



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115916218 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 04

(21) 申请号 202180044451.3

(22) 申请日 2021.04.16

(30) 优先权数据

63/014,194 2020.04.23 US

63/129,418 2020.12.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/027798 2021.04.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/216378 EN 2021.10.28

(71) 申请人 斯格本斯眼科研究所有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·F·阿博莱达-贝拉斯克斯

L·A·金

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

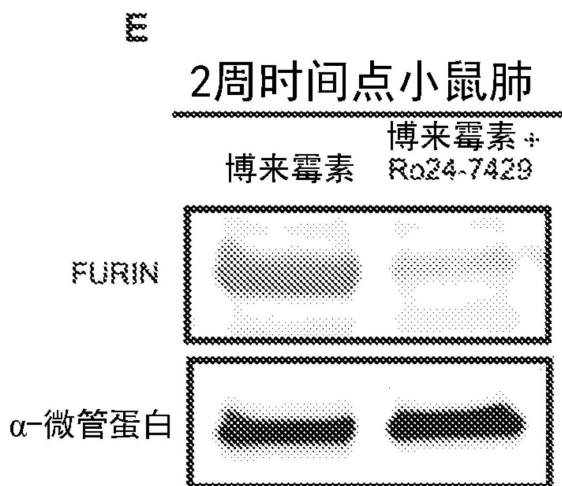
权利要求书2页 说明书22页 附图18页

(54) 发明名称

用于治疗纤维化的方法和材料

(57) 摘要

本文描述了通过例如在患有病毒感染的受试者中施用RUNX家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子 β 亚基 (CBF β) 的抑制剂来治疗受试者中的纤维化如肺纤维化和降低受试者中的纤维化如肺纤维化的风险的方法。



1. 一种用于治疗受试者中的纤维化或降低受试者中的纤维化的风险的方法,所述方法包括施用有效量的runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子 β 亚基 (CBF β) 的抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述纤维化是肺纤维化、肾纤维化、或肝纤维化、或辐射诱导的纤维化。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述纤维化是手术后粘连。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有病毒、细菌或真菌感染,或患有化学性化学性肺损伤,例如来自烟雾、化学烧伤、热损伤的化学性化学性肺损伤。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述受试者患有冠状病毒感染。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述冠状病毒感染是SARS或SARS-CoV-2感染。

7. 一种用于降低病毒的感染的风险、感染的严重程度或病毒后炎症综合征的风险或严重程度的方法,所述病毒依赖于血管紧张素转化酶2 (ACE2) 和/或FURIN进行内在化,所述方法包括施用有效量的runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子 β 亚基 (CBF β) 的抑制剂。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述病毒感染是冠状病毒。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述冠状病毒是SARS-CoV或SARS-CoV-2。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述RUNX家族转录因子1 (RUNX1) 的抑制剂是小分子抑制剂。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述RUNX1的小分子抑制剂是Ro24-7429 (3H-1, 4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氯代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-);Ro5-3335 ([7-氯代-5-(2-吡咯基)-3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-(H)-酮]),3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氟代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-,7-氟代-1,3-二氢-5-(1H-吡咯-2基)-2H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-酮,NSC140873,MLS000548294,MLS001048862,或NSC156594。

12. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述核心结合因子 β 亚基 (CBF β) 的抑制剂是小分子抑制剂。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述CBF β 的抑制剂是2-吡啶基苯并咪唑AI-4-57或其类似物,优选地,其中所述类似物是AI-10-47;AI-10-104;AI-12-16;AI-14-55;AI-12-126;AI-14-91;AI-14-18;或AI-14-72。

14. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述RUNX1或CBF β 的抑制剂是针对RUNX1或CBF β 的抑制性核酸。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述抑制性核酸是反义寡核苷酸、siRNA化合物、或锁核酸 (LNA)。

16. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述RUNX1的抑制剂是抑制RUNX1的融合蛋白,优选包含CBF β 的融合蛋白,优选CBF β -MYH11融合物。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述融合蛋白作为蛋白或作为编码所述融合蛋白的核酸施用。

18. 一种组合物,其包含runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子 β 亚基 (CBF β) 的抑制剂,其用于治疗受试者中的纤维化或降低受试者中的纤维化的风险的方法中的用途。

19. 根据权利要求18所述的用于所述用途的组合物,其中所述纤维化是肺纤维化、肾纤维化、或肝纤维化。

20. 根据权利要求18所述的用于所述用途的组合物,其中所述纤维化是手术后粘连。

21. 根据权利要求18所述的用于所述用途的组合物,其中所述受试者患有病毒感染。

22. 根据权利要求21所述的用于所述用途的组合物,其中所述受试者患有冠状病毒感染。

23. 根据权利要求22所述的用于所述用途的组合物,其中所述冠状病毒感染是SARS或SARS-CoV-2感染。

24. 一种组合物,其包含runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子 β 亚基 (CBF β) 的抑制剂,所述组合物用于降低病毒的感染的风险、感染的严重程度、或病毒后炎症综合征的风险或严重程度的方法中的用途,所述病毒依赖于血管紧张素转化酶2 (ACE2) 和/或FURIN进行内在化。

25. 根据权利要求24所述的用于所述用途的组合物,其中所述病毒感染是冠状病毒。

26. 根据权利要求25所述的用于所述用途的组合物,其中所述冠状病毒是SARS-CoV或SARS-CoV-2。

27. 根据权利要求18-26中任一项所述的用于所述用途的组合物,其中所述RUNX家族转录因子1 (RUNX1) 的抑制剂是小分子抑制剂。

28. 根据权利要求27所述的用于所述用途的组合物,其中所述RUNX1的小分子抑制剂是Ro24-7429 (3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氟代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-);Ro5-3335 ([7-氟代-5-(2-吡咯基)-3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-(H)-酮]),3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氟代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-,7-氟代-1,3-二氢-5-(1H-吡咯-2基)-2H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-酮,NSC140873,MLS000548294,MLS001048862,或NSC156594。

29. 根据权利要求18-26中任一项所述的用于所述用途的组合物,其中所述核心结合因子 β 亚基 (CBF β) 的抑制剂是小分子抑制剂。

30. 根据权利要求29所述的用于所述用途的组合物,其中所述CBF β 的小分子抑制剂是2-吡啶基苯并咪唑AI-4-57或其类似物,优选地,其中所述AI-4-57的类似物是AI-10-47;AI-10-104;AI-12-16;AI-14-55;AI-12-126;AI-14-91;AI-14-18;或AI-14-72。

31. 根据权利要求18-26中任一项所述的用于所述用途的组合物,其中所述RUNX1或CBF β 的抑制剂是针对RUNX1或CBF β 的抑制性核酸。

32. 根据权利要求31所述的用于所述用途的组合物,其中所述抑制性核酸是反义寡核苷酸、siRNA化合物、或锁核酸 (LNA)。

33. 根据权利要求18-26中任一项所述的用于所述用途的组合物,其中所述RUNX1的抑制剂是抑制RUNX1的融合蛋白,优选包含CBF β 的融合蛋白,优选CBF β -Myosin11 (CBH β -MYH11) 融合物。

34. 根据权利要求33所述的用于所述用途的组合物,其中所述融合蛋白作为蛋白或作为编码所述融合蛋白的核酸施用。

用于治疗纤维化的方法和材料

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2020年4月23日提交的美国临时专利申请序列号63/014,194和2020年12月22日提交的美国临时专利申请序列号63/129,418的权益。前述内容的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本文描述了通过例如在患有病毒感染的受试者中使用runt相关转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子β亚基 (CBFβ) 的抑制剂来治疗受试者中的纤维化如肺纤维化和降低受试者中的纤维化如肺纤维化的风险的方法。

背景技术

[0004] 肺纤维化是一种慢性且通常致命的肺病,其特征在于细胞外基质的积累和肺实质的破坏(1-3)。肺纤维化的原因在大多数情况下是未知的,因此被称为特发性肺纤维化(IPF)。估计IPF影响100,000个个体中的约50个,使得IPF成为美国最常见的间质性肺病,诊断后中位生存期为3-5年(4,5)。

发明内容

[0005] 本文提供了用于治疗受试者中的纤维化或降低受试者中的纤维化的风险的方法。所述方法包括施用有效量的runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子β亚基 (CBFβ) 的抑制剂。还提供了包含runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子β亚基 (CBFβ) 的抑制剂的组合物,其用于治疗受试者中的纤维化或降低受试者中的纤维化的风险的方法中的用途。

[0006] 在一些实施方案中,纤维化是肺纤维化、肾纤维化、或肝纤维化、或辐射诱导的纤维化。在一些实施方案中,纤维化是手术后粘连。在一些实施方案中,纤维化不是眼纤维化。

[0007] 在一些实施方案中,受试者患有病毒、细菌或真菌感染,或患有化学性化学性肺损伤,例如来自烟雾、化学烧伤、热损伤的化学性化学性肺损伤。

[0008] 在一些实施方案中,受试者患有冠状病毒感染或流感。在一些实施方案中,冠状病毒感染是SARS或SARS-CoV-2感染。

[0009] 本文还提供了用于降低病毒的感染的风险、感染的严重程度、或病毒后炎症综合征的风险或严重程度的方法,所述病毒依赖于血管紧张素转化酶2 (ACE2) 和/或FURIN进行内在化。所述方法包括施用有效量的runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子β亚基 (CBFβ) 的抑制剂。在一些实施方案中,病毒感染是冠状病毒或流感。在一些实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV或SARS-CoV-2。还提供了包含runt相关家族转录因子1 (RUNX1) 或核心结合因子β亚基 (CBFβ) 的抑制剂的组合物,所述组合物用于降低病毒的感染的风险、感染的严重程度、或病毒后炎症综合征的风险或严重程度的方法中的用途,所述病毒依赖于血管紧张素转化酶2 (ACE2) 和/或FURIN进行内在化。

[0010] 在一些实施方案中,RUNX家族转录因子1 (RUNX1)的抑制剂是小分子抑制剂。

[0011] 在一些实施方案中,RUNX1的小分子抑制剂是Ro24-7429 (3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氯代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-);Ro5-3335 ([7-氯代-5-(2-吡咯基)-3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-(H)-酮]),3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氟代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-,7-氟代-1,3-二氢-5-(1H-吡咯-2基)-2H-1,4-苯丙二氮杂-2-酮,NSC140873,MLS000548294,MLS001048862,或NSC156594。

[0012] 在一些实施方案中,核心结合因子 β 亚基 (CBF β)的抑制剂是小分子抑制剂。在一些实施方案中,CBF β 的抑制剂是2-吡啶基苯并咪唑AI-4-57或其类似物,优选地,其中类似物是AI-10-47;AI-10-104;AI-12-16;AI-14-55;AI-12-126;AI-14-91;AI-14-18;或AI-14-72。

[0013] 在一些实施方案中,RUNX1或CBF β 的抑制剂是针对RUNX1或CBF β 的抑制性核酸。在一些实施方案中,抑制性核酸是反义寡核苷酸、siRNA化合物、或锁核酸 (LNA)。

[0014] 在一些实施方案中,RUNX1的抑制剂是抑制RUNX1的融合蛋白,优选包含CBF β 的融合蛋白,优选CBF β -MYH11融合物。

[0015] 在一些实施方案中,融合蛋白作为蛋白或作为编码融合蛋白的核酸施用。

[0016] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;也可以使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法、和实施例仅是说明性的而不旨在进行限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目、和其它参考文献通过引用以其整体并入本文。在冲突的情况下,本说明书包括定义将占主导。

[0017] 本发明的其它特征和优点将从以下详细描述和附图、以及从权利要求书显而易见。

附图说明

[0018] 本专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。具有彩色附图(一幅以上)的本专利或专利申请公开的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0019] 图1A-J.PF的博来霉素模型中在第14天的Ro24-7429的抗纤维化和抗炎作用。A-B)通过H&E和Masson三色染色来评价肺组织的组织学图像和胶原沉积,并使用明视场显微镜可视化(比例尺分别为-50 μ m和1000 μ m)。C)第14天的博来霉素和Ro24-7429处理的肺的低放大率(比例尺-2 μ m)和高放大率(比例尺-500 μ m)的代表性TEM显微照片。D)纤维化评分。E-F)在博来霉素和Ro24-7429处理的肺中,通过免疫印迹法的RUNX1和E-钙粘着蛋白和纤连蛋白水平的检测和定量。G)博来霉素和Ro24-7429处理的肺中的纤连蛋白、胶原3A1、RUNX1、和 α -SMA的mRNA水平的qRT-PCR分析。H-I)石蜡切片上对 α -SMA、RUNX1、IBA1、IB4和LY6G的免疫组织化学(比例-100 μ m)。J)博来霉素和Ro24-7429处理的肺中的IB4、IBA1和LY6G阳性细胞的定量。(所有数据表示为平均值 \pm S.E.M,n=5-6,ns-不显著,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和****P<0.0001)。

[0020] 图2A-I. IPF的博来霉素模型中在第7天的Ro24-7429的抗纤维化和抗炎作用。A-B)通过H&E和Masson三色染色来评价肺组织的组织学图像和胶原沉积,并使用明视场显微镜可视化(比例尺分别为-50 μ m和1000 μ m)。C)第14天的博来霉素和Ro24-7429处理的肺的低放

大率(比例尺-2 μ m)和高放大率(比例尺-500 μ m)的代表性TEM显微照片。D-E)在博来霉素(N=3)和Ro24-7429(N=3)处理的肺中,通过免疫印迹法的纤连蛋白、E-钙粘着蛋白和RUNX1水平的检测。F)博来霉素(N=6)和Ro24-7429(N=6)处理的肺中的纤连蛋白、胶原3A1、和RUNX1、和 α -SMA的mRNA水平的qPCR分析。G-H)石蜡切片上对 α -SMA、RUNX1、IBA1、IB4和LY6G的免疫组织化学(比例-100 μ m)。I)博来霉素和Ro24-7429处理的肺中的IB4、IBA1和LY6G阳性细胞的定量。所有数据表示为平均值 \pm S.E.M, n=6, ns-不显著,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和****P<0.0001)。

[0021] 图3A-J. 细胞因子刺激和Ro24-7429处理对肺上皮和血管内皮细胞中纤维化标志物的表达的影响。A) A549细胞中用TGF- β 1孵育24、48和72小时后,RUNX1、N-钙粘着蛋白和 α -SMA的mRNA水平的qRT-PCR分析。B) A459细胞中用TGF- β 1处理24、48和72小时的RUNX1、N-钙粘着蛋白和 α -SMA的免疫印迹法。C) A549细胞中TGF- β 1时序的免疫印迹法的定量。D-E)显示A459细胞中用TGF- β 1处理72小时后,Ro24-7429对纤维化标志物N-钙粘着蛋白的影响的免疫印迹法。F-G)在有和没有Ro24-7429预处理的情况下,用TGF- β 1或TNF- α 刺激的人肺泡上皮细胞(HPAEpi细胞)中的纤维化标志物N-钙粘着蛋白的免疫印迹法。H)用CD31(绿色)RUNX1(红色)和DAPI(蓝色)荧光标记的HMEC-L的代表性图像(比例-100 μ m)。I) HMEC-L细胞中用TNF- α 处理24、48和72小时后RUNX1的mRNA水平的qRT-PCR分析。J)在用AI-14-91和Ro24-7429以及TNF- α 处理预处理后的RUNX1表达的qRT-PCR。(所有数据表示为平均值 \pm S.E.M, n=3, ns-不显著,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和****P<0.0001)。

[0022] 图4A-I. SARS-CoV2感染期间的RUNX1表达,以及RUNX1抑制在人上皮和内皮细胞中的体外和体内作用。A)通过免疫染色的人对照肺和肺中具有低丰度的病毒蛋白(病例1)或高丰度的病毒蛋白(病例2)的SARS-CoV-2的两个病例中的RUNX1表达。仅病例2显示血管内皮(黄色三角形)和毛细血管(插图)中的RUNX1信号(比例尺-100 μ m)。B)在2周时间点的ACE2- α -SMA免疫染色。C-D)显示在有或没有Ro24-7429预处理的情况下,ACE2的TGF- β 1和TNF- α 诱导的免疫印迹法。E-F)显示博来霉素和Ro24-7429处理的肺(N=5)中的FURIN表达的免疫印迹法。G)在HMEC-L细胞中,在存在TNF- α 的情况下,用AI-14-91或Ro24-7429预处理后FURIN的mRNA的qRT-PCR分析。H) RUNX1在TGF- β 1(蓝色)和TNF- α (粉红色)信号传导中的作用及其对SARS CoV-2相关蛋白FURIN和ACE2的影响的假设的示意图。I)显示来自oPOSSUM分析的SARS-CoV-2相关基因的百分比分布的饼状图,RUNX1(红色)、RUNX1和AP-1(橙色)、AP-1(黄色)的转录因子结合位点(TFBS)、JNK途径基因(黑色)、具有AP-1TFBS的JNK途径基因(粉色)和具有AP-1和RUNX1 TFBS的JNK途径基因(紫色)以及不具有RUNX1或AP-1TFBS的其它(灰色)SARS-CoV-2基因。所有数据表示为平均值 \pm S.E.M, n=5-6, (ns-不显著,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001和****P<0.0001)。

[0023] 图5A-B. Ro24-7429的腹膜内注射的抗纤维化剂量反应比较。A-B)通过H&E和Masson三色染色评价肺组织的组织学图像和胶原沉积,并使用明视场显微镜可视化(比例尺分别为-50 μ m、100 μ m和1000 μ m)。

[0024] 图6A-F. 与溶媒(vehicle)处理相比,用RUNX1抑制剂Ro5-3335 150 μ M、增加剂量的Ro24-7429(50 μ M-200 μ M)、吡非尼酮(Pirfenidone)500 μ g/ml和尼达尼布(Nintedanib)5 μ M单独处理后48小时(6A、6D)和72小时(6B、6C、6E、6F)的CyQuant细胞增殖测定和乳酸脱氢酶(LDH)测定显示活细胞百分比在48小时显著降低,以及在72小时甚至更大的抑制。RUNX1抑

制有效抑制A549上皮细胞(6A、6B、6D、6E)和人肺成纤维细胞(HLF、6C、6F)的生长。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 。

[0025] 图7.COVID-19的情况中的AP-1和RUNX1转录因子结合位点(TFBS)的oPOSSUM分析。

[0026] 图8.来自一个对照和三个SARS-CoV-2阳性尸检病例的死后人肺组织的RUNX1免疫染色。两个病例显示出毛细血管和血管内皮中明显的阳性信号(黄红色箭头)。

[0027] 图9.来自4个SARS-CoV-2阳性病例的人肺组织的RUNX1免疫染色。未观察到阳性信号。

具体实施方式

[0028] 尽管在减缓IPF进展的抗纤维化药物如尼达尼布和吡非尼酮的最近发展,但仍没有广泛接受的可以降低IPF中的死亡率的的治疗(6)。迫切需要鉴定调节肺纤维化的病理机制中的关键靶标的治疗剂。随着IPF的发生率上升,具有强安全性的现有治疗剂的再利用可以提供鉴定迫切需要的治疗的加速路径(7,8)。

[0029] RUNX1是发育期间调节造血干细胞的分化的过程中至关重要的转录因子(20)。RUNX1作为与CBF β 结合的转录因子核心结合因子(CBF)的 α -DNA结合组分起作用(21)。虽然RUNX1在散发性骨髓增生异常综合征和白血病中反复突变,但在10-15%的成人新生急性髓性白血病(AML)病例中发现CBF β 突变。这些与癌症的联系已经引起了对RUNX1功能的小分子调节剂的发现和表征的兴趣,尽管迄今为止还没有一种被批准用于临床使用(22,23)。RUNX1在血管内皮细胞的TNF- α 驱动的增殖和迁移中起作用,在VEGF非依赖性途径中驱动异常血管生成(24,25)。RUNX1还在称为增殖性玻璃体视网膜病变的与眼纤维化相关的致盲病况中通过TGF- β 2信号传导、抑制上皮表型并促进间充质转化而起到上皮至间充质转化(EMT)的主要调节因子的作用(26)。这些结果表明RUNX1活性与作为应答于许多疾病的关键细胞过程的病理性血管生成和纤维化两者相关。因此,RUNX1调节可以导致用于普遍的非肿瘤病况的新治疗方式(24)。

[0030] Ro24-7429和Ro5-3335是RUNX1活性的小分子抑制剂。Ro5-3335已作为RUNX1抑制剂广泛用于多项研究中,并且是市售可得的(22)。Ro24-7429最初是由于其作为Tat拮抗剂的潜在作用而开发的,并且在感染人免疫缺陷病毒(HIV)的患者中在治疗获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的治疗中在2期临床试验中进行了测试(27)。Ro24-7429在这些临床试验中具有可接受的安全性,但发现没有可检测的抗病毒活性(28)。该研究评价了RUNX1在肺纤维化中的作用,并使用博来霉素诱导的肺损伤模型测试了Ro24-7429的潜在抗纤维化作用(29)。

[0031] 本研究表明了PF的博来霉素模型中使用小分子Ro24-7429的RUNX1抑制的临床前功效。这里使用的Ro24-7429剂量相当于先前在1/2期试验中测试的具有强安全性的剂量(28)。用Ro24-7429的预处理通过抑制RUNX1活性显著减少纤维化并维持肺泡结构。

[0032] 已经发现例如尼达尼布和吡非尼酮等具有抗纤维化活性的当前药物减慢IPF进展(4)。不希望受理论束缚,本数据表明RUNX1抑制可以通过影响PF进展的不同阶段的多种途径起作用,导致纤维化的强力预防。目前的结果体外和体内表明RUNX1抑制分别防止人肺泡上皮细胞和人血管内皮细胞中在TGF- β 1和TNF- α 的存在下的病理变化。由免疫细胞活化、细胞损伤和炎症导致的细胞因子信号传导激活下游途径,包括内皮细胞中的JNK途径和肺上皮细胞中的SMAD途径(24,44,45)。JNK和SMAD途径都集中在AP-1上,因为分别能够激活/磷

酸化c-Jun,其与c-Fos二聚化以形成AP-1。已知AP-1引起炎性细胞因子的进一步产生,并且还和RUNX1表达相关(图4H)(24,46)。这些数据阐明了细胞因子信号传导在多种细胞类型中的IPF的博来霉素诱导的模型中介导会聚型(convergent)RUNX1活性中的作用。

[0033] 评价RUNX1在肺上皮中的作用的先前研究已经显示,应答于经由脂多糖(LPS)暴露的急性肺损伤,肺组织中增加的RUNX1表达(47)。然而,肺上皮内RUNX1的条件性敲除通过NF- κ B的激活增加了急性肺损伤对LPS的易感性(48)。本工作显示了通过Ro24-7429的RUNX1抑制的药理学抑制,抑制了成体组织中的炎症。不希望受理论束缚,本结果表明药理学抑制可以允许正常的基线RUNX1活性,同时抑制RUNX1的异常活性。RUNX1的发育转录靶也可能不同于成体组织中的转录靶。此外,在一些实施方案中,本发明的方法可以包括全身抑制RUNX1,允许在上皮以外、包括成纤维细胞、血管内皮和炎性细胞在内的多种细胞类型内进行抑制。

[0034] Ro24-7429也作为Tat拮抗剂进行了研究(27,28)。为了排除脱靶效应,还在HMEC-L中测试了经过验证的RUNX1抑制剂AI-14-91。Ro24-7429导致纤维化标志物的减少,一种也在通过分子方法抑制RUNX1的研究中报道的表型(3)。

[0035] 纤维化的炎症介质-TGF- β 1、TNF- α 、和FURIN

[0036] TGF- β 1是肺纤维化的关键介质,并且其表达在肺纤维化的动物模型和患有IPF的人肺(30,32)中、在肝纤维化(56)中、在辐射暴露后诱导的纤维化(57)和手术粘连(58)中增强。TGF- β 1参与一系列的细胞变化,包括增殖、分化、凋亡和死亡(33)。TGF- β 1激活诱导细胞外基质产生,并且其作用通过SMAD2/3途径介导,如通过SMAD3敲除所说明的,SMAD3敲除被发现在博来霉素小鼠模型中防止纤维化(34)。最近的出版物强调了TGF- β 1/SMAD/RUNX1信号传导在IPF中的作用(3)。人们越来越关注RUNX1在包括肾小管上皮细胞的各种器官系统的纤维化中的作用,其中发现RUNX1调节EMT的标志物,并且RUNX1的敲除防止肾纤维化(35)。已经提出RUNX1在成纤维细胞激活和增殖中起作用(36)。RUNX1在被认为是有助于IPF的肌成纤维细胞的来源的脂成纤维细胞中高度表达(37)。成纤维细胞和肌成纤维细胞的激活导致细胞外基质(ECM)蛋白的过度沉积,这是损害肺功能的重要致病事件(38)。

[0037] TNF- α 被认为是体内促血管生成的,并且升高的TNF- α 水平与几种呼吸系统疾病包括哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)相关(39-42)。重要的是,TNF- α 表达与增加的内皮通透性直接相关(43)。在血管内皮细胞中,TNF- α 通过JNK途径反馈回路向RUNX1发信号(24)。具体地,在肺中,已显示TNF- α 信号传导的抑制减少胶原沉积,并附加地调节促纤维化介质TGF- β 1的表达(31,41)。

[0038] 总之,目前的数据表明RUNX1参与肺纤维化的病理生物学的多个步骤,并且RUNX1抑制可能导致用于多病因的PF的有效的新的疗法。因此,RUNX1抑制剂如Ro24-7429可用于治疗纤维化,包括肺中的PF,以及包括肾和肝的其它器官中的纤维化;辐射暴露后诱导的纤维化;和手术粘连。因此,RUNX1抑制剂可用于治疗肺和其它器官中的炎症病况,所述肺中的炎症病况包括慢性阻塞性肺病(COPD)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、和哮喘。

[0039] SARS-CoV-2

[0040] 最近的SARS-CoV-2大流行可能导致世界范围的病毒感染后诱导的PF病例的激增(9-12)。与SARS-CoV-2感染相关的肺病理学中涉及的关键病理生理学机制包括1)弥漫性肺泡损伤(13,14);2)肺纤维化(10);3)增加的血管渗漏/通透性(肺水肿)和异常血管生成

(15); 和, 4) “细胞因子风暴”, 其中不受控的炎症导致多种细胞因子的过度释放, 导致 COVID-19 患者的发病和死亡 (15, 16)。虽然瑞德西韦 (remdesivir)、地塞米松 (dexamethasone)、和抗 SARS-CoV-2 抗体混合物已获得紧急批准用于治疗 COVID-19, 但临床上迫切需要可以方便地施用并对临床结果产生显著影响的新的治法 (17-19)。疗法还可以用于缓解不同突变体版本的病毒, 因为它们变得对现有疫苗具有抗性。如本文所示, RUNX1 定位和信号在感染 SARS-CoV-2 的人肺的亚群中增加。观察到 RUNX1 核定位, 这是活性的指示。目前的数据表明, RUNX1 转录活性可能在 SARS-CoV-2 感染的病理性宿主应答 (调节上皮细胞、成纤维细胞和内皮细胞应答) 中起关键作用。发现在 COVID-19 患者中失调的基因中的转录因子结合位点 (TFBS) 的 oPPOSUM 分析显示这些基因的 78% 包含 RUNX1 TFBS, 表明 RUNX1 在 COVID-19 的病理生物学中具有重要作用 (15)。本结果表明 Ro24-7429 可用于治疗 COVID-19 患者中的 PF。

[0041] ACE2 和 FURIN 对于宿主细胞内的 SARS-CoV-2 病毒摄取为至关重要的。FURIN 是一种普遍存在的前蛋白转化酶, 其参与多种前体蛋白的蛋白水解加工, 并且激活许多被认为在 IPF 中为重要的因子, 包括 TGF- β 1, 一种与 IPF 相关的纤维化变化的主要促成因子。最初, TGF- β 1 作为无活性多肽产生, 其激活需要正确的蛋白水解切割。TGF- β 1 切割位点由类似于前蛋白转化酶 (PC) 识别基序的 R-H-R-R 序列组成。有趣的是, 该切割位点被作为 PC 家族的成员的 FURIN 正确切割 (50, 51)。然而, TGF- β 1 也被许多其它因子切割, 包括整合素 α v β 6 和丝氨酸蛋白酶纤溶酶 (30)。

[0042] 使用我们的博来霉素诱导的肺损伤模型和体外 TGF β /TNF- α 刺激的肺上皮和血管内皮细胞评价 RUNX1 功能与 ACE2 和 FURIN 的表达之间的潜在直接联系。基于上游调控元件的基因组指导的分子谱, RUNX1 最近被预测为 ACE2 和 FURIN 表达的几种潜在调节剂之一 (49)。我们首次报道了在体外和体内, RUNX1 表达与 ACE2 和 FURIN 表达水平直接相关。

[0043] 这提供了 Ro24-7429 可在患有 SARS-CoV2 的受试者中用作治疗剂的进一步证据, 因为这可具有多种功效途径; 在来自 COVID-19 患者的死后肺的肺组织中鉴定到 RUNX1 上调 (见实施例 6 和参考文献 15)。FURIN 是参与刺突蛋白 S1/S2 的切割以允许随后与 ACE2 相互作用和病毒内在化的关键酶, 并且重要的是, Ro24-7429 可能具有预防感染后相关纤维化的潜力。RUNX1 抑制在肺损伤的小鼠模型和体外人上皮和血管内皮细胞中减弱 ACE2 和 FURIN 的表达 (参见实施例 6), 表明 RUNX1 抑制可以降低 SARS-CoV-2 感染的风险。

[0044] 治疗方法

[0045] 本文所述的方法包括用于治疗与纤维化相关的病症的方法。在一些实施方案中, 所述病症是肺纤维化, 例如 IPF; 在一些实施方案中, 所述病症是继发于细菌或病毒如冠状病毒如 SARS2 或 SARS-CoV-2 或流感感染的肺纤维化。在一些实施方案中, 所述病症是肾或肝纤维化; 辐射暴露后诱导的纤维化; 手术粘连; 辐射暴露后诱导的纤维化; 和手术粘连。所述方法还可用于治疗肺和其它器官中的炎症病况, 所述肺中的炎症病况包括慢性阻塞性肺病 (COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 和哮喘。在一些实施方案中, 受试者患有化学性肺损伤, 例如来自烟雾、化学烧伤或热损伤等的化学性肺损伤。

[0046] 如在本上下文中使用的, “治疗” 意指改善病症的至少一种症状。施用治疗有效量的本文所述的化合物用于治疗与纤维化相关的病况将导致纤维化减少。例如, 肺纤维化, 包括继发于病毒感染如冠状病毒 (例如 SARS2 或 COVID-19) 或流感的纤维化, 可导致肺功能降

低;因此,治疗可以导致肺功能增加和恢复或接近正常肺功能。肺功能可以例如通过血氧饱和度(正常高于95%)、肺活量测定、不需要呼吸机支持来评价。还可以评价动脉血气参数,例如氧分压(PaO_2) (正常为75-100mmHg);二氧化碳分压(PaCO_2) (正常为38-42mmHg);动脉血pH(正常为7.38-7.42);或氧饱和度(SaO_2) (正常为94-100%)。

[0047] 还可以测定肺功能测试,例如,

[0048] FEV_1 80%至120%

[0049] FVC 80%至120%

[0050] 绝对 FEV_1/FVC 比在预测比的5%以内

[0051] TLC 80%至120%

[0052] FRC 75%至120%

[0053] RV 75%至120%

[0054] DLCO >60%至<120%

[0055] DLCO=肺一氧化碳弥散量。

[0056] FVC-用力肺活量;最大用力呼气期间可呼出的气体的总体积。

[0057] FEV_1 -第一秒用力呼气量;最大吸气后,第一秒中用力呼出的气体的体积。

[0058] FEV_1/FVC 比-一秒内呼出的FVC的百分比。

[0059] MVV-最大自主通气量。ERV-呼气储备量;呼气末呼出的气体的最大体积。

[0060] IRV-吸气储备量;吸气末吸入的气体的最大体积。

[0061] RV-余气量;最大呼气后肺中剩余的气体的体积。

[0062] VT-潮气量;各个呼吸循环期间吸入或呼出的气体的体积。

[0063] 参见,例如,Barreiro等人,Am Fam Physician.2004Mar 1;69(5):1107-1115。

[0064] 在一些实施方案中,所述方法用于患有COVID-19的受试者,并且可缩短恢复时间或降低病毒后肺部综合征的风险或严重程度;治疗或改善肺炎、或肺炎相关纤维化的风险或严重程度,例如减少患有病毒诱导的肺炎如COVID-19相关肺炎的受试者中的血管源性水肿、血管渗漏、和/或血管生成。在一些实施方案中,所述方法用于在无症状但测试为SARS-CoV-2阳性的个体中预防疾病或疾病进展(降低其风险)。

[0065] 此外,本文描述了用于降低依赖于ACE2进行内在化的病毒如冠状病毒如SARS2和SARS-CoV-2的感染的风险、感染的严重程度、或病毒后炎症综合征的风险或严重程度的方法。参见,例如,Monteil等人,Cell.2020May14;181(4):905-913.e7。

[0066] 通常,所述方法包括将治疗有效量的如本文所述的RUNX1的抑制剂或CBF β (RUNX1的结合配偶体)的抑制剂施用至有此类治疗需要或已确定需要此类治疗的受试者。

[0067] RUNX1/CBF β 抑制剂

[0068] 许多RUNX1抑制剂是本领域已知的,包括小分子,例如Ro24-7429(3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氟代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-)和Ro5-3335([7-氟代-5-(2-吡咯基(pyrryl))-3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-(H)-酮]),以及各自的类似物,例如3H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-胺,7-氟代-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-和7-氟代-1,3-二氢-5-(1H-吡咯-2基)-2H-1,4-苯丙二氮杂卓-2-酮(参见W02019099595),NSC140873,MLS000548294,MLS001048862,或NSC156594。参见,例如,W02018093797,Cunningham等人.(2012) Proc Natl Acad Sci USA,109(36):14592-14597,和美国专利申请公开号2014/0004082,其各自

的完整内容通过引用并入本文。RUNX1抑制剂的附加实例描述于5,641,773;5,164,376;5,141,735;5,041,438;5,036,101;和3,405,122,以及美国专利申请公开号2014/0004082,其各自的完整内容通过引用并入本文。

[0069] 许多CBF β 抑制剂是本领域已知的,包括小分子,例如2-吡啶基苯并咪唑AI-4-57及其类似物,例如,AI-10-47;AI-10-104;AI-12-16;AI-14-55;AI-12-126;AI-14-91;AI-14-18;或AI-14-72(参见Illendula等人,EBioMedicine.2016Jun;8:117-131);和W02018093797中描述的那些。认为苯并咪唑化合物与CBF β -SMMHC融合蛋白的CBF β 部分结合,并抑制其与RUNX蛋白的Runt结构域的结合。

[0070] 也可以使用导致形成显性阴性抑制剂的RUNX1或CBF β 与其它蛋白的一些融合物,例如,CBF β 的片段与Myosin11的片段的融合物(Liu等人,Science.1993Aug 20;261(5124):1041-4)(CBF β -My11)。这些融合物可以作为RUNX1的抑制剂作为蛋白施用、或作为编码这些蛋白的DNA或RNA施用。

[0071] 可选地,本方法可以包括使用针对RUNX1或CBF β 的抑制性核酸。可用于本方法和组合物的抑制性核酸包括反义寡核苷酸、核酶、siRNA化合物、单链或双链RNA干扰(RNAi)化合物如siRNA化合物、修饰的碱基/锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、以及与靶核酸的至少一部分杂交并调节其功能(即抑制表达)的其它低聚化合物或寡核苷酸模拟物。在一些实施方案中,抑制性核酸包括反义RNA、反义DNA、嵌合反义寡核苷酸、包括修饰键的反义寡核苷酸、干扰RNA(RNAi)、短干扰RNA(siRNA);小时序RNA(stRNA);或短发夹RNA(shRNA);小RNA诱导的基因激活(RNAa);小激活RNA(saRNA)、或其组合。参见,例如,W0 2010040112。

[0072] 人RUNX1的示例性序列如下:

[0073]

核酸	蛋白质	变体	名称
NM_001754.5	NP_001745.2	1	runt相关转录因子1亚型AML1c
NM_001122607.2	NP_001116079.1	2	runt相关转录因子1亚型AML1a
NM_001001890.3	NP_001001890.1	3	runt相关转录因子1亚型AML1b

[0074] 变体1代表最长的亚型(AML1c)。变体2与变体1相比的不同在于5'UTR和编码区。与亚型AML1c相比,所得亚型(AML1b)更短并且具有不同的N-末端。变体3与变体1相比的不同在于5'UTR和编码区以及3'UTR和编码区。与亚型AML1c相比,所得亚型(AML1a)更短并且具有不同的N-末端和C-末端。

[0075] 人CBF β 的示例性序列如下:

[0076]

核酸	蛋白质	名称
NM_022845.3	NP_074036.1	核心结合因子 β 亚基亚型1
NM_001755.3	NP_001746.1	核心结合因子 β 亚基亚型2
NM_001368707.1	NP_001355636.1	核心结合因子 β 亚基亚型3
NM_001368708.1	NP_001355637.1	核心结合因子 β 亚基亚型4
NM_001368709.1	NP_001355638.1	核心结合因子 β 亚基亚型5
NM_001368710.1	NP_001355639.1	核心结合因子 β 亚基亚型6

[0077] 变体1编码最长的亚型1。与变体1相比,变体2在3'编码区中使用替代剪接位点,导致移码。与亚型1相比,所得亚型2更短并且具有不同的C末端。变体3和4编码长度相同但具有不同蛋白质序列的亚型。变体5和6编码长度相同但具有不同蛋白质序列的亚型。

[0078] 药物组合物和施用方法

[0079] 本文所述的方法包括使用含有RUNX1抑制剂作为活性成分的药物组合物。

[0080] 药物组合物通常包括药学上可接受的载体。如本文所用,语言“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。补充活性化合物也可以引入组合物中,例如,在吡非尼酮、尼达尼布、托珠单抗(tocilizumab)、类固醇类(例如,皮质类固醇类(例如,泼尼松))、瑞德西韦、恢复期血浆(convalescent plasma)、针对SARS-CoV-2的单克隆抗体的实施方案中。

[0081] 药物组合物通常配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服、鼻(例如吸入,例如经由吸入器)、经皮(局部)、经粘膜、和直肠施用。

[0082] 配制合适的药物组合物的方法是本领域已知的,参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st ed.,2005;和Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a Series of Textbooks and Monographs(Dekker,NY)系列中的书籍。例如,用于肠胃外、皮内、或皮下应用的溶液或悬浮液可以包含以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、固定油(fixed oil)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂如氯化钠或葡萄糖。可以用例如盐酸或氢氧化钠等酸或碱调节pH。肠胃外制剂可以包封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0083] 适于注射用途的药物组合物可包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,NJ)、或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况中,组合物必须是无菌的,并且应该是达到存在容易注射性的程度的流体。它在制造和贮存条件下应该是稳定的,并且必须防止例如细菌和真菌等微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等)、及其合适的混合物。适当的流动性可以例如通过使用例如卵磷脂等包衣、在分散体的情况中通过维持所需的粒径和通过使用表面活性剂来维持。对微生物作用的预防可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、和硫柳汞等来实现。在许多情况中,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖类,如甘露醇、山梨醇等多元醇,氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0084] 无菌可注射溶液剂可以通过将所需量的活性化合物根据需要与上述列举的成分中的一种或组合一起引入适当的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。通常,分散液通过将活性化合物引入无菌溶媒中来制备,所述无菌溶媒含有基础分散介质和来自上述列举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分以及来自先前无菌过滤的溶液的任何附加所需成分的粉末。

[0085] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。为了口服治疗施用的目的,活性化合物可以混有赋形剂,并以片剂、锭剂、或胶囊剂如明胶胶囊的形式使用。也可以使用流

载体制备口服组合物用作漱口水 (mouthwash)。可以包含药学上相容的结合剂 (binding agent) 和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、和锭剂等可以包含任何以下成分或类似性质的化合物: 粘合剂例如微晶纤维素、黄耆胶或明胶; 赋形剂例如淀粉或乳糖, 崩解剂例如海藻酸、Primogel 或玉米淀粉; 润滑剂例如硬脂酸镁或 Sterotes; 助流剂例如胶体二氧化硅; 甜味剂例如蔗糖或糖精; 或矫味剂例如薄荷、水杨酸甲酯、或橙调味剂。

[0086] 对于通过吸入来施用, 化合物可以气溶胶喷雾剂的形式从含有合适的喷射剂如气体如二氧化碳的加压容器或分配器、或雾化器 (nebulizer) 递送。此类方法包括美国专利号 6,468,798 中描述的那些。尽管也可以使用全身方法, 包括通过吸入来施用的此类方法可以特别地用于通过抑制病毒进入呼吸系统的细胞的能力来降低冠状病毒感染的风险。

[0087] 如本文所述的治疗性化合物的全身施用也可以通过经粘膜或经皮方式。对于经粘膜或经皮施用, 在制剂中使用适合于要渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域已知的, 并且例如对于经粘膜施用包括洗涤剂、胆盐、和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现。对于经皮施用, 如本领域通常已知的, 将活性化合物配制成软膏剂、药膏、凝胶或霜剂。

[0088] 药物组合物还可以以栓剂 (例如, 用常规栓剂基质如可可脂和其它甘油酯) 或保留灌肠剂的形式制备用于直肠递送。

[0089] 作为核酸或包括核酸的治疗性化合物可以通过适合于施用核酸试剂例如 DNA 疫苗的任何方法施用。这些方法包括基因枪、生物注射器、和皮肤贴剂以及无针方法, 例如美国专利号 6,194,389 中公开的微粒 DNA 疫苗技术, 以及美国专利号 6,168,587 中公开的用粉末形式疫苗的哺乳动物经皮无针疫苗接种。此外, 鼻内递送是可能的, 特别地, 如 Hama jima 等人, Clin. Immunol. Immunopathol., 88 (2), 205-10 (1998) 中所描述的。也可以使用脂质体 (例如, 如美国专利号 6,472,375 中所描述的) 和微型胶囊。也可以使用可生物降解的靶向性微粒递送系统 (例如, 如美国专利号 6,471,996 中所描述的)。在一些实施方案中, 组合物是纳米乳液, 例如, 如 WO2019099595 中所描述的。

[0090] 在一些实施方案中, 治疗性化合物由将保护治疗性化合物免于从体内快速消除的载体制备, 例如控释制剂, 包括植入物和微胶囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物, 例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸。这样的制剂可以使用标准技术制备、或例如从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 商购获得。脂质体悬浮液 (包括由针对细胞抗原的单克隆抗体靶向所选细胞的脂质体) 也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备, 例如, 如美国专利号 4,522,811 中所描述的。

[0091] 药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装、或分配器中。

[0092] 实施例

[0093] 在以下实施例中进一步描述本发明, 这些实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

[0094] 材料和方法

[0095] 在本文的实施例中以下材料和方法。

[0096] 材料:

[0097] 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子 β 1 (TGF β 1) 购自 PeproTech (Rocky Hill,

NJ, USA)。RUNX1抑制剂Ro5-3335购自Millipore-Sigma (Burlington, MA, USA)。我们将Ro24-7429的合成以按服务收费与Medkoo Biosciences签订合同,通过¹H-NMR核磁共振(NMR)和质谱法确认了正确的结构,并且通过高效液相色谱法(HPLC,数据未显示)确认了纯度>99%。剩余的Ro24-7429作为好心的礼物从Paul Liu收到。如先前所述(19)合成CBFB-RUNX1蛋白-蛋白相互作用抑制剂AI-14-91。

[0098] 方法:

[0099] 动物模型

[0100] 动物程序由马萨诸塞州眼耳研究所的机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Massachusetts Eye and Ear)批准,并根据视觉和眼科研究协会关于在眼科和视觉研究中使用动物的声明(Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)进行。6-8周龄的C57BL/6J雄性和雌性小鼠购自杰克逊实验室(Jackson Laboratories)。对于所有程序,通过腹膜内注射氯胺酮/赛拉嗪混合物(100/50mg/kg)麻醉小鼠。

[0101] 实验设计

[0102] 将硫酸博来霉素(Sigma-Aldrich)溶解于无菌0.9%盐水中,并以每只动物50μl总体积的盐水溶液中的0.05单位的单剂量气管内(IT)施用。对照动物仅接受0.05mL盐水。选择预防性方案,并且每只动物在模型的诱导前7天每隔一天接受Ro24-7429药物70mg/kg或溶媒,并持续直至实验结束,持续1周或2周。所有动物在第0天如前所述(52-55)接受任一博来霉素的气管内滴注。用类似的药物-溶媒处理和IT盐水滴注用于对照进行了单独的实验。进行IT滴注的外科医生对治疗组的身份不知情。

[0103] 形态学检查

[0104] 在10%中性缓冲福尔马林(Sigma, HT501128-4L)中固定肺样品24小时用于组织学分析。将固定的肺石蜡包埋并切片(5μm厚),用苏木精和伊红(H&E)染色以检查总体形态,并进行Masson三色染色以使胶原沉积可视化并通过显微镜检查。使用利用Ashcroft分析方法的定量组织学测定肺纤维化。所有测量均由两名独立的评级员以盲法方式进行。用具有Olympus DP70相机的Nikon Eclipse E800显微镜获取图像。使用Adobe Photoshop CS6将肺的相邻2x图像拼接在一起。

[0105] 肺组织的免疫荧光分析

[0106] 使用以下抗体处理石蜡包埋的切片用于免疫荧光:抗RUNX1(1:100;LS-B13948; Lifespan Biosciences, Seattle, WA),抗人 α -SMA抗体(1:200;NB500-170;Novus Biologicals, Ontario, Canada),抗Iba1抗体(1:100;ab5076;Abcam, Cambridge, United Kingdom),抗Ly6g抗体(1:100;ab25377;Abcam, Cambridge, United Kingdom),和Isolectin GS-IB4 Alexa Fluoro 594缀合物(1:250;121413;Invitrogen, Carlsbad, CA)。对于热诱导的抗原修复,将切片在10mM柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中煮沸,然后在亚沸腾温度(95-100°C)下保持20分钟,随后在工作台上冷却30分钟。用蒸馏水洗涤切片,并用PBS中的0.5% Triton X-100透化5分钟,并在室温下封闭(PBS中的10%山羊血清)1小时。在抗体稀释缓冲液(5%山羊血清)中制备一抗,并在4°C下将样品与抗体溶液孵育过夜。用PBS洗涤切片,并与山羊抗兔Alexa Fluor 594二抗(1:500;A-11012;Invitrogen, Carlsbad, CA)在室温下孵

育2小时。安装切片并使用具有DAPI的Prolong Gold抗褪色试剂(P36935, Invitrogen)使其可视化。使用EVOS FL全自动台式活细胞成像系统(Life Technologies, Cambridge, MA)获得图像。

[0107] 透射电子显微镜(TEM)法:

[0108] 用盐水灌注小鼠肺,并在冷藏下用半强度Karnovsky固定液(2%甲醛+2.5%戊二醛,在0.1M二甲胍酸钠缓冲液中,pH 7.4)固定24小时。固定后,将样品修剪成1mm厚的片段,用0.1M二甲胍酸钠缓冲液冲洗,用0.1M二甲胍酸钠缓冲液中2%四氧化锇后固定1.5小时,用0.05M马来酸钠缓冲液中2%三乙酸钨(pH 6)整体染色30分钟,然后用梯度乙醇溶液脱水,用环氧丙烷转化并浸润在tEPON-812环氧树脂(Tousimis, Rockville, Maryland, USA)中,使用自动化EMS Lynx 2EM组织处理器(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA)。将加工的样品在平坦模具内定向至tEPON-812环氧树脂,并使用60°C烘箱聚合。使用Leica UC7超薄切片机(Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, USA)和金刚石刀(Diatome, Hatfield, Pennsylvania, USA)获得半薄和超薄切片(section)。通过用1%四硼酸钠水溶液中1%甲苯胺蓝染色不同的瓣(lobe),将半薄切片切成1 μ m厚度,用于通过光学显微镜进行评价。用水性2.5%三乙酸钨和改性的Sato柠檬酸铅染色网格上的超薄切片。使用FEI Tecnai G2 Spirit透射电子显微镜(FEI, Hillsboro, Oregon, USA)在80kV下对网格成像,所述透射电子显微镜与AMT XR41数字CCD相机(Advanced Microscopy Techniques, Woburn, Massachusetts, USA)连接用于数字TIFF文件图像采集。以2kx2k像素@16位分辨率获得TEM数字图像。

[0109] 细胞培养:

[0110] 人II型肺泡上皮细胞(A549)是来自Lagares博士(Mass General Hospital)的慷慨的礼物。在37°C、在潮湿的5% CO₂气氛中,将细胞维持在含有10% FBS、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的低葡萄糖-DMEM中。用Ro24-7429预处理细胞的汇合培养物24小时,然后用5ng/ml的TGF- β 1刺激。

[0111] 在37°C和5% CO₂下孵育购自Lonza (Basel, Switzerland)的P1时的人微血管内皮细胞(肺)(HMEC-L, CC-2527)。使用补充有EGMTM-2MV微血管内皮细胞生长培养基-2BulletKitTM(CC-2527)的内皮生长培养基(EGM-2)(Lonza),铺板P2-6时的HMEC-L。在补充有5% FBS、1%庆大霉素/两性霉素和选择的刺激物的内皮基础培养基(EBM-2)(Lonza)中处理P3-7时的细胞。

[0112] 人肺泡上皮细胞(HPAEPiC)购自ScienCell (Carlsbad, CA, USA)并在补充有2%胎牛血清(FBS)、上皮细胞生长补充物、100U/ml青霉素G和100 μ g/ml链霉素的肺泡上皮细胞培养基(ScienCell)中培养。为了实验目的,在6孔板中培养和维持细胞。

[0113] oPOSSUM分析:

[0114] 先前报道了COVID-19死亡患者中的血管生成相关基因(15)。使用由RUNX1或AP-1作为JASPAR核心转录因子结合位点(TFBS)谱的人单位点分析工具oPOSSUM(v.3.0)进行该基因集的分析。保守截断值0.4;矩阵得分阈值85%;上/下游序列5000。手动比较针对AP-1和RUNX1的靶基因命中,同时将与JNK途径相关的基因与amigo.geneontology.org报道的JNK信号传导途径基因手动匹配。

[0115] 人组织免疫组织化学:

[0116] SARS-CoV-2感染的死者的所有尸检均在汉堡埃彭多夫大学医学中心的法律医学研究所(Institute of Legal Medicine, of the University Medical-Center of Hamburg-Eppendorf) 如先前工作(55)中所描述的、在2020年3月和9月之间在解剖室进行,得到汉堡大学的独立伦理委员会的机构审查委员会(Institutional Review Board approval from the independent ethics committee of the Hamburg University)(方案号PV7311)批准。选择7例COVID-19患者和1例PCR病毒检测阴性的病例。评价临床数据,包括预先存在的医疗状况、死亡前的医疗过程和死前诊断发现(表2)。将肺组织样品福尔马林固定并石蜡包埋(FFPE)。使用Ventana Benchmark XT自动染色仪(Ventana, Tucson, AZ, USA)对样品进行免疫组织化学染色。根据制造商的建议,使用RUNX1抗体(HPA004176;兔多克隆, Sigma Aldrich, Hamburg, Germany; 稀释1:200)进行RUNX1染色。为了检测特异性结合,使用Ultra View Universal 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)检测试剂盒(Ventana, Roche),其含有二抗、DAB染色剂和复染试剂。由有经验的肺病理学家(SS)检查和诊断切片。然后用NanoZoomer 2.0-HT(Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)以高放大率($\times 40$)电子扫描完整玻片作为高分辨率图像(1900 \times 1200像素)。

[0117] 表2:患者人口统计特征

#	性别	年龄	死后间隔(天)	死亡地点	死因	并存病	组织学
1	M	82	5	普通病房	肺炎伴有急性心脏代偿失调	高血压, COPD, 糖尿病, CHD	DAD, 主要为肺气肿
2 (病例 1)	F	84	4	自家	肺栓塞, 肺炎, 心肌梗塞	糖尿病, 心功能不全	低 DAD, RUNX1 信号
3 (病例 2)	F	75	2	自家	肺栓塞, 肺炎	CHD, 高血压	DAD, RUNX1 信号
4	M	76	3	ICU	败血症, 肺炎	C.a.后病况, 甲状腺癌, 急性骨髓性白血病, 扩张型心肌病	DAD
5	M	81	1	ICU	肺栓塞, 肺炎	骨髓纤维化, CHD, 脂肪性肝病	DAD
6	F	59	0	ICU	肺炎	多发性骨髓瘤	DAD
7	F	83	2	ICU	肺炎	肺栓塞后病况, 非霍奇金淋巴瘤	DAD

[0119] DAD=弥漫性肺泡损伤, CHD=冠状动脉心脏病, COPD=慢性阻塞性肺病, ICU=重症加强护理病房。

[0120] 免疫印迹法:

[0121] 根据制造商的说明书,通过Pierce Bicinchonic acid (BCA) 蛋白检测试剂盒(ThermoFisher; 23227)测定蛋白质浓度。在4 μ L 1M 1,4-二硫苏糖醇(DTT; Sigma Aldrich)和10 μ L Laemmli缓冲液(Boston Bioproducts)中制备20 μ g的总细胞裂解物至最终体积为40 μ L,在90 $^{\circ}$ C下变性5分钟。使用4-20%预制梯度凝胶(Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad)和SDS-Tris-甘氨酸缓冲液(Bio-rad)在70V下电泳分离样品1小时。在冰冷的20%甲醇Tris-甘氨酸缓冲液(Bio-rad)中在70V下将蛋白质转移至0.45 μ m硝酸纤维素膜1小时。用Odyssey封闭

缓冲液 (LI-COR Biosciences) 封闭膜1小时。然后与一抗在室温下孵育3小时或在4℃下孵育过夜,然后用TBS-T洗涤3次,并与二抗IRDye 800CW驴抗小鼠孵育1小时并用TBS-T洗涤3次。使用Odyssey红外成像系统检测免疫反应条带,并在Image Studio软件 (版本2.1,LI-COR Biosciences) 上可视化。

[0122] 定量RT-PCR:

[0123] 将HMEC-L铺板并如上所述处理24至72小时。当未指定时,qRT-PCR裂解物收集的时间点是处理48小时。根据制造商的说明书,使用RNeasy Mini试剂盒 (QIAGEN,Hilden, Germany) 提取RNA。按照制造商的方案,使用iScript cDNA合成试剂盒 (Bio-Rad,Hercules, CA,USA) 进行转录成互补DNA,并使用FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Hoffmann-La Roche,Basel,Switzerland) 在384孔白板中进行探测。

[0124] 在安乐死之前如前所述处理小鼠。收集肺样品用于qRT-PCR分析,并通过均质化来裂解组织。根据制造商对组织样品的说明书,使用RNeasy Mini试剂盒 (QIAGEN) 提取RNA。如前所述进行转录成互补DNA和分析。所选基因的引物 (表1) 购自Integrated DNA Technologies (Coralville,IA,USA)。

[0125] 表1:qRT-PCR分析中使用的引物序列

基因	物种	正向	反向
HPRT1	人	ACCCTTTCCAAATCCTCAGC	GTTATGGCGACCCGCAG
RUNX1	人	TCCACAAACCCACCGCAAGT	CGCTCGGAAAAGGACAAGC
FURIN	人	TCGGGGACTATTACCACTTCTG	CCAGCCACTGTACTTGAGGC
ACE2	人	ACAGTCCACACTTGCCCAAAT	TGAGAGCACTGAAGACCCAT T
HPRT1	小鼠	TCAGTCAACGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCA G
RUNX1	小鼠	TGGTGGAGGTACTAGCTGACC	CGAGTAGTTTTTCATCGTTGC CTG
FURIN	小鼠	AGGGACGTGTATCAGGAGCC	CCTGCTAGGTCGGGATGATT C
ACE2	小鼠	GGCGACAAGCACAGACTACAA	GCCATCTCGTTTTTCAGGAC C
α-SMA	小鼠	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGG A
TNF-R1	小鼠	GGGCACCTTTACGGCTTCC	TCTCCTTACAGGGGATTGTC AC
TGFβ1	小鼠	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATC TG
纤连蛋白	小鼠	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT	GCCCAGTGATTTTCAGCAAAG G
胶原蛋白	小鼠	CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA	CCATAGCTGAACTGAAAACC ACC

[0127] 统计学分析:

[0128] 结果表示为平均值±S.E.M。用方差分析 (单向ANOVA) 评价数据,然后进行Dunnett多重比较检验。双尾非配对t检验用于两组之间的比较。具有统计显著性的值表示为*p<0.05,**p<0.01和***p<0.01。

[0129] 实施例1.RUNX1抑制剂Ro24-7429的剂量依赖性抗纤维化活性

[0130] 博来霉素在第7天在肺中引发强烈的炎症反应,其特征在于中性粒细胞和巨噬细

胞浸润、血管渗漏和细胞因子、趋化因子和其它炎症介质的上调。到第14天,预期博来霉素处理的小鼠发展显著肺纤维化,包括正常肺结构的破坏、肺泡隔的增厚、和肺泡结构周围的过量细胞外基质和胶原沉积。我们在第14天通过H&E和Masson三色染色检查了递增剂量的Ro24-7429(每天17.5、35和70mg/kg)对小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化的影响(图1A-B,图5A-B)。估计这些剂量与Ro24-7429人体试验中使用的剂量相当,分别为每天75、150或300mg(28)。我们在气管内滴注博来霉素前1周开始治疗,因为对于COVID-19的治疗似乎在疾病显著改变肺功能之前的早期阶段更有效,并且因为未来的临床试验可能在预防性治疗模式下更可行。

[0131] 使用Masson三色染色在博来霉素滴注后两周显著检测到纤维化病灶的致密区域,并通过透射电子显微镜(TEM)确认(图1A-C)。相反,用Ro24-7429(70mg/kg)处理的小鼠在博来霉素滴注后显示出肺结构的稳健保留,类似于用气管内盐水滴注的小鼠(图1A-B,图5A-B)。如通过Ashcroft纤维化评分的显著降低所确证的,在Ro24-7429处理的小鼠中观察到较少至没有纤维化区域(图1D)。在肺表型上观察到药物的剂量依赖性作用,最低剂量(17.5mg/kg)显示轻微作用,而35mg/kg剂量显示对纤维化的进展的中等但可变的作用(图5A-B)。

[0132] 实施例2.RUNX1抑制遏制受损小鼠肺中纤维化标志物的表达

[0133] 我们评价了用Ro24-7429或溶媒处理的用博来霉素滴注的小鼠的肺组织中RUNX1和纤维化的已知标志物的表达。如所预期的,免疫印迹法分析显示,Ro24-7429处理降低了RUNX1和纤连蛋白的表达,而它保留了上皮标志物E-钙粘着蛋白的表达(图1E-F)。定量RT-PCR(qRT-PCR)分析显示,与来自盐水组的组织相比,用博来霉素滴注的小鼠的肺组织中包括 α -SMA、胶原3A1、和纤连蛋白的纤维化标志物的mRNA表达上调(图1G)。免疫荧光染色和qRT-PCR揭露了博来霉素滴注后诱导纤维化时的RUNX1的显著上调(图1G-H)。在博来霉素损伤的小鼠中观察到的对RUNX1上调的这种作用在用Ro24-7429处理的小鼠中显著减弱。与溶媒处理的小鼠相比,Ro24-7429处理还减弱了由博来霉素引发的纤维化标志物的上调(图1E-H)。

[0134] 最高剂量的Ro24-7429(70mg/kg)的保护作用进一步得到了疤痕形成肌成纤维细胞的标志物 α -SMA的免疫染色分析的支持,所述 α -SMA共定位于博来霉素滴注的肺中的致密纤维化区域内,但如所预期的,仅定位于Ro24-7429处理的小鼠中的血管(染色的壁细胞)(图1H)。

[0135] 实施例3.Ro24-7429的抗炎活性

[0136] 我们评价了Ro24-7429对肺损伤后1周和2周博来霉素诱导的炎症的潜在影响(图1I-J和图2)。如所预期的,博来霉素在1周时间点没有引发显著的纤维化(图2A-G)。如图1I-J和图2H-I所示,在博来霉素注射的小鼠中观察到中性粒细胞和巨噬细胞的大量流入。用Ro24-7429处理的小鼠在1周和2周时间点显示炎症细胞、特别是中性粒细胞和巨噬细胞的减少的浸润。这些结果表明,RUNX1抑制强力消除博来霉素损伤模型中的肺纤维化和炎症。

[0137] 实施例4.RUNX1调节培养的肺细胞中的增殖和TGF- β 1诱导的纤维化

[0138] 我们在细胞培养中进行了机制研究以检查RUNX1抑制在针对博来霉素诱导的肺损伤的保护中的强力作用的细胞和分子机制。我们测试了RUNX1抑制对人肺泡基底上皮细胞系(A549)、原代人源肺泡上皮细胞(HPAEpi)、和人源原代培养肺成纤维细胞(HLF)的增殖的

影响。对于具体分析,我们使用了递增剂量的Ro24-7429 (50-200 μ M)、Ro5-3335 (150 μ M)、吡非尼酮 (500 μ g/ml) 和尼达尼布 (5 μ M), 后两者是目前批准的用于IPF的药物。

[0139] Ro24-7429以剂量依赖性方式强烈抑制A549和HLF细胞的增殖,如通过CyQUANT直接细胞增殖检测所测定的(图6)。在两种细胞类型中在Ro24-7429浓度(50-200 μ M)和Ro5-3335 (150 μ M)的浓度下通过LDH分析检测到非常低水平的细胞死亡,表明RUNX1抑制对增殖的直接作用(图6)。在48小时,Ro24-7429处理在最高浓度(200 μ M)下显著降低A549细胞的增殖68%,在最低浓度(50 μ M)下降低62%。我们在72小时观察到增殖的降低减少,降低82%(200 μ M)。在HLF细胞中观察到对增殖的类似显著作用。在72小时,Ro24-7429在最高浓度(200 μ M)导致增殖的55%降低。而在最低浓度(50 μ M)下观察到增殖的30%降低。在A549细胞中,Ro5-3335在48小时(32%)和72小时(50%)也表现出强抗增殖作用。我们还观察到Ro5-3335在HLF细胞中的类似强力作用,导致在72小时的增殖的40%降低。与尼达尼布和吡非尼酮相比,Ro24-7429对增殖的作用是强力的并且具有相似的量级。然而,吡非尼酮(500 μ g/ml)在48小时导致显著的细胞死亡(8%),这在A549细胞中在72小时增加至11%(图6B)。

[0140] 我们评价了在24、48和72小时,RUNX1抑制对A549细胞中由TGF- β 1 (PF的关键介质)诱导的纤维化标志物表达的作用(30)。我们使用qRT-PCR(图3A)和免疫印迹法分析(图3B-C),在暴露后的所有三个时间点,发现TGF- β 1暴露强烈诱导A549细胞中 α -SMA和N-钙粘着蛋白的表达。在24、48和72小时,TGF- β 1暴露也强烈诱导RUNX1表达(图3A-C)。我们使用免疫印迹法分析发现,由TGF- β 1暴露前24小时施用的Ro24-7429 (150 μ M和200 μ M)的RUNX1抑制有效地防止了A549细胞和HPAEPi中TGF- β 1诱导的N-钙粘着蛋白上调(图3D-G)。我们得出结论,TGF- β 1介导对肺上皮细胞中肺纤维化的作用的调节是解释RUNX1抑制对博来霉素诱导的肺损伤的结果的强烈影响的潜在机制。

[0141] 实施例5. TNF- α 显著增加原代肺内皮细胞中RUNX1表达

[0142] 促炎介质如TNF- α 在导致纤维化的组织损伤的炎症阶段增加(31)。已发现该细胞因子在感染SARS-CoV-2的患者中高度升高(24)。我们通过免疫荧光、qRT-PCR和免疫印迹法评价了TNF- α 刺激(5ng/ml)对来自肺的人微血管内皮细胞(HMEC-L)原代培养物中RUNX1表达的影响。与对照相比,单独的TNF- α 刺激增加了RUNX1染色,而RUNX1染色在暴露于TGF- β 1时没有变化(图3H)。时序实验表明了了在TNF- α 刺激后48和72小时,RUNX1 mRNA增加2倍(图3I)。在48小时,Ro24-7429处理(75 μ M)显著降低TNF- α 诱导的RUNX1 mRNA上调50%(图3J)。类似地,用另一RUNX1抑制剂AI-14-91 (1 μ M) (23)的处理在48小时减弱TNF α 诱导的RUNX1 mRNA上调50%(图3J)。该数据表明了肺内皮细胞中炎性细胞因子相关机制,这潜在地解释了RUNX1抑制通过调节血管内皮细胞功能对博来霉素诱导的肺损伤的炎症阶段的强力影响。

[0143] 实施例6. COVID-19肺组织中的RUNX1表达和RUNX1对关键SARS-CoV-2摄取蛋白的调节

[0144] 我们通过免疫组织化学检验了来自COVID-19死亡患者的7例死后肺组织和1例对照患者中的RUNX1的表达。我们发现,在来自七例死亡病例中的两例的SARS-CoV-2病毒感染的肺的亚组中的RUNX1表达的异常分布,定位于血管内皮和小毛细血管。七例病例中的五例呈现纤维化和弥漫性肺泡损伤。局部RUNX1信号与病理表现无关,尽管一例RUNX1阳性病例

在福尔马林固定的石蜡包埋的 (FFPE) 肺组织中呈现病毒载量 (图4A;图8-9;表2)。总之,这些发现强调了RUNX1可能是改善重症COVID-19中肺病理学的新靶标的可能性。

[0145] 我们使用我们的博来霉素诱导的肺损伤模型和体外TGF β /TNF- α 刺激的肺上皮和血管内皮细胞进一步评价了RUNX1功能与ACE2受体和前蛋白转化酶FURIN的表达之间的潜在功能联系,ACE2受体和FURIN对于宿主细胞内SARS-CoV-2病毒摄取为至关重要的。

[0146] 博来霉素小鼠模型中2周时间点的免疫荧光分析显示了ACE2表达定位于具有增加的 α -SMA染色和纤维化的区域。Ro24-7429处理显著减少肺中ACE2染色和纤维化 (图4B)。此外,我们研究了RUNX1抑制对TGF- β 1和TNF- α 刺激的HPAEpi细胞中ACE2表达的表达影响。我们发现TGF- β 1和TNF- α 暴露引起ACE2蛋白水平的上调 (图4C-D)。RUNX1抑制显著降低HPAEpi细胞中TGF- β 1和TNF α 诱导的ACE2蛋白水平。如通过免疫印迹法评价的,在Ro24-7429处理的小鼠中也观察到FURIN蛋白水平降低70% (图4E-F)。

[0147] 我们用TNF- α (5ng/ml) 刺激HMEC-L以使用qPCR分析进一步检验RUNX1功能和FURIN表达之间的联系。Ro24-7429显著降低FURIN mRNA表达70% (图4G),而AI-14-91降低mRNA表达50%。由于RUNX1抑制在小鼠肺损伤模型以及体外人上皮和血管内皮细胞中减弱ACE2和FURIN的表达,因此这种处理方式可对COVID-19的治疗具有作用 (图4H)。

[0148] 在COVID-19患者的肺中,其它人鉴定了血管生成相关基因的表达的相对变化 (15)。与对照相比,在113种报道的基因中,100种在COVID-19患者中的基因表达相对增加。我们使用oPOSSUM软件来绘制这113种基因中的RUNX1或AP-1 (先前显示驱动内皮细胞中的RUNX1表达) 转录因子结合位点 (TFBS) 谱 (图7)。其中,88种基因 (78%) 是RUNX1的靶基因命中 (Z-得分15.370;Fisher得分11.682),这意味着它们共享保守TFBS,并且98种基因 (87%) 是AP-1的靶基因命中 (Z-得分14.568;Fisher得分12.297)。TFBS的手动分析表明了包含AP-1和RUNX1 TFBS二者在内的85种基因、以及与JNK信号传导途径强烈相关的17种基因的重叠。113种COVID-19基因中只有12种未显示针对AP-1或RUNX1 JASPAR CORE谱的靶基因命中 (图4I,图7)。该数据支持RUNX1、以及JNK-AP-1-RUNX1途径 (图4F) 在调节血管生成相关基因中的重要性,血管生成相关基因在严重的COVID-19疾病状态中被上调,在许多情况下最终导致患者死亡。

[0149] 参考文献和注释:

[0150] 1.Lederer DJ,Martinez FJ.Idiopathic Pulmonary Fibrosis.New England Journal of Medicine.2018;378 (19):1811-23.

[0151] 2.Selman M,Pardo A.Idiopathic pulmonary fibrosis:an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder.Respir Res.2002;3 (1):3.

[0152] 3.Lin S,Zhang R,Xu L,Ma R,Xu L,Zhu L,et al.LncRNA Hoxaas3promotes lung fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-450b-5p to regulate Runx1.Cell Death&Disease.2020;11 (8):706.

[0153] 4.Graney BA, Lee JS.Impact of novel antifibrotic therapy on patient outcomes in idiopathic pulmonary fibrosis:patient selection and perspectives.Patient Relat Outcome Meas.2018;9:321-8.

[0154] 5.Maher TM.PROFILEing idiopathic pulmonary fibrosis:rethinking biomarker discovery.European Respiratory Review.2013;22 (128):148.

- [0155] 6.Vancheri C,Kreuter M,Richeldi L,Ryerson CJ,Valeyre D,Grutters JC,et al.Nintedanib with Add-on Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.Results of the INJOURNEY Trial.Am J Respir Crit Care Med.2018;197(3):356-63.
- [0156] 7.Hutchinson J,Fogarty A,Hubbard R,McKeever T.Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis:a systematic review.European Respiratory Journal.2015;46(3):795.
- [0157] 8.Strongman H,Kausar I,Maher TM.Incidence,Prevalence,and Survival of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the UK.Adv Ther.2018;35(5):724-36.
- [0158] 9.Ojo AS,Balogun SA,Williams OT,Ojo OS.Pulmonary Fibrosis in COVID-19 Survivors:Predictive Factors and Risk Reduction Strategies.Pulmonary Medicine.2020;2020:6175964.
- [0159] 10.George PM,Wells AU,Jenkins RG.Pulmonary fibrosis and COVID-19:the potential role for antifibrotic therapy.The Lancet Respiratory Medicine.2020;8(8):807-15.
- [0160] 11.Eapen MS,Lu W,Gaikwad AV,Bhattarai P,Chia C,Hardikar A,et al.Endothelial to mesenchymal transition:a precursor to post-COVID-19 interstitial pulmonary fibrosis and vascular obliteration?European Respiratory Journal.2020;56(4):2003167.
- [0161] 12.Huertas A,Montani D,Savale L,Pichon J,Tu L,Parent F,et al.Endothelial cell dysfunction:a major player in SARS-CoV-2 infection(COVID-19)?European Respiratory Journal.2020;56(1):2001634.
- [0162] 13.Martines RB,Ritter JM,Matkovic E,Gary J,Bollweg BC,Bullock H,et al.Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease,United States.Emerg Infect Dis.2020;26(9):2005-15.
- [0163] 14.Schaefer I-M,Padera RF,Solomon IH,Kanjilal S,Hammer MM,Hornick JL,et al.In situ detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19.Modern Pathology.2020;33(11):2104-14.
- [0164] 15.Ackermann M,Verleden SE,Kuehnel M,Haverich A,Welte T,Laenger F,et al.Pulmonary Vascular Endothelialitis,Thrombosis,and Angiogenesis in Covid-19.New England Journal of Medicine.2020;383(2):120-8.
- [0165] 16.Polak SB, Van Gool IC,Cohen D,von der Thüsen JH,van Paassen J.A systematic review of pathological findings in COVID-19:a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression.Mod Pathol.2020;33(11):2128-38.
- [0166] 17.Beigel JH,Tomashek KM,Dodd LE,Mehta AK,Zingman BS,Kalil AC,et al.Remdesivir for the Treatment of Covid-19—Final Report.New England Journal of Medicine.2020;383(19):1813-26.

- [0167] 18. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19—Preliminary Report. *New England Journal of Medicine*. 2020.
- [0168] 19. Pashaei M, Rezaei N. Immunotherapy for SARS-CoV-2: potential opportunities. *Expert Opin Biol Ther*. 2020;20(10):1111-6.
- [0169] 20. Yzaguirre AD, de Bruijn MFTR, Speck NA. The Role of Runx1 in Embryonic Blood Cell Formation. In: Groner Y, Ito Y, Liu P, Neil JC, Speck NA, van Wijnen A, editors. *RUNX Proteins in Development and Cancer*. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 47-64.
- [0170] 21. Bravo J, Li Z, Speck NA, Warren AJ. The leukemia-associated AML1 (Runx1)-CBF β complex functions as a DNA-induced molecular clamp. *Nature Structural Biology*. 2001;8(4):371-8.
- [0171] 22. Cunningham L, Finckbeiner S, Hyde RK, Southall N, Marugan J, Yedavalli VRK, et al. Identification of benzodiazepine Ro5-3335 as an inhibitor of CBF leukemia through quantitative high throughput screen against RUNX1-CBF β interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(36):14592.
- [0172] 23. Illendula A, Gilmour J, Grembecka J, Tirumala VSS, Boulton A, Kuntimaddi A, et al. Small Molecule Inhibitor of CBF β -RUNX Binding for RUNX Transcription Factor Driven Cancers. *EBioMedicine*. 2016;8:117-31.
- [0173] 24. Whitmore HAB, Amarnani D, O'Hare M, Delgado-Tirado S, Gonzalez-Buendia L, An M, et al. TNF- α signaling regulates RUNX1 function in endothelial cells. *The FASEB Journal*. n/a(n/a).
- [0174] 25. Lam JD, Oh DJ, Wong LL, Amarnani D, Park-Windhol C, Sanchez AV, et al. Identification of RUNX1 as a Mediator of Aberrant Retinal Angiogenesis. *Diabetes*. 2017;66(7):1950-6.
- [0175] 26. Delgado-Tirado S, Amarnani D, Zhao G, Rossin EJ, Elliott D, Miller JB, et al. Topical delivery of a small molecule RUNX1 transcription factor inhibitor for the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Scientific Reports*. 2020;10(1):20554.
- [0176] 27. Hsu MC, Dhingra U, Earley JV, Holly M, Keith D, Nalin CM, et al. Inhibition of type 1 human immunodeficiency virus replication by a tat antagonist to which the virus remains sensitive after prolonged exposure in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(14):6395-9.
- [0177] 28. Haubrich RH, Flexner C, Lederman MM, Hirsch M, Pettinelli CP, Ginsberg R, et al. A randomized trial of the activity and safety of Ro 24-7429 (Tat antagonist) versus nucleoside for human immunodeficiency virus infection. The AIDS Clinical Trials Group 213 Team. *J Infect Dis*. 1995;172(5):1246-52.
- [0178] 29. Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, Williams K, Elliot SJ, Ninou I, et

al.Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis.Frontiers in Medicine.2017;4(118).

[0179] 30.Yue X,Shan B,Lasky JA.TGF- β :Titan of Lung Fibrogenesis.CurrEnzym Inhib.2010;6(2).

[0180] 31.Malaviya R,Laskin JD,Laskin DL.Anti-TNF α therapy in inflammatorylung diseases.Pharmacol Ther.2017;180:90-8.

[0181] 32.Hoyt DG,Lazo JS.Alterations in pulmonary mRNA encodingprocollagens,fibronectin and transforming growth factor-beta precedebleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.J Pharmacol Exp Ther.1988;246(2):765-71.

[0182] 33.Lee J,Choi JH,Joo CK.TGF- β 1 regulates cell fate during epithelial-mesenchymal transition by upregulating survivin.Cell Death&Disease.2013;4(7):e714-e.

[0183] 34.Bonniaud P,Kolb M,Galt T,Robertson J,Robbins C,Stampfli M,et al.Smad3 Null Mice Develop Airspace Enlargement and Are Resistant toTGF- β -MediatedPulmonary Fibrosis.The Journal of Immunology.2004;173(3):2099.

[0184] 35.Zhou T,Luo M,Cai W,Zhou S,Feng D,Xu C,et al.Runt-RelatedTranscription Factor 1(RUNX1)Promotes TGF- β -Induced Renal TubularEpithelial-to-Mesenchymal Transition(EMT)and Renal Fibrosis through thePI3K Subunit p110 δ .EBioMedicine.2018;31:217-25.

[0185] 36.Kim W,Barron DA,San Martin R,Chan KS,Tran LL,Yang F,et al.RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblastdifferentiation.Proc Natl Acad Sci U S A.2014;111(46):16389-94.

[0186] 37.Xie T,Wang Y,Deng N,Huang G,Taghavifar F,Geng Y,et al.Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse PulmonaryFibrosis.Cell Rep.2018;22(13):3625-40.

[0187] 38.Frangogiannis NG.Fibroblast-Extracellular Matrix Interactions in TissueFibrosis.Curr Pathobiol Rep.2016;4(1):11-8.

[0188] 39.Sainson RC,Johnston DA,Chu HC,Holderfield MT,Nakatsu MN,Crampton SP,et al.TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting byinducing a tip cell phenotype.Blood.2008;111(10):4997-5007.

[0189] 40.Fräter-Schröder M,Risau W,Hallmann R,Gautschi P,Böhlen P.Tumornecrosis factor type alpha,a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro,isangiogenic in vivo.Proc Natl Acad Sci U S A.1987;84(15):5277-81.

[0190] 41.Malaviya R,Sunil VR,Venosa A,Verissimo VL,Cervelli JA,Vayas KN,et al.Attenuation of Nitrogen Mustard-Induced Pulmonary Injury and Fibrosis byAnti-Tumor Necrosis Factor- α Antibody.Toxicological Sciences.2015;148(1):71-88.

- [0191] 42. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respiratory Research*. 2006;7(1):125.
- [0192] 43. Sinha P, Ware LB. Selective tumour necrosis factor receptor-1 inhibition in acute lung injury: a new hope or a false dawn? *Thorax*. 2018;73(8):699.
- [0193] 44. Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Shen X, Wong C, Rougier-Chapman EM, et al. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):4844-9.
- [0194] 45. Yan X, Xiong X, Chen Y-G. Feedback regulation of TGF- β signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2018;50(1):37-50.
- [0195] 46. Ji Z, He L, Regev A, Struhl K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(19):9453.
- [0196] 47. Tang X, Sun L, Jin X, Chen Y, Zhu H, Liang Y, et al. Runt-Related Transcription Factor 1 Regulates LPS-Induced Acute Lung Injury via NF- κ B Signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;57(2):174-83.
- [0197] 48. Bellissimo DC, Chen C-h, Zhu Q, Bagga S, Lee C-T, He B, et al. Runx1 negatively regulates inflammatory cytokine production by neutrophils in response to Toll-like receptor signaling. *Blood Advances*. 2020;4(6):1145-58.
- [0198] 49. Glinsky GV. Tripartite Combination of Candidate Pandemic Mitigation Agents: Vitamin D, Quercetin, and Estradiol Manifest Properties of Medicinal Agents for Targeted Mitigation of the COVID-19 Pandemic Defined by Genomics-Guided Tracing of SARS-CoV-2 Targets in Human Cells. *Biomedicines*. 2020;8(5).
- [0199] 50. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(10):753-66.
- [0200] 51. Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, Seidah NG. Evidence that furin is an authentic transforming growth factor- β 1-converting enzyme. *Am J Pathol*. 2001;158(1):305-16.
- [0201] 52. Kremer S, Breuer R, Lossos IS, Berkman N, Christensen TG, Connor MW, et al. Effect of immunomodulators on bleomycin-induced lung injury. *Respiration*. 1999;66(5):455-62.
- [0202] 53. Laxer U, Lossos IS, Gillis S, Or R, Christensen TG, Goldstein RH, et al. The effect of enoxaparin on bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res*. 1999;25(6):531-41.
- [0203] 54. Berkman N, Kremer S, Or R, Lossos IS, Christensen TG, Goldstein RH, et al. Human recombinant interferon- α 2a and interferon- α A/D have different effects on bleomycin-induced lung injury. *Respiration*. 2001;68(2):169-77.

[0204] 55.Edler C, **Schröder** AS, Aepfelbacher M, Fitzek A, Heinemann A, Heinrich F, et al. Dying with SARS-CoV-2 infection—an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. International Journal of Legal Medicine. 2020;134(4):1275-84.

[0205] 56. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005 Feb;115(2):209-18.

[0206] 57. Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000 May 1;47(2):277-90.

[0207] 58. Lucas PA, Warejcka DJ, Young HE, Lee BY. Formation of abdominal adhesions is inhibited by antibodies to transforming growth factor-beta1. J Surg Res. 1996 Oct;65(2):135-8.

[0208] 其它实施方案

[0209] 应理解,虽然已经结合本发明的详细说明描述了本发明,但是前述说明书旨在进行说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点和修改在所附权利要求书的范围内。

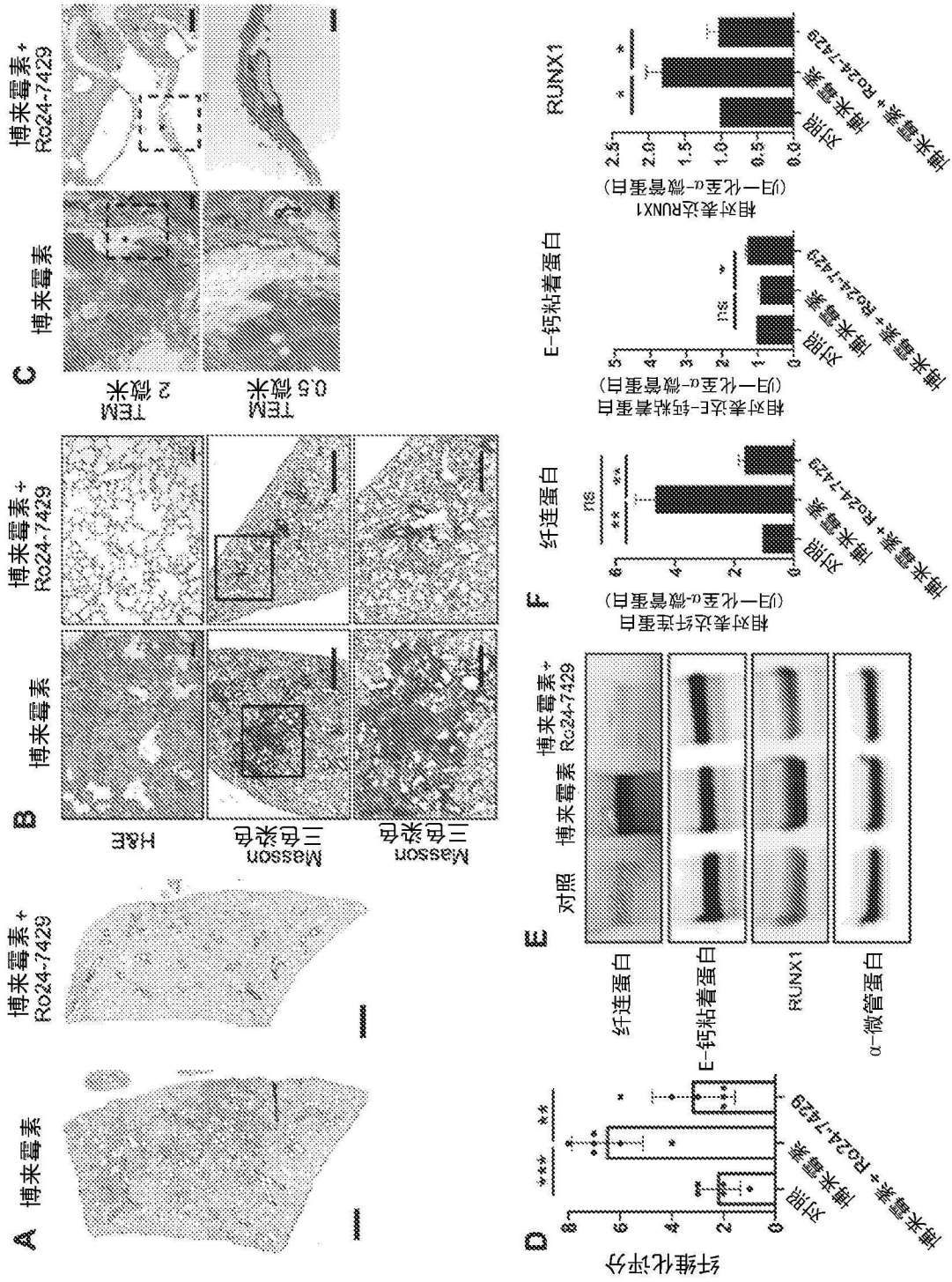


图1A-F

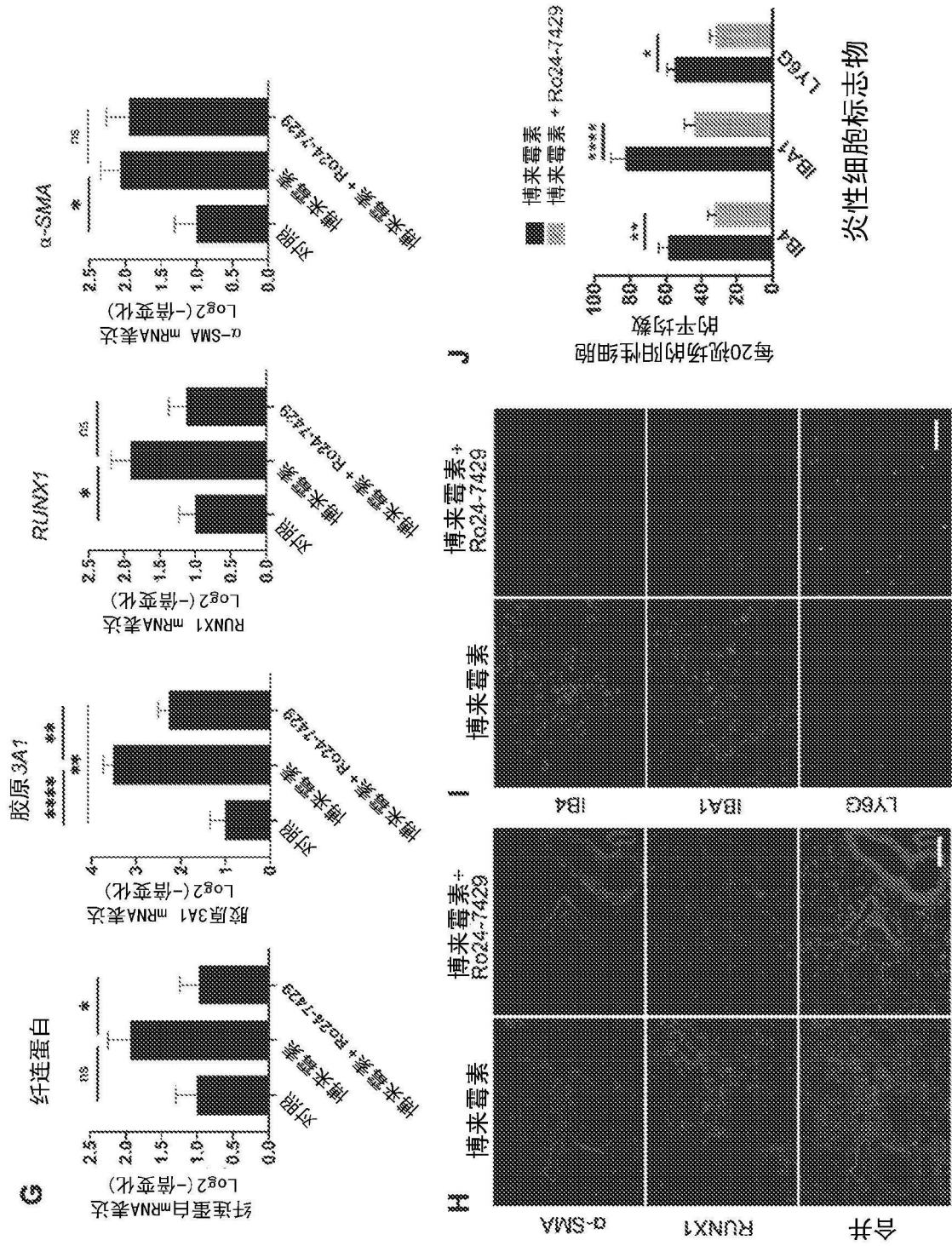


图1G-J

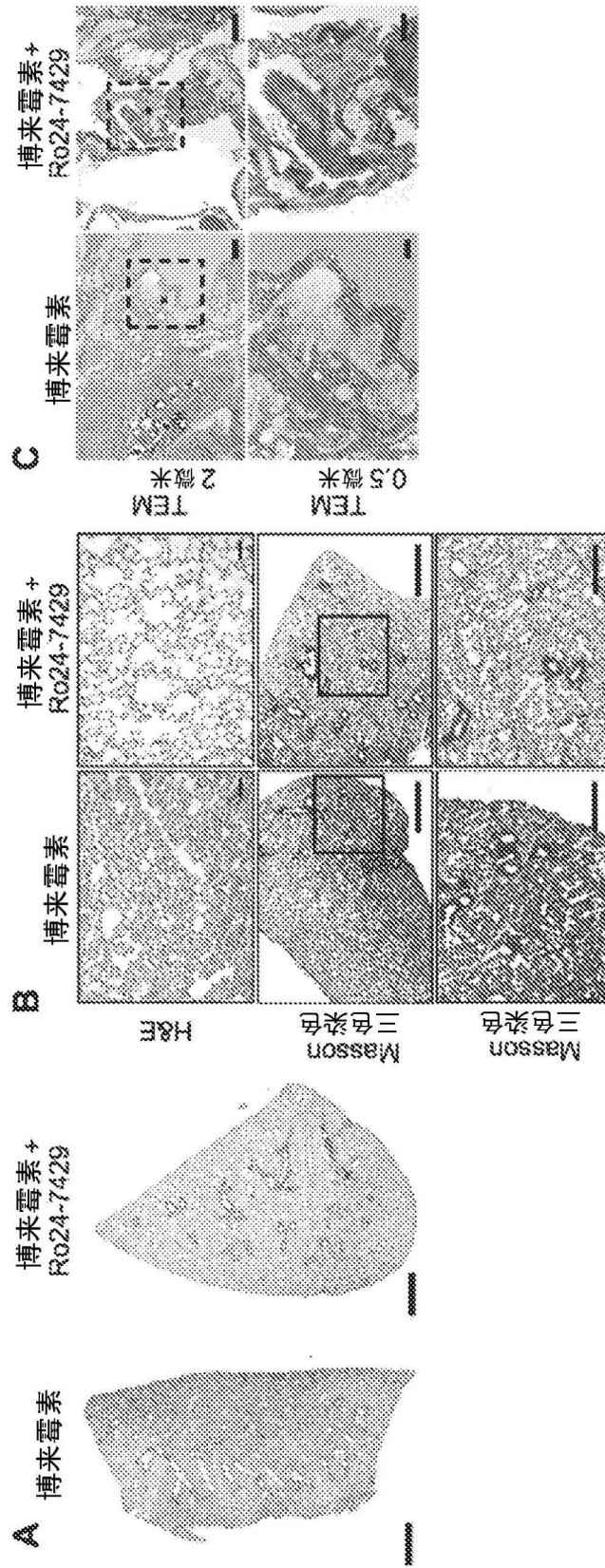


图2A-C

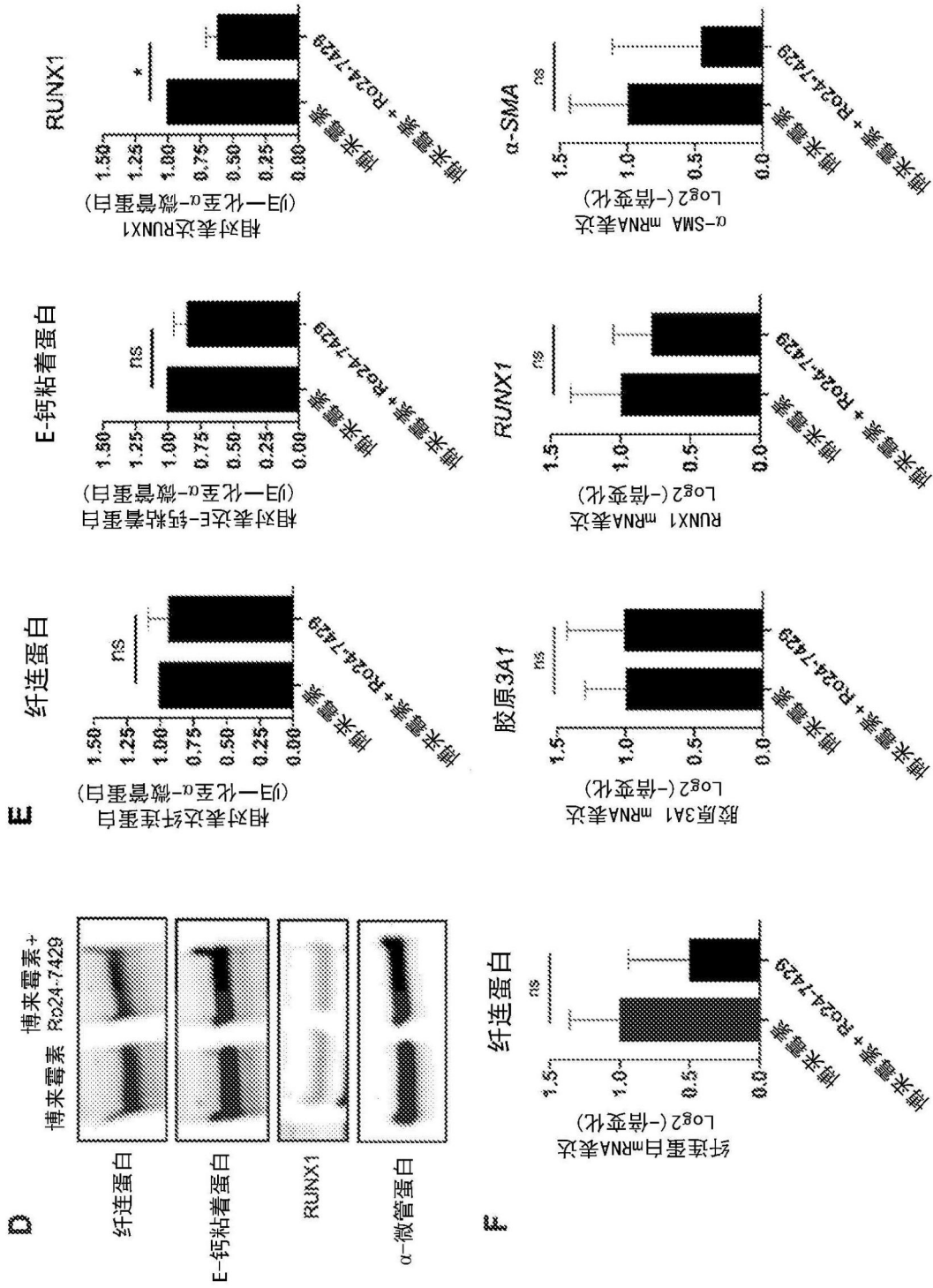


图2D-F

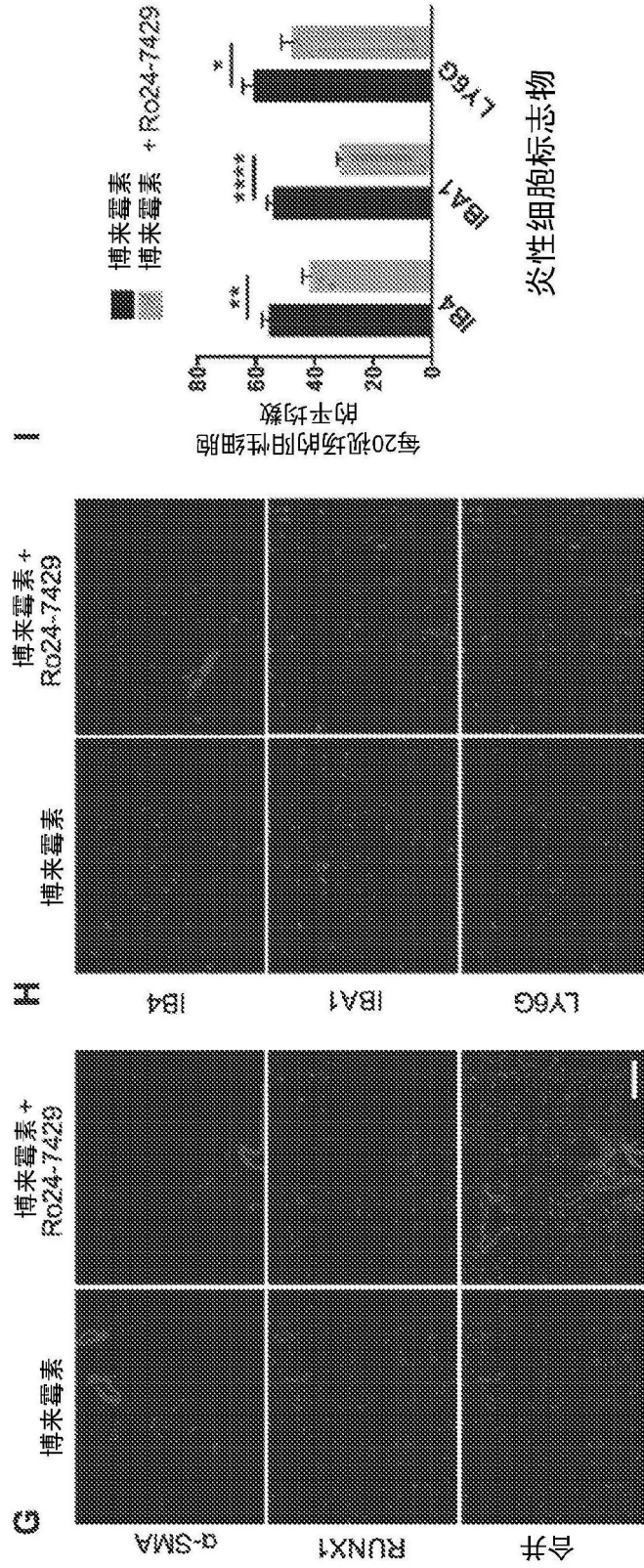


图2G-I

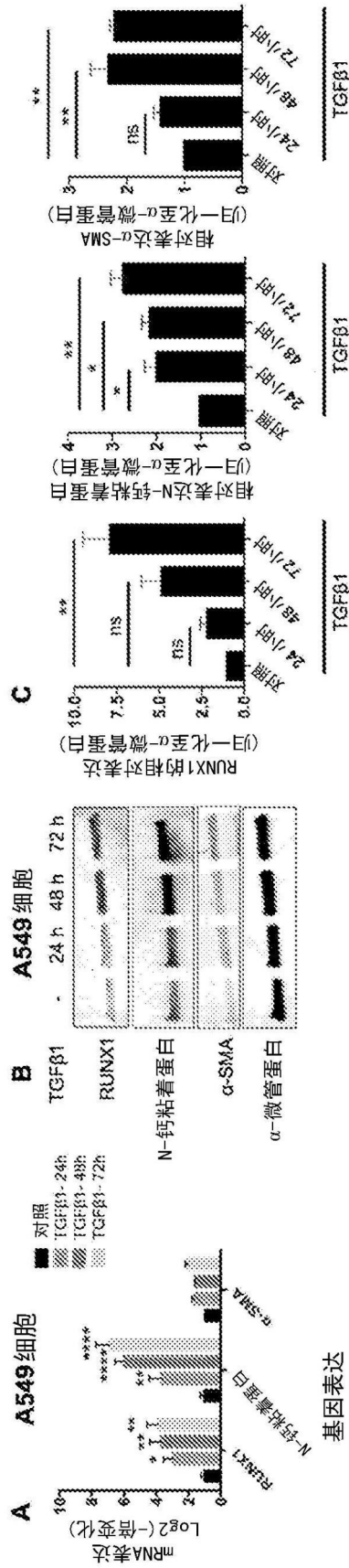


图3A-C

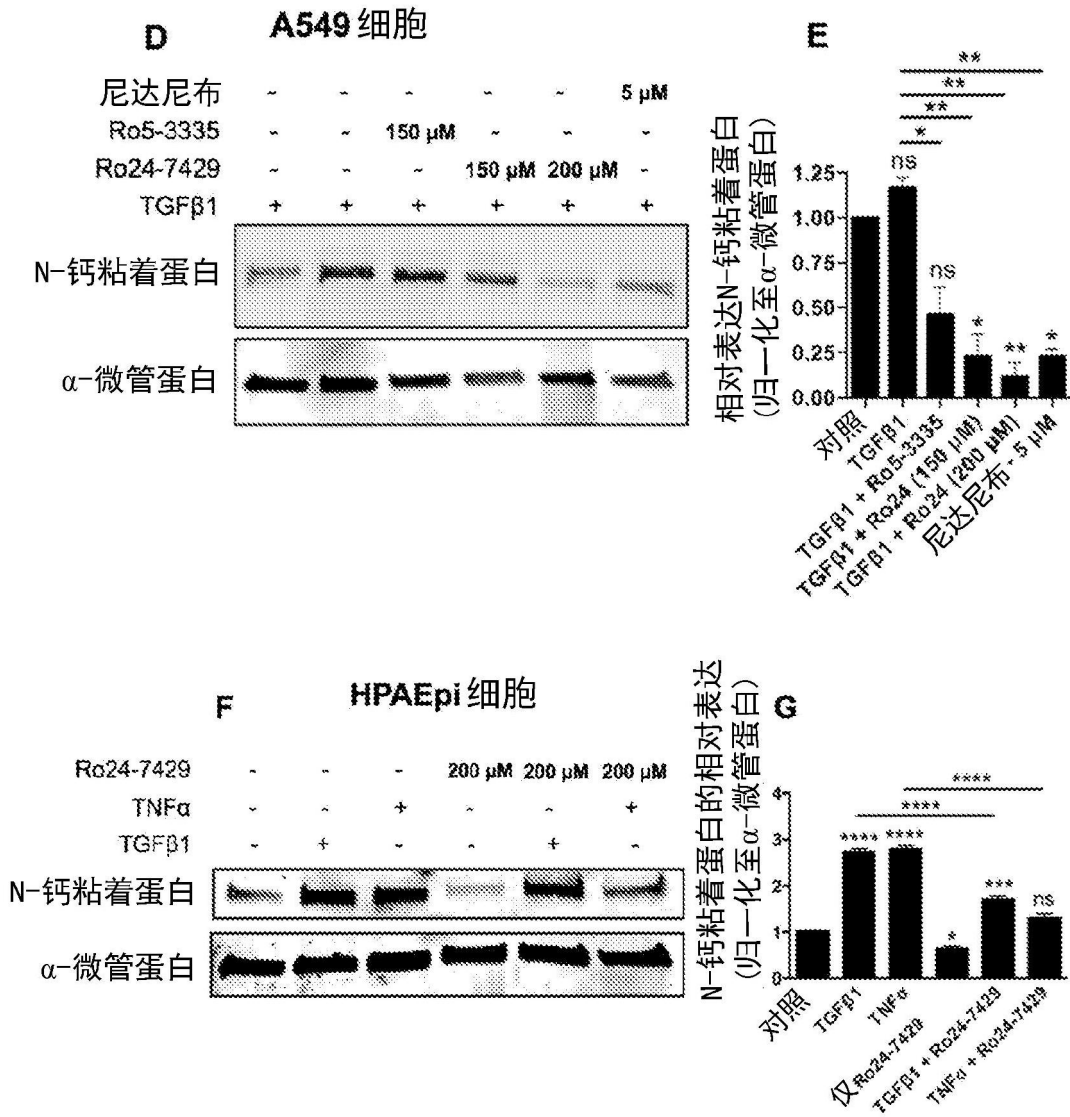


图3D-G

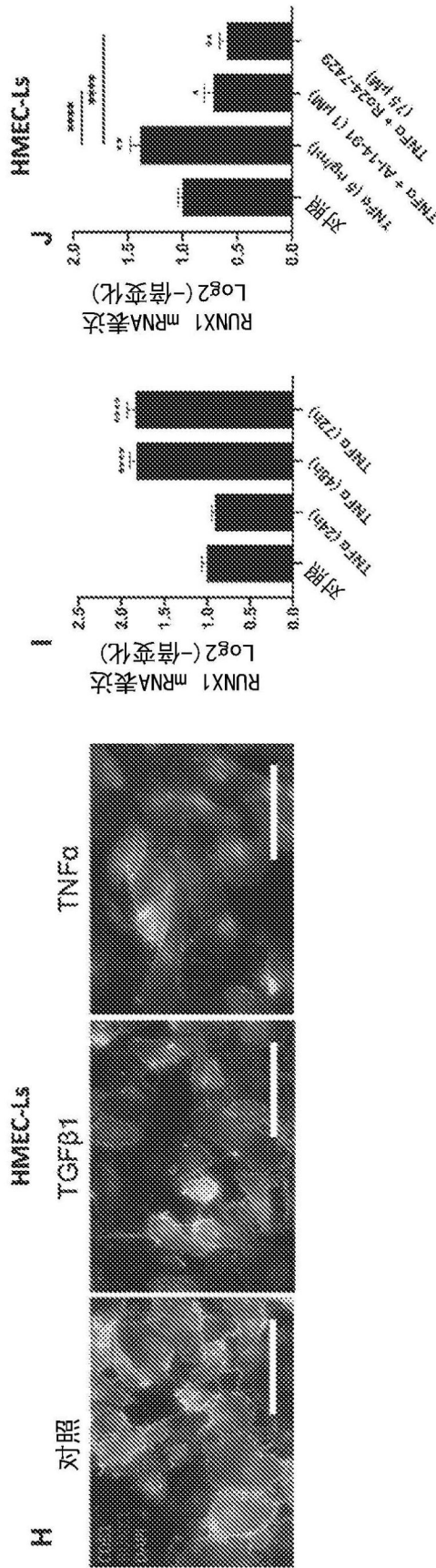


图3H-J

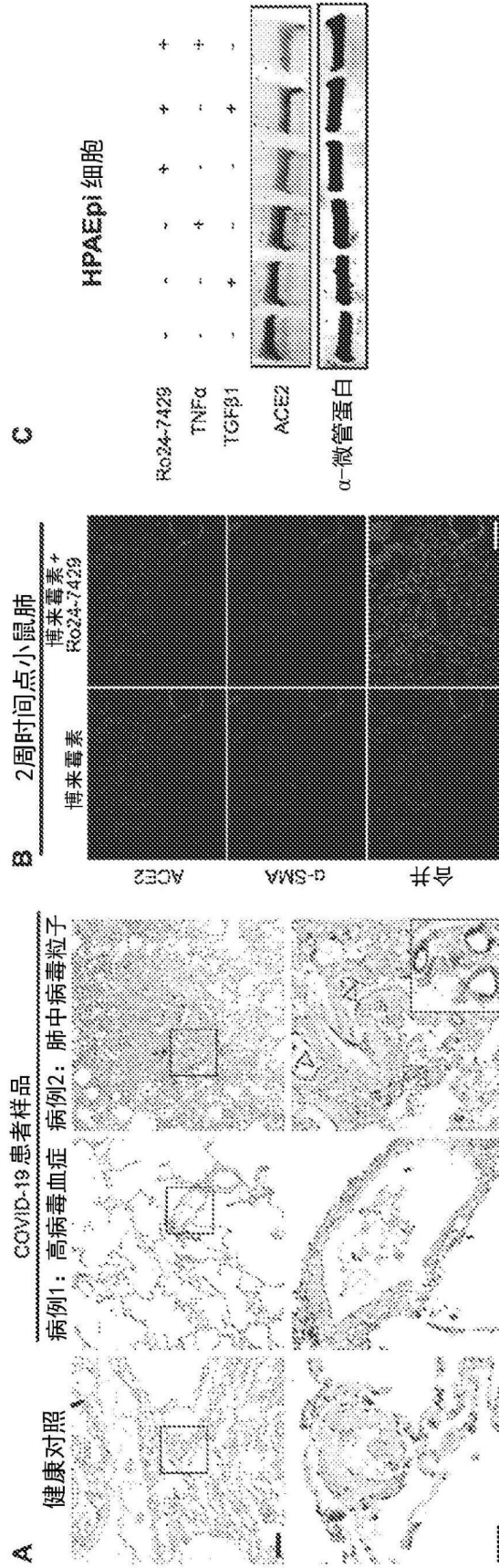


图4A-C

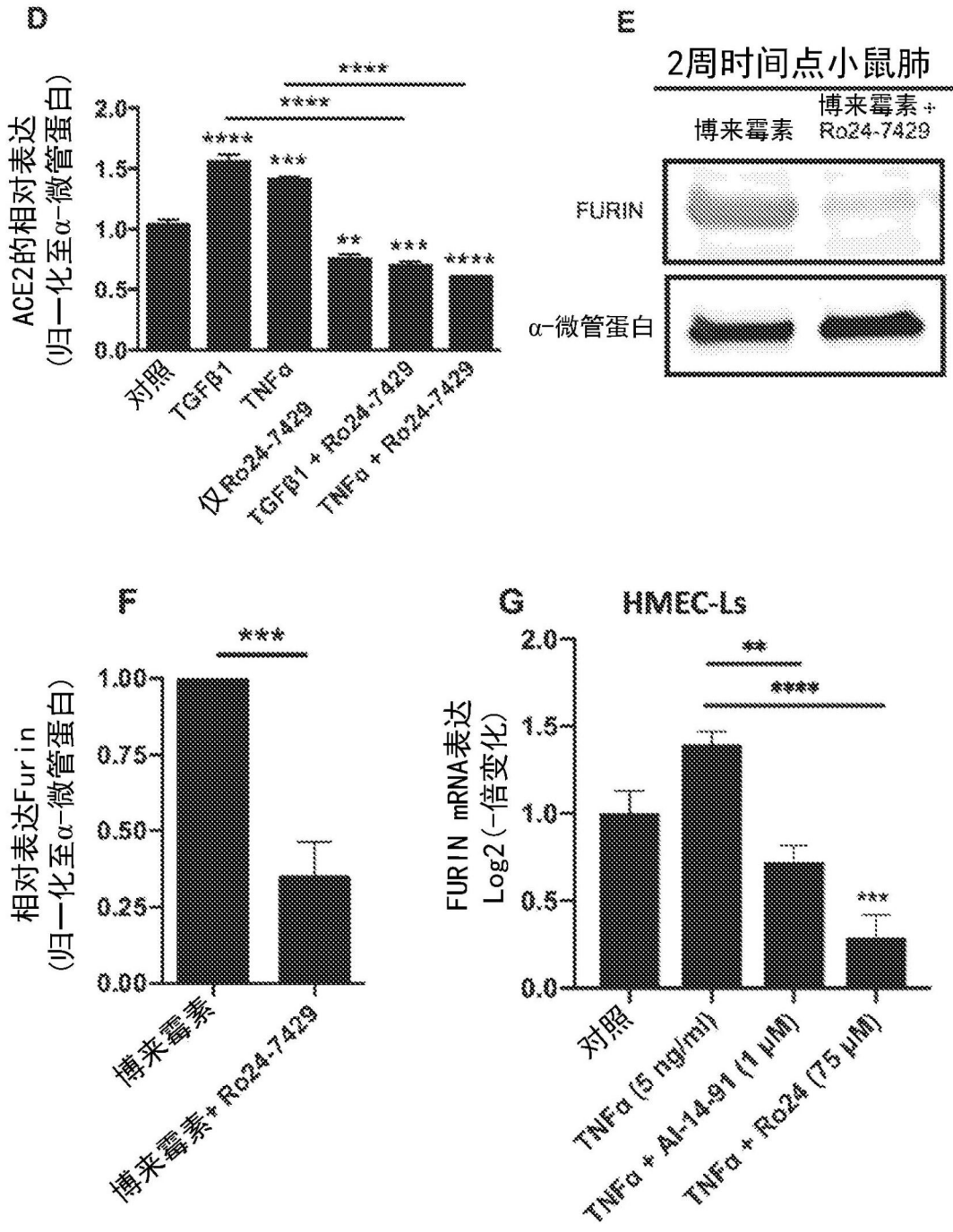


图4D-G

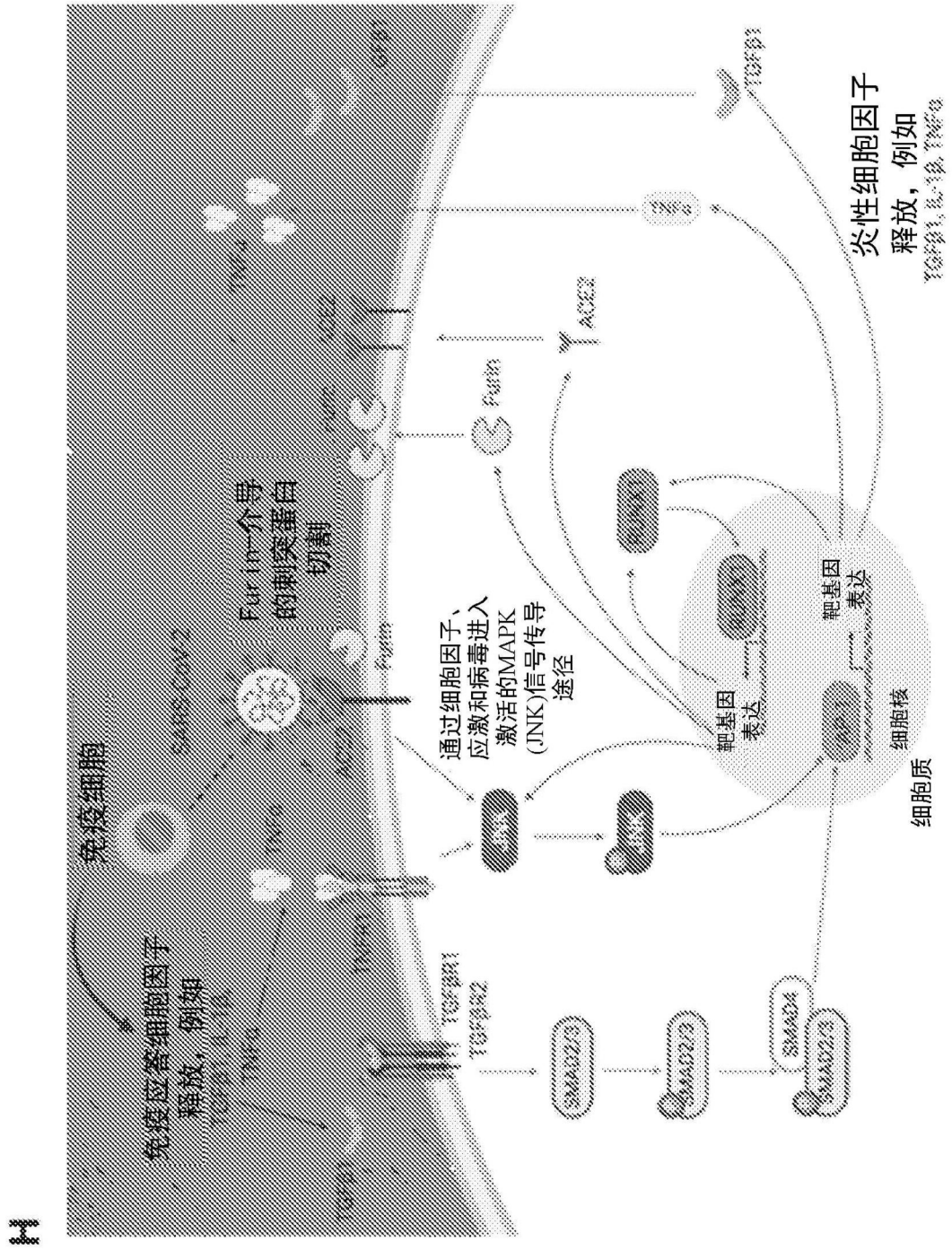


图4H

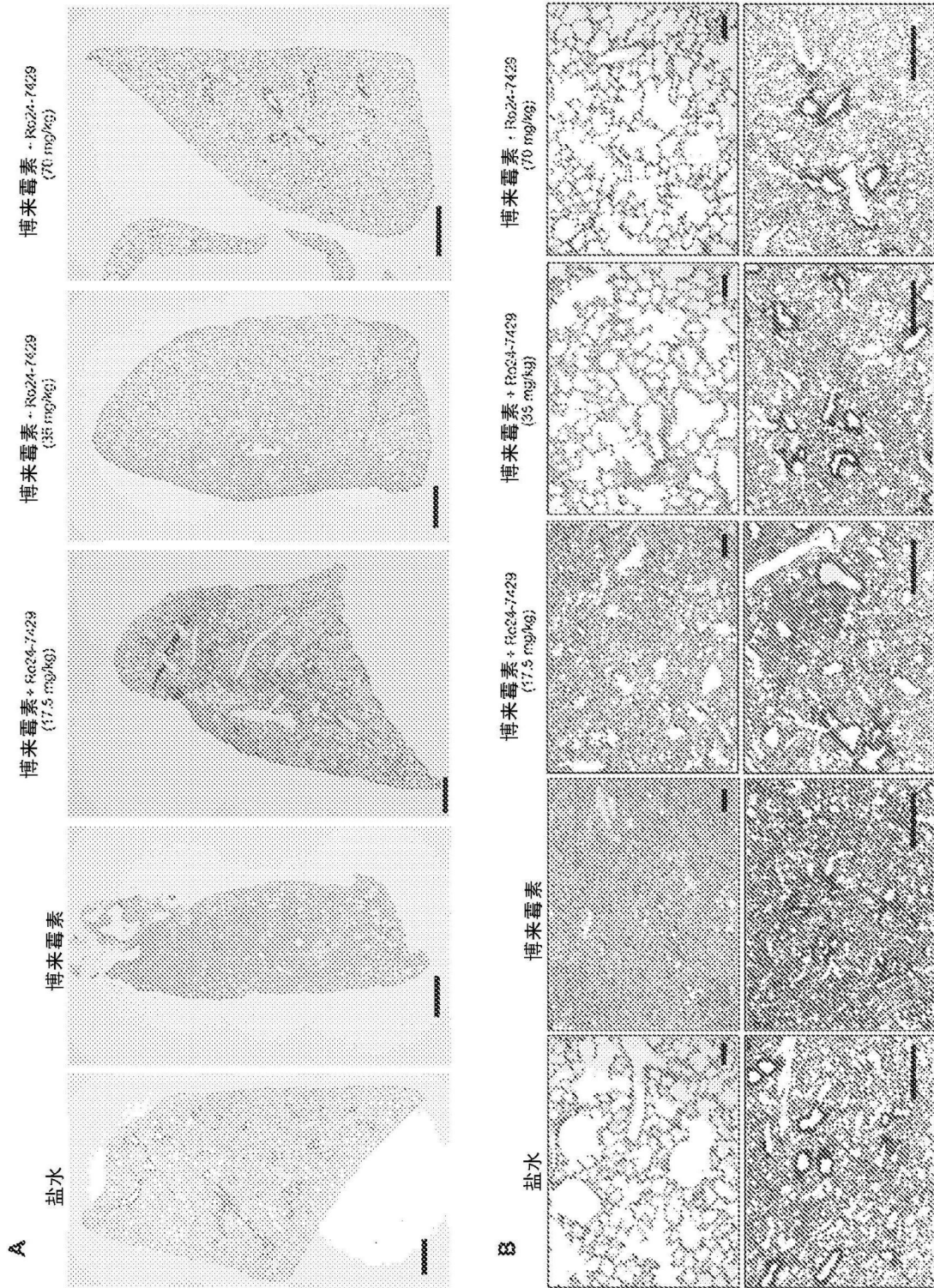


图5A-B

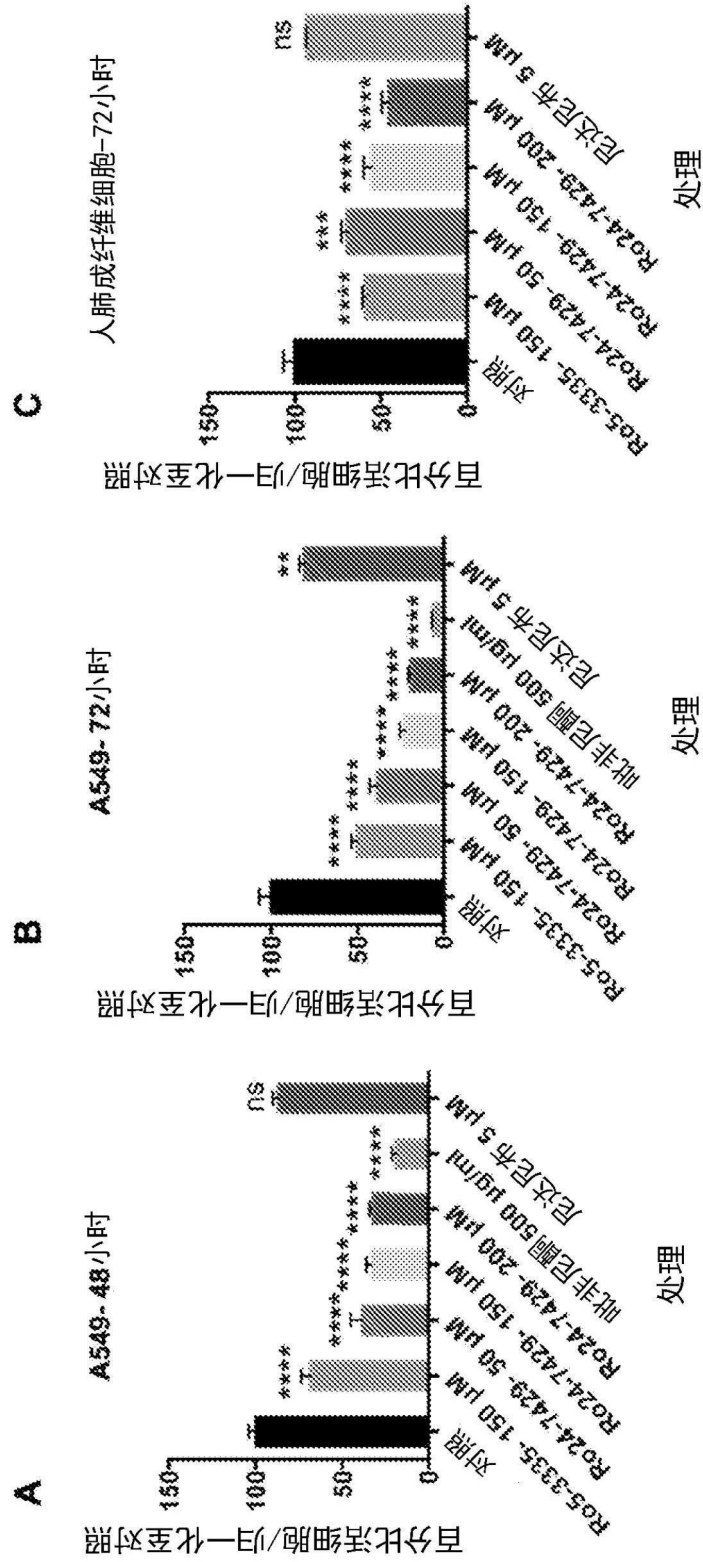


图6A-C

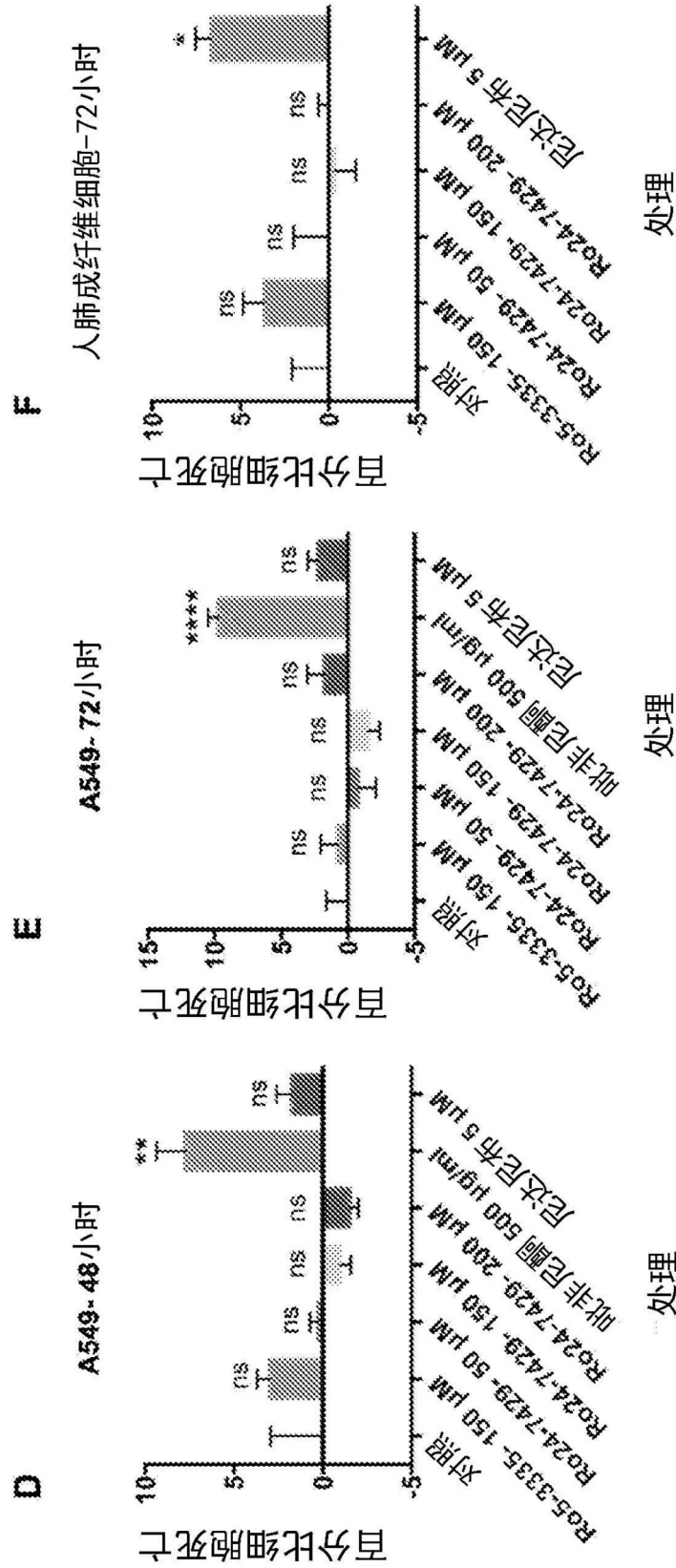


图6D-F

无AP-1或RUNX1 TFBS的COVID-19相关基因:

ADAM8 ANXA2P2 GPI MMP2 PDCL3 PIK3CA PLA2G2A PLA2G2D RAMP1 SERPINC1 VHL

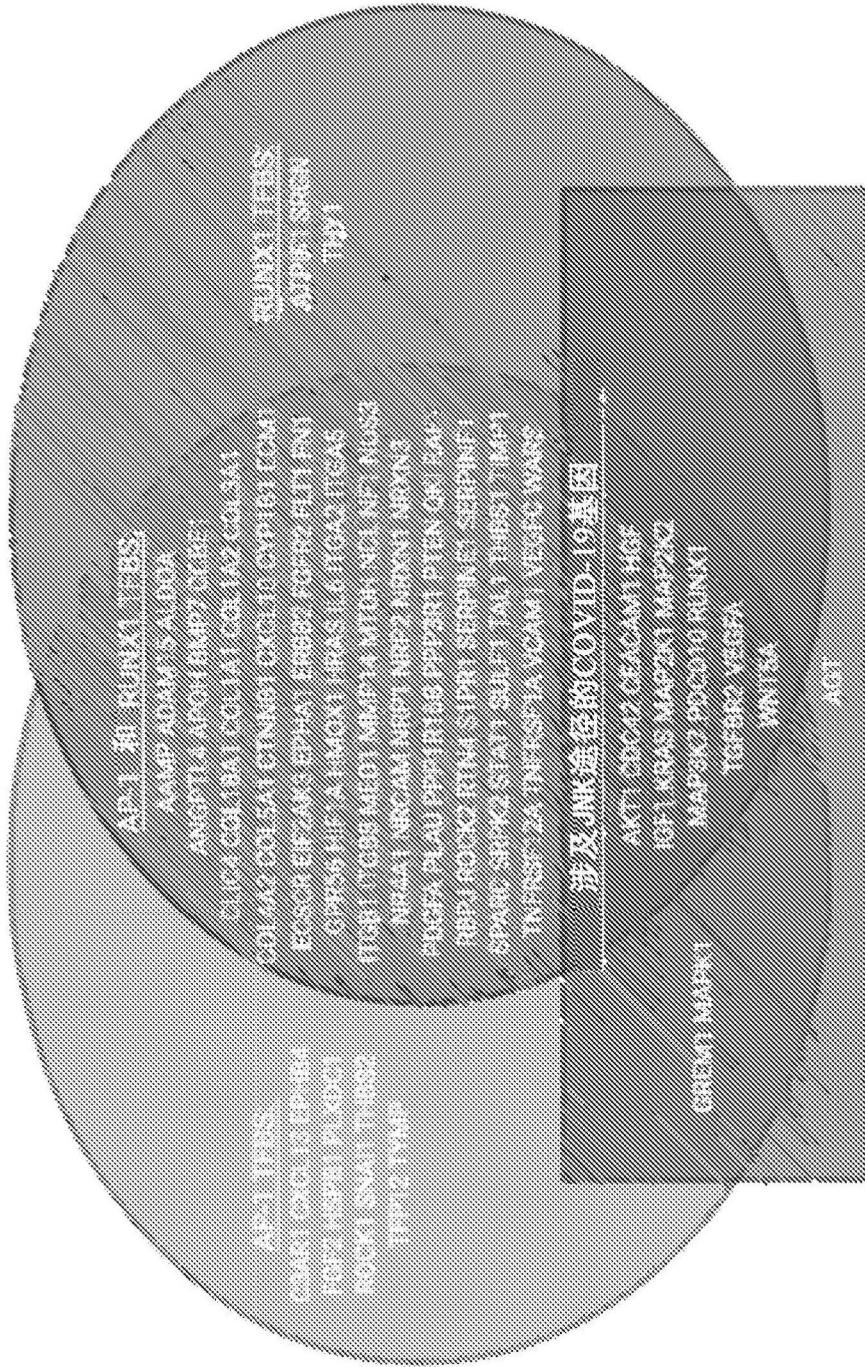


图7

产生于BioRender.com bio

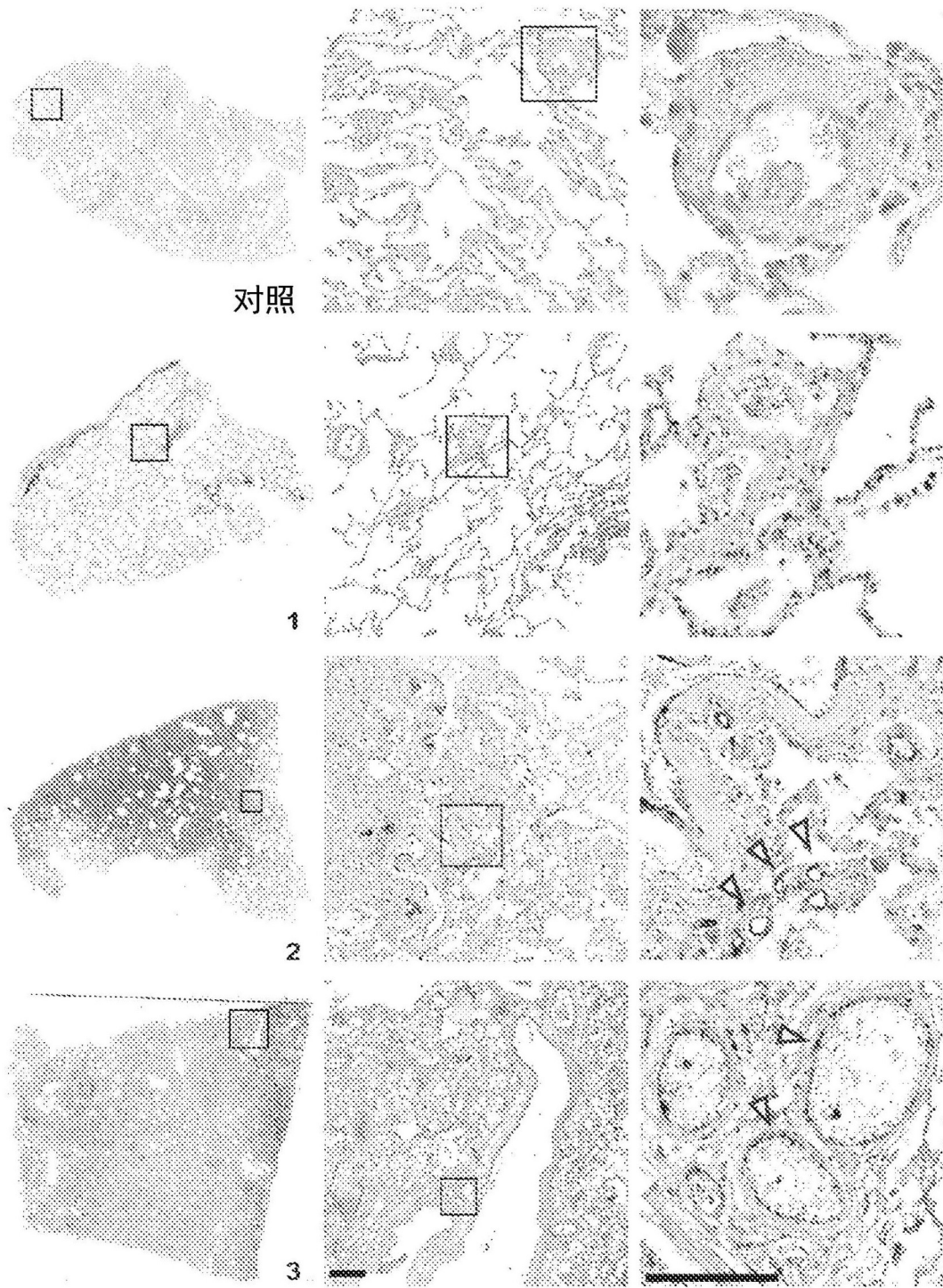


图8

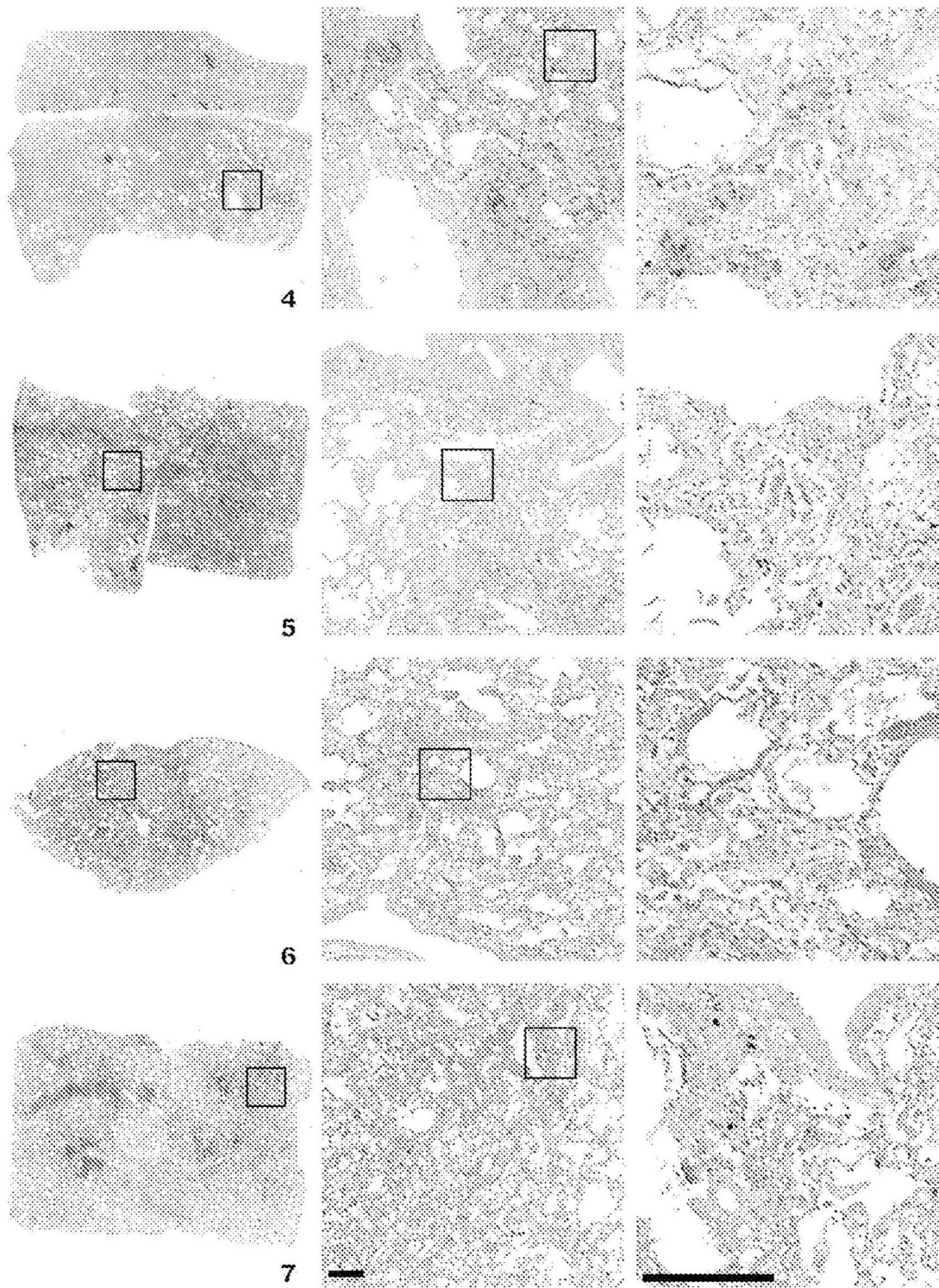


图9