



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103547261 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201180065791. 0

A61K 31/50 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 23

A61K 31/415 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/426, 788 2010. 12. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 07. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/067251 2011. 12. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/088525 EN 2012. 06. 28

(71) 申请人 德克萨斯大学系统董事会

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 萨蒂什·K·斯里瓦斯塔瓦

科塔·V·拉马南 乌梅什·亚达夫

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 彭鲲鹏 卢蓓

(51) Int. Cl.

A61K 31/045 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书17页

序列表2页 附图10页

(54) 发明名称

用于治疗 COPD 的方法

(57) 摘要

本发明的一些实施方案包括用于治疗 COPD 的涉及醛糖还原酶抑制剂的方法和组合物。

1. 一种在对象中治疗 COPD 的方法,其包括向被诊断患有 COPD、表现出其症状、或有其发生风险的对象施用,包括向所述对象施用治疗有效量的醛糖还原酶抑制剂。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述对象目前吸烟或者先前吸烟。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂作为前药施用。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂通过吸入或滴注施用。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂经口施用。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂是特异性抑制剂。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂是羧酸、乙内酰脲、哒嗪酮、或其可药用衍生物。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂是非达司他、索比尼尔、依帕司他、泊那司他、甲索比尼尔、利沙司他、咪瑞司他、ALO-1567、槲皮素、唑泊司他、AD-5467、NZ-314、M-16209、米那司他、AS-3201、WP-921、木犀草素、托瑞司他、EBPC、或其可药用衍生物。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂是非达司他。

10.

11. 权利要求 10 的方法,其中所述醛糖还原酶抑制剂以 1 至 800mg/ 天的剂量施用。

12. 一种治疗与吸烟相关之健康风险的方法,其包括向目前吸烟或先前吸烟的对象施用治疗有效量的醛糖还原酶抑制剂。

用于治疗 COPD 的方法

[0001] 描述

[0002] 本申请要求 2010 年 12 月 23 日提交的序列号为 61/426,788 的美国临时申请的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明在美国哮喘基金会 (American Asthma Foundation) 资助的资助号 08-0219 的政府支持下完成。该基金会可享有本发明的某些权利。

[0005] 背景

[0006] 本发明的一些实施方案一般地涉及生理学和医学。更具体地,本发明涉及醛糖还原酶抑制剂 (aldose reductase inhibitor, ARI) 及其在治疗慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 中的用途。

[0007] 醛糖还原酶 (aldose reductase, AR) 催化很多种醛类的还原 (Bhatnager 和 Srivastava, Biochem Med Metab Biol. 48(2) :91-121,1992)。酶底物的范围为从芳香醛和脂肪族醛到醛糖 (例如葡萄糖、半乳糖和核糖)。通过 AR 的葡萄糖还原在高血糖期间特别显著,并且已将经由 AR 的葡萄糖流量提高与发生继发性糖尿病并发症在病因学上联系起来 (Bhatnager 和 Srivastava, Biochem Med Metab Biol. 48(2) :91-121,1992; Yabe-Nishimura, Pharmacol Rev. 50(1) :21-33,1998)。然而,显示 AR 是用于还原脂质过氧化衍生醛及其谷胱甘肽缀合物之优良催化剂的最新研究 (Srivastava 等, Biochem Biophys Res Commun. 217 :741-746,1995; Vander Jagt 等, Biochim Biophys Acta. 1249(2) :117-26,1995; Srivastava 等, Biochemistry. 37(37) :12909-17,1998; Srivastava 等, Adv Exp Med Biol. 463 :501-7,1999; Dixit 等, J Biol Chem. 275 :21587-21595,2000; Ramana 等, Biochemistry. 39 :12172-12180,2000) 表明,在正常葡萄糖浓度下,与其在糖尿病期间的有害作用相比,AR 可参与对氧化应激 (oxidative stress) 和亲电子应激 (electrophilic stress) 提供保护。AR 的抗氧化作用与在多种细胞类型中氧化剂使 AR 上调的观察结果相一致,所述氧化剂例如过氧化氢 (Spycher 等, FASEB J. 11(2) :181-8,1997)、脂质过氧化衍生醛 (Ruef 等, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(7) :1745-52,2000; Rittner 等, J Clin Invest. 103(7) :1007-13,1999)、晚期糖基化终末产物 (Nakamura 等, Free Radic Biol Med. 29(1) :17-25,2000) 和一氧化氮 (Seo 等, J Biol Chem. 275(39) :30355-62,2000)。在与氧化应激或亲电子应激提高相关的几种病理状况下,酶的表达也提高,所述病理状况例如铁过载 (Barisani 等, FEBS Lett. 469(2-3) :208-12,2000)、酒精性肝病 (O' Connor 等, Biochem J. 343Pt2 :487-504,1999)、心力衰竭 (Yang 等, Circulation. 102(25) :3046-52,2000)、心肌缺血 (Shinmura 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 97(18) :10197-202,2000)、血管炎症 (Rittner 等, J Clin Invest. 103(7) :1007-13,1999) 和再狭窄 (Ruef 等, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(7) :1745-52,2000) 以及多种形式的癌症。

[0008] 醛糖还原酶的抑制剂已用于一些病症和疾病,例如糖尿病并发症、非心脏组织的局部缺血性损伤、亨廷顿病 (Huntington's disease)。参见美国专利 6,696,407、

6, 127, 367、6, 380, 200, 其均通过引用并入本文。在一些情况下, 其中醛糖还原酶在与病症或疾病相关的机制中的作用是已知的。例如, 在美国专利 6, 696, 407 中表明醛糖还原酶抑制剂提高了对于治疗亨廷顿病产生影响的纹状体睫状神经营养因子 (striatal ciliary neurotrophic factor, CNTF)。然而, 在另一些情况下, 其中醛糖还原酶或醛糖还原酶抑制剂对于特定疾病或病症发挥作用的方式尚不知晓。

[0009] 因此, 因为患有这些疾病和病症的患者仍然需要新的治疗, 所以需要阐明醛糖还原酶在多种疾病和病症中的作用。因此, 需要涉及醛糖还原酶和醛糖还原酶抑制剂的预防性和治疗性方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的一些实施方案涉及通过施用治疗有效量的醛糖还原酶抑制剂 (ARI) 在被诊断患有 COPD、表现出其症状、或有其发生风险的对象中治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 的方法。本文中使用的患 COPD 的“风险”基于对象的病史、个人史和 / 或家族史。特别地, 目前或先前吸烟 (最主要是香烟, 但是还包括其他尼古丁或非尼古丁制品, 例如大麻制品) 显示出发生 COPD 的风险, 但是风险因素还包括但不限于暴露于烟雾或其他环境危害 (例如, 矿业或纺织工业危害物、烟尘、空气污染)、遗传易感性、自身免疫病和支气管高应答性。对象还可以是表现出 COPD 的一种或更多种症状的对象, 所述症状包括但不限于: 慢性咳嗽、痰液生成 (sputum production)、呼吸困难 (呼吸浅短)、干啰音 (rhonchi) (咯咯的呼吸声) 和肺功能测试中的气道受限 (airway limitation)。

[0012] 在某些方面中, 将醛糖还原酶作为前药施用于患者。通常, 前药是药物的无活性或活性较小的形式, 其在体内代谢或转化成有活性或活性更大的形式。

[0013] ARI 可通过任何途径施用, 包括经口、经内窥镜、气管内、支气管内、静脉内、病变内 (intralesionally)、肌内、腹膜内、经皮或皮下。在某些方面中, ARI 经口或者通过吸入或滴注 (instillation) (例如, 通过吸入器 (inhaler) 或其他气雾剂递送装置) 施用。

[0014] 在某些实施方案中, 醛糖还原酶抑制剂是肽、肽模拟物 (peptide mimetic)、小分子或抑制性 RNA (inhibitory RNA)。醛糖还原酶抑制剂可以是 siRNA 或另一些抑制性核酸、羧酸、乙内酰脲 (hydantoin)、哒嗪酮或其可药用衍生物。在一些具体的方面中, 醛糖还原酶抑制剂是非达司他 (fidarestat)、索比尼尔 (sorbiniol)、依帕司他 (epalrestat)、泊那司他 (ponalrestat)、甲索比尼尔 (methosorbiniol)、利沙司他 (risarestat)、咪瑞司他 (imirestat)、AL0-1567、槲皮素 (quercetin)、唑泊司他 (zopolrestat)、AD-5467、NZ-314、M-16209、米那司他 (minalrestat)、AS-3201、WP-921、木犀草素 (luteolin)、托瑞司他 (tolrestat)、EBPC、或其可药用衍生物。在某些实施方案中, 醛糖还原酶抑制剂是非达司他。

[0015] 在本申请通篇中讨论了本发明的另一些实施方案。针对本发明的一个方面讨论的任何实施方案同样适用于本发明的另一些方面, 并且反之亦然。实施例部分中的实施方案应理解为可用于本发明所有方面的本发明实施方案。

[0016] 术语“治疗”包括治疗疾病的生理原因、治疗疾病相关病症、以及治疗疾病的一种或多种症状。治疗包括降低严重程度 (包括任何可测量的降低至完全消除)、降低一种或更多种疾病症状的频率、减缓或停止其进展、延长其发病之前的时间、或者预防其发病。

[0017] 权利要求书和 / 或说明书中使用的没有数量词修饰的名词当与术语“包含 / 包括”

连用时可意指“一个”，但是也符合“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的意思。

[0018] 在本申请通篇中，术语“约”用于指这样的值，其包括用于测定所述值的装置或方法之误差的标准偏差。

[0019] 除非明确表明指唯一的替代物或者替代物相互排斥，否则权利要求书中使用的术语“或”用来指“和 / 或”，尽管本公开内容支持指唯一替代物以及“和 / 或”的定义。

[0020] 本说明书和权利要求书中使用的词语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”是包括性的或开放式的，并且不排除另外的未列举的要素或方法步骤。

[0021] 根据以下详细的描述，本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而，应理解的是，尽管指出了本发明的一些具体实施方案，但详细的描述和具体实施例仅是通过举例说明方式给出的，因为根据该详细描述，在本发明的精神和范围内的多种改变和修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

附图说明

[0022] 以下附图构成本说明书的一部分，其被包括在说明书内以进一步展示本发明的某些方面。通过参照与本文所述具体实施方案的详细描述相组合的这些附图中的一个或更多个，可以更好地理解本发明。

[0023] 图 1. 对 AR 的抑制阻止香烟烟雾提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 诱导的小气道上皮细胞 (small airway epithelial cell, SAEC) 的细胞死亡。在不存在和存在 10 μ M 非达司他下将细胞与不同浓度的 CSE 孵育 24 小时后进行 MTT 测定。条 (bar) (平均值 $\pm$ SD ; n = 6) 表示对应于活细胞的 570nm 处的吸光度。

[0024] 图 2. 由醛糖还原酶 (AR) 抑制所阻止的 CSE 诱导的 SAEC 中细胞因子水平的变化。
* 相对于对照 $p < 0.01$; ** 相对于 CSE50% $p < 0.05$; # 相对于对照 $p < 0.001$; ## 相对于 CSE50% $p < 0.01$ 。

[0025] 图 3. 由 AR 抑制所阻止的 CSE 诱导的 SAEC 中细胞因子和生长因子水平的变化。
* 相对于对照 $p < 0.01$; ** 相对于 CSE50% $p < 0.05$; # 相对于对照 $p < 0.001$; ## 相对于 CSE50% $p < 0.01$ 。

[0026] 图 4. 通过 AR 抑制阻止氧化还原信号传导。用豚草花粉 (ragweed pollen)、变应原 (allergen)、生长因子或细胞因子刺激导致细胞内 ROS 产生提高。ROS 可氧化膜脂质以形成脂质醛 (例如 4-羟基壬烯酸 (4-hydroxynonenal, HNE)), 其容易与谷胱甘肽反应并形成 GS 缀合物 (例如 GS-HNE)。AR 催化 GS-HNE 还原为 GS-1,4-二羟基壬烯 (GS-1,4-dihydroxynonene, GS-DHN)。已知后者活化多种下游蛋白激酶, 例如 PKC、PI3K 和 MAPK, 活化转录因子 NF- κ B 和 AP-1, 其转录多种炎症标志物 (包括 IL-13), 其以旁分泌方式诱导更多 ROS 形成。GS-DHN 也可使 JAK-1 和 MAPK (例如 ERK1/2) 磷酸化, 最终使 STAT-6 磷酸化并活化, 其移位至细胞核并转录基因 (包括黏蛋白基因)——导致杯状细胞化生 (goblet cell metaplasia)。持续形成的 GS-DHN 可经由 PKC/NOX 途径通过提高的 ROS 产生来放大信号传导回路。抑制 AR 阻断最初的回路以及放大回路, 并且阻止 ROS 诱导的病理学变化 (Ramana 等 J BiolChem281:33019-33029, 2006; Tammali 等 Cancer Res66:9705-9713, 2006)。

[0027] 图 5A ~ 5B. 抑制 AR 阻止 IL-13 诱导的 SAEC 中活性氧簇 (reactive oxygen

species, ROS) 产生。(A) 将约 5×10^4 个细胞接种到 2 室载玻片 (2-chambered slide) 上, 使其在含有或没有非达司他的无血清基础培养基中饥饿过夜。细胞用 $1 \times$ HBSS 清洗并与 $10 \mu\text{M}$ H2DCF-DA 在 37°C 下孵育 30 分钟, 再次清洗并用 IL-13 (25ng/ml) 处理 1 小时。细胞用冷的 $1 \times$ HBSS 清洗两次并使用含有 DAPI 的 floursave 封固剂 (mounting medium) 进行封固。使用荧光显微镜 (Nikon) 得到显微照片。示出了代表性图像 ($n = 4$); 放大率 $400\times$ 。(B) 将每孔约 10,000 个 SAEC 平板接种到 96 孔板中并在含或含有非达司他下进行血清饥饿 24 小时。细胞用 $1 \times$ HBSS 清洗并与 $10 \mu\text{M}$ H2DCF-DA 在 37°C 下孵育 30 分钟。再次清洗细胞以除去过量的 H2DCF-DA 并在基础培养基中用 IL-13 (25ng/ml) 处理 1 小时。在处理结束时, 用 HBSS 清洗细胞两次并以 485nm 激发波长和 538nm 发射波长测定荧光。相对 ROS 产生表示为平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) (任意单位)。条表示平均值 $\pm$ SD ($n = 4 \sim 6$); (* 相对于对照 $p < 0.01$; ** 相对于 IL-13 $p < 0.05$)。

[0028] 图 6A ~ 6B. AR 抑制阻止 IL-13 诱导的气道上皮细胞单层中纤毛和 β -微管蛋白的损失。每 12mm 直径 PET 透明插入皿 (insert) 中接种约 8.5×10^4 个 SAEC, 并在由下侧和上侧二者提供的分化培养基中培养 7 天, 然后在 ALI 上培养 11 天以分化为纤毛细胞。单层用 AR 抑制剂处理过夜后用 IL-13 处理 48 小时。将膜插入皿上的单层在 4°C 在 z-fix (含有锌的 10% 缓冲福尔马林) 中固定 24 小时, 石蜡包埋并切割为 $5 \mu\text{M}$ 切片。(A) 在光学显微镜下检查 H&E 染色切片; 放大率 $400\times$ 。插图示出从每个代表性显微照片中选择的区域的放大视图 ($n = 4$)。(B) 在切片上使用 β -微管蛋白进行免疫组织化学。单层中的深棕色染色对应于纤毛轴丝 (axoneme) β -微管蛋白。箭头示出随着纤毛细胞转变为杯状细胞的 β -微管蛋白的损失。示出了代表性显微照片 ($n = 4$); 放大率 $400\times$ 。

[0029] 图 7A ~ 7C. AR 抑制阻止 IL-13 诱导的气道上皮单层中的杯状细胞化生和 Muc5AC 表达。(A) 在不含或含有 AR 抑制剂非达司他下将气液界面 (air-liquid interface, ALI) 处分化良好的气道上皮细胞与 IL-13 孵育 48 小时。如所描述地将单层固定并且使用 Muc5AC 抗体对切片进行免疫组织化学。示出了代表性显微照片 ($n = 4$); 放大率 $400\times$ 。(B) 条形图示出显微镜下每个切片中随机计数的 10 个区域中每个观察区域中 Muc5AC 阳性细胞的数目 ($n = 4$); * 相对于对照 $p < 0.0005$; ** 相对于 IL-13 $p < 0.004$ 。(C) 在 AR 抑制剂非达司他不存在和存在下使气道上皮单层浸入基础培养基中与 IL-13 孵育 48 小时。从顶室中收集培养基并用于通过 ELISA 测定 Muc5AC ($n = 4$); * 相对于对照 $p < 0.005$; ** 相对于 IL-13 $p < 0.01$ 。

[0030] 图 8A ~ 8B. AR 抑制阻止 IL-13 诱导的气道上皮细胞单层中黏蛋白和转录因子 SPDEF 的表达。(A) 在不含或含有非达司他下使 ALI 处的气道上皮细胞单层进行血清饥饿并与 IL-13 孵育 18 小时。分离总 RNA, 随后进行 RT-PCR 以评估 Muc5AC 和 SPDEF 的表达。条形图示出对应印迹的密度分析 (densitometric analysis) ($n = 4$)。* 相对于对照 $p < 0.001$; ** 相对于 IL-13 $p < 0.001$;(B) 用 AR 抑制剂处理 ALI 处的纤毛气道细胞单层 24 小时, 随后与 IL-13 孵育 24 或 48 小时。在孵育结束时, 制备细胞裂解物并使用抗 Muc5AC、Muc5B 和 SPDEF 的抗体进行 western 印迹。剥去膜并用抗 GAPDH 的抗体进行预探测以显示出蛋白质的等量加载。示出了代表性印迹 ($n = 4$)。* 相对于对照 $p < 0.0001$; ** 相对于 IL-13 $p < 0.001$ 。

[0031] 图 9. AR 抑制阻止 IL-13 诱导的气道上皮单层中 JAK-1、ERK1/2 和 STAT-6 的磷酸

化。用 AR 抑制剂处理 ALI 处气道细胞的纤毛单层 24 小时并用 IL-13 刺激所示的不同时间段。在孵育结束时,裂解细胞并使用抗磷酸化和非磷酸化 JAK-1、ERK1/2 和 STAT-6 的抗体对裂解物进行 western 印迹以分析这些信号传导蛋白质的活化。示出了代表性印迹 ($n = 4$)。# 相对于对照 $p < 0.001$; * 相对于 IL-13p < 0.01 以及 ** 相对于 IL-13p < 0.001 。

[0032] 图 10. AR 抑制阻止 RWE 诱导的小鼠肺中 IL-13 表达。在不含或含有 AR 抑制剂下用 PBS 或 RWE 敏化并激发小鼠,16 小时后收获肺并分离总 RNA ($n = 4$)。将来自每个样本的 1 微克总 RNA 转录为第一链 cDNA,然后使用 IL-13 特异性正向引物和反向引物进行定量 RT-PCR。通过溶解曲线分析测定对于靶序列的 RNA 水平。在此示出的值是相对于对照改变的倍数。(** $p < 0.001$)。RWE,豚草花粉提取物;ARI,醛糖还原酶抑制剂。

[0033] 图 11A ~ 11B. AR 抑制阻止小鼠肺上皮中 STAT-6 的磷酸化。在不含或含有 AR 抑制剂下用 PBS 或 RWE 敏化并激发小鼠,20 小时后灌注肺并用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,并切成 5 μ M 的切片。以 p-STAT-6 特异性抗体对切片进行免疫染色,使用免疫荧光二抗 (A) 或以苏木精和伊红对比染色的基于 DAB 的 HRP 缀合抗体 (B)。通过荧光显微镜或光学显微镜获得显微照片。示出每组的代表性视野 (放大率:200 $\times$)。在 (A) 中,插图示出代表性显微照片中所选择区域的放大视图 ($n = 4$)。RWE,豚草花粉提取物;ARI,醛糖还原酶抑制剂。

[0034] 图 12A ~ 12B. AR 抑制或缺陷阻止 RWE 诱导的小鼠肺中的杯状细胞化生。用 RWE 激发经 RWE 敏化的正常小鼠和 AR 缺失的小鼠,72 小时后从未经或经 AR 抑制剂处理的小鼠 (A) 或 AR 缺陷小鼠 (B) 中收获肺,进行灌注,用 4% 多聚甲醛固定并进行石蜡包埋。切片用 PAS 染色进行染色并在光学显微镜下观察,得到显微照片。示出每组的代表性显微照片 ($n = 4$)。放大率 200 $\times$ (A);400 $\times$ (B)。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明人证明了醛糖还原酶 (AR) 对于脂质醛的解毒来说是重要的。除了解毒作用之外,AR 活性对于引起细胞凋亡和增殖的细胞因子、趋化因子、内毒素、高葡萄糖和生长因子的细胞信号传导来说是必需的,所述细胞凋亡和增殖引起导致炎症和多种疾病的组织功能不良,即,AR 是由通过激酶级联活化转录因子 NF- κ B 和 AP1 诱导的细胞因子、趋化因子、生长因子和细菌内毒素的专性介质 (obligatory mediator)。活化转录因子是引起细胞毒性的多种细胞因子、趋化因子和生长因子之合成和释放的原因。它们一般来说是引起与 COPD 和变应性哮喘相关之炎症的原因 (参见美国公开 2004/0047919、美国公开 2006/0293265 和美国公开 2010/0144748,其均通过引用并入本文)。

[0037] I. 醛糖还原酶和 COPD

[0038] 在本发明的某些方面中,醛糖还原酶抑制剂 (ARI) 用于治疗 COPD。由长期暴露于香烟烟雾、有害气体和 / 或颗粒引起的慢性阻塞性肺病 (COPD) 是世界范围内较高发病率和死亡率的最常见原因之一,并且如世界卫生组织所估计的,困扰着超过 6 亿人。气道炎症在 COPD 的发病机理中发挥主要作用,其包括气道中炎性细胞的浸润和炎性黏液性渗出物的积累。COPD 发病机理中的主要风险因子是香烟烟雾,其通过活化产生活性氧簇 (ROS) 并释放蛋白酶而导致细胞损伤的居留细胞 (resident cell) (包括气道上皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和 T 淋巴细胞) 引起气道炎症。ROS 的产生与蛋白质、DNA 和脂质的氧化直接相关,其可通过产生次级代谢活性物质 (secondary metabolic reactive species) 引起直接的肺损伤或者诱发多种细胞应答。本发明人证明了抑制醛糖还原酶 (AR) 阻止香烟烟雾提取

物 (CSE) 诱导的人小气道上皮细胞 (SAEC) 中的细胞变化, 所述细胞变化是 COPD 的特征, 包括细胞凋亡以及分泌细胞因子、趋化因子和其他炎症标志物。醛 - 酮还原酶超家族中的成员醛糖还原酶 (AR) 是在高血糖条件下催化葡萄糖的 NADPH 依赖性还原为山梨糖醇的胞质蛋白质, 其与糖尿病并发症有关。然而, 最近有证据表明 AR 对于氧化应激诱导的分子信号至关重要, 并且 AR 催化的代谢产物是氧化还原信号传导的优良介质, 其在多种炎症相关病理状况 (例如糖尿病并发症、心血管疾病、哮喘、COPD、癌症和传染性疾病) 中发挥重要作用。本文所述结果显示 AR 抑制在体外和体内都阻止 IL-13 诱导的杯状细胞形成。这些以及目前的结果一起表明, AR 抑制在预防和治疗 COPD 中是有益的, 因为它阻止了人气道上皮细胞的细胞死亡、细胞因子释放和黏液形成。

[0039] 醛 - 酮还原酶超家族中的成员醛糖还原酶 (AR) 是在高血糖条件下催化葡萄糖 NADPH 依赖性还原为山梨糖醇的胞质蛋白质, 该酶与糖尿病并发症有关。最近有证据表明 AR 对于氧化应激诱导的分子信号至关重要, 并且 AR 催化的代谢产物是氧化还原信号传导的优良介质。本文所述结果显示 AR 抑制在体外和体内都阻止 IL-13 诱导的杯状细胞形成。这些结果表明, AR 抑制在预防和治疗 COPD 中是有益的, 因为它阻止了人气道上皮细胞中的细胞死亡、细胞因子释放和黏液形成。

[0040] II. 醛糖还原酶抑制剂

[0041] 醛糖还原酶抑制剂是抑制醛糖还原酶的任何化合物。示例性的醛糖还原酶抑制剂容易得到或者可由本领域技术人员使用有机合成的常规方法容易地合成。这些抑制剂中有许多为本领域技术人员所公知, 并且多种制药级 AR 抑制剂是可商购的, 例如非达司他 (SNK-860), (2S, 4S)-2-氨基甲酰基-6-氟-螺[色满-4, 4'-咪唑烷]-2', 5'-二酮 (CAS 号 136087-85-9); 托瑞司他 (Tolrestat), N-[[6-甲氧基-5-(三氟甲基)-1-萘基] 硫代甲基]-N-甲基甘氨酸, [Wyeth-Ayerst, Princeton, N. J. ; 其他名称为 Tolrestatin, CAS 注册号 82964-04-3, 药品编码 AY-27, 773, 并且商品名为 ALREDASE (Am. Home) 和 LORESTAT (Recordati)]; 泊那司他, 3-(4-溴-2-氟苄基)-4-氧代-3H-酞嗪-1-基乙酸 [ICI, Macclesfield, U. K. ; 其他名称为 CAS 注册号 72702-95-5, ICI-128, 436 和 STATIL (ICI)]; 索比尼尔, (S)-6-氟-2, 3-二氢螺[4H-1-苯并吡喃-4, 4'-咪唑烷]-2', 5'-二酮 (Pfizer, Groton, Conn. ; CAS 注册号 68367-52-2, 药品编码 CP-45, 634); 依帕司他 (ONO, Japan); 甲索比尼尔 (Eisai); ALCONIL (Alcon); AL-1576 (Alcon); CT-112 (Takeda) 和 AND-138 (Kyorin)。

[0042] 描述了另一些 ARI。对于用于糖尿病情况之 ARI 的综述, 参见 Humber, "Aldose Reductase Inhibition: An Approach to the Prevention of Diabetes Complications", Porte 编, 第 5 章, 第 325-353 页; Tomlinson 等, 1992), 例如螺乙内酰脲 (spirohydantoin) 及相关结构, 螺-咪唑烷-2', 5'-二酮, 以及杂环基链烷酸。另一些醛糖还原酶抑制剂是 ONO-2235、唑泊司他、SNK-860、5-3-噻吩基四唑-1-基乙酸 (TAT)、WAY-121, 509、ZENCAZD5522、M16209、(5-(3'-吡啶醛))-2-硫乙内酰脲、折那司他、折那司他 1-O-酰基葡萄糖苷酸、SPR-210、(2S, 4S)-6-氟-2', 5'-二氧代螺-[色满-4, 4'-咪唑烷]-2-甲酰胺 (SNK-880)、芳基磺酰基氨基酸、2, 7-二氟螺芬-9, 5'-咪唑烷-2', 4'-二酮 (imiriestat, Al11576, HOE843)、异甘草素、3, 4-二氢-4-氧代-3-[[5-(三氟甲基)-2-苯并噻唑基] 甲基]-1-酞嗪乙酸、(S)-6-氟螺[色满-4, 4'-咪唑烷]-2, 5'-二

酮、N-[(5- 三氟甲基)-6- 甲氧基-1- 萘基] 硫代甲基 }-N- 甲基甘氨酸、3-(4- 溴-2- 氟苄基)-3,4- 二氢-4- 氧代-1- 酞嗪乙酸、5-[(Z, E)- β - 甲基亚桂皮基]-4- 氧代-2- 硫代-3- 噻唑烯乙酸、3-(4- 溴-2- 氟苄基)-7- 氯-3,4- 二氢-2,4- 二氧代-1(2H) 噻唑啉乙酸、3,4- 二氢-3- 氧代-4-[(4,5,7- 三氟-2- 苯并噻唑基) 甲基]-2H-1,4- 苯并噻嗪-2- 乙酸、N-[3,5- 二甲基-4-[(硝基甲基) 磺酰基] 苯基]-2- 甲苯乙酰胺、(2S,4S)-6- 氟-2', 5' - 二氧代螺(色满-4,4' - 咪唑烷)-2- 甲酰胺、2-[(4- 溴-2- 氟苄基) 甲基]-6- 氟螺[异噻啉-4(1H),3- ' - 吡咯烷]-1,2', 3,5' (2H)- 四酮、2R,4R-6,7- 二氯-4- 羟基-2- 甲基色满-4- 乙酸、2R,4R-6,7- 二氯-6- 氟-4- 羟基-2- 甲基色满-4- 乙酸、3,4- 二氢-2,8- 二异丙基-3- 氧代-2H-1,4- 苯并噻嗪-4- 乙酸、d-2- 甲基-6- 氟-螺(色满-4',4' - 咪唑烷)-2', 5' - 二酮、2- 氟-螺(9H- 茛-9,4' - 咪唑烷)-2', 5' - 二酮、2,7- 二- 氟-螺(9H- 茛-9,4' - 咪唑烷)-2', 5' - 二酮、2,7- 二- 氟-5- 甲氧基-螺(9H- 茛-9,4' - 咪唑烷)-2', 5' - 二酮、7- 氟-螺(5H- 茛酚[1,2-b] 吡啶-5,3' - 吡咯烷)-2,5' - 二酮、d- 顺式-6' - 氯-2', 3' - 二氢-2' - 甲基-螺-(咪唑烷-4,4' -4' H- 吡喃酮(2,3-b) 吡啶)-2,5- 二酮、螺[咪唑烷-4,5' (6H)- 噻啉]-2,5- 二酮-3' - 氯-7, ' 8' - 二氢-7' - 甲基-(5' - 顺式)、3,4- 二氢-3-(5- 氟苯并噻唑-2- 基- 甲基)-4- 氧代酞嗪-1- 基- 乙酸、3-(5,7- 二氟苯并噻唑-2- 基甲基)-3,4- 二氢-4- 氧代酞嗪-1- 基- 乙酸、3-(5- 氯苯并噻唑-2- 基甲基)-3,4- 二氢-4- 氧代酞嗪-1- 基- 乙酸、3-(5,7- 二氯苯并噻唑-2- 基甲基)-3,4- 二氢-4- 氧代酞嗪-1- 基- 乙酸、3,4- 二氢-4- 氧代-3-(5- 三氟甲基苯并噻唑-2- 基- 甲基) 酞嗪-1- 基- 乙酸、3,4- 二氢-3-(5- 氟苯并噻唑-2- 基甲基)-4- 氧代酞嗪-1- 基- 乙酸、3-(5,7- 二氟苯并噻唑-2- 基甲基)-3,4- 二氢-4- 氧代酞嗪-1- 基- 乙酸、3-(5- 氯苯并噻唑-2- 基甲基)-3,4- 二氢-4- 氧代酞嗪-1- 基乙酸和 3-(5,7- 二氯苯并噻唑-2- 基甲基)-3,4- 二氢-4- 氧代酞嗪-1- 基- 乙酸。

[0043] 在一些实施方案中，醛糖还原酶抑制剂是直接抑制由醛糖还原酶催化的葡萄糖至山梨糖醇之生物转化的化合物。这样的醛糖还原酶抑制剂是直接抑制剂或特异性抑制剂，这被视为本发明的一部分。直接抑制由本领域技术人员根据标准测定来容易地测定(Malone, 1980)。

[0044] 除了通过活性分类之外，ARI 还可通过化学结构分类。在一个实施方案中，ARI 是羧酸、乙内酰脲、哒嗪酮或其可药用衍生物。在一些实施方案中，ARI 是合成的化合物。或者，ARI 是天然化合物(例如，抑制醛糖还原酶的植物提取物或内源性抗氧化剂)。

[0045] 以下专利和专利申请(其各自均在此通过引用整体并入本文)举例说明了可用于本发明的组合物、方法和药盒(kit) 的醛糖还原酶抑制剂，并且涉及制备这些醛糖还原酶抑制剂的方法：美国专利 4,251,528、4,600,724、4,464,382、4,791,126、4,831,045、4,734,419、4,883,800、4,883,410、4,883,410、4,771,050、5,252,572、5,270,342、5,430,060、4,130,714、4,540,704、4,438,272、4,436,745、4,438,272、4,436,745、4,438,272、4,436,745、4,438,272、4,980,357、5,066,659、5,447,946、以及 5,037,831。

[0046] 除了本文具体描述的醛糖还原酶抑制剂之外，本领域技术人员已知另一些醛糖还原酶抑制剂。另外，常用化学名和其他命名在适当情况下与公开所述化合物的适当专利

文献一起在括号中。因此,可用于本发明的组合物、方法和药盒的醛糖还原酶抑制剂的实例包括但不限于:3-(4-溴-2-氟苄基)-3,4-二氢-4-氧代-1-呋喃乙酸(泊那司他,美国专利 4,251,528)、N-[(5-三氟甲基)-6-甲氧基-1-萘基]硫代甲基}-N-甲基甘氨酸(托瑞司他,美国专利 4,600,724)、5-[(Z,E)- β -甲基亚桂皮基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烯乙酸(依帕司他,美国专利 4,464,382、美国专利 4,791,126、美国专利 4,831,045)、3-(4-溴-2-氟苄基)-7-氯-3,4-二氢-2,4-二氧代-1(2H)-噻唑啉乙酸(折那司他,美国专利 4,734,419 和美国专利 4,883,800)、2R,4R-6,7-二氯-4-羟基-2-甲基色满-4-乙酸(美国专利 4,883,410)、2R,4R-6,7-二氯-6-氟-4-羟基-2-甲基色满-4-乙酸(美国专利 4,883,410)、3,4-二氢-2,8-二异丙基-3-氧代-2H-1,4-苯并噻嗪-4-乙酸(美国专利 4,771,050)、3,4-二氢-3-氧代-4-[(4,5,7-三氟-2-苯并噻唑基)甲基]-2H-1,4-苯并噻嗪-2-乙酸(SPR-210、美国专利 5,252,572)、N-[3,5-二甲基-4-[(硝基甲基)磺酰基]苯基]-2-甲基-苯乙酰胺(ZD5522,美国专利 5,270,342 和美国专利 5,430,060)、(S)-6-氟螺[色满-4,4'-咪唑烷]-2,5'-二酮(索比尼尔,美国专利 4,130,714)、d-2-甲基-6-氟-螺(色满-4',4'-咪唑烷)-2',5'-二酮(美国专利 4,540,704)、2-氟-螺(9H-茛-9,4'-咪唑烷)-2',5'-二酮(美国专利 4,438,272)、2,7-二-氟-螺(9H-茛-9,4'-咪唑烷)-2',5'-二酮(美国专利 4,436,745、美国专利 4,438,272)、2,7-二-氟-5-甲氧基-螺(9H-茛-9,4'-咪唑烷)-2',5'-二酮(美国专利 4,436,745、美国专利 4,438,272)、7-氟-螺(5H-茛酚[1,2-b]吡啶-5,3'-吡咯烷)-2,5'-二酮(美国专利 4,436,745、美国专利 4,438,272)、d-顺式-6'-氯-2',3'-二氢-2'-甲基-螺-(咪唑烷-4,4'-4'-H-吡喃酮(2,3-b)吡啶)-2,5-二酮(美国专利 4,980,357)、螺[咪唑烷-4,5'-(6H)-噻啉]-2,5-二酮-3'-氯-7,'8'-二氢-7'-甲基-(5'-顺式)(美国专利 5,066,659)、(2S,4S)-6-氟-2',5'-二氧代螺(色满-4,4'-咪唑烷)-2-甲酰胺(非达司他,美国专利 5,447,946)、以及 2-[(4-溴-2-氟苄基)甲基]-6-氟螺[异噻啉-4(1H),3'-吡咯烷]-1,2',3,5'(2H)-四酮(米那司他,美国专利 5,037,831)。另一些化合物包括美国专利 6,720,348、6,380,200 和 5,990,111 中描述的那些,其通过引用并入本文。此外,在另一些实施方案中,具体考虑了可作为本发明的一部分而不包括这些中的任何一种。

[0047] III. 药物组合物和施用途径

[0048] 本发明的药物组合物可包含溶解于或分散于对于对象可药用的载体中的有效量的一种或更多种 AR 抑制剂。短语“药用”或“可药用”指当需要时施用于动物(例如人)时不产生不利的、过敏的或其他不良反应的分子实体和组合物。鉴于本公开内容,并且如 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 18 版. Mack Printing Company,1990(通过引用并入本文)所举例说明的,制备包含至少一种 AR 抑制剂或另外的活性成分的药物组合物对于本领域技术人员是已知的。此外,就动物(例如人)施用而言,应理解,制剂应当满足 FDA 生物学标准办公室所要求的无菌、致热原性(pyrogenicity)、一般安全和纯度标准。

[0049] 本发明醛糖还原酶抑制剂的可药用盐可通过使游离酸形式的醛糖还原酶抑制剂与适当的碱(通常为 1 当量)在共溶剂中反应而容易地制备。典型的碱是氢氧化钠、甲醇钠、乙醇钠、氢化钠、甲醇钾、氢氧化镁、氢氧化钙、苄星(benzathine)、胆碱、二乙醇胺、哌嗪和氨丁三醇。通过浓缩至干或通过添加非溶剂来分离盐。在许多情况下,盐优选通过以下

方法制备：将酸溶液与阳离子的不同盐溶液（乙基己酸钠或乙基己酸钾、油酸镁）混合，并且采用期望阳离子盐从其中沉淀的溶剂（例如乙酸乙酯）；或者盐可另外地通过浓缩和/或添加非溶剂来分离。

[0050] 本发明醛糖还原酶抑制剂的酸加成盐可通过使游离碱形式的所述醛糖还原酶抑制剂与适当酸反应来容易地制备。当盐是一元酸的盐（例如，盐酸盐、氢溴酸盐、对甲苯磺酸盐、乙酸盐）、二元酸之氢形式的盐（例如，硫酸氢盐、琥珀酸盐）或三元酸之二氢形式的盐（例如，磷酸二氢盐、柠檬酸盐）时，采用至少一分子当量和通常超过 1 摩尔的酸。然而，当期望这样的盐，例如硫酸盐、半琥珀酸盐、磷酸氢盐或磷酸盐时，一般使用适当且精确化学当量的酸。游离碱和酸通常在共溶剂中结合，使期望盐从其中沉淀；或者可另外地通过浓缩和/或添加非溶剂来分离。

[0051] 此外，可根据本发明使用的醛糖还原酶、其前药、和其可药用盐或所述前药的可药用盐可作为水合物或溶剂合物出现。这些水合物和溶剂合物也在本发明范围内。

[0052] 本发明的药物组合物可包含不同类型的载体，这取决于其是以固体、液体或气雾剂形式施用，以及就作为注射施用途而言其是否需要无菌。如本领域普通技术人员所公知的，本发明的药物组合物可通过静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、关节内、胸膜内、支气管内、胸膜内、鼻内、表面 (topically)、肌内、腹膜内、皮下、结膜下、囊内 (intravesicularlly)、经黏膜 (mucosally)、心包内、脐带内、经口、表面、局部 (locally)、吸入（例如，气雾剂吸入）、滴注、注射、输注、连续输注、通过插管、通过灌洗、在脂质组合物（例如脂质体）中、或者通过其他方法或前述方法的任意组合来施用（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, 1990, 通过引用并入本文）。

[0053] 载体包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂（例如，抗菌剂、抗真菌剂）、等张剂、吸收延缓剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、黏合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、染料、类似物质及其组合，如本领域普通技术人员所公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Printing Company, 1990, 第 1289-1329 页, 1990, 通过引用并入本文）。除非任何常规载体与活性成分不相容，否则本发明考虑了其在治疗组合物或药物组合物中的用途。

[0054] 向对象施用的本发明组合物的实际剂量可通过身体和生理因素（例如，体重、病症严重程度、所治疗疾病的类型、之前或同时进行治疗干预、患者的特发病 (idiopathy) 以及施用途）来确定。给药次数和给药可经过的时间段可改变。在任何情形下，负责施用的从业者会确定组合物中活性成分的浓度和合适剂量，以及对于单个对象施用时间的长度。使用对于抑制醛糖还原酶活性有效的醛糖还原酶抑制剂的量。通常，对于抑制剂的有效剂量的单次剂量或分次剂量在约 0.01mg/kg/ 天至 100mg/kg/ 天的范围内，优选单次剂量或分次剂量在约 0.1mg/kg/ 天至 20mg/kg/ 天的范围内。约、至少约或至多约 0.01、0.05、0.1、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100mg/kg/ 天或可从中得出的任何范围的剂量。通常，剂量为 25 至 1200mg/ 天，并且在

某些方面中,在 100 与 800mg/ 天之间。

[0055] 在某些实施方案中,药物组合物可包含例如至少约 0.1% 的活性组合物。在另一些实施方案中,活性化合物可占例如单位重量的约 2% 至约 75%, 或约 25% 至约 60%, 以及可从中得出的任何范围。在另一些非限制性实例中,每次施用的剂量还可以是约 1 微克 /kg/ 体重、约 5 微克 /kg/ 体重、约 10 微克 /kg/ 体重、约 50 微克 /kg/ 体重、约 100 微克 /kg/ 体重、约 200 微克 /kg/ 体重、约 350 微克 /kg/ 体重、约 500 微克 /kg/ 体重、约 1 毫克 /kg/ 体重、约 5 毫克 /kg/ 体重、约 10 毫克 /kg/ 体重、约 50 毫克 /kg/ 体重、约 100 毫克 /kg/ 体重、约 200 毫克 /kg/ 体重、约 350 毫克 /kg/ 体重、约 500 毫克 /kg/ 体重至约 1000mg/kg/ 体重或更多, 以及可从中得出的任何范围。在可从本文所列数值中得出的范围的非限制性实例中,基于上述的数值,可施用约 5mg/kg/ 体重至约 100mg/kg/ 体重、约 5 微克 /kg/ 体重至约 500 毫克 /kg/ 体重等。

[0056] 在任何情形下,所述组合物可包含多种抗氧化剂以延缓一种或更多种组分的氧化。此外,可通过防腐剂来阻止微生物的作用,所述防腐剂例如多种抗菌剂或抗真菌剂,包括但不限于对羟基苯甲酸酯类(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合。

[0057] 在本发明的某些方面中,制备 AR 抑制剂用于通过诸如经口摄取的途径来施用。在这些实施方案中,所述固体组合物可包括例如溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂(例如硬壳或软壳明胶胶囊)、持续释放制剂、口含组合物、锭剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂(wafer) 或其组合。经口组合物可直接掺入到膳食食物中。用于经口施用的优选载体包括惰性稀释剂、可吸收的可食用载体或其组合。在本发明的另一些方面中,可将所述经口组合物制备成糖浆剂或酞剂。糖浆剂或酞剂可包含例如至少一种活性剂、甜味剂、防腐剂、矫味剂、染料、防腐剂或其组合。

[0058] 在某些优选的实施方案中,经口组合物可包含一种或更多种黏合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂或其组合。在某些实施方案中,组合物可包含下述物质中的一种或更多种:黏合剂,例如西黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶或其组合;赋形剂,例如磷酸二钙、甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或其组合;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸或其组合;润滑剂,例如硬脂酸镁;甜味剂,例如蔗糖、乳糖、糖精或其组合;矫味剂,例如薄荷、冬青油、樱桃香料、橙子香料等;或前述物质的组合。当所述剂量单位形式是胶囊时,除上述类型的物质以外,其还可包含载体,例如液体载体。多种其他材料可作为包衣存在,或者用于改变所述剂量单位的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊剂可用虫胶、糖或这二者进行包衣。

[0059] 需要时,通过将所需量的活性化合物掺入到含有以上列举的多种其他成分的合适溶剂中并随后进行过滤除菌来制备无菌注射溶液。通常,通过将多种经灭菌的活性成分掺入到包含基础分散介质和 / 或其他成分的无菌载剂中来制备分散体。在用于无菌注射溶液、混悬剂或乳剂的无菌粉末的情况下,制备的优选方法是真空干燥或冷冻干燥技术,其产生活性成分的粉末和来自之前其无菌过滤的液体介质的任意其他期望成分。必要时,应对所述液体介质适当地进行缓冲处理,所述液体稀释剂首先使得在用足够的盐水或葡萄糖注射之前是等张的。还考虑了用于直接注射的高浓度组合物的制备,其中预计将 DMSO 用作溶剂以导致非常迅速的渗透,将高浓度的活性剂递送至小区域中。

[0060] 在一些具体的实施方案中,通过在组合物中使用吸缓延迟剂(例如单硬脂酸铝、明胶或其组合)可实现注射组合物的延长吸收。

[0061] 为了提高用本发明组合物(例如AR抑制剂)治疗的有效性,可期望将本发明化合物与其他治疗剂相组合。该方法可包括使细胞与AR抑制剂和治疗剂同时或在一段时间内相接触,其中向细胞、组织或生物体分开施用调节剂和药剂产生了所期望的治疗益处。当应用于细胞、组织或生物体时,本文中使用的术语“接触”和“暴露”来描述AR抑制剂和/或治疗剂递送至靶细胞、组织或生物体或者放置在与靶细胞、组织或生物体直接毗邻处的方法。可使细胞、组织或生物体与单一组合物或包含AR抑制剂和一种或更多种药理制剂二者的药物制剂相接触(例如,通过施用)、或者使细胞与两种或更多种不同组合物或制剂相接触来实现,其中一种组合物包含AR抑制剂,另一种组合物包含一种或更多种药剂。

[0062] AR抑制剂可以数分钟至数周的间隔在所述其他药剂之前、同时和/或之后施用。在其中AR抑制剂和其他药剂被分别施用给细胞、组织或生物体的实施方案中,通常将保证显著的时间段不在每一递送时间之间结束,使得所述抑制剂和药剂仍将能对细胞、组织或生物体发挥有利的组合作用。例如,在这样的情况下,考虑了可使细胞、组织或生物体与基本上同时(即在小于约1分钟内)作为调节剂的两种、三种、四种或更多种形式相接触。在另一些方面中,一种或更多种药剂可基本上同时、在施用AR抑制剂之前和/或之后约1分钟、约5分钟、约10分钟、约20分钟、约30分钟、约45分钟、约60分钟、约2小时或更多小时、或约1天或更多天、或约4周或更多周、或约3个月或更多个月、或约1年或更多年以及可从其中得出的任何范围内施用。

[0063] 在这样的组合中,AR抑制剂和其他活性剂可一起或分开施用。此外,施用一种药剂可以在施用其他药剂之前、同时或之后进行。

[0064] IV. 实施例

[0065] 本发明包括以下实施例以及附图以展示本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应当理解,在实施例或附图中公开的技术代表由本发明人发现的会很好实施本发明的技术,因此可以视为构成其实施的优选方式。然而,本领域技术人员根据本公开内容应当理解,可以对公开的具体实施方案作出许多改变但仍获得相似或类似的结果,而不背离本发明的精神和范围。

[0066] A. 香烟烟雾提取物

[0067] 1. 结果

[0068] CSE导致SAEC的剂量依赖性细胞死亡,其在12.5、25、50和75%浓度的CSE下在24小时时分别为23%、26%、37%和40%。用非达司他处理SAEC阻止了CSE诱导型细胞死亡,使得在50% CSE下>85%的细胞存活并且在12.5% CSE下超过95%的细胞存活(图1)。SAEC的TNF- α 诱导的细胞死亡用作阳性对照。

[0069] 此外,在CSE(50%)处理24小时后在SAEC培养基中测量细胞因子、趋化因子和生长因子的水平(图2)。细胞因子(例如IL-1 α 和IL-8)的水平提高了约2倍,而IL-6的水平增加了约10倍,TNF- α 的水平增加了3倍。SAEC中由AR抑制阻止的所有变化都是显著的($p < 0.05$ 和 0.01)(图2)。类似地,趋化因子(例如G-CSF(~ 7 倍)、MCP-1(~ 15 倍)、GM-CSF(~ 0.75 倍)和IP-10(超过30倍))的水平显著升高,生长因子(例如TGF- α (3倍)和VEGF(4倍))的水平显著升高,并且用AR抑制剂处理阻止了这些变化的超

过 50% (图 2)。

[0070] 2. 材料和方法

[0071] 细胞的选择:气道上皮细胞(这是变应原与呼吸系统之间的首次接触点)在作为外来颗粒的屏障方面发挥着重要作用,所述外来颗粒包括环境气体和颗粒,香烟烟雾,以及扰乱细胞氧化还原稳态导致细胞活力、气道上皮细胞形态和生理变化而引起 COPD 的其他外源物。因此,我们选择了原代人小气道上皮细胞。

[0072] 细胞培养:得自于 Lonza 的原代人小气道上皮细胞(SAEC)(Walkersville, MD)是从 18 岁男性供体的远端气道收获的正常人 SAEC。根据供应商的说明书,在含有 52 μ g/ml 牛垂体提取物、0.5ng/ml 人重组表皮生长因子(EGF)、0.5 μ g/ml 肾上腺素、1 μ g/ml 氢化可的松、10 μ g/ml 转铁蛋白、5 μ g/ml 胰岛素、0.1ng/ml 视黄酸(RA)、6.5ng/ml 三碘甲腺原氨酸、50 μ g/ml 庆大霉素/两性霉素 B(GA-1000)和 50 μ g/ml 不含脂肪酸之牛血清白蛋白(BSA)的补充物的小气道上皮基础培养基(small airway epithelial basal medium, SABM)中,在含有 95%空气和 5% CO₂ 的潮湿气氛下在 37°C 下培养细胞。

[0073] 制备香烟烟雾提取物(CSE):使用 Carp 和 Janoff 开发的方法(Am Rev Respir Dis. 1978;118(3):617-621)的改良方法,在通风橱中使来自肯塔基大学肯塔基烟草研究和开发中心(Lexington, KY)的带有过滤嘴的研究级香烟(1R3F)吸至过滤嘴以上 0.5cm 处。通过将来自 1 根香烟的烟雾以 1cm/分钟的速率鼓入 10ml 不含血清的培养基中来制备 CSE 并标记为 100%。通过用培养基稀释制备多种浓度的 CSE。将培养基的 pH 调节至 7.4 并用 0.2 μ m 过滤器(Millipore)对培养基进行无菌过滤。CSE 总是在实验当天新鲜制备。

[0074] 细胞活力测定:将 SAEC 以 5000 个细胞/孔的密度平板接种到 96 孔板上并通过将完全培养基替换为包含非达司他(20 μ M)或载体的新鲜基础培养基中进行生长阻止 24 小时。在含有或没有非达司他的情况下使细胞与 CSE(75、50、25、12.5、0%)孵育另外的 24 小时,然后向每个孔中添加 10 μ l MTT(5mg/ml)并在 37°C 孵育另外的 2 小时。移除培养基并将甲臜颗粒溶解于 100% DMSO 中。使用 96 孔 ELISA 读板仪在 570nm 处读取吸光度。

[0075] 在细胞培养基中通过 milliplex 测定细胞因子和趋化因子:使细胞生长至汇合,用 PBS 清洗,然后进行 CSE 或载剂暴露。为了模拟一根香烟的烟雾,将细胞暴露于 CSE15 分钟。移除 CSE;用 PBS 清洗细胞并放置在新培养基中。收集培养基,通过以 2,500rpm 离心 5 分钟使其澄清。将上清液储存在 -200°C 直至用于分析。通过 Milliplex MAP 试剂盒根据制造商说明书(Millipore Corporation, Bellerica, MA)测定上清液中细胞因子和趋化因子的水平。

[0076] 统计学:数据表示为平均值 $\pm$ SD,使用 graph pad prism 软件(GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA)通过非配对 t 检验确定统计显著性。P < 0.05 的值认为是统计显著的。

[0077] B. 豚草花粉提取物

[0078] 1. 结果

[0079] AR 抑制阻止 IL-13 诱导的 SAEC 中 ROS 水平:因为已知细胞因子诱导的氧化应激介导导致气道上皮细胞分化为黏液细胞的分子信号传导,所以我们通过两种不同方法确定了 AR 抑制对 IL-13 诱导的 SAEC 中 ROS 水平的作用。如图 3A 和 3B 所示,用 IL-13 刺激导致 ROS 水平与对照相比提高了约 2 倍,用非达司他处理细胞显著(80%)阻止了所述提高。

这些结果表明通过抑制 AR 可阻止细胞因子诱导的氧化应激。

[0080] AR 抑制阻止 IL-13 诱导的 SAEC 中的杯状细胞化生：为了研究 AR 在调节杯状细胞化生和黏液产生中的作用，本发明人使用了模拟体内气道环境的气液界面培养系统。首先，本发明人在含有 1 型骨胶原包衣的聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 膜插入皿上培养原代人气道上皮细胞。胶原包被的膜插入皿上的细胞形成气道细胞一致的 2 ~ 3 个细胞厚的层。此外，当在包含 EGF 的培养基上培养 11 天后单层细胞完全分化为纤毛细胞 (图 4A)，并且当用 IL-13 刺激这些细胞 48 小时后，纤毛细胞数目显著降低，正如还通过使用 β -微管蛋白特异性抗体的免疫染色确定的。但是，非达司他的 AR 抑制保留了纤毛的形态 (图 4B)。单独的 AR 抑制剂没有毒性作用，并且纤毛细胞的单层大部分是完整的。如通过 PAS 染色确定的，当用 IL-13 刺激 48 小时后，大量纤毛细胞 (~6 倍) 转化为充满黏液的杯状细胞，而在 IL-13 激发之前向培养基中添加 AR 抑制剂非达司他阻止了气道细胞分化为杯状细胞 (数据未示出)。

[0081] AR 抑制阻止 IL-13 诱导的气道上皮单层中黏蛋白和 SPDEF 的表达：接着，用抗 Muc5AC 的抗体对单层细胞切片进行染色。如图 5A 和 5B 所示，IL-13 刺激产生了大量的 Muc5AC 免疫阳性细胞。当用 AR 抑制剂处理细胞并与 IL-13 孵育时，具有 Muc5AC 阳性染色的细胞的数目显著降低 (~70%)，这表明仅有少数细胞转变为杯状细胞。接着，本发明人使用 ELISA 测量了培养基中分泌的 Muc5AC 的水平。在 IL-13 刺激后培养基中 Muc5AC 的分泌显著提高，其通过用 AR 抑制剂处理被显著 (~80%) 阻止 (图 5C)。这些结果表明 AR 调节气道上皮细胞中 IL-13 介导的化生和黏液产生，并且抑制 AR 可阻止这些事件。

[0082] 接着，本发明人检查了这些细胞中的黏蛋白水平是否通过转录或翻译调节。如图 6A 上图所示，经 IL-13 处理的 SAEC 单层中 Muc5AC 特异性 RNA 表达提高了约 3 倍，而非达司他显著阻止所述提高。多个研究已显示出 SPDEF 调节气道上皮细胞中几种基因 (包括酸性和中性黏蛋白二者) 的表达并且引起杯状细胞化生。因此，本发明人在我们的细胞培养模型中通过 RT-PCR 确定了 SPDEF mRNA 的表达水平，并且观察到 IL-13 显著提高上皮细胞中 SPDEF 的表达，而对照仅具有基础水平的表达。当在 IL-13 刺激之前用 AR 抑制剂处理这些细胞时，SPDEF mRNA 水平显著降低 (图 6A，下图)。

[0083] 接着，在与 IL-13 孵育 24 小时和 48 小时后，在 SAEC 单层中通过免疫印迹测量 Muc5AC 和 Muc5B 的水平。在与 IL-13 孵育 24 小时后检测不到 Muc5AC/B，但是在 48 小时后蛋白质表达水平显著提高 (图 6B，顶部两幅图)，其在经非达司他处理的细胞中被显著 (分别为 ~75% 和 ~50%) 阻止。另外，在与 IL-13 孵育的气道上皮细胞单层中，细胞中 SPDEF 蛋白质的水平在 24 小时后显著升高并且在 48 小时后进一步升高，并且所述升高被经 AR 抑制剂处理的细胞显著 (~50%) 阻止 (图 6B)。蛋白质水平的降低对应于 SPDEF 和 Muc5AC/B 的 mRNA 水平的降低，这表明在 IL-13 存在下诱导了 SPDEF 和 Muc5AC 基因，并且通过 AR 抑制在转录水平上阻止了 Muc5AC 的表达。

[0084] AR 抑制阻止 IL-13 诱导的信号传导介质的磷酸化和活化：因为 ALI 上气道上皮细胞单层的 AR 抑制成功地阻止了转录调节剂 SPDEF 的表达和黏蛋白的后续表达，所以研究了 AR 抑制对调节这些哮喘介质之表达的分子机制的作用。在 AR 抑制剂存在或不存在下用 IL-13 刺激在 ALI 上生长的细胞，并确定 JAK1、ERK1/2 和 STAT-6 蛋白质的磷酸化。如图 7 所示，IL-13 导致 STAT-6 和上游介质例如 JAK1 和 ERK1/2 磷酸化的时间依赖性升高。当在

IL-13 刺激之前用 AR 抑制剂处理这些细胞时,这些蛋白质的磷酸化显著降低。此外,在单独用 AR 抑制剂处理的细胞中,JAK1 的基础磷酸化降低,而 ERK1/2 和 STAT-6 的基础磷酸化没有降低。这些结果表明 AR 调节参与使气道纤毛上皮细胞转化为黏液分泌杯状细胞的杯状细胞化生的关键信号传导中间体的活化。

[0085] AR 抑制阻止 RWE 诱导的小鼠肺中的 IL-13 之表达和 STAT-6 激活:因为 Th2 细胞因子(尤其是 IL-13)参与杯状细胞化生,所以本发明人检查了 RWE 激发后小鼠肺中 IL-13 的表达水平,并且发现其水平与对照相比提高了约 6 倍,而在激发之前用非达司他处理阻止了该提高(图 8)。为了检查提高的 IL-13 水平是否与在化生中发挥主要作用之 STAT-6 的磷酸化和激活相一致,在 RWE 激发 20 小时后处死小鼠并使用磷酸化-STAT-6 抗体对肺部切片进行免疫荧光研究。观察到当对照小鼠的肺部仅显示背景时,经 RWE 激发的小鼠肺部上皮显示出针对磷酸化-STAT-6 的荧光强度显著提高,其被 AR 抑制阻止(图 9A)。还通过肺部切片的基于 DAB 的免疫组织化学确证结果(图 9B)。这些结果表明 AR 抑制可在体内阻止变应原诱导的 IL-13 表达和随后的 STAT-6 激活。

[0086] AR 抑制/缺陷阻止 RWE 诱导的小鼠肺中的杯状细胞化生:本发明人接着检查了在 RWE 敏化和激发的小鼠中 AR 抑制对杯状细胞化生的作用。在激发 72 小时后,得到肺部切片并用 PAS 染色,然后检查气道上皮的变化。如图 10A 所示,PAS 阳性细胞在 RWE 激发小鼠的气道中显著提高,而在 RWE 激发前用非达司他处理的小鼠的肺中不存在。与经抑制剂处理的小鼠类似,用 RWE 激发的 AR 缺失小鼠显示出气道中不存在 PAS 阳性细胞(图 10B)。这些结果进一步确定了 AR 在杯状细胞化生中发挥重要作用并且 AR 抑制可阻止变应性哮喘的化生。

[0087] 2. 材料和方法

[0088] 动物:所有的动物实验都根据实验动物饲养和使用的健康指导国家研究院(National Institutes of Health Guide for Care and Use of Experimental Animals)进行并且由德克萨斯大学医学分部动物饲养和使用委员会(University of Texas Medical Branch Animal Care and Use Committee)批准(动物福利保证 No. A3314-01)。

[0089] 试剂:小气道上皮基础培养基(SABM)和小气道上皮生长培养基(SAGM™)bulletkit;以及含有胰蛋白酶 0.025%/EDTA0.01%、胰蛋白酶中和溶液和 HEPES 缓冲盐溶液的 Reagentpack™ 购买自 Lonza Walkersville Inc. (Walkersville, MD)。杜氏改良培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)和磷酸盐缓冲盐水(PBS)购买自 Gibco, Invitrogen(Grand Island, NY)。AR 抑制剂非达司他由 Sanwa-Kayagu(South Korea)惠赠。人重组 IL-13 来自 R&D systems (Minneapolis, MN)。二甲基亚砜(DMSO)获自 Fischer scientific (Pittsburg, PA)。人黏蛋白 5AC ELISA 试剂盒来自 Cosmo Bio USA (Carlsbad, CA)。抗 STAT-6、磷酸化-STAT-6、磷酸化-JAK1、JAK1、ERK1/2、磷酸化-ERK1/2 的抗体来自 Cell Signaling Tech(Danvers, MA),黏蛋白 5 亚型 A 和 C(Muc5AC)、Muc5B、GAPDH 和 β -肌动蛋白抗体来自 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA)。抗含有 SAM 指定结构域之 ETS 转录因子(SAM pointed domain-containing ETS transcription factor, SPDEF)的抗体购买自 Abcam Inc. (Cambridge MA)。具有 1.0 μ m 孔的聚对苯二甲酸乙二醇酯透明 12 孔 Millicell 细胞培养插入皿购买自 Millipore Corp. (Billerica, MA)。大鼠尾 1 型胶原蛋白和全反式视黄酸来自 Sigma-Aldrich(Saint Louis, MO)。用于 Western 印迹分析的

试剂获自 Sigma。所使用的所有的其他试剂为分析级。

[0090] 细胞培养:获自 Lonza Walkersville, Inc. 的原代人小气道上皮细胞 (SAEC) (Walkersville, MD) 是从远端气道收获的正常人 SAEC。根据供应商的说明书,在补加有 52 μ g/ml 牛垂体提取物、0.5ng/ml 人重组表皮生长因子 (EGF)、0.5 μ g/ml 肾上腺素、1 μ g/ml 氢化可的松、10 μ g/ml 转铁蛋白、5 μ g/ml 胰岛素、0.1ng/ml 视黄酸 (RA)、6.5ng/ml 三碘甲腺原氨酸、50 μ g/ml 庆大霉素 / 两性霉素 B (GA-1000) 和 50 μ g/ml 不含脂肪酸之牛血清白蛋白 (BSA) 的小气道上皮基础培养基 (SABM) 中,在含有 95% 空气和 5% CO_2 的潮湿气氛下在 37°C 培养并维持细胞。

[0091] ROS 水平测定:将约 5×10^4 个 SAEC 接种到 2 室培养载玻片中,一式三份,或者以每孔 10,000 个 SAEC 平板接种到 96 孔板中。在它们贴壁后,在不含或含有非达司他 (10 μ M) 的情况下,使细胞在含有 0.1% 血清的基础培养基中饥饿过夜。第二天,用 1 $\times$ HBSS 缓冲剂清洗细胞并与 10 μ M $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 在 37°C 孵育 30 分钟,再次清洗以除去过量的 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$,并用 IL-13 (25ng/ml) 处理 1 小时。在孵育结束时,细胞用冷的 1 $\times$ HBSS 缓冲液清洗两次。使用带有 DAPI 的 flouresave 封固剂对培养玻片上的细胞进行封固,然后使用荧光显微镜 (Nikon) 得到显微照片。使用 485nm 激发和 538nm 发射波长测定 96 孔板中细胞的荧光,并且相对 ROS 产量表示为平均荧光强度 (MFI) (任意单位)。

[0092] 气液界面培养:对于气液界面 (ALI) 培养,以 8.5×10^4 个细胞 / 具有 1.0 μ M 孔的 12mm 直径 PET 透明插入皿 (12 孔 millicell 培养插入皿; Millipore) 接种 SAEC,并且用大鼠尾 1 型胶原蛋白 (Sigma-Aldrich) 进行预包被。细胞浸没在 Zhen 等 (Am J Respir Cell Mol Biol 36:244-253, 2007) 先前所述的分化培养基中生长。分化培养基包含 DMEM 和小气道上皮生长培养基的 1:1 混合物,所述小气道上皮生长培养基补加有如上所述的那些,除了将硫酸庆大霉素、两性霉素 B 和三碘甲腺原氨酸替换为 1% 青霉素 / 链霉素和 50nM 全反式视黄酸之外。在最初 7 天使 SAEC 维持浸没,之后移除顶上的培养基并建立气液界面培养。将细胞在 ALI 处维持培养时间的剩余时间。每三天更换培养基并且每周用 PBS 清洗细胞的顶部表面一次以移除累积的黏液和碎片。在湿润的孵育器中在 37°C 以及 95% 空气和 5% CO_2 下维持细胞。在建立 ALI 并通过在所指示的不同时间段中将重组人 IL-13 (25ng/ml) 添加到培养基中进行 IL-13 刺激后第 11 天,开始从不含 EGF 的分化培养基底侧用 AR 抑制剂非达司他 (10 μ M) 预处理 ALI 上的细胞过夜。

[0093] 细胞固定和免疫细胞化学:在与 IL-13 孵育完成后,细胞的顶部表面用 PBS 冲洗并在 4°C 下将细胞固定在 10% z-fix (含水缓冲的锌福尔马林) (Anatech Ltd; Battle Creek, MI) 中维持 24 小时,然后包埋在石蜡中。用 H&E 和高碘酸希夫 (PAS) 染剂对膜插入皿上之上皮细胞单层的 5 μ M 厚切片进行染色。分析经染色切片并使用安装在 NIKON Eclipse TE200UV 显微镜上的 Photometrix CoolSNAP Fx 照相机拍摄代表性视野。将抗 β -微管蛋白和 Muc5AC 的抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 和匹配的对照 IgG 用于免疫细胞化学。使用 Vector LSAB 试剂盒 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 如制造商所建议的那样检测抗体。

[0094] RT-PCR:通过使用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明书,从在含有或不含 AR 抑制剂的情况下用 IL-13 处理的分化 SAEC 中分离总 RNA。在 55°C 使用 HotStar Taq DNA 聚合酶 (Qiagen) 通过 Omniscript 和 Sensiscript 逆转录酶一步 RT-PCR 系统

逆转录分离自每个样品的 RNA (1.0 μ g) 的等量份, 维持 30 分钟, 然后进行 PCR 扩增。寡核苷酸引物序列如下: Muc5AC :5' -TCCGGCCTCATCTTCTCC-3' (SEQ ID NO:1) (正义) 和 5' -ACTTGGGCACTGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:2) (反义); SPDEF :5' -CGAAGTGCTCAAGGACATCGAG-3' (SEQ ID NO:3) (正义) 和 5' -CGGTATTGGTGCTCTGTCCACA-3' (SEQ ID NO:4) (反义); 以及 GAPDH :5' -GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3' (SEQ ID NO:5) (正义) 和 5' -CATACCAGGAAATGAGCTTG-3' (SEQ ID NO:6) (反义)。RT-PCR 反应在 PCR Sprint 热循环仪 (Thermo electron corporation, Milford, MA) 中在以下条件下进行: 在 95°C 初次变性 15 分钟, 然后在 94°C 下 1 分钟、60°C 下 1 分钟、72°C 下 1 分钟, 进行 35 个循环, 然后在 72°C 下 10 分钟进行最终延伸。使 RT-PCR 产物在包含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖 -1 $\times$ TAE 凝胶上进行电泳。使用 NIH 图像分析软件进行凝胶的光密度分析。

[0095] Western 印迹分析: 孵育之后, 细胞用冷 PBS 清洗并在 RIPA 裂解缓冲液中裂解。合并细胞裂解物并通过离心使其澄清。使用 Bradford 试剂 (Biorad, Hercules, CA) 测定蛋白质水平。将 40 微克蛋白质与样品缓冲剂混合并在 10% SDS-PAGE 上解析。电泳之后, 将蛋白质电转移至硝化纤维素膜上, 用 TBST 中的 5% 脱脂奶进行封闭, 并且用抗磷酸化 -ERK1/2、ERK1/2、磷酸化 -STAT-6、STAT-6、Muc5AC、Muc5B 和 SPDEF 的抗体在 4°C 下探测过夜。然后清洗印迹, 暴露于 HRP 缀合二抗 (1 : 5,000 稀释) 1 小时, 并且通过增强化学发光 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 检测抗原 - 抗体复合物。剥去膜并用抗 GAPDH 的抗体再次探测以描述负载对照。通过来自 Ultra Violate Products Ltd. (Cambridge, UK) 的 biospectrum410 图像系统进行密度测定。

[0096] Muc5AC ELISA: 使用可商购的人抗 Muc5AC ELISA, 基本上如制造商上所述 (Cosmo Bio USA; Carlsbad, CA), 通过 ELISA 评估培养基中的 Muc5AC 水平。

[0097] 敏化和激发动 物: 野生型 C57BL/6 和 Balb/cJ 小鼠购买自 Harlan Sprague-Dawley (San Diego, CA, USA), 并且我们在动物资源中心 (UTMB, Galveston, TX) 培育 C57BL/6 背景的 AR 缺陷小鼠。如先前所述用 RWE 敏化 6 至 8 周龄的雌性小鼠 (Hwang 等, FASEB J. 19:795-797, 2005)。简言之, 在第 0 天和第 4 天通过两次腹膜内施用 100 μ l 比例 (v/v) 为 3 : 1 的不含内毒素之 RWE (150 μ g) 以及明矾佐剂 (1mg) 使小鼠敏化。在第 11 天, 用 RWE (100 μ g) 在鼻内激发小鼠 (n = 6)。从激发前一天开始, 平行组的小鼠在饮水中接受非达司他 (7mg/kg 体重 / 天)。对照组的小鼠用等体积的 PBS 激发。在所述的不同时间点用氯胺酮 (135mg/kg 体重) 和甲苯噻嗪 (15mg/kg 体重) 使动物安乐死, 灌注肺部并用 4% 多聚甲醛固定, 包埋在石蜡中, 并切成 5 μ m 的切片。用 PBS 对肺部切片进行染色, 并使用安装在 NIKON Eclipse TE200UV 显微镜上的 Photometrix CoolSNAP Fx 照相机观察并拍摄代表性视野。

[0098] 测定小鼠肺中的 IL-13: 在 RWE 激发 16 小时后收获小鼠肺部并分离总 RNA。对于每种样品, 将 1 微克总 RNA 转录为第一链 cDNA, 使用 IL-13 特异性正向和反向引物 5' AGACCAGACTCCCCTGTGCA (SEQ ID NO:7)、3' TGGGTCCTGTAGATGGCATTG (SEQ ID NO:8) 进行定量 RT-PCR; GAPDH 特异性引物 5' TGTGTCCGTCGTGGATCTGA (SEQ ID NO:9)、3' CCTGCTTACCACCTTCTTGAT (SEQ ID NO:10) 用作管家基因 (HK) 对照。收集数据并通过 ABI7000 System 仪器和软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 分析。为了评估表达水平, 使用 $\delta - \delta C_t$ 法 ($\Delta \Delta C_t$)。通过 $\delta - \delta C_t$ ($\Delta \Delta C_t$) 的方法使用对于相对表达的以下公

式计算表达值的提高倍数（与对照之比）： $F = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, F = 变化倍数（与对照之比）， $-\Delta\Delta C_T = (C_{T_靶} - C_{T_HKG})^{时间x} - (C_{T_靶} - C_{T_HKG})^{时间0}$ 。时间 x 是任意时间点。时间 0 代表相对于 HGK 归一化的靶基因的 $1 \times$ 表达。

[0099] 检测小鼠肺中的 STAT-6 磷酸化：在 RWE 激发约 20 小时后，处死小鼠，并对其肺部进行灌注，用 4% 多聚甲醛固定，包埋在石蜡中，获得 $5 \mu m$ 切片。用 p-STAT-6 特异性一抗对切片进行免疫染色，然后用 FITC 标记的二抗探测并用带有 DAPI 的 flourosave 封固剂进行封固，或者用来自 Vector LSAB 试剂盒（Vector Laboratories, Burlingame, CA）的基于 DAB 的 BRP 缀合抗体探测并用苏木精和伊红进行对比染色。通过安装在 NIKON Eclipse TE200UV 显微镜上的 Photometrix CoolSNAP Fx 照相机分别使用荧光或明视野显微镜获得显微照片。

[0100] 统计：数据表示为平均值 $\pm$ SE，使用 graph pad prism 软件（GraphPadSoftware, Inc. La Jolla, CA）通过非配对 t 检验确定统计显著性。 $P < 0.05$ 的值认为是统计显著的。

[0001]

IP1349155P. 序列表.txt

序列表

<110> The Board of Regents of The University of Texas System
Srivastava, Satish K
Ramana, Kota V.
Yadav, Umesh

<120> 用于治疗COPD的方法

<130> UTMB0297W0

<150> 61/426,788

<151> 2010-12-23

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 1
tccggcctca tcttctcc 18

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 2
acttgggcac tgggtctg 18

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 3
cgaagtgtc aaggacatcg ag 22

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4
cggtatttgt gctctgtcca ca 22

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 5

[0002]

gaccccttca ttgacctcaa c		IP1349155P. 序列表.txt	21
<210> 6			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的寡核苷酸			
<400> 6			
cataccagga aatgagcttg			20
<210> 7			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的寡核苷酸			
<400> 7			
agaccagact cccctgtgca			20
<210> 8			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的寡核苷酸			
<400> 8			
tgggtcctgt agatggcatt g			21
<210> 9			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的寡核苷酸			
<400> 9			
tgtgtccgtc gtggatctga			20
<210> 10			
<211> 22			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的寡核苷酸			
<400> 10			
cctgcttcac caccctcttg at			22

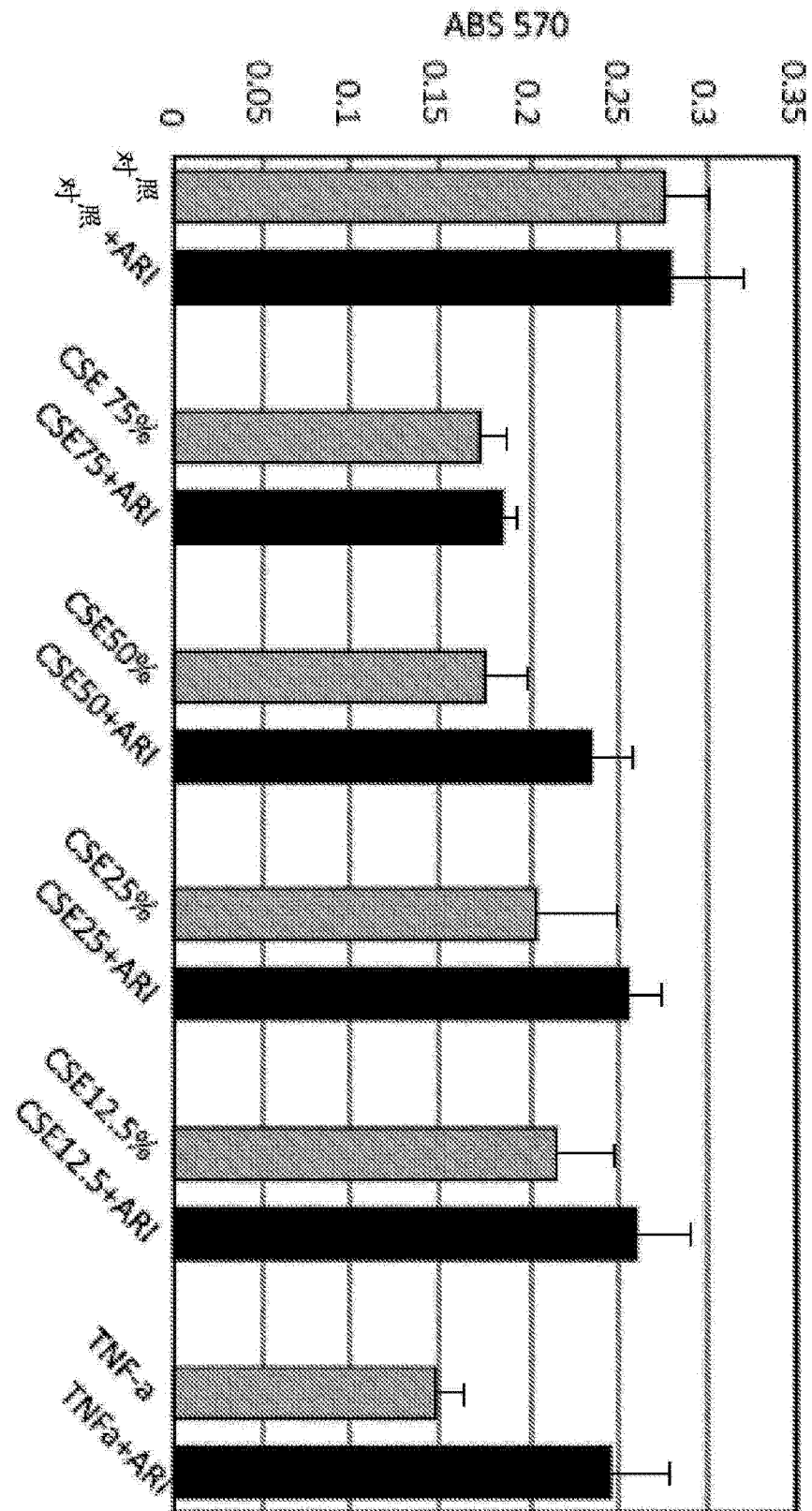


图 1

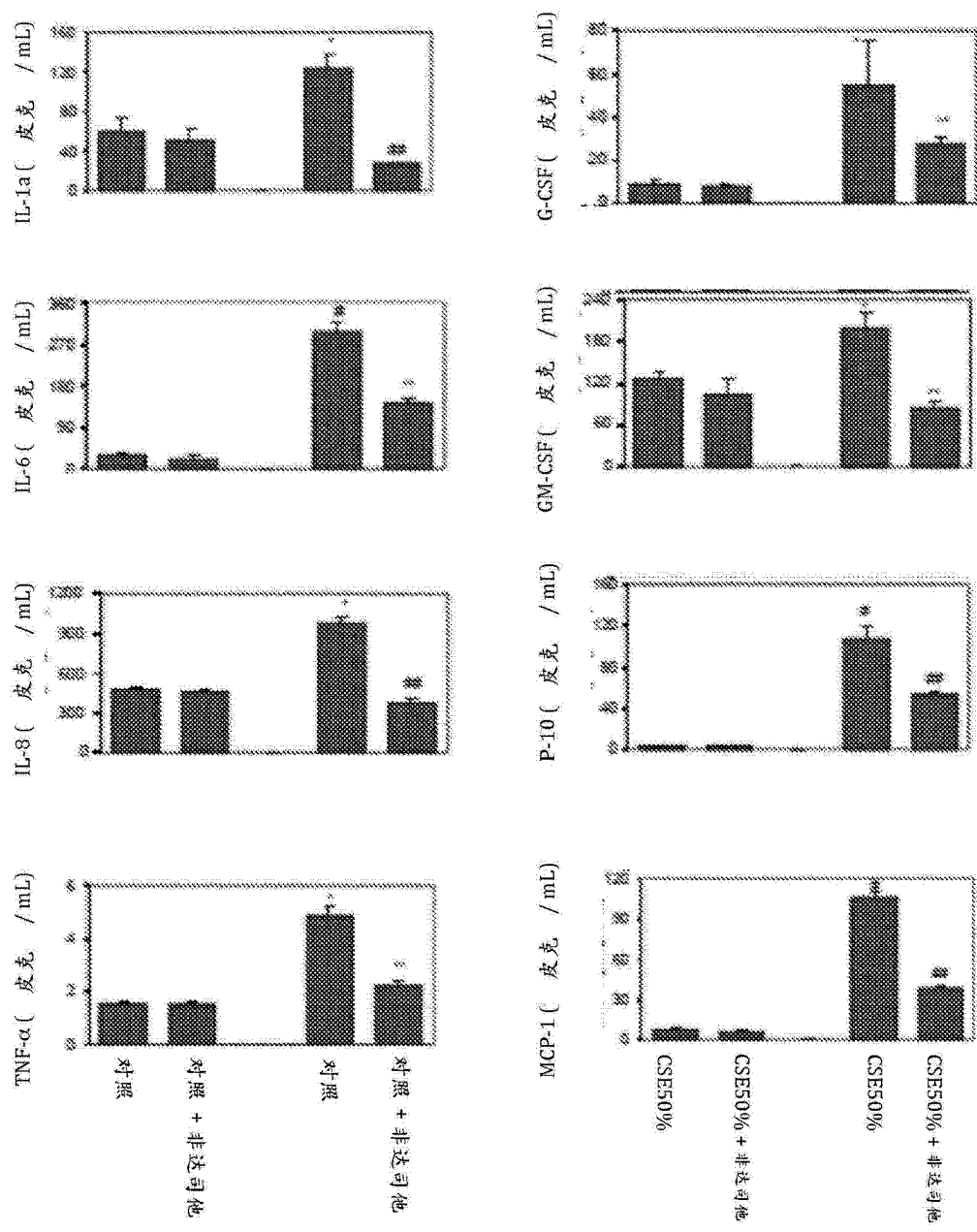


图 2

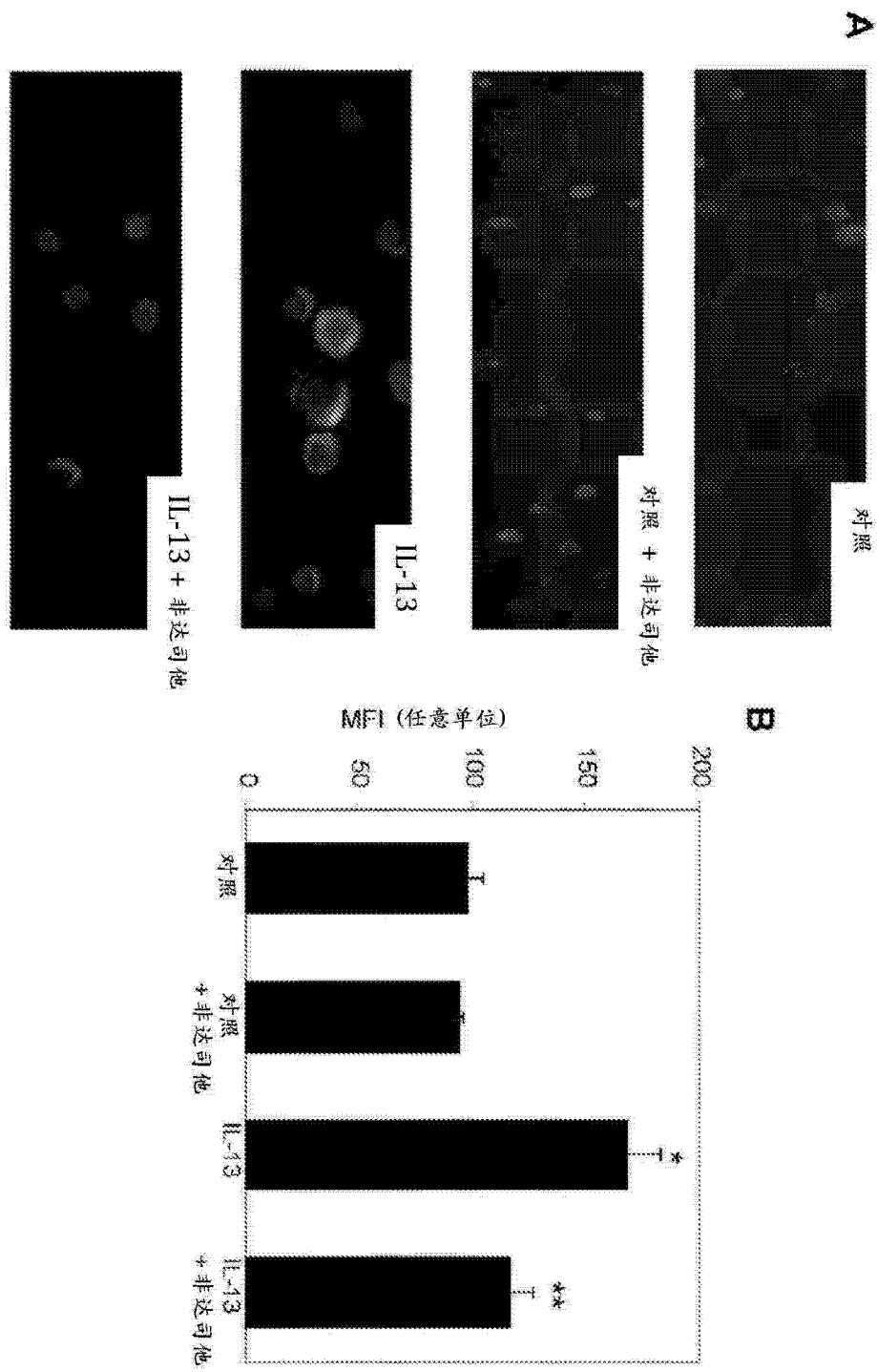


图 3A-3B

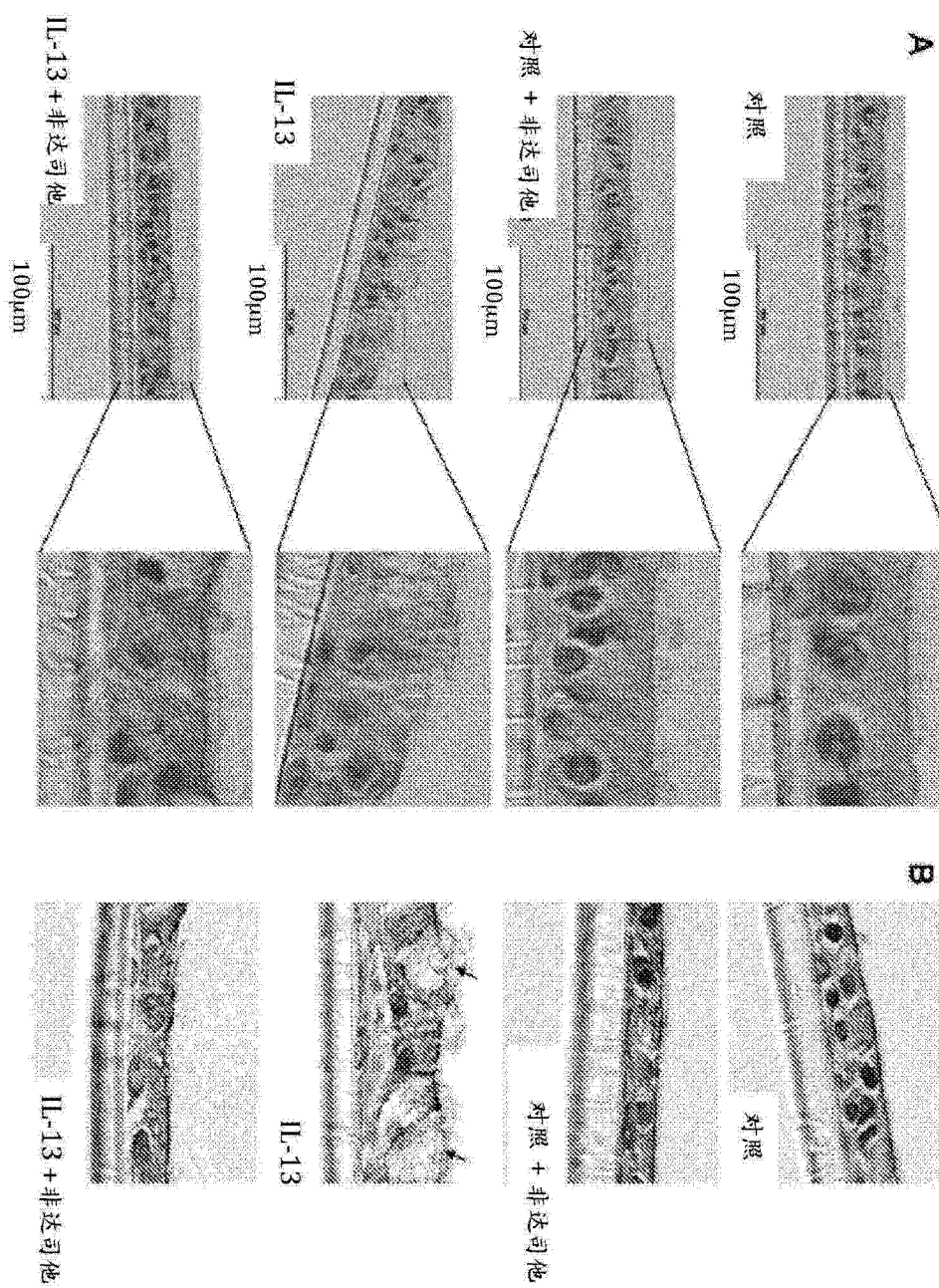


图 4A-4B

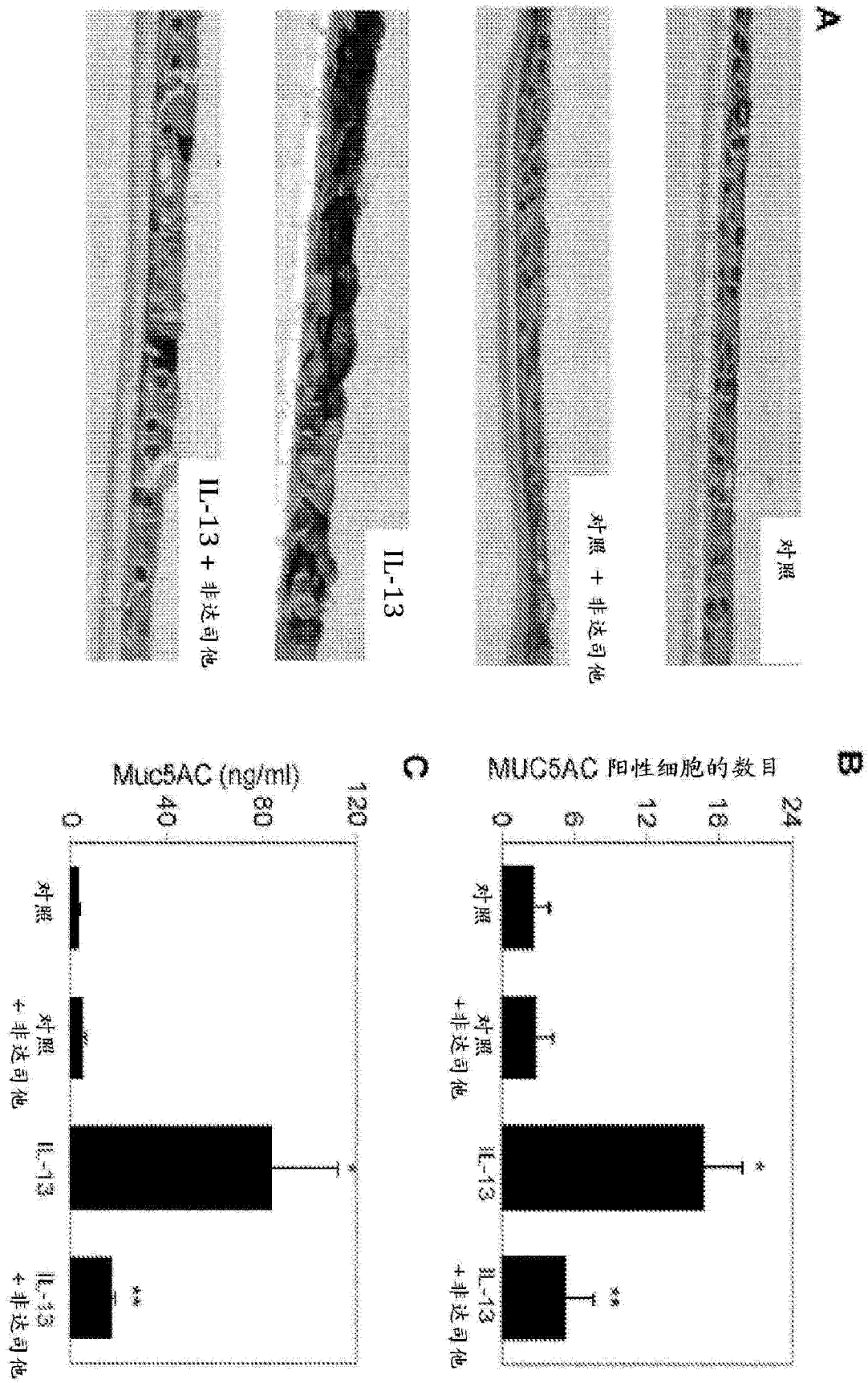


图 5A-5C

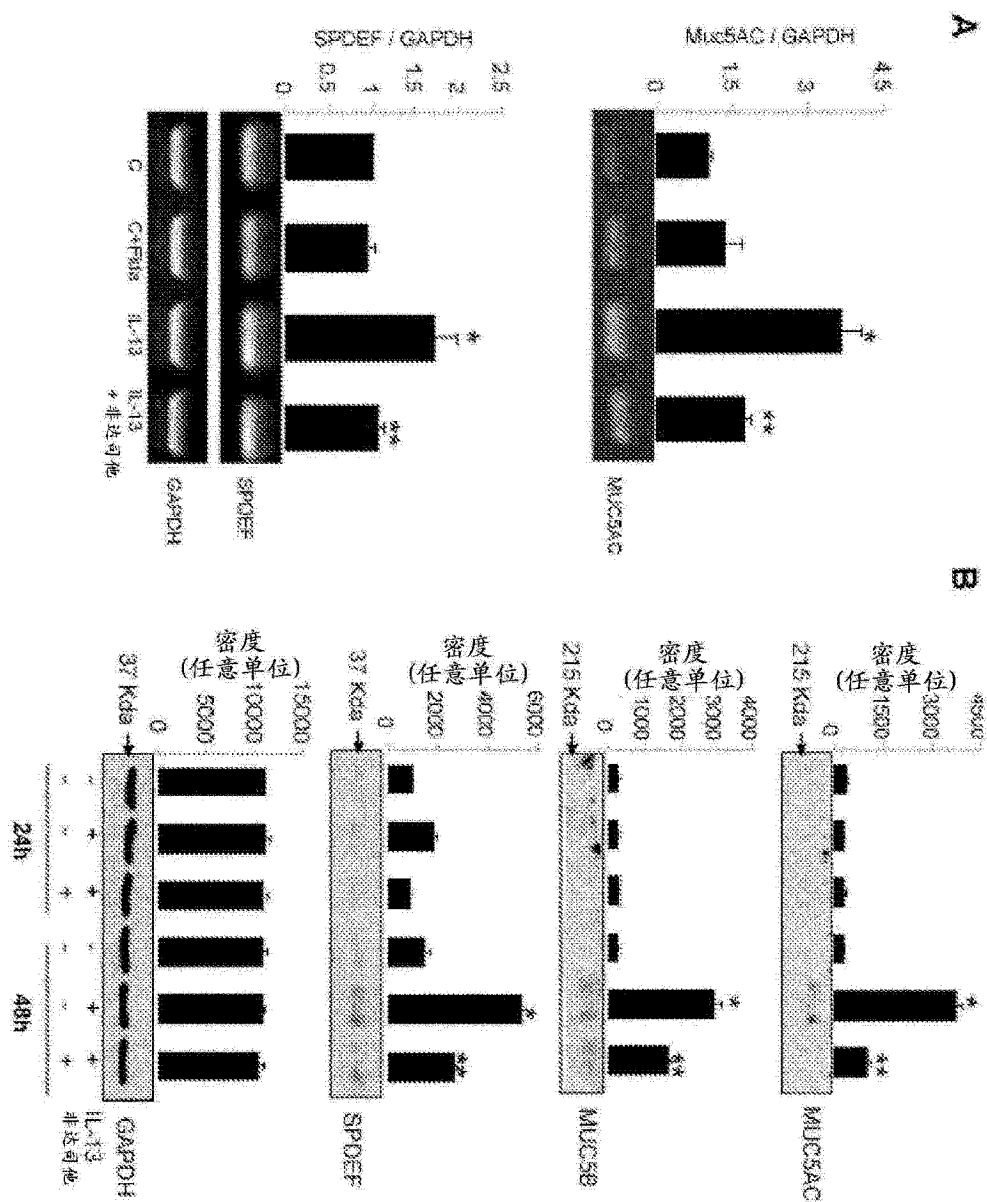


图 6A-6B

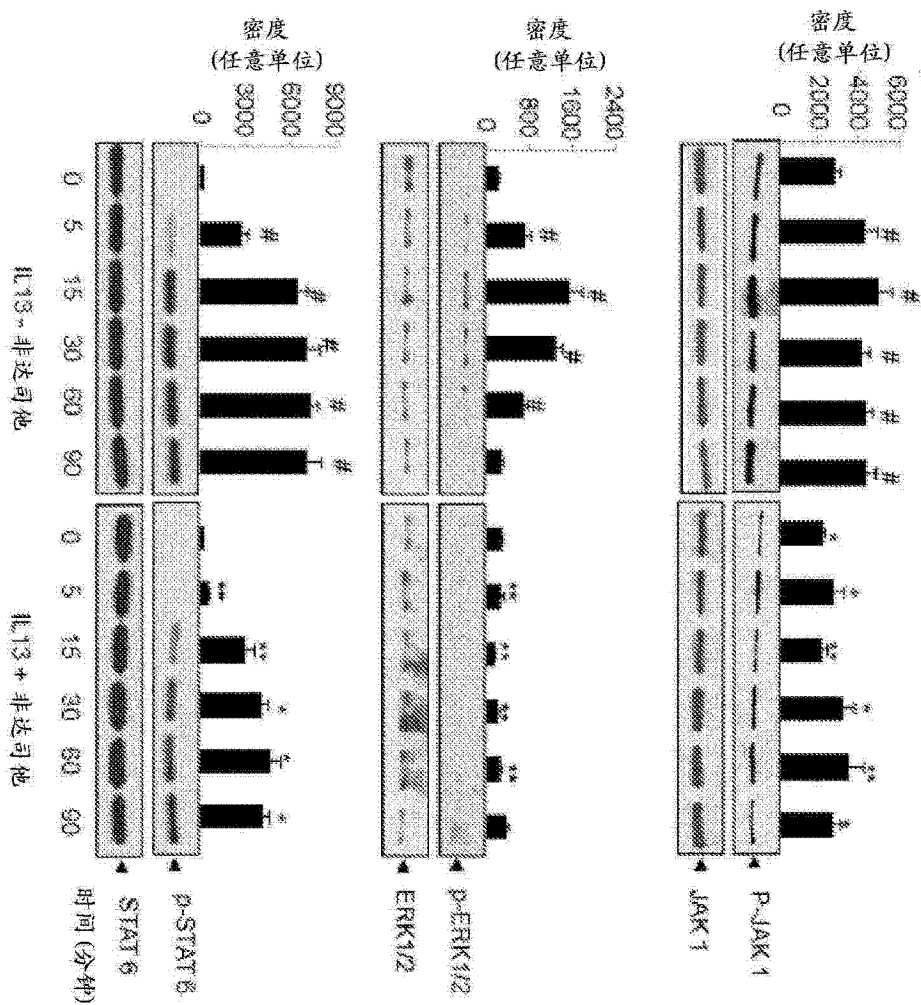


图 7

变化倍数(与对照之比)

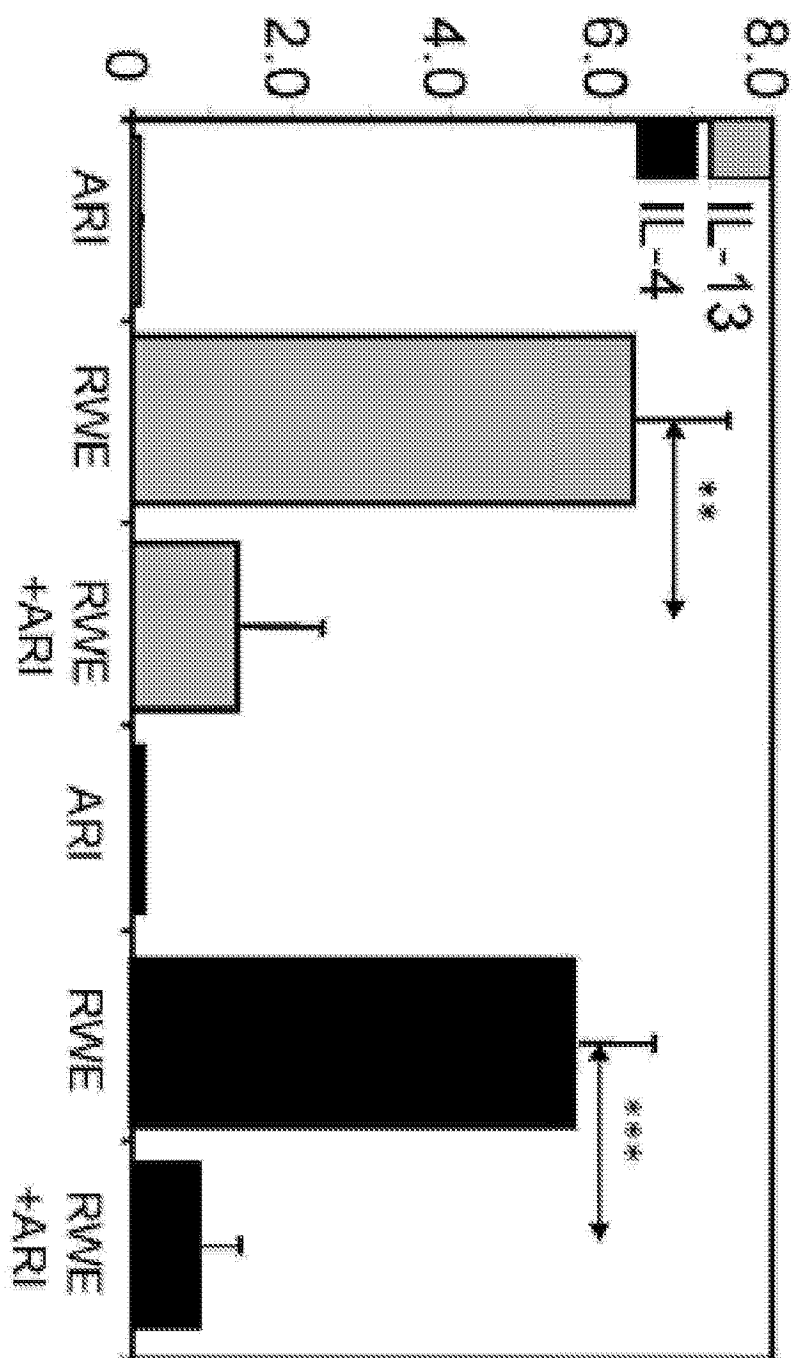


图 8

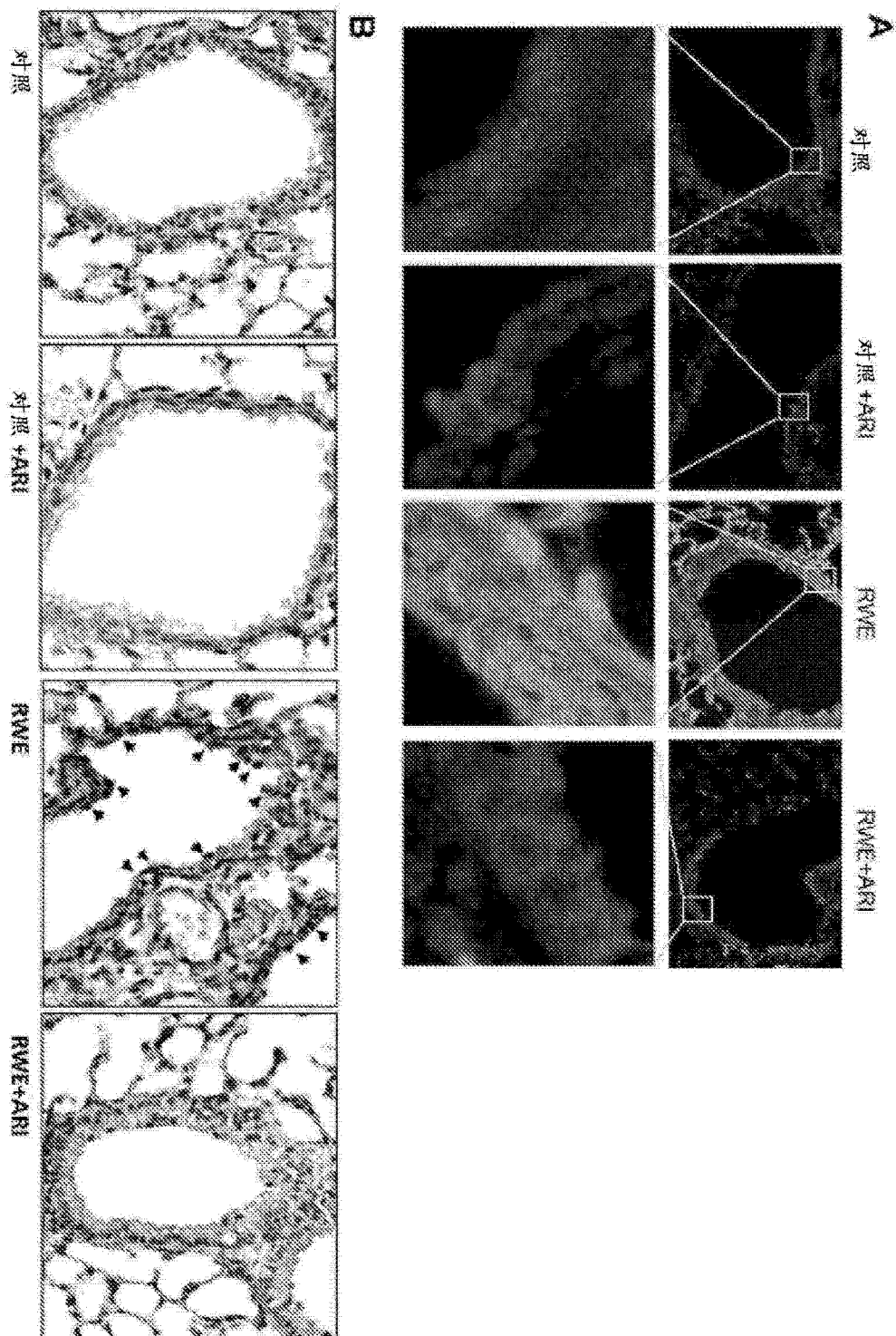


图 9A-9B

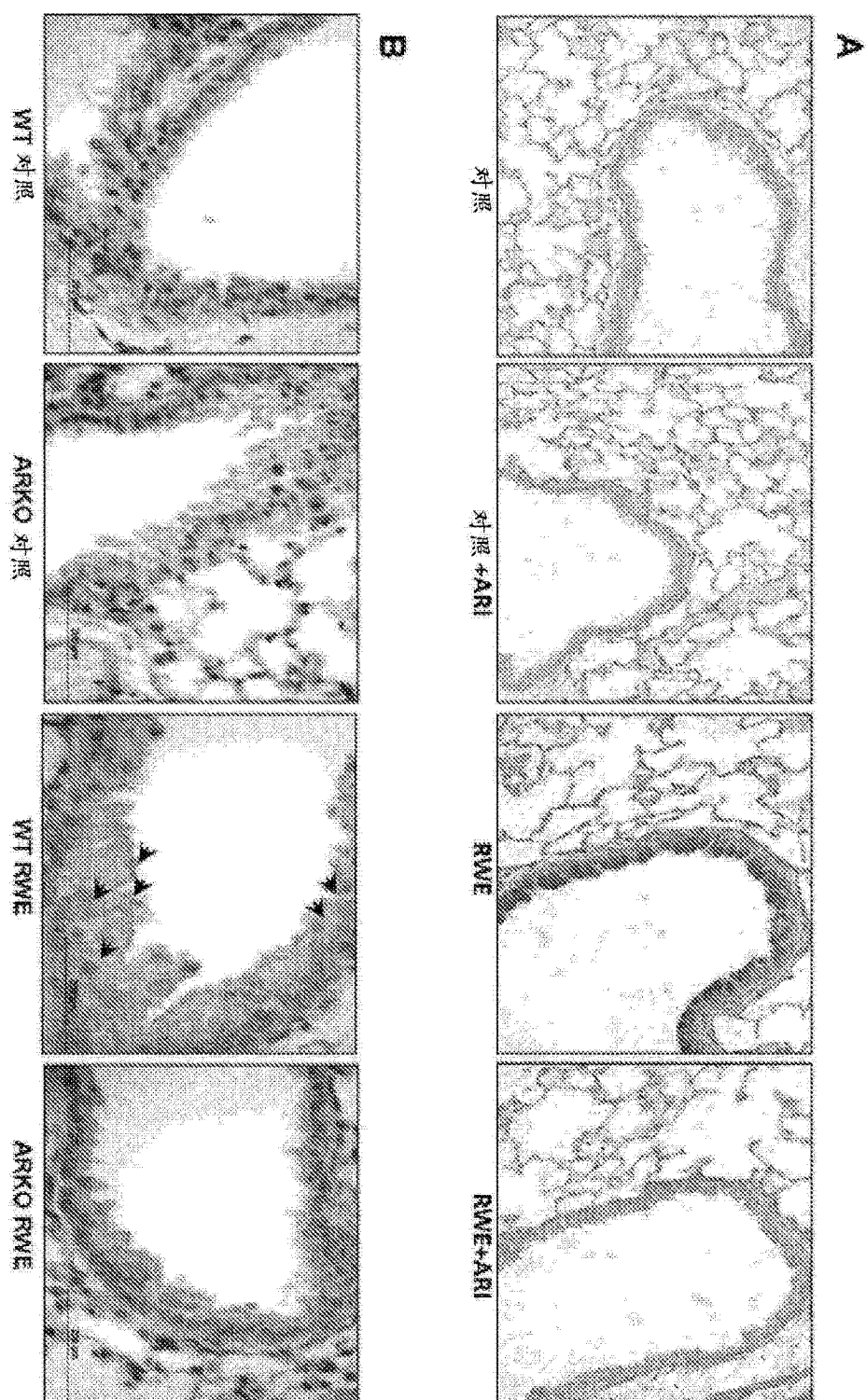


图 10A-10B