



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107427500 A

(43)申请公布日 2017. 12. 01

(21)申请号 201680016932.2

(22)申请日 2016.03.21

(30)优先权数据

62/136,115 2015.03.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/023475 2016.03.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/154143 EN 2016.09.29

(71)申请人 佐治亚州立大学研究基金会公司

地址 美国佐治亚州

(72)发明人 李建东

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

(51)Int.Cl.

A61K 31/44(2006.01)

A61K 31/085(2006.01)

A61K 31/165(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书25页 附图10页

(54)发明名称

治疗COPD和其它炎症性病况的组合物和方法

(57)摘要

本发明特别涉及药物组合物及其在制备药物(例如用于炎症如炎性肺病的药物)或治疗方案中的用途。所述组合物可包括至少两种活性剂:抑制PDE4的第一活性剂(例如罗氟司特)和抑制一种或多种PDE4B变体(例如PDE4B2)的表达或活性的第二活性剂。所述组合物和方法将减弱PDE4B(例如PDE4B2)的不期望的上调,从而改进用第一活性剂(例如罗氟司特)的治疗。例如,第二活性剂可以改进第一活性剂的功效,降低第一活性剂的有效剂量,减轻否则产生的第一活性剂的耐药性(例如,在COPD恶化患者中),减少由第一活性剂引起的不想要的副作用,或以其它方式改进包括PDE4抑活性剂的治疗方案。

1. 一种药物组合物,其包含第一活性剂和第二活性剂,其中所述第一活性剂是罗氟司特以及所述第二活性剂抑制PDE4B2的表达或活性。

2. 权利要求1所述的药物组合物,其中所述第二活性剂是抑制PDE4B2活性的烯基二芳基甲烷(ADAM)化合物或其衍生物。

3. 权利要求2所述的药物组合物,其中所述ADAM化合物是ADAM5或ADAM6。

4. 权利要求1所述的药物组合物,其中所述第二活性剂是地塞米松、姜黄素或HIF-1 $\alpha$ 抑制剂。

5. 权利要求1所述的药物组合物,其中所述第二活性剂是选择性抑制PDE4B2表达的核酸分子。

6. 权利要求5所述的药物组合物,其中所述第二活性剂抑制蛋白激酶A催化亚基 $\beta$  (PKA-C $\beta$ )的表达或活性,或抑制PKA-C $\beta$ 与NF $\kappa$ B p65的相互作用。

7. 权利要求1所述的药物组合物,其中小于500mcg的罗氟司特被包含在单位剂型中。

8. 一种试剂盒,其包含:罗氟司特,抑制PDE4B2的表达或活性的第二活性剂,使用说明书,以及任选的一种或多种在向患者施用所述第一活性剂或第二活性剂时所用的稀释剂、递送装置或敷料。

9. 一种分离细胞,其稳定地过表达PDE4B2。

10. 权利要求9所述的分离细胞,其中所述细胞是确立的细胞系中的一种。

11. 权利要求10所述的分离细胞,其中所述细胞是人细胞。

12. 一种治疗患有炎症性肺病的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的罗氟司特和抑制PDE4B2的表达或活性的第二活性剂。

13. 权利要求12所述的方法,其中所述炎症性肺病是慢性阻塞性肺病(COPD)。

14. 权利要求12所述的方法,其中所述第一活性剂和第二活性剂组合为单一剂型。

15. 权利要求12所述的方法,其中所述第一活性剂和第二活性剂通过相同或不同的施用途径同时或按序施用。

16. 权利要求15所述的方法,其中所述第一活性剂被口服施用且所述第二活性剂被直接施用至肺。

17. 权利要求16所述的方法,其中所述第二活性剂被配制成干粉用于通过吸入被直接施用至肺。

## 治疗COPD和其它炎症性病况的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 该申请要求2015年3月20日提交的美国临时申请62/136,115的优先权日期的权益。该在先申请的整个内容由此通过参考并入本文中。

[0003] 关于联邦政府资助的研究的声明

[0004] 该发明是在由国家卫生研究院颁发的拨款号DC005843的政府支持下进行的。政府在本发明中享有特定的权利。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及将至少两种活性剂组合使用的组合物和方法,所述活性剂抑制被限定为家族4 (PDE4) 的家族中的磷酸二酯酶,更具体地说,本发明涉及包括化合物如罗氟司特和抑制B亚家族的PDE4 (即PDE4B如PDE4B2) 的第二活性剂的组合疗法。所述组合物和方法将减弱PDE4B (如PDE4B2) 的不期望的上调,由此可以改进用所述第一活性剂 (例如罗氟司特) 的治疗。例如,所述第二活性剂可以改进所述第一活性剂的功效,降低所述第一活性剂的有效剂量,减轻如若不然则会产生的对第一活性剂的耐药性 (例如,在COPD恶化患者中),减少由所述第一活性剂引起的不期望的副作用,或者以其它方式改进包括施用PDE4抑制剂的治疗方案。

### 背景技术

[0006] 磷酸二酯酶 (PDE) 是重要的酶,因为它们水解第二信使cAMP和cGMP (分别为3'5'-环状单磷酸腺苷和3'-环状单磷酸鸟苷) 并由此使它们失活。除了终止由cAMP和cGMP介导的信号之外,PDE也在环状核苷酸信号传导的胞内定位中起着至关重要的作用,并将这些通路与其它信号传导通路整合 (关于综述,参见Halpin,国际慢性阻塞性肺病杂志 (Int.J.of COPD) 3 (4) :543-561,2008)。

[0007] 随着时间的推移,研究人员已经鉴定了具有不同色谱和动力学性质以及不同底物特异性的PDE,其现在构成了含有至少11个家族 (PDE4-PDE11;Halpin,同上) 的酶的超家族。在人类基因组中,迄今为止已经鉴定了至少21个编码PDE的基因,许多研究已集中在编码蛋白的物化性质和调节性质上 (参见,例如Conti和Jin,核酸研究与分子生物学研究进展 (Prog.Nucleic Acid Res.Mol.) 63:1-38;Soderling和Beavo,细胞生物学新观点 (Curr.Opin.Cell Biol.) 12:174-179,2000;和Francis等,核酸研究与分子生物学研究进展 (Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.) 65:1-52,2001)。11个家族中的一些包括多于一个成员,由在确定家族的阿拉伯数字后的大写字母确定亚家族的各个成员 (例如,PDE4A、PDE4B、PDE4C和PDE4D)。更进一步地,编码PDE的大多数基因具有多于一个启动子,并且编码序列被交替地剪接。在亚家族指定之后,剪接变体由另外的阿拉伯数字指定。例如,PDE4D3是家族4、亚家族D中的PDE,并被指定为第三剪接变体。至少有100种不同的PDE开放读码框架 (Halpin,同上,参考Conti和Beavo,生物化学综合年刊 (Annu.Rev.Biochem.) 76:481-511,2007)。

[0008] 磷酸二酯酶4B (PDE4B) 在调节炎症中起关键作用。罗氟司特是一种PDE4选择性抑制剂,最近已被批准用于治疗严重慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化患者。然而,还有临床证据表明,罗氟司特的重复给药产生快速抗药反应 (tachyphylaxis) 或耐药性。因此,需要一种会减轻对罗氟司特的耐药性发展的改进疗法。

## 发明内容

[0009] 在第一方面,本发明的特征在于如下的药物组合物,其包含两种活性剂:抑制家族4中的磷酸二酯酶的第一活性剂 (PDE4; 例如式I的化合物,如罗氟司特), 和抑制家族B中PDE4 (PDE4B; 如PDE4B2) 的表达或活性的第二活性剂。所述第二活性剂能够直接或间接抑制PDE4B (例如, PDE4B2) 的表达或活性。例如,直接抑制剂可以抑制编码PDE4B的基因的表达,或直接与PDE4B (例如, PDE4B2) 结合或以其它方式直接与其相互作用; 间接抑制剂可以抑制同一生物化学通路内的PDE4B (例如, PDE4B2) 以外的分子的表达或活性。例如,当组合物包含间接抑制PDE4B (例如, PDE4B2) 的表达或活性的第二活性剂时,该制剂可以抑制IKK $\beta$ 、IKK $\alpha$ 、p50、NF $\kappa$ B p65或PKA-C $\beta$ 的表达或活性或所表达蛋白的活性 (例如,一种制剂可以抑制包含p50和p65的复合物 (例如,图1所示的IKK $\alpha$ -p50-p65复合物或p50-p65-PKA-C $\beta$ 复合物) 的形成)。

[0010] 所述第一活性剂和第二活性剂可以独立地是化学化合物或生物化合物 (例如核酸, 肽核酸 (PNA), 或多肽)。例如,在一个实施方式中,所述第一活性剂是化学化合物,且所述第二活性剂是核酸; 在另一个实施方式中,所述第一活性剂和第二活性剂两者都是化学化合物。例如,本发明的组合物可以包括作为第一活性剂的式I化合物 (例如罗氟司特) 和抑制PDE4B (例如, PDE4B2) 活性的烯基二芳基甲烷 (ADAM) 化合物 (例如, ADAM5或ADAM6)、其衍生物或其盐。在提及化学化合物时,为了便于阅读,我们可能不每次都明确提及其衍生物和盐。要理解,当使用本文所述的化合物时,也可以使用其药物活性衍生物或其盐。在其它实施方式中,所述第二活性剂可以是甾体化合物 (例如,糖皮质激素如地塞米松,皮质醇,可的松,泼尼松龙,泼尼松龙,甲基强的松龙,倍他米松,曲安奈德,倍氯米松,醋酸氟氢可的松,醋酸脱氧皮质酮 (DOCA) 和醛固酮)。在一些实施方式中,所述第二活性剂是地塞米松、姜黄素或HIF-1抑制剂。

[0011] 如下文进一步描述的,所述药物组合物能够以各种方式进行配制以用于向患者施用或用于药物的制备 (例如,用于炎症如炎性肺病或本文所述的适于治疗的任何其它疾病、病症或病况的药物)。例如,本组合物可以被配制成通过吸入施用的粒子,配制成用于局部给药的乳膏、凝胶或软膏,配制成口服施用的片剂或胶囊,或配制成注射 (例如静脉内,肌肉内,腹膜内或皮下注射) 用溶液或悬浮液。当呈单位剂量形式时,则药物组合物可以包括比如果在不存在所述第二活性剂的情况下施用所述第一活性剂实现特定结果所需要的量更少的量的所述第一活性剂。例如,当所述第一活性剂是式I的化合物时,在第二活性剂存在下施用以获得给定临床结果的该化合物的量,可以小于在不存在所述第二活性剂的情况下施用以实现大致相同结果的该化合物的量。在一个实施方式中,所述第一活性剂是以约500mcg的量存在于单位剂型中的式I化合物 (例如罗氟司特)。如在本文中使用的,术语“约”表示参考值的 $\pm 10\%$  (例如,约500mcg的罗氟司特为450-550mcg的罗氟司特) 或包括用于确定该值所使用的装置或方法的固有误差变化的值,以较大者为准。尽管我们可以将本文中

的方法描述为治疗方法,但是任何这样的描述也可以同样呈现为“用途”,并且本发明可以被要求保护为本文中描述的组合作为用途,例如,药物的制备或在制备用于治疗本文所述的疾病、病症或病况的药物中的用途(根据世界各地不同的专利实践)。

[0012] 如指出的,所述第一活性剂和第二活性剂可以是选择性抑制PDE4(例如,4A或4B亚家族中的PDE)表达,或者在第二活性剂的情况下选择性抑制PDE4B(例如,PDE4B2)的核酸分子。

[0013] 在另一方面,本发明的特征是包括本文中所述组合物的试剂盒。在所述试剂盒中,所述第一活性剂和第二活性剂(或其多个活性剂)可以与使用说明书一起分别被组合或包含在内。在一个实施方式中,本发明的特征在于一种试剂盒,所述试剂盒包含:罗氟司特,抑制PDE4B(例如PDE4B2)的表达或活性的第二活性剂,使用说明书,和任选的一种或多种在向患者施用所述第一活性剂或第二活性剂时所用的稀释剂、递送装置或敷料。

[0014] 另一方面,本发明的特征在于稳定地过表达PDE4B(例如PDE4B2)的分离的细胞。所述细胞可以是原代细胞或可以是不成熟的(immortalized),并且可以是已建立的细胞系之一。所述细胞可以是人细胞。除了别的以外,这些细胞可用于筛选试验以鉴定PDE4/PDE4B/PDE4B2介导的炎症的抑制剂。PDE4/PDE4B/PDE4B2基因产物可以从诸如病毒载体或质粒的表达载体表达或整合到细胞的基因组中。在任一情况下,过表达可以来自组成型活性或诱导型启动子(例如,受本文中所述疾病影响的组织中存在的转录因子活化的启动子,例如,肺组织特异性启动子)。

[0015] 在另一方面,本发明的特征在于治疗患有本文中所述病况(例如炎症性肺病如COPD)的患者的方法。所述方法可以通过向患者施用治疗有效量的至少一种第一活性剂(例如,式I化合物,如罗氟司特或咯利普兰或西洛司特)和至少一种抑制PDE4B(如PDE4B2)的表达或活性的第二活性剂。所述第一活性剂和第二活性剂能够被组合在单一剂型内。或被维持在通过相同或不同的施用途径同时或按序施用的两种剂型内。例如,所述第一活性剂可以口服施用,所述第二活性剂可以通过吸入(例如,直接进入肺部)或通过注射(例如,静脉内注射)局部施用(例如,作为治疗中耳炎的耳用滴耳剂)。在另一个实施方式中,所述第一活性剂和第二活性剂两者通过吸入来施用(例如,作为其中活性剂与纳米粒子如脂质体结合的干粉剂)。因此,本发明包括所述第一活性剂和第二活性剂以及干粉的干粉剂和其中活性剂中的一种或多种与纳米粒子如脂质体结合的其它剂型(例如,用于输液的液体)。

[0016] 在另一个方面,本发明的特征在于鉴定PDE4B(如PDE4B2)的抑制剂的方法。如下文进一步描述的,我们假设PDE4B2调节促炎症趋化因子(包括趋化因子(C-C基序)配体5(CCL5)),趋化因子(C-C基序)配体7(CCL7),C-X-C基序趋化因子10(CXCL10)和C-X-C基序趋化因子11(CXCL11)(CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11被称为A组趋化因子),至少部分地地与PDE4B2的众所周知的酶活性无关的方式进行调节。该测定可以在培养的细胞中或体外不同地配置,并通过其在转染有野生型PDE4B2或酶致残PDE4B2(例如突变体PDE4B2-D392A)的细胞中抑制IKK $\beta$ -CA诱导的NF- $\kappa$ B启动子活性和A组趋化因子表达的能力来鉴定潜在的PDE4B2抑制剂。该方法可以包括提供转染有NF- $\kappa$ B报告载体(例如,包含可检测标签或检测系统如荧光素酶类系统的载体)的细胞(例如,诸如BEAS-2B细胞的细胞)的步骤。所述细胞能够任选地表达或过表达(例如,通过转染的方式)IKK $\beta$ -CA和野生型和/或变体PDE4B2。在给定的时间段(例如1-24小时)后,可以测量NF- $\kappa$ B活性,并将细胞暴露于潜在的抑制剂(例如,培养

物中的细胞可以暴露于抑制剂下约1-12小时),然后测量NF- $\kappa$ B或A组趋化因子的表达或活性。抑制NF- $\kappa$ B或A组趋化因子中的一种或多种的表达或活性的潜在抑制剂可进一步作为PDE4B2的抑制剂进行测试。

### 附图说明

[0017] 图1是由NTHi和罗氟司特通过p65和PKA-C $\beta$ 导致的PDE4B2诱导的示意图。

[0018] 图2A-2I示出表明罗氟司特与NTHi协同作用以在体外和体内上调PDE4B2表达的结果。在图2A-2F中,分析了PDE4B mRNA表达。图2A是示出用罗氟司特预处理1小时(Rof;0.1 $\mu$ M)、然后用NTHi刺激1.5小时的BEAS-2B细胞中PDE4B mRNA表达的柱状图(MOI为25、50和100)。在感染的各多重性中,相对于对照,Rof处理的NTHi刺激的细胞中PDE4B mRNA增加。在图2B中,BEAS-2B细胞用Rof(0.01,0.1和1 $\mu$ M)预处理1小时,然后用NTHi刺激1.5小时。在Rof的每个浓度下,相对于对照,Rof处理的NTHi刺激的细胞中PDE4B mRNA增加。在图2C中,原代NHBE细胞用Rof(0.1 $\mu$ M)预处理1小时,然后用NTHi刺激1.5小时,相对于对照细胞显著增加了PDE4B mRNA。在图2D中,BEAS-2B细胞用转录抑制剂放线菌素D(ActD;5ng/ml)和Rof(0.1 $\mu$ M)预处理1小时,然后用NTHi刺激1.5小时。ActD完全废除了NTHi和罗氟司特的PDE4B诱导,表明PDE4B的协同诱导发生在转录水平(图2D)。在图2E中,小鼠用Rof(5mg/kg i.p.)接种2小时,然后用NTHi( $5 \times 10^7$ cfu/肺)进行气管内接种。5小时后,分析肺组织中的PDE4B mRNA表达,发现在Rof处理的NTHi刺激的细胞中显著升高。在图2F中,BEAS-2B细胞用Rof(0.1 $\mu$ M)预处理1小时,然后用NTHi或TNF- $\alpha$ (10ng/mL)刺激1.5小时。在图2G中,BEAS-2B细胞用Rof(0.1 $\mu$ M)预处理1小时,然后用NTHi刺激3小时,分析PDE4B2蛋白表达。在图2H和2I中,小鼠如图E中所述用Rof和NTHi接种。5小时后,分析肺组织中的PDE4B2蛋白表达(H),针对PDE4B对肺组织染色(I)。放大倍率200 $\times$ ,刻度棒100 $\mu$ m。用 $\alpha$ -微管蛋白(G)或 $\beta$ -肌动蛋白(H)标准化PDE4B2蛋白的相对密度。A-E、G和H中的数据是平均值 $\pm$ SD(n=3);\*P<0.05;n.s.=P>0.05。数据是三个或更多独立实验的代表。CON,对照;n.s.,不显著。

[0019] 图3是说明PDE4B siRNA在BEAS-2B细胞中显著耗尽PDE4B2表达的柱状图;参见实施例2;NTHi诱导的促炎介质的表达需要PDE4B。

[0020] 图4A-4B显示增加的PDE4B2表达增强了NTHi诱导的趋化因子的表达。图4A是显示模拟转染的细胞和稳定表达PDE4B2的细胞中的PDE4B2表达的蛋白印迹的照片。图4B是说明在如指示的用NTHi和Rof处理的模拟转染的细胞和PDE4B2转染的细胞中细胞因子CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11的表达增加的一组柱状图。细胞用Rof预处理1小时,然后用NTHi刺激5小时,之后分析mRNA表达。图4B中的数据是平均值 $\pm$ SD(n=3);\*P<0.05。

[0021] 图5是蛋白印迹的照片;在BEAS-2B细胞中用针对PKA-C $\alpha$ 和PKA-C $\beta$ 的siRNA转染48小时后分析蛋白质表达。 $\beta$ -肌动蛋白作为对照进行分析。

[0022] 图6是说明药物和siRNA的卡通画,所述药物和siRNA中的任一种可以用作如本文中所述的第一活性剂或第二活性剂,与脂质类纳米粒子结合施用于患者。

[0023] 图7A-7H是主要来自旨在确定地塞米松是否可以抑制由NTHi和Rof导致的PDE4B诱导的研究的数据集合。

[0024] 图8是人类PDE4B的mRNA序列(SEQ ID NO:1)的表示。

[0025] 图9是人类PDE4B2的核酸序列(SEQ ID NO:2)的表示。

[0026] 图10A和10B是11个已知PDE家族中的PDE中存在的结构域(A;来自Halpin,同上,最初由Conti和Beavo出版,生物化学综合年刊(Annu.Rev.Biochem),76:481-511,2007)和PDE4家族中的剪接变体的比较(B)的示意图。

[0027] 发明详述

[0028] 本发明的组合物包括可以包含两种或更多种可用于治疗炎症(例如炎症性肺病,例如COPD)的活性剂的剂型(例如,药学或生理学可接受的剂型)。在本领域中理解的是,药物组合物/制剂是包含至少一种活性剂的非天然存在的组合物,并且这些组合物被认为是生理学上可接受的,是因为它们在规定的剂量下是无毒的。虽然本发明的组合物不限于通过任何特定的作用机制达到期望结果的组合物,但组合物可包括抑制PDE4家族成员的表达或活性的第一活性剂和抑制“B族”中的一种或多种PDE(即,PDE4B,例如PDE4B2)的表达或活性的第二活性剂。如有疑问,术语“第一活性剂”和“第二活性剂”用于表示彼此不同的两种活性剂。此外,虽然选择性是优选的,但是第一活性剂和第二活性剂中的每一个可以抑制多于一个PDE4家族成员并且可以抑制相同PDE4家族成员中的一种或多种。例如,第一活性剂和第二活性剂两者都可以抑制家族4亚族B中的磷酸二酯酶,并且第一活性剂和第二活性剂两者都可以抑制亚家族内多于一个的剪接变体。例如,第一活性剂和第二活性剂两者可以抑制PDE4B1和PDE4B2。在一些实施方式中,第一和/或第二活性剂抑制家族4亚族B中的磷酸二酯酶,排除其它家族或亚家族中的PDE。例如,第一和/或第二活性剂可以抑制PDE4B的一个或多个剪接变体,但不抑制PDE4D的任何剪接变体。

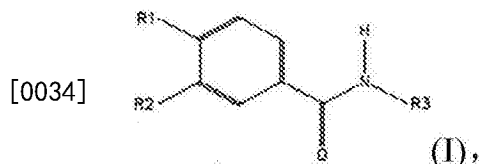
[0029] 我们使用术语“活性的”和“药学上活性的”来表示活性剂在体内影响其靶标(例如活化,抑制,上调或下调)的能力。要成为“活性的”,制剂对其靶标的效果必须足以为特定患者或通常对患者群体提供临床益处(应认识到,反应可能因个人而异,并且可能在某些个体中无效)。

[0030] 我们使用术语“抑制剂”、“抑制(inhibiting)”、“抑制(inhibit)”等来表示活性剂降低所述靶标(这里通常是PDE4家族中的酶)的表达或活性的能力。虽然抑制不必实现靶标表达或活性的完全和整体的减少,但是减少必须发生达到其对特定患者或通常对患者群体赋予益处的程度(应认识到,反应可以因个人而异,可能在某些个体中无效)。在这种情况下,该益处可以是,例如,对用PDE4抑制剂如罗氟司特、西洛司特或本文中公开的另一种PDE4抑制剂治疗有改进的反应。如本文中其它地方所述的,抑制剂可以直接(例如,通过抑制靶标本身的转录、翻译或活性)或间接(例如通过抑制在细胞通路中靶标上游或下游起作用的部分)对靶标发挥作用。第一活性剂和第二活性剂可以独立地是化学化合物(例如,分子量小于约1,000g/摩尔的碳基小分子;化学化合物在本文中可称为“药物”),核酸(例如,介导RNAi的核酸,微小RNA或反义寡核苷酸),或多肽(例如,抗体)。

[0031] 在各种实施方式中,组合物和方法可以包括多于一种类型的第一活性剂和多于一种类型的第二活性剂。

[0032] 第一活性剂:在一些实施方式中,第一活性剂可以是PDE4抑制剂。第一活性剂可以是包括以下的PDE4同种型中的一种或多种的抑制剂:PDE4A(例如PDE4A1,PDE4A5,PDE4A8,PDE4A10,PDE4A11和PDE4A7),PDE4B(例如PDE4B1,PDE4B2,PDE4B3和PDE4B4),PDE4C(例如PDE4C1),和PDE4D(例如PDE4D1,PDE4D2,PDE4D3,PDE4D4,PDE4D5,PDE4D6,PDE4D7,PDE4D8和PDE4D9)。

[0033] 在一个实施方式中,第一活性剂可以由美国专利5,712,298中所述的式I表示



所述专利的整个内容通过本参考并入本文中。对于式I,取代基R1和R2中的一个为氢、1-6C-烷氧基、3-7C-环烷氧基、3-7C-环烷基甲氧基、苄氧基或完全或部分被氟取代的1-4C-烷氧基,另一个是完全或部分被氟取代的1-4C-烷氧基;

[0035] R3是苯基,吡啶基,被R31、R32和R33取代的苯基或被R34、R35、R36和R37取代的吡啶基,其中

[0036] R31是羟基,卤素,氰基,羧基,三氟甲基,1-4C-烷基,1-4C-烷氧基,1-4C-烷氧基羰基,1-4C-烷基羰基,1-4C-烷基羰氧基,氨基,单或二-4C-烷基氨基或1-4C-烷基羰基氨基;

[0037] R32是氢,羟基,卤素,氨基,三氟甲基,1-4C-烷基或1-4C-烷氧基;

[0038] R33是氢,卤素,1-4C-烷基或1-4C-烷氧基;

[0039] R34是羟基;卤素,氰基,羧基,烷基,1-4C-烷氧基,1-4C-烷氧基羰基或氨基;

[0040] R35是氢,卤素,氨基或1-4C-烷基;

[0041] R36是氢或卤素;和

[0042] R37是氢或卤素,

[0043] 这些化合物的盐,以及吡啶及其盐的N-氧化物。

[0044] 在某些实施方式中,R1是完全或部分被氟取代的1-4C-烷氧基。

[0045] 在其它实施方式中,R1是完全或部分被氟取代的甲氧基。

[0046] 在一个具体实施方式中,R1是二氟甲氧基。

[0047] 在某些实施方式中,R2是3-5C-环烷氧基或3-5C-环烷基甲氧基。

[0048] 在另一个实施方式中,R2是3-5C-环烷基甲氧基。

[0049] 在一个具体实施方式中,R2是环丙基甲氧基。

[0050] 在某些实施方式中,R3是吡啶基,或被R34、R35、R36和R37取代的吡啶基。

[0051] 在其它实施方式中,R3是被R34、R35、R36和R37取代的吡啶基。

[0052] 在一个具体实施方式中,R3是3,5-二氯吡啶-4-基。

[0053] 在某些实施方式中,R1是完全或部分被氟取代的1-4C-烷氧基;R2是3-5C-环烷氧基或3-5C-环烷基甲氧基;或R3为吡啶基,或被R34、R35、R36和R37取代的吡啶基。

[0054] 在其它实施方式中,R1是完全或部分被氟取代的甲氧基;R2是3-5C-环烷基甲氧基;并且R3是被R34、R35、R36和R37取代的吡啶基。

[0055] 在某些具体实施方式中,R34是卤素或1-4C-烷基;R35是氢,卤素;R36是氢或卤素。

[0056] 在一个具体实施方式中,R1是二氟甲氧基;R2是环丙基甲氧基;并且R3是3,5-二氯吡啶-4-基。

[0057] 1-6C-烷氧基是除了氧原子外含有具有1-6个碳原子的直链或支链烷基的基团。在本文中提及的具有1至6个碳原子的烷基例如是己基,异己基(2-甲基戊基),新己基(2,2-二甲基丁基),戊基,异戊基(3-甲基丁基),新戊基(2,2-二甲基丙基),丁基,异丁基,仲丁基,丁基,丙基,异丙基,乙基和甲基。

[0058] 3-7C-环烷氧基例如是环丙氧基,环丁氧基,环戊氧基,环己氧基和环庚氧基。

[0059] 3-7C-环烷基甲氧基例如是环丙基甲氧基,环丁基甲氧基,环戊基甲氧基,环己基甲氧基和环庚基甲氧基。

[0060] 完全或部分被氟取代的1-4C-烷氧基例如是1,2,2-三氟乙氧基,2,2,3,3,3-五氟丙氧基,全氟乙氧基,并且特别是1,1,1,2-四氟乙氧基,三氟甲氧基,2,2,2-三氟乙氧基,和二氟甲氧基。

[0061] 本发明所指的卤素是溴,氯和氟。

[0062] 1-4C-烷基是具有1至4个碳原子的直链或支链烷基。实例是丁基,异丁基,仲丁基,叔丁基,丙基,异丙基,乙基和甲基。

[0063] 1-4C-烷氧基是除氧原子外含有上述1-4C-烷基之一的基团。实例是甲氧基和乙氧基。

[0064] 1-4C-烷氧羰基是与上述1-4C-烷氧基中的一个键合的羰基。实例是甲氧羰基( $\text{CH}_3\text{O}-\text{CO}-$ )和乙氧羰基( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-$ )。

[0065] 1-4C-烷基羰基是与上述1-4C-烷基中的一个键合的羰基。一个实例是乙酰基( $\text{CH}_3\text{CO}-$ )。

[0066] 1-4C-烷基羰氧基除氧原子之外还含有上述1-4C-烷基羰基之一。例如乙酰氧基( $\text{CH}_3\text{CO}-\text{O}-$ )。

[0067] 单-或二-1-4C-烷基氨基例如是甲基氨基,二甲基氨基和二乙基氨基。

[0068] 1-4C-烷基羰基氨基例如是乙酰氨基( $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ )。

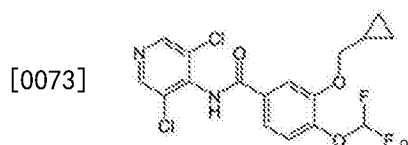
[0069] 被R31、R32和R33取代的示例性苯基是2-乙酰基苯基,2-氨基苯基,2-溴苯基,2-氯苯基,2,3-二氯苯基,2,4-二氯苯基,4-二乙基氨基-2-甲基苯基,4-溴-2-三氟甲基苯基,2-羧基-5-氯苯基,3,5-二氯-2-羟基苯基,2-溴-4-羧基-5-羟基苯基,2,6-二氯苯基,2,5-二氯苯基,2,4,6-三氯苯基,2,4,6-三氟苯基,2,6-二溴苯基,2-氰基苯基,4-氰基-2-氟苯基,2-氟苯基,2,4-二氟苯基,2,6-二氟苯基,2-氯-6-氟苯基,2-羟基苯基,2-羟基-4-甲氧基苯基,2,4-二羟基苯基,2-甲氧基苯基,2,3-二甲氧基苯基,2,4-二甲氧基苯基,2,6-二甲氧基苯基,2-二甲基氨基苯基,2-甲基苯基,2-氯-6-甲基苯酚,2,4-二甲基苯基,2,6-二甲基苯基,2,3-二甲基苯基,2-甲氧基羰基苯基,2-三氟甲基苯基,2,6-二氯-4-甲氧基苯基,2,6-二氯-4-氰基苯基,2,6-二氯-4-氨基苯基,2,6-二氯-4-甲氧基羰基苯基,4-乙酰氨基-2,6-二氯苯基和2,6-二氯-4-乙氧基羰基苯基。

[0070] 被R34、R35、R36和R37取代的示例性吡啶基是3,5-二氯吡啶-4-基,2,6-二氨基吡啶-3-基,4-氨基吡啶-3-基,3-甲基吡啶-2-基,4-甲基吡啶-2-基,5-羟基吡啶-2-基,4-氯吡啶-3-基,3-氯吡啶-2-基,3-氯吡啶-4-基,2-氯吡啶-3-基,2,3,5,6-四氟吡啶-4-基,3,5-二氯-2,6-二氟吡啶-4-基,3,5-二溴吡啶-2-基,3,5-二溴吡啶-4-基,3,5-二氯吡啶-4-基,2,6-二氯吡啶-3-基,3,5-二甲基吡啶-4-基,3-氯-2,5,6-三氟吡啶-4-基和2,3,5-三氟吡啶-4-基。

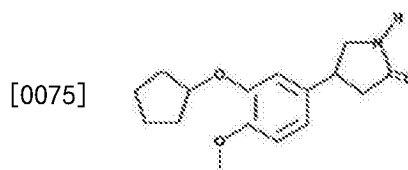
[0071] 根据取代,本文中所述化合物(例如,式I的化合物)的合适的盐全部是酸加成盐,特别地全部是与碱形成的盐。特别地,所述盐可以是通常用于制药的药理学上可耐受的无机酸或有机酸和碱。例如作为在工业规模化合物制备过程中的过程产物可获得的药学上不能耐受的盐可以通过本领域普通技术人员已知的方法转化为药理学上可耐受的盐。适用盐

包括与酸例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、乙酸、柠檬酸、D-葡萄糖酸、苯甲酸、2-(4-羟基苯基)苯甲酸、丁酸、磺基水杨酸、马来酸、月桂酸、苹果酸、富马酸、琥珀酸、草酸、酒石酸、草酸、硬脂酸、甲苯磺酸、甲磺酸和3-羟基-2-萘甲酸等的水溶性和水不溶性酸加成盐,根据是否涉及单酸或多元酸和根据想要哪种盐,这些酸以等摩尔定量比例或与其不同的比例用于盐制备中。其它合适的盐是与碱形成的盐。碱性盐的实例是锂,钠,钾,钙,铝,镁,钛,铵,葡甲胺,氨基丁三醇或胍的盐。碱性盐制备中使用的碱能够以等摩尔定量比例或与其不同的比例存在。

[0072] 在一个实施方式中,第一活性剂是罗氟司特或其盐:



[0074] 在一个实施方式中,第一活性剂是咯利普兰或其盐:



[0076] 可用于本发明组合物和方法的化合物可以通过本领域已知的方法购买或合成、分离或纯化。可用作第一活性剂的其它化合物包括西洛司特(由GlaxoSmithKline开发;参见Christensen等,药物化学杂志(J Med. Chem.) 41:821-835,1998);BAY 19-8004(由Bayer PLC开发;参见Grootendorst等,肺药理学与治疗学(Pulm. Pharmacol. Ther.) 16:341-347,2003;AWD 12-281(由Elbion AG/GlaxoSmithKline开发;参见Gutke等,研究药物的现行意见(Curr, Opin. Investig. Drugs) 6:1149-1158,2005);西潘茶碱,FRL-61063(由Leo Pharmaceuticals开发;参见Kucharekova等,皮肤病研究档案(Arch. Dermatol. Res.) 295:29-32,2003);mesopram,SH-636(由Schering AG开发;参见Loher等,药理学与实验治疗学杂志(J. Pharmacol. Exp. Ther.) 305:549-556,2003);CC-10004(由Celgene开发;参见Baumer等,炎症和过敏药物靶点(Inflamm. Allergy Drug Targets) 6:17-26,2007);glemilast,GRC-3886(由Glenmark开发;参见Enefer,炎症2005-第七届世界会议.要点I.I 药物,8:788-790,2005);替托司特,OPC-6535(由Otsuka开发;参见Chihiro等,药物化学杂志(J Med. Chem.) 38:353-358,1995);tofimilast,CP-325366(由Pfizer开发;参见Duplantier等,药物化学杂志(J Med. Chem.) 50:344-349,2007);ON0-6126(由Ono Pharmaceuticals开发;参见Furuie等,欧洲呼吸杂志(Eur. Respir. J.) 22(附录 45):395,2003);CI-1044(由辉瑞开发;参见Ouagued等,肺药理学与治疗学(Pulm. Pharmacol. Ther.) 18:49-54,2005);HT-0712(由Inflazyme/Helicon开发;参见MacDonald等,神经技能恢复.神经修复(Neurorehabil. Neural Repair) 21:486-496,2007);ibudilast(由Merck-Frosst开发;参见Huang等,生命科学(Life. Sci.) 78:2663-2668,2006);MK-0873(由Merck开发;参见Boot等,肺药理学与治疗学(Pulm. Pharmacol. Ther.) 2008);arofylline,LAS-31025(由Almirall开发;参见Beleta等,关于环核苷酸磷酸二酯酶的第三届国际会议:从基因到治疗(Third International Conference on Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: From Genes to Therapies),Glasgow,1996);CI-1018(由辉瑞开发;参见Burnouf等,药物化学杂

志 (J Med.Chem.) 43:4850-4867, 2000); T-2585 (由Tanabe开发; 参见Ukita等, 药物化学杂志 (J Med.Chem.) 42:1088-1099, 1999); YM-976 (由Yamanouchi开发; 参见Aoki等, J.Pharmacol.Exp.Ther. 295:255-260, 2000); V 11294A (由Napp开发; 参见Gale等人, Br.J.Clin.Pharmacol. 54:478-484, 2002); piclamilast, RP-73401 (由Rhone-Poulenc-Rorer开发; 参见Chen等, Acta Pharmacol.Sin. 25:1171-1175, 2004); atizoram, CP-80633 (由辉瑞开发; 参见Wright等人, Can.J.Physiol.Pharmacol. 75:1001-1008, 1997); filaminast, WAY-PDA-641 (由Wyeth-Ayerst开发; 见Heaslip等人, 药理学与实验治疗学杂志 (J.Pharmacol.Exp.Ther.) 268:888-896, 1994); SCH 351591 (Schering-Plough开发; 参见Billah等, 药理学与实验治疗学杂志 (J.Pharmacol.Exp.Ther.) 302:127-137, 2002); IC-485 (由ICOS公司开发); lirimilast, BAY-19-8004 (由Bayer开发; 参见Sturton和Fitzgerald, 胸科学 (Chest) 121:192S-196S, 2002), D4418 (由Celltech/Schering-Plough开发; 参见Buckley等, 生物有机化学与医药化学通讯 (Bioorg.Med.Chem.Lett) 10:2137-2140, 2000); CDP-840 (由Celltech/Merck-Frosst开发; 参见Alexander等, 生物有机化学与医药化学通讯 (Bioorg.Med.Chem.Lett) 12:1451-1456, 2002); L-826, 141 (由Celltech/Merck-Frosst开发; 参见Claveau等, 药理学与实验治疗学杂志 (J.Pharmacol.Exp.Ther.) 310:752-760, 2004); AN2728 (由Anacor医药开发); apremilast (由Celgene开发); 地西泮 (由Hoffmann-La Roche 1963开发); 木犀草素 (还具有IGF-1性的提取自花生的增补物) 和 mesembrenone (来自草药 *Sceletium tortuosum* 的生物碱)。

[0077] 在某些实施方式中, 第一活性剂可以本身或连同生物环境中的其它因子上调包括PDE4B同种型的一种或多种PDE4同种型的表达或增加其活性。PDE4B同种型可以是PDE4B1, PDE4B2, PDE4B3或PDE4B4, 生物环境中因子可以包括环状单磷酸腺苷 (cAMP) 升高剂、脂多糖 (LPE)、或细菌中的一种或多种。细菌可以是未分型流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (NTHi)。

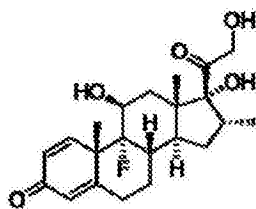
[0078] 第二活性剂: 本文所述的任何第一活性剂可与直接或间接抑制PDE4B (例如, PDE4B2) 的表达或活性的第二活性剂配制、包装或施用。在某些实施方式中, 第二活性剂抑制一种或多种其它PDE4B同种型而不抑制PDE4B2或除PDE4B2之外还可以抑制一种或多种其它PDE4B同种型。如上所述, 第二活性剂可以抑制PDE4B的一种或多种剪接变体, 但不能抑制PDE4D的任何剪接变体。

[0079] 第二活性剂可以抑制能够上调PDE4B同种型 (例如PDE4B2) 表达的基因和/或酶中一种或多种。例如, 第二活性剂可以抑制I $\kappa$ B激酶 (IKK $\beta$ )、I $\kappa$ B $\alpha$ 、转录因子核因子- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) 或其亚基 (例如p50或p65) 或蛋白激酶A-C $\beta$  (PKA-C $\beta$ ) 的表达或所表达的蛋白的活性 (例如, 一种可以抑制包括p50和p65的复合物 (例如, 图1所示的I $\kappa$ B-p50-p65复合物或p50-p65-PKA-C $\beta$ 复合物) 的形成)。

[0080] 第二活性剂可以抑制PDE4B (例如PDE4B2) 可能上调的细胞通路中的一种或多种。该通路能够以酶活性依赖性方式或酶活性非依赖性方式起作用。

[0081] 第二活性剂可以是糖皮质激素如地塞米松或其生物活性衍生物:

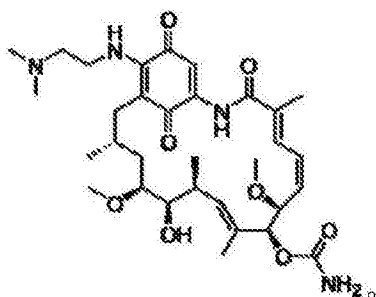
[0082]



[0083] 其它有用的糖皮质激素包括皮质醇,可的松,强的松,泼尼松龙,甲泼尼龙,倍他米松,曲安奈德,倍氯米松,醋酸氟氢可的松,醋酸脱氧皮质酮(DOCA),醛固酮,布地奈德,氢化可的松,曲安奈德及其药学上可接受的盐。

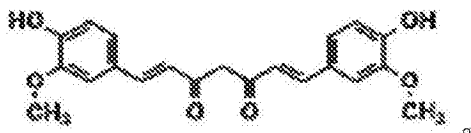
[0084] 第二活性剂可以是HIF-1 $\alpha$ 抑制剂。例如,第二活性剂可以是缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 抑制剂,二甲氧基酰基甘氨酸(DMOG),白杨素,黑毛霉素,YC-1,二甲基-双酚A,2-甲氧基雌二醇,IOX2,BAY 87-2243,PX-478 2HCl,FG-2261,KC7F2,隐丹参酮,EF-24,FM19G11或PX12。在某些实施方式中,第二活性剂可以是17-二甲基氨基乙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-DMAG)或其衍生物或盐:

[0085]



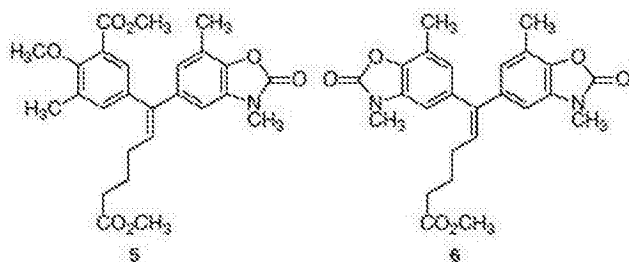
[0086] 第二活性剂还可以是姜黄素(即(1E,6E)-1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮)或其衍生物或盐:

[0087]



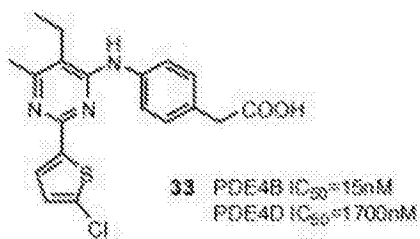
[0088] 第二活性剂可以包括ADAM5或ADAM6 (Cullen等,生物有机化学与医药化学通讯(Bioorg.Med.Chem.Lett.) 18:1530-1533,2008)或其药物活性衍生物或其盐:

[0089]



[0090] 第二活性剂也可以是或包括Naganuma等(生物有机化学与医药化学通讯(Bioorg.Med.Chem.Lett.) 19(12):3174-3176,2009)所述由先导2-芳基嘧啶衍生物生成的化合物A-33,包括化合物33或其药物活性衍生物或盐:

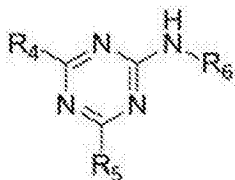
[0091]



[0092] 三嗪衍生物也已知是PDE4B的有效抑制剂,可用作本发明各种实施方式中的第二活性剂(Hagen等,生物有机化学与医药化学通讯(Bioorg.Med.Chem.Lett.) 24(16):4031-4034,2014)。本领域已知的结构研究已经证明,有效的和选择性的PDE4B抑制剂可以结合CR3(控制区3,位于催化结构域的羧基侧),从而将酶锁定在封闭的构象中。PDE4B选择性被认为是由于CR3中的单个氨基酸多态性在活性位点上封闭时选择结构域的螺旋对位。用PDE4B CR3中的亮氨酸交换PDE4D中的谷氨酰胺导致抑制剂选择性有70-80倍偏移。注意到上文中,Hagen等(同上)描述了一系列类似地结合于CR3的三嗪类似物,从而导致PDE4B特异性(Hagen等,同上)。

[0093] 第二活性剂可由式II表示:

[0094]

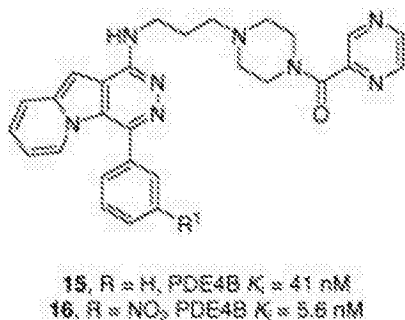


[0095] 关于式II,R4、R5和R6各自为氢,卤素,氰基,羧基,烷基,芳基或杂环,并且可任选被一个或多个卤素、氰基、羧基、烷基(例如甲基,乙基,丙基,异丙基,环丙基)、芳基或杂环取代。

[0096] 在某些实施方式中,R4可以是甲基,乙基,丙基,异丙基或环丙基。R5可以是任选被卤素(例如F或Cl)取代的芳基或任选被卤素(例如,F或Cl)取代的杂环(例如呋喃或噻吩)。R6可以是任选被羧酸、烷基羧酸(例如 $CH_2CO_2H$ ,  $CH_2(CH_3)CO_2H$ ,  $CH_2(CH_3)_2CO_2H$ )、卤素(例如F或Cl)、杂环(例如哌啶酮,咪唑烷酮,四唑)、氰基、氰基烷基(例如 $CH_2CN$ )、烷基杂环、磺酰胺或氨基磺酰胺取代的芳基,或其衍生物。

[0097] 可用作第二活性剂的其它化合物包括如Donnell等(生物有机化学与医药化学通讯(Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters) 20(7):2163-2167,2010)所述的取代的哒嗪并[4,5-b]吡啶化合物。例如,可以使用化合物:

[0098]



或其药物活性衍生物或盐。

[0099] 当第二活性剂是核酸时,其可以通过靶向和抑制PDE4B2或本文所述的其它靶标如PKA-CB的表达来介导RNAi(例如siRNA或shRNA)的核酸。其它有用的核酸基抑制剂包括微

小RNA和反义寡核苷酸。用于产生抑制性RNA分子的相关序列和方法是本领域已知的。为了便于参考,人类PDE4B的mRNA序列显示于图8中。关于1.6kb部分PDE4B cDNA的信息,包括可用于产生各种PDE4B同种型的引物和序列比较可根据需要在人类PDE4B3的克隆报告中找见(Huston等,生物化学杂志(Biochem.J.),328:549-558,1997;另见Bolger等,分子和细胞生物学(Mol.Cell.Biol.),136558-6571,1993;McLaughlin等,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),268:6470-6476,1993;和Obernolte等,基因(Gene),129:239)。在靶向PDE4B2时,选择的活性剂(例如,抑制PDE4B2的siRNA)可以选择性地(例如,该活性剂可以仅抑制PDE4B2的表达,排除其它PDE4B变体或其他PDE4家族成员)或非选择性地(即,该活性剂可抑制PDE4B2以及其它PDE4B变体或其他PDE4家族成员)靶向。PKA-CB的mRNA序列可通过例如NCBI“GenBank”网站获得(参见例如登录号NM-002731和Taylor等,生物化学综合年刊(Annu.Rev.Biochem.),59:971-1005,1990)。

[0100] 本领域已经表明,可以通过利用活性位点外的序列差异来设计高度选择性的PDE4B抑制剂(参见Fox等,细胞信号传导(Cellular Signaling)26:657-663,2014)。具体地,PDE4B选择性可以通过跨过活性位点以关闭cAMP的通道的构象捕获被称为CR3(对照区域3)的C末端螺旋来实现。

[0101] PKA-CB的mRNA序列可通过例如NCBI“GenBank”网站获得(参见例如登录号NM-002731和Taylor等,生物化学综合年刊(Annu.Rev.Biochem.),59:971-1005,1990)。

[0102] 第二活性剂可以是siRNA或其片段。可用作第二活性剂的siRNA(即作为直接或间接抑制PDE4B2的表达或活性的活性剂)可从例如Santa Cruz生物科技公司(流通目录#sc-41599)和GE健康护理(GE HealthCare)获得。长度往往为19-21个核苷酸的siRNA、shRNA、微小RNA和反义寡核苷酸可以根据本领域已知的方法合成和根据需要基于待抑制靶标的序列进行定制。在第二活性剂是抑制性RNA的情况下,所有活性剂可以具有单个序列或可以是不同序列的库(例如,抑制PDE4B、PKA-CB或本文中所述的另外靶标的表达的3-7个siRNA的库)。

[0103] 第二活性剂可以是多肽或其片段。可用作第一活性剂或第二活性剂的多肽包括与本文中所述的靶标特异性结合的抗体,其中靶标是PKA-CB,所述多肽可以是TTYADFIASGRTGRRNAIHD(SEQ ID NO:3)或其活性片段或其它变体。

[0104] 如下文实施例所述,IKK $\beta$ 抑制剂显著抑制NTHi和罗氟司特对PDE4B2的协同诱导,但不影响单独使用罗氟司特对PDE4B2的诱导。因此,在COPD被NTHi感染加重或与NTHi感染有关的患者中,可以用例如罗氟司特和IKK $\beta$ 抑制剂进行治疗。

[0105] 制剂:在各种实施方式中,第一活性剂和第二活性剂可以配制成同时或分开施用。第一活性剂和/或第二活性剂可以配制成丸剂,胶囊,颗粒剂,片剂,小球剂,悬浮液,注射剂,输注剂,栓剂,连续输送系统,糖浆,酏剂,软膏剂,霜剂,滴眼剂,滴眼剂,冲洗液,灌洗液,缓慢吸收贮存库,敷料,锭剂或任何药学上可接受的应用或营养补充剂。

[0106] 如本文所公开的第一活性剂和/或第二活性剂可以通过适合于待治疗病况的任何途径施用。合适途径可包括口服,吸入,肠胃外(包括皮下,肌内,静脉内,皮内,鞘内和硬膜外),直肠,鼻,局部,阴道等。

[0107] 当用于口服给药时,制剂可以是片剂,锭剂,菱形剂,水或油悬浮液,可分散粉末或颗粒剂,乳剂,硬胶囊或软胶囊,糖浆剂或酏剂。

[0108] 当用于吸入给药时,制剂可以包括包含小粒子的气溶胶或干粉。制剂也可以是悬浮液(例如,悬浮在液化推进剂中的第一和/或第二活性剂粒子)或溶液(例如,溶解在液化推进剂中的第一和/或第二活性剂粒子)。粒子的尺寸可以为约10 $\mu$ m或更小。优选地,粒子的尺寸可以小于5 $\mu$ m(例如2-3 $\mu$ m)。制剂可以根据常规方法制备并且可以与其它治疗制剂一起递送。制剂还可以包括一种或多种HFA推进剂,表面活性剂助溶剂和/或赋形剂。

[0109] 当用于肠胃外给药时,制剂可以包括:水性和非水性无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与目标接受者的血液等渗的溶质;和水性和非水性无菌悬浮液,其可以包含助悬剂和增稠剂。当用于注射时,第一活性剂和/或第二活性剂的药物组合物可以是无菌可注射制剂(例如,无菌的可注射的水性或油性悬浮液)。无菌可注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液(例如,在1,3-丁二醇中的溶液或作为冻干粉末制备)。

[0110] 试剂盒:本发明的试剂盒可以包括本文所述的任何一种或多种组合物,包括在进一步操作后(例如,稀释或重新悬浮后)准备好用于施用或可以施用的制剂中含有本文所述的第一活性剂和第二活性剂的药物组合物。在一些实施方式中,第一活性剂和第二活性剂在单独的容器内并被一起包装在试剂盒内。在任何实施方式中,试剂盒可包括使用说明书(例如书面文件,网址的公开,或音频或视觉呈现)。在任何实施方式中,试剂盒可以包括用于施用其中包含的组合物的用具(例如针,注射器,管道,灭菌剂,手套,面罩,喷雾器,滴管,纱布,胶带或敷料)。该试剂盒可以包括一个或多个吸入装置,例如喷雾器,雾化器,蒸发器,计量吸入器(MDI),干粉末吸入器等。

[0111] 适合治疗的病况:本发明的组合物可以作为治疗剂用于人和兽医学,其中其可以用于例如治疗和预防以下疾病:急性和慢性(特别是炎性和过敏原-诱发)的不同来源的气道障碍(支气管炎,过敏性支气管炎,支气管哮喘);皮肤病(特别是增生性,炎性和过敏型),如牛皮癣(寻常型),有毒和过敏性接触性湿疹,特应性湿疹,脂溢性湿疹,单纯疱疹,晒伤,肛门生殖器瘙痒,斑秃,肥大性瘢痕,盘状狼疮红斑,滤泡和广泛的皮炎,内源性和外源性疼痛,痤疮性红斑痤疮和其它增殖性、炎性和过敏性皮肤病;基于TNF(例如TNF $\alpha$ )和白细胞三烯的过量释放的病症,例如关节炎类型的病症(类风湿性关节炎,类风湿性脊椎炎,骨关节炎和其他关节炎病症和关节炎症),免疫系统的病症(AIDS),休克类型(脓毒性休克,内毒素休克,革兰氏阴性脓毒症,中毒性休克综合征和ARDS(成人呼吸窘迫综合征))以及胃肠道区域的广泛性炎症(克罗恩病和溃疡性结肠炎);基于上呼吸道(咽部,鼻子)和相邻区域(鼻窦,眼睛)的过敏性和/或慢性免疫性错误反应的病症,如过敏性鼻炎/鼻窦炎,慢性鼻炎/鼻窦炎,过敏性结膜炎以及鼻息肉;中耳炎和其它耳鼻感染;以及可以通过PDE抑制剂治疗的心脏病,例如心脏功能不全,或由于PDE抑制剂的组织松弛作用而可以治疗的病症,例如肾脏的绞痛和与肾结石有关的输尿管的绞痛。也可以治疗眼睛和眼睛周围和影响眼睛的组织的炎症。尽管本发明不限于治疗由于任何特定分子机制引起的病症,但可治疗的病症可被认为与组胺,血小板活化因子(PAF),花生四烯酸衍生物如白三烯和前列腺素,细胞因子如IL-1至IL-12中的人一种, $\alpha$ -、 $\beta$ -或 $\gamma$ -干扰素,肿瘤坏死因子(TNF)或氧自由基和蛋白酶的错误表达(例如,过表达)有关。在影响呼吸系统(包括从鼻子到肺泡的呼吸道的任何部分),耳朵或鼻窦的病症中,待处理的病况可能是其中粘液过度产生的一种。

[0112] 第一种活性剂是罗氟司特的实施方式:罗氟司特可用于治疗肺部炎症性疾病(例

如慢性阻塞性肺疾病 (COPD), 与慢性支气管炎相关的COPD, 和COPD恶化)。流感嗜血杆菌 (NTHi) 是COPD恶化的主要细菌因素。因此, 本发明的组合物和方法可以包括罗氟司特, 以在具有与慢性支气管炎相关的严重COPD、恶化病史和NTHi感染的患者中降低COPD恶化的风险。治疗在患有中度至重度肝损伤 (Child-Pugh B或C) 的患者中可能是禁忌。

[0113] 本文中所述的结合治疗可以改进与罗氟司特治疗有关的一个或多个不良反应 (例如, 胃肠道问题, 例如腹痛, 腹泻, 恶心; 相关症状, 例如体重减轻和食欲不振; 头痛; 背痛; 流感; 眩晕; 失眠; 焦虑, 抑郁, 自杀念头或其它情绪变化; 鼻炎和鼻窦炎; 以及尿路感染)。

[0114] 目前推荐的用于COPD患者的罗氟司特剂量在有或没有食物的情况下为每天500mcg片。该剂量可以在本发明的组合物和方法中维持, 增加或减少 (例如, 至450-499mcg/天; 400-450mcg/天; 300-400mcg/天; 或小于300mcg/天 (例如, 100-300mcg/天)。在其它实施方案中, 用于治疗皮肤病的局部应用形式 (例如软膏) 可以含有浓度例如为0.1-99%的第一和/或第二活性剂。通过吸入施用的剂量通常在0.01-0.5mg/kg之间。在全身治疗的情况下的常规剂量为0.05-2mg/天。

[0115] 还可以包括辅助剂, 并且本发明的组合物可与一种或多种溶剂、凝胶形成剂、软膏剂基质和其它活性化合物赋形剂 (例如抗氧化剂, 分散剂, 乳化剂, 防腐剂, 增溶剂或渗透促进剂) 或其任意组合一起配制。合适的非活性成分包括乳糖一水合物, 玉米淀粉, 聚维酮和硬脂酸镁。合适的药物制剂包括例如粉末, 乳剂, 悬浮液, 喷雾剂, 油, 软膏, 脂肪软膏, 霜剂, 糊剂, 凝胶剂, 片剂, 药丸, 胶囊和溶液。

[0116] 本文所述的第一活性剂和第二活性剂中的一种或两种可以被配制用于直接递送至炎症部位。例如, 在患者患有与呼吸系统中炎症相关的疾病 (例如肺部炎症) 的情况下, 第一和/或第二活性剂可以配制成用于通过吸入递送的多孔粒子。例如, 所述活性剂可以直接作为粉末 (优选微粉化形式) 或通过雾化含有它们的溶液或悬浮液来施用。第一和/或第二活性剂可以配制成气雾剂。在一些实施方案中, 本发明的活性剂可以由目前由Aerx公司销售的AERxEssence®肺部输送装置和AERx®系统来递送。

[0117] 本文所述的第一活性剂和第二活性剂中的一种或两种可以别掺入到纳米粒子 (例如, 治疗性纳米粒子) 中, 其可以改进递送分布模式和靶向特异性组织如肺组织。纳米粒子可以是如Sung等 (生物技术动向 (Trends Biotechnol.), 25 (12): 563-570, 2007) 或Azarmi等 (先进药物递送综述 (Advanced Drug Delivery Reviews), 60 (8): 863-876, 2008) 所述的微米级别干粉和纳米粒子的形式, 并且可以是基于脂质的 (例如, 脂质体或胶束) 或不基于脂质的。除了脂质体和胶束之外, 第一活性剂和第二活性剂也可以与介孔二氧化硅纳米粒子 (MSN)、聚丙烯亚胺 (PPI)、量子点和聚合物 (例如聚乙二醇) 结合 (例如共价或非共价地结合)。包括本文中所述的第一活性剂和第二活性剂的这些递送载体中的每一种都在本发明的范围内, 本文中所述的治疗方法可以采用联合任何这种递送载体的第一和/或第二活性剂的施用。制备和施用纳米颗粒的方法是本领域公知的 (参见例如Garbuzenko等, 癌症生物学与医学 (Cancer Biol. Med.), 11 (1): 44-55, 2014)。

[0118] 我们倾向于使用术语“疾病”来描述疾病, 如本文中所使用的, 术语“疾病”包括可能在文献中更频繁地描述为疾病, 病症, 障碍, 感染, 综合征等。

[0119] 本发明的组合物和方法可以并入第三活性剂, 如细胞色素P450酶诱导剂 (如利福平, 苯巴比妥, 卡马西平和苯妥英), CYP3A4抑制剂, 或CYP3A4和CYP1A2双重抑制剂 (如红霉

素,酮康唑,氟西汀,依诺沙星和西咪替丁)。通常,这些药物避免与罗氟司特联合,因为它们被认为增加了患者对罗氟司特的全身暴露,因此导致不良反应增加。然而,在本发明的情况下,其中组合物和治疗包括PDE4B2的抑制剂,与此同时使用相关的风险降低。

## 具体实施方式

### [0120] 实施例

[0121] 我们想更好地了解PDE4B如何在COPD复杂发病机制和药物治疗情况下的上调,以及抵消这种上调是否可以有助于提高罗氟米特的疗效并可能减轻耐药性。在以下研究中,我们显示罗氟司特与COPD恶化的主要细菌因素未分型流感嗜血杆菌(NTHi)协同作用,从而在体外和体内上调人气道上皮细胞中的PDE4B2表达。上调的PDE4B2有助于以酶活性依赖和非依赖性方式诱导一些重要的趋化因子。我们还发现PDE4B2的协同诱导需要蛋白激酶A催化亚基 $\beta$  (PKA-C $\beta$ ) 和核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65亚基。PKA-C $\beta$ 磷酸化p65呈cAMP依赖性方式。此外,p65的Ser276对于介导PKA-C $\beta$ 诱导的p65磷酸化和PDE4B2的协同诱导至关重要。总体上,我们的数据通过PKA-C $\beta$ 和p65之间的串扰揭示了PDE4B2协同上调的新机制,并为开发新的改进PDE4抑制剂如罗氟司特的功效的治疗策略提供了基础(参见图1)。

[0122] 在下述实施例中采用以下材料和方法。

[0123] 试剂和抗体。霉菌素D和蛋白酶抑制剂混合物(PIC)购自Sigma-Aldrich。十八烷基化PKA抑制剂和IKK $\beta$ 抑制剂IV购自EMD Millipore。罗氟司特购自Santa Cruz Biotechnology。N<sup>6</sup>-苯基-cAMP (6-Phe-cAMP)、8-pCPT-2'-O-Me-cAMP和Rp-8-CPT-cAMP购自BioLog。佛司可林购自Enzo Life Sciences。Phos-tag丙烯酰胺购自Wako Chemicals USA。重组p65蛋白购自Active Motif。重组PKA-C $\beta$ 蛋白购自R&D系统。用于PKA-C $\beta$  (sc-904)、p65 (sc-8008)、 $\beta$ -肌动蛋白(sc-8432)、 $\alpha$ -微管蛋白(sc-69969)、PDE4B (sc-25812)和TFIIB (sc-225)购自Santa Cruz Biotechnology,PKA-C $\alpha$  (#4782)和c-Rel (#4727)的抗体购自Cell Signaling。

[0124] 细菌菌株和培养条件。本研究使用NTHi菌株12的临床分离株(Ishinaga等,EMBO J., 26 (4):1150-1162, 2007)。细菌在37℃的巧克力琼脂平板上、在5%的CO<sub>2</sub>气氛中过夜生长,随后接种于补充有3.5 $\mu$ g/mL NAD和血红蛋白(BD Biosciences)的脑心脏输注(BHI)培养液中。温育过夜后,将细菌传代培养至新鲜肉汤和对数期细菌,通过光学密度(OD)值的测量进行监测,洗涤并悬浮在DMEM中用于体外细胞实验和等渗盐水中用于体内动物实验。对于除剂量依赖性实验之外的所有体外实验,在感染多重性(MOI)为50治疗NTHi。

[0125] 细胞培养。将以下所有培养基补充10%的胎牛血清(Sigma-Aldrich)。将人支气管上皮细胞BEAS-2B细胞保持在RPMI培养基(Life Technologies) (ATCC®CRL-9609™)中。人原发性支气管上皮NHBE (Lonza)细胞保持在补充有BEGM SingleQuots的支气管上皮生长培养基(BEGM)中(Jono等,生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 277 (47):45547-45557, 2002)。稳定表达人PDE4B2的BEAS-2B细胞(PDE4B2稳定的细胞)通过遗传霉素选择(300 $\mu$ g/mL)后的质粒转染获得。细胞在37℃下在5%的CO<sub>2</sub>潮湿气氛中培养。

[0126] 实时定量和半定量RT-PCR分析。按照制造商的说明,用TRIzol试剂(Life Technologies)分离总RNA。对于逆转录反应,如前所述使用TaqMan逆转录试剂(Life Technologies)。对于定量RT-PCR分析,使用SYBR Green Universal Master Mix (Life

Technologies) 进行PCR扩增。简而言之,将反应一式三份进行,其中含有2×Universal Master Mix、1μL模板cDNA和500nM引物,最终体积为12.5μL,并在96孔光学反应板(USA Scientific)中分析反应。通过使用StepOnePlus实时PCR系统和制造商的相应软件(StepOnePlus Software v2.3;Life Technologies)扩增和定量反应。通过使用比较Ct方法获得mRNA的相对量,并使用人亲环素或小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内源对照进行标准化。对于半定量RT-PCR分析,按照制造商的说明书,用PrimeSTAR Max聚合酶(Takara)进行PCR扩增。使用的引物序列列于下表。

[0127]

| 引物名称                 | 正向(5'-3')                                       | 逆向(5'-3')                                      |
|----------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>对于 Q-PCR (人)</b>  |                                                 |                                                |
| 亲环素 A                | CGGGTCCTGGCATCTTGT<br>(SEQ ID NO:4)             | GCAGATGAAAACTGGGAACCA<br>(SEQ ID NO:5)         |
| PDE4A                | TGTCGGATTACGCTGGAGGC<br>(SEQ ID NO:6)           | CATCGTGTCACAGGGATGC<br>(SEQ ID NO:7)           |
| PDE4B                | CTATACCGATCGCATTCAAGTC<br>(SEQ ID NO:8)         | CTGTCCATTGCCGATACAATT<br>(SEQ ID NO:9)         |
| PDE4C                | GACTTACCCCTCGACAACCA<br>(SEQ ID NO:10)          | GAAAGTCTCCTGCCAAGAG<br>(SEQ ID NO:11)          |
| PDE4D                | TGTGTGACAAGCACAATGCTTCC<br>(SEQ ID NO:12)       | CACGATTGTCCTCCAAAGTGTCC<br>(SEQ ID NO:13)      |
| CCL5                 | CTACACCAAGTGGCAAGTGC<br>(SEQ ID NO:14)          | CTTTCGGGTGACAAAGACGAC<br>(SEQ ID NO:15)        |
| CCL7                 | GGCTTGCTCAGC CAGT TG<br>(SEQ ID NO:16)          | GGTGGTCCCTCTGTAGCTCTC<br>(SEQ ID NO:17)        |
| CXCL8/IL-8           | TCCTGATTCTGCAAGCTCTG<br>(SEQ ID NO:18)          | GTCCACTCTCAATCACTCTCAG<br>(SEQ ID NO:19)       |
| CXCL12               | GAAATTAT TCCTGCAAGCCAATT TTG<br>(SEQ ID NO:20)  | CCC TTCTTTTTCATTGTAGCAATG<br>(SEQ ID NO:21)    |
| CXCL11               | ATTGTGTGCTACAGTTGT TCAAG<br>(SEQ ID NO:22)      | TTTCTCAATATCTGCCACTTTTCA<br>(SEQ ID NO:23)     |
| TNF-α                | CCCAGGCAGTCAGATCATCTT<br>(SEQ ID NO:24)         | AGCTGCCCCCTCAGCT TGA<br>(SEQ ID NO:25)         |
| GM-CSF               | AACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTG<br>(SEQ ID NO:26) | GCTGGCCATCATGGT CAAG<br>(SEQ ID NO:27)         |
| <b>对于 Q-PCR (小鼠)</b> |                                                 |                                                |
| GAPDH                | AC CCAGAAGACTGTGGATGG<br>(SEQ ID NO:28)         | GGATGCAGGGATGATGT TCT<br>(SEQ ID NO:29)        |
| PDE4B                | GTAGAGGC CAGTTCCCATCA<br>(SEQ ID NO:30)         | CCAACACCTAGTGCAGAGC<br>(SEQ ID NO:31)          |
| <b>对于半-Q-PCR (人)</b> |                                                 |                                                |
| GAPDH                | AAGGCTGGGCTCATTTG<br>(SEQ ID NO:32)             | GTGTGGT GGGG GACTGAG<br>(SEQ ID NO:33)         |
| PDE4B1               | ACCTTTCCTGGGCACAGCCAC<br>(SEQ ID NO:34)         | GCAGCGTGCAGGCTGTTGTG<br>(SEQ ID NO:35)         |
| PDE4B2               | AGCGGT GGTAGCGGTGAC TC<br>(SEQ ID NO:36)        | GCAGCGTGCAGGCTGTTGTG<br>(SEQ ID NO:37)         |
| PDE4B3               | CTCCACGCAGTT CACCAAGGAAC<br>(SEQ ID NO:38)      | TGTGTCAGTCCCGGTTTCAGC<br>(SEQ ID NO:39)        |
| PDE4B5               | ACTGTGAATTCTTTCAAAGGGATTGTG<br>(SEQ ID NO:40)   | GGTCTATTGTGAGAATATCCAGCCACAT<br>(SEQ ID NO:41) |

[0128] 质粒、转染和荧光素酶检测。IKKα (IKKα-CA, S176E/S180E) 和IKKβ (IKKβ-CA, S177E/S181E) 的表达质粒、组成型活性形式和IκBα (IκBα-DN, S32A/S36A) 显性负面形式之前已有描述(Shuto等,美国科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA), 98(15):8774-8779, 2001;Ishinaga等,同上)。NF-κB (pGL4.32) 的荧光素酶报告基因构建体购自Promega。人PDE4B2、p65 (RelA) 和PKA-Cβ1/2ccDNA序列生成并被插入pcDNA3.1/mycHis(-) 载体的BamHI和HindIII位点内。突变p65和PDE4B2-D392A通过使用PrimeSTAR Max (Takara) 生成。将空载体用作对照,并在必要时加入以确保等量的输入DNA。按照制造商的说明,使用TransIT-LT1

试剂(Mirus)一式三份进行所有瞬时转染。

[0129] siRNA介导的敲除。人类验证的siRNA寡核苷酸获自GE Healthcare(阴性对照,D001810-10;PDE4B,L007648-01;PKA- $\alpha$ ,M004649-01;PKA- $\beta$ ,M004650-00;p65,L003533-00;c-Rel,L004768-00)。使用DharmaFECT-4(Thermo Scientific)用50nM siRNA转染细胞,48小时后收集或处理。对于用DNA共转染siRNA,使用Lipofectamine 3000(Life Technologies)用10nM siRNA转染细胞。

[0130] 亚细胞分离。将细胞洗涤两次并用冰冷的PBS校正,并以 $3,000\times g$ 离心5分钟。然后用缓冲液A(10mM HEPES,pH7.4,10mM KCl,0.1mM EDTA,0.1mM EGTA,1mM DTT,补充有1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 和PIC)将细胞悬浮,并在冰上温育10分钟(Schreiber等,核酸研究(Nucleic Acids Res.) 17(15):6419,1989)。通过加入NP40(0.5%)并涡旋15秒使细胞裂解,然后以 $3,000\times g$ 离心5分钟,之后除去上清液(细胞质级分)。将沉淀物重新悬浮于缓冲液B(20mM HEPES,pH7.5,5mM NaCl,1mM EDTA,1mM EGTA,1mM DTT,补充有1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 和PIC),并在冰上温育10分钟,之后涡旋并以 $16,000\times g$ 离心15分钟以回收上清液(核级分)。

[0131] 蛋白质印迹。用裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,pH7.4,1%NP40,0.25%脱氧胆酸盐,150mM NaCl,1mM EDTA,1mM NaF,补充有1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 和PIC)回收全细胞提取物和小鼠肺组织提取物。对于PDE4B蛋白,如上所述用缓冲液A回收细胞提取物。在8%的SDS-PAGE凝胶上分离细胞或组织提取物,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(GE Healthcare Life Sciences)。用含有0.1%吐温20(TBS-T)和5%非脂肪干乳的TBS溶液封闭该膜。然后将该膜在第一抗体在5%BSA-TBS-T中的1:1000-1:2000稀释液中温育。用TBS-T洗涤( $\times 3$ )后,将膜与相应第二抗体在2.5%非脂肪干燥牛奶-TBS-T中的1:5000稀释液一起温育。使用Amersham ECL Prime Regent(GE Healthcare Life Sciences)可视化各种蛋白质。

[0132] 免疫沉淀。将Cell提取物与1 $\mu$ g第一抗体在4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜,然后与蛋白G PLUS-琼脂糖珠(Santa Cruz Biotechnology)温育2小时。然后将免疫沉淀物悬浮于样品缓冲液中,在8%SDS-PAGE凝胶上分离,转移到PVDF膜,并通过如上所述的免疫印迹分析进行检测。

[0133] PDE4活性。使用环状核苷酸PDE测定试剂盒(Enzo Life Sciences),按照制造商说明书测量用PDE4B2构建体转染的细胞的全细胞提取物中的PDE4活性。由总的和耐罗氟司特PDE活性之间的差值估算PDE4活性。

[0134] Phos-tag PAGE。根据制造商的说明,在没有EDTA/EGTA的情况下回收的重组p65蛋白质或核提取物,利用含有50 $\mu$ M  $\text{Mn}^{2+}$ -Phos-tag丙烯酰胺的6%凝胶通过SDS-PAGE进行分离,并转移到PVDF膜(Kinoshita等,分子与细胞蛋白质组学(Mol.Cell.Proteomics) 5(4):749-757,2006)。

[0135] 体外激酶测定。将重组p65蛋白(70ng)和重组PKA- $\beta$ (50ng)在激酶测定缓冲液(pH为7.5的20mM HEPES,2mM  $\text{MgCl}_2$ ,1mM DTT,10mM ATP)中混合并在30 $^{\circ}\text{C}$ 温育0.5小时。通过加入4 $\times$ SDS样品缓冲液(pH 6.8的0.24M Tris-HCl,40%甘油,8%SDS,20%的2-巯基乙醇,0.04%的溴苯酚蓝)来终止反应。

[0136] 小鼠和动物实验。对于C57BL/6J小鼠(7周龄)中的NTHi诱导的炎症,将麻醉小鼠用NTHi以每只小鼠 $5\times 10^7$ CFU浓度气管内接种,接种盐水作为对照。接种的小鼠在NTHi接种后5小时处死。对于抑制研究,小鼠在NTHi接种前2小时用罗氟司特腹膜内预处理。所有动物实验均由佐治亚州立大学的机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准。

[0137] 免疫荧光染色。将甲醛固定的石蜡包埋的小鼠肺组织切片(4 $\mu$ m),并使用兔抗PDE4B和FITC结合的山羊抗兔IgG(Santa Cruz Biotechnology)检测PDE4B蛋白。然后对所染色的切片进行成像,在光和荧光显微镜系统(AxioVert 40CFL,AxioCam MRC和AxioVision LE成像系统,Carl Zeiss)下记录图像。

[0138] 统计学分析。所有实验重复至少三次,结果一致。数据显示为平均值 $\pm$ SD。统计学分析采用不配对的双尾学生t检验进行评估, $p<0.05$ 被认为具有统计学意义。

[0139] 实施例1:罗氟司特与NTHi协同作用以在体外和体内上调PDE4B2的表达。因为PDE4同种型的表达是由PDE4抑制剂诱导的(Campos-Toimil等,英国药理学杂志(Br.J.Pharmacol.) 154(1):82-92,2008;Dlaboga等,脑研究(Brain Res.) 1096(1):104-112,2006;Giorgi等,行为大脑研究(Behav.Brain Res.) 154(1):99-106,2004)并且PDE4B也由NTHi诱导(Komatsu等,自然通讯(Nat.Comm.) 4:1684,2013),我们试图确定罗氟司特是否与NTHi协同作用以诱导人气道上皮细胞(BEAS-2B细胞)中的PDE4B表达。如图2A和2B所示,罗氟司特确实与NTHi协同,以在人支气管上皮细胞BEAS-2B细胞中在mRNA水平下通过定量PCR(Q-PCR)分析评估的剂量依赖性方式上调PDE4B表达。在原发性正常人支气管上皮(NHBE)细胞中也证实了类似的结果(图2C)。我们还分析了其它PDE4家族成员在相同条件下的表达,发现PDE4A和PDE4C不被NTHi或罗氟司特上调。PDE4D被NTHi或罗氟司特上调,但没有观察到显著的协同作用,表明PDE4B被NTHi和罗氟司特以协同方式特异性调控。为了进一步确定PDE4B的协同诱导是否在转录水平发生,我们用转录抑制剂放线菌素D(ActD)(据信通过在转录起始复合物上结合DNA并通过RNA聚合酶阻止RNA延伸来抑制转录;Sobell,美国科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA), 82(16):5328-5331,1985)处理BEAS-2B细胞。ActD完全废除了NTHi和罗氟司特的PDE4B诱导,表明PDE4B的协同诱导发生在转录水平(图2D)。我们接下来确定罗氟司特是否与NTHi协同上调体内PDE4B表达。与体外结果一致,罗氟司特协同性地增强小鼠肺中在mRNA水平下的由NTHi诱导的PDE4B表达(图2E)。

[0140] 我们还进行了半定量RT-PCR分析,以确定哪些PDE4B同种型被NTHi和罗氟司特上调。人类PDE4B基因编码许多不同的同种型,所谓的长形式PDE4B1和PDE4B3,短形式PDE4B2和超短形式PDE4B5(Huston等,生物化学杂志(Biochem.J.) 328(Pt 2):549-558,1997;Cheung等,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.) 322(2):600-609,2007;Bolger等,分子细胞生物学(Mol.Cell Biol.) 13(10):6558-6571,1993;Colicelli等,美国科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 86(10):3599-3603,1989;Zhang,当今制药(Curr.Pharm.Des) 15(14):1688-1698,2009)。我们无法检测另一种长形式PDE4B4,因为其cDNA已经被克隆到大鼠中,并且该同种型似乎不被人类基因组编码(Shepherd等,生物化学杂志(Biochem.J.) 370(Pt 2):429-438,2003)。如图2F所示,PDE4B2的表达由罗氟司特和NTHi或TNF- $\alpha$ 协同上调。PDE4B1、PDE4B3和PDE4B5的扩增的PCR带即使在BEAS-2B细胞扩增40个循环后也未检测到。

[0141] 在体外和体内蛋白质水平也证实了PDE4B2表达的协同诱导(图2G-I)。气道上皮细胞提取物和小鼠肺组织提取物的蛋白印迹分析显示,NTHi和罗氟司特引起 $\sim$ 70-kDa的PDE4B同种型的增加,所述同种型与过表达的人PDE4B2蛋白共迁移(图2G和2H)(Huston等,生物化学杂志(Biochem.J.) 328(Pt2):549-558,1997;Marquette等,自然结构与分子生物学(Nat.Struct.Mol.Biol.), 18(5):584-591,2011;Millar等,科学(Science), 310(5751):

1187-1191, 2005; Youghare等, 美国生理学杂志肺细胞与分子生理学 (Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.), 301 (4): L441-L450)。免疫荧光染色显示, PDE4B免疫荧光信号的高强度在小鼠肺组织的支气管上皮中大部分被检测到(图2I, 箭头)。一致地, 由于罗氟司特和NTHi引起的PDE4B2蛋白表达上调, PDE4B酶活性也有所增加。总体上, 我们的数据表明罗氟司特与NTHi协同作用在体外和体内在mRNA和蛋白质水平下特异性地上调PDE4B2表达。

[0142] 实施例2: NTHi诱导的促炎介质表达需要PDE4B2。接下来, 我们试图确定人类气道上皮细胞中NTHi诱导的炎症反应中PDE4B2表达的作用。包括细胞因子和趋化因子在内的促炎介质在气道炎症性疾病中在从循环到肺的白细胞的募集和活化中起关键作用 (Donnelly和Barnes, 药理科学趋势 (Trends Pharmacol. Sci.), 27 (10): 546-553, 2006; Le等, 细胞与分子免疫 (Cell Mol. Immunol.), 1 (2): 95-104, 2004; Quint和Wedzicha, 过敏及临床免疫学杂志活化 (J. Allergy Clin. Immunol.), 119 (5): 1065-1071, 2007)。气道上皮细胞是细菌性病原体诱导的促炎介质的重要来源 (Hallstrand等, 临床免疫学 (Clin. Immunol.), 161 (1): 1-15, 2014)。因此, 我们首先确定NTHi是否诱导了许多关键促炎介质的表达, 这些介导物显示在COPD的发病机制中是至关重要的。我们发现, NTHi显著上调CCL5、CCL7、CXCL10、CXCL11、白细胞介素-8 (IL-8/CXCL8)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和TNF- $\alpha$ 在BEAS-2B细胞中的表达。有趣的是, 罗氟司特各种程度地抑制了NTHi诱导的这些促炎症介质的表达。罗氟司特显著抑制TNF- $\alpha$ 和GM-CSF的诱导, 但适度抑制CCL5、CCL7和IL-8的诱导。相比之下, 它表现出即使在更高浓度下也对CXCL10和CXCL11诱导几乎没有抑制作用。这些有趣的结果使我们假设罗氟司特抑制这些促炎介质的低或有限的效力可能是由于在NTHi存在下由罗氟司特导致的上调的PDE4B2表达所致。因此, 我们通过使用PDE4B siRNA评估PDE4B2耗尽对NTHi诱导这些促炎症介质的影响来确定PDE4B2的作用。如预期的, PDE4B siRNA在BEAS-2B细胞中显著耗尽PDE4B2表达 (图3)。PDE4B2耗尽进一步显著抑制了仅有罗氟司酮时适度或最低程度被抑制的CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11 (A组) 的诱导。相比之下, PDE4B2耗尽仅最低限度地影响仅有罗氟司特时被适度或明显抑制的IL-8、GM-CSF和TNF- $\alpha$ 的诱导 (B组)。

[0143] PDE4D也被NTHi和罗氟司特上调, 并且以前的研究表明, PDE4D与PDE4B具有不同的非冗余的作用 (Ariga等, 免疫学杂志 (J. Immunol.), 173 (12): 7531-7538, 2004; Blackman等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 286 (14): 12590-12601, 2011)。因此, 我们还评估了PDE4D耗尽对NTHi诱导的促炎介质表达的影响。A组中趋化因子的诱导通过PDE4D耗尽减弱, 但与PDE4B耗尽相比达到小的多的程度。B组中趋化因子和细胞因子的诱导不受PDE4D耗尽影响甚至略微增强。总体上, 这些结果表明, 不同的促炎症介质由PDE4B和PDE4D差异性地调节, 以及PDE4B的表达在支气管上皮细胞中在NTHi诱导的CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11的表达中起着更重要的作用。

[0144] 为了进一步证实PDE4B2上调在NTHi诱导的趋化因子表达中的作用, 我们开发了稳定过表达野生型PDE4B2 (PDE4B2稳定细胞) 的细胞。PDE4B2在PDE4B2稳定细胞中的表达比在模拟转染 (Mock) 细胞中更高 (图4A)。与Mock细胞相比, PDE4B2稳定细胞中CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11的NTHi诱导表达显著增强 (图4B)。有趣的是, 罗氟司特即使在最高测试浓度 (10  $\mu$ M) 下也不能完全抑制这些趋化因子在PDE4B2稳定细胞中的NTHi诱导的表达。注意, 在PDE4B2稳定细胞中, CXCL10和CXCL11的NTHi诱导的表达甚至被较低剂量的罗氟司特 (<1  $\mu$

M) 稍微增强(图4B)。与PDE4B耗尽的结果相符,PDE4B2过表达在罗氟司特存在下不显著增加NTHi诱导的IL-8、GM-CSF和TNF- $\alpha$ 的表达。总之,这些结果表明,由NTHi和罗氟司特协同上调的PDE4B2可能至少部分地促进了罗氟司特在抑制支气管上皮细胞中的CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11诱导的降低的疗效。

[0145] 以前已经表明,PDE4的酶活性对于调节炎症反应是至关重要的(Bender和Beavo,药理学评论(Pharmacol.Rev.),58(3):488-520,2006;Lipworth,柳叶刀(Lancet),365(9454):167-175,2005;Karlsson等,过敏及临床免疫学杂志(Int.Arc.Allergy Immunol.),107(1-3):426-426,1995;Michalski等,临床药理学与治疗学(Clin.Pharmacol.Ther.),91(1):134-142,2012)。然而,我们的数据显示,上调的PDE4B2以高剂量罗氟司特(高达10 $\mu$ M,该药物的非常高的水平,因为IC<sub>50</sub>评估小于1nM)(Bender和Beavo,同上)不能克服的方式诱导某些促炎介质。这些非常有趣但相当意想不到的结果使我们假设PDE4B2可以至少部分地独立于其众所周知的酶活性,例如作为衔接蛋白来调节这些趋化因子的表达。为了测试这个假说,我们比较了表达野生型PDE4B2(PDE4B2-WT)和PDE4B2催化无活性形式(PDE4B2-D392A)(Mongillo等,循环研究(Circ.Res.),95(1):67-75,2004;Xu等,科学(Science),288(5472):1822-1825,2000)对NF- $\kappa$ B依赖性启动子活性和趋化因子诱导的影响。在转染的BEAS-2B细胞中,PDE4B2-WT和PDE4B2-D392A同等表达,PDE4活性在被PDE4B2-D392A突变体转染的细胞中显著低于被PDE4B2-WT转染的细胞。我们发现PDE4B2-WT以剂量依赖性方式显著增强NF- $\kappa$ B(I $\kappa$ B)激酶 $\beta$ (IKK $\beta$ -CA)诱导的NF- $\kappa$ B启动子活性的抑制剂的组成型活性形式,并且还增强IKK $\beta$ -CA诱导的组A-趋化因子表达。有趣的是,尽管与PDE4B2-WT相比程度较低,PDE4B2-D392A也增强了IKK $\beta$ -CA诱导的NF- $\kappa$ B启动子活性和趋化因子表达。此外,罗氟司特(高达10 $\mu$ M)不能完全抑制被PDE4B2-D392A转染的细胞中IKK $\beta$ -CA诱导的NF- $\kappa$ B启动子活性和A组趋化因子表达。总之,这些结果表明PDE4B2以PDE酶活性依赖性和非依赖性两种方式增强了炎症反应,这可能促进了罗氟司特的耐药性。

[0146] 实施例3:PDE4B2的协同诱导需要PKA-C $\beta$ 而不是PKA-C $\alpha$ 。为了研究PDE4B2的协同诱导机制,我们首先检验由罗氟司特增加的cAMP是否参与PDE4B2的协同诱导。佛司可林(FSK)是一种有效的cAMP升高剂,与NTHi协同以上调PDE4B2表达,表明cAMP参与BEAS-2B细胞中PDE4B2的协同诱导。因此,我们进一步研究了两种普遍表达的细胞内cAMP效应子、PKA和由cAMP(Epac)直接活化的交换蛋白的参与。特异性PKA抑制剂(PKI)显著抑制NTHi和罗氟司特的PDE4B2协同诱导。该抑制剂多肽TTYADF IASGRTGRRNAIHD(SEQ ID NO:3)可以容易地合成,也可从Santa Cruz Biotechnologies获得。PKI和其活性片段或变体(例如,与其至少80%(例如,85%,90%或95%)相同的多肽)可用于本发明的组合物和方法中来抑制PKA-C $\beta$ 。与此结果一致,不活化Epac的PKA选择性活化剂6-Phe-cAMP协同增强NTHi诱导的PDE4B2表达。相反,Epac选择性活化剂8-pCPT-2'-O-Me-cAMP与NTHi不显著协同诱导PDE4B2表达。这些结果表明,支气管上皮细胞中PDE4B2的协同诱导需要PKA而不是Epac的cAMP依赖性活化。

[0147] PKA是由两个催化(C)和两个调节(R)亚基组成的四聚体酶。cAMP与R亚基的结合导致C亚基的R亚基抑制的缓解,其然后磷酸化各种蛋白质底物(Krebs和Beavo,生物化学综合年刊(Annu.Rev.Biochem.),48:923-959,1979;Levitan,生理学年评(Annu.Rev.Physiol.),56:193-212,1994;Montminy等,神经科学动态(Trends Neurosci.),13(5):184-188;1990;Gamm等,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),271(26):

15736-15742, 1996; Padmanabhan等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 288 (20): 14158-14169, 2013)。在人类中已经鉴定了三种C亚基同种型, PKA- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\gamma$ , 虽然C $\gamma$ 是睾丸特异性的 (Beebe等, 分子内分泌学 (Mol. Endocrinol.), 4 (3): 465-475, 1990)。我们接下来通过使用特异性siRNA耗尽PKA- $\alpha$ 和- $\beta$ 来确定哪种PKA同种型涉及PDE4B2的协同诱导。蛋白印迹分析显示PKA- $\alpha$ 和 $\beta$ 的蛋白表达分别在siRNA转染的细胞中有效和选择性地降低 (图5)。有趣的是, NTHi和罗氟司特的PDE4B2的协同诱导通过PKA- $\beta$ 耗尽显著减弱, 而在PKA- $\alpha$ -耗尽的细胞中仅观察到轻微的抑制。接下来, 我们确定了PKA- $\beta$ 耗尽对在罗氟司特存在下由NTHi诱导的促炎介质上调的影响。PKA- $\beta$ 耗尽对促炎介质表达的抑制效果与PDE4B2耗尽的抑制效果高度一致, 不同之处在于相比于PDE4B2耗尽, PKA- $\beta$ 耗尽更大程度地减少CCL7和GM-CSF上调。这些结果表明, PKA- $\beta$ 在由NTHi和罗氟司特诱导的PDE4B2和促炎介质的协同上调中充当关键正调节剂。一些NTHi诱导的促炎介质甚至通过PKA- $\alpha$ 耗得以增加, 这与其它细胞类型中报道的PKA- $\alpha$ 的抗炎作用相一致 (Ollivier等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 271 (34): 20828-20835, 1996)。

[0148] 由于已经显示cAMP反应元件 (CRE) 在上调大鼠神经元中PDE4B2表达中起着特别重要的作用 (D'Sa等, 神经化学杂志 (J. Neurochem.), 81 (4): 745-757, 2002), 我们检查了CRE结合蛋白 (CREB) 和活化转录因子1 (ATF1) 这两种普遍表达的PKA依赖性转录因子 (Mayr和Montminy, 自然评论分子细胞生物学 (Nat. Rev. Mol. Cell Biol.), 2 (8): 599-609, 2001) 在BEAS-2B细胞中的NTHi和罗氟司特的PDE4B2协同诱导中的参与。有趣的是, CREB或ATF1的耗尽降低了PDE4B2的协同诱导, 但与PKA- $\beta$ 耗尽相比程度较低。这些结果表明PKA- $\beta$ 的其它下游分子可能在支气管上皮细胞中的PDE4B2协同诱导中起重要作用。然而, 我们的数据表明PKA- $\beta$ 而不是PKA- $\alpha$ 对于NTHi和罗氟司特的PDE4B2协同诱导是至关重要的。

[0149] 实施例4: PDE4B2的协同诱导需要IKK $\beta$ -p65但不是c-Rel。因为NTHi被称为IKK $\beta$  (也称为IKK2) 的有效活化剂, 导致NF- $\kappa$ B依赖性炎症反应的活化 (Shuto等, 美国科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 98 (15): 8774-8779, 2001; Oeckinghaus和Ghosh, 冷泉港生物学视角 (Cold Spring Harb. Perspect. Biol.), 1 (4): a000034, 2009; Chen等, 生物化学和生物物理研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 324 (3): 1087-1094, 2004), 我们检测了协同诱导PDE4B2中IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ B信号传导的要求。我们首先评估了IKK $\beta$ 的作用。IKK $\beta$ 抑制剂显著抑制了NTHi和罗氟司特对PDE4B2的协同诱导, 但不影响罗氟司特单独对PDE4B2的诱导。为了进一步确定IKK $\beta$ 的活化是否确实与罗氟司特协同作用以诱导PDE4B2的协同上调, 用IKK $\alpha$  (IKK $\alpha$ -CA) 和IKK $\beta$  (IKK $\beta$ -CA) 的组成型活性形式转染BEAS-2B细胞。我们发现在IKK $\beta$ -CA而不是IKK $\alpha$ -CA转染的细胞中, 罗氟司特或PKA活化剂6-Phe-cAMP协同增强了PDE4B2表达。此外, 我们还证明IKK $\beta$ 的下游分子I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ -DN) 的显性阴性突变体的表达完全阻断了IKK $\beta$ -CA转染的细胞中IKK $\beta$ -CA诱导的PDE4B2表达和罗氟司特的PDE4B2协同诱导。这些结果表明, PDE4B2的协同诱导需要IKK $\beta$ - $\kappa$ B $\alpha$ 信号通路。

[0150] I $\kappa$ B $\alpha$ 阻止了以前已知分别由PKA- $\alpha$ 和PKA- $\beta$ 活化的包括p65和c-Rel的NF- $\kappa$ B复合物的活化和核移位 (Gerlo等, 细胞与分子生命科学 (Cell Mol. Life Sci.), 68 (23): 3823-3841, 2011; Yu等, 分子医学杂志 (J. Mol. Med. (Berl.)), 82 (9): 621-628, 2004; Zhong等, 细胞 (Cell), 89 (3): 413-424, 1997; Zhong等, 分子细胞 (Mol. Cell.), 1 (5): 661-671, 1998)。因此, 我们首先研究NTHi是否诱导p65和c-Rel的核移位。我们发现p65和c-Rel在BEAS-2B细胞

中NTHi处理后60分钟内被转移到细胞核。这些结果使我们进一步通过使用siRNA选择性耗尽p65或c-Rel来确定p65和c-Rel对于PDE4B2协同诱导的需求。我们发现p65而不是c-Rel的耗尽显著抑制了NTHi和罗氟司特对PDE4B2的协同诱导,或抑制了NTHi单独的PDE4B2诱导而不是罗氟司特单独的PDE4B2诱导,从而表明p65在NTHi诱导的PDE4B2表达中的重要作用。我们进一步确定p65的过表达是否与罗氟司特协同以诱导PDE4B2。罗氟司特确实协同增强p65转染细胞中的PDE4B2表达。总体上,我们的数据表明,IKK $\beta$ -I $\kappa$ B $\alpha$ -p65信号通路是支气管上皮细胞中协同诱导PDE4B2所必需的。

[0151] 实施例5:PKA-C $\beta$ 磷酸化p65。为了进一步确定PKA-C $\beta$ 如何与p65相互作用以及这些分子如何协同以上调PDE4B2表达,我们首先通过进行共免疫沉淀实验来研究p65是否与PKA-C $\beta$ 物理结合。我们发现在用p65和PKA-C $\beta$ 两者转染的BEAS-2B细胞中p65和PKA-C $\beta$ 彼此物理结合。此外,它们的相互作用通过罗氟司特与NTHi的联合处理得到增强。我们发现罗氟司特不影响BEAS-2B细胞中p65或PKA-C $\beta$ 的核表达水平。因此,我们接下来检查PKA-C $\beta$ 是否影响p65磷酸化。p65多重残基的磷酸化已被证明可调节p65的各种功能,如DNA结合和转录活性(Huang等,细胞信号(Cell Signal),22(9):1282-1290,2010;Chaturvedi等,癌基因(Oncogene),30(14):1615-1630,2011)。然而,PKA-C $\beta$ 在调节p65磷酸化中的作用仍然是未知的。为了评估p65磷酸化,我们进行了磷酸亲和力(Phos-tag)PAGE,是一种新的磷酸盐结合标签类方法,已被开发用于特异性降低磷酸化蛋白质迁移速度,使得磷酸化蛋白质可以与非磷酸化蛋白质分离(Kinoshita等,分子与细胞蛋白质组学(Mol.Cell.Proteomics),5(4):749-757,2006)。罗氟司特与NTHi的联合处理诱导p65的磷酸化,其被Rp-8-CPT-cAMP(一种cAMP依赖性PKA激活的特异性抑制剂)所抑制。PKA-C $\beta$ 耗尽或H89处理表现出相似的抑制作用。与这些结果一致,cAMP依赖性PKA选择性活化剂6-Phe-cAMP也诱导该磷酸化。值得注意的是,NTHi单独在BEAS-2B细胞中没有诱导类似的磷酸化,这表明p65磷酸化需要cAMP的PKA-C $\beta$ 活化。我们还发现BEAS-2B细胞中主要的C $\beta$ 亚型PKA-C $\beta$ 1的过表达诱导p65的磷酸化,其被H89而不是p38抑制剂(SB203580)或ERK抑制剂(PD98059)抑制。这些结果表明PKA-C $\beta$ 1直接磷酸化p65,与p38、ERK或它们下游的已经显示磷酸化p65的激酶MSK1(丝裂原和应激活化的激酶1)的活化无关(Geritset等,细胞信号传导(Cellular Signaling),20(9):1592-1607,2008;Joo和Jetten,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),283(24):16391-16399,2008;Reber等,PloS one 4(2):e4393,2009)。寻找PKA共有磷酸化序列(RRXS/T)显示丝氨酸276残基(Ser276)是潜在的PKA磷酸化位点(Songyang等,当代生物学(Curr.Biol.),4(11):973-982,1994),这与以前的表明PKA-C $\alpha$ 在Ser276残基磷酸化p65(Zhong等,1998和Zhong等,1998,同上)的研究结果一致。为了确定p65是否也在Ser276被PKA-C $\beta$ 磷酸化,BEAS-2B细胞用p65的磷酸化缺陷突变体(S276A)转染,并通过Phos-tag PAGE进行分析。还分析了具有已知被其它激酶磷酸化的其它丝氨酸残基(S468A,S529A和S536A)突变的p65构建体。与野生型p65转染的细胞相比,S276A和S536A转染的细胞中PKA-C $\beta$ 诱导的磷酸化的强度比降低。为了进一步确定PDE4B2诱导中这些残基处p65磷酸化的功能参与,我们检验了在用这些不同的p65磷酸化位点突变体转染的细胞中的PDE4B2表达。罗氟司特和NTHi协同增强了用p65突变体S468A、S529A和S536A转染而不是用S276A转染的细胞中的PDE4B2表达。我们接下来通过进行NF- $\kappa$ B启动子活性分析来确定PKA-C $\beta$ 导致的Ser276磷酸化对p65的转录活性的影响。用PKA-C $\beta$ 1共转染显著增强p65诱导的NF- $\kappa$ B启动子活性,其通过共表达p65的

S276A突变体而消除。这些结果表明罗氟司特和NTHi增加了PKA-C $\beta$ 与p65的物理相互作用,进而导致p65在Ser276处的磷酸化和随后的p65依赖性转录活性的上调。

[0152] 实施例6:地塞米松通过NTHi和Rof抑制PDE4B诱导,改进Rof在体外肺上皮细胞中和小鼠肺中抑制NTHi诱导的炎症的功效。

[0153] 我们用Rof (1 $\mu$ M)、FSK (1 $\mu$ M)、Iso (0.1 $\mu$ M)和DEX (10nM)预处理BEAS-2B细胞1小时,然后用NTHi刺激1.5小时,并通过Q-PCR分析PDE4B mRNA表达(图7A和7B)。我们还用Rof (0.1 $\mu$ M)和DEX (6.5nM)预处理BEAS-2B细胞1小时,然后用NTHi刺激1.5小时,并通过半定量RT-PCR分析PDE4B2mRNA表达(图7C)。为了评估蛋白质表达,将BEAS-2B细胞用Rof (0.1 $\mu$ M)和DEX (100nM)预处理1小时,然后用NTHi刺激5小时,通过免疫印迹分析PDE4B蛋白的表达(图7D)。每个目标数据用处理的NTHi标准化。数据为平均值 $\pm$ SD (n=3);\*p<0.05,相对于NTHi;†p<0.05,相对于Rof+NTHi。小鼠用Rof (5mg/kg i.p.)和/或DEX (2mg/kg i.p.)接种2小时,然后用NTHi (5 $\times$ 10<sup>7</sup>CFU/肺)气管内接种(图7E和7G)。5小时后,通过Q-PCR分析肺组织中的mRNA表达,以评估PDE4B或各种促炎介质的表达,并且肺组织针对PDE4B进行染色(放大倍数 $\times$ 200,比例尺,100 $\mu$ m)(图7F),并使用H&E染色评估炎症(图7H)。

[0154] 评论:PDE4B已被证明是由各种炎性刺激上调,其在介导炎症反应中发挥关键作用(Gobejishvili等,美国生理学胃肠和肝脏生理学杂志(Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.),294(4):G718-G724,2008;Gobejishvili等,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.),337(2):433-443,2011;Jin和Conti,美国科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),99(11):7628-7633,2002;Ma等,分子药理学(Mol.Pharmacol.),55(1):50-57,1999;Cohen等,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),275(15):11181-11190,2000;Borysiewicz等,代谢性脑疾病(Metab.Brain Dis.),24(3):481-491,2009;Christiansen等,国际神经化学(Neurochem.Int.),59(6):837-846,2011)。我们最近还发现PDE4B是由细菌NTHi诱导的(Komatsu等,自然通讯(Nat.Comm.),41684,2013)。也已知PDE4同种型的表达水平由包括PDE4抑制剂本身的cAMP升高剂所诱导(Jin和Conti,同上;Mehats等,内分泌学(Endocrinology),140(7):3228-3237,1999;Campos-Toimil等,英国药理学杂志(Br.J.Pharmacol.),154(1):82-92,2008;D'Sa,同上;Daboga等,脑研究(Brain Res.),1096(1):104-112,2006;Giorgi等,行为大脑研究(Behav.Brain Res.),154(1):99-106,2004),其被认为是在cAMP信号传导的负反馈调节中是重要的。然而,在细菌病原体和cAMP升高剂存在下PDE4的调节方式尚不清楚。在本研究中,我们首次显示了罗氟司特(临床批准用于COPD恶化的PDE4抑制剂)与NTHi(COPD恶化的主要细菌原因)协同作用,在COPD的复合发病机制和药物的情况下,通过cAMP/PKA-C $\beta$ 和p65之间的串扰来诱导PDE4B2表达(图1)。在其它炎性刺激如TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 以及cAMP升高剂的存在下也观察到PDE4B2的协同诱导。PDE4B2表达在以前已被证明在COPD恶化发病机制中至关重要的趋化因子CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11的NTHi诱导的表达中起至关重要的作用。这些趋化因子在COPD患者的诱导痰、支气管肺泡灌洗液(BAL)液或外周气道中增加(Saetta等,美国呼吸和重症监护医学杂志(Am.J.Resp.Crit.Care Med.),165(10):1404-1409,2002;Fujimoto等,欧洲呼吸学会(Eur.Respiratory J.),25(4):640-646,2005;Costa等,胸科学(Chest),133(1):26-33,2008;Hacievliyagil等,呼吸内科(Respiratory Med.),100(5):846-854,2006;Frankenberger等,分子医学(Mol.Med.),17(7-8):762-770,2001)并在巨噬细胞、CD8<sup>+</sup>T细

胞、B细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞募集到气道腔中起重要作用 (Donnelly和Barnes, 药理学科学趋势 (Trends PharmacolSci.), 27 (10) :546-553, 2006; Le等, 细胞与分子免疫 (Cell Mol.Immunol.), 1 (2) :95-104, 2004; Quint和Wedzicha, 过敏及临床免疫学杂志活化 (J.Allergy Clin.Immunol.), 119 (5) :1065-1071, 2007; Michalec等, 免疫学杂志 (J.Immunol.), 168 (2) :846-852, 2002; Gross, 胸科学 (Chest), 142 (5) :1300-1307, 2012)。

[0155] 本研究的第二个主要发现是PDE4B2以酶活性依赖性和非依赖性两种方式调节某些趋化因子的表达。这可能导致由于协同上调的PDE4B2, 罗氟司特在某些临床条件下抑制炎症的功效降低。例如, 我们观察到罗氟司特抑制NTHi诱导的CCL5、CCL7、CXCL10和CXCL11 (命名为A组趋化因子) 的作用小于其抑制一些其它促炎症介质如支气管上皮细胞中的GM-CSF和TNF- $\alpha$ 的作用。此外, 罗氟司特在抑制PDE4B耗尽而不是PDE4D耗尽的细胞中的A组趋化因子时更有效。与这些结果一致, 罗氟司特 (甚至10 $\mu$ M) 不能完全抑制过表达PDE4B2的稳定细胞系中NTHi诱导的A-趋化因子的表达。此外, PDE4B2-WT和PDE4B2-D392A (没有酶活性的突变体) 显著增强NF- $\kappa$ B启动子活性和A组趋化因子的表达, 但与PDE4B2-WT相比, PDE4B2-D392A增强NF- $\kappa$ B的活化和趋化因子表达的程度较低。还应指出, 罗氟司特 (高达10 $\mu$ M) 不能完全抑制过表达PDE4B2-WT或PDE4B2-D392A的细胞中IKK $\beta$ -CA诱导的NF- $\kappa$ B启动子活性和A组趋化因子表达。总之, 这些结果表明上调的PDE4B2可能有助于这些趋化因子以酶活性依赖性和非依赖性两种方式上调, 从而首次提供PDE4B2可能作为非酶衔接蛋白来调节免疫反应的证据。有必要进行进一步的研究, 以进一步阐明潜在的机制。

[0156] 本研究的第三个主要发现是介导PDE4B2的协同诱导和所导致的人气道上皮细胞中的炎症反应特异性地需要PKA-C $\beta$ 而不是PKA-C $\alpha$ 。以前, 已经表明PKA-C $\alpha$ 通过在Ser276磷酸化p65而以cAMP非依赖性方式活化NF- $\kappa$ B信号 (Zhong等, 细胞 (Cell), 89 (3) :413-424, 1997)。已经显示PKA-C $\alpha$ 通过与I $\kappa$ B复合物结合而保持为非活性状态。导致I $\kappa$ B降解的信号导致PKA-C $\alpha$ 活化和随后在Ser276磷酸化p65。以前的研究表明, cAMP非依赖性的PKA活化机制响应炎症刺激如LPS、有丝分裂原、细胞因子和病毒而参与NF- $\kappa$ B活化和炎症反应。在本研究中, 我们报道了在存在细菌病原体和cAMP升高剂两者的情况下, cAMP与NF- $\kappa$ B信号传导协同作用以通过PKA-C $\beta$ 而不是PKA-C $\alpha$ 介导的在Ser276处的p65磷酸化来上调PDE4B2的不同新机制。需要未来的研究来进一步确定PKA-C $\alpha$ 和PKA-C $\beta$ 是否分别特异性地介导p65磷酸化的cAMP非依赖性调节和cAMP依赖性调节。

[0157] 除了PKA-C $\alpha$ 和PKA-C $\beta$ 在调节PDE4B2表达中的不同作用之外, PKA-C $\alpha$ 和PKA-C $\beta$ 也似乎差异性地调节促炎介质的表达。例如, 我们发现一些NTHi诱导的促炎介质在PKA-C $\alpha$ 基因敲除时增加, 这与先前在其它细胞类型中报道的PKA-C $\alpha$ 的抗炎作用相一致 (Ollivier等, 生物化学杂志 (J.Biol.Chem.), 271 (34) :20828-20835, 1996)。PKA-C $\beta$ 在介导炎症反应中的作用仍然很不清楚。在本研究中, 我们发现促炎介质的表达由PKA-C $\beta$ 敲除降低, 表明了PKA-C $\beta$ 的促炎作用。这些数据表明, PKA-C $\beta$ 选择性抑制可能代表抑制促炎介质而不会影响PKA-C $\alpha$ 介导的抗炎效果的有潜力的策略。鉴于PKA-C $\alpha$ 和PKA-C $\beta$ 在调节PDE4B2和促炎介质中的不同作用, PKA可能以同种型特异性方式参与调节生理和病理反应 (Padmanabhan等, 生物化学杂志 (J.Biol.Chem.), 288 (20) :14158-14169, 2013)。因此, 对于旨在确定PKA参与的研究, 需要特别注意PKA的各种同种型的作用。

[0158] PKA在调控NF- $\kappa$ B信号传导中的作用和潜在机制似乎相当复杂。在一些模型系统

中,PKA的活化抑制NF- $\kappa$ B核移位。例如,在HeLa细胞中,TNF- $\alpha$ 介导的p65的核移位通过使用siRNA的PKA耗尽来增强(King等,PloS ONE,6(4):e18713,2011)。佛司可林在Jurkat T淋巴细胞中损害p65的核移位(Neumann等,EMBO J.,14(9):1991-2004,1995)。还有与NF- $\kappa$ B核移位无关的机制。例如,在人单核细胞和内皮细胞中,cAMP抑制NF- $\kappa$ B介导的转录,而不会阻止NF- $\kappa$ B复合物的核移位。相反,cAMP/PKA通过磷酸化CREB来抑制NF- $\kappa$ B依赖性转录活性,CREB与p65竞争有限量的NF- $\kappa$ B共活化剂CREB结合蛋白(CBP)(Parry和Mackman,免疫学杂志(J.Immunol.),159(11):5450-5456,1997)。还表明,cAMP/PKA途径对Jurkat T淋巴细胞中NF- $\kappa$ B的转录活性的抑制作用是通过直接或间接修饰p65的C-末端反式活化结构域而实现的,这独立于CREB和Ser276处的p65磷酸化(Takahashi等,欧洲生物化学杂志(Eur.J.Biochem.),269(18):4559-4565,2002)。所有上述研究提供了cAMP/PKA对NF- $\kappa$ B转录活性的抑制作用的证据。然而,还有证据表明PKA能够活化NF- $\kappa$ B信号传导,其中Ser276的p65磷酸化似乎是关键的。例如,NF- $\kappa$ B在Ser276处被PKA磷酸化通过促进NF- $\kappa$ B与共激活剂CBP/p300的相互作用来刺激NF- $\kappa$ B转录活性(Zhong等,1998,同上)。由PKA导致的在Ser276处的NF- $\kappa$ B p65磷酸化活化NF- $\kappa$ B并导致头颈部癌的恶性表型(Arun等,临床癌症研究(Clin.Cancer Res.),15(19):5974-5984,2009)。还表明,PKA-C $\alpha$ 通过以IKK $\beta$ 依赖但cAMP非依赖的方式在Ser276处磷酸化p65而活化NF- $\kappa$ B信号传导(Zhong等,1997,同上)。在本研究中,我们显示PKA-C $\beta$ 还在Ser276处磷酸化p65,但以cAMP依赖性方式磷酸化,这对于支气管上皮细胞中NTHi和罗氟司特协同诱导PDE4B2至关重要。总之,这系列实验证据表明,cAMP和/或PKA可以通过各种机制调节NF- $\kappa$ B活化/失活,这可能取决于cAMP和PKA的细胞类型和来源以及存在于不同信号传导复合物中的NF- $\kappa$ B亚基。此外,各种细胞类型或条件下A激酶相互作用蛋白1(AKIP1)的表达水平对于PKA对NF- $\kappa$ B活性的影响似乎也是重要的。已经表明,在低水平AKIP1的细胞中,PKA活化剂抑制NF- $\kappa$ B的转录活性。相比之下,在高水平的AKIP1细胞中,PKA活化增加了Ser276处的p65磷酸化,并与NF- $\kappa$ B活化协同作用(Gao等,生物化学杂志(J.Biol.Chem.),285(36):28097-28104,2010)。

[0159] 总之,我们的研究不仅对在COPD的复杂发病机制和药物的情况下协同诱导PDE4B2表达的分子机制提供了新观点,而且还对PKA-C $\beta$ 和p65之间通过cAMP非依赖性方式的信号串扰提供了新观点。我们的研究结果也首次证明,PDE4B2可能至少部分作为非酶衔接蛋白在调节炎症反应中起作用。罗氟司特与PKA-C $\beta$ 选择性抑制剂(和/或本文所述的其它抑制剂)的组合施用可有助于减弱PDE4B2的不期望的上调,从而代表改进COPD恶化患者中PDE4抑制剂的功效、降低有效剂量并可能减轻耐药性的有潜力的治疗策略。

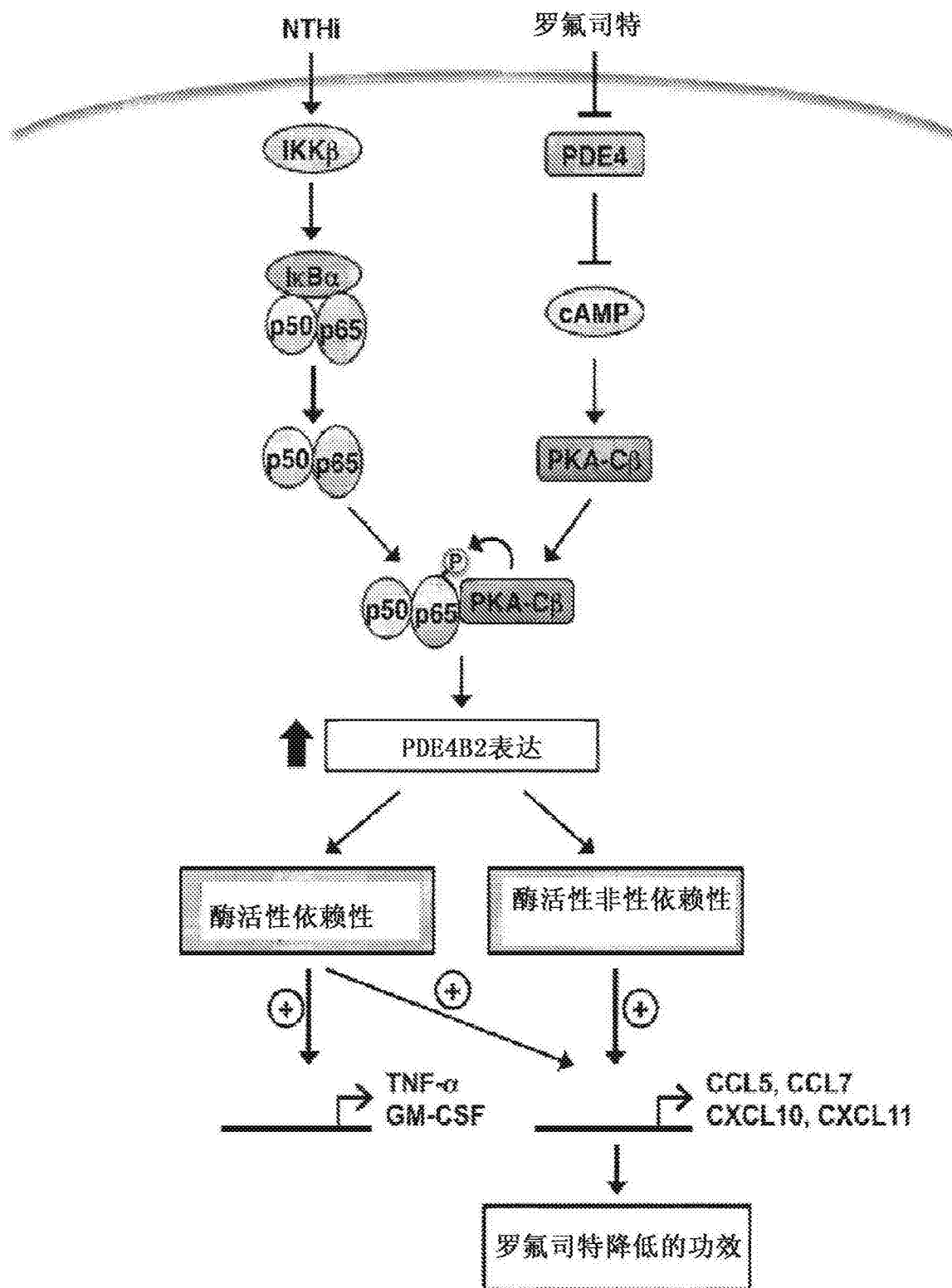


图1

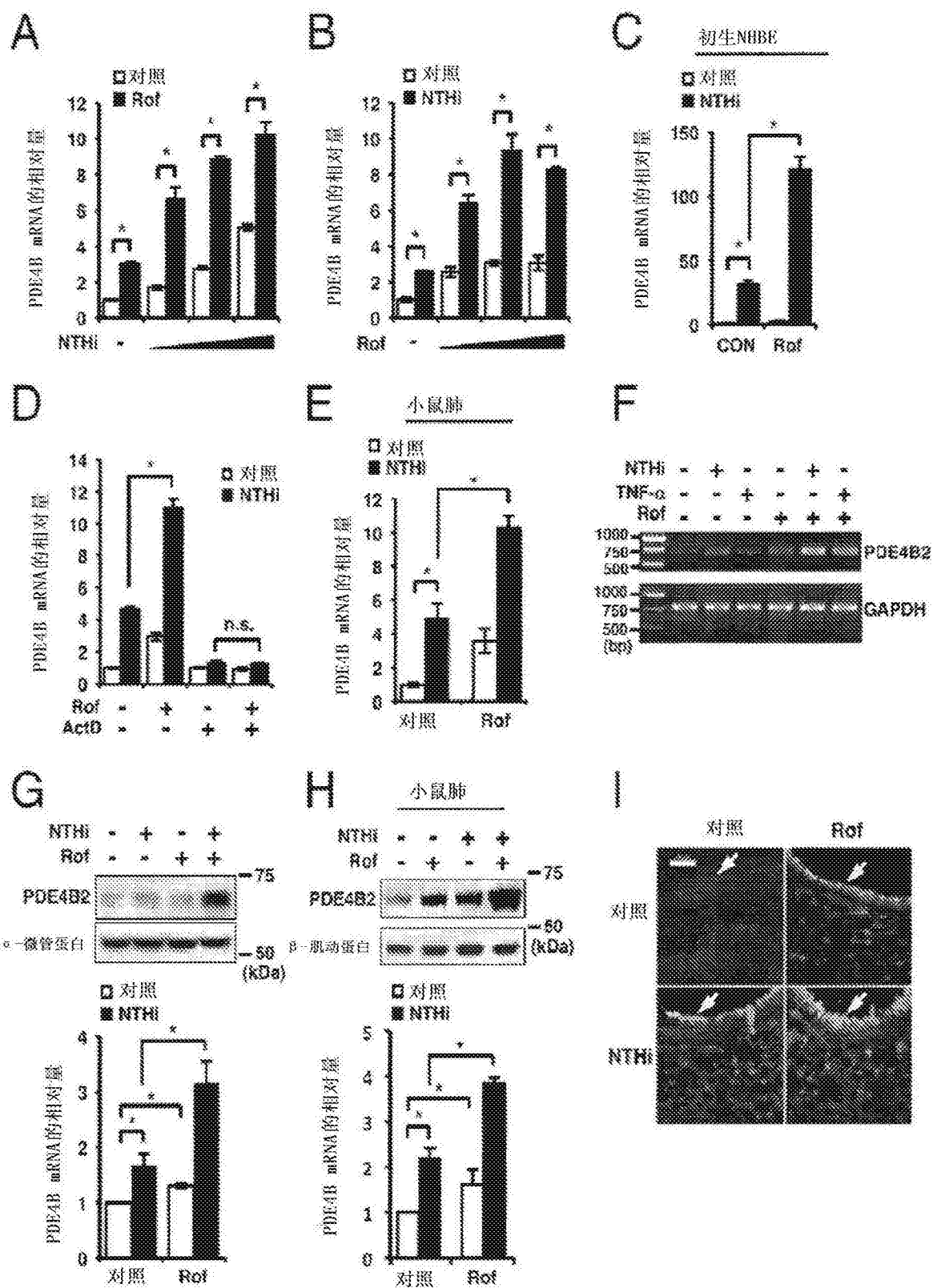


图2A-I

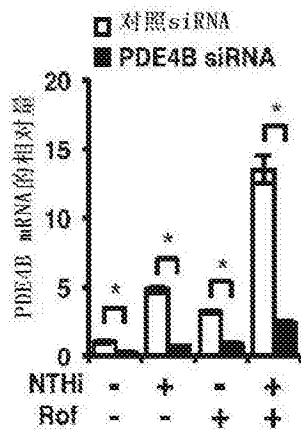


图3

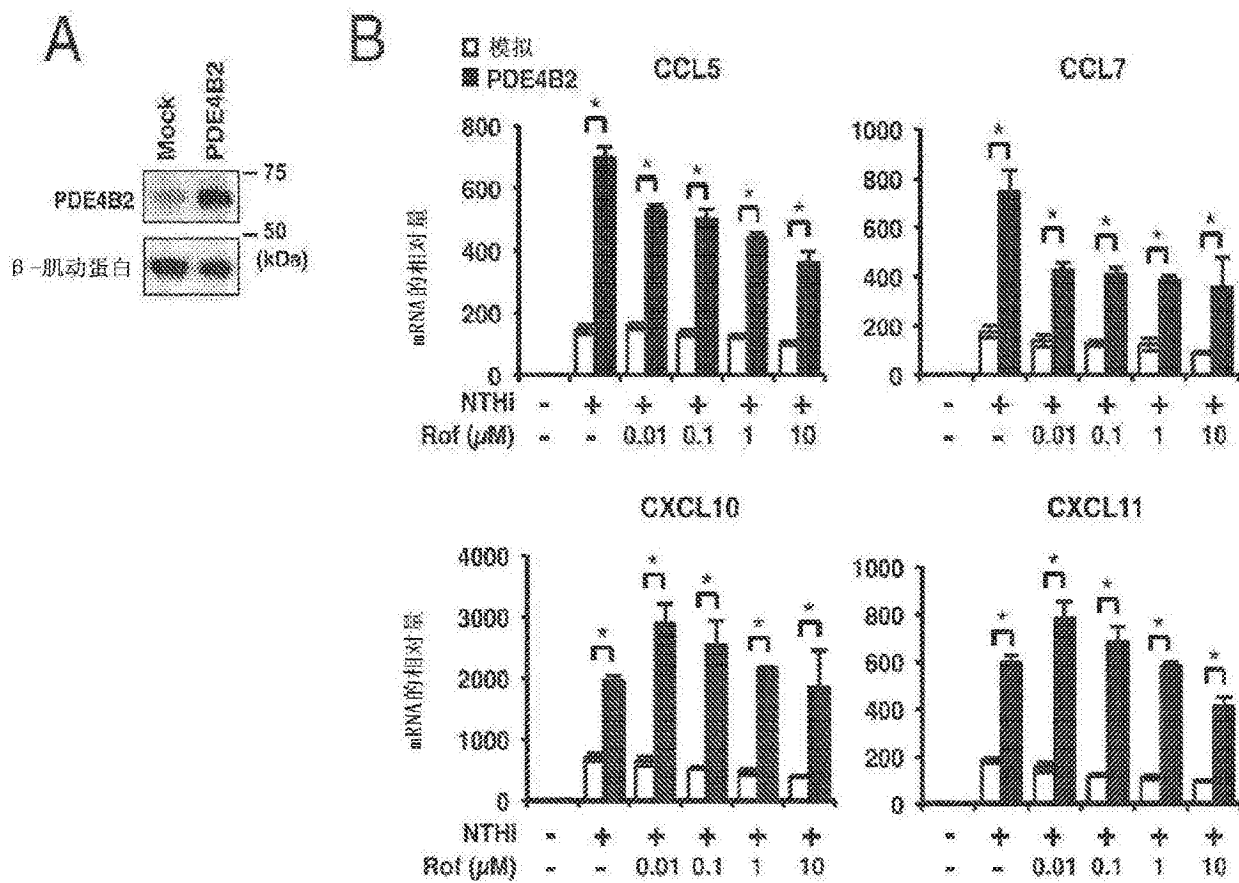


图4A-B

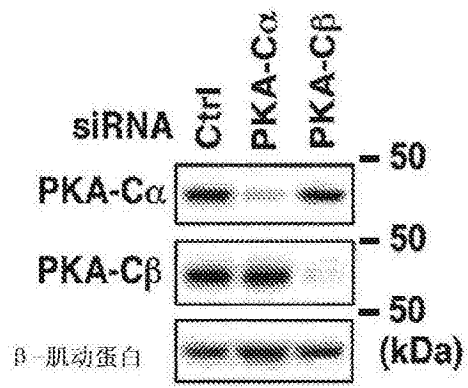


图5

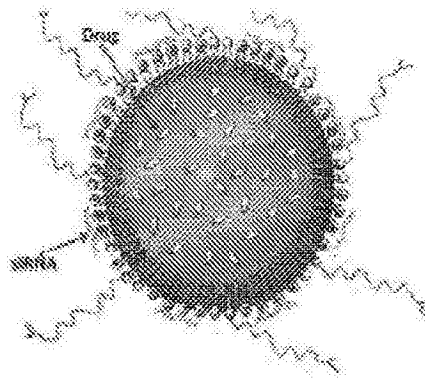


图6

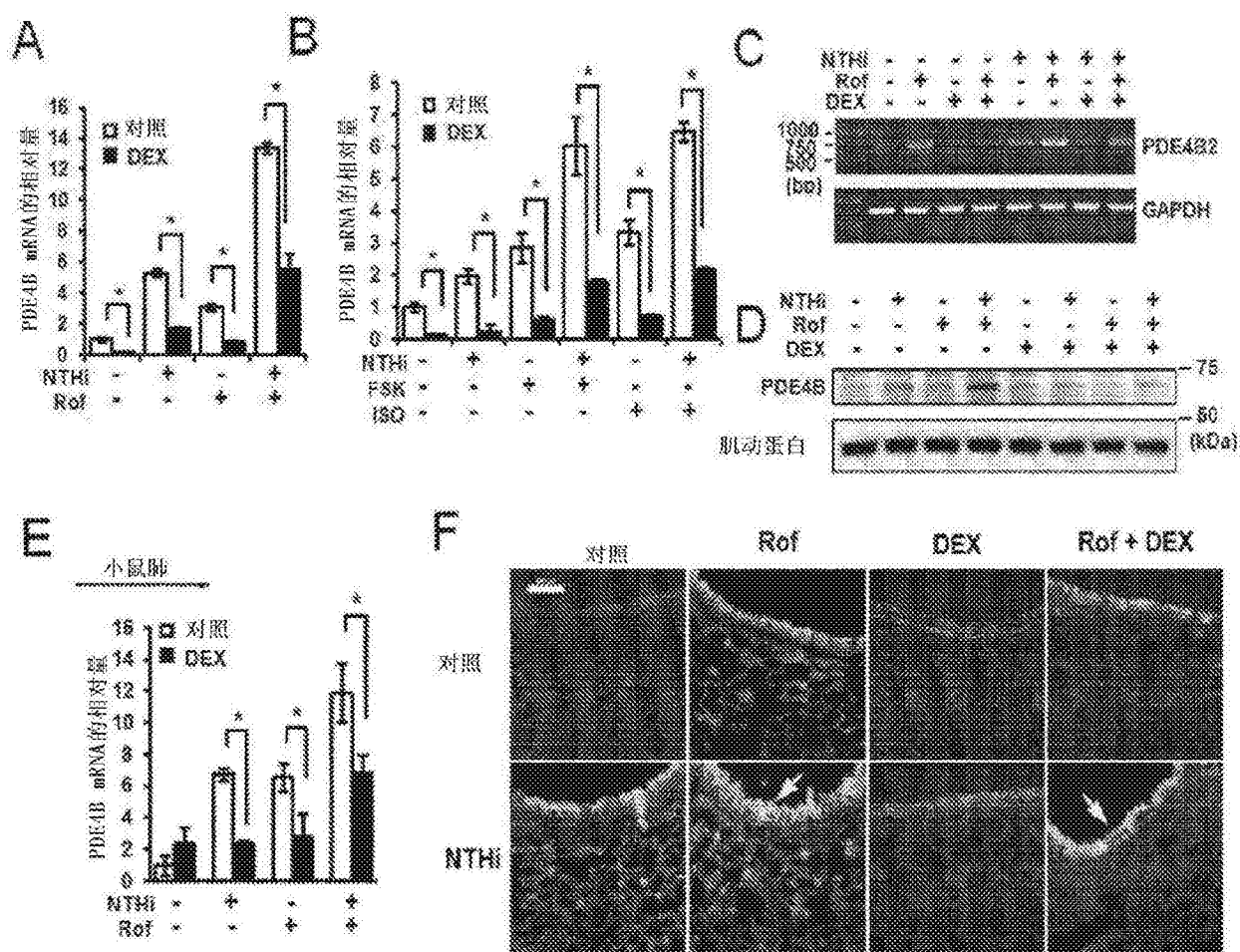


图7A-F

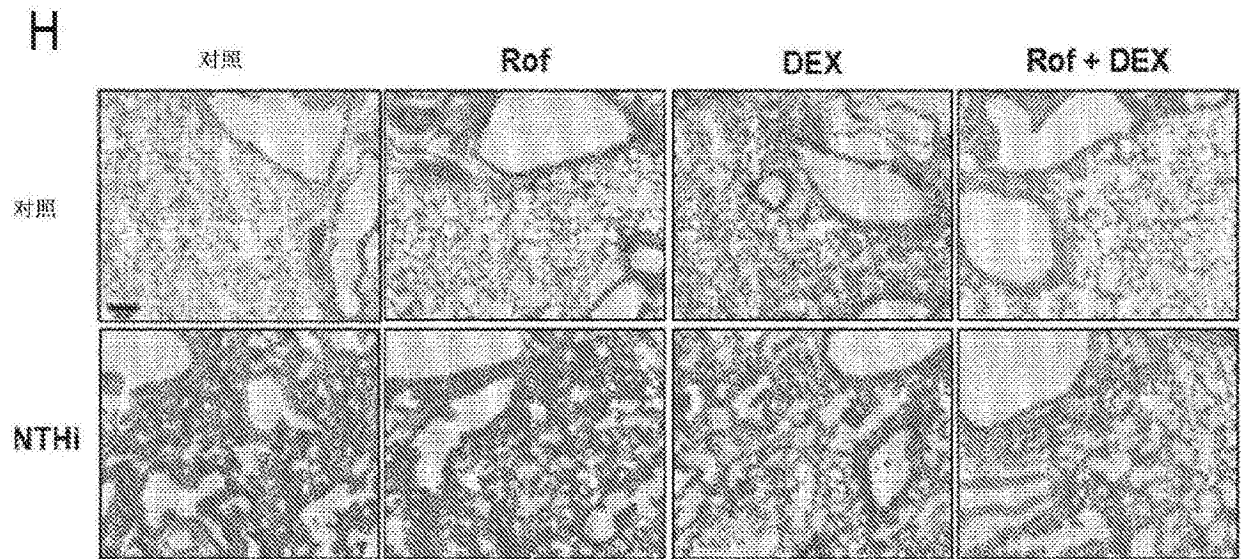
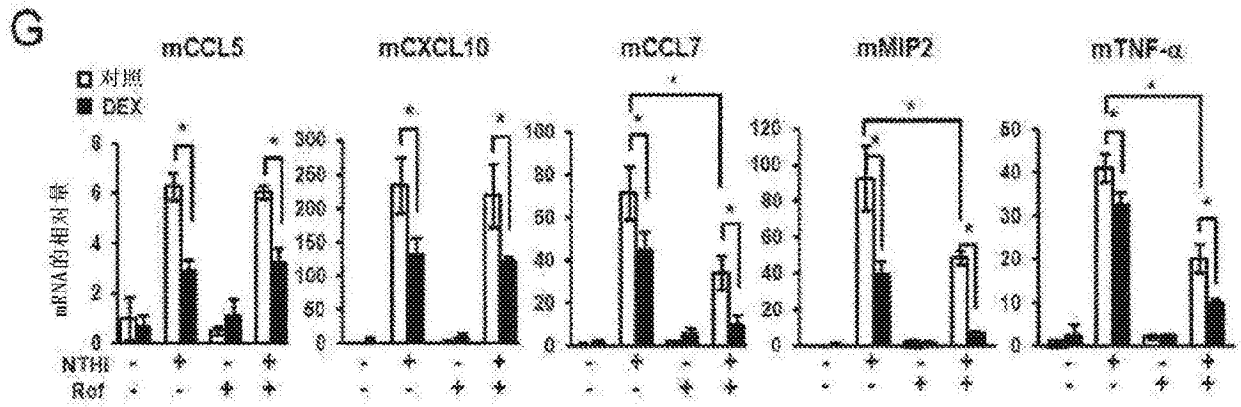


图7G-H

```

2401 tccctgggag agactgacat agacattgca acagaagaca agtccccogt ggatacataa
2461 tccccctctc cctgtggaga tgaacattct atccttgatg agcatgccag ctatgtggtg
2521 gggccagccc accatggggg ccaagacctg cacaggacaa gggccacctg gcctttcagt
2581 tacttgagtt tggagtcaga aagcaagacc aggaagcaca tagcagotca ggaaatccca
2641 cggttgactt gccttgatgg caagcttggc ggagagggct gaagctggtg ctgggggccc
2701 attctgatca agacacatgg cttgaaaatg gaagacacaa aactgagaga tcattctgca
2761 ctaagtttcg ggaacttata ccgacagtg actgaactca ctgactaata acttcattta
2821 tgaatcttct cacttgctcc tttgtctgcc aacctgtgtg ccttttttgt aaaacatttt
2881 catgtcttta aaatgcctgt tgaatacctg gagtttagta tcaacttcta cacagataag
2941 ctttcaaagt tgacaaaact ttttgactct ttctggaaaa gggaaagaaa atagtcttcc
3001 ttctttcttg ggcaatatcc ttcactttac tacagttaact tttgcaaca gacagaaagg
3061 atacacttct aaccacattt tacttcttcc cctgttgtc cagtccaact ccacagtcac
3121 tcttaaaaact tctctctgtt tgcctgacct caacagtact tttaaacttt tgctgtaaac
3181 agaataaact tgaacaaact agggggtaga aaggagcagt ggtgtcgttc accgtgagag
3241 tctgcataga actcagcagt gtgcctgtct gtgtcttgga cctgcccccc cacaggagtt
3301 gctacagtcg ctggccctgc ttcccatcct cctctcttca cccogttagc tgttttcaat
3361 gtaatgctgc cgtccttctc ttgcactgcc ttctggcgta apacctccat tctgttttat
3421 aaccgtgtat ttattactta atgtatataa tgtaatgttt tgtaaagtta taatttatat
3481 atctaacatt gcctgccaat ggtggtgtta aatttgtgta gaaaactctg cctaagagtt
3541 acgaottttt cttgtaaatgt tttgtattgt gtattatata acccaaacgt cacttagtag
3601 agacatatgg ccccttggc agagaggaca ggggtgggct tttgttcaaa gggctctgcc
3661 tttccctgcc tgagttgcta cttctgcaca acccctttat gaaccagttt tggaaacaat
3721 attctcacat tagatactaa atgggtttata ctgagtcctt tacttttgta tagcttgata
3781 ggggcagggg caatgggatg tagtttttac ccaggttcta tccaaatcta tgtgggcatg
3841 agttgggtta taactggatc ctactatcat tgtggctttg gttcaaaaag aaaaactaca
3901 tttgctcaca gatgattctt ctgattcttc tgsatgctcc cgaactactg actttgaaga
3961 ggtagcctcc tgccctgccat taagcaggaa tgtcatgttc cagttcatta caaaagaaaa
4021 caataaaaaca atgtgaattt ttataataaa aaaaaaaaaa aggaattc

```

图8

atcacataccctaagaacccctgggagactaaggcagagagagctcagagaaactcttllggctcctcctgctttagtttaggcacatltatgcagatg  
agcttataagagaccgttccctccgcttctctcagagggaagtcttctggtagatcaccgacaccctacccaggcgggggggttggggggaaacttg  
gcaccagccatcccaggcagagcaccactgtgtatgttctcctcgttggagagagctgggaagggaaggagccagcgttgcataatgaaggagc  
gggggcaccttcagtagcaccggaatcagcgggtggtagcgggtgactctgctatgacagcctgcagccgtccagcctaactacatgcctgtgtgtt  
gttgcagaagaatcttatcaaaaatitagcaatggaaacgttggaggaatitagactgtgtttagaccagctagagaccatacagacctaccggctgt  
cagtgcagatggcttctaacaagttcaaaaagaatgctgaaccgggagctgacacacctctcagagatgagccgatcagggaaccagggtgtctgaata  
catttcaatacittcttagacaagcagaatgatgtggagatcccatctcctaccagaaaagacagggagaaaaagaaaaagcagcagctcatgacc  
cagataagtggaagtgaagaaatlaatgcatagttcaagcctaacaalacaagcaltcacgcttggagtgcaacctgaaaatgaagalcacctggc  
caaggagctggaagaccgaacaaatggggcttaacatcttaatgtggctggatattctacaatagaccttaacatgcatactgtatctatattcc  
aggaaaagagacctccataaagacatcagaatctcatctgacacatttataacctataatgatgactttagaagaccattaccattctgacgtggcatac  
aacagcctgcacgctgtgtatgtagccagctgacccatgttctcttctacaccagcattagacgctgtcttcacagattggagatcctggctgcca  
titttgcagctgccaatcagcgttgcatactctggagctcctaactcagtttctacacacaaatcagaacttgccttgcattatgaatgatgaatctgt  
ttggaaaatcatcacttgcctgtgtgggttcaactgtctgaagaagaacactgtgacatcttcatgaaltccaccaagaagcagcgtcagacactcagg  
aagatgggtatgacatgggtgtagcaactgatatgtctaaacatatgacctgtctggcagacctgaagacaatggtagaagcgaagaaagttaacagt  
tcaggcgttcttctcttagacaactataccgatcgcattcaggctcttccgaacatgggtacactgtgcagacctgagcaaccccaccaagctccttggaa  
tgtatcggcaatggacagaccgcatcatggaggaaattttccagcaggggagacaaagagcgggagaggggaatggaaatagcccaatgtgtgata  
aacacacagccttctgtggaanaatcccagggttgggttctcagacacatgtctcctcattgttggagacatgggcagatttggtagaccctgatctca  
ggacattctcgatacctttagaagataacaggaaacttggtatcagagcatgatacctcaaaagtccctcaccaccactggacgagcagaacagggactgc  
cagggctctgatggagaagtgtcagtgtgaactgactctcgaatgaggaagatctgaaggacctgagaaggaggggagagggacacagctatttcagca  
gcacaaagacgcttgtgtgattgatccagaaaacagagattccctggggagagactgacatagacattgcaacagaagacaagtcctcccggtggatac  
ataatccccctctccctgtggagatgaacattctatccttgatgagcatgccagctatgtgttagggccagcccacatgggggccaagacctgcaca  
ggacaagggccacctggccttfcagtiacttgagtttggagtgacagaaagcaagaccagggaagcaaalagcagctcaggaaalcccacgggtgacttg  
ccttgatggcaagccttgggtggagagggctggaagctgttgcctggggggcgattctgatacagacacatggcttgaanaatggagacacaaaactgaga  
gatcattctgcactaagtttccgggaacttaccctgacagtgactgaactcactgactaataacttattatgaatcttctacattgtcccttgtctgcca  
cctgtgtgcttcttctgtaaaaactttcatgtctttaaataatgctgttgaataacctggagtttagtataacttctacacagataagctttcaaaagtgcacaa  
ctttttgactcttctggaaaaagggaagaaatagcttctcttcttcttggcaatacttcaacttaactacagtiacttttgcacacagacagaaaggt  
aaccttetaaceaaatttacttcttccctgttgcacgtccaaactccacagtcactttaaacttctctctgttggctgcctccacacagtaactttaact  
tttctgtlaaacagaataaaatgaacaaatlaggggttagaaaggagcagtggtgtcgttaccgtgagagcttgcatalagaactcagcagtggtgccc  
tgtgtgtcttggaccttgcctcccccacaggagttgtacagctccctggcctgttccctacctctctcttcccccgttaggctgtttcaatgtaatgtgt  
ccgtccttctcttgcactgcccttctgcgctaacacctcattctctttataacccgtgtatttacttaattgtatataatgtaatgtttgttaagttattaattat  
atatctaacattgcttgcacatgtgtgttgaatgtgttagaaaactctgctaagagttacgacttttcttgaatgtttgtattgtattatataaccca  
aacgtcacttagtagagacatatggccccccttggcagagagagcaggggtgggttcttcttcaaaaggggttgccttcccttgcctgagttgctacttct  
gcacaaccccttatagaaccagtttggaaacaataattctcacattagatactaaatgggttatactgagcttttactttgtatagcttgataggggcaggg  
ggcaatgggatgtgttttaccagggttctatccaaatctatgtgggcatgagttgggttataactggatctctacttacttggcttgggttcaaaaagg  
aacactacattgtctacagatgattctctgaatgcctccgaacttgaacttgaagaggtagcctcctgccttccatlaagcaggaatgtcatgttcc  
agttcattacaaaagaaaacaataaaacaatgtgaattttataataaaatgtgaactgatgtagcaaatfacgcaaatgtgaagcctctctgalaacact  
tgttaggctcttactgtatgtcagttcagtttgaanaatgtttcatgttctcaggtcagcatgtgtactcagtaattacagaaaaatggcacaatgtgtcag  
accaatgtatgtctatgaacactgcattgttccagggtggacatttatcattttcaaatgttctcacaatgtatgtatagattattatataattgtgtcaaat  
gcattctaaagagacttttataggttgaataaaagaaaagcagattagattaaaaaa

图9

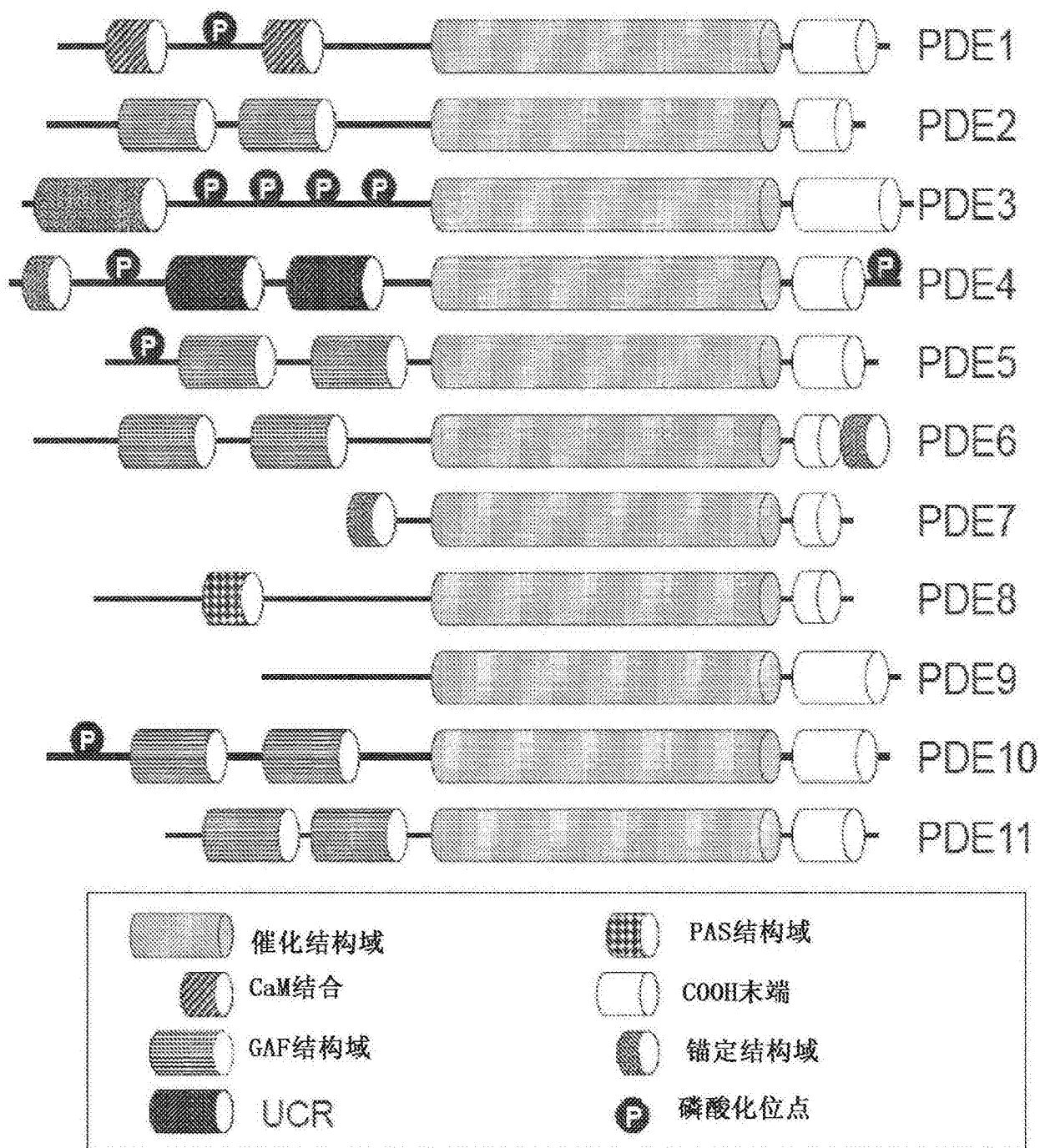


图10A

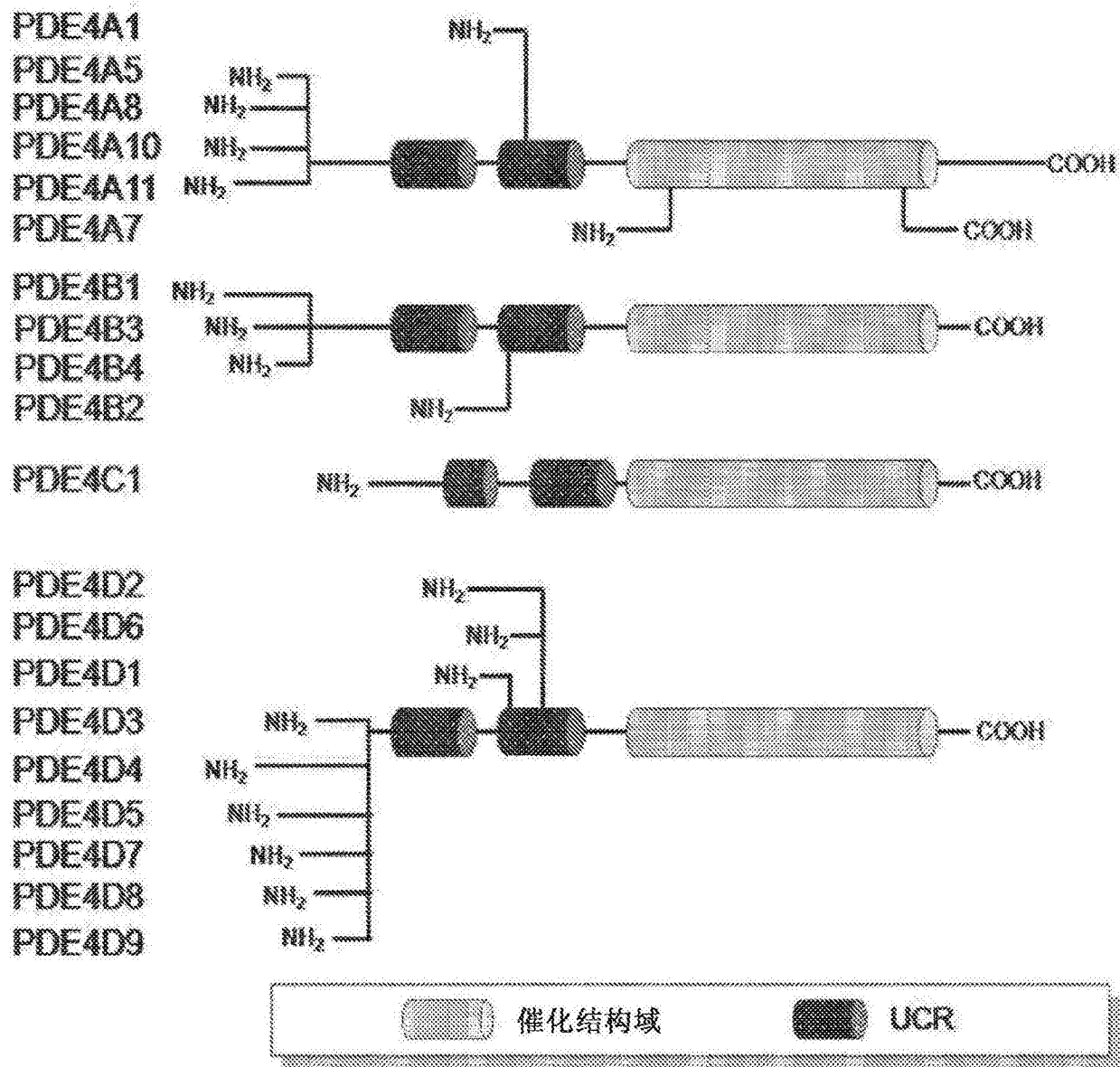


图10B