(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119730867 A
(43)申请公布日 2025.03.28

(21)申请号 202380032652.0

(22)申请日 2023.02.09

(30)优先权数据
63/308,330 2022.02.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/062247 2023.02.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/154770 EN 2023.08.17

(71)申请人 因特路德生物制药公司
地址 美国佛罗里达州
申请人 马里兰大学派克分院

(72)发明人 Y·秦 N·巴拉克 J·金

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
专利代理师 付文川

(51)Int.Cl.
A61K 38/08(2019.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

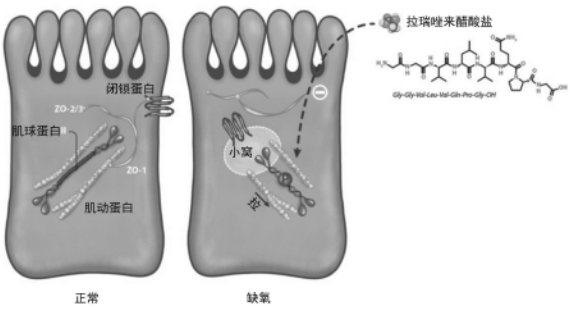
权利要求书2页 说明书14页
序列表（电子公布） 附图15页

(54)发明名称

用于抑制RHO激酶的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了通过以有效抑制组织中Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)活性的量和方式向有需要的受试者施用有效量的拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物或其药学上可接受的盐,治疗所述受试者中以ROCK活性为特征的疾病的组合物和方法。



CN 119730867 A

1.治疗受试者的以Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)活性为特征的疾病的方法,所述方法包括:

以有效抑制组织中ROCK活性的量和方式向所述受试者施用有效量的拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物或其药学上可接受的盐。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述组织是胃肠道。

3.根据权利要求2所述的方法,其中所述病症选自癌症、腺瘤、乳糜泻、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、环境性肠病、食管炎、坏死性小肠结肠炎、肠缺血、炎性肝病、肾病、胰腺炎、高血糖症和肺部或心脏炎症或纤维化。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述癌症源自任何组织,任选地其中所述癌症源自皮肤、结肠、乳腺、肺、脑、骨、胰腺、肾、肝、膀胱、卵巢、睾丸或前列腺。

5.根据权利要求3所述的方法,其中所述癌症任选地是结直肠癌、白血病、骨髓瘤或淋巴瘤。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者有患结直肠癌的风险。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述受试者的家族史、基因突变和/或健康史增加了患结直肠癌的风险。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述受试者的家族成员患有或曾经患有家族性腺瘤性息肉病(FAP)、遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)、波伊茨-耶格综合征或MUTYH相关息肉病(MAP)。

9.根据权利要求7所述的方法,其中所述受试者具有选自APC、MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、EPCAM、STK11(LKB1)和MUTYH中的一个或多个基因的增加患结直肠癌风险的突变。

10.根据权利要求6至9中任一项所述的方法,其中所述受试者具有选自rs6983267、rs4939827、rs3802842、rs16892766、rs10795668、rs4444235、rs10411210、rs6691170、rs4925386、rs3824999、rs647161、rs2423279、rs3217810和rs59336的一个或多个单核苷酸多态性(SNP)。

11.根据权利要求1所述的方法,其中所述组织是癌症,其任选地是原发性癌症或转移性癌症。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、乳腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、卵巢癌、骨癌、尿路上皮癌、胃癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、头颈鳞状细胞癌(HNSCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌、激素难治性前列腺癌和淋巴瘤。

13.根据权利要求11或12所述的方法,其中所述组织是转移性癌症。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述患者患有转移性黑色素瘤。

15.根据权利要求11至14中任一项所述的方法,其中所述癌症是肉瘤或癌。

16.根据权利要求11至15中任一项所述的方法,其中所述受试者正在接受或已经接受选自化疗、放疗、切除术和免疫治疗以及免疫肿瘤学药剂中的一种或多种的癌症治疗,任选地其中所述癌症免疫治疗是采用免疫检查点抑制剂的治疗。

17.根据权利要求11至16中任一项所述的方法,其中所述拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物被配制用于肿瘤内施用。

18.根据权利要求1所述的方法,其中所述组织是眼睛。

19.根据权利要求18所述的方法,其中所述拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物被配制用于眼部施用,任选地施用至眼表,或眼内施用至眼后部。

20.根据权利要求1所述的方法,其中所述拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物被配制用于施用至鼻腔和/或鼻窦腔。

21.根据权利要求1所述的方法,其中所述拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物被配制用于施用至耳道。

22.根据权利要求1所述的方法,其中所述组织是呼吸道,并且所述受试者任选地患有选自哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化、囊性纤维化、急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺气肿、支气管炎、肺炎、肺癌和呼吸道感染的疾病。

23.根据权利要求22所述的方法,其中所述拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物被配制用于作为溶液气溶胶或粉末施用于肺部。

24.根据权利要求1所述的方法,其中所述组织是脉管系统,并且所述受试者任选地具有选自心脏纤维化、心脏肥大、高血压、肺动脉高压、心绞痛、血管痉挛性心绞痛、心力衰竭和卒中的疾病。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物被配制用于肺部施用。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述受试者具有选自以下一个或多个的ROCK突变:相对于ROCK1同工型的Val1309、Tyr405、Ser1126、Pro1193S,和/或相对于ROCK2同工型的Thr431Asn、Asp601Val和Lys1083Met。

27.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用拉瑞唑来衍生物或其药学上可接受的盐。

28.根据权利要求27所述的方法,其中所述拉瑞唑来衍生物包含与拉瑞唑来相比增加ROCK抑制剂活性的一个或多个修饰。

29.根据权利要求27所述的方法,其中所述拉瑞唑来衍生物包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个D-氨基酸。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述拉瑞唑来衍生物的每个氨基酸(Gly除外)都是D-氨基酸,并且该衍生物任选地是逆反式拉瑞唑来。

31.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物局部施用于组织。

32.一种药物组合物,其包含有效量的用于抑制组织中ROCK活性的具有氨基酸序列Gly-Gly-Val-Leu-Val-Gln-Pro-Gly(SEQ ID NO:1)的肽或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

用于抑制RHO激酶的组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明提供了用于治疗和预防与Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rho-associated coiled-coil kinase,ROCK)活性相关的疾病的组合物、制剂和方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2022年2月9日提交的美国临时专利申请第63/308,330号的权益,该申请的全部内容在此通过引用以其整体并入本文。

[0004] 电子提交的文本文件的描述

[0005] 本申请包含通过Patent Center以电子方式提交的XML格式的序列表。XML拷贝的内容于2023年2月7日创建,名为“NMT-038PC_116031-5038.xml”,大小为6,919字节。序列表通过引用以其整体并入本文。

[0006] 发明背景

[0007] Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)是RhoA小GTPase的效应子,在促进位于RhoA和RhoC激活下游的肌动球蛋白细胞骨架收缩性方面发挥着关键作用。ROCK激酶对于细胞收缩、迁移、凋亡、存活和增殖等过程至关重要。两种哺乳动物ROCK同源物,ROCK1和ROCK2,与诸如心血管疾病、血管损伤、纤维化、炎性肠病和癌症等的各种疾病过程有关。

[0008] 需要用于抑制ROCK、治疗或预防ROCK相关医学疾病的药物组合物和方法。

发明内容

[0009] 本发明部分涉及可用于治疗Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)相关疾病的组合物和方法。

[0010] 在多个方面,本发明提供了治疗受试者的以Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)活性为特征的疾病的方法。所述方法包括以有效抑制器官或组织中ROCK活性的量和方式向所述受试者施用有效量的拉瑞唑来(larazotide)或拉瑞唑来衍生物或其药学上可接受的盐。在各种实施方案中,所述器官或组织选自胃肠道、癌组织、眼睛、呼吸道和脉管系统。

[0011] 在一些实施方案中,将拉瑞唑来或其衍生物施用于胃肠道。在此类实施方案中,受试者可患有选自以下的疾病:癌症(例如,诸如结直肠癌或胃癌的GI癌症,或非GI癌症)、腺瘤、炎性肠病(IBD)(例如,克罗恩病或溃疡性结肠炎)、乳糜泻、食管炎、炎性肝病、肾病、胰腺炎、高血糖症、糖尿病和肺部或心脏炎症或纤维化。在某些实施方案中,受试者患有结直肠癌或有患结直肠癌的风险。例如,受试者的家族史、基因突变和/或健康史可增加受试者患结直肠癌的风险。

[0012] 在其他实施方案中,拉瑞唑来或衍生物直接递送至癌症组织,其可以是原发性肿瘤或转移性肿瘤。例如,受试者可患有选自以下的癌症:肺癌、乳腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、卵巢癌、骨癌、尿路上皮癌(urothelial cancer)、胃癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、头颈鳞状细胞癌(HNSCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌、激素难治性前列腺癌和淋巴瘤。在一些实施方案中,组织是转移性癌症,例如转移性黑色素瘤。在一些实施方案中,癌症是肉瘤(sarcoma)或癌(carcinoma)。

[0013] 在其他实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物施用于眼睛。例如,受试者可患有选自Sjogren综合征、干眼综合征(dry eye syndrome)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、黄斑水肿、糖尿病性视网膜病变和青光眼的眼部疾病。

[0014] 在一些实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物施用于呼吸道。例如,受试者可患有选自哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化、囊性纤维化、急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺气肿、支气管炎、肺炎、肺癌和呼吸道感染的疾病。

[0015] 在其他实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物施用至脉管系统或全身施用。例如,受试者可患有选自心脏纤维化、心脏肥大、高血压、肺动脉高压、心绞痛、血管痉挛性心绞痛、心力衰竭、动脉粥样硬化、动脉硬化、糖尿病、胰腺炎、肾病(包括肾纤维化)和卒中(例如,在预防或卒中或卒中恢复中)的疾病。

[0016] 在各种实施方案中,拉瑞唑来衍生物包含一个或多个相比于拉瑞唑来可提高ROCK抑制剂活性的修饰。例如,在一些实施方案中,拉瑞唑来衍生物包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个(d)-氨基酸。在某些实施方案中,拉瑞唑来衍生物的每个氨基酸(Gly除外)均为(d)-氨基酸,并且所述衍生物任选地是逆反式拉瑞唑来(retro-inverso larazotide)。

[0017] 本发明的其他方面和实施方案通过以下详细描述和工作的实施例将是显而易见的。

[0018] 附图简要说明

[0019] 图1A-B显示的是对用拉瑞唑来醋酸盐(LA)处理的C2BBe1肠细胞在缺氧/复氧(anoxia/reoxygenation,A/R)损伤期间旁细胞通透性的评估。图1A显示的是LA处理和A/R损伤中TEER测量的时间表的示意图。图1B显示,与未经处理的A/R损伤细胞相比,用10mM LA处理显著($p<0.001$)增加了TEER。

[0020] 图2显示缺氧导致肌球蛋白被磷酸化,从而导致紧密连接蛋白闭锁蛋白(occludin)的内化。该图显示了预测LA如何阻止这种磷酸化。

[0021] 图3显示了在1小时复氧后通过膜和细胞质级分的免疫印迹以及IF分析所分析的TJ蛋白分布。图3显示,与对照细胞相比,跨膜蛋白闭锁蛋白在缺氧损伤细胞中被显著($p<0.05$)内化。然而,与未处理的缺氧损伤细胞相比,10mM LA使膜中的闭锁蛋白显著($p<0.05$)增加。

[0022] 图4显示了在1小时氧合时通过免疫荧光显微镜分析对紧密连接蛋白和细胞骨架蛋白的定位的评估。将可渗透的支持膜固定并针对ZO-1(红色)、闭锁蛋白(绿色)和F-肌动蛋白(紫色)染色。通过Z堆栈3-D分析分析了ZO-1和闭锁蛋白的免疫定位。未经处理的缺氧损伤细胞显示出闭锁蛋白、ZO-1和F-肌动蛋白的破坏,而用拉瑞唑来醋酸盐(LA)处理的细胞显示出组织良好的紧密连接蛋白和F-肌动蛋白。

[0023] 图5显示了在1小时复氧时间点通过免疫印迹评估的pMLC-2/MLC-2比率。pMLC-2的表达在A/R损伤后急剧增加,而用10mM LA进行预处理则显著降低(##$p<0.01$)。

[0024] 图6显示了调节MLC磷酸化以调节肠上皮细胞的TJ屏障。TJ屏障主要由调节性肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化水平决定,而后者又受肌球蛋白轻链激酶(MLCK)和rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)两种酶的调控。胞内Ca^{2+}水平的升高会刺激MLCK活性。增强的Rho激酶(ROCK)活性也直接磷酸化MLC,并通过磷酸化肌球蛋白磷酸酶靶亚基1(MYPT1)而抑制肌球

蛋白轻链磷酸酶(MLCP)活性。

[0025] 图7显示了与未处理的A/R损伤细胞相比,使用或不使用拉瑞唑来时抑制MLCK和ROCK增加了TEER。Pep 18(MLCK抑制剂)单独处理或与LA联合处理增加了TEER。用法舒地尔(Fasudil,ROCK抑制剂)处理的单层细胞显示TEER增加。法舒地尔和LA联合处理增加了TEER,但程度低于单独用法舒地尔处理(*<p0.05,**p<0.01,***p<0.005,****p<0.0001)。

[0026] 图8示出了调节MLC磷酸化以调节肠上皮细胞中旁细胞肌动蛋白肌球蛋白环的可能机制。TJ屏障主要由调节性肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化水平决定,而后者受肌球蛋白轻链激酶(MLCK)和肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)两种酶调节。这些机制可以通过诸如Ca^{2+}稳态、G蛋白偶联受体(GPCR)和生长因子(GF)途径的多种细胞途径进行调节。

[0027] 图9A-B显示了使用下一代RNA测序进行的差异表达分析。图9A示出了对所鉴定的差异表达基因(DEG)数量的维恩图分析。图9B示出了DEG的层次聚类,用于评估不同实验条件下的表达谱。

[0028] 图10示出了来自不同组合的组的DEG的基因本体论(GO)功能分类分析。它包括三个主要分支:生物过程、细胞组分和分子功能。padj<0.05的GO项为显著富集。图10显示了20个显著富集的生物过程、细胞组分和分子功能。

[0029] 图11显示了来自不同组合的组的DEG的富集的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)途径分析。padj<0.05的KEGG途径项为显著富集。

[0030] 图12显示了C2BBe1肠细胞中旁细胞通透性的评估。与未处理的A/R损伤细胞相比,用10mM LA处理在处理后1小时显著增加了TEER。

[0031] 图13示出了对C2BBe1肠细胞增殖的评估。与未处理的细胞相比,用10mM LA处理显著增加了增殖。

[0032] 图14A-B显示了C2BBe1肠细胞增殖和迁移的评估。图14A显示,常规培养基中用10mM LA处理的细胞在48小时显示显著提高的伤口愈合。图14B显示,在无血清培养基中用10mM LA处理的细胞和未处理的细胞之间未检测到显著不同的迁移模式。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明提供了通过以有效抑制组织中Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)活性的量和方式向有需要的受试者施用有效量的拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物或其药学上可接受的盐,治疗所述受试者中以ROCK活性为特征的疾病的组合物和方法。

[0035] 本公开表明,拉瑞唑来和拉瑞唑来衍生物或其药学上可接受的盐抑制rho相关蛋白激酶(ROCK)。ROCK的抑制可为患有与ROCK活性相关的疾病的受试者提供治疗益处。ROCK及其下游靶标参与调节肌动蛋白细胞骨架动力学,因此负责细胞迁移和运动。此外,它们还参与多种生物学过程,例如细胞连接完整性、细胞周期控制和细胞凋亡。

[0036] ROCK酶具有两种亚型:ROCK1和ROCK2。两种激酶均包含N端的催化激酶结构域,随后是包括Rho结合结构域(RBD)的中央卷曲螺旋蛋白结构域,和C端的普列克同源(pleckstrin-homology,PH)结构域。

[0037] 被称为拉瑞唑来的肽剂具有氨基酸序列Gly-Gly-Val-Leu-Val-Gln-Pro-Gly(SEQ ID NO:1)。拉瑞唑来促进上皮和内皮组织(包括肠上皮)的紧密连接完整性,并正在作为乳糜泻(CeD)患者的治疗剂而接受评估。根据某些方面和实施方案,本发明提供了拉瑞唑来衍

生物,其赋予了增强的针对包括氨基肽酶降解在内的外肽酶降解的抗性等。在多种实施方案中,拉瑞唑来衍生物相对于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽包含一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。示例性修饰描述于US 8,785,374、US 8,957,032、US 9,279,807、PCT/US2019/19350和PCT/US21/27410(其全部通过引用并入本文)。

[0038] 在一些实施方案中,拉瑞唑来的肽衍生物含有一个或多个(d)氨基酸。例如,拉瑞唑来衍生物可以含有1、2、3、4或5个(d)氨基酸(即D构型,与L构型相对)。在一些实施方案中,拉瑞唑来衍生物具有Gly-Gly-Val-Leu-Val-Gln-(d)Pro-Gly(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列。该肽在本文中称为“(d)-Pro”或(d)-Pro拉瑞唑来。在其他实施方案中,拉瑞唑来衍生物具有Gly-Gly-(d)Val-(d)Leu-(d)Val-(d)Gln-(d)Pro-Gly(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。该肽在本文中称为“(d)-拉瑞唑来”。如本文所证明的,与拉瑞唑来(其显示钟形剂量-反应曲线)相比,(d)-拉瑞唑来在显著较低浓度和较高浓度惊人地有效促进紧密连接完整性。这是一个惊人的结果,因为通常情况下在肽类药物中用D氨基酸替代L氨基酸会导致效力丧失。即,与具有天然L氨基酸的肽相比,具有D氨基酸的肽预期与受体功能的结合亲和力较低。

[0039] 在多种实施方案中,与拉瑞唑来相比,本发明采用的拉瑞唑来衍生物在显著较低剂量或高剂量下更有效,尤其是用于胃肠道施用时。因此,本发明的药物组合物可以含有少于约0.5mg的拉瑞唑来衍生物。例如,在一些实施方案中,药物组合物含有约0.4mg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约0.3mg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约0.25mg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约0.2mg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约0.15mg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约0.1mg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约50μg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约25μg或更少的拉瑞唑来衍生物。在一些实施方案中,所述药物组合物含有约50μg至约400μg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约50μg至约200μg或更少的拉瑞唑来衍生物,或约50μg至约150μg或更少的拉瑞唑来衍生物。

[0040] 在其他实施方案中,本发明涉及药物组合物,其含有超过约0.5mg的拉瑞唑来衍生物,并且基本上避免了使用拉瑞唑来观察到的逆剂量或“钟形”反应。例如,在一些实施方案中,所述药物组合物含有约0.6mg或更多的拉瑞唑来衍生物,或约0.75mg或更多的拉瑞唑来衍生物,或约1.0mg或更多的拉瑞唑来衍生物,或约1.25mg或更多的拉瑞唑来衍生物,或约1.5mg或更多的拉瑞唑来衍生物,或约2.0mg或更多的拉瑞唑来衍生物。

[0041] 在一些实施方案中,拉瑞唑来衍生物(例如,(d)-拉瑞唑来或(d)-Pro)以约0.5mg施用。例如,所述衍生物在0.5mg剂量下能够比拉瑞唑来更有效。

[0042] 本发明提供了通过将包含拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物的组合物施用至具有ROCK活性的组织从而抑制所述组织中的ROCK活性,治疗有需要的受试者中与ROCK活性相关的疾病的方法和组合物。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,并且通常是指哺乳动物受试者/患者。在各种实施方案中,受试者是人受试者。因此,所述组合物可以通过各种途径配制和/或递送以抑制目标器官或组织中的ROCK活性。在多种实施方案中,将包含拉瑞唑来或其衍生物(或其盐)的药物组合物施用至例如胃肠道(GI)(例如,肠内递送),或通过胃肠外、鼻内、脸颊、眼部或肺部递送。递送可以是局部递送至受影响的组织或全身递送。

[0043] 在一些实施方案中,将肽或药物组合物施用于受试者的胃肠道(GI)。

[0044] 在一些实施方案中,受试者患有胃肠道的炎性疾病或损伤,例如乳糜泻、炎性肠病

(IBD)(例如克罗恩病或溃疡性结肠炎)、环境性肠病、食管炎、坏死性小肠结肠炎和肠缺血。在一些实施方案中,受试者患有腺瘤(例如晚期腺瘤)、结直肠癌或胃癌。已证明ROCK活性与肿瘤发展有关。Wei L.,et al.,Novel Insightsinto the Roles of Rho KinaseinCancer,Arch Immunol Ther Exp(Warsz).2016;64:259-278。在一些实施方案中,受试者患有可以源自任何组织的癌症,例如源自皮肤、结肠、乳腺、肺、脑、骨、胰腺、肾、肝、膀胱、卵巢、睾丸或前列腺。

[0045] 在其他实施方案中,受试者患有白血病、骨髓瘤或淋巴瘤。

[0046] 在一些实施方案中,受试者有患结直肠癌的风险。例如,在一些实施方案中,由于受试者的家族史、基因突变和/或健康史(例如,晚期腺瘤或结直肠癌的既往史),受试者患结直肠癌的风险增加。在一些实施方案中,受试者或受试者的家族成员患有或曾经患有家族性腺瘤性息肉病(FAP)、遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)、波伊茨-耶格综合征(Peutz-Jeghers syndrome)或MUTYH相关息肉病(MAP)。在一些实施方案中,受试者具有一种或多种增加结直肠癌风险的基因的突变,例如但不限于APC、MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、EPCAM、STK11(LKB1)和MUTYH。例如,不受限制,受试者可以具有选自rs6983267、rs4939827、rs3802842、rs16892766、rs10795668、rs4444235、rs10411210、rs6691170、rs4925386、rs3824999、rs647161、rs2423279、rs3217810和rs59336的一个或多个单核苷酸多态性(SNP)。在一些实施方案中,受试者已经历长期抗生素使用。例如,长期抗生素使用包括使用至少6个月的抗生素方案,这会增加CRC的风险。

[0047] 在一些实施方案中,受试者具有与癌症发展相关的ROCK突变。示例性的此类突变包括相对于ROCK1同工型的Val1309、Tyr405、Ser1126、Pro1193S,或相对于ROCK2同工型的Thr431Asn、Asp601Val和Lys1083Met。

[0048] 在一些实施方案中,受试者正在接受或已经接受选自化疗、放疗、切除术和免疫治疗以及免疫肿瘤学药剂中的一种或多种的癌症治疗。在一些实施方案中,癌症免疫治疗是使用免疫检查点抑制剂或免疫刺激配体的治疗,其包括但不限于以下分子的抑制剂:程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、IDO1、IDO 2。T细胞刺激配体包括但不限于CD28、OX-40和ICOS的激动剂。在某些实施方案中,受试者接受选自抗CTLA-4、抗PD-1、抗PD-L1和/或PD-L2剂的免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂选自伊匹单抗(ipilimumab)、曲美木单抗(tremelimumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和纳武单抗(nivolumab)。

[0049] 在其它实施方案中,受试者患有炎性肝病、肾病、胰腺炎、高血糖症或肺部或心脏炎症或纤维化。例如,在一些实施方案中,受试者患有脂肪肝疾病,包括但不限于NAFLD,NASH,酒精性脂肪性肝炎(ASH),或由肝炎、肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗、高甘油三酯血症、慢性肾病、IgA肾病(也称为Berger病)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、Weber-Christian病、Wolmans病、妊娠急性脂肪肝和脂肪营养障碍引起的脂肪肝疾病。参见US 2019/0358289和US2021/0069286,其通过引用以其整体并入本文。

[0050] 在一些实施方案中,受试者患有涉及器官纤维化的疾病,例如肺纤维化、心脏纤维化、肾纤维化或肝纤维化。Knipe R.,et al.The Rho Kinases:Critical Mediators of Multiple ProfibroticProcessesandRational Targets for New Therapies for Pulmonary Fibrosis,Pharmacol Rev.2015Jan;67(1):103-117。在一些实施方案中,受试

者患有与肺纤维化相关的疾病,例如慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺气肿、支气管炎、哮喘、肺炎和呼吸道感染。

[0051] 在其他实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物直接施用至癌组织,包括但不限于肿瘤内施用或通过封装或与纳米颗粒结合或其他方式。ROCK酶在癌症进展的多个过程中发挥作用,例如肿瘤侵袭和转移、增殖和凋亡或存活,并影响癌症和癌症相关细胞,例如成纤维细胞和内皮细胞。

[0052] 在一些实施方案中,组织是原发性癌症。原发性癌症是指在起源部位变得临床可检测的癌细胞,并且可以是原发性肿瘤。例如,癌症可以是I期或II期癌症。在一些实施方案中,组织是原发性癌症,并且癌症选自肺癌、乳腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、卵巢癌、骨癌、尿路上皮癌、胃癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、头颈鳞状细胞癌(HNSCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌、激素难治性前列腺癌和淋巴瘤。

[0053] 在一些实施方案中,组织是转移性癌症。“转移”是指癌症从原发部位扩散到身体的其他部位。癌细胞可以脱离原发性肿瘤,渗透到淋巴管和血管中,通过血流循环,并在身体其他部位的正常组织中远距离生长(转移)。转移可以是局部的或远距离的。在一些实施方案中,组织是转移性癌症,例如转移性黑色素瘤。在多种实施方案中,患者患有的癌症是肉瘤或癌。

[0054] 在一些实施方案中,受试者正在接受或已经接受选自化疗、放疗、切除术和免疫治疗以及免疫肿瘤学药剂中的一种或多种的癌症治疗。在一些实施方案中,癌症免疫治疗是使用免疫检查点抑制剂或免疫刺激配体的治疗,其包括但不限于以下分子的抑制剂:程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、IDO1、IDO 2。T细胞刺激配体包括但不限于CD28、OX-40和ICOS的激动剂。在某些实施方案中,受试者接受选自抗CTLA-4、抗PD-1、抗PD-L1和/或PD-L2剂的免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂选自伊匹单抗、曲美木单抗、派姆单抗和纳武单抗。

[0055] 在一些实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物施用于眼睛,例如眼睛表面,或通过玻璃体内注射。

[0056] 在一些实施方案中,受试者患有Sjogren综合征(SS)。Sjogren综合征是一种身体产生水分的腺体受到影响的自身免疫性疾病,其中,导致出现例如口干(口腔干燥症(xerostomia))、干眼综合征(dry eye syndrome)(例如,慢性干眼症和/或xerosis)和/或皮肤干燥(例如,xerosis)以及其他症状。根据本发明的一些实施方案,Sjogren综合征可以是原发性Sjogren综合征,也可以是继发性Sjogren综合征,即与另一种自身免疫或结缔组织疾病相关联而发生。由SS引起的炎症逐渐损害腺体,并以腺体内淋巴细胞浸润、B细胞活化因子(BAFF)水平升高以及自身抗体产生(例如,抗SSA/Ro)为特征。参见Nair JJ and Singh TP,Sjogren'ssyndrome:Reviewof the etiology pathophysiology&potential therapeutic interventions.J.Clin.Exp.Dent.2017;9(4):e584-9。在一些示例性实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物施用于眼表面,用于治疗原发性或继发性Sjogren综合征。

[0057] 在一些实施方案中,受试者患有青光眼。ROCK抑制剂是例如降低青光眼中眼压(IOP)的有前景的治疗选择。例如,在一些实施方案中,通过将拉瑞唑来或其衍生物(或其

盐)施用至眼表来治疗青光眼。

[0058] 在其他实施方案中,受试者患有炎性眼病,例如黄斑变性、黄斑水肿或糖尿病性视网膜病变。年龄相关性黄斑变性(AMD)是一种随着年龄的增长而逐渐加重的致盲性眼病。炎症参与AMD的发病过程,包括脉络膜新生血管形成和地图样萎缩。在一些实施方案中,将拉瑞唑来或其衍生物通过眼内施用(例如玻璃体内注射)而施用至眼后部。

[0059] 在本发明的一些实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物施用至呼吸道。参见US10,723,763、美国临时申请号63/181,486和PCT/US21/2741,所有这些均通过引用并入本文。在一些实施方案中,受试者患有选自慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化、囊性纤维化、急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺气肿、支气管炎、哮喘、肺炎、肺癌和呼吸道感染的疾病。

[0060] 在一些实施方案中,将拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物配制用于作为溶液气溶胶或粉末施用于肺部。

[0061] 在其他实施方案中,将拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物作为鼻溶液或鼻乳剂施用于鼻上皮。

[0062] 在一些实施方案中,将拉瑞唑来或衍生物施用至脉管系统。例如,拉瑞唑来或衍生物可以全身施用,或通过导管局部应用。例如,受试者可患有选自心脏纤维化、心脏肥大、高血压、肺动脉高压、心绞痛、血管痉挛性心绞痛、心力衰竭、动脉粥样硬化、动脉硬化、糖尿病、胰腺炎、肾病(包括肾纤维化)和卒中(例如,在预防或缺血性卒中或卒中恢复中)的疾病。

[0063] 本文提供的药物组合物可以配制成在GI的患病部分(例如,胃、小肠和/或大肠)中释放。在其他实施方案中,拉瑞唑来或衍生物是全身施用的(例如,静脉内或皮下注射)。在一些实施方案中,将肽组合物以溶液气溶胶或粉末的形式施用至肺部。在一些实施方案中,将肽组合物作为鼻溶液或鼻乳剂施用至鼻上皮。在一些实施方案中,将肽组合物作为液体或口腔崩解片施用至口腔或食道。在一些实施方案中,将肽组合物施用至眼表面或眼内。

[0064] 本发明的拉瑞唑来衍生物可以以包括盐的任何合适的形式施用。例如,肽可以以醋酸盐施用。可以使用可替代的盐,包括任何药学上可接受的盐,例如Journal of Pharmaceutical Science,66,2-19(1977)和The Handbook of Pharmaceutical Salts;Properties,Selection,and Use.P.H.Stahl and C.G.Wermuth(eds.),Verlag,Zurich(Switzerland)2002中列出的盐,其通过引用以其整体并入本文。

[0065] 在多种实施方案中,将肽配制成药物组合物,其可以采用片剂、丸剂(pill)、微丸(pellet)、胶囊、含液体的胶囊、含多颗粒的胶囊、粉末、溶液、乳剂、滴剂、栓剂、乳剂、气溶胶、喷雾剂、悬浮液、延迟释放制剂(delayed-release formulation)、持续释放制剂(sustained release formulation)、改良释放制剂(modified release formulation)、控制释放制剂(controlled release formulation)的形式或任何其他适合使用的形式。

[0066] 在一些实施方案中,将药物组合物配制成适合胃肠外施用的组合物。适合胃肠外施用(例如静脉内、肌内、皮下或腹膜内注射和输注)的剂型包括例如溶液、悬浮液、分散液、乳剂等。它们还可以制成无菌固体组合物(例如冻干组合物)的形式,其可以在使用前即刻溶解或悬浮在无菌可注射介质中。它们可以含有例如悬浮剂或分散剂。在这些实施方案中,所述组合物可以有效治疗涉及全身炎症或者受损的或发炎的内皮组织的疾病。

[0067] 在一些实施方案中,通过接触胃肠道的上皮组织或粘膜表面将组合物施用于受试者。例如,组合物可以配制用于递送至胃、小肠和/和大肠中的一个或多个。通过将肽释放靶向在患病区域(例如十二指肠、空肠和回肠、横结肠、降结肠、升结肠、乙状结肠和盲肠)中,可以实现GI任何位置的ROCK抑制。可以通过用肽包覆珠子或颗粒以及延迟释放包衣(防止在胃中释放和在目标位置处或附近降解)来实现肽在小肠或大肠中的靶向递送。

[0068] 在一些实施方案中,拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物以持续释放或控制释放制剂的形式施用,该制剂在肠道中释放约0.5至约5mg的拉瑞唑来或衍生物。在某些实施方案中,控制释放制剂含有至少0.5或1mg的拉瑞唑来或衍生物。

[0069] 在一些实施方案中,肽(例如,拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物)被配制用于在GI的一个或多个位置中持续或改进或控制的递送。例如,本发明包括一种持续或控制释放制剂,其可以在至少约2小时、或至少约2.5小时、或至少约3小时、或至少约4小时、或至少约5小时的时间内功能性地在小肠和/或大肠中释放肽。在一些实施方案中,持续释放或控制释放组合物在暴露于模拟肠液约10至约30分钟内开始释放肽,暴露于模拟肠液肽的释放持续至少约180分钟、或至少约210分钟、或至少约240分钟、或至少约280分钟。例如,可以使用具有不同肠溶聚合物包衣和/或不同厚度的聚合物包衣的组合物来制备释放曲线。在一些实施方案中,本发明提供了一种组合物,该组合物包含有效量的拉瑞唑来或衍生物(或其盐),其包含在可生物降解或可侵蚀的聚合物基质中,还包含肠溶包衣。采用可生物降解或可侵蚀基质的制剂描述在WO 2021/034629中,该文献在此通过引用以其整体并入本文。此外,可侵蚀的聚合物基质可以包含多糖基质。在一些实施方案中,基质包括以下一种多多种:纤维素、几丁质、壳聚糖、藻酸盐、直链淀粉、果胶、胼胝质(callose)、昆布多糖、金藻昆布多糖、木聚糖、阿拉伯木聚糖、甘露聚糖、岩藻多糖、半乳甘露聚糖、黄原胶、葡聚糖、威兰胶(welan gum)、结冷胶(gellan gum)、定优胶(diutan gum)、普鲁兰多糖、透明质酸及其衍生物。在进一步的实施方案中,基质包括微晶纤维素。在这些实施方案中,组合物利用低有效剂量的拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物(例如,(d)-拉瑞唑来或(d)-Pro),同时还最小化无活性片段的任何局部积累。此外,这些实施方案中的制剂具有用在转运过程中持续沉积的小剂量肽治疗GI的大表面的好处。

[0070] 在多种实施方案中,药物组合物可以配制成具有延迟释放特征,即不在摄入后立即释放活性成分;而是将活性成分的释放推迟至肽通过胃并位于胃肠道下部时;例如,用于在小肠(例如十二指肠、空肠、回肠中的一个或多个)或大肠(例如盲肠、升结肠、横结肠、降结肠或乙状结肠中的一个或多个)中释放。在一个实施方案中,药物组合物配制成具有延迟释放特征,如例如美国专利号8,168,594中所述,其全部内容通过引用并入本文。

[0071] 例如,可以将肽以含有肽的口服剂量延迟释放组合物的形式施用至患者的至少十二指肠。在此类实施方案中,组合物包括第一珠群,该珠群具有在胃液中稳定而在肠液中不稳定的包衣,从而在十二指肠中降解并显著释放肽。组合物还可以包括第二珠群,该珠群具有pH依赖性包衣,以影响肽在患者空肠和/或回肠中的释放。例如,第二珠群可以在十二指肠释放肽的珠子释放后约30分钟或约45分钟释放肽。口服剂量组合物可以是胶囊或片剂的形式。在一些实施方案中,pH依赖性包衣是甲基丙烯酸和乙基丙烯酸酯的1:1共聚物,其中该层的厚度决定了每个珠子的释放特征。珠子可以具有一个或多个额外包衣,例如基础包衣、分离层和外包衣层。在这些实施方案中,珠子的内容物将在目标位置以更浓注的方式释

放,但(d)-拉瑞唑来或(d)-Pro的性质将比具有此类释放特征的拉瑞唑来更有效。

[0072] 在示例性口服剂量组合物中,有效量的肽(例如,以醋酸盐形式)在能够在患者十二指肠中释放肽的第一延迟释放颗粒中,并在能够在患者空肠中释放肽的第二延迟释放颗粒中提供。每个颗粒具有核心颗粒、核心颗粒上的包含肽(例如,(d)-拉瑞唑来或(d)-Pro)的包衣以及在包含肽的包衣外部的延迟释放包衣(例如,丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的1:1共聚物)。而第一延迟释放颗粒在暴露于pH大于5的模拟肠液的约60分钟释放第一延迟释放颗粒中至少70%的肽;第二延迟释放颗粒在暴露于pH大于5的模拟肠液的约30和约90分钟释放至少70%的肽。

[0073] 通常,延迟释放包衣可随时间降解,与pH值和/或酶的存在无关。这种包衣可包括例如水不溶性聚合物。因此,其溶解度不依赖于pH值。本文所用的术语"不依赖于pH"是指聚合物的渗透性和其释放药物成分的能力不随pH值变化和/或仅非常轻微地依赖于pH值。此类包衣可用于制备例如持续释放制剂。合适的水不溶性聚合物包括但不限于纤维素醚、纤维素酯或纤维素醚-酯,即纤维素骨架上的一些羟基被烷基取代并且一些羟基用烷酰基修饰的纤维素衍生物。实例包括乙基纤维素、乙酰纤维素、硝化纤维素等。

[0074] 用于构建延迟释放包衣的聚合物的其他实例包括但不限于漆(lacquer)、丙烯酸和/或甲基丙烯酸的酯聚合物、具有低季铵含量的丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯的聚合物或共聚物、或它们的混合物等。不溶性聚合物的实例包括

EUDRAGIT RS®、EUDRAGIT RL®和EUDRAGIT NE®。不溶性聚合物包括例如聚乙烯酯、聚乙烯缩醛、聚丙烯酸酯、丁二烯苯乙烯共聚物等。

[0075] 已知有各种类型的用于将活性剂延迟但大量递送至GI道的肠溶包衣。在一些实施方案中,持续释放组合物包括在酸性环境中基本稳定而在近中性至碱性环境中基本不稳定的肠溶剂。在一个实施方案中,持续释放包衣包含在胃液中基本稳定的肠溶剂。肠溶剂可以选自例如甲基丙烯酸共聚物、纤维素醋酸邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、聚乙烯基乙酸酯邻苯二甲酸酯、羧甲基乙基纤维素和EUDRAGIT®型聚合物(聚(甲基丙烯酸,甲基甲基丙烯酸酯)、羟丙基甲基纤维素醋酸酯琥珀酸酯、纤维素醋酸酯偏苯三酸酯、虫胶(shellac)或其他合适的肠溶性包衣聚合物的溶液或分散液。EUDRAGIT®型聚合物包括例如EUDRAGIT®FS 30D、L 30D-55、L 100-55、L 100、L 12,5、L 12,5P、RL 30D、RL PO、RL 100、RL 12,5、RS 30D、RS PO、RS100、RS12,5、NE 30D、NE 40D、NM 30D、S100、S12,5和S12,5P。在一些实施方案中,使用EUDRAGIT®FS 30D、L 30D-55、L100-55、L 100、L 12,5、L 12,5P RL 30D、RL PO、RL 100、RL 12,5、RS 30D、RS PO、RS100、RS12,5、NE 30D、NE 40D、NM 30D、S100、S12,5和S12,5P中的一种或多种。肠溶剂可以是前述溶液或分散液的组合。在一些实施方案中,肠溶剂是EUDRAGIT F30D,其包含丙烯酸酯甲基、甲基丙烯酸酯甲基和甲基丙烯酸的共聚物。该共聚物的游离羰基与酯基的比例为约1:10。

[0076] 在一些实施方案中,珠子包含在模拟胃液中基本上能抵抗溶解的肠溶包衣。组合物在胃液中基本保持完整,或可基本不溶解。胃抗性包衣的稳定性可取决于pH。例如,肠溶包衣可防止肽在模拟胃液以及pH约5.5的模拟肠液中大量释放。在一些实施方案中,基质提供了肽在pH约6或更高(例如约6.5至约7.0)的模拟肠液中的持续释放。因此,肠溶包衣在模拟胃液中稳定,但在pH高于约6.0的模拟肠液中不稳定。在这样的实施方案中,肠溶包衣在

十二指肠中基本上不释放肽,而是延迟释放直至组合物进入空肠,然后在空肠和回肠中提供持续释放。

[0077] 在一些实施方案中,组合物是包含珠群的用于口服递送的胶囊,该珠群包含了包含在可蚀性聚合物基质内的有效量的拉瑞唑来或衍生物(例如,(d)-拉瑞唑来或(d)-Pro或其盐),该珠子还包含肠溶包衣,该肠溶包衣可包含甲基丙烯酸酯、甲基甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸的共聚物。共聚物中游离羰基与酯基的比率可为约1:10(例如,EUDRAGIT F30D)。在此类实施方案中,肠溶包衣可占组合物总重量的约20%至约30%。在一些实施方案中,可蚀性基质包含微晶纤维素。在一些实施方案中,组合物在模拟胃液中在约2小时后释放少于约15%的肽。此外,组合物在pH约5.5的模拟肠液中在约2小时后释放少于约25%的肽。在多种实施方案中,组合物在pH约7.0的模拟肠液中在约2小时后释放至少约40%但不超过约80%的肽。在多种实施方案中,在pH约7的模拟肠液中,直到至少三小时,或在一些实施方案中直到至少约3.5小时或至少约四小时,才能达到100%的释放。

[0078] 在一些实施方案中,药物组合物涉及包衣片剂或者包衣珠子或颗粒,具有延迟释放特性,如例如美国专利号8,168,594中所述,该专利的全部内容在此通过引用并入。示例性肠溶包衣包括丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的共聚物,在一些实施方案中,该共聚物为1:1共聚物。其他填充剂、粘合剂和增塑剂(包括用于密封包衣或顶层包衣的增塑剂)在US 8,168,594中描述,该专利在此通过引用并入。

[0079] 根据某些实施方案,本发明提供了每天一次或多次施用的本文所述的组合物。例如,可以约每天一次、约每天两次或约每天三次施用组合物。在多种实施方案中,每天一次至每天三次的方案持续一段延长的时间。在一些实施方案中,每天施用组合物。在其他实施方案中,每周施用拉瑞唑来或拉瑞唑来衍生物组合物1至3次。在一些实施方案中,所述方案持续至少约1个月、至少约2个月、至少约4个月、至少约6个月或至少约8个月。在一些实施方案中,治疗是持续的,以延迟或预防疾病进展或减轻或改善慢性疾病的症状。

实施例

[0080] 实施例1:阐明拉瑞唑来醋酸盐在肠屏障功能中的作用机制

[0081] 该实施例提供了拉瑞唑来醋酸盐在A/R损伤期间调节MLC-2磷酸化作用的研究结果。结果表明,顶端处理的拉瑞唑来醋酸盐在A/R损伤的Caco-2BBe1单层细胞上通过调节TJ蛋白和肌动蛋白稳定化而保护了上皮屏障功能。此外,拉瑞唑来醋酸盐处理还降低了A/R损伤期间增加的MLC-2磷酸化,从而调节上皮屏障功能。

[0082] A.屏障功能的评估

[0083] 用拉瑞唑来醋酸盐对人肠上皮细胞的预处理显示在缺氧/复氧(A/R)损伤期间收紧肠道屏障。结合前肌动球蛋白环响应于肌球蛋白轻链2(MLC-2)的磷酸化而收缩,从而导致TJ跨膜蛋白的内化,因此本研究评估了拉瑞唑来醋酸盐是否通过抑制MLC-2磷酸化而在缺氧/复氧(A/R)损伤期间保护TJ屏障。

[0084] 具体而言,为了评估屏障功能,在用或不用拉瑞唑来醋酸盐(LA)处理的缺氧/复氧(A/R)损伤的C2BBe1(表达Caco-2的Caco-2刷状缘)细胞中测量了跨上皮电阻(TEER)。C2BBe1单层细胞用LA(0.001、0.1、1和10mM)处理,并使其缺氧2小时,然后用21% O_2复氧。参见图1A。为了产生A/R损伤,将C2BBe1细胞放置在模块化培养室(Billups-Rothenberg,圣

地亚哥,CA)中,并用95% N2/5% CO_2冲5分钟。然后将模块化培养室密封并放置在培养箱中2小时。2小时后,将细胞从模块化培养箱室中取出,并放置在21%O_2正常环境中。测量TEER以评估A/R损伤和恢复期间的屏障功能。在单层细胞的基底侧和顶侧,使用筷子电极组(WPI,LLC,Sarasota,FL)和连接的上皮伏特欧姆计2(WPI,LLC,Sarasota,FL)测量TEER。

[0085] 与对照细胞相比,用10mM LA处理的C2BBe1单层细胞的TEER显著增加($p<0.001$)。图1B。TEER增加证明了LA能够关闭缺氧损伤引起的"渗漏的"紧密连接屏障。

[0086] B.紧密连接和MLC活性的评估

[0087] 如图2所示,A/R损伤引起肌球蛋白轻链2(MLC-2)的磷酸化,以内化紧密连接蛋白。本实验的目的是确定LA是否有助于抑制磷酸化的MLC-2以在A/R损伤期间保护紧密连接屏障。为此,研究了紧密连接蛋白的定位、肌动蛋白的结构和pMLC-2。

[0088] 具体而言,使用膜和胞质级分的蛋白质印迹和免疫荧光显微镜分析,来评估紧密连接蛋白和肌动蛋白结构的分布。使用Mem-PER真核膜蛋白提取试剂盒(Thermo Scientific)来分级膜和胞质区室。用一抗抗ZO-1和抗闭锁蛋白(Invitrogen)对提取的蛋白进行印迹。用一抗(ZO-1和闭锁蛋白)和鬼笔环肽(F-肌动蛋白)对冷甲醇固定的单层细胞进行染色,以进行免疫荧光显微镜分析。使用配备有cellSens软件的Olympus IX83倒置电动显微镜(Olympus,东京,日本)检查染色的单层细胞。使用针对pMLC-2和MLC-2的一抗(CST,Danvers,MA)进行蛋白质印迹分析,以评估pMLC-2/MLC-2表达。

[0089] 数据显示,在A/R损伤期间,紧密连接蛋白闭锁蛋白被内化到细胞质中并且ZO-1被破坏。然而,如图3所示,用10mM LA处理可阻止A/R损伤期间紧密连接蛋白的破坏。F-肌动蛋白结构在A/R损伤期间也遭到破坏并用10mM LA得到保护。参见图4。此外,图5显示,pMLC-2因A/R损伤而显著增加,而用10mM LA处理则显著降低了这种磷酸化。总之,数据表明LA通过降低pMLC-2而在A/R损伤期间保护紧密连接屏障。

[0090] LA处理提高了A/R损伤期间人肠道细胞中的紧密连接屏障。结果表明,在A/R损伤期间,LA处理保护了C2BBe1细胞中的紧密连接蛋白。A/R损伤期间缺氧诱导的磷酸化MLC-2增加,而LA显著降低了磷酸化MLC-2。

[0091] 在A/R损伤期间,LA处理保护了人肠上皮细胞中紧密连接蛋白的分布。这种由LA处理引起的A/R损伤期间的屏障功能增强是由磷酸化MLC-2减少和肌动蛋白稳定化引起的。

[0092] C.MLCK和ROCK活性评估

[0093] 图6显示磷酸化肌球蛋白轻链(pMLC)受肌球蛋白轻链激酶(MLCK)、肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)和Rho激酶(ROCK)调控。本实施例的目的是通过进行激酶抑制实验来阐明LA在激酶活性中的作用。

[0094] 为了评估屏障功能,在用或不用LA处理的A/R损伤的C2BBe1细胞中测量TEER。C2BBe1单层细胞用10mM LA、1μM Y-27632二盐酸盐(ROCK抑制剂,ApexBio,休斯顿,TX)和400μM肽18(MLCK抑制剂,Tocris Bioscience,明尼阿波利斯,MN)处理,然后使其缺氧2小时,再用21% O_2进行复氧。

[0095] 如图7所示,与未处理的A/R损伤的细胞相比,用肽18单独处理或与LA联合处理A/R损伤的细胞提高了TEER值。特别是,用肽18和LA联合处理在A/R损伤的细胞中表现出协同作用。然而,Y-27632与LA联合处理没有表现出任何加成或协同作用。

[0096] 根据在A/R损伤细胞中同时使用LA和肽18时TEER的显著增加,推测LA作用于与

MLCK不同的独立途径。经LA处理的A/R损伤的细胞以及经LA和Y-27632处理的A/R损伤的细胞中的TEER水平相似。这些数据表明,通过LA降低的MLC-2磷酸化可通过ROCK活性进行调节。

[0097] D.RNAseq分析

[0098] 由于MLC的磷酸化可受多种细胞途径调控,如图8所示,进行了高通量RNAseq分析以阐明LA的作用机制。具体来说,用10mM LA处理C2BBe1单层细胞,使其缺氧2小时,然后用21% O_2复氧1小时。采用下一代RNA测序和生物统计学分析来评估细胞调控途径。

[0099] 不同的表达分析显示存在12,999个簇,其中11,925个簇由对照(CT)、对照与LA(CT+LA)、缺氧(Anox)、和缺氧与LA(Anox+LA)共享。参见图9B。这些分析还显示了CT相比CT+LA以及Anox相比Anox+LA之间最显著的差异表达的基因(如表1所示)。

[0100] 表1:对照与暴露于LA 3小时相比的最显著DEG

[0101]

基因名称	注释	相对于对照的表达	Padj
DDIT4	DNA 损伤诱导转录蛋白_4	上	1.16E-45
EGR1	早期生长反应蛋白 1	上	1.30E-38
H1F0	H1 组蛋白家族成员 0	上	1.42E-33
CEBPB	CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)β	上	4.22E-29
ID2	DNA 结合 2 抑制剂显性负螺旋环螺旋蛋白	上	2.05E-28
ITGA2	整合蛋白 α2	下	1.86E-115
SAMD5	不育 α 基序结构域包含蛋白_5	下	3.66E-63
MAT2A	甲硫氨酸腺苷转移酶 II α	下	2.36E-41
IGFBP4	胰岛素样生长因子结合蛋白 4	下	2.56E-40
SYTL2	突触结合蛋白-样 2	下	5.24E-40

[0102] 基因本体注释的进一步分析表明,在用LA处理的细胞中存在许多差异表达的关键信号传导途径,包括参与建立细胞极性的生物过程、调节连接结构的分子功能以及与上皮修复相关的细胞组分(细胞前缘、褶边和顶端连接复合体)。见表2。

[0103] 表2:缺氧细胞与暴露于LA 3小时细胞相比的最显著DEG

[0104]

基因名称	注释	相对于对照的表达	Padj
TNS1	张力蛋白 1	上	1.02E-255
NDRG1	N-myc 下游调控蛋白 1	上	738E-230
PFKFB4	6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-26-二磷酸酶 4	上	2.49E-180
SLC2A3	溶质运载蛋白家族 2(促进葡萄糖转运蛋白)成员 3	上	4.83E-131
JPH2	亲联蛋白 2	上	6.06E-100
EGR1	早期生长反应蛋白 1	下	1.78E-100
HES1	发状分裂相关增强子 1(果蝇)	下	6.63E-96
HSPH1	热休克 105KDa/110kDa 蛋白 1	下	2.92E-72
SAMD5	不育 α 基序结构域包含蛋白_5	下	1.87E-69
AMOTL2	血管动蛋白样 2	下	3.77E-62

[0105] 此外,图10表明,Ras/Rho GTPase结合和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性在用LA处理的细胞中差异表达。此外,京都基因和基因组百科全书途径富集分析显示“细胞周期”、“粘附连接”和“Wnt信号传导途径”的靶基因富集。参见图11。

[0106] 根据GO分析,与未处理的细胞相比,用LA处理的细胞中多种翻译过程显著提高。分析表明,LA在蛋白翻译信号传导中具有关键作用。LA处理还与多种连接途径有关,例如钙粘蛋白结合和细胞粘附。KEEG途径分析表明,LA与细胞周期、粘附连接和翻译途径密切相关。包括RNAseq分析在内的数据表明,LA通过调节包括细胞周期、迁移和顶端连接复合体在内的多种细胞途径而在A/R损伤期间保护紧密连接屏障。

[0107] E.正常条件下屏障功能的评价

[0108] 本实验评价了正常条件下LA在细胞旁通透性中的作用。

[0109] 为了进行屏障功能分析,在用或未用10mM LA处理的C2BBe1细胞单层中测量TEER。在单层细胞的基底和顶端,使用筷子电极组(WPI,LLC,Sarasota,FL)并连接上皮伏特欧姆计2(WPI,LLC,Sarasota,FL)测量TEER。

[0110] 图12所示的结果显示,用10mM LA处理增加了C2BBe1单层细胞中的TEER,表明LA在正常条件下以及在A/R损伤期间具有收紧细胞旁孔的功能。LA在正常条件下具有收紧细胞间连接结构的功能。

[0111] F.增殖和迁移的评估

[0112] 本实验评估了LA在增殖和迁移中的作用。具体而言,根据制造商的说明,使用CCK-8测定试剂盒(Dojindo Molecular Technologies,Rockville,MD)评估未处理或用LA处理(10mM)的C2BBe1细胞的增殖。每隔一天用10mM LA处理接种在96孔培养板中的细胞。连续五天使用CCK-8检测试剂盒评估活细胞。通过将C2BBe1细胞接种在3孔培养插入物(ibidi GmbH,Gräfelfing,德国)中并在达到汇合后取出插入物以在细胞单层中形成“伤口”来评估迁移。将10mM LA分别添加至无血清和常规培养基中以评估迁移和增殖。使用Axio Vert A1

显微镜(Carl Zeiss AG,Oberkochen,德国)在0、4、8、24和48小时拍摄图像,并使用ImageJ软件测量迁移距离来分析伤口闭合情况。

[0113] 图13表明,在C2BBe中用10mM LA处理显著增加了通过CCK8测量的增殖。与未处理的C2BBe1细胞相比,经10mM LA处理的细胞的增殖显示出显著增加。此外,图14表明,添加LA不显著改变迁移,这从无血清培养基条件可以看出。

[0114] 结果表明,LA促进细胞增殖但不促进细胞迁移。LA诱导的这种增殖可促进肠道损伤的修复机制。

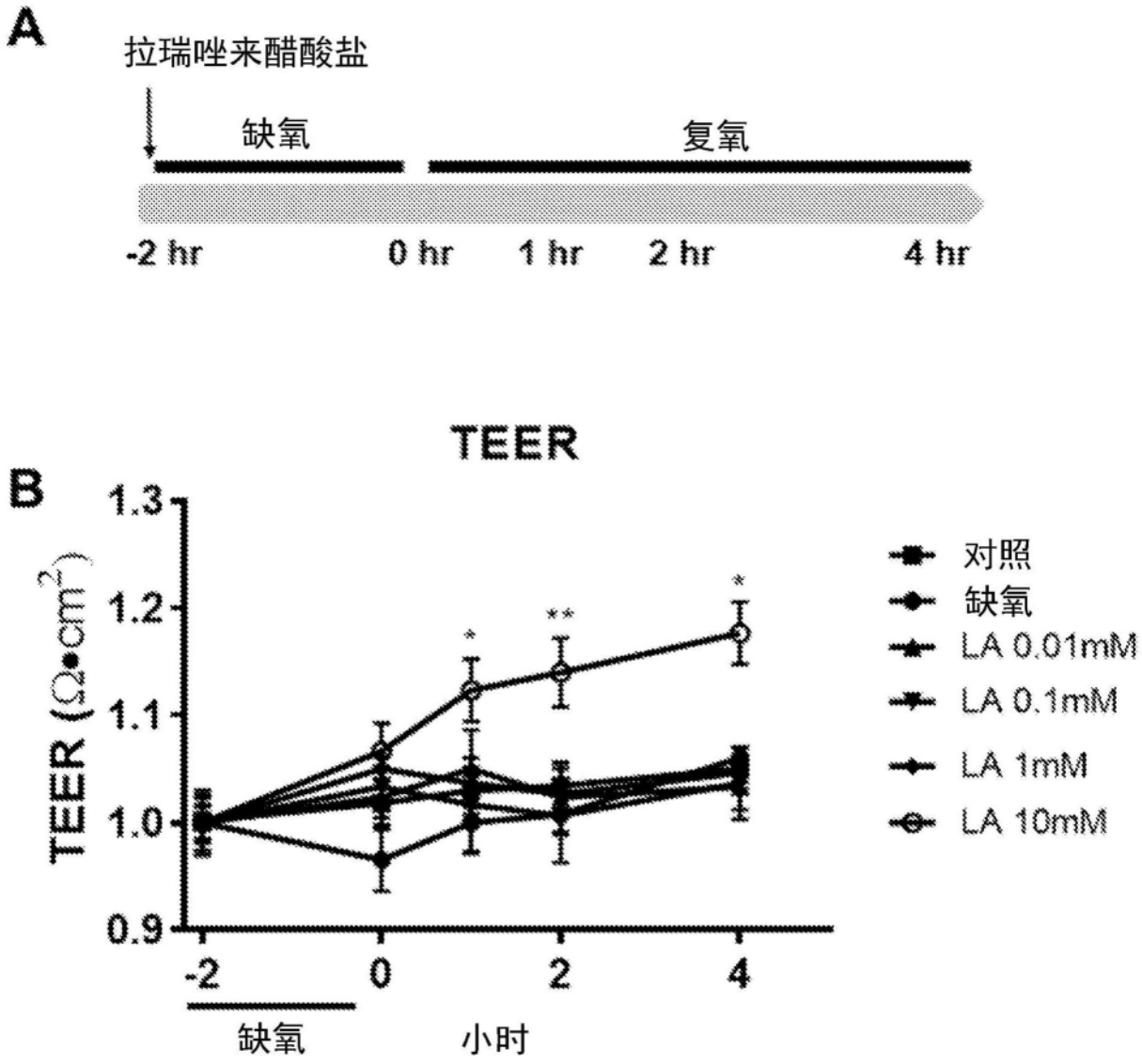

A
拉瑞唑来醋酸盐
缺氧
复氧
-2 hr
0 hr
1 hr
2 hr
4 hr
B
TEER
TEER (Ω•cm²)
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
-2
0
2
4
缺氧
小时
对照
缺氧
LA 0.01mM
LA 0.1mM
LA 1mM
LA 10mM

图1

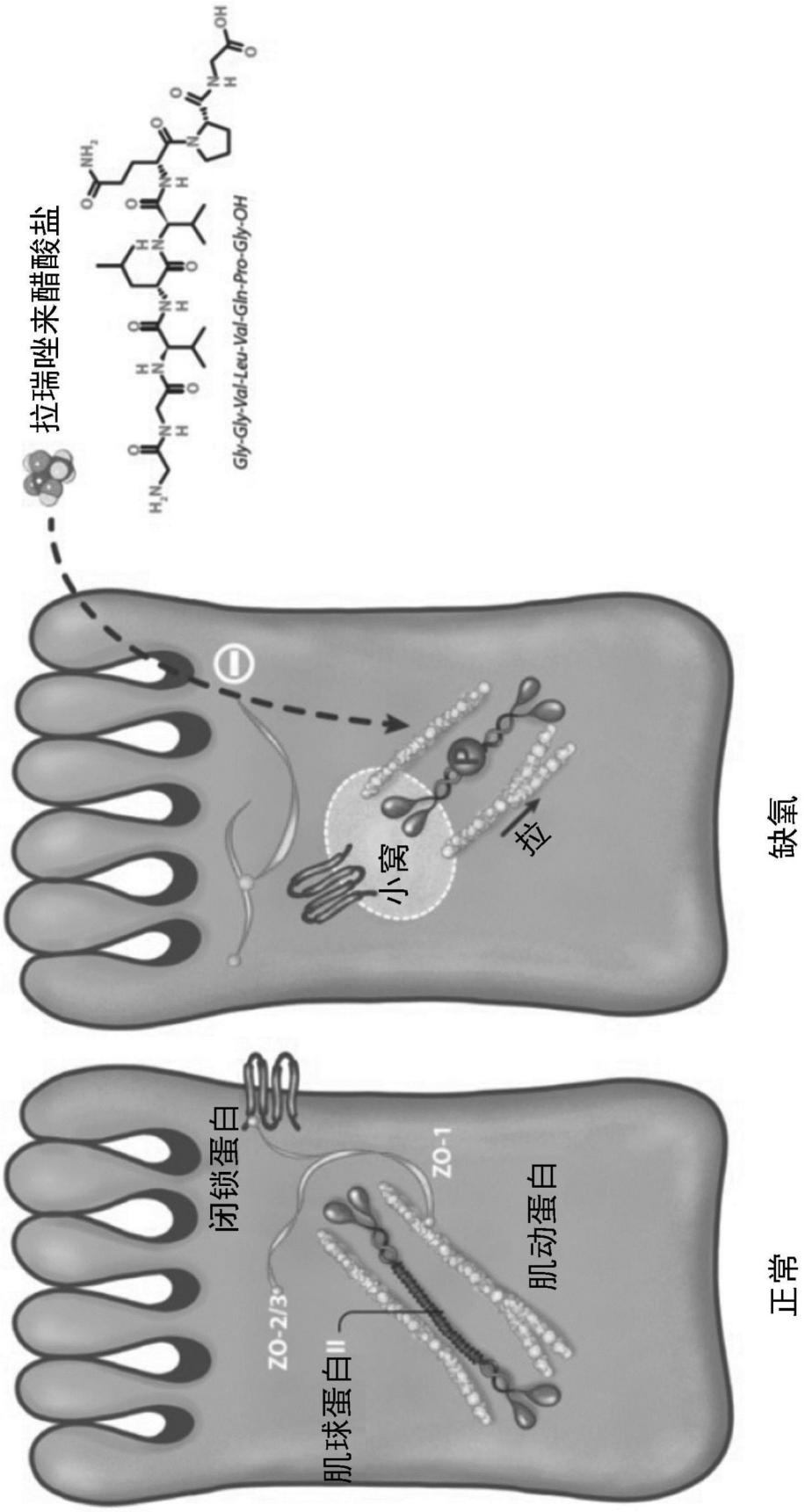
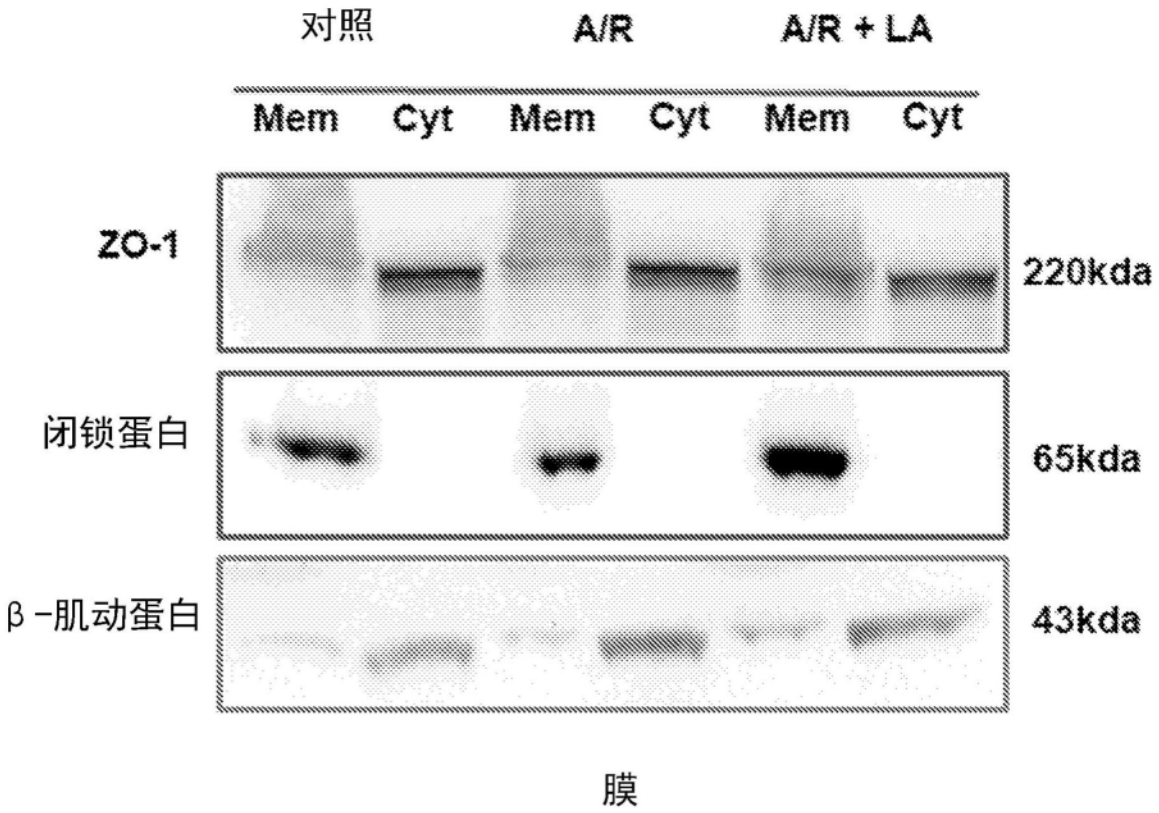

拉瑞唑来醋酸盐
Gly-Gly-Val-Leu-Val-Gln-Pro-Gly-OH
闭锁蛋白
ZO-2/3
肌球蛋白II
ZO-1
肌动蛋白
正常
小窝
坑
缺氧

图2


对照
A/R
A/R + LA
Mem
Cyt
Mem
Cyt
Mem
Cyt
ZO-1
220kda
闭锁蛋白
65kda
β-肌动蛋白
43kda
膜

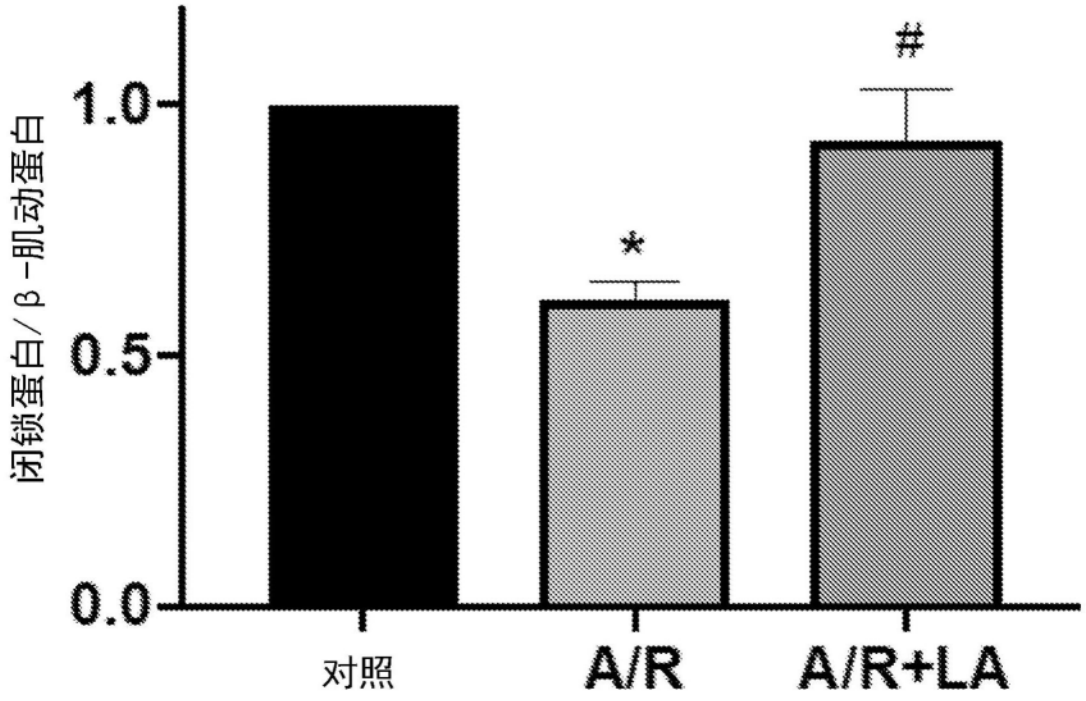

闭锁蛋白/β-肌动蛋白
1.0
0.5
0.0
*
#
对照
A/R
A/R+LA

图3

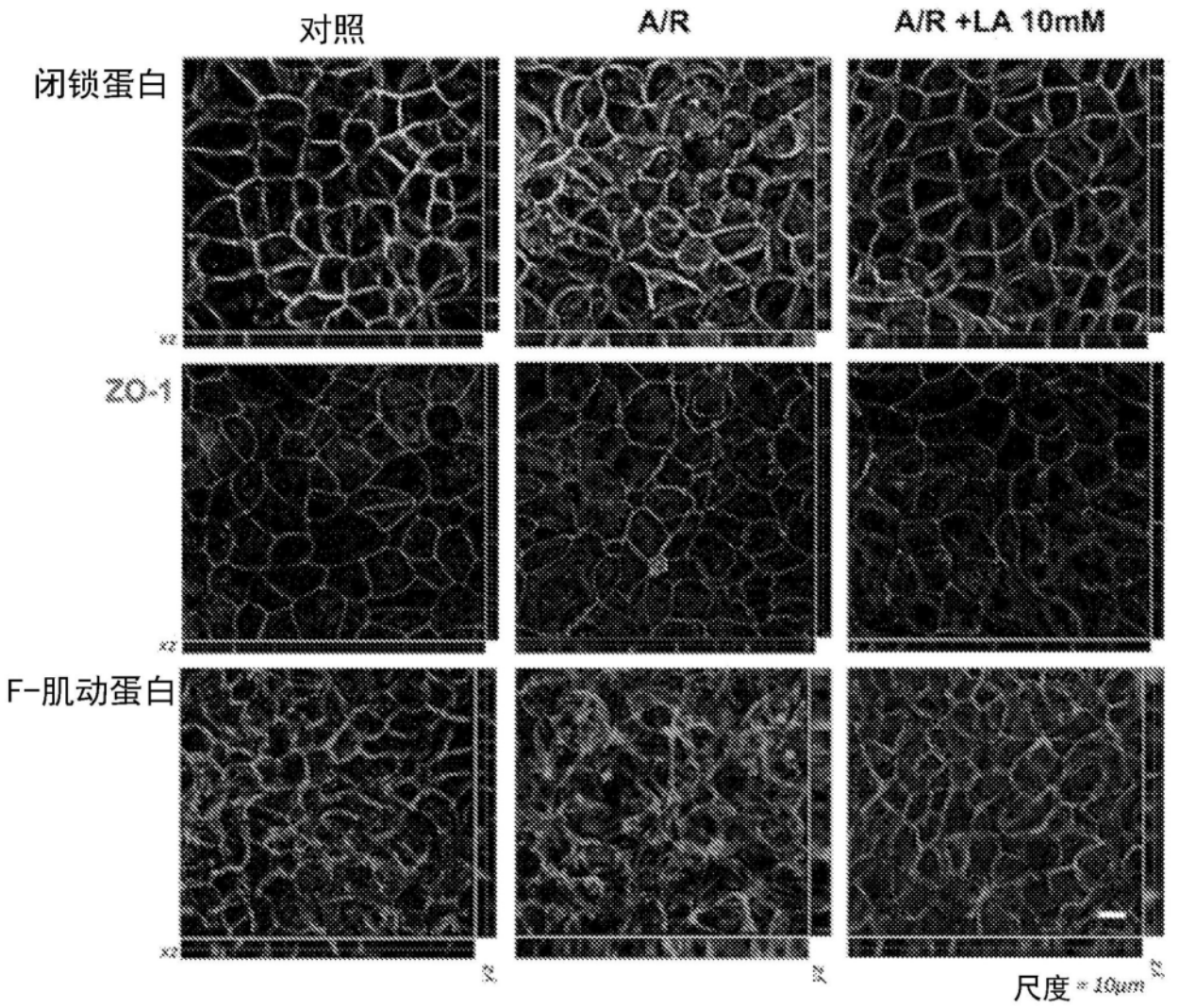


图4

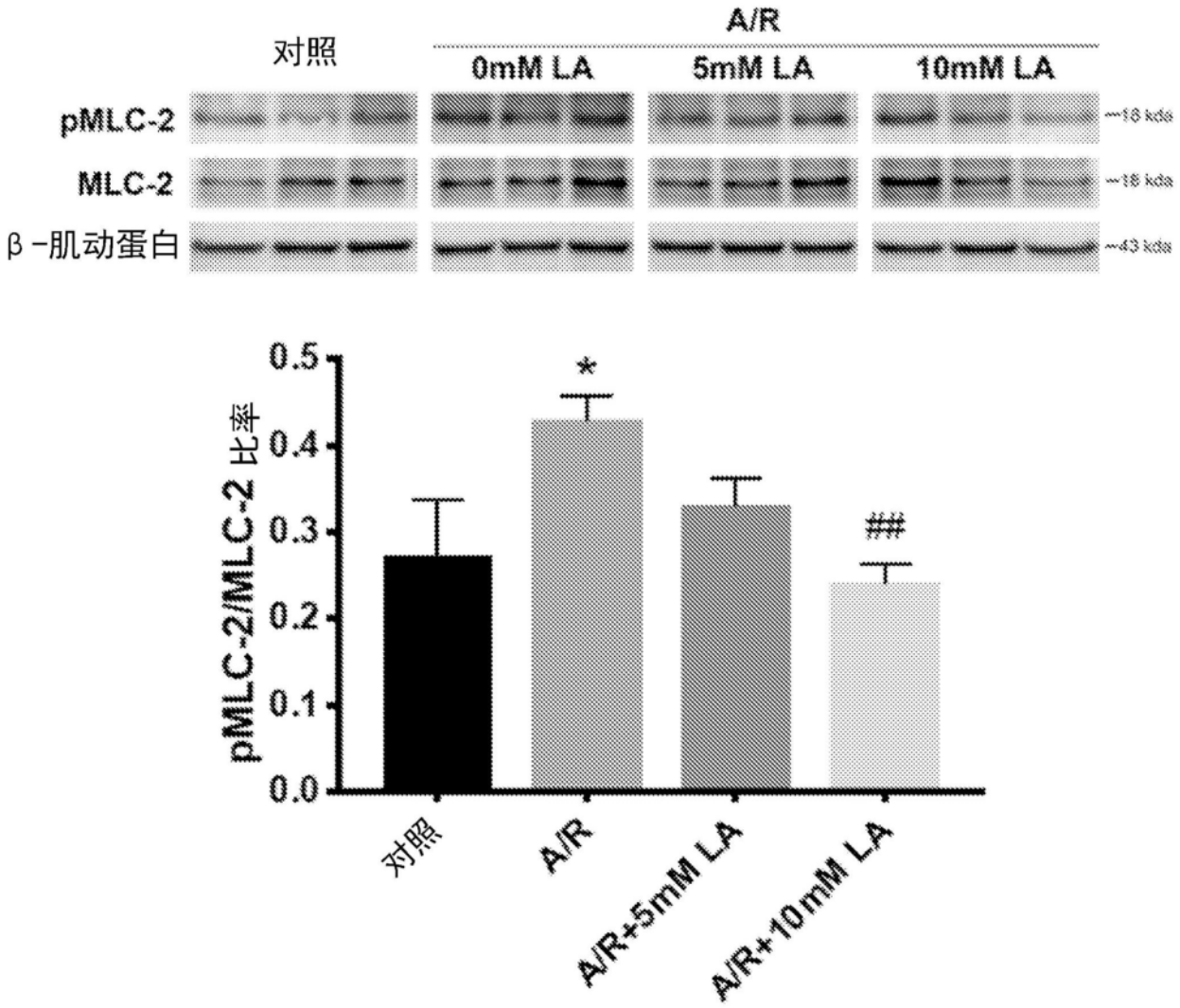

对照
A/R
0mM LA
5mM LA
10mM LA
pMLC-2
MLC-2
β-肌动蛋白
~18 kda
~18 kda
~43 kda
pMLC-2/MLC-2 比率
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
##
对照
A/R
A/R+5mM LA
A/R+10mM LA

图5

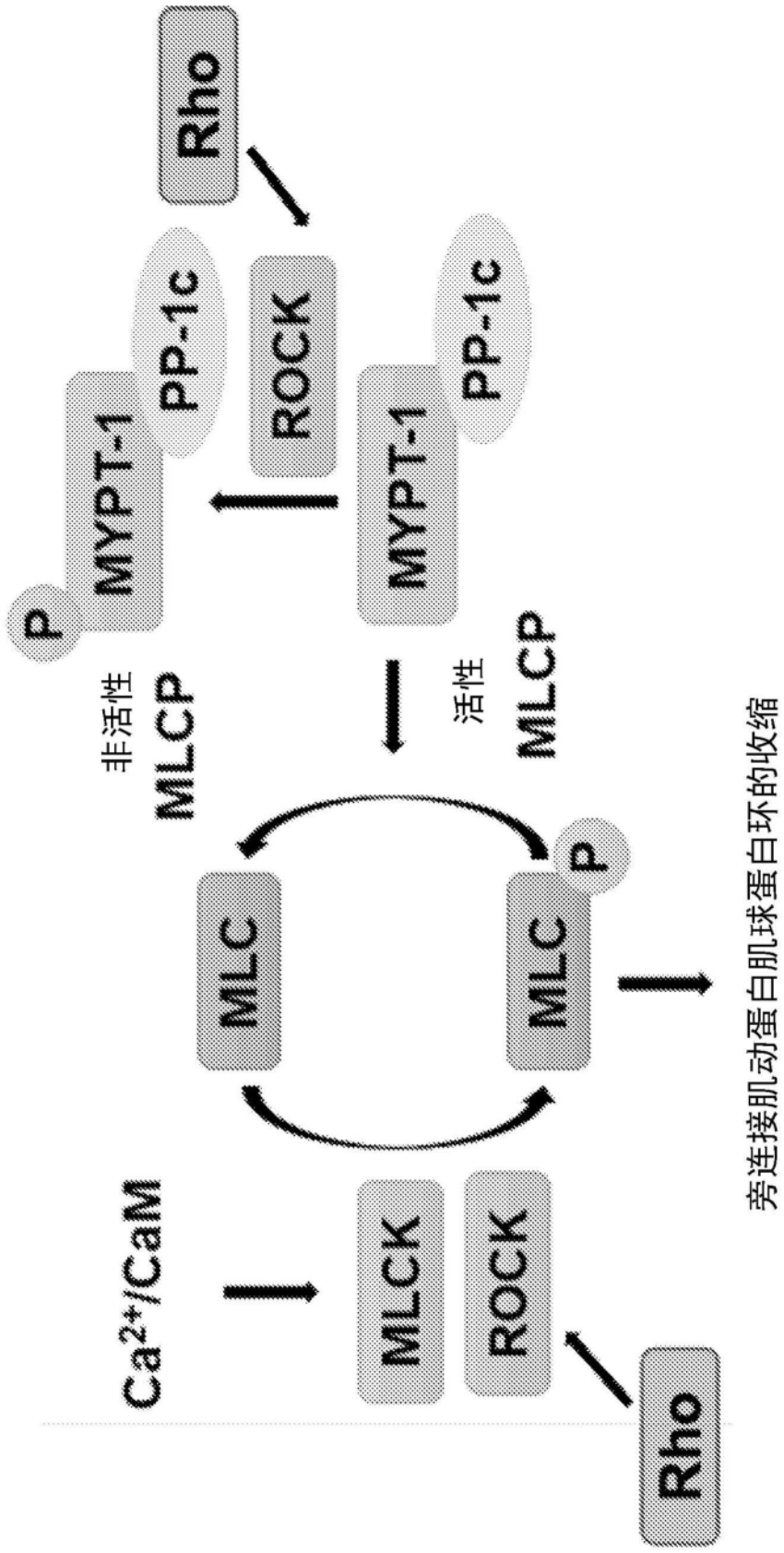

Rho
ROCK
PP-1c
MYPT-1
P
非活性
MLCP
活性
MLCP
MLC
MLC
P
Ca2+/CaM
MLCK
ROCK
Rho
旁连接肌动蛋白肌球蛋白环的收缩

图6

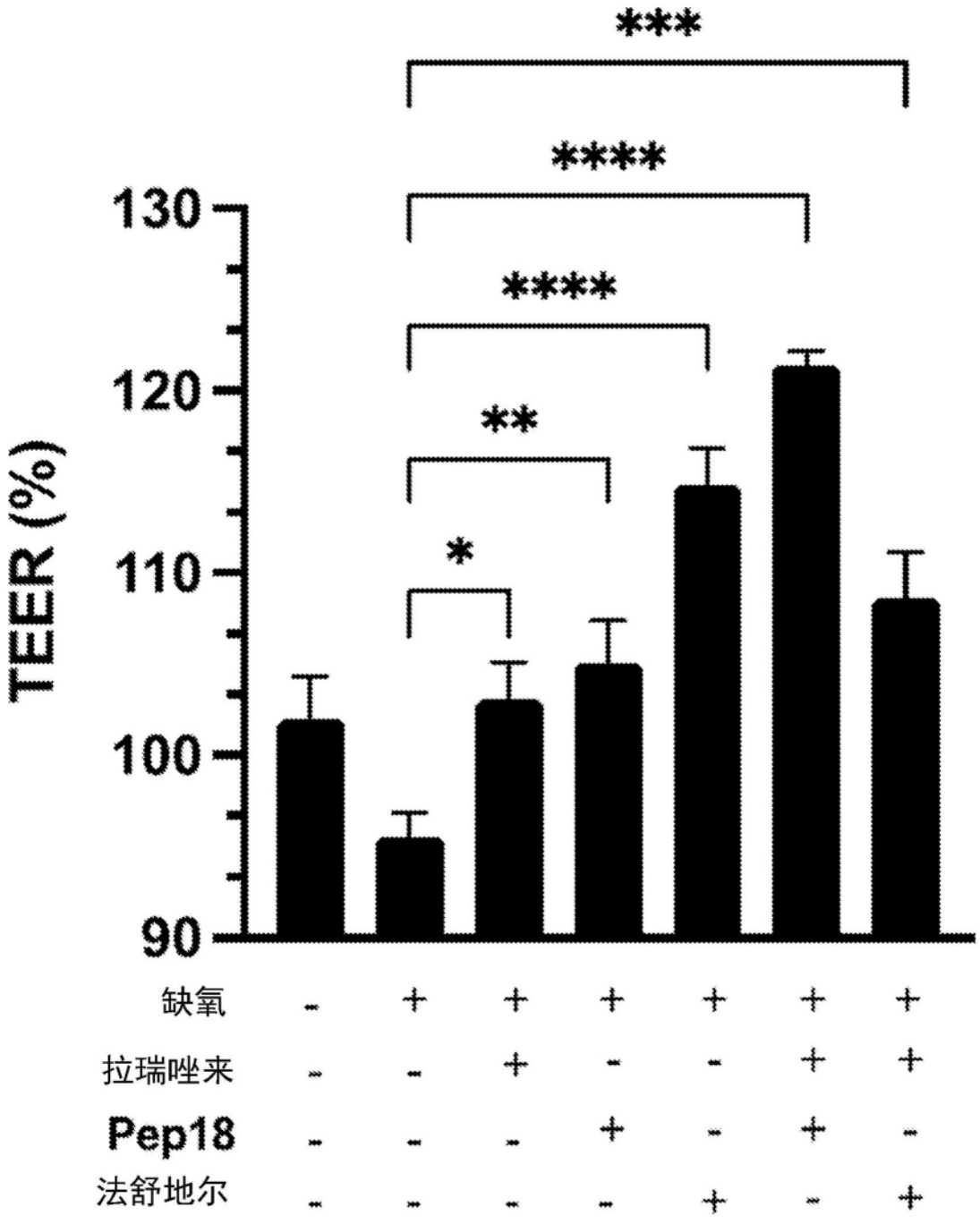


图7

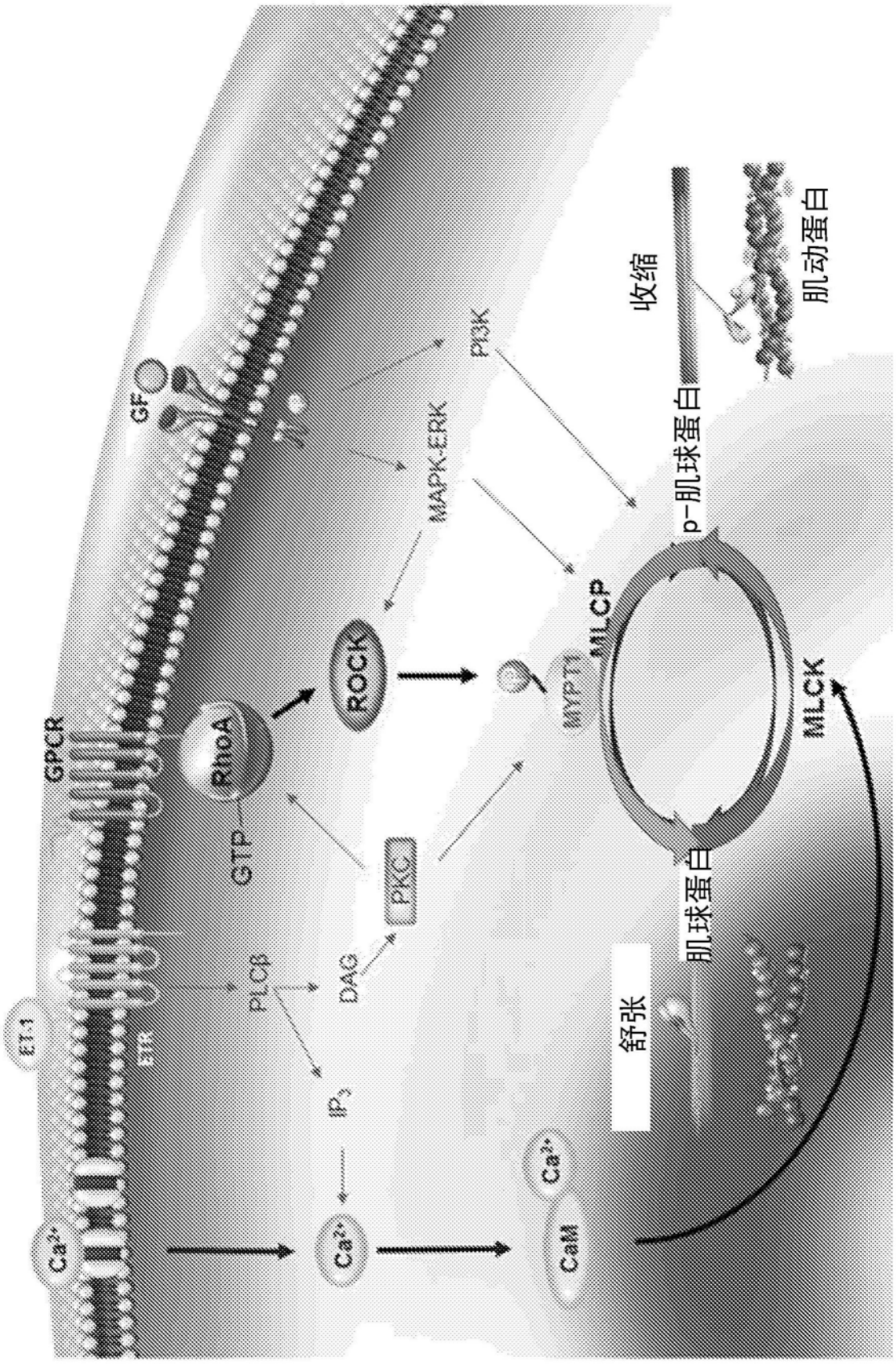

GF
GPCR
ET-1
ETR
PLCβ
DAG
PKC
RhoA
GTP
ROCK
MAPK-ERK
PI3K
MYPT1
MLCP
MLCK
收缩
舒张
p-肌球蛋白
肌球蛋白
肌动蛋白
Ca^{2+}
IP_3
CaM

图8

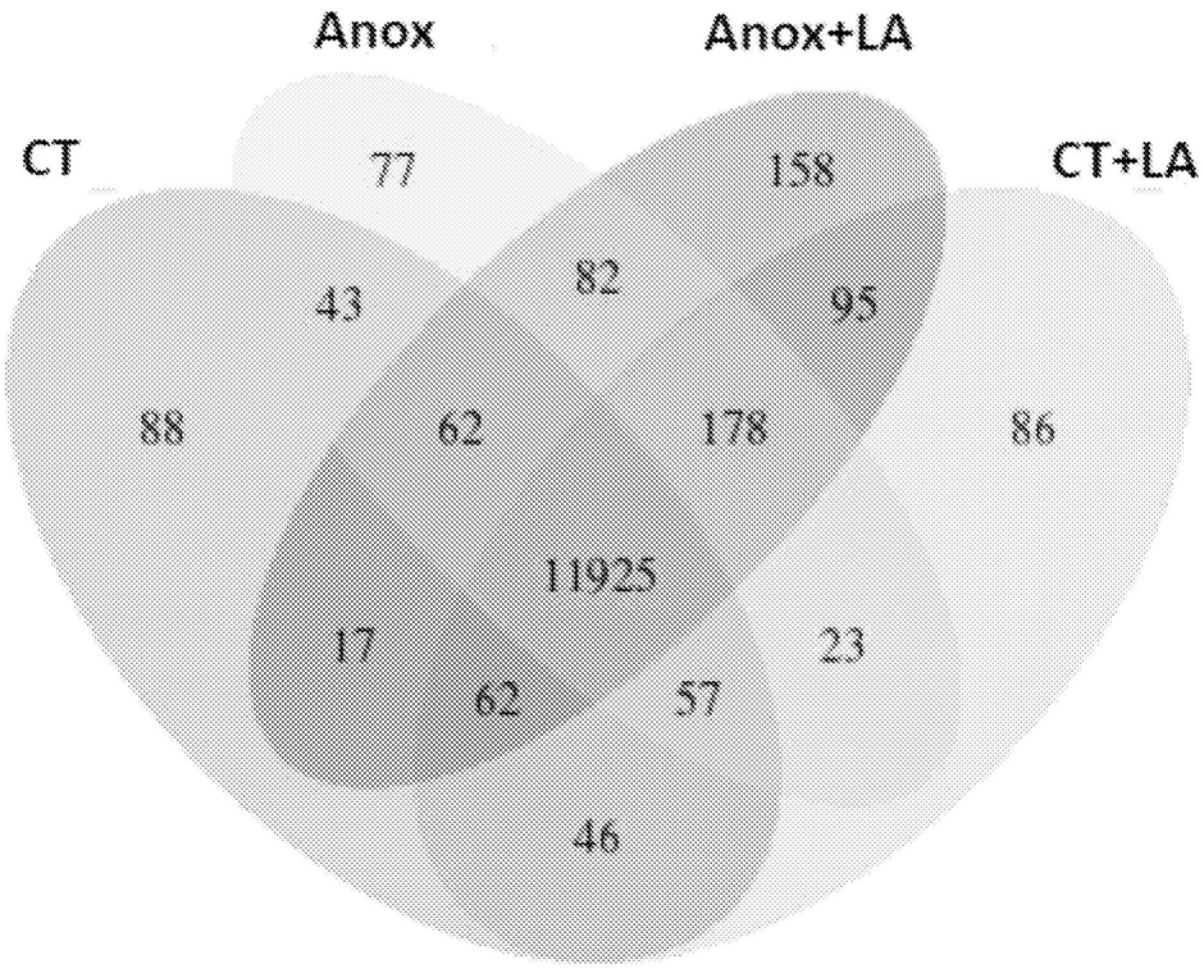

Anox
Anox+LA
CT
CT+LA
77
158
43
82
95
88
62
178
86
11925
17
23
62
57
46

图9A

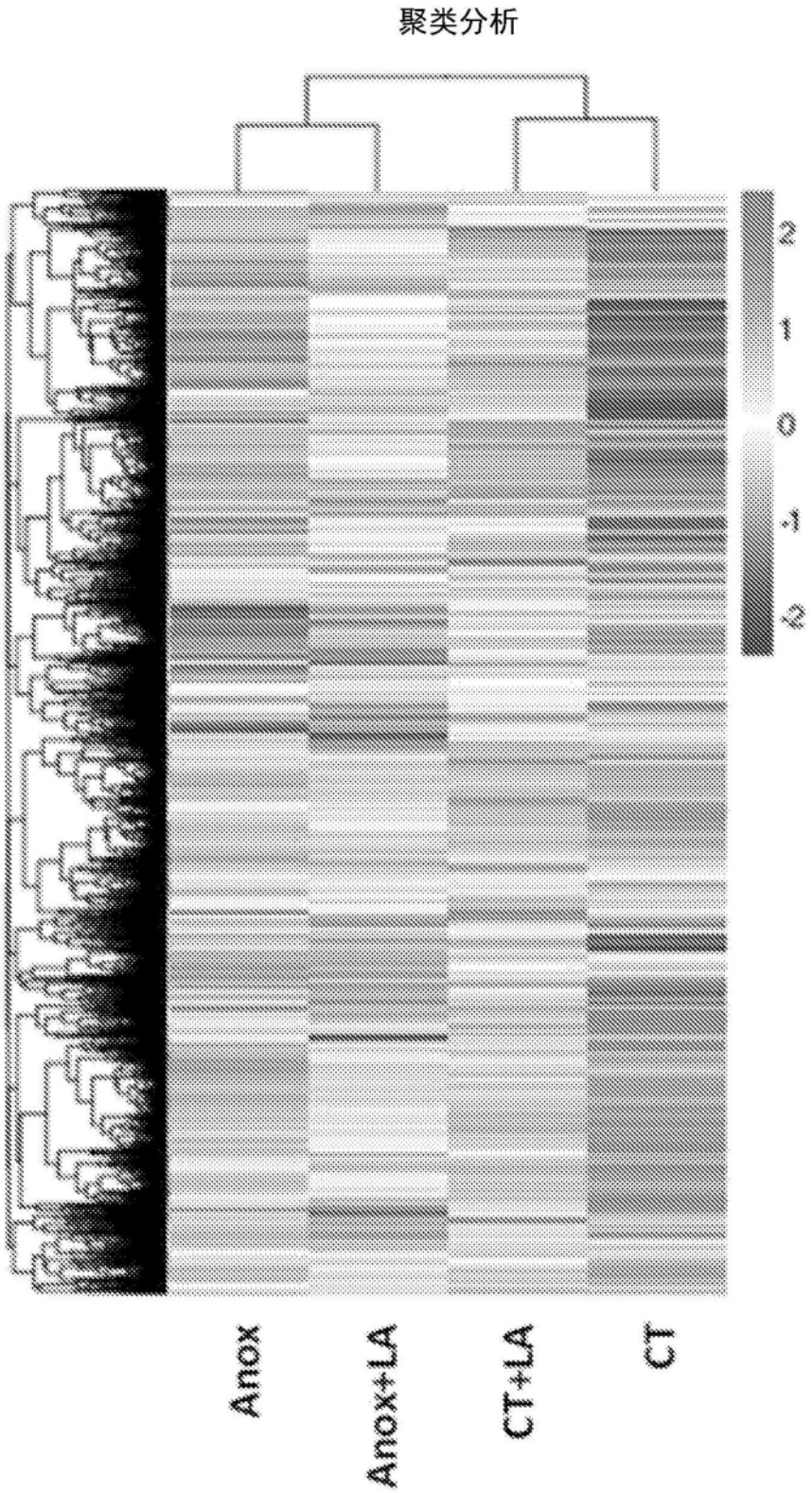


图9B

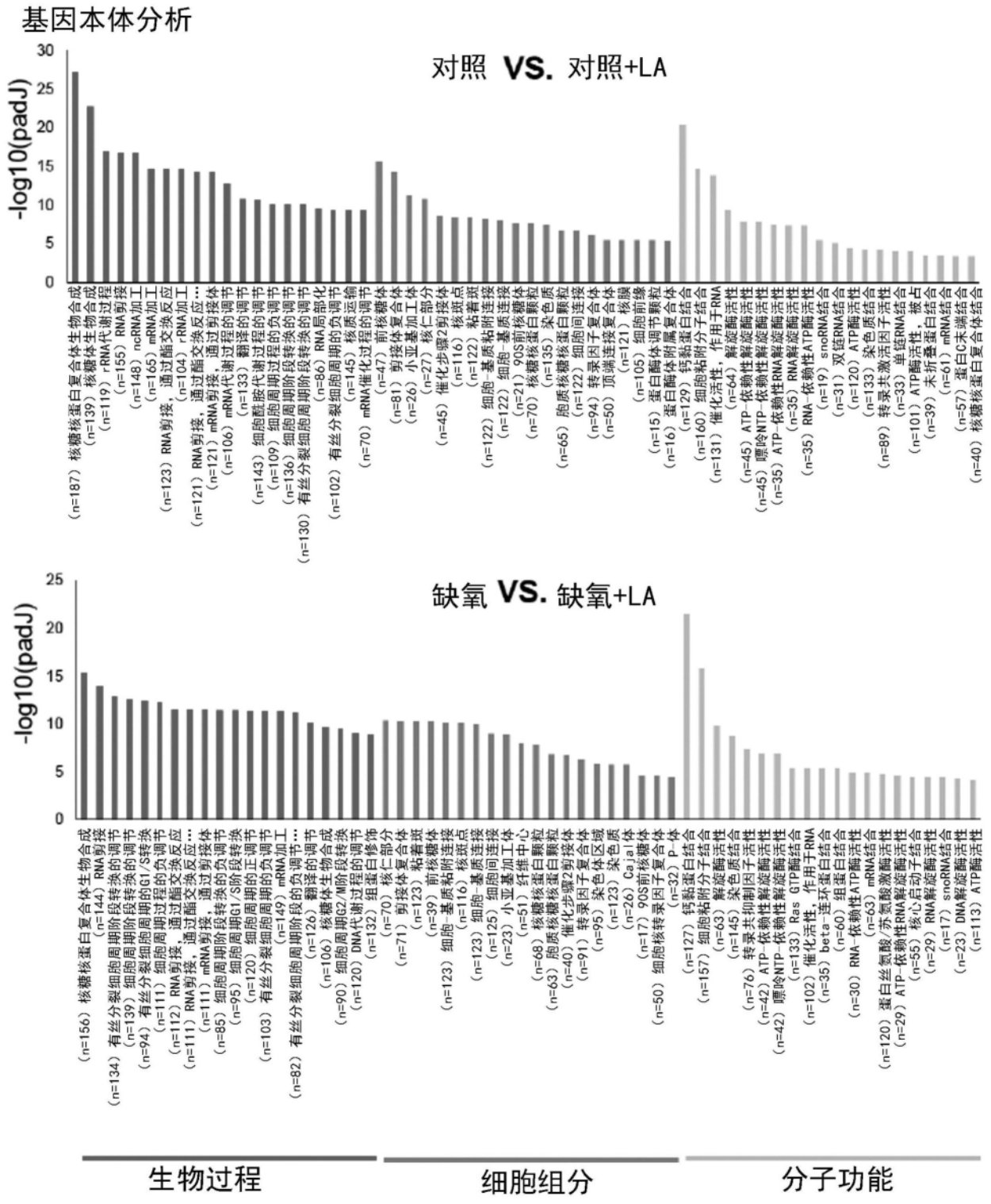

基因本体分析
对照 VS. 对照+LA
-log10(padJ)
缺氧 VS. 缺氧+LA
-log10(padJ)
生物过程
细胞组分
分子功能

图10

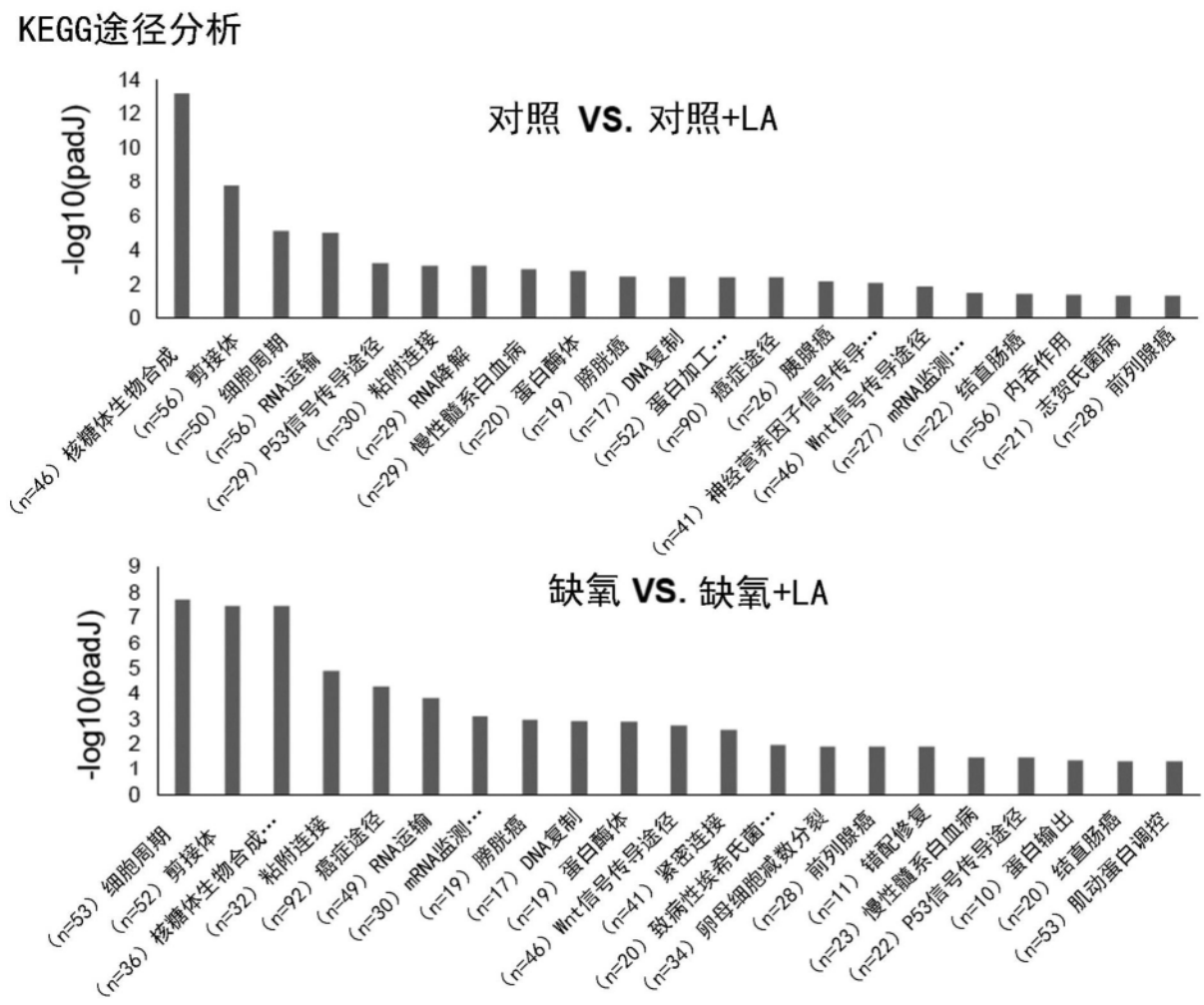

KEGG途径分析
对照 VS. 对照+LA
-log10(padJ)
14
12
10
8
6
4
2
0
(n=46) 核糖体生物合成
(n=56) 剪接体
(n=50) 细胞周期
(n=56) RNA运输
(n=29) P53信号传导途径
(n=30) 粘附连接
(n=29) RNA降解
(n=29) 慢性髓系白血病
(n=20) 蛋白酶体
(n=19) 膀胱癌
(n=17) DNA复制
(n=52) 蛋白加工…
(n=90) 癌症途径
(n=26) 胰腺癌
(n=41) 神经营养因子信号传导…
(n=46) Wnt信号传导途径
(n=27) mRNA监测…
(n=22) 结直肠癌
(n=56) 内吞作用
(n=21) 志贺氏菌病
(n=28) 前列腺癌
缺氧 VS. 缺氧+LA
-log10(padJ)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
(n=53) 细胞周期
(n=52) 剪接体
(n=36) 核糖体生物合成…
(n=32) 粘附连接
(n=92) 癌症途径
(n=49) RNA运输
(n=30) mRNA监测…
(n=19) 膀胱癌
(n=17) DNA复制
(n=19) 蛋白酶体
(n=46) Wnt信号传导途径
(n=41) 紧密连接
(n=20) 致病性埃希氏菌…
(n=34) 卵母细胞减数分裂
(n=28) 前列腺癌
(n=11) 错配修复
(n=23) 慢性髓系白血病
(n=22) P53信号传导途径
(n=10) 蛋白输出
(n=20) 结直肠癌
(n=53) 肌动蛋白调控

图11

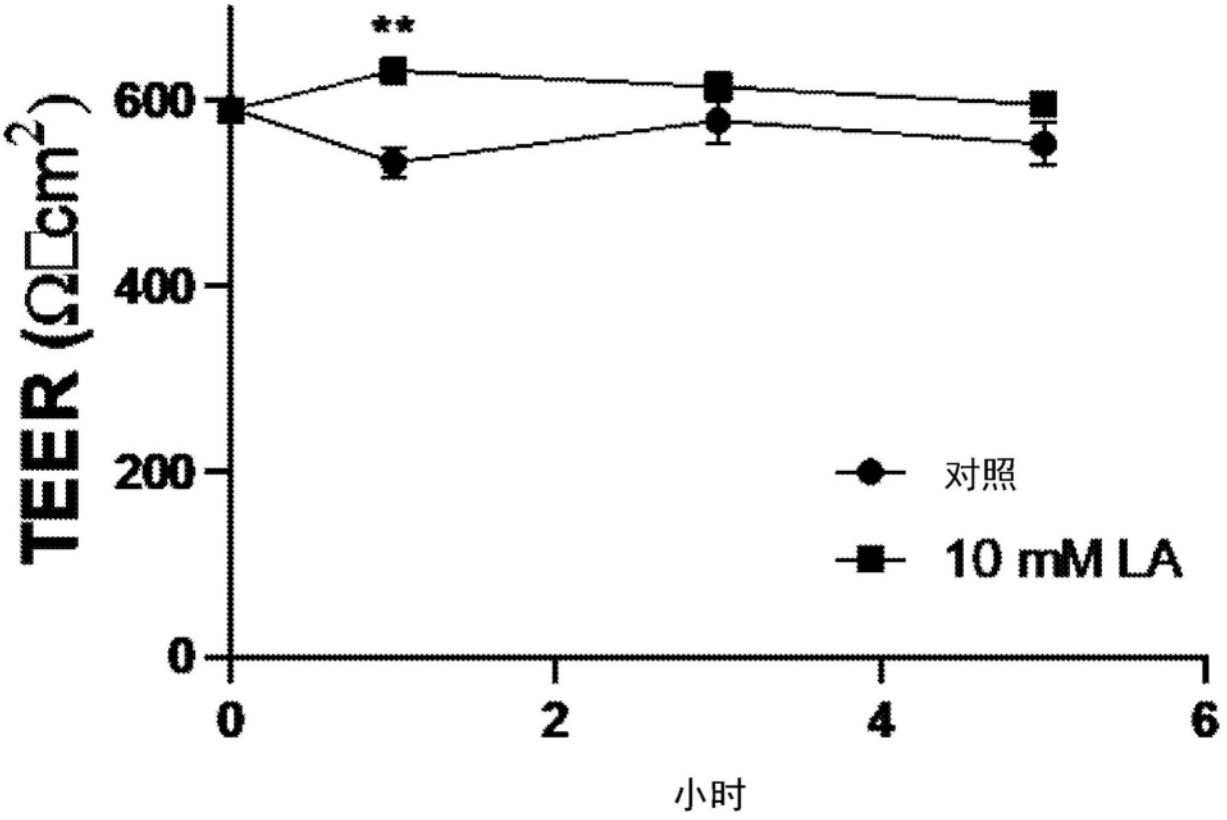


图12

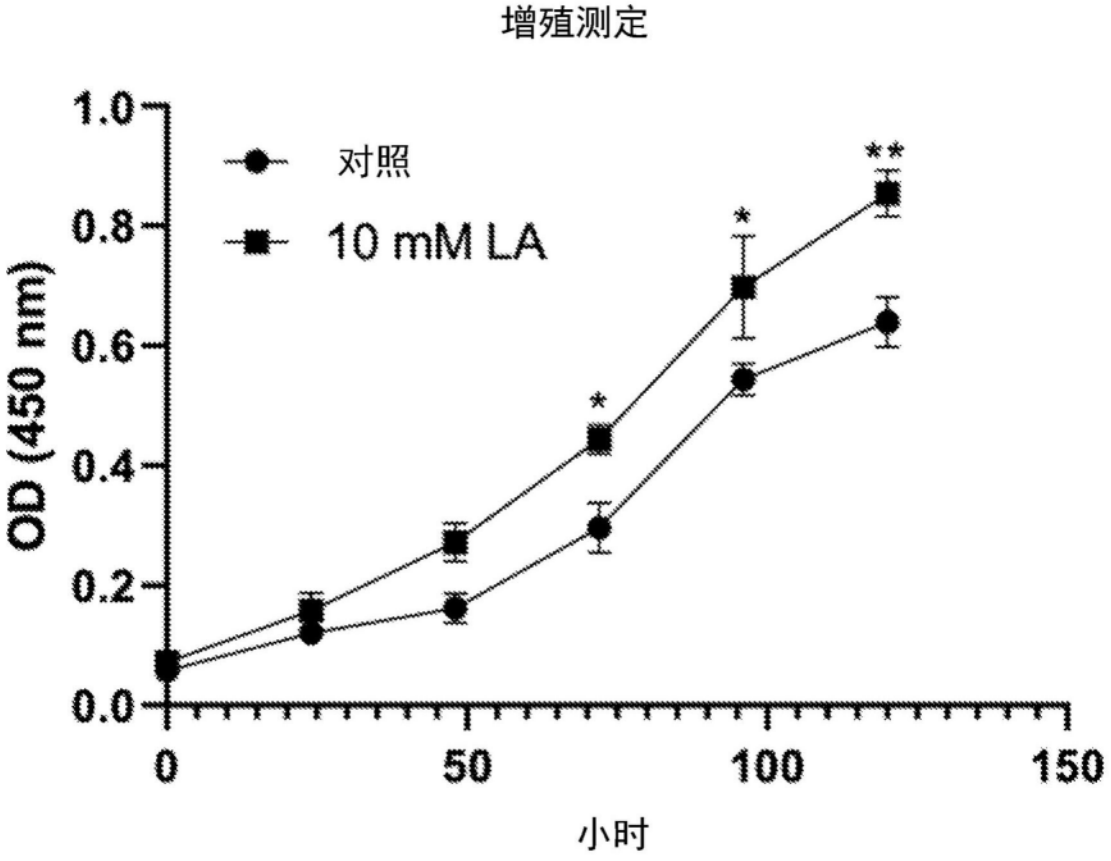


图13

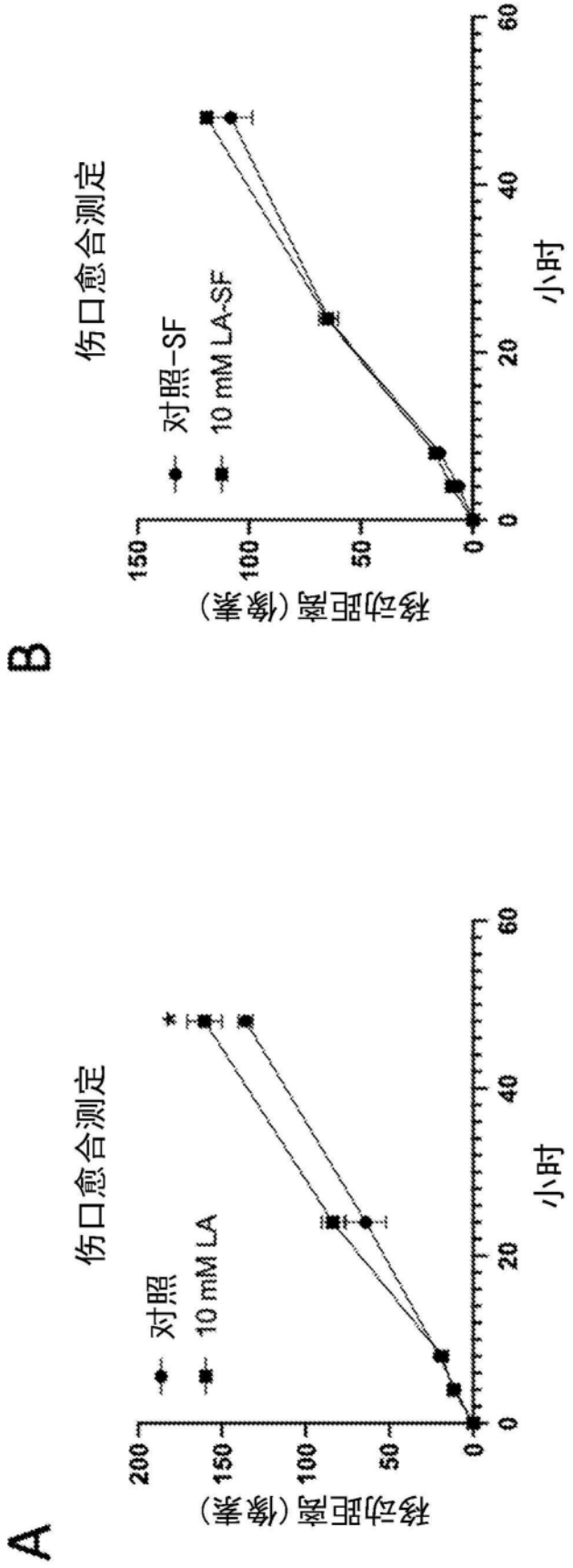

B
伤口愈合测定
对照-SF
10 mM LA-SF
移动距离(像素)
小时
0
50
100
150
0
20
40
60
A
伤口愈合测定
对照
10 mM LA
*
移动距离(像素)
小时
0
50
100
150
200
0
20
40
60

图14