



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119896726 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 29

(21) 申请号 202411827248.5

(22) 申请日 2020.06.03

(30) 优先权数据

62/856,309 2019.06.03 US

(62) 分案原申请数据

202080053704.9 2020.06.03

(71) 申请人 特里瓦生物制剂有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 M·卡拉科 R·斯泰普尔顿

A·布里斯托尔 S·休伯特

C·弗莱雷

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 付文川

(51) Int.Cl.

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 9/52 (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

权利要求书3页 说明书66页

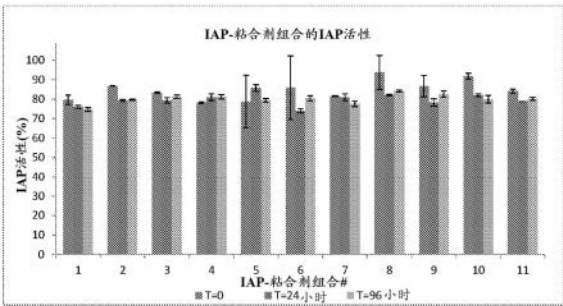
序列表(电子公布) 附图22页

(54) 发明名称

碱性磷酸酶制剂及其用途

(57) 摘要

本发明涉及碱性磷酸酶制剂及其用途,特别地,本发明部分地提供包含碱性磷酸酶的制剂。特别地,提供了包含碱性磷酸酶的改良的释放制剂,其在肠中释放大量碱性磷酸酶。还提供了碱性磷酸酶制剂的治疗用途。



1. 一种改良的释放制剂,其包含至少一种容纳在胶囊中的包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂的改良的释放小丸,所述改良的释放小丸在胃肠道中释放大量基于AP的剂,其中所述改良的释放制剂包含:

约10重量%的基于AP的剂;
约39重量%的蔗糖球;
约20重量%的羟丙基纤维素;
约0.5重量%的缓冲盐;和
约26重量%的肠溶聚合物,

其中当在2-8°C下储存至少1个月、3个月、6个月或12个月时,所述制剂保持至少约80%的基于AP的剂活性。

2. 一种改良的释放制剂,其包含至少一种容纳在胶囊中的包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂的改良的释放小丸,所述改良的释放小丸在胃肠道中释放大量基于AP的剂,其中所述改良的释放制剂包含:

约10.0重量%的基于AP的剂;
约38.9重量%的蔗糖球;
约20.0重量%的羟丙基纤维素;
约0.3重量%的缓冲盐;和
约26.3重量%的肠溶聚合物,

其中当在2-8°C下储存至少1个月、3个月、6个月或12个月时,所述制剂保持至少约80%的基于AP的剂活性。

3. 如权利要求1或2所述的改良的释放制剂,其中所述胶囊包含约15mg或5mg基于AP的剂。

4. 一种改良的释放制剂,其包含至少一种容纳在胶囊中的包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂的改良的释放小丸,所述改良的释放小丸在胃肠道中释放大量基于AP的剂,其中所述改良的释放制剂包含:

约10重量%的基于AP的剂;
约38重量%的蔗糖球;
约19重量%的羟丙基纤维素;
约2重量%的缓冲盐;和
约26重量%的肠溶聚合物,

其中当在2-8°C下储存至少1个月、3个月、6个月或12个月时,所述制剂保持至少约80%的基于AP的剂活性。

5. 一种改良的释放制剂,其包含至少一种容纳在胶囊中的包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂的改良的释放小丸,所述改良的释放小丸在胃肠道中释放大量基于AP的剂,其中所述改良的释放制剂包含:

约9.7重量%的基于AP的剂;
约37.7重量%的蔗糖球;
约19.4重量%的羟丙基纤维素;
约2.4重量%的缓冲盐;和

约26.3重量%的肠溶聚合物,

其中当在2-8°C下储存至少1个月、3个月、6个月或12个月时,所述制剂保持至少约80%的基于AP的剂活性。

6.如权利要求4或5所述的改良的释放制剂,其中所述胶囊包含约25mg或5mg基于AP的剂。

7.如权利要求1、2、4或5中任一项所述的改良的释放制剂,其还包含1-10%的HTP-20。

8.如权利要求1、2、4或5中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述胶囊包含明胶或羟丙基甲基纤维素。

9.一种改良的释放制剂,其包含至少一种包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂的改良的释放小丸,所述改良的释放小丸在胃肠道中释放大量基于AP的剂,其中每个改良的释放小丸包含:

约5重量%的基于AP的剂;

约85重量%的蔗糖球;

约9重量%的羟丙基纤维素;和

约1重量%的缓冲盐。

10.一种改良的释放制剂,其包含至少一种包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂的改良的释放小丸,所述改良的释放小丸在胃肠道中释放大量基于AP的剂,其中每个改良的释放小丸包含:

约4.7重量%的基于AP的剂;

约84.9重量%的蔗糖球;

约9.3重量%的羟丙基纤维素;和

约1.2重量%的缓冲盐。

11.如权利要求9或10所述的改良的释放制剂,其还包含具有20-40%肠溶聚合物增重、任选地具有约30%肠溶聚合物增重的单层肠溶包衣。

12.如权利要求9或10所述的改良的释放制剂,其还包含具有20-40%肠溶聚合物增重的肠溶包衣层和具有5-15%羟丙基纤维素增重、任选地具有约30%肠溶聚合物增重并且具有约7%羟丙基纤维素增重的肠溶包衣层。

13.如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述基于AP的剂包含与SEQ ID NO:39和1-17中的任一个具有至少90%同一性的氨基酸序列。

14.如权利要求13所述的改良的释放制剂,其中所述基于AP的剂包含与SEQ ID NO:39具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

15.如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述基于AP的剂基本上在小肠中释放。

16.如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述基于AP的剂基本上在大肠中释放。

17.如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述制剂包含核心颗粒和在所述核心颗粒上的基底包衣,其中所述基底包衣包含所述基于AP的剂。

18.如权利要求17所述的改良的释放制剂,其中所述核心颗粒包含蔗糖。

19.如权利要求17所述的改良的释放制剂,其中所述制剂包含多个核心颗粒。

20. 如权利要求19所述的改良的释放制剂,其中所述核心颗粒直径大小介于1mm至1.3mm。

21. 如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述制剂还包含在胃液中基本上稳定的改良的释放包衣。

22. 如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述制剂包含受肠道菌群中存在的微生物酶降解的改良的释放包衣。

23. 如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述制剂包含具有pH依赖性的溶解度的改良的释放包衣。

24. 如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述制剂包含具有时间依赖性侵蚀特性的改良的释放包衣。

25. 如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述制剂还包含附加治疗剂。

26. 如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述缓冲盐选自Tris碱、氯化镁、硫酸镁、氯化锌和硫酸锌。

27. 如权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的改良的释放制剂,其中所述肠溶聚合物选自EUDRAGIT L30 D-55、FS 30D、L 100-55、L 100、L 12,5、L 12,5P、RL 30D、RL P0、RL 100、RL 12,5、RS 30D、RS P0、RS100、RS12,5、NE 30D、NE 40D、NM 30D、S100、S12,5和S12,5P。

28. 如权利要求27所述的改良的释放制剂,其中所述肠溶聚合物是EUDRAGIT L 30D-55(聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1)。

29. 权利要求1、2、4、5、9或10中任一项所述的制剂在制备用于治疗或预防有需要的受试者中辐射诱导的病症的药物中的用途。

30. 如权利要求29所述的用途,其中所述辐射诱导的病症选自癌症放射疗法引起的小肠结肠炎、辐射诱导的肠病、结肠炎和直肠炎。

31. 如权利要求29所述的用途,其中所述辐射诱导的病症包括肠毒性。

32. 如权利要求29所述的用途,其中所述辐射诱导的病症包括粘膜萎缩、血管硬化和进行性肠壁纤维化中的一种或多种。

33. 如权利要求29所述的用途,其中所述辐射包括电离辐射,任选地,其中所述辐射包括X射线、 γ 射线和带电粒子中的一种或多种。

34. 如权利要求29所述的用途,其中所述辐射诱导的病症是放射疗法的副作用。

35. 如权利要求34所述的用途,其中所述放射疗法包括约20Gy、或约30Gy、或约40Gy、或约50Gy、或约60Gy、或约70Gy、或约80Gy、或约90Gy、或约100Gy的剂量,任选地分次的。

碱性磷酸酶制剂及其用途

[0001] 本申请是申请号为2020800537049,申请日为2020年6月3日,发明名称为“碱性磷酸酶制剂及其用途”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明部分地提供包含碱性磷酸酶的制剂及其用途。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2019年6月3日提交的美国临时申请第62/856,309号的权益,所述临时申请的全部内容特此通过引用整体并入。

[0005] 以电子方式提交的文本文件的说明

[0006] 随此以电子方式提交的文本文件的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读格式拷贝(文件名称:“SYN-044PC_ST25.txt”;创建日期:2020年6月2日;文件大小:78,381字节)。

背景技术

[0007] 碱性磷酸酶是二聚体金属酶,在生理和较高pH下催化磷酸酯水解并且使多种靶底物去磷酸化。在原核生物和真核生物(例如,大肠杆菌(E.coli)和哺乳动物)中发现碱性磷酸酶(AP)。已经证实哺乳动物AP在肠道稳态、粘膜屏障功能、促进共生细菌和抵御病原体方面发挥重要作用。哺乳动物AP通过主要靶向脂多糖(LPS,一种toll样受体4(TLR4)激动剂)、鞭毛蛋白(一种TLR5激动剂)和CpG DNA(一种TLR9激动剂)发挥其特性。AP还降解肠腔核苷三磷酸(NTP,例如ATP、GTP等),从而促进有益细菌的生长并逆转生态失调。

[0008] 胃肠(GI)病症的治疗越来越多地指望微生物组在保持胃肠道健康功能中作为介质的作用。因而,碱性磷酸酶(AP)在促进有益细菌生长和逆转生态失调方面的作用是推进GI病症治疗选择的一个重要且不断发展的研究领域。因此,AP可在临床上用作例如用于治疗各种胃肠(GI)病症的微生物组保存剂。

[0009] 然而,鉴于药物施用途径必须考虑的各种因素,配制包括AP在内的蛋白生物制剂是一项特别具有挑战性的任务。此外,由于蛋白生物制剂的复杂性,提供既稳定又表现出足够的溶出/释放曲线以允许靶向释放到胃肠道的药物覆层的改良的释放制剂可能具有挑战性。

[0010] 因此,仍然需要用于治疗干预的新型碱性磷酸酶制剂。

发明内容

[0011] 因此,本发明提供了包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂和/或附加治疗剂的改良的释放制剂。在各个实施方案中,所述制剂在胃肠道中释放大量基于AP的剂。在一个实施方案中,所述制剂包含至少一种核心颗粒和在所述核心颗粒上的基底包衣,其中所述基底包衣包含基于AP的剂。在另一个实施方案中,所述制剂包含至少一种核心颗粒,其中所述基于AP的剂包封在所述核心颗粒中。在各个实施方案中,所述制剂包含改良的释放包衣,诸如置于

核心颗粒上的延迟释放包衣。在一些实施方案中,延迟释放包衣在胃液中基本上稳定。在一些实施方案中,延迟释放包衣在肠液中基本上稳定。在一个实施方案中,延迟释放包衣包含EUDRAGIT化合物。在各个实施方案中,所述制剂可以是蔗糖小丸的形式。在一些实施方案中,所述小丸包括多个核心颗粒。

[0012] 这些基于AP的剂可用于多种疗法,包括预防或治疗CDI和/或艰难梭菌(*C.difficile*)相关疾病或其它抗生素诱导的胃肠道不良反应。本发明的基于AP的剂还用于针对微生物组相关病症的疗法,包括但不限于代谢病症、神经系统病症、乳糜泻、囊性纤维化、放射性肠炎、脓毒症和HIV介导的肠道生态失调。

[0013] 例如,基于AP的剂可用于使患者接受抗生素疗法,同时防止因过量抗生素对微生物组产生负面影响而导致的疾病。此类用途不会干扰抗生素的全身效用。相反,不希望受理论束缚,基于AP的剂维持肠道微生物区系,从而防止与本文所述的各种疾病状态相关的微生物区系的破坏。

附图说明

[0014] 图1描绘了与本文所述的制剂中存在的基于碱性磷酸酶的剂有关的序列。

[0015] 图2示出了IAP-粘合剂评价中96小时内的IAP活性。在每组直方图中,呈现了不同时间点,其中最左边的条形表示0小时;中间的条形表示24小时;并且最右边的条形表示96小时。

[0016] 图3描绘了IAP-赋形剂评价中16天内的IAP活性。在每组直方图中,呈现了不同的时间点,从最左侧到最右侧的条形表示0小时、24小时、48小时、6天和16天。

[0017] 图4描绘了一个包衣小丸(包被在小丸上的30% EUDRAGIT L30 D-55)的SEM图片。

[0018] 图5描绘了一个包衣小丸(包被在小丸上的30% EUDRAGIT L30 D-55)的SEM图片。

[0019] 图6描绘了通过UV分析获得的在含有禁食状态模拟胃液(FaSSGF)/禁食状态模拟肠液(FaSSIF)或单独的FaSSIF的溶出装置中包衣IAP小丸的两种制剂的释放百分比。

[0020] 图7示出了通过酶促测定获得的包衣小丸在FaSSGF/FaSSIF或单独的FaSSIF中的活性百分比。

[0021] 图8示出了基于线性趋势线方程为计算不同时间点的样品浓度而生成的校准曲线。“SYN-020”与IAP同义(即,SEQ ID NO:39)。

[0022] 图9描绘了一个月后使用包衣小丸胶囊的溶出试验的稳定性结果。

[0023] 图10示出了溶出试验的结果,其中包衣小丸已储存约一年。

[0024] 图11A-H描绘了非GMP SYN-020 5mg和15mg胶囊剂量的分析结果。

具体实施方式

[0025] 在各个方面,本发明提供了包含基于碱性磷酸酶(AP)的剂和/或附加治疗剂的改良的释放制剂。在各个实施方案中,所述制剂在胃肠道中释放大量基于AP的剂。在一个实施方案中,所述制剂包含至少一种核心颗粒和在所述核心颗粒上的基底包衣,其中所述基底包衣包含基于AP的剂。在各个实施方案中,所述制剂包含改良的释放包衣,诸如置于核心颗粒上的延迟释放包衣。在一些实施方案中,延迟释放包衣在胃液中基本上稳定。在一个实施方案中,延迟释放包衣包含EUDRAGIT化合物。

[0026] 基于碱性磷酸酶的剂

[0027] 本发明部分地涉及一种或多种基于碱性磷酸酶的剂(基于AP的剂)的药物组合物、制剂和用途。可用于本发明的示例性的基于AP的剂包括但不限于肠碱性磷酸酶(IAP;例如人IAP、小牛IAP或牛IAP、鸡IAP、山羊IAP)、牛肠碱性磷酸酶(bIAP)、重组牛肠碱性磷酸酶(rbIAP)、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、胎盘样碱性磷酸酶、生殖细胞碱性磷酸酶(GCAP)、组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP;其主要存在于肝脏、肾脏和骨中)、骨碱性磷酸酶、肝碱性磷酸酶、肾碱性磷酸酶、细菌碱性磷酸酶、真菌碱性磷酸酶、虾碱性磷酸酶、修饰的IAP、重组IAP或任何具有碱性磷酸酶活性的多肽。

[0028] 在各个实施方案中,本发明考虑包括但不限于肠碱性磷酸酶(IAP)、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、生殖细胞碱性磷酸酶(GCAP)和组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)的哺乳动物碱性磷酸酶的用途。

[0029] IAP

[0030] 在一些实施方案中,基于AP的剂是IAP。IAP在近端小肠中产生,并经由糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚点与肠细胞结合。一些IAP连同细胞脱落的囊泡一起释放到肠腔中,并作为可溶性蛋白经由磷脂酶从细胞剥离。然后酶穿过小肠和大肠,从而可以在粪便中检测到一些活性酶。在一个实施方案中,IAP是人IAP(hIAP)。在一个实施方案中,IAP是小牛IAP(cIAP),也称为牛IAP(bIAP)。bIAP有多种同工酶,例如,bIAP II和IV具有比bIAP I更高的比活性。在一个实施方案中,IAP是cIAP或bIAP同工酶中的任一种(例如,bIAP I、II和IV)。在一个实施方案中,IAP是bIAP II。在另一个实施方案中,IAP是bIAP IV。

[0031] IAP变体

[0032] IAP的定义中还包括IAP变体。与亲本野生型序列相比,IAP变体具有至少一个或多个氨基酸修饰,通常是氨基酸取代。在一些实施方案中,本发明的IAP包含与本文公开的任何序列具有至少约60%(例如,约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%)序列同一性的氨基酸序列。另外,如本文所述测量的,IAP变体保留其大部分或全部生物化学活性。

[0033] 哺乳动物碱性磷酸酶是GPI锚定蛋白。它们具有信号肽并被翻译到分泌途径中。一旦进入内质网(ER),蛋白就会糖基化和折叠。存在两个二硫键以及单个在表面上显然无法接近的游离半胱氨酸。在晚期ER中,羧基末端被去除并附加GPI锚点。因此,GPI锚定是发生在碱性磷酸酶羧基末端的过程。在锚定位点包含终止密码子使得生物活性蛋白(可能是同型二聚体)的分泌成为可能。虽然不存在共有序列,但羧基末端包括三个氨基酸,称为 ω 、 $\omega+1$ 和 $\omega+2$,其后是一小段亲水性氨基酸,然后是一段疏水性氨基酸。不希望受理论束缚,据信疏水性对于使羧基末端嵌入ER膜中很关键。在那里,酶促反应用GPI锚点置换羧基末端。

[0034] 在人胎盘碱性磷酸酶(hPLAP)中,GPI锚点附接在序列DAAH中的天冬氨酸处。类似地,hIAP、bIAP II和bIAP IV也具有该保守的DAAH序列,可能用作GPI锚定位点。hPLAP的突变研究表明,阻止GPI锚定会导致细胞内滞留。另外,锚定位点周围或疏水结构域中的突变

1) 阻止锚点附接, 导致细胞内滞留或2) 不会阻断锚点附接。不希望受理论束缚, 据信疏水结构域充当GPI锚点附接的信号。截短或消除疏水结构域导致分泌。最后, 疏水结构域中存在hPLAP中使蛋白能够在其疏水结构域完整的情况下分泌的单一突变。

[0035] 在其它实施方案中, 本发明的基于AP的剂是分泌性蛋白; 即, 在一些实施方案中, 基于AP的剂不是GPI锚定的, 导致分泌而不是细胞内滞留。这可以通过几种方式实现。在一些实施方案中, 基于AP的剂可能缺乏GPI锚定位点, 例如去除了DAAH位点, 导致分泌。可替代地, 这可以在一些实施方案中实现, 基于AP的剂包含紧接在GPI锚定位点之前插入的终止密码子。在一个实施方案中, 基于AP的剂在DAAH共有位点中的天冬氨酸后 (例如, 在hIAP和bIAP IV的氨基酸503处或bIAP II的氨基酸506处) 包含终止密码子。图1描绘了具有终止密码子的hIAP (SEQ ID NO:4)、具有终止密码子的bIAP II (SEQ ID NO:5) 和具有终止密码子的bIAP IV (SEQ ID NO:6)。在一个实施方案中, 基于AP的剂是bIAP IV并且在氨基酸508之后包括终止密码子以模拟如图1所描绘的分泌性PLAP构建体 (SEQ ID NO:7)。

[0036] 人IAP

[0037] 在各个实施方案中, 基于AP的剂是hIAP。在一些实施方案中, 基于AP的剂是包含如图1所描绘的SEQ ID NO:1的氨基酸序列的hIAP或如本文所述的变体, 只要使用本文概述的测定法, hIAP变体与野生型酶相比保留至少80%、85%、90%、95%、98%或100%的磷酸酶活性。

[0038] hIAP的定义中包括氨基酸修饰, 其中氨基酸取代在本发明中特别有用。例如, 不希望受理论束缚, 据信在基于AP的剂的羧基末端 (例如, 在SEQ ID NO:1的位置500处) 的半胱氨酸可干扰蛋白折叠。因此, 在一些实施方案中, 基于AP的剂包括半胱氨酸的突变 (例如, 在SEQ ID NO:1的位置500处)。在一些实施方案中, 半胱氨酸被任何氨基酸置换, 但是甘氨酸在一些实施方案中特别有用。此外, 还可以删除C端半胱氨酸。

[0039] 如本领域技术人员将理解的, 可以在如本文所讨论的hIAP中产生另外的氨基酸修饰。例如, 在一些实施方案中, 终止密码子可以插入在DAAH共有位点中的天冬氨酸之后 (例如, 在hIAP的氨基酸503处)。图1描绘了具有插入的终止密码子的hIAP (SEQ ID NO:4)。

[0040] 牛IAP

[0041] 在一些实施方案中, IAP是牛IAP (bIAP)。

[0042] 在各个实施方案中, 基于AP的剂是如本文所述的IAP II (bIAP II) 或变体, 只要使用本文概述的测定法, bIAP变体保留至少80%、85%、90%、95%、98%或100%的磷酸酶活性。在一个实施方案中, bIAP II包含bIAP I的信号肽和羧基末端。在一个实施方案中, bIAP II在位置248处包含天冬氨酸 (类似于bIAP IV)。在一个实施方案中, bIAP II包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。图1描绘了具有248D的BIAP II-SEQ ID NO:2。信号肽和480后的序列源自bIAP I。

[0043] bIAP II的定义中还包括本文所述的氨基酸变体。例如, 在一些实施方案中, 终止密码子可以插入在DAAH共有位点中的天冬氨酸之后 (例如, 在bIAP II的氨基酸506处)。图1描绘了具有插入的终止密码子的bIAP II (SEQ ID NO:5)。

[0044] 在各个实施方案中, bIAP II包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0045] 具有终止密码子而没有前导序列的BIAP II (SYN-020) (SEQ ID NO:39):

[0046] LIPAEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNGKLGPEPL

AMDQFP

[0047] YVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYRTIGVSAAARYNCNTTRGNEVTSVINRAKKAGKAVG
VVT TT

[0048] RVQHASPAGAYAHTVNRNWYSADLPADAQKNGCQDIAAQLVYNMDIDVILGGGRMYMFEGTPDPEYP
DDAS

[0049] VNGVRKDKQNLVQEWQAKHQGAQYVWNRTALLQAADDSSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDHTKDPTLAEM
TE

[0050] AALQVLSRNPRGFYLFVEGGRIDHGHHDGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSELDTLILVTADHSHVF
SFGGYTL

[0051] RGTSIFGLAPGKALDSKSYTSILYGNGPGYALGGGSRPDVNGSTSEEPSYRQQAAPLASETHGGEDVA
VFARG

[0052] PQAHLVHGVQEETFVAHIMAFAGCPEPYTDCNLPAPATATSIDP

[0053] 在各个实施方案中,基于AP的剂是如本文所述的bIAP IV或其变体,只要使用本文概述的测定法,bIAP IV变体保留至少80%、85%、90%、95%、98%或100%的磷酸酶活性。在一个实施方案中,bIAP IV包含如图1描绘的SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0054] bIAP IV的定义中还包括本文所述的氨基酸变体。例如,在一些实施方案中,终止密码子可以插入在DAAH共有位点中的天冬氨酸之后(例如,在bIAP IV的氨基酸503处)。图1描绘了具有插入的终止密码子的bIAP IV(SEQ ID NO:6)。在一个实施方案中,基于AP的剂是bIAP IV并且在氨基酸508之后包括终止密码子以模拟如图1所描绘的分泌性PLAP构建体(SEQ ID NO:7)。

[0055] 细菌AP

[0056] 在各个实施方案中,本发明考虑使用细菌碱性磷酸酶。在一些实施方案中,本发明的基于AP的剂源自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。枯草芽孢杆菌是在土壤和人类胃肠道中发现的一种革兰氏阳性细菌。枯草芽孢杆菌将高水平的正确折叠的蛋白分泌到环境和人类胃肠道中。不希望受理论束缚,据信在胃肠道中枯草芽孢杆菌分泌的蛋白可以抵抗常见胃肠蛋白酶的降解。枯草芽孢杆菌高水平表达碱性磷酸酶多基因家族。在这些同工酶中,碱性磷酸酶IV负责枯草芽孢杆菌中大部分碱性磷酸酶的表达和活性。在一些实施方案中,本发明的基于AP的剂源自地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。在一些实施方案中,本发明的基于AP的剂源自大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

[0057] 因此,在一个说明性的实施方案中,本发明的基于AP的剂源自枯草芽孢杆菌的碱性磷酸酶IV。在一个实施方案中,细菌碱性磷酸酶可具有如图1描绘的核苷酸和氨基酸序列,包括枯草芽孢杆菌JH642碱性磷酸酶IV,成熟蛋白核苷酸序列-SEQ ID NO:16;和枯草芽孢杆菌JH642碱性磷酸酶IV,成熟蛋白氨基酸序列-SEQ ID NO:17,或如本文所述的变体,只要使用本文概述的测定法,hIAP变体保留至少80%、85%、90%、95%、98%或100%的磷酸酶活性。

[0058] 在一些实施方案中,基于AP的剂包括具有改变催化活性的一个或多个突变的细菌碱性磷酸酶。在一些实施方案中,细菌碱性磷酸酶包括一个或多个突变,使得它们的催化活性与哺乳动物碱性磷酸酶相似或更高。在一些实施方案中,细菌碱性磷酸酶包括改变其去磷酸化特性的一个或多个突变。在一个实施方案中,本发明的细菌碱性磷酸酶表现出与哺

乳动物碱性磷酸酶相似的去磷酸化特性。在一些实施方案中,细菌碱性磷酸酶包括改变它们在较高pH下的活性的一个或多个突变。在一个实施方案中,本发明的细菌碱性磷酸酶在较高pH下表现出与哺乳动物碱性磷酸酶相似的活性。在一些实施方案中,细菌碱性磷酸酶包括改变其金属需求的一个或多个突变。在一个实施方案中,本发明的细菌碱性磷酸酶表现出与哺乳动物碱性磷酸酶相似的金属需求(例如,Mg)。

[0059] 例如,在某些实施方案中,本发明的基于AP的剂源自枯草芽孢杆菌JH642碱性磷酸酶IV,并且在位置101、328、A330和374处具有一个或多个突变。例如,基于AP的剂可以包括以下突变中的一种或多种:D101A、W328H、A330N和G374C。

[0060] 融合蛋白

[0061] 在一些实施方案中,基于AP的剂包含与“融合配偶体”融合的碱性磷酸酶,该“融合配偶体”是添加到IAP结构域的N-末端或C-末端的蛋白结构域,任选地包括接头。在一些实施方案中,碱性磷酸酶与促进蛋白折叠和/或蛋白纯化和/或蛋白二聚化和/或蛋白稳定性的蛋白结构域融合。在各个实施方案中,基于AP的剂融合蛋白具有延长的血清半衰期。在各个实施方案中,本发明的基于AP的剂是Fc融合蛋白。

[0062] 在一个实施方案中,碱性磷酸酶与免疫球蛋白Fc结构域和/或铰链区融合。在一个实施方案中,本发明的基于AP的剂包含与IgG的铰链区和/或Fc结构域融合的碱性磷酸酶。

[0063] 在各个实施方案中,基于AP的剂与包含一个或多个突变的IgG的Fc结构域融合。在一些实施方案中,IgG的Fc结构域中的所述一个或多个突变起到增加血清半衰期和寿命的作用。在一些实施方案中,IgG的Fc结构域在氨基酸残基251-256、285-290、308-314、385-389和428-436处包含一个或多个突变,根据如同Kabat中的EU索引编号(参见Kabat等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC)。在一些实施方案中,IgG的Fc结构域中的至少一个氨基酸取代位于氨基酸残基252、254、256、309、311、433或434处。在一个实施方案中,氨基酸残基252处的氨基酸取代是用酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或苏氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基254处的氨基酸取代是用苏氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基256处的氨基酸取代是用丝氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、天冬氨酸或苏氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基309处的氨基酸取代是用脯氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基311处的氨基酸取代是用丝氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基385处的氨基酸取代是用精氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、组氨酸、赖氨酸、丙氨酸或甘氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基386处的氨基酸取代是用苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、赖氨酸、精氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基387处的氨基酸取代是用精氨酸、脯氨酸、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸或丙氨酸取代。在一个实施方案中,氨基酸残基389处的氨基酸取代是用脯氨酸、丝氨酸或天冬酰胺取代。在一个实施方案中,氨基酸残基433处的氨基酸取代是用精氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、脯氨酸或谷氨酰胺取代。在一个实施方案中,氨基酸残基434处的氨基酸取代是用组氨酸、苯丙氨酸或酪氨酸取代。

[0064] 在一些实施方案中,IgG的Fc结构域在氨基酸残基252、254、256、433、434或436处包含一个或多个突变。在一个实施方案中,IgG的Fc结构域包括三重M252Y/S254T/T256E突变或YTE突变。在另一个实施方案中,IgG的Fc结构域包括三重H433K/N434F/Y436H突变或

KFH突变。在再一个实施方案中,IgG的Fc结构域包括组合的YTE和KFH突变。IgG的Fc结构域中的其它说明性突变例如在Robbie等人, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2013), 57(12):6147-6153, Dall'Acqua等人, *JBC* (2006), 281(33):23514-24, Dall'Acqua等人, *Journal of Immunology* (2002), 169:5171-80和美国专利第7,083,784号中有描述,其全部内容特此通过引用并入。在各个实施方案中,IgG的Fc结构域中的所述一个或多个突变增加了对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力。在一些实施方案中,IgG的Fc结构域中的所述一个或多个突变在约6.0、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4或约6.5的pH下增加对FcRn的亲和力。

[0065] 在各个实施方案中,碱性磷酸酶与PEG、XTEN基化(例如作为rPEG)、聚唾液酸(POLYXEN)、白蛋白、弹性蛋白样蛋白、弹性蛋白样蛋白(ELP)、PAS、HAP、GLK、CTP和转铁蛋白中的一种或多种融合。在各个实施方案中,碱性磷酸酶与BioDrugs (2015) 29:215-239中描述的一种或多种剂融合,该文献的全部内容特此通过引用并入。

[0066] 接头

[0067] 在一个实施方案中,碱性磷酸酶经由连接GPI锚定位点的接头与蛋白结构域(例如,免疫球蛋白Fc结构域)融合。例如,碱性磷酸酶可以经由GPI锚定序列处的天冬氨酸与蛋白结构域融合。本发明考虑使用多种接头序列。在各个实施方案中,接头可以源自天然存在的多结构域蛋白或者是例如以下文献中描述的经验接头:Chichili等人, (2013), *Protein Sci.* 22(2):153-167, Chen等人, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369,其全部内容特此通过引用并入。在一些实施方案中,可以使用接头设计数据库和计算机程序,诸如Chen等人, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369和Crasto等人, (2000), *Protein Eng.* 13(5):309-312中描述的那些来设计接头,其全部内容特此通过引用并入。在各个实施方案中,接头可以是功能性的。例如但不限于,接头可以起到改善本发明基于AP的剂的折叠和/或稳定性,改善表达,改善药代动力学,和/或改善生物活性的作用。在另一个实例中,接头可以起到将基于AP的剂靶向特定的细胞类型或位置的作用。

[0068] 在一些实施方案中,接头是多肽。在一些实施方案中,接头长度小于约100个氨基酸。例如,接头长度可小于约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3或约2个氨基酸。在一些实施方案中,接头是柔性的。在另一个实施方案中,接头是刚性的。

[0069] 在各个实施方案中,接头基本上由甘氨酸和丝氨酸残基组成(例如,约30%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%、或约80%、或约90%、或约95%、或约97%的甘氨酸和丝氨酸)。在一个实施方案中,接头序列是GGSGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:18)。其它说明性接头包括但不限于具有序列LE、GGGS (SEQ ID NO:19)、(GGGS)_n (n=2-4) (SEQ ID NO:20-22)、(Gly)₈ (SEQ ID NO:23)、(Gly)₆ (SEQ ID NO:24)、(EAAAK)_n (n=1-3) (SEQ ID NO:25-27)、A(EAAAK)_nA (n=2-5) (SEQ ID NO:28-31)、AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO:32)、A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A (SEQ ID NO:33)、PAPAP (SEQ ID NO:34)、KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:35)、EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO:36)、GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO:37)和(XP)_n的接头,其中X表示任何氨基酸,例如Ala、Lys或Glu。在一些实施方案中,接头是抗体(例如,IgG、IgA、IgD和IgE,包括亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及IgA1和IgA2))的铰链区。在一些实施方案中,接头是合成接头,诸如PEG。

[0070] 本发明的说明性Fc融合构建体包括图1中描绘的那些,包括具有Fc融合的BIAP II (SEQ ID NO:8)-Fc结构域加有下划线;和具有Fc融合的BIAP IV (SEQ ID NO:9)-Fc结构域加有下划线。

[0071] 酶原融合物

[0072] 本发明另外提供了用于酶原功能的C端融合物。不希望受理论束缚,据信哺乳动物碱性磷酸酶也可以作为无活性的酶原产生。这是因为碱性磷酸酶可以使ATP去磷酸化,使得ER中的活性可消耗ER的主要能量来源。不希望受理论束缚,据信抑制功能位于羧基末端,羧基末端在添加GPI锚点时会被解除。可替代地,其它活动,诸如折叠或金属(Zn或Mg)夹杂可以控制活性。

[0073] 在各个实施方案中,本发明的基于AP的剂是酶原。在一个实施方案中,酶原的活性受羧基末端阻抑。在一个实施方案中,羧基末端的蛋白酶去除重新激活碱性磷酸酶的酶活性。在一个实施方案中,酶原比没有羧基末端的酶更有效地分泌。

[0074] 酵母属碱性磷酸酶Pho8是作为无活性的酶原产生的。它不是GPI锚定的,而是一种跨膜蛋白,其氨基末端从溶酶体延伸到细胞质中。在溶酶体内,一种酶PEP4裂解羧基末端以激活该酶。

[0075] 在一些实施方案中,为了产生酶原,碱性磷酸酶的天然羧基末端被来自hPLAP的类似序列置换。在一些实施方案中,在疏水性羧基尾中产生突变以促进蛋白分泌而不裂解羧基末端。在一个说明性的实施方案中,在疏水性羧基末端产生单个点突变,诸如用例如精氨酸取代亮氨酸(例如ALLPLLAGTL变为例如ALLPLRAGTL)以导致酶的分泌而无需去除羧基末端。

[0076] 在一个实施方案中,将基于AP的剂改变为包括允许后续去除羧基末端的特定酶裂解位点。在一个实施方案中,基于AP的剂包括蛋白酶裂解位点。说明性的蛋白酶裂解位点包括但不限于由弗林蛋白酶、鼻病毒16 3C蛋白酶、Xa因子蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、V-8蛋白酶、颌下腺蛋白酶(submaxillaris protease)、梭菌蛋白酶、凝血酶、胶原酶和任何其它内切蛋白酶识别的裂解位点。在一个替代实施方案中,基于AP的剂包括被胃肠道中存在的消化酶识别的裂解位点。在此类实施方案中,基于AP的剂可以作为前药施用,该前药随后在胃肠道中被激活。

[0077] 在一个说明性的实施方案中,酶原是具有图1描绘的序列的bIAP IV的酶原,包括具有hPLAP羧基末端和用于未加工的分泌和RV3C裂解的突变(在...LEVLFQGP...处)的BIAP IV (SEQ ID NO:10);具有hPLAP羧基末端和用于未加工的分泌和FXa裂解的突变(在...IEGR...处)的BIAP IV (SEQ ID NO:11)。

[0078] 表达变体

[0079] 在各个实施方案中,本发明的基于AP的剂有效表达并且从宿主细胞分泌。在一个实施方案中,本发明的基于AP的剂在宿主细胞中有效转录。在另一个实施方案中,基于AP的剂在宿主细胞中表现出增强的RNA稳定性和/或转运。在另一个实施方案中,基于AP的剂在宿主细胞中有效翻译。在另一个实施方案中,基于AP的剂表现出增强的蛋白稳定性。

[0080] 在各个实施方案中,基于AP的剂在宿主细胞中有效表达。在一个实施方案中,优化了编码基于AP的剂的DNA构建体的Kozak序列。Kozak序列是位于ATG起始密码子侧翼的,指示核糖体开始翻译的核苷酸序列。Kozak序列的设计具有灵活性,但一种规范序列是

GCCGCCACCATGG (SEQ ID NO:38)。-3位置的嘌呤和+4位置的G是翻译起始最重要的碱基。对于hIAP、bIAP II和bIAP IV,第二个氨基酸,即起始甲硫氨酸之后的氨基酸,是谷氨酰胺。谷氨酰胺的密码子在第一个位置都具有C。因此,它们的Kozak序列全部具有ATGC序列。因此,在各个实施方案中,ATGC序列变为ATGG。这可以通过将第二个氨基酸变为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、天冬氨酸或谷氨酸来实现,其全部密码子在第一个位置都具有G。这些氨基酸可与信号肽功能相容。在替代实施方案中,整个信号肽被具有规范Kozak序列的肽取代,并且源自高度表达的蛋白,诸如免疫球蛋白。

[0081] 在各个实施方案中,基于AP的剂的信号肽可以缺失和/或取代。例如,信号肽可以缺失、突变和/或取代(例如,用另一种信号肽取代)以确保蛋白表达。

[0082] 在一些实施方案中,编码本发明的基于AP的剂的DNA构建体包含未翻译的DNA序列。此类序列包括内含子,所述内含子可以与IAP蛋白异源或是IAP蛋白天然的,包括天然的第一和/或第二内含子和/或天然的3'UTR。不希望受理论束缚,据信包括这些序列通过稳定mRNA而增强蛋白表达。因此,在各个实施方案中,编码本发明的基于AP的剂的DNA构建体包含5'UTR和/或3'UTR。图1中提供了具有第一内含子和3'UTR的说明性IAP DNA序列,包括具有天然的第一内含子的hIAP (以粗体和下划线示出) -SEQ ID NO:12;具有天然的3'UTR的hIAP (以粗体和下划线示出) -SEQ ID NO:13;具有来自bIAP I的第一内含子的bIAP IV (以粗体和下划线示出) -SEQ ID NO:14;和具有来自bIAP I的3'UTR的bIAP IV (以粗体和下划线示出) -SEQ ID NO:15。

[0083] 在各个实施方案中,本发明的基于AP的剂包含与本文公开的任何序列具有至少约60% (例如,约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%) 序列同一性的核苷酸序列。

[0084] 在各个实施方案中,本发明的基于AP的剂可包含相对于本文所述的任何蛋白序列具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失及截短。

[0085] 在各个实施方案中,取代还可以包括非经典氨基酸(例如硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、 β -丙氨酸、GABA和 δ -氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、常见氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、半胱氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸(designer amino acid) (诸如 β -甲基氨基酸)、C α -甲基氨基酸、N α -甲基氨基酸和一般的氨基酸类似物)。

[0086] 可以对本发明的基于AP的剂进行突变以选择具有所需特征的剂。例如,可以进行突变以产生具有增强的催化活性或蛋白稳定性的基于AP的剂。在各个实施方案中,可以利用定向进化来产生本发明的基于AP的剂。例如,易错PCR和DNA改组可用于鉴定细菌碱性磷酸酶中赋予增强的活性的突变。

[0087] 改良的释放制剂和剂型

[0088] 基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的改良的释放制剂还可包含药学上可接受的载剂或赋形剂。正如本领域技术人员将认识到,制剂可以是适于所需用途和施用途径的任何合适的形式。

[0089] 在各个实施方案中,本发明的改良的释放制剂包含核心颗粒、在所述核心颗粒上的基底包衣,并且其中所述基底包衣包含基于AP的剂。在其它实施方案中,核心颗粒包含蔗糖。在一些实施方案中,基底包衣的基于AP的剂包封在核心颗粒内,并且可以包括多个核心颗粒。

[0090] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)、蔗糖球(所述基于AP的剂,例如IAP或变体,喷涂在蔗糖球上)、粘合剂赋形剂(例如,羟丙基纤维素(HPC))、肠溶聚合物(例如EUDRAGIT L30 D-55)、HTP-20(例如PLASACRYL HTP 20)(这是一种提高包衣效率和减少加工时间的添加剂)以及缓冲盐(例如,Tris碱、氯化镁、硫酸镁、氯化锌或硫酸锌)。

[0091] 在各个实施方案中,本发明的制剂包含在胃液和/或肠液中稳定并且受肠道菌群中存在的微生物酶降解的改良的释放包衣。在其它实施方案中,改良的释放包衣溶解度是pH依赖性的。在其它实施方案中,改良的释放包衣具有时间依赖性侵蚀特性。

[0092] 在各个实施方案中,本发明的制剂包含至少一种改良的释放小丸,其中每个改良的释放小丸包含约1-10重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)可以按重量计以约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%或约10%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约75-95重量%的蔗糖球。例如,蔗糖球可以按重量计以约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%或约95%存在。在各个实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约5-15重量%的羟丙基纤维素(HPC)。例如,羟丙基纤维素可以按重量计以约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%或约15%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.5-2重量%的缓冲盐。缓冲盐可以选自Tris碱、氯化镁和硫酸锌。例如,缓冲盐可以按重量计约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%或约2.0%存在。在一些实施方案中,所述制剂包含单层肠溶包衣,所述单层肠溶包衣包含约20-40%、约25-40%、约25-35%、约30-40%或约35-40%的肠溶聚合物增重。在一些实施方案中,所述制剂包含双层肠溶包衣,所述双层肠溶包衣包含约20-40%、约25-40%、约25-35%、约30-40%或约35-40%的肠溶聚合物(例如,EUDRAGIT L30 D-55)增重和约5-15%、约5-10%、约7-15%、约7-10%、约10-15%、约6-9%或约7-8%的羟丙基纤维素增重。如本文所述的重量是指所有组分的总重量。

[0093] 在各个实施方案中,本发明的制剂包含至少一种改良的释放小丸,其中每个改良的释放小丸包含约5重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约85重量%的蔗糖球;约9重量%的羟丙基纤维素;和约1重量%的缓冲盐。在一些实施

方案中,所述制剂包含含有约20-40%肠溶聚合物(例如EUDRAGIT L30 D-55)增重的单层肠溶包衣或含有约30%肠溶聚合物(例如EUDRAGIT L30 D-55)增重和约7%羟丙基纤维素增重的双层肠溶包衣。如本文所述的重量是指所有组分的总重量。

[0094] 在各个实施方案中,本发明的制剂包含至少一种改良的释放小丸,其中每个改良的释放小丸包含约4.7重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约84.9重量%的蔗糖球;约9.3重量%的羟丙基纤维素;和约1.2重量%的缓冲盐。在一些实施方案中,所述制剂包含含有约20-40%肠溶聚合物(例如EUDRAGIT L 30D-55)增重的单层肠溶包衣或含有约30%肠溶聚合物(例如EUDRAGIT L 30D-55)增重和约7%羟丙基纤维素增重的双层肠溶包衣。如本文所述的重量是指所有组分的总重量。

[0095] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约25mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在各个实施方案中,本发明的制剂包含至少一种改良的释放小丸,其中每个改良的释放小丸包含约1-15重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)可以按重量计以约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约12%、约13%、约14%或约15%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约30-55重量%的蔗糖球。例如,蔗糖球可以按重量计以约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%或约55%存在。在各个实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约5-25重量%的羟丙基纤维素(HPC)。例如,羟丙基纤维素可以按重量计以约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%或约25%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约20-35重量%的EUDRAGIT L30 D-55。例如,EUDRAGIT L30 D-55可以按重量计以约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%或约35%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.5-11重量%的HTP-20。例如,HTP-20可以按重量计以约0.5%、约1.0%、约1.5%、约2.0%、约2.5%、约3.0%、约3.5%、约4.0%、约4.5%、约5.0%、约5.5%、约6.0%、约6.5%、约7.0%、约7.5%、约8.0%、约8.5%、约9.0%、约9.5%、约10.0%、约10.5%或约11.0%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.5-2.5重量%的缓冲盐。缓冲盐可以选自Tris碱、氯化镁、硫酸镁、氯化锌和硫酸锌。例如,缓冲盐可以按重量计以约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2.0%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%或约2.5%存在。

[0096] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约25mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约10重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约38重量%的蔗糖球;约19重量%的羟丙基纤维素(HPC);约2重量%的缓冲盐;和约26重量%的肠溶聚合物(例如,

EUDRAGIT L30 D-55)。

[0097] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约25mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约9.7重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约37.7重量%的蔗糖球;约19.4重量%的羟丙基纤维素(HPC);约2.4重量%的缓冲盐;和约26.3重量%的肠溶聚合物(例如,EUDRAGIT L 30D-55)。

[0098] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约5mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在各个实施方案中,本发明的制剂包含至少一种改良的释放小丸,其中每个改良的释放小丸包含约1-15重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)可以按重量计以约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约12%、约13%、约14%或约15%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约30-55重量%的蔗糖球。例如,蔗糖球可以按重量计以约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%或约55%存在。在各个实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约5-25重量%的羟丙基纤维素(HPC)。例如,羟丙基纤维素可以按重量计以约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%或约25%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约20-35重量%的EUDRAGIT L30 D-55。例如,EUDRAGIT L30 D-55可以按重量计以约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%或约35%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.5-11重量%的HTP-20。例如,HTP-20可以按重量计以约0.5%、约1.0%、约1.5%、约2.0%、约2.5%、约3.0%、约3.5%、约4.0%、约4.5%、约5.0%、约5.5%、约6.0%、约6.5%、约7.0%、约7.5%、约8.0%、约8.5%、约9.0%、约9.5%、约10.0%、约10.5%或约11.0%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.5-2.5重量%的缓冲盐。缓冲盐可以选自Tris碱、氯化镁、硫酸镁、氯化锌和硫酸锌。例如,缓冲盐可以按重量计以约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2.0%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%或约2.5%存在。

[0099] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约5mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约9.7重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约37.7重量%的蔗糖球;约19.4重量%的羟丙基纤维素(HPC);约2.4重量%的缓冲盐;和约26.3重量%的肠溶聚合物(例如,EUDRAGIT L 30D-55)。

[0100] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含

约5mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约9.7重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约37.7重量%的蔗糖球;约19.4重量%的羟丙基纤维素(HPC);约2.4重量%的缓冲盐;和约26.3重量%的肠溶聚合物(例如,EUDRAGIT L 30D-55)。

[0101] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约15mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在各个实施方案中,本发明的制剂包含至少一种改良的释放小丸,其中每个改良的释放小丸包含约1-15重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)可以按重量计以约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约12%、约13%、约14%或约15%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约30-55重量%的蔗糖球。例如,蔗糖球可以按重量计以约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%或约55%存在。在各个实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约5-25重量%的羟丙基纤维素(HPC)。例如,羟丙基纤维素可以按重量计以约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%或约25%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约20-35重量%的EUDRAGIT L30 D-55。例如,EUDRAGIT L30 D-55可以按重量计以约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%或约35%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.5-11重量%的HTP-20。例如,HTP-20可以按重量计以约0.5%、约1.0%、约1.5%、约2.0%、约2.5%、约3.0%、约3.5%、约4.0%、约4.5%、约5.0%、约5.5%、约6.0%、约6.5%、约7.0%、约7.5%、约8.0%、约8.5%、约9.0%、约9.5%、约10.0%、约10.5%或约11.0%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.1-2.5重量%的缓冲盐。缓冲盐可以选自Tris碱、氯化镁、硫酸镁、氯化锌和硫酸锌。例如,缓冲盐可以按重量计以约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2.0%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%或约2.5%存在。

[0102] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约15mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约10重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约39重量%的蔗糖球;约20重量%的羟丙基纤维素(HPC);约0.5重量%的缓冲盐;和约26重量%的肠溶聚合物(例如,EUDRAGIT L30D-55)。

[0103] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约15mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约10.0重量%的基于

AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约38.9%重量%的蔗糖球;约20.0重量%的羟丙基纤维素(HPC);约0.3重量%的缓冲盐;和约26.3重量%的肠溶聚合物(例如,EUDRAGIT L30 D-55)。

[0104] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约5mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在各个实施方案中,本发明的制剂包含至少一种改良的释放小丸,其中每个改良的释放小丸包含约1-15重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)可以按重量计以约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约12%、约13%、约14%或约15%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约30-55重量%的蔗糖球。例如,蔗糖球可以按重量计以约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%或约55%存在。在各个实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约5-25重量%的羟丙基纤维素(HPC)。例如,羟丙基纤维素可以按重量计以约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%或约25%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约20-35重量%的EUDRAGIT L30 D-55。例如,EUDRAGIT L30 D-55可以按重量计以约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%或约35%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.5-11重量%的HTP-20。例如,HTP-20可以按重量计以约0.5%、约1.0%、约1.5%、约2.0%、约2.5%、约3.0%、约3.5%、约4.0%、约4.5%、约5.0%、约5.5%、约6.0%、约6.5%、约7.0%、约7.5%、约8.0%、约8.5%、约9.0%、约9.5%、约10.0%、约10.5%或约11.0%存在。在一些实施方案中,小丸(或每个单独的小丸)包含约0.1-2.5重量%的缓冲盐。缓冲盐可以选自Tris碱、氯化镁、硫酸镁、氯化锌和硫酸锌。例如,缓冲盐可以按重量计以约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2.0%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%或约2.5%存在。

[0105] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约5mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约10重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约39重量%的蔗糖球;约20重量%的羟丙基纤维素(HPC);约0.5重量%的缓冲盐;和约26重量%的肠溶聚合物(例如,EUDRAGIT L30D-55)。

[0106] 在各个实施方案中,本发明的制剂呈胶囊形式(例如,硬明胶或HPMC胶囊),其包含约5mg基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。该胶囊包括多个肠溶包衣的含基于AP的剂的小丸。在此类实施方案中,所述制剂包含约10.0重量%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体);约38.9%重量%的蔗糖球;约20.0重量%的羟丙基纤维素(HPC);约0.3重量%的缓冲盐;和约26.3重量%的肠溶聚合物

(例如,EUDRAGIT L30 D-55)。

[0107] 在一些实施方案中,包含基于AP的剂(和/或附加治疗剂)的改良的释放制剂的施用是口服、静脉内和胃肠外中的任一种。在一些实施方案中,包含基于AP的剂(和/或附加剂)的改良的释放制剂的施用不是静脉内的,以便例如防止对全身施用的抗生素的干扰。在其它实施方案中,施用途径包括例如:口服、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、舌下、脑内、阴道内、透皮、直肠、通过吸入或局部,特别是施用至耳、鼻、眼或皮肤。

[0108] 在一些实施方案中,本发明的任何制剂包含大小介于约0.8mm至约2.0mm、约0.9mm至约1.9mm、约1mm至约1.8mm、约1.1mm至约1.7mm、约1.2mm至约1.6mm、约1.3mm至约1.5mm、约1mm至约1.3mm、约1mm至约1.4mm、约1mm至约1.5mm、约1mm至约1.6mm、约1mm至约1.7mm、约1mm至约1.9mm、约1mm至约2.0mm直径之间的核心颗粒。在一些实施方案中,该制剂包含大小为约0.8mm、约0.9mm、约1mm、约1.1mm、约1.2mm、约1.3mm、约1.4mm、约1.5mm、约1.6mm、约1.7mm、约1.8mm、约1.9mm或约2.0mm直径的核心颗粒。

[0109] 包括如本文所述的基于AP的剂(和/或附加治疗剂)的任何改良的释放制剂可以不含辅因子(例如,CaCl₂或CoCl₂)。

[0110] 可口服施用包含如本文所述的基于AP的剂(和/或附加治疗剂)的任何改良的释放制剂。此类本发明制剂也可通过任何其它方便的途径施用,例如通过静脉内输注或团注注射,通过经由上皮或粘膜皮肤衬层(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可与附加治疗剂一起施用。可以全身或局部施用。

[0111] 用于口服使用的合适剂型包括例如固体剂型,诸如片剂、可分散粉末、颗粒剂和胶囊。在一个实施方案中,改良的释放制剂呈胶囊形式。在另一个实施方案中,改良的释放制剂呈片剂形式。在又一个实施方案中,改良的释放制剂呈软凝胶胶囊的形式。在另一实施方案中,改良的释放制剂呈明胶或羟丙基甲基纤维素(HPMC)胶囊的形式。

[0112] 在一些剂型中,将本文所述的剂与以下混合:至少一种惰性、药学上可接受的赋形剂或载体,诸如柠檬酸钠、磷酸二钙等,和/或a)填充剂或增量剂(extender),诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、硅酸、微晶纤维素和面包师专用糖(Bakers Special Sugar)等;b)粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、阿拉伯胶、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、羟丙基纤维素(HPC)和羟甲基纤维素等;c)湿润剂,诸如甘油等;d)崩解剂,诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐、碳酸钠、交联聚合物,诸如交联维酮(交联聚乙烯吡咯烷酮)、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素钠)、羟基乙酸淀粉钠等;e)溶液阻溶剂(solution retarding agent),诸如石蜡等;f)吸收促进剂,诸如,季铵化合物等;g)润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯等;h)吸附剂,诸如,高岭土和膨润土粘土等;i)润滑剂,诸如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠、山嵛酸甘油酯(glyceryl behenate)等;j)以及此类赋形剂的混合物。本领域技术人员将认识到,特定的赋形剂在口服剂型中可具有两种或更多种功能。在口服剂型例如胶囊或片剂的情况下,该剂型还可包含缓冲剂。

[0113] 改良的释放制剂可另外包含表面活性剂。适合用于本发明的表面活性剂包括但不限于任何药学上可接受的无毒表面活性剂。适合用于本发明组合物的表面活性剂种类包括但不限于聚乙氧基化脂肪酸、PEG-脂肪酸二酯、PEG-脂肪酸单酯和二酯混合物、聚乙二醇甘油脂肪酸酯、醇-油酯交换产物、聚甘油脂肪酸、丙二醇脂肪酸酯、丙二醇酯-甘油酯的混合

物、甘油单酯和甘油二酯、甾醇和甾醇衍生物、聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚乙二醇烷基醚、糖酯、聚乙二醇烷基酚、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物、脱水山梨糖醇脂肪酸酯、低级醇脂肪酸酯、离子表面活性剂以及它们的混合物。在一些实施方案中,本发明的组合物可包含一种或多种表面活性剂,包括但不限于月桂基硫酸钠、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80和柠檬酸三乙酯。

[0114] 改良的释放制剂还可含有药学上可接受的增塑剂以获得所需的机械性能,诸如柔性和硬度。此类增塑剂包括但不限于三醋精、柠檬酸酯、柠檬酸三乙酯、邻苯二甲酸酯、癸二酸二丁酯、鲸蜡醇、聚乙二醇、聚山梨醇酯或其它增塑剂。

[0115] 改良的释放制剂还可包含一种或多种施加溶剂。可用于施加例如延迟释放包衣组合物的一些更常见的溶剂包括异丙醇、丙酮、二氯甲烷等。

[0116] 改良的释放制剂还可包含一种或多种碱性材料。适用于本发明组合物中的碱性材料包括但不限于酸诸如磷酸、碳酸、柠檬酸的钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐以及其他铝/镁化合物。另外,碱性材料可选自抗酸剂材料(antacid material),诸如氢氧化铝、氢氧化钙、氢氧化镁和氧化镁。

[0117] 固体口服剂型可通过例如将本发明的剂与一种或多种合适的赋形剂制粒(例如湿法或干法制粒)来制备。可替代地,可以使用常规方法诸如流化床或锅包衣将本发明的剂覆层到惰性核心(例如,那普瑞尔(nonpareil)/糖球,诸如蔗糖球或二氧化硅球)上,或使用本领域中已知的方法挤出和滚圆成含活性化合物的小丸。在实施方案中,基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)喷涂包被到蔗糖球上。然后可以使用常规方法将此类小丸掺入片剂或胶囊中。

[0118] 除活性剂之外,悬浮液还可含有助悬剂,诸如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂、黄蓍胶等,以及它们的混合物。

[0119] 除惰性稀释剂外,口服组合物还可包含佐剂,诸如甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0120] 适于胃肠外施用(例如,静脉内、肌内、腹膜内、皮下和关节内注射和输注)的剂型包括例如溶液、悬浮液、分散液、乳液等。它们也可以无菌固体组合物(例如冻干组合物)的形式制造,所述无菌固体组合物可在使用前立即溶解或悬浮于无菌可注射介质中。它们可含有例如本领域已知的悬浮剂或分散剂。

[0121] 包含基于AP的剂(和/或附加治疗剂)的制剂可方便地以单位剂型提供并且可通过制药领域所熟知的任何方法进行制备。此类方法通常包括将治疗剂结合于由一种或多种附加成份所构成的载体中的步骤。通常,制剂是通过将治疗剂与液体载体、细粒的固体载体或两者均匀而紧密地结合,然后,如果需要,将产品成形为所需制剂的剂型(例如,湿式或干式制粒、粉末掺混等,随后使用本领域已知的常规方法压片)来制备的。

[0122] 在各个实施方案中,本发明的改良的释放制剂可利用一种或多种改良的释放包衣诸如延迟释放包衣以提供基于AP的剂(例如IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)与任选其它附加治疗剂一起向胃肠道的有效、延迟大量递送。

[0123] 在一个实施方案中,延迟释放包衣包括在酸性环境中基本上稳定而在近中性至碱性环境中基本上不稳定的肠溶剂。在一个实施方案中,延迟释放包衣包含在胃液和/或肠液中基本上稳定的肠溶剂。肠溶剂可选自例如甲基丙烯酸共聚物、邻苯二甲酸醋酸纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯、羧甲基乙基纤维素和EUDRAGIT型

聚合物(聚(甲基丙烯酸,甲基丙烯酸甲酯)、乙酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素)、乙酸偏苯三酸纤维素、虫胶或其他合适的肠溶包衣聚合物的溶液或分散液。EUDRAGIT型聚合物包括例如EUDRAGIT FS 30D、L 30D-55、L 100-55、L 100、L 12,5、L 12,5P、RL 30D、RL P0、RL 100、RL 12,5、RS 30D、RS P0、RS100、RS12,5、NE 30D、NE 40D、NM 30D、S100、S12,5和S12,5P。类似聚合物包括KOLLICOAT MAE 30DP和KOLLICOAT MAE 100P。在一些实施方案中,使用EUDRAGIT FS 30D、L 30D-55、L 100-55、L 100、L 12,5、L 12,5P RL 30D、RL P0、RL 100、RL 12,5、RS 30D、RS P0、RS100、RS12,5、NE 30D、NE 40D、NM 30D、S100、S12,5S12,5P、KOLLICOAT MAE 30DP和KOLLICOAT MAE 100P中的一者或多者。在各个实施方案中,肠溶剂可以是前述溶液或分散液的组合。在一个实施方案中,延迟释放包衣包括肠溶剂EUDRAGIT L 30D-55(聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1)。

[0124] 在某些实施方案中,一种或多种包衣系统添加剂与肠溶剂一起使用。例如,一种或多种PLASACRYL添加剂可用作抗粘剂(anti-tacking agent)包衣添加剂。示例性的PLASACRYL添加剂包括但不限于PLASACRYL HTP20和PLASACRYL T20。在一个实施方案中,PLASACRYLHTP20与EUDRAGIT L 30D-55包衣一起配制。在另一个实施方案中,PlasACRYLT20与EUDRAGIT FS 30D包衣一起配制。

[0125] 在另一个实施方案中,延迟释放包衣在水溶液中时可随时间变化而降解,而不考虑溶液中的pH和/或酶的存在。此类包衣可包含水不溶性聚合物。因此,它在水溶液中的溶解度与pH无关。如本文所用的术语“非pH依赖性”是指聚合物的水渗透性及其释放药物成分的能力不随pH变化和/或仅非常轻微地依赖于pH。此类包衣可用于制备例如持续释放制剂。合适的水不溶性聚合物包括药学上可接受的无毒聚合物,所述聚合物基本上不溶于水性介质(例如水),与溶液的pH无关。合适的聚合物包括但不限于纤维素醚、纤维素酯或纤维素醚-酯,即其中纤维素骨架上的一些羟基被烷基取代并且一些羟基被烷酰基改性的纤维素衍生物。实例包括乙基纤维素、乙酰基纤维素、硝基纤维素等。不溶性聚合物的其他实例包括但不限于漆(lacquer)和丙烯酸和/或甲基丙烯酸酯聚合物、具有低季铵含量的丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯的聚合物或共聚物、或其混合物等。不溶性聚合物的其它实例包括EUDRAGIT RS、EUDRAGIT RL和EUDRAGIT NE。可用于本发明的不溶性聚合物包括聚乙烯酯、聚乙烯醇缩醛、聚丙烯酸酯、丁二烯苯乙烯共聚物等。在一个实施方案中,通过使用缓慢侵蚀的蜡塞(例如,各种PEGS,包括例如PEG6000)来实现结肠递送。

[0126] 在另一实施方案中,延迟释放包衣可由肠道菌群中存在的微生物酶降解。在一个实施方案中,延迟释放包衣可由小肠中存在的细菌降解。在另一个实施方案中,延迟释放包衣可由大肠中存在的细菌降解。

[0127] 在各个实施方案中,本发明提供了一种制剂,其包含:具有包含一种或多种基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的基底包衣的核心颗粒,以及置于所述包衣核心颗粒上的延迟释放包衣。延迟释放包衣可在酸性环境和/或胃液中基本上稳定,和/或在近中性至碱性环境和/或肠液中基本不稳定,从而将包衣核心颗粒暴露于肠液。例如,在一些实施方案中,本发明的包衣小丸在FaSSGF中基本上不释放基于AP的剂,但在FaSSIF中基本上释放基于AP的剂。在一些实施方案中,本发明的包衣小丸在约20分钟、约40分钟、约1小时、约80分钟、约100分钟、约2小时、约140分钟、约160分钟、约3小时、约200分钟、约220分钟或约4小时在模拟胃液和/或肠液中释放至少约40%、至少约45%、至少约

50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%基于AP的剂。

[0128] 在一些实施方案中,包含基于AP的剂的本发明的包衣小丸在储存中稳定至少约3天、至少约9天、至少约12天、至少约15天、至少约20天、至少约23天、至少约27天、至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约7个月、至少约8个月、至少约9个月、至少约10个月、至少约11个月、至少约1年、至少约1.5年、至少约2年。在一些实施方案中,小丸在干燥条件下储存在2-8°C下。在其它实施方案中,包含基于AP的剂的本发明的包衣小丸在储存持续时间内保留至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的活性。

[0129] 包含一种或多种基于AP的剂的基底包衣还可包含一种或多种附加治疗剂。任选地,可以将多个基底包衣施加到核心上,每个基底包衣可以包含基于AP的剂和/或附加治疗剂。在一个实施方案中,核心颗粒包括蔗糖。所述制剂可通过本领域已知的方法来制备。例如,可将基于AP的剂(例如,IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)喷涂到惰性核心(例如,蔗糖核或蔗糖球)上并与肠溶层(例如,EUDRAGIT L30 D-55)一起喷雾干燥以形成含基于AP的剂(例如,IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的小丸。

[0130] 任选地,核心颗粒可包含一种或多种基于AP的剂(例如,IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或一种或多种附加治疗剂。在一个实施方案中,一个或多个剂量的基于AP的剂可被包封在核心颗粒中,例如,呈微球的形式。例如,基于AP的剂可与聚合物(例如胶乳)结合,然后形成微粒、微囊化酶制备物,而不使用蔗糖核。由此形成的微球可任选地被延迟释放包衣包覆。

[0131] 用于产生微粒(诸如微球、聚集体等)的多种方法是已知的,这些方法适于包含酶。它们通常涉及至少两相,一相含有酶,一相含有形成微粒骨架的聚合物。最常见的是凝聚,其中通过添加第三组分使聚合物与其溶剂相分离;或多相乳液,诸如水包油包水(w/o/w)乳液,其中内部水相含有蛋白,中间有机相含有聚合物,以及支持w/o/w双重乳液直到可去除溶剂以形成微球的外部水相稳定剂。可替代地,将基于AP的剂(例如,IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和稳定赋形剂(例如,海藻糖、甘露醇、吐温80、聚乙烯醇)组合并且从水溶液喷洒并收集。然后将颗粒悬浮在无水的、与水不混溶的含有聚合物和释放改性化合物的有机溶剂中,并对悬浮液进行超声处理以分散颗粒。另一种方法使用水相但不使用有机溶剂。具体地,将酶、缓冲组分、聚合物胶乳以及稳定和释放调节赋形剂溶解/分散于水中。将水性分散体喷雾干燥,从而导致胶乳聚结,并将蛋白和赋形剂掺入聚结的胶乳颗粒中。当释放改性剂在酸性条件下不溶但在较高pH(诸如羧酸)下可溶时,从基质中的释放在胃环境中受到抑制。

[0132] 在一些实施方案中,在将延迟释放包衣施加至包衣的核心颗粒之前,所述颗粒可任选地被一个或多个分离层包覆,所述一个或多个分离层包含药物赋形剂,包括碱性化合物例如pH缓冲化合物。分离层基本上使包衣核心颗粒与延迟释放包衣分离。

[0133] 分离层可通过通常与包衣设备诸如包衣锅、包衣制粒机一起使用或在使用水和/或有机溶剂进行包衣过程的流化床装置中使用的包衣或覆层程序施加至包衣核心颗粒上。作为替代方案,可通过使用粉末包衣技术将分离层施加至核心材料上。用于分离层的材料

是药学上可接受的化合物,例如糖、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠等,单独或混合使用。添加剂诸如增塑剂、着色剂、颜料、填充剂、抗粘剂和抗静电剂(诸如硬脂酸镁、二氧化钛、滑石)和其它添加剂也可以包含在分离层中。

[0134] 在一些实施方案中,具有延迟释放包衣的包衣颗粒可进一步被外包衣层(overcoat layer)包覆。外包衣层可以如针对其它包衣组合物所述的那样施加。外包衣材料是药学上可接受的化合物,诸如糖、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠等,单独或混合使用。外包衣材料可防止被延迟释放包衣包覆的颗粒的潜在团聚,保护延迟释放包衣在压实过程中不开裂或增强压片过程。

[0135] 在一些实施方案中,改良的释放制剂是填充有多个含基于AP的剂的小丸(例如,IAP(或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的胶囊,从所述胶囊释放基于AP的剂。在一个实施方案中,胶囊是明胶胶囊,诸如硬明胶胶囊。在另一个实施方案中,胶囊是羟丙基甲基纤维素(HPMC)胶囊。例如,制剂可以是包含多个小丸的胶囊形式。例如,制剂可以是胶囊的形式,例如包含多个含基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的肠溶包衣小丸的明胶或羟丙基甲基纤维素(HPMC)胶囊。在此类实施方案中,可利用小丸的组合,其中每个小丸被设计成在特定时间点或位置释放。在各个实施方案中,小丸(例如,肠溶包衣小丸)被设计成原样通过胃,然后将基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)释放到肠的一个或多个区域。在一些实施方案中,含基于AP的剂的小丸可有肠溶包衣以在不同的肠道pH值下释放基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0136] 本发明还提供了沿着胃肠道释放多个剂量的基于AP的剂(例如,IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或附加治疗剂的改良的释放制剂。在此类实施方案中,此类制剂的总体释放特性可通过利用例如多种颗粒类型或多个层来调整。在一个实施方案中,基于AP的剂的第一剂量可被配制用于在例如小肠(例如,十二指肠、空肠、回肠中的一者或多者)或大肠(例如,盲肠、结肠的升部、横部、降部或乙状结肠部分以及直肠中的一者或多者)中释放,而第二剂量被配制用于在例如小肠(例如,十二指肠、空肠、回肠中的一者或多者)或大肠(例如,盲肠、结肠的升部、横部、降部或乙状结肠部分以及直肠中的一者或多者)的不同区域中延迟释放。可替代地,在沿着肠的不同位置释放多个剂量。例如,在一个实施方案中,基于AP的剂的第一剂量可被配制用于在例如小肠(例如,十二指肠、空肠、回肠中的一者或多者)中释放,而第二剂量被配制用于例如在小肠的另一部分(例如,十二指肠、空肠、回肠中的一者或多者)中延迟释放。在另一个实施方案中,基于AP的剂的第一剂量可被配制用于在例如大肠(例如,盲肠、结肠的升部、横部、降部或乙状结肠部分以及直肠中的一者或多者)中释放,而第二剂量被配制用于在例如大肠的另一部分(例如,盲肠、结肠的升部、横部、降部或乙状结肠部分以及直肠中的一者或多者)中延迟释放。

[0137] 在各个实施方案中,本文所述的剂呈药学上可接受的盐的形式,即适合与人和其它动物的组织接触使用而无过度毒性、刺激、过敏反应等,并且与合理的益处/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐是本领域公知的。盐可在治疗剂的最终分离和纯化过程中原位制备,或者通过使游离碱官能团与合适的酸或者游离酸官能团与合适的碱部分反应来单

独制备。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等,以及无毒的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。

[0138] 在各个实施方案中,本发明制剂提供了许多优点。例如,发明人已经成功地配制了蛋白(即基于AP的剂),其本身具有挑战性。在各个实施方案中,本发明的制剂在其中释放药物的胃肠道环境进一步加剧了这一点。此外,在各个实施方案中,本发明的制剂提供足够缓慢的胃肠道释放以允许在胃肠道中的良好保护性包覆而免受例如在小肠中的各种抗生素的不利影响(这是通过与较慢释放相称的基于AP的剂的半衰期的增加来突出的一种益处)。此外,例如,与EUDRAGIT不同,通过用HPC包衣本发明小丸的原料药层,本发明制剂使制剂中EUDRAGIT的量最小化,并且因此减轻可能的剂量限制性毒性和制造并发症。

[0139] 改良的释放特性

[0140] 一方面,本发明提供了包含至少一种基于碱性磷酸酶(AP)的剂的改良的释放制剂,其中所述制剂将大量的基于AP的剂释放到胃肠道的一个或多个区域中。在一些实施方案中,基于AP的剂是IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体(例如,如上所述)。例如,该制剂可以在胃之后将至少约60%的基于AP的剂(例如IAP)释放到胃肠道的一个或多个区域中。

[0141] 在各个实施方案中,将本发明的改良的释放制剂设计为立即释放(例如在摄入时)。在各个实施方案中,改良的释放制剂可具有持续释放特性,即活性成分在身体(例如,胃肠道)中在延长的时间段内缓慢释放。在各个实施方案中,改良的释放制剂可具有延迟释放特性,即在摄入时不立即释放活性成分;而是,推迟活性成分的释放,直到组合物在胃肠道下部;例如,用于在小肠(例如,十二指肠、空肠、回肠中的一者或多者)或大肠(例如,盲肠、结肠的升部、横部、降部或乙状结肠部分以及直肠中的一者或多者)中释放。例如,组合物可以被肠溶包衣以延迟活性成分的释放直到它到达小肠或大肠。在一些实施方案中,粪便中不存在大量本发明制剂的活性成分。

[0142] 在各个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在胃之后将至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)释放到肠的一个或多个区域。例如,改良的释放制剂在肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0143] 在各个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在小肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在小肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0144] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在十二指肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在十二指肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0145] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在空肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在空肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0146] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在回肠和/或回盲连接处释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在回肠和/或回盲连接处释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0147] 在各个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在大肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在大肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂

(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0148] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在盲肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在盲肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0149] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在升结肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在升结肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0150] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在横结肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在横结肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0151] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在降结肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在降结肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0152] 在一个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在乙状结肠中释放至少60%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,改良的释放制剂在乙状结肠中释放至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、

至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0153] 在各个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在胃中基本上不释放基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。

[0154] 在各个实施方案中,本发明的改良的释放制剂在特定pH下释放基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。例如,在一些实施方案中,改良的释放制剂在酸性环境中基本上稳定并且在接近中性至碱性环境中基本上不稳定(例如,快速溶解或物理不稳定)。在一些实施方案中,稳定表示基本上不释放,而不稳定表示基本上释放。例如,在一些实施方案中,改良的释放制剂在约7.0或更低、或约6.5或更低、或约6.0或更低、或约5.5或更低、或约5.0或更低、或约4.5或更低、或约4.0或更低、或约3.5或更低、或约3.0或更低、或约2.5或更低、或约2.0或更低、或约1.5或更低、或约1.0或更低的pH下基本上稳定。在一些实施方案中,本发明的制剂在较低pH区域中是稳定的,并且因此基本上不会在例如胃中释放。在一些实施方案中,改良的释放制剂在约1至约4或更低的pH下基本上稳定,并且在更高的pH值下基本上不稳定。在这些实施方案中,改良的释放制剂基本上不在胃中释放。在这些实施方案中,改良的释放制剂基本上在小肠(例如,十二指肠、空肠和回肠中的一者或多者)和/或大肠(例如,盲肠、升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠中的一者或多者)中释放。在一些实施方案中,改良的释放制剂在约4至约5或更低的pH下基本上稳定,并且因此在更高的pH值下基本上不稳定,且因此基本上不在胃和/或小肠(例如,十二指肠、空肠和回肠中的一者或多者)中释放。在这些实施方案中,改良的释放制剂基本上在大肠(例如,盲肠、升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠中的一者或多者)中释放。在各个实施方案中,本文所述的pH值可如本领域中已知的那样进行调节以说明受试者的状态,例如,是处于禁食状态还是餐后状态。

[0155] 在一些实施方案中,改良的释放制剂在胃液中基本上稳定并且在肠液中基本上不稳定,并且因此基本上在小肠(例如,十二指肠、空肠和回肠中的一者或多者)和/或大肠(例如,盲肠、升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠中的一者或多者)中释放。

[0156] 在一些实施方案中,改良的释放制剂在胃液中稳定或在酸性环境中稳定。这些改良的释放制剂在约15、或约30、或约45、或约60或约90分钟内在pH为约4至约5或更低的胃液,或pH为约4至约5或更低的模拟胃液中释放约30重量%或更少的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或改良的释放制剂中的附加治疗剂。本发明的改良的释放制剂可在约15、或约30、或约45、或约60或约90分钟内在pH为4-5或更低的胃液,或pH为4-5或更低的模拟胃液中释放按重量计约0%至约30%、约0%至约25%、约0%至约20%、约0%至约15%、约0%至约10%、约5%至约30%、约5%至约25%、约5%至约20%、约5%至约15%、约5%至约10%的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或改良的释放制剂中的附加治疗剂。本发明的改良的释放制剂可在约15、或约30、或约45、或约60或约90分钟内在pH为5或更低的胃液,或pH为5或更低的模拟胃液中释放按重量计约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%或约10%总的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或改良的释放制剂中的附加治疗剂。

[0157] 在一些实施方案中,改良的释放制剂在肠液中不稳定。这些改良的释放制剂在约

15、或约30、或约45、或约60或约90分钟内在肠液或模拟肠液中释放约70重量%或更多的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或改良的释放制剂中的附加治疗剂。在一些实施方案中,改良的释放制剂在接近中性至碱性的环境中不稳定。这些改良的释放制剂在约15、或约30、或约45、或约60或约90分钟内在pH为约4-5或更高的肠液或pH为约4-5或更高的模拟肠液中释放约70重量%或更多的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或改良的释放制剂中的附加治疗剂。在接近中性或碱性环境中不稳定的改良的释放制剂可在约5分钟至约90分钟,或约10分钟至约90分钟,或约15分钟至约90分钟,或约20分钟至约90分钟,或约25分钟至约90分钟,或约30分钟至约90分钟,或约5分钟至约60分钟,或约10分钟至约60分钟,或约15分钟至约60分钟,或约20分钟至约60分钟,或约25分钟至约90分钟,或约30分钟至约60分钟内在pH大于约5的流体(例如,pH为约5至约14、约6至约14、约7至约14、约8至约14、约9至约14、约10至约14、或约11至约14的流体)中释放70重量%或更多的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和/或改良的释放制剂中的附加治疗剂。

[0158] 模拟胃液和模拟肠液的实例包括但不限于2005药典23NF/28USP中在第2858页 Test Solutions中公开的那些和/或本领域技术人员已知的其它模拟胃液和模拟肠液,例如,在没有酶的情况下制备的模拟胃液和/或肠液。

[0159] 在一个实施方案中,改良的释放制剂可以在胃液中保持基本完整,或可以基本不溶。改良的释放制剂可包括一种或多种pH依赖性的延迟释放包衣。pH依赖性的延迟释放包衣在酸性环境(约5或更低的pH)中将是基本上稳定的,并且在接近中性至碱性环境(pH大于约5)中基本上不稳定。例如,延迟释放包衣可在接近中性至碱性环境中基本上崩解或溶解,如在小肠(例如,十二指肠、空肠和回肠中的一者或多者)和/或大肠(例如,盲肠、升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠中的一者或多者)中发现的。

[0160] 可替代地,改良的释放制剂的稳定性可以是酶依赖性的。在此类实施方案中,改良的释放制剂可包含一种或多种酶依赖性的延迟释放包衣。酶依赖性的延迟释放包衣在不含特定酶的流体中将是基本上稳定的,并且在含有酶的流体中基本上不稳定。延迟释放包衣将在含有适当酶的流体中基本上崩解或溶解。可例如通过使用仅在暴露于肠中的酶如半乳糖苷聚糖时释放活性成分的材料来实现酶依赖性控制。此外,在肠道菌群中存在微生物酶的情况下,改良的释放制剂的稳定性可取决于酶的稳定性。

[0161] 在各个实施方案中,包含基于AP的剂(例如IAP或其变体)的改良的释放制剂在食糜中基本上稳定。例如,在一些实施方案中,在施用后约10、或9、或8、或7、或6、或5、或4、或3、或2、或1小时内基于AP的剂活性的损失小于约50%或约40%、或约30%、或约20%、或约10%。

[0162] 在一些实施方案中,提供双脉冲制剂。在各个实施方案中,本发明提供了在不同时间和/或不同pH,在沿着肠道的不同位置释放多个剂量的基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的改良的释放制剂。在一个说明性的实施方案中,改良的释放制剂包含第一剂量的基于AP的剂和第二剂量的基于AP的剂,其中第一剂量和第二剂量在不同时间和/或不同pH,在沿着肠道的不同位置释放。例如,第一剂量在十二指肠释放,而第二剂量在回肠释放。在另一个实例中,第一剂量在空肠释放,而第二剂量在回肠释放。在其它实施方案中,第一剂量在沿小肠的位置(例如,十二指肠)释放,而第二剂量沿大肠(例如,

升结肠)释放。在各个实施方案中,改良的释放制剂可以在不同时间和/或不同pH,在沿着肠道的不同位置释放至少一个剂量、至少两个剂量、至少三个剂量、至少四个剂量、至少五个剂量、至少六个剂量、至少七个剂量或至少八个剂量的基于AP的剂(例如IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)。此外,本文中的双脉冲描述适用于释放基于AP的剂(例如IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)和附加治疗剂的改良的释放制剂。

[0163] 施用和剂量

[0164] 应当理解,根据本发明施用的基于AP的剂(例如,IAP,或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的实际剂量将根据例如特定的剂型和施用模式变化。本领域技术人员可考虑许多可改变基于AP的剂的作用的因素(例如,体重、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、受试者的疾患、药物组合、遗传倾向和反应敏感性)。施用可在最大耐受剂量范围内连续进行或者以一个或多个离散剂量进行。本领域技术人员可使用常规剂量施用测试来确定一组给定条件下的最佳施用速率。

[0165] 基于AP的剂(例如,IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的单独剂量可以单位剂型(例如,片剂或胶囊剂)施用,所述单位剂型含有例如每单位剂型约0.01mg至约1,000mg、约0.01mg至约950mg、约0.01mg至约900mg、约0.01mg至约850mg、约0.01mg至约800mg、约0.01mg至约750mg、约0.01mg至约700mg、约0.01mg至约650mg、约0.01mg至约600mg、约0.01mg至约550mg、约0.01mg至约500mg、约0.01mg至约450mg、约0.01mg至约400mg、约0.01mg至约350mg、约0.01mg至约300mg、约0.01mg至约250mg、约0.01mg至约200mg、约0.01mg至约150mg、约0.01mg至约100mg、约0.1mg至约90mg、约0.1mg至约80mg、约0.1mg至约70mg、约0.1mg至约60mg、约0.1mg至约50mg、约0.1mg至约40mg活性成分、约0.1mg至约30mg、约0.1mg至约20mg、约0.1mg至约10mg、约0.1mg至约5mg、约0.1mg至约3mg、约0.1mg至约1mg,或每单位剂型约5mg至约80mg。例如,单位剂型可以是约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约650mg、约700mg、约750mg、约800mg、约850mg、约900mg、约950mg或约1,000mg,包括其间的所有值和范围。在一个实施方案中,以含有25mg基于AP的剂的单位剂型施用基于AP的剂(例如,IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的单独剂量。在另一个实施方案中,以含有50mg基于AP的剂的单位剂型施用基于AP的剂(例如,IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的单独剂量。在再一个实施方案中,以含有75mg基于AP的剂的单位剂型施用基于AP的剂(例如,IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的单独剂量。

[0166] 在一个实施方案中,以每天约0.01mg至100mg的量,每天约0.01mg至约1,000mg、每天约0.01mg至约950mg、每天约0.01mg至约900mg、每天约0.01mg至约850mg、每天约0.01mg至约800mg、每天约0.01mg至约750mg、每天约0.01mg至约700mg、每天约0.01mg至约650mg、每天约0.01mg至约600mg、每天约0.01mg至约550mg、每天约0.01mg至约500mg、每天约0.01mg至约450mg、每天约0.01mg至约400mg、每天约0.01mg至约350mg、每天约0.01mg至约

300mg、每天约0.01mg至约250mg、每天约0.01mg至约200mg、每天约0.01mg至约150mg、每天约0.1mg至约100mg、每天约0.1mg至约95mg、每天约0.1mg至约90mg、每天约0.1mg至约85mg、每天约0.1mg至约80mg、每天约0.1mg至约75mg、每天约0.1mg至约70mg、每天约0.1mg至约65mg、每天约0.1mg至约60mg、每天约0.1mg至约55mg、每天约0.1mg至约50mg、每天约0.1mg至约45mg、每天约0.1mg至约40mg、每天约0.1mg至约35mg、每天约0.1mg至约30mg、每天约0.1mg至约25mg、每天约0.1mg至约20mg、每天约0.1mg至约15mg、每天约0.1mg至约10mg、每天约0.1mg至约5mg、每天约0.1mg至约3mg、每天约0.1mg至约1mg或每天约5mg至约80mg的量施用基于AP的剂。

[0167] 在各个实施方案中,以约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约650mg、约700mg、约750mg、约800mg、约850mg、约900mg、约950mg或约1,000mg (包括其间的所有值和范围)的每日剂量施用基于AP的剂。

[0168] 在一些实施方案中,基于AP的剂(例如,IAP或本文所述的其它基于AP的剂,及其变体)的合适剂量在约0.01mg/kg至约100mg/kg受试者体重的范围内,例如约0.01mg/kg、约0.02mg/kg、约0.03mg/kg、约0.04mg/kg、约0.05mg/kg、约0.06mg/kg、约0.07mg/kg、约0.08mg/kg、约0.09mg/kg、约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约1.1mg/kg、约1.2mg/kg、约1.3mg/kg、约1.4mg/kg、约1.5mg/kg、约1.6mg/kg、约1.7mg/kg、约1.8mg/kg、约1.9mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg或约100mg/kg体重,包括其间的所有值和范围。在其它实施方案中,基于AP的剂的合适剂量在约0.01mg/kg体重至约10mg/kg体重的范围内,在约0.01mg/kg体重至约9mg/kg体重的范围内,在约0.01mg/kg体重至约8mg/kg体重的范围内,在约0.01mg/kg体重至约7mg/kg体重的范围内,在约0.01mg/kg体重至约6mg/kg体重的范围内,在约0.05mg/kg体重至约5mg/kg体重的范围内,在约0.05mg/kg体重至约4mg/kg体重的范围内,在约0.05mg/kg体重至约3mg/kg体重的范围内,在约0.05mg/kg体重至约2mg/kg体重的范围内,在约0.05mg/kg体重至约1.5mg/kg体重的范围内,或在约0.05mg/kg体重至约1mg/kg体重的范围内。

[0169] 根据本发明的某些实施方案,可以例如约每日一次、约每隔一日一次、约每三日一次、约每周一次、约每两周一次、约每月一次、约每两个月一次、约每三个月一次、约每六个月一次或约每年一次施用基于AP的剂。在某些实施方案中,可以每日多于一次,例如,每日约两次、约三次、约四次、约五次、约六次、约七次、约八次、约九次或者约十次施用基于AP的剂。

[0170] 附加治疗剂和组合疗法或联合配制

[0171] 包含基于AP的剂的本发明组合物和制剂的施用可以与附加治疗剂组合。附加治疗剂和本发明组合物/制剂的联合施用可以是同时的或依次的。此外,本发明组合物/制剂可包含附加治疗剂(例如,经由联合配制)。例如,附加治疗剂和基于AP的剂可以组合成单一制剂。可替代地,附加治疗剂和基于AP的剂可以分开配制。

[0172] 在一个实施方案中,同时向受试者施用附加治疗剂和基于AP的剂。如本文中所用,术语“同时”意指附加治疗剂和基于AP的剂以不超过约60分钟,诸如不超过约30分钟、不超过约20分钟、不超过约10分钟、不超过约5分钟或不超过约1分钟的时间间隔施用。附加治疗剂和基于AP的剂的施用可以通过同时施用单一制剂(例如,包含附加治疗剂和基于AP的剂的制剂)或单独的制剂(例如,包含附加治疗剂的第一制剂和包含基于AP的剂的第二制剂)来进行。

[0173] 在另一个实施方案中,将附加治疗剂和基于AP的剂同时施用于受试者,但附加治疗剂和基于AP的剂从它们各自的剂型(或如果联合配制则为单一单位剂型)释放依次发生。

[0174] 如果附加治疗剂和基于AP的剂的施用时间安排使得所述附加治疗剂和基于AP的剂的药理学活性在时间上重叠,则联合施用不需要同时施用附加治疗剂和基于AP的剂。例如,可以依次施用附加治疗剂和基于AP的剂。如本文中所用,术语“依次”意指附加治疗剂和基于AP的剂以超过约60分钟的时间间隔施用。例如,附加治疗剂与基于AP的剂的依次施用之间间隔的时间可以超过约60分钟、超过约2小时、超过约5小时、超过约10小时、超过约1天、超过约2天、超过约3天或超过约1周。最佳施用时间将取决于正在施用的附加治疗剂和基于AP的剂的代谢速率、排泄速率和/或药效活性。可以先施用附加治疗剂或基于AP的剂中的任一种。

[0175] 联合施用也不需要通过相同的施用途向受试者施用附加治疗剂和基于AP的剂。相反,每种治疗剂可以通过任何适当的途径(例如,肠胃外或非肠胃外)施用。

[0176] 在一些实施方案中,附加治疗剂是抗菌剂,包括但不限于头孢菌素类抗生素(头孢氨苄、头孢呋辛、头孢羟氨苄、头孢唑啉、头孢噻吩、头孢克洛、头孢孟多、头孢西丁、头孢丙烯和头孢比普);氟喹诺酮类抗生素(西普罗(cipro)、左氧氟沙星(Levaquin)、氧氟沙星(floxin)、加替沙星(tequin)、威洛速(avelox)和诺氟沙星(norflox));四环素类抗生素(四环素、米诺环素、土霉素和强力霉素);青霉素类抗生素(阿莫西林、氨苄西林、青霉素V、双氯西林、羧苄青霉素、万古霉素和甲氧西林);单胺菌素类抗生素(氨基曲南);和碳青霉烯类抗生素(厄他培南(ertapenem)、多利培南(doripenem)、亚胺培南(imipenem)/西司他丁(cilastatin)和美罗培南(meropenem))。在一些实施方案中,抗菌剂可以是青霉素、头孢菌素、单胺菌素和碳青霉烯类抗生素中的任一种。

[0177] 在一些实施方案中,附加治疗剂是用于例如治疗CDI的辅助疗法。在一些实施方案中,附加治疗剂是甲硝唑(例如FLAGYL)、非达霉素(例如DIFICID)或万古霉素(例如VANCOCIN)、利福昔明(rifaximin)、基于木炭的粘合剂/吸附剂(例如DAV132)、粪便细菌疗法、益生菌疗法(参见,例如Intnat'l J Inf Dis,16(11):e786,其内容特此通过引用并入,说明性的益生菌包括布拉氏酵母菌(*Saccharomyces boulardii*);鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)GG;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)299v;丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)M588;艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)VP20621(非产毒艰难梭菌菌株,以前称为艰难梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*));干酪乳杆菌

(*Lactobacillus casei*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 的组合 (Bio-K+CL1285); 干酪乳杆菌、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 的组合 (Actimel); 嗜酸乳杆菌、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 的组合 (Florajen3); 嗜酸乳杆菌、德氏保加利亚乳杆菌保加利亚种 (*Lactobacillus bulgaricus delbrueckii subsp.bulgaricus*)、干酪保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus casei*)、植物保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus plantarum*)、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、唾液链球菌嗜热亚种 (*Streptococcus salivarius subsp.thermophilus*) 的组合 (VSL#3)) 以及抗体或其它生物疗法 (例如针对艰难梭菌的单克隆抗体, 如 N Engl J Med. 2010; 362 (3) : 197 中所述, 其内容特此通过引用整体并入; 中和结合蛋白, 例如排列为多聚体的中和结合蛋白, 其针对美国专利公开号 2013/0058962 中叙述的 SEQ ID NO 中的一个或多个 (例如 SEQ ID No: 59、60、95、67、68 和 87 中的一个或多个), 其内容特此通过引用整体并入); 或针对艰难梭菌二元毒素的任何中和结合蛋白。

[0178] 在一些实施方案中, 附加治疗剂是止泻剂。适合用于本发明的止泻剂包括但不限于 DPP-IV 抑制剂、天然阿片类药物 (诸如鸦片酊剂、止痛药和可待因)、合成阿片类药物 (诸如地芬诺酯、地芬诺辛和洛哌丁胺)、次水杨酸铋、兰瑞肽 (lanreotide)、伐普肽 (vapreotide) 和奥曲肽 (octreotide)、胃动素拮抗剂、COX2 抑制剂 (如塞来昔布 (celecoxib))、谷氨酰胺、沙利度胺 (thalidomide) 和传统止泻药 (诸如高岭土、果胶、小檗碱和毒蕈碱剂)。

[0179] 在一些实施方案中, 附加治疗剂是抗炎剂, 诸如甾体抗炎剂或非甾体抗炎剂 (NSAID)。类固醇, 特别是肾上腺皮质类固醇及其合成类似物是本领域众所周知的。可用于本发明中的皮质类固醇的实例包括但不限于, 羟基曲安西龙、 α -甲基地塞米松、 β -甲基倍他米松、二丙酸倍氯米松、苯甲酸倍他米松、二丙酸倍他米松、戊酸倍他米松、戊酸氯倍他素、地松奈德、去氧甲米松、地塞米松、二醋酸双氟拉松、戊酸双氟可龙、氟羟可舒松 (fludrenolone)、氟氯奈德 (fluclorolone acetate)、新戊酸氟米松、肤轻松醋酸酯、肤轻松、氟科汀丁酯、氟可龙、醋酸氟泼尼定 (fluprednidene (fluprednylidene) acetate)、氟氢缩松、哈西奈德、醋酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、甲基强的松龙、曲安奈德、可的松、可托多松、氟西奈德、氟氢可的松、双醋酸双氟若松、氟轻可舒松奈德、甲羟松、安西那非、安西非特、倍他米松及其酯平衡、氯泼尼松、氯可托龙、地西龙、二氯松、二氟泼尼酯、氟二氯松、氟尼缩松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼龙、氢化可的松、甲泼尼松、帕拉米松、泼尼松龙、泼尼松、二丙酸倍氯米松。可以在本发明中使用的 (NSAID) 包括但不限于水杨酸、乙酰水杨酸、水杨酸甲酯、水杨酸二醇酯、水杨酰胺、苄基-2,5-二乙酰氧基苯甲酸、布洛芬、富林达克 (fulindac)、萘普生、酮洛芬、依托芬那酯、苯基丁氮酮和吡罗美辛。另外的抗炎剂描述于例如美国专利号 4,537,776 中, 其全部内容通过引用并入本文。

[0180] 在一些实施方案中, 附加治疗剂可以是镇痛剂。可用于本发明的组合物和方法中的镇痛剂包括但不限于吗啡、可待因、海洛因、美沙酮和相关化合物、蒂巴因、奥匹维 (orpiavine) 及其衍生物、丁丙诺啡、哌啶、吗啡喃、苯并吗啡烷、四氢异喹啉、硫代丁烷、苄胺、替利定 (tilidine)、维米醇 (viminol)、奈福泮 (nefopam)、辣椒素 (8-甲基-N-香草基-

6E-壬烯酰胺)、“合成”辣椒素(N-香草基壬烯酰胺)和相关化合物。

[0181] 在一些实施方案中,附加治疗剂可以是抗病毒剂,包括但不限于阿巴卡韦(Abacavir)、阿昔洛韦(Acyclovir)、阿德福韦(Adefovir)、安普那韦(Amprenavir)、阿扎那韦(Atazanavir)、西多福韦(Cidofovir)、达芦那韦(Darunavir)、地拉韦定(Delavirdine)、地达诺新(Didanosine)、二十二烷醇(Docosanol)、依法韦仑(Efavirenz)、艾维替拉韦(Elvitegravir)、恩曲他滨(Emtricitabine)、恩夫韦肽(Enfuvirtide)、依曲韦林(Etravirine)、泛昔洛韦(Famciclovir)和膦甲酸(Foscarnet)。

[0182] 在一些实施方案中,附加治疗剂可以是用于治疗炎症性肠病的剂。例如,该剂可用于治疗结肠炎(例如溃疡性结肠炎)和克罗恩病(Crohn's disease),包括但不限于维多珠单抗(vedolizumab)(ENTYVIO)、托法替尼(tofacitinib)(XELJANZ)、DIMS 0150(KAPPAPROCT)、戈利木单抗(golimumab)(SIMPONI)、阿达木单抗(adalimumab)(HUMIRA)和其它抗TNF治疗剂。

[0183] 在一些实施方案中,附加治疗剂可以是用于治疗乳糜泻的剂。说明性的剂包括但不限于AVX-176(Avaxia Biologics)、Actobiotics(ActoGeniX)、CALY-002(Calypso biotech)、HLA-DQ2拮抗剂、HLA-DQ2/DQ8拮抗剂、tTG抑制剂,包括ERW1041E(GlaxoSmithKline)和ZED-101/ZED-1227(Zedira)、乙酸拉拉唑肽(Larazotide actate)(Alba Therapeutics)、Latiglutenase(Alvine Pharmaceuticals)、BL-7010(BioLineRx)和NexVax-2(ImmunsanT)。

[0184] 在一些实施方案中,附加治疗剂可以是用于治疗囊性纤维化的剂。说明性的剂包括但不限于伊伐卡托(ivacaftor)(KALYDECO;Vertex)、鲁玛卡托(lumacaftor)/伊伐卡托(ORKAMBI;Vertex)、VX-152(Vertex)、VX-440(Vertex)、VX-371(Vertex)、一氧化氮、苯丁酸甘油酯、利奥西呱(riociguat)(Bayer)、重组A1PI(Grifols,SA)、半胱胺IR、JBT-101(Corbus Pharmaceuticals)、N-91115(Nivalis Therapeutics)和万古霉素。

[0185] 在一些实施方案中,附加治疗剂是用于治疗肥胖的剂。说明性的剂包括但不限于奥利司他(orlistat)、氯卡色林(lorcaserin)、芬特明-托吡酯(phentermine-topiramate)、纳曲酮-安非他酮(naltrexone-bupropion)、利莫那班(rimonabant)、艾塞那肽(exenatide)、普兰林肽(pramlintide)、芬特明、苄非他明(benzphetamine)、二乙胺苯酮(diethylpropion)、苯二甲吗啉(phendimetrazine)、安非他酮(bupropion)和二甲双胍(metformin)。在各个实施方案中,附加的剂是干扰身体吸收食物中特定营养物的能力的剂,例如奥利司他、葡甘露聚糖和瓜尔胶。抑制食欲的剂也属于附加的剂,例如儿茶酚胺及其衍生物(诸如芬特明和其它基于安非他明的药物)、各种抗抑郁药和情绪稳定剂(例如安非他酮和托吡酯)、食欲不振剂(例如右旋安非他明、地高辛)。增加身体代谢的剂也属于附加的剂。在一些实施方案中,附加的剂可选自食欲抑制剂、神经递质再摄取抑制剂、多巴胺能激动剂、血清素能激动剂、GABA能信号传导调节剂、抗惊厥药、抗抑郁药、单胺氧化酶抑制剂、P物质(NKI)受体拮抗剂、黑素皮质素受体激动剂和拮抗剂、脂肪酶抑制剂、脂肪吸收抑制剂、能量摄入或代谢调控剂、大麻素受体调节剂、成瘾治疗剂、代谢综合征治疗剂、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)调节剂;和二肽基肽酶4(DPP-4)拮抗剂。在一些实施方案中,附加的剂可以选自安非他明类、苯二氮卓类、磺酰脲类、美格列奈类、噻唑烷二酮类、双胍类、 β -受体阻滞剂类、ACE抑制剂类、利尿剂类、硝酸盐类、钙通道阻滞剂类、苯丁胺、西布曲

明(sibutramine)、氯卡色林(lorcaserin)、西替利司他(cetilistat)、利莫那班(rimonabant)、泰伦那班(taranabant)、托吡酯(topiramate)、加巴喷丁(gabapentin)、丙戊酸盐、氨己烯酸、安非他酮、噻加宾(tiagabine)、舍曲林(sertraline)、氟西汀(fluxetine)、曲唑酮(trazodone)、唑尼沙胺(zonisamide)、哌醋甲酯、瓦伦尼克林(varenicline)、纳曲酮(naltrexone)、安非拉酮(diethylpropion)、苯二甲吗啉、瑞格列奈(repaglinide)、那格列奈(nateglinide)、格列美脲(glimepiride)、吡格列酮(pioglitazone)、罗格列酮(rosiglitazone)、利拉鲁肽(liraglutide)和西他列汀(sitagliptin)。

[0186] 在一个实施方案中,附加治疗剂是用于治疗前驱糖尿病(pre-diabetes)、糖尿病、II型糖尿病、胰岛素抗性、葡萄糖耐受不良或高血糖症的剂。药物的实例包括但不限于 α -葡萄糖苷酶抑制剂、胰岛淀粉素(amylin)类似物、二肽基肽酶-4抑制剂、GLP1激动剂、美格列奈类、磺酰脲类、双胍类、噻唑烷二酮类(TZD)和胰岛素。此类剂的其它实例包括溴隐亭(bromocriptine)和Welchol。 α -葡萄糖苷酶抑制剂的实例包括但不限于阿卡波糖和米格列醇。胰岛淀粉素类似物的实例是普兰林肽(pramlintide)。二肽基肽酶-4抑制剂的实例包括但不限于沙格列汀(saxagliptin)、西格列汀(sitagliptin)、维格列汀(vildagliptin)、利格列汀(linagliptin)和阿格列汀(alogliptin)。GLP1激动剂的实例包括但不限于利拉鲁肽(liraglutide)、艾塞那肽(exenatide)、艾塞那肽缓释剂。美格列奈的实例包括但不限于那格列奈(nateglinide)和瑞格列奈(repaglinide)。磺酰脲类的实例包括但不限于氯磺丙脲(chlorpropamide)、格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide)、格列本脲(glyburide)、妥拉磺脲(tolazamide)和甲苯磺丁脲(tolbutamide)。双胍的实例包括但不限于二甲双胍、Riomet、Glucophage、Glucophage XR、Glumetza。噻唑烷二酮的实例包括但不限于罗格列酮和吡格列酮。胰岛素的实例包括但不限于天冬胰岛素(Aspart)、地特胰岛素(Detemir)、甘精胰岛素(Glargine)、赖谷胰岛素(Glulisine)和赖脯胰岛素(Lispro)。组合药物的实例包括但不限于格列吡嗪/二甲双胍、格列本脲/二甲双胍、吡格列酮/格列美脲、吡格列酮/二甲双胍、瑞格列奈/二甲双胍、罗格列酮/格列美脲、罗格列酮/二甲双胍、沙格列汀/二甲双胍、西格列汀/辛伐他汀、西格列汀/二甲双胍、利格列汀/二甲双胍、阿格列汀/二甲双胍和阿格列汀/吡格列酮。

[0187] 治疗方法

[0188] 在各个实施方案中,本发明提供了治疗或预防辐射诱导的病症的方法,所述病症包括但不限于因癌症放射疗法引起的小肠结肠炎、辐射诱导的肠病、结肠炎和/或直肠炎。辐射诱导的肠病的特征在于粘膜萎缩、血管硬化和进行性肠壁纤维化。该病症的症状可包括营养吸收不良、肠道运输改变、运动障碍和肠道内容物的异常推进。在一些实施方案中,辐射诱导的急性肠病发生在辐射暴露后的前一个月、前2个月或前3个月内。在一些实施方案中,迟发性辐射肠病症状是慢性的并且可能直到辐射暴露后至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11或至少12个月才呈现。在一些实施方案中,延迟性辐射肠病症状可能直到辐射暴露后约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11或约12个月才呈现。在一些实施方案中,延迟性辐射肠病症状可能直到辐射暴露后约1年、约2年、约3年、约4年或约5年才呈现。

[0189] 在一些实施方案中,本发明提供了对已经暴露于辐射(包括但不限于放射疗法)的

受试者的基于AP的剂的治疗和/或施用。在各个实施方案中,基于AP的剂的施用发生在暴露于辐射之前,例如在作为癌症治疗的一部分的放射疗法之前。在某些实施方案中,基于AP的剂的施用发生在辐射暴露时。在各个实施方案中,基于AP的剂的施用发生在暴露于辐射时以及暴露于辐射之后不久。在一些实施方案中,基于AP的剂的施用发生在暴露于辐射之后不久。在各个实施方案中,基于AP的剂的施用发生在暴露于辐射时并且在暴露于辐射之后长期持续。在一些实施方案中,基于AP的剂的施用在暴露于辐射之后长期持续。在各个实施方案中,基于AP的剂的施用发生在迟发性辐射肠病发作时。在一些实施方案中,本发明提供了对已经暴露于或将要暴露于辐射的受试者的基于AP的剂的治疗和/或施用,其中基于AP的剂的施用发生在暴露于辐射后至少1年、至少1.5年、至少2年、至少2.5年、至少3年、至少3.5年、4年、至少4.5年、至少5年、至少5.5年、至少6年、至少6.5年或至少7年。

[0190] 在各个实施方案中,本发明提供了对患有辐射相关疾病或病症(例如但不限于放射疗法或ARS的副作用)的受试者的治疗和/或施用。

[0191] 在一些实施方案中,本发明提供了对患有放射性肠炎的受试者的预防、治疗和/或施用。例如,受试者可能患有急性或慢性放射性肠炎。放射性肠炎的症状包括但不限于恶心、呕吐、胃痉挛、频繁上厕所、水样腹泻、直肠粘液排出、直肠疼痛、直肠出血、体重减轻和波状胃痛。

[0192] 在一些实施方案中,本发明涉及在有需要的受试者中治疗或预防辐射相关疾病或病症的方法,包括向受试者施用本文所述的包含基于AP的剂的改良的释放制剂。例如但不限于,制剂的基于AP的剂是可以口服施用的IAP。

[0193] 在各个实施方案中,本发明提供了对患有迟发性放射性肠病和/或肠毒性的受试者的治疗和/或施用。在一些实施方案中,迟发性放射性肠病发生在放射疗法结束后至少3个月。在各个实施方案中,放射疗法是治疗癌症的放射疗法。在各个实施方案中,受试者是癌症患者。在一个实施方案中,放射疗法针对骨盆、腹部或下躯干中的肿瘤。在一些实施方案中,本发明的本治疗不干扰癌症治疗,包括但不限于放射疗法。

[0194] 在各个实施方案中,辐射包括电离辐射。在各个实施方案中,辐射包括X射线、 γ 射线和带电粒子中的一种或多种。

[0195] 在各个实施方案中,辐射暴露是约2Gy,或约2.5Gy,或约3Gy,或约3.5Gy,或约4Gy,或约4.5Gy,或约5Gy,或约10Gy,或约20Gy,或约30Gy,或约40Gy,或约50Gy,或约60Gy,或约70Gy,或约80Gy,或约90Gy,或约100Gy的剂量。

[0196] 在各种实施方案中,辐射暴露是局部的或全身的。

[0197] 在一些实施方案中,本发明涉及在有需要的受试者中治疗或预防辐射相关疾病或病症的方法,其包括向受试者施用本文所述的改良的释放制剂,所述改良的释放制剂包含在辐射相关疾病或病症是放射疗法的结果或副作用的情况下可以口服施用的基于AP(任选地IAP)的剂。

[0198] 在一些实施方案中,本方法涉及预防或减少肠道微生物组多样性降低,例如,肠道微生物组多样性降低是辐射暴露(包括放射疗法)和/或化疗的副作用或结果。在一些实施方案中,本方法涉及在辐射暴露(包括放射疗法)和/或化疗后修复和/或重建受试者的肠道微生物组。

[0199] 在一些实施方案中,放射疗法可以是癌症治疗的一部分,作为主要疗法或辅助疗

法(例如,与化疗一起)。在一些实施方案中,放射疗法可用于防止手术后肿瘤复发和/或去除原发性恶性肿瘤。在各个实施方案中,受试者是癌症患者。

[0200] 在一些实施方案中,放射疗法可以是杜普伊特伦病(Dupuytren's disease)、莱德尔豪斯病(Ledderhose disease)的治疗的一部分,或作为术后治疗的一部分。在各个实施方案中,受试者患有杜普伊特伦病、莱德尔豪斯病或最近接受了手术。

[0201] 在各个实施方案中,本方法减少或消除放射疗法的副作用,包括急性副作用、长期副作用或累积副作用。在各个实施方案中,本方法减少或消除放射疗法的局部或全身副作用。在各个实施方案中,放射疗法和/或辐射暴露的副作用是以下中的一种或多种:疲劳、恶心和呕吐、对上皮表面的损伤(例如但不限于湿润脱皮)、口腔、喉咙和胃痛、肠道不适(例如但不限于酸痛、腹泻和恶心)、肿胀、不育、纤维化、脱毛、干燥(例如但不限于口干(口腔干燥症)和干眼(干眼症),以及腋窝和阴道粘膜干燥)、淋巴水肿、心脏病、认知减退、放射性肠病(例如但不限于萎缩、纤维化和血管变化,其可产生吸收不良、腹泻、脂肪痢和出血,伴随通常由于回肠受累而发现的胆汁酸腹泻和维生素B12吸收不良)。盆腔放射性疾病包括放射性直肠炎、出血、腹泻和尿急,以及放射性膀胱炎。

[0202] 在各个实施方案中,放射疗法是盆腔放射疗法。在此类实施方案中,本文所述的包含可以口服施用的基于AP(任选地IAP)的剂的改良的释放制剂,减少或消除了本文所述的胃肠相关副作用。在此类实施方案中,可以口服施用的基于AP(任选地IAP)的剂减少或消除了如本文所述的下肢相关副作用。

[0203] 在各个实施方案中,放射疗法是盆腔放射疗法,并且本文所述的改良的释放制剂减少或消除了放射性肠病、萎缩、纤维化和血管变化、吸收不良、腹泻、脂肪泻、胆汁酸腹泻出血、吸收不良(例如维生素吸收不良,例如维生素B12吸收不良)中的一种或多种。在各个实施方案中,放射疗法是盆腔放射疗法,并且本文所述的改良的释放制剂减少或消除了放射性直肠炎、出血、腹泻和尿急以及放射性膀胱炎。

[0204] 在各个实施方案中,放射疗法作为外束放射疗法(external-beam radiation therapy)、近距离放射疗法和全身放射疗法中的一种或多种递送。

[0205] 在各个实施方案中,放射疗法是外束放射疗法,选自3维适形放射疗法(3D-CRT)、调强放射疗法(IMRT,例如RAPIDARC)、图像引导放射疗法(IGRT)、电磁引导放射疗法(例如CALYPSO)、螺旋断层放射疗法、立体定向放射外科(SRS)、立体定向体部放射疗法(SBRT,例如CYBERKNIFE、GAMMAKNIFE、X-KNIFE、CLINAC)、术中放射疗法(IORT)和质子疗法。

[0206] 在各个实施方案中,放射疗法是近距离放射疗法,选自间质近距离放射疗法、腔内近距离放射疗法、巩膜外近距离放射疗法。

[0207] 在各个实施方案中,放射疗法是全身放射疗法,选自放射性碘和放射性生物制剂。例如,放射疗法可以是放射性碘(¹³¹I)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)(ZEVALIN)、托西莫单抗(tositumomab)和碘I ¹³¹托西莫单抗(BEXXAR)、来昔决南钐¹⁵³(QUADRAMET)和氯化锶-89(METASTRON)。

[0208] 在各个实施方案中,放射疗法包括约20Gy、或约30Gy、或约40Gy、或约50Gy、或约60Gy、或约70Gy、或约80Gy、或约90Gy、或约100Gy的剂量,任选地分次的。

[0209] 在一些实施方案中,本发明涉及在有需要的受试者中治疗或预防辐射相关疾病或病症的方法,在辐射相关疾病或病症是急性放射综合征的情况下,所述方法包括向受试者

施用本文所述的改良的释放制剂。

[0210] 在一些实施方案中,ARS包括以下中的一种或多种:胃肠综合征;造血综合征;神经血管综合征;凋亡介导的组织损伤,其中凋亡任选地可归因于细胞应激;以及电离辐射诱导的凋亡组织损伤。在一些实施方案中,高剂量辐射(例如电离辐射)为约5至约30Gy,或约10至约25Gy,或约15至约20Gy,并且任选地足以用于RES 3单位辐射暴露状态的分类。在各个实施方案中,高剂量辐射是辐射灾难的结果和/或正在接受治疗的人类患者由于以下的一种或多种原因已经暴露于高剂量辐射或处于暴露于高剂量辐射的风险中:在受污染地区的军事行动或第一响应者行动;核爆炸;临界事故;放射疗法事故;恐怖袭击;太空旅行的暴露;放射性废弃物逸出;暴露于开源辐射;和核反应堆故障。

[0211] 在各个实施方案中,本发明的方法和组合物提供对辐射相关病症诸如ARS的治疗或预防。在各个实施方案中,本文所述的治疗降低暴露的人类患者群体的发病率或死亡率或加速从ARS症状的恢复。ARS通常呈现为一系列阶段性症状,所述症状可能因个体辐射敏感性、辐射类型和吸收的辐射剂量而异。通常,不希望受理论束缚,随着辐射剂量增加,症状的程度将加剧,并且每个阶段的持续时间将缩短。ARS可分为三个阶段:前驱期(也称为N-V-D期)、潜伏期和显化疾病。在各个实施方案中,本发明的基于AP的剂的改良的释放制剂可以在这三个阶段中的任何一个阶段施用于人类患者(即基于AP的剂可以在前驱期施用于人类患者,基于AP的剂可以在潜伏期施用于人类患者,或者基于AP的剂可以在显化疾病阶段施用于人类患者)。

[0212] 在前驱期,常常存在相对快速的恶心、呕吐和不适发作。在高剂量辐射暴露已经发生、可能或不可避免的情况下,可指示使用止吐剂(例如口服预防性止吐剂),诸如格拉司琼(KYTRIL)、昂丹司琼(ZOFRAN)和5-HT₃阻滞剂,有或无地塞米松。因此,在各个实施方案中,基于AP的剂可在接受止吐剂的过程中施用于人类患者,或者基于AP的剂可与止吐剂组合施用于人类患者。例如,基于AP的剂也可添加到以下止吐方案中:昂丹司琼:初始0.15mg/kg IV;连续IV剂量选择包括8mg,然后在接下来的24小时内1mg/h。根据需要,口服剂量是每8小时8mg,或者格拉司琼(口服剂型):初始剂量通常是1mg,并且在第一剂量后12小时重复。可替代地,2mg可作为一个剂量服用。IV剂量是基于体重;通常为10μg/kg (4.5μg/lb) 体重。

[0213] 在潜伏期,人类患者可能相对没有症状。此阶段的长度随剂量而变化。潜伏期在造血综合征的骨髓抑制之前最长,并且可在约2与6周之间变化。潜伏期在胃肠综合征之前稍短,持续数天至一周。它是神经血管综合征之前所有中最短的,仅持续几个小时。这些时间是可变的,并且可因其它疾病或损伤的存在而改变。显化疾病呈现为与主要器官系统受损(骨髓、肠道、神经血管)相关的临床症状。

[0214] 在一些实施方案中,本发明涉及减轻或保护细胞免受暴露于辐射的影响。在一些实施方案中,本发明涉及一种减轻和/或保护人类患者免于辐射的方法,所述方法包括施用本文所述的基于AP的剂。在一些实施方案中,辐射是电离辐射。在一些实施方案中,电离辐射足以引起胃肠综合征或造血综合征。

[0215] 在一些实施方案中,ARS包括以下中的一种或多种:胃肠综合征;造血综合征;神经血管综合征;凋亡介导的组织损伤,其中凋亡任选地可归因于细胞应激;以及电离辐射诱导的凋亡组织损伤。

[0216] 造血综合征(又名骨髓综合征)的特征在于造血细胞及其祖细胞的丧失,从而使血

液和淋巴系统无法再生。这种综合征通常以血细胞数量下降为特征,即再生障碍性贫血。这可导致由于白细胞数量少所致的感染(例如机会性感染)、由于缺乏血小板所致的出血以及由于循环中的红细胞很少所致的贫血。这些变化可在接受全身急性剂量后通过验血检测到。由炸弹爆炸引起的常规创伤和烧伤由于造血综合征引起的伤口愈合不良而变得复杂,从而增加死亡率。死亡可由于感染(例如,作为免疫抑制的结果)、出血和/或贫血而发生。造血综合征通常在较低剂量的辐射下盛行,并导致比胃肠综合征更延迟的死亡。

[0217] 胃肠综合征由肠上皮(主要是小肠)中的大量细胞死亡引起,随后肠壁崩解并且死于菌血症和脓毒症。这种形式的辐射损伤的症状包括恶心、呕吐、食欲不振、吸收能力丧失、裸露区域出血和腹痛。胃肠综合征的说明性全身影响包括营养不良、脱水、肾衰竭、贫血、脓毒症等。如果不进行治疗(包括,例如,骨髓移植),死亡很常见(例如,通过肠道细菌感染)。在一些实施方案中,基于AP的剂可与骨髓移植组合使用。在一些实施方案中,基于AP的剂可与一种或多种胃肠综合征抑制剂和/或本文所述的任何附加的剂组合使用。

[0218] 神经血管综合征呈现神经系统症状,诸如头晕、头痛或意识水平下降,在几分钟到几小时内发生,并且没有呕吐。另外的症状包括极度紧张和困惑;严重恶心、呕吐和水样腹泻;意识丧失;以及皮肤烧灼感。神经血管综合征通常是致命的。

[0219] 在各个实施方案中,本发明的方法和组合物提供对辐射诱导的肠纤维化的治疗或预防。在一些实施方案中,辐射诱导的肠纤维化包括肠炎、肠纤维化、血管硬化、慢性溃疡、粘膜下层扩大、成纤维细胞和平滑肌细胞增殖增强以及胶原和其它细胞外基质组分的过度沉积中的一种或多种。

[0220] 在一些实施方案中,本发明提供了一种降低暴露于辐照后的死亡风险的方法,其包括施用有效量的基于AP的剂。在一些实施方案中,辐射可能是致命的,并且任选地作为辐射灾难的结果发生。在各个实施方案中,基于AP的剂在辐射暴露后24小时内施用。在各个实施方案中,基于AP的剂在辐射暴露后48小时内施用。

[0221] 在一些实施方案中,基于AP的剂的改良的释放制剂与包括但不限于辐射防护剂(例如抗氧化剂(例如氨磷汀和维生素E)、细胞因子(例如干细胞因子))等的本文所述的任何附加的剂组合施用。正常细胞因电离辐射的损伤和死亡是辐射诱导对暴露细胞的直接损伤和对辐射诱导应激的活跃遗传程序化细胞反应的组合,导致自杀性死亡或细胞凋亡。细胞凋亡在几种辐射敏感器官(例如,造血和免疫系统、消化道上皮等)中发生的大量细胞丢失中起关键作用,细胞凋亡的失败决定了生物体的一般辐射敏感性。在一些实施方案中,向有需要的人类患者施用本发明的基于AP的剂会抑制细胞的凋亡。在一些实施方案中,将本发明的基于AP的剂施用于人类患者以保护健康细胞免受放射治疗的损害效应。

[0222] 在各个实施方案中,本发明提供了一种减少暴露于辐照后的细胞凋亡的方法。在一个实施方案中,本发明提供了一种减少辐照后造血细胞的凋亡的方法。在另一个实施方案中,本发明提供了一种减少辐照后胃肠细胞的凋亡的方法。

[0223] 在各个实施方案中,基于AP的剂的施用刺激并保护干细胞。例如,本发明和组合物可以刺激和保护造血干细胞,包括各种造血祖细胞。在另一个实例中,本发明和组合物可以刺激和保护胃肠干细胞,诸如肠隐窝干细胞。在一些实施方案中,可以刺激干细胞增殖和再生。因此,本发明提供了扩增患者体内干细胞诸如造血干细胞或胃肠干细胞数目的方法。在一些实施方案中,扩增造血祖细胞或胃肠祖细胞。在各个实施方案中,本发明提供了保护干

细胞或祖细胞免于细胞死亡(例如,细胞凋亡或坏死)的方法和组合物。

[0224] 在各个实施方案中,本发明的方法和组合物显著增强辐照后造血系统和胃肠系统的恢复。例如,本发明的方法和组合物增强辐照后的骨髓恢复。在另一个实例中,本发明的方法和组合物增强胃肠隐窝的再生。

[0225] 暴露于电离辐射(IR)可以是短期或长期的,和/或它可作为单剂量或多剂量体验,和/或它可应用于全身或局部。在一些实施方案中,本发明涉及核事故或军事攻击,其可能涉及暴露于单次高剂量的全身辐照(有时随后是放射性同位素的长期中毒),如本文进一步所述。例如,对于骨髓移植患者的预治疗,当需要通过从宿主血液前体中“清除”它们而使造血器官准备好供者骨髓时也是如此(严格控制所施加的剂量)。癌症治疗可牵涉多剂量的局部辐照,如果将其作为全身辐照施加,则大大超过致死剂量(例如化疗事故)。放射性同位素中毒或治疗导致所靶向的器官(例如,在吸入¹²⁵I的情况下为甲状腺)长期局部暴露于辐射。此外,存在许多物理形式的在生物效应的严重程度方面存在显著差异的电离辐射。

[0226] 在分子和细胞水平上,辐射颗粒能够产生DNA、蛋白、细胞膜和其它大分子结构的破裂和交联。电离辐射还通过产生自由基和活性氧(ROS)而诱导对细胞组分的二次损伤。多种修复系统可抵消这种损伤,诸如恢复DNA的完整性和保真度的几种DNA修复途径,以及清除自由基和ROS并减少氧化蛋白和脂质的抗氧化剂化学物质和酶。细胞检查点系统检测DNA缺陷并延迟细胞周期进展,直到损伤得到修复或决定使细胞生长停滞或达到程序性细胞死亡(细胞凋亡)。

[0227] 辐射可对哺乳动物生物体造成损伤,范围从低剂量的轻度诱变和致癌作用到高剂量的几乎立即杀灭。生物体的总体辐射敏感性由在包括造血系统、生殖系统和具有高细胞更新率的不同上皮在内的几种敏感组织中发展的病理改变决定。

[0228] 导致死亡的 γ 辐照的急性病理结果因不同剂量而异,并且可由某些器官的衰竭决定,所述器官限定了生物体对每个特定剂量的敏感性阈值。因此,较低剂量的致死率由于骨髓发育不全发生,而中等剂量通过诱导胃肠(GI)综合征而更快致死。非常高剂量的辐射可导致几乎立即死亡,从而引发神经元变性。在辐射急性毒性期存活下来的生物体可遭受长期远程后果,其包括辐射诱导的致癌作用和辐照后数月和数年内暴露器官(例如肾脏、肝脏或肺)中发展的纤维化。细胞DNA是IR的主要靶标,其通过直接和间接(例如基于自由基的)机制导致各种类型的DNA损伤(基因毒性应激)。所有生物体维持能够有效恢复辐射损伤的DNA的DNA修复系统;DNA修复过程中的错误可导致突变。

[0229] 基于AP的剂在细胞水平和对整个生物体具有强促存活活性。响应于超致死剂量的辐射,基于AP的剂可抑制胃肠综合征和造血综合征,它们是因急性辐射暴露所致的死亡的主要原因。由于这些性质,基于AP的剂可用于治疗自然辐射事件和核事故的影响。而且,基于AP的剂可与其它辐射防护剂组合使用,从而显著增加电离辐射防护的等级。

[0230] 基于AP的剂可用作辐射防护剂,以通过例如将人类生物体的辐射抗性提高到超出目前可用措施(屏蔽和施加现有生物保护剂)可达到的水平而扩大可耐受辐射剂量的范围,并且例如在核事故或大规模太阳粒子事件的情况下显著增加全体人员存活的机会。

[0231] 基于AP的剂可响应于DNA和其它细胞结构的损伤而抑制辐射诱导的程序性细胞死亡或细胞凋亡。在一些实施方案中,基于AP的剂可能不处理细胞水的损伤并且可能不防止突变。自由基和活性氧(ROS)是突变和其它细胞内损伤的主要原因。抗氧化剂和自由基清除

剂可有效防止自由基造成的损伤。

[0232] 此外,在一些实施方案中,本发明涉及皮肤辐射综合征(CRS)的预防或治疗,所述皮肤辐射综合征即两个月后辐射暴露的皮肤症状(例如发红(任选地伴有瘙痒)、起泡、溃疡、脱发、皮脂腺和汗腺受损、萎缩、纤维化、皮肤色素沉着减少或增加、暴露组织溃疡或坏死、湿性脱屑和真皮血管系统的塌陷,导致暴露皮肤全层损失。

[0233] 在各个实施方案中,基于AP的剂的施用降低了患者辐照后伤口、败血并发症和微生物感染的发生率。

[0234] 在一些实施方案中,本发明的人类患者经历白细胞减少和/或中性粒细胞减少(例如嗜中性粒细胞绝对计数(ANC) <100个细胞/ μL 。在一些实施方案中,本发明的方法和组合物涉及在约24至约48小时内呈现淋巴细胞计数减少约50%的人类患者。在一些实施方案中,人类患者的淋巴细胞计数小于约1000个细胞/ μL 或约900个细胞/ μL 或约800个细胞/ μL 或约700个细胞/ μL 或约600个细胞/ μL 或约500个细胞/ μL 或约400个细胞/ μL 或约300个细胞/ μL 或约200个细胞/ μL 或约100/个细胞 μL (例如在约24至约48小时内)。在一些实施方案中,通过安德鲁斯淋巴细胞列线图评估患者的淋巴细胞谱(参见Andrews GA,Auxier JA,Lushbaugh CC.The Importance of Dosimetry to the Medical Management of Persons Exposed to High Levels of Radiation.In Personal Dosimetry for Radiation Accidents.Vienna:International Atomic Energy Agency;1965,其内容特此通过引用并入)。在一些实施方案中,本发明的方法和组合物涉及在约24至约48小时内呈现凝血细胞计数减少约50%的人类患者。在一些实施方案中,本发明的人类患者经历血小板减少、贫血和/或中性粒细胞减少。血小板减少定义为血小板计数低于50,000/ μL 。例如,血小板减少可表征为1级血小板减少(即,血小板计数为75,000至150,000/ μL)、2级(即,血小板计数为50,000至<75,000/ μL)、3级(血小板计数为25,000至<50,000/ μL)或4级(即,血小板计数低于25,000/ μL)。贫血在男性中可以诊断为血红蛋白含量低于13至14g/dL,而在女性中可以诊断为血红蛋白含量为12至13g/dL。例如,基于血红蛋白水平将贫血分为不同等级:0级(在正常限值范围内, $\geq 12\text{g/dL}$);1级(轻度,11.9至10g/dL);2级(中等,9.9至8g/dL);3级(严重/重度,7.9至6.5g/dL);和4级(危及生命,<6.5g/dL)。中性粒细胞减少可定义为中性粒细胞绝对计数(ANC)小于1,500个细胞/ mm^3 。例如,中性粒细胞减少分级为1级(即,ANC为1,500/ mm^3 或以下至大于2,000/ mm^3)、2级(ANC为1,000/ mm^3 或以下至大于1,500/ mm^3)、3级(ANC为500/ mm^3 或以下至大于1,000/ mm^3)、或4级(ANC小于500/ mm^3)。在各个实施方案中,本发明的方法和组合物降低了患者辐照后血小板减少、贫血和/或中性粒细胞减少的持续时间和严重程度。例如,本发明的方法和组合物可以降低患者辐照后4级血小板减少、贫血和/或中性粒细胞减少的持续时间和严重程度。

[0235] 在各个实施方案中,高剂量辐射是指全身剂量。在各个实施方案中,高剂量辐射可能不均匀。在各个实施方案中,ARS是高剂量辐射的结果。在各个实施方案中,高剂量辐射为约2Gy,或约2.5Gy,或约3Gy,或约3.5Gy,或约4Gy,或约4.5Gy,或约5Gy,或约10Gy,或约15Gy,或约20Gy,或约25Gy,或约30Gy。在各个实施方案中,高剂量辐射为约5至约30Gy,或约10至25Gy,或约15至20Gy。在一些实施方案中,高剂量辐射通过物理剂量学和/或生物剂量学(例如多参数剂量评估)、细胞遗传学(例如,用于例如血液样品的染色体分析(包括,通过非限制性实例,具双着丝粒分析)中的一项或多项来评估。

[0236] 在各个实施方案中,全身辐射剂量可分为亚致死剂量(<2Gy)、潜在致死剂量(2-10Gy)和超致死剂量(>10Gy)。

[0237] 给定单位的辐射暴露状态(RES)基于高于正常背景辐射的操作暴露。基于单位剂量计将其设计为平均值。在各个实施方案中,高剂量的辐射足以用于RES 3单位辐射暴露状态的分类。

[0238] 在各个实施方案中,辐射是电离辐射(例如 α 粒子、 β 粒子、 γ 射线和中子中的一种或多种)。在各个实施方案中,当辐射与原子相互作用时,能量被存储,导致电离(电子激发)。这种电离可通过直接和间接作用损伤细胞中的某些关键分子或结构。辐射可直接击中细胞中特别敏感的原子或分子。由此造成的损伤是无法弥补的;细胞死亡或导致功能障碍。辐射还可通过与体内水分子相互作用而间接损伤细胞。存储在水中的能量会导致产生不稳定的有毒超氧化物分子;然后这些会损伤敏感分子并影响亚细胞结构。

[0239] 在一些实施方案中,辐射可由以下放射性材料中的一种或多种引起:镅(例如241Am)、铯(例如137Cs)、钴(例如60Co)、铀(例如贫铀)、碘(例如131、132、134、135I)、磷(例如32P)、钚(例如238、239Pu)、镭(例如226Ra)、锶(例如90Sr)、氚(例如3H)和铀(例如235U、238U、239U)。

[0240] 在各个实施方案中,高剂量辐射是辐射灾难的结果。在各个实施方案中,人类患者已经暴露于高剂量辐射或处于暴露于高剂量辐射的风险中,所述高剂量辐射可能是以下一种或多种原因的结果:在受污染地区的军事行动或第一响应者行动;核爆炸;临界事故;放射疗法事故;恐怖袭击;太空旅行的暴露;放射性废弃物逸出;暴露于开源辐射;和核反应堆故障。

[0241] 一种在有需要的受试者中治疗或预防化学治疗性治疗的副作用的方法,包括向受试者施用本文所述的改良的释放制剂。

[0242] 在各个实施方案中,本发明提供了对遭受化学治疗性治疗的副作用的受试者的治疗和/或施用。

[0243] 在一些实施方案中,化学治疗性治疗的副作用选自秃发、骨髓抑制、肾毒性、体重减轻、疼痛、恶心、呕吐、腹泻、便秘、贫血、营养不良、脱发、麻木、味觉改变、食欲不振、稀疏或焦枯的毛发、口疮、记忆丧失、出血、心脏毒性、肝毒性、耳毒性和化疗后认知障碍。

[0244] 一种在有需要的受试者中通过提高化学治疗性治疗的有效性来治疗癌症的方法,包括向受试者施用本文所述的改良的释放制剂。在各个实施方案中,本文所述的基于AP的剂的改良的释放制剂充当本文所述的化学治疗性治疗的佐剂。在各个实施方案中,本文所述的基于AP的剂的改良的释放制剂改善了本文所述的任何化学治疗性治疗的抗癌效果和/或增加了其治疗窗。在各个实施方案中,向受试者施用基于AP的剂的改良的释放制剂不会干扰癌症的治疗。

[0245] 在某些方面,本发明进一步提供了改善或减少和/或治疗或预防受试者虚弱的方法,其中该方法包括:鉴定期望或需要治疗或预防虚弱的受试者,并向该受试者施用本文所述的基于AP的剂的改良的释放制剂。

[0246] 衰老是哺乳动物生物体随时间推移进展的渐进式全身病理转化。它与多个器官和组织的多种功能缺陷的累积和再生能力降低相关,导致发展年龄相关性慢性疾病,包括动脉粥样硬化、糖尿病、肺纤维化、失明、痴呆、肾功能障碍、骨关节炎和低度慢性无菌性炎症

以及本文考虑的其它年龄相关性疾病和病症。这些疾患经常与老年综合征(包括虚弱、认知障碍和行动不便)的逐渐发展同时发生。衰老是自然且不可避免的过程。衰老的根本原因仍然存在争议;然而,衰老的两个特征一般认为是普遍存在的:DNA损伤的增加和全身性无菌性慢性炎症的发展,两者都被认为是年龄相关性病理的主要促成因素。

[0247] 在一些实施方案中,本发明提供了改善或减少和/或治疗或预防受试者虚弱的方法,如通过受试者的PFI评分降低所测量的。在一些实施方案中,用于改善或减少和/或治疗或预防受试者虚弱的本发明的方法和组合物包括随时间维持PFI评分,使得评分以比受试者未施用本发明的基于AP的剂的改良的释放制剂时更慢的速率增加。在本发明的一些实施方案中,患者的PFI评分随时间保持几乎相同。在其它实施方案中,本发明的方法提供与自然衰老和/或加速衰老(例如,由例如癌症或癌症治疗诱导的加速衰老)相关的细胞老化和免疫老化的减少。

[0248] 在另一方面,本发明提供了治疗或预防受试者的年龄相关疾病或病症的方法,其中该方法包括:鉴定期望或需要治疗或预防年龄相关疾病或病症的受试者,并向所述受试者施用基于AP的剂的改良的释放制剂。在一些实施方案中,年龄相关疾病或病症的特征在于细胞老化或免疫老化增加。

[0249] 在一些实施方案中,年龄相关疾病或病症选自加速衰老、心血管疾病、脑血管疾病、外周血管疾病、心脏舒张功能不全、良性前列腺肥大、主动脉瘤、肺气肿、动脉粥样硬化、糖尿病、肺纤维化、失明、痴呆、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、肾功能障碍、骨关节炎、低级别慢性无菌性炎症、椎间盘突出、虚弱、脱发、听力损失、视力丧失、肌肉疲劳、皮肤疾患、皮肤痣、皱纹皮肤、色素沉着过度、疤痕、瘢痕瘤、酒渣鼻、白斑病、寻常性鱼鳞病、皮炎、光化性角化病和肌少症。

[0250] 在具体实施方案中,本发明的方法包括治疗或预防加速衰老。在一些实施方案中,加速衰老是早衰综合征或其症状,包括但不限于哈金森-吉尔福德早衰综合征(Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS)、沃纳综合征(Werner syndrome, WS)、布卢姆综合征(Bloom syndrome, BS)、罗斯蒙特-汤姆森综合征(Rothmund-Thomson syndrome, RTS)、科克因综合征(Cockayne syndrome, CS)、着色性干皮病(XP)、毛发低硫营养不良(TTD)、合并着色干皮病和科克因综合征(XP-CS)或限制性皮肤病(RD)。患有这些疾病或病症之一的受试者通常寿命(即生活期限)缩短。

[0251] 在其它实施方案中,加速衰老是由癌症或癌症治疗诱导的。例如,本发明考虑到诱导自然衰老过程加速的癌症治疗选自由以下组成的一种或多种疗法:放射疗法、激素、酪氨酸激酶抑制剂、蒽环类、烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢物/细胞毒性药物、BRAF抑制剂、抗肿瘤抗生素、异喹啉生物碱、Bcl-2抑制剂、造血细胞移植(HCT)、端粒酶抑制剂、核苷类似物逆转录酶抑制剂、DNA交联剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、微管抑制剂和miRNA。

[0252] 在一些实施方案中,考虑了受试者接受可诱导加速衰老的治疗的任何癌症。在一个实施方案中,受试者接受治疗的癌症是血液学癌症。此外,在一些实施方案中,受试者在儿童时期接受过癌症治疗。

[0253] 在一些实施方案中,虚弱包括主要生理功能缺陷的累积、再生能力的降低、伤口愈合受损和年龄相关疾病的风险增加。例如,在一些实施方案中,虚弱与自然衰老或加速衰老有关。可以根据本领域技术人员已知的许多指数或实验来测量虚弱。例如,一种此类指数,

即生理虚弱指数 (PFI), 包括一个或多个参数的测量, 这些参数选自握力、收缩压、舒张压、血流量、血液中性粒细胞的数目、血液中性粒细胞的百分比、血液单核细胞的数目、血液单核细胞的百分比、淋巴细胞的数目、红细胞的数目、血红蛋白水平、血细胞比容水平、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白水平、平均红细胞血红蛋白浓度和角质形成细胞来源的细胞因子水平。任何一个个体与参考标准的偏差都称为缺陷, 并且个体的总体平均PFI评分是缺陷与测量参数总数的比率。

[0254] 虚弱可以表现为对应激物的脆弱性和承受应激的能力降低。例如, Buchner和Wagner 1992 Clin Geriatr Med. 1992年2月; 8(1): 1-17的公开内容特此通过引用整体并入。虚弱可以表现为体内平衡机制 (例如, 互联性和/或反馈或前馈) 的复杂性的丧失。例如, Lipsitz 2002 J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002年3月; 57(3): B115-25的公开内容特此通过引用整体并入。如特此通过引用整体并入的Bortz 2002, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002年5月; 57(5): M283-8中所述, 虚弱还可以表现为失用和/或通过生物体的能量流减少。如特此通过引用整体并入的Ferrucci 2005 J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 60, 56所述, 虚弱也可以表现为体内平衡失调。

[0255] 存在几种综合方法用于定量评估人和动物中的衰老相关性缺陷和虚弱的累积。个体生物体的健康状况和衰老速率各不相同。为了解释这种异质性, 虚弱指数 (FI) 被引入作为数字评分, 其是人中存在的缺陷与研究中考虑的缺陷总数的比率。FI的变化表征个体衰老的速率。类似的方法已应用于实验室动物。虚弱指数被认为是可靠且广泛接受的“生物年龄”的衡量, 以及指示生活质量下降的总体健康下降程度。

[0256] 在某些方面和实施方案中, 本文提供包括用于改善和/或治疗或预防受试者的虚弱和/或降低虚弱指数的方法。可以用本领域已知的许多方法中的任何一种来评估虚弱。例如, 在Hubbard等人, Ageing, published electronically November, 2008第115-118页; Cesari等人, Age and Ageing, 43: 10-12, 2014; 以及Mohler等人, Experimental Gerontology, 54: 6-13, 2014中描述了虚弱和评价虚弱/测量虚弱指数的方法, 其全部特此通过引用并入。

[0257] 在各个实施方案中, 如美国专利申请公开号2015/0285823中所述计算虚弱指数, 其通过引用并入本文。例如, 提供了对虚弱指数的测定的描述。开发虚弱指数是为了评估相同实龄生物体的健康到虚弱的范围, 以解决实龄并不总是反映生物年龄的看法。基于16项参数 (包括体重、握力、血压、全血细胞计数、细胞因子水平分析的测量), FI计算为所测量缺陷总数的比率并且分配介于0 (无缺陷=健康) 和1 (存在所有缺陷=虚弱) 之间的FI评分。因此, FI越高表明生物体的健康状况越差。在这方面, 提供FI作为用于评估相同实龄生物体的“健康”到“虚弱”的范围。

[0258] 在某些实施方案中, 如Antoch等人 Aging. 2017; 9: 1-12 (特此通过引用整体并入) 所述, 本发明的方法降低或预防根据生理虚弱指数 (PFI) 测量的受试者虚弱。例如, 可以参考年轻参考受试者来测定个体受试者的PFI。对于每个受试者, 测量各种参数。这些参数包括非侵入式测量, 包括年龄、体重、握力和舒张压。还可以测定另外的血液化学测量值, 包括白细胞计数、中性粒细胞计数、中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、嗜酸性粒细胞百分比、红细胞计数、血红蛋白水平、血细胞比容水平、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白水平、平均红细胞血红蛋白浓度、血小板计数和平均血小板体积。计算每个参数

的平均值和标准偏差。从参考组中排除与任何单个参数的平均值相差超过一个标准偏差 (STDEV) 的受试者。将针对年龄较大的受试者测量的每个参数的值与参考组的相应值进行比较并分配评分。为小于1个STDEV的值分配评分0 (无缺陷, 在参考组范围内)。相差一个STDEV的值评分为0.25 (最小缺陷)。与参考组中相应值相差2个STDEV的值评分为0.5, 相差3个STDEV的那些值评分为0.75。如果该值高于3个STDEV, 则将其评分1 (极度缺陷)。个体受试者表现出的缺陷数目计算为测量参数总数的比率并且称为生理虚弱指数 (PFI)。

[0259] 在一些实施方案中, 本发明的方法减少或改善和/或治疗或预防受试者的虚弱, 如通过PFI所测量的。例如, 向受试者施用基于AP的剂的改良的释放制剂以减少或改善和/或治疗或预防虚弱可导致PFI评分降低。在一些实施方案中, 受试者的PFI评分降低至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、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%或100%。在一些实施方案中, 受试者的PFI评分降低约25%-75%、约25%-50%或约50%至75%。在其它实施方案中, 受试者的PFI评分降低到不大于0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1或0.5。

[0260] 进一步地, 如通过引用整体并入的Rockwood等人, *J Gerontol ABiol Sci Med Sci*. 2007年7月; 62(7): 722-727中所述, 作为缺陷累积的虚弱可以通过Rockwood虚弱指数来测量。在实施方案中, 本方法减少或预防了如通过Rockwood虚弱指数评估的虚弱。

[0261] 虚弱作为一种由多个生理系统累积下降导致的储备减少的生物学综合征, 可以通过Fried虚弱评分来测量, 如Fried等人, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001年3月; 56(3): M146-56所述, 其通过引用整体并入。Fried虚弱评分包括身体虚弱表型 (PFP), 它度量各种参数, 诸如体重减轻超过10磅; 与握力相关的虚弱; 自我报告的疲惫; 15英尺步行速度; 和每周以Kcal计的身体活动量。Fried虚弱评分包括0 (不虚弱)、1-2 (中等虚弱) 和大于或等于3 (虚弱) 的评分。在各个实施方案中, 本发明的方法减少或改善和/或治疗或预防受试者的虚弱, 如通过Fried虚弱评分所测量的。例如, 向受试者施用基于AP的剂的改良的释放制剂以便减少或改善和/或治疗或预防虚弱可导致Fried虚弱评分从3降到2、从3降到1、从3降到0、从2降到1、从2降到0或从1降到0。进一步地, 在一些实施方案中, 向受试者施用基于AP的剂的改良的释放制剂以便减少或改善和/或治疗或预防虚弱导致受试者的Fried虚弱评分没有增加。

[0262] 虚弱也可以通过FRAIL量表来测量, 如Abelle Van Kan等人, *J Am Med Dir Assoc*. 2008年2月; 9(2): 71-2. doi:10.1016/j.jamda.2007.11.005所述, 其通过引用整体并入。FRAIL量表中测量的参数包括持续疲劳感; 阻力 (爬上一段楼梯的能力); 行走 (走一个街区的能力); 超过五种疾病; 以及体重减轻超过5%。FRAIL量表并入0 (不虚弱)、1-2 (中等虚弱) 和大于或等于3 (虚弱) 的评分。在各个实施方案中, 本发明的方法减少或改善受试者的虚弱, 如通过FRAIL量表评分所测量的。例如, 向受试者施用基于AP的剂的改良的释放制剂以便减少或改善虚弱可导致FRAIL量表评分从3降到2、从3降到1、从3降到0、从2降到1、从2降到0或从1降到0。进一步地, 在一些实施方案中, 向受试者施用基于AP的剂的改良的释放制剂以便减少或改善和/或治疗或预防虚弱导致受试者的FRAIL量表评分没有增加。

[0263] 在一些实施方案中, 如本文所提供的方法使用至少一种接受的虚弱测量来改善 (或降低) 虚弱指数, 或延迟或减缓虚弱的下降。在一些实施方案中, 如本文所提供的方法使

用选自虚弱指数 (FI)、生理虚弱指数 (PFI)、Fried虚弱评分、Rockwood虚弱指数、FRAIL量表和修正虚弱指数的至少一种接受的虚弱测量来改善 (或降低) 虚弱指数, 或延迟或减缓虚弱的下降。

[0264] 在一些实施方案中, 虚弱包括低瘦体重、虚弱、疲惫、低能量消耗和/或慢步行速度。在实施方案中, 本方法减少或预防低瘦体重、虚弱、疲惫、低能量消耗和/或慢步行速度中的一种或多种的发生或发展。

[0265] 不希望受理论束缚, 据信基于AP的剂, 包括基于AP的剂 (例如IAP) 在许多胃肠和全身过程中起关键作用, 包括例如参与肠道防御、介导抗炎功能、维持正常的肠道菌群分布、维持粘膜屏障的完整性, 以及调节消化和营养 (脂肪) 吸收。因此, 本发明提供了基于AP的剂在用于调节免疫功能、代谢功能和神经功能的广泛治疗应用中的用途。在各个实施方案中, 本发明提供微生物组相关病症、胃肠失调、胃肠炎症、结肠炎 (例如, 溃疡性结肠炎)、代谢疾病 (例如, 代谢综合征、肥胖和糖尿病)、神经系统疾病 (例如, 多发性硬化和脊髓损伤)、囊性纤维化、脓毒症和肾衰竭的治疗。

[0266] 在各个方面, 本发明提供了用于调节和保护受试者的胃肠微生物组的方法, 其包括向受试者施用有效量的包含基于AP的剂 (和/或附加治疗剂) 的药物组合物。在一些实施方案中, 本发明的方法可用于通过施用本发明的基于AP的剂来治疗胃肠道菌群水平和/或功能降低的受试者, 以便增加或保持共生细菌的数目和胃肠微生物组的组成。在其它实施方案中, 本发明的方法涉及治疗由病原菌引起的感染和/或抑制胃肠道中病原菌的生长或减少其数目。

[0267] 在各个实施方案中, 本发明的方法包括治疗或预防微生物组介导的病症。说明性的微生物组介导的病症包括但不限于例如在WO 2014/121298的表3中发现的那些, 其全部内容通过引用并入本文。例如, 所述方法可用于治疗与共生细菌水平降低和/或胃肠道菌群功能降低相关的症状, 例如抗生素相关性腹泻 (AAD)、艰难梭菌相关疾病 (CDAD)、炎症病症、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) (包括HIV介导的肠道生态失调和胃肠屏障功能障碍)、甲状腺功能减退和肥胖。

[0268] 在各个方面, 本发明提供了包含本发明的基于AP的剂 (和/或附加治疗剂) 的药物组合物, 其用于在需要的受试者中治疗有胃肠道中抗生素诱导的副作用和/或预防或治疗艰难梭菌感染 (CDI) 和/或艰难梭菌相关疾病。不希望受理论束缚, 据信本发明的基于AP的剂介导三磷酸核苷去磷酸化, 其促进共生细菌优先于病原菌的生长并促进从抗生素诱导的生态失调中恢复。因此, 用本发明的基于AP的剂治疗具有防止艰难梭菌感染和肠革兰氏阴性病原体的潜力。在各个实施方案中, 抗生素诱导的副作用和/或CDI或艰难梭菌相关疾病是以下的一种或多种: 抗生素相关性腹泻、艰难梭菌腹泻 (CDD)、艰难梭菌肠道炎性疾病、结肠炎、假膜性结肠炎、发烧、腹痛、脱水和电解质紊乱、巨结肠、腹膜炎及结肠穿孔和/或破裂。

[0269] 在各个实施方案中, 受试者包括但不限于处于微生物组介导的病症的特定风险中的受试者, 诸如, 通过非限制性实例的方式, 那些正在接受治疗或最近接受过抗生素治疗的受试者。例如, 受试者可能在过去约30天左右服用了抗生素和/或免疫系统弱 (例如由慢性病引起) 和/或是女性和/或老年人 (例如超过约65岁) 和/或正在接受 (或已经接受) 胃灼热或胃酸疾病的治疗 (例如用诸如PREVACID、TAGAMET、PRILOSEC或NEXIUM等剂和相关药物治

疗)和/或最近住院,包括在重症监护室住院,或住在疗养院。因此,在一些实施方案中,本发明的方法和用途治疗或预防院内感染和/或继发性紧急感染和/或医院获得性感染(HAI)。

[0270] 在各个实施方案中,本发明提供了用于治疗胃肠道中抗生素诱导的副作用的方法,其包括向有需要的受试者有效量的本发明的基于AP的剂(和/或附加治疗剂)。在另一个实施方案中,本发明提供了用于预防胃肠道中抗生素诱导的副作用的方法,其包括向有需要的受试者有效量的本发明的基于AP的剂(和/或附加治疗剂)。

[0271] 在各个实施方案中,本发明的基于AP的剂保护肠道微生物组免受抗生素诱导的损害。在一个实施方案中,基于AP的剂保护肠道微生物组免受头孢菌素诱导的损害。在一些实施方案中,本发明的基于AP的剂保护肠道微生物组免受头孢曲松(CRO)诱导的损害。在一些实施方案中,本发明的方法治疗或预防抗生素相关的副作用,包括但不限于腹泻、恶心、呕吐、味觉障碍、结肠炎和假膜性结肠炎疾病和/或症状。在一个实施方案中,本发明的方法可用于治疗或预防抗生素相关性腹泻(AAD)。

[0272] 在各个实施方案中,本发明提供了用于治疗由病原菌引起的感染和/或抑制胃肠道中病原菌的生长或减少其数目的组合物和方法。在各个实施方案中,本发明提供了减轻或防止患者肠道中各种大肠菌(包括具有毒力和/或抗生素抗性的大肠菌)过度生长的组合物和方法。说明性的大肠菌包括柠檬酸菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、哈夫尼菌属(*Hafnia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和埃希氏菌属(*Escherichia*)。在各个方面,本文所述的方法和组合物预防或减少耐药生物的继发感染。在一个实施方案中,病原菌是肠细菌,诸如沙门氏菌属(*Salmonella*)。

[0273] 在一些实施方案中,本发明防止肠道耐药基因组的扩增。肠道耐药基因组是指人类肠道微生物区系可能隐匿的抗生素抗性基因贮库。此类抗生素抗性基因在对公共健康构成主要威胁的细菌病原体中赋予抗生素抗性。细菌可以通过动员和转移来自供者菌株的抗性基因而获得抗生素抗性基因。在各个实施方案中,本方法减少了胃肠道中抗生素抗性细菌的数目,从而减少了肠道耐药基因组的扩增。在各个实施方案中,本发明减轻或防止抗生素抗性细菌的生长,从而防止或减少肠道耐药基因组的扩增。

[0274] 在各个实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防艰难梭菌感染(CDI)和/或艰难梭菌相关疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的基于AP的剂。在各个实施方案中,本发明提供了用于预防艰难梭菌感染(CDI)和/或艰难梭菌相关疾病的方法,其包括向有需要的受试者(通过非限制性实例的方式,是正在施用抗生素或将要施用抗生素的患者)施用有效量的施用有效量的本发明的基于AP的剂。

[0275] 在各个实施方案中,本发明涉及预防艰难梭菌感染(CDI)和/或艰难梭菌相关疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的基于AP的剂,其中所述受试者正在接受主要抗生素的疗法。“主要抗生素”是指施用给患者并且可能导致CDI和/或艰难梭菌相关疾病的抗生素。这些包括最常导致CDI和/或艰难梭菌相关疾病的抗生素:例如,氟喹诺酮、头孢菌素、克林霉素和青霉素。

[0276] 在各个实施方案中,在初始发作或再发/复发(例如由于继续或重新开始抗生素治疗)的情况下治疗或预防CDI和/或艰难梭菌相关疾病。例如,在先前患有CDI的患者中,可以在复发的首发症状时施用本发明的基于AP的剂。通过非限制性实例的方式,复发的症状包括,在轻微的情况下,每天约5至约10次水样排便,无明显发烧,仅轻度腹部绞痛,而验血可

能显示白血细胞计数轻度升高达到约15,000(正常水平高达约10,000),并且在严重的情况下,每天超过约10次水样排便、恶心、呕吐、高烧(例如约102-104°F)、直肠出血、严重腹痛(例如有压痛)、腹胀和白血球计数高(例如约15,000至约40,000)。

[0277] 无论是初始发作还是再发/复发,CDI和/或艰难梭菌相关疾病都可以经由本文所述的任何症状来诊断(例如每天约3次或更多次水样腹泻,持续约2天或更长时间,轻度至重度腹部绞痛和疼痛、发烧、便血或脓液、恶心、脱水、食欲不振、体重减轻等)。无论是初始发作还是再发/复发,CDI和/或艰难梭菌相关疾病也可以经由酶免疫测定(例如,检测艰难梭菌毒素A或B抗原和/或谷氨酰胺脱氢酶(GDH),其由艰难梭菌生物体产生)、聚合酶链反应(例如检测艰难梭菌毒素A或B基因或其一部分(例如tcdA或tcdB)(包括ILLUMIGENE LAMP测定)、细胞毒性测定来诊断。例如,可以使用以下任何试验:Meridian ImmunoCard毒素A/B;Wampole毒素A/B快速检查;Wampole艰难梭菌完全快速检查;Remel Xpect艰难梭菌(前称艰难梭状芽孢杆菌)毒素A/B;Meridian Premier毒素A/B;Wampole艰难梭菌毒素A/B II;Remel前景毒素A/B EIA;Biomerieux Vidas艰难梭菌毒素A和B;BD Geneohm艰难梭菌;Prodesse Progestro CD;和Cepheid Xpert艰难梭菌。在各个实施方案中,临床样品是患者的粪便样品。还可以使用灵活的乙状结肠镜检查“范围”测试和/或腹部X射线和/或计算机断层(CT)扫描(提供您结肠的图像)来评估患者(例如寻找附着于结肠壁上的特征性乳白色或黄色斑块)。进一步地,可以使用活检(例如胃肠道任何区域的活检)来评估潜在在CDI和/或艰难梭菌相关疾病患者。

[0278] 在一些实施方案中,本发明的方法和用途包括向受试者施用初始和/或辅助疗法的方法和用途。初始和/或辅助疗法表示在检测到微生物组介导的病症或疾病时用于治疗例如此类病症或疾病的疗法。在一个实施方案中,初始和/或辅助疗法表示在检测到CDI和/或艰难梭菌相关疾病时用于治疗此类疾病的疗法。在一些实施方案中,初始和/或辅助疗法是甲硝唑、万古霉素、非达霉素、利福昔明、木炭基粘合剂/吸附剂、粪便细菌疗法、益生菌疗法和抗体疗法中的一种或多种。在各个实施方案中,本发明的方法和用途包括使用碱性磷酸酶作为这些初始和/或辅助疗法(包括共同施用或依次施用)中的任一种的佐剂。在各个实施方案中,本发明的方法和用途包括将本文所述的基于AP的剂施用于接受初始和/或辅助疗法的受试者。

[0279] 在各个实施方案中,将本发明的基于AP的剂施用于遭受胃肠道粘膜渗透性增加的受试者。在一些实施方案中,胃肠道粘膜渗透性增加是肠灌注减少或缺血的结果。缺血或血流供氧不足可由例如心力衰竭、先天性心脏病、充血性心力衰竭、冠心病、缺血性心脏病、损伤、外伤或手术引起。

[0280] 在一些实施方案中,胃肠道粘膜渗透性增加与自身免疫性和炎症性肠病(IBD),例如,乳糜泻、克罗恩病和结肠炎(例如,溃疡性结肠炎)相关或由其引起。因此,在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防自身免疫性和炎症性肠病(IBD)例如乳糜泻、克罗恩病和结肠炎(例如,溃疡性结肠炎)的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的基于AP的剂。炎症性肠病(IBD)是一类大肠炎性疾病并且在一些情况下,还有小肠炎性疾病。IBD的主要形式是克罗恩病和溃疡性结肠炎(UC)。IBD还包括胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、白塞氏综合征(Behçet's syndrome)、感染性结肠炎和未定型结肠炎。

[0281] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗乳糜泻的方法。在一些实施方案中,本发明提供了治疗与乳糜泻相关的胃肠病症的方法。乳糜泻是一种自身免疫性病症,可发生在具有遗传倾向的人中,其中摄入谷蛋白会导致小肠受损。患有乳糜泻的个体肠道渗透性增加,这使得谷蛋白分解产物(乳糜泻的触发抗原)到达肠道相关淋巴组织,从而引发炎症反应,包括炎性细胞因子释放和T细胞募集。乳糜泻的特征在于小肠粘膜的慢性炎症,可导致小肠绒毛萎缩和诸如吸收不良、腹泻、腹痛、腹胀、疲劳和恶心等多种症状。在各个实施方案中,本发明的方法有效治疗乳糜泻的一种或多种症状,包括胃肠症状、腹部症状和非胃肠症状。

[0282] 用于测量乳糜泻的一种或多种症状改善的方法可以包括评估乳果糖与甘露醇(LAMA)的比率,该比率是肠道渗透性的实验生物标志物(Kelly等人,(2012) *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:252-262,整个公开内容特此通过引用并入);测量抗转谷氨酰胺酶抗体水平;以及使用例如W0/2015/154010(其全部内容特此通过引用并入)中公开的乳糜泻患者报告结果(CeD PRO)、胃肠症状评定量表(GSRS)、乳糜泻胃肠症状评定量表(CeD GSRS)、Bristol大便形状量表(BSFS)、一般健康问卷、简短表格12健康调查第2版(SF12V2)、乳糜泻生活质量问卷(CeD-QoL)和临床医师全球疾病活动评估(CGA)来评估临床症状。在各个实施方案中,治疗乳糜泻的本方法提供了通过这些测量中的一种或多种评估的治疗效果。

[0283] 在一些实施方案中,本方法治疗乳糜泻并允许受试者在没有大量症状的情况下将谷蛋白引入其饮食中。

[0284] 在各个实施方案中,胃肠道粘膜渗透性增加与恶病质相关或由恶病质引起,诸如与癌症、AIDS、心力衰竭和/或慢性阻塞性肺病(COPD)中的一种或多种相关的恶病质。在一些实施方案中,本发明治疗或预防与恶病质相关的肠渗透性增加和/或肠道生态失调。

[0285] 在一些实施方案中,本方法治疗或预防恶病质或消耗综合征。在一些实施方案中,本方法减少、消除或预防体重减轻、肌肉萎缩、疲劳、虚弱和食欲不振中的一种或多种。在一些实施方案中,本方法减少、消除或预防在营养上无法逆转的体重减少和脂肪组织积聚减少中的一种或多种。在一些实施方案中,本方法治疗或预防肌少症。

[0286] 在一些实施方案中,在患有癌症、HIV或AIDS、乳糜泻、慢性阻塞性肺病、多发性硬化、类风湿性关节炎、充血性心力衰竭、结核病、家族性淀粉样多神经病、汞中毒(肢痛症)和激素缺乏症中的一种或多种的患者中发现了本发明治疗的恶病质。

[0287] 在各个实施方案中,用本发明的基于AP的剂治疗或预防恶病质可与以下的一种或多种组合使用或用于正在接受以下的一种或多种的患者中: β -羟基 β -甲基丁酸(HMB)、各种孕激素(例如醋酸甲地孕酮)、雄性合成类固醇(例如氧雄龙)、沙利度胺(thalidomide)和细胞因子拮抗剂、大麻素、 ω -3脂肪酸(例如二十碳五烯酸(EPA))、非甾体抗炎药、促动力剂、饥饿素和饥饿素受体激动剂、合成分解代谢转化剂(诸如MT-102)、选择性雄激素受体调节剂、赛庚啶(cyproheptadine)和胍。

[0288] 在一些实施方案中,胃肠道粘膜渗透性增加与获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关或由其引起。因此,在一些实施方案中,本发明提供了治疗与获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关的胃肠病症的方法。胃肠病症是人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)或人类免疫缺陷病毒2(HIV-2)相关AIDS患者中最常见的主诉之一。HIV疾病的胃肠表现包括腹泻、吞咽困难、吞咽痛、恶心、呕吐、体重减轻、腹痛、肛门直肠疾病、黄疸、肝肿大、胃肠道出血和胃肠肿瘤(例

如,卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma))。

[0289] 进行性HIV感染常常导致胃肠道损伤、微生物易位、炎症和免疫活化,从而推动疾病进展为AIDS。术语“HIV肠病”已用于描述与肠道介导的免疫功能障碍相关的粘膜结构和功能的变化,以及用于指代没有确定感染原因的慢性腹泻的临床综合征。除了慢性腹泻外,HIV肠病的特征常常是胃肠炎症增加、肠渗透性增加以及胆汁酸和维生素B12的吸收不良-这些异常被认为是由于HIV对肠粘膜的直接或间接影响(Brenchley JM,Douek DC.Mucosal Immunol 2008;1:23-30)。临床后果包括脂肪和碳水化合物吸收减少、趋向于小肠转运时间减少和空肠萎缩。在各个实施方案中,本发明的方法有效治疗HIV肠病的症状影响。在各个实施方案中,本发明的方法预防、减缓或逆转HIV感染向AIDS的进展。在各个实施方案中,本发明的方法预防或减缓AIDS向死亡的进展。

[0290] 此外,受试者感染的HIV-1亚型可能是向AIDS进展的速率的一个因素。在各个实施方案中,本方法有效治疗感染了HIV-1亚型C、D和G的患者。在另一个实施方案中,本方法有效治疗感染了HIV-1亚型A的患者。

[0291] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗与HIV感染和/或AIDS相关的胃肠病症的方法。例如,本发明提供了治疗HIV介导的肠道生态失调和胃肠屏障功能障碍的方法,在各个实施方案中,肠道生态失调和胃肠屏障功能障碍可由HIV、施用于HIV感染受试者的抗生素和/或正在施用于HIV感染受试者的药物引起。例如,HIV感染受试者可能正在服用一种或多种核苷类似物,诸如脱氧腺苷类似物(例如,去羟肌苷、阿糖腺苷)、腺苷类似物(例如,BCX4430)、脱氧胞苷类似物(例如,阿糖胞苷、恩曲他滨(emtricitabine)、拉米夫定(lamivudine)、扎西他滨(zalcitabine))、鸟苷和脱氧鸟苷类似物(例如,阿巴卡韦(abacavir)、阿昔洛韦(aciclovir)、恩替卡韦(entecavir))、胸苷和脱氧胸苷类似物(例如,司他夫定(stavudine)、替比夫定(telbivudine)、齐多夫定(zidovudine))和脱氧尿苷类似物(例如,碘苷、三氟尿苷)。在一些实施方案中,HIV感染受试者可能正在服用高活性抗逆转录病毒疗法(HAART)方案的一种或多种药物。示例性的HAART药物包括进入抑制剂或融合抑制剂(例如,马拉韦罗(maraviroc)、恩夫韦地(enfuvirtide))、核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)和核苷酸逆转录酶抑制剂(NtRTI)(诸如本文所述的核苷和核苷酸类似物)、非核苷逆转录酶抑制剂(例如,奈韦拉平(nevirapine)、依法韦仑(efavirenz)、依曲韦林(etravirine)、利匹韦林(rilpivirine))、整合酶抑制剂(例如,雷特格韦(raltegravir))和蛋白酶抑制剂(例如,洛匹那韦(lopinavir)、茚地那韦(indinavir)、奈非那韦(nelfinavir)、安普那韦(amprenavir)、利托那韦(ritonavir)、达芦那韦(darunavir)、阿扎那韦(atazanavir))。

[0292] 在各个实施方案中,本方法在HIV感染受试者和/或患有AIDS的受试者中减少局部炎症,改变胃肠微生物区系的组成,增强微生物易位产物从循环中的清除,并修复肠细胞屏障。在一个实施方案中,本方法减少HIV感染受试者和/或患有AIDS的受试者中的胃肠道损伤和肠道生态失调。例如,本方法可以逆转在HIV感染受试者或患有AIDS的受试者中观察到的胃肠微生物区系的变化。例如,可以通过本方法逆转的这些胃肠微生物区系的变化包括微生物区系改变,其特征是病原体增加,诸如葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、具有促炎潜力的肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)成员,以及将色氨酸分解代谢为犬尿氨酸衍生物的肠道致病细菌(包括假单胞菌属、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、芽

孢杆菌属 (*Bacillus*) 和伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)。在一个实施方案中, 本方法减少 HIV 感染受试者和/或患有 AIDS 的受试者的 GI 屏障功能障碍。例如, 本方法可以逆转 HIV 感染受试者和/或患有 AIDS 的受试者中的肠渗透性增加 (例如, 肠漏综合征)。在一个实施方案中, 本方法减少了 HIV 感染受试者和/或患有 AIDS 的受试者中的微生物易位或微生物产物和炎症介质 (例如, LPS) 易位进入体循环中。在此类方法中, 可以降低受试者血浆中的 LPS、EndoCAb、sCD14 和 I-FABP 的水平。在一个实施方案中, 本方法减少 HIV 感染受试者和/或患有 AIDS 的受试者中的免疫活化和炎症 (例如, 局部和全身性免疫活化和炎症)。例如, 本方法可以降低肠道相关淋巴组织 (GALT) 中的炎症并增加 CD4⁺ 细胞和 Th17 细胞的数目。本方法可进一步抑制细胞毒性 T 细胞的释放以及炎性粘膜细胞因子和标志物诸如干扰素- α 、肿瘤坏死因子- α 、CRP、IL-1 β 、IL-2、IL4、IL-6 和 IL-13 的产生。

[0293] 在一些实施方案中, 本发明提供了用于治疗或预防囊性纤维化 (CF) 患者的生态失调和胃肠功能障碍的方法。遗传性疾病囊性纤维化 (CF) 与调节上皮细胞离子和水的渗透性的 CF 跨膜传导调节因子 (CFTR) 的突变相关。在一些实施方案中, 本方法用于治疗对于 CFTR 基因中的一个或多个突变是纯合的受试者。在一些实施方案中, 受试者对于 CFTR 基因中的一个或多个突变是杂合的。在一些实施方案中, 所述一个或多个 CFTR 突变是无义突变。在一些实施方案中, 所述一个或多个 CFTR 突变是门控突变。在一些实施方案中, 所述一个或多个 CFTR 突变是蛋白加工突变。在一些实施方案中, 所述一个或多个 CFTR 突变是传导 (conductance) 突变。在一些实施方案中, 所述一个或多个 CFTR 突变是翻译突变。CFTR 突变的实例包括但不限于 F508del、G542X、G85E、R334W、Y122X、G551D、R117H、A455E、S549R、R553X、V520F、R1162X、R347H、N1203K、S549N、R347P、R560T、G1244E、G1349D、G178R、G551S、S1251N、S1255P、S549R、S1255X、Add9T、Y1092X、M1191K、W 1282X、3659delC、394delTT、3905insT、1078delT、delta 1507、3876delA、2184delA、2307insA、711+1G>T、1717-1G>A、2789+5G>A、1898+5G>T、3120+1G>A、621+1G>T、3849+10kbC>T、1898+1G>A、2183AA>G 和/或 5/7/9T。在各个实施方案中, 本发明的方法用于治疗具有本文公开的一种或多种 CFTR 突变的 CF 患者。在一个实施方案中, 患者具有以下的一个或多个 CFTR 突变: G551D、G1244E、G1349D、G178R、G551S、S1251N、S1255P、S549N、S549R 和/或 R117H。在一个实施方案中, 患者具有 F508del 突变。用于筛选患者基因型的 CFTR 突变的方法是已知的并且可以通过例如 DNA 测序诸如双向测序来进行。

[0294] CF 患者常常表现出包括慢性呼吸道感染和胃肠 (GI) 粘膜表面功能障碍在内的症状, 导致大幅发病率和死亡率。CF 最早的表现之一是胃肠功能障碍, 包括严重和复发性肠梗阻以及营养吸收不良, 这会导致生长不足。CF 患者还表现出胃肠生态失调, 诸如粪便微生物区系中的大肠杆菌 (*E. coli*) 过于丰富, 以及双歧杆菌属的种的相对丰度降低。在各个实施方案中, 本发明的方法有效治疗 CF 患者的一种或多种胃肠相关症状。

[0295] 用于测量胃肠道功能变化和/或改善的方法可以包括但不限于: 用于直接检查上皮和粘膜的内窥镜检查; 用于直接评价结构变化和/或免疫生物标志物的组织学评价和/或组织取得; 用于评估不可吸收糖的渗透性和 LPS 水平的尿液测试; 用于评估炎症和/或微生物区系变化的粪便测试 (例如通过 PCR); 和/或用于评估特定标志物的血液测试, 包括 CD4⁺ 细胞计数、Th17 细胞计数和/或 LPS 水平。

[0296] 在一些实施方案中, 本发明提供了治疗与甲状腺功能减退相关的胃肠病症的方

法。甲状腺功能减退是甲状腺未产生足够的甲状腺激素(甲状腺素或T4)的疾患。常常,甲状腺功能减退会减缓消化道的活动,导致便秘,或者消化道可完全停止运动。本发明的方法可以减轻与甲状腺功能减退相关的一种或多种胃肠症状。

[0297] 在一些实施方案中,本发明提供了用于预防或治疗坏死性小肠结肠炎(NEC)的方法。

[0298] 在各个实施方案中,本发明的方法涉及预防或治疗NEC的儿科受试者。在各个实施方案中,儿科受试者可以是约1天至约1周大、约1周至约1个月大、约1个月至约12个月大、约12个月至约18个月大、约18至约36个月大、约1至约5岁、约5至约10岁、约10至约15岁或约15至约18岁。在一些实施方案中,儿科受试者是约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月或约12个月年龄的婴儿。在各个实施方案中,儿科受试者以配方奶和/或奶为食。在各个实施方案中,儿科受试者正在接受抗生素治疗或最近接受过抗生素治疗。

[0299] 在各个实施方案中,儿科受试者是早产儿。在一些实施方案中,早产儿在小于37周胎龄时出生。在一些实施方案中,早产儿在约21周、约22周、约23周、约24周、约25周、约26周、约27周、约28周、约29周、约30周、约31周、约32周、约33周、约34周、约35周、约36周或约37周胎龄时出生。在其它实施方案中,儿科受试者是足月儿,例如晚于约37周胎龄出生的婴儿。在一些实施方案中,儿科受试者可表现出产前窒息、休克、脓毒症或先天性心脏病中的一种或多种。在各个实施方案中,儿科受试者出生体重低。在各个实施方案中,儿科受试者的体重小于约5磅、约4磅、约3磅或约2磅。

[0300] 在各个实施方案中,本发明的方法涉及预防或治疗NEC的孕妇。在一些实施方案中,孕妇正在接受抗生素治疗或最近接受过抗生素治疗。

[0301] NEC的存在和严重程度使用如下Bell等人,J.Ped.Surg.,15:569(1980)的分期系统进行分级:在各个实施方案中,本方法治疗处于任何这些分期的疾病。

- | | |
|---------------------------------------|--|
| I 期
(疑似 NEC) | <ul style="list-style-type: none"> • 全身表现 - 体温不稳定、昏睡、呼吸暂停、心动过缓 • 胃肠表现—喂养不良、灌胃前残留物增加、呕吐(可能是胆汁或潜血测试阳性)、轻度腹胀、粪便潜血(无裂隙) • 非特定或正常的放射学体征 |
| II 期

[0302] (明确的 NEC)
(NEC) | <ul style="list-style-type: none"> • 上述体征和症状加上持续的隐匿性或严重胃肠出血,明显腹胀 • 腹部放射照片显示明显的肠膨胀伴肠梗阻、小肠分离(肠壁或腹膜液水肿)、不变或持续的“刚性”肠袢、肠积气、门静脉积气 • 实验室变化(血小板减少、代谢性酸中毒) |
| III 期
(晚期 NEC) | <ul style="list-style-type: none"> • 上述体征和症状加上生命体征恶化、败血性休克的证据或明显的胃肠出血、低血压、明显腹胀、腹膜炎 • 除了 II 期所列发现外,腹部放射照片还显示气腹 • 另外的实验室变化(代谢性和呼吸性酸中毒、弥散性血管内凝血) |

[0303] 在各个实施方案中,本发明的方法有效治疗NEC的一种或多种症状,包括上述任何症状以及本领域已知的那些症状,包括胃肠症状、腹部症状和非胃肠症状。在各个实施方案中,本发明的方法有效预防受试者诸如儿科受试者中NEC的发展。在各个实施方案中,本发明的方法有效预防受试者诸如儿科受试者中NEC的进展,例如从I期进展到II期或从II期进展到III期。在各个实施方案中,本发明的方法有效地引起受试者诸如儿科受试者中NEC的消退,例如从III期消退到II期或I期至完全治愈,或从II期消退到I期或至完全治愈。

[0304] 肠道生态失调与NEC的发展相关,并且可以在该疾病的任何临床证据之前在受试者中检测到。在各个实施方案中,本发明的方法有效地恢复所治疗的受试者的肠道中的正常微生物区系。在一些实施方案中,本发明的方法维持肠道中的正常微生物区系。例如,在一些实施方案中,本发明的方法维持受试者肠道微生物区系的健康平衡(例如,健康比率和/或健康分布)。在另一个实施方案中,本发明的方法治疗或预防胃肠道中一种或多种病原微生物的过度生长。在某些实施方案中,本发明的方法有效地降低肠道中丁酸梭菌和/或产气荚膜梭菌的水平。

[0305] 用于测量一种或多种NEC症状的改善的方法包括诊断成像方式,诸如X射线和超声检查。用于测量胃肠道功能的变化和/或改善的方法可以包括但不限于:用于直接检查上皮和粘膜的内窥镜检查或结肠镜检查;用于直接评价结构变化和/或免疫生物标志物的组织学评价和/或组织取得;用于评估炎症和/或微生物区系变化的粪便测试(例如通过PCR);和/或用于评估特定标志物和细胞的血液测试。

[0306] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗或预防代谢综合征、糖尿病、高血压、心血管疾病、非酒精性脂肪肝和其它代谢疾病的方法。在各个实施方案中,代谢综合征与甘油三酯升高、低密度脂蛋白升高、高密度脂蛋白降低、脂蛋白指数降低、空腹血糖水平升高、空腹胰岛素升高、进食后葡萄糖清除率降低、胰岛素抗性、葡萄糖耐量受损、肥胖及其组合相关。例如,本方法可用于治疗患有代谢综合征并患有腹部肥胖(例如,男性腰围为40英寸或以上或女性腰围为35英寸或以上)、血液甘油三酯水平为150mg/dL或更高、男性HDL低于40mg/dL或女性低于50mg/dL、收缩压为130mm Hg或更高或舒张压为85mm Hg或更高和/或空腹血糖为100mg/dL或更高的受试者。可以使用本发明的方法治疗的其它代谢疾病包括在US2013/0251701、US2011/0206654和US2004/0115185中描述的那些,其全部内容特此通过引用并入。

[0307] 在一个实施方案中,代谢疾病是肥胖。早期接触抗生素(例如在生命的前2年内)会破坏微生物组并最终导致疾病。Bailey等人JAMA Pediatr.168(11),2014年11月(其全部内容特此通过引用并入),描述了早期接触抗生素与肥胖的联系。因此,在一些实施方案中,本方法保护儿童的微生物组并预防疾病诸如肥胖。另外,在肥胖个体中常常观察到细菌划分厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)之间比率的变化。因此,在一些实施方案中,本发明提供了通过施用本发明的AP剂来治疗或预防肥胖的方法。本发明的方法保持肠道中正常的细菌多样性,诸如拟杆菌门、变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门,从而治疗或预防肥胖。此外,基于AP的剂可能会影响胃肠道的脂肪吸收。因此,在各个实施方案中,本发明提供了通过限制胃肠脂肪吸收来治疗或预防肥胖的方法。在各个实施方案中,本发明的方法对于诱导体重减轻或防止体重增加是有效的。在一些实施方案中,受试者可能已经进行或将进行消化系统手术;超重大于约80-100磅;BMI大于约35kg/m²;或具有与肥胖有

关的健康问题。在一些实施方案中,受试者可能患有血脂异常,包括高脂血症和高脂蛋白血症。

[0308] 在另一个实施方案中,代谢疾病是糖尿病。在各个实施方案中,本发明涉及糖尿病(1型或2型)和/或葡萄糖耐受不良的治疗。在各个实施方案中,本发明涉及糖尿病(1型或2型)和/或葡萄糖耐受不良的预防。在各个实施方案中,本发明涉及糖尿病(1型或2型)和/或葡萄糖耐受不良的并发症的减少。在一些实施方案中,本发明涉及用于治疗处于糖尿病、胰岛素抵抗、前驱糖尿病、空腹血糖受损(IFG)和葡萄糖耐量受损(IGT)中的一种或多种的风险中的受试者的方法。

[0309] 在各个实施方案中,本发明涉及用基于AP的剂治疗1型糖尿病。1型糖尿病,曾经称为青少年糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病,是胰腺产生很少胰岛素或不产生胰岛素的一种慢性疾患。治疗常常经由强化胰岛素方案进行,该方案试图模拟身体的正常胰岛素分泌模式,并且常常牵涉基础和推注胰岛素覆盖。例如,一种常见的方案是每天一次或两次施用长效胰岛素(包括例如甘精胰岛素/地特胰岛素)并且在餐前或餐后和根据需要施用速效胰岛素(包括例如门冬胰岛素、赖谷胰岛素、赖脯胰岛素)以矫正高血糖(例如通过血糖仪监测)。餐前或餐后或根据需要施用以矫正高血糖的剂量可称为推注施用。另一种常见方案牵涉给药,包括经由胰岛素泵(或连续皮下胰岛素输注装置(CSII))对例如速效胰岛素(如本文所述并且包括例如门冬氨酸、赖谷氨酸、赖脯)的连续给药。在各个实施方案中,基于AP的剂可以替代在各种方案中使用的任何胰岛素,包括胰岛素不能在患者中提供有效治疗的情况,基于AP的剂可引起患者依从性增加,因为相对于各种形式的胰岛素,它可以允许更容易的自我给药,所述各种形式的胰岛素必须在一天中以不同剂量施用-即使在需要编程的胰岛素泵的情况下也是如此。进一步地,基于AP的剂可以抵消糖尿病患者给药的常见挫折,例如黎明现象。可替代地,可以使用基于AP的剂作为本文所述的任何1型糖尿病治疗的佐剂,以例如使患者的方案标准化并避免折磨许多患者的血糖“下降”(例如低血糖,例如血糖低于约70mg/dL)和“上升”(例如高血糖,例如血糖高于约200mg/dL)。因此,在一些实施方案中,基于AP的剂可以治疗或预防与低血糖相关的症状,包括例如颤抖、焦虑、紧张、心悸、心动过速、脸色苍白、寒冷、湿冷、瞳孔扩大(瞳孔散大)、饥饿、腹鸣、恶心、呕吐、腹部不适、头痛、精神异常、判断力受损、非特异性的烦躁不安、感觉异常、违拗症、易怒、好战、好斗、愤怒、性格改变、情绪不稳、疲劳、虚弱、冷漠、昏睡、做白日梦、睡眠、混乱、健忘症、头晕目眩或眩晕、谵妄、凝视、“玻璃样”外观、视力模糊、复视、视野中闪光、自动症、说话困难、言语不清、共济失调、不协调、局灶性或一般运动缺陷、瘫痪、偏瘫、感觉异常、头痛、木僵、昏迷、呼吸异常、全身性或局灶性癫痫发作、记忆力丧失、CNS损伤(例如认知损害)、健忘症和死亡。因此,在一些实施方案中,基于AP的剂可治疗或预防与高血糖相关的症状,包括例如贪食、烦渴、多尿、视力模糊、疲劳、体重减轻、伤口愈合不良、口干、皮肤干燥或发痒、脚或脚跟刺痛、勃起功能障碍、反复感染、外耳感染(例如游泳耳)、心律失常、木僵、昏迷和癫痫发作。在各个方案中,1型糖尿病患者可接受附加的剂来补充胰岛素疗法。在一些实施方案中,以这种方式使用基于AP的剂。基于AP的剂可为单独用胰岛素疗法难以管理1型糖尿病的患者提供附加治疗益处。在一些实施方案中,如本文所述,单独用胰岛素疗法难以管理1型糖尿病的患者具有如本文所述的血糖控制不良。

[0310] 在一些实施方案中,基于AP的剂可用于将患者的血糖水平降低至低于约10mM,例

如在约4mM至约7mM的范围内。

[0311] 在一些方面,本发明提供了一种用于治疗1型或2型糖尿病的方法,其包括施用有效量的基于AP的剂。

[0312] 在许多实施方案,包括基于AP的剂预防糖尿病和/或治疗前驱糖尿病疾患的那些实施方案中,如果患者的特征在于以下的一种或多种,则患者处于糖尿病的风险中:身体不活动;父母或同胞患有糖尿病;具有与糖尿病高发生率相关的家庭背景,选自非裔美国人、阿拉斯加原住民、美洲印第安人、亚裔美国人、西班牙人/拉丁美洲人或美国太平洋岛民;生下体重超过9磅的婴儿;被诊断出患有妊娠糖尿病;有约140/90mmHg或以上的高血压;正在接受高血压治疗;具有低于约35mg/dL的HDL胆固醇水平和/或高于约250mg/dL的甘油三酯水平;患有多囊卵巢综合征(PCOS);并且患有心血管疾病。

[0313] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于在住院的情况下治疗糖尿病。例如,在一些实施方案中,可以向处于糖尿病昏迷状态的患者施用基于AP的剂。在一些实施方案中,可以施用的患者是患有以下的一种或多种的患者:严重糖尿病低血糖症、晚期糖尿病酮症酸中毒(例如,晚期到足以导致无意识,促成因素可以包括高血糖症、脱水、休克和疲惫中的一种或多种)、高渗性非酮症昏迷(例如,高血糖症和脱水中的一种或多种是促成因素)。在这些实施方案中,基于AP的剂可以连同糖尿病昏迷的标准治疗方案一起使用,包括施用葡萄糖、胰高血糖素、胰岛素、流体(例如含钾和/或其它电解质的盐水)中的一种或多种,其中任何一种任选地静脉内施用。在一些实施方案中,基于AP的剂可以替代这些治疗方案中的胰岛素,并且任选地口服施用。

[0314] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗妊娠糖尿病风险增加的孕妇。一些孕妇在妊娠24周左右开始发展妊娠糖尿病,并且如果不治疗,妊娠糖尿病可导致早产和死产。在一些实施方案中,本发明提供了预防和/或治疗孕妇妊娠糖尿病的方法。在各个实施方案中,本发明的方法还可用于治疗处于炎症诸如胃肠炎症风险增加的孕妇。在一些实施方案中,本方法减少孕妇的炎症。

[0315] 进一步地,在与糖尿病有关的各个实施方案中,患者可能正在接受或可能与一种或多种附加的剂共同施用。说明性的附加的剂包括胰岛素或任何抗糖尿病剂(例如双胍、胰岛素促分泌素(诸如磺酰脲类或美格列奈(meglitinide))、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类等)。在各个实施方案中,本文所述的治疗方法可以包括向正在接受一种或多种附加的剂和/或非胰岛素糖尿病剂的患者施用基于AP的剂。附加的剂包括以下的一种或多种:磺酰脲(例如DYMELOR(醋磺己脲)、DIABINESE(氯磺丙脲)、ORINASE(甲磺丁脲)和TOLINASE(妥拉磺脲)、GLUCOTROL(格列吡嗪)、GLUCOTROL XL(缓释)、DIABETA(格列本脲)、MICRONASE(格列本脲)、GLYNASE PRESTAB(格列本脲)和AMARYL(格列美脲));双胍(例如二甲双胍(GLUCOPHAGE、GLUCOPHAGE XR、RIOMET、FORTAMET和GLUMETZA));噻唑烷二酮(例如ACTOS(吡格列酮)和AVANDIA(罗格列酮)); α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如,PRECOSE(阿卡波糖)和GLYSET(米格列醇));美格列奈(例如,PRANDIN(瑞格列奈)和STARLIX(那格列奈));二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制剂(例如,JANUVIA(西格列汀)、NESINA(阿格列汀)、ONGLYZA(沙格列汀)和TRADJENTA(利拉利汀));钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂(例如INVOKANA(卡格列净));以及组合丸剂(例如,组合了格列本脲(一种磺酰脲)和二甲双胍的GLUCOVANCE,组合了格列吡嗪(一种磺酰脲)和二甲双胍的METAGLIP,以及在一个丸剂中使用了二甲双胍和罗

格列酮 (AVANDIA) 两者的AVANDAMET, KAZANO (阿格列汀和二甲双胍) 和OSENi (阿格列汀加吡格列酮)。

[0316] 其它附加的剂包括口服二甲双胍、口服ACTOS、BYETTA皮下注射液、口服JANUVIA、口服WELCHOL、口服JANUMET、口服格列吡嗪、口服格列美脲、口服GLUCOPHAGE、LANTUS皮下注射液、口服格列本脲、口服ONGLYZA、口服AMARYL、LANTUS SOLOSTAR皮下注射液、BYDUREON皮下注射液、LEVEMIR FLEXPEN皮下注射液、口服ACTOPLUS MET、口服GLUMETZA、口服TRADJENTA、口服溴隐亭、口服KOMBIGLYZE XR、口服INVOKANA、口服PRANDIN、LEVEMIR皮下注射液、口服PARLODEL、口服吡格列酮、NOVOLOG皮下注射液、NOVOLOG FLEXPEN皮下注射液、VICTOZA 2-PAK皮下注射液、HUMALOG皮下注射液、口服STARLIX、口服FORTAMET、口服GLUCOVANCE、口服GLUCOPHAGE XR、NOVOLOG混合70-30FLEXPEN皮下注射液、口服格列本脲-二甲双胍、口服阿卡波糖、SYMLINPEN 60皮下注射液、口服GLUCOTR01 XL、NOVOLIN R注射液、口服GLUCOTROL、口服DUETACT、口服西他列汀、SYMLINPEN 120皮下注射液、HUMALOG KWIKPEN皮下注射液、口服JANUMET XR、口服GLIPIZIDE-METFORMIN、口服CYCLOSET、HUMALOG MIX 75-25皮下注射液、口服那格列奈、HUMALOG混合75-25KWIKPEN皮下注射液、HUMULIN 70/30皮下注射液、口服PRECOSE、APIDRA皮下注射液、Humulin R注射液、口服Jentadueto、Victoza3-Pak皮下注射液、Novolin 70/30皮下注射液、NOVOLIN N皮下注射液、地特胰岛素皮下注射液、口服微粉化格列本脲、口服GLYNASE、HUMULIN N皮下注射液、甘精胰岛素皮下注射液、口服RIOMET、口服吡格列酮-二甲双胍、APIDRA SOLOSTAR皮下注射液、赖脯胰岛素皮下注射液、口服GLYSET、HUMULIN 70/30Pen皮下注射液、口服考来维纶 (colesevelam)、口服西他列汀-二甲双胍、口服DIABETA、胰岛素常规人类注射液、HUMULIN N Pen皮下注射液、艾塞那肽 (exenatide) 皮下注射液、HUMALOG混合50-50KWIKPEN皮下注射液、利拉鲁肽 (liraglutide) 皮下注射液、口服KAZANO、口服瑞格列奈、口服氯磺丙脲、门冬胰岛素皮下注射液、NOVOLOG混合70-30皮下注射液、HUMALOG混合50-50皮下注射液、口服沙格列汀、口服ACTOPLUS Met XR、口服米格列醇、人重组NPH胰岛素皮下注射液、胰岛素NPH和常规人类皮下注射液、口服妥拉磺脲、口服米非司酮、门冬胰岛素鱼精蛋白-门冬胰岛素皮下注射液、口服瑞格列奈-二甲双胍、口服沙格列汀-二甲双胍、口服利拉利汀-二甲双胍、口服NESINA、口服OSENi、口服甲磺丁脲、赖脯胰岛素鱼精蛋白和赖脯胰岛素注射液、普兰林肽皮下注射液、赖谷胰岛素皮下注射液、口服吡格列酮-格列美脲、口服PRANDIMET、NOVOLOG PenFill皮下注射液、口服利拉利汀、艾塞那肽微球皮下注射液、口服KORLYM、口服阿格列汀、口服阿格列汀-吡格列酮、口服阿格列汀-二甲双胍和口服卡格列净。

[0317] 其它附加的剂包括赖脯胰岛素 (HUMALOG) ; 门冬胰岛素 (NOVOLOG) ; 赖谷胰岛素 (APIDRA) ; 常规 (NOVOLIN R或HUMULIN R) ; NPH (NOVOLIN N或HUMULIN N) ; 甘精胰岛素 (LANTUS) ; 地特胰岛素 (LEVEMIR) ; HUMULIN或NOVOLIN 70/30; 和NOVOLOG混合70/30HUMALOG混合75/25或50/50。

[0318] 在各个实施方案中, 本发明用于治疗或预防各种神经退行性疾病。在一些实施方案中, 神经退行性疾病选自多发性硬化症 (MS; 包括但不限于良性多发性硬化、复发缓解型多发性硬化 (RRMS)、继发性进行性多发性硬化 (SPMS)、进行性复发性多发性硬化 (PRMS) 和原发性进行性多发性硬化 (PPMS))、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) (包括但不限于早发性阿尔茨海默病、迟发性阿尔茨海默病和家族性阿尔茨海默病 (FAD)、帕金森氏病

(Parkinson's) 和帕金森症 (包括但不限于特发性帕金森氏病、血管性帕金森症、药物诱导的帕金森症、路易体痴呆、遗传性帕金森氏病、青少年型帕金森氏病)、亨廷顿病 (Huntington's disease) 和肌萎缩侧索硬化 (ALS, 包括但不限于散发性ALS、家族性ALS、西太平洋ALS、青少年ALS、平山病 (Hirabayashi Disease))。

[0319] 在各个实施方案中, 本发明用于治疗脊髓损伤和/或与脊髓损伤相关的生态失调。已经证实脊髓损伤会增加肠道渗透性和肠道细菌易位。这些变化与肠道相关淋巴组织 (GALT) 中的免疫细胞活化和肠道微生物组的变化相关。与脊髓损伤相关的肠道生态失调已经牵连于损害运动恢复和加剧神经病变病理和脊柱内炎症。在一些实施方案中, 本发明预防和/或治疗与脊髓损伤相关的细菌易位和肠道生态失调。在一些实施方案中, 本发明的方法赋予神经保护和/或改善脊髓损伤后的运动恢复。在一些实施方案中, 本发明的方法在 GALT 中诱导抗炎免疫表型。在一些实施方案中, 本发明的方法减少与脊髓损伤相关的神经系统病变和脊柱内炎症。

[0320] 在各个实施方案中, 基于 AP 的剂可用于治疗创伤性脑损伤 (TBI) 及其症状。在各个实施方案中, 基于 AP 的剂可用于治疗与例如由作用于颅骨或脊柱的物理力引起的脑或脊髓创伤相关的各种疾患、缺血、中风、呼吸停止、心搏停止、脑血栓形成或栓塞、AIDS 引起的神经系统问题、脑出血、脑脊髓炎、脑积水、术后事件、脑感染和脑震荡或颅内压升高。

[0321] 在各个实施方案中, 基于 AP 的剂可用于治疗由外力引起的脑功能改变或脑病理学的其它迹象 (evidence)。

[0322] 在各个实施方案中, 基于 AP 的剂可用于治疗通过各种方法分类的 TBI。例如, 可以使用临床严重程度 (例如格拉斯哥昏迷量表 (GSC), 参见 Teasdale 和 Jennett (1974) Lancet, 2, 81-84, 研究复苏后患者的运动、声音和睁眼反应的 15 分量表)。在各个实施方案中, 基于 AP 的剂可用于治疗由 GSC 定义的轻度、中度或重度头部损伤。此外, TBI 可以使用基于病理学的 TBI 分类, 例如基于从解剖学和生理学角度对需要治疗的异常的评估来分类。用于描述 TBI 的最常见的病理-生理模型是评价损伤是原发性损伤还是继发性损伤。人们普遍认为, 原发性损伤是由于初始的直接损伤引起的并且不可避免的损伤。继发性损伤是指可以避免的后续损伤, 诸如缺氧、高血压或高碳酸血症。进一步地可以评估 TBI, 例如计算机断层扫描 (CT) 或磁共振成像 (MRI), 以及脑电图 (EEG) 和颅内压 (ICP)。

[0323] 在各个实施方案中, 基于 AP 的剂可用于治疗或预防中风。例如, 治疗的中风可以是缺血性或出血性的。在各个实施方案中, 出血性中风是脑血管原因的神经系统缺陷, 其持续超过 24 小时或在 24 小时内因死亡而中断。由于实质内出血或脑室内出血, 出血性中风可以是脑出血 (脑内出血)。出血性中风可以是蛛网膜下出血。在各个实施方案中, 中风是缺血性的, 例如根据牛津社区中风项目分类 (OCSP, 即分类为完全前循环梗死 (TACI)、部分前循环梗死 (PACI)、腔隙性梗死 (LACI) 或后循环梗死 (POCI) 或 TOAST (急性中风治疗组织 10172 试验) 分类 (即将中风分类由于以下原因引起: (1) 由于大动脉的动脉粥样硬化引起的血栓形成或栓塞, (2) 起源于心脏的栓塞, (3) 小血管完全阻塞, (4) 其它确定的原因, (5) 未确定的原因 (两个可能的原因, 无确定原因, 或调查不完全))。

[0324] 在各个实施方案中, 本发明提供了治疗或预防脓毒症的方法。脓毒症的特征在于由感染引起的全身炎症状态。脓毒症包括血液或组织中存在各种成脓的和其它病原生物或其毒素。在一些实施方案中, 本发明提供了治疗或预防败血症 (血液中毒)、菌血症、病毒血

症和/或真菌血症的方法。在各个实施方案中,本发明治疗与脓毒症相关的各种终末器官病理,诸如低血压、急性肾小管坏死(ATN)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0325] 在各个实施方案中,本发明提供了治疗或预防肾衰竭诸如急性肾衰竭(ARF)的方法。急性肾衰竭牵涉急性肾功能丧失,导致血清肌酐水平升高。在急性肾衰竭中,肾小球滤过率在数天至数周内下降。因此,含氮废弃物的排泄减少,并且无法维持流体和电解质平衡。急性肾衰竭患者常常无症状,并且该疾患可通过观察到的血尿素氮(BUN)和血清肌酐水平升高来诊断。当血清肌酐水平升高至少0.5mg/dL/天且尿排出量低于400mL/天(少尿)时,存在完全的肾闭症(renal shutdown)。本文所述的基于AP的剂不仅可用于治疗肾衰竭,而且可用于改善肾功能至少部分受损或降低的肾脏情况。

[0326] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防充血性心力衰竭。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防充血性心力衰竭的一种或多种症状,诸如呼吸短促、感觉疲劳和腿部肿胀。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防由冠状动脉疾病引起的充血性心力衰竭,所述冠状动脉疾病包括陈旧性心肌梗塞(心脏病发作)、高血压、心房纤颤、心脏瓣膜病、过量饮酒、感染和不明原因的心肌病。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防I类充血性心力衰竭。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防II类充血性心力衰竭。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防III类充血性心力衰竭。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防IV类充血性心力衰竭。

[0327] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防慢性疲劳综合征,包括肌痛性脑脊髓炎(ME)和最近的全身劳力不耐症(SEID)。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防慢性疲劳综合征的一种或多种症状,包括疲劳、记忆力或专注力丧失、喉咙痛、颈部或腋窝淋巴结肿大、不明原因的肌肉疼痛、关节疼痛、头痛、睡眠不足以及在身体或精神锻炼后持续超过24小时的极度疲惫。

[0328] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防胰腺炎。在各个实施方案中,胰腺炎是轻度急性胰腺炎。在各个实施方案中,胰腺炎是严重的胰腺炎,例如与器官衰竭、坏死、感染性坏死、假性囊肿和脓肿相关。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防胰腺炎的一种或多种症状,诸如可辐射至背部的上腹部痛或不明确的腹痛、血清淀粉酶或脂肪酶水平>正常上限的约3倍,以及有特征性变化的成像研究(例如CT、MRI、腹部超声或内窥镜超声)。

[0329] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防具有一种或多种风险因素的受试者的胰腺炎,所述风险因素诸如:胆结石、酒精消耗、创伤、类固醇消耗、腮腺炎感染、自身免疫性疾病、蝎螫伤、高脂血、体温过低、甲状旁腺功能亢进、内窥镜逆行胰胆管造影和使用某些药物(例如硫唑嘌呤(azathioprine)、丙戊酸)。

[0330] 使用几种评分系统预测胰腺炎发作的严重程度。实例包括APACHE II、Ranson、BISAP和Glasgow。在各个实施方案中,胰腺炎根据格拉斯哥修改标准由以下的至少三项定义:pO₂<60mmHg或7.9kPa;年龄>55岁;嗜中性白细胞>15;钙<2mmol/L;肾尿素>16mmol/L;乳酸脱氢酶(LDH)>600iu/L;天冬氨酸转氨酶(AST)>200iu/L;白蛋白<32g/L;和葡萄糖>10mmol/L。

[0331] 在一些实施方案中,基于AP的剂用于降低与向allo-HCT受者施用IVβ-内酰胺抗生素相关的并发症(包括但不限于aGVHD和/或VRE定植和/或感染)的发生率和/或严重程度。

[0332] 在特定实施方案中,本发明提供了用于预防VRE定植和/或感染的组合物和方法。在一些实施方案中,本发明的方法预防与VRE定植和/或感染相关的肠道生态失调。

[0333] 在一些方面,提供了在移植受者中预防VRE定植和/或感染的方法,其包括施用本发明的 β -内酰胺酶剂。

[0334] 在特定实施方案中,本发明提供了用于降低aGVHD的发生率和/或严重程度的组合物和方法。在各个实施方案中,处于发展aGVHD风险中的受试者是移植受者。在进一步的实施方案中,受试者是allo-HCT的受者。在一些实施方案中,受试者是骨髓细胞、外周血细胞和脐带细胞中的一种或多种的受者。在各个实施方案中,处于发展aGVHD风险中的受试者正在施用或已经施用了IV β -内酰胺抗生素。

[0335] 在一些实施方案中,本发明的方法预防与aGVHD相关的肠道生态失调。在各个实施方案中,本发明的方法预防与aGVHD相关的肠道微生物区系多样性的丧失和/或肠道生态失调。例如,本发明的方法考虑施用用于调节和/或减少与aGVHD相关的任何给定细菌菌株(例如肠球菌(*Enterococcus*))的单显性化的组合物。本发明的另外实施方案提供了用于预防已经接受移植的受试者中微生物组多样性降低的组合物和方法。

[0336] 在一些方面,提供了一种降低移植受者中aGVHD的发生率和/或严重程度的方法,所述方法包括施用本发明的 β -内酰胺酶剂。例如,降低aGVHD的严重程度可以包括接受低于IV级(被归类为最严重的aGVHD形式)的等级的患者。

[0337] 在实施方案中,本方法涉及降低移植受者中aGVHD的发生率和/或严重程度。在实施方案中,移植受者是癌症患者,例如已经接受或正在接受放射或化学疗法并且随后已经接受allo-HCT的患者。在实施方案中,移植受者患有血癌或骨髓癌。在实施方案中,移植受者是造血干细胞移植的受者。在某些实施方案中,癌症选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和脊髓发育不良。在某些实施方案中,癌症选自骨肉瘤、尤文氏肿瘤(Ewing tumor)、脊索瘤和软骨肉瘤。

[0338] aGVHD是由于受者的免疫系统识别细胞或组织是外来的,从供者移植到受者的细胞或组织的退化。因此,由于I类MHC处于身体的更多细胞上,因此最理想的是从具有最高匹配I类MHC特性,然后是最高匹配的II类MHC特性的人移植细胞和组织。因此,在大多数移植受者中,aGVHD是由于免疫系统对错配的II类MHC分子和其它多形态蛋白(次要组织相容性抗原)的活化引起的。

[0339] 治疗血癌和骨髓癌的一种选择是杀伤现有的血液和骨髓细胞,例如通过放射疗法或化疗,并从健康供者中移植类似细胞,称为同种异体造血干细胞移植(allo-HCT)。

[0340] 在实施方案中,本方法涉及急性和慢性形式的GVHD。该疾病的典型急性或暴发性形式(aGVHD)通常在移植后的前100天内观察到,并且由于相关的发病率和死亡率是对移植有效性的重大挑战。移植物抗宿主病(cGVHD)的慢性形式传统上发生在100天后。中度至重度cGVHD病例的出现对长期生存产生不利影响。骨髓移植后,移植物中存在的T细胞,无论是作为污染物还是有意引入宿主中,在将宿主组织视为外来抗原后攻击移植受者的组织。T细胞产生过量的细胞因子,包括TNF α 和干扰素- γ (IFN γ)。cGVHD中的组织损伤主要是由于纤维化。多种宿主抗原可引发移植物抗宿主病,其中包括人白细胞抗原(HLA)。然而,即使HLA相同的同胞是供者,也可能发生GVHD。aGVHD的特征在于对肝脏、皮肤和粘膜以及胃肠道的选择性损伤。aGVHD中的组织损伤主要是由于细胞凋亡。aGVHD严重程度基于病变/皮疹(皮

肤)的范围和类型、腹泻量(胃肠)和血清胆红素水平(肝脏)按I(轻度)至IV(非常严重)的量表分级。cGVHD的特征在于比aGVHD更广泛的组织分布。皮肤和肺被认为是cGVHD的主要靶器官,还有胃肠道、肝脏、眼睛、肌肉骨骼系统和造血系统。在同种异体HCT的前2周内可发生超急性和快速致命形式的aGVHD,通常是由于HLA显著错配或GVHD预防不足。与cGVHD相关的风险因素在针对先前的aGVHD进行调节后通常不会变化,表明cGVHD不仅仅是先前aGVHD的演变。

[0341] 在实施方案中,本发明的方法涉及降低aGVHD的发生率和/或严重性。在实施方案中,本方法预期将 β -内酰胺酶施用于用IV β -内酰胺抗生素治疗并且具有一种或多种aGVHD风险因素的患者,所述风险因素诸如HLA“错配”或无关供者、患者年龄较大、女性供者对男性受者、调理方案的强度或调理方案期间的全身辐照以及供者淋巴细胞输注。在实施方案中,本方法降低aGVHD症状诸如皮疹、胃肠(GI)道病症和肝脏症状的发生率和/或严重程度。

[0342] 在实施方案中,本方法涉及如比林汉姆标准中的一项或多项所定义的GVHD:1)施用具有存活和功能免疫细胞的免疫活性移植;2)受者是免疫组织不相容的;和3)受者免疫功能低下并且因此不能破坏或灭活移植的细胞。

[0343] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防过敏。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防特应性过敏或IgE介导的过敏。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防枯草热、毛皮过敏、尘螨过敏、昆虫毒液过敏、外源性哮喘和许多类型的食物过敏中的一种或多种。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防过敏反应、药物过敏、皮肤过敏、湿疹、过敏性鼻炎、荨麻疹、特应性皮炎、干眼病、过敏性接触过敏、食物过敏、过敏性结膜炎、昆虫毒液过敏、支气管哮喘、过敏性哮喘、内源性哮喘、职业性哮喘、特应性哮喘、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和慢性阻塞性肺病(COPD)中的一种或多种。

[0344] 在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防哮喘,包括但不限于过敏性哮喘。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于减少免疫球蛋白E刺激、气道高反应性、肥大细胞浸润、嗜酸性粒细胞增多和肺中交替活化的巨噬细胞的积聚。在各个实施方案中,基于AP的剂可用于治疗或预防复发性哮喘和间歇性气流受限中的一种或多种。

[0345] 在一些实施方案中,术语“患者”和“受试者”可互换使用。在一些实施方案中,受试者和/或动物是哺乳动物,例如,人、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪、兔、绵羊,或非人灵长类动物,诸如猴子、黑猩猩或狒狒。在其它实施方案中,受试者和/或动物是非哺乳动物,诸如斑马鱼。

[0346] 在各个实施方案中,本发明的方法可用于治疗人类受试者。在一些实施方案中,所述人是儿科人。在其它实施方案中,所述人是成人。在其它实施方案中,所述人是老年人。在其它实施方案中,人可称为患者。在一些实施方案中,所述人为女性。在一些实施方案中,所述人为男性。

[0347] 在某些实施方案中,人的年龄在约1至约18个月、约18至约36个月、约1至约5岁、约5至约10岁、约10至约15岁、约15至约20岁、约20至约25岁、约25至约30岁、约30至约35岁、约35至约40岁、约40至约45岁、约45至约50岁、约50至约55岁、约55至约60岁、约60至约65岁、约65至约70岁、约70至约75岁、约75至约80岁、约80至约85岁、约85至约90岁、约90至约95岁大或约95至约100岁的范围内。

[0348] 药盒

[0349] 本发明提供了可简化本文所述的改良的释放制剂的施用的药盒。所述药盒是材料或组分的集合,包括至少一种本文所述的改良的释放制剂。药盒中配置的组分的确切性质取决于其预期目的。在一个实施方案中,药盒被配置成用于治疗人受试者。

[0350] 使用说明书可包括在药盒中。使用说明书通常包括描述在使用药盒的组分来实现所需的结果(如治疗本文所述相关的病症)中待采用的技术的切实表述。任选地,药盒也含有其它有用组分,如稀释剂、缓冲剂、药学上可接受的载体、注射器、导管、施用器、移液或测量工具、绷带材料或如将易于由本领域技术人员认识到的其它有用随身用品。

[0351] 装配在药盒中的材料或组分可以维持其可操作性和实用性的任何方便且合适的方式提供给从业者商店。例如,所述组分可在室温、冷藏或冷冻温度下提供。所述组分通常包含在合适的包装材料中。在各个实施方案中,所述包装材料通过熟知的方法构建,优选地以提供无菌的、无污染的环境。所述包装材料具有外标签,其显示了药盒和/或其组件的内容物和/或目的。

[0352] 定义

[0353] 如本文所用,“一个/种(a/an)”或“所述(the)”可意指一个/种或多于一个/种。

[0354] 另外,当与参考数字指示结合使用时,术语“约”意指参考数字指示加上或减去该参考数字指示的多至10%。例如,语言“约50%”覆盖45%至55%的范围。

[0355] 当与医疗用途结合使用时,“有效量”是有效提供目标病症的可测量治疗、预防或其发病率的降低的量。

[0356] 如本文所用,如果相对于不存在此类调节,在存在剂或刺激的情况下活性和/或效果的读数降低显著量,诸如降低至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%或更多直至并包括至少约100%,则某物“减少”。如本领域普通技术人员将理解的,在一些实施方案中,活性降低并且一些下游读数将减少但其它可增加。

[0357] 相反,如果相对于不存在剂或刺激物,在这种剂或刺激物存在下,活性和/或效果的读数增加显著量,例如增加至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%或更多、直至并包括至少约100%或更多、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍,则活性“增加”。

[0358] 如本文所提及的,除非另外指定,否则所有组成百分比均按总组合物的重量计。如本文所用的,单词“包括”及其变型意图为非限制性的,以使得列表中的项目的详述不排除也可适用于此技术的组合物和方法的其它类似项目。类似地,术语“可以”和“可”以及其变型意图为非限制性的,以使得实施方案可以或可包括某些元素或特性的详述不排除不包含那些元素或特性的本技术的其它实施方案。

[0359] 尽管作为诸如包括、含有或具有等术语的同义词的开放式术语“包括”在本文中用于描述并要求保护本发明,可选地可以使用诸如“由…组成”或“基本上由…组成”等替代性术语来描述本发明或其实施方案。

[0360] 如本文所用的,单词“优选的”和“优选地”是指本技术在某些情况下提供某些益处的实施方案。然而,在相同或其它情况下,其它实施方案也可以是优选的。此外,一个或多个

优选实施方案的详述并不意味着其它实施方案不适用的,并且并不意图从本技术的范围内排除其它实施方案。

[0361] 本文描述的实现治疗效果所需要的组合物的量可出于特定目的根据常规程序凭经验确定。通常,为了治疗目的而施用治疗剂(例如,本文所述的 β -内酰胺酶和/或附加治疗剂),以药理学有效剂量给予所述治疗剂。“药理学有效量”、“药理学有效剂量”、“治疗有效量”或“有效量”是指足以产生所需生理效果的量或能够实现所需结果,尤其是治疗病症或疾病的量。如本文所用的有效量包括足以例如延迟病症或疾病的症状的发展、改变病症或疾病的症状的进程(例如,减缓疾病症状的进展)、减少或消除病症或疾病的一个或多个症状或表现并且逆转病症或疾病的症状的量。治疗益处还包括停止或减缓潜在疾病或病症的进展,不论是否实现改善。

[0362] 可通过标准药物程序在细胞培养物、组织样品、组织匀浆或实验动物中测定有效量、毒性和治疗功效,所述标准药物程序例如用于测定LD50(对约50%群体致死的剂量)和ED50(在约50%群体中治疗有效的剂量)。剂量可根据所采用的剂型和利用的施用途而改变。毒性作用与治疗作用之间的剂量比是治疗指数,并且它可被表示为比率LD50/ED50。在一些实施方案中,表现出大治疗指数的组合物和方法为优选的。可以初始由体外测定,包括例如细胞培养物测定评估治疗有效剂量。另外,可在动物模型中配制剂量,以实现循环血浆浓度范围,所述循环血浆浓度范围包括如在细胞培养物中或在适当的动物模型中测定的IC50。可例如通过高效液相色谱测量血浆中所述组合物的水平。可通过合适的生物测定来监测任何特定剂量的效果。可由医师确定剂量,并且必要时进行调整以适合所观察到的治疗作用。

[0363] 在某些实施方案中,所述效果将引起至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约50%、至少约70%或至少约90%的可量化变化。在一些实施方案中,所述效果将引起约10%、约20%、约30%、约50%、约70%或甚至约90%或更大的可量化变化。治疗益处还包括停止或减缓潜在疾病或病症的进展,不论是否实现改善。

[0364] 如本文所用,“治疗方法”同样适用于治疗本文所述的疾病或病症的组合物的用途和/或用于治疗本文所述的疾病或病症的组合物和/或在制造用于治疗本文所述的疾病或病症的药物中的用途。

[0365] 实施例

[0366] 实施例1: IAP延迟释放肠溶包衣小丸的开发

[0367] 以3.45% w/w(第一批)和4.65% w/w(第二批)的酶载量制备两批IAP覆层蔗糖核心。与用于覆层的IAP溶液相比,覆层后的IAP活性得以维持。IAP溶液呈现出与Sigma标准品相比为约70%的活性,而药物覆层核心呈现出与Sigma标准品相比为60%的活性。

[0368] 研究药物覆层核心批次1以通过活性测定评估IAP的稳定性。在存在和不存在二氧化硅干燥剂的情况下将核心储存在冷藏条件下并且发现在两种情况下IAP活性在8周内保持稳定。然后将药物覆层核心批次2进行包衣至30% EUDRAGIT L30D-55增重(单层)或7% HPC增重作为内部隔离层,然后是30% EUDRAGIT L30D-55。两种包衣制剂在禁食状态模拟胃液(FaSSGF)中均呈现出2小时的耐酸性,并且在禁食状态模拟肠液(FaSSIF)中的溶出曲线非常相似,在溶出度测试结束时酶活性没有损失。

[0369] 在二氧化硅存在的情况下,将包衣小丸在冷藏条件下储存并且在6个月后,酶活性

没有降低,这表明在这6个月期间HPC(粘合剂)和包衣层(酸性聚合物EUDRAGIT L30D-55)对酶活性没有影响。

[0370] 总体而言,由于获得的溶出曲线和小丸的良好流动性,药物覆层小丸制剂是配制IAP的有前景的选择。它的另一个优点是可以基于一种配方灵活地获得各种酶强度。它还提供了一种简化的方法,因为覆层和肠溶包衣可以在同一流化床包衣机中进行。

[0371] 实施例2:赋形剂-IAP相容性的评估

[0372] 将IAP与选择的潜在粘合剂组合,以确定粘合剂对IAP活性的影响。如表1和图2所示,在存在蔗糖或乳糖的情况下测试与IAP相容性的粘合剂在孵育96小时后未显著改变IAP活性,并且显示出与单独的初始IAP溶液(IAP-粘合剂组合#11)相似的活性%。

[0373] 表1. IAP-粘合剂组合编号和组成。

[0374]

IAP-粘合剂组合#	组成			
	IAP	11.0 mg/mL 的粘合剂	糖	盐
1	5.50 mg/mL	-	5.50 mg/mL 蔗糖	1.25 mg/mL
2		HPC		
3		PEG4000		
4		PEG8000		
5		Kollicoat IR		
6		-	5.50 mg/mL 乳糖	
7		HPC		
8		PEG4000		
9		PEG8000		
10		Kollicoat IR		

[0375]

11		-	-	
----	--	---	---	--

[0376] 如表1和图2所示,与 $t=0$ 小时的初始值相比,大多数组合不会导致酶活性的显著变化。结果显示在当前测试条件下,在任何测试的赋形剂的存在下都没有观察到IAP活性的损失,因此没有确定不相容性。结果表明,使用HPC作为粘合剂的药物覆层核心不会损害IAP活性并且这是选择用于进一步研究的建议组合。

[0377] 测试与IAP相容性的辅因子如表2和图3所示。发现辅因子在当前测试条件下并未显著增加IAP活性。

[0378] 表2. IAP-赋形剂组合编号和组成。

	IAP-赋形剂组合 #	IAP	HPC	蔗糖	辅因子	盐
[0379]	1	5.50 mg/mL	-	-	-	1.25 mg/mL
	2		11.0 mg/mL	-	-	
	3			5.50 mg/mL	-	
	4		-			
	5		11.0 mg/mL		CoCl ₂ (2.75 mM)	
	6				CoCl ₂ (5.5 mM)	
	7			CaCl ₂ (2.75 mM)		
	8			CaCl ₂ (5.5 mM)		

[0380] 如表2和图3所示,与含辅因子的四种组合(#5-#8)相比,无任何辅因子存在的前四种组合(#1-#4)未显示出IAP活性的降低趋势。与IAP-粘合剂相容性研究(图2中提供的结果)类似,IAP辅因子相容性研究的结果已经证实在HPC、蔗糖或两者的组合的存在下,IAP活性不会受到损害。向制剂中添加辅因子在不同时间点都没有显著增加IAP活性。因此,没有进一步研究含辅因子的制剂。IAP缓冲溶液含有1.0mM MgCl₂和0.1mM ZnCl₂。在这些实验中测试的其它金属离子(CoCl₂和CaCl₂)并未改变IAP-粘合剂混合物的酶活性。

[0381] 将赋形剂/IAP混合溶液在37°C下孵育并且因此,由于孵育温度,水性介质随时间蒸发并且观察到溶液体积明显损失。这导致组合#2在最后时间点的酶活性增加。在最后时间点,#4、#5、#7和#8组合中酶活性的降低可能与测定可变性有关。

[0382] 实施例3:第一批核心的稳定性测试

[0383] IAP溶液作为在pH为7.5的20mM Tris、0.1mM ZnSO₄和1mM MgCl₂缓冲液中的10.1mg/mL IAP(肠碱性磷酸酶)冷冻提供并用于药物覆层。为了制备最终的药物覆层溶液,在缓慢磁力搅拌(低于200RPM)下将1.12g的HPC(Klucel EF)添加到49.5mL IAP溶液中。在Caleva小型包衣机/干燥器中将后续溶液喷涂覆层到6.00g的600/710 μ m Suglet上。

[0384] 将IAP-HPC溶液以0.8巴的雾化气压与11.5m/s的进气速度和10.5Hz的腔室搅拌速率进行喷涂。喷涂工艺温度在初始30-45分钟为45°C,然后降至40°C。这是因为在包衣工艺的早期,如果温度不足以快速干燥核心表面上的水溶液,则Suglet容易聚集。随着包衣工艺的进行,核心具有薄包衣层,所述薄包衣层可以保护核心并引起聚集机会的减少,因此降低了工艺温度。

[0385] 每喷涂1小时后,将药物覆层核心在35°C下干燥30分钟,一旦完成包衣,就将药物覆层核心在40°C下另外再干燥1小时,之后确认实际增重。

[0386] 药物覆层核心(AP0361/24/1)由分别为87.92/3.45/7.77/0.87%w/w的Suglet/IAP/HPC/盐(来自IAP溶液)组成。由于制备错误,这批核心的IAP/HPC比率略有不同,为1:2.25w/w,而不是预期的1:2w/w比率。药物覆层过程完成后,将核心在2-8°C下储存在装有二氧化硅干燥剂袋的密闭玻璃小瓶中。

[0387] 在药物覆层后的前12天,将所得核心保存在密闭小瓶中,在2-8℃下干燥。为了研究非干燥条件的影响,在初始干燥12天后,从玻璃小瓶中取出一半内容物,并且在不存在二氧化硅袋的情况下储存在2-8℃下。在这些药物覆层核心的短期稳定性研究中随时间测量的酶活性结果如表3所示。

[0388] 表3.干燥/非干燥条件下冷藏室中药物覆层核心的IAP活性。

[0389]	冷藏室中的储存天数		活性%	
	-		72.1 (IAP 溶液)	
	3		71.3(干燥的)	
	12		45.2(干燥的)	
	从 12 天开始		干燥的	非干燥的
	27		74.7	68.3
	35		73.1	73.4
	42		63.6	65.4
	54		61.5	55.4

[0390] 观察到IAP活性%随时间的一些波动;然而,这些可能与测定方法的可变性有关。基于表3中的结果,可以得出结论,与干燥条件相比,非干燥条件没有显著降低IAP活性。

[0391] 对于酶活性测试,将核心溶解在二乙醇胺缓冲液中。具体地,进行了IAP活性测定方法。使用二乙醇胺(Sigma D8885)在纯净水中制备140mg/mL溶液,并在37℃下用5M HCl将二乙醇胺的pH调节至9.8。用纯净水将经pH调节的溶液稀释至105mg/mL的最终二乙醇胺浓度。最后,将500μL/L的1M氯化镁溶液(Sigma M1028)添加到溶液中。新鲜制备二乙醇胺并避免阳光直射。

[0392] 通过在二乙醇胺缓冲液中将19.4mg/mL储备溶液(浓度可能因Sigma不同批次而异)稀释到1.00mg/mL(在92μL二乙醇胺缓冲液中为5μL)来制备IAP酶标准溶液。在进一步稀释之前将酶溶液保持在冰上。这种纯化的肠碱性磷酸酶(Sigma#P0114)用作对照来测试所测定的样品的活性。

[0393] 将所有样品(包括Sigma标准品和IAP溶液)上样到96孔板上,并用二乙醇胺缓冲液稀释至理论5ng/mL的溶液。

[0394] 将pNPP(Abcam ab146203)以1.86mg/mL测定缓冲液重构为5mM溶液,并且pNPP溶液在冰上稳定12小时。

[0395] 然后进行动力学测定。在读板仪(DYNEX#MRX TC II)上,将80μL标准品和样品添加到96孔板的孔中。所有酶反应均在一式两份孔中运行。在每个空孔中添加足够的5mM pNPP溶液,以备稍后添加到样品中并将板在37℃下孵育5分钟。使用多通道移液管快速地将50μL预热的5mM pNPP溶液添加到含有标准品或样品的每个孔中。在此添加过程中,避免气泡形成。反应顺序在37℃下开始并进行。在另外10分钟初始延迟和2秒初始振荡步骤后,在5分钟内每20秒测量一次比色输出(经由酶磷酸酶活性进行的pNPP NPP去磷酸化)作为405nm下光密度(OD)增加的函数。不含酶的空白孔在同一板上并行运行。

[0396] 动力学测定提供了此时间段内酶动力学的读数,并将斜率用于与IAP Sigma标准品产生的斜率进行比较(样品活性%=样品斜率/Sigma标准品斜率*100%;从样品和Sigma标准品的斜率中减去空白的斜率)。

[0397] 实施例4:第二批核心的肠溶包衣和溶出度测试

[0398] 制备第二批药物覆层核心用于包衣试验并按照与第一批核心(实施例3)相同的设备参数制造。第二批核心由84.9/4.7/9.3/1.2%w/w的Suglets/IAP/HPC/盐(来自IAP溶液)组成。使用在缓慢磁力搅拌(低于200RPM)下以1:2w/w的IAP:HPC比添加到47.0mL IAP溶液中的0.948g的HPC(Klucel EF)制备药物覆层溶液。

[0399] 将两种类型的包衣施加到第二批药物覆层核心上,即增重30%的EUDRAGIT L30D-55(单肠溶层)或增重7%的HPC层,然后是聚合物增重30%的EUDRAGIT L30D-55的外层(带底层的肠溶层)。配方列于表4中。

[0400] 表4.第二批具有肠溶包衣的药物覆层核心的配方组成。

组分	单层	双层
	总量%	总量%
蔗糖核心(“Suglet”)	84.9	84.9
羟丙基纤维素	9.3	9.3
盐	1.2	1.2
IAP (SYN-020)	4.7	4.7
EUDRAGIT L30D-55 增重	30	30
HPC 底层增重	0	7

[0402] 药物覆层核心(批次2)以1:2w/w固体比与IAP/HPC覆层,最终组成为IAP增重4.65%,然后是单层包衣(EUDRAGIT L30D-55增重30%)或双层包衣(HPC增重7%+EUDRAGIT L30D-55增重30%)。如图4中的SEM图像所示,单层包衣小丸的直径为大约800 μ m。图4描绘了一个包衣小丸(包被在第二批小丸上的30% EUDRAGIT L30D-55)的SEM图片。

[0403] 第二批小丸的横截面也示于图5中,其中蔗糖核心、IAP/HPC层和L30D-55包衣层可以清楚地区分。IAP/HPC层的厚度为大约20 μ m且EUDRAGIT L30D-55包衣层的厚度为大约40 μ m(聚合物制造商Evonik推荐的厚度)。图5描绘了一个包衣小丸(包被在第二批小丸上的30% L30D-55)的横截面的SEM图片。

[0404] 研究了这些包衣小丸的溶出行为。每个溶出容器中小丸的量为1.14g单层包衣小丸和1.22g双层包衣小丸,这对应于两种制剂的40mg IAP量。在每项溶出试验中,在加热器/振荡器上将一个药片在60mL小瓶中的20mL FaSSIF(pH 1.6)中在37°C和200RPM振荡下孵育2小时。在初始2小时后,添加20mL双倍强度FaSSIF并使用1M NaOH将pH调节至5.5或5.8。再过45分钟后,进一步将pH调至6.5或6.8并且再进行2-3小时的溶出试验。

[0405] 将包衣小丸在pH 1.6的FaSSGF中测试2小时,然后添加FaSSIF以达到pH5.8,保持45分钟,然后增加至pH 6.8,再保持3小时。还进行了包衣小丸在单独的FaSSIF中的溶出试验(pH 5.8保持45分钟,然后pH 6.8保持3小时)以进行比较。

[0406] UV蛋白释放曲线如图6所示。在单独的FaSSIF中溶出期间IAP的释放%对于单层和双层包衣而言分别呈现为“x”和“三角形”曲线。在FaSSGF和FaSSIF溶出期间IAP的释放%对于单层和双层包衣而言分别呈现为红色和蓝色曲线。

[0407] 曲线表明包衣小丸在低pH下受到肠溶保护,因为通过UV分析在FaSSGF中未检测到IAP释放。而且,单级和双级方法之间的溶出曲线非常相似-在小丸暴露于pH 5.8的FaSSIF后立即开始出现释放,并且在pH 5.8下45分钟后,当pH调至pH 6.8时溶出速率增加。在pH 6.8下再过3小时后实现完全释放。

[0408] 酶活性曲线如图7所示。在单独的FaSSIF中溶出期间IAP的活性%对于单层和双层包衣而言分别呈现为“x”和“三角形”曲线。在FaSSGF和FaSSIF溶出期间IAP的活性%对于单层和双层包衣而言分别呈现为红色和蓝色曲线。

[0409] 酶活性曲线与图6中因UV引起的IAP释放%遵循相同的趋势。在两项溶出试验的终点检测到的最大酶活性为大约45%-55%,与原材料处于相同水平(药物覆层核心的大约50%)。结果表明所施加的包衣在低pH下受到肠溶保护,并且在包衣聚合物的存在下酶活性没有降低。由于单层和双层包衣覆层核心产生的溶出曲线相似,可以得出结论,不需要底层HPC来隔离和保护酶免受酸性包衣聚合物的影响。

[0410] 通过将小丸暴露于单独的FaSSIF所获得的活性%与暴露于FaSSGF/FaSSIF相似,这表明包衣小丸中的IAP没有受FaSSGF pH 1.6影响或变性。这证实了在获得相同水平的酶活性时施加了足够的肠溶衣厚度。

[0411] 研究显示,具有30%聚合物增重EUDRAGIT L30D-55水性分散体的覆层核心的肠溶包衣在FaSSGF中提供长达2小时的耐酸性并且在4小时内在FaSSIF中持续释放IAP。7% HPC隔离层的存在不会改变溶出曲线,也不会影响酶活性。因此,判断不需要隔离亚层。

[0412] 实施例5:小丸中IAP活性的稳定性评估

[0413] 将未包衣/包衣的药物覆层核心于2-8℃下置于装有二氧化硅干燥剂袋的密闭玻璃小瓶中长达12个月,以进行稳定性评估。在0、1、3和6个月时通过使核心溶解到二乙醇胺缓冲液中并分析IAP活性来监测这些核心的酶活性。

[0414] 未包衣的小丸和包衣小丸均在干燥条件下在冷藏温度下储存。在长达6个月的时间内测量酶活性并且结果如表5所示。

[0415] 表5. 未包衣/包衣的药物覆层小丸在2-8℃干燥条件下储存时IAP活性的稳定性。

[0416]

样品	储存持续时间
----	--------

	0	1 个月	3 个月	6 个月
	平均活性%			
[0417] 未包衣的小丸	56.69±4.23	52.37±1.81	58.45±0.97	63.2±1.73
7% HPC+30% L30D-55 包衣小丸	48.77±2.90	46.93±0.39	57.94±5.35	56.1±0.67
30% L30D-55 包衣小丸	48.80±0.17	49.50±0.97	58.47±2.66	58.3±4.65

[0418] 结果显示,未包衣的核心和包衣小丸的酶活性在干燥条件下在冷藏温度下储存6个月内保持在相同水平。

[0419] 实施例6:25mg和5 mg IAP小丸胶囊的稳定性评估

[0420] 2号HPMC透明胶囊填充有包衣IAP小丸,其相对于Sigma标准品,呈现出9.7%w/w的载药量(通过紫外光谱仪分析)和78.1%的酶活性(通过DYNEX酶标仪分析)。90粒胶囊含有25mg IAP,90粒胶囊含有5mg IAP。通过将IAP/HPC (1/2w/w)覆层到600/710μm Suglet (Colorcon)上,然后是EUDRAGIT L30D-55 (Evonik)包衣来制造小丸。

[0421] 表6.含有5mg和25mg IAP的胶囊的组成

组分	5 mg 胶囊		25 mg 胶囊	
	mg	总量%	mg	总量%
蔗糖核心	-19.5	37.7	97.3	37.7
羟丙基纤维素	10.0	19.4	50.0	19.4
盐	1.3	2.4	6.3	2.4
[0422] IAP (SYN-020)	5.0	9.7	25.0	9.7
EUDRAGIT L30D-55	13.5	26.3	67.7	26.3
HTP-20	2.3	4.5	11.5	4.5
小计	51.6	100.0	257.7	100.0
HPMC 胶囊#2	60.0	-	60.0	-
总计	111.6	-	317.7	-

[0423] 小丸胶囊在冷藏室中储存一年过程中的稳定性和活性百分比显示在下表7中。

[0424] 表7.一年过程中的小丸胶囊活性。

[0425]	2-8℃下的储存持续时间	活性% (对比IAP标准品)
	0 (制造日期)	93.0
	1个月	93.8
	3个月	87.3
	6个月	83.4

12个月

79.7

[0426] 本发明人惊奇地发现,当在2-8℃下储存一年时间时,IAP小丸胶囊维持约至少80%的IAP活性。

[0427] 然后进行体外溶出试验。将大约450mg包衣小丸在60mL玻璃小瓶中的25mL FaSSGF (pH 1.6,37℃)中孵育,在加热器/振荡器上以200RPM轨道振荡速度轻轻振荡小瓶。在60分钟和120分钟时,通过10μm套管过滤器抽取1mL介质,并通过0.2μm过滤器过滤进行UV分析。将50μL过滤后的溶液冷冻用于进一步的活性分析。之后将溶液放回小瓶中。

[0428] 在FaSSGF中初始孵育2小时后,将25mL FaSSIF添加到小瓶中以获得pH5.8。每15分钟取样一次。45分钟后,将pH调至6.8并且每15分钟取样一次。取样方法与上一段所述相同。

[0429] 过滤后的样品在紫外光谱仪中在280nm和320nm下进行分析并且吸收值等于A280-A320。从样品吸收值中进一步减去空白介质的吸收值,并且将随后的值用于计算释放%。如图8所示,首先生成校准曲线。基于线性趋势线方程计算每个时间点的样品浓度。

[0430] 图9中描绘了溶出试验的结果。包衣小丸对FaSSGF具有抗性2小时,因为未检测到释放。在60和120分钟(T=0,红线)的释放%为大约1%。另外,在溶出试验结束时,小丸的活性完全恢复,这表明在初始孵育期间酸没有渗透过包衣膜。在pH 5.8的FaSSIF中的前45分钟期间IAP释放缓慢,因为pH接近5.5,即EUDRAGIT L30D-55的溶出阈值。一旦将pH调至6.8,包衣膜就开始迅速溶解并且IAP释放量急剧增加。

[0431] 图10描述了溶出试验的结果,其中包衣小丸已储存约一年。包衣小丸对FaSSGF具有抗性2小时,因为未检测到释放。在60和120分钟(T=0,红线)的释放百分比为大约1%。另外,在溶出试验结束时,小丸的活性完全恢复,这表明在初始孵育期间酸没有渗透过包衣膜。在pH 5.8的FaSSIF中的前45分钟期间IAP释放缓慢,因为pH接近5.5,即EUDRAGIT L30D-55的溶出阈值。一旦将pH调至6.8,包衣膜就开始迅速溶解并且IAP释放量急剧增加。

[0432] 对单独的IAP小丸批次进行各种测试,包括:非GMP SYN-020小丸;非GMP SYN-020小丸(HPD514-A-001);非GMP SYN-020胶囊(5mg);非GMP SYN-020胶囊(15mg);和GMP SYN-020小丸。下面表8和表9中描绘了SYN-020延迟释放胶囊即15mg和5mg胶囊以及SYN-020安慰剂小丸的组成和各种测试的结果。

[0433] 表8.SYN-020延迟释放胶囊即15mg和5mg胶囊的组成。

组分	15 mg 胶囊		5 mg 胶囊	
	mg	总量%	mg	总量%
蔗糖球	58.35	38.9	19.45	38.9
羟丙基纤维素	30.00	20.0	10.00	20.0
SYN-020	15.00	10.0	5.00	10.0
[0434] 缓冲盐	0.45	0.3	0.15	0.3
EUDRAGIT L30 D-55	39.45	26.3	13.15	26.3
HTP-20	6.75	4.5	2.25	4.5
小计	150.0	100.0	50.0	100.0
HPMC 硬胶囊#3	48.0		48.0	
总计	198.0		98.0	

[0435] HTP-20是单硬脂酸甘油酯、聚山梨醇酯-80和柠檬酸三乙酯的预混合制剂,其提供了抗粘、增塑剂和稳定剂的功能。

[0436] 表9.SYN-020IAP包衣小丸和胶囊的批次分析

批次信息	非 GMP SYN-020 小丸, AP0361	非 GMP SYN-020 小 丸	非 GMP SYN-020 胶 囊, 15 mg	GMP SYN-020 小丸	GMP SYN-020 胶 囊, 15 mg
测试方法	结果	结果	结果	结果	结果
外观					
胶囊颜色	透明的	不适用	透明的, 3 号	不适用	白色, 不透 明, 3 号
胶囊内容物 颜色	淡黄色	微黄色小丸	未确定	不适用	微黄色小丸
流动性	未确定	自由流动			自由流动
粒度分布	未确定	98%	不适用	100%	不适用
通过 pNPP/IAP 测定法测 定的酶活 性	相对于 SYN-020 溶液为 93.0%	616 单位 /mg	未确定	612 单位/mg	未确定
通过 A280 nm 测定的 蛋白质含 量	9.7%	10%	未确定	9.9%	未确定
通过 pNPP/IAP 测定法测 定的含量 均匀性	不适用	未确定	681 单位 /mg, 符合	未确定	614 单位 /mg, 符合
RP-HPLC 体外溶出 度检测	在 0.1N HCl 中 2 小时为 0%; 在 pH 6.8 下 1 小时 为 94%; 在 0.75 小 时为 87%; 在 2 小时 为 95%	未确定	在 0.1N HCl 中 2 小 时为 0%; 在 pH 6.8 下 1 小时 为 82%; 在 0.25、 0.5、0.75 和 1.25 小 时为 47、 84%、93%、 86%	不适用	在 0.1N HCl 中 2 小时 <1%; 在 pH 6.8 下 1 小时为 88%; 在 0.25、0.5、 0.75 和 1.25 小时为 53%、 87%、88%、 91%
通过卡尔 费休法 (Karl Fischer Method)测 定的含水 量	未确定	3%	3%	不适用	2%

[0437]

[0438]

批次信息	非 GMP SYN-020 小丸, AP0361	非 GMP SYN-020 小 丸	非 GMP SYN-020 胶 囊, 15 mg	GMP SYN-020 小丸	GMP SYN-020 胶 囊, 15 mg
RP-HPLC 纯度	未确定	85.1%主峰	未确定	未确定	79%主峰
特性		主峰 RRT 与参考标 准相当	未确定		主峰共洗脱 ±参考标准 的 10% RRT
微生物计 数 总需氧微 生物计数 酵母和霉 菌总计数 大肠杆菌	未确定	<10 <10 不存在	未确定	未确定	0 0 不存在

[0439] 图11A-H描绘了非GMP SYN-020 5mg和15mg胶囊剂量的其它分析。关于剂量强度和稳定性的结果,包括诸如比活性、纯度、含水量和溶出度等参数,进行为期6个月的分析。

[0440] 等效方案

[0441] 尽管已经结合其具体的实施方案描述本发明,但应理解,本发明能够有进一步的修改,并且本申请旨在涵盖本发明的任何变型、用途或变更,所述变型、用途或变更大体上符合本发明的原理,且包括在本发明所属领域内的已知或常规实践范围内的并可以适用于上文阐述的和所附权利要求范围内的基本特征的与本公开的此类偏离。

[0442] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文明确描述的特定实施方案的许多等效方案。所述等效方案意图涵盖于所附权利要求书的范围内。

[0443] 通过引用并入

[0444] 本文引用的所有专利和出版物以引用的方式整体并入本文。

[0445] 本文所论述的出版物仅仅出于其在本申请的提交日期之前公开而提供。本文中的任何内容均不得解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于此类出版物。

[0446] 如本文所用,所有标题仅用于组织,并不意图以任何方式限制本公开。任何单个章节的内容可以同样适用于所有章节。

HIAP – SEQ ID NO: 1

1 mqqgpwvllll glrlqlslgv ipaceenpaf wnrqaacald aakklqpiqk vaknlilflg
 61 dglgvptvta trilkgqkng klgpctplam drfpylalsk tynvdrqvpd saatataylc
 121 gvkanfqtig lsaaarfnqc nttrgnevis vmnrakqagk svgvvttrv qhaspagtya
 181 htvnrnwysd admpasarqe gcqdiatqli snmdidvilg ggrkymfpmg tpdpeypada
 241 sqngirldegk nlvqewlakh qgawyvwnrt elmqasldqs vthlmglfep gdtkyeihrd
 301 ptldpslmem teaalrllsr nprgfy lfve ggridhghhe gvayqalte vmfddaiera
 361 gqitseedtl tlvtadhshv fsfgytlrg ssifglapks aqds kaytsi lyngpgyvf
 421 nsgvrpdvne sesgspdyqq qaavplsset hggedvavfa rgpqahlvhg vqeqsfvahn
 481 mafaaclepy tacdlappac tdaahpva slpplagtl llgasaap

具有248D的BIAP II– SEQ ID NO: 2。信号肽和480后的序列源自BIAP I。

1 mqqacvllll glhlqlslgl ipaccenpaf wnrqaaqald vakklqpiqt aaknvilflg
 61 dgmvgvptvta trilkgqmng klgpctplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
 121 gvkgnyrtig vsaaarynqc nttrgnevts vinrakkagk avgvvttrv qhaspagaya
 181 htvnrnwysd adlpadaqkn gcqdiaaqlv ynmdidvilg ggrmymfpeg tpdpeypdda
 241 svngvrkdkq nlvqewqakh qgaqyvwnrt allqaaddss vthlmglfep admkynvqqd
 301 htkdptlaem teaalqvlsr nprgfy lfve ggridhghhd gkaymaltea imfdnaiaka
 361 neltseldtl ilvtadhshv fsfgytlrg tsifglapks aldsksytsi lyngpgyal
 421 gggsrpdvng stseepsyrq qaavplaset hggedvavfa rgpqahlvhg vqeetfvahi
 481 mafagcvepy tdcnlpapat atsipdaahl aasppplall agamllllap tly

BIAP IV – SEQ ID NO: 3

1 mqwacvllll glwlqlsltf ipaeedpaf wnrqaaqald vakklqpiqt aaknvilflg
 61 dgmvgvptvta trilkgqmng klgpctplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
 121 gvkgnyktig vsaaarynqc nttsgnevts vmnrakkagk svgvvttsrv qhaspagaya
 181 htvnrnwysd adlpadaqty gcqdiatqlv nnmdidvilg ggrmymfpeg tpdpeypydv
 241 nqtgyrkdqr nlvqewqakh qgaqyvwnrt ellqaandps vthlmglfep admkynvqqd
 301 ptkdptleem teaalqvlsr npqgyf lfve ggridhghhe gkaymaltdt vmfdnaiaka
 361 neltseldtl ilatadhshv fsfgytlrg tsifglapks asdnksytsi lyngpgyvl
 421 ggglrpdvnd sisedpsyrq qaavplsset hggedvavfa rgpqahlvhg vqeetfvahn
 481 mafagcvepy tdcnlpaps lsaahlaas ppsllalaga mllllapaly

图1

具有终止密码子的HIAP (SEQ ID NO: 4)

1 mqqgpwvllll glrlqlslgv ipaceenpaf wnrqaacald aakklqpiqk vaknlilflg
61 dglgvptvta trilkqkng klqpetplam drfpylalsk tynvdrqvpd saatataylc
121 gykanftig lsaarfnqc ntrgnevis vmnrakqagk svgvvttrv qhaspagya
181 htvnrnwysd admpasarqe gcqdiatqli snmdidvilg ggrkymfpmg tpdpeypada
241 sqngirldgk nlvqewlakh qgawyvwnrt elmqasldqs vthlmglfep gdtkyeihrd
301 ptldpslmem teaalrllsr nprgfylfve ggridhghhe gvayqalte vmfddaiera
361 gqitseedtl tlvtadhshv fsfggytlrg ssifglapsk aqdskeytsi lyngpgyvf
421 nsgvrpdvnc scsgspdyqq qaavplssct hggcdvavfa rqpqahlvhg vqcqsfvahv
481 mafaaclepy tacdlappag ttd

具有终止密码子的BIAP II (SEQ ID NO: 5)

1 mqqgacvllll glhlqlslgl ipaceenpaf wnrqaacald vakklqpiqt aaknvilflg
61 dgmgyptvta trilkqgmng klqpetplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
121 gvkgnrtig vsaarynqc ntrgnevts vinrakkagk avgvvttrv qhaspagaya
181 htvnrnwysd adlpadaqkn gcqdiaaqlv ynmddidvilg ggrmymfpeg tpdpeypdda
241 svngvrkdqk nlvqewqakh qgaqyvwnrt allqaaddss vthlmglfep admkynvqqd
301 htkdptlaem teaalqvlsr nprgfylfve ggridhghhd gkaymaltea imfdnaiaka
361 neltseidtl ilvtadhshv fsfggytlrg tsifglapkg aldskeytsi lyngpgyval
421 gggsrpdvng steeepsyrq qaavplaset hggcdvavfa rqpqahlvhg vqetfvahi
481 mafagevepy tdcnlpatat atsidp

具有终止密码子的BIAP IV (SEQ ID NO: 6)

1 mqwacvllll glwlqlsltf ipaeedpaf wnrqaacald vakklqpiqt aaknvilflg
61 dgmgyptvta trilkqgmng klqpetplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
121 gvkgnrtig vsaarynqc ntrgnevts vmnrakkagk svgvvttrv qhaspagaya
181 htvnrnwysd adlpadaqty gcqdiatqlv nmddidvilg ggrmymfpeg tpdpeypydv
241 nqtgvrkdkr nlvqewqakh qgaqyvwnrt ellqaandps vthlmglfep admkynvqqd
301 ptkdptleem teaalqvlsr npqgfylfve ggridhghhe gkaymalttd vmfdnaiaka
361 neltseidtl ilatadhshv fsfggytlrg tsifglapsk asdnkeytsi lyngpgyvl
421 ggglrpdvnd sisedpsyrq qaavplsses hggcdvavfa rqpqahlvhg vqetfvahv
481 mafagevepy tdcnlpapsd lsd

图1 (续)

具有氨基酸508的BIAP IV (SEQ ID NO: 7)

1 mqwacvllll glwlqlsltf ipaeedpaf wnrqaaqald vakklpiqt aaknvilflg
61 dgmvgvptvta trlkgqmng klgpctplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
121 gvkgnykting vsaaarynqc nttsgnevtv vmnrakkagk svgvvttsrv qhaspagaya
181 htvmrnwysd adlpadaqty gcqdiatqlv nnmdidvilg ggrmymfpeg tpdpeypydv
241 nqtgvrkdkr nlvqewqakh qgaqyvwnrt ellqaandps vthlmglfep admkynvqqd
301 ptkdptleem tealqvlr npqgfylfve ggridhghhe gkaymaltdt vmfdnaiaka
361 neltseldtl ilatadhshv fsfggytlrg tsifglapks asdnksytsi lyngpgyvl
421 ggglrpdvnd sisedpsyrq qaavplsscs hggedvavfa rgpqahlvhg vqectfvahv
481 mafagcvepy tdcnlpaps g lsdaahla

具有Fc融合的BIAP II (SEQ ID NO: 8) – Fc结构域加有下划线

1 mqgacvllll glhlqlslgl ipaeenpaf wnrqaaqald vakklpiqt aaknvilflg
61 dgmvgvptvta trlkgqmng klgpctplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
121 gvkgnyrting vsaaarynqc nttgnevtv vinrakkagk avgvvttrv qhaspagaya
181 htvmrnwysd adlpadaqkn gcqdiaaqlv ynmdivilg ggrmymfpeg tpdpeypdda
241 svngvrkdkq nlvqewqakh qgaqyvwnrt allqaaddss vthlmglfep admkynvqqd
301 htkdptlaem tealqvlr nprgfyfve ggridhghhd gkaymaltea imfdnaiaka
361 neltseldtl iltadhshv fsfggytlrg tsifglapkg aldsksytsi lyngpgyal
421 gggsrpdvng stseepsyrq qaavplaset hggedvavfa rgpqahlvhg vqectfvahi
481 mafagcvepy tdcnlpatat atspidGGSGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPQV KFNWYVDGVQVHNAKTKPRE
QOYNSTYRVVSVLTVLHONW LDGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGOPREPOVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGSSFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

具有Fc融合的BIAP IV (SEQ ID NO: 9) – Fc结构域加有下划线

1 mqwacvllll glwlqlsltf ipaeedpaf wnrqaaqald vakklpiqt aaknvilflg
61 dgmvgvptvta trlkgqmng klgpctplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
121 gvkgnykting vsaaarynqc nttsgnevtv vmnrakkagk svgvvttsrv qhaspagaya
181 htvmrnwysd adlpadaqty gcqdiatqlv nnmdidvilg ggrmymfpeg tpdpeypydv
241 nqtgvrkdkr nlvqewqakh qgaqyvwnrt ellqaandps vthlmglfep admkynvqqd
301 ptkdptleem tealqvlr npqgfylfve ggridhghhe gkaymaltdt vmfdnaiaka

图1 (续)

361 neltseidtl ilatadhshv fsfggytlrg tsifglapask asdnksytsi lyngngpyvl
 421 ggglrpdvnd sisedpsyrq qaavplsses hggedvavfa rgpqahlvhg vqeetfvahv
 481 mafagcvepy tdcnlpaps gsdGGSGGSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPOV KFNWYVDGVQVHNAKTKPRE
QOYNSTYRVVSVLTVLHQNW LDGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPOVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

具有hPLAP羧基末端和用于未加工分泌和RV3C裂解的突变(在...LEVLFQGP...处)的BIAP IV: SEQ ID NO: 10

1 mqwacvllll glwlqlsltf ipaeedpaf wnrqaaqald vakklqpiqt aaknvilflg
 61 dgmgvptvta trilkgqmng klqpetplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
 121 gvkgnytig vsaaarynqc nttsgnevts vmnrakkagk svgvvttsrv qhaspagaya
 181 htvnrnwysd adlpadaqy gcqdiatqlv nnmdidvilg ggrnymfpeg tpdpeypydv
 241 nqtgvrkdcr nlvqewqakh qgaqyvwnrt ellqaandps vthlmglfep admkynvqqd
 301 ptkdptleem teaalqvlsr npqgfylfve ggridhghhe gkaymaltdt vmfdnaiaka
 361 neltseidtl ilatadhshv fsfggytlrg tsifglapask asdnksytsi lyngngpyvl
 421 ggglrpdvnd sisedpsyrq qaavplsses hggedvavfa rgpqahlvhg vqeetfvahv
 481 mafagcvepy tdcnlevlfq gpappagttt aahpgrsvvp allplragtl lletatap

具有hPLAP羧基末端和用于未加工分泌和FXa裂解的突变(在...IEGR...处)的BIAP IV: SEQ ID NO: 11

1 mqwacvllll glwlqlsltf ipaeedpaf wnrqaaqald vakklqpiqt aaknvilflg
 61 dgmgvptvta trilkgqmng klqpetplam dqfpyvalsk tynvdrqvpd sagtataylc
 121 gvkgnytig vsaaarynqc nttsgnevts vmnrakkagk svgvvttsrv qhaspagaya
 181 htvnrnwysd adlpadaqy gcqdiatqlv nnmdidvilg ggrnymfpeg tpdpeypydv
 241 nqtgvrkdcr nlvqewqakh qgaqyvwnrt ellqaandps vthlmglfep admkynvqqd
 301 ptkdptleem teaalqvlsr npqgfylfve ggridhghhe gkaymaltdt vmfdnaiaka
 361 neltseidtl ilatadhshv fsfggytlrg tsifglapask asdnksytsi lyngngpyvl
 421 ggglrpdvnd sisedpsyrq qaavplsses hggedvavfa rgpqahlvhg vqeetfvahv
 481 mafagcvepy tdcnlappag ttdaahpieg rsvpallpl ragtllllet atap

图1 (续)

具有天然第一内含子的hIAP(以粗体和下划线示出)- SEQ ID NO: 12

ATGCAGGGGGCCCTGGGTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCGTC
ATCCCAGG**TAATGAGGCTCCCCAAGCTGTTCCACACACAGGGCACCCCTCAGCCA**
GGCTGACCTGATCTCTACTCTCCCCCTGGCCAGCTGAGGAGGAGAACCCGGCCTTCTG
GAACCGCCAGGCAGCTGAGGCCCTGGATGCTGCCAAGAAGCTGCAGCCCATCCAGAAGG
TCGCCAAGAACCTCATCTCTTCCCTGGGCGATGGGTTGGGGGTGCCACGGTGACAGCCA
CCAGGATCCTAAAGGGGCAGAAGAATGGCAAACCTGGGGCCTGAGACGCCCTGGCCATG
GACCGCTTCCCATACCTGGCTCTGTCCAAGACATACAATGTGGACAGACAGGTGCCAGA
CAGCGCAGCCACAGCCACGGCCTACCTGTGCGGGGTCAAGGCCAACTTCCAGACCATCG
GCTTGAGTGACAGCCGCCGCTTTAACCAGTGCAACACGACACGCGGCAATGAGGTCATC
TCCGTGATGAACCGGGCCAAGCAAGCAGGAAAGTCAGTAGGAGTGGTGACCACCACACG
GGTGACGACGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCACACACAGTGAACCGCAACTGGTACT
CAGATGCTGACATGCCTGCCTCAGCCCGCCAGGAGGGGTGCCAGGACATCGCCACTCAG
CTCATCTCCAACATGGACATTGACGTGATCCTTGGCGGAGGCCGCAAGTACATGTTTCCC
ATGGGGACCCCAAGACCTGAGTACCCAGCTGATGCCAGCCAGAATGGAATCAGGCTGGA
CGGGAAGAACCTGGTGCAGGAATGGCTGGCAAAGCACCAAGGGTGCCTGGTATGTGTGGA
ACCGCACTGAGCTCATGCAGGCGTCCCTGGACCAGTCTGTGACCCATCTCATGGGCCCTCT
TTGAGCCCGGAGACACGAAATATGAGATCCACCGAGACCCACACTGGACCCCTCCCTG
ATGGAGATGACAGAGGCTGCCCTGCGCCTGCTGAGCAGGAACCCCGCGGCTTCTACCT
CTTTGTGGAGGGCGGCCGATCGACCATGGTCATCATGAGGGTGTGGCTTACCAGGCACT
CACTGAGGCGGTTCATGTTTCGACGACGCCATTGAGAGGGCGGGCCAGCTCACCAGCGAGG
AGGACACGCTGACCTCGTCACCGCTGACCACTCCCATGTCTTCTCCTTTGGTGGCTACA
CCTTGCGAGGGAGCTCCATCTTCGGGTGGCCCCCAGCAAGGCTCAGGACAGCAAAGCC
TACACGTCCATCTGTACGGCAATGGCCGGGCTACGTGTTCAACTCAGGCGTGCGACCA
GACGTGAATGAGAGCGAGAGCGGGAGCCCCGATTACCAGCAGCAGGCGGCGGTGCCCT
GTCGTCCGAGACCCACGGAGGCGAAGACGTGGCGGTGTTTGGCGCGGCCCGCAGGCGC
ACCTGGTGCATGGTGTGACGAGCAGAGCTTCGTAGCGCATGTCATGGCCTTCGCTGCCT
GTCTGGAGCCCTACACGGCCTGCGACCTGGCGCCTCCCGCCTGCACCACCGACGCCGCGC
ACCCAGTTGCCGCGTCGCTGCCACTGCTGGCCGGGACCCTGCTGCTGCTGGGGGCGTCCG
CTGCTCCCTGA

具有天然3' UTR的 hIAP(以粗体和下划线显示)- SEQ ID NO: 13

ATGCAGGGGGCCCTGGGTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCGTC
ATCCCAGCTGAGGAGGAGAACCCGGCCTTCTGGAACCGCCAGGCAGCTGAGGCCCTGGA
TGCTGCCAAGAAGCTGCAGCCCATCCAGAAGGTCGCCAAGAACCTCATCTCTTCCCTGGG
CGATGGGTTGGGGGTGCCACGGTGACAGCCACCAGGATCCTAAAGGGGCAGAAGAATG
GCAAACCTGGGGCCTGAGACGCCCTGGCCATGGACCGCTTCCCATACCTGGCTCTGTCCA
AGACATACAATGTGGACAGACAGGTGCCAGACAGCGCAGCCACAGCCACGGCCTACCTG
TGCGGGGTCAAGGCCAACTTCCAGACCATCGGCTTGAGTGACAGCCGCCGCTTTAACCAG
TGCAACACGACACGCGGCAATGAGGTCTATCTCCGTGATGAACCGGGCCAAGCAAGCAGG
AAAGTCAGTAGGAGTGGTGACCACCACACGGGTGCAGCACGCCTCGCCAGCCGGCACCT
ACGCACACACAGTGAACCGCAACTGGTACTCAGATGCTGACATGCCTGCCTCAGCCCGC
CAGGAGGGGTGCCAGGACATCGCCACTCAGCTCATCTCCAACATGGACATTGACGTGAT
CCTTGGCGGAGGCCGCAAGTACATGTTTCCCATGGGGACCCAGACCCTGAGTACCCAG
CTGATGCCAGCCAGAATGGAATCAGGCTGGACGGGAAGAACCTGGTGCAGGAATGGCTG
GCAAAGCACCAAGGTGCCTGGTATGTGTGGAACCGCACTGAGCTCATGCAGGCGTCCCT
GGACCAGTCTGTGACCCATCTCATGGGCCCTC

图1 (续)

TTTGAGCCCCGAGACACGAAATATGAGATCCACCGAGACCCCACACTGGACCCCTCCCT
GATGGAGATGACAGAGGCTGCCCTGCGCCTGCTGAGCAGGAACCCCCGCGGCTTCTACC
TCTTTGTGGAGGGCGGCCGCATCGACCATGGTCATCATGAGGGTGTGGCTTACCAGGCAC
TCACTGAGGCGGTCATGTTGACGACGCCATTGAGAGGGCGGGCCAGCTCACCAGCGAG
GAGGACACGCTGACCCCTCGTCACCGCTGACCACTCCCATGTCTTCTCCTTTGGTGGCTAC
ACCTTGCGAGGGAGCTCCATCTTCGGGTGGCCCCCAGCAAGGCTCAGGACAGCAAAGC
CTACACGTCCATCCTGTACGGCAATGGCCCGGGCTACGTGTTCAACTCAGGCGTGCGACC
AGACGTGAATGAGAGCGAGAGCGGGAGCCCCGATTACCAGCAGCAGGCGGCGGTGCC
CTGTCTGCCGAGACCCACGGAGGCGAAGACGTGGCGGTGTTTGC GCGCGGCCCGCAGGC
GCACCTGGTGCATGGTGTGCAGGAGCAGAGCTTCGTAGCGCATGTCATGGCCTTCGCTGC
CTGTCTGGAGCCCTACACGGCCTGCGACCTGGCGCCTCCCGCCTGCACCACCGACGCCGC
GCACCCAGTTGCCGCGTGCCTGCCACTGCTGGCCGGGACCTGCTGCTGCTGGGGGCGTC
CGCTGCTCCCTGATTTACTAAACCTTGAAATAAAATTGTAAACATCAGTTTGAAGG
CCTGACTCTCAGGGTAGTTCTTTTAAATTCTGGGTTT

具有来自bIAP I的第一内含子的bIAP IV(以粗体和下划线示出)- SEQ ID NO: 14

ATGCAGTGGGCCTGTGTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGTGGCTACAGCTCTCCCTCACCTTC
ATCCAGGTAATCAGGCGGCTCCCAGCAGCCCCACTCAGAGGGGCGGCTCTAGGC
TGACCTGACCAACACTCTCCCTTGGGCAGCTGAGGAGGAAGACCCCGCCTTCTGGAA
CCGCCAGGCAGCCCAGGCCCTTGATGTAGCCAAGAAGTTGCAGCCGATCCAGACAGCTG
CCAAGAATGTCATCCTCTTCTTGGGGGATGGGATGGGGGTGCCTACGGTGACAGCCACTC
GGATCCTAAAGGGGCAGATGAATGGTAAGCTGGGACCTGAGACACCCCTGGCCATGGAC
CAGTCCCATACGTGGCTCTGTCCAAGACATAACAAGTGGACAGACAGGTGCCAGACAG
CGCAGGCACTGCCACTGCCTACCTGTGTGGGGTCAAGGGCAACTACAAAACCATTTGGTG
TAAGTGCAGCCGCCGCTACAACAGTGCAACACAACAAGTGGCAATGAGGTACGCTCT
GTGATGAACCGGGCCAAGAAAGCAGGAAAGTCAGTGGGAGTGGTGACCACCTCCAGGG
TGCAGCATGCCTCCCCAGCCGGTGCTTATGCACACACGGTGAACCGAAACTGGTACTCAG
ATGCCGACCTGCCTGCCGATGCACAGACGTATGGCTGCCAGGACATCGCCACACAAGTG
GTCAACAACATGGATATTGACGTGATCCTGGGTGGAGGCCGAATGTACATGTTTCTGAG
GGGACCCCGGATCCTGAATACCCATACGATGTCAATCAGACTGGAGTCCGGAAGGACAA
GCGGAATCTGGTGCAGGAGTGGCAGGCCAAGCACCAGGGAGCCCAGTATGTGTGGAACC
GCACGGAGCTCCTTCAGGCAGCCAATGACCCAGTGTAACACACCTCATGGGCCTCTTTG
AGCCGGCAGACATGAAGTATAATGTTTCAGCAAGACCCACCAAGGACCCGACCCTGGAG
GAGATGACGGAGGCGGCCCTGCAAGTGCTGAGCAGGAACCCCGAGGGCTTCTACCTCTT
CGTGGAGGGAGGCCGCTTACCACGGTACCATGAAGGCAAAGCTTATATGGCACTGA
CTGATACAGTCATGTTTGACAATGCCATCGCCAAGGCTAACGAGCTCACTAGCGAACTGG
ACACGCTGATCCTTGCCACTGCAGACCACTCCCATGTCTTCTTTTGGTGGCTACACACT
GCGTGGGACCTCCATTTTCGGTCTGGCCCCCAGCAAGGCCTCAGACAACAAGTCTACAC
CTCCATCCTCTATGGCAATGGCCCTGGCTACGTGCTTGGTGGGGGCTTAAGGCCCGATGT
TAATGACAGCATAAGCGAGGACCCCTCGTACCGGCAGCAGGCGGCCGTGCCCTGTCTA
GTGAGTCCCACGGGGGCGAGGACGTGGCGGTGTTTCGCGCAGGGCCCGCAGGCGCACCTG
GTGCACGGCGTGACAGGAGGAGACCTTCGTGGCGCACGTGTCATGGCCTTTGCGGGCTGCGT
GGAGCCCTACACCGACTGCAATCTGCCGGCCCCCTCTGGCCTCTCCGACGCCGCGCACCT
GGCGGCCAGCCCGCCTTCGCTGGCGCTGCTGGCCGGGCGATGCTGCTGCTGCTGGCGCC
TGCCCTGTACTGA

图1 (续)

具有来自bIAP I的3' UTR的bIAP IV(以粗体和下划线示出)- SEQ ID NO: 15

ATGCAGTGGGCCTGTGTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGTGGCTACAGCTCTCCCTCACCTTC
ATCCCAGCTGAGGAGGAAGACCCCGCCTTCTGGAACCGCCAGGCAGCCCAGGCCCTTGA
TGTAAGCAAGAAGTTGCAGCCGATCCAGACAGCTGCCAAGAATGTCATCCTCTTCTTGGG
GGATGGGATGGGGGTGCCTACGGTGACAGCCACTCGGATCCTAAAGGGGCAGATGAATG
GTAAGCTGGGACCTGAGACACCCCTGGCCATGGACCAGTTCCTACATGCTGGCTCTGTCCA
AGACATACAACGTGGACAGACAGGTGCCAGACAGCGCAGGCAGTGCCTACCTG
TGTGGGGTCAAGGGCAACTACAAAACCATTTGGTGTAAAGTGCAGCCGCCCGCTACAACCA
GTGCAACACAACAAGTGGCAATGAGGTACGTCTGTGATGAACCGGGCCAAGAAAGCAG
GAAAGTCAGTGGGAGTGGTGACCACCTCCAGGGTGCAGCATGCCTCCCCAGCCGGTGTCT
TATGCACACACGGTGAACCGAAACTGGTACTCAGATGCCGACCTGCCTGCCGATGCACA
GACGTATGGCTGCCAGGACATCGCCACACAACCTGGTCAACAACATGGATATTGACGTGA
TCCTGGGTGGAGGCCGAATGTACATGTTTCCTGAGGGGACCCCGGATCCTGAATACCCAT
ACGATGTCAATCAGACTGGAGTCCGGAAGGACAAGCGGAATCTGGTGCAGGAGTGGCAG
GCCAAGCACCAGGGAGCCCAGTATGTGTGGAACCGCACGGAGCTCCTTCAGGCAGCCAA
TGACCCAGTGTAACACACCTCATGGGCCTCTTTGAGCCGGCAGACATGAAGTATAATGT
TCAGCAAGACCCACCAAGGACCCGACCTGGAGGAGATGACGGAGGCGGCCCTGCAA
GTGCTGAGCAGGAACCCCGAGGGCTTCTACCTCTTCGTGGAGGGAGGCCGCATTGACCA
CGGTCACCATGAAGGCAAAGCTTATATGGCACTGACTGATACAGTCATGTTTGACAATGC
CATCGCCAAGGCTAACGAGCTCACTAGCGAACTGGACACGCTGATCCTTGCCACTGCAG
ACCACTCCCATGTCTTCTCTTTTGGTGGCTACACACTGCGTGGGACCTCCATTTTCGGTCT
GGCCCCAGCAAGGCCTCAGACAACAAGTCCCTACACCTCCATCCTCTATGGCAATGGCCC
TGGCTACGTGCTTGGTGGGGGCTTAAGGCCCGATGTTAATGACAGCATAAGCGAGGACC
CCTCGTACCGGCAGCAGGCGGCCGTGCCCTGTCTAGTGAGTCCACGGGGGCGAGGAC
GTGGCGGTGTTTCGCGCGAGGGCCCGCAGGCGCACCTGGTGCACGGCGTGCAGGAGGAGAC
CTTCGTGGCGCACGTATGGCCTTTGCGGGCTGCGTGGAGCCCTACACCGACTGCAATCT
GCCGGCCCCCTCTGGCCTCTCCGACGCCGCGCACCTGGCGGCCAGCCCGCCTTCGCTGGC
GCTGCTGGCCGGGGCGATGCTGCTGCTGCTGGCGCCTGCCTTGTACTGAGGGGACCCGG
GGGTGGGGACACAGGCCCCCGCCCTCCCTGGGAGGCAGGAAGCAGCTCTCAAATAA
ACTGTTCTAAGTATGATACAGGAGTGATACATGTGTGAAGAGAAGCCCTTAGGTGG
GGGCACAGAGTGTCTGGGTGAGGGGGGTGAGGGTCACATCAGGAGGTTAGGGAGG
GGTTGATGAAGGGCTGACGTTGAGCAAAGACCAAAGGCAACTCAGAAGGACAGTG
GTGCAGGACTGGGTGTGGTCAGCAGGGGGACTGGTTGGGGGATCC

枯草芽孢杆菌JH642碱性磷酸酶 IV，成熟蛋白核苷酸序列 - SEQ ID NO: 16

AAAAAACAAGACAAAGCTGAGATCAGAAATGTCATTGTGATGATAGGCGACGGCATGG
GGACGCCTTACATAAGAGCCTACCGTTCCATGAAAAATAACGGTGACACACCGAATAAC
CCGAAGTTAACAGAATTTGACCGGAACCTGACAGGCATGATGATGACGCATCCGGATGA
CCCTGACTATAATATTACAGATTACAGCAGCAGCCGGAACAGCATTAGCGACAGGCGTTA
AGACATATAACAATGCAATTGGCGTCGATAAAAACGGAAAAAAAGTGAAATCTGTACTT
GAAGAGGCCAAACAGCAAGGCAAGTCAACAGGGCTTGTCGCCACGTCTGAAATTAACCA
CGCCACTCCAGCCGCATATGGCGCCCAATGAATCACGGAAAAACATGGACCAATCG
CCAACAGCTATATGGATGACAAGATAAAAGGCAAAACATAAAATAGACGTGCTGCTCGGC
GGCGGAAAAATCTTATTTTAACCGCAAGAACAGAACTTGACAAAGGAATTCAAACAAGC
CGGCTACAGCTATGTGACAACTAAACAAGCATTGAAAAAAATAAAGATCAGCAGGTGC
TCGGGCTTTTCGAGATGGAGGGCTTGCTAAAGCGCTCGACCGTGACAGTAAACACCG
TCTCTCAAAGACATGACGGTTTCAG

图1(续)

CAATTGATCGCCTGAACCAAAATAAAAAAGGATTTTTCTTGATGGTCGAAGGGAGCCAG
ATTGACTGGGCGGCCCATGACAATGATACAGTAGGAGCCATGAGCGAGGTTAAAGATTT
TGAACAGGCCTATAAAGCCGCGATTGAATTTGCGAAAAAAGACAAACATACACTTGTGA
TTGCAACTGCTGACCATAACAACCGGCGGCTTTACCATTGGCGCAAACGGGGAAAAGAAT
TGGCACGCAGAACCGATTCTCTCCGCTAAGAAAACACCTGAATTCATGGCCAAAAAAT
CAGGAAGGCAAGCCGGTTAAAGATGTGCTCGCCCGCTATGCCAATCTGAAAGTCACATC
TGAAGAAATCAAAGCGTTGAAGCAGCTGCACAGGCTGACAAAAGCAAAGGGGCCTCC
AAAGCCATCATCAAGATTTTAAATACCCGCTCCAACAGCGGATGGACGAGTACCGATCAT
ACCGGCGAAGAAGTACCGGTATACGCGTACGGCCCCGAAAAAGAAAAATTCCGCGGATT
GATTAACAATACGGACCAGGCAAACATCATATTTAAGATTTTAAAACTGGAAAA

枯草芽孢杆菌JH642碱性磷酸酶 IV，成熟蛋白氨基酸序列 - SEQ ID NO: 17

KKQDKAEIRNVIVMIGDGMGTPYIRAYRSMKNNGDTPNNPKLTEFDRNLTGMMMTHPDDP
DYNITDSAAAGTALATGVKTYNNAIGVDKNGKKVKSLEEAKQQGKSTGLVATSEINHATP
AAYGAHNSRKNMDQIANSYMDDKIKGKHKIDVLLGGGKSYFNRKNRNLKEFKQAGYSY
VTTKQALKKNKDQQLGLFADGGLAKALDRDSKTPSLKDMTVSAIDRLNQKKGGFFLMVE
GSQIDWAAHDNDTVGAMSEVKDFEQAYKAAIEFAKKDKHTLVIATADHTTGFTIGANGEK
NWAEPILSAKKTPEFMAKKISEGKPKVDLARYANLKVTSEEIKSVEAAAQADKSKGASK
AIIKIFNTRSNSGWTSTDHTGEEVPVYAYGPGKEKFRGLINNTDQANIIFKILKTGK

具有终止密码子而没有前导序列的BIAP II (SYN-020) - SEQ ID NO: 39:

LIPAEENPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKGQMNG
KLGPETPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNYRTIGVSAAARYNQC
NTTRGNEVTSVINRAKKAGKAVGVVTTTRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSADLPADAQK
NGCQDIAAQLVYNMDIDVILGGGRMYMFPEGTPDPEYPDDASVNGVRKDKQNLVQEWQAK
HQGAQYVWNRTALLQAADDSSVTHLMGLFEPADMKYNVQQDHTKDPTLAEMTEAALQVL
SRNPRGFYLFVEGGRIDHGHHDGKAYMALTEAIMFDNAIAKANELTSSELDLILVTADHSHV
FSFGGYTLRGTSIFGLAPGKALDSKSYTSILYGNPGYALGGGSRPDVNGSTSEEPSYRQQA
VPLASETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEETFVAHIMAFAGCPEPYTDCNLPAPATATSIP
D

图1 (续)

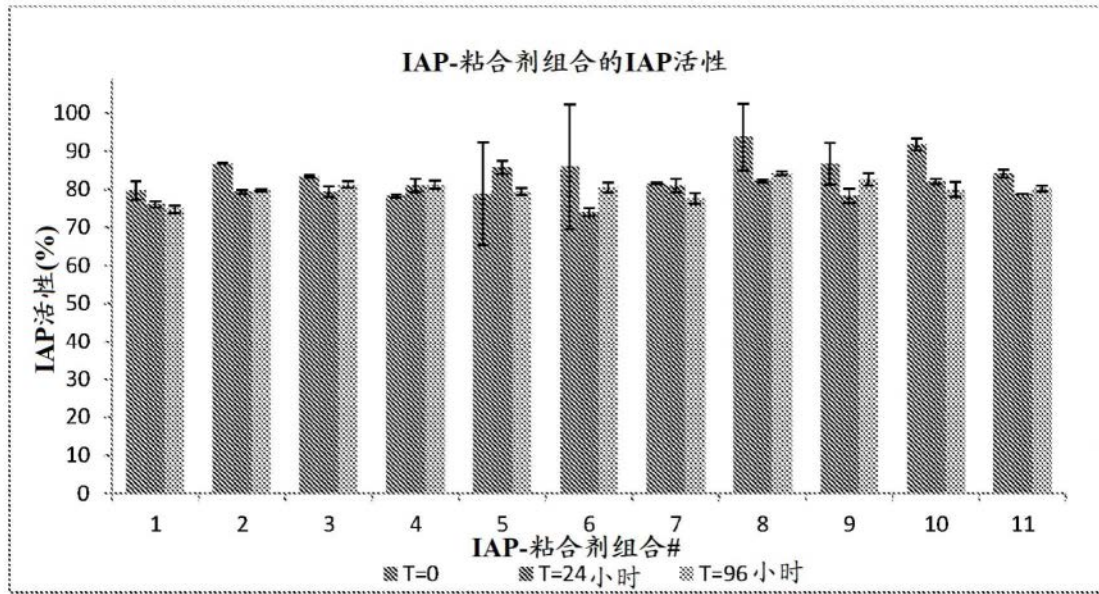


图2

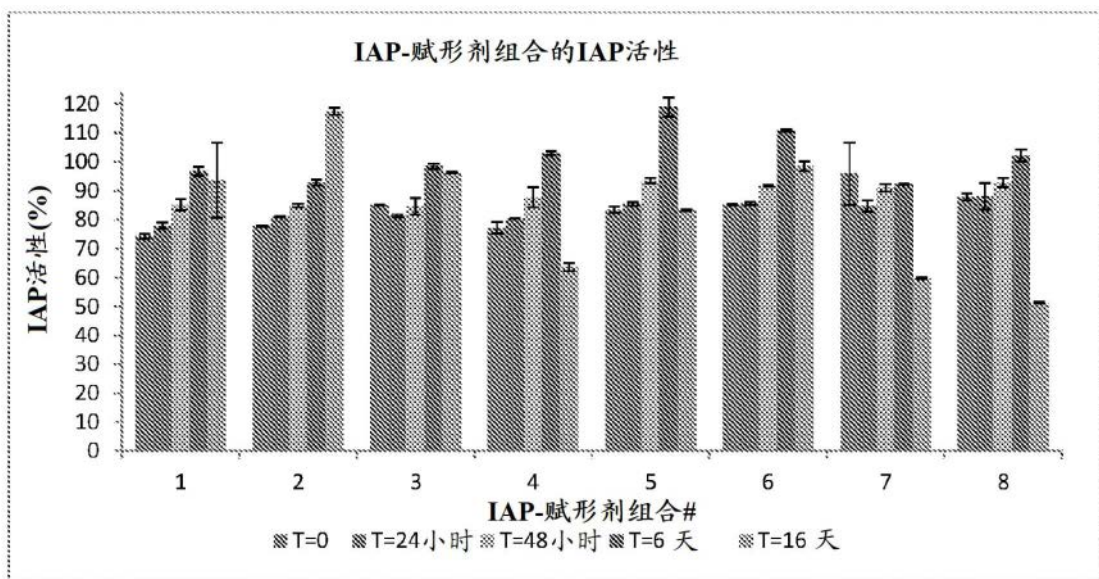


图3

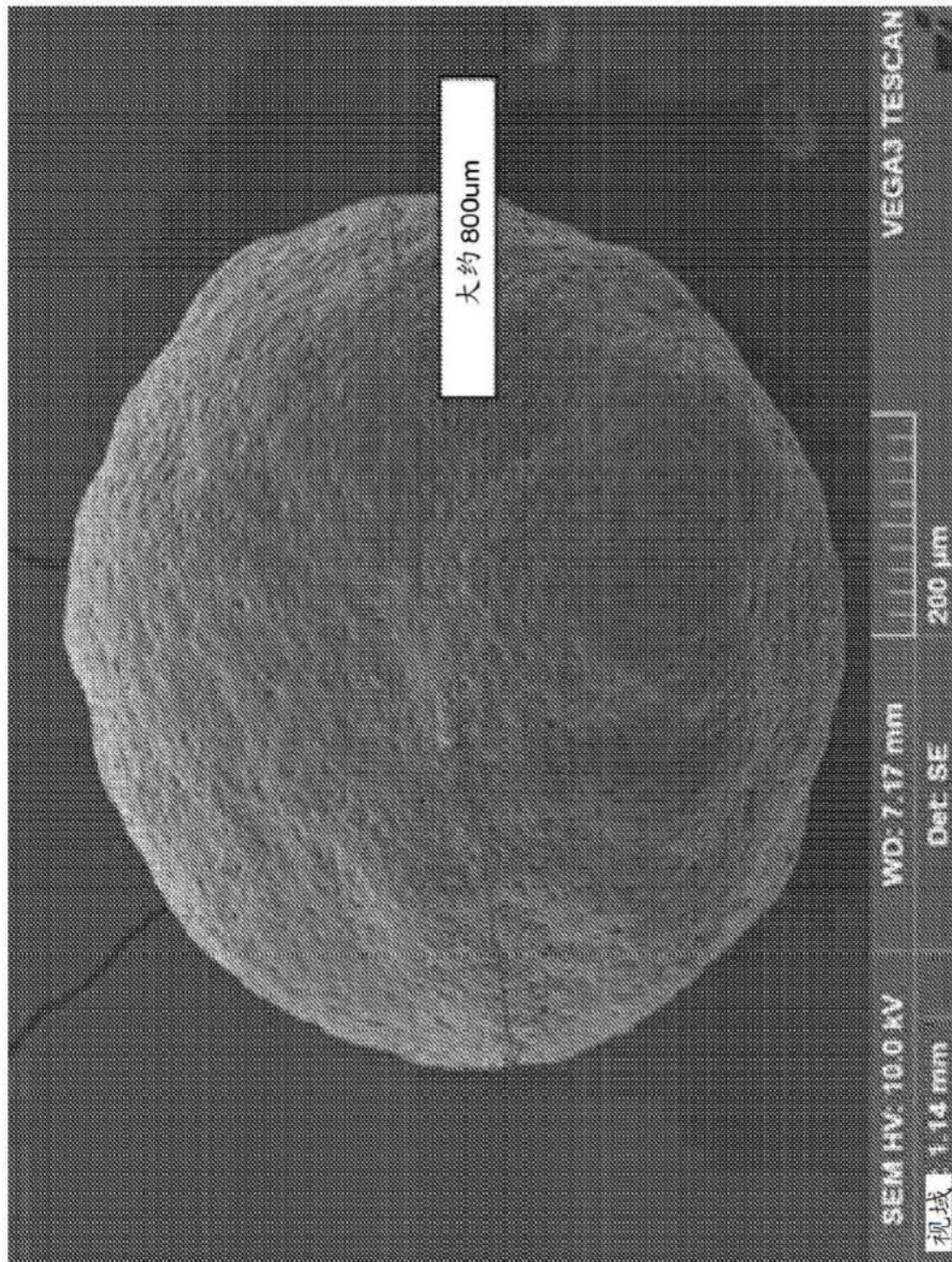


图4

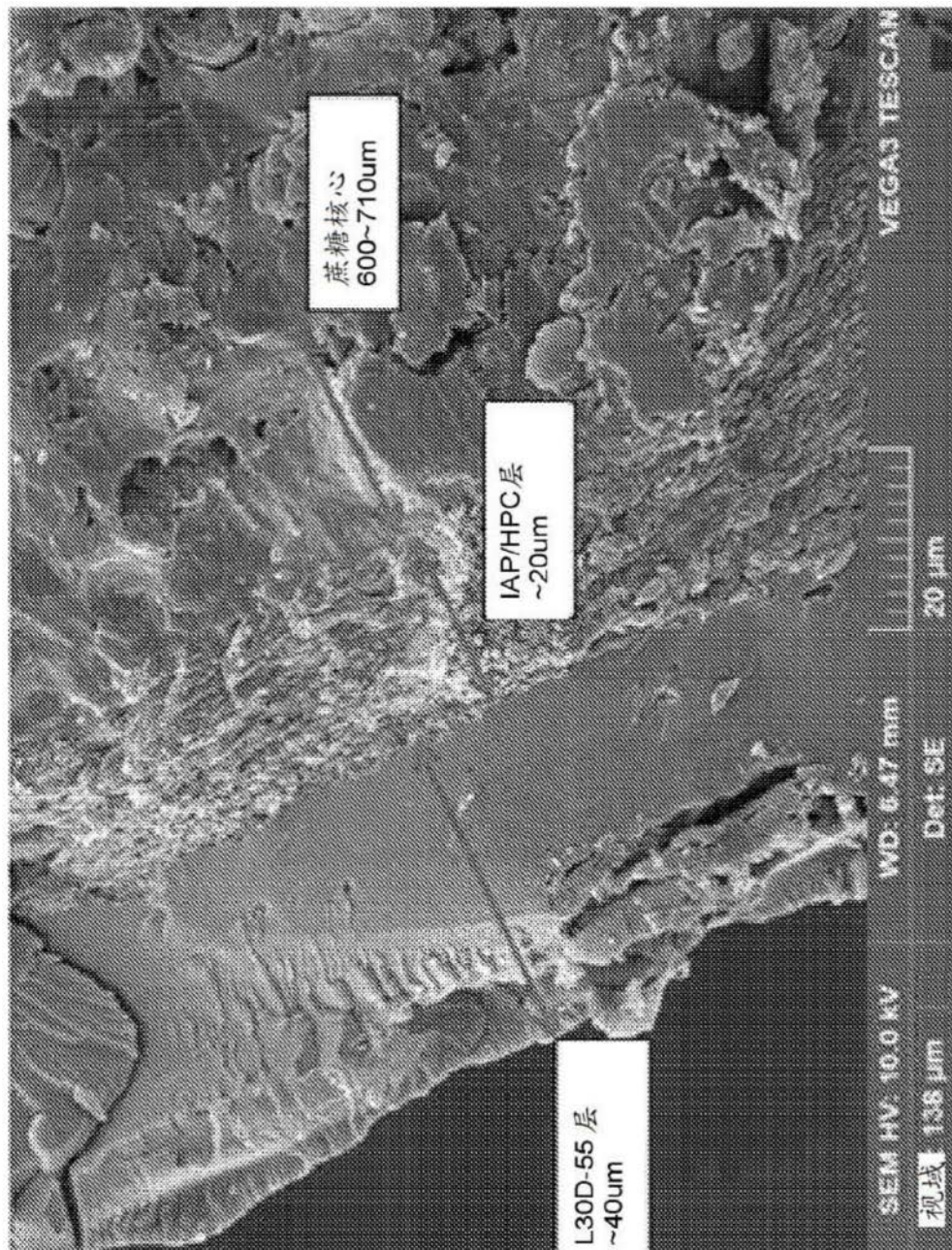


图5

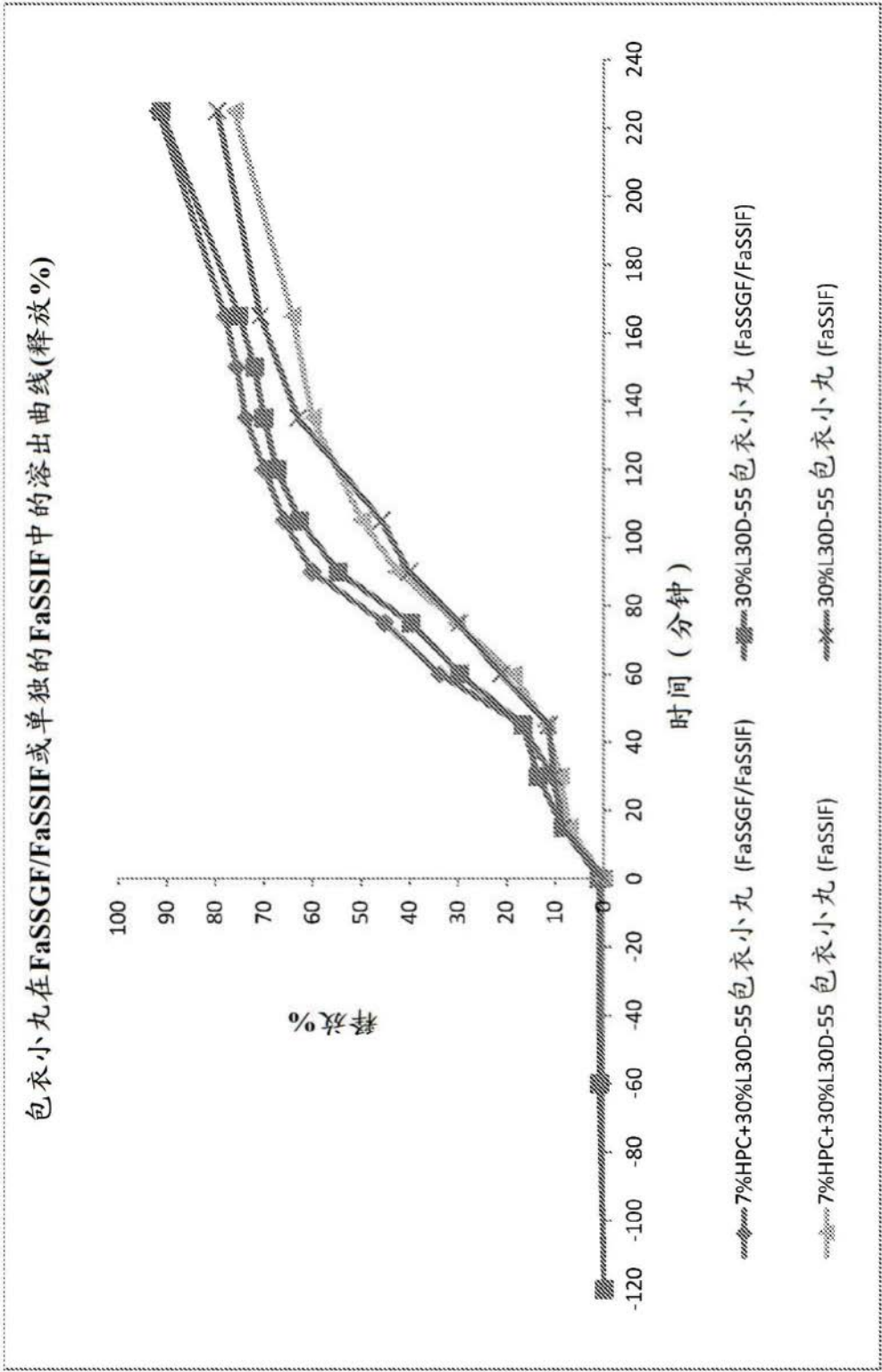


图6

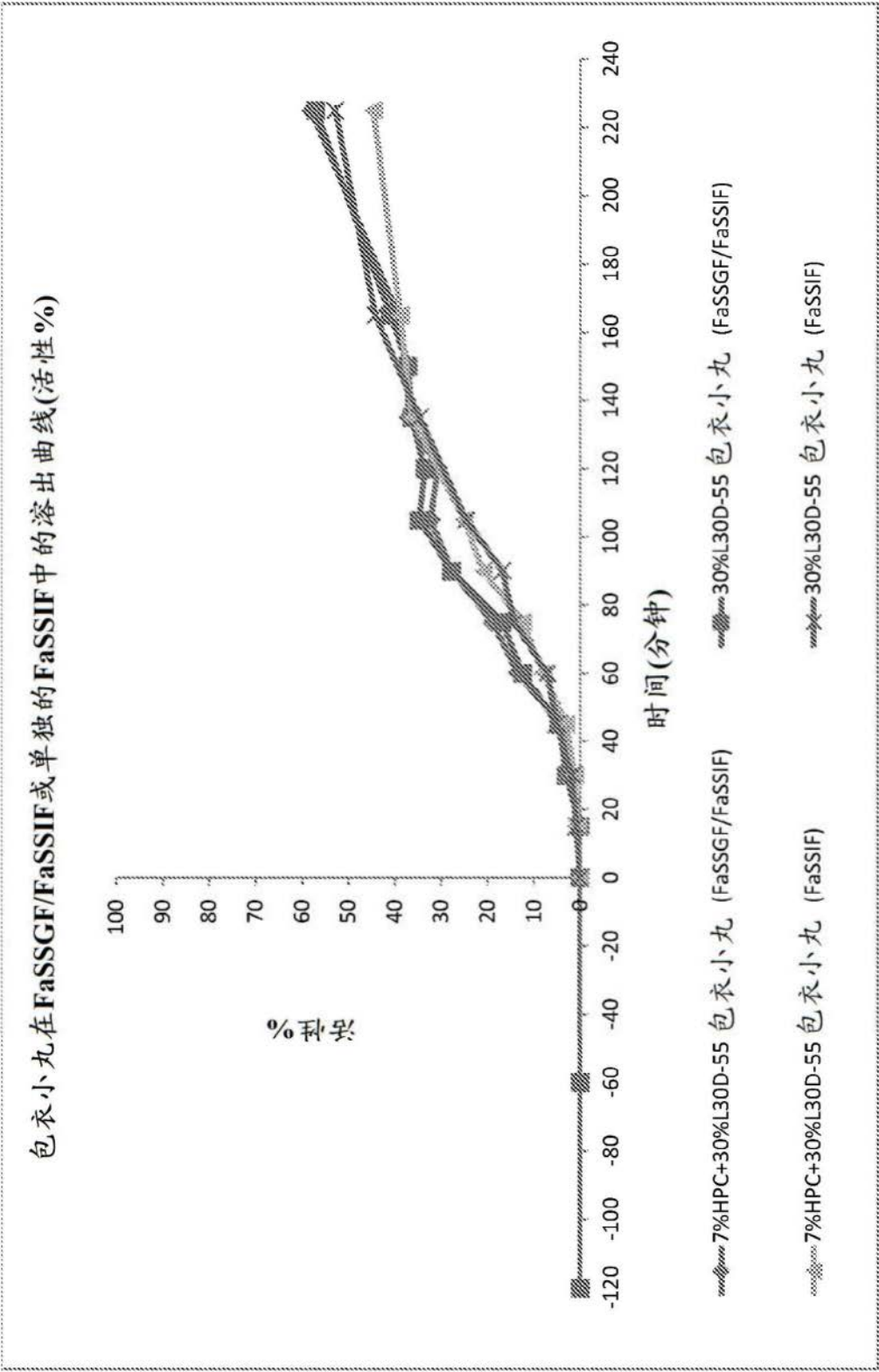


图7

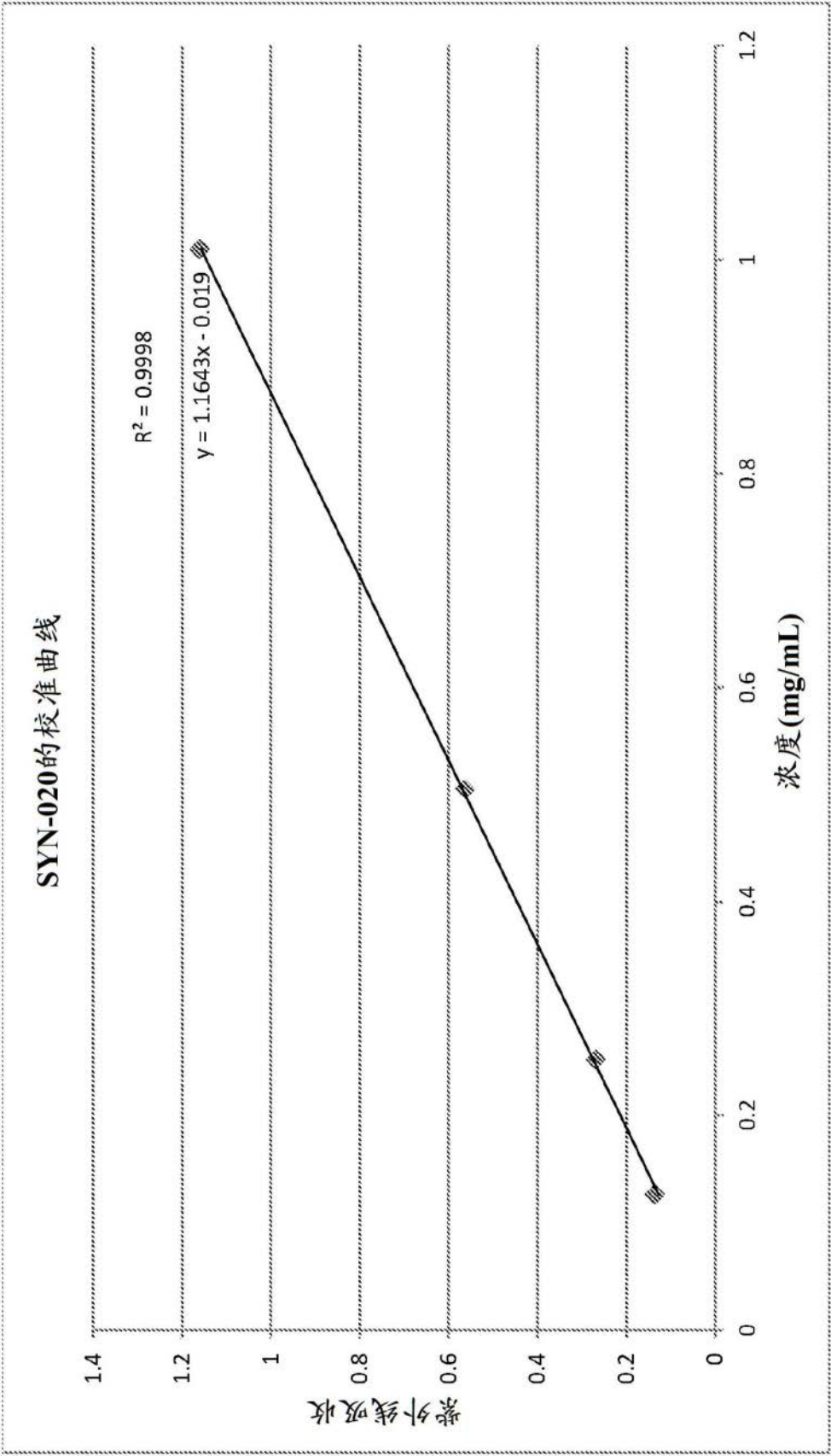


图8

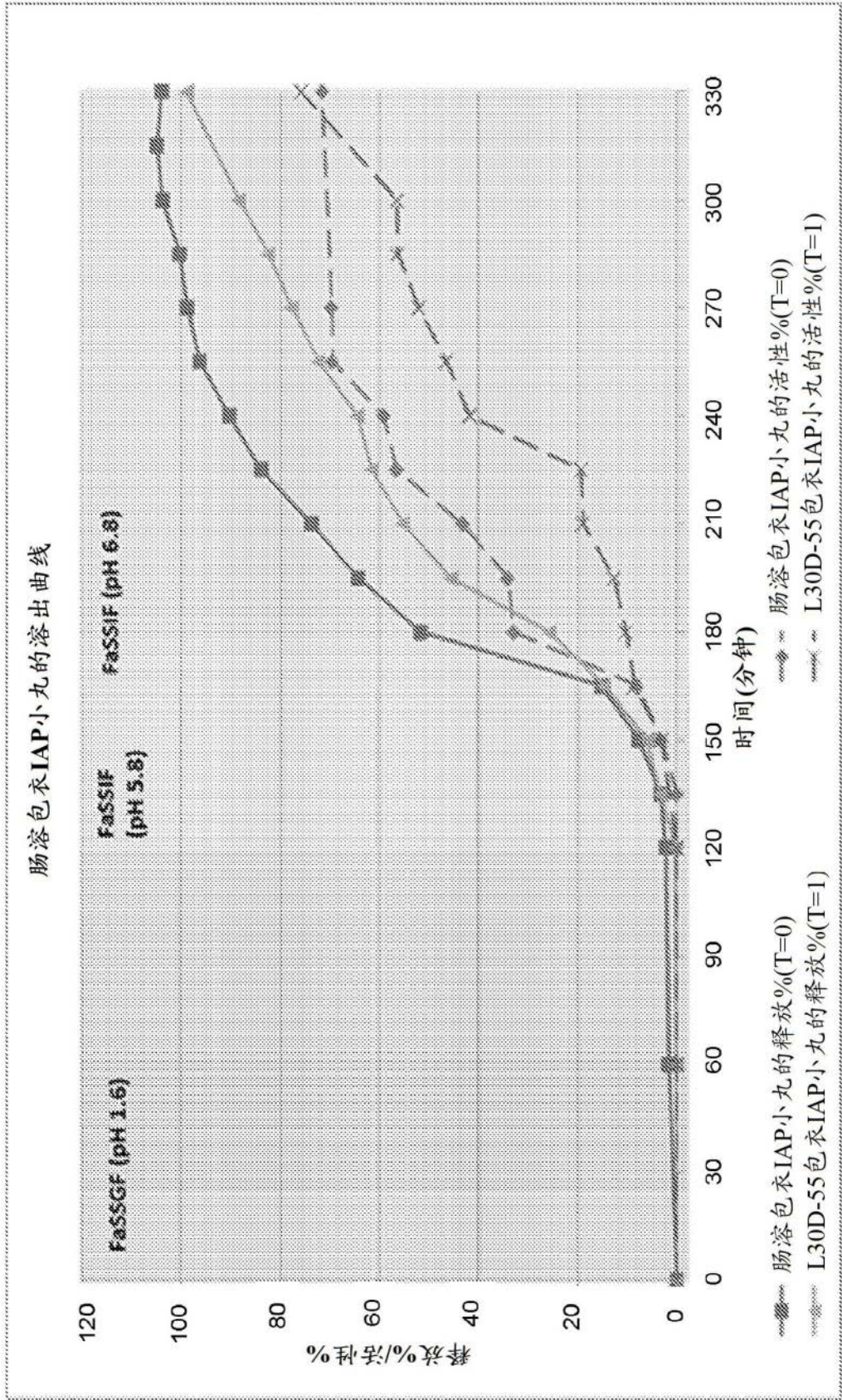


图9

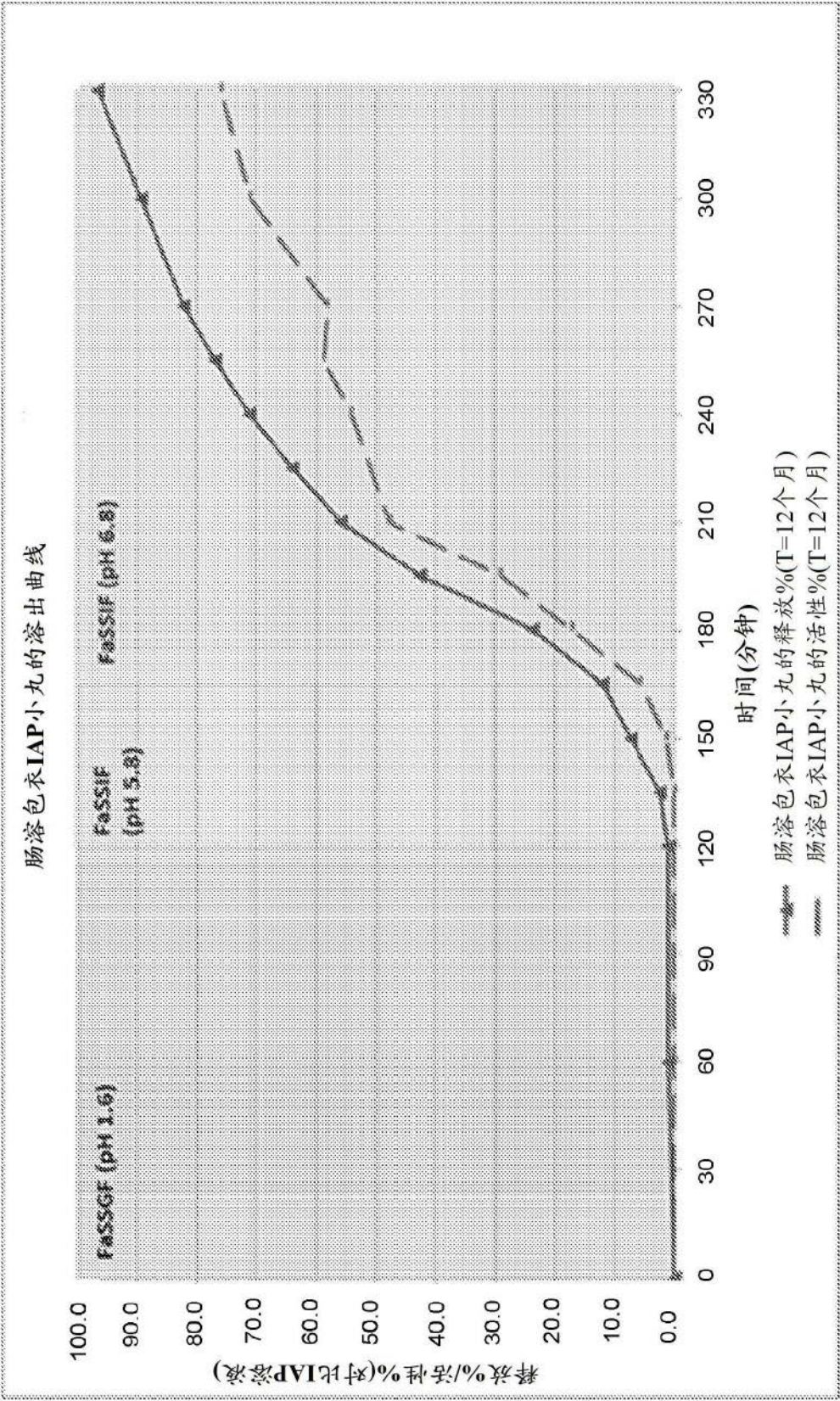


图10

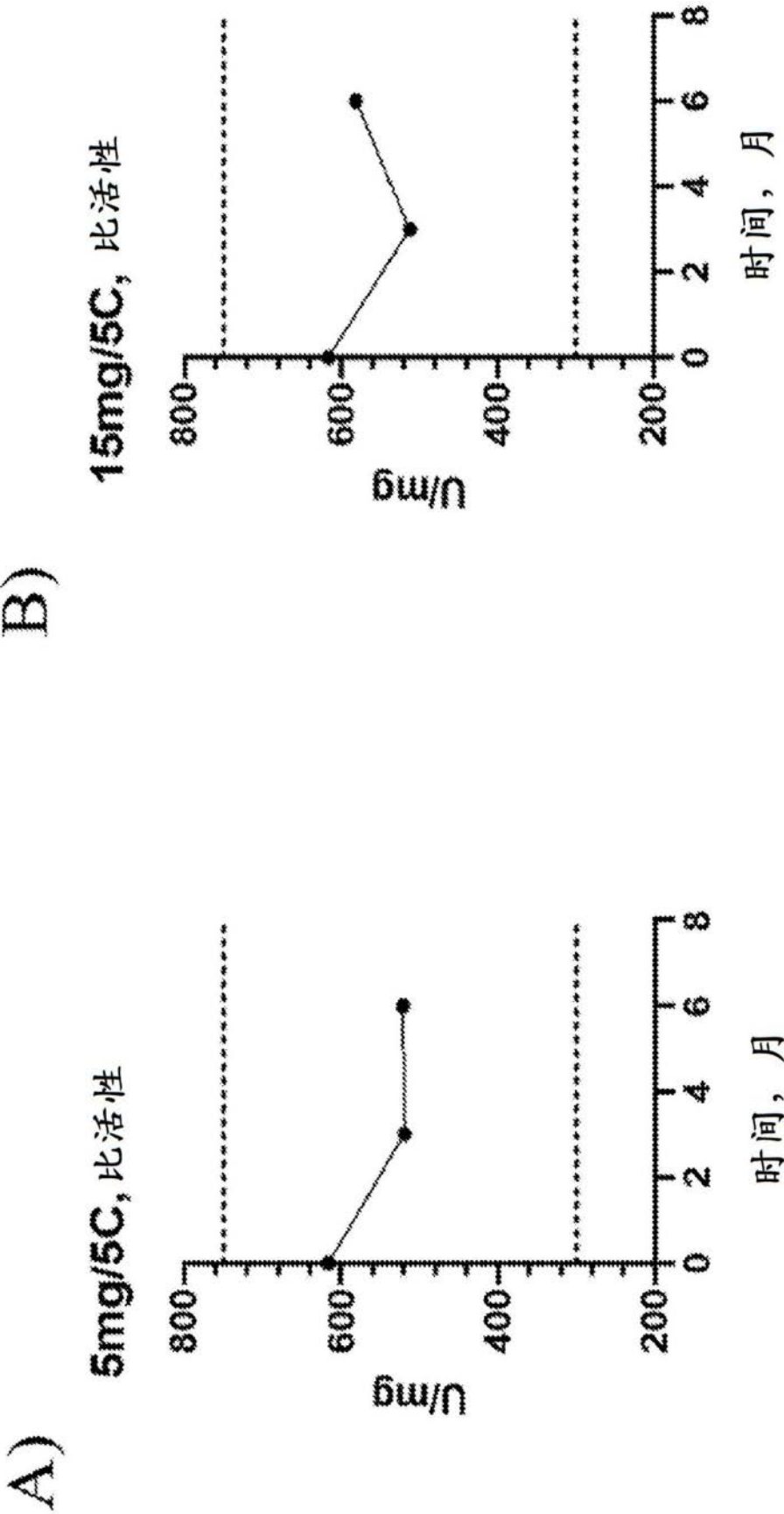


图11

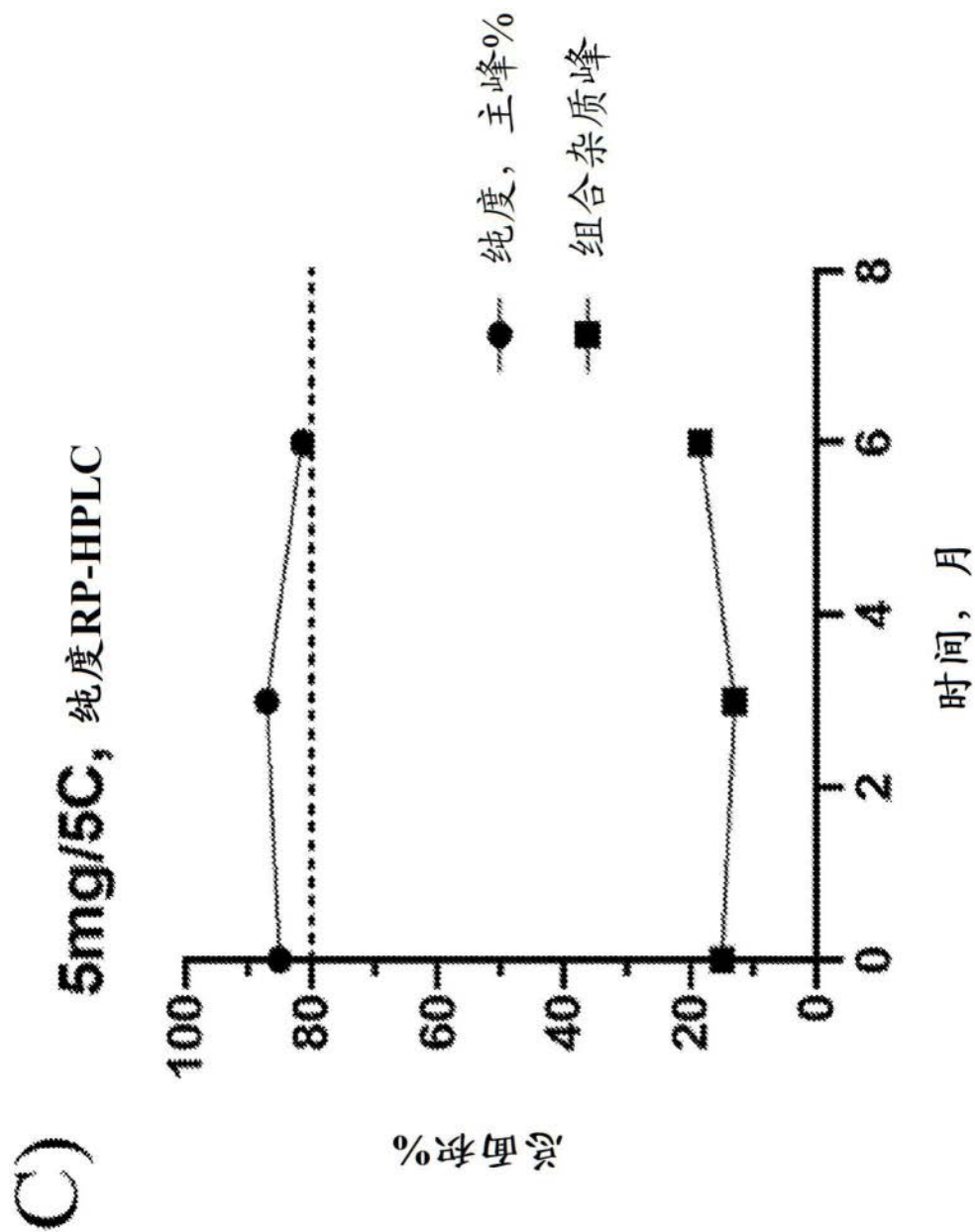


图11(续)

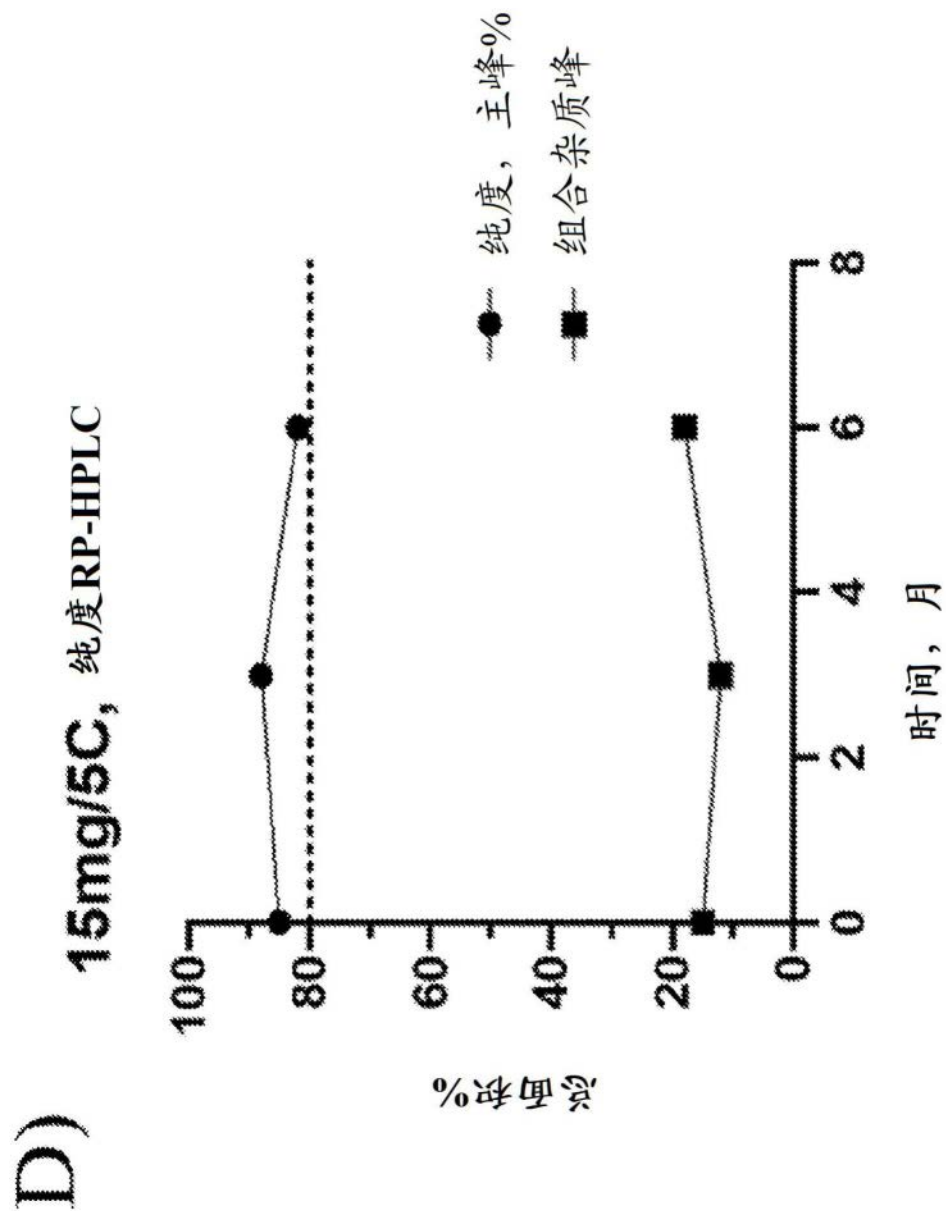


图11(续)

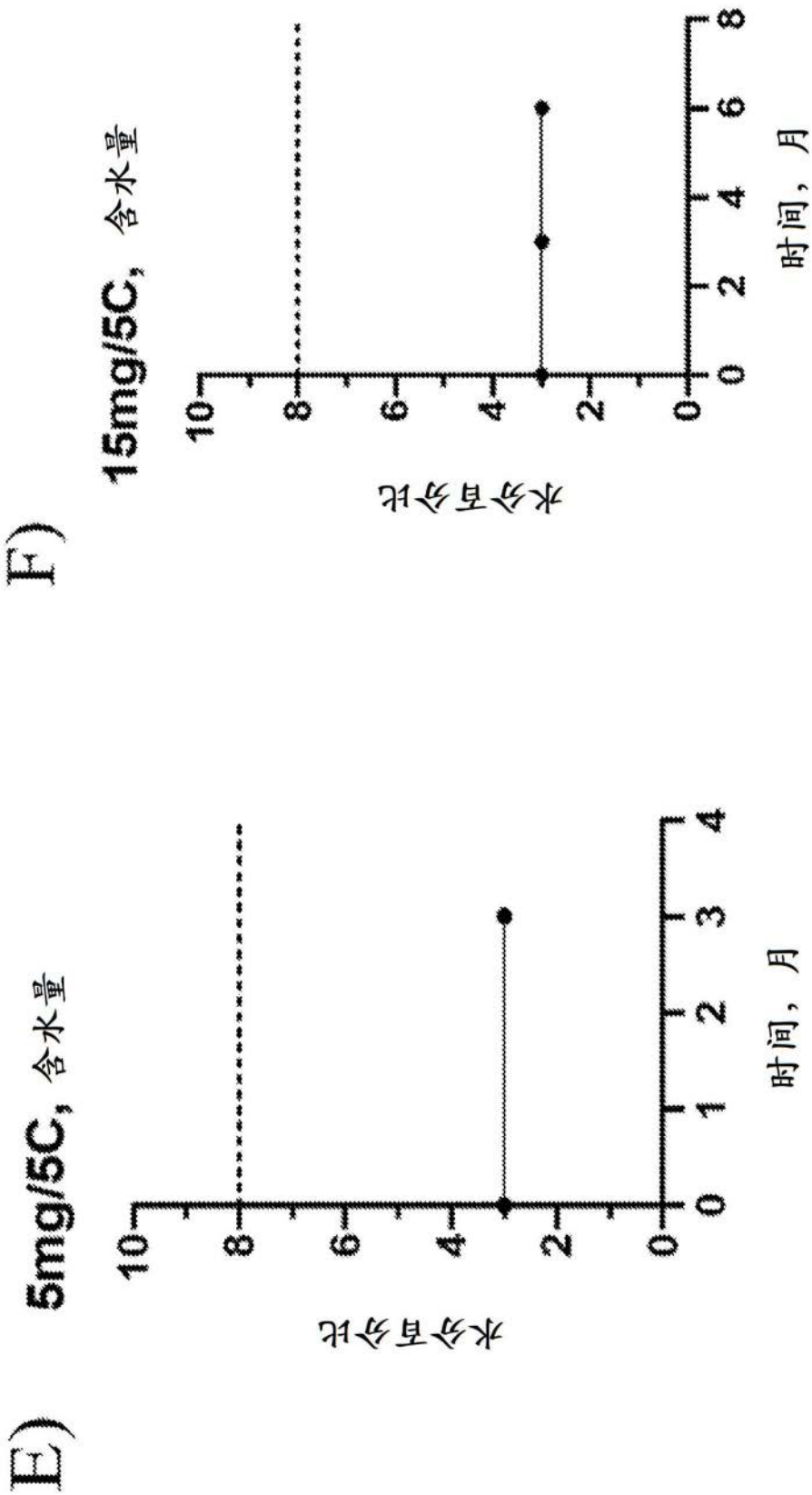


图11(续)

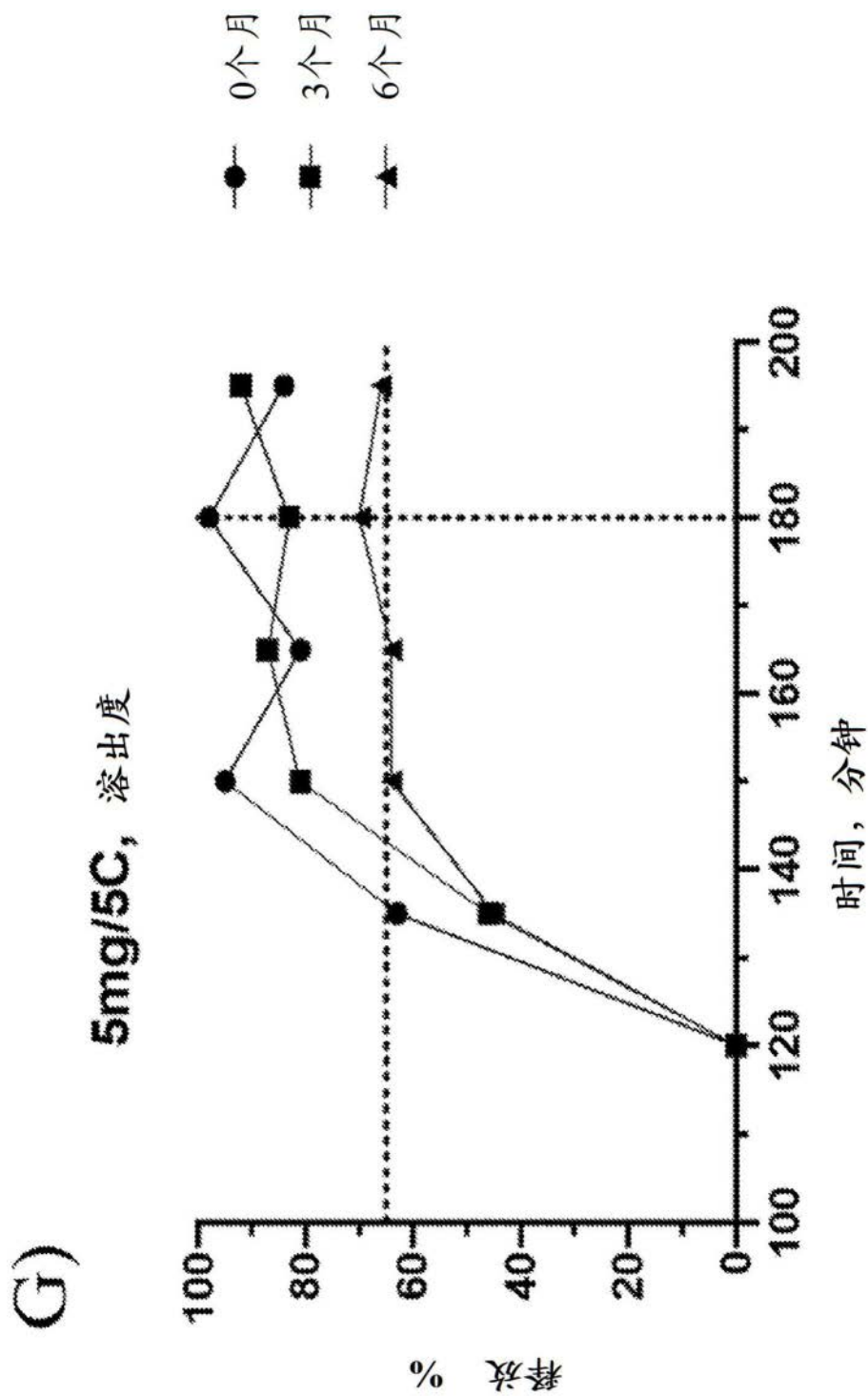


图11(续)

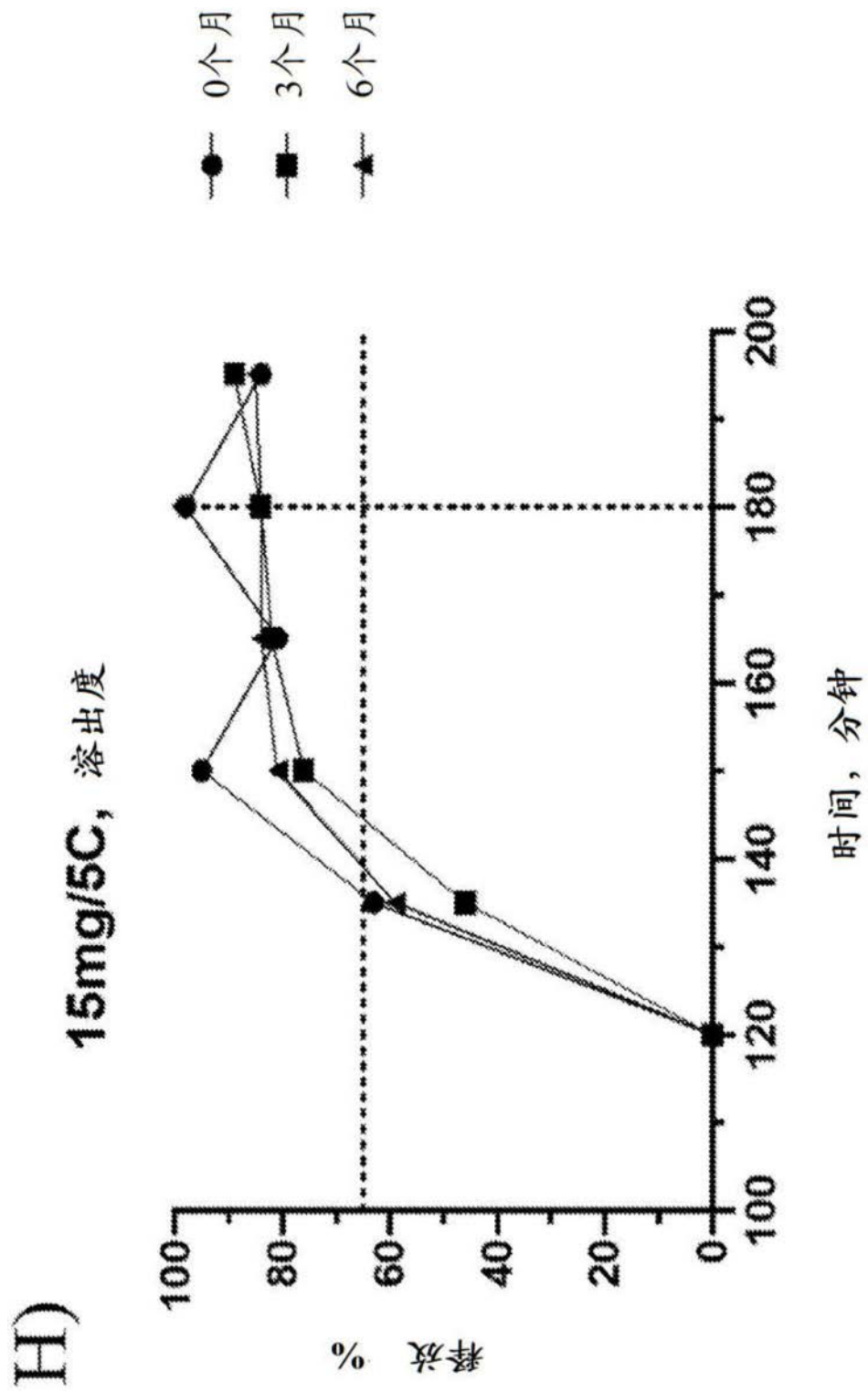


图11(续)