



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107106650 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580062363.0

(22)申请日 2015.11.17

(30)优先权数据

62/080784 2014.11.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/061118 2015.11.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/081475 EN 2016.05.26

(71)申请人 莫伊莱麦屈克斯公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 C.兰德 C.布罗菲

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 刘辛 罗文锋

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

A61P 9/14(2006.01)

A61K 31/7072(2006.01)

权利要求书3页 说明书120页

序列表9页 附图21页

(54)发明名称

用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的组合和方法

(57)摘要

描述的发明提供了用于减小选自肝、肾或血管纤维化的对象的组织中的纤维化的进展的组合和方法,纤维化的进展表征为组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积。方法包括施用治疗量的药物组合物,其包含具有氨基酸序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等价物,和药学上可接受的载体,其中治疗量的多肽对减小纤维化的进展、治疗组织的重构、或其组合是有效的。

1. 用于减小肝组织、肾组织或血管组织中的纤维化的进展的方法,其包括:

向有需要的对象施用药物组合物,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的多肽或由第一多肽和第二多肽之间的融合制成的其功能等价物,和其药学上可接受的载体,所述第一多肽是选自氨基酸序列 WLRRIKAWLRRRIKA (SEQ ID NO:12)、WLRRRIKA (SEQ ID NO:13)、YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)、WLRRIKAWLRRRI (SEQ ID NO:15)、FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)、KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17) 和HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18) 的多肽的细胞穿透肽(CPP),所述第二多肽是选自氨基酸序列 KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)、KALARQLGVA (SEQ ID NO:9) 和KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10) 的多肽的治疗结构域(TD),

所述纤维化的进展表征为在肝组织、肾组织或血管组织中产生重构的异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积中的一种或多种,

其中所述治疗量的多肽对减小所述纤维化的进展、治疗所述组织的重构、或其组合是有效的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组织纤维化进一步表征为所述组织中的炎症。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述炎症是急性或慢性炎症。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述炎症被选自肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)、和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的至少一种细胞因子介导。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组织中所述异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积表征为与促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 在正常健康对照组织的组织中的活性相比,促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 在所述组织中的异常活性。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述施用步骤口服地、在气管内、胃肠外、静脉内、或腹腔内发生。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述药物组合物进一步包括至少一种另外的治疗剂。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述另外的治疗剂是抗感染剂。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述抗感染剂是抗病毒剂。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗病毒剂是索非布韦(Sovaldi®)、HCV促进的蛋白酶抑制剂 (ABT-450, AbbVie)、非核苷NS5B抑制剂 (达卡他韦, ABT-333, AbbVie)、NS5a抑制剂 (ombitasvir, ABT-267, AbbVie)、ABT-450/r (ABT-450以及利托那韦)、与ABT-267共配制的ABT-450、与索非布韦一起配制的ABT-450、和病毒唑中的一种或多种。

11. 根据权利要求7所述的方法,其中所述另外的治疗剂是选自强的松、布地奈德、莫米松糠酸酯、丙酸氟替卡松、糠酸氟替卡松、和其组合的糖皮质激素。

12. 根据权利要求7所述的方法,其中所述另外的治疗剂是镇痛剂。

13. 根据权利要求7所述的方法,其中所述另外的治疗剂选自纯化的牛V型胶原、IL-13受体拮抗物、蛋白质酪氨酸激酶抑制剂、内皮受体拮抗物、双内皮素受体拮抗物、前列环素类似物、抗CTGF单克隆抗体、内皮素受体拮抗物(A-选择性)、AB0024、赖氨酰氧化酶样2 (LOXL2) 抗体、c-Jun N-末端激酶 (JNK) 抑制剂、吡非尼酮、IFN- $\gamma$  1b、针对全部三种TGF- $\beta$ 同种型的人抗体、TGF- $\beta$ 活化抑制剂、重组人正五聚蛋白-2蛋白 (rhPTX-2)、双特异性IL4/IL13抗体、靶向整合蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 的抗体、N-乙酰半胱氨酸、西地那非、肿瘤坏死因子 (TNF) 拮抗物

(依那西普)、和其组合。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVAA (SEQ ID NO:26)。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVA (SEQ ID NO:27)。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的由可操作地连接至第二多肽的第一多肽的融合制成——所述第一多肽是细胞穿透肽(CPP),所述第二多肽是治疗结构域(TD)——的功能等价物的治疗结构域(TD)是其序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有基本同一性的多肽。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述第二多肽是氨基酸序列KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)的多肽。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中所述第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVA (SEQ ID NO:9)的多肽。

24. 根据权利要求21所述的方法,其中所述第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10)的多肽。

25. 根据权利要求21所述的方法,其中所述第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVAA (SEQ ID NO:28)的多肽。

26. 根据权利要求21所述的方法,其中所述第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVA (SEQ ID NO:29)的多肽。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)的功能等价物是融合蛋白,其包括可操作地连接至第二多肽的第一多肽,其中所述第一多肽是功能上等价于YARAAARQARA (SEQ ID NO:11)的细胞穿透肽,其选自氨基酸序列WLRIKAWLRIKA (SEQ ID NO:12)、WLRIKA (SEQ ID NO:13)、YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)、WLRIKAWLRI (SEQ ID NO:15)、FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)、KAFKLAARLYR (SEQ ID NO: 17)和HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽,并且所述第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。

28. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一多肽是氨基酸序列WLRIKAWLRIKA (SEQ ID NO:12)的多肽。

29. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一多肽是氨基酸序列WLRIKA (SEQ ID

NO:13)的多肽。

30. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一多肽是氨基酸序列YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)的多肽。

31. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一多肽是氨基酸序列WLRRIKAWLRRRI (SEQ ID NO:15)的多肽。

32. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一多肽是氨基酸序列FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽。

33. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一多肽是氨基酸序列KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多肽。

34. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第一多肽是氨基酸序列HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。

35. 根据权利要求1所述的方法,其中所述载体选自控释载体、延释载体、缓释载体、和长期释放载体。

## 用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年11月17日提交的名称为“用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的组合物和方法”的美国临时专利申请号62/080,784和2015年11月17日提交的名称为“用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的组合物和方法”的美国实用新型专利申请号14/943,752的优先权的权益,其每个的内容通过引用以其全部并入。

[0003] 政府资助的声明

[0004] 描述的发明利用由小企业创新研究 (Small Business Innovation Research) (SBIR) 给予Moerae Matrix, LLC的政府支持完成。政府具有本发明中的某些权利。

### 发明领域

[0005] 本发明在细胞和分子生物学、多肽、和治疗使用方法的领域中。

### 背景技术

[0006] 1. 创伤愈合和纤维化的机制

[0007] 术语“创伤愈合”指的是身体将任何其组织的创伤——尤其是由物理手段造成并且具有连续性中断的那些——修复的过程。

[0008] 创伤愈合反应通常描述为具有三个不同的阶段——损伤、炎症和修复。一般而言,身体利用炎性反应响应损伤,其对维持生物体的健康和完整性是至关重要的。然而,如果它失败,其可以导致组织破坏。

[0009] I阶段: 损伤

[0010] 由包括但不限于自身免疫或过敏反应、环境微粒、感染或机械伤害的因素造成的损伤通常导致正常组织架构的破裂,开始愈合反应。受损上皮和内皮细胞必须被替换以分别地维持屏障功能与完整性和阻止失血。对内皮细胞的急性伤害导致释放炎症介质和开始抗纤维蛋白溶解凝块级联,其利用血小板和富含纤维蛋白的凝块暂时地堵塞受损脉管。例如,与慢性阻塞性肺病 (COPD) 和对照患者相比,来自特发性肺纤维化 (IPF) 患者的肺匀浆、上皮细胞或支气管肺泡灌洗液包含更大水平的血小板-分化因子、X-盒-结合蛋白-1,这表明凝块形成反应被连续地激活。此外,凝血酶(将纤维蛋白原转化为纤维蛋白所需的丝氨酸蛋白酶) 也容易在多种肺纤维变性条件的肺和肺泡内空间内检测到,这进一步确认凝血途径的激活。凝血酶还可以直接地活化成纤维细胞,其增加增殖并促进成纤维细胞分化为产胶原成肌纤维细胞。对气道上皮——具体地,肺泡肺细胞——的伤害可以诱发类似的抗纤维蛋白溶解级联,并且导致间质性水肿、急性炎症的区域和上皮从基底膜分离。

[0011] 血小板募集、脱粒和凝块形成迅速地发展为具有增加的渗透性的血管收缩阶段,其允许外渗(白细胞从毛细血管至环绕它们的组织的移动)和直接募集白血球至损伤位点。基底膜——其形成在实质组织的上皮和内皮下方的细胞外基质——妨碍直接接近受损组

织。为了破裂此物理屏障,锌依赖性肽链内切酶——也称为基质金属蛋白酶(MMP)——裂解一种或多种细胞外基质成分,允许细胞的外渗物进入和离开受损位点。具体地,MMP-2(明胶酶A,N型胶原酶)和MMP-9(明胶酶B,IV型胶原酶)裂解N型胶原和明胶——基底膜的两种重要的成分。最近的研究已经发现MMP-2和MMP-9是上调的,这强调组织破坏和再生过程在纤维变性条件中是常见的。MMP的活性受包括转录调节、酶原调节的多种机制,和具体的MMP的组织抑制剂控制。MMP和多种抑制机制之间的平衡可以调节炎症和确定在愈合反应期间沉积的胶原的净量。

[0012] 使用变应性气道炎症的模型和利用MMP-2<sup>-/-</sup>、MMP-9<sup>-/-</sup>和MMP-2<sup>-/-</sup>MMP-9<sup>-/-</sup>双基因敲除小鼠重构的以前的研究显示MMP-2和MMP-9对炎性细胞从发炎组织成功地外出和清除并进入气室是必需的。在不存在这些MMP的情况下,细胞被截留在肺的实质内,并且不能够移动进入气室,其导致致命的窒息。

[0013] II阶段:炎症

[0014] 一旦已经实现接近组织伤害的位点,趋化因子梯度募集炎性细胞。在急性损伤的位点处观察到嗜中性粒细胞、嗜酸性细胞、淋巴细胞和巨噬细胞,以及细胞碎片和被吞噬细胞清除的坏死的区域。

[0015] 提供炎性细胞因子和趋化因子的嗜酸性细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞的早期募集可以有助于局部的TGF-β和IL-13积聚。在最初损伤和炎性细胞的波动之后,炎性细胞的晚期募集可以帮助吞噬——在清除细胞碎片中——和控制过量的细胞增殖,其一起可以有助于正常的愈合。晚期炎症可以起抗纤维变性的作用并且对成功地消除(resolution)创伤愈合反应可以是必需的。例如,帮助成纤维细胞——除IL-10分泌调节T细胞之外——清除、抑制局部的趋化因子产生和TGF-β的在吞噬性巨噬细胞中丰富的晚期炎症谱(profile)可以阻止过量的成纤维细胞活化。

[0016] 损伤或病原体的性质通常决定随后发生的炎症反应的特性。例如,外源性刺激如病原体相关分子模式(PAMP)被病原体识别受体——比如toll样受体和NOD样受体(炎性和凋亡反应的调节中具有各种功能的胞质蛋白)——识别,并且影响先天细胞对入侵病原体的应答。内源性危险信号还可以影响局部的先天细胞并协调地安排炎症级联。

[0017] 炎症反应的性质显著地影响居民组织细胞和随后发生的炎症细胞。炎症细胞自身还通过分泌趋化因子、细胞因子和生长因子传播进一步的炎症。许多细胞因子参与整个创伤愈合和纤维变性反应,其中具体的基因的组在多种条件中活化。例如,哮喘患者中的慢性变应性气道疾病一般地与升高的2型辅助T细胞(Th2)相关细胞因子谱(包括但不限于,白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)、白介素-6(IL-6)、白介素-13(IL-13)、和白介素-9(IL-9))相关联,而慢性阻塞性肺病和纤维变性肺病(比如特发性肺纤维化)患者更频繁地呈现促炎细胞因子谱(包括但不限于,白介素-1α(IL-1α)、白介素-1β(IL-1β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、转化生长因子β(TGF-β)、和血小板源生长因子(PDGF))。已经显示这些细胞因子中的每个展示显著的促纤维变性活性,通过成纤维细胞、巨噬细胞和成肌纤维细胞的募集、活化和增殖作用。

[0018] III阶段:组织修复和收缩

[0019] 创伤愈合的闭合阶段由以下构成:由富含纤维蛋白(聚合以形成“网状物”的纤维状蛋白质,所述网状物形成创伤位点上方的凝块)的支架形成引导的协调地安排的细胞重

组、创伤收缩、闭合和再上皮化(re-epithelialization)。阐明涉及此阶段的创伤修复的过程的绝大部分研究来自真皮创伤研究和体外系统。

[0020] 成肌纤维细胞源胶原和平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA),与形成纤维蛋白支架的巨噬细胞、血小板、和成纤维细胞源纤连蛋白一起形成临时性细胞外基质。共同地,这些结构一般地称为肉芽组织。从特发性肺纤维化患者分离的原代成纤维细胞或肺泡巨噬细胞比对照成纤维细胞产生显著更多的纤连蛋白和 $\alpha$ -SMA,其指示提高的成纤维细胞活化的状态。已经报道了经历类固醇治疗的IPF患者具有与不治疗的IPF患者相似的升高水平的巨噬细胞源纤连蛋白。因而,类似于类固醇抗性IL-13-介导的成肌纤维细胞分化,巨噬细胞源纤连蛋白释放还似乎耐受类固醇治疗,这提供了类固醇治疗为什么可能无效的另一种原因。根据动物模型,纤连蛋白似乎对肺纤维化的发展是必需的,因为与它们的野生型对应物(counterpart)相比,具有纤连蛋白的额外(extra) III型结构域(EDA)的具体缺失的小鼠在博来霉素施用之后发展出显著更少的纤维化。

[0021] 除纤连蛋白以外,临时性细胞外基质还由糖蛋白(比如PDGF)、糖葡胺聚糖(比如透明质酸)、蛋白多糖和弹性蛋白构成。生长因子和TGF- $\beta$ -活化的成纤维细胞沿着细胞外基质网络迁移并修复创伤。在皮肤创伤内,TGF- $\beta$ 还诱导收缩反应,调节胶原纤维的取向。如上面讨论的,成纤维细胞至成肌纤维细胞分化还产生应力纤维和新表达的 $\alpha$ -SMA,其二者均给予成肌纤维细胞内的高收缩活性。称为“纤维融合膜(fibronexus)”或“超成熟黏着斑”的特定位点处的成肌纤维细胞至细胞外基质的附着将创伤拉在一起,其减小病变在收缩阶段期间的大小。细胞外基质铺设的程度和活化的成肌纤维细胞的数量决定胶原沉积量。为此,基质金属蛋白酶(MMP)对金属蛋白酶的抑制(TIMP)和胶原对胶原酶的平衡贯穿反应变化,从促合成(pro-synthesis)和增加的胶原沉积朝向受控的平衡移动,而没有胶原的净增加。对于成功的创伤愈合,当成纤维细胞经历凋亡,炎症开始消退,并且肉芽组织退缩时,通常发生此平衡,留下富含胶原的病变。炎症细胞——并且尤其是 $\alpha$ -SMA-阳性成肌纤维细胞——的移除对终止胶原沉积是必不可少的。有趣地,在特发性肺纤维化患者中,成纤维细胞的移除可以被延迟,其中细胞耐受凋亡信号,尽管观察到升高水平的促凋亡和FAS-信号传导分子。此对凋亡的相对抗性可以潜在地是此纤维变性疾病的病因。然而,多种研究还已经在特发性肺纤维化中观察到增加比率的胶原分泌成纤维细胞和上皮细胞凋亡,这表明有另一种平衡需要监测成纤维细胞凋亡和成纤维细胞增殖。根据皮肤研究,创伤位点的再上皮化重建屏障功能并允许包被的细胞重组。多种体外和体内模型——使用在胶原基上方生长的人或大鼠上皮细胞——或体内气管创伤已经用于鉴定细胞迁移、增殖、和细胞扩散的显著阶段。迅速的和动态的机动性和增殖,以及上皮从裸露区域的边缘的整复发生在初始创伤的数小时内。此外,上皮细胞的滑片(sliding sheet)可以在损伤区域上方迁移,帮助创伤覆盖。已经显示多种因子调节再上皮化,包括血清源转化生长因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、和基质金属蛋白酶-7(MMP-7)(其自身由TIMP-1调节)。

[0022] 共同地,炎症的程度、血管发生、和细胞外基质沉积量均有助于纤维变性病变的最终发展。因而,干扰成纤维细胞活化、增殖或凋亡的治疗干预需要对创伤修复的全部阶段的彻底理解和领会。虽然这三个阶段通常顺序地呈现,但是在慢性或反复损伤期间,这些过程并行地作用,向调控机制提出显著的要求。(Wilson和Wynn, *Mucosal Immunol.*, 2009, 3(2): 103-121)。

[0023] 2. 作为病理学的纤维化

[0024] 纤维化代表器官或组织中过量的纤维结缔组织的形成和发育,其由于导致疤痕的正常或异常/反应性创伤愈合反应而形成。纤维化的特征在于,例如,非限制性地,细胞外基质蛋白的异常沉积、成纤维细胞增殖的异常促进、成纤维细胞群分化为成肌纤维细胞群的异常诱导、成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进、或其组合。

[0025] 促炎介质

[0026] 越来越多的证据已经表明已知为细胞因子的多肽介质——包括多种淋巴因子、白介素和趋化因子——对纤维化中的胶原沉积是重要的刺激。由居民组织细胞和募集的炎性细胞释放,细胞因子被认为刺激成纤维细胞增殖和细胞外基质蛋白——包括胶原——的增加的合成。例如,特发性肺纤维化的发病机理中的早期特征是肺泡上皮和/或毛细血管细胞损伤。这促进募集循环免疫细胞进入肺,比如单核细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和嗜酸性细胞。然后,这些效应细胞与居民肺细胞——比如巨噬细胞、肺泡上皮和内皮细胞——一起释放细胞因子,其刺激靶细胞——通常地,成纤维细胞——以复制和合成增加量的胶原。还可以抑制细胞外基质蛋白的断裂,从而有助于纤维变性过程。(Coker和Laurent, Eur Respir J, 1998, ;11:1218-1221)

[0027] 众多细胞因子已经涉及纤维化的发病机理,非限制性地包括,转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、血小板源生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、内皮素-1 (ET-1) 和白介素——白介素-1 (IL-1)、白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8) 和白介素-17 (IL-17)。趋化因子白血球化学引诱物——包括调节活化正常T-细胞表达和分泌的因子 (factor Regulated upon Activation in Normal T-cells, Expressed and Secreted) (RANTES)——也被认为发挥重要的作用。升高水平的促炎细胞因子,比如白介素 8 (IL-8),以及相关的下游细胞粘着分子 (CAM) 比如细胞间粘着分子-1 (ICAM-1) 和血管细胞粘着分子-1 (VCAM-1),基质金属蛋白酶比如基质金属蛋白酶-7 (MMP-7),和信号传导分子比如S100钙结合蛋白A12 (S100A12, 又称为钙粒蛋白C),在周围血中已经发现与死亡率、无肺移植存活、和患有特发性肺纤维化的患者中的疾病进展相关联 (Richards等, Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185:67-76)。

[0028] TGF- $\beta$ 蛋白家族对细胞外基质沉积具有强有力的刺激作用,并且实际上已经用于通过基因转移构建纤维化的诱导动物模型。体外研究显示TGF- $\beta$ 1——分泌为潜在前体——促进成纤维细胞前胶原基因表达和蛋白质合成。数据表明其它哺乳动物同种型TGF- $\beta$ 2和TGF- $\beta$ 3也刺激人肺成纤维细胞胶原合成和减少体外断裂。在肺纤维化的动物模型中,增强的TGF- $\beta$ 1基因表达与增加的胶原基因表达和蛋白质沉积在时间上和空间上相关。TGF- $\beta$ 1抗体减少鼠博来霉素诱导的肺纤维化中的胶原沉积,并且人纤维变性肺组织显示增强的TGF- $\beta$ 1基因和蛋白质表达。

[0029] TNF- $\alpha$ 可以刺激体外成纤维细胞复制和胶原合成,并且在小鼠中,肺TNF- $\alpha$ 基因表达在施用博来霉素后上升。可溶性TNF- $\alpha$ 受体减少鼠模型中的肺纤维化,并且转基因小鼠中肺TNF- $\alpha$ 的过表达表征为肺纤维化。在患有IPF或石棉沉着病(由石棉纤维的吸入和滞留引起的影响肺的实质组织的慢性炎性和纤维变性医疗状况)的患者中,与对照相比,支气管肺泡灌洗液源巨噬细胞释放增加量的TNF- $\alpha$ 。

[0030] 内皮素 (ET-1) 还满足原纤维变性 (profibrotic) 细胞因子的标准。此分子促进成

纤维细胞增殖和趋化性并刺激前胶原产生。在患有肺纤维化的患者的肺中呈现,并且最近的报道表明当施用至实验动物时,ET-1受体拮抗物波生坦改善肺纤维化。

[0031] 未受遏制的成肌纤维细胞增殖/活化和纤维变性病灶形成

[0032] 成纤维细胞分化为成肌纤维细胞已经长期被认为是许多状况中的重要事件,包括创伤修复和纤维化。例如,已经报道了成肌纤维细胞在活跃纤维化的区域中出现,并且是肺纤维化中细胞外基质 (ECM) 蛋白产生和沉积的原因。(Liu, T. 等, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37:507-517)。

[0033] 特发性肺纤维化的成因的一个假设表明仍未确定的刺激产生急性肺损伤的反复发作。这些损伤位点处的创伤愈合最终导致纤维化,以及失去肺功能。成纤维细胞病灶——特发性肺纤维化的特征病变——以活跃复制的间充质细胞和丰富沉积的新鲜细胞外基质为特征。这样的病灶是典型的肺泡上皮细胞损伤,伴有腔内血浆渗出和远端气室的萎陷。正常地与创伤愈合相关联的介质——比如转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 和结缔组织生长因子——也在这些位点处表达。此局部急性肺损伤和创伤修复的驱动力是未知的。

[0034] 3. 纤维化发挥作用的疾病或状况

[0035] 纤维化已经涉及大量异质性疾病或状况,包括但不限于,间质性肺病,比如特发性肺纤维化、急性肺损伤 (ALI)、辐射诱发的纤维化、移植排斥、肝纤维化、肾纤维化和血管纤维化。

[0036] 3.1. 特发性肺纤维化 (IPF)

[0037] 特发性肺纤维化 (IPF, 又称为隐源性纤维性肺泡炎 CFA, 或特发性纤维性间质性肺炎) 被限定为主要在老年人中发生的不确定病因的慢性、进行性纤维性间质性肺炎的具体形式,被限于肺,并且与常见的间质性肺炎 (UIP) 的放射学和组织学模式相关联 (Raghu G. 等, *Am J Respir Crit Care Med.*, 183 (6):788-824, 2011; Thannickal, V. 等, *Proc Am Thorac Soc.*, 3 (4):350-356, 2006)。其可以表征为肺间质中纤维变性组织的异常和过量沉积。在高分辨率计算机断层摄影术 (HRCT) 图像上, UIP 表征为存在通常与牵拉性支气管扩张症 (traction bronchiectasis) 相关联的网状混浊。随着 IPF 进展, 蜂窝样变得更显著 (Neininger A. 等, *J Biol Chem.*, 277 (5):3065-8, 2002)。肺功能测试通常揭示一氧化碳的限制性损害和减小的弥散量 (Thomas, T. 等, *J Neurochem.*, 105 (5):2039-52, 2008)。研究已经报道了在患有特发性肺纤维化 (IPF) 的患者中释放的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的显著增加 (Zhang, Y, 等, *J. Immunol.* 150 (9):4188-4196, 1993), 其已经归因于 IL-1 $\beta$  的表达水平 (Kolb, M., 等, *J. Clin. Invest.*, 107 (12):1529-1536, 2001)。IPF 症状——呼吸急促和咳嗽——的发病通常是隐伏的但逐步地进展, 在诊断后五年内 70% 的患者发生死亡。此糟糕的预后类似于有乳腺癌引起的年死亡数 (Raghu G. 等, *Am J Respir Crit Care Med.*, 183 (6):788-824, 2011)。

[0038] 在美国, IPF 困扰几乎 130,000 名患者, 以及全世界每年大约 50,000 名新患者和每年几乎 40,000 例死亡 (Raghu G. 等, *Am J Respir Crit Care Med.*, 183 (6):788-824, 2011)。虽然这些数据是显著的, 但是最近的研究报道可能由于增加的流行率或增强的诊断能力, IPF 可能比先前认为的更流行 5-10 倍 (Thannickal, V. 等, *Proc Am Thorac Soc.*, 3 (4):350-356, 2006)。肺移植被认为是用于 IPF 的确定性疗法, 但是肺移植之后的五年存活小于 50%。因此, 甚至肺移植不能被认为是用于 IPF 的“治愈疗法 (cure)”。除对患者的身体

和情绪影响以外,IPF的治疗和护理极度昂贵,每年国家医疗保健为每100,000名患者花费在\$28亿美元的范围。

[0039] 此外,先前的研究已经表明叠加的环境损伤在特发性肺纤维化的发病机理中可以是重要的。在大多数报道的病例系列中,多至75%患有特发性肺纤维化的索引患者(index patient)是现或曾吸烟者。在大规模流行病学研究中,吸烟已经与特发性肺纤维化强烈地相关联。此外,特发性肺纤维化的许多炎性特征相对于潜在的肺病更强烈地关联至吸烟状态。因而,吸烟可以是特发性肺纤维化的独立危险度因子。潜伏性病毒感染,尤其是疱疹病毒家族的那些,也已经被报道与特发性肺纤维化相关联。

[0040] 由于不存在用于IPF的已知的有效治疗,包括肺移植,对开发新型疗法仍存在关键的需要。存在当前正在研究的各种治疗途径,包括可以减慢或抑制身体产生疤痕或纤维变性组织的能力的抗纤维变性疗法和增加肺中用于气体交换的组织面积的肺血管舒张剂。除肺移植以外,潜在的IPF治疗已经包括皮质类固醇、硫唑嘌呤、环磷酰胺、抗凝剂、和N-乙酰半胱氨酸(Raghu G.等,Am J Respir Crit Care Med.,183(6):788-824,2011)。此外,常规地采用支持疗法比如氧气疗法和肺康复。然而,这些中没有一种已经明确地影响IPF患者的长期存活,其进一步强调IPF中治疗选择的未满足的医疗需要。作为实例,不管混合临床计划结果,InterMune的口服小分子Esbriet®(吡非尼酮)接受欧洲和日本批准用于患有IPF的患者。Esbriet®因而成为具体地指示用于IPF的治疗的第一种药物;由于可疑的试验结果和药物副作用,药物的实用性在美国审查时被怀疑,并且基于那时提交的数据没有收到FDA批准。因此,大规模的3期临床试验在进行中以测定其功效,从而支持在美国的新药申请。

[0041] 组织病理学上,IPF可以描述为成纤维细胞病灶中活化的成肌纤维细胞(或间充质细胞)的积聚(Thannickal,V.等,Proc Am Thorac Soc.,3(4):350-356,2006)。成肌纤维细胞的受损的凋亡可以导致以组织纤维化告终的持续的和失调的修复过程。可以说,炎症还在IPF中发挥关键的作用,可能通过成纤维细胞的周期性急性刺激。这些发现指向用于治疗干预的潜在目标。

[0042] 3.1.1.特发性肺纤维化(IPF)的发病机理

[0043] 虽然不完全地理解致病机制,当前接受的范例提出在对肺泡上皮的损伤之后,接着发生引发与正常的组织修复相关联的应答的促炎和纤维增殖介质的爆发。出于不清楚的原因,这些修复过程从不消除且进行性纤维化随后发生。(Selman M,等,Ann Intern Med,134(2):136-151,2001;Noble,P.和Homer R.,Clin Chest Med,25(4):749-58,2004;Strieter,R.,Chest,128(5Suppl 1):526S-532S,2005)。

[0044] 3.1.2.肺纤维化的博来霉素小鼠模型

[0045] 虽然存在大量动物模型并且可以有用的(例如,TGF- $\beta$ 腺病毒转导模型或辐射诱导的纤维化模型),但是博来霉素模型是现今使用的证据充分和最佳表征的鼠模型以证明炎症后/纤维变性前/纤维预防阶段中特定药物或蛋白激酶抑制剂的功效(Vittal,R.等,J Pharmacol Exp Ther.,321(1):35-44,2007;Vittal,R.等,Am J Pathol.,166(2):367-75,2005;Hecker L.等,Nat Med.,15(9):1077-81,2009)。

[0046] 抗生素博来霉素最初从轮丝链霉菌分离(Umezawa,H.等,Cancer 20:891-895,1967)。此抗生素随后被发现针对鳞状细胞癌和皮肤肿瘤有效(Umezawa,H.,Fed Proc,33:

2296-2302,1974);然而,其作为抗肿瘤剂的有效性受限于导致纤维化的剂量依赖性肺毒性(Muggia,F.等,Cancer Treat Rev,10:221-243,1983)。经由气管内途径递送博来霉素(通常1.25-4U/kg,其取决于来源)具有优势,药物的单次注射在啮齿动物中产生肺损伤和由此导致的纤维化(Phan,S.等,Am Rev Respir Dis 121:501-506,1980;Snider,G.等,Am Rev Respir Dis.117:289-297,1978;Thrall,R.等,Am J Pathol,95:117-130,1979)。气管内递送药物至啮齿动物导致最初对肺泡上皮细胞的直接伤害。第一周内,此事件之后接着发生嗜中性粒细胞和淋巴细胞全肺泡炎的发展(Janick-Buckner,D.等,Toxicol Appl Pharmacol.,100(3):465-73,1989)。随后,肺泡炎性细胞被清除,成纤维细胞增殖是显著的,并且细胞外基质被合成(SchrierD.等,Am Rev Respir Dis.,127(1):63-6,1983)。此模型中纤维化的发展可以在第14天在生物化学上和组织学上看到,而且最大应答通常在第21-28天左右显著(Izbicki G.等,Int J Exp Pathol.,83(3):111-9,2002;Phan,S.等,Chest.,83(5Suppl):44S-45S,1983)。然而,超过第28天,对博来霉素的应答是更可变的。原始报道表明气管内递送的博来霉素可以诱导进展或持续60-90天的纤维化(Thrall R.等,Am J Pathol.,95(1):117-30,1979;Goldstein R.,等,Am Rev Respir Dis.,120(1):67-73,1979;Starcher B.等,Am Rev Respir Dis.,117(2):299-305,1978);然而,其它报道证明了在此时期后开始消除的自限性反应(Thrall R.等,Am J Pathol.,95(1):117-30,1979;Phan,S.等,Chest,83(5Suppl):44S-45S,1983;Lawson W.等,Am J Pathol.2005;167(5):1267-1277)。虽然此模型的消除性质不模拟人疾病,但是模型的此方面提供了在这些随后的时间点处研究纤维变性消除的机会。

### [0047] 3.2.急性肺损伤(ALI)

[0048] 急性肺损伤(ALI)和其更严重的形式——急性呼吸窘迫综合征(ARDS)——是由急性肺水肿和炎症引起的急性呼吸衰竭的综合征。ALI/ARDS是由包括脓毒症(肺源性和非肺源性)、肺炎(细菌性、病毒性和真菌性)、胃和口咽内容物的误吸、严重创伤、和多种其它临床障碍——包括重度急性胰腺炎、药物过量、和血液产品——的各种临床障碍在全部年龄的患者中发展的急性呼吸衰竭的原因(Ware,L.和Matthay,M.,N Engl J Med,342:1334-1349,2000)。大多数患者需要利用正压力辅助通气。主要的生理学异常是重度动脉低氧血症以及继发于肺死腔分数急剧增加的每分通气量的显著增加。患有ALI/ARDS的患者发展出由流体外渗进入肺的间质和气室隔室造成的富含蛋白质的肺水肿,所述流体的外渗继发于屏障的增加的渗透性。另外的病理学变化指示涉及肺水肿的机制是复杂的,并且水肿只是ALI/ARDS中的病理生理学事件之一。一个生理学结果是导致增加的呼吸功的肺顺应性的显著降低(Nuckton T.等,N Engl J Med,346:1281-1286,2002)——需要辅助通气支持大多数患者的原因之一。

[0049] 已经表明机械通气(MV)——用于ALI的支柱治疗——通过在呼吸系统的多种组成上实施引起通气机相关肺损伤(VALI)的机械应力潜在地有助于且恶化渗透性(Fan,E.等,JAMA,294:2889-2896,2005;MacIntyre N.,Chest,128:561S-567,2005)。最近的试验证明了与高潮气量(HV<sub>T</sub>)相比,以低潮气量(LV<sub>T</sub>)通气的患者中显著改善的存活(The Acute Respiratory Distress Syndrome N.Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome.N Engl J Med;342:1301-1308,2000)。不同于在较低的

潮气量下通气,其假定施加更低的机械应力,存在极少病理生理学的机械学理解,并且没有用于VALI的定向疗法。

[0050] 已经表明高潮气量(HV<sub>T</sub>)机械通气(MV)导致p38MAP激酶的磷酸化、MK2的活化和HSPB1的磷酸化——引起肌动蛋白从HSPB1离解并且聚合以形成应力纤维的过程,其最终导致穿细胞间隙和增加的血管渗透性。此外,显示抑制p38MAP激酶或其下游效应子MK2阻止HSPB1的磷酸化并通过废除肌动蛋白应力纤维形成和细胞骨架重排保护免受血管渗透性,这表明靶向抑制MK2可能是用于治疗急性肺损伤的潜在的治疗策略(Damarla, M.等, PLoS ONE, 4 (2):E4600, 2009)。

[0051] 而且,研究已经表明肺纤维化还可以由ALI造成。ALI可以完全消除或继续至纤维性肺炎,伴随持续的血液中的低氧(低氧血症)和减小的肺每次呼吸膨胀的能力(减小的肺顺应性)。表明虽然损伤诱发的肺纤维化的病因不同于特发性肺纤维化,但是两种疾病共享共同的病理学机制,即使成纤维细胞浸润入肺的气室(Tager等., Nat. Med. 14:45-54, 2008; Ley, K. 和 Zarbock, A., Nat. Med. 14:20-21; 2008)。

[0052] 3.3. 辐射诱发的纤维化

[0053] 纤维化是通过放射治疗的两种癌症治疗和事故性辐照的常见后遗症。放射治疗之后的纤维变性病变已经在许多组织中描述,包括皮肤(Bentzen, S.等, Radiother. Oncol. 15:261-214, 1989; Brocheriou, C., 等, Br. J. Radiol. Suppl. 19:101-108, 1986)、肺(Lopez Cardozo, B.等, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 11:907-914, 1985)、心(Fajardo, L. 和 Stewart, J., Lab. Invest., 29:244-257, 1973)、和肝(Ingold, J.等, Am. J. Roentgenol., 93:200-208, 1965)。

[0054] 在肺(晚期应答组织)中,可以发生两种辐射毒性综合征——辐射性肺炎和肺纤维化。肺炎在完成放射治疗2-3个月后显现。病理学上,肺炎表征为间质性水肿,存在间质性和肺泡炎性细胞,并且II型肺细胞的数目增加(Gross, N.等, Radiat. Res., III:143-50, 1981; Guerry-Force, M.等, Radiat. Res. 114:138-53, 1988)。在肺炎中,对组织的主要伤害最可能由实质细胞的耗竭造成(Hendry, J., Radiat. Oncol. Vol. 4, 2:123-132, 1994; Rosiello, R.等, Am. Rev. Respir. Dis., 148:1671-1676, 1993; Travis, E. 和 Terry, N., Front. Radiat. Ther. Oncol., 23:41-59, 1989)。

[0055] 纤维变性反应具有以下特点:增加的间质性胶原沉积、血管壁的增厚和血管闭塞(Vergava, J.等, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2:723-732, 1987)。纤维变性病变的组织学检查已经揭示了纤维变性组织包含浸润性炎性细胞、成纤维细胞、和更大量的多种细胞外基质组分。在纤维变性组织中,已经描述了间质性胶原、纤连蛋白和蛋白多糖的增强的合成和沉积(Maasiha, P.等, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 20:973-980, 1991),并且这已经解释为成纤维细胞细胞系统的辐射诱发的调节的结果(Remy, J.等, Radiat. Res. 125:14-19, 1991)。

[0056] 辐射诱发的纤维化——尤其是肺的纤维化——表明是由于从事纤维变性反应的多种细胞系统之间的细胞和分子事件的相互影响。辐照能够单独地诱导成纤维细胞/纤维细胞细胞系统的过早的终末分化过程,其导致有丝分裂期后的纤维细胞的增强的积聚,这表征为间质性胶原的合成的数倍增加。与此同时,附带的实质细胞类型——比如肺泡巨噬细胞和肺泡II型肺细胞——的辐照诱导具体的细胞因子如TGF- $\beta$ 1的立即合成,其然后变更

实质细胞与成纤维细胞细胞系统的相互作用。TGF- $\beta$ 1——作为负责纤维变性反应的主要的细胞因子之一——经由祖成纤维细胞细胞类型的扩展以及祖成纤维细胞过早地终末分化为有丝分裂期后的纤维细胞诱导成纤维细胞增殖。由于干扰祖成纤维细胞和有丝分裂期后的纤维细胞的均衡细胞类型比率,这导致有丝分裂期后的纤维细胞的积聚。建议辐照之后的病理生理学组织应答由变更的细胞因子-和生长因子-介导的多细胞细胞系统的相互作用造成,其导致干扰间质性成纤维细胞/纤维细胞细胞系统的均衡细胞类型比率。(Rodemann,H.和Bamberg,M.,Radiotherapy and Oncology,35,83-90,1995)。

#### [0057] 3.4. 移植排斥

[0058] 移植是从一个位点转移细胞、组织或器官至另一个位点的行为。可以利用来自供体的器官(例如,肾、肝、心、肺或胰腺)的移植矫正器官系统的机能障碍。然而,免疫系统保持作为常规医疗的对移植的最强大的屏障,并且这样的器官的排斥通常对应于移植器官中的纤维变性表型。免疫系统已经发展出周密和有效的机制以对抗外来物(foreign agent)。这些机制还参与移植器官的排斥,其被宿主的免疫系统识别为外源的。

[0059] 免疫反应对移植的程度部分地取决于移植器官和宿主之间的遗传差异的程度。异种移植——其是不同物种的成员之间的移植——具有最大差异并且引起最大的免疫反应,经历迅速的排斥。自体移植——其是从身体的一部分至另一部分的移植(例如,皮肤移植)——不是外源组织,并且因此不引起排斥。同系移植——其是遗传上同一的个体(例如,同卵双胞胎)之间的移植——也不经历排斥。

[0060] 同种异体移植是遗传上不同的相同物种的成员之间的移植。这是移植的最常见形式。同种异体移植经历排斥的程度部分地取决于供体和宿主之间的相似性或组织相容性的程度。

[0061] 应答的程度和类型还随着移植的类型改变。一些位点——比如眼和脑——免疫特殊的(即,它们具有最小的或不具有免疫系统细胞,并且可以耐受甚至不匹配的移植)。皮肤移植不被初始地血管化,并且所以不显现排斥直到血液供给发展。肺、心、肾和肝是高度血管器官并且在宿主中通常导致有力的细胞介导的应答,其需要免疫抑制疗法。

[0062] 缩窄性细支气管炎(CB)——也称为肺移植患者闭塞性细支气管炎——是主要在膜性和呼吸性细支气管的壁和相邻组织中发生的炎症和纤维化,以及它们的腔由此导致的变窄。CB在各种环境(setting)中发现,最经常作为肺与心-肺移植(影响34%至39%的患者,通常在移植后的头2年)和骨髓移植的并发症,但是也在类风湿性关节炎中,在吸入毒剂比如二氧化氮后,在摄取某些药物比如青霉胺和摄取东亚蔬菜大戟科守宫木属(Sauropus androgynous)后,并且作为儿童中腺病毒、A型流感、麻疹和肺炎支原体感染的罕见并发症。在肺移植中,CB是导致其后死亡的单个最重要的因素。在一个研究中,总死亡率是25%。然而,同时,有症状并且由经支气管活组织检查单独诊断的87%的患者具有消除或稳定的疾病。FEV1从基线的降低可以用于临床支持移植患者中的CB;术语闭塞性细支气管炎综合征用于表示此临床机能障碍,并且已经为其分级系统,其现在在文献中广泛地使用。肺移植中CB的发展的显著危险度因子包括同种异体抗原依赖性和非依赖性机制。在前者组中,为晚期急性排斥和A位置处的HLA错配;在后者中,为由移植手术和巨细胞病毒感染造成的对气道的局部缺血/再灌注损伤(Schlesinger C.等,Curr Opin Pulm.Med.,4(5):288-93,1998)。

[0063] 排斥的机制

[0064] 对移植器官的免疫反应由细胞(淋巴细胞介导的)和体液(抗体介导的)机制二者组成。虽然也涉及其它细胞类型,但是T细胞是移植物排斥的中枢。排斥反应由致敏阶段和效应阶段组成。

[0065] 致敏阶段

[0066] 在此阶段中,CD4和CD8T细胞经由它们的T-细胞受体识别在外源移植物的细胞上表达的同种异体抗原。抗原的识别需要两个信号;第一个通过T细胞受体与MHC分子提供的抗原的相互作用提供,第二个由T细胞/APC表面上的共刺激受体/配体相互作用提供。在众多的共刺激途径中,T细胞表面上的CD28与其APC表面配体B7-1或B7-2(一般分别已知为CD80或CD86)的相互作用已经研究最多(Clarkson, M. 和 Sayegh, M., *Transplantation*; 80(5):555-563, 2005)。此外,细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA4) 还结合至这些配体并且提供抑制剂信号。其它共刺激分子包括CD40和其配体CD40L (CD154)。典型地,MHC分子的单环形成肽结合沟并且被源自组成细胞蛋白质的肽占据。胸腺或中枢耐受机制(克隆缺失)和外周耐受机制(例如,无反应性)确保这些自体肽MHC复合物不被T细胞识别,从而预防自身免疫反应。

[0067] 效应阶段

[0068] 同种异体抗原依赖性和非依赖性因素有助于效应机制。最初,非免疫性“损伤反应”(局部缺血)诱导非特异性炎性反应。正因如此,由于粘着分子、II类MHC、趋化因子和细胞因子的表达上调,至T细胞的抗原呈递增加。其还促进可以活化间接的同种异体识别途径的完整的可溶性MHC分子去除。在活化后,CD4阳性T细胞起始巨噬细胞介导的迟发型超敏反应(DTH)应答并且向B细胞提供帮助用于抗体产生。

[0069] 多种T细胞和T细胞源细胞因子比如IL-2和IFN- $\gamma$ 在移植后不久上调。稍后,表达 $\beta$ -趋化因子如RANTES(在活化,正常的T细胞表达和分泌后调节)、IP-10和MCP-1,并且这促进同种异体移植的强烈的巨噬细胞浸润。IL-6、TNF- $\alpha$ 、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和生长因子也在此过程中发挥作用。生长因子——包括TGF- $\beta$ 和内皮素——引起平滑肌增殖、内膜增厚、间质性纤维化、和在肾的情况下的肾小球硬化症。

[0070] 由T细胞源细胞因子活化的内皮细胞和巨噬细胞表达II类MHC、粘着分子和共刺激分子。这些可以存在抗原并且从而募集更多的T细胞,其扩大排斥过程。CD8阳性T细胞介导细胞介导的细胞毒性反应或者通过递送“致死一击(lethal hit)”,或者可选地,通过诱导凋亡。

[0071] 此外,新兴研究已经表明纤维变性过程涉及器官移植的慢性移植排斥。例如,显示慢性肺同种异体移植排斥由相对缺乏的同种异体移植内皮细胞源HIF-1 $\alpha$ 介导,其导致移植器官的纤维变性重构(Wilkes, D., *JClin Invest.*, 121(6):2155-2157, 2011; Jiang, X. 等, *JClin Invest.*, 121(6):2336-2349, 2011)。

[0072] 3.5. 慢性阻塞性肺病(COPD)

[0073] 慢性阻塞性肺病(COPD)是由慢性和相对不可逆的呼气气流机能障碍——由于慢性阻塞性支气管炎、气肿和/或慢性哮喘的一些组合——代表的肺病的共同描述。COPD由一系列环境和遗传危险度因子造成,包括有助于疾病的抽烟。

[0074] COPD的流行在全世界增加,并且COPD已经成为美国的第四大死亡原因。在美国,尽

管最近数十年中吸烟降低,但是与COPD相关联的流行率和死亡率增加并且预计仍继续增加数年。此外,COPD是昂贵的,并且急性发作——其在患有中度或更严重的COPD的患者中大致上一年发生一次——构成最昂贵的组成。

[0075] 在COPD中,气流阻塞可以在肺的两个非常不同的病例生理学过程中的任一个的基础上发生:1)实质的炎症,其导致肺实质的蛋白质水解和肺弹性的失去(气肿);和2)小气道的炎症、结疤和变窄(“小气道疾病”)。在个体患者中,这些过程中的一个——其可以受控于不同的遗传因素——可以占优势,但是二者通常共存。最后,这些过程二者均产生相似模式的功能损害:减少的呼气流、充气过度和气体交换的异常。

[0076] 在COPD的早期阶段,在COPD患者的肺中发现下列症状:1)通过破坏气溶胶使气道上皮破裂,2)炎性粘液性渗出物的积聚,3)通过炎性免疫细胞浸润气道壁,4)气道重构/气道壁增厚和侵占腔空间,和5)对气流的增加的阻力。在此早期阶段期间,平滑肌收缩和高反应性也增加阻力,但是增加的阻力通过支气管扩张药解除。

[0077] 在晚期阶段,COPD患者在环绕气道壁的上皮下和外膜(aventitial)隔室中独特地发展纤维结缔组织的沉积。这样的细支气管周纤维化通过限制随肺膨胀发生的气道管径的扩大有助于固定的气道闭塞。

#### [0078] 3.5.1.慢性支气管炎

[0079] 慢性支气管炎限定为在连续两年的至少三个月内存在慢性咳嗽和痰产生,而不存在认为引起痰产生的其它疾病。在慢性支气管炎中,在流行病学上,支气管上皮变得慢性发炎,以及粘液腺体肥大和增加数目的杯状细胞。纤毛也被毁坏,并且粘液纤毛活动梯(escalator)的效率被极大地损害。粘液粘性和粘液产生增加,导致难以咯痰。粘液的淤积导致对感染的增加的易感性。

[0080] 在显微镜上,存在炎性细胞对气道壁的浸润。炎症在增厚壁并且还导致气道变窄的结疤和重构之后。随着慢性支气管炎进展,存在鳞状化生(衬在气道内部的组织中的异常变化)和纤维化(进一步增厚气道壁和其使结疤)。这些变化的结果是气流的限制。随时间的反复感染和炎症导致对气道壁的不可逆性结构伤害并且导致结疤,以及较小的外周气道的变窄和畸变。

#### [0081] 3.5.2.气肿

[0082] 按照其病理学特征限定气肿,表征为在末端细支气管远端的末端气室的异常扩张,以及它们的壁的毁坏和肺弹性的失去。如果气肿的区域的直径大于1cm,则由于膨胀过度可以发展出大疱(大于1cm宽的疱)。异常气室的分布允许两种主要模式的气肿的分类:全腺泡性(全小叶性)气肿,其导致膨胀,并且毁坏整个腺泡,特别是肺的下半部。腺泡中央性(小叶中央性)气肿包含围绕呼吸细支气管的伤害,其影响肺的上叶和下叶的上部。气肿的某些形式另外已知与纤维化相关联。

[0083] 气肿的破坏过程主要与吸烟相关联。香烟烟雾是刺激物并且导致气道和肺泡的低度炎症。已知香烟包含超过4,000中毒性化学品,其影响肺内的抗蛋白酶和蛋白酶之间的平衡,引起永久的伤害。炎性细胞(巨噬细胞和嗜中性粒细胞)产生被称为弹性酶的蛋白水解酶,其破坏弹性蛋白——肺组织的重要组分。

[0084] 肺的肺泡或气囊包含弹性组织,其支持和维持肺内气道的效能。肺泡壁的毁坏允许通过放松帮助保持气道开放的牵绳(guy rope)使小气道变窄。在正常吸气期间,膈向下

移动同时胸腔(rib cage)向外移动,并且空气通过产生的负压吸入肺内。在呼气时,随着胸腔和膈放松,肺实质的弹性回位向上和向外推动空气。在肺实质破坏的情况下,其导致松软的肺和失去肺泡牵绳,发生小气道塌陷和空气积存,导致肺充气过度。充气过度使膈变平,其导致不太有效的收缩和减小的肺泡效率,其转而导致进一步的空气积存。描述的机制随着时间导致重度气流阻塞,其导致不充分的呼气以允许肺在下一次吸气之前完全地放气。

#### [0085] 3.5.3慢性哮喘

[0086] 哮喘限定为气道的慢性炎性状况,其导致普遍的和广泛的气道阻塞,所述气道阻塞是自发地可逆或利用治疗可逆的。在患有慢性哮喘的一些患者中,具体地,如果哮喘是未治疗的——因为其还没有被诊断或者处置不当——或如果其特别严重,则该疾病进展,导致不可逆性气道阻塞。患有哮喘的儿童具有发展不可逆性哮喘的十分之一的几率,而成年型哮喘患者的风险是四分之一。研究也已经发现在儿童和成人中,如果它们的哮喘没有被适当地治疗,具体地使用皮质类固醇疗法,则该哮喘可能导致肺功能的不可逆的恶化。

[0087] 哮喘中的气道炎症随着时间可以通过增加的平滑肌、表面上皮的破裂、增加的胶原沉积和基底膜的增厚导致气道的重构。

#### [0088] 3.6其它类型的纤维化

[0089] 其它类型的纤维化非限制性地包括胰腺和肺的囊性纤维化、注射纤维化(injection fibrosis)、心内膜心肌纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化、和肾原性系统性纤维化。

[0090] 囊性纤维化(CF、mucovidosi s、粘液粘稠病(mucovisidosis))是遗传性常染色体隐形障碍。它是美国最常见的致死性遗传障碍之一,影响大约30,000名个体,并且在白种人群体中最流行,每3,300名新生儿中出现一例。涉及囊性纤维化的基因——在1989年被鉴定——编码称为囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)的蛋白质。CFTR正常地由遍及身体的外分泌上皮细胞表达,并且调节氯根离子、碳酸氢盐离子和谷胱甘肽进出细胞的运动。在囊性纤维化患者中,CFTR基因的突变导致CFTR蛋白功能的改变或完全失去,其导致外分泌分泌物的克分子渗透压浓度、pH和氧化还原性质的缺失。在肺中,CF自身通过存在堵塞气道的厚粘液分泌物显现。在其它外分泌器官比如汗腺中,CF自身可以不通过阻塞性表型显现,而是通过分泌物中异常的盐组成显现(因此临床汗液克分子渗透压浓度测试检测CF患者)。囊性纤维化患者疾病和死亡的主要原因是进行性肺病。阻塞气道通道的CF粘液的厚度被认为由分泌物的克分子渗透压浓度的异常,以及由存在大量源自炎性细胞的亚类——称为嗜中性粒细胞——的DNA、肌动蛋白、蛋白酶和促氧化酶(prooxidative enzyme)造成。实际上,CF肺病表征为对病毒和细菌病原体二者的早期极度活跃的嗜中性粒细胞介导的炎性反应。CF肺的高炎性(hyperinflammatory)综合征具有多种基础,在其之中促炎趋化因子——主要是IL-8——和抗炎性细胞因子——主要是IL-10——之间的不平衡已经被报道起主要的作用。参见Chmiel等,Clin Rev Allergy Immunol.3(1):5-27(2002)。研究已经报道了囊性纤维化患者的支气管肺泡灌洗液中的TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的水平比在健康对照支气管肺泡灌洗液中高(Bondfield,T.L.等Am.J.Resp.Crit.Care Med.152(1):2111-2118,1995)。

[0091] 注射纤维化(IF)是肌肉内注射的并发症,其通常发生在婴儿和儿童的四头肌、三头肌和臀肌中,其中对象不能完全地弯曲受影响的肌肉。其通常是无痛的,但是是进展的。研究已经报道了糖蛋白骨桥蛋白(OPN)在组织重构中起作用(Liaw,L.等,

J.Clin.Invest.101(7):1469-1478,1998),并且此促炎介质诱导人单核细胞中IL-1 $\beta$ 上调和伴随增强的TNF- $\alpha$ 和IL-6的产生(Naldini,A.等,J.Immunol.177:4267-4270,2006;Weber,G.F.和Cantor,H.Cytokine Growth Factor Reviews.7(3):241-248,1996)。

[0092] 心内膜心肌病(嗜酸性细胞增多综合征(HS))是表征为血液中持续升高的嗜酸性细胞计数(1500个嗜酸性细胞/mm<sup>3</sup>)的疾病过程。HS同时影响很多器官。研究已经报道了IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 在病毒诱导的心肌炎患者中以高水平表达(Satoh,M.,等,Virchows Archiv.427(5):503-509,1996)。症状可以包括心肌病、皮肤病变、血栓栓塞疾病、肺病、神经病、肝脾肿大(肝脏和脾脏同时增大)和减小的心室大小。治疗可以包括利用皮质类固醇减小嗜酸性细胞水平。

[0093] 纵隔纤维化(MF)表征为集中在淋巴结上的浸润性钙化纤维化,其封阻大脉管和气道。MF是组织胞浆菌病的晚期并发症。纤维化的鼠模型中的研究已经报道了IL-10和TNF- $\alpha$ 显著地升高(Ebrahimi,B,等Am.J.Pathol.158:2117-2125,2001)。

[0094] 骨髓纤维化(髓样化生、慢性特发性骨髓纤维化、原发性骨髓纤维化)是其中骨髓经历纤维化的骨髓的障碍。骨髓纤维化导致进行性骨髓衰竭。平均存活是五年,并且死因包括感染、出血、器官衰竭、门静脉高血压和白血病转化。已经报道了TNF- $\alpha$ 和IL-6水平在病毒诱导的骨髓纤维化的动物模型中升高(Bousse-Kerdiles,M.,等Ann.Hematol.78:434-444,1999)。

[0095] 腹膜后纤维化(奥蒙德病)是特征为腹膜后腔中的纤维组织增殖的疾病。腹膜后腔是包含肾、主动脉、肾道(renal tract)、和其它结构的体室(body compartment)。已经报道了IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 在腹膜后纤维化的发病机理中具有关键作用(Demko,T.等,J.Am.Soc.Nephrol.8:684-688,1997)。腹膜后纤维化的症状可以包括但不限于:下背疼痛、肾衰竭、高血压和深静脉血栓形成。

[0096] 肾原性系统性纤维化(NSF、肾原性纤维化皮肤病)涉及皮肤、关节、眼睛和内部器官的纤维化。NSF可能与暴露于钆相关联。患者发展出大面积的硬化皮肤并且具有纤维变性的结节和斑块。还可以出现伴随限制运动范围的屈曲挛缩。NSF显示了真皮成纤维细胞和树突细胞的增殖、增厚的胶原束、增加的弹性纤维、和粘蛋白的沉积物。一些报道已经表明促炎状态提供了引起肾原性系统性纤维化的诱病因素(Saxena,S.等,Int.Urol.Nephrol.40:715-724,2008),并且TNF- $\alpha$ 的水平在肾原性系统性纤维化的动物模型中升高(Steger-Hartmann,T.,等Exper.Tox.Pathol.61(6):537-552,2009)。

[0097] 4.危险度因子

[0098] 4.1.主要危险度因子

[0099] 4.1.1.吸烟

[0100] 虽然已经鉴定了纤维变性气道疾病的大量危险度因子(其中的一些可能在它们的成因中起作用),烟草烟雾保持COPD的主要的和最重要的原因。吸的烟的数目越大,发展出纤维变性气道疾病的风险越大。发展出纤维变性气道疾病的压倒性多数的人是吸烟者,并且他们的肺功能比不吸烟者降低得更快。

[0101] 最有效的干预是停止吸烟,优选地在早期阶段。戒烟的吸烟者将不会恢复失去的肺功能,但是减退速率可以回复至非吸烟者的减退速率。在早期阶段停止吸烟改善预后,而不管戒烟需要多少尝试。个体对发展纤维变性气道疾病的易感性关于吸烟变化。大约15%

的吸烟者将发展出临床上显著的COPD,而大约50%将永远不发展出任何症状。肺功能的降低是逐步的,并且因为患者可以适应呼吸急促的症状,或可能未注意该症状,该疾病经常被延误诊断。研究已经显示取决于每天吸的烟的数目,24-47%的吸烟者发展出气流阻塞。暴露于被动吸烟增加对该疾病的易感性。

#### [0102] 4.1.2. $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺陷

[0103] 此罕见的遗传状况导致肺中关键的抗蛋白酶保护系统之一的完全缺乏。其是影响1:4000的人口的隐形障碍。患有 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺陷的患者处于在早期年龄——20和40岁的年龄之间——发展出气肿的危险中,并且通常具有重度家族病史。患有该缺陷和气肿的患者从每个父母遗传一个异常基因;也就是说,父母是该基因的携带者。这样的父母将具有血液中正常水平一半的抗胰蛋白酶,其可以足够保护免于发展出气肿。同样地, $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺陷患者的全部儿童将携带一个异常基因,但是将不受影响。 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺陷的两种常见形式由编码 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶的基因中的点突变造成。

#### [0104] 4.2. 相关的危险度因子

##### [0105] 4.2.1. 环境污染

[0106] 存在有力的证据表明纤维变性气道疾病可以被空气污染恶化,但是当与吸烟相比时,污染在纤维变性气道疾病的病因中的作用很小。具有大量微粒物质、碳和二氧化硫的空气污染——其通过煤和石油化石燃料的燃烧产生——是纤维变性气道疾病的发展中重要的原因或辅因子。这些主要地源自汽车废气排放,并且具体而言,光化学污染物比如臭氧受到谴责。在发展中国家,具体地对女性而言,通风不良的家庭中来自燃烧用于烹饪和供暖的生物燃料的室内空气污染可以是纤维变性气道疾病比如COPD的重要的危险度因子。

##### [0107] 4.2.2. 职业因素

[0108] 其中工作者暴露于煤、二氧化硅和阳离子的一些职业——比如矿工、纺织工人和水泥工——与纤维变性气道疾病的增加的风险相关联。自20世纪50年代起,暴露于镉——一种重金属——和焊接烟气已经被认为是气肿的原因。

[0109] 许多粉尘职业比暴露于气体或烟气更危险,并且与慢性支气管炎和多种形式的气道阻塞性疾病的发展相关联。船坞焊工和捻缝工也已知具有发展出纤维变性气道疾病的增加的风险,以及在暴露于水泥粉尘的建筑业中工作的那些。

##### [0110] 4.2.3. 儿童期呼吸感染

[0111] 出生后第一年内的胸部感染——比如肺炎和细支气管炎——可以在以后的生活中易于发展出COPD。这可能是由于出生时直到早期成年期肺生长结束呼吸系统的不完全发育。如果发育中的肺被伤害,将不能达到最大的潜在肺功能,其在早年产生COPD的症状。

#### [0112] 4.3. 其它危险度因子

[0113] 其它危险度因子——其在成因中起作用和/或充当纤维变性气道疾病的早期症状,比如肺纤维组织形成——包括超敏感性肺炎(最通常由吸入被细菌、真菌或动物制品污染的粉尘造成)、一些典型的结缔组织疾病(比如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)和硬皮病)、涉及结缔组织(比如肉样瘤病和韦格纳肉芽肿病)的其它疾病、感染、某些药物(例如胺碘酮、博来霉素、白消安、甲氨蝶呤、和呋喃妥因)、和对胸部的放射疗法。

#### [0114] 5. 肝组织重构

[0115] 肝组织重构具有临床兴趣,因为对肝的慢性损伤诱导坏死或具有随之增加的细胞

外基质 (ECM) 的沉积的实质, 其是发生肝硬化、肝细胞癌和肝纤维化的原因 (Moshage H., J.Pathol.1997;181:257-266)。在重构期间, 肝经受原始架构的重排, 以及随之发生的空间组织的变化和组织学边界的重新定义 (Giannelli G.等, Histol.Histopathol.2003;18:1267-1274)。组织边界的破除和组织架构的重排似乎由基质金属蛋白酶 (MMP) —— 锌-肽链内切酶的大家族, 其具有针对ECM组分的蛋白水解活性 —— 调控 (Giannelli G.等, Histol.Histopathol.2003;18:1267-1274)。

[0116] MMP家族的一个成员MMP2被发现遍及人体并且具备针对ECM的宽的作用谱 (Giannelli G.等, Histol.Histopathol.2003;18:1267-1274)。它作为酶原被分泌并且在MMP抑制剂 —— 金属蛋白酶-2的组织抑制剂 (TIMP2) —— 的帮助下通过膜型MMP (MT1-MMP) 在细胞表面处被活化 (Strongin A.Y., 等, Biol.Chem.1993;268:14033-14039)。MMP2的蛋白水解活性通过TIMP2的存在被平衡, 其不仅通过促进将MMP2结合至MT1-MMP来活化MMP2, 而且抑制MMP-2, 在ECM蛋白质水解的调控中产生反馈系统 (Fridman R.等, Biochem.J.1993;289 (Pt 2):411-416)。

[0117] 炎症和炎症的介质也在肝组织重构中发挥作用 (Giannelli G.等, Histol.Histopathol.2003;18:1267-1274)。已经报道了大量不同的细胞因子 —— 包括肿瘤坏死因子 (TNF) - $\alpha$ 、白介素 (IL) - $1\beta$ 、转化生长因子 (TGF) - $\beta 1$  和血小板源生长因子 (PDGF) —— 在慢性肝炎期间在肝实质中上调 (Castilla A.等, N.Engl.J.Med.1991;324:933-940)。细胞因子的改变的网络被认为不仅在介导炎症中而且在介导MMP和TIMP的表达中发挥作用, 从而影响ECM蛋白的局部蛋白质水解 (Knittel T.等, J.Hepatol.1999;30:48-60)。

#### [0118] 5.1肝纤维化

[0119] 肝纤维化的发病机理涉及纤维状胶原和其它细胞外基质蛋白的显著沉积。它是响应于通过因素比如乙醇摄入、病毒感染、药物、毒素、胆汁郁积和代谢障碍引起的各种持续性肝损伤创伤愈合的动态过程。肝纤维化扭曲肝架构, 减少内皮细胞穿孔 (fenestration) 的数目并且引起门静脉高血压 (Mormone E.等, Chem.Biol.Interact.2011September 30;193 (3):225-231)。关键事项是活化静息肝星状细胞和将其转化入成肌纤维细胞样细胞, 以及随后的蛋白质比如 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白、间质胶原、基质金属蛋白酶、金属蛋白酶的抑制剂和蛋白多糖的上调 (Mormone E.等, Chem.Biol.Interact.2011September 30;193 (3):225-231)。氧化应激是肝纤维化的发作的主要影响因素, 并且其通常与抗氧化防御的降低相关联 (Mormone E.等, Chem.Biol.Interact.2011September 30;193 (3):225-231)。目前, 对晚期肝纤维化不存在有效的疗法。在它的早期阶段, 肝纤维化在中止病原体之后是可逆的; 在申请人的认识中, 肝纤维蛋白发生 (fibrinogenesis) 的过程中的最新发展建议从晚期纤维化恢复的能力是可能的 (Pellicoro A, 等, Fibrogenesis&Tissue Repair 2012,5 (Suppl 1):S26;Benyon R C and Iredale J P, Gut 2000;46:443-446 (April))。

#### [0120] 5.1.1病因学

[0121] 大多数慢性肝病与纤维化相关联并且表征为实质损害和炎症。酗酒、慢性病毒性肝炎 (HBV和HCV)、肥胖、自身免疫性肝炎、寄生虫病 (例如, 血吸虫病)、代谢障碍 (例如, 血色病和威尔逊病)、胆系疾病、持续暴露于毒素和化学品、和药物诱导的慢性肝病是最常见的肝纤维化的病因 (Mormone E.等, Chem.Biol.Interact.2011September 30;193 (3):225-

231)。

#### [0122] 5.1.1.1酒精消耗

[0123] 酒精消耗在全世界是慢性肝病的发病机理中主要的病因,其导致脂肪肝、酒精性肝炎、纤维化/硬化、和肝细胞癌 (Miller AM, 等, *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 2011;35 (5) :787-793)。酒精代谢的产物乙醛增加转化生长因子B1 (TGF $\beta$ 1) 的分泌和诱导肝星状细胞 (HSC) ——肝内的一种关键的产胶原的细胞——中的TGF $\beta$ II型受体表达 (Anania F A, 等, *Arch.Biochem.Biophys.*1996;331 (2) :187-193)。TGF $\beta$ 1是患有脂肪变性和脂肪性肝炎的患者中的酒精性肝病 (ALD) 的进展中的关键因子,并且作为酒精诱导的肝纤维化的介体发挥重要作用 (Weng H L, 等, *Hepatology* 2009;50 (1) :230-243)。乙醛还选择性地诱导Smad3而不是Smad2的磷酸化 (Greenwel P, 等, *Hepatology* 2000;31 (1) :109-116)。乙醇和乙醛二者均诱导COL1A2启动子和上调胶原I蛋白表达 (Chen A, *Biochem.J.*2002;368 (Pt 3) :683-693)。

[0124] 肝酒精代谢生成活性氧种类 (ROS), 其引起显著的细胞死亡 (Parola M和Robino G, *J.Hepatol.*2001;35 (2) :297-306)。氧化应激促进干细胞坏死和/或凋亡。在肝细胞内生成ROS可以是改变的代谢状态的结果,这是由于其在非酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎中发生 (Mormone E. 等, *Chem.Biol.Interact.*2011September 30;193 (3) :225-231)。可选地,它可以如在酒精性脂肪性肝炎中一样由乙醇代谢引起,其中ROS主要由线粒体电子传递链——细胞色素P450同种型比如细胞色素P4502E1 (CYP2E1)、受损的线粒体、黄嘌呤氧化酶、NADPH氧化酶——生成,并且生成脂质过氧化-终产物 (Haorah J, 等, *Free Radic.Biol.Med.*2008;45 (11) :1542-1550)。此外,已知慢性酒精消耗降低谷胱甘肽水平,因而有助于肝损伤 (Cederbaum A I, *World J.Gastroenterol.*2010;16 (11) :1366-1376)。由受损的邻近细胞释放的ROS源介体可以直接地影响肝星状细胞 (HSC) 性状。ROS可能经由大量关键的信号转导途径和转录因子——其包括c-jun N-末端激酶 (JNK)、激活蛋白1 (AP-1) 和核因子 $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ——的激活上调与纤维蛋白发生相关的关键基因的表达,包括I型前胶原、单细胞趋化蛋白1 (MCP-1) 和金属蛋白酶-1的组织抑制剂 (TIMP1) (Battaller R, 等, *Journal of Clinical Investigation* 2005;115 (2) :209-218)。

#### [0125] 5.1.1.2慢性病毒性肝炎

[0126] 慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 和丙型肝炎病毒 (HCV) 在全世界是肝病的最常见的病因, 分别有估计3,500,000,000和1,700,000,000名患有慢性感染的个体 (Custer B, 等, *J.Clin.Gastroenterol.*2004;38 (10) :S158-S168)。在两种病例中,存在显著的慢性肝损伤并且随后进展至晚期肝纤维化。

#### [0127] 5.1.1.3肝纤维化的其它病因

[0128] 有助于肝纤维化的其它因素是肥胖和脂肪变性,其可以导致非酒精性脂肪肝和慢性脂肪性肝炎。也已经在发展中国家中的非肥胖个体中报道了非酒精性脂肪肝 (Das K, 等, *Hepatology*,2010;51 (5) :1593-1602)。

[0129] 自身免疫性肝炎——其是肝细胞中人白细胞抗原 (HLA) II类的异常呈现的结果——引起针对宿主肝脏的细胞介导的免疫反应,其可以导致肝纤维化 (Lim Y S, 等, *J.Hepatology*,2008;48 (1) :133-139)。寄生虫感染如血吸虫病也已经显示引发晚期肝纤维化和门静脉高血压 (Andersson K L和Chung R T, *Curr.Treat.Options Gastroenterol.*,

2007;10 (6) :504-512)。

[0130] 代谢障碍比如血色病和威尔逊病通常伴随慢性肝炎和纤维化(Lefkowitz J H, Curr.Opin.Gastroenterol.,2006;22 (3) :198-208)。在遗传性血色病中,包括肝的组织和器官中铁的过量吸收和积聚与HFE(High-iron)基因中的突变相关(Feder J N,等,J.Hepatol.,2003;38 (6) :704-709)。铁的病理学积聚加剧氧化应激,其导致增加的脂质过氧化。这导致细胞器膜的破坏并且转而经由肝细胞坏死和/或凋亡导致细胞死亡(Sidorska K,等,J.Biotech.,Computational Bio.And Bionanotech.,2011;92 (1) :54-65)。威尔逊病或肝豆状核变性是导致肝中的铜积聚的遗传障碍并且是由于运输铜的APTase(ATP7B)中的突变(Zhang S,等,Hum.Mol.Genet.,2011Aug 15;20 (16) :3176-3187)。威尔逊病患者表征为由严重的线粒体变化引起的肝纤维化,其与增加数目的过氧化物酶体、细胞质脂滴以及由高电子密度溶酶体围绕的脂质液泡(lipid vacuole)形成的典型的胞质体(cytoplasmic body)——脂溶酶体(lipolysosome)的存在相关联。细胞核频繁地涉及核质的解体和糖原内含物(Fanni D,等,Curr.Med.Chem.,2014;DOI:10.2174/0929867321666140601163244)。

[0131] 由于胆道阻塞的胆汁郁积导致慢性门静脉纤维化和最终的硬化。而且,慢性暴露于毒素或化学品比如N-亚硝基二甲胺、四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)或硫代乙醇胺在实验动物模型中导致严重的肝纤维化(George J,等,Gene Therapy,2007;14 (10) :790-803;Domoenicali M,等,J.Hepatol.,2009;51 (6) :991-999;Salguero P R,等,Lab.Invest.2008;88 (11) :1192-1203)。在人中,暴露于这些化学品是罕见的并且通常发生在经常使用这些化学品的行业中(Mormone E.等,Chem.Biol.Interact.2011September 30;193 (3) :225-231)。

[0132] 5.2.涉及肝纤维化的发病机理的细胞类型

[0133] 5.2.1肝星状细胞

[0134] 肝星状细胞(HSC)存在于肝细胞和窦内皮细胞之间的迪赛间隙中(Friedman S L, Gastroenterology,2008;134 (6) :1655-1669)。静息HSC表征为结蛋白的显著表达和维生素A储存。在肝损伤之后,HSC失去维生素A含量,增加 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达,获得成肌纤维细胞样表型,成为增殖的、能动的、促纤维发生的和收缩的,并且显示出丰富的粗面内质网(Gressner A M,Kidney International,1996;49:S39-S45)。

[0135] 已知许多因子有助于HSC的活化。对肝细胞的损害和库普弗细胞(Kupffer cell)活化仍然被认为是驱动HSC活化的主要效应物(Nieto N,等,J.Biol.Chem.2002;277 (12) :9853-9864;Nieto N,Hepatology,2006;44 (6) :1487-1501)。由受损的肝细胞释放的介体比如脂质过氧化产物、药物或肝毒素的中间代谢物、来自酒精代谢的乙醛和1-羟乙基自由基、以及ROS(例如,过氧化氢和超过氧化物自由基)是HSC活化的强有力的诱导物(Mormone E.等,Chem.Biol.Interact.2011September 30;193 (3) :225-231)。

[0136] 活化的库普弗细胞也释放对HSC活化至关重要的ROS和细胞因子(Nieto N, Hepatology,2006;44 (6) :1487-1501)。它们是TGF $\beta$ 和血小板源生长因子(PDGF)——两种有力的促纤维发生的细胞因子,其传统上被认为是对HSC的关键的纤维发生和增殖性刺激——的主要来源(Tsukamoto H,Alcoholism-Clinical and Experimental Research,1992;23 (5) :911-916)。库普弗细胞吞噬活性生成大量的ROS,其可以进一步活化HSC并且诱导它们的纤维发生潜能。此外,已经显示了协同添加乙醇和花生四烯酸通过涉及TNF $\alpha$ 、减少的谷胱甘肽、和TGF $\beta$ 的机制活化库普弗细胞调节纤维发生反应(Cubero F J和Nieto N,

Hepatology, 2008; 48 (6) : 2027-2039)。

[0137] 同样, ROS的细胞色素P4502E1-依赖性生成已经显示对肝细胞和HSC的共培养中增加的胶原I蛋白合成是关键的 (Nieto N, 等, J. Biol. Chem., 2002; 277 (12) : 9853-9864)。

#### [0138] 5.2.2 门静脉成纤维细胞

[0139] 健康肝脏中的门静脉结缔组织被静息门静脉成纤维细胞围绕, 其构成在门静脉纤维化中暗示的第二干细胞群 (Tuchweber B, 等, Laboratory Investigation, 1996; 74 (1) : 265-278)。来源于小的门静脉血管, 它们表达与HSC不同的标志物 (例如弹性蛋白) (Li Z, 等, Hepatology, 2007; 46 (4) : 1246-1256)。胆管细胞的增殖经常伴随门静脉成纤维细胞的增殖, 其形成在胆管结构周围的洋葱状构型并且获得成肌纤维细胞表型。这些细胞被认为参与细胞外基质 (ECM) 在门静脉区域中的早期沉积 (Desmouliere A, 等, Lab Invest, 1997; 76 (6) : 765-778)。

#### [0140] 5.2.3 骨髓源间充质干细胞

[0141] 证据表明骨髓源干细胞在肝纤维化的进展和消退二者期间被募集。在从CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化消退期间, 骨髓源间充质干细胞迁移入纤维化的肝, 它们在其中可以表达基质金属蛋白酶-13 (MMP13) 和MMP9 (Cheng Y J, 等, Life Sci., 2009; 85 (13-14) : 517-525)。此外, 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和肝细胞生长因子 (HGF) 处理显著地增强了骨髓源细胞迁移入纤维化的肝并且加速肝纤维化的消退 (Higashiyama R, 等, Hepatology, 2007; 45 (1) : 213-222)。肝细胞生长因子 (HGF) 连同粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 的过表达协同地刺激MMP9表达, 然后是纤维化瘢痕的加速解决 (Bird T G, 等, Cell Tissue Res., 2008; 331 (1) : 283-300)。虽然已经在人肝纤维化中显示了骨髓源细胞的显著贡献, 但是仍不清楚涉及哪种类型的间充质干细胞 (Forbes S J, 等, Gastroenterology, 2004; 126 (4) : 955-963)。

#### [0142] 5.2.4 肝细胞和胆管上皮细胞

[0143] 上皮细胞至间充质细胞转化 (EMT) 浮现为源自定居肝细胞或胆管上皮细胞的损伤相关间充质细胞的可能的来源 (Dooley S, 等, Gastroenterology, 2008; 135 (2) : 642-659; Nitta T, 等, Hepatology, 2008; 48 (3) : 909-919)。诱导EMT的主要分子是TGF $\beta$ 、表皮生长因子 (EGF)、胰岛素样生长因子-II (IGF-II) 和成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2) (Zeisberg M, 等, J. Biol. Chem., 2007; 282 (32) : 23337-23347)。表达白蛋白的肝细胞也响应于CCl<sub>4</sub>体内表达或响应于TGF $\beta$ 1体外表达成纤维细胞特异性蛋白-1 (FSP 1) (Zeisberg M, 等, J. Biol. Chem., 2007; 282 (32) : 23337-23347)。已经报道了肝细胞响应于TGF $\beta$ 1体外表达COL1A1, 和Smad信号传导介导EMT (Kaimori A, 等, J. Biol. Chem., 2007; 282 (30) : 22089-22101)。

[0144] 已经描述了胆管上皮细胞参与肝纤维发生中的EMT。在原发性胆汁性肝硬化中, 已经显示了胆管的细胞表达成纤维细胞特异性蛋白-1 (FSP 1) 和波形蛋白——成纤维细胞的早期标志物 (Robertson H, 等, Hepatology, 2007; 45 (4) : 977-981)。胆管上皮细胞中的EMT的结果是放大门静脉成纤维细胞的池 (pool), 其显著地有助于门静脉纤维化。人胆管上皮细胞的体外研究已经确认了这些临床观察 (Rygiel KA, Lab. Invest., 2008; 88 (2) : 112-123)。因而, EMT可以被认为是参与慢性胆汁郁积性肝病的发病机理的机制。

#### [0145] 5.2.5 纤维细胞

[0146] 纤维细胞是最初与皮下创伤中的组织修复相关联的具有成纤维细胞样性质的循

环的骨髓源CD34<sup>+</sup>细胞亚群 (Bucala R.等, Mol. Med. 1994; 1 (1) : 71-81)。它们包括大约1%的表达间充质细胞的标志物的白细胞的循环池的一部分 (Moore B B,等, Am. J. Pathol., 2005; 166 (3) : 675-684)。已经假定骨髓源循环CD34<sup>+</sup>成纤维细胞表示Abcb4<sup>-/-</sup>小鼠中的肝纤维发生的关键介体, Abcb4<sup>-/-</sup>小鼠表示用于人中的胆管病 (cholangiopathy) 的可繁殖的、良好表征的非手术小鼠模型 (Roderfeld M,等, Hepatology, 2010; 51 (1) : 267-276)。

[0147] 5.3肝纤维化的分子发病机理

[0148] 5.3.1细胞-细胞和细胞-基质相互作用

[0149] 正常的细胞-细胞和细胞-基质相互作用中的改变在肝纤维化的发病机理中发挥显著的作用。当正常的细胞-细胞和细胞-基质相互作用由于肝细胞坏死或炎性细胞的浸润被改变时,建立了引发纤维发生反应的新的相互作用 (Mormone E.等, Chem. Biol. Interact. 2011 September 30; 193 (3) : 225-231)。在纤维化的肝中,在门静脉周和窦周区域中的ECM的组成中发生显著的定量和定型变化 (Zeisberg M,等, Mol. Cell Biochem., 2006; 283 (1-2) : 181-189)。纤维化的瘢痕通常由I和III型纤维状胶原、蛋白多糖、纤连蛋白和透明质酸组成 (George J,等, International J. Biochem. & Cell Biol., 2004; 36 (2) : 307-319),结果,发生肝的生理学架构的改变,特别是在迪赛间隙中,其中低电子密度ECM被替换为纤维状胶原和纤连蛋白的ECM。这导致失去内皮细胞穿孔、邻近细胞之中受损的溶质交换、改变的肝细胞功能和随后的非实质细胞损害 (Hernandez-Gea V. and Friedman S L, Annu. Rev. Pathol. 2011; 6: 425-456)。

[0150] 5.3.2氧化应激

[0151] 如本文使用的术语“氧化应激”指的是产生活性氧种类 (游离基) 和抗氧化防御之间的平衡中的紊乱。

[0152] 慢性HBV感染和酒精的长期消耗通过增加的活性氧种类 (ROS) 的生成诱导细胞损害 (Muriel P, Hepatol. Int. 2009; 3 (4) : 526-536)。

[0153] 氧化应激,其有利于线粒体通透性转变,能够促进肝细胞坏死和/或凋亡 (Mormone E.等, Chem. Biol. Interact. 2011 September 30; 193 (3) : 225-231)。已经假定在一些临床相关条件中,在肝细胞内生成ROS可以代表如非酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎中的改变的代谢状态,或如在酒精性脂肪性肝炎中发生的显著的乙醇代谢 (Mormone E.等, Chem. Biol. Interact. 2011 September 30; 193 (3) : 225-231)。

[0154] ROS主要经由线粒体电子传递链或经由细胞色素P450 (大部分是细胞色素P4502E1)、NADPH氧化酶、黄嘌呤氧化酶的活化或经由线粒体损害生成。生成的ROS可以直接地影响HSC和成肌纤维细胞性状 (Tilg H和Hotamisligil G S, Gastroenterology, 2006; 131 (3) : 934-945; Nieto N, Hepatology, 2006; 44 (6) : 1487-1501)。ROS经由信号转导途径和转录因子——包括JNK、激活蛋白-1 (AP-1) 和NFκB——的活化上调关键的纤维化相关基因比如COL1A1、COL1A2、MCP1和TIMP1的表达 (Battaller R和Brenner DA, Journal of Clinical Investigation, 2005; 115 (2) : 209-218)。HSC和成肌纤维细胞中的ROS生成响应于几种已知的促纤维发生介体发生,其包括血管紧张素II、血小板源生长因子 (PDGF)、TGFβ和瘦蛋白 (De Minicis S,等, Gastroenterology, 2006; 131 (1) : 272-275)。总的来说,抗氧化防御系统比如GSH、过氧化氢酶或SOD的降低,连同增强的脂质过氧化通过增强胶原I蛋白表达导致促纤维发生反应 (George J, Clin. Chim. Acta, 2003; 335 (1-2) : 39-47)。

[0155] p38促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)在促炎细胞因子的上调中可以是必需的,并且可以被转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、和氧化应激活化(Tormos A M,等,Hepatology,2013;57(5):1950-1961)。p38的底物包括蛋白激酶,比如MAPKAP激酶2(MK2)和MK5,以及转录因子,比如ATF2、p53和Mitf(Hui L,等,Cell Cycle,2007;6(20):2429-2433)。这些多样的靶标介导激活的p38信号至多种类型的细胞功能比如分化、凋亡、细胞因子产生和细胞周期控制(Nakagawa H和Maeda S,Pathology Research International,2012;doi:10.1155/2012/172894)。最近的体内研究已经显示了在c-JunNH2-末端激酶(JNK)和p38上会聚的应激活化的促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号传导在炎症-介导的肝损伤和代偿性肝细胞增殖中发挥核心作用(Sakurai T,等,PNAS,2006;103(28):10544-10551;Hui L,等,Nature Genetics,2007;39(6):741-749;Hui L,等,JCI,2008;118(12):3943-3953;Sakurai T,等,Cancer Cell,2008;14(2):156-165;Maeda S,Gastroenterology Research and Practice,2010;doi:10.1155/2010/367694;Wagner E F和Nebreda A R,Nature Reviews Cancer,2009;9(8):537-549;Min L,等,Seminars in Cancer Biology,2011;21(1):10-20)。

### [0156] 5.3.3MMP和TIMP

[0157] ECM是经受恒定的重构的高度动态的环境。当ECM重构变得过量或不受控时引起威胁生命的病理学条件。涉及肝ECM降解的细胞是HSC、中性粒细胞和巨噬细胞。MMP是负责ECM降解的主要的酶(Goto T,等,Pathophysiology,2004;11(3):153-158)。基质金属蛋白酶-1的组织抑制剂(TIMP)具有抑制MMP的能力(Goto T,等,Pathophysiology,2004;11(3):153-158)。因此,调控MMP-TIMP平衡对高效的ECM重构是至关重要的。MMP-TIMP平衡响应于多种促纤维发生的损伤变得倾斜。活化的HSC不仅合成和分泌ECM蛋白比如I型和III型胶原,而且产生MMP1和MMP13(Iredale J P,等,Clin.Sci.(Lond),1995;89(1):75-81;Knittel T,等,Histochem.Cell Biol.,2000;113(6):443-453)。然而,MMP1和MMP13表达随着HSC活化进展降低,而其它MMP的活性保持相对恒定,除MMP2和MMP9之外(Benyon R C和Arthur M J,Semin.Liver Dis.2001;21(3):373-384)。MMP2活性的增加与正常的小叶架构的扭曲相关联,其进一步活化HSC(Benyon R C和Arthur M J,Semin.LiverDis.2001;21(3):373-384)。活化的HSC上调TIMP1和TIMP2的表达和合成(Iredale J P,等,Hepatology,1996;24(1):176-184)。TIMP1不仅通过阻断MMP阻止快速增加的ECM的降解,而且抑制活化的HSC的凋亡(Murphy F R,等,J.Biol.Chem.,2002;277(13):11069-11076)。净结果是导致瘢痕化的迪赛间隙内的成熟胶原纤维的沉积。

### [0158] 6.肾纤维化

[0159] 肾纤维化是在几乎每种类型的慢性肾病中发生的细胞外基质的过量累积的结果(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217)。从慢性肾病至肾纤维化的进展经常导致广泛的组织瘢痕化、肾实质的完全破坏、和末期肾衰竭——一种需要透析或肾移植的状况(Schieppati A等,Kidney International 2005;68(Suppl 1):S7-S10)。肾纤维化代表慢性的、持续的损伤后肾组织的失败的创伤愈合过程。几个细胞途径——包括系膜和成纤维细胞活化,以及肾小管上皮细胞-间充质细胞转化——已经被认定为在肾病状况中生成产生基质的细胞(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217)。

### [0160] 6.1肾纤维化中的细胞性活动

[0161] 肾纤维化经常在病理学上被描述为肾小球硬化症、肾小管-间质纤维化,炎性浸润和由肾小管萎缩、毛细血管损失和足细胞耗竭表征的肾实质损失(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217)。导致这些组织学表现的潜在的细胞性活动包括系膜和成纤维细胞活化、肾小管上皮细胞-间充质细胞转化(EMT)、单核细胞/巨噬细胞和T细胞浸润、和细胞凋亡(Eddy AA,Pediatr.Nephrol.2000;15:290-301;Iwano M和Neilson EG,Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.2004;13:279-284;Hirschberg R,J.Am.Soc.Nephrol.2005;16:9-11;Liu Y,J.Am.Soc.Nephrol.2004;15:1-12)。

[0162] 6.2肾纤维化的分子发病机理

[0163] 虽然在肾纤维化的发病机理中已经表明了多于十二种不同的纤维发生因子,包括多种细胞因子和激素、代谢和血液动力学因子,但是广泛接受的是,转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )和其下游Smad信号传导介体发挥至关重要的作用(Bottinger EP和Bitzer M,J.Am.Soc.Nephrol.2002;13:2600-2610;Schnaper HW等,Am.J.Physiol.Renal.Physiol.2003;284:F243-F252)。在体外,TGF- $\beta$ 作为单独的因子可以刺激系膜细胞、间质成纤维细胞、和肾小管上皮细胞经肌成纤维性活化或转化,以成为产生基质的纤维发生细胞(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217;Bottinger EP和Bitzer M,J.Am.Soc.Nephrol.2002;13:2600-2610;Schnaper HW等,Am.J.Physiol.Renal.Physiol.2003;284:F243-F252)。外源性TGF- $\beta$ 的表达——经由体外基因递送或在转基因小鼠中——引起肾纤维化(Liu Y,Kidney International 2006)。相反地,通过多种策略抑制TGF- $\beta$ 阻抑肾纤维化损伤并且阻止肾功能的进行性损失(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217;Bottinger EP和Bitzer M,J.Am.Soc.Nephrol.2002;13:2600-2610;Schnaper HW等,Am.J.Physiol.Renal.Physiol.2003;284:F243-F252)。TGF- $\beta$ 诱导还似乎是直接地或间接地整合许多其它纤维发生因子的作用的会聚途径。这些中的一些,比如血管紧张素II和高葡萄糖,充当上游TGF- $\beta$ 诱导物,然而其它,比如结缔组织生长因子,担当其下游效应物(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217;Bottinger EP和Bitzer M,J.Am.Soc.Nephrol.2002;13:2600-2610;Schnaper HW等,Am.J.Physiol.Renal.Physiol.2003;284:F243-F252)。

[0164] TGF- $\beta$ 信号通过其细胞膜I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体被转导(Bottinger EP和Bitzer M,J.Am.Soc.Nephrol.2002;13:2600-2610)。受体活化引发其下游信号传导介体Smad2和Smad3的磷酸化和活化(Liu Y,Kidney International 2006)。磷酸化的Smad2/3结合至共同的配偶体Smad4,并且随后易位入细胞核,它们在其中控制TGF- $\beta$ -应答基因的转录(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217;Bottinger EP和Bitzer M,J.Am.Soc.Nephrol.2002;13:2600-2610;Schnaper HW等,Am.J.Physiol.Renal.Physiol.2003;284:F243-F252)。TGF- $\beta$ /Smad信号传导通过多种水平的调节——其包括TGF- $\beta$ 基因表达、latent TGF- $\beta$ 活化、其受体表达、和受体后Smad信号传导——在受体前和受体后阶段二者处被调控(Liu Y,Kidney International 2006)。在纤维化的肾中,众多机制导致机能亢进的TGF- $\beta$ /Smad信号传导,其包括诱导TGF- $\beta$ 表达、TGF- $\beta$ 蛋白的增强的翻译后活化和其从潜在的复合体释放。TGF- $\beta$ 的受体还在患病的肾中被诱导(Liu Y,Kidney International 2006;69:213-217)。

[0165] 正常的肾中的Smad信号传导被已知为Smad转录辅阻遏物的蛋白质家族严密地约束,其包括SnoN、Ski和TGIF (Liu Y, *Kidney International* 2006;69:213-217)。通过多种机制,这些Smad拮抗物有效地约束Smad-介导的基因转录,从而保护组织免于不需要的TGF- $\beta$ 应答 (Liu Y, *Kidney International* 2006;69:213-217)。最近,已经表明SnoN和Ski在纤维化的肾中渐进地减少,这说明Smad拮抗物的损失是放大TGF- $\beta$ 信号的重要机制 (Yang J等, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14:3167-3177)。

#### [0166] 6.3肾纤维化中的基质降解酶

[0167] 一般认为在纤维化的肾中可见的过量的基质积聚起因于基质组分的过度产生和其降解中的缺陷二者。此理念由如下的许多观察支持:纤溶酶原活化因子抑制剂-1和基质金属蛋白酶-1的组织抑制剂经常在患病的肾中被上调。肾组织产生大量蛋白酶,其中纤溶酶原/纤维蛋白溶酶和基质金属蛋白酶 (MMP) 系统构成了能够降解基质蛋白的所有组分的蛋白水解网络 (Liu Y, *Kidney International* 2006)。

[0168] 考虑到它们的蛋白水解能力,基质降解酶在历史上被认为减少基质积聚,从而在损伤后减弱肾纤维化。然而,最近的使用敲除小鼠的遗传研究已经描绘出这些蛋白质关于体内纤维化损伤的功能的不同的和复杂的图画 (Liu Y, *Kidney International* 2006)。已经报道了组织型纤溶酶原活化因子 (tPA) 的清除保护肾脏免于在阻塞性肾病发展出间质纤维化,其似乎与它的蛋白水解活性没有关系 (Yang J等, *J. Clin. Invest.* 2002;110:1525-1538)。tPA在阻塞性肾病中的致病作用主要取决于其诱导MMP-9基因表达的能力 (Liu Y, *Kidney International* 2006)。增加的MMP-9破坏肾小管基膜的完整性,其导致促进肾小管EMT。进一步的调查揭示了tPA能够结合至细胞膜受体低密度脂蛋白受体相关蛋白-1,诱导其在酪氨酸残基上的磷酸化,引发细胞内信号转导,和反式激活肾间质成纤维细胞中的MMP-9基因表达 (Liu Y, *Kidney International* 2006)。

[0169] 纤维蛋白溶酶——一种可以直接降解基质蛋白和活化MMP的丝氨酸蛋白酶——也被认为有利于减少肾纤维化 (Liu Y, *Kidney International* 2006)。然而,纤溶酶原基因的敲除没有加剧输尿管阻塞后的纤维化损伤。相反,缺少纤维蛋白溶酶的小鼠展示了减少的胶原积聚,这表明了此酶的显著的致病作用 (Edgton KL等, *Kidney International* 2004;66:68-76)。

[0170] MMP-2还被发现必须和足以体外诱导肾小管EMT (Cheng S和Lovett DH, *Am. J. Pathol.* 2003;162:1937-1949)。具有过表达的MMP-2的转基因小鼠展示了纤维化损伤 (Liu Y, *Kidney International* 2006)。最近的研究还表明MMP-3诱导Rac1表达,其引起细胞活性氧种类的增加和促进EMT (Radisky DC等, *Nature* 2005;436:123-127)。

#### [0171] 7. 药物诱导的肾损伤

[0172] 多种体外和体内研究已经显示了某些药物的施用充当引发多种MAPK级联的刺激,其转而介导对肾损伤的细胞反应 (Naughton C.A., *American Family Physician*, vol.78, no.6, pp.743-750, 2008)。已经在急性和慢性肾损伤二者中表明了正常的MAPK信号传导途径的激活和调节异常 (Cassidy H等, *Journal of Signal Transduction*, vol.2012, Article ID 463617, 15页)。人中的肾活检已经显示了MAPK在各种肾脏状况中的上调,这表明参与人肾病 (Cassidy H等, *Journal of Signal Transduction*, vol.2012, Article ID 463617, 15页)。

### [0173] 7.1 抗生素-诱导的肾损伤

[0174] 急性肾损伤(AKI)是抗生素疗法的常见副作用。几种研究已经表明抗生素-诱导的肾损伤中的MAPK信号传导级联由集中不同类别的抗生素引发。

[0175] 例如,Volpini等显示了MAPK可能涉及使用庆大霉素治疗之后的急性肾损伤的发病机理(Volpini R.A.等,Brazilian Journal of Medical and Biological Research, vol.39,no.6,pp.817-823,2006)。简略地,在存在或不存在NF- $\kappa$ B抑制剂的情况下,在庆大霉素处理的大鼠中调查了肾小管间质性肾炎(tubulointerstitial nephritis)的演化期间p-p38MAPK和NF- $\kappa$ B在肾中的表达和其与组织学特征的关系和肾功能。在此研究中获得的数据显示p38MAPK表达在庆大霉素诱导的间质性肾炎的发展期间增加,和这样的改变与NF- $\kappa$ B表达的增强和肾皮质中的炎性过程相关联,这表明p38MAPK途径涉及庆大霉素诱导的肾损伤(Volpini R.A.等,Brazilian Journal of Medical and Biological Research, vol.39,no.6,pp.817-823,2006)。同样地,Ozbek等发现p38-MAPK在庆大霉素处理之后的大鼠肾脏中被上调,并且已经显示了使用降脂药物阿托伐他汀的联合治疗通过抑制p38-MAPK和NF- $\kappa$ B表达减轻庆大霉素诱导的肾毒性(Ozbek E.等,Renal Failure,vol.31,no.5,pp.382-392,2009)。

[0176] 调查肾LLCPK1细胞中的万古霉素暴露对细胞增殖的作用的研究显示了细胞数目和总细胞蛋白的剂量和时间依赖性增加(Cassidy H等,Journal of Signal Transduction,vol.2012,Article ID 463617,15页;King D.W.和Smith M.A.,Toxicology in Vitro,vol.18,no.6,pp.797-803,2004)。这些作用通过使用MAPK抑制剂PD098059预处理被抑制,因而阻止万古霉素-诱导的进入细胞周期。此数据表明了万古霉素的细胞增殖效应和MAPK信号传导级联的诱导之间的关联(Cassidy H等,Journal of Signal Transduction,vol.2012,Article ID 463617,15页;King D.W.和Smith M.A.,Toxicology in Vitro,vol.18,no.6,pp.797-803,2004)。

### [0177] 7.2 神经钙蛋白-抑制剂诱导的肾损伤

[0178] 神经钙蛋白抑制剂(CNI)CsA和FK506广泛地用于移植器官受体。然而,已经显示了在肾同种异体移植物中,CsA和FK506引起肾小管间质性纤维化,以及系膜纤维化(Sutherland B.W.等,Oncogene,vol.24,no.26,pp.4281-4292,2005)。CNI在肾同种异体移植物中的纤维发生作用主要受TGF- $\beta$ 的升高的肾内表达和随后的过量的细胞外基质(ECM)生成介导(Shihab F.S.等,American Journal of Kidney Diseases,vol.30,no.1,pp.71-81,1997;Ignatz R.A.和Massague J.,Journal of Biological Chemistry,vol.261,no.9,pp.4337-4345,1986;Schnaper H.W.等,American Journal of Physiology,vol.284,no.2,pp.F243-F252,2003)。使用大鼠肾系膜细胞的研究已经显示CsA和FK-506以细胞类型特异性方式诱导Y-盒-结合蛋白-1(YB-1)含量的极度快速的和剂量依赖性的增加。YB-1,一种具有促有丝分裂性质的冷休克蛋白家族的成员,其控制——除别的之外——近端肾小管细胞中的TGF- $\beta$ 1翻译,是MAPK ERK1/2的下游靶标(Lu Z.H.等,Molecular and Cellular Biology,vol.25,no.11,pp.4625-4637,2005;Fraser D.J.等,Kidney International,vol.73,no.6,pp.724-732,2008;Hanssen L.等,Journal of Immunology,vol.187,no.1,pp.298-308,2011)。

### [0179] 7.3 化学治疗剂诱导的肾损伤

[0180] 癌症化疗药物非限制性地包括烷化剂(例如,环磷酰胺);抗代谢物(例如,甲氨蝶呤);植物碱(例如,依托泊苷);蒽环类药物(例如,阿霉素(doxirubicin));抗肿瘤抗生素(例如,丝裂霉素C);铂化合物(例如,顺铂);和紫杉烷(例如,紫杉酚)(Chu E.和Devita Jr.V.T.,Eds.,Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2001,Jones and BartlettPublishers,London,UK,2001)。化学治疗剂可以以多种方式引起肾毒性,其中一些药物对肾功能施加即刻效应而其它已知具有累积效应,在长的使用期后引起肾损伤(Vogelzang N.J.,Oncology,vol.5,no.10,pp.97-105,1991)。例如,顺铂——迄今为止最成功的抗肿瘤剂之一——引起急性肾损伤,经常在施用后10天检测到临床上可测量的肾毒性(Cassidy H等,Journal of Signal Transduction,vol.2012,Article ID 463617,15页)。

[0181] 认为MAPK在顺铂诱导的肾毒性中发挥枢纽作用。Arany等显示了ERK而不是p38或JNK/SAPK抑制阻止顺铂诱导的毒性(Arany I.等American Journal of Physiology,vol.287,no.3,pp.F543-F549,2004)。其它研究已经显示了p38的体外和体内药理学抑制均阻止毒性(Ramesh G.和Reeves W.B.,American Journal of Physiology,vol.289,no.1,pp.F166-F174,2005;Francescato H.D.C.等,Life Sciences,vol.84,no.17-18,pp.590-597,2009)。也已经显示了JNK/SAPK抑制在体内导致顺铂诱导的肾毒性的显著减小(Francescato H.D.C.等,Nephrology Dialysis Transplantation,vol.22,no.8,pp.2138-2148,2007)。Pabla等将PKC $\delta$ 认定为顺铂肾毒性的关键调节物。数据显示在顺铂肾毒性期间,Src与小鼠肾裂解产物中的PKC $\delta$ 相互作用,使其磷酸化,和使其活化。在活化后,PKC $\delta$ 调节MAPK而不是p53以诱导肾细胞凋亡。因而,PKC $\delta$ 的抑制药理学地或遗传学地减弱肾细胞凋亡和组织损害,在顺铂治疗期间保持肾功能。相反地,PKC $\delta$ 的抑制在多种癌细胞系中增强顺铂诱导的细胞死亡,并且在几种异种移植和同源小鼠肿瘤模型中显著地增强顺铂的化学治疗效果,同时保护肾脏免于肾毒性(Pabla N.等,Journal of Clinical Investigation,vol.121,no.7,pp.2709-2722,2011;Cassidy H等,Journal of Signal Transduction,vol.2012,Article ID 463617,15页)。

[0182] 7.4非甾体抗炎性药(NSAID)诱导的肾损伤

[0183] 非甾体抗炎性药(NSAID)包括羧酸(例如,阿司匹林);醋酸(例如,双氯芬酸);丙酸(例如,布洛芬和酪洛芬);和Cox-2抑制剂(例如,塞来昔布(celecoxib))。NSAID已知为肾毒性的,具有包括如下的肾毒性谱:急性肾小管坏死、急性肾小管间质性肾炎、肾小球性肾炎、肾乳头坏死、慢性肾衰竭、盐和水潴留(salt and water retention)、高血压、和高钾血症(Perazella M.A.和Tray K.,American Journal of Medicine,vol.111,no.1,pp.64-67,2001;Ejaz P.等,Journal of Association of Physicians of India,vol.52,pp.632-640,2004;Schier R.W.和Henrich W.L.,Journal of the American Medical Association,vol.251,no.10,pp.1301-1302,1984)。

[0184] Hou等通过评估应激标志物血红素加氧酶-1(HO-1)在塞来昔布刺激的肾小球系膜细胞中的表达调查了由NSAID诱导的肾损伤的分子基础(Ho C.C.等,Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1042,pp.235-245,2005)。使用塞来昔布的治疗导致HO-1表达的浓度和时间依赖性增加(Ho C.C.等,Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1042,pp.235-245,2005)。相反地,使用N-乙酰半胱氨酸——一种游离基清

除剂——的治疗强烈地降低HO-1表达,这表明涉及活性氧种类(ROS) (Ho C.C.等,Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1042,pp.235-245,2005)。使用多种MAPK抑制剂的的治疗显示了仅特异性的JNK抑制剂减弱塞来昔布诱导的HO-1表达 (Ho C.C.等,Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1042,pp.235-245,2005)。激酶测定证明了NSAID治疗之后c-JNK的增加的磷酸化和活化 (Ho C.C.等,Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1042,pp.235-245,2005)。使用PI-3K特异性抑制剂的的治疗阻止HO-1表达的增强,其与PDK-1下游底物Akt/蛋白激酶B (PKB) 的磷酸化的抑制相关联 (Ho C.C.等,Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1042,pp.235-245,2005)。此研究的结果表明肾小球系膜细胞中的塞来昔布诱导的HO-1表达可以经由JNK-PI-3K级联由ROS介导 (Ho C.C.等,Annals of the New York Academy of Sciences,vol.1042,pp.235-245,2005)。

#### [0185] 8. 血管纤维化

[0186] 血管纤维化表征为减小的管腔直径和动脉壁增厚,其归因于细胞外基质 (ECM) 的过量沉积。其涉及血管平滑肌细胞 (VSMC) 的增殖、ECM的积聚和基质降解的抑制。其与肾-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS)、氧化应激、炎症因子、生长因子和内皮源细胞因子分泌的不平衡相关联。具体地,已经在血管纤维化的病理生理学中表明了血管紧张素II (Ang II) 和醛固酮 (RAAS的循环效应激素)。转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 已经显示经由结缔组织生长因子 (CTGF) 和成纤维细胞生长因子等的上调在ECM积聚和血管重构中发挥关键作用。基质金属蛋白酶 (MMP) 和金属蛋白酶的抑制剂 (TIMP) 之间的不平衡导致胶原积聚和不利的基质重构。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) 的异常表达和功能也已经被报道有助于病理学纤维化和血管重构的进展 (Lan T-H等,Cardiovascular Pathology 22(2013) 401-407)。

[0187] 已经表明与心血管疾病——包括高血压、高血糖、血脂异常和高同型半胱氨酸血症 (HHcy) ——相关联的风险因素还充当血管纤维化的起始和进展因素 (Lan T-H等,Cardiovascular Pathology 22(2013) 401-407)。

#### [0188] 8.1. 血管纤维化的发病机理

##### [0189] 8.1.1. 肾-血管紧张素-醛固酮系统

[0190] RAAS已经显现为血管重构的发展中的关键环节之一 (Sun Y, Congest. Heart Fail. 2002;8:11-6)。血管紧张素II (Ang II) 和醛固酮——RAAS的循环效应激素——被认为负责血管纤维化的病理生理学。

[0191] Ang II——RAAS的主要效应激素——不仅介导血管收缩的即刻生理效应和血压调节,而且调控血管病理生理学中涉及的许多过程,包括血管细胞的细胞生长/凋亡、VSMC的迁移、炎症反应和ECM重构 (Ruiz-Ortega M等,Hypertension 2001;38:1382-7)。Ang II通过两种主要的特异性受体AT1和AT2作用。将Ang II结合至AT1受体激活一系列信号传导级联,包括表皮生长因子受体 (EGFR)、血小板源生长因子受体 (PDGFR)、胰岛素受体、c-Src家族激酶、Ca<sup>2+</sup>依赖性富含脯氨酸的酪氨酸激酶2 (Pyk2)、黏着斑激酶 (FAK) 和Janus激酶 (JAK),其转而调控脉管系统中的Ang II病理效应 (Hunyady L, Catt KJ, Mol Endocrinol 2006;20:953-70)。AT1也已经通过活化PKC和MAPK——包括ERK1/2、p38MAPK、和c-Jun NH2-末端激酶 (JNK) ——涉及细胞生长和肥大 (Suzuki H等,Curr Med Chem Cardiovasc

Hematol Agents 2005;3:305-22)。Ang II-介导的EGFR活化以Src依赖性、氧化还原敏感性方式,并且还通过钙依赖性和独立性途径发生(Eguchi S等,J Biol Chem 1998;273:8890-6;Ushio-Fukai M等,Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:489-95)。证据表明Ang II通过将酪氨酸-磷酸化的Shc结合至PDGF $\beta$ -R刺激PDGF- $\beta$ 受体(PDGF $\beta$ -R)的磷酸化(Heeneman S等,J Biol Chem 2000;275:15926-32)。Ang II还已经显示增加胰岛素受体 $\beta$ -亚基的丝氨酸磷酸化,引起胰岛素受体底物(IRS-1)失活,其通过使其从下游效应物解偶联(PI3K, PDK1, Akt)和通过靶向其用于在蛋白酶体途径中降解二者(Folli F等,J Clin Invest 1997;100:2158-69;Natarajan R等,Hypertension 1999;33:378-84)。Ang II促进细胞增殖和ECM合成和诱导几种介体,比如TGF- $\beta$ 、结缔组织生长因子(CTGF)、细胞因子(例如,IL-6、TNF- $\alpha$ )、和I型单核细胞趋化蛋白(MCP-1)。通常接受的是,Ang II诱导的ECM产生主要由TGF- $\beta$ 和其下游介体CTGF的上调介导(Border WA, Noble NA, Hypertension 1998;31:181-8;Wolf G, Kidney Int 2006;70:1914-9)。Ang II通过PKC和p38MAPK依赖性途径激活核蛋白至TGF- $\beta$ 1启动子的激活蛋白-1(AP-1)的结合位点的结合。最近的研究已经显示了Ang II还经由TGF- $\beta$ 独立性Smad信号传导途径诱导CTGF表达并且增加涉及基质降解的MMP的产生,其导致血管壁的弱化(Rodriguez-Vita J等,Circulation 2005;111:2509-17;Yang F等,Hypertension 2009;54:877-84)。Ang II已知刺激醛固酮产生,因而促进纤维化和胶原形成(Brilla CG等,J Mol Cell Cardiol 1994;26:809-20)。

[0192] 醛固酮通过几种机制促进纤维化结和胶原形成,其包括上调Ang II受体、刺激TGF- $\beta$ 和CTGF合成、刺激MMP活性、和参与VSMC肥大和内皮功能紊乱(Epstein M, Nephrol Dial Transplant 2003;18:1984-92)。已经报道了醛固酮刺激纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)——纤溶酶原激活物的主要的生理学抑制剂——的表达,其经由p38MAPK级联和盐皮质激素受体二者通过抑制基质降解和诱导CTGF表达涉及ECM积聚(Brown NJ,等,Kidney Int 2000;58:1219-27;Lee YS等,J Korean Med Sci 2004;19:805-11)。醛固酮已经显示经由盐皮质激素受体PKC的活化,和MEK/ERK途径的活性氧种类(ROS)依赖性激活诱导成年大鼠心室肌细胞中的MMP活性(Rude MK等,Hypertension 2005;46:555-61)。

[0193] 8.1.2. 转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

[0194] 转化生长因子(TGF)- $\beta$ 是泛表达的细胞因子,其属于大的超家族,TGF- $\beta$ 1在ECM重构中被最频繁地上调(Massague J等,Cell 2000;103:295-309)。TGF- $\beta$ 发送信号通过两种类型的跨膜的丝氨酸/苏氨酸激酶I型受体和II型受体的异聚体(heteromeric)细胞表面复合体(Derynck R等,Nat Genet 2001;29:117-2)。由II型受体激活的I型受体磷酸化对下游靶蛋白的活化是必需的(Derynck R, Feng XH, Biochim Biophys Acta 1997;1333:F105-50)。

[0195] TGF- $\beta$ 主要地发送信号通过称为Smad的转录因子(Massague J等,Genes Dev 2005;19:2783-810.)。Smad2和Smad3是TGF- $\beta$ /激活素途径的特异性介体,然而Smad1、Smad5和Smad8涉及骨形成蛋白(BMP)信号传导(尤其是BMP-7),其经由I-Smad(Smad6和Smad7)活化抑制VSMC增殖(Singh NN, Ramji DP, Cytokine Growth Factor Rev 2006;17:487-99)。研究已经显示Smad6的过表达可以选择性地抑制BMP受体信号传导,然而Smad7抑制BMP和TGF- $\beta$ /激活素受体信号传导二者(Nakao A等,Trends Mol Med 2002;8:361-3)。导致抑制TGF- $\beta$ 诱导的纤连蛋白、胶原和CTGF表达的Smad7表达还可以由EGF受体的活化、IL- $\gamma$ 信号

传导通过信号转导和转录活化因子 (STAT)、和TNF- $\alpha$ 诱导的NF- $\kappa$ b的活化被诱导 (Wang M等, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1503-9; Ikedo H等, *Int J Mol Med* 2003;11:645-50.)。

[0196] 除Smad途径之外,非Smad途径也参与TGF- $\beta$ 信号传导并且充当与其它主要信号传导途径通讯 (crosstalk) 的节点 (Ruiz-Ortega M等, *Cardiovasc Res* 2007;74:196-206; Bobik A, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1712-20)。JNK/p38、Erk/MAPK、Rho-样GTPase和PI3/Akt途径被认为加强、减弱或调节下游细胞反应,其可能导致TGF- $\beta$ 的改变的效应 (Zhang F等, *J Biol Chem* 2009;284:17564-74)。TGF- $\beta$ 参与许多心血管疾病的发病机理,其包括高血压、再狭窄、动脉粥样硬化、心脏肥大和心力衰竭。TGF- $\beta$ 经由上调几种试剂——包括生长因子 (例如,CTGF、FGF)、相关基因 (例如,c-myc、cjun、junB、p53) 和PAI-1——的产生在ECM积聚和血管重构中发挥关键作用 (Perbal B, *Lancet* 2004;363:62-4; Hayashida T等, *FASEB J* 2003;17:1576-8; Samarakoon R等, *J Cell Physiol* 2005;204:236-46; Seay U等, *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:1005-12)。血管紧张素II、机械应激、内皮素-I、高葡萄糖、温度和pH的极端条件、类固醇和活性氧种类已经被发现作为血管纤维化的介体刺激TGF- $\beta$ 活化 (Ruiz-Ortega M等, *Curr Hypertens Rep* 2003;5:73-9; Li JH等, *Kidney Int* 2003;63:2010-9.)。此外,MMP (比如MMP-2和-9) 增强TGF- $\beta$ 的释放,其刺激TIMP,最终导致ECM (即,ECM积聚) 和血管重构的抑制 (Derynck R, Zhang YE, *Nature* 2003;425:577-84)。

[0197] 8.1.3. 结缔组织生长因子 (CTGF)

[0198] 有力的促纤维发生生长因子CTGF已经涉及成纤维细胞增殖、细胞粘附、血管生成和ECM合成 (Ruperez M等, *Circulation* 2003;108:1499-505)。CTGF途径VSMC增殖、迁移、和ECM的产生,其可以在动脉粥样硬化的发展和进展中发挥作用 (Leask A等, *Curr Rheumatol Rep* 2002;4:136-42)。CTGF表达受几种试剂调控,其包括TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、cAMP、高葡萄糖、地塞米松、因子VIIa、和机械应激 (Lau LF, Lam SC, *Exp Cell Res* 1999;248:44-57)。TGF- $\beta$ 诱导的CTGF产生涉及几种信号途径,包括Smad、Ras/MEK/Erk、Ap-1/JNK、PKC和Tyr,并且其表达可以通过TGF- $\beta$ 下调被TNF- $\alpha$ 、cAMP、PGE2、IL-4和PPAR降低 (Leask A等, *J Biol Chem* 2003;278:13008-15; Leask A, Abraham DJ, *Biochem Cell Biol* 2003;81:355-63)。CTGF还似乎增加MMP-2的表达 (Fan WH, Karnovsky MJ, *J Biol Chem* 2002;277:9800-5)。已经报道了添加CTGF至原代系膜细胞诱导纤连蛋白产生、细胞迁移和细胞骨架重排,其与Src的募集和p42/44MAPK与蛋白激酶B的磷酸化相关联 (Crean JK et al, *J Biol Chem* 2002;277:44187-94)。

[0199] 8.1.4. 基质金属蛋白酶 (MMP)

[0200] MMP连同半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、和丝氨酸蛋白酶是涉及ECM和基膜 (BM) 降解的蛋白水解酶 (Lan T-H等, *Cardiovascular Pathology* 22 (2013) 401-407)。MMP在纤维化的生理学中发挥重要的作用,如在肝硬化、纤维化肺病、耳硬化、动脉粥样硬化和多发性硬化。MMP被认为介导稳定的动脉粥样硬化病变的进展至易于通过破坏EC蛋白而破裂的不稳定的表型 (Lan T-H等, *Cardiovascular Pathology* 22 (2013) 401-407)。MMP-1、MMP-2、MMP-3和MMP-9参与内膜中结缔组织基质的弱化,其导致斑块破裂、急性血栓形成、以及SMC增殖和迁移 (Amalinei C等, *Rom J Morphol Embryol* 2010;51:215-28)。EC基膜在炎

性细胞的血细胞渗出期间的MMP降解可能有助于降低的内皮屏障功能,其具有增加的血浆蛋白流入。所有这些相互作用已经显示增加巨噬细胞中的MMP产生,其也可以体邻近细胞中MMP产生的刺激和分泌的MMP酶原的活化机制,这导致发展动脉粥样硬化病变,其可以促进进一步的结构变化和使它们能够生长(Galis ZS,Khatrri JJ,Circ Res 2002;90:251-62)。

[0201] 大多数MMP的表达在某些生理学和病理学重构过程期间被上调,并且被各种炎症细胞因子、激素、和生长因子比如IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、EGF、PDGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、和CD40介导[111-113]。TGF- $\beta$ 上调MMP-2和MMP-9的表达,同时它降低MMP-1和MMP-3的表达(Mauviel A,J Cell Biochem 1993;53:288-95)。

[0202] 完全活化的MMP可以被金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP)抑制。心肌MMP和TIMP之间的不平衡导致胶原积聚、不利的基质重构和反应性间质性纤维化(Nagase H等,Cardiovasc Res 2006;69:562-73)。

[0203] 8.1.5.过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )

[0204] 已经报道了PPAR $\gamma$ 的异常表达和功能有助于病理学纤维化和血管重构的进展(Wei J等,Curr Opin Rheumatol 2010;22:671-6)。PPAR $\gamma$ 对废除TGF- $\beta$ 诱导的胶原和纤连蛋白合成的刺激以及包括TGF- $\beta$ 和CTGF的纤维化生长因子的分泌的拮抗效应揭示了PPAR $\gamma$ 在纤维发生中的抗纤维化作用(GhoshAK等,Arthritis Rheum 2004;50:1305-18;Burgess HA等,Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;288:L1146-53)。已经观察到PPAR $\gamma$ 通过靶向p300转录辅激活物废除Smad依赖性胶原刺激(GhoshAK等,FASEB J 2009;23:2968-77)。已经假定PPAR $\gamma$ 独立性途径可能还涉及由PPAR $\gamma$ 配体引发的抗纤维化效应,其包括抑制成纤维细胞迁移、脂肪细胞分化和成肌纤维细胞转变(Lan T-H等,Cardiovascular Pathology 22(2013) 401-407)。

[0205] 9.用于治疗纤维变性疾病或状况的当前的和新兴的治疗途径

[0206] 当前正在用于治疗纤维变性疾病的治疗剂被公开在Datta等,British Journal of Pharmacology,163:141-172,2011中;其通过引用并入本文。这样的治疗剂的非限制性实例包括但不限于,纯化的牛V型胶原(例如,IW-001;ImmuneWorks;United Therapeutics)、IL-13受体拮抗物(例如,QAX576;Novartis)、蛋白质酪氨酸激酶抑制剂(例如,伊马替尼(imatinib) (**Gleevec®**);Craig Daniels/Novartis)、内皮受体拮抗物(例如,ACT-064992(马西替坦(macitentan));Actelion)、双内皮素受体拮抗物(例如,波生坦(**Tracleer®**);Actelion)、前列环素类似物(吸入性伊洛前列素(例如,**Ventavis®**);Actelion)、抗CTGF单克隆抗体(例如,FG-3019)、内皮素受体拮抗物(A-选择性)(例如,安立生坦(ambrisentan) (**Letairis®**),Gilead)、AB0024(Arresto)、赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)单克隆抗体(例如,GS-6624(以前的AB0024);Gilead)、c-Jun N-末端激酶(JNK)抑制剂(例如,CC-930;Celgene)、吡非尼酮(例如,**Esbriet®** (InterMune), **Pirespa®** (Shionogi))、IFN- $\gamma$  1b(例如,**Actimmune®**;InterMune)、针对全部三种TGF- $\beta$ 同种型的全中和IgG4人抗体(例如,GC1008;Genzyme)、TGF- $\beta$ 活化抑制剂(例如,Stromedix (STX-100))、重组人正五聚蛋白-2蛋白(rhPTX-2)(例如,PRM151;Promedior)、双特异性IL4/IL13抗体(例如,SAR156597;Sanofi)、人源化单克隆抗体靶向整合蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 6(BIBF 1120;Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸(Zambon SpA)、西地那非(**Viagra®**)、TNF拮抗物(例如,依那西普(etanercept)

(Enbrel®);Pfizer)、糖皮质激素(例如,强的松、布地奈德、莫米松糠酸酯、丙酸氟替卡松、和糠酸氟替卡松)、支气管扩张药(例如,白三烯改性剂(例如,孟鲁司特(SINGUAIR®))、抗胆碱能(anticholinergic)支气管扩张药(例如,异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 $\beta_2$ 激动剂(例如,甲磺酸乙基异丙肾上腺素(Bronkometer®)、肾上腺素、舒喘灵/舒喘宁、和特布他林)、长效 $\beta_2$ 激动剂(例如,沙美特罗、福莫特罗、indacaterol(Onbrez®))、和混合型支气管扩张药,其包括但不限于,SYMBICORT®(包含布地奈德和福莫特罗二者)、皮质类固醇(例如,强的松、布地奈德、莫米松糠酸酯)、甲基化黄嘌呤和其衍生物(例如,咖啡因、氨茶碱、IBMX、副黄嘌呤、己酮可可碱、可可碱、和茶碱)、嗜中性粒细胞弹性酶抑制剂(例如,ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616和TEI-8362,和过渡态抑制剂,比如ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892和ZD-8321)、磷酸二酯酶抑制剂(例如,罗氟司特(roflumilast)(DAXAS®; Daliresp®)、西洛司特(cilomilast)(Ariflo®,SB-207499))和索非布韦(sofosbuvir)(Sovaldi®)。

[0207] 9.1.用于肝纤维化的当前的疗法

[0208] 尽管在理解肝纤维化和在定义用于治疗的目标中有显著的进步,但是有限数目的抗纤维化药物被批准在患有晚期肝病的患者中临床应用(Mormone E等, Chem.Biol.Interact.2011September 30;193(3):225-231)。可以在经受有效的干扰素疗法的患有慢性肝病的选择的个体中完成确定的纤维化的消退(Shiratori Y,等, Ann.Intern.Med.2000;132(7):517-524)。然而,一大群患者不响应于常规治疗并且因而停留在纤维化进展至肝硬化的风险下(Mormone E.等,Chem.Biol.Interact.2011September 30;193(3):225-231)。

[0209] 已经在人试验中研究了具有抗纤维化活性的几种化合物,包括秋水仙素和马洛替酯,但是发现无效(Brenner D A和Alcorn J M,Semin.Liver Dis.1990;10(1):75-83; Takase S,等,Gastroenterol.Jpn.,1988;23(6):639-645)。许多药剂比如马洛替酯、金雀异黄素、姜黄素和水飞蓟素已经显示在体外和在实验动物模型中有效(Takase S,等, Gastroenterol Jpn.1988;23(6):639-645;Fu Y M,等,Mol.Pharm.,2008;3(2):399-409; George J,等,Biomedicine,2006;26(3-4):18-26)。在不同机械水平下工作的联合疗法可以更适于阻断HSC活化和肝纤维化的发病机理(Mormone E.等, Chem.Biol.Interact.2011September 30;193(3):225-231)。

[0210] 10.激酶和磷酸化

[0211] 激酶是催化从磷酸供体(通常是5'-三磷酸腺苷(ATP))至受体底物的磷酸基转移反应的一组普遍的酶。虽然全部激酶均催化大体上相同的磷酸基转移反应,但是它们在它们的底物特异性、结构、和它们参与其中的途径中展示出卓越的多样性。全部可获得的激酶序列(大约60,000个序列)的最近的分类指示激酶可以被分组为25个同源(意思是源自共同的祖先)蛋白家族。基于结构折叠的相似性,这些激酶家族被装配为12个折叠组。进一步,25个家族中的22个(大约98.8%的全部序列)属于结构折叠已知的10个折叠组。其它3个家族中,多磷酸激酶形成不同的折叠组,并且2个剩余的家族均是整合膜激酶并且包括最后一个折叠组。这些折叠组不仅包括最广泛地传播的蛋白质折叠中的一些,比如罗斯曼样折叠(通过两个 $\alpha$ 螺旋以拓扑顺序 $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ 连接的三个或更多个平行 $\beta$ 链)、铁氧还蛋白样折叠(沿

着其主链具有特征 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构的常见的 $\alpha+\beta$ 蛋白质折叠)、TIM-桶折叠(barrel fold)(意思是由沿着肽主链交替的八个 $\alpha$ 螺旋和八个平行 $\beta$ 链构成的保守型蛋白质折叠)、和反向平行 $\beta$ 桶折叠( $\beta$ 桶是扭转和卷曲以形成其中第一条链氢键结合至最后一条链的闭合结构的大 $\beta$ 片层),还包括蛋白质结构的全部主要类别(全部 $\alpha$ 、全部 $\beta$ 、 $\alpha+\beta$ 、 $\alpha/\beta$ )。在折叠组中,每个家族的核苷酸结合阈的核心具有相同的架构,并且蛋白质核心的拓扑学或者是同一的或者与循环交替变换相关。折叠组内的家族之间的同源性不被暗示。

[0212] I组(23,124个序列)激酶包含蛋白S/T-Y激酶、非典型蛋白激酶、脂质激酶、和ATP抓握酶(grasp enzyme)并且进一步包括包括蛋白S/T-Y激酶和非典型蛋白激酶家族(22,074个序列)。这些激酶包括:胆碱激酶(EC 2.7.1.32);蛋白激酶(EC 2.7.1.37);磷酸化酶激酶(EC 2.7.1.38);高丝氨酸激酶(EC 2.7.1.39);I-磷脂酰肌醇4-激酶(EC 2.7.1.67);链霉素6-激酶(EC 2.7.1.72);乙醇胺激酶(EC 2.7.1.82);链霉素3'-激酶(EC 2.7.1.87);卡那霉素激酶(EC 2.7.1.95);5-甲硫核糖激酶(EC 2.7.1.100);紫霉素激酶(EC 2.7.1.103);[羟甲基戊二酰-CoA还原酶(NADPH<sub>2</sub>)]激酶(EC 2.7.1.109);蛋白质-酪氨酸激酶(EC 2.7.1.112);[异柠檬酸脱氢酶(NADP<sup>+</sup>)]激酶(EC 2.7.1.116);[肌球蛋白轻链]激酶(EC 2.7.1.117);潮霉素-B激酶(EC 2.7.1.119);钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶(EC 2.7.1.123);视紫红质激酶(EC 2.7.1.125);[ $\beta$ -肾上腺素能受体]激酶(EC 2.7.1.126);[肌球蛋白重链]激酶(EC 2.7.1.129);[Tau蛋白]激酶(EC 2.7.1.135);大环内脂2'-激酶(EC 2.7.1.136);I-磷脂酰肌醇3-激酶(EC 2.7.1.137);[RNA-聚合酶]-亚基激酶(EC 2.7.1.141);磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶(EC 2.7.1.153);和磷脂酰肌醇-4-磷酸3-激酶(EC 2.7.1.154)。I组进一步包括脂质激酶家族(321个序列)。这些激酶包括:I-磷脂酰肌醇-4-磷酸5-激酶(EC 2.7.1.68);ID-肌-肌醇-三磷酸3-激酶(EC 2.7.1.127);肌醇-四磷酸5-激酶(EC 2.7.1.140);I-磷脂酰肌醇-5-磷酸4-激酶(EC 2.7.1.149);I-磷脂酰肌醇-3-磷酸5-激酶(EC 2.7.1.150);肌醇-多磷酸多激酶(EC 2.7.1.151);和肌醇-六磷酸激酶(EC 2.7.4.21)。I组进一步包括ATP-抓握激酶(729个序列),其包括肌醇-四磷酸I-激酶(EC 2.7.1.134);丙酮酸、磷酸二激酶(EC 2.7.9.1);和丙酮酸、水二激酶(EC 2.7.9.2)。

[0213] II组(17,071个序列)激酶包含罗斯曼样激酶。II组包括P-环激酶家族(7,732个序列)。这些包括葡萄糖激酶(EC 2.7.1.12);磷酸核酮糖激酶(EC 2.7.1.19);胸苷激酶(EC 2.7.1.21);核糖基烟酰胺激酶(EC 2.7.1.22);脱磷酸-CoA激酶(EC 2.7.1.24);腺苷酰硫酸激酶(EC 2.7.1.25);泛酸激酶(EC 2.7.1.33);蛋白激酶(细菌)(EC 2.7.1.37);尿苷激酶(EC 2.7.1.48);莽草酸激酶(EC 2.7.1.71);脱氧胞苷激酶(EC 2.7.1.74);脱氧腺苷激酶(EC 2.7.1.76);多核苷酸5'-羟基-激酶(EC 2.7.1.78);6-磷酸果糖-2-激酶(EC 2.7.1.105);脱氧鸟苷激酶(EC 2.7.1.113);四酰基二糖4'-激酶(EC 2.7.1.130);脱氧核苷激酶(EC 2.7.1.145);腺苷钴啉醇酰胺激酶(EC 2.7.1.156);多磷酸激酶(EC 2.7.4.1);磷酸甲羟戊酸激酶(EC 2.7.4.2);腺苷酸激酶(EC 2.7.4.3);核苷-磷酸激酶(EC 2.7.4.4);鸟苷酸激酶(EC 2.7.4.8);胸苷酸激酶(EC 2.7.4.9);核苷-三磷酸-腺苷酸激酶(EC 2.7.4.10);(脱氧)核苷-磷酸激酶(EC 2.7.4.13);胞苷酸激酶(EC 2.7.4.14);和尿苷酸激酶(EC 2.7.4.22)。II组进一步包括烯醇丙酮酸磷酸羧激酶家族(815个序列)。这些酶包括蛋白激酶(HPr激酶/磷酸酶)(EC 2.7.1.37);烯醇丙酮酸磷酸羧激酶(GTP)(EC 4.1.1.32);和烯醇丙酮酸磷酸羧激酶(ATP)(EC 4.1.1.49)。II组进一步包括磷酸甘油酸激

酶(1,351个序列)家族。这些酶包括磷酸甘油酸激酶(EC 2.7.2.3)和磷酸甘油酸激酶(GTP)(EC 2.7.2.10)。II组进一步包括天冬氨酸激酶家族(2,171个序列)。这些酶包括氨基甲酸激酶(EC 2.7.2.2);天冬氨酸激酶(EC 2.7.2.4);乙酰谷氨酸激酶(EC 2.7.2.81);谷氨酸5-激酶(EC 2.7.2.1)和鸟苷酸激酶(EC 2.7.4.)。II组进一步包括磷酸果糖激酶样激酶家族(1,998个序列)。这些酶包括6-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.11);NAD(+)激酶(EC 2.7.1.23);I-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.56);二磷酸-果糖-6-磷酸I-磷酸转移酶(EC 2.7.1.90);鞘氨醇激酶(EC 2.7.1.91);二酰基甘油激酶(EC 2.7.1.107);和神经酰胺激酶(EC 2.7.1.138)。II组进一步包括核糖激酶样家族(2,722个序列)。这些酶包括:葡糖激酶(EC 2.7.1.2);己酮糖激酶(EC 2.7.1.3);果糖激酶(EC 2.7.1.4);6-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.11);核糖激酶(EC 2.7.1.15);腺苷激酶(EC 2.7.1.20);吡哆醛激酶(EC 2.7.1.35);2-脱氢-3-脱氧葡糖酸激酶(EC 2.7.1.45);羟甲基嘧啶激酶(EC 2.7.1.49);羟乙基噻唑激酶(EC 2.7.1.50);I-磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.56);肌苷激酶(EC 2.7.1.73);5-脱氢-2-脱氧葡糖酸激酶(EC 2.7.1.92);塔格糖-6-磷酸激酶(EC 2.7.1.144);ADP依赖性磷酸果糖激酶(EC 2.7.1.146);ADP-依赖性果糖激酶(EC 2.7.1.147);和磷酸甲基嘧啶激酶(EC 2.7.4.7)。II组进一步包括硫胺素焦磷酸激酶家族(175个序列),其包括硫胺素焦磷酸激酶(EC 2.7.6.2)。II组进一步包括甘油酸激酶家族(107个序列),其包括甘油酸激酶(EC 2.7.1.31)。

[0214] III组激酶(10,973个序列)包括铁氧还蛋白样折叠激酶。III组进一步包括核苷-二磷酸激酶家族(923个序列)。这些酶包括核苷-二磷酸激酶(EC 2.7.4.6)。III组进一步包括HPPK激酶家族(609个序列)。这些酶包括2-氨基-4-羟基-6-羟甲基二氢喋啶焦磷酸激酶(EC 2.7.6.3)。III组进一步包括胍基激酶家族(324个序列)。这些酶包括胍乙酸激酶(EC 2.7.3.1);肌酸激酶(EC 2.7.3.2);精氨酸激酶(EC 2.7.3.3);和吡啶磷脂激酶(EC 2.7.3.5)。III组进一步包括组氨酸激酶家族(9,117个序列)。这些酶包括蛋白激酶(组氨酸激酶)(EC 2.7.1.37);[丙酮酸脱氢酶(硫辛酰胺)]激酶(EC 2.7.1.99);和[3-甲基-2-氧丁酸脱氢酶(硫辛酰胺)]激酶(EC 2.7.1.115)。

[0215] IV组激酶(2,768个序列)包含核糖核酸酶H样激酶。这些酶包括己糖激酶(EC 2.7.1.1);葡糖激酶(EC 2.7.1.2);果糖激酶(EC 2.7.1.4);鼠李树胶糖激酶(EC 2.7.1.5);甘露糖激酶(EC 2.7.1.7);葡糖酸激酶(EC 2.7.1.12);L-核酮糖激酶(EC 2.7.1.16);木酮糖激酶(EC 2.7.1.17);赤藓糖醇激酶(EC 2.7.1.27);甘油激酶(EC 2.7.1.30);泛酸激酶(EC 2.7.1.33);D-核酮糖激酶(EC 2.7.1.47);L-岩藻酮糖激酶(EC 2.7.1.51);L-木酮糖激酶(EC 2.7.1.53);阿洛糖激酶(EC 2.7.1.55);2-脱氢-3-脱氧半乳糖酸激酶(EC 2.7.1.58);N-乙酰葡糖胺激酶(EC 2.7.1.59);N-乙酰甘露糖胺激酶(EC 2.7.1.60);多磷酸-葡萄糖磷酸转移酶(EC 2.7.1.63);β-糖苷激酶(EC 2.7.1.85);乙酸激酶(EC 2.7.2.1);丁酸激酶(EC 2.7.2.7);支链脂肪酸激酶(EC 2.7.2.14);和丙酸激酶(EC 2.7.2.15)。

[0216] V组激酶(1,119个序列)包含TIMB桶激酶。这些酶包括丙酮酸激酶(EC 2.7.1.40)。

[0217] VI组激酶(885个序列)包含GHMP激酶。这些酶包括半乳糖激酶(EC 2.7.1.6);甲羟戊酸激酶(EC 2.7.1.36);高丝氨酸激酶(EC 2.7.1.39);L-阿拉伯糖激酶(EC 2.7.1.46);岩藻糖激酶(EC 2.7.1.52);莽草酸激酶(EC 2.7.1.71);4-(胞苷5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-

赤藓糖醇激酶 (EC 2.7.1.148) ; 和磷酸甲羟戊酸激酶 (EC 2.7.4.2) 。

[0218] VII组激酶 (1,843个序列) 包含AIR合成酶样激酶。这些酶包括硫胺素-磷酸激酶 (EC 2.7.4.16) 和硒化物、水二激酶 (EC 2.7.9.3) 。

[0219] VIII组激酶 (565个序列) 包含核黄素激酶 (565个序列) 。这些酶包括核黄素激酶 (EC 2.7.1.26) 。

[0220] IX组激酶 (197个序列) 包含二羟基丙酮激酶。这些酶包括甘油酮激酶 (EC 2.7.1.29) 。

[0221] X组激酶 (148个序列) 包含推定的甘油酸激酶。这些酶包括甘油酸激酶 (EC 2.7.1.31) 。

[0222] XI组激酶 (446个序列) 包含多磷酸激酶。这些酶包括多磷酸激酶 (EC 2.7.4.1) 。

[0223] XII组激酶 (263个序列) 包含整合膜激酶。XII组包括多萜醇激酶家族。这些酶包括多萜醇激酶 (EC 2.7.1.108) 。XII组进一步包括十一萜醇激酶家族。这些酶包括十一萜醇激酶 (EC 2.7.1.66) 。

[0224] 激酶在众多细胞代谢及信号传导途径中起必不可少的作用, 并且它们属于在结构水平、生物化学水平和细胞水平方面研究最彻底的酶。尽管事实上所有激酶使用相同的磷酸供体 (大部分情况下为ATP), 并且表面上催化同样的磷酸基转移反应, 但它们在结构折叠和底物识别机制上展示出显著的多样性。这很可能主要是由于它们的底物的结构和性质极为多样化的特性。

[0225] 10.1. 促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶 (MK2和MK3)

[0226] 不同组的MAPK-活化蛋白激酶 (MAP-KAPK) 已经限定了促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的下游。这些酶将信号转导至不为MAPK的直接底物的靶蛋白, 并且因此, 用来利用MAPK级联将磷酸化依赖的信号传导转至多种细胞功能。这些组中的一个由三种MAPKAPK: MK2、MK3 (又称为3pK) 和MK5 (还命名为PRAK) 形成。促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (也称作“MAPKAPK2”、“MAPKAP-K2”、“MK2”) 是丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶家族的激酶。MK2与MK3高度同源 (大约75%氨基酸同一性)。MK2和MK3的激酶结构域与钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (CaMK)、磷酸化酶b激酶和核糖体S6激酶 (RSK) 同种型的C-末端激酶结构域 (CTKD) 最相似 (大约35%-40%同一性)。mk2基因编码两种可变剪接的370个氨基酸 (MK2A) 和400个氨基酸 (MK2B) 的转录物。mk3基因编码382个氨基酸的一种转录物。MK2蛋白和MK3蛋白高度同源, 但MK2A具备较短的C-末端区。MK2B的C-末端包含较短的MK2A同种型中不存在的功能二分的核定位序列 (NLS) (Lys-Lys-Xaa<sub>10</sub>-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys; SEQ ID NO:23), 其指示可变剪接决定MK2同种型的细胞定位。MK3具备相似的核定位序列。在MK2B和MK3二者中发现的核定位序列均包含D结构域 (Leu-Leu-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys; SEQ ID NO:24), 研究已经显示其介导MK2B和MK3与p38 $\alpha$ 和p38 $\beta$ 的特异性相互作用。MK2B和MK3还具备位于NLS和D结构域的N-末端的功能核输出信号 (NES)。MK2B中的NES足以在刺激之后引发核输出, 该过程可以被来普霉素 (leptomycin) B抑制。MK2和MK3中的催化结构域的N-末端序列富含脯氨酸, 并且包含一个 (MK3) 或两个 (MK2) 推定的Src同源3 (SH3) 结构域-结合位点, 研究已经显示对于MK2其介导体外与c-Abl的SH3结构域的结合。最近的研究表明此结构域参与MK2介导的细胞迁移。

[0227] MK2B和MK3主要位于休眠细胞的细胞核中, 而MK2A存在于细胞质中。MK2B和MK3二

者均在应激刺激之后经由染色体区域维持蛋白 (CRM1) 依赖性机制迅速地输出至细胞质。MK2B的核输出似乎由激酶活化介导, 因为激酶的活化环内 Thr334 的磷酸模拟突变 (phosphomimetic mutation) 提高了MK2B的细胞质定位。不受理论的束缚, 认为MK2B和MK3可以包含组成型活性的NLS和磷酸化调节的NES。

[0228] MK2和MK3似乎广泛表达, 主要在心、骨骼肌和肾组织中表达。

[0229] 10.1.1. 活化

[0230] p38 $\alpha$ 和p38 $\beta$ 的多种活化剂有效地刺激MK2和MK3活性。p38在四个脯氨酸定向位点 Thr25、Thr222、Ser272和Thr334上介导MK2的体外和体内磷酸化。在这些位点中, 只有Thr25在MK3中是非保守的。不受理论的束缚, 虽然不知道磷酸化的Thr25的功能, 但是其在两个SH3结构域-结合位点之间的位置表面其可以调节蛋白质-蛋白质相互作用。MK2中的Thr222 (MK3中的Thr201) 位于激酶结构域的活化环中, 并且已经显示对MK2和MK3激酶活性必不可少。MK2中的Thr334 (MK3中的Thr313) 位于催化结构域的C-末端, 并且对激酶活性必不可少。已经解析了MK2的晶体结构并且——不受理论的束缚——表明Thr334磷酸化可以充当MK2核输入和输出的转换。Thr334的磷酸化还可以减弱或干扰MK2的C末端与催化结构域的结合, 这暴露了NES并且促进核输出。

[0231] 研究已经显示, 虽然p38能够在细胞核中活化MK2和MK3, 但是实验证据表明MK2和MK3的活化和核输出偶联磷酸化依赖性构象转换, 其还支配p38稳定性和定位, 并且p38自身的细胞定位受MK2并且可能受MK3控制。另外的研究已经显示, 在MK2的磷酸化和活化之后, 细胞核的p38以与MK2的复合物输出至细胞质。p38和MK2之间的相互作用对于p38稳定性可能是重要的, 因为研究指示MK2缺陷型细胞中的p38水平低, 并且无催化活性的MK2蛋白的表达恢复p38水平。

[0232] 10.1.2. 底物和功能

[0233] 进一步的研究已经显示小的热休克蛋白HSP27 (又称为热休克蛋白27或Hsp27)、淋巴细胞特异性蛋白LSP-1和波形蛋白被MK2磷酸化。HSPB1是特别感兴趣的, 因为其形成大的寡聚物, 其可以充当分子伴侣并且保护细胞免受热休克和氧化应激。在磷酸化之后, HSPB1失去其形成大的寡聚物的能力, 并且不能够阻断肌动蛋白聚合, 这表明MK2介导的HSPB1的磷酸化起内环境稳定功能, 其目标在于调节否则将在应激期间非稳定的肌动蛋白动力学。

[0234] MK3也显示在体外和体内磷酸化HSPB1, 但是还没有阐明其在应激条件期间的作用。MK2与MK3共享许多底物。两种酶具有相当的底物偏好, 并且以相似的动力学常数磷酸化肽底物。发现被MK2高效磷酸化所需的最小序列是Hyd-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-pSer/Thr (SEQ ID NO: 25), 其中Hyd是体积大的疏水残基。

[0235] 实验证据支持p38在调节细胞因子生物合成和细胞迁移中的作用。定向缺失小鼠中的mk2基因表明, 虽然p38介导许多相似激酶的活化, 但是MK2似乎是负责这些p38依赖性生物过程的关键激酶。失去MK2导致 (i) 脂多糖 (LPS) 诱导的细胞因子比如肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6) 和 $\gamma$ 干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 合成中的缺陷, 和 (ii) 改变小鼠胚胎胎成纤维细胞、平滑肌细胞和嗜中性粒细胞的迁移。

[0236] 与MK2在炎性反应中的作用一致, MK2缺陷型小鼠显示对单核细胞增多性李斯特菌感染的增加的易感性, 和局部缺血之后减少的炎症介导的神经元死亡。因为在MK2缺陷型细胞中p38蛋白水平也显著减小, 辨别这些表型是否单独地由于失去MK2是必要的。为达到此

目的,在MK2缺陷型细胞中表达MK2突变体,并且结果指示MK2催化活性对恢复p38水平不是必要的,但是为调节细胞因子生物合成所需。

[0237] MK2的敲除和敲落研究为以下提供了有力支持:活化的MK2通过与IL-6mRNA的富含AU的3'非翻译区相互作用的蛋白质的磷酸化来增强IL-6mRNA的稳定性。具体而言,已经显示MK2主要地负责hnRNPA0——稳定IL-6RNA的mRNA-结合蛋白——的磷酸化。此外,调查多种的炎症疾病的多种另外的研究已经发现促炎细胞因子——比如IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-8——的水平在来自患有稳定的慢性阻塞性肺病(COPD)的患者的诱导痰或吸烟者的肺泡巨噬细胞中增加(Keatings V.等,Am J Resp Crit Care Med,1996,153:530-534;Lim,S.等,JRespir Crit Care Med,2000,162:1355-1360)。促炎细胞因子比如白介素-8(IL-8)和白介素-6(IL-6)、以及相关的下游细胞粘着分子(CAM)比如细胞间粘着分子-1(ICAM-1)和血管细胞粘着分子-1(VCAM-1)、基质金属蛋白酶比如基质金属蛋白酶-7(MMP-7)、和信号传导分子比如S100钙结合蛋白A12(S100A12,又称为钙粒蛋白C)在周围血中升高的水平已经发现与患有特发性肺纤维化的患者中的死亡率、无肺移植存活和疾病进展相关联(Richards等.,Am JRespir Crit CareMed,2012,185:67-76;Richards,T.等,Am J Respir Crit Care Med,181:A1120,2010;Moodley,Y.等,Am J Respir Cell Mol Biol.,29(4):490-498,2003)。合起来,这些研究暗示通过MK2活化诱导的升高水平的炎症细胞因子可以参与气道或肺组织疾病的发病机理;并且表明了其用于治疗气道或肺组织疾病——比如特发性肺纤维化和慢性阻塞性肺病(COPD)——的抗细胞因子疗法的可能性(Chung,K.,Eur Respir J,2001,18:Suppl.34:50-59)。

#### [0238] 10.1.3.mRNA翻译的调节

[0239] 使用MK2基因敲除小鼠或MK2缺陷型细胞的先前的研究已经显示,MK2通过增加其mRNA的翻译速率来增加炎症细胞因子——包括TNF- $\alpha$ 、IL-1和IL-6——的产生。在MK2缺陷型小鼠中不能检测到TNF- $\alpha$ 转录、加工和释放的显著减少。已知p38途径在调节mRNA稳定性中起重要作用,并且MK2代表p38通过其介导此功能的很可能的靶标。利用MK2缺陷型小鼠的研究指示,MK2的催化活性对其在细胞因子产生和迁移中的作用是必需的,这表明——不受理论的束缚——MK2磷酸化涉及mRNA稳定性的靶标。与此一致,MK2已经显示结合和/或磷酸化核内不均一核糖核蛋白(hnRNP)A0、锌指蛋白36(tristetraprolin)、聚(A)-结合蛋白PABP1和HuR——广泛表达的RNA结合蛋白的elav(黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中的胚胎致性异常视觉)家族的成员。已知这些底物与在3'非翻译区富含AU元件的mRNA结合或共纯化,这表明MK2可以调节富含AU的mRNA比如TNF- $\alpha$ 的稳定性。当前不知道MK3是否起相似的作用,但是MK2缺陷成纤维细胞的LPS处理完全地废除了hnRNP A0磷酸化,这表明MK3不能够补偿MK2的失去。

[0240] MK3与MK2一起参与真核生物延伸因子2(eEF2)激酶的磷酸化。eEF2激酶磷酸化和钝化eEF2。eEF2活性对mRNA在翻译期间的延伸很关键,并且eEF2在Thr56上的磷酸化导致mRNA翻译的终止。eEF2激酶在Ser377上的MK2和MK3磷酸化表明这些酶可以调节eEF2激酶活性,并且从而调节mRNA翻译延伸。

#### [0241] 10.1.4.通过MK2和MK3的转录调节

[0242] 与许多MK相似,细胞核的MK2有助于cAMP应答元件结合(CREB)蛋白、血清应答因子(SRF)和转录因子ER81的磷酸化。野生型和MK2缺陷型细胞的比较揭示了MK2是应激诱导的

主要SRF激酶,这表明MK2在应激介导的立即早期应答中的作用。MK2和MK3二者均在体内与碱性螺旋-环-螺旋转录因子E47相互作用,并且在体外磷酸化E47。发现MK2介导的E47的磷酸化抑制E47的转录活性,并且从而抑制E47依赖性基因表达,这表明MK2和MK3可以调节组织特异性基因表达和细胞分化。

#### [0243] 10.1.5. MK2和MK3的其它靶标

[0244] 还已经鉴别了多种其它MK2和MK3底物,其反映了MK2和MK3在多种生物过程中的多样功能。支架蛋白14-3-3 $\zeta$ 是生理性MK2底物。研究指示14-3-3 $\zeta$ 与大量细胞信号转导途径的组分相互作用,包括蛋白激酶、磷酸酶和转录因子。另外的研究已经显示,MK2介导的14-3-3 $\zeta$ 在Ser58上的磷酸化危害其结合活性,这表明MK2可以影响通常由14-3-3 $\zeta$ 调节的多种信号转导分子的调节。

[0245] 另外的研究已经显示,MK2也与7元Arp2和Arp3复合物的p16亚基(p16-Arc)相互作用并使其在Ser77上磷酸化。p16-Arc在调节肌动蛋白细胞骨架中起作用,这表明MK2可能参与此过程。

[0246] MK2和MK3还可以磷酸化5-脂加氧酶。5-脂加氧酶催化炎性介质白细胞三烯的形成中的初始步骤。酪氨酸羟化酶、糖原合酶和Akt也显示被MK2磷酸化。最后,MK2在Ser1210上磷酸化肿瘤抑制蛋白马铃薯球蛋白,其形成14-3-3 $\zeta$ 的停靠位点。马铃薯球蛋白和错构瘤蛋白通常形成功能复合物,其通过拮抗mTOR依赖性信号传导负调节细胞生长,这表明p38-介导的MK2的活化可以通过增加14-3-3 $\zeta$ 与马铃薯球蛋白的结合来调节细胞生长。

#### [0247] 10.2. 激酶抑制

[0248] 真核生物蛋白激酶构成借助其催化结构域而相关的最大的同源蛋白超家族之一。最相关的蛋白激酶特异于丝氨酸/苏氨酸或酪氨酸磷酸化。蛋白激酶在细胞对细胞外刺激物的应答中起不可或缺的作用。因而,认为蛋白激酶的刺激是信号转导系统中最常见的活化机制之一。已知许多底物通过多种蛋白激酶经历磷酸化,并且已经公布了关于多种蛋白激酶的催化结构域的一级序列的相当量的信息。这些序列共享参与ATP结合、催化和结构完整性的维持的大数目残基。大部分蛋白激酶具备很保守的30-32kDa催化结构域。

[0249] 研究已经试图鉴定和利用蛋白激酶的调节元件。这些调节元件包括抑制剂、抗体和封闭肽。

##### [0250] 10.2.1. 抑制剂

[0251] 酶抑制剂是与酶结合从而降低酶活性的分子。结合抑制剂可以阻止底物进入酶的活性位点和/或妨碍酶催化其反应。抑制剂结合是可逆或不可逆的。不可逆的抑制剂通常与酶作用并且在使其化学地改变(例如,通过修饰酶活性必需的关键氨基酸残基),使得其不再能够催化其反应。与此相反,可逆的抑制剂非共价地结合,并且取决于这些抑制剂是否结合酶、酶-底物复合物或二者,产生不同的抑制类型。

[0252] 酶抑制剂通常通过其特异性和效价来评估。如在此环境中使用的,术语“特异性”指的是抑制剂与其它蛋白质的选择性附着或其没有结合至其它蛋白质。如本文使用的,术语“效价”指的是抑制剂的解离常数,其指示抑制酶所需的抑制剂的浓度。

[0253] 已经研究了用作蛋白激酶活性调节中的工具的蛋白激酶的抑制剂。已经研究了将抑制剂用于,例如,细胞周期蛋白依赖性(Cdk)激酶、MAP激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶、Src家族蛋白酪氨酸激酶、酪氨酸激酶、钙调蛋白(CaM)激酶、酪蛋白激酶、限制点激酶(Chk1)、糖原

合酶激酶3 (GSK-3)、c-JunN-末端激酶 (JNK)、促分裂原活化蛋白激酶1 (MEK)、肌球蛋白轻链激酶 (MLCK)、蛋白激酶A、Akt (蛋白激酶B)、蛋白激酶C、蛋白激酶G、蛋白质酪氨酸激酶、Raf激酶和Rho激酶。

#### [0254] 10.2.2. 封闭肽

[0255] 肽为由两个或更多个氨基酸的链组成的化合物,由此链中的一个氨基酸的羧基经由肽键连接至另一个氨基酸的氨基连接。肽已经尤其用于研究蛋白质结构和功能。合成肽尤其可以用作探针以查看在哪里发生蛋白质-肽相互作用。抑制性肽尤其可以用于临床研究以检查肽对蛋白激酶、癌蛋白和其它障碍的抑制作用。

[0256] 已经研究了多种封闭肽的用途。例如,细胞外信号调节激酶 (ERK) ——一种MAPK蛋白激酶——对细胞增殖和分化必不可少。MAPK的活化需要级联机制,由此MAPK被上游MAPKK (MEK) 磷酸化,其然后转而被第三激酶MAPKKK (MEKK) 磷酸化。ERK抑制肽通过与ERK结合起MEK诱饵的作用。

[0257] 其它封闭肽包括autocamtide-2相关抑制肽 (AIP)。此合成肽具有高度特异性,是Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II (CaMKII) 的有效抑制剂。AIP是autocamtide-2的不可磷酸化的类似物——CaMKII的高选择性肽底物。AIP以100nM的IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>是获得50%抑制所需的抑制剂的浓度) 抑制CaMKII。AIP抑制关于syntide-2 (CaMKII肽底物) 和ATP是非竞争性的,但是关于autocamtide-2是竞争性的。抑制不受是否存在Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白影响。CaMKII活性完全被AIP (1μM) 抑制,而PKA、PKC和CaMKIV不受影响。

[0258] 其它封闭肽包括细胞分裂蛋白激酶5 (Cdk5) 抑制肽 (CIP)。Cdk5当与p25缔合时,磷酸化阿尔茨海默病特异性磷酸化表位处的微管蛋白tau。p25是截短的活化剂,其在暴露于淀粉状蛋白β肽之后,由生理性Cdk5活化剂p35产生。在神经元感染CIP之后,CIP选择性地抑制p25/Cdk5活性,并抑制皮层神经元中异常的tau磷酸化。由CIP展现的特异性的原因不被完全地理解。

[0259] 已经研究了下列另外的封闭肽:细胞外调节激酶2 (ERK2)、ERK3、p38/HOG1、蛋白激酶C、酪蛋白激酶II、Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白激酶IV、酪蛋白激酶II、Cdk4、Cdk5、DNA依赖性蛋白激酶 (DNA-PK)、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶PAK3、磷酸肌醇 (PI) -3激酶、PI-5激酶、PSTAIRE (cdk高度保守序列)、核糖体S6激酶、GSK-4、生发中心激酶 (GCK)、SAPK (应激活化蛋白激酶)、SEK1 (应激信号传导激酶)、和粘着斑激酶 (FAK)。

#### [0260] 11. 细胞穿透肽 (CPP)

[0261] 细胞穿透 (penetrating) 肽 (CPP) 是能够穿透哺乳动物细胞的质膜并且跨越膜运输许多类型和分子量的复合物的一类肽。这些复合物包括效应分子,比如蛋白质、DNA、缀合肽 (conjugated peptide)、寡核苷酸,和小颗粒比如脂质体。当CPP化学地连接或融合至其它蛋白质时,得到的融合蛋白仍能够进入细胞。虽然转导的准确机制是未知的,但是这些蛋白质的内化不认为是受体介导或转运体介导的。CPP的长度通常是10-16个氨基酸,并且可以更具其组成分组,比如,例如,富含精氨酸和/或赖氨酸的肽。

[0262] 能够将效应分子传输入细胞的CPP的用途在药物的设计中越来越有吸引力,因为其促进细胞摄取货物分子。这些通常取决于其序列分类为两亲性 (意思是具有极性 & 非极性端二者) 或阳离子 (意思是或涉及包含净正电荷原子) 的细胞穿透肽,其为大分子提供非侵入性递送技术。CPP通常被称为“特洛伊肽 (Trojan peptide)”、“膜易位序列”、“蛋白转导

结构域(PTD)”或“细胞穿透性蛋白(CPP)”。CPP也可以用于帮助新型HSPB1激酶抑制剂穿透细胞膜(参见:2008年1月10提交的标题为“Polypeptic Inhibitors of HSPB1Kinase and Uses Thereof”的美国专利申请序号11/972,459;和2008年8月7日提交的标题为“Kinase Inhibitors and Uses Thereof”的美国专利申请序号12/188,109,每个申请的内容通过引用以其全部并入)。

#### [0263] 11.1.含有病毒CPP的蛋白质

[0264] 描述为具有转导性质的第一蛋白质是病毒来源的。这些蛋白质仍为用于CPP作用的最普遍认可的模型。在细胞穿透肽之中,已经最广泛地研究了富含精氨酸的细胞穿透肽,包括但不限于TAT肽(E1-Sayed, A.等, AAPS J. 11, 13-22, 2009; Wender, P.等, Adv. Drug Deliv. Rev. 60, 452-472, 2008)。

[0265] TAT(HIV-1反式激活蛋白基因产物)是86个氨基酸的多肽,其充当整合的HIV-1基因组的强大的转录因子。TAT在潜伏感染的细胞中对病毒基因组作用刺激病毒复制。TAT蛋白的易位性质使得其能够活化休眠的感染细胞,并且其可以通过调节包括细胞因子的许多细胞基因来参与引发未感染细胞的随后感染。TAT的最小CPP是9个氨基酸的蛋白质序列RKKRRQRRR(TAT49-57; SEQ ID NO:20)。利用较长的TAT片段的研究成功地证明了大至120kDa的融合蛋白的转导。已经证明多种TAT-CPP的添加以及合成的TAT衍生物介导膜易位。含有TAT CPP的融合蛋白已经在涉及癌症、传输死亡-蛋白质进入细胞、和神经变性障碍的疾病模型的实验中用作治疗部分。

[0266] VP22是HSV-1被膜蛋白(tegument protein)——HSV病毒粒子的结构部分。VP22能够不依赖于受体易位,并且在细胞核中积聚。VP22的此性质将该蛋白质归类为含有CPP的肽。包含全长VP22的融合蛋白已经有效跨越质膜易位。

#### [0267] 11.2.具有细胞间易位性质的同源异型蛋白

[0268] 同源异型蛋白是参与形态学过程的高度保守的反式激活转录因子。它们通过60个氨基酸的特异序列结合至DNA。DNA-结合同源域是同源异型蛋白的最高度保守的序列。已经描述了多种同源异型蛋白展现CPP样活性;它们能够以不具有细胞类型特异性的不依赖于能量且不依赖于胞吞作用的方式有效地跨越细胞膜易位。

[0269] 触角蛋白(Antp)是能够跨越细胞膜易位的反式激活因子;能够易位的最小序列是16个氨基酸的肽,其对应于蛋白质的同源域(HD)的第三个螺旋。此螺旋的内化在4℃发生,这表明此过程不依赖于胞吞作用。作为具有AntpHD的融合蛋白产生的多至100个氨基酸的肽穿透细胞膜。

[0270] 能够易位的其它同源域包括果蝇ftz(Ftz)和果蝇en(En)同源域。许多同源域共享高度保守的第三螺旋。

#### [0271] 11.3.人CPP

[0272] 人CPP在引入人患者之后可以绕过可能的免疫原性问题。具有CPP序列的肽包括:Hoxa-5、Hox-A4、Hox-B5、Hox-B6、Hox-B7、HOX-D3、GAX、MOX-2和FtzCPP。这些蛋白质均共享在AntpCPP中发现的序列。其它CPP包括胰岛-1、白介素-1、肿瘤坏死因子、和来自卡波西-成纤维细胞生长因子(或FGF-4)信号肽的疏水序列,其能够不依赖于能量、受体和胞吞作用易位。未确定的CPP包括成纤维细胞生长因子(FGF)家族的成员。

#### [0273] 12.MK2抑制剂和纤维变性疾病或状况的治疗

[0274] 促分裂原活化蛋白激酶活化蛋白激酶2 (MAPKAPK2或MK2)——p38MAPK下游的丝氨酸/苏氨酸激酶底物——已经暗示在通过结疤和纤维化并发的许多炎症性疾病中 (Lopes, L. 等, *Biochem Biophys Res Commun.*, 382 (3) :535-9, 2009)。这些包括但不限于癌症、内膜增生、器官纤维化、腹腔粘连、炎症肠道疾病、和类风湿性关节炎。除特发性肺纤维化 (IPF) 之外, 涉及炎症和纤维化并且影响肺的其它障碍包括急性肺损伤 (ALI)、器官移植排斥 (肺移植也是 IPF 的后期治疗)、继发于脓毒症的器官衰竭、急性肺衰竭、自身免疫性疾病比如硬皮病、和慢性阻塞性肺病 (COPD)。

[0275] 纤维化的发展已知需要导致成肌纤维细胞表型的细胞的成纤维细胞的炎症、增殖和募集 (Horowitz J. 等, *Semin Respir Crit Care Med.*, 27 (6) :600-612, 2006)。已经显示 MK2 在转录和转录后水平上控制基因表达 (Neininger A. 等, *J Biol Chem.* 2002; 277 (5) : 3065-8, Thomas T. 等, *J Neurochem.*, 105 (5) :2039-52, 2008; Johansen C. 等, *J Immunol.*, 176 (3) :1431-8, 2006; Rousseau S. 等, *EMBO J.* 21 (23) :6505-14, 2002) 以及细胞骨架架构 (Lopes, L. 等, *Biochem Biophys Res Commun.*, 382 (3) :535-9, 2009)。此外, 已经显示活化的 MK2 增加炎症细胞因子 mRNA 的翻译和稳定性, 并且引起肌动蛋白重组; 并且 MK2 的抑制与减少的炎症 (Ward, B. 等, *J Surg Res.*, 169 (1) :e27-36, 2011) 和成肌纤维细胞分化 (Lopes, L. 等, *Biochem Biophys Res Commun.*, 382 (3) :535-9, 2009) 相关联。

[0276] 总之, 这些数据表明 MK2 的抑制可以向患有纤维变性障碍或状况——例如, 特发性肺纤维化 (IPF)、急性肺损伤 (ALI)、肝纤维化、肾纤维化、血管纤维化和移植排斥——的患者提供治疗益处。在这点上, 描述的发明提供了使用 MK2 的细胞穿透性肽基抑制剂干预炎症和纤维化的过程的方法。

## 发明内容

[0277] 根据一方面, 描述的发明提供了用于减小选自肝组织、肾组织或血管组织的组织中的纤维化的进展的方法, 其包括: 向有需要的对象施用药学组合物, 其包括治疗量的氨基酸序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的多肽或由第一多肽和第二多肽之间的融合制成的其功能等价物, 和其药学上可接受的载体, 所述第一多肽是选自氨基酸序列 WLRRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12)、WLRRIKA (SEQ ID NO:13)、YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)、WLRRIKAWLRRRI (SEQ ID NO:15)、FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)、KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17) 和 HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18) 的多肽的细胞穿透肽 (CPP), 所述第二多肽是选自氨基酸序列 KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)、KALARQLGVA (SEQ ID NO:9) 和 KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10) 的多肽的治疗结构域 (TD), 纤维化的进展表征为在肝组织、肾组织或血管组织中产生重构的异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积中的一种或多种, 其中治疗量的多肽对减小纤维化的进展、治疗组织的重构、或其组合是有效的。

[0278] 根据一个实施方式, 纤维化进一步表征为组织中的炎症。根据另一个实施方式, 炎症是急性或慢性炎症。根据另一个实施方式, 炎症被选自肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)、和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的至少一种细胞因子介导。

[0279] 根据一个实施方式, 组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积表征为与促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 在正常健康对照对象——即, 不具有肝、肾或血管纤维化状况、障碍或疾病的症状或其它迹象的对象——的组织中的活性相比, 促分裂原

活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)在组织中的异常活性。

[0280] 根据一个实施方式,施用的步骤口服地、在气管内、胃肠外、静脉内、或腹腔内发生。

[0281] 根据一个实施方式,药物组合物进一步包括一种或多种另外的治疗剂(一个或多个)。根据另一个实施方式,另外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方式,抗感染剂是抗病毒剂。根据另一个实施方式,抗病毒剂是索非布韦(Sovaldi®)、HCV促进的蛋白酶抑制剂(ABT-450,AbbVie)、非核苷NS5B抑制剂(达卡他韦(dasabuvir),ABT-333,AbbVie)、NS5a抑制剂(ombitasvir,ABT-267,AbbVie)、ABT-450/r(ABT-450以及利托那韦)、与ABT-267共配制的ABT-450、或与索非布韦一起配制的ABT-450、病毒唑、或其组合中的一种或多种。

[0282] 根据一个实施方式,另外的治疗剂是选自强的松、布地奈德、莫米松糠酸酯、丙酸氟替卡松、糠酸氟替卡松、和其组合的糖皮质激素。

[0283] 根据一个实施方式,另外的治疗剂是镇痛剂。

[0284] 根据一个实施方式,另外的治疗剂选自纯化的牛V型胶原、IL-13受体拮抗物、蛋白质酪氨酸激酶抑制剂、内皮受体拮抗物、双内皮素受体拮抗物、前列环素类似物、抗CTGF抗体、内皮素受体拮抗物(A-选择性)、AB0024、赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)抗体、c-JunN-末端激酶(JNK)抑制剂、吡非尼酮、IFN- $\gamma$  1b、针对全部三种TGF- $\beta$ 同种型的抗体、针对全部三种TGF- $\beta$ 同种型的全中和IgG4人抗体、TGF- $\beta$ 活化抑制剂、重组人正五聚蛋白-2蛋白(rhPTX-2)、双特异性IL4/IL13抗体、靶向整合蛋白 $\alpha v \beta 6$ 的抗体、N-乙酰半胱氨酸、西地那非、肿瘤坏死因子(TNF)拮抗物(依那西普)、和其组合。

[0285] 根据一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA(SEQ ID NO:3)。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA(SEQ ID NO:4)。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA(SEQ ID NO:5)。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA(SEQ ID NO:6)。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA(SEQ ID NO:7)。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVAA(SEQ ID NO:26)。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAARQARAKALNRQLAVA(SEQ ID NO:27)。

[0286] 根据一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的由可操作地连接至为治疗结构域(TD)的第二多肽的为细胞穿透肽(CPP)的第一多肽的融合制成的功能等价物的第二多肽是其序列与氨基酸序列KALARQLGVAA(SEQ ID NO:2)具有基本同一性的多肽。

[0287] 根据一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLAVA(SEQ ID NO:8)的多肽。根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVA(SEQ ID NO:9)的多肽。根据另一个

实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10)的多肽。根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVAA (SEQ ID NO:28)的多肽。根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVA (SEQ ID NO:29)的多肽。

[0288] 根据一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物是融合蛋白,其包括可操作地连接至第二多肽的第一多肽,其中第一多肽是功能上等价于YARAAARQARA (SEQ ID NO:11)的细胞穿透肽,其选自氨基酸序列WLRRKAWLRRRIKA (SEQ ID NO:12)、WLRRRIKA (SEQ ID NO:13)、YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)、WLRRKAWLRRRI (SEQ ID NO:15)、FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)、KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)和HRRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽,并且第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。

[0289] 根据一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRKAWLRRRIKA (SEQ ID NO:12)的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRRIKA (SEQ ID NO:13)的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRKAWLRRRI (SEQ ID NO:15)的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列HRRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。

[0290] 根据一个实施方式,载体选自控释载体、延释载体、缓释载体、和长期释放载体。

## 附图说明

[0291] 图1显示了纯喷雾干燥胰岛素的递送性能。

[0292] 图2显示了喷雾干燥胰岛素的颗粒大小分布,其通过安德森多级撞击 (Anderson Cascade Impaction) (ACI) 测定。

[0293] 图3显示了微剂量干粉吸入器 (DPI) 对两种市售的“被动 (passive)”干粉吸入器 (DPI) 的效率和流量比较。

[0294] 图4显示了喷雾干燥纯肽的流量独立性。

[0295] 图5显示了喷雾干燥肽 (非胰岛素) 的代表性显微照片。

[0296] 图6显示了喷雾干燥肽 (非胰岛素) 的颗粒大小分布。

[0297] 图7显示了微粉化/乳糖掺和物组合的颗粒大小分布,其通过下一代撞击器 (Next Generation Impactor) (NGI) 测定。

[0298] 图8显示了微粉化小分子 (长效草毒碱剂 (LAMA) /乳糖掺和物) 的递送性能。

[0299] 图9显示了石蜡包埋的人特发性肺纤维化IPF肺的免疫组织化学分析,其显示了活化的MK2 (即,磷酸化-Thr<sup>334</sup>-MAPKAPK2) 在成纤维细胞病灶处的核定位。正常肺 (左图板); IPF肺组织活检切片 (右图板)。插图显示了衬在具有活化的MK2的细胞染色阳性 (暗灰色) 的病灶处的上皮破裂。图9中显示的缩写如下:NL (具有具有肺泡囊的正常肺架构);AW (气道);FF (来自患有IPF的肺组织外植体的成纤维细胞病灶)。

[0300] 图10显示了测试化合物抑制肺纤维化的博来霉素小鼠模型 (特发性肺纤维化 (IPF) 预防模型) 中的纤维化发展的能力的示意图。在当炎症消退和纤维变性机制激活时的博来霉素递送后的第7天开始,经由喷雾或向腹腔内每天施用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)),直到当观察到显著的纤维化时的博来霉

素递送后的第21天。

[0301] 图11显示了吸入疗法和全身施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 防范小鼠中的博来霉素诱导的肺纤维化。上图板:第21天的代表性小鼠肺组织的苏木精和伊红(H&E)染色。下图板:马逊蓝色三色染色的相同视野揭示了具有博来霉素损伤的大量胶原沉积(箭头)。缩写:AW:气道;NL:正常肺架构;FF:纤维变性病灶;V:静脉。

[0302] 图12显示了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 预防由博来霉素损伤引起的显著的胶原沉积。值代表平均值 $\pm$ SEM。 $n=5$ 只动物/组。‘\*’  $p<0.05$ ; ‘\*\*’  $p<0.01$ ; ‘\*\*\*’  $p<0.001$ 。胶原指数=胶原的常量因子 $7.5 \times$ 羟脯氨酸浓度。

[0303] 图13显示了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 以剂量依赖方式预防由博来霉素损伤引起的纤维化。马逊蓝色三色染色博来霉素小鼠的肺切片。(A) MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1); (B) MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEQ ID NO:19)。

[0304] 图14显示了全身施用的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 废除以博来霉素损伤引起的系统性T细胞活化。值代表平均值 $\pm$ SEM。‘p’值 $<0.01$ 。 $n=4$ 只动物/组。图14中显示的缩写如下:(i) 利用PBS (PBS) 治疗的野生型小鼠;(ii) 利用PBS (BLEO) 治疗的博来霉素小鼠;(iii) 利用喷雾的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) (BLEO+MMI-0100 (NEB)) 治疗的博来霉素小鼠;和(iv) 利用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) (BLEO+MMI-0100 (IP)) 治疗的博来霉素小鼠。

[0305] 图15显示了测试MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 废除特发性肺纤维化的博来霉素模型(IPF治疗模型)中的纤维化进展的能力的示意图。在博来霉素递送后的第14天开始,以 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 每天的剂量经由喷雾或向腹腔内PBS或MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)),直到博来霉素递送后的第28天。

[0306] 图16显示了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的全身(IP)或喷雾(NEB)施用改善小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化。上图板:苏木精和伊红(H&E)染色。下图板:相同视野的马逊蓝色三色染色。图16中显示的缩写如下:PBS(利用PBS治疗的野生型小鼠);BLEO(利用PBS治疗的博来霉素小鼠);MMI-0100 (NEB) (利用喷雾的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 治疗的博来霉素小鼠);MMI-0100 (IP) (利用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 治疗的博来霉素小鼠);NL(具有肺泡囊的正常肺架构);AW(气道);FF(来自患有IPF的肺组织外植体的成纤维细胞病灶)。

[0307] 图17显示了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 停滞由博来霉素损伤引起的显著的胶原沉积。图17中显示的缩写如下:PBS(利用PBS治疗的野生型小鼠);BLEO(利用PBS治疗的博来霉素小鼠);BLEO+MMI-0100 (NEB) (利用喷雾的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 治疗的博来霉素小鼠);BLEO+MMI-0100 (IP) (利用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) 治疗的博来霉素小鼠)。值代表平均值 $\pm$ SEM。 $n=5$ 只动物/组。胶原指数=胶原的常量因子 $7.5 \times$ 羟脯氨酸浓度。

[0308] 图18显示了肺切片(博来霉素损伤后第28天)的抗磷酸化-Thr<sup>334</sup>-MAPKAPK2 (MK2的活化形式)染色的代表性显微照片,所述肺切片来自(i) 利用PBS (PBS) 治疗的博来霉素小鼠;(ii) 利用PBS (BLEO) 治疗的博来霉素小鼠;(iii) 利用喷雾的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) (BLEO+MMI-0100 (NEB)) 治疗的博来霉素小鼠;

和(iv)利用腹腔内的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)) (BLEO+MMI-0100 (IP))治疗的博来霉素小鼠。C57-BL/6小鼠在第0天遭受博来霉素损伤。在第14天,小鼠通过腹腔内(IP)注射或喷雾器(NEB)每天施用50 $\mu$ g/kg的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1),直到博来霉素损伤后的第28天。原始放大倍数:20 $\times$ 。

[0309] 图19显示了涉及TGF- $\beta$ 介导的炎性和纤维变性途径的关键信号传导分子。

[0310] 图20显示了在最后施用24小时后,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)下调特发性肺纤维化的博来霉素小鼠模型(治疗模型)中循环炎性细胞因子的水平。

[0311] 图21显示了MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)抑制特发性肺纤维化治疗模型中的成肌纤维细胞 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)活化。C57-BL/6小鼠在第0天遭受博来霉素损伤。在第14天到第28天,小鼠通过腹腔内(IP)注射或喷雾器(NEB)施用50 $\mu$ g/kg/日的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)。福尔马林固定的肺组织切片针对 $\alpha$ -SMA免疫染色。利用生物素化二次IgG抗体进行对照染色。链亲和素缀合的辣根过氧化物酶与3,3'-二氨基联苯胺一起用作底物,并且利用苏木精复染细胞核。原始放大倍数:20 $\times$ 。

[0312] 图22显示了正常人胚胎肺成纤维细胞(IMR-90)中通过MK2肽抑制剂的TGF- $\beta$ 诱导的成肌纤维细胞活化的调节。利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEQ ID NO:19)以规定剂量预处理IMR-90细胞持续1h,并且然后在存在或不存在TGF- $\beta$ 1 (2ng/ml)的情况下培养48h。细胞裂解产物针对 $\alpha$ -SMA(成肌纤维细胞活化的标志物)和GAPDH(加样对照)的抗体进行免疫印迹。

[0313] 图23显示了人胚胎肺成纤维细胞(IMR-90)中TGF- $\beta$ 介导的纤连蛋白质表达的调节。利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEQ ID NO:19)以规定剂量预处理IMR-90细胞持续1h,并且然后在存在或不存在TGF- $\beta$ 1 (2ng/ml)的情况下培养72h。纤连蛋白被测量为条件培养基中的分泌片段。来自条件培养基的等量(14 $\mu$ g)的总蛋白被加样在每个泳道中。

[0314] 图24显示了涉及通过 $\alpha$ 5 $\beta$ 1-整合蛋白介导的PDGFR- $\beta$ 的活化由纤连蛋白调节间充质干细胞迁移的关键信号传导分子(Veevers-Lowe J等., J Cell Sci, 124:1288-1300, 2011)。

[0315] 图25显示了由IPF患者活化的MK2激酶水平的增加。(A)正常和IPF组织中磷酸化-Thr<sup>334</sup>水平的定量分析;(C)肺功能和MK2活化之间的关联。

[0316] 图26显示了导致肾纤维化的发病机制的示意图(Cho M H, Korean J. Pediatr. 2010; 53 (7): 735-740)。

## 具体实施方式

[0317] 描述的发明提供了用于在有需要的对象中减小选自肝组织、肾组织或血管组织的组织中的纤维化的进展的组合物和方法,进展表征为产生组织重构的异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积中的一种或多种,方法包括施用治疗量的组合物,其包括具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等价物,其中治疗量的多肽对减小纤维化的进展、治疗组织的重构、或其组合是有效的。

[0318] 术语表

[0319] 如本文使用的,术语“气道”指的是空气通过其进入或离开身体的通道。肺气道包括空气通过其在呼吸期间穿过的呼吸道的那些部分。

[0320] 如本文使用的,术语“气道阻塞”指的是气流的任何异常减小。气流阻力可以发生在从上气道至末端支气管的气道中的任何地方。

[0321] 如本文使用的,术语“气道疾病”指的是影响携带氧气和其它气体进入和离开肺的管(气道)的疾病。气道疾病包括但不限于慢性阻塞性肺病(COPD),其包括哮喘、气肿和慢性支气管炎。

[0322] 如本文使用的,术语“肺组织疾病”指的是影响肺组织——例如,肺间质——的结构。肺组织的结疤或炎症使得肺不能完全地膨胀(“限制性肺病”)。它还使得肺吸收氧气(氧合)和释放二氧化碳的能力减弱。肺组织疾病的实例包括但不限于特发性肺纤维化(IPF)、急性肺损伤(ALI)、肺中的辐射诱发的纤维化、和与肺移植相关联的纤维变性状况。肉样瘤病是其中在淋巴结、肺、肝、眼、皮肤或其它组织中发生肿胀(炎症)的疾病。

[0323] 术语“肺间质”或“肺的间质”在本文可交换地使用,指的是位于肺中的气室上皮和胸膜间皮之间的区域。基质蛋白、胶原和弹性蛋白的纤维是肺间质的主要组分。这些纤维的主要功能是形成维持通气期间的结构完整性的力学支。

[0324] 如本文使用的,术语“可及表面积”或“ASA”指的是暴露于溶剂的生物分子的表面积。如本文使用的,术语“溶剂可及表面”或“SAS”指的是可及溶剂的给定残基的表面积的百分比。其被计算为ratio between三维结构中的残基的ASA和其延伸的肽确认的最大ASA之间的比率。

[0325] 术语“氨基酸残基”或“氨基酸”或“残基”在本文可交换地使用,指的是并入蛋白质、多肽或肽的氨基酸,其包括但不限于天然存在的氨基酸和已知的天然氨基酸的类似物,其可以以与天然存在的氨基酸相似的方式作用。氨基酸可以是L-或D-氨基酸。氨基酸可以被合成氨基酸取代,如此改变是为了增加肽的半衰期,增加肽的效价,或增加肽的生物利用度。

[0326] 在本文主要地使用氨基酸的单字母名称。如本领域技术人员熟知的,这样的单字母名称如下:

[0327] A是丙氨酸;C是半胱氨酸;D是天冬氨酸;E是谷氨酸;F是苯丙氨酸;G是甘氨酸;H是组氨酸;I是异亮氨酸;K是赖氨酸;L是亮氨酸;M是甲硫氨酸;N是天冬酰胺;P是脯氨酸;Q是谷氨酰胺;R是精氨酸;S是丝氨酸;T是苏氨酸;V是缬氨酸;W是色氨酸;并且Y是酪氨酸。

[0328] 下列代表彼此保守取代的氨基酸组:1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);和6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0329] 如本文使用的,除非上下文另外清楚地规定,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物。例如,提及“多肽”意思是一个或多个多肽。

[0330] 如本文使用的,术语“添加”指的是将一个或多个碱基、或一个或多个氨基酸插入序列。

[0331] 如本文使用的,术语“施用”指的是配药、供给、施加、给予、分配或供量。术语“施用(administering)”或“施用(administration)”可交换地使用,并且包括体内施用,以及直接施用至离体组织。通常,组合物可以根据需要包含常规无毒的药学上可接受的载体、佐

剂和媒介的剂量单位制剂,口服、含服、胃肠外、外用——通过吸入或吹入(即,通过嘴或通过鼻)、或直肠来全身施用;或可以通过比如而限于注射、植入、移植、外部施加、或胃肠外的手段局部施用。可以进行另外的施用,例如,静脉内、经心包、口服、经由植入物、经粘膜、经皮、外用、肌肉内、皮下、腹膜内、鞘内、淋巴内、病灶内、或硬膜外。例如,可以进行一次、多次、和/或在一个或多个延长期内施用。

[0332] 如本文使用的,术语“过敏反应”指的是免疫系统的超敏反应。过敏反应由称为变应原的正常无害的环境物质引起;这些反应是后天的、可预见的、和迅速的。过敏反应表征为称为肥大细胞和嗜碱性粒细胞的某些白细胞被称为IgE的抗体类型过度的活化,其导致极端的炎性反应。常见的过敏反应包括湿疹、荨麻疹、枯草热、哮喘发作、食物过敏、和对螫针昆虫比如胡蜂和蜜蜂的毒液的反应。

[0333] 如本文使用的,术语“ $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白”或“ $\alpha$ -SMA”指的是首先上血管中分离平滑肌细胞的肌动蛋白蛋白、 $\alpha$ -肌动蛋白-2(ACTA2;又称为肌动蛋白或主动脉平滑肌肌动蛋白)。肌动蛋白是在所有真核细胞中表达的高度保守的蛋白质。肌动蛋白丝形成细胞骨架的一部分,并且在调节细胞形状和运动中起至关重要的作用。已经在哺乳动物细胞中鉴定了六个不同的肌动蛋白同种型。每个由单独的基因编码并且以发育调节和阻止特异的方式表达。 $\alpha$ 和 $\beta$ 细胞质肌动蛋白在各种各样的细胞中表达,由此 $\alpha$ 骨骼肌动蛋白、 $\alpha$ 心脏肌动蛋白、 $\alpha$ 血管肌动蛋白、和 $\gamma$ 肠肌动蛋白的表达更限制于特化的肌肉细胞类型。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的基因是其表达相对地限制于血管平滑肌细胞的少数基因之一,但是其现在最常用作成肌纤维细胞形成的标志物。 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白的表达由激素和细胞增殖调节,并且被病理学状况改变,包括致癌性转化和动脉粥样硬化。

[0334] 如本文使用的,术语“肺泡(alveolus)”或“肺泡(alveoli)”指的是具有空腔形式的解剖结构。在肺中发现,肺泡是与血液气体交换的呼吸位点的球形露出。肺泡包含一些胶原和弹性纤维。当吸气时,弹性纤维允许肺泡随着其充满空气而伸展。它们然后在呼气期间回弹,以便排除富含二氧化碳的空气。

[0335] 如本文使用的,术语“生物标志物”(或“生物特征”)指的是肽、蛋白质、核酸、抗体、基因、代谢物、或用作生物学状态的指示物的任何其它物质。它是被客观地测量并且评估为正常的生物过程、致病过程、或治疗干预的药理反应的细胞或分子指示物的特性。

[0336] 如本文使用的,术语“博来霉素”指的是由细菌链霉菌产生的糖肽抗生素。其通过诱导DNA链断裂和抑制胸苷并入DNA链起作用。博来霉素的最严重的并发症是肺纤维化和受损的肺功能。

[0337] 如本文使用的,术语“支气管肺泡灌洗”或“BAL”指的是其中支气管镜穿过嘴和鼻进入肺并且流体被喷入肺的一小部分并且然后被重新收集用于检查的医疗过程。BAL通常进行以诊断肺病。BAL一般地用于诊断具有免疫系统问题的人中的感染、使用呼吸机的人中的肺炎、一些类型的肺癌的、和肺的结疤(间质性肺病)。BAL是采样上皮内衬液(epithelial lining fluid)(ELF)的组分和测定肺气道的蛋白质组成的最常见的方式,并且通常作为采样肺中的细胞或病原体水平的手段用于免疫学研究。

[0338] 如本文使用的,术语“载体”和“药学载体”指的是用于将一种或多种活性剂递送至对象的药学上可接受的惰性药剂或媒介,并且通常被称为“赋形剂”。(药学)载体必需具有足够高的纯度和足够低的毒性以使得其适于施用至正在治疗的对象。(药学)载体进一步应

当维持活性剂——例如，描述的发明的多肽——的稳定性和生物利用度。当与给定组合物的活性剂或其它组分结合时，(药学)载体可以是流体或固体，并且以所考虑的计划的施用方式选择以提供期望的体积、稠度等。(药学)载体可以非限制性地是结合剂(例如，预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等)、填料(例如，乳糖和其它糖类、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯、磷酸氢钙等)、润滑剂(例如，硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶体二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等)、崩解剂(例如，淀粉、羧基乙酸淀粉钠等)、或湿润剂(例如，十二烷基硫酸钠等)。用于描述的发明的组合物的其它合适的(药学)载体包括但不限于水、盐溶液、醇类、聚乙二醇、明胶、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。用于胃肠外施用描述的多肽的组合物可以包括(药学)载体比如无菌水溶液、常见溶剂中的非水溶液比如醇类、或多肽在液体油基中的溶液。

[0339] 如本文使用的，术语“胶原”指的是在哺乳动物的新鲜结缔组织中发现的一组天然存在的蛋白质。其是结缔组织的主要组分，并且是哺乳动物中最丰富的蛋白质，占据全身蛋白质含量的大约25%至35%。细长纤丝形式的胶原最主要地发现于纤维组织，比如腱、韧带和皮肤，并且还富含于角膜、软骨、骨髓、血管、内脏和椎间盘。目前为止，已经鉴定了29种类型的胶原，并且身体中超过90%的胶原是I型(皮肤、腱、血管、韧带、器官、骨髓)、II型(软骨)、III型(网状体(reticulate)(网状纤维的主要组分))、和IV型(其形成细胞基底膜的基底)胶原。

[0340] 如本文使用的，术语“状况”指的是各种健康状态，并且意为包括由任何潜在机制、障碍、或损伤引起的障碍或疾病。

[0341] 术语“细胞因子”——其指的是由细胞分泌的小的可溶性蛋白物质，其对其它细胞具有多种作用——通常用于指许多信号传导分子，非限制性地包括淋巴因子、白介素和趋化因子。细胞因子介导许多重要的生理学功能，包括生长、发育、创伤愈合和免疫反应。它们通过与位于细胞膜的其细胞特异性受体结合发挥作用，这使得在细胞中开始独特的信号转导级联，其最终将导致靶标细胞中的生化和表型变化。通常，细胞因子在局部起作用，但是一些已经发现具有系统性免疫调节作用，以及类似于激素的多效性自分泌、旁分泌和内分泌作用。它们包括：I型细胞因子，其包含许多白介素，以及多种造血生长因子；II型细胞因子，包括干扰素和白介素-10；肿瘤坏死因子(“TNF”)相关分子，包括TNF- $\alpha$ 和淋巴毒素；免疫球蛋白超家族成员，包括白介素1(“IL-1”)；和趋化因子——在各种各样免疫和炎症功能中起关键作用的分子家族。相同的细胞因子可以取决于细胞状态对细胞具有不同的作用。细胞因子通常调节其它细胞因子的表达并引发级联。

[0342] 如本文使用的，术语“疾病”或“障碍”指的是健康的损害或异常功能的状况，而不管原因(是否是可遗传的、环境的、饮食的、传染的、由于创伤、或另外的)。例如，障碍可以包括但不限于：炎性或纤维变性疾病、纤维化、急性肺损伤、辐射诱发的纤维化、移植排斥、慢性阻塞性肺病(COPD)、内毒素休克、局限性炎性疾病、动脉粥样硬化性心血管疾病、阿尔茨海默病、肿瘤疾病、神经缺血、结缔组织与系统性自身免疫疾病、类风湿性关节炎、克罗恩病、炎性肠道疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、斯耶格伦综合症、硬皮病、血管炎、内膜增生、狭窄、再狭窄、动脉粥样硬化、平滑肌细胞肿瘤与转移、平滑肌痉挛、心绞痛、普林兹迈托心绞痛、缺血、中风、心动过缓、高血压、心脏肥大、肾衰竭、中风、肺动脉高压、哮喘、妊娠毒血症、

未足月产、先兆子痫、子痫、雷诺病或现象、溶血性尿毒症、肛裂、失弛缓症、阳痿、偏头疼、与平滑肌痉挛相关联的缺血性肌肉损伤、血管病变、缓慢性心律失常 (bradyarrhythmia)、充血性心力衰竭、顿抑心肌 (stunned myocardium)、肺动脉高血压、舒张期功能障碍、神经胶质增生 (星形胶质细胞的增殖, 并且可以包括中枢神经系统的受损区域中的细胞外基质 (ECM) 沉积)、慢性阻塞性肺病 (即, 表征为气流阻塞或限制的呼吸道病; 包括但不限于慢性支气管炎、气肿和慢性哮喘)、骨质减少、内皮功能障碍、炎症、变性关节炎、强直性脊柱炎、格-巴二氏病、传染病、脓毒病、内毒素休克、银屑病、放射性小肠炎、肝硬化、间质纤维化、肺纤维化 (包括特发性肺纤维化)、结肠炎、阑尾炎、胃炎、喉炎、脑膜炎、胰腺炎、耳炎、再灌注损伤、外伤性脑损伤、脊髓损伤、周围神经病变、多发性硬化、过敏症、心代谢疾病、肥胖、II型糖尿病、I型糖尿病、和NASH/肝硬化。

[0343] 如本文使用的, 术语“结构域”指的是具有典型的三级结构和功能的蛋白质的区域, 并且指的是一起组成通过折叠其线性肽链形成的其三级结构的蛋白质的任意三维亚基。

[0344] 如本文使用的, 术语“治疗结构域” (也称为“TD”) 指的是肽、肽区段或变体、或其衍生物, 其与肽KALARQLGVAA (SEQ ID NO: 2)、或其区段具有实质同一性。治疗结构域通过其自身通常不能够穿透哺乳动物细胞的质膜。一旦在细胞内, 治疗结构域可以抑制具体组的激酶的激酶活性。

[0345] 如本文使用的, 术语“细胞穿透肽” (也称为“CPP”、“蛋白质转导结构域”、“PTD”、“特洛伊肽”、“膜易位序列”和“细胞穿透性蛋白”) 指的是能够穿透哺乳动物细胞细胞的质膜的肽类。其还指的是肽、肽区段、或变体或其衍生物, 其与肽YARAAARQARA (SEQ ID NO: 11)、或其功能区段具有实质同一性, 并且指的是肽、肽区段、或变体或其衍生物, 其在功能上等同于SEQ ID NO: 11。CPP的长度通常为10-16个氨基酸, 并且能够跨越哺乳动物细胞传输许多类型和分子量的化合物。这样的化合物包括但不限于效应分子, 比如蛋白质、DNA、缀合肽、寡核苷酸)、和小颗粒比如脂质体。化学连接或融合至其它蛋白质 (“融合蛋白”) 的CPP仍能够穿透质膜并进入细胞。

[0346] 如本文使用的术语“细胞外基质”指的是经由特异性细胞表面受体与细胞相互作用的细胞的外部环境中的支架。细胞外基质由纤维状蛋白质和糖葡胺聚糖 (GAG) 的连锁网 (interlocking mesh) 组成。在细胞外基质中发现的纤维状蛋白质的实例非限制性地包括胶原、弹性蛋白、纤连蛋白、和层粘连蛋白。在细胞外基质中发现的GAG的实例非限制性地包括蛋白多糖 (例如, 硫酸肝素)、硫酸软骨素、硫酸钾蛋白、和非蛋白多糖的多糖 (例如, 透明质酸)。术语“蛋白多糖”指的是包含一种或多种糖葡胺聚糖附着至其的核心蛋白的一组糖蛋白。细胞外基质发挥许多功能, 包括但不限于向细胞提供支撑和锚定、从一个组织分离另一个组织、和调节细胞内通讯。

[0347] 术语“功能等价物”或“在功能上等价的”在本文可交换地使用, 指的是具有相似或相同作用或用途的物质、分子、多核苷酸、蛋白质、肽或多肽。在功能上等价于例如多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1) 的多肽可以具有基本上类似于或同一于SEQ ID NO: 1的表达多肽的生物学活性, 例如, 抑制活性、动力学参数、盐度抑制、辅因子依赖活性、和/或功能单位大小。

[0348] 在功能上等价于YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1) 的多肽的实例包括但不

限于氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)的多肽、氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)的多肽、氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)的多肽、氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)的多肽、氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVAA (SEQ ID NO:26)的多肽、氨基酸序列YARAARQARAKALNRQLAVA (SEQ ID NO:27)的多肽和氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)的多肽。

[0349] 本发明中描述的氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)肽包括融合蛋白,其中为了增强治疗效果,细胞穿透肽(CPP; YARAAARQARA; SEQ ID NO:11)可操作地连接至治疗结构域(KALARQLGVAA; SEQ ID NO:2)。

[0350] 在功能上等价于多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的治疗结构域(TD; KALARQLGVAA; SEQ ID NO:2)的多肽的实例包括但不限于氨基酸序列KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)的多肽、氨基酸序列KALARQLGVA (SEQ ID NO:9)的多肽、氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10)的多肽、氨基酸序列KALNRQLAVAA (SEQ ID NO:28)的多肽、和氨基酸序列KALNRQLAVA (SEQ ID NO:29)的多肽。

[0351] 在功能上等价于多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的细胞穿透肽(CPP; YARAAARQARA; SEQ ID NO:11)的多肽的实例包括但不限于氨基酸序列WLRRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12)的多肽、氨基酸序列WLRRIKA (SEQ ID NO:13)的多肽、氨基酸序列YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)的多肽、氨基酸序列WLRRIKAWLRRI (SEQ ID NO:15)的多肽、氨基酸序列FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽、氨基酸序列KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多肽、和氨基酸序列HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。

[0352] 如本文使用的,术语“内源的”指的是在生长或源自于内部、或内部衍生的。

[0353] 如本文使用的,术语“内皮”指的是衬在血管的内表面的细胞内的薄层,其形成腔中循环血液和其余脉管壁之间的界面。内皮细胞将衬在整个循环系统内,从心至最小的毛细血管。这些细胞减少血液流动的湍流,使得流体被泵送得更远。

[0354] 如本文使用的,术语“嗜酸性细胞”或“嗜酸性粒细胞”指的是负责防治脊柱动物中的多细胞寄生虫和某些感染的白细胞。它们是在迁移入血液前在造血期间在骨髓中发育的粒细胞。连同肥大细胞一起,它们还控制与过敏症和哮喘相关联的机制。在活化之后,嗜酸性细胞发挥多样的功能,包括(1)产生阳离子颗粒蛋白和其通过脱粒的释放,(2)产生活性氧种类,比如,超氧化物、过氧化物、和次溴酸盐(次溴酸,其由嗜酸性细胞过氧化物酶优先地产生),(3)产生脂质介质,比如,来自白三烯和前列腺素家族的类花生酸,(4)产生生长因子,比如转化生长因子(TGF- $\beta$ )、血管内皮生长因子(VEGF)、和血小板源生长因子(PDGF),和(5)产生细胞因子比如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13和TNF- $\alpha$ 。

[0355] 如本文使用的,术语“上皮”指的是由衬在遍及身体的结构的腔和表面内的细胞组成的组织。上皮的基底面面向下面的结缔组织,并且两层被基底膜分离。

[0356] 如本文使用的,术语“外渗”指的是血细胞组分从毛细血管至环绕它们的组织的移动(血细胞渗出)。在恶性肿瘤转移的情况下,它指的是离开毛细血管和进入器官的癌细胞。

[0357] 如本文使用的,术语“渗出”指的是来自循环系统的流体通过其穿过血管的壁进入病变或炎症区域的过程。血液渗出物包含一些或全部血浆蛋白、白细胞、血小板和红细胞。

[0358] 如本文使用的,术语“纤维蛋白”指的是参与凝血的纤维状蛋白质。其是聚合以形

成“网”的纤维性蛋白,所述“网”在创伤位点上方形成止血栓子或凝块(连同血小板)。纤维蛋白参与信号转导、血液凝固、血小板活化、和蛋白质聚合。

[0359] 如本文使用的,术语“成纤维细胞”指的是制造和分泌细胞外基质蛋白——包括但不限于,胶原——的结缔组织细胞。成纤维细胞——在结缔组织中发现的最常见的细胞类型——愈合伤口中起重要的作用。与结缔组织的其它细胞一样,成纤维细胞源自原始间质(源自全部三个胚层并且位于胚胎的疏松结缔组织类型)。在某些情况下,上皮细胞可以产生成纤维细胞——称为上皮间充质转换的过程。成纤维细胞和纤维细胞是相同细胞的两种状态,前者是活化状态,后者是低活性状态,与维持和组织代谢相关,其中两种术语偶尔可交换地使用。

[0360] 如本文使用的,术语“游离基”指的是具有一个或多个为配对的电子的高度反应性和通常短暂的分子片段。游离基是高度化学反应性分子。因为游离基需要从邻近分子提取第二电子以配对其单个电子,它经常与其它分子反应,其在自蔓延连锁反应(self-propagating chain reaction)中起始更多游离基类别的形成。此自蔓延的能力使得游离基对活的生物体高度毒性。氧化损伤可以导致细胞内广泛的生物化学损害。负责此损害的分子机制是复杂的。例如,游离基可以损害细胞内大分子,比如核酸(例如,DNA和RNA)、蛋白质和脂质。对细胞蛋白的游离基损害可以导致酶功能的失去和细胞死亡。对DNA的游离基损害可以引起复制或转录问题,其导致细胞死亡或不受控的细胞生长。对细胞膜脂质的游离基损害可以引起受损的膜失去它们的运输氧、营养物或水至细胞的能力。

[0361] 如本文使用的,术语“成肌纤维细胞”指的是创伤区域中的成纤维细胞,其具有平滑肌的一些特性——比如收缩性质——和纤维,并且被认为暂时地产生III型胶原。虽然存在许多可能方式的成肌纤维细胞发育,但是成肌纤维细胞是在其分化中在成纤维细胞和平滑肌细胞之间的细胞。在许多器官如肝、肺和肾中,它们主要地涉及纤维化。在创伤组织中,其与伤口加固(通过细胞外胶原纤维沉积)和然后创伤收缩(通过细胞内收缩和通过整合蛋白介导的拉动至胶原束的胶原纤维的伴行排列(concomitant alignment))相关。

[0362] 如本文使用的,术语“纤连蛋白”指的是高分子量(~440kDa)细胞外基质糖蛋白,其与跨膜细胞表面基质受体蛋白(“整合蛋白”)并且与细胞外基质组分比如胶原、纤维蛋白和硫酸肝素蛋白多糖(例如多配体聚糖)结合。纤连蛋白作为二聚物存在,其由通过一对二硫键连接的两个几乎相同的单体构成。存在纤连蛋白的多种同种型。血浆纤连蛋白是可溶的并且在血液和其它体液中循环,其中其被认为增强凝血、创伤愈合和吞噬作用。其它同种型在细胞的表面上聚集,并且作为高度不溶性纤连蛋白丝沉积于细胞外基质。成纤维细胞的表面上或附近形成的纤连蛋白丝通常与相邻的细胞内肌动蛋白应力纤维对齐,其促进分泌的纤连蛋白分子聚集为丝并且影响丝取向。纤连蛋白在细胞粘附、细胞生长、细胞迁移和细胞分化中起主要作用,并且其对过程比如创伤愈合和胚胎发育是重要的。

[0363] 如本文使用的,术语“纤维化”指的是器官或组织中因部分损伤或炎症或因干扰其血液供应而产生的过量的纤维结缔组织的形成或发展。其可以为导致疤痕的正常愈合反应、异常的反应过程的结果,或不具有已知的或理解的成因。

[0364] 如本文使用的,术语“吸入”指的是利用呼吸吸取含药蒸气的动作。

[0365] 如本文使用的,术语“吹入”指的是在压力下递送空气、气体或粉末至身体的腔或室的动作。例如,鼻吹入涉及通过鼻在压力下递送空气、气体或粉末至身体的腔或室的动

作。

[0366] 如本文使用的,术语“吸入递送装置”指的是从液体或干粉气溶胶制剂产生小液滴或气溶胶,并且用于通过嘴施用以便实现药物——例如,在溶液、粉末等中——的肺施用的机器/设备或组件。吸入递送装置的实例包括但不限于喷雾器、定量吸入器和干粉吸入器(DPI)。

[0367] 如本文使用的,术语“喷雾器”指的是用于以雾的形式施加吸入肺的液体药物的装置。

[0368] 如本文使用的,术语“定量吸入器”、“MDI”或“喷气机(puffer)”指的是加压的手持装置,其使用推进剂以递送特定量的药物(“定量”)至患者的肺。如本文使用的,术语“推进剂”指的是通常由通过会聚的扩散喷嘴的气体压力用于排出物质的材料。压力可以来自压缩气体、或通过化学反应产生的气体。排放材料可以是气体、液体、等离子体或化学反应前的固体、液体或胶体。用于加压定量吸入器的推进剂是液化气体,传统上是氯氟烃(CFC)且越来越多是氢氟烷烃(HFA)。合适的推进剂包括,例如,氯氟烃(CFC),比如三氯氟甲烷(也称为推进剂11)、二氯二氟甲烷(也称为推进剂12)、和1,2-二氯-1,1,2,2-四氟乙烷(也称为推进剂114);氢氯氟烃;氢氟烷(HFC),比如1,1,1,2-四氟乙烷(也称为推进剂134a、HFC-134a或HFA-134a)和1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(也称为推进剂227、HFC-227或HFA-227);二氧化碳;二甲醚;丁烷;丙烷;或其混合物。在其它实施方式中,推进剂包括氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烷、或其混合物。在其它实施方式中,氢氟烷被用作推进剂。在其它实施方式中,HFC-227和/或HFC-134a被用作推进剂。

[0369] 如本文使用的,术语“干粉吸入器”或“DPI”指的是类似于定量吸入器的装置,但是其中药物是粉末的形式。患者呼出完整呼吸,将嘴唇放在衔口(mouthpiece)周围,并且然后快速地吸入粉末。干粉吸入器不需要MDI必需的时机和协作。

[0370] 如本文使用的,术语“颗粒”指的是极小的构分(例如纳米颗粒、微粒或在一些情况下更大的颗粒),在其中或其上包含本文所述的组合物。

[0371] 如本文使用的,术语“肺纤维化”、“特发性肺纤维化”和“隐源性纤维性肺泡炎”指的是间质性肺病的主要构成,其表征为重构正常肺组织结构和危害其功能的异常成纤维细胞增殖和细胞外基质蛋白的沉积。特发性肺纤维化的标志病变是成纤维细胞病灶。这些位点具有以下特点:间充质细胞的活跃复制和新鲜细胞外基质的丰富沉积。

[0372] 如本文使用的,术语“纤维变性位置”或“纤维变性病灶”可交换地指的是由过量的纤维组织形成或发展的组织中的特定位置。

[0373] 如本文使用的,术语“融合蛋白”指的是出于制造具有源自原始蛋白质或多肽中的每个的功能性质的单个多肽或蛋白质的目的,通过结合多个蛋白结构域或多肽构建的蛋白质或多肽。融合蛋白的制造可以通过以下完成:经由重组DNA技术可操作地结合或连接编码每个蛋白结构域或多肽的两个不同的核苷酸序列,从而制造编码期望的融合蛋白的新的多核苷酸序列。可选地,可以通过化学地接合期望的蛋白结构域制造融合蛋白。

[0374] 如本文使用的,术语“特发性”意思是自发地产生或来自模糊或未知的原因。

[0375] 如本文使用的,术语“炎症”指的是血管化组织通过其响应损伤的生理过程。参见,例如,FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY,4th Ed.,William E.Paul,ed.Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia(1999) at 1051-1053,其通过引用并入本文。在炎性过程期间,

参与解毒和修复的细胞被炎性介质动员至危害位点。炎症通常表征为白血球特别是嗜中性粒细胞(多形核细胞)在炎症位点的强烈浸润。这些细胞通过在血管壁处或在未损伤组织中释放有毒物质来促进组织伤害。传统地,炎症已经被分为急性和慢性反应。

[0376] 如本文使用的。术语“急性炎症”指的是对急性损伤的迅速的、短暂(几分钟至几天)的、相对一致的反应,其表征为流液、血浆蛋白和嗜中性白血球的聚积。引起急性炎症的有害因素(injurious agent)的实例包括但不限于病原体(例如细菌、病毒、寄生虫)、来自外源性(例如石棉)或内源性(例如,尿酸盐结晶、免疫复合物)来源的异物、和物理(例如,烧伤)或化学(例如,腐蚀剂)因素。

[0377] 如本文使用的,术语“慢性炎症”指的是较长持续时间的炎症,并且其具有不明确且不确定的终止期。当急性炎症通过不完全清除初始炎性因素(例如,吸烟)或由于在相同位置出现的多个急性事件而持续时,慢性炎症接管。包括淋巴细胞与巨噬细胞的流入和成纤维细胞生长的慢性炎症可以在延长或反复的炎性活动的位点导致组织结疤。

[0378] 如本文使用的,术语“炎性介质”指的是炎性和免疫过程的分子介质。这些可溶性可扩散的分子在组织伤害和感染的位点的局部和更远的位点二者处起作用。一些炎性介质通过炎性过程活化,而其它的响应于急性炎症或通过其它可溶性炎性介质从细胞来源合成和/或释放。炎性反应的炎性介质的实例包括但不限于血浆蛋白酶、补体、激肽、凝血蛋白和溶纤维蛋白、脂质介质、前列腺素、白细胞三烯、血小板活化因子(PAF)、肽、激素(包括类固醇激素比如糖皮质激素)、和胺——包括但不限于组胺、血清素和神经肽、和促炎性细胞因子——包括但不限于白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-4(IL-4)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (IF- $\gamma$ )、白介素12(IL-12)和白介素-17(IL-17)。

[0379] 在促炎介质之中,已知IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 在在急性期反应中活化肝细胞以合成活化补体的急性期蛋白。补体是与病原体相互作用以标记它们被吞噬细胞破坏的血浆蛋白的系统。补体蛋白可以被病原体直接地或被病原体结合抗体间接地活化,其导致在病原体的表面上发生并且生成具有多种效应功能的活性组分的级联反应。IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 还激活骨髓内皮以动员嗜中性粒细胞,并且作为内源性致热原起作用,提高体温,其帮助从身体消除感染。细胞因子的主要作用是作用于下丘脑——改变体温调节,和作用于肌肉和脂肪细胞——刺激肌肉和脂肪细胞的分解代谢以升高体温。在升高的温度下,细菌和病毒复制降低,同时适应性免疫系统更高效地运行。

[0380] 如本文使用的,术语“肿瘤坏死因子”指的是响应于抗原或感染由白细胞制造的细胞因子,其诱导肿瘤细胞坏死(死亡)并且具备宽范围的促炎作用。肿瘤坏死因子还是对脂质代谢、凝血、胰岛素抗性、和衬在血管内的内皮细胞的功能作用的多功能细胞因子。

[0381] 如本文使用的,术语“白介素(IL)”指的是来自第一次观察到由白血球分泌并且作用于白血球的一类同源相关蛋白的细胞因子。已经发现白介素由各种体细胞产生。白介素调节细胞生长、分化和运动,并且刺激免疫反应,比如炎症。白介素的实例包括白介素-1(IL-1)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、白介素-12(IL-12)和白介素-17(IL-17)。

[0382] 在本文使用的术语“抑制(inhibiting)”、“抑制(inhibit)”或“抑制(inhibition)”指的是减小过程的量或速率,完全停止过程,或降低、限制或阻断其作用或功能。抑制可以包括将物质的量、速率、作用功能、或过程减小或降低至少5%、至少10%、至

少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0383] 如本文使用的,术语“抑制剂”指的是与第一个分子结合从而降低第一个分子的活性的第二个分子。酶抑制剂是与酶结合从而降低酶活性的分子。抑制剂的结合可以阻止底物进入酶的活性位点和/或阻碍酶催化其反应。抑制剂结合是可逆的或不可逆的。不可逆的抑制剂通常与酶反应并且使其化学地改变,例如,通过修饰酶活性所必需的关键氨基酸残基。相比之下,可逆的抑制剂非共价地结合并且取决于这些抑制剂是否结合酶、酶-底物复合物、或二者产生不同类型的抑制。酶抑制剂通常通过其特异性和效价进行评估。

[0384] 如本文使用的,术语“损伤”指的是由外部因素或外力——其是物理的或化学的——引起的身体的结构或功能的损害或伤害。

[0385] 本文使用的术语“分离的”指的是物质,比如,但不限于核酸、肽、多肽或蛋白质,其:(1)基本上或大体上不含正常地在其天然存在环境中发现的与其伴随或互相作用的组分。本文使用的术语“基本上不含”或“大体上不含”指的是相当地或显著地不含,或多于大约95%不含,或多于大约99%不含这样的组分。分离的物质任选包括在其天然环境中未发现物质;或(2)如果物质在其天然环境中,则该物质已经通过有意的人为介入被合成地(非天然地)改变为组合物和/或被置于细胞中的某个位置(例如,基因组或亚细胞器),其对在环境中发现的物质是非天然的。可以对处于其天然状态的物质进行改变,或从其天然状态移除,以产生合成物质。例如,借助在其来源的细胞内进行人为介入,如果天然存在的核酸被改变,或如果其从已经被改变的DNA转录,则其成为分离的核酸。参见,例如,Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells, Kmiec, 美国专利号 5,565,350; In Vivo Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells; Zarling 等, PCT/US93/03868, 每个通过引用以其全部并入本文。同样地,天然存在的核酸(例如,启动子),如果通过非天然存在的手段引入对该核酸非天然的基因座的基因座,则其称为分离的。如本文限定的,“分离的”核酸也称为“异源”核酸。

[0386] 如本文使用的,术语“激酶”指的是将磷酸基团从高能供体分子转移至特异性靶分子或底物的酶类型。高能供体组可以包括但不限于ATP。

[0387] 如本文使用的。术语“白血球”或“白细胞(WBC)”指的是免疫细胞类型。大多数白血球在骨髓中制造并且发现于血液和淋巴组织。白血球帮助身体与感染和其它疾病斗争。粒细胞、单核细胞和淋巴细胞是白血球。

[0388] 如本文使用的,术语“淋巴细胞”指的是小的白细胞(白血球)在保护身体抵御疾病中起大作用。存在两种主要类型的淋巴细胞:B细胞和T细胞。B细胞制造攻击细菌和毒素的抗体,而当体细胞已经被病毒接管或已经变为癌性时,T细胞自身攻击体细胞。淋巴细胞分泌调节许多其它类型的细胞的功能活性并且通常存在于慢性炎症的位点的产物(淋巴因子)。

[0389] 如本文使用的,术语“巨噬细胞”指的是环绕和杀死微生物,移除死细胞,并且刺激其它免疫系统细胞的作用的白细胞类型。在消化病原体后,巨噬细胞呈递病原体的抗原(分子,最通常是在病原体的表面上发现的蛋白质,由免疫系统用于识别)至对应的辅助T细胞。通过将其整合入细胞膜并且展示附着至MHC II类分子的其完成呈递,其向其它白细胞指示

巨噬细胞不是病原体,而不管在其表面上具有抗原。最后,抗原呈递导致附着至病原体的抗原的抗体的产生,使得巨噬细胞更易于附着至它们的细胞膜和更易于吞噬作用。

[0390] 如本文使用的,术语“间充质细胞”或“间质”指的是源自全部三个胚层的细胞,其发育为结缔组织、骨骼、软骨、淋巴系统和循环系统。

[0391] 如本文使用的,术语“MK2激酶”或“MK2”指的是促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(也称为“MAPKAPK2”、“MAPKAP-K2”、“MK2”),其是丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶家族的成员。

[0392] 如本文使用的,术语“质量中值直径”或“MMAD”指的是空气散播颗粒质量关于空气动力学直径的分布的中值。MMAD通常伴随几何标准差( $g$ 或 $\sigma g$ ),其表征颗粒大小分布的可变性。

[0393] 如本文使用的,术语“调节”意思是调整、改变、适应或调节至某一测量或比例。

[0394] 如本文使用的,术语“单核细胞”指的是在骨髓中制造并且经过血液至身体中的组织——其在其中变为巨噬细胞的免疫细胞类型。单核细胞是白细胞类型和吞噬细胞类型。

[0395] 如本文使用的,术语“嗜中性粒细胞”或“多形核嗜中性粒细胞(PMN)”指的是哺乳动物中最丰富的白细胞类型,其形成先天免疫系统的基本部分。它们连同嗜碱性细胞和嗜酸性细胞一起形成多形核细胞家族(PMN)的一部分。嗜中性粒细胞正常地发现于血流。在炎症的开始(急性)期期间,特别地由于细菌感染和一些癌症,嗜中性粒细胞是炎症细胞朝向炎症位点迁移的第一应答者之一。它们在称为趋化性的过程中,跟随化学信号比如白介素-8(IL-8)和C5a迁移通过血管,然后通过间质性组织,所述过程是运动性细胞或部分沿着化学浓度梯度朝向其视为吸引性的环境条件和/或远离其发现排斥(repellent)的环境的定向运动。

[0396] 如本文使用的,术语“正常健康对照对象”指的是不具有气道或肺组织疾病的症状或其它临床证据的对象。

[0397] 本文使用的术语“核酸”指的是单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,并且除非另外限制,包含具有天然核苷酸的基本性质的已知类似物(例如,肽核酸),其中它们以与天然存在的核苷酸相似的方式与单链核酸杂交。

[0398] 本文使用的术语“核苷酸”指的是由杂环碱基、糖和一个或多个磷酸基团构成的化合物。在最常见的核苷酸中,碱基是嘌呤或嘧啶的衍生物,并且糖是戊糖脱氧核糖或核糖。核苷酸是核酸的单体,其中三个或更多个结合在一起以形成核酸。核苷酸是RNA、DNA和多种辅因子——包括但不限于CoA、FAD、DMN、NAD和NADP——的结构单位。嘌呤包括腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G);嘧啶包括胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。

[0399] 本文使用下列术语描述两种或更多种核酸或多核苷酸之间的序列关系:(a)“参考序列”、(b)“比较窗口”、(c)“序列同一性”、(d)“序列同一性的百分比”、和(e)“基本同一性”。

[0400] (a) 术语“参考序列”指的是用作序列比较的基础的序列。参考序列可以是指定序列的子集或全部;例如,作为全长cDNA或基因序列的区段,或完整的cDNA或基因序列。

[0401] (b) 术语“比较窗口”指的是多核苷酸序列的连续的指定区段,其中所述多核苷酸序列可以与参考序列比较,并且其中比较窗口中的多核苷酸序列部分与参考序列(其不包括添加或缺失)相比,可以包括添加或缺失(即空位)用于两个序列的最佳比对。通常,比较

窗口的长度是至少20个连续核苷酸,并且任选地可以是至少30个连续核苷酸、至少40个连续核苷酸、至少50个连续核苷酸、至少100个连续核苷酸长或更长。本领域技术人员理解,为了避免由于在多核苷酸序列中包含空位而与参考序列高度相似,通常引入空位罚分,并且从匹配数减去空位罚分。

[0402] 用于比较的序列比对方法在本领域是熟知的。可以通过以下实施用于比较的序列最佳比对:Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) 的局部同源性算法;Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源性比对算法;Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444 (1988) 的相似性检索方法;这些算法的计算机执行包括但不限于:PC/基因程序中的CLUSTAL, *Intelligenetics*, Mountain View, Calif.; Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., USA; 由Higgins和Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988) 很好描述的CLUSTAL程序;Higgins和Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet, 等, *Nucleic acids Research* 16:10881-90 (1988); Huang等, *Computer Applications in the Biosciences* 8:155-65 (1992); 和Pearson等, *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331 (1994)。可以用于数据库相似性检索的BLAST程序家族包括:用于针对核苷酸数据库序列的核苷酸查询序列的BLASTN;用于针对蛋白质数据库序列的核苷酸查询序列的BLASTX;用于针对蛋白质数据库序列的蛋白质查询序列的BLASTP;用于针对核苷酸数据库序列的蛋白质查询序列的TBLASTN;和用于针对核苷酸数据库序列的核苷酸查询序列的TBLASTX。参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 19, Ausubel, 等, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)。

[0403] 除非另外说明,本文提供的序列同一性/相似性值指的是使用BLAST 2.0程序套件使用默认参数获得的值。Altschul等, *Nucleic acids Res.* 25:3389-3402 (1997)。用于进行BLAST分析的软件是可以公开获得的,例如,通过国家生物技术信息中心。此算法包括首先通过识别查询序列中长度W的短字 (short word) 识别高分序列对 (HSP), 所述短字当与数据库序列中相同长度的字比对时,与一些正值的阈值分数T匹配或符合。T被称为邻近字分数阈值 (Altschul等, 如上)。这些初始邻近字命中作为用于起始检索以发现包含它们的更长的HSP的种子。然后,只要累积的比对分数可以增加,字命中沿着每个序列以两个方向延伸。对于核苷酸序列,使用参数M (匹配残基对的奖励分数;总是 $>0$ ) 和N (不匹配残基的罚分;总是 $<0$ ) 计算累积的分数。对于氨基酸序列,评分矩阵被用于计算累积的分数。当出现以下情况时,停止每个方向中字命中的延伸:累积的比对分数从其最大获得值减少数量X;由于一个或多个负评分残基比对的积累,累积的分数变为0或低于0;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序 (对于核苷酸序列) 使用以下作为默认值:11的字长 (W), 10的期望值 (E), 100的切分点 (cutoff),  $M=5$ ,  $N=-4$ , 和两条链进行比较。对于氨基酸序列, BLASTP程序使用以下作为默认值:3的字长 (W), 10的期望值 (E), 和BLOSUM62评分矩阵 (参见Henikoff&Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915)。

[0404] 除计算序列同一性百分比之外, BLAST算法还进行两个序列之间相似性的统计学分析 (参见, 例如, Karlin&Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993))。由BLAST算法提供的一种相似性测量是最小和概率 (P (N)), 其提供两个核苷酸或氨基酸序列

之间将偶然出现匹配的可能性的指示。BLAST检索假设蛋白质可以作为随机序列建模。然而,许多真实的蛋白质包括非随机序列的区域,其可以是同聚物区域(homopolymeric tract)、短期重复、或富集于一种或多种氨基酸的区域。可以在不相关的蛋白质之间比对这样的低复杂度区域,即使蛋白质的其它区域完全不相似。可以采用大量的低复杂度过滤程序以减少这样的低复杂度比对。例如,可以单独地或组合地采用SEG(Wooten和Federhen, *Comput.Chem.*, 17:149-163 (1993))和XNU(Claverie和States, *Comput.Chem.*, 17:191-201 (1993))低复杂度过滤器。

[0405] (c) 本文在两个核酸或多肽序列的背景下使用的术语“序列同一性”或“同一性”指的是在指定的比较窗口内当比对最大一致性时两个序列中相同的残基。当在关于蛋白质使用序列同一性的百分比时,认识到不同一的残基位置通常是因保守氨基酸取代而不同,即,其中氨基酸残基被具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的其它氨基酸残基取代,并且因此不改变分子的功能性质。在序列因保守取代而不同时,可以向上调节序列同一性百分比以校正取代的保守性质。据说因这样的保守取代而不同的序列具有“序列相似性”或“相似性”。用于进行此调节的手段对本领域技术人员是熟知的。通常,这包括将保守取代评分为部分不匹配而不是完全不匹配,从而增加序列同一性百分比。因而,例如,在给予相同氨基酸1分并且给予非保守取代0分时,保守取代被给予0和1之间的分数。例如,根据例如在程序PC/GENE(Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA)中执行的Meyers和Miller, *Computer Applic.Biol.Sci.*, 4:11-17 (1988))的算法计算保守取代的评分。

[0406] (d) 本文使用的术语“序列同一性的百分比”意思是通过在比较窗口内比较两个最佳比对的序列而测定的值,其中比较窗口中的多核苷酸序列部分与参考序列(其不包括添加或缺失)相比可以包括添加或缺失(即,空位)用于两个序列的最佳比对。百分比如下计算:通过测定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目产生匹配位置的数目,用匹配位置的数目除以比较窗口中的位置的总数,并且将该结果乘以100以产生序列同一性的百分比。

[0407] (e) 多核苷酸序列的术语“基本同一性”意思是使用描述的比对程序中的一种,使用标准参数,多核苷酸与参考序列相比包括具有至少70%序列同一性、至少80%序列同一性、至少90%序列同一性和至少95%序列同一性的序列。技术人员将认识到,可以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、读框定位等,适当调整这些值以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。出于这些目的,氨基酸序列的基本同一性通常意思是至少60%、或至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%的序列同一性。核苷酸序列基本上同一的另一个指示是两个分子在严格条件下是否彼此杂交。然而,如果其编码的多肽基本上同一,则在严格条件下彼此不杂交的核酸仍然基本上同一。例如,这可以当使用遗传密码所允许的最大密码子简并性形成核酸的拷贝时发生。两个核酸序列基本上同一的一个指示是第一核酸编码的多肽与由第二核酸编码的多肽有免疫学交叉反应。

[0408] 如本文使用的,短语“可操作地连接的”指的是其中两个或多个蛋白结构域或多肽经由重组DNA技术或化学反应接合或组合的连接,以使得得到的融合蛋白的每个蛋白结构域或多肽保留其原始功能。例如,SEQ ID NO:1通过可操作地连接细胞穿透肽(SEQ ID NO:11)与治疗结构域(SEQ ID NO:2)构建,从而产生具备SEQ ID NO:11的细胞穿透功能和SEQ ID NO:2的激酶抑制剂功能二者的融合肽。

[0409] 如本文使用的,术语“氧化应激”指的是活性氧种类(游离基)的产生和抗氧化防御之间平衡的紊乱。

[0410] 如本文使用的,术语“实质”指的是如与结缔组织或血管对比构成器官的基本部分的动物组织。术语“实质的”意思是涉及器官的实质。

[0411] 如本文使用的,术语“胃肠外”指的是通过注射引入身体(即,通过注射施用),包括,例如,皮下(即,在皮肤下注射)、肌肉内(即,注射入肌肉)、静脉内(即,注射入静脉)、鞘内(即,注射入脊髓周围空间或大脑的蛛网膜下)、胸骨内注射或输注技术,并且包括腹膜内注射或输入体腔(例如腹膜)。使用针——例如,外科手术针——或其它身体进入装置(corporal access device)递送胃肠外施用的组合物。如本文使用的,术语“外科手术针”指的是适于递送流体(即,能够流动)组合物进入选择的解剖结构的任何进入装置。可以使用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂,根据已知技术配制可注射的制剂,比如无菌注射的水性或油性悬浮液。

[0412] 如本文使用的,术语“微粒”指的是悬浮在气体或液体中的固体或液体物质的细小颗粒。

[0413] 如本文使用的术语“药学上可接受的载体”指的是常规地可用于施用药物的任何基本上无毒的载体,其中本发明的分离的多肽将保持稳定和生物利用。药学上可接受的载体必须具有足够高的纯度和足够低的毒性以使得其适合施用至正在治疗的哺乳动物。其进一步应当维持活性剂的稳定性和生物利用度。药学上可接受的载体可以是液体或固体,并且利用考虑的计划施用方式选择,以当与活性剂和给定组合物的其它组分结合时提供期望的体积、稠度等。

[0414] 术语“药学上可接受的盐”意思是以下那些盐,其在可靠医学判断的范围内,适合用于与人和低级动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、变应性反应等,且与合理的效益/风险比相称。

[0415] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可交换地使用,指的是氨基酸残基的聚合物。术语适用于其中一个或多个氨基酸残基为相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。天然存在的氨基酸的这样的类似物的基本性质是,当将并入蛋白质时,该蛋白质与完全由天然存在的氨基酸组成的相同的蛋白质引出的抗体有特异反应性。

[0416] 还在本文以最广义地使用的术语“多肽”和“蛋白质”指的是亚基氨基酸、氨基酸类似物或模拟肽的序列。除注释的地方之外,亚基通过肽键连接。本文描述的多肽可以是化学合成的或重组表达的。描述的发明的多肽也可以是化学合成的。使用固相、液相或肽缩合技术、或其任意组合的熟知技术制备的合成多肽可以包括天然和非天然氨基酸。用于肽合成的氨基酸可以是利用Merrifield(1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154)的原始固相过程的标准去保护、中和、偶联和清洗方案的标准Boc(N- $\alpha$ -氨基保护的N- $\alpha$ -叔丁氧羰基)氨基酸树脂,或Carpino和Han(1972, J. Org. Chem. 37: 3403-3409)首先描述的碱不稳定的N- $\alpha$ -氨基保护的9-芴甲氧羰基(Fmoc)氨基酸。Fmoc和Boc N- $\alpha$ -氨基保护的氨基酸二者可以从Sigma, Cambridge Research Biochemical或本领域技术人员熟悉的其它化学公司获得。此外,可以利用本领域技术人员熟悉的其它N- $\alpha$ -保护基团合成多肽。可以通过本领域技术人员熟悉和例如在Stewart和Young, 1984, Solid Phase Synthesis, Second Edition, Pierce

Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields和Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214中提供的技术, 或使用自动合成仪完成固相肽合成。本发明的多肽可以包括D-氨基酸(其在体内耐受L-氨基酸特异性蛋白酶)、D-和L-氨基酸的组合、和多种“设计的”氨基酸(例如,  $\beta$ -甲基氨基酸、C- $\alpha$ -甲基氨基酸和N- $\alpha$ -甲基氨基酸等)以传达特殊的性质。合成氨基酸包括针对赖氨酸的鸟氨酸, 和针对亮氨酸或异亮氨酸的正亮氨酸。此外, 多肽可以具有模拟肽键, 比如酯键, 以制备具有新性质的肽。例如, 可以生成并入减少的肽键的肽, 即,  $R_1-CH_2-NH-R_2$ , 其中 $R_1$ 和 $R_2$ 是氨基酸残基或序列。减少的肽键可以介绍为二肽亚基。这样的多肽可以耐受蛋白酶活性, 并且将具备延长的体内半衰期。因此, 这些术语可以适用于其中一个或多个氨基酸残基为相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物, 以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。天然存在的氨基酸的这样的类似物的基本性质是, 当将并入蛋白质时, 该蛋白质与完全由天然存在的氨基酸组成的相同的蛋白质引出的抗体有特异性。

[0417] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”还包括修饰, 其包括但不限于糖基化、脂质附着、硫酸盐化、谷氨酸残基的 $\gamma$ -羧基化、羟基化和ADP-核糖基化。将了解, 如熟知且如上面记载的, 多肽可以是不完全线性的。例如, 多肽可以由于泛素化而是分支的, 并且它们可以通常由于翻译后事项而为具有或不具有分支的环状, 所述翻译后事项包括天然加工事项和天然存在的人为操作带来的事项。也可以通过非翻译天然过程和通过完全合成方法来合成环状、分支及分支环状多肽。在一些实施方式中, 肽是任意长度或大小的。

[0418] 如本文使用的, 术语“酶原(proenzyme)”或“酶原(zymogen)”指的是无活性酶前体。酶原需要生化改变(比如显露活性位点的水解反应, 或改变构型以显露活性位点)以使其变为活性酶。生化改变通常发生于溶酶体, 其中为了使其活化前体酶的特异部分被裂解。在活化后释放的氨基酸链被称为活化肽。

[0419] 如本文使用的, 术语“增殖”指的是通过将单个细胞连续地分裂为同一的子细胞来扩增细胞群。

[0420] 如本文使用的, 术语“肺间质”指的是肺的气囊周围的组织和空间。

[0421] 如本文使用的, 术语“肺泡”指的是具有空腔形式的解剖结构。肺泡位于肺的呼吸区, 在肺泡管和肺泡前房的末端处, 形成呼吸道的端点。肺泡是与血液气体交换的呼吸位点的球形露出, 并且仅在哺乳动物肺中发现。肺泡膜是气体交换表面。血液携来自身体其余部分的二氧化碳用于释放入肺泡, 并且肺泡中的氧气被肺泡血管中的血液携带以传输至身体中的全部细胞。肺泡包含一些胶原和弹性纤维。当吸气时, 弹性纤维允许肺泡随着其充满空气而伸展。它们然后在呼气期间回弹, 以便排除富含二氧化碳的空气。在肺泡壁中存在三种主要肺泡细胞, (1) 鳞状肺泡细胞, 其形成肺泡壁的结构, (2) 大肺泡细胞, 其分泌肺表面活性物以降低水的表面张力和使得膜分离, 从而增加气体交换的能力, (3) 巨噬细胞, 其消灭外源病原体, 比如细菌。

[0422] 如本文使用的, 术语“活性氧种类”(“ROS”), 比如游离基和过氧化物, 指的是源自氧的代谢并且固有地在所有好氧生物体中存在的一类分子。如本文使用的, 术语“氧自由基”指的是携带为配对的电子的任何氧类别(除单体氧之外)。电子到氧的传递还可以导致产生毒性游离基类别。这些中的最佳的记录的是超氧自由基。氧自由基, 比如羟基(OH $\cdot$ )和超氧离子(O $_2\cdot^-$ )是非常强大的氧化剂, 其引起对蛋白质、脂质和核酸的结构损害。正常细胞

代谢的产物游离基超氧阴离子由于氧的不完全还原主要由线粒体产生。超氧自由基虽然与许多其它自由基相比无活性,但是可以通过生物系统转化为其它更活性的类别,比如氢过氧自由基(peroxyl radical) (ROO<sup>-</sup>)、烷氧基(RO<sup>-</sup>)和羟基(OH<sup>-</sup>)。

[0423] 如本文使用的,短语“组织中的重构”、“组织重构”等指的是在胎儿和成人生活期间发生的动态过程,并且涉及组织的原始构成和功能的改变。

[0424] 术语“相似的”与术语类似的、等价的、或相像的可交换地使用,意思是具有共同的性状或特性。

[0425] 如本文使用的,术语“溶液”指的是两种或更多种物质的均匀混合物。它通常但未必是液体。在溶液中,溶质分子(或溶解的物质)在溶剂中均一分布。

[0426] 术语“可溶性”和“溶解性”指的是易于溶解于指定流体(溶剂)的性质。术语“不溶性”指的是在指定溶剂中具有最小或限制溶解性的物质的性质。在溶液中,溶质分子(或溶解的物质)在溶剂中均一分布。

[0427] 如本文使用的,术语“应力纤维”指的是由肌动蛋白丝、交联蛋白(将连个或更多个丝结合在一起的蛋白质)和肌球蛋白II马达构成的细胞中的高度有序结构。肌动蛋白是球状蛋白质(~43kDa),其聚合和形成具有彼此卷绕的原丝的有序丝状结构,以形成单个“肌动蛋白丝”,又称为“微丝”。肌球蛋白马达在应力纤维中移动,其滑动肌动蛋白丝越过彼此,使得纤维可以收缩。为了收缩以生成力,纤维必须被锚定至某物。应力纤维可以锚定至细胞膜,并且通常是其中此锚定发生也连接至细胞外的结构(基质或一些其它基底)的位点。这些连接位点被称为粘着斑。许多蛋白质需要适当的粘着斑产生和维持。针对这些固定的外部基底的收缩是允许由肌球蛋白马达生成的力和丝生长和重排移动和重塑细胞的收缩。

[0428] 如本文使用的,术语“悬浮物”指的是其中细微分散的种类与另一个种类结合的分散物(混合物),而且前者被如此细微地分散和混合,使得其不迅速地沉淀。在日常生活中,最常见的悬浮物是液体中的固体。

[0429] 可交换地使用的术语“对象”或“个体”或“患者”指的是哺乳动物来源的动物物种的成员,包括但不限于小鼠、大鼠、猫、山羊、绵羊、马、仓鼠、雪貂、鸭嘴兽、猪、狗、豚鼠、兔和灵长类,比如,例如,猴、猿或人。

[0430] 如本文使用的,短语“需要这样的治疗的对象”指的是遭受疾病、障碍、状况或病理过程的患者。在一些实施方式中,术语“需要这样的治疗的对象”还用于指(i)将施用至少本发明的至少一种多肽;(ii)正在接受本发明的至少一种多肽;或(iii)已经接受本发明的至少一种多肽的患者,除非上下文和短语的用法另外指示。

[0431] 在本文使用的术语“取代”指的是其中DNA序列中的一个或多个碱基被交换为另一个或多个碱基的情况。取代可为同义取代或非同义取代。取代可以是同义取代或非同义取代。如本文使用的,“同义取代”指的是在编码蛋白质的基因的外显子中一个碱基取代另一个碱基以使得产生的氨基酸序列未被修饰。如本文使用的“非同义取代”指的是在编码蛋白质的基因的外显子中一个碱基取代另一个碱基以使得产生的氨基酸序列被修饰。

[0432] 可交换地使用的活性剂的术语“治疗量”、“有效量”或“药学有效量”指的是足以提供预期的治疗益处的量。例如,抑制描述的发明的组合物的激酶的“治疗量”包括但不限于以下量,其足以:(1)移除至少一个纤维变性位置或降低其大小或(2)减小细胞外基质——包括胶原和纤连蛋白——沉积在肺纤维化患者的肺中的间质中的速率。术语还包含足以抑

制或减轻肺纤维化患者的至少一种症状的量,其中症状包括但不限于氧饱和、呼吸困难(难以呼吸)、干咳(意思是空气从肺中突然地、嘈杂地呼出,其可能由刺激或炎症引起并且不从呼吸道移除痰)、杵状指(clubbing)(手指成为球根状外观的缺陷)、和捻发音(在吸入期间肺中的噼啪声,偶尔被称为啰音或爆裂声)。

[0433] 根据描述的发明可以采用的活性剂的有效量通常在大约0.001mg/kg体重至大约10g/kg体重的范围内。然而,剂量水平基于各种因素,包括损伤的类型、年龄、重量、性别、患者的医疗状况、状况的严重程度、给药的途径和频率、和采用的具体活性剂。因而给药方案可以广泛地变化,但是可以使用标准方法由医师常规地确定。

[0434] 术语“治疗(treat)”或“治疗(treating)”包括废除、基本上抑制、减慢或逆转疾病、状况或障碍的进展,基本上减轻状况的临床或美容症状,基本上预防疾病、状况或障碍的临床或美容症状的出现,并且保护免受有害或恼人的症状。治疗进一步指的是实现下列中一个或多个:(a)减小障碍的严重程度;(b)限制正在治疗的障碍(一种或多种)特有的症状的发展;(c)限制正在治疗的障碍(一种或多种)特有的症状的恶化;(d)限制先前已经患有障碍(一种或多种)的患者中的障碍(一种或多种)的复发;和(e)限制先前有障碍(一种或多种)症状的患者的症状的复发。

[0435] 本文使用的术语“变体”、“突变体”和“衍生物”指的是与参考核苷酸或多肽序列具有基本同一性的核苷酸或多肽序列。序列中的差异可以是在序列或结构上自然地或通过设计改变的结果。天然改变可以在特定核酸序列的正常复制或自然复制过程期间产生。设计的改变可以出于具体的目的而具体地设计并且将其引入序列。这样的具体的改变可以在体外使用各种诱变技术完成。这样具体生成的序列变体可以被称为原始序列的“突变体”或“衍生物”。

[0436] 技术人员同样可以生产具有单个或多个氨基酸取代、缺失、添加或置换,但是功能上等价于SEQ ID NO:1的多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA(SEQ ID NO:1)的多肽变体。这些变体尤其可以包括:(a)其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸取代的变体;(b)其中添加一个或多个氨基酸的变体;(c)其中至少一个氨基酸包括取代基的变体;(d)其中来自一个物种的氨基酸残基被取代为另一个物种中的对应残基——在保守或非保守位置处——的变体;和(d)其中靶蛋白与另一个肽或多肽比如融合配偶体(fusionpartner)、蛋白标签或其它化学部分融合的变体,其可以赋予靶蛋白有用的性质,例如,抗体的表位。用于获得这样的变体的技术包括但不限于遗传(抑制、缺失、突变等)、化学和酶技术,其是技术人员所知。如本文使用的,术语“突变”指的是生物体的基因或染色体内的DNA序列的变化,其导致产生在亲代型中未发现的新品质或性状,或通过改变编码基因的DNA的核苷酸序列或通过改变染色体的物理排列而在染色体中发生这类变化的过程。突变的三种机制包括取代(一个碱基对交换另一个碱基对)、添加(将一个或多个碱基插入序列)、和缺失(失去一个或多个碱基对)。

[0437] 如本文使用的,术语“媒介”指的是促进与其混合的药物或其它材料的物质。

[0438] 如本文使用的,术语“创伤愈合”或“创伤修复”通常指的是身体在创伤后修复组织的自然过程。当个体受伤时,发生一系列复杂的生化事项以修复伤害,所述生化事项包括止血、炎症、增殖和重构。

[0439] I. 组合物:用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和胶原沉积的疾病的治

疗肽

[0440] 根据一方面,描述的发明提供了用于治疗表征为对象的组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的药物组合物,

[0441] 其中药物组合物包括治疗量的氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1) 的多肽或其功能等价物、和其药学上可接受的载体,并且

[0442] 其中治疗量对减少对象的组织中的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0443] 根据一个实施方式,疾病或状况是急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0444] 根据另一个实施方式,疾病或状况是辐射诱发的纤维化。

[0445] 根据另一个实施方式,疾病或状况是移植排斥。

[0446] 根据另一个实施方式,组织是肺组织。

[0447] 根据另一个实施方式,疾病或状况是间质性肺病。

[0448] 根据另一个实施方式,其中疾病或状况是肺纤维化。

[0449] 根据另一个实施方式,其中肺纤维化是特发性肺纤维化。

[0450] 根据另一个实施方式,肺纤维化由施用博来霉素造成。

[0451] 根据另一个实施方式,肺纤维化由过敏反应、吸入环境微粒、吸烟、细菌感染、病毒感染、对对象的肺的机械伤害、肺移植排斥、自身免疫障碍、遗传障碍、或其组合造成。

[0452] 根据另一个实施方式,组织是肝组织。

[0453] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肝纤维化。

[0454] 根据另一个实施方式,组织是肾组织。

[0455] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肾纤维化。

[0456] 根据另一个实施方式,组织是血管组织。

[0457] 根据另一个实施方式,疾病或状况是血管纤维化。

[0458] 根据另一个实施方式,疾病或状况进一步表征为组织中的炎症。

[0459] 根据另一个实施方式,炎症是急性或慢性炎症。

[0460] 根据另一个实施方式,炎症由选自肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6) 和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的至少一种细胞因子介导。

[0461] 根据另一个实施方式,肺纤维化表征为选自以下的至少一种病理:与正常健康对照对象相比,肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积、肺中成纤维细胞增殖的异常促进、肺中成肌纤维细胞分化的异常诱导、和成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0462] 根据另一个实施方式,组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积表征为与正常健康对照对象的组织中促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的活性相比,组织中促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的异常活性。

[0463] 根据另一个实施方式,组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由以下证明:与正常健康对照对象的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的量或分布相比,组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的异常的量 and 分布。

[0464] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制选自本文在表1中列出的组的激酶的激酶活性。

[0465] 根据另一个实施方式,此抑制可以,例如,对减少对象的组织中的成纤维细胞增殖、细胞外基质沉积、或其组合是有效的。

[0466] 根据另一个实施方式,此抑制可以,例如,对减少选自以下的至少一种病理是有效的:与正常健康对照对象相比,肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积、肺中成纤维细胞增殖的异常促进、肺中成肌纤维细胞分化的异常诱导、和成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0467] 根据一些实施方式,MMI抑制剂在体内的抑制概况取决于剂量、给药途径、和响应于抑制剂的细胞类型。

[0468] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制激酶的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少95%的激酶活性。

[0469] 根据一些实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2激酶)的激酶活性。根据一些其它实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少50%的激酶活性。根据一些其它实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少95%的激酶活性。

[0470] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3(MK3激酶)的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK3激酶的至少95%的激酶活性。

[0471] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,

药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少95%的激酶活性。

[0472] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方式, 药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式, 药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式, 药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式, 药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少75%的激酶活性。

[0473] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0474] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0475] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0476] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0477] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0478] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的至少65%的激酶活性。

[0479] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3) 的至少65%的激酶活性。

[0480] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少65%的激酶活性。

[0481] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少65%的激酶活性。

[0482] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的至少65%的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3) 的至少65%的激酶活性。

[0483] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的至少65%的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少65%的激酶活性。

[0484] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的至少65%的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少65%的激酶活性。

[0485] 根据另一个实施方式, 药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的至少65%的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3) 的至少65%的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少65%的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少65%的激酶活性。

[0486] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制选自MK2、MK3、CaMKI、TrkB的至少一种激酶的激酶活性,而基本上不抑制从本文在表1中列出的其余组的一种或多种其它选择的激酶的活性。

[0487] 根据一些实施方式,MMI抑制剂在体内的抑制概况取决于剂量、给药途径、和响应于抑制剂的细胞类型。

[0488] 根据这样的实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于50%的激酶活性。根据这样的实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于40%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于20%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于15%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于10%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于5%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物增加其它选择的激酶的激酶活性。

[0489] 根据前一段的实施方式,基本上不抑制的一种或多种其它选择的激酶选自Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II (CaMKII,包括其亚基CaMKII $\delta$ )、原癌基因丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(PIM-1)、细胞肉瘤(c-SRC)、脾脏酪氨酸激酶(SYK)、C-src酪氨酸激酶(CSK)、和胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)。

[0490] 根据一些实施方式,药物组合物进一步包括至少一种另外的治疗剂。

[0491] 根据一些这样的实施方式,这样的另外的治疗剂的实例非限制性地包括纯化的牛V型胶原(例如,IW-001;ImmuneWorks;United Therapeutics)、IL-13受体拮抗物(例如,QAX576;Novartis)、蛋白质酪氨酸激酶抑制剂(例如,伊马替尼(Gleevec®);Craig Daniels/Novartis)、内皮受体拮抗物(例如,ACT-064992(马西替坦);Actelion)、双内皮素受体拮抗物(例如,波生坦(Tracleer®);Actelion)、前列环素类似物(吸入性伊洛前列素(例如,Ventavis®);Actelion)、抗CTGF单克隆抗体(例如,FG-3019)、内皮素受体拮抗物(A-选择性)(例如,安立生坦(Letairis®),Gilead)、AB0024(Arresto)、赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)单克隆抗体(例如,GS-6624(以前的AB0024);Gilead)、c-Jun N-末端激酶(JNK)抑制剂(例如,CC-930;Celgene)、吡非尼酮(例如,Esbriet®(InterMune),Pirespa®(Shionogi))、IFN- $\gamma$  1b(例如,Actimmune®;InterMune)、针对全部三种TGF- $\beta$ 同种型的全中和IgG4人抗体(例如,GC1008;Genzyme)、TGF- $\beta$ 活化抑制剂(例如,Stromedix(STX-100))、重组人正五聚蛋白-2蛋白(rhPTX-2)(例如,PRM151;Promedior)、双特异性IL4/IL13抗体(例如,SAR156597;Sanofi)、人源化单克隆抗体靶向整合蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 6(BIBF 1120;Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸(Zambon SpA)、西地那非(Viagra®)、TNF拮抗物(例如,依那西普(Enbrel®);Pfizer)、糖皮质激素(例如,强的松、布地奈德、莫米松糠酸酯、丙酸氟替卡松和糠酸氟替卡松)、支气管扩张药(例如,白三烯改性剂(例如,孟鲁司特(SINGUAIR®))、抗胆碱能支气管扩张药(例如,异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 $\beta$ 2激动剂

(例如,甲磺酸乙基异丙肾上腺素(Bronkometer®)、肾上腺素、舒喘灵/舒喘宁、和特布他林)、长效 $\beta_2$ 激动剂(例如,沙美特罗、福莫特罗、indecaterol(Onbrez®)、和其组合。

[0492] 根据一些其它实施方式,另外的治疗剂包括支气管扩张药,其包括但不限于白三烯改性剂、抗胆碱能支气管扩张药、 $\beta_2$ 激动剂、或其组合。

[0493] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括皮质类固醇,其包括但不限于强的松、布地奈德、莫米松、倍氯米松 (beclemethasone)、或其组合。

[0494] 根据一些其它实施方式,另外的治疗剂是抗炎性剂。

[0495] 根据一些这样的实施方式,抗炎性剂是非甾体抗炎性剂。如本文使用的,术语“非甾体抗炎性剂”指的是在其作用上类似阿司匹林的一大群药剂,包括但不限于布洛芬(Advil®)、萘普生钠(Aleve®)和扑热息痛(Tylenol®)。有用于描述的发明的上下文的非甾体抗炎性剂的另外的实例非限制性地包括昔康类,比如吡罗昔康、伊索昔康、替诺昔康、舒多昔康和CP-14,304;双水杨酸、贝诺酯 (benorylate)、三柳胆镁(trilisate)、safapryn、solprin、二氟尼柳和芬度柳;乙酸衍生物,比如双氯芬酸、芬氯酸、消炎痛、舒林酸、托美丁、伊索克酸、吠罗芬酸、硫平酸、齐多美辛、阿西美辛、芬替酸、佐美酸、环氯弗酸(clindanac)、奥昔平酸、联苯乙酸和酮咯酸;灭酸类 (fenamates),比如甲芬那酸、甲氯芬那酸、氟芬那酸、尼氟灭酸和托芬那酸;丙酸衍生物,比如苯暗洛芬、氟比洛芬、酮洛芬、非诺洛芬、芬布芬、吲哚洛芬、吡洛芬、卡洛芬、噻丙嗪、普拉洛芬、咪洛芬、硫噻洛芬、舒洛芬、阿明洛芬和噻洛芬酸;吡唑,比如保泰松、羟布宗、非普拉宗、阿扎丙宗和曲保松。还可以采用这些非甾体抗炎性剂的混合物,以及这些药剂的皮肤病学上可接受的盐和酯。例如,依托芬那酯——氟芬那酸衍生物——对外部应用是特别有用的。

[0496] 根据另一个实施方式,非甾体抗炎性剂包括转化生长因子- $\beta_3$  (TGF- $\beta_3$ )、抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 药剂、或其组合。

[0497] 根据另一个实施方式,抗炎性剂是甾体抗炎性剂。如本文使用的,术语“甾体抗炎性剂”指的是包含17个碳4个环系统的众多化合物中的任一个,并且包括固醇、多种激素(如促蛋白合成类固醇)和糖苷。甾体抗炎性药物的代表性实例非限制性地包括皮质类固醇比如氢化可的松、羟基曲安西龙、 $\alpha$ -甲基地塞米松、地塞米松-磷酸盐、二丙酸倍氯米松、戊酸氯倍他索、地奈德、去羟米松、醋酸去氧皮质酮、地塞米松、二氯松、戊酸二氟米松、氟轻可舒松 (fluadrenolone)、氟氯奈德、特戊酸氟米松、氟轻可舒松缩酮 (fluosinolone acetonide)、氟轻松醋酸酯、氟可丁丁酯 (flucortine butylester)、氟可龙、醋酸氟泼尼定 (fluprednylidene)、氟氢缩松、哈西奈德、醋酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、甲基泼尼松龙、曲安奈德、可的松、可托多松、醋酸氟轻松 (flucetonide)、氟氢可的松、双醋二氟拉松 (difluorosone diacetate)、氟轻可舒松缩酮、氟氢可的松、双醋二氟拉松 (diflorosone diacetate)、氟轻可舒松缩酮、甲羟松、安西法尔 (amcinafel)、安西非特、倍他米松和其酯的余量、氯化强的松、醋酸氯化强的松醋、氯可托龙 (clocortelone)、地西松 (clescinolone)、二氯松、二氟泼尼酯 (diflurprednate)、氟二氯松、氟尼缩松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼松龙、戊酸氢化可的松、氢化可的松环戊丙酸酯、氢可他酯、甲泼尼松、帕拉米松、泼尼松龙、强的松、二丙酸倍氯米松、曲安西龙、和其混合物。

[0498] 根据另一个实施方式,甾体抗炎性剂包括选自强的松,布地奈德、莫米松、倍氯米

松、和其组合的至少一种皮质类固醇。

[0499] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括黄嘌呤或黄嘌呤衍生物,比如甲基黄嘌呤。

[0500] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括嗜中性粒细胞弹性酶抑制剂。

[0501] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是至少一种嗜中性粒细胞弹性酶抑制剂,其包括但不限于ICI 200355、ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616、TEI-8362、ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892、ZD-8321、和其组合。

[0502] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括至少一种磷酸二酯酶抑制剂,其包括但不限于磷酸二酯酶4抑制剂。磷酸二酯酶4抑制剂的实例包括但不限于罗氟司特、西洛司特或其组合。

[0503] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是镇痛剂。根据一些实施方式,镇痛剂通过提高痛阈而不干扰意识或改变其它感觉模式来缓解疼痛。根据一些这样的实施方式,镇痛剂是非阿片镇痛药。“非阿片镇痛药”是减少疼痛但不是阿片镇痛药的天然或合成物质。非阿片镇痛药的实例包括但不限于依托度酸、消炎痛、舒林酸、托美丁、萘丁美酮、吡罗昔康、扑热息痛、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、酮洛芬、萘普生、萘普生钠、塞丙嗪、阿司匹林、三水杨酸胆碱镁、二氟尼柳、甲氯芬那酸、甲芬那酸、和保泰松。根据一些其它实施方式,镇痛药是阿片镇痛药。“阿片镇痛药”、“阿片”或“麻醉性镇痛药”是与中枢神经系统中的阿片受体结合,产生对抗行为的天然或合成物质。阿片镇痛药的实例包括但不限于可待因、芬太尼、氢吗啡酮、左啡诺、哌替啶、美沙酮、吗啡、羟考酮、羟吗啡酮、丙氧芬、丁丙诺啡、布托啡诺、地佐辛、纳布啡、和喷他佐辛。

[0504] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方式,抗感染剂是抗生素药剂。如本文使用的,术语“抗生素药剂”意思是在传染病的治疗中主要使用的具有抑制细菌和其它微生物的生长或消灭细菌和其它微生物的能力的任意组化学物质。抗生素药剂的实例包括但不限于青霉素G;甲氧西林;萘夫西林;苯唑西林;氯唑西林;二氯唑西林;氨苄青霉素;阿莫西林;替卡西林;羧苄青霉素;美洛西林;阿洛西林;哌拉西林;亚胺培南;氨曲南;头孢噻吩;头孢克洛;头孢西丁;头孢呋辛;头孢尼西;头孢美唑;头孢替坦;头孢丙烯;氯碳头孢;头孢他美;头孢哌酮;头孢噻肟;头孢唑肟;头孢曲松;头孢他啶;头孢吡肟;头孢克肟;头孢泊肟;头孢磺啶;氟罗沙星;萘啶酸;诺氟沙星;环丙沙星;氧氟沙星;依诺沙星;洛美沙星;西诺沙星;多西环素;米诺环素;四环素;阿米卡星;庆大霉素;卡那霉素;奈替米星;妥布霉素;链霉素;阿奇霉素;克拉霉素;红霉素;依托红霉素;琥乙红霉素;葡庚糖酸红霉素;乳糖酸红霉素;硬脂酸红霉素;万古霉素;太古霉素;氯霉素;克林霉素;甲氧苄啶;新诺明;呋喃妥因;利福平;莫匹罗星;灭滴灵;头孢氨苄;罗红霉素;Co-amoxiclavuanate;哌拉西林和他唑巴坦的组合;和其多种盐、酸、碱和其它衍生物。抗菌抗生素药剂包括但不限于青霉素、头孢菌素、碳头孢烯、头霉素、碳青霉烯、单环 $\beta$ -内酰胺、氨基糖苷、糖肽、喹诺酮、四环素、大环内脂、和氟喹诺酮。

[0505] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制在对象的肺中发生的炎症。根据另一个实施方式,炎症是急性炎症。根据另一个实施方式,炎症是慢性炎症。根据另一个实施方式,炎症由肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 介导。根据另一个实施方式,炎症由白介素-6 (IL-6) 介导。根据另一个实施方式,炎症由白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 介导。

[0506] 根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节肺中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的量。根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节肺中白介素-6 (IL-6) 的量。根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节肺中白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的量。

[0507] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制热休克27kDa蛋白1 (HSPB1) 的活性。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成纤维细胞增殖的异常诱导。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成肌纤维细胞分化的异常诱导。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是细胞外基质蛋白沉积入肺间质。根据另一个实施方式,细胞外基质蛋白是胶原。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是纤维变性位置形成的促进。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成肌纤维细胞收缩活性的增加。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成肌纤维细胞附着至细胞外基质的促进。

[0508] 根据一些实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有基本序列同一性。

[0509] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%序列同一性。

[0510] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。

[0511] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。

[0512] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。

[0513] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。

[0514] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。

[0515] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVAA (SEQ ID NO:26)。

[0516] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVA (SEQ ID NO:27)。

[0517] 根据一些其它实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物是包括可操作地连接至第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),并且第二多肽包括治疗结构域,其序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有基本同一性。

[0518] 根据一些这样的实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少70%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少80%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少90%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2) 具有至少95%序列同一性。

[0519] 根据一些实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLAVA (SEQ ID NO:8) 的多肽。

[0520] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVA (SEQ ID NO:9) 的多肽。

[0521] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10) 的多肽。

[0522] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVAA (SEQ ID NO:28) 的多肽。

[0523] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列YKALNRQLAVA (SEQ ID NO:29) 的多肽。

[0524] 根据一些其它实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物是包括可操作地连接至第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中第一多肽包括在功能上等价于YARAAARQARA (SEQ ID NO:11) 的细胞穿透肽,并且第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。

[0525] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRKAWLRRKA (SEQ ID NO:12) 的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRKA (SEQ ID NO:13) 的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14) 的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRKAWLRR (SEQ ID NO:15) 的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16) 的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17) 的多肽。根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列HRRKAWLKKI (SEQ ID NO:18) 的多肽。

[0526] 根据另一方面,描述的发明还提供了分离的核酸,其编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其它实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其它实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0527] 根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.00001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.0001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.001mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.01mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.1mg/kg (或100μg/kg) 体重至大约10mg/kg



疗性抑制肽的治疗剂量在4 $\mu$ g/kg/天至5 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在5 $\mu$ g/kg/天至6 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在6 $\mu$ g/kg/天至7 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在7 $\mu$ g/kg/天至8 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在8 $\mu$ g/kg/天至9 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在9 $\mu$ g/kg/天至10 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在1 $\mu$ g/kg/天至5 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在5 $\mu$ g/kg/天至10 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在10 $\mu$ g/kg/天至15 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在15 $\mu$ g/kg/天至20 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在25 $\mu$ g/kg/天至30 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在30 $\mu$ g/kg/天至35 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在35 $\mu$ g/kg/天至40 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在40 $\mu$ g/kg/天至45 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在45 $\mu$ g/kg/天至50 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在50 $\mu$ g/kg/天至55 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在55 $\mu$ g/kg/天至60 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在60 $\mu$ g/kg/天至65 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在65 $\mu$ g/kg/天至70 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在70 $\mu$ g/kg/天至75 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在80 $\mu$ g/kg/天至85 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在85 $\mu$ g/kg/天至90 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在90 $\mu$ g/kg/天至95 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在95 $\mu$ g/kg/天至100 $\mu$ g/kg/天的范围内。

[0529] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是1 $\mu$ g/kg/天。

[0530] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是2 $\mu$ g/kg/天。

[0531] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是5 $\mu$ g/kg/天。

[0532] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是10 $\mu$ g/kg/天。

[0533] 根据一些实施方式,本发明的多肽包括D-氨基酸(其在体内耐受L-氨基酸特异性蛋白酶)、D-和L-氨基酸的组合、和多种“设计的”氨基酸(例如, $\beta$ -甲基氨基酸、C- $\alpha$ -甲基氨基酸和N- $\alpha$ -甲基氨基酸等)以传达特殊的性质。合成氨基酸取代的实例包括鸟氨酸取代赖氨酸,和正亮氨酸取代亮氨酸或异亮氨酸。

[0534] 根据一些实施方式,多肽可以被连接至其它化合物以促进增加的体内半衰期,比如聚乙二醇或葡聚糖。这样的连接可以是共价的或非共价的,如本领域技术人员所理解的。根据一些其它实施方式,多肽可以被包裹在微团比如由聚(乙二醇)-聚(聚丙二醇)或聚(乙

二醇)-聚乳酸嵌段共聚物制造的微团中。根据一些其它实施方式,多肽可以被包裹在由可降解的聚酯——包括但不限于,聚乳酸、聚乙交酯和聚己酸内酯——组成的可降解的纳米颗粒或微粒中。

[0535] 根据另一个实施方式,多肽可以以固体形式(包括颗粒剂、粉末或栓剂)或液体形式(例如,溶液、悬浮液或乳液)制备。

[0536] 根据另一个实施方式,描述的发明的组合物可以是可分散的干粉的形式,以便通过吸入或吹入递送(分别通过嘴或通过鼻)。干粉组合物可以通过本领域已知的工艺制备,比如冻干和气流粉碎,如在国际专利公布号W0 91/16038中公开的和如在美国专利号6,921,527中公开的,其公开内容通过引用并入。描述的发明的组合物以足以给对象提供单位剂量治疗的量放置在合适的剂量受器内。剂量受器是以下受器:在合适的吸入装置内适配以允许通过散布入气流来气溶胶化干粉组合物,从而形成气溶胶并且然后在腔室中捕获如此产生的气溶胶,所述腔室具有附加的衔口,以便需要治疗的对象的随后的吸入。这样的剂量受器包括本领域已知的封装组合物的任意容器比如明胶或塑料胶囊,其具有允许气流(例如,空气)导向进入容器以分散干粉组合物的可移除的部分。这样的容器由在美国专利号4,227,522;美国专利号4,192,309;和美国专利号4,105,027中显示的那些例证。合适的容器还包括与Glaxo的Ventolin® Rotohaler牌粉末吸入器或Fison的Spinhaler®牌粉末吸入器共同使用的那些。提供优良防潮层的另一种合适的单位剂量容器由铝箔层压塑料形成。基于药物的粉末按重量计或按体积计填充入可成形的箔中的凹陷,并且利用覆箔-层压塑料密封。与粉末吸入装置一起使用的这样的容器描述在美国专利号4,778,054中,并且与Glaxo的Diskhaler®(美国专利号4,627,432;4,811,731;和5,035,237)一起使用。全部这些参考文献通过引用以其全部并入本文。

[0537] 根据另一个实施方式,描述的发明的组合物的载体包括释放剂,比如缓释或延释载体。在这样的实施方式中,载体可以是能够缓释或延释多肽以提供更高效的施用的任意物质,例如,导致多肽的更不频繁和/或降低的剂量,提高操作的便利,并且延长或延迟对正在治疗、预防或促进的疾病、障碍、状况、综合征等的作用。这样的载体的非限制性实例包括天然和合成聚合物等的脂质体、微海绵、微球、或微胶囊。脂质体可以由各种磷脂形成,包括但不限于,胆固醇、硬脂胺或磷脂酰胆碱。

[0538] 用于合成和制备小肽的方法是本领域熟知的,并且公开在例如美国专利号5,352,461;5,503,852;6,071,497;6,331,318;6,428,771和美国公布号20060040953中。美国专利号6,444,226和6,652,885描述了为了使活性剂与颗粒结合,在向其中添加活性剂的溶液的水性悬浮液中制备和提供二酮哌嗪的微粒。这些专利进一步描述了通过冻干移除液体介质以产生包括活性剂的微粒的方法。改变这样的悬浮液的溶剂条件以促进活性剂与颗粒的结合公开在美国申请号60/717,524;11/532,063;和11/532,065;美国专利号6,440,463;和美国申请号11/210,709和11/208,087中。这些专利和专利申请中的每个通过引用并入本文。

[0539] 在一些实施方式中,本发明的MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)和其功能等价物可以通过在例如美国申请号11/678,046(通过引用并入本文)中公开的喷雾干燥的方法干燥。

[0540] 在又一个实施方式中,本发明的多肽可以应用于各种溶液。合适的制剂是无菌的,溶解足够量的多肽,并且对提出的应用无害。例如,描述的发明的组合物可以配制为水

性悬浮液,其中活性成分(一种或多种)在与适于制造水性悬浮液的赋形剂的掺合物中。

[0541] 这样的赋形剂非限制性地包括悬浮剂(例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄耆胶和阿拉伯树胶),分散或湿润剂,其包括天然存在的磷脂(例如,卵磷脂)、或环氧烷烃与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯)、或环氧烷烃与长链脂肪醇的缩合产物(例如,十七碳乙烯氧基鲸蜡醇(heptadecaethyl-eneoxycetanol))、或环氧烷烃与源自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨醇单油酸酯)、或环氧烷烃与源自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如,聚乙烯失水山梨醇单油酸酯)。

[0542] 描述的发明的组合物还可以通过在植物油(例如,花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或在矿物油(例如,液体石蜡)中悬浮活性成分配制为油性悬浮液。油性悬浮液可以包含增稠剂(例如,蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇)。

[0543] 描述的发明的组合物还可以通过添加水以适于制备水性悬浮液的可分散的粉末或颗粒剂的形式配制。这样的粉末和颗粒剂中的活性成分提供在与分散或湿润剂、悬浮剂、和一种或多种防腐剂的掺合物中。合适的分散或湿润剂和悬浮剂由上面已经提及的那些例证。还可以存在另外的赋形剂。

[0544] 根据一些实施方式,干粉由喷雾干燥过程产生。

[0545] 根据一些其它实施方式,干粉由微粉化产生。

[0546] 根据另一个实施方式,干粉包括具有1至5微米的质量中值直径(MMAD)的微粒。

[0547] 根据另一个实施方式,干粉包括具有大约2微米的质量中值直径(MMAD)的微粒。

[0548] 根据另一个实施方式,药物组合物包装在吸入装置中,包括,例如,不限于喷雾器、定量吸入器(MDI)、和干粉吸入器(DPI)。

[0549] 根据一些其它实施方式,药物组合物是使用喷雾器进行气溶胶递送的液体。根据一些这样的实施方式,药物组合物的流量是至少0.3ml/min,并且药物组合物被递送为2mm颗粒,分布入最深的肺泡。

[0550] 描述的发明的组合物还可以是乳液的形式。乳液是通过结合两种不混溶的液体载体制备的两相系统,其中的一个贯穿另一个均匀地散开(disburse)并且由小球构成,所述小球的直径等于或大于最大的胶体颗粒的直径。小球大小是关键,并且必须使得系统实现最大稳定性。通常,两个相的分离将不会发生,除非并入第三种物质——乳化剂。因而,基本的乳液包含至少三种组分——两种不混溶的液体载体和乳化剂,以及活性成分。大多数乳液浆水相并入非水相(或反之亦然)。然而,制备基本上非水性的乳液是可能的,例如,非水性不混溶系统甘油和橄榄油的阴离子和阳离子表面活性剂。因而,本发明的组合物可以是水包油乳液的形式。油相可以是植物油,例如,橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或其混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶,例如,阿拉伯树胶或黄耆胶,天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂,和源自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯,例如失水山梨醇单油酸酯,和偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如,聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯。

[0551] 根据一些实施方式,描述的发明的多肽是化学合成的。使用固相、液相或肽缩合技术、或其任意组合的熟知技术制备的这样的合成多肽可以包括天然或非天然氨基酸。用于肽合成的氨基酸可以是利用Merrifield(1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154)的原始固相过程的标准去保护、中和、偶联和清洗方案的标准Boc(N- $\alpha$ -氨基保护的N- $\alpha$ -叔丁氧羰基)氨

基树脂,或Carpino和Han(1972,J.Org.Chem.37:3403-3409)首先描述的碱不稳定的N- $\alpha$ -氨基保护的9-芴甲氧羰基(Fmoc)氨基酸。Fmoc和Boc N- $\alpha$ -氨基保护的氨基酸二者可以从Sigma, Cambridge Research Biochemical或本领域技术人员熟悉的其它化学公司获得。此外,可以利用本领域技术人员熟悉的其它N- $\alpha$ -保护基团合成多肽。可以通过本领域技术人员熟悉和例如在Stewart和Young,1984,Solid Phase Synthesis,Second Edition,Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.;Fields和Noble,1990,Int.J.Pept.Protein Res.35:161-214中提供的技术,或使用自动合成仪完成固相肽合成,每个通过引用以其全部并入本文。

[0552] II.用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和胶原沉积的疾病的方法

[0553] 根据另一方面,描述的发明提供了用于治疗表征为对象的组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的方法,方法包括:

[0554] 施用药物组合物至对象,所述药物组合物包括治疗量的氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的多肽或其功能等价物、和其药学上可接受的载体,其中治疗量对减少对象的组织中的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0555] 根据方法的一个实施方式,疾病或状况是急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0556] 根据另一个实施方式,疾病或状况是辐射诱发的纤维化。

[0557] 根据另一个实施方式,疾病或状况是移植排斥。

[0558] 根据另一个实施方式,组织是肺组织。

[0559] 根据另一个实施方式,疾病或状况是间质性肺病。

[0560] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肺纤维化。

[0561] 根据另一个实施方式,肺纤维化是特发性肺纤维化。

[0562] 根据另一个实施方式,肺纤维化由施用博来霉素造成。

[0563] 根据另一个实施方式,肺纤维化由过敏反应、吸入环境微粒、吸烟、细菌感染、病毒感染、对对象的肺的机械伤害、肺移植排斥、自身免疫障碍、遗传障碍、或其组合造成。

[0564] 根据另一个实施方式,组织是肝组织。

[0565] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肝纤维化。

[0566] 用于检测、诊断和评估肝纤维化的治疗的方法包括但不限于活组织检查、成像分析和血液检查。成像分析的非限制性实例包括超声图像检查、计算机断层摄影术(CT)和弹性成像(elastography)。弹性成像的实例包括但不限于超声弹性成像、磁共振弹性成像等。血液检查包括但不限于用于检测生物标志物的血液检查。生物标志物的非限制性实例包括肽、蛋白质、核酸(例如,DNA、RNA和mRNA)、抗体和基因。

[0567] 肝纤维化的生物标志物包括但不限于直接生物标志物(又称为I类纤维化标志物);细胞因子和趋化因子;和间接生物标志物(又称为II类纤维化标志物)。

[0568] 超声图像检查是通过记录指向组织的超声波的反射(即,回波)可视化身体的深层结构的成像技术。1,000,000至10,000,000赫兹的范围中的频率被用于诊断超声图像检查。较低的频率提供了较大的穿透深度并且用于检查腹部器官。较高范围中的频率提供了较小的穿透并且主要地用于检查更表面的结构,比如眼。超声图像检查的基本原理与海底的海洋学研究中的测深相同。超声波被限制为可以传输通过它们指向的介质、或被其折射、吸收或反射的窄波束,这取决于它们撞击的表面的性质。在诊断超声图像检查中,超声波通过电

力刺激称为换能器的压电晶体产生。随着波束撞击不同的声阻抗的组织(例如肌肉和血液)之间的界面或边界,声波中的一些作为回波反射回换能器。回波然后被转换为在示波器上显示的电脉冲,其呈现在检查下的组织的‘图片’。超声图像检查可以用于例如心脏的检查(超声心动描记)和用于鉴定盆腹腔中的器官(例如,肝纤维化、肝硬化等中的肝)的大小和结构变化。它还有用于鉴定和区分癌症和良性囊肿。

[0569] 计算机控制断层扫描(CT)或计算机控制轴向断层扫描(CAT)是其中容纳在环形部件中的X射线源和X射线检测器围绕躺在机动化台面——其移动通过机器——上的患者环形地移动的成像技术。通常,使用具有4至64或更多列检测器的多检测器扫描仪,以便允许更快的扫描和更高分辨率的图像。来自检测器的数据大体上代表从围绕患者的多个角度拍摄的一系列X射线图像。图像不能直接查看而是发送至计算机,其快速地将它们重建为代表期望的任何平面中的身体的切片的二维图像(X线断层图)。数据还可以用于构建详细的三维图像。对于一些CT扫描,台面递增地移动并且当得到每个扫描(切片)时停止。对于其它CT扫描,台面在扫描期间连续地移动;因为患者以直线移动并且检测器以圆形移动,图像系列似乎以围绕患者的螺旋方式拍摄。与普通X射线相比,CT的断层扫描切片提供了更多空间细节并且可以更好地区分多种软组织密度。因为它提供了更多的信息,对于成像大多数颅内、头颈部、脊柱、胸内和腹内结构,CT比普通X射线更优选。病变的三维图像可以帮助外科医生计划手术。CT是用于检测和定位尿结石的最准确的研究。CT可以在有或没有IV造影(IV contrast)的情况下完成。非增强CT(noncontrast CT)用于检测,例如,脑中的急性出血、尿结石和肺结节,以及表征骨折和其它骨骼异常。IV造影用于,例如,提高软组织中肿瘤、感染、炎症和创伤的成像和当怀疑肺栓塞、主动脉瘤或主动脉夹层时评估脉管系统。

[0570] 肝弹性成像是用于评估肝硬度的方法。弹性成像可以通过超声或磁共振完成。

[0571] 超声弹性成像(也称为瞬时弹性成像)

[0572] FibroScan装置(EchoSens,Paris,France)使用传输通过肝的温和振幅、低频率(50-Hz)振动。它诱导通过脉冲回波超声图像检查检测为传播通过器官的波的弹性剪切波。波速与组织硬度相关联,即,波更快地经过更密实的纤维化组织。超声弹性成像可以采样比肝活组织检查更大的面积,其提供了对整个肝实质的更好的理解。而且,它可以被通常无风险地重复。

[0573] 磁共振弹性成像

[0574] 磁共振弹性成像与超声弹性成像类似,其在于它使用在肝中诱导剪切波的振动装置。然而,在此情况下,波通过改良的磁共振成像机器被检测,并且生成了描绘波速,并且因此遍及器官的硬度的彩色编码图像。在磁共振弹性成像中,大于4.46kPa的值以高程度的可能性指示肝硬化(和小于4.13的值指示无肝硬化),并且小于2.84的值排除显著纤维化的可能性。

[0575] 肝纤维化的直接(I类)生物标志物包括但不限于与基质沉积关联的直接标志物和与基质降解关联的直接标志物。与基质沉积关联的直接标志物的非限制性实例包括I型前胶原(PC1CP)、3型前胶原(PCIIINP)、IV型胶原、透明质酸(HA)、层粘连蛋白和YXL-40chondrex。与基质降解关联的直接标志物的实例包括但不限于基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP)。

[0576] 肝纤维化的细胞因子和趋化因子生物标志物包括但不限于转化生长因子- $\beta$  (TGF $\beta$ )、转化生长因子- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) 和血小板源生长因子 (PDGF)。

[0577] 肝纤维化的间接 (II类) 生物标志物包括但不限于天冬氨酸转氨酶/丙氨酸转氨酶 (AST/ALT) 比值、PGA (凝血酶原指数、 $\gamma$  谷氨酸转移酶 (GGT) 和载脂蛋白A1)、APRI (AST/血小板 (platelet) 计数比值)、FibroSpect II (HA、TIMP-1、 $\alpha$ 2-巨球蛋白)、FibroTest/FibroSure ( $\gamma$  2巨球蛋白、 $\gamma$  2球蛋白、 $\gamma$  球蛋白、载脂蛋白A1、GGT、总胆红素)、FibroIndex (血小板计数、AST、GGT)、FibroMeter (血小板计数、 $\gamma$  2巨球蛋白、AST、年龄、凝血酶原指数、HA、血尿素氮)、Forns (年龄、血小板计数、GGT、胆固醇水平)、Hepascore (年龄、性别、胆红素、GGT、HA、 $\gamma$  2巨球蛋白)、FIB-4 (血小板计数、ALT、AST、年龄)、SHASTA指数 (HA、AST、白蛋白)、简单测试 (Simple test) (年龄、高血糖、血小板计数、白蛋白、AST/ALT、体重指数 (BMI)) 和OELF/ELF (年龄、HA、III型胶原的N-末端前肽、TIMP-1)。

[0578] 根据另一个实施方式,组织是肾组织。

[0579] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肾纤维化。

[0580] 用于检测、诊断和评估肾纤维化的治疗的方法包括但不限于活组织检查、成像分析和血液检查。成像分析的非限制性实例包括苦味酸天狼星红 (pricrosirius red) 染色的组织学定量图像分析。血液检查包括但不限于用于检测生物标志物的血液检查。生物标志物的非限制性实例包括肽、蛋白质、核酸 (例如, DNA、RNA和mRNA)、抗体和基因。肾纤维化生物标志物包括但不限于羟脯氨酸、MCP-1、胶原1a1、胶原3a1、TGF- $\beta$ 、纤连蛋白-1、 $\alpha$ -SMA、结缔组织生长因子-1 (CTGF-1) 等。

[0581] 根据另一个实施方式,组织是血管组织。

[0582] 根据另一个实施方式,疾病或状况是血管纤维化。

[0583] 用于检测、诊断和评估血管纤维化的治疗的方法包括但不限于活组织检查、成像分析和血液检查。成像分析的非限制性实例包括苦味酸天狼星红染色、3',3'-二氨基联苯胺 (DAB) 和苏木精的组织学定量图像分析。血液检查包括但不限于用于检测生物标志物的血液检查。生物标志物的非限制性实例包括肽、蛋白质、核酸 (例如, DNA、RNA和mRNA)、抗体和基因。血管纤维化生物标志物包括但不限于羟脯氨酸、MCP-1、胶原1a1、胶原3a1、TGF- $\beta$ 、纤连蛋白-1、 $\alpha$ -SMA、结缔组织生长因子-1 (CTGF-1)、PARA  $\gamma$  等。

[0584] 根据另一个实施方式,描述的发明利用分离的核酸。核酸包括,例如, DNA、RNA和mRNA。核酸可以从例如组织、细胞、血液、血清、血浆、尿液、唾液、精液等分离。用于分离核酸的方案和试剂是已知的。用于核酸分离的试剂的非限制性实例包括硫氰酸胍、盐酸胍和硫氰酸胍-苯酚-氯仿;此试剂的有产权的配方被称为 **Trizol**<sup>®</sup>。

[0585] 根据另一个实施方式,描述的发明利用采用核酸的扩增的方法。核酸的扩增通过聚合酶链反应 (PCR) 完成。PCR的非限制性实例包括常规PCR、实时PCR、定量PCR、定量实时PCR、多重PCR、常规逆转录酶PCR (RT-PCR)、实时RT-PCR、定量RT-PCR、定量实时RT-PCR、多重RT-PCR等。

[0586] 可以依照标准程序基于设计靶序列的序列靶序列 (例如, TGF $\beta$ 和 $\alpha$ -SMA基因的mRNA序列) 的PCR扩增引物。引物作用以退火和扩增独特的靶序列和作为用于检测和监测扩增反应的信号的发生物 (generator)。根据一些实施方式,引物是未标记的 (比如在常规PCR中),而在其它实施方式中,引物标记有比如荧光部分。标记的引物可以具有任何类型,包括通常

用于定量RT-PCR反应的那些,比如蝎形引物(Scorpion)、分子信标等。

[0587] 除引物之外还可以提供探针。可以用于检测独特的基因组序列的扩增的探针(例如, **TaqMan**<sup>®</sup> 探针)可以设计为杂交至两个扩增引物之间的序列,优选地在引物结合位点之一的5-15个碱基内。通常,探针连同引物或引物组以反应混合物存在用于特定的扩增反应,例如,独特的靶序列的扩增。然而,探针可以提供为单独的组分,其与反应混合物的引物(一种或多种)或其它组分分离。

[0588] 引物和探针被设计以具有用于PCR反应的引物和探针的典型大小。一般而言,引物是相对短(长度是大约10-30个碱基)的寡核苷酸,而探针(例如, **TaqMan**<sup>®</sup> 探针)的长度可以是大约15-35个碱基。引物和探针通过如下过程设计:其包括鉴定靶核酸上独特的序列,设计短的寡核苷酸以扩增或检测那些序列,和合成寡核苷酸。当设计引物和探针时可以考虑几种特性:例如,探针解链温度应当高于引物解链温度,和一个引物的3'-端和探针的5'-端之间的距离可以大于8个核苷酸。本领域技术人员可以在这样的考虑和特性中选择以提供合适的引物和探针。用于合成寡核苷酸的方案是本领域技术人员已知的。任何合适的方案可以用于合成本发明的引物和探针。

[0589] 定量实时RT-PCR是准确的、精确的高通量试验。实时PCR在每个循环中使定量每种样品的反应产物的过程自动化。根据一些实施方式,实时PCR系统依赖于检测和定量荧光报道分子,其信号与反应中PCR产物的量成正比例增加。

[0590] 根据另一个实施方式,例如,报道分子是双链DNA特异性染料 **SYBR**<sup>®</sup> Green (Molecular Probes),其结合双链DNA,并且在激发后发光。因而,随着PCR产物积累,荧光增加。**SYBR**<sup>®</sup> Green (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) 系统是实时检测和定量PCR产物的一种方法。**SYBR**<sup>®</sup> Green染料以序列非特异性方式结合至双链核酸。它因而可以用于检测和定量由单链模板(例如, mRNA)产生的双链产物。其它可检测的探针和引物,比如 **amplifluor**<sup>®</sup> 探针和脱氧核酶,可以被最优化以用于扩增产物的定量检测。

[0591] **SYBR**<sup>®</sup> Green的替代方案包括但不限于 **TaqMan**<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 和分子信标,二者均是依赖于荧光共振能量转移(FRET)进行定量的杂交探针。**TaqMan**<sup>®</sup> 探针是包含通常在5'碱基上的荧光染料和通常位于3'碱基上的猝灭染料的寡核苷酸。更具体地,对于 **TaqMan**<sup>®</sup> 探针,当探针是完整的时,猝灭剂猝灭由荧光标签产生的信号。然而,在探针与靶序列结合和随后通过聚合酶——比如Taq聚合酶——的5'-3'核酸外切酶活性消化探针后,荧光部分从猝灭剂部分释放,并且与产生的靶核酸的量成比例的可检测的信号被产生并且可以被监测。根据一个实施方式, **Taq**聚合酶由于其5'-3'核酸外切酶活性用于qRT-PCR,并且它改变探针的荧光和允许CDR1 mRNA的扩展。**TaqMan**<sup>®</sup> 探针依赖于通过聚合酶的降解以生成可检测的信号,而 **Scorpions**<sup>®</sup> 和分子信标依赖于发夹结构的打开以提供可检测的信号。与 **TaqMan**<sup>®</sup> 探针一样, **Scorpion**<sup>®</sup> 探针在单个探针上包含荧光部分和猝灭部分二者。然而,与 **TaqMan**<sup>®</sup> 探针不同, **Scorpions**<sup>®</sup> 在扩增反应期间不被降解。而是,它们被设计为扩增反应的引物。**Scorpion**<sup>®</sup> 引物被设计以在溶液

中形成发夹结构,其引起荧光部分和猝灭部分极为贴近。引物与靶核酸的结合打开发夹结构并且使猝灭部分移动远离荧光部分——其发射可检测的荧光——足够的距离。

[0592] 分子信标也包含荧光和猝灭染料,但是FRET仅当猝灭染料与荧光染料直接相邻时才发生。分子信标被设计以采用发夹结构同时在溶液中游离,促使荧光染料和猝灭剂极为贴近。当分子信标杂交至靶标时,荧光染料和猝灭剂分离,不发生FRET,并且荧光染料在照射后发光。

[0593] 多重的PCR反应是常见的。多重允许调查者通过使用多种探针或引物——每个特异于其自身的靶标并且每个包含在独特的波长(与其它探针相比)下发射的荧光部分——在单个反应中试验两种或更多种不同的基因靶标。在使用TaqMan<sup>®</sup>探针、分子信标和蝎形引物的情况下多重是可能的。由于其非特异性结合性质,SYBR<sup>®</sup> Green可能不能服从于多重。

[0594] 通常,定量RT-PCR反应通过如下两种方法之一进行:与标准曲线比较或比较Ct值。在这些方法中的第一种中,特定mRNA的扩增产物的标准曲线基于一系列不同的、已知量的预选的核酸完成。对靶核酸进行的反应的扩增结果然后与标准曲线比较以获得数量,并且该数量可以被外推为原始样品中靶标的量。虽然使用mRNA作为标准曲线的来源是优选的,但是已知mRNA的稳定性影响这样的标准曲线的有效性,并且克服或使此问题最小化已经被证明是困难的。为了避免与使用作为标准曲线的来源相关联的问题,研究者已经使用DNA来生成标准曲线。虽然DNA的使用克服了与使用mRNA相关联的问题,但是事实不过是它避免了该问题而产生了又另一个问题,即,因为DNA模板是相对稳定的,并且因为DNA的扩增不需要第一链合成步骤(其在样品或制剂之中可以是无效的和可变的),由DNA来源产生的标准曲线经常不与测试样品中mRNA的量准确地关联。

[0595] 在用于定量PCR产物的Ct比较方法中,持家基因(比如 $\beta$ -肌动蛋白)的表达被用作针对其比较靶核酸(例如,TGF $\beta$ 和 $\alpha$ -SMA)的扩增的标准物。通常,在此方法中,进行靶核酸在两种不同条件下的表达的比较以测定表达模式的变化。此方法避免了当使用经典的标准曲线方法时可见的与RNA的不稳定性或使用DNA作为对照相关联的问题。

[0596] 在相同的PCR反应混合物中扩增作为靶序列的对照,试图定量PCR产物和测定靶核酸在样品中的量。这些对照通常是持家基因的转录物。这样的持家基因包括但不限于 $\beta$ -肌动蛋白和GAPDH。对照被添加至反应混合剂并且与靶核酸共扩增。特异于二者的荧光探针包括在混合物中,并且获得两个扩增曲线。然后测定了靶核酸关于对照的相对表达。使用此技术,参照回相同的对照,多种不同的样品可以比较靶基因(例如,TGF $\beta$ 和 $\alpha$ -SMA)的表达。虽然添加对照至扩增反应可以是定量表达水平的的其它方法的有用的替代方案,并且可以是用于在样品之中标准化PCR反应的有用的方法,但是它不允许测定在扩增反应混合物或在原始样品中存在的材料的绝对量。相反,结果是定性的或半定量的,其仅给出一种核酸(例如,靶标)与另一种(例如,对照)相比的量的想法。

[0597] 根据另一个实施方式,描述的发明提供了检测从对象获得的样品中的蛋白质的方法。这样的蛋白质检测方法包括但不限于蛋白质印迹、免疫组织化学、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定等。

[0598] 检测蛋白质的方法可以采用抗体。抗体是血清蛋白,其分子具备与它们的靶标上的小的化学基团(chemical grouping)互补的小面积的它们的表面。每个抗体分子存在至

少两个这些互补区域(称为抗体结合位点或抗原结合位点),并且在一些类型的分子中,十个、八个,或在一些种类中多达12个可以与抗原上的它们的对应的互补区域反应(抗原决定簇或表位)以将多价抗原的几个分子连接在一起以形成晶格。

[0599] 完整抗体分子的基础结构单元由四个多肽链——两个相同的轻(L)链(每个包含大约220个氨基酸)和两个相同的重(H)链(每个通常包含大约440个氨基酸)——构成。两个重链和两个轻链通过非共价和共价(二硫)键的组合被保持在一起。分子由两个相同的等份组成,每个具有由轻链的N-末端区和重链的N-末端区组成的相同的抗原结合位点。轻和重链二者通常协作以形成抗原结合表面。

[0600] 人抗体显示了两个种类的轻链 $\kappa$ 和 $\lambda$ ;免疫球蛋白的个体分子通常是仅一种或另一种。在正常血清中,60%的分子已经被发现具有 $\kappa$ 决定簇和30% $\lambda$ 。许多其它种类已经被发现显示两个种类的轻链,但是它们的比例变化。例如,在小鼠和大鼠中, $\lambda$ 链包括但是几个百分比的总数;在狗和猫中, $\kappa$ 链非常低;马似乎不具有任何 $\kappa$ 链;兔可以具有5至40% $\lambda$ ,这取决于品种和b-基因座同种异型;和鸡轻链相对于 $\kappa$ 更同源于 $\lambda$ 。

[0601] 在哺乳动物中,存在五种类别的抗体IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,每个具有其自身类别的重链 $\alpha$ (对于IgA)、 $\delta$ (对于IgD)、 $\epsilon$ (对于IgE)、 $\gamma$ (对于IgG)和 $\mu$ (对于IgM)。此外,存在四种子类别的IgG免疫球蛋白(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4),其分别具有 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 和 $\gamma 4$ 重链。在它的分泌形式中,IgM是由五种四链单元(four-chain unit)组成的五聚体,给予其总计10个抗原结合位点。每个五聚体包含J链的一个拷贝,其共价地插入两个相邻的尾区之间。

[0602] 全部五种免疫球蛋白类别区别于其它血清蛋白,在于它们显示了宽范围的电泳迁移率并且是不均匀的。此不均匀性——一个体IgG分子,例如,在静电荷上区别于另一种——是免疫球蛋白的固有性质。

[0603] 抗原决定簇或表位是分子上的抗原位点。连续的抗原决定簇或表位大体上是直链。在有序结构中,比如螺旋聚合物或蛋白质,抗原决定簇或表位大体上将涉及来自可以相互接近的分子的不同部分的氨基酸侧链的结构的面中或上的受限的区域或块。这些是构象决定簇。

[0604] 互补原理,其通常被比作锁匙适配,涉及相对弱的结合力(疏水键和氢键、范德华力和离子相互作用),其仅当两个反应分子可以非常近地相互接近和事实上如此接近——一个分子的突出构成原子或原子组可以适配进入另一个的互补凸处或凹处——时能够有效地作用。抗原-抗体相互作用显示了高程度的特异性,其在许多水平下是明显的。接前至分子水平,特异性意思是抗体对抗原的结合位点具有与不相关抗原的抗原决定簇完全不相似的互补性。无论何时两种不同抗原的抗原决定簇具有相同的结构相似性,对其它可以发生一些程度的适配一个决定簇进入一些抗体的结合位点,并且此现象引起交叉反应。交叉反应在理解抗原-抗体反应的互补性或特异性中具有重要的价值。免疫特异性或互补性使得检测抗原之中少量的杂质/污染成为可能。

[0605] 单克隆抗体(mAb)可以通过使来自免疫的供体的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系融合以产生在选择培养基中生长的建立的小鼠杂交瘤克隆来生成。杂交瘤细胞是由使分泌抗体的B细胞与骨髓瘤细胞体外融合产生的永生化杂交细胞。体外免疫,其指的是培养中的抗原特异性B细胞的初次活化,是另一种生产小鼠单克隆抗体的已经建立的手段。术语“人源化单克隆抗体”指的是互补决定区(“CDR”)——其塑造小鼠单克隆抗体的抗体结合位

点——被替换为人蛋白的CDR,同时维持小鼠抗体的框架和恒定区的单克隆抗体。

[0606] 来自外周血淋巴细胞的免疫球蛋白重(VH)和轻(V<sub>K</sub>和V<sub>λ</sub>)链可变基因的不同文库也可以通过聚合酶链反应(PCR)扩增被扩增。编码单个多肽链的基因——其中重和轻链可变结构域通过多肽间隔区(单链Fv或scFv)被连接——可以通过使用PCR随机组合重和轻链V-基因来制造。通过融合至噬菌体的尖端处的次要外壳蛋白,组合文库然后可以被克隆,用于在丝状噬菌体的表面上展示。

[0607] 导向选择的技术基于使用啮齿动物免疫球蛋白V基因改组人免疫球蛋白V基因。方法需要(i)使用与感兴趣的抗原反应的小鼠单克隆抗体的重链可变区(VH)结构域改组人λ轻链的所有组成成分;(ii)选择该抗原上的半-人Fab;(iii)在第二次改组中使用选择的λ轻链基因作为“入坞结构域”用于人重链的文库以分离具有人轻链基因的克隆Fab片段;(v)通过电穿孔包含基因的哺乳动物细胞表达载体感染小鼠骨髓瘤细胞;和(vi)将与抗原反应的Fab的V基因表达为小鼠骨髓瘤细胞中完整的IgG1,λ抗体分子。

[0608] 根据另一个实施方式,描述的发明利用多重珠技术(例如,Luminex<sup>®</sup>)检测蛋白质和核酸生物标志物。例如,涂覆有识别不同靶标的分析物特异性抗体(即,用于蛋白质生物标志物检测)或抗TAG序列(即,用于核酸生物标志物检测)的彩色编码的聚苯乙烯或超顺磁珠被混合在一起并且与生物素标记的靶标(即,蛋白质或核酸生物标志物)一起培育。捕获的靶标随后使用链亲和素-藻红素缀合物进行检测。

[0609] 根据另一个实施方式,疾病或状况进一步表征为组织中的炎症。

[0610] 根据另一个实施方式,炎症是急性或慢性炎症。

[0611] 根据另一个实施方式,炎症由选自肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)和白介素-1β(IL-1β)的至少一种细胞因子介导。

[0612] 根据另一个实施方式,肺纤维化表征为选自以下的至少一种病理:与正常健康对照对象相比,肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积、肺中成纤维细胞增殖的异常促进、肺中成肌纤维细胞分化的异常诱导、和成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0613] 根据另一个实施方式,组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积表征为与正常健康对照对象的组织中促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的活性相比,组织中促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的异常活性。

[0614] 根据另一个实施方式,组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由以下证明:与正常健康对照对象的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的量或分布相比,组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的异常量和分布。

[0615] 根据另一个实施方式,肺纤维化表征为选自以下的至少一种病理:与正常健康对照对象相比,肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积、肺中成纤维细胞增殖的异常促进、肺中成肌纤维细胞群分化为成肌纤维细胞群的异常诱导、和成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0616] 根据另一个实施方式,疾病或状况是慢性阻塞性肺病(COPD)。根据另一个实施方式,慢性阻塞性肺病(COPD)由吸烟造成。根据另一个实施方式,慢性阻塞性肺病(COPD)由环境微粒造成。根据另一个实施方式,慢性阻塞性肺病(COPD)由α-1抗胰蛋白酶缺陷造成。根据另一个实施方式,慢性阻塞性肺病(COPD)由儿童期呼吸道感染造成。

[0617] 根据另一个实施方式,肺纤维化表征为与正常健康对照对象相比,对象的肺中热休克27kDa蛋白1 (HSPB1) 的异常活性。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比,对象的肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积。根据另一个实施方式,细胞外基质蛋白是胶原。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺中成纤维细胞增殖的异常促进。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺中成肌纤维细胞分化的异常诱导。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺中纤维变性位置形成的促进。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺中成肌纤维细胞收缩活性的增加。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺中成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0618] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制在对象的肺中发生的炎症。根据另一个实施方式,炎症是急性炎症。根据另一个实施方式,炎症是慢性炎症。根据另一个实施方式,炎症由肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 介导。根据另一个实施方式,炎症由白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 介导。根据另一个实施方式,炎症由白介素-6 (IL-6) 介导。

[0619] 根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节对象的肺中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的量。根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节对象的肺中白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的量。根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节对象的肺中白介素-6 (IL-6) 的量。

[0620] 根据另一个实施方式,与对象的肺中的正常健康对照对象相比,药物组合物抑制HSPB1的异常活性。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积。根据另一个实施方式,细胞外基质蛋白是胶原。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺中成纤维细胞增殖的异常促进。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比肺中成纤维细胞分化为成肌纤维细胞的异常诱导。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比纤维变性位置形成的异常促进。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比成肌纤维细胞的收缩活性的异常增加。根据另一个实施方式,与正常健康对照对象相比,成肌纤维细胞收缩活性表征为升高水平的 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)。根据另一个实施方式,与正常健康对照对象相比,成肌纤维细胞收缩活性表征为应力纤维形成的增加。根据另一个实施方式,HSPB1的异常活性是与正常健康对照对象相比成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0621] 根据一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2 激酶) 的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少95%的激酶活性。

[0622] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3激酶) 的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少50%

的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少95%的激酶活性。

[0623] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的至少95%的激酶活性。

[0624] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的至少75%的激酶活性。

[0625] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性。

[0626] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性。

[0627] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0628] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0629] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI) 的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB) 的激酶活性。

[0630] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的至少65%的激酶活性。

[0631] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3

(MK3)的至少65%的激酶活性。

[0632] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少65%的激酶活性。

[0633] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB)的至少65%的激酶活性。

[0634] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2)的至少65%的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3)的至少65%的激酶活性。

[0635] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2)的至少65%的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少65%的激酶活性。

[0636] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2)的至少65%的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB)的至少65%的激酶活性。

[0637] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2)的至少65%的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3)的至少65%的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少65%的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB)的至少65%的激酶活性。

[0638] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制选自MK2、MK3、CaMKI、TrkB的至少一种激酶的激酶活性,而基本上不抑制来自本文在表1中列出的其余组的一种或多种其它选择的激酶的活性。

[0639] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制选自本文在表1中列出的组的激酶的激酶活性。

[0640] 根据另一个实施方式,此抑制可以,例如,对减少对象的组织中的成纤维细胞增殖、细胞外基质沉积、或其组合是有效的。

[0641] 根据另一个实施方式,此抑制可以,例如,对减少选自以下的至少一种病理是有效的:与正常健康对照对象相比,肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积、肺中成纤维细胞增殖的异常促进、成肌纤维细胞分化的异常诱导、和成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0642] 根据一些实施方式,MMI抑制剂在体内的抑制概况取决于剂量、给药途径、和响应于抑制剂的细胞类型。

[0643] 根据这样的实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于50%的激酶活性。根据这样的实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于40%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于20%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于15%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于10%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于5%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物增加其它

选择的激酶的激酶活性。

[0644] 根据前一段的实施方式,基本上不抑制的一种或多种其它选择的激酶选自Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII,包括其亚基CaMKII $\delta$ )、原癌基因丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(PIM-1)、细胞肉瘤(c-SRC)、脾脏酪氨酸激酶(SYK)、C-src酪氨酸激酶(CSK)、和胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)。

[0645] 根据一些实施方式,药物组合物进一步包括另外的治疗剂。

[0646] 根据一些这样的实施方式,另外的治疗剂是选自如下的一种或多种:纯化的牛V型胶原(例如,IW-001;ImmuneWorks;United Therapeutics)、IL-13受体拮抗物(例如,QAX576;Novartis)、蛋白质酪氨酸激酶抑制剂(例如,伊马替尼(Gleevec®);Craig Daniels/Novartis)、内皮受体拮抗物(例如,ACT-064992(马西替坦);Actelion)、双内皮素受体拮抗物(例如,波生坦(Tracleer®);Actelion)、前列环素类似物(吸入性伊洛前列素(例如,Ventavis®);Actelion)、抗CTGF单克隆抗体(例如,FG-3019)、内皮素受体拮抗物(A-选择性)(例如,安立生坦(Letairis®),Gilead)、AB0024(Arresto)、赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)单克隆抗体(例如,GS-6624(以前的AB0024);Gilead)、c-Jun N-末端激酶(JNK)抑制剂(例如,CC-930;Celgene)、吡非尼酮(例如,Esbriet®(InterMune)、Pirespa®(Shionogi))、IFN- $\gamma$  1b(例如,Actimmune®;InterMune)、针对全部三种TGF- $\beta$ 同种型的全中和IgG4人抗体(例如,GC1008;GENZYME)、TGF- $\beta$ 活化抑制剂(例如,Stromedix(STX-100))、重组人正五聚蛋白-2蛋白(rhPTX-2)(例如,PRM151;Promedior)、双特异性IL4/IL13抗体(例如,SAR156597;Sanofi)、人源化单克隆抗体靶向整合蛋白 $\alpha v \beta 6$ (BIBF 1120;Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸(Zambon SpA)、西地那非(Viagra®)、TNF拮抗物(例如,依那西普(Enbrel®);Pfizer)、糖皮质激素(例如,强的松、布地奈德、莫米松糠酸酯、丙酸氟替卡松和糠酸氟替卡松)、支气管扩张药(例如,白三烯改性剂(例如,孟鲁司特(SINGUAIR®))、抗胆碱能支气管扩张药(例如,异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 $\beta 2$ 激动剂(例如,甲磺酸乙基异丙肾上腺素(Bronkometer®)、肾上腺素、舒喘灵/舒喘宁和特布他林)、长效 $\beta 2$ 激动剂(例如,沙美特罗、福莫特罗、indacaterol(Onbrez®)、索非布韦、HCV促进的蛋白酶抑制剂(ABT-450,AbbVie)、非核苷NS5B抑制剂(达卡他韦,ABT-333,AbbVie)、NS5a抑制剂(ombitasvir,ABT-267,AbbVie)、ABT-450/r(ABT-450以及利托那韦)、与ABT-267共配制的ABT-450、或与索非布韦一起配制的ABT-450。根据另一个实施方式,用于HCV治疗的另外的治疗剂是病毒唑、和其组合。

[0647] 根据一些其它实施方式,另外的治疗剂包括支气管扩张药,其包括但不限于白三烯改性剂、抗胆碱能支气管扩张药、 $\beta 2$ 激动剂、或其组合。

[0648] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括皮质类固醇,其包括但不限于强的松、布地奈德、莫米松、倍氯米松、索非布韦(Sovaldi®)或其组合。

[0649] 根据一些其它实施方式,另外的治疗剂包括支气管扩张药,其包括但不限于白三烯改性剂、抗胆碱能支气管扩张药、 $\beta 2$ 激动剂、或其组合。

[0650] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括皮质类固醇,其包括但不限于强的松、布地奈德、莫米松、倍氯米松、或其组合。

- [0651] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是抗炎性剂。
- [0652] 根据另一个实施方式,抗炎性剂是非甾体抗炎性剂。还可以采用非甾体抗炎性剂的混合物,以及这些药剂的皮肤病学上可接受的盐和酯。例如,依托芬那酯——氟芬那酸衍生物——对外部应用是特别有用的。
- [0653] 根据另一个实施方式,其中非甾体抗炎性剂包括转化生长因子- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3)、抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 药剂、或其组合。
- [0654] 根据另一个实施方式,抗炎性剂是甾体抗炎性剂。根据另一个实施方式,甾体抗炎性剂包括选自强的松、布地奈德、莫米松、倍氯米松、和其组合的至少一种皮质类固醇。
- [0655] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括甲基黄嘌呤。
- [0656] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括嗜中性粒细胞弹性酶抑制剂。
- [0657] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是至少一种嗜中性粒细胞弹性酶抑制剂,其包括但不限于ICI 200355、ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616、TEI-8362、ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892、ZD-8321、和其组合。
- [0658] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括至少一种磷酸二酯酶抑制剂,其包括但不限于磷酸二酯酶4抑制剂。磷酸二酯酶4抑制剂的实例包括但不限于罗氟司特、西洛司特或其组合。
- [0659] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是镇痛剂。根据一些这样的实施方式,镇痛剂是非阿片镇痛药。根据一些其它实施方式,镇痛药是阿片镇痛药。
- [0660] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是抗感染剂。根据另一个实施方式,抗感染剂是抗生素药剂。
- [0661] 根据一些实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有基本序列同一性。
- [0662] 根据一些这样的实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%序列同一性。
- [0663] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。
- [0664] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。
- [0665] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。
- [0666] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。
- [0667] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 的功能等价

物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVAA (SEQ ID NO:26)。

[0668] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVA (SEQ ID NO:27)。

[0669] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。

[0670] 根据一些其它实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物是包括可操作地连接至第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中第一多肽是氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),并且第二多肽包括治疗结构域,其序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有基本同一性。

[0671] 根据另一个实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少70%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少80%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少90%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少95%序列同一性。

[0672] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)的多肽。

[0673] 根据另一个实施方式,第二多肽氨基酸序列KALARQLGVA (SEQ ID NO:9)的多肽。

[0674] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10)的多肽。

[0675] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVAA (SEQ ID NO:28)的多肽。

[0676] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVA (SEQ ID NO:29)的多肽。

[0677] 根据一些实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物是包括可操作地连接至第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中第一多肽包括在功能上等价于YARAAARQARA (SEQ ID NO:11)的细胞穿透肽,并且第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2),并且药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2)的激酶活性。

[0678] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12)的多肽。

[0679] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRIKA (SEQ ID NO:13)的多肽。

[0680] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)的多肽。

[0681] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRIKAWLRRI (SEQ ID NO:15)的多肽。

[0682] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽。根据一些这样的实施方式,第一多肽是氨基酸序列KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多肽。根据一些这样的实施方式,第一多肽是氨基酸序列HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。

[0683] 根据另一方面,描述的发明还提供了分离的核酸,其编码与氨基酸序列

YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少70%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0684] 根据一些这样的实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少80%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其它实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少90%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些其它实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列 YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1) 具有至少95%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0685] 根据另一个实施方式,施用的步骤可以口服、含服、胃肠外、外用——通过吸入或吹入、或直肠来全身发生,或可以通过比如而限于注射、植入、移植、外部施加、或胃肠外的手段局部发生。可以进行另外的施用,例如,静脉内、经粘膜、经皮、肌肉内、皮下、气管内(包括通过肺吸入)、腹膜内、鞘内、淋巴内、病灶内、或硬膜外。可以作为单独的单位剂量或以包括多种药物和/或物质的多单位剂量的治疗方案的形式进行施用,例如,一次、多次、和/或在一个或多个延长期内。

[0686] 根据一些其它实施方式,施用的步骤作为单一剂量发生一次。根据一些其它实施方式,施用的步骤作为时间周期内的多个剂量进行。根据一些这样的实施方式,时间周期是一天、一周、一个月、一个月、一年、或其倍数。根据一些实施方式,施用的步骤每天进行持续至少一周的时期。根据一些实施方式,施用的步骤每周进行持续至少一个月的时期。根据一些实施方式,施用的步骤每月进行持续至少两个月的时期。根据另一个实施方式,施用的步骤在至少一年的时期内重复进行。根据另一个实施方式,施用的步骤每月进行至少一次。根据另一个实施方式,施用的步骤每周进行至少一次。根据另一个实施方式,施用的步骤每天进行至少一次。

[0687] 根据一些其它实施方式,治疗量的药物组合物经由吸入装置施用。可以用于施用药物组合物的吸入装置的实例包括但不限于喷雾器、定量吸入器(MDI)、干粉吸入器(DPI)、和干粉喷雾器。

[0688] 根据另一个实施方式,干粉包括具有1至5微米的质量中值直径(MMAD)的微粒。根据另一个实施方式,干粉包括具有大约2微米的质量中值直径(MMAD)的微粒。

[0689] 根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.00001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.0001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.001mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.01mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.1mg/kg(或100μg/kg)体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约1mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约10mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约10mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约2mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约3mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。



kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在9 $\mu$ g/kg/天至10 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在1 $\mu$ g/kg/天至5 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在5 $\mu$ g/kg/天至10 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在10 $\mu$ g/kg/天至15 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在15 $\mu$ g/kg/天至20 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在25 $\mu$ g/kg/天至30 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在30 $\mu$ g/kg/天至35 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在35 $\mu$ g/kg/天至40 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在40 $\mu$ g/kg/天至45 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在45 $\mu$ g/kg/天至50 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在50 $\mu$ g/kg/天至55 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在55 $\mu$ g/kg/天至60 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在60 $\mu$ g/kg/天至65 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在65 $\mu$ g/kg/天至70 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在70 $\mu$ g/kg/天至75 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在80 $\mu$ g/kg/天至85 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在85 $\mu$ g/kg/天至90 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在90 $\mu$ g/kg/天至95 $\mu$ g/kg/天的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在95 $\mu$ g/kg/天至100 $\mu$ g/kg/天的范围内。

[0691] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是1 $\mu$ g/kg/天。

[0692] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是2 $\mu$ g/kg/天。

[0693] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是5 $\mu$ g/kg/天。

[0694] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是10 $\mu$ g/kg/天。

[0695] III. 用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和胶原沉积的疾病的系统

[0696] 根据另一方面,描述的发明提供了用于治疗表征为对象的组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的系统,

[0697] 其中药物组合物包括治疗量的氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1) 的多肽或其功能等价物、和其药学上可接受的载体,并且其中治疗量对减少对象的组织中的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积是有效的。

[0698] 根据方法的一个实施方式,疾病或状况是急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0699] 根据另一个实施方式,疾病或状况是辐射诱发的纤维化。

[0700] 根据另一个实施方式,疾病或状况是移植排斥。

[0701] 根据另一个实施方式,组织是肺组织。

[0702] 根据另一个实施方式,疾病或状况是间质性肺病。

- [0703] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肺纤维化。
- [0704] 根据另一个实施方式,肺纤维化是特发性肺纤维化。
- [0705] 根据另一个实施方式,肺纤维化由施用博来霉素造成。
- [0706] 根据另一个实施方式,肺纤维化由过敏反应、吸入环境微粒、细菌感染、病毒感染、对对象的肺的机械伤害、肺移植排斥、自身免疫障碍、遗传障碍、或其组合造成。
- [0707] 根据另一个实施方式,组织是肝组织。
- [0708] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肝纤维化。
- [0709] 根据另一个实施方式,组织是肾组织。
- [0710] 根据另一个实施方式,疾病或状况是肾纤维化。
- [0711] 根据另一个实施方式,组织是血管。
- [0712] 根据另一个实施方式,疾病或状况是血管纤维化。
- [0713] 根据另一个实施方式,疾病或状况进一步表征为组织中的炎症。
- [0714] 根据另一个实施方式,炎症是急性或慢性炎症。
- [0715] 根据另一个实施方式,炎症由选自肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)、和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )的至少一种细胞因子介导。
- [0716] 根据另一个实施方式,组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积表征为与促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 在正常健康对照对象的组织中的活性相比,促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 在组织中的异常活性。
- [0717] 根据另一个实施方式,组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由以下证明:与正常健康对照对象的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的量或分布相比,组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的异常的量 and 分布。
- [0718] 根据另一个实施方式,肺纤维化表征为选自以下的至少一种病理:与正常健康对照对象相比,肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积、肺中成纤维细胞增殖的异常促进、肺中成肌纤维细胞群分化为成肌纤维细胞群的异常诱导、和成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。
- [0719] 根据另一个实施方式,药学上可接受的载体包括但不限于控释载体、延释载体、缓释载体、和长期释放载体。
- [0720] 根据另一个实施方式,吸入装置是喷雾器。
- [0721] 根据另一个实施方式,吸入装置是定量吸入器 (MDI)。
- [0722] 根据另一个实施方式,吸入装置是干粉吸入器 (DPI)。
- [0723] 根据另一个实施方式,吸入装置是干粉喷雾器。
- [0724] 根据另一个实施方式,药物组合物是干粉的形式。
- [0725] 根据另一个实施方式,干粉包括具有1至5微米的质量中值直径 (MMAD) 的微粒。
- [0726] 根据另一个实施方式,干粉包括具有大约2微米的质量中值直径 (MMAD) 的微粒。
- [0727] 根据一些实施方式,药物组合物进一步包括另外的治疗剂。
- [0728] 根据一些这样的实施方式,另外的治疗剂选自纯化的牛V型胶原(例如, IW-001; ImmuneWorks; United Therapeutics)、IL-13受体拮抗物(例如, QAX576; Novartis)、蛋白质酪氨酸激酶抑制剂(例如, 伊马替尼(Gleevec®); Craig Daniels/Novartis)、内皮受体拮

抗物(例如,ACT-064992(马西替坦);Actelion)、双内皮素受体拮抗物(例如,波生坦(**Tracleer®**);Actelion)、前列环素类似物(吸入性伊洛前列素(例如,**Ventavis®**);Actelion)、抗CTGF单克隆抗体(例如,FG-3019)、内皮素受体拮抗物(A-选择性)(例如,安立生坦(**Letairis®**),Gilead)、AB0024(Arresto)、赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)单克隆抗体(例如,GS-6624(以前的AB0024);Gilead)、c-Jun N-末端激酶(JNK)抑制剂(例如,CC-930;Celgene)、吡非尼酮(例如,**Esbriet®**(InterMune)、**Pirespa®**(Shionogi))、IFN- $\gamma$  1b(例如,**Actimmune®**;InterMune)、针对全部三种TGF- $\beta$ 同种型的全中和IgG4人抗体(例如,GC1008;GENZYME)、TGF- $\beta$ 活化抑制剂(例如,Stromedix(STX-100))、重组人正五聚蛋白-2蛋白(rhPTX-2)(例如,PRM151;Promedior)、双特异性IL4/IL13抗体(例如,SAR156597;Sanofi)、人源化单克隆抗体靶向整合蛋白 $\alpha v \beta 6$ (BIBF 1120;Boehringer Ingelheim)、N-乙酰半胱氨酸(Zambon SpA)、西地那非(**Viagra®**)、TNF拮抗物(例如,依那西普(**Enbrel®**);Pfizer)、糖皮质激素(例如,强的松、布地奈德、莫米松糠酸酯、丙酸氟替卡松、和糠酸氟替卡松)、支气管扩张药(例如,白三烯改性剂(例如,孟鲁司特(**SINGUAIR®**))、抗胆碱能支气管扩张药(例如,异丙托溴铵和噻托溴铵)、短效 $\beta 2$ 激动剂(例如,甲磺酸乙基异丙肾上腺素(**Bronkometer®**))、肾上腺素、舒喘灵/舒喘宁、和特布他林)、长效 $\beta 2$ 激动剂(例如,沙美特罗、福莫特罗、indacaterol(**Onbrez®**))、索非布韦(**Sovaldi®**)、HCV促进的蛋白酶抑制剂(ABT-450,AbbVie)、非核苷NS5B抑制剂(达卡他韦,ABT-333,AbbVie)、NS5a抑制剂(ombitasvir,ABT-267,AbbVie)、ABT-450/r(ABT-450以及利托那韦)、与ABT-267共配制的ABT-450、或与索非布韦一起配制的ABT-450、病毒唑、和其组合。

[0729] 根据一些其它实施方式,另外的治疗剂包括支气管扩张药,其包括但不限于白三烯改性剂、抗胆碱能支气管扩张药、 $\beta 2$ 激动剂、或其组合。

[0730] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括皮质类固醇,其包括但不限于强的松、布地奈德、莫米松、倍氯米松、或其组合。

[0731] 根据一些这样的实施方式,另外的治疗剂包括支气管扩张药,其包括但不限于白三烯改性剂、抗胆碱能支气管扩张药、 $\beta 2$ 激动剂、或其组合。

[0732] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括皮质类固醇,其包括但不限于强的松、布地奈德、莫米松、倍氯米松、或其组合。

[0733] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是抗炎性剂。

[0734] 根据另一个实施方式,抗炎性剂是非甾体抗炎性剂。还可以采用非甾体抗炎性剂的混合物,以及这些药剂的皮肤病学上可接受的盐和酯。例如,依托芬那酯——氟芬那酸衍生物——对外部应用是特别有用的。

[0735] 根据另一个实施方式,其中非甾体抗炎性剂包括转化生长因子- $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$ )、抗肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )药剂、或其组合。

[0736] 根据另一个实施方式,抗炎性剂是甾体抗炎性剂。根据另一个实施方式,甾体抗炎性剂包括选自强的松、布地奈德、莫米松、倍氯米松、和其组合的至少一种皮质类固醇。

[0737] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括甲基黄嘌呤。

[0738] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括嗜中性粒细胞弹性酶抑制剂。

[0739] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是至少一种嗜中性粒细胞弹性酶抑制剂,其

包括但不限于ICI 200355、ONO-5046、MR-889、L-694,458、CE-1037、GW-311616、TEI-8362、ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200,880、ZD-0892、ZD-8321、和其组合。

[0740] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂包括至少一种磷酸二酯酶抑制剂,其包括但不限于磷酸二酯酶4抑制剂。磷酸二酯酶4抑制剂的实例包括但不限于罗氟司特、西洛司特或其组合。

[0741] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是镇痛剂。根据一些这样的实施方式,镇痛剂是非阿片镇痛药。根据一些其它实施方式,镇痛药是阿片镇痛药。

[0742] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是的抗感染剂。根据另一个实施方式,抗感染剂是抗生素药剂。

[0743] 根据另一个实施方式,另外的治疗剂是抗病毒剂。示例性的这样的抗病毒剂非限制性地包括HCV促进的蛋白酶抑制剂 (ABT-450, AbbVie)、非核苷NS5B抑制剂 (达卡他韦, ABT-333, AbbVie)、NS5a抑制剂 (ombitasvir, ABT-267, AbbVie)、ABT-450/r (ABT-450以及利托那韦)、与ABT-267共配制的ABT-450、或与索非布韦一起配制的ABT-450、病毒唑、或索非布韦。根据另一个实施方式,药物组合物抑制在对象的肺中发生的炎症。根据另一个实施方式,炎症是急性炎症。根据另一个实施方式,炎症是慢性炎症。根据另一个实施方式,炎症由升高水平的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 介导。根据另一个实施方式,炎症由升高水平的白介素-6 (IL-6) 介导。根据另一个实施方式,炎症由升高水平的白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的介导。

[0744] 根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节肺中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的量。根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节肺中白介素-6 (IL-6) 的量。根据另一个实施方式,与对照相比,药物组合物调节肺中白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的量。

[0745] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制HSPB1的活性。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成纤维细胞增殖的异常诱导。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成纤维细胞群分化为成肌纤维细胞群的异常诱导。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是细胞外基质蛋白沉积入肺间质。根据另一个实施方式,细胞外基质蛋白是胶原。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是纤维变性位置形成的促进。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成肌纤维细胞收缩活性的增加。根据另一个实施方式,被药物组合物抑制的HSPB1的活性是成肌纤维细胞附着至细胞外基质的促进。

[0746] 根据另一个实施方式,组织中异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积由以下证明:与正常健康对照对象的组织中活化的促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的量或分布相比,组织中活化的(磷酸化的)促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2) 的异常的量 and 分布。

[0747] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制选自本文在表1中列出的组的激酶的激酶活性。

[0748] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制激酶的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式药物组合物抑制激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,

药物组合物抑制该激酶的至少95%的激酶活性。

[0749] 根据一些实施方式,MMI抑制剂在体内的抑制概况取决于剂量、给药途径、和响应于抑制剂的细胞类型。

[0750] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制激酶的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制该激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式药物组合物抑制该激酶的至少95%的激酶活性。

[0751] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2 (MK2激酶)的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制MK2激酶的至少95%的激酶活性。

[0752] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3 (MK3激酶)的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制MK3激酶的至少95%的激酶活性。

[0753] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少65%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少75%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少80%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少85%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少90%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物进一步抑制Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I (CaMKI)的至少95%的激酶活性。

[0754] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB)的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB)的至少50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体 (TrkB)的至少65%

的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的至少70%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物进一步抑制BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的至少75%的激酶活性。

[0755] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3(MK3)的激酶活性。

[0756] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性。

[0757] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0758] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3(MK3)的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0759] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的激酶活性。

[0760] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的至少65%的激酶活性。

[0761] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3(MK3)的至少65%的激酶活性。

[0762] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少65%的激酶活性。

[0763] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的至少65%的激酶活性。

[0764] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的至少65%的激酶活性和促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3(MK3)的至少65%的激酶活性。

[0765] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的至少65%的激酶活性和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少65%的激酶活性。

[0766] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的至少65%的激酶活性和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的至少65%的激酶活性。

[0767] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)的至少65%的激酶活性、促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3(MK3)的至少65%的激酶活性、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI)的至少65%的激酶活性、和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB)的至少65%的激酶活性。

[0768] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制选自MK2、MK3、CaMKI、TrkB的至少一种激酶的激酶活性,而基本上不抑制来自本文在表1中列出的其余组的一种或多种其它选择的激酶的活性。

[0769] 根据另一个实施方式,药物组合物抑制选自本文在表1中列出的组的激酶的激酶

活性。

[0770] 根据另一个实施方式,此抑制可以,例如,对减少对象的组织中的成纤维细胞增殖、细胞外基质沉积、或其组合是有效的。

[0771] 根据另一个实施方式,此抑制可以,例如,对减少选自以下的至少一种病理是有效的:与正常健康对照对象相比,肺间质中细胞外基质蛋白的异常沉积、肺中成纤维细胞增殖的异常促进、成肌纤维细胞分化的异常诱导、和成肌纤维细胞附着至细胞外基质的异常促进。

[0772] 根据一些实施方式,MMI抑制剂在体内的抑制概况取决于剂量、给药途径、和响应于抑制剂的细胞类型。

[0773] 根据这样的实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于50%的激酶活性。根据这样的实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于65%的激酶活性。根据这样的实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于50%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于40%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于20%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于15%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于10%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物抑制其它选择的激酶(一种或多种)的小于5%的激酶活性。根据另一个实施方式,药物组合物增加其它选择的激酶的激酶活性。

[0774] 根据前一段的实施方式,基本上不抑制的一种或多种其它选择的激酶选自Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II (CaMKII,包括其亚基CaMKII $\delta$ )、原癌基因丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(PIM-1)、细胞肉瘤(c-SRC)、脾脏酪氨酸激酶(SYK)、C-src酪氨酸激酶(CSK)、和胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)。

[0775] 根据一些实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有基本序列同一性。

[0776] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少70%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少80%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少90%序列同一性。根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少95percent序列同一性。

[0777] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:3)。

[0778] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO:4)。

[0779] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLAVA (SEQ ID NO:5)。

[0780] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVA (SEQ ID NO:6)。

[0781] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO:7)。

[0782] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVAA (SEQ ID NO:26)。

[0783] 根据另一个实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物具有氨基酸序列YARAAARQARAKALNRQLAVA (SEQ ID NO:27)。

[0784] 根据一些其它实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物是包括可操纵地连接至第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中第一多肽具有氨基酸序列YARAAARQARA (SEQ ID NO:11),并且第二多肽包括治疗结构域,其序列与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有基本同一性。

[0785] 根据另一个实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少70%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少80%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少90%序列同一性。根据一些其它实施方式,第二多肽与氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)具有至少95%序列同一性。

[0786] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLAVA (SEQ ID NO:8)的多肽。

[0787] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVA (SEQ ID NO:9)的多肽。

[0788] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:10)的多肽。

[0789] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVAA (SEQ ID NO:28)的多肽。

[0790] 根据另一个实施方式,第二多肽是氨基酸序列KALNRQLAVA (SEQ ID NO:29)的多肽。

[0791] 根据一些其它实施方式,多肽YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)的功能等价物是包括可操纵地连接至第二多肽的第一多肽的融合蛋白,其中第一多肽包括在功能上等价于YARAAARQARA (SEQ ID NO:11)的细胞穿透肽,并且第二多肽具有氨基酸序列KALARQLGVAA (SEQ ID NO:2)。

[0792] 根据进一步的实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRIKAWLRRIKA (SEQ ID NO:12)的多肽。

[0793] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRIKA (SEQ ID NO:13)的多肽。

[0794] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:14)的多肽。

[0795] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列WLRRIKAWLRRI (SEQ ID NO:15)的多肽。

[0796] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列FAKLAARLYR (SEQ ID NO:16)的多肽。

[0797] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列KAFKLAARLYR (SEQ ID NO:17)的多

肽。

[0798] 根据另一个实施方式,第一多肽是氨基酸序列HRRIKAWLKKI (SEQ ID NO:18)的多肽。

[0799] 根据另一方面,描述的发明还提供了分离的核酸,其编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少70%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些这样的实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少80%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些这样的实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少90%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。根据一些这样的实施方式,分离的核酸编码与氨基酸序列YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1)具有至少95%氨基酸序列同一性的蛋白质序列。

[0800] 根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.00001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.0001mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.001mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.01mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.1mg/kg (100 $\mu$ g/kg) 体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约1mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约10mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约2mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约3mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约4mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约5mg/kg体重至大约10mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约60mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约70mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约80mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约90mg/kg体重至大约100mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约90mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约80mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约70mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约60mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约50mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗量具有从大约0.000001mg/kg体重至大约40mg/kg体重的量。根据另一个实施方式,治疗性抑制肽的治疗量具有从大约



至70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 至75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 至85 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在85 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 至90 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在90 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 至95 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的范围内。根据一些其它实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量在95 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 至100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的范围内。

[0802] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 。

[0803] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 。

[0804] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 。

[0805] 根据另一个实施方式,药物组合物的治疗性抑制肽的治疗剂量是10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 。

[0806] 在本申请内,除非另外说明,利用的技术可以发现于任意多种熟知的参考文献,比如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook,等,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press),Gene Expression Technology (Methods in Enzymology,Vol.185, edited by D.Goeddel,1991.Academic Press,San Diego,CA),“Guide to Protein Purification” in Methods in Enzymology (M.P.Deutschcer,ed.,(1990)Academic Press, Inc.);PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications (Innis,等1990.Academic Press,San Diego,CA),Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,2nd Ed. (R.I.Freshney.1987.Liss,Inc.New York,NY),和Gene Transfer and Expression Protocols,pp.109-128,ed.E.J.Murray,The Humana Press Inc.,Clifton,N.J.),其全部通过引用并入本文。

[0807] 除非另外定义,本文使用的全部技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员一般所理解的相同的含义。虽然与本文描述的方法和材料相似或等同的任何方法及材料也可以用于本发明实践或测试,但是现在描述了优选的方法和材料。本文提及的全部出版物通过引用并入本文,以公开和描述与引用的出版物关联的方法和/或材料。

[0808] 除非上下文另外明确地规定,在提供数值范围时,可以理解,在该范围的上限和下限之间的每个介于其间的值(至下限单位的十分之一)、和该规定范围中的任何其它规定值或介于其间的值包含在本发明内。可以独立地包括在较小范围中的这些较小范围的上限和下限也包含在本发明内,在规定的范围中服从任何具体排除限制。在规定的范围包括限制中的一种或两种时,排除那些包括的限制二者中的任一种的范围也包括在本发明中。

[0809] 还必须注意,除非上下文另外明确地规定,如在本文和所附权利要求中所用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物。本文使用的全部技术和科学术语具有相同的含义。

[0810] 本文讨论的出版物通过引用以其全部并入本文,并且仅因其公开内容先于本申请的提交日期而提供。本文的任何事物不解释为承认描述的发明由于在先的发明而不享有先于这样的出版物的权利。另外,提供的出版物的日期可能不同于实际出版日期,其可能需要独立地确认。

[0811] 本领域技术人员应当理解,可以做出多种改变并且可以进行等价物替换,而不背离本发明的真实精神和范围。此外,对于描述的发明的客观精神和范围,可以进行很多修改

以适应具体的情况、材料、物质组成、过程、过程步骤或多个步骤。所有这样的修改都意欲落入所附权利要求的范围内。

#### [0812] 实施例

[0813] 提出下列实施例,以便为本领域普通技术人员提供如何制造和使用描述的发明的完整公开内容和描述,并且不意欲限制本发明人认为的其发明的范围,也不意欲表示下面的实验是全部实验或仅被实施的实验。已经做出努力以确保关于使用的数字(例如量、温度等)的准确性,但是一些实验误差和偏差在所难免。除非另外指出,份是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,并且压力是大气压或接近大气压。

#### [0814] I. 材料和方法

##### [0815] MMI-0100药物研发

[0816] 对于MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)生产的优质生产规范(GMP),大约1kg的Fmoc-Ala-王氏树脂被转移入装备有机械搅拌器的50L玻璃固相合成反应器。树脂允许在吸干(drain)DMF前在二甲基甲酰胺(DMF)中膨胀不少于(NLT)2小时。然后利用DMF的连续漂洗来清洗树脂珠。通过DMF中20%的哌啶的处理N-端保护基团(即Fmoc)被移除(去封闭步骤),并且利用DMF清洗树脂。序列中的下一个氨基酸在存在1-羟基苯并三唑(HOBt)和二异丙基碳二亚胺(DIC)的情况下被偶联。通常,合成规模的2.5-3.5摩尔当量的Fmoc-氨基酸(Fmoc-AA)被用于偶联。Fmoc-AA溶解于DMF并且通过添加HOBt和DIC被活化。通过茚三酮检验监测每个偶联的完成。如果偶联未完成,则通过使用对称酸酐法进行利用相同氨基酸的第二次偶联。通常,合成规模的3.0-6.0摩尔当量的Fmoc-AA被用于偶联。Fmoc-AA溶解于二氯甲烷(DCM)和最小体积的DMF通过添加Fmoc-AA/DIC=1.0/0.5的摩尔比的DIC被活化。当完整的肽序列完成时,利用DMF和MeOH的连续清洗来彻底地漂洗肽树脂。树脂然后在真空下干燥不少于3小时。典型回收的总的干燥肽树脂是大约2800克,其代表~65%的肽树脂产率。

[0817] 大约370-500克的肽树脂然后被转移入装备有磁力搅拌棒的合适大小的玻璃瓶。包含肽树脂的烧瓶在冰/水浴或在冰箱中冷却不晚于30分钟。三氟乙酸(TFA)混合物(95mL:2.5mL:2.5mL的比率的TFA、TIS和水的混合物)在冰/水浴中预冷不晚于30分钟。每克树脂大约8-12mL的TFA裂解混合物被添加至此容器。一旦肽树脂和TFA混合物结合,就移除冰/水浴并且反应混合物在室温下搅拌2-3小时。反应混合物然后通过粗玻璃滤器过滤,并且利用每次清洗每克树脂0.1-1.0mL的TFA清洗树脂两次。收集合并滤液并且丢弃树脂。滤液然后以每10mL醚1mL的滤液的比率添加至在冰箱中预冷少于30分钟的醚,以沉淀裂解的肽。肽-醚混合物被平衡(equilibrate)至室温持续不晚于30分钟。在中等(medium)玻璃滤器上收集沉淀的肽。利用冷醚彻底地清洗沉淀物三次,使用足够的醚至少覆盖滤器上的全部沉淀物。醚然后通过相同的中等玻璃滤器洗脱。粗肽被转移入塑料瓶并且被放置于与机械真空泵连接的干燥器以干燥不晚于12小时。在干燥后,粗肽在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 下储存。裂解过程重复多次直到全部肽树脂被裂解。典型批量回收的总的干燥的粗肽是大约1250克,其代表大约110%的裂解产率。

[0818] 通过将肽以20mg/mL的最终粗肽浓度溶解于HPLC缓冲液,来自裂解反应的粗肽制备用于高效液相色谱(HPLC)纯化。肽溶液通过 $1\mu\text{m}$ 玻璃滤膜过滤并且被装载至由制备型HPLC系统操作的C18反相柱上。清洗和平衡柱。线性梯度用于从柱洗脱粗肽。在每次粗纯化

之后,使用Kromasil C18, 5 $\mu$ m, 100 Å 4.6×250 mm柱,通过分析型HPLC系统分析级分。基于每个级分的HPLC纯度和杂质概况,合并由初次纯化生成的级分。肽池 (peptide pool) 在2-8°C下储存直到进一步处理。此过程重复直到所有粗肽通过HPLC柱纯化并且满足主池纯度标准。通过HPLC进行醋酸盐的盐交换。最终肽溶液通过0.22 $\mu$ m过滤器过滤并且被装载至托盘冻干器上。在开始冻干周期前,肽在40°C下预冻不晚于720分钟。冻干耗费大约5天。有纯化和冻干步骤造成大约50-55%的最终产率。

[0819] 放射性测量的IC<sub>50</sub>测定

[0820] 由二分之一对数稀释液 (one-half log dilution) 的10点曲线 (10-point curve) 估算IC<sub>50</sub>值。肽供应在二甲基亚砜 (DMSO) 中。具体地,利用50mM 3-甘油磷酸钠 (pH=7.5)、0.1mM EGTA、30 $\mu$ M的底物肽 (KKLNRTLSVA; SEQ ID NO:21)、10mM醋酸镁、和90 $\mu$ M  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP (25 $\mu$ L的最终体积) 在室温下培育人重组MK2 (h) (5-10mU) 持续40分钟。然后,利用3%磷酸终止反应。10 $\mu$ L的此混合物被点至P30过滤垫 (filtermat) 上,并且利用75mM磷酸清洗三次持续五分钟和利用甲醇清洗一次。最后,膜被干燥并且使用闪烁计数器。选择ATP的表观K<sub>m</sub>在15 $\mu$ M之内的ATP浓度,因为Hayess和Benndorf (Biochem Pharmacol, 1997, 53 (9) :1239-47) 显示了它们的原始抑制肽 (即,肽KKKALNRQLGVAA; SEQ ID NO:22) 的机制不与ATP结合竞争。

[0821] 除测定MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的IC<sub>50</sub>值以外,使用Millipore的IC<sub>50</sub>Profiler Express服务 (Millipore, Billerica, MA) 测试针对266种人激酶的抑制活性。

[0822] 对于特异性分析,使用溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 的每个100 $\mu$ M的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)、MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEQ ID NO:19)、MMI-0300 (FAKLAARLYRKALARQLGVAA; SEQ ID NO:3)、MMI-0400 (KAFKLAARLYRKALARQLGVAA; SEQ ID NO:4)、和MMI-0500 (HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA; SEQ ID NO:7)。选择100 $\mu$ M浓度,因为此浓度在体内研究中抑制粘附形成 (如在2009年10月20日提交的美国申请号12/582,516中公开的,其内容通过引用以其全部并入本文)。每种激酶活性测量以一式两份实施。

[0823] 组织化学和免疫组织化学

[0824] 通过气管内施用0.025U的博来霉素/PBS至C57BL/6小鼠来生成肺纤维化的小鼠模型。从博来霉素损伤后第7天 (对于分析炎性后/纤维变性后阶段;预防模型) 或博来霉素损伤后第14天 (对于分析纤维变性后阶段;治疗模型) 开始至博来霉素递送后第21或28天,每天气管内施用或经由喷雾施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEQ ID NO:19) (以每天50 $\mu$ g/kg、75 $\mu$ g/kg和100 $\mu$ g/kg的剂量)。在博来霉素递送后第21天 (对于预防模型) 或博来霉素递送后第28天 (对于治疗模型),利用戊巴比妥钠注射 (120mg/kg) 处死一组小鼠并且打开胸腔。结扎右主支气管 (mainstem bronchus) 并且移除右肺。气管被插管并且左肺在21cm H<sub>2</sub>O压力下灌注有4%甲醛。组织块然后被包埋在石蜡中,并且制备4-mm切片用于染色。利用苏木精和伊红 (H&E) 对来自每只动物的切片进行染色以使细胞可视化,或利用马逊蓝色三色染色突出胶原沉积。在培育后,利用0.2%醋酸清洗切片,通过浸入95%乙醇脱水,并且利用染色皿中的二甲苯 (3-4次) 透明。利用有机封固剂将染色切片固定在贴标签的载玻片上。

[0825] II. 结果

[0826] 实施例1.MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的IC<sub>50</sub>和特异性。

[0827] 使用Millipore的IC<sub>50</sub>Profiler Express服务测定MK2抑制(MMI-0100; YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1))的IC<sub>50</sub>(半抑制浓度)值。此定量测定测量抑制50%的给定的生物过程或该过程的组分(即,酶、细胞或细胞受体)需要多少抑制剂[IC<sub>50</sub>]。具体地,在这些测定中,如果激酶未被抑制肽抑制,则带正电荷的底物被来自ATP的放射性标记的磷酸基团磷酸化。带正电荷的底物然后被吸引到带负电荷的滤膜,利用闪烁计数器定量,并且与100%活性对照比较。

[0828] 选择ATP的表观K<sub>m</sub>在15μM内的ATP浓度,因为靠近该K<sub>m</sub>的ATP浓度可以允许激酶具有相同的相对量的磷酸化活性。MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的IC<sub>50</sub>测定为22μM。

[0829] 除测定化合物的IC<sub>50</sub>以外,通过检查可用于在Millipore激酶概况服务中测试的全部266种人激酶的活性来评估MK2抑制肽的特异性(表1)。对于分析,测定被MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1);MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19);MMI-0300 (FAKLAARLYRKALARQLGVAA;SEQ ID NO:3);MMI-0400 (KAFKLAARLYRKALARQLGVAA;SEQ ID NO:4);和MMI-0500 (HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA;SEQ ID NO:7)抑制大于65%的激酶。

[0830] 如表1中所示,在100μM下,MK2抑制肽MMI-0100 (SEQ ID NO:1)、MMI-0200 (SEQ ID NO:19)、MMI-0300 (SEQ ID NO:3);MMI-0400 (SEQ ID NO:4);和MMI-0500 (SEQ ID NO:5)抑制具体组的激酶并且显示非常有限的脱靶激酶抑制。更具体地,MK2抑制肽MMI-0100 (SEQ ID NO:1)、MMI-0200 (SEQ ID NO:19)、MMI-0300 (SEQ ID NO:3);MMI-0400 (SEQ ID NO:4);和MMI-0500 (SEQ ID NO:5)在体外抑制促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶2(MK2)、促分裂原活化蛋白激酶-活化蛋白激酶3(MK3)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶I(CaMKI,丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶)、和BDNF/NT-3生长因子受体(TrkB,酪氨酸激酶)的大于65%的激酶活性。

[0831] 表1.激酶概况测定

[0832]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
Abl(h)	136	107	69	84	16
Abl(H396P)(h)	130	121	101	105	51
Abl(M351T)(h)	128	119	90	121	61
Abl(Q252H)(h)	105	107	82	98	40
Abl(T315I)(h)	98	108	97	105	16
Abl(Y253F)(h)	104	102	86	78	29
ACK1(h)	106	97	104	95	64
ALK(h)	118	95	19	16	12
ALK4(h)	124	152	140	130	81
Arg(h)	89	82	72	84	22
AMPK $\alpha$ 1(h)	107	108	71	87	35
AMPK $\alpha$ 2(h)	121	88	54	58	9
ARK5(h)	108	93	78	69	20
ASK1(h)	100	101	80	69	-4
Aurora-A(h)	120	107	92	119	110
Aurora-B(h)	94	166	128	150	5
Axl(h)	81	99	52	41	12

[0833]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
Bmx(h)	62	76	N/D	26	45
BRK(h)	70	127	35	18	41
BrSK1(h)	100	93	67	76	72
BrSK2(h)	129	102	83	86	84
BTK(h)	112	100	102	94	18
BTK(R28H)(h)	91	104	74	24	10
CaMKI(h)	13	21	1	0	-1
CaMKII $\beta$ (h)	58	53	2	11	3
CaMKII $\gamma$ (h)	106	94	5	3	3
CaMKI $\delta$ (h)	59	47	10	17	0
CaMKII $\delta$ (h)	89	2	1	2	1
CaMKIV(h)	87	71	17	18	-1
CDK1/细胞周期蛋白 B(h)	96	115	73	74	57
CDK2/细胞周期蛋白 A(h)	97	114	86	92	87
CDK2/细胞周期蛋白 E(h)	106	112	94	83	19
CDK3/细胞周期蛋白 E(h)	106	104	94	92	8
CDK5/p25(h)	114	97	89	92	66
CDK5/p35(h)	94	92	79	76	59
CDK6/细胞周期蛋白 D3(h)	103	100	86	85	23
CDK7/细胞周期蛋白 H/MAT1(h)	89	67	65	47	15
CDK9/细胞周期蛋白 T1(h)	228	103	91	235	6
CHK1(h)	97	115	91	87	65

[0834]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
CHK2(h)	104	105	66	54	13
CHK2(I157T)(h)	97	85	43	41	3
CHK2(R145W)(h)	97	81	33	31	3
CK1 $\gamma$ 1(h)	110	98	111	116	109
CK1 $\gamma$ 2(h)	119	104	123	114	119
CK1 $\gamma$ 3(h)	105	96	125	115	114
CK1 $\delta$ (h)	115	92	92	93	78
CK2(h)	90	83	90	101	93
CK2 $\alpha$ 2(h)	104	88	105	96	103
CLK2(h)	88	97	103	116	116
CLK3(h)	108	76	61	84	76
cKit(h)	95	110	53	43	45
cKit(D816V)(h)	117	118	60	35	30
cKit(D816H)(h)	79	106	126	143	194
cKit(V560G)(h)	94	115	102	124	198
cKit(V654A)(h)	69	113	134	150	223
CSK(h)	70	33	49	16	2
c-RAF(h)	97	115	107	102	19
cSRC(h)	70	32	26	14	30
DAPK1(h)	97	113	46	36	0
DAPK2(h)	41	92	32	16	3
DCAMKL2(h)	146	131	81	70	56
DDR2(h)	105	104	94	95	79
DMPK(h)	60	66	59	54	12
DRAK1(h)	47	34	14	14	8
DYRK2(h)	99	142	155	195	127
eEF-2K(h)	113	136	91	43	43
EGFR(h)	95	83	21	16	-1
EGFR(L858R)(h)	76	120	N/D	52	26
EGFR(L861Q)(h)	53	74	25	22	15

[0835]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
EGFR(T790M)(h)	106	113	100	106	70
EGFR(T790M,L858R)(h)	93	108	85	78	53
EphA1(h)	114	136	73	61	40
EphA2(h)	58	95	31	17	N/D
EphA3(h)	107	117	6	12	33
EphA4(h)	110	127	88	65	48
EphA5(h)	110	123	18	24	42
EphA7(h)	193	220	159	222	189
EphA8(h)	181	133	93	146	337
EphB2(h)	68	128	18	22	70
EphB1(h)	99	95	44	58	37
EphB3(h)	109	128	62	47	79
EphB4(h)	62	131	44	28	38
ErbB4(h)	73	82	40	0	2
FAK(h)	98	110	111	96	94
Fer(h)	117	101	130	108	196
Fes(h)	44	74	20	16	23
FGFR1(h)	120	97	55	59	18
FGFR1(V561M)(h)	108	72	74	74	113
FGFR2(h)	49	73	14	18	12
FGFR2(N549H)(h)	95	104	116	112	105
FGFR3(h)	73	208	102	0	10
FGFR4(h)	67	75	28	19	3
Fgr(h)	54	71	60	47	109
Flt1(h)	109	96	69	48	27
Flt3(D835Y)(h)	120	115	80	71	65
Flt3(h)	104	99	84	18	17
Flt4(h)	135	105	83	89	73
Fms(h)	89	92	45	37	14

[0836]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
Fms(Y969C)(h)	126	88	72	91	N/D
Fyn(h)	71	75	74	54	83
GCK(h)	98	99	70	66	30
GRK5(h)	117	135	136	131	116
GRK6(h)	131	132	147	141	174
GRK7(h)	111	124	122	100	93
GSK3 $\alpha$ (h)	183	119	157	164	175
GSK3 $\beta$ (h)	113	132	205	202	238
单激酶(h)	127	71	48	36	25
Hck(h)	354	107	72	72	78
活化的 Hck(h)	58	100	82	81	67
HIPK1(h)	94	115	74	91	47
HIPK2(h)	98	102	73	90	38
HIPK3(h)	105	105	93	105	85
IGF-1R(h)	102	49	119	90	117
IGF-1R(h), 活化的	126	94	80	77	45
IKK $\alpha$ (h)	108	104	93	87	50
IKK $\beta$ (h)	105	109	84	84	71
IR(h)	112	90	96	85	95
IR(h), 活化的	127	105	79	59	90
IRR(h)	85	69	8	8	10
IRAK1(h)	97	101	95	93	5
IRAK4(h)	100	110	59	59	3
Itk(h)	99	98	77	63	7
JAK2(h)	89	131	133	119	49
JAK3(h)	150	117	121	122	95
JNK1 $\alpha$ 1(h)	91	106	97	98	109
JNK2 $\alpha$ 2(h)	114	109	98	96	81
JNK3(h)	104	90	89	70	171
KDR(h)	100	110	101	94	15

[0837]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
Lck(h)	346	113	-2	228	359
活化的 Lck(h)	106	90	243	216	76
LIMK1(h)	103	109	88	92	87
LKB1(h)	111	99	101	89	51
LOK(h)	37	67	37	18	7
Lyn(h)	113	98	69	3	31
MAPK1(h)	108	97	107	100	102
MAPK2(h)	98	105	98	93	60
MAPKAP-K2(h)	19	35	5	5	9
MAPKAP-K3(h)	27	39	3	7	9
MEK1(h)	86	116	77	77	21
MARK1(h)	109	102	132	120	110
MELK(h)	74	59	16	17	0
Mer(h)	47	90	52	50	17
Met(h)	104	71	65	62	27
Met(D1246H)(h)	99	139	125	68	150
Met(D1246N)(h)	114	149	82	31	90
Met(M1268T)(h)	114	143	255	265	239
Met(Y1248C)(h)	77	141	84	36	73
Met(Y1248D)(h)	87	118	102	31	218
Met(Y1248H)(h)	88	153	117	63	126
MINK(h)	96	103	48	52	5
MKK6(h)	74	98	48	44	18
MKK7 $\beta$ (h)	137	117	100	94	102
MLCK(h)	85	103	2	1	0
MLK1(h)	77	84	40	33	43
Mnk2(h)	94	106	89	86	6
MRCK $\alpha$ (h)	98	103	104	97	5
MRCK $\beta$ (h)	103	102	83	71	-10
MSK1(h)	52	50	32	28	8

[0838]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
MSK2(h)	105	88	56	52	14
MSSK1(h)	82	100	77	75	22
MST1(h)	85	72	14	6	3
MST2(h)	98	104	19	11	2
MST3(h)	104	95	45	36	4
mTOR(h)	102	110	91	93	135
mTOR/FKBP12(h)	117	118	145	125	140
MuSK(h)	85	106	93	93	27
NEK2(h)	102	97	78	61	0
NEK3(h)	100	100	92	85	20
NEK6(h)	109	98	82	85	49
NEK7(h)	97	96	84	87	89
NEK11(h)	102	95	53	33	2
NLK(h)	100	106	87	90	19
p70S6K(h)	89	84	35	33	3
PAK2(h)	71	69	65	59	44
PAK4(h)	92	98	94	89	86
PAK3(h)	N/D	50	140	121	102
PAK5(h)	97	100	110	117	125
PAK6(h)	121	105	104	100	107
PAR-1B $\alpha$ (h)	62	110	113	109	97
PASK(h)	81	60	29	28	9
PDGFR $\alpha$ (h)	104	108	65	40	40
PDGFR $\alpha$ (D842V)(h)	103	107	114	118	170
PDGFR $\alpha$ (V561D)(h)	58	106	82	100	146
PDGFR $\beta$ (h)	116	137	81	53	40
PDK1(h)	144	143	135	159	178
PhK $\gamma$ 2(h)	62	86	46	38	16
Pim-1(h)	44	18	8	7	0
Pim-2(h)	117	74	76	92	46

[0839]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
Pim-3(h)	98	94	80	80	37
PKA(h)	138	110	119	119	118
PKB $\alpha$ (h)	140	110	57	67	30
PKB $\beta$ (h)	284	250	84	98	21
PKB $\gamma$ (h)	105	103	20	41	20
PKC $\alpha$ (h)	94	100	89	86	3
PKC $\beta$ I(h)	88	98	78	78	1
PKC $\beta$ II(h)	102	100	82	75	3
PKC $\gamma$ (h)	94	101	89	79	6
PKC $\delta$ (h)	100	101	101	90	61
PKC $\epsilon$ (h)	102	98	79	59	23
PKC $\eta$ (h)	105	101	103	98	45
PKC $\iota$ (h)	110	97	68	46	7
PKC $\mu$ (h)	79	73	22	14	10
PKC $\theta$ (h)	102	101	88	76	62
PKC $\zeta$ (h)	82	98	81	75	7
PKD2(h)	84	78	33	25	10
PKG1 $\alpha$ (h)	82	70	64	58	25
PKG1 $\beta$ (h)	71	57	50	53	24
Plk1(h)	109	128	115	119	104
Plk3(h)	107	107	127	129	122
PRAK(h)	159	115	128	118	95
PRK2(h)	72	74	33	27	7
PrKX(h)	84	112	61	76	57
PTK5(h)	135	108	132	129	96
Pyk2(h)	113	127	47	34	46
Ret(h)	108	96	140	145	174
Ret(V804L)(h)	113	100	79	73	20
Ret(V804M)(h)	92	105	95	87	36
RIPK2(h)	92	98	97	98	30

[0840]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 $\mu$ M)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 $\mu$ M)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 $\mu$ M)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 $\mu$ M)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 $\mu$ M)
ROCK-I(h)	99	117	79	73	17
ROCK-II(h)	102	85	74	77	2
Ron(h)	117	120	93	79	46
Ros(h)	107	86	95	99	150
Rse(h)	109	88	88	89	63
Rsk1(h)	86	102	46	54	34
Rsk2(h)	65	101	51	38	14
Rsk3(h)	76	109	76	71	23
Rsk4(h)	99	125	90	91	29
SAPK2a(h)	110	107	90	85	52
SAPK2a(T106M)(h)	101	100	97	99	32
SAPK2b(h)	99	95	81	82	42
SAPK3(h)	106	97	84	79	24
SAPK4(h)	98	106	96	91	48
SGK(h)	128	115	48	54	2
SGK2(h)	103	119	56	98	-1
SGK3(h)	95	58	10	8	-3
SIK(h)	113	102	66	68	40
Snk(h)	94	109	114	131	122
Src(1-530)(h)	95	75	23	19	21
Src(T341M)(h)	98	56	70	76	59
SRPK1(h)	69	93	90	96	80
SRPK2(h)	92	100	106	97	80
STK33(h)	99	98	45	52	16
Syk(h)	45	36	24	9	5
TAK1(h)	116	124	122	177	N/D
TAO1(h)	99	105	82	73	24
TAO2(h)	95	93	70	74	15
TAO3(h)	45	102	77	67	12
TBK1(h)	106	98	37	39	16

[0841]

	MMI-0100 (SEQ ID NO: 1) (100 μM)	MMI-0200 (SEQ ID NO: 19) (100 μM)	MMI-0300 (SEQ ID NO: 3) (100 μM)	MMI-0400 (SEQ ID NO: 4) (100 μM)	MMI-0500 (SEQ ID NO: 7) (100 μM)
活化的 Tec(h)	100	77	56	29	33
Tie2(h)	28	53	26	21	22
Tie2(R849W)(h)	102	89	117	108	106
Tie2(Y897S)(h)	99	85	83	87	80
TLK2(h)	113	129	114	151	133
TrkA(h)	74	N/D	25	17	24
TrkB(h)	4	7	5	8	12
TSSK1(h)	99	98	79	79	46
TSSK2(h)	107	91	98	94	92
Txk(h)	87	98	48	37	10
ULK2(h)	123	132	122	131	124
ULK3(h)	142	164	167	147	177
WNK2(h)	95	94	64	54	8
WNK3(h)	100	97	77	74	9
VRK2(h)	112	109	161	185	169
Yes(h)	49	93	67	14	N/D
ZAP-70(h)	79	58	75	33	1
ZIPK(h)	80	67	28	13	1

N/D: %活性不能重复测定。

MMI-0100: YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 1)

MMI-0200: YARAAARQARAKALNRQLGVA (SEQ ID NO: 19)

MMI-0300: FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 3)

MMI-0400: KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 4)

MMI-0500: HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEQ ID NO: 7)

[0842] 实施例2.MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:

[0843] 1) 和其功能等价物的制剂

[0844] 根据一些实施方式,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 和其功能等价物经由喷雾干燥、微粉化(例如,气流粉碎)配制为冻干粉末,或配制为用于喷雾的液体制剂。

[0845] 喷雾干燥

[0846] 在一些实施方式中,考虑到下列因素,喷雾干燥用于制备MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 和其功能等价物:

[0847] (a) 蛋白质和肽易于变性——即,破裂为三级结构并且有时破裂为二级结构;

[0848] (b) 变性可以是可逆的或不可逆的,并且可以由各种条件造成,比如温度增加、温

度降低、极端的pH、添加溶剂、压力、和剪切变性(此适用于微粉化)；

[0849] (c) 变性蛋白质是低活性和无治疗性的,有时是完全无活性的；

[0850] (d) 喷雾干燥能够将这些无定型的大分子变为具有指定的颗粒大小分布——由加工参数控制——的离散的球形颗粒；喷雾干燥颗粒可以是非常球形、环形的,并且通常是中空的,这意味着 $>5\mu\text{m}$ 的颗粒仍可以是可呼吸的,但是抵御肺中的清除机制；和

[0851] (e) 利用或不利用赋形剂的喷雾干燥通常改进蛋白质的稳定性。

[0852] MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 和其功能等价物的冻干制剂被评估用于与喷雾干燥工艺潜在协同(例如,匹配最佳湿度水平、缓冲液浓度/pH、赋形剂选择等)以确保肽稳定性的保护。

[0853] 最初的喷雾干燥运行以限定喷雾干燥操作的工艺参数为目的,目标是相互同意的验收标准。对于吸入产品,颗粒大小被认为是重要的标准。对于感兴趣区域中的肺泡沉积(II型),1-5微米的质量中值直径(MMAD)通常被接受为适于肺泡空间中的外周沉积(Heyder, J. Proc Am Thorac Soc, 1(4):315-320, 2004, 其通过引用并入本文)。其它研究已经表明1-3微米的MMAD是用于喷雾干燥工艺的期望的起始靶标颗粒大小。由于MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的可能的生物空间靶标在肺泡区域中,最初靶向大约2微米范围中的MMAD以确保沉积入肺泡空间。

[0854] 验收标准包括但不限于(1)颗粒大小(即,大约 $2\mu\text{m}$ 的 $D_{90}$ )；(2)湿度水平(即,小于3%w/w的湿度)；(3)粉末密度；和(4)表面形貌(球形、粗糙、曲面)。

[0855] 然后实施工艺设计实验以优化喷雾干燥工艺参数,包括,例如,但不限于(1)入口压力和干燥温度；(2)原料浓度和进料速率(federate)；和(3)肽/赋形剂比率(例如,赋形剂是缓冲盐和单糖)。

[0856] 实施例3. 用于持续气溶胶性能评估的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)的批量生产

[0857] 在上面描述的限定的工艺参数下进行2-3次喷雾干燥运行以生成用于气溶胶性能评估的材料。

[0858] 喷雾干燥粉末良好地适于从吸入器递送,例如,非限制性地, a微剂量吸入器。对于纯或共喷雾干燥掺和物二者,微剂量利用此配制方案常规地实现高射出剂量,和高细小颗粒级分与剂量二者。喷雾干燥胰岛素的示例性气溶胶性能显示在图1和2中。

[0859] 虽然干微粉化是小分子用于肺递送的优选的粉末生产方法,与喷雾干燥相比,它是产生压力的方法,其使用高剪切力。因为使用高剪切力可以导致蛋白质和肽的断裂,干粉末化通常不用于大分子。此外,如果剂量大小很小,则需要增量剂以改进流动性和允许填充操作中粉末的精确测量。主要的赋形剂,和仅出于此目的批准用于肺递送的赋形剂是乳糖,可能需要测试与MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或其功能等价物的化学相容性,因为乳糖与某些肽不相容。

[0860] 微粉化工艺是本领域中相当简单和熟知的。简略地, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 和其功能等价物的冻干干粉经历研磨阶段直到达到规定的目标颗粒大小分布(即, MMAD、 $D_{10}$ 、 $D_{50}$ 、 $D_{90}$ )。此纯粉末化粉末测试效能以确保其粉末化后的活性,优化用于从吸入器递送,并且在初级(热封泡罩)包装中测试其化学和物理稳定性。纯粉末然后与优先选择的批准的对于目标为肺乳糖级掺和,测试掺和均一性,

并且经历相同的吸入器优化和稳定性测试。

[0861] 微剂量干粉吸入器 (DPI)

[0862] 根据一些实施方式,可以使用干粉吸入器 (DPI) 施用 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 和其功能等价物。例如,微剂量干粉吸入器 (DPI) 具有‘主动的’压电驱动气溶胶发生器,其是呼吸驱动的并且独立于患者的吸入流量和体积实现高效率的肺递送。与需要大约40-60升/分钟 (LPM) 的用于有效肺递送的流动的强有力吸入的‘被动的’ DPI不同,微剂量DPI不需要呼吸动作 (breathing maneuver),因为它可以在低至10LPM多至90LPM的流动的流量的非常宽的范围内有效地递送,而且具有等价的性能 (参见图3和4中的性能实施例)。

[0863] 根据一些其它实施方式,可以使用潮式呼吸应用施用 MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 和其功能等价物,比如‘干粉喷雾器’ (DPN)。DPN递送干粉剂量同步于具有低至2升/分钟 (LPM) 的触发 (triggering)、5和15LPM之间期望的峰值流动和低至30ml的潮气量的吸入潮式呼吸,其是比成人IPF患者所期望的更加挑战的条件。此新型DPN已经成功地完成其第二次成人临床试验,而且在2011年11月完成其第一次研究。这些结果经由互联网在万维网 (www) URL “clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01489306?spons=Microdose&rank=1” 可获得。

[0864] 微剂量电子吸入器系统是极端灵活的构想 (formulation),可以利用喷雾干燥药物产品以特别高的效率精确地和高效地递送上面的制剂模式二者,并且已经显示此性能伴随超过30种小分子和大分子。初级包装中的喷雾干燥胰岛素,例如,可以维持至少18个月。喷雾干燥肽和微粉化小分子二者的递送性能的实施例显示在图5-8中。

[0865] 关于干粉制剂对肺膜 (pulmonary membrane) 的作用,例如,致敏、干粉递送,尤其在低粉末负载 (<4-5mg) 下,这不太可能影响肺膜或引起致敏 (咳嗽等),除非这是活性分子的固有性质 (我们在动物研究中还没有观察到)。选择已经由于卓越的肺生物相容性而被肺部批准的选择赋形剂,并且其以非常低的数量 (即,低mg范围) 存在。例如,低的数量下的甘露醇不太可能具有效果。

[0866] 液体喷雾

[0867] 可选地,可以经由液体喷雾递送MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或其功能等价物。先前的临床前研究已经显示MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 可以经由改造适于动物使用的 **AeroGen®** 喷雾器系统递送至啮齿动物。

[0868] 为了特别地处理MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的递送能力以积极地影响被危害的肺,在博来霉素动物模型功效实验中,有效地气溶胶化MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的溶液。局部的肺MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 施用通过由 **Aerogen®** (www.aerogen.com) 设计和制造的啮齿动物喷雾器装置实现。**Aeroneb®** 实验室微泵喷雾器使用用于临床前气溶胶调查吸入研究的高效气溶胶化技术,其提供了临床前和临床产品研发之间的有价值的连接。流量是>0.3ml/min,并且设计为递送2mm大小的颗粒,而且分布入最深的肺泡。已经肺纤维化的博来霉素小鼠模型中证明了雾化的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的功效和遍及肺的细胞摄取 (参见图16)。局部的、临床相关的吸入施用在减弱MK2活化中等效于常规的全身注射。

[0869] 实施例4.活化的MK2的水平在患有特发性肺纤维化 (IPF) 的患者肺的纤维变性病变中增加

[0870] 促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK)-活化蛋白激酶2 (MK2) 在通过p38MAPK- $\alpha$ 和 $\beta$ 的应激之后被活化。p38MAPK的这两种同种型与MK2的羧基端中的碱性停靠基序 (basic docking motif) 结合,其随后磷酸化其调节位点。由于活化,MK2从细胞核输出至细胞质并且协同转运活性p38MAPK至此区室。MK2稳定p38MAPK定位并且对分化、迁移和细胞因子产生至关重要 (Kotlyarov, A., Mol Cell Biol. 22 (13):4827-4835, 2002)。

[0871] 因此,为了检查p38MAPK-MK2信号传导途径在受IPF影响的肺中是否活化,利用针对MK2 (抗磷酸化-Thr<sup>334</sup>-MAPKAPK2) 的活化形式的磷酸化-特异性抗体对从正常和IPF患者获得的肺切片进行染色。使用DAB对正常肺和IPF肺组织进行免疫染色,并且利用苏木精复染细胞核。如图9中所示,与正常肺活检组织 (左) 相比,在来自患有IPF的肺组织外植体的纤维变性病灶中的细胞中观察到增加表达的活化的MK2。这些结果表明IPF患者的肺中的纤维化形成表征为p38MAPK-MK2信号传导途径的异常活化。

[0872] 实施例5.雾化和全身施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 防护小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化。

[0873] 特发性肺纤维化 (IPF) 的标志之一是间充质细胞的活化和基质的——特别是胶原——的丰富沉积。可以通过组织学和生物化学技术二者测量肺中胶原的由此导致的积聚,最显著地经由羟脯氨酸的积聚,其几乎完全源自肺中的胶原,并且因而充当整体肺胶原含量的替代物 (Umezawa H. 等, Cancer, 20 (5):891-895, 1967)。

[0874] 因此,通过在预防或预纤维变性阶段期间全身地 (腹膜内) 或局部地 (经由雾化给药) 递送MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 肽 (即,从博来霉素损伤后第7天开始的药物施用;参见图10) 和通过测量作为博来霉素小鼠中的纤维化指数的胶原水平,使用博来霉素诱导的肺纤维化的小鼠模型,评估MMI-0100肽 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 对治疗肺纤维化的疗效。

[0875] 简略地,通过气管内递送大约0.025U的博来霉素 (溶解于PBS) 至C57BL/6小鼠来诱导小鼠的肺中的纤维变性位置。为了检查MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 在预防/预纤维变性期中的博来霉素损伤的肺的治疗的功效,从博来霉素递送后第7天 (当炎症消退和纤维变性机制被激活时) 开始直到博来霉素递送后第21天 (当观察到显著的纤维化时) (图10),每天腹腔内施用或经由喷雾施用对照 (PBS) 或MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)。在博来霉素递送后第21天,来自利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或对照 (PBS) 处理的博来霉素小鼠的肺组织被分离、固定、包埋在石蜡中、并且切片用于染色。简略地,利用戊巴比妥钠注射 (120mg/kg) 处死小鼠并且打开胸腔。结扎右主支气管并且移除右肺。气管被插管并且左肺在21cm H<sub>2</sub>O压力下灌注有4%甲醛。组织块然后被包埋在石蜡中,并且制备4-mm切片,并且利用苏木精和伊红 (H&E; 用于病理学检查) 或利用马逊三色 (用于胶原染色) 进行染色。

[0876] 如图11中所示,来自PBS处理的小鼠的肺切片展示出正常肺结构 (NL) 和气道 (AW)。相比之下,来自博来霉素小鼠 (第21天) 的肺切片揭示出变窄的气道 (AW) 结构,其具有肺组织中纤维变性病灶 (FF) 的形成 (上图板; 苏木精和伊红 (H&E) 染色) 和增加积聚的胶原 (下图板中的箭头; 马逊三色染色), 其令人联想起在IPF患者中发现的那些。然而,经由喷雾施用

或腹膜内施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 在博来霉素小鼠的肺中显著地减少纤维变性位置形成的发展(上图板,MMI-0100 (NEB) 和MMI-0100 (IP)) 和减少胶原积聚(下图板,MMI-0100 (NEB) 和MMI-0100 (IP))。

[0877] 接着,通过计算来自羟脯氨酸浓度的胶原的常量转化因子(7.5),定量地分析博来霉素损伤的小鼠的肺中的总胶原水平(图12) (Neuman R.和Logan M,JBiol Chem.,186(2):549-56,1950,其通过引用并入)。如图12中所示,在炎症后/预纤维变性阶段期间,与博来霉素对照相比,喷雾(BLEO+NEBULIZED) 和全身(BLEO+IP) 施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 二者显著地降低胶原沉积。

[0878] 实施例6.MK2肽抑制剂在特发性肺纤维化预防模型中的剂量应答数据

[0879] 接着,使用特发性肺纤维化的博来霉素小鼠模型(预防模型),体内检查增加剂量的MK2肽抑制剂对的胶原沉积的作用。简略地,C57-BL/6小鼠在第0天经历博来霉素损伤。从第7天开始和持续至第21天,小鼠经由腹膜内(IP) 注射每天施用25、50或75 $\mu$ g/kg的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 或MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19)。如图13中所示,马逊蓝色三色染色揭示出利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 处理的博来霉素损伤的小鼠的肺中的胶原水平的降低,这表明MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 可以以剂量依赖的方式预防由于博来霉素损伤造成的肺中的纤维化。这些数据表明MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 甚至在较高的剂量下保持其作为纤维化预防性(fibroprotective) 化合物的潜能。

[0880] 相比之下,利用MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19) 处理博来霉素损伤的小鼠在测试的剂量下没有减少,反而增加肺中的胶原沉积。然而,此结果与涉及MK2基因敲除小鼠和MK2<sup>-/-</sup>小鼠胚胎成纤维细胞(MEF) 的先前研究一致,其中所有MK2活性被消除,其展示出恶化的纤维化表型(Liu等.,AmJRespir Cell Mol Biol,37:507-517,2007)。

[0881] 不受限于理论,这些结果表明(1) 描述的发明的MK2抑制肽可以展示出针对具体组的激酶的抑制活性谱;(2) MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 和MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19) 可以区别地抑制MK2和其它激酶,这取决于应用的剂量,其有助于此抑制活性谱;(3) 成肌纤维细胞形成和/或迁移也可能是纤维化的修复期的一部分,而不是纤维化的活性伤害;和(4) 某一水平的MK2活性因此对发生的该过程是必需的(Liu等.,AmJ Respir Cell Mol Biol,37:507-517,2007)。

[0882] 此外,描述的发明的MK2抑制肽源自MK2下游靶标HSPB1的底物结合位点。因此,它们可以竞争性抑制MK2向HSPB1的激酶活性。不受限于理论,MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19) 对纤维化的差异效应可以归因于其序列差异、其与HSPB1结合位点的同源性、其对MK2激酶活性向不同的靶蛋白结合位点的差异抑制、或其组合。

[0883] 实施例7.施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 有效地阻断特发性肺纤维化预防模型中的系统性T-细胞活化

[0884] 最近的研究强调了T淋巴细胞在博来霉素诱导的纤维化中的关键作用(Wilson,M.等,TheJournal of Experimental Medicine,207(3):535-552,2010)。因此,为了调查脾(全)T细胞在利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1) 处理的博来霉素损伤

的小鼠中的功能性作用,自体混合淋巴细胞反应 (MLR) 如先前描述的进行 (Wilkes, D. 等, *Journal of Leukocyte Biology*, 64 (5) :578-586, 1998, 其通过引用并入本文)。具体地,在测定中检查C57BL/6纯化抗原呈递细胞诱导C57BL/6T淋巴细胞中的增殖的能力。

[0885] C57-BL/6小鼠在第0天经历博来霉素损伤。在第7天直到第21天,小鼠通过腹膜内 (IP) 注射或喷雾器 (NEB) 每天施用50 $\mu$ g/kg/天的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1)。脾T细胞被分离,和单独地或在存在自体抗原呈递细胞 (来自C57-BL/6小鼠的APC) 的情况下培养或利用针对CD3 ( $\alpha$ -CD3) 的抗体刺激48h。然后,利用磨碎的腺苷放射性标记细胞16h并且评估增殖速率。

[0886] 如图14中所示,T细胞单独地——不管如何处理——展示出非常低的增殖能力。然而,当T细胞与自体抗原呈递细胞 (即,从C57-BL/6小鼠分离的APC) 时,博来霉素损伤的小鼠的增殖能力比对照小鼠高。有趣地,在存在抗原呈递细胞的情况下看到的来自博来霉素处理的小鼠的T细胞的增殖通过全身施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 显著地减少,但是如期望的,不是通过吸入模式。这些数据表明MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 对脾T细胞活化的抑制,并且指示肽MK2抑制剂为纤维化预防性的。

[0887] 还通过利用针对 $\alpha$ -CD3的抗体——多克隆T细胞活化剂——刺激细胞来确认T细胞的生存能力。不论处理组, $\alpha$ -CD3诱导细胞的强健增殖。对多克隆活性剂的增殖反应表明MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 肽抑制剂不影响脾T细胞的功能性质,并且在此特定剂量下施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 不存在毒性。此外,缺少对雾化的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 的脾T细胞应答表明在此肽递送模式的情况下发生的极少的全身分布。

[0888] 实施例8. 全身或雾化的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理在纤维变性后阶段保护博来霉素损伤的肺

[0889] 如图10中描述的,典型的博来霉素模型已经广泛地用于预纤维变性阶段中的文献中以测试任意介入的功效。由于雾化和全身施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 二者显著地保护肺免于博来霉素诱导的纤维化,在纤维变性后阶段进一步检查全身 (腹膜内) 或局部 (雾化) 施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 在治疗博来霉素损伤的肺中的作用,药物介入在第14天开始,这是当肺被显著地纤维化的时间点 (图15) (Pottier, N. 等, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176 (11) :1098-1107, 2007, 其通过引用并入本文)。此模型中显示的疤痕化肺的救护是临床相关的,只要IPF患者的肺在诊断时已经是疤痕化的。

[0890] 更具体地,通过气管内递送大约0.025U的博来霉素 (溶解于PBS) 至C57BL/6小鼠来诱导肺中的纤维变性位置。为了检查MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 在预纤维变性后阶段中的博来霉素损伤的肺的治疗的功效,从博来霉素递送后第14天开始直到博来霉素递送后第28天,每天腹腔内施用或经由喷雾施用对照 (PBS) 或MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 至小鼠。在博来霉素递送后第28天,利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或对照 (PBS) 处理的博来霉素小鼠的肺组织被分离、固定、包埋在石蜡中、并且切片用于染色。利用戊巴比妥钠注射 (120mg/kg) 处死小鼠并且打开胸腔。结扎右主支气管并且移除右肺。气管被插管并且左肺在21cm H<sub>2</sub>O压力下

灌注有4%甲醛。组织块然后被包埋在石蜡中,并且制备4-mm切片,并且利用苏木精和伊红(H&E;用于病理学检查)或利用马迹三色(用于胶原染色)进行染色。

[0891] 如图16中所示,不管药物施用的模式,即,无论腹膜内递送或局部应用至肺,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理“救护”严重疤痕化肺。采用组织学评估检查肺架构(苏木精和伊红(H&E)染色,上图板)和胶原分布(马迹蓝色三色染色,下图板)。组织化学结果显示虽然博来霉素损伤的肺是严重疤痕化的,但是MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理的小鼠具有更光洁的肺实质。

[0892] 接着,通过使用整个左肺的标准的羟脯氨酸测定来定量地测定胶原沉积。通过分析博来霉素损伤后第28天的鼠肺中的羟脯氨酸浓度来评估总胶原(可溶的和不可溶的)沉积。从博来霉素损伤后第14天开始,通过腹膜内注射(IP)或喷雾器(NEB)以50 $\mu$ g/kg/天的剂量施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEQ ID NO:1))。

[0893] 如图17中所示,与基线相比,在博来霉素损伤后第28天和开始MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理时,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理显著地停滞胶原沉积的进一步进展。这是显著的,因为虽然当前的文献显示了药物研发中的有效预防,但是当IPF患者被诊断时,存在已经存在的纤维化。这些结果还表明MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)具有有效地停止或减慢疾病的进一步进展和改善生活质量的潜能;并且MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)肽——如果在较高的剂量下使用和/或持续更长的治疗周期——可以导致肺组织学和病理学中甚至更大的改善,并且减少纤维化。

[0894] 实施例9.全身或局部施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)与特发性肺纤维化的博来霉素小鼠模型中减少活化的MK2相关

[0895] 如上面讨论的,MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)和其功能等价物在肺中的主要靶标之一是MK2激酶,其在受影响的肺中引发炎性和纤维变性反应。因此,为了进一步验证MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)的体内作用,在未处理的博来霉素损伤的小鼠以及MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)处理的小鼠中检查活化的MK2(磷酸化-Thr<sup>334</sup>-MAPKAPK2)的水平。

[0896] 简略地,C57-BL/6小鼠在第0天经历博来霉素损伤。在博来霉素损伤后第14天直到第28天,小鼠通过腹膜内(IP)注射或喷雾器(NEB)每天施用50 $\mu$ g/kg的MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)。福尔马林固定的肺组织切片针对磷酸化-Thr<sup>334</sup>MK2进行免疫染色。对照染色利用生物素化的二次IgG抗体。链亲和素缀合的辣根过氧化物酶与3,3'-二氨基联苯胺一起用作底物,并且利用苏木精复染细胞核。然而,博来霉素小鼠显示了如果不处理活化的MK2存在(黑色结节)中可视的增加,最特别地在显著的胶原沉积的区域中,利用MMI-0100处理的小鼠展示出与正常组织相似的活化的MK2存在,而且这样的分布集中于外周气道和血管区域。

[0897] 如图18中所示,不论递送模式,即,或者全身施用或者局部施用,与对照相比,雾化或气管内施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)与博来霉素小鼠模型中降低的磷酸化-Thr<sup>334</sup>-MAPKAPK2染色(MK2的活化形式)相关联。

[0898] 实施例10.MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)下调特发性肺纤维化治疗模型中的炎性细胞因子

[0899] MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 可以通过其抑制肺中的纤维化形成的一种潜在机制是通过降低促炎细胞因子的局部浓度,并且从而制止单核细胞的募集和通过肺中的巨噬细胞的细胞外重构(例如,增加胶原沉积、增加细胞粘附和迁移、降低基质降解)。为了探索这种可能性,通过在利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 腹膜内治疗或经由喷雾治疗后测量白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平的变化,检查MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 肽抑制促炎细胞因子的产生的能力。

[0900] 白介素-6 (IL-6) 是多功能细胞因子,其主要作用包括免疫球蛋白合成的增强、T细胞的活化、和急性期蛋白质合成的调节。已经许多不同类型的细胞产生IL-6,包括单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞,并且这些细胞中IL-6基因的表达由各种诱导物调节。白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 是IL-6基因表达的两种关键的已知诱导物。其它诱导物包括蛋白激酶C的活化剂、钙离子载体A23187、和引起细胞内环AMP (cAMP) 水平升高的多种药剂。

[0901] 肿瘤坏死因子 (TNF, 也称为TNF- $\alpha$ ) 是参与系统性炎症的细胞因子,并且是刺激急性期反应的细胞因子组的成员。研究已经显示TNF- $\alpha$  经由细胞内部三种不同的信号传导途径诱导IL-6的表达,即,1) NF- $\kappa$ B途径、2) MAPK途径、和3) 死亡信号传导途径。

[0902] 如图20中所示,在特发性肺纤维化的博来霉素小鼠模型中,气管内 (BLEO+MMI-0100 (IP)) 或雾化 (BLEO+MMI-0100 (NEB)) 施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 显著地减少TNF- $\alpha$  (A, 上图板) 和IL-6 (B, 下图板) 二者的血浆水平。

[0903] 实施例11. 全身或局部施用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 有效地阻断由博来霉素损伤造成的显著疤痕化鼠肺中的成肌纤维细胞活化积聚。

[0904] 特发性肺纤维化 (IPF) 的标志是纤维变性病变处成肌纤维细胞的积聚和丰富的 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) ——成肌纤维细胞活化的标志物——的表达。此外,活化的成肌纤维细胞部分地负责肺实质的僵化和肺功能的恶化。

[0905] 因此,在利用MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 全身(经由腹膜内施用) 或局部(经由喷雾) 处理的博来霉素损伤的小鼠的肺中评估博来霉素损伤的肺中 $\alpha$ -SMA的表达水平。如图21中所示,与未处理的博来霉素损伤的肺中 $\alpha$ -SMA的水平相比, $\alpha$ -SMA的水平在MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 处理的肺中被显著地减弱。

[0906] 实施例12. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 在调节TGF- $\beta$ 1诱导的成肌纤维细胞活化中的体外剂量应答研究

[0907] 特发性肺纤维化 (IPF) 的主要标志是存在非典型和凋亡上皮细胞,连同分泌旺盛量的基质蛋白——包括胶原、纤连蛋白和基质金属蛋白酶——的活化的成肌纤维细胞 (Horowitz, J和Thannickal, V., *Treatments in Respiratory Medicine*, 5 (5):325-42, 2006)。在正常创伤愈合过程中,临时性基质由成肌纤维细胞形成为暂时支架。临时性基质的收缩导致随后的再上皮化和最终的创伤愈合。然而,当活化的成肌纤维细胞耐受凋亡时,由此导致的旺盛的胶原沉积导致基质的稳定化 (Tomasek, J. 等, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3 (5):349-63, 2002)。未受抑制的成肌纤维细胞增殖、活化和耐受凋亡的最终结果导致纤维变性病变以及由胶原沉积造成的稳定的基质,并且因而导致最终畸变的肺架构 (Yamashita, C. 等, *The American Journal of Pathology*, 179 (4):1733-

45,2011)。

[0908] 因此,由于成纤维细胞是参与疤痕形成的关键细胞,所以通过检查在利用TGF- $\beta$ 处理的培养的人胚胎肺成纤维细胞(IMR-90细胞)中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和纤连蛋白的蛋白质水平,评估MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)对成肌纤维细胞活化的作用。如图22和23中所示,MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)以剂量依赖的方式有效地防止由TGF- $\beta$ 诱导的成肌纤维细胞活化,如由 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)(图22)和纤连蛋白(图23)二者的水平的降低显示的。

[0909] 相比之下,如由成肌纤维细胞活化标志物 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(图21)和纤连蛋白(图23)的蛋白质水平中无变化指示的,测试剂量下的MMI-0200(YARAAARQARAKALNRQLGVA;SEQ ID NO:19)不影响TGF- $\beta$ 介导的成肌纤维细胞活化。不受限于理论,这些结果表明(1)描述的发明的MK2抑制肽可以展示出针对具体组的激酶的抑制活性谱;(2)MMI-0100(SEQ ID NO:1)和MMI-0200(SEQ ID NO:19)可以区别地抑制MK2和其它激酶,这取决于应用的剂量,其有助于此抑制活性谱;(3)可能存在调节 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的代偿途径;(4)成肌纤维细胞形成和/或迁移也可能是纤维化的修复期的一部分,而不是纤维化的活性伤害;和(4)某一水平的MK2活性因此对发生的该过程是必需的(Liu等.,Am J Respir Cell Mol Biol, 37:507-517,2007)。

[0910] 此外,描述的发明的MK2抑制肽源自MK2下游靶标HSPB1的底物结合位点。因此,它们可以竞争性抑制MK2向HSPB1的激酶活性。不受限于理论,MMI-0200(SEQ ID NO:19)对纤维化的差异效应可以归因于其序列差异、其与HSPB1结合位点的同源性、其对MK2激酶活性向不同的靶蛋白结合位点的差异抑制、或其组合。

[0911] 实施例12.MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)和MMI-0100联合抗病毒剂例如索非布韦(Sovaldi®)对鼠肝纤维化模型中的肝纤维化的功效

[0912] 诱导实验性肝炎症和纤维蛋白生成的最常用的方法是在小鼠中周期性施用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)(Liedtke C,等,Fibrogenesis&Tissue Repair,2013;6:19)。CCl<sub>4</sub>模型与人肝纤维化的所有重要性质类似,包括炎症、再生、纤维形成和潜在地纤维化消退(Liedtke C,等,Fibrogenesis&Tissue Repair,2013;6:19;Heindryckx F,等,Int.J.Exp.Pathol., 2009;90:367-386;Iredale J P,等,J.Clin.Invest.,1998;102:538-549;Kisseleva T,等,PNAS,2012;109:9448-9453)。大多数研究仍依赖于CCl<sub>4</sub>模型以在小鼠中诱导毒性肝纤维化,这是由于其与众多先前出版物良好的相似性、卓越的再现性和对动物温和的负担(Liedtke C,等,Fibrogenesis&Tissue Repair,2013;6:19)。

[0913] 可以从Charles River Laboratories(Wilmington,MA)获得无病原体的8-10周龄雌性BALB/c小鼠。小鼠可以划分为三组:第1组接受MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)或功能等价物;第2组接受MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)或功能等价物+索非布韦(Sovaldi®)、HCV促进的蛋白酶抑制剂(ABT-450,AbbVie)、非核苷NS5B抑制剂(达卡他韦,ABT-333,AbbVie)、NS5a抑制剂(ombitasvir,ABT-267,AbbVie)、ABT-450/r(ABT-450以及利托那韦)、与ABT-267共配制的ABT-450、或与索非布韦一起配制的ABT-450、病毒唑或组合中的一种。第3组接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)(对照组)。小鼠可以每周腹腔内注射CCl<sub>4</sub>(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)(0.5至2mL/kg体重,以玉米油稀释)二至三次持续4至6周。在CCl<sub>4</sub>注射时,第1组小鼠可以腹腔内施用100 $\mu$ L PBS中的MMI-0100或

功能等价物(例如,3、30、100、300ng/kg);第2组小鼠可以腹腔内施用100 $\mu$ L PBS中的MMI-0100或功能等价物+抗病毒剂(例如,3、30、100、300ng/kg);和第3组小鼠可以腹腔内施用100 $\mu$ L PBS。可以贯穿研究的持续期间收集样品(例如,可以在每次腹腔内注射之前立即从尾静脉收集血液样品)。在研究结束时,小鼠可以被麻醉并且在处死之前收集血液和肝组织样品,以便测定MMI-0100或功能等价物和MMI-0100或功能等价物+抗病毒剂对肝纤维化的作用。

[0914] 例如,肝功能可以通过根据制造商的指导(例如,Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),使用商业上可获得的试剂盒测量丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、 $\gamma$ -谷氨酸转氨酶(GGT)和白蛋白的血清水平来测定。

[0915] 例如,通过羟脯氨酸含量、组织学和免疫组织化学、和促纤维化和炎性生物标志物的mRNA表达,可以在肝组织中评估肝纤维化的水平。

[0916] 可以以下列方式测定肝组织样品的羟脯氨酸含量。100mg的肝样品可以在110 $^{\circ}$ C下在6M HCl中水解24小时。接着,样品在48 $^{\circ}$ C、2,000rpm下离心5分钟。收集2mL的上清液并且与50mL的1%酚酞和8N KOH混合至pH 7-8。5mL样品可以经受560nm下的分光光度计以测定羟脯氨酸含量。

[0917] 组织学和免疫组织化学可以如下进行。肝组织可以在10%中性缓冲甲醛中固定并且包埋在石蜡中。可以使用马迹三色(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)和高碘酸-希夫(PAS)染色(Millipore,Billerica,MA)使石蜡切片染色以检验胶原沉积。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和胶原蛋白的特异性染色可以使用抗- $\alpha$ -SMA和抗-胶原I和III抗体进行(分别为R&D Systems,Minneapolis,MN;EMD Millipore,Billerica,MA;和abcam,Cambridge,MA)。可以取得使用马迹三色——胶原I、胶原III和 $\alpha$ -SMA染色的肝切片的X100-放大倍数的显微图像。图像可以三个通道(红色、绿色和蓝色)上以每个像素24位被编码并且可以在图像上进行由马迹三色——胶原I、胶原III和 $\alpha$ -SMA揭示的纤维化修饰的百分比的定量评价。可以使用ImageJ(Wyne Rasband,National Institutes of Health,Bethesda,MD)和Matlab(The MathWorks Inc.,Natick,MA)处理彩色图像以产生仅显示由马迹三色——胶原I、胶原III和 $\alpha$ -SMA染色的区域的图谱。图谱可以定义为与在肝的ECM中沉积的纤维化组分(一种或多种)对应的染色区域。纤维化的生物标志物指数(BIF)可以计算为生物标志物(例如,马迹三色——胶原I、胶原III和 $\alpha$ -SMA)的图谱占整个图像的百分比,如由Salazar-Montes,等(European Journal of Pharmacology,2008;595(1-3):69-77)和Salgado,等(Molecular Therapy,2000;2:545-551)描述的。

[0918] 促纤维化和炎性生物标记物——包括MCP-1、胶原1 $\alpha$ 1、胶原3 $\alpha$ 1、TGF $\beta$ 、纤连蛋白-1、 $\alpha$ -SMA和结缔组织生长因子-1(CTGF-1)——的mRNA表达可以根据制造商的指导通过Luminex<sup>®</sup>(Life Technologies,Carlsbad,CA)测定进行评估。相对表达可以被归一化为次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)。

[0919] 数据可以表达为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)。可以使用计算机软件比如GraphPad Prism<sup>®</sup>(GraphPad Software,Inc.,San Diego,CA)进行统计学分析。组之间的处理差异可以通过未配对的t检验和ANOVA进行分析。

[0920] 实施例13.MMI-0100(YARAAARQARAKALARQLGVAA;SEQ ID NO:1)对鼠肾纤维化模型中的肾纤维化的功效

[0921] 越来越多使用和流行的肾纤维化的动物模型是完全性单侧输尿管梗阻 (UUO) (Cho M H, Korean J. Pediatr. 2010; 53 (7) : 735-740)。UUO程序具有如下优势:它以加速的方式模拟导致肾小管间质性纤维化——细胞浸润、肾小管增殖和凋亡、上皮细胞-间充质细胞转化 (EMT)、(肌)成纤维细胞积聚、增加的细胞外基质 (ECM) 沉积和肾小管萎缩——的人阻塞性肾病的不同阶段 (Bascands J-L和Schanstra J P, Kidney Int. 2005; 68 (3) : 925-937)。这些病理学特征快速出现 (所有均在UUO程序后大约1周内) 并且是从一个实验至另一个实验高度可再现的 (Bascands J-L和Schanstra J P, Kidney Int. 2005; 68 (3) : 925-937)。

[0922] 可以从Charles River Laboratories (Wilmington, MA) 获得无病原体的7-8周龄雄性CD-1小鼠。小鼠可以划分为三组:第1组接受MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或功能等价物;第2组接受磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (对照组);第3组经历假手术 (即, 没有结扎) 并且接受PBS。UUO可以如Yamashita等 (Journal of the American Society of Nephrology 2004; 15 (1) : 91-101) 描述的进行。简而言之, 在通过腹腔内注射戊巴比妥 (50mg/kg体重) 诱导全身麻醉后, 腹腔可以经由中线切口被暴露并且右侧输尿管可以使用4-0丝线在三个点处被结扎。从第0天至第5天, 第1组小鼠可以腹腔内施用100 $\mu$ L PBS中的MMI-0100或功能等价物 (例如, 3、30、100、300ng/kg)。第2组和第3组小鼠可以腹腔内施用100 $\mu$ L PBS。可以贯穿研究的持续期间收集样品 (例如, 可以在每次腹腔内注射之前立即从尾静脉收集血液样品)。在第5天, 小鼠可以被麻醉并且在处死之前收集血液和肾组织样品, 以便测定MMI-0100或功能等价物对肾纤维化的作用。可以通过观察骨盆和近端输尿管的扩张和远端输尿管的塌缩确认UUO。没有结扎的假手术的肾可以被用作对照。

[0923] 研究终点可以包括, 例如, 体重和肾重; 经由苦味酸天狼星红染色 (Polysciences, Inc., 目录号24901-250, Warrington, PA) 的组织学定量图像分析 (例如, 使用200 $\times$ 下的光学显微术以盲方式 (blinded fashion) 获得和评估十张图像/深度/肾, 以使得能够取样60-70%的肾皮质区) 评价和通过表达为跨越来自阻塞的肾的三个结构学上不同 (例如, 相距200-250 $\mu$ m) 的组织切片或深度的平均阳性染色的复合胶原体积分数 (CVF (成像的总面积%)) 评分定量的阻塞的肾中的纤维化; 通过生物化学分析评估的冷冻肾皮质组织活组织检查的羟脯氨酸含量; 和根据制造商的指导通过Luminex<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA) 测定的促纤维化和炎症生物标志物比如MCP-1、胶原1 $\alpha$ 1、胶原3 $\alpha$ 1、TGF- $\beta$ 、纤连蛋白-1、 $\alpha$ -SMA和结缔组织生长因子-1 (CTGF-1) 的mRNA表达, 其中相对表达归一化为次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT)。

[0924] 数据可以表达为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差 (SEM)。可以使用计算机软件比如GraphPad Prism<sup>®</sup> (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 进行统计学分析。组之间的处理差异可以通过未配对的t检验和ANOVA进行分析。

[0925] 实施例14. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 对自发性高血压大鼠 (SHR) 中的血管纤维化的功效

[0926] 自发性高血压大鼠 (SHR) 一般用于研究血管纤维化 (Gao D等, PPAR Res. 2012; 2012:856426)。对于此研究, 可以从Charles River Laboratories (Wilmington, MA) 获得8-10周龄雄性SHR和年龄相一致的雄性Wistar Kyoto (WKY) 大鼠。SHR可以接受MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或功能等价物 (第1实验组); WKY大鼠 (第1对照组) 可以接受MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEQ ID NO:1) 或功能等价物; 和SHR大鼠

可以仅接受媒介物 (PBS) (第2对照组)。第1实验组和第1对照组大鼠可以腹腔内施用100 $\mu$ L PBS中的MMI-0100或功能等价物 (例如, 3、30、100、300ng/kg); 第2对照组大鼠可以仅接受媒介物。可以贯穿研究的持续期间收集样品 (例如, 可以在每次腹腔内注射之前立即从尾静脉收集血液样品)。在研究结束时, 大鼠可以被麻醉并且在处死之前收集血液和血管组织样品, 以便测定MMI-0100或功能等价物对血管纤维化的作用。

[0927] 例如, 促纤维化和炎性生物标记物——包括PPAR $\gamma$ 、MCP-1、胶原1a1、胶原3a1、TGF $\beta$ 、纤连蛋白-1、 $\alpha$ -SMA和结缔组织生长因子-1 (CTGF-1) ——的mRNA表达可以根据制造商的指导通过Luminex<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA) 测定进行评估。相对表达可以被归一化为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)。

[0928] 可以例如通过蛋白质印迹评估包括CTGF和TGF- $\beta$ 的促纤维化生物标志物的蛋白表达。简而言之, 蛋白质样品 (20 $\mu$ g) 可以在10% SDS-PAGE上被分辨, 在半干系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 中转移至聚偏氟乙烯膜并且使用抗CTGF (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、TGF- $\beta$  (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 和 $\beta$ -肌动蛋白 (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 的抗体培育。蛋白质可以通过化学发光 (Pierce Corp., Rockford, IL) 被可视化和使用Gel Doc 2000 系统 (Bio-Rad) 被量化。

[0929] 包括PARA $\gamma$ 和III型胶原 (Col III) 的促纤维化生物标志物的蛋白表达可以例如通过免疫组织化学被评估。简而言之, 石蜡包埋的大鼠胸主动脉切片可以使用抗PPAR $\gamma$  (1:300) (Upstate Inc., Chicago, IL) 和Col III (1:250) (Upstate Inc., Chicago, IL) 的初次抗体在40 $^{\circ}$ C下培育过夜, 并且然后使用生物素化的和亲和纯化的IgG (Zymed USA) 二次抗体在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。链亲和素-酶缀合物可以顺序地添加持续20min, 并且样品可以使用底物3', 3'-二氨基联苯胺 (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 培育, 接着进行苏木精复染 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。可以使用Qwin 550定量图像分析系统 (Leica, Germany) 通过测量灰度进行定量分析。阴性对照可以包括未使用初次抗体培育的石蜡包埋的切片。

[0930] 数据可以表达为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差 (SEM)。可以使用计算机软件比如GraphPad Prism<sup>®</sup> (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 进行统计学分析。组之间的处理差异可以通过未配对的t检验和ANOVA进行分析。

[0931] 虽然已经参考其具体实施方案描述了描述的发明, 但是本领域技术人员应当理解, 可以做出多种改变并且可以进行等价物替换, 而不背离本发明的真实精神和范围。此外, 对于描述的发明的客观精神和范围, 可以进行很多修改以适应具体的情况、材料、物质组成、过程、过程步骤或多个步骤。所有这样的修改都意欲落入所附权利要求的范围内。

## 序列表

- <110> 莫伊莱麦屈克斯公司  
 <120> 用于预防或治疗表征为异常的成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积的疾病、状况或过程的组合物和方法  
 <130> 17456.0054  
 <150> US 62/080,784  
 <151> 2014-11-17  
 <160> 29  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 未知  
 <220>  
 <223> 哺乳动物  
 <400> 1

[0001] Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg  
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala  
 20

- <210> 2  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 未知  
 <220>  
 <223> 哺乳动物  
 <400> 2

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala  
 1 5 10

- <210> 3  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 未知  
 <220>  
 <223> 哺乳动物

<400> 3

Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Arg Gln  
1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Ala  
20

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 4

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala  
20

[0002]

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 5

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg  
1 5 10 15

Gln Leu Ala Val Ala  
20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 6

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg  
1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala  
20

<210> 7  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 7

His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile Lys Ala Leu Ala Arg  
1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala Ala  
20

[0003] <210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 8

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 9

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala  
1 5 10

<210> 10  
<211> 11

<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 10

Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala  
1 5 10

<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 11

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala  
1 5 10

[0004] <210> 12  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 12

Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala  
1 5 10

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 13

Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala  
1 5

<210> 14  
<211> 11

<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 14

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 15  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 15

Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile  
1 5 10

[0005]

<210> 16  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 16

Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg  
1 5 10

<210> 17  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 17

Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg  
1 5 10

<210> 18  
<211> 11

<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 18

His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile  
1 5 10

<210> 19  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 19

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg  
1 5 10 15

[0006] Gln Leu Gly Val Ala  
20

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 20

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5

<210> 21  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 未知

<220>  
<223> 哺乳动物

<400> 21

Lys Lys Leu Asn Arg Thr Leu Ser Val Ala  
1 5 10

<210> 22  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 哺乳动物

<400> 22

Lys Lys Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 哺乳动物

<220>  
 <221> 不能用任何其它的特征关键词表述的具有生物学意义的区域  
 <222> (3)..(12)  
 <223> 其中"Xaa's"代表任何氨基酸和具有10个残基的长度的氨基酸的序列。

[0007]

<400> 23

Lys Lys Xaa Lys Arg Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys

<210> 24  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 哺乳动物

<400> 24

Leu Leu Lys Arg Arg Lys Lys  
 1 5

<210> 25  
 <211> 6

- <212> PRT  
 <213> 未知  
  
 <220>  
 <223> 哺乳动物  
  
 <220>  
 <221> 不能用任何其它的特征关键词表述的具有生物学意义的区域  
 <222> (1).. (1)  
 <223> 其中"Xaa"代表选自Val、Ile、Leu、Met和Phe的大体积疏水残基。  
  
 <220>  
 <221> 不能用任何其它的特征关键词表述的具有生物学意义的区域  
 <222> (2).. (2)  
 <223> 其中"Xaa"代表任何氨基酸  
  
 <220>  
 <221> 不能用任何其它的特征关键词表述的具有生物学意义的区域  
 <222> (4).. (5)  
 <223> 其中"Xaa's"代表任何氨基酸和具有2个残基的长度的氨基酸的序列。  
  
 <220>  
 <221> 不能用任何其它的特征关键词表述的具有生物学意义的区域  
 <222> (6).. (6)  
 <223> 其中"Xaa"代表磷酸化的Ser或磷酸化的Thr。

[0008] <400> 25

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa  
 1 5

- <210> 26  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 哺乳动物

<400> 26

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg  
 1 5 10 15

Gln Leu Ala Val Ala Ala  
 20

- <210> 27  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 27

Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg Gln  
1 5 10 15

Leu Ala Val Ala  
20

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 未知

[0009] <220>

<223> 哺乳动物

<400> 28

Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Ala Val Ala Ala  
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 哺乳动物

<400> 29

Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Ala Val Ala  
1 5 10

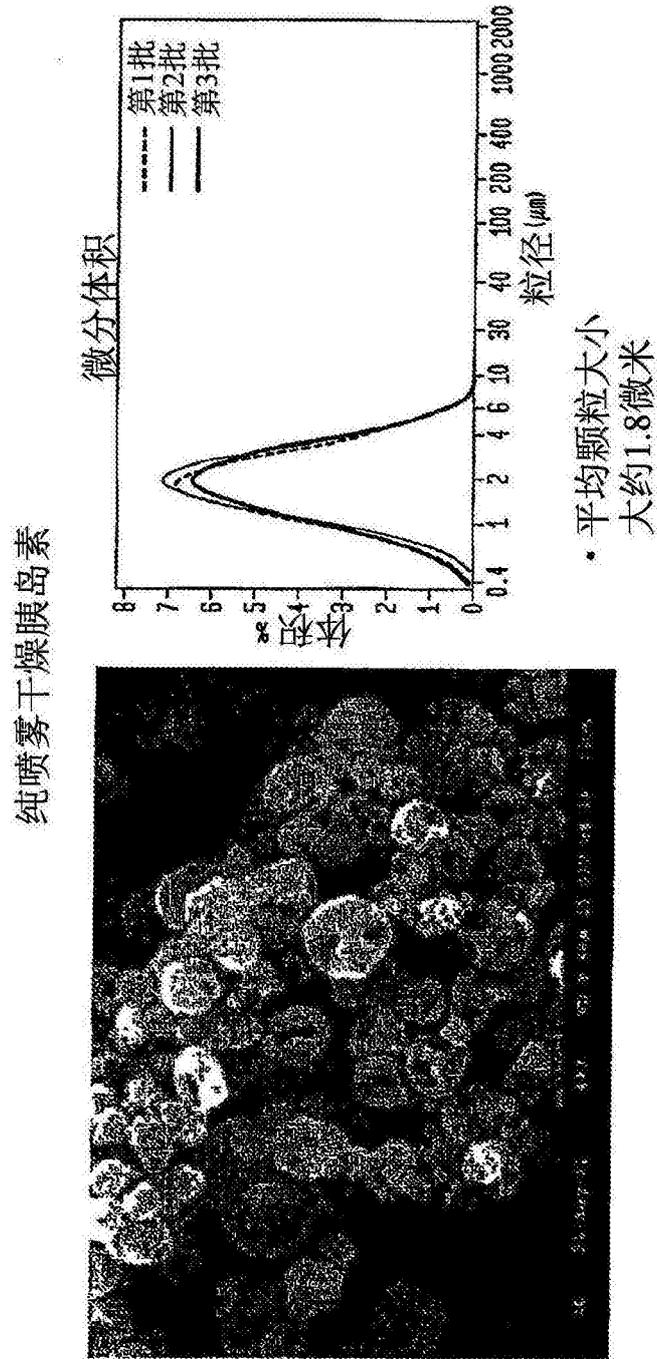


图1

颗粒大小分布-胰岛素  
2.4 mg 剂量, AC1@20, 3L/min

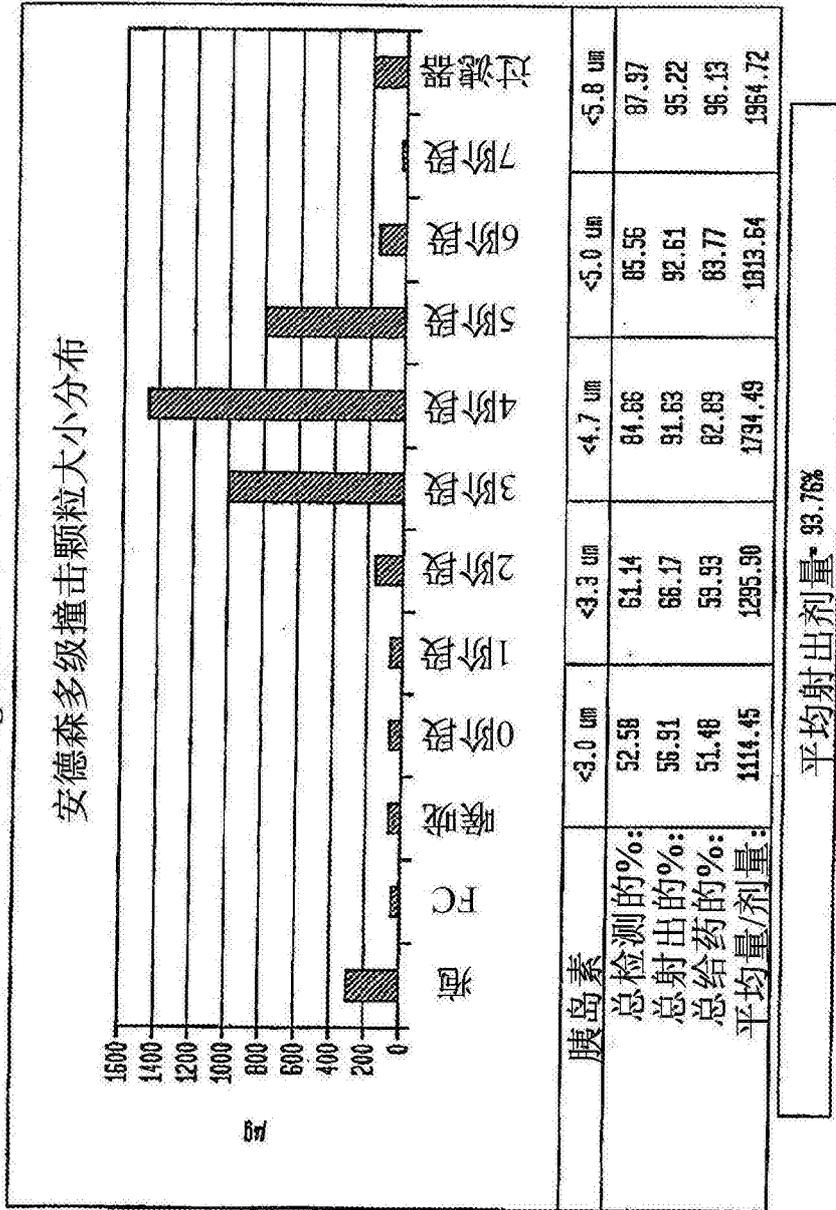
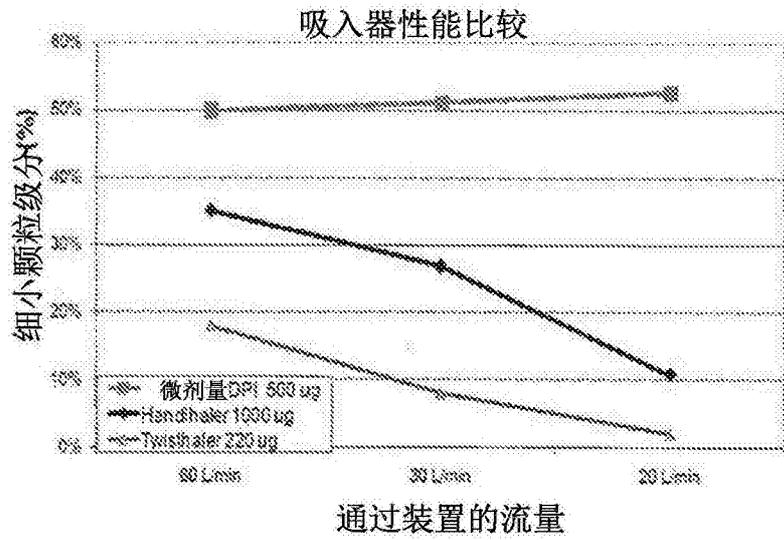


图2

### 微剂量DPI对两种市售的‘被动的’ DPI的效率和流量比较



气流粉碎（微粉化）的皮质类固醇w/乳糖

图3

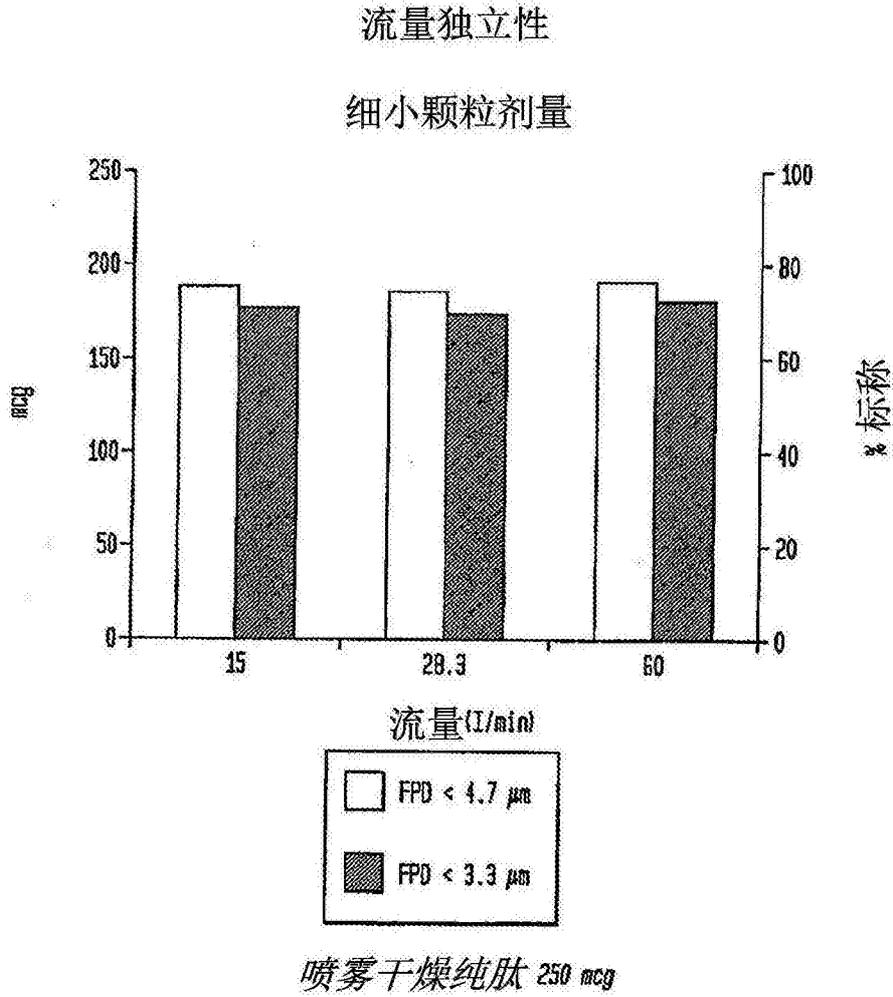


图4

喷雾干燥肽#2 (非胰岛素)

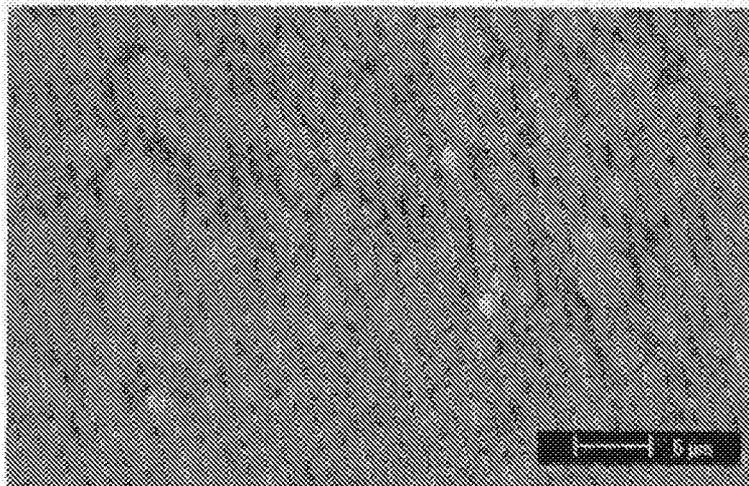


图5

颗粒大小分布-肽#2  
 250 mcg 剂量, ACI 28, 3L/min

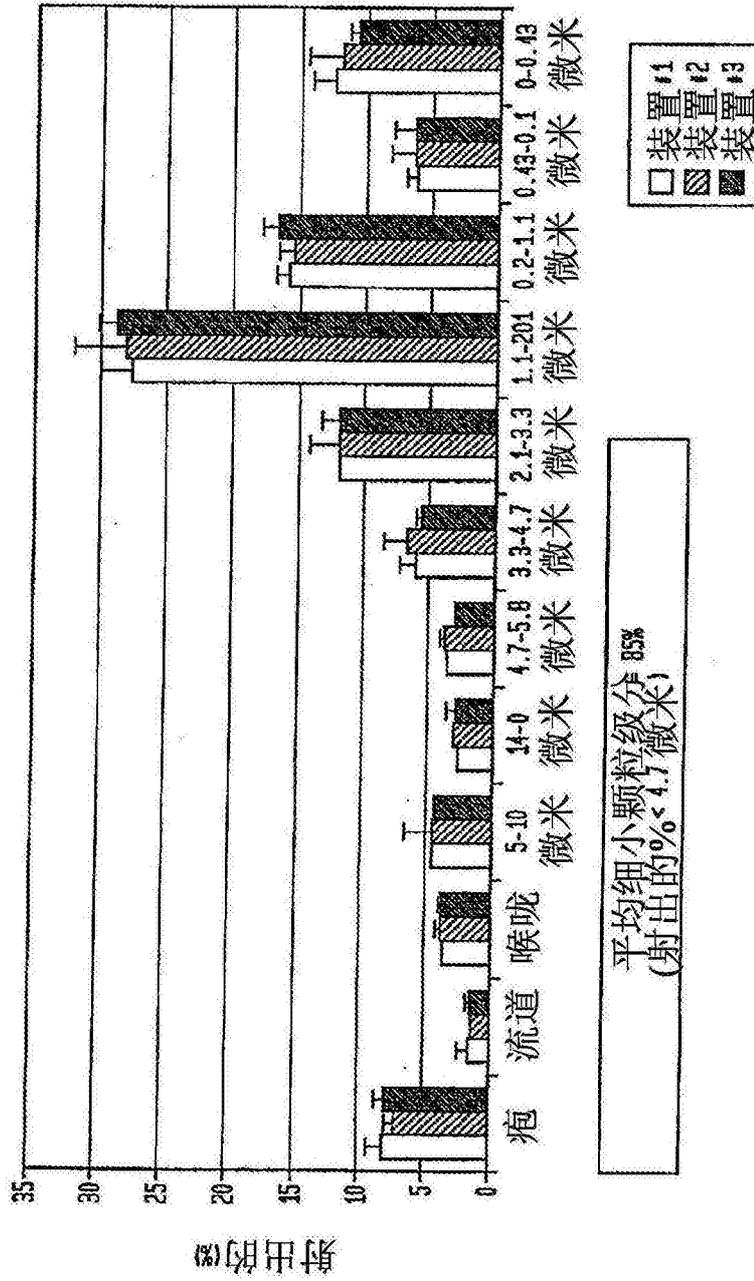
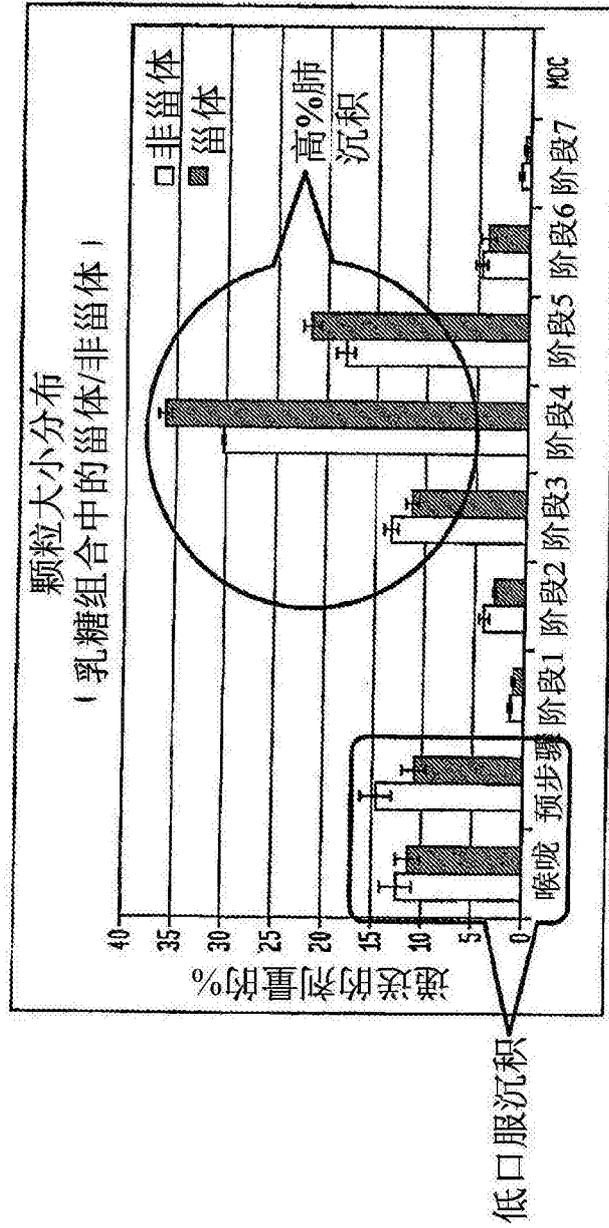


图6

微粉化/乳糖掺合物组合  
 通过NGI的颗粒大小分布  
 以运行30L/min 流量 11mg 填充WT.



- 对于‘其它’62%肺剂量≤5.0 μm, 对于n=5, 1.95% ASD
- 对于‘甾体’70%肺剂量≤5.0 μm, 对于n=5, 1.92% ASD

图7

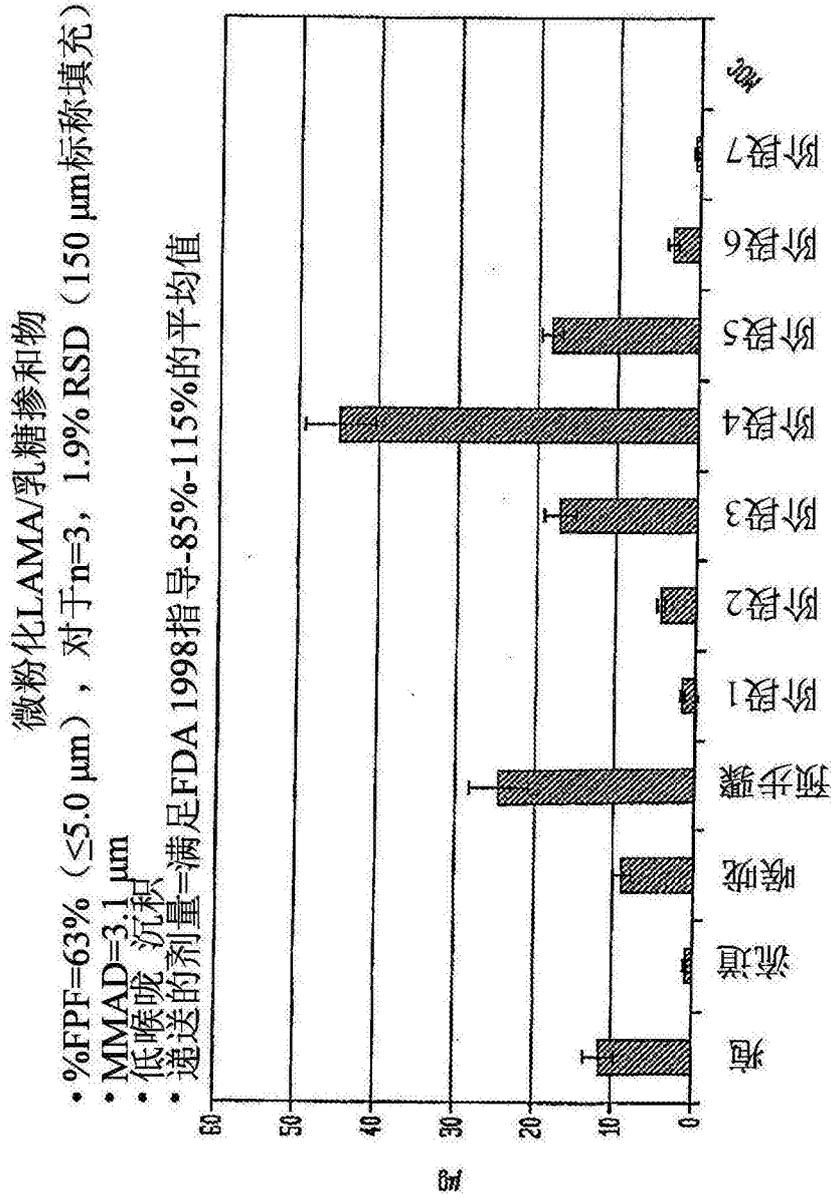


图8

# 在人IPF对正常肺中区别地表达的活化的MK2

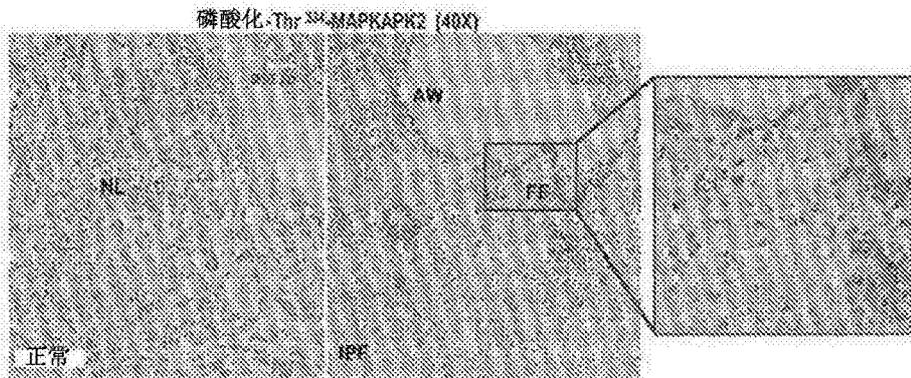


图9

特发性肺纤维化的博来霉素模型：预防模型

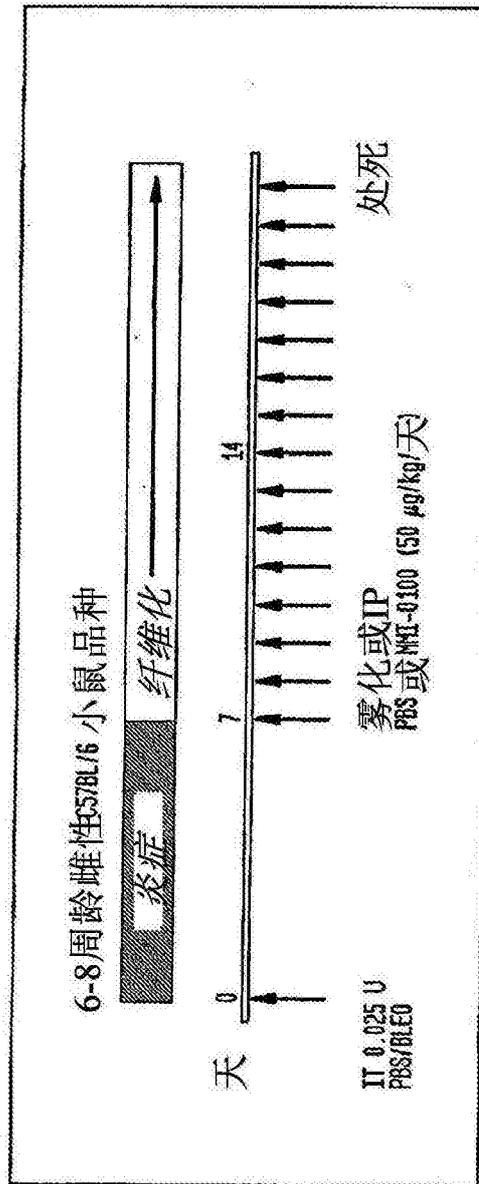


图10

### MMI-0100抑制特发性肺纤维化预防模型中纤维化的发展

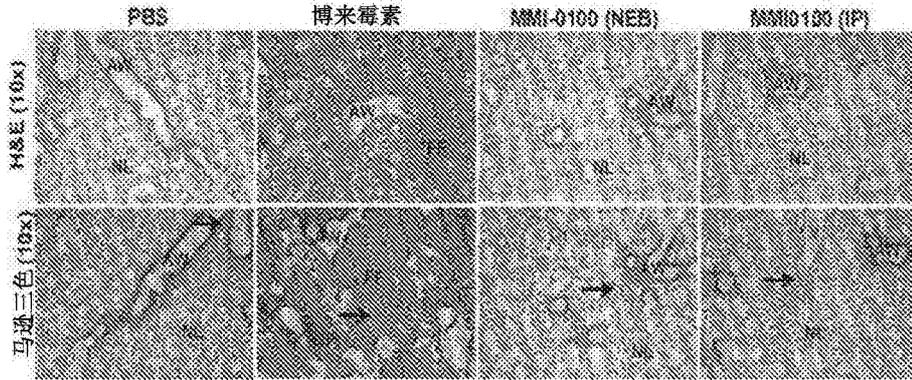


图11

### MMI-0100抑制特发性肺纤维化预防模型中纤维化的发展

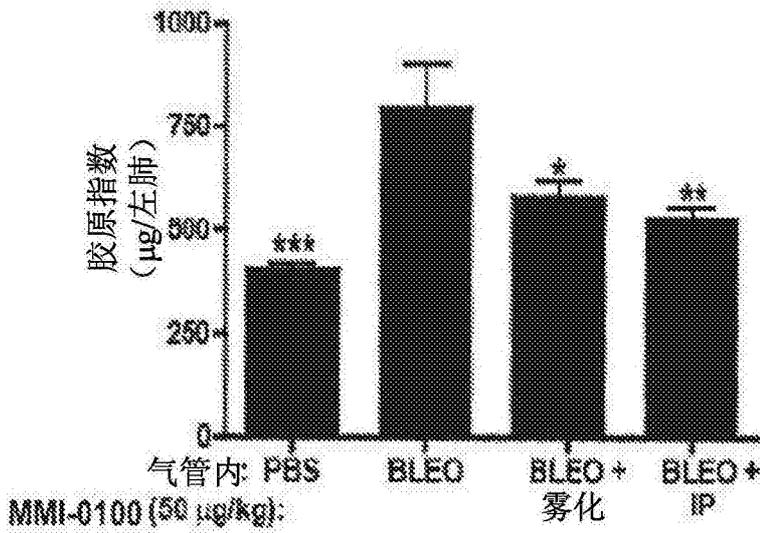


图12

特发性肺纤维化预防模型中MMI-0100剂量应答数据

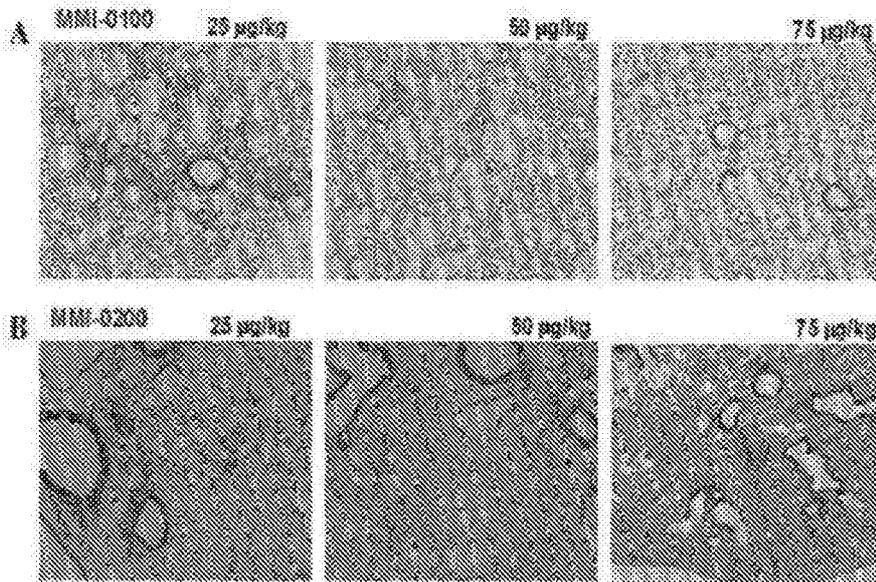


图13

MMI-0100减少特异性肺纤维化预防模型中的系统性T细胞活化

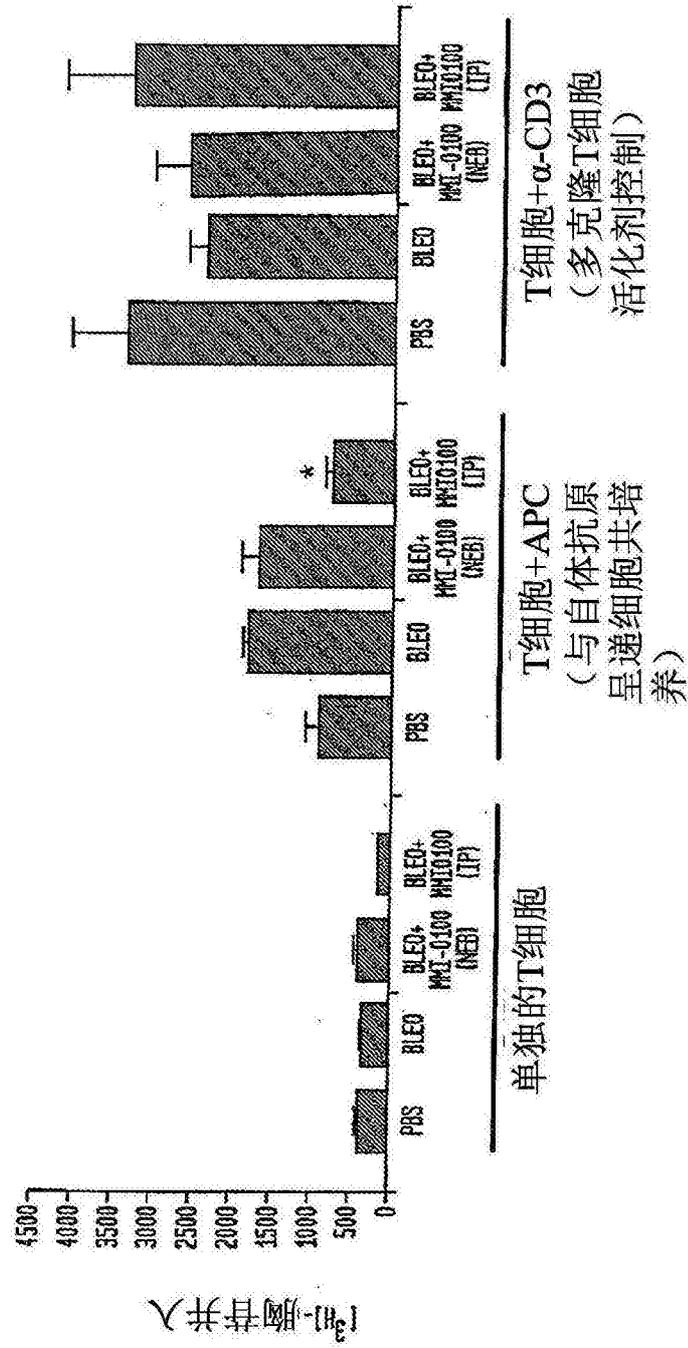


图14

特发性肺纤维化的博来霉素模型：治疗模型

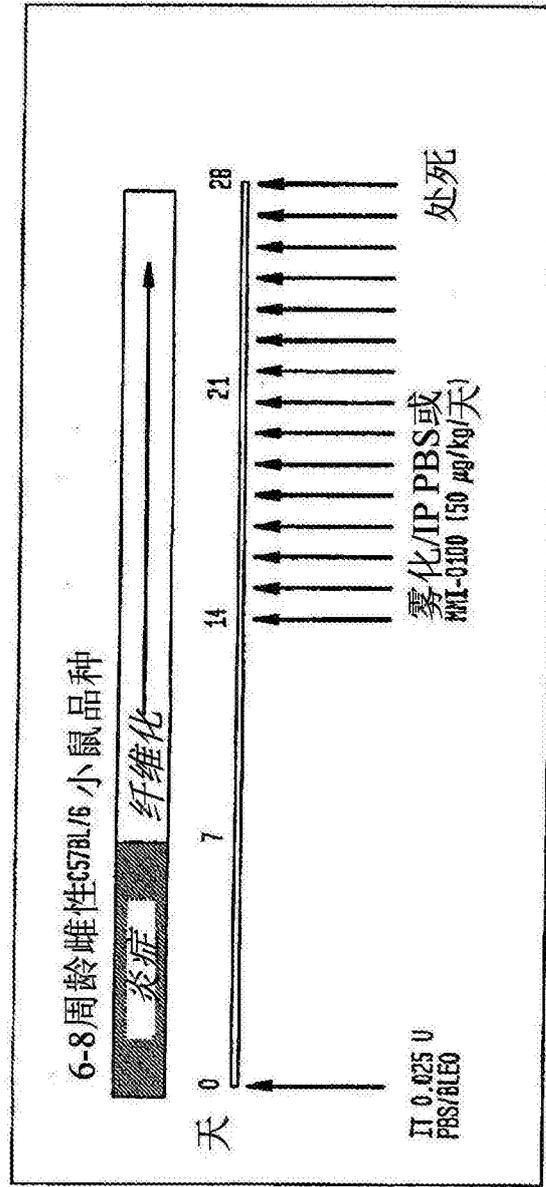


图15

### MMI-0100改善IPF治疗模型中的纤维化

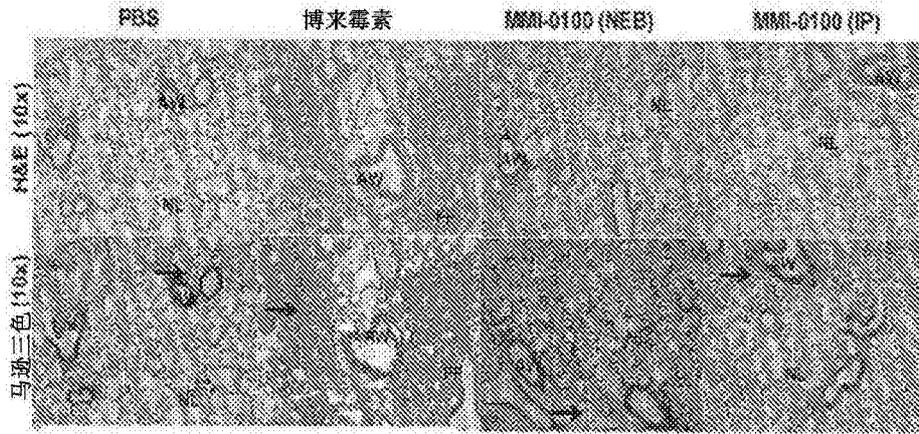


图16

### 定量胶原分析

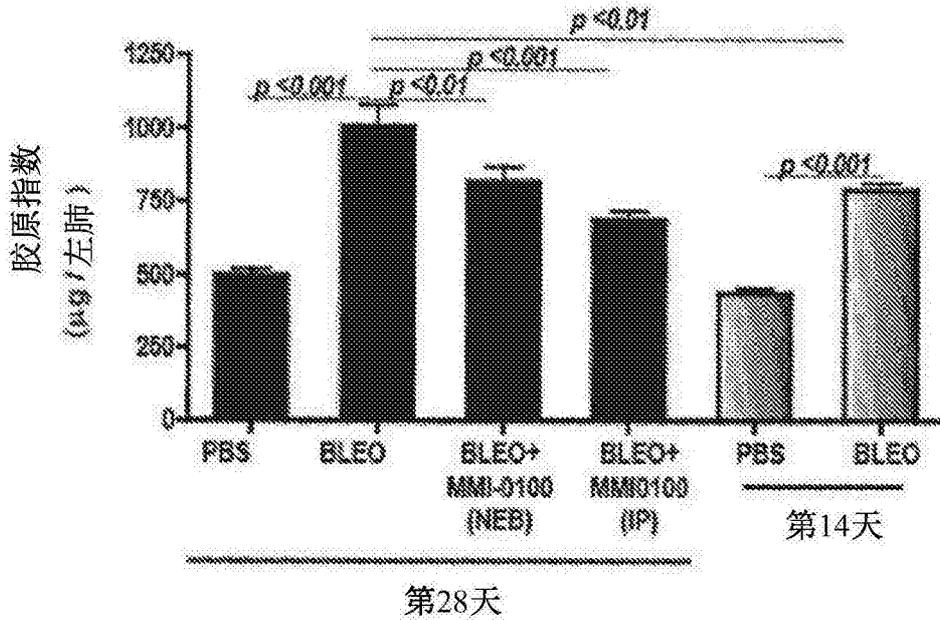


图17

### IPF治疗模型中的减小活化的MK2和MMI-0100

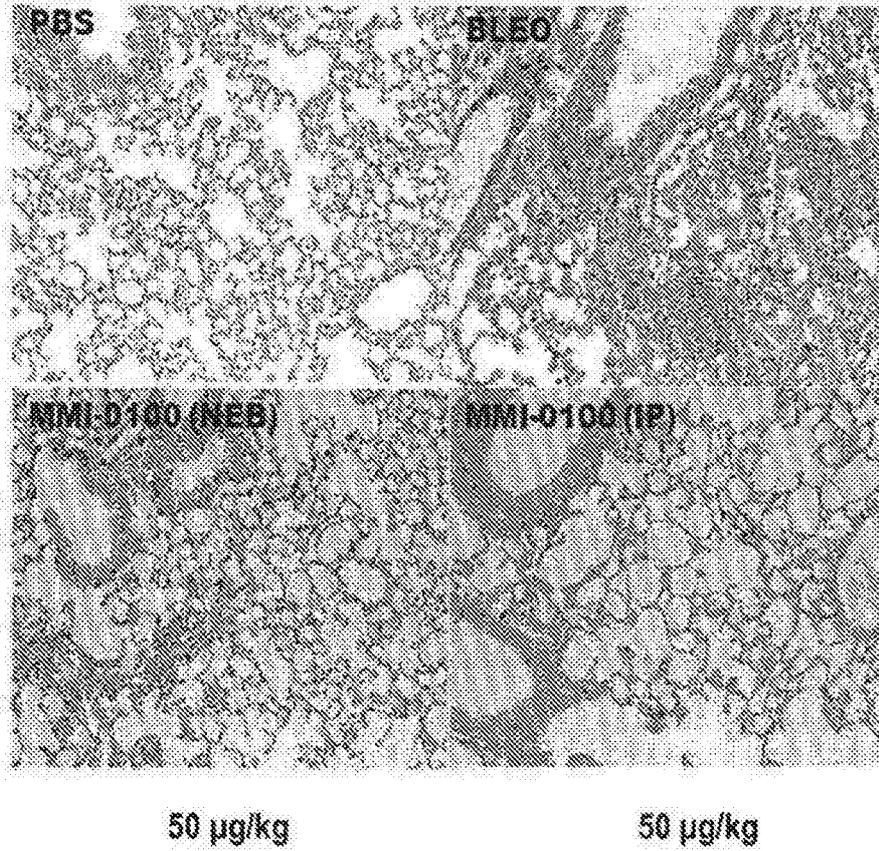


图18

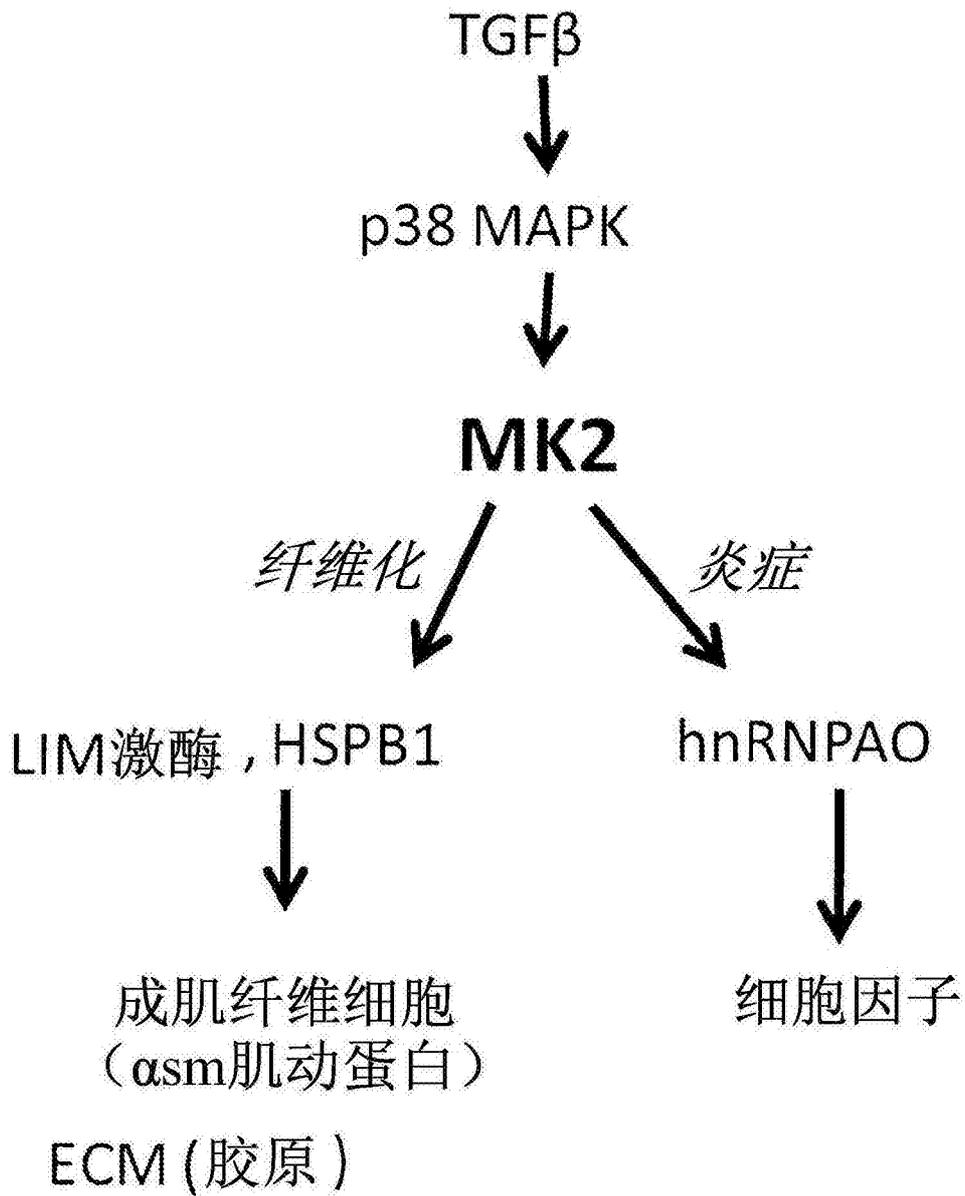
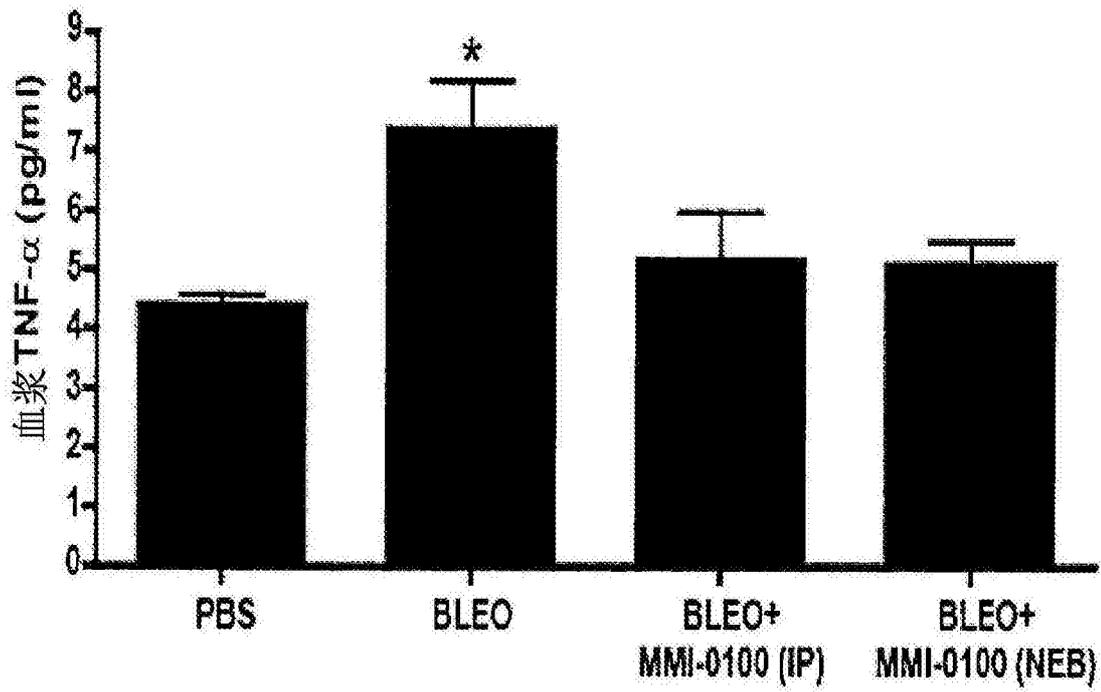


图19

A



B

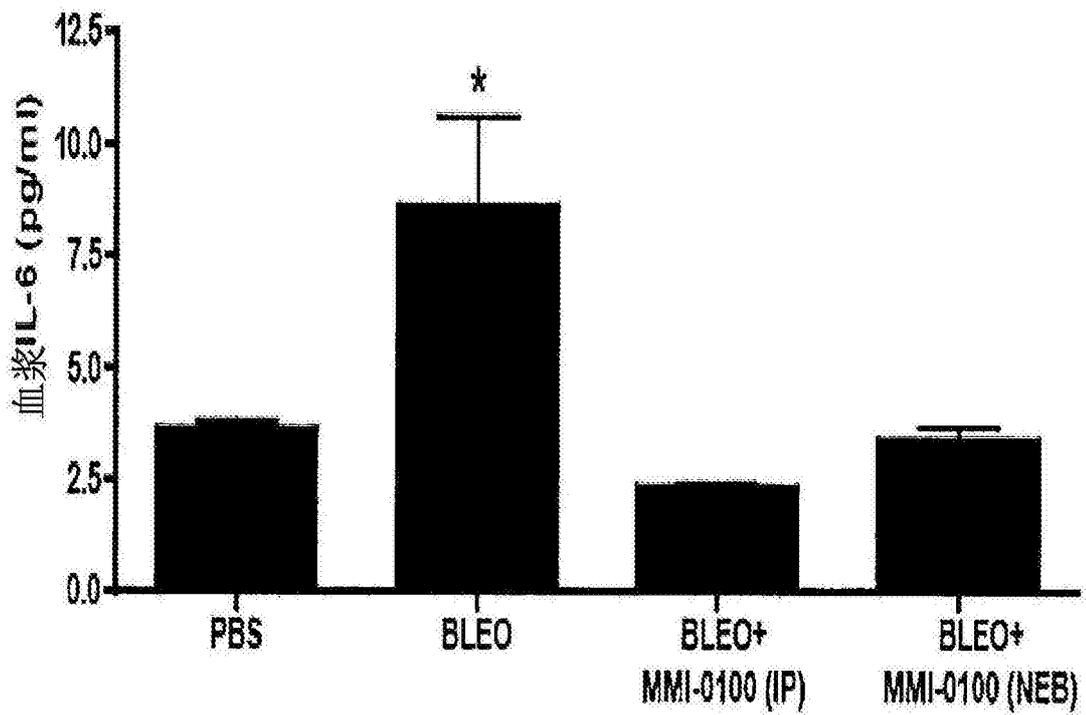


图20

MMI-0100抑制IPF治疗模型中的成肌纤维细胞 ( $\alpha$ -SMA) 活化

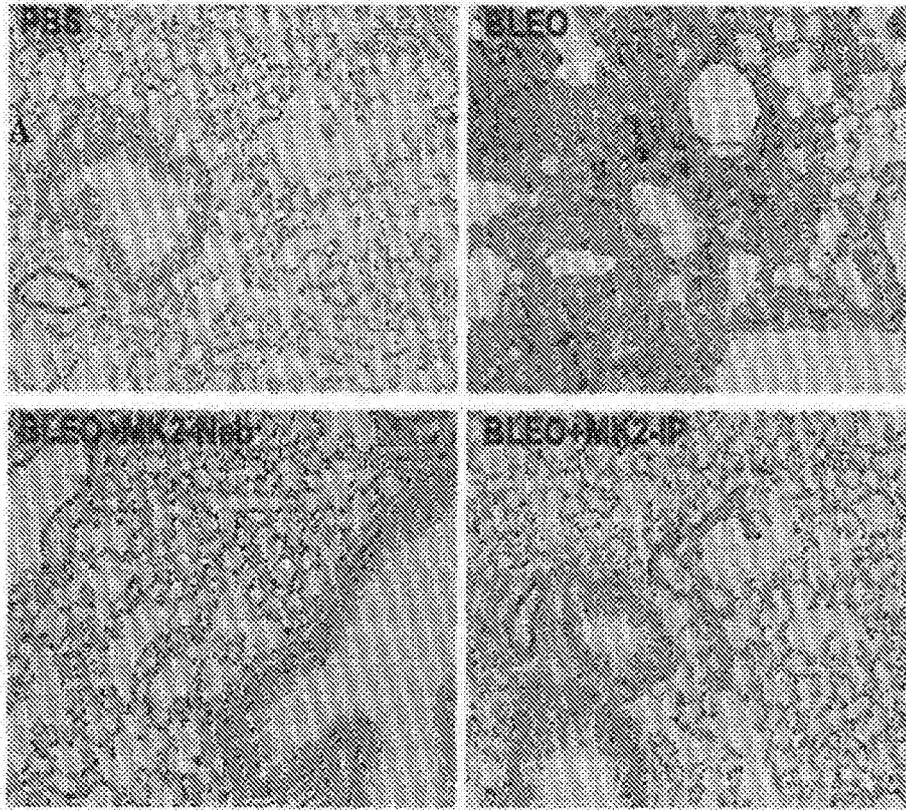


图21

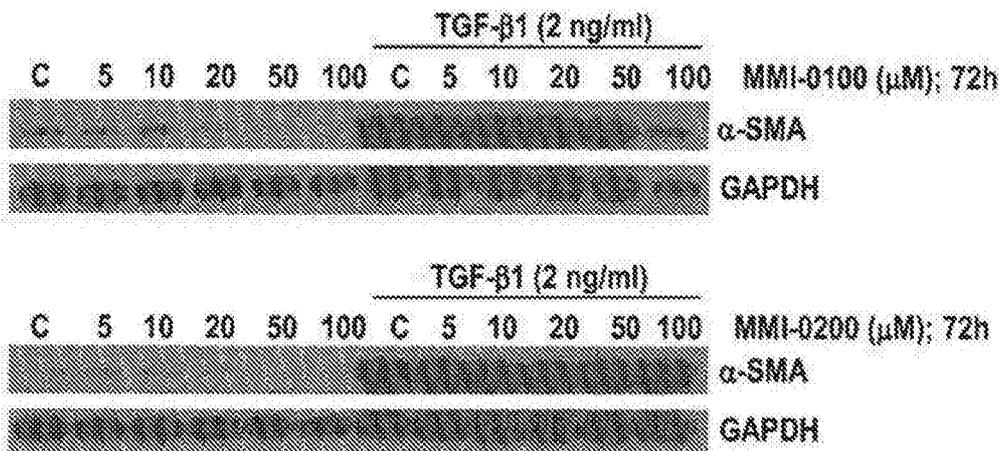


图22

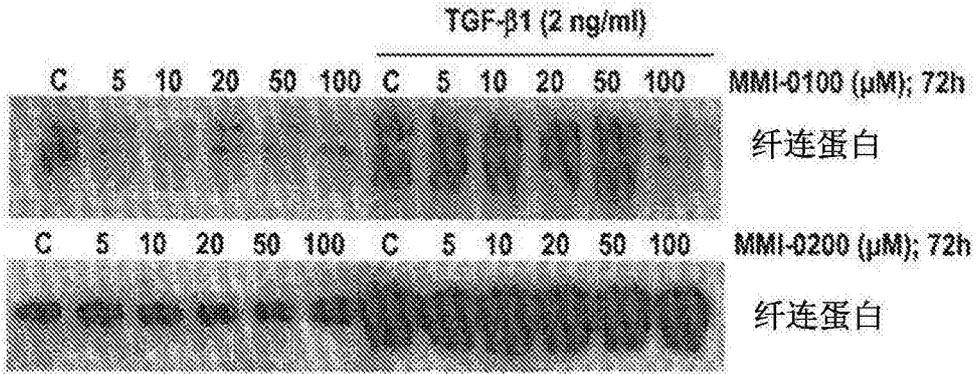


图23

### MISC迁移由纤连蛋白通过 $\alpha 5\beta 1$ -整合蛋白介导的PDGFR- $\beta$ 的活化调节

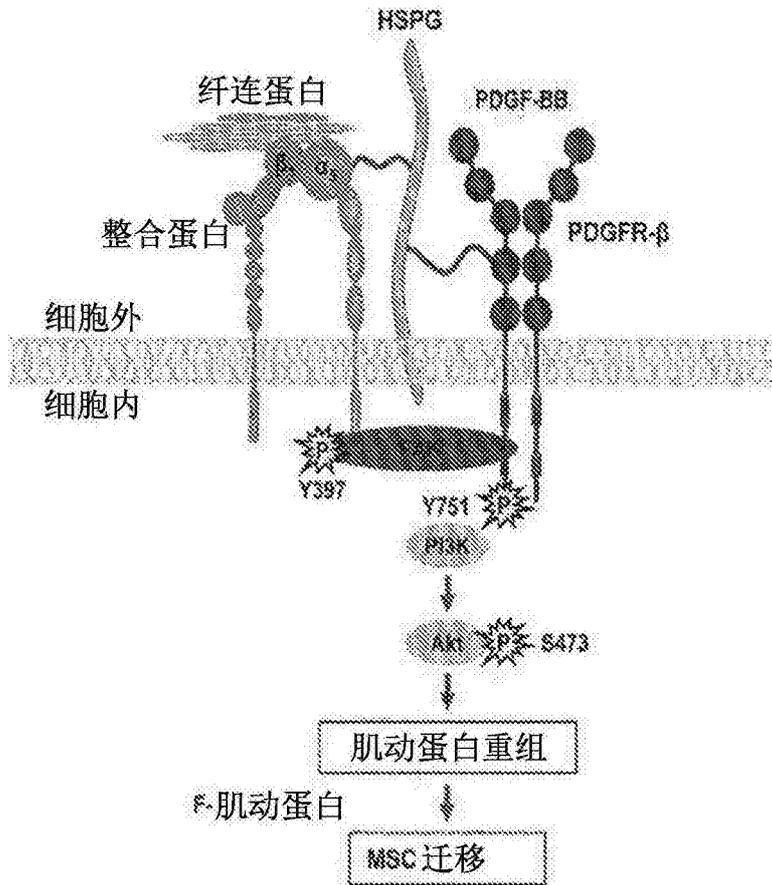
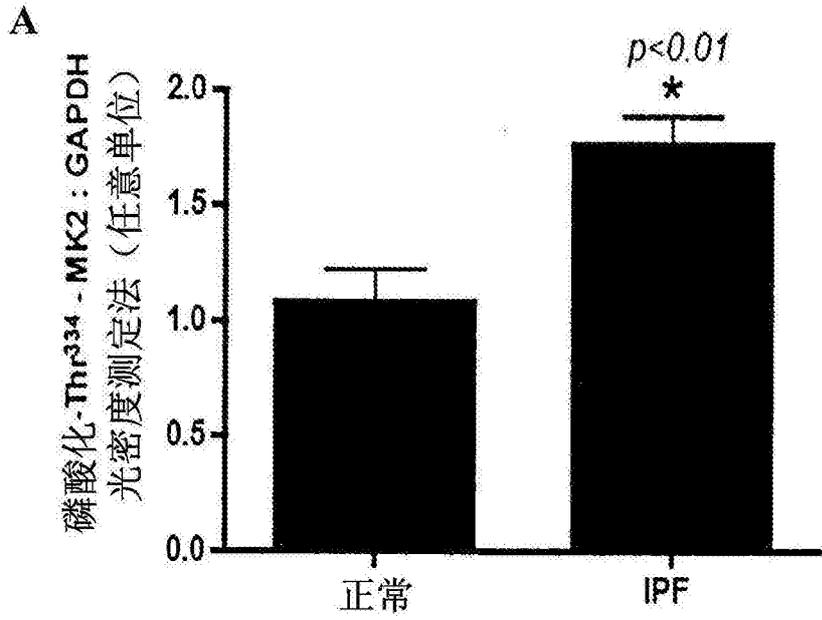


图24



肺功能和MK2活化之间的关联

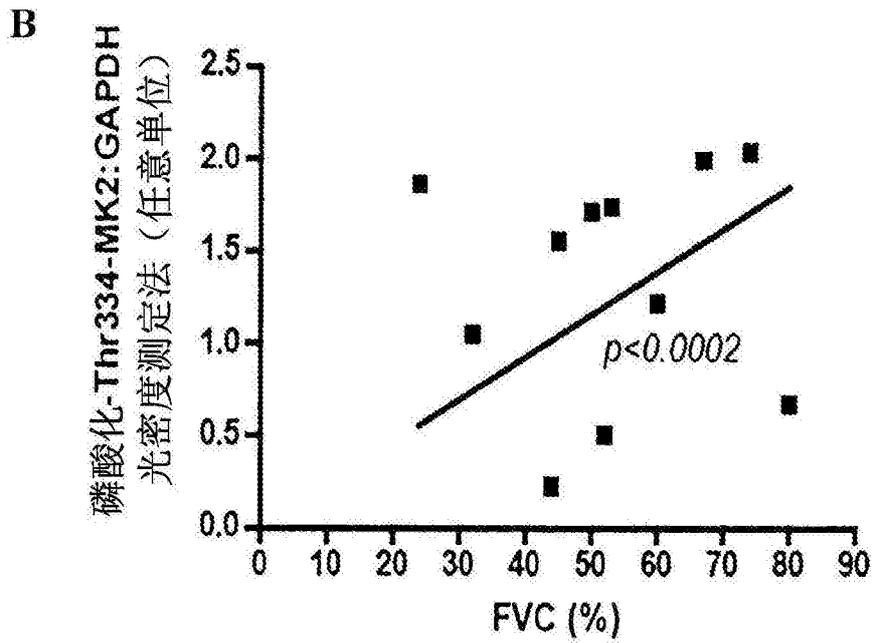


图25

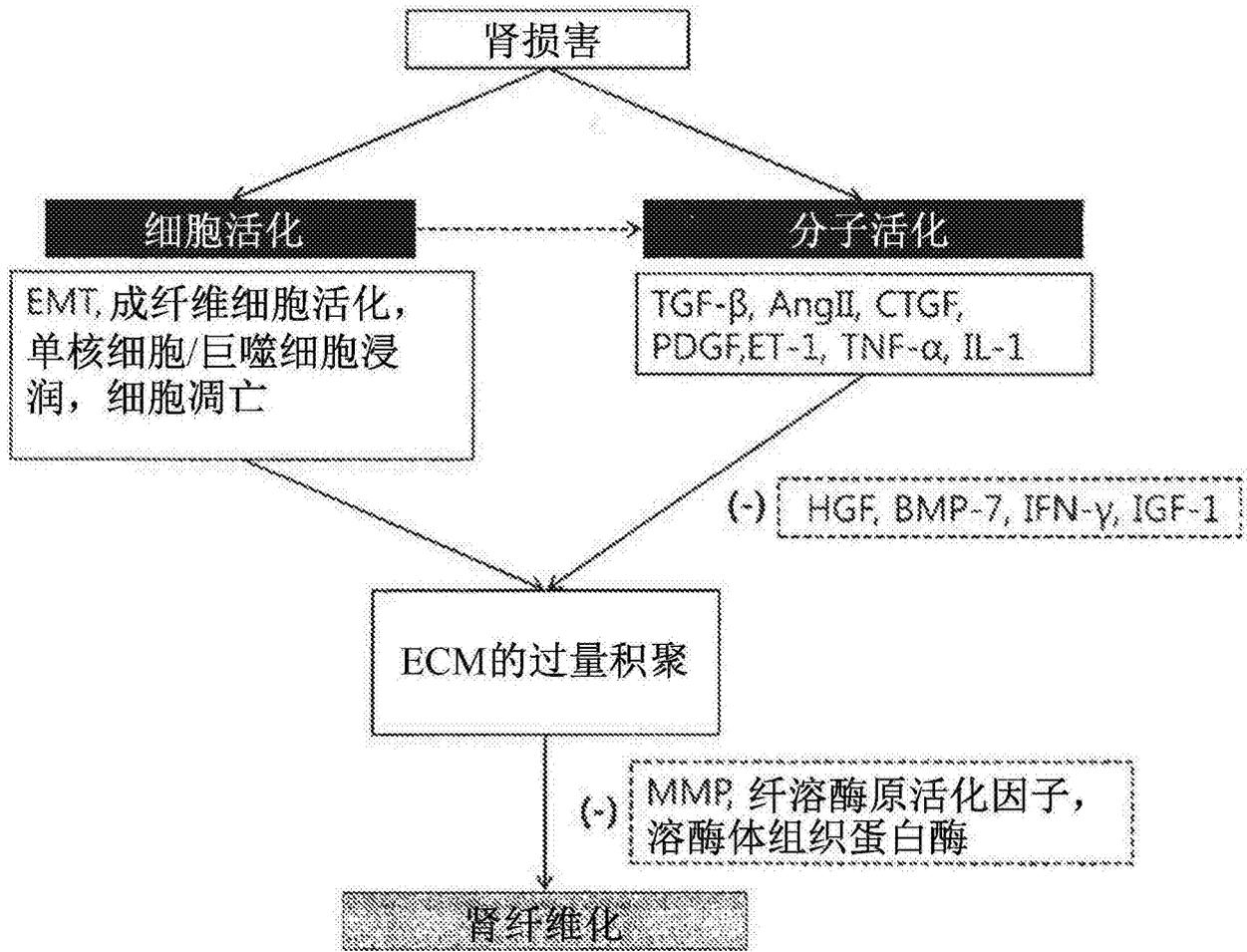


图26