



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102266272 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 26

(21) 申请号 201110158436. X

审查员 田丽丽

(22) 申请日 2003. 11. 25

(30) 优先权数据

60/429, 924 2002. 11. 27 US

(62) 分案原申请数据

200380109316. 4 2003. 11. 25

(73) 专利权人 DMI 生物科学公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 戴维·巴-奥尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 孔宪静

(51) Int. Cl.

A61K 38/10(2006. 01)

(56) 对比文件

US 3966915 A, 1976. 06. 29, 全文.

US 5279814 A, 1994. 01. 18, 全文.

WO 8203008 A1, 1982. 09. 16, 全文.

权利要求书 3 页 说明书 40 页

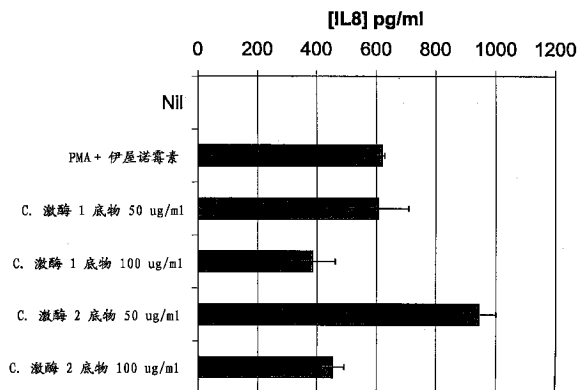
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种个人护理组合物及其产品

(57) 摘要

本发明提供了治疗由增强磷酸化介导的疾病和病况比如炎症和癌症的方法。本发明还提供了抑制细胞、组织和器官内增强磷酸化的方法。该方法利用磷酸基受体化合物 (PAC)。本发明还提供了包含 PAC 的产品。



1. 一种个人护理产品,其包括磷酸基受体化合物,其中所述磷酸基受体化合物为:
  - A) 卵黄高磷蛋白,所述卵黄高磷蛋白至少部分脱磷酸化;或
  - B) 具有序列Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr Ala SEQ ID NO:3或序列Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp SEQ ID NO:4的肽。
2. 权利要求1的产品,其是个人护理装置。
3. 权利要求2的产品,其是海绵、布、擦子或衬垫。
4. 权利要求2的产品,其是绷带、缝合线或外科海绵。
5. 权利要求2的产品,其是药签。
6. 权利要求1的产品,其中所述磷酸基受体化合物是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白。
7. 权利要求1的产品,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。
8. 权利要求1的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少10%脱磷酸化。
9. 权利要求7的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少10%脱磷酸化。
10. 权利要求8的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少20%脱磷酸化。
11. 权利要求9的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少20%脱磷酸化。
12. 权利要求10的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少35%脱磷酸化。
13. 权利要求11的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少35%脱磷酸化。
14. 权利要求12的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少50%脱磷酸化。
15. 权利要求13的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少50%脱磷酸化。
16. 权利要求14的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少70%脱磷酸化。
17. 权利要求15的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少70%脱磷酸化。
18. 权利要求16的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少90%脱磷酸化。
19. 权利要求17的产品,其中所述卵黄高磷蛋白至少90%脱磷酸化。
20. 权利要求1的产品,其中所述肽具有序列Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu GluAsp GluAla Met Ser Ile ThrAla SEQ ID NO:3。
21. 权利要求1的产品,其中所述肽具有序列Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp SEQ ID NO:4。
22. 一种个人护理组合物,其包含磷酸基受体化合物和可药用载体,其中所述磷酸基受体化合物为:
  - A) 卵黄高磷蛋白,所述卵黄高磷蛋白至少部分脱磷酸化;或
  - B) 具有序列Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr Ala SEQ ID NO:3或序列Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp SEQ ID NO:4的肽。
23. 权利要求22的组合物,其中该组合物是乳剂或洗剂。
24. 权利要求23的组合物,其中该组合物是晒黑乳剂或洗剂。
25. 权利要求23的组合物,其中该组合物是增加水分的乳剂或洗剂。
26. 权利要求22的组合物,其中该组合物是洗液、清洗液或溶液。
27. 权利要求22的组合物,其中该组合物是凝胶或软膏。
28. 权利要求22的组合物,其中该组合物是粉剂。
29. 权利要求22的组合物,其中该组合物是唇膏、唇彩或唇香膏。

30. 权利要求 22 的组合物,其中所述磷酸基受体化合物是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白。

31. 权利要求 22 的组合物,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

32. 权利要求 30 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 10% 脱磷酸化。

33. 权利要求 31 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 10% 脱磷酸化。

34. 权利要求 32 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 20% 脱磷酸化。

35. 权利要求 33 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 20% 脱磷酸化。

36. 权利要求 34 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 35% 脱磷酸化。

37. 权利要求 35 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 35% 脱磷酸化。

38. 权利要求 36 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 50% 脱磷酸化。

39. 权利要求 37 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 50% 脱磷酸化。

40. 权利要求 38 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 70% 脱磷酸化。

41. 权利要求 39 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 70% 脱磷酸化。

42. 权利要求 40 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 90% 脱磷酸化。

43. 权利要求 41 的组合物,其中所述卵黄高磷蛋白至少 90% 脱磷酸化。

44. 权利要求 22 的组合物,其中所述肽具有序列 Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr Ala SEQ ID NO:3。

45. 权利要求 22 的组合物,其中所述肽具有序列 Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp SEQ ID NO:4。

46. 一种包含个人护理产品的试剂盒,该个人护理产品包含磷酸基受体化合物,所述磷酸基受体化合物为:

A) 卵黄高磷蛋白,所述卵黄高磷蛋白至少部分脱磷酸化;或

B) 具有序列 Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr Ala SEQ ID NO:3 或序列 Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp SEQ ID NO:4 的肽。

47. 权利要求 46 的试剂盒,其中其中所述磷酸基受体化合物是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白。

48. 权利要求 46 的试剂盒,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

49. 一种包含个人护理装置的试剂盒,该个人护理装置包含磷酸基受体化合物,所述磷酸基受体化合物为:

A) 卵黄高磷蛋白,所述卵黄高磷蛋白至少部分脱磷酸化;或

B) 具有序列 Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr Ala SEQ ID NO:3 或序列 Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp SEQ ID NO:4 的肽。

50. 权利要求 49 的试剂盒,其中该装置是海绵、布、擦子或衬垫。

51. 权利要求 49 的试剂盒,其中该装置是绷带、缝合线或外科海绵。

52. 权利要求 49 的试剂盒,其中该装置是药签。

53. 权利要求 49 的试剂盒,其中所述磷酸基受体化合物是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白。

54. 权利要求 49 的试剂盒,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

55. 一种包含个人护理组合物的试剂盒,该个人护理组合物包含磷酸基受体化合物和

可药用局部载体,所述磷酸基受体化合物为:

A) 卵黄高磷蛋白,所述卵黄高磷蛋白至少部分脱磷酸化;或

B) 具有序列Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr Ala SEQ ID NO:3 或序列Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp SEQ ID NO:4 的肽。

56. 权利要求 55 的试剂盒,其中该组合物是乳剂或洗剂。

57. 权利要求 56 的试剂盒,其中该组合物是晒黑乳剂或洗剂。

58. 权利要求 56 的试剂盒,其中该组合物是增加水分的乳剂或洗剂。

59. 权利要求 55 的试剂盒,其中该组合物是洗液、清洗液或溶液。

60. 权利要求 55 的试剂盒,其中该组合物是凝胶或软膏。

61. 权利要求 55 的试剂盒,其中该组合物是粉剂。

62. 权利要求 55 的试剂盒,其中该组合物是唇膏、唇彩或唇香膏。

63. 权利要求 55 的试剂盒,其中所述磷酸基受体化合物是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白。

64. 权利要求 55 的试剂盒,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

## 一种个人护理组合物及其产品

[0001] 本申请是申请号为 200380109316.4 的中国专利申请（申请日：2003 年 11 月 25 日，发明名称：治疗由增强磷酸化介导的疾病和病况）的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及治疗由增强磷酸化 (increased phosphorylation) 介导的疾病和病况的方法，比如炎症和癌症。本发明还涉及抑制在细胞、组织和器官内增强磷酸化的方法。该方法利用磷酸基受体化合物 (phosphate acceptor compound, PAC)。本发明还涉及包含 PAC 的产品。

### [0003] 发明背景

[0004] 信号转导是级联过程，通过这一过程细胞外信号与细胞表面受体相互作用最终影响细胞功能的改变。蛋白的磷酸化在信号转导中起重要作用。蛋白的磷酸化是通过蛋白激酶进行的，而且实际上细胞功能的所有方面均以一种或另一种方式依赖于激酶活性。这样很显然，异常（经常增强的）的激酶活性与宿主疾病和病症相关。

[0005] 蛋白激酶催化磷酸基团 (phosphate) 从三磷酸腺苷 (ATP) 转移给蛋白的特定氨基酸残基（几乎总是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基）。激酶具有的几种特性使得它们理想地适于信号转导功能。一种是它们通常具有重叠的靶底物特异性，其使得在不同的信号通路中进行“交叉对话” (cross-talk)，允许不同信号的整合 (integration)。另一个特性是激酶被组织成为几个分子功能区域。这些区域通过进化显示已被混和并匹配以生成大的蛋白激酶家族，而且这些激酶在结构上和催化性能上相似。第三个特性是它们的速度。磷酸化和脱磷酸化的动力学非常快，提供了快速应答和很短的复原时间，其又使得重复的信号传递成为可能。

[0006] 考虑到它们在大量疾病和信号转导中的作用，已进行了大量努力以开发蛋白激酶抑制剂。就目前所知，所有的这些努力均瞄向开发仅抑制单一激酶的特异性抑制剂。但是，开发单一激酶的特异性抑制剂是使人畏缩的工作。目前的估计预测人类基因组中存在超过 2,000 蛋白激酶基因。Shanley, Crit. Care Med., 30 (No. 1, Suppl) :S80-S88 (2002) ;Cohen, Current Opinion in Chemical Biology, 3:459-465 (1999)。此外，上述各种特征使得激酶在信号转导中如此有效并使得他们进化为几乎任一细胞功能的关键，同时使得它们极难研究和理解。US 专利申请 6,383,790。不幸地，激酶的庞大种类及其之间的相似性阻挠了特异性抑制剂的开发和设计。US 专利申请 6,383,790。此外，由于激酶网络高度退化并以未知方式相互连接，在考虑抑制哪些激酶可以作为治疗疾病的靶点时存在大量不确定性。US 专利申请 6,383,790。而且，无法确定特定激酶的特异性抑制剂将对特定疾病起作用。US 专利申请 6,383,790。由于激酶可高度混杂，很可能抑制一种激酶后却仅仅使另一种激酶替代了它。US 专利申请 6,383,790。

[0007] 综上，显然需要在不需要确定个别激酶的特异性抑制剂的条件下，减少不必要的磷酸化的方法和产品。还需要可以有效治疗由增强磷酸化介导的疾病和病况的方法和产品，而不需要确定个别激酶的特异性抑制剂。本发明提供了这样的方法和产品。

[0008] 发明简介

[0009] 特别地,本发明提供了治疗由增强磷酸化介导的疾病和病况的方法和产品。本发明还提供抑制在细胞、组织或器官内增强磷酸化的方法和产品。本发明的方法和产品利用磷酸基受体化合物(PAC)。PAC是能够被磷酸化的化合物。PAC的磷酸化具有减少由其正常底物的激酶进行的磷酸化中ATP和磷酸基团的量的作用,从而抑制不必要的增强磷酸化。因而,对于PAC的鉴定并不重要,不必知晓在引起不必要的增强磷酸化中涉及了哪些激酶。

[0010] 本发明具体涉及以下方面:

[0011] 1. 一种治疗由增强磷酸化介导的疾病和病况的方法,其包括向需要治疗的动物给予有效量的细胞外磷酸基受体化合物(EPAC)。

[0012] 2. 方面1的方法,其中EPAC是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。

[0013] 3. 方面2的方法,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

[0014] 4. 方面2的方法,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约35%脱磷酸化。

[0015] 5. 方面4的方法,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约50%脱磷酸化。

[0016] 6. 方面5的方法,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约70%脱磷酸化。

[0017] 7. 方面6的方法,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约90%脱磷酸化。

[0018] 8. 方面1的方法,其中EPAC是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。

[0019] 9. 方面8的方法,其中酪蛋白是 $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。

[0020] 10. 方面9的方法,其中酪蛋白是 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白或其片段。

[0021] 11. 方面1的方法,其中EPAC是至少部分脱磷酸化的酰化白蛋白。

[0022] 12. 方面11的方法,其中EPAC是至少部分脱磷酸化的乙酰化白蛋白。

[0023] 13. 方面1的方法,其中EPAC是具有下列序列的肽:

[0024]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2]_p (Xaa_1)_m$  或

[0025]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2 Xaa_2 (Xaa_1)_n Lys-Ac]_p (Xaa_1)_m$

[0026] 其中:

[0027] Ac是酰基;

[0028]  $Xaa_1$ 是任一氨基酸;

[0029]  $Xaa_2$ 是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;

[0030] m是0-10;

[0031] n是1-3;

[0032] p是1-5;以及

[0033] 选择m、n和p使氨基酸的总数为至少约20和/或选择各 $Xaa_1$ 使得该肽将是亲水性的。

[0034] 14. 方面13的方法,其中肽为Ac-Lys Cys Ala Ser[SEQ ID NO:1]或Ac-Lys Ala Ser Ser Ala Lys-Ac[SEQ ID NO:2]。

[0035] 15. 方面1的方法,其中EPAC是至少部分脱磷酸化的血浆蛋白混合物。

[0036] 16. 方面1的方法,其中EPAC是激酶底物。

[0037] 17. 方面16的方法,其中激酶底物是酪蛋白激酶底物,所述酪蛋白激酶底物具有序列Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr Ala[SEQ

ID NO :3] 或序列 Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp[SEQ ID NO :4]。

[0038] 18. 方面 1 的方法,其中 EPAC 是包含一个或多个可磷酸化氨基酸的合成肽。

[0039] 19. 方面 18 的方法,其中合成肽以随机序列包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸。

[0040] 20. 方面 18 的方法,其中合成肽包含一个或多个磷酸化位点。

[0041] 21. 方面 1 的方法,其中 EPAC 以所选择的细胞、组织或器官为靶点。

[0042] 22. 方面 1-21 任一项的方法,其中疾病或病况是炎症或炎性疾病或病况。

[0043] 23. 方面 1-21 任一项的方法,其中疾病或病况是皮肤疾病或病况。

[0044] 24. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是炎症或炎性皮肤病或病况。

[0045] 25. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是变应性反应。

[0046] 26. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是灼伤。

[0047] 27. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是湿疹或皮炎。

[0048] 28. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是痤疮。

[0049] 29. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是牛皮癣。

[0050] 30. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是角化病或弹性组织变性。

[0051] 31. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是感染。

[0052] 32. 方面 23 的方法,其中皮肤疾病或病况是麻疹和水痘。

[0053] 33. 方面 1-21 任一项的方法,其中疾病或病况是变态反应、自身免疫疾病或其它免疫疾病。

[0054] 34. 方面 1-21 任一项的方法,其中疾病或病况是增生性疾病。

[0055] 35. 方面 1-21 任一项的方法,其中疾病或病况是血管生成性疾病或病况。

[0056] 36. 一种治疗癌症的方法,其包括向需要治疗的动物给予有效量磷酸基受体化合物 (PAC)。

[0057] 37. 方面 36 的方法,其中 PAC 是细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0058] 38. 方面 36 的方法,其中 PAC 是细胞内磷酸基受体化合物 (IPAC)。

[0059] 39. 方面 38 的方法,其中 IPAC 是具有下列序列的肽:

[0060]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2]_p (Xaa_1)_m$  或

[0061]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2 Xaa_2 (Xaa_1)_n Lys-Ac]_p (Xaa_1)_m$

[0062] 其中:

[0063] Ac 是酰基;

[0064]  $Xaa_1$  是任一氨基酸;

[0065]  $Xaa_2$  是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;

[0066] m 是 0-10;

[0067] n 是 1-3;

[0068] p 是 1-5;以及

[0069] 选择 m、n 和 p 使氨基酸的总数为低于约 20,并且选择各  $Xaa_1$  使得该肽将是疏水性的。

[0070] 40. 方面 38 的方法,其中 IPAC 是激酶底物。

[0071] 41. 方面 38 的方法,其中 IPAC 是包含一个或多个可磷酸化氨基酸的合成肽。

- [0072] 42. 方面 41 的方法,其中合成肽以随机序列包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸。
- [0073] 43. 方面 41 的方法,其中合成肽包含一个或多个磷酸化位点。
- [0074] 44. 方面 38 的方法,其中 IPAC 以癌细胞为靶点。
- [0075] 45. 方面 36-44 任一项的方法,其中癌症是癌、肉瘤、脑癌、头部癌症、颈部癌症、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、甲状腺癌、肝癌、肺癌、骨癌、皮肤癌、血液癌症、淋巴瘤和白血病。
- [0076] 46. 一种药物组合物,包含磷酸基受体化合物 (PAC) 和可药用载体。
- [0077] 47. 方面 46 的组合物,其中 PAC 是细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。
- [0078] 48. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。
- [0079] 49. 方面 48 的组合物,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。
- [0080] 50. 方面 48 的组合物,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约 35% 脱磷酸化。
- [0081] 51. 方面 50 的组合物,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约 50% 脱磷酸化。
- [0082] 52. 方面 51 的组合物,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约 70% 脱磷酸化。
- [0083] 53. 方面 52 的组合物,其中卵黄高磷蛋白或其片段至少约 90% 脱磷酸化。
- [0084] 54. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。
- [0085] 55. 方面 54 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。
- [0086] 56. 方面 55 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白或其片段。
- [0087] 57. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酰化白蛋白。
- [0088] 58. 方面 57 的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的乙酰化白蛋白。
- [0089] 59. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 是具有下列序列的肽:
- [0090]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2]_p (Xaa_1)_m$  或
- [0091]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2 Xaa_2 (Xaa_1)_n Lys-Ac]_p (Xaa_1)_m$
- [0092] 其中:
- [0093] Ac 是酰基;
- [0094]  $Xaa_1$  是任一氨基酸;
- [0095]  $Xaa_2$  是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;
- [0096] m 是 0-10;
- [0097] n 是 1-3;
- [0098] p 是 1-5; 以及
- [0099] 选择 m、n 和 p 使氨基酸的总数为至少约 20 和 / 或选择各  $Xaa_1$  使得该肽将是亲水性的。
- [0100] 60. 方面 59 的组合物,其中肽为 Ac-Lys Cys Ala Ser [SEQ ID NO:1] 或 Ac-Lys Ala Ser Ser Ala Lys-Ac [SEQ ID NO:2]。
- [0101] 61. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的血浆蛋白混合物。
- [0102] 62. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 是激酶底物。
- [0103] 63. 方面 62 的组合物,其中激酶底物是酪蛋白激酶底物,所述酪蛋白激酶底物具有序列 Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile Thr



Ala[SEQ ID NO :3] 或 Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp[SEQ ID NO :4]。

[0104] 64. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 是包含一个或多个可磷酸化氨基酸的合成肽。

[0105] 65. 方面 64 的组合物,其中合成肽以随机序列包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸。

[0106] 66. 方面 64 的组合物,其中合成肽包含一个或多个磷酸化位点。

[0107] 67. 方面 47 的组合物,其中 EPAC 与靶向性分子相连。

[0108] 68. 方面 47-67 任一项的组合物,其适于局部给予 EPAC。

[0109] 69. 方面 68 的组合物,其中组合物适于将 EPAC 局部给药至动物皮肤。

[0110] 70. 方面 69 的组合物,其中组合物是乳剂、洗剂、软膏、糊剂、凝胶、溶液、喷雾剂或滴剂。

[0111] 71. 方面 70 的组合物,其中组合物是乳剂或软膏。

[0112] 72. 方面 46 的组合物,其中 PAC 是细胞内磷酸基受体化合物 (IPAC)。

[0113] 73. 方面 72 的组合物,其中 IPAC 是具有一列序列的肽:

[0114]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2]_p (Xaa_1)_m$  或

[0115]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2 Xaa_2 (Xaa_1)_n Lys-Ac]_p (Xaa_1)_m$

[0116] 其中:

[0117] Ac 是酰基;

[0118]  $Xaa_1$  是任一氨基酸;

[0119]  $Xaa_2$  是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;

[0120] m 是 0-10;

[0121] n 是 1-3;

[0122] p 是 1-5;以及

[0123] 选择 m、n 和 p 使氨基酸的总数为低于约 20,并且选择各  $Xaa_1$  使得该肽将是疏水性的。

[0124] 74. 方面 72 的组合物,其中 IPAC 是激酶底物。

[0125] 75. 方面 72 的组合物,其中 IPAC 与靶向性分子相连。

[0126] 76. 一种抑制从动物体内移出的细胞、组织或器官内增强磷酸化的方法,其包括使该细胞、组织或器官接触包含有效量细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC) 的溶液或介质。

[0127] 77. 方面 76 的方法,其中 EPAC 抑制炎症。

[0128] 78. 方面 76 或 77 的方法,其中所述细胞、组织或器官在接触包含 EPAC 的溶液或介质后被移植到动物体内。

[0129] 79. 一种用于接触从动物体内移出的组织或器官的溶液,其包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0130] 80. 方面 79 的溶液,其包含 EPAC 的组合。

[0131] 81. 一种用于使从动物体内移出的细胞、组织或器官接触细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC) 或者 EPACs 组合的试剂盒,该试剂盒包括:

[0132] 具有 EPAC 的容器;

[0133] 具有 EPACs 组合的容器;或

[0134] 分别具有 EPAC 的复数个容器,其中复数个 EPACs 中的每个可以与其它的 EPAC(s)

相同或不同。

[0135] 82. 一种抑制动物口腔组织增强磷酸化的方法,其包括使该组织接触有效量的细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0136] 83. 方面 82 的方法,其中该组织进行了预防性治疗。

[0137] 84. 方面 83 的方法,其中该组织按照部分预防性口腔方案进行了治疗。

[0138] 85. 方面 82 的方法,其中该组织在手术之前、手术之间、手术之后或其组合进行了治疗。

[0139] 86. 方面 82 的方法,其中该组织在拔牙之前、拔牙之间、拔牙之后或其组合进行了治疗。

[0140] 87. 方面 82 的方法,其中全部或基本上全部的口腔组织与 EPAC 接触。

[0141] 88. 一种治疗由增强磷酸化介导的动物口腔组织疾病或病况的方法,该方法包括使该组织接触有效量的细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0142] 89. 方面 88 的方法,其中全部或基本上全部的口腔组织与 EPAC 接触。

[0143] 90. 一种治疗动物口腔组织的炎症或炎性疾病或病况的方法,其包括使该组织接触有效量的细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0144] 91. 方面 90 的方法,其中炎症是牙周组织炎症。

[0145] 92. 方面 90 的方法,其中疾病或病况是龈炎。

[0146] 93. 方面 90 的方法,其中疾病或病况是牙周炎。

[0147] 94. 方面 90 的方法,其中炎症与手术或拔牙相关。

[0148] 95. 方面 90 的方法,其中疾病或病况是细菌、酵母、真菌或病毒感染。

[0149] 96. 方面 90 的方法,其中疾病或病况是口疮、唇疱疹或溃疡。

[0150] 97. 方面 90 的方法,其中全部或基本上全部的口腔组织与 EPAC 接触。

[0151] 98. 一种增白一个或多个动物牙齿的方法,其包括使动物口腔组织接触有效量的细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0152] 99. 方面 98 的方法,其中全部或基本上全部的口腔组织与 EPAC 接触。

[0153] 100. 方面 98 的方法,其中该组织在增白牙齿之前、增白牙齿之间、增白牙齿之后或其组合与 EPAC 进行接触。

[0154] 101. 方面 82-100 任一项的方法,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。

[0155] 102. 方面 101 的方法,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

[0156] 103. 方面 82-100 任一项的方法,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。

[0157] 104. 方面 103 的方法,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。

[0158] 105. 方面 104 的方法,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白。

[0159] 106. 一种口腔护理产品,其包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0160] 107. 方面 106 的产品,其是口腔护理装置。

[0161] 108. 方面 107 的装置,其是缝合线或牙线。

[0162] 109. 方面 107 的装置,其是条带。

- [0163] 110. 方面 109 的装置,其中条带进一步包含牙齿增白剂。
- [0164] 111. 方面 106-110 任一项的产品,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。
- [0165] 112. 方面 111 的产品,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。
- [0166] 113. 方面 106-110 任一项的产品,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。
- [0167] 114. 方面 113 的产品,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。
- [0168] 115. 方面 114 的产品,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白。
- [0169] 116. 一种口腔护理组合物,其包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC) 和可药用载体。
- [0170] 117. 方面 116 的组合物,其中该组合物是软膏或乳膏。
- [0171] 118. 方面 116 的组合物,其中该组合物是洗液、清洗液、漱口液、喷雾液或溶液。
- [0172] 119. 方面 116 的组合物,其中该组合物是凝胶、糊剂或粉剂。
- [0173] 120. 方面 116 的组合物,其中该组合物是片剂、树胶剂、锭剂、薄荷剂、薄膜剂或贴片。
- [0174] 121. 方面 116 的组合物,其中该组合物是牙齿增白组合物。
- [0175] 122. 方面 116-121 任一项的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。
- [0176] 123. 方面 122 的组合物,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。
- [0177] 124. 方面 116-121 任一项的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。
- [0178] 125. 方面 124 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。
- [0179] 126. 方面 125 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白。
- [0180] 127. 一种包含口腔护理产品的试剂盒,该口腔护理产品包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。
- [0181] 128. 一种包含口腔护理装置的试剂盒,该口腔护理装置包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。
- [0182] 129. 方面 128 的试剂盒,其中该装置是条带。
- [0183] 130. 方面 129 的试剂盒,其中该条带进一步包含牙齿增白剂。
- [0184] 131. 方面 128 的试剂盒,其中该试剂盒进一步包含牙齿增白剂。
- [0185] 132. 一种包含口腔护理组合物的试剂盒,该口腔护理组合物包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC) 和可药用载体。
- [0186] 133. 方面 132 的试剂盒,其中该试剂盒进一步包含牙齿增白剂。
- [0187] 134. 方面 132 的试剂盒,其中该试剂盒进一步包括含牙齿增白剂的条带。
- [0188] 135. 方面 127-134 任一项的试剂盒,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。
- [0189] 136. 方面 135 的试剂盒,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

- [0190] 137. 方面 127-134 任一项的试剂盒,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。
- [0191] 138. 方面 137 的试剂盒,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。
- [0192] 139. 方面 138 的试剂盒,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白。
- [0193] 140. 一种抑制动物皮肤内增强磷酸化的方法,其包括使皮肤接触有效量的细胞外磷酸化受体化合物 (EPAC)。
- [0194] 141. 方面 140 的方法,其中该皮肤进行了预防性治疗。
- [0195] 142. 一种个人护理产品,其包括细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。
- [0196] 143. 方面 142 的产品,其是个人护理装置。
- [0197] 144. 方面 143 的装置,其是海绵、布、擦子或衬垫。
- [0198] 145. 方面 143 的装置,其是绷带、缝合线或外科海绵。
- [0199] 146. 方面 143 的装置,其是药签。
- [0200] 147. 方面 142-146 任一项的产品,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。
- [0201] 148. 方面 147 的产品,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。
- [0202] 149. 方面 142-146 任一项的产品,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。
- [0203] 150. 方面 149 的产品,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。
- [0204] 151. 方面 150 的产品,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白。
- [0205] 152. 一种个人护理组合物,其包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC) 和可药用载体。
- [0206] 153. 方面 152 的组合物,其中该组合物是乳剂或洗剂。
- [0207] 154. 方面 153 的组合物,其中该组合物是晒黑乳剂或洗剂。
- [0208] 155. 方面 153 的组合物,其中该组合物是增加水分的乳剂或洗剂。
- [0209] 156. 方面 152 的组合物,其中该组合物是洗液、清洗液或溶液。
- [0210] 157. 方面 152 的组合物,其中该组合物是凝胶或软膏。
- [0211] 158. 方面 152 的组合物,其中该组合物是粉剂。
- [0212] 159. 方面 152 的组合物,其中该组合物是唇膏、唇彩或唇香膏。
- [0213] 160. 方面 152-159 任一项的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。
- [0214] 161. 方面 160 的组合物,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。
- [0215] 162. 方面 152-159 任一项的组合物,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。
- [0216] 163. 方面 162 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。
- [0217] 164. 方面 163 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白。
- [0218] 165. 一种包含个人护理产品的试剂盒,该个人护理产品包含细胞外磷酸基受体

化合物 (EPAC)。

[0219] 166. 一种包含个人护理装置的试剂盒,该个人护理装置包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC)。

[0220] 167. 方面 166 的试剂盒,其中该装置是海绵、布、擦子或衬垫。

[0221] 168. 方面 166 的试剂盒,其中该装置是绷带、缝合线或外科海绵。

[0222] 169. 方面 166 的试剂盒,其中该装置是药签。

[0223] 170. 一种包含个人护理组合物的试剂盒,该个人护理组合物包含细胞外磷酸基受体化合物 (EPAC) 和可药用局部载体。

[0224] 171. 方面 170 的试剂盒,其中该组合物是乳剂或洗剂。

[0225] 172. 方面 171 的试剂盒,其中该组合物是晒黑乳剂或洗剂。

[0226] 173. 方面 171 的试剂盒,其中该组合物是增加水分的乳剂或洗剂。

[0227] 174. 方面 170 的试剂盒,其中该组合物是洗液、清洗液或溶液。

[0228] 175. 方面 170 的试剂盒,其中该组合物是凝胶或软膏。

[0229] 176. 方面 170 的试剂盒,其中该组合物是粉剂。

[0230] 177. 方面 170 的试剂盒,其中该组合物是唇膏、唇彩或唇香膏。

[0231] 178. 方面 165-177 任一项的试剂盒,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的卵黄高磷蛋白或其片段。

[0232] 179. 方面 178 的试剂盒,其中卵黄高磷蛋白是鸡卵黄高磷蛋白。

[0233] 180. 方面 165-177 任一项的试剂盒,其中 EPAC 是至少部分脱磷酸化的酪蛋白或其片段。

[0234] 181. 方面 180 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、上述任一的片段或上述一种或多种的组合。

[0235] 182. 方面 181 的组合物,其中酪蛋白是  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白。

[0236] 183. 方面 72 的组合物,其中 IPAC 是包含一个或多个可磷酸化氨基酸的合成肽。

[0237] 184. 方面 75 的组合物,其中合成肽以随机序列包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸。

[0238] 185. 方面 75 的组合物,其中合成肽包含一个或多个磷酸化位点。

## 附图简介

[0239] 附图 1 :表明白介素 8 (IL-8) 的量与治疗关系的条线图。

[0240] 本发明优选实施方案的详述

[0241] 如上所述,本发明提供了治疗由增强磷酸化介导的疾病和病况的方法和产品。本发明还提供抑制在细胞、组织或器官内增强磷酸化的方法和产品。这些方法和产品利用磷酸基受体化合物 (PAC)。

[0242] 此处所用的“治疗”及其变化意指治疗、预防、消除、改善、缓解或减轻疾病或病况或至少其某些症状或作用的严重程度。

[0243] 如此处所用“由增强磷酸化介导的疾病或病况”意指疾病或病况,其是由患疾病或病况动物的蛋白和 / 或肽的增强磷酸化引起、加重或参与的。

[0244] “增强磷酸化”意指磷酸化水平高于无此类疾病或病况时的水平。增强磷酸化是由

激酶活性的净增加引起的,是由提高的激酶活性和 / 或降低的磷酸酶活性引起的。

[0245] 此处所用的“抑制”或其变化意指减少、消除或预防。

[0246] A. 磷酸基受体化合物

[0247] 如此处所用,“磷酸基受体化合物”或“PAC”是能被磷酸化的化合物。PAC 可以是细胞外 PAC (“EPAC”) 或细胞内 PAC (“IPAC”)。

[0248] PAC 的磷酸化具有减少由其正常底物的激酶进行的磷酸化中 ATP 和磷酸基团的量的作用,从而抑制不必要的增强磷酸化。因而,对于 PAC 的鉴定并不重要,不必知晓在引起不必要的增强磷酸化中涉及了哪些激酶。

[0249] 如果已知或怀疑一种特定激酶导致或至少涉及引起不必要的增强磷酸化,该激酶的一种或多种底物,如果已知,可用作 PAC。使用这些底物可能更有效地或彻底地抑制不必要的增强磷酸化,但是使用这些底物并非必需的。此外,使用这些底物可能不引起对抑制的任何改善,因为,如上所述,激酶可能是高度混杂的,而且其它激酶可简单地辅助被怀疑是导致或涉及引起该不必要的增强磷酸化的激酶而执行其功能。

[0250] 1. 细胞外磷酸基受体化合物

[0251] “细胞外”意味着细胞外的磷酸基受体化合物 (EPAC) 不足以穿透至细胞内部与涉及磷酸化的胞内路径相互作用。这样做可以严重地损伤乃至杀死细胞。该 EPAC 可全部残留在细胞外部,可与细胞膜上或细胞膜内的受体和 / 或其它分子相互作用或相结合,或者只要 EPAC 穿透细胞膜时不是与涉及磷酸化的胞内路径相互作用的方式甚至可穿透细胞膜。

[0252] EPAC 是由膜 - 结合的和 / 或循环的 / 可溶性的激酶进行的磷酸化的底物。EPAC 与正常底物相竞争而被激酶磷酸化,并且 EPAC 的磷酸化减少或防止 细胞外的和胞内的蛋白质、肽以及其它化合物的磷酸化 (EPAC 的磷酸化具有减少可用于细胞外和细胞内的蛋白质、肽以及其它化合物磷酸化的三磷酸腺苷和磷酸根基团的量的作用)。此外,由膜 - 结合激酶对 EPAC 进行的磷酸化减少或阻止从细胞外到内的信号转导。

[0253] 此外,磷酸化的蛋白质和肽可以结合金属离子,包括铁和铜离子。因此,它们可以起抗氧化剂作用。由此,本发明的 EPAC 蛋白质和肽在磷酸化后将提供额外的抗氧化益处。

[0254] 合适的 EPAC 包括具有一个或多个磷酸化位点的蛋白质和肽。如上所述,事实上所有蛋白激酶均磷酸化丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基,并且现在已知超过 1000 个包含丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基的磷酸化位点。参见例如 Kreegipuu 等“PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0,” *Nucleic Acids Res.*, 27(1) : 237-239 (1999) 和 <http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/>。蛋白质和肽可以是天然存在的蛋白质和肽,这些蛋白质和肽的片段以及合成的蛋白质和肽 (包括天然存在蛋白质和肽的突变和部分合成形式以及全合成蛋白质和肽),其包含至少一个可磷酸化的氨基酸。该蛋白质和肽必须具有足够的大小 (通常大于约 20 个氨基酸的长度) 和 / 或具有电荷 (即,是亲水性的) 使得它们保持在细胞外。

[0255] 当然,EPAC 的磷酸化位点中至少一个必须是未磷酸化的以起到磷酸酯受体的作用。未磷酸化的蛋白质和肽可以通过使用本领域公知的方法化学合成制备。例如,该蛋白质和肽可以通过标准固相多肽合成方法合成。本领域熟知合适的技术,包括描述于 Merrifield, *Chem. Polypeptides*, 335-61 页 (Katsoyannis 和 Panayotis eds. 1973); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149 (1963); Davis 等, *Biochem. Int* ' 1, 10,

394-414(1985); Stewart 和 Young, *SolidPhase Peptide Synthesis*(1969); US 专利申请 3,941,763 和 5,786,335; Finn 等, *The Proteins*, 第 3 版, 2 卷, 105-253 页 (1976); 以及 Erickson 等, *The Proteins*, 第 3 版, 2 卷, 257-527 页 (1976) 中。除了可磷酸化的氨基酸(丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸) 优选不是 D-氨基酸之外, 化学合成的蛋白质和肽可以包含 L-氨基酸、D-氨基酸或其组合。使用由一个或多个 D-氨基酸组成的蛋白质和肽是合意的, 因为包含 D-氨基酸的蛋白质和肽可抗蛋白水解酶, 比如将该蛋白质和肽给予动物时将遭遇的酶或存在于切除器官中的酶, 其中所述切除器官是由包含该蛋白质或肽的溶液所灌注的。此外, 使用 D-氨基酸不应改变蛋白质或肽被磷酸化的能力。

[0256] 未磷酸化的蛋白质和肽还可在细菌中通过重组 DNA 技术制备。参见 US 专利申请 5,942,254。磷酸化蛋白质和肽可以如下所述地在其它宿主中制备然后脱去磷酸。用于在细菌以及其它宿主中表达蛋白质的重组 DNA 技术、带菌体和试剂为本领域技术人员所熟知。参见例如 Maniatis 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY(1982), Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY(1989)。

[0257] 现已知一些可起 EPAC 作用的天然存在的未磷酸化蛋白质和肽。例如, 人初乳中发现的  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白基本上未磷酸化的。

[0258] 被磷酸化的蛋白质和肽必须在使用前至少部分地脱磷酸。此处所用的“至少部分地脱磷酸”意指存在于蛋白质或肽总体中磷酸化氨基酸的数目减少了至少约 10%。使用前, 存在于蛋白质或肽总体中的磷酸化氨基酸的数目优选减少至少约 35%, 更优选至少约 50%, 更加优选至少约 70%, 最优选至少约 90%。此外, 正如此处所用的, 那些制备的或发现的未磷酸化的或基本未磷酸化的蛋白质在“至少部分地脱去磷酸”的蛋白质和肽的定义范围内。

[0259] 将磷酸化蛋白质和肽进行脱磷酸的方法为大家所熟知。特别地, 蛋白质和肽可以经酶催化或化学方法脱去磷酸。参见例如 US 专利号 6,355,297 和 5,068,118, Miller 等, *J. Biol. Chem.*, 257:6818-6824(1982), Jiang 和 Mine, *J. Agric. Food Chem.*, 48:990-994(2000), 以及实施例 2。对于酶催化的脱磷酸, 可以使用任何一种大量的磷酸酶。优选是一种酸性磷酸酶或一种碱性磷酸酶。这些磷酸酶是非特异性的磷酸单酯酶并可用于脱去大多数蛋白质和肽的磷酸基。优选是一种碱性磷酸酶, 最优选来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。此外, 可以使用丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶、酪氨酸磷酸酶、酪氨酸 / 苏氨酸磷酸酶和上述的组合。合适的磷酸酶可购自许多公司, 包括 Sigma-Aldrich Co.、Worthington Biochemical Corp.、Takara BioInc、CHIMERx 和 Promega。在化学脱磷酸中, 通过在碱性 pH( 优选约 pH 10-12) 下将蛋白质和肽加热( 优选在 35°C -70°C ) 足够长的时间来断裂磷酸酯以获得所需量的脱磷酸。在实施例 2 以及 Jiang 和 Mine, *J. Agric. Food Chem.*, 48:990-994(2000) 中给出了目前的优选条件。

[0260] 可以确定脱磷酸前后蛋白或肽的磷酸化程度。合适的方法已为本领域所公知, 参见例如, Miller 等, *J. Biol. Chem.*, 257:6818-6824(1982) 和实施例 2。此外, 商业可得的试剂盒可用于测量磷酸化水平。这些试剂盒可购自例如 Pierce( 磷蛋白磷酸酯评价试剂盒, 其是基于从丝氨酸和苏氨酸残基碱解磷酸酯, 接着使用孔雀绿和钼酸铵进行量化磷酸盐)。此外, 可应用使用适当抗体( 例如, 磷酸化丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的特异性抗体) 的

免疫测定法。这些抗体可商业购得例如购自 Zymed Laboratories。

[0261] 可用于本发明实践的特定蛋白质包括卵黄高磷蛋白及其片段。卵黄高磷蛋白是蛋黄蛋白质。已报道鸡卵黄高磷蛋白具有 109 个磷酸化位点 (Miller 等, J. Biol. Chem., 257:6818-6824(1982)), 特别优选用于此处。鸡卵黄高磷蛋白可通过本领域公知的方法制备 (参见日文申请 JP 3056500) 并可商业购得例如购自 U. S. Biochemical Amersham 和 Sigma-Aldrich。其可如上述脱去磷酸。

[0262] 可用于本发明实践的其它合适蛋白质包括酪蛋白。可使用全部酪蛋白、 $\alpha$ -酪蛋白、 $\alpha$ -酪蛋白几种同种型中的一种、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白和 / 或  $\kappa$ -酪蛋白和 / 或上述任一的片段。酪蛋白具有多个磷酸化位点。例如,  $\beta$ -酪蛋白具有 5 个磷酸化位点。全部酪蛋白、 $\alpha$ -酪蛋白、 $\alpha$ -酪蛋白的同种型、 $\beta$ -酪蛋白、 $\gamma$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白可商业购得 (例如购自 Sigma-Aldrich) 或可通过本领域公知的方法制备 (参见例如 US 专利申请 5,068,118、5,739,407、5,795,611、5,942,274 和 6,232,094 以及 <http://www.worthington-biochem.com/CASA>)。优选通过重组 DNA 技术在细菌中制备酪蛋白,因为它们不会被磷酸化。此外,如上所述,来自人类初乳的  $\alpha$ S1 酪蛋白是天然未磷酸化的并因此非常便于使用。它可以自 Sigma-Aldrich 购得。酪蛋白的脱磷酸,如果必要的话,可以如上所述进行。参见例如 US 专利申请 6,355,297 和 5,068,118。

[0263] 可用于本发明实践的其它合适 EPAC 包括血液蛋白质和肽。如果向动物给予的蛋白质和 / 或肽是来自于与所治疗动物同种的动物,那么该蛋白质和 / 或肽就不是免疫原性的。由此,同源的血液蛋白质和肽特别适合全身给药。

[0264] 血液蛋白质和 / 或肽的一种或其混合物可作为 EPAC。例如,库存血浆或库存血清样品中所有的蛋白质和肽可经脱磷酸化并用于本发明的实践中。或者,可通过重组 DNA 技术从血浆或血清中分离具有一个或多个磷酸化位点的单独 (individual) 血浆蛋白质或肽,并用于本发明的实践中。

[0265] 已经发现人白蛋白可被磷酸化。但是,为了发生磷酸化需要乙酰化的白蛋白。据信 202 位的丝氨酸磷酸化而 199 位的赖氨酸乙酰化。此外还相信,在没有乙酰化的白蛋白中,赖氨酸的正电侧链与丝氨酸的负电侧链相互作用,阻碍了丝氨酸的磷酸化。当该赖氨酸被乙酰化时,它的电荷被中和,不再与丝氨酸相互作用,因而丝氨酸可以被磷酸化。还发现乙酰化人白蛋白存在于血浆和血清中,特别是服用阿司匹林的个体体内,它可以从库存的血浆或血清中分离出来,脱去磷酸,并用于本发明的实践中。或者,白蛋白可通过重组 DNA 技术 (优选在细菌中从而不会被磷酸化) 制备并乙酰化。乙酰化蛋白质的方法为大家所熟知。例如,白蛋白可经含有 1mM 阿司匹林的孵育血浆 (包含酯化酶) 于 37°C 乙酰化 1 小时,并通过本领域公知的方法从血浆中分离乙酰化白蛋白。此外,血清或白蛋白 (优选通过重组 DNA 技术制备的白蛋白) 可在酯酶存在下使用阿司匹林或在酰基转移酶存在下使用 N-乙酰基天冬氨酸进行孵育从而乙酰化白蛋白。白蛋白还可以使用乙酸酐乙酰化。当然,可以进行其它的酰化比如甲基化作用代替乙酰化。

[0266] 此外,可以制备包含从 199 到 202 位白蛋白序列的肽并乙酰化。从 199 到 202 位白蛋白序列为 Lys Cys Ala Ser[SEQ ID NO:1]。其它氨基酸可以代替在赖氨酸和丝氨酸残基之间的半胱氨酸和丙氨酸残基,并且丝氨酸残基可以被苏氨酸或酪氨酸残基替代。此外,可向任一末端加入其它的氨基酸。丝氨酸和赖氨酸残基之间的氨基酸数目可以从 1-3 中



变化,并且该序列重复一次或多次。从而,另一种可用于本发明实践中的肽为 Lys Ala Ser Ser Ala Lys[SEQ ID NO:2],其中两个赖氨酸残基均乙酰化。就 EPAC 而言,代替半胱氨酸和 / 或丙氨酸的氨基酸和 / 或被加到任一末端的氨基酸应包括足够的带电荷的氨基酸,这样该肽将是亲水的和 / 或添加足够的氨基酸以致该肽将至少为 20 个氨基酸长度。具体地,这样的肽优选具有下面的序列:

[0267]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2]_p (Xaa_1)_m$  或

[0268]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2 Xaa_2 (Xaa_1)_n Lys-Ac]_p (Xaa_1)_m$

[0269] 其中:

[0270] Ac 是酰基;

[0271]  $Xaa_1$  是任一氨基酸;

[0272]  $Xaa_2$  是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;

[0273] m 是 0-10;

[0274] n 是 1-3;

[0275] p 是 1-5;以及

[0276] 选择 m、n 和 p 使氨基酸的总数为至少约 20 和 / 或选择各  $Xaa_1$  使得该肽是亲水性的。

[0277] 可用于本发明实践的其它合适的 EPAC 包括已知的激酶底物。已知许多这样的激酶底物,一些可商业购得,例如购自 Sigma-Aldrich 和 Promega。如上所述,PAC 起非特异性作用以减少了可用的 ATP 和磷酸基的数量,并且不论激酶的种类是否导致或涉及引起不必要的增强磷酸化,这些底物可用作 EPAC。

[0278] 可用于本发明实践的其它合适 EPAC 包括具有至少一个可磷酸化氨基酸的合成蛋白质和肽。例如,可使用包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基的蛋白或肽。丝氨酸是最常见的磷酸化氨基酸,因此这些蛋白或肽可仅包含丝氨酸。但是优选这些蛋白或肽包含所有这三种氨基酸。还优选丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基被一个或多个其它氨基酸所间隔。如上所述,如果赖氨酸在 1-3 个丝氨酸之内,该赖氨酸优选被乙酰化。既然这些蛋白质和肽是 EPAC,它们就将包含至少约 20 氨基酸和 / 或带电荷(即是亲水的)。由此,除丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸外的部分其它氨基酸优选是带电荷的氨基酸。可以使用具有一个或多个优选许多个可磷酸化氨基酸的一个蛋白或肽。或者,可以使用鸡尾酒式肽(a cocktail of peptides),其中每个所述肽包含一个可磷酸化氨基酸。此处所用的“合成”意指不是天然存在的。

[0279] 因为激酶高度混杂的,可以预料即使是包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基的随机序列也将被磷酸化。但是,在优选实施方案中,合成的蛋白质或肽将包含一个或多个已知的磷酸化位点。如上所述,现在已知超过 1000 个磷酸化位点,其包含丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基。参见,例如 Kreegipuu 等, " Phospho Base, a database of phosphorylation sites:release2.0, " *Nucleic Acids Res.*, 27(1):237-239(1999) 和 <http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/>。还可参见 Aitken, *Mol. Biotechnol.*, 12:241-53(1999)。此外,已开发了从随机肽库中确定可磷酸化肽的方法。参见 Wu 等, *Biochemistry*, 13:14825-14833(1994) 和 Songyang 等, *Curr. Biol.*, 4:973-982(1994)。由于 EPAC 按照非特异性起作用,识别磷酸化位点不是关键的。当使用大量的磷酸化位点时,

各磷酸化位点可与其它磷酸化位点相同或不同。

[0280] 2. 细胞内的磷酸基受体化合物

[0281] 通过“胞内的”意指细胞内磷酸基受体化合物足以穿透到细胞内部 (IPAC), 与涉及磷酸化的胞内路径相互作用。优选地, IPAC 将透过细胞膜进入该细胞的细胞质。

[0282] IPAC 是磷酸化的底物, 并且一旦进入细胞内部, IPAC 将与正常底物竞争而被细胞内激酶磷酸化。IPAC 的磷酸化抑制细胞内蛋白质、肽以及其它化合物的磷酸化, 并将抑制细胞内的信号转导过程。考虑到磷酸化对于细胞功能的关键性能, 可以预期 IPAC 将严重损害或杀死它们所进入的细胞。由此, 它们只应当用来治疗需要或可以忍受细胞死亡的疾病和病况比如癌症。优选地, IPAC 将如下述具有靶向性以致它们将仅进入需要灭亡的细胞。当它们全身给药时靶向性尤为重要。

[0283] 合适的 IPAC 包括具有一个或多个磷酸化位点的肽。这些肽可以是天然存在的肽、天然存在的蛋白质片段和合成肽 (包括由天然存在的肽和蛋白片段的突变或部分合成形式以及包含至少一个可磷酸化氨基酸的全合成肽)。该肽优选小于约 20 个氨基酸长度, 更优选小于约 10 个氨基酸长度, 最优选小于约 5 个氨基酸长度, 因为较短的肽更易于进入细胞。为了增强肽和片段穿透细胞膜的能力, 该肽优选是疏水的和 / 或包含精氨酸低聚物 (参见 Rouhi, Chem. & Eng. News, 49-50 (January 15, 2001))。该精氨酸低聚物优选包含 6-9 个精氨酸残基 (参见 Rouhi, Chem. & Eng. News, 49-50 (January 15, 2001))。当局部或透皮给予该肽时, 使用精氨酸低聚物可能是特别合意的。该肽可以是合成的以及, 如果必要的话, 如上所述脱去磷酸。

[0284] 特别合适的 IPAC 包括如下肽序列:

[0285]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2]_p (Xaa_1)_m$  或

[0286]  $(Xaa_1)_m [Ac-Lys (Xaa_1)_n Xaa_2 Xaa_2 (Xaa_1)_n Lys-Ac]_p (Xaa_1)_m$

[0287] 其中:

[0288] Ac 是酰基;

[0289]  $Xaa_1$  是任一氨基酸;

[0290]  $Xaa_2$  是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;

[0291] m 是 0-10;

[0292] n 是 1-3;

[0293] p 是 1-5; 以及

[0294] 选择 m、n 和 p 使氨基酸的总数低于约 20, 并且选择各  $Xaa_1$  使得该肽 将是疏水性的。

[0295] 可用于本发明实践的其它合适的 IPAC 包括已知的能穿透细胞的激酶底物。优选为疏水性的且包含小于约 20 个氨基酸的肽。

[0296] 可用于本发明实践的其它合适的 IPAC 包括具有至少一个可磷酸化氨基酸的合成肽。例如, 可以使用包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基的肽。丝氨酸是最常见的磷酸化氨基酸, 因此该肽可仅包含丝氨酸。但是优选该蛋白或肽包含所有这三种氨基酸。还优选丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基被一个或多个其它氨基酸所间隔。既然该肽是 IPAC, 它们就将优选包含小于约 20 氨基酸且是疏水的。由此, 除丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸外的部分其它氨基酸应该是不带电的氨基酸。可以使用具有一个或多个优选许多个可

磷酸化氨基酸的一个肽。或者,可使用鸡尾酒式肽,其中每个所述肽包含一个可磷酸化氨基酸。

[0297] 因为激酶高度混杂的,可以预料即使是包含一个或多个丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基的随机序列将被磷酸化。但是,在一个优选实施方案中,合成肽将包含一个或多个已知的磷酸化位点。如上所述,现在已知超过 1000 个磷酸化位点,其包含丝氨酸、苏氨酸和 / 或酪氨酸残基。参见,例如 Kreegipuu 等, " PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0, " *Nucleic Acids Res.*, 27(1) :237-239(1999) 和 <http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/>。还参见 Aitken, *Mol. Biotechnol.*, 12 : 241-53(1999)。还开发了从随机肽库中确定可磷酸肽的方法。参见 Wu 等, *Biochemistry*, 13 :14825-14833(1994) 和 Songyang 等, *Curr. Biol.*, 4 :973-982(1994)。由于 IPAC 按照非特异性起作用,识别磷酸化位点不是关键的。当使用大量的磷酸化位点时,各磷酸化位点可与其它磷酸化位点相同或不同。

[0298] 3. 磷酸基受体化合物的靶向性

[0299] 对动物给药时, PAC 可以以所选择的细胞、组织或器官为靶点。PAC 的靶向性将集中强化它们对靶细胞、组织或器官的效应,减少有害副作用的可能性,并且降低所需的给药剂量。就 IPAC 而言,当全身给药时,靶向性是非常合意的,靶向性将减少或防止采用其它给药方式时不必要的细胞损坏和死亡。

[0300] 此处所用的“所选择的”细胞、组织和器官是那些意在受到 PAC 作用的 细胞、组织和器官。就 IPAC 而言,“所选择的”细胞、组织和器官是意在被 IPAC 损伤、损伤或破坏的细胞、组织和器官。所选择的细胞、组织和器官有时在此还称为靶细胞、组织和器官。

[0301] 本领域已知许多使得治疗化合物以所选择的细胞或所选择的组织或器官为靶点的方法,这些方法可用以使得本发明的 PAC 以细胞、组织或器官为靶点。例如, PAC 可结合于靶向分子。该靶向分子可以是已知对靶细胞、组织或器官具有活性的特定配体,比如受体特异性配体(例如趋化因子或生长因子)或对于细胞、组织或器官表面抗原的特异性抗体。合适的抗体包括多克隆的抗体、全克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体 (bispecific antibodies)、人化抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、通过 Fab 表达文库制备的片段、上述任一的表位结合片段以及互补性测定区域 (CDRs)。该靶向分子还可以是下述归巢分子 (homing molecules) 之一。

[0302] 另一种可能性是应用多价抗体。参见 US 专利申请 5, 861, 156, 其全部的公开在此引入作为参考。例如,可以使用与 PAC 以及与结合蛋白相结合的多价抗体,其中所述结合蛋白与靶细胞、组织和器官的细胞表面标记物具有反应活性。在将三种均给予动物后, PAC 将与多价抗体相结合,然后将与结合蛋白相结合,再将与靶细胞上的细胞表面标记物相结合。优选地,该结合蛋白是单特异性结合蛋白,比如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fab 融合蛋白质、单链 Fv 蛋白质(单链抗体)、单链 Fv 融合蛋白质、嵌合抗体蛋白质(例如,来源于转染瘤细胞的重组抗体蛋白质)、嵌合单链蛋白质以及其它单链融合 Fv 类似物蛋白质如单链 T-细胞受体。US 专利申请 5, 861, 156 报道说这样的单特异性结合蛋白质具有独特的穿透实体瘤并且如果没有定位于靶点具有从循环中快速清除的能力,使得它们非常适合肿瘤的治疗。该多价抗体是任何多价抗体,其包括多克隆抗体、单克隆抗体、杂双特异性 (heterobispecific) 抗体、上述任一的片段、嵌合抗体、双特异性单链抗体、同二聚体 (homodimeric) IgG 分子

等。在另一实施方案中,使用一种鸡尾酒式结合蛋白质,其中每个结合蛋白对于靶细胞上不同的表面标志具有特异性并且分别由多价抗体识别的基团(例如,肽标签)所标记从而允许以靶细胞的多个位点为靶点。该多价抗体还识别 PAC 以及所述基团。由此,因为各类靶细胞具有其自己独特的细胞表面标记物特性,与应用对于单一细胞表面标记物具有特异性的单一结合蛋白相比,PAC 可以以更高的特异性和选择性以靶细胞为靶点。

[0303] 锚定特定细胞、组织或器官的蛋白质、肽以及其它分子可通过体内淘选技术(panning technique)而确定。参见 US 专利申请 6,610,651、5,622,699 和 6,296,832,其全部公开在此引入作为参考。可确定在组织或器官中锚定细胞、组织或器官的分子,所述细胞、组织或器官是正常的或者显示出病态比如炎症或病理损害比如癌症。体内筛选包括向受试者给予(通过任何途径)分子文库,从受试者收集器官或组织样品,并使用本领域公知的各种方法确定归巢分子。通常,所选择的器官或组织将使用比如 HPLC 的方法处理,HPLC 可用于从复杂混合物获得具有确定分子量范围或极性等的浓缩馏分。然后为了确定细胞、器官或组织归巢分子的目的,可进一步使用例如 HPLC、质谱和气相色谱法分析该浓缩馏分的分子。该文库可以由天然存在的分子和/或非天然存在的分子组成并由本领域公知的方法制备。参见 US 专利申请 6,610,651。这些归巢分子可以结合于 PAC 使得该 PAC 以所需的靶细胞、组织或器官为靶点。此外,可使用重组 DNA 技术将归巢蛋白或肽和 PAC 表达为融合蛋白。该归巢分子还可用于将基因递送至靶细胞、组织和器官。由此,可使用归巢分子将编码 PAC (IPAC 或 EPAC) 的基因递送至靶细胞、组织或器官,在那里其可被表达。

[0304] B. 治疗方法和药品

[0305] 该发明提供了治疗由增强磷酸化介导的疾病和病况的方法。EPAC 可以用于治疗任何这些疾病或病况。IPAC 应仅用于治疗其中需要或可忍受细胞死亡的疾病和病况,比如癌症。本发明还提供包含 PAC 的药品。

[0306] 由增强磷酸化介导的疾病和病况包括炎症、炎症性疾病和病况、癌症、其它增生性疾病、自身免疫疾病、过敏性反应以及其它免疫疾病。

[0307] 炎症是级联的事件,通过所述的级联事件躯体对各种损伤、感染和应激反应产生应答。炎症的许多特征现象与细胞和分子水平上加强的信号转导有关。细胞信号传导的一个重要的特征是磷酸化。酶、蛋白质、肽以及其它分子通过磷酸化或脱磷酸路径而被激活。在许多情况中,当激活事件包括磷酸化时,其后为反向-脱磷酸化步骤这样受到持续刺激时可传递脉冲信号。在磷酸化酶/激酶和磷酸酶之间通常存在着平衡。在分子水平上,炎症可视为激酶的失衡。炎症涉及细胞内激酶的表达和对于细胞外膜上激酶的分泌(externalization)或激活,以及在一些情况中涉及磷酸酶的抑制,其导致增强的激酶活性。

[0308] 炎症应答是应激反应应答的关键,其抗击感染并愈合伤口,但是炎症也可以引起损伤。实际上,炎症是许多疾病和病症病原性过程的重要组成。此外,许多疾病比如癌症中存在的炎症表现出较差的预后。最终,在极端情况下,如果不适当地治疗炎症可引起危及生命的全身应答。

[0309] 如上所述,EPAC 是膜-结合的和/或循环的/可溶性的激酶在磷酸化时的底物,其中所述激酶在炎症中被增强了。EPAC 的磷酸化减少或防止了细胞外和细胞内蛋白质、肽以及其它化合物的磷酸化,所述蛋白质、肽以及其它化合物由于磷酸化将参与炎症过程。特

别地, EPAC 通过膜 - 结合激酶的磷酸化减少或防止从细胞外到内的信号转导。由此, EPAC 阻碍炎症过程并抑制炎症。

[0310] 可使用本发明 EPAC 治疗的特定炎症疾病和病况包括急性的呼吸困难综合征 (acute respiratory distress syndrome)、变态反应症 (allergies)、关节炎 (arthritis)、哮喘 (asthma)、自身免疫疾病 (autoimmune diseases) (例如, 多发性硬化 (multiple sclerosis))、支气管炎 (bronchitis)、癌症 (cancer)、克罗恩氏病 (Cronh' s disease)、囊性纤维化 (cystic fibrosis)、气肿 (emphysema)、心内膜炎 (endocarditis)、胃炎 (gastritis)、感染 (infections) (细菌、病毒、酵母、真菌和寄生感染)、炎性肠病 (inflammatory bowel disease)、炎性皮肤病 (infiammatory skin disorders)、缺血再灌注 (ischemia reperfusion)、多器官功能障碍综合症 (multiple organ dysfunction syndrome)、多器官故障 (multiple organ failure)、肾炎 (nephritis)、神经变性的疾病 (neurodegenerative diseases) (例如, 阿尔茨海默氏病 (Alzheimer' s disease)、肌萎缩性侧索硬化 (amyotropic lateral sclerosis)、亨廷顿氏舞蹈病 (Huntington' s chorea)、帕金森氏病 (Parkinson' s desease)、老年性痴呆 (senile dementia))、胰腺炎 (pancreatitis)、牛皮癣 (psoriasis)、呼吸道病毒感染 (respiratory viral infections)、脓毒症 (sepsis)、休克 (shock)、全身炎症应答综合症 (systemic inflammatory response syndrome)、创伤 (trauma)、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis) 以及其它炎性疾病、病况和病症。

[0311] 可以使用 EPAC 和 / 或 IPAC 治疗癌症。如上所述, IPAC 优选是靶向性的这样它们仅进入癌细胞。可使用本发明 EPAC 治疗的特定癌症包括癌 (carcinomas)、肉瘤 (sarcomas)、脑癌 (brain cancers)、头部和颈部癌症 (head and neck cancers)、乳腺癌 (breast cancers)、卵巢癌 (ovarian cancers)、前列腺癌 (protate cancers)、胃癌 (gastric cancers)、结肠癌 (colon cancers)、胰腺癌 (pancreatic cancers)、膀胱癌 (bladder cancers)、甲状腺癌 (thyroid cancers)、肝癌 (hepatic cancers)、肺癌 (lung cancers)、骨癌 (bone cancers)、皮肤癌 (skin cancers)、血液癌症 (blood cancers)、淋巴瘤 (lymphomas) 和白血病 (leukemias)。

[0312] 其它增生性病况包括血管增生病症、系膜细胞增生病症和纤维化病症。血管增生病症包括血管生成性 (angiogenic) 疾病和病况。血管生成的疾病或病况包括由血管生成所引起、加重或依赖血管生成的疾病或病况。血管生成是体内形成新血管的过程。可根据本发明进行治疗的特定血管生成疾病和病况包括肿瘤疾病 (例如, 肿瘤 (如, 膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌和子宫癌) 和肿瘤转移)、良性肿瘤 (例如, 血管瘤 (hemangiomas)、听神经瘤 (acoustic neuromas)、神经纤维瘤 (neurofibromas)、沙眼 (trachomas) 和致热肉芽瘤 (pyrogenic granulomas))、肥大 (例如, 甲状腺激素诱发的肥大 (cardiac hypertrophy))、结缔组织病症 (例如, 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis) 和动脉粥样硬化 (atherosclerosis))、牛皮癣、眼睛血管生成疾病 (例如, 糖尿病性视网膜病 (diabetic retinopathy)、早产儿视网膜病 (retinophthy of prematurity)、黄斑变性 (macular degeneration)、角膜的移植排斥 (corneal graft rejection)、新生血管性青光眼 (neovascular glaucoma)、新生儿晶体后纤维组织形成 (retrolental fibroplasia) 和潮红 (rubeosis))、心血管

疾病 (cardiovascular diseases)、脑血管疾病 (cerebral vascular diseases)、子宫内膜异位 (endometriosis)、息肉病 (polyposis)、肥胖症 (obesity)、糖尿病相关疾病 (diabetes-associated diseases)、血友病性关节 (hemophilic joints) 和免疫疾病 (immune disorders) (例如,慢性炎症和自体免疫)。如上所述这些肿瘤疾病可以使用 EPAC 和 / 或 IPAC 治疗。其它的血管生成疾病和病况可以使用 EPAC 治疗。本发明的 EPAC 还可用于抑制胚移植所需的血管化,由此提供一种节育的方法。

[0313] 系膜细胞增生病症是指系膜细胞的异常增生引起的病症。系膜细胞增生病症包括肾病,比如血管球性肾炎 (glomerulonephritis)、糖尿病患者肾病 (diabetic nephropathy)、恶性肾硬化 (malignant nephrosclerosis)、血栓形成性微血管病综合征 (thrombotic microangiopathy syndromes) 和肾小球病 (glomerulopathies)。恶性系膜细胞增生病症可以使用 EPAC 和 / 或 IPAC 治疗,且残存病症 (remaining disorders) 可以使用 EPAC 治疗。

[0314] 纤维化病症是指细胞外基质的异常形成。纤维化病症的例子包括肝硬化 (hepatic cirrhosis)、肺纤维化 (pulmonary fibrosis) 和动脉粥样硬化。纤维化病症可使用 EPAC 治疗。

[0315] 其它增生病症包括过度增生 (hyperproliferative) 皮肤病,比如牛皮癣、皮肤癌和表皮过度增生。牛皮癣的特征在于炎症、表皮过度增生和细胞分化的降低。皮肤癌可以使用 EPAC 和 / 或 IPAC 治疗,且残存病症可以使用 EPAC 治疗。

[0316] 可使用本发明的 EPAC 治疗的自身免疫疾病包括多发性硬化。可使用本发明的 EPAC 治疗的其它免疫疾病包括移植排斥。

[0317] 在本发明的优选实施方案中, PAC 用于治疗皮肤疾病和病况。可使用本发明的 EPAC 治疗的皮肤病和病况包括皮炎 (dermatitis)、湿疹 (eczema)、角化病 (keratosis)、弹性组织变性 (elastosis)、牛皮癣、感染 (例如,麻疹 (measles) 和水痘 (chicken pox))、粉刺 (acne)、灼伤 (burns)、晒斑 (sunburn)、过敏性反应 (allergic reactions) (例如,皮疹 (rashes) 和荨麻疹 (hives)) 以及任何其它炎性疾病或病况。如上所述皮肤癌可以使用 EPAC 和 / 或 IPAC 治疗。

[0318] 在本发明的另一优选实施方案中, PAC 用于治疗口腔疾病和病况。可使用本发明 EPAC 治疗的口腔疾病和病况包括黏膜白斑病 (leukoplakia)、扁平苔藓病 (lichen planus)、感染以及其它炎症疾病和病况。如上所述口腔癌可以使用 EPAC 和 / 或 IPAC 治疗。许多其它口腔疾病和病况比如牙龈炎 (gingivitis) 和牙周炎 (periodontitis), 通常将由牙科医生或在其监督下治疗,对于这些疾病和病况的治疗将在下面的口腔护理产品和方法部分中描述。

[0319] 在本发明的另一个优选实施方案中, EPAC 将用于治疗粘膜或涉及粘膜的疾病和病况。这些疾病和病况包括变态反应症、感染和炎性的疾病和病况。

[0320] 为了治疗患由增强磷酸化介导的疾病或病况的动物,可向该动物给予有效量 PAC 或 PAC 的组合。如上所述, EPAC 可以用于治疗任何这样的疾病或病况。

[0321] IPAC(s) 应仅用于治疗需要或可以忍受细胞死亡的疾病和病况,比如癌症。优选地,动物是哺乳动物,比如兔、山羊、狗、猫、马、牛或人类,最优选人类。

[0322] 各种 PAC 的有效剂型、给药方式和剂量可以凭经验决定,这样的决定在本领域技

术人员能力范围内。本领域技术人员应理解,剂量随着所应用的具体 PAC(s),该 PAC(s) 是否是预防性地给药或是以治疗存在的疾病或病况 而给药,所治疗的特定疾病或病况,该疾病或病况的严重程度,给药途径,组合物和 / 或用于给予该 PAC(s) 装置的类型,该 PAC(s) 的排泄速率,治疗的持续时间,同时给予该动物的任何其它药物的特性,动物的年龄、大小和物种,以及医学和兽医学领域已知的类似因素而变化。通常,本发明 PAC 的合适日剂量是该化合物能够产生疗效的最低有效剂量。如果需要,该有效的日剂量可以以两个、三个、四个、五个、六个或更多的亚剂量在全天内以适当的间隔分别给予。该 PAC(s) 的给药应持续直至实现可接受的应答。

[0323] 本发明的 PAC(s) 可以通过任何合适的给药途径向动物患者给予,用于治疗由增强磷酸化介导的疾病或病况,给药途径包括口服、经鼻、直肠、阴道、胃肠外(例如,静脉内、椎管内、腹膜内、皮下或肌内)、脑池内、透皮、经粘膜、颅内(intracranially)、大脑内(intracerebrally)以及局部给药。优选给药途径是局部给药、口服和定位(locally)给药。定位给药的例子包括颅内、进入肿瘤或癌性病变内、眼内、进入病变内、经鼻、阴道、肛门、进入肺内、进入胃肠道内和进入口腔内给药。IPAC 经常不得不全身给药以治疗癌症。如上所述,当 IPAC 全身给药时,其高度优选是靶向性的以使得其仅进入或优先进入所选择的细胞、组织或器官。

[0324] 尽管本发明的 PAC 可以单独给药,优选将该 PAC 作为药物制剂(组合物)给药。本发明的药物组合物包括作为活性成分的 PAC 或 PAC 组合与一种或多种可药用载体以及任选与一种或多种其它化合物、药物或其它原料。各载体必须是“可接受的”,其意义为与该制剂的其它成分相兼容并对动物无害。本领域公知这样的可药用载体。无论选择何种给药途径,本发明的 PAC 均通过本领域技术人员已知的常规方法配制成可药用剂型。例如参见,Remington's Pharmaceutical Sciences。

[0325] 本发明适于口服给药的制剂可以是胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、粉剂、颗粒剂的形式,或作为在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或糖浆,或作为锭剂(使用惰性基质,比如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)等,各自包含预定量的本发明化合物(compound)或一些化合物(compounds)作为活性成分。本发明的化合物还可作为大丸剂、药糖剂或糊剂给予。

[0326] 在本发明的用于口服给药(胶囊、片剂、丸剂、糖衣片、粉剂、颗粒剂等)的固体剂型中,该活性成分(即, PAC 或 PAC 的组合)与一种或多种可药用载体比如柠檬酸钠或磷酸二钙和 / 或下列的任一进行混合:(1) 填料或膨胀剂,比如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和 / 或硅酸;(2) 粘合剂,比如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯胶;(3) 湿润剂(humectants),比如甘油;(4) 崩解剂,比如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液阻滞剂(solution retarding agents),比如石蜡;(6) 吸收加速剂,比如季铵化合物;(7) 润湿剂(wetting agents),比如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯;(8) 吸附剂,比如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,比如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物;以及(10) 着色剂。就胶囊、片剂和丸剂而言,该药物组合物还可包含缓冲剂。可使用相似的固体组合物作为在软和硬-填充明胶胶囊中的填充剂,其中所述的明胶胶囊是使用乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量的聚乙二醇等作为赋形剂。

[0327] 片剂可通过任选与一种或多种助剂压制或模制而制备。制备压制片时可以使用粘合剂（例如，明胶或羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（例如，淀粉乙醇酸钠或交联的羧甲基纤维素钠）、表面活性剂或分散剂。模制片可通过在合适的机器中模制混合物而制备，其中所述的混合物是经惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物。

[0328] 本发明药物组合物的片剂和其它固体剂型比如糖衣片、胶囊、丸剂和颗粒剂，可以任选被刻痕或用包衣和外壳比如肠溶衣以及药物制剂领域公知的其它包衣来制备。它们还可经配制以提供其中活性成分的缓慢或控制释放，例如使用改变比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放特性，使用其它聚合基质、脂质体和 / 或微球体。它们可通过例如细菌 - 截留过滤器过滤而灭菌。这些组合物还可任选包含遮光剂，并且这些组合物可以是仅在或优先在胃肠道某一部分，任选以延迟的方式，释放活性成分的组合物。可使用的包埋组分的例子包括聚合物和蜡。该活性成分还可以是微囊形式。

[0329] 本发明化合物口服给药的液体剂型包括可药用乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除活性成分之外，该液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂，比如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂，比如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯醇、苯甲酸苯酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类（特别是棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油类）、甘油、四氢呋喃基醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯及其混合物。

[0330] 除惰性稀释剂之外，该口腔组合物还可以包括助剂比如润湿剂、乳剂和悬浮剂、增甜剂、调味剂、着色剂、香味剂和防腐剂。

[0331] 除活性化合物之外，悬浮液可以包含悬浮剂如乙氧基化异硬脂酰基醇 (ethoxylated isostearyl alcohols)，聚氧乙烯山梨糖醇和山梨聚糖酯、微晶纤维素、偏铝酸 (aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和黄耆胶及其混合物。

[0332] 用于直肠或阴道给药的本发明药物组合物的制剂可以是栓剂，其可以通过将一种或多种本发明化合物与一种或多种合适的无刺激性的赋形剂或载体混合制备，其中所述赋形剂或载体包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐，该栓剂在室温下是固体但在体温下是液体，因此，将在直肠和阴道腔内熔融并释放活性化合物。适于阴道给药的本发明制剂还包括子宫托剂、棉塞剂、乳剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷射制剂，其包含本领域已知的适当载体。

[0333] 本发明化合物局部、透皮或经粘膜给药的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、乳剂、洗剂、凝胶剂、溶液、补片剂 (patch)、滴剂和吸入剂。活性化合物可以在无菌条件下与可药用载体混合，并与所需的任何缓冲液或推进剂混合。

[0334] 除本发明化合物或一些化合物之外，软膏、糊剂、乳剂和凝胶剂可以包含赋形剂，比如动物和植物脂肪、油类、蜡、石蜡、淀粉、黄耆胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌或其混合物。

[0335] 除本发明化合物或一些化合物之外，粉剂和喷雾剂包含赋形剂比如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷雾剂还可包含惯常的推进剂比如氯氟烃和挥发性的未取代的烃比如丁烷和丙烷。

[0336] 活性成分（即，本发明的 PAC 或 PAC 的组合）还可使用传统透皮药物递送系统即透皮补片被递送穿过皮肤，其中该活性成分通常被包含在附着于皮肤的起药物递送装置作用的片状结构内。在这一结构中，活性成分通常包含在上背面层 (upper backing layer)



下面的层或“储存器”中。该片状装置可包含单一储存器或者它可以包含多个储存器。在一个实施方案中,该储存器包含可药用接触粘合剂材料的聚合物基质以在给药期间将该系统粘附于皮肤上。合适的皮肤接触粘合剂材料的例子包括但不限于聚乙烯、聚硅氧烷、聚异丁烯、聚丙烯酸酯、聚氨基甲酸酯等。或者,包含药物的储存器和皮肤接触粘合剂作为单独的不同层存在,其中粘合剂在储存器下面,在这种情况下,所述储存器或者可以是如上所述的聚合物基质,或者可以是液体或水凝胶储存器,或者可以采用其它的形式。

[0337] 这些层叠的背面层,其作为该装置的上表面,用作该片状结构的基本结构元件并给该装置提供了较大的柔韧性。所选择的背面材料应该对于活性成分和任何其它存在的材料基本上是不可渗透的。背面层可以是闭合的或非闭合的,这取决于在药物递送期间是否要求皮肤接触水。背面优选由柔韧的弹性体材料片或层制备。适于背面层的聚合物的例子包括聚乙烯、聚丙烯、聚酯等。

[0338] 在储存期间和使用之前,该片状结构包括一种释放衬里。在使用前,从该装置除去该衬里以暴露其基础表面,该基础表面或者是药物储存器或者是单独的接触粘合剂层,使得该系统可以粘附于皮肤。该释放衬里应由药物/赋形剂防渗材料制备。

[0339] 可以使用本领域已知的传统方法制造透皮给药装置,例如通过将粘合剂、活性成分和赋形剂的液体混合物浇铸背面层上,接着层叠释放衬里。类似地,混合粘合剂可以是浇铸到释放衬里上,接着层叠背面层。或者,药物储存器可以在不含活性成分或赋形剂的情况下制备,然后通过药物/赋形剂混合物中“浸渍”而加载。

[0340] 此外,该层叠透皮药物释放系统可以还包含透皮增强剂。也就是说,因为皮肤对某一活性成分的固有渗透性可能太低而使得透过未破损皮肤适度大小区域的药物无法达到治疗水平,就必需与这些药物共同给予皮肤透过增强剂。本领域熟知合适的增强剂。

[0341] 本发明的药物组合物可通过经鼻气雾剂或吸入剂给药。根据药剂领域公知的工艺制备这些组合物并可制备为盐水溶液,可应用苯醇或其它合适的防腐剂、增强生物利用率的吸收促进剂、推进剂比如碳氟化合物或氮气和/或其它常规的增溶剂或分散剂。

[0342] 局部给药的优选制剂是软膏和乳剂。软膏是通常基于矿脂或其它石油产品衍生物的半固体制剂。包含所选择活性药物的乳剂是本领域已知的水包油型或油包水型的粘性液体或半固体乳剂。乳剂基质是可水洗的,并且包含油相、乳化剂和水相。油相,有时还称为“内”相,通常包含矿脂和脂肪醇比如十六烷基醇或硬脂醇;该水相的体积,虽并不必需,通常超过油相,并且通常包含湿润剂。乳剂中的乳化剂通常是非离子的、阴离子的、阳离子的或两性的表面活性剂。如本领域技术人员所理解的,特定软膏或乳剂是将提供最佳的药物递送。和其它载体或赋形剂一样,软膏基质应该是惰性的、稳定的、无刺激性的且非致敏的。

[0343] 口腔给药的制剂包括片剂、锭剂、凝胶剂等。或者,口腔给药可使用本领域技术人员已知的经粘膜递送系统而起作用。

[0344] 适于胃肠外给药的本发明药物组合物包括一种或多种本发明化合物与一种或多种可药用无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳剂、或者可在使用前重新组成无菌注射液或分散液的无菌粉剂相混合,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、使得制剂与预期受者血液等渗的溶质或者悬浮剂或增稠剂。

[0345] 本发明药物组合物的合适的水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(比如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油比如橄榄油,以及可注射的有机

酯比如油酸乙酯。例如通过使用包衣物质如卵磷脂适当的流动性,对于分散剂而言使用表面活性剂维持维持所需的粒径。

[0346] 这些组合物还可包含助剂比如润湿剂、乳化剂和分散剂。在组合物中还包括等渗剂比如糖、氯化钠等也是可取的。此外,通过包含延迟吸收的试剂比如单硬脂酸铝和明胶可导致注射剂型的吸收延长。

[0347] 在一些情况中,为了延长药物的作用,从皮下注射或肌肉注射中延缓药物的吸收是可取的。这可通过使用水溶性差的晶体或无定形物质的液体悬浮液而实现。药物的吸收率取决于它的溶解速度,而溶解速度可能取决于晶体大小和晶形。或者,胃肠外给药药物的延迟吸收可通过将药物溶解于或悬浮于油性载体中而实现。

[0348] 通过药物在可生物降解聚合物比如聚交酯-聚乙交酯中形成微囊基质制备注射长效形式(injectable depot forms)。可取决于药物与聚合物的比例以及应用的具体聚合物的性质控制药物释放速率。其它可生物降解聚合物的例子包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。长效注射制剂还可通过将药物包埋在与机体组织相兼容的脂质体或微乳剂中制备。可注射的材料可以经截留细菌的滤器过滤灭菌。

[0349] 该制剂可存在于单元剂量或多剂量密封容器例如安瓿和小瓶中,并可以以冷冻干燥的状态贮存,其仅需要在使用前加入无菌液体载体例如注射用水。可以由如上所述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备临时的注射剂溶液和悬浮液。

[0350] 本发明的PAC可单独给药或可以与一种或多种其它药物、化合物或其它材料组合给药。例如,EPAC可以与一种或多种其它消炎药化合物包括甾体、非甾体消炎药化合物(例如,阿斯匹林、布洛芬等)组合给药,这些消炎药化合物描述于US专利申请09/678,202、09/922,234和10/186,168,以及PCT申请WO 01/25265、WO 02/11676和WO 02/64620中,其全部内容在此引入作为参考。

[0351] C. 切除的细胞、组织和器官

[0352] 本发明的EPAC还可以用于抑制已从动物体内移出的细胞、组织或器官中的增强磷酸化。由于炎症,细胞、组织或器官中可存在增强磷酸化。为了抑制组织或器官内增强磷酸化,使该组织或器官与包含有效量本发明EPAC或EPACs组合的溶液(例如,通过将该组织或器官放置在该溶液中和/或通过使用该溶液灌注器官(例如,肾))接触。包含于这些溶液中的EPAC的有效量可凭经验确定,并且这是在本领域技术人员能力范围内。得到的组织或器官随后可用于移植入受者体内或用于研究目的(例如,使用灌注肝筛选药物)。本发明的EPAC可单独使用或与其它化合物、药物或材料组合使用。

[0353] 已知许多适于与组织和器官一起使用的溶液,其中可使用本发明的EPAC或EPACs的组合。参见Hauet等,J. Pharmacol. Exp. Ther., 297, 946-953(2001);Hauet等,J. Pharmacol. Exp. Ther., 292, 254-260(2000);Dunphy等,Am. J. Physiol., 276, H1591-H1598(1999);Muhlbacher等,Transplant Proc., 31, 2069-2070(1999);Watts等,J. Mol. Cell. Cardiol., 31, 1653-1666(1999);Suzer等,Pharmacol. Res., 37, 97-101(1998);Collins等,Kidney Int' 1, 42, Suppl. 38, S-197-S-202(1992);Paller, Ren. Fail., 14, 257-260(1992);Baron等,J. Surg. Res., 51, 60-65(1991);Hisatomi等,Transplantation, 52, 754-755(1991);Belzer等,Transplantation, 45, 673-76(1988);US专利申请4,798,824、4,873,230、4,879,283、5,514,536和5,710,172;以及PCT申请WO

98/35551(前述全部公开在此引入作为参考)。

[0354] 例如,一种冲洗和冷藏心脏的溶液是 Celsiof™ 溶液(可以从 SangStat Medical Corp., Fremont, CA 获得)。Celsiof™ 溶液包含:

[0355] 表 A

[0356]

组分	浓度
甘露醇	60mmol
乳糖酸	80mmol
谷氨酸	20mmol
组胺酸	30mmol
氯化钙	0.25mmol
氯化钾	15mmol
氯化镁	13mmol
氢氧化钠	100mmol
还原的谷胱苷肽	3mmol
注射用水	加至 1 升

[0357] 可接受的用于保存肾脏的标准溶液是 University Of Wisconsin 溶液(可从 Barr Laboratories 获得,商标名为 ViaSpan®),其具有下列组成:

[0358] 表 B

[0359]

成分	浓度	功能
棉子糖	30 mM (17.83 g/L)	防渗透剂(Impermeant):抑制低温细胞肿胀
乳糖酸	100 mM (35.83 g/L)	防渗透剂:抑制低温细胞肿胀
Pentafraction(羟乙基淀粉)	50 g/L	胶体:减少间质浮肿和内皮细胞肿胀
谷胱苷肽	3 mM (0.992 g/L)	抗氧化剂
别嘌醇	1 mM (0.136 g/L)	抑制黄嘌呤氧化酶活性和嘌呤代谢/还原氧自由基
阿糖腺苷	5 mM (1.34 g/L)	恢复高能磷酸酯
磷酸钾	25 mM (3.4 g/L)	PH 缓冲液:维持细胞内钠和钾离子浓度:恢复高能磷酸酯
硫酸镁	5 mM	保留细胞内镁离子浓度

[0360]

	(1.23 g/L)	
氢氧化钾	100 mM (5.61 g/L)	维持细胞内钠和钾离子浓度
氢氧化钠	27 mM	维持细胞内钠和钾离子浓度
<p>使用氢氧化钠或盐酸将溶液调至 pH 7.4。</p> <p>最终：钠离子= 29 mM；钾离子= 125 mM；mOsm/L =320±10</p> <p>使用前即刻配制最终的溶液，无菌加入：青霉素 G 200,000 单位，常规胰岛素 40 单位和地塞米松 16 mg。</p>		

[0361] 本发明的 EPAC 或 EPACs 的组合可用于这两种溶液任何之一、这些溶液的变化、本领域已知的或将要开发的其它许多溶液之一。EPAC 可以包括在溶液内或单独进行供应（例如，以冷冻干燥的形式）并在使用时加入。

[0362] 从动物分离的细胞可以储存或培养在包含本发明有效量 EPAC 或 EPACs 组合的培养基中。已知许多合适的培养基。包含在培养基内的 EPAC 的有效量可以凭经验确定，并且这是在本领域技术人员的能力范围内。EPAC 可以包括在该培养基内或单独地供应（例如，以冷冻干燥的形式）并在使用时加入。所述细胞可以给予需要的受者（例如，用于基因治疗）或可以用于研究目的。

[0363] 本发明进一步提供了一种试剂盒，用于抑制已从动物体内移出的细胞、组织或器官内的增强磷酸化。该试剂盒是一种或多种容器的包装组合，其包含试剂以及可用于保存收获的细胞、组织或器官的其它物品。该试剂盒包含一种或多种本发明 EPAC 的容器。合适的容器包括瓶子、袋、小瓶、试管、注射器以及本领域已知的其它容器。例如，该试剂盒可以包括含有冷冻干燥 EPAC 的小瓶。该试剂盒还可包含本领域已知的以及基于商业和使用者的立场所希望的其它物品，比如细胞、组织或器官的容器，稀释剂，缓冲液，空注射器，输液管，纱布垫，消毒剂溶液等。该试剂盒还包含使该试剂盒应用其所包含的 EPAC 来接触细胞、组织或器官的说明书。

[0364] D. 口腔护理产品和方法

[0365] 本发明的 EPAC 还可作为口腔护理产品给予动物。口腔护理产品包括口腔护理组合物和口腔护理装置。用于本发明口腔护理产品的优选 EPAC 是至少部分脱去磷酸的卵黄高磷蛋白和酪蛋白。

[0366] 本发明口腔护理组合物包括洗液 (washes)、清洗液 (rinses)、漱口液、溶液、滴剂、乳剂、悬浮液、液体、糊剂、凝胶剂、软膏、乳剂、喷雾剂、粉剂、片剂、树胶剂 (gum)、锭剂、薄荷剂 (mints)、薄膜、补片和牙齿增白组合物。本发明口腔护理组合物包括意在用于消费者和患者使用的组合物以及意在供牙科从业人员（例如，牙科保健员、牙科医生和口腔外科医生）使用的组合物。

[0367] 本发明口腔护理组合物将包含作为活性成分的本发明 EPAC 或 EPAC(s) 以及一种或多种可药用载体的混合物。本发明口腔护理组合物还可包含一种或多种其它可接受成

分,所述成为包含其它活性化合物和 / 或其它通常用于口腔护理组合物的成分。各载体和成分必须是“可接受的”,其意义为与该制剂的其它成分相兼容并对动物无害。

[0368] 本领域公知用于口腔护理组合物的合适成分,包括可药用载体,以及口腔护理组合物的制备和使用方法。参见例如 US 专利申请 4,847,283、5,032,384、5,043,183、5,180,578、5,198,220、5,242,910、5,286,479、5,298,237、5,328,682、5,407,664、5,466,437、5,707,610、5,709,873、5,738,840、5,817,295、5,858,408、5,876,701、5,906,811、5,932,193、5,932,191、5,951,966、5,976,507、6,045,780、6,197,331、6,228,347、6,251,372 和 6,350,438, PCT 申请 W095/32707、W0 96/08232 和 W0 02/13775 以及 EP 471,396,其全部公开在此引入作为参考。用于口腔护理组合物的常规成分包括水、醇、湿润剂、表面活性剂、增稠剂、研磨剂、调味剂、甜味剂、抗菌剂、抗龋剂、抗斑剂 (anti-plaque)、抗结石剂、pH- 调节剂等。

[0369] 用于口腔护理组合物的水优选低离子含量的水。它还应不含有机杂质。

[0370] 醇必须是无毒的。优选醇是乙醇。乙醇是溶剂并还可用作抗菌剂和收敛剂。

[0371] 适于用于口腔护理组合物的湿润剂包括可食用的多元醇的比如甘油、山梨糖醇、木糖醇、丁二醇、聚乙二醇、丙二醇、甘露醇和乳糖醇。湿润剂帮助防止口腔护理组合物比糊剂接触空气时的硬化,使得口腔护理组合物在口腔中具有湿润的感觉,并且可赋予所希望的甜味。

[0372] 表面活性剂包括阴离子、非离子、两性、两性离子和阳离子的合成洗涤剂。阴离子表面活性剂包括在烷基中具有 8-20 个碳原子的烷基硫酸盐的水溶盐 (比如烷基硫酸钠),磺化的脂肪酸单甘油酯的水溶盐 (比如月桂基硫酸钠和磺酸椰子单甘油酯钠 (sodium coconut monoglyceride sulfonates)),其中所述 脂肪酸具有 8-20 个碳原子,肌氨酸盐 (比如月桂酰肌氨酸、十四酰肌氨酸、棕榈酰肌氨酸、硬脂酰肌氨酸和油酰肌氨酸的钠盐和钾盐),牛磺酸盐,较高级烷基磺基乙酸盐 (比如月桂基磺基乙酸钠),羟乙基磺酸盐 (比如月桂酰羟乙基磺酸钠),十二烷基聚氧乙烯醚羧酸钠 (sodium laureth carboxylate),十二烷基苯磺酸钠及上述混合物。优选为肌氨酸盐,因为它们能在口腔中抑制由碳水化合物降解导致的酸的形成。非离子型表面活性剂包括泊洛沙姆 (以 Pluronic 商标名出售),聚氧乙烯山梨聚糖酯 (以商标名 Tween 出售),脂肪醇乙氧基化物,烷基酚的聚氧化乙烯缩合物,由氧化乙烯与脂肪酸、脂肪醇、脂肪酰胺、多元醇和聚环氧丙烷缩合得到的产品,脂肪族醇的氧化乙烯缩合物,长链叔胺氧化物,长链叔膦氧化物,长链二烃基亚砷以及这些物质的混合物。两性表面活性剂包括甜菜碱 (比如椰油酰胺丙基甜菜碱),脂肪族的仲和叔胺衍生物,其中所述的脂肪族基可以是直链或支链的并且其中脂肪族取代基中的一个包含约 8-18 个碳原子并且一个包含阴离子水增溶基 (比如羧酸盐、磺酸盐、硫酸盐、磷酸盐或膦酸盐),以及这些物质的混合物。两性离子表面活性剂包括脂肪族季铵、磷鎓和铈化合物的衍生物,其中所述的脂肪族基可以是直链或支链的并且其中脂肪族取代基中的一个包含约 8-18 个碳原子并且一个包含阴离子水增溶基 (比如羧基、磺酸盐、硫酸盐、磷酸盐或膦酸盐)。阳离子表面活性剂包括脂肪族季铵化合物 (比如月桂基三甲基氯化铵、氯化十六烷基吡啶鎓、十六烷基三甲基溴化铵、二异丁基苯氧乙基二甲基苄基氯化铵、椰子烷基三甲基亚硝酸铵、氟化十六烷基吡啶鎓),其具有包含约 8-18 个碳原子的长烷基链。某些阳离子表面活性剂还可起抗菌剂的作用。

[0373] 增稠剂包括羧基乙烯基聚合物、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、角叉菜胶、纤维素衍生物（如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素和羟乙基纤维素）、合成黏土（laponite）、纤维素醚的水溶盐（比如羧甲基纤维素钠和羧甲基羟乙基纤维素钠）、天然树胶（比如梧桐胶、黄原胶、阿拉伯胶和黄芪胶）、聚合聚醚化合物（比如聚氧化乙烯和聚氧化化丙烯）、丙烯酸与季戊四醇烷基醚交联的均聚物、蔗糖的烷基醚、卡波姆（以 Carbopol® 商标名出售）、淀粉、交酯和乙交酯的共聚物（该共聚物具有约 1,000–120,000 的平均分子量）、胶体硅酸镁铝和精细分割的硅石。将加入足够量的增稠剂以使得口腔护理组合物具有所需的粘度。

[0374] 研磨剂包括二氧化硅（包括凝胶和沉淀）、矾土、碳酸钙、磷酸钙、磷酸二钙、磷酸三钙、羟磷灰石、焦磷酸钙、三偏磷酸盐、不溶性聚偏磷酸（比如不溶性聚偏磷酸钠和聚偏磷酸钙）、碳酸镁、氧化镁、树脂研磨剂材料（比如脲和甲醛的微粒缩合产物）、聚合树脂的微粒热凝物（合适的树脂包括三聚氰胺、酚醛塑料、脲、三聚氰胺-脲、三聚氰胺-甲醛、尿素甲醛、三聚氰胺-尿素-甲醛、交联的环氧化物和交联的聚酯）以及上述的组合。优选二氧化硅研磨剂，因为它们提供极好的牙齿的擦拭性能而不过度地磨损牙釉质或牙质。

[0375] 调味剂包括薄荷、油、留兰香油、冬青油、丁香、薄荷醇、二氢茴香脑（dihydroanethole）、草蒿脑（estragole）、水杨酸甲酯、桉叶脑、肉桂、1-醋酸薄荷酯、鼠尾草、丁香酚、欧芹油、薄荷酮、oxanone、 $\alpha$ -紫罗兰酮（irisone）、 $\alpha$ -紫罗兰酮（ionone）、茴香、马郁兰、柠檬、橙子、丙烯基乙基愈创木酚、桂皮、香草醛、乙基香兰素、麝香草酚、芳樟醇、柠檬烯、乙酸异戊酯、苯甲醛、丁酸乙酯、苯乙醇、甜味桦木、肉桂醛、肉桂醛甘油缩醛（被称为 CGA）以及上述的混合物。

[0376] 甜味剂包括蔗糖、葡萄糖（glucose）、糖精、葡萄糖（dextrose）、果糖（levulose）、乳糖、甘露醇、山梨糖醇、果糖（fructose）、麦芽糖、木糖醇、糖精盐、祝马汀、阿司帕坦、D-色氨酸、二氢查耳酮、乙酰舒泛、环己基氨基磺酸盐以及上述的混合物。

[0377] 除调味剂和甜味剂之外，该口服的护理组合物可以包含冷却剂、流涎剂、温热剂（warming agents）和麻醉剂作为任选的成分。冷却剂包括羧酰胺、薄荷醇、对薄荷烷羧酰胺（paramenthan carboxamide）、异丙基丁酰胺、缩酮、二醇、3-1-薄荷氧丙烷（menthoxypropane）-1,2-二醇、薄荷酮甘油乙缩醛、薄荷基乳酸酯及其混合物。流涎剂包括 Jambu®（Takasago 制造）。温热剂包括辣椒和烟酸酯（比如苜基烟酸酯）。麻醉剂包括苯佐卡因、利多卡因、丁香花蕾油和乙醇。

[0378] 抗菌剂和抗斑剂包括三氯生、血根碱和血根、季铵化合物、氯化十六烷吡啶、氯化十四烷基吡啶鎓和 N-十四烷基-4-乙基吡啶鎓氯化物、苯扎氯铵、bisquanides、氯己定、氯己定二葡萄糖酸盐、双辛氢啶、奥替尼啶、阿立西定、卤化二酚化合物、2,2'-亚甲基二-(4-氯-6-溴苯酚)、5-氯-2-(2,4-二氯苯氧基)-酚、水杨苯胺、度米芬、地莫匹醇、辛哌醇、其它 piperadino 衍生物、nicin、锌亚锡离子剂、抗生素（比如 augimentin、阿莫西林、四环素、多西环素、米诺环素和甲硝唑）、上述的类似物和盐以及上述的混合物。

[0379] 抗龋剂包括氟化钠、氟化亚锡、氟化钾、氟化胺、氟化钡、单氟磷酸钠、乳酸钙、甘油磷酸钙、锶盐和聚丙烯酸锶盐。

[0380] 抗结石剂包括焦磷酸盐比如焦磷酸二碱金属盐和焦磷酸四碱金属盐（例如，焦磷酸二氢二钠、焦磷酸四钠和焦磷酸四钾的水合和未水合的形式）。其它可代替焦磷酸盐的或

除焦磷酸盐之外的抗结石剂包括合成的阴离子聚合物（比如聚丙烯酸酯以及马来酐或酸与甲基乙烯基醚的共聚物）、聚氨基丙磺酸、柠檬酸锌三水合物、多磷酸盐（比如三聚磷酸盐和六偏磷酸盐）、聚膦酸酯（比如乙烷-1-羟基-1,1-二膦酸二钠盐（EHDP）、甲二磷酸、2-磷酸丁基-1,2,4-三羧酸）和多肽（例如聚天冬氨酸和聚谷氨酸）。

[0381] 本发明口腔护理组合物的 pH 优选不是酸性的。由此，本发明口腔护理组合物的 pH 值应大于约 6.5，优选地约 7.0 至约 8.5，更优选地约 7.2 到约 7.6。由此，该口服护理组合物中可能需要包括 pH 调节剂和 / 或缓冲剂。该 pH- 调节剂可以是达到所需 pH 值的任何化合物或化合物的混合物。合适的 pH- 调节剂包括有机和无机酸和碱，比如苯甲酸、柠檬酸、氢氧化钾和氢氧化钠。根据需要实现并维持所需的 pH，缓冲剂包括醋酸盐、硼酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐（例如，碱金属碳酸氢盐，比如碳酸氢钠（亦称小苏打））、葡糖酸盐、酒石酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐（比如柠檬酸钠）、苯甲酸盐、硝酸盐（比如硝酸钠和钾）以及上述的组合。

[0382] 除一种和多种 EPAC 之外，本发明的口腔护理组合物可包含一种或多种其它的消炎药、抗氧化剂和 / 或金属-结合化合物。

[0383] 合适的消炎药包括布洛芬、氟比洛芬、酮洛芬、阿司匹林、kertorolac、萘普生、吲哚美辛、吡罗昔康、甲氯灭酸、甾体以及上述的混合物。

[0384] 合适的抗氧化剂包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化酶，依布硒、谷胱甘肽、半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、青霉胺、别嘌呤醇、别嘌呤二醇、抗坏血酸、 $\alpha$ -生育酚、Trolox（水溶性  $\alpha$ -生育酚）、维生素 A、 $\beta$ -胡萝卜素、脂肪酸结合蛋白、fenozan、普罗布考、cyanidanol-3、二巯基丙醇、吲达帕胺、emoxipine、二甲亚砷等。例如参见 Das 等, *Methods Enzymol.*, 233, 601-610 (1994); Stohs, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 6, 205-228 (1995)。

[0385] 合适的金属-结合化合物包括金属-结合肽和 / 或非肽螯合剂。本领域已知金属-结合肽和非肽螯合剂。优选的金属-结合肽和非肽螯合剂描述在 PCT 申请 WO 01/25265 和 WO 02/64620 中，其全部公开在此引入作为参考。其它的金属-结合化合物是多乙撑多胺，比如四乙撑三胺（三乙撑四胺）。

[0386] 本发明口腔护理组合物可有利地包含蛋白酶抑制剂以防止 EPAC 的降解和 / 或用于其它的疗效（在口腔中某些蛋白酶涉及炎症过程而另一些与组织降解有关）。适当的蛋白酶抑制剂包含金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶抑制剂，比如描述于 US 专利申请 6,403,633、6,350,438、6066673、5,622,984 和 4,454,338 中那些化合物，这些公开在此全部引入作为参考。

[0387] 已知许多并入口腔护理组合物中的其它成分。包括悬浮剂（比如多糖 - 参见 US 专利申请 5,466,437）、可增强活性成分递送的聚合物（比如聚乙烯甲酯与马来酐的共聚物以及描述于 DE 942,643 和 US 专利申请 5,466,437 中的递送增强聚合物）、可将口腔护理组合物强烈并且持续粘附于口腔组织从而提供长期局部疗效的物质（比如天然树胶、植物提取物、动物提取物（如明胶）、天然和合成的聚合物以及淀粉衍生物，例如参见 US 专利申请 5,032,384、5,298,237 和 5,466,437）、油、蜡、硅酮、着色剂（比如 FD&C 染料）、变色系统、防腐剂（比如尼泊金甲酯、尼泊金丙酯和苯甲酸钠）、遮光剂（比如二氧化钛）、植物提取物、增溶剂（比如丙二醇，例如参见 US 专利申请 5,466,437）、酶（比如右旋糖酐酶和 / 或 mutanase、淀粉葡萄糖苷酶、葡萄糖氧化酶与乳过氧化物酶以及神经氨酸酶）、合成或天然

的聚合物、牙齿增白剂（约 0.1 重量%到约 10 重量%的过氧化物，关于牙齿增白组合物的其它讨论参见下文）、碱金属碳酸氢盐（比如碳酸氢钠（亦称小苏打），通常含有约 0.01 重量%到约重量 30%）、脱敏剂（比如钾盐（如硝酸钾、柠檬酸钾、氯化钾、酒石酸钾、碳酸氢钾和草酸钾）和锶盐）、镇痛药（比如利多卡因或苯佐卡因）、抗真菌剂、抗病毒剂等。

[0388] 将理解为可利用上述成分或者其它本领域已知或将开发的其它成分制备各式各样的不同口腔护理组合物。根据本领域的知识和此处所提供的指导，在本领域的技术范围可选择适当的成分和成分组合，并可确定包含在特定口腔护理组合物中的本发明 EPAC 的有效量。

[0389] 下列所述是一些其中加入了 EPAC 或 EPACs 组合的口腔护理组合物的例子。本领域技术人员将理解，可利用本领域的知识和技能以及此处提供的指导制备其它类型的口腔护理组合物和其它具有不同成分和 / 或不同量成分 的口腔护理组合物。

[0390] 牙膏剂 (dentifrices) 包括牙膏、牙齿凝胶剂、牙粉和液体牙膏剂。牙膏和牙齿凝胶剂通常包括牙齿研磨剂、表面活性剂、增稠剂、湿润剂、调味剂、甜味剂、着色剂和水。牙膏和牙齿凝胶剂还可包括遮光剂、抗龋剂、抗结石剂、牙齿增白剂以及其它任选成分。通常，牙膏或牙齿凝胶剂将包含约 5%至约 70%，优选约 10%至约 50%的研磨剂；约 0.5%至约 10%的表面活性剂；约 0.1%至约 10%的增稠剂；约 10%至约 80%的湿润剂；约 0.04%至约 2%的调味剂；约 0.1%至约 3%的甜味剂；约 0.01%至约 0.5%的着色剂；约 0.05%至约 0.3%的抗龋剂；约 0.1%至约 13%的抗结石剂；以及约 2%到约 45%水。牙粉当然基本上仅包含非液体组分并通常包含约 70%到约 99%的研磨剂。液体牙膏剂可包含包含水、乙醇、湿润剂、表面活性剂、增稠剂、研磨剂（如果包含研磨剂，则必需包含悬浮剂（例如，高分子量聚糖）；参见 US 专利申请 5,466,437）、抗菌剂、抗龋剂、调味剂和甜味剂。典型的液体牙膏剂将包含约 50%至约 85%水，约 0.5%至约 20%乙醇，约 10%至约 40%的湿润剂，约 0.5%至约 5%的表面活性剂，约 0.1%至约 10%的增稠剂，并可以包含约 10%至约 20%的研磨剂，约 0.3%至约 2%的悬浮剂，约 0.05%至约 4%的抗菌剂，约 0.0005%至约 3%的抗龋剂，约 0.1%至约 5%的调味剂以及约 0.1%到约 5%的甜味剂。

[0391] 凝胶剂包括牙膏剂凝胶剂（参见上面的描述）、非研磨剂凝胶剂和龈下凝胶剂。非研磨剂凝胶剂和龈下凝胶剂通常包含增稠剂、湿润剂、调味剂、甜味剂、着色剂和水。这些凝胶剂还可包含一种或多种抗龋剂和 / 或抗结石剂。通常，这些凝胶剂将包含约 0.1%到约 20%的增稠剂，约 10%至约 55%的湿润剂，约 0.04%至约 2%的调味剂，约 0.1%至约 3%的甜味剂，约 0.01%至约 0.5%的着色剂以及平衡水。这些凝胶剂还可包含约 0.05%至约 0.3%的抗龋剂和约 0.1%到约 13%的抗结石剂。

[0392] 乳剂通常包含增稠剂、湿润剂和表面活性剂，并且可以包含调味剂、甜味剂、着色剂。通常，乳剂将包含约 0.1%至约 30%的增稠剂，约 0%至约 80%的湿润剂，约 0.1%至约 5%的表面活性剂，约 0.04%至约 2%的调味剂，约 0.1%至约 3%的甜味剂，约 0.01%至约 0.5%的着色剂，以及约 2%到约 45%的水。

[0393] 适于口服使用的软膏描述于例如 US 专利申请 4,847,283、5,855,872 和 5,858,408 中，其全部公开在此引入作为参考。软膏通常包括一种或多种下列物质：脂肪、油、蜡、石蜡、硅酮、plastibase、醇、水、湿润剂、表面活性剂、增稠剂、滑石粉、膨润土、氧化锌、铝化合物、防腐剂、抗病毒化合物以及其它成分。例如，该软膏可以包含约 80%至约



90%的凡士林油和约10%到约20%的乙醇或丙二醇。作为另一例子,该软膏可以包含约10%的凡士林油,约9%的羊毛脂,约8%的滑石粉,约32%的鳕鱼肝油,以及约40%的氧化锌。作为第三个例子,该软膏可以包含约30%至约45%水,约10%到约30%的油(例如凡士林油或矿物油),约0.1%至约10%的乳化剂(例如,蜡NF),约2%至约20%湿润剂(例如,丙二醇),约0.05%至约2%的防腐剂(例如,尼泊金甲酯和尼泊金丙酯),以及约10%到约40%的甾醇。

[0394] 嗽口水、清洗剂、漱口剂和喷雾剂通常包含水、乙醇和/或湿润剂,并优选同时包含表面活性剂、调味剂、甜味剂和着色剂,还可包含增稠剂和一种或多种抗龋剂和/或抗结石剂。一种典型组合物包含约0%至约80%的湿润剂,约0.01%至约7%的表面活性剂,约0.03%至约2%的调味剂,约0.005%至约3%的甜味剂,约0.001%到约0.5%的着色剂,并用水平衡。另一典型组合物包含约5%至约60%,优选约5%至约20%的乙醇,约0%至约30%、优选约5%到约20%的湿润剂,约0%至约2%的乳化剂,约0%至约0.5%的甜味剂,约0%到约0.3%的调味剂,以及平衡水。另一种典型组合物包含约45%至约95%的水,约0%至约25%的乙醇,约0%至约50%的湿润剂,约0.1%至约7%的表面活性剂,约0.1%至约3%的甜味剂,约0.4%至约2%的调味剂,以及约0.001%到约0.5%的着色剂。这些组合物还可包含约0.05%至约0.3%的抗龋剂,以及约0.1%到约3%的抗结石剂。

[0395] 溶液通常包含水、防腐剂、调味剂以及甜味剂,并可以包含增稠剂和/或表面活性剂。通常,溶液包含约85%至约99%的水,约0.01%至约0.5%的防腐剂,约0%至约5%的增稠剂,约0.04%至约2%的调味剂,约0.1%至约3%的甜味剂,并且约0%到约5%的表面活性剂。

[0396] 锭剂和薄荷剂通常包含基质、调味剂和甜味剂。该基质可以是糖果基质(砂糖糖果)、甘油胶或使用足够的粘质所形成的糖的组合。参见US专利申请6,350,438和Remington, The Science And Practice Of Pharmacy, 19th edition(1995)。锭剂组合物通常还包含一种或多种填料(例如,可压缩糖)和润滑剂。

[0397] 口香糖、咀嚼片以及咀嚼锭剂描述于US专利申请6,471,991、6,296,868、6,146,661、6,060,078、5,869,095、5,709,873、5,476,647和5,312,626,PCT申请WO 84/04453和WO 99/02137以及Lieberman等,Pharmaceutical Dosage Forms, 2nd ed. (1990)中,其全部公开在此引入作为参考。

[0398] 作为一个例子,压缩咀嚼片包含水可崩解的、可压缩的碳水化合物(比如甘露醇、山梨糖醇、麦芽糖醇、葡萄糖、蔗糖、木糖醇、乳糖及其混合物)、粘合剂(比如纤维素、纤维素衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、改性淀粉及其混合物)、和任选的润滑剂(比如硬脂酸镁、硬脂酸、滑石粉和蜡)、甜味剂、着色剂和调味剂、表面活性剂、防腐剂以及其它成分。包括本发明EPAC的所有成分,均经干燥混合压制成片。

[0399] 作为另一例子,咀嚼片可以包含一个片芯,其被包裹该片芯的外层围绕。该芯可以包含本发明EPAC或EPACs,以及任选地包含凝胶基质和咀嚼基质中的其它成分。该外层可以是咀嚼基质。凝胶基质可以包含果胶、山梨糖醇、麦芽糖醇、异麦芽糖醇、液状葡萄糖、糖、柠檬酸和/或调味剂。该片芯或外层的咀嚼基质可以是树胶、软糖果、牛乳糖、焦糖或硬糖果。挤压片芯和外层以形成绳状(rope),接着切割该绳以形成片剂。

[0400] 口香糖组合物通常包含树胶碱、调味剂和甜味剂。合适的树胶基质包括节路顿胶、

橡胶、乳液、糖胶树胶和维尼莱特树脂 (vinylite resin), 可合意地使用常规的增塑剂或软化剂。增塑剂包括三乙酸甘油酯、柠檬酸乙酰基三丁酯、癸二酸二乙酯、柠檬酸三乙酯、癸二酸二丁酯、丁二酸二丁酯、邻苯二甲酸二乙酯和乙酰化单甘油酯。通常, 口香糖组合物包含约 50% 至约 99% 树胶基质, 约 0.4% 至约 2% 的调味剂和约 0.01% 到约 20% 的甜味剂。将本发明的 EPAC 以及其它活性成分加入树胶基质的方法, 例如通过将其搅拌加入酯温热的树胶基质和将其包衣在树胶基质的外表面。

[0401] 薄膜和片材以及在口腔中形成固体的凝胶, 可由丙交酯 / 乙交酯共聚物制备, 描述于 US 专利申请 5, 198, 220、5, 242, 910 和 6. 350, 438。其它适用于口腔的聚合物薄膜描述于 PCT 申请 WO 95/32707 中。粘附于坚硬牙齿表面比如牙齿和假牙以及在口腔中降解的贴片, 描述于 US 专利申请 6, 197, 331 中。所有这些物质缓慢地将包含其中的活性剂释放于口腔中。还已知提供活性物质的缓释的其它组合物 (包括糊剂、凝胶剂、软膏、液体制剂和薄膜)。例如参见 US 专利申请 5, 032, 384、5, 298, 237、5, 466, 437、5, 709, 873 和 6, 270, 781。

[0402] 牙齿增白组合物将包含牙齿增白剂。牙齿增白剂包括过氧化物、碱和碱土金属的过碳酸盐和过硼酸盐或包含过氧化氢的络合物。牙齿增白剂还包括碱或碱土金属的过氧化物盐。最常使用的牙齿增白剂是过氧化氢脲。其它通常使用的牙齿增白剂是过氧化氢、过乙酸和高硼酸钠。这些牙齿增白剂释放活性氧和过氧化氢。牙齿增白剂在牙齿增白组合物中的浓度约为 0.1% 至约 90% 的话; 通常, 过氧化氢脲在牙齿增白组合物中的浓度约为 10% 至 25%。

[0403] 本领域已知许多牙齿增白组合物, 包括水溶液、凝胶剂、糊剂、液体制剂、薄膜、条带、一部分系统、二部分系统、需要活化牙齿增白剂的组合物 (例如, 通过吸附辐射能量或热能量的吸收物质, 实际上是例如共轭烃, 当照射时其激活漂白剂) 等。参见例如 US 专利申请 5, 302, 375、5, 785, 887、5, 858, 332、5, 891, 453、5, 922, 307、6, 322, 773、6, 419, 906, 以及 PCT 申请 W099/37236、W001/89463 和 WO 02/07695, 其全部公开在此引入作为参考。此外, 许多其它口服护理组合物 (例如, 牙膏) 和装置 (例如, 牙线) 包含牙齿增白组合物。

[0404] 使用牙齿增白组合物或使用包含牙齿增白剂的许多口腔护理组合物和装置中的一种, 可引起活性氧物 (ROS) 的生成并可引起口腔组织炎症。在牙齿增白组合物以及其它包含牙齿增白剂的口腔护理组合物和装置中加入 EPAC 或 EPACs 将减少或预防炎症, 并还将减少 ROS 的生成 (如上所述, 一旦磷酸化, 该 EPAC 结合金属离子并由此减少 ROS 的生成)。这些组合物中包含的 EPAC 或 EPACs 还可引起更有效的增白, 因为过氧化氢 (其是使用过氧化氢型增白剂增白牙齿的原因, 并在金属离子存在下转变为羟基) 可能无法转变为羟基 (由于磷酸化的 EPAC 结合了金属例子), 并因此将保持比较久的活性。可选择地, 包含 EPAC 或 EPACs 的口腔护理组合物或装置可在牙齿增白组合物或包含牙齿增白剂的口腔护理组合物或装置之前或之后使用, 从而减少或预防炎症以及可能的 ROS 生成。

[0405] 例如, 通常通过齿托或齿槽将牙齿增白组合物应用于牙齿从而增白牙齿。本发明的 EPAC 或 EPACs 可加入在齿托或齿槽中使用的牙齿增白组合物中。或者, 可以在完成牙齿增白组合物应用后, 将包含本发明 EPAC 或 EPACs 的单独组合物应用于在干净或不同的齿托或齿槽中的牙齿。在另一种选择中, 可以在应用牙齿增白组合物之前和 / 或之后使用包含本发明 EPAC 或 EPACs 的洗剂或清洗剂漂洗口腔。

[0406] 最近开发的用于牙齿增白的产品是一种柔韧的条带。参见例如 US 专利申请

5, 891, 453 和 6, 419, 906。EPAC 或 EPACs 可加入这样的条带中。例如在制造过程中或应用于患者之前, EPAC 可加入牙齿增白组合物中, 然后将其用于条带中, 或者可将包含 EPAC 的溶液、凝胶或其它组合物单独应用于条带。在另一种选择中, 包含牙齿增白组合物的条带和包含 EPAC 的条带可都提供给患者并相继使用。

[0407] 本发明口腔护理组合物可以包含单相或多相。例如当一些成分不相兼容、一些成分不稳定或在使用时成分为最优组合时, 将使用多相。由此, 多相中的一相将包含某些成分, 而其余的成分将包含于一种或多种其它相中。多相可以是许多的单独组合物, 无论在何种情况下多相将在许多的单独容器中或单一容器的许多隔室中被提供, 且该多相将在使用时合并。作为一种选择, 多相可通过封装一些成分而形成, 无论在何种情况下, 多相可以全部包含于单一容器。多相口腔护理组合物描述于例如 US 专利申请 5, 302, 375、5, 906, 811、5, 976, 507、6, 228, 347 和 6, 350, 438 以及 PCT 申请号 W099/37236 中。

[0408] 本发明还提供包含 EPAC 或 EPACs 的口腔护理装置。本发明口腔护理装置包括设计供消费者和患者使用的装置和设计供牙科专业人员 (例如牙科保健员、牙科医生和口腔外科医生使用的装置) 使用的装置。

[0409] 本发明口腔护理装置包括具有粘附、吸附、结合、附着、包埋、涂布或者加入了 EPAC 或 EPACs 的外科材料 (比如缝合线 (sutures) 和海绵 (sponges))、丝线 (flosses)、带子 (tapes)、碎片 (chips)、条带 (strips)、纤维 (fibers)、牙签 (toothpick) 或橡胶塞子 (rubber tip)、牙齿植入物 (dental implants) 和牙齿用具 (dental appliances) (例如安装并覆盖牙齿和任选地覆盖牙周组织的齿托和齿槽)。例如参见 US 专利申请 5, 709, 873、5, 863, 202、5, 891, 453、5, 967, 155、5, 972, 366、5, 980, 249、6, 026, 829、6, 080, 481、6, 102, 050、6, 350, 438、6, 419, 906、PCT 申请 W0 02/13775 以及 EP 申请 752833, 其描述了向其中加入化合物的这样的口腔护理装置和方法 (这些公开在此全部引入作为参考)。例如, 可以将 EPAC 或 EPACs 加入到粘合剂 (例如, 蜡或聚合物) 和涂布到牙线上, 牙线可以在包含 EPAC 或 EPACs 的液体槽中浸渍吸收或使用化合物进行涂布, 固态的 EPAC 或 EPACs (例如冷冻干燥的) 可以加入到适于应用于牙齿的聚合物膜中, EPAC 或 EPACs 溶液或胶体可应用于适于应用于牙齿的柔韧条带中, 或者, 缝合线或其它外科材料可吸收包含 EPAC 或 EPACs 的溶液随后除去溶剂使得化合物与该缝合线或外科材料相连 (结合、包埋、涂布等)。参见例如 US 专利申请 5, 891, 453、5, 967, 155、5, 972, 366、6, 026, 829、6, 080, 481、6, 102, 050 和 6, 419, 906。

[0410] 用于动物的口腔护理产品比如食物、咀嚼物和玩具也包括在本发明范围内。适宜的产品描述于 US 专利申请 6, 350, 438 中。

[0411] 本发明的 EPAC 或 EPACs 可以用于治疗动物口腔组织以抑制增强磷酸化。在此所用的“口腔”意指外面由唇里面由咽限定的包括舌头、齿龈和牙齿的腔。由此, 口腔组织包括唇、舌头、齿龈、颊组织、腭和牙齿。可根据本发明治疗口腔的单一组织、多个组织、一种或多种组织的部分、所有或基本上所有的组织或上述的组合。

[0412] 为了治疗口腔组织, 使该组织与本发明的 EPAC 或 EPACs 相接触。例如接触包含 EPAC 的口腔护理组合物。本领域公知使口腔组织与口腔护理组合物接触的方法。合适的方法包括使用溶液 (例如, 嗽口水、清洗剂、喷雾剂、液体牙膏剂或其它溶液) 漂洗该组织, 使用牙膏剂 (例如, 牙膏、牙齿凝胶或粉剂) 洗刷牙齿, 将非研磨剂溶液、凝胶、糊剂、乳剂或软

膏直接应用于组织（使用或不使用涂药器）、口香糖、咀嚼或吸入的锭剂、薄荷或片剂以及许多其它局部施用的方法。将口腔护理组合物比如溶液、凝胶剂、糊剂、乳剂和软膏应用于组织的适合的涂药器包括药签、小棒、塑料搅棒、滴管、注射器、条带（比如描述于US专利申请5,891,453和6,419,906）、指状物或者齿托或允许将牙齿以及任选地牙周组织浸润于例如凝胶或溶液中的装置（比如US专利申请5,863,202和5,980,249以及EP申请752833）。此外，为了治疗口腔组织，可以将组织与包含EPAC的口腔护理装置接触。本领域公知使口腔组织与口腔护理装置接触的方法。例如，缝合线可以用于封闭外科伤口或由于拔牙引起的伤口，牙线可以用于缠绕牙齿等。

[0413] 对组织的治疗可以是预防治疗。例如，该组织可以作为预防性口腔护理方案的一部分进行治疗。可以将EPAC加入口腔护理组合物或装置中，比如牙膏、牙齿凝胶、漱口水或清洗剂或牙线，其被应用于这样的体系中并将经常使用，优选至少每天一次，更优选每天两或三次。在另一种选择中，EPAC(s)可包含于单独的口腔护理组合物或装置中，其将与应用于该预防性口腔护理体系中的其它组合物和装置分开使用。例如，EPAC(s)可加入漱口水或清洗剂、树胶、锭剂或咀嚼片中，其将经常使用，优选至少每天一次，更优选至少每天两或三次。

[0414] 还可对组织进行与各种牙科过程有关的预防性治疗，这些牙科过程包括手术和拔牙。例如，正在进行手术的组织、正在进行手术处周边的组织或，为了方便治疗，全部或基本上全部的口腔组织可以在手术之前、手术期间、手术之后或其组合进行治疗。类似地对于拔牙而言，所拔牙齿的周围组织、相邻组织或，为了方便治疗，全部或基本上全部的口腔组织在拔牙之前、拔牙期间、拔牙之后或组合进行治疗。例如，可以在手术或拔牙之前使用包含EPAC(s)的溶液漂洗口腔，手术或拔牙引起的伤口可经其中加入了EPAC(s)缝合线缝合，和/或可在手术或拔牙之后立即和/或此后不时地使用包含EPAC(s)的溶液漂洗口腔。最后，如上所述，可对组织进行与动物牙齿增白有关的预防性治疗。

[0415] 本发明的EPAC或EPACs还可用于治疗动物口腔组织内由增强磷酸化介导的疾病或病况。可根据本发明治疗的特定疾病和病况包括炎症和炎性疾病和病况，比如牙周组织炎症、龈炎、牙周炎、感染（细菌感染、病毒感染、酵母感染和真菌感染）、溃疡（ulcer）、唇疱疹（cold sore）、口疮（canker sore）和伴随手术或拔牙的炎症。对于口腔的其它疾病和病况比如癌症的治疗通常是由内科医生而不是牙科医生实施或监督实施的。因此，这些疾病和病况的治疗涉及上面讨论的治疗方法和药品。但是，在这些类型的口腔疾病和病况的治疗中，同时使用本发明的口腔护理产品和本发明的药物将是有益的。

[0416] 本领域技术人员会理解到治疗动物口腔组织所需的EPAC(s)剂量将随着所用的特定EPAC、对于所治疗的疾病或病况是否是预防性的或是治疗性的、所治疗的疾病或病况的特性、该疾病或病况的严重程度、所用口腔组合物类型、治疗的持续时间、给予该动物的任何其它药物的特性、动物的年龄、大小和物种等医学和兽医学领域所知的因素而变化。通常，本发明化合物的合适日剂量是该化合物能够产生疗效的最低有效剂量。期望包含约0.000001%到约20%的EPAC或EPACs的口腔护理组合物每天一次或多次的用法将提供有效的日剂量。但是，所应用的实际日剂量、治疗的天数以及治疗的长短将由护理牙医或兽医在健全的医学判断范围内确定。

[0417] 该发明还提供一种包含本发明口腔护理产品的试剂盒。当该口腔护理产品是一种

口腔护理组合物时,该试剂盒还可包括用于将该口腔护理组合物施于动物口腔组织的涂药器,比如药签、小棒、塑料搅棒、滴管、注射器、条带(比如描述于US专利申请5,891,453和6,419,906)或者齿托或允许将牙齿以及任选地牙周组织浸润于例如凝胶或溶液中的装置(比如US专利申请5,863,202和5,980,249以及EP申请752833)。该试剂盒还可包括杯子、小瓶或用于分配和/或测量本发明口腔护理组合物预期需要的用量的其它装置。当然,试剂盒可以包括根据本发明的口腔护理组合物和根据本发明的口腔护理装置。除本发明口腔护理组合物和/或装置外,该试剂盒还可包含另一类型口腔护理组合物或装置,比如牙齿增白组合物,包含牙齿增白剂的条带,施用口腔护理组合物的涂药器等。根据本发明的试剂盒还将包含使用本发明的试剂盒和/或口腔护理产品的说明书并可包含任何其它所需的物品。

#### [0418] E. 个人的护理产品和方法

[0419] 本发明的EPAC还可作为个人的护理产品给予动物。个人的护理产品包括个人的护理组合物和个人的护理装置。

[0420] 本发明个人的护理组合物与装置包括为消费者和患者设计的组合物与装置以及为从业人员(例如皮肤科医生、美容院和spas)设计的组合物与装置。用于本发明个人的护理产品中的优选EPAC是至少部分脱去磷酸的卵黄高磷蛋白和酪蛋白。

[0421] 个人的护理组合物包括化妆品、护肤霜和洗剂,面部和身体补湿器,晒黑乳剂和洗剂,油类,洗剂,清洗剂,溶液,眼药水,乳剂,液体,凝胶剂,软膏,喷雾剂,粉剂,除臭剂,洗发剂,治疗头皮组合物,唇彩(lip glosses),唇香膏(lip balms),抗粉刺制剂,镇痛药等。

[0422] 本发明个人的护理组合物包含EPAC或EPACs和可药用载体。该个人的护理组合物还可包含一种或多种其它可接受的成分,所述成分包括其它活性化合物和/或其它通常用于个人的护理组合物内的成分。各载体和成分必须是“可接受的”,其意义在于与EPAC(s)和该组合物中任何其它成分相兼容且对动物无害。本领域公知用于个人的护理组合物的合适成分以及制备和使用个人的护理组合物的方法。

[0423] 本领域公知各式各样的适用于皮肤护理组合物中的载体。例如,可以使用乳液载体(包括水包油型、油包水型、水包油包水型和硅胶包水包油型乳液)。这些乳剂可覆盖较大的粘度范围(例如,约100厘泊(cps)到约200,000cps)。其它合适的载体包括:无水液体溶剂,比如油类、醇和硅酮(例如,矿物油、乙醇、异丙醇,二甲聚硅氧烷、环甲基硅酮、等);以水为基础的单相液体溶剂(例如,水-酒精性溶剂体系);以及这些无水和以水为基础的单相溶剂的增稠形式(例如,通过加入适当的树胶、树脂、蜡、聚合物、盐等使得溶剂的粘度增加以形成固体或半固体)。载体优选包含以重量计约50%至约99%的该皮肤护理组合物,更优选约75%至约99%,最优选约85%到约95%。

[0424] 本领域还公知各式各样适用于毛发护理组合物中的载体。例如,可使用水、醇(例如,甲醇、乙醇和异丙醇)及其混合物。该载体还可以包含各式各样的其它材料,包括丙酮、烃(例如,异丁烷、己烷、癸烯)、芳樟醇、酯(例如,乙酸乙酯和邻苯二甲酸二丁酯)、挥发性的硅酮衍生物(例如,硅氧烷,比如苯基五甲基二硅氧烷、甲氧基丙基七甲基环四硅氧烷、氯丙基五甲基二硅氧烷、羟丙基五甲基二硅氧烷、八甲基环四硅氧烷、十甲基环戊硅氧烷、环甲基硅酮和二甲聚硅氧烷)及其混合物。低粘度的毛发护理产品还可利用乳化剂(优选在以组合物重量计的约0.01%到约7.5%)。载体将包含以重量计约0.5%至约99.5%的

该毛发护理组合物,优选约 5.0%至约 99.5%,更优选约 10.0%到约 98.0%。

[0425] 除 EPAC(s) 和载体外,本发明个人的护理组合物可以包含各式各样的其它成分。这些其它成分包括药学活性成分(例如,抗粉刺活性物、止痛活性物、止痒活性物、麻醉活性物和抗菌活性物)、其它活性成分(例如,遮光活性物、防晒晒黑活性物(sunless tanning actives)、皮肤漂白剂活性物、抗头屑活性物、止汗药活性物和除臭剂活性物)、调节剂、湿润剂、补湿剂、表面活性剂、增稠剂、润肤剂以及常用于个人的护理组合物的其它成分。

[0426] 如上所述,可归入本发明个人护理组合物的这些药学上活性成分除 EPAC 外,包括抗粉刺活性物、止痛活性物、止痒活性物、麻醉活性物和抗菌活性物。本领域已知或可凭经验确定组合物中包含的这些成分的量。合适的剂量将随着例如特定的活性成分、组合物中活性成分穿透皮肤的能力、所应用组合物的量、所治疗的特定病况、治疗的持续实践、共存疗法的性质等因素而变化。

[0427] 抗粉刺活性物包括角质层分离药(比如水杨酸、硫、乳酸、乙醇酸、丙酮酸、脲、间苯二酚和 N-乙酰半胱氨酸)、类视色素(比如维生素 A 酸及其衍生物)、抗生素和抗微生物药(比如过氧苯甲酰、羟甲辛吡酮、红霉素、锌、四环素、三氯生、壬二酸及其衍生物、苯氧基乙醇、苯氧基丙醇、乙酸乙酯、克林霉素和甲氯环素)、sebastats(例如 flavinoids)、 $\alpha$  和  $\beta$  羟酸以及胆汁盐(比如鲨胆甾醇硫酸盐及其衍生物、脱氧胆酸盐和胆盐)。

[0428] 止痛活性物包括水杨酸衍生物(比如水杨酸甲酯)、辣椒属物质和衍生物(比如辣椒辣素)、甾体(比如氢化可的松)和非类固醇的消炎药药物(NSAIDs)。该 NSAIDs 可以选自下列的种类:丙酸衍生物(阿斯匹林、扑热息痛、布洛芬、萘普生、苯噻洛芬、氟比洛芬、非诺洛芬、芬布芬、酮洛芬、吲哚洛芬、吡洛芬、卡洛芬、奥沙普秦、普拉洛芬、咪洛芬、硫噻洛芬、舒洛芬、阿明洛芬、噻洛芬酸、氟洛芬和布氯酸)、乙酸衍生物、灭酸衍生物、二苯羧酸衍生物和昔康。

[0429] 止痒活性物包括 methdilazine 和异丁嗪的可药用盐。

[0430] 麻醉活性物包括利多卡因、布比卡因、盐酸氯普鲁卡因、辛可卡因、依替卡因、甲哌卡因、丁卡因、达克罗宁、海克卡因、普鲁卡因、可卡因、氯胺酮、丙吗卡因和酚的可药用盐。

[0431] 抗菌(抗菌的、抗真菌的、抗原生动物的和抗病毒)活性物包括  $\beta$ -内酰胺、喹诺酮、环丙沙星、诺氟沙星、四环素、红霉素、阿米卡星、三氯生、多西环素、卷曲霉素、氯己定、氯四环素、土霉素、克林霉素、乙胺丁醇、甲硝唑、戊烷脒、庆大霉素、卡那霉素、lineomycin、美他环素、乌洛托品、米诺环素、新霉素、奈替米星、巴龙霉素、链霉素、妥布霉素、咪康唑、amanfadine、羟甲辛吡酮、对氯间二甲苯酚、制霉菌素、发癣退和克霉唑的可药用盐。

[0432] 遮光剂包括 2-乙基己基对甲氧基肉桂酸酯、2-乙基己基 N,N-二甲基对氨基苯甲酸酯、对氨基苯甲酸、2-苯基苯并咪唑-5-磺酸、氰双苯丙烯酸辛酯、羟苯甲酮、水杨酸三甲环己酯、水杨酸辛酯、4,4'-甲氧基-叔丁基二苯甲酰基甲烷、4-异丙基二甲酰基甲烷、3-苯亚甲基樟脑、3-(4-甲基苯亚甲基)樟脑、二氧化钛、氧化锌、二氧化硅、氧化铁及其混合物。其它的遮光剂剂包括那些在单一分子中具有两个不同的发色团部分的化合物,其中所述两个发色团部分表现出不同的紫外线吸收光谱(一个主要在 UVA 范围内吸收,一个吸收主在 UVB 范围内吸收),比如 2,4-二羟基苯甲酮的 4-N,N-(2-乙基己基)甲基氨基苯甲酸酯、4-羟基二苯甲酰基甲烷的 4-N,N-(2-乙基己基)甲基氨基苯甲酸酯、2-羟基-4-(2-羟

乙氧基)二苯甲酮的 4-N, N-(2-乙基己基)甲基氨基苯甲酸酯、4-(2-羟乙氧基)二苯甲酰基甲烷的 4-N, N-(2-乙基己基)甲基氨基苯甲酸酯及其混合物。也参见 PCT 申请 WO 03/013468, 其中描述了其它合适的遮光剂。通常, 该遮光剂将包含以组合物重量计约 0.5% 到约 20%。确切的量将取决于所选择的遮光剂和所需的太阳保护因子 (SPF) 而改变。SPF 是通常使用的遮光剂抗红斑的光保护作用的测量尺度。参见 Federal Register, 43 卷, No. 166, 38206-38269 页, August 25, 1978。

[0433] 防晒晒黑活性物包括二羟丙酮、甘油醛、吡啶和其衍生物等。

[0434] 皮肤漂白剂活性物包括氢醌、抗坏血酸、曲酸和焦亚硫酸钠。

[0435] 抗头屑活性物包括巯氧吡啶锌、羟甲辛吡酮、二硫化硒、硫、煤焦油等。

[0436] 止汗药活性物包括收敛剂金属盐类, 比如铝、锆和锌及其混合物的无机和有机盐。

[0437] 除臭剂活性物包括抑菌剂(例如, 2,2'-亚甲基二(3,4,6-三氯苯酚)、2,4,4'-三氯-2'-羟基(二苯基醚)(还称为三氯生)、苯酚磺酸锌、2,2'-硫代二(4,6-二氯苯酚)、对-氯-间-二甲苯酚、二氯-间-二甲苯酚、N-月桂酰肌氨酸钠、N-棕榈酰肌氨酸钠、月桂酰肌氨酸、N-十四酰甘氨酸、N-月桂酰肌氨酸钾、氯羟基乳酸铝等)。

[0438] 可用于组合物尤其是毛发护理组合物中的调节剂包括烃、硅酮液体和阳离子材料。该烃可以是直链或支链并可以包含约 10 到约 16 个碳原子。合适的烃的例子包括癸烷、十二烷、十四烷、十三烷及其混合物。硅酮调节剂包括环状或线性聚二甲硅氧烷、苯基和烷基苯基硅氧烷以及硅氧烷共聚醇 (silicone copolyol)。阳离子调节剂包括季铵盐(例如, 二烷基二甲基铵盐, 其中所述烷基具有 12-22 个碳原子(比如二牛油二甲基氯化铵、二牛油二甲基甲硫酸铵、二己基二甲基氯化铵和二(氢化牛脂)氯化铵)和双阳离子物(比如牛脂丙烷二氯二铵))、四元的咪唑鎓盐(例如, 包含具有 12-22 个碳原子烷基的咪唑鎓盐(比如 1-甲基-1[(硬脂酰胺)乙基]-2-十七基-4,5-二氢咪唑鎓氯化物、1-甲基-1[(棕榈酰胺)乙基]-2-十八烷基-4,5-二氢咪唑鎓氯化物、1-甲基-1[(牛脂酰胺)乙基]-2-牛脂-咪唑鎓甲基硫酸酯)) and 脂肪族胺的盐(例如, 硬脂酰胺盐酸盐、大豆胺盐酸盐和硬脂酰胺甲酸盐)。

[0439] 湿润剂和润湿剂包括脲、胍、羟乙酸和羟乙酸盐(例如, 铵和季烷基铵)、乳酸和乳酸盐(例如, 铵和季烷基铵)、各种形式的库拉索芦荟 (aloe vera) (例如芦荟凝胶)、多羟基醇(例如, 山梨糖醇、甘油、己三醇、丙二醇、丁二醇、己二醇等)、聚乙二醇、糖和淀粉、糖和淀粉衍生物(例如, 烷氧基化葡萄糖)、透明质酸、乳酰胺单乙醇胺、乙酰胺单乙醇胺及其混合物。这些试剂通常为以组合物重量计约 0.1% 到约 20% 存在。

[0440] 组合物中有助表面活性剂包括阴离子、非离子的、阳离子的、两性离子的和两性表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂包括长链硫酸盐、磺酸盐、羟乙基磺酸盐、羧酸盐、牛磺酸盐以及磺基丁二酸盐, 比如烷基甘油基醚磺酸盐、月桂烷硫酸铵、十二烷基聚氧乙烯醚硫酸铵、三乙胺月桂基硫酸酯、三乙胺十二烷基聚氧乙烯醚硫酸酯、三乙醇胺月桂基硫酸酯、三乙醇胺十二烷基聚氧乙烯醚硫酸酯、单乙醇胺月桂基硫酸酯、单乙醇胺十二烷基聚氧乙烯醚硫酸酯、二乙醇胺月桂基硫酸酯、二乙醇胺十二烷基聚氧乙烯醚硫酸酯、月桂酸单甘油酯硫酸钠、月桂基硫酸钠、十二烷基聚氧乙烯醚硫酸钠、月桂基硫酸钾、十二烷基聚氧乙烯醚硫酸钾、月桂基肌氨酸钠、月桂酰肌氨酸钠、月桂基肌氨酸、椰油基肌氨酸、椰油基硫酸铵、月桂酰硫酸铵、椰油基硫酸钠、月桂酰硫酸钠、椰油基硫酸钾、月桂基硫酸钾、三乙醇胺

月桂基硫酸酯、单乙醇胺椰油基硫酸酯、单乙醇胺月桂基硫酸酯、十三烷基苯磺酸钠和十二烷基苯磺酸钠。对于阳离子表面活性剂,参见 US 专利申请 5,916,548 并且引用其中的参考文献。非离子型表面活性剂包括由氧化烯基团(性质为亲水性的)与有机疏水化合物缩合而制备的化合物,其中所述的有机疏水化合物可以是脂肪族的或烷基芳香族化合物。两性的和两性离子表面活性剂包括甜菜碱,比如氨基羧基甜菜碱(amidocarboxybetain)、烷基甜菜碱、氨基丙基甜菜碱、amidopropyl sultaine 和磺基甜菜碱。其它的两性或两性离子表面活性剂包括脂肪族季铵、硫鎓衍生物,其中所述脂肪基团可以是直链或支链的并且其中所述脂肪族取代基中的一个包含约 8-18 个碳原子并且一个包含阴离子水增溶基(例如,羧基、磺酸盐或硫酸盐)。两性和两性离子表面活性剂还包括脂肪族仲胺和叔胺衍生物,其中所述脂肪基团可以是直链或支链且其中所述脂肪族取代基中的一个包含约 8-18 个碳原子并且一个包含阴离子水增溶基(例如,羧基、磺酸盐或硫酸盐),比如 3-十二烷基-氨基丙酸钠、3-十二烷基氨基丙磺酸钠和 N-烷基牛磺酸。该表面活性剂或表面活性剂混合物通常为以组合物重量计的约 0.2% 到约 30% 存在。

[0441] 增稠剂包括羧酸聚合物(描述于 US 专利申请 5,916,548 中,其全部公开在此引入作为参考)。这些交联聚合物包含一种或多种单体,所述单体来源于丙烯酸、取代丙烯酸和盐以及这些丙烯酸和取代丙烯酸的酯,其中交联剂包含两个或更多碳-碳双键并来源于多元醇。这些聚合物的特定实施例是卡波姆,其是丙烯酸与蔗糖或季戊四醇的烯丙基醚的交联均聚物(作为 **Carbopol®** 900 系列购自 B. F. Goodrich),以及 C<sub>10-30</sub> 烷基丙烯酸酯与一种或多种丙烯酸、甲基丙烯酸或它们短链(C<sub>14</sub> 醇)酯的一个的共聚物,其中交联剂是蔗糖或季戊四醇的烯丙基醚(亦称丙烯酸酯/C<sub>10-30</sub> 烷基丙烯酸酯交联聚合物并可作为 **Carbopol®** 1342、PemulenTR-1 和 Pemulen TR-2 购自 B. F. Goodrich)。其它增稠剂包括黄原胶、瓜尔胶、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、烷基改性羟烷基纤维素(例如,长链烷基改性羟乙基纤维素,比如十六烷基羟乙基纤维素)和硅酸铝镁。这些增稠剂通常将为以组合物重量计的约 0.025% 到约 1% 存在。

[0442] 适用于个人护理组合物中的乳化剂可以是各式各样非离子的、阳离子的、阴离子和两性离子的乳化剂。合适的乳化剂的例子包括甘油酯、丙二醇酯、聚乙二醇脂肪酸酯、聚丙二醇脂肪酸酯、山梨糖醇酯、山梨聚糖酸酐酯、羧酸共聚物、葡萄糖的酯和醚、乙氧基化醚、乙氧基化醇、脂肪酸酰胺、酰基乳酸酯(lactylates)、肥皂及其混合物。特定的合适乳化剂包括聚乙二醇 20 去水山梨糖醇单月桂酸酯(Polysorbate 20)、聚乙二醇 5 大豆甾醇、Steareth-20、Cetareth-20、PMG-2 甲基葡萄糖醚二硬脂酸酯、Ceteth-10、Polysorbate 80、Polysorbate 60、甘油基硬脂酸酯、PEG-100 硬脂酸酯及其混合物。该乳化剂通常将以组合物重量计的约 0.1% 到约 10% 存在。

[0443] 润肤剂包括挥发性的和不挥发的硅氧烷油类、多支链的烃和非极性羧酸和醇酯及其混合物。该润肤剂通常将以组合物重量计约 1% 到约 50% 存在。

[0444] 各种其它成分可被加入个人理组合物中。这些其它成分包括维生素及其衍生物(例如,抗坏血酸、维生素 E 醋酸生育酚、维生素 A 酸、视黄醇、类视色素等)、polyquatium 和矿物油、树脂、树胶、用于辅助组合物成膜性质和直接性的聚合物(比如二十烯和乙烯基吡咯烷酮的共聚物)、悬浮剂(例如,乙二醇二硬脂酸盐等)、防腐剂、经皮渗透助剂、抗氧化剂、螯合剂、多价螯合剂和美容组分(例如,香精、着色剂、精油、皮肤感觉剂、收敛药和皮肤



抚慰剂,这些美容组分的特定例子包括泛醇及其衍生物、泛酸及其衍生物、丁香油、薄荷醇、樟脑、桉树油、丁香酚、薄荷基乳酸酯、金缕梅馏出物、尿囊素和 bisabolol)。

[0445] 可利用上述成分或者其它本领域已知或将开发的其它成分制备各式各样的不同个人护理组合物是能够理解的。在本领域技术人员能力范围内可选择适当的成分和成分的组合并确定包含在特定的个人护理组合物中本发明 EPAC 的有效量。

[0446] 本发明还提供个人护理装置。个人护理装置包括外科材料(比如缝合线和海绵)、绷带(bandage)、海绵、布(cloth)、药签(swab)、衬垫(pad)和擦子(wipe)。本发明的个人护理装置将 EPAC 或 EPACs 粘附于,吸附其中,吸附其上,结合于,附着于,包埋于,注入,包衣在或者加入于它们。例如,装置可以是吸收 EPAC 或 EPACs 的溶液,接着除去该溶剂,以在该装置上粘附、吸收、吸附、结合、连接、包埋、注入、包衣 EPAC(s)。参见例如制备口腔护理装置的上述说明。

[0447] 本发明还提供一种抑制动物皮内增强磷酸化的方法。该方法包括使用有效量的 EPAC 或 EPACs 接触该皮肤。例如,该皮肤可以与包含 EPAC(s) 的个人护理组合物相接触。本领域公知使个人护理组合物接触皮肤的方法。合适的方法包括使用洗涤液冲洗该皮肤液,使用清洗液漂洗该皮肤,将溶液、凝胶、乳剂、洗剂或软膏施用于该皮肤(使用或不使用涂药器),使用接触头皮的洗发剂冲洗毛发,以及许多其它局部施用的装置。施用个人护理组合物的合适涂药器包括棉球、纱布垫、擦子、布、药签、滴管、注射器或指状物。此外,该皮肤可以与包含 EPAC(s) 的个人护理装置相接触。本领域公知使个人护理装置接触皮肤的方法。例如,缝合线可以用于封闭外科伤口,浸透 EPAC(s) 的擦子或衬垫可以用于清理皮肤,包含 EPAC 的绷带可以施用于皮肤等。

[0448] 对皮肤的治疗可以是预防治疗。例如,该皮肤可以作为预防性皮肤护理体系的一部分。EPAC(s) 可以并入在这些疗法中所应用的个人护理组合物或装置中,或者 EPAC(s) 可以包含于单独的个人护理组合物或装置中,其将与在该预防性皮肤护理疗法中应用的其它组合物或装置分离使用。该预防疗法是有规律地进行的(例如,每月或每日)。

[0449] 皮肤还可进行与各种皮肤病学过程相关的预防性治疗,包括手术、皮肤擦除术和化学脱皮。例如,将进行手术的皮肤区域可在手术之前、手术期间、手术之后或其组合进行治疗。例如,可以在手术之前使用包含 EPAC(s) 的溶液漂洗皮肤,由手术引起的伤口可经其中加入 EPAC(s) 的缝合线缝合,和/或可在手术后立即和/或此后不时地使用包含 EPAC(s) 的溶液漂洗皮肤。

[0450] 包含本发明 EPAC 或 EPACs 的个人护理产品可以用来治疗由增强磷酸化介导的皮肤疾病或病况。根据本发明可治疗的特定疾病和病况描述于上面关于治疗方法和药物组合物的讨论中。将会理解的是皮肤疾病和病况可以使用药物组合物和/或个人护理组合物或装置治疗。

[0451] 本领域技术人员会理解到使用个人护理产品治疗动物皮肤所需的 EPAC(s) 剂量将随着所用的特定 EPAC、对于所治疗的疾病或病况是否是预防性的或是治疗性的、所治疗的疾病或病况的特性、该疾病或病况的严重程度、所用个人的护理组合物的类型、治疗的持续时间、给予该动物的任何其它药物的特性、动物的年龄、大小和物种等医学和兽医学领域所知的因素而变化。

[0452] 本发明还提供包含根据本发明的个人护理产品的试剂盒。当该个人护理产品是个

人护理组合物时,该试剂盒还可包括用于施用个人护理组合物的涂药器,比如药签、棉球、擦子、衬垫、塑料搅棒、塑料挤瓶、泵瓶、滴管或注射器。该试剂盒还可包括杯子、小瓶或用于分配和/或测量本发明个人护理组合物预期需要的用量的其它装置。当然,该试剂盒既可包括本发明的个人护理组合物又可包括个人护理装置。除本发明个人护理组合物和/或装置之外,该试剂盒还可以包含另一类型的个人护理组合物或装置。根据本发明的试剂盒还将包含使用本发明的试剂盒和/或个人护理产品的说明书并可包含任何其它所需的物品。

[0453] 应当注意“一种”实体(entity)是指一种或多种那些实体。例如,“一种组织”是指一种或多种组织。

## 实施例

[0454] 实施例 1:脱磷酸卵黄高磷蛋白对 IL-8 的抑制

[0455] 卵黄高磷蛋白是从鸡蛋蛋黄中提取的,描述于 Losso 和 Nakai 的 Egg Uses And Processing Technologies:New Developments,150-157 页 (Simand Nakai, eds., Cab International, Oxon, UK,1994) 中。按照 Reimerdes 和 Klostermeyer 在 Methods in Enzymology,Volume 45,26-28 页 (1976) 中的描述将其脱磷酸化。估计这一卵黄高磷蛋白制品约 20-50%被脱磷酸化。

[0456] 鸡卵黄高磷蛋白还可购自 Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO,同样可购得牛血清蛋白(BSA;ELIS 级=低脂肪酸和 IgG)。各自以从制造商处得到的形式使用而无需脱磷酸化。

[0457] 于 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 的条件下,将 Jurkat 细胞 (American Type Culture Collection(ATCC),Rockville,MD) 培养(每 0.5ml 培养基中 1×10<sup>6</sup> 细胞)在包含胰岛素转铁蛋白亚硒酸盐溶液(ITSS;Sigma)的 IMDM 培养基(ATCC)中 30 分钟,该培养基中含有或不含卵黄高磷蛋白或 BSA。然后,加入佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA;100mg/ml;Sigma)和伊屋诺霉素(ionomycin)(100mg/ml;Sigma)刺激细胞,并在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 中进一步培养细胞 24 小时。

[0458] 通过 ELISA 分析细胞培养上清液中 IL-8 的含量。IL-8ELISA 的方法按照如下进行:将抗人 IL-8 抗体 (Pierce Endogen,Rockford,IL;目录号 M801-E,批号 CK41959) 在磷酸缓冲盐水 pH 7.2-7.4 中稀释为 1 μg/ml,并向 Nunc Maxisorb ELISA 条板的各孔中加入 100 μl 稀释的抗体。室温孵育这些板过夜。从孔中吸出液体,并将这些板印迹于纸巾上。然后将 200 μl 测验缓冲液(磷酸缓冲盐水,pH 7.2-7.4,包含 4% BSA)加入各孔中,并室温孵育这些板 1 小时。从各孔中吸出液体,并使用清洗缓冲液(50mM Tris,0.2%吐温-20,pH7.9-8.1)洗涤这些孔 3 次,然后印迹于纸巾上。将标准品和上清液样品(50 μl/孔;标准品在测验缓冲液中稀释)加入这些孔中,室温轻微振荡下孵育这些板 1 小时。吸出液体,并使用清洗缓冲液洗涤这些孔 3 次,然后印迹于纸巾上。然后,将在测验缓冲液中稀释成 60ng/ml 的 100 μl 生物素标记的抗人 IL-8 (Pierce Endogen,Rockford,IL;目录号 M802-E,批号 CE49513) 加入各孔中。室温孵育这些板 1 小时,吸出液体,使用清洗缓冲液洗涤这些孔 3 次,并将这些板印迹于纸巾上。然后向各孔中加入在测验缓冲液中的 100 μl HRP-结合的抗生蛋白链菌素 (Pierce Endogen,Rockford,IL;目录号 N100)。室温孵育这些板 30 分钟,吸出液体,使用清洗缓冲液洗涤这些孔 3 次,并将这些板印迹于纸巾上。最后,将 100 μl

的 TMB 底物溶液 (Pierce Endogen, Rockford, IL ;目录号 N301) 加入各孔中。室温孵育这些板 30 分钟。向每孔加入 100  $\mu$ l 的 0.18M  $H_2SO_4$  终止该反应。在 ELISA 板计数仪上读取 450nm 和 530nm 处的光密度并计算差值 (OD 450-OD 530)。

[0459] 结果示于表 1 中。正如所见,发现了与阳性对照相比从鸡蛋蛋黄中分离的卵黄高磷蛋白以剂量依赖的方式抑制 IL-8 释放。购自 Sigma 的 BSA 和卵黄高磷蛋白没有显著地抑制 IL-8 释放。

[0460] 表 1

[0461]

样品	IL-8(pg/ml)	IL-8 释放的抑制百分比
阴性对照(无 PMA, 无伊屋诺霉素, 无 BSA, 无卵黄高磷蛋白)	0.0	---
阳性对照(PMA 和伊屋诺霉素; 无 BSA 或卵黄高磷蛋白)	1119.2	---
0.1 mg/ml 鸡蛋黄卵黄高磷蛋白(脱磷酸化的)和 PMA 和伊屋诺霉素	1024.7	6.4 %
0.5 mg/ml 鸡蛋黄卵黄高磷蛋白(脱磷酸化的)和 PMA 和伊屋诺霉素	830.4	25.8 %
1.0 mg/ml 鸡蛋黄卵黄高磷蛋白(脱磷酸化的)和 PMA 和伊屋诺霉素	686.9	38.6 %
1.0 mg/ml Sigma 卵黄高磷蛋白(未处理的)和 PMA 和伊屋诺霉素	1153.6	0 %
1.0 mg/ml Sigma BSA(未处理的)和 PMA 和伊屋诺霉素	1048.1	6.3 %

[0462] 实施例 2 :应用脱磷酸化的卵黄高磷蛋白治疗炎症

[0463] 在 37°C 向蒸馏水中的鸡卵黄高磷蛋白 (Sigma) (0.5g/100ml) 加入 0.4N NaOH 脱磷酸化 3 小时, 如 Jiang 等, J. Agric. Food Chem., 48 :990-994 (2000) 中所述。脱磷酸化后, 使用 0.1N HCl 将卵黄高磷蛋白溶液 pH 调至 7.8。使用镓柱发现这一卵黄高磷蛋白制品 73% 被脱磷酸化。

[0464] 通过混合脱磷酸化的卵黄高磷蛋白与 100ml Eucerin 乳膏 (Beiersdorf Inc., Wilton, CT) 制备乳剂, 最终得到的卵黄高磷蛋白浓度为约 0.25%。

[0465] 患有慢性皮肤损伤 (病因未知) 的人类志愿者每天两次将该卵黄高磷蛋白乳剂应用于损伤处, 持续两天。经此治疗后损伤完全消失。

[0466] 另一患慢性皮肤损伤 (诊断为特应性皮炎) 的人类志愿者每天两次将该卵黄高磷

蛋白乳剂应用于背部,持续一周。所治疗的损伤完全消失。同一志愿者的其它未使用该卵黄高磷蛋白乳剂治疗的损伤没有变化。

[0467] 第三个患慢性皮肤损伤(诊断为慢性湿疹)的人类志愿者每天两次将该卵黄高磷蛋白乳剂应用于损伤处,持续一周。经此治疗后损伤完全消失。该志愿者已经对所有先前的处方疗法产生耐药性,包括局部用的类固醇。

[0468] 第四个在头部顶端患慢性皮肤损伤(经活组织检查诊断为慢性日光性角化病/弹性组织变性)的人类志愿者每天两次将该卵黄高磷蛋白乳剂应用于损伤处,持续一周。其损伤几乎完全消失。该志愿者已患病 25 年,并对之前的所有皮肤学疗法包括类固醇、抗生素、抗真菌剂、硝酸银以及液氮冷冻均不应答。

[0469] 第五个在脚踝处患银屑病的志愿者每天两次将该卵黄高磷蛋白乳剂应用于损伤处,持续一周。经此治疗后损伤完全消失。

[0470] 实施例 3:由未磷酸化的激酶底物对于 IL-8 的抑制

[0471] 酪蛋白激酶 I 底物(序列 Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu AspGlu Ala Met Ser Ile Thr Ala[SEQ ID NO:3])和酪蛋白激酶 II 底物(序列 ArgArg Arg Ala Asp Asp Ser Asp[SEQ ID NO:4])购自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO。由于它们没有磷酸化,各自以从制造商处得到的形式使用。

[0472] 于 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 的条件下,将 Jurkat 细胞(American Type Culture Collection(ATCC), Rockville, MD)培养(每 1.0ml 培养基中 2×10<sup>6</sup> 细胞)在包含胰岛素转铁蛋白亚硒酸盐溶液(ITSS;Sigma)的 IMDM 培养基(ATCC)中 15 分钟,该培养基中含有或不含有各种酪蛋白激酶底物(50 μg/ml 和 100 μg/ml)。然后,加入佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA;100mg/ml;Sigma)和伊屋诺霉素(100mg/ml;Sigma)刺激细胞,并在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 中进一步培养细胞 24 小时。

[0473] 如实施例 1 所述,经 ELISA 分析细胞培养上清液中的 IL-8 含量。结果示于附图 1 中。正如所见,与阳性对照相比,两种酪蛋白激酶底物均以剂量依赖的方式抑制 IL-8 释放。

[0001]

## 序 列 表

<110> DMI 生物科学公司 (DMI BioSciences)  
Bar-Or, David

<120> 治疗由增强磷酸化介导的疾病和病情

<130> 4172-82

<140> 待定

<141> 2003-11-25

<150> 60/429,924

<151> 2002-11-27

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Lys Cys Ala Ser

1

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

Lys Ala Ser Ser Ala Lys

1

5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

[0002]

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3

Arg Arg Lys Asp Leu His Asp Asp Glu Glu Asp Glu Ala Met Ser Ile  
1                    5                    10                    15

Thr Ala

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 4

Arg Arg Arg Ala Asp Asp Ser Asp  
1                    5

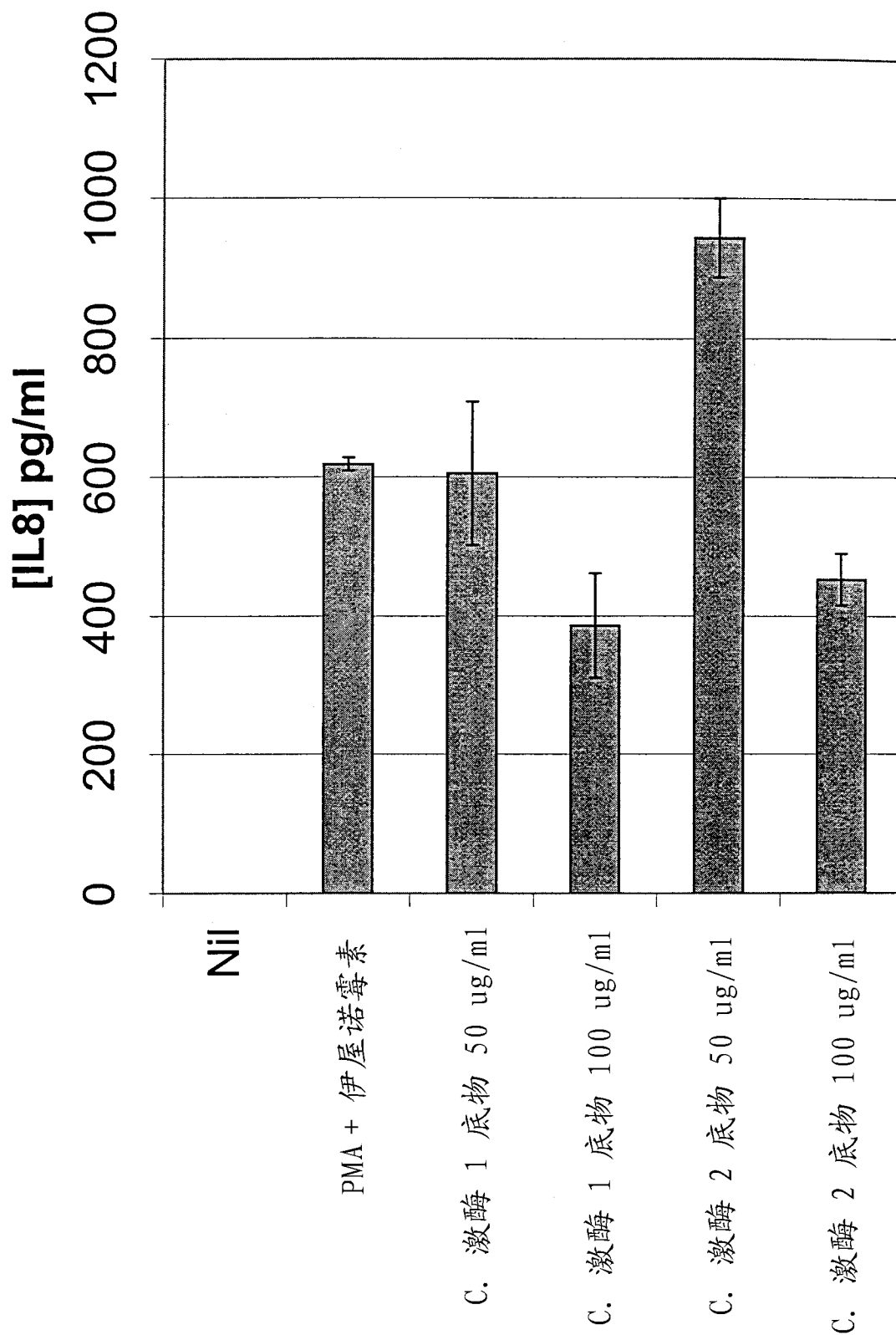


图 1