

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 38/18 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480038178.X

[43] 公开日 2007 年 1 月 17 日

[11] 公开号 CN 1897965A

[22] 申请日 2004.12.22

[21] 申请号 200480038178.X

[30] 优先权

[32] 2003.12.22 [33] US [31] 60/530,893

[86] 国际申请 PCT/US2004/042993 2004.12.22

[87] 国际公布 WO2005/062864 英 2005.7.14

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.20

[71] 申请人 雷金纳克斯生物制药公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 阿兰·L·戈尔茨坦

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司  
代理人 吴小瑛

权利要求书 3 页 说明书 7 页

## [54] 发明名称

反应性的化学剂、生物剂或毒素引起的生物反应或免疫反应的治疗方法或预防方法

## [57] 摘要

一种治疗、预防、抑制或降低由主体组织产生的针对反应性化学剂、生物剂或毒素的生物或免疫反应的治疗方法，其包括向需要治疗的主体给予有效量的组合物，该组合物包括反应抑制剂，该反应抑制剂包括 LKKTET 氨基酸序列、其保守变体或刺激组织产生 LKKTET 多肽或其保守变体的试剂，从而抑制所述反应。

1. 一种治疗、预防、抑制或降低由主体组织产生的针对反应性化学剂、生物剂或毒素的生物反应或免疫反应的治疗方法，其包括向需要治疗的主体给予有效量的组合物，该组合物包括反应抑制剂，该反应抑制剂包括氨基酸序列 LKKTET、其保守变体或刺激所述组织产生 LKKTET 肽或其保守变体的试剂，从而抑制这种反应。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述的生物反应或免疫反应包括红斑、硬化、肿胀、瘙痒、皮疹、水泡、发炎、红疹或其组合。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述的反应抑制剂具有下调炎症因子、趋化因子或其组合的能力，导致在所述组织中生物反应或免疫反应的抑制。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述的反应抑制剂是胸腺素  $\beta 4$ (T $\beta 4$ )。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述的反应抑制剂不是 T $\beta 4$ 。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述的试剂包括氨基酸序列 KLKKTET、氨基酸序列 LKKTETQ 和 N-端变异的 T $\beta 4$ 、C-端变异的 T $\beta 4$ 、T $\beta 4$  的同型物、氧化的 T $\beta 4$  或 T $\beta 4$  亚矾。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述的反应抑制剂直接地或间接地抑制所述反应。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述的反应抑制剂间接地抑制所述的反应，所述的反应抑制剂在所述的主体组织中刺激 LKKTET 肽的产生。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述的反应抑制剂施用于所述主体的剂量范围为约 1-25 毫克。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述的反应抑制剂是直接地注射到所述的组织内，或通过静脉内、腹膜内、肌内、皮下、吸入、经真皮或口服的方式施用于所述的主体。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述组合物是系统给药。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述组合物是局部地执行。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述组合物是凝胶剂、乳剂、帖剂、洗液、喷雾剂、悬液、分散剂、药膏、水凝胶剂、或油膏的剂型。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述的试剂是重组的或合成的肽。

15. 权利要求 1 的方法，其中所述的试剂是抗体。

16. 权利要求 7 的方法，其中所述的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

17. 一种治疗、预防、抑制或降低由主体组织产生的针对反应性化学剂、生物剂或毒素的生物反应或免疫反应的治疗方法，其包括向需要治疗的主体给予有效量的组合物，该组合物包括能刺激生物反应或免疫反应的抑制性多肽的生成的刺激剂，所述多肽包括具有生物反应或免疫反应抑制活性的氨基酸序列 LKKTET 或其保守变体。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述的多肽是胸腺素  $\beta 4$ 。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述的试剂是胸腺素  $\beta 4$  的拮抗剂。

20. 权利要求 1 的方法，其中所述的组织是表面组织，其选自所述主体的皮肤或粘膜、肺组织或胃肠组织。

21. 权利要求 17 的方法，其中所述的组织包括表面组织，其选自所述主体的皮肤或粘膜、肺组织或胃肠组织。

22. 一种筛选生物反应或免疫反应抑制剂的方法，该方法包括将呈现出生物反应或免疫反应的组织与候选化合物相接触；并测定所述组织中生物反应或免疫反应的降低水平，其中与缺乏候选化合物的相应组织相比，所述组织的水平的降低表明所述化合物具有治疗、预防、抑制或降低生物反应或免疫反应的能力。

23. 一种筛选生物反应或免疫反应抑制剂的方法，该方法包括将组织与候选化合物相接触；将组织与在不存在所述候选化合物的情况下能诱导生物反应或免疫反应的物质相接触；以及测定所述组织中生物反应或免疫反应的降低水平，其中与缺乏候选化合物的相应组织相比，所述组织水平的降低表明所述化合物具有治疗、预防、抑制或降低生物反应或免疫反应的能力。

24. 一种筛选能够刺激组织生成生物反应或免疫反应抑制剂的刺激剂的方法，该方法包括将呈现生物反应和免疫反应的组织与候选化合物相接触；以及测定所述组织中生物反应或免疫反应抑制剂的活性，其中，与缺乏候选化合物的相应组织中反应抑制剂的活性水平相比，所述组织中反应抑制剂活性出现提高表明所述化合物能够诱导所述刺激剂。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述的反应抑制剂是 LKKTET 肽。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述的 LKKTET 肽是胸腺素  $\beta 4$ 。

27. 一种筛选能够刺激组织生成生物反应或免疫反应抑制剂的刺激剂的

方法，该方法包括将组织与候选化合物相接触；将组织与在所述组织中无候选化合物的情况下能诱导生物反应或免疫反应的物质相接触；以及测定所述组织中所述反应抑制剂的活性，与缺乏所述候选化合物的相应组织中所述活性水平相比，在所述组织中所述反应抑制剂的活性出现提高，表明所述候选化合物能够刺激所述组织产生反应抑制剂。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述的反应抑制剂是 LKKTET 肽。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述的 LKKTET 肽是胸腺素  $\beta 4$ 。

## 反应性的化学剂、生物剂或毒素引起的生物反应或免疫反应的治疗方法或预防方法

### 相关申请的交叉参考

本申请要求 2003 年 12 月 22 日提交的美国临时申请 60/530,893 的优先权。

### 发明背景

#### 发明领域

本发明涉及针对反应性的化学剂或生物剂引起的生物或免疫反应的治疗或预防领域。

#### 背景技术

由化学的或生物的皮肤致敏剂、环境毒素或刺激物导致的接触性皮炎和其它过敏反应可以引起人类皮肤发生红斑、肿胀、硬化、皮疹、水泡、灼伤、感染或湿疹等变化。

虽然针对这类疾病有很多的治疗方法，但是对反应性化学剂、生物剂或毒素的生理和免疫反应引起的红斑、肿胀、硬化、皮疹、瘙痒、水泡和/或发炎等的治疗或预防方法和组合物还需要改进。

#### 发明概述

本发明的一个方案在于提供一种治疗、预防、抑制或降低主体组织针对反应性的化学剂、生物剂或毒素引起的生物或免疫反应的治疗方法，其包括向需要治疗的主体给予有效量的组合物，该组合物包括反应抑制剂，该反应抑制剂包括 LKKTET 氨基酸序列、其保守变体或刺激组织产生 LKKTET 多肽或其保守变体的试剂，从而抑制这种反应。

#### 发明详述

未被任何特定理论所发现, 诸如胸腺素  $\beta$  4(T $\beta$ 4 或 TB4)的肌动蛋白-静息多肽 (sequestering peptide) 和其它包括含有 LKKTET 氨基酸序列或其保守变体的肌动蛋白-静息多肽或肽片段的反应抑制剂, 对暴露于反应性的化学剂、生物剂或毒素引起的生物或免疫反应有促进逆转或预防的作用。本发明适用的病症为, 但不仅限于为: 由过敏反应、化学物质和毒素引起的反应、接触性皮炎、和植物引起的反应, 所述植物包括但不限于: 有毒常春藤、毒橡树和毒漆树; 昆虫的叮咬, 所述昆虫包括但不限于: 蚊子、火蚁、恙螨、扁虱、蜜蜂、蜘蛛、跳蚤和苍蝇; 爬行动物的叮咬, 特别是有毒爬行动物、两栖动物和其它动物; 皮肤与各种有毒动物接触, 如有毒青蛙等引起的皮肤或粘膜等表面组织的生物或免疫反应、皮肤病和其它疾病; 以及肺组织系统和胃肠系统的过敏反应。本发明也可用于皮肤致敏剂、牛皮癣、遗传性过敏症的皮炎和湿疹以及其它病症如鳞片、斑块或大泡和小泡等。本发明还可用于职业性过敏接触性皮炎, 但不仅限于如镍皮炎。

胸腺素 4 是首先被鉴定为在体外有上调上皮细胞迁移和分化的蛋白质。胸腺素 4 最初是从胸腺中分离得到, 是有 43 个氨基酸, 4.9kDa 的泛素多肽, 在很多组织中存在。有几种功能归于这种蛋白质, 包括在上皮细胞分化和迁移、T 细胞分化、肌动蛋白静息、脉管形成和创伤愈合中的作用。

本发明的一个实施方案涉及一种治疗、预防、抑制或降低由主体组织产生的针对反应性化学剂、生物剂或毒素的生物或免疫反应的治疗方法, 其包括向需要治疗的主体给予有效量的组合物, 该组合物包括生物或免疫反应的反应抑制剂, 该反应抑制剂可以是包括具有生物或免疫反应抑制活性的 LKKTET 氨基酸序列或其保守变体的多肽, 优选为胸腺素  $\beta$ 4 和/或 T $\beta$ 4 的同型物、类似物或衍生物, 其包括 KLKKTET、LKKTETQ、氧化的 T $\beta$ 4、T $\beta$ 4 亚砷、N-端变异的 T $\beta$ 4、C-端变异的 T $\beta$ 4 和 T $\beta$ 4 的拮抗剂。

本申请可使用的组合物包括下述试剂, 如胸腺素  $\beta$ 4(T $\beta$ 4)和/或 T $\beta$ 4 同型物、类似物或衍生物, 包括氧化的 T $\beta$ 4、T $\beta$ 4 亚砷、N-端变异的 T $\beta$ 4、C-端变异的 T $\beta$ 4 和 T $\beta$ 4 的拮抗剂, 具有生物反应或免疫反应抑制活性的包括或基本上由 LKKTET 氨基酸序列或其保守变体构成的多肽或肽片段。国际申请号 PCT/US99/17282, 在此被参考并入, 其公开了可用于本发明的 T $\beta$ 4 同型物, 具有对生物反应或免疫反应抑制活性的氨基酸序列 LKKTET 及其保守变体。

国际申请号 PCT/GB99/00833(WO99/49883), 在此被参考引用, 其公开了可用于本发明的氧化的胸腺素  $\beta 4$ 。虽然本发明的以下内容主要涉及  $T\beta 4$  和  $T\beta 4$  同型物, 但应该理解, 以下内容同样适用于氨基酸序列 LKKTET, 具有生物反应或免疫反应抑制活性的包括或基本上由 LKKTET、其保守变体组成的肽和片段、和/或  $T\beta 4$  同型物、类似物或衍生物, 其包括氧化的  $T\beta 4$ 、 $T\beta 4$  亚砷、N-端变异的  $T\beta 4$ 、C-端变异的  $T\beta 4$  和  $T\beta 4$  的拮抗剂。

在一个具体实施方案中, 本发明提供了一种治疗、预防、抑制或降低由主体组织产生的针对反应性化学剂、生物剂或毒素引起的生物反应或免疫反应的治疗方法, 通过使组织接触生物反应或免疫反应抑制有效量的包括本文所述的反应抑制剂的组合物。在非限定性的实施例, 所述组织可选自所述主体的表面组织, 如皮肤或粘膜、肺组织或胃肠组织。所述接触可以是外用 (topical) 或系统使用。外用的例子包括如用含有本文所述的反应抑制剂的洗液、药膏、凝胶剂、乳剂、贴剂、喷雾剂、悬液、分散剂、水凝胶剂、油膏或油接触皮肤。系统使用的例子包括, 如注射用水, 静脉内、腹膜内、肌内注射存在于可药用载体中的包括本文所述反应抑制剂的组合物。

本文所述的用于本发明的反应抑制剂可以任何生物反应或免疫反应抑制的适宜剂量施用。例如, 在此描述的反应抑制剂的施用剂量范围可为约 0.001-1,000,000 毫克, 优选为约 0.1-5,000 毫克, 更优选为约 1-25 毫克。

本发明的组合物可以每日、隔日等方式施用, 每日施用一次或多次, 如每日施用 2、3、4 或更多次。

许多  $T\beta 4$  同型物有大约 70%或大约 75%, 或大约 80%或更高的已知  $T\beta 4$  氨基酸序列的同源性。这些同型物包括, 例如,  $T\beta 4^{ala}$ ,  $T\beta 9$ ,  $T\beta 10$ ,  $T\beta 11$ ,  $T\beta 12$ ,  $T\beta 13$ ,  $T\beta 14$  和  $T\beta 15$ 。与  $T\beta 4$  相似,  $T\beta 10$  和  $T\beta 15$  同型物也显示了对静息肌动蛋白的作用。 $T\beta 4$ 、 $T\beta 10$  和  $T\beta 15$ , 以及其它同型物具有相同的 LKKTET 氨基酸序列, 该序列与调节肌动蛋白的静息或结合有关。尽管不希望局限于某些特定的理论, 但发现  $T\beta 4$  同型物的活性部分归因于使肌动蛋白发生聚合的能力。例如,  $T\beta 4$  可以调节皮肤中肌动蛋白的聚合(例如  $\beta$ -胸腺素通过静息游离的 G-肌动蛋白使 F-肌动蛋白解聚)。 $T\beta 4$  调节肌动蛋白聚合的能力可能全部或部分源于通过 LKKTET 序列结合或静息肌动蛋白的能力。因此和  $T\beta 4$  一样, 可以结合或静息肌动蛋白或调节肌动蛋白聚合的其它蛋白质, 包括含

LKKTET 氨基酸序列的 T $\beta$ 4 同型物，单独地或与 TB4 联用，如本文所述，很可能都是有效的。

因此，可明确地预期，已知的 TB4 同型物如 T $\beta$ 4<sup>ala</sup>, T $\beta$ 9, T $\beta$ 10, T $\beta$ 11, T $\beta$ 12, T $\beta$ 13, T $\beta$ 14 和 T $\beta$ 15，以及至今未鉴定的 T $\beta$ 4 同型物，都可用于本发明的方法中。因此，T $\beta$ 4 同型物可用于本发明的方法中，该方法包括施用于主体的方法。本发明因此进一步提供了药物组合物，该组合物包括 T $\beta$ 4 和 T $\beta$ 4 同型物，如 T $\beta$ 4<sup>ala</sup>, T $\beta$ 9, T $\beta$ 10, T $\beta$ 11, T $\beta$ 12, T $\beta$ 13, T $\beta$ 14 和 T $\beta$ 15，以及药学上可接受的载体。

另外，有肌动蛋白静息或结合能力的、或可以动员肌动蛋白或调节肌动蛋白聚合的，如在合适的静息、结合、动员或聚合检测中所展示、或如鉴定出含有调节肌动蛋白结合的氨基酸序列如 LKKTET 的其它反应抑制剂或蛋白质都可用于本发明的方法中。这样的蛋白质包括，例如凝溶胶蛋白 (gelsolin)、维生素 D 结合蛋白 (DBP)、profilin、cofilin、depactin、DnaseI、villin、fragmin、severin、加帽蛋白， $\beta$ -肌动蛋白和 acumentin。这些方法包括那些在主体中应用的方法。本发明进一步提供了药物组合物，其包括如本文所述的凝溶胶蛋白、维生素 D 结合蛋白 (DBP)、profilin、cofilin、depactin、DnaseI、villin、fragmin、severin、加帽蛋白、 $\beta$ -肌动蛋白和 acumentin。因此本发明包括含有氨基酸序列 LKKTET 及其保守变体的 EB-抑制性多肽的应用。

本文所用的术语"保守变体"或其语法表述上的变化形式是指氨基酸残基被其它生物学相似的残基所替代。保守变体的例子包括，用疏水性残基，如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸替代其它氨基酸，用极性残基替代其它氨基酸，如用精氨酸代替赖氨酸，用谷氨酸替代天冬氨酸或谷氨酰胺替代天冬酰胺等。

T $\beta$ 4 处于很多类型的组织和细胞中，因此能刺激生成 LKKTET 肽的试剂，如 T $\beta$ 4 或在此描述的其它反应抑制剂都可被加入或组成组合物以使组织和/或细胞产生反应抑制剂。这样的刺激剂包括生长因子家族成员，如胰岛素样生长因子 (IGF-1)、血小板源生长因子 (PDGF)、上皮生长因子 (EGF)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、碱性纤维生长因子 (bFGF)、胸腺素  $\alpha$ 1 (T $\alpha$ 1) 和血管上皮生长因子 (VEGF)。优选地，刺激剂是转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 或 TGF- $\beta$  超家族的其它成员。本发明的组合物可以减少反应性化学剂或生物剂的生物反应或免疫反



应的效应，该效果是通过细胞外基质的合成、细胞迁移和脉管的形成等连接组织的生长而实现。

根据本发明的一个具体实施方案，主体经过刺激剂的治疗，该刺激剂可以刺激主体体内生成本文所述的生物反应或免疫反应抑制剂。

另外，有助于减少反应性化学剂、生物剂或毒素引起的生物反应或免疫反应的其它试剂，可与本文所述的反应抑制剂一同加到组合物中。所述的其它试剂包括血管生成剂、生长因子、指导细胞分化的试剂、促进细胞迁移的试剂、和刺激组织内细胞外基质生成的试剂。例如，但不局限于此，单独加入在此描述的反应抑制剂，或其与有效剂量的以下试剂的一种或多种一同加入：VEGF、KGF、FGF、PDGF、TGF $\beta$ 、IGF-1、IGF-2、IL-1、前胸腺素  $\alpha$  和/或胸腺素  $\alpha 1$ 。

本发明还包括一种药物组合物，其包括药学可接受载体中的本文所述的治疗有效量的反应抑制剂。所述载体包括本文所列的载体。

用于治疗、预防、抑制或降低针对反应性化学剂、生物剂或毒素引起的生物反应或免疫反应而达到治疗目的的实际剂量或试剂、配方或组合物依赖于很多因素，这些因素包括主体的身体大小和健康状况。但是，本领域的技术人员可以根据如参考引用于此的 PCT/US99/17282, *supra* 中公布的确定临床剂量的方法和技术的教导来确定适宜的使用剂量。

适宜配方可包括本文所述的反应抑制剂，其浓度为约 0.001wt%-50wt%，优选为约 0.01wt%-0.1wt%，最优选为约 0.05wt%。

本发明所述的治疗方法包括本发明所述的反应抑制剂的各种给药途径或递送途径，其包括向主体施用的任何常规给药技术(例如，但不限于，外用给药、局部注射、吸入或系统给药)。使用本发明所述的反应抑制剂的方法和包含该反应抑制剂的组合物可以通过与药学可接受的无毒赋形剂或载体混合而配制成药物组合物。

本发明包括与本文所述的反应抑制剂相互作用的抗体的应用。抗体基本上由混合的针对不同表位的单克隆抗体组成，也提供了独特的单克隆抗体制备物。单克隆抗体是由包括蛋白质片段的抗原所制得，其制备方法是如同 PCT/US99/17282, *supra* 中所公开的熟知方法。本发明中的术语“抗体”是指包括单克隆抗体和多克隆抗体。

在另一具体实施方案中,本发明提供了给予主体有效剂量的调节基因表达的刺激剂从而对主体进行治疗的方法。术语"调节"是指当在此描述的反应抑制剂过度表达时,抑制或压制这种表达;当反应抑制剂进行低表达时,则诱导进行表达。术语"有效量"是指刺激剂的量可以有效地调节反应抑制剂的基因表达,导致反应性化学剂、生物剂或毒素引起的生物反应或免疫反应的症状减少。在此描述的调节反应抑制剂基因表达的刺激剂可以是如多聚核苷酸。多聚核苷酸可以是反义链、三联剂(triplex agent)或核糖酶。例如,针对在此描述的反应抑制剂的结构基因部位或启动子部位的反义链。调节在此描述的反应抑制剂基因表达的刺激剂也可以是小干涉 RNAs (siRNAs)。

在另一具体实施方案中,本发明提供了一种利用调节在此描述的反应抑制剂活性的化合物的方法。影响在此描述的反应抑制剂活性的化合物(例如拮抗剂和激动剂)包括肽、拟肽、多肽、化学化合物、矿物质,如锌、和生物剂。

本发明进一步涉及一种筛选在此描述的反应抑制剂的方法,其包括将呈现出生物反应、或免疫反应的组织与候选化合物相接触;并在所述组织中测定生物反应或免疫反应的降低水平,其中与缺乏候选化合物的相应组织相比较的所述组织水平的降低,表明了所述化合物具有治疗、预防、抑制或降低生物反应或免疫反应的能力。

本发明进一步涉及一种筛选在此描述的反应抑制剂的方法,其包括将组织与候选化合物相接触;将组织与在不存在所述候选化合物的情况下能诱导生物反应或免疫反应的物质相接触;和测定所述组织中生物反应或免疫反应的降低水平,其中与缺乏候选化合物的相应组织相比较的所述组织水平的降低,表明了所述化合物具有治疗、预防、抑制或降低生物反应或免疫反应的能力。

本发明进一步涉及一种筛选在此描述的刺激剂的方法,该刺激剂能够刺激组织中反应抑制剂的产生,该方法包括将呈现生物反应和免疫反应的组织与候选化合物相接触;以及测定所述组织中 T $\beta$ 4 或在此描述的其它反应抑制剂的活性,其中,与缺乏候选化合物的相应组织中反应抑制剂的活性水平相比较,在所述组织中在此描述的 T $\beta$ 4 或其它反应抑制剂的活性的提高表明了所述化合物能够诱导所述刺激剂。

本发明进一步涉及一种筛选在此描述的刺激剂的方法,该刺激剂能够刺激组织中反应抑制剂的产生,该方法包括将组织与候选化合物相接触,将组织与

在所述组织中无候选化合物的情况下能诱导生物或免疫反应的物质相接触；测定所述组织中在此描述的反应抑制剂的活性，与缺乏所述候选化合物的相应组织中所述活性水平相比较，在所述组织中在此描述的反应抑制剂的活性的提高表明了所述候选化合物能够刺激所述组织中产生反应抑制剂。

### 实施例

对暴露于毒常春藤的有可见红斑、硬化、肿胀和红疹的一块皮肤表面，用包含 2wt% 的 T $\beta$ 4 的药物进行外用给药治疗，而对暴露于毒常春藤的另一块有可见红斑、硬化、肿胀和红疹的皮肤表面，不做治疗。一天后，治疗区域的硬化和红疹与未治疗区域相比明显减少，治疗区域内的瘙痒与未治疗区域相比明显减轻。