429] 根据另一个实施方案,所述干燥粉末包括质量中值空气动力学直径(MMAD)为1至5微米的微粒。

[0430] 根据另一个实施方案,所述干燥粉末包括质量中值空气动力学直径(MMAD)为约2微米的微粒。

[0431] 根据另一个实施方案,所述药物组合物是包装在吸入装置中,包括,例如,但不限于雾化器、计量剂量吸入器(MDI)和干粉吸入器(DPI)。

[0432] 根据一些其他实施方案,所述药物组合物是适合于使用雾化器雾化递送的液体。根据一些这类实施方案,所述药物组合物的流速是至少0.3ml/分钟,并且所述药物组合物是作为2mm的粒子被递送,分布至最深的肺泡中。

[0433] 本发明的组合物也可以为乳液形式。乳液为通过混合两种不相溶的液体载体制备的两相体系,其中一种载体均一地分散于另一种中,并由直径等于或大于最大胶粒直径的微球组成。微球尺寸非常关键,其必须使得体系能够达到最大稳定性。通常,两相的分离将不会发生,除非掺入第三种物质,即乳化剂。因此,基本的乳液含有至少三种组分,两种不相溶的液体载体和乳化剂,以及活性成分。大部分乳液是将水相混入非水相中(或者反之亦然)。然而,制备基本上非水性的乳液是可能的,例如,甘油和橄榄油非水性不相溶体系的阴离子和阳离子表面活性剂。因此,本发明的组合物可以是水包油乳液的形式。油相可以为植物油,例如,橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或其混合物。合适的乳化剂可以为天然存在的树胶,例如,阿拉伯胶或黄芪胶,天然存在的磷脂,例如大豆磷脂、卵磷脂和从脂肪酸和己糖醇酐获得的酯类或偏酯,例如失水山梨糖醇酐单油酸酯,以及偏酯与环氧乙烷的缩聚产物,例如,聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯。

[0434] 根据一些实施方案,本发明的多肽为化学合成的。用公知的固相技术、液相技术或者肽缩合技术或者这些技术的任意组合制备的这种合成多肽可以包括天然和非天然氨基酸。用于肽合成的氨基酸可以是标准的Boc (N- α -氨基受保护的N- α -特丁氧基羰基) 氨基酸树脂,利用Merrifield的原始固相工艺的标准脱保护、中和、偶联和洗涤方案(1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154), 或者可以是最先由Carpino和Han描述(1972, J. Org. Chem. 37:3403-3409) 的碱基不稳定的N- α -氨基受保护的9-芴基甲氧羰基(Fmoc) 氨基酸。Fmoc和Boc N- α -氨基受保护的氨基酸都可以从Sigma, Cambridge Research Biochemical, 或者其他本领域人员所熟悉的其他化学公司获得。此外,多肽可以利用本领域技术人员所熟悉的其他N- α -保护基合成。固相肽合成可以用本领域技术人员所熟知的技术完成,例如,在Stewart和Young, 1984, Solid Phase Synthesis, 第二版, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields和Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214中提供的技术, 或者使用自动合成器, 每篇文献通过引用的方式全部并入本文。

[0435] II. 用于预防或治疗以异常成纤维细胞增殖和胶原蛋白沉积为特征的疾病的方法

[0436] 根据另一个方面,本发明提供一种用于治疗以受治疗者的组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病程的方法,所述方法包括:

[0437] 施用药物组合物至受治疗者,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列为 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的多肽或其功能等同物,和其药学上可接受的载体,

[0438] 其中,所述治疗量对减少受治疗者的组织中成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0439] 根据该方法的一个实施方案,所述疾病或病状是急性肺损伤(ALI) 或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0440] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是辐射诱导的纤维化。

[0441] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是移植排斥。

[0442] 根据另一个实施方案,所述组织是肺组织。

[0443] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是间质性肺病。

[0444] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是肺纤维化。

[0445] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化是特发性肺纤维化。

[0446] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化由施用博莱霉素引起。

[0447] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化由变态反应、环境颗粒物吸入、吸烟、细菌性感染、病毒性感染、对受治疗者肺部的机械损伤、肺移植排异、自体免疫性疾病、遗传性疾病或其组合引起。

[0448] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状进一步以所述组织中的炎症为特征。

[0449] 根据另一个实施方案,所述炎症是急性或慢性炎症。

[0450] 根据另一个实施方案,所述炎症由选自由肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 所组成的组的至少一种细胞因子介导。

[0451] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化是以与正常健康对照受试者相比选自由肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到胞外基质所组成的组的至少一种病变为特征。

[0452] 根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积以与正常健康对照受试者的组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的活性相比所述组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的异常活性为特征。

[0453] 根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由与正常健康对照受试者的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的量或分布相比所述组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的异常量或分布表明。

[0454] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化是以与正常健康对照受试者相比选自由肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中肌成纤维细胞群分化成肌成纤维细胞群和异常促进肌成纤维细胞附着到胞外基质所组成的组的至少一种病变为特征。

[0455] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是慢性阻塞性肺病 (COPD)。根据另一个实施方案,所述慢性阻塞性肺病 (COPD) 由吸烟引起。根据另一个实施方案,所述慢性阻塞性肺病 (COPD) 由环境颗粒物引起。根据另一个实施方案,所述慢性阻塞性肺病 (COPD) 由 α -1抗胰蛋白酶缺乏症引起。根据另一个实施方案,所述慢性阻塞性肺病 (COPD) 由儿童呼吸道感染引起。

[0456] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化是以与正常健康对照受试者相比受治疗者的肺中热休克27kDa蛋白质1 (HSPB1) 的异常活性为特征。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比受治疗者的肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积。根据另一个实施方案,所述细胞外基质蛋白是胶原蛋白。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比异常促进肺中成纤维细胞增殖。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比异常诱导肺中肌成纤维细胞分化。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比促进肺中纤维化病灶的形成。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比增加肺中肌成纤维细胞收缩性。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比异常促进肺中肌成纤维细胞附着到细胞外基质。

[0457] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制在受治疗者的肺中出现的炎症。根据另一个实施方案,所述炎症是急性炎症。根据另一个实施方案,所述炎症是慢性炎症。根据另一个实施方案,所述炎症由肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 介导。根据另一个实施方案,所述炎症由白细胞介素-1 β (IL-1 β) 介导。根据另一个实施方案,所述炎症由白细胞介素-6 (IL-6) 介导。

[0458] 根据另一个实施方案,与未处理的对照相比,所述药物组合物调节受治疗者的肺中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的量。根据另一个实施方案,与未处理的对照相比,所述药物组合物调节受治疗者的肺中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的量。根据另一个实施方案,与未处理的对照相比,所述药物组合物调节受治疗者的肺中白细胞介素-6 (IL-6) 的量。

[0459] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制受治疗者的肺中与正常健康对照受试者相比的HSPB1的异常活性。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积。根据另一个实施方案,所述细胞外基质蛋白是胶原蛋白。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相

比异常促进肺中成纤维细胞增殖。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比异常诱导肺中成纤维细胞分化成肌成纤维细胞。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比异常促进纤维化病灶形成。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比肌成纤维细胞的收缩性异常增加。根据另一个实施方案,所述肌成纤维细胞收缩性是以与正常健康对照受试者相比平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的水平升高为特征。根据另一个实施方案,所述肌成纤维细胞收缩性是以与正常健康对照受试者相比应力纤维形成增加为特征。根据另一个实施方案,所述HSPB1的异常活性是与正常健康对照受试者相比异常促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质。

[0460] 根据一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2激酶)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少50%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少75%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少80%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少85%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少90%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少95%的MK2激酶的激酶活性。

[0461] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3(MK3激酶)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少80%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少85%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少90%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少95%的MK3激酶的激酶活性。

[0462] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少80%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少85%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少90%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少95%的 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。

[0463] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激

酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0464] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3(MK3)的激酶活性。

[0465] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。

[0466] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0467] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3(MK3)的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0468] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0469] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性。

[0470] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3(MK3)的激酶活性。

[0471] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。

[0472] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0473] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3(MK3)的激酶活性。

[0474] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的的激酶活性促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)和至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。

[0475] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0476] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的激酶活性、至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3(MK3)的激酶活性、至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性和至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0477] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制选自MK2、MK3、CaMKI、TrkB的组的至少

一种激酶的激酶活性,而基本上不抑制来自本文表1中列出的余下组的一种或多种其他选择的激酶的激酶活性。

[0478] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制选自本文表1中所列出的组的激酶的激酶活性。

[0479] 根据另一个实施方案,这种抑制可以,例如,对减少所述受治疗者的组织中成纤维细胞增殖、细胞外基质沉积或其组合是有效的。

[0480] 根据另一个实施方案,这种抑制可以,例如,对减少与正常健康对照受试者相比选自由肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到胞外基质所组成的组的至少一种病变是有效的。

[0481] 根据一些实施方案,MMI抑制剂的体内抑制性取决于剂量、施用途径和响应于该抑制剂的细胞类型。

[0482] 根据此类实施方案,所述药物组合物抑制小于50%的其他选择的激酶的激酶活性。根据此类实施方案,所述药物组合物抑制小于65%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于50%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于40%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于20%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于15%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于10%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于5%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物增加其他选择的激酶的激酶活性。

[0483] 根据前述段落的实施方案,基本上不被抑制的一种或多种其他选择的激酶选自由 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CAMK II, 包括其亚基CaMK II δ)、原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PIM-1)、细胞肉瘤(c-SRC)、脾酪氨酸激酶(SYK)、C-src酪氨酸激酶(CSK)和胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)所组成的组。

[0484] 根据一些实施方案,所述药物组合物进一步包括额外的治疗剂。

[0485] 根据一些这类实施方案,所述额外的治疗剂选自由纯化的牛V型胶原蛋白(例如, IW-001; Immune Works; United Therapeutics)、IL-13受体拮抗剂(例如, QAX576; Novartis)、蛋白酪氨酸激酶抑制剂(例如, 伊马替尼(**Gleevec®**); Craig Daniels/Novartis)、内皮素受体拮抗剂(例如, ACT-064992(马西替坦); Actelion)、双重内皮素受体拮抗剂(例如, 波生坦(**Tracleer®**); Actelion)、前列环素类似物(吸入的伊洛前列素(例如, **Ventavis®**); Actelion)、抗CTGF单克隆抗体(例如, FG-3019)、内皮素受体拮抗剂(A-选择性)(例如, 安贝生坦(**Letairis®**), Gilead)、AB0024 (Arresto)、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2)单克隆抗体(例如, GS-6624 (前身为AB0024); Gilead)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂(例如, CC-930; Celgene)、吡非尼酮(例如, **Esbriet®** (InterMune)、**Pirespa®** (Shionogi))、IFN- γ 1b(例如, **Actimmune®**; InterMune)、抗所有三种TGF- β 亚型的泛中和IgG4人类抗体(例如, GC1008; Genzyme)、TGF- β 活化抑制剂(例如, Stromedix (STX-100))、

重组人Pentraxin-2蛋白(rhPTX-2)(例如,PRM151;Promedior)、IL4/IL13双特异性抗体(例如,SAR156597;Sanofi)、靶向整合素 $\alpha v\beta 6$ 的人源化单克隆抗体(BIBF 1120;Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸(Zambon SpA)、西地那非(**Viagra®**;)、TNF拮抗剂(例如,依那西普(**Enbrel®**);Pfizer)、糖皮质激素(例如,泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松和糠酸氟替卡松)、支气管扩张剂(例如,白三烯调节剂(例如,孟鲁司特(**SINGUAIR®**))、抗胆碱能支气管扩张剂(例如,异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 $\beta 2$ -激动剂(例如,甲磺酸乙基异丙肾上腺素(**Bronkometer®**))、肾上腺素、salbutamol/沙丁胺醇和特布他林)、长效 $\beta 2$ -激动剂(例如,沙美特罗、福莫特罗、indacaterol(**Onbrez®**))和其组合。

[0486] 根据一些其他实施方案,所述额外的治疗剂包括支气管扩张剂,包括但不限于白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、 $\beta 2$ -激动剂或其组合。

[0487] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括皮质类固醇,包括但不限于泼尼松、布地奈德、莫米松、丙酸倍氯松或其组合。

[0488] 根据一些其他实施方案,所述额外的治疗剂包括支气管扩张剂,包括但不限于白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、 $\beta 2$ -激动剂或其组合。

[0489] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括皮质类固醇,包括但不限于泼尼松、布地奈德、莫米松、丙酸倍氯松或其组合。

[0490] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是抗炎剂。

[0491] 根据另一个实施方案,所述抗炎剂是非甾体类抗炎剂。也可以使用这些非甾体抗炎剂的混合物,以及皮肤病学上可接受的盐和这些药剂的酯类。例如,依托芬那酯,一种氟芬那酸衍生物,对局部施用特别有用。

[0492] 根据另一个实施方案,其中,所述非甾体类抗炎剂包括转化生长因子- $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$)、抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 剂或其组合。

[0493] 根据另一个实施方案,所述抗炎剂是甾体抗炎剂。根据另一个实施方案,所述甾体抗炎剂包括选自泼尼松、布地奈德、莫米松、丙酸倍氯松和其组合所组成的组的至少一种皮质类固醇。

[0494] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括甲基黄嘌呤。

[0495] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂。

[0496] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是至少一种中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂,包括但不限于ICI 200355、ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616、TEI-8362、ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892、ZD-8321和其组合。

[0497] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括至少一种磷酸二酯酶抑制剂,包括但不限于磷酸二酯酶4抑制剂。磷酸二酯酶4抑制剂的实例包括但不限于罗氟司特、西洛司特或其组合。

[0498] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是镇痛剂。根据一些这类实施方案,所述镇痛剂是非阿片类镇痛剂。根据一些其他实施方案,所述镇痛药是阿片类镇痛剂。

[0499] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方案,所述

抗感染剂是抗生素剂。

[0500] 根据一些实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有基本的序列同一性。

[0501] 根据一些这类实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少70%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少80%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少90%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少95%的序列同一性。

[0502] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。

[0503] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。

[0504] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。

[0505] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。

[0506] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。

[0507] 根据一些其他实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),并且所述第二多肽包括序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有基本同一性的治疗性结构域。

[0508] 根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少70%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少80%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少90%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少95%的序列同一性。

[0509] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)的多肽。

[0510] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVA (SEQ ID NO:9)的多肽。

[0511] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是氨基酸序列为KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10)的多肽。

[0512] 根据一些实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽包括功能上

与YARAAARQARA (SEQ ID NO:11) 等同的细胞渗透肽,并且所述第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2),并且所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性。

[0513] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12) 的多肽。

[0514] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKA (SEQ ID NO:13) 的多肽。

[0515] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14) 的多肽。

[0516] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRR (SEQ ID NO:15) 的多肽。

[0517] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16) 的多肽。根据一些这类实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17) 的多肽。根据一些这类实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18) 的多肽。

[0518] 根据另一个方面,本发明还提供了一种分离的核酸,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0519] 根据一些这类实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其他实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其他实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0520] 根据另一个实施方案,所述施用步骤可以通过吸入、通过吹入以经口、经颊、肠胃外、局部的方式全身性地或直肠地发生,或者可以通过例如但不限于注射、植入、移植、局部用药的方式局部地或肠胃外地发生。额外的施用可以以例如,静脉内、透粘膜、透皮、肌内、皮下、气管内(包括通过肺部吸入)、腹腔内、鞘内、淋巴管内、病灶内或硬膜外的方式进行。施用可以以单独的单元剂量或者以包括多种药物和/或物质的多个单元剂量的治疗方案的形式进行,例如,一次、多次和/或经过一个或多个延长的时间段。

[0521] 根据一些其他实施方案,所述施用步骤是以单剂量发生一次。根据一些其他实施方案,所述施用步骤是以多个剂量在一段时间内进行。根据一些这类实施方案,所述一段时间是一日、一周、一个月、一个月、一年、或其倍数。根据一些实施方案,所述施用步骤是每日进行持续至少一周的时间段。根据一些实施方案,所述施用步骤是每周进行持续至少一个月的时间段。根据一些实施方案,所述施用步骤是每月进行持续至少两个月的时间段。根据另一个实施方案,所述施用步骤是反复进行持续至少一年的时间段。根据另一个实施方案,所述施用步骤是每月进行至少一次。根据另一个实施方案,所述施用步骤是每周进行至少一次。根据另一个实施方案,所述施用步骤是每日进行至少一次。

[0522] 根据一些其他实施方案,通过吸入装置施用所述治疗量的所述药物组合物。可以

用于施用所述药物组合物的吸入装置包括但不限于雾化器、计量剂量吸入器 (MDI)、干粉吸入器 (DPI) 和干粉雾化器。

[0523] 根据另一个实施方案,所述干燥粉末包括质量中值空气动力学直径 (MMAD) 为1至5微米的微粒。根据另一个实施方案,所述干燥粉末包括质量中值空气动力学直径 (MMAD) 为约2微米的微粒。

[0524] 根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.00001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.0001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.001mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.01mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.1mg/kg (或100ug/kg) 体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约1mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约10mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约2mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约3mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约4mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约5mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约60mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约70mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约80mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约90mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约90mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约80mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约70mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约60mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约50mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约40mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约30mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约20mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约1mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约0.1mg/kg体重的量。根据另一个

实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约0.1mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约0.01mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约0.001mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约0.0001mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约0.00001mg/kg体重的量。

[illegible]

药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从95 μ g/kg/日至100 μ g/kg/日。

[0526] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是1 μ g/kg/日。

[0527] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是2 μ g/kg/日。

[0528] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是5 μ g/kg/日。

[0529] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是10 μ g/kg/日。

[0530] III. 用于预防或治疗以异常成纤维细胞增殖和胶原蛋白沉积为特征的疾病的系统

[0531] 根据另一个方面,本发明提供了一种用于治疗以受治疗者的组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积为特征的疾病、病状或病程的系统,

[0532] 其中,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列为YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等同物,和其药学上可接受的载体,并且

[0533] 其中,所述治疗量对减少受治疗者的组织中成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0534] 根据该方法的一个实施方案,所述疾病或病状是急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0535] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是辐射诱导的纤维化。

[0536] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是移植排斥。

[0537] 根据另一个实施方案,所述组织是肺组织。

[0538] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是间质性肺病。

[0539] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状是肺纤维化。

[0540] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化是特发性肺纤维化。

[0541] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化由施用博莱霉素引起。

[0542] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化由变态反应、环境颗粒物吸入、细菌性感染、病毒性感染、对受治疗者肺部的机械损伤、肺移植排异、自体免疫性疾病、遗传性疾病或其组合引起免疫失调。

[0543] 根据另一个实施方案,所述疾病或病状进一步以所述组织中的炎症为特征。

[0544] 根据另一个实施方案,所述炎症是急性或慢性炎症。

[0545] 根据另一个实施方案,所述炎症由选自由肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的所组成的组的至少一种细胞因子介导。

[0546] 根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积以与正常健康对照受试者的组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的活性相比所述组织中促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的异常活性为特征。

[0547] 根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由与正常健康对照受试者的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的量或分布相比所述组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)的异常量或分布证明。

[0548] 根据另一个实施方案,所述肺纤维化是以与正常健康对照受试者相比选自由肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中成纤维细胞

群分化成肌成纤维细胞群和异常促进肌成纤维细胞附着到胞外基质的至少一种病变为特征。

[0549] 根据另一个实施方案,所述可药用载体包括但不限于控释载体、延迟释放载体、持续释放载体和长期释放载体。

[0550] 根据另一个实施方案,所述吸入装置是雾化器。

[0551] 根据另一个实施方案,所述吸入装置是计量剂量吸入器(MDI)。

[0552] 根据另一个实施方案,所述吸入装置是干粉吸入器(DPI)。

[0553] 根据另一个实施方案,所述吸入装置是干粉雾化器。

[0554] 根据另一个实施方案,所述药物组合物呈干燥粉末的形式。

[0555] 根据另一个实施方案,所述干燥粉末包括质量中值空气动力学直径(MMAD)为1至5微米的微粒。

[0556] 根据另一个实施方案,所述干燥粉末包括质量中值空气动力学直径(MMAD)为约2微米的微粒。

[0557] 根据一些实施方案,所述药物组合物进一步包括额外的治疗剂。

[0558] 根据一些这类实施方案,所述额外的治疗剂选自自由纯化的牛V型胶原蛋白(例如, IW-001; Immune Works; United Therapeutics)、IL-13受体拮抗剂(例如, QAX576; Novartis)、蛋白酪氨酸激酶抑制剂(例如, 伊马替尼(**Gleevec®**); Craig Daniels/Novartis)、内皮素受体拮抗剂(例如, ACT-064992(马西替坦); Actelion)、双重内皮素受体拮抗剂(例如, 波生坦(**Tracleer®**); Actelion)、前列环素类似物(吸入的伊洛前列素(例如, **Ventavis®**); Actelion)、抗CTGF单克隆抗体(例如, FG-3019)、内皮素受体拮抗剂(A-选择性)(例如, 安贝生坦(**Letairis®**), Gilead)、AB0024 (Arresto)、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2)单克隆抗体(例如, GS-6624 (前身为AB0024); Gilead)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂(例如, CC-930; Celgene)、吡非尼酮(例如, **Esbriet®** (InterMune)、**Pirespa®** (Shionogi))、IFN- γ 1b(例如, **Actimmune®**; InterMune)、抗所有三种TGF- β 亚型的泛中和IgG4人类抗体(例如, GC1008; Genzyme)、TGF- β 活化抑制剂(例如, Stromedix (STX-100))、重组人Pentraxin-2蛋白(rhPTX-2)(例如, PRM151; Promedior)、IL4/IL13双特异性抗体(例如, SAR156597; Sanofi)、靶向整合素 α v β 6的人源化单克隆抗体(BIBF 1120; Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸(Zambon SpA)、西地那非(**Viagra®**;)、TNF拮抗剂(例如, 依那西普(**Enbrel®**); Pfizer)、糖皮质激素(例如, 泼尼松、布地奈德、糠酸莫米松、丙酸氟替卡松和糠酸氟替卡松)、支气管扩张剂(例如, 白三烯调节剂(例如, 孟鲁司特(**SINGUAIR®**))、抗胆碱能支气管扩张剂(例如, 异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 β 2-激动剂(例如, 甲磺酸乙基异丙肾上腺素(**Bronkometer®**))、肾上腺、salbutamol/沙丁胺醇和特布他林)、长效 β 2-激动剂(例如, 沙美特罗、福莫特罗、茚达特罗(indacaterol) (**Onbrez®**))和其组合。

[0559] 根据一些其他实施方案,所述额外的治疗剂包括支气管扩张剂,包括但不限于白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、 β 2-激动剂或其组合。

[0560] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括皮质类固醇,包括但不限于泼尼松、布地奈德、莫米松、丙酸倍氯松或其组合。

[0561] 根据一些这类实施方案,所述额外的治疗剂包括支气管扩张剂,包括但不限于白三烯调节剂、抗胆碱能支气管扩张剂、 β_2 -激动剂或其组合。

[0562] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括皮质类固醇,包括但不限于泼尼松、布地奈德、莫米松、丙酸倍氯松或其组合。

[0563] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是抗炎剂。

[0564] 根据另一个实施方案,所述抗炎药是非甾体类抗炎剂。也可以使用这些非甾体抗炎剂的混合物,以及皮肤病学上可接受的盐和这些物质的酯类。例如,依托芬那酯,一种氟芬那酸衍生物,对局部施用特别有用。

[0565] 根据另一个实施方案,其中,所述非甾体类抗炎剂包括转化生长因子- β_3 (TGF- β_3)、抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 剂或其组合。

[0566] 根据另一个实施方案,所述抗炎剂是甾体抗炎剂。根据另一个实施方案,所述甾体抗炎剂包括选自泼尼松、布地奈德、莫米松、丙酸倍氯松和其组合所组成的组的至少一种皮质类固醇。

[0567] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括甲基黄嘌呤。

[0568] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂。

[0569] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是至少一种中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂,包括但不限于ICI 200355、ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616、TEI-8362、ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892、ZD-8321和其组合。

[0570] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂包括至少一种磷酸二酯酶抑制剂,包括但不限于磷酸二酯酶4抑制剂。磷酸二酯酶4抑制剂的实例包括但不限于罗氟司特、西洛司特或其组合。

[0571] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是镇痛剂。根据一些这类实施方案,所述镇痛剂是非阿片类镇痛剂。根据一些其他实施方案,所述镇痛药是阿片类镇痛剂。

[0572] 根据另一个实施方案,所述额外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方案,所述抗感染剂是抗生素剂。

[0573] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制在受治疗者的肺中出现的炎症。根据另一个实施方案,所述炎症是急性炎症。根据另一个实施方案,所述炎症是慢性炎症。根据另一个实施方案,所述炎症由升高的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平介导。根据另一个实施方案,所述炎症由升高的白细胞介素-6 (IL-6) 的水平介导所述炎症。根据另一个实施方案,所述炎症由升高的白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的水平介导。

[0574] 根据另一个实施方案,与未处理的对照相比,所述药物组合物调节受治疗者的肺中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的量。根据另一个实施方案,与未处理的对照相比,所述药物组合物调节受治疗者的肺中白细胞介素-6 (IL-6) 的量。根据另一个实施方案,与未处理的对照相比,所述药物组合物调节受治疗者的肺中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的量。

[0575] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制HSPB1的活性。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是异常诱导成纤维细胞增殖。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是异常诱导成纤维细胞群分化成肌成纤维细胞群。

根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是细胞外基质蛋白沉积至肺间质中。根据另一个实施方案,所述细胞外基质蛋白是胶原蛋白。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是促进纤维化病灶形成。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是增加肌成纤维细胞收缩性。根据另一个实施方案,由所述药物组合物抑制的HSPB1的活性是促进肌成纤维细胞附着到细胞外基质。

[0576] 根据另一个实施方案,所述组织中异常成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由与正常健康对照受试者的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的量或分布相比所述组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的异常量或分布表明。

[0577] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制选自本文表1中所列出的组的激酶的激酶活性。

[0578] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少50%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少75%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少80%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少85%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少90%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少95%的所述激酶的激酶活性。

[0579] 根据一些实施方案,MMI抑制剂的体内抑制性取决于剂量、施用途径和响应于该抑制剂的细胞类型。

[0580] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少50%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少75%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少80%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少85%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少90%的所述激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少95%的所述激酶的激酶活性。

[0581] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2激酶) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少50%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少75%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少80%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少85%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少90%的MK2激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少95%的MK2激酶的激酶活性。

[0582] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3激酶) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的MK3激酶的激酶活性。

酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少80%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少85%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少90%的MK3激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少95%的MK3激酶的激酶活性。

[0583] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少80%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少85%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少90%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少95%的Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0584] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少50%的BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少70%的BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物进一步抑制至少75%的BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0585] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0586] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0587] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0588] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0589] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0590] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性。

[0591] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0592] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0593] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0594] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0595] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0596] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0597] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、至少65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性、至少65%的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性和至少65%的BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0598] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制选自MK2、MK3、CaMKI、TrkB的组的至少一种激酶的激酶活性,而基本上不抑制来自本文表1中列出的余下组的一种或多种其他选择的激酶的活性。

[0599] 根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制选自本文表1中所列出的组的激酶的激酶活性。

[0600] 根据另一个实施方案,这种抑制可以,例如,对减少所述受治疗者的组织中成纤维细胞增殖、细胞外基质沉积或其组合是有效的。

[0601] 根据另一个实施方案,这种抑制可以,例如,对减少与正常健康对照受试者相比选自由肺间质中细胞外基质蛋白异常沉积、异常促进肺中成纤维细胞增殖、异常诱导肺中肌成纤维细胞分化和异常促进肌成纤维细胞附着到胞外基质所组成的组的至少一种病变是有效的。

[0602] 根据一些实施方案,MMI抑制剂的体内抑制性取决于剂量、施用途径和响应于该抑制剂的细胞类型。

[0603] 根据此类实施方案,所述药物组合物抑制小于50%的其他选择的激酶的激酶活性。根据此类实施方案,所述药物组合物抑制小于65%的其他选择的激酶的激酶活性。根据此类实施方案,所述药物组合物抑制小于50%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于40%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于20%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于15%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于10%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物抑制小于5%的其他选择的激酶的激酶活性。根据另一个实施方案,所述药物组合物增加其他选择的激酶的激酶活性。

[0604] 根据前述段落的实施方案,基本上不被抑制的一种或多种其他选择的激酶选自由 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CAMK II, 包括其亚基CaMK II δ)、原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (PIM-1)、细胞肉瘤 (c-SRC)、脾酪氨酸激酶 (SYK)、C-src酪氨酸激酶 (CSK) 和胰岛素样生长因子1受体 (IGF-1R) 所组成的组。

[0605] 根据一些实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有基本的序列同一性。

[0606] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%的序列同一性。根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%的序列同一性。

[0607] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。

[0608] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。

[0609] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。

[0610] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。

[0611] 根据另一个实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。

[0612] 根据一些其他实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),并且所述第二多肽包括序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有基本同一性的治疗性结构域。

[0613] 根据另一个实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少70%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少80%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少90%的序列同一性。根据一些其他实施方案,所述第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少95%的序列同一性。

[0614] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是的多肽氨基酸序列为KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)。

[0615] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是的多肽氨基酸序列为KALARQLGVA (SEQ ID NO:9)。

[0616] 根据另一个实施方案,所述第二多肽是的多肽氨基酸序列为KALARQLGVAA (SEQ ID

NO:10)。

[0617] 根据一些其他实施方案,所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等同物是包括有效连接到第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中,所述第一多肽包括功能上与YARAAARQARA (SEQ ID NO:11)等同的细胞渗透肽,并且所述第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。

[0618] 根据又一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12)的多肽。

[0619] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKA (SEQ ID NO:13)的多肽。

[0620] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)的多肽。

[0621] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为WLRRIKAWLRRRI (SEQ ID NO:15)的多肽。

[0622] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽。

[0623] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为KAFAKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多肽。

[0624] 根据另一个实施方案,所述第一多肽是氨基酸序列为HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。

[0625] 根据另一个方面,本发明还提供了一种分离的核酸,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少70%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些这类实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少80%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些这类实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少90%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些这类实施方案,所述分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少95%的氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0626] 根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.000001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.00001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.0001mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.001mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.01mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约0.1mg/kg (100ng/kg) 体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约1mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约10mg/kg体重至约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量是从约2mg/kg体重至约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗

[illegible]

[0627] 根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从1μg/kg/日至25μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从1μg/kg/日至2μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从2μg/kg/日至3μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从3μg/kg/日至4μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从4μg/kg/日至5μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从5μg/kg/日至6μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从6μg/kg/日至7μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从7μg/kg/日至8μg/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的

治疗剂量的范围从8 μ g/kg/日至9 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从9 μ g/kg/日至10 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从1 μ g/kg/日至5 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从5 μ g/kg/日至10 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从10 μ g/kg/日至15 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从15 μ g/kg/日至20 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从25 μ g/kg/日至30 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从30 μ g/kg/日至35 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从35 μ g/kg/日至40 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从40 μ g/kg/日至45 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从45 μ g/kg/日至50 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从50 μ g/kg/日至55 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从55 μ g/kg/日至60 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从60 μ g/kg/日至65 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从65 μ g/kg/日至70 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从70 μ g/kg/日至75 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从80 μ g/kg/日至85 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从85 μ g/kg/日至90 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从90 μ g/kg/日至95 μ g/kg/日。根据一些其他实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量的范围从95 μ g/kg/日至100 μ g/kg/日。

[0628] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是1 μ g/kg/日。

[0629] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是2 μ g/kg/日。

[0630] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是5 μ g/kg/日。

[0631] 根据另一个实施方案,所述药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是10 μ g/kg/日。

[0632] 在本申请内,除非另外声明,所采用的技术可以在几篇公知的参考文献中找到,例如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook等人,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press),Gene Expression Technology (Methods in Enzymology,Vol.185,D.Goeddel编著,1991.Academic Press,San Diego,CA),“Guide to Protein Purification”in Methods in Enzymology (M.P.Deutschcer,ed.,(1990)Academic Press, Inc.);PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications (Innis等人1990.Academic Press,San Diego,CA),Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,第二版,(R.I.Freshney.1987.Liss,Inc.New York,NY)和Gene Transfer and Expression Protocols,第109-128页,ed.E.J.Murray,The Humana Press Inc.,Clifton,N.J.),全部这些文献通过引用方式并入本文。

[0633] 除非另有定义,在本文中使用的所有技术和科学术语如本发明所属领域的普通技

术人员通常理解的那样,具有相同的含义。尽管任何与本文中所述的那些类似或等同的方法和材料也可用在本发明的实施和试验中,但现在对优选的方法和材料进行描述。在本文中所提及的所有公开出版物通过引用的方式并入本文,以结合引用的公开出版物披露和描述这些方法和/或材料。

[0634] 在提供数值范围的情况下,除非文中另外明确指明,应当理解为在该范围及任一其他所描述范围的上限和下限之间的每一个中间值,到下限单位的十分之一,或在所描述范围内的中间值均包括在本发明的范围内。被独立地包括在这些较小范围内的这些较小的范围的上限和下限也都包括在本发明的范围内,在所描述的范围内的任何明确排除的界限。当所描述的范围包括一个或者两个界限时,排除这些所包括的界限的两者中任一个的范围也包括在本发明中。

[0635] 也必须指出,如本文和所附权利要求书中所用的,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数指示,除非上下文另外清楚地说明。本文中所用的全部技术与科学术语具有相同的含义。

[0636] 本文中讨论的公开出版物以引用的方式全部并入本文并且被提供仅是因为它们公开于本发明的申请日之前。本文中并没有内容可理解为承认本发明由于在先发明而不能早于这样的出版物。此外,所提供的公开日也可能不同于需要独立核实的实际公开日。

[0637] 本领域技术人员应当理解的是,在不偏离本发明的真实精神和范围的情况下可以做出各种变化并且可以用等同物进行替换。另外,可以做出许多修改以使特定的情况、材料、物质的组成、工艺、工艺步骤适合本发明的客观精神和范围。所有这类修改均是在所附权利要求的范围之内。

[0638] 实施例

[0639] 提出以下的实施例,以便为本领域普通技术人员提供如何做出和使用本发明的完整公开和描述,并不是用来限制发明人认为的本发明的范围,也不是用来代表下面的实验是所有实验或者仅做了的实验。已经为确保有关所用数值(例如用量、温度等等)的准确度作出了努力,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,份数为重量份,分子量为重均分子量,温度为摄氏温度,压力为大气压或接近大气压。

[0640] I. 材料与方法

[0641] MMI-0100药物开发

[0642] 为了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)生产的良好作业规范(GMP),将大约1kg Fmoc-Ala-Wang树脂转移到50L配备机械搅拌器的玻璃固相合成反应釜中。在排掉DMF之前使树脂在二甲基甲酰胺(DMF)中溶胀不少于(NLT)2小时。随后用连续的DMF冲洗洗涤树脂珠。通过用在DMF中的20%哌啶处理除去N-端保护基(即Fmoc)(解封闭步骤),并且用DMF洗涤树脂。在存在1-羟基苯并三唑(HOBt)和二异丙基碳二亚胺(DIC)的情况下偶联序列中紧接着的氨基酸。通常,对于该合成规模偶联使用2.5-3.5摩尔当量的Fmoc-氨基酸(Fmoc-AA)。将Fmoc-AA溶解于DMF中,并通过增加HOBt和DIC活化。各偶联的完成由茚三酮试验监测。如果偶联未完成,通过使用对称酸酐法采用相同的氨基酸进行二次偶联。通常,对于该合成规模偶联使用3.0-6.0摩尔当量的Fmoc-AA。将Fmoc-AA溶解于二氯甲烷(DCM)和很小体积的DMF中,并且通过以Fmoc-AA/DIC=1.0/0.5的摩尔比增加DIC活化。当完成全部肽序列时,用连续的DMF和MeOH洗涤剂彻底地冲洗肽树脂。随后将树脂在真空下干燥

NLT3小时。总的干肽树脂的典型的回收量是大约2800g,表示肽树脂的产率是约65%。

[0643] 随后将大约370-500g的肽树脂转移到适当大小的配备磁力搅拌棒的玻璃瓶中。将装有肽树脂的烧瓶在冰/水浴或冰箱中冷却不多于30分钟。将三氟乙酸(TFA)裂解混合物(比例为95mL:2.5mL:2.5mL的TFA、TIS和水的混合物)在冰/水浴预冷不多于30分钟。将大约8-12mL的TFA裂解混合物/g树脂增加到该容器中。一旦肽树脂和TFA混合物混合,就将冰/水浴移去并且将反应混合物在室温下搅拌2-3小时。随后将反应混合物通过粗玻璃过滤器过滤并且将树脂用每次洗涤0.5-1.0mL TFA/g树脂洗涤两次。收集合并的滤液并且弃去树脂。随后以每10mL乙醚1mL滤液的比例将滤液增加到在冰箱中预冷不多于30分钟的乙醚中以沉淀裂解肽。将肽-乙醚混合物平衡至室温不多于30分钟。在介质玻璃过滤器上收集沉淀的肽。用冷乙醚将沉淀物彻底洗涤3次,使用足够的乙醚以至少覆盖过滤器上的全部沉淀物。随后通过相同的介质玻璃过滤器将乙醚洗脱。将粗肽转移到塑料瓶中并且置于与机械真空泵连接的干燥器中干燥不多于12小时。在干燥后,将粗肽贮存于 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。重复裂解程序多次直至全部肽树脂被裂解。总的干燥粗肽的典型批回收量是大约1250g,表示裂解产率是大约110%。

[0644] 通过溶解肽在HPLC缓冲液中以最终粗肽浓度为20mg/ml来制备用于高效液相色谱(HPLC)纯化的来自裂解的粗肽。将肽溶液通过 $1\mu\text{m}$ 玻璃滤膜过滤并加载到通过制备型HPLC系统操作的C18反相柱上。洗涤和平衡所述柱。用线性梯度将粗肽从柱上洗脱。在各粗纯化后,使用Kromasil C18, $5\mu\text{m}$, 100 \AA 4.6x 250mm柱通过分析型HPLC系统分析馏分。基于每种馏分的HPLC纯度和杂质谱汇集从初步纯化产生的馏分。将肽汇集物贮存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下直到进一步处理。重复该过程直到全部粗肽通过HPLC柱纯化并且符合Main Pool纯度标准。通过HPLC进行盐交换成乙酸盐。将最终的肽溶液通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器过滤并加载到托盘式冷冻干燥机上。在冻干循环开始之前将肽在 40°C 下预冷冻不多于720分钟。冻干需要大约5日。纯化和冻干步骤产生大约50-55%的最终产率。

[0645] 放射性 IC_{50} 测定

[0646] 从10-点半对数稀释曲线估算 IC_{50} 值。将肽供应到二甲基亚砜(DMSO)中。特别地,将人重组MK2(h) (5-10mU)与50mM3-甘油磷酸钠($\text{pH}=7.5$)、0.1mM EGTA、30 μM 底物肽(KKLNRTLVA;SEQ ID NO:21)、10mM乙酸镁和90 μM γ - ^{33}P -ATP(最终体积为25 μL)在室温下孵育40分钟。随后,用3%磷酸终止反应。将10 μL 该混合物点到P30滤板(filtermat)上并用75mM磷酸洗涤3次持续5分钟和用甲醇洗涤1次。最后,将膜干燥并使用闪烁计数器。由于Hayess和Benndorf(Biochem Pharmacol,1997,53(9):1239-47)表明了它们的初始抑制肽(即,肽KKKALNRQLGVAA;SEQ ID NO:22)的机制与ATP结合不是竞争性的,因此选择了在15 μM 的ATP表观 K_m 之内的ATP浓度。

[0647] 除测定MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的 IC_{50} 值之外,还使用Millipore的 IC_{50} 图表达服务(ProfilerExpress Service)(Millipore,Billerica,MA)测试了对266种人类激酶的抑制活性。

[0648] 对于特异性分析,使用了溶解于二甲基亚砜(DMSO)中的MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1),MMI-0200(YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19),MMI-0300(FAKLAARLYRKALARQLGVAA;SEQ ID NO:3),MMI-0400(KAFKLAARLYRKALARQLGVAA;SEQ ID NO:4)和MMI-0500(HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA;SEQ ID

NO:7) 各100 μ m。选择了100 μ M浓度,因为在体内研究中该浓度抑制粘附形成(如2009年10月20日提交的美国申请No.12/582,516中所公开的,该申请的内容通过引用的方式全部并入本文)。对各激酶活性进行两次测定。

[0649] 组织化学和免疫组织化学

[0650] 通过将0.025U博莱霉素/PBS经气管内地施用至C57BL/6小鼠产生肺纤维化小鼠模型。经腹腔内或通过雾化吸入每日施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19) (以每日50 μ g/kg、75 μ g/kg和100 μ g/kg的剂量),在博莱霉素损伤后第7日(用于炎症后/纤维化前期分析;预防模型)或在博莱霉素损伤后第14日(用于纤维化后期分析;治疗模型)开始,直到博莱霉素递送后第21或28日。在博莱霉素递送后第21日(用于预防模型)或在博莱霉素递送后第28日(用于治疗模型),用戊巴比妥钠注射(120mg/kg)处死小鼠组并将胸腔打开。将右主干支气管结扎并摘除右肺。对气管插管并在21cm H₂O压力下用4%甲醛灌注左肺。随后将组织块包埋在石蜡中,并且制备4-mm切片用于染色。将来自各只动物的切片用苏木精和伊红(H&E)染色以使细胞可视或用马松三色染色以突出胶原蛋白沉积。在孵育后,用0.2%醋酸洗涤切片,通过浸没至95%乙醇中脱水,并且在染色皿中用二甲苯清洁(3-4次)。用有机封固介质将染色的切片安装到标记的玻璃载片上。

[0651] II. 结果

[0652] 实施例1.MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的IC₅₀和特异性。

[0653] 使用Millipore的IC₅₀谱表达服务测定MK2抑制肽(MMI-0100; YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1))的IC₅₀(半数最大抑制浓度)值。该定量测定法测定抑制50%的特定生物学过程或过程的组成部分(即,酶、细胞或细胞受体)需要多少抑制剂[IC₅₀]。特别地,在这些测定中,如果激酶不被抑制肽抑制,则用来自ATP的放射性标记的磷酸基将带正电荷的底物磷酸化。随后带正电荷的底物被带负电荷的滤膜吸引,用闪烁计数器定量,并且与100%活性对照比较。

[0654] 选择了在15 μ M的ATP表观K_m之内的ATP浓度,因为接近该K_m的ATP浓度可能允许激酶具有相同相对量的磷酸化活性。测定了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的IC₅₀为22 μ M。

[0655] 除了测定该化合物的IC₅₀之外,还通过分析可用于Millipore激酶谱服务中的测试的全部266种人类激酶的活性评估了MK2抑制肽的特异性(表1)。为了分析,测定了被MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1);MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19);MMI-0300 (FAKLAARLYRKALARQLGVAA;SEQ ID NO:3);MMI-0400 (KAFKLAARLYRKALARQLGVAA;SEQ ID NO:4);和MMI-0500 (HRRKAWLKKIKALARQLGVAA;SEQ ID NO:7)抑制高于65%的激酶。

[0656] 如表1中所示,在100 μ M,MK2抑制肽MMI-0100 (SEQ ID NO:1)、MMI-0200 (SEQ ID NO:19)、MMI-0300 (SEQ ID NO:3);MMI-0400 (SEQ ID NO:4);和MMI-0500 (SEQ ID NO:5)抑制特定组的激酶并显示了非常有限的脱靶激酶抑制作用。更具体地,MK2抑制肽MMI-0100 (SEQ ID NO:1)、MMI-0200 (SEQ ID NO:19)、MMI-0300 (SEQ ID NO:3);MMI-0400 (SEQ ID NO:4);和MMI-0500 (SEQ ID NO:5)在体外抑制高于65%的促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶2(MK2)、促分裂原活化蛋白激酶活化的蛋白激酶3(MK3)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激

酶I (CaMKI, 丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶) 和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB, 酪氨酸激酶) 的激酶活性。

[0657] 表1. 激酶谱测定

[0658]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μ M)	MMI-11.VIII (SEQ ID NO: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μ M)
Abl(h)	136	107	69	84	16
Abl (H396P) (h)	130	121	101	105	51
Abl (M351T)(h)	128	119	90	121	61
Abl (Q252H) (h)	105	107	82	98	40
Abl(T315I)(h)	98	108	97	105	16
Abl(Y253F)(h)	104	102	86	78	29
ACK1(h)	106	97	104	95	64
ALK(h)	118	95	19	16	12
ALK4(h)	124	152	140	130	81
Arg(h)	89	82	72	84	22
AMPK α 1(h)	107	108	71	87	35
AMPK α 2(h)	121	88	54	58	9
ARK5(h)	108	93	78	69	20
ASK1(h)	100	101	80	69	-4
Aurora-A(h)	120	107	92	119	110
Aurora-B(h)	94	166	128	150	5
Axl(h)	81	99	52	41	12
Bmx(h)	62	76	N/D	26	45
BRK(h)	70	127	35	18	41
BrSK1(h)	100	93	67	76	72

[0659]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μ M)	MMI-II.VIII (SEQ ID NO: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μ M)
BrSK2(h)	129	102	83	86	84
BTk(h)	112	100	102	94	18
BTk(R28H)(h)	91	104	74	24	10
CaMK I (h)	13	21	1	0	-1
CaMK II β (h)	58	53	2	11	3
CaMK II γ (h)	106	94	5	3	3
CaMK I δ (h)	59	47	10	17	0
CaMK II δ (h)	89	2	1	2	1
CaMKIV(h)	87	71	17	18	-1
CDK1/cyclinB(h)	96	115	73	74	57
CDK2/cyclinA(h)	97	114	86	92	87
CDK2/cyclinE(h)	106	112	94	83	19
CDK3/cyclinE(h)	106	104	94	92	8
CDK5/p25(h)	114	97	89	92	66
CDK5/p35(h)	94	92	79	76	59
CDK6/cyclinD3 (h)	103	100	86	85	23
CDK7/cyclinH/MAT1 (h)	89	67	65	47	15
CDK9/cyclin TI(h)	228	103	91	235	6
CHK1(h)	97	115	91	87	65
CHK2(h)	104	105	66	54	13
CHK2(I157T)(h)	97	85	43	41	3
CHK2(R145W) (h)	97	81	33	31	3
CKI γ 1(h)	110	98	111	116	109
CKI γ 2(h)	119	104	123	114	119
CKI γ 3(h)	105	96	125	115	114
CKI δ (h)	115	92	92	93	78
CK2(h)	90	83	90	101	93
CK2 α 2(h)	104	88	105	96	103
CLK2(h)	88	97	103	116	116
CLK3(h)	108	76	61	84	76
cKit(h)	95	110	53	43	45
cKit(D816V)(h)	117	118	60	35	30
cKit(D816H)(h)	79	106	126	143	194
cKit(V560G)(h)	94	115	102	124	198
cKit(V654A)(h)	69	113	134	150	223
CSK(h)	70	33	49	16	2
c-RAF(h)	97	115	107	102	19
eSRC(h)	70	32	26	14	30
DAPK1(h)	97	113	46	36	0
DAPK2(h)	41	92	32	16	3
DCAMKL2(h)	146	131	81	70	56
DDR2(h)	105	104	94	95	79
DMPK(h)	60	66	59	54	12
DRAK1(h)	47	34	14	14	8
DYRK2(h)	99	142	155	195	127
eEF-2K(h)	113	136	91	43	43

[0660]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μ M)
EGFR(h)	95	83	21	16	-1
EGFR(L858R)(h)	76	120	N/D	52	26
EGFR(L861Q)(h)	53	74	25	22	15
EGFR(T790M)(h)	106	113	100	106	70
EGFR(T790M,L858R)(h)	93	108	85	78	53
EphA1(h)	114	136	73	61	40
EphA2(h)	58	95	31	17	N/D
EphA3(h)	107	117	6	12	33
EphA4(h)	110	127	88	65	48
EphA5(h)	110	123	18	24	42
EphA7(h)	193	220	159	222	189
EphA8(h)	181	133	93	146	337
EphB2(h)	68	128	18	22	70
EphB1(h)	99	95	44	58	37
EphB3(h)	109	128	62	47	79
EphB4(h)	62	131	44	28	38
ErbB4(h)	73	82	40	0	2
FAK(h)	98	110	111	96	94
Fer(h)	117	101	130	108	196
Fes(h)	44	74	20	16	23
FGFR1(h)	120	97	55	59	18
FGFR1(V561M)(h)	108	72	74	74	113
FGFR2(h)	49	73	14	18	12
FGFR2(N549H)(h)	95	104	116	112	105
FGFR3(h)	73	208	102	0	10
FGFR4(h)	67	75	28	19	3
Fgr(h)	54	71	60	47	109
Fltl(h)	109	96	69	48	27
Flt3(D835Y)(h)	120	115	80	71	65
Flt3(h)	104	99	84	18	17
Flt4(h)	135	105	83	89	73
Fms(h)	89	92	45	37	14
Fms(Y969C)(h)	126	88	72	91	N/D
Fyn(h)	71	75	74	54	83
GCK(h)	98	99	70	66	30
GRK5(h)	117	135	136	131	116
GRK6(h)	131	132	147	141	174
GRK7(h)	111	124	122	100	93
GSK3 α (h)	183	119	157	164	175
GSK3 β (h)	113	132	205	202	238
Haspin(h)	127	71	48	36	25
Hck(h)	354	107	72	72	78
Hck(h)活化的	58	100	82	81	67
HIPK1(h)	94	115	74	91	47
HIPK2(h)	98	102	73	90	38
HIPK3(h)	105	105	93	105	85

[0661]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μ M)
IGF-IR(h)	102	49	119	90	117
IGF-IR(h),活化的	126	94	80	77	45
IKK α (h)	108	104	93	87	50
IKK β (h)	105	109	84	84	71
IR(h)	112	90	96	85	95
IR(h),活化的	127	105	79	59	90
IRR(h)	85	69	8	8	10
IRAK1(h)	97	101	95	93	5
IRAK4(h)	100	110	59	59	3
Itk(h)	99	98	77	63	7
JAK2(h)	89	131	133	119	49
JAK3(h)	150	117	121	122	95
JNK1 α (h)	91	106	97	98	109
JNK2 α 2(h)	114	109	98	96	81
JNK3(h)	104	90	89	70	171
KDR(h)	100	110	101	94	15
Lck(h)	346	113	-2	228	359
Lck(h)活化的	106	90	243	216	76
LIMK1(h)	103	109	88	92	87
LKB1(h)	111	99	101	89	51
LOK(h)	37	67	37	18	7
Lyn(h)	113	98	69	3	31
MAPK 1(h)	108	97	107	100	102
MAPK2(h)	98	105	98	93	60
MAPK AP -K2 (h)	19	35	5	5	9
MAPK AP -K3 (h)	27	39	3	7	9
MEK 1(h)	86	116	77	77	21
MARK 1(h)	109	102	132	120	110
MELK(h)	74	59	16	17	0
Mer(h)	47	90	52	50	17
Met(h)	104	71	65	62	27
Met(D1246H)(h)	99	139	125	68	150
Met(D1246N)(h)	114	149	82	31	90
Met(M1268T)(h)	114	143	255	265	239
Met(Y1248C)(h)	77	141	84	36	73
Met(Y1248D)(h)	87	118	102	31	218
Met(Y1248H)(h)	88	153	117	63	126
MINK(h)	96	103	48	52	5
MKK6(h)	74	98	48	44	18
MKK7 β (h)	137	117	100	94	102
MLCK(h)	85	103	2	1	0
MLK1(h)	77	84	40	33	43
Mnk2(h)	94	106	89	86	6
MRCK α (h)	98	103	104	97	5
MRCK β (h)	103	102	83	71	-10
MSK1(h)	52	50	32	28	8

[0662]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μ M)
MSK2(h)	105	88	56	52	14
MS SKI(h)	82	100	77	75	22
MST1(h)	85	72	14	6	3
MST2(h)	98	104	19	11	2
MST3(h)	104	95	45	36	4
mTOR(h)	102	110	91	93	135
mTOR/FKBP12(h)	117	118	145	125	140
MuSK(h)	85	106	93	93	27
NEK2(h)	102	97	78	61	0
NEK3(h)	100	100	92	85	20
NEK6(h)	109	98	82	85	49
NEK7(h)	97	96	84	87	89
NEK 11(h)	102	95	53	33	2
NLK(h)	100	106	87	90	19
p70S6K(h)	89	84	35	33	3
PAK2(h)	71	69	65	59	44
PAK4(h)	92	98	94	89	86
PAK3(h)	N/D	50	140	121	102
PAK5(h)	97	100	110	117	125
PAK6(h)	121	105	104	100	107
PAR-1Ba(h)	62	110	113	109	97
PASK(h)	81	60	29	28	9
PDGFR α (h)	104	108	65	40	40
PDGFR α (D842V)(h)	103	107	114	118	170
PDGFR α (V561D)(h)	58	106	82	100	146
PDGFR β (h)	116	137	81	53	40
PDK1(h)	144	143	135	159	178
PhKy2(h)	62	86	46	38	16
Pim-1(h)	44	18	8	7	0
Pim-2(h)	117	74	76	92	46
Pim-3(h)	98	94	80	80	37
PKA(h)	138	110	119	119	118
PKBa(h)	140	110	57	67	30
PKB β (h)	284	250	84	98	21
PKB γ (h)	105	103	20	41	20
PKC α (h)	94	100	89	86	3
PKC β I (h)	88	98	78	78	1
PKC β II (h)	102	100	82	75	3
PKC γ (h)	94	101	89	79	6
PKC δ (h)	100	101	101	90	61
PKC ϵ (h)	102	98	79	59	23
PKC η (h)	105	101	103	98	45
PKC ι (h)	110	97	68	46	7
PKC μ (h)	79	73	22	14	10
PKC θ (h)	102	101	88	76	62
PKC ζ (h)	82	98	81	75	7

[0663]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μ M)
PKD2(h)	84	78	33	25	10
PKG1 α (h)	82	70	64	58	25
PKG1 β (h)	71	57	50	53	24
Plk1(h)	109	128	115	119	104
Plk3(h)	107	107	127	129	122
PRAK(h)	159	115	128	118	95
PRK2(h)	72	74	33	27	7
PrKX(h)	84	112	61	76	57
PTK5(h)	135	108	132	129	96
Pyk2(h)	113	127	47	34	46
Ret(h)	108	96	140	145	174
Ret (V804L)(h)	113	100	79	73	20
Ret(V804M)(h)	92	105	95	87	36
RIPK2(h)	92	98	97	98	30
ROCK- I (h)	99	117	79	73	17
ROCK- II (h)	102	85	74	77	2
Ron(h)	117	120	93	79	46
Ros(h)	107	86	95	99	150
Rse(h)	109	88	88	89	63
Rsk1(h)	86	102	46	54	34
Rsk2(h)	65	101	51	38	14
Rsk3(h)	76	109	76	71	23
Rsk4(h)	99	125	90	91	29
SAPK2a(h)	110	107	90	85	52
SAPK2a(T106M) (h)	101	100	97	99	32
SAPK2b(h)	99	95	81	82	42
SAPK3(h)	106	97	84	79	24
SAPK4(h)	98	106	96	91	48
SGK(h)	128	115	48	54	2
SGK2(h)	103	119	56	98	-1
SGK3(h)	95	58	10	8	-3
SIK(h)	113	102	66	68	40
Snk(h)	94	109	114	131	122
Src(l-530)(h)	95	75	23	19	21
Src(T341M)(h)	98	56	70	76	59
SRPK1(h)	69	93	90	96	80
SRPK2(h)	92	100	106	97	80
STK33(h)	99	98	45	52	16
Syk(h)	45	36	24	9	5
TAK1(h)	116	124	122	177	N/D
TAO1(h)	99	105	82	73	24
TAO2(h)	95	93	70	74	15
TAO3(h)	45	102	77	67	12
TBK1(h)	106	98	37	39	16
Tec(h)活化的	100	77	56	29	33
Tie2(h)	28	53	26	21	22

[0664]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 μ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μ M)
Tie2(R849W)(h)	102	89	117	108	106
Tie2(Y897S)(h)	99	85	83	87	80
TLK2(h)	113	129	114	151	133
TrkA(h)	74	N/D	25	17	24
TrkB(h)	4	7	5	8	12
TSSK1(h)	99	98	79	79	46
TSSK2(h)	107	91	98	94	92
Txk(h)	87	98	48	37	10
ULK2(h)	123	132	122	131	124
ULK3(h)	142	164	167	147	177
WNK2(h)	95	94	64	54	8
WNK3(h)	100	97	77	74	9
VRK2(h)	112	109	161	185	169
Yes(h)	49	93	67	14	N/D
ZAP-70(h)	79	58	75	33	1
ZIPK(h)	80	67	28	13	1
N/D : %两次都没有检测到活性。					
MMI-0100: YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)					
MMI-0200: YARAAARQARAKALNRQLGVA (SEQ ID NO: 19)					
MMI-0300: FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 3)					
MMI-0400: KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 4)					
MMI-0500: HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 7)					

[0665] 实施例2 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO: 1) 制剂和其功能等同物

[0666] 根据一些实施方案, 通过喷雾干燥、微粉化(例如, 喷射研磨)将MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO: 1) 和其功能等同物制成冻干粉末, 或制成用于雾化吸入的液体制剂。

[0667] 喷雾干燥

[0668] 在一些实施方案中, 使用喷雾干燥制备MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO: 1) 和其功能等同物, 考虑了以下因素:

[0669] (a) 蛋白质和肽是易于变性的-也就是说, 破坏成三级结构和有时的二级结构;

[0670] (b) 变性可以是可逆的或不可逆的并且可以由诸如温度增加、温度下降、极端pH、增加溶剂、压力和剪切变性(这适用于微粉化)的多种情况导致;

[0671] (c) 变性的蛋白质活性较低并且无治疗性, 有时完全是非活性的;

[0672] (d) 喷雾干燥能够将这些非晶态大分子转变成具有由工艺参数控制的特定粒度分布的离散球状粒子; 喷雾干燥的粒子可以是完全球形的、圆环形的和典型中空的, 意味着粒子 $>5\mu\text{m}$ 仍然可以是可吸入的但是会抵抗肺中的清除机制; 和

[0673] (e) 在具有或没有赋形剂的情况下, 喷雾干燥通常改善蛋白质的稳定性。

[0674] 评价了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO: 1) 和其功能等同物的冻干制剂与喷雾干燥法的潜在协同性(例如, 最佳水分含量缓冲液浓度/pH的匹配、赋形剂选择等)以确保保护肽的稳定性。

[0675] 初始的喷雾干燥运行针对相互约定的接受标准,目的在于限定喷雾干燥操作的工艺参数。对于吸入产品,粒度被认为是一个重要的标准。对于在利害区域的肺泡沉积(II型),1-5 μm 的质量中值空气动力学直径(MMAD)通常被认为适合于在肺泡腔隙中的外周沉积(Heyder, J. Proc Am Thorac Soc, 1(4):315-320, 2004, 通过引用的方式并入本文)。其他研究表明1-3微米的MMAD对于喷雾干燥法是合乎需要的初始目标颗粒大小。由于MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)的可能生物腔隙靶是肺泡区,在约2微米范围的MMAD是初始的目标以确保沉积到肺泡腔隙中。

[0676] 接受的标准包括但不限于(1)粒度(即,大约2 μm 的D₉₀);(2)水分含量(即,水分小于3%w/w);(3)粉末密度;和(4)表面外观(球形的、粗糙的、环形的)。

[0677] 随后进行工艺设计实验以优化喷雾干燥工艺参数,包括,例如,但不限于,(1)入口压力和干燥温度;(2)原料浓度和federate;和(3)肽/赋形剂比例(赋形剂包括,例如,缓冲液盐和单糖)。

[0678] 实施例3.用于连续雾化性能评估的MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)的批生产

[0679] 以上文所描述的限定的工艺参数进行2-3次喷雾干燥运行以产生用于雾化性能评估的材料。

[0680] 喷雾干燥粉末很适合于从吸入器(例如,而限于,微剂量(MicroDose)吸入器)递送。为了纯的以及同步喷雾干燥(co-spray-dried)的混合,微剂量吸入器常规地均实现高发射剂量,和高细粒级和采用该制剂方案的剂量。喷雾干燥胰岛素的示例性雾化性能在图1和2中显示。

[0681] 虽然干微粉化对于用于肺部递送的小分子是优选的粉末生产方法,但与喷雾干燥相比它是一种有压力的方法,该方法使用高剪切力。由于使用高剪切力可能导致蛋白质和肽的断裂,干微粉化常规地不用于大分子。此外,如果剂量大小是小的,需要填充剂以改善流动性并且允许在填充操作中精确计量粉末。需要测试主赋形剂,并且用于该目的被认可的用于肺部递送的单独的赋形剂中的一种是乳糖,与MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)或其功能等同物的化学相容性,因为乳糖与某些肽是不相容的。

[0682] 微粉化工艺在本领域是相当简单和公知的。简而言之,MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)和其功能等同物的冻干干燥粉末经历研磨阶段直至实现规定的目标粒度分布(即,MMAD、D10、D50、D90)。测试该纯微粉化粉末的效力以确保其微粉化后的活性,对其进行优化用于从吸入器递送,并且在一级包装(热封的水泡)中测试其化学和物理稳定性。随后将纯的粉末与优先选择的被认可的用于肺部的乳糖级混合到靶点,测试混合的均一性,并且使其经历相同的吸入器优化和稳定性测试。

[0683] 微剂量干粉吸入器(DPI)

[0684] 根据一些实施方案,可以使用干粉吸入器(DPI)施用MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)和其功能等同物。例如,微剂量干粉吸入器(DPI)具有‘主动的’压电驱动雾化发生器,该雾化发生器是呼吸驱动的并且实现与患者的吸入流速和体积无关的高效肺部递送。不同于用于有效的肺部递送的需要大约40-60L/分钟(LPM)流速的强且有力吸入的‘被动的’DPI,微剂量DPI不需要呼吸动作,因为它可以在低至10LPM一直到90LPM的很宽的流速范围内有效地递送,具有相当的性能(见图3和4的性能实施例)。

[0685] 根据一些其他实施方案,可以使用例如“干粉雾化器”(DPN)的潮式呼吸施加器施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 和其功能等同物。DPN递送干燥粉末剂量同步的吸入潮式呼吸,具有低至2L/分钟(LPM)的触发、5和15LPM之间的预期峰流量和低至30ml的潮气量,这些比预期的成人IPF患者的条件更加具有挑战性。这种新的DPN成功地完成了其在成人中的第二次临床试验,它的第一次研究在2011年11月完成。这些结果通过因特网在全球互联网上是可以获得的,URL“clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01489306?spons=Microdose&rank=1”。

[0686] 微剂量电子吸入器系统是非常灵活的构思,可以精确和高效地递送上述制剂形式,对于喷雾干燥药品具有特别高的效率,并且对超过30种小分子和大分子显示了这种性能。一级包装中的喷雾干燥胰岛素,例如,可以持续至少18个月。喷雾干燥肽和微粉化小分子的递送性能的实例在图5-8中显示。

[0687] 对于干燥粉末制剂对肺膜的作用,例如,过敏,干燥粉末递送,特别是低的粉末载量(<4-5mg),不可能影响肺膜或引起过敏(咳嗽等),除非这是活性分子的固有性能(我们未在动物研究中观察到该性能)。选择了被认可的已经用于肺部的具有优异肺部生物相容性的赋形剂,并且赋形剂以很低的量存在(即,低的mg范围)。例如,少量的甘露醇不可能具有作用。

[0688] 液体雾化

[0689] 可选地,可以通过液体雾化递送MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 或其功能等同物。先前的临床前研究表明可以通过适于动物使用的AeroGen®雾化器系统将MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 递送到啮齿类。

[0690] 为了特别探讨MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 被递送以积极影响受损害的肺的能力,在博莱霉素动物模型功效实验中,将MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 的溶液有效雾化。通过由Aerogen® (www.aerogen.com) 设计并制造的啮齿类雾化器装置实现MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 的局部肺部施用。Aeroneb®实验室微型泵雾化器使用高效雾化技术,用于临床前雾化研究和吸入研究,提供了在临床前和临床产品开发之间的有价值连接。流速是>0.3ml/分钟,并且设计成递送2mm大小的粒子,分布至最深的肺泡中。已经在肺纤维化的博莱霉素小鼠模型中表明了雾化MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 的功效和经过肺部的细胞摄取(参见图16)。局部化的临床吸入施用在减弱MK2活化作用方面与常规的全身性注射一样有效。

[0691] 实施例4在患有特发性肺纤维化(IPF)的患者肺部的纤维化损害中活化的MK2的水平增加

[0692] 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)-活化的蛋白激酶2(MK2)在p38MAPK- α 和 β 应激下被活化。p38MAPK的这两个亚型结合到MK2羧基端中的基本对接基序,随后磷酸化其调节的位点。作为活化结果,MK2被从细胞核输出到细胞质并且共转运活性的p38 MAPK到该区室中。MK2稳定p38MAPK定位并且对分化、迁移和细胞因子生产是必需的(Kotlyarov, A., Mol Cell Biol. 22 (13):4827-4835, 2002)。

[0693] 因此,为了研究p38MAPK-MK2信号传导途径是否在受IPF影响的肺中被活化,将从正常和IPF患者获得肺切片用针对MK2的活化形式(抗磷酸化-Thr³³⁴-MAPKAPK2)的磷酸化特

异性抗体染色。使用DAB将正常肺和IPF肺组织免疫染色并且用苏木精将细胞核复染。如图9中所示,与正常肺活检组织(左边)相比,在来自IPF患者的肺组织外植体的纤维化病灶中观察到活化的MK2的表达增加。这些结果表明IPF患者肺中纤维化形成以p38MAPK-MK2信号传导途径的异常活化为特征。

[0694] 实施例5.MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的雾化和全身性施用防止小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化

[0695] 特发性肺纤维化(IPF)的标志之一是间充质细胞的活化和基质的极度沉积,特别是胶原蛋白。所产生的肺中胶原蛋白的积累可以通过组织学和生物化学技术测量,尤其是通过羟脯氨酸的积累,羟脯氨酸几乎完全来自肺中的胶原蛋白,并且因此作为整个肺胶原蛋白含量的代表(Umezawa H.等人,Cancer,20(5):891-895,1967)。

[0696] 因此,使用博来霉素诱导的肺纤维化的小鼠模型,通过在预防或纤维化前期阶段(即,药物施用在博来霉素损伤后第7日开始;参见图10)全身性(腹腔内)或局部地(通过雾化给药)递送MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)肽并通过测量作为博来霉素小鼠中纤维化指标的胶原蛋白的水平评价了MMI-0100肽(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)在治疗肺纤维化方面的治疗功效。

[0697] 简而言之,通过将约0.025U的博来霉素(溶解于PBS中)经气管内递送至C57BL/6小鼠引起小鼠肺中的纤维化病灶。为了研究MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)在预防/纤维化前期治疗博来霉素损伤的肺方面的功效,或者腹腔内地或通过雾化每日施用对照(PBS)或MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1),在博来霉素递送后第7日(当炎症减退并且纤维化机理活化时)开始直至在博来霉素递送后第21日(当观察到显著纤维化时)(图10)。在博来霉素递送后第21日,将来自用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)或对照(PBS)处理的博来霉素小鼠的肺组织分离、固定、包埋在石蜡中,并且切片用于染色。简而言之,用戊巴比妥钠注射(120mg/kg)处死小鼠组并将胸腔打开。将右主干支气管结扎并摘除右肺。对气管插管并在21cm H₂O压力下用4%甲醛灌注左肺。随后将组织块包埋在石蜡中,制备4-mm切片,并且用苏木精和伊红(H&E;用于病理检验)或马松三色(用于胶原蛋白染色)染色。

[0698] 如图11中所示,来自PBS处理的小鼠的肺切片显示出正常的肺结构(NL)和气道(AW)。相比之下,来自博来霉素小鼠(在第21日)的肺切片显示出形成有纤维化病灶(FF)的狭窄气道(AW)结构(上小图;苏木精&伊红(H&E)染色)和肺组织中胶原蛋白的积累增加(下小图中的箭头;马松三色染色),这使人想起在IPF患者中发现的那些。然而,或者通过雾化或者腹腔内地施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)显著地减少在博来霉素小鼠肺中纤维化病灶形成(上小图,MMI-0100 (NEB)和MMI-0100 (IP))并且减少胶原蛋白积累(下小图,MMI-0100 (NEB)和MMI-0100 (IP))。

[0699] 接下来,通过计算对于胶原蛋白的常数换算系数(7.5)(Neuman R.和Logan M,J Biol Chem.,186(2):549-56,1950,通过引用方式并入)由羟脯氨酸浓度定量分析博来霉素小鼠肺中总胶原蛋白水平(图12)。如图12中所示,与博来霉素对照相比,在炎症后期/纤维化前期阶段MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的雾化(BLEO+雾化)和全身性(BLEO+IP)施用均显著减少胶原蛋白沉积。

[0700] 实施例6.MK2肽抑制剂在特发性肺纤维化预防模型中的剂量-反应数据接下来,使

用特发性肺纤维化的博莱霉素小鼠模型(预防模型)在体内研究了增加MK2肽抑制剂的剂量对胶原蛋白沉积的影响。简而言之,在第0日C57-BL/6小鼠经历博莱霉素损伤。在第7日开始并且持续至到第21日,通过腹腔内(IP)注射每日对小鼠施用25、50或75 μ g/kg的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19)。如图13中所示,马松蓝色三色染色显示出在用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理的博莱霉素损伤的小鼠肺中胶原蛋白水平下降,表明了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)能够以剂量依赖性方式保护由博莱霉素损伤引起的肺纤维化。这些数据表明了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)保留其作为纤维化保护性化合物的潜力,即使在较高的剂量下。

[0701] 相比之下,在测试剂量下用MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19)处理博莱霉素损伤的小鼠不减少而是增加肺中胶原蛋白沉积。然而,该结果与涉及MK2敲除小鼠和MK2^{-/-}小鼠胚性成纤维细胞(MEF)的先前研究(其中全部MK2活性消除)一致,显示出加重的纤维化表型(Liu等人,Am J Respir Cell Mol Biol,37:507-517,2007)。

[0702] 不受理论限制地,这些结果表明了(1)本发明的MK2抑制肽可以显示出对特定组的激酶的抑制活性谱;(2)MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)和MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19)可以差异性地抑制MK2和其他激酶,这(取决于所施用的剂量)有助于抑制活性谱;(3)肌成纤维细胞形成和/或迁移也是纤维化修复阶段而非活性损伤的一部分;和(4)一定水平的MK2活性对那一过程的发生因此是必需的(Liu等人,Am J Respir Cell Mol Biol,37:507-517,2007)。

[0703] 此外,本发明的MK2抑制肽来自MK2下游靶HSPB1的底物结合位点。因此,它们可以竞争性地抑制MK2对HSPB1的激酶活性。不受理论限制地,MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19)对纤维化的差异性作用可能归因于其序列差异、其对HSPB1结合位点的同源性、其对不同靶蛋白结合位点的MK2激酶活性的差异性抑制或其组合。

[0704] 实施例7.在特发性肺纤维化预防模型中MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的施用有效阻断全身性T-细胞活化

[0705] 最近的研究突显了在博莱霉素诱导的纤维化中对T淋巴细胞的关键作用(Wilson等人,M.The Journal of Experimental Medicine,207(3):535-552,2010)。因此,为了研究在用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理的博莱霉素损伤的小鼠中脾脏(pan)T细胞的功能性作用,如先前所描述地(Wilkes,D.等人,Journal of Leukocyte Biology,64(5):578-586,1998,通过引用的方式并入本文)进行自体混合淋巴细胞反应(MLR)。特别地,在测试中研究了C57BL/6纯化抗原呈递细胞诱导C57BL/6T淋巴细胞中增殖的能力。

[0706] C57-BL/6小鼠在第0日经历博莱霉素损伤。在第7日,每日通过腹腔内(IP)注射或雾化器(NEB)将50 μ g/kg/日MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)施用至小鼠直至第21日。将脾T细胞分离并单独或在存在自体抗原呈递细胞(APC来自C57-BL/6小鼠)的情况下培养或用针对CD3(α -CD3)的抗体刺激48小时。随后用³H标记胸苷放射性标记细胞16小时并评估增殖速率。

[0707] 如图14中所示,无论处理与否,单独的T细胞显示出很低的增殖能力。然而,当T细

胞与自体抗原呈递细胞共培养时(即,从C57-BL/6小鼠分离的APC),博莱霉素损伤的小鼠增殖能力比对照小鼠显著更高。有趣的是,在存在抗原呈递细胞情况下见到的来自博莱霉素处理的小鼠的T细胞的增殖通过全身性施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)显著降低,但是如所预期的那样并没有被吸入模式降低。这些数据表明了脾T细胞活化被MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)抑制,并且表明了肽MK2抑制剂是纤维化保护性的。

[0708] 通过用针对 α -CD3的抗体(一种多克隆T细胞活化物)刺激细胞也证实了T细胞的生存力。不论是否是处理组, α -CD3诱导细胞的稳健增殖。对多克隆活化物的响应增殖表明了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)肽抑制剂不影响脾T细胞的功能性,并且以该特计量剂量施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)不存在毒性。此外,缺少对雾化MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的脾T细胞的响应表明了采用该肽递送模式发生的全身性分布很少。

[0709] 实施例8.全身性或雾化MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理在纤维化后期保护博莱霉素损伤的肺

[0710] 经典博莱霉素模型,如图10中所示,在文献中已经广泛地用在纤维化前期中以测试任何介入治疗的的功效。由于雾化和全身性施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)均显著地保护了博莱霉素诱导纤维化的肺,在纤维化后期进一步研究了全身性(腹腔内)或局部(雾化)施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)在治疗博莱霉素损伤的肺的效果,药物介入治疗在第14日开始,该日期是当肺部显著地形成纤维性组织的时间点(图15)(Pottier,N.等人,American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine,176(11):1098-1107,2007,通过引用的方式并入本文)。鉴于IPF患者的肺在诊断时已经留下瘢痕,在该模型中所示的瘢痕肺的救治是临床相关的。

[0711] 更具体地,通过将约0.025U的博莱霉素(溶解于PBS中)经气管内递送至C57BL/6小鼠引起肺中的纤维化病灶。为了研究MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)在纤维化后期治疗博莱霉素损伤的肺方面的功效,在博来霉素递送后第14日开始直至博来霉素递送后第28日,或者腹腔内地或通过雾化每日将PBS(对照)或MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)施用至小鼠。在博莱霉素递送后第28日,将用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)或对照(PBS)处理的博莱霉素小鼠的肺组织分离、固定、包埋在石蜡中,并且切片用于染色。用戊巴比妥钠注射(120mg/kg)处死小鼠组并将胸腔打开。将右主干支气管结扎并摘除右肺。对气管插管并在21cm H₂O压力下用4%甲醛灌注左肺。随后将组织块包埋在石蜡中,制备4-mm切片,并且用苏木精和伊红(H&E;用于病理检验)或马松三色(用于胶原蛋白染色)染色。

[0712] 如图16中所示,不管药物施用的模式,即,无论是腹腔内递送还是局部施加至肺,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理“救治”严重使肺留下瘢痕。使用组织学评估研究肺构造(苏木精&伊红(H&E)染色,上小图)和胶原蛋白分布(马松蓝三色染色,下小图)。组织化学结果表明尽管博莱霉素损伤的肺严重留下瘢痕,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理的小鼠具有较清晰的肺实质。

[0713] 其次,通过使用标准的羟脯氨酸测定左全肺来定量确定胶原沉积。通过分析博莱霉素损伤后第28日鼠肺中的羟脯氨酸浓度评估总胶原蛋白(可溶的和不可溶的)沉积。通过

腹腔内注射 (IP) 或雾化器 (NEB) 以 $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 的剂量施用 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1), 在博莱霉素损伤后第14日开始。

[0714] 如图 17 中所示, 与基线相比, 在损伤后第 28 日和 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理开始时 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理显著地阻止胶原蛋白沉积的进一步进展。这是显著的, 因为虽然目前的文献表明了药物开发中有效的预防, 但是当患者得到诊断时, 存在先前存在的纤维化。这些结果也表明了 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 具有有效阻止或减缓疾病的进一步进展并且改善生活质量的潜能; 以及如果使用较高的剂量和/或持续较长的治疗期, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 肽可以产生更大的肺组织学和生理学改善, 并且减少纤维化。

[0715] 实施例 9. 在特发性肺纤维化的博莱霉素小鼠模型中 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的全身性或局部施用与活化的 MK2 的减少相关联

[0716] 如上文讨论, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 和其功能等同物在肺中的主要靶点之一是 MK2 激酶, 该激酶在受累的肺中引起炎症和纤维化反应。因此, 为了进一步证实 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 在体内的作用, 分析了未处理的博莱霉素损伤的小鼠中以及 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理的小鼠中活化的 MK2 (磷酸化-Thr³³⁴-MAPKAPK2) 的水平。

[0717] 简而言之, C57-BL/6 小鼠在第 0 日经历博莱霉素损伤。在第 14 日, 每日通过腹腔内 (IP) 注射或雾化器 (NEB) 将 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 施用至小鼠直至博莱霉素损伤后第 28 日。将福尔马林固定的肺组织切片针对磷酸化-Thr³³⁴ MK2 进行免疫染色。对照染色是采用生物素酰化的二级 IgG 抗体。使用了链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶与 3,3'-二氨基联苯胺一起作为底物并且用苏木精复染细胞核。在未处理的情况下博莱霉素小鼠显示出活化的 MK2 存在 (黑色结节) 明显增加, 特别是在显著胶原蛋白沉积的区域中, 而用 MMI-0100 处理的小鼠显示出与正常组织类似的活化的 MK2 存在, 并且这类分布集中在外围气道和血管区域中。

[0718] 如图 18 中所示, 不管递送的模式, 即, 或者全身性或局部施用, 与对照相比, 在博莱霉素小鼠模型中 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的雾化或腹腔内施用与磷酸化-Thr³³⁴-MAPKAPK2 染色 (MK2 的活化形式) 减少相关联。

[0719] 实施例 10. 在特发性肺纤维化治疗模型中 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 下调炎性细胞因子

[0720] MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 可以抑制肺中纤维化形成的一种可能机理是通过降低局部促炎性细胞因子的浓度, 并且因此通过肺中巨噬细胞阻止单核细胞补充和异常细胞外重塑 (例如, 胶原蛋白沉积增加, 细胞粘附和迁移增加, 基质降解减少)。为了探究这种可能性, 通过测量经腹腔内或通过雾化用 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理后的白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平的变化, 对 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 肽抑制促炎性细胞因子产生的能力进行了研究。

[0721] 白细胞介素-6 (IL-6) 是一种多功能细胞因子, 其主要作用包括增强免疫球蛋白合成、活化 T 细胞和调节急性期蛋白质合成。已知许多不同类型的细胞产生 IL-6, 包括单核细

胞、巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞,IL-6基因在这些细胞中的表达由多种诱导物调节。白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 是两种重要已知的IL-6基因表达的诱导物。其他诱导物包括蛋白激酶C的活化剂、钙离子载体 (calcium inophore) A23187,和各种引起胞内环状AMP (cAMP) 水平升高的物质。

[0722] 肿瘤坏死因子 (TNF, 也称作TNF- α) 是参与全身性炎症的细胞因子并且是刺激急性期反应的细胞因子组的一员。研究表明了TNF- α 通过细胞内部三种不同的信号传导途径诱导IL-6的表达,即,1) NF- κ B途径2) MAPK途径,和3) 死亡信号传导途径。

[0723] 如图20中所示,在特发性肺纤维化的博来霉素小鼠模型中,腹腔内 (BLEO+MMI-0100 (IP)) 或雾化施用 (BLEO+MMI-0100 (NEB)) MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 显著地降低TNF- α (A, 上小图) 和IL-6的血浆水平 (B, 下小图)。

[0724] 实施例11. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的全身性或局部施用有效地阻断由于博来霉素损伤显著留下瘢痕的鼠肺中肌成纤维细胞活化积累

[0725] 特发性肺纤维化 (IPF) 的标志是在纤维性病变处肌成纤维细胞的积累和大量 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达 (肌成纤维细胞活化的标记)。另外,活化的肌成纤维细胞是肺实质僵硬和肺功能恶化的部分原因。

[0726] 因此,在或者全身性 (通过腹腔内施用) 或者局部 (通过雾化) 地用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理的博来霉素损伤的小鼠的肺中评估了博来霉素损伤的肺中 α -SMA的表达水平。如图21中所示,与未处理的博来霉素肺中 α -SMA的水平相比,在用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理的肺中 α -SMA的水平显著地减小。

[0727] 实施例12. 在体外调节TGF- β 1诱导的肌成纤维细胞活化方面对MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的剂量反应研究

[0728] 特发性肺纤维化 (IPF) 的主要标志是存在非典型凋亡上皮细胞,伴随分泌大量基质蛋白 (包括胶原蛋白、纤维连接蛋白和基质金属蛋白酶) 的活化的肌成纤维细胞 (Horowitz, J和Thannickal, V., Treatments in Respiratory Medicine, 5 (5): 325-42, 2006)。在正常伤口愈合过程中,由肌成纤维细胞形成临时基质作为临时性支架。临时基质收缩引起随后的再上皮化和最终的伤口愈合。然而,当活化的肌成纤维细胞对凋亡有抵抗性时,所产生的大量胶原蛋白沉积导致基质的稳定作用 (Tomasek, J. 等人 Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3 (5): 349-63, 2002)。不受抑制的肌成纤维细胞增殖、活化和对凋亡的抗性的最终结果导致纤维性病变,伴随由胶原蛋白沉积引起的稳定的基质,并因此导致最终的肺构造扭曲 (Yamashita, C. 等人, The American Journal of Pathology, 179 (4): 1733-45, 2011)。

[0729] 因此,由于成纤维细胞是参与瘢痕形成的重要细胞,通过检测在用TGF- β 处理的培养人胎肺成纤维细胞 (IMR-90细胞) 中的 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和纤维连接蛋白的蛋白水平评估了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 对肌成纤维细胞活化的作用。如图22和23中所示,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 以剂量依赖性方式有效地防止由TGF- β 引起的肌成纤维细胞活化,如由 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) (图22) 和纤维连接蛋白 (图23) 的水平降低所显示的。

[0730] 相比之下,在测试的剂量下,MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEQ ID NO:19)

不影响TGF- β -介导的肌成纤维细胞活化,如由肌成纤维细胞活化标记 α -平滑肌肌动蛋白(图21)和纤维连接蛋白(图23)的蛋白质水平无变化所表明的。不受理论限制,这些结果表明了(1)本发明的MK2抑制肽可以显示出针对特定激酶组的抑制性活性谱;(2)MMI-0100 (SEQ ID NO:1)和MMI-0200 (SEQ ID NO:19)可以差异性地抑制MK2和其他激酶,取决于所施用的剂量,这对该抑制性活性谱有贡献;(3)可能存在调节 α -平滑肌肌动蛋白的代偿性途径;(4)肌成纤维细胞形成和/或迁移也可能是纤维化而非活性损伤的修复期的一部分;和(5)一定的MK2水平因此对那个过程的发生是必须的(Liu等人,Am J Respir Cell Mol Biol, 37:507-517,2007)。

[0731] 此外,本发明的MK2抑制肽是来自MK2下游靶HSPB1的底物结合位点。因此,它们可以竞争性地抑制MK2对HSPB1的激酶活性。不受理论限制,MMI-0200 (SEQ ID NO:19)对纤维化的差异性作用可以归因于其序列差异,其与HSPB1结合位点的同源性,和其对不同靶蛋白结合位点的MK2激酶活性的差异性抑制。

[0732] 虽然参照其具体实施方案对本发明进行了描述,但是本领域技术人员应当理解的是,在不偏离本发明的真实精神和范围的情况下可以做出各种变化并且可以用等同物进行替换。另外,可以做出许多修改以使特定的情况、材料、物质的组成、工艺、工艺步骤适合本发明的客观精神和范围。所有这类修改均是在所附权利要求的范围之内。

<110> 莫伊莱麦屈克斯公司 (Moerae Matrix, LLC)

<120> 用于预防或治疗以成纤维细胞异常增殖及细胞外基质沉积为特征的疾病的组合物和方法

<130> 117477.010802

<150> US 61/474,370

<151> 2011-04-12

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 1

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 2

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 3

Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Arg Gln

1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 4

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala

1

5

10

15

Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 5

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg

1

5

10

15

Gln Leu Ala Val Ala

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 6

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg

1

5

10

15

Gln Leu Gly Val Ala

20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 7

His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile Lys Ala Leu Ala Arg

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala

20

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 8

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Ala Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 9

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 10

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 11

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 12

Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 13

Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 14

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 15

Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 16

Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 17

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 18

His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile

1 5 10

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 19

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg

1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala

20

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 20

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 21

Lys Lys Leu Asn Arg Thr Leu Ser Val Ala

1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 22

Lys Lys Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) .. (12)

<223> 其中,“Xaa”表示具有10个残基长度的任何氨基酸和氨基酸序列

<400> 23

Lys Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Arg Arg Lys

1 5 10 15

Lys

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 24

Leu Leu Lys Arg Arg Lys Lys

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<223> 哺乳动物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 其中,“Xaa”表示选自由Val、Ile、Leu、Met和Phe组成的组的庞大的疏水性残基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 其中,“Xaa”表示任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (5)

<223> 其中,“Xaa”表示具有2个残基长度的任何氨基酸和氨基酸序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> 其中,“Xaa”表示磷酸化的Ser或磷酸化的Thr

<400> 25

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa

1 5

纯净的喷雾干燥胰岛素

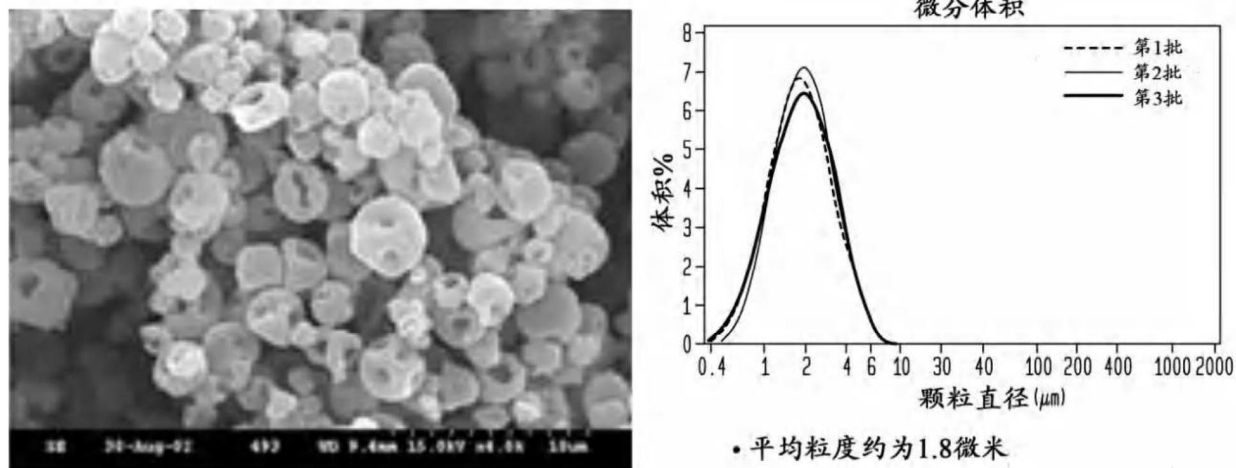
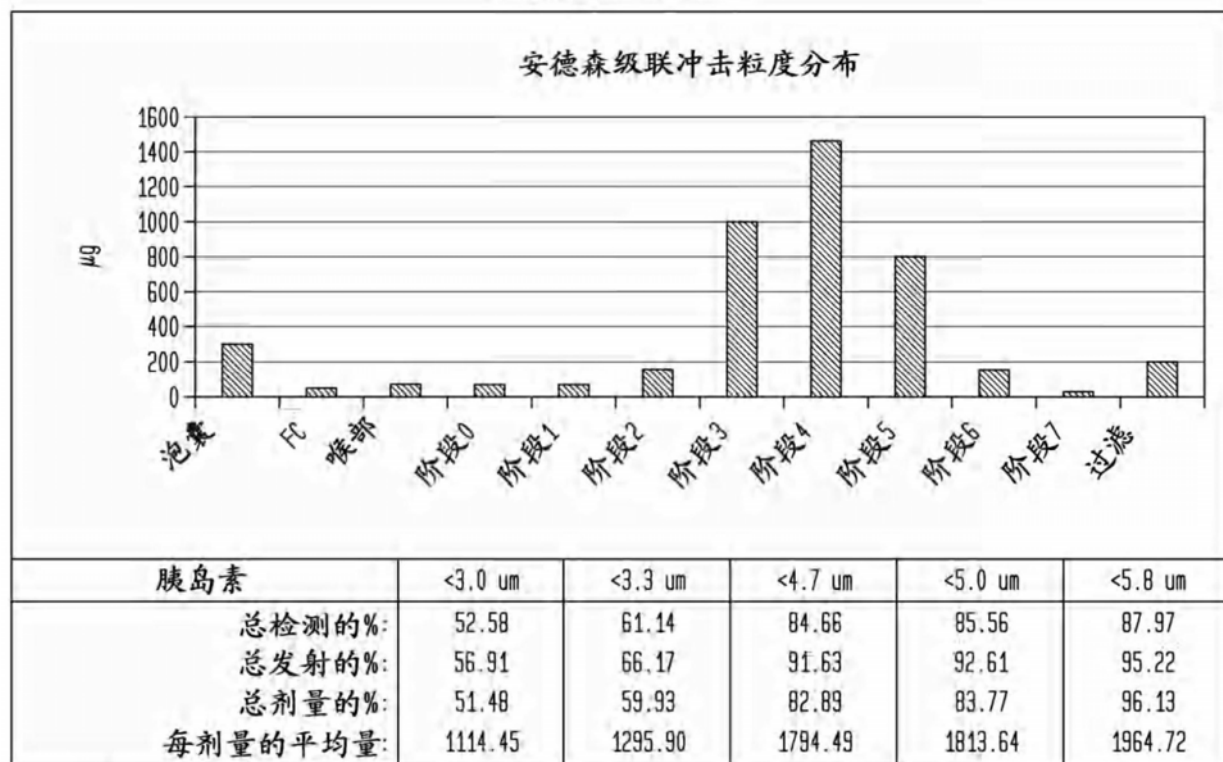


图1

粒度分布-胰岛素
2.4mg 剂量, ACI@28.3L/min



平均发射剂量 = 93.76%

图2

微剂量DPI与两种市售的“被动”PI(易得喷(Handihaler)和多乐(Twisthaler))
效率和流速的比较
吸入性能比较

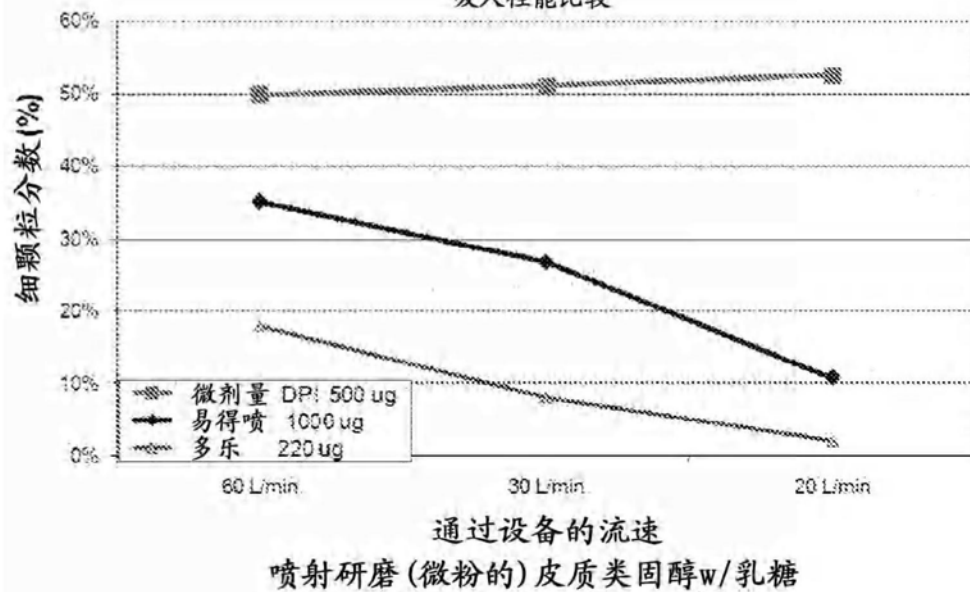


图3

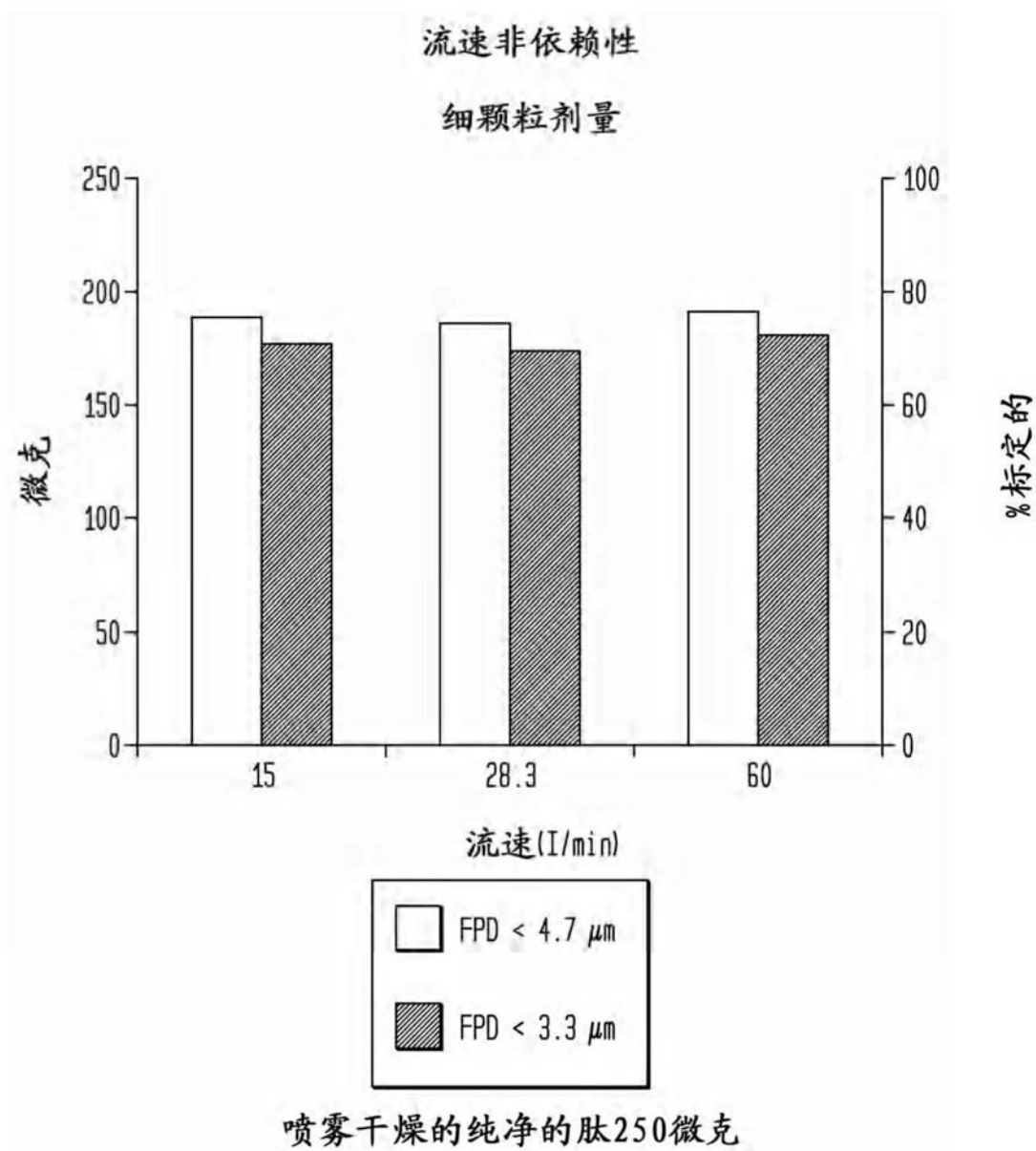


图4

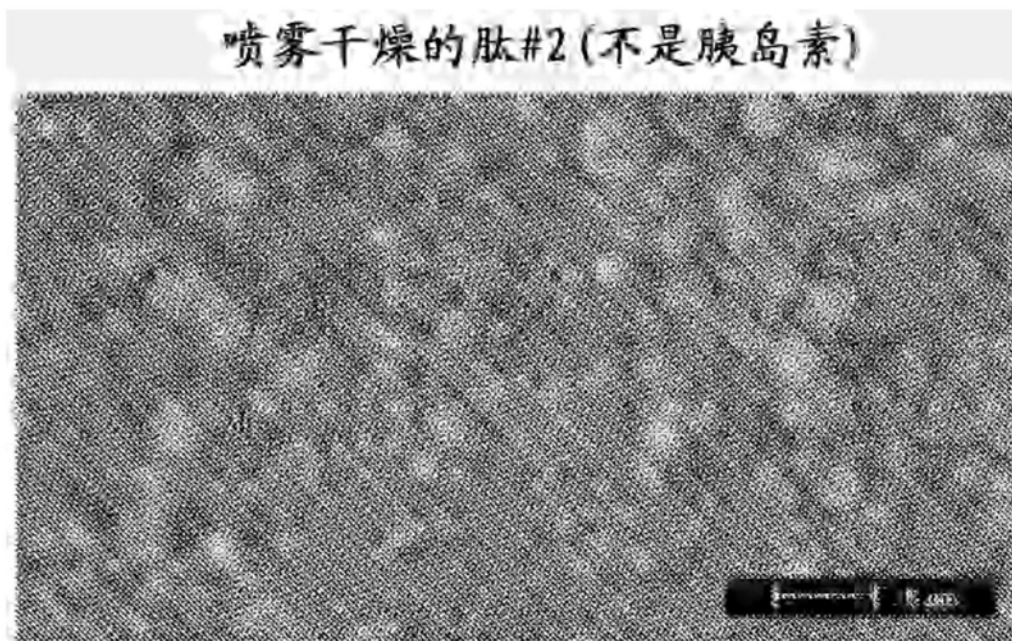


图5

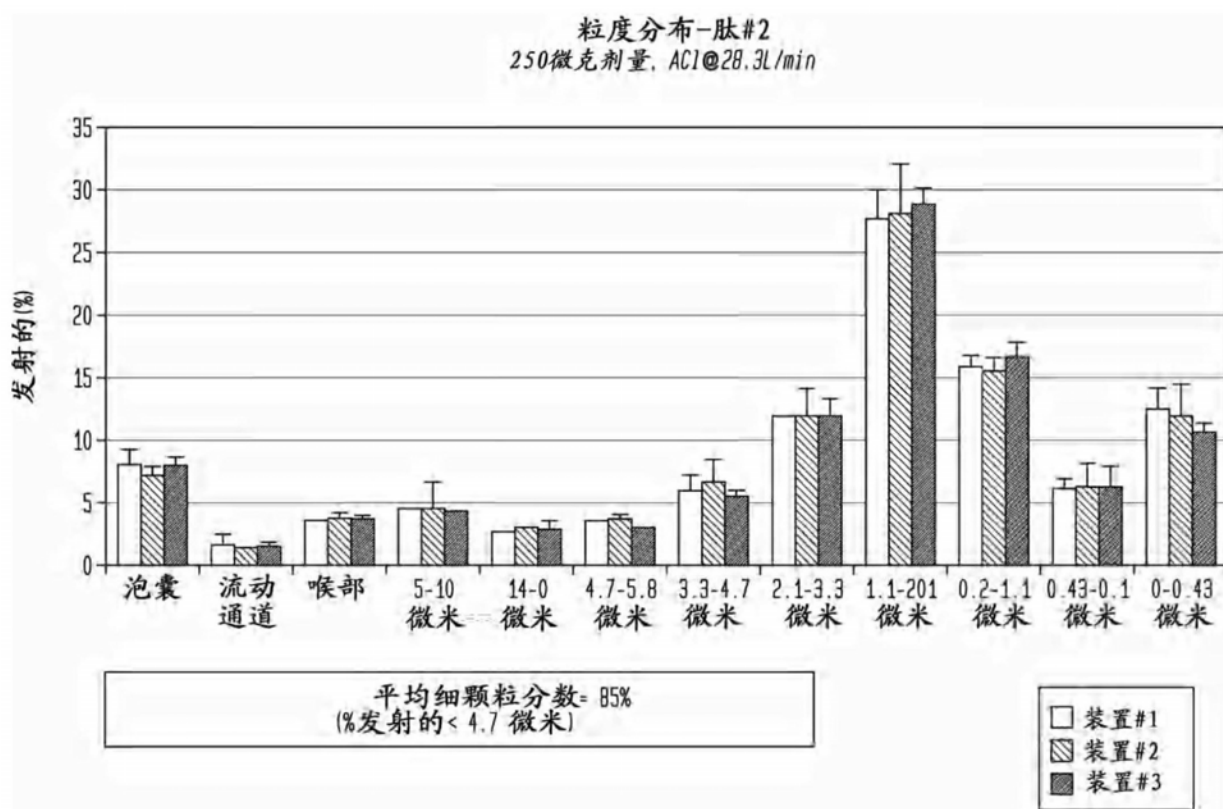


图6

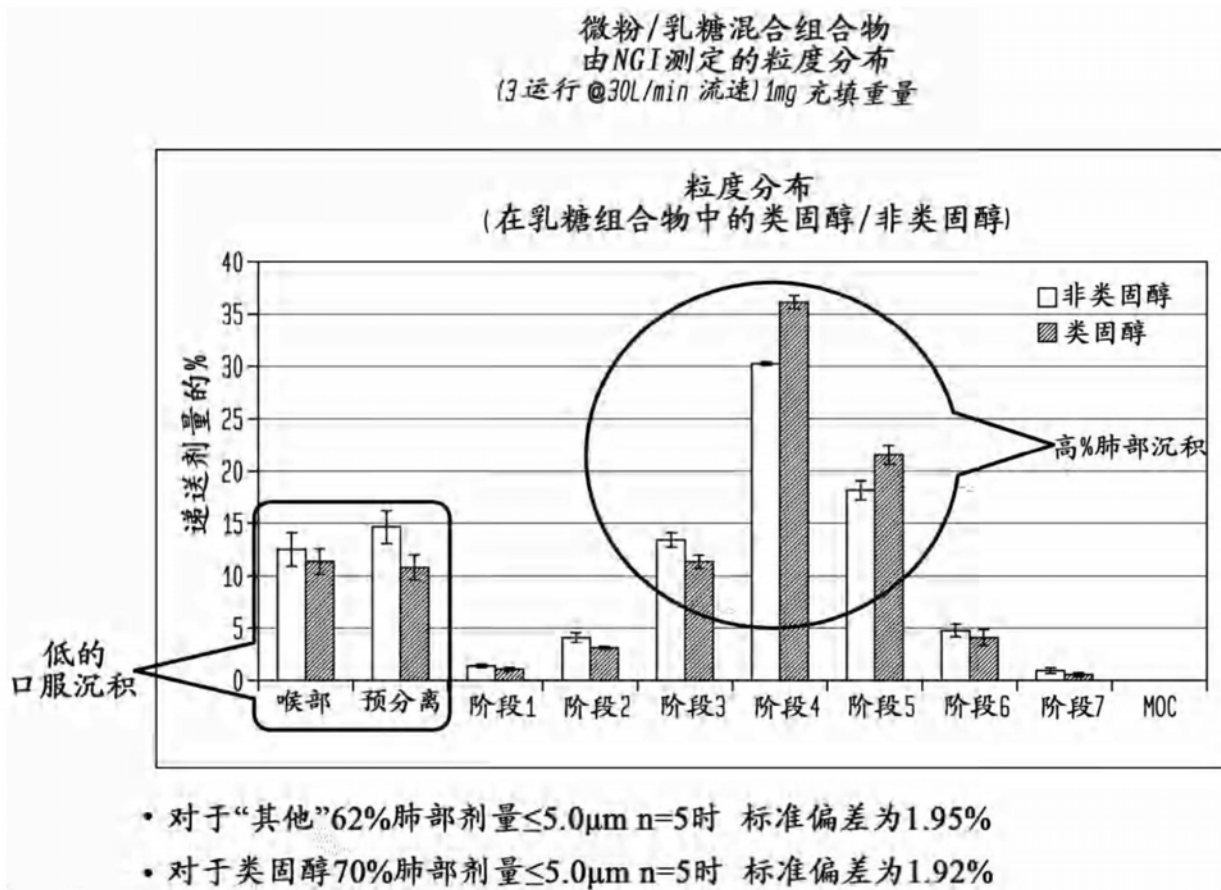


图7

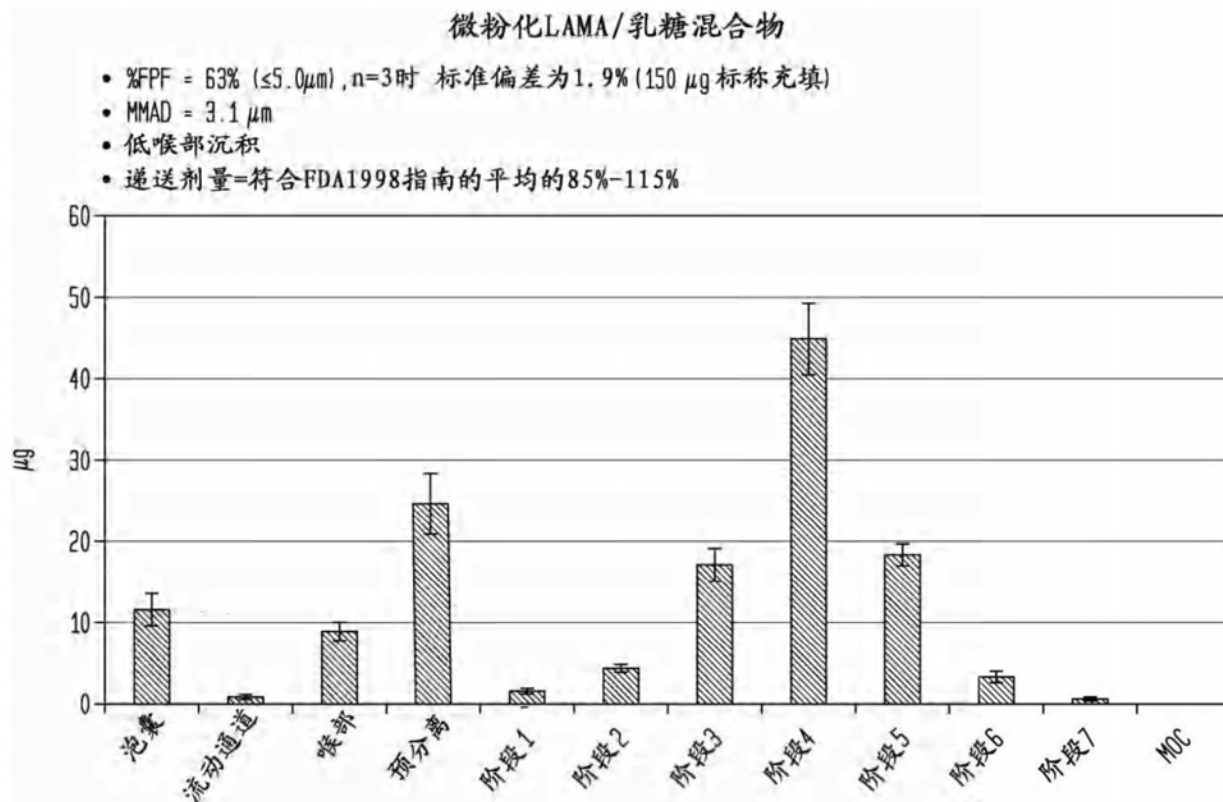


图8

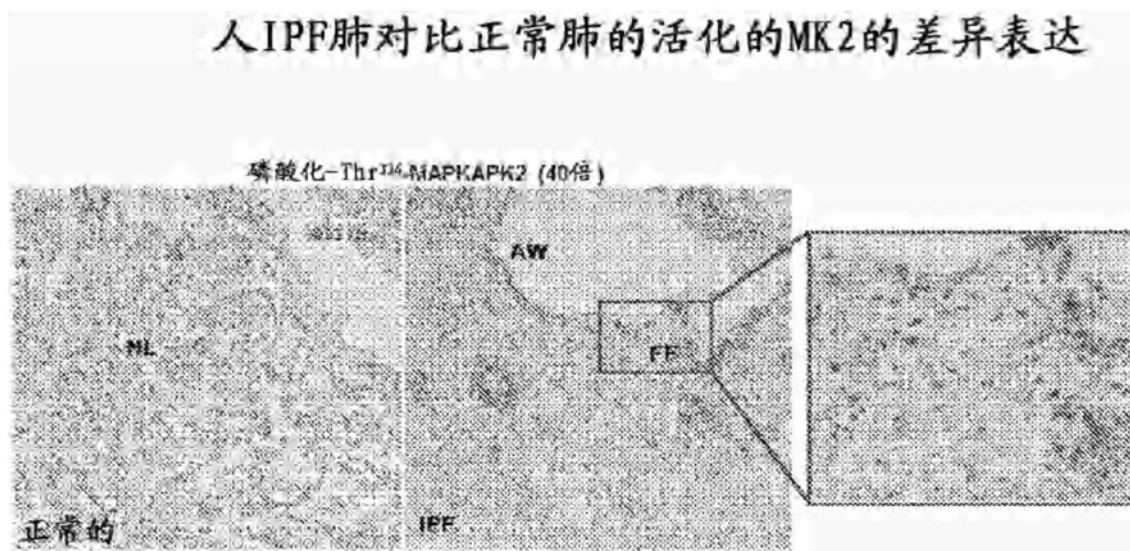


图9

特发性肺纤维化的博莱霉素模型: 预防模型

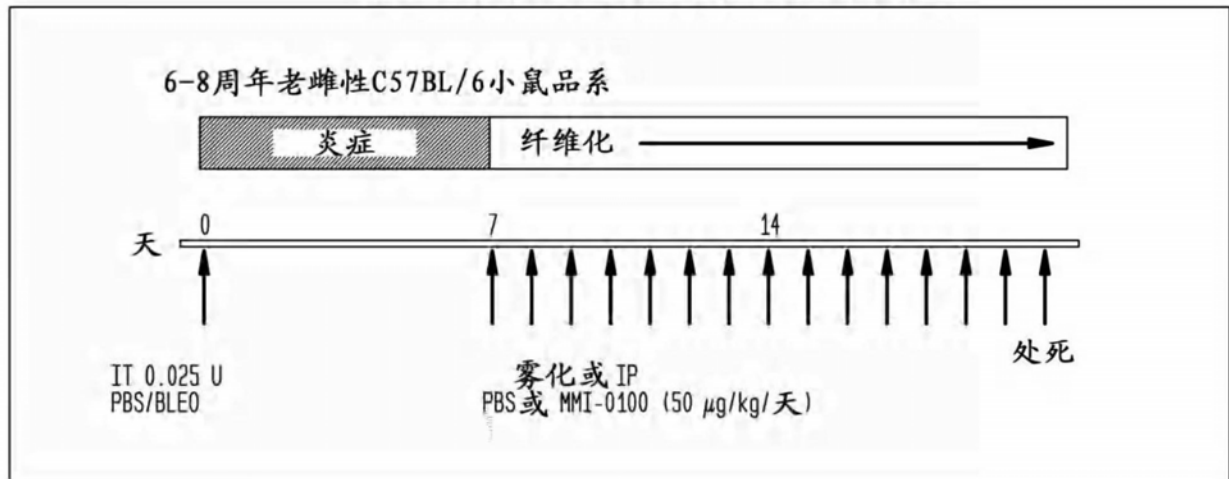


图10

在特发性肺纤维化预防模型中MMI-0100抑制纤维化的进展

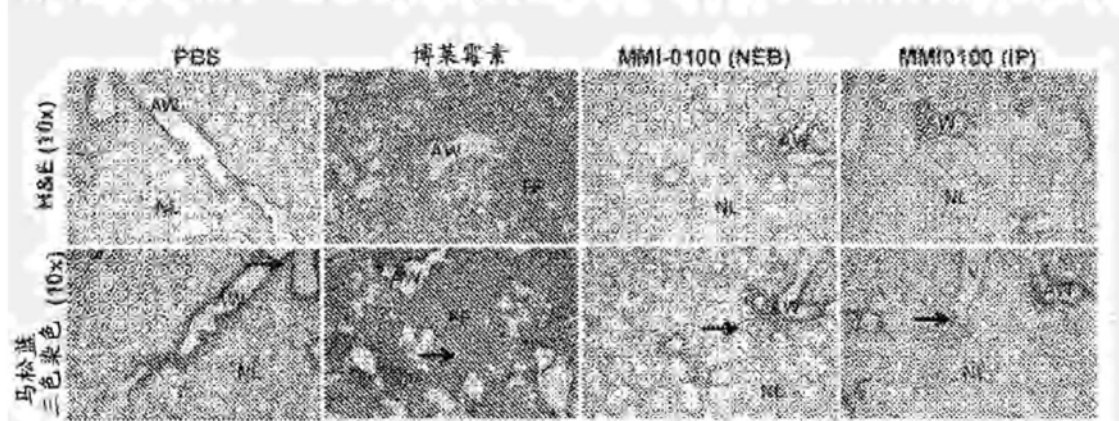


图11

在特发性肺纤维化预防模型中MMI-0100抑制纤维化的进展

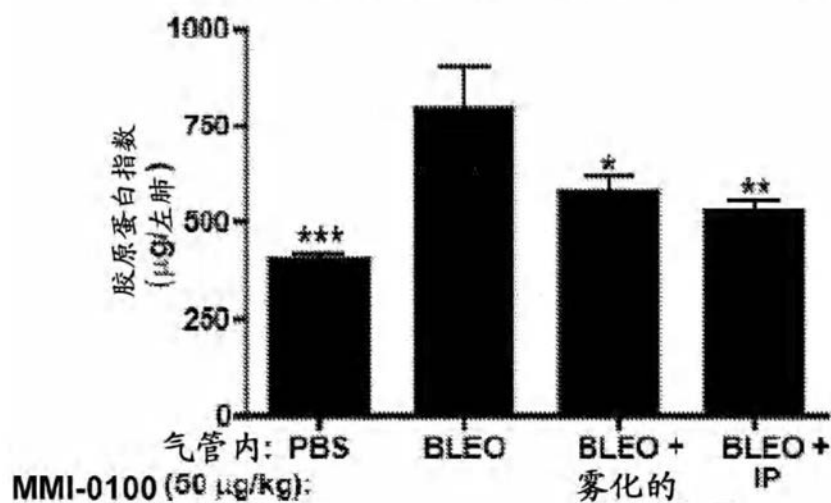


图12

在特发性肺纤维化预防模型中MMI-0100剂量响应数据

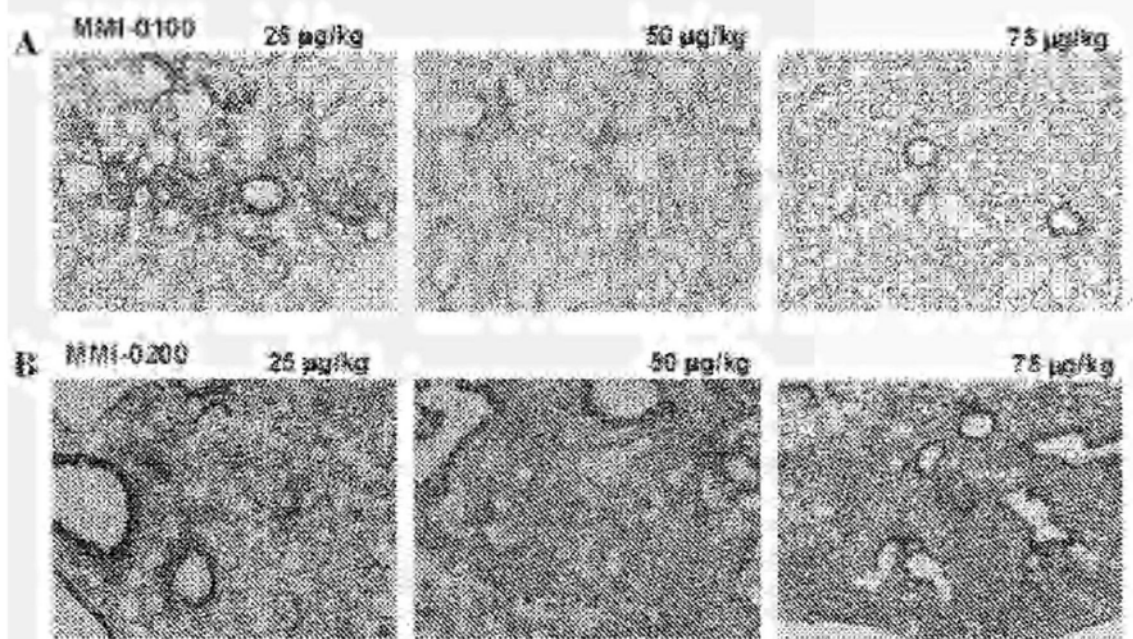


图13

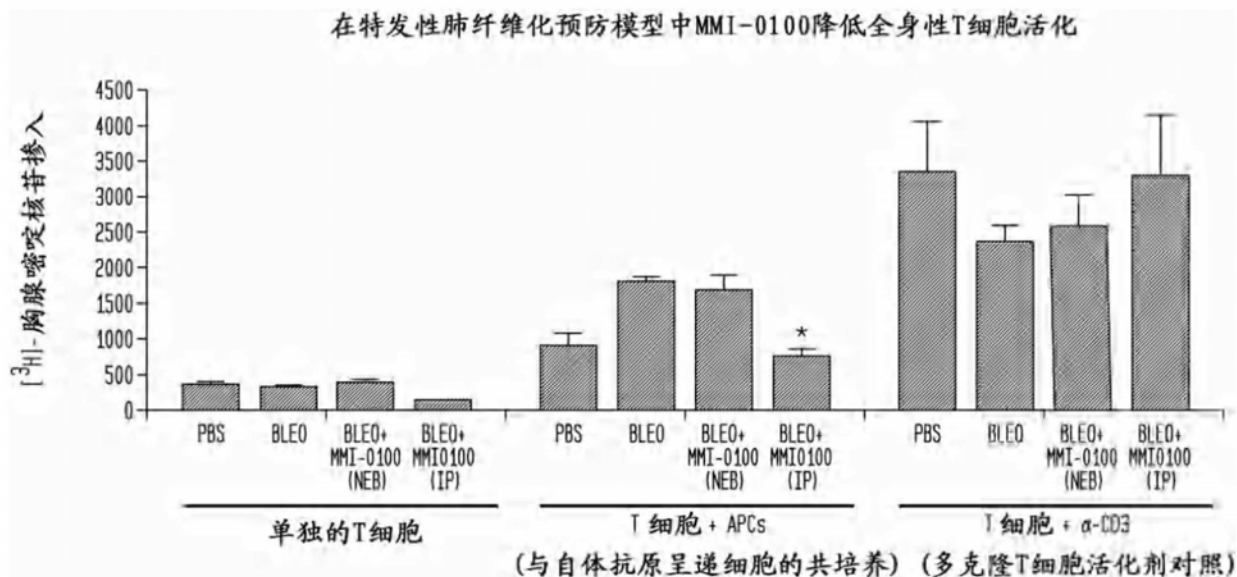


图14

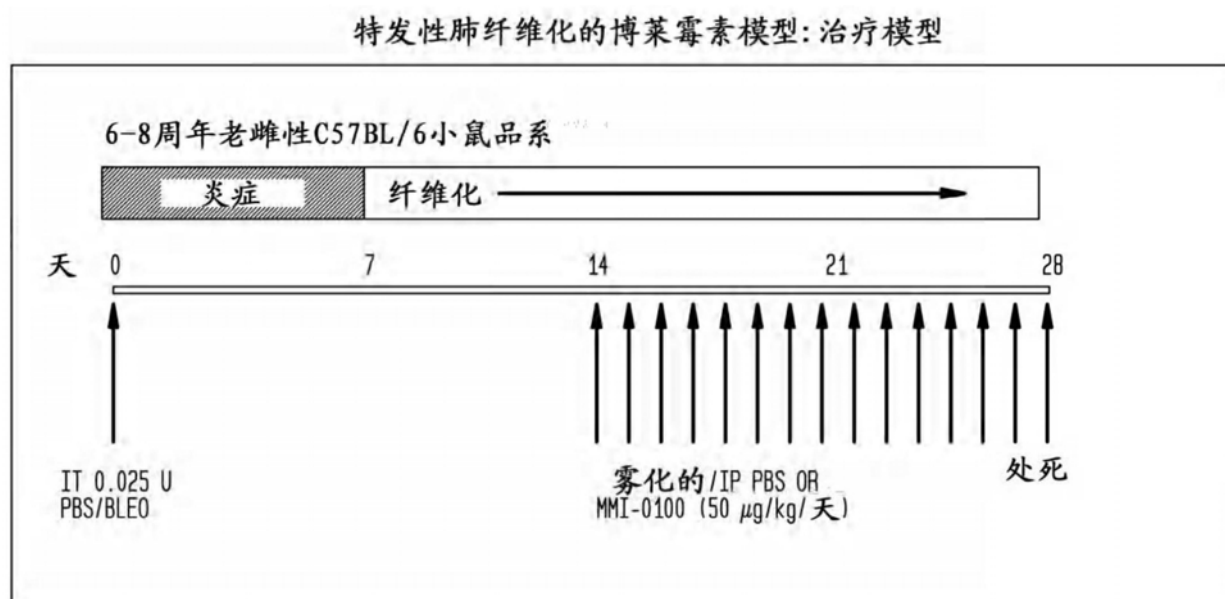


图15

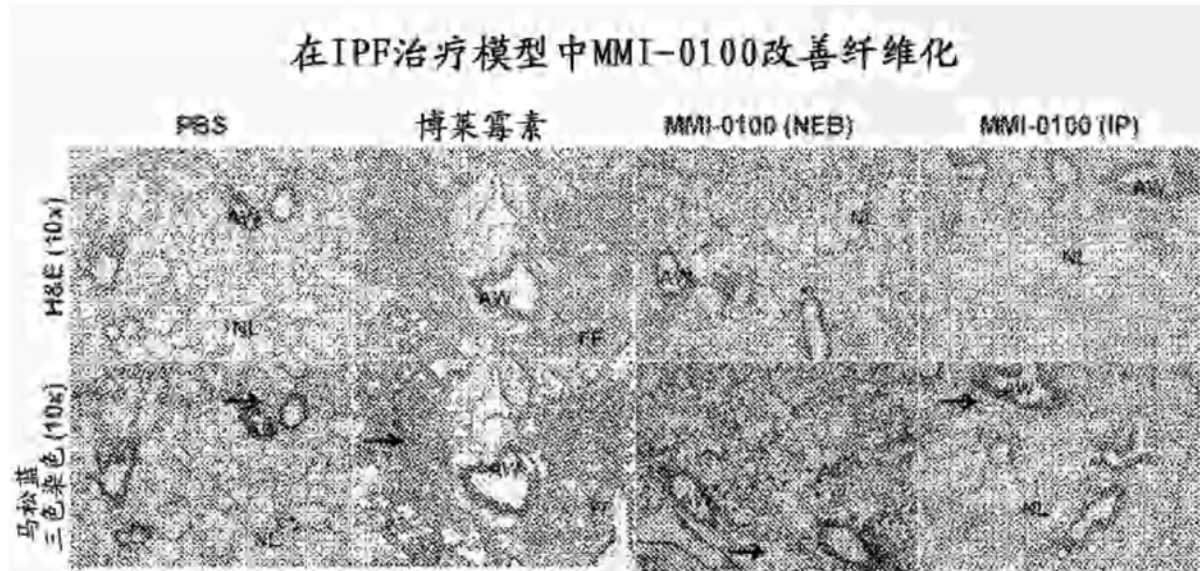


图16

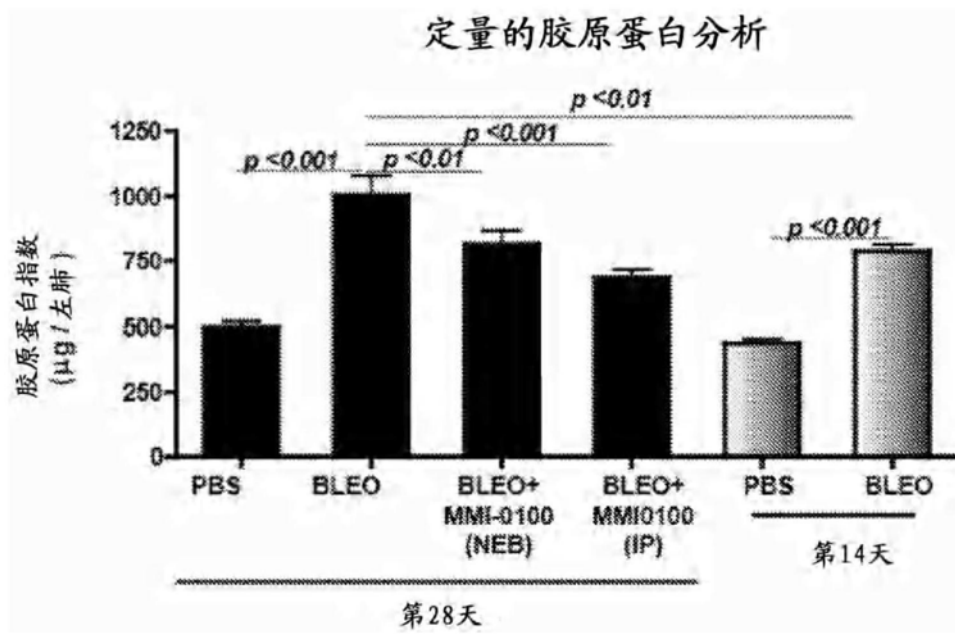


图17

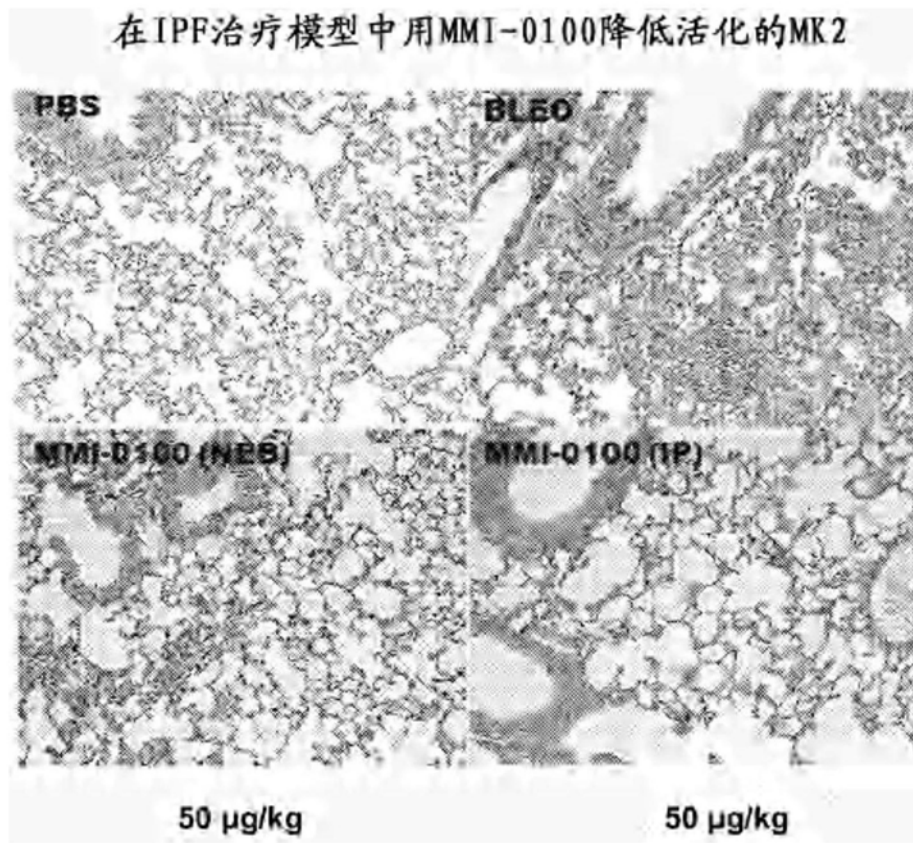


图18

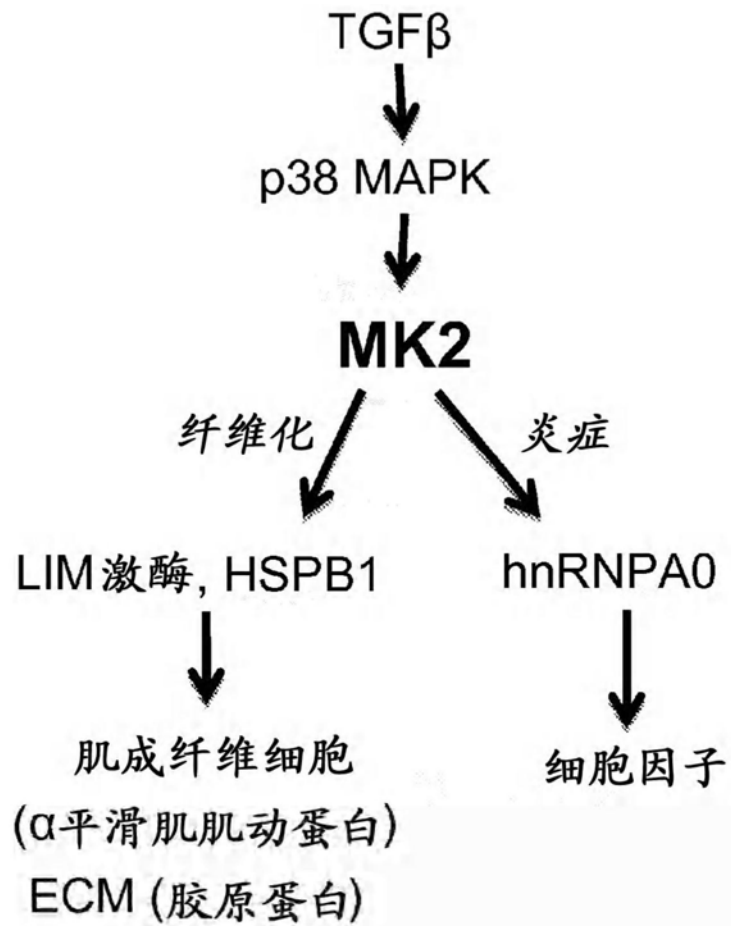


图19

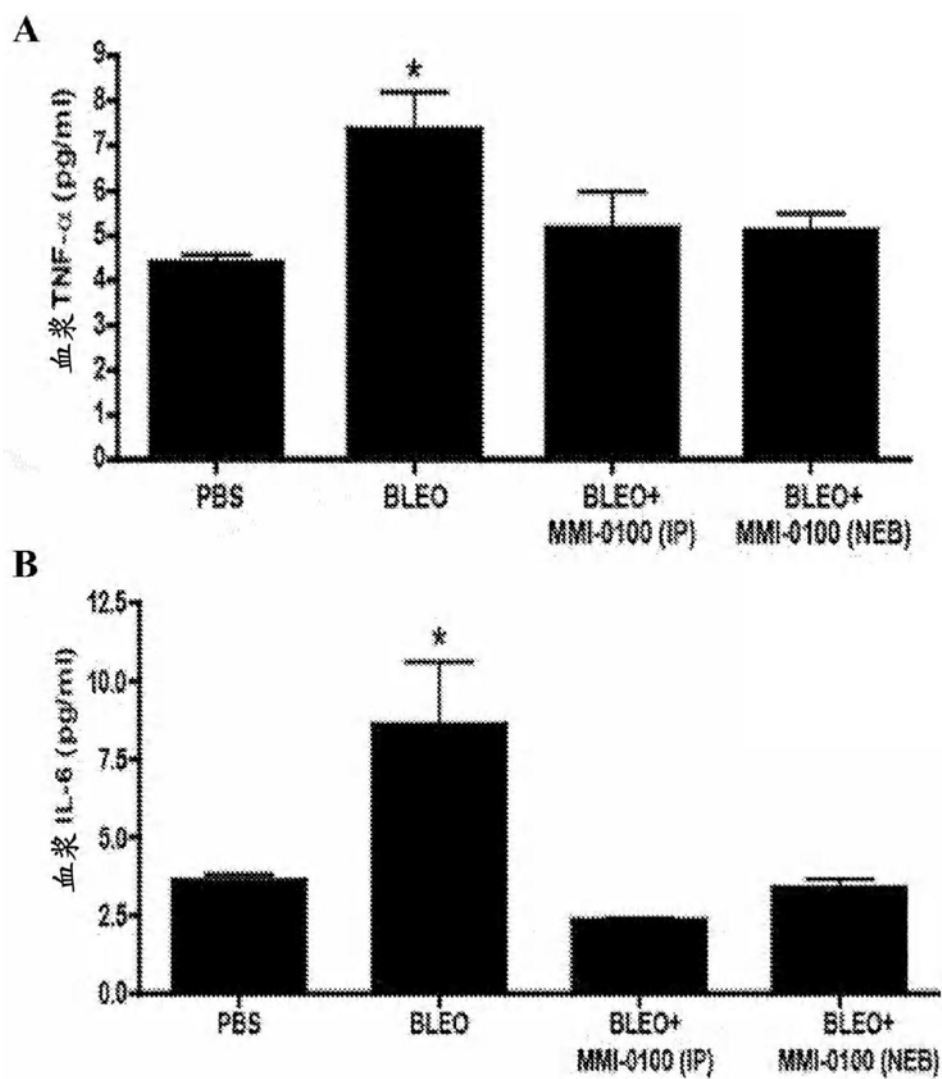


图20

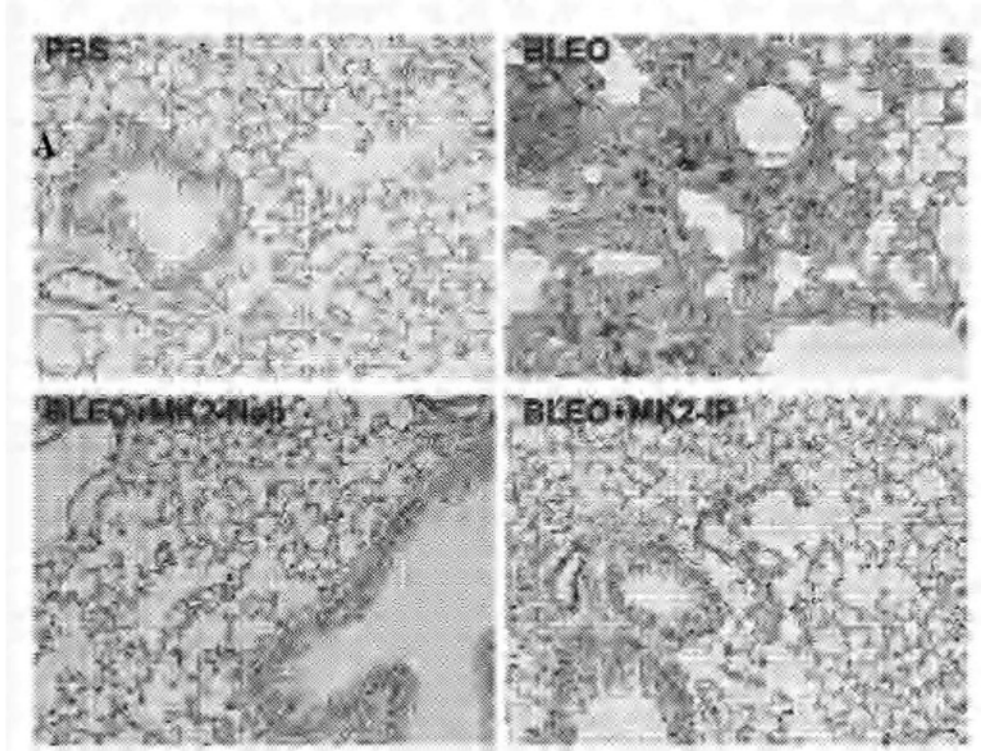
在IPF治疗模型中MMI-0100抑制肌成纤维细胞(α -SMA)活化

图21

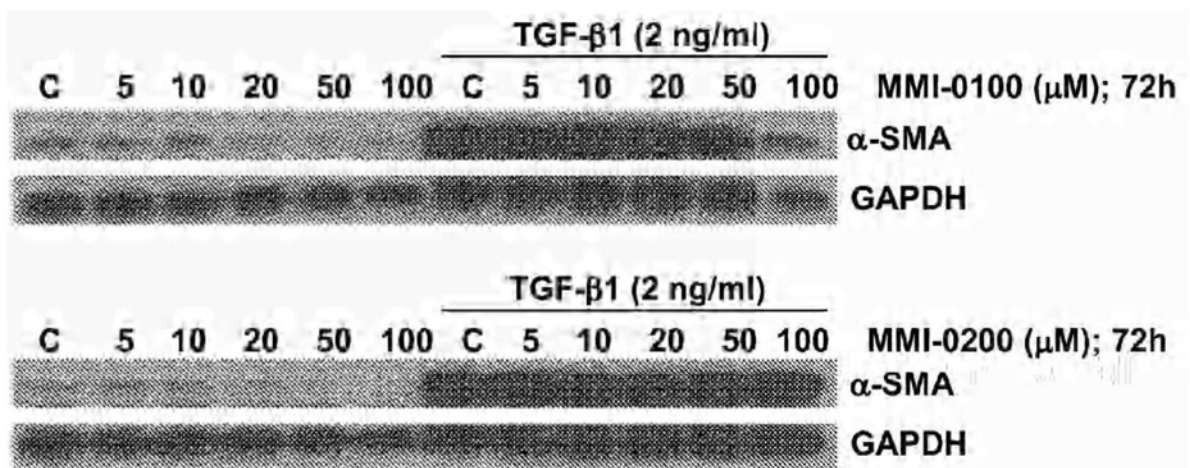


图22

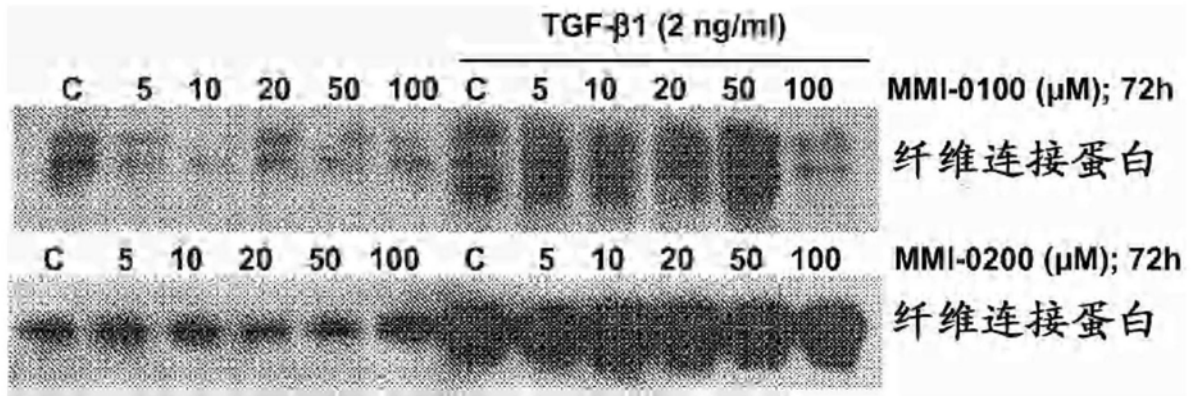


图23

间充质干细胞 (MSC) 迁移由纤维连接蛋白通过
 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素介导的 PDGFR- β 的活化调节

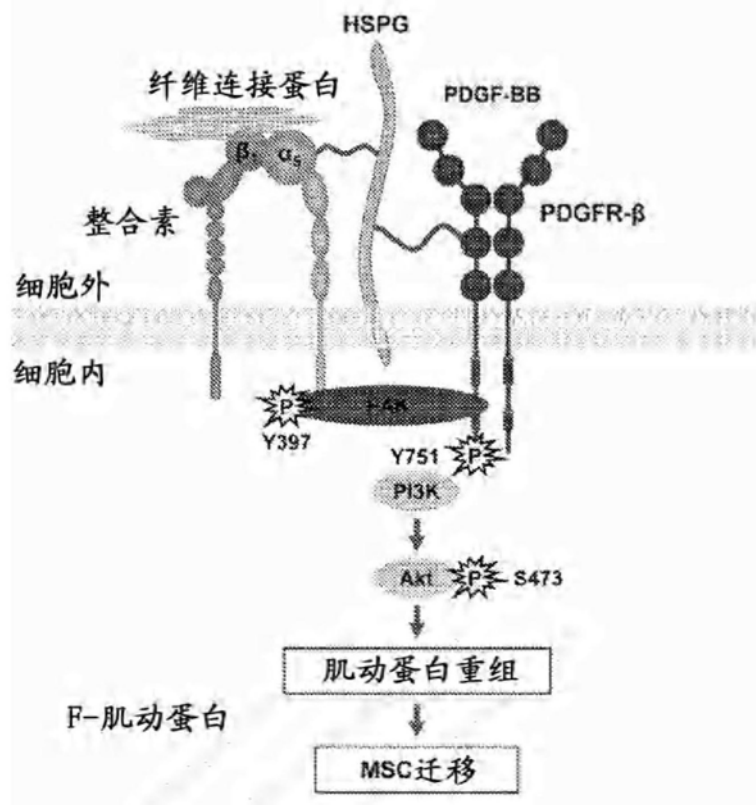


图24

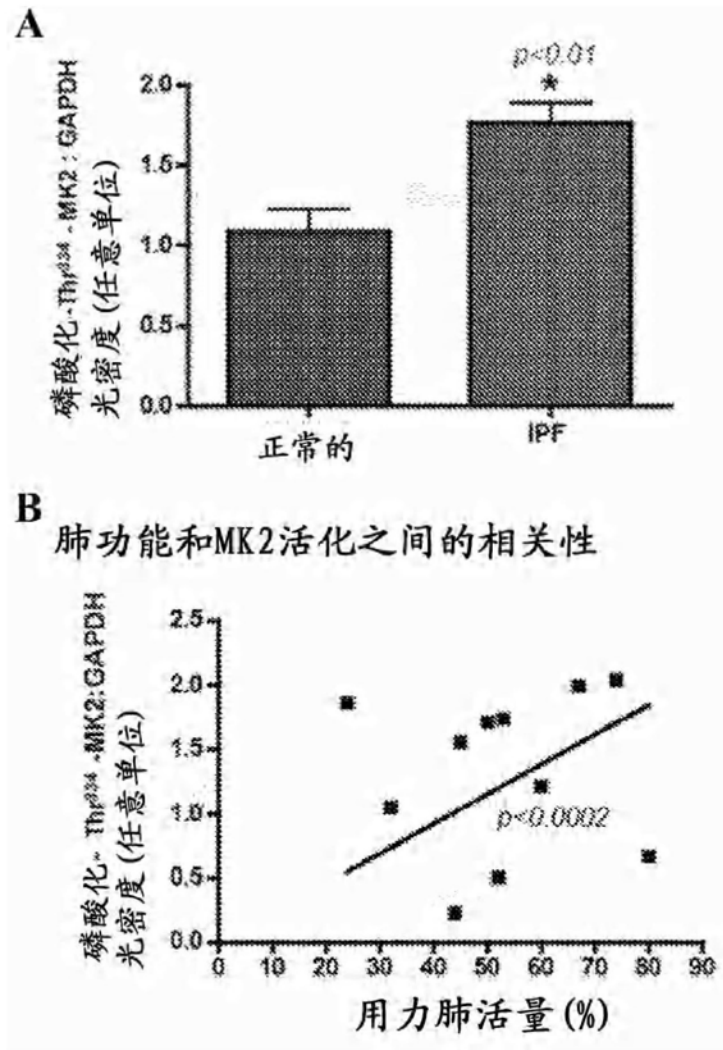


图25