



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114181281 A

(43) 申请公布日 2022.03.15

(21) 申请号 202111595612.6

C07K 5/11 (2006.01)

(22) 申请日 2016.04.11

A61K 38/08 (2019.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/10 (2006.01)

62/160,173 2015.05.12 US

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 13/12 (2006.01)

201680024300.0 2016.04.11

A61P 11/00 (2006.01)

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·赛基亚 M·巴克

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

11713

代理人 王思琪 刘小立

(51) Int.Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书62页

C07K 7/08 (2006.01)

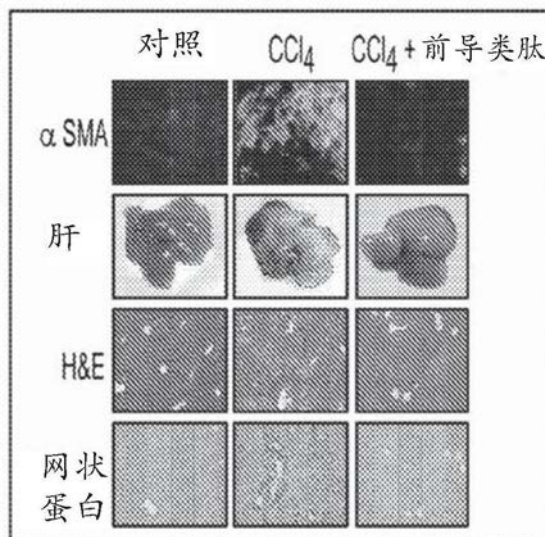
序列表3页 附图34页

(54) 发明名称

用于炎症和纤维化的肽治疗

(57) 摘要

本申请涉及用于炎症和纤维化的肽治疗。特别地,本申请涉及在C/EBP β 的磷酸受体结构域中抑制氨基酸的磷酸化的肽,以及其用于治疗炎症和纤维化的用途。



1. 一种分离肽,所述分离肽选自由以下组成的组:Lys-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser-Asp (SEQ ID NO:3),Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser (SEQ ID NO:4)和Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His (SEQ ID NO:5),其每一个都包含氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp,其中在所述氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp内的Ala和/或Val是D-氨基酸,并且其中所述肽能够在苏氨酸266 (Thr 266)处抑制人类CCAAT/增强子结合蛋白-β(C/EBPβ)的磷酸化。

2. 如权利要求1所述的肽,其中所述肽是Lys-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser-Asp (SEQ ID NO:3)。

3. 如权利要求1所述的肽,其中所述肽是Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser (SEQ ID NO:4)。

4. 如权利要求1所述的肽,其中所述肽是Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His (SEQ ID NO:5)。

5. 如权利要求4所述的肽,其中所述肽能够抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞炎性体的激活。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的肽,其中所述肽进一步包含聚乙二醇(PEG)。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的肽,其中所述肽进一步包含酸(Ac)或巯基丙酸(Mpr)的接头。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的肽,其中所述肽的羧基末端基团是OH、OCH₃或NH₂基团。

9. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-8中任一项所述的一种或多种肽和药学上可接受的载体。

10. 如权利要求9所述的药物组合物,其中所述一种或多种肽以有效抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞炎性体的激活的量存在。

11. 如权利要求1-8中任一项所述的一种或多种肽或如权利要求9或10所述的药物组合物在制备用于在有需要的受试者中抑制组织纤维化的药物中的用途。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述组织纤维化与肝损伤或肝炎症相关。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述组织纤维化与肺损伤或肺炎症相关。

14. 如权利要求11所述的用途,其中所述组织纤维化与肾损伤或肾炎症相关。

15. 如权利要求11所述的用途,其中所述组织是在肝、肺或肾中。

16. 如权利要求1-8中任一项所述的一种或多种肽或如权利要求9或10所述的药物组合物在制备用于在有需要的受试者中抑制巨噬细胞和/或T细胞炎症的药物中的用途。

17. 如权利要求1-8中任一项所述的一种或多种肽或如权利要求9或10所述的药物组合物在制备用于在有需要的受试者中治疗组织纤维化疾病的药物中的用途。

18. 如权利要求17所述的用途,其中所述疾病与肝损伤、肝炎症和/或肝纤维化相关。

19. 如权利要求17所述的用途,其中所述疾病是任何病因的肝硬化或肝纤维化。

20. 如权利要求18所述的用途,其中所述疾病选自下组,该组由以下各项组成:非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、酒精性脂肪肝病、酒精性脂肪性肝炎、肝性脂肪变性、自身免疫性肝炎、慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化、继发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、α-1-抗胰蛋白酶缺乏、威尔逊氏症和胆道闭锁。

21. 如权利要求17所述的用途,其中所述疾病与肺损伤、肺炎症和/或肺纤维化相关。
22. 如权利要求21所述的用途,其中所述疾病选自由以下组成的组:特发性肺纤维化、放射性诱导的肺炎、慢性阻塞性肺病和肺气肿。
23. 如权利要求17所述的用途,其中所述疾病与肾损伤、肾炎症和/或肾纤维化相关。
24. 如权利要求23所述的用途,其中所述疾病是肾小球肾炎或小管间质纤维化。
25. 如权利要求17所述的用途,其中所述疾病选自由以下组成的组:继发于烧伤的皮肤纤维化、瘢痕疙瘩、肥厚性手术后伤口、硬皮病、继发于腐蚀性物质的食管或胃肠道纤维化、继发于炎性疾病的食管或胃肠道纤维化、继发于缺血性疾病的纤维化、腹膜纤维化、胰腺纤维化、照射后纤维化、继发于梗死的心肌纤维化、继发于缺血或梗死的脑纤维化、创伤后脑纤维化、创伤后肌肉纤维化和滑膜/关节纤维化。
26. 如权利要求1-8中任一项所述的一种或多种肽或如权利要求9或10所述的药物组合物在制备用于在有需要的受试者中治疗炎性疾病的药物中的用途。
27. 如权利要求26所述的用途,其中所述疾病选自下组,该组由以下各项组成:酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、自身免疫性肝炎、慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化、继发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、威尔逊氏症、胆道闭锁、特发性肺纤维化、放射性诱导的肺炎、慢性阻塞性肺病、肺气肿、肺慢性感染和/或炎症、肾小球肾炎、小管间质纤维化、继发于烧伤的皮肤炎症、硬皮病、银屑病、炎性肠疾病、食管损伤和/或炎症、放射后食管或胃肠道炎症、炎症性心肌病、创伤后脑部炎症、阿尔茨海默病、脑炎、脑膜炎、肌炎和关节炎。
28. 如权利要求11-27中任一项所述的用途,其中所述药物经全身给予。
29. 如权利要求11-27中任一项所述的用途,其中所述药物通过选自由以下各项组成的途径来给予:通过吸入、经局部、经舌下、经口服、或经鼻内。
30. 如权利要求11-27中任一项所述的用途,其中所述药物通过直接滴注给组织或器官来给予。
31. 如权利要求11-27中任一项所述的用途,其中所述受试者是人类。
32. 如权利要求28所述的用途,其中所述受试者是人类。
33. 如权利要求29所述的用途,其中所述受试者是人类。
34. 如权利要求30所述的用途,其中所述受试者是人类。

用于炎症和纤维化的肽治疗

[0001] 本申请是申请日为2016年4月11日,申请号为201680024300.0,发明名称为“用于炎症和纤维化的肽治疗”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年5月12日提交的美国临时专利申请号62/160,173的优先权,将其全部内容和基本内容通过引用结合在此,如同下文完全阐述一样。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有一份已经以ASCII格式电子递交的序列表并且该序列表通过引用以其全文结合在此。创建于2016年4月11日的所述ASCII副本名称为247106.000034_SL.txt并且大小为1,917字节。

技术领域

[0006] 本发明涉及抑制C/EBP β 的磷酸化的治疗性肽,以及其用于治疗炎症和纤维化的用途。

背景技术

[0007] 肝肌成纤维细胞(不同来源)的激活是慢性肝病中肝纤维化发展的原因,并且明显地,通过细胞凋亡清除肌成纤维细胞允许从肝损伤恢复和肝纤维化逆转。肝专家认为抑制或逆转不同来源的肌成纤维细胞的激活对于治疗肝纤维化是至关重要的。最后,阻断肝纤维化的进展将减少原发性肝癌的发展,因为大多数肝细胞癌出现在肝脏硬化症的肝中。

[0008] 根据NIH和WHO (32;33),肝病的影响可以每年总结如下:i)肝硬化:其死亡率在全球大约800,000人(32),并且在美国为27,000人;ii)慢性肝病:在美国有421,000人由于慢性肝病住院治疗。此外,预防肝纤维的进展并减轻肝炎症的药物可以影响患有以下疾病的患者的管理:非酒精性脂肪性肝炎(在美国影响约1000万人,并且这是全世界的“流行病”);丙型肝炎(在美国约300万人以及在全球1.7亿人患有慢性感染),乙型肝炎(在美国约100万人以及在全球35亿人患有慢性感染),以及折磨成年人的那些不太常见的慢性肝病(原发性胆汁性肝硬化;硬化性胆管炎;自身免疫性肝炎;遗传性血色病)和折磨儿童的那些不太常见的慢性肝病(包括胆道闭锁; α -1抗胰蛋白酶缺乏和其他罕见家族遗传障碍),对于这些疾病目前没有可用的治疗。

[0009] 目前没有直接抑制或逆转肝纤维化的批准药物。目前的治疗重点是管理由肝炎症和纤维化引起的并发症。在此领域临床开发的候选药物包括:a) GR-MD-02(半乳凝素治疗公司(Galectin Therapeutics Inc.)-适应症-患有晚期纤维化的NASH(脂肪肝病)患者-2期)。此药物在脂质体中递送,并靶向用于细胞凋亡的巨噬细胞,而不靶向负责纤维发生途径的肝肌成纤维细胞。由于杀死巨噬细胞可能会改变免疫平衡,因此预期会出现显著的非靶标不良反应;b) 司妥佐单抗(Simtuzumab),针对赖氨酰氧化酶-样2(LOXL2)酶的抗纤维化的单克隆抗体(吉利德科学公司(Gilead Sciences)-适应症:肝纤维化;原发性硬化性胆管炎;非酒精性脂肪性肝炎-2期)。此药物可以预防活性纤维发生的进展,但不会逆转现有的

交联的胶原纤维。此外,其可以诱导免疫原性反应。大蛋白(抗体)的功效也是一个问题,因为它必须在肝脏硬化症的肝的潜在不可接近的细胞外基质中与LOXL2相互作用;c) 奥贝胆酸(OCA)是胆汁酸类似物和法尼醇X受体(FXR)的激动剂(拦截制药公司(Intercept Pharmaceuticals)-正在开发OCA用于各种慢性肝病,这些慢性肝病包括原发性胆汁性肝硬化(PBC)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、和原发性硬化性胆管炎(PSC)-3期)。一个主要的问题是,在不存胆汁酸受体法尼醇X受体(26)的情况下,FXR的阻断与肝肿瘤的自发性发展相关;以及d) 恩利卡生(Emricasan)(中大制药公司(Conatus Pharmaceuticals)-患有炎症和/或纤维化非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的患者的非酒精性脂肪肝病(NAFLD)亚组-2期)。此药物是活性半胱天冬酶蛋白酶抑制剂。一个主要的问题是,肝细胞半胱天冬酶的延长抑制可以通过消除关键的抗肿瘤检查点(22)来促进肝细胞癌和其他器官肿瘤的发展。

[0010] 减少或预防肺纤维化的进展的药物会影响患有特发性肺纤维化(IPF)患者的保健。IPF影响全球五(5)百万人和美国200,000患者(11)。已知没有疗法可以改进患有IPF的患者的健康相关的生活质量或生存质量,并且这些患者在诊断后仅存活3至5年。

[0011] 在此领域临床开发的候选药物包括:a) 吡非尼酮(Esbriet,pirfenidone),被FDA新批准用于治疗IPF。然而,产品说明书指出“在患有轻度至中度肝损伤(Child Pugh A级和B级)的患者中应谨慎使用吡非尼酮”,以及在患有轻度、中度或重度肾损伤的那些患者中也是如此。该药物还可以导致肝酶升高;光敏反应或皮疹;肠胃失调以及在与CYP1A2的强抑制剂(例如,氟伏沙明)同时给予的情况下的药物反应;b) OFEV(尼达尼布(nintedanib))也被FDA批准用于治疗IPF。然而,关于OFEV的安全信息表描述了该治疗剂可以引起未出生婴儿的出生缺陷或死亡、肝问题、出血和肠胃失调,并且在更严重的情况下,可以引起中风和心脏病发作;c) 口服强的松(或一些其他形式的皮质类固醇)可以减轻肺炎症,并且这些症状可以显著地改进。可以将这些类固醇与其他药物组合使用。然而,对患者的效益过程(根据所看到的结果)可能是缓慢的(1-3个月),并且皮质类固醇具有显著副作用的风险;d) 富露施(Fluimucil)(N-乙酰半胱氨酸)主要用于IPF的症状缓解;然而,支持性姑息治疗可能是昂贵的;e) 环磷酰胺(cytoxan,cyclophosphamide)可以用于如下那些患者,在那些患者中类固醇疗法不能有效或是不可能的,并且该药物也可用作与皮质类固醇的组合治疗剂。该药物是免疫抑制的,并且对疗法的响应可能是缓慢的(6个月或更长),并可能存在显著的副作用(包括骨髓抑制、血液紊乱、和膀胱炎);仅举几例;以及f) 强的松、硫唑嘌呤、和N-乙酰半胱氨酸(NAC)的组合用于治疗IPF患者。然而,NAC被认为与IPF患者的死亡和住院治疗风险增加相关。

[0012] 炎症有助于大多数急性和慢性肝病的发病机制¹。与由病毒性疾病、毒性疾病、免疫性疾病、和代谢性疾病诱导的肝病相关的过度肝损伤和炎症²导致在疤痕组织的潜在沉积和肝硬化的发展中的肝功能障碍以及慢性病,这进而是受慢性肝病影响的患者的发病率和死亡率的主要原因^{2,3}。据报道,由于TLR-4ko小鼠对肝毒素具有抗性并且骨髓辐射的TLR-4ko小鼠与TLR-4^{+/+}巨噬细胞的重建赋予了这些动物对肝毒素的易感性⁴,因此毒性肝损伤的扩增是由巨噬细胞介导的。巨噬细胞在毒性肝损伤的肝炎症中的作用已经使用巨噬细胞消融证实⁵,并且进一步在试验性酒精性肝损伤模型中使用IL-1受体拮抗剂表征⁶,以及在LPS/D-半乳糖胺诱导的肝损伤中使用腺苷-_{2A}(A_{2A})受体-ko小鼠表征⁷。Fas介导的从巨噬细胞的IL-18分泌在小鼠中引起急性肝损伤⁸,并且巨噬细胞吞噬作用在肝细胞损伤期间除去

肝细胞碎片⁹。然而,肝巨噬细胞中对扩增肝损伤不可缺少的信号转导机制仅部分被表征¹。

[0013] 炎性体是蛋白质复合物,其对于触发巨噬细胞中的炎症反应的激活、以及随后的巨噬细胞激活是必需的^{1,10,11}。已经证明CCAAT/增强子结合蛋白-β (C/EBPβ)^{12,13,14}是作为表达C/EBPβDNA-结合位点的显性抑制剂的巨噬细胞的关键信号分子¹⁵,或者C/EBPβ的靶向缺失导致巨噬细胞分化受损¹⁶。

[0014] 此外,C/EBPβ表达在这些细胞的分化期间剧烈地增加,并且由巨噬细胞调节剂(LPS、IL-1、G-CSF、TGFβ、维生素D、视黄酸)诱导^{13,17}。在此上下文中,研究人员已经表明,通过核糖体S-激酶-2 (RSK-2) (该核糖体S-激酶-2直接通过细胞外调节的激酶(ERK)-1/2磷酸化激活)的C/EBPβ的磷酸化在调节细胞存活的ERK/分裂素激活的蛋白激酶(MAPK)信号途径中起重要作用^{18,19,20,21}。与巨噬细胞激活和存活相关,据报道,显性阳性磷酸化突变体C/EBPβ-Glu217 (其在生物测定中模拟磷酸化的C/EBPβ-Thr217²²)的表达足以拯救受损的巨噬细胞功能和由炭疽致死毒素诱导的活性。

发明内容

[0015] 如以上背景部分指定,需要特别地用于人类肝、肺、肾和任何其他组织和/或器官的炎症和纤维化的有效治疗。本发明通过提供新颖的治疗性肽以及相关的组合物和方法来说明这些和其他需要。

[0016] 在一个方面,本发明提供一种分离肽,该分离肽包含氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp,其中至少一个氨基酸是D-氨基酸,并且其中所述肽能够在苏氨酸266 (Thr 266)处抑制人类CCAAT/增强子结合蛋白-β (C/EBPβ)的磷酸化或者能够在Thr 217处抑制小鼠C/EBPβ的磷酸化。

[0017] 在一个实施例中,在氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp内的Ala和/或Val是D-氨基酸(DAla、DVal)。在一个实施例中,该肽能够在苏氨酸266 (Thr 266)处选择性地抑制人类CCAAT/增强子结合蛋白-β (C/EBPβ)的磷酸化。在一个实施例中,该肽能够抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞炎性体的激活。在一个实施例中,该肽在四个氨基酸和八个氨基酸长度之间。在一个实施例中,该肽包含选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Lys-DAla-Val-Asp和Lys-Ala-DVal-Asp。在一个实施例中,该肽由选自下组的氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Lys-DAla-Val-Asp和Lys-Ala-DVal-Asp。在一个具体地实施例中,该肽包含氨基酸序列Lys-DAla-DVal-Asp。在一个具体地实施例中,该肽由氨基酸序列Lys-DAla-DVal-Asp组成。在一个实施例中,该肽由选自下组的氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:Lys-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser-Asp (SEQ ID NO:3)、Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser (SEQ ID NO:4)、和Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His (SEQ ID NO:5) (例如,其中在氨基酸基序Lys-Ala-Val-Asp内的Ala和/或Val是D-氨基酸的肽)。在一个实施例中,本发明的肽进一步包含聚乙二醇(PEG)。在一个实施例中,本发明的肽进一步包含酸(Ac)或巯基丙酸(Mpr)或三甲基锁(TML)内酯化的接头(参见,例如,Greenwald, Journal of Controlled Release [控释杂志] 74, 2001, 159-171)。在一个实施例中,本发明的肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。在一个实施例中,本发明的肽是环肽。

[0018] 在一个实施例中,该肽选自下组,该组由以下各项组成:

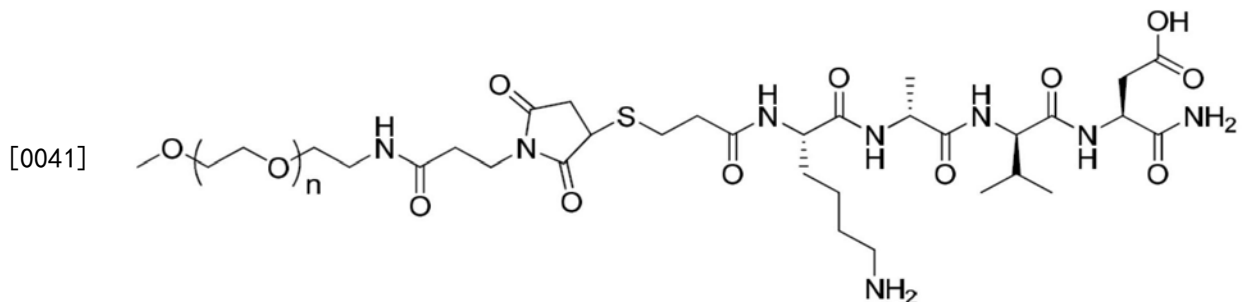
- [0019] Lys-DAla-DVal-Asp、
 [0020] Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、
 [0021] Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、
 [0022] PEG-Lys-DAla-DVal-Asp、
 [0023] PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、
 [0024] PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、
 [0025] Lys-DAla-Val-Asp、
 [0026] Ac-Lys-DAla-Val-Asp、
 [0027] Mpr-Lys-DAla-Val-Asp、
 [0028] PEG-Lys-DAla-Val-Asp、
 [0029] PEG-Ac-Lys-DAla-Val-Asp、
 [0030] PEG-Mpr-Lys-DAla-Val-Asp、
 [0031] Lys-Ala-DVal-Asp、
 [0032] Ac-Lys-Ala-DVal-Asp、
 [0033] Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、
 [0034] PEG-Lys-Ala-DVal-Asp、
 [0035] PEG-Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、和
 [0036] PEG-Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0037] 其中该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。

[0038] 在一个实施例中,该肽选自下组,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、PEG-Lys-DAla-DVal-Asp、PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、和PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp,其中该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。

[0039] 在一个实施例中,该肽选自下组,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、PEG-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、和PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂。

[0040] 在一个实施例中,该肽具有如化学式(I)所示的结构:



[0042] 结合本发明的肽,本发明提供了包含本发明的一种或多种肽的药物组合物。在一个实施例中,该一种或多种肽以有效抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞炎性体的激活的量存在于组合物中。

[0043] 在另一个方面,本发明提供了一种用于在对其有需要的受试者中抑制组织纤维化的方法,所述方法包括向该受试者给予有效量的本发明的一种或多种肽、或包含此类一种

或多种肽的药物组合物。在一个实施例中,该组织是在肝、肺或肾中。在一个实施例中,该组织纤维化与肝损伤或肝炎症相关。在一个实施例中,该组织纤维化与肺损伤或肺炎症相关。在一个实施例中,该组织纤维化与肾损伤或肾炎症相关。

[0044] 在另一个方面,本发明提供了一种用于在对其有需要的受试者中抑制巨噬细胞和/或T细胞炎症的方法,所述方法包括向该受试者给予有效量的本发明的一种或多种肽、或包含此类一种或多种肽的药物组合物。

[0045] 在又另一个方面,本发明提供了一种用于在对其有需要的受试者中治疗组织纤维化疾病的方法,该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的一种或多种肽、或包含此类一种或多种肽的药物组合物。在一个实施例中,该疾病与肝损伤、肝炎症和/或肝纤维化相关。在一个实施例中,该疾病是任何病因的肝硬化或肝纤维化。在一个实施例中,该疾病选自下组,该组由以下各项组成:非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、酒精性脂肪肝病、酒精性脂肪性肝炎、肝性脂肪变性、自身免疫性肝炎、慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化、继发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、威尔逊氏症、和胆道闭锁。在一个实施例中,该疾病与肺损伤、肺炎症和/或肺纤维化相关。在一个实施例中,该疾病选自下组,该组由以下各项组成:特发性肺纤维化、放射性诱导的肺炎、慢性阻塞性肺病、和肺气肿。在一个实施例中,该疾病与肾损伤、肾炎症和/或肾纤维化相关。在一个实施例中,该疾病是肾小球肾炎或小管间质纤维化。在一个实施例中,该疾病选自下组,该组由以下各项组成:继发于烧伤的皮肤纤维化、瘢痕疙瘩、肥厚性手术后伤口、硬皮病、继发于腐蚀性物质的食管或胃肠道纤维化、继发于炎症性疾病的食管或胃肠道纤维化、继发于缺血性疾病的纤维化、腹膜纤维化、胰腺纤维化、照射后纤维化、继发于梗死的心肌纤维化、继发于缺血或梗死的脑纤维化、创伤后脑纤维化、创伤后肌肉纤维化、和滑膜/关节纤维化。

[0046] 在另一个方面,本发明提供了一种用于在对其有需要的受试者中治疗炎症性疾病的方法,该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的一种或多种肽、或包含此类一种或多种肽的药物组合物。在一个实施例中,该疾病选自下组,该组由以下各项组成:酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、自身免疫性肝炎、慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化、继发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、威尔逊氏症、胆道闭锁、特发性肺纤维化、放射性诱导的肺炎、慢性阻塞性肺病、肺气肿、肺慢性感染和/或炎症、肾小球肾炎、小管间质纤维化、继发于烧伤的皮肤炎症、硬皮病、银屑病、炎症肠疾病、食管损伤和/或炎症、放射后食管或胃肠道炎症、炎症性心肌病、创伤后脑部炎症、阿尔茨海默病、脑炎、脑膜炎、肌炎、和关节炎。

[0047] 在本发明的任何以上方法中,肽或药物组合物可以例如经全身、通过吸入、经局部、经舌下、经口服、经鼻内、或通过直接滴注给组织或器官来给予。

[0048] 在本发明的任何以上方法中,该受试者可以是例如人类或兽医动物或试验性的动物模型。

[0049] 具体地,本申请提供了以下方案:

[0050] 1. 一种分离肽,该分离肽包含氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp,其中至少一个氨基酸是D-氨基酸,并且其中所述肽能够在苏氨酸266 (Thr 266) 处抑制人类CCAAT/增强子结合蛋白- β (C/EBP β) 的磷酸化。

- [0051] 2. 如方案1所述的肽,其中在氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp内的Ala和/或Val是D-氨基酸。
- [0052] 3. 如方案1所述的肽,其中所述肽能够在苏氨酸266 (Thr 266) 处选择性地抑制人类CCAAT/增强子结合蛋白- β (C/EBP β) 的磷酸化。
- [0053] 4. 如方案1或方案2所述的肽,其中所述肽能够抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞炎性体的激活。
- [0054] 5. 如方案1-4中任一项所述的肽,其中所述肽在四个氨基酸和八个氨基酸长度之间。
- [0055] 6. 如方案1-5中任一项所述的肽,其中所述肽包含选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Lys-DAla-Val-Asp和Lys-Ala-DVal-Asp。
- [0056] 7. 如方案6所述的肽,其中所述肽由选自下组的氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Lys-DAla-Val-Asp和Lys-Ala-DVal-Asp。
- [0057] 8. 如方案1-5中任一项所述的肽,其中所述肽包含氨基酸序列Lys-DAla-DVal-Asp。
- [0058] 9. 如方案8所述的肽,其中所述肽由氨基酸序列Lys-DAla-DVal-Asp组成。
- [0059] 10. 如方案1-4中任一项所述的肽,其中所述肽由选自下组的氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:Lys-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser-Asp (SEQ ID NO:3)、Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser (SEQ ID NO:4)、和Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His (SEQ ID NO:5)。
- [0060] 11. 如方案1-10中任一项所述的肽,其中所述肽进一步包含聚乙二醇 (PEG)。
- [0061] 12. 如方案1-11中任一项所述的肽,其中所述肽进一步包含酸 (Ac) 或巯基丙酸 (Mpr) 的接头。
- [0062] 13. 如方案1-12中任一项所述的肽,其中该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。
- [0063] 14. 如方案1-10中任一项所述的肽,其中所述肽是环肽。
- [0064] 15. 如方案1所述的肽,其中所述肽选自下组,该组由以下各项组成:
- [0065] Lys-DAla-DVal-Asp、
- [0066] Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、
- [0067] Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、
- [0068] PEG-Lys-DAla-DVal-Asp、
- [0069] PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、
- [0070] PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、
- [0071] Lys-DAla-Val-Asp、
- [0072] Ac-Lys-DAla-Val-Asp、
- [0073] Mpr-Lys-DAla-Val-Asp、
- [0074] PEG-Lys-DAla-Val-Asp、
- [0075] PEG-Ac-Lys-DAla-Val-Asp、
- [0076] PEG-Mpr-Lys-DAla-Val-Asp、
- [0077] Lys-Ala-DVal-Asp、

[0078] Ac-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0079] Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0080] PEG-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0081] PEG-Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、和

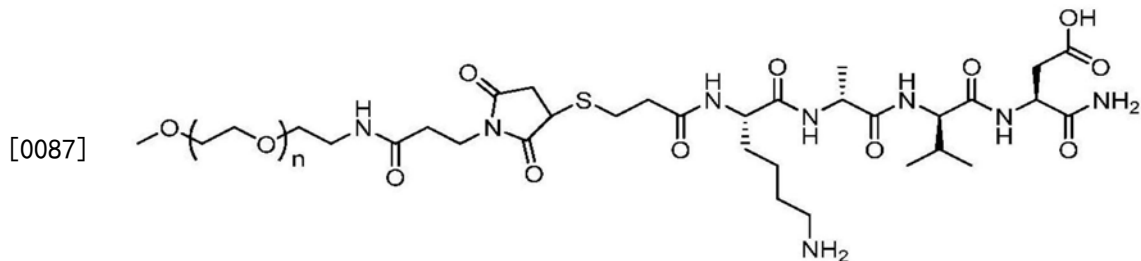
[0082] PEG-Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0083] 其中该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。

[0084] 16. 如方案15所述的肽, 其中所述肽选自下组, 该组由以下各项组成: Lys-DAla-DVal-Asp、Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、PEG-Lys-DAla-DVal-Asp、PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、和PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp, 其中该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。

[0085] 17. 如方案16所述的肽, 其中所述肽选自下组, 该组由以下各项组成: Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、PEG-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂和PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂。

[0086] 18. 如方案1所述的肽, 其中所述肽具有如化学式(I)所示的结构:



[0088] 19. 一种药物组合物, 该药物组合物包含如方案1-18中任一项所述的一种或多种肽和药学上可接受的载体。

[0089] 20. 如方案19所述的药物组合物, 其中所述一种过多种肽以有效抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞炎性体的激活的量存在。

[0090] 21. 一种用于在对其有需要的受试者中抑制组织纤维化的方法, 所述方法包括向该受试者给予有效量的如方案1-18中任一项所述的一种或多种肽、或如方案19或20所述的药物组合物。

[0091] 22. 如方案21所述的方法, 其中该组织纤维化与肝损伤或肝炎症相关。

[0092] 23. 如方案21所述的方法, 其中该组织纤维化与肺损伤或肺炎症相关。

[0093] 24. 如方案21所述的方法, 其中该组织纤维化与肾损伤或肾炎症相关。

[0094] 25. 如方案21所述的方法, 其中该组织是在肝、肺或肾中。

[0095] 26. 一种用于在对其有需要的受试者中抑制巨噬细胞和/或T细胞炎症的方法, 所述方法包括向该受试者给予有效量的如方案1-18中任一项所述的一种或多种肽、或如方案19或20所述的药物组合物。

[0096] 27. 一种用于在对其有需要的受试者中治疗组织纤维化疾病的方法, 该方法包括向该受试者给予有效量的如方案1-18中任一项所述的一种或多种肽、或如方案19或20所述的药物组合物。

[0097] 28. 如方案27所述的方法, 其中所述疾病与肝损伤、肝炎症和/或肝纤维化相关。

[0098] 29. 如方案27所述的方法, 其中所述疾病是任何病因的肝硬化或肝纤维化。

[0099] 30. 如方案28所述的方法, 其中该疾病选自下组, 该组由以下各项组成: 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、酒精性脂肪肝病、酒精性脂肪性肝炎、肝性脂肪变性、自身免疫性肝炎、慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化、继发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、威尔逊氏症、和胆道闭锁。

[0100] 31. 如方案27所述的方法, 其中所述疾病与肺损伤、肺炎症和/或肺纤维化相关。

[0101] 32. 如方案31所述的方法, 其中该疾病选自下组, 该组由以下各项组成: 特发性肺纤维化、放射性诱导的肺炎、慢性阻塞性肺病、和肺气肿。

[0102] 33. 如方案27所述的方法, 其中所述疾病与肾损伤、肾炎症和/或肾纤维化相关。

[0103] 34. 如方案33所述的方法, 其中该疾病是肾小球肾炎或小管间质纤维化。

[0104] 35. 如方案27所述的方法, 其中该疾病选自下组, 该组由以下各项组成: 继发于烧伤的皮肤纤维化、瘢痕疙瘩、肥厚性手术后伤口、硬皮病、继发于腐蚀性物质的食管或胃肠道纤维化、继发于炎性疾病的食管或胃肠道纤维化、继发于缺血性疾病的纤维化、腹膜纤维化、胰腺纤维化、照射后纤维化、继发于梗死的心肌纤维化、继发于缺血或梗死的脑纤维化、创伤后脑纤维化、创伤后肌肉纤维化、和滑膜/关节纤维化。

[0105] 36. 一种用于在对其有需要的受试者中治疗炎性疾病的方法, 该方法包括向该受试者给予有效量的如方案1-18中任一项所述的一种或多种肽、或如方案19或20所述的药物组合物。

[0106] 37. 如方案36所述的方法, 其中所述疾病选自下组, 该组由以下各项组成: 酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、自身免疫性肝炎、慢性丙型肝炎、慢性乙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化、继发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、威尔逊氏症、胆道闭锁、特发性肺纤维化、放射性诱导的肺炎、慢性阻塞性肺病、肺气肿、肺慢性感染和/或炎症、肾小球肾炎、小管间质纤维化、继发于烧伤的皮肤炎症、硬皮病、银屑病、炎性肠疾病、食管损伤和/或炎症、放射后食管或胃肠道炎症、炎症性心肌病、创伤后脑部炎症、阿尔茨海默病、脑炎、脑膜炎、肌炎、和关节炎。

[0107] 38. 如方案21-38中任一项所述的方法, 其中将所述肽或药物组合物经全身给予。

[0108] 39. 如方案21-38中任一项所述的方法, 其中将所述肽或药物组合物通过选自下组的途径来给予, 该组由以下各项组成: 通过吸入、经局部、经舌下、经口服、或经鼻内。

[0109] 40. 如方案21-38中任一项所述的组合物, 其中将所述肽或药物组合物通过直接滴注给组织或器官来给予。

[0110] 41. 如权利要求21-41中任一项所述的方法, 其中该受试者是人类。

[0111] 在下面的说明书、权利要求书和附图中, 本发明的这些和其他方面对于本领域普通技术人员是明显的。

附图说明

[0112] 图1. 该治疗性前导肽抑制肝肌成纤维细胞的激活和肝损伤, 该肝肌成纤维细胞的激活和肝损伤在暴露于人肝毒素CC14后诱导纤维化。向C/EBP β -wt小鼠 (4) 给予单剂量的CC14。八小时后, 动物接受IP注射的治疗性前导肽 (连接至PEG的5 μ g的肽)。在CC14给予后30hr处死动物。仅接受CC14的动物具有肌成纤维细胞的强烈激活 (如由 α -SMA确定) (上排) 和严重的肝损伤 (如通过处死之前的标准临床检查所评估的); 前导肽阻断严重肝损伤的变

色和颗粒状外观。所治疗小鼠的肝相似于对照(第二排)。由CC14诱导的组织病理学是肌成纤维细胞(α -SMA)的激活,严重肝损伤(H&E染色),伴随结构破裂(网状蛋白染色)。该治疗性PEG-30kDa-肽降低了肌成纤维细胞的激活和对肝的损伤。

[0113] 图2A-2B. 治疗性PEG-30kDa肽在肝纤维化的慢性小鼠模型中的高功效。所有组的小鼠(对照组除外)接受了CC14给予持续16周($n=6$ /组)。CC14治疗组仅接受肝毒素,而其他组在第8周开始还接受指定的治疗性PEG-30kDa肽(连接至420 μ g PEG-30kDa的7 μ g的肽,每周一次)。图2A. 如描述的通过定量Sirius染色(纤维化百分比/面积)来确定肝纤维化(7; 25):对照(0.02+/-0.01);前导肽(0.8+/-0.7);可替代的肽1(2.1+/-1.0);可替代的肽2(3.5+/-1.2)和CC14(6.7+/-1.6%)。对于前导肽 $1P<0.0001$,并且对于可替代的肽1和2 $P<0.001$ 。图2B. 通过肝纤维化的三色染色组织学检测肝纤维化,因为它是临床标准。对照动物(仅接受媒介物对照)具有可忽略的纤维化(阶段0-1/VI);接受CC14持续16周的动物形成严重的纤维化(阶段5/VI或6/VI;这在患者中是临床上显著的);而接受CC14持续16周以及在第8周开始还接受前导PEG-30kDa肽1的动物具有轻微的纤维化(阶段1-2/VI;这在患者中不是临床上显著的)。

[0114] 图3. 诱导C/EBP β -Thr²¹⁷的磷酸化,并且C/EBP β -Thr²¹⁷的磷酸化对于博来霉素的Th1/Th17响应是必需的。在用博来霉素治疗7天的C/EBP β^{wt} 小鼠中诱导肺炎症。如在表2和图5中描述的,鉴定纯化的肺T细胞(CD-4+),磷酸-C/EBP β Thr217、IL-12R β 、IL-23R、和IL-4R α 。C/EBP β -Ala217小鼠阻断T细胞中磷酸化的C/EBP β -Thr217,并且对用博来霉素诱导Th1/Th2表型是不起反应的。在C/EBP β -Ala217小鼠中,博来霉素诱导IL-4R α 的T细胞表达(Th2表型)。

[0115] 图4. 诱导C/EBP β -Thr²¹⁷的磷酸化,并且C/EBP β -Thr²¹⁷的磷酸化对于博来霉素的Th1/Th17响应是必需的。在用博来霉素治疗7天的C/EBP β^{wt} 小鼠中诱导肺炎症。如表2和图5描述的,鉴定纯化的肺T细胞(CD-4+)、磷酸-C/EBP β Thr217、IL-12R β 、IL-23R、和IL-4R α 。C/EBP β 肽阻断T细胞中的磷酸化的C/EBP β -Thr217、Th1/Th17表型,并诱导IL-4R α (Th2表型)的T细胞表达。

[0116] 图5. 诱导Th1/Th17细胞,并且该Th1/Th17细胞与响应于博来霉素治疗的肺肌纤维细胞的激活相关。来自M1巨噬细胞消融实验的证据。在博来霉素治疗后的第7天,纯化的CD4+小鼠肺T细胞表达IL-12R或IL-23R(Th1/Th17表型)和 α SMA(激活的肌成纤维细胞)。当小鼠接受博来霉素和氯磷酸盐(ATP生产的阻断剂)脂质体(经气管内(intracheally)和IP)时,在第7天存在优先消融吞噬作用的M1巨噬细胞(不可检测的TNF α R2)以及优先消融在诱导IL-4R α (aqua)(Th2表型)和明显地减少的 α SMA(激活的肌成纤维细胞)(品红色)情况下的Th1(IL-12R-红)/Th17(IL-23R-绿)细胞。通过M1巨噬细胞消融阻断Th1/Th17细胞21天明显地抑制博来霉素诱导的肺纤维化(三色),表明Th1/Th17表型而不是Th2表型是造成这种影响的原因。

[0117] 图6. Th2刺激物和C/EBP β 肽诱导来自博来霉素治疗的动物的分离的原代小鼠肺Th1和Th17细胞的细胞凋亡。将T细胞通过CD-4+亲和分离并用10 μ g/ml的IL-10或IL-4,或者用100pM C/EBP β 肽处理6hr。如描述的检测细胞凋亡(12)。Th2诱导剂和C/EBP β 肽($P<0.05$)刺激Th-1和Th-17肺细胞体外细胞凋亡。

[0118] 图7A-7B. 人类Th1和Th17细胞在共培养中诱导人类肺肌成纤维细胞的增殖。图7A.

将LMF与诱导的Th1或Th17或Th2、未诱导的对照、以及用肽处理的Th1或Th17共培养。对于PCNA计数至少100个细胞/样品(N:3),对于Th1和Th17细胞(其他共培养系统的NS) $P < 0.01$ 。图7B. Th1/Th17-LMF; Th2-LMF; 和用肽-LMF共培养物处理的Th1/Th17的示意图。

[0119] 图8. 诱导C/EBP β -Thr266的磷酸化, 并且该C/EBP β -Thr266的磷酸化与来自IPF患者的肺中的Th1响应相关。研究了患有IPF的代表性患者和代表性对照个体。通过共焦激光扫描显微术鉴定DNA、磷酸-C/EBP β Thr266、T-Bet、和GATA-3。

[0120] 图9. 诱导C/EBP β -Thr266的磷酸化, 并且该C/EBP β -Thr266的磷酸化与来自IPF患者的肺中的Th1/Th17响应相关。研究了患有IPF的代表性患者和代表性对照个体。通过共焦激光扫描显微术鉴定磷酸-C/EBP β Thr266、IL-12R、IL-23R、IL-4R α 、和 α SMA。

[0121] 图10. 诱导在Thr266上的C/EBP β 的磷酸化, 并且该在Thr266上的C/EBP β 的磷酸化对于人类CD4+T细胞对炎性诱导剂的Th1/Th17响应是必需的。用人类血液前体T细胞的体外实验。在用人类重组IL-12(Th1诱导剂)处理16小时后, 正常人类CD-4+T细胞表达了IL-12R β 和T-Bet(Th1表型)。当用IL-23(Th17诱导剂)体外处理正常人类血液CD-4+T细胞时, 它们表达IL-23R和GATA-3(数据未显示)(Th17表型)。

[0122] 图11. 诱导C/EBP β -Thr266的磷酸化, 并且该C/EBP β -Thr266的磷酸化与来自IPF肺组织的肺中的Th1/Th17响应相关。新鲜分离的T细胞如以下描述的进行纯化和表征。通过共焦激光扫描显微术鉴定磷酸-C/EBP β Thr266、IL-12R、IL-23R、和IL-4R α 。

[0123] 图12. Th2刺激物和C/EBP β 肽诱导来自IPF患者的分离的原发性人类肺Th1和Th17细胞的细胞凋亡。将T细胞通过CD-4+亲和分离并用10 μ g/ml的IL-10或IL-4, 或者用100pM C/EBP β 肽处理16hr。如描述的检测细胞凋亡(12)。Th2诱导剂和C/EBP β 肽($P < 0.05$)刺激Th-1和Th-17肺细胞体外细胞凋亡。

[0124] 图13A-13D. Fas-L的调节通过在小鼠中的磷酸化的C/EBP β -Thr217诱导肝损伤和炎症。图13A. 在单次IP剂量的Jo-2 Ab(FasL)后12小时确定血清ALT(IU/ml)水平。通过血清ALT水平判断, 表达磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因的小鼠比对照C/EBP β -wt小鼠更容易受到用Jo-2 Ab诱导的肝损伤($P < 0.0001$)。表达不可磷酸化的C/EBP β -Ala217转基因的小鼠对Fas-L诱导肝损伤具有高度抗性($P < 0.01$); $n = 20$ 只小鼠/组。图13B. 通过细胞凋亡膜联蛋白-V测定判断, 当与来自C/EBP β -wt小鼠(开环)的肝细胞相比时, Jo-2 Ab诱导对从磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因小鼠(闭环)分离的培养的原代肝细胞的最小损伤($P < 0.001$)。来自不用Jo-2处理的C/EBP β -wt的对照培养的原代肝细胞具有小于5%基线的细胞凋亡。图13C. Jo-2 Ab在C/EBP β -Glu217小鼠肝中比在C/EBP β -wt小鼠肝中刺激了更多的F4/80+巨噬细胞炎症细胞的浸润($P < 0.01$)。图13D. Jo-2 Ab在C/EBP β -Glu217小鼠肝中比在C/EBP β -wt小鼠肝中诱导更大面积的肝细胞凋亡损伤($P < 0.005$)。值是每组至少6只动物的平均值(SD)并且代表三个实验。

[0125] 图14A-14B. 通过TGF- α 激活培养的原代肝巨噬细胞与C/EBP β -Thr217的磷酸化相关。将在RPMI 1640、具有L-谷氨酰胺的10%胎牛血清、25 μ M HEPES和青霉素/链霉素中培养的肝巨噬细胞用TGF α (10 μ M)处理8hr。图14A. 用TGF- α 处理后, 从C/EBP β -wt小鼠新鲜分离的培养的肝巨噬细胞表达激活的RSK-磷酸-Ser380和内源性C/EBP β 在Thr217上被磷酸化($P < 0.001$)。来自三个实验的一式三份样品的代表性实例。图14B. 在培养的肝巨噬细胞中TGF- α 还诱导了NOS-2的表达($P < 0.01$)。使用TO-PRO3来染色细胞的DNA。来自三个实验的一式三份

样品的代表性实例。使用Keyence显微镜BZ9000分析软件程序对荧光和明场像进行定量。

[0126] 图15A-15E. 诱导在Thr217上的C/EBP β 的磷酸化, 并且该在Thr217上的C/EBP β 的磷酸化对于在小鼠肝毒素治疗后的肝巨噬细胞激活是必需的。图15A. 如通过显微术通过F4/80的表达所鉴定的, 与C/EBP β -wt小鼠 ($P < 0.0001$) 相比, CCl_4 的急性给予在磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217小鼠肝中刺激了更程度的巨噬细胞浸润。当与C/EBP β -wt小鼠 ($P < 0.0001$) 相比时, C/EBP β -Ala217转基因抑制 CCl_4 -诱导的巨噬细胞肝浸润约90%。 CCl_4 -诱导的巨噬细胞肝浸润在TGF α 转基因小鼠和C/EBP β -wt小鼠中是相似的(NS)。图15B. 由 CCl_4 诱导的肝细胞凋亡的程度在C/EBP β -Glu217小鼠 ($P < 0.005$) 以及在TGF α 小鼠 ($P < 0.05$) 中增加了, 但是当与C/EBP β -wt小鼠相比时, 其在C/EBP β -Ala217小鼠 ($P < 0.01$) 中有所改善。图15C. 与C/EBP β -wt小鼠 ($P < 0.01$) 相比, CCl_4 在C/EBP β -Glu217小鼠中刺激血清ALT更高。当与C/EBP β -wt小鼠 ($P < 0.001$) 相比时, C/EBP β -Ala217转基因抑制 CCl_4 -诱导的血清ALT约50%。 CCl_4 -诱导的血清ALT在TGF α 转基因小鼠和C/EBP β -wt小鼠中是相似的(NS)。图15D. 阻断C/EBP β -Thr217磷酸化的显性阴性肽也抑制 CCl_4 诱导肝巨噬细胞浸润约60% ($P < 0.01$)。图15E. 该肽抑制 CCl_4 诱导肝细胞凋亡约45% ($P < 0.001$)。值是每组至少6只动物的平均值(SD) 并且代表两个实验。

[0127] 图16A-16F. 诱导巨噬细胞, 并且该巨噬细胞对于响应于小鼠中肝毒素治疗的肝损伤是必需的。图16A. 在给予 CCl_4 之前24hr接受氯膦酸盐脂质体来消耗巨噬细胞的C/EBP β -wt小鼠在 CCl_4 处理后30hr具有显著减少的肝巨噬细胞(约90%; $P < 0.005$)。图16B. 如通过计数肝活组织检查中的凋亡肝细胞所评估的, 在C/EBP β -wt小鼠中用氯膦酸盐脂质体消耗巨噬细胞导致在 CCl_4 处理后30小时肝损伤减少 ($P < 0.01$)。图16C. C/EBP β -wt小鼠的氯膦酸盐脂质体预处理在 CCl_4 处理后30小时也减少了血清ALT水平约75% ($P < 0.005$)。图16D、16E和16F. 与从未接受氯膦酸盐脂质体的 CCl_4 处理的C/EBP β -wt小鼠分离的肝巨噬细胞相比, 氯膦酸盐脂质体在 CCl_4 处理后30hr在从C/EBP β -wt小鼠分离的肝巨噬细胞中诱导了TLR5、MyD88和TLR4表达的抑制 ($P < 0.001$)。值是每组至少6只动物的平均值(SD) 并且代表两个实验。

[0128] 图17A-17B. 磷酸化的C/EBP β -Thr217刺激了小鼠中肝巨噬细胞中的炎性体信号1复合物。图17A. CCl_4 处理后三十小时, 从C/EBP β -wt小鼠分离的CD-11/CD-68原代肝巨噬细胞表达磷酸化的C/EBP β -Thr217和炎性体信号1复合基因产物、TLR4、NF κ B、IRF8和MyD88。磷酸化的C/EBP β -Thr217、TLR4、NF κ B、IRF8和MyD88的表达在C/EBP β -Ala217转基因小鼠中被阻断。从C/EBP β -Glu217转基因小鼠分离的肝巨噬细胞在不存在 CCl_4 处理的情况下表达炎性体信号1复合物, 而从TGF α 小鼠分离的肝巨噬细胞在不存在 CCl_4 处理的情况下表达磷酸化的C/EBP β -Thr217、TLR4、NF κ B、IRF8和MyD88(对于用 CCl_4 处理的C/EBP β -wt小鼠、C/EBP β -Glu217小鼠、和TGF α 小鼠, $P < 0.05$)。使用Keyence显微镜BZ9000分析软件程序对荧光和明场像进行定量。如图15A-15E描述的三个独立实验的代表性实例。图17B. 将C/EBP β 免疫沉淀, 并分析用媒介物或 CCl_4 处理小鼠后30hr来自新鲜分离的原代肝巨噬细胞的其相关蛋白质。磷酸化的C/EBP β -Thr217(或C/EBP β -Glu217)与TLR4、NF κ B、IRF8和MyD88相关, 而不是未磷酸化的C/EBP β -Thr217(或C/EBP β -Ala217)与TLR4、NF κ B、IRF8和MyD88相关。用 CCl_4 处理(和巨噬细胞激活)增加了磷酸化的C/EBP β -Thr217和炎性体信号1蛋白之间的关联。将P-肌动蛋白用作样品加载的内部对照。如图15A-15E描述的三个独立实验的代表性实例。

[0129] 图18A-18B. 磷酸化的C/EBP β -Thr217刺激了小鼠中肝巨噬细胞中炎性体复合信号2的表达。图18A. CCl_4 处理三十小时后,从C/EBP β -wt小鼠纯化的CD-11/CD-68原代肝巨噬细胞表达磷酸化的C/EBP β -Thr217和炎性体信号2复合基因产物、NALP3、TLR5、IL-1R1和衔接蛋白ASC。磷酸化的C/EBP β -Thr217、NALP3、TLR5、IL-1R1和衔接蛋白ASC的表达在C/EBP β -Ala217转基因小鼠中被阻断。从C/EBP β -Glu217转基因小鼠分离的肝巨噬细胞在不存在 CCl_4 处理的情况下表达炎性体信号2复合物,而从TGF α 小鼠分离的肝巨噬细胞在不存在 CCl_4 处理的情况下表达磷酸化的C/EBP β -Thr217、NALP3、TLR5、IL-1R1和衔接蛋白ASC(对于用 CCl_4 处理的C/EBP β -wt小鼠、C/EBP β -Glu217小鼠、和TGF α 小鼠, $P < 0.01$)。使用Keyence显微镜BZ9000分析软件程序对荧光和明场像进行定量。如图15A-15E描述的三个独立实验的代表性实例。图18B. 将C/EBP β 免疫沉淀,并分析用媒介物或 CCl_4 处理小鼠后30hr来自新鲜分离的原代肝巨噬细胞的其相关蛋白质。磷酸化的C/EBP β -Thr217(或C/EBP β -Glu217)与NALP3、TLR5、IL-1R1和衔接蛋白ASC相关,而不是未磷酸化的C/EBP β -Thr217(或C/EBP β -Ala217)与NALP3、TLR5、IL-1R1和衔接蛋白ASC相关。用 CCl_4 处理(和巨噬细胞激活)增加了磷酸化的C/EBP β -Thr217和炎性体信号2蛋白之间的关联。将 β -肌动蛋白用作样品加载的内部对照。如图15A-15E描述的三个独立实验的代表性实例。

[0130] 图19A-19C. 磷酸化的C/EBP β -Thr217刺激了小鼠中肝巨噬细胞中炎性体结构和副产物基因的表达。图19A. 当与C/EBP β -wt小鼠相比时,从磷酸化的模拟物C/EBP β -Glu217小鼠新鲜分离的肝巨噬细胞表达与炎性体相关的激活的转录体。这包括炎性体基因(ASC、IRF-1、IRF-4、IRF-5、TCAM-2、TLR-6、TRAF-6、MyD-88、Nod-1和Rel)的增加的表达,以及直接和间接细胞因子副产物(IL-1 β 、IL-6、IL-15、IL-18和TNF α)的增加的表达。图19B. 当与从用 CCl_4 处理的C/EBP β -wt小鼠的新鲜分离的肝巨噬细胞相比时,从用 CCl_4 处理的小鼠中新鲜分离的C/EBP β -Ala217肝巨噬细胞表达抑制的炎性体转录体。这包括炎性体基因(IRF-4、NALP- α 、NALP-3、TCAM-2、TLR-1、TLR-3、TLR-5、TLR-6、TLR-7、TLR-8、TLR-9、Nod-1和Rel)降低的表达,以及直接和间接细胞因子炎性体副产物(IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-15、IL-18、IL-23 α 和CXCL-3)降低的基因表达。图19C. 用 CCl_4 处理与在C/EBP β -wt、C/EBP β -Glu217、和TGF α 小鼠的肝中IL-18、活性半胱天冬酶-1和IL-1 β 炎性体蛋白表达的诱导相关。值是一式三份的平均值(SD)并且代表三个实验。

[0131] 图20A-20J. C/EBP β -Thr266与来自患有毒油综合征患者的肝巨噬细胞中的炎性体复合物相关。用TOS对来自所有16例患者的肝活组织检查进行分析,TOS仍然可以在康普顿斯大学医学中心,马德里,西班牙获得。这些患者患有中度严重急性肝损伤。图20A和20C. 与正常受试者(图20B和20D)相比,在TOS患者中,存在肝的巨噬细胞浸润的显著增加(约20倍; $1,004,683 \pm 140,485$ 与 $41,160 \pm 3,353$; $P < 0.001$) (图20A)和肝细胞凋亡程度的显著增加(约30倍; $32.0 \pm 4.7\%$ 与 $1.0 \pm 0.2\%$; $P < 0.001$) (图20C)。图20F、20H和20J. 当与正常肝中巨噬细胞相比时,来自患有TOS的患者的肝中的肝巨噬细胞表达MyD-88、磷酸化的C/EBP β -Thr266、和TLR-5(图20E, 20G和20I) (对于所有, $P < 0.001$)。

[0132] 图21. 磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因小鼠比对照C/EBP β -wt小鼠更易受到由FAS-R激活诱导的肝损伤。在用媒介物或 CCl_4 处理30hr后,C/EBP β -wt和C/EBP β -Glu217(E)小鼠的代表性组织学样品。将福尔马林固定的肝样品用网状蛋白组织化学或F4/80免疫组织化学染色。通过Jo-Ab(FAS)诱导肝损伤(网状蛋白染色)和肝巨噬细胞浸润(F4/80),但在

来自C/EBP β -Glu217小鼠的肝组织中诱导更为突出。实验的代表性实例描述在以上图13A-13D中。

[0133] 图22. 乳胞素诱导对从C/EBP β -Glu217转基因小鼠分离的原代肝细胞的最小损伤。通过细胞凋亡膜联蛋白-V测定判断, 当与来自C/EBP β -wt小鼠(开环)的肝细胞相比时, 乳胞素诱导对从磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因小鼠(闭环)分离的培养的肝细胞的最小损伤($P < 0.0001$)。来自不用乳胞素处理的C/EBP β -wt的对照培养的原代肝细胞具有小于5%基线的细胞凋亡。值是一式三份样品的平均值(SD)并且代表两个实验。

[0134] 图23A-23B. 磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因小鼠比对照小鼠更易受到由CC14激活诱导的肝损伤。图23A. 在用媒介物或CC14处理30hr后, C/EBP β -wt、TGF α 、C/EBP β -Glu217(E)、和C/EBP β -Ala217(A)的代表性组织学样品。将福尔马林固定的肝样品用网状蛋白组织化学或F4/80免疫组织化学染色。通过CC14诱导肝损伤(网状蛋白染色)和肝巨噬细胞浸润(F4/80), 但在来自C/EBP β -Glu217小鼠的肝组织中诱导更为突出。C/EBP β -Ala217小鼠对肝损伤和肝巨噬细胞浸润的CC14刺激均不起反应的。图23B. 用媒介物或CC14处理30hr后, C/EBP β -wt小鼠的代表性组织学样品。将福尔马林固定的肝样品用网状蛋白或F4/80免疫组织化学染色。阻断C/EBP β -Thr217磷酸化的显性阴性肽(在8hr时, 100 μ g IP)抑制CC14诱导的肝损伤(网状蛋白染色)约90% ($P < 0.001$)并且抑制肝巨噬细胞浸润(F4/80)约60% ($P < 0.01$)。实验的代表性实例描述在以上图15A-15E中。

[0135] 图24. 巨噬细胞消融预防CC14-诱导的肝损伤和巨噬细胞浸润。在给予媒介物或CC14之前24hr, 接受氯膦脂质体消耗巨噬细胞的C/EBP β -wt小鼠的组织学样品。用CC14处理30hr后, 巨噬细胞耗尽的小鼠肝损伤(网状蛋白染色)和肝巨噬细胞浸润(F4/80)显著减少。实验的代表性实例描述在以上图16A-16F中。

[0136] 图25A-25B. 用PEG-30kDa肽IP处理、气管内滴注该肽(阳性对照)、或通过吸入的肽可明显地降低肺纤维化的程度; α -SMA(激活的肌成纤维细胞的标志物)的表达, 该表达与C/EBP β -Thr217磷酸化共定位。此外, 如通过IL-23R(Th-17细胞的标志物)的表达确定的, 所有治疗都减轻了肺炎症。与对照动物相比, 博来霉素使肺纤维化增加了>5倍。相比之下, 在第10天、第17天和第24天用3次剂量的仅14天治疗中, 接受PEG-30kDa肽或通过吸入接受该肽的动物肺纤维化减少约60% ($P < 0.001$)。如预期的那样, 气管内滴注(治疗性阳性对照)具有突出的功效, 与对照动物只有很小的差异($P < 0.001$)。通过降低的IL-23R的表达判断, 该肽也降低了Th-17炎症(可能是IPF炎症的重要组分)。从基本上正常的表面活性蛋白C(SFPC)表达通过定量C/EBP β -wt判断, 在用博来霉素治疗后, 接受PEG-30kDa肽或通过吸入接受该肽的C/EBP β -wt小鼠比对照C/EBP β -wt小鼠具有更少的肺损伤($P < 0.001$, 图25A)。与定量IMH一致, 如通过RT-PCR确定的, 通过三种肽配制品降低胶原 $\alpha 1$ (主要的ECM基因)和TGF $\beta 1$ (纤维形成细胞因子)。

[0137] 图26. 如图25A-25B描述的用PEG-30kDa肽IP处理、气管内滴注该肽(阳性对照)、或通过吸入的肽。尽管14天治疗很短暂, 但所有治疗均改进了潮气量>35% ($P < 0.01$)。

[0138] 图27表明, 通过肺泡上皮细胞凋亡的明显抑制判断, 在博来霉素治疗之后, 接受PEG-30kDa-肽或通过吸入接受该肽的C/EBP β -wt小鼠比对照C/EBP β -wt小鼠具有较少的肺损伤(约60%) ($P < 0.005$)。

[0139] 图28. 来自患有肾小球肾炎的患者的肾活组织检查的代表性的免疫组织化学。如

针对肝和肺炎症和纤维化记录的,肾小球肾炎具有显著增加的激活的肌成纤维细胞(α -SMA)并具有增强的巨噬细胞炎症反应(F4/80)。这些细胞对C/EBP β -266是阳性的,表明用PEG-30kDa肽靶向肾脏炎症和纤维化的高可行性。

具体实施方式

[0140] 定义

[0141] 除非另外指明,在此所用的所有科学技术术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同意义。其他具体定义的术语应以与在此提供的定义一致的方式来解释。虽然任何相似或等同于在此所描述的方法和材料的方法与材料均可用于本发明的测试的实践中,在此描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

[0142] 如在本说明书和所附权利要求书中所用的,单数形式“一个/一种(a/an)”以及“该(the)”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指示。因此,例如,提及“构建体”包括两个或更多个核酸构建体的组合等。

[0143] 如在此使用的,术语“受试者”是指人类、哺乳动物和/或兽医动物(例如,猫、狗、牛、马、绵羊、猪等)和试验性动物模型。在某些实施例中,受试者是指人类患者,包括成人和儿童人群中的两种性别。

[0144] 在本发明的上下文中,在其涉及在此引用的任何疾病症状的情况下,术语“治疗(treat/treatment等)”意指缓解或减轻与此类病症相关的至少一个症状、或者减慢或逆转此类病症的进展。在本发明的含义内,术语“治疗”还表示阻止、延缓发作(即,疾病的临床表现之前的时期)和/或降低疾病发展或恶化的风险。关于状态、障碍或病症的术语“治疗(treat/treatment等)”还可以包括(1)预防或延缓在受试者中发展的状态、障碍或病症的至少一个临床或亚临床症状的出现,该受试者可以受到该状态、障碍或病症的折磨或易患有该状态、障碍或病症,但是还没有经受或展示该状态、障碍或病症的临床或亚临床症状;或者(2)抑制该状态、障碍或病症,即阻止、减轻或延缓疾病的发展或其复发(在维持治疗的情况下)或其至少一个临床或亚临床症状;或者(3)减轻该疾病,即引起该状态、障碍或病症或其临床或亚临床症状中至少一个的消退。

[0145] 除非另有说明,本发明的实践采用在本领域技术范围内的统计分析、分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学和生物化学的常规技术。此类工具和技术在以下详细描述,例如:Sambrook等人,(2001),Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册]第3版冷泉港实验室出版社:冷泉港,纽约;Ausubel等人编,(2005),Current Protocols in Molecular Biology[现代分子生物学实验方案],约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons,Inc.):霍博肯,新泽西州;Bonifacino等人编,(2005),Current Protocols in Cell Biology[现代细胞生物学实验方案],约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons,Inc.):霍博肯,新泽西州;Coligan等人编,(2005),Current Protocols in Immunology[现代免疫学实验方案],约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons,Inc.):霍博肯,新泽西州;Coico等人编,(2005),Current Protocols in Microbiology[现代微生物学实验方案],约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons, Inc.):霍博肯,新泽西州;Coligan等人编,(2005),Current Protocols in Protein Science[现代蛋白质科学实验方案],约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons,

Inc.):霍博肯,新泽西州;和Enna等人编,(2005),Current Protocols in Pharmacology [现代药物实验方案],约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons,Inc.):霍博肯,新泽西州。另外的技术解释在例如美国专利号7,912,698和美国专利号申请公开号2011/0202322和2011/0307437中。

[0146] 本发明的肽、组合物和给予

[0147] 本发明提供了治疗性肽,该治疗性肽被设计为阻断在肝、肺、肾和/或其他疤痕组织中的一种分子蛋白靶标上的一种磷酸化,以预防和/或抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞的激活和产生,从而抑制肝、肺、和/或其他疤痕组织炎症和/或纤维化。由于本发明的肽对其他机械过程是不必要的,因此它们具有高度特异性和有效性,同时使任何潜在的脱靶毒性最小化。

[0148] 在某些实施例中,本发明提供了针对分子靶标具有高功效的治疗性肽,这些分子靶标预防肌成纤维细胞的激活并抑制肝、肺、和肾纤维化。在其他实施例中,本发明进一步提供了通过调节炎性巨噬细胞中炎性体的激活并激活肌成纤维细胞,磷酸化的C/EBP β -磷酸-Thr266(人类同源的小鼠C/EBP β -Thr217)在肝、肺以及肾炎症和损伤中起主要作用。在进化上保守的C/EBP β -磷酸-Thr217信号传导(在人类C/EBP β -磷酸-Thr266中相同)调节巨噬细胞炎性体活性以及由不同作用的肝毒素诱导的肝损伤。在某些实施例中,这些治疗性肽也通过细胞凋亡机制阻断肌成纤维细胞的激活、预防疤痕组织的纤维化的进展并允许疤痕组织的纤维化的消退。

[0149] 本发明提供了设计为阻断一种蛋白上的磷酸化的治疗性肽,对肝、肺、肾和/或其他疤痕组织产生至关重要的并且对其他机械过程是非必需的单个事件。因此,候选药物具有高度的特异性和有效性,同时使任何潜在的脱靶毒性最小化。在某些实施例中,本发明提供了通过调节肝肺和/或肾巨噬细胞中炎性体的激活,磷酸化的C/EBP β -Thr217在肝、肺和/或肾炎症和损伤中起主要作用。进化上保守的C/EBP β -磷酸-Thr217信号传导(在人类C/EBP β -磷酸-Thr266中相同)调节巨噬细胞炎性体活性和由不同作用的肝肾和/或肺毒素诱导的肝、肺和/或肾损伤。

[0150] 在某些实施例中,已经显示出本发明的肽刺激细胞凋亡并阻断纤维发生,预防肝、肺、肾、和/或其他组织炎症和/或纤维化的进展并诱导肝、肺、肾、和/或其他组织炎症和/或纤维化的消退。在某些实施例中,本发明的肽也显示出针对分子靶标的高功效,例如在激活的肝、肺、和/或肾肌成纤维细胞和/或巨噬细胞中C/EBP β -Thr217的磷酸化,预防肌成纤维细胞和/或巨噬细胞的激活并抑制肝、肺和/或肾炎症和纤维发生。

[0151] 在一个方面,本发明提供一种分离肽,该分离肽包含氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp,其中至少一个氨基酸是D-氨基酸,并且其中所述肽能够在苏氨酸266(Thr 266)处抑制人类CCAAT/增强子结合蛋白- β (C/EBP β)的磷酸化或者能够在Thr 217处抑制小鼠C/EBP β 的磷酸化。对于人类和小鼠C/EBP β 序列的实例,参见,例如,人类:GenBank基因ID 1051;小鼠:GenBank基因ID 12608。

[0152] 在一个实施例中,在氨基酸序列Lys-Ala-Val-Asp内的Ala和/或Val是D-氨基酸。在一个实施例中,该肽能够在苏氨酸266(Thr 266)处选择性地抑制人类CCAAT/增强子结合蛋白- β (C/EBP β)的磷酸化。在一个实施例中,该肽能够抑制肌成纤维细胞和/或巨噬细胞炎性体的激活。在一个实施例中,该肽在四个氨基酸和八个氨基酸长度之间。在一个实施例

中,该肽包含选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Lys-DAla-Val-Asp和Lys-Ala-DVal-Asp。在一个实施例中,该肽由选自下组的氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Lys-DAla-Val-Asp和Lys-Ala-DVal-Asp。在一个实施例中,该肽包含氨基酸序列Lys-DAla-DVal-Asp。在一个实施例中,该肽由氨基酸序列Lys-DAla-DVal-Asp组成。在一个实施例中,该肽由选自下组的氨基酸序列组成,该组由以下各项组成:Lys-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser-Asp (SEQ ID NO:3)、Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser (SEQ ID NO:4)、和Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His (SEQ ID NO:5) (例如,其中在氨基酸基序Lys-Ala-Val-Asp内的Ala和/或Val是D-氨基酸的肽)。在一个实施例中,该肽进一步包含聚乙二醇 (PEG)。在一个实施例中,该肽进一步包含酸 (Ac) 或巯基丙酸 (Mpr) 或三甲基锁 (TML) 内酯化的接头 (参见,例如,Greenwald, Journal of Controlled Release. [控释杂志]74,2001,159-171)。在一个实施例中,该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。在一个实施例中,该肽是环肽。

[0153] 在一个实施例中,该肽选自下组,该组由以下各项组成:

[0154] Lys-DAla-DVal-Asp、

[0155] Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、

[0156] Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、

[0157] PEG-Lys-DAla-DVal-Asp、

[0158] PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、

[0159] PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、

[0160] Lys-DAla-Val-Asp、

[0161] Ac-Lys-DAla-Val-Asp、

[0162] Mpr-Lys-DAla-Val-Asp、

[0163] PEG-Lys-DAla-Val-Asp、

[0164] PEG-Ac-Lys-DAla-Val-Asp、

[0165] PEG-Mpr-Lys-DAla-Val-Asp、

[0166] Lys-Ala-DVal-Asp、

[0167] Ac-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0168] Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0169] PEG-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0170] PEG-Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、和

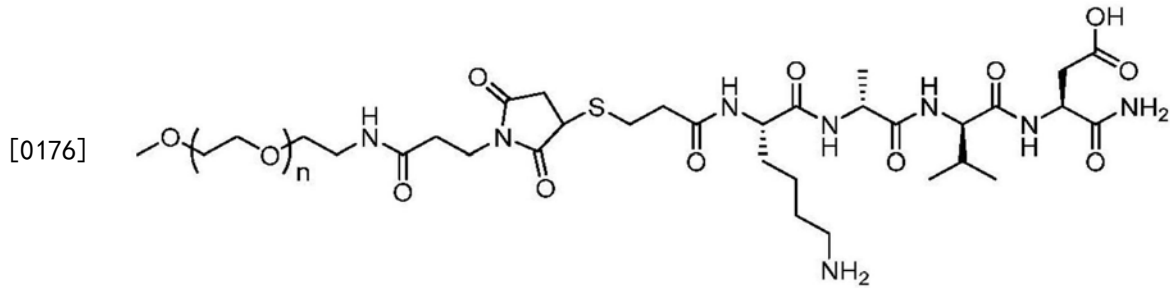
[0171] PEG-Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp、

[0172] 其中该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。

[0173] 在一个实施例中,该肽选自下组,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp、Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp、PEG-Lys-DAla-DVal-Asp、PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp、和PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp,其中该肽的羧基末端基团是OH、OCH₃、或NH₂基团。

[0174] 在一个实施例中,该肽选自下组,该组由以下各项组成:Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、PEG-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、PEG-Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂、和PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂。

[0175] 在一个实施例中,该肽具有如化学式(I)所示的结构:



[0177] 除上述公开的肽之外,本发明还涵盖了C/EBPβ-Ala-217氨基酸1至296(小鼠),C/EBPβ-Ala-217片段氨基酸216至253(小鼠)和C/EBPβ-Ala-217氨基酸1至285(小鼠)(例如,基于在位置217处具有Ala的GenBank基因ID 12608获得)。还涵盖了相应的人类序列和片段,并且这些相应的人类序列和片段可以基于在位置266处具有Ala的人类C/EBPβ序列(例如,基于在位置266处具有Ala的GenBank基因ID 1051)获得。

[0178] 本发明的肽可以例如通过使用异双功能接头进行修饰。对于异双功能PEG的末端基团的非限制性实例是马来酰亚胺、乙烯砜类、吡啶基二硫物、胺、羧酸和NHS酯(参见,例如,Veronese,Francesco M.“peptide and protein PEGylation:a review of problems and solutions.[肽和蛋白质聚乙二醇化:对问题和解决方案的回顾]”Biomaterials[生物材料]22.5(2001):405-417)。本发明的肽可以采用例如支链的,Y形的或梳状的第三代聚乙二醇化剂(参见,例如,Ryan,Sinéad M;Mantovani,Giuseppe;Wang,Xuexuan;Haddleton,David M;Brayden,David J,(2008),“Advances in PEGylation of important biotech molecules:Delivery aspects[重要生物技术分子的聚乙二醇化的进展:递送方面]”,Expert Opinion on Drug Delivery[药物递送的专家意见]5(4):371-83)。本发明的肽可以多聚化和/或环化(例如,多肽基团)。

[0179] 对于本发明的肽的有用递送技术包括例如LAR-贮库微球聚合物基质(Midatech Pharma)和受保护的接枝共聚物(Protected Graft Copolymer)(PGCTM)技术(PharmaIN)。

[0180] 发明的肽能够以各种方式进行修饰以改进其药代动力学和其他性质。肽可以在氨基(N-)末端和/或羧基(C-)末端修饰和/或通过用非常规氨基酸替代一个或多个天然存在的遗传编码氨基酸,修饰一个或多个氨基酸残基、肽磷酸化等的侧链。

[0181] 氨基末端修饰包括甲基化(例如,-NHCH₃或-N(CH₃)₂)、乙酰化(例如,用乙酸或其卤代的衍生物(如α-氯乙酸、α-溴乙酸或α-碘乙酸)),添加苄氧羰基(Cbz)基团,或者用含有羧酸酯官能团(由RCOO-定义的)或磺酰基官能团(由R-SO₂-定义的)(其中R选自烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基等)和相似基团的任何阻断基团阻断氨基末端。人们也可以在N-末端并入去氨基酸(这样使得不存在N-末端氨基基团)以减少对蛋白酶的敏感性或者以限制肽化合物的构象。

[0182] 羧基末端修饰包括用甲酰胺基团替代游离酸或在羧基末端形成环内酰胺以引入结构限制。人们也可以环化本发明的肽,或者可以在肽的末端并入去氨基或去羧基残基,这样使得不存在末端氨基或羧基基团,以减少对蛋白酶的敏感性或者以限制该肽的构象。本发明的化合物的C-末端官能团包括酰胺、酰胺低级烷基、酰胺二(低级烷基)、低级烷氧基、羟基、和羧基、以及其低级酯衍生物、以及其药学上可接受的盐。

[0183] 人们可以用其他侧链替代天然存在的具有20个遗传编码的氨基酸(或立体异构的D-氨基酸)的侧链,例如用以下基团,如烷基,低级烷基,环4元、5元、6元至7元烷基,酰胺,酰胺低级烷基,酰胺二(低级烷基),低级烷氧基,羟基,羧基及其低级酯衍生物,以及用4元、5元、6元至7-元杂环替代。例如,可以采用其中脯氨酸残基的环尺寸从5元至4元、6元或7元变化的脯氨酸类似物。环基团可以是饱和的或不饱和的,并且如果是不饱和的可以是芳香族的或非芳香族的。杂环基团优选地含有一个或多个氮、氧和/或硫杂原子。此类基团的实例包括咪唑基、咪唑基、咪唑烷基、咪唑基、咪唑啉基、异噻唑基、异噻唑基、吗啉基(例如,吗啉代)、噁唑基、哌嗪基(例如,1-哌嗪基)、哌啶基(piperidyl)(例如,1-哌啶基、哌啶基(piperidino))、吡喃基、吡嗪基、吡啶烷基、吡啶啉基、吡咯基、吡嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯烷基(例如,1-吡咯烷基)、吡咯啉基、吡咯基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、硫代吗啉基(例如,硫代吗啉代)、和三唑基。这些杂环基团可以是经取代的或未经取代的。在基团是经取代的时,该取代基可以是烷基、烷氧基、卤素、氧、经取代的或未经取代的苯基。

[0184] 常规氨基酸替代的常见实例包括立体异构(例如,D-氨基酸)和非天然氨基酸像例如L-鸟氨酸、L-高半胱氨酸、L-高丝氨酸、L-瓜氨酸、3-亚磺基-L-丙氨酸、N-(L-精氨酸)琥珀酸、3,4-二羟基-L-苯丙氨酸、3-碘-L-酪氨酸、3,5-二碘-L-酪氨酸、三碘甲腺原氨酸、L-甲状腺素、L-硒代半胱氨酸、N-(L-精氨酸)牛磺酸、4-氨基丁酸、(R,S)-3-氨基-2-甲基丙酸、 α,α -二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、 β -丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-羟基脯氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-甲基甘氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、正亮氨酸和其他相似的氨基酸和亚氨基酸。用于将非天然氨基酸位点特异性并入蛋白质和肽中的一般方法描述在Noren等人,Science[科学],244:182-188(1989年4月)。

[0185] 人们还可以通过磷酸化和其他方法容易地修饰肽(例如,如在Hruby等人,(1990),Biochem J.[生物化学杂志]268:249-262中描述的)。

[0186] 本发明的肽化合物还用作用于具有相似生物学活性的非肽化合物的结构模型。本领域技术人员认识到,可以使用各种技术来构建化合物,这些化合物与前导肽化合物具有相同或相似的所需生物活性,但关于溶解度、稳定性和水解作用和蛋白质水解的敏感性,具有比前导更有利的活性(参见,例如,Morgan和Gainor,(1989),Ann.Rep.Med.Chem.[医药化学报告年刊]24:243-252)。这些技术包括用由膦酸盐、酰胺化物、氨基甲酸酯、磺酰胺、仲胺和N-甲基氨基酸组成的骨架替代肽骨架。

[0187] 本发明还提供了披露的肽单体的缀合物。因此,根据优选的实施例,本发明的单体肽是二聚的或寡聚的,由此增强其生物活性。

[0188] 在一个实施例中,本发明的肽单体可以使用生物素/链霉亲和素系统进行寡聚。肽单体的生物素化的类似物可以通过标准技术来合成。例如,这些肽单体可以是C-末端生物素化的。然后将这些生物素化的单体通过用链霉亲和素孵育进行寡聚[例如,在4:1摩尔比,在室温下,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)或HEPES-缓冲的RPMI介质(英杰公司(Invitrogen))中,持续1小时]。在此实施例的变型中,生物素化的肽单体可以通过用许多可商购的抗生物素抗体中任一种的孵育进行寡聚[例如,来自基尔克高&佩里实验室公司(Kirkegaard&Perry Laboratories,Inc.) (华盛顿DC)的山羊抗生物素IgG]。

[0189] 接头在其他实施例中,本发明的这些肽单体可以通过共价结合至至少一个接头部分进行二聚。该接头(L_R)部分可以是C₁₋₁₂连接部分,该连接部分任选地用一个或两个-NH-连

接终止并在一种或多种可获得的碳原子上任选地用低级烷基取代基取代(例如, -NH-R-NH-, 其中R是用官能团如羧基基团或氨基基团(像例如, 赖氨酸残基或赖氨酸酰胺)取代的低级(C₁₋₆)亚烷基)。

[0190] 在另外的实施例中, 聚乙二醇(PEG)可以用作接头L_K, 该接头L_K使两个肽单体二聚: 例如单个PEG部分可以同时地附接至肽二聚物的两个肽链的N-末端。

[0191] 在又一个另外的实施例中, 该接头(L_K)部分优选地但不是必然地是分子, 该分子含有两个羧酸并任选地在一个或多个可获得的原子上被另外的官能团(如能够结合至一个或多个PEG分子上的胺)取代。此类分子可以描绘为:

[0192] $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-$

[0193] 其中n是从0至10的整数, m是从1至10的整数, X选自O、S、N(CH₂)_pNR₁、NCO(CH₂)_pNR₁和CHNR₁, R₁选自H、Boc、Cbz等, 并且p是从1至10的整数。

[0194] 在肽合成期间可以将接头并入该肽中。例如, 在接头L_K部分含有能够充当用作肽合成的起始位点的两个官能团和能够与另一个分子部分结合的第三官能团(例如羧基基团或氨基基团)时, 该接头可以缀合至固体支持物上。此后, 两种肽单体可以在固相合成技术的变体中直接合成到接头L_K部分的两个反应性氮基团上。

[0195] 在其中肽二聚物由接头L_K部分二聚的可替代的实施例中, 在肽合成之后, 所述接头可以缀合至肽二聚物的两个肽单体上。此类缀合可以通过本领域中已建立的方法来实现。在一个实施例中, 该接头含有适合用于附接至合成的肽单体的靶标官能团的至少两个官能团。例如, 具有两个游离胺基团的接头可以与两种肽单体每个的C末端羧基基团反应。在另一个实例中, 含有两个羧基基团(预激活的或在合适的偶合试剂存在下)的接头可以与两种肽单体中的每个的N-末端或侧链胺基团、或者C-末端赖氨酸酰胺反应。

[0196] 间隔区。肽单体或二聚物可以进一步包含一个或多个间隔区部分。此类间隔区部分可以附接至肽单体或肽二聚物(例如此类间隔区部分可以附接至连接肽二聚物的单体的接头L_K部分)。例如, 此类间隔区部分可以经由赖氨酸接头的羰基碳、或者经由亚氨基二乙酸接头的氮原子附接至肽。此类间隔区可以将肽连接至附接的水溶性聚合物部分或保护基团上。

[0197] 在一个实施例中, 该间隔区部分是C₁₋₁₂连接部分, 该C₁₋₁₂连接部分任选地用-NH-连接或羧基(-COOH)基团终止, 并任选地在一个或多个可获得的碳原子上被低级烷基取代基取代。在一个实施例中, 该间隔区是R-COOH, 其中R是低级(C₁₋₆)亚烷基, 该低级(C₁₋₆)亚烷基任选地被能够结合至另一个分子部分的官能团(如羧基基团或氨基基团)取代。例如, 该间隔区可以是甘氨酸(G)残基、或氨基己酸。

[0198] 在其他实施例中, 该间隔区是-NH-R-NH-, 其中R是低级(C₁₋₆)亚烷基, 该低级(C₁₋₆)亚烷基被能够结合至另一个分子部分的官能团(如羧基基团或氨基基团)取代。例如, 该间隔区可以是赖氨酸(K)残基或赖氨酸酰胺(K-NH₂、赖氨酸残基, 其中羧基基团已经转化为酰胺部分-CONH₂)。

[0199] 在肽合成期间可以将间隔区并入该肽中。例如, 在间隔区含有游离氨基基团和能够结合至另一个分子部分的第二官能团(例如羧基基团或氨基基团)时, 该间隔区可以缀合至固体支持物上。此后, 肽可以通过标准固相技术直接合成到间隔区的游离氨基基团上。

[0200] 例如, 含有两个官能团的间隔区首先经由第一官能团偶联至固体支持物上。接下

来,具有能够用作用于肽合成的起始位点的两个官能团和能够结合另一个分子部分的第三官能团(例如,羧基基团或氨基基团)的接头 L_k 部分经由间隔区的第二官能团和接头的第三官能团缀合至间隔区上。此后,两种肽单体可以在固相合成技术的变体中直接合成到接头 L_k 部分的两个反应性氮基团上。例如,具有游离胺基团的固体支持物偶联间隔区可以经由接头的游离羧基基团与赖氨酸接头反应。

[0201] 在其中肽化合物含有间隔区部分的可替代的实施例中,在肽合成之后,所述间隔区可以缀合至该肽。此类缀合可以通过本领域中已建立的方法来实现。在一个实施例中,该接头含有适合用于附接至合成的肽的靶标官能团的至少一个官能团。例如,具有游离胺基团的间隔区可以与肽的C-末端羧基基团反应。在另一个实例中,具有游离羧基基团的接头可以与肽的N-末端的游离胺基团或赖氨酸残基的游离胺基团反应。在又一个实例中,含有游离巯基基团的间隔区可以通过氧化缀合至肽的半胱氨酸残基以形成二硫键。

[0202] 水溶性化合物部分。这些肽单体、二聚物、或本发明的多聚体可以进一步包含一种或多种水溶性聚合物部分。优选地,这些聚合物共价附接至本发明的肽化合物上。包括在以下描述中,将于2004年5月12日提交的美国专利申请序列号10/844,933和国际专利申请号PCT/US 04/14887以其全文通过引用结合在此。

[0203] 在最近几年,已经使用水溶性的聚合物(如聚乙二醇(PEG))用于共价修饰具有治疗和诊断重要性的肽。认为此类聚合物的附接增强生物活性,延长血液循环时间,减少免疫原性,增加水溶解度,并增强对蛋白酶消化的抗性(参见,例如,J.M.Harris编,“Biomedical and Biotechnical Applications of Polyethylene Glycol Chemistry[聚乙二醇化学的生物学和生物技术应用]”Plenum,纽约,1992;Knauf等人,(1988),J.Biol.Chem.[生物化学杂志]263:15064;Tsutsumi等人,(1995),J.Controlled Release[控释杂志]33:447;Kita等人,(1990),Drug Des.Delivery[药物设计和递送]6:157;Abuchowski等人,(1977),J.Biol.Chem.[生物化学杂志]252:582;Beauchamp等人,(1983),Anal.Biochem.[分析生物化学]131:25;Chen等人,(1981),Biochim.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学报]660:293)。

[0204] 用于本发明的肽化合物的水溶性聚合物可以是例如聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐、聚氨基酸(均聚物或无规则共聚物之一)、聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/乙烯氧化物共聚物、和聚氧乙烯多元醇。

[0205] 该水溶性聚合物可以是任何分子质量的、或者可以是支链的或非支链的。用于本发明的优选的PEG包含具有低分子量的直链、非支链的PEG。应当理解,在给定的PEG制剂中,在各个分子中,分子量通常会变化。一些分子会比所述分子量更多、和更少一些。这种变化通常通过使用词“约”反映来描述PEG分子的分子量。

[0206] 可以使用将一个或多个水溶性聚合物连接至分子的受体结合部分(例如,肽+间隔区)上的各种化学反应中的任一种,将本发明的肽、肽二聚体和其他基于肽的分子附接至水溶性聚合物(例如,PEG)上。典型的实施例采用单个附接连接将一个或多个水溶性聚合物共价附接到受体结合部分,然而,在可替代的实施例中,可以使用多个附接连接,包括另外的变型(其中不同类型的水溶性聚合物在不同的附接连接处附接至受体结合部分),其可以包括与间隔区和/或一个或两个肽链的一个或多个共价附接连接。在一些实施例中,二聚体或

更高级多聚体将包含不同种类的肽链(即,异二聚体或其他异多聚体)。作为举例而非限制,二聚体可以包含具有PEG附接连接的第一肽链,并且第二肽链可以缺少PEG附接连接或利用与第一肽链不同的连接化学,并且在一些变体中该间隔区可以包含或缺少PEG附接连接,并且如果所述间隔区聚乙二醇化,则所述间隔区可以利用不同于第一和/或第二肽链的连接化学。可替代的实施例采用附接至受体结合部分的间隔区部分的PEG以及不同的水溶性聚合物(例如,碳水化合物),该不同的水溶性聚合物缀合至分子的肽部分的氨基酸之一的侧链。

[0207] 可以使用多种聚乙二醇(PEG)种类用于受体结合部分(肽+间隔区)的PEG化。基本上可以使用任何合适的反应性PEG试剂。在优选的实施例中,当与受体结合部分缀合时,反应性PEG试剂将导致形成氨基甲酸酯或酰胺键。适合的反应性PEG种类包括但不限于在NOF公司的药物递送系统目录(2003)(惠比寿花园广场塔(Yebisu Garden Place Tower),惠比寿(Ebisu)4-丁目20-3,涩谷区,东京150-6019)和内克塔治疗公司(Nektar Therapeutics)的分子工程目录(2003)(发现大道(Discovery Drive)490,亨茨维尔,阿拉巴马州35806)中出售可获得的那些。例如并不限于,在各种实施例中通常优选以下PEG试剂:mPEG2-NHS、mPEG2-ALD、多臂PEG、mPEG(MAL)2、mPEG2(MAL)、mPEG-NH₂、mPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG-硫酸酯、mPEG-双酯、mPEG-BTC、mPEG-ButyrALD、mPEG-ACET、杂功能PEG(NH₂-PEG-COOH、Boc-PEG-NHS、Fmoc-PEG-NHS、NHS-PEG-VS、NHS-PEG-MAL)、PEG丙烯酸酯(ACRL-PEG-NHS)、PEG-磷脂(例如,mPEG-DSPE)、SUNBRITE系列的多臂PEG(包括通过本领域技术人员所选择的化学反应激活的基于甘油的PEG的GL系列)、任何SUNBRITE激活的PEG(包括但不限于羧基-PEG、p-NP-PEG、三氟乙磺酰基(Tresyl)-PEG、乙醛PEG、乙缩醛-PEG、氨基-PEG、硫醇-PEG、顺丁烯二酰亚胺基-PEG、羟基-PEG-胺、氨基-PEG-COOH、羟基-PEG-乙醛、酸酐类-PEG、功能化的PEG-磷脂、和如由本领域技术人员所选择的用于其特定应用和用途的其他相似的和/或适合的反应性PEG)。

[0208] 所附接的聚合物分子数量可以改变:例如,一个、两个、三个、或更多个水溶性聚合物可以附接至本发明的肽。多个附接的聚合物可以是相同或不同的化学部分(例如,不同分子量的PEG)。在一些情况下,聚合物附接的程度(附接至肽的聚合物部分的数量和/或聚合物附接的肽的总数)可能受到附接反应中聚合物分子与肽分子的比例的影响、以及通过反应混合物中各自的总浓度影响。通常,最佳的聚合物与肽的比例(在不提供过量的未反应的肽和/或聚合物部分的反应效率方面)将由以下因素确定如:所希望的聚合物附接的程度(例如,单聚、二聚、三聚等)、所选择的聚合物的分子量、聚合物是支链的还是非支链的、以及特定附接方法的反应条件。

[0209] 本领域技术人员可以使用许多PEG附接方法(参见,例如,Goodson等人,(1990),Bio/Technology[生物/技术]8:343;EP 0 401 384;Malik等人,(1992),Exp.Hematol.[实验血液学]20:1028-1035;PCT公开号W090/12874;美国专利号5,757,078;以及美国专利号6,077,939)。例如,激活的PEG可以通过反应性基团共价结合至氨基酸残基,如N-末端氨基酸残基和赖氨酸(K)残基中的游离氨基基团或C-末端氨基酸残基中的游离羧基基团。巯基基团(例如,如在半胱氨酸残基上发现的)也可以用作用于附接PEG的反应性基团。此外,已经描述了具体地在多肽的C-末端用于引入激活的基团(例如,酰肼、醛和芳香族-氨基基团)的酶辅助方法(Schwarz等人,(1990),Methods Enzymol.[酶方法]184:160;Rose等人,

(1991), *Bioconjugate Chem.* [生物缀合化学]2:154; Gaertner等人, (1994), *J. Biol. Chem.* [生物化学杂志]269:7224)。

[0210] 例如, 使用具有不同活性部分的甲氧基化PEG (“mPEG”) 可以将PEG分子附接至肽氨基基团上。此类聚合物包括mPEG-琥珀酰亚胺琥珀酸酯、mPEG-琥珀酰亚胺碳酸酯、mPEG-酰亚胺酯(imidate)、mPEG-4-硝基苯基碳酸酯、和mPEG-氰尿酸氯。相似地, 可以使用具有游离胺基团的甲基化的PEG (mPEG-NH₂) 将PEG分子附接至肽羧基基团。

[0211] 在PEG的附接是非特异性的并且需要含有特异性PEG附着的肽时, 可以从PEG化的化合物的混合物中纯化所希望的PEG化的化合物。例如, 如果需要N-末端PEG化的肽, 则可以从随机PEG化的肽的群体中纯化N-末端PEG化的形式(即将该部分与其他单PEG化部分分离)。

[0212] 在N-末端、侧链、和C-末端处的位点特异性PEG化可以通过以下进行: (i) 固相合成(参见, 例如, Felix等人, (1995), *Int. J. Peptide Protein Res.* [国际肽和蛋白质研究杂志]46:253) 或(ii) 以位点特异性方式通过由N-末端苏氨酸的高碘酸钠氧化产生的N末端的反应性醛基基团将肽附接至脂质体表面接枝的PEG链的端点上(参见, 例如, Zalipsky等人, (1995), *Bioconj. Chem.* [生物缀合化学]6:705; 该方法仅限于具有N-末端丝氨酸或苏氨酸残基的多肽), 或(iii) 经由描述于美国专利号6,077,939中的脞、还原的脞、脞或还原的脞键。

[0213] 在一个方法中, 可以通过还原性烷基化实现选择性N-末端PEG化, 该还原性烷基化利用可用于特定蛋白质衍生化的不同类型的伯氨基基团(赖氨酸与N-末端)的差异反应性。在适当的反应条件下, 含有PEG的羰基基团选择性附接至肽的N-末端。例如, 人们可以通过在利用赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团和肽的N-末端残基的 α -氨基基团之间的pK_a差异的pH下进行反应来选择性地N末端PEG化蛋白质。通过此类选择性附接, PEG化主要发生在蛋白质的N-末端, 而没有其他反应性基团(例如, 赖氨酸侧链氨基基团)的显著修饰。使用还原性烷基化, PEG应该具有用于偶联到蛋白质的单个反应性的醛(例如, 可以使用PEG丙醛)。

[0214] 位点特异性诱变是可用于制备用于位点特异性聚合物附接的肽的另一种方法。通过此方法, 将肽的氨基酸序列设计为在肽内的所希望位置处并入适当的反应性基团。例如, WO 90/12874描述了通过插入半胱氨酸残基或者用其他残基取代半胱氨酸残基所修饰的蛋白质的定点PEG化。

[0215] 在PEG附接至间隔区或接头部分时, 可以使用相似的附接方法。在这种情况下, 接头或间隔区含有反应性基团, 并且使用含有适当的互补反应性基团的激活的PEG分子来实现共价附接。在优选的实施例中, 接头或间隔区反应性基团含有末端氨基基团(即, 位于接头或间隔区的末端), 末端氨基基团该与适当激活的PEG分子反应以制备稳定的共价键(如酰胺或氨基甲酸酯)。合适的激活的PEG种类包括但不限于: mPEG-对硝基苯基碳酸酯(mPEG-NPC)、mPEG-琥珀酰亚胺基碳酸酯(mPEG-SC)、和mPEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯(mPEG-SPA)。在其他优选的实施例中, 接头或间隔区反应性基团含有羧基基团, 该羧基基团在合适的反应条件下能够被激活以与含胺的PEG分子形成共价键。合适的PEG分子包括mPEG-NH₂, 并且合适的反应条件包括碳二亚胺介导的酰胺形成等。

[0216] 本发明的肽可以通过本领域已知的传统方法进行制备。这些标准方法包括专一固相合成、自动固相合成、部分固相合成方法、片段缩合、传统溶液合成和重组DNA技术(参见,

例如, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. [美国化学学会学报] 1963 85:2149 和 Merrifield 等人, 1982, Biochemistry [生物化学] 21:502)。

[0217] 用于肽合成的优选的方法是固相合成。固相肽合成程序是本领域公知的(参见, 例如, Stewart, Solid Phase Peptide Syntheses [固相肽合成], 弗雷曼公司 (Freeman and Co.): 旧金山, 1969; 来自 Novabiochem 公司的 2002/2003 总目录, 圣地亚哥, 美国; Goodman, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics [肽和多肽模拟物的合成], Houben-Weyl, 斯图加特 (Stuttgart) 2002)。在固相合成中, 通常使用 α -氨基保护的树脂从肽的 C-末端开始合成。可以例如通过将所需的 α -氨基酸附接至氯甲基化树脂、羟甲基树脂、聚苯乙烯树脂、二苯甲基胺树脂等上来制备合适的起始材料。一种此类的氯甲基化树脂由伯乐实验室 (Bio Rad Laboratories) (里士满, 加利福尼亚州) 在商品名 BIO-BEADS SX-1 下出售。已经描述了羟甲基树脂的制备 (Bodonszky 等人, (1966), 化学工业公司 (Chem. Ind.), 伦敦 38:1597)。已经描述了二苯甲基胺 (BHA) 树脂 (Pietta 和 Marshall, 1970, Chem. Commun. [化学通讯], 650), 并且盐酸盐形式是可从贝克曼仪器有限公司 (Beckman Instruments, Inc.) (帕洛阿尔托, 加利福尼亚州) 商购的。例如, 根据 Gisin 描述的方法, α -氨基保护的氨基酸可借助于碳酸氢铯催化剂的帮助偶联至氯甲基化的树脂 (1973, Helv. Chim. Acta [瑞士化学学报] 56:1467)。

[0218] 初始偶联后, 例如在室温下在有机溶剂中使用三氟乙酸 (TFA) 或盐酸 (HCl) 溶液, 去除 α -氨基保护基团。此后, α -氨基保护的氨基酸依次偶联至生长的支持物结合肽链。 α -氨基保护的基团是已知在肽的逐步合成领域中有用的那些, 包括: 酰基类的保护基团 (例如, 甲酰基、三氟乙酰基、乙酰基)、芳香族尿烷类的保护基团 [例如, 苄氧基羰基 (Cbz) 和经取代的 Cbz]、脂肪族尿烷保护基团 [例如, 叔丁氧基羰基 (Boc)、异丙基羰基、环己基氧羰基]、和烷基类的保护基团 (例如, 苄基、三苯基甲基)、苄氧基羰基 (Fmoc)、烯丙氧羰基 (Alloc) 和 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧环己-1-亚基) 乙基 (Dde)。

[0219] 侧链保护基团 (典型地醚、酯、三苯甲基、PMC (2,2,5,7,8-五甲基-色满-6-磺酰基) 等) 在偶联期间保持原样, 并且在氨基末端保护基团的脱保护期间或在偶联期间不分裂出去。在完成最终肽的合成时并在不会改变靶肽的反应条件下, 侧链保护基团必须是可去除的。Tyr 的侧链保护基团包括四氢吡喃基、叔丁基、三苯甲基、苄基、Cbz、Z-Br-Cbz 和 2,5-二氯苄基。Asp 的侧链保护基团包括苄基、2,6-二氯苄基、甲基、乙基和环己基。Thr 和 Ser 的侧链保护基团包括乙酰基、苄甲酰基、三苯甲基、四氢吡喃基、苄基、2,6-二氯苄基、和 Cbz。Arg 的侧链保护基团包括硝基、甲苯磺酰基 (Tos)、Cbz、金刚烷基氧羰基均三甲磺酰基 (Mts)、2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基 (Pbf)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基 (Mtr) 或 Boc。Lys 的侧链保护基团包括 Cbz、2-氯苄氧羰基 (2-Cl-Cbz)、2-溴苄氧羰基 (2-Br-Cbz)、Tos 或 Boc。

[0220] 在去除 α -氨基保护基团后, 剩余的保护的氨基酸以所需顺序逐步偶联。每个保护的氨基酸通常使用适当的羧基基团激活剂 (如在溶液 (例如, 在二氯甲烷 (CH_2Cl_2)、N-甲基吡咯烷酮、二甲基甲酰胺 (DMF) 或其混合物) 中的 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU) 或二环己基碳二亚胺 (DCC)) 以大约 3 倍的过量进行反应。

[0221] 在所希望的氨基酸序列已经完成之后, 通过用试剂 (如三氟乙酸 (TFA) 或氟化氢 (HF)) 的处理来将所需的肽从树脂支持物解偶联, 其不仅从树脂切割肽, 而且还切割所有剩

余的侧链保护基团。当使用氯甲基化树脂时,氟化氢处理导致游离肽酸的形成。当使用二苯甲基胺树脂时,氟化氢处理直接导致游离肽酰胺。可替代地,当采用氯甲基化树脂时,可以通过用氨处理肽树脂来解偶联侧链保护的肽以给出所希望的侧链保护的酰胺,或者通过用烷基胺处理肽树脂来解偶联侧链保护的肽以给出侧链保护的烷基酰胺或二烷基酰胺。然后以常规方式通过用氟化氢处理去除侧链保护以给出游离酰胺、烷基酰胺或二烷基酰胺。在制备本发明的酯时,采用用于制备肽酸的树脂,并用碱和适当的醇(例如甲醇)将侧链保护的肽切割。然后以常规方式通过用氟化氢处理去除侧链保护基团以获得所希望的酯。所得肽可以使用HPLC进一步纯化。

[0222] 这些程序也可以用于合成肽,其中除20个天然存在的遗传编码氨基酸之外的氨基酸在本发明任何化合物的一个、两个或更多个位置被取代。可以被取代到本发明的肽中的合成氨基酸包括但不限于N-甲基、L-羟丙基、L-3,4-二羟基苯丙氨酰基、 δ 种氨基酸如(L- δ -羟基赖氨酰基和D- δ -甲基丙氨酰基、L- δ -甲基丙氨酰、 β 氨基酸和异喹啉基)。D-氨基酸和非天然存在的合成氨基酸也可以并入本发明的肽中。

[0223] 除了化学合成之外,本发明的肽可以通过采用重组DNA技术通过表达一种或多种包含肽编码区的多核苷酸来合成。因此,在此提供了编码本发明的肽的分离的多核苷酸以及已被遗传修饰以表达或过表达本发明的肽的重组载体和宿主细胞(包括真核和原核)。

[0224] 在一个实施例中,本发明提供了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码本发明的肽的核苷酸序列。

[0225] 可以在本领域已知的任何常规表达系统中通过将编码感兴趣的肽的DNA片段分离并克隆到表达载体中来实现表达。

[0226] 本发明有用的化合物不限于并入天然和/或非天然氨基酸中的肽。本发明还涵盖了各种模拟肽,像例如类肽(一类模拟肽,其侧链附着于肽骨架的氮原子而不是 α -碳上)。可以开发出许多与本发明的肽具有相似功能特性的非肽分子,以在单个分子内引入不同的化学官能团。这些分子通常被称为支架分子或支架,因为它们可以适应广泛的化学功能,并可被设计成在空间中呈现出广泛的相对几何取向的化学官能团。分子支架系统包括但不限于碳水化合物(参见,例如,Tamaruya等人,Angew Chem.Int.Ed.Engl.[应用化学国际英语版],2004,43(21):2834-7)、肽核酸(PNA's)(参见,例如,Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications[肽核酸:方案方案和应用],第2版,Peter E.Nielsen编,Horizon Bioscience[地平线生物科学],2004)和不是衍生自生物前体的分子(参见,例如,Savinov和Austin,Org.Lett.[有机化学通讯]2002,4(9):1419-22)。此类不同的一组化学反应的合并可能需要在合成过程中对反应性官能团进行化学保护。这些技术是本领域公知的,并可以在参考(如T.W.Green、P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis[有机合成中的保护性基团]威利国际科学出版公司(Wiley-Interscience),纽约,1999)中找到。

[0227] 在此披露的的肽及其衍生物可以与药学上可接受的载体(如佐剂或媒介物)和/或赋形剂和/或稀释剂一起配制成组合物。本发明的组合物可以包括其中组分的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐,包括酸加成盐(与肽的游离氨基形成),该酸加成盐与无机酸(如像盐酸或磷酸)或有机酸(如乙酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。与游离羧基基团形成的盐可以衍生自无机碱(像例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物)和有机碱(如异丙胺、三甲胺、2-乙

基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0228] 药学上可接受的载体是本领域技术人员熟悉的,并可以包括无菌液体,如水和油,包括石油,动物,植物油,或合成来源的那些(如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)。优选地将水或水溶液盐水溶液和右旋糖水溶液以及甘油溶液用作具体地用于可注射溶液的载体。合适的药物载体描述在E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿药物科学]”中。对于配制为液体溶液的组合物,可接受的载体和稀释剂包括盐水和无菌水,并可以任选地包括抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和其他常用的添加剂。这些组合物还可以配制成丸剂、胶囊、颗粒剂或片剂,这些丸剂、胶囊、颗粒剂或片剂除了本发明的肽之外,还可以含有稀释剂、分散剂和表面活性剂、粘合剂和润滑剂。适当的配制品取决于所选择的给予途径。

[0229] 考虑到确切的给予方式、药物的给予形式、给予涉及的指示、所涉及的受试者(例如,体重、健康状况、年龄、性别等)以及负责的医师或兽医的偏好和经验,可以通过实验来确定本发明的化合物或组合物的最佳治疗有效量。

[0230] 本发明的肽和组合物的功效可以使用以下实施例部分描述的体外和体内测定来确定。

[0231] 遵循本领域良好建立的方法,在体内测试中表现良好本发明的肽和组合物的有效量和毒性,可以在研究中使用小动物模型(例如,小鼠、大鼠或狗)来确定,在这些动物中其被发现是治疗有效的,并在这些动物中这些药物可以通过针对人类试验提出的相同途径来给予。

[0232] 对于在本发明的方法中使用的任何药物组合物,从动物系统衍生的剂量-响应曲线可用于确定给予至人类的测试剂量。在每种组合物的安全性测定中,给予的剂量和频率应满足或超过预期在任何临床试验中使用的那些。

[0233] 如在此披露的,确定本发明组合物中化合物的剂量以确保连续或间歇给予的剂量不会超过在考虑测试动物的结果和患者的个体状况后确定的量。取决于剂量程序、患者或受试动物的状况(如年龄、体重、性别、敏感性、喂养、剂量期间,组合使用的药物、疾病严重程度等),具体剂量自然不同(并且最终根据执业医生的判断和每个患者的情况来决定)。

[0234] 本发明组合物的毒性和治疗功效可以通过试验性动物中的标准药物程序来确定,例如通过确定LD₅₀(对群体的50%致死的剂量)和ED₅₀(在50%群体中的治疗有效剂量)。治疗和毒副作用之间的剂量比是治疗指标,可以它表示为ED₅₀/LD₅₀的比例。

[0235] 所有已知的肽递送方法可用于将本发明的肽递送至靶组织。用于给定肽的特定类型的递送通过其具体的大小、灵活性、构象、组成氨基酸的生物化学性质和氨基酸排列来确定。肽组合物还部分地决定了蛋白质结合的程度、酶稳定性、细胞螯合、到非目标组织中的摄取、清除率和对蛋白质载体的亲和力。还必须考虑独立于肽组合物的其他方面,如脑血流量、饮食、年龄、性别、物种(用于实验研究的)、给予途径和现有病理状况的影响。

[0236] 包含本发明的肽的肽和/或药物组合物可以经由各种给予途径给予至需要的受试者(例如,人或动物),这些给予途径包括但不限于全身给予、吸入、局部、舌下、口服、鼻内和/或直接滴注(例如,用于肺部治疗的气管内滴注)。此外,可以将本发明的肽用或不用任何药学上可接受的载体、赋形剂、溶剂和/或溶液,并且以某个的适当剂量配制用于任何合适的给予。

[0237] 用于获得本发明的肽的有效组织递送的递送方法(以及在脑组织的情况下有效通过血脑屏障[BBB])的实例包括但不限于以下各项(例如,在Witt和Davis,AAPS Journal [AAPS期刊],2006;8(1):E76-E88中所综述的):

[0238] (i) 浸入式程序(例如,直接注射[例如,使用外部泵或静脉内线]、瞬时渗透开放、分流器和可生物降解植入物);

[0239] (ii) 基于药理学的方法通过肽分子本身的化学修饰来增加组织递送,或通过将肽附接或包封在增加通透性、稳定性、生物利用度和/或受体亲和力的物质中;此外,肽结构的修饰和/或成分的添加(例如,亲脂性增强剂、聚合物、抗体),这些成分可以增强靶组织中的局部肽浓度;

[0240] (iii) 利用各种载体机制的基于生理学的策略;可以将这些策略组合,取决于给定肽的性质,产生的“杂交”肽,导致协同递送和端效应。

[0241] 用于改进本发明的肽的递送的肽修饰和方法的具体实例包括但不限于,脂化(lipidization)(例如,组成氨基酸的甲基化、二甲基化、卤化,或N-末端氨基酸的酰化或烷基化),结构修饰以增强稳定性(例如,使用D-氨基酸、N-酰化、或环化,例如经由二硫键或经由酰肼键),糖基化(例如,添加单糖像例如葡萄糖或木糖),增加营养转运体的亲和力(例如,添加己糖或促进将物质递送至大脑的大中性氨基酸载体),通过将肽缀合至具有已知转运体活性的分子或者缀合至亲脂性增强剂形成前药,该前药在作用位点处或附近切割(例如使用酯化[例如,用芳族苯甲酰酯或支链叔丁基酯]或氨基、羟基或含羧酸的肽的酰胺化;同样,可以使用与甲基二氢吡啶载体的缀合和随后通过脑中的NADH连接的脱氢酶的氧化来促进向脑的氧化还原系统介导的递送,这导致季铵盐,其不穿过BBB内皮),基于载体的递送(例如,通过将肽耦合到物质,该物质通过受体介导的或吸收介导的内吞作用增加亲和力并通过生物膜传递,然后通过酶切割释放肽(例如,通过将肽偶联至物质,该物质增加对生物膜的亲和力并增加经由受体介导的或吸收介导的内吞作用至生物膜的转运,随后通过酶法分析产物[将肽缀合至鼠单克隆抗体(0X26)至转铁蛋白或缀合至阳离子化白蛋白以增加脑吸收]),阳离子化以增加经由吸收介导的内吞作用的膜进入,以及聚合物缀合/封装(例如,缀合至聚(乙二醇)[PEG]或聚(苯乙烯顺丁烯二酸)或经由微胶囊或纳米胶囊的封装[例如,尺寸在10nm和1000nm之间的聚合物纳米颗粒,其具有聚山梨酯外涂层,像例如聚山梨醇酯-80]、脂质体[例如,用柔性亲水性聚合物像例如PEG和/或由磷脂双层组成的脂质体(例如普鲁尼克共聚物P85)接枝的表面改性的长循环脂质体,其作为亲水和疏水肽的载体]、胶束[例如,由两亲性PEG-磷脂缀合物制备的稳定的聚合胶束]或细胞影)。综述在Torchilin和Lukyanov,DDT,2003,8(6):259-266;Egleton和Davis,NeuroRx,2005,2:44-53;Witt和Davis,AAPS Journal [AAPS期刊],2006;8(1):E76-E88中。

[0242] 不管所用的递送方法,本发明的一个重要方面是保持所得到的递送的肽的尺寸足够小(例如,通过使用可切割的缀合物)。

[0243] 口服递送。在此考虑使用的是口服固体剂型,这些口服固体剂型通常描述在Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿药物科学],第18版,1990(麦克出版公司(Mack Publishing Co)伊斯顿,宾夕法尼亚州18042)在第89章,将其通过引用结合在此。固体剂型包括片剂、胶囊、丸剂、糖剂或锭剂、扁囊剂、丸剂、粉末或颗粒剂。此外,可以使用脂质体或类蛋白酶包封来配制本发明的组合物(像例如美国专利号4,925,673中报道的类蛋

白微球)。可以使用脂质体包封,并且这些脂质体可以用各种聚合物衍生化(例如美国专利号5,013,556)。治疗剂的可能的固体剂型的描述由以下给出:Marshall,K.,在:Modern Pharmaceuticals[现代制药],由G.S.Banker和C.T.Rhodes编辑,第10章,1979,通过引用结合在此。通常,该配制品将包括本发明的肽(或其化学修饰形式)和允许保护免受胃环境和肠中释放的生物活性物质的惰性成分。

[0244] 在此还考虑使用的是口服给予的液体剂型,这些液体剂型包括药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮液和糖浆,其可含有包括惰性稀释剂的其他成分;助剂如润湿剂、乳化剂和悬浮剂;和甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0245] 如以上讨论,这些肽可以被化学修饰这样使得衍生物的口服递送是有效的。通常,所考虑的化学修饰是将至少一个部分附接至组分分子本身,其中所述部分允许(a)增加肽稳定性(例如,通过抑制蛋白水解)和(b)从胃或肠中有效摄取到血流中。如以上讨论的,常见的改进递送的肽修饰包括PEG化或添加部分(如丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚脯氨酸、聚-1,3-二氧戊环和聚-1,3,6-三氧杂环辛烷(tioxocane)(参见,例如Abuchowski和Davis,(1981),“Soluble Polymer-Enzyme Adducts[可溶性聚合物-酶加合物]”,在:Enzymes as Drugs[作为药物的酶]中,Hocenberg和Roberts编,(威利国际科学出版公司(Wiley-Interscience):纽约,纽约州),第367-383页;和Newmark等人,(1982),J.Appl.Biochem.[应用生物化学杂志]4:185-189)。

[0246] 对于口服配制品,释放的位置可以是胃、小肠(十二指肠、空肠或回肠)或大肠。本领域技术人员可获得的配制品,该配制品不会溶解在胃中,而是会将物质释放在十二指肠或肠内其他部位。优选地,该释放将通过保护肽(或衍生物)或通过肽(或衍生物)超出胃环境(如在肠中)释放来避免胃环境的有害影响。

[0247] 为了确保充分的抗胃液性,在至少pH 5.0下不可渗透的涂层是至关重要的。用作肠溶衣的更常见的惰性成分的实例是醋酸纤维素偏苯三酸酯(CAT)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯(HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯(PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)、Eudragit L、Eudragit S、和虫胶。可以将这些涂层作为混合膜使用。

[0248] 也可以将涂层或涂层混合物在片剂上使用,这些片剂不是旨在针对胃的保护。这可以包括糖衣或使片更容易吞咽的涂层。胶囊可以由用于递送干燥治疗剂(即粉末)的硬壳(如明胶)组成,对于液体形式可以使用软明胶壳。扁囊剂的外壳材料可以是厚淀粉或其他可食用纸。对于丸剂、锭剂、模塑片剂或片剂磨碎物,可以使用潮湿集结技术。

[0249] 肽(或衍生物)可以以粒度约1mm的颗粒或球粒形式作为精细多颗粒包含在配制品中。用于胶囊给予的材料的配制品还可以是粉末、轻压缩的栓、甚至是片剂。这些治疗剂可以通过压缩来制备。

[0250] 还可以包括着色剂和/或调味剂。例如,该肽(或衍生物)可以被配制(如通过脂质体或微球包封),并且然后进一步包含在可食用产品(如含有着色剂和调味剂的冷冻饮料)中。

[0251] 人们可以用惰性物质稀释或增加肽(或衍生物)的体积。这些稀释剂可以包括碳水化合物,特别是甘露糖醇、乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、改性葡聚糖和淀粉。某些无机盐(包括三磷酸钙、碳酸镁和氯化钠)还可以用作填料。一些可商购的稀释剂是Fast-Flo、

Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress、和Avicel。

[0252] 崩解剂可以包括在固体剂型的治疗剂配制品中。用作崩解剂的材料包括但不限于淀粉,该淀粉包括基于淀粉的商业崩解剂Explotab。羟基乙酸淀粉钠、Amberlite、羧甲基纤维素钠、超支链淀粉(ultramylopectin)、海藻酸钠、明胶、橙皮、酸性羧甲基纤维素、天然海绵和膨润土均可使用。崩解剂也可以是不溶性的阳离子交换树脂。粉状胶可用作崩解剂和粘合剂,并且可以包括粉状树胶,如琼脂、卡拉亚胶(Karaya)或黄芪胶。海藻酸及其钠盐也可用作崩解剂。

[0253] 可以使用粘合剂将肽(或衍生物)试剂保持在一起以形成硬片剂,并且包括来自天然产物的材料(如阿拉伯胶、黄芪胶、淀粉和明胶)。其他包括甲基纤维素(MC)、乙基纤维素(EC)和羧甲基纤维素(CMC)。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和羟丙基甲基纤维素(HPMC)都可以用于酒精性溶液中以使肽(或衍生物)粒子化。

[0254] 抗磨擦剂可以包括在肽(或衍生物)的配制品中,以在配制过程中预防粘连。润滑剂可以用作肽(或衍生物)和模具壁之间的层,并且这些可以包括但不限于:硬脂酸包括其镁盐和钙盐、聚四氟乙烯(PTFE)、液体石蜡、植物油和蜡。还可以使用可溶性润滑剂,如月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁、各种分子量的聚乙二醇、Carbowax 4000和6000。

[0255] 可以添加助流剂,该助流剂可以在配制品过程中改进药物流动性质并且在压缩过程中帮助重排。助流剂可以包括淀粉、滑石、热解二氧化硅和水合硅铝酸盐。

[0256] 为了帮助肽(或衍生物)溶解到水性环境中,可以添加表面活性剂作为润湿剂。表面活性剂可以包括阴离子洗涤剂,如月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。可以使用阳离子洗涤剂,并且可以包括苯扎氯铵或苜索氯铵。可以作为表面活性剂包括在配制品中的潜在的非离子洗涤剂的列表是聚桂醇400,硬脂酸聚乙二醇40,聚氧乙烯化蓖麻油10、50和60,单硬脂酸甘油酯,聚山梨醇酯20、40、60、65和80,蔗糖脂肪酸酯,甲基纤维素和羧甲基纤维素。这些表面活性剂可以单独或作为不同比例的混合物存在于蛋白质或衍生物的配制品中。

[0257] 潜在地增强肽(或衍生物)摄取的添加剂是例如脂肪酸油酸、亚油酸和亚麻酸。

[0258] 控释口服配制品可能是希望的。可以将肽(或衍生物)并入惰性基质中,其允许通过扩散或浸出机制释放,例如胶。缓慢降解的基质也可以并入该配制品中。一些肠溶衣也具有延缓释放的作用。控释的另一种形式是通过基于Oros治疗系统(阿尔扎公司(Alza Corp.))的方法,即将药物封闭在半透膜中,该半透膜由于渗透作用,允许水进入并通过单个小开口推出药物。

[0259] 可以将其他涂层用于配制品。这些包括可在涂布盘中使用的各种糖类。该肽(或衍生物)也可以在薄膜涂覆的片剂中给出,并且将在这种情况下使用的材料分成2组。第一组是非肠溶材料并包括甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、甲基羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基-甲基纤维素、羧基-甲基纤维素钠、聚维酮和聚乙二醇。第二组由肠溶材料组成,这些肠溶材料是邻苯二甲酸的常见的酯。

[0260] 可以使用材料的混合物来提供最佳的膜涂层。膜涂层可以在锅式涂布机中或在流化床中或通过压缩涂覆进行。

[0261] 肠胃外递送。根据本发明的用于肠胃外给予的制品包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液或乳剂。非水溶剂或媒介物的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油和玉米

油)、明胶、和可注射有机酯(如油酸乙酯)。此类剂型还可以含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。他们可以通过例如过滤(通过细菌保持过滤器)、通过将灭菌试剂并入组合物中、通过照射组合物或通过加热组合物来灭菌。它们也可以在使用前立即用无菌水或一些其他无菌注射培养基制造。

[0262] 通过吸入给予和鼻内给予。本发明涵盖了适于通过吸入给予和鼻内给予本发明的组合物的任何递送装置。优选地,此类手段给予定量的组合物。只要提供将组合物递送到口腔或肺或鼻粘膜的手段,本发明的组合物可以包装在任何适当的形式或容器中。有用的递送装置的非限制性实例包括例如滴注导管、滴管、单位剂量容器、挤压瓶泵喷雾器、无空气以及无防腐剂喷雾器、压缩空气雾化器、定量吸入器、吹入器和加压定量吸入器。为了给予液滴形式的液体,本发明的组合物可以放置在提供有常规滴管/闭合装置的容器中,例如,包含移液管等,优选地递送基本上固定体积的组合物/液滴。为了以喷雾剂的形式给予水溶液,可以通过本领域技术人员已知的各种方法将水溶液分配成喷雾形式。例如,此类组合物将被放置在适当的雾化装置中,例如,在泵-雾化器等中。雾化装置将以适当的方式提供,如用于将水性喷雾剂递送到鼻孔的喷雾适配器。优选地,其将以确保递送基本上固定体积的组合物/致动(即每个喷雾单元)的手段提供。鼻喷雾剂的实例包括由Ing. Erich Pfeiffer GmbH, Radolfzell, 德国产生的鼻制动器(参见美国专利号4,511,069、美国专利号4,778,810、美国专利号5,203,840、美国专利号5,860,567、美国专利号5,893,484、美国专利号6,227,415、和美国专利号6,364,166)。另外的气溶胶递送形式可以包括例如压缩的空气雾化器、喷射雾化器、超声波雾化器和压电式雾化器。可替代地,喷雾可以在气溶胶装置中在压力下装瓶。推进剂可以是气体或液体(例如,氟化烃和/或氯化烃)。喷雾组合物可以悬浮或溶解在液体推进剂中。可以存在稳定剂和/或悬浮剂和/或共溶剂。干粉可以容易地分散在吸入装置中,如在美国专利号6,514,496和Garcia-Arieta等人, Biol. Pharm. Bull. [生物与药物公报]2001;24:1411-1416中描述的。如果需要,可以将粉末或液体填充到软或硬胶囊中或在适于鼻给予的单剂量装置中。粉末可以在填充到胶囊(如明胶胶囊)中之前进行过滤。递送装置可能具有打开胶囊的手段。粉状鼻组合物可以作为单位剂型的粉末直接使用。可以使用例如吹入器给予胶囊或单剂量装置的内容物。优选地,其将用确保给药基本上固定量的组合物的手段提供。

[0263] 在另一个实施例中,本发明的组合物可以作为具有本发明的一种或多种肽的鼻插入物提供。该插入物可以保留在鼻中,但是被鼻粘液冲洗,并且可以设计成在鼻的相同位置释放本发明的肽、片段或衍生物。合适的鼻插入物类型包括鼻栓、棉塞等。鼻插入物的另外的实例、其特征和制备描述在EP490806中。

[0264] 递送装置不仅对于递送本发明的肽而言是重要的,而且对于提供用于储存的适当的环境也是重要的。这将包括防止微生物污染和化学降解的保护。装置和配方应是兼容的,以避免潜在的浸出或吸附。递送装置(或其包装)可以任选地提供有标签和/或使用说明书。

[0265] 可以使用本领域已知的任何标准给予途径和技术给予本发明的肽。还可以使用具有表达本发明的肽的能力的载体(如病毒载体)递送这些肽。

[0266] 本发明的肽的治疗性应用

[0267] 可以由本发明的肽靶向的纤维化疾病包括但不限于肝病,这些肝病包括但不限于任何病因的肝硬化和纤维化(酒精性;非酒精性脂肪性肝炎;自身免疫性肝炎;慢性丙型肝炎

炎;慢性乙型肝炎;原发性胆汁性肝硬化;继发性胆汁性肝硬化;硬化性胆管炎; α -1-抗胰蛋白酶缺乏;威尔逊氏症;胆道闭锁);肺疾病,包括但不限于特发性肺纤维化;放射性诱导的肺炎;慢性阻塞性肺病;肺气肿;继发于慢性感染和炎症;肾疾病,包括但不限于肾小球肾炎和小管间质纤维化;皮肤疾病,包括但不限于继发于烧伤;瘢痕疙瘩;肥厚性手术后伤口;硬皮病;食管-胃肠道,包括但不限于继发于腐蚀性物质;继发于炎症性疾病(炎症肠疾病;食管损伤和炎症);继发于缺血性疾病;腹膜纤维化;胰腺纤维化;放射后;继发于梗死的心血管疾病;继发于缺血/梗死的脑疾病;创伤后;和肌骨骼疾病,包括但不限于创伤后肌肉纤维化和滑膜/关节纤维化。

[0268] 可以由本发明的肽靶向的炎症性疾病包括但不限于肝病,这些肝病包括但不限于肝炎症性疾病,这些肝炎性疾病包括但不限于酒精性肝病;非酒精性脂肪性肝炎;自身免疫性肝炎;慢性丙型肝炎;慢性乙型肝炎;原发性胆汁性肝硬化;继发性胆汁性肝硬化;硬化性胆管炎; α -1-抗胰蛋白酶缺乏;威尔逊氏症;胆道闭锁;与特发性肺纤维化相关的肺炎;放射性诱导的肺炎;慢性阻塞性肺病;肺气肿;继发于慢性感染和炎症;与肾小球肾炎相关的肾炎;小管间质纤维化;继发于烧伤的皮肤炎症;硬皮病;银屑病;继发于炎症性疾病的食管-胃肠道(炎症肠疾病;食管损伤和炎症);放射后;炎症性心肌病;脑炎症(创伤后;阿耳茨海默病;脑炎;脑膜炎);由于肌炎和关节炎造成的肌骨骼炎症。

[0269] 本发明的肽可以作为组合治疗的一部分,与已知的用于被靶向的具体疾病的各种其他治疗一起使用。

[0270] 肝纤维化的治疗靶点和其潜在的临床相关性

[0271] 肝肌成纤维细胞(不同来源)的激活是慢性肝病中肝纤维化发展的原因(13;15;19;20),并且明显地,通过细胞凋亡清除肌成纤维细胞允许从肝损伤恢复和肝纤维化逆转(7;20;24)。肝专家认为抑制或逆转不同来源的肌成纤维细胞的激活对于治疗肝纤维化是至关重要的(7;15;19;20;24)。最后,阻断肝纤维化的进展将减少原发性肝癌的发展,因为大多数肝细胞癌出现在肝脏硬化症的肝中(34)。

[0272] 用于开发本发明治疗性肽的基本原理提供如下:a)肝肌成纤维细胞的激活是所有原因的慢性肝病中肝纤维化的发展的原因(13;15;19;20);b)通过细胞凋亡抑制肌成纤维细胞活性将允许从肝损伤恢复和肝纤维化的潜在逆转(7;20;24);c)通过结合非活性的半胱天冬酶原8复合物并防止其自身切割和激活,磷酸化的C/EBP β -Thr217对于激活的肝肌成纤维细胞的存活是不可缺少的(4);d)在激活的肝肌成纤维细胞中磷酸化的C/EBP β -Thr217对于肝纤维的进展是重要的。这是使用在小鼠(15;24;38)中的和原发性小鼠和人类肝肌成纤维细胞(4;6;7;23;27)中的经典的人类肝毒素-诱导的肝损伤和纤维化模型来确定的;e)在激活的肝肌成纤维细胞中的C/EBP β -Thr217的磷酸化在其他动物模型中也是重要的,这些动物模型模拟人类肝损伤-纤维化的其他原因(急性Fas-诱导和慢性二甲基二硝铵-诱导的肝损伤和纤维发生);f)在激活的肝肌成纤维细胞中的人类C/EBP β -Thr266(同源人类磷酸受体)的磷酸化也发生在人类肝纤维化中(7)和培养的激活的原代人类肌成纤维细胞中(7);g)表达不可磷酸化的C/EBP β -Ala217转基因的小鼠对由不同肝毒素诱导肌成纤维细胞的激活和增殖是不起反应的(4;7);h)不可磷酸化的C/EBP β -Ala217存在于具有活性半胱天冬酶8的死亡受体复合物II内,并且与转基因小鼠中激活的肝肌成纤维细胞的细胞凋亡有关(4;7;9);i)用C/EBP β -Ala217转基因或通过C/EBP β 基因敲除阻断C/EBP β -Thr217的磷酸

化降低了肝对急性和慢性损伤的纤维化响应(4;7);j)在C/EBP β -ko小鼠中肝对肝毒素的纤维化响应降低表明激活的肝肌成纤维细胞中RSK磷酸化的重要靶标是C/EBP β -Thr217而不是c-Fos、CREB、CBP或其他蛋白质中的其他磷酸受体(4;44;45;46;52);k)该肽可预防由胶原1型基质在培养中或在小鼠中由肝损伤激活的肌成纤维细胞中C/EBP β -Thr217(分子靶)的磷酸化(4);以及l)治疗性前导肽和两种可替代的肽刺激肝肌成纤维细胞在培养中通过胶原1型基质或通过在小鼠中肝损伤激活后的细胞凋亡,并阻断活性纤维发生,预防肝纤维化的进展并且诱导消退;m)在肝硬化的慢性动物模型中,肽刺激激活的肝肌成纤维细胞的细胞凋亡和纤维化的逆转(7);以及n)治疗性前导化合物针对分子靶标具有非常高的功效,预防肌成纤维细胞的激活并抑制肝纤维化。

[0273] 肝炎症的治疗靶点和其潜在的临床相关性

[0274] 肝巨噬细胞(不同来源)的激活是急性和慢性肝病中肝炎症发展的原因。与由病毒性疾病、毒性疾病、免疫性疾病、和代谢性疾病诱导的肝病相关的过度肝损伤和炎症(13)导致在疤痕组织的潜在沉积和肝硬化的发展中的肝功能障碍以及慢性病(15)。肝损伤的扩增可以由巨噬细胞介导(14,40)。

[0275] 炎性体激活所需基因的表达对于巨噬细胞激活和炎性体功能是不可缺少的。C/EBP β 似乎是巨噬细胞的重要信号分子,因为其在这些细胞分化期间的表达显著增加,并且由巨噬细胞调节剂(LPS、IL-1、G-CSF、TGF β 、维生素D、视黄酸)诱导(Akira等人,1990){Friedman,2007 2075/id}。在巨噬细胞激活和分化后,C/EBP β 可以调节炎性细胞因子和趋化因子的表达,这与炎性体激活有关{Friedman,2007 2075/id}。此外,C/EBP DNA-结合位点的显性抑制剂的表达{Iwama,2002 2077/id}或C/EBP β 靶向缺失导致巨噬细胞分化受损{Sebastian,2006 2079/id}。

[0276] 通过核糖体S激酶(RSK)(该核糖体S激酶直接通过细胞外调节激酶(ERK)-1/2磷酸化激活)的CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)- β 的磷酸化在调节细胞存活的ERK/分裂素激活的蛋白激酶(MAPK)信号途径中起重要作用(Buck等人,Mol Cell[分子细胞]4:1087,1999;Buck等人,Mol Cell[分子细胞]8:807-16,2001;Buck和Chojkier,PLoS One[公共科学图书馆期刊]2:e1372,2007)。磷酸化突变体C/EBP β -Glu217(其在生物测定中模拟磷酸化的C/EBP β -Thr217)的表达(Trautwein等人,Nature[自然]364:544-547,1993)足以拯救由炭疽致死毒素诱导的巨噬细胞损伤(Buck和Chojkier,Am J Physiol Cell Physiol[美国生理学细胞生理学杂志]293:C1788-96,2007)。

[0277] 肺炎症和纤维化的治疗靶点和其潜在的临床相关性

[0278] LMF的激活是IPF中肺纤维化的发展的原因(11;14;15)。通过结合至非活性的半胱天冬酶原8复合物并防止其自身切割和激活,磷酸化的C/EBP β -Thr217促进激活的LMF的存活(6)。在激活的LMF中的C/EBP β -Thr217的磷酸化对于肺纤维化的进展是关键。这是通过使用经典的博来霉素诱导的肺纤维化模型在小鼠、原代小鼠和人类LMF在组织培养物和无细胞系统中确定的(5;6);在激活的LMF中人类C/EBP β -Thr266的磷酸化发生在IPF的人类肺纤维化中(5)。表达不可磷酸化的C/EBP β -Ala217转基因的小鼠对由博来霉素诱导LMF的激活和增殖是不起反应的(5);通过结合至非活性半胱天冬酶原并诱导其自身切割和激活,不可磷酸化的C/EBP β -Ala217促进激活的LMF的死亡(5)。不可磷酸化的C/EBP β -Ala217显性阴性转基因存在于具有活性半胱天冬酶8的死亡受体复合物II内,并与转基因小鼠中激活的

LMF的细胞凋亡有关(3;5;6)。用C/EBPβ-A1a217转基因或通过C/EBPβ基因敲除阻断C/EBPβ-Thr217的磷酸化降低了肺的纤维化响应(5;25);在C/EBPβ-ko小鼠中,肺对博来霉素的纤维化响应降低(25)表明,激活的LMF中的RSK的重要靶标是C/EBPβ-Thr217而不是在c-Fos、CREB、CBP或其他蛋白质上的其他RSK磷酸受体。抑制性亲本肽通过胶原1型基质在培养中激活的LMF中防止C/EBPβ-Thr217的磷酸化,或者通过肺损伤在体内防止C/EBPβ-Thr217的磷酸化(5)。

[0279] 在以下提供了含有非天然存在的具有或不具有N-末端PEG-30kDa的氨基酸的本发明的治疗性肽的合成和分析

[0280] 这些肽的氨基酸序列在以下提供:

	序列
	TAGGGTGTGTTTAGGCGAAA (SEQ ID NO: 1)
	TCTGTTGCCTTCCTAATAAG (SEQ ID NO: 2)
	Lys-DAla-DVal-Asp-NH ₂
	Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH ₂
	Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH ₂
[0281]	PEG-Lys-DAla-DVal-Asp-NH ₂
	PEG-Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH ₂
	Lys-DAla-Val-Asp-NH ₂
	Ac-Lys-DAla-Val-Asp-NH ₂
	Mpr-Lys-DAla-Val-Asp-NH ₂
	PEG-Lys-DAla-Val-Asp-NH ₂
	PEG-Mpr-Lys-DAla-Val-Asp-NH ₂
	Lys-Ala-DVal-Asp-NH ₂
	Ac-Lys-Ala-DVal-Asp-NH ₂
	Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp-NH ₂
	PEG-Lys-Ala-DVal-Asp-NH ₂
	PEG-Mpr-Lys-Ala-DVal-Asp-NH ₂
[0282]	Ac-Lys-Ala-Val-Asp-NH ₂ (SEQ ID NO: 6)
	Ac-Lys-Ala-Val-Lys-CHO (SEQ ID NO: 7)
	DLys-Ala-DVal-Asp-NH ₂
	DLys-Ala-Val-DAsp-NH ₂
	Lys-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser-Asp (SEQ ID NO: 3)
	Lys-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His-Ser (SEQ ID NO: 4)
	Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Asp-Lys-His (SEQ ID NO: 5)

[0283] 酸接头(Ac);巯基丙酸接头(Mpr);D-氨基酸表1

[0284] 用于治疗肝纤维化的治疗性肽

[0285] (功效和稳定性)

肽	小鼠 激活的肝肌 成纤维细胞 死亡细胞(%) [20 ng/ml]	人类激活的 肝肌成纤维 细胞死亡细 胞(%)	肝细胞毒 性 [20 ng/ml]	小鼠毒 性(体 内)	功效[培养 物/小鼠]
[0286] 亲本肽 Ac-Lys-Ala -Val-Asp-N H ₂ (SEQ ID NO: 6)	89.5	80.9	当在原代 小鼠和人 类肝细胞 中测试时 没有发现 毒性	无: 2 0 mg/kg	在人类/小 鼠激活的成 肌纤维细胞 和肝纤维化 的小鼠模型 中显著
前导治疗 性肽 Peg-30kDa	90.5	86.2	当在原代 小鼠和人 类肝细胞 中测试时	无: 20 mg/kg	在人类/小 鼠激活的成 肌纤维细胞 和肝纤维化

	-Lys DAla-DVal -Asp-NH ₂			没有发现 毒性		的小鼠模型 中显著
	<u>可替代的 治疗性肽 1</u>	79.9	67.9	当在原代 小鼠和人 类肝细胞 中测试时 没有发现 毒性	无：20 mg/kg	在人类/小 鼠激活的成 肌纤维细胞 和肝纤维化 的小鼠模型 中显著
	Peg-30kDa -Lys-DAla- Val-Asp-N H ₂					
[0287]	<u>可替代的 治疗性肽 2</u>	57.1	72.3	当在原代 小鼠和人 类肝细胞 中测试时 没有发现 毒性	无：20 mg/kg	在人类激活 的成肌纤维 细胞和肝纤 维化的小鼠 模型中显著
	Peg-30kDa -Lys-Ala-D Val-Asp-N H ₂					
	*DLys-Ala -DVal-Asp- NH ₂	N/A	30.6	N/A	N/A	N/A
	DLys-Ala- Val-DAsp- NH ₂	N/A	44.0	N/A	N/A	N/A

[0288] 基于发现C/EBP β -Thr217的重要的下游特异性MAPK途径磷酸化来开发亲本肽。因此,作为广泛信号传导网络中的最后一步的目标可以被较少的副作用阻止。实际上,表达显性阴性全长C/EBP β -Ala217的小鼠具有正常的表型并且是能生育的。

[0289] 本发明提供了治疗性肽的功效和安全性。在某些实施例中,本发明提供了非常有效地防止在培养中原代人类和小鼠肝肌成纤维细胞激活的三种所选择的PEG-肽(参见表1)。它们的功效与亲本肽的功效相当。亲本肽和三种所选择的肽中的任何一种都不会在体内诱导对人或小鼠培养的原代肝细胞或对小鼠体内的肝细胞损伤(在100倍治疗剂量下)(表1)。

[0290] 尽管在具有亲本化合物的小鼠中没有观察到毒性问题,但是使用类似合成来开发相关的肽以改进人类潜在的免疫原性可预测的缺陷、半衰期短和有限的生物利用度(29; 39; 42)。在基于亲本肽制作文库后(测试了可以合成的76种肽中的全部56种),经由类似合成产生氨基酸的多个取代。本发明的所选择的PEG-肽是在此文库内的所有化合物的体外测试结果。

[0291] 以逐步方式使用测定法以选择最安全和最有效的肽(包括在激活的原代人类肝肌成纤维细胞中的细胞凋亡测定;无细胞半胱天冬酶8激活测定;急性肝损伤/纤维发生模型;

在高度分化的原代人类肝细胞培养物和小鼠中的毒性测定)。

[0292] 本发明还通过以下实例进行了描述和说明。然而,在说明书中的任何地方使用这些和其他实例仅是说明性的,并不以任何方式限制本发明或任何示例性术语的范围和含义。同样地,本发明不限于在此描述的任何特定实施例。实际上,本发明的许多修改和变化在阅读本说明书之后对于本领域技术人员而言是显而易见的,并且在不脱离本发明的精神和范围下可以做出这些改变。因此,本发明旨在仅由所附权利要求书的条款来限制,这些权利要求书的条款覆盖了落入本发明的真实精神和范围内的此类等同变化的全部和整个范围。

[0293] 贯穿整个说明书,引用了各种引文,并且每个引文的全部内容通过引用结合在此。提供以下实例来更具体描述本发明。这只是在阐述而不是限制本发明。

[0294] 实例1:前导治疗性PEG-30kDa-肽在急性肝损伤和肝肌成纤维细胞的激活中的体内功效和安全性试点研究

[0295] 为了诱导急性肝损伤,向正常小鼠给予单剂量的人类肝毒素四氯化碳(CC14) (4)。8小时后,动物接受了前导治疗性PEG-30kDa-肽的IP注射(连接至PEG-30kDa的5 μ g肽[肽与PEG以1:60])。30hr后,在如通过ALT测量的肝细胞死亡峰值处死动物(临床实践中常规使用的并且由FDA在人类药物研究中的肝毒性评估测定中使用的临床终点) (16)。与接受CC14和前导治疗性PEG-肽的小鼠的次要表达相比,仅接受CC14的小鼠在肝中强烈表达 α -SMA,激活的肝肌成纤维细胞的主要指标(4;7)。在接受CC14的动物中存在严重急性肝损伤,而在接受CC14和前导治疗性化合物两者的动物中则轻度至中度损伤(图1)。

[0296] 治疗性前导PEG肽阻断由肝毒素CC14诱导的严重肝损伤的典型的肝变色和颗粒状外观,并且这些所治疗的小鼠的肝与对照肝相似(图1)。由CC14诱导的组织病理学是如通过标准临床染色(H&E和网状蛋白)反映的严重肝损伤和结构破裂之一(图1)。

[0297] 前导PEG-30kDa-肽减少了急性肝损伤(图1)。血清ALT明显地被肝毒素CC14(10,554 \pm 867IU/dL)诱导,但在伤害建立后8hr(6,754 \pm 905IU/dL),尽管只有治疗性前导肽的单一治疗,血清ALT改进了。白蛋白mRNA(正常肝特异性基因表达的主要指标) (14)降低了16倍,并且IL-6和TNF- α mRNA(肝炎症的主要指标)分别通过CC14与对照值相比增加了3倍和85倍。治疗性前导PEG肽明显地改进了这些值(白蛋白mRNA:仅降低2倍,IL-6mRNA正常,并且TNF- α 仅比对照值增加4倍)。

[0298] 另外两种可替代的PEG肽1和肽2在最小化急性肝损伤和肌成纤维细胞的激活中表现相似于前导PEG肽。因此,治疗性肽的早期安全性在肝损伤和肝肌成纤维细胞激活的急性小鼠模型中是非常高的。

[0299] 实例2:前导治疗性肽在肝纤维化的慢性小鼠模型中的高效

[0300] 治疗性前导PEG-肽经历了在经典慢性肝纤维化模型中的功效和安全性的系统分析(7;15;24;38)。将CC14(人类肝毒素)依照肝纤维化的经典模型给予至小鼠持续16周(7)。一旦已经建立严重的肝纤维化,三种所选择的治疗性PEG-肽在第8周开始每周一次IP给予(连接至PEG的7 μ g肽)。三种所选择的PEG肽的功效包括肝纤维化的定量分析(7)。向小鼠给予CC14持续16周诱导肝硬化(图2A和2B)。发现前导PEG-30kDa肽(一旦肝纤维化已经严重,从第8周起每周一次给予)将肝纤维化降低了 >8 倍。另外两种PEG-30kDa肽1和肽2也有效地降低了肝纤维化(分别为约3倍和约2倍)(图2A)。这模拟了向患有已经建立的严重肝纤维化

的患者给予若干年的治疗。

[0301] 因此,在给予CCl₄持续8周之后在肝硬化已经建立之后,此实例提供了具有Ac-Lys-D-Ala-D-Val-Asp-NH₂的氨基酸序列的前导治疗性肽在预防肝纤维化的进展以及诱导肝纤维化的消退中是高度有效的。将Ac-Lys-D-Ala-D-Val-Asp-NH₂每周一次IP给予(连接至PEG-30kDa的7μg肽)持续另外4周或8周。CCl₄给予继续4周或8周。该Ac-Lys-D-Ala-D-Val-Asp-NH₂肽抑制肝纤维化8倍。

[0302] 相比之下,在第8周建立肝硬化后,用具有不含任何D-氨基酸的Ac-Lys-Ala-Val-Lys-CHO (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的亲本肽处理持续另外的4周或8周(5μg IP,3次/周并且持续9周,随后为1μg IP,3次/周持续第10-12周或第10-16周),同时用CCl₄继续诱导肝损伤和纤维化。亲本肽抑制肝纤维化仅2倍至3倍。

[0303] 实例3:诱导在小鼠T细胞中Thr217上的C/EBPβ的磷酸化并且该C/EBPβ的磷酸化与炎性Th1/Th17对博来霉素治疗的响应相关-C/EBPβ肽的抑制作用

[0304] 使用新鲜分离的CD-4+小鼠肺T细胞获得支持在Thr217上小鼠C/EBPβ的磷酸化赋予Th1/Th17表型的结果。在博来霉素治疗后的第7天,来自C/EBPβ-wt小鼠的纯化的肺T细胞表达IL-12Rβ (Th1表型)或IL-23R (Th17表型),以及在Thr217上内源性C/EBPβ被磷酸化(使用针对此表位开发的特异性抗体所检测的)(图3和4)。用博来霉素处理C/EBPβ-Ala217小鼠(图3)或用博来霉素和C/EBPβ肽处理C/EBPβ-wt小鼠阻断了磷酸化的C/EBPβ-Thr217和Th1/Th17表型并且诱导了IL-4Rα的T细胞表达(Th2表型)(图4)。

[0305] 实例4:诱导Th1/Th17细胞,并且该Th1/Th17细胞与响应于博来霉素治疗的肺肌纤维细胞的激活相关-来自M1巨噬细胞消融实验的证据

[0306] 在博来霉素治疗后的第7天,纯化的CD4+小鼠肺T细胞表达IL-12R或IL-23R (Th1/Th17表型)和αSMA (激活的肌成纤维细胞)。当小鼠接受博来霉素和氯膦酸盐(ATP生产的阻断剂)脂质体(经气管内和IP)时,在第7天存在优先消融吞噬作用的M1巨噬细胞(不可检测的TNFαR2)以及优先消融在诱导IL-4Rα (Th2表型)和明显地减少的αSMA (激活的肌成纤维细胞)情况下的Th1 (IL-12R) /Th17 (IL-23R) 细胞(图5)。通过M1巨噬细胞消融(混淆因素)阻断Th1/Th17细胞21天明显地抑制博来霉素诱导的肺纤维化(图5,三色),表明Th1/Th17 (M1) 表型而不是Th2表型是造成这种影响的原因。

[0307] 实例5:来自博来霉素处理的小鼠的T细胞的分离和纯化及其通过C/EBPβ肽和Th2诱导剂的体外抑制

[0308] 在使用针对表面受体的特异性抗体的博来霉素治疗后,在第7天,从165mg的C/EBPβ-wt小鼠肺中分离并纯化大约500万个CD4+T细胞。大于95%的T细胞是Th1或Th17。将这些Th1/Th17细胞用10μg/ml的IL-4、IL-10 (Th2诱导剂)或100pM C/EBPβ肽(C/EBPβ-Thr217磷酸化的抑制剂)体外处理4hr。通过Th2诱导剂或C/EBPβ肽的处理刺激了>50%的细胞凋亡,表明这是一个近似合理的机制,通过该近似合理的机制抑制C/EBPβ-Thr217磷酸化阻断了Th1/Th17诱导。这种效果与在磷酸化的C/EBPβ-Thr217/半胱天冬酶原-8之间蛋白质/蛋白质相互作用,以及通过C/EBPβ中的Thr-217磷酸化产生的XEVD半胱天冬酶抑制盒抑制半胱天冬酶原-8切割和自身激活相一致(12)。通过Th2诱导剂刺激Th1/Th17细胞的细胞凋亡是意想不到的(表明IL-4和IL-10信号途径的上调),并为分析Th1/Th17调控提供了一个激动人心的工具(图6)。

[0309] 实例6:人类Th1和Th17而不是Th2细胞在共培养系统中诱导人类肺肌成纤维细胞的增殖-证明抑制C/EBP- β -Thr266磷酸化阻断肺炎细胞的证据

[0310] 将培养在玻璃上的原代人类前体CD-4+T细胞用IL-12(Th1)、IL-23(Th17)或IL-4(Th2)诱导6hr。此外,将用Th1和Th17诱导剂刺激的前体T细胞用C/EBP β 肽(100pM)处理6小时,以试图预防Th1和Th17表型。在将T细胞诱导剂用新鲜介质去除之后,将培养在限定的没有血清的介质中的胶原1型载玻片上的原代肺肌成纤维细胞插入T细胞培养物中[插入相同的载玻片空间](图7B)通过增殖细胞核抗原(PCNA;DNA聚合酶 δ 辅助蛋白)、S期标志物的存在来分析LMF增殖(12)。通过Th1和Th17细胞刺激LMF细胞的增殖(图12),高于对照LMF(用未诱导前体T细胞培养的)约4倍(图7)($P < 0.01$)。LMF细胞增殖不是通过用IL-12或IL-23加上C/EBP β 肽处理的Th2细胞(图12)或T细胞刺激(图7)。因此,人类LMF细胞增殖(在其激活中的重要步骤)是通过人类Th1和Th17细胞刺激。此新颖的系统将允许T细胞/LMF相互作用的分析。

[0311] 实例7:人类Th1/Th17细胞是IPF中的普遍表型

[0312] 实验发现的临床相关性通过IPF中的肺Th1和Th17细胞中磷酸化的C/EBP β -Thr266的存在来证实(图8和9)。如图11和12描绘,IPF外植体中>95%的肺CD-4+T细胞表达IL-12R和T-bet(Th1表型(55,84));IL-23R(Th17表型(49,80));以及磷酸-C/EBP β Thr266。在这些样品中,5%的T细胞表达IL-4R和GATA-3(Th2表型(95))。在Th2细胞的适度流行(约60%)的情况下,正常肺具有少约10倍的T细胞。某些实验将系统地表征来自IPF患者的纯化的肺Th1/Th2/Th17的分子和功能特征。

[0313] 实例8:诱导在Thr266上的C/EBP β 的磷酸化并且该在Thr266上的C/EBP β 的磷酸化对于人类CD4+T细胞对炎性诱导剂的Th1/Th17响应是必需的-证明抑制C/EBP- β -Thr266磷酸化阻断了肺炎细胞的证据

[0314] 使用新鲜分离的人类CD-4+人类血液T细胞获得支持在Thr266上人类C/EBP β 的磷酸化赋予Th1/Th17表型的结果。在用人重组IL-12(Th1诱导剂)处理后,正常人类血液CD-4+T细胞表达IL-12R β 和T-Bet(Th1表型)。当用IL-23(Th17诱导剂)体外处理正常人类CD-4+T细胞时,它们表达IL-23R(图10)和GATA-3(数据未显示)(Th17表型)。Th1和Th17细胞的诱导与Thr217上的内源性C/EBP β 的磷酸化有关。用显性阴性C/EBP β 肽阻断内源性C/EBP β 的磷酸化预防CD-4+T细胞激活至Th1(以及转成Th2细胞的群体)或Th17(诱导Th2细胞的细胞凋亡和不存在)表型(图10)。IL-4诱导Th2表型,而未处理的CD-4+T细胞仍然未定型。

[0315] 实例9:从新鲜IPF肺组织中分离和纯化T细胞及其对C/EBP β 肽和Th2诱导剂的体外响应

[0316] 使用针对表面受体的特异性抗体从0.5mg新鲜的IPF肺活组织检查中分离并纯化大约1000万CD4+T细胞。通过其IL-12R和IL-23R标志物判断,大于95%的T细胞是Th1或Th17(图11)。大于90%的T细胞表达Th17标志物。将这些Th1/Th17细胞用10 μ g/ml的IL-4、IL-10(Th2诱导剂)或100pM C/EBP β 肽(人类C/EBP β -Thr266磷酸化的抑制剂)体外处理16hr。通过Th2诱导剂或C/EBP β 肽的处理刺激了与基线相比的>35%的细胞凋亡(图12),表明这是一个近似合理的机制,通过该近似合理的机制抑制C/EBP β -Thr217磷酸化有助于阻断Th1/Th17诱导。这种效果与在磷酸化的C/EBP β -Thr217/半胱天冬酶原-8之间蛋白质/蛋白质相互作用,以及通过C/EBP β 中的Thr-217磷酸化产生的XEVD半胱天冬酶抑制盒抑制半胱天冬酶原-

8切割和自身激活相一致(12)。

[0317] 总之,以上实例3-9证明了a) C/EBP β -Thr217磷酸化对于激活人类和小鼠肌成纤维细胞是必需的。本发明的新颖的肽抑制肌成纤维细胞激活;b) C/EBP β -Thr217磷酸化对于博来霉素-诱导的肺Th1和Th17细胞的激活是必需的;c) Th1和Th17细胞而不是Th2细胞的选择性消耗,通过吞噬作用的M1巨噬细胞的消融预防博来霉素诱导的LMF的激活和肺纤维化;d) 人类Th1和Th17细胞而不是Th2细胞刺激在共培养中的人类LMF的增殖/激活;e) 这些发现的临床相关性通过IPF肺组织中的肺Th1和Th17细胞中的、和从IPF肺组织新鲜分离的T细胞中的磷酸化的C/EBP β -Thr266的存在来证实;f) IPF中的肺T细胞是>95% Th1/Th17;以及g) C/EBP β 肽和Th2诱导剂刺激从博来霉素处理的小鼠或从IPF肺组织体外新鲜分离的肺Th1/Th17细胞的细胞凋亡。

[0318] 实例10:C/EBP β -Thr217磷酸化刺激巨噬细胞炎性体激活和肝损伤

[0319] 此实例提供研究,以研究通过C/EBP β -Thr217(潜在的新颖的治疗靶标)的磷酸化的信号传导是否是通过激活肝巨噬细胞中的炎性体而引起肝炎和损伤的主要机制。研究了进化上保守的C/EBP β -磷酸-Thr217信号传导(在人类C/EBP β -磷酸-Thr266中相同)对由小鼠和人类中肝毒素诱导的巨噬细胞炎性体细胞活性和肝损伤的影响。

[0320] 方法

[0321] C/EBP β -Ala217和C/EBP β -Glu217小鼠的结构

[0322] 动物方案由VA圣地亚哥医疗保健系统的兽医医疗单位批准。将表达C/EBP β -Thr217磷酸受体的C/EBP β -Ala217(显性阴性、无磷酸化突变)或C/EBP β -Glu217(显性阳性、磷酸化模拟物突变)的转基因小鼠如先前²⁷描述的生殖,并与亲代野生型近交FVB小鼠回交持续>10代。将rsv基因的存在通过PCR用于鉴定这些转基因小鼠。定制设计RSV PCR的引物序列(RSV.2271正义TAGGGTGTGTTTAGGCGAAA (SEQ ID NO:1),和RSV.2510反义TCTGTTGCCTTCTAATAAG (SEQ ID NO:2))。

[0323] 动物程序

[0324] 在急性暴露于肝毒素中,C/EBP β -wt、C/EBP β -Ala217和C/EBP β -Glu217小鼠²⁷ (23-27g)各自仅接受一次腹腔内注射CCl₄ (70 μ l CCl₄和30 μ l的矿物油)或矿物油(70 μ l盐水和30 μ l矿物油)、或Jo-2 Ab (Fas-L;0.2 μ g/g体重)或盐水媒介物(50 μ l)。在其他实验中,C/EBP β -wt小鼠(25g)各接受一次腹腔内注射CCl₄ (70 μ l CCl₄和30 μ l的矿物油)或矿物油(70 μ l盐水和30 μ l矿物油),但是在8hr之后,动物接受50 μ l盐水(媒介物)或细胞渗透的Ac-KAla217VD-CHO²¹ (美国肽公司(American Peptide)) (100 μ g IP)。在这些实验中,在最后一次CCl₄注射后30hr或Fas-L注射后8hr处死动物。

[0325] 巨噬细胞纯化

[0326] 遵循以下报道的用巨噬细胞体外实验的标准⁴²。使用FVB背景的成年C/EBP β -wt(产生1.3x 10⁵巨噬细胞/肝)、C/EBP β -Ala217(产生2.2x 10⁵巨噬细胞/肝)、C/EBP β -Glu217(产生1.4x 10⁵巨噬细胞/肝)和TGF α (产生1.6x 10⁵巨噬细胞/肝)小鼠用于分离原代肝巨噬细胞。如先前所述的,通过原位灌注和单步密度Nycodenz梯度(Accurate Chemical & Scientific[准确的化学与科学],韦斯特伯里(Westbury),纽约州)制备细胞⁴³。以13%的密度梯度分离肝巨噬细胞,并且然后通过与CD-11/CD-68抗体(美天旎生物技术公司(Miltenyl Biotechnology))连接的磁珠进行亲和纯化。没有使用CSF-1或补充剂。将等分

试样涂在玻璃盖玻片上,并允许在37℃下静置1hr,并且然后用丙酮:甲醇固定。肝巨噬细胞通过其典型形态、对玻璃的粘附以及用针对F-4/80和CD-68的抗体鉴定。这些制品的纯度大于95%。将巨噬细胞的等分试样培养在RPMI 1640、具有L-谷氨酰胺的10%胎牛血清、25μM HEPES和青霉素/链霉素中。在一些实施例中,将肝巨噬细胞用TGFα (10μM) 处理8hr。

[0327] 显微术

[0328] 使用针对C/EBPβ/RSK磷酸Ser380、F4/80、NOS-2TLR4、NFκB、IRF8、MyD88、NALP3、TLR-5、IL-1R1和ASC (圣克鲁兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology), 圣克鲁兹, 加利福尼亚) 的抗体观察荧光标记,或者在所使用的Keyence荧光显微镜荧光染料中C/EBPβ-磷酸Thr217是Alexa 488、750、350、647、和594。每个试验点分析至少100个细胞^{18,21,23,27}。使用T0-PRO-3 (分子探针公司 (Molecular Probes), 尤金 (Eugene), 俄勒冈州) 分析核形态。使用Keyence显微镜BZ9000分析软件程序对荧光和明场像进行定量。观察者间一致>90%。

[0329] 炎性基因

[0330] 通过使用如通过制造商 (SAB生物科学公司 (SABiosciences); 巴伦西亚, 加利福尼亚州) 所描述的RT²定量实时PCR阵列确定86个炎症基因的肝巨噬细胞表达。使用伯乐iQ5实时PCR检测系统 (伯乐实验室公司 (Bio-Rad), 赫拉克勒斯, 加利福尼亚), 将对照和试验的新鲜分离的肝巨噬细胞样品与内部对照样品一起针对RNA纯化和扩增步骤,以及针对管家基因 (β-肌动蛋白) 进行分析²¹。遵循制造商的建议,如针对RT-PCR描述的,使用1μg的总RNA,进行总RNA的分离、用DNA酶的处理、用氯仿的沉淀、以及cDNA合成。

[0331] 免疫沉淀和免疫印迹

[0332] 将预先清除的新鲜分离的肝巨噬细胞裂解物与纯化的C/EBPβ抗体孵育2hr,然后添加A/G+琼脂糖 (圣克鲁兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology)) 持续12hr。免疫沉淀反应各含有500μg总蛋白质和2μg抗体 (或纯化的IgG免疫前血清作为阴性对照)。将免疫沉淀物在500ml细胞裂解缓冲液中洗涤3次,并通过SDS-PAGE分辨,并且遵循化学发光方案 (珀金埃尔默公司 (Perkin-Elmer), 谢尔顿, 康涅狄格州), 使用特定的抗体,通过蛋白质印迹检测C/EBPβ-磷酸Thr217、TLR4、NFκB、IRF8、MyD88、NALP3、TLR-5、IL-1R1、ASCβ-肌动蛋白、活性半胱天冬酶3、IL-1β、以及IL-18^{18,19,21,27}。免除第一抗体进行阴性样品。

[0333] 人类肝

[0334] 从16个患有继发于毒性油综合征的急性肝损伤和中度重度肝损伤³⁵的患者,以及从10个没有肝病的对照受试者 (NDRI) 获得匿名的、去识别的肝样品。该方案经圣地亚哥大学,圣地亚哥人类保护计划批准。因为所有这些样品都是过量的,护理和归档样品的标准是免除的、未经许可的IRB批准的方案。

[0335] 统计分析

[0336] 结果表达为平均值 (±SD或±SE)。使用Student-f或Wilcoxon Mann-Whitney测试来分别评估参数群体和非参数群体之间的平均值的差异,其中P值<0.05为显著。

[0337] 结果

[0338] Fas-L的调节通过在小鼠中的磷酸化C/EBPβ-Thr217诱导肝损伤和炎症。

[0339] 在暴露于小鼠中的肝毒素 (Fas和CCl₄) 之后,在临床药物研究中,通过定量组织学和免疫组织化学²⁴、细胞死亡测定²³,并通过通过测量血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平²¹ (在患者护理中常规使用肝损伤指标),以及通过食品和药物管理局²⁵来确定肝损伤程度。

[0340] 通过巨噬细胞⁸Fas介导的IL-18分泌,以及Fas激动剂抗体(Jo-2 Ab)的注射²⁶在小鼠中诱导严重的肝损伤。首先,通过血清ALT水平($P<0.0001$) (图13A)和组织学判断(图21),数据显示,表达显性阳性、磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因的小鼠比对照C/EBP β -wt小鼠更容易受到通过用Jo-2Ab的Fas-R激活诱导的肝损伤。表达显性阴性,不可磷酸化的C/EBP β -Ala2177转基因的小鼠对Fas-L诱导肝损伤具有高度抗性($P<0.01$) (图13A)。相比之下,通过细胞凋亡膜联蛋白-V测定判断,当与来自C/EBP β -wt小鼠的肝细胞相比时,Fas-L(Jo-2 Ab)诱导对从磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因小鼠分离的培养的原代肝细胞的最小损伤($P<0.001$) (图13B)。来自不用Jo-2处理的C/EBP β -wt的对照培养的原代肝细胞具有小于5%基线的细胞凋亡。当与C/EBP β -wt培养的原代肝细胞相比时,与抗Fas诱导的细胞损伤相一致,C/EBP β -Glu217培养的原代肝细胞对由蛋白酶体抑制剂乳胞素诱导的细胞凋亡²⁷也是不起反应的(图22)。总的来说,这些实验表明,对由Fas-L信号传导诱导的严重肝损伤的易感性需要除了从这些组织培养研究中缺失的肝细胞以外的肝细胞中的C/EBP β -Thr217的磷酸化。尽管感兴趣,但是C/EBP β -Glu217肝细胞对Fas和乳胞素诱导的损伤的抗性并不是这些研究的重点。

[0341] 肝细胞和非实质肝细胞(包括巨噬细胞)均表达Fas受体(CD95)²⁸。在此上下文中,发现Fas-L还在C/EBP β -Glu217小鼠肝中比在C/EBP β -wt小鼠肝中刺激了更多的F4/80+巨噬细胞炎症细胞的浸润(图13C和图21),其对应于更大面积的肝细胞凋亡损伤(图13D和图21)。

[0342] 通过TGF- α 激活培养的原代肝巨噬细胞与C/EBP β -Thr217的磷酸化相关。

[0343] 以上实验表明,肝巨噬细胞有助于C/EBP β -Glu217小鼠中由Fas-L诱导的肝损伤的扩增,并且是C/EBP β -wt小鼠中损伤的一般机制,如对于Fas-L和肝损伤的其他动物模型所报道的^{4,5,6,7,8}。因为巨噬细胞中C/EBP β 的表达与这些细胞的成熟和功能紧密相关^{13,14,15,16,17},因此评估了磷酸化的C/EBP β -Thr217是否调节如先前报道分离的炎性原代肝巨噬细胞的极化²³。

[0344] 在用TGF- α 、MAPK信号传导的激活剂¹⁸和经典的炎性巨噬细胞诱导剂¹⁷处理后,来自C/EBP β -wt小鼠的新鲜分离的培养的肝巨噬细胞表达激活的RSK-磷酸-Ser380并在Thr217上表达内源性C/EBP β 被磷酸化¹⁸(图14A),以及在激活的巨噬细胞中由C/EBP β 介导表达的NOS-2²⁹(图14B)。总之,这些结果表明在肝细胞中C/EBP β -Thr217的磷酸化、在小鼠体内以及在培养细胞中巨噬细胞激活和肝损伤之间的潜在联系。

[0345] 诱导在Thr217上的C/EBP β 的磷酸化,并且该在Thr217上的C/EBP β 的磷酸化对于在小鼠肝毒素治疗后的肝巨噬细胞激活是必需的。

[0346] 为了通过化学性肝损伤分析在Thr217上的C/EBP β 的磷酸化是否被诱导以及对肝巨噬细胞激活是否是必需的,向C/EBP β -wt、TGF- α 、C/EBP β -Glu217、和C/EBP β -Ala217转基因小鼠给予单剂量的CCl₄,该CCl₄是在啮齿动物和人类肝中诱导氧化应激的经典和可预测的肝毒素^{21,30,31}。八小时后,C/EBP β -wt小鼠接受腹腔内注射细胞渗透的、显性阴性C/EBP β 肽(100 μ g)或媒介物(50 μ g盐水)。在早期研究中,发现此肽剂量提供在小鼠中足够的全身和肝生物利用度并阻断C/EBP β -Thr217的磷酸化^{21,27}。在肝损伤峰值的30hr处死动物。

[0347] CCl₄处理在C/EBP β -wt小鼠中诱导严重的急性肝损伤(具有结构破裂),但在C/EBP β -Ala217小鼠中诱导轻度至中度损伤(图23A,网状蛋白染色)。如对于Fas发现的(图13A和

图21),由CCl₄诱导的肝损伤在C/EBPβ-Glu217小鼠中也更严重(图15A-15E和图23A)。在这些动物模型中通过组织学分析的肝损伤程度与肝的巨噬细胞浸润(图15A和图23A,F4/80染色),肝细胞凋亡的程度(图15B)和血清ALT水平两者有关(图15C)。

[0348] 急性给予CCl₄在30hr后在C/EBPβ-wt小鼠中刺激约20倍的肝的巨噬细胞浸润(P<0.005),如通过定量显微术由F4/80的表达所鉴定的²³(图15A)。CCl₄给予在磷酸化模拟物C/EBPβ-Glu217小鼠的肝中诱导了甚至更高层次的巨噬细胞浸润(约40倍)(P<0.0001)(图15A)。此外,当与C/EBPβ-wt小鼠(P<0.001)相比时,用C/EBPβ-Ala217转基因阻断C/EBPβ-Thr217的磷酸化抑制CCl₄-诱导的巨噬细胞肝浸润约90%(图15A)。

[0349] 阻断C/EBPβ-Thr217磷酸化的显性阴性肽²¹也抑制CCl₄诱导肝巨噬细胞浸润约60%(P<0.01)(图15D和图23B,F4/80染色),以及抑制肝损伤约45%(P<0.001)(图15E和图23B,网状蛋白染色)。

[0350] 诱导巨噬细胞,并且该巨噬细胞对于响应于小鼠中肝毒素治疗的肝损伤是必需的。

[0351] 为了用可替代的方法确定巨噬细胞在毒性肝损伤中的作用,在给予肝毒素前24hr,C/EBPβ-wt小鼠接受氯膦酸盐脂质体以消耗巨噬细胞⁵。这些动物在CCl₄处理后30小时具有肝巨噬细胞浸润明显减少(约90%;P<0.005)(图16A和图24)以及肝损伤明显减少,如通过计数肝活组织检查中的凋亡肝细胞(P<0.01)(图16B和图24)并通过血清ALT的测量(约75%;P<0.005)(图16C)所评估的。

[0352] CCl₄处理后三十小时,从C/EBPβ-wt小鼠的肝纯化的CD-11/CD-68小鼠巨噬细胞表达高水平的TLR5、MyD88和TLR4(图16D、16E和16F),这些是炎性体的关键组分¹。与从未接受氯膦酸盐脂质体的CCl₄处理的动物中分离的肝巨噬细胞(P<0.001)(图16D,16E和16F)相比,氯膦酸盐脂质体诱导在从CCl₄处理的动物中分离的肝巨噬细胞中TLR5、MyD88和TLR4表达的抑制,表明肝巨噬细胞中炎性体的激活与由肝毒素诱导的肝损伤有关。总之,获得自具有磷酸化显性阳性和显性阴性C/EBPβ-Thr217转基因小鼠和肝细胞连同具有巨噬细胞消融的实验的结果表明,巨噬细胞中C/EBPβ-Thr217(或C/EBPβ-Glu217)的磷酸化是肝毒素诱导的肝损伤的关键步骤。

[0353] 磷酸化的C/EBPβ-Thr217刺激了小鼠中肝巨噬细胞中的炎性体信号1复合物。

[0354] 通过NFκB途径起作用的启动刺激(信号1)通常先于炎性体复合物的组装,以便上调前-IL-1β和NALP3的表达。在细胞溶质中的配体传感或酶激活(信号2)时,细胞溶质传感器寡聚以形成半胱天蛋白酶1的激活平台³²。

[0355] CCl₄处理后三十小时,从C/EBPβ-wt小鼠纯化的CD-11/CD-68原代肝巨噬细胞表达磷酸化的C/EBPβ-Thr217,该磷酸化的C/EBPβ-Thr217与炎性体信号1复合物基因产物的关键组分(包括TLR4、NFκB、IRF8和MyD88)共表达(图17A)¹。

[0356] C/EBPβ-Thr217的磷酸化是由肝毒素处理诱导的肝巨噬细胞中炎性体信号1复合物的表达所必需的,因为它在不可磷酸化的C/EBPβ-Ala217转基因小鼠中被阻断(图17A)。相比之下,即使在不存在肝毒素治疗的情况下,从显性阳性C/EBPβ-Glu217转基因小鼠分离的肝巨噬细胞表达炎性体信号1复合物(图17A)。相似地,在具有刺激MAPK信号传导的TGFα转基因小鼠分离的肝巨噬细胞中,磷酸化的C/EBPβ-Thr217与炎性体信号1复合物的关键蛋白质组分(包括TLR4、NFκB、IRF8和MyD88)的表达相关(图17A)。

[0357] 为了进一步描绘磷酸化的C/EBP β -Thr217与肝毒素处理后纯化的肝巨噬细胞中的炎性体信号1复合物的成员的物理结合,我们将免疫沉淀C/EBP β (该C/EBP β 通过 β -肌动蛋白标准化用于免疫印迹),并分析其相关的蛋白质。发现在新鲜分离的原代肝巨噬细胞中,磷酸化的C/EBP β -Thr217或C/EBP β -Glu217,而不是不可磷酸化的C/EBP β -Thr217或C/EBP β -Ala217与TLR4、NF κ B、IRF8和MyD88物理相关(图17B)。用CCl₄处理(以及随后的巨噬细胞激活)增加了磷酸化的C/EBP β -Thr217或C/EBP β -Glu217与炎性体信号1蛋白之间的关联(图17B)。

[0358] 磷酸化的C/EBP β -Thr217刺激了小鼠中肝巨噬细胞中炎性体复合信号2的表达。

[0359] 鉴于炎性体信号2途径的激活对于表达若干种炎性细胞因子是必需的^{1,11,33},在肝巨噬细胞中分析了磷酸化的C/EBP β -Thr217对炎性体信号2途径的作用。发现C/EBP β -wt小鼠的CCl₄处理刺激了炎性体信号2蛋白质在肝巨噬细胞中的表达(图18A)。CCl₄处理后三十小时,从C/EBP β -wt小鼠中新鲜纯化的CD-11/CD-68肝巨噬细胞表达磷酸化的C/EBP β -Thr217,该磷酸化的C/EBP β -Thr217与炎性体复合物信号2的关键组分(包括NALP3、TLR5、IL-1R1和衔接蛋白质ASC)共表达(图18A)¹。还需要磷酸化的C/EBP β -Thr217的表达用于在由肝毒素处理刺激的肝巨噬细胞中诱导炎性体多蛋白复合物信号2,因为两者都在不可磷酸化的C/EBP β -Ala217小鼠中被阻断(图18B)。相比之下,即使在不存在肝毒素治疗的情况下,从磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217小鼠分离的肝巨噬细胞也表达部分激活的(引发的)炎性体信号2复合物(图18A)。此外,在从TGF α 转基因小鼠中分离的肝巨噬细胞中,将磷酸化的C/EBP β -Thr217与炎性体信号2复合物的关键组分(包括NALP3、TLR5、IL-1R1和ASC)的表达相关(图18A)。

[0360] 为了进一步描绘磷酸化的C/EBP β -Thr217与肝毒素处理后纯化的原代肝巨噬细胞中的炎性体信号2复合物的成员的物理结合,免疫沉淀C/EBP β 并分析其相关的蛋白。发现肝损伤增加了在肝巨噬细胞中的炎性体信号2复合物蛋白质(NALP3、TLR-5、IL-1R1和ASC)与磷酸化的C/EBP β -Thr217或C/EBP β -Glu217,而不是与不可磷酸化的C/EBP β -Thr217或C/EBP β -Ala217的物理结合(图18B)。

[0361] 磷酸化的C/EBP β -Thr217刺激了小鼠中肝巨噬细胞中炎性体结构和副产物基因的表达。

[0362] 发现,当与C/EBP β -wt小鼠相比时,从磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217小鼠新鲜分离的肝巨噬细胞表达与炎性体相关的激活的转录体。这包括炎性体基因(ASC、IRF-1、IRF-4、IRF-5、TCAM-2、TRL-6、TRAF-6、Myo-D88、Nod-1和Rel1)的增加的表达、以及直接和间接细胞因子基因副产物(IL-1 β 、IL-6、IL-15、IL-18和TNF α)的增加的表达^{1,11,33}(图19A)。这些数据表明磷酸化的C/EBP β -Thr217(或C/EBP β -Glu217)是炎性体结构蛋白质和副产物的表达所必需的。此外,当与从用CCl₄处理的C/EBP β -wt小鼠新鲜分离的肝巨噬细胞相比时,从用CCl₄处理的小鼠中新鲜分离的C/EBP β -Ala217肝巨噬细胞表达抑制的炎性体转录体。这包括炎性体基因(IRF-4、NALP- α 、NALP-3、TCAM-2、TRL-1、TRL-3、TLR-5、TRL-6、TRL-7、TRL-8、TRL-9、Nod-1和Rel1)降低的表达,以及直接和间接细胞因子炎性体基因副产物(IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-15、IL-18、IL-23 α 和CXCL-3)降低的表达^{1,11,33}(图19B)。此外,用CCU处理与在C/EBP β -wt、C/EBP β -Glu217、和TGF α 小鼠的肝中IL-18、活性半胱天冬酶-1和IL-1 β 炎性体蛋白表达的诱导¹相关(图19C)。

[0363] 由毒性油综合征诱导的人类肝损伤的特征还在于与肝巨噬细胞中的炎性体复合物相关的磷酸化的C/EBP β -Thr217。

[0364] 1981年夏天在西班牙中西部地区发生的毒性油综合征(TOS)影响了约20,000万人,这些人受急性肝损伤折磨。通过3-(N-苯基氨基)-1,2-丙二醇的橄榄油污染物1,2-二油酰酯以剂量响应方式诱导氧化应激肝损伤^{34,35}。用TOS对来自所有16例患者的肝活组织检查进行分析,TOS仍然可以在康普顿斯大学医学中心,马德里,西班牙获得。当与正常个体相比时,这些患者患有中度严重的急性肝损伤(如由升高的ALT和天冬氨酸氨基转移酶(AST)表征的),其中胆汁瘀积组分由增加的碱性磷酸酶和总胆红素判断(表3)。与对照(图20A和20C)和血清ALT水平(表3)相比,通过组织学分析,在这些TOS患者中的肝损伤程度与肝的巨噬细胞浸润(图20B)、肝细胞凋亡程度(图20D)相关。

[0365] 表3. 在患有毒性油综合征(TOS)的受试者中的基线人口统计学和临床肝测试。在受毒性油综合征(N=16)折磨的患者的群组中,以下各项的值是增加的:血清氨基转移酶(ALT;普遍高达40IU/ml);天冬氨酸氨基转移酶(AST;普遍高达35IU/ml);碱性磷酸酶(Alk.Phosphatase;普遍高达126IU/ml);和总胆红素(T.Bilirubin;普遍高达1.2mg/dL)。显示的值是平均值(SE)或%以及(95%置信区间(CI))。

参数	平均值(SE)或数量(%)	95%CI
年龄(岁)	37.7(3.7)	30.0至45.5
性别(雄性)	8(50%)	N/A
ALT(IU/mL)	277(50)	171至382
AST(IU/mL)	138(20)	94至181
碱性磷酸酶(IU/mL)	454(89)	264至644
总胆红素(mg/dL)	2.5(0.8)	0.9至4.1

[0367] 因为TOS表征为导致急性炎性肝损伤的氧化应激,分析TOS折磨的患者的肝是否与患有急性炎性肝损伤的CCl₄动物模型具有相似特征。当与正常肝中巨噬细胞相比时,在来自患有TOS的患者的肝中的由如以上描述的特异性标志物的表达表征的肝巨噬细胞表达磷酸化的C/EBP β -Thr266(小鼠Thr217的确切同源物)(图20G和20H)。发现当与正常肝中的巨噬细胞相比时(图20F和20J),TOS肝具有激活的炎性体MyD-88和TLR-5的增加的标志物特征(图20E和20I)。

[0368] 讨论

[0369] 在这些研究中,诸位发明人发现磷酸化的C/EBP β -Thr217在肝巨噬细胞中激活炎性体中的新颖作用,导致由CCl₄或Fas-L诱导的肝损伤的扩增。C/EBP β -Thr217磷酸化是,在小鼠中通过氧化应激肝毒素CCl₄或通过Fas-L诱导肝损伤后肝的巨噬细胞浸润所必需的,并且是原代肝巨噬细胞培养物中巨噬细胞激活所必需的(由TGF α (C/EBP β -Thr217磷酸化的诱导剂)刺激18)。

[0370] 显著地,通过在小鼠中表达显性阴性非磷酸化的C/EBP β -Ala217转基因或通过向C/EBP β -wt小鼠给予C/EBP β 磷酸化抑制肽来阻断C/EBP β -Thr217的磷酸化,预防了由CCl₄或由Fas-L诱导的肝损伤。抑制C/EBP β -Thr217的磷酸化还改善了巨噬细胞肝浸润、炎性体多蛋白复合物的表达和激活、以及促发炎性的肝巨噬细胞的极化。先前显示,与对照小鼠相比,在C/EBP β -Ala217转基因小鼠体内的脾巨噬细胞具有增加的半胱天冬酶3表达(暗示激

活的细胞凋亡途径)²⁸。然而,与对照小鼠相比,诸位发明人在C/EBP β -Ala217转基因小鼠中没有发现肝巨噬细胞数量的减少(图15A),强烈地表明在肝中不同于脾脏,C/EBP β -Ala217巨噬细胞的细胞凋亡没有增加。

[0371] 具体地,在肝巨噬细胞中的C/EBP β -Thr217的磷酸化是刺激多蛋白复合物炎性体信号1(NF κ B、IRF8、衔接蛋白MyD88和TLR4)和炎性体信号2途径(NALP3、TLR5、IL-1R1和衔接蛋白ASC)的表达所必需的^{1,11,33}。还发现磷酸化的C/EBP β -Thr217,而不是不可磷酸化的C/EBP β -Thr217与炎性体多蛋白复合物信号1和信号2物理相关。

[0372] 炎性体的中心组分是NALP家族的成员,并且此蛋白质与衔接蛋白细胞凋亡相关的斑点状蛋白质(ASC)相关,这进而来募集促发炎性的半胱天蛋白酶前体(如半胱天冬酶原-1)³⁶。诸位发明人在其肝巨噬细胞中炎性体激活模型中发现的NALP3能够形成炎性体,而编码NALP3(CIAS1)的基因中的突变导致若干种自身炎性障碍,表明其生理相关性³⁶。

[0373] 在磷酸化的模拟物C/EBP β -Glu217小鼠中用CCl₄的急性氧化应激肝损伤诱导肝巨噬细胞炎性体基因(ASC、IRF-1、IRF-4、IRF-5、TCAM-2、TRL-6、TRAF-6、Myo-D88、Nod-1和Rel)的表达、以及肝巨噬细胞的直接的间接的细胞因子炎性体副产物(IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-15、IL-18、IL-23 α 和CXCL-3)的增加的基因表达、炎性体激活的标志^{1,11,33,37}。相比之下,当与从用CCl₄处理的C/EBP β -wt小鼠新鲜分离的肝巨噬细胞相比时,从用CCl₄处理的小鼠中新鲜分离的不可磷酸化的C/EBP β -Ala217肝巨噬细胞表达抑制的炎性体转录体。这包括炎性体基因(IRF-4、NALP- α 、NALP-3、TCAM-2、TRL-1、TRL-3、TRL-5、TRL-6、TRL-7、TRL-8、TRL-9、Nod-1和Rel)降低的表达,以及直接和间接细胞因子炎性体副产物(IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-15、IL-18、IL-23 α 和CXCL-3)降低的基因表达。

[0374] C/EBP β -Ala217突变体起C/EBP β -Thr217磷酸化的转显性阴性的作用²¹。相比之下,C/EBP β -Glu217突变体起C/EBP β -Thr217磷酸化的反显性阳性的作用¹⁸。在肝损伤中,巨噬细胞中C/EBP β -Thr217的磷酸化可以刺激巨噬细胞增殖/存活(如对于炭疽致死毒素所报道的)和/或促进转移到受损的肝细胞、并直接破坏受损的肝细胞或吞噬受损的肝细胞²³。CCl₄增加肝巨噬细胞浸润约20倍,而缺乏肝细胞损伤的转基因小鼠中巨噬细胞刺激因子TGF α 并没有增加巨噬细胞肝浸润。在用Fas-L急性治疗的动物肝中也观察到了巨噬细胞浸润,表明无论肝损伤的机制如何,通过这些细胞巨噬细胞中C/EBP β -Thr217磷酸化的刺激调节对肝的浸润。

[0375] Fas-L实验是生理相关的,因为可溶性Fas-L的显著升高发生在患有药物诱导的肝损伤或酒精性肝病的患者中^{38,39}。急性FasL给予(作用于TNF超家族受体)在磷酸化模拟物C/EBP β -Glu217转基因小鼠中诱导更大的巨噬细胞浸润和肝损伤。表达C/EBP β -Ala217转基因的小鼠对通过Fas-L的肝损伤的发展是不起反应的。

[0376] 通过消融调节巨噬细胞活性也表明磷酸化的C/EBP β -Thr217在巨噬细胞中在肝毒素暴露后对于诱导肝损伤的重要作用。诸位发明人已经报道,由于TLR-4ko小鼠对肝毒素具有抗性并且骨髓辐射的TLR-4ko小鼠与TLR-4^{+/+}巨噬细胞的重建赋予了这些动物对肝毒素的易感性⁴,因此毒性肝损伤的扩增是由巨噬细胞介导的。最近,巨噬细胞在毒性肝损伤中的作用已经使用巨噬细胞消融证实⁵,在试验性酒精性肝损伤模型中使用IL-1受体拮抗剂证实⁶,以及在LPS/D-半乳糖胺诱导的肝损伤中使用腺苷-_{2A}(A_{2A})受体-ko小鼠证实⁷。腺苷是经由A_{2A}受体和HIF-1 α 途径维持炎性体激活所必需的⁷。此外,A_{2A}腺苷受体和C/EBP β 都是通

过暴露于大肠杆菌的巨噬细胞的IL-10产生所必需的⁴⁰,表明磷酸化的C/EBP β -Thr217和A_{2A}信号途径在激活的肝巨噬细胞中的潜在集合。

[0377] 因此,在此呈现的研究将巨噬细胞中的磷酸化的C/EBP β -Thr217表征为肝毒素诱导的肝损伤中的新型和主要的信号途径。磷酸化的C/EBP β -Thr217(人类Thr266)也可以在由试验性的以及人类酒精性的和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)诱导的肝损伤中的巨噬细胞炎性体中发挥主要作用^{1,41}。在此呈现的这些发现与C/EBP β 作为巨噬细胞的重要信号传导蛋白质的作用一致,因为C/EBP β DNA-结合位点的显性抑制剂的表达或C/EBP β 的靶向缺失导致巨噬细胞分化受损¹⁶。

[0378] 由毒性污染物诱导的良好表征的急性人类氧化应激性肝损伤,毒性油综合征(TOS)的特征,至少部分地模拟和验证了在急性氧化应激炎性肝损伤的动物模型情况下的发现。由于TOS造成的人类急性肝损伤的发现表明细胞和动物模型中的发现可能适用于人类中的某些类型的急性肝损伤。进一步了解人类急性肝损伤中的这些途径的研究可以定义巨噬细胞中磷酸化的C/EBP β -Thr266是否在这些损伤中是致病的。

[0379] 总之,在此实例中呈现的发现通过C/EBP β -Thr217(人类Thr266)对肝巨噬细胞中的炎性体多蛋白复合物激活提供了作为肝炎症和损伤的发展的关键步骤的新颖的信号机制¹。肝炎症和损伤是人类急性和慢性肝病发病率和死亡率的主要因素^{1,2,3,41}。因此,IL-1 β 受体拮抗剂⁶、A_{2A}受体拮抗剂⁷、和小分子肽模拟物在肝巨噬细胞中作为人类C/EBP β -Thr266磷酸化的靶标抑制剂是用于预防和治疗炎性肝损伤的潜在候选物。

[0380] 实例11:经由各种给予途径,治疗性PEG-30kDa肽在肺纤维化的博来霉素小鼠模型中的高功效

[0381] C/EBP β -wt小鼠接受如以上描述的博来霉素给予。在第10天,一旦纤维化反应已经建立,小鼠经腹腔内(IP)接受i) PEG-30kDa-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂(连接至PEG的10 μ g肽,在第10天、第17天和第24天);或者ii)通过吸入接受肽PEG-30kDa-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂(平均粒度1.3 μ m-其有效地到达肺泡,在第10天、第17天和第24天800 μ g的肽;具体吸入参数示于表2中)。以1.0mg/L[800 μ g/剂量]的标称浓度,经由仅鼻吸入测试物质气溶胶,每天给予肽持续少于1小时[在第10天、第17天和第21天]。或者iii)通过气管内滴注接受肽PEG-30kDa-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂(40 μ g的肽,在第10天、第17天和第24天)。

[0382] 表2.通过吸入的肽给予的气溶胶参数

[0383]

溶液浓度 (mg/ml)	帕里分散率 (Pari Disperse Rate) (ml/min)	帕里流速 (Pari Flow Rate) (L/min)	气溶胶浓度 (mg/L)	RMV (L/min)	所吸入的类肽 /天 (ug)	暴露时间/天 (min)	消耗/天 (ml)	消耗/天 (mg)
31	0.25	5.5	1.00	0.022	800	36.3	12.1	374.7

[0384] 对照组接受无菌水而不是博来霉素;IP接受肽;通过吸入接受肽;或通过气管内滴注接受肽。在第27天将这些动物处死。将左肺用固定剂膨胀,通过三色染色分析并通过Odyssey Visualization显微软件方案以其整体进行定量,以最小化如前所述的分析误差(Ramamoorthy等人,2009,American Journal of Physiology,Endocrinology and

Metabolism[美国生理学、内分泌学和代谢学杂志]297:e392-401)。将右肺在液氮中快速冷冻并用于IMH、免疫印迹和qRT-PCR。用PEG-30kDa肽IP处理、气管内滴注该肽(阳性对照)、或通过吸入的肽可明显地降低肺纤维化的程度; α -SMA(激活的肌成纤维细胞的标志物)的表达,该表达与C/EBP β -Thr217磷酸化共定位。

[0385] 此外,如通过IL-23R(Th-17细胞的标志物)的表达确定的,所有治疗都减轻了肺炎症。与对照动物相比,博来霉素使肺纤维化增加了>5倍。相比之下,在第10天、第17天和第24天用3次剂量的仅14天治疗中,接受PEG-30kDa肽或通过吸入接受该肽的动物肺纤维化减少约60%($P<0.001$) (图25A)。气管内滴注(治疗性阳性对照)具有突出的功效,与对照动物只有很小的差异($P<0.001$) (图25A-25B)。通过降低的IL-23R(68)的表达判断,该肽也降低了Th-17炎症(可能是IPF炎症的重要组分(69)) (图25A)。与定量IHC一致,如通过RT-PCR确定的,通过三种肽配制品降低胶原 $\alpha 1$ (主要ECM基因(5))和TGF $\beta 1$ (纤维形成细胞因子(5)) (图25B)。

[0386] 因此,在患者中更高和延长的剂量(通过FDA表校正,以及针对患有IPF的患者的基于生理学的PK分析)可以是更有效的。尽管14天治疗很短暂,但所有治疗均改进了潮气量>35% ($P<0.01$) (图26)。从基本上正常的表面活性蛋白C(SFPC)表达通过定量IHC ($P<0.001$) (图25A)并通过肺泡上皮细胞细胞凋亡的显著抑制(约60%) ($P<0.005$) (图27)判断,在用博来霉素治疗后,接受PEG-30kDa肽或通过吸入接受该肽的C/EBP β -wt小鼠比对照C/EBP β -wt小鼠具有更少的肺损伤。

[0387] 实例12:在肾纤维化中激活的肌成纤维细胞的数量显著增加以及磷酸-C/EBP β Thr266(小鼠磷酸-C/EBP β Thr217的人类同源物)的表达,以及具有激活的巨噬细胞炎症

[0388] 分析了来自三例患有继发于肾小球肾炎的肾纤维化的患者肾活组织检查。这些活组织检查显示广泛的肾小球纤维化,其中激活的肌成纤维细胞数量显著增加(由 α -SMA表达表明)以及磷酸-C/EBP β Thr266(小鼠磷酸-C/EBP β Thr217的人类同源物)的显著表达,以及具有激活的巨噬细胞的炎症(由F4/80表示) (图28)。

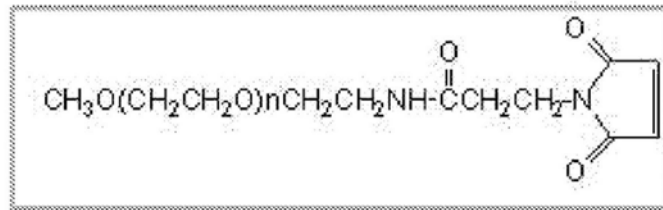
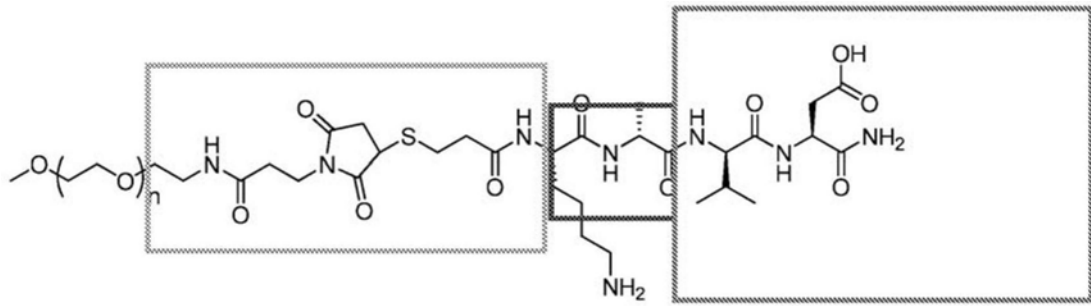
[0389] 这些发现表明导致组织纤维化的机制在肝、肺和肾中是相同的,并且指向涉及在所有组织纤维化疾病中可能的激活的肌成纤维细胞炎症性巨噬细胞和磷酸-C/EBP β Thr266的常见机制。因此,通过用本发明的PEG-30kDa肽靶向磷酸-C/EBP β -Thr266,治疗肾纤维化也是可行的。

[0390] 实例13:从PEG30 kD-Mpr-肽体内释放的中间体分子是具有药理学活性的

[0391] 以下显示了测试肽的结构,其中一个前导分子是Mpr连接的PEG肽(又称PEG-30kDa-Mpr-肽)。

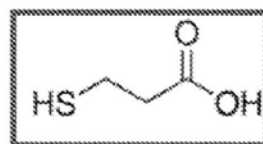
	测试品	物理形式	MW
	Ac-Lys-DAla-DVal-Asp-NH ₂	固体	473.52
[0392]	Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH ₂ (又称 PEG-30 kDa-Mpr 肽)	固体	518
	PEG 化的肽 361332	固体	约 30 KDa

[0393] PEG化的肽361332的化学结构在以下展示:

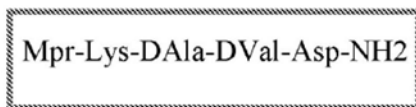


MPEG-马来酰亚胺

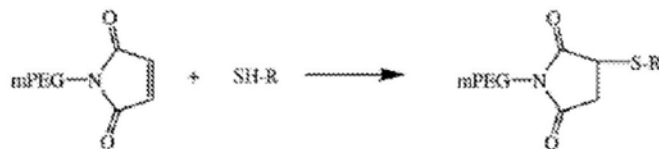
[0394]



巯基丙酸接头 (Mpr)



肽 w/ 接头



PEG-马来酰亚胺/硫醇Rxn-

[0395] 提供了使用PEG化的肽361332的研究

[0396]

测试品	给予途径	小鼠病毒株	动物的数量	剂量 (mg/kg) ^a	收集的样品	收集时间点
PEG 化的肽 361332	IV	CD-1	4	7.5	血浆、肝	4、8、24 和 48 小时

[0397] ^a剂量反应了7.5mg/kg的肽当量;对于此试点研究,n=1只小鼠/时间点。血浆样品中肽和MPR-中间体的水平

[0398] 时间 Ac-Lys-Dala-Dval-Asp-NH₂ Mpr-Lys-DAla-DVal-Asp-NH₂

	浓度 (ng/mL)	浓度 (ng/mL)
	4	1291
[0399]	8	900
	24	921
	48	1523

[0400] 由于Mpr肽释放活性肽,所以Mpr肽也可以作为另外配制品的治疗剂。因此,它可以作为用于治疗各种组织纤维化疾病的可替代的配制品来给予。

[0401] 对于肝炎症和纤维化的参考文献

[0402] 1.Bravo R, Frank R, Blundell PA and MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. Nature 326:515-7, 1987.

[0403] 2. Buck M, Turler H and Chojkier M. LAP (NF-IL6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. EMBO J 13:851-860, 1994.

[0404] 3. Buck M, Poli V, Chojkier M and Hunter T. Phosphorylation of rat serine105 or mouse threonine 217 in C/EBP β is required for hepatocyte proliferation induced by TGF α . Mol Cell 4:1087, 1999.

[0405] 4. Buck M, Poli V, Hunter T and Chojkier M. C/EBP β phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. Mol Cell 8:807-16, 2001.

[0406] 5. Buck M, Zhang L, Hunter T and Chojkier M. Nuclear export of phosphorylated C/EBP β mediates the inhibition of albumin expression by TNF. EMBO J 20:6712-23, 2001.

[0407] 6. Buck M, Chojkier M. Signal Transduction in the Liver. Hepatology 37: 731-8, 2003.

[0408] 7. Buck M, Chojkier M. A ribosomal S6K-mediated signal to C/EBP β is critical for the development of liver fibrosis. PLOS One 2:e1372, 2007.

[0409] 8. Buck M, Chojkier M. C/EBP β phosphorylation rescues macrophage dysfunction and apoptosis induced by anthrax lethal toxin. Am J Physiol Cell Physiol 293:C1788-96, 2007.

[0410] 9. Buck M and Chojkier M. C/EBP β Associates With Caspase 8 Complex Proteins and Modulates Apoptosis in Hepatic Stellate Cells. J Clin Gastroenterol 41:S295-99, 2007.

[0411] 10. Buck M. Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, and 4 in normal human hepatocyte cultures. PLOS One 3:2660, 2008.

[0412] 11. Buck M and Chojkier M. C/EBP β -Thr217 phosphorylation Signaling Contributes to the Development of Lung Injury and Fibrosis in Mice. PLOS One 2011.

- [0413] 12.Castilla R,R Gonzalez,D Fouad,E.Fraga and J Muntane.Dual Effect of Ethanol on Cell Death in Primary Culture of Human and Rat Hepatocytes.*Alcohol&Alcoholism* 39,290-6,2004.
- [0414] 13.Chung R and Podolsky D.Cirrhosis and its Complications.In: Harrison's Principles of Internal Medicine,New York:McGraw-Hill,2005,p.1754-1767
- [0415] 14.Chojkier M.Regulation of liver-specific gene expression.In: Progress in Liver Diseases,edited by Boyer J and OcknerR.Orlando: W.B.Saunders,1995,p.37-61.
- [0416] 15.Chojkier,M.Regulation of collagen gene expression.In Liver growth and repair.430-50;1998.
- [0417] 16.Chojkier M.Troglitazone and liver injury:in search of answers.*Hepatology* 41:237-246,2005.PMID:15657914
- [0418] 17.Descombes P,Chojkier M,Lichtsteiner S,Falvey E and Schibler U.LAP, a novel member of the C/EBP gene family,encodes a liver-enriched transcriptional activator protein.*Genes Dev* 4:1541-51,1990.
- [0419] 18.Friedman JR,Larris B,Le PP,Peiris TH,Arsenlis A,Schug J,Tobias JW, Kaestner KH,Greenbaum LE.Orthogonal analysis of C/EBP β targets in vivo during liver proliferation.*Proc Natl Acad Sci USA*.2004;101(35):12986-91.
- [0420] 19.Friedman SL.Molecular regulation of hepatic fibrosis,an integrated cellular response to tissue injury.*J Biol Chem* 275:2247-2250,2000.PMID: 10644669
- [0421] 20.Friedman SL and Bansal MB.Reversal of hepatic fibrosis--fact or fantasy?*Hepatology* 43:S82-S88,2006.PMID:16447275.
- [0422] 21.Gewolb J.Protecting the Liver From Itself.*Science Now* 4,2001.
- [0423] 22.Gyrd-Hansen M&Pascal Meier.IAPs:from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B,inflammation and cancer *Nature Reviews Cancer* 10,561-574 (August 2010)doi:10.1038/nrc2889
- [0424] 23.Houglum K, Lee KS and Chojkier M.Proliferation of hepatic stellate cells is inhibited by phosphorylation of CREB on Serine 133.*J Clin Invest* 99: 1322,1997.
- [0425] 24.Iredale J.Stellate cell behavior during resolution of liver injury.*Semin Liv Dis* 21:427-436,2001.
- [0426] 25.Jimenez W,Pares A,Caballeria J,Heredia D,Bruguera M,Torres M, Rojkind M and Rodes J.Measurement of fibrosis in needle liver biopsies: evaluation of a colorimetric method.*Hepatology* 5:815-818,1985.PMID:4029893
- [0427] 26.Kim K,Keiichirou Morimura,Yatrik Shah,Qian Yang,Jerrold M.Ward and Frank J.Gonzalez Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor.*Carcinogenesis* (2007) 28(5):940-

946.doi:10.1093/carcin/bgl249.

[0428] 27.Lee KS,Buck M,Houglum K and Chojkier M.Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression.J Clin Invest96:2461-2468,1995.PMID#7593635.

[0429] 28.McKnight SL.McBindall-a better name for CCAAT/enhancer binding proteins?Cell 107:259-261,2001.

[0430] 29.Magzoub,M.;Graslund,A.Cell-penetrating peptides.Q Rev Biophys 37; 147-195;2004.

[0431] 30.Nakajima T,Kishimoto T,Akira S.Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6.PNAS.90:2207-11.1993

[0432] 31.Patsch W,T Tamai,and G Schonfeld.Effect of fatty acids on lipid and apoprotein secretion and association in hepatocyte cultures.J Clin Invest.1983;72:371-8.

[0433] 32.Reducing Risks,Promoting Healthy Life.In:The World Health Report2002,Geneva:World Health Organization,2002,p.1-230.

[0434] 33.Report 04-5491.Executive Summary.In:Action Plan for Liver Disease Research,NIH,2004,p.1-6.

[0435] 34.Report 04-5491.Liver Cancer.Action Plan for Liver Disease Research.137-143.2004.U.S.Department of Health and Human Services,NIH.

[0436] 35.Report 04-5491.Chapter 2.In:Action Plan for Liver Disease Research,NIH,2004,p.39-43.

[0437] 36.Rojas M,Lin YZ.Controlling EGF-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor.J Biol Chem.271:27456-61.1996.

[0438] 37.Roy SK,Hu J,Meng Q,Shapiro PS,Reddy SP,Platanias LC,Lindner DJ, Johnson PF,Pritchard C,Pages G,Pouyssegur J and Kalvakolanu DV.MEKK1plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma.Proc NatlAcadSci USA 99:7945-7950, 2002.PMID:12048245

[0439] 38.Rudolph K,Chang S,Millard M,Schreiber-Agus N and DePinho R.Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery.Science 287:1253-1258,2000.PMID:10678830

[0440] 39.Sato,A.K.;Viswanathan,M.;Kent,R.B.;Wood,C.R.Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development.Curr.Opin.Biotech. 17;638-42;2006.

[0441] 40.Trautwein C,Caelles C,van der Geer P,Hunter T,Karin M and Chojkier M.Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain.Nature 364:544-547,1993.

- [0442] 41. Trautwein C, Karin M, Hunter T and Chojkier M. PKA and C site-specific phosphorylations of LAP modulate its binding affinity to DNA-recognition elements. *J Clin Inv* 93:2554-61, 1994.
- [0443] 42. Veronese, F.M. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Disc Today* 10;1451-8; 2005.
- [0444] 43. Wegner M, Cao Z and Rosenfeld MG. Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP. *Science* 256:370-373, 1992. PMID:1314426
- [0445] 44. Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH, III and Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334:494-498, 1988. PMID:290047.
- [0446] 45. Chen RH, Abate C, Blenis J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Dec 1; 90(23):10952-6.
- [0447] 46. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002; 298:1912-34.
- [0448] 47. Jhappan C, C. Stahle, R. N. Harkins, N. Fausto, G. H. Smith and G. T. Merlino. 1990. TGF overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 61: 1137-1146.
- [0449] 48. Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003; 14(9):931-42.
- [0450] 49. Olsen JV, Ong SE, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics*. 2004; 3(6):608-14.
- [0451] 50. Sherman, Nicholas E.; Kinter, Michael (2000). Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. New York: John Wiley.
- [0452] 51. Wible B.A., Peter Hawryluk, Eckhard Ficker, Yuri A. Kuryshev, Glenn Kirsch, Arthur M. Brown. HERG-Lite: A novel comprehensive high-throughput screen for drug-induced hERG risk. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 52(2005) 136-145.
- [0453] 52. Johnson S.A., Tony Hunter. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature Methods* 2, 17-25 (2005).
- [0454] 53. Sinz M, Gillian Wallace, and Jasminder Sahi. Current Industrial Practices in Assessing CYP450 Enzyme Induction: Preclinical and Clinical. *AAPS J*. 2008; 10(2):391-400.
- [0455] 54. Bernardi M, Calandra S, Colantoni A, Trevisani F, Raimondo ML, Sica G, Schepis F, Mandini M, Simoni P, Contin M, Raimondo G. Q-T interval prolongation in cirrhosis: prevalence, relationship with severity, and etiology of the disease and possible pathogenetic factors. *Hepatology*. 1998; 27(1):28-34.
- [0456] 55. Baker MP, and Jones TD. Identification and removal of immunogenicity

from therapeutic proteins. *Curr Opin Drug Discov Devel.* (2007) 10:219.

[0457] 56. Perry LCA, Jones TD, and Baker MP. New approaches to prediction of immune responses to therapeutic proteins during pre-clinical development. *Drugs RD* (2008) 9 (6) :385.

[0458] 针对肺炎症和纤维化引用的参考文献

[0459] 1. Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T and Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9:1897-1906, 1990.

[0460] 2. Barron L and Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J of Phys-Gastroint. and Liver Physiology* 300:723-728, 2011.

[0461] 3. Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, Holstege A and Chojkier M. Stimulation of collagen 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury. A link to tissue fibrosis? *Hepatology* 19:1262-1271, 1994.

[0462] 4. Berberich-Siebelt F, Berberich I, Andrulis M, Santner-Nanan B, Jha MK, Klein-Hessling S, Schimpl A and Serfling E. SUMOylation interferes with CCAAT/Enhancer-binding protein-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T-cells. *J Immunol* 176:4851, 2006.

[0463] 5. Bravo R, Frank R, Blundell PA and MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326:515-517, 1987.

[0464] 6. Buck M. Targeting ribosomal S-6 kinase for the prevention and treatment of liver injury and liver fibrosis. *Drug News Perspect* 21:301-306, 2008.

[0465] 7. Buck M and Chojkier M. A ribosomal S-6 kinase-mediated signal to C/EBP is critical for the development of liver fibrosis. *PLoS One* 2:e1372, 2007.

[0466] 8. Buck M and Chojkier M. C/EBP (beta) phosphorylation rescues macrophage dysfunction and apoptosis induced by anthrax lethal toxin. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1788-C1796, 2007.

[0467] 9. Buck M and Chojkier M. Signal Transduction in the Liver: C/EBP Modulates Cell Proliferation and Survival. *Hepatology* 37:731-738, 2003.

[0468] 10. Buck M and Chojkier M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J* 15:1753-65, 1996.

[0469] 11. Buck M and Chojkier M. C/EBP-Thr217 phosphorylation Signaling Contributes to the Development of Lung Injury and Fibrosis in Mice. *PLoS One* 2011.

[0470] 12. Buck M, Poli V, Hunter T and Chojkier M. C/EBP phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell

survival. *Mol Cell* 8:807-816,2001.

[0471] 13. Buck M, Poli V, van der Geer P, Chojkier M and Hunter T. Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP is required for hepatocyte proliferation induced by TGF. *Mol Cell* 4:1087-92,1999.

[0472] 14. Buck M, Turler H and Chojkier M. LAP (NF-IL6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. *EMBO J* 13:851-860,1994.

[0473] 15. Buck M, Zhang L, Hunter T and Chojkier M. Nuclear export of phosphorylated C/EBP mediates the inhibition of albumin expression by TNF. *EMBO J* 20:6712-6723,2001.

[0474] 16. Chojkier M and Fierer J. D-galactosamine hepatotoxicity is associated with endotoxin sensitivity and mediated by lymphoreticular cells in mice. *Gastroenterology* 88:115-121,1985.

[0475] 17. Chojkier M. Regulation of collagen gene expression. In: *Liver growth and repair*, edited by Strain A and Diehl A. London: Chapman&Hall, 1998, p.430-450.

[0476] 18. Crystal RG, Bitterman PB, Mossman B, Schwarz MI, Sheppard D, Almsy L, Chapman HA, Friedman SL, King TE, Jr., Leinwand LA, Liotta L, Martin GR, Schwartz DA, Schultz GS, Wagner CR and Musson RA. Future Research Directions in IPF: *Am J Respir Crit Care Med* 166:236-46,2002.

[0477] 19. Cutroneo KR, White SL, Phan SH and Ehrlich HP. Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *Journal of Cellular Physiology* 211:585-589,2007.

[0478] 20. Degryse AL, Xu XC, Tanjore H, Polosukhin VV, Jones B, Mc Mahon FB, Ortiz C, Blackwell TS and Lawson WE. TGF Signaling In Epithelium Regulates Bleomycin Induced Alveolar Injury And Fibroblast Recruitment. *Am J Respir Crit Care Med* 183:A6144,2011.

[0479] 21. Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E and Schibler U. LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* 4:1541-1551,1990.

[0480] 22. Fichtner-Fiegl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK and Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 receptor is involved in induction of TGF-1 production and fibrosis. *Nature Medicine* 12:99-106,2006.

[0481] 23. Franchi L, Eigenbros T, Munoz-Planillo R and Nunez G. The Inflammasome: A caspase-1 activation platform regulating immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10:241,2009.

[0482] 24. Garantziotis S, Steele MP and Schwartz DA. Pulmonary fibrosis: thinking outside of the lung. *J Clin Invest* 114:319-321,2004.

[0483] 25. Green D and Reed J. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312,1998.

- [0484] 26.Hardie WD,Glasser SW and Hagood JS.Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis.Am J Pathol 175:3-16,2009.
- [0485] 27.He W,Zhang L,Ni A,Zhang Z,Mirotso M,Mao L,Pratt RE and Dzau VJ.Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction.PNAS 2010.
- [0486] 28.Hilgendorff A,Doerner M,Rawer D,Leick J,Trotter A,Ebsen M,Ruppert C,Gunther A,Gortner L and Reiss I.Effects of a recombinant surfactant protein-C-based surfactant on lung function and pulmonary surfactant system in a model of meconium aspiration syndrome.Crit Care Med 134:203-210,2006.
- [0487] 29.Homer RJ,Elias JA,Lee CG and Herzog E.Modern concepts on the role of inflammation in pulmonary fibrosis.Archives of Pathology&Laboratory Medicine 135:780-788,2011.
- [0488] 30.Houglum K,Lee KS and Chojkier M.Proliferation of hepatic stellate cells is inhibited by phosphorylation of CREB on Serine 133.J Clin Invest 99: 1322-1389,1997.
- [0489] 31.Hu B,Ullenbruch MR,Jin H,Gharaee-Kermani M and Phan SH.An essential role of CCAAT/enhancer binding protein beta in bleomycin-induced pulmonary fibrosis.J Pathol 211:455-462,2007.
- [0490] 32.Huh JR,Leung MWL,Huang P,Ryan DA,Krout MR,Malapaka R,Chow J,Manel N,Ciofani M,Kim SV,Cuesta A,Santori FR,Lafaille JJ,Xu HE,Gin DY,Rastinejad F and Littman DR.Digoxin and its derivatives suppress Th17cell differentiation by antagonizing ROR γ t activity.Nature 472:486-490,2011.
- [0491] 33.Jakubzick C,Choi ES,Joshi BH,Keane MP,Kunkel SL,Puri RK and Hogaboam CM.Therapeutic Attenuation of Pulmonary Fibrosis Via Targeting of IL-4-and IL-13-Responsive Cells.J Immunol 171:2684-2693,2003.
- [0492] 34.Jenner RG,Townsend MJ,Jackson I,Sun K,Bouwman RD,Young RA,Glimcher LH and Lord GM.The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes.Proc Natl Acad Sci USA 106:17876-17881,2009.
- [0493] 35.Kabelitz D.Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes.Curr Opin Imm19:39-45,2007.
- [0494] 36.Kamei Y,Xu L,Heinzel T,Torchia J,Kurokawa R,Gloss B,Lin SC,Heyman RA,Rose DW,Glass CK and Rosenfeld MG.A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.Cell85: 403-414,1996.
- [0495] 37.Karpel JP,Aldrich TK,Mitsudo S and Norin AJ.Lung Lymphocytes in Bleomycin-Induced Pulmonary Disease.Lung 167:163-172,1989.
- [0496] 38.Kelley J.Cytokines of the lung.American Review of respiratory

disease141:765-788,1990.

[0497] 39.Kinoshita SM and Taguchi S.NF-IL6 (C/EBPbeta) induces HIV-1 replication by inhibiting cytidine deaminase APOBEC3G.Proc Natl Acad Sci USA105:15022-15027,2008.

[0498] 40.Konigshoff M,Kramer M,Balsara N,Wilhelm J,Amarie OV,Jahn A,Rose F, Fink L,Seeger W,Schaefer L,Gunther A and Eickelberg O.WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis.J Clin Invest 119:772-787,2009.

[0499] 41.Kowenz-Leutz E,Twamley G,Ansieau S and Leutz A.Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control:activation through derepression.Genes Dev 8:2781-2791,1994.

[0500] 42.Lee F,Hagler J,Chen Z and Maniatis T.Activation of the I kappa B alpha kinase complex by MEKK1,a kinase of the JNK pathway.Cell 88:213-222, 1997.

[0501] 43.Li B,Tournier C,Davis RJ and Flavell RA.Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation.EMBO J 18:420-432,1999.

[0502] 44.Li M,Krishnaveni MS,Li C,Zhou B,Xing Y,Banfalvi A,Li A,Lombardi V, Akbari O,Borok Z and Mino P.Epithelium-specific deletion of TGF-B receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis.Journal of Clinical Investigation 121:277-287,2011.

[0503] 45.Magzoub M and **Gräslund** A.Cell-penetrating peptides:[corrected]from inception to application.Q Rev Biophys 37:147-195,2004.

[0504] 46.Maitra A,Shen F,Hanel W,Mossman K,Tocker J,Swart D and Gaffen SL.Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression.Proc Natl Acad Sci USA 104:7506-7511, 2007.

[0505] 47.Martinon F,Burns K and Tschopp J.The inflammasome:a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.Molecular Cell 10:417-426,2002.

[0506] 48.Matsusaka T,Fujikawa K,Nishio Y,Mukaido N,Matsushima K,Kishimoto T and Akira S.Transcription Factors NF-IL6 and NF-kappa B Synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines,interleukin 6 and interleukin 8.PNAS 90:10193-10197,1999.

[0507] 49.McGeachy MJ and Cua DJ.Th17 Cell Differentiation:The Long and Winding Road.Immunity 28:445-453,2008.

[0508] 50.McGuirk P and Mills KHG.Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases.Trends Immunol 23:450-455,2002.

- [0509] 51.McKnight SL.McBindall-a better name for CCAAT/enhancer binding proteins?Cell 107:259-261,2001.
- [0510] 52.Meneghin A and Hogaboam CM.Infectious disease,the innate immune response,and fibrosis.J Clin Invest 117:530-538,2007.
- [0511] 53.Mombaerts,Peter,Iacomini,John,Johnson,Randall S.,Herrup,Karl, Tonegawa,Susumu,and Papaioannou, Virginia E.RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.Cell 68,869-77.1992.
- [0512] 54.Moore BB and Hogaboam CM.Murine models of pulmonary fibrosis.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:L152-L160,2008.
- [0513] 55.Mullen AC,High FA,Hutchins AS, Lee HW,Villarino AV,Livingston DM, Kung AL,Cereb N,Yao TP,Yang SY and Reiner SL.Role of T-bet in Commitment of TH1 Cells Before IL-12-Dependent Selection.Science 292:1907-1910,2001.
- [0514] 56.Murray PJ and Wynn TA.Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.Nat Rev Immunol 11:723-737,2011.
- [0515] 57.Nakajima T,Kinoshita S,Sasagawa T,Sasaki K,Naruto M,Kishimoto T and Akira S.Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6.Proc Natl Acad Sci USA 90:2207-2211,1993.
- [0516] 58.Nguyen TL.Targeting RSK:an overview of small molecule inhibitors.Anti-Cancer Agents Med Chem 8:710-716,2008.
- [0517] 59.Olson AL,Swigris JJ,Lezotte DC,Norris JM,Wilson CG and Brown KK.Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to2003.Am J Respir Crit Care Med 176:277-284,2007.
- [0518] 60.Orens JB,Estenne M,Arcasoy S,Conte JV,Corris P,Egan JJ,Egan T, Keshavjee S,Knoop C,Kotloff R,Martinez FJ,Nathan S,Palmer S,Patterson A, Singer L,Snell G,Studer S,Vachiary JL,Gianville AR.J Heart Lung Transplant 25:745-755,2006.
- [0519] 61.Palombella VJ,Rando OJ,Goldberg AL and Maniatis T.The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kB1 precursor protein and the activation of NF-kB.Cell 78:773-785,1994.
- [0520] 62.Pantelidis P,Fanning GC,Wells AU,Welsh KI and du Bois RM.Analysis of tumor necrosis factor-alpha,lymphotoxin-alpha,tumor necrosis factor receptor II,and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.Am J Respir Crit Care Med 163:1432-1436,2001.
- [0521] 63.Pardo A,Gibson K,Cisneros J,Richards TJ,Yang Y,Becerril C,Yousem S,Herrera I,Ruiz V,Selman Ms and Kaminski N.Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis.PloS Med 2:e251, 2005.
- [0522] 64.Pedroza M,Schneider DJ,Karmouty-Quintana H,Coote J,Shaw S,Corrigan

R, Molina JG, Alcorn JL, Galas D, Gelinas R and Blackburn MR. Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenine mediated lung injury. *PLoS One* 6:e22667, 2011.

[0523] 65. Phillipps RJ, Burdick MJ, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP and Strieter RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL 12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 114:438-446, 2004.

[0524] 66. Pulendran B, Tang H and Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. *Nature Immunology* 11:647-655, 2010.

[0525] 67. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ and Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Res Critical Care Med* 174:810-816, 2006.

[0526] 68. Ramamoorthy S, Donohue M and Buck M. Decreased Jun-D and myogenin expression in muscle wasting of human cachexia. *American J of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 297:e392-401, 2009.

[0527] 69. Rosati M, Valentin A, Patenaude DJ and Pavlakis GN. CCAT-Enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) activates CCR5 promoter: increased C/EBP beta and CCR5 in T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *J Immunol* 167:1654-1662, 2001.

[0528] 70. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL and Gaffen SL. Functional Cooperation between Interleukin-17 and Tumor Necrosis Factor- α is Mediated by CCAAT/Enhancer-binding Protein Family Members. *The Journal of Biological Chemistry* 279:2559-2567, 2004.

[0529] 71. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N and Nerlov C. A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *PNAS* 106:17475-17480, 2009.

[0530] 72. Sato AK, Viswanathan M, Kent RB and Wood CR. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotech* 17:638-642, 2006.

[0531] 73. Schreck R, Rieber P and Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258, 1991.

[0532] 74. Schrier DJ, Phan SH and McGarry BM. The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *The American Rev of Respiratory Disease* 127:614-617, 1983.

[0533] 75. Schwabe RF and Sakurai H. IKK phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2. *FASEB J* 19:1758-1760, 2005.

[0534] 76. Screpanti I, Musiani P, Bellavia D, Cappelletti M, Aiello FB, Maroder M, Frati L, Modesti A, Gulino A and Poli V. Inactivation of the IL-6 Gene

Prevents Development of Multicentric Castleman's Disease in C/EBP[3-deficient Mice. *Journal of Experimental Medicine* 184:1561-1566,1996.

[0535] 77. Selman M, King TE and Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134:136-151,2001.

[0536] 78. Shen F, Li N, Gade P, Kalvakolanu DV, Weibley T, Doble B, Woodgett JR, Wood TD and Gaffen SL. IL-17 Receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci Signal* 2:ra8,2009.

[0537] 79. Smith JA, Poteet-Smith C, Xu Y, Errington TM, Hecht SM and Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res* 65:1027-1034,2005.

[0538] 80. Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, Istrate MA, Kamenecka TM, Roush WR, Vidovic D, Schurer SC, Xu J, Wagoner G, Drew PD, Griffin PR and Burris TP. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 472:491-494,2011.

[0539] 81. Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U and Green D. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 310:66-67,2005.

[0540] 82. Stein B and Baldwin A. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kB. *Mol Cell Biol* 13:7191-7198,1993.

[0541] 83. Stein B, Cogswell P and Baldwin A, Jr. Functional and physical associations between NF-kB and C/EBP family members: Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 13:3964-3974,1993.

[0542] 84. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG and Glimcher LH. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100:655-669,2000.

[0543] 85. Takeshita F, Suzuki K, Sasaki S, Ishii N, Klinman DM and Ishii KJ. Transcriptional Regulation of the Human TLR9 Gene. *J Immunol* 173:2552-2561, 2004.

[0544] 86. Trautwein C, Caelles C, van der Geer P, Hunter T, Karin M and Chojkier M. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* 364:544-547,1993.

[0545] 87. Trautwein C, van der Geer P, Karin M, Hunter T and Chojkier M. Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA-recognition elements. *J Clin Invest* 93:2554-2561,1994.

[0546] 88. Trujillo G, Meneghin A, Flaherty KR, Sholl LM, Myers JL, Kazerooni EA, Gross BH, Oak SR, Coelho AL, Evanoff H, Day E, Toews GB, Joshi AD, Schaller MA,

Waters B, Jarai G, Westwick J, Kunkel SL, Martinez FJ and Hogaboam CM. TLR9 Differentiates Rapidly from Slowly Progressing Forms of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Science Translational Medicine* 2:57ra82, 2010.

[0547] 89. Veronese FM and Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10:1451-1458, 2005.

[0548] 90. Wegner M, Cao Z and Rosenfeld MG. Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP. *Science* 256:370-373, 1992.

[0549] 91. Wilson MS, Elnekave E, Mentink-Kane MM, Hodges MG, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson RW, Kamanaka M, Flavell RA, Keane-Myers A, Cheever AW and Wynn TA. IL-13Ra2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway hyperreactivity, and fibrosis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 117:2941-2951, 2007.

[0550] 92. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW and Wynn TA. Bleomycin and IL-1-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *Journal of Experimental Medicine* 207:535-552, 2010.

[0551] 93. Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincón M and Flavell RA. Differentiation of CD4+ T Cells to Th1 Cells Requires MAP Kinase JNK2. *Immunity* 9:575-585, 1998.

[0552] 94. Zhang K, Gharaee-Kermani M, McGarry B, Remick D and Phan SH. TNF- α -mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. *Journal of Immunology* 158:954-959, 1997.

[0553] 95. Zheng W-P and Flavell RA. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell*.

[0554] 对于巨噬细胞炎性体激活和肝损伤的参考文献

[0555] 1. Szabo, G. & Petrasek, J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 12, 387-400 (2015).

[0556] 2. Chung, R. & Podolsky, D. Cirrhosis and its Complications. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill: New York, 1754-1767 (2005).

[0557] 3. Chojkier, M. Regulation of collagen gene expression. *Liver Growth and Repair*. Chapman & Hall: London, 430-450 (1998).

[0558] 4. Chojkier, M. & Fierer, J. D-Galactosamine hepatotoxicity is associated with endotoxin sensitivity and mediated by lymphoreticular cells in mice. *Gastroenterology* 88, 115-121 (1985).

[0559] 5. Duffield, J. S. et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*. 115, 56-65 (2005).

[0560] 6. Petrasek, J. et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *The Journal of Clinical*

Investigation 122,3476-3489 (2012) .

[0561] 7.Ouyang,X.et al.Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A2Areceptor and the HIF-1a pathway.Nat Commun.4,1-18 (2013) .

[0562] 8.Tsutsui,H.et al Caspase-1-Independent,Fas/Fas Ligand-Mediated IL-18Secretion from Macrophages Causes Acute Liver Injury in Mice.Immunity 11, 359-367 (1999) .

[0563] 9.Diehl,A.M.Neighborhood watch orchestrates liver regeneration.Nature Medicine 18.,497-499 (2012) .

[0564] 10.Martinon,F.,Burns,K.&Tschopp,J.The inflammasome:a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.Molecular Cell 10,417-426 (2002) .

[0565] 11.Franchi,L.,Eigenbrod,T.,Munoz-Planillo,R.&Nunez,G.The inflammasome:a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis.Nat.Immunol.10,241-247 (2009) .

[0566] 12.Descombes,P.,Chojkier,M.,Lichtsteiner,S.,Falvey,E.&Schibler,U.LAP, a novel member of the C/EBP gene family,encodes a liver-enriched transcriptional activator protein.Genes Dev 4,1541-1551 (1990) .

[0567] 13.Akira,S.et al.Anuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family.The EMBO Journal 9,1897-1906 (1990) .

[0568] 14.Poli,V.,Mancini,F.P.&Cortese,R.IL6-DBP,a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction,defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP.Cell 63,643-653 (1990) .

[0569] 15.Iwama,A.et al.Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment.J.Exp.Med.195,547-558 (2002) .

[0570] 16.Sebastian,T.&Johnson,P.F.Stop and go:anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPb.Cell Cycle 5,953-957 (2006) .

[0571] 17.Friedman,A.D.Transcriptional control of granulocyte and monocyte development.Oncogene 26,6816-6828 (2007) .

[0572] 18.Buck,M.,Poli,V.,van der Geer,P.,Chojkier,M.&Hunter,T.Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha.Mol Cell 4,1087-1092 (1999) .

[0573] 19.Buck M,C.M.C/EBPβAssociates With Caspase 8 Complex Proteins and Modulates Apoptosis in Hepatic Stellate Cells.J Clin Gastroenterol 41,S295-S299 (2001) .

[0574] 20.Buck,M.&Chojkier,M.Signal Transduction in the Liver:C/EBPb

Modulates Cell Proliferation and Survival. *Hepatology* 37,731-738 (2003) .

[0575] 21. Buck, M. & Chojkier, M. A ribosomal S-6 kinase-mediated signal to C/EBP-beta is critical for the development of liver fibrosis. *PLoS One* 2, e1372 (2007) .

[0576] 22. Trautwein, C. et al. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* 364, 544-547 (1993) .

[0577] 23. Buck, M. & Chojkier, M. C/EBP (beta) phosphorylation rescues macrophage dysfunction and apoptosis induced by anthrax lethal toxin. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1788-C1796 (2007) .

[0578] 24. Ramamoorthy, S., Donohue, M. & Buck, M. Decreased Jun-D and myogenin expression in muscle wasting of human cachexia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E392-401 (2009) .

[0579] 25. Chojkier, M. Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology* 41, 237-246 (2005) .

[0580] 26. Ogasawara, J. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-809 (1993) .

[0581] 27. Buck, M., Poli, V., Hunter, T. & Chojkier, M. C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell* 8, 807-816 (2001) .

[0582] 28. Malhi, H. & Gores, G. J. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology* 134, 1641-1654 (2008) .

[0583] 29. Cieslik, K., Zhu, Y. & Wu, K. K. Salicylate Suppresses Macrophage Nitric-oxide Synthase-2 and Cyclo-oxygenase-2 Expression by Inhibiting CCAAT/Enhancer-binding Protein-beta Binding via a Common Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49304-49310 (2002) .

[0584] 30. Rudolph, K. L., Chang, S., Millard, M., Schreiber-Agus, N. & Depinho, R. A. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 287, 1253-1258 (2000) .

[0585] 31. Julien, B. et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 128, 742-755 (2005) .

[0586] 32. Walsh, J. G., Muruve, D. A. & Power, C. Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 84-97 (2014) .

[0587] 33. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annual Review of Immunology* 27, 229-265 (2009) .

[0588] 34. Tabuenca, J. M. Toxic-allergic syndrome caused by ingestion of rapeseed oil denatured with aniline. *The Lancet* 318, 567-568 (1981) .

[0589] 35. Solis-Herruzo, J. A. et al. Hepatic injury in the toxic epidemic syndrome caused by ingestion of adulterated cooking oil. *Hepatology* 4, 131-139 (1984) .

[0590] 36. Dadley-Moore, D. Switching on the inflammasome. Nature Reviews Immunology 6, 88-89 (2006).

[0591] 37. Lamkanfi, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. Nat Rev Immunol 11, 213-220 (2011).

[0592] 38. Ryo, K. et al. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. Am J Gastroenterol 95, 2047-2055 (2000).

[0593] 39. **Taïeb**, J., Mathurin, P., Poynard, T., Gougerot-Pocidallo, M. A. & Chollet-Martin, S. Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease. Lancet 351, 1930-1931 (1998).

[0594] 40. Csóka, B. et al. A2A adenosine receptors and C/EBPβ are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli. Blood 110, 2685-2695 (2007).

[0595] 41. Mehal, W. Z. The Inflammasome in Liver Injury and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Digestive Diseases 32, 507-515 (2014).

[0596] 42. Murray, Peter J. et al Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Immunology 41, 14-20 (2014).

[0597] 43. Brenner DA, Alcorn JM, Feitelberg SP, Leffert HL, Chojkier M. Expression of collagen genes in the liver. Mol Biol Med. 7, 105-15 (1990).

[0598] ***

[0599] 本发明在范围方面不被在此说明的具体实施例限制。实际上,除了在此描述的那些之外,本发明的各种修改将因前述说明而对本领域的技术人员变得清楚。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0600] 在此引用的所有专利、说明书、出版物、测试方法、文献和其他材料通过引用以其全文结合在此,如同在本说明书中实际存在的那样。

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会

<120> 用于炎症和纤维化的肽治疗

<130> 247106.000034

<140>

<141>

<150> 62/160,173

<151> 2015-05-12

<160> 7

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的引物

<400> 1

taggggtgtgt ttaggcgaaa 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的引物

<400> 2

tctgttgcct tcctaataag 20

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 3

Lys Ser Lys Ala Lys Lys Ala Val Asp Lys His Ser Asp

1

5

10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

Lys Ala Val Lys

1

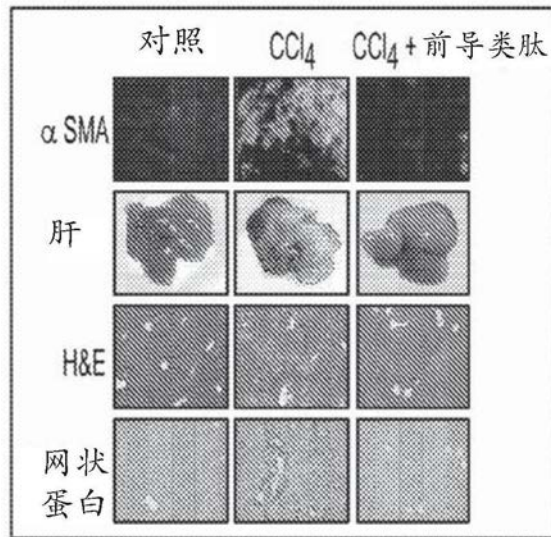


图1

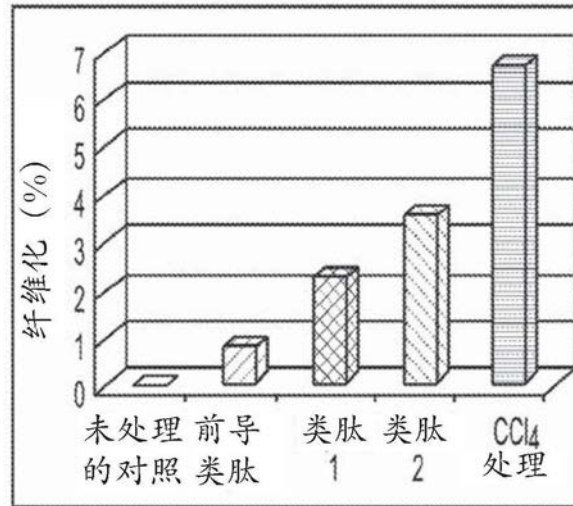


图2A

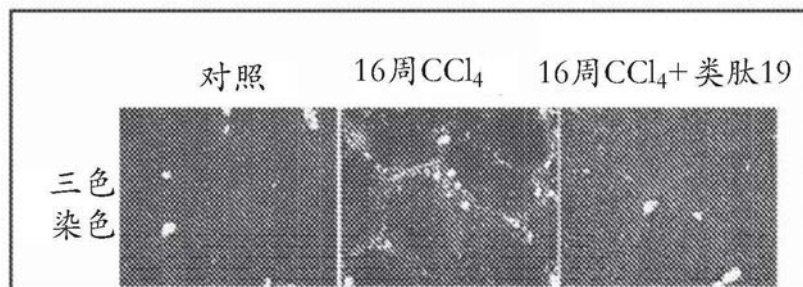


图2B

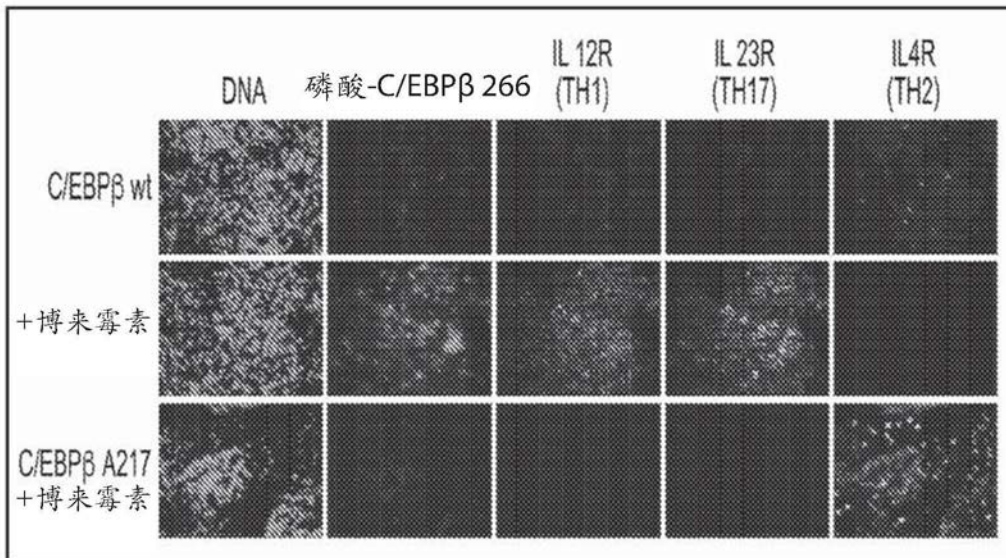


图3

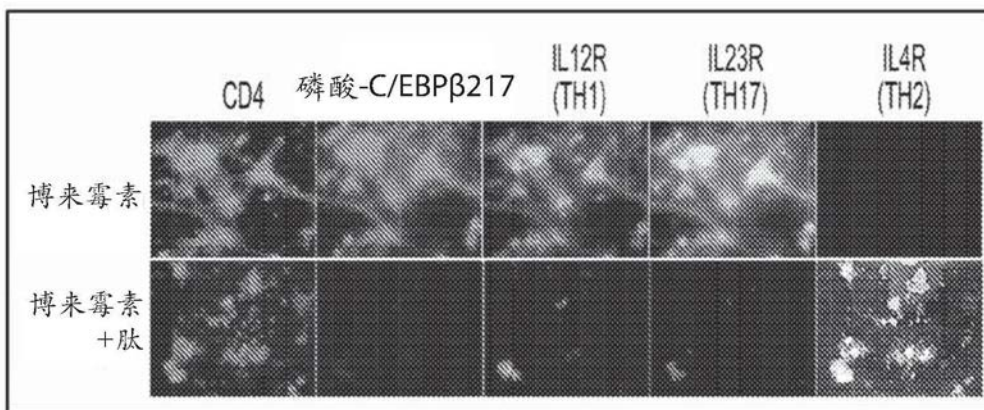


图4

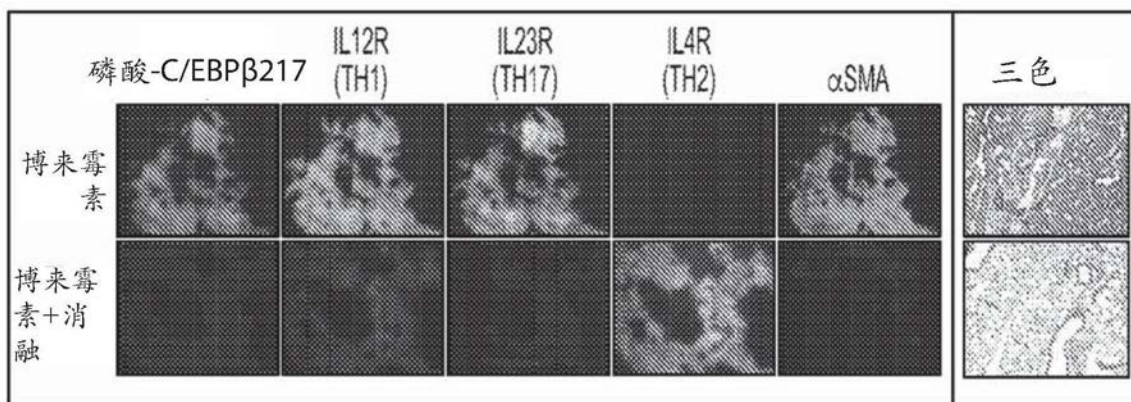


图5

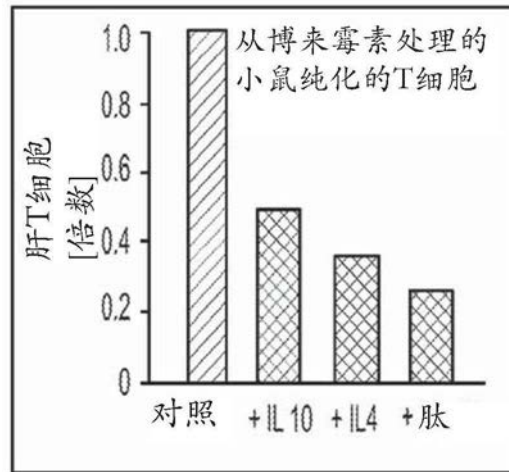


图6

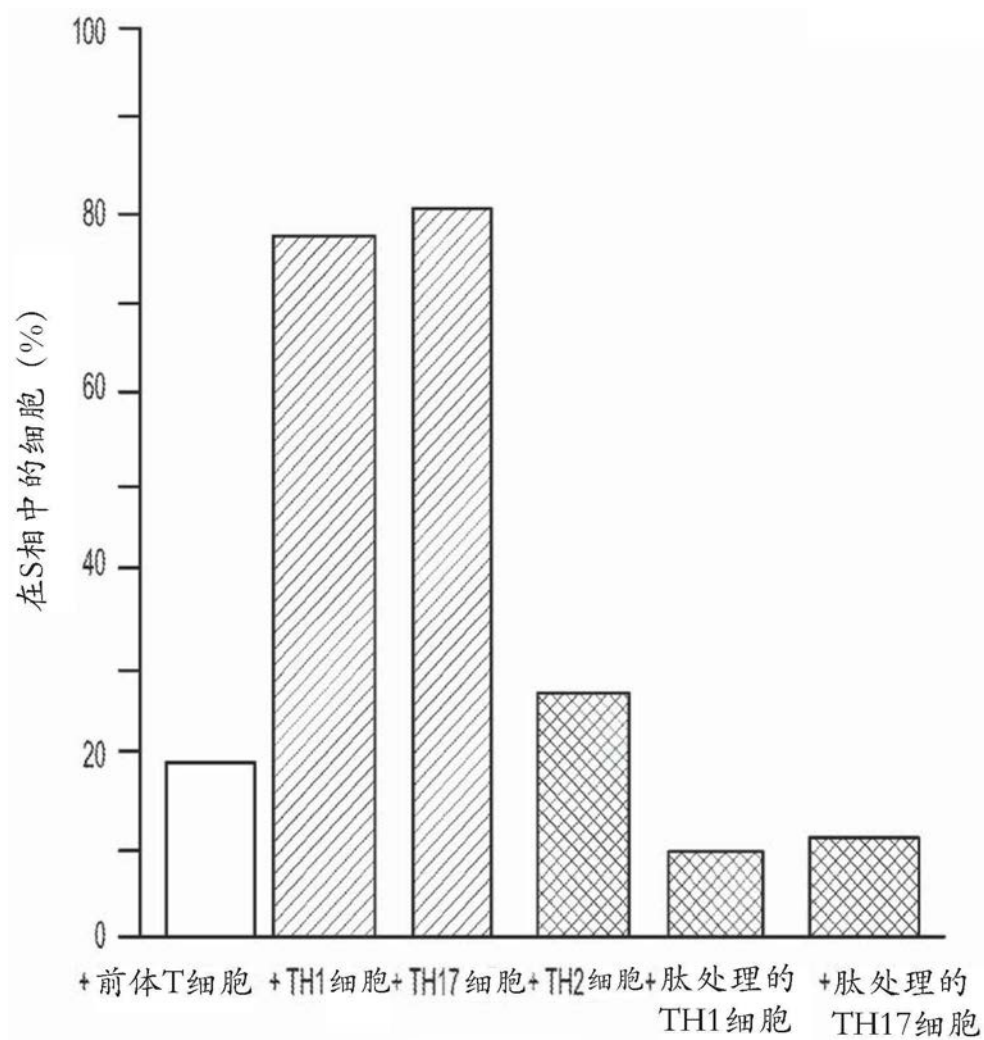


图7A

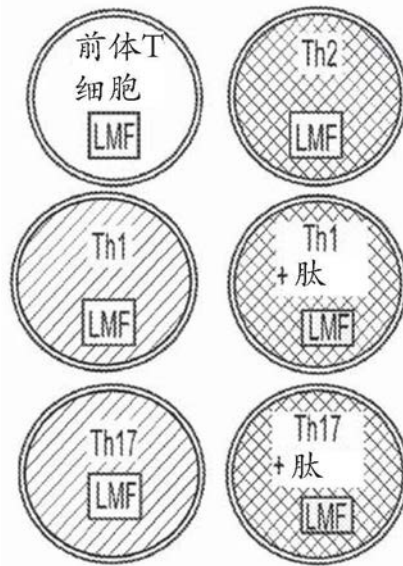


图7B

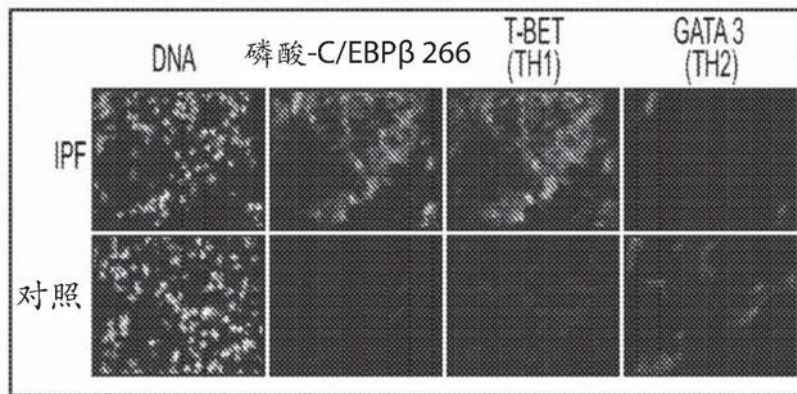


图8

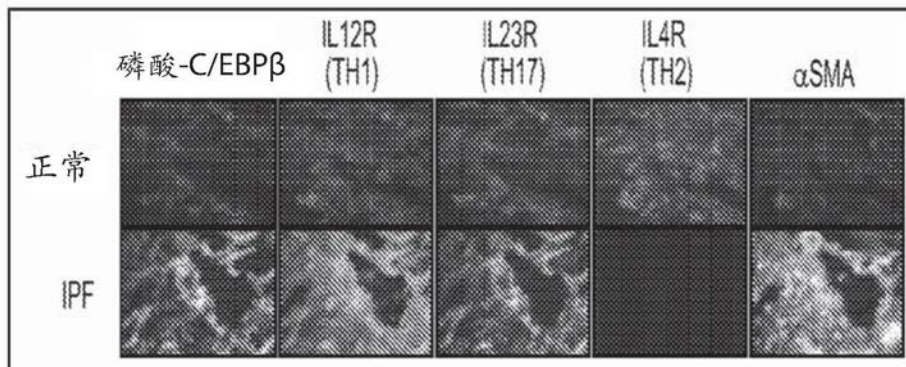


图9

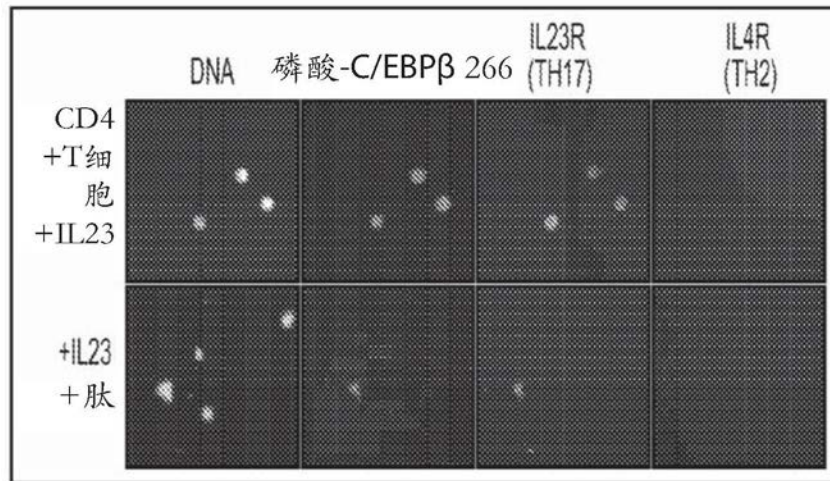


图10

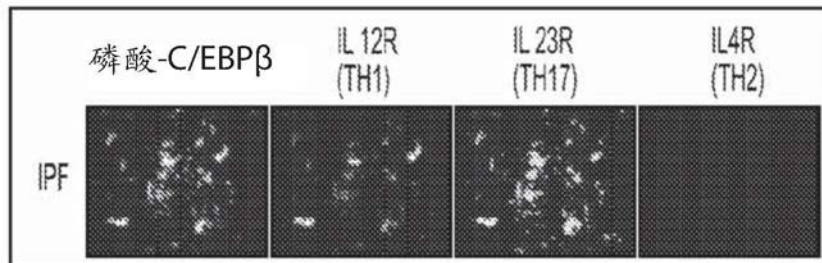


图11

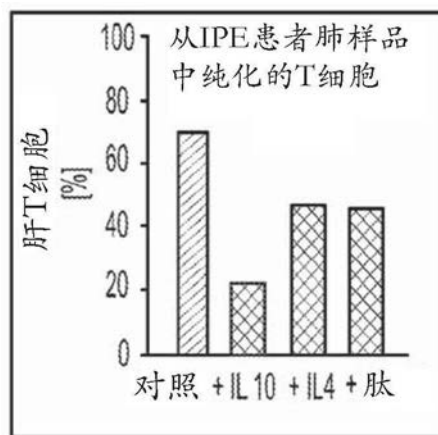


图12

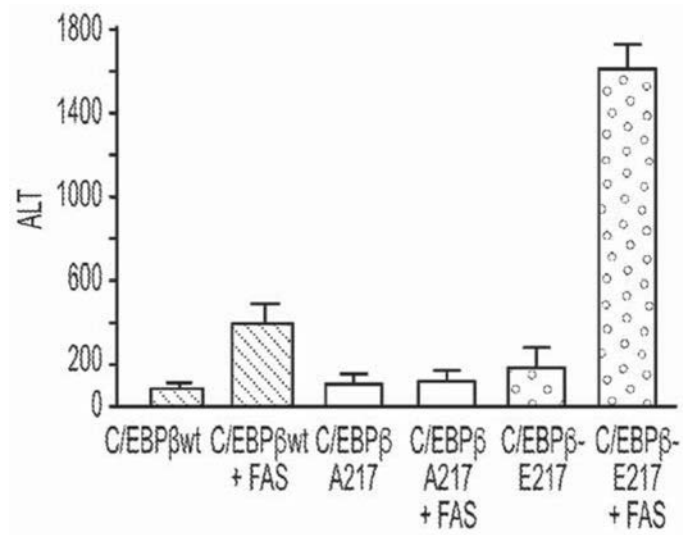


图13A

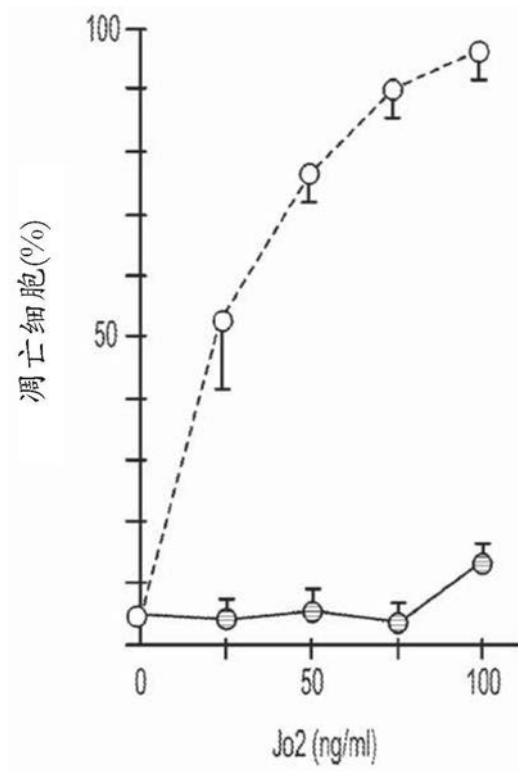


图13B

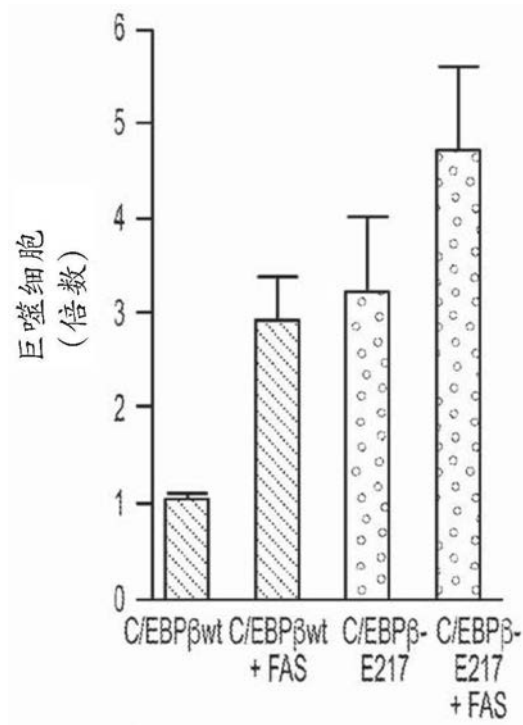


图13C

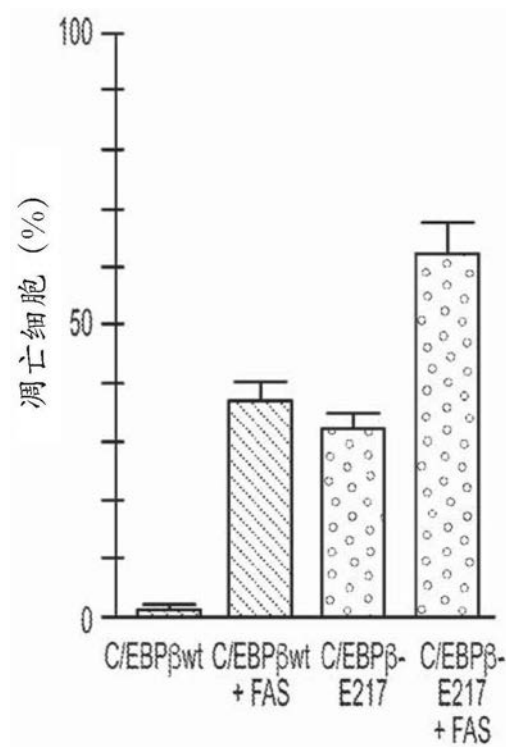


图13D

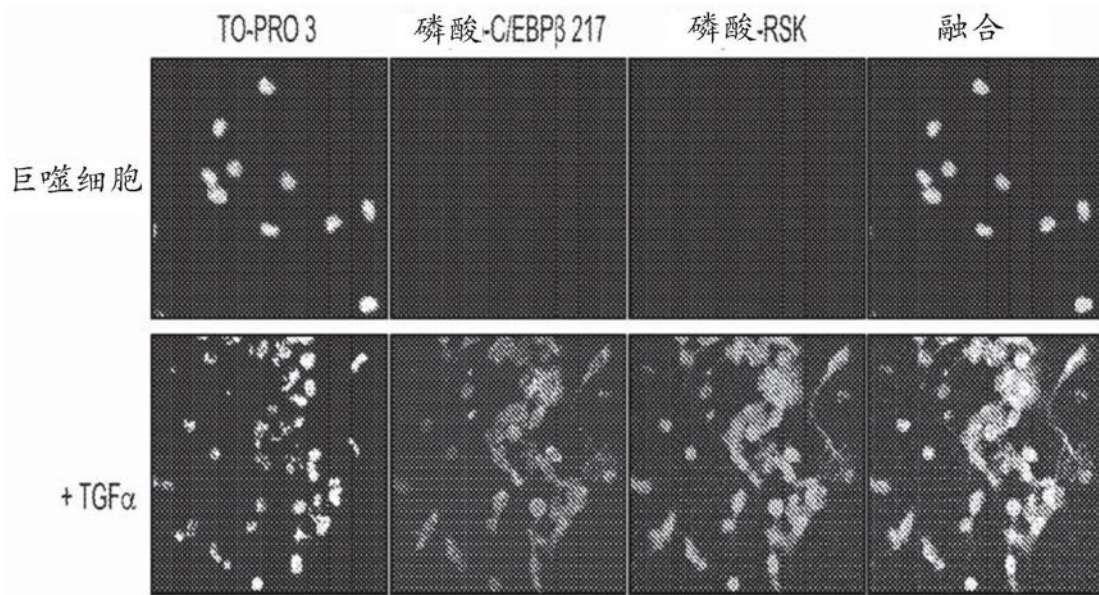


图14A

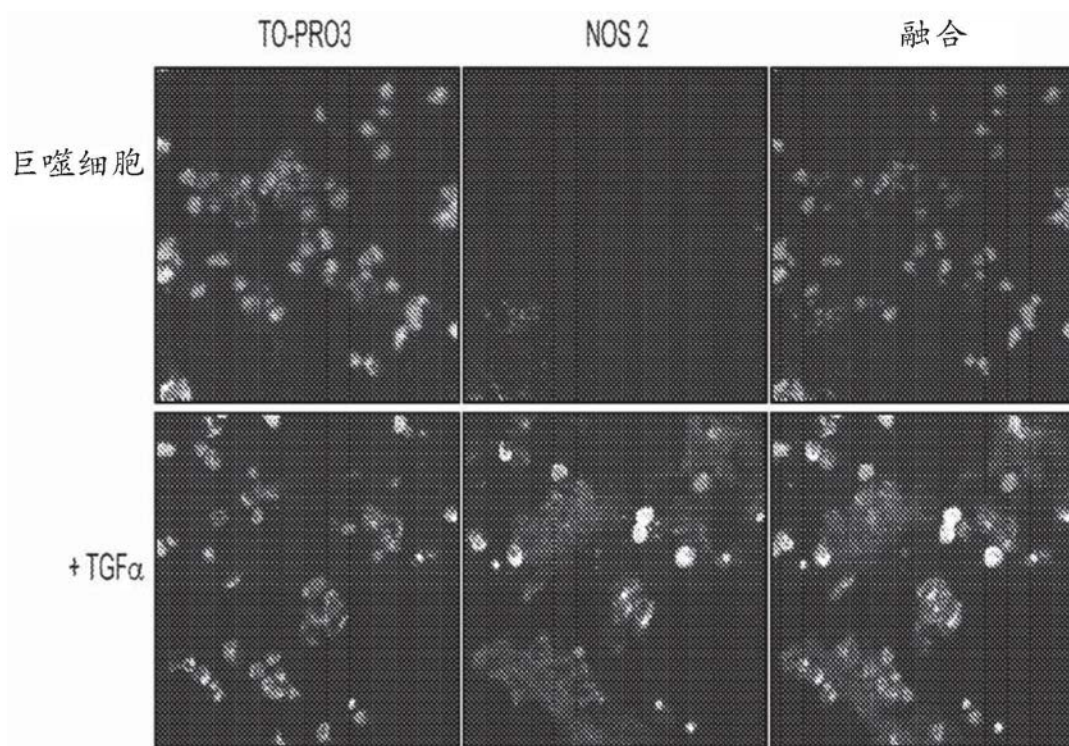


图14B

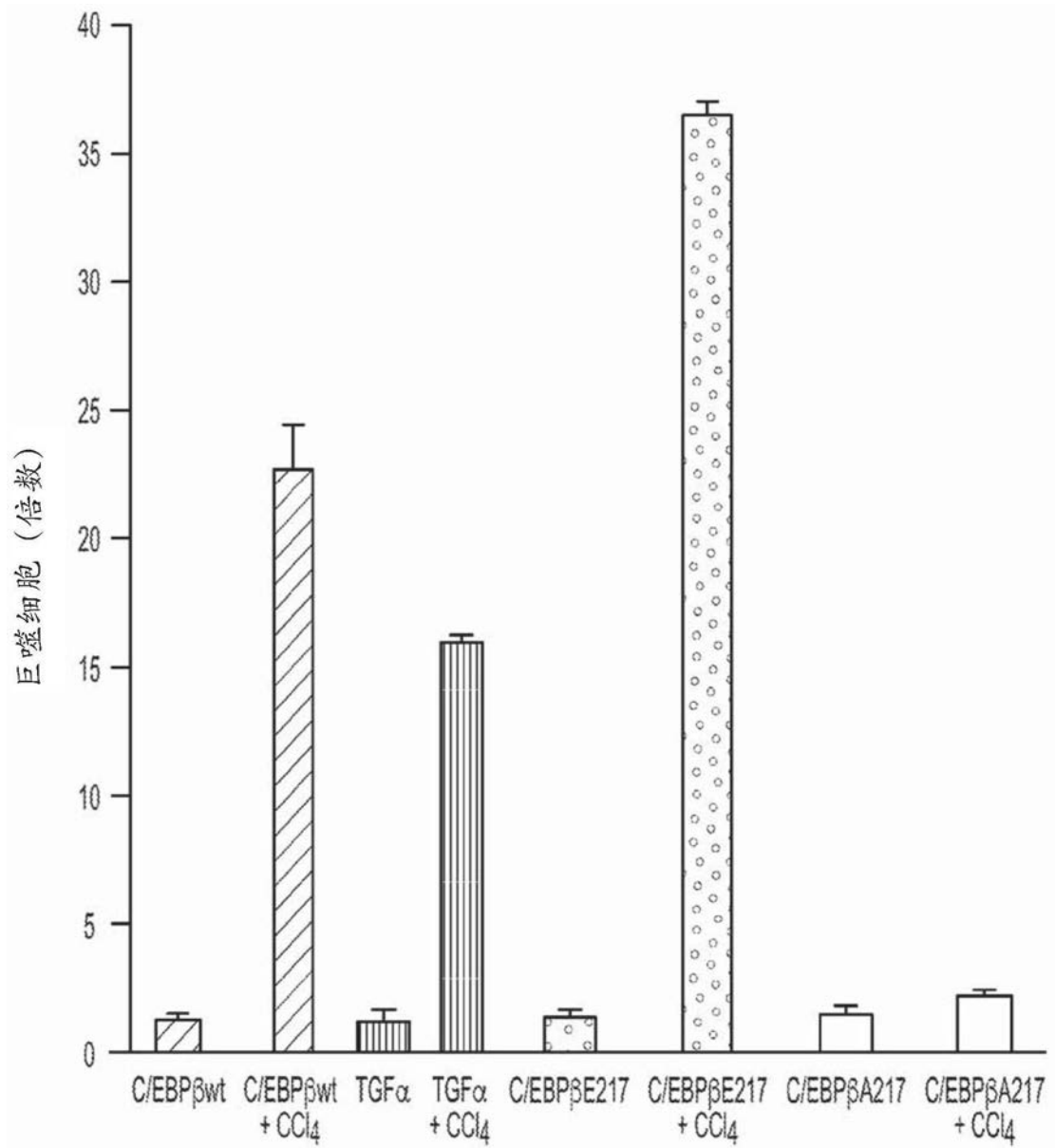


图15A

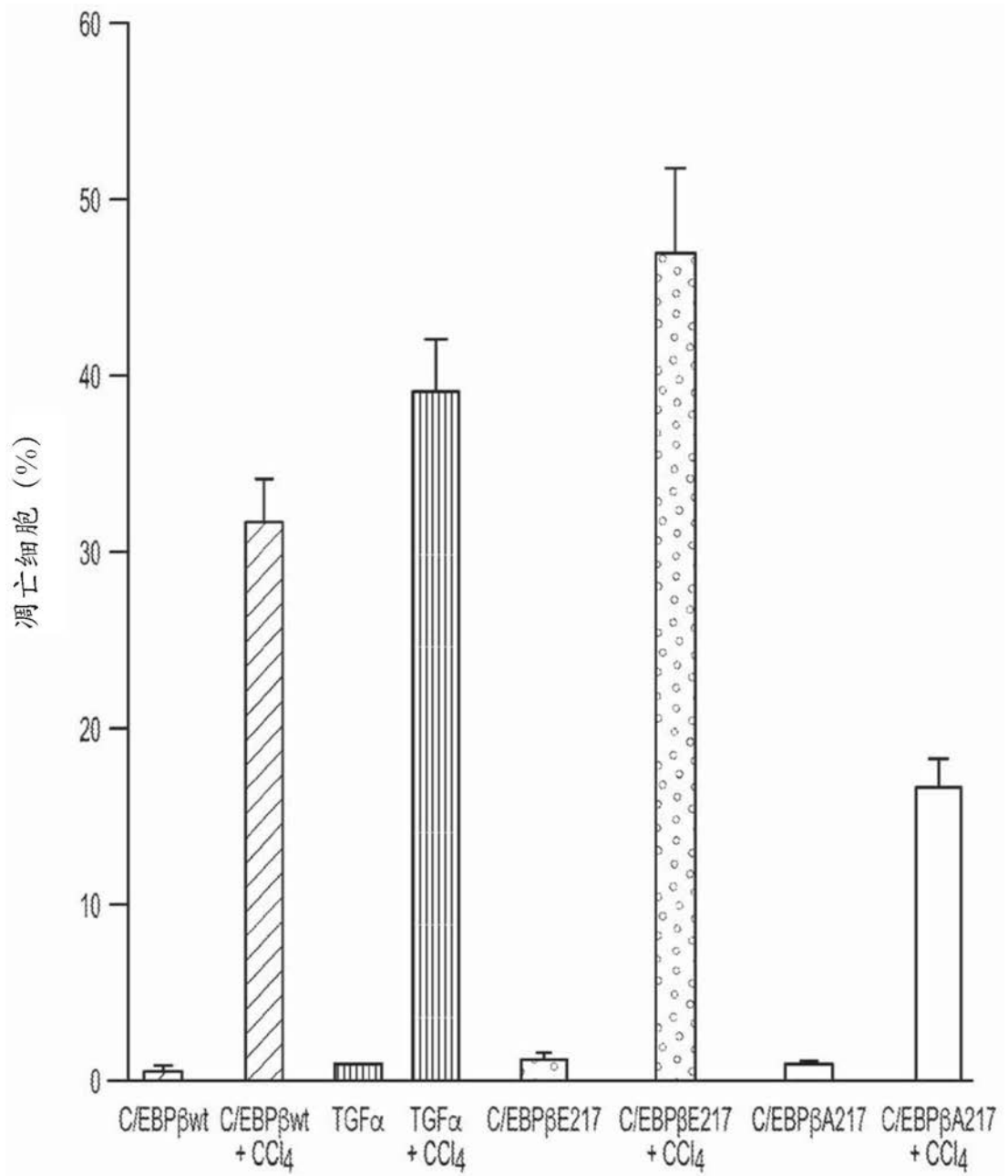


图15B

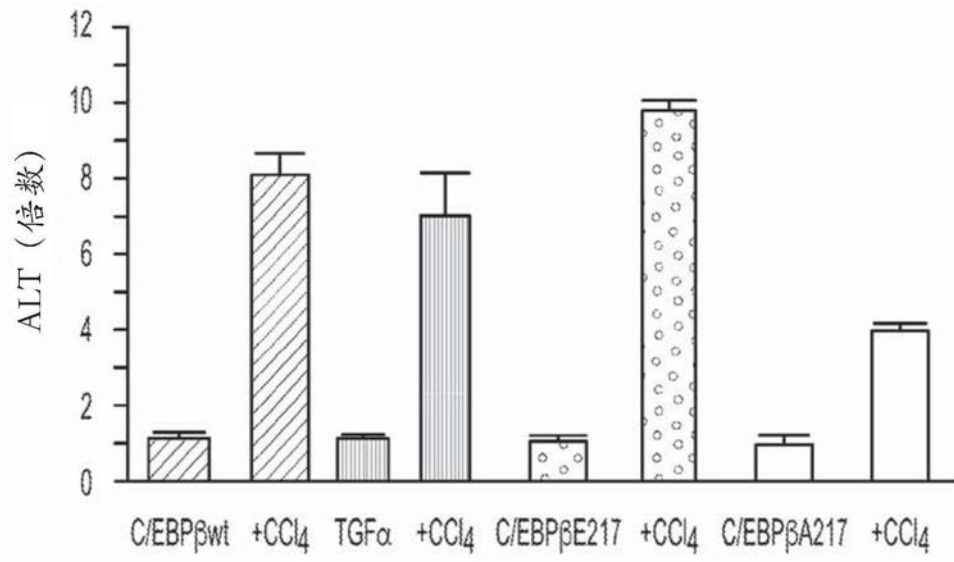


图15C

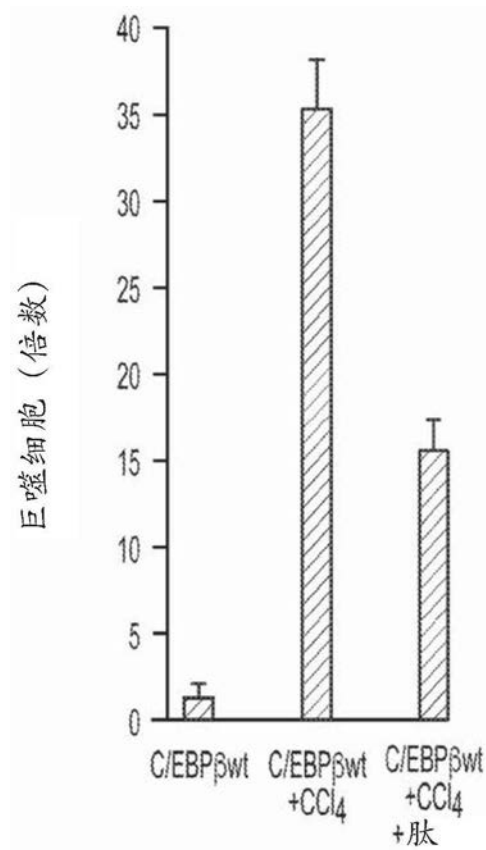


图15D

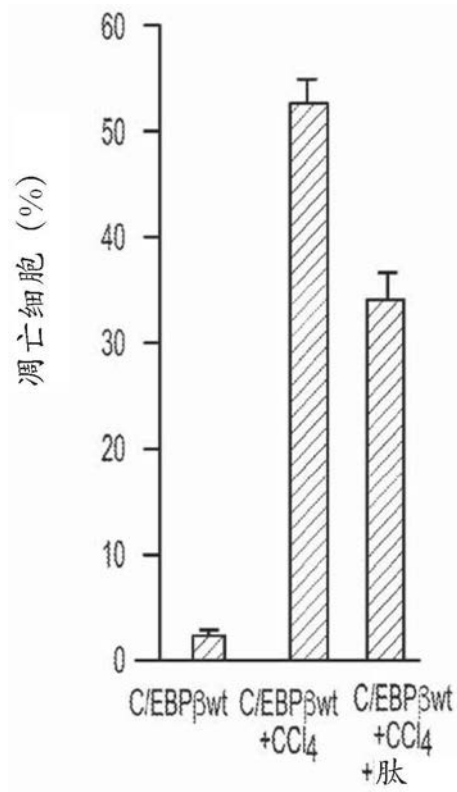


图15E

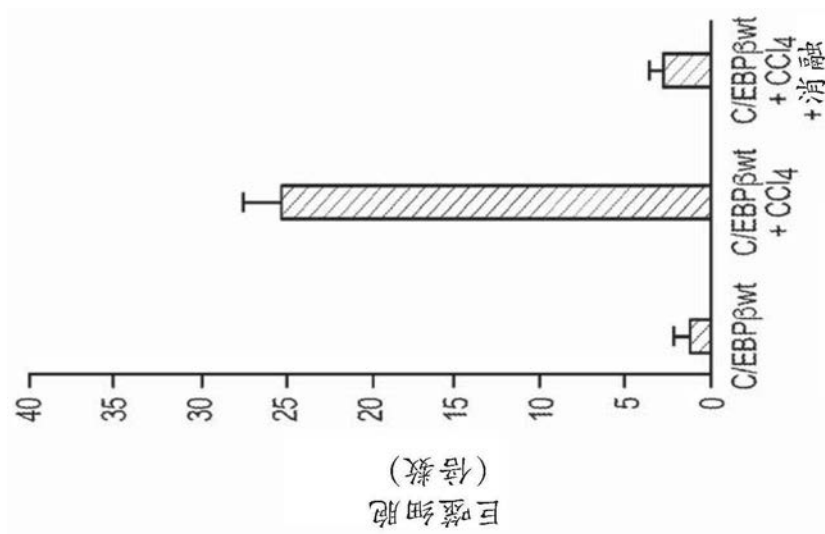


图16A

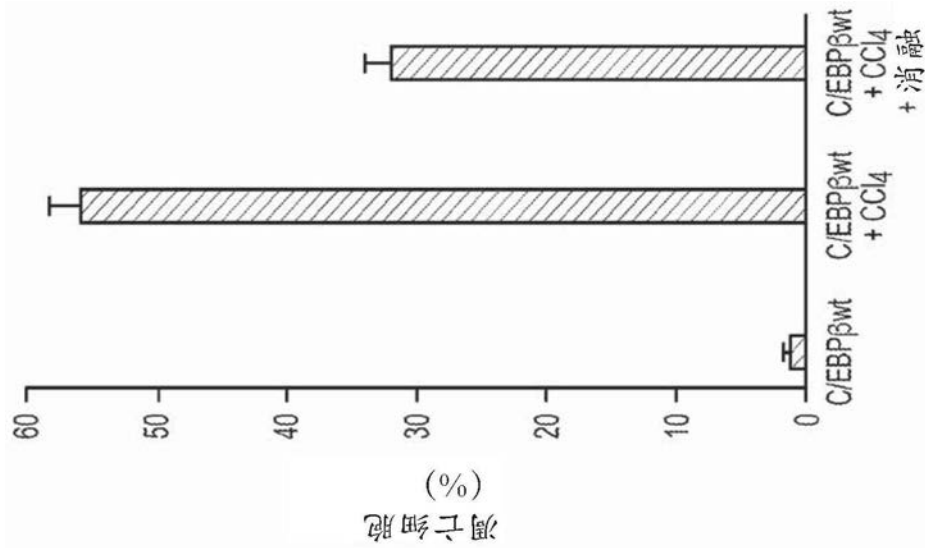


图16B

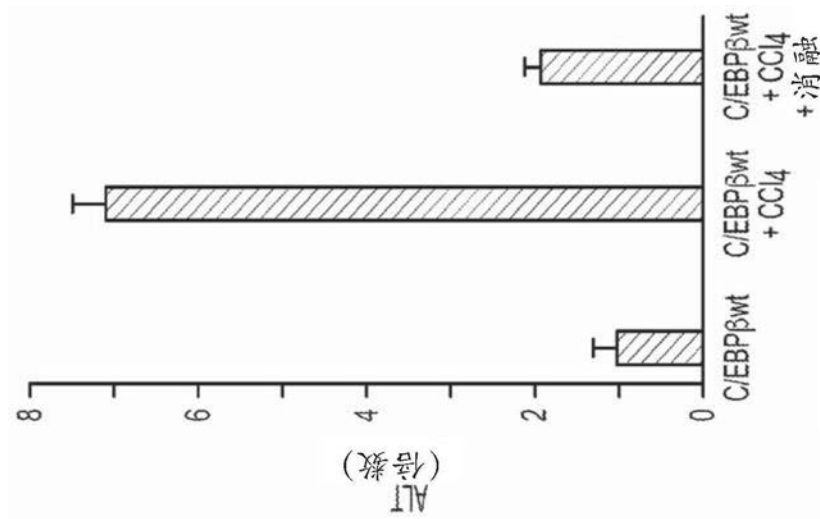


图16C

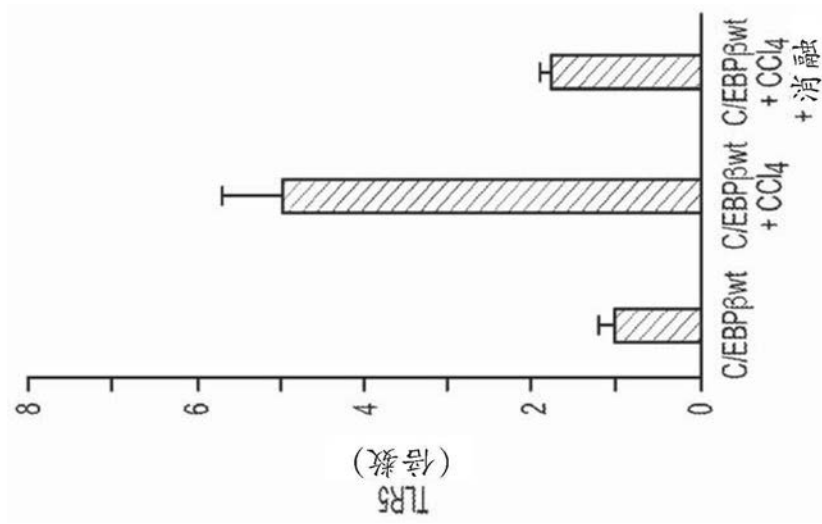


图16D

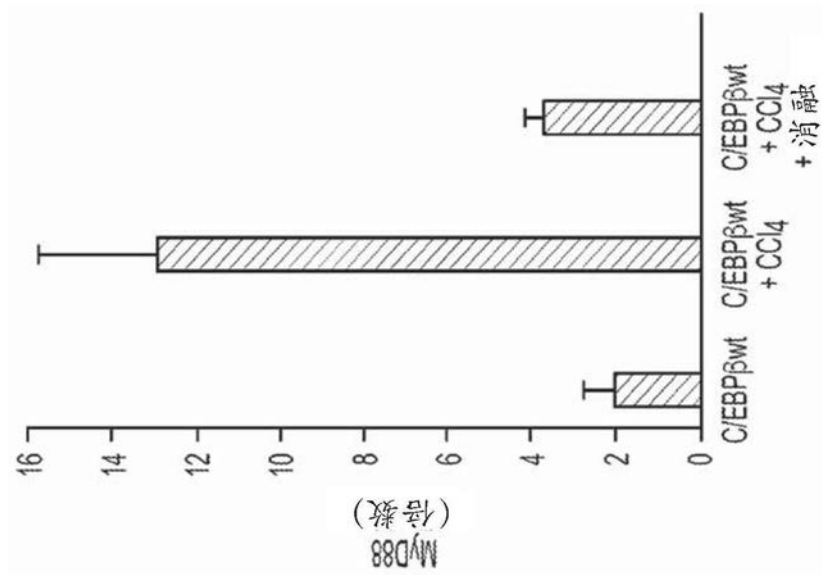


图16E

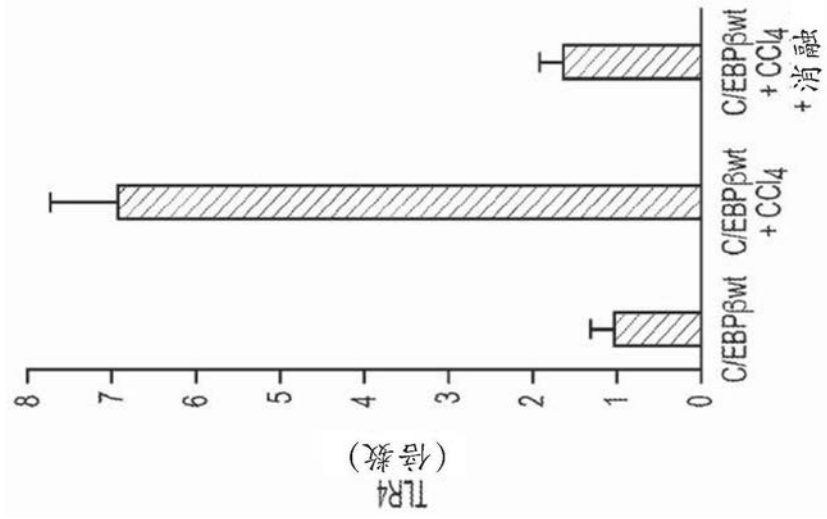


图16F

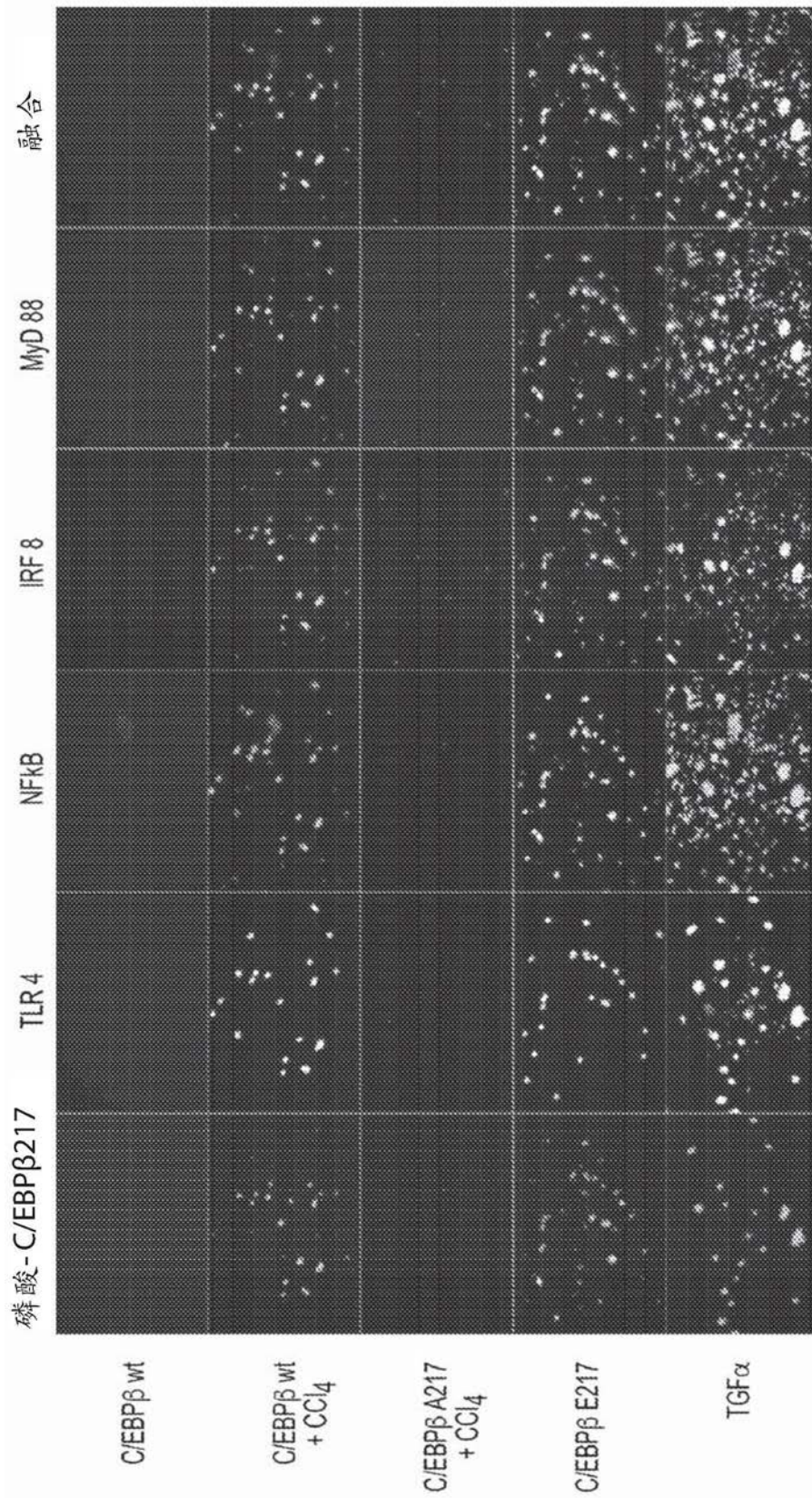


图17A

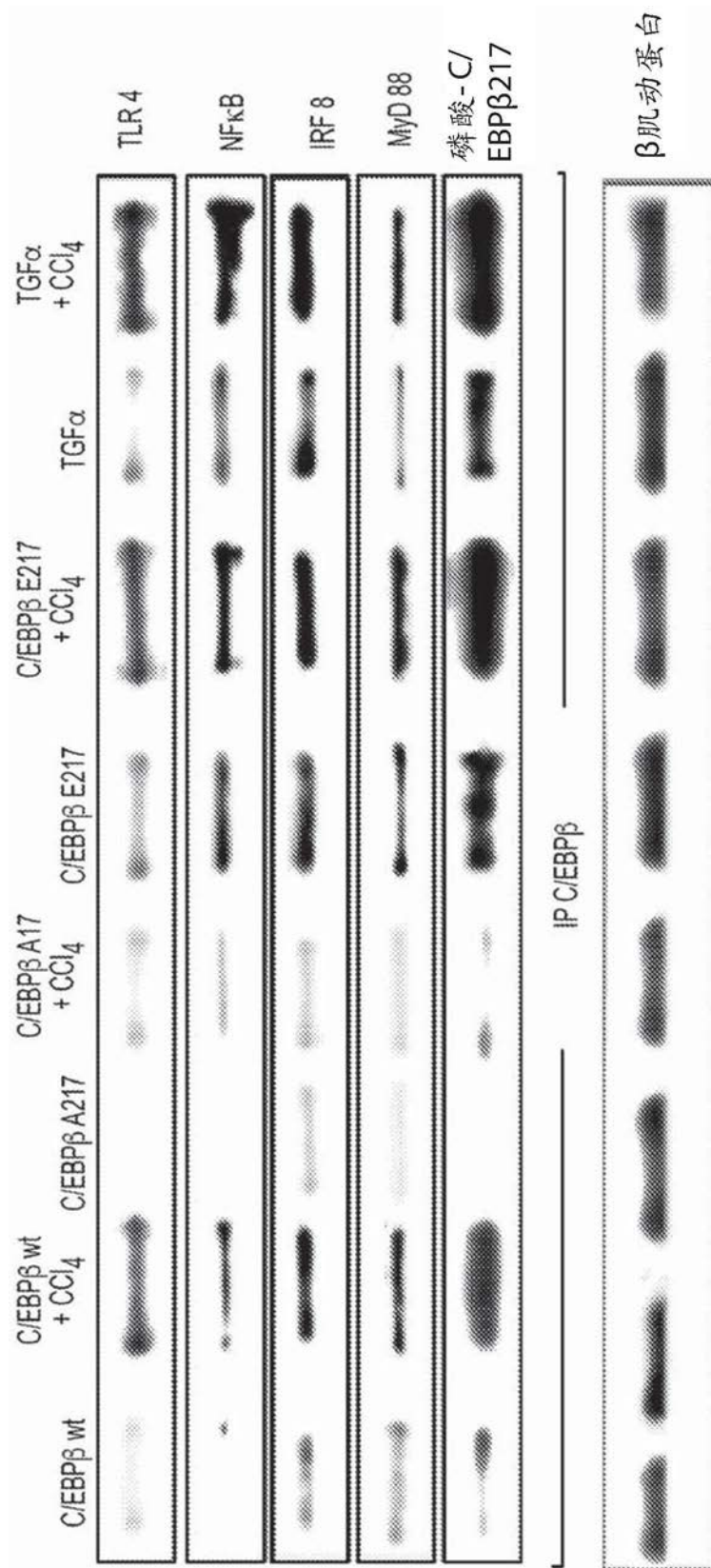


图17B

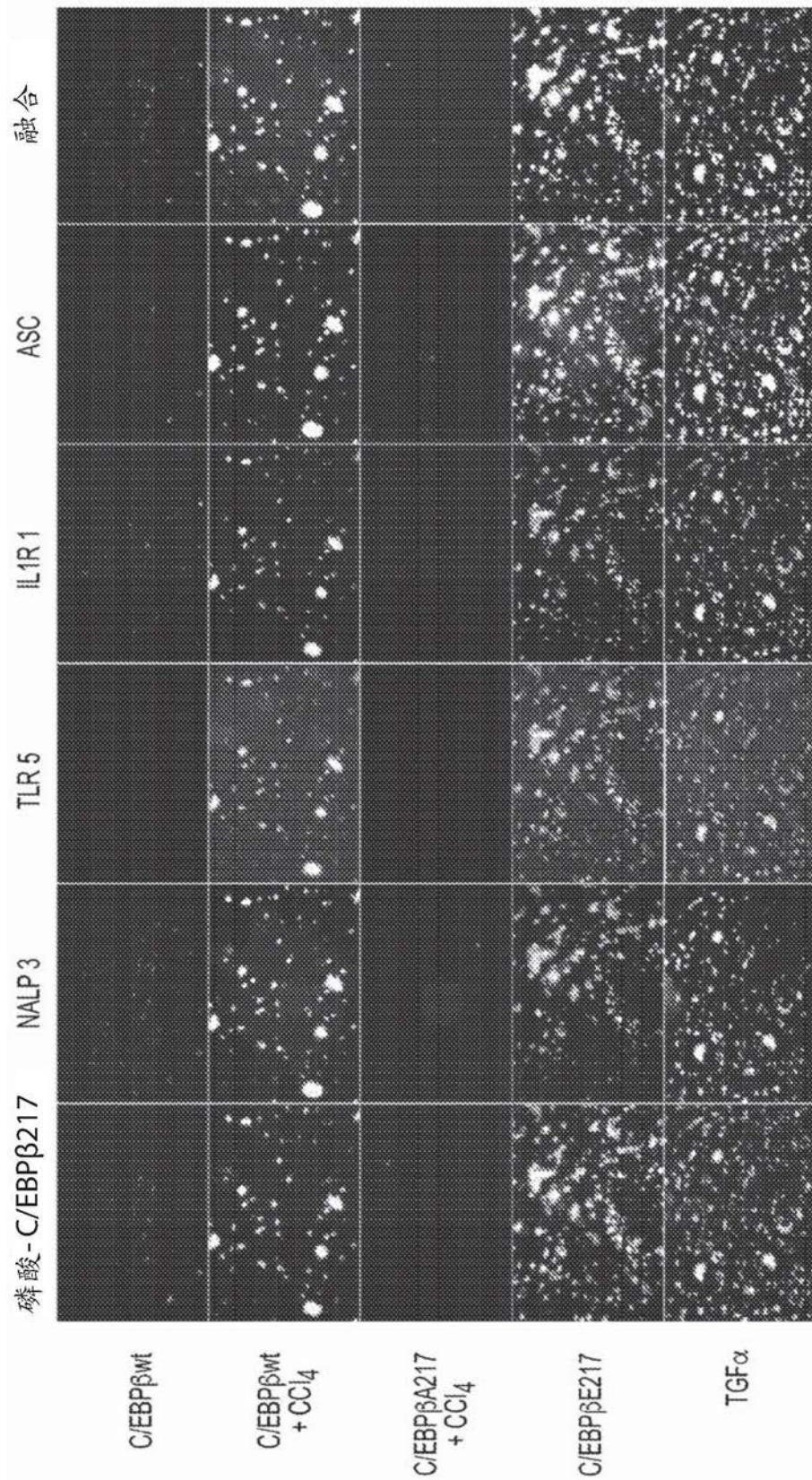


图18A

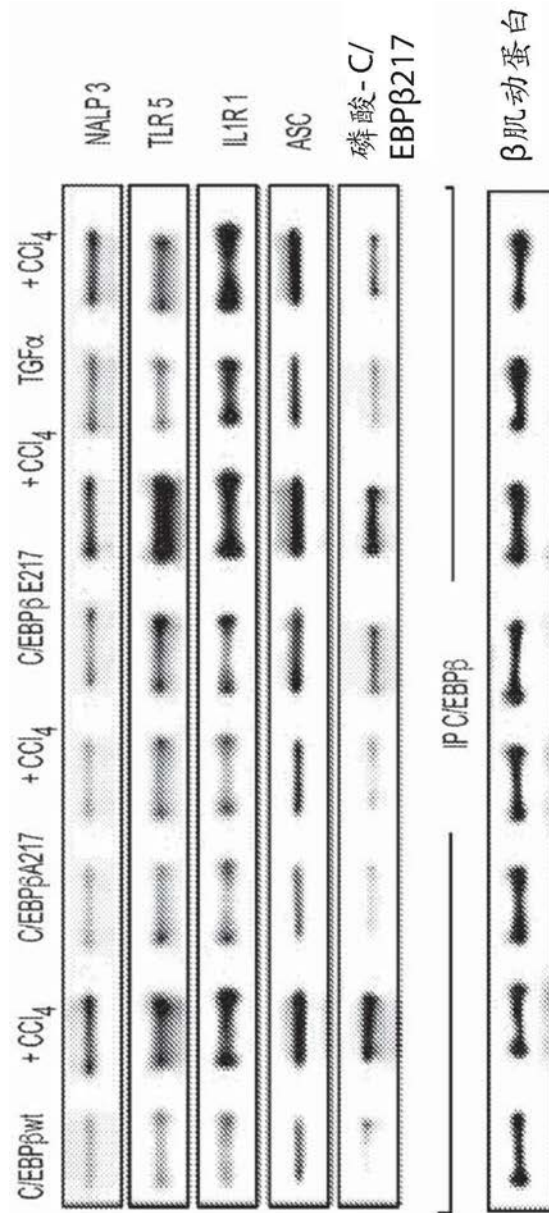


图18B

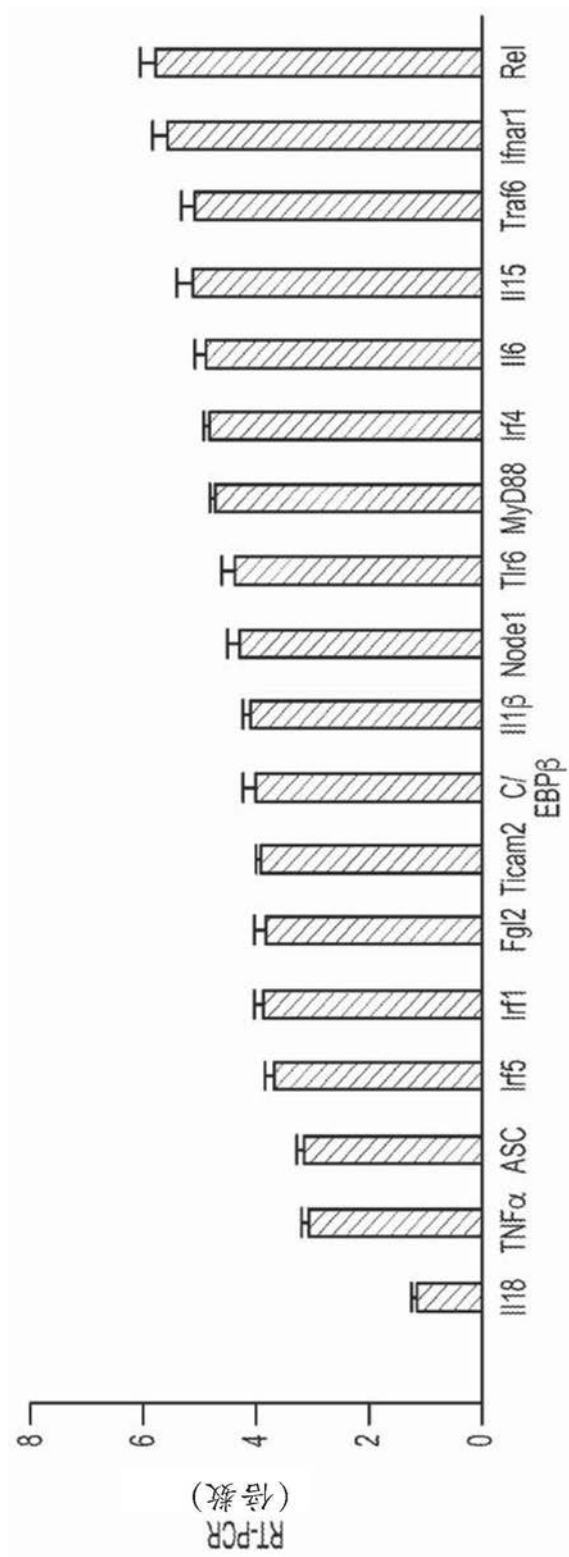


图19A

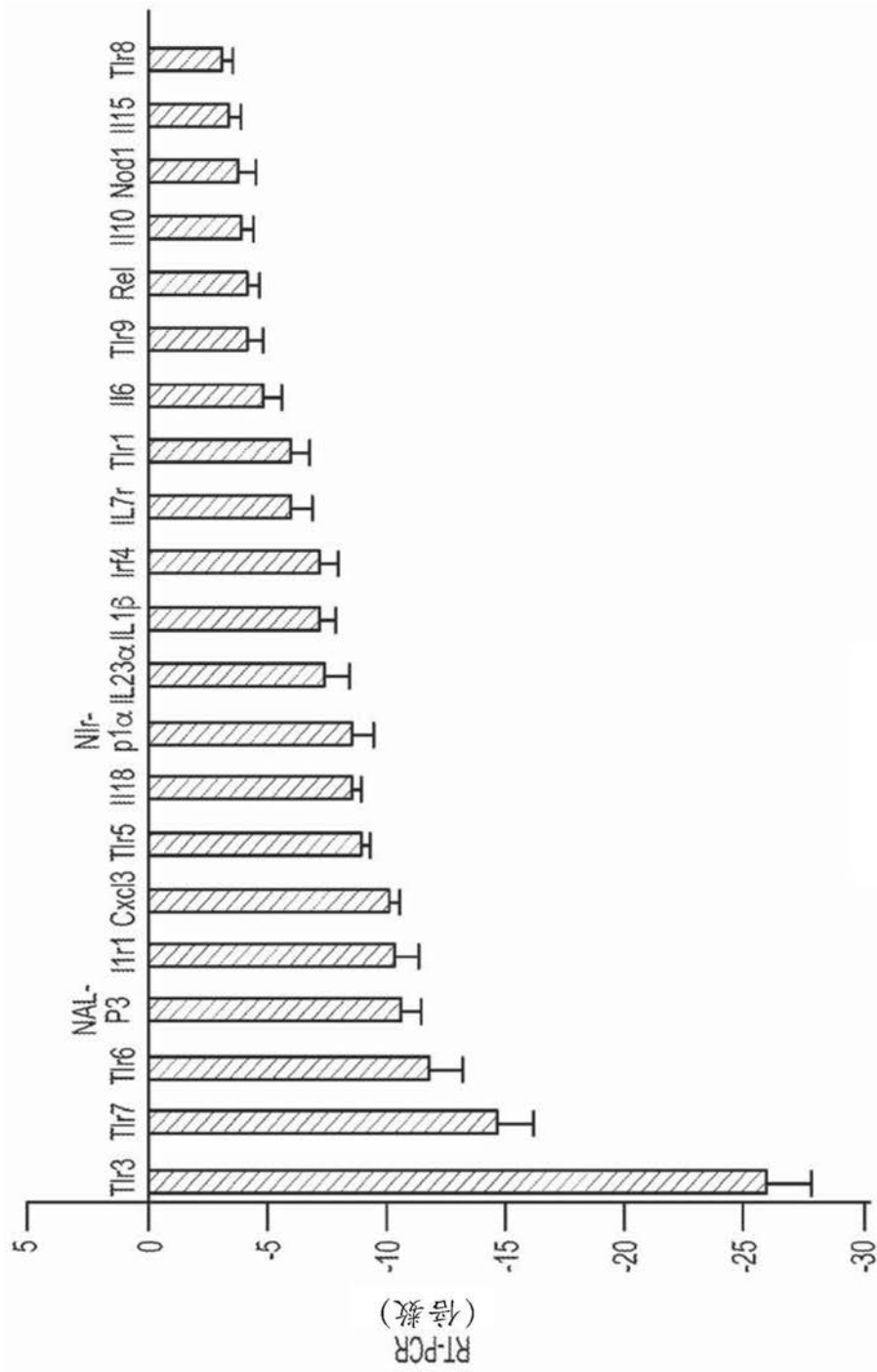


图19B

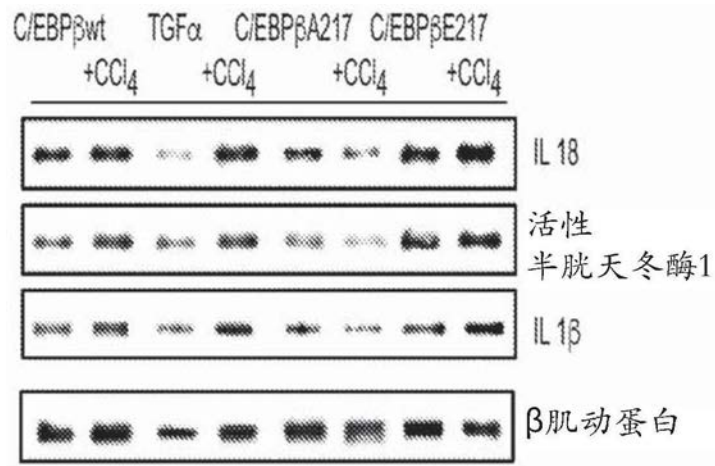


图19C

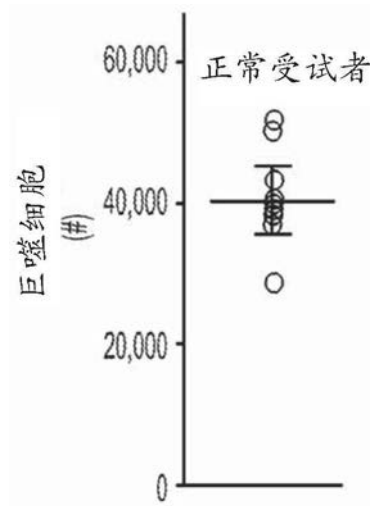


图20A

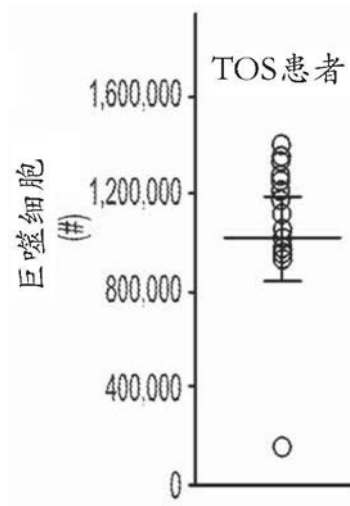


图20B

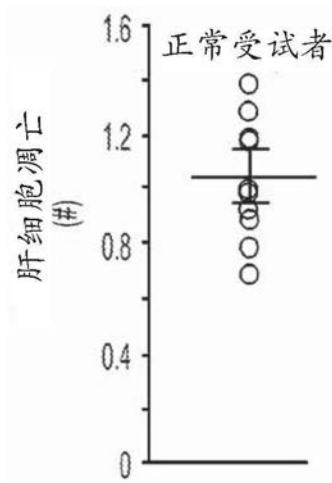


图20C

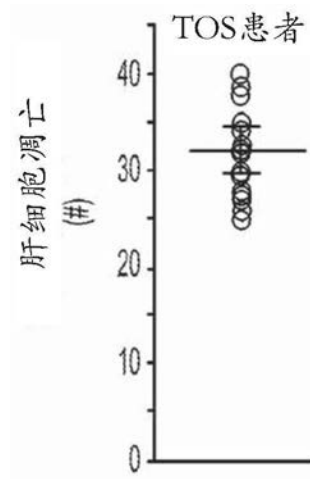


图20D

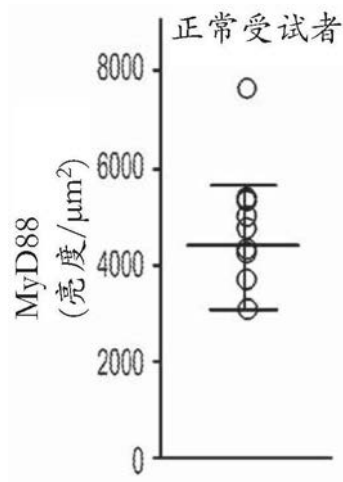


图20E

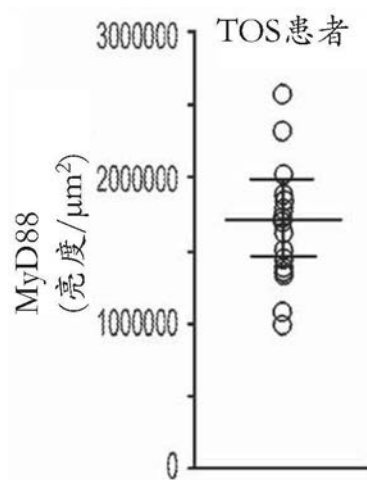


图20F

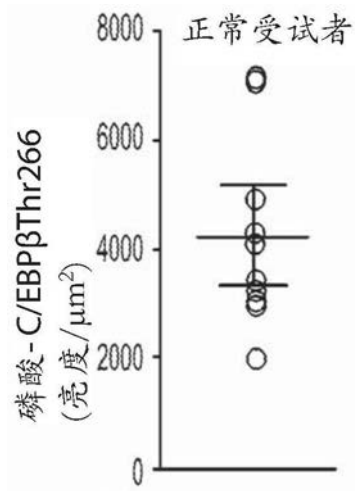


图20G

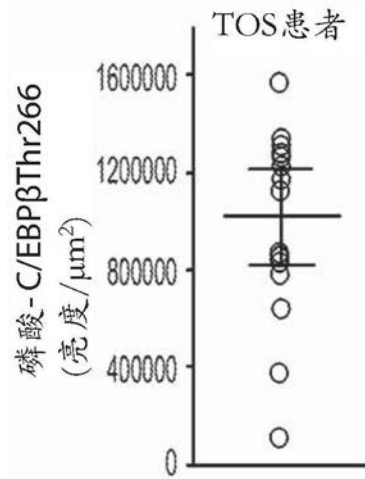


图20H

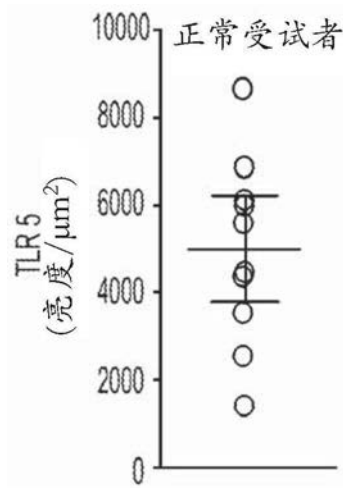


图20I

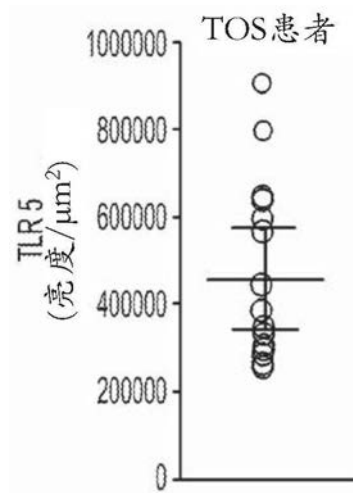


图20J

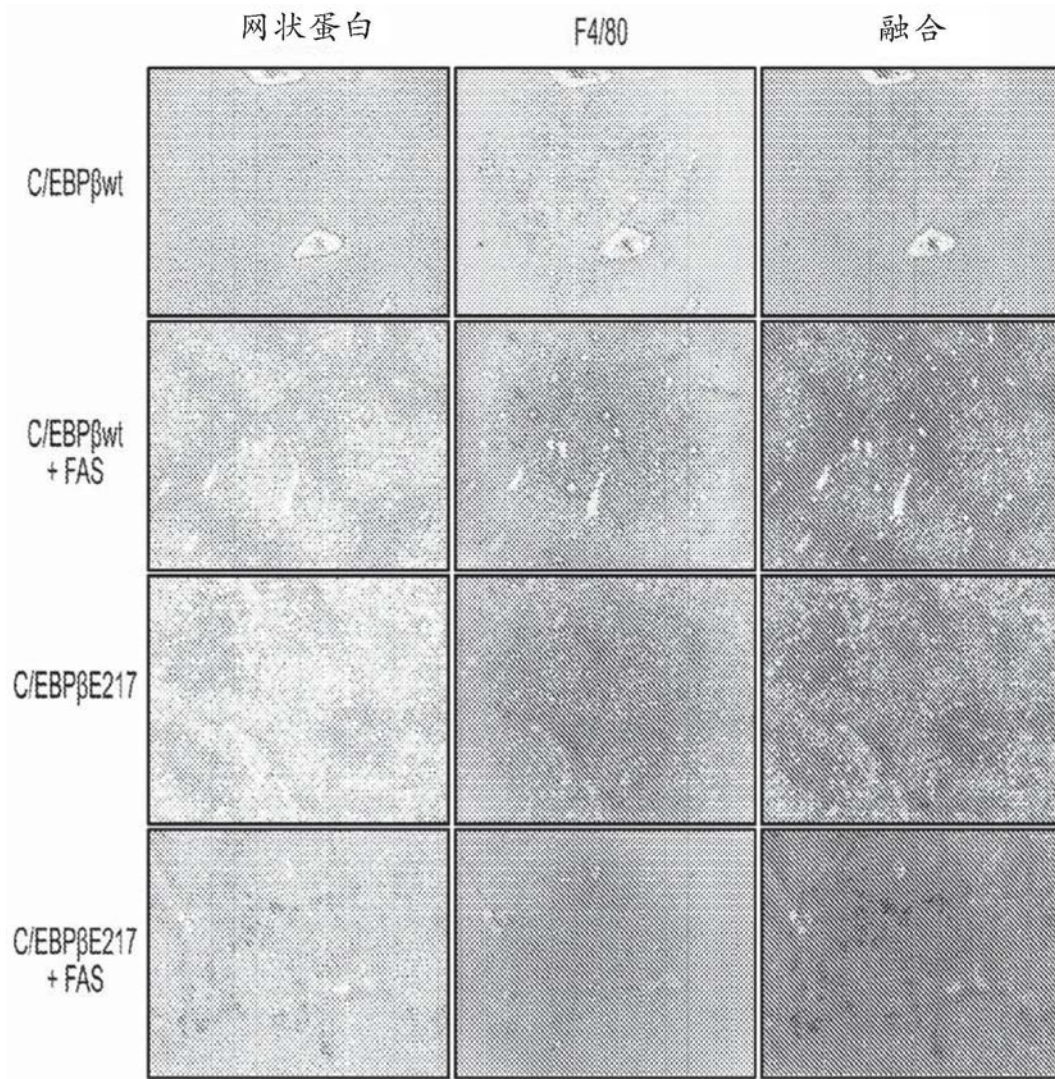


图21

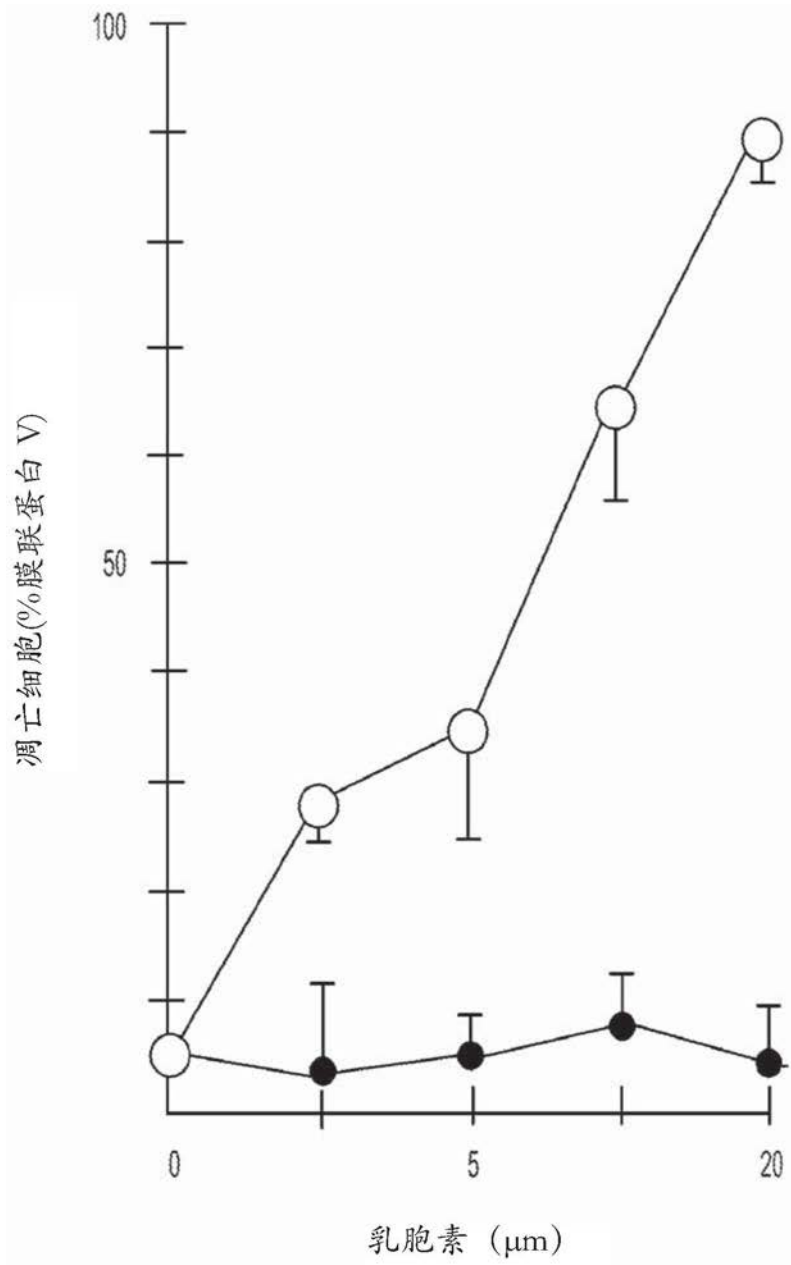


图22

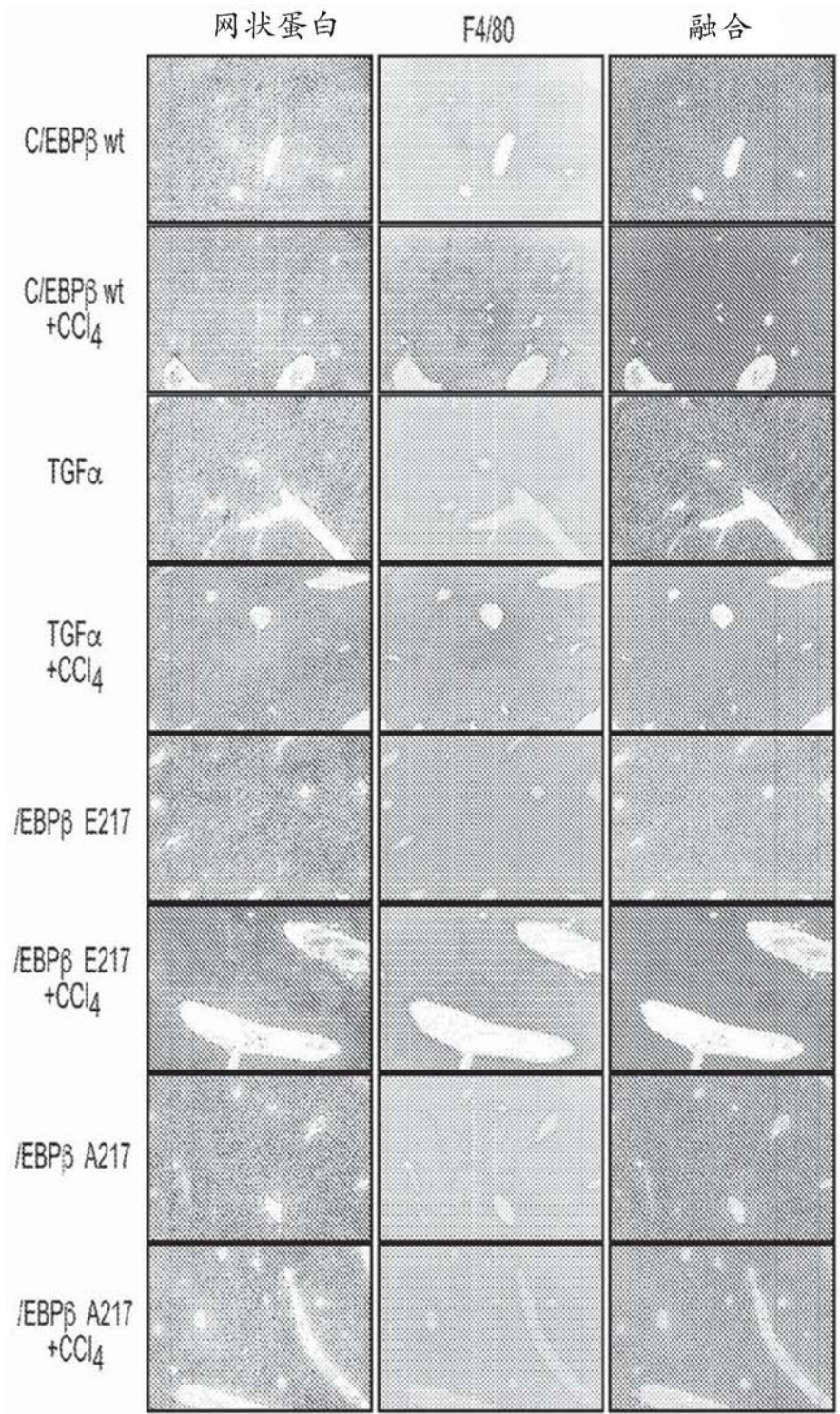


图23A

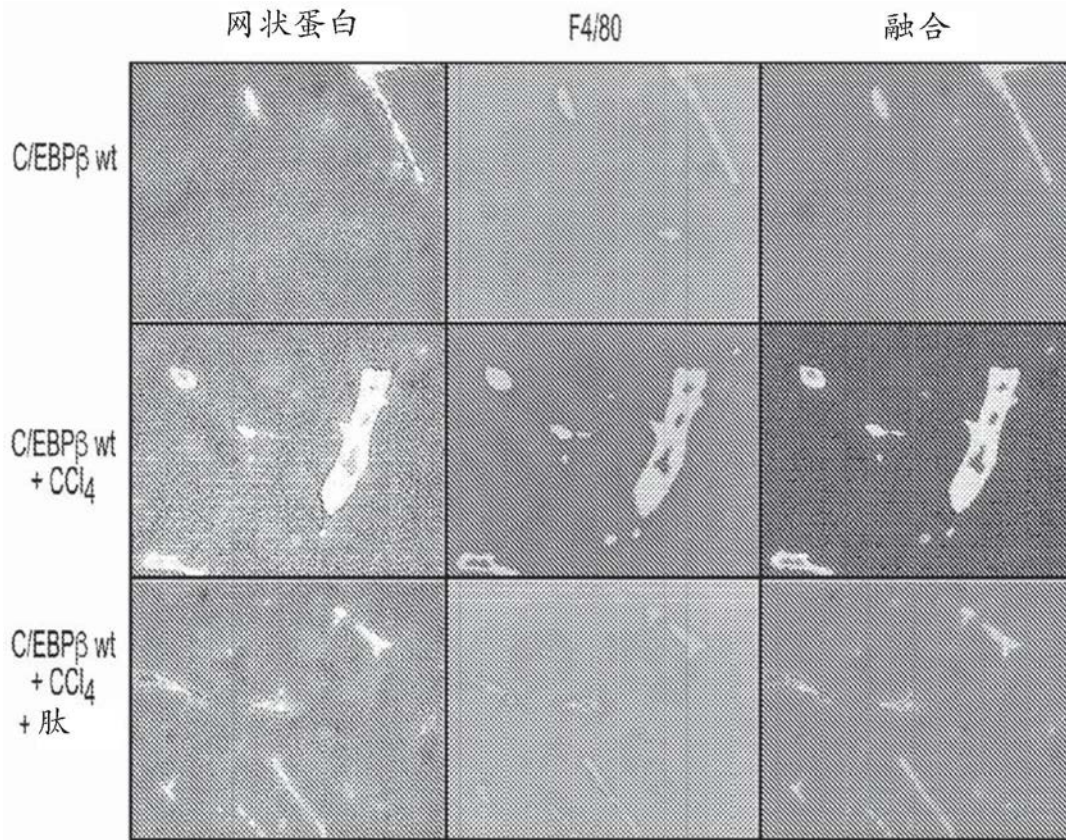


图23B

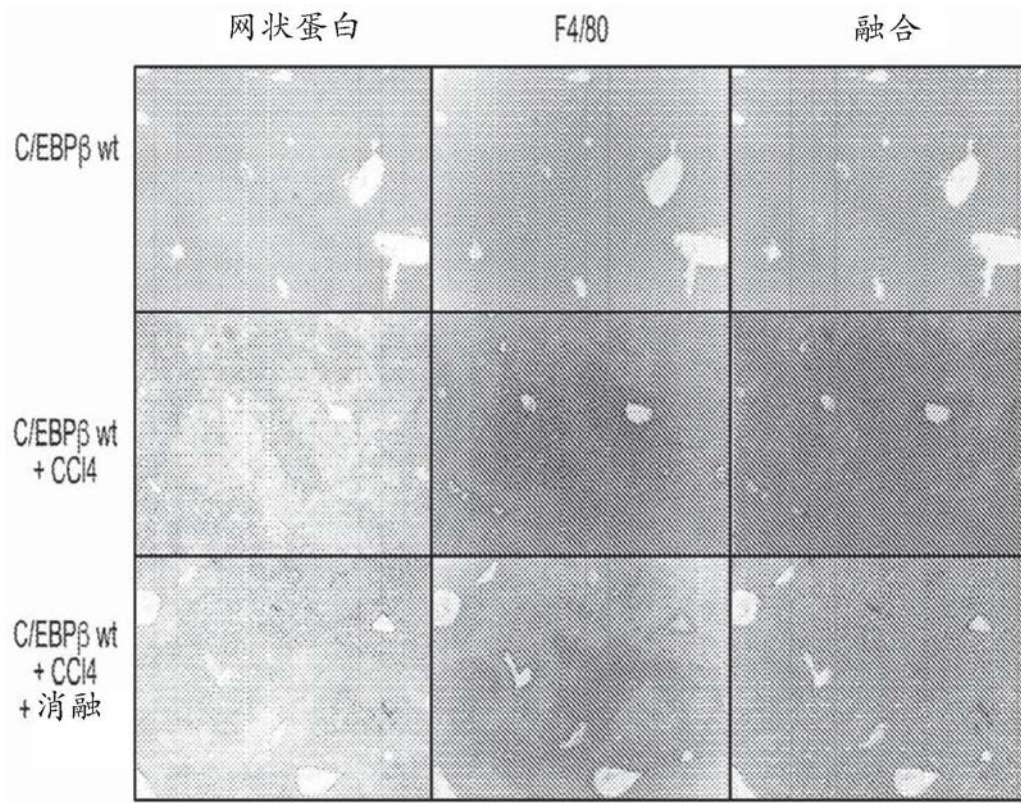


图24

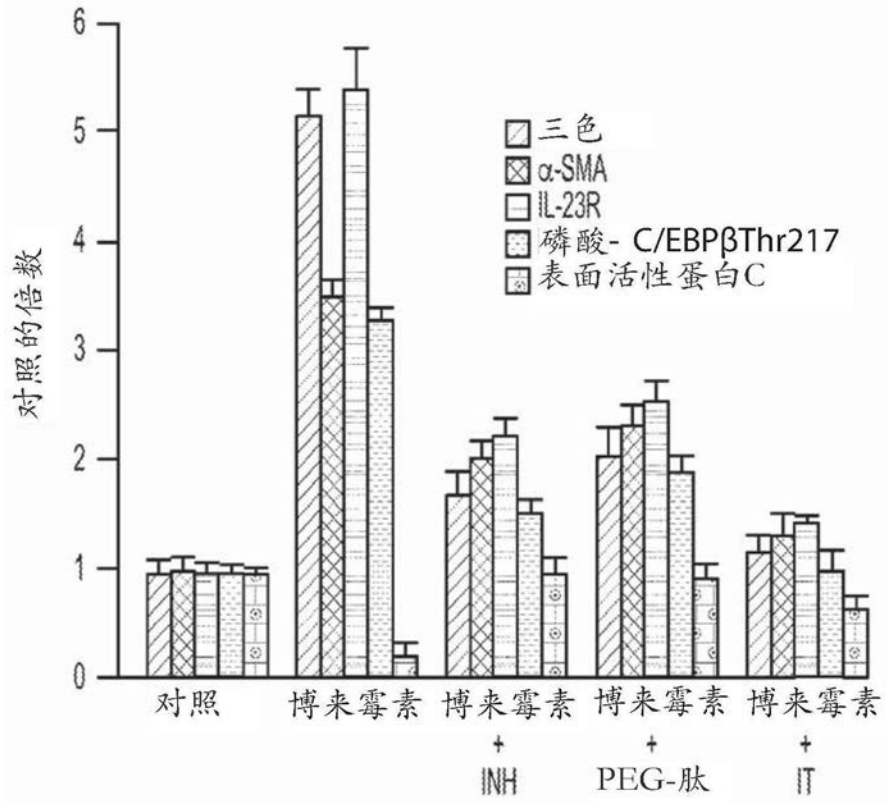


图25A

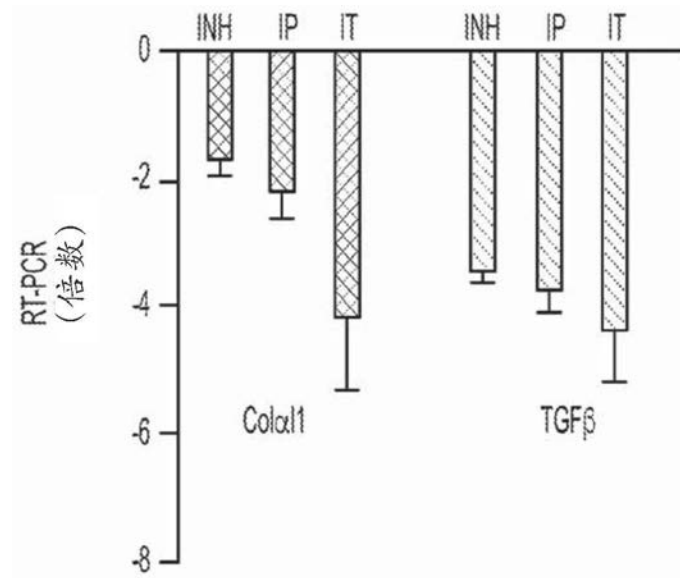


图25B

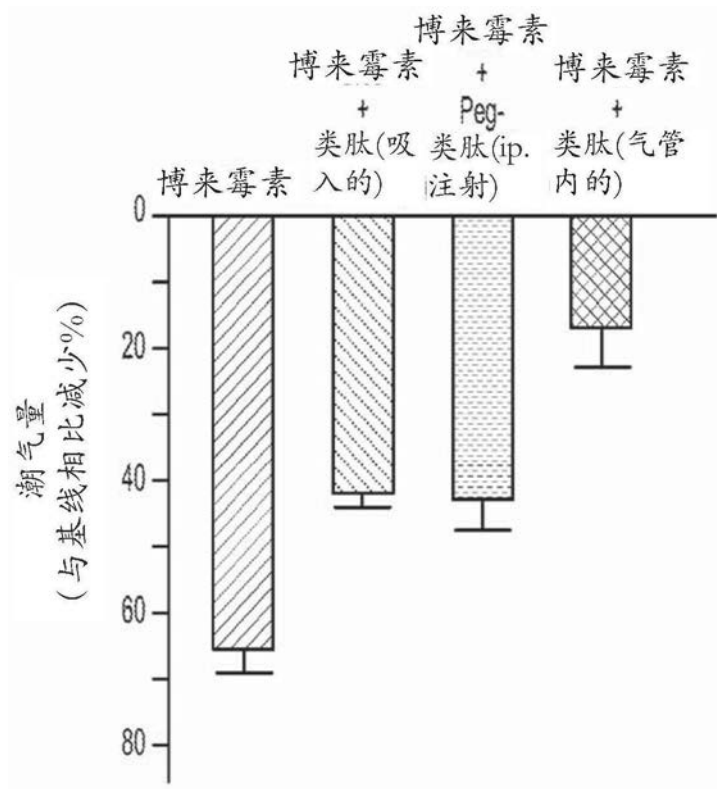


图26

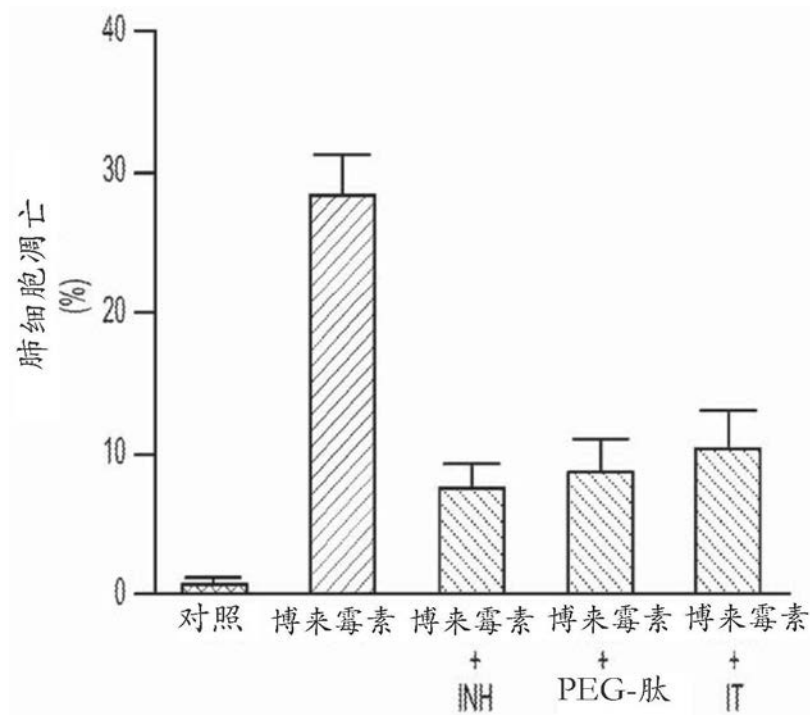


图27

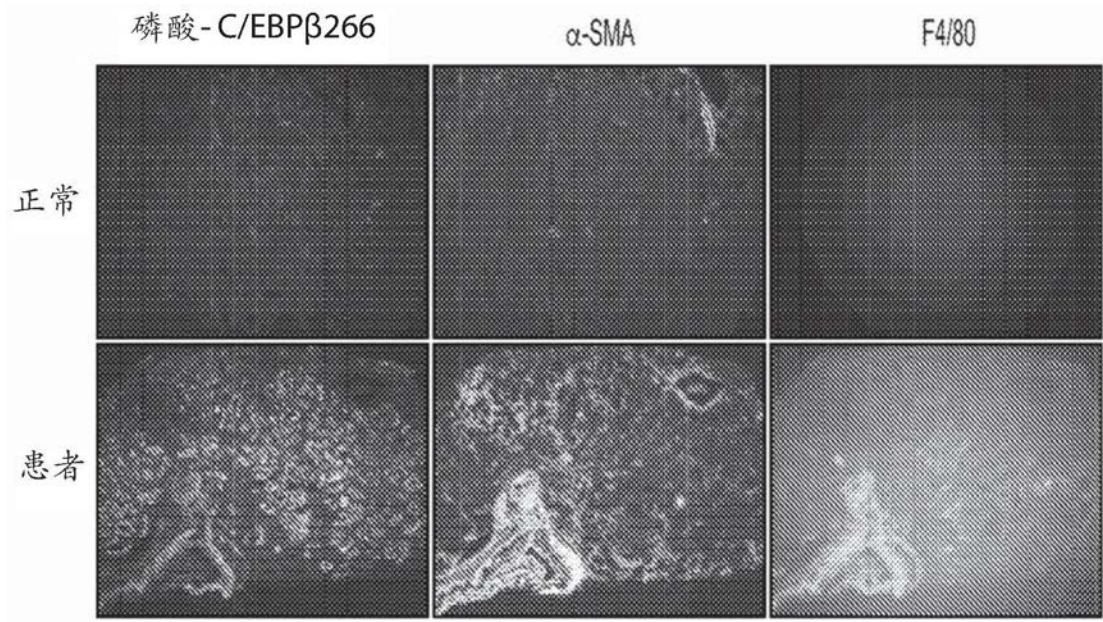


图28